



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**ESTUDO DO EFEITO DA CATÁLISE ÁCIDA GERAL INTRAMOLECULAR
NA DEGRADAÇÃO DO 8-N,N-DIMETILAMINONAFIL-1-FOSFATO**

Davi da Silva

FLORIANÓPOLIS
2006

Davi da Silva

**ESTUDO DO EFEITO DA CATÁLISE ÁCIDA GERAL INTRAMOLECULAR NA
DEGRADAÇÃO DO 8-N,N-DIMETILAMINONAFIL-1-FOSFATO**

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

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Florianópolis

2006

Silva, Davi da

Estudo do efeito da catálise ácida geral intramolecular na degradação do 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato. / Davi da Silva – Florianópolis, 2006.

126f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Título em inglês: Study of the effect of the intramolecular general acid catalysis in the degradation of the 8-*N,N*-dimethylammonium-naphthyl-1-phosphate.

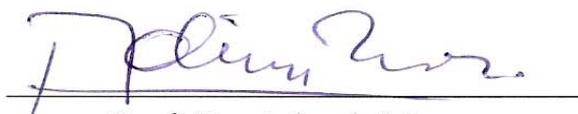
1. monoéster de fosfato. 2. catálise. 3. α -nucleófilos. 4. ligação de hidrogênio.

Davi da Silva

**ESTUDO DO EFEITO DA CATÁLISE ÁCIDA GERAL INTRAMOLECULAR NA DEGRADAÇÃO DO
8-N,N-DIMETILAMINONAFIL-1-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, 11 de dezembro de 2006.



Prof. Dr. Ademir Neves

Coordenador do Curso de Pós-graduação em Química

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
(Orientador)



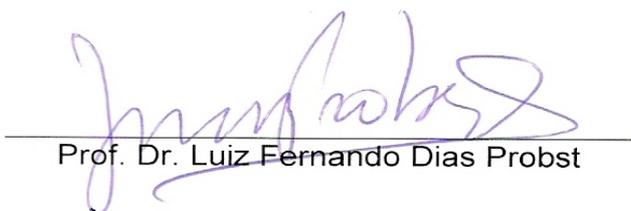
Prof. Dr. João Batista Neves da Costa
(Relator)



Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira



Prof. Dr. César Zucco



Prof. Dr. Luiz Fernando Dias Probst



Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

*À minha esposa Márcia,
e a meus filhos
Rafael e Gabriela*

AGRADECIMENTOS

A Deus, a meus Pais: Vicente Paulo da Silva (*in memoriam*) e Ema da Silva, a minha Esposa Márcia e a meus Filhos: Rafael e Gabriela, pelo incentivo, paciência e compreensão dos momentos ausentes e a saudade deixada durante todo este trabalho, todo meu amor;

Ao Professor Faruk Nome, pela orientação, disponibilidade, paciência, competência e sabedoria que conduziu este trabalho, e pela amizade, pelas confraternizações (comes e bebes) que foram muitas, nas quais sempre tinha uma história pra contar;

A Professora Dra. Haidi Dálida Lentz Fiedler, pela dedicação, consideração, apoio e sugestões que ajudaram a enriquecer mais este trabalho e a minha vida;

Aos Professores membros da Banca Examinadora: Dr. João Batista Neves da Costa (UFFRJ), Dr. Vitor Francisco Ferreira (UFF/RJ), Dr. Cezar Zucco (UFSC), Dr. Luiz Fernando Dias Probst (UFSC) e Dr. Bruno Szpoganicz (UFSC), por toda contribuição técnica ou acadêmica, direta ou indiretamente, para a realização dessa Tese de Doutorado;

Ao Marcelo de Freitas Lima (Lab. 210) e ao Professor Anthony J. Kirby por toda colaboração nesse trabalho;

A todos da minha família e amigos pelos momentos felizes e inesquecíveis;

A todos do Laboratório Catálise e Fenômenos Interficiais (Lab. 210 e 203), pelos momentos de questionamentos e descontração;

Ao Pedro (Pedrinho), Marcelo de F. Lima e Margarete (Lab. 210), pela disponibilidade e amizade feita durante a realização deste trabalho;

Aos colegas, Alexandre C. Teixeira, Alexandre G. Dal Bó, Arlindo C. Felipe, Cristiano Mora, Eduardo S. Zanetti, José L. Westrup, Luiz G. Verdi (*in memoriam*), pela amizade, descontração, comes e bebes, na convivência no Palace Plaza Pantanal Resort;

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Química que contribuíram para minha formação;

Ao Jadir Carminatti e Maria da Graça Pereira Hoeller, secretários do Curso de Pós-Graduação, que muito me ajudaram no decorrer deste trabalho;

Ao CNPq, CAPES e a UFSC, pelo apoio financeiro.

Sumário

1.	Introdução	17
2.	Revisão bibliográfica	19
2.1.	As enzimas e o seu alto poder catalítico	19
2.1.1.	Reações modelos para catálise enzimática	24
2.2.	Reações intramoleculares	25
2.3.	Ésteres fosfóricos	27
2.4.	Reações de substituição nucleofílica em ésteres fosfóricos	30
2.4.1.	Reatividade e mecanismos	30
2.5.	Efeito- α na hidrólise de fosfato	40
2.6.	Catálise em reações intramoleculares	45
2.7.	Estudo químico computacional	49
3.	Objetivos	53
3.1.	Objetivo Geral	53
3.2.	Objetivos específicos	53
4.	Parte experimental	55
4.1.	Reagentes	55
4.2.	Instrumentação	55
4.3.	Preparação do substrato	56
4.4.	Estudos cinéticos	59
4.5.	Estudo computacional	61
4.5.1.	Equipamentos	61
4.5.2.	Programas	61
4.5.3.	Metodologia para os cálculos	61
5.	Resultados e discussão	62
5.1.	Determinação do pKa do MANEP	62
5.2.	Reação do MANEP com água acompanhada por Uv-Vis	65
5.3.	Reação do MANEP com água acompanhada por ESI-MS e ESI-MS/MS	72
5.4.	Reação de hidrólise do MANEP sob influência de forte acidez	74
5.5.	Efeito isotópico do deutério.	77

5.5.1.	Sob influência de forte acidez	77
5.5.2.	Reação de hidrólise do MANEP em misturas de D ₂ O e H ₂ O	79
5.6.	Efeito do solvente	81
5.7.	Reações do MANEP com outros nucleófilos	84
5.7.1.	Perfil de pH da reação do MANEP com hidroxilamina	84
5.7.2.	Reação do MANEP com hidroxilamina em D ₂ O e H ₂ O	86
5.7.3.	Reação do MANEP com hidroxilamina seguida por ESI-MS	88
5.7.4.	Efeito da concentração de α -nucleófilos na reação do MANEP	89
5.7.5.	Reação do MANEP com fosfato	91
5.7.6.	Reação do MANEP com acetato e formiato	92
5.7.7.	Reação do MANEP com fluoreto de potássio (KF)	94
5.7.7.1.	Acompanhamento da reação do MANEP com KF por UV-Vis	94
5.7.7.2.	Acompanhamento da reação do MANEP com KF por ESI-MS e ESI-MS/MS	95
5.8.	Correlação de Brønsted da reação do MANEP com nucleófilos	97
5.9.	Parâmetros de ativação	100
5.10.	Cálculos <i>ab initio</i>	103
5.10.1.	Otimização da estrutura do MANEP	104
5.10.2.	Estrutura do MANEP e o efeito da solvatação	107
6.	Conclusões	110
7.	Referências	112
8.	Anexos	119

Lista de figuras

Figura 1.	Comparação da afinidade ao estado de transição e fundamental de uma enzima na velocidade de reação.	21
Figura 2.	Escala logarítmica de valores de k_{cat} e k_0 para reações representativas a 25°C. A altura de cada barra vertical representa o aumento de velocidade por: <i>ADC</i> = arginina decarboxilase; <i>ODC</i> = oritidina 5'-fosfato decarboxilase; <i>STN</i> = estafilococo-nuclease; <i>GLU</i> = b-amilase; <i>FUM</i> = fumarase; <i>MAN</i> = mandelato racemase; <i>PEP</i> = carboxipeptidase; <i>CDA</i> = colicitidina deaminase; <i>KSI</i> = cetoesteróide isomerase; <i>CMU</i> = corismato mutase; <i>CAN</i> = anidrase carbônica.	22
Figura 3.	Representação da tríade catalítica do sítio ativo da enzima serina protease, que utiliza os resíduos serina, ácido aspártico e histidina para a catálise nucleofílica.	23
Figura 4.	Diagrama de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila entre os grupos X e Y.	34
Figura 5.	Efeito da basicidade do grupo de saída sobre a velocidade de hidrólise de ânions de fosfato de acila, benzoíla e fenila a 39 °C.	36
Figura 6.	Efeito da basicidade sobre a reatividade de aminas com o diânion do fosfato de p-nitrofenila a 39 °C.	37
Figura 7.	Perfil de pH do monoetilfosfato, a 100°C.	39
Figura 8.	Algumas espécies nucleofílicas que apresentam o efeito- α em processos nucleofílicos.	41
Figura 9.	Relação entre o logaritmo da constante de velocidade e o pKa de nucleófilos para a desfosforilação do BDNPP. As constantes de velocidade e os valores de pKa foram corrigidos estatisticamente.	44
Figura 10.	Estruturas dos compostos: MANEP 1 , DANMEP 2 e TANEP 3 .	45
Figura 11.	Perfil pH de hidrólise do TANEP, a 60°C, força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ .	46
Figura 12.	Perfil cinético completo para hidrólise do DANMEP 1,0×10 ⁻⁴ mol.dm ⁻³ , força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ de KCl e a 60°C.	47
Figura 13.	Gráfico de correlação de Brønsted para a reação do DANMEP, com diferentes nucleófilos em solução aquosa a 60°C.	49
Figura 14.	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.	51
Figura 15.	Diésteres e triésteres de fosfato utilizados nos estudos de Iché-Tarrat et al.	51
Figura 16.	Variação espectral do MANEP (1,0 x 10 ⁻⁵ mol.dm ⁻³) em soluções aquosas, a pH 3,0, 6,0 e 9,5, a 60°C, força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	62
Figura 17.	Valores da absorbância a 330nm das soluções aquosas de MANEP (1,0x10 ⁻⁵ mol.dm ⁻³) em função do pH, a 60°C, força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	64
Figura 18.	Variação espectral da reação do MANEP com H ₂ O, pH 7,0, 60°C, força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ . Inserido, o perfil cinético em $\lambda = 320\text{nm}$.	66

