



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ATIVIDADE CATALÍTICA DE SISTEMAS BASEADOS EM
QUÍMICA SUPRAMOLECULAR E EFEITO DE NUCLEÓFILOS
ALFA NA DEGRADAÇÃO DE ÉSTERES DE FOSFATO**

BRUNO SURDI OLIVEIRA

FARUK JOSE NOME AGUILERA

LEANDRO SCORSIN

Florianópolis
Julho/2017

Bruno Surdi Oliveira

**ATIVIDADE CATALÍTICA DE SISTEMAS BASEADOS EM
QUÍMICA SUPRAMOLECULAR E EFEITO DE NUCLEÓFILOS
ALFA NA DEGRADAÇÃO DE ÉSTERES DE FOSFATO**

Relatório apresentado ao Departamento de
Química da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial da disciplina
de Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Florianópolis
Julho/2017

Bruno Surdi Oliveira

**ATIVIDADE CATALÍTICA DE SISTEMAS BASEADOS EM
QUÍMICA SUPRAMOLECULAR E EFEITO DE NUCLEÓFILOS
ALFA NA DEGRADAÇÃO DE ÉSTERES DE FOSFATO**

Prof. Dr. Luciano Vitali
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Orientador

Dr. Leandro Scorsin
coorientador

Prof. Maria da Graça Nascimento

Prof. Fábio Zazyki Galetto

Florianópolis
Julho/2017

Aos meus pais e a minha amada nona Amabile Cleides Surdi.

Agradecimentos

Antes de tudo agradeço à minha família, Juares, Salete, Victor e Amabile, pelos puxões de orelha, pelo amor e compreensão, por serem meu exemplo de vida e minha inspiração. Agradeço não só por tudo o que vocês fizeram/fazem, mas sim por terem insistido e visto um futuro em mim, por nunca terem desistido. Agradeço por sempre estarem ao meu lado, mesmo eu não sendo o melhor do mundo, vocês nunca me viraram as costas, mesmo nesse momento triste e pesado que estamos vivendo, vocês estão sempre aqui e sempre estarão, por que isso é o significado de família, UNIÃO, amor, companheirismo e PRESENÇA. Sou o que sou hoje por vocês e por mais ninguém.

Um agradecimento especial ao professor Faruk Nome, um homem com uma inteligência magnífica, pela oportunidade de trabalhar nesse fantástico grupo de pesquisa, pela orientação, pelo incentivo e todo conhecimento passado. Todo o conhecimento adquirido em seu laboratório foi de grande importância para meu amadurecimento estudantil e profissional.

Às pessoas especiais do grupo LACFI do laboratório 312 que me acolheram nesse ano e sempre estavam dispostos a me ajudar. Agradecimento especial a Michelle Medeiros e ao Leandro Scorsin pelas conversas e pela ajuda ativa nesse projeto.

Agradeço ao meu amigo e companheiro de apartamento, irmão de coração, Luan Felipe Sievers, pelo apoio, por ter lavado as louças enquanto eu escrevia o TCC ou tinha que estudar, por ter sido um amigo protetor e fiel. Amizade rara. Gostaria de agradecer a todos os meus amigos e colegas que fiz nesses anos de graduação, que me fizeram viver intensamente, tantas festas, tantas parcerias, tantas risadas, tantas memórias. Vocês fazem parte de uma das partes mais importantes da minha vida e graças a vocês foi inesquecível. Aos Bohemios e amigos queridos que sempre vou guardar comigo Thamara, Giliandro, Jéssica, Ana, Sabrina, Mariana (mais conhecida como Mariany), Patrícia Sangaletti, Nicolle e Kalyinka, nesse momento não existem palavras para descrever o quanto sou grato a vocês. Enfim, vamos ser amigos para todo o sempre. Obrigado.

E por fim, porém não menos importante, gostaria de agradecer ao apoio financeiro concedido pela Capes, CNPq, FAPESC e Universidade Federal de Santa Catarina.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Ésteres de fosfato	13
2.1.1. Transferência do grupo fosforila em ésteres de fosfato.....	16
2.2. Catálise	17
2.2.1 Enzimas	19
2.3. Química Supramolecular	20
2.4. Efeito alfa nucleófilo	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Reagentes	25
4.2. Medidas Cinéticas.....	25
4.3. Metodologia.....	26
4.3.1 Hidrólise do DEDNPP com P5A	26
4.3.2 Hidrólise do paraoxon etílico com hidroxilamina	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Cinética da hidrólise do triéster DEDNPP catalisada com P5A	29
5.2. Cinética da hidrólise do Paraoxon-Et: Catálise básica.....	32
5.3. Cinética da hidrólise do Paraoxon-Et em presença de NH₂OH.....	37
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural para os três diferentes tipos de ésteres de fosfato derivados do ácido fosfórico.....	13
Figura 2. Reação de hidrólise da acetilcolina em ácido acético e colina catalisada pela enzima acetilcolinesterase.....	14
Figura 3. Agentes nervosos e pesticidas organofosforados.....	15
Figura 4. Dessulfurização oxidativa mediada pela enzima citocromo P450 para conversão de parationa em paraoxon em mamíferos.....	16
Figura 5. Mecanismos para substituição nucleofílica de ésteres de fosfato.....	16
Figura 6. Princípio da catálise ácido-básica geral em ésteres de fosfato.....	18
Figura 7. Exemplo de estruturas de algumas ciclodextrinas, típicas moléculas hospedeira, classificadas com α , β e γ de acordo com o número de unidade de dextrinas no ciclo, sendo 6, 7 e 8, respectivamente.....	20
Figura 8. Estrutura química de um pilar[n]areno ($n=5, 6, 7$)	21
Figura 9. Modelo representativo da doação de elétrons do átomo adjacente.....	22
Figura 10. Espécies da hidroxilamina em função do pH.....	22
Figura 11. Degradação do triéster DEDNPP na presença de P5A	23
Figura 12. Degradação do triéster Paraoxon Etílico na presença e na ausência de Hidroxilamina , resoectivamente.....	23
Figura 13. Espectrofotômetro de UV-Vis Cary 50.....	25
Figura 14. Reações de dissociações consecutivas do ácido cítrico.....	26
Figura 15. Reação de dissociação do ácido acético.....	26
Figura 16. Gráfico de k_{obs} em função da concentração de P5A para a reação de hidrólise do DEDNPP com o tampão Bis-Tris, a 25 °C e pH 7,0.....	29
Figura 17. Absorvâncias vs. comprimento de onda para a reação de hidrólise do DEDNPP no tampão [acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M a 25 °C e pH 5,8.....	30
Figura 18. Gráfico das absorvâncias obtidas em $\lambda = 360$ nm vs. tempo para a reação de hidrólise do DEDNPP no tampão [acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M a 25 °C e pH 5,8.....	30
Figura 19. Absorvâncias vs. comprimento de onda para a reação de hidrólise do DEDNPP na presença de [P5A] = $1,6 \times 10^{-3}$ M e tampão [acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M a 25 °C e pH 5,8.....	31

Figura 20. Gráfico de absorvâncias obtidas em $\lambda = 360$ nm vs. tempo para a reação de hidrólise do DEDNPP na presença de $[P5A] = 1,6 \times 10^{-3}$ M e tampão [acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M a 25 °C e pH 5,8.....	31
Figura 21. Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm em função do tempo nas reações de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et em pH 7,0, a 25 °C.....	33
Figura 22. Gráfico de absorvância vs. comprimento de onda para a reação de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et, a 25 °C e pH 8,5.....	33
Figura 23. Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm em função do tempo nas reações de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et em pH 8,5 a 25 °C.....	34
Figura 24. Gráfico de absorvância vs. comprimento de onda para a reação de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et, a 25 °C e pH 12.....	34
Figura 25. Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm em função do tempo nas reações de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et em pH 12, a 25 °C.....	35
Figura 26. Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm em função do tempo nas reações de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et em pH = 13,4 a 25 °C.....	35
Figura 27. Gráfico das constantes observadas em função do pH (6,0-13,4) nas reações de hidrólise do Paraoxon-Et em água a 25 °C.....	36
Figura 28. Gráficos de absorvâncias vs. comprimento de onda para reações de hidrólise do Paraoxon-Et a 25 °C e pH 12,0 na presença de (a) 0,05 M de NH_2OH e (b) 0,5 M de NH_2OH ; (c) Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm vs. tempo das reações de hidrólise do Paraoxon-Et a 25 °C.....	38
Figura 29. Gráfico das constantes observadas em função do pH (5,5-9,0) nas reações de hidrólise do Paraoxon-Et na presença da hidroxilamina 0,5 M a 25 °C.....	39
Figura 30. Gráfico das constantes observadas em função do pH (9,0-13,4) na reação de hidrólise do Paraoxon-Et na presença de NH_2OH (a) 0,5 M e (b) 0,05 M.....	40
Figura 31. Gráfico da k_{obs} em relação a concentração de NH_2OH , nas condições de (a) pH = 9,0 e (b) $[KOH] = 2,0$ M.....	40

Figura 32. Gráfico das constantes observadas em função do pH (5,5-13,4) nas reações de hidrólise do Paraoxon-Et em ausência e em presença de 0,5 e 0,05 M de NH_2OH42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constantes obtidas para a reação de hidrólise do **DEDNPP** com **P5A** nos tampões acetato e citrato.....32

Tabela 2. Constantes de primeira e segunda ordem obtidas em função do pH.....37

Tabela 3. Constantes de velocidades k_0 , k_{OH} , k_1 e k_2 utilizados do ajuste dos dados cinéticos obtidos da **Figura 31**, através da equação (iv).....41

LISTA DE ABREVIATURAS

DEDNPP – Dietil 2,4-dinitrofenil fosfato

Paraoxon-Et – Dietil 4-nitrofenil fosfato/ paraoxon etílico

DNP – 2,4-dinitrofenolato

PNP – 4-nitrofenolato

P5A – Pilar[5]areno

DNA – Ácido desoxirribonucléico

RNA – Ácido ribonucleico

AChe – Enzima acetilcolinestase

LaCFI – Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais

pK_a – Logaritmo da constante de dissociação ácida de uma espécie

pK_w – Logaritmo da constante de auto-protólise da água

k_{obs} – Constante de velocidade observada

k_{cat} – Constante de velocidade obtida na reação catalisada

k₀ – Constante de velocidade espontânea

k_{OH} – Constante de velocidade obtida em meio básico

k₁ – Constante de velocidade obtida pela hidrólise com o nucleófilo NH₂OH

k₂ – Constante de velocidade obtida pela hidrólise com o nucleófilo NH₂O⁻

RESUMO

O presente trabalho reporta as reações de desfosforilação dos triésteres de fosfato dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) e dietil 4-nitrofenil fosfato (**Paraoxon etílico**) em seus produtos dietil fosfato e 2,4-dinitrofenolato (**DNP**) ou 4-nitrofenolato (**PNP**), respectivamente. Sendo o primeiro catalisado com sistemas baseados na química supramolecular, o pilarareno **P5A**, enquanto o segundo pelo nucleófilo hidroxilamina. Uma catálise modesta foi observada no primeiro caso, apresentando um aumento de aproximadamente 2,2 vezes para a reação de hidrólise do **DEDNPP** com o **P5A** em meio aquoso com os tampões acetato e citrato, em comparação com a reação do triéster apenas em água. Enquanto as reações do **Paraoxon etílico** com o nucleófilo alfa **hidroxilamina** em dois momentos (i) desprotonada (NH_2O^-) apresentou uma aceleração de mais de 10^6 vezes em relação as reações de hidrólise espontânea do substrato e aproximadamente 20 vezes em relação à hidrólise com OH^- ; (ii) neutra (NH_2OH) apresentou um acréscimo de cerca de 1200 vezes em relação à hidrólise espontânea e uma velocidade em cerca de 63 vezes mais lenta comparado à hidrólise com OH^- . Os dados cinéticos foram tratados como sendo de pseudo-primeira ordem e segunda ordem e as medidas cinéticas foram realizadas utilizando a espectroscopia UV-Vis, monitorando as reações através da formação dos produtos **DNP** em 360 nm e **PNP** em 400 nm.

Palavras-chave: *Triésteres de fosfato, desfosforilação, química supramolecular, alfa nucleófilo.*

1. INTRODUÇÃO

Os ésteres de fosfato apresentam grande importância em sistemas biológicos, por exemplo, participam das ligações que mantêm a estrutura do DNA estável. As enzimas têm atraído atenção considerável em função das excelentes propriedades catalíticas e eficiente aplicabilidade na catálise de diversos tipos de reações em sistemas biológicos. Em reações de transferência de grupo fosforila, foco deste trabalho, a fosforilação pode causar uma alteração na enzima, o que promove uma modificação da reatividade da mesma, ativando ou desativando para uma determinada reação.

