



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

HIDRÓLISIS DE FOSFODIÉSTERES EN PRESENCIA DE
METALES ALCALINOTÉRREOS

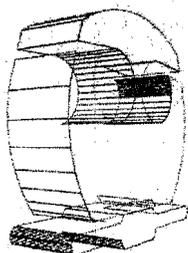
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA :

OLGA TARAN IOUROVA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

AÑO 2004

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Dr. Rafael Moreno Esparza
VOCAL	Dra. Silvia Elena Castillo Blum
SECRETARIO	Dr. Anatoli Iatsimirski
1er. Suplente	Dr. Jesús Gracia Mora
2º. Suplente	M en C. Marcos Flores Alamo

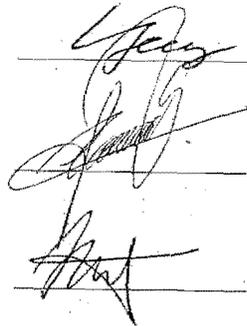
LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

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

Asesor del tema: Dr. Anatoli Iatsimirski

Supervisor técnico: Dra. Paola Gómez-Tagle Chávez

Sustentante: Olga Taran Iourova



The image shows three handwritten signatures, each written on a horizontal line. The top signature is in dark ink and appears to be 'A. Iatsimirski'. The middle signature is in dark ink and appears to be 'P. Gómez-Tagle'. The bottom signature is in dark ink and appears to be 'O. Taran Iourova'.

маме, папе, Саньке, бабушке и деду...

...у а Hebert...

Agradecimientos

Al Dr. Anatoli Iatsimirski por no cansarse de enseñar y explicar

A la Dra. Paola Gómez-Tagle por el enorme trabajo de corregir, corregir y corregir

A todos los compañeros de Laboratorio 213

Al Subprograma 127 Formación de Investigadores de Facultad de Química UNAM

Al Proyecto PAPIIT IN 208901

Contenido

<i>Símbolos y abreviaturas</i>	1
<i>1. Introducción</i>	2
<i>2. Antecedentes</i>	4
<i>2.1 Hidrólisis de diésteres fosfato</i>	4
2.1.1 Mecanismo general de hidrólisis de diésteres fosfato	4
2.1.2 Efecto de los iones metálicos.	
2.1.3 Mecanismo de hidrólisis en las enzimas naturales.	7
<i>2.2 Efecto del disolvente en la rapidez de reacción</i>	9
2.2.1 Consideraciones generales	9
2.2.2 Solvatación de los no electrolitos	12
2.2.3 Solvatación de los electrolitos.	13
2.2.4 Solvatación del estado de transición.	14
2.2.5 Efecto del disolvente en rapidez de reacción.	16
<i>2.3 Caso particular, mezclas de DMSO y agua.</i>	18
2.3.1 Propiedades de las mezclas DMSO y agua.	18
2.3.2 Efecto del DMSO en las reacciones de hidrólisis de los ésteres.	21
<i>2.4 Efecto de los metales alcalinotérreos en la hidrólisis de los ésteres fosfato.</i>	23
2.4.1 El ión Mg^{2+}	23
2.4.2 El ión Ca^{2+}	24
2.4.3 Los iones Sr^{2+} y Ba^{2+}	25
<i>3. Objetivos.</i>	26
<i>4. Procedimiento experimental</i>	27
<i>4.1 Sustancias empleadas</i>	27
<i>4.2 Equipo</i>	28
<i>4.3 Estudio cinético</i>	29
<i>4.4 Estudio potenciométrico</i>	34
<i>5. Resultados</i>	38
<i>5.1 Hidrólisis acuosa de los diésteres fosfato</i>	38
5.1.1 Hidrólisis básica de BNPP	38

5.1.2 Efecto de NaCl	39
5.1.3 Efecto del ion Mg^{2+}	41
5.1.4 Efecto del ion Ca^{2+}	43
5.1.5 Efecto del ion Sr^{2+}	47
5.1.6 Efecto del ion Ba^{2+}	48
5.1.7 Resumen y análisis de los resultados de la hidrólisis acuosa del BNPP con metales alcalinotérreos.	50
<i>5.2 Efecto del DMSO</i>	59
5.2.1 Hidrólisis básica de BNPP	60
5.2.2 Efecto de metales alcalinos en la reacción	67
5.2.3 Efecto del ion Mg^{2+}	70
5.2.4 Efecto del ion Ca^{2+}	78
5.2.5 Efecto del ion Sr^{2+}	81
5.2.6 Efecto del ion Ba^{2+}	87
5.2.7 Resumen de los resultados de la hidrólisis de diésteres fosfato en mezclas DMSO-agua	89
6. Conclusiones	92
7. Bibliografía	93
<i>Anexo 1. Graficas del comportamiento cinética.</i>	96
<i>Anexo 2. Derivación de las ecuaciones para ajustar los datos experimentales</i>	114
<i>Anexo 3. Derivación de la ecuación de velocidad de hidrólisis alcalina con saturación</i>	117

Símbolos y abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BNPP	fosfodiéster, bis(4-nitrofenil) fosfato
D	constante dieléctrica del medio
DL ₅₀	Dosis letal de compuesto suficiente para matar 50 % de la población
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
<i>I</i>	fuerza iónica
ΔG°_{tr}	Energía libre de transferencia
K	constante de equilibrio en términos de concentración
K _{OH}	constante de formación de hidroxocomplejo
K _M	constante de Michaelis
<i>k</i>	constante de velocidad
<i>k</i> ₂	constante catalítica de segundo orden
MNPP	mono-p-nitrofenil fosfato
nm	nanómetros
pK _w	menos logaritmo de constante de disociación de agua
R	coeficiente de la regresión lineal obtenido por ajuste de mínimos cuadrados
SA	parámetro de acidez
SB	parámetro de basicidad.
S _N 1	sustitución nucleofílica, mecanismo monomolecular
S _N 2	sustitución nucleofílica, mecanismo bimolecular
SP	parámetro de polaridad
UV	ultravioleta
Vis	visible

1. Introducción

La hidrólisis de los ésteres fosfato ha llamado mucha atención en los últimos años debido a su gran importancia en los procesos biológicos.⁽¹⁾ Por ejemplo, los monoésteres fosfato son los modificadores covalentes más comunes en procesos metabólicos que incluyen la fosforilación y la defosforilación tales como la respiración, la glucólisis, la gluconeogénesis, la transmisión del impulso nervioso, etc.⁽²⁾ Por otro lado los triésteres fosfato son tóxicos en su mayoría y se han utilizado como pesticidas y armas químicas (el gas soman tiene una $DL_{50}=0.1$ mg/kg). El tratamiento de estos compuestos, sin crear otros desechos tóxicos, es muy importante para eliminar las grandes cantidades almacenadas de ellos.

Recientemente, la hidrólisis de los diésteres fosfato que forman parte de la estructura del ADN y el ARN (Fig. 1.1), ha despertado un gran interés, principalmente debido a los avances de la ingeniería genética en las últimas décadas: hoy la hidrólisis eficiente y selectiva de estos enlaces es un problema de gran importancia.

Se sabe que los diésteres fosfato son muy estables hacia la hidrólisis. Por ejemplo, el tiempo de vida media del ADN a 25°C es alrededor de 200 millones de años en tanto que para el ARN en las mismas condiciones es cercano a 100 años.⁽³⁾

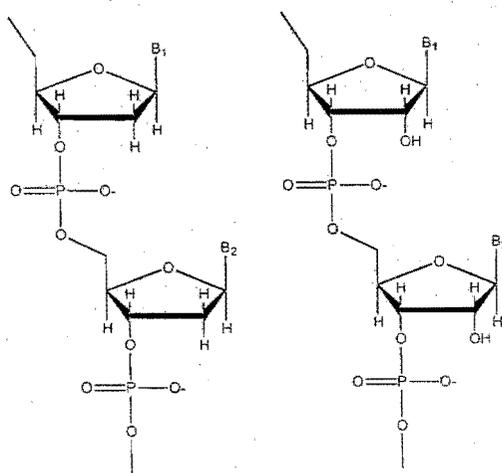


Figura 1.1 ADN y ARN. El tiempo de vida media de ARN es significativamente menor debido a la presencia del grupo 2'-hidroxi en la ribosa.

En la naturaleza, la hidrólisis de los fosfodiésteres se lleva a cabo por ciertas enzimas especiales: las fosfatasas y las nucleasas. Las nucleasas son enzimas cuyo centro activo tiene aminoácidos polares y uno o varios iones metálicos. En algunos casos el aumento de la rapidez de la reacción llega a ser hasta 10^{16} veces. La gran eficiencia de estas enzimas se debe a la perfecta cooperación entre los grupos funcionales en sus sitios activos. ⁽³⁾

Sin embargo, las enzimas de este tipo son específicas sólo para unas cuantas secuencias de nucleótidos, lo que limita su uso en ingeniería genética.

¿Qué ventajas tendría una nucleasa sintética? Se podrían hacer diversos cortes de las cadenas de ADN lo que ayudaría a los proyectos geonómicos que en la actualidad dependen de las nucleasas naturales. Se podrían reconocer y eliminar los ADN malignos, por ejemplo, los de un virus, o las secuencias responsables de diferentes tipos de cáncer. Otra aplicación sería la caracterización de las estructuras espaciales de ácidos nucleicos. Por ahora, para las caracterizaciones de este tipo se requieren las técnicas de RMN y difracción de rayos X. En el caso de RMN la técnica es muy poco sensible, por lo cual se necesitan grandes cantidades de muestra y tiempos prolongados de adquisición de datos. La difracción de rayos X utiliza muestras cristalinas y es muy difícil obtener cristales adecuados de ADN. En cambio, las nucleasas artificiales podrían ser creadas para reconocer conformaciones específicas de estas moléculas, tales como cruces, regiones de una sola cadena, espiral izquierda, etc. Finalmente, estudios en las nucleasas artificiales podrían ayudar a la mejor comprensión de los mecanismos de las hidrolasas naturales, en particular del papel que juegan en éstas los iones metálicos.

Es importante resaltar que el medio que rodea el ion metálico en los centros activos de las enzimas es polar con bajo contenido de agua. Por otra parte, la hidrólisis de los diésteres fosfato se lleva a cabo por un mecanismo concertado, ⁽⁴⁾ que es favorecido en disolventes polares apróticos, tales como DMSO o DMF. Por lo cual, utilizando un medio como DMSO acuoso, podríamos acelerar esta reacción. Además, utilizando iones metálicos en estas condiciones es probable crear un sistema que actúe de manera parecida a las enzimas hidrolíticas.

2. Antecedentes

2.1 Hidrólisis de los diésteres fosfato

2.1.1 Mecanismo general de la hidrólisis de los diésteres fosfato.

La hidrólisis de los diésteres fosfato involucra el mecanismo concertado de sustitución-eliminación, donde el intermediario formado tiene una geometría de bipirámide trigonal con los grupos entrante y saliente en las posiciones axiales. ⁽⁴⁾

Debido a la gran estabilidad de los ésteres fosfato, hay muy pocas especies capaces de llevar a cabo eficientemente el ataque nucleofílico a este sustrato.

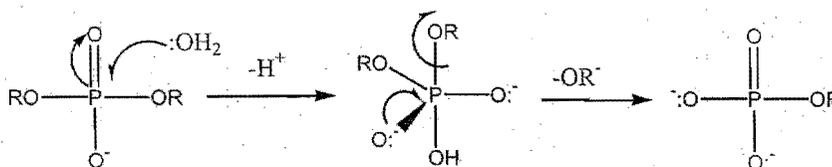


Figura 2.1 Mecanismo general de hidrólisis de un fosfodiéster ⁽⁴⁾

La hidrólisis de diésteres fosfato puede ser acelerada tanto en medio ácido como en medio básico. En medio ácido, ocurre a una catálisis específica, donde la protonación del sustrato facilita el ataque nucleofílico. En medio básico el nucleófilo es el ión hidróxido (HO⁻) en vez del agua. Este nucleófilo es muy fuerte y la rapidez de la reacción crece linealmente al aumentar la concentración de hidróxido en la disolución observándose un gran efecto catalítico.

Tabla 2.1 Velocidad de hidrólisis acuosa y alcalina y el pK_a de algunos grupos salientes para fosfodiésteres comunes.

Ester	pK_a	$k_{hyd} [s^{-1}]$, agua 100°C	$k_{hyd} [s^{-1}M^{-1}]$, [OH ⁻] 25°C	Ref.
Bis-(2,4-dinitrofenil) fosfato	4.07	1.55×10^{-4}		4
Bis-(4-cloro-2-nitrofenil) fosfato	6.36	4.08×10^{-7}		4
Bis-(4-nitrofenil)fosfato	7.15	6.3×10^{-8}	5.83×10^{-6}	4
Bis-(2-nitrofenil)fosfato	7.23	5.62×10^{-8}		4
Bis-(3-nitrofenil)fosfato	8.35	5.03×10^{-9}		4
Difenil fosfato	9.99	Muy lenta para medirse	7×10^{-6} (75° C)	6
ADN	-	$\leq 1 \times 10^{-16}$	$\approx 1 \times 10^{-12}$	7
ARN	-	2×10^{-11}		7

La velocidad de hidrólisis de los fosfodiésteres con distintos sustituyentes depende del pK_a del grupo saliente disminuyendo para los grupos mas básicos.

2.1.2 Efecto de iones metálicos.

Se han probado numerosos iones metálicos como catalizadores de la hidrólisis de diésteres fosfato. Se ha descubierto que algunos de ellos pueden poseer una actividad catalítica considerable y se han encontrado los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la catálisis^(3, 5, 7-9)

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 por disminuir el pK_a de las moléculas de agua coordinadas al metal, generando de esta manera al nucleófilo OH^- .

Al estudiar diferentes sistemas, se han propuesto varios mecanismos catalíticos posibles para los iones metálicos en medio acuoso ⁽⁵⁾ como se muestra en la Fig. 2.2. En el primer mecanismo propuesto el metal actúa como un ácido Lewis y activa el enlace del éster. En el segundo caso el metal se coordina con el grupo saliente, disminuyendo de esta manera su basicidad. En el tercero, al polarizar al agua el metal hace que disminuya su pK_a y por lo tanto se genera el nucleófilo a un menor pH. En el cuarto mecanismo, el metal se coordina con el sustrato y el nucleófilo dejando a ambos en posición *cis*, lo suficientemente cerca para que ocurra la reacción. En menor proporción, el metal coordinado al oxígeno puede participar en la catálisis ácida o básica general de la hidrólisis al participar el H_2O u OH^- coordinados respectivamente, mecanismos 5 y 6.

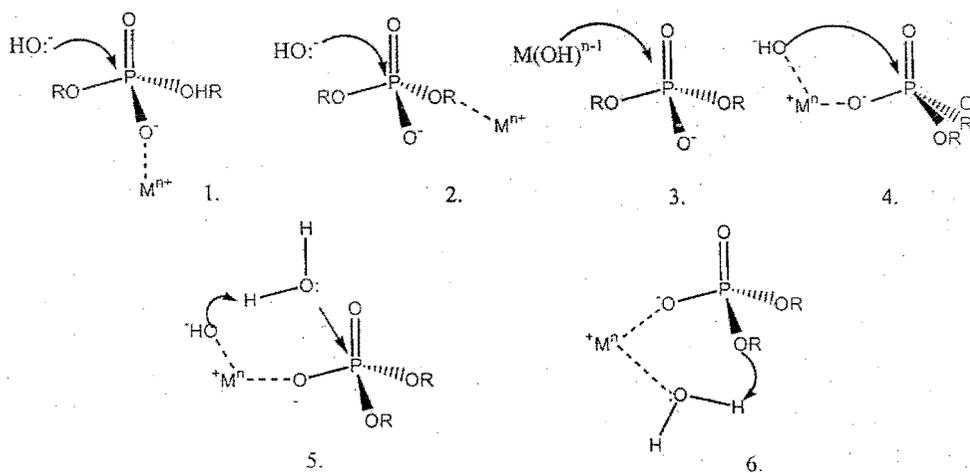


Figura 2.2 Mecanismos propuestos de la hidrólisis de diésteres fosfato con iones metálicos

Se espera que en el caso de los sistemas que incluyen dos metales, el efecto catalítico es mayor, Fig. 2.3. Los mecanismos en los cuales participan los dos iones metálicos pueden incluir una doble activación del éster por ambos ácidos de Lewis, y las combinaciones de la activación del éster por un metal con la coordinación ya sea del nucleófilo o el grupo saliente por el otro metal.

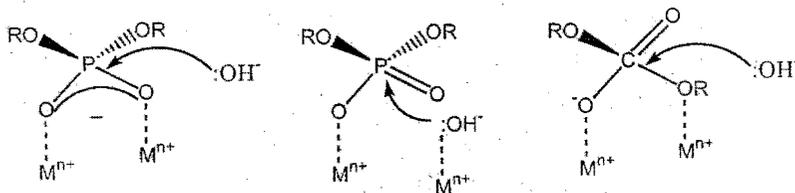


Figura 2.3 Mecanismos de hidrólisis catalítica de diésteres fosfato en presencia de dos iones metálicos

Tradicionalmente se han utilizado los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} que son ácidos de Lewis fuertes, tienen una química de coordinación bien conocida y se encuentran ampliamente distribuidos en los sistemas biológicos. También se han realizado estudios con otros metales de transición como Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{2+} , etc.⁽⁸⁾

Los iones lantánidos han mostrado la mayor actividad hidrolítica conocida hasta la fecha.⁽⁹⁾ Lamentablemente, los mecanismos de reacción que los involucran son difíciles de esclarecer debido a las dificultades para obtener complejos estables. Los metales alcalinotérreos, que son el tema del presente trabajo también se han utilizado con este propósito. Algunos trabajos se citarán más adelante.

En la mayoría de los trabajos de este tipo, los iones metálicos se encuentran coordinados a diversos ligantes. Esta coordinación puede cambiar su acidez de Lewis, estabilizarlos en disolución o permitir que se generen nucleófilos suficientemente reactivos.

Debido a que la mayoría de las enzimas hidrolíticas tienen iones metálicos en su sitio activo, los sistemas artificiales con iones metálicos que simulan el centro activo de una enzima han despertado mucho interés.

2.1.3 Mecanismo de hidrólisis en enzimas naturales.

Los diésteres fosfato son muy poco reactivos, sin embargo una célula viva necesita llevar a cabo la hidrólisis en tiempos razonables desde el punto de vista biológico. Una hidrólisis rápida es indispensable en los casos de reparación del ADN, digestión de fragmentos de ADN viejos o recibidos como alimentación, eliminación de ADN viral, etc. Todo esto es posible gracias a las enzimas hidrolíticas.

Se han aislado y descrito numerosas enzimas de este tipo; casi todas ellas contienen uno o varios iones metálicos (los más comunes son Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , y Mg^{2+} ⁽⁸⁾) rodeados por aminoácidos polares, ver tabla 2.2.

Tabla 2.2 Iones metálicos y aminoácidos presentes en los sitios activos de las nucleasas naturales.

Enzima	Metal	Grupo funcional (papel catalítico)	Ref.
Nucleasa de estafilococo	Ca^{2+}	2Arg-guanidinio (ácido) Glu-carboxilato (base)	(3)
Nucleasa SI	Zn^{2+}	Lis-amonio (ácido) Glu-carboxilato (nucleófilo)	(3)
Fosfatasa alcalina	2Zn^{2+} y Mg^{2+}	2Arg-guanidinio (ácido) Ser-alcohol (nucleofilo)	(8a)
Fosfatasa Ácida Purpura	Zn^{2+} y Fe^{3+}	His-imidazolium (ácido)	(8a)
Fosfatasa de proteína 1	Zn^{2+} y Fe^{3+}	His-imidazolium (ácido)	(3)

El mecanismo de acción de una enzima incluye una cooperación perfecta entre el metal y los ligantes. Uno de los mecanismos conocidos es el de la hidrólisis llevada a cabo por la nucleasa de estafilococo que es una enzima digestiva que no puede hidrolisar selectivamente una secuencia de nucleótidos, sin embargo, aumenta la rapidez de

hidrólisis del ADN 10^{16} veces; este es el mayor aumento catalítico conocido para este tipo de reacciones.⁽¹⁰⁾ Esta enzima tiene sólo un metal en su sitio activo, el ión Ca^{2+} . La enorme eficiencia que presenta la nucleasa de estafilococo se logra debido a la cooperación entre el ión Ca^{2+} y los aminoácidos polares del sitio activo.

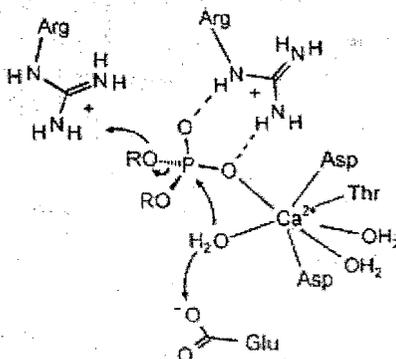


Figura 2.4 Mecanismo propuesto para reacción de Nucleasa de Estafilococo.⁽¹³⁾

Como podemos observar en la figura 2.4 hay varias interacciones simultáneas: el ion Ca^{2+} neutraliza la carga negativa del fosfato, mientras el agua coordinada al metal (en posición *cis* respecto al sustrato) actúa como nucleófilo que ataca al átomo de fósforo; los aminoácidos de la enzima que se encuentran en el sitio activo ayudan a estabilizar la geometría del estado de transición del fosfato que es una bipirámide trigonal.

En la mayoría de los sistemas artificiales se trata de simular de alguna manera el funcionamiento de una enzima. Así pues, además del sitio activo, es deseable simular su entorno protéico, polar y con bajo contenido acuoso. Una de las formas más sencillas de hacerlo es usar un medio diferente al agua, por ejemplo, disolventes polares apróticos.

2.2 Efecto del disolvente sobre la rapidez de una reacción

2. 2.1 Consideraciones generales

El disolvente puede ejercer diferentes efectos sobre las reacciones químicas. Así, las reacciones bimoleculares de sustitución o adición que incluyen aniones como reactivos a veces son mucho más rápidas en disolventes dipolares apróticos que en agua, mientras que las reacciones que implican reacomodos o disociaciones pueden ser más rápidas en agua y la velocidad de los procesos redox prácticamente no depende del disolvente empleado. ⁽¹⁾

Los disolventes dipolares apróticos son disolventes cuya constante de permitividad eléctrica (D) es mayor que 15. Además son donadores pobres de enlace de hidrógeno* y ácidos de Lewis muy débiles. Ejemplos de este tipo de disolventes son DMSO y DMF.

El cambio de disolvente afecta la energía libre de un soluto al modificar su potencial químico (μ). El potencial químico de una especie i en un disolvente dado S cambiará de acuerdo a su coeficiente de actividad, γ_i^S , que representa la diferencia de energía al transferir un compuesto de un disolvente de referencia, 0, al disolvente en cuestión, S (ecuación 2.1) a temperatura y concentración constantes

$$\mu_i^S = \mu_i^0 + RT \ln \gamma_i^S \quad (2.1)$$

El cambio de la velocidad de la reacción al cambiar el 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 de sustitución nucleofílica, la diferencia en términos de las constantes de velocidad puede expresarse mediante la ecuación 2.2.

* En esta tesis se llaman donadores de enlaces de hidrógeno a las moléculas que ceden parcialmente un protón para formar enlaces de hidrógeno. De la misma manera, los aceptores de enlace de hidrógeno son las moléculas que ceden un par electrónico al protón para formar el enlace.

$$\log k_s / k_0 = \log^0 \gamma_Y^S + \log^0 \gamma_{RX}^S - \log^0 \gamma_{YRX}^S \quad (2.2)$$

donde Y es el nucleófilo aniónico, RX el sustrato y YRX[‡] el estado de transición.

El valor de $^0\gamma_i^S$ puede medirse usando varias técnicas: cambio de potencial eléctrico durante la transferencia, cambio de solubilidad, etc. ⁽¹²⁾

Además de los datos que podemos encontrar en tablas para distintos iones (la tabla 2.3 presenta $^{\text{agua}}\gamma^{\text{DMSO}}$ para algunos cationes), el valor de $^0\gamma_i^S$ puede calcularse para estimar el posible efecto del nuevo disolvente en el cambio de velocidad de reacción a partir de varias suposiciones simples que discutiremos más adelante. Sin embargo, hay que considerar que al pasar de un disolvente al otro la geometría de una especie puede verse afectada por la estructura interna del disolvente. También hay que tener en cuenta que en las reacciones de hidrólisis, el agua, que es el disolvente, participa en la reacción y si hay un cambio por otro disolvente, se elimina uno de los reactivos. En ambos casos los cambios de rapidez de las reacciones se debe a los cambios en los mecanismos, por lo cual no pueden ser explicados simplemente en términos de cambio de $^0\gamma_i^S$.

Para predecir el efecto del disolvente sobre una reacción en particular, hay que saber cómo se ven afectados por el cambio los potenciales químicos de diferentes especies: cationes, aniones y no electrolitos. Las interacciones principales entre el soluto y el disolvente involucran entre otras, interacciones electrostáticas (por ejemplo, dipolo-dipolo), los puentes de hidrógeno, las fuerzas de dispersión y los gastos energéticos involucrados para cambiar la estructura interna del disolvente.

Las interacciones electrostáticas dependen de la permisividad eléctrica del disolvente. Las interacciones débiles dependerán de la polarizabilidad del disolvente. La posibilidad de formar puentes de hidrógeno puede ser determinada a partir de la estructura molecular del disolvente. La última propiedad, la estructura de disolvente es determinada por las interacciones entre las moléculas del disolvente y se estima a partir de la constante de Trouton (parámetro de desviación del comportamiento ideal para el cambio de presión de vapor de un líquido al aumentar la temperatura). ⁽¹⁴⁾

Tabla 2.3 Coeficientes de actividad para la transferencia de algunos iones metálicos de agua a DMSO recalculados a partir de valores de energía libre de transferencia. (Tomado de Ref. 12 para metales alcalinos y Ref. 13 para metales alcalinotérreos)

Ion	$\text{Log}^{\text{agua}} \gamma^{\text{DMSO}}_i$
Na^+	-11.80
K^+	-11.33
Li^+	-16.07
H^+	-18.02
Mg^{2+}	-5.25
Sr^{2+}	-5.65
Ba^{2+}	-10.13

2.2.2 La solvatación de no electrolitos. ⁽¹¹⁾

El disolvente de referencia más común para disoluciones de no electrolitos es el metanol. Los solutos polares que no pueden formar enlaces de hidrógeno son más solubles en disolventes polares apróticos. 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. Los donadores de enlace de hidrogeno son más solubles en disolventes básicos

Para solutos grandes la estructura interna del disolvente tiene una gran importancia. Así, para la solvatación de xenón en agua o en DMSO puros, la diferencia observada en los coeficientes de actividad es muy pequeña a pesar de que el agua es un disolvente prótico que funciona como donador y aceptor enlace de hidrógeno y el DMSO es un disolvente aprótico muy básico. Sin embargo, los mecanismos de solvatación son diferentes.

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 2.3):

$$\log^0 \gamma_A^S = \log(S^0 / S^S) \quad (2.3)$$

2.2.3 La solvatación de electrolitos. ⁽¹¹⁾

Para los iones esféricos en disolventes polares es válida la ecuación de Born, ecuación 2.5. ⁽¹⁵⁾

$$\log^0 \gamma_i^S = \frac{NZ_i^2 e^2}{4.606RT\epsilon_s} \left(\frac{1}{\epsilon_s} - \frac{1}{\epsilon_0} \right) \quad (2.5)$$

en donde N es el numero de partículas, Z es la carga de la partícula, e es la carga del electrón, R la constante de gases, T la temperatura en K, r el tamaño iónico y ϵ_i son las permisividades eléctricas del disolvente problema y del disolvente de referencia respectivamente.

En el caso de los electrolitos es imposible determinar la actividad de cada ion por separado ya que siempre está presente el contraión correspondiente. Normalmente en estos casos se pueden utilizar varias suposiciones extratermodinámicas ⁽¹¹⁾ que pueden ser muy útiles para estimar el cambio de coeficiente de actividad. Las suposiciones extratermodinámicas 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 ión. La interacción electrostática es pequeña y depende sólo de la constante dieléctrica del disolvente. La actividad del disolvente para el catión y el anión es la misma.
- ❖ Para un ion grande con carga dispersa el coeficiente de actividad para dos 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 estos no pueden ser medidos directamente. Así, el estado de transición de una reacción puede ser representado como un ion grande con carga dispersa y ser tratado de manera similar.

En los disolventes próticos, los aniones pequeños que no tienen sustituyentes atrayentes de electrones son aceptores de enlace de hidrógeno muy fuertes, por lo cual, están más solvatados. Por otro lado, los aniones grandes con carga dispersa (como podemos considerar al estado de transición YRX^{\ddagger}) son aceptores débiles lo que disminuye su solvatación en estos disolventes.

Los disolventes dipolares apróticos son mucho más polarizables que los disolventes próticos, por lo cual los aniones polarizables pueden estar más solvatados en estos disolventes. Esto es aplicable a muchos estados de transición aniónicos. Los aniones pequeños se desestabilizan en disolventes dipolares apróticos.

Los aniones grandes 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 de energía extra necesario para romper la estructura del disolvente y orientarlo de manera diferente alrededor de las moléculas del soluto.

Los aniones grandes y polarizables pueden ser solvatados más eficientemente en disolventes dipolares, sin embargo, en los disolventes con gran estructura intermolecular se desestabilizan aún más.

Los cationes en general son más pequeños y menos polarizables que los aniones y no pueden ser aceptores de enlaces 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 próticos. Mientras más grandes son los cationes, están menos solvatados en disolventes con estructura interna.

2.2.. Solvatación de estado de transición.

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.

Si consideramos la sustitución nucleofílica sobre el C, tenemos una reacción parecida a la presentada en la figura 2.1. La sustitución puede ocurrir como una reacción S_N2 donde la formación y la ruptura de los enlaces en el estado de transición ocurren simultáneamente, o como una reacción S_N1 , donde primero ocurre la ruptura. Sin embargo, en la práctica son pocas las reacciones que coinciden con estos casos límite. En realidad las reacciones de sustitución nucleofílica pueden presentar geometrías intermedias entre S_N2 y S_N1 dependiendo de las distancias entre el sustrato, grupo entrante y grupo saliente (Fig 2.5).

Si la formación y la ruptura de enlace son simultáneas el estado de transición es tenso como en A (más S_N2); si la ruptura ocurre antes es relajado como en el C (más S_N1). Debido a su posición relativa en la coordenada de reacción el mecanismo puede ser más tenso o más relajado. El reactivo aniónico tendrá una densidad de carga mayor en el estado relajado, es decir, cuando la carga está menos dispersa por toda la estructura. Lógicamente, en el caso límite este estado corresponde al ataque del nucleófilo al ion ya formado, o un mecanismo S_N1 .

