

13



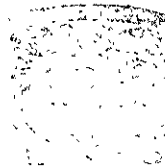
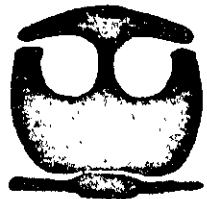
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**SINTESIS Y CARACTERIZACION DE
p-NITROFENIL FOSFATO DE SODIO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C A
P R E S E N T A :
ELVIA FLORES COSS

ASESOR: O SELMA SONIA SOSA SEVILLA



MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HONORABLE JURADO

Prof. Elvia Pilar Martínez Izaguirre

Prof. Adrián Javier Manríquez González

Prof. Selma Sonia Sosa Sevilla

Prof. Benjamín Ruíz Loyola

Prof. Mario Alberto Maldonado Tapia

*Solo se ve bien con el corazón,
Lo esencial es invisible a los ojos.
Lo que hace tan importante a tu rosa,
Es el tiempo que perdiste por ella,
Eres responsable de tu rosa.
El Principito.*

*A MI MAMÁ
Gracias Mami por tus palabras de aliento,
tu paciencia, comprensión y tu amor.
Mi cosita dulce y tierna, TE AMO MUCHO*

*A MI PAPÁ
Siempre has estado detrás de mi,
apoyándome e impulsándome,
quisiera poder expresar en palabras
cuanto valoro esto.
Pero lo único que puedo decir
con certeza es que TE AMO*

A MIS HERMANAS

Graciela y Elsa

Las quiero mucho.

A MIS SOBRINOS

Mauricio, Omar, David, Andrés y Miroslava.

A estos seres pequeñitos,

que son parte muy importante de mi vida.

Dios los bendiga e ilumine su camino.

A MI FAMILIA

A todos sin excepción alguna,

tíos, primos y sobrinos.

Los quiero

*A MI ASESORA DE TESIS
Q. Selma Sonia Sosa Sevilla
Un agradecimiento especial.
Por su guía y paciencia.
Muchas gracias.*

*A MIS AMIGOS
Araceli S. Sotelo Martel
y Jorge Sosa Quiroz*

INDICE

INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES.....	4
2.1 Esteres fosfóricos y Bioquímica.	5
2.2 Química del Fósforo.....	8
2.3 Métodos de preparación de Halofosfatos.....	10
2.3.1 Hidrólisis de Halofosfatos.....	17
2.4. Aplicaciones del Producto. Actualización Bibliográfica.	24
2.4.1. Aplicaciones Bioquímicas.....	24
2.4.2. Aplicaciones generales.....	25
PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1 Síntesis	28
3.1.1 Material y equipo	28
3.1.1.1 Equipo	28
3.1.1.2 Reactivos.....	28
3.1.2 Método de obtención.....	29
3.1.2.1 Preparación de p-Nitrofenil Fosfato de Sodio usando Oxicloruro de Fósforo, p-Nitrofenol y Piridina.	30
3.2 Caracterización.....	33
3.2.1 Espectroscopía Infrarrojo.....	33
3.2.2 Espectroscopía Ultravioleta	37
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA.....	41

El cierre de las importaciones y la caída del peso, reflejado en bajos presupuestos para la división profesional, dado durante el periodo Gubernamental de 1982-1988 obligó a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, a sintetizar p-nitrofenil fosfato de sodio; reactivo que era utilizado como sustrato para el seguimiento de una fosfatasa, en una de las prácticas de Cinética Enzimática I correspondiente al curso de Bioquímica I.

Este sustrato era utilizado para conocer los efectos de la concentración de enzima, del pH y de la temperatura sobre la velocidad de reacción enzimática.

Como una utilización secundaria, pero no por ello menos importante actualmente también se usa, como agente fosforilante en la síntesis de nucleótidos.

El objetivo de la Tesis es desarrollar un método de síntesis fácil, viable y que sea accesible económicamente, además de reunir los requerimientos analíticos suficientes para su uso como sustrato, y con la posibilidad de ser desarrollado a nivel laboratorio o a escala industrial.

2.1 Esteres fosfóricos y Bioquímica.

Los ésteres de fósforo y en particular los de ortofosfato son muy numerosos y muchos de éstos juegan un papel central en los procesos de los seres vivos, aunque no todos se producen naturalmente y/o son de interés biológico directo.

El fósforo es un elemento vital en la composición de toda la materia viva y no hay organismo en el cual la química de este elemento no sea utilizada. El cuerpo humano contiene cerca del 1% de su peso de este elemento, aproximadamente 4/5 partes del ser humano se presenta como hidroxapatita en huesos y dientes.

La dieta humana necesita cerca de 1.3 g de fósforo por día y es fácilmente reunida, la deficiencia de fosfato en el ganado lleva a una condición similar a la deficiencia de vitamina D en humanos, enfermedad llamada osteomalacia [5]. Otros elementos tales como Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Mo, F, Si, Al, etc., cubren el resto del 100% del peso del cuerpo humano según se muestra en la Tabla 1. Aún cuando no todos los elementos en trazas tienen funciones biológicas conocidas, algunos metales como el Magnesio parecen ser vitales para la función de ciertas enzimas.

Tabla 1

Mayores componentes del cuerpo humano % en peso

Oxígeno	65	Nitrógeno	3	Potasio	0.3
Carbono	18	Calcio	1.5	Azufre	0.2
Hidrógeno	10	Fósforo	1.0	Total	99.0

El metabolismo animal del fósforo está en gran parte relacionado con el del Ca^{2+} , y la relación Ca/P en la dieta afecta la adsorción y secreción de

ambos elementos. El fósforo lo absorben los animales de los alimentos y las plantas del suelo, en forma de iones fosfato monoácido (HPO_4^-) y fosfato diácido (H_2PO_4^-).

En los animales estos elementos se encuentran como sales inorgánicas de calcio en huesos y dientes. El fósforo restante está presente como fosfatos orgánico, invariablemente en la forma de mono y diésteres; en éstos, el fósforo está completamente oxidado unido indirectamente al carbono a través del oxígeno, y directamente al oxígeno en enlaces P-O-C, como en la sangre, orina y fluidos tisulares.

No es común que existan compuestos de fósforo con enlaces P-C, ya que el fosfonato es capaz de sintetizarse en forma natural y tener la posibilidad de ser la base de sistemas de vida; así a los ésteres de fosfato, algunas bacterias los reducen de fosfato a fosfito [5].

Durante los últimos 20 años se ha recopilado mucha información en la cual los ésteres de fosfato son sintetizados y usados en sistemas vivos; estando presentes en los ácidos nucleicos, bacterias, virus, vitaminas y enzimas, jugando un papel esencial en la fotosíntesis, en los carbohidratos, en el metabolismo de lípidos, en el ciclo del nitrógeno, y en otras numerosas reacciones bioquímicas donde éstos son la principal fuente de transferencia de energía.

Muchos ésteres de fósforo activados biológicamente son disimétricos y capaces de existir en formas ópticamente activas (D y L), usualmente solo uno de éstos enantiómeros es de importancia.