Os triésteres de fosfato estão presentes na composição de armas químicas e em agrotóxicos. Esses compostos apresentam riscos de ataque ao sistema nervoso central pela inibição da enzima acetilcolinesterase. A degradação desses compostos pode ser uma excelente solução para eliminar armas químicas, que se encontram isoladas em diversos locais, e compostos que possam ser utilizados como agrotóxicos. As reações de degradação destes são extremamente desfavoráveis em condições normais de temperatura e pressão, principalmente pela alta estabilidade da ligação entre o fósforo e o oxigênio.

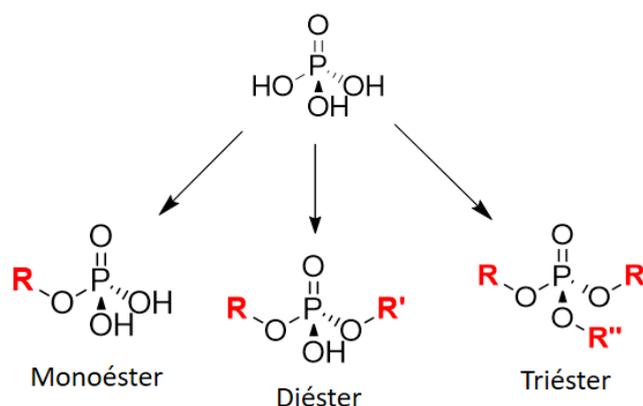
Uma estratégia vantajosa consiste na utilização de sistemas catalíticos baseados em química supramolecular. A catálise supramolecular oferece sistemas modelo com interações eletrostáticas e não covalentes, concebidos para mimetizar as interações enzima-substrato. Nesses sistemas, ocorre a formação de complexos hóspede-hospedeiro, nos quais a molécula hospedeira exerce função catalítica para melhorar velocidades de reação, com seletividade induzida por fatores espaciais. Outra estratégia vantajosa é o uso da hidroxilamina, um nucleófilo detentor do efeito alfa, que possui uma reatividade maior daquelas observadas em nucleófilos normais de mesma basicidade, promovendo incrementos nas constantes de velocidade de reações de degradação de ésteres de fosfato.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ésteres de fosfato

Os ésteres de fosfato, derivados do ácido fosfórico, compreendem uma classe de compostos imensamente abrangente. Sua classificação está relacionada com o grau de substituição dos hidrogênios ionizáveis do grupo fosfato, sendo assim, classificados quimicamente como monoésteres, diésteres e triésteres de fosfato (**Figura 1**). Devido a sua estabilidade geral, os ésteres de fosfato têm muitas aplicações industriais, como por exemplo, são empregados como surfactantes e detergentes.^{1,2}

Figura 1. Representação estrutural para os três diferentes tipos de ésteres de fosfato derivados do ácido fosfórico.



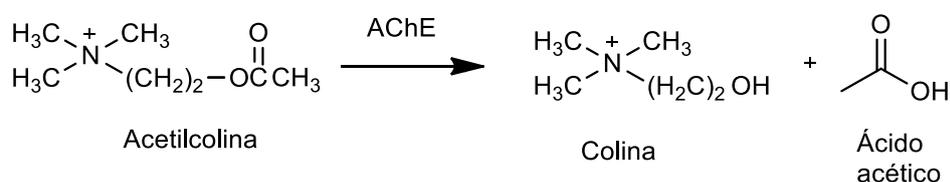
A aplicabilidade de cada classe apresentada acima está diretamente ligada à ocorrência natural, reatividade e suas respectivas funções que exercem nos sistemas biológicos. Os monoésteres e diésteres apresentam alta estabilidade e por apresentarem o grupo hidroxila na sua estrutura, a sua reatividade é influenciada pelo pH, podendo assim, atuar como ácidos dipróticos e monopróticos, respectivamente. Isso ocorre já que as cargas negativas geradas nas suas espécies desprotonadas podem dificultar o ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo, ou seja, asseguram maior estabilidade, dificultando reações como a hidrólise.^{1,3}

Além da alta estabilidade dos monoésteres e diésteres de fosfato, ambos têm sua ocorrência de modo natural e estão amplamente presentes em processos biológicos. Os monoésteres, por sua vez, estão presentes em vários processos de

sinalização e regulação da atividade biológica. Já os diésteres de fosfatos estão presentes nas estruturas do RNA e DNA com o grupo fosfato ligando os nucleotídeos individuais, os quais por serem altamente estáveis mantêm a sequência de bases.^{3,4} Ânions desses diésteres são bem conhecidos por estarem entre os ésteres de fosfato menos reativos, já que com pK_a normalmente entre 1 e 2, os diésteres se encontram em água em pHs neutros na forma monoaniônica e a carga negativa simples, compartilhada entre os dois oxigênios equivalentes, faz com que o fósforo central seja menos eletrofílico quando comparado a um triéster. Conseqüentemente, a transferência de fosfato a partir de um diéster é tipicamente um processo muito lento na ausência de uma ou mais características estruturais específicas, ou de uma enzima apropriada.^{5,6}

Os triésteres de fosfato não ocorrerem naturalmente e são reconhecidos pela elevada toxicidade. Muitos desses compostos organofosforados possuem efeito tóxicos aos seres vivos devido à inibição da ação de diversas enzimas do organismo, podendo destacar a enzima que catalisa a hidrólise da acetilcolina em ácido acético e colina, a acetilcolinesterase (**Figura 2**), provocando um colapso no sistema nervoso central. Este tipo de inibição ocorre pela facilidade que alguns organofosforados possuem em se ligar ao sítio ativo de enzimas, formando uma ligação estável e formando assim um novo éster fosfórico.

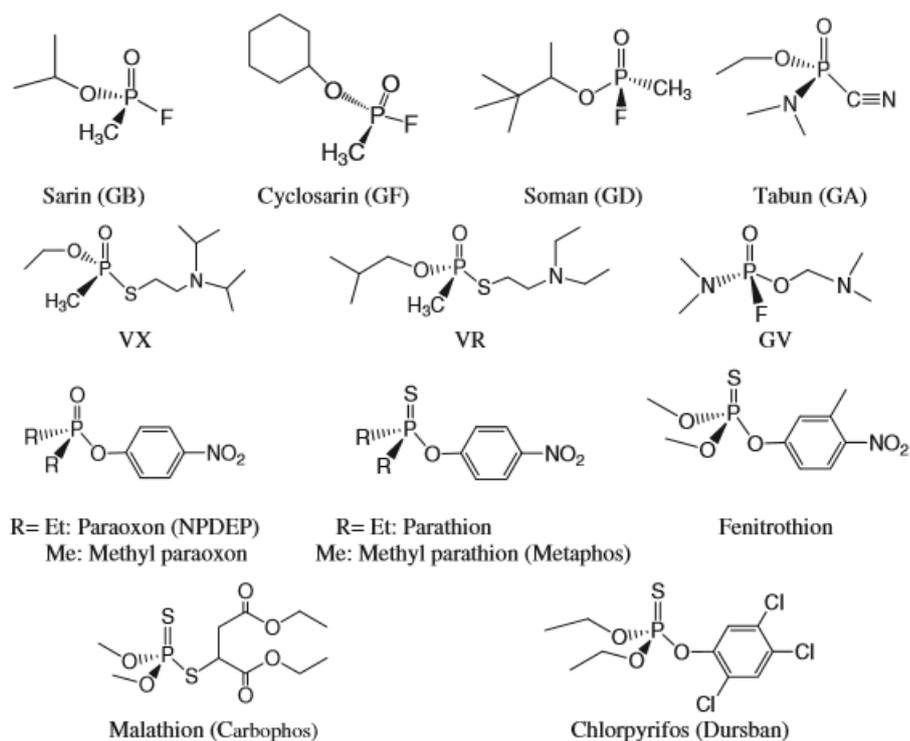
Figura 2. Reação de hidrólise da acetilcolina em ácido acético e colina catalisada pela enzima acetilcolinesterase.



Os triésteres de fosfato ainda possuem diferentes aplicações, por exemplo, na agricultura (como pesticidas), na indústria química (como retardadores de chamas) e na produção de armas químicas (**Figura 3**).¹ Diferentemente aos monoésteres e diésteres, os triésteres de fosfato tem atraído grande interesse em relação a sua química, visando a necessidade de tornar estoques de organofosforados, que incluem gases neurotóxicos, em produtos inofensivos. O objetivo em si é converter um triéster em um diéster pouco reativo.⁶

O efeito tóxico dos pesticidas à base de organofosforados e as suas descontaminações são problemas críticos e em curso. Tais pesticidas são uma das mais abundantes poluições ambientais e da cadeia alimentar, atraindo atenção global em relação a saúde humana, animal e dos insetos. Devido a isso, estudos visam métodos para melhorar os meios para estas descontaminações de compostos organofosforados tóxicos.^{7,8}

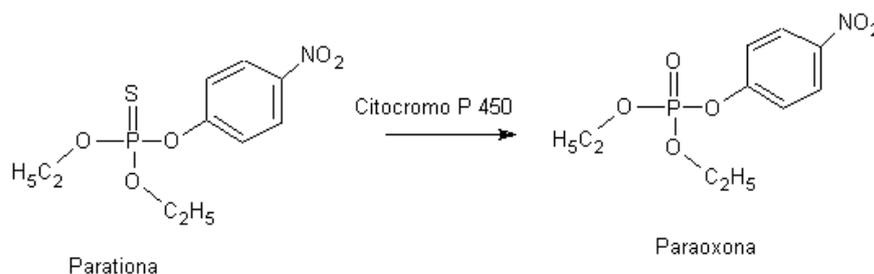
Figura 3. Agentes nervosos e pesticidas organofosforados.⁷



Um exemplo de inseticida organofosforado é a parathion, sendo essa responsável por grande parte de envenenamentos que ocorrem no mundo. Descoberta em 1944 por Schrader e em 1991 tornou-se um pesticida de uso restrito, devido a sua toxicidade. O parathion é uma substância lipossolúvel que normalmente é biotransformada em seu derivado oxigenado, um metabólito ativo conhecido como paraoxon etílico (4-nitrofenilfosfato de dietila), que apresenta uma toxicidade (DL_{50} 1,80 mg.kg⁻¹, via oral em rato) maior e mais efetiva que a da substância original (DL_{50} 6,01 mg.kg⁻¹, via oral em rato), sendo um inseticida inibidor da acetilcolinesterase mais potente disponível e ainda apesar de ser utilizada como um medicamento oftalmológica, hoje em dia é raramente utilizado como inseticida, devido ao risco de intoxicação. A reação de transformação da mesma pode ser

realizada por meio biótico ou abiótico e é denominada dessulfurização oxidativa, podendo ocorrer em diversas partes do ambiente e no fígado de mamíferos na presença de enzima citocromo P450 (**Figura 4**).^{9,10,11,12}

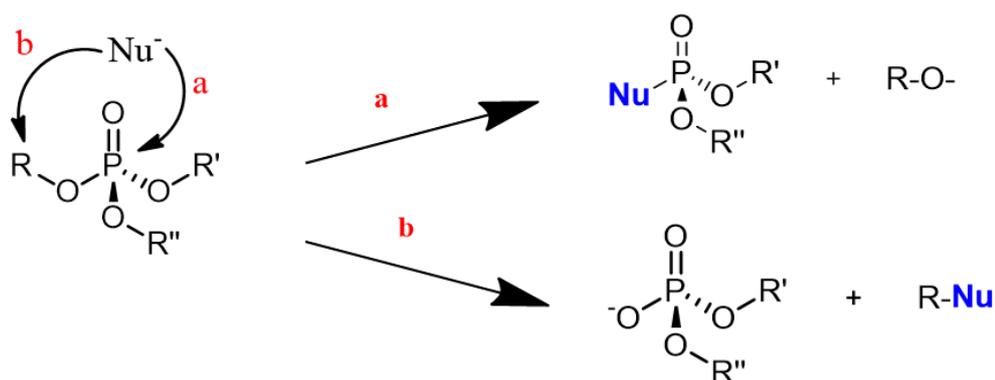
Figura 4. Dessulfurização oxidativa mediada pela enzima citocromo P450 para conversão de parathion em paraoxon em mamíferos.



2.1.1. Transferência do grupo fosforila em ésteres de fosfato

A transferência do grupo fosforila tem a possibilidade de ocorrer via substituição nucleofílica, podendo ocorrer de dois modos (**Figura 5**): (i) ataque nucleofílico ao átomo de carbono situado na ligação P-O-C, rompendo a ligação C-O e formando a ligação do átomo de carbono com o nucleófilo, ou (ii) ataque nucleofílico ao átomo de fósforo central, formando uma ligação do átomo de fósforo com o nucleófilo.¹³

Figura 5. Mecanismos para substituição nucleofílica de ésteres de fosfato.



