



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Hidrólisis de ésteres fosfato en mezclas  
agua - disolvente orgánico.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

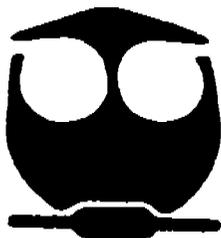
**Q U I M I C A**

P R E S E N T A

**GABRIELA IDANIA VARGAS ZUÑIGA**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA



MEXICO, D.F.

2005

m340082



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gabriela Idania Vargas

~~Zuriga~~ 19 de enero de 2005

FECHA: 19 de enero de 2005

FIRMA: [Firma manuscrita]

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Silvia Elena Castillo Blum.
Vocal	Prof. Anatoli Iatsimirski.
Secretario	Prof. Pandiyan Thangarasu.
1er. Suplente	Prof. Baldomero Gómez Reyes.
2º. Suplente	Prof. Juvenal Flores De la Rosa.

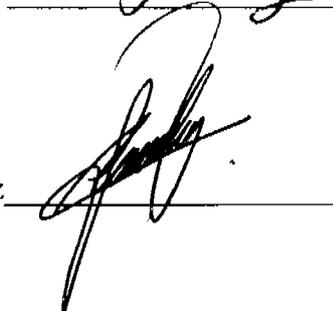
## SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio de Inorgánica 213.  
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear  
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México

**Asesor del tema:** Dr. Anatoli Iatsimirski



**Supervisor técnico:** Dra. Paola Gómez-Tagle Chávez



**Sustentante:** Gabriela Idania Vargas Zúñiga



*A mi familia*

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer de forma muy especial al Dr. Anatoli Iatsimirski por toda la paciencia, el apoyo y la disponibilidad sin la cual este trabajo no se hubiese llevado a cabo.

A la Dra. Paola Gómez-Tagle por la gran ayuda prestada en todo momento y el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al matrimonio Flores-Maldonado por animarme.

A todos mis compañeros del laboratorio 213 por la buena compañía y el ambiente agradable.

A todos mis amigos.

Al Dr. Rodríguez porque siempre con su compañía me siento bien.

A DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM), por el apoyo financiero para la realización de este trabajo mediante el proyecto IN208901.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito.

A esta Universidad.

## *Índice*

<b>Símbolos y abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	2
<b>1. Introducción</b>	3
<b>2. Antecedentes</b>	
2.1. Hidrólisis básica de los ésteres fosfato	5
2.2. Mecanismo general de la hidrólisis de los di y triésteres fosfato	7
2.3. Efecto de los iones metálicos en la hidrólisis de ésteres fosfato	9
2.4. Efecto del disolvente sobre la velocidad de reacción	13
2.5. Efecto del disolvente basado en parámetros empíricos	17
2.6. Solvatación de no electrolitos	19
2.7. Solvatación de electrolitos	21
2.8. Solvatación de aniones	22
2.9. Solvatación de cationes	23
2.10. Solvatación del estado de transición	24
2.11. Efecto de disolventes orgánicos en la hidrólisis de ésteres fosfato	26
<b>3. Objetivos</b>	29
<b>4. Parte experimental</b>	
4.1. Reactivos	30
4.1.1. Sustratos	30
4.1.2. Sales inorgánicas y otros	31
4.1.3. Disolventes	31
4.2. Equipo	32
4.3. Estudios cinéticos	32
<b>5. Resultados</b>	
5.1. Hidrólisis básica acuosa de BNPP	35
5.2. Efecto de los iones $\text{Li}^+$ , $\text{Na}^+$ y $\text{Bu}_4\text{N}^+$ en la hidrólisis básica acuosa de BNPP	39
5.3. Efecto de mezclas acuosas de disolventes orgánicos apróticos en la hidrólisis de BNPP	44
5.3.1. Mezclas acuosas de dioxano	44
5.3.2. Mezclas acuosas de acetoniitrilo	53

5.4. Efecto del catión $\text{Na}^+$ en mezclas acuosas de dioxano y acetonitrilo	57
5.5. Efecto de cationes monovalentes en mezclas acuosas de disolvente orgánico	60
5.6. Hidrólisis básica de PNPDP en mezclas dioxano-agua	65
<b>6. Conclusiones</b>	<b>73</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>74</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>78</b>



## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxiribonucleico
ADN <sub>SE</sub>	fosfodiéster, ácido desoxiribonucleico super enrollado
ARN	ácido ribonucleico
BNPP	fosfodiéster, bis(4-nitrofenil)fosfato
PNPDPP	fosfotriéster, <i>p</i> -nitrofenildifenil fosfato
PNPMP	fosfonato, <i>p</i> -nitrofenilmetil fosfonato
MNPP	monoéster, mono- <i>p</i> -nifenil fosfato
HNPP	monoéster, mono- <i>p</i> -nifenil fosfato en su forma protonada
NMP	<i>N</i> -metil fosforamida
DMSO	dimetil sulfóxido
$\Delta G_{1 \rightarrow 2}^R$	energía libre de transferencia de un reactivo
$\Delta G_{1 \rightarrow 2}^*$	energía libre de transferencia en el estado de transición
$\Delta H^*$	entalpía de activación
$E_a$	energía de activación
R	constante de los gases
T	temperatura
A	parámetro de la ecuación de Debye-Hückel
$\epsilon$	constante dieléctrica
$\epsilon_0$	constante dieléctrica del vacío
$\epsilon_p$	coeficiente de absorción molar para nitrofenolato
<i>I</i>	fuerza iónica
<i>k</i>	constante de velocidad
<i>k</i> <sub>obs</sub>	constante de velocidad observada
<i>k</i> <sub>2</sub>	constante de segundo orden
<i>k</i> <sub>OH</sub>	constante catalítica de segundo orden
nm	nanómetros
SA	parámetro de acidez
SB	parámetro de basicidad
SPP	parámetro de polaridad/polarizabilidad
S <sub>N</sub> 1	sustitución nucleofílica, mecanismo monomolecular
S <sub>N</sub> 2	sustitución nucleofílica, mecanismo bimolecular
X	fracción mol
$\gamma$	coeficiente de actividad
$\nu$	frecuencia
UV	ultravioleta
Vis	visible
$\mu\text{L}$	microlitros

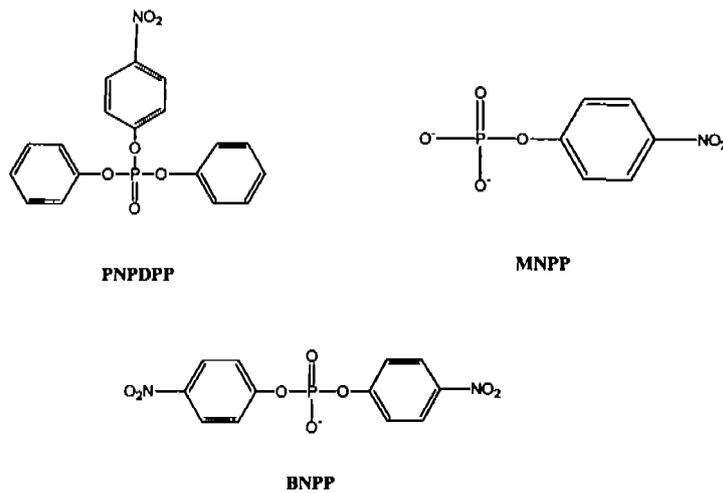
## RESUMEN

En el presente trabajo se hizo un estudio cinético detallado de la hidrólisis básica de ésteres fosfato en mezclas acuosas de disolventes orgánicos (dioxano, acetonitrilo) incluyendo el efecto de cationes metálicos alcalinos (Li, Na, K, Rb, Cs), de la temperatura y de concentraciones de los componentes en estos medios, empleando sustratos cromogénicos (bis-4-nitrofenil fosfato y 4-nitrofenil-difenil fosfato). Se observaron dos efectos: la aceleración notable de la hidrólisis alcalina en medios con alta concentración de disolvente orgánico atribuido a la deshidratación del nucleófilo y el fortalecimiento de la catálisis del catión de litio en las mezclas. Al presentar el ion  $\text{Li}^+$  mayor actividad catalítica en medios con bajo contenido de agua, indica un papel específico del medio en la activación tanto del sustrato como del nucleófilo por parte de cationes de manera análoga a lo que se ha observado en sistemas biológicos.

## 1. INTRODUCCIÓN

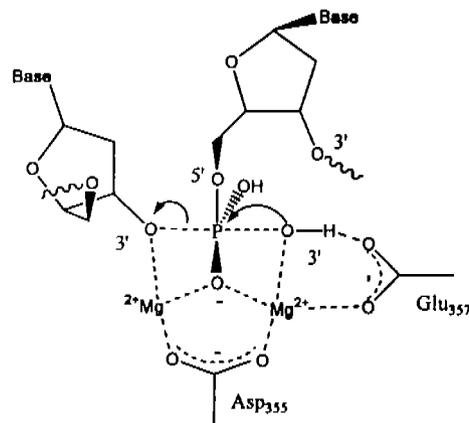
Los ésteres fosfato son moléculas ampliamente distribuidas tanto en la naturaleza como en sistemas químicos, por ejemplo, los monoésteres fosfato son los modificadores covalentes más comunes en procesos metabólicos que incluyen fosforilación y desfosforilación en la respiración, glucólisis, gluconeogénesis, transmisión del impulso nervioso, etc <sup>(1)</sup>. Los diésteres fosfato forman parte de la estructura de las moléculas que almacenan nuestra información genética, ADN y ARN; desde el punto de vista de la biotecnología, en particular de la ingeniería genética, un paso muy importante para manipular el material genético es la hidrólisis eficiente y selectiva de estas moléculas. Los triésteres fosfato son tóxicos en su mayoría y se han utilizado como pesticidas y armas químicas, por lo que existe interés ambiental en el tratamiento y desactivación de estos compuestos mediante su hidrólisis para eliminar grandes cantidades almacenadas de ellos y evitar que se formen subproductos tóxicos <sup>(2)</sup>.

Estas especies son cinéticamente muy estables a la hidrólisis básica en un orden de reactividad relativa: triésteres > monoésteres >> diésteres; además, la hidrólisis es mucho más lenta para ésteres fosfato alifáticos que para derivados aromáticos <sup>(3)</sup>. Por ejemplo, la hidrólisis acuosa tiene una  $k_{obs}$  de  $9.7 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  para el triéster PNPDP,  $1.55 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$  para el monoéster MNPP y  $1.1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$  para el diéster BNPP (ver figura 1.1). Los ácidos nucleicos tienen tiempos de vida media en agua a 25 ° C de 200 millones de años para ADN y de 100 años para ARN (el tiempo de vida media de ARN es mucho menor por acción del grupo OH del azúcar que actúa como nucleófilo intramolecular) <sup>(4)</sup>. Por lo que uno de los intereses de estos últimos años es el de crear catalizadores para la hidrólisis de los ésteres fosfato debido a la importancia biológica y biotecnológica que esto representa <sup>(5)</sup>. Uno de estos enfoques está inspirado en la imitación de las enzimas naturales. En particular, los ésteres fosfato son hidrolizados mediante enzimas conocidas como nucleasas y fosfatasa, estas enzimas constan de un sitio activo formado de aminoácidos polares y uno o varios centros metálicos <sup>(4)</sup>.



**Figura 1.1.** Estructuras de algunos ésteres fosfato, usados como modelos para estudiar su hidrólisis.

Hasta ahora se sabe que la gran eficiencia de estas enzimas se debe a la perfecta cooperación entre los grupos funcionales de sus sitios activos y se cree que un factor importante que contribuye a la eficiencia de la catálisis enzimática es la deshidratación parcial del sustrato y del sitio activo debido al microambiente creado por la presencia de grupos laterales hidrofóbicos de aminoácidos. Por ejemplo, en la figura 1.2 se presenta el sitio activo de la DNA polimerasa I, en donde podemos observar que existe una cooperación entre los grupos funcionales de sus sitios activos y los iones metálicos; en el interior de la enzima el éster fosfato se encuentra totalmente deshidratado.



**Figura 1.2.** Uno de los posibles mecanismos propuestos para la hidrólisis de DNA por la DNA polimerasa I. <sup>(4)</sup>

Se ha informado en la literatura que al emplearse medios no acuosos en la hidrólisis de monoésteres <sup>(6)</sup> y triésteres <sup>(3, 7)</sup> fosfato, ésta transcurre más rápidamente que en agua, sin embargo, se sabe muy poco respecto al efecto que tienen las mezclas acuosas de disolventes orgánicos en la hidrólisis de fosfodiésteres, y aún menos del papel que tienen los cationes metálicos en estos medios. Recientemente se informó una actividad catalítica alta de cationes de metales alcalinotérreos en la hidrólisis de ésteres fosfato en mezclas DMSO-agua 90% v/v. <sup>(8)</sup> En este mismo trabajo se informa de manera cualitativa la existencia de un efecto catalítico de los cationes alcalinos en este medio. En este sentido, resulta de gran interés hacer un estudio más amplio del efecto del medio sobre la reactividad de los ésteres fosfato, en particular empleando mezclas acuosas de disolventes orgánicos apróticos de diferente polaridad y determinar el efecto del medio sobre la eficiencia catalítica de los cationes metálicos alcalinos en la hidrólisis básica. A pesar de que los cationes metálicos alcalinos no se encuentran en sitios activos de fosfatasas/nucleasas su comportamiento catalítico en sistemas modelo es de gran interés ya que tienen la configuración electrónica y el tipo de enlace metal-ligante similares a los cationes de metales alcalinotérreos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Hidrólisis básica de los ésteres fosfato

Los ésteres fosfato son especies muy estables a la hidrólisis. En particular, los fosfodiésteres son mucho menos reactivos que los ésteres derivados de ácidos carboxílicos y hay pocos nucleófilos con los que se pueda llevar a cabo la ruptura del enlace P-O de manera eficiente.

En la literatura existen datos de las constantes de velocidad de hidrólisis de ésteres fosfato en presencia de OH<sup>-</sup> como nucleófilo, aunque pocos de éstos son comparables entre sí porque, generalmente, las constantes de velocidad observadas de primer orden están informadas en condiciones de reacción muy diferentes. En la tabla 2.1 se muestran las constantes de segundo orden para la hidrólisis alcalina de algunos ésteres fosfato a 25°C; se

Se ha informado en la literatura que al emplearse medios no acuosos en la hidrólisis de monoésteres <sup>(6)</sup> y triésteres <sup>(3, 7)</sup> fosfato, ésta transcurre más rápidamente que en agua, sin embargo, se sabe muy poco respecto al efecto que tienen las mezclas acuosas de disolventes orgánicos en la hidrólisis de fosfodiésteres, y aún menos del papel que tienen los cationes metálicos en estos medios. Recientemente se informó una actividad catalítica alta de cationes de metales alcalinotérreos en la hidrólisis de ésteres fosfato en mezclas DMSO-agua 90% v/v. <sup>(8)</sup> En este mismo trabajo se informa de manera cualitativa la existencia de un efecto catalítico de los cationes alcalinos en este medio. En este sentido, resulta de gran interés hacer un estudio más amplio del efecto del medio sobre la reactividad de los ésteres fosfato, en particular empleando mezclas acuosas de disolventes orgánicos apróticos de diferente polaridad y determinar el efecto del medio sobre la eficiencia catalítica de los cationes metálicos alcalinos en la hidrólisis básica. A pesar de que los cationes metálicos alcalinos no se encuentran en sitios activos de fosfatasas/nucleasas su comportamiento catalítico en sistemas modelo es de gran interés ya que tienen la configuración electrónica y el tipo de enlace metal-ligante similares a los cationes de metales alcalinotérreos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Hidrólisis básica de los ésteres fosfato

Los ésteres fosfato son especies muy estables a la hidrólisis. En particular, los fosfodiésteres son mucho menos reactivos que los ésteres derivados de ácidos carboxílicos y hay pocos nucleófilos con los que se pueda llevar a cabo la ruptura del enlace P-O de manera eficiente.

En la literatura existen datos de las constantes de velocidad de hidrólisis de ésteres fosfato en presencia de OH<sup>-</sup> como nucleófilo, aunque pocos de éstos son comparables entre sí porque, generalmente, las constantes de velocidad observadas de primer orden están informadas en condiciones de reacción muy diferentes. En la tabla 2.1 se muestran las constantes de segundo orden para la hidrólisis alcalina de algunos ésteres fosfato a 25°C; se

incluyen algunas constantes de velocidad de hidrólisis espontánea ( $\text{H}_2\text{O}$ , pH neutro), ya que puede ser tan lenta que no siempre es posible medirla o estimarla.

**Tabla 2.1.** Hidrólisis alcalina e hidrólisis espontánea de ésteres fosfato a 25°C.

No.	Sustrato	$k_{\text{OH}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{\text{H}_2\text{O}} (\text{s}^{-1})$	Ref.
1	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$	$1.32 \times 10^{-5}$		9
2	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})\text{PO}$	$6.67 \times 10^{-3}$		9
3	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})_2\text{PO}$	$5.17 \times 10^{-1}$		9
4	$(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})_3\text{PO}$	$3.33 \times 10^2$		9
5	$(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_2(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})\text{PO}$ <b>PNPDPP</b>	0.35	$9.7 \times 10^{-6}$	10
6	$(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{O}^-$ <b>BNPP<sup>-</sup></b>	$5.83 \times 10^{-6}$	$1.1 \times 10^{-11}$	9
7	$(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2$ <b>MNPP<sup>2-</sup></b>		$1.55 \times 10^{-8b}$	6, 11
8	$\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)(\text{OC}_6\text{H}_4\text{-NO}_2\text{-4})$ <b>PNPMP<sup>a</sup></b>	$2.3 \times 10^{-5}$	$2.0 \times 10^{-9}$	10
9	ADN <sub>SE</sub>		$\leq 1 \times 10^{-11}$	12
10	ARN		$2 \times 10^{-11}$	13
11	ADN	$\approx 1 \times 10^{-12}$	$\leq 1 \times 10^{-16}$	14, 13, 15

<sup>a</sup> 30°C

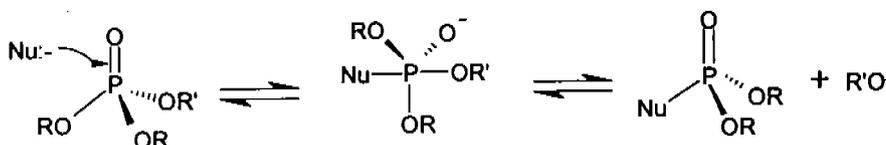
<sup>b</sup> 39°C

De la tabla 2.1 podemos ver dos características importantes: 1) la reactividad de  $\text{OH}^-$  como nucleófilo es mayor hacia los fosfoésteres trisustituidos que hacia los disustituidos y 2) para un mismo tipo de fosfoéster, la constante de velocidad depende notoriamente de los grupos sustituyentes, es decir, la hidrólisis es más rápida cuando se tiene un mejor grupo saliente. Por ejemplo la hidrólisis de un fosfodiéster, renglón 6, es 4 órdenes de magnitud más lenta que la de un triéster fosfato, renglón 5, ambos con el mismo grupo saliente (4-nitrofenol); si se comparan constantes de velocidad con diferentes grupos salientes para fosfotriésteres, tenemos que la reacción es siete órdenes de magnitud más rápida con 4-nitrofenol como

grupo saliente, renglón 4, que con un grupo saliente alcoxo, renglón 1. Finalmente, podemos ver que los ácidos nucleicos son sustratos muy estables a la hidrólisis.

## 2.2. Mecanismo general de la hidrólisis de los di y triésteres fosfato

En general, la hidrólisis de los di y triésteres fosfato sigue un mecanismo de adición-eliminación probablemente concertado, pasando por la formación de un estado de transición o intermediario pentacoordinado (bipirámide trigonal) en el cual el grupo entrante y saliente ocupan las posiciones axiales<sup>(3, 16)</sup> (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Mecanismo de adición-eliminación para la hidrólisis básica de diésteres y triésteres fosfato.

La hidrólisis de los diésteres fosfato puede ser acelerada tanto en medio ácido como en medio básico. En medio ácido se observa un mecanismo de catálisis ácida específica en el cual el sustrato se protona y esto favorece el ataque nucleofílico del agua. En medio básico el nucleófilo es el ion hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) en lugar de agua; la nucleofilia de este anión es grande y la rapidez de la reacción crece linealmente al aumentar la concentración de hidróxido en la disolución observándose un gran efecto catalítico<sup>(2)</sup>.

La velocidad de hidrólisis de los diésteres y triésteres fosfato con distintos sustituyentes depende del  $\text{pK}_a$  de la forma protonada del grupo saliente: en general, los grupos con mayores valores de  $\text{pK}_a$  son peores grupos salientes debido a que la estabilidad del enlace P-O es mayor (el átomo de oxígeno es más básico). Esto lo podemos observar en la tabla 2.2, donde se incluyen datos cinéticos para algunos fosfodiésteres con los diferentes grupos salientes. Es decir, una vez formado el intermediario pentacoordinado, la probabilidad de que se disocie el grupo saliente es menor para grupos salientes más básicos y la reacción es más lenta; por el contrario, los grupos con menor  $\text{pK}_a$  tienden a disociarse, y por lo tanto a salir más fácilmente, promoviendo que la reacción proceda.



**Tabla 2.2.** Velocidad de hidrólisis acuosa y alcalina de algunos fosfodiésteres comunes y valores de  $pK_a$  de los grupos salientes.

Sustrato	$pK_a$	$k_{H_2O}$ ( $s^{-1}$ ), 100°C	$k_{OH}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ), 25°C	Ref.
Bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato	4.07	$1.55 \times 10^{-4}$		17
Bis-(4-cloro-2-nitrofenil) fosfato	6.36	$4.08 \times 10^{-7}$		17
Bis-(4-nitrofenil) fosfato	7.15	$6.3 \times 10^{-8}$	$5.83 \times 10^{-6}$	17
Bis-(2-nitrofenil) fosfato	7.23	$5.62 \times 10^{-8}$		17
Bis-(3-nitrofenil) fosfato	8.35	$5.03 \times 10^{-9}$		17
Difenil fosfato	9.99	Muy lenta para ser medida	$7 \times 10^{-6}$ (75°C)	18

Podemos considerar que la hidrólisis de ésteres fosfato involucra predominantemente el rompimiento del enlace P-O. En el caso de los triésteres fosfato, éstos se hidrolizan en disoluciones básicas más fácilmente que los diésteres y monoésteres, y siempre se rompe el enlace P-O ( $OH^-$  como nucleófilo). Sin embargo, cuando el nucleófilo es muy débil o se tiene un muy mal grupo saliente, como en el caso de los fosfodiésteres con sustituyentes alifáticos, es posible que el enlace que se rompa sea el enlace C-O. <sup>(2)</sup>

El orden de reacción de cada uno de los componentes junto con la posición del rompimiento del enlace ha permitido proponer que en el mecanismo de ruptura el nucleófilo ataca al átomo de fósforo en el paso determinante de la reacción. Por ejemplo la hidrólisis de los triésteres trimetil y trifenilfosfato en disolución básica es de primer orden para  $OH^-$  y de primer orden para el éster, en donde el orden de las cinéticas de hidrólisis junto con la posición del rompimiento del enlace permite establecer que el ion hidróxido ataca al átomo de fósforo en el paso determinante de la reacción. <sup>(3)</sup> En la tabla 2.3, se presentan las constantes de velocidad de hidrólisis de algunos triésteres fosfato.