Los triésteres neutros del tipo $(\text{RO})_3\text{P}=\text{O}$, donde R es un alquilo simple o un arilo, son similares a los ésteres de ácidos orgánicos, que pueden ser destilados a presión reducida sin que se descompongan, teniendo también la propiedad de ser solubles en un gran número de disolventes orgánicos, una

característica de identificación de los alquil derivados inferiores es su estado líquido, estos triésteres son muy estables a temperatura ambiente; para que ocurra una descomposición de ellos, se debe elevar la temperatura a 150°C por un periodo de 24 horas.

Los triésteres son compuestos covalentes iónicos, a diferencia de los ésteres diácido o monoácido los cuales, bajo determinadas condiciones pueden ser reemplazados por cationes metálicos o no metálicos, según sea necesario (Fig.1) [5]:

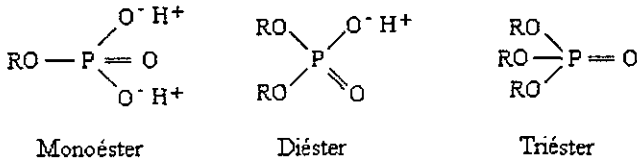


Fig. 1

2.2 Química del Fósforo

Siendo una de las finalidades de este trabajo la obtención del p-nitrofenil fosfato de sodio (éster mono fosfato), es conveniente señalar algunas de las características del fósforo y sus derivados órgano fosforados. En forma principal nos interesa esencialmente su estado pentavalente.

El compuesto H_3PO_4 (ácido ortofosfórico) por su naturaleza triprótica reúne las características y propiedades necesarias que nos servirán de base para llevar a cabo la síntesis propuesta, como por ejemplo la formación de sales al unirse con diferentes cationes como el sodio, (Fig-2) [2]:

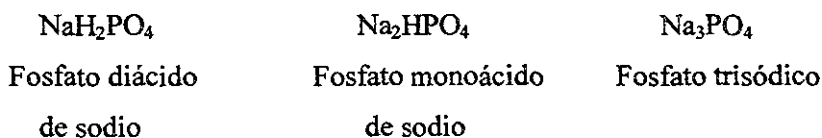


Fig. 2

Existen ácidos derivados del P^{III} y del P^V . La estructura fundamental del P^{III} es el $P(OH)_3$, y para el P^V es $O=P(OH)_3$ siendo esta última la configuración más estable del fósforo, por lo que es de esperar que sea la predominante Fig-4 [6]:

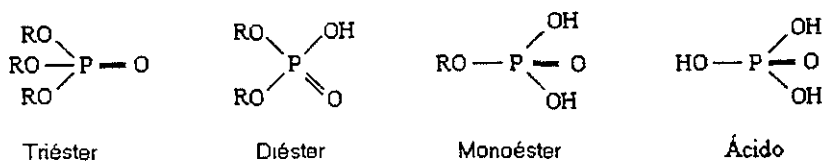
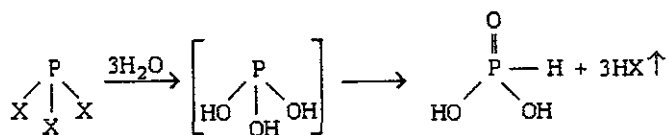


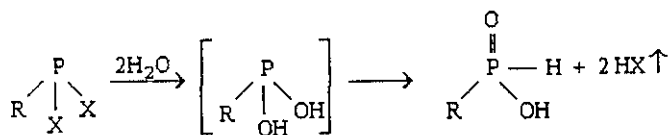
Fig. 3

En el ácido fosfórico el grado de ionización exacto depende, de la acidez del medio; por ello la preparación de ésteres de fosfato debe llevarse a cabo en un medio de reacción anhidro para evitar la hidrólisis del producto.

Una propiedad importante de los compuestos del fósforo es su tendencia a formar enlaces P-O y P=O, lo que nos permite explicar y predecir reacciones y estructuras (Reac. 1) y (Reac. 2) [12]:



Reac. 1



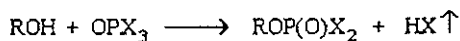
Reac. 2

2.3 Métodos de preparación de Halofosfatos.

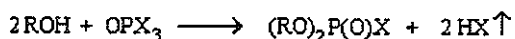
1. En la preparación del p-Nitrofenil fosfato de sodio por uno de los métodos de síntesis se obtiene el cloro fosfonato de dietilo (un intermediario halofosforado), por lo que a continuación se explican los métodos de preparación de halofosfatos.

Las reacciones de hidroxocompuestos con compuestos halofosforados son uno de la métodos más simples y comúnmente usados para la preparación de halofosfatos, consisten esencialmente en la reacción de alcoholes o fenoles con sustancias como oxihaluros de fósforo (POCl_3) y tíohaluros de fósforo (PSCl_3), este proceso ocurre satisfactoriamente tanto a temperatura ambiente como debajo de ésta cuando el compuesto hidroxilo es un alcohol alifático primario, en estas reacciones el hidrógeno del hidroxilo y el halógeno del compuesto de fósforo son eliminados en forma de ($\text{HX}\uparrow$) haluro de hidrógeno [5]; para lograrlo en forma satisfactoria debe suprimirse de la reacción mediante alguno de los siguientes métodos, a presión reducida y con agitación o burbujeando un gas inerte. La formación de los derivados primario y secundario dependerán de la proporción relativa de los reactivos [20].

La reacción puede ser restringida a la monosustitución empleando un exceso de oxihaluro (Reac. 3). Sin embargo al hacer reaccionar 2 moles del alcohol primario por una mol del oxihaluro se da la disustitución (Reac. 4). Los alcoholes secundarios y terciarios, generalmente, no reaccionan fácilmente [20].



Reac. 3

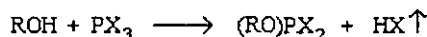


Reac. 4

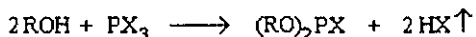
Si este proceso se lleva a cabo con fenoles requiere calentamiento, generalmente a reflujo, bajo estas drásticas condiciones la restricción para la monosustitución no es muy efectiva y los rendimientos de derivados monoarilos, como regla general en teoría son bajos, por lo que, para los fenoles superiores se recomienda el uso de catalizadores como el cloruro u óxido de magnesio.

La reacción de alcoholes primarios con los trihaluros de fósforo, da por resultado una serie bastante extensa de halofosfatos y ésteres de halofosfato.

Las ecuaciones típicas involucradas para la síntesis de estos compuestos serían:



Reac. 5



Reac. 6

En las series de alcoholes aromáticos (como el p-nitrofenol) la primera reacción mostrada en (Reac. 5) normalmente procede sin muchas complicaciones, no siendo así para la segunda reacción (Reac. 6) donde se

observan muy pobres rendimientos cuando se trata de condensar dos moléculas de alcoholes.

Los dicloruros de alquil fosfato derivados de alcoholes de alto peso molecular (alquilos de C₇ a C₁₂) son inestables y como ya se mencionó sufren descomposición antes de alcanzar su punto de ebullición.

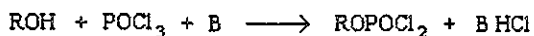
En el método para sintetizar los fosfatos dialquil arilo los grupos alquilo se introducen primero, porque el cloruro de hidrógeno liberado provocaría la ruptura y la separación del grupo arilo.