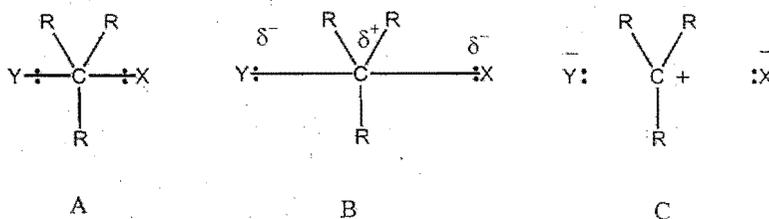


Figura 2.5. Tres posibles tipos de mecanismo de reacción de sustitución nucleofílica

Algunos factores que cambian el estado de transición volviéndolo más relajado son: las interacciones estéricas negativas entre los grupos saliente y entrante, el impedimento estérico por parte del grupo sustituyente R, la presencia de grupos electrodonadores, y la presencia de carga negativa localizada sobre los grupos saliente y entrante. El valor positivo de $\delta \log^0 \gamma_{\neq}^S$ (Eq. 2.2) 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 rapidez de la reacción al cambiar de un disolvente prótico a un 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. Sin embargo, mientras más relajado es el estado de transición, menor es el efecto del disolvente siendo casi nulo o negativo para las reacciones S_N1 .

Si en el estado de transición primero ocurre la formación del enlace y después su ruptura, tenemos el caso del mecanismo de adición-eliminación. En este caso el efecto del disolvente va a depender de la forma y tamaño de estado de transición formado. El efecto disminuye para moléculas pequeñas y con carga localizada. Por ejemplo, las reacciones de sustitución aromática son mucho más susceptibles al cambio de disolvente que las reacciones de sustitución en ésteres, donde la carga negativa se localiza en el átomo de oxígeno. Se esperaría que la tendencia fuera la misma para ésteres fosfato.

2.2.5 Efecto general del disolvente sobre velocidad de reacción.

El efecto de aceleración en las reacciones llevadas a cabo en disolventes dipolares apróticos se atribuye principalmente a que todos los reactivos aniónicos están mucho

menos solvatados por disolventes dipolares apróticos que por disolventes próticos lo que aumenta la energía de los reactivos y de esta manera disminuye la energía de activación (Fig. 2.6). Otro efecto favorable pero de menor contribución, es la buena solvatación de los estados de transición grandes y polarizables en disolventes dipolares apróticos.

En el caso de un estado de transición sin carga, el efecto del disolvente es más notable, debido a que las moléculas grandes, neutras y polarizables que se forman se solvatan con mayor facilidad en disolventes apróticos.⁽¹¹⁾

Cuando se tienen reacciones entre moléculas polares sin carga, donde el estado de transición tampoco posee carga, el efecto del disolvente es insignificante. Además, si el grupo entrante es lo suficientemente voluminoso en comparación con el compuesto que sufre el ataque, el efecto de solvatación prácticamente es imperceptible. Sin embargo puede observarse la aceleración cuando el estado de transición es un donador fuerte de enlaces de hidrógeno. Esto haría que estuviera más solvatado en disolventes muy básicos como DMF o DMSO.⁽¹⁹⁾

En el caso de reacciones donde el reactivo y el estado de transición son especies catiónicas, se observa un aumento de velocidad muy pequeño ya que aunque la solvatación de un estado de transición grande, polarizable, y donador de enlaces de hidrógeno por disolventes dipolares apróticos es fuerte, también lo es la solvatación de los reactivos; finalmente, ambas contribuciones se contrarrestan.

Cuando la reacción ocurre entre dos aniones y el estado de transición es un dianión, que se solvata mucho mejor en disolventes próticos, los disolventes polares apróticos aumentan la velocidad de estas reacciones en mucho menor grado que en las reacciones donde participan un anión y una molécula polar neutra.

Como podemos ver, el cambio de solvatación de un estado de transición puede modificar significativamente la velocidad de la reacción. Así, estimarlo para los compuestos participantes en una reacción puede ayudar a predecir el cambio de las velocidades de la reacción.⁽¹¹⁾

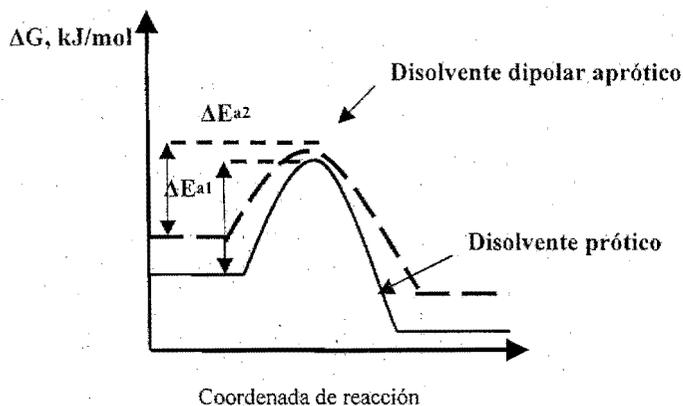


Figura 2.6 Representación esquemática del efecto de un disolvente polar aprótico cuando la reacción ocurre entre un anión y una molécula polar. La desestabilización de reactivos disminuye el valor total de ΔE_a del sistema.

A veces, en vez de disolventes puros se utilizan mezclas de disolventes. En el caso de las mezclas de un disolvente dipolar aprótico con agua, en concentraciones grandes de disolvente se forma un aducto capaz de solvatar mejor los estados de transición aniónicos y aumentar aun más la velocidad de la reacción. Se esperaría que la esfera de solvatación para aniones esté constituida de varias moléculas de ambos disolventes- el prótico y el aprótico.⁽¹²⁾

Para los disolventes polares de baja permitividad eléctrica ($0 < \epsilon < 30$) es válida la suposición de que los iones no se disocian por completo, por lo cual, en las reacciones participan como pares iónicos.

Una propuesta empírica del efecto de mezclas de dos disolventes sobre la velocidad de reacción está basada en el hecho de que el cambio de las concentraciones relativas de disolventes modifica la constante dieléctrica.⁽¹⁶⁾ La ecuación se aplica no sólo a mezclas de disolventes, sino también puede describir el efecto general de la fuerza iónica en cualquier medio, ecuación 2.6.^(16b)

$$\ln k = \ln k_0 + A \ln(c/c^* + 1) \quad (2.6)$$

donde k_0 es la velocidad de reacción en el disolvente de referencia y A y c^* son parámetros empíricos.

2.3. Caso particular, mezclas de DMSO y agua.

2.3.1 Propiedades de mezclas DMSO – agua.

El dimetilsulfóxido (DMSO) y sus mezclas con agua se han estudiado ampliamente, debido a la variedad de aplicaciones de este disolvente en la industria, medicina, síntesis química, etc. El DMSO es un buen disolvente para muchos compuestos; como su toxicidad es relativamente baja frecuentemente se utiliza en farmacología para disolver las medicinas que no son solubles en agua.

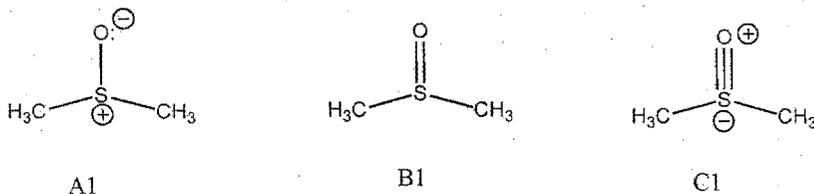


Figura 2.7. Estructuras posibles de la molécula de DMSO

El DMSO es un disolvente dipolar aprótico. Se puede representar por tres estructuras resonantes, de las cuales predomina la estructura A1.⁽¹⁷⁾ Esto convierte al disolvente en un buen aceptor de enlaces de hidrógeno y en una base muy fuerte en términos de Lewis.

El disolvente puro posee una estructura intermolecular bien definida. El DMSO puede formar cadenas largas por los enlaces que se forman entre el azufre y el oxígeno de sus moléculas. Este efecto desaparece al cambiar la temperatura o agregar disolventes donadores de protones.

El agua, al igual que el DMSO es un disolvente polar pero puede donar y aceptar protones. Debido a estas propiedades, estos disolventes interactúan fuertemente entre sí,

formando enlaces entre el oxígeno del DMSO y los protones del agua. El resultado es la formación de cumulos moleculares cuando la relación de DMSO:agua en la mezcla tiende a ser 1:2. A concentraciones de DMSO más elevadas ($X_w < 0.19$) se espera la formación de especies $(\text{DMSO})_2\text{H}_2\text{O}$. Las propiedades fisicoquímicas de estos disolventes, tales como presión de vapor, tensión superficial, viscosidad y entalpía de mezclado cambian de manera no lineal cuando la proporción de los disolventes en la mezcla es cercana a esta relación.⁽¹⁸⁾

Las propiedades macroscópicas de las mezclas muestran una correlación con la acidez, la basicidad y la polaridad del medio (ecuación 2.7).

$$P(\text{propiedad macroscópica}) = SP (\text{polaridad}) + SA (\text{acidez}) + SB (\text{basicidad}) + P_0 \quad (2.7)$$

La acidez, basicidad y polaridad de un disolvente se miden por la absorbancia de pares homomorfos (dos especies que intercambian una partícula de interés (protón o electrón)). Actualmente existen varias escalas diferentes dependiendo de los compuestos utilizados. La escala que utilizamos para análisis de algunos de los resultados obtenidos es la informada por Catalán⁽¹⁸⁾ y utilizada por él para analizar mezclas de DMSO y agua.

La basicidad de mezclas de DMSO con agua es mayor que el valor esperado si el comportamiento de la mezcla fuera ideal, mientras que la acidez siempre es menor que este valor. En cambio, la polaridad es menor que la del comportamiento ideal a bajas concentraciones de agua ($X_w < 0.4$) y crece al aumentar el porcentaje de DMSO (Fig. 2.8).

El nucleófilo que utilizamos en los experimentos es el ion OH^- cuya energía libre cambia al transferirlo a las mezclas con diferentes concentraciones de DMSO, lo que puede afectar la velocidad de reacción (Tabla 2.4). No se encontraron en la literatura valores de energía de transferencia elevadas de DMSO debido a las dificultades experimentales de las mediciones potenciométricas a altas concentraciones del disolvente.

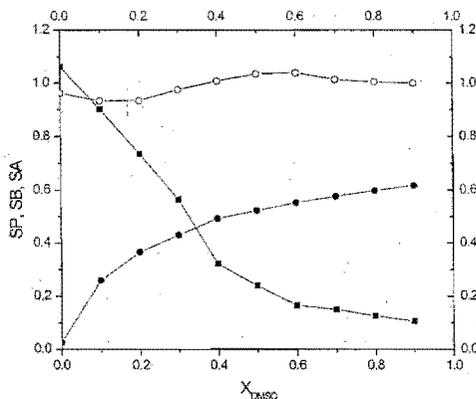


Figura 2.8. Cambio de acidez (cuadros negros), basicidad (círculos negros) y polaridad (círculos abiertos) del medio de la reacción al variar cantidad de DMSO. ⁽¹⁸⁾

Tabla 2.4. Energía libre de transferencia de H^+ y OH^- a mezclas DMSO/agua ($25^\circ C$ / $kcal\ mol^{-1}$). ⁽¹⁹⁾

% peso de DMSO	Fracción mol H_2O	$\Delta G^0_{tr}(H^+)$	$\Delta G^0_{tr}(OH^-)$
20	0.94	-0.21	1.2
40	0.86	-1.69	3.2
60	0.74	-3.52	6.2
80	0.53	-6.20	10.2

2.3.2 Efecto de DMSO en las reacciones de hidrólisis de ésteres.

Se ha observado que la hidrólisis de los ésteres de ácidos carboxílicos transcurre más rápido en mezclas de agua con DMSO que en medio puramente acuoso. Este efecto es mayor para los ésteres aromáticos que para los alifáticos. ⁽¹⁹⁾

La etapa que determina la velocidad de la reacción es la formación de un intermediario tetraédrico. Lo más importante para la aceleración de la reacción de

hidrólisis alcalina es la desestabilización del ión hidróxido, un anión pequeño con carga localizada (duro en términos de Pearson). La aceleración de la reacción puede ser analizada usando la ecuación (2.2): la solvatación del sustrato no tiene gran influencia sobre la aceleración; la solvatación del estado de transición para los ésteres aromáticos es mayor que para los alifáticos debido a una mayor dispersión de carga en estas moléculas.

La transferencia a DMSO afecta la constante de autoionización de agua y todas las reacciones de transferencia de protón. El pK_a de los ácidos aumenta linealmente al crecer la proporción de DMSO en la mezcla y este aumento tiene una pendiente mayor para ácidos más débiles. Sin embargo este comportamiento no es general y hay casos para los que se observan funciones no lineales.⁽¹⁹⁾

Hay pocos estudios del efecto del medio sobre la rapidez de la reacción para las reacciones de hidrólisis de los ésteres fosfato. Varios de estos trabajos han sido hechos por Hengge y su grupo; estudian la hidrólisis de monoésteres de fósforo⁽²⁰⁾ con base en investigaciones previas hechas por Kirby,⁽²¹⁾ quien informó que la rapidez de la hidrólisis del dianión de *p*-nitrofenilfosfato (NPP) aumentó hasta 10^6 veces al pasar de un medio acuoso a una mezcla acuosa con 95% de DMSO, mientras que es prácticamente cero para su monoanión. Las razones principales por las que se le atribuye esta aceleración son la desestabilización de los reactivos y el alargamiento del enlace P-O con el fin de dispersar la carga, lo que debilita mucho este enlace. Para los sustratos con un grupo saliente más básico que el fenolato (el valor de pK_a del fenol en agua es de 9.95 y en el artículo no se mencionan los valores en las mezclas de DMSO-agua) el efecto del medio fue insignificante. Ambos autores enfatizan la posible semejanza de los mecanismos propuestos con los de las nucleasas en sistemas biológicos.

Prácticamente no hay datos del efecto del disolvente en presencia de iones metálicos a pesar de que se utilizan con frecuencia mezclas de disolventes, como DMSO con agua, para disolver ligantes sintéticos. Además no existe en la literatura ningún intento de interpretar estos datos en función de la cantidad de disolvente empleado.

Hay un estudio con pocos detalles que informa una ligera disminución de la velocidad de la reacción de hidrólisis de fosfodiésteres en mezclas acuosas con 40 % de DMSO v/v en presencia de iones Eu(III).⁽²²⁾

Recientemente se publicó un estudio de la reactividad nucleofílica del ión etóxido en etanol empleando como sustrato *p*-nitrofenilfosfonato y el efecto catalítico de metales alcalinos.⁽²³⁾ En este caso se informa la participación simultánea de varios iones metálicos (3 en el caso de K^+ , 4 en el caso de Na^+ y 5 en el caso de Li^+).

2.4 Efecto de los metales alcalinotérreos sobre la hidrólisis de ésteres fosfato.

A pesar de que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} son metales alcalinotérreos con importancia biológica, no se han realizado muchos estudios de la actividad hidrolítica de esta familia de cationes.

Los metales alcalinotérreos tienen un sólo estado de oxidación, son relativamente grandes y tienen una configuración electrónica de capa cerrada. Se ha propuesto de datos de RMN que el número de coordinación para Ba^{2+} , Sr^{2+} y, probablemente Ca^{2+} es 8, sin embargo, al pasar al DMSO cambia a 6.⁽¹³⁾

Entre las razones por las que estos metales no han generado un gran interés como catalizadores de reacciones de hidrólisis en sistemas artificiales, están su poca capacidad de formar enlaces de coordinación con diferentes ligantes, (lo que hace prácticamente imposible la modificación de la velocidad de la reacción con distintos ligantes), y la baja solubilidad de sus hidróxidos.

2.4.1 El ion Mg^{2+}

Se ha observado que la adición de Mg^{2+} al medio de reacción causa que la velocidad de la reacción disminuya o, en el mejor de los casos, tenga un ligero aumento. Así, por ejemplo, la rapidez de hidrólisis del monoéster NPP a 39.2°C, fuerza iónica 1.0 M KCl y pH 9.1 disminuye un poco (de $1.7 \times 10^{-8} M^{-1} s^{-1}$ a 1.4×10^{-8}) en presencia de 0.33 M de Mg^{2+} , mientras que la hidrólisis de 2,4-dinitrofenilfosfato a pH 8 y a las mismas condiciones, decae gradualmente al aumentar la concentración de Mg^{2+} . Su constante de velocidad de segundo orden es menor a $2 \times 10^{-5} M^{-1} s^{-1}$ con 0.33 M de Mg^{2+} , mientras que en ausencia de magnesio, la constante de segundo orden es de $1.9 \times 10^{-4} M^{-1} s^{-1}$ para la misma reacción.⁽²⁴⁾

La actividad catalítica de Mg^{2+} y otros iones alcalinotérreos se ha observado en los estudios de hidrólisis de ARN realizados por M. Komiyama y su grupo ⁽²⁵⁾ en medio acuoso (50 °C, pH 7.3 con buffer HEPES, concentración de nucleótidos 0.1 mM, concentración de metal 0.1-1.0 M ($MgCl_2$)). Los autores indican que con Mg^{2+} hay una aceleración de la reacción y para Sr^{2+} y Ba^{2+} prácticamente no se observa catálisis. El efecto con Ca^{2+} es diferente ya que de forma simultánea ocurren ataques a sitios diferentes en los nucleótidos. La reacción con metales alcalinotérreos es de primer orden con respecto al metal, a diferencia de lo reportado con Na^+ en etanol donde el orden respecto al metal es muy alto (*vide supra*). Se propone, a partir de estudios de RMN, que la reacción se lleva a cabo por la cooperación entre dos iones Mg^{2+} . Valé la pena mencionar, que al ajustar la fuerza iónica con NaCl reportan una competencia por el sustrato entre los iones Na^+ y Mg^{2+} , ya que la velocidad de hidrólisis decae en presencia de iones sodio.

Además de esto, observaron que los iones Mg^{2+} en presencia de oligonucleótidos prediseñados para reconocer al sustrato, ARN, promueven su catálisis eficientemente. En este caso, las secuencias sintéticas activan el enlace P-O al ser hidrolizado y el metal funciona como proveedor del nucleófilo para hacer un corte específico. ⁽²⁶⁾

En un modelo del sitio activo de la fosfatasa alcalina simulado por ATP unido a un complejo de cobalto, que promueve la hidrólisis intramolecular de ATP en medio acuoso, existe un aumento de la velocidad de reacción de hidrólisis hasta 3000 veces a pH 9.97 en presencia de iones Mg^{2+} . En este caso se propone un mecanismo cooperativo entre dos metales diferentes – Co(II) presente en el complejo y Mg^{2+} presente en la disolución como $MgCl_2$ (25 °C, fuerza iónica 1.0 KCl, concentración de Mg 0.33 M). ⁽²⁷⁾

2.4.2 El ion Ca^{2+}

A pesar de que los iones Ca^{2+} forman parte del sitio activo de la nucleasa de estafilococo, una de las enzimas más eficientes, no hay muchos estudios donde se haya probado su actividad fosfoesterolítica. Algunos de ellos señalan que el hidróxido de calcio podría poseer cierta actividad esterolítica, sin embargo, los resultados son solamente cualitativos y no muy recientes (1953). ⁽²⁸⁾

Al igual que para el Mg^{2+} , se ha probado la actividad del Ca^{2+} con monoésteres de *p*-nitrofenilfosfato, y 2,4-dinitrofenil fosfato. A diferencia del Mg^{2+} , que funciona como inhibidor, el Ca^{2+} acelera ligeramente la rapidez de la reacción.⁽²⁴⁾

2.4.3 Los iones Sr^{2+} y Ba^{2+}

Sr^{2+} y Ba^{2+} no son metales de importancia biológica, por lo cual el interés en ellos ha sido aún menor que para calcio y magnesio. Sin embargo se ha informado la actividad del hidróxido de bario en la hidrólisis de diésteres fosfato es un estudio solo cualitativo donde no se midieron las constantes de rapidez de las reacciones.⁽²⁹⁾

Recientemente, se ha descubierto que complejos de Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} y Zn^{2+} y Sr^{2+} juntos, con el ligante CRTPA presentado en la figura 2.12, pueden ser dinucleares y poseen una gran actividad hacia la hidrólisis de bis-*p*-nitrofenilfosfato.⁽³⁰⁾ A pH 8.5, 50° C y 20 % de DMSO en agua la rapidez de la hidrólisis de BNPP aumenta 1120 veces para $[ZnSr(CRTPA)]^{4+}$, 2800 veces para $[ZnBa(CRTPA)]^{4+}$ a pH 9.3 y 1050 veces para $[ZnCa(CRTPA)]^{4+}$. En ausencia del segundo ión metálico, el aumento de la rapidez de la reacción fue mucho menor: sólo 150 veces para $[Ba(CRTPA)]^{2+}$.

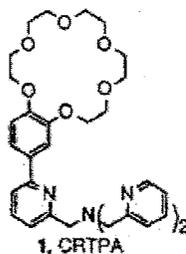


Figura 2.12. El ligante CRTPA con dos sitios de coordinación.

Como podemos ver, la información sobre la actividad catalítica de los iones de los metales alcalinotérreos es sumamente escasa, por lo cual, es importante un estudio más profundo.

3. Objetivos.

Es importante elucidar el papel de los iones de los metales alcalinotérreos en la hidrólisis de los diésteres fosfato con el fin de buscar una explicación plausible de su capacidad para servir como cofactores en los sitios activos de las enzimas hidrolíticas.

Objetivo General

Estudiar el efecto catalítico de metales alcalinotérreos en la hidrólisis básica de fosfodiésteres en agua y en medios con características similares al sitio activo de una enzima.

Encontrar las condiciones óptimas y caracterizar las especies responsables del cambio de reactividad en estos sistemas.

Objetivos Particulares

1. Estudiar el efecto catalítico de los iones de metales alcalinotérreos en la hidrólisis básica acuosa de diésteres fosfato.
2. Estudiar el efecto del disolvente en la rapidez de la reacción de hidrólisis alcalina de diésteres fosfato.
3. Estudiar el efecto catalítico de los metales alcalinotérreos en la hidrólisis en un disolvente dipolar aprótico con bajo contenido de agua.
4. Identificar las especies activas responsables de la catálisis en cada caso.

4. Procedimiento experimental

4.1 Sustancias empleadas

Sustrato

Se empleó como sustrato el fosfodiéster bis-*p*-nitrofenil fosfato (de aquí en adelante, BNPP), que es un sustrato ampliamente empleado para estudios de hidrólisis de fosfodiésteres. Su hidrólisis es irreversible y da como producto nitrofenol. Este último es fácilmente detectable debido a que su anión nitrofenolato tiene una banda característica en la región visible del espectro de absorción en 400 nm.

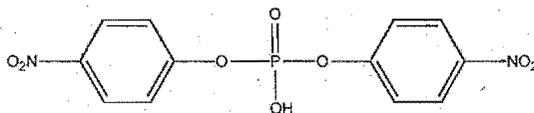


Figura 4.1 bis-*p*-nitrofenilfosfato. Peso fórmula 340.18 g/mol, pK_a 1.04. Apariencia física: polvo blanco. El diéster fue comprado de Aldrich, pureza 99%, y se recristalizó de agua en medio ácido.

Sales inorgánicas

Se emplearon cloruros de los metales alcalinotérreos. Las disoluciones de las sales de los cationes metálicos empleados fueron preparadas y valoradas por métodos estándares: con EDTA en el caso de Ca^{2+} y Mg^{2+} y gravimétricamente como MSO_4 para Sr^{2+} y Ba^{2+} .⁽³¹⁾

- $MgCl_2$, pureza 97.5 % (las impurezas son principalmente agua), Strem Chemicals
- $CaCl_2$, pureza, 99.9 %, Aldrich
- $BaCl_2 \cdot 2H_2O$, pureza 100.1 % (determinada por titulación con EDTA), Baker Analyzed
- $SrCl_2 \cdot 6H_2O$, pureza 98 %, Aldrich.

Disolventes

En todos los experimentos se utilizó agua destilada y desionizada con una resistividad de $18.2 \pm 0.1 \text{ M}\Omega\text{cm}$ obtenida mediante un sistema Barnstead Nanopure®.

El DMSO utilizado fue Aldrich 99.9 % de pureza, sin ningún tratamiento previo.

Reactivos adicionales

- Disolución de NaOH Aldrich certificada 1.0 M y disolución de NaOH preparada del reactivo sólido Aldrich 99.99%.
- Disolución de HCl Aldrich certificada 1.0 M
- EDTA, sal disódica, Aldrich 99.99%
- Zn metálico Aldrich 99.998%
- Bifalato de Potasio, Aldrich 99.9%

Todos empleados sin tratamiento adicional.

4.2 Equipo

Las mediciones de volumen se realizaron con micropipetas Eppendorf Research serie 2000 con volúmenes variables. Las mediciones de pH se hicieron con un potenciómetro digital Orion Model 710-A, utilizando un electrodo de vidrio Orion ROSS®. Para calibrar el potenciómetro se usaron amortiguadores de referencia frescos a 25°C, pH 4.00, 7.00 y 10.00 (Aldrich, precisión de ± 0.01). Durante los experimentos se mantuvo constante la temperatura utilizando un baño de recirculación de agua marca Fischer Scientifics Isotemp 1016S ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). Las mediciones espectrofotométricas en el ultravioleta y el visible se hicieron en los espectrofotómetros Hewlett Packard HP8453 de

arreglo de diodos e UNICAM UV 500 de doble haz, ambos con compartimentos termostatados $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

4.3 Estudio cinético

El transcurso de todas las reacciones de hidrólisis con BNPP (Figura 4.2) se siguió espectrofotométricamente midiendo la aparición del anión 4-nitrofenolato.

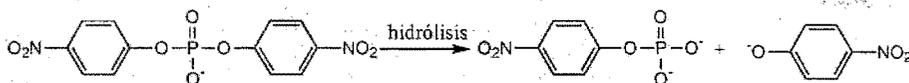


Figura 4.2 Reacción general observada de hidrólisis de BNPP

Se emplearon disoluciones patrón recién preparadas de BNPP. Todas las disoluciones patrón se mantuvieron selladas y en refrigeración por periodos de no más de 2 semanas para evitar su descomposición. Para las mediciones cinéticas se empleó el intervalo de concentración del sustrato de 2×10^{-5} a 1×10^{-4} M.

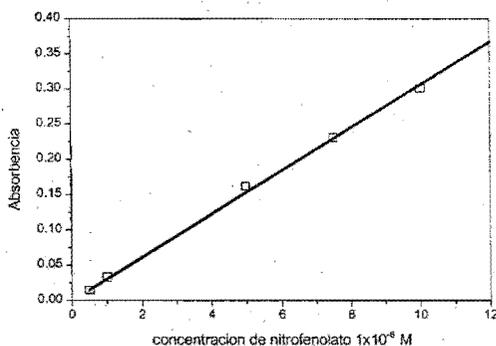


Figura 4. Curva de calibración para la determinación de nitrofenolato en una mezcla DMSO 90 % v/v, $\epsilon=30500$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Al trabajar en mezclas de DMSO-agua, se observó que la intensidad de las bandas para este anión y su posición varían al aumentar la concentración de DMSO (Fig. 4.4).

El anión 4-nitrofenolato, como ya se había mencionado, es un anión intensamente colorido; su cuantificación mediante espectrofotometría UV-visible es sencilla y permite detectarlo en cantidades micromolares, con siguientes parámetros λ_{\max} es 400 nm (H₂O 100%) y 425 nm (DMSO 90 % v/v), ϵ_{400} es 18,000 M⁻¹cm⁻¹ (H₂O 100%), ϵ_{425} es 30,500 M⁻¹cm⁻¹ (DMSO 90 % v/v)

La cantidad de nitrofenolato producida por la hidrólisis en las mezclas de 90% DMSO v/v, se cuantificó mediante una curva de calibración en este medio, el cual fue el más empleado para el estudio cinético (ver Fig. 4.3). La curva es lineal en todo el intervalo estudiado y el coeficiente de extinción molar es de ϵ_{425} 30,500 M⁻¹cm⁻¹

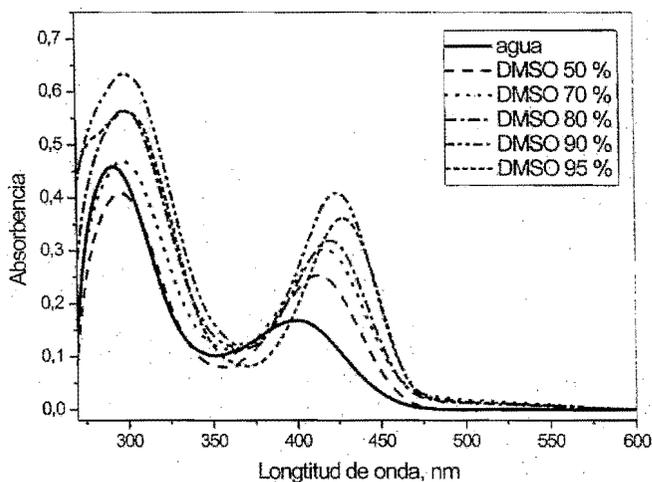


Figura 4.4 Espectro de absorción de nitrofenolato 1×10^{-5} M a diferentes concentraciones de DMSO.

Como se ve en la Fig.4.5, el máximo se desplaza desde 400 nm en agua, hasta 425 nm en 90% DMSO. El coeficiente de absortividad molar se incrementa casi al doble: ϵ_{400} 18,000 M⁻¹cm⁻¹ en agua y ϵ_{425} 30,500 M⁻¹cm⁻¹ en 90% DMSO. Esto se debe probablemente a cambios en la solvatación del anión.

En los casos de reacciones con porcentajes de DMSO variables se hicieron adiciones estándar de nitrofenol al final de cada reacción.

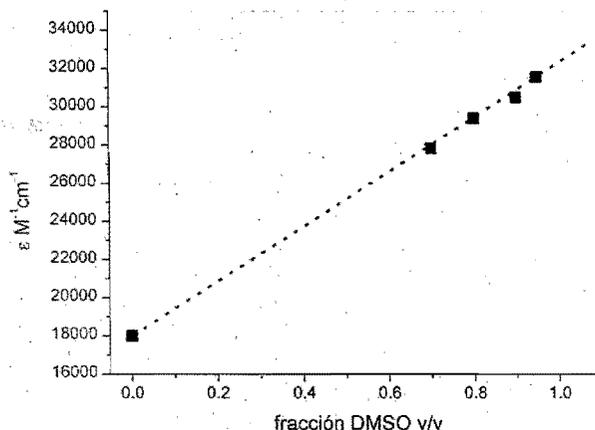


Figura 4.5 Cambio de la absorción molar de nitrofenolato al aumentar la concentración de DMSO en el máximo de adsorción para cada caso.

Durante la cinética de hidrólisis del BNPP se observó la liberación de un equivalente de 4-nitrofenolato por mol de sustrato. Cuando la reacción es muy lenta y durante el experimento se libera menos del 10 % del producto esperado, es razonable suponer que la concentración de reactivo es constante y calcular la velocidad de reacción con un ajuste lineal (ecuación 4.1, velocidad inicial)

$$A = \epsilon_p \times k_{obs} \times [BNPP]_0 \times t \quad (4.1)$$

donde A es la absorbencia registrada, ϵ_p es la absorción molar de nitrofenolato y k_{obs} la constante de velocidad observada.

