

Marcelo de Freitas Lima

ESTUDO DO EFEITO DA CATÁLISE ÁCIDA GERAL INTRAMOLECULAR
NA DEGRADAÇÃO DE DIÉSTERES DE FOSFATO

FLORIANÓPOLIS

2006



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

**ESTUDO DO EFEITO DA CATÁLISE ÁCIDA GERAL INTRAMOLECULAR NA
DEGRADAÇÃO DE DIÉSTERES DE FOSFATO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Marcelo de Freitas Lima

Florianópolis, fevereiro de 2006.

Marcelo de Freitas Lima

**ESTUDO DO EFEITO DA CATÁLISE ÁCIDA GERAL INTRAMOLECULAR NA
DEGRADAÇÃO DE DIÉSTERES DE FOSFATO**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em Química
no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa
Catarina

Florianópolis, 15 de março de 2003.

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Coordenador do Curso de Pós-graduação em Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
(Orientador)

Prof. Dr. Willian Ricardo Rocha
(Relator)

Prof. Dr. Omar Abdel Moneim Abou El Seoud

Prof. Dr. Ademir Neves

Prof. Dr. Alfredo Tibúrcio Nunes Pires

Prof. Dr. Luiz Fernando Dias Probst

*Dedico esse trabalho a minha Esposa, Aline
Margarete Furuyama Lima, e a meus Pais, Osvaldo
Jorcelino de Lima e Maria Tereza de Freitas Lima.*

“A palavra, **impossível**, foi criada para
os tolos que nela acreditam.”

(MFLima, 2006)

AGRADECIMENTOS



Agradeço a Deus, a meus Pais, a minha Esposa tão amada, e também:

Ao Professor Faruk José Nome Aguilera e a Professora Haidi Dálida Lentz Fiedler, pela orientação e consideração.

Ao Davi da Silva e ao Professor Anthony J. Kirby por toda colaboração nesse trabalho.

Aos Doutores Eberlin, Szpoganicz, Zucco, Gesser, Spinelli, Probst, Pires, El Seoud, Rocha, Neves, por toda contribuição técnica ou acadêmica, direta ou indiretamente, para a realização dessa Tese de Doutorado.

Aos colegas de laboratório, principalmente das unidades 203 e 210 do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI).

A todos os integrantes do Departamento de Química, presentes entre os anos de 2002 e 2006, em especial aos secretários: Maria da Graça Pereira Hoeller e Jadir Carminatti.

E ao CNPq.

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1. Introdução	1
1.1. Enzimas.....	5
1.2. Catálise Intramolecular.....	6
1.3. Efeitos entrópicos	11
1.4. A importância das ligações de hidrogênio e interações iônicas	12
1.5. Complexidade do estudo enzimático.....	16
1.6. Exemplos de estudos não-miméticos.....	18
1.7. Reações químicas e mecanismos.....	20
1.8. Nucleófilos Alfa.....	23
1.9. Estudo químico computacional.....	29
Capítulo 2	33
2. Objetivos	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos específicos	34
2.2.1. Cinéticos e Termodinâmicos.....	34
2.2.2. Quânticos.....	34
2.2.3. Objetivo final.....	35
Capítulo 3	36
3. Metodologias.....	36
3.1. Metodologia Experimental	36
3.1.1. Os reagentes	36
3.1.2. Síntese do DANMEP	36
3.1.3. Controle do pH.....	40

3.1.4.	Determinação potenciométrica da constante de dissociação do DANMEP	41
3.1.5.	As soluções dos nucleófilos	43
3.1.6.	Os estudos espectrofotométricos	44
3.1.7.	Procedimento utilizado para avaliação do efeito isotópico	46
3.1.8.	Procedimento utilizado para avaliação do efeito da temperatura... ..	46
3.2.	Metodologia Computacional	47
3.2.1.	Equipamentos	47
3.2.2.	Construção do Cluster Beowulf	47
3.2.3.	Programas	50
3.2.4.	Metodologia para os cálculos	51
Capítulo 4	52
4.	Resultados e Discussões.....	52
4.1.	Equilíbrio químico de protonação do DANMEP	52
4.2.	Reação de hidrólise do DANMEP	58
4.3.	Reação de hidrólise do DANMEP sob influência de forte acidez.....	62
4.4.	Reações com outros nucleófilos.	67
4.5.	Parâmetros Extratermodinâmicos	72
4.6.	Cálculos dos orbitais moleculares	74
4.7.	Estrutura do DANMEP e o efeito da solvatação	75
4.7.1.	O efeito da solvatação na estrutura do DANMEP	76
4.7.2.	Metodologia explícita de solvatação	78
4.7.3.	Modelo misto de solvatação (implícito + explícito)	79
4.7.4.	O estado de transição do DANMEP.....	83
4.7.5.	Possíveis intermediários da reação de decomposição do DANMEP	87
Capítulo 5	88

5. Conclusões	88
Capítulo 6	90
6. Referências	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) e (B) Processo de ancoragem e restrição espacial mostrados no trabalho de Chiosis <i>et al.</i>	2
Figura 2- Desferal - droga de baixo peso molecular com capacidade de quelar íons metálicos, principalmente os de Ferro.....	3
Figura 3 - Sideróforo utilizado em clivagem de oligonucleotídeos, onde M pode ser Cu^{2+} , Co^{3+} e Ni^{2+}	3
Figura 4 – Representação esquemática da diferença energética de barreira potencial de uma ligação de hidrogênio O—H—O, produzida pela variação da distância entre os heteroátomos.....	15
Figura 5 – Representação esquemática do grupo fosforil, sendo transferido entre o substrato e o carboxilato da enzima.	17
Figura 6 - Interação enzima-substrato para um fosfodiéster e dois resíduos de arginina na nuclease estafilococal.....	18
Figura 7 – Catálise ácida geral intramolecular sobre a ciclização de um diéster de fosfato a 50°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	19
Figura 8 - Estrutura de um pentóxi fosforano solvatada explicitamente numa simulação de dinâmica molecular ^[1]	22
Figura 9 - Relação entre o logaritmo da constante de velocidade e o pK _a de nucleófilos para a desfosforilação do BDNPP. As constantes de velocidade e valores de pK _a são corrigidos estatisticamente. ^[49]	27
Figura 10 - Hidroxilamina em (A) Modelo implícito onde o substrato se encontra numa cavidade (superfície interseccional pontilhada) circundada pelo contínuo dielétrico (superfície negra com constante dielétrica constante). (B) Solvatação explícita da hidroxilamina por moléculas de água.	30
Figura 11 - Diésteres e triésteres de fosfato utilizados nos estudos de Iché-Tarrat <i>et al.</i>	31
Figura 12 – Caracterização do DANMEPNa por Espectroscopia de RMN- ¹ H. ...	38
Figura 13 - Caracterização do DANMEPNa por Espectrometria de massas por meio de ionização por spray de elétrons, ESI-MS (ESI+).	39
Figura 14 - Caracterização do DANMEPNa por Espectrometria de massas com ionização por spray de elétrons, ESI-MS (ESI-).	39
Figura 15 – Espetros de absorção do DANMEP (linha contínua) e do DANOL (linha tracejada).	44

Figura 16 - Ilustração representativa para o procedimento experimental adotado na preparação das amostras para análise por UV-Vis.....	45
Figura 17 - Titulação potenciométrica da solução aquosa de DANMEP com KOH padrão $0,09938 \text{ mol.dm}^{-3}$ a 25°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl.	52
Figura 18 - Variação espectral do DANMEP em soluções aquosas, em função do valor de pH, a 25°C	54
Figura 19 - Titulação espectrofotométricas a 320 nm das soluções aquosas de DANMEP a 25°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl.	55
Figura 20 – Titulação espectrofotométricas a 320 nm das soluções aquosas de DANMEP a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl.	56
Figura 21 - Titulação espectrofotométricas a 320 nm das soluções aquosas de DANMEP a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl, na presença de hidroxilamina $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$	57
Figura 22 - Perfil cinético de hidrólise do DANMEP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$, comparado aos seus derivados mono (3) e triéster (6). Todos os dados foram obtidos em soluções aquosas, força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl e a 60°C ...	59
Figura 23 - Perfil de hidrólise em altas concentrações de HCl (●) e DCl (○) a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl.	63
Figura 24 - Perfil cinético completo para hidrólise do DANMEP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$, força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl e a 60°C	64
Figura 25 - Perfil cinético para a reação do DANMEP ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$) com hidroxilamina ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$) em H_2O (●) e em D_2O (○), realizadas em força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl e a 60°C	68
Figura 26 - Gráfico de correlação de Brønsted para a reação do DANMEP 17, com diferentes nucleófilos em solução aquosa a 60°C	71
Figura 27 - Estrutura otimizada do DANMEP por cálculos de orbitais moleculares em nível HF 6-31G(d) em fase gasosa.	75
Figura 28 - Diferença geométrica estrutural para o DANMEP em estado gasoso (A) e com simulação de solvente via metodologia PCM.....	76
Figura 29 - Derivado metilfosfato do benzoquinolidinium.....	78
Figura 30 - DANMEP otimizado na presença de um agregado de 15 moléculas de água.	79
Figura 31 - Otimização de geometria para o DANMEP utilizando-se o modelo "Cluster-Continuum"	80

- Figura 32 - Estruturas A (17) e B (3), ambas solvatadas por um agregado com 15 moléculas de água, calculadas em nível HF 6-31G(d). 82
- Figura 33 - Forma dimerizada do DANMEP, 17, calculada em nível HF 6-31G(d). 83
- Figura 34 - Estrutura otimizada do estado de transição para a reação do DANMEP (17) com hidroxilamina, assumindo um pré-equilíbrio de transferência de prótons, utilizando método de cálculo HF 6-31G(d) e PCM. 84
- Figura 35 - Estrutura otimizada do estado de transição para a reação do DANMEP (17) com óxido de amônio, mostrando a transferência de próton intramolecular NH₂---H---OP, utilizando método de cálculo HF 6-31G(d) e PCM..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre reações catalisadas e não-catalisadas por enzimas.	5
Tabela 2 - Comparação entre reações intra e intermoleculares [□] .	7
Tabela 3 - Grupos funcionais que são importantes doadores/aceptores de ligações de hidrogênio.	13
Tabela 4 - Distâncias entre aceptores e doadores de ligações de hidrogênio em condições de equilíbrio.	14
Tabela 5 - Identificação dos nodos do cluster Beowulf.	49
Tabela 6 - Dados experimentais e resultados obtidos para a determinação do valor de pK_a do DANMEP.	53
Tabela 7 - Reatividade relativa para a reação de hidrólise de diversos fosfatos monoaniônicos, a 100°C.	66
Tabela 8 - Valores de pK_a para diversos mono e dialquilésteres de fosfato.	67
Tabela 9 – Nucleófilos utilizados para obtenção os parâmetros de correlação de Brønsted.	69
Tabela 10 - Sumário dos parâmetros termodinâmicos extraídos a partir dos gráficos envolvendo a constante de velocidade e o inverso da temperatura.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucléico

ARN: ácido ribonucléico

B3LYP: método híbrido que combina cinco funcionais: Becke, Slater e Hartree-Fock (para parte de troca), LYP e VWN5 (para parte de correlação eletrônica)

BDNPP: bis-(dinitrofenil) fosfato

C: linguagem de programação de médio a baixo nível utilizada, por exemplo, na programação do kernel Linux.

C-PCM: Conductor-like Polarizable Continuum Model

D-PCM: Polarizable Continuum Model (formulação original)

DANMEP: 8-dimetilaminonaftil-1-metilfosfato

DANMEPNa: 8-dimetilaminonaftil-1-metilfosfato de sódio

DANOL: 8-dimetilaminonaftil-1-ol

DDI: interface de dados distribuídos

DFT: teoria do funcional da densidade

DMHP: dimetil-hidrogenofosfato

DMNPP: dimetil 4-nitrofenilfosfato

DMP⁻: dimetilfosfato

DNP: 2,4-dinitrofenolato

ESI-MS: espectrometria de massa com ionização por spray de elétrons

GAMESS: General Atomic and Molecular Electronic Structure System

GNU: GNU is Not Unix (GNU não é Unix), acrônimo recursivo criado por Richard Stallman, quando criou a filosofia que fundamenta a criação, uso e distribuição de softwares livres e gratuitos.

GPL: general public license (Licença Pública Geral), certidão que garante o direito a livre modificação, cópia e distribuição aos softwares filiados à mesma.

GROMACS: GRONingen MACHine for Chemical Simulations

MANEP: 8-dimetilaminonaftil-1-fosfato

MH₂P: metil di-hidrogenofosfato

MHP⁻: metil hidrogenofosfato

MOLDen: MOLEcular DENsity

MP²⁻: metil fosfato

MPE: MultiPolar Expansion

NCBL: *N*-(*o*-carboxibenzoil)-L-leucina

NFS: servidor de sistema de arquivos em rede

Nü: Nucleófilo

PCM: polarizable continuum model

RFC 1918: Norma que regulamenta a alocação de endereços para redes privadas

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹H: Ressonância magnética de prótons

RMN ³¹P: Ressonância magnética de fósforo

RP-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

TANEP: 8-dimetilaminonaftil-1-dietilfosfato

TCP/IP: Protocolos de transferências e endereçamento em sistemas de rede

TFEA: 2,2,2-trifluoroetilamina

TLC: cromatografia de camada delgada

TMP: Trimetilfosfato

RESUMO

O diéster 8-dimetilaminonaftil-1-metil fosfato (DANMEP) foi estudado como um modelo de catálise enzimática do tipo ácida geral intramolecular com a transferência do grupo fosforila, a partir da ruptura de uma ligação O—P, facilitada por um grupo ^+NH vizinho. As reações de hidrólise do DANMEP são consistentes com um mecanismo do tipo $SN_2(P)$, tanto na faixa de $HCl > 1 M$, quanto na região de pH ácido. Na região de pH entre 1 e 7, o DANMEP se hidrolisa numa velocidade constante, com um fator catalítico de $2,56 \times 10^6$ a $60^\circ C$. Este efeito está associado à reação da forma íon dipolar do DANMEP, onde o grupo dimetilamônio ($pK_{a2} = 7,06 \pm 0,06$) atua como catalisador ácido geral. Na presença de HCl entre 1 e 12 M, há um efeito catalítico significativo, mostrando um valor de $pK_{a1} = -1,93 \pm 0,12$ a $60^\circ C$, que indica que a forma ácida do DANMEP é a espécie reativa nessa região de elevada acidez. Na reação entre a hidroxilamina e o DANMEP, a constante de velocidade é cerca de 70 vezes maior que a reação de hidrólise. Os cálculos realizados para investigação da geometria do DANMEP realizados com a combinação dos modelos contínuo e discreto mostram um diéster altamente estável. O comprimento da ligação entre o átomo de fósforo e oxigênio do grupo abandonador foi de $1,63 \text{ \AA}$ e, o ângulo diedro **C2—C1—N13—H19** foi de 30° , demonstrando melhor direcionamento do grupo catalítico para uma catálise ácida geral intramolecular. A comparação entre as estruturas do DANMEP e seu derivado monoéster (MANEP), otimizadas na presença de 15 moléculas de água, indicam que no caso do MANEP, o grupo fosforila tem uma estrutura mais solvatada e planar, o que deve favorecer uma reatividade maior desse éster se comparado ao DANMEP. Foi constatada a existência de um estado de transição onde a quebra da ligação do grupo abandonador está consideravelmente adiantada e há um pequeno grau de formação de ligação (através de um ataque de um óxido de amônio), numa configuração bipirâmide trigonal. Este resultado é consistente com os dados cinéticos, os parâmetros termodinâmicos e os cálculos *ab initio* de orbitais moleculares, todos os quais se corroboram mutuamente.

ABSTRACT

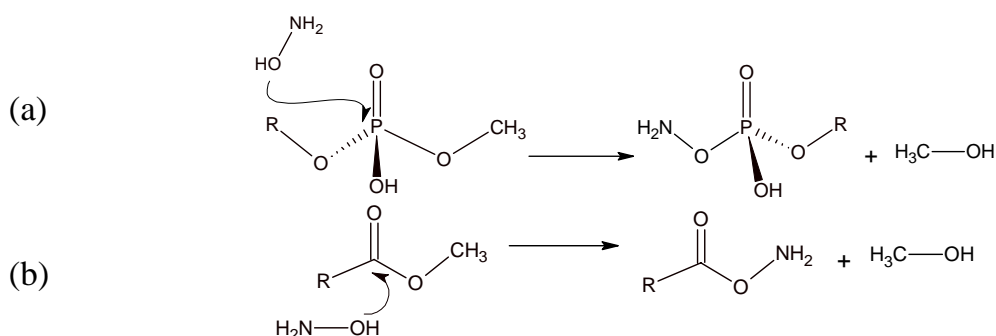
The diester 8-dimethylaminonaphthyl-1-methyl phosphate (DANMEP) was studied as a model of enzymatic catalysis of the intramolecular general acid type, with the phosphoryl group transfer starting from the rupture of the O—P bond, facilitated by a neighbor group ^+NH . DANMEP's hydrolysis reactions agree with a $\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$ mechanism, so much in $\text{HCl} > 1 \text{ M}$ region, as in the acid pH range. In the pH area between 1 and 7, DANMEP is hydrolyzed in a rate constant, with a catalytic factor of 2.56×10^6 at 60°C . This effect is associated to the reaction of the zwitterionic form of DANMEP, where the dimethylamonium group ($\text{p}K_{\text{a}2} = 7.06 \pm 0.06$) acts as general acid catalyst. In the presence of HCl between 1 and 12 M, there is a significant catalytic effect, showing a $\text{p}K_{\text{a}1}$ value equals to -1.93 ± 0.12 at 60°C , that it indicates that the acid form of DANMEP it is the reactive species in that high acidity area. In the reaction between hydroxylamine and DANMEP, the rate constant is about 70 times larger than the hydrolysis reaction. The calculations accomplished for investigation of the geometry of DANMEP were done with the combination of the continuous and discreet models showing a highly stable diester. The obtained bond length between the phosphor atom and leaving group's oxygen was 1.63\AA , and the dihedral angle C2-C1-N13-H19 was 30 degrees, demonstrating a better positioning of the catalytic group for a intramolecular general acid catalysis. The comparison between DANMEP's structures and yours monoéster derivative (MANEP), optimized in the presence of 15 water molecules, indicates that in the MANEP's case, the phosphoryl group has a most solvated and planar structure, what should favor a larger reactivity of that ester if compared to DANMEP. The transition state existence was verified where the break of the leaving group's bond is considerably early and there is a small degree of bond making (through a ammonium oxide attack), together with a proton transfer $\text{NH}_2\text{---H---OP}$, in a pentavalent configuration. This result agrees with the kinetic data, the thermodynamic parameters and the molecular orbital *ab initio* calculations, all which are corroborated mutually.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A físico-química orgânica dos organofosfatos, não é recente, apresentando uma longa e importante história na linha do tempo das descobertas químicas e biológicas^[1].

Dentre esses compostos os ésteres de fosfato desempenham um papel central na bioquímica. As reações de transferência de fosfato (**Esquema 1a**) são as mais comuns, apresentando uma complexidade superior àquelas equivalentes para transferência de grupos acila (**Esquema 1b**).^[2,3,4,5]



Esquema 1

Especificamente os diésteres de fosfato têm ganhado crescente destaque na literatura especializada, graças à possibilidade que hoje temos de poder entender e controlar o organismo humano através dos diversos derivados destes compostos distribuídos no nosso organismo, principalmente na forma de ácidos nucleicos e enzimas.

O grande marco para o estudo dos fosfodiésteres foi o trabalho de diversos grupos de pesquisa, em especial o de Watson e Crick, na elucidação da estrutura e função do ADN^[6], como dito pelo próprio James Watson na divulgação de sua descoberta “*nós achamos o segredo da vida*”^[7,8], frase essa corroborada pelos grandes avanços científicos vislumbrados nos dias atuais.

Entender e modificar a estrutura do ADN humano é um propósito irreversível para os cientistas atuais. As justificativas para tal intento são as mais diversas e sujeitas a uma nova legislação de bioética que, embora ainda praticamente inexistente, está em discussão em todos os países envolvidos neste nicho de pesquisa.

Do ponto de vista médico, tratar imperfeições em nível molecular, no sentido de se poderem trocar fragmentos de ADN responsáveis pelos mais diversos tipos de doenças como, por exemplo, o câncer é um sonho agora não impossível e nem muito distante.

A atuação de moléculas que possam seletivamente buscar sítios específicos em outras, se ancorando a elas, e causando sua decomposição em algum grau, já é possível. Um exemplo é o trabalho de Chiosis *et al* ^[9], que se interessou pela resistência apresentada por uma bactéria enterococci patogênica a antibióticos como a vancomicina.

Nesse trabalho foi possível a utilização de pequenas moléculas, com um sistema nucleófilo-eletrófilo bem orientado e também quiralidade adequada, para a seleção específica e posterior clivagem de um sítio precursor peptideoglicano terminal (**Figura 1**), o qual impede a ação de antibióticos como a vancomicina. Estas moléculas foram testadas juntamente com vancomicina e permitiram que a bactéria resistente fosse re-sensibilizada à ação do antibiótico.

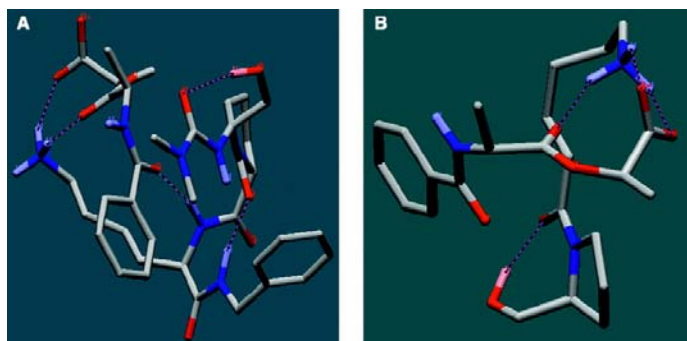


Figura 1 – (A) e (B) Processo de ancoragem e restrição espacial mostrados no trabalho de Chiosis *et al*.

Repetir esse mesmo procedimento, contudo aplicado a ligações fosfodiésteres, depende do bom conhecimento do substrato a ser clivado, bem como das propriedades necessárias que permitam ao catalisador ancorar e clivar eficientemente uma determinada ligação química. As moléculas que desempenham tal função catalítica são chamadas de “tesouras moleculares”.

Um exemplo de tesoura molecular aplicada a ADN está no trabalho de Joshi *et al*^[10], onde são descritas as habilidades metalo-dependentes de alguns sideróforos a base de Desferal (**Figura 2**).

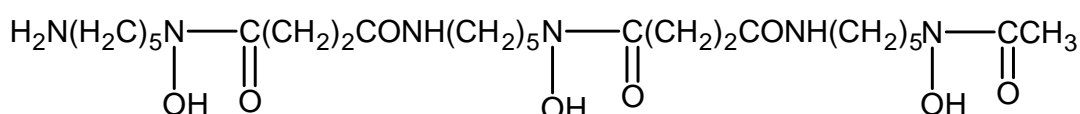


Figura 2- Desferal - droga de baixo peso molecular com capacidade de quelar íons metálicos, principalmente os de Ferro.

Este tipo de composto, associado a diferentes metais na forma descrita por Joshi e colaboradores (**Figura 3**), é de elevada eficiência na clivagem de ADN plasmídicos.

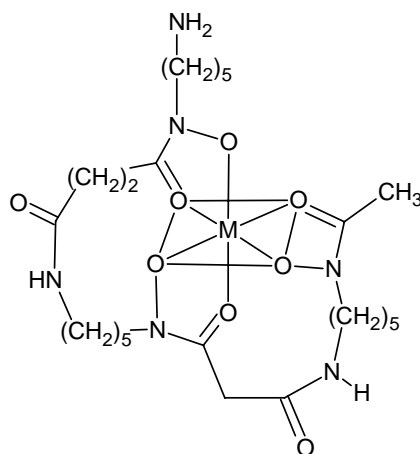


Figura 3 - Sideróforo utilizado em clivagem de oligonucleotídeos, onde M pode ser Cu^{2+} , Co^{3+} e Ni^{2+} .

Nesse estudo foram sintetizados os complexos de Desferal com Cu(II) , Co(III) e Ni(II) e analisada a seqüência preferencial das reações de clivagem de cada um.

Constatou-se que quando um oligonucleotídeo está associado a essas tesouras moleculares, os complexos baseados nos conjugados oligonucleotídeo-Cu(II)/Co(III)-desferal, apresentaram sítio-especificidade e eficiência razoáveis sobre o ADN plasmídico, podendo acontecer a clivagem de uma fita simples, ou mesmo dupla, de DNA.

Há uma rica e vasta literatura, principalmente nos últimos anos, citando trabalhos que utilizam metais associados a ligantes orgânicos ou não, com o propósito de clivar a ligação fosfodiéster. Um exemplo é o trabalho de Longhinotti *et al*^[11], em que foram analisadas as cinéticas de reação do bis (2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) em soluções básicas na presença de La³⁺, Sm³⁺, Tb³⁺ e Er³⁺, utilizando-se o tampão bis-tris propano (BTP) para estabilizar os complexos de íons hidróxidos e lantanídeos formados em solução. Constatou-se que a reação mostra um comportamento cinético de primeira ordem em relação ao BDNPP, e que a constante de velocidade medida para diferentes hidroxocomplexos dos lantanídeos pode chegar a valores da ordem de 2,3 a 3,1 x 10⁻² s⁻¹ a 25° C.

A motivação para a utilização de metais é a difícil tarefa de clivar a ligação fosforodiéster fora do organismo, na ausência de enzimas específicas, principalmente em se tratando do ADN em condições fisiológicas, onde o tempo de meia vida está estimado em 200 milhões de anos^[12]. Contudo sem a assistência de metais, o processo de clivagem se torna praticamente inviável.

Por outro lado, a decomposição de diésteres de fosfato em organismos vivos pode levar apenas algumas horas, graças à ação de enzimas específicas para sua clivagem^[13]. Sendo assim, o estudo das enzimas, o qual vem sendo cada vez mais facilitado devido ao aprimoramento das técnicas experimentais, bem como ao advento das técnicas de cálculo de orbitais moleculares, tudo isso associado ao avanço computacional, proporcionam um horizonte novo para a síntese de moléculas de alta especificidade e eficiência na decomposição de diésteres de fosfato.

1.1. Enzimas

As enzimas são biopolímeros de arranjo espacial singular, que têm por finalidade catalisar reações químicas sobre um ou mais substratos específicos através da ancoragem e subsequente clivagem e/ou formação das ligações do(s) mesmo(s)^[14]. A diminuição dos graus de liberdade rotacionais e principalmente translacionais da molécula-alvo quando associada à enzima, permite que a probabilidade reacional seja aumentada e conseqüentemente a velocidade de reação. Exemplos de aumento na velocidade de reação para reações catalisadas e não-catalisadas por enzimas são mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Comparação entre reações catalisadas e não-catalisadas por enzimas.

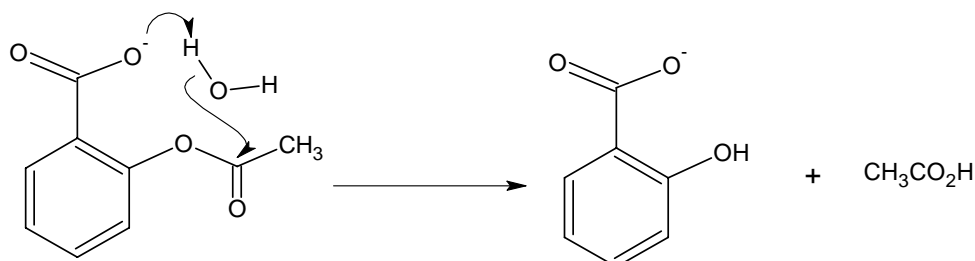
Enzima	$k_{\text{cat}}/k_{\text{não-cat}}$ ^[a]
β -amilase de batata-doce	$7,2 \times 10^{17}$
Orotidina 5'-fosfatase decarboxilase	$1,4 \times 10^{17}$
Fumarase	$3,5 \times 10^{15}$
Mandelato racemase	$1,7 \times 10^{15}$
Carboxipeptidase B	$1,3 \times 10^{13}$
Adenosino deaminase	$2,1 \times 10^{12}$
Fosfotriesterase	$2,8 \times 10^{11}$
Triosefosfato isomerase	$1,0 \times 10^9$
Corismato mutase	$1,9 \times 10^6$

[a] As reações não-catalisadas foram realizadas em solução aquosa sobre as mesmas condições das reações catalisadas.

Uma boa aproximação ou modelo para o fenômeno catalítico desenvolvido pelas enzimas pode ser proporcionado por moléculas de baixo peso molecular que possuem grupamentos especiais próximos ao centro reacional, e que por fatores estereoeletrônicos, acabam por catalisar intramolecularmente uma dada reação que acontece na própria molécula.

Um exemplo clássico da literatura é a catálise intramolecular promovida na molécula do ácido acetilsalicílico (**Esquema 2**), onde um grupo carboxilato, através de uma reação de transferência de prótons, facilita o ataque de uma molécula de água via catálise básica geral, ao lado do carbono mais

eletrofílico da molécula, causando a hidrólise numa velocidade 100 vezes maior que a mesma reação catalisada intermolecularmente. Este valor poderia passar a 5000 vezes caso o pK_a da base fosse ao redor de 7,0, ao invés de 3,7, que é o caso da aspirina ^[15].



Esquema 2

1.2. *Catálise Intramolecular*

Como no exemplo citado anteriormente, é conhecido que as catálises intramoleculares – fonte da alta efetividade nas enzimas – ocorrem numa velocidade muito superior à sua equivalente intermolecular, e dada sua importância, foi estabelecido o conceito de “*molaridade efetiva*” ou *ME* que é simplesmente a relação entre as constantes de velocidade para a reação catalisada intramolecularmente (1) e intermolecularmente (2) como na **Equação (1)**.

$$ME = \frac{k_1}{k_2} \quad (1)$$

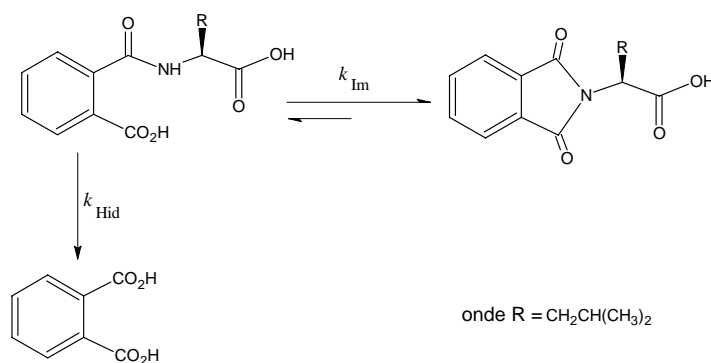
Esta grandeza (*ME*) é medida em $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, e representa a quantidade de vezes em que a concentração do nucleófilo ou eletrófilo na reação intermolecular deve ser aumentada a fim de ter o mesmo efeito catalítico que a reação intramolecular^[16]. Em outras palavras, o resultado da **Equação (1)** define *ME* como a concentração de catalisador externo necessária para igualar a concentração efetiva do catalisador interno.

Alguns exemplos de catálises intra e intermoleculares são mostrados na **Tabela 2**, acompanhados de suas respectivas *ME*.

Tabela 2 - Comparação entre reações intra e intermoleculares ^[17].

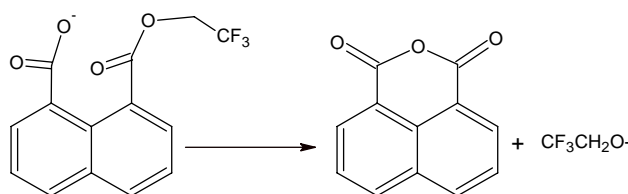
Reação	Esquema	Constante	ME (mol.dm ⁻³)
Transferências de grupos acila em succinatos		$k_1 = 0,8 \text{ s}^{-1}$	2×10^5
		$k_2 = 4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$	
Transferência de grupos acila em derivados da aspirina		$k_1 \geq 0,02 \text{ s}^{-1}$	$> 2 \times 10^7$
		$k_2 \approx 10^{-10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$	
Transferência de grupos acila em succinatos (equilíbrio)		$K_{eq} = 8 \times 10^{-7}$	3×10^5
		$K_{eq} = 3 \times 10^{-12} \text{ M}^{-1}$	

Onofrio *et al*^[18] estudaram a decomposição *N*-(*o*-carboxibenzoil)-L-leucina (NCBL) a qual acontece por duas vias distintas: uma levando ao produto imídico *N*-ftaloil-leucina (NPL) via reação de ciclização intramolecular e outra pela hidrólise, produzindo o ácido ftálico. Para a reação de hidrólise constataram uma molaridade efetiva de aproximadamente 4.600 vezes, comparado à hidrólise na ausência do grupo catalítico, um efeito provavelmente devido à catálise intramolecular de um grupamento carboxila vicinal ao centro eletrofílico da NCBL conforme mostrado no **Esquema 3**.



Esquema 3

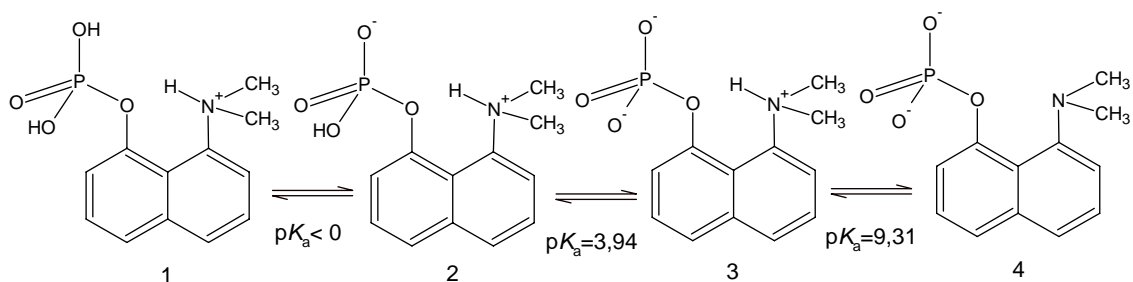
Nessa mesma linha de reações intramoleculares com participação de carboxilatos, Yunes *et al*^[19] observaram um valor para a molaridade efetiva da hidrólise do monoéster 2',2',2'-trifluoroetil do ácido 1,8-naftálico, **Esquema 4**, maior que 10^{13} vezes.