As diferentes maneiras pelas quais os ésteres de fosfato sofrem a degradação são de interesse químico, não apenas pela ótica de se compreender os mecanismos, como também pela importância de se obter produtos de menor toxicidade. Devido a isso, os processos de hidrólise espontânea têm recebido uma

atenção especial e vários estão reportados na literatura. Entretanto, o desenvolvimento de estratégias para catálise, com a finalidade de quebrar ligações em ésteres de fosfato, estão sempre trazendo novas descobertas e contribuições.¹³ Dentre essas, as que mais se destacam são aquelas vinculadas à catálise homogênea que envolvem a presença de inúmeros nucleófilos, no seguinte trabalho foi estudado com a hidroxilamina, íons metálicos, catálise micelar, entre outras, onde em menor evidência está o uso de sistemas baseados em química supramolecular e sua catálise, que por sua vez, foi um dos objetivos deste trabalho.

A seguir serão apresentadas, de forma sucinta, as principais classes e subclasses de catálise que envolvem ésteres de fosfato. De modo geral classificam-se de acordo com o número de fases: catálise heterogênea e homogênea. E ainda de acordo com a quantidade de moléculas que auxiliam na reação, sendo elas: catálise intermolecular e intramolecular.

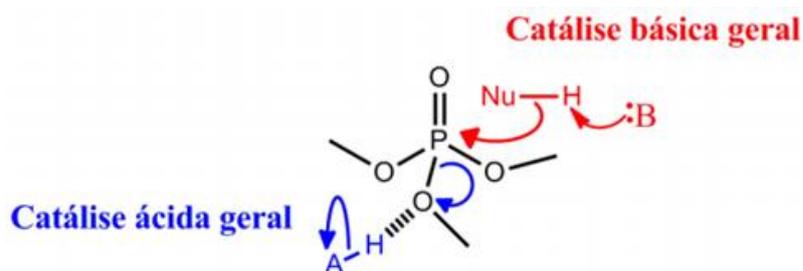
2.2. Catálise

Um catalisador é uma substância que aumenta a velocidade de uma reação química, através da mudança do caminho reacional, do mecanismo, para um de menor energia de ativação, sem ser consumido ou modificado durante o processo.¹⁴ É grande o número de aplicações dos processos catalíticos nas indústrias, na geração de energia e desenvolvimento de novos materiais. De modo geral as reações catalíticas podem ser classificadas em: (1) homogênea, quando os catalisadores e os reagentes estão em uma única fase; e (2) heterogênea, quando o catalisador constitui uma fase separada dos reagentes e produtos.¹⁵

Além da classificação acima, a catálise também pode ser do tipo intramolecular, na qual um ou mais grupos funcionais de uma molécula podem auxiliar a hidrólise de outro grupo funcional da mesma molécula, diferindo da catálise intermolecular, na qual os grupos reativos se encontram em moléculas diferentes. A eficiência desse tipo de processo é determinada de maneira simples em termos de molaridade efetiva do grupo catalítico (ME), a qual 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 intermolecular, que seguem o mesmo mecanismo, sob as mesmas condições reacionais.

Uma catálise inter/intramoleculares ainda podem ser divididas em básica (geral ou específica), ácida (geral ou específica) e nucleofílica. Na catálise ácida, o catalisador ácido aumenta a velocidade da reação por meio da doação de próton ao reagente. Há dois tipos de catálise ácida: geral e específica. Na catálise ácida geral, o próton é transferido ao reagente durante a etapa lenta da reação. Já na catálise ácida específica, o próton é completamente transferido ao reagente antes do início da etapa lenta da reação. Já quando se fala da catálise básica, um catalisador básico aumenta a velocidade de uma reação pela remoção de um próton do reagente e assim como na catálise ácida, existem dois tipos de catálise básica: geral e específica. Na catálise básica geral, o próton é retirado do reagente durante a etapa lenta da reação. Já na catálise básica específica, o próton é completamente retirado do reagente antes do início da etapa lenta. Por último, na catálise nucleofílica, um catalisador nucleofílico aumenta a velocidade de uma reação atuando como um nucleófilo, gerando um intermediário por meio de uma ligação covalente com um dos reagentes. Pode-se observar na **Figura 6** a ilustração do princípio da catálise ácido-básica geral envolvendo ésteres de fosfato, o qual ocorre de maneira simplificada. ^{14,16}

Figura 6. Princípio da catálise ácido-básica geral em ésteres de fosfato.



A catálise ácido-básica geral que explica a eficiência catalítica de muitas enzimas serve de parâmetro para a formulação de modelos catalíticos intramoleculares. A característica comum nesses sistemas é a presença de fortes ligações de hidrogênio, tanto no produto como no estado de transição. ¹⁷

Um tipo de catalisador específico que tem um elevado poder catalítico são as enzimas. São consideradas como o modelo ideal para atividade catalítica, sendo assim apresentada a seguir e ainda demonstrando seus componentes e suas principais aplicações. ¹⁸

2.2.1. Enzimas

As enzimas são moléculas de proteínas com grande massa molar que atuam como catalisadores biológicos, também chamados de biocatalisadores, ou seja, elas conseguem acelerar o metabolismo (reações do organismo). Elas são consideradas o modelo ideal para a atividade catalítica.^{18,19} Em sua maioria, as enzimas são constituídas de 50 a 2000 resíduos de aminoácidos unidos através de ligações covalentes em longas sequencias contendo ligações peptídicas. As variadas possibilidades de combinações de 20 tipos de aminoácidos possibilitam a obtenção de uma ampla quantidade de enzimas visando à catálise de diferentes tipos de reações em sistemas biológicos.^{19,20}

O sítio ativo, presente em uma pequena região da enzima, é responsável pela interação e reação de conversão do substrato em produto, e pode promover o aumento da velocidade da reação. O poder catalítico das enzimas depende de diversos fatores, como proximidade/orientação, distorção e efeito do meio. Esses fatores favorecem a reação química criando um caminho reacional de menor energia de ativação.^{21,22}

Enzimas participam de reações com elevada seletividade pela formação de complexos não covalentes com o substrato. Em tais complexos, o substrato está acomodado dentro da cavidade da enzima a fim de maximizar o contato com sua superfície. Esse encaixe complementar ocorre em sítios múltiplos de interação. Embora a energia de interação em cada sítio seja menor que aquela típica de ligação covalente, o efeito somado resulta em uma forte interação do substrato com o sítio ativo da enzima, possibilitando o contato, sem gerar fortes repulsões não-ligante. Portanto, o requisito fundamental para a formação e reconhecimento molecular é o princípio da complementaridade.^{23,24}

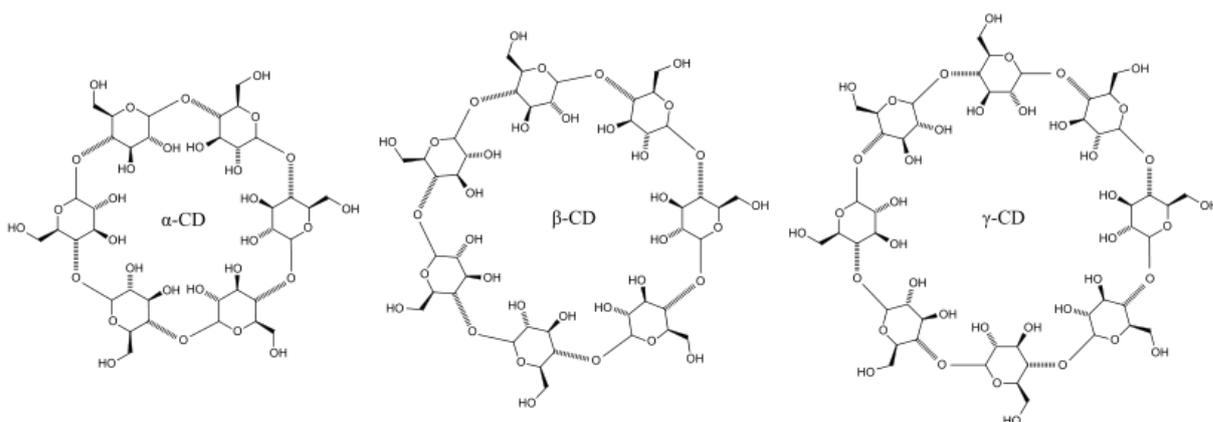
A transferência do grupo fosforila dos monoésteres e diésteres de fosfato é uma das reações mais eficientes catalisadas por enzimas e seu mecanismo tem sido investigado ao longo de muitos anos.²⁵

Mimeticamente a atividade catalítica enzimática pode-se introduzir o sistema catalítico baseado na química supramolecular, o qual possui similaridade do complexo Enzima-Substrato com o sistema Hospede-Hospedeiro. Sendo então introduzida a seguir.

2.3. Química Supramolecular

A química supramolecular é a química da ligação intermolecular, podendo ser estabelecida por ligações de hidrogênio, forças de empilhamento e/ou forças de dispersão, relacionando-se à estrutura e função das entidades formadas pela associação de duas ou mais espécies químicas.²⁶ A química hóspede-hospedeiro tem como objetivo estudar as interações seletivas que ocorrem entre moléculas hóspede e hospedeira. Normalmente, a molécula hospedeira contém grande volume de cavidade, como ciclodextrinas (**Figura 7**), calixarenos, pilararenos, entre outros. Assim, as moléculas hospedeiras usualmente apresentam forma complementar e interação com uma molécula hóspede, permitindo assim, a seletividade entre hóspede e hospedeiro, chamado de reconhecimento molecular. Este pode incluir diversas interações não covalentes, tais como ligação de hidrogênio, eletrostática, van der Waals e interações hidrofóbicas.²³

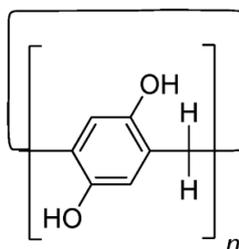
Figura 7. Exemplo de estruturas de algumas ciclodextrinas, típicas moléculas hospedeira, classificadas com α , β e γ de acordo com o número de unidade de dextrinas no ciclo, sendo 6, 7 e 8, respectivamente.



Pilar[n]arenos são uma classe relativamente nova de macrociclos, que se tornaram um dos tópicos mais populares nos estudos químicos de hospede-hospedeiro (**Figura 8**). Compostos por unidades de hidroquinonas dissubstituídas ligadas na posição para por pontes de metila, foram reportados pela primeira vez em 2008, por Tomoki Ogosh, *et al.*²⁷ Estes compostos podem reconhecer seletivamente moléculas hóspedes em solventes orgânicos, devido à cavidade rica em elétrons e a formação de interações de C-H- π . O reconhecimento ocorre também, de modo mais interessante, em meio aquoso, como por exemplo, recentemente foi reportado que

um pilar[5]areno solúvel em água totalmente substituído com grupos alquilamônios formam complexos de inclusão muito estáveis com ânions orgânicos em competição com os contra-íons do macrociclo.²⁸

Figura 8. Estrutura química de um pilar[*n*]areno (*n*=5, 6, 7).



Os pilararenos apresentam algumas vantagens sobre as moléculas tradicionais utilizadas como hospedeiras, por exemplo, são mais simétricos e rígidos comparados aos éteres de coroa e calixarenos, proporcionando ligação seletiva com os hóspedes. Além de serem solúveis em solventes orgânicos, são mais fáceis de funcionalizar com substituintes diferentes em todos os anéis benzênicos.²⁹

2.4. Efeito alfa nucleófilo

O efeito alfa pode ser descrito como um aumento da reatividade apresentada por um centro nucleofílico que tem como vizinho um átomo com pares de elétrons livres, quando comparado com um nucleófilo normal e com mesmo valor de pK_a . Dentre os exemplos de nucleófilos que apresentam tal efeito, pode-se citar a hidroxilamina, os ácidos hidroxâmicos, a hidrazina, dentre outros.

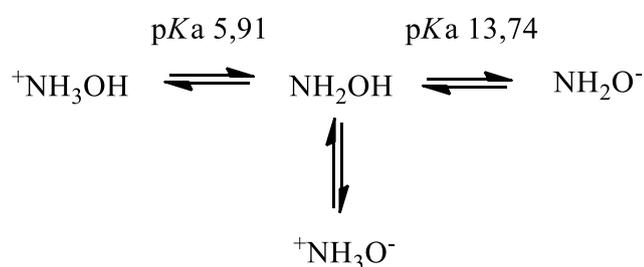
A origem do efeito alfa pode ser atribuído a três fatores: (i) Ao aumento da nucleofilicidade pelo aumento da densidade eletrônica no centro da reação, devido aos pares de elétrons presentes no átomo na posição alfa; (ii) À compensação eletrônica por ressonância pelos pares de elétrons no átomo adjacente, como se pode ver na **Figura 9**; (iii) À desestabilização do estado fundamental, devido a repulsão proveniente da ocupação dos orbitais $p\pi$ dos átomos adjacentes, acarretando em um aumento de energia do orbital HOMO que participa da reação. Devido a este aumento do nível de energia, o orbital HOMO reage eficientemente com o centro eletrofílico, causando assim uma diminuição na repulsão existente nos orbitais $p\pi$, aumentando a reatividade.

Figura 9. Modelo representativo da doação de elétrons do átomo adjacente.