Cuando se observa una saturación en el crecimiento de absorbencia de la muestra se puede emplear la ecuación 4.2, que corresponde a la reacción de primer orden con respecto al sustrato.

$$A = A_{inf}(1 - e^{-k_1 t}) + A_0 \quad (4.2)$$

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

Sin embargo en algunos casos los perfiles de absorbancia en función del tiempo mostraron una desviación notable de una cinética de primer orden cuando la velocidad de hidrólisis del intermediario, *p*-nitrofenilfosfato, fue más rápida. Estas curvas se ajustaron a una ecuación exponencial derivada del esquema de dos etapas sucesivas de hidrólisis de primer orden (ecuación 4.3): la hidrólisis de BNPP a *p*-nitrofenilfosfato y la posterior hidrólisis de este a fosfato con la liberación de un equivalente de 4-nitrofenolato en cada etapa.

$$A = A_{inf} \left\{ 2 + \frac{(k_1 e^{-k_2 t} + (k_1 - 2k_2) e^{-k_1 t})}{k_2 - k_1} \right\} \quad (4.3)$$

donde k_1 y k_2 son las constantes de velocidad observadas de la ruptura de BNPP y MNPP respectivamente. La derivación de cada expresión se presenta en el apéndice 2. Los ejemplos de cada curva cinética con su respectivo ajuste son presentados en la figura 4.6

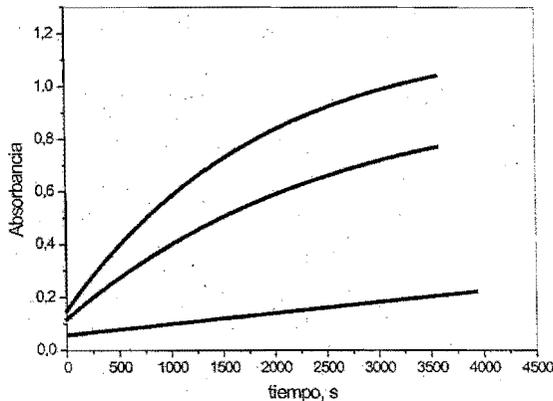


Figura 4.6 Ejemplo de los tres posibles ajustes en la hidrólisis de 2×10^{-5} M de BNPP en presencia de Sr^{2+} 1.5 mM y diferentes concentraciones de NaOH en DMSO 90 % v/v.

La reacción de hidrólisis de BNPP en agua es extremadamente lenta aún a temperaturas elevadas, por lo que no es práctico observarla midiendo el cambio de la absorbencia directamente en una celda en función del tiempo: el cambio es muy pequeño y se requieren celdas selladas para evitar la evaporación del disolvente. Para obtener curvas cinéticas se prepararon muestras de 10 mL que contenían las cantidades necesarias del sustrato (1×10^{-4} M), hidróxido de sodio y sales metálicas. De cada disolución se obtuvieron 6 muestras de 1.5 mL. Estas muestras se colocaron en tubos de plástico herméticos (viales Eppendorf), y los viales se incubaron simultáneamente en un baño de agua a 70° C, en una canastilla diseñada especialmente para garantizar la inmersión total de la disolución. A intervalos de tiempo determinados, se detuvo la reacción de hidrólisis en cada uno de los viales, colocándolos en una mezcla hielo-agua y se analizó la cantidad del producto formado a ese tiempo. Para ello, se tomaron espectros UV-Vis de las alícuotas de 1 mL.

Las alícuotas fueron llevadas a un volumen final de 3 mL con agua destilada y desionizada. La cantidad de nitrofenol se cuantificó a 400 nm. En algunos casos, las disoluciones que contenían sales metálicas en alta concentración en presencia de OH^{-} podían formar hidróxidos insolubles por lo cual su preparación requería de mucho cuidado para evitar la formación de precipitado.

En el caso de las reacciones de hidrólisis en DMSO, las disoluciones se prepararon combinando, directamente en la celda, las cantidades apropiadas de DMSO, agua y las disoluciones de hidróxidos y sales metálicas; adicionando el sustrato como último componente para iniciar las reacciones. El volumen final de cada disolución fue de 3000 μL . Para evitar la evaporación del disolvente y prevenir la formación de carbonatos en el transcurso de la reacción, las celdas se sellaron con tapones de polietileno. Las curvas cinéticas se obtuvieron tomando espectros de las muestras a intervalos de tiempo regulares, manteniendo el sistema a temperatura constante.

4.3 Estudio potenciométrico

Todas las titulaciones se realizaron en mezclas de DMSO-agua a 25°C , siguiendo las recomendaciones generales para titulaciones potenciométricas. El volumen inicial de

las disoluciones a titular fue de 30.0 mL, 90% DMSO v/v en todos los casos, y el volumen final variaba. Para evitar cambios de concentración de DMSO las titulaciones se realizaban con una disolución de base en DMSO al 90 % v/v. Debido a que no son completamente aditivos los volúmenes de DMSO y agua, existe un error pequeño que en todos los casos fue despreciado. Las disoluciones a titular se burbujearon con N_2 y se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno durante todo el experimento para evitar la presencia de CO_2 en disolución ya que la presencia de carbonatos dificultaba el alcance del equilibrio en el electrodo después de cada adición del titulante. El potenciómetro se calibró usando amortiguadores de referencia a 25° C, pH 4.00, 7.00 y 10.00 en agua. Consideramos que al no tener amortiguadores estándar para DMSO este tipo de calibración sería adecuado ya que a partir de titulaciones de HCl en los medios empleados, es posible introducir una corrección para obtener la concentración de protones en medio no acuoso (vide infra). Se decidió no usar un electrolito soporte ya que hay efectos específicos de varios iones sobre la velocidad de la reacción (ver resultados), probablemente debido a que las especies existentes en disolución son diferentes en presencia de estos cationes. Además, la variación de la fuerza iónica en el transcurso de una titulación es suficientemente pequeña, ± 0.01 M, debido a la presencia de sales de metales alcalinos ó alcalinotérreos.

Debido a que los valores de diferencia de potencial obtenidos en las celdas electroquímicas utilizadas en potenciometría dependen de la actividad y no de la concentración de las especies, las constantes determinadas directamente de los valores de mediciones potenciométricas son en realidad constantes mixtas pues contienen términos de actividades (para protones) y de concentraciones (para las otras especies). Existen dos razones principales para usar las constantes de equilibrio en términos de concentraciones en estudios de equilibrios en disolución. Primero, como la actividad de una especie iónica no es un parámetro determinable experimentalmente, estas constantes están definidas más claramente. Segundo, el cálculo de las constantes de equilibrio a partir de datos potenciométricos se basa en la solución de sistemas de ecuaciones en los que se incluye el balance de masa para protones, por lo que se requiere conocer la concentración y no la

actividad de los protones. Por esto, es más adecuado calibrar al electrodo en términos de la concentración de protones.

Es posible demostrar que en una titulación de ácido fuerte con base fuerte, la relación entre las variables involucradas puede representarse con la ecuación 4.4. ⁽³²⁾

$$V + \frac{(V + V_0) \times [H^+] \times f}{C_B} - \frac{(V_0 + V) \times K_w}{C_B \times [H^+] \times f} - V_e = 0 \quad (4.4)$$

Donde V es el volumen de titulante de concentración C_B molar, V_0 es el volumen inicial de la muestra, K_w es el producto iónico del agua, V_e es el volumen de equivalencia, $[H^+]$ es la concentración de H^+ no corregida, tomada directamente de las mediciones instrumentales de pH ($[H^+] = 10^{-pH}$), f es el factor de corrección que es una función de los coeficientes de actividad y del potencial de unión líquida

Entonces, si conocemos la concentración de la base añadida, el volumen inicial, los volúmenes adicionados, la concentración exacta del ácido fuerte a titular y los valores de pH para cada adición, es posible calcular el valor de f y de pK_w en las condiciones experimentales.

Como parte de la calibración rutinaria del electrodo se titularon 30.0 mL de HCl 0.001 M estandarizado con Bu_4NOH 0.1 M en DMSO 90 % v/v, haciendo pequeñas adiciones de Bu_4NOH , permitiendo a la disolución equilibrarse y registrando el pH instrumental. Las curvas de titulación obtenidas se ajustaron mediante una regresión no lineal de mínimos cuadrados a la ecuación anterior despejada en términos del volumen (ecuación 4.5) para obtener los valores de pK_w y f .

$$V = \frac{V_e \times C_B + \frac{V_0 \times K_w}{[H^+]} - V_0 \times [H^+] \times f}{C_B + [H^+] \times f - \frac{K_w}{[H^+]}} \quad (4.5)$$

Con el valor de f se corrigió la escala del potenciómetro; este factor incluye el cambio en los coeficientes de actividad y el error asociado a la variación del potencial de

unión líquida. Al emplear valores de pH debe restarse el logaritmo de f del valor de pH observado para corregir la escala del potenciómetro y usarla en términos de la concentración de protones.

$$pH = pH_{obs} - \log f \quad (4.6)$$

En las condiciones experimentales de esta tesis se determinó un valor promedio de pK_w de 21.3 ± 0.2 (Fig 4.7) como uno de los parámetros de ajuste y f se determinó antes de cada titulación como el otro parámetro de ajuste. El valor informado en la literatura para el pK_w en la concentración de DMSO dada es el mismo dentro de los límites del error, al valor reportado en la literatura.⁽³³⁾

El valor de $-\log f$, en el intervalo de 3.01-3.05, se usó para corregir la escala de pH del potenciómetro (ecuación 4.4) y calibrar el electrodo en términos de la concentración de protones en este medio de reacción.

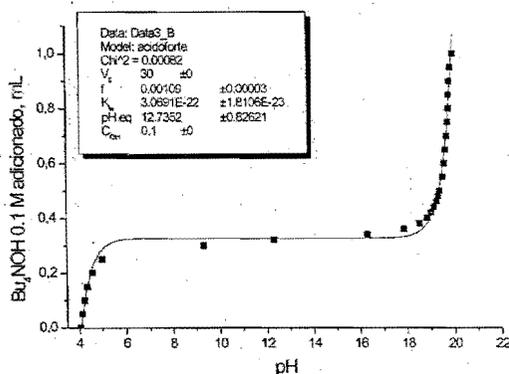


Figura 4.7 Calibración del electrodo en DMSO 90 % v/v. utilizando HCl 1 mM en 30 mL de disolución y titulándolo con Bu_4NOH 0.1 M preparado en DMSO 90 % v/v..

Una titulación típica se realizó adicionando pequeñas cantidades (50-200 μL) de Bu_4NOH de concentración 0.1 M a la muestra y registrando los valores de pH obtenidos

teniendo cuidado de que estos valores fueran estables. Las muestras a titular se prepararon añadiendo a las disoluciones de HCl y las sales correspondientes la cantidad necesaria en volumen de DMSO y agua para tener al final una mezcla con 90 % en volumen de DMSO. Cada muestra se desgasificó y se mantuvo bajo atmósfera de N_2 durante toda la titulación. Es de suma importancia que la disolución a titular esté libre de carbonatos y que no haya absorción de CO_2 durante la titulación para obtener curvas de titulación reproducibles. Estas curvas de pH vs. volumen de Bu_4NOH adicionado fueron corregidas por el factor f determinado para cada uno de ellas para obtener los valores de $-\log[H^+]$ vs. volumen de Bu_4NOH adicionado.

5. Resultados

5.1 Hidrólisis acuosa de diésteres fosfato

5.1.1 Hidrólisis básica de BNPP.

Conocer el mecanismo de reacción de hidrólisis básica de BNPP permite evaluar mejor el efecto de los metales alcalinotérreos.

Debido a la extrema lentitud de las reacciones, la hidrólisis alcalina acuosa fue llevada a cabo a 70° C y las mediciones experimentales se hicieron en el intervalo de 0.005 - 0.1 M NaOH. La finalidad de este experimento fue determinar el orden de la reacción de hidrólisis básica respecto a la concentración de OH⁻ y tener datos propios contra los cuales comparar si existe un efecto catalítico al trabajar con iones metálicos.

En este caso la rapidez de todas las reacciones observadas se calcula a usando el ajuste a la ecuación 4.1 (velocidades iniciales), considerando la ruptura de un sólo ión nitrofenolato. Para varios casos se observó que los primeros puntos de las curvas indicaban una rapidez de reacción mayor que el resto, probablemente esto se debe a la presencia de una impureza que se hidroliza más rápidamente (ver las curvas en el Anexo 1). Estos puntos no fueron considerados para calcular las constantes de velocidad.

Se estableció la dependencia de la constante de velocidad de reacción observada con respecto a la concentración del NaOH agregado, Tabla 5.1. La relación resultó ser lineal ($R = 0.998$), por lo cual podemos concluir que la reacción es de primer orden con respecto al nucleófilo, Fig.5.1. La extrapolación de la dependencia lineal a la concentración de OH⁻ cero permite estimar el valor de la constante de la hidrólisis espontánea que resultó ser igual a $k_{H_2O} = (3.3 \pm 0.9) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Es un valor mucho más alto que el informado en la literatura ($k_{H_2O} = 6.3 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ (a 100 °C y $I=1.0$)).⁽⁵⁾ Una posible explicación de esta inconsistencia es que a baja concentración de OH⁻ es mayor la contribución de la hidrólisis de la posible impureza del sustrato como mono *p*-nitrofenil fosfato cuya velocidad de hidrólisis no depende del pH, y esto aumenta la velocidad observada. La pendiente de la gráfica en la Fig.5.1 da un valor de la constante de la hidrólisis alcalina de segundo orden $k_{OH} = (4.8 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que concuerda

razonablemente con el valor informado en la literatura para k_{OH} a 25°C extrapolado mediante la ecuación de Arrhenius a 70°C con un valor de entalpía de activación de 74.09 kJ/mol, $k_{OH}=2.3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁽⁵⁾

Tabla 5.1 Hidrólisis básica de BNPP en agua en presencia de NaOH a concentración variable

[NaOH], M	$k_{obs} \times 10^6, \text{ s}^{-1}$
0.005	6.78
0.010	8.57
0.025	14.1
0.050	25.8
0.100	52.0

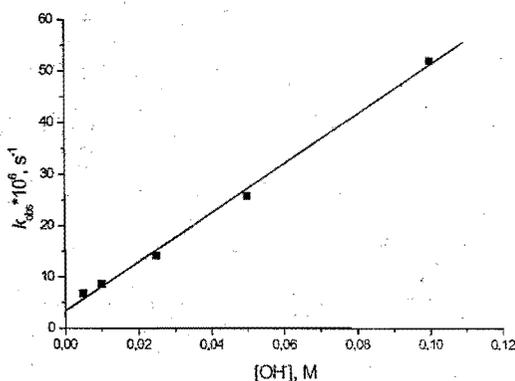


Figura 5.1 Datos de la Tabla 5.1 en forma gráfica ($k_{obs}/[\text{OH}] = 4.8 \pm 0.17 \times 10^{-4} \text{ M}$, $R = 0.9980$).

Para los experimentos subsiguientes, dedicados al estudio de los efectos de los iones metálicos, se realizó una medición de la rapidez de la reacción en ausencia del ión metálico para cada serie de mediciones. Esto se hizo con el fin de poder corroborar los resultados obtenidos y verificar las condiciones planteadas en cada caso.

5.1.. Efecto de NaCl

En las mediciones efectuadas, no se intentó fijar la fuerza iónica (I , M) para simplificar lo más posible el sistema en estudio y evitar interferencias. Sin embargo se decidió evaluar este efecto para corregir las mediciones a realizar.

Así, se varió la concentración de NaCl con el fin de cubrir el intervalo de fuerza iónica requerido para futuras mediciones en presencia de metales alcalinotérreos y se estimó el cambio en las velocidades de reacción. Basándose en resultados obtenidos es posible hacer una corrección con respecto a la fuerza iónica en el resto de los experimentos.

La velocidad en todos los casos se calculó mediante el ajuste a la ecuación de velocidad inicial (4.1), donde se consideraba que al final de la reacción se hidroliza sólo un ión nitrofenolato. En la tabla 5.2 se presentan los resultados obtenidos.

Estos resultados se analizaron en términos de la teoría de Debye-Hückel. Debido a que los experimentos fueron realizados a fuerzas iónicas altas, hemos empleado una versión modificada de la ecuación de Debye, la ecuación de Davies ecuación (5.1),⁽³⁴⁾ para calcular los coeficientes de actividad de especies iónicas. Esta versión semiempírica, es válida hasta fuerza iónica 0.5 M.

$$\log \gamma_i = -0.51z_i^2(I^{0.5}/(1 + I^{0.5}) - 0.2I) \quad (5.1)$$

La reacción de hidrólisis alcalina incluye la interacción entre dos aniones de carga -1 cada uno. En este caso, de acuerdo con la teoría del estado de transición, al emplear la ecuación (5.1) obtuvimos la ecuación (5.2) para la constante de hidrólisis de segundo orden

$$\log k_{\text{OH}} = \log k_{\text{OH}}^0 + 1.02(I^{0.5}/(1 + I^{0.5}) - 0.2I) \quad (5.2)$$

Donde k_{OH}^0 es la constante de la hidrólisis alcalina a $I=0$. La figura 5.2 presenta los resultados en coordenadas de la ecuación (5.2). Como se espera, la dependencia de $\log k_{\text{OH}}$ vs. $I^{0.5}/(1 + I^{0.5}) - 0.2I$ es lineal con pendiente positiva. El valor de la pendiente, 2.6 ± 0.2 , es mayor que el esperado. Esto se debe probablemente a que el modelo de Debye-Hückel considera a los iones como especies esféricas y con distribución de carga uniforme mientras que BNPP es un anión orgánico de tamaño grande con fragmentos voluminosos hidrofóbicos los cuales pueden modificar el efecto salino. El valor de $\log k_{\text{OH}}^0 = -4.97 \pm 0.041$ da un valor de $k_{\text{OH}}^0 = (1.1 \pm 0.1) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tabla 5.2 Dependencia de la velocidad de la hidrólisis básica de BNPP. I 0.075 M. NaOH y NaCl variable.

I	$k_{\text{obs}} \times 10^5, \text{s}^{-1}$
0.075	3.53
0.085	3.73
0.095	3.83
0.125	4.39

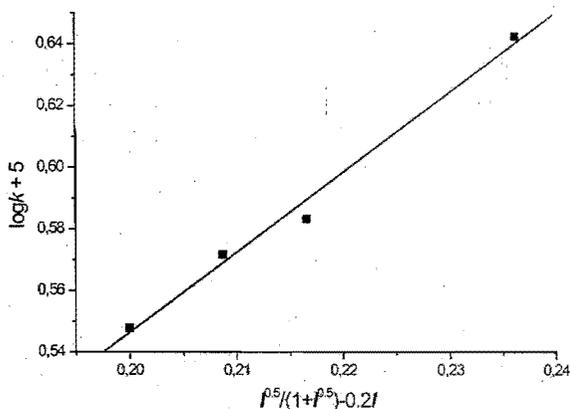


Figura 5.2. Datos de la Tabla 5.2 en coordenadas de la ecuación 5.2 (pendiente 2.6 ± 0.2 , $R = 0.9945$).

Los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente: el efecto de la fuerza iónica es positivo y cualitativamente concuerda con lo esperado con base en la teoría de Debye-Hückel para una reacción entre especies iónicas. Cuantitativamente el efecto observado es mayor que el teórico, sin embargo su valor absoluto es pequeño y por esto es posible despreciarlo para reacciones en las que el efecto catalítico producido por iones alcalinotérreos es significativo.

5.1.3. Efecto del ion Mg^{2+}

Anteriormente se habían realizado algunos estudios cinéticos utilizando este metal. Sin embargo, el resultado obtenido varía tanto de un experimento al otro, que todavía no se pueden indicar las tendencias generales para este ion en la hidrólisis de diésteres fosfato⁽²⁴⁻²⁷⁾.

Hasta la fecha no se han informado datos precisos para la hidrólisis básica de diésteres fosfato con iones acuosos de Mg^{2+} sin algún tipo de amortiguador. La razón principal es que la poca solubilidad del hidróxido de Mg^{2+} que se forma durante la reacción.

En los experimentos realizados durante este trabajo nos encontramos con el mismo problema. Sin embargo, a concentraciones bajas del metal o del hidróxido (menores que 0.01M) logramos obtener una disolución homogénea de la sal metálica, aparentemente sobresaturada respecto al hidróxido de magnesio. Los experimentos se repitieron varias veces, ya que las disoluciones en los que desde el inicio se formaba precipitado se descartaban. Para prevenir la distorsión de resultados por la aparición de precipitado, las reacciones se observaban a 400 nm y a 600nm. Si la absorbancia de la disolución problema medida a 600 nm (donde no debe haber ningún cambio) no se incrementaba en valores mayores que 0.05 los resultados se consideraban aceptables. En la Tabla 5.3 se presentan los resultados obtenidos.

Las constantes observadas resultaron tener una dependencia lineal con respecto a la variación de la concentración de Mg^{2+} , por lo cual la reacción es de primer orden con respecto al metal. La pendiente de la gráfica en la Fig. 5.3 representa la constante observada de segundo orden y es igual a $4.87 \times 10^{-4} M^{-1} s^{-1}$. Debido a que el efecto del ion Mg^{2+} es muy pequeño y los problemas de solubilidad causan una gran dispersión en datos experimentales, no fue posible estudiar la cinética de hidrólisis mediante la variación de la concentración de hidróxido de sodio.

Tabla 5.3 Hidrólisis de BNPP en presencia de iones Mg^{2+} con NaOH 0.005 M.

Mg^{2+} , M	k_{obs} , $\times 10^6 s^{-1}$
0	5.21
0.001	5.91
0.003	6.86
0.005	7.70
0.008	9.32

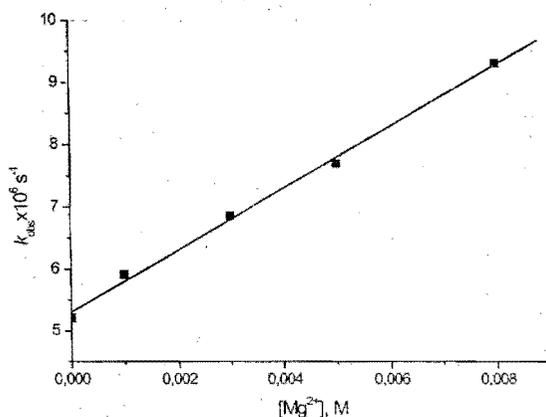


Figura 5.3 Datos de la Tabla 5.3 en forma grafica

$$(k_{obs}/[Mg^{2+}]) = 5.0 \pm 0.17 \times 10^{-4} M, R = 0.9983.$$

5.1.4 Efecto de ion Ca^{2+}

Se ha observado que el ion Ca^{2+} tiene un efecto catalítico moderado en diversos sistemas. Como se mencionó en los antecedentes, se ha observado un efecto cualitativo del ion Ca^{2+} en la hidrólisis básica de diésteres fosfato⁽²⁴⁾.

El ion Ca^{2+} presenta una gran actividad catalítica en la reacción en este sistema. Las velocidades de reacción observadas son tan altas, que en algunos casos las constantes de velocidad observada se obtuvieron mediante ajustes integrales de primer orden a partir de las curvas cinéticas obtenidas. Debido a que el hidróxido de calcio es suficientemente soluble, se logró llegar a concentraciones relativamente altas del metal y del sustrato y se obtuvo una curva de saturación con respecto al hidróxido.

La mayoría de las constantes de velocidad de las reacciones se calcularon a partir de velocidades iniciales, para lo que se consideró que al final de la reacción se produce sólo un ión nitrofenolato por molécula de sustrato. Cuando las reacciones fueron lo suficientemente rápidas, las constantes de velocidad se obtuvieron mediante ajustes a una ecuación de primer orden, ecuación 4.2. En la Tabla 5.4 y Figura 5.4 se presentan los resultados obtenidos.

La dependencia lineal de k_{obs} vs. concentración de calcio, Fig. 5.5, nos indica que la reacción es de primer orden con respecto al metal y la constante observada de segundo orden, calculada como la pendiente de la línea recta, es de $0.037 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Cabe señalar, que la aceleración observada en presencia de ión Ca^{2+} es casi 100 veces mayor que en el de ion del Mg^{2+} .

Sin embargo, para calcular la constante de velocidad de reacción con el hidroxocomplejo del ión Ca^{2+} es indispensable evaluar la constante de formación de la especie activa CaOH^+ , que presumiblemente es la especie nucleofílica en este medio.

Tabla 5.4 Hidrólisis de BNPP, en presencia de Ca^{2+} con NaOH 0.075 M

Ca^{2+} , mM	$k_{\text{obs}} \times 10^5, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
0	4.88
1	7.81
3	14.83
5	19.20
10	42.79

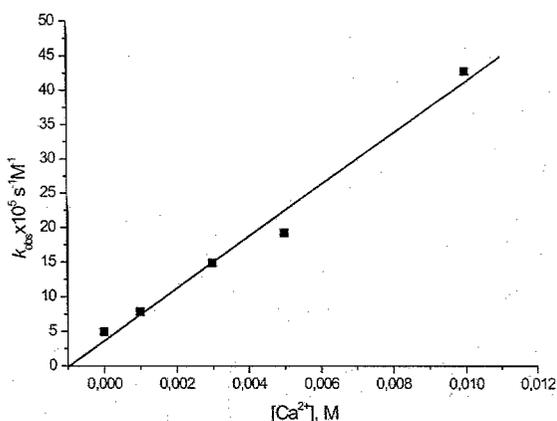


Figura 5.4 Datos de la Tabla 5.4 en forma grafica.

$$(k_{\text{obs}}/[\text{OH}^-] = 3.7 \pm 0.3 \times 10^{-2} \text{ M}, R = 0.9918).$$

La constante de formación se calculó a partir de los datos cinéticos obtenidas al variar la concentración de hidróxido manteniendo la concentración del metal fija e igual a 0.005 M. Las constantes de velocidad de las reacciones donde se empleó menor concentración de NaOH (0.001 M y 0.005M) se calcularon mediante ajustes a la ecuación de velocidad inicial (Ecuación 4.1), para lo que se consideró que al final de la reacción se produce sólo un ion nitrofenolato por molécula de sustrato. En otros casos fue necesario realizar un ajuste a la ecuación de primer orden (Ecuación 4.2). En la tabla 5.5 y figura 5.5 se presentan los resultados obtenidos.

En este caso se observa una “saturación” de k_{obs} al incrementarse la concentración de NaOH; es decir, k_{obs} llega a un valor máximo que ya no depende de la concentración de hidróxido. Este fenómeno no se observa en la figura 5.4 que corresponde a la variación de la concentración del catión metálico porque en este experimento la concentración del metal siempre es menor que la de hidróxido de sodio. Sin embargo, en las condiciones de la figura 5.5 podemos llegar a tener un exceso de OH^- sobre el metal y esto nos permite ver que el efecto de saturación se debe a la formación del hidroxocomplejo metálico.

Tabla 5.5 Hidrólisis de BNPP en presencia de CaCl_2 0.005 M.

OH^-	$k_{\text{obs}} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{obs}}^{\text{corr}} \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ a)}$
0.001	0.72	0.346
0.005	3.90	3.33
0.01	6.67	5.86
0.02	9.23	7.93
0.05	13.18	10.45

a) valor corregido por la contribución de la velocidad de hidrólisis alcalina.

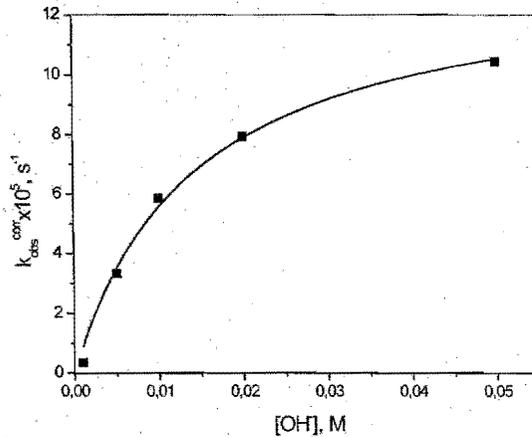


Figura 5.5 Datos de la Tabla 5.5 en forma grafica. ($(k_{\text{obs}} \times [\text{Ca}^{2+}]/[\text{OH}^-]) = 14 \pm 0.8 \times 10^{-5} \text{ M}$, $K_{\text{OH}} = 69.9 \pm 10$, $R^2 = 0.9932$).

El esquema del mecanismo de la reacción se presenta en la figura 5.6.

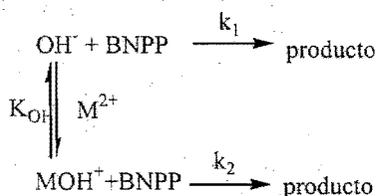


Figura 5.6 Posibles rutas para la hidrólisis de BNPP.

Debido a que la concentración de hidróxido en cada punto es variable, es necesario corregir las constantes observadas por la contribución de la velocidad de hidrólisis alcalina en cada punto.

Las velocidades de hidrólisis alcalina en los puntos de interés se obtienen a partir de la gráfica 5.1. Se realizó el ajuste de los datos cinéticos de acuerdo con el mecanismo propuesto usando la ecuación 5.3. La ecuación explica la saturación en los valores de las constantes observables. Su desarrollo se presenta en el Anexo 3. Es una expresión parecida a la conocida ecuación de Michaelis-Menten.

$$k_{\text{obs}} = k_2 \frac{K_{\text{OH}}[\text{OH}^-]_{\text{T}}[\text{M}]_{\text{T}}}{K_{\text{OH}}[\text{OH}^-]_{\text{T}} + 1} \quad (5.3)$$

donde $[\text{M}]_{\text{T}}$ y $[\text{OH}]_{\text{T}}$ son, respectivamente, las concentraciones totales de metal y de ion hidróxido, k_2 es la constante catalítica de segundo orden y K_{OH} la constante de formación de la especie activa MOH^+ .

Como resultado, se obtuvo la constante catalítica y la constante de formación del hidroxocomplejo de Ca^{2+} . Su comparación con los datos informados y un análisis más exhaustivo de los resultados se realizará más adelante. De acuerdo al ajuste realizado, la constante de formación del complejo catalítico CaOH^+ a 70°C es de 70 M^{-1} y el valor de k_2 catalítica es $1.40 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

5.1.5 Efecto del ión Sr^{2+}

Los iones de estroncio y bario no se encuentran presentes en los sistemas biológicos, sin embargo, se esperaría que su comportamiento químico fuera similar al del calcio por pertenecer a la misma familia. La solubilidad relativamente elevada de los hidróxidos de ambos metales permitió incrementar las concentraciones del metal e hidróxido, y explorar su comportamiento en un intervalo más amplio, lo cual no fue posible con los otros cationes estudiados.

Las constantes de velocidad de las reacciones se calcularon mediante ajustes a la ecuación de velocidad inicial, para lo que se consideró que al final de la reacción se produce sólo un ión nitrofenolato por molécula de sustrato. Se obtuvieron los siguientes valores.

En presencia de Sr^{2+} , la reacción es de primer orden con respecto al metal. El efecto catalítico es moderado: la constante observada de segundo orden es de $7.32 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tabla 5.6 Hidrólisis de BNPP en presencia de Sr^{2+} y NaOH 0.1 M.