**Tabla 2.3.** Velocidad de hidrólisis alcalina en H<sub>2</sub>O de algunos triésteres fosfato comunes y valores de pK<sub>a</sub> de los grupos salientes.<sup>(3)</sup>

Sustrato	pK <sub>a</sub>	k <sub>OH/H<sub>2</sub>O</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>OH</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
(CH <sub>3</sub> O) <sub>3</sub> PO	15.5	3.36×10 <sup>-4</sup> <sup>d</sup>	3.36×10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>
(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O) <sub>3</sub> PO	15.9		3.73×10 <sup>-5</sup> <sup>b</sup>
(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> ( <i>p</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O)PO	15.5, 7.2		8.8×10 <sup>-2</sup> <sup>b</sup>
(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O) <sub>2</sub> ( <i>p</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O)PO	15.9, 7.2		2.67×10 <sup>-2</sup> <sup>b</sup>
(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)( <i>p</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>2</sub> PO	15.9, 7.2	3.4×10 <sup>-6</sup> <sup>c</sup>	
( <i>p</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>3</sub> PO	7.2	1×10 <sup>-8</sup> <sup>c</sup>	

<sup>a</sup> 35°C

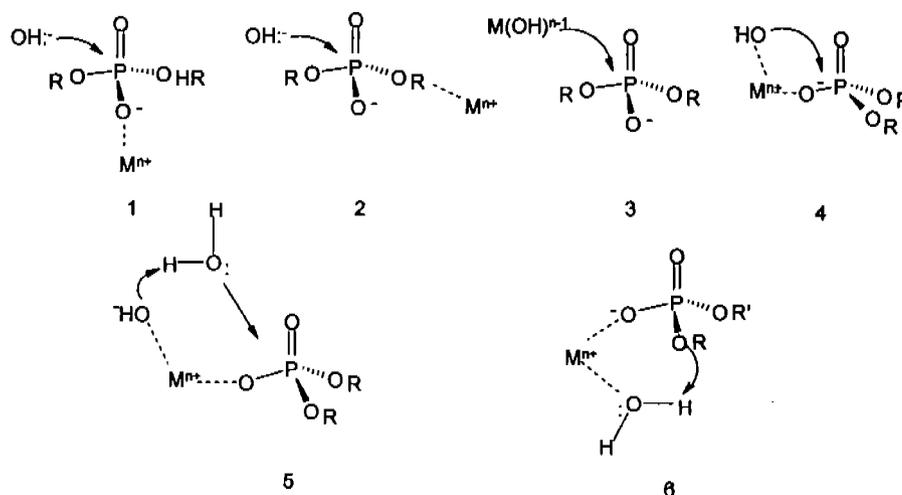
<sup>b</sup> 37°C

<sup>c</sup> 25°C

<sup>d</sup> 80°C, estas reacciones probablemente se llevan a cabo por el rompimiento del enlace C-O

### 2.3. Efecto de los iones metálicos en la hidrólisis de ésteres fosfato

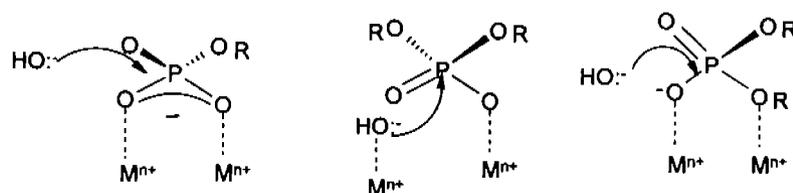
Se han estudiado muchos complejos con iones metálicos como modelos de metaloenzimas para catalizar la hidrólisis de los ésteres fosfato, y se han discutido y analizado los aspectos generales del papel que juegan estos iones metálicos.<sup>(2, 4, 14, 19)</sup> Es bien aceptado que el papel del ion metálico es el de promover la formación del nucleófilo a valores de pH neutro o ligeramente básico, al disminuir el pK<sub>a</sub> de la molécula de agua coordinada. Sin embargo, dependiendo del tipo de ion metálico de que se trate, puede participar de otras maneras. En la figura 2.2 se ilustran los tipos de mecanismos más comunes.<sup>(2)</sup>



**Figura 2.2.** Mecanismos propuestos de la hidrólisis de diésteres fosfato con iones metálicos

En el mecanismo 1 el ion metálico actúa como un ácido de Lewis y aumenta la carga positiva sobre el grupo fosfato. En el segundo caso el metal se coordina al grupo saliente, disminuyendo su basicidad. En el mecanismo propuesto 3, al polarizar al agua el metal hace que disminuya su  $pK_a$  y por lo tanto se genera más nucleófilo,  $OH^-$ , a menores valores de pH (el  $pK_a$  del agua es 15.7). En el mecanismo 4, el metal se coordina al sustrato y al nucleófilo dejando a ambos en posición *cis*, lo suficientemente cerca para que se lleve a cabo de manera más efectiva el ataque nucleofílico. En los mecanismos 5 y 6 el metal se encuentra coordinado al oxígeno del éster fosfato y puede, aunque en menor proporción, participar en la catálisis ácida o básica mediante  $H_2O$  u  $OH^-$  coordinados, respectivamente.

En algunos casos se ha observado que participan dos iones metálicos en la etapa limitante de la velocidad; para estos casos el efecto catalítico esperado es mayor. <sup>(2)</sup> Los mecanismos propuestos para catálisis con dos iones metálicos comprenden las posibilidades de una doble activación del éster por ambos ácidos de Lewis, o las combinaciones de la activación del éster por un metal con la coordinación ya sea del nucleófilo o del grupo saliente por el otro metal, figura 2.3.



**Figura 2.3.** Mecanismos de hidrólisis catalítica de diésteres fosfato en presencia de dos iones metálicos. <sup>(2)</sup>

Los mejores catalizadores son aquellos iones metálicos que son ácidos de Lewis fuertes, lo que les permite activar los enlaces de los ésteres fosfato vía la polarización o la neutralización de la carga del sustrato, y también al disminuir el  $pK_a$  de las moléculas de agua coordinadas al metal, generando más eficientemente al nucleófilo  $\text{OH}^-$ .

Tradicionalmente se han utilizado como catalizadores iones metálicos con una química de coordinación bien conocida, que se hallan en sistemas biológicos (como  $\text{Zn}^{2+}$ ) <sup>(20)</sup> y que son ácidos de Lewis fuertes; se han usado en menor proporción iones de otros metales de transición como  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$ . <sup>(20, 21)</sup> En presencia de estos iones metálicos las constantes de velocidad observadas a pH cercano a la neutralidad son del orden de  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  y el efecto catalítico es considerable. Podemos observar (tabla 2.4), que para ácidos de Lewis fuertes como son los iones metálicos  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Yb}^{3+}$  <sup>(21, 22)</sup>, la aceleración relativa aumenta hasta 9500 veces <sup>(22)</sup> y que cationes que son poco ácidos, como los iones de metales alcalinotérreos tienen una aceleración de sólo 46 veces incluso para sustratos activados como HNPP. <sup>(22)</sup> Vale la pena mencionar que los hidróxidos de todos estos metales son bastante insolubles, y las especies que pueden catalizar la hidrólisis se hallan en fracciones muy pequeñas, por esto, se ha buscado estabilizarlas con diversos ligantes.

**Tabla 2.4.** Hidrólisis del fosfodiéster ( $p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O}$ )( $2\text{-OHC}_3\text{H}_6\text{O}$ )PO (HNPP) en sistemas con metales divalentes y trivalentes a una concentración fija de 0.5mM, a 37°C y manteniendo un pH de 7.0. <sup>(23)</sup>

Ion Metálico	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{rel}}$
Ninguno	$3.333 \times 10^{-8}$	1
$\text{Ca}^{2+}$	$8.89 \times 10^{-8}$	3
$\text{Mg}^{2+}$	$1.47 \times 10^{-6}$	46
$\text{Zn}^{2+}$	$4.722 \times 10^{-6}$	150
$\text{Pb}^{2+}$	$8.9 \times 10^{-5}$	2800
$\text{Eu}^{3+}$	$2.47 \times 10^{-4}$	7700
$\text{Tb}^{3+}$	$3.05 \times 10^{-4}$	9500
$\text{Yb}^{3+}$	$3.03 \times 10^{-4}$	9500

\*Se utiliza un amortiguador (Hepes 10mM)

Entre los iones divalentes, podemos observar que  $\text{Zn}^{2+}$ , que es más ácido en términos de Lewis, tiene un mayor efecto catalítico (ver renglones 2-4 de la tabla 2.4); su reactividad se modifica al estar coordinado: sus complejos pueden tener mayor reactividad. Otros metales de transición tienen ciertos inconvenientes, por ejemplo,  $\text{Co}^{3+}$  es cinéticamente inerte <sup>(14)</sup>,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  <sup>(24)</sup>, tienen actividad redox que no siempre es compatible con las condiciones a las que se quiere medir y otros cationes tienen efectos catalíticos muy pequeños. <sup>(25)</sup>

También se han utilizado iones lantánidos <sup>(22, 2)</sup> por tener mayor carga y han mostrado una buena actividad hidrolítica con constantes de aceleración relativa de 7500 a 9500 veces mayores a las de los cationes divalentes (renglones 6-8 de la tabla 2.4). Sin embargo, los principales obstáculos que se tienen con estos iones para lograr aplicaciones prácticas derivan de que las especies activas son hidroxocomplejos de los iones metálicos, por lo que a pH básicos, se forman hidróxidos que son altamente insolubles, quedando fracciones muy pequeñas de las especies activas (aproximadamente 1% cuando se usan concentraciones milimolares). Otro problema al utilizar estos cationes de lantánidos es que es muy difícil estabilizar las especies activas y esclarecer los mecanismos de reacción que las involucran.

Los cationes alcalinos prácticamente no han sido estudiados en la hidrólisis de ésteres fosfato.

#### 2.4. Efecto del disolvente sobre la velocidad de reacción

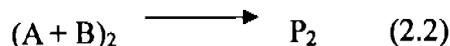
Un disolvente puede tener diferentes efectos sobre la rapidez de las reacciones químicas en fase homogénea ya que es el medio que está solvatando a todas las especies participantes en la reacción. De manera general podemos clasificar a los disolventes en polares o no polares, dependiendo del valor de su constante dieléctrica, y en próticos o apróticos dependiendo de si pueden o no formar puentes de hidrógeno. Hay que enfatizar que esta clasificación no es totalmente rígida; hay muchos disolventes que no pueden ser clasificados de esta manera, como son los éteres y los ésteres entre otros.

El agua es un disolvente polar prótico capaz de solvatar solutos iónicos y polares, pero tiene una habilidad muy pobre para solvatar moléculas no polares. Estas propiedades del agua han moldeado todas las funciones que se llevan a cabo en los sistemas biológicos, y son de gran interés e importancia para los sistemas químicos. Una característica muy importante es su habilidad para formar puentes de hidrógeno.

Los disolventes dipolares apróticos se caracterizan por poseer una constante dieléctrica mayor que 15 <sup>(26)</sup> y no actúan como donadores de enlace de hidrógeno ya que sus enlaces C-H no son lo suficientemente polarizables. Ejemplos de este tipo de disolventes son DMSO, DMF, acetonitrilo, etc. <sup>(27)</sup> Los disolventes con constantes dieléctricas menores, se consideran apolares o no-polares y pueden ser apróticos como el caso del dioxano. Se ha observado que las reacciones que implican reacomodos o disociaciones, generalmente son más rápidas en agua que en este tipo de disolventes y en el caso de algunos procesos de óxido-reducción, se ha observado que la velocidad prácticamente no depende del disolvente empleado. <sup>(26)</sup> Sin embargo, las reacciones bimoleculares de sustitución o adición que incluyen aniones como especies reactivas pueden ser mucho más rápidas en disolventes dipolares apróticos que en agua probablemente porque el anión está menos solvatado en disolventes dipolares apróticos que en agua <sup>(26)</sup> (al estar menos solvatado hay un aumento

de energía en términos de  $\Delta G$ , y esta desestabilización es responsable del efecto de aceleración observado).

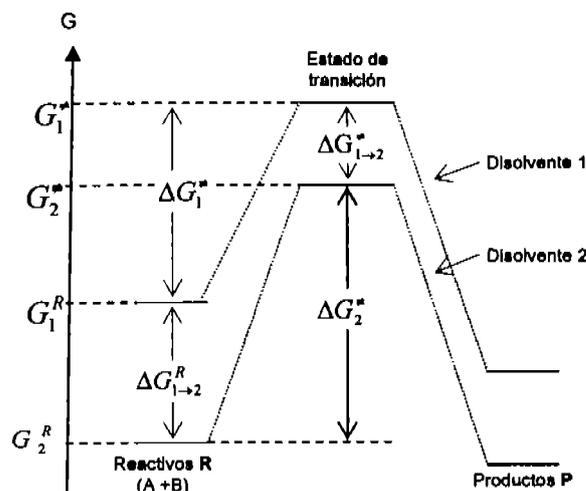
Si tenemos la reacción entre A y B para dar P en un disolvente 1 y esta misma reacción se lleva a cabo en un disolvente 2, podemos escribir:



Si alguno de los dos disolventes estabiliza mejor a los reactivos A y B, entonces al transferir los reactivos de un disolvente a otro hay una diferencia de energía libre. La energía libre para los reactivos A y B en el disolvente 1 se denomina  $G_1^R$  y en el disolvente 2,  $G_2^R$ ; la diferencia de energía libre entre estos dos disolventes ( $G_1^R - G_2^R$ ) se denomina energía libre de transferencia  $\Delta G_{1 \rightarrow 2}^R$ . Además, si consideramos que la reacción entre A y B pasa por el mismo estado de transición en ambos disolventes (1 y 2), también podemos expresar el cambio de solvatación del estado de transición como una diferencia de energía libre ( $G_1^* - G_2^*$ ), o bien la energía libre de transferencia para el estado de transición  $\Delta G_{1 \rightarrow 2}^*$ . La diferencia en las energías libres de activación para la reacción en dos disolventes se denominaría como  $\Delta \Delta G^*$  y se expresa mediante la ecuación 2.3.

$$\Delta \Delta G^* = \Delta G_1^* - \Delta G_2^* = (G_1^* - G_2^*) - (G_1^R - G_2^R) = \Delta G_{1 \rightarrow 2}^* - \Delta G_{1 \rightarrow 2}^R \quad (2.3)$$

Este cambio de energía, está representado en la figura 2.4. Así, si el reactivo se desestabiliza o si el estado de transición se estabiliza al cambiar de disolvente, la diferencia energética entre reactivos y estado de transición será menor al cambiar de disolvente y por lo tanto la reacción transcurre más rápidamente.



**Figura 2.4.** Diagrama de la energía libre de Gibbs para una reacción química en dos disolventes 1 y 2.

La energía libre de transferencia,  $\Delta G_{1 \rightarrow 2}^R$ , puede obtenerse a partir de los valores de los coeficientes de actividad, ecuación 2.4.

$$\Delta G_{1 \rightarrow 2}^R = -RT \ln(\gamma_1 / \gamma_2) \quad (2.4)$$

El cambio de disolvente afecta la energía libre de un soluto al modificar su potencial químico ( $\mu$ ). El potencial químico de una especie  $i$  en un disolvente dado  $S$  cambiará de acuerdo a su coeficiente de actividad, ecuación 2.5<sup>(26)</sup>,  ${}^0\gamma_i^S$ , que representa la diferencia de energía al transferir un compuesto de un disolvente de referencia, 0, al disolvente en cuestión,  $S$ , a temperatura y concentración constantes.

$$\mu_i^S = \mu_i^0 + RT \ln {}^0\gamma_i^S \quad (2.5)$$

El cambio de la velocidad de la reacción al cambiar de disolvente depende de la diferencia entre los potenciales químicos de las especies en ambos medios. Si estamos describiendo dos procesos isotérmicos iguales en disolventes diferentes, por ejemplo, una reacción nucleofílica, la diferencia en términos de las constantes de velocidad puede expresarse mediante la ecuación 2.6<sup>(26)</sup>, donde  $Y^-$  es un nucleófilo aniónico,  $RX$  el sustrato y  $YRX^\ddagger$  es el estado de transición.



$$\log k_s / k_0 = \log^0 \gamma_{Y^-}^S + \log^0 \gamma_{RX}^S - \log^0 \gamma_{YRX^*}^S \quad (2.6)$$

Los valores de  ${}^0\gamma_i^S$  para cada especie pueden medirse usando diferentes técnicas experimentales como el cambio de potencial eléctrico durante la transferencia, cambio de solubilidad, etc. <sup>(27)</sup>

Aplicando este tipo de análisis para reacciones que son más rápidas en disolventes dipolares apróticos, observamos que el logaritmo del coeficiente de actividad de transferencia para el nucleófilo ( ${}^0\gamma_{Y^-}^S$ ) es más positivo (el reactivo aniónico está más solvatado por disolventes próticos que por disolventes dipolares apróticos) o bien que el logaritmo del coeficiente de actividad de transferencia para el estado de transición ( ${}^0\gamma_{YRX^*}^S$ ) es menor al cambiar de un disolvente prótico a uno dipolar aprótico.

Para predecir el efecto del disolvente sobre una reacción, es necesario saber además de cómo se ven afectados los potenciales químicos de las especies involucradas por el cambio de disolvente, cuáles son y cómo se modifican las interacciones principales entre el soluto y el disolvente, tales como interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de dispersión, etc. La constante dieléctrica, la polarización molar, y el momento dipolar de un disolvente nos permiten considerar que tan fuerte puede interactuar electrostáticamente con un soluto, es decir, qué tan solvatado estará el soluto en este disolvente. Además, dependiendo de que tan fuerte sea la interacción soluto-disolvente, existen cambios en la orientación y estructura del disolvente porque éste se alinea para obtener la máxima interacción con el soluto; esto involucra otro gasto energético, el necesario para modificar la estructura interna del disolvente. Otra consideración que puede resultar pertinente al haber un cambio de disolvente, es la de los cambios en la geometría de las especies involucradas que puede afectar, por varias razones, la velocidad de una reacción. Finalmente, hay que tener en cuenta que en las reacciones de hidrólisis, el agua, que es el disolvente, participa en la reacción; al cambiar por completo de disolvente, la velocidad se vería afectada por la eliminación de uno de los reactivos.

Así, para poder entender cuál sería el cambio en la velocidad de la hidrólisis de los di- y triésteres fosfato al modificar el medio de reacción, es necesario evaluar cómo se verían modificadas la actividad del nucleófilo ( $Y^-$ ) que es un anión, la del sustrato ( $RX$ ) que en nuestro caso puede ser o no un electrolito, la del estado de transición ( $YRX^\ddagger$ ) tanto con fosfodiésteres como con triésteres y de los cationes metálicos que se han usado como catalizadores de este tipo de reacciones.

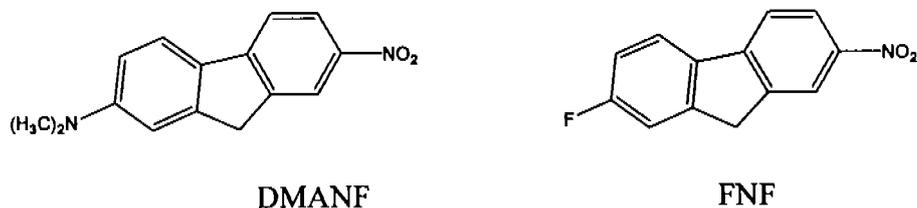
### **2.5. Efecto del disolvente basado en parámetros empíricos.**

El disolvente en una reacción tiene un papel muy importante y puede alterar la velocidad de una reacción por el tipo de interacciones que presente con los reactivos, con los productos y con el complejo activado en el estado de transición, por lo que describir las propiedades de los disolventes de una manera exacta ha despertado el interés los investigadores durante muchos años<sup>(27, 28)</sup>. Estas interacciones han sido descritas en términos del concepto global llamado “polaridad del disolvente” (por ejemplo, asumir que el disolvente es un medio continuo con cierta constante dieléctrica) o bien disecando la naturaleza de las interacciones en no-específicas y específicas, que puede resultar más adecuado cuando son relevantes las interacciones donador-aceptor. Para racionalizar el comportamiento de los disolventes se han propuesto varias escalas empíricas que no reflejan solamente efectos generales sino efectos específicos de naturaleza variable que dependen de los compuestos modelo, generalmente solvatocrómicos, empleados para construir la escala.

Los parámetros que describen algunas propiedades importantes de mezclas acuosas de los disolventes orgánicos de interés para este estudio son los parámetros propuestos por Catalán y colaboradores<sup>(28, 29)</sup>: SPP (polaridad/polarizabilidad), SB (basicidad) y SA (acidez).

El parámetro de polaridad/polarizabilidad (SPP) que proponen<sup>(28)</sup> usa como compuesto solvatocrómico modelo DMANF que cumple varios requisitos deseables: (a) su momento dipolar aumenta marcadamente pero su orientación sigue siendo inalterada en respuesta a la excitación electrónica: (b) no experimenta ningún cambio estructural por efecto de la

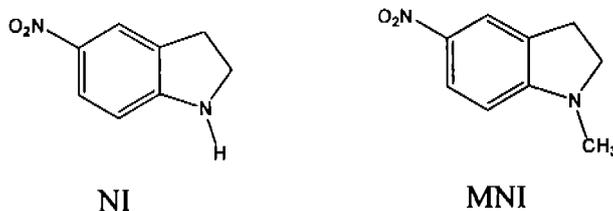
excitación electrónica o de la naturaleza del disolvente; (c) su basicidad o acidez cambia muy poco por la excitación electrónica tal que es insignificante comparado a los causados por la polaridad; (d) la ventana espectral de la banda de la transición electrónica no cambia con la naturaleza del disolvente; y (e) su estructura molecular facilita el uso de FNF como par homomorfo.



Así, la polaridad de un disolvente en la escala de SPP está dada por la diferencia entre el solvatochromismo de DMANF y su homomorfo FNF [ $\Delta v_{disolvente} = v_{FNF} - v_{DMANF}$ ] y puede ser evaluada en una escala fija en la que se asigna un valor de 0 para la fase de gas (es decir, en ausencia de disolvente) y un valor de 1 para DMSO de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$SPP_{disolvente} = [\Delta v_{disolvente} - \Delta v_{gas}] / [\Delta v_{DMSO} - \Delta v_{gas}] \quad (2.7)$$

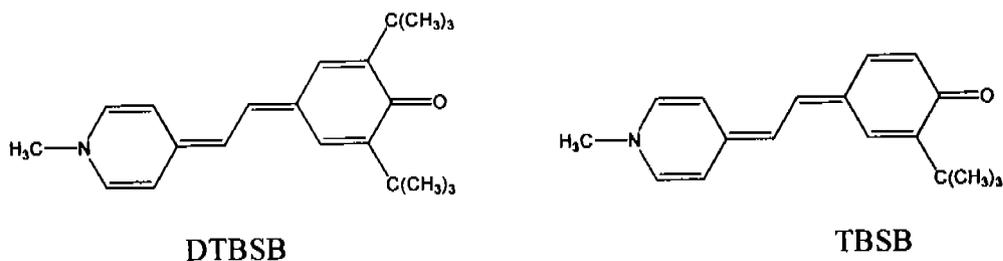
Para el parámetro de basicidad (SB) utilizan 5-Nitroindolina (NI) y par homomorfo 1-metil-5-nitroindolina (MNI), que cumple con ser lo bastante ácida en su estado basal electrónico como para permitir la caracterización de basicidad de su entorno. NI presenta un desplazamiento batocrómico en la posición de su banda de absorción, y la intensidad de esta banda aumenta con el aumento de la basicidad del ambiente.