A hidroxilamina é um nucleófilo que possui uma maior reatividade quando comparada a nucleófilos comuns que apresentam o mesmo pK_a , devido ao efeito alfa. Uma outra explicação para o excesso de reatividade da hidroxilamina leva em consideração os estados de protonação da mesma e as possíveis estruturas formadas em diferentes valores de pK_a (**Figura 10**), foi proposta por Kirby *et al.*³⁰

Figura 10. Espécies da hidroxilamina em função do pK_a .



A partir disso, sugere-se que o ataque nucleofílico da substância tem maior relevância entre os valores de pK_a de 5,91 e 13,74, pois nessa faixa a hidroxilamina apresenta-se em equilíbrio tautomérico entre as estruturas NH_2OH e ${}^+\text{NH}_3\text{O}^-$, onde se encontra nas melhores condições para a sua estabilidade, porém na sua forma desprotonada maior é a sua reatividade. A literatura sugere ainda que o ataque da hidroxilamina no átomo de fósforo ocorre pelo átomo de oxigênio.³¹

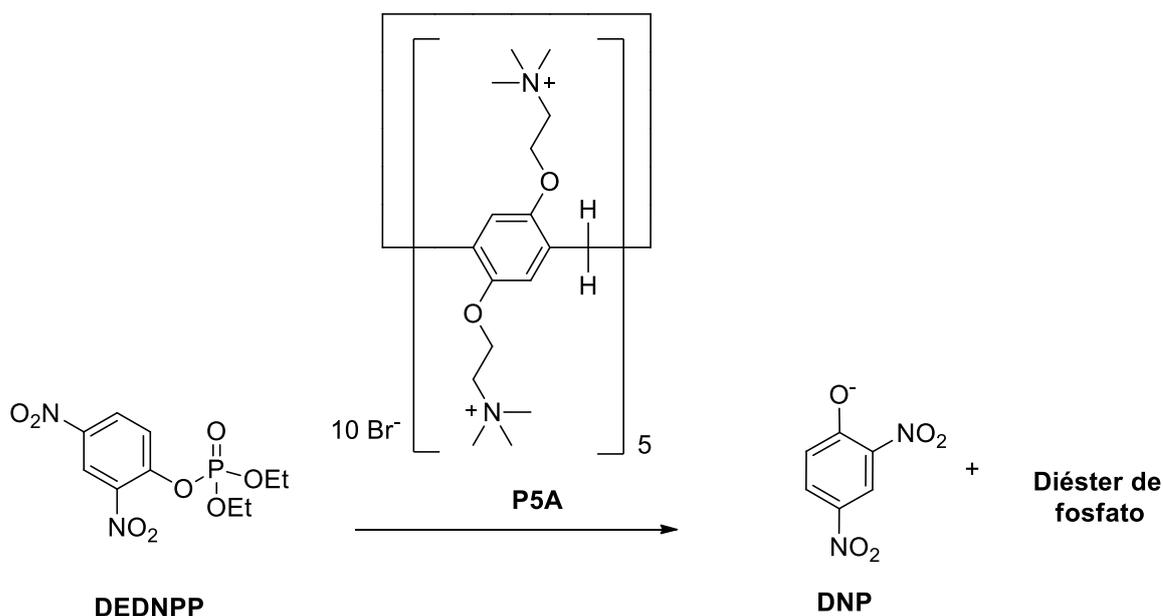
Levando em consideração todos os conceitos abordados, neste trabalho, o pesticida organofosforado modelo utilizado nesse projeto foi o Paraoxon etílico, substância de elevada toxicidade e tem seu uso restringido em diversos países.³² A degradação do mesmo, que é um dos objetivos propostos pelo trabalho, foi realizada por meio de reações com a hidroxilamina, um nucleófilo que possui o efeito alfa, como citado anteriormente, como método alternativo à incineração, que atualmente é a prática de destoxicação mais empregada para pesticidas. Também foi realizada a degradação espontânea sem a presença de um nucleófilo alfa para base de comparação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

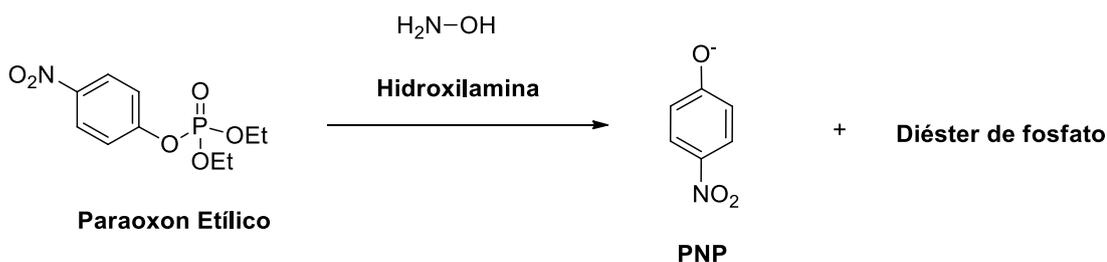
O presente trabalho tem dentre os objetivos gerais avaliar a reação de degradação do triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) na presença do pilar[5]areno (**P5A**) (**Figura 11**).

Figura 11. Degradação do triéster **DEDNPP** na presença de **P5A**.



E ainda, avaliar a reação de degradação do triéster **Paraoxon Etílico** na presença, e ausência, de NH_2OH - **Hidroxilamina**, (**Figura 12**).

Figura 12. Degradação do triéster **Paraoxon Etílico** na presença de **Hidroxilamina**.



3.2. Objetivos específicos

- Acompanhar as reações de degradação do **DEDNPP** na presença de **P5A** utilizando espectroscopia UV-Vis, através da formação do produto 2,4-dinitrofenol e avaliar os seguintes efeitos: (I) concentração de **P5A**, (II) pH e (III) tampão;
- Acompanhar as reações de degradação do **Paraoxon Etílico** na ausência e na presença de **Hidroxilamina**, NH_2OH , utilizando espectroscopia UV-Vis, através da formação do produto 4-nitrofenolato, **PNP** e avaliar os seguintes efeitos: (I) eficiência do nucleófilo, (II) pH do meio reacional e (III) Hidrólise espontânea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

O triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), disponível no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI), foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita por Moss, R. A *et al.*³³ O pilarareno **P5A**, também disponível no LaCFI, foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Min, X *et al.*²⁹

O triéster Paraoxon etílico foi adquirido comercialmente junto a Sigma Aldrich, juntamente com o nucleófilo hidroxilamina. Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich, Carlo Erba, Merck, Acros e Vetec, e tratados com técnicas adequadas de purificação, quando necessário.

4.2. Medidas Cinéticas

As medidas cinéticas foram realizadas em um espectrofotômetro de UV-Vis Cary 50 acoplado a um computador contendo sistemas de aquisição e tratamentos de dados CaryWinUV 3.00 (**Figura 13**). Para todas as medidas foram utilizadas cubetas de quartzo termostatzadas com capacidade de 3,5 mL e 1,0 cm de caminho óptico.

Figura 13. Espectrofotômetro de UV-Vis Cary 50.



As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro digital Hanna, calibrado a 25 °C com soluções padrões com pHs 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlo Erba).

As reações foram acompanhadas pela formação do produto no comprimento de onda adequado por cinco tempos de meia-vida. Os ajustes dos dados cinéticos foram realizados pelo programa ORIGIN versão 8.0.

Em experimentos acima de 25 °C, as medidas foram realizadas com compensação de temperatura, em cela acoplada a banho termostático Microquímica, modelo MQBTC99-20.

4.3. Metodologia

4.3.1. Hidrólise do DEDNPP com P5A

Inicialmente, foram preparadas soluções estoques de **P5A** $1,0 \times 10^{-3}$ M e os tampões citrato de sódio 0,1 M, acetato de sódio 0,1 M e Bis-Tris 0,1 M. O triéster disponível apresenta a concentração: $[\text{DEDNPP}] = 5,0 \times 10^{-3}$ M.

Para o planejamento do trabalho, foi necessário o conhecimento dos valores de pK_a e concentração dos tampões. O ácido cítrico, apresenta 3 valores de pK_a , sendo eles $pK_{a1} = 3,14$; $pK_{a2} = 4,77$ e $pK_{a3} = 6,40$ (**Figura 14**). Já o ácido acético, apresenta o pK_a de 4,75 a 25 °C (**Figura 15**).

Figura 14. Reações de dissociação consecutivas do ácido cítrico.

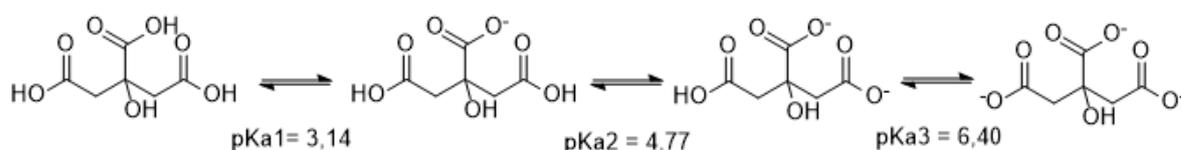
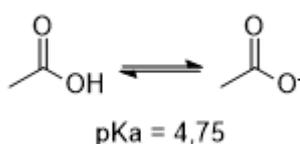


Figura 15. Reação de dissociação do ácido acético.



Primeiramente a solução estoque de **P5A** foi diluída com o tampão Bis-Tris em diferentes concentrações na faixa de $2,0 \times 10^{-3}$ M a $8,0 \times 10^{-4}$ M. Os valores de pH dessas amostras foram ajustados ao valor 7,0, com soluções de $\text{KOH}_{(\text{aq})}$ e $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ no pHmetro calibrado com soluções padrões. Com o pH 7,0, foi ajustado ao volume desejado e retirada uma alíquota de 2,0 mL, a qual foi transferida para a cubeta. Foram injetados 20,0 μL de **DEDNPP** e colocadas no espectrofotômetro UV-Vis.

Da solução estoque, as soluções de tampão acetato de sódio e citrato de sódio foram diluídas em água, na ausência de **P5A**, o pH foi ajustado no pHmetro calibrado e a concentração foi de $4,0 \times 10^{-2}$ M, com um valor superior ao do maior pK_a garantindo que a espécie se encontre totalmente desprotonada. Dessa solução, foram transferidos 2,0 mL para as cubetas e, por fim, foi adicionado o triéster **DEDNPP** e colocadas no espectrofotômetro UV-Vis podendo conhecer assim sua hidrólise espontânea na presença de acetato e de citrato, separadamente. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas em 360 nm. O mesmo processo foi repetido, porém agora com a presença de uma solução de **P5A**, na concentração final de $1,6 \times 10^{-3}$ M.

4.3.2. Hidrólise do Paraoxon etílico com hidroxilamina

Foi padronizada uma solução estoque de $\text{KOH}_{(\text{aq})}$ e diluída em seguida em diversas concentrações, e seus respectivos valores de pH. Com isso, foram transferidas para a cubeta adicionando o triéster e colocadas no espectrofotômetro UV-Vis, obtendo as constantes de velocidade da hidrólise espontânea, sem a presença do nucleófilo hidroxilamina. O procedimento foi realizado para o triéster Paraoxon etílico em acetonitrila ($8,3 \times 10^{-3}$ M).

Para os valores de pH menores (7,0-11,5) foram preparados os seguintes tampões: KHCO_3 , CHES e Tris. Foram ajustados os valores de pH desejados manualmente no pHmetro, adicionado o triéster e colocados no espectrofotômetro UV-Vis. As constantes de velocidade obtidas (k_{obs}) foram encontradas através do método da velocidade inicial (eq. i), pois são cinéticas muito lentas. A razão entre o valor do coeficiente angular da reta encontrado (velocidade inicial) e a absorvância final resulta no valor de constante de velocidade observada, k_{obs} (eq. ii).

$$v_i = \frac{\Delta \text{Absorvância}}{\Delta \text{tempo}} \quad (\text{i})$$

$$k_{obs} = \frac{v_i}{\Delta Abs_{total}} \quad (ii)$$

Para as cinéticas com valores de pH inferiores a 7,0 foi preparada uma solução de tampão Bis-Tris e o pH ajustado manualmente no pHmetro. Foi adicionado o triéster na solução e colocadas num banho termostático a 25 °C. No momento em que foi colocado, uma alíquota de 1,0 mL é retirada e congelada, sendo considerada o tempo zero da reação. A cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e congelado. Após alguns dias é possível realizar a leitura através do descongelamento das alíquotas e adição de 1,0 mL da solução de tampão [Tris] = 0,2 M em pH = 9,0. A mistura foi colocada numa cubeta e realizada a leitura dos pontos no espectrofotômetro UV-Vis. O cálculo da k_{obs} é feito pelo método da velocidade inicial, obtendo assim um perfil de pH.

