

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Michelle Medeiros

**EFEITO DE GRUPOS ESPECTADORES NA HIDRÓLISE DE
DIÉSTERES FOSFÓRICOS. ESTUDOS DA HIDRÓLISE DO
BIS-2-PIRIDIL FOSFATO E DAS REAÇÕES DO FÁRMACO
DEFEROXAMINA COM MONO- E TRIÉSTER DE FOSFATO**

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera.

Florianópolis

2013

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Medeiros, Michelle
Efeito de grupos espectadores na hidrólise de diésteres
fosfóricos. Estudos da hidrólise do bis-2-piridil fosfato e
das reações do fármaco deferroxamina com mono- e triéster de
fosfato [tese] / Michelle Medeiros ; orientador, Faruk
Nome - Florianópolis, SC, 2013.
190 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. ésteres de fosfato. 3. catálise
intramolecular. 4. relações lineares de energia livre. 5.
deferroxamina. I. Nome, Faruk. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Michelle Medeiros

**EFEITO DE GRUPOS ESPECTADORES NA HIDRÓLISE DE
DIÉSTERES FOSFÓRICOS. ESTUDOS DA HIDRÓLISE DO
BIS-2-PIRIDIL FOSFATO E DAS REAÇÕES DO FÁRMACO
DEFEROXAMINA COM MONO- E TRIÉSTER DE FOSFATO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 7 de Fevereiro de 2013.

Prof. Almir Spinelli, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Faruk José
Nome Aguilera, Dr.
Orientador
UFSC

Prof. Hugo Alejandro
Gallardo Olmedo, Dr.
UFSC

Prof. Paulo Anselmo
Ziani Suarez, Dr.
Relator
UnB

Prof. Maria da Graça
Nascimento, Dra.
UFSC

Prof. Adriano Lisboa
Monteiro, Dr.
UFRGS

Prof. Gustavo Amadeu
Micke, Dr.
UFSC

Aos meus pais, que me deram oportunidade à educação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela educação que recebi, pelo amor incondicional e por todo apoio que me oferecem sempre. Certamente essas são as maiores riquezas que um filho pode receber. Pai e mãe, amo vocês! Muito obrigada!

Agradeço ao Thiago, meu grande amor, que está sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e, principalmente, demonstrando total compreensão e paciência.

Ao professor Faruk Nome e professora Haidi Fiedler pela oportunidade de ingressar no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais, orientação, confiança, e principalmente, conhecimentos recebidos durante todos esses anos.

Ao professor Anthony J. Kirby (Universidade de Cambridge) pelas inúmeras discussões acerca dos resultados de todos os trabalhos realizados durante a minha formação, e pela sua dedicação à química dos ésteres de fosfato.

Ao professor Nicholas H. Williams e Almahdi Amer (Universidade de Sheffield) pela colaboração efetiva neste trabalho.

Ao professor Gustavo Amadeu Micke (UFSC) e à doutoranda Melina Heller pelas análises de LC-MS/MS e pela contínua disposição em ajudar.

Ao Dr. José Ramón Mora, meu querido “Pepe”, que além de todo o empenho em me ajudar diretamente no desenvolvimento deste trabalho, tornou-se meu grande amigo.

Ao Alex Molina Manfredi pelas análises de RMN, e principalmente, pela grande amizade que construímos, e pelo exemplo de sabedoria e paciência com o próximo.

Ao Tiago Pacheco de Camargo, que sob orientação do professor Ademir Neves (UFSC), se prontificou a colaborar nos experimentos, demonstrando muita persistência nas inúmeras tentativas de síntese de ésteres de fosfato assimétricos.

Aos meus amigos Raphael Moreira e Eduardo H. Wanderlind pela amizade e contribuições importantes ao trabalho.

Aos amigos do LACFI, que fizeram do ambiente de trabalho um lugar muito agradável, Gizelle Almerindo, Franciane Dutra, Emma Drinkel, Elder Leopoldino, Iasminy Brasil, Daiane de Liz e Lizandra Zimmermann e Luciano Giusti.

Ao Pedro S. M. de Oliveira, Bruno S. Souza e Tiago Brandão, que hoje já não estão no grupo LACFI, mas acompanharam grande parte da minha trajetória acadêmica, sempre disponíveis a me ensinar, demonstrando muita dedicação à pesquisa e ética profissional.

Aos todos os funcionários da UFSC, principalmente, Graça Hoeller e Jadir Carminatti, pela competência profissional e toda dedicação à secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Química.

Aos membros da banca examinadora, que aceitaram prontamente o convite, Paulo Anselmo Ziani Suarez, Adriano Lisboa Monteiro, Maria da Graça Nascimento, Hugo Alejandro Gallardo Olmedo e Gustavo Amadeu Micke.

Ao INCT-Catálise, CNPq, CAPES, UFSC, pelo apoio financeiro e infra-estrutura.

RESUMO

Esta tese de doutoramento compreende: (i) Estudo cinético das reações de deferoxamina (**DFO**) com os ésteres fosfóricos 2,4-dinitrofenil fosfato (**DNPP**) e dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**). Em comparação com as reações de hidrólise espontânea dos substratos, **DFO** acelera aproximadamente 10^7 vezes a quebra do triéster **DEDNPP**, em contraste com a reação o monoéster **DNPP**, acelerada modestamente por **DFO**. A elevada reatividade na quebra do triéster modelo **DEDNPP** foi também observada com o pesticida paraoxon metílico (dimetil 4-nitrofenil fosfato), sugerindo possível utilização adicional para o fármaco **DFO**: reativação da acetilcolinesterase em casos de intoxicação aguda por compostos organofosforados. (ii) Efeito de grupos espectadores na hidrólise de diésteres de fosfato. Foram sintetizados dois novos diésteres: 2,4-dinitrofenil fenil fosfato e 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato, e hidrolisados a 100°C. Os dados de hidrólise de quatro diésteres, com grupo de saída em comum (2,4-dinitrofenol) e diferentes grupos espectadores (metil, fenil, 4-nitrofenil ou 2,4-dinitrofenil), foram correlacionados como gráfico de Brønsted para grupo espectador, que fornece um valor β_{NLG} igual a $-0,031 \pm 0,001$, a 100°C. Esses resultados trazem uma nova relação linear de energia livre (**LFER**) à literatura, a qual indica que a sensibilidade à natureza dos grupos espectadores na hidrólise de diésteres de fosfato é mínima. (iii) Reatividade do *bis*-2-piridil fosfato (**DPP**). A constante de velocidade para a reação de hidrólise da espécie aniônica **DPP**⁻, na região de patamar de perfil de pH a 25°C, é cerca de 10000 vezes maior do que o previsto para a hidrólise espontânea de um diéster de fosfato diarílico simples com grupo de saída de pK_a similar. As evidências computacionais e cinéticas (incluindo o estudo da hidrólise do monoéster 2-piridil fosfato **PP**, e reação de **DPP** com hidroxilamina), combinadas em um estudo mecanístico rigoroso, mostram que a reação de hidrólise espontânea de **DPP**⁻ ocorre com catálise básica-geral intramolecular pelo nitrogênio piridínico do grupo espectador.

Palavras-chave: mecanismos, ésteres de fosfato, deferoxamina, relações lineares de energia livre, hidrólise e catálise intramolecular.

ABSTRACT

This thesis includes: (i) Kinetic study of the reactions of the drug Deferoxamine (**DFO**) with phosphate esters 2,4-dinitrophenyl phosphate (**DNPP**) and diethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (**DEDNPP**). Compared with the spontaneous hydrolysis of the substrate, **DFO** promotes rate enhancements of about 10^7 -fold in the dephosphorylation of **DEDNPP**, in contrast to the reaction with the monoester **DNPP**, which is only slightly promoted by **DFO**. The high reactivity in the dephosphorylation of the model triester **DEDNPP** was also observed in the reaction with pesticide methyl paraoxon (dimethyl 4-nitrophenyl phosphate), which suggests a possible additional use of drug **DFO**: reactivation of acetylcholinesterase in acute poisoning with organophosphorus compounds. (ii) Non-leaving group effect in phosphate diester hydrolysis. Two novel phosphate diesters were synthesized (2,4-dinitrophenyl phenyl phosphate and 2,4-dinitrophenyl 4-nitrophenyl phosphate) and hydrolyzed at 100°C. Data for the hydrolysis of four phosphate diesters with the same leaving group (2,4-dinitrophenol) but different spectator groups (methyl, phenyl, 4-nitrophenyl and 2,4-dinitrophenyl) were analyzed in terms of a Brønsted relationship depending on the non-leaving group, and the β_{NLG} obtained was $-0,031 \pm 0,001$, at 100°C. The results introduce a new linear free energy relationship (**LFER**) into the literature and indicate a minimal dependence of phosphate diester hydrolysis upon the nature of the non-leaving group. (iii) Reactivity of di-2-pyridyl phosphate (**DPP**). The rate constant for the hydrolysis of the anionic species **DPP**⁻, at 25°C, is 10000 times higher than expected for the hydrolysis of a simple diaryl phosphate diester with a leaving group of similar pK_a . Theoretical calculations and kinetic evidence (including the hydrolysis of phosphate monoester 2-pyridyl phosphate **PP**, and the reaction of **DPP** with hydroxylamine), combined with an accurate mechanistic study, show that **DPP**⁻ hydrolysis occurs through an intramolecular general base catalysis promoted by the pyridyl nitrogen of the non-leaving group.

Keywords: mechanisms, phosphate esters, deferoxamine, linear free energy relationships, hydrolysis and intramolecular catalysis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estruturas gerais para monoéster, diéster e triéster de fosfato. O primeiro pK_a para um monoéster alquílico e diéster alquílico são valores normalmente entre 1 e 2. O segundo pK_a para o monoéster alquílico é em torno de 7, aproximadamente 2 unidades maior que para monoésteres arílicos.¹ 23
- Figura 2** – Estruturas de alguns pesticidas e agentes neurotóxicos organofosforados.¹⁰ 25
- Figura 3** – Inibição da AChE por organofosforados.¹³ 26
- Figura 4** – Três mecanismos possíveis para o ataque nucleofílico de Nu sobre ésteres de fosfato, exemplificado para um monoéster de fosfato. De acordo com a nomenclatura IUPAC, A_ND_N , A_N e D_N , correspondem aos caminhos concertado, associativo e dissociativo, respectivamente.³⁸ 30
- Figura 5** – Diagrama simplificado de More O’Ferrall-Jencks para uma reação de transferência de grupo fosforila. Um estado de transição “solto” é aquele em que a quebra de ligação está adiantada em relação à formação de ligação, e está situado no canto inferior esquerdo do diagrama. Um estado de transição “rígido” é a situação reversa, e está situado ao lado apostro.¹ 31
- Figura 6** – Relações lineares de energia livre para vários tipos de ésteres de fosfato, normalizadas a 25°C.⁴¹ 35
- Figura 7** - Gráfico de Brønsted para a reação de nucleófilos com EDNPP. Os pontos abertos correspondem a ânions oxigenados na reação com metil 2,4-dinitrofenil fosfato a 39°C.^{4,26} 36
- Figura 8** – Estrutura geral do triéster de fosfato dialquil aril (**17**), onde os grupos Ar são: (a) 2,4-dinitrofenil; (b) 4-acetil-2-nitrofenil; (c) 4-cloro-2-nitrofenil; (d) 4-nitrofenil; (e) 2-nitrofenil; (f) 3-nitrofenil; (g) fenil. 57
- Figura 9** – Constantes de velocidade para hidrólise de triésteres de fosfato (**17**), a 39°C e força iônica 1,0 M, com grupos Ar: (▲) 2,4-dinitrofenil, (○) 4-acetil-2-nitrofenil e (■) 4-nitrofenil.⁶⁰ 58

Figura 10 – Relação linear de energia livre entre constante de velocidade para as reações de hidrólise de triésteres de fosfato e pK_a do grupo de saída, 39°C e força iônica 1,0 M. ⁶⁰	59
Figura 11 – Relações lineares de energia livre para 3 séries de triésteres de fosfato. ⁴¹	62
Figura 12 – Gráfico de Brønsted (log de k_{obs} em função do somatório dos pK_a s dos grupos espectadores) para a hidrólise de triésteres diaril (círculos abertos) e dialquil (círculos fechados) 4-nitrofenil fosfato. ^{41,46}	63
Figura 13 – Logaritmo das constantes de velocidade para hidrólise de ânions de diésteres de fosfato diarílicos em função do pH, a 100°C e força iônica 1,0 M: (■) <i>bis</i> -2,4-dinitrofenil fosfato, (○) <i>bis</i> -4-acetil-2-nitrofenil fosfato, (▼) <i>bis</i> -4-cloro-2-nitrofenil fosfato, (□) <i>bis</i> -4-nitrofenil fosfato e (●) <i>bis</i> -3-nitrofenil fosfato. ⁴	65
Figura 14 – Relação linear de energia livre entre constante de velocidade para reações de hidrólise de ânions de diésteres de fosfato diarílicos e pK_a do grupo de saída, a 100°C e força iônica 1,0 M. ⁴	66
Figura 15 – Espectros sucessivos de UV-VIS típicos para a reação de (a) hidrólise do DPP em função do tempo em pH 4, a 25°C; (b) DFO com o monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato DNPP , a 25°C. As figuras no canto superior direito são os gráficos de absorvância em função do tempo em 294nm e 360nm, para 2-piridona e 2,4dinitrofenol, respectivamente.....	73
Figura 16 – Perfil de pH para a reação do DEDNPP com DFO 0,01M (■) a 25°C e $\mu=1,0M$. As reações de hidrólise espontânea (□) e reação com BHA 0,05M (●) foram obtidas da literatura ^{82,107} e estão mostradas para comparação. Os dados para a reação do DEDNPP com DFO estão no ANEXO 1	79
Figura 17 – Área de m/z 339 em função tempo para a reação de hidrólise do 2,4-dinitrofenil fenil fosfato a 100°C. Os pontos são experimentais e a linha corresponde ao ajuste teórico segundo a Equação 4 . Os dados de área de m/z 339 em função do tempo estão no ANEXO 2	87
Figura 18 – Área de m/z 384 em função tempo para a reação de hidrólise do 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato a 100°C. Os pontos são experimentais e a linha corresponde ao ajuste teórico segundo a	

Equação 4. Os dados de área de m/z 384 em função do tempo estão no ANEXO 2.	88
Figura 19 – Constantes de velocidade para as reações de hidrólise dos ânions de diésteres de fosfato RO(PO₂⁻)–O-2,4-DNP em função do pK _a do ácido conjugado do grupo espectador, a 100°C.....	89
Figura 20 – Titulação potenciométrica de 0,05 mmol de DPP a 25°C, e diagrama de distribuição de espécies de acordo com o pK _a calculado de 2,73±0,01 (eixo Y, ao lado direito).	92
Figura 21 – Deslocamento químico (δ, RMN de ¹ H) em função de pD para DPP em D ₂ O, a 25°C. Os dados estão no ANEXO 3.	93
Figura 22 – Deslocamento químico (δ, RMN de ³¹ P) em função de pD(100% D ₂ O) ou pL (10% D ₂ O) para DPP em D ₂ O, a 25°C. Os dados estão no ANEXO 3.	94
Figura 23 – Constante de velocidade observada em função de pH/H ₀ para a reação de hidrólise do DPP a 25°C e força iônica 1,0 M. Os pontos são experimentais e a linha sólida (log k _{obs}) corresponde ao ajuste teórico segundo a Equação 7 e os parâmetros obtidos estão apresentados na Tabela 8. A linha pontilhada (log k _{calc}) refere-se ao ajuste teórico com a Equação 7 considerando a contribuição k ₀ igual a zero (mantida invariável no ajuste da curva). Os dados de k _{obs} em função de pH estão no ANEXO 5.	96
Figura 24 – Constante de velocidade observada (k _{obs} /a _w) em função de pH/H ₀ para a reação de hidrólise do PP a 25°C e força iônica 1,0 M. Os pontos são experimentais, a linha corresponde ao ajuste teórico segundo a Equação 9 e os parâmetros obtidos estão apresentados na Tabela 10. Os dados de (k _{obs} /a _w) em função de pH/H ₀ estão no ANEXO 6.	102
Figura 25 – Espectros sucessivos de RMN de ³¹ P para a reação de hidrólise do DPP em D ₂ O, a 100°C e pD 9.	106
Figura 26 – Espectros sucessivos de RMN de ¹ H para a reação de hidrólise do DPP em D ₂ O, a 100°C e pD 9.	107
Figura 27 – Gráfico de área relativa <i>versus</i> tempo, calculado a partir dos espectros sucessivos de RMN de ³¹ P (A) e ¹ H (B), da reação de hidrólise do DPP em pD 9, a 100°C.....	108
Figura 28 – Gráfico de ln(k _{obs} /T) vs T ⁻¹ para reação de hidrólise de DPP em pH 9,50 e μ=1,0 (KCl).	110

Figura 29 – Logaritmo da constante de velocidade observada (k_{obs}) em função do pH para a reação do DPP com $[NH_2OH]=1,0M$ (●), a 25 °C. A linha pontilhada refere-se à reação em água. Os dados de k_{obs} em função do pH para a reação com hidroxilamina estão no ANEXO 8	113
Figura 30 – Distribuição de espécies para substrato e nucleófilo em função do pH, de acordo com os pK_a s do DPP (obtido experimentalmente, Tabela 8) e com o valor da literatura para a hidroxilamina ($pK_a=6,06$).	114
Figura 31 – Estrutura otimizada do estado de transição para a reação de DPP com hidroxilamina.....	120
Figura 32 – Coordenada de reação intrínseca para a reação do DPP com NH_2OH com 1 molécula de água.	122
Figura 33 – IRC para a reação de hidrólise do DPP	134
Figura 34 – IRC para a reação de hidrólise do 4-CIPP	136
Figura 35 – Estruturas otimizadas dos complexos ativados nas reações de hidrólise de DPP (TS1) e 4-CIPP (TS2)	137
Figura 36 – Estados de transição para as reações de hidrólise de DPP (TS1) e 4-CIPP (TS2)	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Magnitude do efeito alfa da hidroxilamina nas reações com ésteres de fosfato derivados de 2,4-dinitrofenol (1) e 8-dimetilamônio-1-naftol (2). ^{a 26}	38
Tabela 2 – Constantes de velocidade para hidrólise de triésteres de fosfato (17), a 39°C e força iônica 1,0 M. ⁶⁰	58
Tabela 3 – Constantes de velocidade para hidrólise de ânions de diésteres de fosfato diarílicos, a 100°C e força iônica 1,0 M. ⁴	65
Tabela 4 – Massas monitoradas e energias de ionização do espectrômetro de massas.	76
Tabela 5 – Constantes de velocidade observada em função do pH para as reações de DNPP com DFO e BHA 0,01M, a 25°C e força iônica 1,0 M.	80
Tabela 6 – Constantes de velocidade e dissociação para a reação de DEDNPP com DFO , a 25°C e força iônica 1,0 M.	81
Tabela 7 – Resultados cinéticos para a reação do DFO com Paraoxon Metílico à 25° C, pH 11 e $\mu=1,0$ M.	83
Tabela 8 – Constantes de velocidade para as reações de hidrólise dos ânions de diésteres de fosfato RO(PO₂⁻)–O-2,4-DNP em função do pK _a do ácido conjugado do grupo espectador, a 100°C.....	89
Tabela 9 – Constantes de dissociação e parâmetros cinéticos para a hidrólise do DPP , a 25°C e força iônica 1,0 M.	99
Tabela 10 – Constantes de dissociação e parâmetros cinéticos para a hidrólise do PP , a 25°C e força iônica 1,0 M.	102
Tabela 11 – Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e ³¹ P para as espécies observadas na reação de hidrólise do DPP	107
Tabela 12 – Constantes de velocidade observadas em diferentes temperaturas para a hidrólise do DPP em pH 9,4-9,7 (tampão CHES) e força iônica 1,0 M.	109
Tabela 13 – Parâmetros de ativação para a hidrólise espontânea de ânions de diésteres de fosfato.....	111

Tabela 14 – Constantes utilizadas no ajuste não linear dos dados da Figura 29 e efeito isotópico do solvente (k^H/k^D).	115
Tabela 15 – Energia livre de ativação e constantes de velocidade para a reação do DPP com hidroxilamina a 25°C, calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p).	118
Tabela 16 – Índices de ligação de Wiberg para reagente (R), estado de transição (TS) e produto (P), calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Mecanismo SN ₂ (P) com 1 molécula de água... 123	123
Tabela 17 – Hidrólise do DPP em tampão CHES a 25 e 75°C, com força iônica 1,0 M.	124
Tabela 18 – Comparação de constantes de velocidade de segunda ordem para reações de hidróxido e hidroxilamina com diésteres de fosfato.	125
^a Dados da literatura. ¹⁰⁸ ^b Valor necessário para explicar k_0 pelo mecanismo (i).	125
Tabela 19 – Efeito isotópico do solvente para a reação de hidrólise do DPP , medidas realizadas em triplicata em pH 9,4 (CHES) e força iônica 1,0 M.	127
Tabela 20 – Constantes de velocidade e energia livre de ativação e para a reação de hidrólise do DPP a 25 °C, calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p).	133
Tabela 21 – Energia livre de ativação e constantes de velocidade para a reação de hidrólise do 4-CIPP (mecanismo iiiia) a 100°C, considerando a participação de 2, 3 e 4 moléculas de água, calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p).	135
Tabela 22 – Parâmetros estruturais para reagente (R), estado de transição (TS) e produto (P), calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p).	139
Tabela 23 – Índices de ligação de Wiberg para reagente (R), estado de transição (TS) e produto (P), calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p).	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4-CIPP – *bis*-(4-clorofenil) fosfato
AChE – acetilcolinesterase
ATP – trifosfato de adenosina
BDNPP – *bis*-(2,4-dinitrofenil) fosfato
BHA – ácido benzohidroxâmico
BMIPP – *bis*(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato
CHES – ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico
DANEP – 8-(dimetilamino)-1-naftil metilfosfato
DEDNPP – dietil 2,4-dinitrofenil fosfato
DFO – deferoxamina
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNP – 2,4-dinitrofenol
DNPP – 2,4-dinitrofenil fosfato
DPP – *bis*-2-piridil fosfato
DV – vetor deslocamento
EA 2192 – ácido S-(2-diisopropilaminoetil)-metilfosfonotioico
EDNPP – etil 2,4-dinitrofenil fosfato
Glu – ácido glutâmico (Ácido 2-aminoglutárico)
His – histidina (Ácido 2-amino-3-imidazolpropionico)
IGAC – catálise ácida-geral intramolecular
IGBC – catálise básica-geral intramolecular
IMZ – imidazol
INT – intermediário
IRC – Coordenada de Reação Intrínseca
 k^H/k^D – efeito cinético isotópico do solvente

k_{obs} – constante de velocidade observada

LaCFI – Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

LFER – relação linear de energia livre

MANEP – 8-(dimetilamino)-1-naftil fosfato

ME – molaridade efetiva

Paraoxon metílico – dimetil 4-nitrofenil fosfato

PCM – Solvation Model Density

Pi – fosfato inorgânico

pK_a – logaritmo da constante de dissociação de uma espécie ácida

pK_{LG} – logaritmo da constante de dissociação do grupo de saída

pK_{nuc} – logaritmo da constante de dissociação do nucleófilo

PP – 2-piridil fosfato

QST – Quadratic Synchronous Transit

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – ácido ribonucléico

Ser – serina (Ácido 2-amino-3-hidroxiopropiônico)

SMD – Solvation Model Density.

TANEP– 8-(dimetilamino)-1-naftil dietilfosfato

TPP – *tris*-2-piridil fosfato

TS – estado de transição

VX – etil-S-2-diisopropilaminoetilmetilfosfonotiolato

β_{LG} – constante de Brønsted para grupo de saída

β_{NLG} – constante de Brønsted para grupo espectador

β_{nuc} – constante de Brønsted para nucleófilo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 ÉSTERES DE FOSFATO	23
1.1.1 Reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato	28
1.2 NUCLEÓFILOS ALFA	35
1.3 A QUÍMICA DAS REAÇÕES INTER- E INTRAMOLECULARES	41
1.3.1 Catálise ácida e básica	44
1.3.2 Reações nucleofílicas	48
1.4 ÉSTERES DE FOSFATO DERIVADOS DE 2-HIDROXIPIRIDINA	52
1.5 RELAÇÕES LINEARES DE ENERGIA LIVRE	55
1.5.1 Relações lineares de energia livre para triésteres de fosfato	56
1.5.2 Relações lineares de energia livre para diésteres de fosfato	64
2 OBJETIVOS	67
3 MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1 REAGENTES	69
3.2 SÍNTESES	69
3.2.1 Síntese do metil di-2-piridil fosfato (MeDPP)	69
3.2.2 Síntese do <i>bis</i> -2-piridil fosfato (DPP)	70
3.2.3 Síntese dos diésteres 2,4-DNPO-(PO ₂ ⁻)-OAr.	71
3.3 MEDIDAS CINÉTICAS	72
3.4 CÁLCULOS TEÓRICOS	74
3.5 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA	74
3.6 EXPERIMENTOS DE RMN ¹ H E ³¹ P	75
3.7 EXPERIMENTOS DE LC-MS/MS	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77

4.1 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO FÁRMACO DEFEROXAMINA (DFO) COM MONO- E TRIÉSTER DE FOSFATO DERIVADOS DE 2,4-DINITROFENOL.....	77
4.2 EFEITO DE GRUPOS ESPECTADORES NA HIDRÓLISE DIÉSTERES DE FOSFATO	85
4.2.1 Hidrólise dos diésteres 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato e 2,4-dinitrofenil fenil fosfato por LC-MS/MS.....	86
4.2.2 Gráfico de Brønsted para diésteres de fosfato.....	88
4.3 HIDRÓLISE DO DIÉSTER <i>BIS</i> -2-PIRIDIL FOSFATO (DPP)....	91
4.3.1 Titulação potenciométrica e espectrométrica do DPP.....	91
4.3.2 Reação de hidrólise do DPP: Estudos Cinéticos	94
4.3.3 Estudo cinético da reação de hidrólise do monoéster 2-piridil fosfato (PP).....	100
4.3.4 Caracterização de produtos por RMN.....	105
4.3.5 Parâmetros termodinâmicos	109
4.3.6 Mecanismo da Reação	112
4.3.7 Reação do DPP com hidroxilamina	113
4.3.7.1 Estudo cinético.....	113
4.3.7.2 Cálculos Teóricos.....	117
4.3.8 Reações com nucleófilos: mecanismo (i).....	123
4.3.9 Mecanismos (ii) e (iv): Catálise Intramolecular.....	125
4.3.10 Mecanismos $S_NP(2)$ – (iii)	128
4.3.11 Cálculos computacionais.....	130
4.3.11.1 Análise de ordem de ligação	140
4.3.11.2 Estado de transição e mecanismo.....	142
5 CONCLUSÕES.....	144
REFERÊNCIAS.....	147
ANEXOS.....	167
PUBLICAÇÕES 2009-2012	189

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÉSTERES DE FOSFATO

Os ésteres de fosfato compreendem uma classe de compostos extremamente abrangente e são classificados em mono-, di- ou triésteres, de acordo com o número de substituições de grupos ésteres pelas hidroxilas do ácido fosfórico. Sendo que, os mono- e diésteres de fosfato apresentam reatividades diferenciadas em função do pH, já que estes podem atuar como ácidos di- e monopróticos, respectivamente.¹ (**Figura 1**)

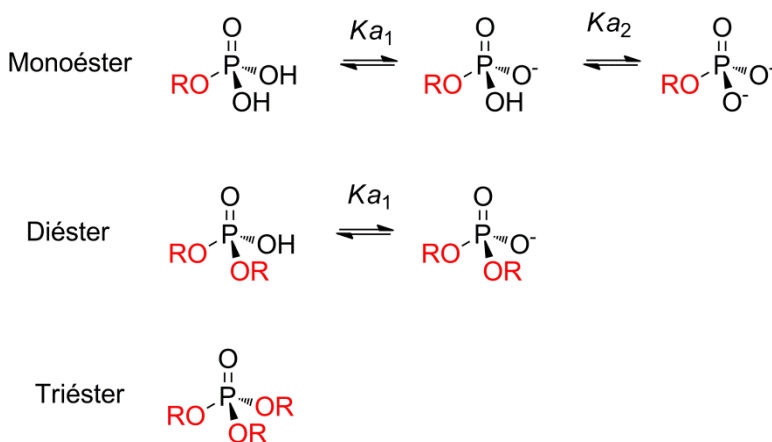


Figura 1 – Estruturas gerais para monoéster, diéster e triéster de fosfato. O primeiro $\text{p}K_a$ para um monoéster alquílico e diéster alquílico são valores normalmente entre 1 e 2. O segundo $\text{p}K_a$ para o monoéster alquílico é em torno de 7, aproximadamente 2 unidades maior que para monoésteres arílicos.¹

Os mono- e diésteres fosfóricos são essenciais aos sistemas biológicos e estão largamente distribuídos na natureza. Os diésteres

de fosfato, por exemplo, estão presentes em diversas coenzimas e nas estruturas do DNA e do RNA, onde são responsáveis pelas ligações entre nucleotídeos e pela origem da informação genética. Já os monoésteres estão presentes em diversos processos de sinalização e regulação da atividade biológica. Além disso, anidridos fosfóricos e compostos orgânicos contendo ligações N-P servem como principal reserva de energia, tais como trifosfato de adenosina (ATP), creatina fosfato, acetilfosfato, fosfoenolpiruvato e polifosfato inorgânico.^{2,3}

A importância dos ésteres fosfóricos na natureza está intimamente relacionada à estabilidade da ligação P-O. Por exemplo, o tempo de meia-vida para a hidrólise espontânea do difenilfosfato é de 180 anos a 100°C,⁴ e esse valor pode chegar à ordem de bilhões de anos para o DNA. Tal estabilidade é coerente com o papel do DNA na preservação da informação genética.⁵ Vale ressaltar que a propriedade de ionização dos fosfatos também é extremamente importante no meio biológico. Os metabólitos fosfatados, retidos no interior das células, encontram-se carregados negativamente, o que faz diminuir a possibilidade de ataque nucleofílico ao grupo fosfato. Além disso, a evolução dos seres vivos teria favorecido metabólitos que pudessem ser conservados dentro da membrana celular. Moléculas eletricamente neutras possuem alguma solubilidade em lipídios e atravessam a membrana, enquanto moléculas que permanecem ionizadas podem seguramente ser mantidas dentro da membrana.⁶

Os triésteres de fosfato não são formados naturalmente nos sistemas biológicos e, historicamente, o interesse nesse tipo de composto foi primeiramente industrial, seguido do descobrimento de compostos organofosforados como o dietil 4-nitrofenil fosfato. Esse composto, conhecido como paraoxon etílico, e produzido como metabólito do seu análogo paration (P=S), é usado como herbicida e inseticida na área agrícola.⁷⁻⁹ Na **Figura 2** estão apresentadas as estruturas de alguns pesticidas e agentes neurotóxicos organofosforados.¹⁰

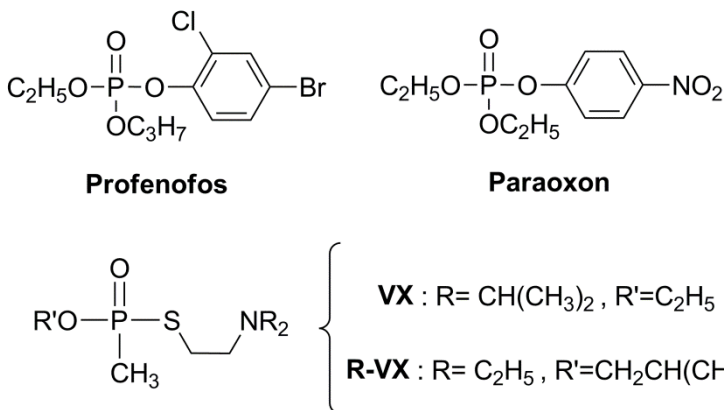


Figura 2 – Estruturas de alguns pesticidas e agentes neurotóxicos organofosforados.¹⁰

Esses compostos inibem a ação de enzimas, principalmente a ação da acetilcolinesterase (**AChE**) - enzima que catalisa a hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor. E, na ausência de **AChE**, a acetilcolina liberada acumula-se nas sinapses das células nervosas, levando a um colapso do sistema nervoso central.^{11,12} A inibição ocorre no interior do sítio ativo, no aminoácido serina da tríade catalítica serina, histidina e ácido glutâmico (**Ser-His-Glu**), conforme mostrado na **Figura 3**. A ligação ocorre entre o átomo de fósforo do organofosforado e o átomo de oxigênio da serina, com subsequente eliminação do grupo de saída (-**X**) do organofosforado. O "envelhecimento" da enzima fosforilada ocorre por desalquilação do grupo fosfato.¹³

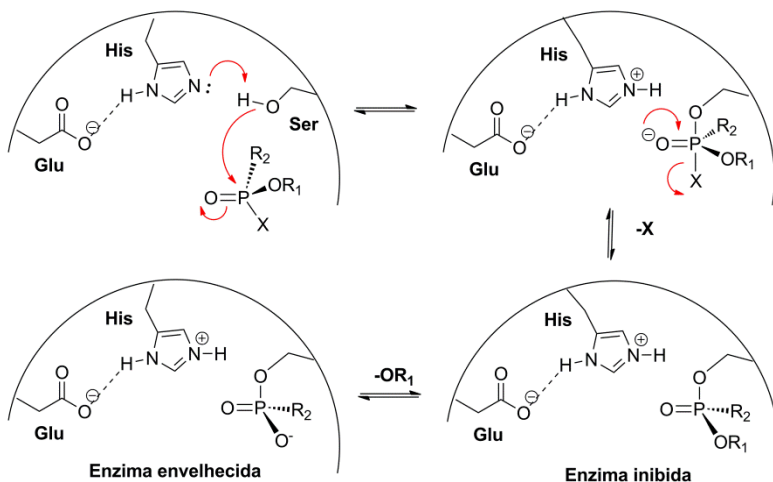
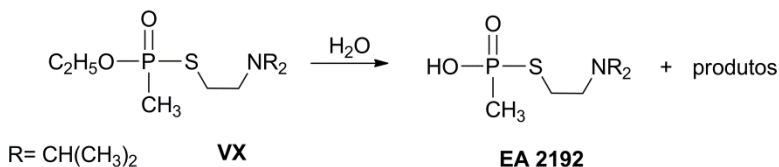


Figura 3 – Inibição da AChE por organofosforados.¹³

Devido à sua atividade antiacetilcolinesterase, vários desses compostos foram desenvolvidos para serem usados como armas de guerra. Como consequência da necessidade de antídotos para venenos organofosforados, e da destruição de estoques enormes de gases de guerra, existe um grande interesse na degradação desses compostos.¹⁴

O processo de degradação desses compostos consiste na remoção do seu caráter tóxico por meio de reações relativamente simples, rápidas e com uso de reagentes estáveis, de baixo custo e baixa massa molar. Além disso, é necessário considerar que os intermediários e produtos gerados pelo processo de descontaminação não apresentem toxicidade.^{13,15} Diferentes métodos têm sido empregados ao longo dos anos, mas nenhum com eficiência que permita produzir resíduos sem efeitos adversos para o meio ambiente.¹⁶⁻¹⁸ Um exemplo desse problema está no etil-S-2-diisopropilaminoetilmetilfosfonotiolato (**VX**), o qual apresenta diferentes possibilidades de ataque nucleofílico à sua estrutura, com geração de vários produtos. Em pH 8, o produto principal da hidrólise do **VX**, o ácido S-(2-diisopropilaminoetil)-

metilfosfonotioico (**EA 2192**), é muito persistente no meio ambiente e apresenta significativa atividade antiacetilcolinesterase, **Esquema 1**.¹⁹ Nesse contexto, reações de substituição nucleofílica com uso de nucleófilos detentores do efeito alfa, os quais produzem clivagem quantitativa da ligação P-O, representam uma alternativa promissora para degradação dessas estruturas. O efeito alfa será discutido com detalhes no item **1.2**.



Esquema 1

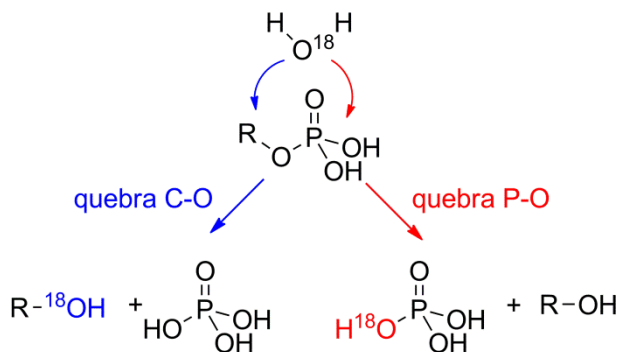
Uma forma de tratamento de vítimas de agentes neurotóxicos consiste na administração de oximas (por exemplo, a pralidoxima) que possuem a capacidade de regenerar a atividade catalítica da enzima **AChE**. No entanto, até o momento, nenhuma oxima apresentou resultados satisfatórios para reativar a **AChE** inibida por todos os agentes neurotóxicos, sendo esta a principal deficiência atual deste tratamento. Isto demonstra a necessidade do desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, que sejam potentes e eficientes contra grande parte dos organosfosforados e com baixo perfil de toxicidade.^{13,20-24}

Enfim, a formação e a clivagem da ligação P-O são processos de importância elementar para a química da vida. Consequentemente, os detalhes, e em especial os mecanismos químicos dessas reações são de grande interesse para a ciência em geral. Neste sentido, existe um interesse crescente do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (**LaCFI**) pela química dos ésteres de fosfato, principalmente no que se refere à compreensão das reações que envolvem a quebra das ligações que constituem esses ésteres. Os sistemas estudados são os mais variados possíveis e

envolvem desde reações simples de hidrólise e reações de desfosforilação na presença de nucleófilos de tamanhos pequenos, sobretudo nucleófilos alfa,²⁵⁻²⁷ até reações na presença de fármacos importantes.²⁸ Além disso, tem sido realizados estudos em meio micelar²⁹ e, especialmente, esforços tem se concentrado no sentido de desenvolver polímeros com grupos funcionais ancorados.³⁰ Destacam-se ainda, efeitos bastante complexos e difíceis de serem avaliados, como reações de hidrólise na presença de centros metálicos^{31,32} e sistemas modelos utilizando moléculas químicas pequenas, que exibem diferentes tipos de catálise intramolecular^{33,34} (o tema catálise será abordado no item **1.3**). Diferentes comportamentos catalíticos, produtos e, principalmente, intermediários “chaves” tem sido detectados nessas reações.