Sr^{2+} mM	$k_{\text{obs}} \times 10^5$
0	6.28
5	10.11
10	13.58
20	19.16
30	29.04

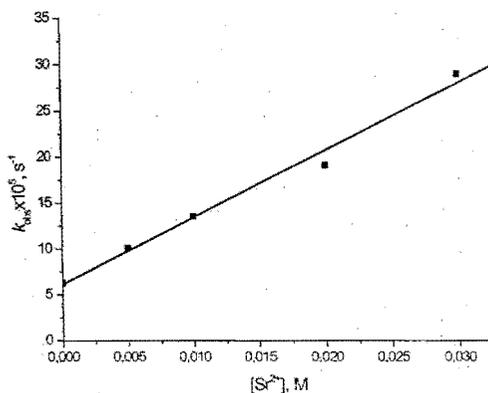
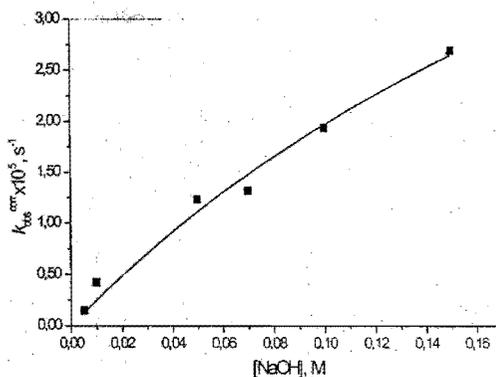


Figura 5.7 Datos de la Tabla 5.6 en forma gráfica ($(k_{\text{obs}}/[\text{OH}]) = 7.3 \pm 0.5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $R = 0.9942$).

La variación de la concentración de hidróxido a concentración fija del metal, da un comportamiento en el cual k_{obs} llega a un valor máximo al aumentar la concentración de hidróxido, es decir se satura (Fig. 5.8). Debido a la pequeña constante de formación de la especie activa $SrOH^+$ la saturación no es muy pronunciada. Sin embargo, fue posible llevar a cabo el ajuste a la ecuación (5.3) (ver sección 5.1.7). Los resultados obtenidos son los siguientes: la constante de formación de la especie activa es $3 M^{-1}$ y el valor de la constante catalítica k_2 es de $1.8 \times 10^{-2} M^{-1} s^{-1}$.

Tabla 5.7 Hidrólisis de BNPP en presencia de $SrCl_2$ 0.005 M.

[OH ⁻], M	$k_{obs} \times 10^5 s^{-1}$	$k_{obs} \times 10^5 s^{-1 a)}$
0.005	0.72	0.15
0.01	1.23	0.42
0.05	3.96	1.23
0.07	5.00	1.31
0.1	7.06	1.93
0.15	10.22	2.69



^{a)} valor corregido por la contribución de velocidad de hidrólisis alcalina

Figura 5.8 Datos de la Tabla 5.7 en forma grafica. $((k_{obs} * Sr^+) / [OH^-] = 9 \pm 4 \times 10^{-5} M, K_{OH} = 3 \pm 1.6, R^2 = 0.9831)$

Por lo tanto, es razonable pensar que la actividad moderada que se logra con Sr^{2+} , se debe a que la constante de formación de la especie activa $SrOH^+$ es muy baja, y por lo tanto existe en una proporción muy pequeña en disolución.

5.1.6. Efecto del ión Ba^{2+}

Este ión metálico tampoco se presenta en enzimas hidrolíticas pero se ha reportado en forma cualitativa que el ión Ba^{2+} aumenta la velocidad de hidrólisis de

diésteres fosfato (ver los antecedentes); no se han obtenido anteriormente los datos del efecto cuantitativo de este ión.

La reacción es de primer orden con respecto al metal, como podemos ver en la Fig. 5.9, la constante observada del segundo orden es igual a $2.34 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menor que en el caso de Ca^{2+} y Sr^{2+} . Para evaluar la reactividad del hidroxocomplejo, es necesario determinar la constante de formación de la especie activa BaOH^+ . Como en los casos anteriores intentamos realizar esto variando la concentración de NaOH a una concentración del metal fija, Tabla 5.8.

Tabla 5.8 Hidrólisis de BNPP en presencia de Ba^{2+} .
La concentración de NaOH empleada es de 0.075 M

Ba^{2+} , mM	$k_{\text{obs}} \times 10^5$
0	3.16
5	4.84
10	5.91
20	8.88
30	10.07

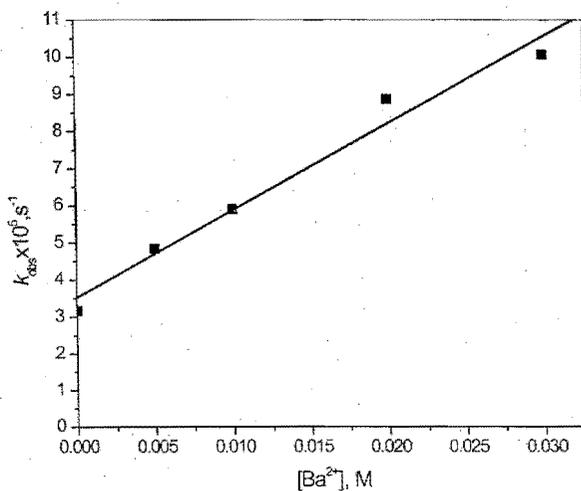


Figura 5.9 Datos de la Tabla 5.8 en forma grafica.

$$((k_{\text{obs}}/[\text{Ba}^{2+}]) = 2.3 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}, R = 0.9872).$$

Al variar la concentración de hidróxido en la hidrólisis de BNPP, después de descartar la contribución del hidróxido libre, se observa una contribución mínima por parte de la especie activa que incluye al metal, probablemente porque la constante de formación de la especie activa es muy pequeña. Debido a que esta constante no pudo ser determinada a partir de nuestros datos cinéticos, se empleó la constante de formación de BaOH^+ informada en la literatura para la evaluación de la actividad catalítica de este ion metálico.

Tabla 5.9 Hidrólisis de BNPP en presencia de BaCl_2 0.005 M

OH	$k_{\text{obs}}, 10^6 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{obs}}^{\text{corr}} \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ a)}$
0.005	0.80	0
0.01	3.29	0
0.02	9.35	0
0.05	22.49	0.92
0.07	27.82	1.93

a) valor corregido por la contribución de la velocidad de hidrólisis alcalina

5.1.7. Resumen y análisis de resultados de la hidrólisis acuosa de BNPP con metales alcalinotérreos.

Las reacciones que ocurren en las disoluciones básicas de sales de metales alcalinotérreos pueden representarse esquemáticamente como se propone en la Figura 5.6.

Aquí podemos ver que, la velocidad de reacción observada es en realidad la suma de las velocidades de dos reacciones paralelas. Por lo cual, la constante de rapidez observable puede obtenerse de la siguiente expresión (ecuación 5.4):

$$k_{obs} = k_1 \times [OH^-] + k_2 \times [MOH^+] \quad (5.4)$$

donde k_1 es la constante de hidrólisis básica, k_2 es la constante de segundo orden correspondiente a la reacción donde participan los hidroxocomplejos metálicos. Al mismo tiempo, la fracción de la especie activa $[MOH^+]$ se calcula a partir de la concentración conocida del metal empleado y del grado de complejación de éste. Por lo cual:

$$[MOH^+] = [M^{2+}] \times \frac{K_{OH} \times [OH^-]}{1 + K_{OH} \times [OH^-]} \quad (5.5)$$

donde $[M^{2+}]$ y $[OH^-]$ corresponden a las concentraciones totales del metal e hidróxido presentes y K_{OH} es la constante de formación de la especie MOH^+ . Esta última ecuación es aproximada y requiere que en el medio de reacción $[OH^-]_{total} \gg [M^{2+}]_{total}$.

La hidrólisis básica con constante de velocidad k_1 ocurre en todos los casos. Esta contribución a la velocidad de reacción depende sólo de la concentración de NaOH empleada. Por ello, es necesario corregir los valores de las constantes observadas, restándoles la contribución del hidróxido, sobre todo, cuando la concentración de este es variable.

Existen varias maneras de determinar la constante catalítica de la hidrólisis debida a los hidroxocomplejos de metales alcalinotérreos. Las pendientes de las dependencias de k_{obs} vs. $[M^{2+}]$ a una concentración de hidróxido fija (constantes observadas de segundo orden mencionadas anteriormente) nos dan valores de $k_2 K_{OH} [OH^-] / (1 + K_{OH} [OH^-])$ en $s^{-1} M^{-1}$ de acuerdo con la figura 5.6. Conociendo el valor de K_{OH} y de $[OH^-]$ se obtienen las constantes catalíticas de segundo orden $k_2 M^{-1} s^{-1}$. También es posible obtener el valor de k_2 a partir del ajuste a la ecuación (5.3) si se tienen las constantes de velocidad observadas en función de la concentración de hidróxido a una concentración de metal fija. Los valores obtenidos de ambas maneras se muestran en la tabla 5.10

Tabla 5.10 Constantes catalíticas de segundo orden k_2

Catión	$k_{obs} s^{-1} M^{-1}$	$[OH^-], M$	K_{OH} M^{-1}	K_{OH} $M(a)$	k_2 $s^{-1} M^{-1} (b)$	k_2 $s^{-1} M^{-1} (c)$	k_2 $s^{-1} M^{-1} (d)$	$k_3 (f)$
Ninguno					0.00048 ^(e)			
Mg^{2+}	0.00049	0.005	-	330	0.00079		-	0.26
Ca^{2+}	0.037	0.075	70.0	36	0.051	0.028	0.044	1.8
Sr^{2+}	0.0073	0.1	2.94	8.4	0.016	0.018	0.032	0.13
Ba^{2+}	0.0023	0.075	-	5.2	0.0083		-	0.043

- (a) Datos obtenidos de la literatura y recalculados a 70°C con los ΔH^0 correspondientes.⁽⁴⁰⁾
- (b) k_2 a partir de $k_2 K_{OH} [OH^-] / (1 + K_{OH} [OH^-])$ y K_{OH} de literatura⁽⁴⁰⁾
- (c) Constantes obtenidas mediante ajustes a la ecuación (5.3).
- (d) k_2 a partir de $k_2 K_{OH} [OH^-] / (1 + K_{OH} [OH^-])$ y K_{OH} de ajuste a la ecuación 5.3
- (e) k_{OH}
- (f) $k_3 = k_2 K_{OH} s^{-1} M^{-2}$

Es posible comparar los valores de k_2 obtenidos por diferentes métodos para Ca^{2+} y Sr^{2+} . Como vemos en Tabla 5.10, los valores de K_{OH} obtenidos para estos cationes de los datos cinéticos son diferentes por un factor de 2-3 veces respecto a los informados en la literatura (estos últimos fueron obtenidos mediante técnicas potenciométricas). Debido a que es posible que el método cinético tenga más errores sistemáticos, consideramos que estas diferencias no son demasiado grandes. En general, los valores de k_2 calculados por diferentes métodos varían entre los límites de 1.5-2 veces. Tomando en cuenta que los valores de K_{OH} reportados en la literatura pueden tener menores errores, consideramos más exactos los valores de k_2 en la sexta columna de la Tabla 5.10.

Además de comparar los valores de k_2 podemos analizar también los valores de las constantes de tercer orden $k_3 = k_2 K_{OH}$. La constante de velocidad k_3 , $s^{-1} M^{-2}$ corresponde a la reacción de tercer orden entre el catión metálico, BNPP y OH^- , y es útil para comparar la reactividad catalítica de los cationes en bajas concentraciones de OH^- , es decir, lejos de la "saturación". A bajas concentraciones de hidróxido la concentración de las especies activas MOH^+ es proporcional a K_{OH} , mientras que a alta concentración de OH^- todo el metal se transforma en el hidroxocomplejo y en estas condiciones la velocidad observada

correlaciona con k_2 . Otra aplicación posible de los valores de k_3 es el cálculo de las constantes de estabilidad de complejos metálicos con el estado de transición de la reacción de hidrólisis.

Revisando los resultados de la tabla 5.10 se observa que todas las especies MOH^+ tienen mayor reactividad que el ion hidróxido libre. Esto claramente indica una contribución del ión metálico en la activación del sustrato. Si el papel del catión fuera únicamente el de aumentar el valor de la constante de autoionización del agua coordinada (por estabilizar el ión OH^-), elevando de esta manera la concentración de OH^- en la disolución, las especies MOH^+ deberían tener una reactividad menor que la del OH^- libre debido a que la basicidad del hidróxido disminuye por efecto de coordinación.

Todos estos cationes forman principalmente enlaces iónicos con átomos donadores de electrones. La característica más simple de la energía de interacción coulombica es la relación de la carga al cuadrado por el radio iónico (z_i^2/r_i). Ya que todos los cationes tienen la misma carga podemos buscar una correlación de las constantes de velocidad simplemente con el valor de $1/r_i$.⁽³⁵⁾ La Figura 5.10 muestra los logaritmos de las constantes de velocidad k_2 y k_3 así como las constantes de formación de hidroxocomplejos K_{OH} en función de $1/r_i$. Se observa una gráfica lineal únicamente para el $\log K_{\text{OH}}$. La pendiente es positiva como se esperaría de acuerdo con el modelo de interacción electrostático entre el catión metálico y el anión OH^- . Para las constantes de velocidad las dependencias no son monotónicas: se observa un máximo para Ca^{2+} . Esto indica la importancia de contribuciones adicionales a la electrostática en el efecto catalítico.

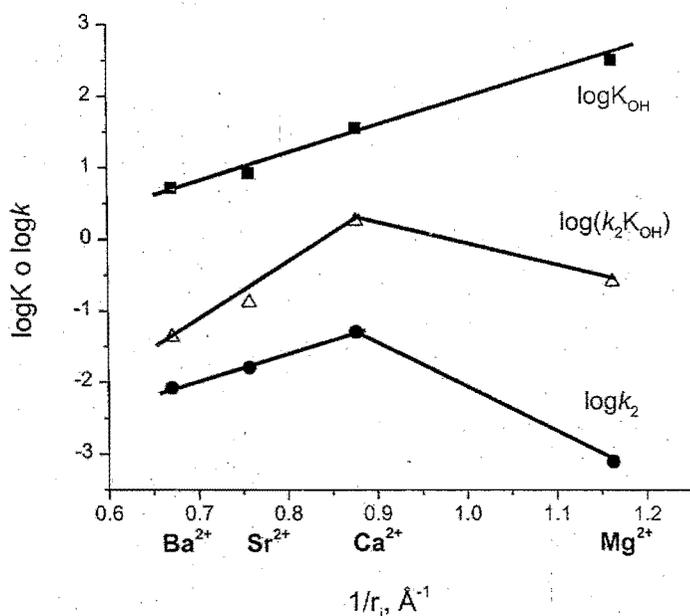


Figura 5.10 Correlación de los parámetros cinéticos y K_{OH} con inverso del radio iónico.

Para interpretar el mecanismo catalítico es importante establecer las propiedades de los cationes relevantes. Los parámetros incluidos en la Tabla 5.11 se emplearon para interpretar o predecir las constantes de estabilidad de los complejos metálicos con diferentes ligantes en medios acuosos con base en la ecuación multiparamétrica 5.6. ⁽³⁶⁾

$$\log K = E_A E_B + C_A C_B - D_A D_B \quad (5.6)$$

donde E es la contribución del enlace iónico por parte del metal (A) y del ligante (B), C es la contribución del enlace covalente y D el efecto estérico.

Tabla 5.11 Características de los cationes de metales alcalinotérreos. ^(36, c)

Catión	$r_i, \text{Å}$	E_A	C_A	D_A	$I_A = E_A/C_A$
Mg ²⁺	0.86	1.86	0.178	1.5	10.46
Ca ²⁺	1.14	0.98	0.081	0	12.16
Sr ²⁺	1.32	0.6	0.057	0	10.53
Ba ²⁺	1.49	0.32	0.03	0	10.67

Si consideramos al estado de transición de la hidrólisis como un ligante, es razonable suponer que los parámetros responsables por su interacción con el ión metálico serán los mismos. Los parámetros E_B , C_B y D_B para el estado de transición se desconocen lo que impide estimar cuantitativamente a partir de la ecuación 5.6 la afinidad de los iones metálicos hacia el estado de transición, y, por lo tanto, sus actividades catalíticas. Además, la ecuación 5.6 se aplica a ligantes monodentados mientras que el estado de transición de la hidrólisis debe considerarse como un "ligante" polidentado (más adelante se presentan las estructuras posibles). Sin embargo, podemos esperar una correlación de las constantes de velocidad en presencia de iones metálicos con los parámetros de la ecuación (5.6).

Como se observa en la Tabla 5.11, los parámetros E_A y C_A disminuyen monótonicamente al pasar de Mg^{2+} a Ba^{2+} , mientras que la reactividad de los hidroxocomplejos pasa por un máximo. A primera vista la disminución de la reactividad de Mg^{2+} podría atribuirse a un efecto estérico ya que el valor de D_A para otros cationes es igual a cero. Sin embargo, para el ligante D_B es un parámetro atómico y para átomos de oxígeno $D_B=0$.⁽³⁶⁾ Entre los parámetros presentados, el parámetro con un máximo para el ión Ca^{2+} es la *ionicidad* (I_A) definido como la relación $I_A=E_A/C_A$.⁽³⁶⁾ La ionicidad representa la tendencia relativa entre dos especies a formar un enlace iónico y correlaciona con el orden de "dureza" de cationes definido por Pearson.⁽³⁶⁾ El parámetro I_A no representa una medida de la energía de interacción, sino del "tipo de enlace" y por esto no es evidente una correlación entre la reactividad observada y este parámetro.

Un tratamiento útil para la interpretación de los datos y diseño de nuevos sistemas catalíticos ha atraído atención recientemente: el efecto catalítico es interpretado en términos de la complejación del catalizador con el estado de transición de la reacción no-catalítica.⁽³⁸⁾

Este enfoque es particularmente útil para la catálisis con iones metálicos ya que permite tratar al estado de transición como un "ligante" para el catalizador metálico y aplicar en catálisis los conceptos de química de coordinación desarrollados para estudios de equilibrios en disolución.

En el caso particular de la catálisis de hidrólisis alcalina con iones metálicos es necesario considerar el siguiente ciclo: ⁽³⁸⁾

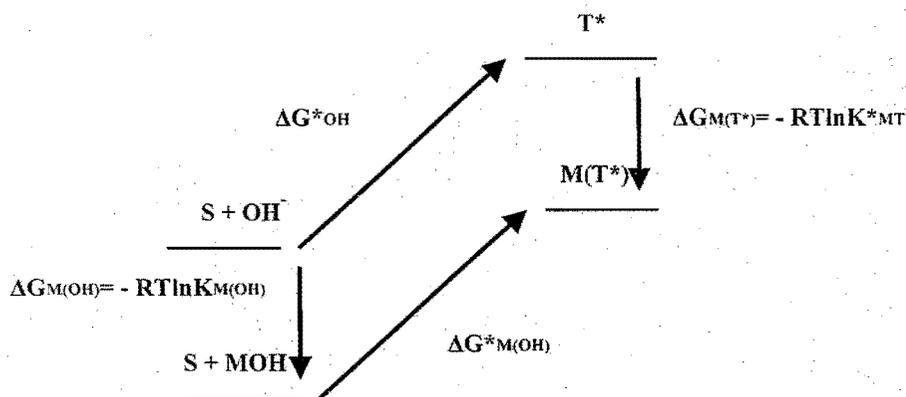


Figura 5.1 Ciclo termodinámico para la hidrólisis del sustrato S en ausencia y en presencia de un ion metálico.

donde ΔG^*_{OH} es la energía libre de activación de la hidrólisis alcalina, $\Delta G^*_{M(OH)}$ es la energía libre de activación de la hidrólisis por interacción del sustrato fosfodiéster (S) con el hidroxocomplejo $M(OH)^+$, $\Delta G_{M(OH)}$ es la energía libre de complejación de OH^- con el catión metálico y $\Delta G_{M(T^*)}$ es la energía libre de complejación del metal con el estado de transición T^* de la reacción entre S y OH^- de acuerdo con la ecuación 5.7:



A partir del ciclo mostrado en la Fig.5.11 se obtiene la relación (5.8):

$$\Delta G_{M(T^*)} = \Delta G_{M(OH)} + \Delta G^*_{M(OH)} - \Delta G^*_{OH} \quad (5.8)$$

o en términos de las constantes de velocidad y equilibrio:

$$\log K_{*MT} = \log\left(\frac{k_2}{k_{OH}}\right) + \log K_{OH} = \log\left(\frac{k_3}{k_{OH}}\right) \quad (5.9)$$

En la Tabla 5.12 se presentan valores de $\log K_{*MT}$ junto con los logaritmos de las constantes de estabilidad de complejos de iones metálicos alcalinotérreos con algunos ligantes seleccionados para su comparación.

Tabla 5.12 Logaritmos de constantes de estabilidad de complejos de cationes de metales alcalinotérreos con el estado de transición de la hidrólisis de BNPP y con algunos ligantes seleccionados (datos para PhOPO_3^{2-} de ref. 41, otros de ref. 40).

Cation	$\log K_{*MT}^a$	log K		
		PhOPO_3^{2-}	$\text{HOCH}_2\text{CO}_2^-$	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$
Mg^{2+}	2.74	1.53	1.33	2.22
Ca^{2+}	3.58	1.45	1.62	1.39
Sr^{2+}	2.43	1.26	1.30	0.91
Ba^{2+}	1.95	1.19	1.01	0.77

a) Calculado con la ecuación 5.9 a partir de resultados de la tabla 5.10

La estructura propuesta del estado de transición T^* para la reacción de hidrólisis alcalina de un fosfodiéster es una bipirámide trigonal con los grupos entrante y saliente en posición axial (ver antecedentes):

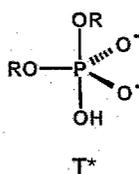


Fig. 5.12 Estado de transición de la reacción

La reacción con el hidroxocomplejo metálico probablemente transcurre a través de la formación reversible de un complejo inestable entre el anión del fosfodiéster y la especie $\text{M}(\text{OH})^+$ sobre el cual se realiza el ataque nucleofílico del OH^- coordinado hacia el fosfodiéster como se muestra esquemáticamente en figura 5.13.

El estado de transición al cual el sistema llega inmediatamente después del ataque nucleofílico debe tener la estructura (a), sin embargo es posible que junto con la formación del enlace P-OH ocurra una migración del catión metálico para formar la estructura (b) que podría tener menor energía. Aparentemente ambas estructuras pueden considerarse como complejos del estado de transición de la reacción no-catalítica con el ión metálico; estos "complejos" tienen constantes de estabilidad K^*_{MT} .

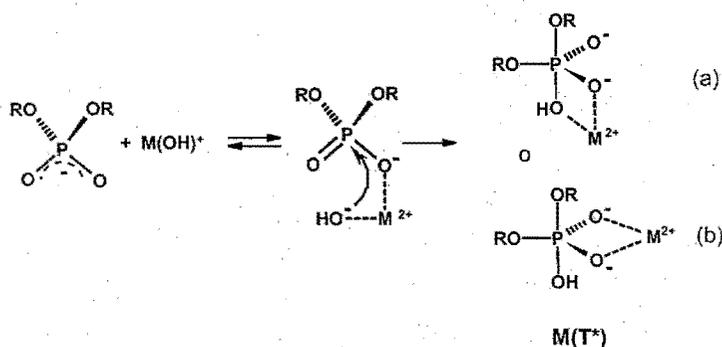


Figura 5.13 Mecanismo propuesto para la reacción entre hidroxocomplejos metálicos y un fosfodiéster.

Los complejos (a) y (b) son diferentes en varios aspectos y uno de los posibles enfoques para discriminar entre ellos es comparar la tendencia de los valores de K^*_{MT} para diferentes metales con las tendencias en las constantes de estabilidad de complejos de los mismos cationes con ligantes que imiten algunos de los aspectos de coordinación que aparecen en los complejos (a) y (b). Por ejemplo, los complejos metálicos con dianiones de monoésteres fosfato como $PhOPO_3^{2-}$ (Figura 5.14) pueden considerarse como posibles análogos del complejo (a). Los complejos metálicos con el anión del ácido láctico, donde la coordinación ocurre con la participación de un grupo oxo aniónico y otro grupo hidroxilo (Figura 5.14), son posibles análogos del complejo (b). Como vemos de los datos presentados en la Tabla 5.14, los valores de $\log K^*_{MT}$ no correlacionan con $\log K$ para el monoéster, pero muestran una buena correlación con $\log K$ para lactato. Es interesante, que si se cambia el grupo OH de lactato por NH_2 en el glicinato, se espera que la geometría de coordinación no se modifique ya que sólo cambia el tipo de átomo

donador (ver la última estructura de la Figura 5.14), sin embargo, la correlación con $\log K$ desaparece (ver la última columna en la Tabla 5.10).

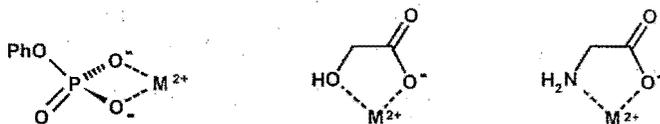


Figura. 5.14 Posibles imitaciones del tipo de coordinación del ión metálico en los estados de transición (a) y (b).

En conclusión, los resultados del estudio de la actividad catalítica de metales alcalinotérreos en la hidrólisis de BNPP indican que las formas activas son complejos $M(OH)^+$ y que se observa el máximo efecto catalítico para el catión de Ca^{2+} . Una posible explicación de por qué se observa mayor actividad con este catión, es su capacidad de formar complejos cíclicos más estables al coordinarse simultáneamente con los grupos $-O^-$ y $-OH$.

5.2. Efecto de DMSO

Como se expuso en los antecedentes, el cambio del medio de reacción puede afectar la velocidad y hasta el mecanismo de una reacción.

Un disolvente dipolar aprótico, como el DMSO, puede incrementar la constante de velocidad de segundo orden para una reacción entre dos especies aniónicas, con respecto a su velocidad en agua, desestabilizando los reactivos aniónicos debido a la pérdida de los enlaces de hidrogeno con las moléculas de disolvente y a la disminución de energía de activación total. Al mismo tiempo, al cambiar de agua a un disolvente orgánico de menor constante dieléctrica, las interacciones iónicas se incrementan produciendo mayor repulsión entre especies reactivas; este factor disminuye la velocidad. Entonces, en términos generales, el efecto de un disolvente orgánico, en este caso DMSO, sobre la rapidez de la reacción de la hidrólisis alcalina de un fosfodiéster puede ser tanto positivo como negativo.

La constante de interacción entre el ión metálico y el hidróxido aumenta en un disolvente orgánico. Lo mismo ocurre con la interacción de la especie catiónica MOH^+ y el anión del fosfodiéster. Considerando los resultados obtenidos para la hidrólisis acuosa de diésteres fosfato en presencia de metales alcalinotérreos, se puede proponer lo siguiente. Los iones de estroncio y bario, resultaron ser buenos catalizadores en agua en forma de MOH^+ pero, debido a las interacciones débiles entre el metal y el OH^- , estas especies activas sólo existen en bajas concentraciones. Las mismas especies se presentarán en una mezcla agua - disolvente orgánico aún utilizando concentraciones de metal e hidróxido más diluidas. Además, la interacción entre especie catiónica MOH^+ y el anión del fosfodiéster se ve favorecida en medios con menor constante dieléctrica. Por estas razones es de esperarse que los cationes de metales tengan un efecto catalítico más grande en DMSO que en agua.

5.2.1 Hidrólisis básica de BNPP

Los primeros experimentos se llevaron a cabo utilizando NaOH como fuente de OH^- pero se observó que el hidróxido de sodio es poco soluble en mezclas DMSO-agua que contienen más de 80% de DMSO v/v. Se decidió emplear como base Bu_4NOH , hidróxido de tetra(*n*-butil)amonio, por ser más soluble en estos medios. Comparando los resultados obtenidos con ambas bases se observó, que los iones Na^+ tienen un efecto catalítico específico.

Primero, se comparan los resultados para estas dos bases y sus efectos en la hidrólisis de BNPP en diferentes porcentajes de DMSO. Vale la pena aclarar que se encontraron algunas dificultades para cuantificar el producto, *p*-nitrofenolato, ya que conforme se incrementa la concentración de DMSO el máximo de absorción en su espectro se desplaza y el valor de la absorptividad molar (ϵ) aumenta. Se decidió medir ϵ en todos experimentos por adiciones estándar de nitrofenolato a cada mezcla DMSO-agua utilizada (los valores obtenidos se pueden consultar en la parte experimental). Todos los experimentos se realizaron a 25°C.

Tabla 5.13. Hidrólisis básica de BNPP a concentración de DMSO variable en presencia de NaOH 0.03 M

% vol DMSO	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
0	0.48
50	0.61
70	1.16
80	2.92
90	16.4
95	9.22

Tabla 5.14. Hidrólisis básica de BNPP a concentración de DMSO variable en presencia de Bu₄NOH 0.075 M

% vol de DMSO	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
0	0.73
50	0.48
60	0.46
70	0.62
80	0.79
90	2.89
95	2.39

Los datos obtenidos en ambos casos, Tablas 5.13, 5.14 y Figura 5.15, se compararon entre sí y se observó que en presencia de iones Na⁺ la velocidad es mayor para concentraciones de DMSO elevadas aún cuando la concentración de hidróxido empleada es menor que en el caso de Bu₄NOH.

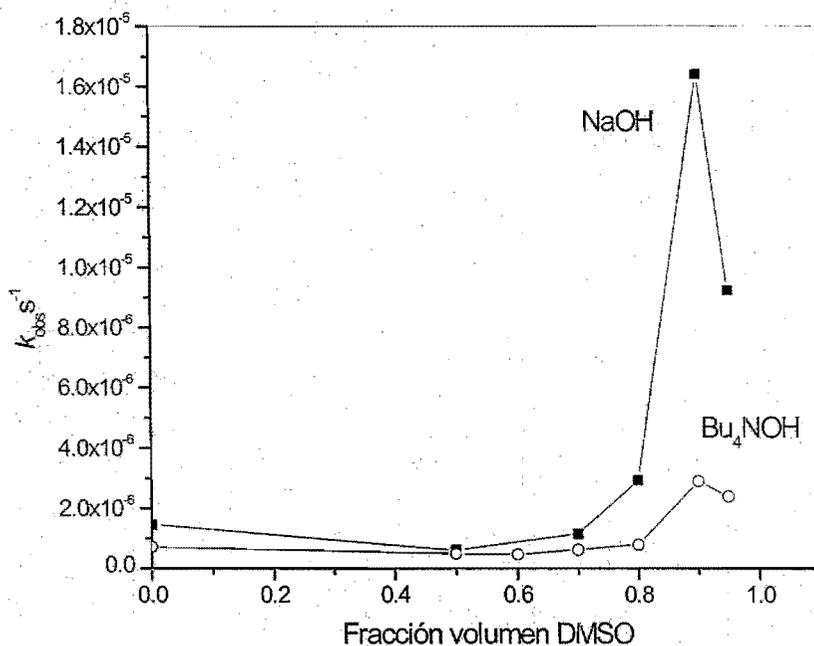


Figura 5.15. Resultados de las Tablas 5.13 y 5.14 en forma grafica.