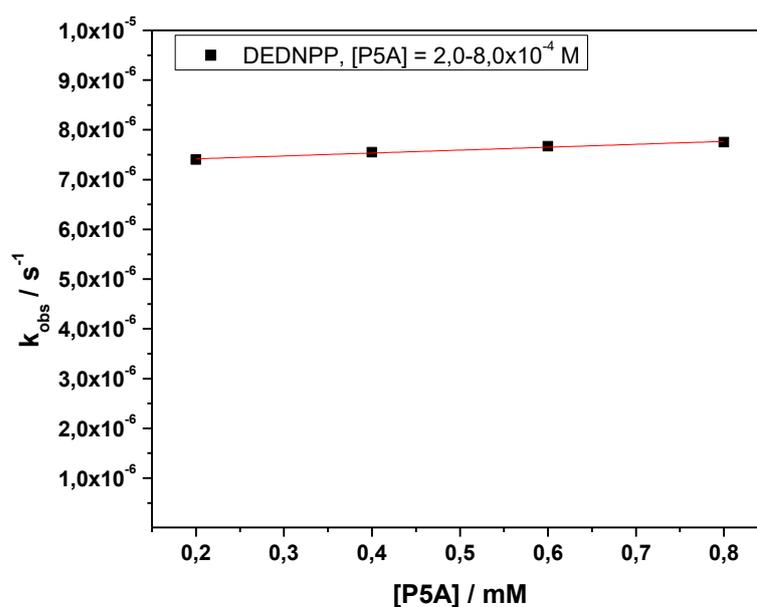
Para observar o efeito do nucleófilo hidroxilamina foi preparada uma solução de hidroxilamina em água destilada e outra com hidroxilamina na solução de KOH titulada. Do mesmo modo citado acima, para os valores pH menores foram utilizados os tampões KHCO₃, CHES e Tris. O triéster é adicionado nas soluções e colocados no espectrofotômetro UV-Vis para obter os valores de k_{obs} . Com os valores da hidrólise espontânea em água e da hidrólise na presença da hidroxilamina, é possível assim avaliar o efeito alfa nucleófilo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cinética da hidrólise do triéster DEDNPP catalisada com P5A

Inicialmente foi avaliado o efeito do **P5A** na hidrólise do triéster **DEDNPP** $5,0 \times 10^{-3}$ M no valor de pH 7,0 com o tampão Bis-Tris 0,1 M, através da variação da concentração do **P5A** na faixa de $2,0 \times 10^{-4}$ M até $8,0 \times 10^{-4}$ M. Foi obtido na **Figura 16** o gráfico com as constantes observadas, k_{obs} , obtidas.

Figura 16. Gráfico de k_{obs} em função da concentração de **P5A** para a reação de hidrólise do DEDNPP com o tampão Bis-Tris, a 25 °C e pH 7,0.

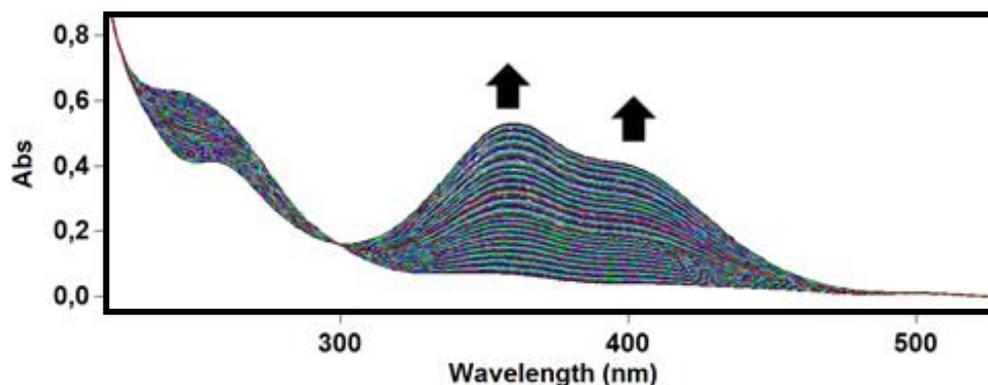


Com isso, primeiramente vemos que a constante aumenta com a concentração do hospedeiro e nessa faixa de concentração estudada, temos uma faixa de k_{obs} de $(7,6 \pm 0,2) \times 10^{-6} s^{-1}$. Valor muito próximo da hidrólise espontânea que é de aproximadamente $k_o = 8,0 \times 10^{-6} s^{-1}$.³⁷ Uma tentativa para explorar o poder catalítico do pilarareno foi a troca de tampão. A hidrólise do triéster **DEDNPP** foi realizada com dois diferentes tampões: acetato e citrato.

As reações foram acompanhadas por espectroscopia UV-Vis, gerando os espectros sucessivos de absorção em função do comprimento de onda (**Figura 17**),

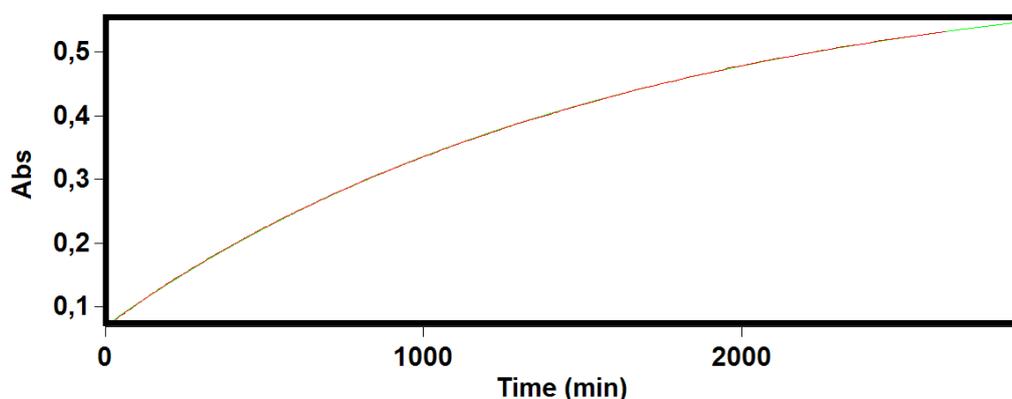
permitindo assim visualizar o crescimento das bandas em 360 nm e 400 nm, referente a formação do produto 2,4-dinitrofenolato (**DNP**).

Figura 17. Absorvâncias vs. comprimento de onda para a reação de hidrólise do **DEDNPP** no tampão [acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M a 25 °C e pH 5,8.



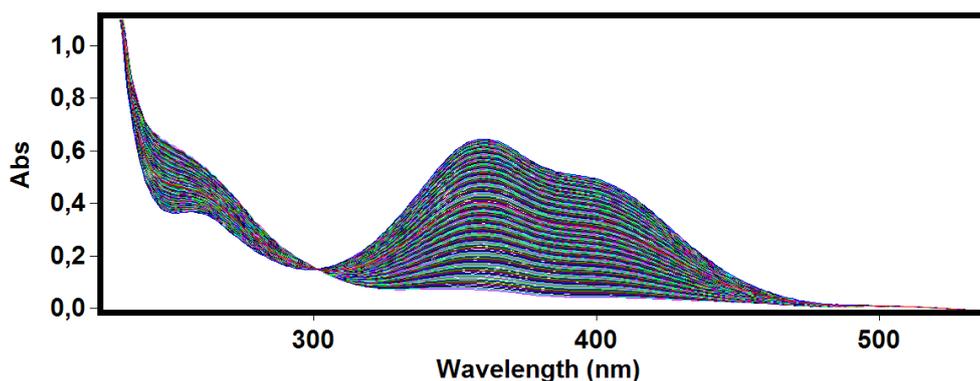
Através do gráfico da **Figura 17**, obtemos um gráfico de absorvância em função do tempo para a formação do **DNP**, em $\lambda = 360$ nm, **Figura 18**, onde podemos concluir com o comportamento da curva apresentada é típica de primeira ordem em relação ao substrato orgânico, em todas as reações estudadas, obtendo assim a k_{obs} de $1,04 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Figura 18. Gráfico das absorvâncias obtidas em $\lambda = 360$ nm vs. tempo para a reação de hidrólise do **DEDNPP** no tampão [acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M a 25 °C e pH 5,8.



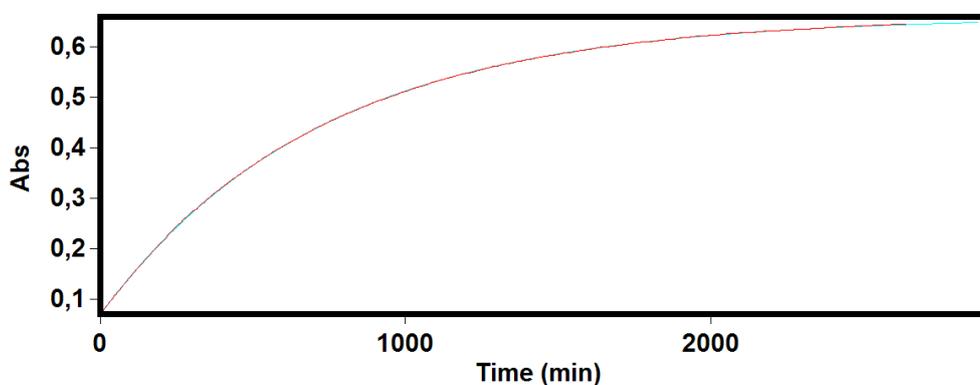
O mesmo procedimento foi realizado, porém com a presença do **P5A**, na concentração de $1,6 \times 10^{-3}$ M, obtendo o gráfico apresentado na **Figura 19**.

Figura 19. Absorvâncias vs. comprimento de onda para a reação de hidrólise do **DEDNPP** na presença de $[P5A] = 1,6 \times 10^{-3}$ M e tampão [acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M a 25 °C e pH 5,8.



A partir do gráfico da **Figura 19**, o gráfico da absorvância vs. tempo para a formação do **DNP** em comprimento de onda $\lambda = 360$ nm (**Figura 20**) é formado, onde do mesmo modo que acima, a curva apresenta um comportamento típico de primeira ordem em relação ao substrato. Foi obtido uma k_{obs} de $2,32 \times 10^{-5}$ s⁻¹.

Figura 20. Gráfico de absorvâncias obtidas em $\lambda = 360$ nm vs. tempo para a reação de hidrólise do **DEDNPP** na presença de $[P5A] = 1,6 \times 10^{-3}$ M e tampão [acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M a 25 °C e pH 5,8.



Com os valores das k_{obs} obtidas, pode-se concluir que a hidrólise na presença do pilarareno é aproximadamente 2,2 vezes mais rápida que a hidrólise na ausência do mesmo, o que comprova o sistema catalítico baseado na química supramolecular. Os mesmos experimentos foram realizados para o tampão citrato em pH 7,4 e concentração de $4,0 \times 10^{-2}$ M, sendo encontrado o valor da constante de velocidade na ausência de pilarareno, $k_{obs} = 1,16 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e na presença de [pilarareno] = $1,6 \times 10^{-3}$ M, $k_{obs} = 2,58 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Novamente, a reação catalisada é aproximadamente 2,2 vezes mais rápida. Todas as constantes obtidas estão apresentadas na **Tabela 1**. Foi observado que, com a presença do pilarareno é comprovada a existência de uma catálise baseada na química supramolecular. Uma proposta para justificar o valor baixo de 2,2 de acréscimo pode ser devido à pequena afinidade do substrato com a cavidade do pilarareno, ou seja, pela razão da constante ser baixa, deve ser pequena a quantidade de substrato que reage dentro da cavidade hospedeiro.

Tabela 1. Constantes obtidas para a reação de hidrólise do **DEDNPP** com **P5A** nos tampões acetato e citrato.

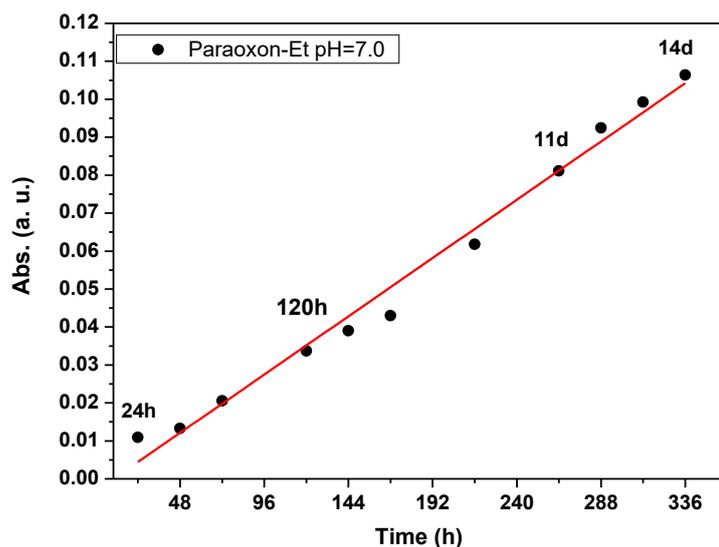
Substrato	$k_{obs} / \text{s}^{-1} (\times 10^{-5})$				k_{cat}/k_o
	[acetato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M		[citrato] = $4,0 \times 10^{-2}$ M		
	pH = 5,8	pH = 5,8 [P5A] $1,6 \times 10^{-3}$ M	pH = 7,4	pH = 7,4 [P5A] $1,6 \times 10^{-3}$ M	
DEDNPP	1,04	2,32	1,16	2,58	2,2

5.2. Cinética de hidrólise do Paraoxon-Et: Catálise básica

Inicialmente avaliou-se o efeito da cinética espontânea do Paraoxon-Et na faixa de valores de pH entre 6,0 e 13,4. Abaixo segue, como exemplo, a **Figura 21** relacionando as absorvâncias obtidas em comprimentos de onda $\lambda = 400$ nm com o tempo em pH = 7,0. Nota-se que levou 14 dias para a reação atingir um valor de 0,11 de absorvância, ou seja, foi formada uma pequena quantidade de **PNP** durante

esse tempo. Utilizando o método da velocidade inicial, pode se obter a constante observada para este valor de pH.