Figura 19.	Perfil de pH para a hidrólise do MANEP ($1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³), 60°C, força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl) com soluções tamponadas em: pH < 2,0 HCl; pH 3,0-4,0 formiato; 4,0-5,5 acetato; 5,5-7,0 bis-Tris; 7,5-9,0 Tris; 9,0-10,0 borato; pH > 10,0 NaOH.	67
Figura 20.	Perfil de hidrólise do MANEP ($1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³), comparado aos seus análogos DANMEP ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.dm ⁻³) e TANEP ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.dm ⁻³), a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	70
Figura 21.	Análise ESI-MS(+) da reação de hidrólise do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ , a 25°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ de KCl.	72
Figura 22.	Espectro de ESI(+)-MS/MS para o íon protonado 9 (m/z 268) da Figura 21.	73
Figura 23.	Valores das constantes de velocidade para a hidrólise do MANEP, $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ , sob a influência de forte acidez: HCl e DCl, a 60°C.	75
Figura 24.	Efeito da concentração de DCl e HCl na hidrólise do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ , a 60°C.	78
Figura 25.	Gráfico de inventário de próton para hidrólise do MANEP ($1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³) em função da fração molar de D ₂ O, 60°C, pH 8,0 e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl)	80
Figura 26.	Constantes de velocidades para a hidrólise de 1m em função da (%) de DMSO, MeOH, DIOXANO e o valor calculado para água a 25°C.	83
Figura 27.	Perfil de pH da reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ com NH ₂ OH 0,6 mol.dm ⁻³ e 1,0 mol.dm ⁻³ , a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	85
Figura 28.	Efeito da concentração de NH ₂ OH na reação do MANEP ($1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³) em D ₂ O e H ₂ O a pH (pD) 7,0, a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl), L representa os átomos de D e H.	87
Figura 29.	Espectro de ESI(+)-MS para a reação do MANEP e NH ₂ OH.	88
Figura 30.	Efeito da concentração do α-Nü na velocidade de reação do MANEP ($1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³) com MeONH ₂ , Me ₂ NOH, NH ₂ OH e MeNHOH, em H ₂ O a pH 7,0, a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	90
Figura 31.	Efeito da concentração de fosfato a pH 7,0 e 8,0 na velocidade de reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ em H ₂ O, a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	92
Figura 32.	Efeito da concentração de acetato e formiato na velocidade de reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ , em água, a 60°C, pH 7,0 e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	93
Figura 33.	Efeito da concentração do fluoreto na velocidade de reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ em H ₂ O, a pH 7,0, 60°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	95
Figura 34.	Espectro de ESI(+)-MS para a reação do MANEP com fluoreto de potássio.	96
Figura 35.	Gráfico de Brønsted para catálise da hidrólise de 1m por nucleófilos, em solução aquosa a 60°C. Os valores experimentais são para água, fosfato mono e diânion, formiato, acetato, fluoreto, hidroxilamina e derivados metilados.	98
Figura 36.	Perfil de pH para a hidrólise do MANEP, a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl). Os dados da curva principal e o ajuste para MANEP, a curva pontilhada é o perfil de pH para a hidrólise do TANEP (a 60°C). Os círculos abertos são os dados para fosfato de 2,4-dinitrofenila a 39°C, para comparação.	99

Figura 37.	Influência da temperatura na reação de hidrólise do MANEP em H ₂ O e F ⁻ .	101
Figura 38.	Estrutura otimizada por cálculos <i>ab initio</i> em fase aquosa, para a espécie monoaniônica do MANEP (1m).	105
Figura 39.	Estrutura otimizada por cálculos <i>ab initio</i> em fase aquosa, para a espécie negatiava do MANEP (hidrogênio ligado ao oxigênio do fosfato (1 ⁻)).	106
Figura 40.	Estrutura otimizada por cálculos <i>ab initio</i> em fase aquosa, para DANOL (P).	106
Figura 41.	Geometria otimizada do diânion de fosfato de metila (a), diânion de fosfato de naftila (b) e a espécie monoaniônica do MANEP 1m (c), com 15 moléculas de água, B3LYP/6-31(d). -2297.1981424105 Hartrees.	107
Figura 42.	Detalhes da ligação de hidrogênio intramolecular da espécie monoaniônica do MANEP 1m com 15 moléculas de água.	108
Figura 43.	Estruturas calculadas usando o modelo contínuo (A) e moléculas de água discretas (B).	109

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Comparação entre a velocidade de reações enzimáticas e intermoleculares similares.	19
Tabela 2.	Valores de absorbância em 330 nm em função do pH para o MANEP.	63
Tabela 3.	Valores de k_{obs} para as cinéticas da reação de hidrólise do MANEP ($1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³) em diferentes pH, 60°C, e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ .	67
Tabela 4.	Valores de k_{obs} para a reação de hidrólise do MANEP em função das concentrações de DCl e HCl.	74
Tabela 5.	Valores de k_{obs} para a reação de hidrólise do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ em função da fração molar de D ₂ O, a 60°C, pH 8,0, e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl)	79
Tabela 6.	Valores das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação de hidrólise do MANEP, em diferentes concentrações de DMSO, DIOXANO e MeOH.	82
Tabela 7.	Valores de k_{obs} para a reação de MANEP com NH ₂ OH em diferentes pH.	84
Tabela 8.	Valores de k_{obs} para a reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ em função da concentração de NH ₂ OH em H ₂ O e D ₂ O a pH (pD) 7,0, a 60°C, e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	86
Tabela 9.	Valores de k_{obs} da reação do MANEP em função da concentração do α -Nü.	90
Tabela 10.	Constantes de velocidade de segunda ordem para a reação do MANEP com α -nucleófilos em estudo.	91
Tabela 11.	Valores das constantes de velocidade de primeira ordem para o reação do MANEP com fosfato em H ₂ O, a 60°C, e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	91
Tabela 12.	Valores k_{obs} para reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm ⁻³ com acetato e formiato em água, a 60°C, pH 7,0, e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	93
Tabela 13.	Valores das constantes de velocidade de primeira ordem para o reação do MANEP com fluoreto em H ₂ O a 60°C, e força iônica 1,0 mol.dm ⁻³ (KCl).	94
Tabela 14.	Valores das constantes de velocidade de segunda ordem para a reação do MANEP com diferentes nucleófilos.	97
Tabela 15.	Constantes de velocidade observadas para as reações do MANEP com vários nucleófilos em água e temperaturas diferentes.	100
Tabela 16.	Parâmetros de ativação para a hidrólise do MANEP com diferentes Nü.	102
Tabela 17.	Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na Figura 38.	120
Tabela 18.	Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na Figura 39.	121
Tabela 19.	Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na Figura 40.	122
Tabela 20.	Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na Figura 41.	123
Tabela 21.	Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na Figura 42.	124
Tabela 22.	Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na Figura 43.	125

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: Trifosfato de adenosina

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

DANMEP: 8- *N,N*-dimetilaminonaftil-1-metilfosfato

DANMEPNa: 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-metilfosfato de sódio

DANOL: 8- *N,N*-dimetilamino 1-naftol

DDI: Interface de dados distribuídos

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DFT: Teoria do funcional da densidade

DMHP: Dimetil-hidrogenofosfato

DMNPP: Dimetil 4-nitrofenilfosfato

DMP : Dimetilfosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNP: 2,4-dinitrofenolato

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

HD: Gás mostarda

LaCFI: Laboratório de catálise e fenômenos interfaciais

MANEP: 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato

ME: Molaridade Efetiva

MeOH: Metanol

MP: Metil fosfato

Nü: Nucleófilo

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹H: Ressonância magnética de prótons

RMN ³¹P: Ressonância magnética de fósforo

RNA: Ácido ribonucléico

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

R-VX: Russian-VX, S-2-(dietilamino)etil O-isobutil metilfosfonotioato)

TANEP: 8- N,N-dimetilaminonaftil-1-dietilfosfato

TFEA: 2,2,2-trifluoroetilamina

TLC: Cromatografia de camada delgada

TMP: Trimetilfosfato

VX: S-2-(diisopropilamino)etil o-etil metilfosfonotioato

RESUMO

O 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato (MANEP) 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 MANEP são consistentes com um mecanismo do tipo $SN_2(P)$, na faixa de $HCl > 1 \text{ mol.dm}^{-3}$. Na região de pH entre 5 e 9, o MANEP se hidrolisa numa velocidade constante, com um fator catalítico de $2,4 \times 10^5$ a 60°C . Este efeito está associado à reação da forma dianiônica do MANEP, onde o grupo dimetilamônio ($pK_{a3} = 9,31 \pm 0,05$) atua como catalisador ácido geral. Na presença de HCl entre 1 e 12 mol.dm^{-3} , há um efeito catalítico significativo, mostrando um valor de $pK_{a1} = 1,47 \pm 0,04$, a 60°C , que indica que a forma ácida do MANEP é a espécie reativa nessa região de elevada acidez. Na reação entre a hidroxilamina e o MANEP, a constante de velocidade é cerca de 3 vezes maior que a reação de hidrólise. Os cálculos para investigação da geometria do MANEP, realizados com a combinação dos modelos contínuo e discreto, mostram um monoéster altamente estável. O comprimento da ligação entre o átomo de fósforo e o oxigênio do grupo de saída 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 MANEP, e seus monoésteres simples (metil e 1-naftilfosfato) otimizadas na presença de 15 moléculas de água, foi encontrado que a ligação P—O(C) é alongada significativamente com valores de $1,702\text{\AA}$ utilizando o modelo contínuo e, $1,693\text{\AA}$ utilizando 15 moléculas de água. Estas distâncias são significativamente maiores que os valores de $1,667$ e $1,648\text{\AA}$ que foram calculados para as formas dianiônicas de 1-naftil e metil fosfato. Foi constatada a existência de um estado de transição onde a quebra da ligação do grupo abandonador é adiantada e há um pequeno grau de formação de ligação, numa configuração bipirâmide trigonal. Este resultado é consistente com os dados cinéticos, com parâmetros termodinâmicos e com cálculos *ab initio* de orbitais moleculares.

ABSTRACT

The diester 8-dimethylaminonaphthyl-1-phosphate (MANEP) 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 . MAMEP hydrolysis reactions agree with a $SN_2(P)$ mechanism, so much in $HCl > 1\text{ M}$ region. In the pH area between 5 and 9, MANEP is hydrolyzed in a rate constant, with a catalytic factor of 2.4×10^5 at $60^\circ C$. This effect is associated to the reaction of the monoanion form of MANEP, where the dimethylamonium group ($pK_{a3} = 9.31 \pm 0.06$) acts as general acid catalyst. In the presence of HCl between 1 and 12 M, there is a significant catalytic effect, showing a pK_{a1} value equals to -1.47 ± 0.12 at $60^\circ C$, that it indicates that the acid form of MANEP it is the reactive species in that high acidity area. In the reaction between hydroxylamine and MANEP, the rate constant is about 3 times larger than the hydrolysis reaction. The calculations accomplished for investigation of the geometry of MANEP were done with the combination of the continuous and discrete models showing a highly stable monoester. 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 MANEP's structures and their monoesters simple (methyl e 1-naphtyl phosphate), optimized in the presence of 15 water molecules, in both environments, the scissile P-O(C) bond is significantly lengthened 1.702 \AA in the continuum model, 1.693 \AA with discrete water molecules present; compared with 1.667 and 1.648 \AA for the 1-naphthyl and methyl phosphate dianions. 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 $NH_2\text{---}H\text{---}OP$, in a pentavalent configuration. This result agrees with the kinetic data, with thermodynamic parameters and with molecular orbital *ab initio* calculations.