Al variar la concentración de DMSO la rapidez de la reacción inicialmente disminuye pero cuando la cantidad de DMSO se incrementa por arriba de 80% v/v, el valor de la rapidez aumenta bruscamente en comparación con el valor observado en agua. No es posible hacer un tratamiento de los resultados obtenidos como un efecto del disolvente en términos de la ecuación (2.1) porque en la literatura solamente se encontraron informados valores de $\Delta G_{tr}^0(OH^-)$ para mezclas DMSO-agua que contienen menos de 80% de DMSO y los valores correspondientes para el sustrato (BNPP) son desconocidos. Como un primer paso en la interpretación se presenta una correlación sencilla entre $\log k_{obs}$ y el inverso de la constante dieléctrica D, Figura 5.16

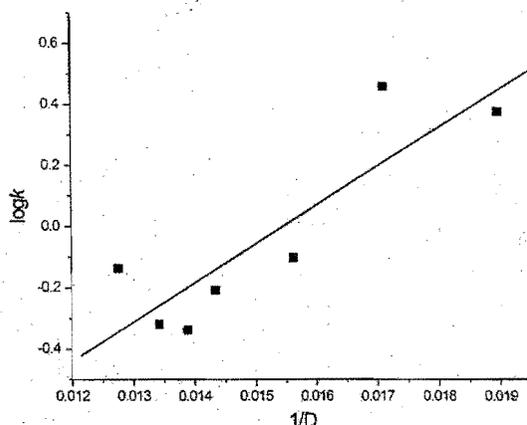


Figura 5.16 Correlación entre $\log k_{\text{obs}}$ y el inverso de la constante dieléctrica D para la cinética de hidrólisis de BNPP en mezclas DMSO-agua con Bu_4NOH como base.

Como es claro de la gráfica, la correlación es pobre y además indica un aumento de la velocidad en medios con valores de D pequeños lo cual no es lógico desde el punto de vista electrostático; en la hidrólisis alcalina la repulsión entre dos cargas negativas es muy fuerte. Sin embargo, hay que considerar otras propiedades del medio que también son importantes.

Otra opción es correlacionar los resultados cinéticos con los parámetros empíricos de polaridad, acidez y basicidad⁽¹⁸⁾; a partir de la ecuación (2.7) se plantea la ecuación 5.10:

$$\log k = s \times \text{SP} + a \times \text{SA} + b \times \text{SB} + \log k_0 \quad (5.10)$$

donde SP es un parámetro de polaridad de disolvente, SA de acidez y SB de basicidad. En la Figura 2.8 se presenta la variación de los tres parámetros en mezclas DMSO-agua; su comparación con la Figura 5.17 permite ver que el $\log k$ correlaciona con el parámetro SP.

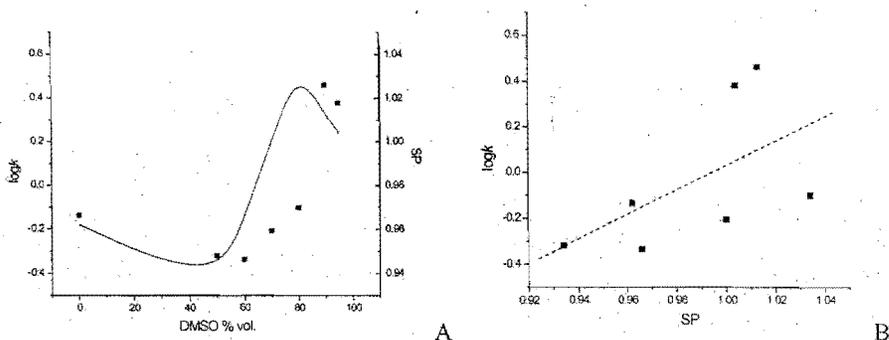


Figura 5.17. (A) El parámetro de polaridad del disolvente (SP, línea) y $\log k$ (puntos) para la hidrólisis de BNPP en función de la composición de la mezcla DMSO-agua. (B) Gráfica de $\log k$ vs. SP.

En la Figura 5.17(A) los valores de $\log k_{\text{obs}}$ se superpusieron con los de SP. Aparentemente los perfiles son parecidos, sin embargo, la grafica de $\log k_{\text{obs}}$ vs. SP muestra una gran dispersión, Fig.5.17B.

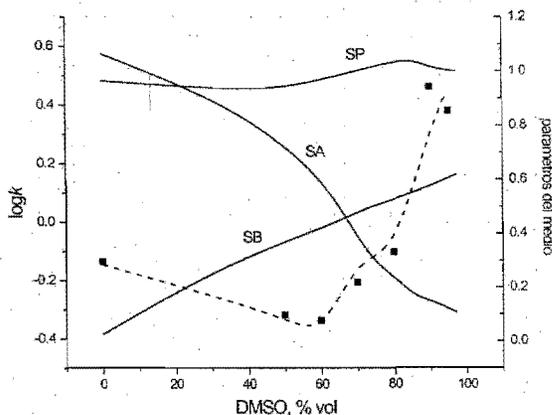


Figura 5.18 Los parámetros empíricos del disolvente (líneas sólidas) y $\log k$ (puntos) para la hidrólisis de BNPP en función de la composición de la mezcla DMSO-agua.

En la Figura 5.18 están sobrepuestos los datos cinéticos con los tres parámetros empíricos del disolvente. En esta figura se ve que SP tiene muy poca variación al

compararlo con los otros dos parámetros y es poco probable que la polaridad sea un parámetro decisivo en el incremento de la velocidad. La regresión multiparamétrica de la ecuación 2.7 da una correlación satisfactoria con los parámetros de la ecuación 5.11 (la línea punteada de la Figura 5.18 es un perfil teórico calculado con la ecuación 5.11).

$$\log k = - (15.0 \pm 3.6) SP - (7.2 \pm 1.3) SB - (5.7 \pm 1.0) SA + (20.5 \pm 4.5) \quad (5.11)$$

Un análisis de esta ecuación nos indica que los tres parámetros contribuyen a la velocidad con coeficientes negativos. Esto quiere decir que la velocidad de hidrólisis se ve favorecida cuando disminuye significativamente la acidez del medio (SA); esto está relacionado con una menor solvatación del OH⁻, es decir la “desestabilización” del nucleófilo. Este efecto, sin embargo, no produce una aceleración tan grande como se observa con los ésteres de ácidos carboxílicos (ver antecedentes) porque esta es compensada por los efectos desfavorables del aumento de polaridad y de basicidad del medio. Un medio más polar debe estabilizar más el estado inicial que el estado de transición que tiene la carga deslocalizada. Es difícil explicar el efecto de basicidad. El parámetro SB refleja capacidad del disolvente de aceptar protones y estabilizar las especies que son ácidos de Lewis (cationes metálicos, etc.). La hidrólisis alcalina de BNPP por Bu₄NOH no incluye ni la transferencia de un protón ni la participación de algún catión. Podemos pensar, sin embargo, que es importante la solvatación del fósforo(V) en BNPP que es un centro ácido en términos de Lewis. Es posible que para el estado inicial (tetraédrico) la solvatación del fósforo(V) sea más fuerte que en el estado de transición (pentacoordinado), al menos por razones estéricas, dando como resultado que el estado inicial fuera más estable con una consecuente disminución de la velocidad de la reacción.

Para los estudios subsiguientes se seleccionó la mezcla DMSO-agua con 90% de DMSO v/v que corresponde al máximo de velocidad observado. En esta mezcla se estudió el efecto de la concentración de OH⁻, empleando ambas bases, Tablas 5.15 y Figura 5.19. Como se ve de estos datos, en ambos casos hay una dependencia lineal entre k_{obs} y la concentración de base con una pendiente mayor para NaOH que para Bu₄NOH, concordando con los resultados previos.

El catión $n\text{-Bu}_4\text{N}^+$ es un catión grande con carga muy dispersa, por lo cual es poco probable que pueda participar en la reacción formando pares iónicos con los reactivos. Por esto, es razonable atribuir el efecto catalítico sobre la reacción con Bu_4NOH en 90% DMSO, únicamente al los cambios que sufre el ión hidróxido en este medio. Por otro lado, cuando se emplea NaOH , se observa un efecto catalítico por parte de ión metálico.

Tabla 5.15 Hidrólisis básica de BNPP en 90 % de DMSO con diferentes bases.

NaOH, M	$k_{\text{obs}} \times 10^6, \text{s}^{-1}$	$\text{Bu}_4\text{NOH}, \text{M}$	$k_{\text{obs}} \times 10^6, \text{s}^{-1}$
0.001	0.17	0.01	0.13
0.003	0.51	0.03	0.49
0.005	1.13	0.05	1.61
0.007	1.06	0.075	2.74
0.01	1.36	0.1	3.44
0.015	2.41		
0.02	3.12		

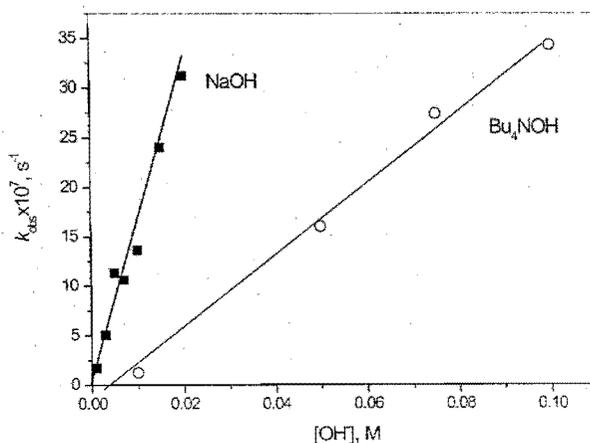


Figura 5.19 Resultados de tabla 5.15 en forma grafica.

5.2.2 Efecto de metales alcalinos en la reacción.

El hecho de encontrar un efecto catalítico con el catión de sodio nos llevó a investigar si la interacción con este catión era específica o se trata de una forma de "efecto salino" que se observa para cualquier catión alcalino. Se decidió comparar las velocidades entre los cloruros de Li^+ , Na^+ y K^+ , Tabla 5.16 y Figura 5.20.

Como ya se mencionó anteriormente, el sodio no tiene ningún efecto catalítico específico sobre la rapidez de la hidrólisis de BNPP en agua donde la adición de NaCl produce un efecto salino positivo como se espera del modelo de Debye-Hückel (capítulo 5.1.2). Sin embargo, al aumentar la concentración de DMSO se observa que el efecto del ion sodio aumenta significativamente.

Tabla 5.16. Efecto de cloruros de metales alcalinos sobre velocidad de hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de Bu_4NOH 0.03 M.

LiCl, M	$k_{\text{obs}} \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	NaCl, M	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$	KCl, M	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
0	4.7	0	0.47	0	0.47
		0.005	1.11		
0.01	9.08	0.01	2.69	0.01	1.86
0.015	6.84	0.02	6.28		
0.03	10.34	0.03	8.93	0.03	3.31
0.045	13.39	0.045	14.85	0.045	5.52

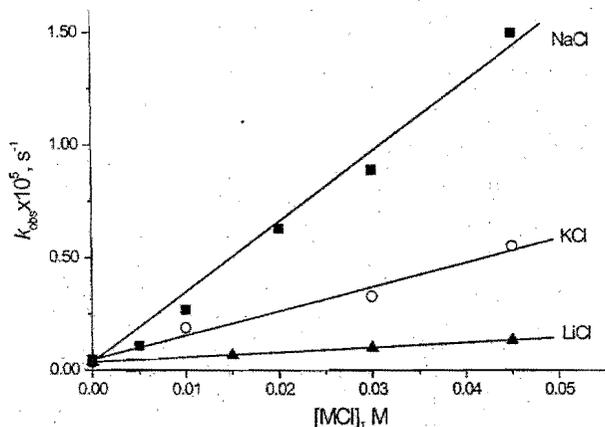


Figura 5.20 Efecto de los cloruros de metales alcalinos sobre la velocidad de hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v. Para hacer los ajustes se utilizó la ecuación 2.6.

Como vemos en la figura 5.20 las dependencias de constantes de velocidad de la concentración de la sal añadida son lineales, lo que permite comparar fácilmente el efecto de cada sal a partir de valor de la pendiente que corresponde a $k_2 M^{-1}s^{-1}$. De aquí podemos ver que el efecto de NaCl es 3 veces mayor que el de KCl y casi 10 veces mayor que el de LiCl.

Las dependencias obtenidas se ajustan muy bien a la ecuación empírica 2.6 aplicable para el efecto de fuerza iónica en medios no-acuosos, por lo cual, se informan los parámetros A y c^* obtenidos, Tabla 5.17.

Tabla 5.17. Parámetros de la ecuación (2.6) para el efecto de los cloruros de metales alcalinos en la hidrólisis de diésteres fosfato.

Sal	$k_2 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	A	c^*
NaCl	3.63	1,73	0,0089
KCl	1.07	0,73	0,0013
LiCl	0.22	1,01	0,017

Para este medio no se conocen las constantes de formación de las especies con posible actividad catalítica (hidroxocomplejos metálicos), sin embargo, se observa que el ión litio con menor radio iónico es el peor catalizador de la reacción. En el caso de LiCl, el parámetro A de susceptibilidad de la reacción es prácticamente 1, lo que corresponde a una reacción con efecto salino "normal", atribuido sólo al cambio de permisividad eléctrica del medio.⁽¹⁶⁾

Al aplicar la ecuación de Debye-Hückel (5.2) para interpretar el efecto salino sobre el cambio de rapidez de hidrólisis alcalina de BNPP obtenemos el mismo resultado. En DMSO 90 % v/v el efecto salino es mas pronunciado que en agua, debido a que el valor de la pendiente en la grafica de $\log k$ vs. $I^{0.5}$ es proporcional a $(1/D)^{3/2}$. La constante dieléctrica del medio ($D=58.5$)⁽¹⁹⁾ es 35% menor que de agua pura ($D=78.6$)⁽¹⁹⁾. Esto implica que en presencia de NaCl 0.045 M (la máxima concentración usada) el incremento de velocidad, de acuerdo con la ecuación (5.2) para un disolvente con 90% v/v DMSO y agua, debe ser alrededor de 2 veces. El efecto observado para los iones Na^+ y K^+ es un orden de magnitud más grande. Por otro lado, el aumento de rapidez de la reacción observado en presencia de 0.045 M LiCl es 2.8 veces lo que es cercano al valor esperado para un efecto salino de Debye-Hückel.

En resumen, se encontró que el ion Li^+ (que tiene un radio pequeño), no afecta la velocidad de la reacción de manera específica, el ion K^+ con radio iónico grande y carga dispersa acelera la reacción pero en menor grado que el ion Na^+ de radio intermedio. Es probable, que el ión Na^+ neutralice eficientemente la carga sobre el sustrato y al mismo

tiempo sea suficientemente pequeño para permitir el ataque nucleofílico de OH^- al fósforo. Otra explicación posible del máximo que se observa en el caso de Na^+ considera dos tendencias opuestas. Los cationes pequeños pueden interactuar fuertemente con el sustrato y el estado de transición debido a que poseen mayor densidad de carga, al mismo tiempo su energía de solvatación es mayor, lo que hace estas interacciones energéticamente desfavorables. La acción de ambos procesos crea un óptimo entre la densidad de carga y tamaño del ion.

5.2.3 Efecto de Mg^{2+}

Al emplear DMSO se logró evitar el problema de precipitación de hidróxido de magnesio. Se observó que el efecto en presencia de Bu_4NOH era relativamente pequeño. Sin embargo, al utilizar NaOH como base el efecto catalítico fue sorprendente.

Los ajustes de las curvas cinéticas se llevaron a cabo con 3 ecuaciones diferentes: ajuste lineal cuando se hidrolizaba menos de 15 % de BNPP, ecuación de primer orden cuando el rendimiento variaba de 15 a 100 % de nitrofenol, y ecuación de primer orden para dos procesos consecutivos cuando la cantidad de nitrofenolato liberado superaba la cantidad de BNPP presente.

Los resultados obtenidos con ambas bases están en Tablas 5.18 y 5.19 y en forma gráfica en las Figuras 5.21 y 5.22. Se puede observar que la reacción en presencia de NaOH tiene un máximo fácilmente detectable, cuando la relación de Mg^{2+} y NaOH es alrededor de 2:5. Podemos suponer, que existe una especie activa en estas concentraciones de reactivos, que al variar la concentración desaparece, para dar lugar a las especies no reactivas, por ejemplo, el complejo $\text{Mg}(\text{OH})_2$. Para comprobar esta suposición, a continuación se hicieron varias titulaciones potenciométricas tanto en ausencia como en presencia de Na^+ que se discutirán más adelante.

Tabla 5.18 Hidrólisis alcalina de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Mg^{2+} 2 mM empleando NaOH como base.

[OH ⁻], M	$k_1 \times 10^4 s^{-1}$
0.001	0.40
0.002	4,6
0.003	7,6
0.004	12.9
0.005	13.7
0.006	7.0
0.007	1,3

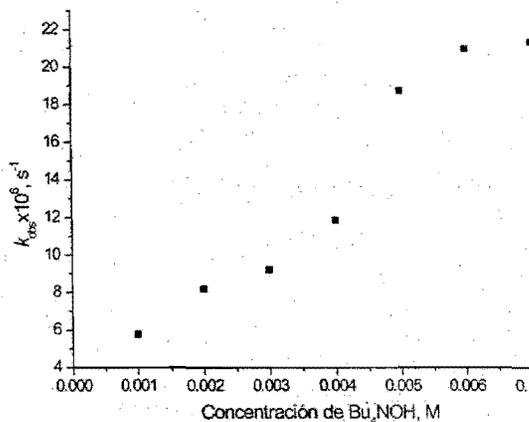


Figura 5.21. Datos de la tabla 5.18 en forma gráfica

Tabla 5.19 Hidrólisis alcalina de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Mg^{2+} 2 mM empleando Bu₄NOH como base.

OH ⁻ , M	$k_{obs} \times 10^6 s^{-1}$
0.001	5.76
0.002	8.20
0.003	9.21
0.004	11.86
0.005	18.76
0.006	21.02
0.007	21.39

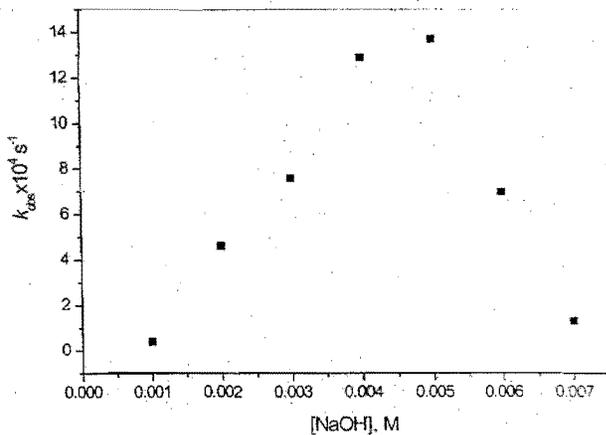


Figura 5.22 Datos de la tabla 5.19 en forma gráfica

Podemos ver, que aún en presencia de Bu_4NOH el efecto catalítico por parte del ion Mg^{2+} es más grande que cuando se usaron metales alcalinos y que el ion sodio aumenta drásticamente la actividad catalítica observada. Sin embargo, al agregar este ion en forma de NaOH , se desconoce la relación precisa de $\text{Mg}:\text{Na}$ necesaria para lograr el máximo de actividad catalítica.

Las siguientes tres series de experimentos fueron llevados a cabo de la siguiente manera: a una disolución de MgCl_2 2 mM en presencia de Bu_4NOH 5 mM usando como disolvente una mezcla de DMSO-agua 90 % v/v, se adicionaron cloruros de metales alcalinos a diferentes concentraciones, Tabla 5.20

Los resultados obtenidos empleando litio, sodio y potasio están en la gráfica 5.23. El efecto promotor de los cationes sigue el mismo orden que al acelerar la hidrólisis alcalina con Bu_4NOH : $\text{Li}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+$ (comparar figuras 5.20 y 5.23). Sin embargo, aún para litio el efecto es cercano a 10 veces, esto es, mayor que el esperado por un simple efecto salino. Además, los perfiles de velocidad vs. concentración de la sal tienen formas diferentes.

Tabla 5.20 Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % en presencia de iones Mg^{2+} 2 mM y diferentes concentraciones de sales de metales alcalinos. $[\text{Bu}_4\text{NOH}] = 5$ mM

LiCl , M	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$	NaCl , M	$k_{\text{obs}} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	KCl , M	$k_{\text{obs}} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
0	7.77	0	0.48	0	0.58
0.001	7.99	0.001	0.35	0.001	3.21
0.0025	9.87	0.0025	0.95	0.0025	20.32
0.005	13.92	0.005	81	0.005	20.75
0.006	15.77	0.006	126	0.006	26.10
0.0075	51.82	0.0075	104	0.0075	26.57
0.01	60.85	-	-	0.01	23.56

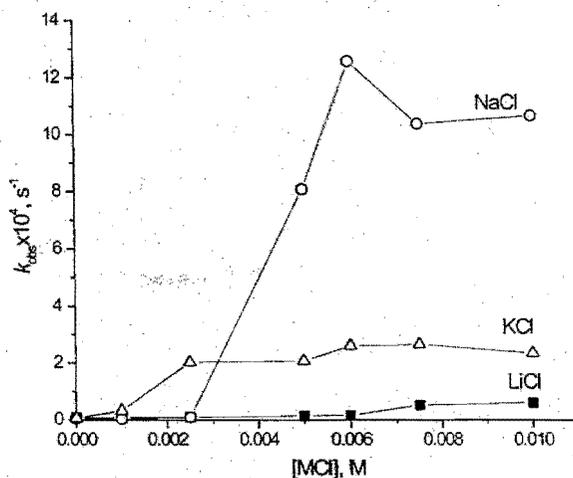
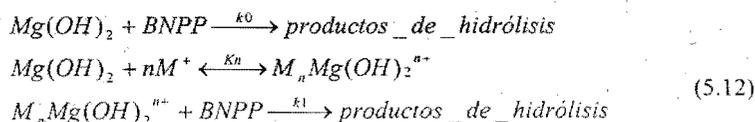


Figura 5.23 Efecto de los cloruros de metales alcalinos sobre la velocidad de hidrólisis de BNPP en presencia de iones Mg^{2+} en 90% DMSO.

En el caso de la hidrólisis alcalina con Bu_4NOH , la adición de la sal aumenta la velocidad proporcionalmente a su concentración de tal manera que k_{obs} es una función lineal de la concentración. En el caso de la reacción en presencia de Mg^{2+} el valor de k_{obs} crece rápidamente en un intervalo de concentración de la sal estrecho y después permanece prácticamente constante. Este comportamiento concuerda con la formación de un complejo con gran actividad catalítica, si se compara con otros cationes metálicos.

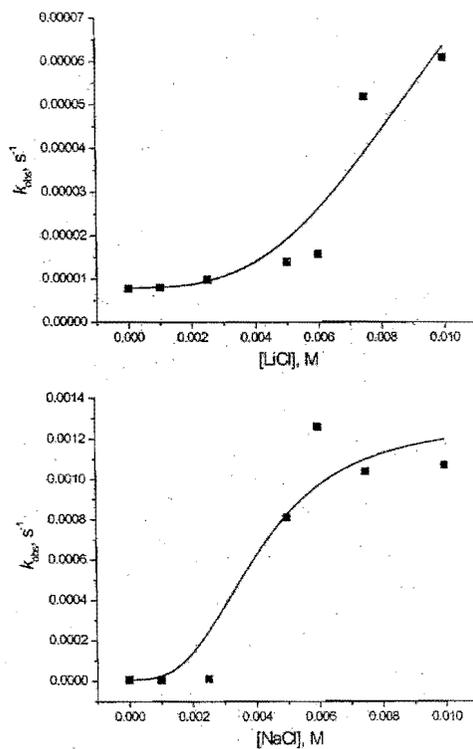
Los resultados de la titulación potenciométrica (ver abajo) indican la formación de sólo una especie hidroxilada en las disoluciones que contienen $MgCl_2$ y Bu_4NOH , $Mg(OH)_2$. Entonces, un esquema posible del efecto de los iones alcalinos es el siguiente:



y la ecuación correspondiente para k_{obs} queda de la siguiente forma:

$$k_{\text{obs}} = (k_0 + k_1 K_n [M^+]^n) [\text{Mg}(\text{OH})_2] / (1 + K_n [M^+]^n) \quad (5.13)$$

En la Figura 5.24 se muestran los ajustes de los resultados para las tres sales empleadas. Un ajuste satisfactorio requiere valor de "n" igual o mayor de 3. Esto concuerda con lo informado en la literatura:⁽²³⁾ una catálisis con diversos metales alcalinos en medios no acuosos (el trabajo citado se llevó a cabo en etanol). Los parámetros de los ajustes con n=3 están en la Tabla 5.21.



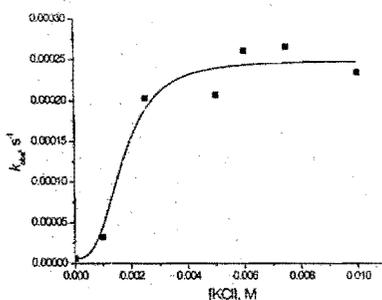
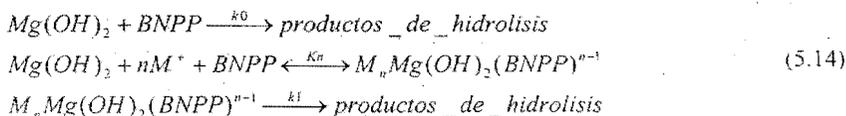


Figura 5.24 Ajustes de los resultados para el efecto de KCl sobre la velocidad de hidrólisis de BNPP en presencia de iones Mg^{2+} a la ecuación (5.13) con $n=3$.

Tabla 5.21 Parámetros de ajuste de efectos de sales de metales alcalinos sobre la velocidad de hidrólisis de BNPP en presencia de $MgCl_2$ usando la ecuación (5.13) con $n=3$.

	$k_1[Mg(OH)_2], s^{-1}$	$K_n M^{-3}$
LiCl	$(1.4 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	$(7.6 \pm 3.5) \times 10^5$
NaCl	0.0013 ± 0.0002	$(1.4 \pm 0.5) \times 10^7$
KCl	$(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^8$

Según el esquema 5.12 la “saturación” observada a alta concentración de la sal se debe a la transformación completa de $Mg(OH)_2$ a un complejo $M_nMg(OH)_2^{n+}$. El ajuste de los resultados a la ecuación (5.13) requiere de valores muy altos de K_n , lo cual no resulta razonable. Por otro lado es necesario tomar en cuenta que, en condiciones a las que se hizo el experimento, se tiene muy baja concentración del sustrato aniónico BNPP comparado con las concentraciones de metales. Por esto la “saturación” puede reflejar un alto grado de complejación del sustrato con la especie $M_nMg(OH)_2^{n+}$. El esquema correspondiente incluye el sistema de ecuaciones 5.14



y la ecuación correspondiente para k_{obs} , ecuación 5.15, tiene una forma indistinguible de la ecuación 5.13:

$$k_{\text{obs}} = (k_0 + k_1 K_n [M^+]^n) [\text{Mg}(\text{OH})_2] / (1 + K_n [\text{Mg}(\text{OH})_2] [M^+]^n) \quad (5.15)$$

Para establecer cuáles son las especies presentes en el sistema realizamos la titulación potenciométrica de MgCl_2 en presencia y en ausencia de Na^+ con Bu_4NOH en DMSO 90 % v/v, Figura 5.26. Para garantizar que al inicio de la titulación la disolución no contiene hidroxocomplejos metálicos, se añadió HCl 1 mM. La titulación del exceso de ácido fuerte sirvió además para comprobar la calibración del electrodo que en un medio con alta concentración de DMSO y baja concentración de agua puede ser poco reproducible.

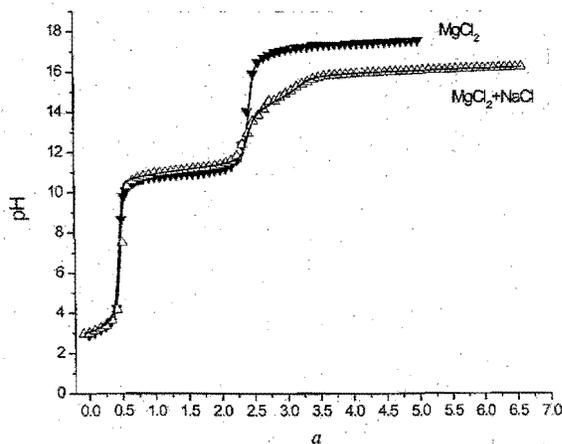
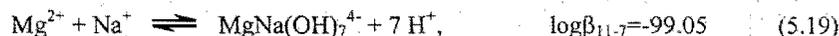
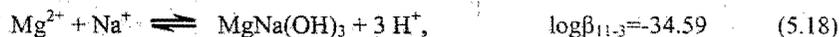
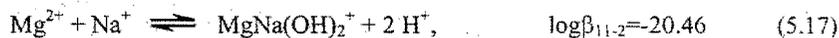


Figura 5.25 Titulación potenciométrica de MgCl_2 2 mM sólo y en presencia de NaCl 6 mM. En ambos casos la disolución contiene 1 mM de HCl añadido para suprimir la formación de hidroxocomplejos metálicos al inicio de titulación. Las líneas son los perfiles teóricos generados por HYPERQUAD 2000 con las constantes de las ecuaciones 5.16 - 5.19.

Los datos fueron introducidos al programa Hyperquad2000. Los ajustes realizados por el programa a las curvas de titulación dieron las siguientes constantes de equilibrio para las especies presentes en la disolución.



La titulación de MgCl_2 en ausencia de NaCl muestra solo un salto de potencial correspondiente a la formación de hidróxido neutro $\text{Mg}(\text{OH})_2$, ecuación 5.16. Es interesante que en este medio es posible observar la formación de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ que no precipita a concentraciones tan elevadas como 2 mM mientras que en agua la solubilidad máxima de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ es solamente 0.18 mM a la misma temperatura. Aparentemente esto se debe a que existe una solvatación más fuerte del centro metálico por moléculas de DMSO que por moléculas de agua. La titulación de la mezcla MgCl_2 en presencia de NaCl da el mismo valor de $\log\beta_{1-2}$ y además los equilibrios adicionales 5.17-5.19, de los cuales el último parece poco probable; es posible que en realidad refleje un error de sodio común en electrodos de vidrio a altos valores de pH;⁽³⁸⁾ este puede ser más pronunciado en esta mezcla agua-disolvente orgánico. Este error distorsiona los valores de todas las constantes obtenidas mediante el ajuste de los datos en la de mezcla MgCl_2 con NaCl y por ello esta titulación sólo puede ser analizada de manera cualitativa: a partir de estas titulaciones se comprueba la existencia de hidroxocomplejos mixtos de ambos cationes.

En la titulación de MgCl_2 no se detectó la presencia de la especie MgOH^+ , probablemente debido a la dismutación de esta especie para dar lugar a $\text{Mg}(\text{OH})_2$. El hidróxido neutro no posee carga positiva, por lo cual no neutraliza la carga sobre el sustrato y la actividad catalítica observada es baja. A continuación se presenta un análisis de los resultados obtenidos con Sr^{2+} que comprueba que la actividad catalítica del complejo catiónico MOH^+ es mucho mayor que la del complejo neutro $\text{M}(\text{OH})_2$.

5.2.4 Efecto de Ca^{2+}

En el caso de ion Ca^{2+} se determinó la dependencia de la rapidez del hidrólisis respecto a la concentración del ion hidróxido a 3 concentraciones diferentes del metal, Tablas 5.22 y 5.23, Figuras 5.26 y 5.27. No se observó un efecto promotor de Na^+ significativo y a pesar de que la rapidez de la reacción con Bu_4NOH para Ca^{2+} fue mayor que para Mg^{2+} , las velocidades de reacción fueron mucho menores que en el caso de mezcla de Mg^{2+} con Na^+ .