1.1.1 Reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato

Os dois mecanismos conhecidos para a reação de substituição nucleofílica de ésteres de fosfato envolvem: (i) quebra da ligação P-O, que acontece quando o nucleófilo ataca o átomo de fósforo; ou (ii) quebra da ligação C-O, em que o átomo de carbono da ligação P-O-C do éster é o eletrófilo, e todo o grupo fosfato é substituído pelo nucleófilo mantendo a ligação P-O intacta.¹⁰ No caso da reação de hidrólise, por exemplo, essas reações podem ser diferenciadas pela hidrólise em água marcada, onde a presença do átomo de ¹⁸O nos produtos da reação indica o local de ataque sobre o fosfato, **Esquema 2**.³⁵ O mecanismo de quebra da ligação C-O geralmente é o caminho principal em pH baixo, em que o grupo de saída é o ácido fosfórico neutro. Já em pH maiores, em que o grupo de saída fosfato possui pelo menos uma carga negativa, a hidrólise deve ocorrer preferencialmente via mecanismos de clivagem da ligação P-O.³⁵



Esquema 2

Em linhas gerais, as reações de substituição com quebra da ligação P-O podem seguir três caminhos: associativo, dissociativo e concertado. Eles diferem apenas no momento em que ocorre a formação da ligação com o nucleófilo e a quebra da ligação do grupo de saída.^{35,36} O mecanismo associativo ocorre em duas etapas, adição e eliminação ($A_N + D_N$, na nomenclatura IUPAC³⁷). Neste caso, o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico leva à formação de uma espécie pentacoordenada com geometria tipo bipirâmide trigonal (intermediário fosforano) e a quebra de ligação com o grupo de saída ocorre em uma segunda etapa. O mecanismo dissociativo também acontece em duas etapas ($D_N + A_N$), a primeira etapa é determinante da velocidade de reação e leva à formação do um intermediário metafosfato, o qual é subsequentemente atacado pelo nucleófilo. Já o mecanismo do tipo concertado ($A_N D_N$) ocorre sem a formação de um intermediário, com adição e eliminação em uma única etapa, passando por um estado de transição. O estado de transição pode ser do tipo associativo ou dissociativo, dependendo do sincronismo entre a formação de ligação com o nucleófilo e da quebra do grupo de saída, **Figura 4**. Um estado de transição do tipo dissociativo é aquele em que a quebra de ligação está adiantada em relação à formação de ligação, e um estado de transição associativo é a situação reversa.³⁸

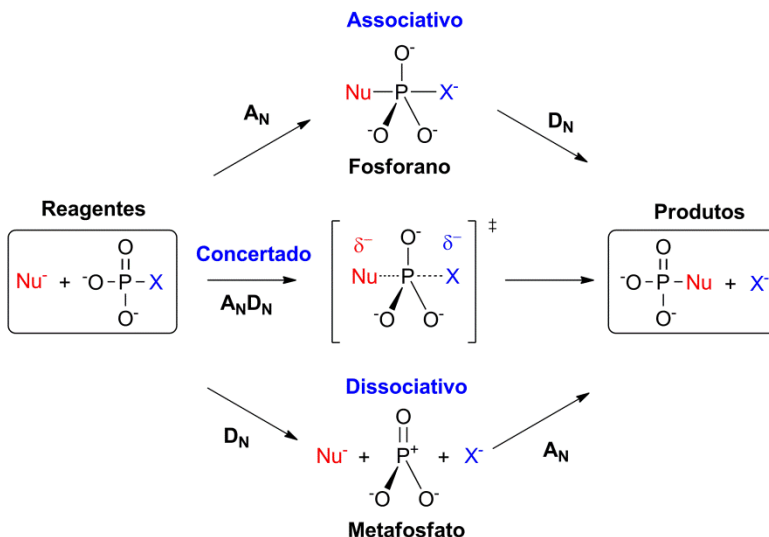


Figura 4 – Três mecanismos possíveis para o ataque nucleofílico de Nu sobre ésteres de fosfato, exemplificado para um monoéster de fosfato. De acordo com a nomenclatura IUPAC, $A_N D_N$, A_N e D_N , correspondem aos caminhos concertado, associativo e dissociativo, respectivamente.³⁸

Os mecanismos dessas reações podem ser visualizados claramente no diagrama de More O'Ferrall-Jencks (**Figura 5**).^{39,40} Nesse diagrama, os mecanismos com mais de uma etapa seguem os caminhos ao longo das bordas, enquanto os mecanismos concertados desviam das bordas do diagrama. Sendo que, os mecanismos associativos seguem a coordenada **Reagentes**→ **Fosforano**→ **Produtos** ($A_N + D_N$) e os mecanismos dissociativos seguem a coordenada **Reagentes**→**Metafosfato**→**Produtos** ($D_N + A_N$).

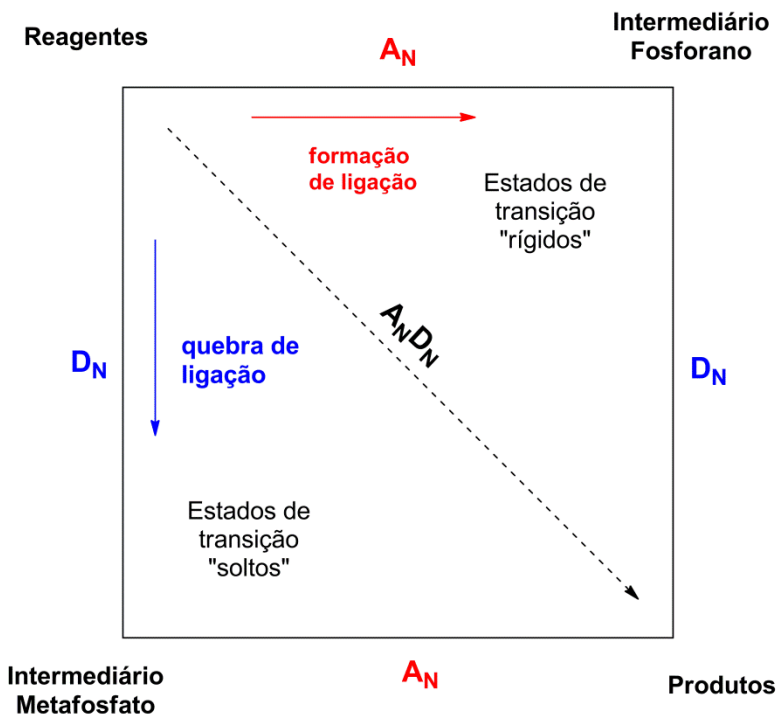
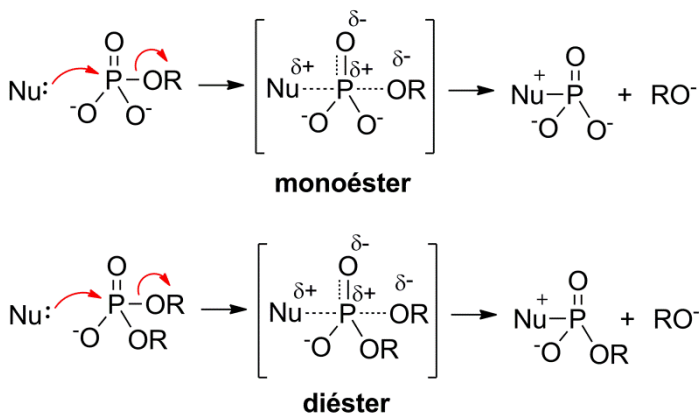


Figura 5 – Diagrama simplificado de More O’Ferrall-Jencks para uma reação de transferência de grupo fosforila. Um estado de transição “solto” é aquele em que a quebra de ligação está adiantada em relação à formação de ligação, e está situado no canto inferior esquerdo do diagrama. Um estado de transição “rígido” é a situação reversa, e está situado ao lado apostro.¹

As reações de transferência do grupo fosforila em mono- ou diésteres geralmente ocorrem via os estados de transição no **Esquema 3**.⁴¹ As relações lineares de energia livre (**LFERs**) mostram que a reatividade em ambos os sistemas do **Esquema 3** é dominada pelo grupo de saída. Os gráficos de Brønsted (grupo de saída: gráfico de k_{obs} vs pK_{LG}) para reações de hidrólise de mono- e diésteres de fosfato, e reações com outros nucleófilos, fornecem valores de β_{LG} perto de -1, consistentes com mudança na carga sobre

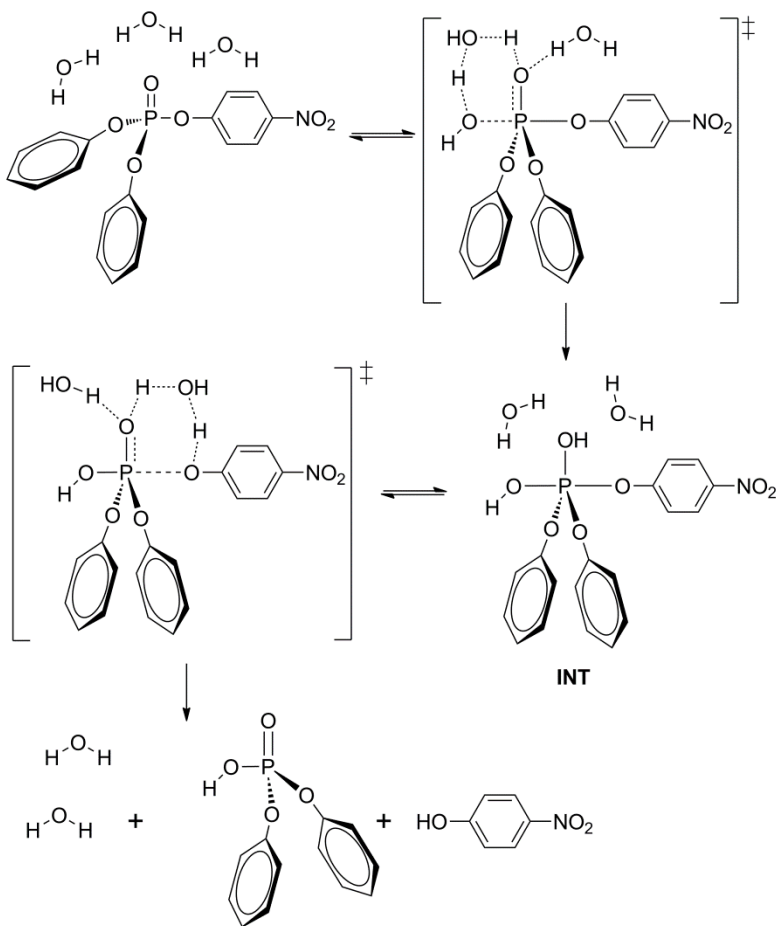
o átomo de oxigênio do grupo de saída. A reatividade também depende do nucleófilo, mas a sensibilidade à basicidade do nucleófilo (β_{nuc}), medida pelo gráfico de Brønsted (nucleófilo: gráfico de k_{obs} vs pK_{nuc}) são pequenas para as reações de monoésteres dianiônicos. Essa dependência mínima é coerente com pouca ligação do nucleófilo com o átomo de fósforo em um mecanismo concertado passando por um estado de transição mais “solto”, não puramente dissociativo. Já o valor de β_{nuc} para os diésteres é relativamente maior que para os monoésteres, o que mostra que o estado de transição para os monoésteres apresenta maior caráter dissociativo.⁴²⁻⁴⁴



Esquema 3

No caso das reações de triésteres de fosfato, estudos teóricos publicados recentemente pelo nosso grupo de pesquisa foram fundamentais no esclarecimento do mecanismo dessas reações. Os resultados computacionais para reações de hidrólise de uma ampla série de triésteres de fosfato, previamente estudadas experimentalmente, demonstraram que as reações ocorrem através de um mecanismo em duas etapas, passando por um intermediário de adição pentacovalente. Os cálculos mostram que o mecanismo em duas etapas pode ser favorecido mesmo para reações envolvendo

grupos de saída como 4-nitrofenolato ($pK_a \sim 7$), conforme mostra o **Esquema 4**. Além disso, os cálculos mostram detalhes não acessíveis aos estudos cinéticos, como o envolvimento de 3 moléculas de água na reação, com funções bem definidas. Na presença de 3 moléculas de água no estado de transição, os resultados teóricos de energia livre de ativação apresentam excelente concordância quantitativa com os valores experimentais. O ataque da água ao átomo de fósforo é assistido por uma segunda molécula de água que atua como catalisador básico-geral no primeiro estado de transição. Enquanto que, a terceira molécula assiste o processo de hidrólise estabilizando o segundo estado de transição por ligações de hidrogênio.^{45,46}



Esquema 4

Na **Figura 6** estão mostradas as relações lineares de energia livre para vários tipos de ésteres de fosfato, com os respectivos valores de β_{LG} normalizados a 25°C^{44,46} (Todos os dados apresentados são para ésteres de fosfato arílicos). O gráfico mostra que a ordem na velocidade de hidrólise é: tri > mono > diésteres.

Sendo que, os monoésteres monoaniônicos apresentam um comportamento especial: com inclinação muito menor que os outros fosfatos, cruzando a linha de diésteres dianiônicos em baixos valores de pK_a . E, por extrapolação, cruza a linha dos triésteres em valores elevados de pK_a . ($> 12,3$).⁴¹

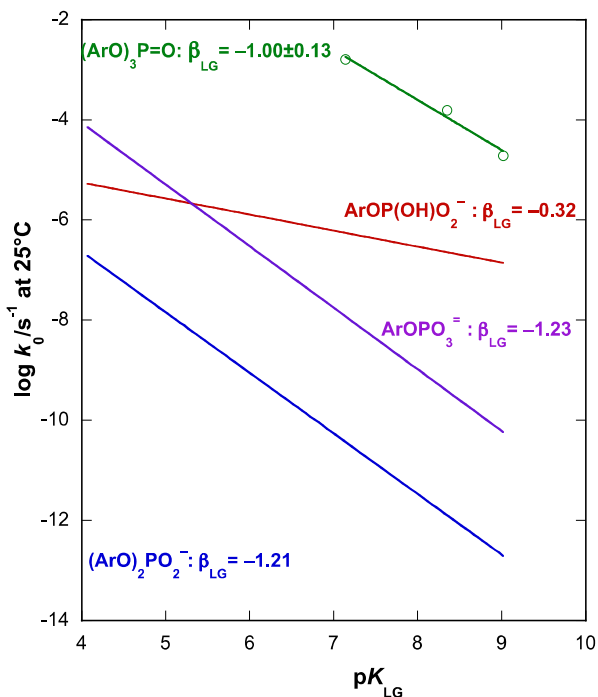


Figura 6 – Relações lineares de energia livre para vários tipos de ésteres de fosfato, normalizadas a 25°C.⁴¹

1.2 NUCLEÓFILOS ALFA

O efeito alfa é a reatividade especial mostrada por um centro nucleofílico que está vizinho a um átomo contendo um par de

elétrons livres e, em uma correlação entre reatividade e basicidade - gráfico de Brønsted - esses nucleófilos mostram reatividade superior àquela esperada para um nucleófilo com o mesmo valor de pK_a . A hidroxilamina, o íon hidroperóxido e a hidrazina são alguns exemplos de nucleófilos que apresentam esse efeito.⁴⁷⁻⁵¹ Este é visivelmente observado no gráfico de Brønsted para a reação de nucleófilos comuns e nucleófilos alfa nas reações com o diéster etil 2,4-dinitrofenil fosfato (**EDNPP**), **Figura 7**.²⁶

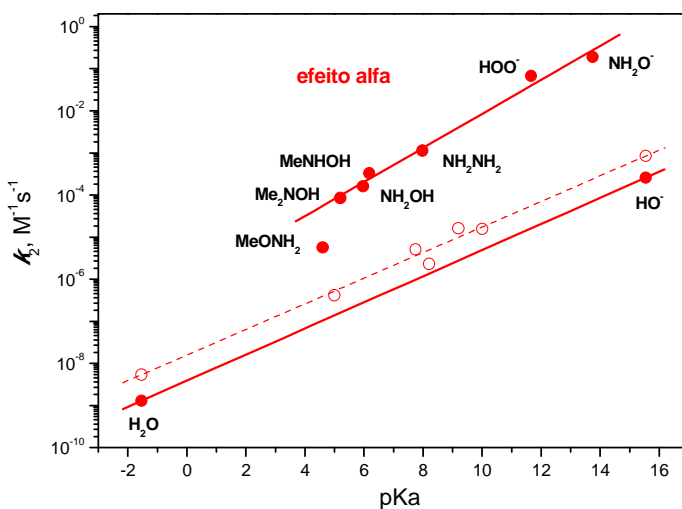


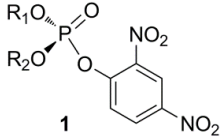
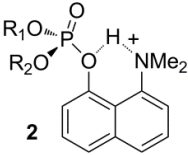
Figura 7 - Gráfico de Brønsted para a reação de nucleófilos com **EDNPP**. Os pontos abertos correspondem a ânions oxigenados na reação com metil 2,4-dinitrofenil fosfato a 39°C.^{4,26}

A origem do efeito alfa é bastante complexa e não foi totalmente esclarecida até o momento.⁵²⁻⁵⁶ No entanto, ela tem sido interpretada principalmente em termos de: (i) desestabilização do estado fundamental provocada pela repulsão eletrostática entre os elétrons do centro nucleofílico e do átomo adjacente, o que torna o nucleófilo alfa instável e, portanto, mais reativo; (ii) estabilização do estado de transição, causada por transferência de elétron, estados de

transição adiantados, catálise intramolecular ou polarizabilidade do α -nucleófilo; (iii) estabilidade termodinâmica do produto; (iv) efeito do solvente, pois embora não exista nenhuma evidência que o solvente desempenhe um papel fundamental na origem do efeito alfa, estudos mostram que a magnitude do efeito alfa é dependente do solvente utilizado. Além disso, estudos computacionais recentes mostram a importância da energia de deformação, definida como a energia eletrônica necessária para transformar os reagentes no estado de transição, no conceito de efeito alfa.

A magnitude do efeito alfa é dependente da eletrofilicidade e da reatividade intrínseca do substrato. Como mostra a **Tabela 1**, que relata a magnitude do efeito alfa para reações de hidroxilamina com duas classes de ésteres de fosfato diferentes: derivados de 2,4-dinitrofenol (**1**) e 8-dimetilamônio-1-naftol (**2**). Ainda que os centros eletrofílicos dos derivados de 8-dimetilamônio-1-naftol sejam essencialmente muito menos reativos em relação aos derivados de 2,4-dinitrofenol, esses compostos apresentam reatividade similar na presença de nucleófilos, em virtude de uma catálise ácida eficiente promovida pelo grupo dimetilamônio. Possivelmente, esta seja o principal motivo da diferença observada na magnitude do efeito alfa para as duas classes de compostos que possuem pK_a s de grupo de saída similares (~ 4): a catálise intramolecular passa a ser mais pronunciada que o efeito alfa. Embora o efeito alfa seja consideravelmente menor para os derivados de 8-dimetilamônio-1-naftol, ele aumenta na ordem triéster>diéster>monoéster, reflexo do aumento na dureza do centro eletrofílico, que depende da natureza dos substituintes.²⁶

Tabela 1 – Magnitude do efeito alfa da hidroxilamina nas reações com ésteres de fosfato derivados de 2,4-dinitrofenol (**1**) e 8-dimetilamônio-1-naftol (**2**).^{a, 26}

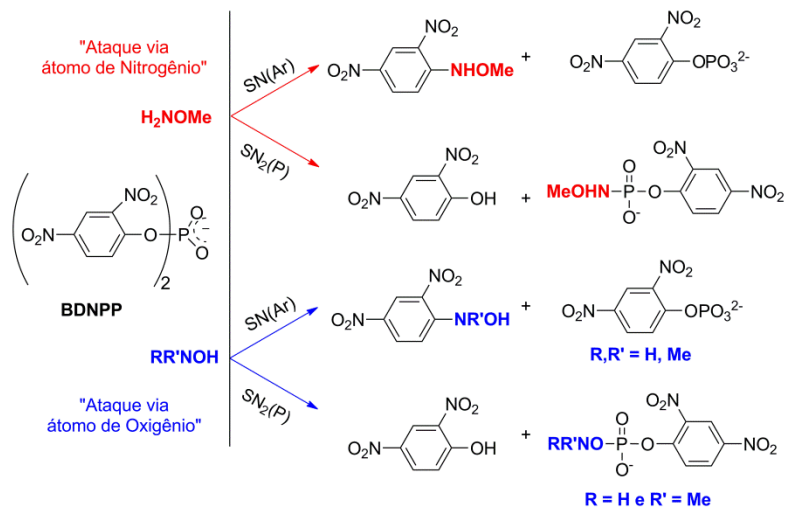
Ésteres	 <p style="text-align: center;">1</p>	 <p style="text-align: center;">2</p>
ArO-PO₃²⁻	< 10 ⁵⁷	3 ⁵⁸
ArO-PO₂OMe⁻	70 ⁴	5 ⁵⁹
ArO-PO(CH₂)₃	700 ⁶⁰	100 ⁶¹

^aEstimativas baseadas na comparação com reações análogas com aminas primárias de mesmo pK_a.

Devido à reatividade extraordinária apresentada pelos nucleófilos detentores do efeito α , eles tem sido largamente utilizados na clivagem de compostos extremamente estáveis. A clivagem do diéster *bis*-(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) vem sendo estudada em reações de substituição nucleofílica na presença de diferentes nucleófilos alfa. Diversos produtos são formados nessas reações, dependendo do nucleófilo, mas em todos os casos, a reatividade é extremamente superior à observada para os nucleófilos que não apresentam efeito alfa.^{27,62,63}

A reação de desfosforilação do **BDNPP** foi estudada na presença de diferentes hidroxilaminas metiladas (MeHNOH, Me₂NOH e NH₂OMe). A hidrólise do **BDNPP** é extremamente lenta, com um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de aproximadamente 43 dias em pH 7, mas na presença de hidroxilamina a clivagem tem um incremento na velocidade em aproximadamente 10³ vezes, apresentando um $t_{1/2}$ de aproximadamente 1 hora. Segundo os autores, a *N*-metilação da hidroxilamina causa um pequeno efeito na etapa inicial da reação. Nesse caso, apenas as reações secundárias são afetadas, devido à estabilidade dos intermediários formados na primeira etapa. No entanto, quando o átomo de oxigênio é metilado,

o ataque inicial sobre o fosfato é fortemente inibido, e então o ataque nucleofílico sobre o anel aromático passa a contribuir significativamente (**Esquema 5**).^{62,63}



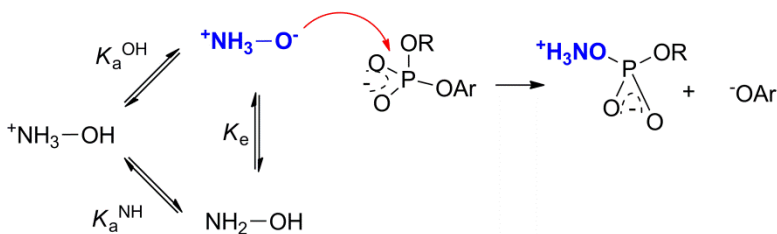
Esquema 5

Dentre esses nucleófilos de reatividade inusitada destacam-se os estudos que envolvem o mecanismo de ataque nucleofílico da hidroxilamina, principalmente porque a seletividade por um de seus centros nucleofílicos (Nitrogênio vs Oxigênio) é dependente do tipo de substrato. As reações de alquilação ocorrem via átomo de nitrogênio, enquanto que, em reações envolvendo ésteres de acila e fosforila o ataque nucleofílico acontece preferencialmente pelo átomo de oxigênio, mesmo o átomo de nitrogênio sendo consideravelmente mais básico.⁶⁴

Segundo Jencks, a extraordinária reatividade da hidroxilamina mostra que o oxigênio aniônico da hidroxilamina é a verdadeira espécie nucleofílica reativa. De acordo com o autor, essa reatividade excepcional deve-se a uma catálise intramolecular (ácida

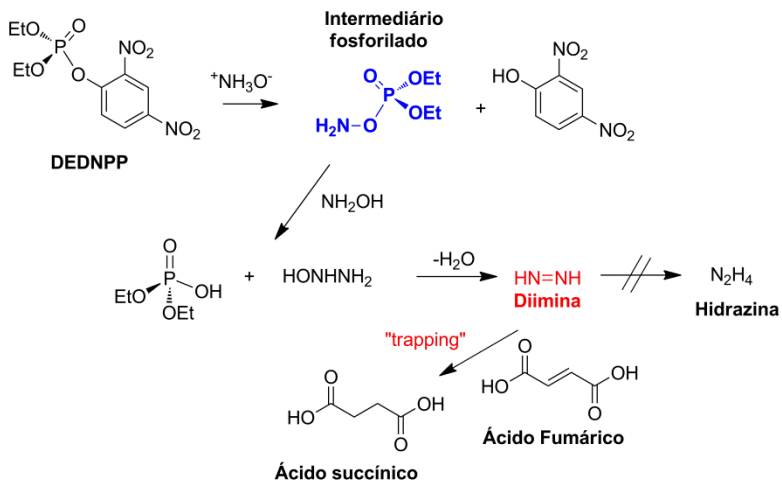
ou básica), em que a hidroxilamina reage pelo átomo de oxigênio com assistência de transferência intramolecular do próton para substrato. Provavelmente, por esse motivo, a *O*-alquilação não é observada, já que a catálise não é importante nesse caso.

Estudos computacionais e cristalográficos mostram que a forma zwitteriônica é preferida no cristal de $(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{HCl}$ (**Esquema 6**).⁶⁵ Resultados determinantes nessa discussão, a partir de estimativas indiretas com base em correlações de estrutura-reatividade indicam que cerca de 20% de hidroxilamina existem em solução aquosa na forma dipolar iônica $^+\text{H}_3\text{NO}^-$.⁶⁶ Provavelmente a forma zwitteriônica é preferida em algumas reações devido à transferência de próton do grupo H_3N^+ para uma carga negativa no substrato, por exemplo, o átomo de oxigênio em diésteres de fosfato, confirmando a proposta de Jencks.



Esquema 6

Além disso, resultados publicados recentemente mostram que o ataque nucleofílico da hidroxilamina ao triéster de fosfato **DENDPP** ocorre via átomo de oxigênio fornecendo o produto *O*-fosforilado, e devido à sua elevada instabilidade, é rapidamente convertido em diimina. Esta reage com outra diimina, gerando $\text{N}_{2(g)}$ e hidrazina, **Esquema 7**. O mecanismo foi proposto com base na identificação da hidrazina por métodos colorimétricos e na captura do intermediário diimina, através da redução do ácido fumárico para succínico. Esses resultados constituíram uma evidência química do ataque nucleofílico via átomo de oxigênio em ésteres de fosfato, fortalecendo a hipótese de que a forma zwitteriônica seja responsável pelo ataque nucleofílico nesses compostos.⁶⁷



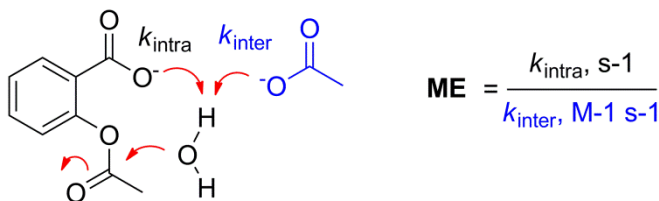
Esquema 7

1.3 A QUÍMICA DAS REAÇÕES INTER- E INTRAMOLECULARES

A catálise em reações intramoleculares ocorre entre grupos reativos próximos ligados na estrutura de uma mesma molécula, diferindo das reações intermoleculares onde os grupos reativos encontram-se em moléculas diferentes.⁶⁸ Em geral, as reações intramoleculares são mais rápidas que as reações intermoleculares, e sua eficiência é definida de maneira simples em termos da molaridade efetiva (**ME**) do grupo catalítico. A molaridade efetiva é definida como sendo a razão entre a constante de velocidade de primeira-ordem da reação intramolecular e a constante de velocidade de segunda-ordem da reação correspondente intermolecular, que seguem o mesmo mecanismo, sob as mesmas condições reacionais. O conceito de **ME** é simplesmente a concentração de catalisador necessária para que a constante de velocidade de reação bimolecular seja igual à intramolecular.⁶⁹ O **Esquema 8** mostra um exemplo

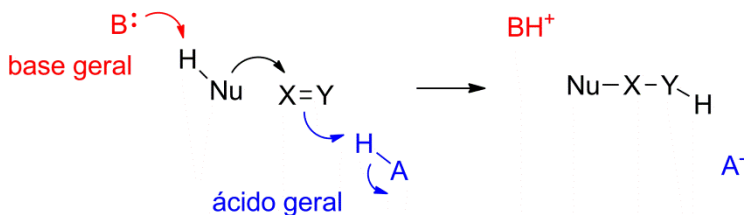
clássico de catálise básica geral intramolecular: a reação de hidrólise da aspirina, na qual o grupo carboxilato ativa o ataque de uma molécula de água sobre o grupo carbonila do éster na etapa determinante da velocidade da reação. A comparação com um sistema intermolecular indica que a reação apresenta **ME** do íon carboxilato igual a 13 M.⁷⁰⁻⁷³

Catálise Intra- vs Intermolecular



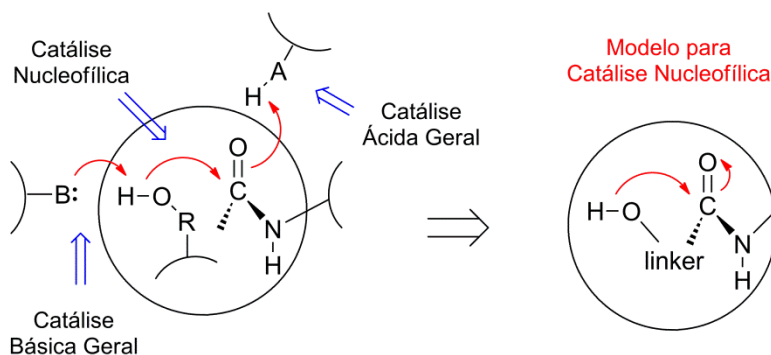
Esquema 8

As reações inter- e intramoleculares ainda podem ser divididas em básica, ácida (gerais ou específicas) e nucleofílica. O **Esquema 9** apresenta o mecanismo geral para a quebra de uma ligação X-Y, no qual acontece a combinação de catálises nucleofílica, básica geral e ácida geral. Embora o custo entrópico desse tipo de mecanismo seja muito grande para ser observado em solução, este não é um problema para um substrato ligado em estreita proximidade com os grupos catalíticos no sítio ativo de uma enzima.⁷⁴



Esquema 9

Um exemplo clássico é o mecanismo utilizado por muitas serinas proteases, **Esquema 10**. Essas enzimas são capazes de hidrolisar ligações peptídicas intrinsecamente inertes de proteínas, utilizando um grupo hidroxila de um resíduo serina do sítio ativo como um nucleófilo. Uma forma bastante apropriada de examinar os mecanismos envolvidos nas enzimas é o desenho de sistemas onde os grupos funcionais reagentes estão conectados em estreita proximidade na mesma molécula. Assim, a reação nucleofílica central pode ser modelada pela ciclização de um hidroxiamida adequada, a qual pode ser muito mais rápida que a hidrólise neutra do grupo amida sob as mesmas condições, permitindo o uso de grupos pouco ativados do substrato.⁷⁴



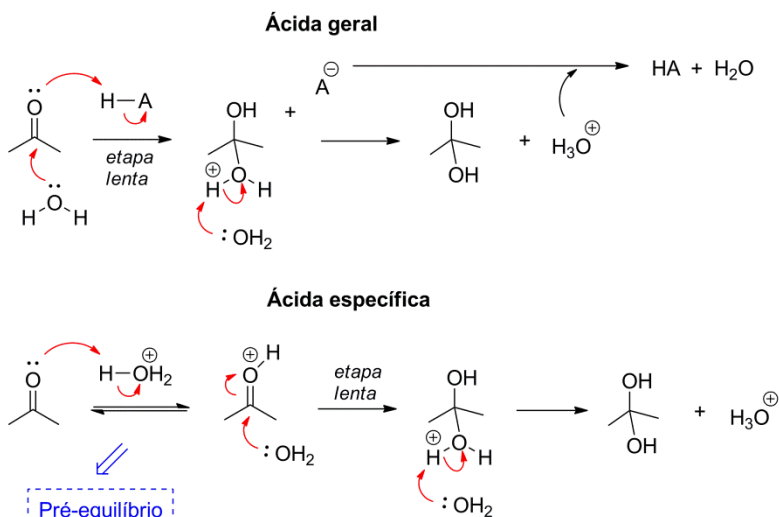
Esquema 10

É importante ressaltar que as reações intramoleculares em sistemas modelos são apenas reações simples que exibem determinadas características de enzimas em condições fisiológicas. No entanto, através desses sistemas, grupos extremamente estáveis da estrutura biológica podem ser clivados em segundos, como amidas e ésteres de fosfato. Consequentemente, modelos de reações inter- e intramoleculares constituem ferramentas interessantes para esclarecer as diferentes formas de catálise.

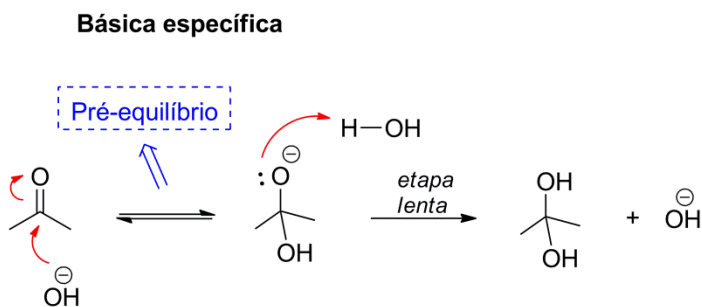
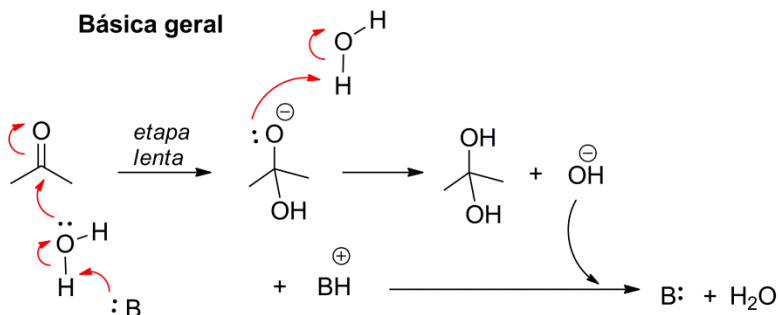
1.3.1 Catálise ácida e básica

O aumento de velocidades de reações via mecanismos de catálise ácida ou básica constituem um comportamento bastante importante em reações de várias classes. Para ilustrar os mecanismos de catálise ácida e básica, gerais e específicas, segue como exemplo as reações de hidratação do grupo carbonila nos **Esquemas 11 e 12**. Esses mecanismos não são necessariamente os mecanismos verdadeiros para essas reações, são apenas possibilidades para ilustrar os conceitos de catálise ácida e básica.^{75,76}

A catálise ácida ocorre com a transferência de um próton do ácido para o substrato e, de acordo com as características dos estados de transição, pode ser classificada em geral ou específica. Na catálise geral, a transferência do próton ocorre na etapa determinante da velocidade de reação, sendo diretamente dependente da força do ácido. Já a catálise do tipo específica não apresenta dependência com relação à força do ácido, pois a transferência de próton ocorre em uma etapa de pré-equilíbrio, antes da etapa determinante da velocidade. (**Esquema 11**)⁷⁵



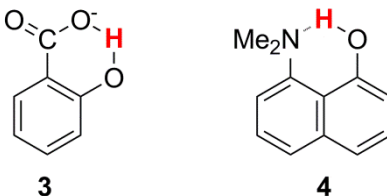
A catálise básica possui o mesmo tipo de classificação. O mecanismo do tipo catálise básica geral envolve a desprotonação do substrato na etapa determinante da velocidade. Enquanto que, na catálise básica específica, a desprotonação do reagente ocorre antes da etapa determinante da velocidade de reação, em um pré-equilíbrio rápido. (**Esquema 12**)⁷⁵



Esquema 12

As catálises ácidas e básicas gerais são importantes em sistemas limitados, como os sítios ativos e as reações intramoleculares. Elas têm sido continuamente consideradas na catálise enzimática, no entanto, sua eficiência em relação aos demais fatores catalíticos tem sido considerada pequena ou de natureza especulativa, principalmente porque a maioria dos modelos intramoleculares que consideram esse efeito são muito deficientes, com valores de **ME** inferiores a 10 M.⁷⁴ Exemplos significativos de catálise ácido-básica geral em reações de desfosforilação estão baseados em modelos intramoleculares, que aproximam eficientemente os grupos reativos. Em especial, destacam-se dois modelos, aqueles derivados do ânion salicilato (**3**) e do 8-(*N,N*-

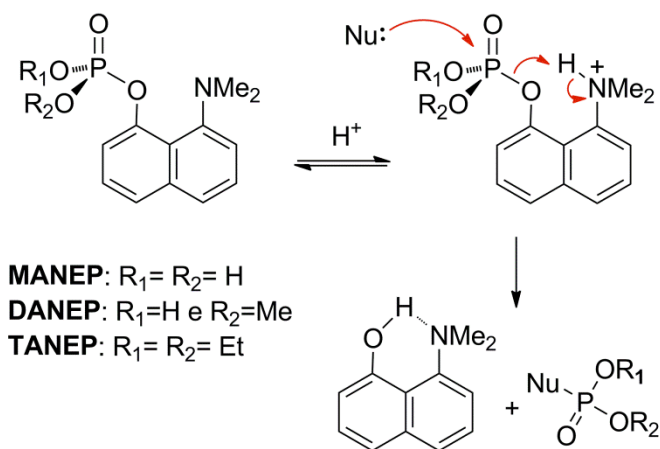
dimetilamino)-1-naftol (4), **Esquema 13**. No primeiro, o grupo carboxilato é desenhado como um catalisador ácido/base geral, enquanto o segundo, como um ácido-geral.^{58,77}



Esquema 13

Os derivados de 8-dimetilamino-naftil-1-fosfato (**MANEP**, **DANEP** e **TANEP** no **Esquema 14**) são ativados em virtude da catálise ácida geral intramolecular, promovida pelo grupamento dimetilamônio, que envolve transferência de próton para o átomo de oxigênio do grupo abandonador, o qual é inicialmente pouco reativo. Nesses compostos, a transferência de hidrogênio é realizada em pequenas distâncias, evitando a forte solvatação dos grupos reativos e impedindo a diluição da catálise ácida-geral intramolecular. Os resultados sugerem que a catálise ácida geral intramolecular contribui com incrementos nas constantes de velocidade de aproximadamente 10^6 vezes.^{58,59,78}

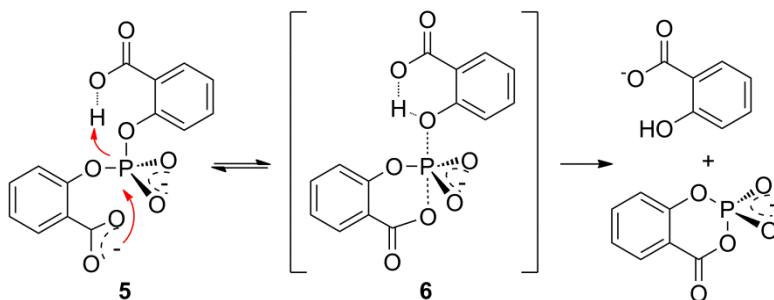
Catálise ácida geral



Esquema 14

1.3.2 Reações nucleofílicas

A catálise nucleofílica decorre quando o nucleófilo liga-se ao substrato, e como consequência, provoca um aumento na velocidade da reação. Ou seja, um dos componentes do sistema, com maior poder nucleofílico que a água ou hidróxido, ataca o substrato formando um intermediário que a seguir é hidrolisado em uma velocidade maior que o reagente de partida. Modelos clássicos de catálise nucleofílica em ésteres de fosfato envolvem reações intramoleculares com o grupo carboxilato. Por exemplo, a reação de quebra do diéster **5** apresenta um tempo de meia vida de aproximadamente 10 minutos a 39°C, na região máxima de velocidade (pH 4,5) do perfil de pH. Essa reação é aproximadamente 10^{10} vezes mais rápida que aquela do difenil fosfato nas mesmas condições. A catálise nucleofílica é dominante, comparada com a contribuição de catálise ácida geral, e a reação envolve um pré-equilíbrio com a provável formação do intermediário **6**, conforme mostra o **Esquema 15**.⁷⁹

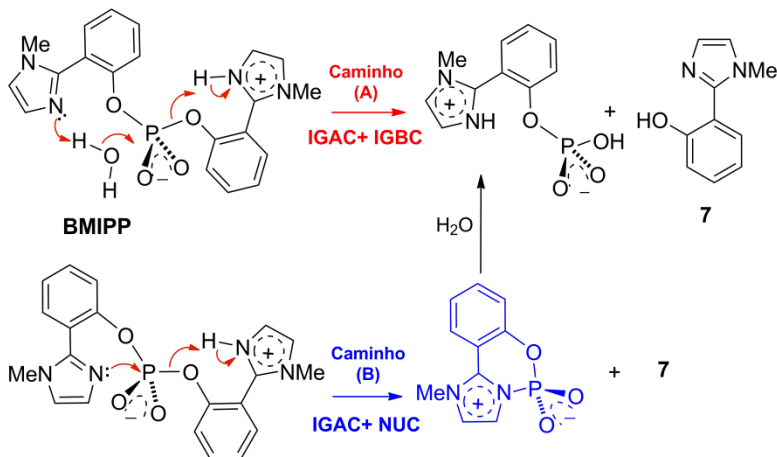


Esquema 15

Nem sempre é fácil distinguir se uma reação ocorre via catálise nucleofílica ou catálise básica geral, já que esses mecanismos são cineticamente equivalentes. Em geral, existem três estratégias, sendo que as duas primeiras são mais aplicáveis: (i) identificação de intermediários, (ii) medidas de efeito isotópico, e (iii) análise do gráfico de Brønsted.⁷⁶ Apesar da identificação de um intermediário confirmar o mecanismo nucleofílico, este não pode ser excluído quando um intermediário não é observado, já que muitos intermediários são extremamente instáveis. Neste sentido, a identificação ou captura de intermediários constitui uma ferramenta importante na distinção mecanística dessas reações.