Figura 21. Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm em função do tempo nas reações de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et em pH 7,0, a 25 °C.



O gráfico das absorvâncias medidas em pH 8,5 em função do comprimento de onda (**Figura 22**) e o gráfico relacionando às absorvâncias com o tempo (**Figura 23**), se encontram abaixo. Nota-se que para a reação atingir um valor de 0,06 de absorvância foram necessários aproximadamente 5 dias. Com isso, pelo método da velocidade inicial, pode-se obter a constante observada para este valor de pH.

Figura 22. Gráfico de absorvância vs. comprimento de onda para a reação de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et, a 25 °C e pH 8,5.

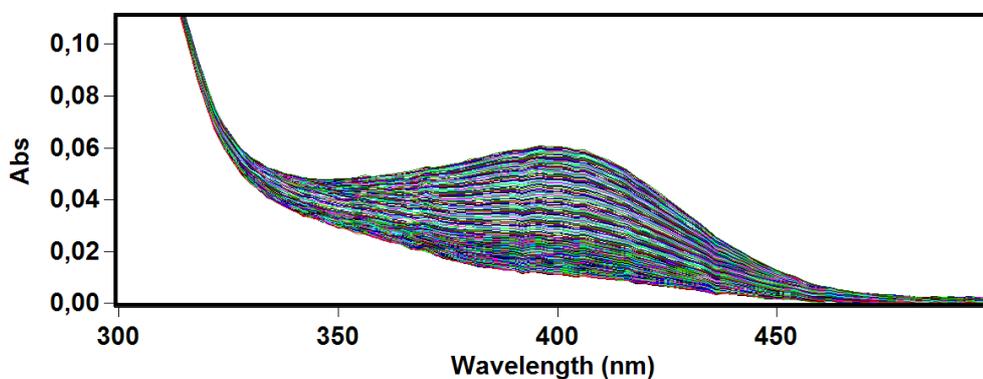
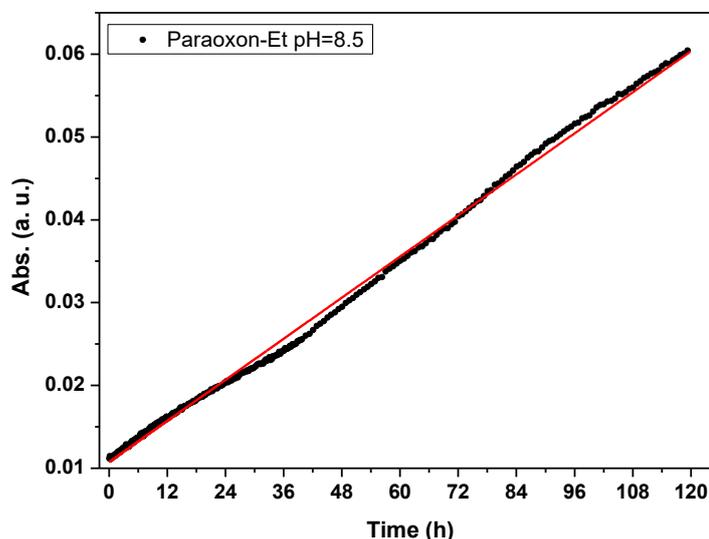


Figura 23. Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm em função do tempo nas reações de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et em pH 8,5 a 25 °C.



O gráfico das absorvâncias medidas em pH = 12,0 em função do comprimento de onda (**Figura 24**) e o gráfico relacionando as absorvâncias com o tempo (**Figura 25**). Nota-se que para a reação atingir um valor de saturação de absorvância foram necessárias aproximadamente 8 horas. Com isso, pela equação de formação de produto de primeira ordem, pode-se obter a constante observada para este valor de pH.

Figura 24. Gráfico de absorvância vs. comprimento de onda para a reação de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et, a 25 °C e pH 12.

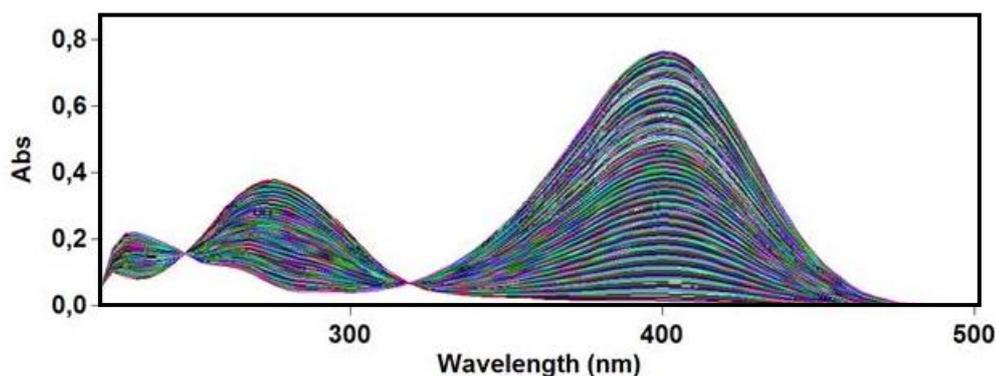
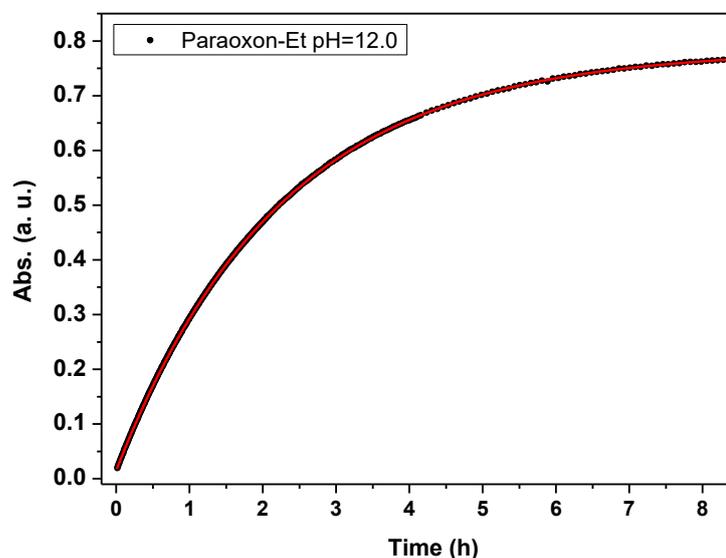
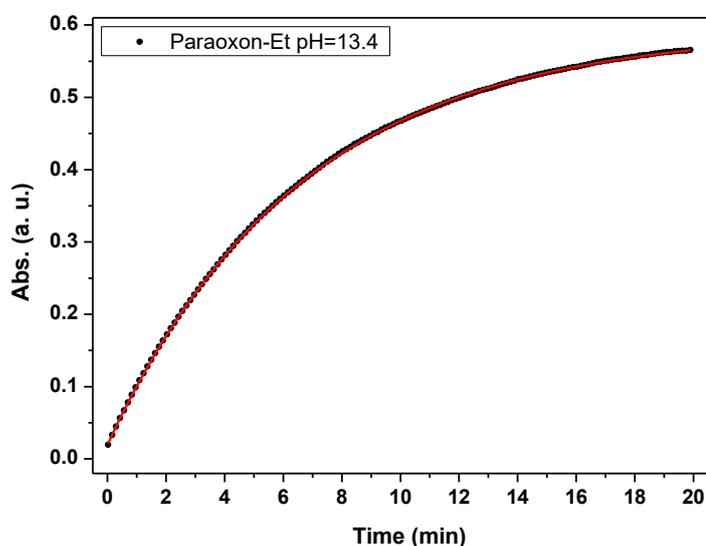


Figura 25. Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm em função do tempo na reação de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et em pH 12, a 25 °C.



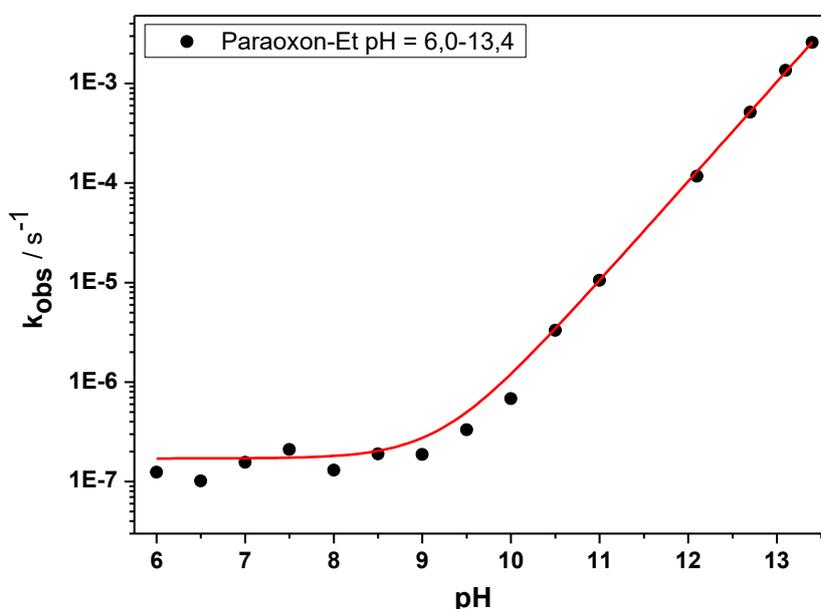
O gráfico relacionando as absorvâncias com o tempo, em pH = 13,4 (**Figura 26**). Nota-se que para a reação atingir um valor de saturação de absorvância foram necessários aproximadamente 20 minutos. Com isso, pela equação de formação de produto de primeira ordem, pode-se obter a constante observada para este valor de pH.

Figura 26. Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm em função do tempo nas reações de hidrólise espontânea do Paraoxon-Et em pH = 13,4 à 25 °C.



Desta maneira, pode-se obter os valores de constante observada k_{obs} para cada valor de pH. O perfil completo de pH estudado apresenta a hidrólise a partir do pH = 6,0. Posteriormente, é atingido um patamar em que os valores de k_{obs} se mantêm constantes até pH = 9,0. Em valores de pH alcalinos ocorre a catálise básica. Esta catálise tem caráter mais pronunciado quando comparado a em pH neutro. Este efeito deve-se ao ataque nucleofílico da OH^- (pH alcalino) ser mais eficiente que a protonação do grupo de saída (4-nitrofenol/PNP) e ataque nucleofílico da H_2O (pH neutro), para este substrato. Segue na **Figura 27** o gráfico relacionando as constantes observadas em função dos valores de pH.

Figura 27. Gráfico das constantes observadas em função do pH (6,0-13,4) nas reações de hidrólise do Paraoxon-Et em água à 25°C



Um ajuste, obtido pela equação (iii), pode ser atribuído para essa variação de valores de constante observada. Esse ajuste é atribuído pelas concentrações de $H_3O^+(H^+)$ e OH^- , em função do pH, sendo assim possível obter a constante de segunda ordem, k_{OH} e a constantes de primeira ordem, k_0 (**Tabela 2**). Essas constantes predizem o comportamento cinético desse triéster de fosfato em solução aquosa, seja ele em faixas de pH ácidos, básicos ou neutros.

$$k_{obs} = k_{OH}[OH^-] + k_0 \quad (iii)$$

Tabela 2. Constantes de primeira e segunda ordem obtidas em função do pH.