Esquema 4

O 8-dimetilaminonafetil-1-hidrogenofosfato (MANEP), tem sido também estudado em nosso grupo, revelando que esta estrutura, até então sem precedentes na literatura, confere um distúrbio anômalo na distribuição de carga na sua forma mono-aniônica **3**, provocando uma desestabilização tal, que permite o pronto ataque de nucleófilos negativamente carregados junto ao centro eletrofílico, com uma aceleração de cerca de 10^6 vezes dessa reação, efeito absolutamente raro de ser observado em condições experimentais^[20,21].

O equilíbrio de desprotonação desse composto com seus respectivos valores de pK_a é mostrado no **Esquema 5**.

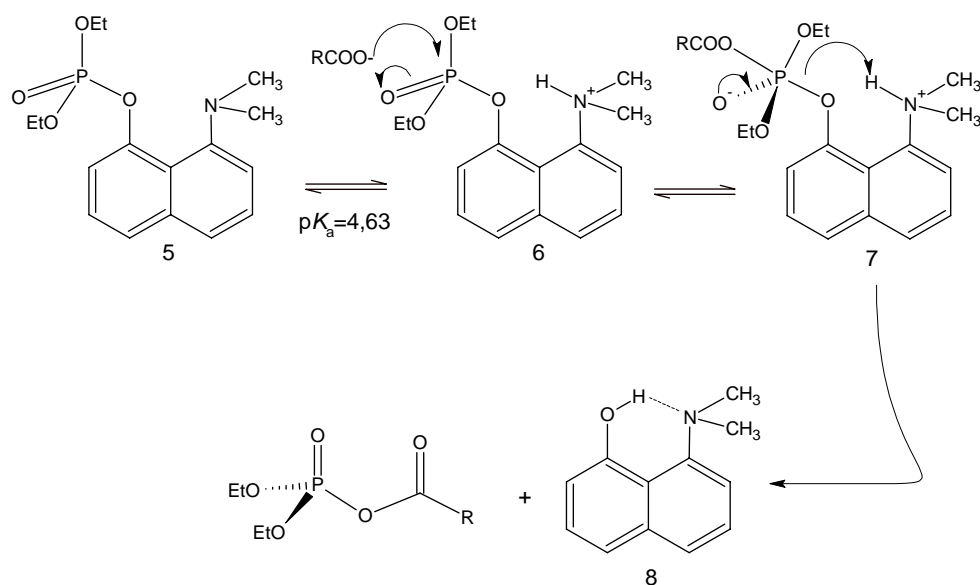


Esquema 5

Com base nos resultados observados para o efeito do grupo dimetilamônio sobre o pK_a do grupo de saída e sobre o ataque de ânions no grupo fosfato, sugere-se que há uma importância especial para a abundância de cadeias

aminoácidas laterais catiônicas no sítio ativo de enzimas, como fosfatases e quinases que catalisam a transferência de grupos fosforila.

No caso do derivado triéster, o dietil 8-dimetilaminonaftil-1-fosfato (TANEP), estudado por Asaad e Kirby^[22], foi observada uma aceleração na constante de velocidade de quase 10^6 vezes em relação ao triéster sem o grupamento dimetilamônio, um resultado que reforça a importância do grupo catalisador ácido geral. Sugere-se também a presença de um intermediário pentacovalente formado a partir do ataque de um oxianion. O **Esquema 6** mostra o equilíbrio de desprotonação do TANEP e a sua reação de decomposição na presença de carboxiânions.



Esquema 6

Várias teorias clássicas a respeito de catálise enzimática foram propostas desde a segunda metade do século XX, dentre elas podemos citar: i) a “Teoria do Direcionamento Orbital” (1970, 1971 e 1972)^[23,24,25], proposta principalmente por Koshland *et al*, salientando que o efeito de alinhamento entre os orbitais que interagem no sítio reacional, promove uma aceleração em reações intramoleculares, em particular reações enzimáticas, através da economia energética relacionada aos graus de liberdade rotacionais perdidos no momento

do estado de transição; e ii) a “*Teoria Espaço-temporal*” (1985)^[26], defendida inicialmente por Menger, que prevê que a velocidade de reação entre dois grupamentos funcionais A e B é proporcional ao tempo que A e B permanecem a uma distância crítica menor ou igual a soma dos raios de van der Waals dos grupos que participam da reação.

Em todas estas teorias estão sempre implícitos os “*Efeitos Entrópicos*” (1971)^[27], abordados principalmente por Page e Jencks. A questão interessante é que embora a entropia não explique totalmente o fenômeno catalítico que ocorre nas reações intramoleculares, fica claro que sem a perda dos graus de liberdade, sejam translacionais, rotacionais, ou vibracionais, nenhuma das outras pode existir, seja no caso da restrição espacial para o alinhamento dos orbitais, ou no caso de se restringir a posição espacial de duas moléculas A e B a ponto de ficarem tempo suficiente a determinada distância uma da outra para sofrerem reação.

Assim, embora existam todas estas teorias, a raiz é única e tem sua origem na entropia do sistema, ou melhor, no abaixamento da entropia, diminuindo os graus de liberdade, e por consequência a aproximação entre os grupos reacionais, em regiões específicas do espaço.

Quaisquer teorias que queiram explicar a grande reatividade apresentada em sistemas de catálise enzimática terão obrigatoriamente de se apoiar, em alguma forma de fenômeno entrópico.

Por outro lado a abordagem via Efeitos Entrópicos para a explicação dos fenômenos catalíticos intramoleculares é também muito genérica. Em muitas reações intramoleculares e enzimáticas há uma contribuição entálpica significativa no aumento da constante de velocidade, conforme normalmente observado na diminuição da energia de ativação de Arrhenius.

Assim, atenção deve ser dada para reações catalisadas intramolecularmente, envolvendo espécies de baixo peso molecular, onde em

alguns casos o termo entrópico acaba por confundir, ou não explicar o fenômeno envolvido devido a sua generalidade, como é o caso das reações onde o valor da molaridade efetiva é menor que a unidade, e os teoremas entrópicos falham em explicá-los.

1.3. Efeitos entrópicos

Uma simples definição de entropia a associa ao grau de desordem de um determinado sistema. Sendo assim, a combinação de duas moléculas para formação de apenas uma, leva a uma perda de entropia, principalmente no que diz respeito à translação e rotação de moléculas. Embora o produto formado tenha algum aumento na entropia interna, esse acréscimo significa apenas um leve incremento nos graus de entropia de vibração e rotação internas, visto que a entropia depende muito pouco do tamanho da molécula^[17].

Desta forma, uma reação catalisada em solução é mais lenta devido à perda de entropia envolvida na aproximação entre o catalisador e o substrato, diferentemente do que ocorre nas catálises intramoleculares, onde a perda da entropia rotacional e translacional é nula.

Para se ter uma idéia matemática do quanto isso afeta a velocidade de uma reação, podemos utilizar a Teoria do Estado de Transição^[28], onde podemos escrever a **Equação (2)**, conhecida como equação de Eyring, que determina a constante de velocidade de primeira ordem (k), para uma dada reação da seguinte maneira:

$$k = \frac{\kappa T}{h} \times e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (2)$$

onde κ é a constante de Boltzmann, h a de Planck e R a dos gases, T é a temperatura (em Kelvin) e ΔG^\ddagger é a diferença na energia livre de Gibbs entre a estrutura do estado de transição e a do estado inicial.

A variação na energia livre de Gibbs da **Equação (2)** pode ser separada nos seus componentes entálpicos e entrópicos pela **Equação (3)** abaixo,

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (3)$$

Assim podemos avaliar as contribuições térmicas e caóticas à constante de velocidade, simplesmente unindo as Equações (2) e (3) na **Equação (4)**, conhecida como equação de Eyring estendida, a qual nos fornece parâmetros qualitativos e uma boa análise das variações na velocidade de reação:

$$k_1 = \left(\frac{\kappa T}{h} \right) \times e^{\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right)} \times e^{\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT} \right)} \quad (4)$$

Analisando a **Equação (4)**, podemos perceber que uma variação brusca no termo entrópico, tornando-o negativo (entropia do estado inicial muito maior que do estado de transição), provoca como resultado uma redução exponencial no valor da constante de velocidade, o que é praticamente inexistente quando temos uma reação, onde a perda entrópica é muito pequena, como nas reações enzimáticas ou intramoleculares.

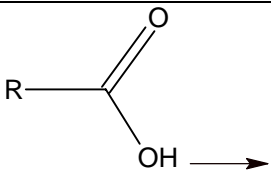
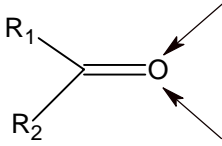
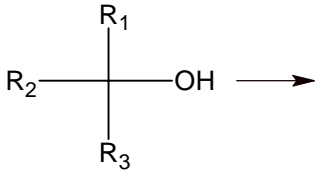
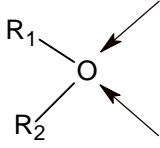
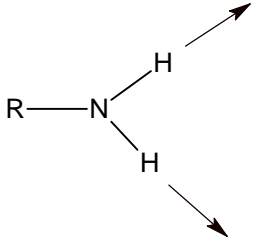
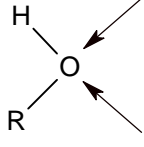
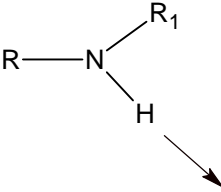
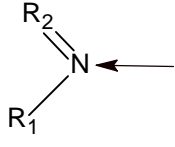
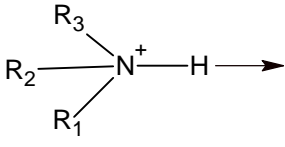
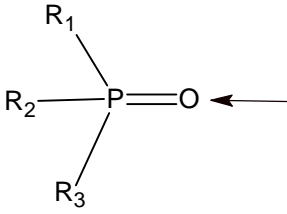
1.4. A importância das ligações de hidrogênio e interações iônicas

Quando mencionamos as catálises intra e intermoleculares, temos em mente que as forças que as originam têm grande relação com os tipos de interações envolvidas em cada sítio de reação, com base nisso uma breve descrição de alguns tipos de interações frequentemente associadas aos diversos tipos de catálise encontrados nos sistemas estudados é mostrada abaixo.

Ligações de hidrogênio formam-se entre um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a um átomo eletronegativo (tal como um oxigênio ou um nitrogênio) e um segundo átomo eletronegativo que serve como um acceptor de ligação de hidrogênio. As ligações de hidrogênio, que tem uma energia de estabilização aproximada de 12 a 30 KJ.mol⁻¹, são mais fortes do que as forças de

van der Waals ($0,4$ a $4,0 \text{ KJ.mol}^{-1}$) e tem uma propriedade adicional: as ligações de hidrogênio tendem a ser altamente direcionais, formando ligações diretas entre os átomos doador, hidrogênio e aceptor. As ligações de hidrogênio são também muito mais específicas do que as interações de van der Waals, isto porque elas requerem a presença simultânea de grupos aceptores e doadores de hidrogênio (Tabela 3).

Tabela 3 - Grupos funcionais que são importantes doadores/aceptores de ligações de hidrogênio.

Doadores	Aceptores
	
	
	
	
	

A Tabela 4 mostra comprimentos aproximados em ligações de hidrogênio formadas entre aceptores e doadores com átomos de oxigênio e nitrogênio.

Tabela 4 - Distâncias entre aceptores e doadores de ligações de hidrogênio em condições de equilíbrio.

Átomos ligados	Comprimento de ligação aproximado /nm*	
O—H ----- O	0,27	* Os comprimentos dados são as distâncias entre o átomo covalentemente ligado ao hidrogênio e o aceptor que interage por ligação de hidrogênio ao hidrogênio. $\begin{array}{c} \text{O} \text{---} \text{H} \text{-----} \text{O} \\ \left \text{---} 0,27 \text{ nm} \text{---} \right \end{array}$
O—H ----- O ⁻	0,26	
O—H ----- N	0,29	
N—H ----- O	0,30	
N ⁺ —H ----- O	0,29	
N—H ----- N	0,31	

Na estabilização de estruturas como o ADN, estruturas terciária e quaternária de proteínas e também nas reações químicas, sobretudo nas enzimáticas, a formação de ligações de hidrogênio é de suma importância.

A formação de tais ligações em condições especiais acaba por fornecer de 10 a 20 quilocalorias por mol, facilitando reações com barreiras energéticas relativamente altas. A intensidade da força de uma ligação de hidrogênio estabelecida entre dois sítios eletronegativos pode levar à efeitos catalíticos de grande magnitude, possibilitando reações, que sem esse tipo de interação seriam praticamente inviáveis. Sendo assim o entendimento de tais fenômenos é de grande importância no estudo da catálise intramolecular.

Nas estruturas dos estados de transição e complexos intermediários-enzimas, em relação às interações do tipo oxigênio-hidrogênio-oxigênio (O—H---O), podemos ter duas situações distintas: (i) quando as distâncias de ligações de hidrogênio (O—O) é de 2,8 a 3,0 Å, sendo o hidrogênio ligado a um ou outro oxigênio por uma ligação covalente, enquanto que a interação com o outro oxigênio é principalmente eletrostática; ou (ii) onde as ligações de hidrogênio são mais curtas (menores que 2,5 Å) e portanto mais fortes, favorecendo a ocorrência do fenômeno conhecido como *ligações de hidrogênio de baixa barreira potencial* (low-barrier hydrogen bond).

O efeito máximo de abaixamento de barreira potencial nesse caso ocorre apenas quando os pK_a , dos átomos eletronegativos que compartilham o hidrogênio são de valores similares, visto que nessa situação o hidrogênio pode se associar a qualquer um dos sítios de alta densidade de cargas negativas, existindo obviamente uma barreira energética para transferência desse próton (**Figura 4**).

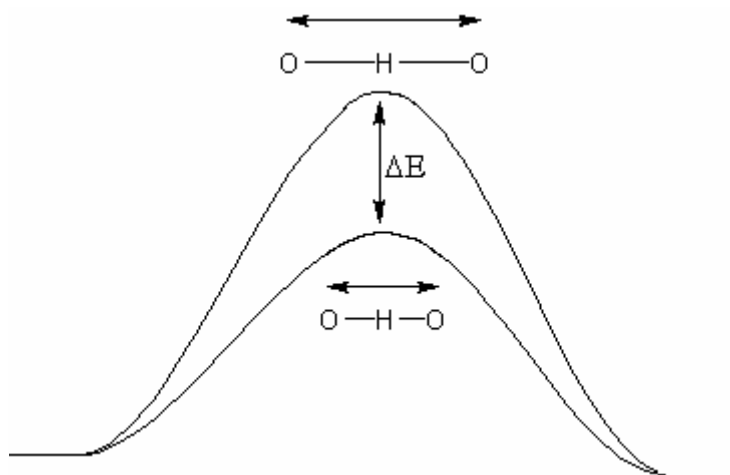


Figura 4 – Representação esquemática da diferença energética de barreira potencial de uma ligação de hidrogênio O—H—O, produzida pela variação da distância entre os heteroátomos.

Numa ligação de hidrogênio onde esses sítios estão muito próximos, a barreira entre as duas posições do hidrogênio torna-se mais baixa e eventualmente é baixa o suficiente para que o nível de energia do ponto zero esteja em cima ou até acima dessa barreira. Neste ponto, que corresponde a uma distância de 2,5 Å, o hidrogênio pode se movimentar livremente no espaço entre os oxigênios, e sua ligação a ambos os oxigênios pode ser considerada essencialmente covalente. As ligações mais fortes são formadas quando os dois heteroátomos são os mesmos (principalmente oxigênios e nitrogênios), mas N—H—O ligações podem apresentar esse fenômeno, embora provavelmente não tão forte quando no caso O—H—O. Sendo importante salientar que a força da ligação é totalmente bem correlacionada com a distância entre os heteroátomos, com as ligações mais curtas sendo as mais fortes.

Assim uma fraca ligação de hidrogênio no complexo enzima-substrato no qual os valores de pK_a não são próximos podem vir a se tornar forte e haver uma formação do fenômeno de abaixamento de barreira se os pK_a virem a se aproximar durante a formação do estado de transição ou na formação do complexo enzima-substrato. Um exemplo de reação enzimática que apresenta este princípio é apresentado no trabalho de Cleland e Kreevoy^[29].

Por outro lado, outros tipos de interações em sistemas catalíticos se fazem importantes como é o caso das interações iônicas, por exemplo, entre grupos carboxilatos (negativos) ou amônios (positivos). Eles possuem uma força média ao redor de 20 KJ.mol^{-1} em soluções aquosas, e têm uma carga elétrica distribuída radialmente o que possibilita a perda de sua direcionabilidade, o que não ocorre no caso das ligação de hidrogênio. Contudo, como as cargas opostas são restritas a posições estereamente definidas, as interações iônicas podem impor um alto grau de especificidade estrutural. A força das interações eletrostáticas é altamente dependente da natureza das espécies interagentes e a distância entre elas.

1.5. Complexidade do estudo enzimático

Uma reação catalisada enzimaticamente apresenta então uma grande vantagem, tendo em vista que enzimas podem apresentar inúmeros sítios com atividade catalítica (de caráter intramolecular) altamente efetiva no complexo enzima-substrato. No entanto, estudar um mecanismo enzimático, não é trivial, tendo em vista que a estrutura da enzima, para isto, deve ser totalmente conhecida, principalmente sua estrutura quaternária, a qual apresenta maior relevância na investigação do processo de acoplamento (“docking”) enzimático onde um substrato se associa de maneira única num sítio de forma geométrica específica. Embora haja bancos de dados de estruturas cristalográficas de enzimas, que apresentam crescimento exponencial ano após ano no número de estruturas analisadas, a dificuldade na cristalização das mesmas ainda é um

grande problema, o qual vem sendo suprido parcialmente pela computação de alto desempenho.

O avanço tecnológico na construção de computadores de altíssima velocidade acabou por suprir uma pequena parcela desse déficit, ampliando os recursos disponíveis para o processamento de cálculos químico-quânticos computacionais, aplicados ao tratamento de enovelamento (“folding”) de proteínas. Estes cálculos têm dado origem a resultados valiosos, principalmente para enzimas que apresentam grande dificuldade em ser cristalizadas, o que é um dos maiores problemas da cristalografia enzimática atual. Contudo ainda assim o estudo teórico é novo, e também possui séria carência em termos de recursos de processamento para cálculos que produzam maior exatidão em sistemas macromoleculares como as proteínas.

Um estudo recente de Lahiri *et al*^[30], conseguiu mapear com ajuda de técnicas de cristalização de difração de raios-X a estrutura de um complexo enzima-substrato baseado na β -fosfoglucomutase na presença de cofatores Mg^{2+} e alguns fosfoglicídeos, revelando pela primeira vez a presença de um intermediário pentacovalente na transferência de grupos fosforila *in situ* (**Figura 5**).

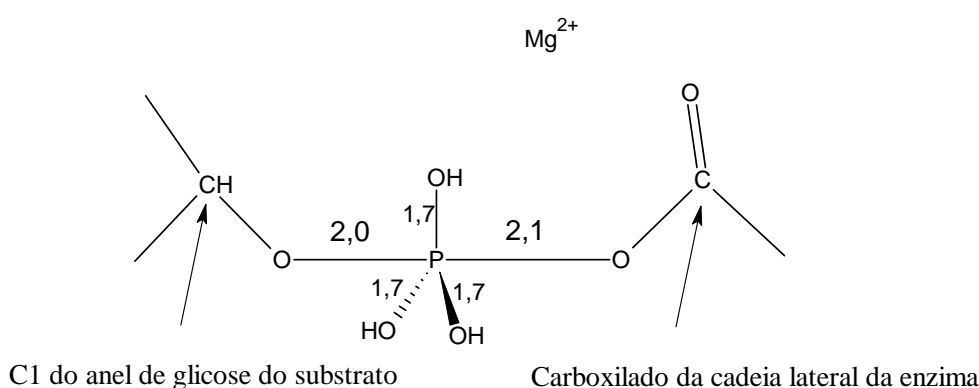


Figura 5 – Representação esquemática do grupo fosforil, sendo transferido entre o substrato e o carboxilato da enzima.

A estrutura proposta por Lahiri e colaboradores tem sido contestada por outros autores^[31,32] que acreditam que o grupo fosforila que aparece na estrutura corresponde de fato a um grupo MgF_3^- .

Embora o panorama científico contemporâneo ainda seja complexo para o estudo de enzimas, uma solução valiosa é o estudo de moléculas-modelo que mimetizam um ou mais sítios de uma proteína. Tais moléculas podem ser modificadas com relativa facilidade com os recursos de síntese orgânica, com a finalidade de se aplicar uma gama mais variada de ensaios, abrangendo assim diferentes aspectos da catálise observada. Revisões sobre modelos para ésteres de fosfato são apresentadas por Kirby^[33] e Williams^[34].

1.6. Exemplos de estudos não-miméticos

Um estudo não-mimético é aquele que tenta analisar apenas parte da ação catalisadora de uma enzima, e não sua função global, pois nesse caso seria denominado estudo mimético^[16].

Exemplos de enzimas que podem ser sítio-especificamente mimetizadas desta forma são vários, por exemplo, qualquer que tiver um resíduo amino livre como a arginina, a lisina, o triptofano, a histidina, entre outros. Um exemplo é o da nuclease estafilococal^[17] (**Figura 6**),

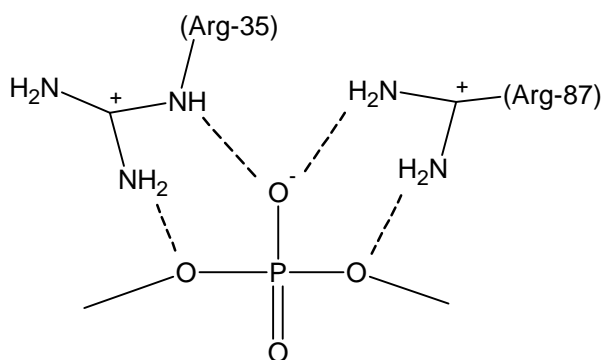


Figura 6 - Interação enzima-substrato para um fosfodiéster e dois resíduos de arginina na nuclease estafilococal.

Um modelo de catálise enzimática não-mimético e intermolecular/intramolecular compatível como o da nuclease estafilococal é o reportado no trabalho de Dalby *et al*^[35], que estuda o efeito de derivados de aminas sobre substratos com especificidade estrutural favoráveis a substituições nucleofílicas intramoleculares (**Figura 7**).

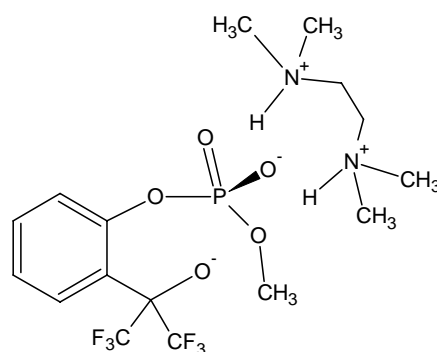


Figura 7 – Catálise ácida geral intramolecular sobre a ciclização de um diéster de fosfato a 50°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ (KCl).

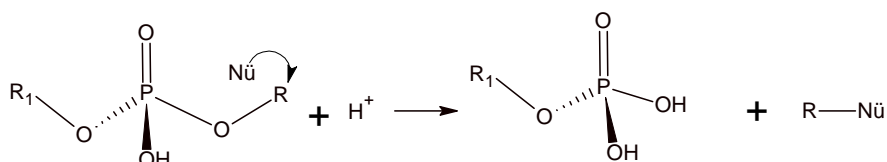
Nesse trabalho um fosfodiéster (**Figura 7**), é cuidadosamente planejado e sintetizado, com o intuito de apresentar alta molaridade efetiva para ciclização intramolecular em água a 50°C com tempo de meia vida de cerca de 40 ms, permitindo a detecção da saída de um grupo alcóxi simples a partir do átomo de fósforo.

Com esse sistema foi analisado o efeito de uma série de dicátions do tipo Me₂NH⁺(CH₂)_nNH⁺Me₂, com n=2,3,4 e 6, sendo constatado que a constante de velocidade aumenta com a diminuição de n, variando de 0,01 dm³.mol⁻¹.s⁻¹ para a maior cadeia até 31,6 dm³.mol⁻¹.s⁻¹ para o dicátion de menor cadeia. Mostrando que a maior concentração de cargas positivas sobre o fosfato fornece maior estabilização eletrostática para o prosseguimento da reação.

Com base principalmente nesses parâmetros, foi concluído que o efeito substancial na velocidade de reação com a combinação de catalisadores ácidos gerais e cargas positivas, sugerem a possibilidade de desenvolvimento de catalisadores mais eficientes para a decomposição de diésteres de fosfato.

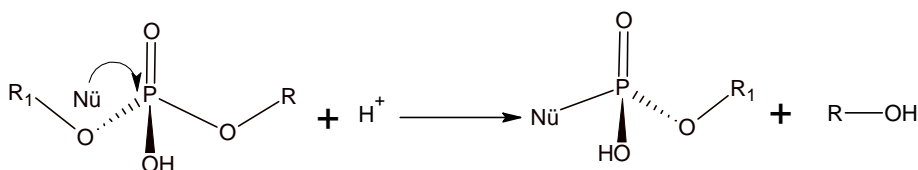
1.7. Reações químicas e mecanismos

Em essência, dois mecanismos fundamentais para uma reação de substituição nucleofílica de ésteres fosfóricos são conhecidos. No primeiro, o átomo de carbono da ligação P—O—C do éster pode servir como eletrófilo, sendo o grupo fosfato substituído pelo nucleófilo (**Esquema 7**).



Esquema 7

No segundo, o nucleófilo ataca o átomo de fósforo central e desloca o álcool ou o alcóxido via quebra da ligação P—O, mantendo a ligação C—O intacta (**Esquema 8**).



Esquema 8

O mecanismo de quebra da ligação alquil-oxigênio somente é o caminho principal em pH muito baixo. A hidrólise de ésteres fosfóricos tais como os benzil e terc-butilfosfato que possuem grupos alquílicos que formam carbocátions estáveis pela quebra da ligação C—O (alquilfosfatos terciários), ocorre via processo de ionização SN1.

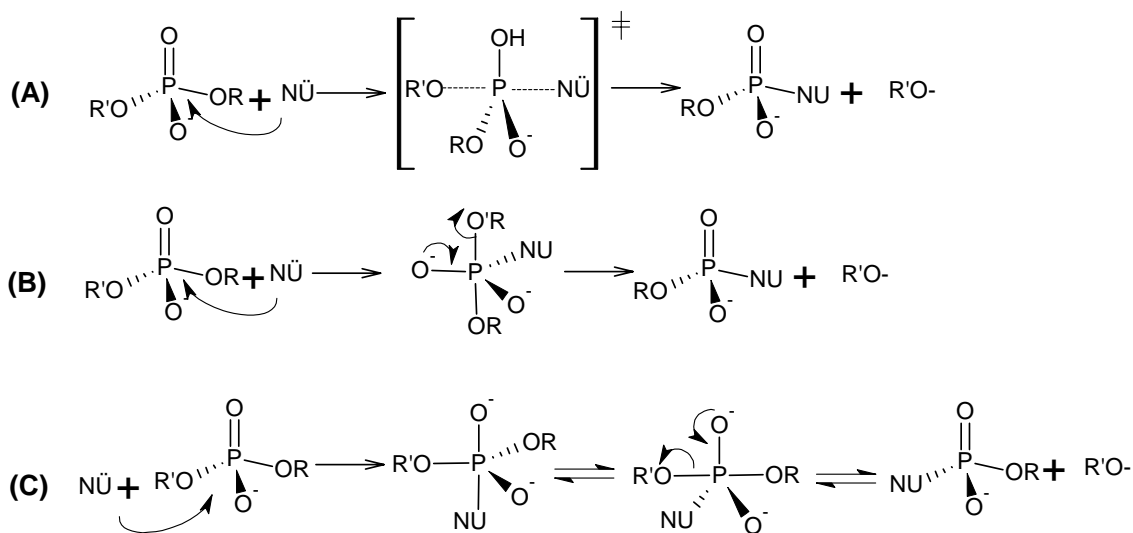
Em pH muito baixo, alquilfosfatos primários e secundários são hidrolisados via dois mecanismos competitivos, por SN2 com clivagem da ligação alquil-oxigênio ou por quebra da ligação P—O.^[36]

Acima de pH 1,5, onde o grupo de saída, fosfato, possui pelo menos uma carga negativa, a hidrólise se processa principalmente via mecanismos de

clivagem da ligação P—O.^[37] De forma semelhante, as reações enzimáticas se processam principalmente via clivagem da ligação P—O do éster fosfórico.^[38]

As reações de substituição em ésteres fosfóricos com quebra da ligação P—O têm sido por muito tempo consideradas mecanisticamente análogas àquelas envolvendo substituição no carbono tetraédrico, do tipo SN1 ou SN2.^[37] Estes mecanismos têm sido descritos na literatura^[37,39,40] como pertencentes a duas classes: dissociativo e associativo.

Os mecanismos associativos de adição-eliminação, denominados SN2(P), são análogos aos equivalentes para a substituição no átomo de carbono. A espécie formada no ataque do nucleófilo sobre o fósforo tetraédrico é pentacoordenada com geometria do tipo bipirâmide trigonal, sendo esta espécie um intermediário ou um estado de transição. Kirby *et al*^[41,42,43] estudaram largamente os efeitos de diferentes nucleófilos sobre diésteres de fosfato, inclusive com catálise intramolecular. Os mecanismos associativos podem ser representados como segue no **Esquema 9**.



Esquema 9

O **Esquema 9A** mostra um processo associativo em linha, onde o estado de transição (ET) é pentacoordenado com o nucleófilo e o grupo de saída

nas posições apicais, parcialmente ligados ao átomo de fósforo central, levando à inversão de configuração.

Um processo associativo em linha é mostrado no **Esquema 9B**, mas levando a um intermediário pentacoordenado estável, e à inversão de configuração;

Alternativamente, no **Esquema 9C** é exibido um mecanismo que leva à retenção de configuração via um processo associativo adjacente, onde é importante notar que o intermediário pentacoordenado sofre uma pseudo-rotação de Berry para que o grupo de saída fique na posição apical.

É importante lembrar que a posição apical de um intermediário ou estado de transição tipo fosforano (**Figura 8**), numa geometria bipirâmide trigonal, é favorável sobre a posição equatorial tanto para o ataque do nucleófilo quanto para a partida do grupo de saída. São duas as razões para justificar esta preferência: (i) a ligação apical é aquela que resulta da interação do nucleófilo com uma determinada face do fósforo tetraédrico no estado fundamental, para providenciar um impedimento estéreo reduzido dos grupos vizinhos; (ii) as ligações apicais possuem comprimentos maiores e são mais fracas que as equatoriais.^[44]

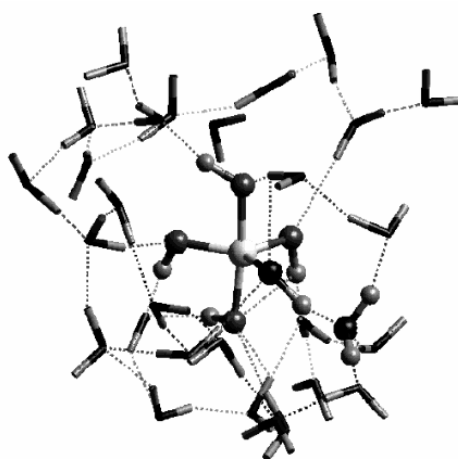


Figura 8 - Estrutura de um pentóxi fosforano solvatada explicitamente numa simulação de dinâmica molecular^[45].

A determinação experimental dos mecanismos de reações de substituição nucleofílica em ésteres fosfóricos é bastante difícil. Os mecanismos destas reações podem ser estudados medindo-se as velocidades das reações de substituição para uma série de substratos e os resultados, expressos em constantes de velocidade, interpretados usando-se as relações lineares de energia livre. Além disso, estudos de efeito isotópico e cálculos computacionais podem também ser realizados. Em alguns casos, podem-se usar informações sobre a estereoquímica dos reagentes e produtos para determinar se a reação segue por caminhos mecanísticos associativos ou dissociativos. Entretanto, como o intermediário pentacoordenado nos mecanismos associativos pode sofrer uma pseudorrotação levando ao produto racêmico^[46], o mecanismo associativo não pode ser excluído unicamente com base na racemização observada, que é característica dos mecanismos dissociativos.

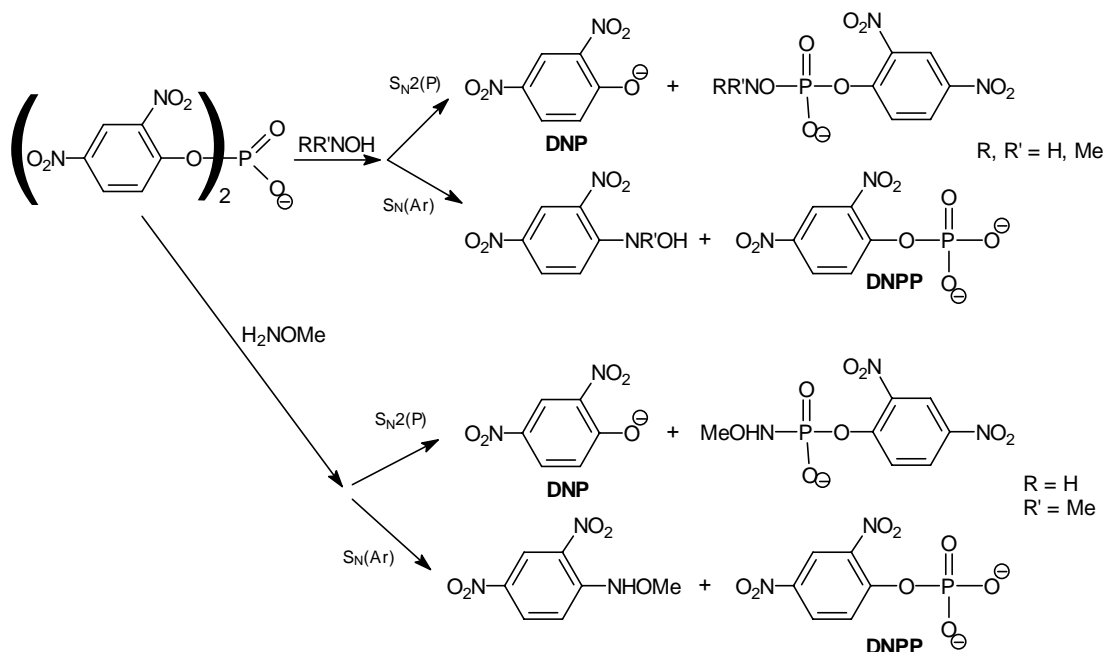
1.8. Nucleófilos Alfa

O chamado “efeito alfa”, atribuído a espécies químicas de alta reatividade, leva em conta as características eletrônicas intrínsecas a esta classe de compostos, colocando-os em destaque, em termos de velocidade de reação, de outros bons grupos nucleofílicos.