Por exemplo, foi estudada a reação do *bis*(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato (**BMIPP**), **Esquema 16**. Esse modelo permite a existência de dois mecanismos cineticamente equivalentes: (i) Catálise intramolecular ácida geral com básica geral (**Caminho A**), ou (ii) catálise intramolecular ácida geral com nucleofílica (**Caminho B**). Inicialmente, evidências cinéticas e experimentos de RMN favorecem um mecanismo onde o grupo imidazol neutro atua como catalisador básico-geral ativando uma molécula de água enquanto que o próton do imidazol protonado estabilizaria o grupo de saída. Além disso, a catálise nucleofílica pelo grupo imidazol forma um intermediário cíclico aparentemente

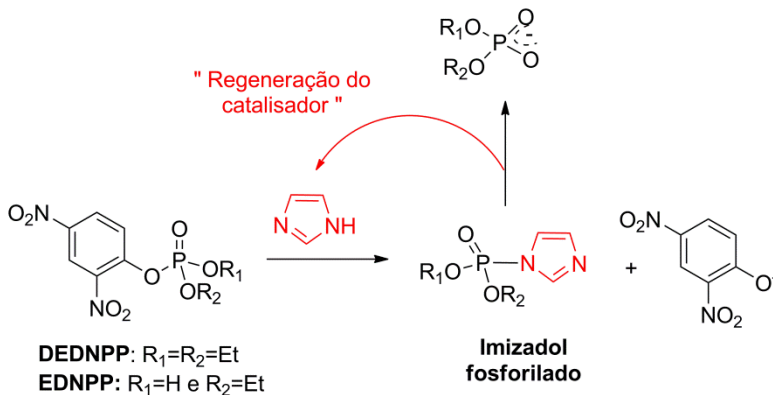
instável.⁸⁰ No entanto, resultados mais recentes de cálculos computacionais e ESI-MS mostraram que o intermediário cíclico é formado durante a reação. Sugere-se que, na reação de hidrólise do **BMIPP**, o grupo imidazol neutro pode promover uma catálise nucleofílica simultânea, ou não, à catálise básica.⁸¹



Esquema 16

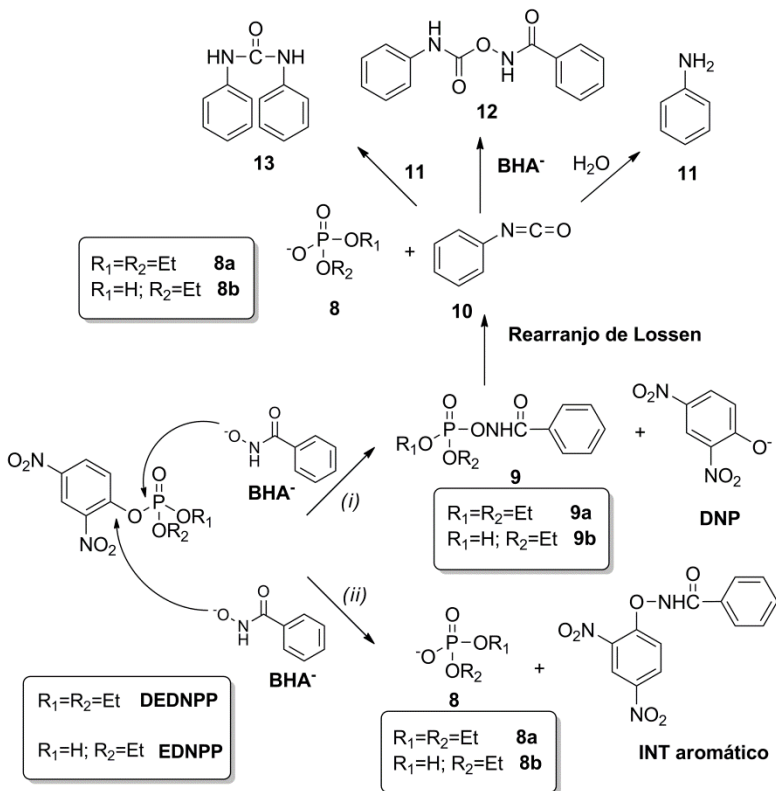
Vale lembrar que nem todas as reações com nucleófilos são do tipo catálise nucleofílica, pois para que uma reação seja considerada catalítica, o catalisador deve ser regenerado ao fim da reação. As reações de ésteres dietil 2,4-dinitrofenol fosfato (**DEDNPP**) e etil 2,4-dinitrofenol fosfato (**EDNPP**) na presença de imidazol (**IMZ**) e ácido benzohidroxâmico (**BHA**) constituem um exemplo típico. Nas reações entre o **IMZ** e os fosfatos **DEDNPP** e **EDNPP** foram detectados os intermediários de imidazol fosforilados. Estes se decompõem lentamente regenerando o **IMZ** de partida e formando os respectivos ésteres fosfóricos, os quais são poucos reativos. Além disso, nessas reações o **IMZ** ataca exclusivamente o átomo de fósforo, pois o ataque nucleofílico no carbono aromático é extremamente desfavorável em meio aquoso

formando um intermediário instável.⁸² Dessa maneira, essas reações constituem um verdadeiro ciclo catalítico. (**Esquema 17**)



Esquema 17

Nas reações com ácido benzohidroxâmico (**BHA**) ocorre ataque nucleofílico do **BHA** ao átomo de fósforo, pelo caminho (i); e ao anel aromático, pelo caminho (ii), **Esquema 18**. Os resultados mostraram que o intermediário fosforilado, que se forma pelo ataque no fósforo, sofre rearranjo de Lossen formando produtos como fenilsocianato, difenilureia, anilina e um derivado carbamílico. Resultados de ESI-MS permitiram detectar o intermediário aromático e os produtos **8(a e b)**, **DNP**, **10**, **11**, **12** e **13**. ref Esses resultados mostram que reações de desfosforilação com o **BHA** não são mecanisticamente simples e constituem uma espécie de ataque nucleofílico “suicida”, pois o nucleófilo alfa **BHA** é completamente destruído, formando produtos que são nucleófilos fracos. O mesmo mecanismo foi previamente observado para a reação do diéster **BDNPP** com **BHA**.²⁵

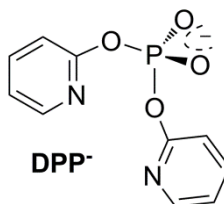


Esquema 18

1.4 ÉSTERES DE FOSFATO DERIVADOS DE 2-HIDROXIPIRIDINA

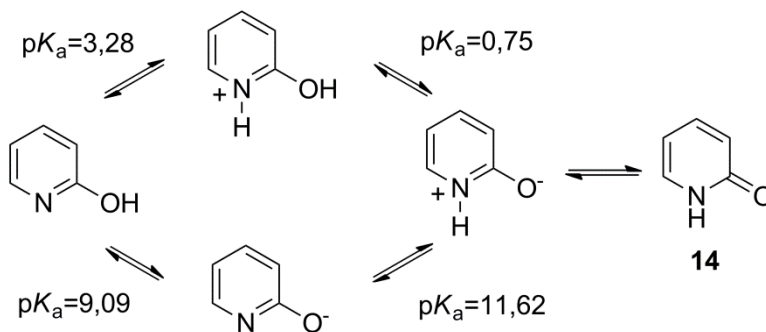
Recentemente foi reportado na literatura que o diéster *bis*-2-piridil fosfato **DPP** (**Esquema 19**) não pode ser preparado devido a sua elevada instabilidade.⁸³ Essa afirmação despertou a atenção do grupo **LaCFI**, uma vez que, diésteres de fosfato são compostos conhecidos por sua elevada estabilidade. E principalmente, gerou um

grande interesse pelas possíveis propriedades catalíticas dos ésteres de fosfato derivados da 2-hidroxipiridina.



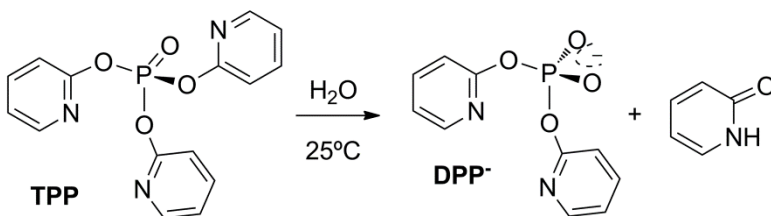
Esquema 19

O grupo de saída 2-hidroxipiridina (**Esquema 20**), o qual existe em água exclusivamente como 2-piridona (**14**), é um interessante modelo de catalisador bifuncional, porém, não é um bom grupo de saída ($pK_a=9,1$).^{84,85} Além disso, a geometria não é favorável para catálise nucleofílica pelo nitrogênio piridínico, a qual envolve a formação de um anel de quatro membros. Entretanto, em princípio, o sistema parecia bastante interessante para catálise básica geral intramolecular.



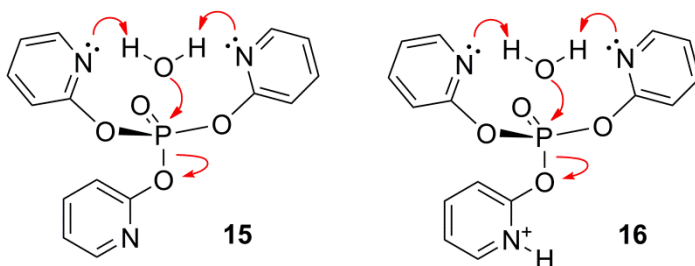
Esquema 20

Os estudos dos fosfatos derivados da 2-hidroxipiridina foram iniciados pelo triéster corresponde *tris*-2-piridil fosfato (**TPP**, **Esquema 21**).⁸⁶ Os triésteres de fosfato oferecem vantagens bem interessantes para esse estudo inicial, em relação a mono- e diésteres de fosfato. Por exemplo, a hidrólise de triésteres em função do pH fornece resultados descomplicados pela ionização do ácido fosfórico (**Figura 1**), o qual seria provavelmente na mesma região do pK_a do nitrogênio piridínico (aproximadamente 1M de HCl).



O perfil de pH para a reação de hidrólise do **TPP** mostra uma velocidade mínima perto de pH 8. Este é significativamente maior que os mínimos observados para triésteres dialquílicos sem funcionalidade no grupo de saída, que normalmente ficam perto de pH 5. Sugeriu-se que essa mudança seria resultado da protonação do nitrogênio piridínico: a diminuição do pK_a do grupo piridínio em várias ordens de magnitude (9,1 para 0,75, conforme o **Esquema 21**), torna este um melhor grupo de saída, comparado com o respectivo grupo neutro. As reações de hidrólise de **TPP** em pH neutro apresentaram um efeito isotópico elevado para o solvente, $k^H/k^D = 3$, e o inventário de prótons mostra que esse valor é produzido por 2 ou 3 prótons no estado de transição. Essas observações sugeriram que, em pH neutro, os dois grupos piridínicos no triéster **TPP** atuam simultaneamente, na direção da coordenada de reação, “retirando” prótons da água e aumentando a nucleofilicidade do átomo de oxigênio (**mecanismo 15** no **Esquema 22**). Esse mecanismo justificaria um incremento em k_{obs} de aproximadamente

10^8 vezes em relação à hidrólise de fosfatos dialquil arílicos, constituindo o primeiro sistema de catálise básica geral intramolecular altamente eficiente em uma reação de hidrólise, reportado na literatura. Além disso, se o **mecanismo 15** é favorecido na hidrólise do **TPP**, com um grupo de saída relativamente pobre, o mesmo mecanismo também poderia ser válido para a hidrólise do monocatión **TPPH⁺** ($pK_a = -0,22$), conforme o **mecanismo 16** no **Esquema 22**.⁸⁶



Esquema 22

No entanto, estudos posteriores com o triéster **TPP** mostraram que a estimativa de que a hidrólise neutra do **TPP** seria mais rápida do que o esperado "por um fator da ordem de 10^8 a 25°C " precisaria ser revista.⁸⁶ Portanto, para esclarecer porque esta estimativa não estava correta, no próximo item será abordado um pouco do tratamento que até então foi realizado em relação à reatividade de ésteres fosfóricos.

1.5 RELAÇÕES LINEARES DE ENERGIA LIVRE

Diversas ferramentas têm sido desenvolvidas para o estudo de mecanismos de reação e, especialmente, para a distinção entre características de estados de transição. Entre elas estão, por exemplo, efeito isotópico cinético (**KIE**), parâmetros de ativação, estudos computacionais e relações lineares de energia livre

(LFERS).⁷⁵ Relações lineares de energia livre são medidas da dependência da velocidade da reação em relação às características eletrônicas do nucleófilo ou grupo de saída. Na relação linear de energia livre de Hammett, o logaritmo da constante de velocidade é relacionado com constantes sigma, que são associadas a efeitos elétron-retirador ou elétron-doador do substituinte. No gráfico de Brönsted, o logaritmo da constante de velocidade é relacionado com o pK_a do nucleófilo e do grupo de saída, fornecendo valores de β_{nuc} e β_{LG} , respectivamente. A magnitude desses parâmetros reflete a quantidade de mudança de carga entre reagente e estado de transição. Um valor alto de β_g indica um estado de transição no qual a ligação com o grupo de saída está substancialmente rompida e há considerável desenvolvimento de carga nesse grupo. Similarmente, um elevado valor de β_{nuc} reflete um estado de transição com considerável formação de ligação com o nucleófilo.^{39,76}

Relações lineares de energia livre são extremamente utilizadas no estudo de mecanismos de reações de ésteres fosfóricos. Nos próximos itens serão mostradas as relações lineares de energia livre que correlacionam a reatividade de ésteres de fosfato em função da estrutura do grupo de saída.

1.5.1 Relações lineares de energia livre para triésteres de fosfato

A maior parte dos dados disponíveis na literatura até 1970, referente aos ésteres fosfóricos, envolvia nucleófilos e substratos atípicos. Trabalhos sistemáticos envolvendo triésteres estavam limitados à hidrólise de vários fosfatos dialquil arílicos, na faixa alcalina ou em única concentração de tampão em valores baixos de pH.^{87,88} A hidrólise neutra não havia sido medida com precisão para um triéster simples. Bunton e colaboradores haviam medido a hidrólise de alguns triésteres e obtiveram constante de velocidade para a hidrólise neutra do trifenil fosfato a 100°C, porém, aparentemente sem controle de pH.⁸⁹⁻⁹¹

Estudos de extrema importância nesse sentido foram publicados por Khan e Kirby em 1970, relatando as reações de

hidrólise de uma ampla série de triésteres de fosfato dialquil arílicos, **Figura 8**.⁶⁰ Os perfis de pH para a hidrólise desses compostos estão apresentados na **Figura 9**; e os valores obtidos para a constante de hidrólise (k_{hid}), na **Tabela 2**. No caso dos compostos menos reativos, as reações catalisadas por ácido e base são mais expressivas e a reação de hidrólise, na região independente de pH, é observada apenas perto de pH 4. A reação de hidrólise espontânea torna-se mais importante para os compostos mais reativos, com melhores grupos de saída: para o derivado de 2,4-dinitrofenol ($\text{p}K_{\text{a}} \sim 4$), a região independente de pH fica em torno de pH 2 e 7.

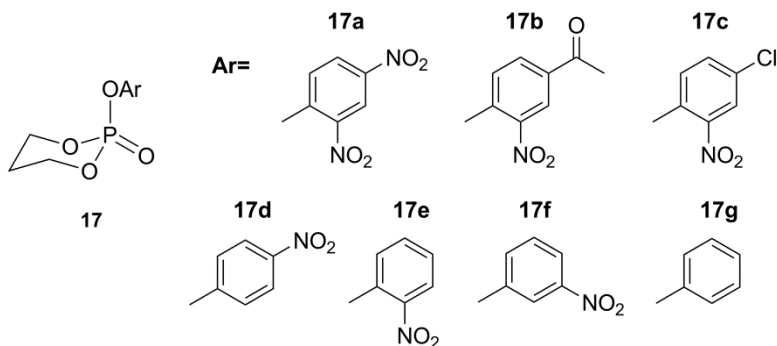


Figura 8 – Estrutura geral do triéster de fosfato dialquil aril (**17**), onde os grupos Ar são: (a) 2,4-dinitrofenil; (b) 4-acetil-2-nitrofenil; (c) 4-cloro-2-nitrofenil; (d) 4-nitrofenil; (e) 2-nitrofenil; (f) 3-nitrofenil; (g) fenil.

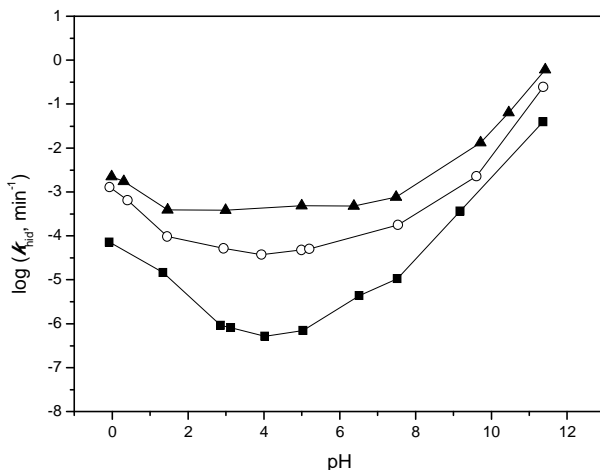


Figura 9 – Constantes de velocidade para hidrólise de triésteres de fosfato (17), a 39°C e força iônica 1,0 M, com grupos Ar: (▲) 2,4-dinitrofenil, (○) 4-acetil-2-nitrofenil e (■) 4-nitrofenil.⁶⁰

Tabela 2 – Constantes de velocidade para hidrólise de triésteres de fosfato (17), a 39°C e força iônica 1,0 M.⁶⁰

Éster de fosfato	pK _a do fenol	k _{hid} (min ⁻¹)
2,4-dinitrofenil fosfato	4,07	6,86 x 10 ⁻³
4-acetil-2-nitrofenil fosfato	5,09	4,29 x 10 ⁻⁴
4-cloro-2-nitrofenil fosfato	6,36	2,30 x 10 ⁻⁵
4-nitrofenil fosfato	7,15	3,78 x 10 ⁻⁶

Um gráfico do logaritmo da constante de velocidade de segunda ordem para hidrólise espontânea vs o pK_a do ácido conjugado do grupo de saída (**Figura 10**) fornece a **Equação 1**, que tem uma inclinação de -0,99. O mesmo gráfico para a hidrólise

alcalina tem uma inclinação de aproximadamente -0,40: as reações com água são muito mais sensíveis à natureza do grupo de saída. Esses compostos são altamente reativos com íon hidróxido, e mesmo grupos de saída relativamente ruins são deslocados.

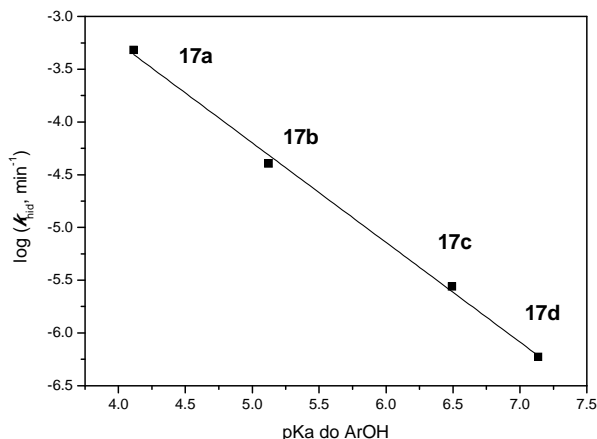
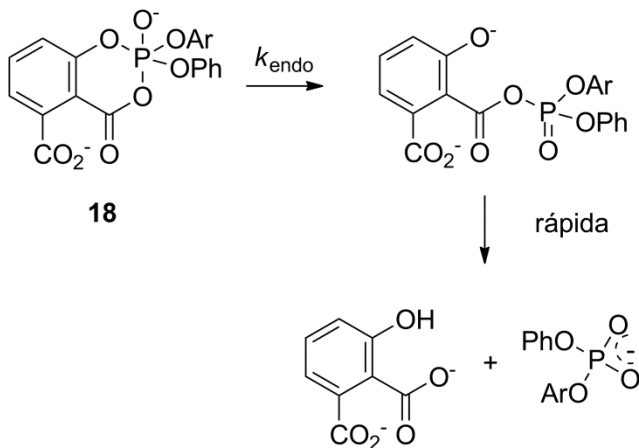


Figura 10 – Relação linear de energia livre entre constante de velocidade para as reações de hidrólise de triésteres de fosfato e pK_a do grupo de saída, 39°C e força iônica 1,0 M.⁶⁰

$$\log k_{hid} = -0,82 - 0,99 pKa \quad (1)$$

Os trabalhos anteriores a 2011 sobre reações de transferência do grupo fosforila dedicaram-se às contribuições do nucleófilo e do grupo de saída na reatividade dos sistemas estudados, tal como a **Figura 10** que representou (até 2011) a mais importante correlação para hidrólise de triésteres de fosfato. No entanto, resultados experimentais e teóricos, ambos recentemente publicados pelo **LaCFI**, mostraram que os efeitos dos grupos espectadores nessas reações são surpreendentemente importantes.^{45,46} Os grupos espectadores são aqueles que não estão envolvidos diretamente na

formação e quebra de ligação, por exemplo, os dois grupos fenóis no **Esquema 4**. Essa conclusão surgiu muito claramente a partir do estudo da reação do **TPP**, conforme mostrado no item **1.4**: a estimativa inicial de $k_0=1,5 \times 10^{-10} \text{ min}^{-1}$, a 39°C , para a hidrólise espontânea de um triéster derivado de um fenol de $\text{p}K_a$ 9,1 foi feito com base na relação linear de energia livre de Khan e Kirby, **Figura 10** e **Equação 1**.⁶⁰ O efeito dos dois grupos arilas espectadores do **TPP** foi considerado relativamente pequeno: a comparação direta de triésteres com grupos espectadores dialquílicos vs diarílicos, em uma reação de substituição endocíclica de um salicilato em um triéster de fosfato salicílico (**18**), fornece uma diferença de apenas 60 vezes, **Esquema 23**.⁹²



Esquema 23

A primeira indicação foi a evidência experimental de que a reação é catalisada por tampão. Sistemas com catálise intramolecular altamente eficientes, como sugerido para a hidrólise de **TPP**, envolvem valores de **ME** para os grupos catalíticos vizinhos tão altos que as reações com as concentrações limitadas de reagentes externos em solução não podem ser competitivas.⁷⁴

Certamente este composto é mais reativo que o previsto pela relação linear de energia livre reportada por Khan e Kirby, os quais eram os dados disponíveis na literatura até o momento. De fato é o que foi feito durante mais de quarenta anos nos estudos de mecanismos de reações de triésteres de fosfato. Entretanto, essa correlação foi feita para triésteres de fosfato dialquil arílicos, e o **TPP** é um triaril fosfato. Nesse sentido, estudos com uma série de triésteres de fosfato foram realizados para confirmar e quantificar o efeito dos “grupos espectadores” na reatividade desses compostos.⁴⁶

A **Figura 11** mostra as correlações lineares de energia livre para três séries de triésteres de fosfato, mostrando que tanto os grupos de saída como os “espectadores” apresentam importante influência na velocidade da reação de hidrólise dos triésteres de fosfato. Claramente, os coeficientes angulares dos gráficos mostrados na **Figura 11** estão compostos por dois termos: $\beta_{LG} + 2\beta_{NLG}$. O β_{NLG} foi obtido das medidas das constantes de velocidade de uma série de compostos, sendo variado o grupo “espectador” e mantido o grupo de saída constante (4-nitrofenolato). Na **Figura 12** está apresentado o gráfico de Brønsted para a hidrólise de diaril e dialquil 4-nitrofenil fosfatos.⁴⁶ Os dados disponíveis, mesmo que limitados, mostram que o efeito dos grupos “espectadores” é muito importante: com valores de -0,28 para os fosfatos triarílicos e -0,61 para os dialquil aril fosfatos (com o grupo de saída 4-nitrofenolato), **Figura 12**. Os resultados indicam que a hidrólise de **TPP** não é significativamente mais rápida do que o esperado para um éster de fosfato triarílico derivado de um fenol de pK_a 9,1. E, principalmente, ficou claro que o termo “grupos espectadores” é um equívoco para as reações de triésteres de fosfato.⁴⁶

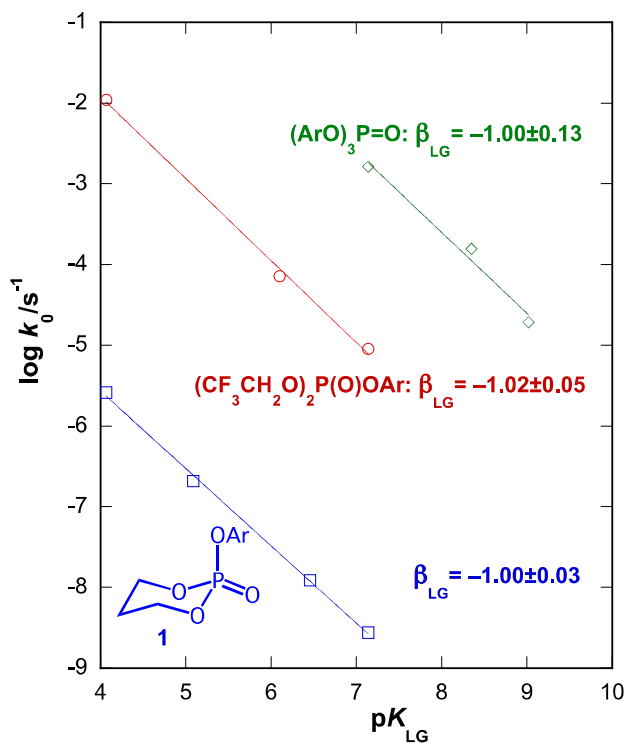


Figura 11 – Relações lineares de energia livre para 3 séries de triésteres de fosfato.⁴¹

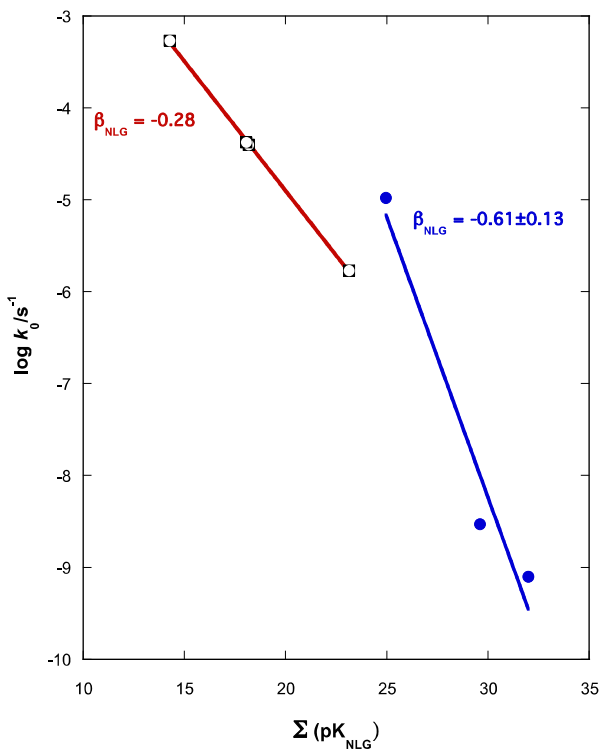
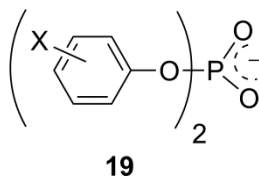


Figura 12 – Gráfico de Brønsted (\log de k_{obs} em função do somatório dos pK_a s dos grupos espectadores) para a hidrólise de triésteres diaril (círculos abertos) e dialquil (círculos fechados) 4-nitrofenil fosfato.^{41,46}

1.5.2 Relações lineares de energia livre para diésteres de fosfato

Ânions de diésteres de fosfato são, em geral, compostos extremamente pouco reativos. Por exemplo, a reação de hidrólise do *bis*-fenil fosfato é tão lenta que apenas 0,1% da reação pode ser acompanhada em pH 10 a 100°C, e o tempo de meia vida do *bis*-4-nitrofenil fosfato em pH 3-4 é maior que 4 meses a 100°C. Já o tempo de meia-vida do *bis*-2,4-dinitrofenil fosfato é apenas 75 min, nas mesmas condições de pH e temperatura, mostrando que a reatividade desses compostos depende fortemente da basicidade do grupo de saída. Estudos muito importantes sobre esse tipo de efeito em diésteres de fosfato foram reportados por Kirby e Younas, em 1970.⁴ Os autores mostram a hidrólise de uma classe simples de diésteres de fosfato simétricos, **Esquema 24**. Os gráficos de perfil de pH para os diversos fosfatos diarílicos estão na **Figura 13**; e os valores obtidos para a constante de hidrólise (k_{hid} , min^{-1}), na **Tabela 3**. O gráfico de logaritmo de constante de velocidade observada vs pK_a do grupo de saída para a hidrólise dos diésteres aniônicos está na **Figura 14**, e fornece uma excelente relação linear, **Equação 2**.



- 19a:** 2,4-dinitrofenil
- 19b:** 4-acetil-2-nitrofenil
- 19c:** 4-cloro-2-nitrofenil
- 19d:** 4-nitrofenil
- 19e:** 2-nitrofenil
- 19f:** 3-nitrofenil

Esquema 24

$$\log k_{hid} = 1,57 - 0,97 pK_a \quad (2)$$

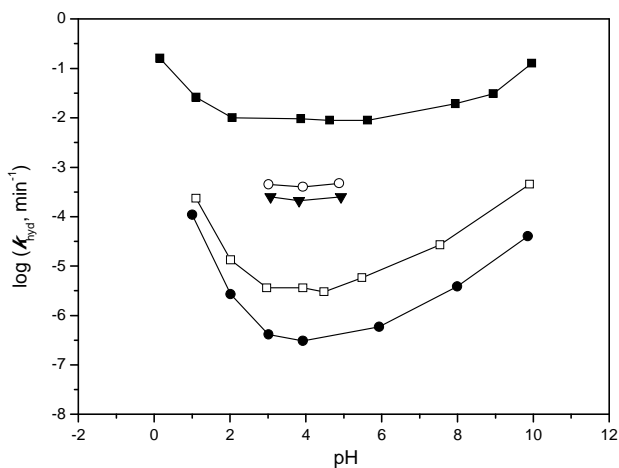


Figura 13 – Logaritmo das constantes de velocidade para hidrólise de ânions de diésteres de fosfato diarílicos em função do pH, a 100°C e força iônica 1,0 M: (■) *bis*-2,4-dinitrofenil fosfato, (○) *bis*-4-acetil-2-nitrofenil fosfato, (▼) *bis*-4-cloro-2-nitrofenil fosfato, (□) *bis*-4-nitrofenil fosfato e (●) *bis*-3-nitrofenil fosfato.⁴

Tabela 3 – Constantes de velocidade para hidrólise de ânions de diésteres de fosfato diarílicos, a 100°C e força iônica 1,0 M.⁴

Éster de fosfato	pK _a do fenol	k _{hidrólise} (min ⁻¹)
<i>Bis</i> -2,4-dinitrofenil fosfato	4,07	6,86 x 10 ⁻³
<i>Bis</i> -4-acetil-2-nitrofenil fosfato	5,09	4,29 x 10 ⁻⁴
<i>Bis</i> -4-cloro-2-nitrofenil fosfato	6,36	2,30 x 10 ⁻⁵
<i>Bis</i> -4-nitrofenil fosfato	7,15	3,78 x 10 ⁻⁶
<i>Bis</i> -2-nitrofenil fosfato	7,23	3,40 x 10 ⁻⁶
<i>Bis</i> -3-nitrofenil fosfato	8,35	3,02 x 10 ⁻⁷

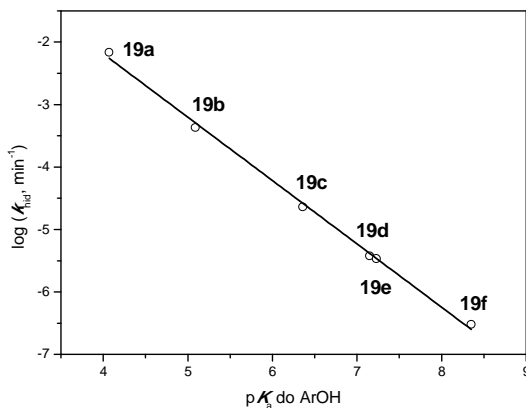


Figura 14 – Relação linear de energia livre entre constante de velocidade para reações de hidrólise de ânions de diésteres de fosfato diarílicos e $\text{p}K_{\text{a}}$ do grupo de saída, a 100°C e força iônica 1,0 M.⁴

As estimativas de valores de k_0 para a hidrólise de diésteres de fosfato disponíveis atualmente na literatura são feitas com base na relação linear de energia livre de Kirby e Younas, **Figura 14** e **Equação 2**. Sobretudo porque as reações de hidrólise desses compostos são extremamente lentas, tornando o estudo cinético bastante complexo. Estimativas de efeito catalítico em sistemas modelos que exibem algum tipo de catálise são feitas com base nessas correlações. Por exemplo, a reação de hidrólise do diéster de fosfato **BMIPP** (**Esquema 16**) é reportada na literatura como sendo aproximadamente 10^7 vezes mais rápida que o esperado para um simples diéster de fosfato com grupo de saída de $\text{p}K_{\text{a}}$ similar ($\sim 7,85$).⁸¹ Até o momento, não há na literatura nenhum estudo em relação à influência dos grupos espectadores nesses compostos. A importância que constituem essas correlações motivou o estudo da influência dos “grupos espectadores” nesta tese de doutoramento, o qual já foi investigado para triésteres e mostrou resultados que adicionam importantes informações à literatura.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar: (i) a reação do fármaco deferoxamina com mono- e triéster de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol; (ii) o efeito de grupos espectadores na hidrólise de diésteres de fosfato; e (iii) reação de hidrólise do diéster *bis*-2-piridil fosfato (**DPP**).

Dentro de um conjunto de estratégias para atingir os objetivos desta tese, destacam-se:

(i) Estudo cinético das reações da deferoxamina (**DFO**) com o monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato (**DNPP**) e triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), em diferentes pHs;

(ii) Síntese e caracterização dos diésteres de fosfato 2,4-dinitrofenil fenil fosfato e 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato; e estudo cinético da reação de hidrólise desses compostos a 100°C;

(iii) Correlação de Brønsted para efeito de grupo espectador em reações de hidrólise de diésteres de fosfato;

(iv) Síntese e caracterização do *bis*-2-piridil fosfato (**DPP**),

(v) Avaliação da reação de hidrólise do **DPP** em diferentes pHs, solventes (H₂O ou D₂O) e temperaturas;

(vi) Estudo cinético da reação de hidrólise do monoéster análogo 2-piridil fosfato (**PP**);

(vii) Estudo da reação entre **DPP** e o nucleófilo alfa hidroxilamina;

(viii) Realização de cálculos teóricos para a reação de hidrólise do **DPP** e para reação com hidroxilamina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

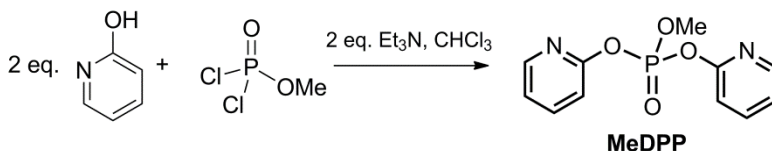
O dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) foi preparado de acordo com a metodologia descrita na literatura.⁹³ As sínteses dos demais ésteres de fosfato seguiram métodos convencionais encontrados na literatura, os quais foram adaptados de acordo com o necessário, conforme descrito a seguir.^{26,86} O monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato (**DNPP**) foi sintetizado pelo Doutorando Tiago Pacheco de Camargo, sob orientação do Prof. Ademir Neves, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química da UFSC. O ácido benzohidroxâmico (**BHA**) foi preparado de acordo com a metodologia descrita na literatura.⁹⁴ O fármaco deferroxamina (**DFO**) foi obtido da empresa Novartis, na forma de sal de mesilato (PM = 560g/mol). A hidroxilamina (NH₂OH) foi obtida da Aldrich, na forma de cloridrato (PM = 69,90g/mol). Os demais reagentes foram adquiridos comercialmente e purificados previamente quando necessário.

3.2 SÍNTESES

3.2.1 Síntese do metil di-2-piridil fosfato (MeDPP)

Adicionou-se trietilamina (12 mmols) a uma solução de 2-piridona (12 mmols) em CHCl₃ seco (15 ml) sob atmosfera de argônio e agitação magnética. A mistura reacional foi mantida em banho de gelo para adição, gota a gota, de uma solução de diclorometilfosfato MeOPOCl₂ (6 mmols) em CHCl₃ seco. Manteve-se agitação magnética por 10 minutos a 0°C e, posteriormente, por mais 2 horas à temperatura ambiente. O cloreto de trietilamônio foi removido através de filtração por gravidade e o filtrado foi extraído com solução saturada de NaHCO₃ e solução salina (NaCl saturada).

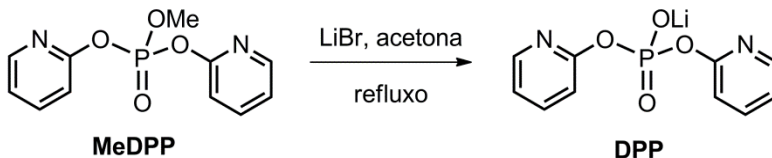
A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi removido à pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo. (**Esquema 25**) A caracterização do produto foi realizada por RMN¹H e ³¹P. RMN¹H (200 MHz, CDCl_3): δ = 8,31 ppm (2H, ddd, J =4,7; 2,0 e 0,8 Hz), 7,76 ppm (2H, m), 7,16 ppm (2H, dd, J =5,9 e 5,1 Hz), 7,11 ppm (1H, dd, J =8,2 e 0,8 Hz), 4,14 ppm (d, $J_{\text{H-P}}$ =12,1 Hz). RMN³¹P (CDCl_3): δ = -11,85 ppm.



Esquema 25

3.2.2 Síntese do *bis*-2-piridil fosfato (DPP)

Em 50 ml de acetona foram dissolvidos 4 mmol de **MeDPP** e 4 mmol de LiBr. Todos os reagentes foram previamente purificados. A mistura foi deixada sob refluxo por aproximadamente 3 horas, a 70°C. Após esse tempo, a solução foi filtrada a vácuo e um sólido branco foi obtido. (**Esquema 26**) A caracterização do produto foi realizada por RMN¹H e ³¹P. RMN¹H (D_2O , 200 MHz): δ = 7,24 ppm (ddd, 1H, J = 8,2; 2,0; 0,8 Hz); 7,29 ppm (ddd, 1H, J = 7,4; 5,1; 0,8 Hz); 7,91 ppm (ddd, 1H, J = 8,2; 8,2; 2,0 Hz); 8,24 ppm (dd, 1H, J = 5,0; 2,0 Hz). RMN³¹P (D_2O): δ = -11,22 ppm.

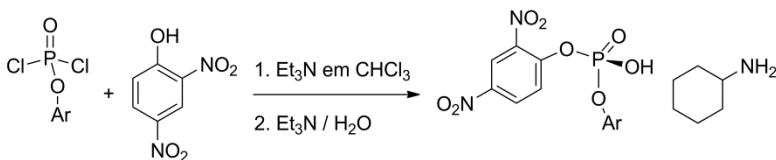


Esquema 26

3.2.3 Síntese dos diésteres 2,4-DNPO-(PO₂⁻)-OAr.

Uma solução de 2,4-dinitrofenol (10 mmol) e trietilamina (10 mmol) em 20 ml de CHCl₃ seco foi adicionada gota-a-gota à uma solução resfriada do fosfato apropriado (10 mmol, 4-nitrofenil ou fenil-OP(O)Cl₂) em 30 ml de CHCl₃ seco. A mistura reacional foi deixada sob agitação durante uma noite à temperatura ambiente. O cloreto remanescente foi hidrolisado em uma mistura água/trietilamina. Essa solução foi extraída duas vezes com CHCl₃ e a fase orgânica seca e evaporada. O diéster foi precipitado como sal de ciclohexilamina e recristalizado, resultando em um sólido de coloração amarela claro. (**Esquema 27**)

2,4-dinitrofenil fenil fosfato: RMN¹H (CD₃CN, 200 MHz): δ= 8,68 ppm (d, 1H); 8,45 ppm (dd, 1H); 7,85 ppm (d, 1H); 7,31 (m, 2H); 7,14 ppm (m, 3H); RMN³¹P (CD₃CN): δ = -13,6 ppm. ESI-MS modo íon-negativo: m/z=339,1 (C₁₂H₈N₂O₈P⁻). **2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato:** RMN³¹P (CD₃CN): δ= -14,9 ppm. ESI-MS modo íon-negativo: m/z=384,0 (C₁₂H₇N₃O₁₀P⁻).



Esquema 27

3.3 MEDIDAS CINÉTICAS

As medidas cinéticas foram realizadas em um espectrofotômetro de UV/VIS Cary 50 acoplado a um computador contendo sistemas de aquisição e tratamento de dados Cary WinUV 3.00. Em todas as medidas foram utilizadas cubetas de quartzo com capacidade de 3,5 ml e 1,0 cm de caminho ótico. As reações foram iniciadas pela adição de uma alíquota de 20 μ L da solução estoque 0,01 M de substrato (estocada em freezer) a 3 ml da solução tamponada. Os pHs das medidas cinéticas foram mantidos com os seguintes tampões: ClCH₂COOH (pH 2,00-3,00), CH₃COOH (pH 4,00-5,00), BIS TRIS (pH 6,00-7,00) e TRIS (pH 8,00-9,00). As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro digital Hanna, calibrado com soluções padrões pHs 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlo Erba). Em experimentos acima de 25°C, as medidas foram realizadas com compensação de temperatura, em cela acoplada a um banho termostático. Para as medidas em D₂O a 25°C, os valores de pD foram corrigidos considerando: $pD = pH_{\text{lido}} + 0,4$.⁹⁵ A força iônica foi mantida em 1,0 M em todas as medidas cinéticas pela adição de quantidades adequadas de solução de KCl.