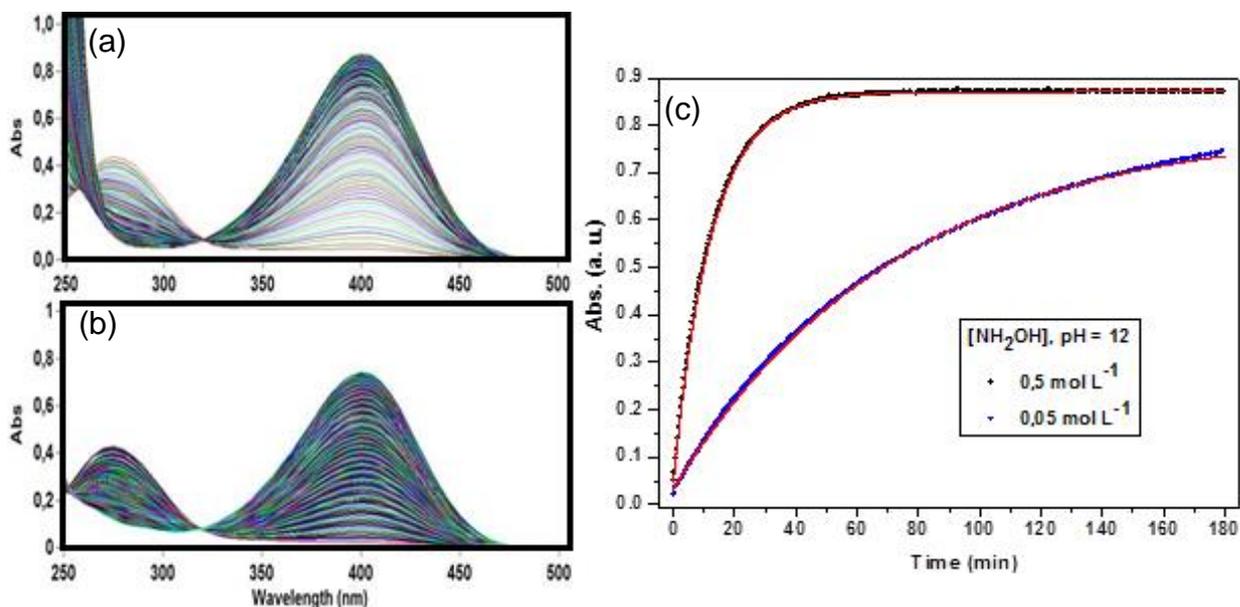
Substrato	$k_{OH} / L.mol^{-1}.s^{-1}$	k_0 / s^{-1}
Paraoxon-Et	$1,39 \times 10^{-2}$	$1,81 \times 10^{-7}$

De acordo com os valores apresentados na **Tabela 2**, observa-se em meio alcalino uma catálise básica que apresenta um caráter mais pronunciado, uma catálise mais efetiva, com um acréscimo maior que $7,5 \times 10^4$ em comparação à hidrólise em meio neutro. Isso se deve ao fato do nucleófilo OH^- ter um ataque nucleofílico mais eficiente quando comparado ao poder nucleofílico da H_2O e ainda ser mais eficiente que a protonação do grupo de saída **PNP**.

5.3. Cinética de hidrólise do Paraoxon-Et em presença de NH_2OH

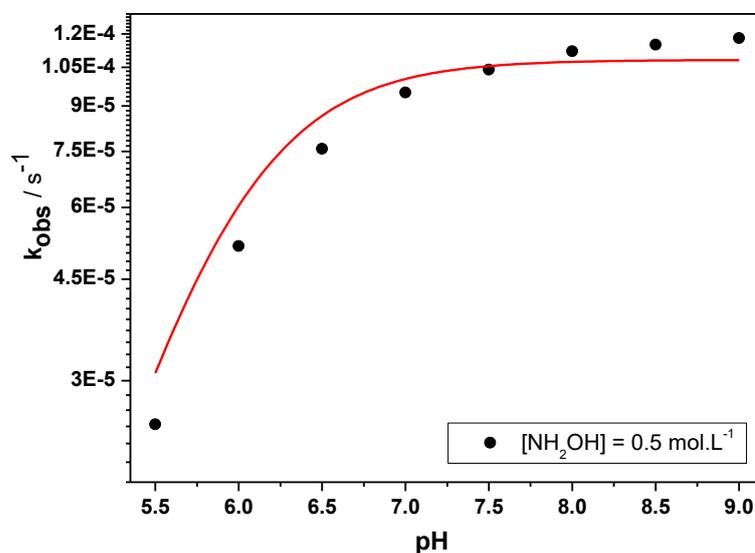
Como observado no item anterior, a hidrólise do Paraoxon-Et pode ser eficientemente realizada em uma faixa ácida ou básica. Especificamente na faixa de valores de pH alcalinos, a hidrólise do Paraoxon-Et acontece pelo ataque do ânion hidroxila (OH^-), atuando como nucleófilo. Em presença de um nucleófilo mais eficiente a reação é acelerada. Quando comparadas com a hidrólise espontânea do Paraoxon-Et, em presença de 0,05 e 0,5 M de hidroxilamina (NH_2OH) e pH = 12,0 a reação é acelerada em, aproximadamente, 2 e 12 vezes, respectivamente. Isso é observado porque a hidroxilamina atua como um alfa nucleófilo. Na **Figura 28**, é possível observar a formação de **PNP** em pH = 12, e $\lambda = 400$ nm nas concentrações de NH_2OH de (a) 0,05 e (b) 0,5 M.

Figura 28. Gráficos de absorvâncias vs. comprimento de onda para reações de hidrólise do Paraoxon-Et a 25°C e pH 12,0 na presença de (a) 0,05 M de NH_2OH e (b) 0,5 M de NH_2OH ; (c) Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 400 nm vs. tempo das reações de hidrólise do Paraoxon-Et a 25 °C.



Devido a essa diferença entre as constantes observadas com concentrações diferentes de hidroxilamina, foi possível avaliar o comportamento do Paraoxon-Et em presença de NH_2OH correlacionando com vários valores de pH. Abaixo, na concentração de $[\text{NH}_2\text{OH}] = 0,5 \text{ M}$, está apresentada a faixa de valores de pH = 5,5-9,0 (**Figura 29**). Pode-se observar que aumentado os valores de pH ocorre um acréscimo de 3 vezes no valor da constante observada, atingindo um patamar de saturação na faixa de entre pH = 8,0-9,0.

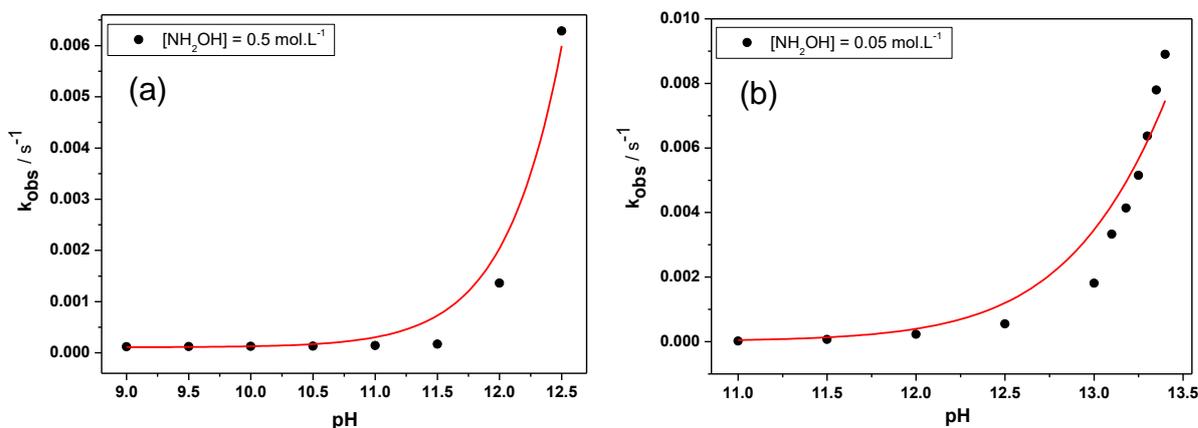
Figura 29. Gráfico das constantes observadas em função do pH (5,5-9,0) nas reações de hidrólise do Paraoxon-Et na presença da hidroxilamina 0,5 M a 25 °C.



Esse aumento é esperado, uma vez que existe um $pK_{a1} = 5,91$ entre as espécies NH_3OH^+ (fraco nucleófilo) e NH_2OH (nucleófilo), sendo correlacionado ao aumento das constantes observadas.

Em uma faixa de valores de pH alcalinos, foi possível observar um aumento nos valores de k_{obs} a partir de $pH = 11,5$ em (**Figura 30a**) $[NH_2OH] = 0,5 M$ e a partir de $pH = 12,5$ em (**Figura 30b**) $[NH_2OH] = 0,05 M$. A diferença entre os valores de pH é aceitável, visto que em uma concentração maior de nucleófilo, o aumento da constante observada acontece em valores de pH menores.

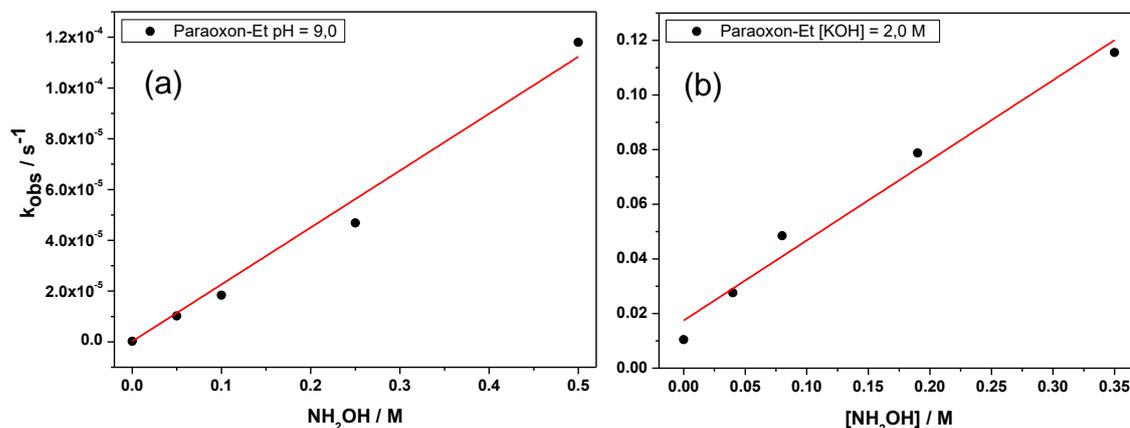
Figura 30. Gráfico das constantes observadas em função do pH (9,0-13,4) na reação de hidrólise do Paraoxon-Et na presença de NH_2OH (a) 0,5 M e (b) 0,05 M.



Esse aumento é esperado, uma vez que existe um $\text{p}K_{\text{a}2} = 13,74$ entre as espécies NH_2OH (nucleófilo) e NH_2O^- (forte nucleófilo), sendo correlacionado ao aumento das constantes observadas.

Foi necessário variar a concentração de NH_2OH entre os valores de 0,05 à 0,5 M, e em valores de pH superiores aos valores de $\text{p}K_{\text{a}1}$ e $\text{p}K_{\text{a}2}$, para observar o efeito nucleofílico das espécies NH_2OH e NH_2O^- . A **Figura 31** apresenta os gráficos com as variações de concentração de NH_2OH em $\text{pH} = 9,0$ e em solução de $[\text{KOH}] = 2,0 \text{ M}$. O coeficiente angular destes gráficos, apresentam as constantes de segunda ordem em relação a atividade nucleofílica do NH_2OH (**Figura 31a**) e NH_2O^- (**Figura 31b**). Os coeficientes lineares, devem aproximados aos valores de k_0 , em relação ao gráfico de NH_2OH , e ao k_{OH} , em relação ao gráfico de NH_2O^- (apresentados anteriormente na **Tabela 2**).

Figura 31. Gráfico da k_{obs} em relação a concentração de NH_2OH , nas condições de (a) $\text{pH} = 9,0$ e (b) $[\text{KOH}] = 2,0 \text{ M}$.



Para ajustar os valores obtidos anteriormente foi utilizado a equação (iv). Esta equação utiliza os valores de constantes k_{OH} e k_0 obtidos em ausência de hidroxilamina. Com a equação pode-se obter k_1 e k_2 , sendo eles constantes de segunda ordem da reação entre NH_2OH e NH_2O^- , respectivamente, como nucleófilos na hidrólise do Paraoxon-Et. Os valores das constantes obtidas para esta reação estão dispostos na **Tabela 3**.

$$k_{obs} = (k_1\alpha_1 + k_2\alpha_2)c_0 + k_{OH}[OH^-] + k_0 \quad (iv)$$

$$\alpha_1 = \frac{K_{a1}[H_3O^+]}{[H_3O^+]^2 + K_{a1}[H_3O^+] + K_{a1}K_{a2}}$$

$$\alpha_2 = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2 + K_{a1}[H_3O^+] + K_{a1}K_{a2}}$$

Tabela 3. Constantes de velocidades k_0 , k_{OH} , k_1 e k_2 obtidas através do ajuste dos dados cinéticos obtidos da **Figura 31** e na equação (iv).