1. Introdução

O fósforo é um elemento presente na composição de toda matéria viva. Os animais absorvem o fósforo a partir do alimento ingerido e as plantas o absorvem do solo na forma de íons fosfato, HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- . Nos animais, grande parte do fósforo está presente como “fosfato orgânico”, que se apresenta invariavelmente na forma de mono e diésteres, nos quais o fósforo está indiretamente ligado ao carbono através do oxigênio nas ligações P—O—C .¹

O corpo humano contém aproximadamente 1% em massa deste elemento e, embora esta quantidade de fósforo orgânico seja pequena se comparada à quantidade de outros elementos presentes, seu papel é essencial nos processos celulares. Os ésteres fosfóricos são os principais responsáveis pelo armazenamento e transmissão de informação genética (os fosfodiésteres DNA e RNA).

Os ésteres de fosfato estão entre os intermediários metabólitos mais importantes, e a chave para a síntese biológica dos mesmos está na transferência de grupos fosforila para a obtenção de energia como no caso do ATP.²

O ATP (trifosfato de adenosina) é um anidrido fosfórico rico em energia, que promove a transferência de grupos fosforila, sendo responsável pela produção de energia em sistemas biológicos.²

Derivados formados por ésteres de fosfato, principalmente os diésteres, apresentam alta resistência à hidrólise, e o desenvolvimento de sistemas capazes de promover a quebra de ligações O—P pode apresentar grande potencial para aplicações *in vivo* e *in vitro*.²

Devido à importância que as reações de quebra da ligação P—O dos ésteres fosfóricos possuem em sistemas biológicos, estudos vêm sendo vastamente orientados a compreender o seu mecanismo, envolvendo modelos e catalisadores que possam mimetizar a ação enzimática, transportando assim as características excepcionais que os sistemas vivos possuem para o desenvolvimento de nova tecnologia capaz de criar novos medicamentos e terapias para o tratamento de doenças.

Reações químicas ocorrem pela reorganização dos elétrons de valência e estes são responsáveis pela natureza da estrutura das moléculas orgânicas (ligações s, ligações p e elétrons livres). Em geral, a reatividade química pode ser

expressa por constantes de velocidade e constante de equilíbrio para reações reversíveis.

O estudo de fatores que interferem na velocidade de reações químicas tais como concentração, pH do meio, solvente, presença de catalisadores, nos trazem valiosas informações de como ocorrem tais transformações químicas.

A utilização de sistemas envolvendo nucleófilos oxigenados, nitrogenados e nucleófilos α , já contribuiu muito para o estudo da hidrólise de mono-, di- e triésteres de fosfato mostrando excelente efeito catalítico nas reações de hidrólise de ésteres de fosfato, como no caso do DNA.

Catalisadores, dentre os quais as enzimas, permitem que reações que naturalmente demorariam meses ou anos para acontecer, como por exemplo, hidrólise de ésteres de fosfato como DNA e RNA ou ainda, a decomposição de armas químicas e/ou defensivos agrícolas, aconteçam em alguns minutos ou horas.³

A grande discrepância entre reações químicas intermediadas por enzimas e as mesmas não catalisadas, despertou o interesse da comunidade científica mundial no que se refere aos fatores físicos e químicos envolvidos no processo. Apesar dos inúmeros esforços realizados até o momento, são poucos os casos onde uma enzima teve seu mecanismo de ação e poder catalítico totalmente elucidado e isto se deve à alta complexidade estrutural das enzimas, compostas por mais de uma centena de resíduos de aminoácidos.

A determinação da estrutura tridimensional das enzimas só foi possível através do avanço das técnicas de raios X, que permitiu colher informações sobre sua estrutura bem como do sítio ativo, composto geralmente por resíduos de aminoácidos presentes em partes distintas da cadeia peptídica. Conhecendo o sítio ativo de uma determinada enzima torna-se possível construir modelos que possam mimetizar a ação enzimática.

Neste sentido, estão as reações intramoleculares que são o tema central desta tese, em que os grupos reacionais estão na mesma estrutura da molécula. A premissa básica é que os princípios sob os quais fundamentam-se tais modelos estabelecem que os mesmos parâmetros físico-químicos, que governam a reatividade entre dois grupamentos funcionais em uma reação intramolecular, estão também presentes nos mesmos grupamentos, que constituem o sítio ativo da enzima. Apresentaremos a seguir uma revisão bibliográfica de temas fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

2. Revisão bibliográfica

2.1 – As enzimas e o seu alto poder catalítico

Os ésteres de fosfatos apresentam grande importância em processos biológicos. Enzimas⁴ apresentando alto desempenho, tal como as fosfatases alcalinas, realizam a hidrólise de ésteres de fosfatos fácil e rapidamente uma vez que, procedimentos químicos comuns envolvem, geralmente, condições drásticas.⁵ Alguns substratos são hidrolisados após horas sob refluxo em HCl 1 mol.dm⁻³. Por outro lado, as reações enzimáticas nas quais estão envolvidos os mesmos grupos funcionais ocorrem em segundos, **Tabela 1**.

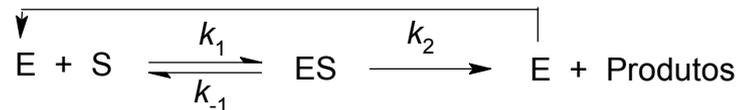
Tabela 1. Comparação entre a velocidade de reações enzimáticas e intermoleculares similares.

Enzima	Análogo não enzimático	Velocidade enzimática (V_e , s ⁻¹)	Velocidade não enzimática (V_o , s ⁻¹)	V_e / V_o
Lisozima	Hidrólises de acetais (catálise básica geral)	$5,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^8$
Quimotripsina	Hidrólise de amidas (catálise básica geral)	$4,0 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^3$
Fumarase	Hidratação de alcenos (catálise ácida geral)	$5,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^{11}$

Os dados experimentais apresentados na **Tabela 1** ilustram claramente que as reações biológicas acontecem rapidamente na presença de uma enzima, sendo que a maioria das enzimas apresenta natureza protéica, com exceção de certas moléculas de RNA que também atuam como catalisadores. Embora as enzimas estejam sujeitas às mesmas leis termodinâmicas da natureza, que governam o comportamento das outras substâncias, elas diferem dos catalisadores químicos comuns em vários aspectos importantes:

- a) as velocidades de reações catalisadas por enzimas apresentam tipicamente fatores da ordem de 10^6 a 10^{12} , ou maiores, quando comparados com as correspondentes reações não catalisadas;
- b) as reações catalisadas por enzimas normalmente ocorrem sob condições relativamente suaves: temperaturas baixas, pressão atmosférica e pH próximo a 7. Em contraste, uma catálise química frequentemente requer temperatura e pressão elevadas, como também valores de pH extremos;
- c) algumas enzimas também mostram uma especificidade singular em relação aos substratos e produtos. Uma reação enzimática raramente produz subprodutos. Por exemplo, numa síntese enzimática de proteínas nos ribossomos, polipeptídios contendo mais de 1000 resíduos de aminoácidos são sintetizados livres de subprodutos.

A reação enzimática ocorre num setor característico dentro da enzima conhecido como "sítio ativo". Dentro deste sítio, existe um centro de reconhecimento molecular ao qual o substrato (S) se liga por complexação não covalente à enzima (E), formando o complexo enzima-substrato (ES), que posteriormente reage liberando os produtos, conforme mostrado no **Esquema 1**.



Esquema 1

Por que alguém iria querer saber a velocidade de uma reação biológica na ausência de uma enzima? Em primeiro lugar, esta informação permite aos biólogos apreciar o que a seleção natural realizou na evolução de enzimas como catalisadores, bem como permitir aos químicos comparar as enzimas com catalisadores não enzimáticos produzidos no laboratório. Tal informação também pode ser de grande valor, considerando-se o estudo associado à inibição do sítio ativo da enzima com o intuito de desenvolver novas drogas para tratamento de doenças. O aumento da velocidade que uma enzima produz deve-se à sua maior afinidade com o estado de transição em comparação com sua afinidade pelo substrato no estado fundamental (**Figura 1**).^{6a-c}

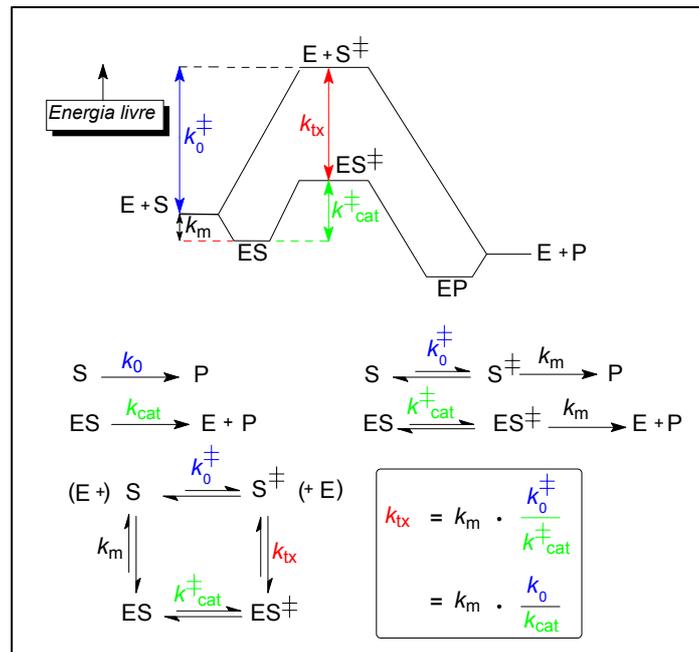


Figura 1. Comparação da afinidade ao estado de transição e fundamental de uma enzima na velocidade de reação.

Este princípio fundamental do processo de catálise enzimática forneceu uma base para o modelo dos análogos do estado de transição, que são moléculas estáveis que exploram esta afinidade especial. Foram descobertos recentemente exemplos destes análogos para enzimas de todas as classes, inclusive agentes que estão sendo usados para controlar a hipertensão, a expansão do HIV, a maturação dos insetos e o crescimento de ervas daninhas.⁷ Ao verificar a ação “instantânea” da enzima, o análogo do estado de transição também mostrou ser uma ferramenta valiosa na investigação de estruturas e mecanismos enzimáticos, como por exemplo, o de formação de ligações peptídicas no centro do ribossomo.⁸

As velocidades observadas elevadas em reações biológicas devem-se ao poder catalítico de enzimas. Observou-se em alguns trabalhos um aumento de velocidade de mais de 16 ordens de magnitude,⁹ com tempos de meia vida que variam de 5 segundos para a hidratação do CO_2 ¹⁰ até 1,1 bilhão de anos para a descarboxilação da glicina.¹¹ Os sítios ativos das enzimas evoluíram para permitir a estas mesmas reações acontecerem dentro de um tempo relativamente curto, com a maioria dos valores de k_{cat} entre 100 a 1000 s^{-1} . As enzimas diferem enormemente no aumento de velocidade (k_{cat}/k_0) que elas produzem e varia de 10^7 para 10^{19} (Figura 2).