As reações foram acompanhadas pela formação do produto no comprimento de onda adequado: (i) 2,4-dinitrofenol em aproximadamente 360 nm (nas reações de **DFO** com **DNPP** e **DEDNPP**); e (i) 2-piridona em aproximadamente 294nm (nas reações do diéster **DPP** e monoéster análogo **PP**). Na **Figura 15** estão apresentados os espectros sucessivos de UV-VIS típicos para a reação de (a) hidrólise do **DPP** em função do tempo em pH 4, a 25°C; (b) **DFO** com **DNPP**, a 25°C.

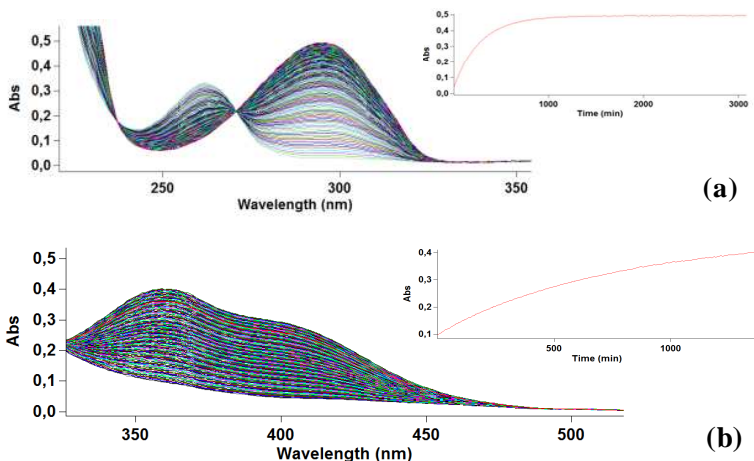


Figura 15 – Espectros sucessivos de UV-VIS típicos para a reação de (a) hidrólise do DPP em função do tempo em pH 4, a 25°C; (b) DFO com o monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato DNPP, a 25°C. As figuras no canto superior direito são os gráficos de absorvância em função do tempo em 294nm e 360nm, para 2-piridona e 2,4dinitrofenol, respectivamente.

As reações foram monitoradas por no mínimo três tempos de meia-vida e as constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas do ajuste iterativo dos gráficos lineares de $\ln(A_{\infty} - A_t)$ em função do tempo, sendo que para todas as medidas os coeficientes de correlações (r) foram superiores a 0,999. Já as reações extremamente lentas ($5t_{1/2} > 5760$ horas) foram acompanhadas por velocidades iniciais e os coeficientes angulares dos gráficos de absorvância *versus* o tempo, do início das reações, foram divididos pelas absorvâncias finais calculadas. Neste caso, em especial a reação de hidrólise do DPP em pH=9, foram utilizadas elevadas concentrações de substrato (5mM). As regressões lineares e não-lineares para ajustes de dados cinéticos foram realizadas com o programa ORIGIN versão 8.

3.4 CÁLCULOS TEÓRICOS

Os cálculos computacionais foram realizados pelo Dr. José Ramón Mora, no nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p) e M06/6-31++G(d, p) utilizando o programa GAUSSIAN 09 implementado para o sistema operacional Linux. Os mínimos globais e estados de transição foram identificados, em cada caso, e as suas estruturas caracterizadas por cálculos de frequências a 1 atm à 25°C e 100°C. Os efeitos do solvente são essenciais quando o próprio solvente é um reagente, e pode afetar de forma significativa a geometria das estruturas, foram otimizadas as estruturas dos substratos utilizando o modelo **PCM** (do inglês, *Solvation Model Density*) e **SMD** (do inglês, *Solvation Model Density*).⁹⁶ Os efeitos de adição de uma série de até 5 moléculas de água foram examinados de acordo com o reportado recentemente para ésteres de fosfato.⁴⁵ Os estados de transição foram obtidos usando o protocolo **QST** (do inglês, *Quadratic Synchronous Transit*) e identificados por uma única frequência imaginária, que caracteriza um ponto de sela ou estado de transição de primeira ordem. Cálculos de Coordenada de Reação Intrínseca (**IRC**) foram realizados para confirmar o caminho de cada reação.

3.5 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

A titulação potenciométrica do **DPP** foi realizada em célula de vidro com a temperatura controlada por um banho termostatizado a 25°C, agitação magnética e fluxo contínuo de nitrogênio. O ácido utilizado (HCl) foi bombeado para a célula de vidro através de um DOSIMAT 765. O pH foi medido através de um equipamento METROHM (modelo 713). O tratamento dos resultados experimentais foi feito com os programas BEST7 e SPECIES. Estes permitem determinar as constantes de dissociação e distribuição de espécies, respectivamente.

3.6 EXPERIMENTOS DE RMN ^1H E ^{31}P

As medidas de RMN de ^1H e ^{31}P foram realizadas em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker, modelo AC 200 MHz, disponibilizado pela Central de Análise da UFSC. Em todos os casos, foram utilizados 3-(trimetilsil) propionato de sódio (TMSP) como referência interna para RMN de ^1H e ácido fosfórico 85% como referência externa para RMN de ^{31}P .

As cinéticas de hidrólise do **DPP** por RMN de ^1H e ^{31}P foram realizadas em D_2O com uma concentração de 10 mg/mL do substrato. Os experimentos em pD=4 e 14 foram realizadas à 25°C, e as medidas de RMN em cada tempo foram feitas em um único tubo de RMN. Já no caso da reação de hidrólise em pD=9, as reações foram realizadas à 100°C. Neste caso, foram preparadas cerca de 20 ampolas, que foram mantidas em banho de óleo, e para cada leitura foi preparado um novo tubo de RMN.

As titulações do **DPP** por RMN de ^1H e ^{31}P foram realizadas em D_2O (10% ou 100%), a 25°C. Cada titulação foi realizada com 10 mg/mL de **DPP**. Os deslocamentos químicos foram registrados após cada pequena adição de DCl e leitura de pH.

Os espectros foram manuseados pelo programa MestreC e a representação quantitativa e ajustes teóricos foram realizados utilizando o programa Origin8.0.

3.7 EXPERIMENTOS DE LC-MS/MS

Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados com o auxílio do Prof. Gustavo Amadeu Micke e doutoranda Melina Heller.

Os experimentos foram realizados em um equipamento de cromatografia líquida Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) modelo 1200 equipado com bomba quaternária, sistema degaseificador, amostrador automático com controle de temperatura e capacidade para 96 frascos de amostra de 2,0 ml e forno para

coluna analítica. Foi utilizada uma coluna cromatográfica da marca Agilent modelo Zorbax Eclipse XDB-C8 com comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 2,1 mm e tamanho da partícula igual a 3,5 μm ; com a temperatura ajustada em 30°C. Taxa de fluxo da fase móvel: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Em todas as análises, o volume injetado foi 10,0 μL e o tempo total de análise 10 min, com pré-condicionamento de 5 min. A fase móvel foi constituída de 25% H_2O e 75% metanol, utilizando o modo de eluição isocrático.

O cromatógrafo líquido foi acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray (3200 Qtrap; Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada) e foi usado o modo negativo de ionização com os seguintes parâmetros da fonte: a interface íon-spray foi mantida em 400°C; voltagem do íon-spray - 4500 V; cortina de gás de dessolvatação (Curtain GasTM), 10 psi; gás nebulizante (GS1), 40 psi; gás secante (GS2), 40 psi; gás de colisão (CAD GasTM), médio; sendo que, ar sintético foi utilizado como GS1 e GS2, assim como, nitrogênio foi empregado como gás de colisão. O software Analyst (versão 1.5.1; Applied Biosystems) foi utilizado para o registro e tratamento dos dados. Os pares monitorados no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas) e outros parâmetros referentes à energia do cone e de colisão são listados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Massas monitoradas e energias de ionização do espectrômetro de massas.

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	DP*	EP	CEP	CE
383,792	183	-45	-4,5	-26	-36
383,792	108,9	-45	-4,5	-26	-84
339,017	183	-75	-4,5	-20	-46
339,017	119,2	-75	-4,5	-20	-74

*DP - Declustering Potential; EP - Entrance Potential; CE - Collision Energy; CEP – Collision Energy Potencial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os temas que foram estudados nessa tese estão organizados da seguinte maneira:

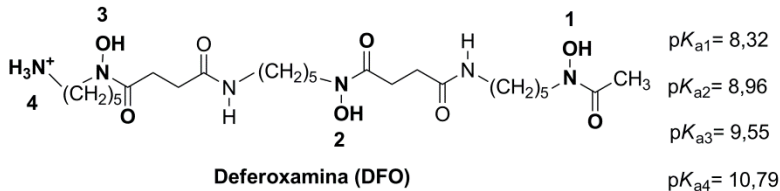
- 4.1) Estudos cinéticos das reações do fármaco deferoxamina (**DFO**) com mono- e triéster de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol;
- 4.2) Efeito de grupos espectadores na hidrólise de diésteres de fosfato;
- 4.3) Reação de hidrólise do diéster *bis*-2-piridil fosfato (**DPP**).

4.1 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO FÁRMACO DEFEROXAMINA (**DFO**) COM MONO- E TRIÉSTER DE FOSFATO DERIVADOS DE 2,4-DINITROFENOL

Parte dos esforços do grupo de pesquisa **LaCFI** tem se dedicado às reações de ésteres de fosfato com nucleófilos. Dentro de conjunto de reações estudadas, destacam-se aquelas com o ácido benzohidroxâmico (**BHA**): reações de desfosforilação de di- e triéster de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol foram avaliadas na presença de **BHA** e resultados surpreendentes foram obtidos. Por exemplo, reação de **BHA** (0,05 M) com o diéster **BDNPP** é cerca de 10^5 vezes mais rápida que a hidrólise espontânea do **BDNPP** ($k_0=1,9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$).²⁵ Nesse contexto, a química do fármaco comercial deferoxamina nos despertou a atenção: **DFO** é um sideróforo bacteriano que contém três grupos de ligantes bidentados contendo oxigênio, que constituem em sua essência grupos de ácido hidroxâmico.⁹⁷ A estrutura da deferoxamina está apresentada no **Esquema 28**, os valores de pK_a foram obtidos da literatura.⁹⁸

A deferoxamina (**DFO**) tem sido utilizada como agente quelante de metais para fins terapêuticos em disfunções de excesso de ferro e alumínio.^{99,100} Por mais de 40 anos, tem sido um tratamento padrão para pacientes que recebem transfusões de sangue.¹⁰¹ Esse tratamento possui inúmeros efeitos colaterais,¹⁰² que

incluem a inibição da síntese de DNA em linfócitos humanos,¹⁰³ o que ampliou a aplicação do **DFO** no uso clínico como uma droga antiproliferativa na quimioterapia do câncer.^{104,105}



Esquema 28

Recentemente foram realizados, no **LaCFI**, estudos detalhados para reação de **DFO** com o diéster **BDNPP**. Os resultados mostram que as constantes de velocidade de segunda-ordem para a reação de quebra do **BDNPP** na presença de **DFO** são apenas 1 ordem de magnitude menor que aquelas obtidas com **BHA**. Lembrando que, estudos anteriores mostram que o **BHA** é um dos nucleófilos mais poderosos conhecidos frente aos diésteres de fosfato como **BDNPP** ($k_{\text{BHA}}=0,108 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).²⁵ E, apesar da complexidade da reação, através da técnica de ESI-MS(/MS) foi possível identificar intermediários fosforilados consistentes com o ataque nucleofílico dos grupos hidroxamatos do **DFO** ao átomo de fósforo do **BDNPP**.⁸² Esses resultados levaram-nos a estender os estudos para mono- e triésteres de fosfato derivados de 2,4-dinitrofenol: 2,4-dinitrofenil dietil fosfato (**DEDNPP**) e 2,4-dinitrofenil fosfato (**DNPP**).

As reações foram acompanhadas por UV-Vis pela formação do produto 2,4-dinitrofenolato em 360 nm, a 25°C. O perfil de pH obtido para a reação com o **DENDPP** está apresentado na **Figura 16**, juntamente com os dados para as reações em água e com **BHA**, para fins comparativos. O incremento global do **DFO** na reação do triéster **DEDNPP** chega a 10^7 vezes, comparado com a reação de hidrólise espontânea ($k_0=1,4 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).⁸² Em contraste, as reações do monoéster **DNPP** com **DFO**, sob as mesmas condições cinéticas do **DEDNPP**, são aceleradas modestamente na presença de **DFO** e

BHA, com um aumento na velocidade de apenas 20% em relação à hidrólise: $k_{\text{obs}} = 1,80 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a 25°C, pH 9 e força iônica 1,0M.¹⁰⁶

Os dados cinéticos obtidos neste trabalho para as reações de **BHA** e **DFO** com **DNPP** estão na **Tabela 5**. Essa reatividade limitada do monoéster **DNPP** frente ao **BHA** e **DFO**, em comparação ao triéster **DENDPP** e diéster **BDNPP**, deve-se: (i) ao impedimento eletrostático de nucleófilos aniônicos sobre um diânion de fosfato, e (ii) ao efeito alfa em diânions de monoésteres de fosfato ser mínimo.⁵⁷

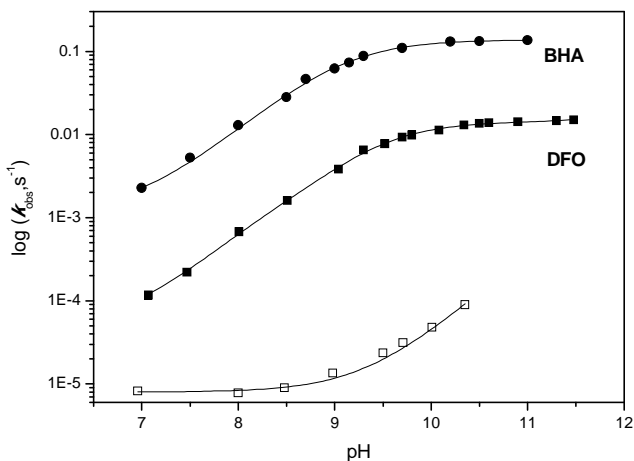


Figura 16 – Perfil de pH para a reação do **DEDNPP** com **DFO** 0,01M (■) a 25°C e $\mu=1,0\text{M}$. As reações de hidrólise espontânea (□) e reação com **BHA** 0,05M (●) foram obtidas da literatura^{82,107} e estão mostradas para comparação. Os dados para a reação do **DEDNPP** com **DFO** estão no ANEXO 1.

Tabela 5 – Constantes de velocidade observada em função do pH para as reações de **DNPP** com **DFO** e **BHA** 0,01M, a 25°C e força iônica 1,0 M.

DFO		BHA	
pH	$10^5 k_{obs}, s^{-1}$	pH	$10^5 k_{obs}, s^{-1}$
6,9	2,09	6,9	2,09
7,5	2,22	7,5	2,16
8,0	2,14	8,2	2,21
8,5	2,19	8,4	2,17
9,0	2,18	9,1	2,13
9,2	2,21	9,5	2,16
9,5	2,20	10,0	2,13
10,0	2,21	10,5	2,08
10,5	2,21	11,0	1,97
10,8	1,98		
11,0	2,29		
11,3	2,07		
11,5	2,20		

Os dados experimentais na **Figura 16** foram ajustados pela **Equação 3**, onde χ_1 , χ_2 , χ_3 e χ_4 correspondem às frações molares das espécies neutra, aniônica, dianiônica e trianiônica do **DFO** (baseado nos pK_a s do **Esquema 28**), e k_1 , k_2 , k_3 e k_4 são as constantes de velocidade das reações das respectivas espécies na reação com **DEDNPP**. A **Equação 3** foi deduzida a partir do **Esquema 29** e os parâmetros cinéticos obtidos estão apresentados na **Tabela 6**.

$$k_{obs} = k_0 + k_{OH}[OH] + (k_1\chi_1 + k_2\chi_2 + k_3\chi_3 + k_4\chi_4)[DFO] \quad (3)$$

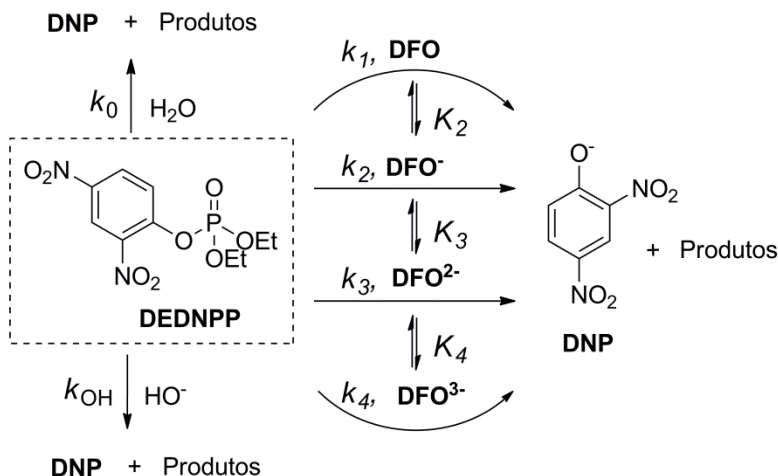


Tabela 6 – Constantes de velocidade e dissociação para a reação de **DEDNPP** com **DFO**, a 25°C e força iônica 1,0 M.

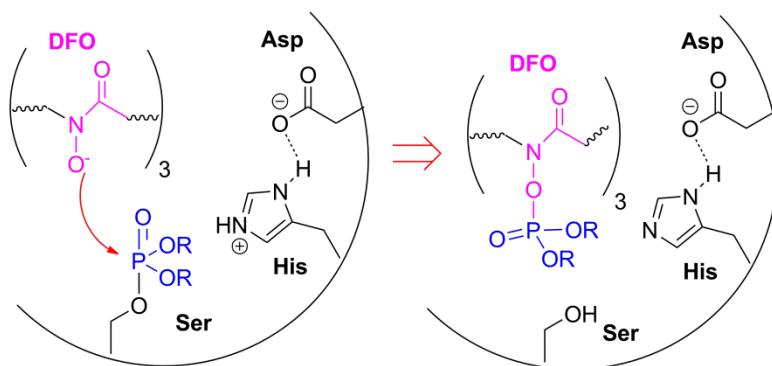
Resultados Cinéticos	
$k_0, \text{s}^{-1} \text{ a}$	$(8,00 \pm 0,50) \times 10^{-6}$
$k_{\text{OH}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \text{ a}$	$(4,20 \pm 0,20) \times 10^{-1}$
$k_1, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$(1,65 \pm 0,51) \times 10^{-1}$
$k_2, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$(3,48 \pm 0,55) \times 10^{-1}$
$k_3, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$1,40 \pm 0,03$
$k_4, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$1,38 \pm 0,03$
$\text{p}K_{\text{a}2}$	8,96
$\text{p}K_{\text{a}3}$	9,55
$\text{p}K_{\text{a}4}$	10,79

^aValores obtidos da literatura.⁹⁸

A constante de velocidade de segunda-ordem (k_2 , **Tabela 6**) para reação de desfosforilação do **DEDNPP** com **DFO** é menos de 2 vezes menor que aquela obtida para o nucleófilo altamente reativo **BHA** ($k_2=2,74 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)¹⁰⁷. O centro nucleofílico do **BHA** é mais exposto, enquanto no **DFO** os grupos hidroxamatos são cercados por uma extensa estrutura que possivelmente representa um efeito estéreo significativo para a reação.

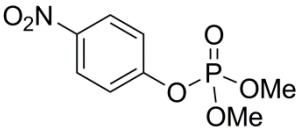
O estudo cinético completo foi realizado com o triéster modelo **DEDNPP**, além das facilidades cinéticas proporcionadas pelo seu bom grupo de saída (2,4-dinitrofenol, $pK_a = 4,07$), já haviam sido estudadas, em nosso grupo de pesquisa, as reações padrões a 25°C (hidrólise espontânea e reação com **BHA**). No entanto, uma vez que o **DFO** já é utilizado como um fármaco, os resultados de alta reatividade em reações com triésteres de fosfato obtidos nesse trabalho sugerem possível utilização adicional para o **DFO**: na reativação da acetilcolinesterase em casos de intoxicação aguda por compostos organofosforados, **Esquema 30**.^{13,14}

Com o objetivo de reforçar essa hipótese, foi realizada a reação de desfosforilação do paraoxon metílico (dietil 4-nitrofenil fosfato, $pK_{LG} = 7,14$) na ausência e presença de **DFO** 0,01 M à 25°C, pH 11 e $\mu=1,0 \text{ M}$. Os dados mostram que, nas condições estudadas, a reação de quebra do organofosforado tem um incremento na constante de velocidade de segunda-ordem em torno de 8×10^4 vezes, **Tabela 7**. Os dados da reação com paraoxon metílico são suficientemente importantes para confirmar que as conclusões com relação ao triéster de fosfato modelo **DEDNPP** podem ser estendidas para pesticidas organofosforados.



Esquema 30

Tabela 7 – Resultados cinéticos para a reação do **DFO** com Paraoxon Metílico à 25° C, pH 11 e $\mu=1,0$ M.

	Constantes de Segunda-Ordem	k^{DFO}/k^0	
H₂O	$1,44 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$8,3 \times 10^4$	
DFO	$1,20 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$		

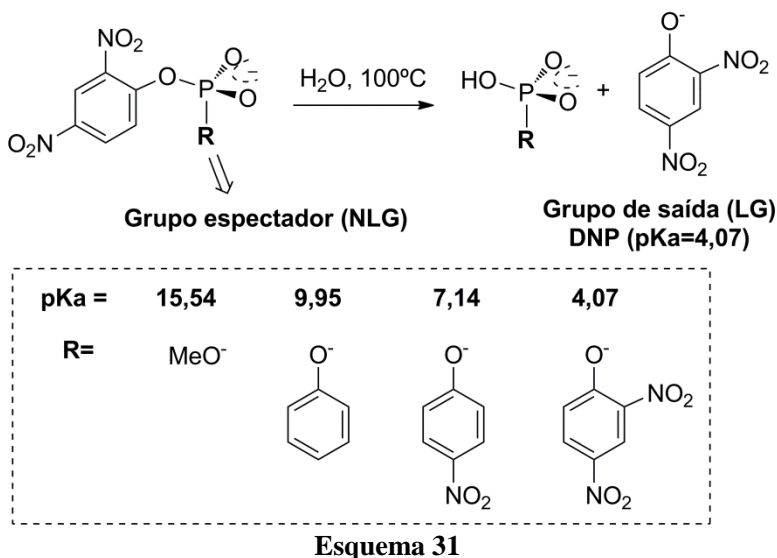
Mesmo que ainda iniciais, os dados desse trabalho são extremamente relevantes, pois sugerem que o fármaco **DFO** pode ter uma aplicação terapêutica como antídoto em casos de intoxicação aguda por agentes organofosforados. Os resultados deste trabalho trazem muitas perspectivas, pois despertam o interesse do **LaCFI**, que durante muitos anos vem se dedicando aos estudos mecanísticos de reações de ésteres de fosfato na presença de nucleófilos, no desenho e estudo cinético de novas estruturas nucleofílicas que, em longo prazo, tenham aplicação de grande impacto científico.

4.2 EFEITO DE GRUPOS ESPECTADORES NA HIDRÓLISE DIÉSTERES DE FOSFATO

Os dados publicados recentemente na literatura para reações de hidrólise de triésteres de fosfato, os quais mostram a grande dependência dos grupos espectadores desses compostos sobre as constantes de velocidade de reação,⁴⁶ conforme mostrado no item **1.5.1** da Introdução, motivou o estudo de efeito de grupos espectadores em diésteres de fosfato.

Até o momento, não havia na literatura nenhum estudo em relação à influência dos grupos espectadores em diésteres de fosfato e, implicitamente, assumia-se que os efeitos de grupos espectadores sobre as reações desses compostos eram mínimos. Considerava-se, por exemplo, que o efeito de troca de um grupo 2,4-nitrofenil por um grupo metila no diéster *bis*-2,4-nitrofenil fosfato fosse basicamente estatístico: o *bis*-2,4-dinitrofenilfosfato é hidrolisado a 39°C apenas 2,88 vezes mais rápido que o 2,4-dinitrofenil metil fosfato - pouco mais do que o fator de 2.¹⁰⁸

Os efeitos dos grupos espectadores na velocidade de hidrólise de ésteres de fosfato podem ser quantificados através das medidas de constante de velocidade para uma série de compostos com um grupo de saída comum e diferentes grupos espectadores, conforme mostra o **Esquema 31**. O grupo de saída mais apropriado para esse estudo é o 2,4-nitrofenol ($pK_a=4,07$), pois o mesmo permite a utilização de diversos grupos espectadores, sem qualquer interferência relacionada à perda de outros grupos de saída mais básicos. Além disso, já estão disponíveis na literatura os dados para a reação de hidrólise do *bis*-2,4-dinitrofenil fosfato (**BDNPP**) e 2,4-dinitrofenil metil fosfato, que tem grupos espectadores com pK_a s iguais a 4,07 e 15,54, respectivamente. Esses valores representam uma faixa representativa de pK_a , e na ausência de outros dados da literatura, foram sintetizados novos ésteres de fosfato com valores de pK_a s intermediários. Foram sintetizados os diésteres assimétricos 2,4-dinitrofenil fenil fosfato ($pK_{NLG}=9,95$) e 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato ($pK_{NLG}=7,14$). As reações de hidrólise dos diésteres foram acompanhadas por LC-MS/MS e estão mostradas a seguir.



4.2.1 Hidrólise dos diésteres 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato e 2,4-dinitrofenil fenil fosfato por LC-MS/MS

A reação de hidrólise dos diésteres foi acompanhada a 100°C em pH 5,5 – região de patamar do perfil de pH para diésteres de fosfato comuns – através da técnica de LC-MS/MS pelo desaparecimento dos reagentes no modo íon negativo: $m/z=339$ e $m/z 384$, para 2,4-dinitrofenil fenil fosfato e 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato, respectivamente. Os gráficos para as reações de hidrólise dos diésteres estão nas **Figuras 17 e 18** e as curvas foram obtidas do ajuste não-linear utilizando a **Equação 4**. Esta descreve o decaimento exponencial da concentração de reagente em função do tempo para uma reação de primeira ordem, onde $[A]_0$ é a concentração inicial de reagente; e k , a constante de velocidade de primeira-ordem.¹⁰⁹ É importante salientar que, através da técnica de LC-MS/MS, não foram observados a formação de outros valores de m/z para produtos referentes à reações paralelas, permitindo afirmar que a reação ocorre exclusivamente pelo ataque nucleofílico da água

ao átomo de fósforo com deslocamento do grupo de saída 2,4-dinitrofenolato. Os dados obtidos estão na **Tabela 8** e discutidos no próximo item por meio da correlação linear de energia livre de Brønsted para grupo espectador.

$$[\text{área}] = [\text{área}]_0 e^{-k_0 t} \quad (4)$$

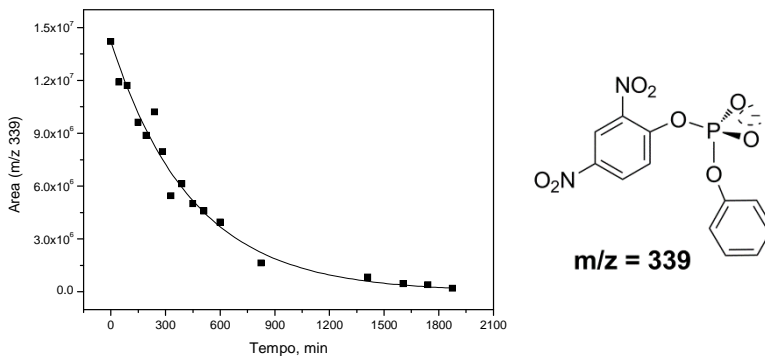


Figura 17 – Área de m/z 339 em função tempo para a reação de hidrólise do 2,4-dinitrofenil fenil fosfato a 100°C. Os pontos são experimentais e a linha corresponde ao ajuste teórico segundo a **Equação 4**. Os dados de área de m/z 339 em função do tempo estão no **ANEXO 2**.

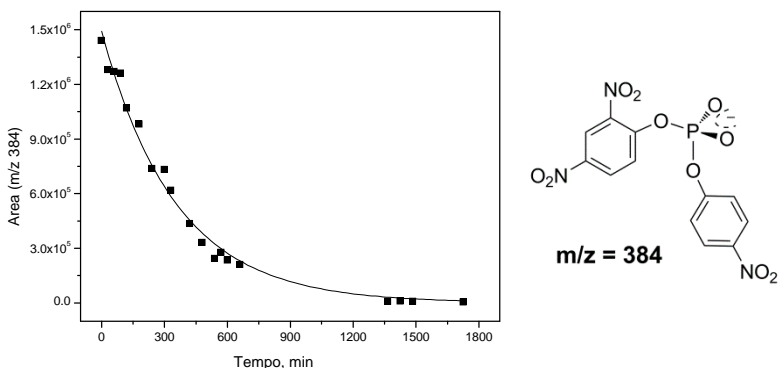


Figura 18 – Área de m/z 384 em função tempo para a reação de hidrólise do 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato a 100°C. Os pontos são experimentais e a linha corresponde ao ajuste teórico segundo a **Equação 4**. Os dados de área de m/z 384 em função do tempo estão no **ANEXO 2**.

4.2.2 Gráfico de Brønsted para diésteres de fosfato

A partir dos valores de constantes de velocidade obtidos, foram correlacionados dados das reações de hidrólise, na região de pH-independente, de quatro diésteres do tipo **RO(PO₂⁻)–O–2,4-DNP** com um grupo de saída em comum (2,4-dinitrofenol) e diferentes grupos espectadores (**RO**⁺): metil, fenil, 4-nitrofenil e 2,4-dinitrofenil. Os valores de constantes de velocidade obtidos foram correlacionados com a equação de Brønsted, que nesse caso, faz a correlação entre a constante de velocidade e p*K*_a do ácido conjugado do grupo espectador. Os dados de *k*₀ à 100°C estão na **Tabela 8**, juntamente com os valores de p*K*_a obtidos da literatura. O gráfico de Brønsted de grupo espectador para as reações de hidrólise de diésteres de fosfato está na **Figura 19**.

Tabela 8 – Constantes de velocidade para as reações de hidrólise dos ânions de diésteres de fosfato **RO(PO₂⁻)–O-2,4-DNP** em função do pK_a do ácido conjugado do grupo espectador, a 100°C.

Grupo espectador RO	pK _a de ROH	10 ⁵ k ₀ , s ⁻¹
2,4-dinitrofenil *	4,07	5,72
4-nitrofenil	7,14	4,72
fenil	9,95	3,87
metil **	15,54	2,50

*Dados da literatura, valor dividido por 2.⁴ **k₀ calculado a partir da constante de velocidade a 39°C,¹⁰⁸ assumindo que a reação possui a mesma entropia de ativação que a hidrólise do **BDNPP**.

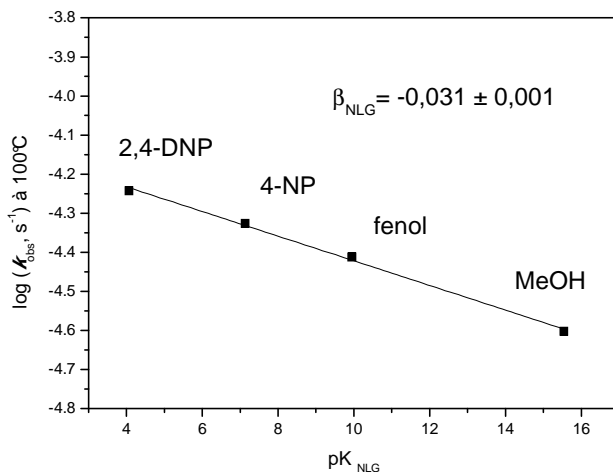


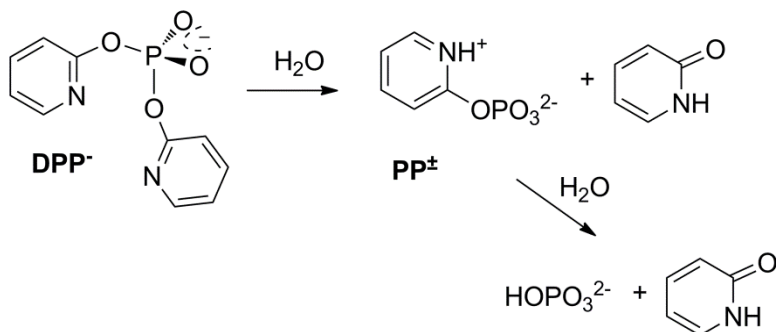
Figura 19 – Constantes de velocidade para as reações de hidrólise dos ânions de diésteres de fosfato **RO(PO₂⁻)–O-2,4-DNP** em função do pK_a do ácido conjugado do grupo espectador, a 100°C.

A relação linear de energia livre, **Figura 19**, fornece o parâmetro de Brønsted do grupo espectador: $\beta_{\text{NLG}} = -0,031 \pm 0,001$, a 100°C. Esse valor indica que as reações de hidrólise de diésteres de fosfato possuem mínima sensibilidade com relação à natureza dos grupos espectadores. Esse valor de β é cerca de 10 vezes menor, em relação ao obtido recentemente para triésteres de fosfato triarílicos, que apresentam um valor de β_{NLG} igual a $-0,29 \pm 0,003$, à 25°C.⁴⁶ Além disso, conforme mostrado na Introdução, no caso das reações de hidrólise de triésteres de fosfato, os resultados mostram que existem diferenças claras entre triésteres de fosfato triarilados e dialquil arilados, em relação à sensibilidade de grupos de saída e espectadores (β_{LG} e β_{NLG}), e foram correlacionados de forma independente. Os sistemas triarilados são mais reativos e apresentam menores valores de β_{LG} e β_{NLG} . ref

A diferença considerável de dependência da constante de velocidade em relação ao grupo espectador entre di- e triésteres de fosfato seguramente está relacionada à diferença intrínseca entre os mecanismos que seguem essas duas classes de fosfatos. As reações de hidrólise de triésteres de fosfato (considerando o grupo de saída 4-nitrofenolato, $pK_a=7,14$) ocorrem via formação de intermediário pentacoordenado em um processo em duas etapas (**Esquema 4**)⁴⁵, enquanto que reações de diésteres de fosfato passam por um mecanismo de caráter concertado. Consequentemente, nas reações de triésteres de fosfato a dependência à natureza de todos os grupos ligados ao átomo de fósforo torna-se mais importante em relação aos diésteres de fosfato. Provavelmente esse é o motivo principal para que o efeito de grupos espectadores seja importante no caso de triésteres e mínimo para os diésteres de fosfato.

4.3 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DIÉSTER *BIS*-2-PIRIDIL FOSFATO (**DPP**)

Nesse item foi estudado o comportamento do diéster de fosfato **DPP**, o alvo original do **LaCFI** acerca da química de ésteres de fosfato derivados da 2-hidroxipiridina, conforme descrito no item **1.4** na introdução. Foi confirmado que a hidrólise do **DPP** é muito lenta, de acordo com aquilo que havia sido reportado na literatura por Brown e Zamkane¹¹⁰: o **DPP** não é hidrolisado sob condições brandas (pH 6 – 8 à 37°C, na presença ou ausência de Co^{2+} ou complexos selecionados). Os resultados deste trabalho mostram que o **DPP** exibe reatividade substancialmente elevada, coerente com catálise intramolecular significativa na reação de hidrólise. Discute-se o mecanismo de reação de hidrólise do **DPP** através de resultados cinéticos, teóricos e da reação do monoéster **PP**, **Esquema 32**.



Esquema 32

4.3.1 Titulação potenciométrica e espectrométrica do **DPP**

Na **Figura 20** estão apresentados os resultados da titulação potenciométrica do **DPP**. A linha corresponde ao ajuste teórico com o programa BEST7. Na faixa de pH estudada (2 a 5) foi observado

um pK_a igual a $2,73 \pm 0,01$, que permitiu a construção do gráfico de distribuição de espécies, **Figura 20**.

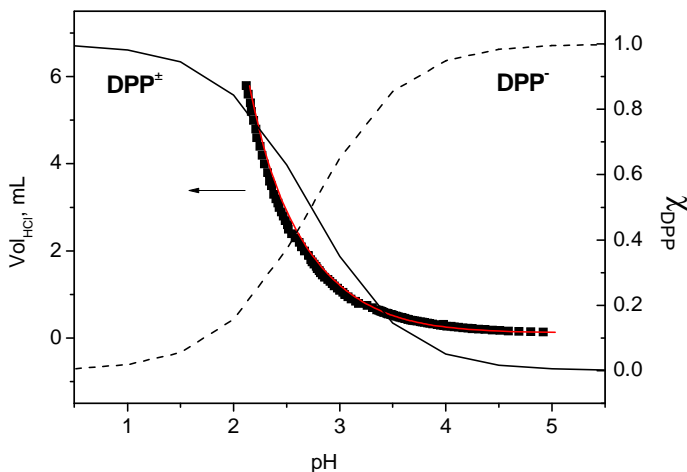


Figura 20 – Titulação potenciométrica de 0,05 mmol de **DPP** a 25°C, e diagrama de distribuição de espécies de acordo com o pK_a calculado de $2,73 \pm 0,01$ (eixo Y, ao lado direito).

Com a finalidade de confirmar o valor de pK_a obtido, foi realizada a titulação espectrométrica utilizando as técnicas de RMN de ^{31}P e ^1H . Os dados experimentais de deslocamento químico em função do pH, obtidos por ambas as técnicas, estão na **Figura 21 e 22**, e foram tratados teoricamente utilizando a **Equação 5**. Nesta, δ_{DPP} e δ_{DPP^-} representam, respectivamente, os deslocamentos do **DPP** nas formas protonada e desprotonada, e K_a representa a constante de dissociação ácida.

$$\delta(\text{ppm}) = \delta_{\text{DPP}} \left(\frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} \right) + \delta_{\text{DPP}^-} \left(\frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \right) \quad (5)$$

A titulação por RMN de ^1H foi realizada em D_2O e foram acompanhados dois hidrogênios do anel aromático do **DPP**, fornecendo um valor médio de pK_a igual a $2,67 \pm 0,01$ (**Figura 21**). A titulação por RMN de ^{31}P foi realizada em D_2O puro e em $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}(10\%)$ e os valores obtidos foram igual a $2,86 \pm 0,01$ e $2,37 \pm 0,01$, respectivamente. (**Figura 22**) Em D_2O , os valores obtidos por titulação espectrométrica são bem similares aquele obtido na titulação potenciométrica. Provavelmente, o valor de pK_a obtido refere-se à protonação do nitrogênio piridínico, uma vez que para a protonação de oxigênio fosforílico de diésteres de fosfato arílicos devem ser observados valores menores que diésteres alquílicos, os quais tem pK_a s na faixa entre 1 e 2.¹

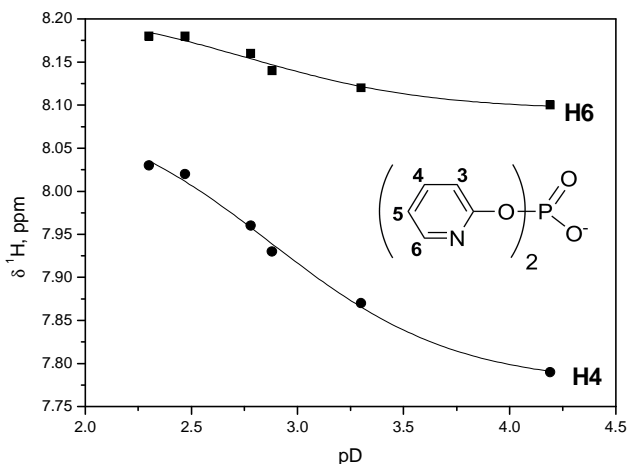


Figura 21– Deslocamento químico (δ , RMN de ^1H) em função de pD para DPP em D_2O , a 25°C . Os dados estão no **ANEXO 3**.

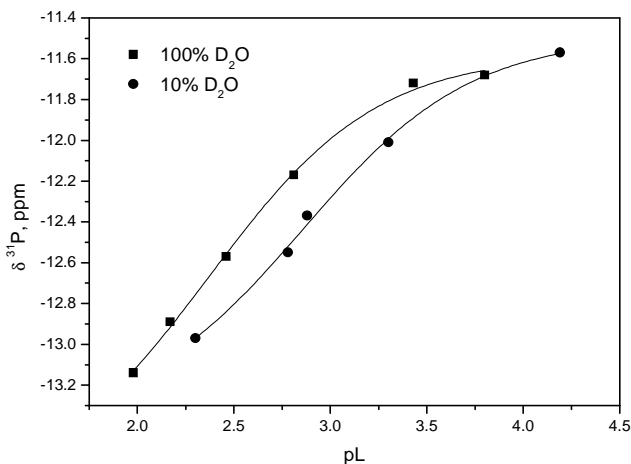


Figura 22 – Deslocamento químico (δ , RMN de ^{31}P) em função de pD(100% D_2O) ou pL (10% D_2O) para **DPP** em D_2O , a 25°C . Os dados estão no **ANEXO 3**.