La escala para el parámetro SB va desde cero para la fase de gas y 1 para el tetrametilguanidina (TMG) de acuerdo a la ecuación 2.8

$$SB_{\text{disolvente}} = [\Delta v_{\text{disolvente}} - \Delta v_{\text{gas}}] / [\Delta v_{\text{TMG}} - \Delta v_{\text{gas}}] \quad (2.8)$$

El parámetro de acidez, SA, está basado en el uso de los compuestos solvatocrómicos TBSB y DTBSB, usando el método propuesto por Kamlet y Taft en 1976.<sup>(30)</sup>



La escala de la acidez la definen fijando el solvatocromismo de DTBSB en un disolvente como la referencia para la acidez cero y para la cual, los disolventes no ácidos obedecen la ecuación:  $\nu_{\text{TBSB}} = 1.409\nu_{\text{DTBSB}} - 6288.7$ . El valor de SA para un disolvente o mezcla de disolventes lo obtienen de la ecuación 2.9<sup>(28)</sup> asignando un valor de 0.4 para etanol ( $\nu$  1299,8  $\text{cm}^{-1}$ ).

$$SA_{\text{disolvente}} = [[\nu_{\text{TBSB}} - (1.409\nu_{\text{DTBSB}} - 6288.7)] / 1299.8] 0.4 \quad (2.9)$$

## 2.6. Solvatación de no electrolitos

Sabemos que los solutos polares (como el sustrato PNPDP) que no pueden formar puentes de hidrógeno son más solubles en disolventes dipolares apróticos.<sup>(27)</sup> Los factores que más afectan la solvatación en este caso son: las fuerzas de dispersión, las interacciones dipolo-dipolo y los cambios en la estructura del disolvente. En cambio, los solutos que son donadores de enlace de hidrógeno son más solubles en disolventes básicos, porque esta interacción predomina.

Para solutos grandes la estructura interna del disolvente tiene una gran importancia. La actividad del soluto en el caso de no electrolitos puede determinarse a partir de los datos de solubilidad. Por ejemplo, si un sólido A tiene una solubilidad  $S^0$  en el disolvente de referencia que cambia a  $S^S$  en el disolvente de interés, dado que al transferir el compuesto de un disolvente a otro lo único que cambia es el coeficiente de actividad del soluto, obtenemos la siguiente expresión, ecuación 2.10

$$\log^0 \gamma_A^S = \log(S^0/S^S) \quad (2.10)$$

Por ejemplo, en la tabla 2.5 se presentan los coeficientes de actividad para  $(\text{PhO})_2\text{PO}\cdot\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ . Podemos ver que estos valores (columna 4) disminuyen notablemente conforme la cantidad de disolvente aprótico en la mezcla es mayor. Sin embargo el cambio en la constante de velocidad es mucho menor que el cambio en el coeficiente de actividad. Los autores proponen que el estado de transición se estabiliza en estas mezclas por lo que la diferencia de energía libre y en consecuencia el cambio en la velocidad de la reacción es mucho más pequeño de lo esperado. <sup>(7)</sup>

**Tabla 2.5.** Constantes de segundo orden de las reacciones del *p*-nitrofenildifenil fosfato y sus coeficientes de actividad <sup>a (7)</sup>

MeCN (vol. %)	$X_{\text{MeCN}}$	$k_2$	$\gamma_s$
0		0.52 <sup>b</sup>	1.00
0.4			
2.12	0.0074	0.458	
10.4	0.038	0.304	0.159
20.3	0.081	0.198	0.025
40.2	0.189	0.081	$6.9 \times 10^{-4}$
60.2	0.343	0.064	$5.2 \times 10^{-5}$
80.1	0.582	0.162	
84.1	0.646	0.231	

<sup>a</sup> Las constantes de segundo orden,  $k_2$ , tienen unidades de  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  a 25°C; los valores de  $\gamma$ , fueron interpolados en algunos casos.

<sup>b</sup> Valores extrapolados.

## 2.7. Solvatación de electrolitos

La solvatación de iones esféricos en disolventes polares se puede evaluar mediante la ecuación de Born <sup>(26)</sup> (ecuación 2.11)

$$\log^0 \gamma_i^s = \frac{NZ_i^2 e^2}{4.606RT r} \left( \frac{1}{\epsilon_s} - \frac{1}{\epsilon_0} \right) \quad (2.11)$$

en donde  $N$  es el número de partículas,  $Z$  es la carga del ion,  $e$  es la carga del electrón,  $R$  la constante de los gases,  $T$  la temperatura en K,  $r$  el tamaño iónico y  $\epsilon_i$  son las constantes dieléctricas del disolvente problema y del disolvente de referencia respectivamente.

Es claro que en el caso de los electrolitos es imposible determinar la actividad de cada ion por separado ya que siempre está presente el contraion correspondiente. Normalmente en estos casos se pueden utilizar varias suposiciones extratermodinámicas que pueden ser muy útiles para estimar el cambio de coeficiente de actividad. <sup>(26)</sup> Estas son:

- Un catión y un anión simétricos grandes con carga muy dispersa de tamaño y forma parecidos tienen el mismo número de moléculas del disolvente alrededor de cada ion. La interacción electrostática es pequeña y depende sólo de la constante dieléctrica del disolvente. El efecto del disolvente para el catión y el anión es el mismo.
- Para un ion grande con carga dispersa el coeficiente de actividad para los disolventes de constante de permeabilidad parecida es semejante y se calcula con la ecuación de Born.
- Los iones grandes con carga dispersa tienen un coeficiente de actividad cercano a uno.

Utilizando estas reglas se puede predecir el comportamiento de los coeficientes de actividad en los casos cuando éstos no pueden ser medidos directamente. Así, el estado de transición

de una reacción puede ser representado como un ion grande con carga dispersa y su solvatación en disolventes dipolares apróticos puede ser tratado de manera similar.

## 2.8. Solvatación de aniones

La solvatación de los reactivos aniónicos es el factor dominante en la determinación de velocidades de reacción en reacciones de sustitución en disolventes apróticos polares. Las variables en el anión son el tamaño de éste, su polarizabilidad, y su carga; las variables consideradas para el del disolvente son su polarizabilidad, su constante dieléctrica, su habilidad para ser donadores de enlace de hidrógeno y su estructura. <sup>(27)</sup>

Para los aniones pequeños que no tienen sustituyentes atrayentes de electrones (como  $F^-$ ,  $OR^-$ ,  $Cl^-$ , o el nucleófilo  $OH^-$ ) y que son buenos aceptores de enlaces de hidrógeno, existen fuertes interacciones de puente de hidrógeno en los disolventes próticos que están ausentes cuando el disolvente es dipolar aprótico. <sup>(27)</sup> De esta manera, el enlace de hidrógeno es la razón principal por la que algunos aniones están más solvatados por disolventes próticos que por disolventes dipolares apróticos, o bien el  $\log^0 \gamma^S_Y$  es positivo cuando el disolvente 0 es prótico y S es un disolvente dipolar aprótico. Esto es, los aniones pequeños se desestabilizan en disolventes dipolares apróticos.

En los aniones grandes y polarizables (como  $I^-$ ,  $SCN^-$ ,  $ClO_4^-$ ) la deslocalización de su carga produce a un anión el cual es un débil aceptor de enlace de hidrógeno. Esto trae en consecuencia que este tipo de aniones no estén significativamente más solvatados en disolventes próticos que en disolventes dipolares o polares apróticos. En particular, los disolventes dipolares apróticos son mucho más polarizables que los disolventes próticos, por lo que la interacción de Van der Waals con aniones grandes es mucho más fuerte en comparación con disolventes próticos. Este tipo de iones a veces están mucho menos solvatados por disolventes con alto grado de estructura intermolecular que en disolventes con poca estructura interna, debido a un gasto extra de energía, necesario para romper la estructura del disolvente y orientarlo de manera diferente alrededor de las moléculas del

soluto. Los aniones grandes pueden solvatarse más eficientemente en disolventes dipolares, sin embargo, se estabilizan aún más en disolventes con gran estructura intermolecular. <sup>(27)</sup>

Los aniones grandes con carga dispersa (como podemos considerar al estado de transición YRX<sup>\*</sup>) son aceptores débiles de enlace de hidrógeno lo que disminuye su solvatación en disolventes próticos. Los disolventes apróticos pueden ser mucho más polarizables que los disolventes próticos, por lo cual los aniones polarizables pueden estar más solvatados en estos disolventes; una solvatación intermedia se esperaría para disolventes apolares apróticos. Esto es aplicable a muchos estados de transición aniónicos. <sup>(8b)</sup>

## 2.9. Solvatación de cationes

Los cationes en general son más pequeños y menos polarizables que los aniones y no pueden ser aceptores de enlace de hidrógeno. Los cationes donadores de enlaces de hidrógeno son más solubles en disolventes básicos. Su solvatación en disolventes dipolares apróticos es mejor que en disolventes próticos. Mientras más grandes son los cationes, están menos solvatados en disolventes con estructura interna.

Algunos cationes son ácidos de Lewis (como Ag<sup>+</sup>, Co<sup>3+</sup>) y el disolvente se comporta como un ligante básico, otros (como R<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>) son donadores de enlace de hidrógeno; pero las interacciones más comunes entre el disolvente y el catión son las catión-dipolo y la formación o ruptura de estructuras. Los cationes pequeños como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, están mucho mejor solvatados en DMF y DMSO, pero se solvatan bien en acetonitrilo, formamida y en agua. <sup>(27)</sup>

Los efectos debido a la estructura del disolvente son aparentes. En cationes orgánicos grandes (como Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, Ph<sub>4</sub>As<sup>+</sup>) y con carga dispersa, sucede algo similar que en el caso de los aniones grandes y los no-electrolitos: se encuentran considerablemente menos solvatados por agua que por metanol y más solvatados por disolventes apróticos dipolares. Los cationes que son donadores de enlace de hidrógeno, están más solvatados en DMF, DMSO y en agua, entre otros disolventes con características parecidas. <sup>(27)</sup>



## 2.10. Solvatación del estado de transición

Como hemos visto hasta ahora, un factor importante para la solvatación de una especie es su carga: si es positiva o negativa, que tan grande es y si está dispersa o localizada. La solvatación del estado de transición en disolventes apróticos dipolares o apolares puede analizarse cualitativamente de la misma forma.

Cuando se tiene una reacción entre moléculas polares sin carga y se forma un estado de transición neutro, se espera que el efecto de este tipo de disolventes sea muy pequeño; si el estado de transición es capaz de formar enlaces de hidrógeno y la reacción se hace en un disolvente básico, se observaría un pequeño aumento porque el estado de transición estaría mejor solvatado. Cuando es una reacción en la que tanto los reactivos como el estado de transición son especies catiónicas, cabe esperar un aumento de velocidad muy pequeño, pues aunque se formara un estado de transición grande, polarizable, e incluso con posibilidades de formar enlaces de hidrógeno que se estabilizara en disolventes apróticos dipolares o apolares, se esperaría que sucediera lo mismo con los reactivos, y el efecto total sería nulo. Cuando el estado de transición es un anión se encuentra mejor solvatado en disolventes próticos que en disolventes apróticos y en disolventes polares que en disolventes apolares, por lo tanto se esperaría que en un disolvente dipolar aprótico como acetonitrilo o en un disolvente apolar aprótico como dioxano no hubiera un efecto significativo. No obstante, si el estado de transición es un anión grande, polarizable y con grupos hidrofóbicos, se esperaría que se estabilizara en este tipo de disolventes, causando un pequeño incremento en la velocidad de la reacción. <sup>(8b)</sup>

Así, para poder predecir el cambio en la velocidad de una reacción por efecto del disolvente, se deben conocer los cambios en la solvatación de los reactivos involucrados, así como del estado de transición. En general se espera que las reacciones de sustitución nucleofílicas sean más rápidas en disolventes apróticos apolares y dipolares porque los reactivos aniónicos, como  $Y^-$ , están mucho más solvatados por disolventes próticos que por disolventes apróticos dipolares, así, el estado de transición aniónico correspondiente tiene un valor de  $\log^0 \gamma_{YRX}^S$  menor que el de  $\log^0 \gamma_Y^S$ . cuando el disolvente de referencia es

prótico y el otro disolvente es aprótico. Sin embargo, el valor del coeficiente de actividad para el estado de transición de una reacción dependerá del mecanismo de reacción, de los grupos entrante y saliente y del efecto estérico que ellos ejercen.

En la práctica son pocas las reacciones de sustitución nucleofílica que se pueden clasificar rigurosamente como reacciones  $S_N2$ , donde la formación y ruptura del estado de transición ocurre simultáneamente, o como reacciones  $S_N1$ , donde primero ocurre una ruptura. En general, se observa que las reacciones son predominantemente de alguno de estos dos tipos. En el caso del estado de transición para mecanismos concertados, se puede decir que está tenso o relajado en función de la distancia entre los grupos entrante y saliente y el átomo sobre el cual se lleva a cabo el ataque nucleofílico. <sup>(26)</sup>

Algunos factores que cambian el estado de transición haciendo que la ruptura ocurra antes, (esto es, pasando por un estado de transición más relajado), son: 1) la repulsión estérica entre los grupos saliente y entrante, 2) el impedimento estérico por parte del grupo sustituyente R, 3) la presencia de grupos electroattractores, y 4) la presencia de carga negativa localizada sobre los grupos saliente y entrante. Podemos observar que entre más positivo sea el valor de  $\delta \log^0 \gamma_{YRX^\ddagger}^S$  indica una mayor localización de carga sobre los grupos entrante y saliente lo que corresponde al estado de transición más relajado, por lo cual, se puede concluir que el cambio de disolvente afecta la geometría del estado de transición. El aumento de la rapidez de la reacción al cambiar de un disolvente prótico a un polar o dipolar aprótico es más pronunciado cuando los grupos sustituyentes son más grandes, más polarizables y menos susceptibles de aceptar enlaces de hidrógeno del disolvente prótico. <sup>(26)</sup>

Los factores determinantes para que la velocidad de la reacción en estos medios sea mayor o menor dependen del mecanismo de sustitución de las reacciones, por lo que, en general, los cambios en el logaritmo del coeficiente de actividad del estado de transición,  $\log^0 \gamma_{YRX^\ddagger}^S$ , son asignados al efecto de una o más variables, como el grupo entrante, el grupo saliente, los sustituyentes, etc. Algunas veces es posible que haya una variable predominante para un determinado mecanismo (por ejemplo el efecto estérico de los

sustituyentes), aunque usualmente es imposible separar rigurosamente sólo un factor al cual atribuir el efecto observado. <sup>(27)</sup>

La solvatación de un soluto, sea iónico o neutro, en una mezcla de disolventes es más compleja que en un disolvente puro. Esto sucede en gran parte porque en una mezcla de disolventes se ven involucradas interacciones entre el soluto y el disolvente pero sólo entre las diferentes moléculas presentes en la mezcla; esto último pertenece a un tipo de contribución que también juega un papel central en el proceso de solvatación. <sup>(28)</sup>

Puede considerarse que la solvatación de los solutos cuando se tienen mezclas de disolventes, la proporción de los componentes de éstos puede ser significativamente diferente alrededor del soluto en la disolución. Puede suceder que el soluto se encuentre solvatado por uno de los disolventes de la mezcla, el cual tenga una energía libre de solvatación más negativa, y en consecuencia este disolvente es el único que se encuentra en la primera esfera de solvatación del soluto. Este fenómeno es conocido como “solvatación preferencial”, un término que indica que el soluto produce un reacomodo en la mezcla de disolventes, rodeándose del disolvente del cual sea más a fin en la solución; sin embargo, la “solvatación referencial” se da por interacciones no específicas entre el soluto y el disolvente llamadas “enriquecimiento dieléctrico” o asociación específica soluto-disolvente. <sup>(28)</sup>

### **2.11. Efecto de disolventes orgánicos en la hidrólisis de ésteres fosfato.**

En particular, el efecto del disolvente y el efecto de mezclas acuosas de disolventes orgánicos en la hidrólisis de ésteres fosfato están poco estudiados.

Kirby y colaboradores <sup>(31)</sup> estudiaron la hidrólisis de monoésteres fosfato en DMSO, HMPA y acetonitrilo, encontrando que para el dianión de MNPP la ruptura del enlace P-O se acelera selectivamente hasta  $10^6$ - $10^7$  veces respecto a la hidrólisis en agua en DMSO acuoso 95%, en presencia de NaOH 20 mM. Este efecto es atribuido a una disminución en la formación de enlaces de hidrógeno al haber menor contenido de agua y a la

desestabilización de los reactivos. También observaron que no hay ningún efecto al variar la composición del disolvente en la hidrólisis del monoanión de MNPP.

Estudios similares fueron realizados por Hengge y para monoésteres de arilfosfato en alcohol terbutílico y teramílico <sup>(32)</sup> encontrando efectos de aceleración de 7500 y 8750 veces respectivamente para el dianión (MNPP<sup>2-</sup>) y de 14 y 16 veces respectivamente para el monoanión (MNPP<sup>-</sup>) al comparar con la hidrólisis en medio acuoso; los autores subrayan que para las enzimas, el complejo sustrato-fosfatasa en el estado basal ya está preasociado y ya no tiene la capa de hidratación, lo cual elimina la necesidad de una reorganización del disolvente, que es otra contribución al efecto catalítico enzimático. Estudios más detallados y resultados de cálculos teóricos para la hidrólisis de monoésteres fosfato en DMSO <sup>(33)</sup> muestran que el efecto de aceleración causado por el disolvente dipolar aprótico está limitado para monoésteres fosfato con grupos salientes menos básicos que el fenol, y apoyan la explicación original del fenómeno propuesta por Kirby. <sup>(31)</sup>

Bunton y colaboradores <sup>(34)</sup> estudiaron el comportamiento de diferentes nucleófilos (OH<sup>-</sup> y oximatos) con ésteres arilfosfato, fosfinato y tioarilfosfato en mezclas acuosas de acetonitrilo, encontrando que la dependencia de la constante de segundo orden pasa por un mínimo al decrementarse el contenido de agua; cualitativamente el efecto de otros disolventes, como alcohol terbutílico y NMP es similar. El comportamiento observado lo atribuyen a la suma de dos efectos: la desestabilización del nucleófilo y a la estabilización de los grupos sustituyentes hidrofóbicos.

Terrier y colaboradores <sup>(35)</sup> observaron que en las reacciones de iones de arilóxidos con bis-(4-nitrofenil)fenilfosfonato en mezclas acuosas de DMSO, el incremento en la velocidad de la reacción al incrementar el contenido del disolvente orgánico es explicado en términos de la parcial desolvatación requerida para el nucleófilo (por ejemplo para OH<sup>-</sup>, la constante de velocidad de segundo orden aumenta 10 veces al ir de un medio acuoso a un medio con 70% DMSO). Sin embargo, existen pocos datos en la literatura del efecto de iones metálicos en medios no acuosos o en mezclas de disolventes.

Schneider y Liu <sup>(36)</sup> informaron en 2002 el efecto del medio en la hidrólisis de BNPP en presencia de Eu(III) estudiando mezclas acuosas de DMSO con contenidos hasta de 40% en volumen de DMSO; observaron que la velocidad de reacción de hidrólisis disminuye al incrementarse el porcentaje del disolvente orgánico. Vale la pena resaltar que los cationes lantánidos son buenos catalizadores de la misma reacción en disolución acuosa <sup>(2)</sup>. Por otro lado, iones de metales alcalinotérreos, que no tienen ninguna actividad catalítica sobre la hidrólisis básica de fosfodiésteres en agua, como  $\text{Ca}^{2+}$ , al cambiar el medio de reacción por un medio dipolar aprótico con bajo contenido de agua (mezcla acuosa con 90 % de DMSO) aparece un efecto catalítico notable <sup>(8a)</sup>. Por ejemplo, la  $k_{\text{obs}}$  para la hidrólisis básica de BNPP a una concentración de base 1 mM a 70° C en agua es de  $8.57 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , en un medio con 90% DMSO a 25° C es de  $1.64 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  y al adicionar  $\text{Ca}^{2+}$  en una concentración 1mM en este medio es de  $2.97 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .

Respecto a los cationes de metales alcalinos se sabe aún menos. Buncel y colaboradores informaron un efecto catalítico muy pequeño de metales alcalinos sobre la hidrólisis de 4-nitrofenilfosfonato en etanol, con etóxido como nucleófilo <sup>(37)</sup>. En el estudio se utilizan altas concentraciones (del orden de 100 mM para los cationes) y reportan la participación simultánea de varios iones metálicos en el estado de transición, teniendo mayores órdenes de reacción los cationes más pequeños (los órdenes de reacción informados son: 3 para  $\text{K}^+$ , 4 para  $\text{Na}^+$  y 5 para  $\text{Li}^+$ ).

Así, las mezclas acuosas de disolventes apróticos apolares o dipolares pueden ser utilizadas para imitar el microambiente enzimático con bajo contenido de agua. Debido a ello el interés de este trabajo es el de estudiar cuál es el efecto de mezclas acuosas de disolventes apróticos miscibles con agua con diferente polaridad (como DMF, dioxano, acetonitrilo) sobre la rapidez de la hidrólisis básica de ésteres fosfato. También se plantea el estudio del posible efecto catalítico de iones metálicos alcalinos, que son ácidos de Lewis muy débiles, pero podrían mostrar algún efecto en medios con bajo contenido de agua.

### 3. OBJETIVOS

Estudiar el efecto de medios que simulen el entorno del sitio activo de las enzimas en la hidrólisis básica de diésteres y triésteres fosfato. Estudiar el efecto catalítico de los cationes de metales alcalinos en la hidrólisis básica de estos sustratos en agua y en estos medios.

#### Objetivos particulares

- ❖ Medir los parámetros cinéticos para la hidrólisis básica en disolución acuosa de un fosfodiéster modelo y estudiar el efecto de cationes de metales alcalinos en disolución acuosa.
  
- ❖ Estudiar el efecto de mezclas acuosas de disolventes orgánicos apróticos sobre la rapidez de hidrólisis básica para un diéster y un triéster fosfato.
  
- ❖ Estudiar el efecto de cationes de metales alcalinos sobre la rapidez de hidrólisis básica para un diéster y un triéster fosfato en mezclas acuosas de disolventes orgánicos apróticos.

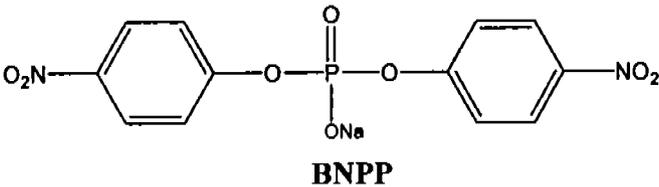
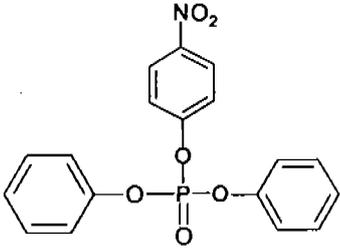
## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Reactivos

#### 4.1.1. Sustratos

Para la realización de este estudio se emplearon dos tipos de ésteres fosfato como sustratos. La hidrólisis de estos compuestos es irreversible dando como producto nitrofenol; su anión, nitrofenolato, es colorido y fácilmente detectable mediante espectrofotometría ( $\lambda_{\text{máx}}$  400 nm,  $\epsilon_{400}$  en agua  $18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). <sup>(8b)</sup> Se usó 4-nitrofenol para hacer curvas de calibración del producto en las mezclas agua-disolvente orgánico y para cuantificar el producto de la reacción por el método de adiciones estándar.