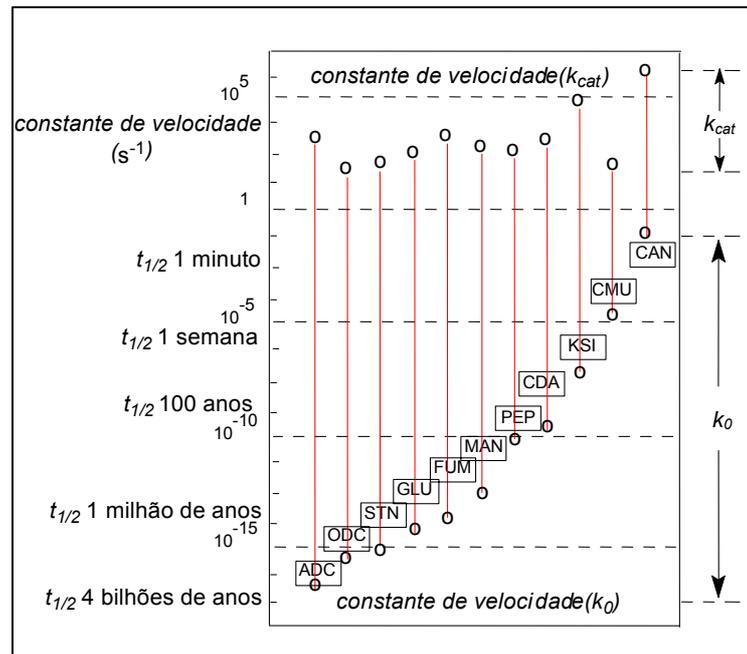


Figura 2. Escala logarítmica de valores de k_{cat} e k_0 para reações representativas a 25°C. A altura de cada barra vertical representa o aumento de velocidade por: ADC = arginina decarboxilase; ODC = oritidina 5'-fosfato decarboxilase; STN = estafilococo-nuclease; GLU = β -amilase; FUM = fumarase; MAN = mandelato racemase; PEP = carboxipeptidase; CDA = colicitidina deaminase; KSI = cetoesteróide isomerase; CMU = corismato mutase; CAN = anidrase carbônica.

Pode-se atribuir o alto poder catalítico das enzimas a três fatores que basicamente abrangem os demais. De uma forma simples, são eles:

- aproximação dos grupos reagentes:** através das interações não covalentes que a enzima estabelece com o substrato, ela consegue estabilizá-lo em uma posição onde os grupos responsáveis pela catálise, no sítio ativo da enzima, se encontram na proximidade e orientação adequadas para o ataque ao substrato. A proximidade dos grupos também é responsável pela dessolvatação, aumentando desta forma a possibilidade de ataque;
- orientação espacial:** em muitas enzimas, a exemplo da lisozima, foi observado que, quando o substrato se liga ao sítio ativo, ocorre uma mudança de conformação forçando assim a ligação do substrato a ser rompida, ou seja, a enzima leva o substrato a atingir uma conformação mais parecida com a do estado de transição, diminuindo assim a energia de ativação;

c) **efeito do meio:** sendo a enzima uma macromolécula orgânica, o sítio ativo em muitos casos pode ser considerado como sendo um meio apolar, assim, grupos reativos, como a hidroxila, sofrem um aumento enorme na sua nucleofilicidade (reatividade) ao perder a sua camada de solvatação. Além disso, a polaridade adequada fornece uma grande força motriz para a reação.

As limitações técnicas e o grande número de variáveis impostas pela complexidade das enzimas forneceram, a partir de meados do século passado, um impulso muito grande às pesquisas mecanísticas de reações-modelo que, tanto simulam a ligação no complexo enzima-substrato, como simulam as transformações químicas ocorridas no sítio ativo das enzimas. Tais modelos só puderam ser propostos e estudados a partir de informações sobre a natureza da composição do sítio ativo da enzima e citamos como exemplo de destaque a tríade catalítica que envolve a serina protease, que utiliza os resíduos serina, ácido aspártico e histidina para a catálise nucleofílica (**Figura 3**).

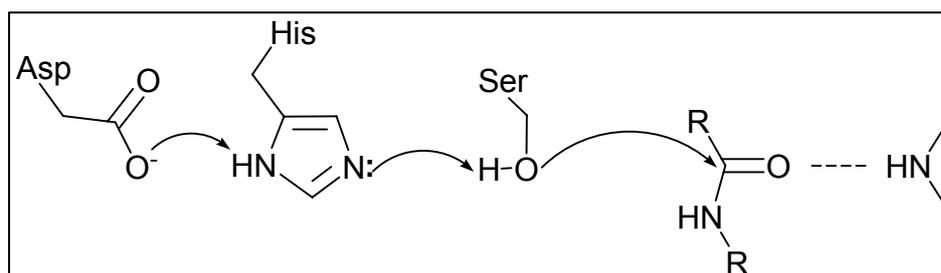


Figura 3. Representação da tríade catalítica do sítio ativo de uma enzima serina protease, que utiliza os resíduos serina, ácido aspártico e histidina para a catálise nucleofílica.

Considerando-se a necessidade do desenvolvimento de modelos de ação enzimática em reações químicas e em consonância com as linhas de pesquisa do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI), este trabalho visa dar continuidade aos estudos realizados anteriormente por um grupo de pesquisadores do LaCFI do Departamento de Química da UFSC, em reações de hidrólise de ésteres de fosfato, tanto em modelos não miméticos de catálise enzimática quanto em reatividade de nucleófilos alfa. A seguir, apresentaremos uma revisão bibliográfica sobre reações-modelo para a catálise enzimática.

2.1.1 – Reações modelos para catálise enzimática

Os modelos artificiais de diversos tipos surgiram da necessidade de se estimar quantitativamente os vários fatores responsáveis pelo aumento na velocidade observado em reações enzimáticas, em comparação com os seus análogos bimoleculares. Quanto mais semelhantes forem as características físico-químicas do modelo com as da enzima em questão, mais informações este modelo proporciona.

Assim, nunca devemos esquecer que um dos grandes desafios atuais das ciências naturais é um entendimento exato de como as enzimas trabalham. Em um certo nível podemos ‘entender’ a catálise enzimática, como uma enzima se liga ao substrato e estabiliza seletivamente o estado de transição para uma reação em particular,¹² mas nosso nível atual de entendimento falha no teste prático mais severo, que é o de projetar e elaborar modelos artificiais com eficiência catalítica que simule as enzimas naturais.¹³

Existem hoje vários tipos de modelos que tentam imitar as mais diversas características das enzimas. No presente trabalho, optou-se por dividir os modelos existentes em duas categorias: aqueles que tentam imitar e modelar o sítio ativo como um todo (modelo mimético) e aqueles nos quais uma característica específica da ação enzimática é imitada (modelo não mimético).¹⁴ Os modelos não miméticos podem ser subdivididos em duas categorias:

- i) aqueles que analisam a interação do substrato com a enzima no complexo enzima-substrato, dando origem aos estudos dos compostos de inclusão formados, essencialmente, por ciclodextrinas e éteres-coroa;
- ii) os direcionados para os princípios físico-químicos que governam as reações no sítio ativo das enzimas, abordados mais freqüentemente por reações intramoleculares. A seguir, serão discutidos aspectos referentes à esta última classe de modelos.

2.2 - Reações intramoleculares

As reações intramoleculares são modelos simples em que os grupos reacionais estão vinculados à mesma estrutura molecular. A premissa básica é que os princípios, sob os quais fundamentam-se tais modelos, estabelecem que os mesmos parâmetros físico-químicos, que governam a reatividade entre dois grupamentos funcionais em uma reação intramolecular estão também, presentes nos mesmos grupamentos que constituem o sítio ativo da enzima.

As reações intramoleculares tais como as ciclizações, especialmente as reações intramoleculares nucleofílicas, são as únicas reações simples que podem competir com a catálise enzimática com velocidade equivalente. Partindo-se deste tipo de reações, pode-se obter sistemas em que grupos estáveis de natureza biológica, tais como: amidas, glicosídeos e ésteres, que tipicamente possuem tempos de meia vida longos sob condições fisiológicas são clivados em questão de segundos ou em menor tempo.

A eficiência da catálise intramolecular é expressa em termos da Molaridade Efetiva (**ME**) do grupo catalítico.¹⁵ A **ME** é definida como a razão da constante de velocidade de primeira-ordem para a reação intramolecular e a constante de velocidade de segunda-ordem para a reação intermolecular que procede pelo mesmo mecanismo sob as mesmas condições, **Equação 1**.

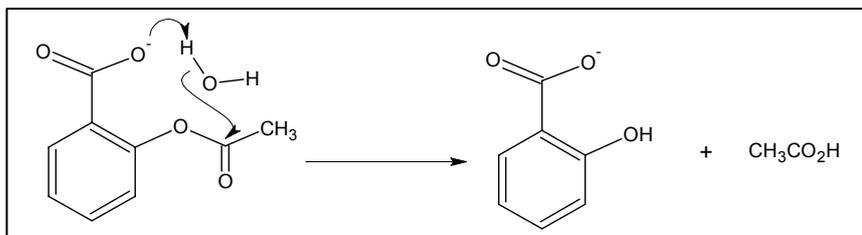
$$\mathbf{ME} = \frac{k_{\text{intramolecular}} (\text{s}^{-1})}{k_{\text{intermolecular}} (\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1})} \quad (1)$$

Como consequência de sua definição, a **ME** tem unidades de concentração ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) e é facilmente entendida como a concentração do grupo catalítico, necessária para que os processos intramolecular e intermolecular ocorram à mesma velocidade.

A **ME** pode dizer como a eficiência catalítica está relacionada com uma determinada estrutura, em sistemas projetados para manter juntos grupos funcionais intimamente próximos. Permitindo assim, comparar o modelo com uma enzima com os mesmos grupos funcionais mantidos juntos em um complexo enzima-substrato.

Um exemplo clássico da literatura é a catálise intramolecular do ácido acetilsalicílico, **Esquema 2**, onde um grupo carboxilato, através de uma reação de

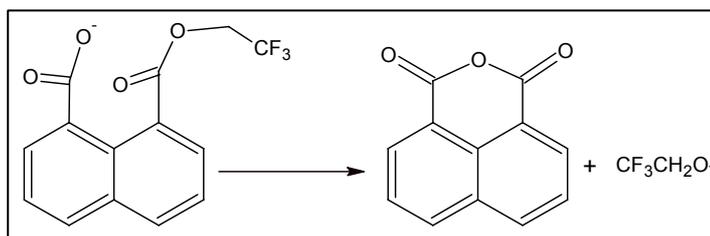
transferência de prótons, facilita o ataque de uma molécula de água via catálise básica geral, ao carbono eletrofílico, hidrolisando o éster numa velocidade 100 vezes maior que a mesma reação intermolecular catalisada. Este valor poderia passar a 5000 vezes caso o pK_a da base fosse ao redor de 7,0, ao invés de 3,7, que é o caso da aspirina.¹⁶



Esquema 2

Existem muitas teorias sobre as causas do aumento da velocidade em sistemas enzimáticos. Do estudo principalmente de reações intramoleculares de lactonização e hidrólise de ésteres e amidas como modelos para a catálise enzimática, surgiram teorias como o controle estereopopulacional, o direcionamento de orbitais, e a teoria espaço-temporal. Estas teorias reivindicam para si a primazia dos efeitos do aumento de velocidade observados em sistemas intramoleculares quando comparados às reações intermoleculares similares.