4.3.2 Reação de hidrólise do DPP: Estudos Cinéticos

Diésteres de fosfato são bem conhecidos por serem os ésteres de fosfato menos reativos na ausência de ácido ou base: a hidrólise espontânea do difenil fosfato é tão lenta que não pode ser medida a 100°C .⁶⁰ Neste trabalho foram feitos grandes esforços para medir a constante de velocidade da reação de hidrólise do diéster de fosfato **DPP** a 25°C , utilizando o método das velocidades iniciais. Inúmeras medidas de constante de velocidade foram feitas ao longo de dois anos, em parceria com os pesquisadores Anthony J. Kirby da Universidade de Cambridge, Nicholas H. Williams e Almahdi Amer da Universidade de Sheffield, na Inglaterra. Não há dúvidas de que os valores mostrados aqui são os melhores que puderam ser obtidos sob essas condições, e a validade desses números é sustentada pela excelente coerência com os dados obtidos em altas temperaturas.

A reação de hidrólise foi estudada em função de pH/H_0 , a 25°C , e os resultados experimentais estão apresentados na **Figura 23**. A escala de H_0 está de acordo com a função de acidez de Hammett.¹¹¹ Os valores de k_{obs} na **Figura 23** foram obtidos com base em observações extremamente cautelosas dos resultados de experimentos de UV-Vis: as medidas cinéticas de UV-Vis mostram claramente que, dependendo do pH, 2 equivalentes de 2-piridona são formados em 294 nm. De fato, conforme relatado na literatura, em algumas regiões de pH as reações de hidrólise de monoésteres de fosfato podem ser mais rápidas que as reações dos diésteres correspondentes.¹⁰⁶ Nesse caso as reações são do tipo consecutivas e o estudo da reação de hidrólise do monoéster correspondente é essencialmente importante para o cálculo das k_{obs} para a reação de hidrólise do **DPP**. A reação de hidrólise do **PP** foi estudada em função do pH e será descrita em detalhes no item **4.3.3**.

Basicamente, foi observado que abaixo de pH 12 a reação de hidrólise do monoéster **PP** é mais rápida que a hidrólise do diéster **DPP**. A hidrólise do **DPP**, exceto em meio fortemente básico, leva à formação de 2 equivalentes de 2-piridona e fosfato inorgânico (**Pi**), **Esquema 33**. Esses resultados foram confirmados com os experimentos de identificação de produtos, que estão discutidos no item **4.3.4**, a seguir. As constantes de hidrólise do monoéster foram utilizadas nos cálculos das constantes observadas do diéster para $\text{pH} < 4$, através da **Equação 6**, que é uma adaptação da equação geral para reações consecutivas¹¹² e considera a formação de 2-piridona na primeira e segunda etapa (k_1 e k_2 , respectivamente), conforme o **Esquema 33**. As constantes de velocidade obtidas para uma reação de primeira ordem são bem similares às constantes derivadas a partir da equação apropriada para reações consecutivas (**Equação 6**), dados no **ANEXO 4**. Na faixa de pH 5-14 as reações são extremamente lentas e foi utilizado o método das velocidades iniciais (abaixo de pH 12 foi considerada a formação de duas piridonas, de acordo com os dados obtidos para a hidrólise do monoéster).

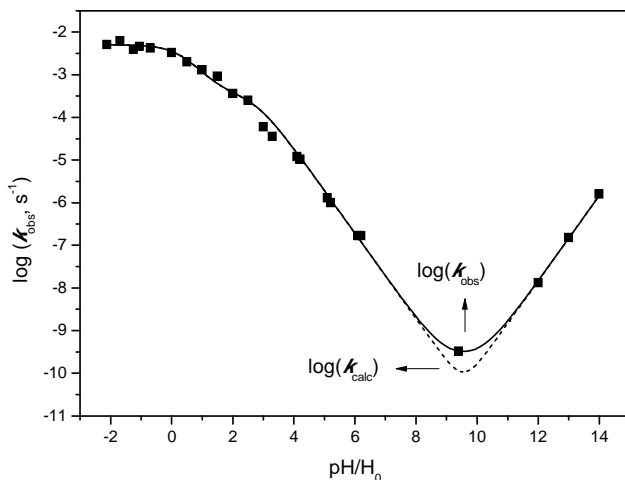
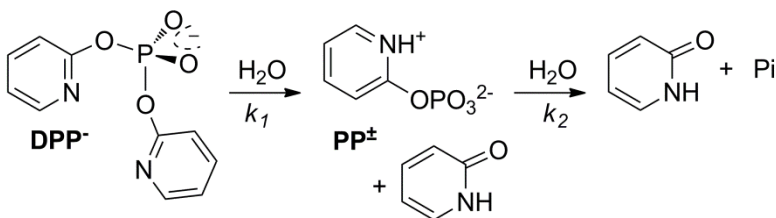


Figura 23 – Constante de velocidade observada em função de pH/H_0 para a reação de hidrólise do **DPP** a 25°C e força iônica $1,0\text{ M}$. Os pontos são experimentais e a linha sólida ($\log k_{\text{obs}}$) corresponde ao ajuste teórico segundo a **Equação 7** e os parâmetros obtidos estão apresentados na **Tabela 8**. A linha pontilhada ($\log k_{\text{calc}}$) refere-se ao ajuste teórico com a **Equação 7** considerando a contribuição k_0 igual a zero (mantida invariável no ajuste da curva). Os dados de k_{obs} em função de pH estão no **ANEXO 5**.



Esquema 33

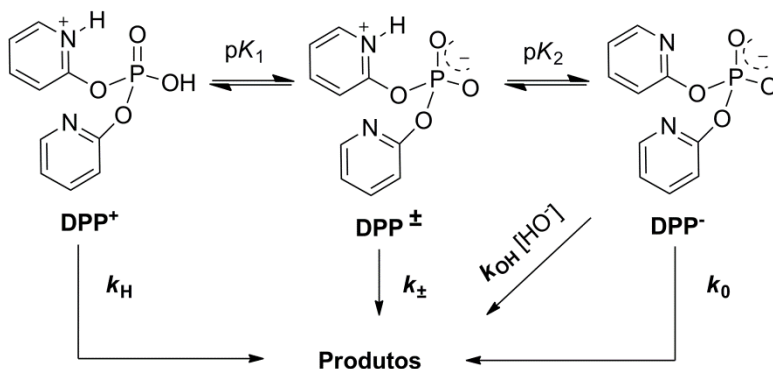
$$[\text{piridona}] = [\text{DPP}]_0 \left[\left(1 + \frac{1}{k_2 - k_1} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right) + (e^{-k_1 t}) \right] \quad (6)$$

Os dados de k_{obs} em função do pH na **Figura 23** foram interpretados em termos das reações das três formas iônicas do **DPP** mostradas no **Esquema 34**, que foi delineado com base nos resultados experimentais. A equação matemática que descreve os dados experimentais em termos de constantes de velocidade e as frações molares de espécies presentes está resumida na **Equação 7**. Nessa equação, as constantes k_{DPP^+} , k_{DPP^\pm} e k_{DPP^-} correspondem às constantes de velocidade referentes às espécies protonada, zwitteriônica e aniônica do **DPP**, respectivamente. (**Esquema 34**) A **Equação 7** expressa de acordo com as frações molares de um ácido diprótico está na **Equação 8**. A região abaixo de pH 5 no perfil de pH (**Figura 23**) mostra inflexões entre pH 0 e 3 indicativas de duas ionizações: (i) a reação em meio ácido (pH < 2) representa a hidrólise do **DPP**⁺ e, (ii) entre pH 2,5 e 5 tem-se a reação da espécie zwitteriônica **DPP**[±] ($pK_2=2,73$). As reações acima de pH 9 são a hidrólise espontânea e alcalina de **DPP**⁻.

Na **Tabela 8** estão apresentadas as constantes de equilíbrio e parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste não-linear dos dados da **Figura 23** com a **Equação 7**.

$$k_{obs} = k_H \chi_{DPP^+} + k_{\pm} \chi_{DPP^\pm} + (k_0 + k_{OH}[OH]) \chi_{DPP^-} \quad (7)$$

$$k_{obs} = k_H \left(\frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2} \right) + k_{\pm} \left(\frac{K_1[H^+]}{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2} \right) + \left((k_0 + k_{OH}[HO^-]) \left(\frac{K_1K_2}{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2} \right) \right) \quad (8)$$



Esquema 34

A reação de hidrólise do **DPP** tem um comportamento diferenciado em relação aos diésteres de fosfato diarílicos derivados de fenóis.⁴ O perfil de pH para a hidrólise de **DPP** mostra as reações catalisadas por ácido e base separadas por uma pequena região independente de pH: a velocidade observada tem um mínimo em pH 9,4 - a qual é aproximadamente 5 vezes mais rápida que aquela calculada pela soma das contribuições catalisadas por ácido e base (k_{calc}).⁷⁴ E ainda, a constante de velocidade nessa região é cerca de 10000 vezes maior do que o previsto para a hidrólise espontânea de um diéster de fosfato diarílico simples com grupo de saída com $\text{p}K_{\text{a}}=9,09$; com base na correlação linear de energia livre medida especificamente para ésteres de fosfato diarílicos a 100°C (**Figura 14** na introdução).⁴ Além disso, esperar-se-ia que essa aceleração moderada deveria gerar uma região de patamar significativa no perfil de pH, mas como resultado da elevada reatividade da forma zwitteriônica **DPP[±]** (**Esquema 34**), a velocidade mínima é deslocada para um pH mais elevado (9-10) em comparação com perfis de pH de outros fosfatos diarílicos, que tipicamente apresentam mínimos na região de pH 4-5 (**Figura 13** na introdução).

A constante de velocidade (k_0, s^{-1}) mostrada na **Tabela 9**, que corresponde a um tempo de meia-vida de 70 anos, é o resultado de

um conjunto de melhores medidas feitas em diferentes concentrações de tampão no pH mínimo de 9,4-9,7, utilizando as concentrações máximas possíveis de substrato para que variação de absorvância fosse considerável. Essas medidas de constantes de velocidade suportam as seguintes conclusões: (i) A constante de velocidade na região independente de pH é muito elevada para ser explicada pela soma das reações catalisadas por ácido e base (**Figura 23**); (ii) Não há catálise por tampão com $pK_a < 10$. A presença ou ausência de catálise por tampão é um teste simples, mas geralmente de confiança para avaliar a eficiência da catálise intramolecular;⁴⁶ (iii) O produto inicial, o monoéster **PP** (**Esquema 33**), é hidrolisado mais rapidamente que o **DPP** em quase toda a faixa de pH, os cálculos de velocidades iniciais de grande parte das constantes de velocidade foram feitos com base na formação de 2 equivalentes de 2-piridona.

A hidrólise espontânea é, indiscutivelmente, a reação mais lenta do **DPP** e pode ser um pouco melhor definida a temperaturas mais elevadas. Nesse sentido, foram feitas medidas de constante de velocidade, especialmente na região independente de pH, sob as condições padrão de pH e tampão, em um faixa de temperaturas até 100°C (Os parâmetros termodinâmicos serão discutidos no item 4.3.5.) A constante de velocidade medida a 100°C é também mais rápida do que o previsto por um fator de aproximadamente 3000 vezes.⁴

Tabela 9 – Constantes de dissociação e parâmetros cinéticos para a hidrólise do **DPP**, a 25°C e força iônica 1,0 M.

	Contantes	pK_a	pK_{LG}^b
DPP⁺ (k_H, s^{-1})	$6,81 \pm 0,89 \times 10^{-3}$	$0,33 \pm 0,2$	0,75
DPP[±] ($k_{±}, s^{-1}$)	$3,56 \pm 0,44 \times 10^{-4}$	2,73 ^a	0,75
DPP⁻ (k_0, s^{-1})	$3,12 \pm 0,85 \times 10^{-10}$		9,09
DPP⁻ ($k_{OH}, M^{-1}s^{-1}$)	$1,47 \pm 0,26 \times 10^{-6}$		9,09

^aValor obtido por titulação potenciométrica (item 4.3.1). ^bValores obtidos da literatura.⁸⁴

As duas constantes de velocidade obtidas (k_{\pm} e k_0) são significativamente elevadas para um diéster de fosfato diarílico com grupo de saída de $pK_a = 9,09$. A constante de velocidade para a hidrólise da forma zwitteriônica (k_{\pm}) é facilmente explicada: a protonação do nitrogênio provoca a diminuição do pK_a do grupo piridínio em várias ordens de magnitude e, conseqüentemente, torna este um melhor grupo de saída (mais de 10^8 vezes menos básico comparado com o respectivo ânion).⁸⁴ Já a constante de velocidade para a hidrólise espontânea do diéster (k_0) é, de fato, significativamente mais rápida do que esperado: o valor observado de k_0 no pH mínimo é cerca de 10000 vezes maior do que o previsto para um diéster de fosfato derivado de um fenol de $pK_a = 9,09$.⁴ A partir desse resultado deu-se início a uma busca por uma explicação mecanística para a reatividade especial do **DPP**, inúmeros estudos experimentais e teóricos foram realizados neste trabalho e os resultados são discutidos a seguir.

4.3.3 Estudo cinético da reação de hidrólise do monoéster 2-piridil fosfato (PP)

A reação de hidrólise do monoéster 2-piridil fosfato (**PP**) foi estudada para auxiliar no cálculo das constantes observadas (k_{obs}) da reação de hidrólise do **DPP**. De fato, como mostram os resultados, o estudo da reação de hidrólise do monoéster **PP** foi fundamental para o cálculo das constantes de velocidade através das equações para reações consecutivas: para obtenção de k_1 (hidrólise do **DPP**, primeira etapa) as constantes k_2 (hidrólise do **PP**, segunda etapa) são mantidas fixas nos ajustes teóricos das curvas.

O monoéster **PP** foi obtido *in situ* na reação do diéster **DPP** com KOH 1M à 80°C, após 10 $t_{1/2}$ da reação de hidrólise do **DPP** nessas condições (aproximadamente 8 horas). A reação de hidrólise do **PP** foi acompanhada pela formação do produto 2-piridona. A reação foi estudada em função do pH/ H_0 e os resultados experimentais estão apresentados na **Figura 24**. O perfil de pH pode ser dividido em três regiões distintas: (i) reação catalisada por ácido, em baixos valores de pH, (ii) reatividade mínima em pHs elevados, e

(iii) máximo de velocidade perto pH 4, de acordo com o esperado para a hidrólise de monoésteres de fosfato.¹⁰⁶

O **Esquema 35** é consistente com os resultados experimentais e mostra que a reação é governada pelo equilíbrio entre cinco espécies do monoéster **PP**. A equação matemática, deduzida a partir do **Esquema 35** que descreve os dados experimentais em termos de constantes de velocidade e frações molares de espécies presentes está resumida na **Equação 9**. Nessa equação, as constantes k_{PP+} , $k_{PP\pm}$, k_{PP-} e k_{PP2-} correspondem às constantes de velocidade referentes às espécies protonada, zwitteriônica, aniônica e dianiônica, respectivamente. (**Esquema 35**). As **Equações 10-13** representam as frações molares para cada uma das espécies, de acordo com os equilíbrios de dissociação para um ácido triprótico. Na **Tabela 10** estão apresentadas as constantes de equilíbrio e parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste não-linear dos dados da **Figura 24** com a **Equação 9**.

$$k_{obs} = k_{PP+}\chi_{PP+} + k_{PP\pm}\chi_{PP\pm} + k_{PP-}\chi_{PP-} + k_{PP2-}\chi_{PP2-} \quad (9)$$

$$\chi_{PP+} = \left(\frac{[H^+]^3}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3} \right) \quad (10)$$

$$\chi_{PP\pm} = \left(\frac{K_1[H^+]^2}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3} \right) \quad (11)$$

$$\chi_{PP-} = \left(\frac{K_1K_2[H^+]}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3} \right) \quad (12)$$

$$\chi_{PP2-} = \left(\frac{K_1K_2K_3}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3} \right) \quad (13)$$

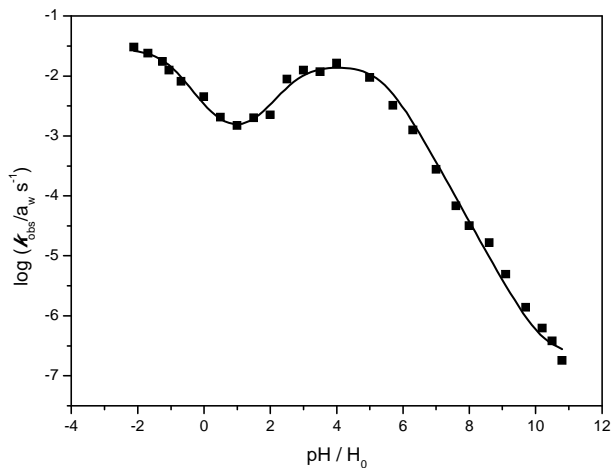
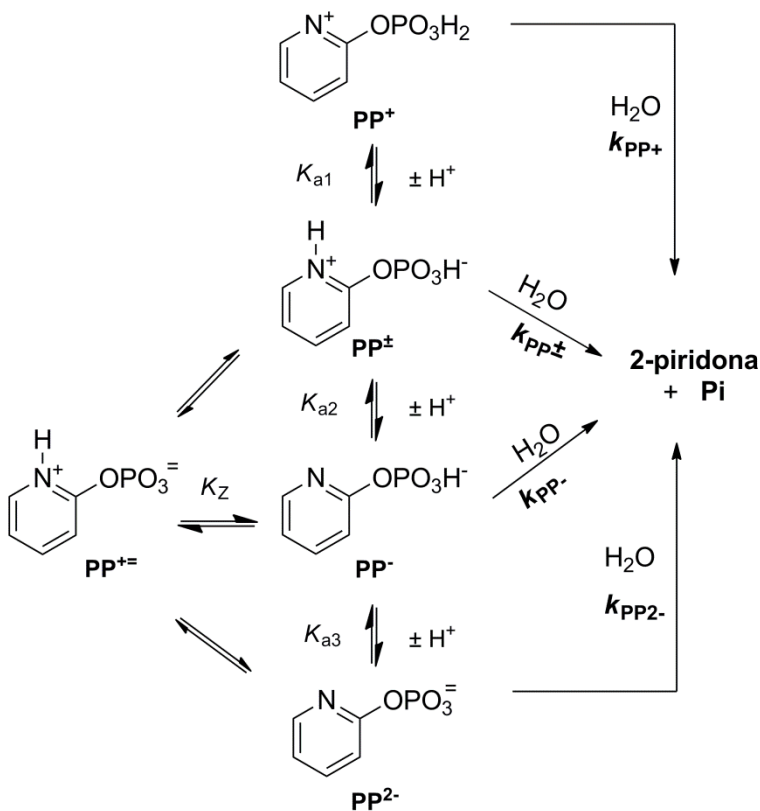


Figura 24 – Constante de velocidade observada (k_{obs}/a_w) em função de pH/H_0 para a reação de hidrólise do **PP** a 25°C e força iônica 1,0 M. Os pontos são experimentais, a linha corresponde ao ajuste teórico segundo a **Equação 9** e os parâmetros obtidos estão apresentados na **Tabela 10**. Os dados de (k_{obs}/a_w) em função de pH/H_0 estão no **ANEXO 6**.

Tabela 10 – Constantes de dissociação e parâmetros cinéticos para a hidrólise do **PP**, a 25°C e força iônica 1,0 M.

Resultados Cinéticos	
PP⁺ (k_{PP^+} , s^{-1})	$1,32 \pm 0,38 \times 10^{-2}$
PP[±] (k_{PP^\pm} , s^{-1})	$1,02 \pm 0,70 \times 10^{-3}$
PP⁻ (k_{PP^-} , s^{-1})	$2,87 \pm 1,04 \times 10^{-2}$
PP²⁻ ($k_{\text{PP}^{2-}}$, s^{-1})	$2,21 \pm 0,64 \times 10^{-7}$
$\text{p}K_{\text{a}1}$	$-1,02 \pm 0,3$
$\text{p}K_{\text{a}2}$	$2,62 \pm 0,3$
$\text{p}K_{\text{a}3}$	$5,62 \pm 0,2$

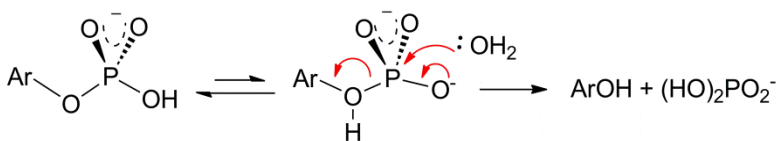


Esquema 35

O ajuste dos dados cinéticos da **Figura 24** fornece um conjunto de constantes de velocidade e de $pK_{a,s}$ (**Tabela 10**). Dois dos valores de $pK_{a,s}$ (pK_2 e pK_3) são compostos de pares de constantes microscópicas. Conforme representado no **Esquema 35**, provavelmente o segundo pK_a ($=2,62$) refere-se à constante de dissociação do nitrogênio piridínico, pois esse valor é muito próximo daquele obtido por titulação para o **DPP** (**Tabela 9**, $pK_{a2}=2,73$).

Além disso, o segundo pK_a de monoésteres de fosfato simples geralmente são mais altos que esse valor (em torno de 5 e 7, para monoésteres arílicos e alquílicos, respectivamente¹).

O máximo observado no perfil de pH em torno de pH 4 sugere que deve existir um equilíbrio com transferência de próton do oxigênio fosforílico da espécie aniônica PP^- para o nitrogênio da piridina levando a formação da espécie PP^{+} , a qual tem um bom grupo de saída. O monoéster na forma PP^{+} deve ser hidrolisado pelo mecanismo observado para a hidrólise de monoânions de monoésteres de fosfato, **Esquema 36**.^{35,113}



Esquema 36

O mecanismo representado no **Esquema 36**, no caso do monoéster 2-piridil fosfato, supostamente envolve o pré-equilíbrio de protonação do oxigênio do grupo de saída do monoéster aniônico, para gerar pequenas quantidades da espécie cineticamente equivalente e altamente reativa de monoéster (P^{+}). O equilíbrio correspondente $PP^- \rightleftharpoons PP^{+}$ deve ser relativamente favorável, pois os pK_a s do oxigênio fosforílico e nitrogênio piridínico do grupo de saída são próximos, **Tabela 10**.

Em linhas gerais, os monoésteres dianiônicos são menos reativos que os monoaniônicos, com exceção de monoésteres derivados de bons grupos de saída. De fato, monoésteres com grupos de saída bons e ruins apresentam comportamentos cinéticos distintos, o que tem sido explicado em termos de mecanismos diferentes. O mecanismo de hidrólise de espécies monoaniônicas de monoésteres de fosfato envolve transferência intramolecular de um próton para o grupo de saída, **Esquema 36**. Em princípio, um substituinte OH deveria ser semelhante a um grupo -OMe, em capacidade de doar elétrons. Porém, a hidrólise do monoânion metil fosfato é muito mais

rápida do que a dimetil fosfato: devido à protonação do grupo de saída, como indicado pelo valor reduzido de $\beta_{LG} = -0,27$ (100°C).⁴¹ Em geral, essa transferência depende da basicidade do grupo de saída, determinante no grau de ligação do próton com o oxigênio do grupo de saída. No estado de transição de substratos com bons grupos de saída, a transferência ocorre cedo na coordenada de reação, ou seja, pouca ligação entre o próton e o átomo de oxigênio do grupo de saída. Enquanto que, em monoésteres com grupos de saída ruins a transferência é mais tardia e a quebra P-O é pouco avançada. O aumento na velocidade da reação devido à transferência de próton para o grupo de saída é o principal motivo pelo qual a hidrólise dos monoésteres de fosfato mostra um pH ótimo em torno de 4, região de concentração máxima do monoânion.^{35,36,106,114-116}

4.3.4 Caracterização de produtos por RMN

Foram obtidos espectros sucessivos de RMN em função do tempo para a reação de hidrólise do **DPP** nas diferentes regiões do perfil de pH: inclinação ácida (pH 4), patamar (pH 9) e inclinação básica (pH 14). As reações em pH 4 e 14 foram acompanhadas à 25°C. Devido ao fato de que a reação é extremamente lenta em pH 9, os experimentos foram realizados à 100°C, durante mais de 50 dias, os espectros de RMN de ³¹P e ¹H estão nas **Figuras 25** e **26**, respectivamente. Os espectros obtidos nas reações em pH 4 e 14 estão no **ANEXO 7**. Os deslocamentos químicos das espécies observadas estão apresentados na **Tabela 11**. A relação da área dos picos de RMN permite a construção de gráficos de área relativa de produtos e reagentes em função do tempo. Os gráficos obtidos a partir dos dados das **Figuras 25** e **26** estão na **Figura 27 A** e **B**, respectivamente.

A análise de produtos por RMN mostra claramente que os únicos produtos da reação de hidrólise do **DPP** em pH 9 e 4, são fosfato inorgânico (**Pi**) e 2-piridona. Já em pH 14, foi observado a formação do monoéster **PP** e 1 equivalente de 2-piridona (**ANEXO 7**). Esses experimentos de RMN fornecem uma evidência química

concreta das observações obtidas previamente por espectrometria UV-Vis. Especialmente na região que se refere à hidrólise do diéster monoaniônico **DPP**⁻ (pH 9): onde tem-se o menor valor de constante de velocidade, a qual foi calculada pelo método das velocidades iniciais assumindo a formação de 2 equivalentes de piridona.

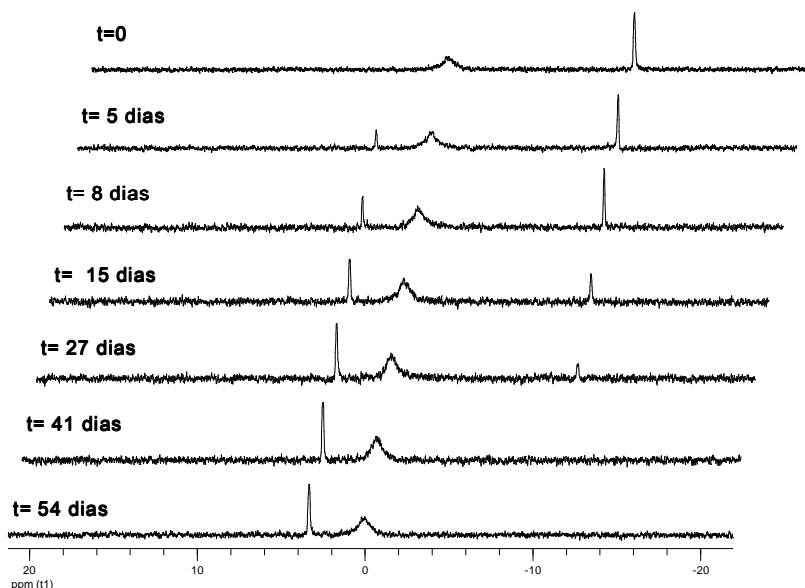


Figura 25 – Espectros sucessivos de RMN de ^{31}P para a reação de hidrólise do **DPP** em D_2O , a 100°C e pD 9.

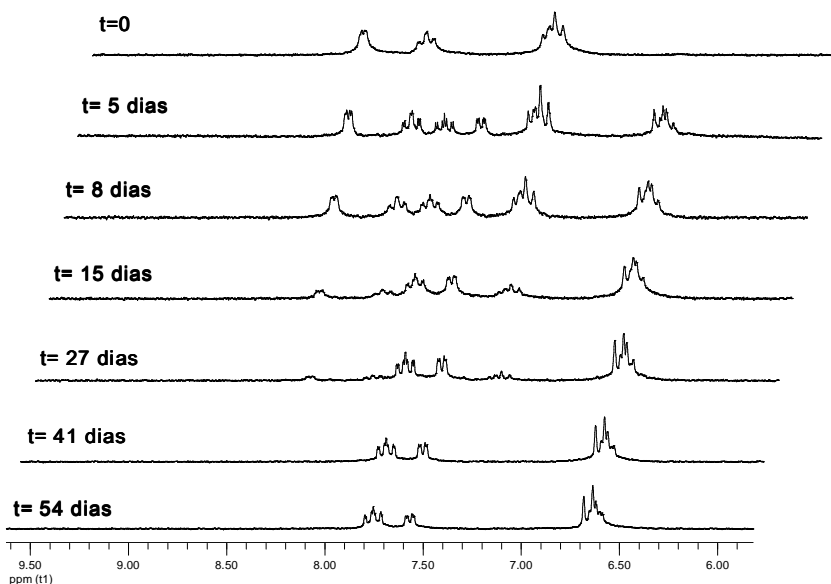


Figura 26 – Espectros sucessivos de RMN de ¹H para a reação de hidrólise do DPP em D₂O, a 100°C e pD 9.

Tabela 11 – Deslocamentos químicos de RMN de ¹H e ³¹P para as espécies observadas na reação de hidrólise do DPP.

Composto	RMN ¹ H δ ppm	RMN ³¹ P δ ppm
2-piridona	6,61 ppm (ddd, 1H, J= 7,2; 6,6; 1,2 Hz); 6,66 ppm (ddd, 1H, J= 9,2; 1,1; 1,1 Hz); 7,55 ppm (ddd, 1H, J= 6,6; 2,0, 0,8 Hz); 7,74 ppm (ddd, 1H, J= 9,4; 7,4; 2,3 Hz)	-
DPP	7,24 ppm (ddd, 1H, J= 8,2; 2,0; 0,8 Hz); 7,29 ppm (ddd, 1H, J= 7,4; 5,1; 0,8 Hz); 7,91 ppm (ddd, 1H, J= 8,2; 8,2; 2,0 Hz); 8,24 ppm (dd, 1H, J= 5,1; 2,0 Hz)	-11,22
Pi	-	3,24

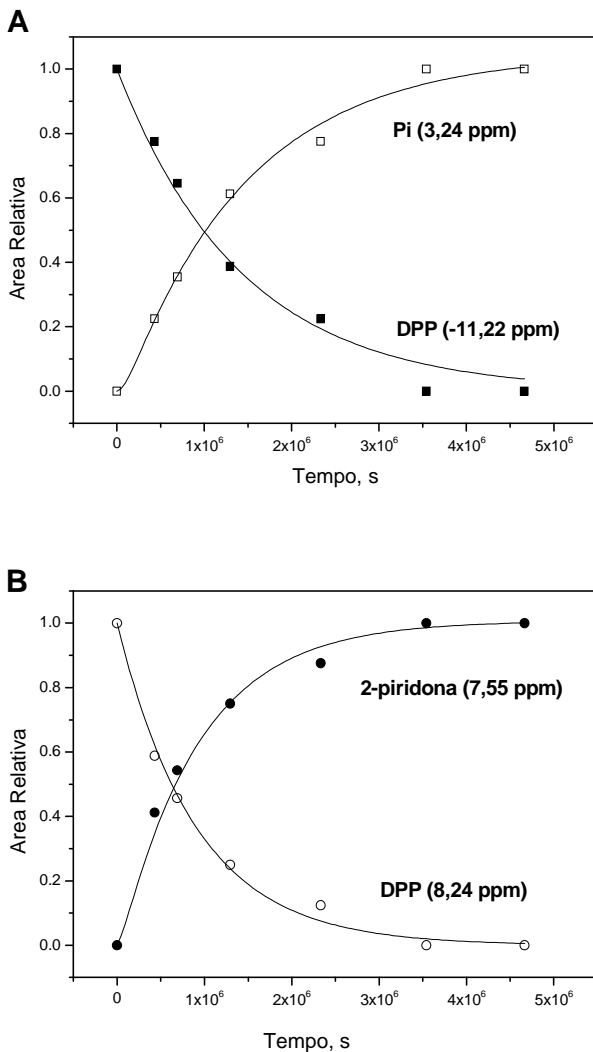


Figura 27 – Gráfico de área relativa *versus* tempo, calculado a partir dos espectros sucessivos de RMN de ^{31}P (A) e ^1H (B), da reação de hidrólise do DPP em pD 9, a 100°C.

4.3.5 Parâmetros termodinâmicos

A fim de obter os parâmetros de ativação para a reação de hidrólise do **DPP**, as constantes de velocidade foram determinadas na região do patamar no gráfico de perfil de pH (9-10) em diferentes temperaturas. Os dados para o k_0, s^{-1} (**Tabela 12**) fornecem uma excelente relação linear de Eyring, de acordo com um mecanismo constante no intervalo de 25-100°C, **Figura 28**. Os parâmetros termodinâmicos foram calculados com as **Equações 14-16**, onde k_b , h e R referem-se às constantes de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$) e universal dos gases ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), respectivamente.¹¹⁷

Tabela 12 – Constantes de velocidade observadas em diferentes temperaturas para a hidrólise do **DPP** em pH 9,4-9,7 (tampão CHES) e força iônica 1,0 M.

pH	T (°C)	k_{obs} (s^{-1})
9,4	25	$3,12 \times 10^{-10}$
9,4	45	$5,44 \times 10^{-9}$
9,7	60	$3,70 \times 10^{-8}$
9,7	75	$1,35 \times 10^{-7}$
9,7	90	$8,50 \times 10^{-7}$
9,7	100	$2,06 \times 10^{-6}$

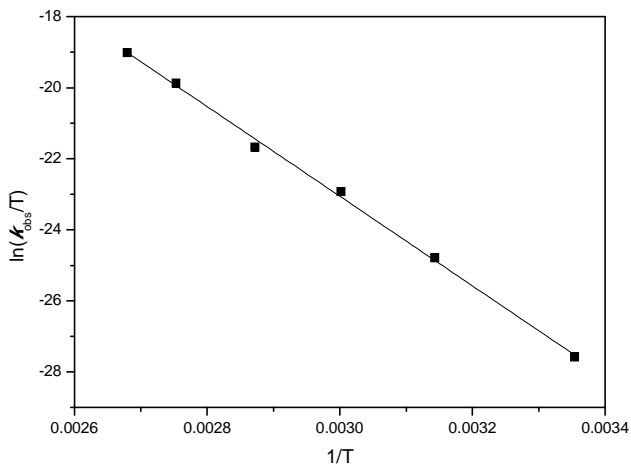


Figura 28 – Gráfico de $\ln(k_{obs}/T)$ vs T^{-1} para reação de hidrólise de **DPP** em pH 9,50 e $\mu=1,0$ (KCl).

$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = \left[\ln\left(\frac{k_b}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right] - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (14)$$

$$\Delta G^\ddagger = \ln\left(\frac{k_{obs}h}{k_bT}\right) RT \quad (15)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (16)$$

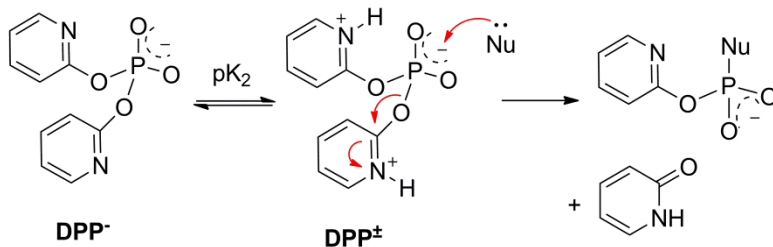
A **Tabela 13** compara dados de entalpia e entropia de ativação da hidrólise espontânea do **DPP** com dados importantes da literatura para diésteres de fosfato dialquílicos e diarílicos. Os dados do diéster **BMIPP**[±] estão incluídos, pois conforme mostrado na introdução, a hidrólise desse diéster ocorre via a combinação de catálise nucleofílica intramolecular e básica geral por dois imidazóis.⁸¹ Os dados da **Tabela 12** mostram claramente a eficiência da catálise nucleofílica intramolecular por nitrogênios imidazolinícos, expressa em termos de entalpia e entropia para a reação de hidrólise do **BMIPP** e no valor de ΔG (8,7 kcal.mol⁻¹). A aceleração modesta observada para a reação de hidrólise do **DPP** é perfeitamente representada por um aumento na entropia de ativação.

Tabela 13 – Parâmetros de ativação para a hidrólise espontânea de ânions de diésteres de fosfato.

Éster de fosfato	Reação	ΔH^\ddagger kcal.mol ⁻¹	ΔS^\ddagger cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG^\ddagger kcal.mol ⁻¹
Dimetil fosfato ¹¹⁸	C-O	25,0	-16,8	30,0
Dineopentil fosfato ¹¹⁹	P-O	29,5	-28,9	38,1
DPP	P-O	25,1	-17,8	30,4
BMIPP ^{± 80}	P-O	19,0	-9,05	21,7
BDNPP ⁴	P-O	19,0	-25,5	26,6

4.3.6 Mecanismo da Reação

O aumento significativo na constante de velocidade da reação de hidrólise espontânea do **DPP** a 25°C e 100°C é, em princípio, uma evidência da participação do(s) nitrogênio(s) piridínico(s) na reação. Vários mecanismos podem ser sugeridos: (i) uma reação envolvendo o ataque do íon hidróxido ao ácido conjugado **DPP[±]** (**Esquema 37**, Nu=HO⁻), a qual é cineticamente equivalente à reação envolvendo o ataque da água ao diéster aniônico (**DPP⁻**); (ii) catálise nucleofílica intramolecular pelo nitrogênio piridínico do grupo espectador; (iii) ataque direto da água ao **DPP⁻**; e (iv) ataque direto da água ao **DPP⁻** com assistência de um nitrogênio piridínico atuando como catalisador básico geral.



Esquema 37

Todas essas possibilidades mecanísticas são minuciosamente discutidas a seguir. O mecanismo (i) está discutido com base na reação com nucleófilos. Nucleófilos fortes, como hidroxilamina podem reagir mais rapidamente com quantidades muito pequenas de **DPP[±]**, mesmo em pHs elevados onde a espécie predominante no meio é o **DPP⁻**.

4.3.7 Reação do DPP com hidroxilamina

4.3.7.1 Estudo cinético

Na **Figura 29** está apresentado o perfil de pH para reação do **DPP** com hidroxilamina entre os pHs 5,0 e 9,0. Os resultados mostram que a velocidade da reação diminui com o aumento do pH, com um máximo de velocidade em pH 5 onde a forma protonada da hidroxilamina é dominante. Esse comportamento é distinto daquele observado normalmente para reações de ésteres de fosfato com hidroxilamina. Em geral, nas reações com ésteres de fosfato simples, por exemplo, aqueles derivados de fenóis, observa-se um aumento de velocidade com aumento do pH até uma região de patamar, onde a concentração da espécie neutra da hidroxilamina é máxima.^{26,63,120}

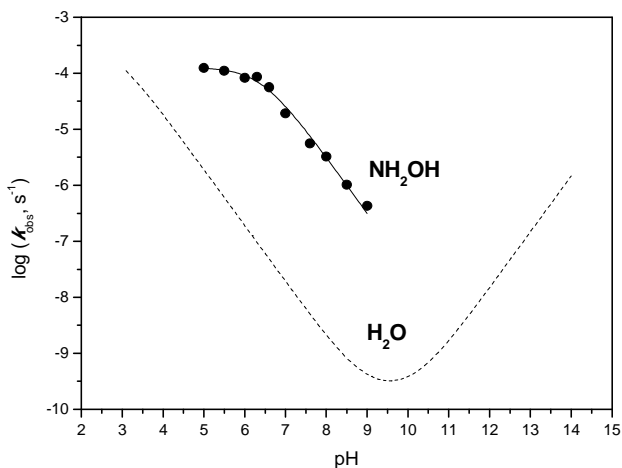


Figura 29 – Logaritmo da constante de velocidade observada (k_{obs}) em função do pH para a reação do **DPP** com $[\text{NH}_2\text{OH}] = 1,0\text{M}$ (●), a 25 °C. A linha pontilhada refere-se à reação em água. Os dados de k_{obs} em função do pH para a reação com hidroxilamina estão no **ANEXO 8**.

Para auxiliar a interpretação dos dados, um gráfico de distribuição de espécies foi construído de acordo com os pK_a s do **DPP** (**Tabela 9**) e da hidroxilamina ($pK_a=6,06$). Conforme mostra o gráfico de distribuição de espécies na **Figura 30**, na região entre pHs 4-5, onde tem-se os maiores valores de constante de velocidade observada, as frações molares mais significativas são: da espécie protonada da hidroxilamina (${}^+\text{NH}_3\text{OH}$) e monoaniônica do diéster de fosfato (**DPP**⁻). Essas espécies têm reatividades limitadas: o nucleófilo está na sua forma não reativa e, neste pH, a hidrólise do substrato tem um tempo de meia vida de aproximadamente 190 horas ($1,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$).