**Tabla 4.1.** Sustratos empleados

<p>Bis(4-nitrofenil)fosfato, sal de sodio Aldrich 99.99% Peso molecular 362.2 g/mol Recristalizado de una mezcla de etanol/agua <sup>(38)</sup></p>	 <p style="text-align: center;"><b>BNPP</b></p>
<p>4-Nitrofenildifenil fosfato Peso molecular 371.3 g/mol Sintetizado y purificado según lo informado por Gulick <sup>(39)</sup></p>	 <p style="text-align: center;"><b>PNPDP</b></p>
<p>4-Nitrofenol Grado espectrofotométrico (Aldrich) Peso molecular 139.11 g/mol Recristalizado de cloroformo <sup>(38)</sup></p>	 <p style="text-align: center;"><b>PNP</b></p>

#### 4.1.2. Sales inorgánicas y otros

Se emplearon cloruros y bromuros de los metales alcalinos (Li, Na, K, Rb, Cs) grado reactivo (Aldrich) sin tratamiento previo. Se prepararon en disoluciones patrón acuosas 1M.

Las disoluciones patrón de NaOH fueron preparadas a partir del reactivo sólido (Aldrich) 99.99% de pureza, evitando la formación de carbonatos. Se estandarizaron con biftalato de potasio en presencia de fenoftaleína como indicador y se usaron frescas.

Se utilizó una solución de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  al 40% en peso (Aldrich) certificada.

Se utilizó una disolución patrón de  $\text{Bu}_4\text{NCl}$  preparada a partir del reactivo sólido (Aldrich) 99.99%.

#### 4.1.3. Disolventes

En todos los experimentos se utilizó agua destilada y desionizada con una resistividad de  $18.0 \pm 0.1 \text{ M}\Omega\text{cm}$ , obtenida mediante el sistema Barnstead Nanopure.

Se utilizó acetonitrilo grado reactivo (Mallinckrodt) 99.9%, fresco y sin tratamiento previo.

Se utilizó dioxano grado reactivo (J. T. Baker) 99.9%, fresco y purificado mediante destilación fraccionada con el fin de eliminar el dietilditiocarbamato de sodio (utilizado como conservador) y otras posibles impurezas.<sup>(38)</sup>

Se utilizó dimetilformamida grado reactivo (J.T. Baker) 99.9% fresca y sin tratamiento previo.

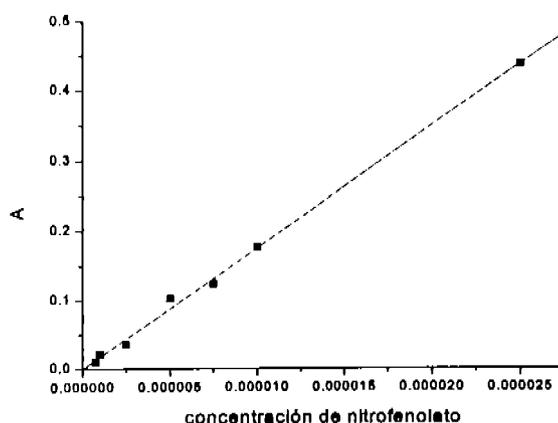


## 4.2. Equipo

Las mediciones de volumen se hicieron utilizando micropipetas Eppendorf Reasearch serie 2000 de volúmenes variables. Para las mediciones espectrofotométricas se emplearon dos equipos de ultravioleta-visible, Hewlett Packard HP8453 de arreglo de diodos y UNICAM UV500 de doble haz, ambos equipados con compartimentos termostatados con sistema Peltier ( $0.1 \pm ^\circ\text{C}$ )

## 4.3. Estudios cinéticos

En estos experimentos se siguió la hidrólisis de los sustratos BNPP y PNPDPD espectrofotométricamente por la aparición del anión 4-nitrofenolato. Para ello se emplearon disoluciones recién preparadas de los sustratos. Las disoluciones de BNPP fueron preparadas en agua en un intervalo de concentraciones de  $8 \times 10^{-5}$  a  $2 \times 10^{-4}$  M.

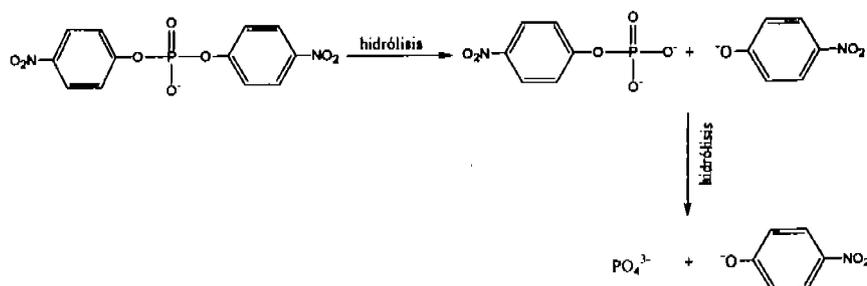


**Figura 4.1.** Curva de calibración para la determinación de nitrofenolato en una mezcla acetonitrilo 90% v/v,  $\epsilon=22900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Las disoluciones patrón de PNPDPD fueron preparadas en agua con 10% de disolvente orgánico, ya que este sustrato es muy poco soluble en agua a una concentración de  $4 \times 10^{-5}$  M. Estas disoluciones se mantuvieron selladas y en refrigeración por periodos máximos de 3 semanas para evitar la descomposición de los sustratos.

Al trabajar en mezclas de agua-disolvente orgánico, se observó que la intensidad de las bandas para el anión 4-nitrofenolato varía al aumentar la concentración de disolvente orgánico. Este anión es intensamente colorido y se detecta y cuantifica fácilmente mediante espectrofotometría UV-visible a una  $\lambda_{\max}$  de 400nm (100% H<sub>2</sub>O), 405nm (en mezclas con 60% acetonitrilo y dioxano). Se observó que el coeficiente de absortividad molar,  $\epsilon$ , aumenta de 18,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a 20,500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, debido posiblemente al cambio de solvatación del anión. Por esta razón, en todas las cinéticas donde se utilizó el sustrato BNPP se hicieron adiciones estándar de nitrofenol al final de cada reacción para cuantificar adecuadamente la cantidad de producto formada en cada disolución.

La hidrólisis completa de BNPP transcurre en dos etapas (Figura 4.2):



**Figura 4.2.** Reacción general observada de hidrólisis de BNPP.

Dependiendo de las condiciones de reacción, se puede observar sólo la primera etapa, formación de un mol de MNPP y un mol de 4-nitrofenolato, o bien una hidrólisis total, hasta la formación de fosfato y dos equivalentes de 4-nitrofenolato.

En las condiciones empleadas en el presente trabajo, la reacción es lenta y las constantes de velocidad observadas de primer orden ( $k_{obs}$ ) fueron calculadas a partir de velocidades iniciales, ecuación 4.1 (Ver Anexo 1 con la derivación de la ecuación).

$$v_o = \left[ \frac{d[NP]}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = k_{obs} \epsilon_{NP} 2[BNPP]_0 \quad (4.1)$$

$$A = \varepsilon_p k_{obs} 2[BNPP]_0 t \quad (4.2)$$

donde A es la absorbancia registrada,  $\varepsilon_{NP}$  es la absorción molar de nitrofenolato en el medio y  $k_{obs}$  la constante de velocidad observada.

En la hidrólisis de PNPDP se observa la liberación de un equivalente de 4-nitrofenolato por un mol de sustrato. Para este sustrato se observó que las curvas cinéticas obtenidas correspondían a la hidrólisis completa del sustrato así que el cálculo de las constantes de velocidad observadas de primer orden ( $k_{obs}$ ) se hizo por el método integral. ecuación 4.3 (Ver Anexo 2 con la derivación de la ecuación).

$$A = A_{inf} (1 - e^{-kt}) + A_0 \quad (4.3)$$

donde  $A_0$  es la absorbancia inicial,  $A_{inf}$  es el cambio de la absorbancia a tiempo infinito y  $k = k_{obs}$  es la constante de velocidad observada.

Todas las reacciones para ambos sustratos (BNPP y PNPDP) se hicieron a 37° C, excepto las indicadas para la dependencia de la temperatura. Durante el transcurso de la reacción, todas las celdas fueron selladas con tapones de polietileno para evitar cambios en el volumen y la concentración por evaporación del disolvente.

Las muestras se prepararon directamente en la celda mezclando las cantidades apropiadas de disolvente orgánico, agua, disoluciones patrón de base y de sales metálicas; adicionando el sustrato al final. El volumen final de cada disolución fue de 2500 $\mu$ L.

## 5. RESULTADOS

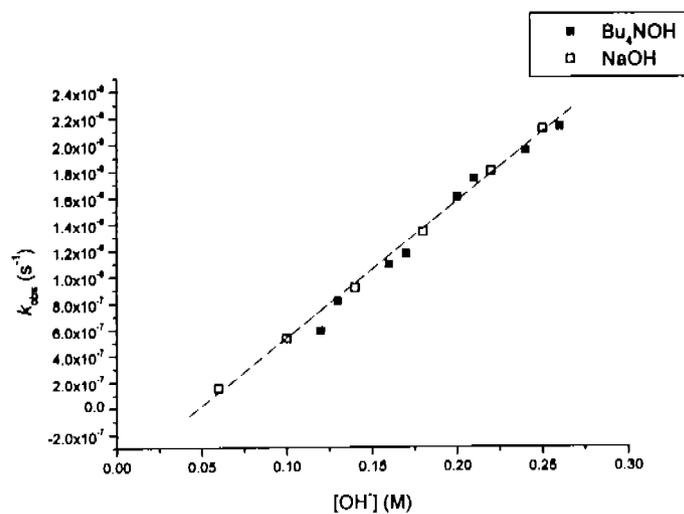
### 5.1. Hidrólisis básica acuosa de BNPP

Las corridas cinéticas para estudiar la hidrólisis alcalina de BNPP en medio acuoso se hicieron a 37° C en un intervalo de concentraciones entre 3 y 260 mM de Bu<sub>4</sub>NOH y de 60 a 250mM de NaOH. La finalidad de estos experimentos fue determinar bajo nuestras condiciones experimentales la constante de segundo orden para la hidrólisis básica de BNPP. Las constantes de velocidad observadas se calcularon por el método de velocidades iniciales, ajustando los datos experimentales a la ecuación 4.1; se consideró que al término de la reacción el sustrato está completamente hidrolizado y se pueden formar 2 equivalentes de 4-nitrofenolato.

Como se muestra en la figura 5.1 (ver también tabla 5.1), la dependencia de  $k_{obs}$  respecto a la concentración de base (Bu<sub>4</sub>NOH) es lineal, de donde sabemos que la hidrólisis es de primer orden respecto al nucleófilo. De esta dependencia lineal se obtuvo un valor de la constante de segundo orden  $k_{OH^-, agua} = (1.24 \pm 0.09) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a 37° C. El valor de esta constante concuerda razonablemente con el informado en la literatura <sup>(2)</sup> que es de  $k_{OH^-, agua} = 2.4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a 35° C y fuerza iónica 0.2 M. Se esperaría que los valores fueran un poco más cercanos a pesar de la diferencia en la fuerza iónica, pero posiblemente el valor encontrado en la literatura contempla solamente la formación de un equivalente de 4-nitrofenolato para calcular las constantes de velocidad observadas.

**Tabla 5.1.** Hidrólisis en agua de BNPP en presencia de Bu<sub>4</sub>NOH y NaOH.

[OH <sup>-</sup> ] (M)	k <sub>obs</sub> (Bu <sub>4</sub> NOH) (s <sup>-1</sup> )	k <sub>obs</sub> (NaOH) (s <sup>-1</sup> )
0.06		1.52×10 <sup>-7</sup>
0.1		5.3×10 <sup>-7</sup>
0.12	5.9×10 <sup>-7</sup>	
0.13	8.1×10 <sup>-7</sup>	
0.14		9.12×10 <sup>-7</sup>
0.16	1.09×10 <sup>-7</sup>	
0.17	1.17×10 <sup>-6</sup>	
0.18		1.34×10 <sup>-6</sup>
0.2	1.6×10 <sup>-6</sup>	
0.21	1.74×10 <sup>-6</sup>	
0.22		1.79×10 <sup>-6</sup>
0.24	1.95×10 <sup>-6</sup>	
0.25		2.11×10 <sup>-6</sup>
0.26	2.13×10 <sup>-6</sup>	



**Figura 5.1.** Hidrólisis de BNPP en agua con dos diferentes bases (■) Bu<sub>4</sub>NOH, (□) NaOH, a 37°C. Datos de la tabla 5.1 en forma gráfica. ( $k_{OH^-, agua} = (1.0 \pm 0.09) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $R = 0.99401$ )

**Tabla 5.2.** Hidrólisis básica en agua de BNPP en presencia de Bu<sub>4</sub>NOH a concentración variable

Bu <sub>4</sub> NOH (M)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{OH, agua}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
0.03	$3.733 \times 10^{-7}$	$1.244 \times 10^{-5}$
0.05	$7.111 \times 10^{-7}$	$1.422 \times 10^{-5}$
0.07	$1.123 \times 10^{-6}$	$1.604 \times 10^{-5}$
0.1	$1.576 \times 10^{-6}$	$1.576 \times 10^{-5}$
0.12	$1.777 \times 10^{-6}$	$1.481 \times 10^{-5}$
0.15	$2.286 \times 10^{-6}$	$1.524 \times 10^{-5}$
0.17	$2.967 \times 10^{-6}$	$1.745 \times 10^{-5}$
0.2	$2.998 \times 10^{-6}$	$1.499 \times 10^{-5}$

La energía de activación, está definida de manera general por la ecuación 5.1 <sup>(40)</sup>, de acuerdo a la teoría del estado de transición, es la mínima energía que se requiere para que los reactivos puedan pasar la barrera energética de la reacción para ir a productos, por lo tanto nos permitirá comparar si un proceso se lleva a cabo más fácilmente en un disolvente que en otro. En nuestro caso, puede obtenerse experimentalmente a partir de la variación de la constante de hidrólisis alcalina en función de la temperatura, graficando estas variables en las coordenadas de Arrhenius ( $\log k$  en función de  $1/T$ ), ecuación 5.2. El valor medido de la energía de activación para la hidrólisis alcalina en agua del sustrato BNPP es de 84 kJ/mol (figura 5.2).

$$E_a = RT^2 \frac{d \ln k}{dT} \quad (5.1)$$

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + C \quad (5.2)$$

Tabla 5.3 Cálculo de energía de activación en agua de la hidrólisis básica de BNPP

T °C	$k_{OH^-}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	1/T (K)	$\ln k_{OH^-}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
25	$5.804 \times 10^{-6}$	0.00335	-12.057
37.4	$1.622 \times 10^{-5}$	0.00322	-11.029
50.5	$7.988 \times 10^{-5}$	0.00309	-9.435

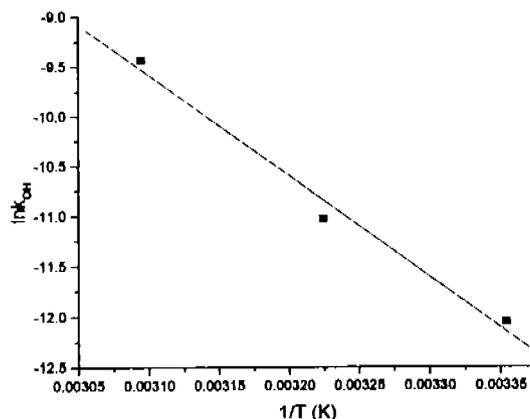
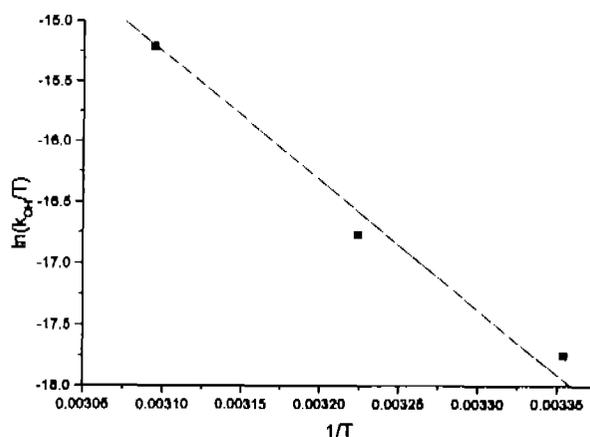


Figura 5.2. Determinación de la  $E_a$  para la hidrólisis básica BNPP en agua ( $E_a = 84 \pm 0.08$ ,  $R = -0.99228$ )

De manera similar, de la ecuación 5.3 <sup>(40)</sup> es posible calcular el valor de la entalpía de activación  $\Delta H^\ddagger$  de la reacción a partir de una gráfica en coordenadas de  $k_{OH^-}/T$  en función de  $1/T$  (o mediante la relación  $\Delta H^\ddagger = E_a - 2RT$ ):

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + C \quad (5.3)$$

El valor de  $\Delta H^\ddagger$  obtenido de 81.5 KJ/mol figura 5.3, es un poco mayor que el informado en la literatura, 74.09 KJ/mol en 20% de etanol. <sup>(3)</sup> Estos valores están en el intervalo de los valores esperados para la hidrólisis alcalina de fosfodiésteres con buenos grupos salientes; por ejemplo, el  $\Delta H^\ddagger$  para la hidrólisis alcalina de bis(2,4-dinitrofenil) fosfato, un sustrato más activado que BNPP, es de 69.4 KJ/mol. <sup>(41)</sup>



**Figura 5.3.** Determinación del  $\Delta H^\ddagger$  para la hidrólisis básica BNPP en agua ( $\Delta H = -81.5 \pm 0.08$ ,  $R = -0.99184$ )

## 5.2. Efecto de los cationes $\text{Li}^+$ , $\text{Na}^+$ y $\text{Bu}_4\text{N}^+$ en la hidrólisis básica acuosa de BNPP

Se estudió el efecto de los cationes alcalinos sodio y litio en la hidrólisis de BNPP en disolución acuosa a una concentración de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  de 0.05M y variando la concentración de los cloruros de litio y de sodio en un intervalo entre 0 a 0.18M, que nos permite tener reacciones de velocidad adecuada para ser medida, es decir, no demasiado lentas. Se estudió también, a las mismas condiciones, el efecto de cloruro de tetrabutilamonio, para poder hacer una comparación con un catión no metálico. Los resultados obtenidos (ver las tablas 5.4, 5.5 y 5.6) se pueden generalizar para otras concentraciones de base ya que el orden de reacción con respecto al nucleófilo  $\text{OH}^-$  es 1.

**Tabla 5.4.** Hidrólisis básica de BNPP en agua en presencia de LiCl,  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  50 mM, 37°C.

[LiCl] (M)	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{OH, LiCl}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
0	$6.01 \times 10^{-7}$	$1.202 \times 10^{-5}$
0.05	$7.135 \times 10^{-7}$	$1.427 \times 10^{-5}$
0.07	$7.602 \times 10^{-7}$	$1.520 \times 10^{-5}$
0.1	$9.003 \times 10^{-7}$	$1.801 \times 10^{-5}$
0.12	$8.999 \times 10^{-7}$	$1.799 \times 10^{-5}$
0.14	$9.654 \times 10^{-7}$	$1.931 \times 10^{-5}$
0.15	$9.653 \times 10^{-7}$	$1.9306 \times 10^{-5}$



**Tabla 5.5.** Hidrólisis básica de BNPP en agua en presencia de NaCl, Bu<sub>4</sub>NOH 50 mM, 37°C.

[NaCl] (M)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{OH, Na}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
0	$5.553 \times 10^{-7}$	$1.111 \times 10^{-5}$
0.05	$6.055 \times 10^{-7}$	$1.211 \times 10^{-5}$
0.07	$7.288 \times 10^{-7}$	$1.458 \times 10^{-5}$
0.10	$6.969 \times 10^{-7}$	$1.394 \times 10^{-5}$
0.12	$7.168 \times 10^{-7}$	$1.434 \times 10^{-5}$
0.14	$7.950 \times 10^{-7}$	$1.590 \times 10^{-5}$
0.15	$7.513 \times 10^{-7}$	$1.503 \times 10^{-5}$

**Tabla 5.6.** Hidrólisis básica de BNPP en agua en presencia de Bu<sub>4</sub>NCl, Bu<sub>4</sub>NOH 50 mM, 37°C.

[Bu <sub>4</sub> NCl] (M)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{OH, Bu_4N^+}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
0	$4.355 \times 10^{-7}$	$8.71 \times 10^{-6}$
0.05	$4.943 \times 10^{-7}$	$9.886 \times 10^{-6}$
0.07	$4.739 \times 10^{-7}$	$9.478 \times 10^{-6}$
0.1	$5.951 \times 10^{-7}$	$1.190 \times 10^{-5}$
0.12	$5.457 \times 10^{-7}$	$1.091 \times 10^{-5}$
0.14	$4.926 \times 10^{-7}$	$9.852 \times 10^{-6}$
0.15	$5.255 \times 10^{-7}$	$1.051 \times 10^{-5}$
0.17	$5.957 \times 10^{-7}$	$1.191 \times 10^{-5}$

La dependencia de la constante de velocidad observada en función de la fuerza iónica se puede analizar empleando la teoría del estado de transición y considerando cómo se ven modificados los coeficientes de actividad, tanto de los reactivos como del complejo activado en el estado de transición, al cambiar la fuerza iónica de la disolución.

Por su parte, el cambio en el coeficiente de actividad para una especie iónica puede ser analizado de dos formas generales: considerando interacciones entre los iones como cargas esféricas uniformes en un medio continuo con cierta constante dieléctrica (teoría de Debye-Hückel) o considerando además interacciones específicas entre los iones (como las ecuaciones de Pitzer<sup>(42)</sup> o las de Baes y Mesmer.<sup>(43)</sup> En nuestro caso se hizo un análisis desde el punto de vista de la teoría de Debye-Hückel porque un análisis más detallado en el que se consideraran interacciones específicas requiere de parámetros que no están

disponibles. Además las interacciones específicas contribuyen notablemente solamente a fuerzas iónicas altas, del orden de 1 M.

Así, se empleó la ecuación extendida de Debye-Hückel (ecuación 5.4) <sup>(44)</sup> ya que nos permite introducir los parámetros correspondientes a la temperatura de trabajo (37°C) y tomar en cuenta el cambio de la constante dieléctrica del disolvente ( $\epsilon$ ) en experimentos realizados en mezclas de disolventes que se presentan más adelante ( $A=1.82 \times 10^6 * (\epsilon T)^{-3/2}$  y  $B=50.3 * (\epsilon T)^{-1/2}$ );  $a$  es el parámetro del tamaño del ion en Å,  $\gamma_i$  es el coeficiente de actividad de la especie  $i$  y  $Z_i$  es la carga de esta especie.

$$\log \gamma_i = -\frac{AZ_i^2 (\epsilon T)^{3/2}}{1 + Ba_i (\epsilon T)^{1/2}} \quad (5.4)$$

Empleando la teoría del estado de transición, se puede escribir la reacción de hidrólisis alcalina para BNPP como:



de donde podemos observar que la reacción de hidrólisis alcalina para BNPP incluye la interacción entre dos aniones, cada uno con carga  $-1$  y que el complejo activado en el estado de transición es dianiónico.

Por otro lado tenemos que la constante de segundo orden a cualquier fuerza iónica está relacionada con la constante a fuerza iónica cero  $k_{\text{OH}^-}^0$  por la ecuación 5.5

$$k_{\text{OH}^-} = k_{\text{OH}^-}^0 \frac{\gamma_{\text{BNPP}^-} \gamma_{\text{OH}^-}}{\gamma_{(\text{BNPP-OH}^{2-})^\ddagger}} \quad (5.5)$$

A partir de las ecuaciones 5.4 y 5.6 se puede llegar a la siguiente expresión que nos permite relacionar la constante de hidrólisis alcalina y la fuerza iónica de la disolución, ecuación (5.7).