Nessa mesma linha de reações intramoleculares com participação de carboxilatos,^{17a-f} foi observado um valor para a molaridade efetiva da hidrólise do monoéster 2',2',2'-trifluoroetil do ácido 1,8-naftálico, **Esquema 3**, maior que 10^{13} vezes^{17b}.

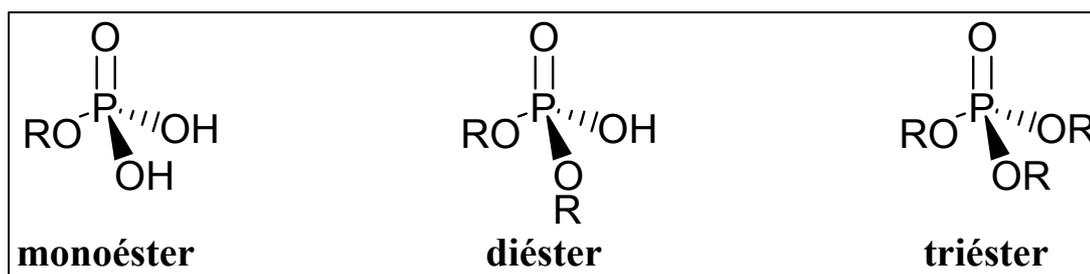


Esquema 3

Este elevado efeito catalítico é consistente com ataque nucleofílico pelo carboxilato, formando um intermediário tetraédrico que se decompõe na etapa limitante da velocidade. De fato, a complexidade das diversas reações nos leva a postular que todos os fatores mencionados nas diversas teorias devem contribuir de alguma maneira para os aumentos significativos observados nas constantes de velocidades de reações químicas.

2.3 - Ésteres fosfóricos

Os ésteres fosfóricos são extremamente numerosos e podem ser classificados de acordo com o número de grupos ésteres presentes: em mono-, di- e triésteres, de acordo com o número de grupos alquil ou aril presentes. De acordo com o número de grupos hidroxila, os mono e diésteres são ácidos dipróticos ou monopróticos, respectivamente.



Os triésteres são compostos covalentes que não têm sido identificados em processos biológicos. Os mono e diésteres contêm átomos de hidrogênio ionizáveis que podem ser substituídos por cátions metálicos ou não metálicos.

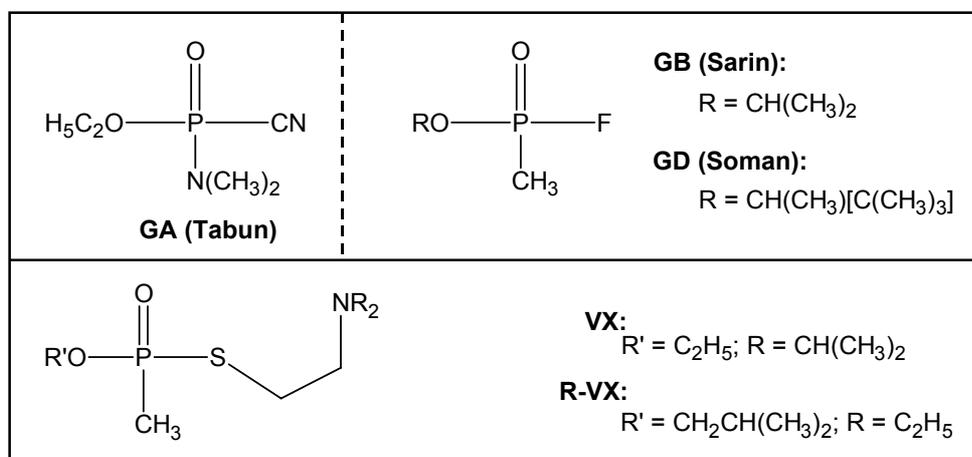
Os fosfodiésteres estão presentes em coenzimas e os anidridos utilizados como principal reserva de energia bioquímica [trifosfato de adenosina (ATP), creatina fosfato e fosfoenolpiruvato]². Estes exemplos mostram a importância dos fosfatos que, nas suas diversas formas, tornam-se fundamentais na estrutura do DNA e RNA, de alta estabilidade frente à hidrólise responsáveis pelo armazenamento e transmissão de informação genética e no armazenamento e transmissão de energia.¹⁸

Os fosfatos derivados da tirosina, serina e treonina, “monoésteres” presentes em diversos processos de sinalização e regulação da atividade biológica, são hidrolisados muito lentamente por fosfatases alcalinas na forma di-aniônica dos monoésteres, e na forma monoaniônica por fosfatases ácidas.¹⁹ Estima-se que o tempo de meia-vida é próximo a 1000 anos para quebra de ligações P—O em diânions de alquil fosfatos a 25°C.²⁰

Além da sua importância biológica, os ésteres fosfóricos apresentam muitas aplicações industriais como: plastificantes, reagentes na preparação de polímeros organofosforados, complexantes de metais pesados, inseticidas e outros compostos tóxicos, tais como gases de guerra.²¹

A utilização irresponsável de tais compostos ao longo dos anos, seja na indústria bélica ou na indústria de agrotóxicos, tem ocasionado graves problemas a sociedade. O uso abusivo de pesticidas e inseticidas faz com que estes compostos altamente tóxicos se acumulem no meio ambiente ou passem a ser ingeridos diretamente junto com os alimentos, ocasionando diversos males à saúde humana podendo levar inclusive a morte.

As pesquisas estimuladas após a 1ª Guerra Mundial, realizadas na Alemanha na década de 1930, desenvolveram agentes asfixiantes (armas químicas) que afetam o sistema nervoso (agentes nervosos) especialmente agentes nervosos tipo-G (tabun, *N,N*-dimetilfosforamidocianidato, Sarin e Somam). Agentes nervosos mais tóxicos e persistentes tipo-V (**VX** (S-2-(diisopropilamino)etil O-etil metilfosfonotioato) (USA e Inglaterra)²² ou **R-VX** (Russian-VX, S-2-(dietilamino)etil O-isobutil metilfosfonotioato))^{23,24} foram desenvolvidos na década de 1950, e estes compostos foram produzidos e estocados em grandes quantidades. A maioria destes agentes nervosos são derivados de ésteres fosfóricos, tendo estrutura similar àquelas dos compostos utilizados como inseticidas e pesticidas.²⁵



Estes compostos organofosforados inibem a ação de diversas enzimas, principalmente a acetilcolinesterase, enzima que controla a hidrólise da acetilcolina, um importante neurotransmissor, assim, na ausência da acetilcolinesterase, a acetilcolina liberada acumula e ativa continuamente a transmissão dos impulsos nervosos, provocando um colapso no sistema nervoso central, com perda da coordenação muscular, convulsões, podendo levar à morte em segundos.²⁶

De acordo com a história, o uso de armas químicas em conflitos é tão antigo quanto à humanidade: em 2000 a.C., na Índia, eram utilizadas cortinas de fumaça

que liberavam vapores tóxicos contra os inimigos; entre 431 e 404 a.C., na Guerra do Peloponeso, Esparta usou madeira impregnada de enxofre e piche que liberava vapores sufocantes e os gregos já usavam flechas envenenadas em suas guerras há mais de 2 mil anos.

Mas foi na primeira Guerra Mundial que as armas químicas foram usadas em larga escala. O cientista alemão Fritz Harber, ganhador do Prêmio Nobel de Química por suas pesquisas sobre a síntese da amônia, propôs, em 1915, o uso de gás cloro contra os inimigos. Sua idéia foi posta em prática na Batalha de Ypres, na Bélgica. Ainda na primeira Guerra Mundial, a Alemanha, em 1915, lançou HD (gás mostarda) sobre as tropas aliadas na cidade de Ypres,²⁶ (gás mostarda, queima e causa bolhas na pele), em 15 minutos, cinco mil pessoas morreram. Estima-se que nessa guerra houve mais de 100 mil mortos vítimas de armas químicas.

Em Tóquio, em 1995, a seita japonesa radical “Verdade Suprema” realizou ataque terrorista usando gás Sarin no metrô levando à morte 12 pessoas.

Um grupo de terroristas chechenos ataca o teatro Dubrovka, em Moscou (Rússia), em outubro de 2002, e faz cerca de 700 reféns. Na tentativa de resgate, as forças especiais lançaram um gás marrom (de uso secreto pelo exército russo), onde morreram 129 reféns (8 estrangeiros), a grande maioria por inalação. Naquela oportunidade, 41 terroristas foram mortos.

No ano de 1993, em Paris (França), 170 países assinaram a *Convenção Internacional Mundial sobre a Proibição do Desenvolvimento, Produção, Estocagem e Uso de Armas Químicas* (CPAQ). Este tratado entrou em vigor no dia 29 de abril de 1997, estabelecendo um prazo de 10 anos para que os países detentores de tais armas procedessem a sua destruição, fazendo crescer nesta última década o interesse na química destes compostos e em sua detoxificação.

Após essa convenção muitos países deram importância à busca de soluções adequadas para a destruição desses agentes nervosos derivados de ésteres fosfóricos. Portanto, estudos vêm sendo orientados à compreensão do seu mecanismo de degradação a partir do uso de modelos e catalisadores que possam mimetizar esses agentes nervosos, transformando-os em produtos inócuos aos seres vivos.

2.4. Reações de substituição nucleofílica em ésteres fosfóricos

Nesta seção, estaremos abordando os diversos caminhos de reação pelos quais os ésteres fosfóricos podem sofrer substituição nucleofílica (reações de hidrólise e transferência do grupo fosforila), e o que se entende por *efeito α* .

2.4.1. Reatividade e mecanismos

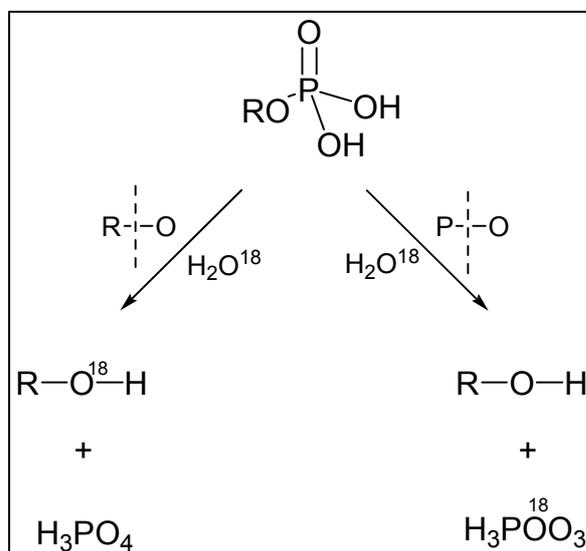
As ligações encontradas nos fosfodiésteres podem ser incrivelmente estáveis. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a hidrólise de certos ésteres fosfóricos, de longe, excede o tempo de vida alcançado por um ser humano. Assim, por exemplo, o $t_{1/2}$ para a reação de hidrólise espontânea do difenilfosfato é de 180 anos a 100°C.²⁷ Tal estabilidade é coerente, por exemplo, com o papel fundamental do DNA na preservação da informação genética. A sua hidrólise espontânea, em solução neutra, é tão lenta que a constante de velocidade para este processo é desconhecida.²⁸

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 todo o grupo fosfato substituído pelo nucleófilo. 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.