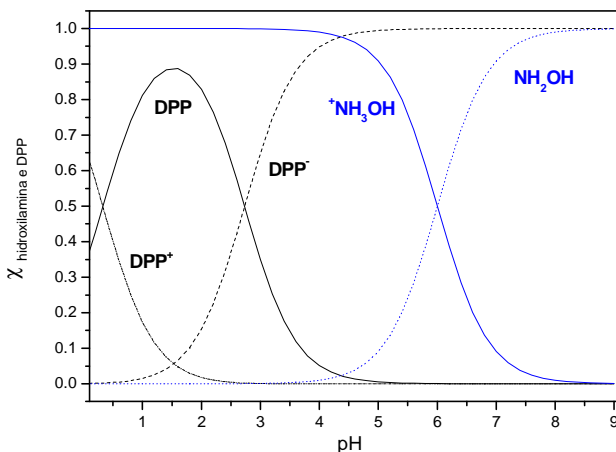
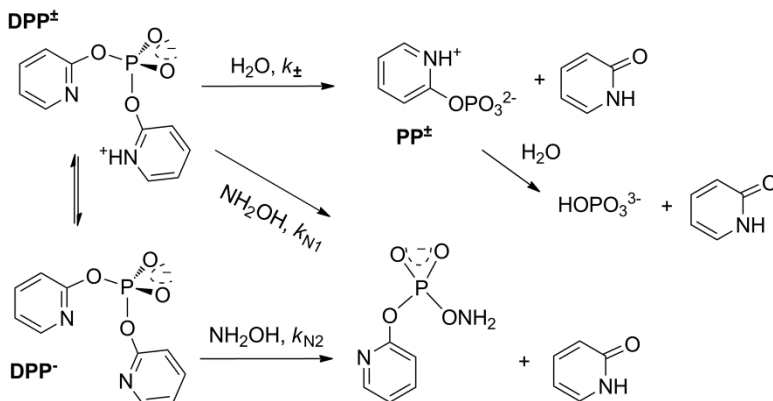


Figura 30 – Distribuição de espécies para substrato e nucleófilo em função do pH, de acordo com os pK_a s do **DPP** (obtido experimentalmente, **Tabela 8**) e com o valor da literatura para a hidroxilamina ($pK_a = 6,06$).

Os dados da **Figura 29** foram ajustados com a **Equação 17**, que considera: as reações da espécie neutra da hidroxilamina com **DPP** dipolar iônico (k_{N1}) e aniônico (k_{N2}), e a reação de hidrólise da espécie zwitteriônica do substrato ($k_{DPP\pm}$), conforme o **Esquema 38**. Os valores obtidos para cada constante, através do ajuste não linear

dos dados da **Figura 29**, estão na **Tabela 14**. Nessa tabela também está apresentado o valor obtido para efeito isotópico de solvente (k^H/k^D) em pD 5, a 25°C e $[\text{NH}_2\text{OH}]=1,0 \text{ M}$.

$$k_{obs} = (k_{N1}\chi_{\text{NH}_2\text{OH}} + k_{\text{DPP}^\pm}) \chi_{\text{DPP}^\pm} + k_{N2}\chi_{\text{NH}_2\text{OH}}\chi_{\text{DPP}^-} \quad (17)$$

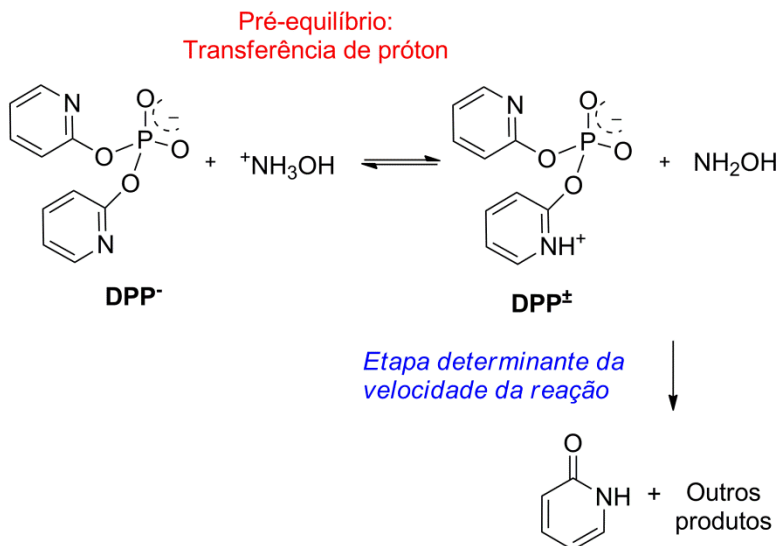


Esquema 38

Tabela 14 – Constantes utilizadas no ajuste não linear dos dados da **Figura 29** e efeito isotópico do solvente (k^H/k^D).

Constantes de velocidade		Constantes de dissociação	
$k_{N1}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	0,42	$\text{p}K_a(\text{DPP}^+)$	0,33
$k_{N2}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$2,40 \times 10^{-7}$	$\text{p}K_a(\text{DPP}^\pm)$	2,73
$\text{DPP}^\pm (k_{\pm}, \text{s}^{-1})$	$3,56 \times 10^{-4}$	$\text{p}K_a(\text{NH}_2\text{OH})$	6,06
Efeito isotópico do solvente (k^H/k^D) em pH(D) 5,0			
k_{obs}, s^{-1} em H ₂ O	$1,15 \times 10^{-4}$	$k^H/k^D=0,64$	
k_{obs}, s^{-1} em D ₂ O	$1,79 \times 10^{-4}$		

Os dados da **Tabela 14** mostram que a constante de velocidade para a reação do **DPP[±]** com **NH₂OH** (k_{N1}) é cerca de 10^3 vezes maior que para a reação de hidrólise do **DPP[±]**. Além disso, a contribuição da reação de **NH₂OH** com **DPP[±]** é mínima (k_{N2}), coerente com o pKa do grupo de saída do substrato (pKa=9,09). Possivelmente a reação acontece via transferência de próton da espécie protonada da hidroxilamina (**⁺NH₃OH**) para a forma aniônica do substrato (**DPP⁻**), conforme mostra o **Esquema 39**. Essa hipótese parece ser coerente, uma vez que, a hidroxilamina protonada não é reativa e, na faixa de pH onde tem-se valores expressivos de k_{obs} , mais de 90% da hidroxilamina presente está na sua forma protonada (**⁺NH₃OH**). O valor de efeito isotópico inverso obtido ($k^H/k^D < 1$), **Tabela 14**, é bastante coerente com a transferência de próton sugerida quando considera-se o conceito geral de catálise ácida específica, conforme mostrado no **Esquema 11** da Introdução. Mecanismos de reações orgânicas que envolvem esse tipo de catálise são conduzidos basicamente por duas etapas: transferência de próton em um pré-equilíbrio, o qual é seguido pela etapa determinante da velocidade. Esta não envolve transferência de próton e automaticamente fornece um valor de efeito isotópico inverso.⁷⁵ Os resultados cinéticos obtidos para a reação entre hidroxilamina e o diéster **DPP** sugerem que a reação ocorre com transferência de próton da espécie **⁺NH₃OH** para **DPP⁻**. Essa transferência de próton leva à formação das espécies altamente reativas: hidroxilamina neutra (**NH₂OH**) e diéster **DPP[±]**, o qual tem um bom grupo de saída (pKa=0,75).⁸⁴ Alguns cálculos teóricos foram realizados com o objetivo de confirmar essa proposta de mecanismo.



Esquema 39

4.3.7.2 Cálculos Teóricos

Reações aparentemente simples de transferência do grupo fosforila apresentam muitas peculiaridades e podem ser bastante complexas, assim como recentemente demonstrado com detalhes o envolvimento de águas na estabilização do estado de transição para um série de triésteres fosfóricos.⁴⁵ Nesse sentido, os cálculos teóricos constituem uma ferramenta de extrema importância na elucidação de mecanismos de reações orgânicas, muitas vezes esclarecendo questões que dificilmente poderiam ser explicadas através de procedimentos experimentais. Em princípio, os mecanismos considerados nos cálculos computacionais devem ser aqueles evidenciados experimentalmente.

Nesse sentido, cálculos teóricos foram realizados considerando a reação de **DPP[±]** com **NH₂OH**, espécies que são

formadas na etapa de pré-equilíbrio, de acordo com os resultados experimentais. De fato, os resultados teóricos corroboram com os dados experimentais, mostrando que o mecanismo sugerido experimentalmente é coerente, como segue. Para essa reação foram considerados: (i) unicamente o substrato e o nucleófilo; (ii) o envolvimento de uma molécula de água; e (iii) a participação de duas moléculas de água. Na **Tabela 15** estão apresentados os valores teóricos obtidos de energia livre de ativação, comparados com o valor experimental. O **Esquema 40** representa a reação estudada considerando os mecanismos na ausência e na presença de 1 molécula de água.

Tabela 15 – Energia livre de ativação e constantes de velocidade para a reação do **DPP** com hidroxilamina a 25°C, calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p).

Número de águas	k ($M^{-1}s^{-1}$)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)
Experimental	0,42	18,0
0	0,006	20,5
1	0,22	18,3
2	0,23	18,3

Os dados da **Tabela 15** mostram que o cálculo da energia livre de ativação forneceu um valor razoável comparado ao experimental, quando uma molécula de água é considerada na estabilização do estado de transição por ligação de hidrogênio. A adição de uma segunda molécula de água não provoca estabilização adicional do estado de transição. A reação acontece por meio de uma reação do tipo $S_N2(P)$, com o ataque do átomo de oxigênio da hidroxilamina ao átomo de fósforo. A estrutura do estado de transição para a reação com 1 molécula de água está representada na **Figura 31**. A forma zwitteriônica da hidroxilamina é considerada nos cálculos conforme os dados experimentais e teóricos já publicados na literatura para reações de hidroxilamina com ésteres de

fosfato que sugerem que o átomo de oxigênio da forma zwitteriônica da hidroxilamina é responsável pelo ataque nucleofílico nesses compostos.⁶⁵⁻⁶⁷

Os resultados de parâmetros estruturais de reagente, estado de transição e produto mostram um alongamento importante da ligação P_2-O_1 de 1,693Å a 1,840Å, indicando quebra de ligação substancial. De forma correspondente, a formação da ligação P_2-O_3 é observada no **TS**: de 5,917Å a 2,234Å. Por outro lado, as distâncias N_4-H_5 e $H_{10}-O_9$ não sofrem mudanças significativas de reagente a **TS**, o que indica que a molécula de água presente estabiliza o **TS** apenas por ligação de hidrogênio. (**Figura 31**) A análise dos ângulos diedrais mostra um estado de transição não planar com pouca rigidez, com um ângulo diedral $O_1-P_2-O_3-N_4$ de 132°. (A tabela de parâmetros estruturais está no **ANEXO 9**). O **TS** da etapa limitante da velocidade foi verificado por meio de cálculos de **IRC**, **Figura 32**. Assumindo a existência do pré-equilíbrio, foram considerados dois mínimos na superfície de energia: o mínimo global, que está identificado como **R1**; e o estado de transição conecta com o mínimo **R2**, **Figura 32**.

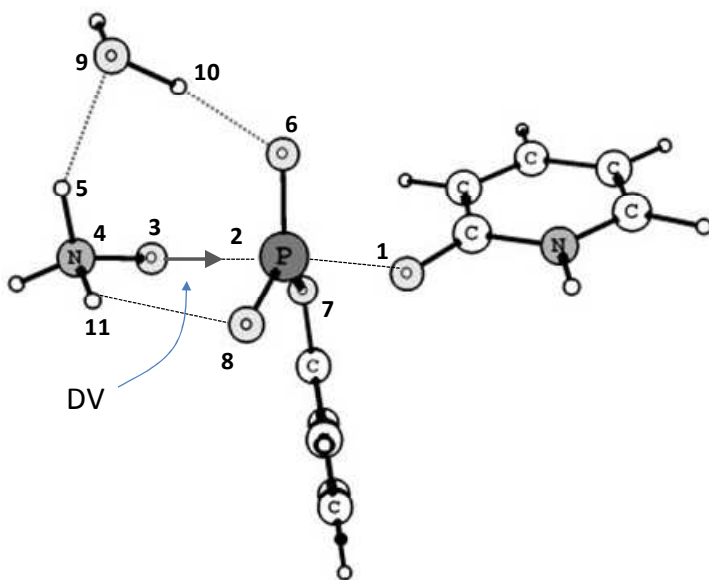
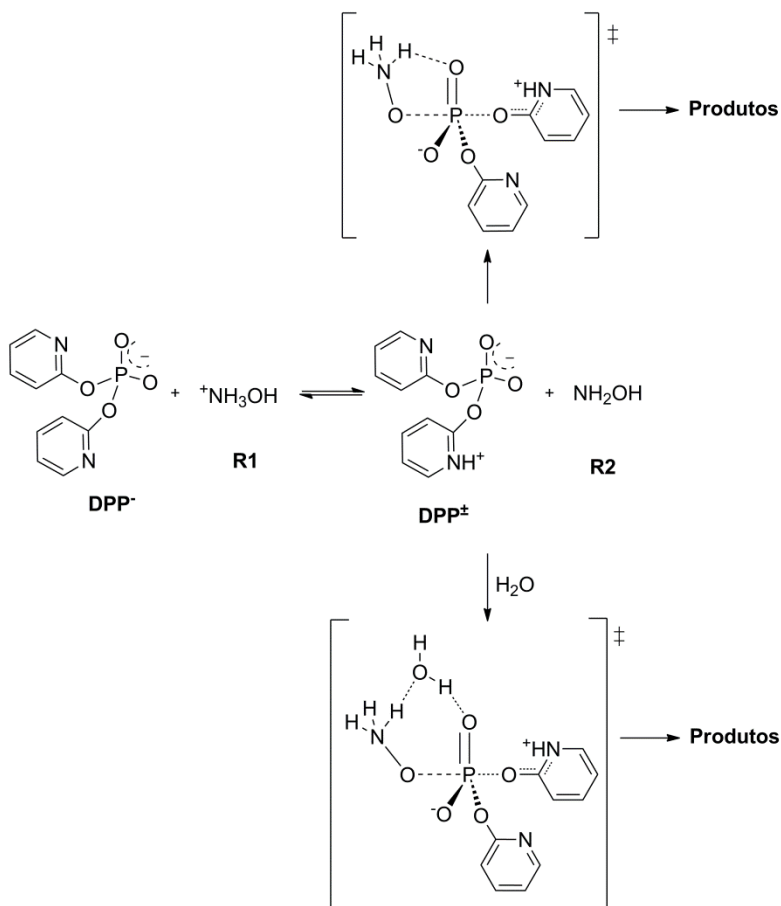


Figura 31 – Estrutura otimizada do estado de transição para a reação de **DPP** com hidroxilamina.



Esquema 40

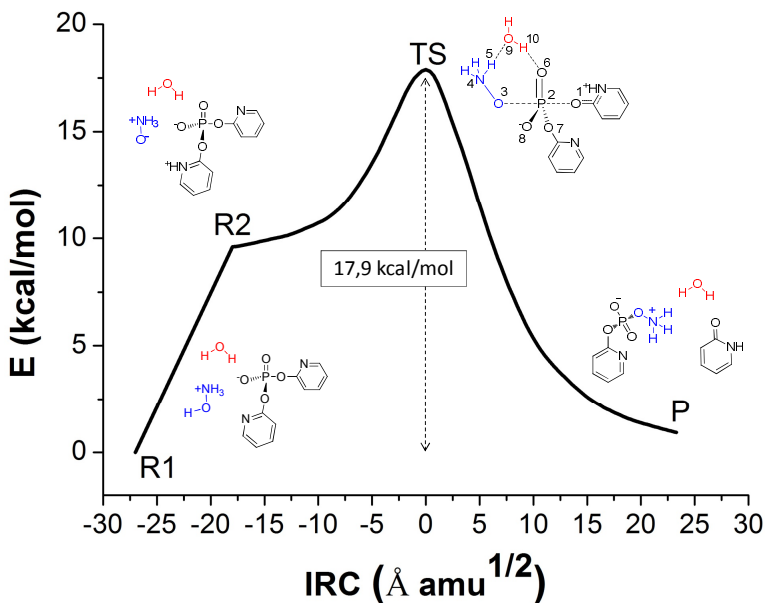


Figura 32 – Coordenada de reação intrínseca para a reação do **DPP** com **NH₂OH** com 1 molécula de água.

Para investigar a natureza do **TS**, foram realizados cálculos **NBO** para mudanças de ordem de ligação. Os índices de ligação de Wiberg (**Bi**) foram calculados para as ligações que sofreram alterações significantes na reação: **O₁-P₂** e **P₂-O₃**, **Tabela 16**.

Tabela 16 – Índices de ligação de Wiberg para reagente (**R**), estado de transição (**TS**) e produto (**P**), calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Mecanismo $SN_2(P)$ com 1 molécula de água.

	O_1-P_2	P_2-O_3	S_v
B_i^{R2}	0,5273	0,0003	
B_i^{TS}	0,3963	0,2302	
B_i^P	0,0006	0,5692	0,762
$\%E_v$	24,9	40,4	

As ordens de ligações estimadas indicam que a formação de ligação P_2-O_3 é a coordenada de reação mais avançada, cerca de 40%. Enquanto que, a quebra O_1-P_2 mostra uma evolução de aproximadamente 25%. Outras ordens de ligações não mudam significativamente. A evolução média na ordem de ligação é de 32,6%, indicando um estado de transição precoce na coordenada de reação, consistente com caráter associativo no estado de transição.

4.3.8 Reações com nucleófilos: mecanismo (i)

A primeira indicação de que a hidrólise espontânea de **TPP** não poderia ocorrer via catálise intramolecular foi a observação de catálise por tampão na região de patamar do perfil de pH.⁴⁶ Tampões ácidos e básicos são tipicamente ácidos, bases e nucleófilos mais fortes que a água neutra, porém não podem competir com a eficiência da catálise intramolecular.¹²¹ O efeito de tampão foi investigado com cuidado para a reação de hidrólise do **DPP**: foram realizados experimentos em diferentes concentrações de CHES ($pK_a=9,4$) a 25°C e 75°C, os dados estão na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Hidrólise do **DPP** em tampão CHES a 25 e 75°C, com força iônica 1,0 M.

[CHES], mM	pH	T (°C)	k_{obs} (s ⁻¹)
50	9,4	25	$2,0 \pm 0,2 \times 10^{-10}$
200	9,4	25	$1,4 \pm 0,2 \times 10^{-10}$
50	7,8	75	$3,2 \pm 0,03 \times 10^{-7}$
50	8,2	75	$1,6 \pm 0,02 \times 10^{-7}$
50	8,6	75	$1,1 \pm 0,01 \times 10^{-7}$
200	7,8	75	$2,6 \pm 0,02 \times 10^{-7}$
200	8,2	75	$1,5 \pm 0,01 \times 10^{-7}$
200	8,6	75	$1,1 \pm 0,01 \times 10^{-7}$

Obs: [DPP] = 15 mM. A variação total na absorvância em 294nm foi calculada considerando a formação de dois equivalentes de 2-piridona.

Os dados da **Tabela 17** mostram que nenhuma indicação de catálise por tampão foi observada para a reação de hidrólise do **DPP**. Ainda, pode-se observar nessa tabela que as constantes de velocidade são ligeiramente reduzidas em concentrações mais elevadas de tampão, provavelmente essa redução é provocada por efeito do meio.

Os resultados experimentais e teóricos da reação de hidroxilamina com **DPP** mostram claramente que esta envolve o ataque ao diéster dipolar iônico **DPP[±]**, uma vez que as constantes de velocidade são menores em pHs mais elevados (**Figura 29**), região onde **DPP[±]** e nucleófilo na forma de base livre são efetivamente as únicas espécie presentes no meio. Além do íon hidróxido, apenas a hidroxilamina é um nucleófilo forte o suficiente para reagir a uma velocidade mensurável com a forma aniônica do diéster **DPP⁻**. O nucleófilo alfa hidroxilamina reage (em pH > 10) com uma constante de velocidade ($2,42 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) próxima do valor observado para a reação com hidróxido ($14,7 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Reatividades semelhantes entre íon hidróxido e hidroxilamina são típicas para reações de diaril

e alquil aril fosfatos, em que não há ambiguidade mecanística, e permitem a escolha entre os mecanismos cineticamente equivalentes, **Tabela 18**. Ainda, a constante de velocidade de segunda ordem, para a reação de hidroxilamina com **DPP[±]** é de $0,42 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$: uma constante de velocidade de segunda-ordem para íon hidróxido (k_{OH^-}) igual a $58 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ seria necessária para que a reação de **DPP[±]** com hidróxido explicasse a constante de velocidade observada na região entre pH 8-11. A diferença de duas ordens de grandeza é um forte indicativo, assumido para a discussão posterior, de que a hidrólise espontânea da **DPP** muito provavelmente envolve uma reação da forma iônica predominante (**DPP[±]**).

Tabela 18 – Comparação de constantes de velocidade de segunda ordem para reações de hidróxido e hidroxilamina com diésteres de fosfato.

Diéster de fosfato	$k_2(\text{OH}^-), \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_2(\text{NH}_2\text{OH}), \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
Bis-2,4DNPP, 25°C	$2,92 \times 10^{-3} \text{ }^a$	$3,96 \times 10^{-3} \text{ }^a$
Me-2,4DNPP, 39°C	$8,40 \times 10^{-4} \text{ }^a$	$8,80 \times 10^{-4} \text{ }^a$
DPP⁻, 25°C	$14,7 \times 10^{-7}$	$2,42 \times 10^{-7}$
DPP[±], 25°C	$(58) \text{ }^b$	0,42

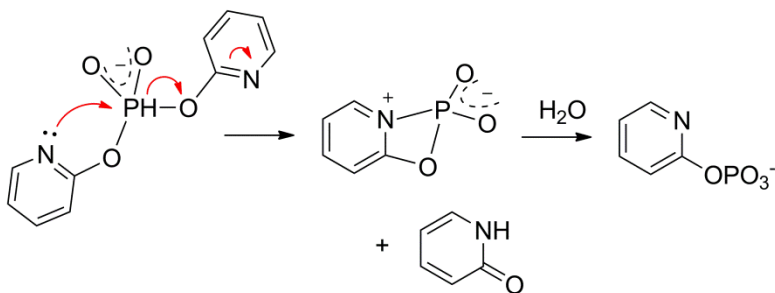
^a Dados da literatura. ¹⁰⁸ ^b Valor necessário para explicar k_0 pelo mecanismo (i).

4.3.9 Mecanismos (ii) e (iv): Catálise Intramolecular

Por que a catálise intramolecular é observada na hidrólise espontânea do **DPP⁻**, sendo que nenhum efeito importante é observado no caso do triéster correspondente **TPP**? Uma importante diferença é que os átomos de nitrogênio piridínicos do **DPP⁻** são substancialmente mais básicos ($\text{p}K_a=2,73$) que os nitrogênios do **TPP** ($\text{p}K_a=-0,22$).⁸⁶ O aumento observado na constante de velocidade da reação de hidrólise do **DPP** (k_0) é significativo e, normalmente, seria indicativo de catálise nucleofílica pelos nitrogênios piridínicos. Valores de molaridade efetiva (**ME**)¹²¹ não estão disponíveis na

literatura para catálise básica geral de hidrólise de diésteres fosfato catalisadas por piridinas, pois as reações observadas são essencialmente nucleofílicas.¹⁰⁸ No entanto, é possível fazer uma estimativa na ordem de 14 M para **ME** necessária para representar a constante de velocidade observada para a reação de hidrólise de **DPP**⁻ por uma piridina com $pK_a=2,73$ através de catálise nucleofílica (Os dados para estimativa de **ME** estão no **ANEXO 10**).

No caso de catálise nucleofílica intramolecular, a reação envolveria a formação de intermediário de 4 membros (**Esquema 39**) e um baixo valor de **ME** seria esperado e, portanto, o valor calculado de 14 M não é conclusivo. No entanto, um valor semelhante de **ME** seria esperado para a reação da espécie zwitteriônica **DPP**[±], que tem geometria idêntica para o ataque nucleofílico intramolecular. O valor de **ME** estimado para este sistema, com um grupo de saída muito melhor, porém com nucleófilo menos básico, é apenas 0,05: o que torna esse mecanismo muito menos provável também para a reação de hidrólise do **DPP**[±].



Esquema 41

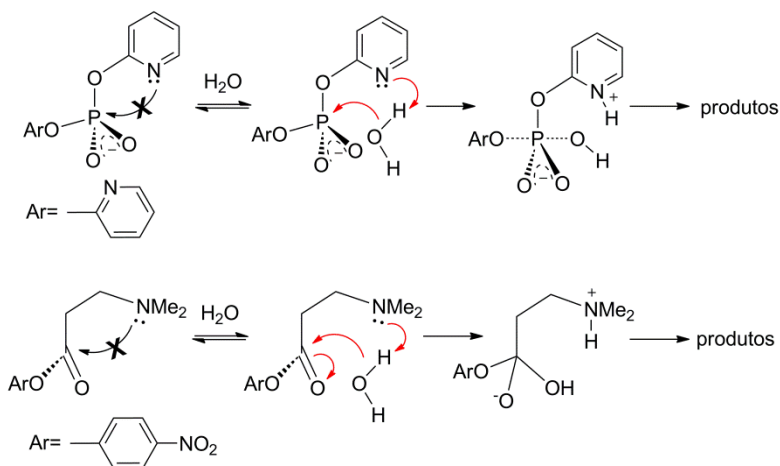
A evidência cinética coerente com catálise nucleofílica intramolecular, embora não exclusivamente coerente, é o baixo valor de efeito isotópico do solvente: $k^H/k^D=1,28$ a 25°C, **Tabela 19**. No entanto, esse número não é consideravelmente menor do que o efeito isotópico do solvente de 1,55 observado, a 39°C, para a hidrólise do **BDNPP**, a qual é supostamente uma reação do tipo $S_N2(P)$.⁴ Além

disso, a entropia de ativação ($\Delta S^\ddagger = -17,8 \text{ cal.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) também é incompatível com um estado de transição unimolecular, ainda que uma reação espontânea $S_N2(P)$ possa envolver água solvatada como o nucleófilo.

Tabela 19 – Efeito isotópico do solvente para a reação de hidrólise do **DPP**, medidas realizadas em triplicata em pH 9,4 (CHES) e força iônica 1,0 M.

Temperatura	Solvente	k_{obs} (s^{-1})	$k^{\text{H}}/k^{\text{D}}$
25°C	H ₂ O	$3,37 \times 10^{-10}$	1,28
	D ₂ O	$2,64 \times 10^{-10}$	
45°C	H ₂ O	$1,51 \times 10^{-8}$	1,20
	D ₂ O	$1,26 \times 10^{-8}$	

O efeito isotópico do solvente surpreendentemente baixo, $k^{\text{H}}/k^{\text{D}} = 1,28$ à 25°C, já foi demonstrado na literatura para a hidrólise do 4-nitrofenil 2-dimetilamino propionato (**Esquema 42**). Esse sistema exibe catálise básica-geral intramolecular porque a estrutura do substrato descarta a possibilidade de um mecanismo via catálise nucleofílica intramolecular, e foi obtido experimentalmente um valor de $k^{\text{H}}/k^{\text{D}} = 1,4$ à 39°C.¹²²



Esquema 42

4.3.10 Mecanismos $S_NP(2)$ – (iii)

O mecanismo "padrão" para a hidrólise espontânea de um diéster de fosfato diarílico envolve o deslocamento concertado do grupo de saída por uma molécula de água, a qual é assistida por outras moléculas de água que atuam como bases gerais deslocalizando a carga positiva em desenvolvimento. Existe na literatura um consenso geral de que as reações de hidrólise de diésteres de fosfato - certamente aqueles com bons grupos de saída - não envolvem a formação de intermediários pentacovalentes dianiônicos.⁴⁴ Todas as evidências experimentais sugerem que a reação de hidrólise espontânea do **DPP** ocorre com catálise intramolecular moderadamente eficiente, supostamente pelo nitrogênio piridínico, e ainda, sugerem fortemente que a reação envolve a água como nucleófilo imediato no ataque nucleofílico sobre o **DPP**.

Sendo que as reações intermoleculares de piridinas com diésteres reativos são essencialmente nucleofílicas, as constantes de velocidade apenas definem os limites superiores para a catálise

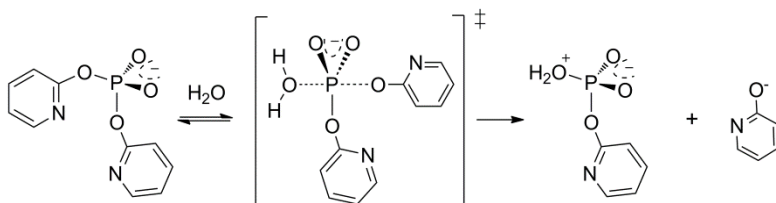
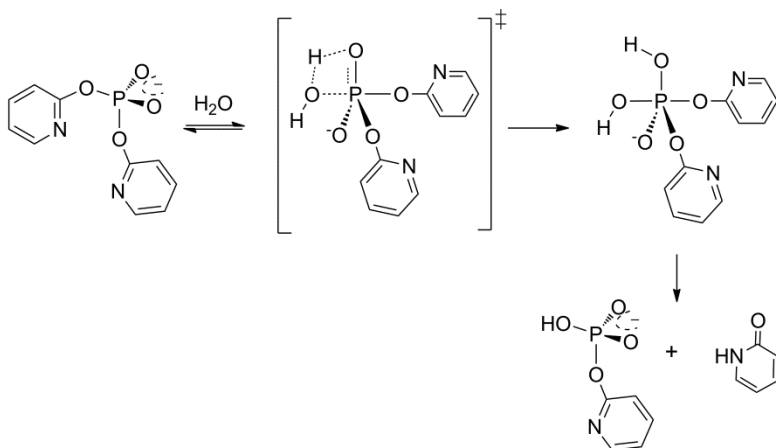
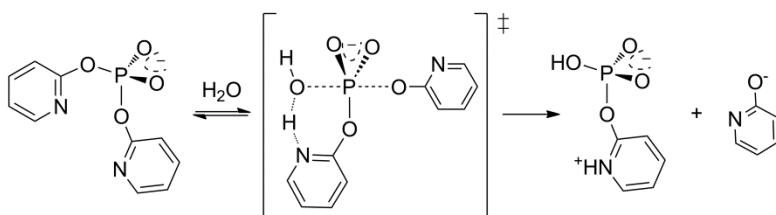
básica geral: de modo que os valores de **ME**, da ordem de 14M, estimados para a catálise nucleofílica representaria um limite inferior para **IGBC** (e ao mesmo tempo um valor relativamente elevado¹²¹). Contudo, os resultados experimentais não são suficientes para apoiar um mecanismo em particular. Nesse sentido, cálculos computacionais foram realizados para uma série de mecanismos possíveis para a hidrólise espontânea de **DPP**⁻, que permitem uma escolha elucidativa acerca do mecanismo. Para fins comparativos, foram realizados cálculos computacionais para um diéster simples: *bis*-4-clorofenil fosfato (**4-CIPP**) derivado de um fenol com pK_a igual a 9,38, próximo da 2-hidroxipiridina ($pK_a=9,09$).

4.3.11 Cálculos computacionais

A coordenada de reação foi avaliada para todas as possibilidades mecanísticas de hidrólise do **DPP**. Pontos estacionários estão localizados para caracterizar reagente (**R**), estado de transição (**TS**), intermediários e produtos, e assim foi obtida a energia livre de ativação. Cinco possíveis mecanismos foram considerados: (i) **Esquema 37**; (ii) **Esquema 41**, (iii) **Esquema 43**, (iiib) **Esquema 44** e (iv) **Esquema 45**.

O cálculo para o mecanismo (i), reação cineticamente equivalente de hidróxido com **DPP[±]** (**Esquema 37**), resultou em uma das mais altas energias livres de ativação, confirmando a conclusão, obtida a partir dos resultados cinéticos, de que esse mecanismo pode ser excluído. Mecanismos (ii), (iii), (iiib) e (iv) foram analisados com maiores detalhes. O mecanismo (ii) é o processo em duas etapas envolvendo catálise nucleofílica intramolecular pelo nitrogênio piridínico por meio de um estado de transição cíclico de 4 membros, **Esquema 42**. O intermediário formado é rapidamente convertido para produtos pelo ataque da água ao átomo de fósforo central (Essa etapa não foi considerada nos cálculos computacionais). Na ausência de uma molécula de água específica, o mecanismo (ii) naturalmente mostra a menor energia de ativação (**Tabela 20**), mas a energia livre de ativação calculada aumenta a medida que moléculas de água são adicionados ao cálculo, tornado-se imediatamente menos favorecido. Então, o mecanismo (ii) deve ser descartado, uma vez que a reação em estudo ocorre em meio aquoso. Enquanto que, mecanismo (iii) envolve o ataque do átomo de oxigênio da água ao átomo de fósforo com deslocamento do grupo de saída (**a**) de forma concertada ($S_N2(P)$), ou (**b**) por uma reação em etapas, **Esquemas 43 e 44**.

Finalmente, o mecanismo (iv) envolve o ataque do átomo de oxigênio da água ao átomo de fósforo assistido pelo átomo de nitrogênio do grupo espectador, **Esquema 45**. Os dados calculados para esses quatro mecanismos são comparados com o valor experimental na **Tabela 20**.

**Esquema 43****Esquema 44****Esquema 45**

Para os mecanismos do tipo $S_N2(P)$ - mecanismos **(iii)** - a adição de moléculas de água provocou a diminuição da barreira de energia livre. No caso do mecanismo concertado **(iiia)** a estabilização ocorreu com 3-5 H_2O , em um valor de 3-4 kcal.mol^{-1} acima do valor observado experimentalmente. Os cálculos teóricos para o diéster diarílico simples **4-CIPP**, descritos a seguir, forneceram um valor de energia livre de ativação consideravelmente maior, e bem próxima daquela esperada para um diéster de fosfato com o grupo de saída 4-clorofenol ($pK_a = 9,38$).

O mecanismo em duas etapas **(iiib)**, envolvendo um intermediário pentacoordenado e uma única molécula de H_2O , levou a um estado de transição com uma energia livre de ativação similar ao encontrado para o mecanismo $S_N2(P)$ concertado **(iiia)**. No entanto, as tentativas para otimizar a estrutura do intermediário pentacoordenado levaram à clivagem da ligação $P-O^{LG}$ e a reversão para um estado de transição bimolecular. A ligação $P-O^{LG}$ é mais longa no intermediário hipotético (1,824Å) que no estado de transição (1,690Å), indicando que o intermediário não é um mínimo de energia para a reação. Além disso, a adição de duas e três moléculas de água forneceu resultados semelhantes. Assim, o **(iiib)** não é suportado pelos cálculos. Resultados semelhantes para a hidrólise de diésteres de fosfato têm sido amplamente discutidos na literatura especializada:^{123,124} intermediários pentacoordenados são observados em condições fortemente ácidas¹²³ e, nesse caso, os diésteres estão presentes na forma neutra e comportam-se como triésteres de fosfato.

Tabela 20 – Constantes de velocidade e energia livre de ativação e para a reação de hidrólise do **DPP** a 25 °C, calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p).

Mecanismo	H ₂ O	$10^{10}k_{\text{calc}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\Delta G^\ddagger \text{ (kcal/mol)}$
i	1	$4,16 \times 10^{-7}$	39,8
	3	$2,39 \times 10^{-5}$	37,4
ii	0	$1,98 \times 10^{-3}$	34,8
	1	$2,54 \times 10^{-4}$	36,0
	2	$7,20 \times 10^{-5}$	36,8
iiia	1	$4,84 \times 10^{-7}$	39,7
	2	$5,24 \times 10^{-4}$	35,6
	3	$2,82 \times 10^{-3}$	34,1
	4	$2,42 \times 10^{-3}$	33,3
	5	$4,48 \times 10^{-3}$	34,3
iiib	1	$3,62 \times 10^{-7}$	39,9
iv	1	$1,72 \times 10^{-2}$	33,5
	2	0,84 (5630)	31,2 (32,7)
	3	0,52	31,5
Observado		3,12 (16000)	30,4 (31,7)

Obs.: Os números entre parênteses referem-se a valores calculados a 100°C.

Para o mecanismo (**iv**), a energia livre de ativação calculada está em excelente concordância com o valor experimental quando 2-3 moléculas de água estão presentes. Esse mecanismo é bastante coerente com o incremento observado na constante de velocidade observada na reação de hidrólise do **DPP** comparado com diésteres de fosfato com grupos de saída com valor de pK_a semelhante.⁴ Esse mecanismo foi examinado com maiores detalhes. O estado de

transição (**TS**) para a reação de hidrólise através do mecanismo (**iv**) foi verificada por meio de cálculos de IRC. O perfil obtido (**Figura 33**) é coerente com reação concertada em única etapa, com duas moléculas de água com papéis bem definidos em **TS** (Coordenadas cartesianas para reagente, complexo ativado e produto estão no **ANEXO 11**).

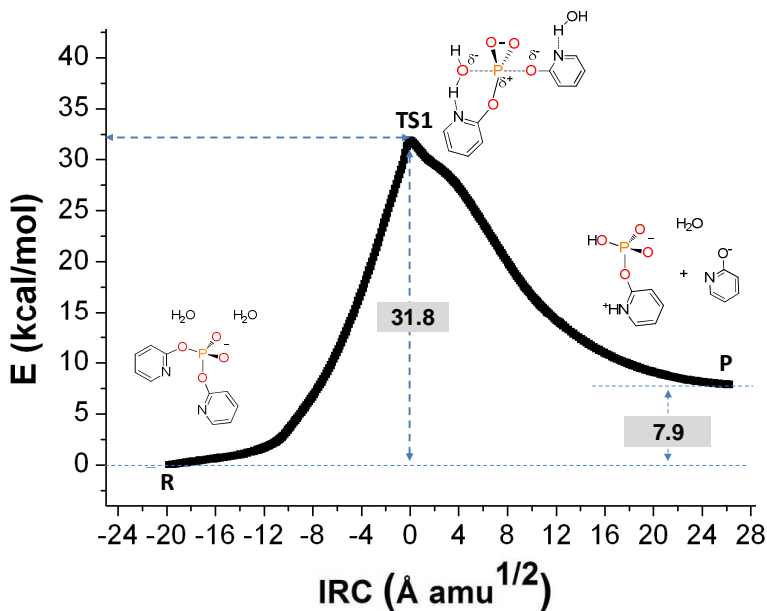


Figura 33 – IRC para a reação de hidrólise do **DPP**.

Para confirmar o incremento de velocidade observado para a hidrólise do **DPP** foram realizados cálculos teóricos para a reação de hidrólise do diéster **4-CIPP**. A hidrólise espontânea do **4-CIPP** tem uma constante de velocidade de hidrólise de $7,71 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ a 100°C e energia livre de ativação igual a $37,57 \text{ kcal.mol}^{-1}$.⁴ Foram realizados os cálculos teóricos para o mecanismo (**iiia**), considerando a participação de 2, 3 e 4 moléculas de água no **TS**. A energia livre de ativação calculada é cerca de 6 kcal.mol^{-1} maior que o valor

observado para o **DPP**, e o valor calculado é bem próximo do esperado para esse diéster a 100°C, **Tabela 21** (Coordenadas cartesianas para reagente, complexo ativado e produto estão no **ANEXO 11**).

Tabela 21 – Energia livre de ativação e constantes de velocidade para a reação de hidrólise do **4-CIPP** (**mecanismo iia**) a 100°C, considerando a participação de 2, 3 e 4 moléculas de água, calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p).

Moléculas de água	$10^{10}k$ (s ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)
2	$1,84 \times 10^{-7}$	40,3
3	15,49	37,1
4	7,71	37,6

Para uma comparação mais detalhada entre as reações de **DPP** e **4-CIPP**, também foi construído o **IRC** para a reação de hidrólise do **4-CIPP** (**TS2**) na presença de 3 moléculas de água, **Figura 34**. O **IRC** confirma a reação do tipo concertada com três moléculas de água com papéis bem definidos. Em especial, existe uma molécula de água que atua como catalisador básico-geral; **Figuras 35 e 36**.