Devido a seu singular efeito catalítico, ele é reportado por diversos autores que estudam a degradação de espécies altamente estáveis e de difícil clivagem, entre os quais Domingos *et al*^[47,48,49]. Nestes recentes trabalhos Domingos estudou o mecanismo de reação do *bis*-(2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) frente a diferentes nucleófilos alfa, como a hidroxilamina e seus derivados *N* e *O*-metilados, hidrazina e peróxido de hidrogênio.

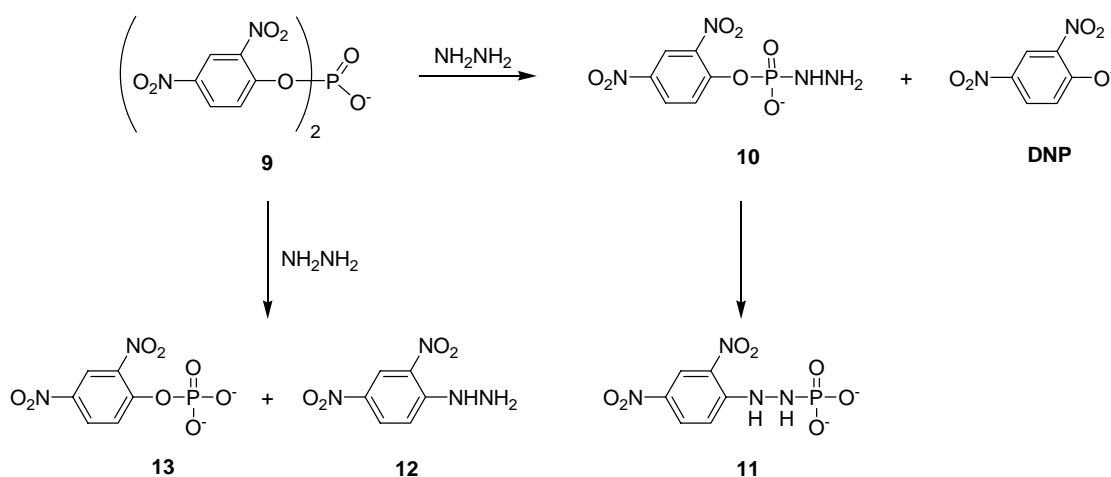
Segundo os autores, a *N*-metilação não afeta significativamente a etapa inicial da reação, afetando as reações secundárias devido à estabilidade dos compostos formados na primeira etapa. Por outro lado a *O*-metilação inibe fortemente o ataque inicial sobre o fosfato, favorecendo o ataque nucleofílico

sobre o anel aromático, que é uma reação secundária para as outras hidroxilaminas como mostra o **Esquema 10**.



Esquema 10

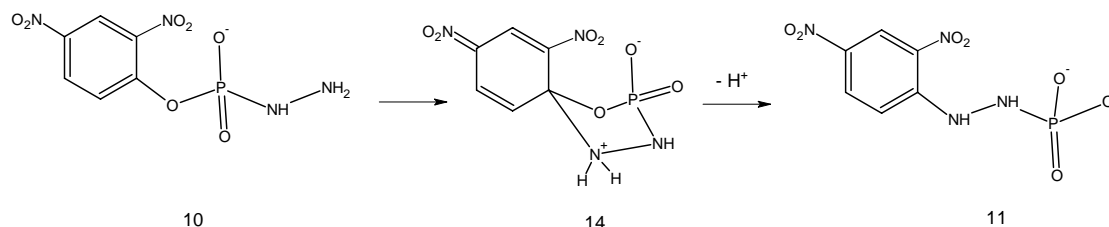
Nessa mesma linha foi proposto um mecanismo de reação para o ataque alfa-nucleofílico da hidrazina no substrato bis-(2,4-dinitrofenil) fosfato BDNPP (**Esquema 11**).



Esquema 11

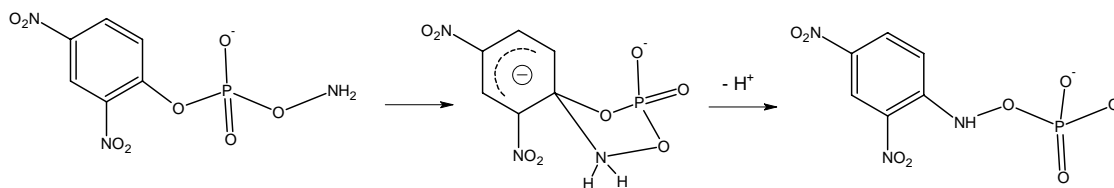
No início da reação, há um ataque nucleofílico no anel aromático que resulta na formação de 2,4-dinitrofenilhidrazina, bem como do monoéster de fosfato **13**. Quando a reação é realizada em escala um pouco maior, adequada então pra análise de RMN, observou-se que durante a reação do BDNPP com hidrazina, ocorreu precipitação de um composto avermelhado que por análise de RMN ^1H , foi determinada sua estrutura como a do composto **12**. Quando a hidrazina ataca no átomo de fósforo P, o 2,4-dinitrofenolato (DNP) é formado. Entretanto observou-se por RMN ^{31}P o aparecimento concomitante de uma espécie transiente **10**, que rapidamente desaparece. Os dados foram confirmados por espectrometria de massa com ionização por spray de elétrons ESI-MS, que permite detectar os intermediários em solução.

O composto **11** se forma através de um rearranjo, semelhante ao de Smiles, do composto **10**. Inicialmente acontece o ataque do grupo NH_2 terminal do composto **10** sobre o carbono aromático, formando um intermediário cíclico **14** que se decompõe para formar **11** (Esquema 12).



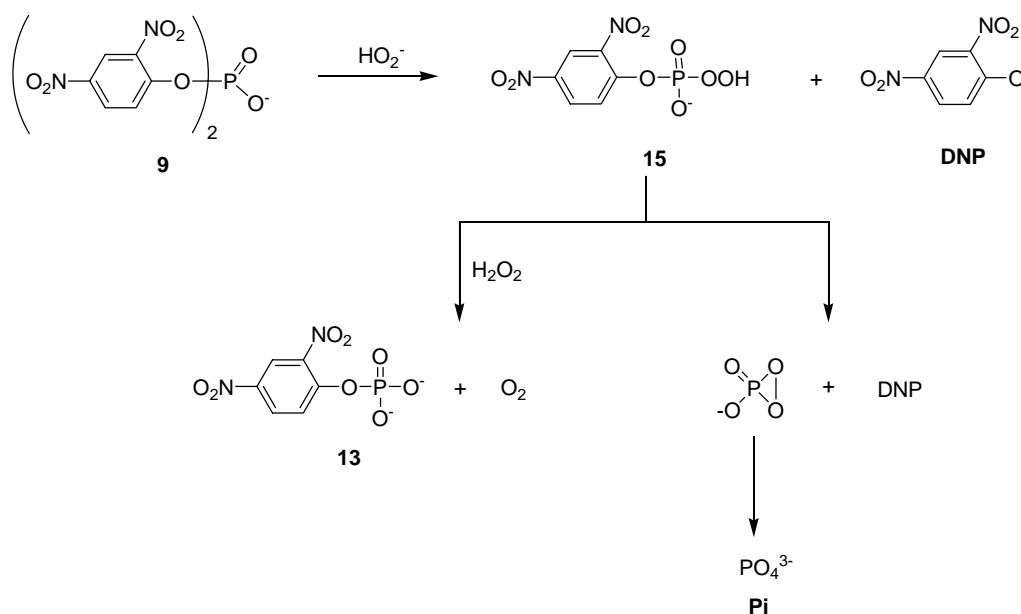
Esquema 12

Um rearranjo muito semelhante acontece quando o nucleófilo é a hidroxilamina e é mostrado no **Esquema 13**. Nesse trabalho foi dada ênfase na elucidação do melhor sítio nucleofílico para o ataque ao átomo de fósforo do BDNPP. Nele, pela primeira vez, foi sugerido um rearranjo do tipo Ar-O-P-O-N para Ar-N-O-P-O , via complexo intermediário cíclico de Meisenheimer, formando a 2,4-dinitrofenilhidroxilamina a partir de seu intermediário precursor *O*-fosforilado, os estudos foram corroborados por RMN ^{31}P e ESI-MS.



Esquema 13

Para o caso do peróxido de hidrogênio uma reação com o BDNPP também foi proposta similarmente. Inicialmente é formado o intermediário **15** pela reação do HO_2^- com o BDNPP. Numa segunda etapa, a decomposição de **15** pode acontecer através da reação com H_2O_2 que resulta na formação de **13**, ou através da clivagem intramolecular, que gera um segundo equivalente de íon DNP (Esquema 14).



Esquema 14

É importante salientar sobre esses trabalhos que diferentes nucleófilos alfa reagem com o BDNPP para formar diversos produtos, dependendo do nucleófilo. Em todos os casos, a reatividade dos mesmos é consideravelmente superior à observada para nucleófilos que não apresentam efeito alfa (Figura 9).

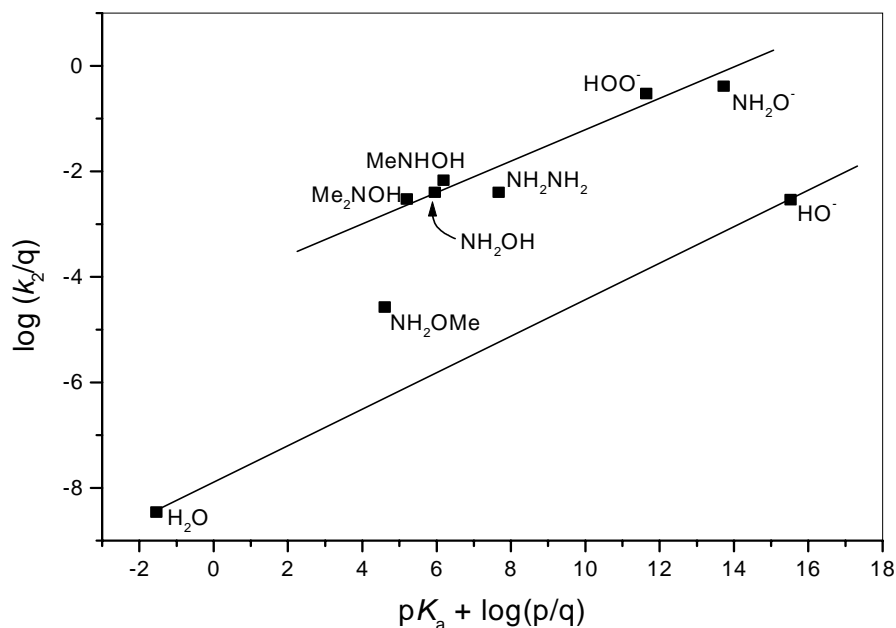


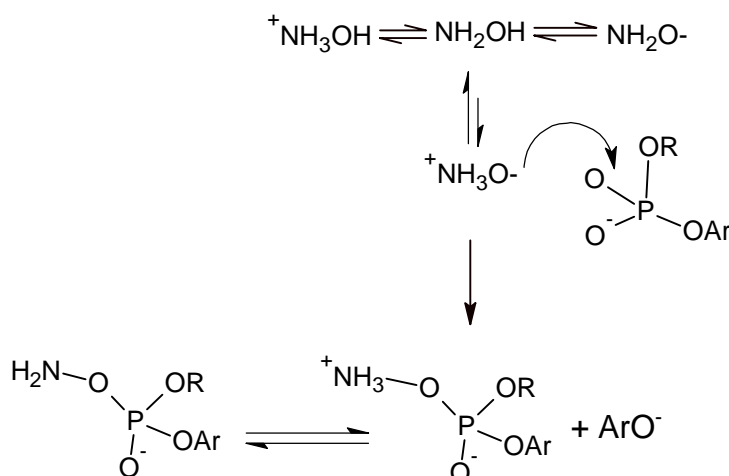
Figura 9 - Relação entre o logaritmo da constante de velocidade e o pK_a de nucleófilos para a desfosforilação do BDNPP. As constantes de velocidade e valores de pK_a são corrigidos estatisticamente.^[49]

O conceito de efeito-alfa, segundo Jencks e Edwards, se aplica diretamente à hidroxilamina, visto que esta possui todos os requerimentos para esta classificação, como: a) o centro nucleofílico é um átomo do segundo período da tabela periódica (oxigênio) com densidade negativa de carga; b) não há substituintes vizinhos ao centro nucleofílico; (c) o nucleófilo contém um grupo cataliticamente ativo (NH₂), o qual pode estabilizar o estado de transição; e (d) o átomo de nitrogênio eletronegativo na posição alfa em relação ao centro reacional possui um par de elétrons desemparelhados o qual desestabiliza o estado fundamental e estabiliza o estado de transição.^[50]

Como descrito na revisão introdutória do trabalho de Simanenko *et al* a forma neutra da hidroxilamina tem uma alta reatividade contra ésteres carboxílicos, fosfóricos e fosfônicos, além dos seus haletos. Ainda nesse trabalho são citados, os esforços de se provar que a sua forma aniônica também possui considerável reatividade, frente a ésteres semelhantes, demonstrando pela primeira vez que as afirmações de Bruice e Benkovic^[36] a respeito de que a

forma aniônica da hidroxilamina usualmente não reagiria com ésteres, não eram tão abrangentes quanto se acreditava, ou pelo menos se conhecia.

Sobre essa questão nosso grupo de pesquisa tem estudado uma proposta a respeito da verdadeira espécie reativa derivada da hidroxilamina, o **Esquema 15** mostra os possíveis equilíbrios envolvidos na dissociação da hidroxilamina.



Esquema 15

O mecanismo de ataque nucleofílico pelo oxigênio da hidroxilamina tem sido discutido por muitos anos. Jencks^[51], estudou o principal modo de ataque no *p*-nitrofenil acetato pela hidroxilamina, constatou então que ambos atacam, mas com uma velocidade anormalmente rápida quando o nucleófilo é o oxigênio. *N,N*-dimetil-hidroxilamina mostra uma reatividade similar, mas NH₂OMe, que não pode atacar pelo oxigênio, é menos reativa do que acetatos de arila^[52] e fosfato^[53], embora possa contar com algum grau de efeito alfa quando o ataque é pelo nitrogênio. Evidentemente mais que um fator está envolvido, como sempre ocorre nos casos de reatividades nucleofílicas.

Com o mecanismo proposto no **Esquema 15**, nosso grupo concluiu que a maior energia do estado fundamental da espécie nucleofílica na forma de íon dipolar é o maior fator para isto. Este mecanismo é de fundamental interesse simplesmente pelo fato de que, o responsável pela reatividade do nucleófilo alfa

seria a sua desestabilização no seu estado fundamental, ao contrário da estabilização do estado de transição, modificando-se assim a origem do efeito alfa aceita até os dias de hoje.

1.9. Estudo químico computacional

A fim de se corroborar os resultados experimentais, atualmente utilizam-se cálculos de orbitais moleculares, tanto em nível *ab initio*, quanto de mecânica molecular, dependendo da aplicação. A intenção primária é a de elucidar a forma geométrica da molécula, inclusive os efeitos da solvatação em água, e seus possíveis intermediários e estados de transição com diferentes nucleófilos.

Otimizações de geometria molecular em nível Hartree-Fock para a molécula no seu estado gasoso, utilizando-se para isso conjuntos de funções de bases relativamente simples podem resultar em estruturas com erros mínimos e irrelevantes. Entretanto, reproduzir a estrutura “imersa” em uma fase condensada (em água, por exemplo), que é de grande interesse para o estudo mais realístico dos mecanismos de reações, é um problema maior que necessita da inclusão de outros efeitos intermoleculares, os quais podem afetar significativamente as estruturas.

Existem praticamente duas formas de se incluírem os efeitos de solvatação no cálculo dos orbitais moleculares, uma de forma implícita e outra de forma explícita.

Para se incluir efeitos de solvatação de forma implícita, admite-se que o solvente nada mais é do que um contínuo com uma constante dielétrica definida, ou seja, esse contínuo dielétrico representa uma média estatística sobre todos os graus de liberdade no equilíbrio térmico, e assim sendo pode-se abrir uma cavidade dentro desse contínuo e inserir a molécula de interesse. A análise do efeito (energia G) é dada pelo cálculo da distribuição de cargas do soluto $\rho(\mathbf{r})$

frente ao potencial eletrostático $\phi(\mathbf{r})$ gerado pelo contínuo dielétrico (**Equação 1.5**).

$$G = -\frac{1}{2} \int \rho(\mathbf{r})\phi(\mathbf{r})d\mathbf{r} \quad (5)$$

Incluindo o efeito de solvatação de forma explícita, existe a vantagem de se obter junto ao resultado final o papel efetivo das interações soluto-solvente na reação de estudo. Assim, há a possibilidade de se avaliar todas as ligações de hidrogênio importantes ao sistema (situação impossível de ser analisada via modelos implícitos).

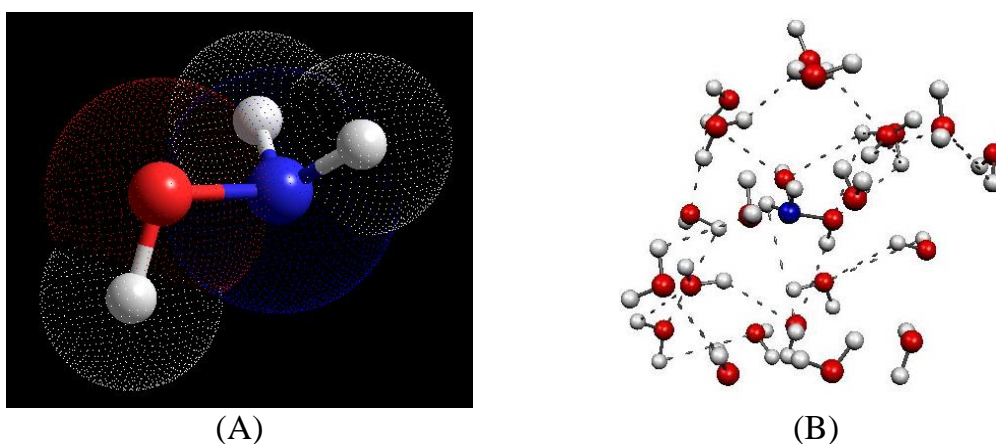


Figura 10 - Hidroxilamina em (A) Modelo implícito onde o substrato se encontra numa cavidade (superfície interseccional pontilhada) circundada pelo contínuo dielétrico (superfície negra com constante dielétrica constante). (B) Solvatação explícita da hidroxilamina por moléculas de água.

Entretanto solvatar explicitamente um soluto, implica em se dispor não só da primeira camada de solvatação, mas de muitas outras, aumentando o número de moléculas para a casa dos milhares. Este aumento do sistema inviabiliza o cálculo em nível *ab initio* devido ao enorme custo computacional em termos de resoluções de equações. Contudo, muitas propriedades termodinâmicas são possíveis de serem analisadas, fazendo uso apenas de cálculos de mecânica molecular ^[54], daí a necessidade de se utilizar tanto o modelo de solvatação implícito (grande precisão, pouca exatidão) ilustrado na **Figura 10A**, quanto do modelo explícito (pouca precisão, razoável exatidão),

Figura 10B, para se construir um modelo misto que possa ajudar a elucidar a estrutura geométrica da molécula.

Outros estudos tornam-se viáveis com a utilização de cálculos computacionais, por exemplo, Iché-Tarrat e colaboradores^[55], aplicaram cálculos baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com funções de base B3LYP e os métodos de solvatação implícitos MPE (MultiPolar Expansion desenvolvido pelos seus colaboradores em Nancy^[56]) e D-PCM (formulação original do Polarizable Continuum Model, criado por Tomasi^[57]) para estudar os perfis de energia livre para a hidrólise alcalina dos triésteres e diésteres de fosfato apresentados na **Figura 11**.

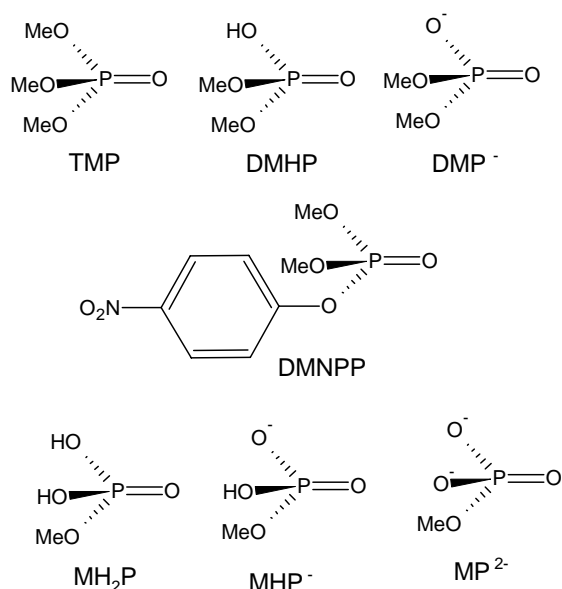


Figura 11 - Diésteres e triésteres de fosfato utilizados nos estudos de Iché-Tarrat *et al.*

Os dados teóricos foram validados pela excelente correlação com os dados experimentais, determinados por entalpias de ativação. Os cálculos realizados com o dimetilfosfato predizem que, ao contrário do que é geralmente observado para o ARN e os fosfodiésteres arílicos, a reação de clivagem da ligação P—O promovida pela água no ADN deve dominar a reação catalisada por base em pH = 7,0. Estes resultados sugerem que as nucleases podem ser

menos eficientes como catalisadores do se tem acreditado atualmente. Uma grande ressalva a se fazer é quanto ao tamanho das moléculas utilizadas nesse estudo, todas de tamanho reduzido e conseqüentemente menor número de elétrons, facilitam a computação dos cálculos quânticos, nesses níveis de teoria. De outro modo, ou seja, para moléculas maiores, o custo computacional se eleva exponencialmente, fazendo com que nos dias atuais sejam necessários computadores de grande capacidade de cálculos como os clusters de processadores de alto desempenho.

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

São inúmeras as possibilidades de se empregar moléculas-modelo no estudo de determinados sítios enzimáticos catalíticos, dentre eles poderemos destacar o presente trabalho, onde foi utilizado o composto 8-dimetilaminonaftil-1-metilfosfato, DANMEP, na forma de seu sal de sódio, a fim de: a) ser estudado como modelo para hidrólise de fosfodiésteres e b) estudar também o efeito catalítico o grupamento amino (amônio) sobre a hidrólise do mesmo.

Este composto pode mimetizar o sítio amino/amônio catalítico de uma série de reações enzimáticas, visto que o grupo acoplado ao carbono oito do anel naftalênico, pode atuar como catalisador ácido ou básico geral, ou nucleofílico sobre o metil fosfato, dependendo das condições do meio reacional, mas principalmente do equilíbrio de protonação da molécula.

De forma geral, esse trabalho almeja contribuir com a literatura atualmente existente sobre os estudos mecanísticos de reações de diésteres de fosfato, estudando-se a reação química do DANMEP frente à ação de diferentes nucleófilos e em diversas condições químicas, através de técnicas experimentais e teóricas. E tendo como finalidade principal propor um mecanismo de reação que leve ao entendimento do papel desempenhado pelo grupo catalítico dimetilamônio nas reações de substituição nucleofílica em diésteres de fosfato.

2.2. *Objetivos específicos*

2.2.1. Cinéticos e Termodinâmicos

Obter e analisar as diferentes constantes de velocidade para a reação do DANMEP com diferentes nucleófilos, em diferentes condições como, pH, temperatura, e efeito isotópico do solvente. E através desses dados:

- Traçar a curva de titulação espectrofotométrica do DANMEP e compara-lo com os dados de titulação potenciométrica;
- Obter o perfil cinético da reação de hidrólise dependente do pH;
- Analisar a influência da temperatura na reação de decomposição do DANMEP e extrair os parâmetros termodinâmicos;
- Avaliar o efeito isotópico do solvente em meio de ácido forte e sobre faixa de pH;
- Investigar a variação na constante de velocidade promovida pela ação de diferentes espécies nucleofílicas, incluindo nucleófilos que apresentam o efeito alfa, na decomposição do DANMEP e obter um gráfico de correlação do pK do nucleófilo com essa constante (gráfico de Brönsted);

2.2.2. Quânticos

Executar os cálculos das funções de onda dos orbitais moleculares para o DANMEP e as diferentes espécies envolvidas na reação de decomposição deste utilizando-se para isso de pacotes computacionais disponíveis gratuitamente pela comunidade científica mundial. Dentre as propriedades calculadas a partir destas funções de onda destacam-se:

- A estrutura otimizada do DANMEP com simulação do solvente água pela metodologia Polarizable Continuum Model (modelo implícito);

- A estrutura otimizada do DANMEP com agregados explícitos de água (modelo explícito);
- A estrutura otimizada do DANMEP inserindo ambos os modelos (implícito e explícito) de solvatação e comparando com os resultados de cada modelo separado;
- Proceder a uma busca pelo estado de transição mais provável para a reação do DANMEP com um nucleófilo;
- Avaliar a estabilidade de possíveis intermediários na reação de decomposição do DANMEP;
- Comparar as estruturas e estabilidades relativas frente a estabilidade da ligação ArO—P obtidas para o DANMEP com seu derivado monoéster.
- Propor estruturas mais reativas por catálise ácida geral intramolecular a partir dos resultados obtidos para o DANMEP.

2.2.3. Objetivo final

Utilizar todos os resultados obtidos para propor um esquema de reação para a decomposição do DANMEP, via catálise ácida geral intramolecular.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGIAS

3.1. *Metodologia Experimental*

3.1.1. Os reagentes

Os reagentes sólidos utilizados nesse trabalho foram de qualidade P.A. ou superior e não tiveram tratamento prévio, mas foi tomado o devido cuidado para que estivessem livres de umidade. Com exceção dos experimentos feitos em solventes deuterados, para avaliação do efeito isotópico do solvente, o solvente padrão para todos os experimentos realizados foi água, sendo ela destilada em destilador elétrico, com tratamento adicional apenas para os experimentos de determinação da constante de dissociação. O D₂O utilizado foi proveniente da Cambridge Isotope Laboratories, com grau de pureza rotulado em 99,9% e a solução de DCl utilizada foi da marca Aldrich[®].

O composto 8-dimetilaminonaftil-1-metilfosfato de sódio foi obtido através da colaboração entre o Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais da UFSC e o grupo de pesquisa do Professor Anthony J. Kirby da Cambridge University em Cambridge no Reino Unido. O composto foi sintetizado e caracterizado espectroscópica e espectrometricamente pela primeira vez, e exclusivamente para esse projeto, pelo Professor Christo D. Roussev, sendo então um composto inédito na literatura.

3.1.2. Síntese do DANMEP

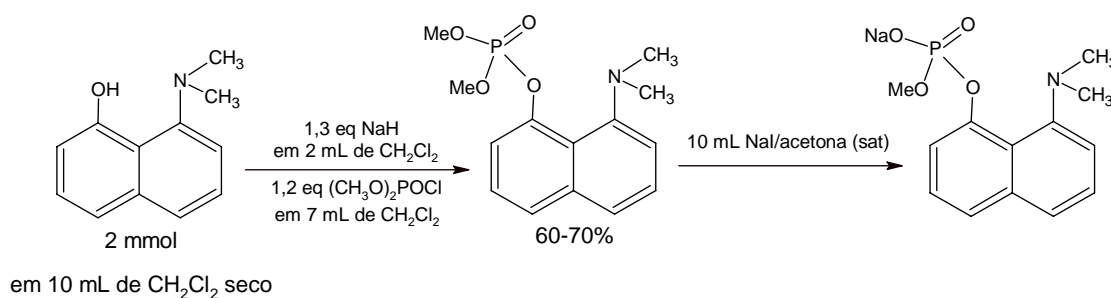
O DANMEP foi sintetizado em duas etapas, A e B, utilizando-se o seguinte procedimento:

A) *Obtenção do triéster 8-dimetilaminonaftil-1-dimetilfosfato.*

Para uma solução de 2 mmol de 8-dimetilamino-1-naftol, em 10 mL de diclorometano seco sob agitação, foram adicionados 1,3 equivalentes de hidreto de sódio em diclorometano. Depois de 30 minutos foram adicionados à suspensão resultante, gota a gota, 1,2 equivalentes de dimetil fosforocloridato em 7 mL de diclorometano e a mistura foi agitada por 20 – 30 minutos até completar a reação (monitorada por RP-HPLC, TLC). Então foram adicionados 5 mL de sílica gel seca na mistura reacional para pré-adsorção direta, e a seguir evaporada e cromatografada (sílica; ETOAc/hexano, 7:3, $R_f=0,25$) para produzir o triéster de fosfato com rendimento entre 60 a 70%. NMR- ^1H (DMSO- d_6 , 250 MHz): 7,74 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 7,54 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 7,44 (q, 2H, $J = 3$ and 10,8 Hz), 7,3 (dt, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,12 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz), 3,8 (d, 6H, $J = 11,3$ Hz, OCH_3), 2,74 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$). ESI-MS (ESI+): calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{P}$ [M] 295,27, encontrado: 295,8 (100%), 317,8 (81,6%, na forma de sal de sódio +Na) e 613,1 (35,7%, dimerizado).

B) Obtenção do Diéster

Uma solução de NaI saturada em acetona (10 mL) foi adicionada ao 8-dimetilaminonafteil-1-dimetilfosfato e o produto levemente amarelado foi refluxado durante 30 – 40 minutos até o desaparecimento do material inicial (TLC). Depois da evaporação, o resíduo sólido foi extraído seco (banho com ultrassom) com diclorometano (3×15 mL), centrifugado e o sobrenadante evaporado, redissolvido em água (5 mL) e passado através de uma coluna RP curta (C18). A evaporação da água fornece o diéster em rendimento próximo ao quantitativo como seu sal de sódio.



Os espectros de RMN-H e ESI-MS com os íons positivos e negativos são mostrados nas **Figuras 12, 13 e 14**, respectivamente.

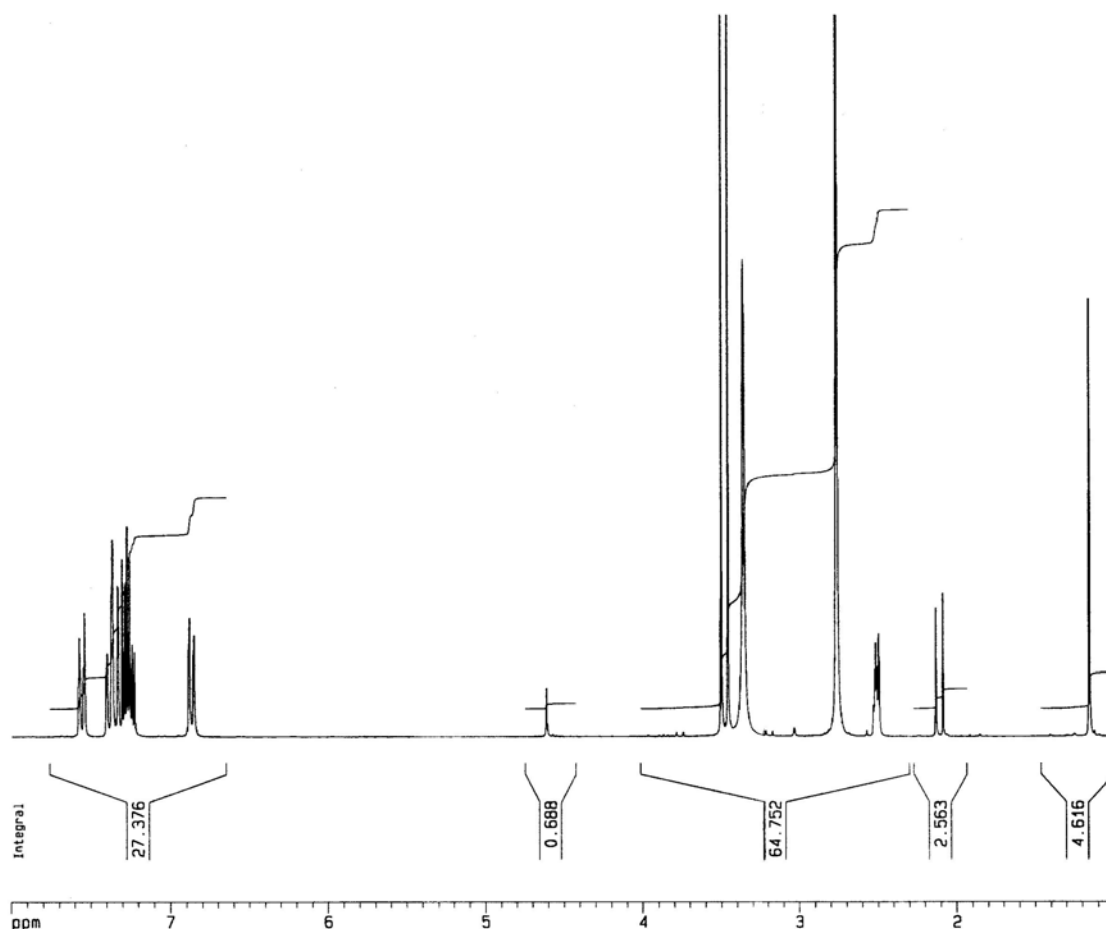


Figura 12 – Caracterização do DANMEPNa por Espectroscopia de RMN-¹H.

O espectro de RMN-¹H foi obtido em DMSO-d₆ sob resolução de 250 MHz e mostrou as seguintes bandas: 7,55 (dt, 1H, $J = 7,5$ and $1,2$ Hz), 7,4-7,2 (m, 4H), 6,86 (dd, 1H, $J = 7,4$ and $1,1$ Hz), 3,48 (d, 3H, $J = 10,8$ Hz, OCH₃), 2,76 (s, 6H, N(CH₃)₂), utilizando um aparelho BRUCKER Avance AM 250 a 300 K, utilizando tetrametilsilano e H₃PO₄ 85%, como padrões interno e externo, respectivamente. O espectro de RMN-³¹P em DMSO, mostrou um único sinal cujo deslocamento foi de -1,69.