El p-nitrofenil fosfato de dietilo es un aril fosfato de dialquilo, que no ha tenido éxito comercial significativo, debido a su poca estabilidad ante la hidrólisis, este compuesto fue descubierto por Schrader y colaboradores [20].

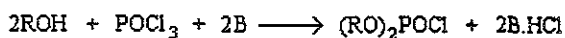
2. Reacción de oxihaluros de fósforo, o halofosfatos, con hidroxicompuestos en presencia de una base.

La preparación del p-Nitrofenil fosfato de sodio, objetivo de esta tesis se lleva a cabo bajo el método de síntesis reportado por Bessey y Love [3], los cuales obtuvieron mejores rendimientos del producto por el uso de piridina:

En la síntesis de ésteres terciarios formados por la esterificación de grupo halofosfato generalmente se usa una cantidad teórica de una base terciaria, en este caso piridina, con el objeto de neutralizar el haluro de hidrógeno formado y así evitar la hidrólisis de molécula condensada. Pocos halofosfatos y tiohalofosfatos se han preparado por este procedimiento empleando una cantidad estequiométrica de la base. La reacción se efectúa en un disolvente inerte, usualmente a temperatura ambiente o por debajo de ésta, y los productos son separados por filtración (Reacs. 7, 8, 9 y 10):



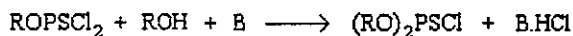
Reac. 7



Reac. 8



Reac. 9



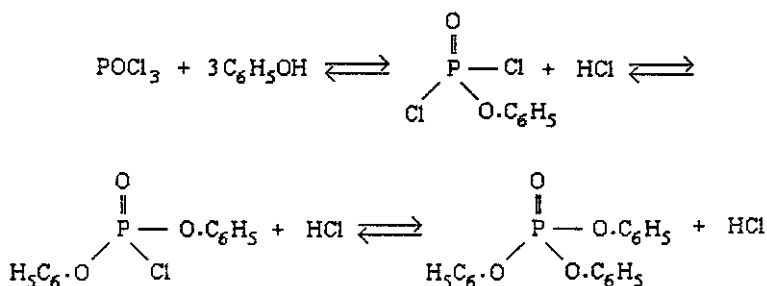
Reac. 10

Se obtienen altos rendimientos de los halofosfatos cuando dos moles de la base son usadas por una mol de oxiclورو de fósforo. Por calentamiento los clorofosfonatos reaccionan con piridina o hidropiridina, formando haluros de alquilo; la reacción se produce más rápido en los derivados halofosforados de arilo, donde R es un grupo fenilo [20].

Algunos investigadores han obtenido fosfatos ácidos de alquilo por hidrólisis del producto resultante de la acción de oxiclورو de fósforo con un alcohol en presencia de piridina. Más recientemente King & Nicholson*, hicieron reaccionar proporciones molares de fenol o fenoles substituidos con oxiclورو de fósforo ante piridina, y el producto obtenido de esta reacción se sometió a hidrólisis llevándose a cabo rápidamente sin la necesidad de un

* *Biochem. J.*, **33**, 1182, (1939)

calentamiento prolongado. Los resultados experimentales indicaron que la reacción está en equilibrio (Reac. 11):



Reac. 11

La piridina no sólo efectúa la eliminación del cloruro de hidrógeno, sino también la estabilización del intermediario clorofosfonato, presumiblemente por formación de un complejo de piridina. Un aumento en la temperatura incrementa las relaciones molares de piridina y fenol con respecto al oxiclورو de fósforo favoreciendo el desplazamiento del equilibrio a la derecha [1].

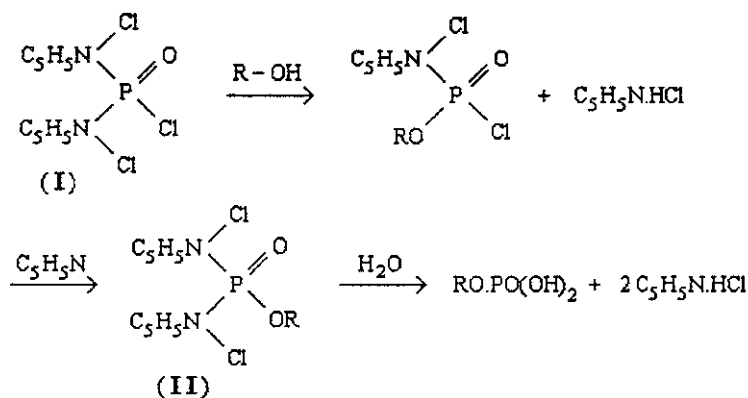
Los alcoholes diaril alquílicos reaccionan lentamente con oxiclورو de fósforo a 100° C y el producto de la reacción al ser tratado con hielo da una mezcla de mono y diésteres del ácido fosfórico. La reacción se lleva a cabo más rápidamente a bajas temperaturas cuando se emplea piridina como disolvente y como agente condensante. La piridina ha sido usada por otros investigadores en la preparación de ésteres de ácidos inorgánicos.

E. Fisher* introdujo el uso de la piridina con oxiclورو de fósforo, para la preparación de ésteres fosfóricos, y el método fue empleado más tarde por

* *Ber.*, 47, 3194, (1914)

Abderhalden*. Este investigador notó que se formaba un compuesto cristalino cuando se mezclaban piridina y POCl_3 . Se cree que la fórmula era $(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2 \cdot \text{POCl}_3$ (aducto I).

Los alcoholes diaril alquílicos reaccionaron a 0°C en una 5ª parte del tiempo requerido cuando se empleaba piridina, esto hizo suponer que la función de la piridina no era solamente la de fijar el cloruro de hidrógeno que se libera. El compuesto de adición piridina-oxicloruro es doble. La reacción es (Reac. 12):

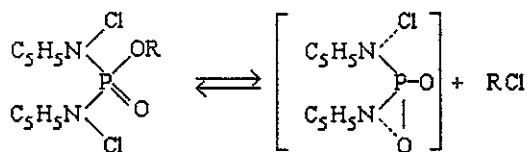


Reac. 12

Pueden ser obtenidos excelentes rendimientos por este método usando piridina y regulando las condiciones de presión y temperatura experimentales. Si hay un exceso de oxicloruro de fósforo la reacción se restringe a la formación del éster monofosfórico.

* Ber., 51, 1380, (1918)

La presencia de la piridina es un factor necesario en la formación del cloruro, y la reacción es más fácil de explicar si se asume que la descomposición del compuesto piridínico (II) se debe a la influencia del aumento de la temperatura (Reac. 13):



Reac. 13

El oxiclorigenato de fósforo ha sido utilizado esencialmente como un agente para introducir el radical H_2PO_4^- . Los experimentos muestran, sin embargo, que el oxiclorigenato de fósforo en asociación con piridina puede actuar de acuerdo con las condiciones experimentales, como un reactivo para la introducción del radical ácido o para el intercambio de un hidroxilo (OH^-) por un cloro.