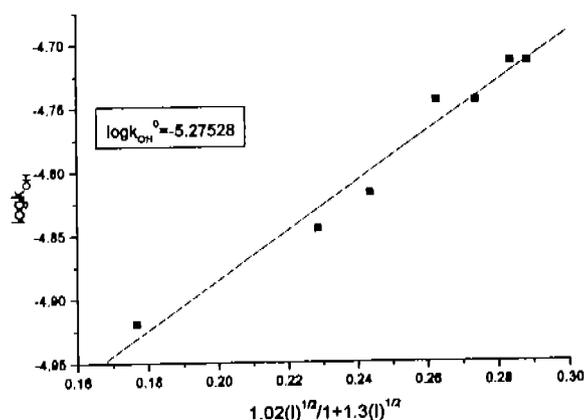
$$\log k_{\text{OH}^-} = \log k_{\text{OH}^-}^0 + \log \gamma_{\text{BNPP}^-} + \log \gamma_{\text{OH}^-} - \log \gamma_{(\text{BNPP-OH}^{2-})^\ddagger} \quad (5.6)$$

$$\log k_{OH^-} = \log k_{OH^-}^0 + \frac{1.02(I)^{1/2}}{1+1.3(I)^{1/2}} (Z_{BNPP} - Z_{OH^-}) \quad (5.7)$$

En estas coordenadas,  $\log k_{OH^-}$  en función de  $\sqrt{I}/(1+1.3\sqrt{I})$ , el valor de la pendiente para un efecto salino normal debe dar un valor de 1.02. En la figura 5.4 se presenta la dependencia de la fuerza iónica para el catión  $Li^+$  en estas coordenadas, y en la tabla 5.7 se muestran los resultados obtenidos para los tres cationes  $Li^+$ ,  $Na^+$  y  $Bu_4N^+$ . En los tres casos, como se espera, la dependencia es lineal con pendiente positiva con valores cercanos a 1.02, dentro de los límites del error, para los iones  $Na^+$  y  $Bu_4N^+$  (ver tabla 5.7). Sin embargo, en el caso del  $Li^+$  se obtuvo una pendiente de  $1.9 \pm 0.2$ , esto es un efecto mayor al efecto salino normal esperado, lo cual nos indica que  $Li^+$  tiene cierta actividad catalítica en la reacción de hidrólisis de BNPP en disolución acuosa.

**Tabla 5.7.** Dependencia de la velocidad de hidrólisis básica de BNPP a 0.05M de  $Bu_4NOH$  y a concentración variable de sales.

$M^+$	Pendiente	$k_{OH^-}^0$
$Li^+$	$1.9 \pm 0.2$	$5.3 \times 10^{-6}$
$Na^+$	$1.3 \pm 0.2$	$6.5 \times 10^{-6}$
$Bu_4N^+$	$0.9 \pm 0.3$	$6.1 \times 10^{-6}$



**Figura 5.4.** Efecto de  $LiCl$  en la hidrólisis básica de BNPP,  $37^\circ C$ . Correlación en coordenadas de la ecuación (5.7).  $k_{OH^-}^0 = (5.3 \times 10^{-6} \pm 0.03) M^{-1} s^{-1}$ ,  $R = 0.98454$ .

Debido a que la ecuación extendida de Debye-Hückel normalmente se usa para ir hasta valores de fuerza iónica 0.1 M y en nuestro caso se emplearon fuerzas iónicas hasta 0.25 M, se probó hacer un análisis similar empleando la ecuación de Davies (ecuación 5.8) <sup>(45)</sup> que es una modificación empírica que permite ir hasta fuerza iónica 0.5 M en disolución acuosa. Sin embargo esta ecuación no se considera del todo adecuada para nuestro caso porque considera los parámetros  $B \cdot a$  de la ecuación 5.3 igual a 1, que implica una temperatura de 25°C, mientras que este estudio se hizo a 37°C.

$$\log \gamma_i = -0.51z_i^2(I^{0.5}/(1+I^{0.5}) - 0.2I) \quad (5.8)$$

Empleando la ecuación 5.8 la teoría del estado de transición, se obtuvo la ecuación 5.9:

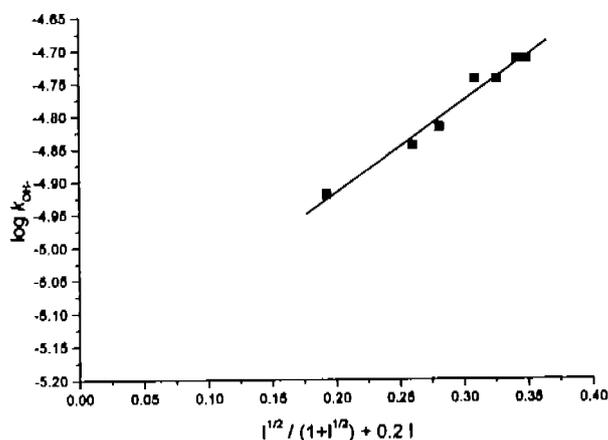
$$\log k_{OH} = \log k_{OH}^0 + 1.02(I^{0.5}/(1+I^{0.5}) - 0.2I) \quad (5.9)$$

Los resultados obtenidos al emplear la ecuación 5.9 para analizar la dependencia de la fuerza iónica en presencia del catión  $\text{Li}^+$  en las coordenadas  $\log k_{OH}$  en función de  $\sqrt{I}/(1+\sqrt{I}) - 0.2I$  se presentan en la figura 5.5, y en la tabla 5.8 se muestran los resultados obtenidos para los tres cationes  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Bu}_4\text{N}^+$ .

**Tabla 5.8.** Dependencia de la velocidad de hidrólisis básica de BNPP calculada a partir de la ecuación 5.9 a una concentración fija de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  de 0.05M.

$\text{M}^+$	Pendiente	$k_{OH}^0$
$\text{Li}^+$	$1.4 \pm 0.1$	$6.3 \times 10^{-6}$
$\text{Na}^+$	$0.9 \pm 0.2$	$7.4 \times 10^{-6}$
$\text{Bu}_4\text{N}^+$	$0.7 \pm 0.3$	$6.6 \times 10^{-6}$

Los resultados son similares al análisis con el modelo anterior: las correlaciones obtenidas son lineales con pendientes positivas cercanas al valor teórico de 1 para  $\text{Na}^+$  y  $\text{Bu}_4\text{N}^+$  ( $0.9 \pm 0.2$  y  $0.7 \pm 0.3$  respectivamente) y se observa una pendiente mayor para  $\text{Li}^+$  ( $1.4 \pm 0.1$ ). De aquí podemos concluir que dentro de los límites del error, observamos un efecto salino normal para la hidrólisis alcalina de BNPP en disolución acuosa en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Bu}_4\text{N}^+$  y para  $\text{Li}^+$  un efecto catalítico además del efecto salino.



**Figura 5.5.** Efecto de LiCl en la hidrólisis básica de BNPP, 37°C. Correlación en coordenadas de la ecuación (5.9).

### 5.3. Efecto de mezclas acuosas de disolventes orgánicos apróticos en la hidrólisis de BNPP

Como se expuso en los antecedentes, el cambio del medio de reacción puede afectar la velocidad y hasta el mecanismo de una reacción. En general, al cambiar de un medio acuoso a uno donde hay presencia de disolvente orgánico, esperamos que las interacciones iónicas se incrementen y produzcan mayor repulsión entre las especies reactivas, lo que en consecuencia disminuye la velocidad de reacción. Sin embargo puede observarse el efecto contrario: un disolvente dipolar aprótico puede incrementar la constante de velocidad de segundo orden para una reacción entre dos especies aniónicas, con respecto a su velocidad en agua, debido a una pérdida de enlaces de hidrógeno de los reactivos con las moléculas de disolvente lo que ocasiona una disminución de la energía de activación total.

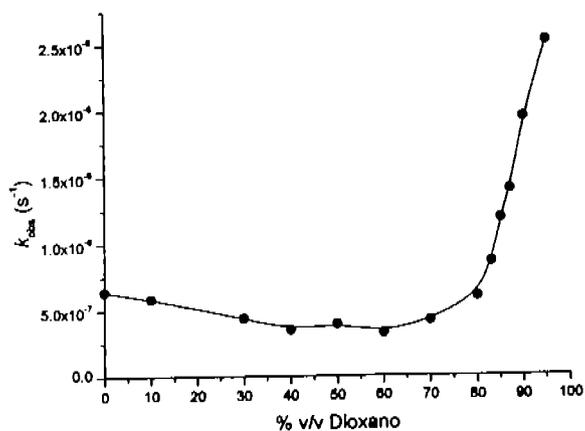
#### 5.3.1. Mezclas acuosas de dioxano

Para la hidrólisis básica de BNPP en mezclas agua-dioxano se utilizó  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  como base que es soluble tanto en dioxano como en agua y por lo tanto permanece soluble a cualquier porcentaje de la mezcla. Al incrementar el porcentaje de dioxano en la mezcla, se observa inicialmente una disminución en la constante de velocidad observada, ver figura 5.6 y tabla

5.9. Sin embargo, para porcentajes por encima de 80% v/v la velocidad de reacción aumenta bruscamente respecto al valor obtenido en agua.

**Tabla 5.9.** Hidrólisis básica de BNPP a diferentes porcentajes v/v de dioxano, utilizando una concentración fija de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  de 50mM.

% v/v dioxano	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$
0	$6.410 \times 10^{-7}$
10	$5.851 \times 10^{-7}$
30	$4.384 \times 10^{-7}$
40	$3.529 \times 10^{-7}$
50	$3.946 \times 10^{-7}$
60	$3.256 \times 10^{-7}$
70	$4.198 \times 10^{-7}$
80	$6.004 \times 10^{-7}$
83	$8.610 \times 10^{-7}$
85	$1.188 \times 10^{-6}$
87	$1.402 \times 10^{-6}$
90	$1.445 \times 10^{-6}$
95	$2.523 \times 10^{-6}$



**Figura 5.6.** Hidrólisis básica de BNPP a diferentes porcentajes de dioxano, con  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  50 mM como base, 37° C.

El análisis cuantitativo del efecto del disolvente en términos de energías de transferencia de los reactivos y el estado de transición a las mezclas acuosas de dioxano en términos de la ecuación (2.1) es esencialmente imposible ya que valores de  $\Delta G_{tr}^0(\text{OH}^-)$  son conocidos únicamente para mezclas con el contenido de disolvente orgánico menor que 80% v/v y los valores correspondientes a BNPP son desconocidos.

Cualitativamente se esperaría que al adicionar un disolvente con menor constante dieléctrica ( $\epsilon_{\text{dioxano}} = 2.25$ )<sup>(46)</sup> la reacción entre dos iones del mismo signo, en nuestro caso dos aniones, fuera más lenta debido a que la interacción entre las cargas es mayor en un medio con menor constante dieléctrica. El cambio en la constante de velocidad al pasar de un medio de referencia ( $k_0$ ) a otro con constante dieléctrica diferente, puede expresarse cuantitativamente por medio de la ecuación 5.10, derivada de un tratamiento clásico que considera la interacción coulombica entre dos esferas con cargas  $Z_A$  y  $Z_B$  que se aproximan a una distancia  $r_{AB}$  en el estado de transición en un medio con cierta constante dieléctrica.<sup>(47)</sup>

$$\ln k = \ln k_0 - \left( \frac{Z_A Z_B e^2}{4\pi \epsilon_0 \epsilon r_{AB} k_B T} \right) \quad (5.10)$$

en donde  $k_0$  es la constante de velocidad de la reacción en el medio de referencia,  $Z_A$  y  $Z_B$  son las cargas de las especies iónicas reactivas,  $e$  es la carga eléctrica del electrón,  $\epsilon_0$  es la constante dieléctrica del vacío,  $\epsilon$  es la constante dieléctrica relativa para el disolvente,  $r_{AB}$  es la distancia entre los iones A y B en el estado de transición,  $k_B$  es la constante de Boltzman y  $T$  es la temperatura absoluta.

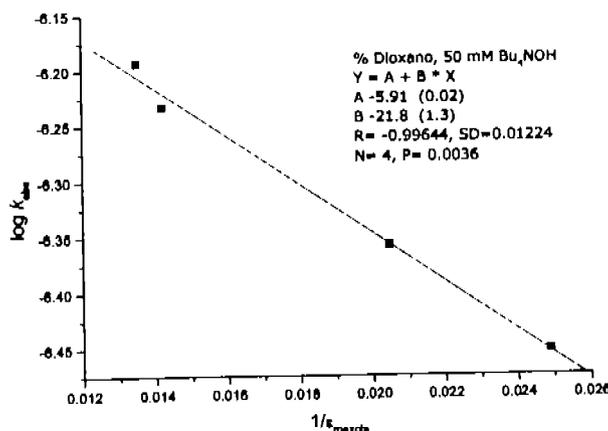
Al utilizar esta expresión para la reacción:  $\text{OH}^- + \text{BNPP}^- \xrightarrow{k} (\text{OH-BNPP}^{2-})^\ddagger$  a 37°C, haciendo la diferencia entre  $\log k$  para agua y para una mezcla acuosa de disolvente orgánico, y considerando que la distancia más próxima entre el nucleófilo  $\text{OH}^-$  y el diéster fosfato en el estado de transición es aproximadamente la suma de los radios de van der Waals para el oxígeno y para el fósforo<sup>(48)</sup>, obtenemos la ecuación 5.11:

$$\log k_{\text{obs}} = \log k_{\text{H}_2\text{O}} + 69.8 \left( \frac{1}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{\epsilon_{\text{mezcla}}} \right) \quad (5.11)$$

o bien:

$$\log k_{\text{obs}} = (0.892 + \log k_{\text{H}_2\text{O}}) - 69.8 \left( \frac{1}{\epsilon_{\text{mezcla}}} \right) \quad (5.12)$$

De esta ecuación podemos esperar una dependencia lineal del logaritmo de la constante de velocidad observada en función del inverso de la constante dieléctrica de la mezcla, y que al adicionar un disolvente de menor polaridad, la reacción de hidrólisis sea más lenta. Como podemos ver en la figura 5.7, esta tendencia lineal se observa al ir incrementando el porcentaje de dioxano en agua a bajos porcentajes de disolvente. La ecuación de la recta encontrada es  $\log k_{\text{obs}} = (-5.91 \pm 0.02) - (22 \pm 1) \times (1/\epsilon)$ , con un coeficiente de correlación de 0.9964. La pendiente obtenida es menor que la teórica, 21.8 en lugar de 69.8, sin embargo es posible que se deba a un error en la estimación de la distancia  $r_{AB}$ .

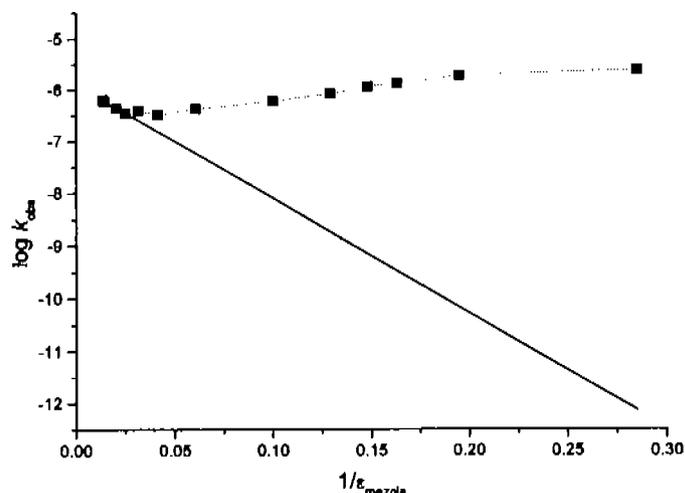


**Figura 5.7.** Efecto del disolvente observado en mezclas con baja cantidad de dioxano a 37°C, Bu<sub>4</sub>NOH 50 mM, en coordenadas de la ecuación 5.11.

Sin embargo, al incrementarse el porcentaje del disolvente dioxano por encima de 40%, hay una desviación del comportamiento esperado. En la figura 5.8, se presenta la recta obtenida a bajos porcentajes de disolvente comparada con los datos experimentales obtenidos para todo el intervalo. De aquí es claro que el efecto de aceleración observado a porcentajes de dioxano mayores que 80% involucra otros factores. Como veremos en la sección 5.5,



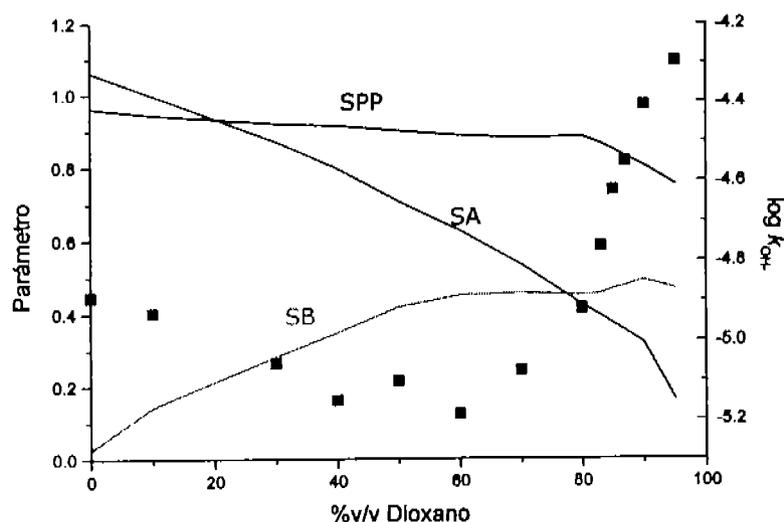
incluso esta parte de los resultados muestra un ajuste satisfactorio a la ecuación (5.1) por azar ya que se observa el mismo comportamiento con un sustrato neutro.



**Figura 5.8.** Efecto electrostático teórico a diferentes porcentajes de dioxano (línea continua) comparado con los datos experimentales obtenidos a 37°C, Bu<sub>4</sub>NOH 50 mM.

Debido a que resulta inadecuado considerar al disolvente simplemente como un medio de cierta constante dieléctrica para explicar la reactividad observada, es necesario un enfoque más químico en donde se consideren las propiedades químicas del disolvente y el efecto pueda ser disecado en contribuciones específicas. Esto puede hacerse con el uso de parámetros empíricos del disolvente obtenidos de mediciones del cambio en alguna propiedad física de compuestos modelo (generalmente propiedades espectroscópicas) al pasar de un disolvente a otro o a mezclas de disolventes. Entre estos parámetros encontramos la basicidad, la acidez, la polaridad y la polarizabilidad del disolvente, para los cuales existen varias escalas propuestas. Catalán y colaboradores determinaron los parámetros de acidez (SA), basicidad (SB) y polaridad/polarizabilidad (SPP) del disolvente para mezclas acuosas de dioxano.<sup>(49)</sup> Vale la pena mencionar que fue demostrado que las escalas clásicas de polaridad (como  $\pi^*$ , S) de basicidad (DN,  $\beta$ ) y acidez (AN,  $\alpha$ ), así como escalas de parámetros únicos (Z Kosower,  $\chi_R$  Brooker, P<sub>y</sub> Dong y Winnick,  $\Phi$  Dubois y Bienvenue, G Allerhand y Schleyer, E<sub>T</sub>(30) Reichardt) intercorrelacionan y pueden ser expresadas como combinación lineal de estos parámetros.<sup>(28)</sup>

En la figura 5.9, se presentan los parámetros SA, SB y SPP en función del porcentaje de dioxano, comparados con las constantes de hidrólisis alcalina para BNPP,  $k_{OH^-}$   $M^{-1}s^{-1}$ , medidas para estos porcentajes de disolvente.



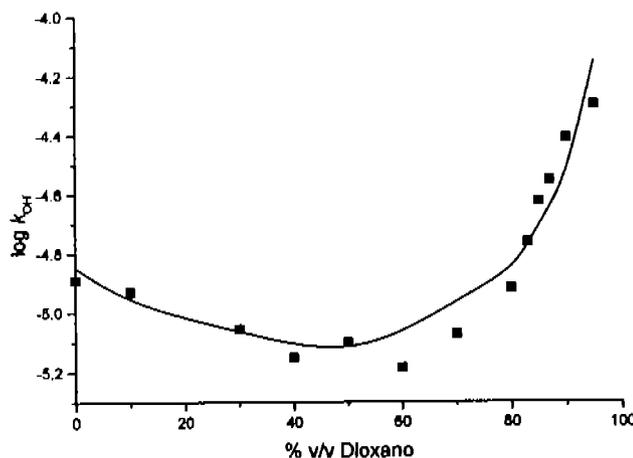
**Figura 5.9.** Parámetros SA, SB y SPP para mezclas acuosas de dioxano y  $\log k_{OH^-}$  para la hidrólisis de BNPP en función del porcentaje de disolvente, 37°C, Bu<sub>4</sub>NOH 50 mM.

Como se puede observar de este perfil, la tendencia de las constantes de velocidad no correlaciona directamente con ninguno de los parámetros, sin embargo, como estos tienen tendencias diferentes, es posible que una combinación lineal de SA, SB y SPP pueda describir el comportamiento observado para las constantes de segundo orden. Inicialmente se hicieron correlaciones empleando solamente dos parámetros (SA y SB, SA y SPP, SB y SPP) pero no se obtuvo ninguna correlación satisfactoria con los datos experimentales. Finalmente, se encontró que es necesaria una combinación lineal de los tres parámetros, ecuación 5.13.

$$\log k_{OH^-} = \log k_0 + (a)(SA) + (b)(SB) + (p)(SPP) \quad (5.13)$$

La regresión multiparamétrica nos da la ecuación 5.13. En la figura 5.10 se muestra el perfil teórico calculado con esta ecuación (línea continua) comparado con los valores de los  $\log k_{OH^-}$  para diferentes porcentajes de dioxano.

$$\log k_{\text{OH}^-} = - (0.1 \pm 1) - (0.9 \pm 0.4)\text{SA} - (2.1 \pm 0.4)\text{SB} - (3.9 \pm 1.5)\text{SPP} \quad (5.14)$$



**Figura 5.10** Valores de  $\log k_{\text{OH}^-}$  experimentales (■) y calculados con la ecuación 5.13 (—) para la hidrólisis de BNPP a 37°C en mezclas agua-dioxano.

De la ecuación 5.14 podemos ver que los tres parámetros contribuyen a la velocidad de hidrólisis con coeficientes negativos. La contribución negativa del parámetro SA puede reflejar que el nucleófilo esté menos solvatado, es decir que el nucleófilo  $\text{OH}^-$  se desestabilice, vale la pena mencionar que el cambio relativo en este parámetro es mayor que para SB y SPP, por lo que podemos decir que es la contribución principal. El “sentido físico” del parámetro SPP no es tan claro y es difícil interpretar la contribución de este parámetro. La basicidad del medio (SB) refleja la capacidad de un disolvente para aceptar protones y para estabilizar especies ácidas en términos de Lewis. Sin embargo, no hay ninguna transferencia de protones, ni están involucrados ácidos de Lewis en la reacción de hidrólisis alcalina de BNPP al emplear  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  como base. El único centro ácido es el P(V) del BNPP, por lo que es posible que esté menos solvatado en el estado de transición pentacoordinado, lo cual favorecería la reacción en altos porcentajes de dioxano.

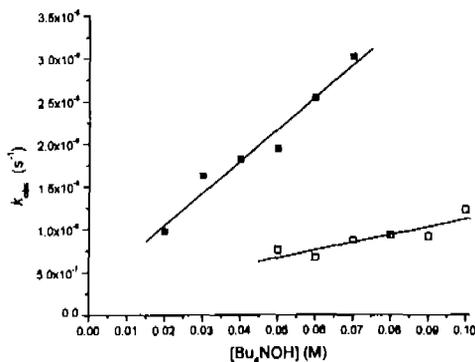
En los experimentos realizados en agua, se comprobó que el orden de reacción por la base es de 1. Este estudio se repitió a 80 y 90% v/v de dioxano, tabla 5.10 y figuras 5.11 y 5.12 respectivamente, empleando como base  $\text{Bu}_4\text{NOH}$ . Las constantes de velocidad observadas a 90% son mucho mayores respecto a las constantes en agua, que está de acuerdo con lo

observado al variar la cantidad de disolvente. En 80% de dioxano, las reacciones con 20-40 mM de base son demasiado lentas como para ser reproducibles.