Tabla 5.22. Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Ca^{2+} a diferentes concentraciones, la base empleada es NaOH.

Ca^{2+} 1 mM		Ca^{2+} 1.5 mM		Ca^{2+} 2 mM	
[NaOH], M	$k_{\text{obs}} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	[NaOH], M	$k_{\text{obs}} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	[NaOH], M	$k_{\text{obs}} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
0.0005	0.68	0.00075	3.34	0.001	5.16
0.001	2.97	0.0015	8.65	0.002	6.65
0.0015	3.85	0.00225	8.81	0.003	10.94
0.002	3.92	0.003	1.86	0.004	5.70
0.0025	0.27	0.00375	0.55	0.005	1.90
0.003	1.22	0.0045	0.26	0.006	0.90
0.004	0.13	0.00525	0.20	0.007	0.83

Tabla 5.23 Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Ca^{2+} a diferentes concentraciones, la base empleada es Bu_4NOH .

Ca^{2+} 0.5 mM		Ca^{2+} 1 mM		Ca^{2+} 1.5 mM	
$[\text{OH}^-]$, M	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$	$[\text{OH}^-]$, M	$k_{\text{obs}} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	$[\text{OH}^-]$, M	$k_{\text{obs}} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
0.0003	9.41	0.0005	0.32	0.0005	9.16
0.0005	11.56	0.001	14.06	0.001	10.6
0.0007	3.03	0.0015	17.69	0.0015	14.6
0.0013	1.84	0.002	6.02	0.002	4.7
0.0012	2.20	0.0025	0.92	0.0025	0.26
0.0015	0.70	0.003	0.20	0.003	0.18
0.002	0.62			0.004	0.087

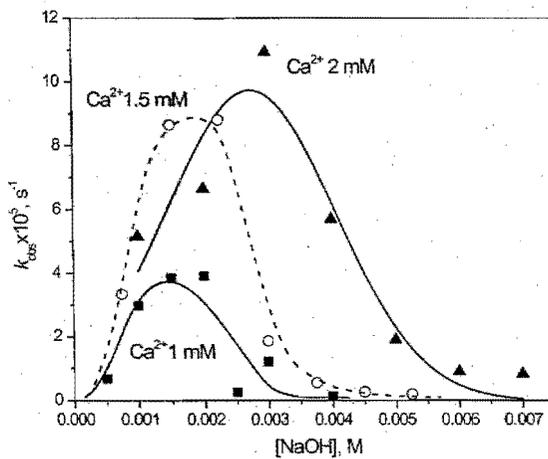


Figura 5.26 Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Ca^{2+} empleando como base NaOH .

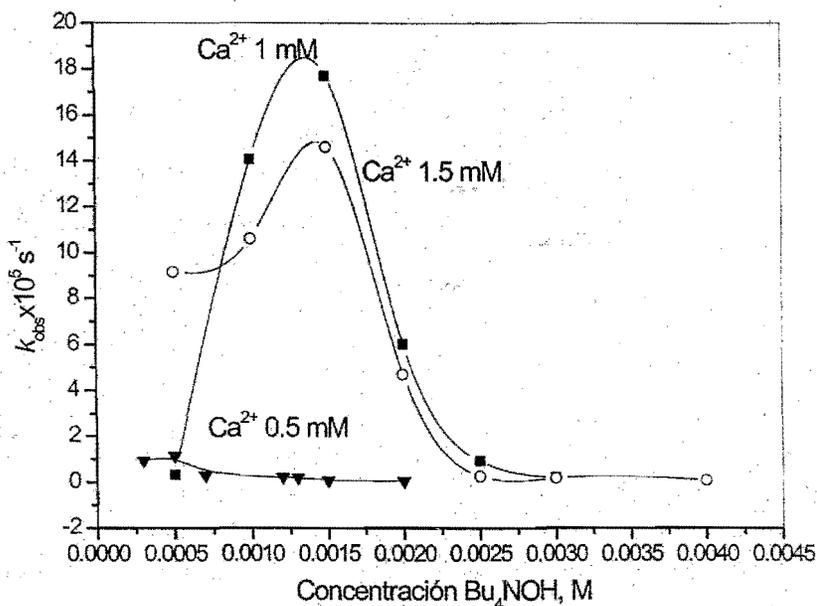


Figura 5.27 Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Ca^{2+} empleando como base Bu_4NOH .

Los perfiles de hidrólisis en presencia de iones Ca^{2+} presentan un máximo cuando la relación molar entre el metal y base empleada es alrededor de 1:1.5 y un brusco decaimiento en la velocidad de la reacción cuando esta relación supera el valor de 1:2. Aparentemente la reactividad del complejo neutro $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es baja y la especie reactiva debe ser CaOH^+ . Al mismo tiempo, una menor reactividad en presencia de iones Na^+ indica que los complejos mixtos del tipo $\text{CaNa}_n(\text{OH})_2^{n+}$ son menos activos que CaOH^+ . Cabe señalar que se desconoce el efecto de la especie activa MgOH^+ que también podría superar al efecto del complejo $\text{MgNa}_n(\text{OH})_2^{n+}$.

La comparación de los valores de k_{obs} en el máximo de cada perfil para diferentes concentraciones del catión Ca^{2+} , muestra una "saturación" a altas concentraciones de metal. Este fenómeno se observa más claramente en los resultados con Sr^{2+} que se presentan a continuación.

5.2.5. Efecto de Sr^{2+}

Se usaron diferentes concentraciones del ion metálico con ambas bases. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Tabla 5.24 Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Sr^{2+} . La base empleada es NaOH.

0.5 mM Sr^{2+}		1 mM Sr^{2+}		1.5 mM Sr^{2+}	
OH ⁻ , M	$k_{obs} \times 10^5 s^{-1}$	OH ⁻ , M	$k_{obs} \times 10^4 s^{-1}$	OH ⁻ , M	$k_{obs} \times 10^4 s^{-1}$
0.0003	0.60	0.0005	2.22	0.0005	0.13
0.0005	0.98	0.001	2.70	0.001	0.14
0.0007	1.12	0.0015	3.9	0.0015	0.28
0.001	3.14	0.002	4.9	0.002	1.17
0.0012	9.01	0.0025	1.17	0.0025	4.4
0.0015	17.92	0.003	0.58	0.003	5.5
0.002	6.99	0.0035	0.35	0.004	5.0

El mismo experimento fue llevado a cabo con hidróxido de tetrabutilamonio como base.

Tabla 5.25 Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Sr^{2+} . La base empleada es Bu_4NOH .

0.5 mM Sr^{2+}		1.0 mM Sr^{2+}		1.5 mM Sr^{2+}		2.0 mM Sr^{2+}	
OH^- , M	$10^4 k_{\text{obs}} \text{s}^{-1}$	OH^- , M	$k_{\text{obs}} \times 10^4 \text{s}^{-1}$	OH^-	$k_{\text{obs}} \times 10^4 \text{s}^{-1}$	OH^- , M	$k_{\text{obs}} \times 10^4 \text{s}^{-1}$
0.00025	0.04	1E-3	6.8*	5E-4	8.5*	1E-3	1.56
0.0005	0.13	0.0015	7.7*	1E-3	8.5*	0.002	9.4
0.001	1.28	0.002	7.2*	0.0015	11.3*	0.003	14.8
0.00125	1.80	0.003	6.9*	0.002	10.1*	0.004	0.004
0.0015	8.8*	0.0035	3.2	0.003	1.3	0.005	0.003
0.00175	0.68	0.004	0.524	0.004	0.12	0.006	0.004
0.002	0.01	0.0045	0.05			0.007	0.002

* Es el valor de ajuste a la ecuación (4.3)

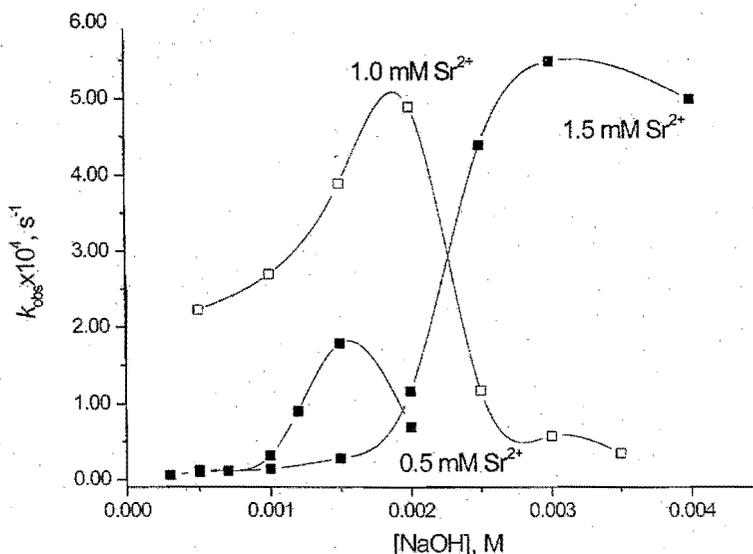


Figura 5.28. Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v utilizando NaOH como fuente de hidróxido en presencia de iones Sr^{2+} .

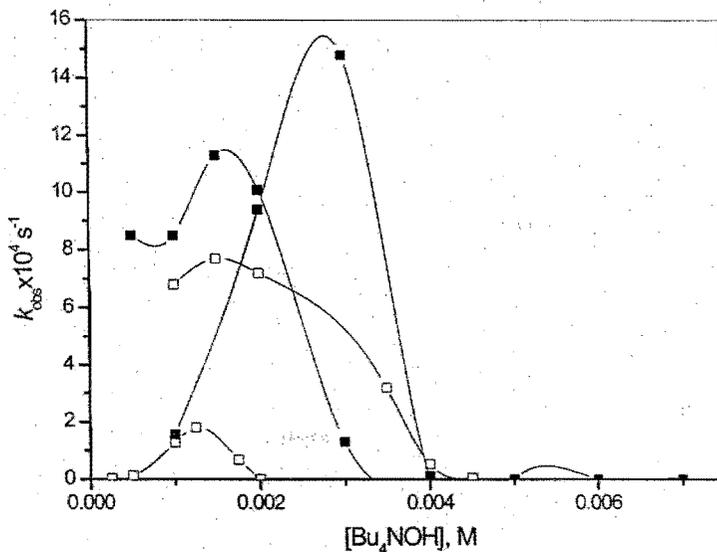


Figura 5.29 Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v utilizando Bu₄NOH como fuente de hidróxido en presencia de iones Sr²⁺.

La constante de rapidez obtenida en presencia de este catión es muy grande. La presencia de NaOH abate la rapidez de la reacción alrededor de dos veces si se compara con la reacción en presencia de Bu₄NOH. Al mismo tiempo, la presencia de iones sodio desplaza el máximo en el perfil de velocidades a una concentración de hidróxido cercana a $2 \times [\text{Sr}^{2+}]$. Por analogía con la reacción ocurrida en presencia de iones Mg²⁺ y Ca²⁺ se puede suponer que en la disolución existen dos especies activas: SrOH⁺ y SrNa(OH)₂⁺, sin embargo, la actividad de la segunda especie es menor.

Debido a la mayor actividad catalítica de Sr²⁺ en ausencia de Na⁺, los equilibrios en disolución para este sistema fueron estudiados con más detalle. Las titulaciones potenciométricas se hicieron en DMSO 90 % v/v, Figura 5.30.

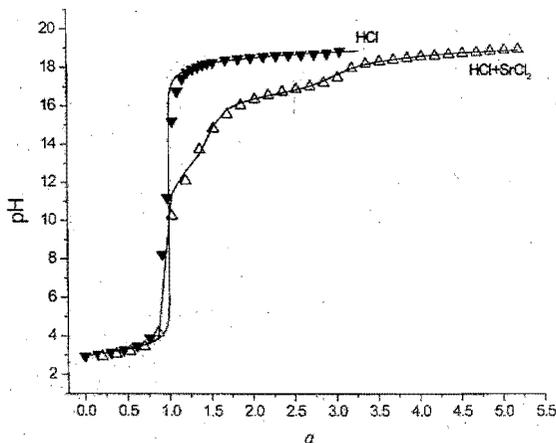


Figura 5.30 Curva de titulación de HCl 1 mM (triángulos negros) y de SrCl₂ 1 mM en presencia de HCl 1 mM (triángulos abiertos) en 30 mL de DMSO acuoso 90 % v/v con Bu₄NOH 0.1 M.

En la curva de titulación de SrCl₂ son claramente visibles dos puntos de inflexión: el primero que corresponde al consumo de 1 equivalente molar de OH⁻ por dos equivalentes del catión metálico y una segunda que corresponde al consumo de dos equivalentes de OH⁻ por un equivalente del catión. Las especies correspondientes según el ajuste en Hyperquad2000 son Sr₂OH³⁺ y Sr(OH)₂. Sin embargo el ajuste de los resultados de la titulación solamente con estas dos especies no es totalmente satisfactorio con base en el valor del parámetro de dispersión σ por lo que se incluyó una la especie adicional, SrOH⁺, que mejoró significativamente el ajuste (el valor del parámetro de dispersión sigma disminuye de 3.2 a 2.1 al incluir el complejo monohidroxo). Los equilibrios y las constantes de formación obtenidos con ajuste en el programa de Hyperquad2000 son las siguientes:



Empleando estas ecuaciones es posible calcular las concentraciones de todas las especies presentes en la disolución para las concentraciones totales de SrCl_2 y Bu_4NOH utilizadas en los experimentos de cinética y correlacionar los valores de k_{obs} con las especies encontradas. El cálculo fue realizado de la siguiente manera. Se pueden escribir las siguientes dos ecuaciones de balance de masa para Sr^{2+} y OH^- respectivamente (5.23 y 5.24).

$$[\text{Sr}^{2+}]_r = [\text{Sr}^{2+}] + 2 \times [\text{Sr}_2\text{OH}^{3+}] + [\text{SrOH}^+] + [\text{SrOH}_2] \quad (5.23)$$

$$[\text{OH}^-]_r = [\text{OH}^-] + [\text{Sr}_2\text{OH}^{3+}] + [\text{SrOH}^+] + 2 \times [\text{SrOH}_2] \quad (5.24)$$

y haciendo uso de las constantes de formación obtenidas, se transforma en el siguiente sistema de ecuaciones.

$$\begin{cases} [\text{Sr}^{2+}]_r = [\text{Sr}^{2+}] + 2 \times 10^{11.91} [\text{Sr}^{2+}]^2 [\text{OH}^-] + 10^{6.96} [\text{Sr}^{2+}] [\text{OH}^-] + 10^{11.76} [\text{Sr}^{2+}] [\text{OH}^-]^2 \\ [\text{OH}^-]_r = [\text{OH}^-] + 10^{11.91} [\text{Sr}^{2+}]^2 [\text{OH}^-] + 10^{6.96} [\text{Sr}^{2+}] [\text{OH}^-] + 2 \times 10^{11.76} [\text{Sr}^{2+}] [\text{OH}^-]^2 \end{cases} \quad (5.25)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones con el programa *Mathematica 4* para diversas concentraciones del metal, se puede calcular la concentración de cada especie en cada punto experimental. La comparación de las curvas de distribución de estas especies con valores de k_{obs} mostró claramente que la velocidad correlaciona únicamente con la concentración de $\text{Sr}(\text{OH})^+$ que, se concluye, es la especie activa. La Figura 5.32 muestra grafica de k_{obs} vs. la concentración de $\text{Sr}(\text{OH})^+$.

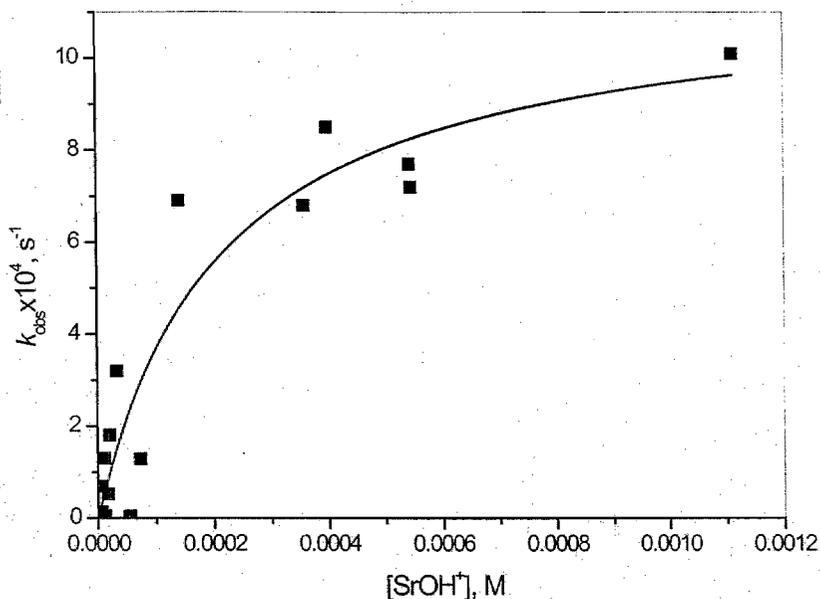
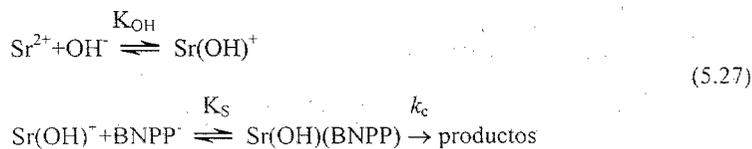


Figura 5.31 Cambio en la velocidad de reacción al variar la concentración de la especie activa SrOH^+ .

La dependencia observada tiene la forma de la ecuación 5.26, que es una modificación de la ecuación de Michaelis-Menten.

$$k_{\text{obs}} = k_c K_S [\text{SrOH}^+] / (1 + K_S [\text{SrOH}^+]) \quad (5.26)$$

donde la constante catalítica es $k_c = (1.2 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y la constante de asociación de la especie activa al sustrato es $K_S = (4.6 \pm 1.9) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. La reacción concuerda con el mecanismo 5.27:



El mecanismo es similar al observado para la catálisis con iones metálicos en agua, pero para los metales alcalinotérreos en este medio los valores de K_{OH} y K_S son muy pequeños (Sr^{2+} $K_{OH}=6.3 M^{-1}$ ⁽³⁹⁾ y $K_S \approx 1 M^{-1}$ (valor estimado a partir de la constante de estabilidad de Sr^{2+} con el ion $H_2PO_4^-$ de estructura similar a BNPP, considerando que la constante para la especie $SrOH^+$ tiene que ser menor).⁽³⁹⁾ Al sustituir estos valores en la ecuación 5.27, aún con el mismo valor de la constante catalítica k_c , los valores de k_{obs} en agua para la mezcla de Sr^{2+} 1 mM y NaOH 2 mM sería $1.5 \times 10^{-8} s^{-1}$ en vez del valor obtenido de $7.2 \times 10^{-4} s^{-1}$ en 90% v/v DMSO (Tabla 5.25). Esto indica que el factor principal de la mayor actividad catalítica en dimetilsulfóxido es el gran aumento en la afinidad del sustrato hacia el catalizador lo que aumenta el efecto de hormado del ion metálico.

5.2.6 Efecto del ión Ba^{2+}

En el caso de reacciones con Ba^{2+} se observó una alta actividad del metal, pero debido a que la precipitación del hidróxido de bario ocurría a concentraciones del metal y OH^- muy bajas, fue imposible una caracterización completa de este sistema.

Tabla 5.26 Hidrólisis de BNPP en DMSO 90 % v/v en presencia de iones Ba^{2+} . La base empleada es Bu_4NOH .

Ba^{2+} 0.5 mM		Ba^{2+} 1 mM		Ba^{2+} 1.5 mM	
[OH] ⁻ , M	$k_{obs} \times 10^5, s^{-1}$	[OH] ⁻ , M	$k_{obs} \times 10^5, s^{-1}$	[OH] ⁻ , M	$k_{obs} \times 10^5, s^{-1}$
0.00035	0.09	0.0005	19.61	0.0005	19.61
0.00065	5.25	0.001	24.29	0.001	24.29
0.00085	7.44	0.0015	25.91	0.0015	25.91
0.00135	5.11	0.002	17.40	0.002	17.40
0.00155	7.05	0.0025	6.37	0.0025	6.37
0.00205	0.85	0.003	4.92	0.003	4.92
		0.004	1.39	0.004	1.39

Graficando estos resultados obtenemos lo siguiente.

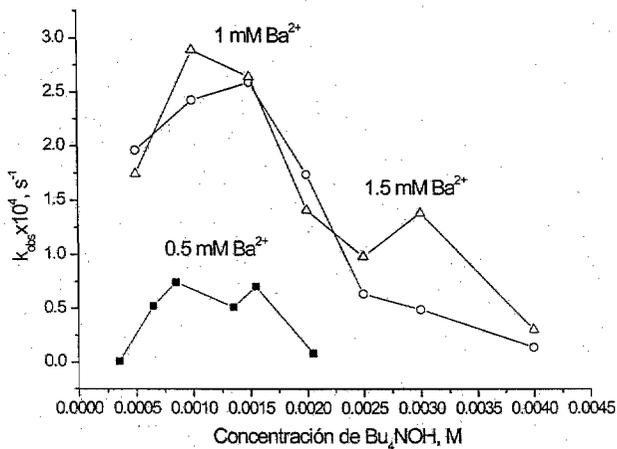


Figura 5.32 Resultados de la tabla 5.26 en forma gráfica.

En presencia de NaOH aparece la precipitación del hidróxido de Ba^{2+} a concentraciones de OH^- mayores que 3 mM. Sólo fue posible hacer mediciones con una concentración de BaCl_2 , 0.5 mM. El resultado obtenido fue el siguiente, Tabla 5.27.

Tabla 5.27 Hidrólisis básica de BNPP en DMSO acuoso 90 % v/v en presencia de 0.5 mM de iones Ba^{2+} . La base utilizada de concentración variable es NaOH

OH ⁻ , M	$k_{\text{obs}} \times 10^{-6}, \text{s}^{-1}$
0.0003	0.2311
0.0005	20.79
0.001	49.38
0.0012	30.33
0.0015	18.049
0.002	10.37
0.0025	6.60

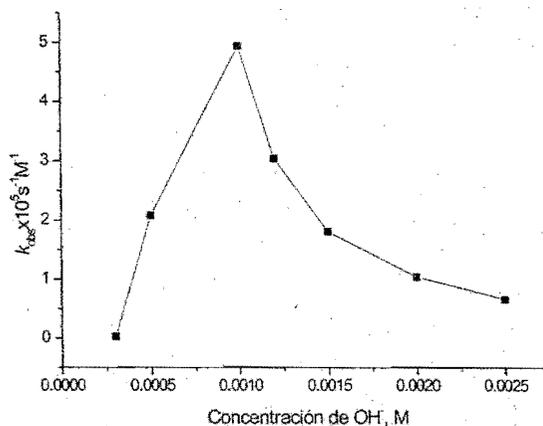


Figura 5.33 Resultados de la tabla 5.27 en forma gráfica.

5.2.7 Resumen de los resultados de la hidrólisis de diésteres fosfato en mezclas DMSO-agua

En las mezclas de DMSO y agua los metales alcalinotérreos presentaron constantes de velocidad observadas muy grandes. Al mismo tiempo, el comportamiento de estas especies en la disolución fue muy diferente a lo esperado. Por lo visto, la especie activa en todos los casos se encuentra presente en un intervalo muy estrecho de concentraciones de metal y de hidróxido. Es imposible determinar la constante de formación de este complejo a partir de los datos cinéticos obtenidos, sólo por la variación de la concentración del ligante del sistema. Es necesario emplear otras técnicas para identificar y calcular la constante de estabilidad de las especies activas presentes, por ejemplo, potenciometría.

En la Tabla 5.28 se resumen las constantes de velocidad de segundo orden observadas para los medios acuoso y mezcla con 90% v/v de DMSO. Se puede observar que al emplear una base con un catión inerte, Bu₄NOH en DMSO o una base con un catión alcalino, NaOH, en agua, hay un máximo en la actividad para un catión del tamaño intermedio: Ca²⁺ en agua y Sr²⁺ en DMSO. Sin embargo, en DMSO observamos la cooperación del ión Na⁺, lo que hace que el sistema con Mg²⁺ se vuelva mucho más activo, y las constantes observadas obtenidas superan los valores observados en los sistemas con Sr²⁺ y Ca²⁺. Cabe señalar, que en estos dos últimos sistemas en DMSO, el ión Na⁺ no presenta ningún efecto e incluso inhibe la reacción de Ca²⁺ probablemente compitiendo con este metal por el sustrato.

Tabla 5.28 Constantes catalíticas obtenidas en DMSO con dos bases diferentes y en agua a 70°C para los metales alcalinotérreos estudiados.

Metal	$k_2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con Bu ₄ NOH ^{a)}	$k_2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con NaOH ^{a)}	$k_2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en agua a 70°C ^{b)}
Mg ²⁺	0.01	0.68	0.00079
Ca ²⁺	0.18	0.04	0.051
Sr ²⁺	0.77	0.49	0.016
Ba ²⁺	0.26	0.06	0.0083

a) constante de velocidad de segundo orden, estimado del valor máximo de k_{obs} .

b) constantes de velocidad para la reacción de BNPP + M(OH)⁺

La principal razón de la mayor actividad de estos cationes en DMSO es el aumento de las constantes de formación para las especies activas, lo que permite obtener un gran efecto catalítico en concentraciones de metal y OH⁻ muy bajas.

Para concluir, el uso de un disolvente dipolar aprótico y bajas concentraciones de agua ayuda a mejorar la actividad catalítica de metales alcalinotérreos en la hidrólisis de

diésteres fosfato. Las constantes de rapidez obtenidas para iones Sr^{2+} y Mg^{2+} en DMSO 90 % v/v son mayores que los valores informados para los acuaiones de lantánidos.⁽⁸⁾ Es probable que estos valores sean mayores que las constantes de rapidez de la hidrólisis que presentan los iones lantánidos en DMSO ya que se sabe que su actividad decrece en mezclas DMSO-agua.⁽²²⁾ Los resultados indican la importancia del efecto de un medio con bajo contenido de agua que ayuda a ácidos de Lewis débiles, como lo son los metales alcalinotérreos, a activar de manera eficiente al sustrato y al nucleófilo.

6. Conclusiones

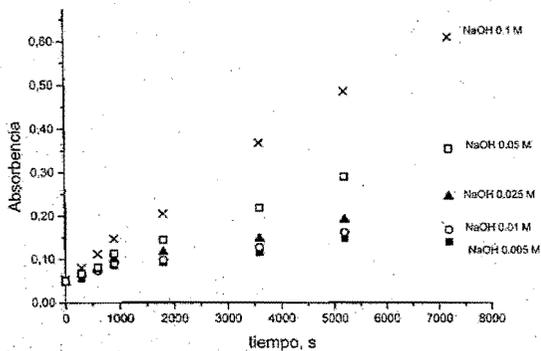
- ❖ Los cationes de metales alcalinotérreos muestran actividad catalítica en la hidrólisis alcalina de BNPP en agua detectable a 70°C. Las especies activas son complejos $M(OH)^+$ y la actividad varía en la serie de cationes estudiados en el orden: $Mg^{2+} \ll Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$. Se observaron efectos de aceleración hasta de un orden de magnitud, en presencia de 0.01-0.1 M de cationes.
- ❖ En mezclas DMSO-agua con 90 % v/v de DMSO, el efecto catalítico de los metales alcalinotérreos se incrementa considerablemente y además aparece un notable efecto catalítico de metales alcalinos, particularmente grande para Na^+ . La actividad catalítica varía en el orden: $Mg < Ca < Sr > Ba$. La aceleración de la hidrólisis de BNPP aumenta hasta 5 órdenes de magnitud en presencia de $Sr(II)$ 1 mM.
- ❖ Se observa un efecto de cooperación entre los cationes Mg^{2+} y Na^+ de tal manera que en presencia de Na^+ el Mg^{2+} tiene una actividad comparable con la del Sr^{2+} .
- ❖ Mediante titulaciones potenciométricas se determinaron la composición y la estabilidad de los hidroxocomplejos de Sr^{2+} y Mg^{2+} en mezclas DMSO-agua con 90% de DMSO v/v.
- ❖ La catálisis más eficiente se obtuvo con el ion Sr^{2+} . Al mismo tiempo, este catión se comporta de una forma sencilla por lo cual fue posible proponer un mecanismo de reacción.

7. Bibliografía

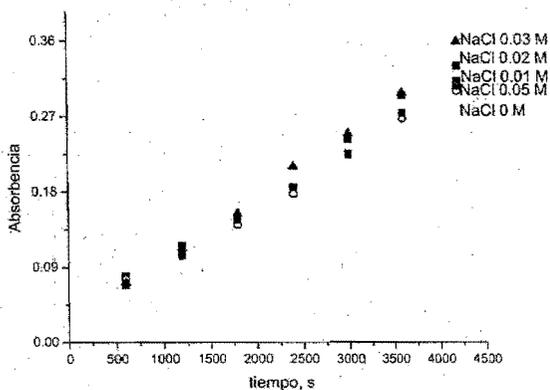
1. F.H. Westheimer, Why nature chose phosphates, *Science*, **1987**, 235, 1173
2. D. Voet, J. Voet *Biochemistry* 2ª Edición, Wiley Text Books, Capítulo 15 (424-455), **1995**
3. R. Kramer, Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, 182, 243
4. A.J. Kirby, M. Yonas The reactivity of Phosphate Esters, Diester Hydrolysis, *Journal of Chemical Society (B)*, **1970**, 510
5. H.-J. Schneider, A. K. Yatsimirsky, Lanthanide-Catalysed Hydrolysis of Phosphate Esters and Nucleic Acids in *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel y H. Sigel editores, M. Dekker, Inc., New York, **2003**, Vol. 40, p. 369
6. E.T. Kaiser, K. Kudo The Alkaline Hydrolysis of Aromatic Esters of Phosphoric Acid *Journal of American Chemical Society* **1967**, 89, p. 6725
7. M. Komiyama, Sequence-specific and hydrolytic scission of DNA and RNA by lanthanide complex-oligo DNA hybrids, *Journal of Biochemistry*, **1995**, 118, 665
8. (a) E.L. Hegg, J.N. Burstyn, Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. *Coordination Chemistry Reviews*, **1998**, 173, 133; (b) M. A. De Rosch, W. C. Trogler, Hydrolysis of phosphodiester with Ni(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II) and Pt(II) complexes, *Inorganic Chemistry*, **1990**, 29, 2409
9. (a) S.J. Franklin, Lanthanide-mediated DNA hydrolysis, *Current Opinion Chemical Biology*, **2001**, 5, 201 (b) M. Komiyama, N. Takeda, H. Shigekawa Hydrolysis of DNA and RNA by lanthanide ions: mechanistic studies leading to new applications. *Chemical Communications*, **1999**, 1443 (c) P. Gomez-Tagle, A. K. Yatsimirsky, Kinetics of phosphodiester hydrolysis by lanthanide ions in weakly basic solutions, *Journal of Chemical Society Dalton Transactions*, **1998**, 2957
10. D.J. Weber, A.K. Meeke, A.S. Mildvan, *Biochemistry* **1991**, 30, 6103
11. A. J. Parker Protic-dipolar aprotic solvent effects on rates of bimolecular reactions, *Chemical Reviews*, **1969**, 69-1, 1
12. C. Kalidas, G. Hefter, Y. Marcus Gibbs Energies of Transfer of Cations from Water to Mixed Aqueous Organic Solvents, *Chemical Reviews*, **2000**, 100-3, 819
13. M. Chaudhry, Y. Kinjo, I. Persson Thermodynamic Study on the Transfer of the Tin (II), Lead(II) and Alkaline-earth-metal Ions from Water to Methanol, Dimethyl Sulfoxide, Acetonitrile, Pyridine and N,N-Dimethylthiourea. *Journal of Chemical Society Faraday Transactions*, **1994**, 2683
14. G. W. Castellan *Fisicoquímica* Addison-Wesley Iberoamericana 2ª Edición **1987**, p 184.