El compuesto piridina-oxiclorigenato (I) fue preparado por Runciman B. D. & Ernest L. D [18] por reacción de piridina y oxiclorigenato de fósforo la cual origina un aceite que produce rápidamente unos cristales, éstos fueron lavados y secados: este producto fue analizado. Observando $\text{P}=9.2\%$, $\text{Cl}=27.8\%$, literatura $\text{P}=9.9\%$; $\text{Cl}=34.1\%$ $(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2.\text{POCl}_3$. Este compuesto es extremadamente higroscópico y se descompone en agua. Es soluble en cloroformo. No es soluble en tetraclorigenato de carbono.

2.3.1 Hidrólisis de Halofosfatos.

En el sistema biológico es de gran importancia que los ésteres fosfato sean hidrolizables (Reac. 14):

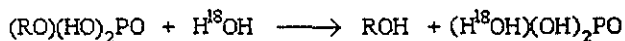


Reac. 14

La acción de las enzimas incrementa en un millón de veces la proporción de la hidrólisis en los sistemas biológicos.

Si R es un grupo complejo; depende de la naturaleza y estructura de éste el grado de hidrólisis, así como también de las condiciones de reacción, a saber: pH, temperatura y concentración.

En condiciones ácidas, neutras, o alcalinas y siendo R un grupo arilo, los mono, di y tri ésteres al ser sometidos al proceso de hidrólisis producen la ruptura en el enlace P-O, lo cual ha sido demostrado por el uso de agua pesada marcada con el isótopo ^{18}O , el cual queda unido al ácido ortofosfórico y no al alcohol (Reac. 15):

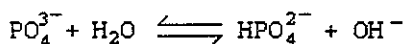


Reac. 15

A todos los valores de pH, la hidrólisis de los dialquil ésteres causa la ruptura del enlace C-O.

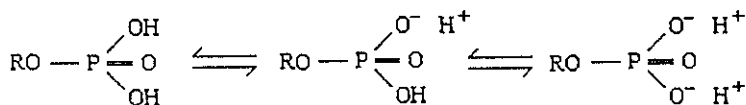
En condiciones alcalinas los mono y tri alquil ésteres, sufren rompimiento de los enlaces P-O. A pH bajo se dan rupturas mínimas C-O. Bajo diferentes condiciones la ruptura puede suceder en cualquiera de los enlaces P-O ó C-O [5].

Las soluciones de los ortofosfatos son fuertemente alcalinas, como consecuencia de la hidrólisis y sus sales (las que contienen los iones H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) son inestables térmicamente descomponiéndose al ser calentados en P_2O_5 y desprendiendo agua (Reac. 16) [2]:



Reac. 16

Los fosfatos así como otros ésteres, son hidrolizables, propiedad que permite regenerar el ácido y el alcohol originales. El OH unido al fosfato le confiere una acidez que permite que puedan estar presentes varias especies en equilibrio en la solución de hidrólisis, mediante esta reacción los ésteres de ácidos fosfóricos se pueden ionizar, como ejemplo, un mono alquil éster podría existir como dianión, monoanión, y éster neutro (Reac. 17):

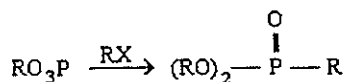


Reac. 17

Difícilmente se produce la ruptura del enlace alquilo-oxígeno y esto se debe a que el anión carboxilato es fuertemente básico y se comporta como un mal grupo saliente, como el ácido fosfórico tiene una acidez intermedia entre los ácidos carboxílicos y sulfónicos el anión fosfato es un grupo saliente superior al carboxilato, por lo que el ataque nucleofílico al fósforo compite con el ataque al carbono alquílico.

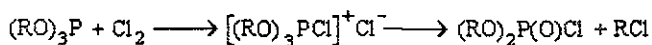
En soluciones ácidas ocurre con mayor facilidad la degradación del éster fosfórico al ácido fosfórico, no siendo así en soluciones alcalinas, en las que sólo se hidroliza un grupo alcoxi de los trialquilfosfatos $(RO)_3PO$. Los mono y dialquil ésteres $ROPO(OH)_2$ y $(RO)_2PO(OH)$, son inertes al álcali, aún después de un tratamiento prolongado, lo que se considera un comportamiento extraordinario pero la explicación es que los grupos OH unidos al fósforo en los ésteres mono y dialquílicos se encuentran en forma aniónica en solución alcalina; por lo que la repulsión entre cargas iguales no permite el ataque del ion hidróxido a estos aniones [15].

En estos ésteres existe una marcada tendencia a formar enlaces $P=O$, lo que causa que se lleve a cabo la reacción de **Arbusov** [12], la cual se cataloga como **una de las reacciones más útiles de la química de los compuestos organofosforados**, de modo que se da la trasposición de un trialquil fosfito a un fosfonato (Reac. 18).



Reac. 18

La reacción (Reac. 19) ilustra la oxidación con halógenos de los trialquilfosfitos [12].



Reac. 19

Para los monoésteres la hidrólisis es más rápida a pH=4, siendo relativamente estables a valores de pH básico, el anión monoácido $(\text{RO})\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{O}^-$ es menos estable que el $(\text{RO})\text{P}(\text{O})\text{O}_2^-$, y la proporción de aniones del monoéster varía considerablemente y está relacionado con la capacidad de donar electrones del grupo R involucrado.

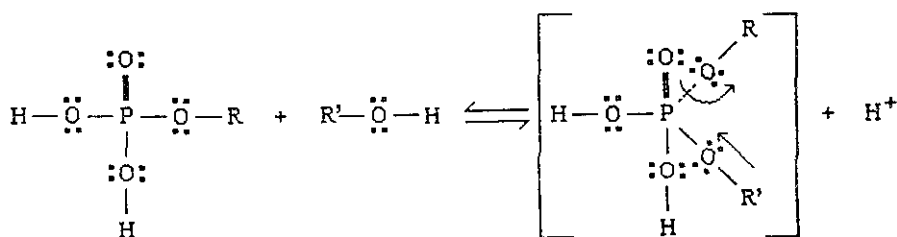
En condiciones alcalinas los trialquil ésteres tienen un comportamiento menos estable en comparación con los mono y dialquil ésteres, sin embargo cuando los mono, di y trialquil fosfatos tienen radicales comunes (R), la hidrólisis se presenta en la misma proporción.

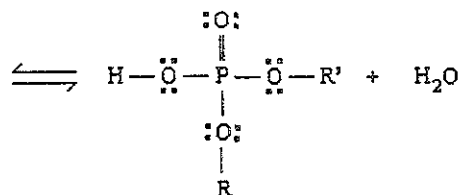
Ésteres de fosfato más complejos muestran variaciones considerables en la proporción de la hidrólisis, así el ácido glucosa-6-fosfórico es más estable en condiciones ácidas, hidrolizándose únicamente por la acción de ácidos minerales, cuando se calienta con HCl a 100°C toma varios días para que se complete la hidrólisis, en contraste el ácido glucosa-1-fosfato bajo estas mismas condiciones en un periodo de 10 min es completamente hidrolizado, Tabla 2 [5].