**Tabla 5.10** Hidrólisis básica de BNPP a 80 y 90% v/v de dioxano.

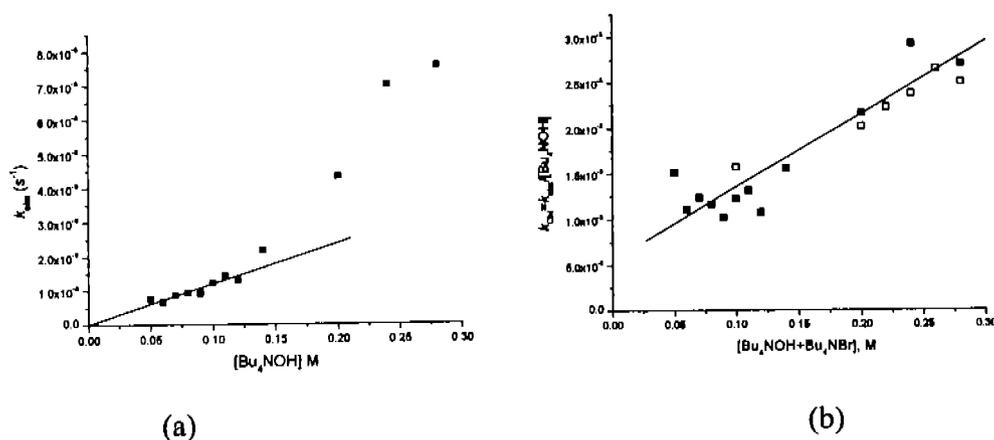
[Bu <sub>4</sub> NOH] (M)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> ) 80% Dioxano	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> ) 90% Dioxano
0.02	-	$9.724 \times 10^{-7}$
0.03	-	$1.621 \times 10^{-6}$
0.04	-	$1.816 \times 10^{-6}$
0.05	$7.562 \times 10^{-7}$	$1.945 \times 10^{-6}$
0.06	$6.646 \times 10^{-7}$	$2.537 \times 10^{-6}$
0.07	$8.649 \times 10^{-7}$	$3.013 \times 10^{-6}$
0.08	$9.312 \times 10^{-7}$	-
0.09	$9.157 \times 10^{-7}$	-
0.10	$1.223 \times 10^{-6}$	-
0.11	$1.444 \times 10^{-6}$	-
0.12	$1.289 \times 10^{-6}$	-
0.14	$2.182 \times 10^{-6}$	-
0.20	$4.330 \times 10^{-6}$	-
0.24	$7.01 \times 10^{-6}$	-
0.28	$7.57 \times 10^{-6}$	-

En ambos casos, la parte inicial es lineal, y de aquí es posible calcular las constantes de hidrólisis alcalina,  $k_{OH^-}$ , para cada caso:  $(9.0 \pm 2.0) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a 80% y  $(3.7 \pm 0.4) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a 90%. El valor obtenido en agua es de  $(1.62 \pm 0.09) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Por lo que todavía a 80% de dioxano esta constante es casi 2 veces menor que en agua, mientras que a 90% ya es 2.3 veces mayor que en agua, que es un cambio notable.



**Figura 5.11.** Hidrólisis básica de BNPP con Bu<sub>4</sub>NOH como base a 80 (□) y 90% (■) de dioxano, 37°C.

En 90% v/v de dioxano sólo se pudo trabajar en el intervalo de 0.02 a 0.06 M de base porque a mayores concentraciones se observa la aparición de precipitado, y en todo el intervalo la dependencia es lineal. En 80% de dioxano, el intervalo estudiado está desplazado, 0.05 a 0.3 M, y se observa que por encima de 0.12 M la dependencia ya no es lineal, figura 5.12.a. Este comportamiento contrasta con lo que se observa en agua, Figura 5.1, donde hay una dependencia lineal hasta 0.22 M hidróxido. La razón más probable de la desviación positiva en la figura 5.12a es que la variación en la concentración del  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  produce también una variación en la fuerza iónica y en el medio de 80% de dioxano de menor polaridad que agua el efecto salino puede ser más notable. Para comprobar esta interpretación fue estudiado el efecto salino en este medio empleando como electrolito la sal de  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , Tabla 5.11.



**Figura 5.12.** (a) Hidrólisis básica de BNPP con  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  como base, 0.05 a 0.3 M, en 80 % de dioxano, 37°C. (b) Dependencia de  $k_{\text{OH}}$  vs. concentración total del electrolito  $[\text{Bu}_4\text{NOH}] + [\text{Bu}_4\text{NBr}]$ , (■) –datos de Tabla 5.10 (□) – datos de Tabla 5.11

Como se ve de la Tabla 5.11 verdaderamente se observa un efecto salino notable: la velocidad de hidrólisis se incrementa en presencia de sal añadida y la dependencia de  $k_{\text{obs}}$  vs.  $[\text{Bu}_4\text{NBr}]$  es aproximadamente lineal. Para comprobar que este efecto es responsable por la desviación positiva en la figura 5.12(a) los resultados obtenidos tanto en presencia de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  solo como en presencia de  $\text{Bu}_4\text{NOH} + \text{Bu}_4\text{NBr}$  (tablas 5.10 y 5.11) se presentan en la figura 5.12(b) como la dependencia de la constante de segundo orden  $k_{\text{OH}}$  en función de la fuerza iónica total creada tanto por hidróxido como bromuro de tetrabutilamonio.

Aparentemente los puntos para ambas series están en la misma línea recta que por extrapolación a la fuerza iónica cero da un valor de  $k_{\text{OH}}^0 = (5.5 \pm 1.5) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

**Tabla 5.11** Efecto salino en la hidrólisis básica de BNPP a 80 % v/v de dioxano, Bu<sub>4</sub>NOH 0.1 M.

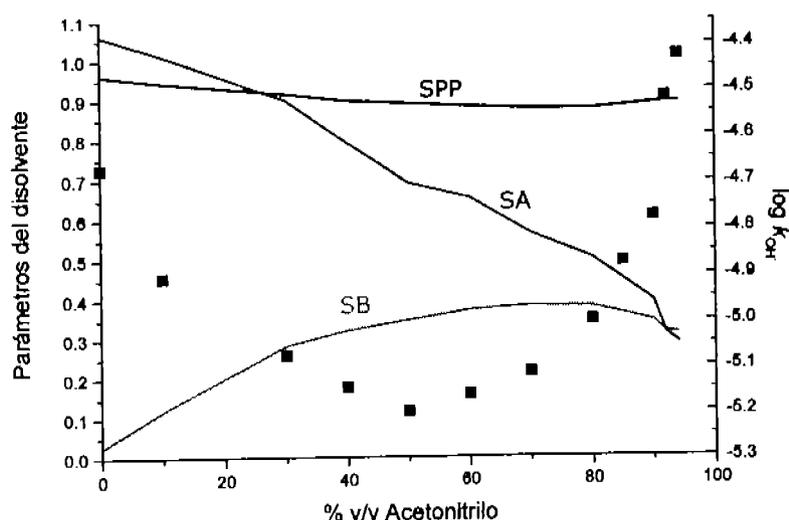
[Bu <sub>4</sub> NBr], M	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )
0	$1.57 \times 10^{-6}$
0.1	$2.02 \times 10^{-6}$
0.12	$2.23 \times 10^{-6}$
0.14	$2.38 \times 10^{-6}$
0.16	$2.65 \times 10^{-6}$
0.18	$2.50 \times 10^{-6}$

### 5.3.2. Mezclas acuosas de acetonitrilo

La hidrólisis básica de BNPP en mezclas agua-acetonitrilo se estudió en presencia de Bu<sub>4</sub>NOH 50 mM como base, ya que tiene solubilidad limitada por encima de 90% v/v de acetonitrilo. De manera similar a lo observado con dioxano, se observa una disminución inicial en la  $k_{obs}$ , y luego un incremento, pasando por un valor mínimo aproximadamente a 50% de acetonitrilo (ver tabla 5.12 y figura 5.13); esta tendencia es mucho más marcada en acetonitrilo que en dioxano. Sin embargo, a diferencia de lo observado con dioxano, los valores sólo son mayores que en el caso de agua cuando el porcentaje de acetonitrilo es mayor a 90% v/v y el efecto relativo es menor: a 94% de acetonitrilo, el mayor porcentaje medido, la  $k_{obs}$  es solamente 1.8 veces mayor que en agua. Este comportamiento fue informado por Bunton y colaboradores <sup>(34)</sup> para la hidrólisis de 4-nitrofenil difenilfosfato (PNPDPP), un triéster fosfato neutro. El decremento inicial en las constantes de velocidad se atribuye a un decremento en el coeficiente de actividad del sustrato hidrofóbico debido a la adición de disolvente orgánico.

**Tabla 5.12** Hidrólisis básica de BNPP a diferentes concentraciones de acetonitrilo,  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  50 mM,  $37^\circ\text{C}$ .

% $\text{CH}_3\text{CN}$	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$
0	$1.060 \times 10^{-6}$
10	$6.194 \times 10^{-7}$
30	$4.194 \times 10^{-7}$
40	$3.567 \times 10^{-7}$
50	$3.156 \times 10^{-7}$
60	$3.438 \times 10^{-7}$
70	$3.837 \times 10^{-7}$
80	$4.999 \times 10^{-7}$
85	$6.691 \times 10^{-7}$
90	$8.361 \times 10^{-7}$
92	$1.518 \times 10^{-6}$
94	$1.867 \times 10^{-6}$

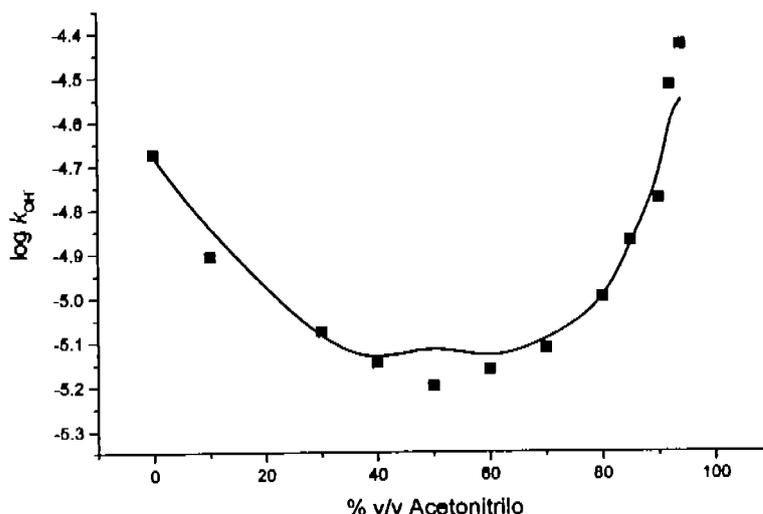


**Figura 5.13.** Hidrólisis de BNPP a diferentes porcentajes de acetonitrilo,  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  50 mM,  $37^\circ\text{C}$ . (Datos de la tabla 5.9 en forma gráfica).

Comparando las tendencias de los parámetros SA, SB y SPP de Catalán y colaboradores informados para mezclas agua-acetonitrilo<sup>(29)</sup> es claro que ninguno de éstos correlaciona con la tendencia observada para las constantes de hidrólisis básica, y tampoco se encontró una correlación satisfactoria con dos de estos parámetros en ninguna combinación. Haciendo una regresión multiparamétrica para  $k_{\text{OH}^-}$  con los valores de estos tres parámetros,

obtenemos la ecuación 5.15. En la figura 5.14 se muestra el perfil teórico calculado con esta ecuación (línea continua) comparado con los valores de los  $\log k_{OH^-}$  para diferentes porcentajes de acetonitrilo.

$$\log k_{OH^-} = -(11 \pm 4) - (1.2 \pm 0.2)SA - (1.0 \pm 0.9)SB + (8 \pm 4)SPP \quad (5.15)$$



**Figura 5.14.** Valores de  $\log k_{OH^-}$  experimentales (■) y calculados con la ecuación 5.14 (—) para la hidrólisis de BNPP en mezclas de acetonitrilo a 37°C.

De la ecuación 5.15 podemos ver que en acetonitrilo los parámetros SA y SB contribuyen a la velocidad de hidrólisis con coeficientes negativos de la misma magnitud, dentro de los límites del error, que en el caso de dioxano. De estos parámetros la mayor contribución relativa es la de SA, indicando que el efecto predominante es la desestabilización del nucleófilo. Sin embargo, mientras que el parámetro SPP que tiene una contribución negativa para dioxano ( $-3.9 \pm 1.5$ ), en acetonitrilo tiene una contribución positiva ( $8 \pm 4$ ). SPP es un parámetro que indica la polaridad/polarizabilidad de un disolvente, y su variación relativa es pequeña, por lo que resulta más difícil de interpretar.

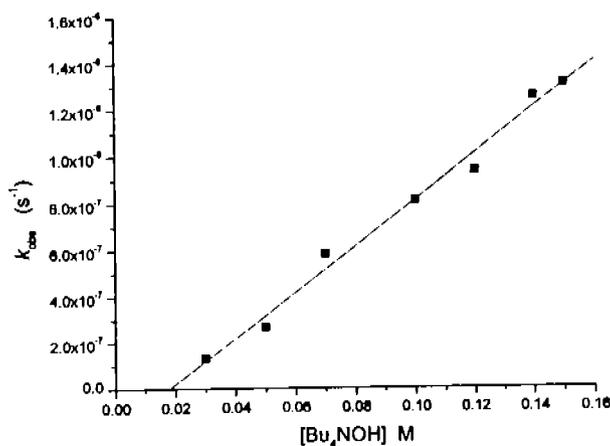
La dependencia de la concentración de la base, se hizo a 60% v/v de CH<sub>3</sub>CN empleando como base Bu<sub>4</sub>NOH en un intervalo de 0.03 a 0.15M (tabla 5.13 figura 5.15). La dependencia observada es lineal para la hidrólisis del BNPP y la constante de segundo



orden calculada,  $k_{OH^-}$ , es de  $(9.9 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  con un coeficiente de correlación de 0.994. El valor de la constante de hidrólisis alcalina es menor que el medido en agua ( $1.62 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) lo cual resulta lógico ya que se está trabajando en el mínimo encontrado para la dependencia del porcentaje del disolvente por razones de solubilidad (ver figura 5.9).

**Tabla 5.13** Hidrólisis básica de BNPP a 60% v/v de acetonitrilo, 37°C.

$[\text{Bu}_4\text{NOH}] \text{ M}$	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$
0.03	$1.313 \times 10^{-7}$
0.05	$2.677 \times 10^{-7}$
0.07	$5.834 \times 10^{-7}$
0.1	$9.373 \times 10^{-7}$
0.12	$1.254 \times 10^{-6}$
0.14	$1.254 \times 10^{-6}$
0.15	$1.310 \times 10^{-6}$



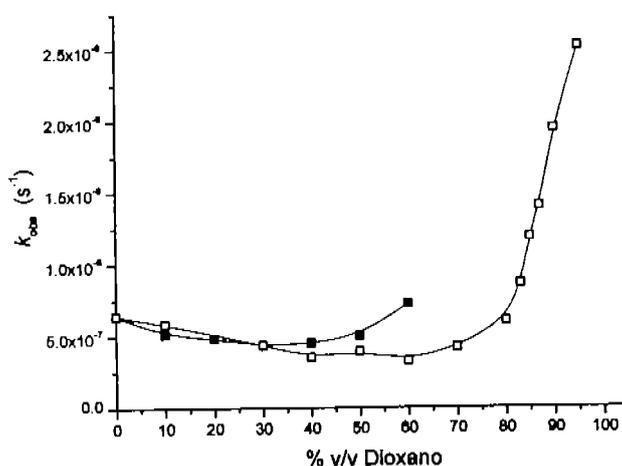
**Figura 5.15.** Hidrólisis de BNPP a 60% v/v de acetonitrilo, 37°C. (Datos de la tabla 5.13 en forma gráfica).  $k_{OH^-} = (9.9 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $R = 0.99412$ .

#### 5.4. Efecto del catión $\text{Na}^+$ en mezclas acuosas de dioxano y acetonitrilo

Inicialmente, se estudió la hidrólisis básica de BNPP empleando como base  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  al variar el porcentaje de dioxano, a  $37^\circ\text{C}$ . Este experimento se repitió empleando como base  $\text{NaOH}$  en el intervalo en que esta base resultó ser soluble, 0-60% v/v dioxano. Como precaución adicional, las reacciones se monitorearon a 400nm y a 580nm (a esta longitud no debe observarse ningún cambio en la absorbancia para esta reacción); si la absorbancia a 580nm mostraba una variación mayor que  $\Delta A=0.05$ , los resultados se desechaban por este cambio refleja posiblemente la aparición de precipitado. Los resultados obtenidos con ambas bases se presentan en la tabla 5.14 figura 5.16

**Tabla 5.14** Hidrólisis básica de BNPP a diferentes porcentajes de dioxano empleando como bases  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  y  $\text{NaOH}$ , a  $37^\circ\text{C}$ .

% Dioxano v/v	$k_{\text{obs}}$ (s <sup>-1</sup> ) NaOH 50 mM	$k_{\text{obs}}$ (s <sup>-1</sup> ) Bu <sub>4</sub> NOH 50 mM
0	$6.41 \times 10^{-7}$	$6.41 \times 10^{-7}$
10	$5.135 \times 10^{-7}$	$5.851 \times 10^{-7}$
20	$4.84 \times 10^{-7}$	
30	$4.337 \times 10^{-7}$	$4.384 \times 10^{-7}$
40	$4.531 \times 10^{-7}$	$3.529 \times 10^{-7}$
50	$5.023 \times 10^{-7}$	$3.946 \times 10^{-7}$
60	$7.22 \times 10^{-7}$	$3.256 \times 10^{-7}$
70		$4.198 \times 10^{-7}$
80		$6.004 \times 10^{-7}$
83		$8.61 \times 10^{-7}$
85		$1.188 \times 10^{-6}$
87		$1.402 \times 10^{-6}$
90		$1.945 \times 10^{-6}$
95		$2.523 \times 10^{-6}$



**Figura. 5.16** Hidrólisis básica de BNPP a diferentes porcentajes de dioxano con dos diferentes bases, (■) NaOH y (□) Bu<sub>4</sub>NOH, 37°C.

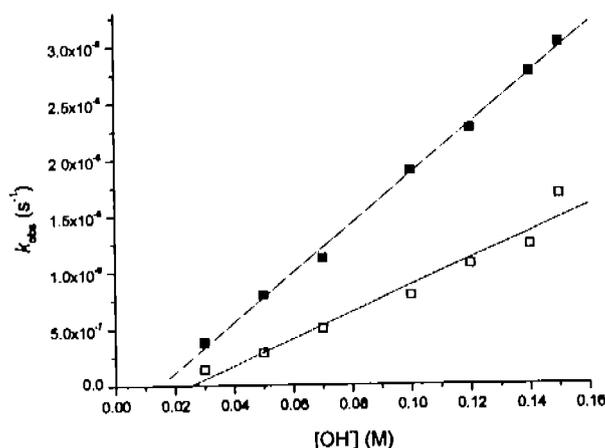
Pudimos observar que conforme se va adicionando dioxano, la rapidez de hidrólisis con NaOH es mayor que con Bu<sub>4</sub>NOH; a 60% v/v de dioxano la rapidez de hidrólisis es ya dos veces mayor para NaOH que para Bu<sub>4</sub>NOH, (ver tabla 5.14, renglón 7). Por esta razón, se decidió hacer un estudio comparativo de la hidrólisis básica de BNPP empleando como bases Bu<sub>4</sub>NOH y NaOH en un intervalo de concentración de 0.03 a 0.15 M, tabla 5.15 a un porcentaje fijo de dioxano de 60% v/v.

**Tabla 5.15** Hidrólisis básica de BNPP utilizando Bu<sub>4</sub>NOH y NaOH en diferentes concentraciones (0.03 a 0.15M) a 60% v/v de dioxano, 37°C.

[Base] (M)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> ) Bu <sub>4</sub> NOH	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> ) NaOH
0.03	$1.412 \times 10^{-7}$	$3.775 \times 10^{-7}$
0.05	$2.848 \times 10^{-7}$	$7.950 \times 10^{-7}$
0.07	$4.955 \times 10^{-7}$	$1.119 \times 10^{-6}$
0.1	$7.867 \times 10^{-7}$	$1.898 \times 10^{-6}$
0.12	$1.063 \times 10^{-6}$	$2.269 \times 10^{-6}$
0.14	$1.235 \times 10^{-6}$	$2.762 \times 10^{-6}$
0.15	$1.685 \times 10^{-6}$	$3.024 \times 10^{-6}$

En ambos casos, observamos que hay una dependencia lineal con respecto al incremento de la concentración de la base; de las pendientes de las rectas obtenidas se obtuvieron las

constantes de segundo orden,  $k_{\text{OH}^-}$ ,  $1.03 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  y  $2.21 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para  $\text{NaOH}$ , figura 5.17 La rapidez de la reacción es mayor con  $\text{NaOH}$  que con  $\text{Bu}_4\text{NOH}$ , lo que nos indica que el ion  $\text{Na}^+$  juega un papel importante en la hidrólisis del BNPP.



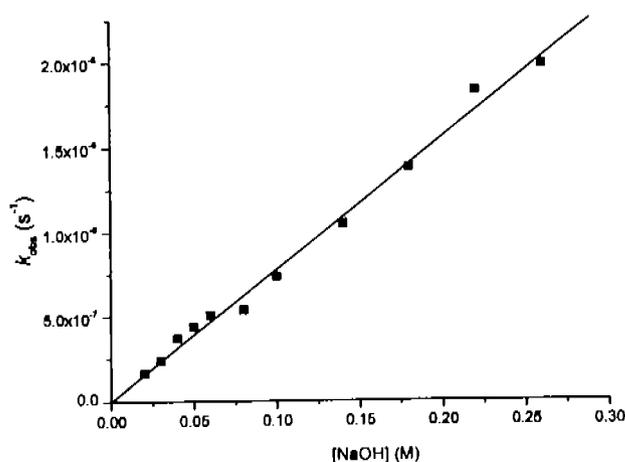
**Figura 5.17** Hidrólisis básica de BNPP en 60% v/v de dioxano, empleando como base (■)  $\text{NaOH}$  y (□)  $\text{Bu}_4\text{NOH}$ .  $k_{\text{OH}^-, \text{NaOH}} = (2.21 \times 10^{-5} \pm 0.02) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $R = 0.99866$ ;  $k_{\text{OH}^-, \text{Bu}_4\text{NOH}} = (1.03 \times 10^{-5} \pm 0.09) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $R = 0.97794$ .