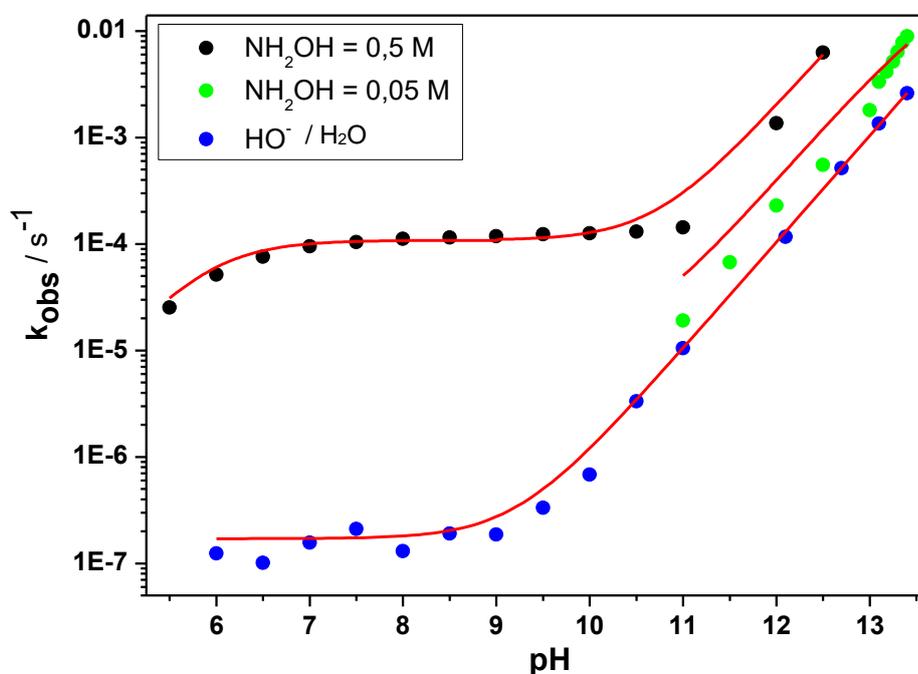
Constantes de velocidade	Paraoxon-Et
k_0 / s^{-1}	$1,81 \times 10^{-7}$
$k_{OH} / L.mol^{-1}.s^{-1}$ (Nu ⁻ =HO ⁻)	$1,39 \times 10^{-2}$
pK _{a1}	5,91
$k_1 / L.mol^{-1}.s^{-1}$ (Nu ⁻ =NH ₂ OH)	$2,20 \times 10^{-4}$
pK _{a2}	13,74
$k_2 / L.mol^{-1}.s^{-1}$ (Nu ⁻ =NH ₂ O ⁻)	0,29

O elevado valor obtido da constante de velocidade de segunda ordem k_1 e k_2 , em relação à constante de velocidade da reação de hidrólise espontânea k_0 mostra que a reação promovida pela água tem uma pequena contribuição. Tal conclusão se deve à elevada reatividade exibida pelo nucleófilo NH_2OH e NH_2O^- , devido ao efeito alfa nucleofílico, aumentando a velocidade em cerca de 1200 vezes e 10^6 vezes, respectivamente. O fato de k_2 ser maior que k_1 se deve a reatividade do nucleófilo desprotonado, NH_2O^- ser maior que a do nucleófilo neutro, NH_2OH , portanto quanto mais básico o meio reacional mais rápida será a reação de hidrólise do Paraoxon-Et. Quando comparados com o nucleófilo OH^- , temos um aumento no caso de k_2 em cerca de 20 vezes, no entanto, com o nucleófilo neutro, NH_2OH , temos uma

velocidade de aproximadamente 63 vezes menor, pelo fato de que a espécie OH^- , é mais reativa mesmo quando comparada com uma espécie que apresenta o efeito alfa nucleofílico.

O formalismo entre os resultados obtidos em presença e ausência de NH_2OH para hidrólise do Paraoxon-Et está apresentado na **Figura 32** em uma relação entre constantes observadas e os valores de pH, com os respectivos ajustes obtidos.

Figura 32. Gráfico das constantes observadas em função do pH (5,5-13,4) nas reações de hidrólise do Paraoxon-Et em ausência e em presença de 0,5 e 0,05 M de NH_2OH .



6. CONCLUSÃO

Neste projeto foi estudado: (i) a reação de degradação do triéster de fosfato **DEDNPP** com **P5A**; (ii) a reação de degradação espontânea do Paraoxon-Et; e (iii) efeito alfa nucleófilo da hidroxilamina na reação de hidrólise do Paraoxon-Et.

Os estudos cinéticos das reações do triéster de fosfato **DEDNPP** com um componente da química supramolecular, o **P5A**, permitem concluir que:

- (i) O incremento na constante de velocidade da reação de quebra do substrato **DEDNPP** na presença de **P5A** encontrado é de aproximadamente 2,2 vezes, porém, apesar de ser pequena é notável a existência de uma catálise baseada em sistemas supramoleculares.
- (ii) Sobre o pequeno incremento, temos a proposta que se deve ao fato da pequena interação que houve entre o triéster (hóspede) e o **P5A** (hospedeiro), ou seja, uma pequena quantidade de substrato que acaba efetivamente entrando na cavidade do pilarareno, algo que será estudado mais a fundo no futuro.
- (iii) Uma solução para um possível estudo futuro é o uso de outros ésteres de fosfato, preferencialmente diésteres ou monoésteres, pois devido a presença de cargas negativas, possivelmente terão uma maior interação com o pilarareno em estudo (carregado com cargas positivas). Ou então, utilizar triésteres de fosfato que possuem os substituintes com grupos funcionais negativamente carregados.

Com relação aos resultados obtidos da reação de hidrólise espontânea do pesticida **Paraoxon-Et** em meios levemente ácidos, neutros e alcalinos, conclui-se que:

- (i) Comparando os valores das constantes de velocidade obtidas, é possível observar que no meio alcalino há uma catálise com um caráter mais efetivo, com um incremento na velocidade de aproximadamente $7,5 \times 10^4$ em comparação com a hidrólise no meio neutro, que pode ser explicado pelo fato do nucleófilo OH^- possuir um ataque nucleofílico mais eficiente, comparado ao poder nucleofílico da molécula da H_2O .
- (ii) A catálise básica observada em uma faixa de pH alcalino é mais eficiente que a protonação do grupo de saída **PNP**, observada em valores neutros e ácidos de pH.

Os estudos sobre o efeito alfa nucleófilo da hidroxilamina, **NH₂OH**, na reação de hidrólise do pesticida **Paraoxon-Et**, permitem obter as seguintes conclusões:

- (i) As elevadas constantes de velocidade de segunda ordem obtidas nas reações da hidrólise do Paraoxon-Et na presença do nucleófilo desprotonado NH_2O^- (k_2) e neutro NH_2OH (k_1) em relação à constante de velocidade da reação de hidrólise espontânea em água (k_0), com um incremento de aproximadamente 10^6 e 1200 vezes, respectivamente, se deve ao fato da elevada reatividade exibida pelos nucleófilos, devido ao efeito alfa nucleófilo e à pequena contribuição da água promovendo a reação.
- (ii) Comparando os valores de k_2 e k_1 com o nucleófilo OH^- , temos um valor de 20 vezes maior para k_2 e um valor de aproximadamente 63 vezes menor para k_1 . Tal decréscimo é justificado pelo fato da forma neutra NH_2OH ser um nucleófilo com um poder nucleofílico menor, menos reativo comparado ao nucleófilo OH^- , mesmo apresentando o efeito alfa nucleofílico.
- (iii) Observa-se que o valor de k_2 é maior que k_1 , e isso se deve a reatividade do nucleófilo desprotonado NH_2O^- ser maior que a do nucleófilo neutro NH_2OH , portanto quanto mais alcalino o meio mais favorecida é a reação de degradação do pesticida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, v.26, p.745-753, 2003.
- ² JOHNSON, D. W.; HILS, J. E. Phosphate Esters, Thiophosphate Esters and Metal Thiophosphates as Lubricant Additives. **Lubricants** 2013, v.1, p. 132-148.
- ³ WESTHEIMER, F. H. Why Nature Chose Phosphates. **Science**, v.235, p. 1173, 1987.
- ⁴ MACHADO, V. G.; NOME, F. Energy-rich phosphate compounds. **Química Nova**, v.22, p.351-355. 1999.
- ⁵ WILLIAMS, N. H.; WYMAN, P. Base catalysed phosphate diester hydrolysis, **Chemical Communications**. 2001, p.1268–1269.
- ⁶ KIRBY, A. J.; SOUZA, B. S.; NOME, F. Structure and reactivity of phosphate diesters. Dependence on the nonleaving group. **Canadian Journal of Chemistry (Print)**, v. 93, p. 422-427, 2015.
- ⁷ SINGH, N.; KARPICHEV, Y.; TIWARI, A. K.; KUCA, K.; GHOSH, K. K. Oxime functionality in surfactant self-assembly: An overview on combating toxicity of organophosphates. **Jornal of Molecular Liquids**, p.237. 2015.
- ⁸ OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Ateneu, 2008.
- ⁹ SIGMA-ALDRICH®. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acessado em 20/04/2017.
- ¹⁰ DERELANKO, M.J. & HOLLINGER, M.A. **Handbook of Toxicology**, 2ª ed. CRC Press, Boca Raton, 2001.
- ¹¹ SILVA, P. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabaa Koogan, 2010.
- ¹² GALICHET, L.Y.; WIDDOP, B.; OSSELTON, D. M.; MOFFAT, A. C. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3ª ed. **Pharmaceutical Press**, 2004.
- ¹³ FLORIÁN, J.; WARSHEL, A.; **The Journal of Physical Chemistry B**, p.719. 1998.
- ¹⁴ BRUICE, P. Y. **QUÍMICA ORGÂNICA**. 4ª Ed., São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. v.2. p.413-429.
- ¹⁵ SCHMAL, M. **Catálise Heterogênea**. ed. Synergia, 2011.
- ¹⁶ ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern physical organic chemistry**. Sausalito, CA: University Science. 2006

- ¹⁷ 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. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, p.16944. 2006.
- ¹⁸ GESSER, J. C.; YUNES, S.; CLEMENTIN, R. M.; NOME, F. Reações intramoleculares como modelos não miméticos de catálise enzimática. **Química Nova**, v. 20, p.631. 1997.
- ¹⁹ STRYER, L. **Bioquímica**. 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1000, 1996.
- ²⁰ NELSON, D.L.; M.M. Cox, **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6ª ed. 2013: W.H.Freeman
- ²¹ 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.
- ²² PRICE, N. C.; JOHNSON, C. M. Proteinases as probes of conformation of soluble proteins. **Proteolytic Ezymes – A practical approach** (Beynon, R. J. & Bond, J. S., eds) p.163-180. IRL Press, Oxford, 1989.
- ²³ MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A.; PILO-VELOSO, D. Drug delivery systems. **Química Nova**, v. 21, p.470-476,1998
- ²⁴ CRAM, D. J; LEIN, G. M. Host-guest complexation. 36. Spherand andlithium and sodium ion complexation rates and equilibria. **Journal American Chemistry Society**, p.3657-3668, 1985.
- ²⁵ GAJEWSKI, S.; COMEAUX, E. Q.; JAFARI, N.; BHARATHAM, N.; BASHFORD, D.; WHITE, S. W.; WAARDENBURG, R. C. Analysis of the active site mechanism of Tyrosyl-DNaphosphodiesterase I: a member of the phospholipase D superfamily. **Journal of Molecular Biology**, 2012. 415(4): p. 741-758.
- ²⁶ LEHN, J.-M.; **Supramolecular Chemistry, VCH: Heidelberg**, 1995.
- ²⁷ OGOSHI, T.; KANAI, S.; FUJINAMI, S.; YAMAGISHI, T.; NAKAMOTO, Y. para-Bridged symmetrical pillar [5] arenes: their Lewis acid catalyzed synthesis and host-guest property. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, n.30, p. 5022. 2008.
- ²⁸ LIZ, D. G.; MANFREDI, A. M.; MEDEIROS, M.; MONTECINOS, R.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B.; GARCÍA-RÍO, L.; NOME, F. Supramolecular phosphate transfer catalysis by pillar[5]arene. **Chemical Communications**, v. 52, p. 3167-3170, 2016.
- ²⁹ MIN, X.; YANG, Y.; CHI, X.; ZHANG, Z.; HUANG, F. Pillararenes, A New Class of Macrocycles for Supramolecular Chemistry. **Accounts of chemical research**, v. 45, n.8, p. 1294-1308. 2012.

- ³⁰ 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. *chemical communications. Journal of the American Chemical Society*. v. 46, p. 1302, 2010.
- ³¹ MEDEIROS, M. Estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e um triéster de fosfato: caracterização de produtos e intermediários. Dissertação (**Mestrado em Química**). Centro de Ciências Física e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- ³² TANG, X.; ZHU, L.; CHEN, J. Reaction pathway for reactivation and aging of paraoxon-inhibited-acetylcholinesterase: A QM/MM study. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1035, p. 44–50, 2014.
- ³³ MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of Phosphate-Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents. **The Journal of Organic Chemistry**, v.48, n.4, p.588. 1983
- ³⁴ FIFE, T. H.; BRUICE, T. C. The temperature dependence of the ΔpD correction for the use of the glass electrode in D₂O. **The Journal of Physical Chemistry**, v.65. 1961.
- ³⁵ LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 2001.
- ³⁶ EDWARDS, J. O; PEARSON, R. G., The factors Determining Nucleophilic Reactivities. **Journal of the American Chemical Society**, v.84, p.16, 1962.
- ³⁷ ORTH, E; 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. **The Journal of Organic Chemistry**, 76 (19), pp 8003–8008. 2011.