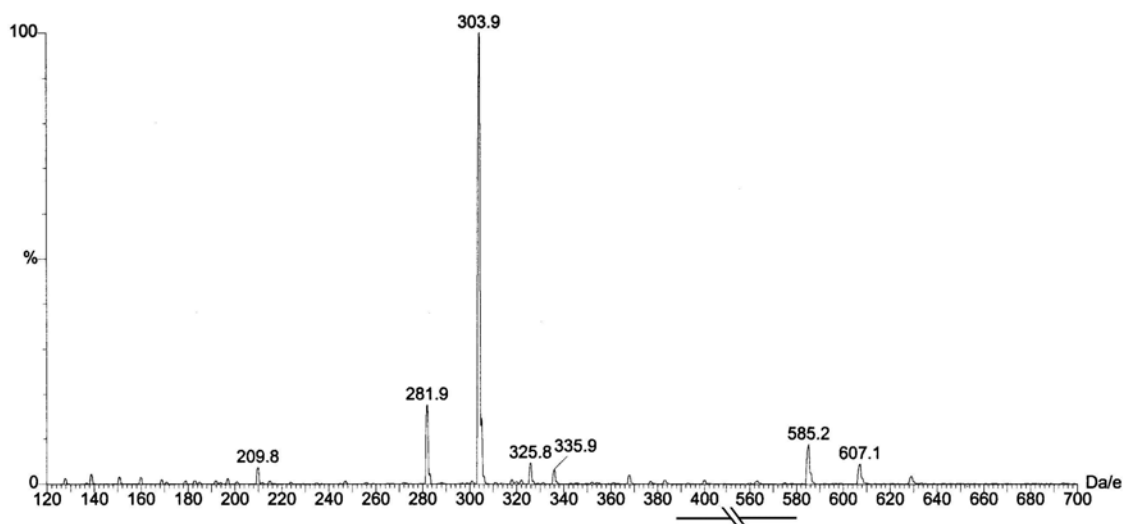


Figura 13 - Caracterização do DANMEPNa por Espectrometria de massas por meio de ionização por spray de elétrons, ESI-MS (ESI+).

O pico de ESI-MS (ESI+) calculado para o $C_{13}H_{15}NNaO_4P [M^- + Na]$ foi de 303.23, e através de um espectrômetro de massas da marca Fisons Instrument VG Plataform II, foram encontrados os seguintes valores: 281.9 (17.6%) para o DANMEP, 303.9 (100%) para o DANMEPNa, 585.2 (8.7%) para o dímero do DANMEP sem o metal e 607.1 (4.4%) para o dímero com sódio.

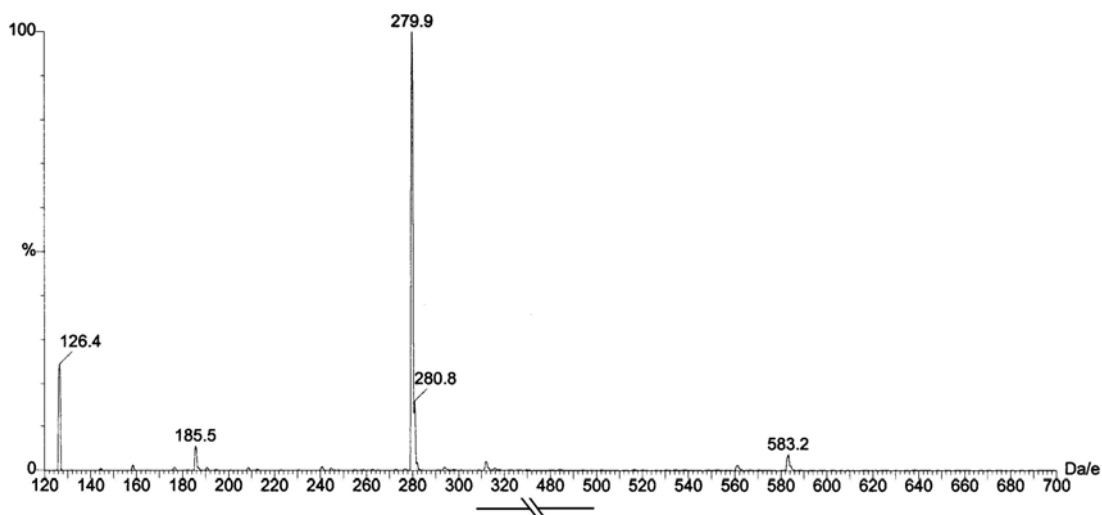


Figura 14 - Caracterização do DANMEPNa por Espectrometria de massas com ionização por spray de elétrons, ESI-MS (ESI-).

No ESI-MS (ESI-), foi calculada uma massa para o $C_{13}H_{16}NO_4P$ [M] de 281.24, encontrando-se os seguintes sinais: 279.9 (100%) para o DANMEP desprotonado, 280.8 (16%) para o DANMEP e 583.2 (3.6%) para a forma dimerizada.

3.1.3. Controle do pH

Todos os experimentos relativos às reações do DANMEP foram realizados com força iônica controlada, $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl, marca Reagen[®], com 99% de pureza.

Vários experimentos foram realizados variando-se o pH do meio com a adição de ácido ou base. O álcali utilizado para o ajuste dos valores de pH das soluções foi uma solução diluída de KOH, base adquirida em formato de pastilhas de marca Vetec[®], e para acidificação foi utilizada solução também diluída de HCl da marca Aldrich[®].

Todos os experimentos foram realizados com pH ajustado ao valor desejado utilizando-se para isso um pHmetro de bancada HANNA Instruments[®] modelo pH 200 e mantendo-se a temperatura constante com a ajuda de um banho termostatizado conectado ao sistema.

O ajuste dos valores de pH das soluções analisadas foi realizado da seguinte maneira: as massas necessárias, do nucleófilo, KCl e da substância tamponante, para atingir as respectivas concentrações desejadas num volume total de 10 mL, eram aferidas em balança analítica e transferidas para um reator cilíndrico de parede e fundo duplos para o controle de temperatura por fluxo de água termostatizada, a seguir pouco menos de 10 mL (~ 8 mL) de água destilada eram então vertidos no reator a fim de dissolver a mistura de solutos, o pH era então ajustado ao valor desejado pela adição de soluções de HCl e KOH diluídas apropriadamente para que o volume não excedesse os 10 mL. Uma vez ajustado o pH, a solução era então transferida para balão volumétrico e completado o volume, caso necessário, com água destilada.

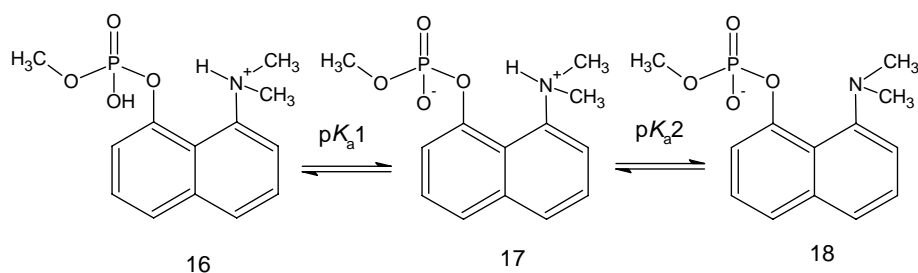
Para manutenção do valor de pH durante todo o experimento cinético, foram utilizados diferentes tampões, para as diferentes faixas de pH cobertas por cada um de acordo com seu pK_a , foi adotado o padrão de se utilizar a solução tampão numa faixa que variasse, em média, entre $\pm 0,75$ do valor do seu pK_a , sempre levando-se em conta que a maioria das medidas eram realizadas a 60°C . Sendo assim as seguintes soluções tampões foram utilizadas: $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$ ($3,0 < \text{pH} < 4,5$) a partir do ácido fórmico da Vetec[®] (98%); $\text{H}_3\text{CCOOH}/\text{H}_3\text{CCOO}^-$ ($4,0 < \text{pH} < 5,5$) a partir do acetato de sódio (98%) da marca Riedel-deHaën[®]; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ($6,5 < \text{pH} < 8,0$) a partir do fosfato monobásico de potássio da marca Vetec[®] (99,7%); $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_4\text{BO}_4^-$ a partir do ácido Bórico Vetec[®] (99%); $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ ($9,5 < \text{pH} < 11,0$) da Vetec[®] (99%). A concentração das soluções tampão utilizadas foi de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Para valores de pH menores que 2,0 e maiores que 11,0 foram utilizadas soluções diluídas de HCl (Aldrich[®]) e KOH (Vetec[®]), respectivamente.

3.1.4. Determinação potenciométrica da constante de dissociação do DANMEP

A técnica de titulação potenciométrica é comumente empregada para equilíbrios em solução. Este tipo de titulação consiste na medida da variação do pH por meio de pequenas adições de uma base (ou ácido) padronizada à solução ácida (ou básica) de um composto. Os experimentos de titulação potenciométrica realizados nesse trabalho foram utilizados para caracterizar a segunda constante de dissociação (pK_{a2}) para o equilíbrio químico do DANMEP.

O equilíbrio de ionização para o DANMEP em soluções aquosas, em função do pH, envolve uma espécie ácida, um íon-dipolar e uma espécie básica,

Esquema 16.



Esquema 16

Nas espécies 16 e 17 do **Esquema 16**, observa-se que o grupo dimetilamino está protonado, o que possibilita um efeito catalítico do tipo ácido-geral a partir do grupamento amônio sobre o oxigênio naftóico. As espécies 16, 17 e 18 correspondem respectivamente às formas catiônica, íon dipolar ou zwitteriônica e aniônica do DANMEP e cada uma delas predomina em diferentes faixas de pH.

A determinação correta dos valores de pK_a , acarretam uma melhor compreensão de possíveis mecanismos de reação já que permite conhecer qual espécie tem importância em determinada condição experimental.

As titulações potenciométricas foram realizadas em célula de vidro, de paredes duplas, com sistema de agitação magnético e capacidade de 100 mL, mantendo a temperatura constante por meio de um banho termostatizado a 25°C. O sistema foi mantido fechado e sob um fluxo contínuo de nitrogênio, sendo esse gás previamente borbulhado em uma solução de KOH 0,1 mol.dm⁻³ para remover traços de CO₂.

O volume inicial da solução a ser titulada foi de 50 mL, sendo a força iônica do meio mantida com KCl 1,0 mol.dm⁻³. Após pequenas adições de KOH padronizado ao meio reacional, por meio de uma sistema de titulação automático, as leituras de pH foram registradas no mesmo equipamento descrito no item 3.1.3. A calibração do eletrodo foi realizada titulando-se HCl com KOH padrão 0.099382 mol.dm⁻³, em uma solução com força iônica de 1,0 mol.dm⁻³ (KCl).

Neste trabalho o tratamento dos dados potenciométricos foi realizado utilizando o programa BEST^[58] (código escrito em Fortran 77) que possibilita o ajuste interativo aos dados obtidos na titulação a fim de minimizar o desvio padrão (σ) entre os dados experimentais e da curva calculada. O arquivo de entrada de dados do BEST7 contém os dados experimentais da variação de pH em função do volume de base ou de ácido, as concentrações do substrato, do ácido e da base, o volume inicial da solução e o conjunto de todos os equilíbrios possíveis para o sistema estudado. Este conjunto compreende as constantes de equilíbrio estimadas, e as constantes a serem determinadas, as quais podem ser também estimadas usando valores conhecidos de constantes já determinadas para sistemas semelhantes.

O programa estabelece o balanço de massas para todas as espécies presentes a cada adição de base e resolve as equações para calcular as concentrações de íons hidrogênio, as quais são comparadas aos valores medidos. A otimização das constantes de equilíbrio procuradas é realizada mantendo-se fixas as constantes de equilíbrio conhecidas e minimizando as diferenças entre os valores de pH calculados e os valores de pH medidos. Nos cálculos, busca-se sempre um desvio padrão mínimo para o sistema, entre os valores experimentais de pH encontrados na titulação e os valores calculados com as equações introduzidas.

3.1.5. As soluções dos nucleófilos

Os compostos derivados de hidroxilamina, utilizados como nucleófilos na reação de decomposição do DANMEP, foram: hidroxilamina (99%), *O*-metil-hidroxilamina (98%), *N*-metil-hidroxilamina (98%) e *N,N*-dimetil-hidroxilamina (99%) na forma de seus cloridratos e da marca ACROS[®]. Fluoreto de potássio (99%) da Merk[®] e 2,2,2-trifluoroetilamina (98%) na forma de cloridrato da ACROS[®], também foram utilizados além de fosfato monobásico de potássio, ácido fórmico e acetato de sódio de proveniência e pureza detalhados

no último parágrafo. As concentrações utilizadas dos nucleófilos não foram menores que 0,01 nem maiores que 1,0 mol.dm⁻³.

3.1.6. Os estudos espectrofotométricos

O acompanhamento da cinética reacional foi realizado com a ajuda da espectroscopia UV-Vis, no comprimento de onda de 320 nm, escolhido pela maior variação da banda espectral sobre esse valor e conseqüentemente melhor análise dos dados. Uma ilustração contendo as espécies que foram monitoradas por esta metodologia e as respectivas bandas de absorção podem ser visualizadas no gráfico da **Figura 15**.

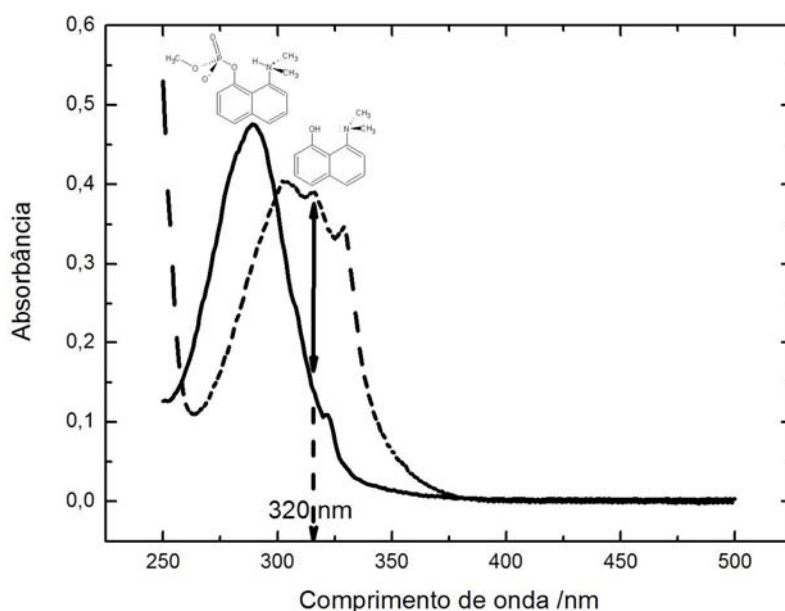


Figura 15 – Espectros de absorção do DANMEP (linha contínua) e do DANOL (linha tracejada).

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se soluções estoque aquosas do substrato, com concentração $3,1 \times 10^{-3}$ mol.dm⁻³, preparadas dissolvendo-se 0,0094 g de 8-dimetilamino-1-metilfosfato de sódio (DANMEPNa), sólido de cor branco-opaco e altamente higroscópico, em um volume total de 10 mL. A solubilidade do composto a 22°C (temperatura média interna do laboratório) nessa concentração mostrou-se adequada para os procedimentos experimentais.

Para a realização dos experimentos de varredura espectrofotométrica 0,100 mL de uma solução estoque era diluído em cubetas de quartzo para perfazer um volume total de 3,1 mL e concentração final de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, o aparelho utilizado para acompanhamento na região do ultravioleta-visível foi um espectrofotômetro Varian®, modelo Cary 50®, provido de fonte de xenônio do tipo “flash”, com acendimento programado especificamente para o momento da leitura, ficando todo o tempo ocioso desligada, e também um suporte móvel com compartimento para cubetas, mantidas a temperatura constante por banho termostático conectado ao compartimento das cubetas e ajustado eletronicamente à temperatura desejada, para automação das varreduras.

O Sistema Cary 50® possui um software que faz o interfaceamento do controle das operações do aparelho, o Cary WinUV versão 3.0, no qual se pode automatizar todo o experimento cinético. Ele também possui ferramentas matemáticas para o tratamento dos dados após as análises, sendo essas ferramentas utilizadas nesse trabalho para o ajuste de primeira ordem das cinéticas de reação acompanhadas. Uma ilustração para o procedimento experimental adotado é mostrada na **Figura 16**.

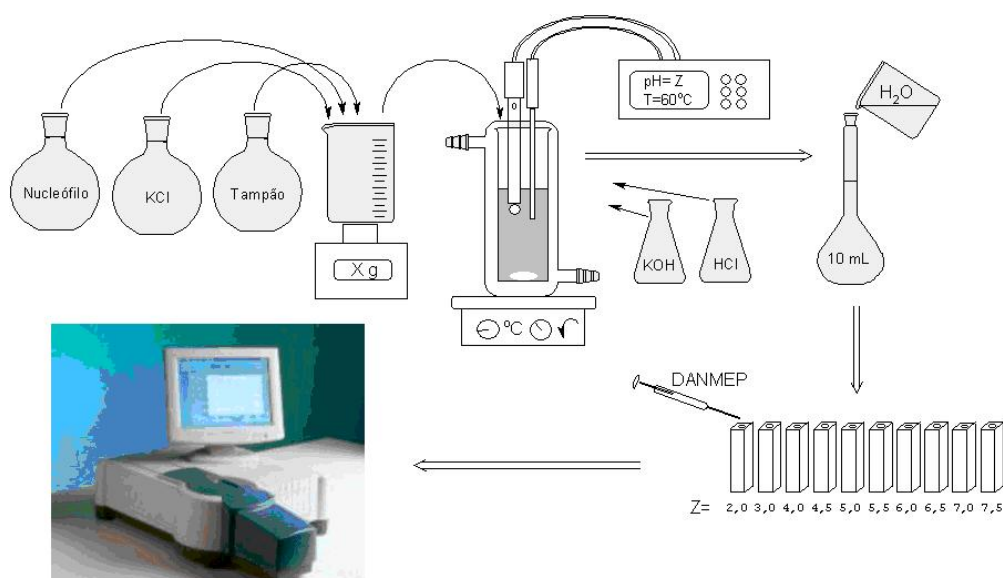


Figura 16 - Ilustração representativa para o procedimento experimental adotado na preparação das amostras para análise por UV-Vis.

Para viabilizar o estudo cinético das reações envolvendo DANMEP, a temperatura escolhida para coleta de dados foi a de 60°C, tendo em vista que a hidrólise e demais reações com o composto têm um tempo de meia vida operacionalmente elevado. Para garantia de temperatura constante durante os experimentos, um banho termostatizado com seletor de temperatura e bomba de fluxo foi acoplado ao compartimento móvel das cubetas o qual é termicamente isolado.

3.1.7. Procedimento utilizado para avaliação do efeito isotópico

Os solventes deuterados utilizado nos experimentos foram DCl e D₂O de alta pureza analítica como detalhado na seção 3.1.1. Uma solução de 5 mL de DANMEP, $3,1 \times 10^{-3}$ mol.dm⁻³ foi preparada em D₂O para o procedimento dessa classe de experimentos. A solução do nucleófilo utilizado (cloridrato de hidroxilamina) foi também preparada em D₂O satisfazendo a concentração de 0,5 mol.dm⁻³. O contato das soluções com o ambiente foi reduzido ao máximo, trabalhando sempre que possível em sistemas fechados, e quando necessário sobre atmosfera de nitrogênio. A partir de então o mesmo procedimento da seção 3.1.6 foi utilizado para se obter os dados cinéticos da reação.

3.1.8. Procedimento utilizado para avaliação do efeito da temperatura

O mesmo procedimento adotado na seção 3.1.6 foi empregado, contudo repetindo-o para as temperaturas de 60, 70, 75 e 80°C, mantidas constantes com auxílio de banho termostatizado conectado ao compartimento das cubetas utilizadas. Utilizando-se como nucleófilos: água, íons fluoreto, íons formiato e hidroxilamina todos em concentração 0,5 mol.dm⁻³ e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl.

Para o caso do fluoreto, os experimentos foram realizados somente em 2 duas temperaturas: a 60° tendo em vista que durante o período de monitoramento nenhum dano, ou opacidade devido a possíveis reações deste nucleófilo com a sílica das paredes do recipiente, foi constatado; e a 80°C devido

à relativa rapidez da reação e conseqüentemente menor tempo de contato do fluoreto com o material do recipiente.

3.2. Metodologia Computacional

3.2.1. Equipamentos

A malha computacional utilizada nesse trabalho foi um computador do tipo PC, provido de um processador da marca AMD modelo Athlon XP[®] 2080 MHz (2800+) e 1024 Mb de memória RAM do tipo DDR. Para os estudos finais foi construído um cluster computacional do tipo Beowulf heterogêneo de classe 1, constituído de 6 processadores (nodos) utilizando-se como gerenciador mestre um processador da marca AMD modelo Athlon XP[®] com velocidade de processamento estimada em 2080 MHz (1,5 GFlops estimados pelo pacote Gromacs^[59]), e 5 computadores escravos, todos de mesma configuração, com processadores Intel com velocidade de processamento de 2,8 GHz implementado com a tecnologia HyperThreading (1,6 GFlops estimados pelo pacote Gromacs) e 1024 Mb de memória RAM do tipo DDR. Para visualização dos resultados, no computador mestre foi instalada uma placa de processamento gráfico da marca Nvidia[®], modelo GeForce4 MX[®] com 128 Mb de memória RAM do tipo DDR e acelerador gráfico 8X.

3.2.2. Construção do Cluster Beowulf

Algum tempo atrás, o paralelismo era visto como uma rara, exótica e interessante sub-área da comutação, mas de uma pequena relevância para o programador ou operador comuns. Contudo empresas de menor porte e universidades agora têm a acessibilidade e podem recorrer a uma alternativa cada vez mais freqüente. Essa alternativa pode ser concretizada através do uso de clusters de computadores, com desempenho da ordem de Gigaflops, o que se tornou possível através do desenvolvimento e barateamento da tecnologia das redes locais de alta velocidade e da evolução dos processadores.

Atualmente, diversas instituições científicas possuem clusters com um porte e poder computacional razoável, com número de computadores variando desde dois até milhares de nodos. No site www.top500.org de atualização semestral, encontra-se uma relação dos supercomputadores proprietários e dos clusters que possuem a maior capacidade de processamento do mundo, muitos clusters presentes nessa lista são do tipo Beowulf, criado pela primeira vez pela NASA no Goddard Space Flight Center em 1994, utilizando uma das primeiras versões do sistema operacional GNU/Linux, que foi originalmente criado, ou melhor, montado, ao redor de 1992.

Basicamente os clusters do tipo Beowulf são divididos em duas classes, os do tipo I e os do tipo II. A principal característica dos clusters do tipo I é a origem dos componentes, que podem ser adquiridos em qualquer loja de informática popular, tornando-os muito acessíveis nos dias de hoje, já para os clusters do tipo II, materiais muitas vezes desenvolvidos especialmente para seu fim, são extremamente específicos, e conseqüentemente elevando drasticamente seu custo final, e embora seu desempenho seja superior devido a arquitetura especial dos seus componentes a relação custo benefício é bem maior que para o caso daqueles do tipo I.^[60]

Para a montagem do cluster foram disponibilizados seis computadores (especificados na seção 3.2.1) os quais foram interligados pelas suas placas de rede fast-ethernet padrão 100/10 da marca Via[®] modelo Rhine III através de um switch da marca 3COM, modelo 3C16792. Uma vez conectados, foi instalado o sistema operacional GNU/Linux baseado na distribuição Debian Sarge 3.1 R0, escolhido pela sua estabilidade, segurança e fácil atualização de pacotes.

Com os sistemas completamente instalados, passou-se a etapa de configuração dos protocolos de intercomunicação, que nesse caso foi baseada no protocolo TCP/IP, o qual atribui uma identificação a cada nó do cluster e conseqüentemente um endereçamento de fácil localização na rede. Para isso foi utilizado um sistema de IP estático, tendo em vista o número reduzido de nodos

no cluster. Os números de IP utilizados foram baseados na norma RFC 1918 seguindo a arquitetura 192.168.X.X e fornecidos na tabela abaixo:

Tabela 5 - Identificação dos nodos do cluster Beowulf.

Nome do computador (mestre/escravo)	nome.domínio na rede	IP
fnome9 (mestre)	fnome9.qmc.ufsc.br	192.168.0.1
fnome101 (escravo)	fnome101.qmc.ufsc.br	192.168.0.2
fnome102 (escravo)	fnome102.qmc.ufsc.br	192.168.0.3
fnome103 (escravo)	fnome103.qmc.ufsc.br	192.168.0.4
fnome104 (escravo)	fnome104.qmc.ufsc.br	192.168.0.5
fnome105 (escravo)	fnome105.qmc.ufsc.br	192.168.0.6

Uma vez endereçados, os computadores foram, um a um, configurados para que os processos pudessem ser compartilhados por meio de software adequado.

O primeiro software a ser instalado e configurado foi o protocolo de acesso remoto RSH (Remote Shell), mecanismo principal para o acesso de todas as máquinas do cluster. É importante salientar que esse protocolo já foi retirado do pacote padrão da distribuição Debian, devido a sua fácil vulnerabilidade a ataques provenientes de redes externas, contudo como o cluster a priori foi idealizado para uso dedicado a sistemas de cálculo computacional, este risco é eliminado pela não conexão do cluster com as redes externas ao mesmo.

O segundo software a ser configurado foi o servidor do sistema de arquivos NFS. Sua função é a de permitir o acesso transparente a discos remotos, baseados em uma arquitetura cliente/servidor, centralizando assim a administração dos discos de dados. O servidor NFS exporta diretórios para disponibilizá-lo para clientes remotos, que nesse caso são os nodos computacionais.

Uma vez configurados adequadamente estes dois softwares, o cluster já se encontra em condições de ser utilizado pelo pacote computacional para cálculos químico-quânticos GAMESS (General Atomic and Molecular Electronic Structure System)^[61]. O GAMESS dispensa qualquer mecanismo de distribuição de tarefas externo como a interface de passagem de mensagem, MPI, tendo em vista que o próprio pacote tem o seu sistema de distribuição chamado de interface de dados distribuídos (DDI) implementado no GAMESS entre os anos de 1999 e 2004 e reescrito a partir daí totalmente em código C e introduzido ao pacote em maio de 2004.

3.2.3. Programas

Os programas utilizados para os cálculos dos orbitais moleculares fazem parte do pacote GAMESS obtido gratuitamente da página na internet do projeto (<http://www.msg.ameslab.gov/GAMESS/GAMESS.html>), hospedada pelo grupo de pesquisa do Professor Gordon no Ames Laboratory da Iowa State University.

A versão utilizada é a de junho de 2005 (última versão até o momento) e foi compilada a partir do código fonte para o uso em cada tipo diferente de nó, tendo em vista que é um cluster heterogêneo baseado em processadores com tecnologia de processamento AMD[®] e INTEL[®].

Para a construção, visualização e rederização dos dados obtidos para as moléculas foram utilizados os seguintes programas gratuitos compilados para plataforma Linux: MOLDen^[62] (versão 4.4), mantido por Gijs Schaftenaar do Center for Molecular and Biomolecular Informatics da Radboud University na Holanda; Molekel^[63] (versão 4.3) desenvolvido e mantido por P. Flükiger, H.P. Lüthi, S. Portmann, J. Weber do Swiss Center for Scientific Computing na Suíça e Ghemical (versão 1.01) um programa desenvolvido por toda comunidade software livre (GNU) e licenciado pela GPL.

3.2.4. Metodologia para os cálculos

Todos os cálculos de otimização de geometria foram executados em nível Hartree-Fock com a utilização de funções de base 6-31G(d). Todos os resultados que incluíram solvatação por modelo implícito foram obtidos com o método “conductor-like PCM” (C-PCM)^[64], sem a utilização de compensação por cargas induzidas, a metodologia para tesselação do C-PCM utilizada foi a GEPOL-AS^[65], o fator para a superfície de acessibilidade do solvente (ALPHA), na formação da cavidade, foi utilizado fixo como 1,2.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Equilíbrio químico de protonação do DANMEP

Os dados experimentais obtidos para a titulação potenciométrica do DANMEP são mostrados na **Figura 17**, como um gráfico da mudança do pH em função do volume de base adicionado.

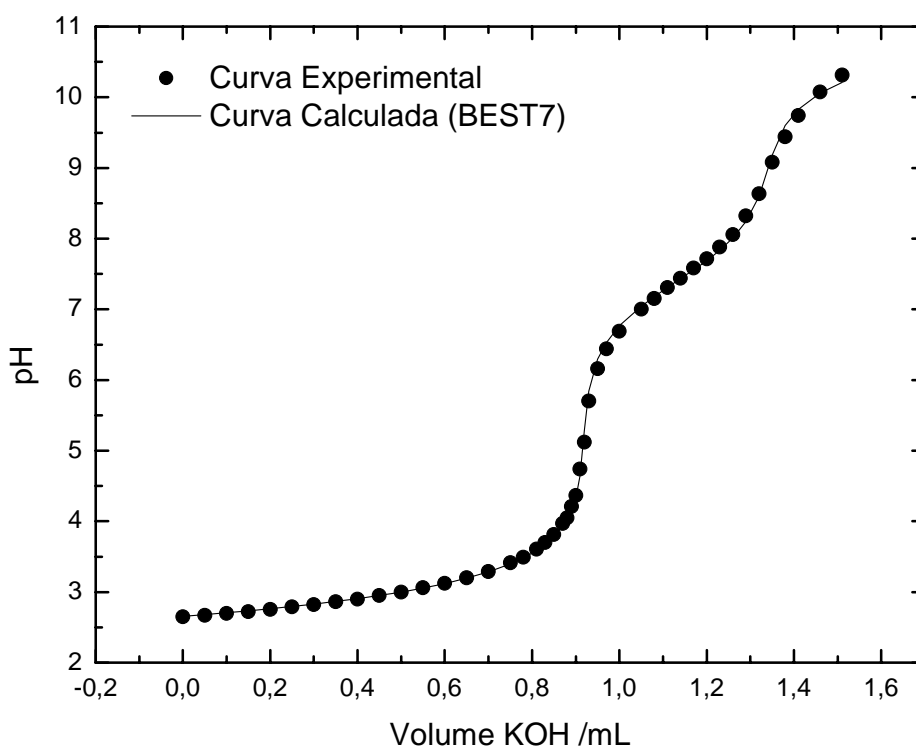


Figura 17 - Titulação potenciométrica da solução aquosa de DANMEP com KOH padrão $0,09938 \text{ mol.dm}^{-3}$ a 25°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl.

Na titulação mostrada na **Figura 17** foi utilizado como álcali, KOH padrão $0,099382 \text{ mol.dm}^{-3}$, em sistema preparado para redução da quantidade de CO_2 , através de linha de gás nitrogênio seco, tentando dessa forma evitar ao máximo a interferência alcalina do mesmo, já que o mesmo é adsorvido com grande facilidade pelo KOH.

Utilizando os dados experimentais mostrados na **Figura 17** e com a ajuda do programa BEST7 foi possível determinar o segundo valor de pK_a do DANMEP correspondente à passagem da espécie íon dipolar **17** para a espécie desprotonada **18**, como sendo de 7,48 a 25°C. A **Tabela 6** sumariza as condições experimentais e resultados obtidos a partir do ajuste.

Tabela 6 - Dados experimentais e resultados obtidos para a determinação do valor de pK_a do DANMEP.

massa _{DANMEP} utilizada	0,0152g
massa _{KCl}	3,725g
Volume inicial da solução	50,0 mL
KOH padrão	0,099382 mol.dm ⁻³
Temperatura	25°C
pK_a determinado	7,48 ± 0,01
σ	0,014

Dados espectrofotométricos a 25° e a 60° foram também obtidos numa tentativa de se obter uma medida de pK_a que permitisse verificar o sítio de protonação para o sistema em estudo. Para tanto foram preparadas várias soluções de DANMEP com diferentes valores de pH, preparadas de acordo com o procedimento experimental na seção 3.1.6 (p. 44), e as diferentes soluções foram submetidas a varreduras nas faixas ultravioleta e visível a fim de se obter o espectro nessa região. As curvas obtidas através destas medidas são mostradas na **Figura 18**.

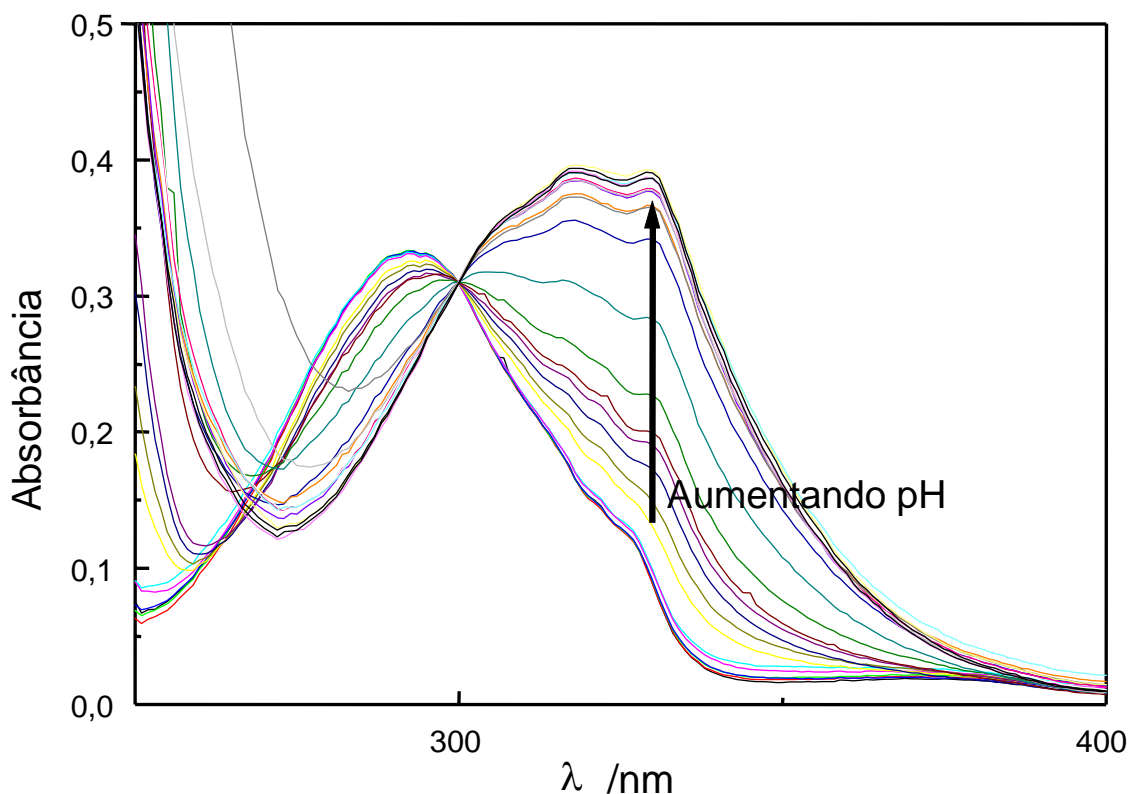


Figura 18 - Variação espectral do DANMEP em soluções aquosas, em função do valor de pH, a 25°C.