Tabla 2
Proporción relativa de hidrólisis de $(RO)P(O)O_2^-$
a 100 °C

Fosfato de Metilo	1.00 (%)
Fosfato de Etilo	0.74
Fenilfosfato	32.0
p-Tolilfosfato	26.6
p-Nitrofenil Fosfato	66.80
Bencil Fosfato	1.61
Glicerol-1-Fosfato	1.85
Glucosa-1-Fosfato	1.85

Las condensaciones y la hidrólisis tienen lugar por derivados intermedios pentacoordinados al fósforo (Reac. 20).

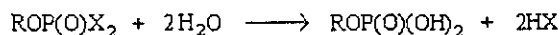




Reac. 20

Por otro lado los polifosfatos y los fosfatos condensados forman puentes C-O-P y P-O-P muy estables para permitir su empleo en las estructuras bioquímicas y lo suficientemente lábiles para permitir su uso en reacciones bioquímicas y como catalizadores [10].

Siendo haluros ácidos, los halofosfatos están sujetos al proceso de hidrólisis dando como resultado de esta reacción los correspondientes ácidos libres de acuerdo con las reacciones (Reac. 21) y (Reac. 22) [20]:



Reac. 21



Reac. 22

Los alquil dihalo fosfatos inferiores y los derivados arilo pueden ser hidrolizados con éxito por tratamiento con agua, a temperatura ambiente o por debajo de ésta. Los derivados secundarios $(\text{RO})_2\text{P(O)X}$ resisten la hidrólisis suave requiriendo temperaturas más altas en comparación con los dihalofosfatos de alquilo, en un medio ácido la hidrólisis parcial de las

ligaduras del éster se ve favorecida. En álcali acuoso los halofosfatos secundarios en general y los dihalofosfatos primarios, se convierten en las correspondientes sales de los ácidos; por acidificación de los halofosfatos secundarios y dihalofosfatos primarios se obtienen los ácidos libres. Los haluros de ésteres cíclicos usualmente sufren apertura de anillo en tratamiento hidrolítico de cualquier clase.

2.4. Aplicaciones del Producto. Actualización Bibliográfica.

2.4.1. Aplicaciones Bioquímicas.

p-Nitrofenil Fosfato:

Como sustrato de fosfatasa de doble especificidad Cdc25 (ejemplo la fosfatasa cisteína) de especificidad dual que catalizan la activación de la quinasa cíclica-dependiente [7].

Como sustrato de una fosfatasa alcalina no dependiente de Mg^{2+} de *Saccharomyces cerevisiae* [9].

Como sustrato de una nueva fosfatasa ácida eucariótica dependiente de Mg^{2+} (MDP-1) [19].

Para medir la influencia de tensión de agua en la hidrólisis de ATP y p-nitrofenil fosfato (pNPP) por la ATPasa de la membrana plasmática, en vesículas purificadas de membrana plasmática del hipocotiledón del frijol de soya por el método de gradiente de centrifugación de la sacarosa. Los resultados experimentales indicaron que la tensión del agua cambia el mecanismo de catálisis de la membrana plasmática H^+ -ATPasa por alteración del proceso de defosforilación catalizado por la fosfatasa [17].

El p-nitrofenil fosfato (pNPP) podría ser hidrolizado por vesículas de la membrana plasmática del hipocotiledón del frijol de soya. El pNPP puede inhibir la hidrólisis de ATP y el transporte de H^+ de la membrana plasmática H^+ -ATPasa. Mientras que la hidrólisis de pNPP es inhibida por $MgATP$ y vanadato; sin embargo, la hidroxilamina y los iones potasio no afectaron la hidrólisis de pNPP. La conclusión es que la defosforilación procede de manera separada de la fosforilación; el K^+ no requirió de defosforilación [16].

Para la determinación de la estructura cristalina de tiroxina fosfatasa una proteína de peso molecular bajo del *Saccharomyces cerevisiae* y su complejo con el sustrato p-nitrofenil fosfato [21].

Para determinar la evidencia de un no-enlace de coordinación del p-nitrofenil fosfato al centro dinuclear del Fe(III)-M(II), en la fosfatasa ácida de bazo púrpura de bovino durante la producción enzimática [14].

p-Nitrofenil Fosfato de Dietilo:

Como sustrato inhibidor para la desacetilación del Rifalazil en microsomas del hígado humano [13].

Como sustrato inhibidor de la enzima fosfolipasa A2 (aiPLA(2)) nativa de los pulmones de humanos, ratas y bovinos [8].

2.4.2. Aplicaciones generales.

Para medir los efectos de isótopos de átomos pesados para las reacciones del p-nitrofenil fosfato (pNPP) en complejos estables de Co como el cis-[Co(en)₂(OH)pNPP] (1), Co(NH₃)₅pNPP (2), y un complejo Co(cíclico) de pNPP (4) formado reversiblemente en solución. Los complejos 1 y 2 sufren disociación de pNPP en competencia con el ataque nucleofílico para liberar p-nitrofenolato [4].

Para la determinación de la aceleración de la catálisis ácida en la transesterificación fosfato de 2-Hidroxipropil-p-nitrofenilo por solventes orgánicos [11].

Otros ésteres fosfóricos tienen propiedades para aplicarse en diferentes áreas como plastificantes, retardantes de flama, reactivos en la preparación de polímeros órgano fosforados, para la extracción de cationes con disolventes, insecticidas y gases enervantes [5].

El p-nitrofenil fosfato de dietilo presenta una marcada acción insecticida, usándose como el precursor de los insecticidas de ésteres de tiofosfato y también se usa en el tratamiento del glaucoma [20].

3.1 Síntesis.

3.1.1 Material y equipo.

3.1.1.1 Equipo.

Espectrofotómetro Perkin-Elmer Hitachi Modelo 200

3.1.1.2 Reactivos.

- 1.- p-Nitrofenol recristalizado (Q.P.)
- 2.- Oxidloruro de fósforo destilado (Q.P.)
- 3.- Piridina seca (Q.P.)
- 4.- Carbonato de sodio (Q.P.)
- 5.- Hidróxido de sodio concentrado (Q.P.)
- 6.- Mezcla (1:1) de etanol-éter
- 7.- Agua

3.1.2 Método de obtención.

El método utilizado para la obtención del producto consiste en hacer reaccionar el p-nitrofenol con oxiclorigo de fósforo usando piridina como disolvente, de este modo se obtiene un derivado dihalofosfato de arilo. Se hidroliza con agua en condiciones de reacción muy controladas.

La obtención de la sal de sodio del p-nitrofenil fosfato se puede realizar con dos reactivos diferentes Na_2CO_3 o NaOH :

1a. Na_2CO_3 . Al utilizar este reactivo el p-nitrofenil fosfato de sodio se obtiene con bajo rendimiento (25.44%) y alta pureza (90.23%).

El producto fue caracterizado por espectroscopía ultravioleta utilizando el coeficiente de extinción molar.

1b. NaOH . Con esta hidrólisis el producto que se obtiene está contaminado con p-nitrofenóxido de sodio, lo que aumenta el rendimiento del producto pero su calidad es menor.