O mecanismo de quebra da ligação alquil-oxigênio é o caminho principal somente em pH abaixo de 1,5, onde o grupo de saída é o ácido fosfórico neutro. 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, ocorre via processo de ionização S_N1 .

Em pH menor que 1,5, alquilfosfatos primários e secundários são hidrolisados via dois mecanismos competitivos, por S_N2 com clivagem da ligação alquil-oxigênio ou por quebra da ligação P—O.²⁹ 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.³⁰ As reações enzimáticas se processam, principalmente, via clivagem da ligação P—O do éster fosfórico.³¹

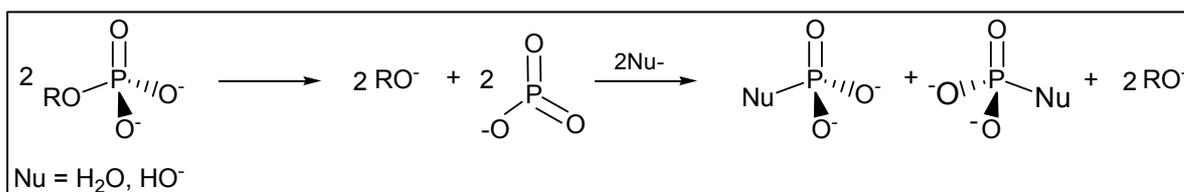
Em princípio, os dois mecanismos podem ser facilmente distinguidos realizando-se a hidrólise em água marcada com oxigênio isotópico (H_2O^{18}) (**Esquema 4**), mas na prática estas análises requerem equipamentos sofisticado.



Esquema 4

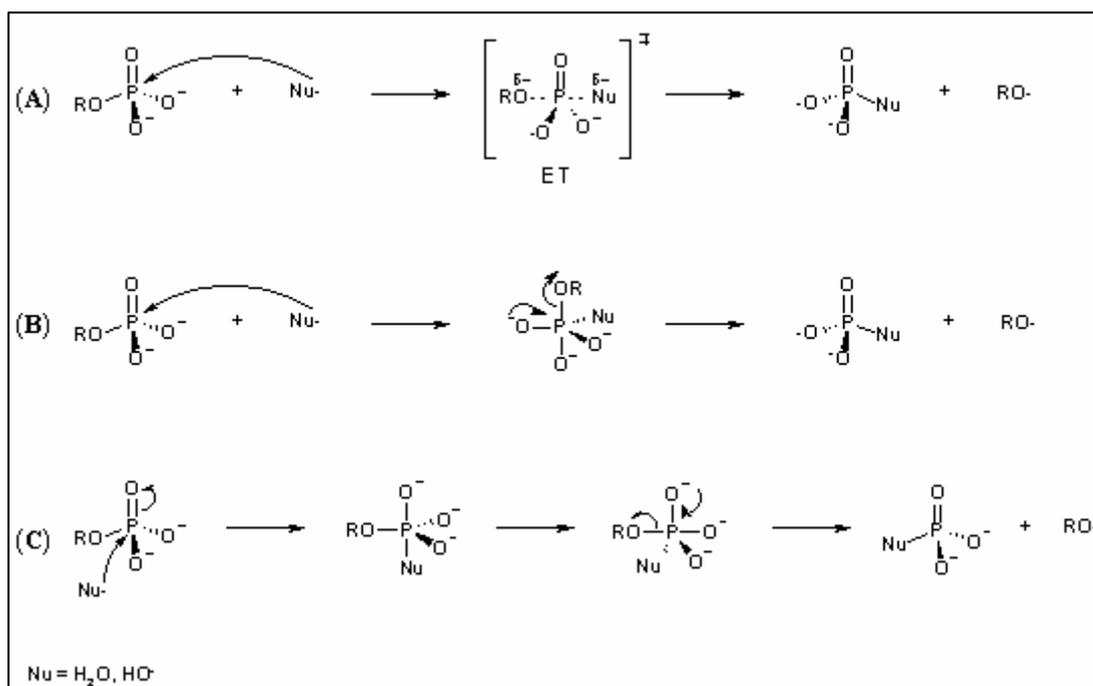
As reações de substituição em ésteres fosfóricos com quebra da ligação P-O têm sido por muito tempo consideradas mecanisticamente análogas àquelas envolvendo substituição no carbono tetraédrico, do tipo $\text{S}_{\text{N}}1$ ou $\text{S}_{\text{N}}2$.³⁰ Estes mecanismos têm sido descritos na literatura^{2,30,32} como pertencentes a duas classes: dissociativo e associativo.

O mecanismo dissociativo procede à liberação do ânion hidratado PO_3^- (metafosfato), sendo análogo ao processo $\text{S}_{\text{N}}1$ na química do carbono. O metafosfato gerado é uma espécie trigonal, e pode reagir com um nucleófilo produzindo um produto racêmico (**Esquema 5**).



Esquema 5

Os mecanismos associativos de adição-eliminação, denominados $S_N2(P)$, são análogos ao mecanismo S_N2 para substituição no átomo de carbono. A espécie formada no ataque do nucleófilo sobre o fósforo tetraédrico é pentacoordenada com geometria do tipo bipirâmide trigonal (TBP), sendo esta espécie um intermediário ou um estado de transição. Os mecanismos associativos podem ser representados como segue (**Esquema 6**):



Esquema 6

A reação (A), no **Esquema 6**, corresponde a 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. No caso (B) observa-se também um processo associativo em linha, mas levando a um intermediário pentacoordenado estável, e à inversão de configuração. Na reação (C) trata-se de um mecanismo que leva à retenção de configuração via um processo associativo adjacente, pelo qual o intermediário pentacoordenado sofre uma pseudo-rotação, via um intermediário tipo pirâmide quadrada, que permite que o grupo de saída fique na posição apical.

É importante lembrar que a posição apical de um fósforo 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 o resultado da interação do nucleófilo com uma determinada face do fósforo tetraédrico no estado fundamental, para propiciar um impedimento estérico reduzido dos grupos vizinhos; (ii) as ligações apicais possuem comprimentos maiores e são mais fracas que as equatoriais.³⁴

Os mecanismos de hidrólise de ésteres fosfóricos são bastante complicados devido ao possível envolvimento de diversas espécies. O substrato corresponde normalmente a uma mistura de ésteres fosfóricos neutros, monoânion e/ou diânion (dependendo do pH), e o ataque nucleofílico pode acontecer pela H_2O ou pelo HO^- .

A determinação experimental dos mecanismos de reações de substituição nucleofílica em ésteres fosfóricos é bastante difícil. Em alguns casos, pode-se usar informações sobre a estereoquímica dos reagentes e produtos para determinar se o mecanismo procede via caminhos mecanísticos associativos ou dissociativos, entretanto, como o intermediário pentacoordenado nos mecanismos associativos pode sofrer uma pseudo-rotação levando ao produto racêmico,³⁴ o mecanismo associativo não pode ser excluído unicamente com base na racemização observada, que é característica dos mecanismos dissociativos. Paralelamente aos métodos estereoquímicos, os mecanismos dessas 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 fornecem informações adicionais.

Um método bastante útil de visualizar a reação entre os mecanismos dissociativo, associativo, e concertado é a utilização do diagrama de coordenada de reação (**Figura 4**). Neste tipo de representação bidimensional da reação, os eixos X superior e inferior correspondem a quebra da ligação P—Y do reagente e do intermediário trigonal bipiramidal, respectivamente. Os eixos Y representam a formação da ligação P—X pela reação do nucleófilo X com o reagente tetraédrico ou com o intermediário metafosfato. A linha pontilhada corresponde ao mecanismo concertado, onde a entrada do nucleófilo é sincrônica com a saída do grupo nucleófugo.

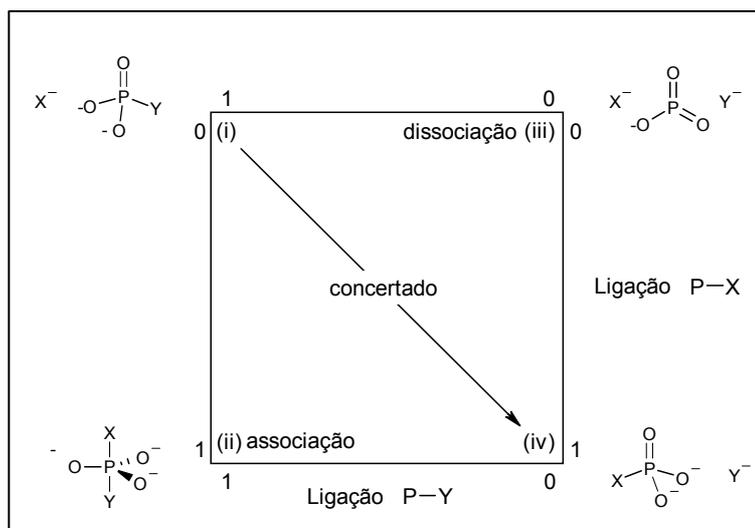
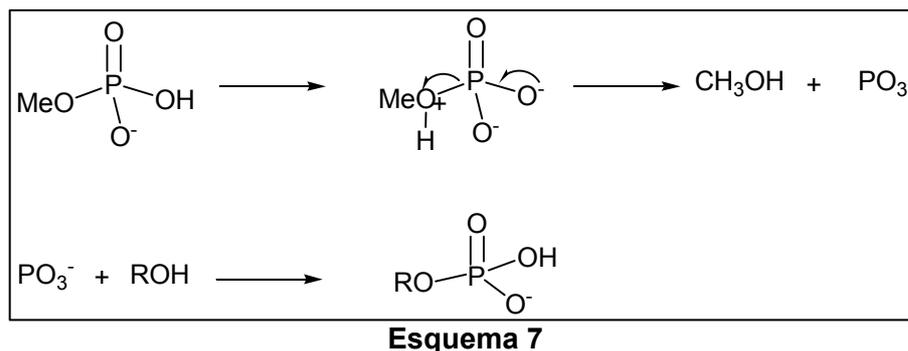


Figura 4 - Diagrama de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila entre os grupos X e Y.

Na **Figura 4** estão representados todos os tipos de mecanismos envolvendo diferentes coordenadas de reação. Por exemplo, em uma das arestas do diagrama, **Figura 4**, está o fósforo pentacoordenado (ii), cuja existência tem sido demonstrada experimentalmente.³⁵ Reações concertadas afastam-se desta aresta, mas muitas reações de substituição em mais de uma etapa envolvem essas espécies como intermediários.