En el caso de acetonitrilo, el  $\text{NaOH}$  es menos soluble a un porcentaje alto de disolvente mayor que 60% v/v, por lo que se decidió investigar la hidrólisis básica de BNPP a un porcentaje de 34% v/v de  $\text{CH}_3\text{CN}$  utilizando  $\text{NaOH}$  como base en un intervalo de 0.02 a 0.26 M (ver tabla 5.16). De manera similar a lo observado en dioxano, hay una dependencia lineal con respecto al aumento de la concentración del nucleófilo, lo que nos indica que la reacción sigue siendo de primer orden para  $\text{OH}^-$  y la pendiente de la recta nos permite calcular la constante de hidrólisis básica  $k_{\text{OH}^-, 34\% \text{CH}_3\text{CN}} = (7.8 \pm 0.3) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , figura 5.18. El valor de esta constante es casi dos veces menor que el obtenido en agua,  $k_{\text{OH}^-, \text{agua}} = (1.24 \pm 0.09) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $37^\circ \text{C}$ , debido a que el efecto del acetonitrilo sobre la rapidez de hidrólisis a bajos porcentajes de disolvente orgánico, es de disminución. Si comparamos las constantes de velocidad observada con ambas bases a la misma concentración (50 mM) y 34% de acetonitrilo, encontramos que son iguales dentro de los límites del error ( $k_{\text{obs}, \text{Bu}_4\text{NOH}} = 4.0 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  y  $k_{\text{obs}, \text{NaOH}} = 3.9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ). Esto resulta lógico

porque el porcentaje de acetonitrilo empleado es muy bajo, 34%, y se esperaría que ambas bases se comportaran igual, tal como sucede en disolución acuosa.

**Tabla 5.16.** Hidrólisis básica de BNPP a 34% v/v de acetonitrilo en presencia de NaOH como base, 37°C.

[NaOH] (M)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )
0.02	$1.63 \times 10^{-7}$
0.03	$2.36 \times 10^{-7}$
0.04	$3.68 \times 10^{-7}$
0.05	$4.37 \times 10^{-7}$
0.06	$5.08 \times 10^{-7}$
0.08	$5.37 \times 10^{-7}$
0.1	$7.37 \times 10^{-7}$
0.14	$1.05 \times 10^{-6}$
0.18	$1.38 \times 10^{-6}$
0.22	$1.83 \times 10^{-6}$
0.26	$1.98 \times 10^{-6}$



**Figura 5.18.** Hidrólisis básica de BNPP a 34% v/v de acetonitrilo con NaOH como base.

### 5.5. Efecto de cationes monovalentes en mezclas acuosas de disolvente orgánico.

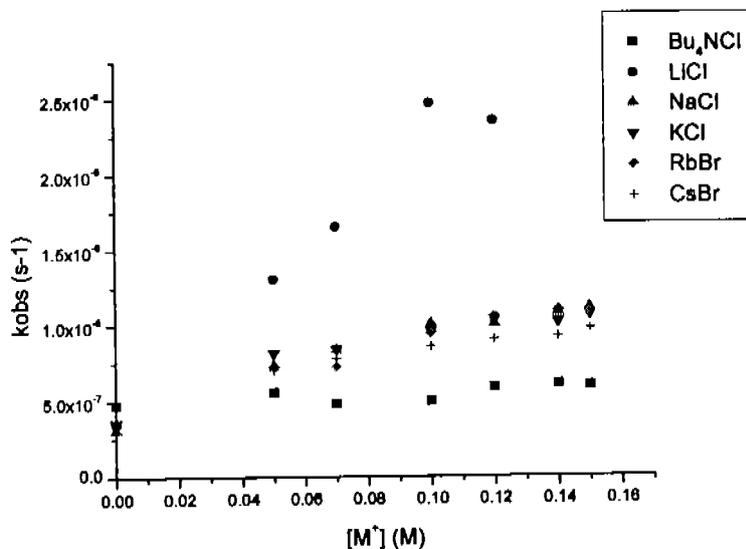
Se estudió la hidrólisis de BNPP en presencia de sales de la familia de los metales alcalinos (Li, Na, K, Rb y Cs) con Bu<sub>4</sub>NOH como base a una concentración fija de 0.05M, en mezclas acuosas con 60% v/v de dioxano y acetonitrilo. Con el fin de comparar el efecto de

una sal no metálica en estos medios en la hidrólisis de BNPP, se empleó  $\text{Bu}_4\text{NCl}$ , que frecuentemente se utiliza en mezclas acuosas de disolventes orgánicos para mantener la fuerza iónica fija. La concentración de las sales se varió en el intervalo de 0 a 0.17 M donde se obtiene una disolución homogénea; con el uso de las sales metálicas a concentraciones mayores se observa la aparición de un precipitado blanco, identificado como el hidróxido del metal. Como precaución adicional se monitoreó la formación de 4-nitrofenolato en el máximo (400nm) y a una longitud donde no absorben ninguno de los componentes de la reacción (580nm), ya que la aparición de precipitado causa un incremento en la absorbancia en todas las longitudes de onda del espectro por dispersión de la luz. Los resultados que mostraron valores de  $\Delta\text{Abs} > 0.05$  no se consideraron aceptables. En el caso de acetonitrilo se usaron celdas con tapones herméticos para evitar pérdidas del disolvente.

Los resultados del estudio cinético hecho en 60% v/v de dioxano se presentan en la tabla 5.17 y figura 5.19. La dependencia de la rapidez de hidrólisis es lineal en todos los casos, aunque para las reacciones más lentas se observa mayor dispersión en los datos. El orden de reactividad entre los sales estudiadas es:  $\text{Bu}_4\text{NCl} < \text{CsBr} \approx \text{RbBr} \approx \text{KCl} \approx \text{NaCl} \ll \text{LiCl}$ . La  $k_{\text{obs}}$  para  $\text{Li}^+$  es casi dos veces mayor que para  $\text{Bu}_4\text{NCl}$  y 1.5 veces mayor que con los otros iones metálicos.

**Tabla 5.17.** Hidrólisis básica de BNPP en presencia de iones de metales alcalinos, 60% v/v de dioxano,  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  50 mM, 37°C.

$[\text{M}^+]$ (M)	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{Bu}_4\text{NCl}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{LiCl}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{NaCl}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{KCl}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{RbBr}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{CsBr}$ )
0	$4.756 \times 10^{-7}$	$3.498 \times 10^{-7}$	$3.124 \times 10^{-7}$	$3.594 \times 10^{-7}$	$3.666 \times 10^{-7}$	$3.620 \times 10^{-7}$
0.05	$5.549 \times 10^{-7}$	$1.303 \times 10^{-6}$	$7.378 \times 10^{-7}$	$8.150 \times 10^{-7}$	$7.269 \times 10^{-7}$	$7.073 \times 10^{-7}$
0.07	$4.790 \times 10^{-7}$	$1.652 \times 10^{-6}$	$8.363 \times 10^{-7}$	$8.377 \times 10^{-7}$	$7.276 \times 10^{-7}$	$7.792 \times 10^{-7}$
0.10	$4.971 \times 10^{-7}$	$2.468 \times 10^{-6}$	$1.008 \times 10^{-6}$	$9.584 \times 10^{-7}$	$9.454 \times 10^{-7}$	$8.577 \times 10^{-7}$
0.12	$5.846 \times 10^{-7}$	$2.349 \times 10^{-6}$	$1.005 \times 10^{-6}$	$1.034 \times 10^{-6}$	$1.049 \times 10^{-6}$	$9.011 \times 10^{-7}$
0.14	$6.052 \times 10^{-7}$		$1.080 \times 10^{-6}$	$1.016 \times 10^{-6}$	$1.094 \times 10^{-6}$	$9.205 \times 10^{-7}$
0.15	$5.945 \times 10^{-7}$		$1.112 \times 10^{-6}$	$1.066 \times 10^{-6}$	$1.081 \times 10^{-6}$	$9.730 \times 10^{-7}$

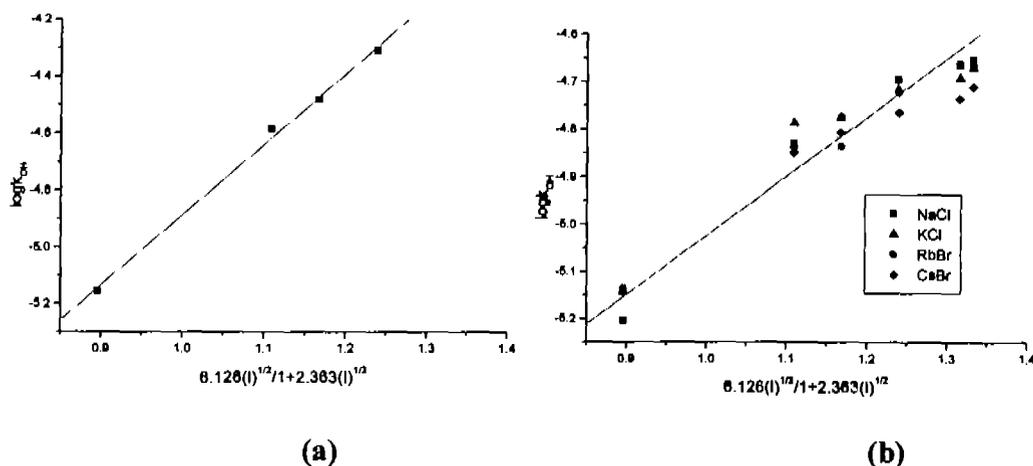


**Figura 5.19.** Hidrólisis de BNPP en presencia de iones metálicos alcalinos a 60% v/v de dioxano.

Para el análisis de la dependencia de la constante de velocidad observada en función de la fuerza iónica, se analizó empleando la teoría del estado de transición y considerando cómo se ven modificados los coeficientes de actividad en estas mezclas donde la constante dieléctrica del medio es diferente. Se hizo un análisis utilizando la teoría de Debye-Hückel. Empleando la ecuación 5.4 y la ecuación 5.6, obtenemos la ecuación 5.16 la cual describe el comportamiento de los cationes alcalinos en la mezcla de agua-disolvente orgánico.

$$\log k_{OH^-} = \log k_{OH^-}^0 + \frac{2A(I)^{1/2}}{1 + Ba(I)^{1/2}} (Z_{BNPP^-} - Z_{OH^-}) \quad \text{ecuación (5.16)}$$

Observamos que ahora el valor de A y de Ba cambian ya que ya cambiado la constante dieléctrica del medio, ( $A = 3.036$  y  $Ba = 2.363$ ). En las figuras 5.20 (a) y 5.20 (b), se muestran la dependencia de la fuerza iónica para el catión  $Li^+$  y de los cationes de la familia de los alcalinos a partir de  $Na^+$  en coordenadas de  $2 \cdot 3.036 \sqrt{I} / (1 + 2.363 \cdot \sqrt{I})$ . Con los cationes  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  y  $Bu_4N^+$  la dependencia es lineal al igual que con el catión  $Li^+$ , sin embargo con este último la pendiente es de 2.48, mientras que los iones de la misma familia se comportan como un efecto salino normal con una pendiente cercana a 1 y para el catión  $Bu_4N^+$  la pendiente es de 0.2.



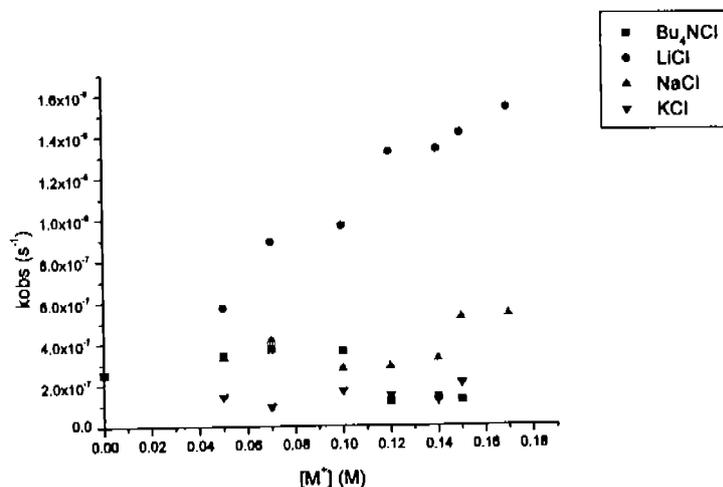
**Figura 5.20** Efecto de diferentes cationes de metales alcalinos sobre la hidrólisis de BNPP a 37°C, en la mezcla de agua-dioxano 60% v/v.

En el estudio que se hizo para acetonitrilo también observamos que el sistema se comporta de manera muy parecida a dioxano, en donde el ion  $\text{Li}^+$  hace que la velocidad de reacción aumente aproximadamente tres veces con respecto a la hidrólisis sin iones metálicos y casi dos veces con respecto a los iones metálicos de la misma familia (Na y K), figura 5.21.

**Tabla 5.18.** Hidrólisis básica de BNPP en presencia de iones metálicos alcalinos a 60% v/v de acetonitrilo.

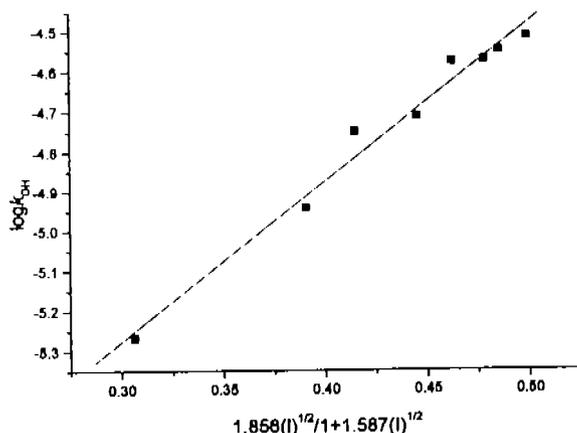
$[\text{M}^+]$ (M)	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{Bu}_4\text{NCl}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{LiCl}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{NaCl}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) ( $\text{KCl}$ )
0	$2.517 \times 10^{-7}$	$2.517 \times 10^{-7}$	$2.517 \times 10^{-7}$	$2.517 \times 10^{-7}$
0.05	$3.382 \times 10^{-7}$	$5.720 \times 10^{-7}$	$3.317 \times 10^{-7}$	$1.416 \times 10^{-7}$
0.07	$3.711 \times 10^{-7}$	$8.884 \times 10^{-7}$	$4.162 \times 10^{-7}$	$9.342 \times 10^{-8}$
0.1	$3.628 \times 10^{-7}$	$9.674 \times 10^{-7}$	$2.790 \times 10^{-7}$	$1.704 \times 10^{-7}$
0.12	$1.189 \times 10^{-7}$	$1.325 \times 10^{-6}$	$2.882 \times 10^{-7}$	$1.458 \times 10^{-7}$
0.14	$1.366 \times 10^{-7}$	$1.336 \times 10^{-6}$	$3.225 \times 10^{-7}$	$1.243 \times 10^{-7}$
0.15	$1.228 \times 10^{-7}$	$1.413 \times 10^{-6}$	$5.224 \times 10^{-7}$	$2.071 \times 10^{-7}$
0.17		$1.523 \times 10^{-6}$	$5.351 \times 10^{-7}$	





**Figura 5.21.** Datos de la tabla 5.18 en forma gráfica de la hidrólisis de BNPP en presencia de ( $Li^+$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ ) a 60% v/v de acetonitrilo.

El análisis de la dependencia de la constante de velocidad observada en función de la fuerza iónica realizado para acetonitrilo fue muy parecido al que se hizo para dioxano cambiando únicamente los valores de A y B ( $A= 0.928$  y  $B= 1.587$ ), para la mezcla de agua-acetonitrilo a 60% v/v. En la figura 5.X se muestra la dependencia de la fuerza iónica en coordenadas  $2 \cdot 0.928 \sqrt{I} / (1 + 1.587 \cdot \sqrt{I})$  y al igual que con dioxano la dependencia es lineal en todos los casos y donde el catión  $Li^+$  tiene una pendiente de 3.99, figura 5.22, mientras que el catión  $Na^+$  la pendiente tiene un valor de 1.32, y para los cationes  $K^+$  y  $Bu_4N^+$  tienen unas pendientes de -1.97 y -3.217 respectivamente.

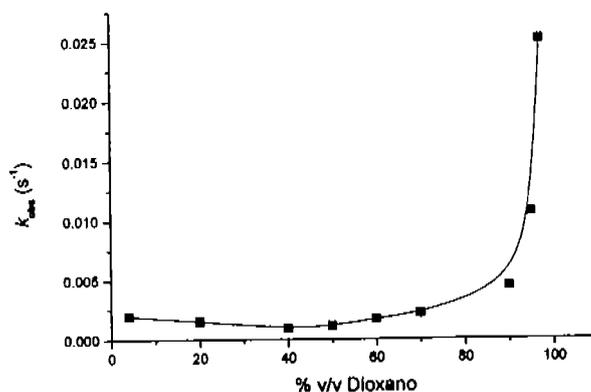


**Figura 5.22** Efecto de LiCl sobre la hidrólisis básica de BNPP a 37°C en la mezcla agua-acetonitrilo 60% v/v.

### 5.6. Hidrólisis básica del PNPDP en mezclas dioxano-agua

Se estudió la hidrólisis básica de 4-nitrofenil-difenilfosfato, que es un triéster neutro, variando el porcentaje de dioxano de la mezcla con el fin de comparar el efecto del medio con el observado para BNPP que es un sustrato aniónico. La rapidez de hidrólisis básica de PNPDP es considerablemente mayor que para BNPP por lo que el estudio se hizo empleando menor concentración de la base,  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  3 mM; en este caso las constantes de velocidad observada,  $k_{obs}$ , se obtuvieron de ajustes integrales de primer orden (ecuación 4.3).

Al variar el porcentaje de dioxano, observamos un comportamiento similar al que se observa con el sustrato BNPP: conforme va aumentando la concentración de dioxano hay una disminución en la velocidad de reacción pasando por un mínimo y después aumenta bruscamente respecto al valor obtenido en agua cuando se tiene un porcentaje de disolvente orgánico mayor que 80% v/v, figura 5.23 y tabla 5.19.



**Figura 5.23.** Hidrólisis básica de PNPDP a diferentes porcentajes de dioxano, Bu<sub>4</sub>NOH 3mM, 37°C. Datos de la tabla 5.14. (La línea continua muestra la tendencia)

**Tabla 5.19.** Hidrólisis básica de PNPDP a diferentes porcentajes de dioxano, Bu<sub>4</sub>NOH 3mM, 37°C.

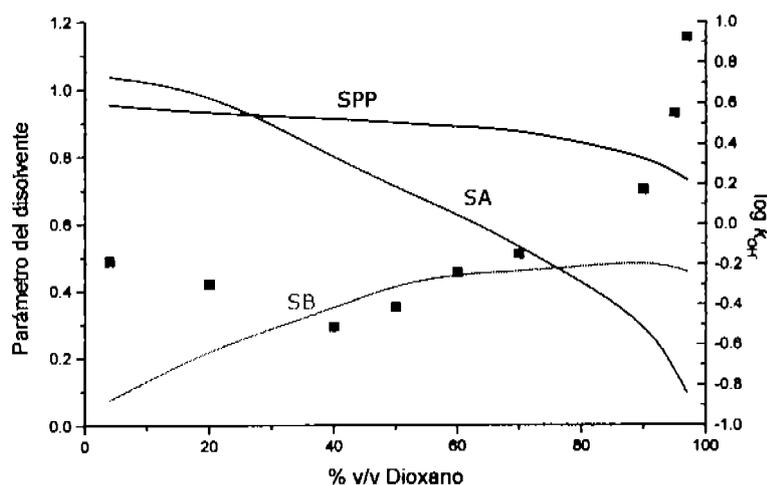
% v/v Dioxano	$k_{obs}$ ( $s^{-1}$ )
4	0.00196
20	0.0015
40	0.00092
50	0.00115
60	0.00171
70	0.00212
90	0.00443
95	0.01065
97	0.02516

De acuerdo a las reglas de Hughes-Ingold<sup>(50)</sup> para predecir el efecto del disolvente en reacciones de sustitución nucleofílica, se esperaría que para una reacción entre un anión (OH<sup>-</sup>) y un sustrato neutro (PNPDPP) cuyo complejo activado en el estado de transición (OH-PNPDP)<sup>‡</sup> también es monoaniónico pero con carga dispersa, se observe un pequeño aumento al disminuir la polaridad del medio, lo cual debería suceder al adicionar un disolvente de menor constante dieléctrica como dioxano ( $\epsilon = 2.25$ ). Sin embargo, la tendencia observada es opuesta: a medida que aumenta el porcentaje de dioxano, hasta aproximadamente 50% se observa un efecto de disminución en la rapidez de hidrólisis cuando la constante dieléctrica del medio ya se redujo más de 2 veces (de 70.4 para 4% de dioxano a 31.9 para 50% de dioxano); tampoco cabe esperar la presencia de un mínimo en la reactividad ni un aumento muy pronunciado después de 80% de dioxano. Entonces es

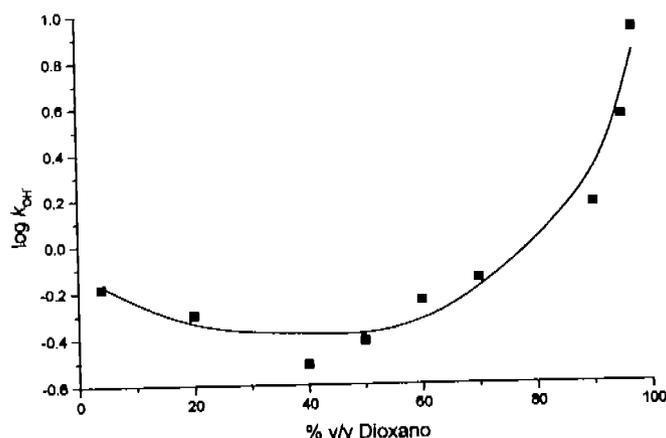
claro que debe haber contribuciones más específicas por parte del disolvente, por lo tanto resulta más adecuado analizar el efecto del disolvente por medio de parámetros empíricos.

Comparando la tendencia de los parámetros empíricos del disolvente propuestos por Catalán y colaboradores <sup>(49)</sup> (SA, SB y SPP) para mezclas acuosas de dioxano con las constantes de hidrólisis básica para PNPDP (Figura 5.24) encontramos que ningún parámetro correlaciona directamente. Sin embargo, mediante una regresión multiparamétrica se obtiene una combinación lineal de los parámetros (ecuación 5.13) que puede describir el comportamiento de las constantes de hidrólisis básica para PNPDP (ecuación 5.17) la figura 5.25 muestra los datos experimentales y la curva teórica calculada con esta ecuación.

$$\log k_{OH^-} = (4.8 \pm 1.9) - (1.1 \pm 0.8)SA - (2.3 \pm 0.7)SB - (3.8 \pm 2.9)SPP \quad (5.17)$$



**Figura 5.24** Parámetros SA, SB y SPP para mezclas acuosas de dioxano y  $\log k_{OH^-}$  para la hidrólisis de PNPDP en función del porcentaje de disolvente, 37°C, Bu<sub>4</sub>NOH 3 mM.



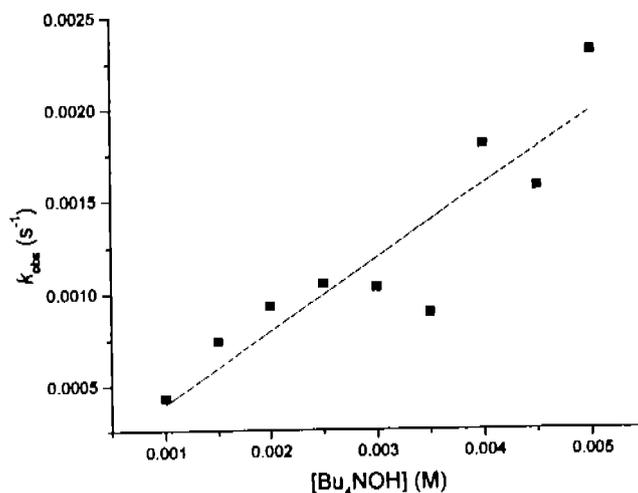
**Figura 5.25** Valores de  $\log k_{OH^-}$  experimentales (■) y calculados con la ecuación 5.17 (-) para la hidrólisis de PNPDP a 37°C.