15. W. F. K. Wynne-Jones, H. Eyring, *Journal of Chemical Physics*, **1935**, *3*, 492
16. (a) C. L. Perrin, J. Pressing A Simple model for Lineal salt Effect in Solvolysis Reactions. *Journal of American Chemical Society*, **1971**, *93*, 5705, (b) M. C. Rezende, C. Zucco, D. Zanette Polarity and salt effect: a general empirical relationship, *Tetrahedron*, **1985**, *41*, p 87
17. M. Calligaris, O. Carugo Structure and bonding in metal sulfoxide complexes, *Coordination Chemistry Reviews*, **1996**, *153*, 83
18. J. Catalan, C. Diaz, F. Garcia-Blanco, Characterization of binary Solvent Mixtures of DMSO with Water and other Cosolvents, *Journal of Organic Chemistry*, **2001**, *66*, 5846
19. E. Bunce, H. Wilson Physical Organic Chemistry of Reactions in Dimethyl Sulfoxide, *Advanced Physical Organic Chemistry*, Vol. 14, Academic Press, London, **1977**, 133
20. (a) R.H. Hoff, A.C. Hengge Entropy and Enthalpy Contributions to Solvent effects on Phosphate monoester Solvolysis. The importance of Entropy Effects in Dissociative Transition State. *Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 6680, (b) P.K. Gryska, Pr.G. Czyryca, J. Golightly, K. Small, P. Larsen, R. Hoff, A. C. Hengge. Generality of Solvation Effects on Hydrolysis Rates of Phosphate Monoesters and Their Possible Relevance to Enzymatic Catalysis, *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 1214
21. K. Abell, A.J. Kirby Acceleration of P-O cleavage Reactions of Phosphate Monoester Dianions in Dipolar Aprotic Solvents, *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27-9*, 1085
22. T. Liu, H.-J. Schneider Temperature and Solvent Effects on the Europium(III)-catalyzed Hydrolysis of Bis-(nitrophenyl) Phosphate *Supramolecular Chemistry*, **2002**, *14*, 231.
23. R. Nagelkerke, G.R.J Thatcher, E. Bunce, Alkali metal ion catalysis and inhibition in nucleophilic displacement reactions at carbon, phosphorus and sulfur centres. IX. P-Nitrophenyl diphenyl phosphate: *Organic Biomolecular Chemistry*, **2003**, *1*, 163
24. D. Herschlag, W. P. Jencks The Effect of Divalent Metal Ions on the Rate and Transition-State Structure of Phosphoryl-Transfer Reactions *Journal of American Chemical Society* **1987**, *109*, 4665
25. M. Yashiro, M. Higuchi, Y. Washizu, M. Komiyama Effect of Alkaline Earth Metal Ions on the Phosphodiester Hydrolysis of RNA, *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **2002**, *75*, 1843
26. M. Komiyama, A. Kuzuya, R. Mizoguchi Site Selective Activation of RNA Leading to Sequence-Selective RNA Cutters, *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **2002**, *75*, 2547
27. N. Williams Magnesium Ion Catalyzed ATP Hydrolysis, *Journal of American Chemical Society*, **2000**, *122*, 12023
28. Cherbuliez E., Leber, J.-P *Helvetica Chimica Acta*, **1953**, *36*, 537
29. C. W. Helleiner, G. C. Butler The hydrolysis of phosphate diesters with barium hydroxide. *Canadian journal Of Chemistry*, **1955**, *33*, 705

Anexo I.
Curvas cinéticas

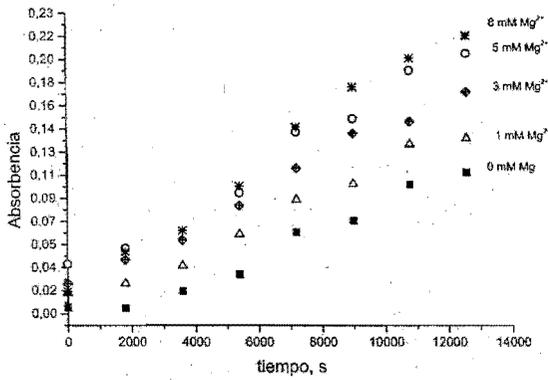


Gráfica 1A. Hidrólisis básica de BNPP 1×10^{-4} M y [NaOH] variable a 70° C en agua.

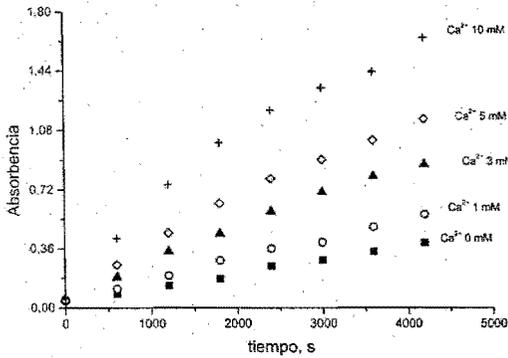


Gráfica 2A. Hidrólisis básica de BNPP en presencia de NaCl. Condiciones de reacción NaOH 0.075 M, BNPP 1×10^{-4} M, NaCl variable, 70° C

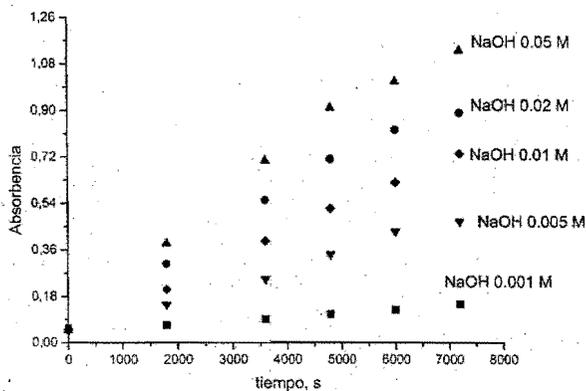
30. dos Santos, O., Lajmi, A. R., Canary, J. W. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 4383
31. J. Bassett J, Mendham, G. H. Jeffery, R. C. Denney, *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*. Addison-Wesley Pub. Co; 5a edición **1989**
32. A.Johansson, S.Johansson, Automatic titration by stepwise addition of equal volumes of titrant. Part III. Use of linear equations to calculate equivalence volumes in acid-base titrations, *Analyst*, **1978**, *103*, 305.
33. E. M. Woolley, L.G. Hepler Apparen Ionization Constants of Water in Aqueous Organic Mixtures and Acid Dissociation Constants of Protonated Co-Solvents in Aqueous Solution, *Analytical Chemistry*, **1972**, *44*, 1520
34. H-J Schneider, A. Yatsimirsky *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Ed. Wiley, **2000**, p. 128
35. J. E. Huheey *Química inorgánica: principios de estructura y reactividad* 4ª Edición. Mexico. Harla, **1981**, 77-80
36. a) R. S. Drago, B. B. Wayland *Journal of American Chemical Society*. **1965**, *87*, 3571; b) V. Gulmann *Electrochimica Acta* **1976** *21*, 661 c) J. E. Huheey *Química inorgánica: principios de estructura y reactividad* 4ª Edición. Mexico. Harla, **1981**, 300-330
37. R.D.Hancock, A.E.Martell, Lewis Acid-Base Behavior in Aqueous Solution: Some Implications for Metal Ions in Biology *Advances in Inorganic Chemistry*,. **1995**, *42*, 89
38. G. E. Lienhard Enzymatic catalysis and Transition-State Theory, *Science*,**1973**, *180*, 149
39. H. Galster *pH Measurement. Fundamentals, Methods, Applications, Instrumentation*, VCH **1991**, 138-142
40. R.M.Smith and A.E. Martell, "Critical Stability Constants", Plenum Press, New York, 1976, Vol.4
41. R. M. Milburn, M. Cautam-Basak, R. Tribolet, and H. Sigel, *Journal of American Chemical Society* **1985**, *107*, 3315



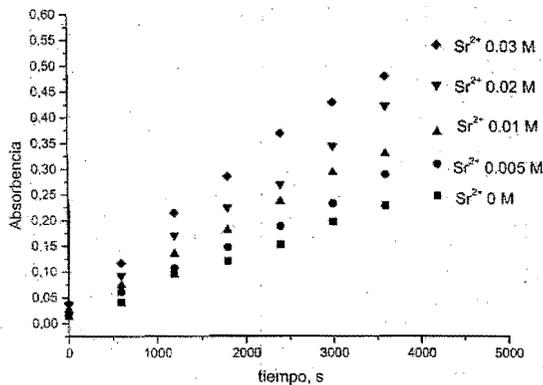
Gráfica 3A. Hidrólisis básica de BNPP en presencia de $MgCl_2$. Condiciones de reacción $NaOH$ $0.005 M$, $BNPP$ $1 \times 10^{-4} M$, $MgCl_2$ variable, $70^\circ C$



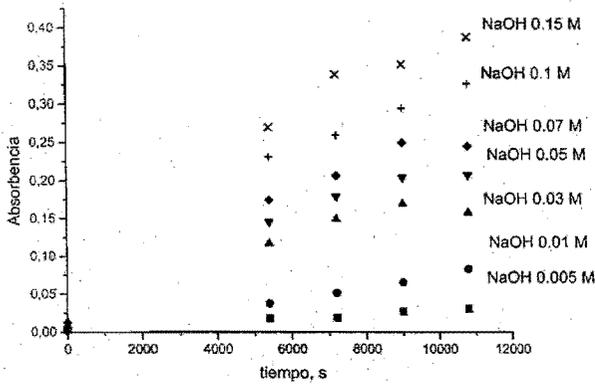
Gráfica 4A. Hidrólisis básica de BNPP en presencia de $CaCl_2$. Condiciones de reacción: $NaOH$ $0.075 M$, $BNPP$ $1 \times 10^{-4} M$, $CaCl_2$ variable, $70^\circ C$



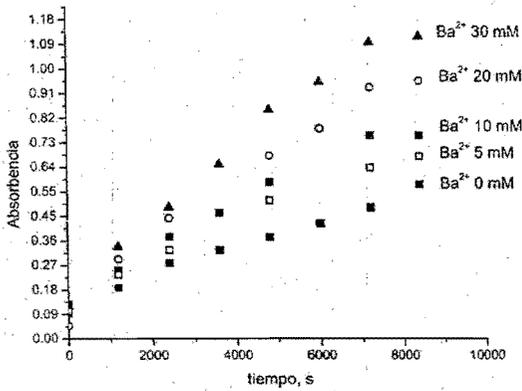
Gráfica 5A. Hidrólisis básica de BNPP en presencia de CaCl_2 . Condiciones de reacción: CaCl_2 0.005 M, BNPP 1×10^{-4} M, NaOH variable, 70°C



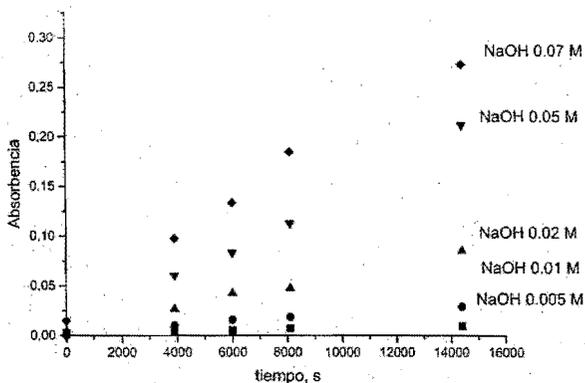
Gráfica 6A. Hidrólisis básica de BNPP en presencia de SrCl_2 . Condiciones de reacción NaOH 0.1 M, BNPP 1×10^{-4} M, SrCl_2 variable, 70°C



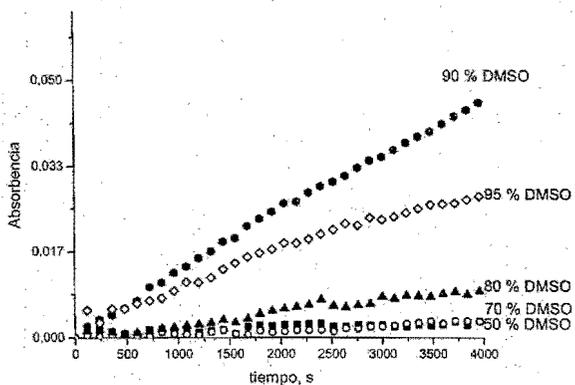
Gráfica 7A Hidrólisis básica de BNPP en presencia de SrCl₂. Condiciones de reacción SrCl₂ variable, BNPP 1×10^{-4} M, NaOH 0.1M, 70° C



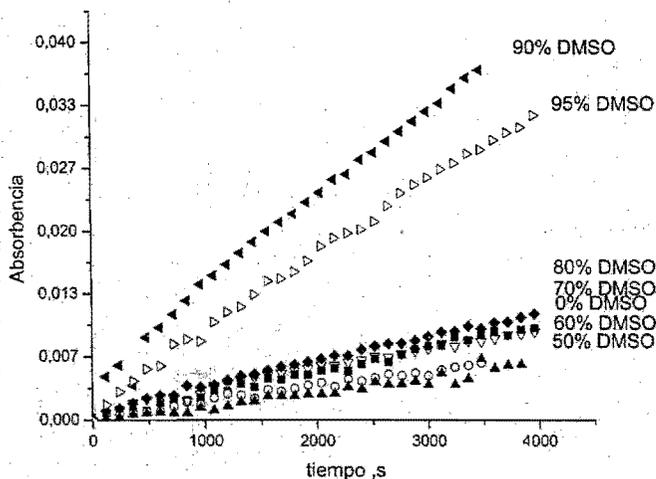
Gráfica 8A. Hidrólisis básica de BNPP en presencia de BaCl₂. Condiciones de reacción NaOH 0.075 M, BNPP 1×10^{-4} M, BaCl₂ variable, 70° C



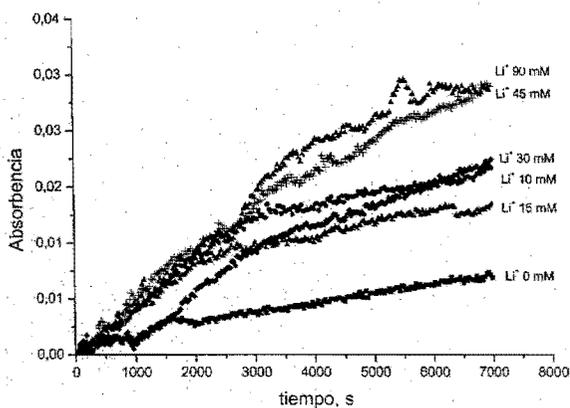
Gráfica 9A. Hidrólisis básica de BNPP en presencia de BaCl₂. Condiciones de reacción BaCl₂ 5mM, BNPP 1×10^{-4} M, NaOH variable, 70°C



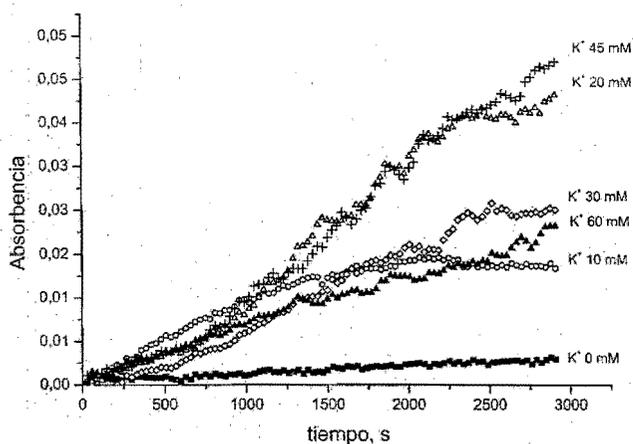
Gráfica 10A. Hidrólisis básica de BNPP con NaOH. Condiciones de reacción NaOH 0.05 M, DMSO variable, BNPP 2×10^{-5}



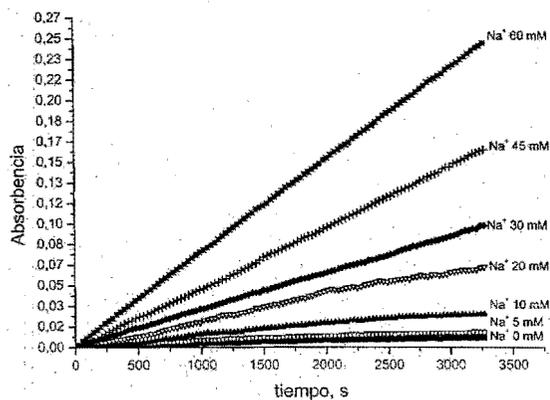
Gráfica 11A. Hidrólisis básica de BNPP con Bu_4NOH . Condiciones de la reacción $OH^- 0.075 M$, BNPP $0.0001 M$, $25^\circ C$



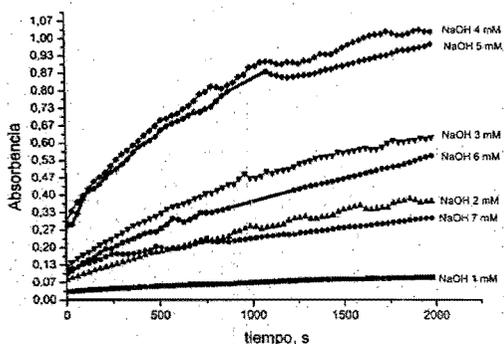
Gráfica 12A. Efecto de ion Li^+ sobre la hidrólisis. Condiciones de reacción: BNPP $0.0001 M$, $Bu_4NOH 30 mM$, DMSO 90% , $LiCl$ variable. $25^\circ C$



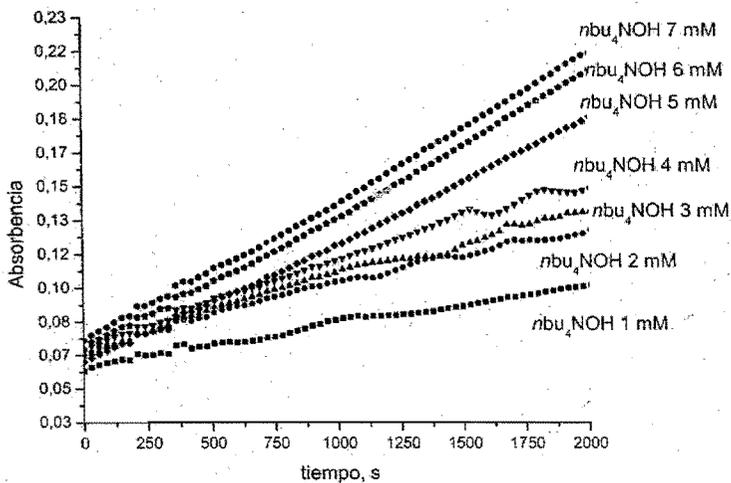
Gráfica 13A. Efecto de ion K^+ sobre la hidrólisis. Condiciones de reacción: BNPP 0.0001 M, Bu_4NOH 30 mM, DMSO 90%, KCl variable. 25 °C



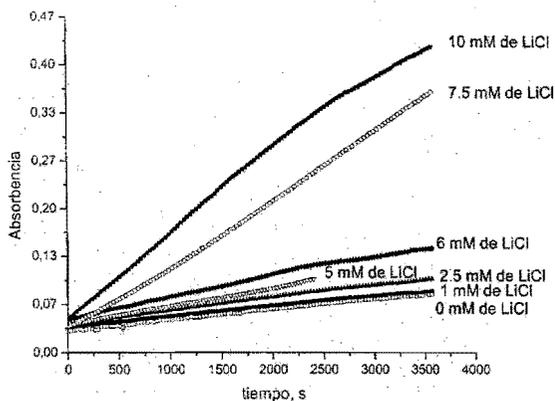
Gráfica 14A. Efecto de ion Na^+ sobre la hidrólisis. Condiciones de reacción: BNPP 0.0001 M, Bu_4NOH 30 mM, DMSO 90%, NaCl variable. 25 °C



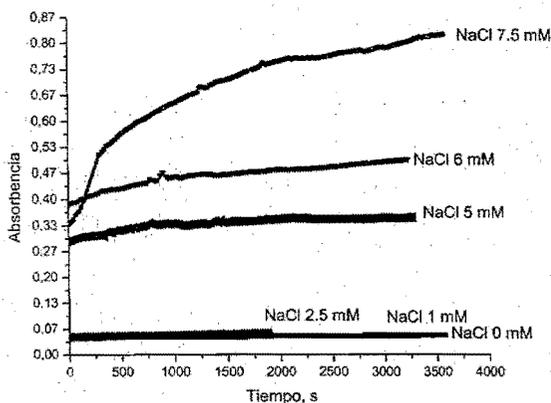
Gráfica 15A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Mg^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} M$, Mg^{2+} 2 mM, NaOH variable, DMSO:90 % v/v, 25°C.



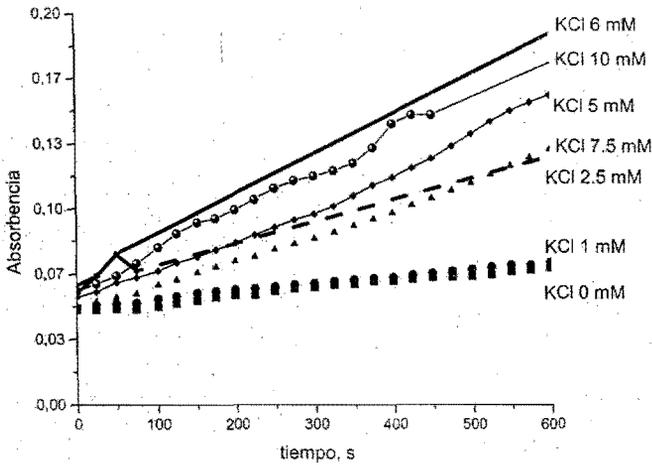
Gráfica 16A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Mg^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $1 \times 10^{-4} M$, Mg^{2+} 2 mM, Bu_4NOH variable, DMSO 90 % v/v, 25°C.



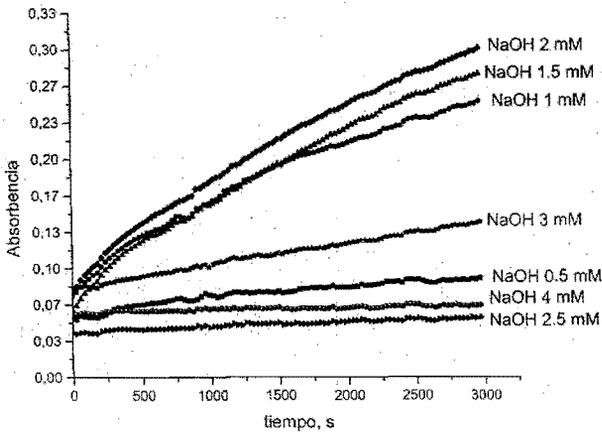
Gráfica 17A. Efecto de iones Li^+ hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Mg^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{M}$, Mg^{2+} 2 mM, Bu_4NOH 5 mM, LiCl variable, DMSO 90 % v/v. 25°C.



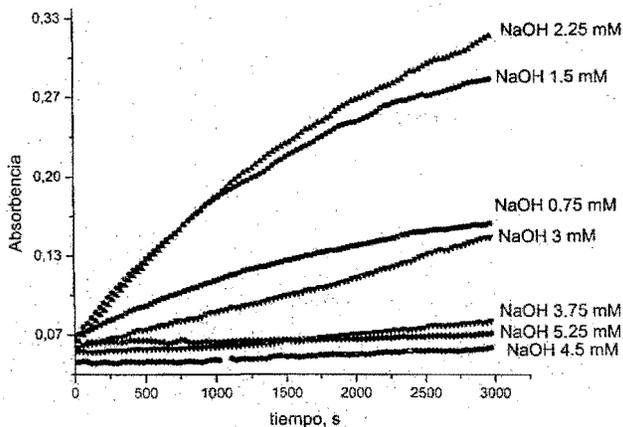
Gráfica 18A. Efecto de iones Na^+ hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Mg^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{M}$, Mg^{2+} 2 mM, Bu_4NOH 5 mM, NaCl variable, DMSO 90 % v/v. 25°C.



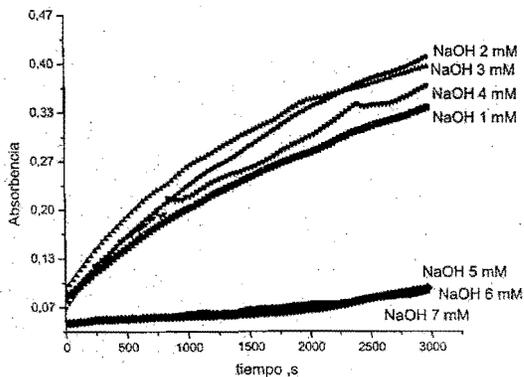
Gráfica 19A. Efecto de iones K^+ hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Mg^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} M$, Mg^{2+} 2 mM, Bu_4NOH 5 mM, KCl variable, DMSO 90 % v/v. 25°C.



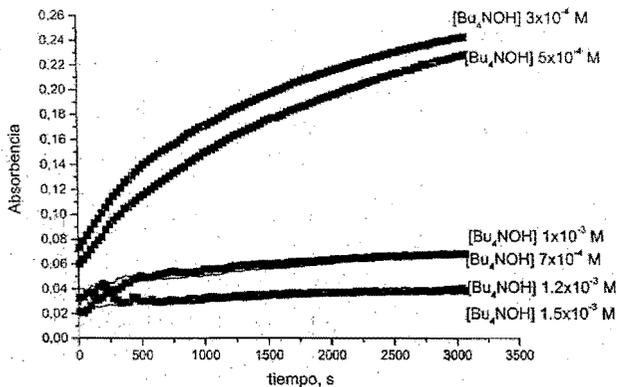
Gráfica 20A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ca^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} M$, Ca^{2+} 1 mM, NaOH variable, DMSO 90 % v/v. 25°C.



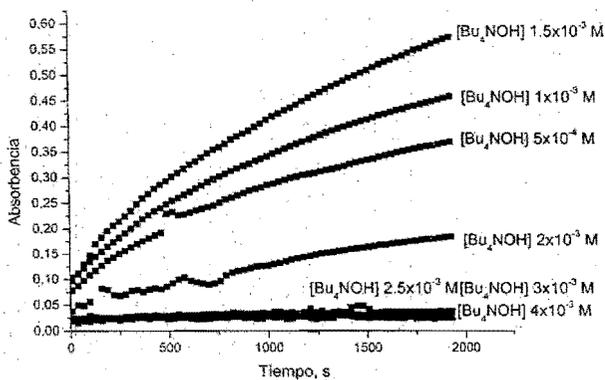
Gráfica 21A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ca^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{M}$, Ca^{2+} 1.5 mM, NaOH variable, DMSO 90 % v/v. 25°C.



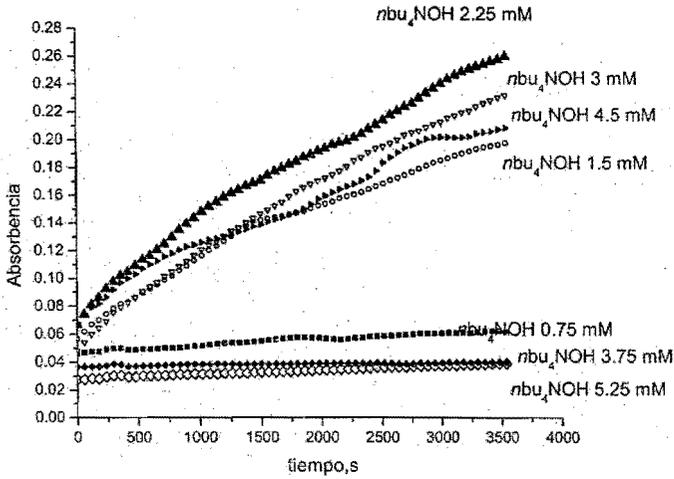
Gráfica 22A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ca^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{M}$, Ca^{2+} 2 mM, NaOH variable, DMSO 90 % v/v. 25°C.



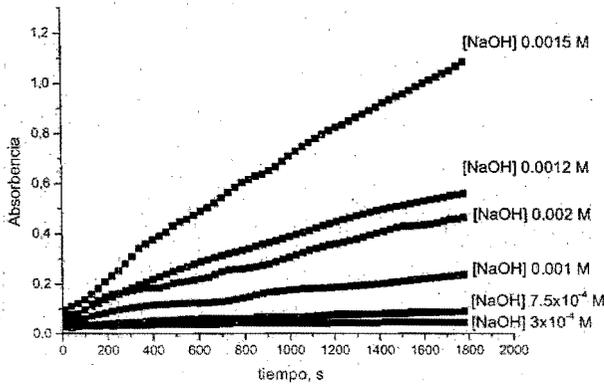
Gráfica 23A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ca^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, Ca^{2+} 0.5 mM, Bu_4NOH variable, DMSO 90 % v/v. 25°C .



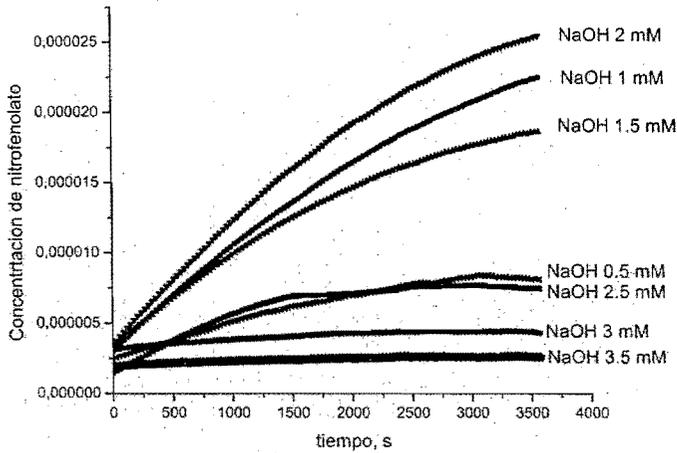
Gráfica 24A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ca^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, Ca^{2+} 1 mM, Bu_4NOH variable, DMSO 90 % v/v. 25°C .



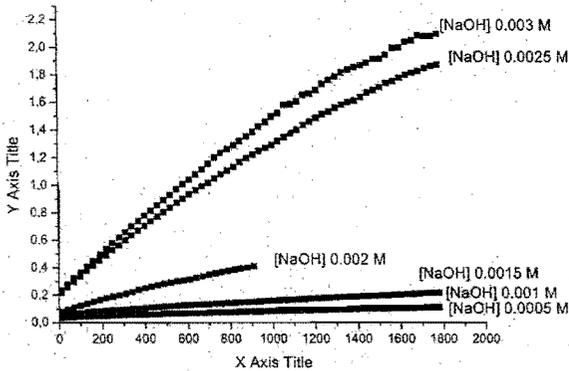
Gráfica 25A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ca^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, Ca^{2+} 1.5 mM.