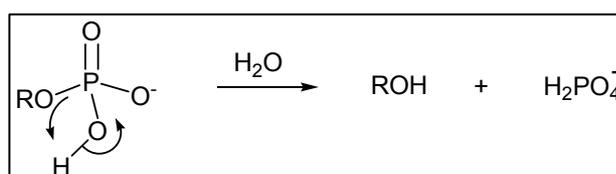
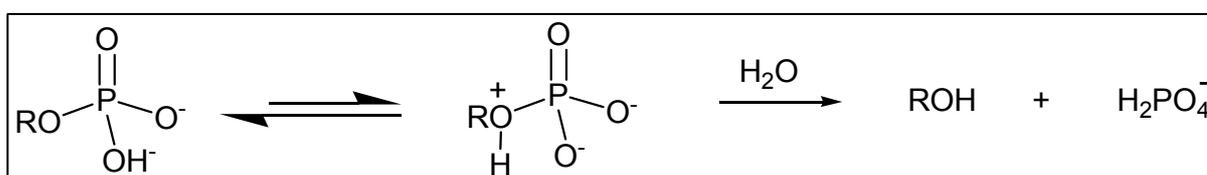
A aresta diagonalmente oposta ao fósforo pentacoordenado é ocupada por uma espécie trigonal do fósforo (iii), que é ou o metafosfato monomérico (no caso da reação de um monoéster) ou um derivado substituído. Contudo, não tem sido demonstrado experimentalmente, o envolvimento de tal espécie em um processo de substituição de mais de uma etapa em solução aquosa. A seguir, discutiremos estes mecanismos, suas variantes e os fatos que fundamentam cada uma delas.

O mecanismo dissociativo para a hidrólise de monoésteres foi proposto por Bunton³⁶ e Westheimer³⁷ para explicar o aumento na reatividade do monoânion, **Esquema 7**. Neste tipo de mecanismo há transferência de próton do ácido monoprótico para o oxigênio do grupo de saída, o que favorece a quebra da ligação O—P.



Um mecanismo S_N2 concertado envolvendo um estado de transição contendo o nucleófilo e o grupo de saída coordenados a uma espécie tipo metafosfato, foi proposto por Bruice e Benkovic em 1966.²⁹

De fato, há divergências em relação ao mecanismo da reação envolvendo o monoânion de ésteres fosfóricos que sugerem que a reação procede por mecanismo dissociativo, com o próton bastante ou completamente deslocado do grupo fosforila para o grupo de saída no estado de transição, como mostrado nos **Esquemas 8** ou **9**.^{38,39}



Esta reação têm uma pequena entropia de ativação e inversão de configuração no fósforo. O valor de β_{lg} é de -0,27, refletindo a transferência do próton para o grupo de saída no estado de transição da etapa determinante. As evidências experimentais, de acordo com Kirby e Varvoglis, são consistentes com um mecanismo no qual o deslocamento do próton poderia ocorrer em uma etapa de pré-equilíbrio, como mostrado no **Esquema 8**, ou através de uma transferência de próton concertada com a partida do grupo de saída, como no **Esquema 9**. Eles concluíram que quando a basicidade do grupo de saída cai abaixo do fenol, a

transferência do próton participa da etapa determinante e ocorre simultaneamente com a partida do grupo de saída.³⁹

A hidrólise de acilfosfatos envolve entropias e volumes de ativação com valores próximo de zero. Ainda, fosfato de acila, fosfato de benzoila e fosfato de fenila na forma de diânions sofrem reações de hidrólise em água com determinados nucleófilos, com uma grande dependência em relação ao pK_a do grupo de saída, e com um β_{lg} de -1,2 (coeficiente de Brønsted em relação ao “grupo de saída” (**Figura 5**). Nas reações de aminólise de fosfato de *p*-NO₂-fenila, observou-se uma pequena dependência em relação ao pK_a do nucleófilo com um β_{nu} de 0,2 (**Figura 6**). Este conjunto de resultados experimental foi interpretado por Jencks e colaboradores como sendo consistentes com um mecanismo S_N1 envolvendo a geração de uma metafosfato livre como intermediário.^{40, 41, 42}

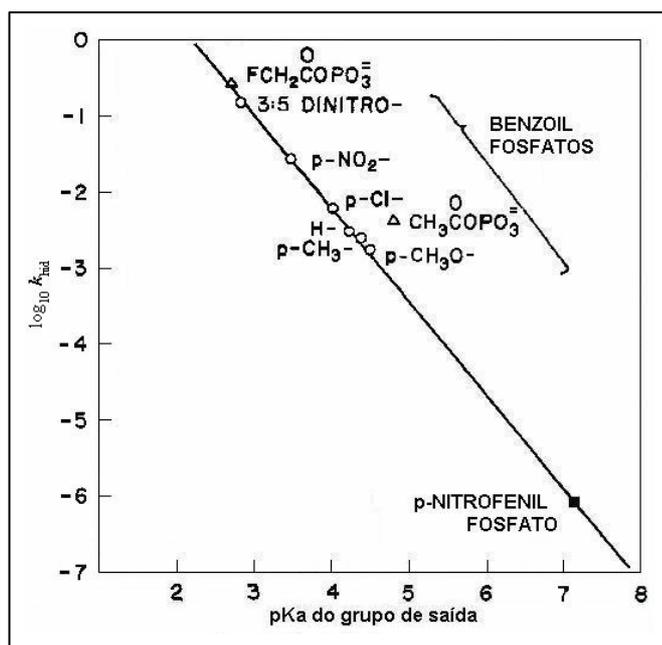


Figura 5 - Efeito da basicidade do grupo de saída sobre a velocidade de hidrólise de ânions de fosfato de acila, benzoíla e fenila a 39 °C.

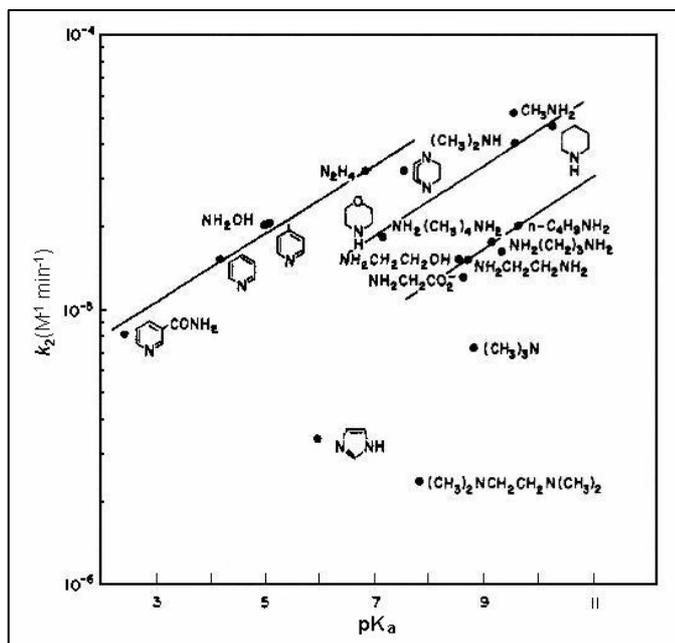
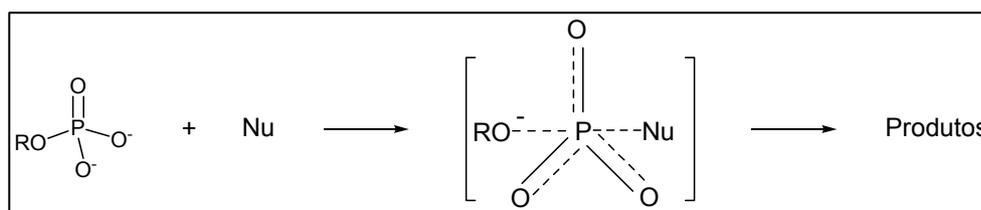


Figura 6 – Efeito da basicidade sobre a reatividade de aminas com o diânion do fosfato de *p*-nitrofenila a 39 °C.

Herschlag e Jencks⁴³ mostraram em 1986 que os dados citados inicialmente, como evidências do mecanismo S_N1, podiam ser reinterpretados para sugerir a existência de uma estrutura de estado de transição S_N2, como proposto por Bruice e Benkovic em 1966.

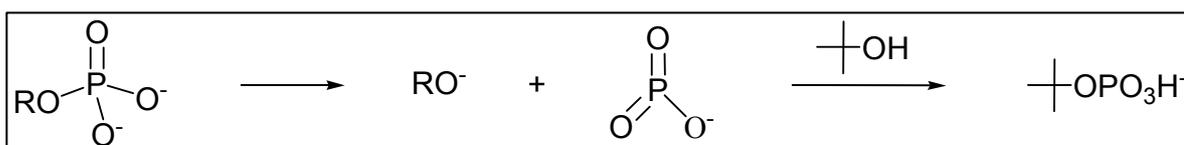
Tais estudos de reações de hidrólise de monoésteres fosfóricos demonstram que esses compostos reagem como monoânions ou diânions por mecanismos exibindo estados de transição com uma pequena quantidade de formação de ligação do nucleófilo e uma grande quantidade de clivagem da ligação do grupo de saída. A reação do diânion pode ser representada como uma reação concertada S_N2(P), como mostrada no **Esquema 10**.



Esquema 10

Este mecanismo tipo S_N2(P) é evidenciado por uma pequena entropia de ativação, um grande valor de β_{lg} e um pequeno valor de β_{nu}, e a ocorrência de inversão de configuração do fósforo quando o grupo fosforila é quiral.³⁸

É importante destacar que a ocorrência de inversão de configuração mostra que não há metafosfato livre como intermediário nas reações de solvólise com solventes próticos, entretanto, Knowles *et al.* mostraram que quando um grupo fosforila quiral é transferido do fosfato de *p*-nitrofenila em álcool *terc*-butílico, o produto fosfato de *terc*-butila é completamente racêmico.³⁸ Assim, sob estas condições, um metafosfato intermediário viável é gerado em um mecanismo (S_N1) de duas etapas como mostrado no **Esquema 11**.



Esquema 11

Apesar de haver evidências para suportar cada um dos mecanismos descritos acima.^{18,23,44,45} Ainda não há consenso em relação aos verdadeiros mecanismos. O ponto de vista dominante atual com relação às reações de hidrólise e transferência do grupo fosforila dos ésteres fosfóricos em solução, considera que os diésteres e triésteres seguem um caminho associativo, enquanto os monoésteres seguem um mecanismo com características de dissociativo, não necessariamente significando que o metafosfato livre seja formado como intermediário, mas que o ET da etapa determinante envolve principalmente a quebra da ligação do grupo de saída com pequena formação da ligação com o nucleófilo.⁴⁶ Em termos do diagrama da coordenada de reação (**Figura 4**), este mecanismo envolve caminhos de reação que se aproximam da aresta ocupada pelo intermediário metafosfato, mas não o alcança. No caso de diésteres de fosfato ativados, caso de fosfato de nitrofenila, o diânion torna-se também reativo, podendo ser ainda mais reativo que o monoânion, como no caso do fosfato de 2,4-dinitrofenila.⁴⁷

Embora muitas evidências experimentais sejam consistentes com esses mecanismos,^{30,32,35} muitas interpretações podem ser feitas sobre os possíveis mecanismos de substituição nucleofílica que tais ésteres podem sofrer. Dentre os fatores mais importantes a serem considerados no estudo mecanístico das reações de hidrólise dos ésteres de fosfato, podemos citar o pH do meio, o efeito do solvente, e as características do grupo de saída.

Os pioneiros no estudo da variação da velocidade de hidrólise de monoésteres do ácido fosfórico, com relação à acidez do meio, foram Bailly e

Desjobert.⁴⁸ Eles observaram que a velocidade de hidrólise do monofosfato etila tem um máximo entre pH 4 e 5, correspondendo a concentração máxima do monoânion em solução.