A partir da **Figura 18** é possível inferir sobre as principais modificações ocasionadas na estrutura do composto a medida em que o pH do meio é alterado. Podemos perceber que a absorbância para comprimentos de onda na faixa entre 280 e 300 nm diminui a medida em que o pH das soluções aumenta e um conjunto de picos na região compreendida entre 300 e 350 nm começa a se formar, um fato que indica que a estrutura totalmente desprotonada absorve em comprimentos de onda maiores provavelmente devido à conjugação do par de elétrons isolado do nitrogênio junto aos anéis aromáticos.

A seqüência de espectros da **Figura 18** permite visualizar um comprimento de onda onde existe um ponto de intersecção para todos os espectros obtidos em diferentes valores de pH, tal ponto possui um valor de absorbância fixo sob toda faixa de pH estudada, chamado de ponto isobéstico,

pode ser utilizado como referência para uma análise mais minuciosa da qualidade das medidas realizadas.

A partir dos valores de absorbância a 320 nm, valor escolhido devido a maior variação espectral, e dos valores de pH nos quais os experimentos foram realizados, foi gerado o gráfico da **Figura 19**.

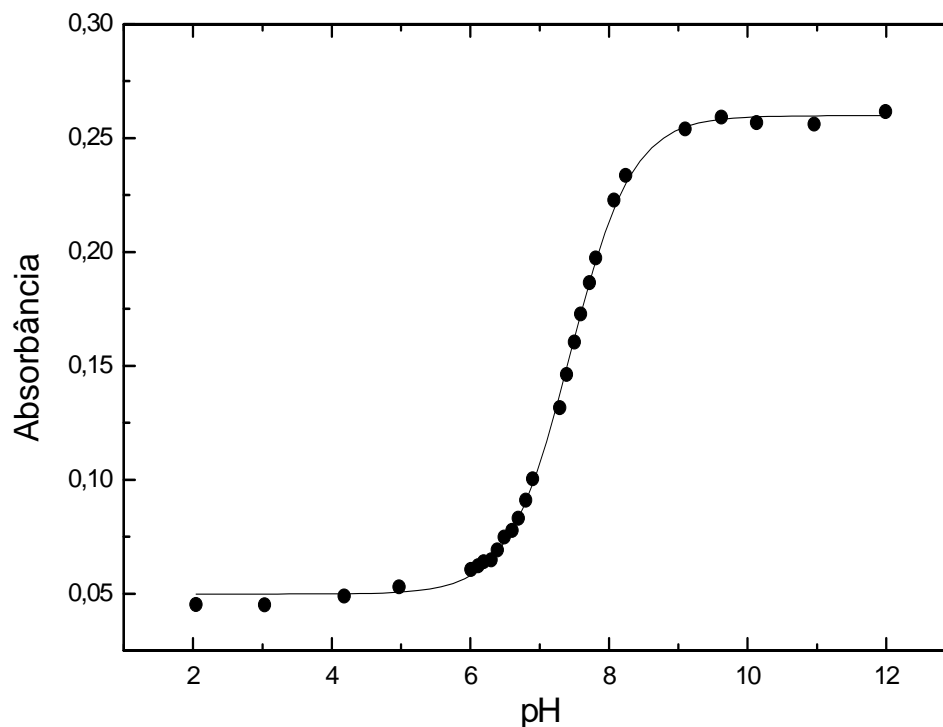


Figura 19 - Titulação espectrofotométricas a 320 nm das soluções aquosas de DANMEP a 25°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl.

Os dados experimentais permitiram calcular um valor de $pK_a = 7,44 \pm 0,02$ foi obtido através do ajuste não-linear dos dados da **Figura 19**, utilizando a **Equação (6)**.

$$Abs = Abs_{\text{inicial}} \times \chi_{17} + Abs_{\text{final}} \times \chi_{18} \quad (6)$$

A **Equação (6)** é uma função de ajuste para os dados obtidos espectroscopicamente para determinação do pK_a do DANMEP e leva em consideração a absorbância inicial (Abs_{inicial}) e final (Abs_{final}) do experimento e as

frações molares das espécies 17 e 18 (**Esquema 16 – p. 42**), fazendo com que, num processo iterativo, seja possível obter o valor do pK_{a2} .

Os valores obtidos pelas duas diferentes metodologias de determinação de pK_a utilizadas se corroboram mutuamente, permitindo afirmar com segurança quais são as espécies presentes em solução, para fins das análises dos resultados relativos ao estudo cinético e mecanístico da reação do DANMEP.

Contudo uma melhor conhecimento do valor de pK_a , nas condições de trabalho experimental, ou seja, força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ e temperatura de 60°C é desejável. Nesse intuito como a titulação espectrofotométrica mostrou-se suficientemente eficiente e precisa, procedeu-se a realizar a mesma a 60°C , obtendo-se o gráfico da **Figura 20**.

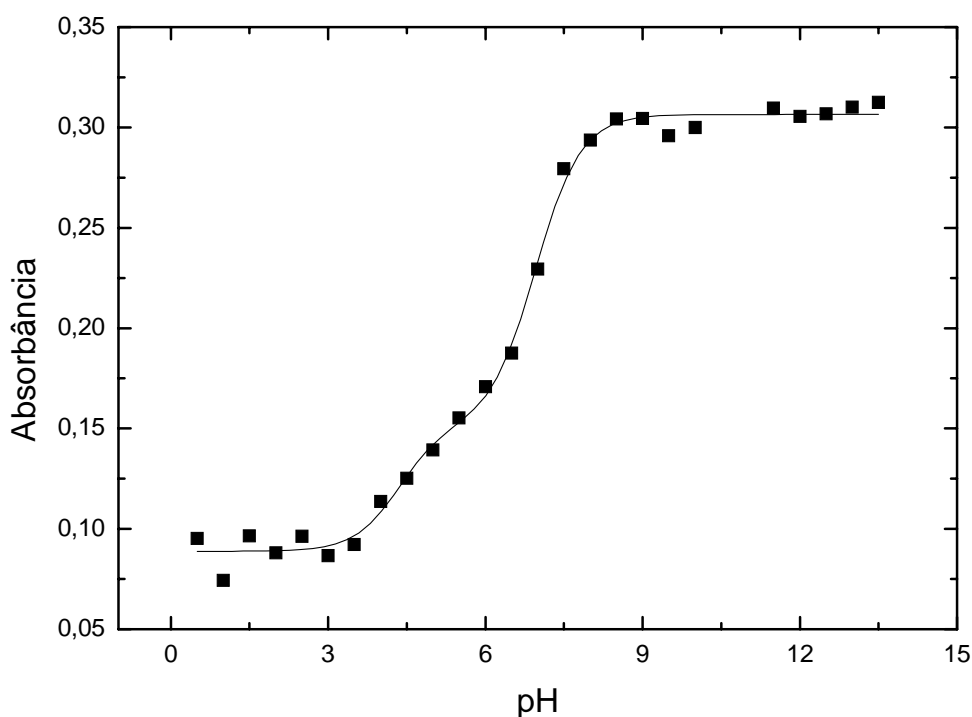


Figura 20 – Titulação espectrofotométricas a 320 nm das soluções aquosas de DANMEP a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl.

O gráfico da **Figura 20** mostra que a precisão das medidas fica prejudicada devido ao aumento da temperatura, e é particularmente interessante o surgimento de um outro valor de pK_a anterior ao pK_{a2} do DANMEP. Utilizando-

se a **Equação (7)** foi possível ajustar os dados obtendo-se um valor de $6,96 \pm 0,07$ para o pK_{a2} do DANMEP a 60°C e um de $4,36 \pm 0,16$, para o outro suposto valor de pK_a , atentando para o fato de que o desvio padrão para as medidas nessa temperatura aumentam em comparação com os dados a 25°C .

$$Abs = a_1 \times \chi_{17} + a_2 \times \chi_{17} \times \chi_{18} + a_3 \times \chi_{18} \quad (7)$$

O resultado indica que o aumento da temperatura provoca uma diminuição significativa do pK_{a2} do DANMEP. Este resultado é consistente com dados da literatura para outros fosfatos onde o mesmo efeito foi observado.

É importante salientar que devido ao aumento da temperatura, e conseqüentemente de uma maior reatividade do DANMEP, o pK_a de valor 4,36 corresponde à formação do produto da reação de decomposição DANOL **8**, o qual possui espectro muito parecido com DANMEP em determinados valores de pH como pode ser comparado entre as **Figuras 15 e 18**.

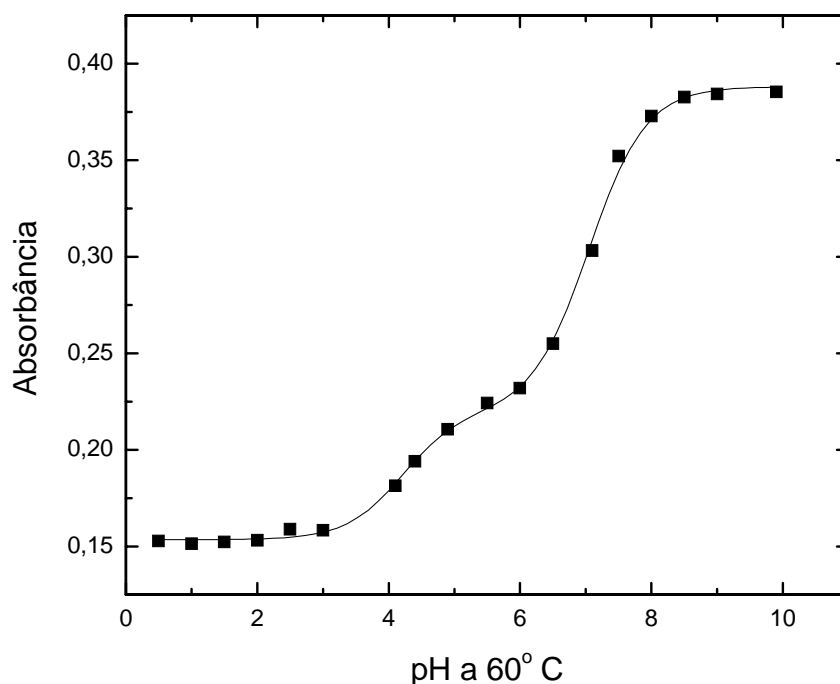
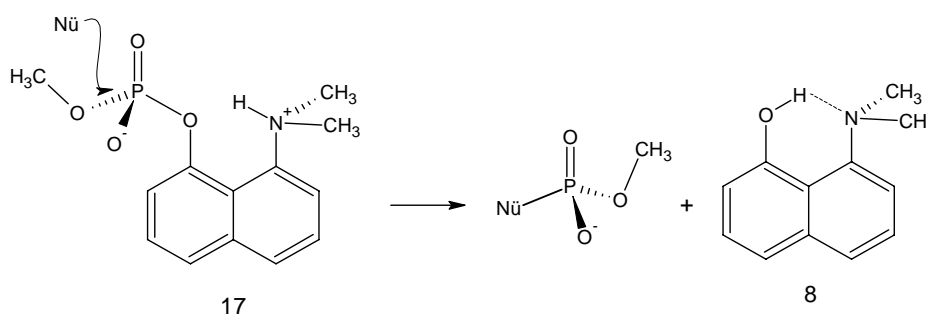


Figura 21 - Titulação espectrofotométricas a 320 nm das soluções aquosas de DANMEP a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de KCl, na presença de hidroxilamina $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Sendo assim, somente quando a formação do produto é acelerada, e conseqüentemente detectável espectroscopicamente, é que surge o suposto valor de pK_a na região de pH 4. Dados obtidos a partir da titulação espectrofotométrica do DANMEP a 25 e 60°C e ajustados com as equações (6) e (7), respectivamente, desta vez com a adição de hidroxilamina 0,5 mol.dm⁻³ e mantendo-se a força iônica de 1,0 mol.dm⁻³ reproduziram esse efeito apresentando um valor de pK_a de $4,21 \pm 0,08$ somente a 60°C (**Figura 21**).

4.2. Reação de hidrólise do DANMEP

A reação de hidrólise do DANMEP deve provavelmente acontecer via um mecanismo de substituição nucleofílica do tipo SN2(P) como mostrado no **Esquema 17**, onde Nü neste caso seria a molécula de água.



Esquema 17

Vários experimentos cinéticos em diferentes condições experimentais foram realizados no sentido de se obter o perfil do comportamento cinético da reação entre DANMEP e a água. A maior dificuldade encontrada foi o relativo longo tempo de monitoramento para coleta de medidas a 60°C. O perfil cinético obtido para a hidrólise do DANMEP a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ é mostrado na **Figura 22**. Para fim de analogia, os dados do DANMEP serão sempre que possível comparados aos seus derivados mono (**Esquema 5**) e triéster (**Esquema 6**), estudados pelo nosso grupo de pesquisa.

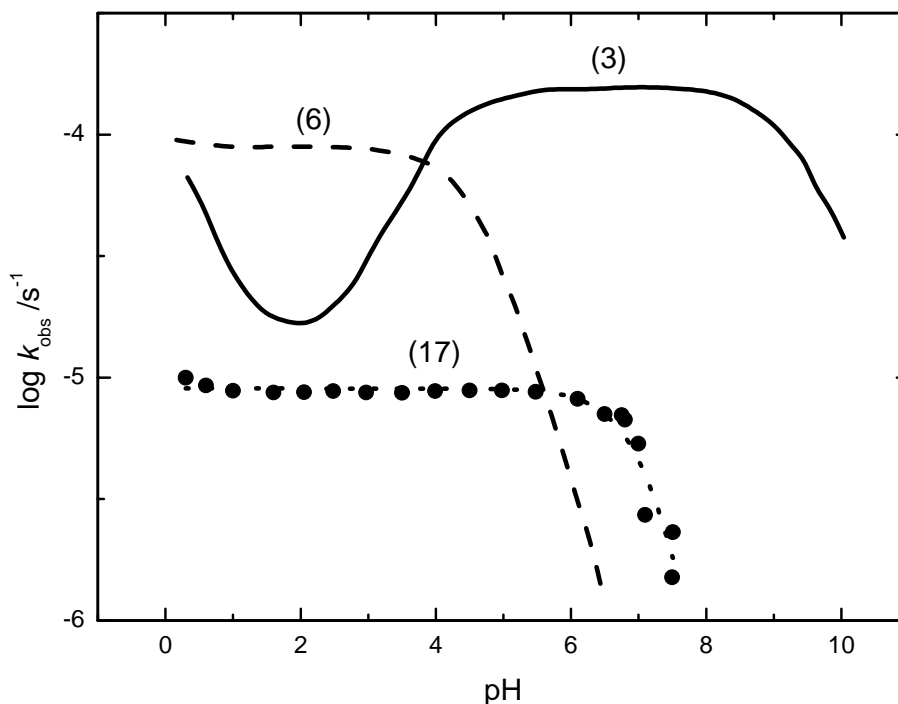


Figura 22 - Perfil cinético de hidrólise do DANMEP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$, comparado aos seus derivados mono (3) e triéster (6). Todos os dados foram obtidos em soluções aquosas, força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl e a 60°C .

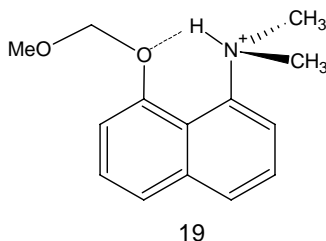
Com a **Figura 22** pode-se analisar o comportamento cinético da reação de hidrólise do DANMEP observando-se um platô na região entre pH 1 e 7, definido por um pK_a aparente de $7,06 \pm 0,06$ que define a transição entre as espécies 17 e 18 e o início de uma reação ácido-catalisada em pH inferior a 1. Assim, os dados mostram um perfil cinético consistente com a participação da forma íon dipolar 17 como espécie reativa. Foram incluídos para fins comparativos, os dados obtidos na reação de hidrólise do monoéster 3 onde a forma monoaniônica é a espécie reativa e o perfil de constante de velocidade em função do pH para o triéster 6, onde a espécie mono catiônica é consistente com a reatividade observada.

É importante verificar que as formas das curvas cinéticas do TANEP e do DANMEP são bastante similares, diferenciando-se apenas numa maior reatividade para o TANEP, sendo que a reatividade deste composto é interrompida pela desprotonação do grupo dimetilamônio de acordo com o equilíbrio químico mostrado no **Esquema 6**.

Entretanto para o derivado monoéster **3**, a região do patamar é definida entre dois valores de pK_a , o de 3,94 e o de 9,31, esses valores (substancialmente deslocados) foram identificados como a ionização do grupo fosfato e desprotonação do grupo dimetilamônio, respectivamente^[21].

Lembrando da titulação realizada para o DANMEP citada acima, verifica-se que o pK_a próximo a 7 pode ser atribuído seguramente ao grupo dimetilamônio, tendo em vista isso, percebe-se que este pK_a é bastante deslocado com respeito aos ésteres analisados passando de 4,63 no triéster para 7,06 no diéster e para 9,31 no caso do monoéster. Essa variação não depende primariamente das interações eletrostáticas envolvidas, mas na força da ligação de hidrogênio intramolecular $O \cdots H-N^+$, a qual aumenta com o aumento da basicidade do oxigênio que liga o grupo fosforil ao anel aromático (P—O—Ar).

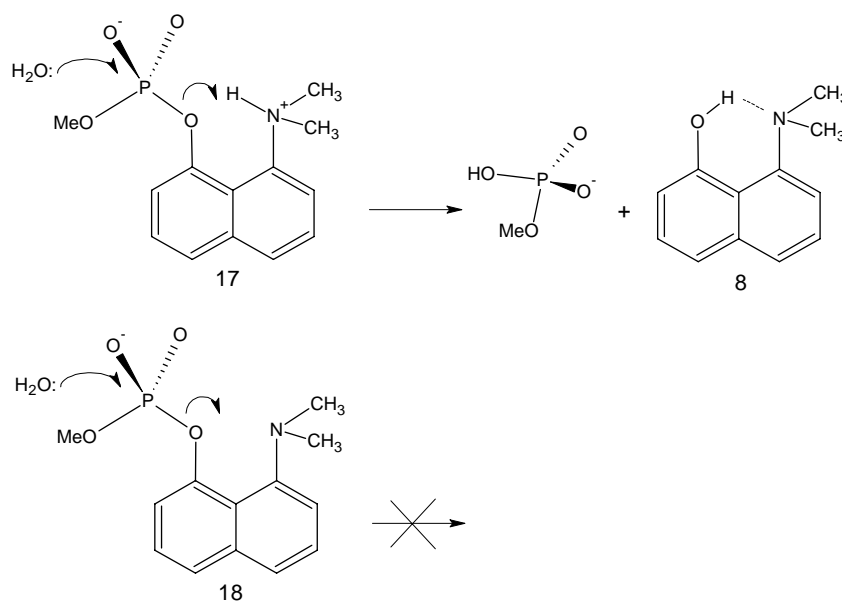
Em particular, o pK_a do grupo dimetilamônio da forma íon dipolar do DANMEP **17** é similar àquele do acetal **19**, estudado por Kirby et al., com um grupo vizinho neutro, que é também hidrolisado com uma eficiente catálise ácida geral intramolecular (aceleração de $\sim 10^4$ vezes).^[66]



Em termos de reatividade, a hidrólise do composto **17** é apenas 18 vezes mais lenta do que a do composto **3**. Em geral, diésteres de fosfato são notoriamente menos reativos que seus derivados monoésteres e, por exemplo, a hidrólise espontânea do 2,4-dinitrofenil fosfato na sua forma de diânion (hidrolisado numa velocidade similar aquela do monoéster **3**) é cerca de 1000 vezes mais rápida do que a aquela correspondente ao diéster 2,4-dinitrofenil metil fosfato.^[67] Comparativamente, a diferença observada entre DANMEP e MANEP é muito menor, o que pode ser explicado por uma eficiente catálise geral ácida

intramolecular para o caso do DANMEP. De fato, a aceleração devido à catálise geral ácida pelo grupo dimetilamônio da estrutura **17** é $2,56 \times 10^6$ a 60°C , um valor que é uma ordem de magnitude maior que a aceleração encontrada para o monoéster **3** ($2,4 \times 10^5$ a 60°C). O $\text{p}K_a$ efetivo do grupo de saída é de 3,6, similar ao valor estimado para o triéster **6**.

O mecanismo mais simples possível, consistente com o perfil cinético de pH na região entre os valores de pH 2 e 8, é mostrado no **Esquema 18**.



Esquema 18

Percebe-se que o esquema reacional proposto no **Esquema 17** (p. 58), permanece inalterado, contudo com a corroboração, desta vez, dos dados sobre a hidrólise do DANMEP que sugerem que a reatividade da forma mono aniônica é muito baixa. Ainda não há nenhuma evidência associada à possível presença de um intermediário de adição pentacovalente, contudo, caso exista, não é acumulado e seu tempo de meia vida seria suficientemente curto a fim de não produzir efeitos significantes no perfil de hidrólise do diéster.

O efeito de solvente deuterado para a hidrólise da estrutura **17** a pH 5,1 (no patamar) é de $\frac{k_H}{k_D} = 1,72 \pm 0,14$. Valores de efeito isotópico desta ordem são típicos para catálise geral ácida nestes sistemas e da mesma ordem de grandeza do que aqueles descritos para sistemas semelhantes, onde valores de $1,46 \pm 0,04$ foram obtidos na hidrólise do monoéster **3**^[21], 1,61 para a hidrólise do triéster **6**^[22] e 1,69 para a do acetal **19**. Estes valores de efeito isotópico são menores que os valores normalmente esperados para o efeito isotópico do solvente, onde normalmente $(k_H/k_D) > 2,5$. A explicação mais simples para o baixo valor do efeito isotópico é a de que nem a ligação da água ao centro eletrofílico, nem a transferência de próton a partir do ácido geral estão muito formadas no estado de transição. Uma alternativa mecanística é que a contribuição do próton a ser transferido é inversa, diminuindo assim o efeito isotópico observado, provavelmente devido ao fato da ligação de hidrogênio intramolecular ser mais forte no estado de transição do que no respectivo material de partida.

4.3. Reação de hidrólise do DANMEP sob influência de forte acidez.

A hidrólise sob condições muito fortemente ácidas, ou seja, com concentração de HCl variando entre 0,5 a 12 mol.dm⁻³, mostram um perfil cinético quantitativamente similar, como se esperaria, àquele para a hidrólise do seu derivado monoéster monoaniônico **2**; e qualitativamente similar àqueles observados para as hidrólises ácidas de muitos ésteres e amidas. Percebe-se pela **Figura 23** que a constante de velocidade aumenta com a concentração de ácido até um máximo ao redor de 8 mol.dm⁻³ de HCl ou DCl, sendo progressivamente diminuída a partir daí. Este é o comportamento esperado para um substrato o qual é reativo na forma de um ácido conjugado, mas totalmente protonado em alta concentração de ácidos. O motivo pelo qual a velocidade da reação decresce é que, em concentrações mais altas do ácido, a atividade da água é altamente diminuída, e sendo ela o nucleófilo na reação, a diminuição de atividade provoca uma diminuição da constante de velocidade.

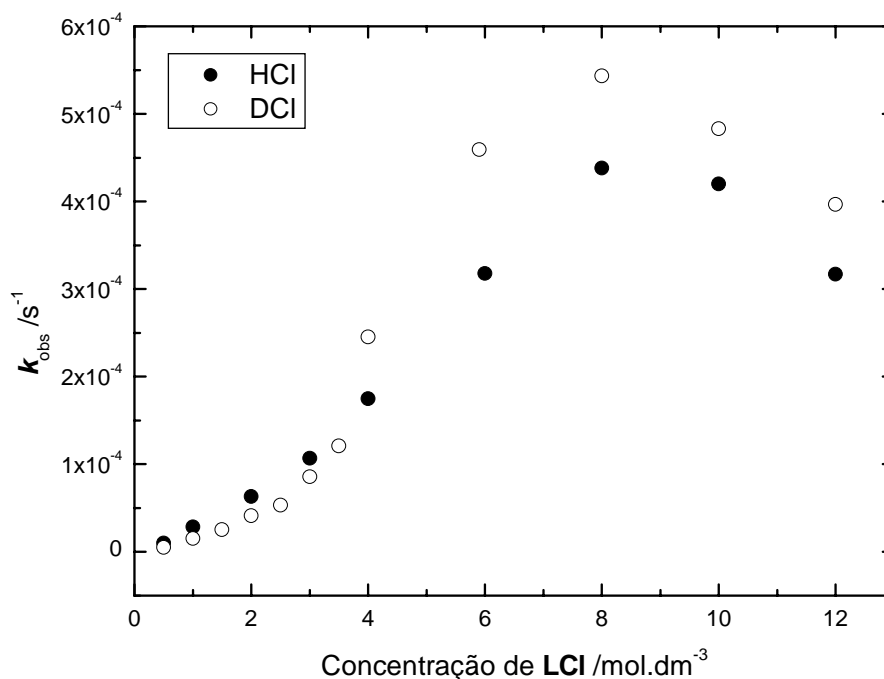


Figura 23 - Perfil de hidrólise em altas concentrações de HCl (●) e DCl (○) a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl.

Conforme pode ser visualizado na **Figura 23**, o efeito isotópico para valores de concentração de HCl menores que aproximadamente 3,0 é normal ($k_H/k_D > 1$) e para elevadas concentrações de ácido é um efeito inverso típico ($k_H/k_D < 1$).

A **Figura 24** mostra o perfil cinético completo em função de H₀/pH para a reação de hidrólise do DANMEP. Os dados na região de H₀ foram corrigidos pela atividade da água (k_{obs} / a_{H_2O})^[68].

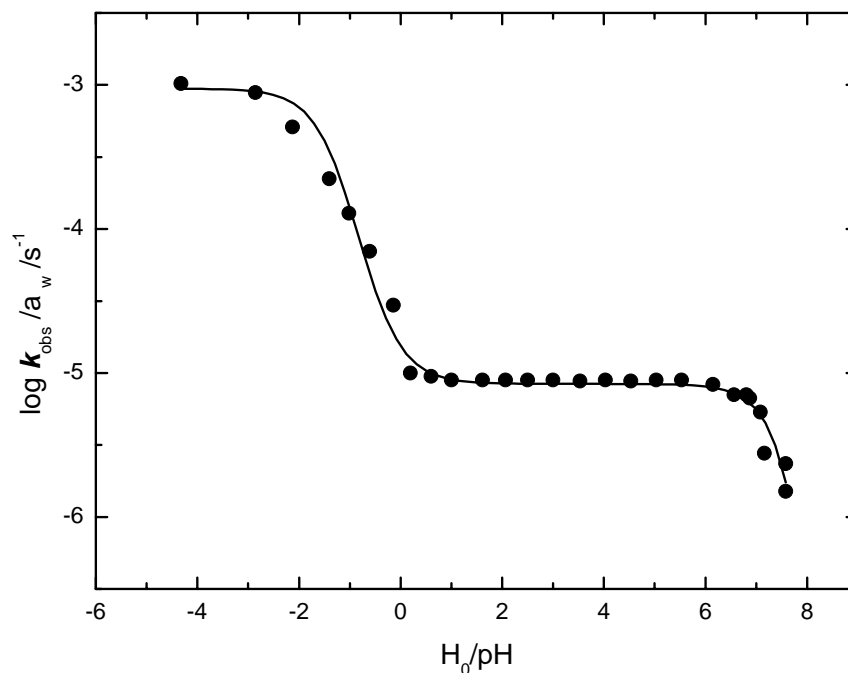
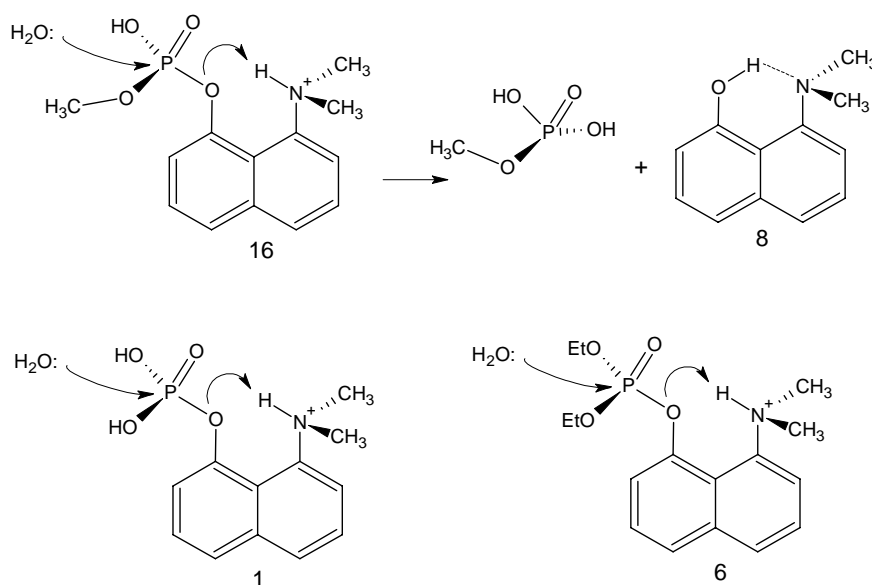


Figura 24 - Perfil cinético completo para hidrólise do DANMEP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$, força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl e a 60°C .

O patamar abaixo de $H_0 = 3$ e a entre pH 1 e 7, correspondem à hidrólise espontânea das duas espécies iônicas **16** e **17**, com valores cineticamente determinados de pK_a de -1,93 e 7,06 associadas respectivamente à desprotonação dos grupos fosfato e dimetilamônio. O primeiro pK_a corresponde à passagem da espécie **16** para **17** (**Esquema 16 – p. 42**), na concentração de $5,6 \text{ mol.dm}^{-3}$ de HCl. Ambos os valores de pK_a são deslocados de 2 a 3 unidades, abaixo e acima, respectivamente, com respeito a ésteres de ácido fosfórico e de grupos amônio terciários: uma consequência, como discutido anteriormente, da estabilização promovida pela forte ligação de hidrogênio na estrutura do DANMEP até pH ao redor de 7.

A aparente hidrólise catalisada por ácido que aparece para valores de $\text{pH} < 1$ para DANMEP na sua forma de íon dipolar **17**, na verdade representa a hidrólise espontânea, cineticamente equivalente, do DANMEP totalmente protonado, **Esquema 19**.



Esquema 19

No **Esquema 19** são incluídas para fins de comparação as espécies reativas em altas concentrações de HCl para o monoéster **1** e para o triéster **6**. Não é esperado que a estrutura **16** sofra uma protonação no grupamento fosfórico neutro, ou seja, protonado numa posição muito próxima a um grupo já carregado positivamente (grupamento dimetilamônio), em ambiente muito ácido. Uma observação que corrobora isso é que a hidrólise ácido-catalisada do triéster **6**, não é observada em pH acima de 0 (**Figura 22 – p. 59**). Assim, os dados experimentais para essa faixa de pH indicam que o modelo cinético apropriado no DANMEP corresponde a uma hidrólise espontânea ao invés de uma hidrólise catalisada por ácido. Em geral, para diésteres na forma ácida, esta reação normalmente é encoberta por uma reação catalisada por ácido, razão pela qual a comparação mais conveniente seria com o análogo fosfotriéster (TANEP), onde a reação espontânea pode ser bem observada naquela região.

Em termos de reatividade a estrutura **16** é efetivamente um triéster ativado, e sendo assim fica interessante comparar as três diferentes espécies **16**, **1** e **6**, todas as quais se acreditam reagir pelo mesmo mecanismo (**Esquema 19**). Comparando-se os resultados experimentais obtidos com estes três compostos, pode-se notar que a região independente do pH, no perfil de hidrólise do triéster

6, a constante de velocidade é 33,6 vezes menor que aquela reportada para a forma ácida do monoéster **1**, sendo que este fato pode ser atribuído “a uma combinação de efeitos eletrônicos e estéreos resultantes da troca de dois prótons OH de **1**, por grupos etila”. Os dados obtidos para **16**, mostram que o mesmo reage 3,4 vezes mais lento do que **1**, indicando que os efeitos estereoeletrônicos são provavelmente responsáveis pela ordem de reatividade observada e seguem a ordem Et > Me > H. Este tipo de efeito é conhecido na literatura e a **Tabela 7** ilustra o efeito da estrutura do substrato na reatividade.

Tabela 7 - Reatividade relativa para a reação de hidrólise de diversos fosfatos monoaniônicos, a 100°C.

Substrato	Reatividade
Metil fosfato	1,00
Etil fosfato	0,74
Fenil fosfato	32,0
p-tolil fosfato	26,6
p-nitrofenil fosfato	66,80
Benzil fosfato	1,61

Tomando como base a **Tabela 7**^[1], é possível correlacionar a reatividade dos derivados fosfóricos com os efeitos estereoeletrônicos presentes em cada um. Por exemplo, para fosfatos de um tipo semelhante como metil e etil fosfato, o aumento do tamanho da cadeia provoca uma diminuição na reatividade. No caso da comparação ente aril e benzil fosfatos, a comparação não é tão simples já que o sítio de quebra da ligação é diferente, mudando de C-O no benzil fosfato para O-P nos aril fosfatos, sendo que nestes há um efeito eletrônico muito importante, com o grupo nitro aumentando a reatividade.

Os valores de pK_a dos grupamentos PO(OMe)OH e PO(OH)₂ de **16** e **1**, são similares, com dissociações em $H_0 = -1,93$ e $-1,48$, respectivamente. Estes valores caem na região esperada para mono e diésteres de ácidos aril fosfóricos, já que o grupo dimetilamônio deve contribuir significativamente com a estabilização da base conjugada (íon dipolar) *via* ligação de hidrogênio. Para fim

de comparação o primeiro pK_a do ácido fenil fosfórico é 0,48^[69]. Outros valores para a constante de dissociação de diversos alquil-ésteres derivados do ácido fosfórico são dados na **Tabela 8**^[1].

Tabela 8 - Valores de pK_a para diversos mono e dialquilésteres de fosfato.