Obviamente la ecuación (5.17) coincide prácticamente con la ecuación correspondiente para un sustrato aniónico BNPP (5.13). El mismo comportamiento de ambos sustratos indica que la disminución inicial de la velocidad no puede atribuirse al efecto del cambio de la constante dieléctrica y entonces el tratamiento en términos de la ecuación (5.11) aún de manera cualitativa no es satisfactorio. De acuerdo con las ecuaciones (5.17) y (5.13) la disminución observada se debe que el efecto inhibitor de la basicidad creciente es mayor comparando con el efecto promotor de la acidez decreciente. A porcentajes mayores de 40% de dioxano el cambio en SB es relativamente pequeño mientras que SA continúa disminuyendo rápidamente y esto produce el efecto total de aceleración. El cambio de SPP es notable sólo para porcentajes mayores que 80% de dioxano y su disminución da un efecto positivo adicional. La interpretación de este efecto no es claro, en particular porque en el caso de mezclas agua-acetonitrilo el efecto de polaridad es inverso (ecuación 5.14). Aparentemente tienen mayor importancia algunos aspectos de la estructura química de las moléculas de los disolventes que no están reflejados en el parámetro SPP (por ejemplo, una mayor superficie de los fragmentos hidrofóbicos del dioxano), pero son importantes para la solvatación de los reactivos o para el complejo activado de la hidrólisis en el estado de transición.

Con el fin de comparar el efecto de la concentración de la base en la hidrólisis del triéster PNPDP, con la observada para el fosfodiéster aniónico BNPP en presencia de disolvente orgánico, se varió la concentración de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  en un intervalo de 1 a 5 mM en una mezcla 60% v/v dioxano-agua. Los resultados se presentan en la tabla 5.20 y figura 5.26.

**Tabla 5.20.** Hidrólisis básica de PNPDP a 60% v/v de dioxano, 37°C.

$[\text{Bu}_4\text{NOH}] \text{ (M)}$	$k_{\text{obs}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
0.0010	$4.3 \times 10^{-4}$
0.0015	$7.9 \times 10^{-4}$
0.0020	$9.3 \times 10^{-4}$
0.0025	$1.05 \times 10^{-3}$
0.0030	$1.03 \times 10^{-3}$
0.0035	$8.9 \times 10^{-4}$
0.0040	$1.80 \times 10^{-3}$
0.0045	$1.57 \times 10^{-3}$
0.0050	$2.31 \times 10^{-3}$



**Figura 5.26** Datos de la tabla 5.20 en forma gráfica de la hidrólisis de PNPDP a 60% v/v de dioxano. ( $k_{\text{OH}^-} = 0.40 \pm 0.03 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $R = 0.90169$ ).

La dependencia de la concentración de  $\text{OH}^-$  es lineal, aunque los datos tienen dispersión, y de la pendiente de la recta se obtuvo la constante de segundo orden de  $k_{\text{OH}^-} = 0.40 \pm 0.03 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , figura 5.26. El valor informado en la literatura para la hidrólisis básica de PNPDP en una mezcla acuosa con 5% de dioxano a 25°C es  $k_{\text{OH}^-} = 0.35 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>(7)</sup> El valor obtenido

concuera razonablemente con el informado ya que a pesar de que la hidrólisis se monitoreó a mayor temperatura (37°C), el efecto del disolvente a 60% de dioxano hace que las constantes en esta mezcla sean menores a las medidas en 5% de dioxano.

Finalmente, se probó el efecto de los cloruros de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  así como  $\text{Bu}_4\text{NCl}$ , como un catión no metálico muy soluble en estos medios. Empleando la teoría del estado de transición es posible analizar el cambio esperado en la constante de hidrólisis básica en función de los cambios en los coeficientes de actividad de los reactivos y del complejo activado en el estado de transición (5.2 y ecuación 5.18a). De la ecuación 5.18b es claro que no se espera ningún cambio en la constante de hidrólisis básica al adicionar una sal y aumentar la fuerza iónica de la disolución.



$$k_{\text{OH}^-} = k_{\text{OH}^-}^0 \frac{\gamma_{\text{PNPDPP}} \gamma_{\text{OH}^-}}{\gamma_{(\text{PNPDPP-OH}^-)^\ddagger}} \quad (5.18a)$$

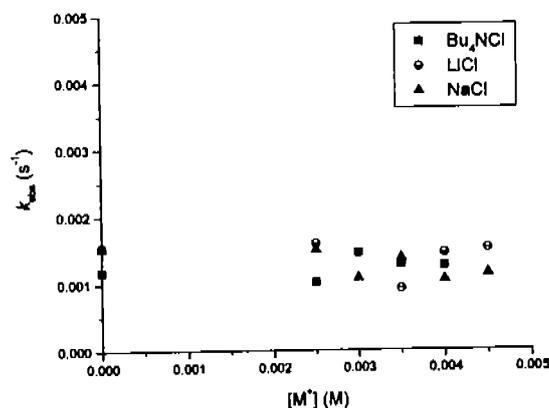
$$\log k_{\text{OH}^-} = \log k_{\text{OH}^-}^0 + \log \gamma_{\text{PNPDPP}} + \log \gamma_{\text{OH}^-} - \log \gamma_{(\text{PNPDPP-OH}^-)^\ddagger} \quad (5.18b)$$

Los resultados obtenidos (ver tabla 5.21) coinciden con lo esperado para un sustrato neutro: no se observa un aumento en la velocidad de hidrólisis debido a la presencia de cloruros metálicos o de  $\text{Bu}_4\text{NCl}$ , figura 5.27

**Tabla 5.21.** Hidrólisis básica de PNPDP en presencia de iones metálicos alcalinos a 60% v/v de dioxano y a una concentración de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  de 3mM.

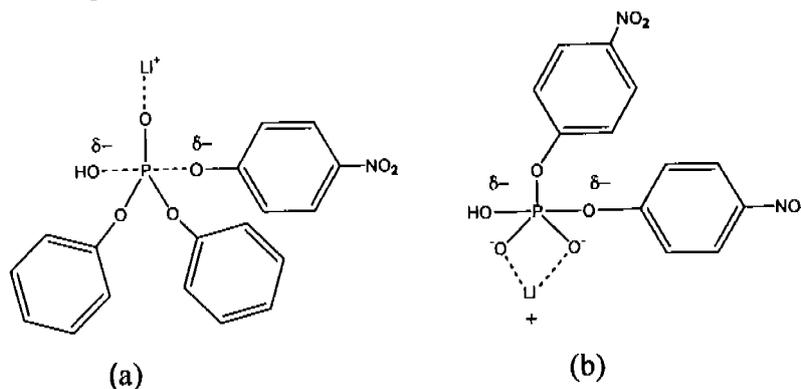
$[\text{M}^+]$ (M)	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$ ( $\text{Bu}_4\text{NCl}$ )	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$ ( $\text{LiCl}$ )	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$ ( $\text{NaCl}$ )
0	0.00118	0.00155	0.00153
0.0025	0.00102	0.0016	0.0015
0.003	0.00146	0.00145	0.00108
0.0035	0.00128	0.00092	0.00137
0.004	0.00126	0.00145	0.00105
0.0045		0.00152	0.00114

Notablemente el catión  $\text{Li}^+$  no presenta ningún efecto cuando el sustrato es neutro, como PNPDP, posiblemente debido a que hay una interacción más débil cuando se forma el estado de transición con este sustrato que cuando se forma el estado de transición con un sustrato aniónico como BNPP.



**Figura 5.27.** Hidrólisis básica de PNPDP en presencia de cloruros de cationes de metales alcalinos y  $\text{Bu}_4\text{NCl}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  de 3mM. Datos de la tabla 5.21 en forma gráfica.

Este ion metálico neutraliza la carga del sustrato e incluso atrae densidad electrónica hacia sí, dejando disponible al fósforo para que sea atacado por el nucleófilo con mayor facilidad en medios que tienen un bajo contenido de agua. Posiblemente en los sistemas biológicos el sitio activo de una enzima se encuentre en un ambiente parecido (polar y con bajo contenido de agua), lo que provoque que este tipo de cationes, que son ácidos de Lewis débiles, en conjunción con los grupos terminales de algunos aminoácidos puedan producir efectos catalíticos importantes.



**Figura 5.28.** Estado de transición para la hidrólisis de ésteres fosfato (a) PNPDP, (b) BNPP en presencia de  $\text{Li}^+$ .



## 6. Conclusiones

1. La velocidad de hidrólisis alcalina para un di y un triéster fosfato inicialmente disminuye al añadir un disolvente orgánico a agua, pero después aumenta en medios con bajo contenido de agua (<10%), debido al cambio de solvatación del sustrato y el nucleófilo. Ambos efectos se describen cuantitativamente mediante una correlación multiparamétrica entre logaritmos de las constantes de velocidad y tres parámetros empíricos de las mezclas de disolventes empleadas.
2. En la hidrólisis básica de un diéster fosfato, que es un sustrato dianiónico, tanto en agua como en una mezcla de agua-disolvente aprótico, los iones metálicos de la serie de  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cs}^+$  aumentan la velocidad de reacción debido a un efecto salino de acuerdo con lo esperado en términos de la teoría de Debye-Hückel.
3. Para la hidrólisis de un diéster fosfato se encontró que el ion  $\text{Li}^+$  es el que presenta un efecto catalítico mayor comparado con los otros iones metálicos de la misma familia, posiblemente porque es un ácido de Lewis más fuerte.
4. Para la hidrólisis básica de un triésteres fosfato en una mezcla de agua-disolvente aprótico, no se observa algún efecto de los iones metálicos alcalinos, incluso para el ion  $\text{Li}^+$ . Esto puede atribuirse a que hay una interacción muy débil del catión con el estado de transición que es monoaniónico en comparación con el estado de transición dianiónico del diéster fosfato.
5. Los resultados obtenidos muestran que el uso de un medio con bajo contenido de agua que simule el entorno parcialmente deshidratado de los sitios activos enzimáticos, permite aumentar notablemente la reactividad de  $\text{OH}^-$  y la eficiencia catalítica de  $\text{Li}^+$ .

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. D. Voet, J. Voet, *Biochemistry*, 2<sup>o</sup> Edition, Wiley Text Books, (1995), Cap. 15, p.424-455.
2. H-J. Shneider, A. K. Yatsimirsky, Lanthanide-Catalysed Hidrolysis of Phosphate Esteres and Nucleic Acids in Metal Ions in Biological Systems, Vol. 40, A. Sigel y H. Sigel Editores, M. Dekker Inc., New York, (2003), pp 370-394.
3. J. R. Cox, Jr. And O.B. Ramsay, Mechanism of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters, *Chem. Rev.*, (1964), 64, 317.
4. R.Krämer, Bioinorganic models for the catalysis cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. *Coord. Chem. Rev.*, (1999), 182, 243.
5. (a) E.L. Hegg, J. N. Burstyn, Toward development of metal- based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry, *Coord. Chem. Rev.* (1998), 173, 133; (b) E. Kimura, T. Koike, *Adv. Inorg. Chem.* (1997), 44, 229.
6. A. J. Kirby, A. G. Varvoglis, The reactivity of phosphate esters. Monoesters hidrolysis, *J. Am. Chem. Soc.*, (1967), 89, 415.
7. C. A. Bunton, S. J. Ferber, E. J. Fendler, The hydrolysis of *p*-nitrophenyl diphenyl phosphate, *J. Org. Chem.*, (1968), 33, 29.
8. (a) O. Taran, A. K. Yatsimirsky, Phosphodiesterolytic activity of alkaline-earth cations in aqueous DMSO, *Chem. Commun*, (2004), 1228; (b) Tesis de licenciatura: Hidrólisis de fosfodiésteres en presencia de metales alcalinotérreos, Olga Taran Iourova, Facultad de Química, UNAM, (2004).
9. E. J. Behrman, M. J. Biallas, H. J. Brass, J. O. Edwards, M. Isaks, Reactions of phosphonic acid esters with nucleophiles, *J. Org. Chem.*, (1970), 35, 3069.
10. J. A. A. Keteclaar, H. R. Gersmann, Chemical studies on insecticides VI. The rate of hidrolysis of some phosphorous acid esterres, *Recl. Trav. Chim.*, (1958), 27, 973.
11. J. D. Chanley, E. Feageson, A study of the hidrolysis of phosphoramidates II. Solvolysis of phosphoramidic acid and comparison with phosphate esters, *J. Am. Chem. Soc.*, (1963), 85, 1181.
12. El valor de kobs para la hidrólisis del ADN<sub>SE</sub> se estima con base a los datos de la referencia: R.OH, R. Krämer, DNA hydrolysis by inorganic catalysts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (1999), 52, 761.

13. M. Komiyama, Sequence-specific and hydrolytic scission of DNA and RNA by lanthanide complex-oligo DNA hybrids, *J. Biochem.*, (1995), 118, 665.
14. J. Chin, B. Banaszczyk, V. Jubian, X. Zou, Co(III) complex promoted hydrolysis of phosphate diesters: comparison in reactivity of rigid *cis*-diaquotetraaza cobalt(III) complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, (1989), 111, 186.
15. A. Radiska, R. Wolfenden, A proficient enzyme, *Science*, (1995), 267, 90.
16. F. H. Westheimer, Pseudo-rotation in the hydrolysis of phosphate esters, *Acc. Chem. Res.*, (1968), 1, 70.
17. A. J. Kirby, M. Yonas, The reactivity of phosphate esters, Diester Hydrolysis, *J. Chem. Soc., B.*, (1970), 510.
18. E. T. Kaiser, K. Kudo, Alkaline hydrolysis of aromatic esters of phosphoric acid, *J. Am. Chem. Soc.*, (1967), 89, 6725.
19. A. Fersht, Structure and Mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding, USA, (1999), pp. 77-92.
20. M. A. De Rosch, W. C. Trogler, Hydrolysis of phosphodiesteres with Ni(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II) and Pt(II) complexes, *Inorg. Chem.*, (1990), 29, 2409.
21. J. R. Morrow and W. C. Trogler, Hydrolysis of phosphate diesters with Copper(II) catalyst, *Inorg. Chem.*, (1998), 27, 3387.
22. A. Roigk, R. Hettich, H-J Schneider, Unusual Catalysis Concentration Effects in the Hydrolysis of Phenyl Phosphate Esters and of DNA: A Systematic Investigation of Lanthanide Series, *Inorg. Chem.*, (1998), 37, 751.
23. R. Breslow and D.-L. Huang, Effects of metal ions, including  $Mg^{2+}$  and lanthanides, on the cleavage of ribonucleotides and RNA model compounds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1991), 88, 4080.
24. J. B. Vincent, G. L. Olivier-Lilley, B. A. Averill, Proteins Containing Oxo-Bridged Dinuclear Iron Centers: A Bioinorganic Perspective, *Chem. Rev.*, (1990), 90, 1447.
25. L. E. Hegg and J. N. Burtyn, Copper(II) Macrocycles Cleave Single-Stranded and Double-Stranded DNA under Both Aerobic and Anaerobic Conditions, *Inorg. Chem.*, (1996), 35, 7474.
26. A. J. Parker, Protic-dipolar aprotic solvent effects on rates of bimolecular reactions, *Chem. Rev.*, (1969), 69(1), 1.
27. C. Reichardt, Solvents and solvent effects in organic chemistry, VCH, New York, (1990), p. 69-71, 136-147, 208.

28. J. Catalán, Solvent Effects Based on Pure Solvent Scales, *Handbook of Solvents*, George Wypych Editor, Chem Tec. Publishing, William Andrew Publishing, New York, (2001), pp. 583-616
29. J. Catalán, C. Díaz, F. García-Blanco, Characterization of binary solvent mixtures: the water-acetonitrile mixture, *Org. Biomol. Chem.*, (2003), 1, 575.
30. M. J. Kamlet, R. W. Taft, The solvatochromic comparison method. I. The .beta.-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities *J. Am. Chem. Soc.*, (1976), 98, 377.
31. K. W. Y. Abell, A. J. Kirby, Acceleration of P-O cleavage reactions of phosphate monoester dianions in dipolar aprotic solvents, *Tet.Lett.* (1986) 27(9), 1085-1088)
32. R. H. Of., A.C. Hengge, Entropy and enthalpy contributions to solvent effects on phosphate monoéster hydrolysis. The importance of entropy effects in the dissociative transition state, *J.Org.Chem.*, (1998), 63, 6680-6688
33. P. K. Gryska, P.G. Czyryca, J. Golightly, K. Small, P. Larsen, R. H. Hoff, A. C. Hengge. Generality of solvation effects on hydrolysis rates of phosphate monoesters and their possible relevance to enzymatic catalysis, *J.Org.Chem.*, (2002), 67, 1214.
34. C. A. Bunton, N. D. Gillit, A. Kumar, Solvent effects on reactions of hydroxyde an oximate ions with phosphorus (V) esters, *J. of Phys.Org.Chem.*, (1997), 10, 221, y referencias ahí citadas.
35. F. Terrier, G. Montiers, L. Xiao, E. de Griével, F. Guir, Nonlinear Brønsted relationships in the reactions of phenoxide ions with bis(4-nitrophenyl)diphenyl phosphonate in H<sub>2</sub>O-Me<sub>2</sub>SO Mixtures. Solvation effects, *J.Org.Chem.*, (1995), 60, 1748.
36. T. Liu, H.-J. Schneider, Temperature and solvent effects on the europium(III)-catalyzed hydrolysis of bis-(4-nitrophenyl) phosphate, *Supramol.Chem.*, (2002), 14(2-3), 231.
37. E. Bunce, R. Nagelkerke, G. R.J Thatcher, Alkali metal ion catalysis in nucleophilic displacement by ethoxide ion on p-nitrophenyl phenylphosphonate: evidence for multiple metal ion catalysis, *Can.J.Chem.*, (2003), 81, 53.
38. D. D. Perrin and W. L. F. Amarego, Purification of Laboratory Chemicals, 3<sup>o</sup> Edition, Pergamon Press, New York, (1991), p. 241, 161.
39. W. M. Gulick Jr., D. H. Geske, Examination of Phosphorus Hyperfine Coupling Constants in Nitroaromatic Anion Radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, (1966), 2928.
40. P. W. Atkins, *Fisicoquímica*, Addison-Wesley Iberoamericana, México, (1987), pp. 809, 823, 852, 864.

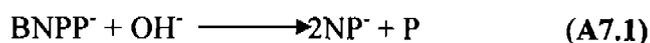
- 
41. C. A. Bunton, S. J. Farber, The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate, *J. Org. Chem.*, (1969), 34, 767.
  42. K. S. Pitzer, "Thermodynamics of electrolytes: I. Theoretical basis and general equations", *J. Phys. Chem.*, (1973), 77, 268.
  43. C. F. Jr. Baes, R. E. Mesmer, *The hydrolysis of cations*, Nueva York. Wiley & Sons, 1976, 4-5, 13, 17.
  44. G. W. Castellan, *Fisicoquímica*, 2<sup>a</sup> edición, Addison-Wesley Iberoamericana, México, (1987), p. 389.
  45. H-J Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Ed. Wiley, (2000), p. 128.
  46. G. Åkerlöf, O. A. Short, The Dielectric Constant of Dioxane-Water Mixtures Between 0 and 80°, *J. Am. Chem. Soc.*, (1936), 58, 1241.
  47. K. J. Laidler, *Chemical Kinetics*, 3<sup>a</sup> edición, Harper Collins Publishers, (1987), pp. 192-193.
  48. J. E. Huheey, E. A. Keiter, R. L. Keiter, *Química Inorgánica. Principios de estructura y reactividad*. 4<sup>a</sup> Edición, OUP-Harla, México, 1997, p. 308.
  49. Catalán J., Díaz C., Barrio L., Análisis of mixed solvent effects on the properties of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ), *Chem. Phys.*, (2004), 300, 33.
  50. (a) C. K. Ingold, *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, 2<sup>a</sup> Edición, Cornell University Press, Ithaca/Nueva York/Londres, 1969, p.457 *et seq.*, p.680 *et seq.*; (b) E. D. Hughes, C. K. Ingold, *J. Chem. Soc.*, (1935), 244; (c) E. D. Hughes, C. K. Ingold, *Trans. Faraday Soc.*, (1941), 37, 603; (d) *idem* p. 657.

## 1. 8. ANEXO

### *Derivación de las ecuaciones para ajustar los datos experimentales*

#### 1. Ecuación para calcular la constante de velocidad ajustando los datos experimentales a una curva cinética de primer orden

En las condiciones de reacción en las que se trabajó en este estudio de hidrólisis básica, el sustrato (BNPP) siempre su concentración era mucho menor la de los demás componentes. Por lo que para fines prácticos esta reacción se consideró como de pseudo primer orden.



Omitimos la formación del mononitrofenil fosfato (MNPP) y se hizo la suposición de que se formaba directamente todo el BNPP en NP y fosfato.

Una reacción de primer orden se podría representar de la siguiente manera:



La velocidad de la reacción sería:

Se modificaron las ecuaciones donde aparece A para el sustrato S porque se confunde con absorbancia

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_1[S] \quad (\text{A7.3})$$

Reagrupando los términos para resolver la ecuación diferencial

$$\frac{d[P]}{[S]} = k_1 dt \quad (\text{A7.4})$$

Si se hace la siguiente consideración

$$[S] = [S]_0 - [P] \quad (\text{A7.5})$$

Si se sustituye A5 en A4 y se integra, obtenemos:

$$[S] = e^{-k_1 t} [S]_0 \quad (\text{A7.6})$$

Sustituyendo [S] por  $[S]_0 - [P]$  y reduciendo la expresión, se llega a A7.7.

$$[P] = (1 - e^{-k_1 t}) [S]_0 \quad (\text{A7.7})$$

Sin embargo todos los experimentos se hicieron midiendo directamente la absorbancia (A) de la muestra en función del tiempo, por lo que podemos expresar la aparición del producto (nitrofenolato) en términos de absorbancia,

$$A_p = \varepsilon_p l [P]_t + A_0 \quad (\text{A7.8})$$

Donde  $\varepsilon_p$  es el coeficiente de absortividad molar del nitrofenolato,  $l$  es la longitud de la celda (1 cm),  $[P]_t$  es la concentración del producto a un tiempo  $t$ , y  $A_0$  es la absorbancia inicial debido a la absorbancia del sustrato o a una pequeña cantidad del producto que se formó antes de empezar a monitorear la reacción.

De la ecuación A7.7, podemos entonces representarla en términos de la absorbancia:

$$A_p = \varepsilon_p (1 - e^{-k_1 t}) [S]_0 + A_0 \quad (\text{A7.9})$$

Finalmente, tomando en cuenta que la cantidad total de producto que se puede formar es igual a la cantidad inicial de sustrato (si se forma un equivalente), entonces, al tiempo infinito la absorbancia del producto será  $A_{inf} = \epsilon_p[S]_0$ . Así, la expresión anterior se puede reducir a:

$$A_p = A_{inf}(1 - e^{-k_1 t}) + A_0 \quad (\text{A7.10})$$

## 2. Ecuación para calcular la constante de velocidad a partir de velocidades iniciales.

La expresión para la velocidad en términos de la absorbancia, de acuerdo con la ecuación A7.10 está dada por:

$$\frac{dA_p}{dt} = k_1 A_{inf} e^{-k_1 t} \quad (\text{A7.11})$$

Cuando la reacción es bastante lenta es conveniente medir la velocidad inicial  $v_0$ , que es la velocidad cuando  $t = 0$ . Al calcular este límite para la ecuación A7.11 obtenemos:

$$v_0 = \left( \frac{dA_p}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = k_1 A_{inf} \quad (\text{A7.12})$$

de donde:

$$k_1 = \frac{v_0}{A_{inf}} \quad (\text{A7.13})$$