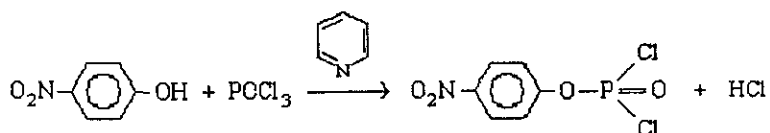
UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PLATA

3.1.2.1 Preparación de p-Nitrofenil Fosfato de Sodio usando Oxicloruro de Fósforo, p-Nitrofenol y Piridina.

1.- Un matraz bola de 3 bocas de 500 ml, se acondiciona con refrigerante en posición de reflujo y dos embudos de adición.

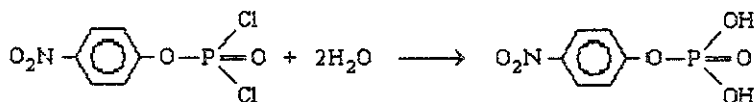
En el matraz, enfriado externamente con baño de hielo, se coloca 0.55 mol (76.7 g) de p-nitrofenol; por uno de los embudos de adición se agrega piridina 0.55 mol (44.41 ml) gota a gota, bajo agitación continua; terminada esta adición se añaden 0.54 mol (51.43 ml) de POCl_3 . Se retira el baño de hielo y se calienta a reflujo durante 25 horas.

Terminado el reflujo se destila la mezcla de reacción a presión reducida. El producto de punto de ebullición de 76°C cristaliza en cuanto se enfría. El destilado es mezcla de oxicloruro de fósforo y piridina que no reaccionaron en el disolvente. El rendimiento del dicloro fosfato de p-nitrofenilo fue del 63.82%.



2.- Hidrólisis

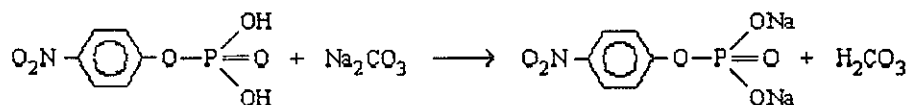
El compuesto dicloro fosfato de p-nitrofenilo obtenido de la destilación se hidroliza con agua y se refluja pasando a través de la solución una corriente de aire seco para eliminar los vapores ácidos que se producen. Se forma el fosfato diácido de p-nitrofenilo, esta solución se evapora en una desecador al vacío que contiene NaOH , precipitando instantáneamente. Este precipitado se filtra. El rendimiento fue del 40.20%.



3.- Formación de la sal de sodio:

3.1.- Na_2CO_3

La sal disódica del fosfato de p-nitrofenilo se prepara adicionando el fosfato ácido de p-nitrofenilo que se encuentra disuelto en agua, carbonato de sodio, la solución cambia a un color amarillo intenso. Se precipita la sal disódica del fosfato de p-nitrofenilo agregando una mezcla (1:1) de éter etílico-etanol, se recrystaliza con la misma mezcla. El rendimiento fue de 25.44% con una pureza del 90.23%.



3.2.- NaOH

El fosfato ácido de p-nitrofenilo se refluja pasando aire seco a través de la mezcla de reacción, se le ajusta el pH a 7-8 con una solución de NaOH concentrada manteniendo la reacción en baño de hielo. El exceso de agua y piridina se eliminan de la mezcla de reacción por destilación a presión reducida a 60 °C.

Al residuo sólido de la destilación se le adiciona etanol caliente al 87% para extraerlo, se filtra en caliente. El producto sólido se seca en un desecador al vacío, obteniéndose un sólido ligeramente amarillo. El rendimiento fue de (30.969 g) 58.88%.

3.2 Caracterización.

3.2.1 Espectroscopía Infrarrojo.

Banda intensa = (i)

Banda media = (m)

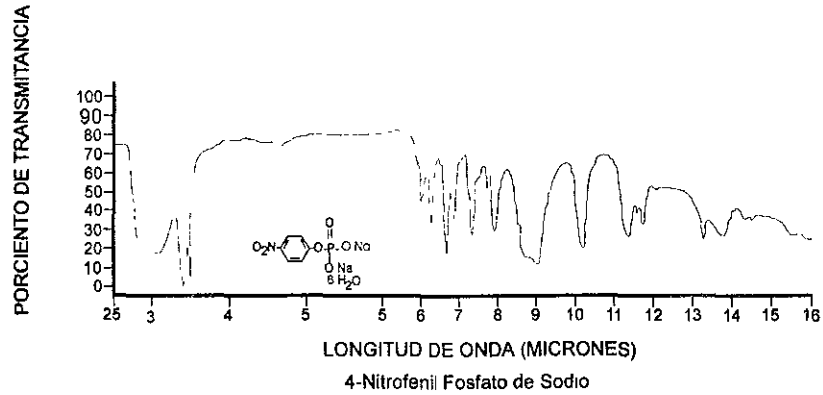
Banda suave = (s)

Banda ancha = (a)

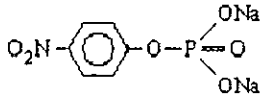
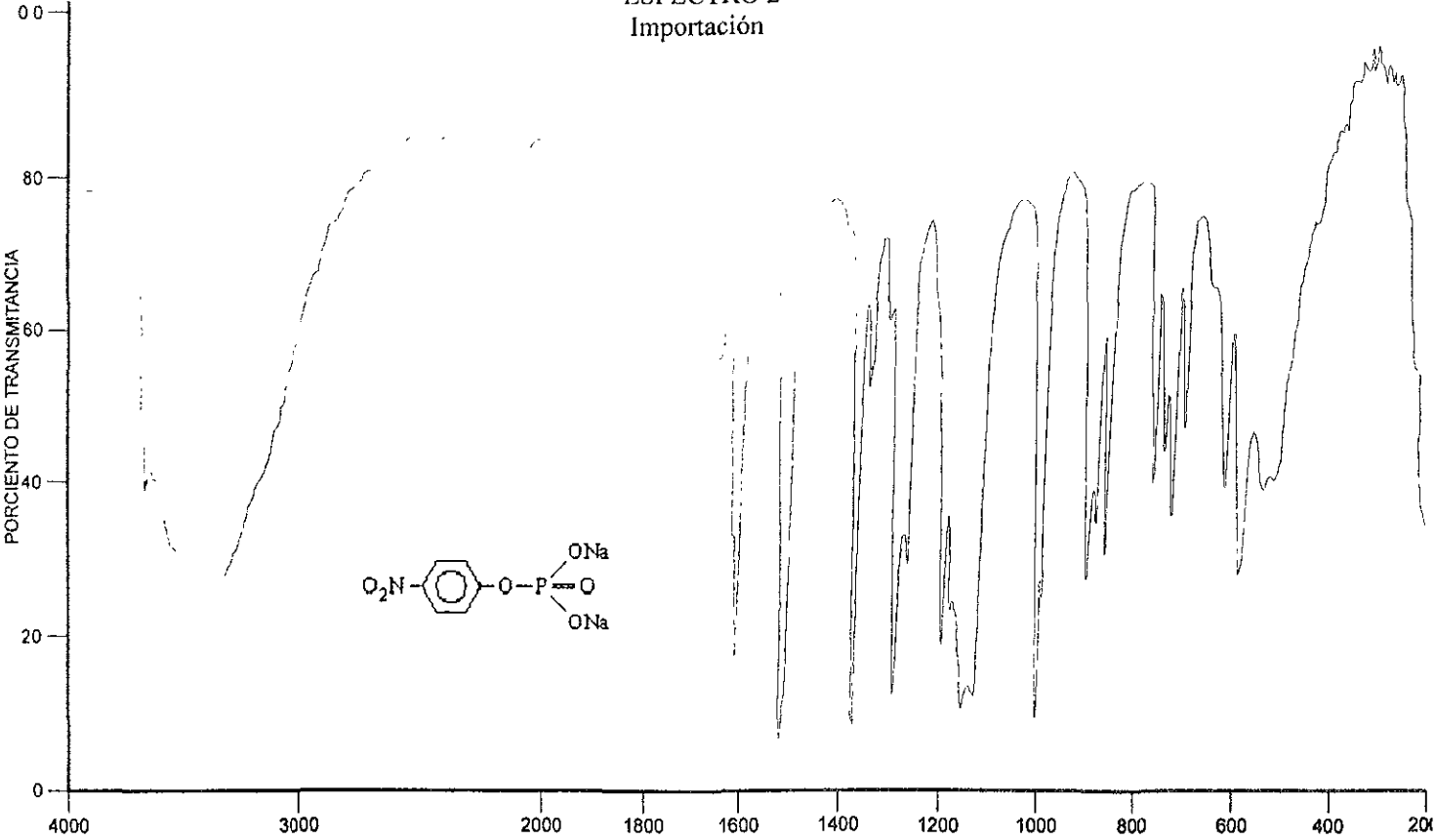
Tabla 3
p-Nitrofenil fosfato de sodio