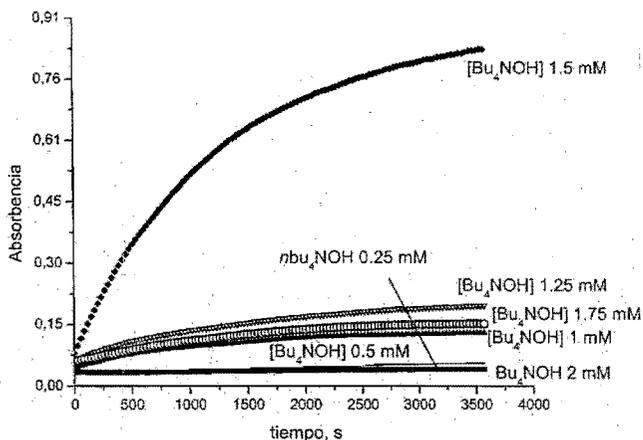
Gráfica 26A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Sr^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ Sr^{2+} 0.5 mM,



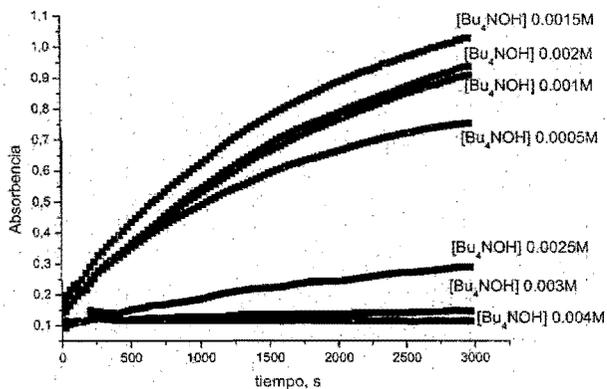
Gráfica 27A . Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Sr^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ Sr^{2+} 1 mM.



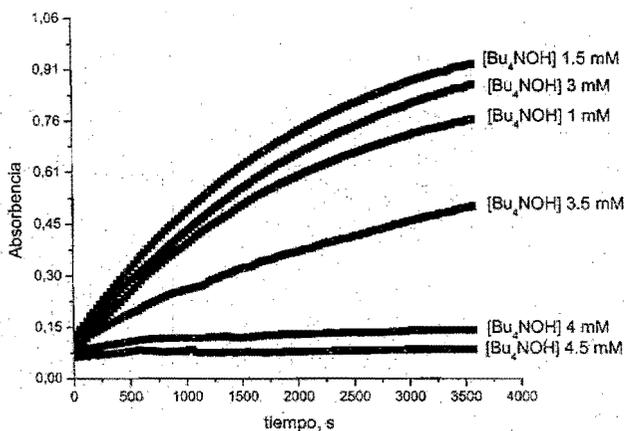
Gráfica 28A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Sr^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ Sr^{2+} 1.5 mM, NaOH variable, DMSO 90 % v/v. 25°C.



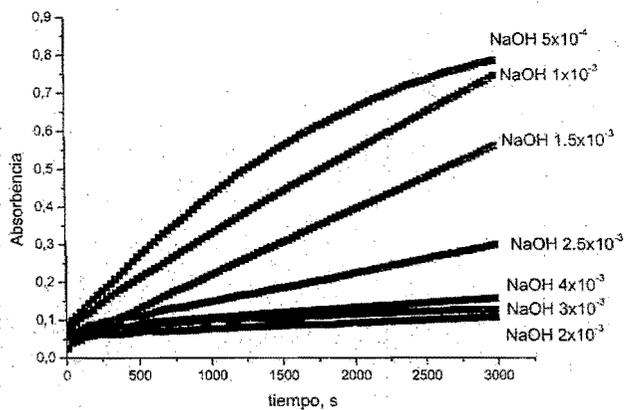
Gráfica 29A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Sr^{2+} . Condiciones de reacción $\text{BNPP } 2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\text{Sr}^{2+} 0.5 \text{ mM}$, Bu_4NOH variable, $\text{DMSO } 90\% \text{ v/v}$, 25°C .



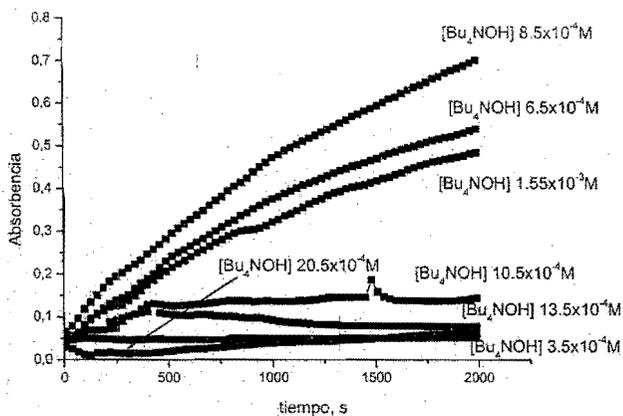
Gráfica 30A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Sr^{2+} . Condiciones de reacción $\text{BNPP } 2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\text{Sr}^{2+} 1 \text{ mM}$, Bu_4NOH variable, $\text{DMSO } 90\% \text{ v/v}$, 25°C .



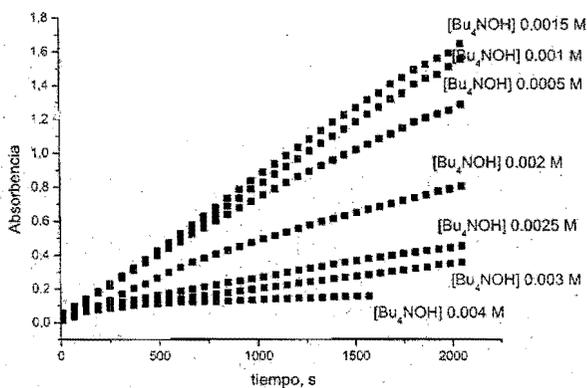
Gráfica 31A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Sr^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Sr^{2+} 1.5 mM, Bu_4NOH variable, DMSO 90 % v/v, 25°C.



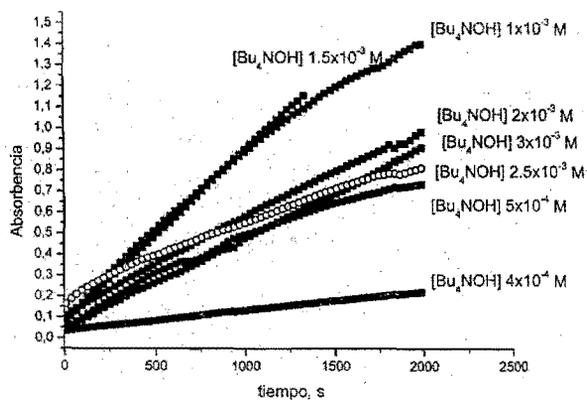
Gráfica 32A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ba^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Ba^{2+} 1 mM, NaOH variable, DMSO 90 % v/v, 25°C.



Gráfica 33A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ba^{2+} . Condiciones de reacción: BNPP $1 \times 10^{-4} M$, Ba^{2+} 0.5 mM, Bu_4NOH variable, DMSO 90 % v/v, 25°C.



Gráfica 34A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ba^{2+} . Condiciones de reacción: BNPP $1 \times 10^{-4} M$, Ba^{2+} 1 mM, Bu_4NOH variable, DMSO 90 % v/v, 25°C.



Gráfica 35A. Hidrólisis alcalina de BNPP en presencia de iones Ba^{2+} . Condiciones de reacción BNPP $1 \times 10^{-4} M$ Ba^{2+} 1.5 mM, Bu_4NOH variable, DMSO 90 % v/v. 25°C.

*Anexo 2.****Derivación de las ecuaciones para ajustar los datos experimentales***

En las reacciones descritas en este trabajo la concentración de sustrato BNPP siempre es menor que las concentraciones de otros componentes. Por lo tanto, se acostumbra considerar este tipo de reacciones como reacciones de pseudo primer orden.

Una reacción de primer orden es una reacción del tipo



La velocidad de la reacción de este tipo obedece a la siguiente ley

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_1[A] \quad (\text{A2.2})$$

Reagrupando los términos se puede obtener siguiente ecuación diferencial.

$$\frac{d[P]}{[A]} = k_1 dt \quad (\text{A2.3})$$

En los pasos iniciales de la reacción $[A]=[A]_0$, por lo cual, la ecuación se resuelve y se obtiene una línea recta del tipo.

$$\Delta[P] = k_1 \Delta T [A]_0 \quad (\text{A2.4})$$

En el caso contrario se puede realizar la sustitución

$$[A] = [P]_{\text{inf}} - [P] \quad (\text{A2.5})$$

y esta expresión al sustituirla en ecuación A2.3 y resolver ecuación obtenida, da

$$[P] = P_{\text{inf}} (1 - e^{-k_1 t}) + P_0 \quad (\text{A2.6})$$

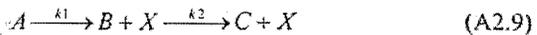
Donde P_0 es la constante de integración.

En los experimentos, las velocidades se median a partir de absorbancia del producto. Según la ley de Lambert y Beer la absorbancia es proporcional a la concentración: $Abs = \epsilon c l$, lo que al sustituirlo a la ecuación da

$$Abs_p = k_1 Abs_{\text{inf } p} t \quad (\text{A2.7})$$

$$Abs_p = Abs_{p \text{ inf}} (1 - e^{-k_1 t}) + Abs_0 \quad (\text{A2.8})$$

Sin embargo, en algunas reacciones en DMSO se observa el desprendimiento de dos moléculas de nitrofenol. El mecanismo de reacción en este caso es:



En este caso la velocidad de formación del producto final X es

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[A] + k_2[B] \quad (\text{A2.10})$$

La concentración de A se determina a partir del siguiente balance de masa

$$[A]_T = [A] + [B] + [C] \quad (\text{A2.11})$$

Por otra parte la concentración del producto X es la siguiente

$$[X] = [B] + 2[C] = 2([A]_T - [A]) - [B] \quad (\text{A2.12})$$

De donde la concentración de B es igual a

$$[B] = 2([A]_T - [A]) - [X] \quad (\text{A2.13})$$

Lo que al sustituir a la ecuación (A2.10) da

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[A] + k_2(2([A]_T - [A]) - [X]) \quad (\text{A2.14})$$

La reacción de desaparición de A es una reacción de primer orden, por lo cual

$$[A] = [A]_T e^{-k_1 t} \quad (\text{A2.15})$$

Lo que al sustituirlo en la ecuación (A2.14) da una ecuación diferencial inexacta

$$d[X] = \{k_2[X] + (2k_2 - k_1)[A]_T e^{-k_1 t} - 2k_2[A]_T\} dt \quad (\text{A2.16})$$

Sin embargo, al multiplicar ambos lados por $e^{k_2 t}$ se obtiene siguiente ecuación exacta

$$e^{k_2 t} d[X] = e^{k_2 t} \{k_2[X] + (2k_2 - k_1)[A]_T e^{-k_1 t} - 2k_2[A]_T\} dt \quad (\text{A2.17})$$

Que tiene la solución

$$e^{k_2 t} [X] + \frac{2k_2 - k_1}{k_2 - k_1} [A]_T e^{k_2 t - k_1 t} - 2[A]_T e^{k_2 t} = \frac{k_1}{k_2 - k_1} [A]_T \quad (\text{A2.18})$$

De aquí, al reorganizarlo, se obtiene la concentración de X a cualquier momento.

$$[X] = [A]_T \left\{ 2 + \frac{(k_1 e^{-k_2 t} + (k_1 - 2k_2) e^{-k_1 t})}{k_2 - k_1} \right\} \quad (\text{A2.19})$$

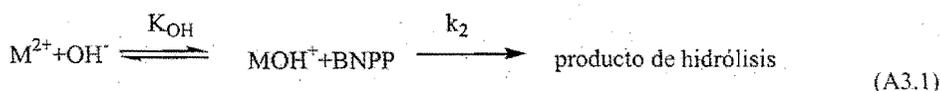
Si la ecuación es representada en función de absorbencia asignando el valor de Abs_{inf} al valor de $\epsilon_X [A]_T$, se obtiene la ecuación 4.3

$$A = A_{\text{inf}} \left\{ 2 + \frac{(k_1 e^{-k_2 t} + (k_1 - 2k_2) e^{-k_1 t})}{k_2 - k_1} \right\} \quad (\text{A2.20})$$

Anexo 3

Derivación de la ecuación de velocidad de hidrólisis alcalina con saturación

Al variar la concentración de hidróxido a concentración de metal constante en la hidrólisis acuosa de BNPP observamos una saturación. La saturación se debe a la formación de la especie catalítica MOH^+ . Puede ser explicada fácilmente si consideramos siguiente mecanismo de reacción.



En este caso la velocidad de la reacción es la siguiente

$$v = \frac{d[\text{producto}]}{dt} = k_2 [MOH^+] [BNPP] \quad (A3.2)$$

El valor de $[MOH^+]$ se calcula a partir de la ecuación de equilibrio

$$[MOH] = K_{OH} [M^{2+}] [OH^-] \quad (A3.3)$$

Y los balances de masa para el metal y hidróxido.

$$M_T = [M^{2+}] + [MOH^+] \quad (A3.4)$$

y

$$OH_T = [OH^-] + [MOH^+] \quad (A3.5)$$

En los experimentos realizados se guarda la condición $[OH^-]_T \gg [M^{2+}]_T$ por lo cual se puede considerar que $[OH^-] \approx [OH^-]_T$.

Igualando A3.3 con la expresión para $[MOH^+]$ expresada a partir de A3.4, se obtiene la siguiente ecuación

$$M_T - [M^{2+}] = K_{OH} [M^{2+}] [OH^-]_T \quad (A3.6)$$

De aquí se puede expresar $[M^{2+}]$

$$[M^{2+}] = \frac{[M]_T}{K_{OH}[OH^-]_T + 1} \quad (A3.7)$$

Sustituyendo este valor en la ecuación A3.3, se obtiene

$$[MOH] = K_{OH}[OH^-]_T \frac{[M]_T}{K_{OH}[OH^-]_T + 1} \quad (A3.8)$$

Y sustituyendo el valor de $[MOH^+]$ obtenido en la ecuación A3.2

$$v = k_2 \frac{K_{OH}[OH^-]_T[M]_T}{K_{OH}[OH^-]_T + 1} [BNPP] = k_{obs}[BNPP], \quad (A3.9)$$

donde

$$k_{obs} = k_2 \frac{K_{OH}[OH^-]_T[M]_T}{K_{OH}[OH^-]_T + 1} \quad (A3.10)$$

que es la ecuación 5.3

En el caso de las reacciones en DMSO se observa una saturación en las constantes observadas debido a la formación de la especie MOHBNPP. Las curvas experimentales se ajustan a la misma ecuación, solo que en este caso $[OH^-]$ corresponde al valor de $[MOH^+]$ y $[M^{2+}]$ corresponde al de $[BNPP]$

$$k_2 \frac{K_{OH}[OH^-][M]_T}{K_{OH}[OH^-]_T + 1} [BNPP] = k_{obs}[BNPP] \quad (A3.11)$$

Phosphodiesterolytic activity of alkaline-earth cations in aqueous DMSO†

Olga Taran and Anatoly K. Yatsimirsky*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

Received (in Cambridge, UK) 17th February 2004, Accepted 31st March 2004

First published as an Advance Article on the web

Rate of the hydrolysis of bis(*p*-nitrophenyl) phosphate in 90% v/v aqueous DMSO increases 10^3 – 10^5 times in the presence of 1–2 mM alkaline-earth cations, which in the same concentration range do not affect the reaction rate in water.

Current efforts in the development of chemical nucleases are mostly concentrated on lanthanide and transition metal complexes.¹ Alkaline-earth cations among which Mg^{2+} and Ca^{2+} are frequent components of active sites of natural nuclease and phosphatase enzymes² show by themselves very low if any phosphoesterase activity,^{3–5} although recently larger accelerations by Mg^{2+} in the hydrolysis of oligoribonucleotides⁶ and Co(*m*)-bound ATP⁷ were reported. An important question is therefore what factors make these cations so efficient in biological systems. Recently, fairly strong alkali metal⁸ and strontium⁹ ion catalysis in the cleavage of respectively phosphonate/phosphate and carboxylic acid esters in ethanol was described. These findings indicate the suitability of non-aqueous media, which imitate the apolar microenvironment of enzyme active sites, for improvement of catalysis by s-block cations. In this paper we report a dramatic increase in the phosphodiesterolytic activity of alkaline-earth cations in DMSO solvent with low water content. The speciation and preliminary mechanistic results are provided for the most active Sr^{2+} cation.

Kinetic studies were performed with often used model substrate bis(*p*-nitrophenyl) phosphate (BNPP), monitoring its hydrolysis spectrophotometrically by the appearance of *p*-nitrophenolate anion.[‡] The rate of alkaline hydrolysis of BNPP initially decreases on increase in DMSO content but then sharply increases in the range 80–90% v/v DMSO. All further experiments were performed in 90% v/v DMSO. The rate of BNPP hydrolysis in this medium was ca. 20 times higher with NaOH than with (*n*-Bu)₄NOH base, Table 1. Thus, the rate increase was ca. 3-fold with (*n*-Bu)₄NOH and ca. 60-fold with NaOH in comparison with that in water.[§] In accordance with this, addition of NaCl in the presence of (*n*-Bu)₄NOH strongly accelerated the reaction, Table 1. Addition of

LiCl and KCl produced much smaller accelerations (see Supplementary Information, Fig. 1S†).

Salts of alkaline-earth metals produced large rate enhancements. The largest catalytic effect was observed with Sr(*n*): in the presence of 1 mM SrCl₂ the rate of hydrolysis by (*n*-Bu)₄NOH increases by a factor of 10^5 (cf. lines 1 and 12 in Table 1). The efficiency of Sr(*n*) with NaOH was somewhat lower. Also large accelerations were observed with Mg(*n*), but in this case the catalytic activity was much higher with NaOH or (*n*-Bu)₄NOH + NaCl than with (*n*-Bu)₄NOH alone (Table 1, lines 7–9). The catalytic activity of Ca(*n*) was lower than that for Sr(*n*) and Mg(*n*) (Table 1, lines 10 and 11), but the reaction rate was still 10^3 times higher in the presence of CaCl₂ than in the presence of equal amount of free hydroxide. Studies with BaCl₂ were limited by low solubility of Ba(OH)₂ in the mixed solvent, but qualitatively the activity of Ba(*n*) was close to that of Ca(*n*). In water all these cations at similar metal and base concentrations did not affect the reaction rate.

Rate-concentration profiles were studied in detail for Na⁺, Mg²⁺ and Sr²⁺ cations. Additions of increased amounts of NaCl up to 0.06 M produced monotonic linear increase in k_{obs} (Fig. 1S†), but both with MgCl₂ and SrCl₂ sharp rate maxima were observed at the metal-to-base ratios between 1:1 and 1:2. Similarly, on varying the base concentration at a fixed metal salt concentration we observed plots with maxima. A typical behavior is illustrated in Fig. 1 for SrCl₂ (results for MgCl₂ and CaCl₂ are shown in Figs. 2S and 3S†).

The existence of optimum metal/base ratios indicates that besides an active metal hydroxo complex other inactive species of different stoichiometries are formed in the solution. To obtain an information on composition and stability of metal hydroxo complexes we performed potentiometric titrations of 1–2 mM SrCl₂ and MgCl₂ by (*n*-Bu)₄NOH in 90% v/v DMSO (titration curves are shown in Supplementary Information, Figs. 4S and 5S†).[¶] First, titrations of dilute HCl solutions were performed for the electrode calibration and from these results the apparent autoprotolysis constant $pK_{w,app} = 21.3 \pm 0.2$ was obtained in a

Table 1 Selected kinetic results for the hydrolysis of BNPP in 90% v/v DMSO at 25 °C

	(<i>n</i> -Bu) ₄ -NOH mM	NaOH mM	NaCl mM	MgCl ₂ mM	CaCl ₂ mM	SrCl ₂ mM	k_{obs} , s ⁻¹
1	5						4.5×10^{-8}
2	30						5.1×10^{-7}
3		5					1.7×10^{-6}
4		30					1.1×10^{-5}
5	30		5				2.0×10^{-6}
6	30		30				1.3×10^{-5}
7	5			2			1.7×10^{-5}
8		5		2			1.0×10^{-3}
9	5		5	2			8.4×10^{-4}
10	2				1		6.0×10^{-5}
11		2			1		3.9×10^{-5}
12	2					1	1.0×10^{-3}
13		2				1	4.9×10^{-4}

† Electronic supplementary information (ESI) available: Figs. S1–S5†. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b402432j/>

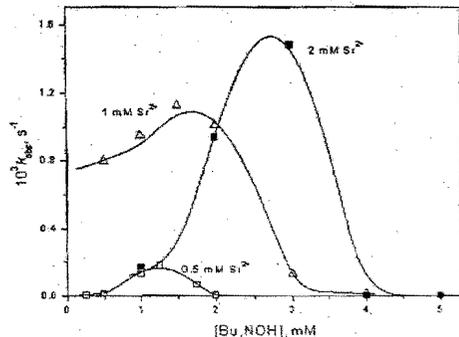
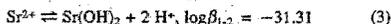
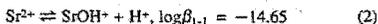
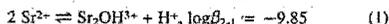


Fig. 1 Observed first-order rate constants for the BNPP hydrolysis at 25 °C in 90% v/v DMSO in the presence of increased amounts of SrCl₂ vs. the base concentration.

reasonable agreement with published values in water-DMSO mixtures.¹⁰ Titration results for SrCl₂ required for the best fit a set of the following equilibria (uncertainty in logβ ± 0.05):



The species distribution diagram calculated in accordance with eqns. (1)–(3) is superimposed with the kinetic results for 1 mM SrCl₂ in Fig. 2. The experimental points follow the curve for Sr(OH)⁺. The dashed line shows the concentration of free hydroxide anions in the system as a function of added total (n-Bu)₄NOH. Evidently at optimum metal/base ratios added OH⁻ anions are nearly completely bound to the metal ion, e.g. in the presence of total 1.0 mM (n-Bu)₄NOH the concentration of free OH⁻ equals only 1.2 × 10⁻⁶ M that corresponds to pH 8.08 in water. Thus, the fact that these systems use added alkali does not mean that the reactivity is observed in strongly basic conditions. In fact, addition of the metal ion completely converts free OH⁻ into hydroxo complexes and the observed increase in reactivity by several orders of magnitude indicates that the metal hydroxo complex reacts with BNPP much faster than the free hydroxide, apparently due to the highly efficient electrophilic assistance by the metal cation.

Rate constants measured in the range of 0.5–1.5 mM Sr(n) and 0.5–5.0 mM (n-Bu)₄NOH were correlated with calculated in accordance with eqns. (1)–(3) concentrations of all three hydroxo species and contributions of Sr₂OH³⁺ and Sr(OH)₂ appeared to be negligible. The dependence of *k*_{obs} on [SrOH⁺] shown in Fig. 3 was of the Michaelis-Menten type:

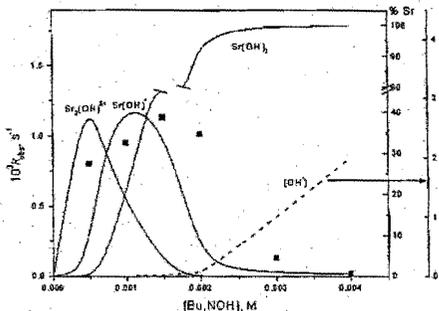


Fig. 2 Observed first-order rate constants for the BNPP hydrolysis at 25 °C in 90% v/v DMSO in the presence of 1 mM SrCl₂ vs. the base concentration superimposed with the species distribution diagram for hydroxo-complexes of Sr(II) calculated in accordance with eqns. (1)–(3).

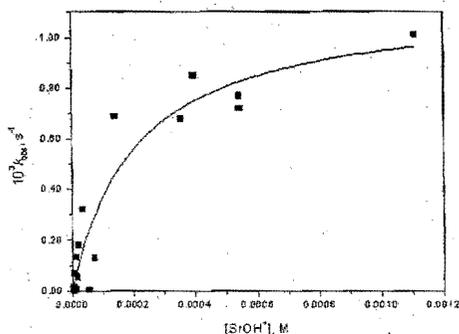
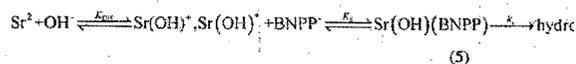


Fig. 3 Plot of *k*_{obs} vs. the concentration of SrOH⁺ species calculated in accordance with eqns. (1)–(3).

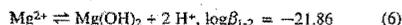
$$k_{\text{obs}} = k_c K_S [\text{SrOH}^+] / (1 + K_S [\text{SrOH}^+]) \quad (4)$$

with *k*_c = (1.2 ± 0.2) × 10⁻³ s⁻¹ and *K*_S = (4.6 ± 1.9) × 10³ M⁻¹. The reaction proceeds therefore via the following steps:



Similar mechanism operates also for metal ion catalysis in water,¹ but for alkaline earth cations both *K*_{OH} and *K*_S are very small, e.g. for Sr²⁺ *K*_{OH} = 6.3 M⁻¹ and *K*_S = 1 M⁻¹.¹¹ Estimated with these association constants value of *k*_{obs} in water (assuming the same value of *k*_c) for a mixture of 1 mM Sr²⁺ and 2 mM OH⁻ equals 1.5 × 10⁻⁸ s⁻¹ (essentially coincides with *k*_{obs} without metal ion) instead of 1.0 × 10⁻³ s⁻¹ in 90% DMSO (Table 1). This indicates that the major factor responsible for larger catalytic activity in DMSO is strongly increased affinity of the reactants to the catalyst providing much higher efficiency of the template effect of the metal ion.

Potentiometric titrations of MgCl₂ revealed formation of a single species:



As one can see from Table 1, Mg(II) in the presence of (n-Bu)₄NOH is ca. 100 times less active than Sr(II). Since the activity of Sr(OH)₂ is also low one may conclude that the neutral hydroxo species are generally low active. Titration of MgCl₂ in the presence of added NaCl showed a complex behavior (see Supplementary Information) and did not allow us to analyze the system quantitatively, but it clearly showed formation of mixed hydroxo complexes MgNa(OH)₂⁺ and MgNa(OH)₃, one of which may be responsible for the increased catalytic activity in the presence of sodium cations.

In conclusion, the use of a dipolar aprotic co-solvent allows one to greatly improve the catalytic activity of alkaline-earth cations in the phosphodiester hydrolysis. The activity of lanthanides decreases in water-DMSO mixtures,¹² but rate constants for the BNPP hydrolysis with simple hydroxo complexes of Sr(II) and Mg(II) in 90% v/v DMSO are even higher than those reported for lanthanide aqua-ions in water.^{13,14} This result indicates the important role of a medium of low water content, which allows rather weak Lewis acids like the alkaline-earth cations to activate efficiently the substrate and the nucleophile.

We gratefully acknowledge the PAPIIT Program of DGAPA-UNAM (Project IN 20890J) for the support of this work.

Notes and references

‡ Kinetic measurements used 20–100 μM BNPP and varied concentrations of metal chlorides and (n-Bu)₄NOH or NaOH in the range 1–5 mM at 25 °C.

§ The positive solvent effect of DMSO on the rate of alkaline hydrolysis of BNPP is much lower than that on the hydrolysis of the dianion of *p*-nitrophenyl phosphate,¹⁴ which proceeds via a dissociative-type mechanism. It is also lower than DMSO effects on rates of carboxylic acid ester hydrolysis,¹⁵ probably because of increased repulsion between similarly charged BNPP and hydroxide in organic medium.

¶ Measurements of pH were taken on an Orion Model 710-A research digital pH meter equipped with an Orion standard research grade combination electrode with Ag/AgCl reference cell as carbonate-free (n-Bu)₄NOH 0.1 M solution in 90% v/v DMSO was added to the system in small increments and with sufficient time intervals (15–20 min between additions in pH range 10–16, but only 2–3 min in more acidic and more basic solutions) to allow the equilibration of the system and obtaining stable pH readings. Careful removal of carbonate and exclusion of CO₂ absorption during the titration were extremely important for obtaining reproducible titration curves. In all titrations 1 mM HCl was added to ensure that at the beginning no hydroxide complexes of alkaline-earth cations were present and to check additionally the electrode calibration in each run. No supporting electrolyte was employed to minimize the ion-pairing of divalent cations with electrolyte anions, which can be significant in this medium. The program Hyperquad¹⁶ 2000 Version 2.1 NT was used to calculate all equilibrium constants.

|| The stability constant of the complex of Sr^{2+} with H_2PO_4^- , a monoanion similar by charge and type of donor atoms to BNPP, equals 2 M^{-1} ,¹¹ but for binding to $\text{Sr}(\text{OH})^+$ one should expect a smaller value.

- 1 Recent reviews: (a) H.-J. Schneider and A. K. Yatsimirsky, in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 40, Eds. A. Sigel and H. Sigel, M. Dekker, Inc., New York, 2003, p. 369; (b) S. J. Franklin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, 5, 201; (c) M. Komiya, N. Takeda and H. Shigekawa, *Chem. Commun.*, 1999, 1443; (d) R. Ott and R. Kramer, *Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52, 761; (e) R. Kramer, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 182, 243; (f) E. L. Hegg and J. N. Burstin, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, 173, 133.
- 2 (a) N. Strater, W. N. Lipscomb, T. Klambunde and B. Krebs, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1996, 35, 2024; (b) D. J. Weber, A. K. Meeker and A. S. Mildvan, *Biochemistry*, 1991, 30, 6103.
- 3 R. M. Milburn, M. Cautam-Basak, R. Tribolet and H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 3315.
- 4 D. Herschlag and W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 4665.
- 5 J. R. Morrow, L. A. Buttrey and K. A. Berback, *Inorg. Chem.*, 1992, 31, 16.
- 6 M. Yashiro, M. Higuchi, Y. Washizu and M. Komiya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2002, 75, 1843.
- 7 N. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 12023.
- 8 (a) E. Bunzel, R. Nagelkerke and G. R. J. Thatcher, *Can. J. Chem.*, 2003, 81, 53; (b) R. Nagelkerke, G. R. J. Thatcher and E. Bunzel, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, 1, 163.
- 9 R. Cacciapaglia, S. Di Stefano and L. Mandolini, *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 5926.
- 10 (a) P. Fiordiponti, F. Rallo and F. Rodante, *Z. Phys. Chem. (N.F.)*, 1974, 88, 149; (b) E. Bosch, G. Fonrodona, C. Ráfolis and M. Rosés, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 349, 367.
- 11 R. M. Smith, A. E. Martell and R. J. Motekaitis, *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes*, NIST Standard Reference Database 46; version 7.0; Gaithersburg, MD, USA, 2003.
- 12 T. Liu and H.-J. Schneider, *Supramol. Chem.*, 2002, 14, 231.
- 13 A. Roigk, R. Hettich and H.-J. Schneider, *Inorg. Chem.*, 1998, 37, 751.
- 14 K. W. Y. Abell and A. J. Kirby, *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 1085.
- 15 E. Bunzel and H. Wilson, *Adv. Phys. Org. Chem.*, 1977, 14, 133.
- 16 P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, 1996, 43, 1739.