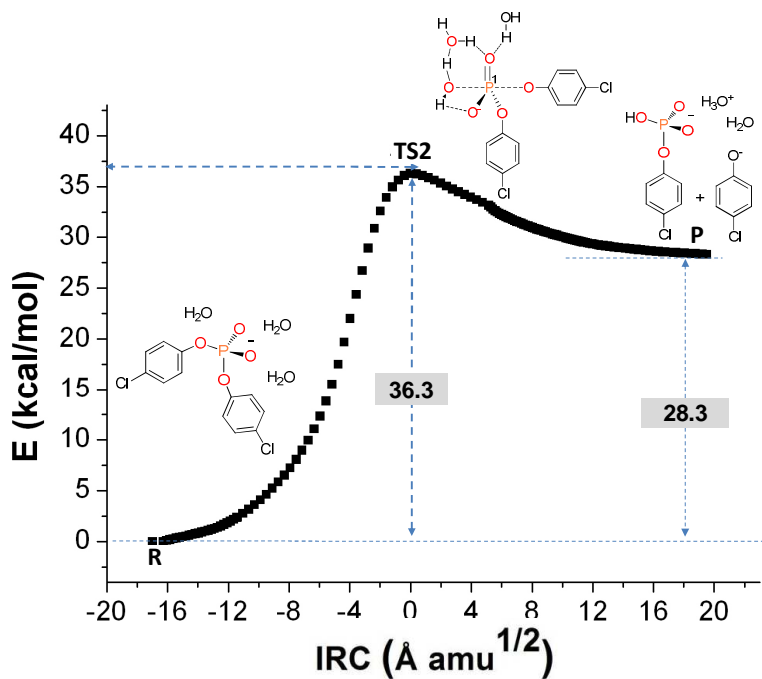
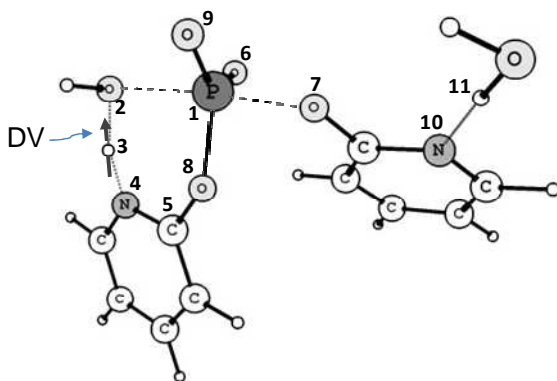
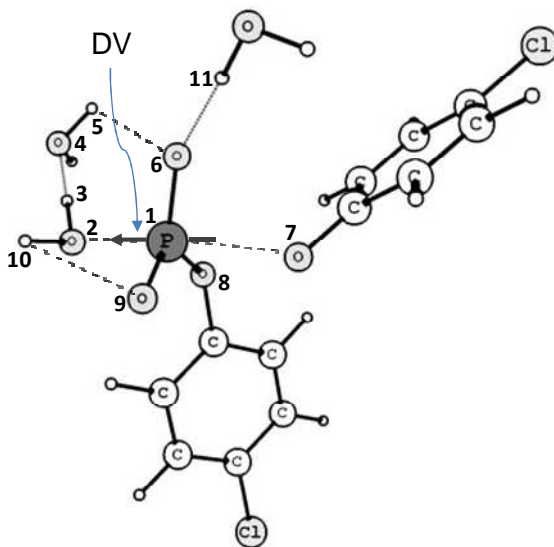


Figura 34 – IRC para a reação de hidrólise do 4-CIPP.



TS 1: DPP ($\nu_{\text{ima}} = 666.24 \text{ i cm}^{-1}$)



TS 2: 4-CIPP ($\nu_{\text{ima}} = 190.95 \text{ i cm}^{-1}$)

Figura 35 – Estruturas otimizadas dos complexos ativados nas reações de hidrólise de **DPP** (TS1) e **4-CIPP** (TS2).

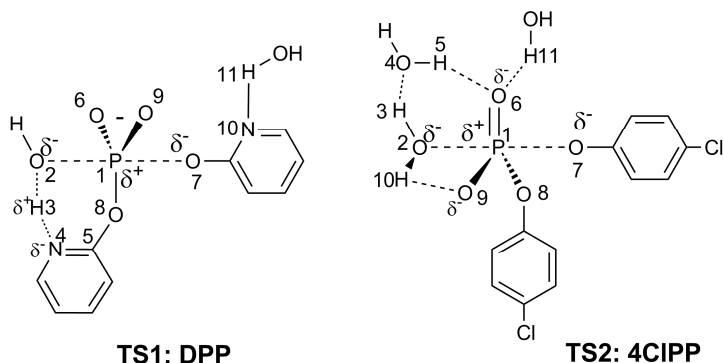


Figura 36 – Estados de transição para as reações de hidrólise de **DPP** (**TS1**) e **4-CIPP** (**TS2**).

Em cada caso, a reação de hidrólise é iniciada pela aproximação de uma molécula de água apropriadamente posicionada próxima ao átomo de fósforo, para formar um estado de transição pentacoordenado quase linear com o átomo de oxigênio do grupo de saída, conforme esperado para um mecanismo do tipo $S_N2(P)$. O ângulo de $O_2\text{---}P_1\text{---}O_7$ no complexo ativado é 171.60° e 172.57° com frequências imaginárias de $666,24i$ e $190,95i$ para **DPP** e **4-CIPP**, respectivamente, conduzindo à formação de produto (**Tabela 22**). O vetor deslocamento (**DV**), associado com a frequência imaginária, é coerente com um estado de transição no qual a formação da ligação $P_1\text{---}O_2$ e clivagem da ligação $P_1\text{---}O_7$ são concertadas. Esse vetor é descrito na **Figura 35** para mostrar a natureza física do efeito observado.

Tabela 22 – Parâmetros estruturais para reagente (**R**), estado de transição (**TS**) e produto (**P**), calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p).

Distâncias Interatômicas (Å)							
DPP							
	P₁-O₂	O₂-H₃	H₃-N₄	N₄-C₅	C₅-O₈	P₁-O₇	P₁-O₈
R	3,55	0,98	1,95	1,33	1,38	1,66	1,67
TS1	1,98	1,31	1,18	1,34	1,34	1,85	1,74
P	1,64	1,91	1,03	1,35	1,33	2,98	1,73
	P₁-O₆	P₁-O₉	N₁₀-H₁₁				
R	1,51	1,51	1,85				
TS1	1,52	1,52	1,80				
P	1,50	1,50	1,82				
4-CIPP							
	P₁-O₂	O₂-H₃	H₃-O₄	O₄-H₅	H₅-O₆	P₁-O₇	P₁-O₈
R	4,51	0,98	1,80	0,99	1,76	1,65	1,65
TS2	1,93	1,02	1,56	0,97	3,08	2,41	1,63
P	1,68	1,44	1,06	0,98	3,23	5,39	1,65
	P₁-O₆	P₁-O₉	O₆-H₁₁				
R	1,52	1,50	1,82				
TS2	1,50	1,50	1,82				
P	1,51	1,50	1,80				
				DPP	4-CIPP		
Ângulo O₂-P₁-O₇ de TS				171,60°	172,57°		
Frequência Imaginária (cm⁻¹)				666,24i	190,95i		

4.3.11.1 Análise de ordem de ligação

Com a finalidade de comparar a evolução do estado de transição com os respectivos reagentes, foram realizados cálculos de ordem de ligação (**NBO**) como implementado no Gaussian 09.¹²⁵⁻¹²⁸ Os índices de ligação de Wiberg foram estimados a partir de análise de população. Os processos de quebra e formação de ligação envolvidos na etapa determinante de velocidade da reação foram examinados em termos de Sincronicidade (S_y), conceito proposto por Moyano *et al.*¹²⁹ O parâmetro S_y fornece uma medida do grau de sincronicidade, variando de 0 a 1, no caso de processos puramente assíncronicos e síncronicos, respectivamente. Os índices resultantes são mostrados na **Tabela 23**. Os índices de ligação de Wiberg foram calculados para todas as ligações alteradas na reação de hidrólise, como mostrado na **Figura 36**. As outras ligações sofrem alterações insignificantes e não foram consideradas.

Tabela 23 – Índices de ligação de Wiberg para reagente (**R**), estado de transição (**TS**) e produto (**P**), calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31++G(d,p).

		<u>P₁-O₂</u>	<u>O₂-H₃</u>	<u>H₃-N₄</u>	<u>N₄-C₅</u>	S _y
	B_i^R	0,0032	0,6726	0,0553	1,3974	
	B_i^{TS1}	0,3613	0,2684	0,4498	1,2893	
	B_i^P	0,6651	0,0379	0,6766	1,2392	
DPP	%E _v	54,1	63,7	63,5	68,3	
		<u>C₅-O₈</u>	<u>O₈-P₁</u>	<u>P₁-O₇</u>		0,889
	B_i^R	0,9537	0,5930	0,5988		
	B_i^{TS1}	1,0603	0,5140	0,4256		
	B_i^P	1,1003	0,5030	0,0169		
	%E _v	72,7	87,8	29,8		
		<u>P₁-O₂</u>	<u>O₂-H₃</u>	<u>H₃-O₄</u>	<u>P₁-O₇</u>	S _y
4-CIPP	B_i^R	0,0004	0,6590	0,0646	0,6177	
	B_i^{TS2}	0,3433	0,5341	0,1367	0,1420	0,654
	B_i^P	0,5906	0,1710	0,4825	0,0002	
	%E _v	58,1	25,6	17,3	77,0	

4.3.11.2 Estado de transição e mecanismo

As distâncias interatômicas semelhantes P_1-O_2 de 1,98 Å e 1,93 Å nos estados de transição para as reações de **DPP** e **4-CIPP**, respectivamente, indicam quantidades comparáveis de formação de ligação com o nucleófilo. Porém, as distâncias com o grupo de saída P_1-O_7 , 1,85 Å e 2,41 Å (**Tabela 22**), diferem substancialmente. Evidentemente, o estado de transição para o processo de transferência do grupo fosforila é adiantado na coordenada de reação para o substrato mais reativo **DPP**, consistente com o envolvimento de um nitrogênio piridínico, o qual é uma base geral mais forte quando comparado a uma molécula de água. De tal modo que a transferência de prótons da água nucleofílica para o catalisador básico geral é mais avançada na coordenada de reação: O_2-H_3 aumenta de 0,98 para 1,31 Å no estado de transição para a reação de **DPP**, em comparação com 1,02 Å para **4-CIPP**. Sendo que, a carga positiva em desenvolvimento é estabilizada de forma mais eficaz pelo nitrogênio piridínico na reação de hidrólise do **DPP** do que a molécula de água do solvente, no caso do **4-CIPP**. A catálise básica geral mais efetiva é refletida também nos índices de ligação Wiberg (**Tabela 23**), os quais indicam que a transferência de próton para o nitrogênio no **TS** para a reação do **DPP** está aproximadamente 65% completa. Enquanto que, a transferência de prótons envolvidos na dispersão da carga positiva desenvolvida sobre a água nucleofílica está claramente atrasada na reação do **4-CIPP**.

Para a reação de hidrólise do **DPP** envolvendo **IGBC**, as ordens de ligações estimadas para formação e quebra de ligação no **TS** indicam que todas as ligações estão em mesmo grau de evolução na coordenada de reação, e as ligações diretamente envolvidas fornecem um valor de sincronicidade próximo da unidade ($S_y=0,889$). As coordenadas mais avançadas estão intimamente associadas à catálise básica geral pelo N_4 , com elevado grau de evolução na transferência de prótons do O_2 para o N_4 , mais de 50% de formação da nova ligação P_1-O_2 . A ligação com o grupo espectador P_1-O_8 , mostra o maior grau de evolução no **TS**, pois é afetada diretamente pelo decréscimo de eletrofilicidade no átomo de fósforo e pelo desenvolvimento de carga positiva no N_4 (87,8%,

Tabela 23). Apenas a clivagem da ligação com o grupo de saída (P_1-O_7) não mostra grande avanço (29,8%), no momento em que o TS é atingido.

Por outro lado, no caso do diéster **4-CIPP** a quebra da ligação P_1-O_7 é a coordenada mais avançada ($E_v=77,0\%$), seguido da formação da ligação P_1-O_2 ($E_v=58,1\%$). Esta reação é governada principalmente pelos grupos de saída. O processo é menos sincrônico para essa classe de compostos ($S_y = 0,654$), mas a transferência de próton envolvendo moléculas de água do solvente é necessária para catálise básica-geral. A segunda molécula de água atua como uma base geral, como indicado pelos avanços significativos na quebra O_2-H_3 e formação H_3-O_4 ao longo da coordenada de reação.

Essas diferenças são provavelmente a base para o baixo valor de efeito isotópico observado para a hidrólise do **DPP**, $k^H/k^D=1,28$ a 25°C . Reconhece-se que as magnitudes de tais efeitos podem ser reduzidos, quando há uma grande diferença de pK_a entre o doador e o receptor de prótons, resultando em um **TS** muito adiantado ou tardio.¹¹³ No presente caso, os dois requisitos são satisfeitos: a molécula de água doadora e piridina receptora de prótons tem pK_a s iguais a 15,7 e 2,73, respectivamente. A transferência de próton (H_3) do oxigênio O_2 para o nitrogênio N_4 está mais de 50% completa no estado de transição, tal como mostrado pelos cálculos de comprimento e ordem de ligação (**Tabelas 22 e 23**).

5 CONCLUSÕES

Nesta tese estudou-se: (i) a reação do fármaco deferoxamina com mono- e triéster de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol; (ii) o efeito de grupos espectadores em hidrólise de diésteres de fosfato; e (iii) a reação de hidrólise do diéster *bis*-2-piridil fosfato (**DPP**).

Os estudos cinéticos das reações do fármaco deferoxamina com mono- e triéster de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol permitem concluir que:

- (i) O incremento global na constante de velocidade de segunda-ordem de reação de quebra do triéster **DEDNPP** na presença de **DFO** chega a 10^7 vezes, comparado à reação de hidrólise espontânea. A constante de velocidade de segunda-ordem com **DFO** é apenas 2 vezes menor que aquela obtida para o nucleófilo altamente reativo **BHA**. Em contraste, as reações do monoéster **DNPP** com **DFO** e **BHA** são aceleradas modestamente, aproximadamente 20%, na presença de ambos os nucleófilos.
- (ii) A reatividade elevada na reação com o triéster de fosfato modelo **DEDNPP** sugere uma utilização adicional para o fármaco **DFO**, na reativação da acetilcolinesterase em casos de intoxicação aguda por compostos organofosforados. Os dados cinéticos adicionais para o paraoxon metílico foram importantes para confirmar que as conclusões em relação ao triéster de fosfato modelo **DEDNPP** podem ser estendidas para pesticidas organofosforados.

Os resultados de efeito de grupos espectadores em diésteres de fosfato mostram:

- (i) Foram sintetizados, e hidrolisados a 100°C, dois novos diésteres: 2,4-dinitrofenil fenil fosfato e 2,4-dinitrofenil 4-nitrofenil fosfato. Os dados de hidrólise de quatro diésteres do tipo **RO(PO₂⁻)–O-2,4-DNP** com um grupo de saída em comum (2,4-dinitrofenol) e diferentes grupos espectadores (**RO** = metil, fenil, 4-nitrofenil e 2,4-dinitrofenil) foram correlacionados como gráfico de Brønsted para os grupos espectadores. O gráfico de constante de velocidade *versus* pK_a do ácido conjugado do grupo espectador forneceu um valor β_{NLG} igual a $-0,031 \pm 0,001$, a 100°C.
- (ii) Os resultados trouxeram uma nova **LFER** à literatura especializada, a qual indica que a sensibilidade à natureza dos grupos espectadores em diésteres de fosfato é mínima. Esse comportamento é diferente do observado previamente para triésteres de fosfato triarílicos: $\beta_{\text{NLG}} = -0,35 \pm 0,02$, a 25°C. Seguramente essa desigualdade de sensibilidade ao grupo espectador está relacionada à diferença intrínseca entre os mecanismos que regem essas duas classes de fosfatos.

O estudo da reação de hidrólise do *bis*-2-piridil fosfato (**DPP**) permite concluir:

- (i) A constante de velocidade para a reação de hidrólise do **DPP**, na região de patamar de perfil de pH à 25°C, é cerca de 10000 vezes maior do que o previsto para a hidrólise espontânea de um diéster de fosfato diarílico simples com grupo de saída de pK_a similar.
- (ii) A reação de hidrólise do monoéster **PP**, produto inicial da hidrólise do diéster **DPP**, foi estudada em função do pH, mostrando claramente que a reação do monoéster é mais rápida que do diéster em quase toda a faixa de pH. O estudo dessa reação foi fundamentalmente importante para os cálculos das constantes de velocidade do **DPP**.
- (iii) Os resultados cinéticos da reação de hidroxilamina com **DPP** mostram que a reação ocorre com transferência de próton em um pré-equilíbrio, que leva à formação das espécies altamente reativas: hidroxilamina neutra (**NH₂OH**) e diéster protonado **DPP[±]**. A proposta de mecanismo foi confirmada por cálculos computacionais. A reação com hidroxilamina foi essencial para descartar a possibilidade de etapa de pré-equilíbrio na reação de hidrólise do **DPP**.
- (iv) Dentro de diferentes possibilidades de mecanismo, as evidências cinéticas e computacionais, combinadas em um estudo mecanístico detalhado, mostram que a reação de hidrólise espontânea de **DPP** ocorre com catálise básica-geral intramolecular pelo nitrogênio piridínico do grupo espectador.

REFERÊNCIAS

1. MANDER, L. N.; LIU, H.-W. **Comprehensive natural products II : chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier Science. 2010. 10 v.
2. WESTHEIMER, F. H. Why Nature Chose Phosphates. **Science**, v.235, p.1173. 1987.
3. MACHADO, V. G.; NOME, F. Energy-rich phosphate compounds. **Quim Nova**, v.22, p.351. 1999.
4. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. Reactivity of Phosphate Esters - Diester Hydrolysis. **J Chem Soc B**, p.510. 1970.
5. THATCHER, G. R. J.; KLUGER, R. Mechanism and Catalysis of Nucleophilic-Substitution in Phosphate-Esters. **Adv Phys Org Chem**, v.25, p.99. 1989.
6. DAVIS, B. D. On the Importance of Being Ionized. **Arch Biochem Biophys**, v.78, p.497. 1958.
7. NALLAPANENI, A.; LIU, J.; KARANTH, S.; POPE, C. Modulation of paraoxon toxicity by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Toxicology**, v.227, p.173. 2006.
8. LAVEY, B. J.; JANDA, K. D. Catalytic antibody mediated hydrolysis of paraoxon. **J Org Chem**, v.61, p.7633. 1996.

9. MOSS, R. A.; KANAMATHAREDDY, S.; VIJAYARAGHAVAN, S. Kinetics of cleavage of paraoxon and parathion by cetyltrimethylammonium iodosobenzoate. **Langmuir**, v.17, p.6108. 2001.
10. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. The chemistry of phosphate esters. **Quim Nova**, v.26, p.745. 2003.
11. VALE, J. A. Nerve agents: Why they are so toxic and can poisoning from these agents be treated? **Toxicology**, v.240, p.141. 2007.
12. MORETTO, A. Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. **Toxicol Lett**, v.509, p.102. 1998.
13. FIGUEROA-VILLAR, J. D.; DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. **J Brazil Chem Soc**, v.20, p.407. 2009.
14. KIM, K.; TSAY, O. G.; ATWOOD, D. A.; CHURCHILL, D. G. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. **Chem Rev**, v.111, p.5345. 2011.
15. SMITH, B. M. Catalytic methods for the destruction of chemical warfare agents under ambient conditions. **Chem Soc Rev**, v.37, p.470. 2008.

16. COLLINS, T. J.; CHANDA, A.; KHETAN, S. K.; BANERJEE, D.; GHOSH, A. Total degradation of fenitrothion and other organophosphorus pesticides by catalytic oxidation employing Fe-TAML peroxide activators. **J Am Chem Soc**, v.128, p.12058. 2006.
17. BROWN, R. S.; NEVEROV, A. A.; LIU, C. T.; BUNN, S. E.; EDWARDS, D.; WHITE, C. J.; MELNYCHUK, S. A. A simple DNase model system comprising a dinuclear Zn(II) complex in methanol accelerates the cleavage of a series of methyl aryl phosphate diesters by 10(11)-10(13). **J Am Chem Soc**, v.130, p.6639. 2008.
18. YANG, Y. C. Chemical detoxification of nerve agent VX. **Accounts Chem Res**, v.32, p.109. 1999.
19. RAUSHEL, F. M.; GHANEM, E.; LI, Y. C.; XU, C. F. Characterization of a phosphodiesterase capable of hydrolyzing EA 2192, the most toxic degradation product of the nerve agent VX. **Biochemistry-U.S**, v.46, p.9032. 2007.
20. ROCHUA, D.; CHABRIÈREA, E.; MASSONA, P. Human paraoxonase: A promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. **Toxicology**, v. 233, p.47. 2007.
21. JOKANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators. Structure-activity relationship and efficacy in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds. **Curr Med Chem**, v.16, p.2177. 2009.

22. CANNARD, K. The acute treatment of nerve agent exposure. **J Neurol Sci**, v.249, p.86. 2006.
23. EKSTRÖM, F.; AKFUR, C.; TUNEMALM, A.-K.; LUNDBERG, S. Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase. **Biochemistry**, v.45, p.74. 2006.
24. ASHANI, Y.; RADIC, Z.; TSIGELNY, I.; VELLOM, D. C.; PICKERING, N. A.; QUINN, D. M.; DOCTOR, B. P.; TAYLOR, P. Importance of aspartate-70 in organophosphate inhibition, oxime re-activation and aging of human butyrylcholinesterase. **J Biol Chem**, v.270, p.6370. 1995.
25. ORTH, E. S.; DA SILVA, P. L. F.; MELLO, R. S.; BUNTON, C. A.; MILAGRE, H. M. S.; EBERLIN, M. N.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Suicide Nucleophilic Attack: Reactions of Benzohydroxamate Anion with Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate. **J Org Chem**, v.74, p.5011. 2009.
26. KIRBY, A. J.; MANFREDI, A. M.; SOUZA, B. S.; MEDEIROS, M.; PRIEBE, J. P.; BRANDAO, T. A. S.; NOME, F. Reactions of alpha-nucleophiles with a model phosphate diester. **Arkivoc**, p.28. 2009.
27. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDAO, T. A. S.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reaction of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydrazine and hydrogen peroxide. Comparison of O- and N-phosphorylation. **J Org Chem**, v.69, p.7898. 2004.

28. ORTH, E. S.; MEDEIROS, M.; BORTOLOTTI, T.; TERENCEZI, H.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Dephosphorylation Reactions with Deferoxamine, A Potential Chemical Nuclease. **J Org Chem**, v.76, p.10345. 2011.
29. NOME, F.; SILVA, M.; MELLO, R. S.; FARRUKH, M. A.; VENTURINI, J.; BUNTON, C. A.; MILAGRE, H. M. S.; EBERLIN, M. N.; FIEDLER, H. D. The Mechanism of Dephosphorylation of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate in Mixed Micelles of Cationic Surfactants and Lauryl Hydroxamic Acid. **J Org Chem**, v.74, p.8254. 2009.
30. MELLO, R. S.; ORTH, E. S.; LOH, W.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Polymers Containing Hydroxamate Groups: Nanoreactors for Hydrolysis of Phosphoryl Esters. **Langmuir**, v.27, p.15112. 2011.
31. NOME, F.; SOUZA, B. S.; BRANDAO, T. A. S.; ORTH, E. S.; ROMA, A. C.; LONGO, R. L.; BUNTON, C. A. Hydrolysis of 8-Quinolyl Phosphate Monoester: Kinetic and Theoretical Studies of the Effect of Lanthanide Ions. **J Org Chem**, v.74, p.1042. 2009.
32. MANFREDI, A. M. **Reações de transferência do grupo fosforila catalisadas por oximas e íons Cu^{2+} em meio micelar.** (Dissertação) Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
33. NOME, F.; BRANDAO, T. A. S.; ORTH, E. S.; ROCHA, W. R.; BORTOLUZZI, A. J.; BUNTON, C. A. Intramolecular general acid catalysis of the hydrolysis of 2-(2'-imidazolium)phenyl phosphate, and bond length-reactivity correlations for reactions of phosphate monoester monoanions. **J Org Chem**, v.72, p.3800. 2007.

34. KIRBY, A. J.; ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; SOUZA, B. S.; PLIEGO, J. R.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles. **J Am Chem Soc**, v.132, p.8513. 2010.
35. COX, J. R.; RAMSAY, O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. **Chem Rev**, v.64, p.317. 1964.
36. HENGGE, A. C.; GRZYSKA, P. K.; CZYRYCA, P. G.; PURCELL, J. Transition state differences in hydrolysis reactions of alkyl versus aryl phosphate monoester monoanions. **J Am Chem Soc**, v.125, Oct 29, p.13106. 2003.
37. GUTHRIE, R. D.; JENCKS, W. P. Iupac Recommendations for the Representation of Reaction-Mechanisms. **Accounts Chem Res**, v.22, p.343. 1989.
38. ALLEN, K. N.; DUNAWAY-MARIANO, D. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. **Trends Biochem Sci**, v.29, p.495. 2004.
39. WILLIAMS, A. **Free energy relationships in organic and bio-organic chemistry**. Cambridge, UK: RSC. 2003.
40. JENCKS, W. P. General Acid-Base Catalysis of Complex Reactions in Water. **Chem Rev**, v.72, p.705. 1972.

41. KIRBY, A. J.; MORA, J. R.; NOME, F. New light on phosphate transfer from triesters. **Biochim Biophys Acta**, v.1834, p.454. 2013.
42. CLELAND, W. W.; HENGGE, A. C. Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. **Chem Rev**, v.106, p.3252. 2006.
43. HENGGE, A. C. Mechanistic studies on enzyme-catalyzed phosphoryl transfer. **Adv Phys Org Chem**, v.40, p.49. 2005.
44. LASSILA, J. K.; ZALATAN, J. G.; HERSCHLAG, D. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. **Annu Rev Biochem**, v.80, p.669. 2011.
45. MORA, J. R.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Theoretical Study of the Importance of the Spectator Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **J Org Chem**, v.77, p.7061. 2012.
46. KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; WANDERLIND, E. H.; AMER, A.; WILLIAMS, N. H.; NOME, F. Activating Water: Important Effects of Non-leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **Chem-Eur J**, v.17, p.14996. 2011.
47. RAPPOPORT, Z.; LIEBMAN, J. F. **The chemistry of hydroxylamines, oximes, and hydroxamic acids**. Chichester, England ; Hoboken, NJ: Wiley. 2009.

48. WOLFE, S.; MITCHELL, D. J.; SCHLEGEL, H. B.; MINOT, C.; EISENSTEIN, O. Theoretical-Studies of Sn₂ Transition-States, the Alpha Effect. **Tetrahedron Lett**, v.23, p.615. 1982.
49. HERSCHLAG, D.; JENCKS, W. P. Nucleophiles of High Reactivity in Phosphoryl Transfer-Reactions - Alpha-Effect Compounds and Fluoride-Ion. **J Am Chem Soc**, v.112, p.1951. 1990.
50. GERSTEIN, J.; JENCKS, W. P. Equilibria + Rates for Acetyl Transfer among Substituted Phenyl Acetates Acetylimidazole O-Acylhydroxamic Acids + Thiol Esters. **J Am Chem Soc**, v.86, p.4655. 1964.
51. EDWARDS, J. O.; PEARSON, R. G. Factors Determining Nucleophilic Reactivities. **J Am Chem Soc**, v.84, p.16. 1962.
52. REN, Y.; YAMATAKA, H. The alpha-effect in gas-phase S(N)₂ reactions: Existence and the origin of the effect. **J Org Chem**, v.72, p.5660. 2007.
53. DIXON, J. E.; BRUICE, T. C. Alpha-Effect .5. Kinetic and Thermodynamic Nature of Alpha-Effect for Amine Nucleophiles. **J Am Chem Soc**, v.94, p.2052. 1972.
54. HOZ, S. The Alpha Effect - on the Origin of Transition-State Stabilization. **J Org Chem**, v.47, p.3545. 1982.

55. PALLING, D. J.; JENCKS, W. P. Nucleophilic Reactivity toward Acetyl-Chloride in Water. **J Am Chem Soc**, v.106, p.4869. 1984.
56. UM, I. H.; BUNCEL, E. The origin of the alpha-effect: Dissection of ground-state and transition-state contributions. **J Org Chem**, v.65, p.577. 2000.
57. KIRBY, A. J.; VARVOGLIAG. Reactivity of Phosphate Esters - Reactions of Monoesters with Nucleophiles . Nucleophilicity Independent of Basicity in a Bimolecular Substitution Reaction. **J Chem Soc B**, p.135. 1968.
58. KIRBY, A. J.; DUTTA-ROY, N.; DA SILVA, D.; GOODMAN, J. M.; LIMA, M. F.; ROUSSEV, C. D.; NOME, F. Intramolecular general acid catalysis of phosphate transfer. Nucleophilic attack by oxyanions on the PO₃²⁻ group. **J Am Chem Soc**, v.127, p.7033. 2005.
59. KIRBY, A. J.; LIMA, M. F.; DA SILVA, D.; ROUSSEV, C. D.; NOME, F. Efficient intramolecular general acid catalysis of nucleophilic attack on a phosphodiester. **J Am Chem Soc**, v.128, p.16944. 2006.
60. KHAN, S. A.; KIRBY, A. J. Reactivity of Phosphate Esters - Multiple Structure Reactivity Correlations for Reactions of Triesters with Nucleophiles. **J Chem Soc B**, p.1172. 1970.
61. KIRBY, A. J.; TONDO, D. W.; MEDEIROS, M.; SOUZA, B. S.; PRIEBE, J. P.; LIMA, M. F.; NOME, F. Efficient Intramolecular General-Acid Catalysis of the Reactions of alpha-

Effect Nucleophiles and Ammonia Oxide with a Phosphate Triester. **J Am Chem Soc**, v.131, p.2023. 2009.

62. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDAO, T. A. S.; BUNTON, C. A.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Mechanisms of nucleophilic substitution reactions of methylated Hydroxylamines with bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. Mass spectrometric identification of key intermediates. **J Org Chem**, v.69, p.6024. 2004.

63. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reactions of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydroxylamine. **J Org Chem**, v.68, p.7051. 2003.

64. JENCKS, W. P. **Catalysis in chemistry and enzymology**. New York,: McGraw-Hill. 1969. (McGraw-Hill series in advanced chemistry)

65. KIRBY, A. J.; DAVIES, J. E.; BRANDAO, T. A. S.; DA SILVA, P. F.; ROCHA, W. R.; NOME, F. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Structure and reactivity of ammonia oxide. **J Am Chem Soc**, v.128, p.12374. 2006.

66. KIRBY, A. J.; DAVIES, J. E.; FOX, D. J.; HODGSON, D. R. W.; GOETA, A. E.; LIMA, M. F.; PRIEBE, J. P.; SANTABALLA, J. A.; NOME, F. Ammonia oxide makes up some 20% of an aqueous solution of hydroxylamine. **Chem Commun**, v.46, p.1302. 2010.

67. KIRBY, A. J.; SOUZA, B. S.; MEDEIROS, M.; PRIEBE, J. P.; MANFREDI, A. M.; NOME, F. Hydroxylamine as an oxygen

nucleophile. Chemical evidence from its reaction with a phosphate triester. **Chem Commun**, p.4428. 2008.

68. MENGER, F. M. On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity. **Accounts Chem Res**, v.18, p.128. 1985.

69. GESSER, J. C.; YUNES, S.; CLEMENTIN, R. M.; NOME, F. Reações intramoleculares como modelos não miméticos de catálise enzimática. **Quim Nova**, v. 20, p.631. 1997.

70. FERSHT, A. R.; KIRBY, A. J. Hydrolysis of Aspirin . Intramolecular General Base Catalysis of Ester Hydrolysis. **J Am Chem Soc**, v.89, p.4857. 1967.

71. FERSHT, A. R.; KIRBY, A. J. Structure and Mechanism in Intramolecular Catalysis . Hydrolysis of Substituted Aspirins. **J Am Chem Soc**, v.89, p.4853. 1967.

72. PIERRE, T. S.; JENCKS, W. P. Intramolecular Catalysis in the Reactions of Nucleophilic Reagents with Aspirin. **J Am Chem Soc**, v.90 p.3817. 1968.

73. FERSHT, A. R.; KIRBY, A. J. Intramolecular Nucleophilic Catalysis of Ester Hydrolysis by the Ionized Carboxyl Group. The Hydrolysis of 3,5-Dinitroaspirin Anion. **J Am Chem Soc**, v.90, p.5818. 1968.

74. KIRBY, A. J.; HOLLFELDER, F. **From enzyme models to model enzymes**. Cambridge: RSC Pub. 2009.

75. ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern physical organic chemistry**. Sausalito, CA: University Science. 2006.
76. MASKILL, H. **Structure and reactivity in organic chemistry**. Oxford ; New York: Oxford University Press. 1999.
77. KIRBY, A. J. Efficiency of proton transfer catalysis in models and enzymes. **Accounts Chem Res**, v.30, p.290. 1997.
78. KIRBY, A. J.; ASAAD, N. Concurrent nucleophilic and general acid catalysis of the hydrolysis of a phosphate triester. **J Chem Soc Perk T 2**, p.1708. 2002.
79. ABELL, K. W. Y.; KIRBY, A. J. Intramolecular General Acid Catalysis of Intramolecular Nucleophilic Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Diester. **J Chem Soc Perk T 2**, p.1171. 1983.
80. ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; MILAGRE, H. M. S.; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Intramolecular acid-base catalysis of a phosphate diester: Modeling the ribonuclease mechanism. **J Am Chem Soc**, v.130, p.2436. 2008.
81. ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; SOUZA, B. S.; PLIEGO, J. R.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles. **J Am Chem Soc**, v.132, p.8513. 2010.

82. ORTH, E. S.; WANDERLIND, E. H.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. **J Org Chem**, v.76, p.8003. 2011.
83. LIU, J.-Q.; WULFF, G. Functional Mimicry of Carboxypeptidase A by a Combination of Transition State Stabilization and a Defined Orientation of Catalytic Moieties in Molecularly Imprinted Polymers. **J Am Chem Soc**, v.130. 2008.
84. ALBERT, A.; PHILLIPS, J. N. Ionization Constants of Heterocyclic Substances .2. Hydroxy-Derivatives of Nitrogenous Six-Membered Ring-Compounds. **J Am Chem Soc**, p.1294. 1956.
85. WOLFE, S.; WEINBERG, N.; HSIEH, Y. The constitution of 2-hydroxypyridine in aqueous solution. **Theor Chem Acc**, v.118, p.265. 2007.
86. KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; BRANDAO, T. A. S.; NOME, F. Activating Water: Efficient Intramolecular General Base Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Triester. **Chem-Eur J**, v.15, p.8475. 2009.
87. FUKUTO, T. R.; METCALF, R. L. Structure and Insecticidal Activity of Some Diethyl Substituted Phenyl Phosphates. **J Agr Food Chem**, v.4, p.930. 1956.
88. FUKUTO, T. R.; METCALF, R. L. Reactivity of Some 2-P-Nitrophenoxy-1,3,2-Dioxaphospholane 2-Oxides and -Dioxaphosphorinane 2-Oxides. **J Med Chem**, v.8, p.759. 1965.

89. BARNARD, P. W.; VERNON, C. A.; LLEWELLYN, D. R.; WELCH, V. A.; BUNTON, C. A. Reactions of Organic Phosphates .5. Hydrolysis of Triphenyl and Trimethyl Phosphates. **J Chem Soc**, p.2670. 1961.
90. BARNARD, P. W. C.; BUNTON, C. A.; KELLERMA.D; MHALA, M. M.; SILVER, B.; VERNON, C. A.; WELCH, V. A. Reactions of Organic Phosphates .6. Hydrolysis of Aryl Phosphates. **J Chem Soc B**, p.227. 1966.
91. BUNTON, C. A.; FARBER, S. J.; FENDLER, E. J. Hydrolysis of P-Nitrophenyl Diphenyl Phosphate. **J Org Chem**, v.33, p.29. 1968.
92. BROMILOW, R. H.; KHAN, S. A.; KIRBY, A. J. Intramolecular Catalysis of Phosphate Triester Hydrolysis - Nucleophilic Catalysis by Neighboring Carboxy-Group of Hydrolysis of Diaryl 2-Carboxyphenyl Phosphates. **J Chem Soc Perk T 2**, p.911. 1972.
93. MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of Phosphate-Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents. **J Org Chem**, v.48, n.4, p.588. 1983.
94. HAUSER, C. R.; JR RENFROW, W. B. Benzohydroxamic acid. **Org Syn Coll**, v.2, p.67. 1943.
95. FIFE, T. H.; BRUICE, T. C. The temperature dependence of the ΔpD correction for the use of the glass electrode in D_2O . **J Phys Chem**, v.65. 1961.

96. MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. **J Phys Chem B**, v.113, p.6378. 2009.
97. BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. D. P. Sideróforos: "uma resposta dos microorganismos". **Quim Nova**, v.25, p.1155. 2002.
98. FARKAS, E.; ENYEDY, E. A.; CSOKA, H. A comparison between the chelating properties of some dihydroxamic acids, desferrioxamine B and acetohydroxamic acid. **Polyhedron**, v.18, p.2391. 1999.
99. MAGGIO, A. Light and shadows in the iron chelation treatment of haematological diseases. **Brit J Haematol**, v.138, n.4, Aug, p.407. 2007.
100. KONTOGHIORGHES, G. J. Comparative Efficacy and Toxicity of Desferrioxamine, Deferiprone and Other Iron and Aluminum Chelating Drugs. **Toxicol Lett**, v.80, p.1. 1995.
101. CAPPELLINI, M. D.; PATTONERI, P. Oral Iron Chelators. **Annu Rev Med**, v.60, p.25. 2009.
102. ABETZ, L.; BALADI, J. F.; JONES, P.; ROFAIL, D. The impact of iron overload and its treatment on quality of life: results from a literature review. **Health Qual Life Out**, v.4, 2006.

103. LEDERMAN, H. M.; COHEN, A.; LEE, J. W. W.; FREEDMAN, M. H.; GELFAND, E. W. Deferoxamine - a Reversible S-Phase Inhibitor of Human-Lymphocyte Proliferation. **Blood**, v.64, p.748. 1984.
104. BECTON, D. L.; ROBERTS, B. Antileukemic Effects of Deferoxamine on Human Myeloid-Leukemia Cell-Lines. **Cancer Res**, v.49, p.4809. 1989.
105. DAYANI, P. N.; BISHOP, M. C.; BLACK, K.; ZELTZER, P. M. Desferoxamine (DFO) - mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer. **J Neuro-Oncol**, v.67, p.367. 2004.
106. KIRBY, A. J.; VARVOGLIAG. Reactivity of Phosphate Esters . Monoester Hydrolysis. **J Am Chem Soc**, v.89, p.415. 1967.
107. MEDEIROS, M.; ORTH, E. S.; MANFREDI, A. M.; PAVEZ, P.; MICKE, G. A.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Dephosphorylation Reactions of Mono-, Di-, and Triesters of 2,4-Dinitrophenyl Phosphate with Deferoxamine and Benzohydroxamic Acid. **J Org Chem**, v.77, p.10907. 2012.
108. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. Reactivity of Phosphate Esters - Reactions of Diesters with Nucleophiles. **J Chem Soc B**, p.1165. 1970.
109. COX, B. G. **Modern Liquid Phase Kinetics**. New York: Oxford University Press. 2005.

110. BROWN, R. S.; ZAMKANEI, M. Hydrolysis of neutral phosphate and phosphonate esters catalysed by Co^{2+} -chelates of tris-imidazolyl phosphines. **Inorg Chim Acta**, v.108, p.201. 1985.
111. ÅKERLÖF, G.; TEARE, J. W. Thermodynamics of concentrated aqueous solutions of hydrochloric acid. **J Am Chem Soc**, v.59, p.1855. 1937.
112. MCQUARRIE, D. A.; SIMON, J. D. **Physical Chemistry: A molecular Approach**; University Science Books: Mill Valley, CA. 1997.
113. GRZYSKA, P. K.; CZYRYCA, P. G.; PURCELL, J.; HENGGE, A. C. Transition state differences in hydrolysis reactions of alkyl versus aryl phosphate monoester monoanions. **J Am Chem Soc**, v.125, p.13106. 2003.
114. HENGGE, A. C.; EDENS, W. A.; ELSING, H. Transition-State Structures for Phosphoryl-Transfer Reactions of P-Nitrophenyl Phosphate. **J Am Chem Soc**, v.116, p.5045. 1994.
115. WILLIAMS, N. H.; LAD, C.; WOLFENDEN, R. The rate of hydrolysis of phosphomonoester dianions and the exceptional catalytic proficiencies of protein and inositol phosphatases. **P Natl Acad Sci USA**, v.100, p.5607. 2003.
116. BIANCIOTTO, M.; BARTHELAT, J. C.; VIGROUX, A. Reactivity of phosphate monoester monoanions in aqueous solution. 2. A theoretical study of the elusive zwitterion intermediates $\text{RO}^+(\text{H})\text{PO}_3^{2-}$. **J Phys Chem A**, v.106, p.6521. 2002.

117. LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 2001.
118. WOLFENDEN, R.; RIDGWAY, C.; YOUNG, G. Spontaneous hydrolysis of ionized phosphate monoesters and diesters and the proficiencies of phosphatases and phosphodiesterases as catalysts. **J Am Chem Soc**, v.120, p.833. 1998.
119. SCHROEDER, G. K.; LAD, C.; WYMAN, P.; WILLIAMS, N. H.; WOLFENDEN, R. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiesteres and of DNA. **P Natl Acad Sci USA**, v.103, p.4052. 2006.
120. MEDEIROS, M. **Estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e um triéster de fosfato: caracterização de produtos e intermediários**. (Dissertação). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
121. KIRBY, A. J. Effective Molarities for Intramolecular Reactions. **Adv Phys Org Chem**, v.17, p.183. 1980.
122. KIRBY, A. J.; LLOYD, G. J. E1cb Mechanism for Ester Hydrolysis - Evidence for a Dianion Intermediate in Hydrolysis of Aryl Malonate Anions. **J Chem Soc Perk T 2**, p.1762. 1976.
123. ICHE-TARRAT, N.; BARTHELAT, J. C.; RINALDI, D.; VIGROUX, A. Theoretical studies of the hydroxide-catalyzed P-O cleavage reactions of neutral phosphate triesters and diesters in aqueous solution: Examination of the changes induced by H/Me substitution. **J Phys Chem B**, v.109, p.22570. 2005.

124. ZHOU, D. M.; TAIRA, K. The hydrolysis of RNA: From theoretical calculations to the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of RNA. **Chem Rev**, v.98, p.991. 1998.
125. FRISCH, M. J. G. W. T., H. B. S., G. E. SCUSERIA, M. A. ROBB, J. R. CHEESEMAN, G. SCALMANI, V. BARONE, B. MENNUCCI, G. A. PETERSSON, H. NAKATSUJI, M. CARICATO, X. LI, H. P. HRATCHIAN, A. F. IZMAYLOV, J. BLOINO, G. ZHENG, J. L. SONNENBERG, M. HADA, M. EHARA, K. TOYOTA, R. FUKUDA, J. HASEGAWA, M. ISHIDA, T. NAKAJIMA, Y. HONDA, O. KITAO, H. NAKAI, T. VREVEN, J. A. MONTGOMERY, JR., J. E. PERALTA, F. OGLIARO, M. BEARPARK, J. J. HEYD, E. BROTHERS, K. N. KUDIN, V. N. STAROVEROV, R. KOBAYASHI, J. NORMAND, K. RAGHAVACHARI, A. RENDELL, J. C. BURANT, S. S. IYENGAR, J. TOMASI, M. COSSI, N. REGA, J. M. MILLAM, M. KLENE, J. E. KNOX, J. B. CROSS, V. BAKKEN, C. ADAMO, J. JARAMILLO, R. GOMPERTS, R. E. STRATMANN, O. YAZYEV, A. J. AUSTIN, R. CAMMI, C. POMELLI, J. W. OCHTERSKI, R. L. MARTIN, K. MOROKUMA, V. G. ZAKRZEWSKI, G. A. VOTH, P. SALVADOR, J. J. DANNENBERG, S. DAPPRICH, A. D. DANIELS, O. FARKAS, J. B. FORESMAN, J. V. ORTIZ, J. CIOSŁOWSKI, AND D. J. FOX. . **Gaussian 09, Revision A.02 Wallingford CT**. 2009.
126. LENDVAY, G. Bond Orders from Abinitio Calculations and a Test of the Principle of Bond Order Conservation. **J Phys Chem**, v.93, p.4422. 1989.
127. REED, A. E.; WEINSTOCK, R. B.; WEINHOLD, F. Natural-Population Analysis. **J Chem Phys**, v.83, p.735. 1985.

128. REED, A. E.; CURTISS, L. A.; WEINHOLD, F. Intermolecular Interactions from a Natural Bond Orbital, Donor-Acceptor Viewpoint. **Chem Rev**, v.88, p.899. 1988.

129. MOYANO, A.; PERICAS, M. A.; VALENTI, E. A Theoretical-Study on the Mechanism of the Thermal and the Acid-Catalyzed Decarboxylation of 2-Oxetanones (Beta-Lactones). **J Org Chem**, v.54, p.573. 1989.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 – Constantes de velocidade observada em função do pH para as reações de DEDNPP com DFO 0,01M a 25°C e força iônica 1,0 M.	168
ANEXO 2 – Área de $m/z = 339$ e $m/z = 384$ em função tempo para a reação de hidrólise dos diésteres assimétricos, a 100°C.	168
ANEXO 3 - Titulação do DPP por RMN	169
ANEXO 4 – Cálculo de constante de velocidade observada, a partir de equações de reações consecutivas, para a reação de hidrólise do DPP a 25°C e força iônica 1,0 M.	169
ANEXO 5 – Constantes de velocidade observada (k_{obs}/a_w) em função de pH ou ($pH < 0$) para hidrólise do DPP a 25°C e força iônica 1,0M.	172
ANEXO 6 – Constantes de velocidade observada (k_{obs}/a_w) em função de pH ou ($pH < 0$) para a hidrólise do PP a 25°C e força iônica 1,0 M.	173
ANEXO 7 – Caracterização de produtos por RMN	174
ANEXO 8 – Constante de velocidade observada (k_{obs}) em função do pH para a reação do DPP com $[NH_2OH] = 1,0M$ (●), a 25°C.	179
ANEXO 9 – Parâmetros estruturais para reagente (R), estado de transição (TS) e produtos (P) para a reação do DPP com NH_2OH , calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Mecanismo $SN_2(P)$ com 1 água.	180
ANEXO 10 – Constantes de velocidade de segunda ordem, k_N ($M^{-1} min^{-1}$, 39°C) para reações de piridinas com diésteres de fosfato.	181
ANEXO 11 – Cálculos Teóricos para reações de hidrólise de diésteres de fosfato.	182

ANEXO 1 – Constantes de velocidade observada em função do pH para as reações de **DEDNPP** com **DFO** 0,01M a 25°C e força iônica 1,0 M.

pH	$10^4 k_{obs}, s^{-1}$	pH	$10^4 k_{obs}, s^{-1}$
7,07	1,17	9,80	98,4
7,47	2,20	10,08	113
8,01	6,77	10,34	130
8,51	16,1	10,50	136
9,04	38,2	10,60	138
9,30	65,3	10,90	142
9,52	77,1	11,30	146
9,70	92,9	11,48	149

ANEXO 2 – Área de m/z =339 e m/z= 384 em função tempo para a reação de hidrólise dos diésteres assimétricos, a 100°C.

Tempo, min	Area(m/z 339)	Tempo, min	Area(m/z 384)
0	1,42E7	0	1,44E6
45	1,19E7	30	1,28E6
90	1,17E7	60	1,27E6
150	9,61E6	90	1,26E6
195	8,87E6	120	1,07E6
240	1,02E7	180	981000
285	7,95E6	240	737000
330	5,45E6	300	732000
390	6,13E6	330	617000
450	5,00E6	420	435000
510	4,59E6	480	332000
600	3,95E6	540	243000
825	1,64E6	570	277000
1410	826000	600	235000
1605	463000	660	209000
1740	402000	1365	8410
1875	203000	1425	9090
		1485	8360
		1725	4800

ANEXO 3 - Titulação do DPP por RMN

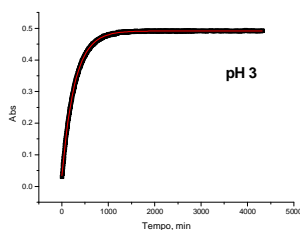
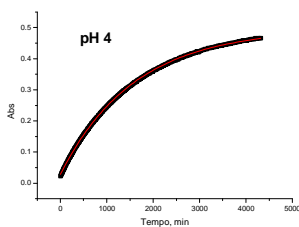
ANEXO 3.1 – Dados para a titulação do DPP por RMN de ^{31}P

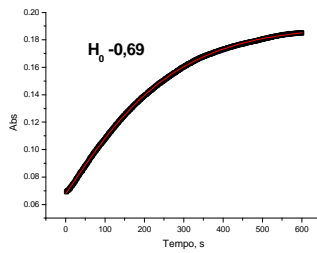
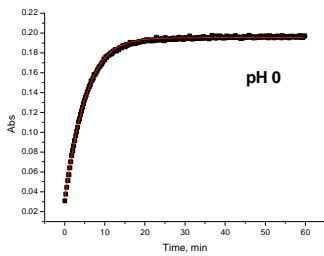
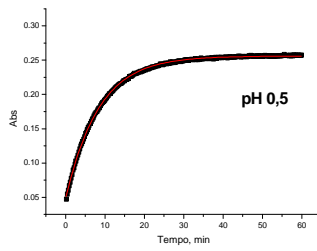
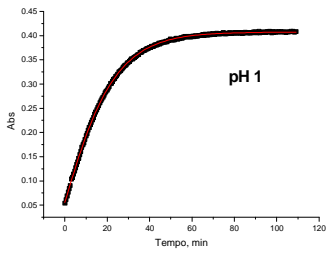
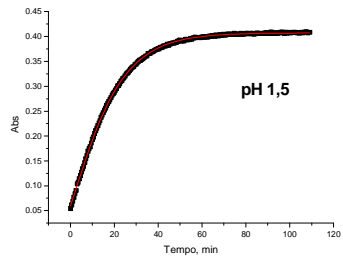
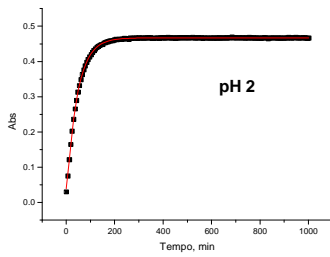
Em 100% D_2O		Em $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (10%)	
pH_{lido}	$\delta^{31}\text{P}$, ppm	pD	$\delta^{31}\text{P}$, ppm
3,80	-11,68	4,19	-11,57
3,43	-11,72	3,30	-12,01
2,81	-12,17	2,88	-12,37
2,46	-12,57	2,78	-12,55
2,17	-12,89	2,30	-12,97
1,98	-13,14		

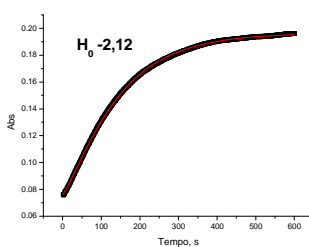
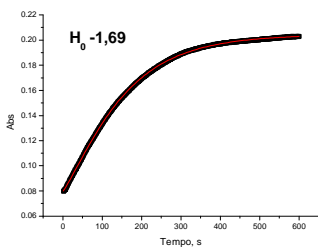
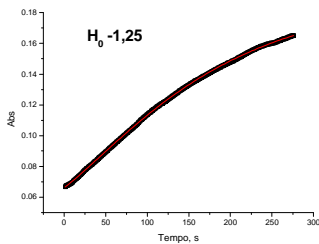
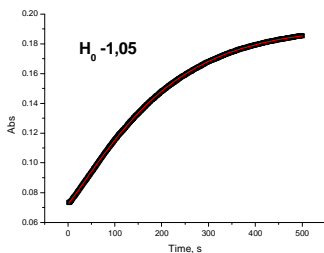
ANEXO 3.2 – Dados para a titulação do DPP por RMN de ^1H

pD	$\delta^1\text{H}$, ppm	
	H6	H4
4,19	8,10	7,79
3,30	8,12	7,87
2,88	8,14	7,93
2,78	8,16	7,96
2,47	8,18	8,02
2,30	8,18	8,03

ANEXO 4 – Cálculo de constante de velocidade observada, a partir de equações de reações consecutivas, para a reação de hidrólise do DPP a 25°C e força iônica 1,0 M.







Resultados obtidos

pH	k_2 PP, s^{-1}	A_0	k_{obs} DPP, s^{-1}	k_1 DPP, s^{-1} (corrigido)
-2,12	2,22E-2	0,060	5,07E-3	8,00E-3
-1,69	1,89E-2	0,062	6,34E-3	7,83E-3
-1,25	1,51E-2	0,062	3,95E-3	6,85E-3
-1,05	1,12E-2	0,060	4,62E-3	6,99E-3
-0,69	7,70E-3	0,061	4,18E-3	6,84E-3
0	4,53E-3	0,080	3,33E-3	5,20E-3
0,6	2,04E-3	0,104	1,99E-3	3,95E-3
1,0	1,48E-3	0,176	1,30E-3	1,40E-3
1,6	2,01E-3	0,174	9,21E-4	1,22E-3
2,0	2,25E-3	0,214	3,64E-4	3,82E-4
3,0	1,26E-2	0,229	6,06E-5	6,05E-5
4,0	1,63E-2	0,233	1,05E-5	1,05E-5

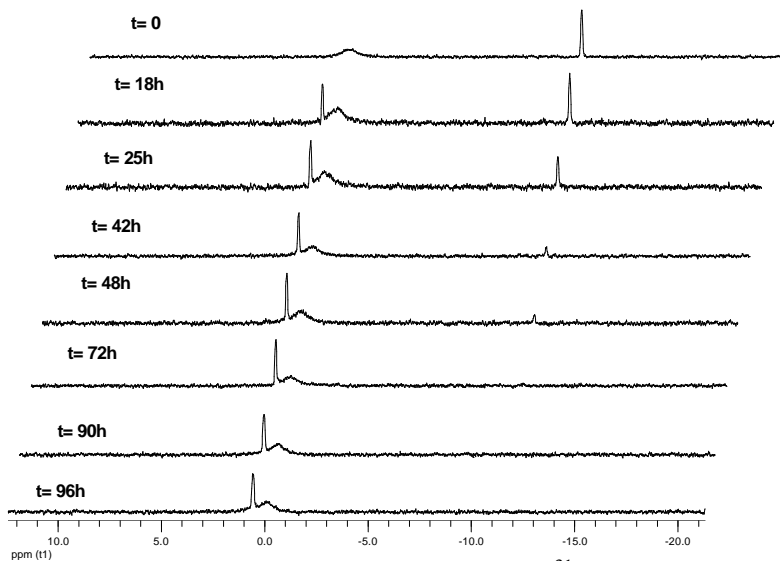
ANEXO 5 – Constantes de velocidade observada ($k_{\text{obs}}/a_{\text{w}}$) em função de pH ou (pH<0) para hidrólise do **DPP** a 25°C e força iônica 1,0M.

pH/H₀	$k_{\text{obs}}\text{s}^{-1}$
-2,12	5,07E-3
-1,69	6,34E-3
-1,25	3,95E-3
-1,05	4,62E-3
-0,69	4,18E-3
0	3,33E-3
0,5	1,99E-3
1,0	1,30E-3
1,5	9,21E-4
2,0	3,64E-4
3,0	6,06E-5
4,2	1,05E-5
5,2	1,00E-6
6,2	1,67E-7
4,1	1,20E-5
5,1	1,30E-6
6,1	1,70E-7
2,5	2,52E-4
3,3	3,58E-5
9,4	3,3E-10
12,0	1,33E-8
13,0	1,52E-7
14,0	1,60E-6

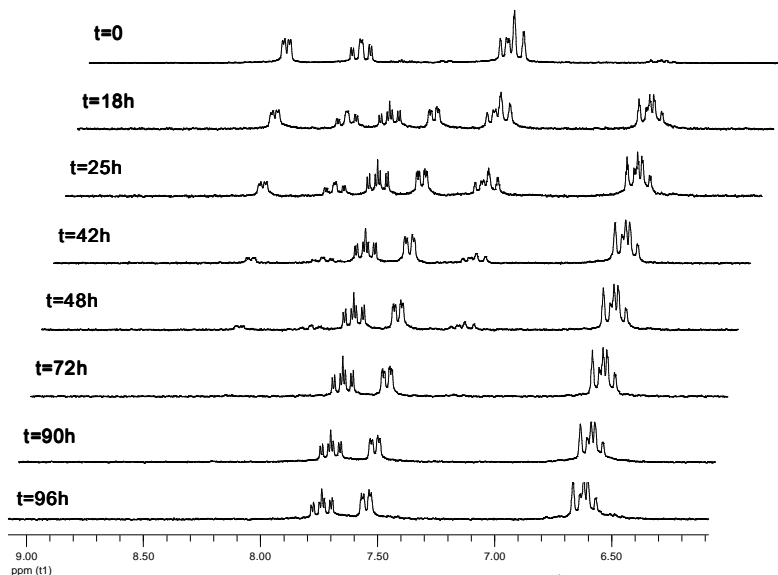
ANEXO 6 – Constantes de velocidade observada ($k_{\text{obs}}/a_{\text{W}}$) em função de pH ou (pH<0) para a hidrólise do **PP** a 25°C e força iônica 1,0 M.

pH/H₀	k_{obs} s⁻¹
-2,12	2,22E-2
-1,69	1,89 E-2
-1,25	1,51 E-2
-1,05	1,12 E-2
-0,69	7,70 E-3
0	4,53 E-3
0,5	2,04 E-3
1,0	1,48 E-3
1,5	2,01 E-3
2,0	2,25 E-3
2,5	8,78 E-3
3,0	1,26 E-2
3,5	1,17 E-2
4,0	1,63 E-2
5,0	9,47 E-3
5,7	3,24 E-3
6,3	1,25 E-3
7,0	2,78 E-4
7,6	6,79 E-5
8,0	3,17 E-5
8,6	1,65 E-5
9,1	4,94 E-6
9,7	1,38 E-6
10,2	6,25 E-7
10,5	3,80 E-7
10,8	1,80 E-7

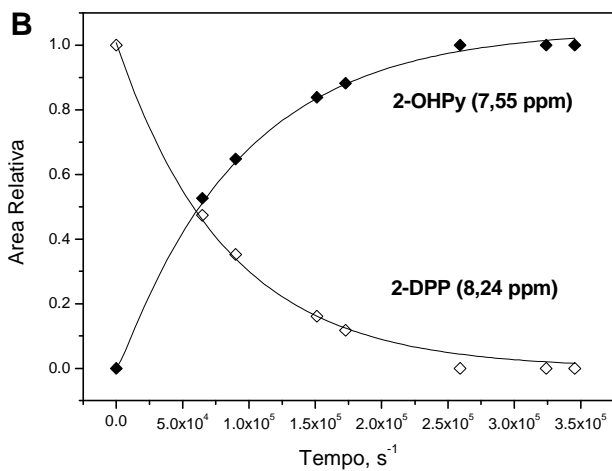
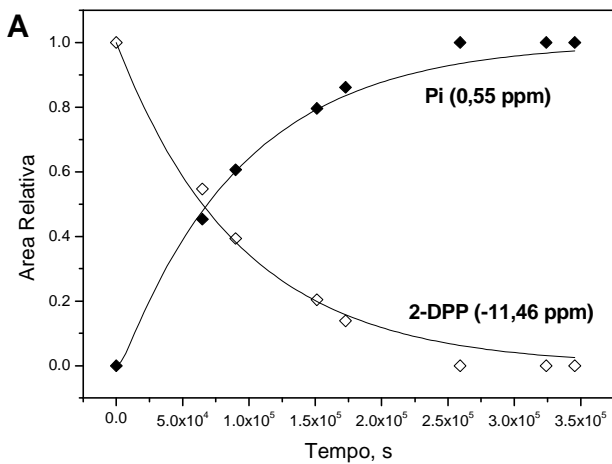
ANEXO 7 – Caracterização de produtos por RMN



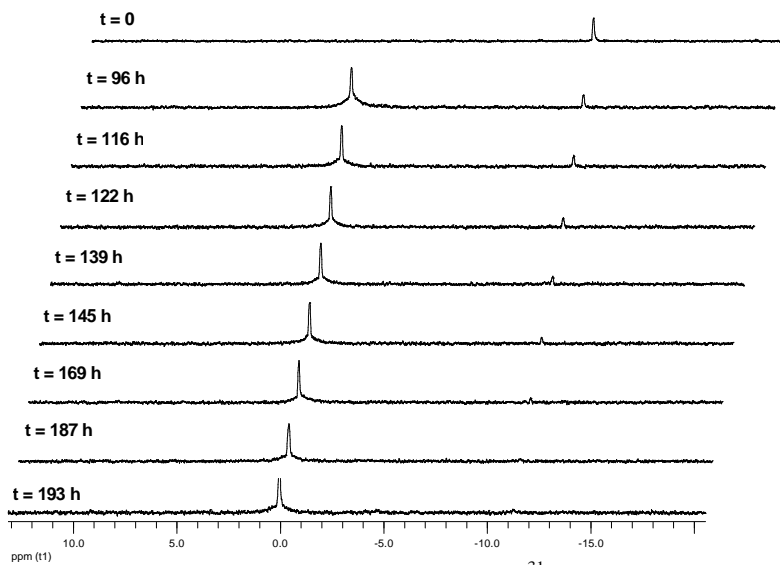
ANEXO 7.1 – Espectros sucessivos de RMN de ^{31}P para a reação de hidrólise do DPP em $\text{pD}=4$ e 25°C .



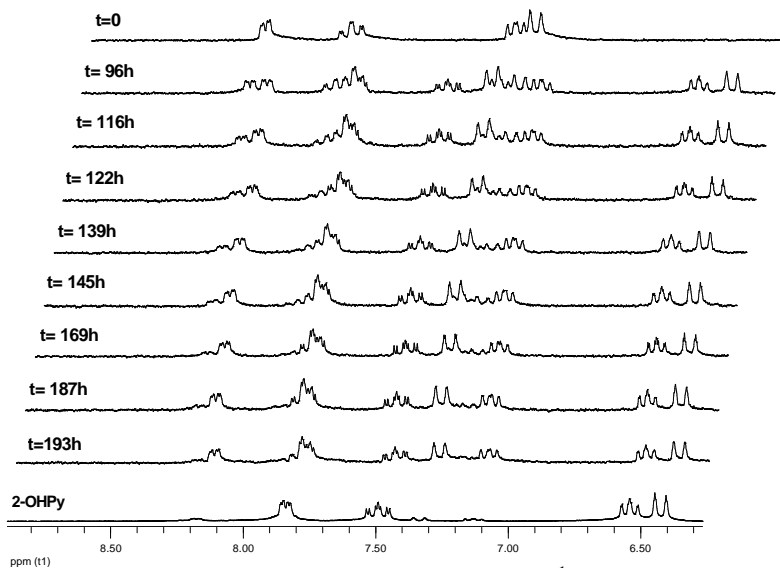
ANEXO 7.2 – Espectros sucessivos de RMN de ^1H para a reação de hidrólise do **DPP** em $\text{pD}=4$ e 25°C .



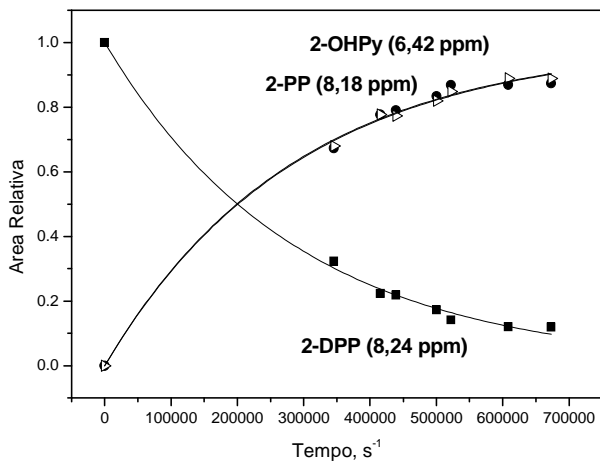
ANEXO 7.3 – Gráfico de área relativa vs tempo, calculado a partir dos espectros sucessivos de RMN de ^{31}P (A) e ^1H (B), para as espécies envolvidas na reação de hidrólise do **DPP** em $\text{pD}=4$, a 25°C .



ANEXO 7.4 – Espectros sucessivos de RMN de ^{31}P para a reação de hidrólise do **DPP** em meio básico, pD=14.



ANEXO 7.5 – Espectros sucessivos de RMN de ^1H para a reação de hidrólise do **DPP** em meio básico, $\text{pD}=14$ e 25°C . O último ponto não foi utilizado no gráfico de concentração, pois representa a adição de 2-piridona ao tubo reacional.



ANEXO 7.6 – Gráfico de área relativa vs tempo, calculado a partir dos espectros sucessivos de RMN de ^1H e ^{31}P , para as espécies envolvidas na reação de hidrólise do **DPP** em $\text{pD}=14$, a 25°C .

ANEXO 8 – Constante de velocidade observada (k_{obs}) em função do pH para a reação do **DPP** com $[\text{NH}_2\text{OH}]=1,0\text{M}$ (\bullet), a 25°C .

pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
5,0	$1,23 \times 10^{-4}$
5,5	$1,10 \times 10^{-4}$
6,0	$8,27 \times 10^{-5}$
6,3	$8,59 \times 10^{-5}$
6,6	$5,57 \times 10^{-5}$
7,0	$1,92 \times 10^{-5}$
7,6	$5,55 \times 10^{-6}$
8,0	$3,24 \times 10^{-6}$
8,5	$1,02 \times 10^{-6}$
9,0	$4,27 \times 10^{-7}$

ANEXO 9 – Parâmetros estruturais para reagente (**R**), estado de transição (**TS**) e produtos (**P**) para a reação do **DPP** com NH_2OH , calculados com o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Mecanismo $\text{SN}_2(\text{P})$ com 1 água.

Distâncias interatômicas (Å)			
	R	TS	P
O₁-P₂	1,693	1,840	3,880
P₂-O₃	5,917	2,234	1,710
P₂-O₆	1,508	1,518	1,505
P₂-O₇	1,635	1,648	1,710
P₂-O₈	1,500	1,508	1,505
O₃-N₄	1,412	1,405	1,360
N₄-H₅	1,041	1,037	1,000
O₉-H₁₀	0,983	0,985	0,960
Ângulos diedrais (TS)			
O₁-P₂-O₃-O₆	-140,18		
O₁-P₂-O₃-N₄	131,96		
O₃-N₄-H₅-O₉	-30,61		
N₄-H₅-O₉-H₁₀	-5,09		
H₅-O₉-H₁₀-O₆	-28,16		
O₆-P₂-O₃-N₄	-87,87		
Frequência Imaginária (cm⁻¹)			
215,24			

ANEXO 10 – Constantes de velocidade de segunda ordem, k_N ($M^{-1}min^{-1}$, 39°C) para reações de piridinas com diésteres de fosfato.

Diéster Metil arílico Ar =	pK_a ArOH	Py	4-Me-Py	4-NH ₂ -Py	β_{nuc}	
		5,17	pK_a 6,02	8,96		
		β_{LG} -1,06	-1,03	-0,98		
2-nitro	7,23	$2,63 \times 10^{-6}$	$7,86 \times 10^{-6}$	$8,86 \times 10^{-5}$	0,38	
4-Cl-2-nitro	6,36	$2,00 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-4}$	0,35	
4-Ac-2-nitro	5,09	$4,30 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-3}$	$8,65 \times 10^{-3}$	0,33	
2,4-Dinitro	4,07	$6,15 \times 10^{-3}$	$1,47 \times 10^{-2}$	0,11	0,31	

ANEXO 11 – Cálculos Teóricos para reações de hidrólise de diésteres de fosfato

ANEXO 11.1 – Coordenadas cartesianas para reagente (**R**) na reação de hidrólise do **DPP**.

Atom	X	Y	Z
P	0.01107700	-1.26107700	-0.43030500
O	0.40911800	-0.86923600	-1.82798000
O	-1.54936700	-0.81528800	-0.08501500
O	0.75647400	-0.26803400	0.68051000
O	0.09241200	-2.69262600	0.04045000
C	-2.12007200	0.42892700	-0.25653700
C	-1.51066100	1.48267200	-0.94611600
C	-3.99832300	1.67761200	0.18643900
C	-2.21693700	2.67845700	-1.05060600
H	-0.53187700	1.36932600	-1.39220700
C	-3.48690600	2.78733300	-0.47682800
H	-4.97979500	1.70526800	0.65089000
H	-1.77524300	3.51689800	-1.58032000
H	-4.06389200	3.70308700	-0.54016700
C	1.98010800	0.34583600	0.51523700
C	2.06400300	1.69971700	0.85220700
C	3.30854000	2.31414800	0.75814200
H	1.17745800	2.23495600	1.17286600
C	4.21196900	0.22537300	0.01519300
C	4.40932900	1.56558200	0.32692900
H	3.41737700	3.36388500	1.01206400
H	5.03647300	-0.39692700	-0.32116100
H	5.39548700	2.00738800	0.23660400
N	3.01402200	-0.38808400	0.11164300
N	-3.32939400	0.51452400	0.29763500
O	2.91019200	-3.29822200	-0.16483800
H	1.93565900	-3.35108300	-0.12001900
H	3.05969200	-2.32904000	-0.09592100
O	-4.40860100	-1.67658600	1.73742200
H	-4.01285400	-0.92544400	1.22822500
H	-3.72747400	-2.36415100	1.72557700

ANEXO 11.2 – Coordenadas cartesianas para estado de transição (TS) na reação de hidrólise do DPP.

Atom	X	Y	Z
P	0.18465400	-1.69343700	-0.38389700
O	0.17844100	-1.33735100	-1.86153200
O	-1.45513100	-0.94279500	0.02862400
O	0.82182200	-0.47944200	0.69152600
O	-0.20585100	-2.97007100	0.34567500
C	-1.92143600	0.27967000	-0.24831000
C	-1.21281400	1.28486200	-0.94338800
C	-3.74691900	1.69848000	0.00092900
C	-1.82451400	2.51585900	-1.14673800
H	-0.21571000	1.09690200	-1.31639500
C	-3.12158700	2.74256300	-0.66875000
H	-4.75409400	1.81273100	0.39473100
H	-1.28941200	3.29789300	-1.67833700
H	-3.62673300	3.69170200	-0.80987300
C	1.92152400	0.28360700	0.57906300
C	1.97193100	1.52369000	1.22822100
C	3.13725300	2.27048100	1.12524400
H	1.11040300	1.86689200	1.78793800
C	4.11145800	0.55535100	-0.23039400
C	4.22860800	1.78693200	0.38265500
H	3.20139000	3.23402800	1.62066600
H	4.90603500	0.10494100	-0.81399700
H	5.14569400	2.35595400	0.28954200
N	2.97429300	-0.16665500	-0.12264900
N	-3.17284800	0.49944700	0.20869200
O	2.03605200	-2.36200200	-0.58804400
H	2.23222800	-2.93217700	0.17272700
H	2.75346100	-1.26685600	-0.47080800
O	-4.42078600	-1.50772900	1.70567300
H	-3.95727300	-0.81073900	1.16541600
H	-3.78330400	-2.23311100	1.76795000

ANEXO 11.3 – Coordenadas cartesianas para produto (**P**) na reação de hidrólise do **DPP**.

Atom	X	Y	Z
P	0.70881300	-2.02125700	-0.45149300
O	0.30268100	-1.49117400	-1.79668800
O	-1.89932700	-0.71644300	0.18042200
O	1.03589300	-0.67704200	0.58369100
O	-0.08666900	-2.96483900	0.40162100
C	-2.29363800	0.46767500	-0.11446400
C	-1.46526300	1.39860700	-0.83282800
C	-3.98307900	2.09524400	-0.03285700
C	-1.93755100	2.66145000	-1.13226400
H	-0.47295300	1.08376400	-1.13610000
C	-3.23420400	3.03652000	-0.72727500
H	-4.98997900	2.34059400	0.30267500
H	-1.30991800	3.36233400	-1.67848400
H	-3.64142300	4.01859800	-0.94249200
C	2.02733500	0.20674800	0.52197800
C	1.94534500	1.41253500	1.23019200
C	3.01902900	2.28851500	1.19215500
H	1.04362500	1.62404800	1.79122500
C	4.21191700	0.79139500	-0.23736500
C	4.17427300	1.98004700	0.45004100
H	2.96357200	3.22198100	1.74255500
H	5.04984300	0.45536800	-0.83462000
H	5.02107300	2.65368700	0.41141100
N	3.15137400	-0.05634300	-0.18458800
N	-3.55395900	0.85628200	0.27325200
O	2.23323000	-2.60340300	-0.65131000
H	2.51991800	-3.15435400	0.09767900
H	3.21381000	-0.96795300	-0.65107600
O	-4.54329200	-1.34738400	1.71832700
H	-4.23333000	-0.54792300	1.20641600
H	-3.81291100	-1.97591900	1.62993800

ANEXO 11.4 – Coordenadas cartesianas para reagente (**R**) na reação de hidrólise do **4-CIPP**.

Atom	X	Y	Z
P	0.08418700	1.30510300	-1.07021900
O	-0.90771700	2.33636400	-0.56438800
O	0.99736900	0.92658500	0.25381000
O	0.96182700	1.55810500	-2.26551600
C	2.13196100	0.11753300	0.15821000
C	4.53137200	-0.07647000	-0.00888100
C	3.15031900	-2.06740600	0.23818000
C	4.39846100	-1.46087800	0.09785000
C	2.00568000	-1.26750800	0.27081900
H	5.50902300	0.38084000	-0.11488600
H	3.06482200	-3.14511500	0.32402800
H	1.02522900	-1.71694000	0.38572500
O	-0.71200700	-0.10213500	-1.41357000
C	-1.82583000	-0.58797200	-0.73418300
C	-1.94397500	-0.54460600	0.65704600
C	-3.95200500	-1.72408700	-0.90926900
C	-3.07729200	-1.08734600	1.26856200
C	-4.06805400	-1.66935300	0.47983900
C	-2.82078200	-1.17802300	-1.51734900
H	-1.16847500	-0.09774300	1.26756900
H	-4.72786400	-2.18112200	-1.51358900
H	-3.17647000	-1.05491500	2.34804300
O	1.85754200	3.21905700	2.60655400
H	2.07336300	2.42907000	2.09020400
H	1.03977800	3.56965300	2.18386400
O	-0.43870700	4.22038200	1.38085300
H	-0.61889700	3.53973400	0.68986800
H	-1.17617100	4.15467900	2.00455200
H	-2.70852600	-1.20469300	-2.59614200
C	3.38369800	0.71856100	0.02248800
H	3.45955900	1.79796200	-0.05643800
Cl	5.84786200	-2.47154500	0.05864100
Cl	-5.50118700	-2.35459600	1.25572100
O	-3.59220800	2.46852500	-1.36730300
H	-3.91255500	1.55498200	-1.38313000
H	-2.64920900	2.39171200	-1.10394600

ANEXO 11.5 – Coordenadas cartesianas para estado de transição (TS) na reação de hidrólise do **4-CIPP**.

Atom	X	Y	Z
P	0.43444100	1.84616800	-0.52098000
O	-0.86114900	2.39976100	-0.00012700
O	1.09147300	0.83878200	0.57631300
O	0.98936600	1.84785800	-1.91162900
C	2.16705900	-0.02181300	0.35200100
C	3.35038100	0.40273500	-0.25405600
C	4.41228700	-0.49573000	-0.38562000
C	3.09474100	-2.21988700	0.71454200
C	4.27249300	-1.79518200	0.09973600
C	2.03247600	-1.32288300	0.83740600
H	3.45712100	1.41768200	-0.61643900
H	5.33556100	-0.17511500	-0.85564000
H	2.99837800	-3.23251500	1.09040600
H	1.10435200	-1.62854200	1.30785600
O	-0.74525200	-0.11827900	-1.28351200
C	-1.86835100	-0.58833200	-0.77885300
C	-2.06018700	-0.79376100	0.61802400
C	-4.16588800	-1.42638100	-1.11398600
C	-3.25612200	-1.29799200	1.13046600
C	-4.30347500	-1.61151000	0.26259000
C	-2.96876600	-0.92040500	-1.62239100
H	-1.25124600	-0.55397800	1.30142100
H	-4.98241100	-1.67157500	-1.78663800
H	-3.36789700	-1.44552200	2.20065300
H	-2.86101400	-0.77717700	-2.69477000
O	1.57584200	3.26733900	0.12133800
H	1.67497600	3.95616300	-0.55988900
H	1.24331400	3.72281800	0.97473100
O	0.74799300	4.43398900	2.27460600
H	-0.17944500	4.18452400	2.41418800
H	1.22072400	4.10111700	3.05356900
Cl	-5.82585800	-2.25743500	0.91551600
Cl	5.61886500	-2.92823500	-0.06289000
O	-3.47239700	2.47240500	-0.99809300
H	-3.69367300	1.55323500	-1.21437900
H	-2.54334000	2.42476300	-0.68533600

ANEXO 11.6 – Coordenadas cartesianas para produto (**P**) na reação de hidrólise do **4-CIPP**.

Atom	X	Y	Z
P	-1.42069400	-0.83104300	0.26495400
O	-1.11917700	0.29972700	1.21657300
O	3.17905400	1.91446300	-0.28631600
O	-1.77149600	-0.08936100	-1.16540400
O	-0.51160200	-2.01042800	0.05452600
C	3.25714300	1.93211500	1.02432400
C	2.67129200	2.97604700	1.80421200
C	4.01295400	0.92492900	3.15071000
C	2.74942800	2.99633500	3.19648800
H	2.14577500	3.77578700	1.28754400
C	3.41983400	1.96880500	3.86564600
H	4.53441400	0.12892100	3.67450600
H	2.29032100	3.80631600	3.75585400
C	-1.77541800	-0.69779100	-2.41885500
C	-2.41765400	-1.91321600	-2.66455100
C	-2.43112600	-2.43416100	-3.96127300
H	-2.91078700	-2.45658700	-1.86663300
C	-1.17510500	-0.50705800	-4.75138600
C	-1.81183100	-1.72506400	-4.98933400
H	-2.92670700	-3.37833500	-4.15925100
H	-0.69644100	0.03667900	-5.55845400
O	-2.92779300	-1.39152600	0.73987000
H	-3.10338600	-2.31667800	0.49370000
H	-3.56153400	-0.96995200	1.95757700
O	-4.06127300	-0.67713500	2.84046500
H	-3.45596900	-0.15594400	3.40254700
H	-4.82335100	-0.11029900	2.61475200
O	0.28722600	0.17718100	3.61343900
H	1.11829300	0.65286100	3.46349500
H	-0.17542000	0.19131300	2.74652500
C	3.93166800	0.90862800	1.75852800
H	4.39190500	0.09245700	1.20651700
C	-1.15650900	0.00574900	-3.45364900
H	-0.66582700	0.94989000	-3.24198300
Cl	3.53690300	2.00055100	5.64056200
Cl	-1.83651900	-2.38138700	-6.63040900

Publicações 2009-2012

1) Kirby, A. J.; Medeiros, M.; Mora, J. R.; Oliveira, P. S. M.; Amer, A.; Williams, N. H.; Nome, F. Intramolecular General Base Catalysis in the Hydrolysis of a Phosphate Diester. Computational Guidance to a Choice of Mechanism. *Journal of Organic Chemistry*, v. 78, pp 1343. 2013.

2) Medeiros, M.; Orth, E. S.; Manfredi, A. M.; Pavez, P.; Mücke, G. A.; Kirby, A. J.; Nome, F. Dephosphorylation Reactions of Mono-, Di-, and Triesters of 2,4-Dinitrophenyl Phosphate with Deferoxamine and Benzohydroxamic Acid. *Journal of Organic Chemistry*, v.77, pp 10907. 2012.

3) Orth, E. S.; Medeiros, M.; Souza, B. S.; Caon, N. B.; Kirby, A. J.; Nome, F. Reactions of substituted aspirins with amino acids. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v.25, pp 939, 2012.

4) Medeiros, M.; Souza, B. S.; Orth, E. S.; Brandão, T. A. S.; Rocha, W. R.; Kirby, A. J.; Nome, F. The Reaction of Hydroxylamine with Aspirin. *ARKIVOC*, pp 461. 2011.

5) Kirby, A. J. ; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Orth, E. S.; Brandão, T. A. S.; Wanderlind, E. H.; Amer, A.; Williams, N. H.; Nome, F. Activating Water: Important Effects of Non-leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. *Chemistry - A European Journal*, v. 17, pp 14996. 2011.

6) Orth, E. S.; Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Kirby, A. J.; Nome, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. *Journal of Organic Chemistry*, v.76, pp 8003. 2011.

7) Orth, E.S.; Medeiros, M.; Bortolotto, T.; Terenzi, H.; Kirby, A.J.; Nome, F. Dephosphorylation Reactions with Deferoxamine, A

Potential Chemical Nuclease. *Journal of Organic Chemistry*, v.76, pp 10345. 2011.

8) Berlamino, A. T. N.; Orth, E. S.; Mello, R. S.; Medeiros, M.; Nome, F. Catalytic nanoreactors for ester hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 332, pp 7. 2010.

9) Zimmermann, L. M.; Silva, A. F.; Medeiros, M.; Bruch, J.; Souza, A. J.; Nome, R. A. ; Fiedler, H. D.; Nome, F. Quantitative Treatment of Magnesium Ion Adsorption at the γ -Al₂O₃-Water Interface. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, pp 15078, 2010.

10) Kirby, A. J.; Tondo, Daniel W.; Medeiros, M.; Souza, B. S.; Priebe, J.P. ; Lima, M. F.; Nome, F. Efficient Intramolecular General-Acid Catalysis of the Reactions of α -Effect Nucleophiles and Ammonia Oxide with a Phosphate Triester. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, pp 2023. 2009.

11) Kirby, A. J.; Medeiros, M.; Oliveira, P.S. M.; Brandão, T. A.S.; Nome, F. Activating Water: Efficient Intramolecular General Base Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Triester. *Chemistry - A European Journal*, v. 15, pp 8475. 2009.