Ácido	pK_1	pK_2
H_3PO_4	1,97	6,82
$(MeO)P(O)(OH)_2$	1,54	6,31
$(EtO)P(O)(OH)_2$	1,60	6,62
$(nPrO)P(O)(OH)_2$	1,88	6,67
$(nBuO)P(O)(OH)_2$	1,89	6,84
$(MeO)_2P(O)(OH)$	1,29	
$(EtO)_2P(O)(OH)$	1,39	
$(nPrO)_2P(O)(OH)$	1,59	
$(nBuO)_2P(O)(OH)$	1,72	

Observa-se claramente que na medida em que a basicidade do grupamento alcóxi diminui o pK_1 também diminui, tanto para mono, quanto para diésteres. Ainda, os valores de pK_1 para os diésteres são inferiores daqueles determinados para os monoésteres correspondentes.

4.4. Reações com outros nucleófilos.

Foram investigadas as reações do DANMEP, **17**, com uma faixa representativa de nucleófilos selecionados, sendo que um estudo mais detalhado foi concentrado nas reações com os nucleófilos que apresentam o chamado “efeito alfa”. Os α -nucleófilos são de especial interesse devido a sua alta reatividade em reações envolvendo centros eletrofílicos como o átomo de fósforo em ésteres de fosfato, fazendo deles reagentes potenciais, principalmente para a desativação de armas químicas baseadas em organofosfatos^[47].

A **Figura 25** mostra o perfil cinético de pH para a reação de **17** com $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ de hidroxilamina determinado na região de pH que cobre os valores de pK_a de ambas as espécies. O perfil realizado sob mesmas condições, contudo em D_2O também consta no gráfico.

A curva segue um formato de sino, já esperado^[21], com uma constante de velocidade máxima na região onde o nucleófilo está presente como base livre e o substrato como um íon dipolar com o grupo dimetilamônio protonado. O perfil de pH foi ajustado de acordo com a **Equação (8)**, onde $k_{obs,w}$ é a constante de velocidade para a reação em água, $k_m(Nu)$ a constante de velocidade de segunda ordem para a reação de **17** com hidroxilamina neutra e χ_{NH_2OH} e χ_{17} correspondem as frações molares das duas espécies reativas. Na prática a catálise por hidroxilamina é muito eficiente, razão pela qual, as contribuições da reação em água são insignificantes.

$$k_{obs} = k_{obs,w} + k_m(Nu) \times \chi_{NH_2OH} \times \chi_{17} \quad (8)$$

As constantes de velocidade de segunda ordem obtidas através do ajuste de mínimos quadrados são $k_m(Nu)=8,30(\pm 0,12)\times 10^{-4}$ e $6,80(\pm 0,10)\times 10^{-4}$ $\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, para as reações em H_2O e D_2O , respectivamente, dando um efeito isotópico de $1,22 \pm 0,11$.

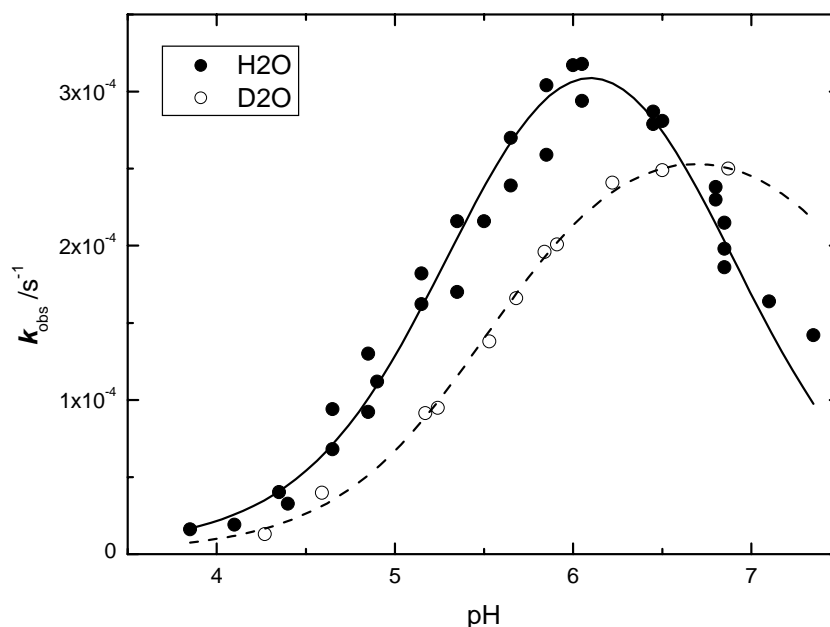


Figura 25 - Perfil cinético para a reação do DANMEP ($1,0\times 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) com hidroxilamina ($0,5$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) em H_2O (●) e em D_2O (○), realizadas em força iônica $1,0$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de KCl e a 60°C .

Para a reação em H₂O o ajuste não linear dos dados é obtido com valores de pK_a de $5,47 \pm 0,05$ e $6,96 \pm 0,05$ para a hidroxilamina e o substrato 2, respectivamente, valores estes que são consistentes com as medidas espectroscópicas e potenciométricas realizadas anteriormente. A curva calculada na **Figura 25** é baseada no valor mais preciso e esperado de $9,17(\pm 0,05) \times 10^{-4} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para a constante de velocidade de segunda ordem da hidroxilamina em água, obtida diretamente do coeficiente angular do gráfico da constante de velocidade de primeira ordem contra a concentração de hidroxilamina, para um valor de pH constante. O ajuste para a reação em D₂O fornece um valor de pK_a de $5,67 \pm 0,09$ para a hidroxilamina a 60°C.

Outros derivados da hidroxilamina como os *N*-metil e *N,N*-dimetil derivados apresentam um efeito alfa significativamente maior do que o observado para a espécie **3**. Entretanto, o derivado *O*-metilado, o qual não pode reagir *via* o grupo hidroxila, é 54 vezes menos reativo do que a própria hidroxilamina. Esta diferença de reatividade entre hidroxilamina e seu derivado *O*-metilado depende da estrutura do substrato e, no caso do monoéster **3** há uma diferença de reatividade entre hidroxilamina e seu derivado *O*-Me de apenas 7 vezes^[21]. A hidroxilamina, por extrapolação, acaba por ter o efeito de um oxiânion de pK_a = 11,5 (sem a correção da abundância do substrato na sua forma de íon-dipolar **17**, que é a forma reativa do composto).

Os dados obtidos para o conjunto completo de nucleófilos estudados são mostrados na tabela x e são correlacionados sob a forma de um gráfico de Brønsted na **Figura 26**.

Tabela 9 – Nucleófilos utilizados para obtenção os parâmetros de correlação de Brønsted.

Nucleófilo	pK _a	pH	k _{Nu} / dm ³ · mol ⁻¹ · s ⁻¹
água	-1,74	5,5	$1,60 \times 10^{-7}$
fluoreto	3,17	6,3	$1,16 \times 10^{-4}$
formiato	3,75	6,3	$1,31 \times 10^{-5}$
NH ₂ OMe	4,62	5,5	$1,71 \times 10^{-5}$

acetato	4,81	6,3	$1,20 \times 10^{-5}$
TFEA	4,86 ^a	6,5	$2,29 \times 10^{-5}$
Me ₃ N ⁺ -O ⁻	4,99 ^a	5,9	$3,52 \times 10^{-5}$
NMe ₂ OH	5,20	6,8	$4,11 \times 10^{-4}$
NH ₂ OH	5,64 ^a	5,5	$9,17 \times 10^{-4}$
NHMeOH	6,18	6,8	$1,43 \times 10^{-3}$
H ₂ PO ₄ ²⁻	6,51	6,3	$4,22 \times 10^{-5}$

^a pK_a medidos a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³.

É importante notar que o íon fluoreto mostra sua reatividade usual, ou seja, muito maior reatividade que os nucleófilos oxiânions, reagindo tão rápido quanto o esperado para uma hidroxilamina de mesmo valor de pK_a. O ponto para o formiato também mostra um pequeno desvio positivo a partir da reta que correlaciona somente os nucleófilos da família dos oxiânions. A correlação observada se mostra adequada e normal para o ataque ao centro eletrofílico fósforo e, seguramente é o resultado da combinação de efeitos estéreos e eletrostáticos durante o ataque nucleofílico.

Um dado que chama bem a atenção é o fato da 2,2,2-trifluoroetilamina (TFEA) a qual se alinha adequadamente com a *O*-metil-hidroxilamina, mostrando uma reatividade levemente superior daquela observada para os oxiânions normais, totalmente diferenciada dos derivados de hidroxilamina com oxigênio “livre”, mostrando que a *O*-metil-hidroxilamina acaba por ter efeito similar a uma alquilamina de mesmo valor de pK_a. O valor da constante de velocidade obtida para o óxido de trimetilamônio demonstra a importância do par de elétrons no efeito-alfa, tendo em vista que em sua ausência esse nucleófilo passa a ter comportamento semelhante ao de um oxiânion comum, apresentando apenas um discreto aumento na velocidade quando comparado a estas espécies, provavelmente atribuído a algum caráter alfa-nucleofílico remanescente.

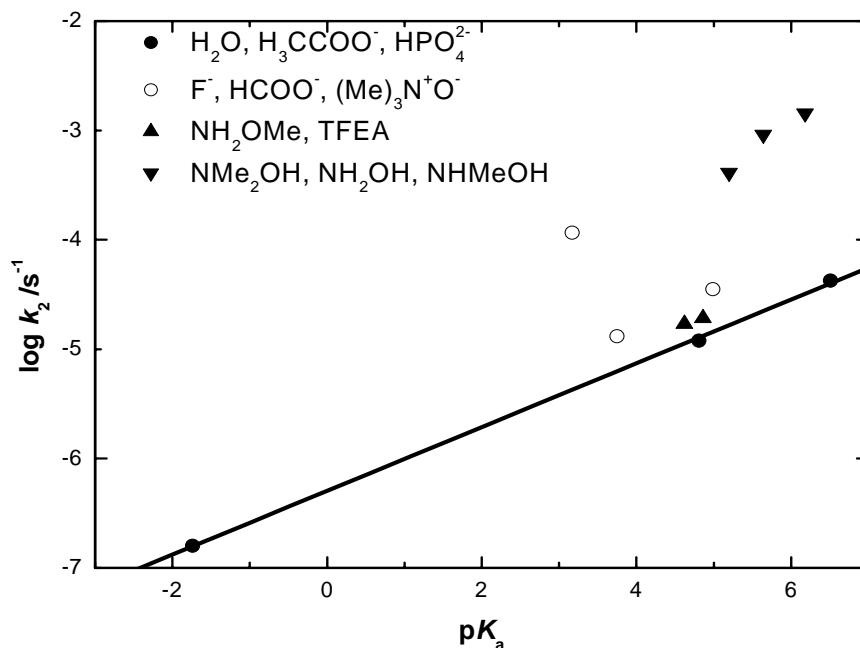


Figura 26 - Gráfico de correlação de Brønsted para a reação do DANMEP 17, com diferentes nucleófilos em solução aquosa a 60°C.

O coeficiente angular das linhas paralelas da **Figura 26**, isto é, o coeficiente de Brønsted β , calculado para a reação com oxianions é de 0,29. Este é o mesmo valor, dentro do erro experimental, que o apresentado para as reações com metil 2,4-dinitrofenil fosfato^[42].

Com os dados obtidos para o DANMEP e os dados da literatura para os derivados na forma de monoéster **3** (monoânion) e o triéster **6** (catiônico), podem-se comparar os parâmetros obtidos com os mesmos para as reações equivalentes aos derivados dos ésteres de 2,4-dinitrofenil fosfato, os quais são ativados em virtude de seus bons grupos de saída e, possuem reatividades similares aos derivados do 8-amino-1-naftol. O β_{nuc} aumenta no sentido de mono < di- < triéster, como observado para as reações de ésteres simples do 2,4-dinitrofenol com nucleófilos neutros. As reações com oxianions são diferentes, tendo em vista que as reações desses com o diânion do 2,4-dinitrofenil fosfato são muito lentas para serem medidas, tanto que nenhum dado é disponível na literatura. O β_{nuc} para reações do diéster **17** com oxianions é praticamente

idêntico daquele observado para as reações do metil-2,4-dinitrofenil fosfato^[43], como descrito anteriormente.

A catálise ácida geral intramolecular pelo grupamento dimetilamônio envolve a transferência do próton para o átomo de oxigênio de um grupo abandonador que é inicialmente relativamente pouco reativo. Considerando que o valor do β_{nuc} de Brønsted é maior para reações de triésteres de fosfato com piores grupos de saída^[42], é razoável esperar que os efeitos catalíticos sejam maiores para as reações com **17**, **3** e **6** do que para as reações correspondentes para os ésteres do 2,4-dinitrofenil fosfato, e é exatamente isso o que foi observado para o mono e o triéster (**3** e **6**, respectivamente). No entanto, isto não acontece para as reações do diéster, **17**. É importante entender esta diferença, tendo em vista que a eficiência da catálise ácida geral intramolecular, e seu potencial para um efeito sinérgico com a catálise nucleofílica, dependerão do aumento da carga negativa desenvolvida no oxigênio do grupo abandonador quando a ligação com o nucleófilo estiver em desenvolvimento.

4.5. *Parâmetros Extratermodinâmicos*

O efeito da temperatura sobre as reações do DANMEP com diferentes nucleófilos também foi avaliado, para conseguir maiores informações sobre o estado de transição em reações envolvendo esse diéster. A partir da Teoria do Estado de Transição é possível obter os parâmetros de ativação ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger (**Tabela 10**), os quais refletem diretamente sobre a cinética das possíveis reações entre este substrato e outros reagentes nucleofílicos. Tais parâmetros podem ser obtidos experimentalmente, medindo-se as constantes de velocidade da reação em um conjunto de temperaturas. Um meio de associar diretamente os parâmetros de ativação termodinâmicos com as constantes de velocidade para as reações é fazendo uso da equação Eyring^[70], **Equação (2) (p. 11)**.

Tabela 10 - Sumário dos parâmetros termodinâmicos extraídos a partir dos gráficos envolvendo a constante de velocidade e o inverso da temperatura.

Nucleófilo	ΔH^\ddagger		ΔS^\ddagger	
	/KJ.mol ⁻¹	/Kcal.mol ⁻¹	/J.K ⁻¹ .mol ⁻¹	/cal.K ⁻¹ .mol ⁻¹
H ₂ O	98,0(±5,2)	23,4(±1,2)	-50,3(±15) [§]	-12,0(±3,6) [§]
Hidroxilamina	79,4(±8,0)	19,0(±1,9)	-97,7(±23)	-23,3(±5,5)
Formiato	83,4	19,3	-78,8	-18,8
Fluoreto	68,0(±7,4)	16,2(±1,8)	-104(±22)	-24,8(±3,1)

[§] ΔS^\ddagger calculado a partir das constantes dos ajustes de primeira ordem. Usando as constantes de segunda ordem os valores são reduzidos por 33,4 J (8,0 cal).

Devido à baixa reatividade do DANMEP em temperaturas próximas a ambiente, foram avaliados os efeitos em temperaturas superiores àquela utilizada para o restante dos experimentos, já discutidos, ou seja, 60°C. Imediatamente pode-se notar um comportamento semelhante para a reação de **17** com os nucleófilos estudados, com entropias de ativação bastante negativas em todos os casos, indicando que o mecanismo da reação, e possivelmente a estrutura do estado de transição, sejam razoavelmente semelhantes, independente da natureza desses nucleófilos.

A partir dos valores obtidos para ΔH^\ddagger pode-se inferir que o rompimento da ligação P—O, entre o centro eletrofilico e o átomo de oxigênio pertencente ao grupo abandonador é altamente favorecida pela ligação de hidrogênio intramolecular, tendo em vista que as entalpias de ativação observadas são relativamente baixas, haja vista que uma ligação simples do tipo P—O necessita em torno de 86 Kcal.mol⁻¹ para ser rompida homoliticamente^[1]. Há uma tendência aparente de diminuição de reatividade para o caso do fluoreto, fato que pode estar relacionado com a elevada estabilidade da ligação fluoreto oxigênio, fato que contribui a levar o estado de transição para um estado mais próximo dos produtos. Analisando os valores de ΔS^\ddagger podemos perceber claramente que a estrutura no estado de transição acaba por ser mais ordenada que a dos reagentes, tendo em vista seu valor negativo, o que favorece enormemente um mecanismo do tipo SN2(P), como esperado e esboçado no **Esquema 17 (p. 58)**. Assim, as entropias são bastante negativas, indicando que o

ganho catalítico obtido com a diminuição da entalpia de ativação é compensado com uma entropia de ativação mais negativa, o que torna a reação relativamente insensível a natureza do nucleófilo, um fato provavelmente vinculado ao fenômeno normalmente observado em diésteres de fosfato: o rompimento da ligação entre o grupo abandonador e o átomo de fósforo, no estado de transição, está muito mais adiantado do que a formação da ligação entre o centro nucleofílico e o átomo de fósforo.

4.6. Cálculos dos orbitais moleculares

Para se conhecer mais sobre a estrutura do DANMEP e sua influência nos efeitos estereoeletrônicos envolvidos nas reações em que ele participa, foram realizados cálculos de orbitais moleculares deste composto, de seus possíveis intermediários, do provável estado de transição e também dos produtos da reação.

Todos os cálculos foram executados pelo pacote computacional GAMESS, que permite realizar a otimização da geometria das diferentes estruturas, os cálculos da matriz Hessiana para localização do estado de transição, e os cálculos de energia para comparação entre as várias etapas da reação.

O nível de cálculo utilizado foi Hartree-Fock restrito, com funções de bases 6-31G, computando a polarização para níveis *d*. Para maior validade dos dados, os efeitos de solvatação foram incluídos durante todos os processos (otimização de geometria, avaliação da energia e localização do estado de transição). Tais efeitos foram inseridos nos cálculos de modo implícito, através da inserção de um ambiente virtual, onde a constante dielétrica do mesmo interage com o potencial eletrostático da molécula por interações de curto, médio e longo alcance. O modelo de solvatação implícito escolhido foi o C-PCM, atualmente utilizado como padrão para os cálculos realizados com o pacote GAMESS. Uma vez calculados, os dados obtidos foram transformados em estruturas visualizáveis através dos programas de visualização.

4.7. Estrutura do DANMEP e o efeito da solvatação

A **Figura 27** mostra a estrutura otimizada do DANMEP em fase gasosa utilizando-se o pacote computacional GAMESS com nível de execução em Hartree-Fock com funções de base 6-31G(d). A numeração desta figura serve de guia para as demais, na localização dos átomos.

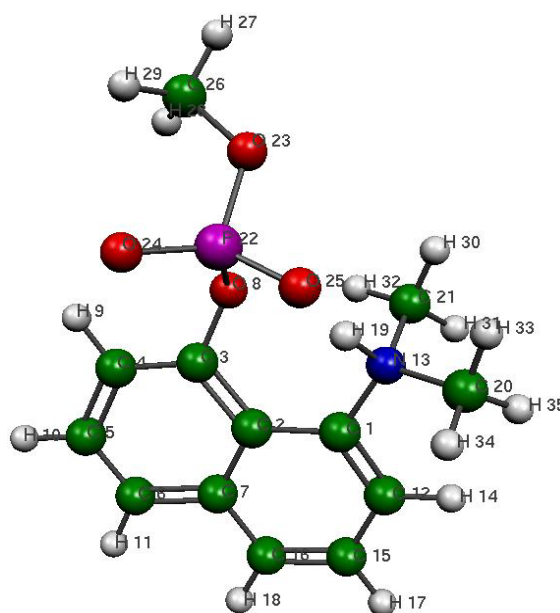


Figura 27 - Estrutura otimizada do DANMEP por cálculos de orbitais moleculares em nível HF 6-31G(d) em fase gasosa.

O primeiro estudo envolvendo DANMEP foi realizado sem a participação de um meio externo (como num estado gasoso – **Figura 27**). Nesse estágio, a molécula de DANMEP modelada de acordo com a forma mais reativa deste composto que é a estrutura em forma de íon dipolar **17**, que prevalece até cerca de pH 7. Esta forma apresenta duas densidades eletrônicas de carga distintas e opostas situadas ao redor do átomo de fósforo (densidade negativa) e sobre o átomo de nitrogênio (densidade positiva). Sendo assim embora a carga total da molécula seja nula, a polarização tão distinta da molécula acaba por acarretar uma tendência a distorções em busca da neutralidade de cada sítio

(Figura 28-A). Sendo assim o cálculo sem a interferência de um meio externo contribui pouco para o conhecimento da geometria da molécula.

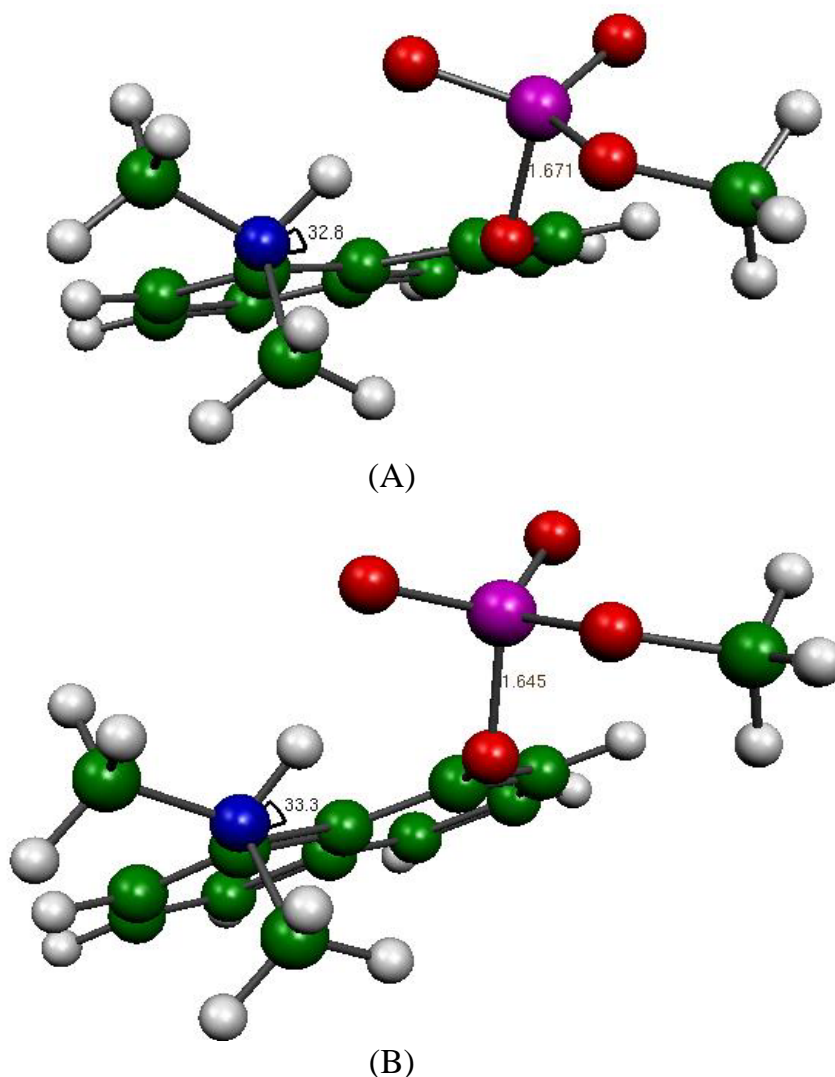


Figura 28 - Diferença geométrica estrutural para o DANMEP em estado gasoso (A) e com simulação de solvente via metodologia PCM.

4.7.1. O efeito da solvatação na estrutura do DANMEP

Em função do conhecido efeito do solvente na estrutura das moléculas orgânicas, foi necessário fazer com que a molécula interagisse com algum meio, neste caso a água. Uma forma foi simular o efeito do solvente, utilizando uma metodologia implícita, por adição de um campo dielétrico que interage com o substrato de forma eletrostática, que para esse estudo foi utilizado o modelo C-PCM (Figura 28-B) já brevemente discutido nas seções 1.9 e 3.2.4.

Observa-se na **Figura 28**, que o comprimento de ligação O8—P22, diminui de 1,671 para 1,645 Å, contudo o ângulo diedro formado pela ligação N13—H19, permanece quase inalterado ao redor de 33°, mostrando que o hidrogênio do grupo dimetilamônio é fortemente despolarizado pelos oxigênios O8 e O25, com distâncias O—H de respectivamente 2,199 e 1,541 Å para a estrutura em 34-A, e 2,126 e 1,856 Å para a estrutura em 34-B. Nesse último caso a despolarização é amenizada em razão do meio poder interagir com a molécula.

De qualquer forma, em ambos os casos, a catálise ácida geral promovida pela presença do grupamento dimetilamônio, que se caracteriza pela despolarização da ligação entre o oxigênio do grupo abandonador (O8) e o átomo de fósforo (P22), acaba por não ser efetiva. Este efeito é provavelmente devido à influência do átomo de oxigênio vizinho e aniônico (O25) que por sua alta densidade eletrônica, acaba por interagir fortemente com o hidrogênio (H19), interação esta facilitada pelo alto grau de liberdade rotacional das ligações sigma C3—O8 e C1—N13.

Um meio simples de se comprovar isso seria estudar uma estrutura que tenha perdido seu grau de liberdade rotacional para a ligação C(Ar)—N13. Como conseqüência, o hidrogênio catalítico é orientado de forma fixa para o oxigênio do grupo abandonador, promovendo uma maior despolarização da ligação O8—P22 e conseqüentemente um maior efeito catalítico na constante de velocidade para a reação de decomposição. Um modelo sugerido para promover tal efeito seria o derivado metilfosfatado da benzoquinolina da **Figura 29**.

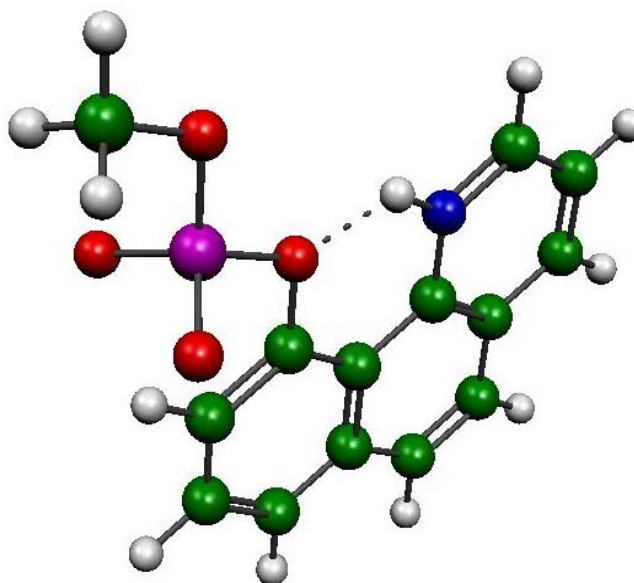


Figura 29 - Derivado metilfosfato do benzoquinolidinium.

Nessa estrutura em sua forma íon dipolar, verifica-se um comprimento de ligação entre o H catalítico e o oxigênio do grupo abandonador de aproximadamente 1,7 Å.

4.7.2. Metodologia explícita de solvatação

Outra forma para incluir o efeito do solvente, foi construir um agregado de n moléculas do solvente, colocadas explicitamente ao redor do substrato, sendo assim o cálculo acabou envolvendo $n+1$ moléculas na busca pela função de onda global, tornando o custo computacional altamente elevado comparado ao modelo mais simples, sem interferência de solvente. A estrutura obtida para o DANMEP na presença explícita de moléculas de água está na **Figura 30**.

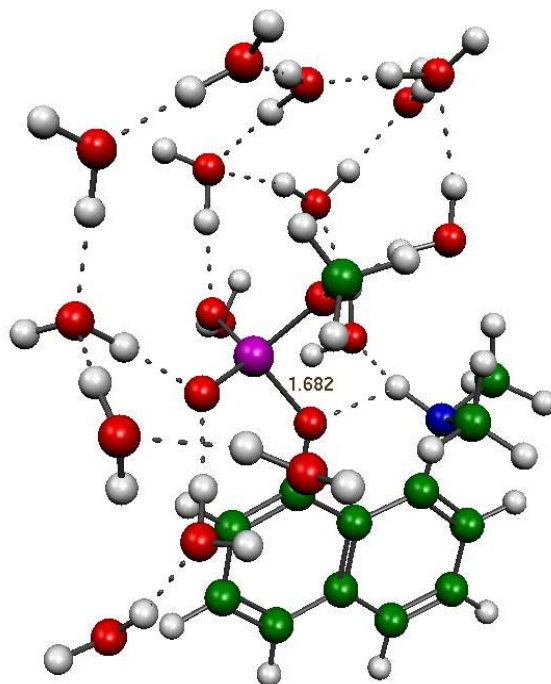


Figura 30 - DANMEP otimizado na presença de um agregado de 15 moléculas de água.

Contudo um modelo como o da **Figura 30**, com apenas um pequeno agregado de solvente envolto em espaço vazio, pouco acrescenta na investigação estrutural do DANMEP, haja vista que o valor do comprimento de ligação **O8—P22**, entre o grupo fosforila e o grupo abandonador, é ainda demasiadamente elevado para validar a reatividade do DANMEP em solução.

4.7.3. Modelo misto de solvatação (implícito + explícito)

Tomando-se esse argumento como base, viu-se a necessidade de se implementar além do agregado um modelo de solvatação contínuo concomitante. O resultado de ambos os efeitos aplicados numa mesma estrutura, pode ser visualizado na **Figura 31** tal modelo é chamado de “modelo cluster-continuum”^[71].

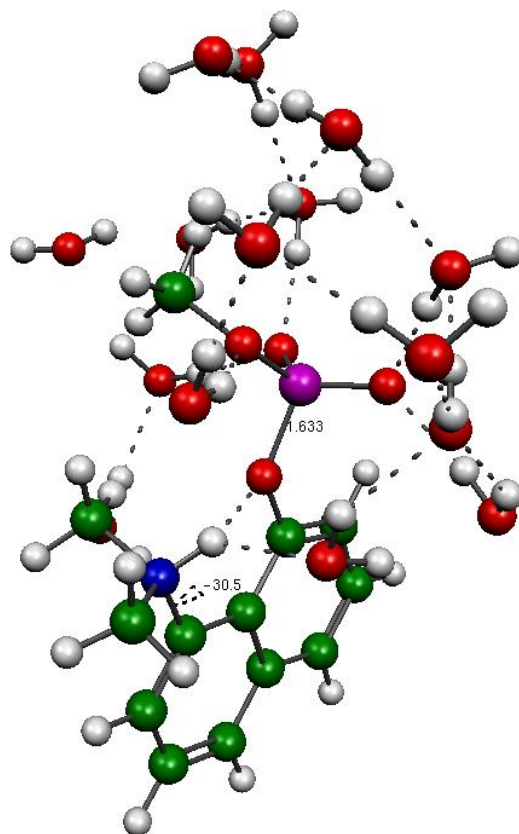


Figura 31 - Otimização de geometria para o DANMEP utilizando-se o modelo "Cluster-Continuum".

Na **Figura 31** pode ser visualizado o incremento na estabilidade da ligação ArO—**P22** promovido pela combinação das metodologias implícita e explícita de solvatação molecular. Nela podemos ver a diminuição do comprimento da ligação **O8—P22** (1,633 Å) comparada às estruturas onde os modelos de solvatação foram aplicados individualmente, onde foram obtidas distâncias de 1,682 e 1,645 Å para os modelos exclusivamente explícito e exclusivamente implícito, respectivamente. Outro parâmetro modificado foi o diedro **C2—C1—N13—H19**, que para esse caso é menor em cerca de 3° que o menor valor obtido anteriormente (modelo contínuo 33,3°). Esta variação é relativamente pequena, contudo mais próxima do modelo proposto para catálise ácida geral intramolecular onde o **H19** deveria estar provavelmente alinhado com o anel aromático.

A posição levemente distorcida do próton em relação ao plano do anel pode estar associada a dois fatores completamente distintos. Uma primeira explicação possível é que, devido à limitação da metodologia que assume um cluster de apenas 15 moléculas de água, o conjunto de cargas isoladas do DANMEP tente disputar um maior número de interações por ligações de hidrogênio com as moléculas discretas de água. Alternativamente, existe uma probabilidade concreta que o desalinhamento realmente existe em solução, e que a reação procede *via* essa estrutura. Mecanicamente, esta possibilidade existe e, não há argumentação que descarte uma distorção no plano como aquela que aparece nas estruturas calculadas.

A fim de tentar elucidar essa questão foi realizado o cálculo da função de onda dos orbitais moleculares para a otimização de geometria do MANEP diânion $\mathbf{3}_{+15}$ nos mesmos níveis de cálculo que os utilizados para o DANMEP $\mathbf{17}_{+15}$. As estruturas escolhidas para comparação foram submetidas a cálculos apenas no modelo explícito com 15 moléculas de água ao redor do grupamento metilfosfato. Os resultados são mostrados na **Figura 32**.

Constata-se pela **Figura 32** que o efeito estereoeletrônico relativo ao grupo metil de $\mathbf{17}_{+15}$ afeta pouco a ligação de hidrogênio estabelecida entre o **H19** e o **O8**, provocando um acréscimo de pouco mais de 2° no ângulo diedral **C2—C1—N13—H19**, comparado à estrutura $\mathbf{3}_{+15}$. Isso mostra que mesmo o monoéster $\mathbf{3}_{+15}$ não possuindo grupos alquílicos em seu fosfato, e conseqüentemente ausência de efeitos estéreos devido aos grupamentos adjacentes, ele acaba por sofrer uma distorção de $38,3^\circ$, provavelmente atribuída ao compartilhamento direcional do **H19** pelas ligações de hidrogênio com as moléculas de água livres e o **O8**.

A partir dessas estruturas pode se constatar uma melhor interação do fosfato do monoéster com as moléculas de água, pelo maior número de ligações de hidrogênio intramolecular (9 na **Fig. 32A** e apenas 5 na **Fig. 32B**), o que leva a uma melhor estabilização do grupo metafosfato, resultando numa maior

planaridade desse grupamento quando comparada com o diéster (ângulo **O8—P22—O** médio de 103,3° no MANEP e 105,3° no DANMEP).

O comprimento de ligação **P22—O8** pouco maior (1,693 Å) obtido para o monoéster também pode ser devido à sua melhor solvatação em comparação ao diéster (1,682 Å).

Esses dados acabam por levar à conclusão de que o grupo dimetilamônio tem um alto grau de liberdade rotacional, interagindo livremente com o solvente em ambos os casos mostrados na **Figura 32**.