Absorciones	Literatura cm^{-1}	Observado cm^{-1} Importación	Observado cm^{-1} Sintetizado
(i), -OH fenoles, aromáticos	3600 – 3100	3500 - 3200	3440 - 3360
(i), -OH, alcoholes, fenoles	3600 – 3100	3500 - 3200	3140 - 3000
(s), -C-NO ₂ , fenoles aromáticos	1600 – 1580	1610	1600
(s), P-fenilo, R-NO ₂	1490	1520	1500
(s), P=O, Ø-O-P=O, -C-NO ₂	1380	1370	1360
(m), P-O-C, Ø-O-P=O, P=O	1260 – 1250	1290 - 1260	1256
(s), P-O-C	1180 – 1100	1200	1160
(s), P-O-C	1180 – 1100	1160 - 1120	1130
(s), C-O-O	1180 – 1100	1160 - 1120	1070
(s), Ø-O-P=O	1000 – 950	1000 - 980	995
(s), Ø-O-P=O	1000 – 950	1000 - 980	960
(s), sales inorg., p-nitrofenóxido	580	600	590

ESPECTRO 1
Literatura

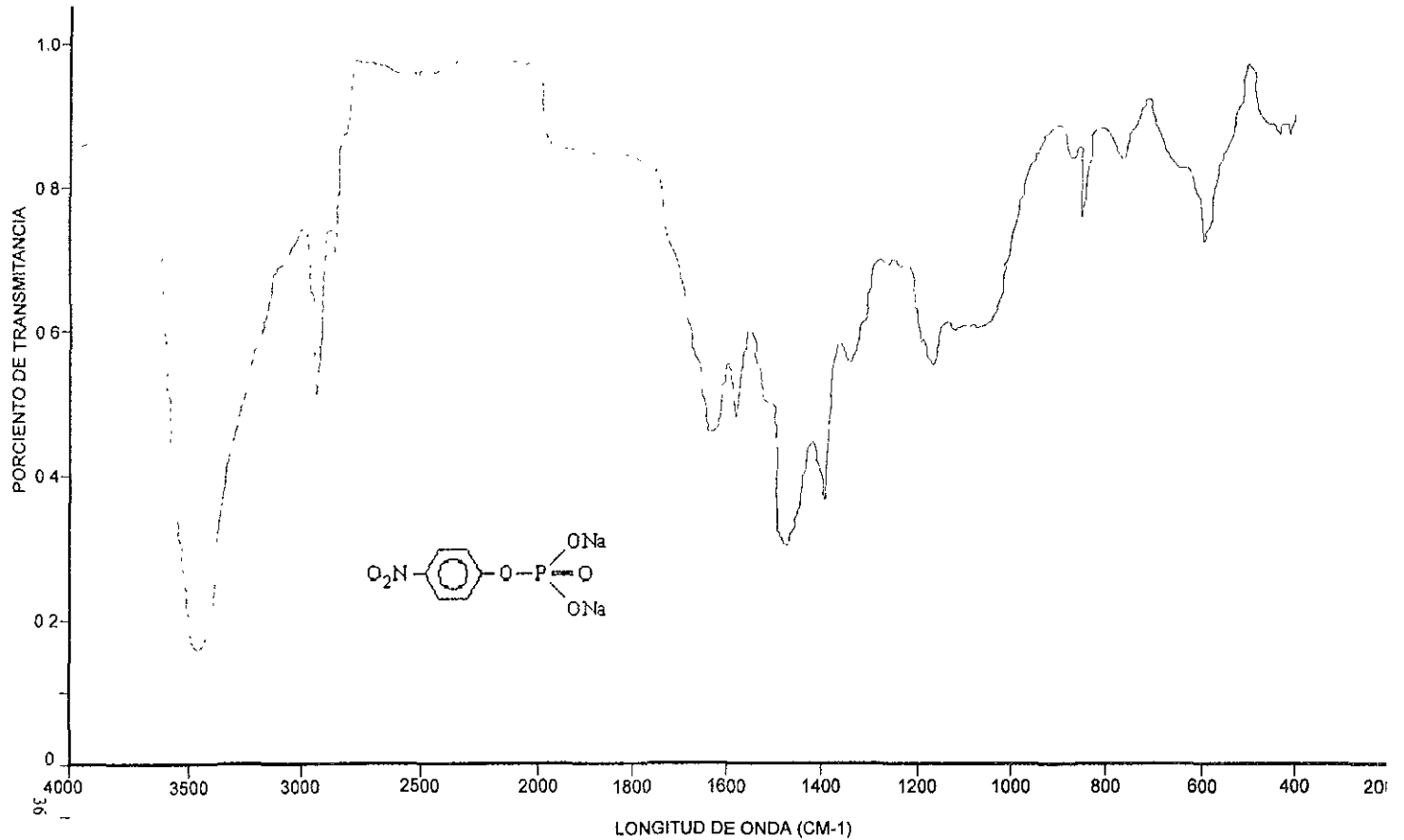


ESPECTRO 2
Importación



35
LONGITUD DE ONDA (CM-1)
p- Nitrofenil Fosfato de Sodio

ESPECTRO 3
Obtenido



p- Nitro Fenil Fosfato de Sodio Sintetizado

3.2.2 Espectroscopia Ultravioleta.

Tabla 4

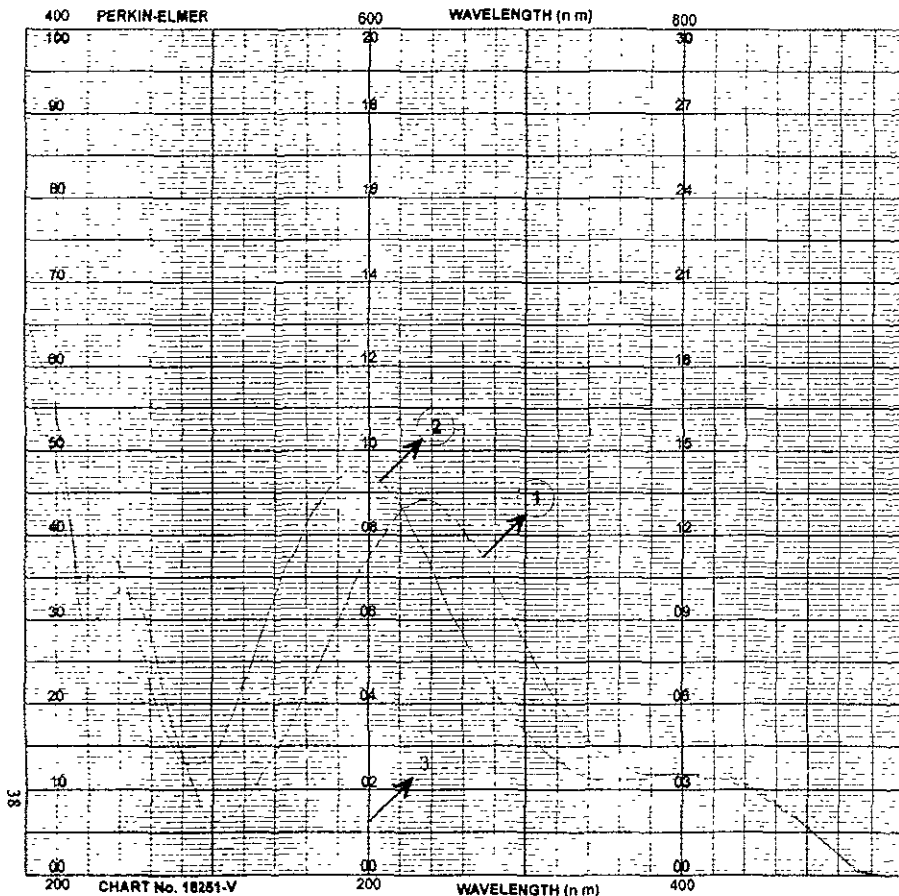
Determinación de pureza del p-Nitrofenil fosfato de sodio

Propiedades	Importación	Sintetizado
A_{MAX}	0.43	0.467
λ_{EM}	311 nm	290 nm
Concentración	7×10^{-5} g/ml	1×10^{-4} g/ml

Se realiza espectroscopia ultravioleta para determinar pureza del producto y cuantificarlo.

ESPECTRO 4

1 p-Nitro Fenil Fosfato de Sodio "Importación"
2 p-Nitrofenil Fosfato de Sodio "1"



PERKIN-ELMER

SPECTRUM No. _____
 SAMPLE: (1)(2)(3)
 CONCENTRATION: _____
 PATHLENGTH: 10mm OTHER
 SOLVENT: H₂O
 ACCESSORY: _____
 REFERENCE: H₂O
 REMARKS: ① = 0.25 mg / 5 ml
 ② = 0.5 mg / 5 ml
 ③ = 0

RANGE	0-100%	0-2A	0-3A	CONC
RECORDER	3	2	<input checked="" type="checkbox"/>	0.5 0.2 0.1 0.05 0.02 A
PRESENTATION	100	60	20	10 5 2 1%T
WAVELENGTH RANGE	UV		VISIBLE	
SCAN SPEED (nm/mm)	30	60	160	240
CHART SPEED (mm/min)	<input checked="" type="checkbox"/> VIS	30	120	240
		15	60	120

RESPONSE FAST MEDIUM SLOW

BANDPASS (nm): _____

ZERO SUPPRESSION ON OFF

DATE 24/7/90 OPERATOR TORRES

1. Se sintetizó el ácido p-nitrofenil clorofosfórico, haciendo reaccionar p-nitrofenol, piridina y POCl_3 .
2. La hidrólisis alcalina para la obtención de la sal se realizó con NaOH y Na_2CO_3 . En el primer caso el producto fue de mayor rendimiento por la hidrólisis parcial del ácido p-nitrofenil fosfórico, al contaminarse con p-nitrofenóxido de sodio