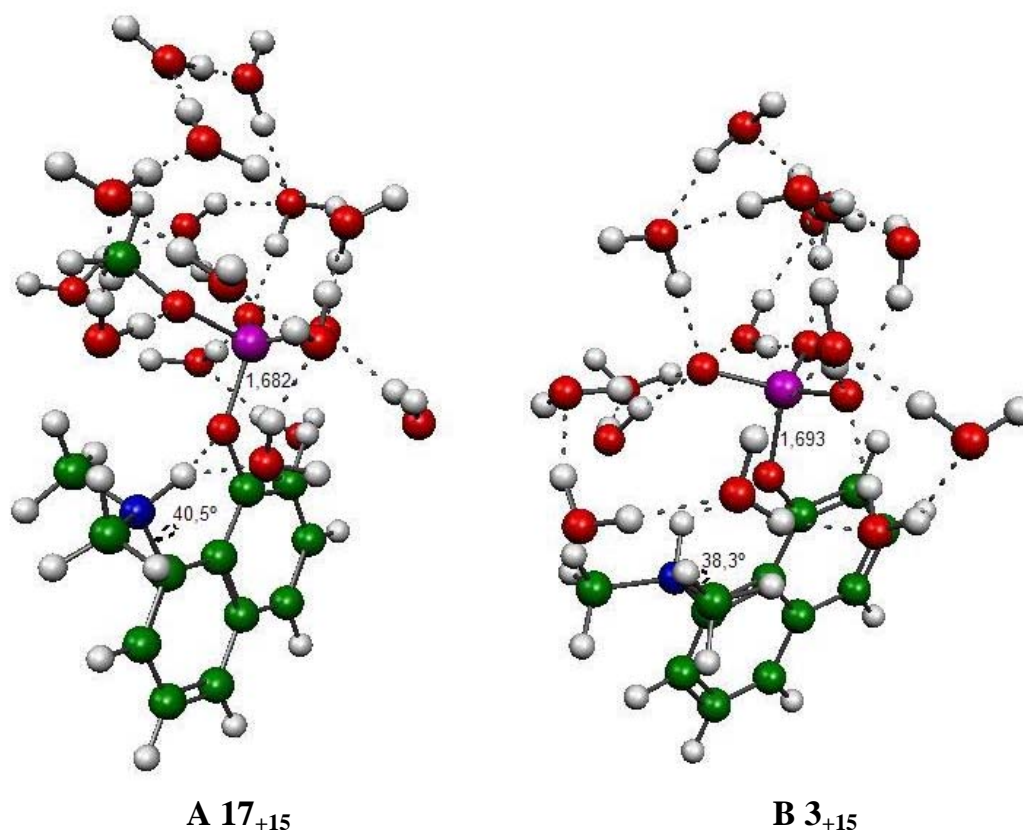


Figura 32 - Estruturas A (17) e B (3), ambas solvatadas por um agregado com 15 moléculas de água, calculadas em nível HF 6-31G(d).

Com base nos dados obtidos até aqui, fica comprovado que pelos modelos empregados nesse estudo, uma estrutura com **H19** orientado diretamente ao **O8**, não pode ser obtida, mantendo-se a estrutura calculada sem nenhum tipo de restrição nos seus graus de liberdade rotacionais internos. Ficando o ângulo diedral associado a esse direcionamento ao redor de 30°.

No entanto estudos computacionais realizados com a forma dimerizada de **17**, justificados pela sua abundância relativa de acordo com os espectros ESI-MS (**Figuras 13 e 14 – p. 39**), revelaram a estrutura mostrada na **Figura 33**.

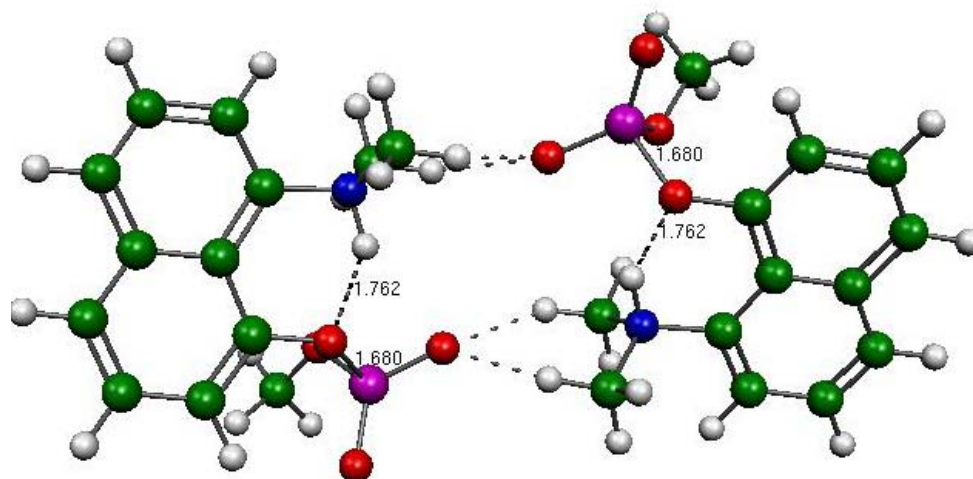


Figura 33 - Forma dimerizada do DANMEP, 17, calculada em nível HF 6-31G(d).

Esta estrutura, calculada em nível HF 6-31G(d) na fase gasosa, desperta curiosidade, tendo em vista que depois de otimizada, evidencia-se uma simetria exata, principalmente nas ligações de hidrogênio intramolecular com comprimentos de ligações (**H19—O8**) iguais a 1,762 Å e nas distâncias **P22—O8** iguais a 1,680 Å, comprimento esse que evidencia a desestabilização dessa ligação quando a transferência de próton associada a catálise ácida geral intramolecular acontece exatamente no plano.

4.7.4. O estado de transição do DANMEP

Conhecendo-se então um pouco mais sobre a estrutura do DANMEP, o próximo passo, foi o de tentar buscar argumentos que corroborassem com os dados experimentais a fim de propor uma explicação para o grande efeito catalítico envolvido nas reações do DANMEP, principalmente com nucleófilos de alta reatividade como os nucleófilos alfa.

Por esse motivo foi realizada a busca do estado de transição para a reação do DANMEP e a hidroxilamina, sendo que a estrutura otimizada para o estado de transição é mostrada na **Figura 34**.

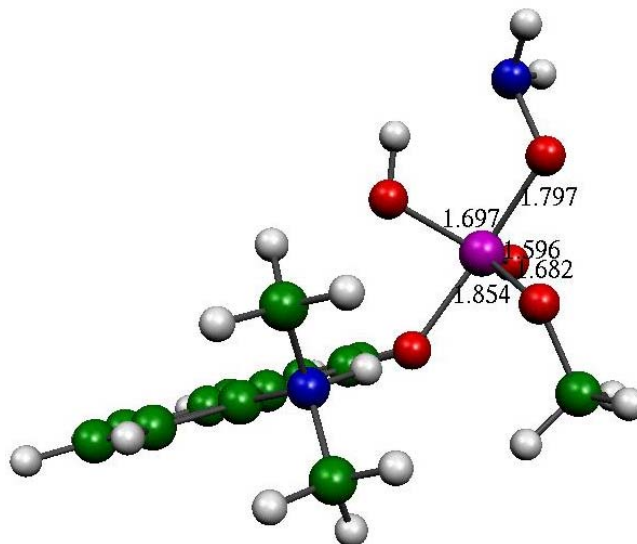
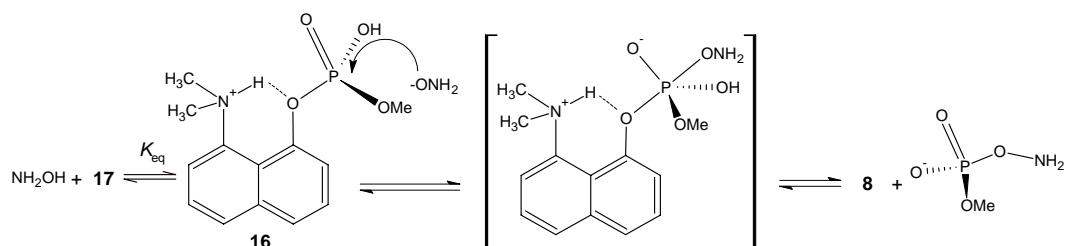


Figura 34 - Estrutura otimizada do estado de transição para a reação do DANMEP (17) com hidroxilamina, assumindo um pré-equilíbrio de transferência de prótons, utilizando método de cálculo HF 6-31G(d) e PCM.

Preliminarmente o que nos chama mais atenção é o formato bipirâmide trigonal ou pentacoordenado assumido nesse estado, como se era esperado para o esquema reacional $S_N2(P)$ proposto a partir dos dados experimentais. Os comprimentos de ligação apicais de respectivamente 1,854 e 1,797 Å para as ligações **O8—P22** e **P22—ONH₂**, respectivamente, que novamente se encontram em concordância com as afirmações formuladas a partir dos dados experimentais na determinação dos parâmetros termodinâmicos, onde foi constatado que o grupo de saída deve ser mais afastado do centro eletrofílico do que o grupo atacante, durante o estado de transição.

É importante salientar que todas as tentativas de se encontrar estruturas envolvendo a transferência de próton do oxigênio da hidroxilamina durante o estado de transição não obtiveram convergência para um estado de transição, mas sim sempre retornando ao estado inicial antes do ataque nucleofílico. Esse fato leva a suposição de que pode existir um pré-equilíbrio de

transferência de próton do oxigênio da hidroxilamina, anterior à formação do estado de transição como mostrado no **Esquema 20**.



Esquema 20

Um esquema semelhante é proposto por Iché-Tarrat e colaboradores^[55], para a hidrólise do dimetilfosfato, contudo o valor de pK_a do diéster de fosfato torna esse modelo praticamente inviável. De fato, a constante de acidez para dissociação do grupamento $PO(OMe)OH$ do composto **16**, estabelecido cineticamente, mostrou ser consistente com um valor de pK_a equivalente a $H_0 = -1,93$ e, este valor de pK_a torna o pré-equilíbrio inicial fortemente desfavorecido. E por fim uma informação importante que pode ser tirada da estrutura da **Figura 34** é o perfeito alinhamento do **H19** com o **O8** do grupo abandonador, ou seja, no estado de transição o alinhamento ao plano do anel naftalênico pelo grupo $N-H$ com o **O8**, se torna altamente necessário, o que mostra que existe um requerimento de estereoespecificidade para o para o prosseguimento da reação.

Uma opção mais plausível para o estado de transição entre DANMEP e hidroxilamina consiste no ataque não da forma neutra da hidroxilamina, mas sim da forma dipolar iônica $+NH_3O^-$. Este modelo passa a contar com uma transferência de próton durante a passagem pelo estado de transição e, parece ser muito mais realístico tendo em vista que, no estado de transição a neutralização da carga do éster de fosfato intramolecularmente promove uma redistribuição de densidade de cargas que facilita a saída do grupo abandonador. A estrutura obtida para esse estado de transição é mostrada na **Figura 35**.

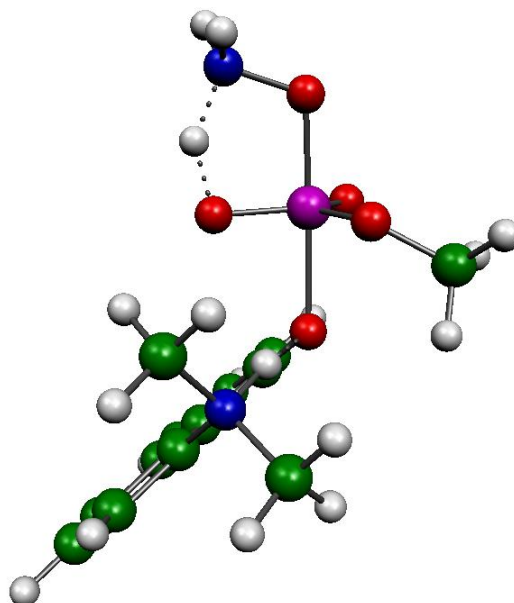
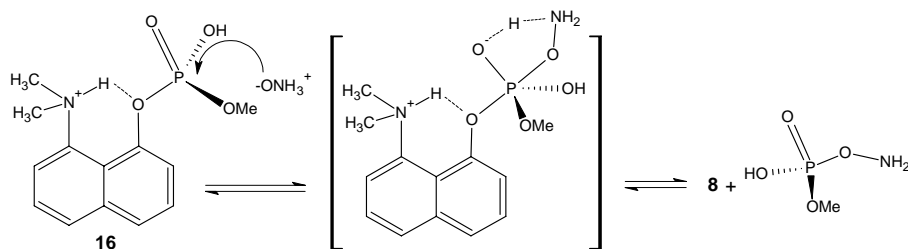


Figura 35 - Estrutura otimizada do estado de transição para a reação do DANMEP (17) com óxido de amônio, mostrando a transferência de próton intramolecular $\text{NH}_2\text{---H---OP}$, utilizando método de cálculo HF 6-31G(d) e PCM.

Na **Figura 35**, observa-se uma ligação **O8—P22** (2,008 Å) muito tênue, indicando uma aceleração na saída do grupo abandonador muito maior que na formação da ligação $\text{NH}_2\text{O—P22}$, fenômeno esse consistente com a efetiva catálise ácida geral intramolecular a partir do grupo vizinho dimetilamônio. Outro efeito de grande importância no mecanismo proposto é a transferência de próton $\text{NH}_2\text{---}\overset{1,233\text{Å}}{\text{H}}\text{---}\overset{1,221\text{Å}}{\text{O25}}\text{---O25}$, o qual diminui a densidade de carga negativa sobre o oxigênio, que acarreta numa despolarização da ligação **O25—P22**, fazendo com que o fósforo perca parte de sua densidade de carga positiva, e conseqüentemente diminuindo ainda mais a sua interação com o **O8** do grupo de saída. Esse efeito é comprovado pelo aumento de 8,3% no comprimento das ligações **O8—P22** comparando-se ao modelo com pré-equilíbrio mostrado na **Figuras 34**.

É importante salientar que a coplanaridade do diedro **C2—C1—N13—H19**, também é requerida pela estrutura apresentada na **Figura 35**.



Esquema 21

A consistência da estrutura corrobora o modelo mecanístico proposto pelo nosso grupo, que detalha a origem da alta reatividade dos chamados nucleófilos alfa, mostrado no **Esquema 15** (p. 28), levando a proposição do mecanismo do **Esquema 21**, onde essencialmente não há efeito alfa e sim uma catálise ácida geral sincronizada com o ataque do oxigênio negativamente carregado. O mecanismo proposto é apenas válido para o caso especial da hidroxilamina e não deve ser utilizado em outros nucleófilos alfa onde não há formação de espécies dipolares iônicas de estabilidade razoável.

4.7.5. Possíveis intermediários da reação de decomposição do DANMEP

Através de modelos de reação entre hidroxilamina e a estrutura 17, foram investigadas as estabilidades estruturais dos dois possíveis intermediários, com ataques nucleofílicos pelo nitrogênio e oxigênio, respectivamente.

Contudo nenhuma das duas estruturas teve estabilidade na forma pentacoordenada, preferindo ao invés, se estabilizarem na forma de fosfato e fosforoamidato e formando DANOL **8**. A partir desses dados, não há como inferir sobre a existência de tais intermediários de reação, como já esperado a partir dos dados experimentais.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

O diéster DANMEP foi estudado como modelo de catálise enzimática do tipo ácida geral intramolecular, visando compreender como a ruptura da ligação O—P pode ser facilitada por um grupo dimetilamônio vizinho ao centro reacional da molécula, na presença de nucleófilos normais ou de nucleófilos alfa.

Os resultados obtidos para a reação de hidrólise do DANMEP são consistentes com um mecanismo do tipo SN2(P), tanto na região onde a concentração de HCl é maior que 1 mol.dm⁻³, quanto na região de pH ácido.

Na região de pH entre 1 e 7, o DANMEP se hidrolisa numa velocidade constante, com um fator catalítico de $2,56 \times 10^6$ a 60°C. Este efeito está associado à reação da forma íon dipolar do DANMEP, onde o grupo dimetilamônio ($pK_{a2} = 7,06 \pm 0,06$) atua como catalisador ácido geral. Na presença de HCl entre 1 e 12 mol.dm⁻³, há um efeito catalítico significativo, consistente com um $pK_{a1} = -1,93 \pm 0,12$ a 60°, que indica que a forma catiônica do DANMEP é a espécie reativa nessa região de elevada acidez.

Na reação entre alfa-nucleófilos e DANMEP, a constante de velocidade é cerca de 70 vezes maior que a reação de hidrólise. Este efeito é resultante do efeito alfa dos nucleófilos cujo centro nucleofílico é o oxigênio. Para o caso da NH₂OMe, a reatividade acaba por ser comparável a uma amina alifática de mesmo valor de pK_a .

Os cálculos realizados para investigação da geometria do DANMEP realizados com a combinação dos modelos contínuo e discreto, mostram um diéster altamente estável. O comprimento da ligação entre o átomo de fósforo e oxigênio do grupo abandonador foi de 1,63Å e, o ângulo diedro C2—C1—

N13—H19 foi de 30°, demonstrando melhor direcionamento do grupo catalítico para uma catálise ácida geral intramolecular.

A comparação entre as estruturas do DANMEP e MANEP, otimizadas na presença de 15 moléculas de água, indicam que no caso do monoéster, o grupo fosforila tem uma estrutura de maior planaridade, o que deve favorecer uma reatividade maior desse composto se comparado ao diéster.

Foi constatada a existência de um estado de transição onde a quebra da ligação do grupo abandonador está consideravelmente adiantada e há um pequeno grau de formação de ligação com um óxido de amônio, concomitante a uma transferência de próton entre o grupo atacante e o oxianion do éster de fosfato, numa configuração bipirâmide trigonal. Este resultado é consistente com os dados cinéticos, os parâmetros termodinâmicos e os cálculos *ab initio* de orbitais moleculares, todos os quais se corroboram mutuamente.

Como sugestão para a seqüência dos trabalhos experimentais, seria oportuno avaliar o efeito da catálise intramolecular no composto 10-hidroxi-7,8-benzoquinolina metilfosfato, onde a restrição espacial é mais efetiva do que no caso do DANMEP. E na parte computacional, é proposto o mapeamento de cargas para validar os aspectos eletrostáticos associados ao deslocamento de grupos abandonadores, correlacionando-os com os pK_{as} efetivos dos mesmos e, desta forma prever de forma teórica a reatividade de diferentes ésteres de fosfato, submetidos a catálise ácida geral intramolecular..

CAPÍTULO 6

6. REFERÊNCIAS

- 1 - Corbridge, D. E. C. **Phosphorus – An Outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology**, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1977, p. 1-3; 24; 268; 272.
- 2 - Knowles, J. R. Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer-reactions. *Annual Review of Biochemistry*, **49** (1980) 877-919.
- 3 - Lowe, G.; Cullis, P. M.; Jarvest, R. L.; Potter, B. V. e Sproat, B. S. Stereochemistry of phosphoryl transfer. *Philosophical Transactions of Royal Society of London Series B – Biological Sciences*, **B293**:1063 (1981) 75-92.
- 4 - Garrett, R. H. e Grisham, C. M. **Biochemistry**, Saunders College Publishing, Nova York, 1995.
- 5 - Tatcher, G. R. J. e Kluger, R. **Advances in Physical Organic Chemistry**, Vol. 25, Academic Press Limited, London, 1989.
- 6 - Watson, J. D. e Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids – a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**:4356 (1953) 737-738.
- 7 - Gibbs N. The Secret of Life, *Times*, vol. **161**, nº 7, New York, 17-02-2003.
- 8 - Garrett, R. H. e Grisham, C. M. **Biochemistry**, 2nd edition, Harcourt Brace, Nova York, 1999, p. 340.
- 9 - Chiosis, G. e Boneca I. G., Selective cleavage of d-Ala-d-Lac by small molecules: re-sensitizing resistant bacteria to vancomycin. *Science* **293**:5534 (2001) 1484-1487.
- 10 - Joshi, R. R. e Ganesh, K. N. Metallodesferals as a new class of DNA cleavers – specificity, mechanism and targeting of DNA scission reactions. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Chemical Sciences*, **106**:5 (1994) 1089-1108.

11 - Longhinotti, E.; Domingos, J. B.; da Silva, P. L. F.; Szpoganicz, B. e Nome, F. Bis-(2,4-dinitrophenyl) phosphate hydrolysis mediated by lanthanide ions. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **18**:2 (2005) 167-172.

12 - Komiyama, M. e Sumaoka, J. Progress towards synthetic enzymes for phosphoester hydrolysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2**:6 (1998) 751-757.

13 - Akamatsu, S. e Kato, H. Affinity between phosphodiesterase and phosphate compounds. *Journal of Biochemistry*, **41**:1 (1954) 23-28.

14 - Nelson, D. L. e Cox, M. M. **Principles of Biochemistry**, 4th edition, W. H. Freeman and Company, Nova York, 2004, p. 191.

15 - Pierre, T. St. e Jencks, W. P. Intramolecular catalysis in reactions of nucleophilic reagents with aspirin. *Journal of American Chemistry Society*, **90**:14 (1968) 3817.

16 - Gesser, J. C., Yunes, S., Clementin, R. M. e Nome, F. Intramolecular reactions as non mimetic models of enzyme catalysis. *Química Nova*, **20**:6 (1997) 631-637.

17 - Fersht, A. **Structure and Mechanism in Protein Science – A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding**. W. H. Freeman and Company, Nova York, 1998.

18 - Onofrio, A. B.; Gesser, J. C.; Joussef, A. C. e Nome, F. Reactions of N-(O-carboxybenzoyl)-l-leucina: intramolecular catalysis of amide hydrolysis and imide formation by two carboxy groups. *Journal of Chemical Society – Perkin Transactions 2*, :9 (2001) 1863-1868.

19 - Yunes, S. F.; Gesser, J. C.; Chaimovich, H. e Nome, F. Mechanistically optimized intramolecular catalysis in the hydrolysis of esters. Global changes involved in molecular reativity. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **10**:6 (1997) 461-465.

20 - Kirby, A. J.; Lima, M. F.; da Silva, D. e Nome, F. Nucleophilic attack by oxyanions on a phosphate monoester dianion: The positive effect of a cationic general acid. *Journal of the American Chemical Society*, **126**:5 (2004) 1350-1351.

21 - Kirby, A. J.; Dutta-Roy, N.; da Silva, D.; Goodman, J. M.; Lima, M. F.; Roussev, C. D. e Nome, F. Intramolecular general acid catalysis of phosphate transfer. Nucleophilic attack by oxyanions on the PO_3^{2-} group. *Journal of the American Chemical Society*, **127**:19 (2005) 7033-7040.

22 - Asaad, N. e Kirby, A. J. Concurrent nucleophilic and general acid catalysis of the hydrolysis of a phosphate triester. *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions 2*, :10 (2002) 1708-1712.

-
- 23 - Storm, D. R. e Koshland, D. E. A source for special catalytic powers of enzymes – orbital steering. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **66**:2 (1970) 445.
- 24 - Dafforn, A. e Koshland, D. E. Theoretical aspects of orbital steering. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **68**:10 (1971) 2463.
- 25 - Storm, D. R. e Koshland, D. E. Indication of magnitude of orientation factors in esterification. *Journal of the American Chemistry Society*, **94**:16 (1972) 5805-5814.
- 26 - Menger, F. M. On the source of intramolecular and enzymatic reactivity. *Accounts of Chemical Research*, **18**:5 (1985) 128-134.
- 27 - Page, M. I. e Jencks, W. P. Entropic contributions to rate accelerations in enzymic and intramolecular reactions and chelate effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **68**:8 (1971) 1678.
- 28 - Gandour, R. D. e Schowen, R. L. **Transition states of biochemical processes**, Plenum Press, Nova York, 1978.
- 29 - Cleland, W. W. e Kreevoy, M. M. Low-barrier hydrogen bonds and enzymatic catalysis. *Science* **264**:5167 (1994) 1887-1890.
- 30 - Lahiri, S. D.; Zhang, G. F.; Dunaway-Mariano, D. e Allen, K. N. The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction. *Science*, **299**:5615 (2003) 2067-2071.
- 31 - Knowles, J. Chemistry: Seeing is believing. *Science*, **299**:5615 (2003) 2002-2003.
- 32 - Yarnell, A. Identity of mystery atoms disputed. *Chemistry & Engineering News*, **81**:37 (2003) 30-31.
- 33 - Kirby, A. J. Efficiency of proton transfer catalysis in models and enzymes. *Accounts of Chemical Research*, **30**:7 (1997) 290-296.
- 34 - Williams, N. H. Models for biological phosphoryl transfer. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, **1697**:1-2 (2004) 279-287.
- 35 - Dalby, K. N.; Kirby, A. J. e Hollfelder, F. Simple but efficient models for nuclease catalysis. *Pure & Applied Chemistry*, **66**:4 (1994) 687-694.
- 36 - Bruice, T. C. e Benkovic, S. J. **Biorganic Mechanisms**. W. A. Benjamin; Nova York; **1966**, p. 1-109.

-
- 37 - Cox, J. R. e Ramsay, O. B. Mechanisms of nucleophilic substitution in phosphate esters. *Chemical Reviews*; **64**:4 (1964) 317.
- 38 - Lum, R. C.; Grabowski, J. J. Trimethyl phosphate – the intrinsic reactivity of carbon versus phosphorus sites with anionic nucleophiles. *Journal of the American Chemical Society*. **114**:22 (1992) 8619-8627.
- 39 - Westheimer, F. H. Monomeric meta-phosphates. *Chemical Reviews*. **81**:4 (1981) 313-326.
- 40 - Florian, J.; Warshel, A. Phosphate ester hydrolysis in aqueous solution: associative versus dissociative mechanisms. *Journal of Physical Chemistry B*. **102**:4 (1998) 719-73.
- 41 - Kirby, J. A. e Younas, M. Reactivity of phosphate esters – reactions of diesters with nucleophiles. *Journal of the Chemical Society (B) – Physical Organic*, :6 (1970) 1165-1172.
- 42 - Khan, S. A. e Kirby, A. J. Reactivity of phosphate esters – multiple structure reactivity correlations for reactions of triesters with nucleophiles. *Journal of the Chemical Society (B) – Physical Organic*, :6 (1970) 1172.
- 43 - Khan, S. A.; Kirby, A. J.; Wakselman, M.; Horning, D. P. e Lawlor, J. M. Intramolecular catalysis of phosphate diester hydrolysis – nucleophilic catalysis by neighbouring carboxy-group of hydrolysis of aryl 2-carboxyphenyl phosphates. *Journal of the Chemical Society (B)*, :6 (1970) 1182.
- 44 - Gillespie, P., Ramirez, F.; Ugi, I. e Marquard, D. Chemistry and logical structures. 5. Displacement reactions of phosphorus(V) compounds and their pentacoordinate intermediates. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, **12**:2 (1973) 91-119.
- 45 - Davies, J. E.; Doltsinis, N. L; Kirby, A. J.; Roussev, C. D. e Sprik, M. Estimating pK_a values for pentaoxyphosphoranes. *Journal of the American Chemical Society*, **124**:23 (2002) 6594-6599.
- 46 - Frey, P. A. Stereochemistry of enzymatic-reactions of phosphates. *Tetrahedron*; **38**:11 (1982) 1541-1567.
- 47 - Domingos, J. B. Longhinotti, E.; Bunton, C. A.; e Nome, F. Reactions of bis-(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydroxylamine. *Journal of Organic Chemistry*, **68**:18 (2003) 7051-7058.
- 48 - Domingos, J. B. Longhinotti, E.; Brandão, T. A. S.; Bunton, C. A.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N. e Nome, F. Mechanism of nucleophilic substitution reactions of

methylated hydroxylamines with bis-(2,4-dinitrophenyl) phosphate. Mass spectrometric identification of key intermediates. *Journal of Organic Chemistry*, **69**:18 (2004) 6024-6033.

49 - Domingos, J. B. Longhinotti, E.; Brandão, T. A. S.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Bunton, C. A.; e Nome, F. Reaction of bis-(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydrazine and hydrogen peroxide. Comparison of *O*- and *N*-phosphorylation. *Journal of Organic Chemistry*, **69**:23 (2004) 7898-7905.

50 - Simanenkov, Y. S.; Popov, A. F., Prokop'eva, T. M.; Karpichev, E. A.; Savelova, V. A.; Suprun, I. P. e Bunton, C. A. Inorganic anionic oxygen-containing alpha-nucleophiles-effective acyl group acceptors: Hydroxylamine ranks first among the alpha-nucleophile series. *Russian Journal of Organic Chemistry*, **38**:9 (2002) 1286-1298.

51 - Jencks, W. P. The reaction of hydroxylamine with activated acyl groups. 1. Formation of *O*-acylhydroxylamine. *Journal of the American Chemical Society*, **80**:17 (1958) 4581-4584.

52 - Jencks, W. P. e Carriuolo, J. Reactivity of nucleophilic reagents toward esters. *Journal of the American Chemical Society*, **82**:7 (1960) 1778-1786.

53 - Kirby, A. J. e Jencks, W. P. Reactivity of nucleophilic reagents toward *p*-nitrophenyl phosphate dianion. *Journal of the American Chemical Society*, **87**:14 (1965) 3209.

54 - Cramer, C. J. **Essentials of Computational Chemistry**. John Wiley & Sons, Nova York, 2002, p. 356 e 400.

55 - Iché-Tarrat, N.; Barchelat, J-C.; Rinaldi, D. e 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. *Journal of Physical Chemistry B*, **109**:47 (2005) 22570-22580.

56 - Rinaldi, D. e Rivail, J. L. Molecular polarizability and dielectric effect of medium in liquid-phase – theoretical study of water molecule and its dimers. *Theoretical Chimica Acta*, **32**:1 (1973) 57-70.

57 - Tomasi, J. e Persico, M. Molecular-interaction in solution – an overview of methods based on continuous distributions of the solvent. *Chemical Review*, **94**:7 (1994) 2027-2094.

58 - Martell, A. E. e Motekaitis, R. J. **Determination and Use of Stability Constants**. 2^a edição, VHC Publishers, Inc., Nova York, 1992, p. 143.

-
- 59 - Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D., van Drunen, R. GROMACS – a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, **91**:1-3(1995) 43–56.
- 60 - Sterling, T. **Beowulf Cluster Computing using Linux**, MIT Press, Massachusetts, 2001.
- 61 - Schmidt, M.W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M. e Montgomery, J. A. General atomic and molecular electronic-structure system. *Journal of Computational Chemistry*, **14**:11 (1993) 1347-1363.
- 62 - Schaftenaar, G. e Noordik. J.H. Molden: a pre- and pos-processing program for molecular and electronic structures. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **14**:2 (2000) 123-134.
- 63 - Portmann, S. e Lüthi, H. P. MOLEKEL: An interactive molecular graphics tool. *CHIMIA* **54**:12 (2000) 766-770.
- 64 - Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani G. e Barone, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *Journal of Computational Chemistry*, **24**:6 (2003) 669-681.
- 65 - Li, H. e Jensen, J. H. Improving the efficiency and convergence of geometry optimization with the polarizable continuum model: New energy gradients and molecular surface tessellation. *Journal of Computational Chemistry*, **25**:12 (2004) 1449-1462.
- 66 - Kirby, A. J. and Percy, J. M. Intramolecular proton-transfer catalysis of nucleophilic catalysis of acetal hydrolysis – the hydrolysis of 8-dimethylamino-1-methoxynaphthalene. *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions 2*, :7 (1989) 907-912.
- 67 - Admiraal, S. J. e Herschlag, D. The substrate-assisted general base catalysis model for phosphate monoester hydrolysis: Evaluation using reactivity comparisons. *Journal of the American Chemical Society*, **122**:10 (2000) 2145-2148.
- 68 - Randall, M. e Young, L. E. The calomel and silver chloride electrodes in acid and neutral solutions. The activity coefficient of aqueous hydrochloric acid and the single potential of the deci-molal calomel electrode. *Journal of the American Chemical Society*, **50**:4 (1928) 989-1004.

69 - Bourne, N. e Williams, A. Effective charge on oxygen in phosphoryl ($-\text{PO}_3^{-2}$) group transfer from an oxygen donor. *Journal of Organic Chemistry*, **49**:7 (1984) 1200-1204.

70 - Pross, A. **Theoretical and Physical Principles of Organic Reactivity**, Wiley-Interscience Publication, Nova York, 1995, p. 131.

71 - Pliego, J. R. e Riveros, J. M. The cluster-continuum model for the calculation of the solvation free energy of ionic species. *Journal of Physical Chemistry A*, **105**:30 (2001) 7241-7247.

ANEXO 1: Análise por Espetrometria de Massas de soluções de DANMEP com diferentes nucleófilos.

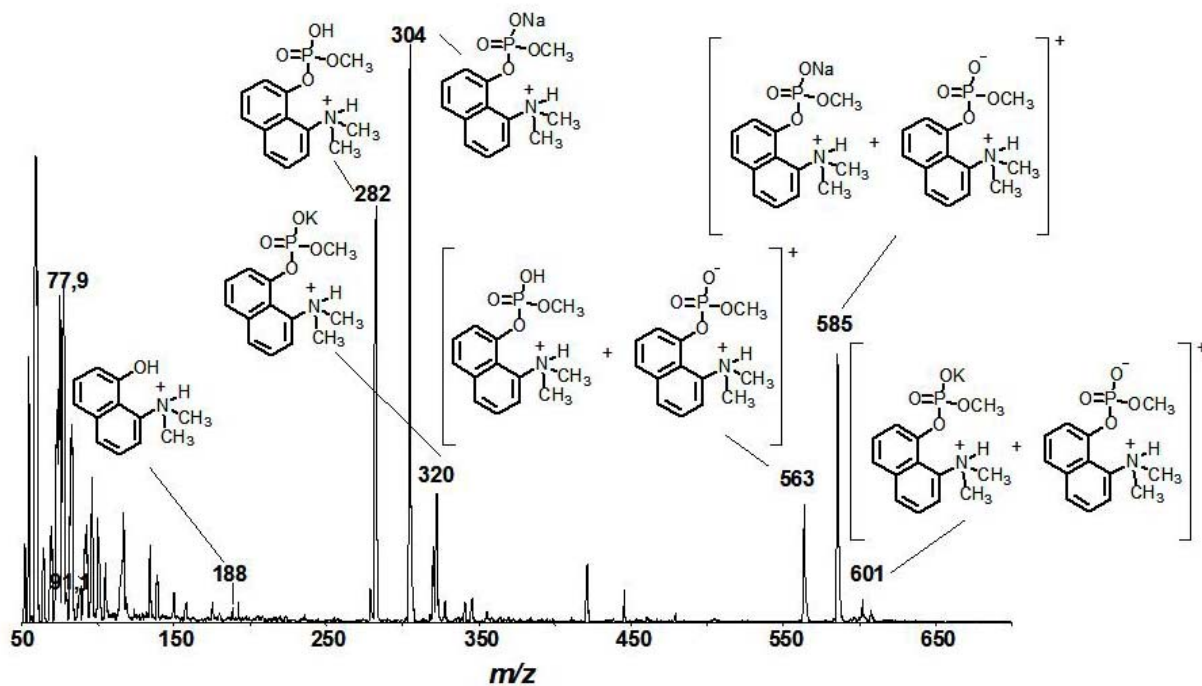


Figura 35- Espectro da análise ESI-MS(+) da reação de hidrólise do DANMEP ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$) com pH na faixa de 6 - 7, a 25°C , força iônica ajustada a $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ com KCl.

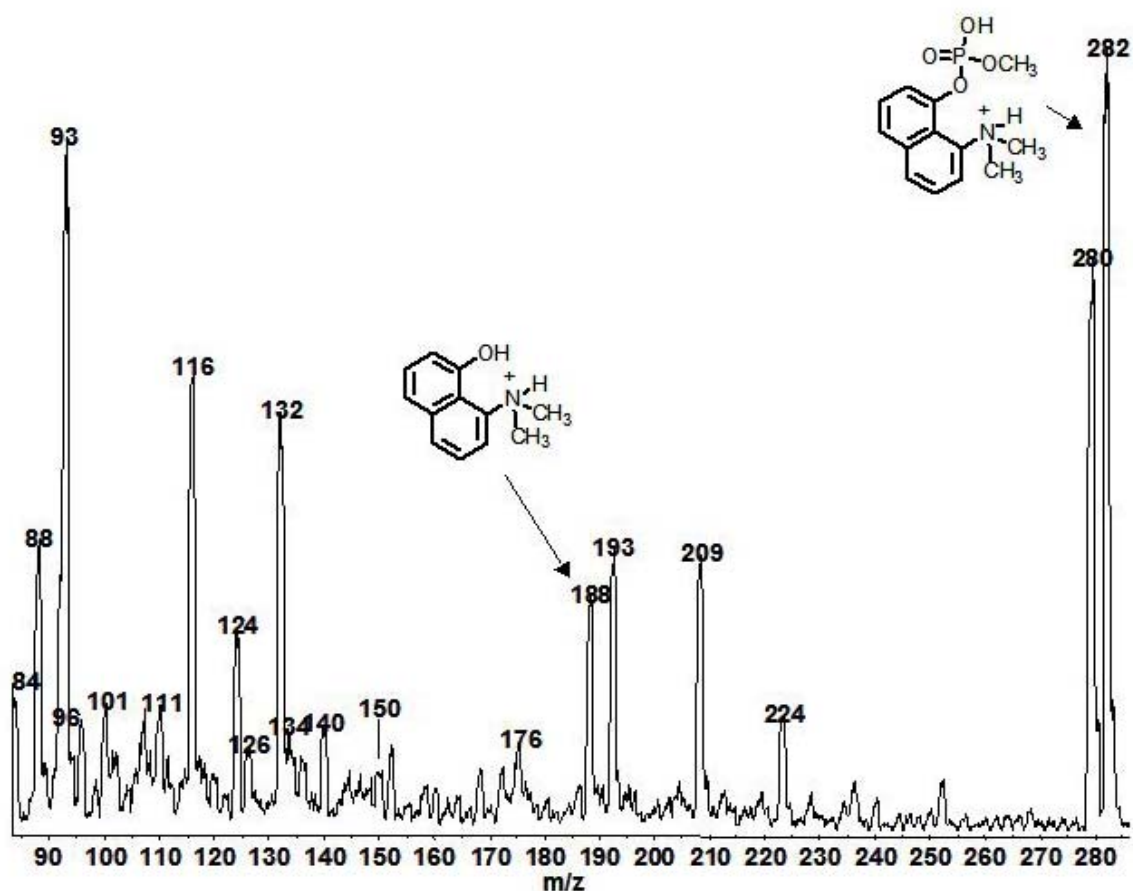


Figura 36- Espectro da análise ESI-MS(+) da reação entre NH_2OH ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) e DANMEP ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) com pH na faixa de 6 - 7 ajustado com solução de NH_4OH , a 25°C , força iônica ajustada a $1,0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ com KCl.

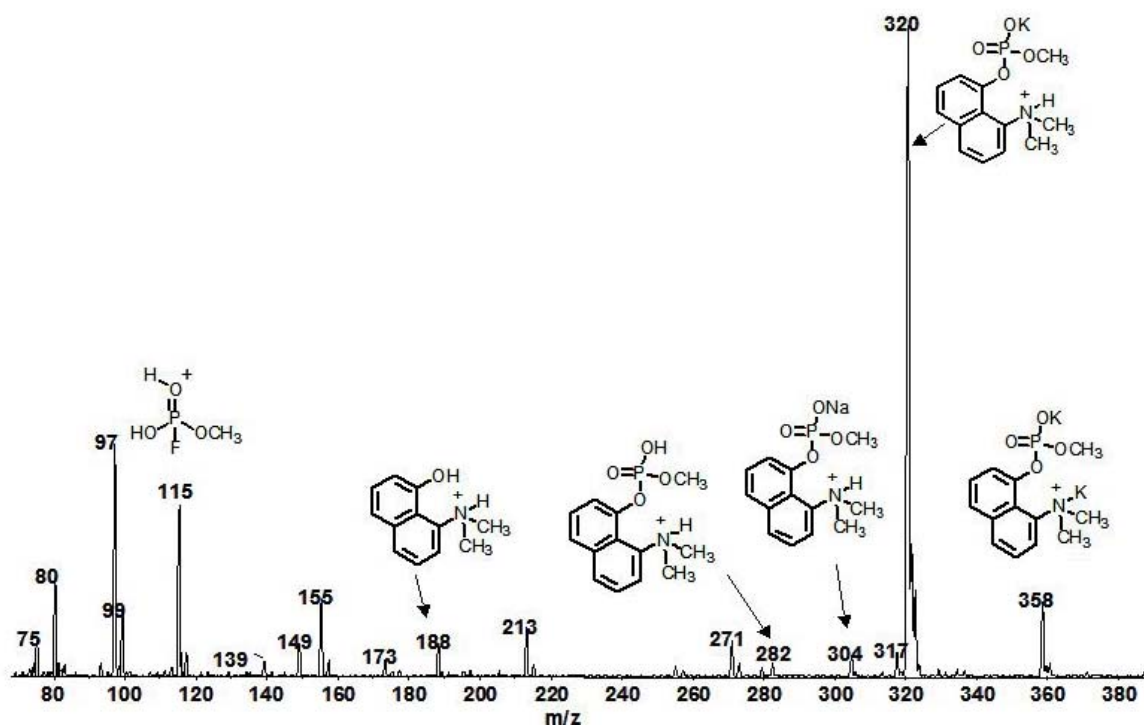


Figura 37- Espectro da análise ESI-MS(+) da reação entre F^- ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$) e DANMEP ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$) com pH na faixa de 6 - 7 ajustado com solução de NH_4OH , a 25°C , força iônica ajustada a $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ com KCl .

ANEXO 2: Tabela com os dados utilizados nos gráficos da tese.**1) Figura 17**

<i>V_{с_{к_{о_н}}}</i>	<i>pH Experimental</i>	<i>pH Teórico</i>
0,00	2,651	2,655
0,05	2,672	2,680
0,10	2,695	2,706
0,15	2,724	2,734
0,20	2,754	2,763
0,25	2,789	2,795
0,30	2,824	2,829
0,35	2,863	2,866
0,40	2,901	2,907
0,45	2,950	2,951
0,50	2,997	3,000
0,55	3,059	3,056
0,60	3,122	3,120
0,65	3,202	3,194
0,70	3,292	3,284
0,75	3,413	3,397
0,78	3,493	3,482
0,81	3,609	3,588
0,83	3,700	3,676
0,85	3,814	3,786
0,87	3,968	3,934
0,88	4,050	4,033
0,89	4,210	4,160
0,90	4,364	4,339
0,91	4,740	4,639
0,92	5,122	5,280
0,93	5,704	5,843
0,95	6,161	6,293
0,97	6,441	6,530
1,00	6,690	6,767
1,05	7,003	7,044
1,08	7,151	7,181
1,11	7,307	7,308
1,14	7,437	7,431
1,17	7,582	7,556
1,20	7,713	7,689
1,23	7,881	7,836
1,26	8,055	8,010
1,29	8,320	8,239
1,32	8,633	8,597
1,35	9,082	9,187
1,38	9,438	9,602
1,41	9,742	9,829
1,46	10,073	10,058
1,51	10,313	10,208

2) Figura 19

<i>pH</i>	<i>Absorbância</i>
2,0	0,04520
3,0	0,04500
4,2	0,04890
5,0	0,05300
6,0	0,06054
6,1	0,06224
6,2	0,06397
6,3	0,06480
6,4	0,06921
6,5	0,07490
6,6	0,07780
6,7	0,08306
6,8	0,09098
6,9	0,10042
7,3	0,13165
7,4	0,14628
7,5	0,16042
7,6	0,17273
7,7	0,18646
7,8	0,19740
8,1	0,22287
8,2	0,23366
9,1	0,25406
9,6	0,25919
10,1	0,25686
11,0	0,25616
12,0	0,26164

3) Figura 20

<i>pH</i>	<i>Absorbância</i>
0,5	0,09529
1,0	0,07425
1,5	0,09648
2,0	0,08804
2,5	0,09634
3,0	0,08663
3,5	0,09220
4,0	0,11358
4,5	0,12526
5,0	0,13926
5,5	0,15520
6,0	0,17079
6,5	0,18764
7,0	0,22931
7,5	0,27939
8,0	0,29368
8,5	0,30423
9,0	0,30439
9,5	0,29582
10,0	0,30004
11,5	0,30963
12,0	0,30554
12,5	0,30677
13,0	0,31007
13,5	0,31250

4) Figura 21

<i>pH</i>	<i>Absorbância</i>
0,5	0,15293
1,0	0,15140
1,5	0,15239
2,0	0,15322
2,5	0,15901
3,0	0,15842
4,1	0,18139
4,4	0,19419
4,9	0,21065
5,5	0,22432
6,0	0,23200
6,5	0,25493
7,1	0,30326
7,5	0,35220
8,0	0,37278
8,5	0,38276
9,0	0,38436
9,9	0,38539

5) Figura 22

<i>pH DANMEP</i>	$\log k_{obs} / s^{-1}$	<i>pH MANEP</i>	$\log k_{obs} / s^{-1}$	<i>pH TANEP</i>	$\log k_{obs} / s^{-1}$
0,3	-5,00	0,3	-4,18	0,2	-4,02
0,6	-5,03	0,5	-4,29	0,6	-4,04
1,0	-5,05	0,8	-4,48	1,0	-4,05
1,6	-5,06	1,2	-4,65	1,6	-4,05
2,1	-5,06	1,5	-4,74	2,2	-4,05
2,5	-5,06	1,7	-4,76	2,8	-4,06
3,0	-5,06	1,9	-4,78	3,4	-4,08
3,5	-5,06	2,2	-4,76	3,8	-4,10
4,0	-5,06	2,5	-4,70	4,1	-4,16
4,5	-5,05	2,8	-4,60	4,4	-4,23
5,0	-5,05	3,0	-4,48	4,6	-4,34
5,5	-5,06	3,3	-4,35	4,8	-4,43
6,1	-5,09	3,7	-4,19	5,0	-4,56
6,5	-5,15	4,0	-4,03	5,2	-4,70
6,6	-5,15	4,4	-3,92	5,4	-4,92
6,8	-5,17	4,8	-3,87	5,8	-5,22
7,0	-5,27	5,2	-3,84	6,1	-5,50
7,1	-5,57	5,5	-3,82	6,3	-5,72
7,5	-5,82	6,2	-3,81	6,5	-5,94
		6,7	-3,81		
		7,7	-3,81		
		8,2	-3,84		
		8,5	-3,86		
		8,8	-3,91		
		9,1	-3,99		
		9,3	-4,05		
		9,5	-4,12		
		9,6	-4,20		
		9,8	-4,30		
		10,0	-4,42		

6) Figura 23

<i>Concentração / mol.dm⁻³</i>	$k_{obs} / 10^{-5} s^{-1} HCl$	$k_{obs} / 10^{-5} s^{-1} DCl$
0,5	1,00	0,511
1,0	2,83	1,52
1,5	--	2,56
2,0	6,30	4,13
2,5	--	5,33
3,0	10,7	8,59
3,5	--	12,1
4,0	17,5	24,6
5,9	--	45,9
6,0	31,8	--
8,0	43,8	54,3
10,0	42,0	48,3
12,0	31,7	39,7

7) Figura 24

<i>Escalas H_0/pH</i>	<i>$\log k_{obs} /s^{-1}$</i>
-4,32	-2,99
-2,86	-3,05
-2,13	-3,29
-1,40	-3,65
-1,02	-3,89
-0,61	-4,15
-0,15	-4,53
0,2	-5,00
0,6	-5,03
1,0	-5,05
1,6	-5,06
2,1	-5,06
2,5	-5,06
3,0	-5,06
3,5	-5,06
4,0	-5,06
4,5	-5,05
5,0	-5,05
5,5	-5,06
6,1	-5,09
6,6	-5,15
6,8	-5,17
7,0	-5,27
7,1	-5,57
7,5	-5,82

8) Figura 25

<i>pL</i>	$k_{obs} / 10^4 s^{-1} NH_2OH/H_2O$	$k_{obs} / 10^4 s^{-1} NH_2OH/D_2O$
5,4	2,16	--
5,4	1,70	--
5,5	--	1,38
5,5	2,16	--
5,7	2,70	--
5,7	2,39	--
5,7	--	1,66
5,8	--	1,96
5,9	3,04	--
5,9	2,59	--
5,9	--	2,01
6,0	3,17	2,06
6,1	2,94	--
6,1	3,18	--
6,2	--	2,41
6,5	2,79	--
6,5	2,87	--
6,5	2,81	2,49
6,8	2,30	--
6,8	2,38	--
6,9	2,15	--
6,9	1,86	--
6,9	1,98	--
6,9	--	2,50
7,1	1,64	--
7,4	1,42	--

ANEXO 3: Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados nas Figuras de 27 a 35.

1) Figura 27 e 28A

C	-1.491821	-1.105554	0.310324
C	-1.393568	0.256839	-0.146461
C	-0.201857	0.924295	-0.579270
C	-0.221721	2.241954	-0.923953
C	-1.418828	2.979888	-0.896087
C	-2.583777	2.374312	-0.546313
C	-2.598546	1.008056	-0.173325
O	0.947700	0.223576	-0.726941
H	0.703534	2.703335	-1.209293
H	-1.403351	4.019821	-1.167953
H	-3.509824	2.920529	-0.542892
C	-2.694542	-1.655958	0.619345
N	-0.290633	-1.939772	0.469646
H	-2.759486	-2.673035	0.952553
C	-3.889040	-0.905280	0.538178
C	-3.834409	0.395437	0.169652
H	-4.823260	-1.372182	0.790881
H	-4.729667	0.989477	0.126908
H	0.526660	-1.338774	0.762678
C	-0.332033	-2.899053	1.606407
C	0.091667	-2.637738	-0.788216
P	2.211089	0.297048	0.364367
O	3.318581	-0.395608	-0.542284
O	2.520289	1.689826	0.670168
O	1.786563	-0.706085	1.384829
C	4.074331	0.354607	-1.472044
H	4.842369	-0.304485	-1.851960
H	3.446327	0.685162	-2.292331
H	4.524598	1.212674	-0.992933
H	1.059638	-3.094609	-0.638627
H	-0.653607	-3.388980	-1.012687
H	0.156248	-1.916961	-1.584554
H	0.679714	-3.241727	1.761360
H	-0.669688	-2.380362	2.489579
H	-0.974931	-3.737270	1.383449

2) Figura 28B

C	-1.576539	-1.086934	-0.045975
C	-1.359562	0.334010	-0.128391
C	-0.109339	1.000955	-0.335489
C	-0.031858	2.356667	-0.418739
C	-1.182012	3.158912	-0.281063
C	-2.390968	2.573490	-0.079055
C	-2.507243	1.161337	-0.008070
O	1.027038	0.269247	-0.530242
H	0.927347	2.806954	-0.587520
H	-1.091587	4.227869	-0.345176
H	-3.281252	3.167268	0.021577
C	-2.822702	-1.599934	0.114373
N	-0.455551	-2.035161	-0.176217
H	-2.977180	-2.658980	0.160559
C	-3.952626	-0.757981	0.227070
C	-3.794476	0.585333	0.174020
H	-4.923290	-1.199079	0.356671
H	-4.641097	1.241690	0.262266
P	2.217945	0.050793	0.582652
H	0.376876	-1.610001	0.220842
C	-0.590397	-3.292913	0.620084
C	-0.163657	-2.355398	-1.607463
H	0.373892	-3.775437	0.604191
H	-0.861474	-3.037419	1.631474
H	-1.326375	-3.940350	0.174673
H	0.737276	-2.949120	-1.640776
H	-0.998251	-2.910494	-2.007068
H	-0.024437	-1.437101	-2.151686
O	3.431036	-0.234858	-0.402661
O	2.417458	1.285013	1.365007
O	1.875202	-1.234198	1.249069
C	4.049924	0.802148	-1.153613
H	4.860359	0.346228	-1.701541
H	3.342844	1.237468	-1.848293
H	4.437267	1.566450	-0.494532

3) Figura 30 e 32A

C	-2.988464	-1.642524	0.137197
C	-2.330367	-0.485593	-0.385315
C	-2.417318	-2.638942	0.999342
C	-3.166064	-3.682032	1.451178
C	-4.518202	-3.827809	1.079667
C	-5.091213	-2.914495	0.258373
C	-4.352725	-1.804775	-0.227321
N	-1.011435	-2.542612	1.439534
C	-2.968708	0.416689	-1.176216
O	-1.012361	-0.290430	-0.001887
C	-4.323005	0.235761	-1.517838
C	-4.993434	-0.852762	-1.060304
P	0.200772	0.744969	-0.535742
C	-0.849065	-1.592792	2.593823
C	-0.345314	-3.849457	1.780241
O	1.260199	0.472659	0.713826
O	0.832034	0.254034	-1.897504
O	-0.314135	2.244433	-0.467413
C	1.639970	1.437707	1.742094
H	-2.737551	-4.421062	2.093155
H	-5.076029	-4.664786	1.450007
H	-6.117614	-3.011540	-0.037482
H	-0.467081	-2.225713	0.626198
H	-2.460327	1.291520	-1.521663
H	-4.803450	0.991616	-2.102542
H	-6.026602	-1.003003	-1.305705
H	0.203007	-1.516829	2.809259
H	-1.246815	-0.633809	2.322576
H	-1.387193	-1.999181	3.436683
H	0.705675	-3.631987	1.866075
H	-0.728201	-4.222974	2.715888
H	-0.513957	-4.542378	0.977162
H	1.984365	0.838433	2.566119
H	2.442451	2.047781	1.365815
H	0.792740	2.039612	2.027638
O	3.510618	4.754485	-0.551897
H	3.845103	5.596939	-0.828402
H	2.589376	4.616636	-0.813222
O	-4.307305	3.468420	-1.361738
H	-3.761149	3.496439	-0.569294
H	-4.533884	4.340044	-1.659187
O	-2.391005	3.574625	0.637967
H	-1.697272	3.030239	0.241136
H	-2.303533	3.578345	1.591157
O	4.907261	2.874853	0.755094
H	5.365176	3.253433	1.493454
H	4.428141	3.541593	0.237941
O	2.876188	-2.812366	-1.779977
H	3.219965	-1.934352	-1.945151
H	3.550084	-3.396227	-1.412618
O	0.467031	-2.028499	-3.515159
H	1.305368	-2.468847	-3.399357
H	0.492246	-1.147659	-3.136164
O	-0.503623	5.700650	0.866517
H	0.180025	5.531173	0.221325

H	-1.328494	5.312596	0.573618
O	4.901924	-3.972169	-0.406715
H	5.054440	-3.332280	0.301247
H	5.596225	-4.609021	-0.500255
O	-0.963077	4.101234	3.030375
H	-0.596709	4.757769	2.424781
H	-0.990460	4.403166	3.928610
O	0.310500	-2.858329	-0.840945
H	-0.074381	-2.713736	-1.704520
H	1.268864	-2.902895	-0.960057
O	2.284125	-1.887567	1.822327
H	3.214309	-2.099505	1.756406
H	2.046444	-1.170478	1.235137
O	4.844846	0.221309	0.072259
H	4.919048	1.143927	0.342685
H	4.411790	0.121871	-0.779379
O	0.913414	4.410673	-1.305588
H	0.660368	4.639157	-2.191791
H	0.479000	3.584180	-1.010519
O	5.168453	-1.964353	1.407858
H	5.720863	-1.912070	2.176685
H	5.104704	-1.107642	0.918361
O	3.423697	-0.068444	-2.317854
H	2.478667	0.129097	-2.185975
H	3.749936	0.222186	-3.159725

4) Figura 31

C	-4.993434	-0.852762	-1.060304
C	-4.352725	-1.804775	-0.227321
C	-2.988464	-1.642524	0.137197
C	-2.330367	-0.485593	-0.385315
C	-2.968708	0.416689	-1.176216
C	-4.323005	0.235761	-1.517838
C	-5.091213	-2.914495	0.258373
C	-4.518202	-3.827809	1.079667
C	-3.166064	-3.682032	1.451178
C	-2.417318	-2.638942	0.999342
O	-1.012361	-0.290430	-0.001887
P	0.186474	0.811942	-0.481406
O	-0.356033	2.293203	-0.308942
N	-1.036510	-2.544330	1.431683
O	1.263885	0.478329	0.737547
C	1.636020	1.380441	1.824096
O	0.812656	0.424724	-1.878497
O	0.821384	4.533846	-1.012660
O	3.405430	0.181683	-2.343100
O	0.285425	-2.860047	-0.848796
O	-2.446080	3.506295	0.901338
O	3.419341	4.877880	-0.261671
O	4.864969	2.943594	0.904755
O	2.851113	-2.814084	-1.787828
O	4.876849	-3.973886	-0.414566
O	5.143378	-1.966070	1.400007
O	4.819770	0.219592	0.064407
O	-4.380830	3.495155	-1.083335
O	2.343921	-1.929572	1.677439
O	0.441955	-2.030217	-3.523010
O	-1.003453	3.901254	3.310226
O	-0.597067	5.649133	1.253219
H	-2.737551	-4.421062	2.093155
H	-5.076029	-4.664786	1.450007
H	-6.117614	-3.011540	-0.037482
H	-2.460327	1.291520	-1.521663
H	-4.803450	0.991616	-2.102542
H	-6.026602	-1.003003	-1.305705
H	2.000316	0.734794	2.603315
H	2.422808	2.029713	1.481807
H	0.780561	1.945385	2.156739
H	3.734880	5.743191	-0.484685
H	2.498196	4.739592	-0.523107
H	-3.827046	3.481353	-0.295825
H	-4.626996	4.379948	-1.320160
H	-1.746337	3.003090	0.462885
H	-2.348730	3.448611	1.851828
H	5.323320	3.281366	1.662390
H	4.367909	3.633585	0.437434
H	3.194890	-1.936070	-1.953002
H	3.525009	-3.397944	-1.420469
H	1.280293	-2.470565	-3.407208
H	0.467170	-1.149377	-3.144015
H	0.082887	5.536189	0.591951
H	-1.417449	5.265219	0.942782

H	5.029365	-3.333997	0.293396
H	5.571150	-4.610738	-0.508106
H	-0.655954	4.603504	2.746226
H	-1.027161	4.142456	4.226741
H	-0.099456	-2.715454	-1.712371
H	1.243789	-2.904613	-0.967908
H	3.277217	-2.118394	1.589057
H	2.086556	-1.179979	1.141366
H	4.893972	1.142210	0.334833
H	4.386714	0.120154	-0.787231
H	0.554796	4.815497	-1.879376
H	0.405830	3.681268	-0.769146
H	5.695788	-1.913787	2.168833
H	5.079629	-1.109359	0.910509
H	2.458255	0.351484	-2.189728
H	3.717277	0.533758	-3.166774
H	-0.510014	-1.822064	0.809546
C	-0.991758	-2.113694	2.815536
C	-0.401482	-3.842050	1.308544
H	0.635552	-3.770993	1.633246
H	-0.927979	-4.564316	1.930680
H	-0.435093	-4.165472	0.269222
H	0.045276	-2.042637	3.140239
H	-1.468686	-1.139061	2.908018
H	-1.518254	-2.835960	3.437673

5) Figura 32B

C	2.599983	-4.387778	0.191897
C	2.599983	-2.968558	0.191897
C	1.436927	-5.085065	0.191897
C	0.204963	-4.397571	0.203581
C	0.164730	-3.037831	0.202017
C	1.369398	-2.262176	0.185100
C	1.432908	-0.833159	0.158269
C	2.627451	-0.176244	0.168751
C	3.833732	-0.900037	0.191596
C	3.826198	-2.259661	0.191905
N	-1.144221	-2.366065	0.297100
C	-2.298174	-3.078376	-0.349051
C	-1.481020	-2.045177	1.739200
O	0.236669	-0.169743	0.118273
P	-0.175396	1.499803	-0.048905
O	-1.616293	1.360853	-0.735005
O	-0.202347	2.101509	1.433026
O	0.933211	2.134901	-0.999762
H	3.544066	-4.897867	0.189745
H	1.437221	-6.157315	0.191891
H	-0.697364	-4.970434	0.218888
H	2.638131	0.891122	0.119789
H	4.760184	-0.360033	0.192121
H	4.743071	-2.816891	0.191911
H	-1.051097	-1.481926	-0.194093
H	-3.142235	-2.414809	-0.299390
H	-2.046355	-3.288142	-1.371587
H	-2.526639	-3.972547	0.205380
H	-2.429767	-1.540352	1.751733
H	-1.546684	-2.979185	2.274821
H	-0.716232	-1.420184	2.160676
O	-4.077078	0.300170	-1.141977
H	-3.814766	-0.259758	-1.866898
H	-3.283040	0.684419	-0.753902
O	-2.365235	3.252982	2.703400
H	-2.666624	4.033568	2.230779
H	-1.650117	2.823616	2.213162
O	1.056758	4.589393	-2.076127
H	0.194242	4.963230	-2.289638
H	0.986447	3.696999	-1.700217
O	0.195819	4.876178	0.787838
H	0.730826	4.976245	0.003472
H	0.281331	3.999657	1.170604
O	-1.196494	2.954813	5.152010
H	-1.762636	3.139284	4.388843
H	-0.571840	3.654788	5.291953
O	1.793205	1.280949	-3.466794
H	2.208009	2.042428	-3.876567
H	1.526769	1.491146	-2.563751
O	-3.418437	0.593924	3.051342
H	-2.548564	0.361047	3.384147
H	-3.442324	1.539870	2.911067
O	0.174544	-0.591745	-4.428581
H	-0.136954	-0.354129	-5.291953
H	0.845168	0.042454	-4.107069

O	-4.708018	-1.126280	1.258282
H	-4.760184	-0.629253	0.441922
H	-4.417594	-0.561564	1.982219
O	-2.551535	5.214395	0.712775
H	-1.586752	5.251463	0.730212
H	-2.873820	4.644565	0.014284
O	-1.570613	5.508287	-2.307783
H	-1.778153	6.157315	-1.645347
H	-2.175705	4.761350	-2.241222
O	-3.126564	3.387990	-1.497256
H	-3.993803	3.042183	-1.674590
H	-2.516732	2.664310	-1.252663
O	-0.647707	0.560354	3.727953
H	-0.686341	1.170164	4.466870
H	-0.347306	1.021936	2.936878
O	-1.603780	-0.901134	-2.330803
H	-1.024755	-0.962264	-3.100030
H	-1.551607	-0.026978	-1.934644
O	2.786353	3.873204	-4.025382
H	2.163526	4.270294	-3.393943
H	3.678152	4.145202	-3.854048

6) Figura 33

C	4.815915	-0.632095	0.517685
C	6.190612	-0.938229	0.661687
C	4.399239	0.700857	0.829205
C	7.094034	0.058096	1.112701
C	5.285407	1.633173	1.267117
C	6.650458	1.305642	1.407174
C	3.953949	-1.683999	0.067942
C	4.440214	-2.917275	-0.224638
C	6.661789	-2.239348	0.348863
C	5.814901	-3.202608	-0.087164
O	3.084384	0.987359	0.708706
P	2.445014	2.145996	-0.325620
O	2.817095	3.481952	0.133561
O	3.269943	1.752715	-1.652988
O	1.063320	1.652275	-0.465623
N	2.500296	-1.475876	-0.068308
C	2.001327	-1.607961	-1.475234
C	1.700782	-2.302393	0.889407
C	4.105048	2.687686	-2.301536
H	8.133374	-0.196357	1.215629
H	4.923186	2.619131	1.485713
H	7.335470	2.059195	1.751069
H	3.781475	-3.695766	-0.560546
H	7.710399	-2.446817	0.463457
H	6.173728	-4.186608	-0.325831
H	2.319648	-0.512452	0.187752
H	2.545760	-0.904390	-2.084360
H	0.946762	-1.386244	-1.465534
H	2.169249	-2.618540	-1.813500
H	0.661925	-2.042815	0.761512
H	2.051315	-2.086693	1.887647
H	1.847460	-3.347090	0.665073
H	4.537646	2.180101	-3.152763
H	4.891073	3.030810	-1.644250
H	3.536218	3.542072	-2.642291
C	-4.815034	0.625099	0.534428
C	-6.189447	0.929366	0.684950
C	-4.397915	-0.711925	0.827351
C	-7.092209	-0.072944	1.123860
C	-5.283424	-1.650024	1.254103
C	-6.648233	-1.324371	1.400736
C	-3.953751	1.682926	0.097445
C	-4.440407	2.920077	-0.177604
C	-6.661044	2.234627	0.390555
C	-5.814822	3.203632	-0.033881
O	-3.083272	-0.996813	0.700864
P	-2.445640	-2.141554	-0.349876
O	-2.817048	-3.483514	0.092014
O	-3.272706	-1.730544	-1.670528
O	-1.064149	-1.646050	-0.485515
N	-2.500362	1.476556	-0.044178
C	-2.003907	1.627473	-1.450098
C	-1.699056	2.290093	0.923106
C	-4.108830	-2.656770	-2.330214
H	-8.131364	0.180139	1.231912

H	-4.920902	-2.638844	1.458835
H	-7.332737	-2.082478	1.735514
H	-3.782181	3.702981	-0.504129
H	-7.709436	2.440598	0.509752
H	-6.173968	4.190793	-0.258606
H	-2.319341	0.509777	0.198621
H	-2.549469	0.932144	-2.067622
H	-0.949336	1.405620	-1.445265
H	-2.172386	2.642499	-1.774487
H	-1.846008	3.337717	0.713056
H	-0.660459	2.032162	0.789890
H	-2.047838	2.061062	1.918986
H	-4.542993	-2.137767	-3.173724
H	-4.893647	-3.008898	-1.676257
H	-3.540483	-3.506368	-2.683521

7) Figura 34

C	-4.166396	-0.640857	-0.564975
C	-2.940448	-1.179675	-0.093154
C	-1.816627	-0.330327	0.078394
C	-1.998018	1.053051	-0.223989
C	-3.184198	1.543527	-0.674032
C	-4.287476	0.682845	-0.852666
C	-2.835975	-2.562541	0.208992
C	-1.662532	-3.077796	0.665881
C	-0.532870	-2.249588	0.837092
C	-0.592587	-0.917238	0.545193
N	-0.877894	1.992358	-0.022256
C	-1.147058	2.990469	1.069374
O	0.490086	-0.096495	0.718874
P	2.206792	-0.289995	0.045230
O	3.790339	0.007806	-0.749259
N	4.000919	-0.774385	-1.938466
C	-0.429675	2.666382	-1.289653
O	2.536102	1.123167	0.896314
C	2.326791	1.302123	2.321701
O	2.519893	-1.724270	0.671648
O	1.434560	-0.149782	-1.459080
H	0.394210	-2.655227	1.180301
H	-1.582016	-4.121445	0.900019
H	-3.698011	-3.186012	0.072102
H	-3.297681	2.586321	-0.893023
H	-5.213888	1.085922	-1.209258
H	-5.000707	-1.303412	-0.689768
H	-0.104489	1.402571	0.297910
H	0.451121	3.244787	-1.064797
H	-0.198993	1.906996	-2.014734
H	-1.212599	3.312333	-1.646738
H	-0.246281	3.557845	1.235281
H	-1.944979	3.646013	0.766173
H	-1.422827	2.456779	1.962968
H	2.849805	2.208960	2.571850
H	1.278000	1.393867	2.538209
H	2.745900	0.470533	2.867188
H	4.556419	-0.202431	-2.542133
H	4.503132	-1.598596	-1.674168
H	2.023359	-0.323131	-2.199212

8) Figura 35

P	0.000000	0.000000	0.000000
O	0.000000	0.000000	1.806822
O	1.465455	0.000000	-0.162874
O	-0.755742	-1.411452	0.012669
O	-0.934331	1.224227	-0.011001
O	-0.344417	-0.107160	-1.974929
N	-0.821257	0.991584	2.305010
H	-1.556422	0.577269	2.849021
H	-0.282727	1.601955	2.891837
H	-1.118888	1.405416	1.181814
C	-0.273743	-2.550755	-0.681910
H	0.801370	-2.520140	-0.776748
H	-0.560264	-3.415069	-0.100504
H	-0.719786	-2.604899	-1.662602
C	-0.106844	0.897403	-2.799683
C	1.160962	1.378582	-3.014932
H	1.967839	0.934338	-2.466756
C	1.408472	2.431301	-3.917015
H	2.419801	2.774086	-4.049070
C	0.397095	3.009315	-4.618135
H	0.583908	3.810090	-5.310599
C	-0.931455	2.548448	-4.439677
C	-1.997072	3.136628	-5.175205
H	-1.766840	3.931671	-5.861381
C	-3.275216	2.711052	-5.023219
H	-4.075423	3.158303	-5.583067
C	-3.566672	1.667189	-4.117006
H	-4.582512	1.338601	-4.005556
C	-2.567382	1.094484	-3.400727
C	-1.202302	1.500009	-3.526705
N	-2.903471	0.007873	-2.467887
C	-3.335130	-1.234530	-3.166306
H	-3.451634	-2.012256	-2.427425
H	-2.573969	-1.507805	-3.879554
H	-4.271919	-1.056447	-3.669132
H	-4.829558	0.603067	-1.841731
H	-3.937613	-0.407842	-0.700299
C	-3.864752	0.408037	-1.402944
H	-3.482395	1.286599	-0.913168
H	-2.008018	-0.210368	-2.016138