3. El mejor producto se consiguió al hidrolizar con Na_2CO_3 porque el p-nitrofenil fosfato de sodio obtenido fue del 90.22% de pureza, aunque el rendimiento es del 25.44%.
4. De la actualización bibliográfica se observa que el p-nitrofenil fosfato de sodio ahora también se utiliza como sustrato en el metabolismo de la respiración, de tal modo que la síntesis de este producto continua siendo vigente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Audrieth, T., *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 2117, (1941).
2. Bailar, J. C., Moeller, T. & Kleinberg, J., Química Básica, Editorial Alambra, México, (1968).
3. Bessey, O. A. and Love, R. H., *J. Biol. Chem.*, 196, 175-178, (1952).
4. Cleland, W. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 119, [3], 542-549, (1997).
5. Corbridge, D. E. C., Studies in Inorganic Chemistry, Elsevier Scientific Publishing, Vol. 2 Phosphorous an Outline of it's Chemistry, Biochemistry and Technology, 2a. ed., Amsterdam.
6. Cotton, A. F. & Wilkinson, G., Química Inorgánica Avanzada, 2ª. Ed., Limusa, México, (1981).
7. Chen, W., Wilborn, M., and Rudolph, J., *Biochem.*, 35, 10781-10789, (2000).
8. Fisher, A. B., et. al, *J. Biol. Chem.*, 37, 28421-28427, (2000).
9. Galabova, D., et. al., *Zeitschrift Fur Naturforschung-A J. Of Biosciences*, 55, [7-8], 588-593, (2000).
10. Gray, H. B. and Haight, G. P., Principios Básicos de Química, Editorial Reverté, S. A., Barcelona, (1976).
11. Hong, S. and Suh, J., *Org. Lett.*, 2, [3], 377-380, (2000).
12. Huheey, J. E., Química Inorgánica, Principios de estructura y reactividad., Harper & Row Latinoamericana, México, (1981).
13. Mae, T., et. al., *Xenobiotica*, 30, [6], 565-574, (2000).
14. Merckx M., et. al., *Biochem.*, 38, [31], 9914-9925, (1999).
15. Morrison, R. T. & Boyd, R. N., Química Orgánica , Fondo Educativo Interamericano, S, A., México, (1976).
16. Qiu, Q. S., *J. Of Plant Physiol*, 154, [5-6], 628-633, (1999).

17. Qiu, Q. S. And Zhang, N., *Australian J. Of Plant Physiol.*, 27, [7], 717-721, (2000).
18. Runciman, B. D. and Ernest, L.D., *J. Chem. Soc.*, 215-222, (1928).
19. Selengut, J.D. and Levine, R.L., *Biochem*, 39, [28], 8315-8324, (2000).
20. Van Waser, J. R., *Phosphorous and it's Compounds*, Interscience Publisher, Vol. 1 y 2, Technology, functions and applications, New York, (1958).
21. Wang, S., et. al., *Biochem.*, 39, [8], 1903 -1914, (2000).