A velocidade diminui muito em soluções alcalinas, passando também por um mínimo em meio ácido (pH~1), tornando a aumentar a valores de pH mais baixos, como mostrado na **figura 7**.³⁰

Wolfenden⁴⁹ mostrou que a hidrólise da forma monoaniônica do metilfosfato ocorre com 99% de quebra da ligação P—O, e a curva de distribuição de espécies é semelhante ao perfil de constante de velocidade em função do pH, mostrado na **Figura 7**.

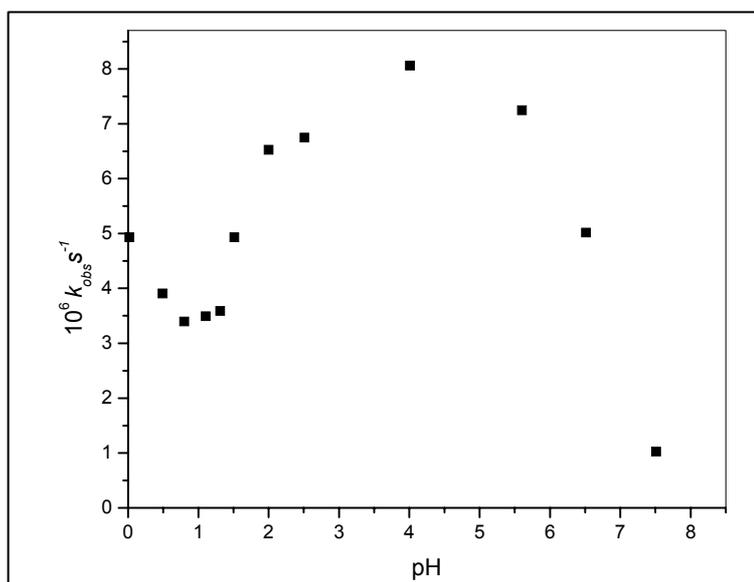
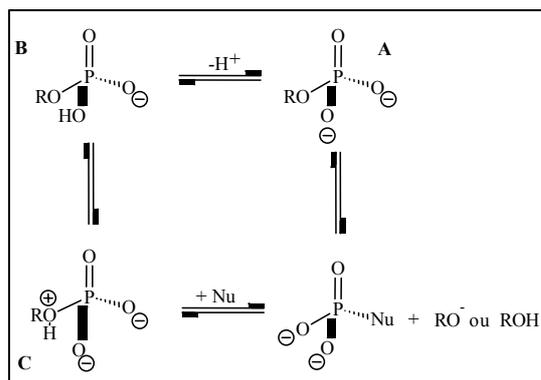


Figura 7 – Perfil de pH do monofosfato de etila a 100°C.³⁰

A maior reatividade do monoânion, provavelmente está relacionada com a alta capacidade de doação dos pares de elétrons π do átomo de oxigênio carregado negativamente, agindo conjuntamente com uma catálise ácida intramolecular.

O efeito diretor destes pares de elétrons conduz à saída do grupo RO^- no caso do diânion **A** e do grupo ROH no caso da reação da forma zwitteriônica **C** do monoânion, **Esquema 12**.



Esquema 12

Os oxianions **A** e **B** são estabilizados em meio aquoso por ligações de hidrogênio, diminuindo sua reatividade e a velocidade da reação. Por outro lado, em meio aprótico, no qual as ligações de hidrogênio não são possíveis, a quebra das ligações P-O é acelerada.⁵⁰

Em 1998, Florián e Warshe³² estudaram a hidrólise não enzimática do monofosfato de metila (neutro, monoânion e diânion) com ataque nucleofílico pela H₂O ou HO⁻ ao fósforo central, usando cálculos *ab initio*, e demonstraram que a hidrólise do monofosfato de metila neutro procede via mecanismo associativo. Para a hidrólise do monofosfato de metila mono e dianiônico, os caminhos de reações associativos e dissociativos demonstraram ter barreiras de ativação similares. A partir destes resultados, concluíram que o sítio ativo de uma enzima poderia selecionar entre esses mecanismos, dependendo particularmente do ambiente eletrostático.³²

2.5. Efeito α na hidrólise de fosfato

Efeito α é o aumento da reatividade de nucleófilos que têm pares de elétrons não compartilhados sobre o átomo adjacente ao centro nucleofílico, quando comparados a um nucleófilo normal (nucleófilo que não possui o *efeito* α) de mesma basicidade. A explicação deste tipo especial de efeito tem sido um contínuo desafio para os pesquisadores desde que este fenômeno foi trazido à luz por Edwards e Pearson.⁵¹

Dentre as espécies que exibem esta reatividade inusitada, estão incluídas hidroxilaminas, hidrazinas, ânions do hipocloreto, ácidos hidroxâmicos, oximas, hidroperóxidos, nitritos e sulfitos, **Figura 8**.

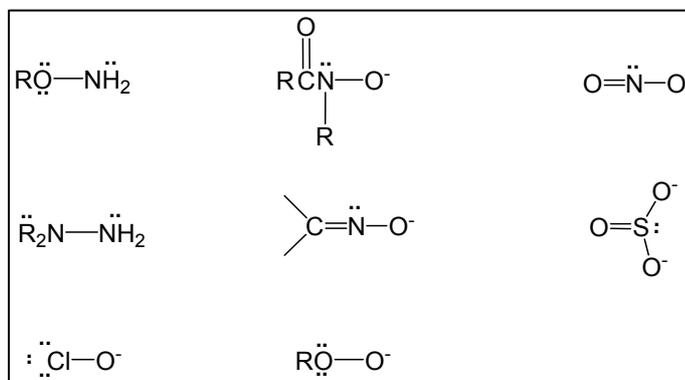
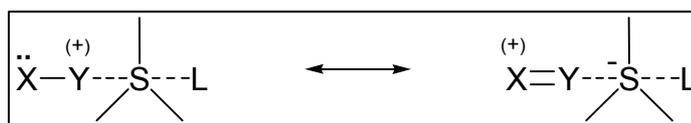


Figura 8. Algumas espécies nucleofílicas que apresentam o *efeito* α em processos nucleofílicos.

Há diferentes fatores que podem influenciar a reatividade nucleofílica e que são importantes no efeito α . De fato, é provável que o átomo eletronegativo que está na posição α com o seu par de elétrons livres, contribui diretamente para o aumento da nucleofilicidade de alguns, se não de todos esses nucleófilos.

A explicação proposta mais frequentemente para efeito α é a de que os pares de elétrons sobre os átomos na posição α aumentam a nucleofilicidade pelo aumento da densidade eletrônica efetiva no centro de reação. Ainda, pode-se argumentar que a remoção parcial dos elétrons de Y no nucleófilo X-Y (**Esquema 13**) por doação ao substrato S no caminho ao estado de transição cria uma deficiência eletrônica sobre Y e esta deficiência eletrônica pode ser estabilizada pela doação eletrônica de X; o resultado será um aumento na densidade eletrônica efetiva no substrato e, conseqüentemente, na nucleofilicidade de X-Y.⁵²



Esquema 13

Buncel e colaboradores⁵³ têm abordado diferentes fatores que influenciam a reatividade de α -nucleófilos em comparação com nucleófilos normais. Estes estudos têm mostrado um efeito do solvente inusitado. Em misturas DMSO-H₂O, o efeito α

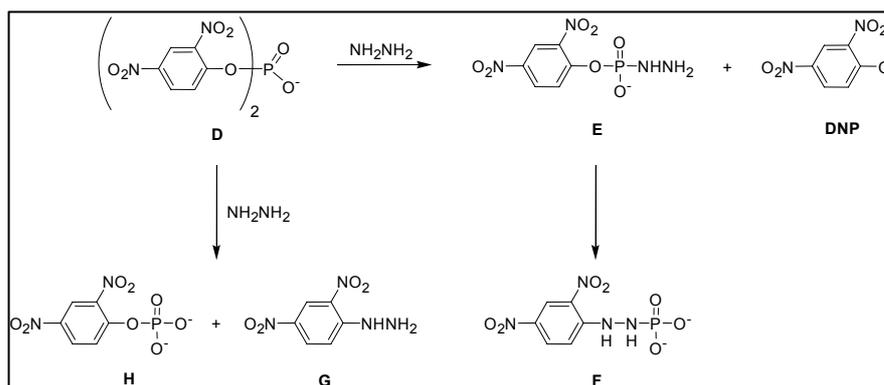
$(k^{\alpha\text{-Nu}}/k^{\text{n-Nu}})$ para a reação do acetato de *p*-nitrofenila com oximato como α -nucleófilo e arilóxido como o nucleófilo normal, exibe um máximo em cerca de 50 % mol de DMSO.⁵⁴ Também encontrou um perfil de sino similar em um gráfico do efeito α para a reação do fosfinato de difenila de *p*-nitrofenila, em função da composição do solvente DMSO - H₂O. Bunce tem atribuído à diferença na dessolvatação do estado fundamental para o α -nucleófilo e o nucleófilo normal, o papel principal no aumento do efeito em um meio rico em água (ca. 50 % mol DMSO).⁵⁵

Um resultado contrário foi reportado com *o*-iodosobenzoato como α -nucleófilo e *p*-clorofenóxido como o nucleófilo normal, na reação com acetato de *p*-nitrofenila, onde nenhum máximo no perfil do *efeito* α versus DMSO-H₂O foi encontrado. Na verdade, o efeito α decresce constantemente à medida que o meio fica mais rico no cossolvente.⁵⁶

Claramente, mais estudos precisam ser realizados e um fator simples tal como a dessolvatação do estado fundamental não é por si só suficiente para explicar a origem do efeito α .

Em trabalhos recentes Domingos estudou e propôs um mecanismo de reação do *bis*-(2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) com nucleófilos alfa, como hidroxilamina e seus derivados *N* e *O*-metilados, hidrazina e peróxido de hidrogênio.⁵⁷

O **Esquema 14** mostra o mecanismo proposto para a reação do *bis*-(2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) com hidrazina.

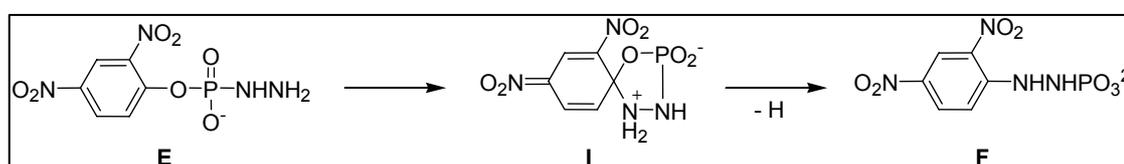


Esquema 14

No início da reação, há um ataque nucleofílico no anel aromático que resulta na formação de 2,4-dinitrofenilhidrazina (**G**), bem como do monoéster **H**. Quando a reação é realizada em escala um pouco maior, adequada para RMN, observou-se que durante a reação do BDNPP com a hidrazina, ocorreu a precipitação de um

composto avermelhado que por análise de $^1\text{H-RMN}$ mostrou ser o composto **G**. Quando a hidrazina ataca no P, o **DNP** é formado. Entretanto, observou-se por $^{31}\text{P-RMN}$ o aparecimento concomitante de uma espécie transiente **E** que rapidamente desaparece. Os dados foram confirmados por **ESI-MS**, que permite detetar os intermediários em solução.

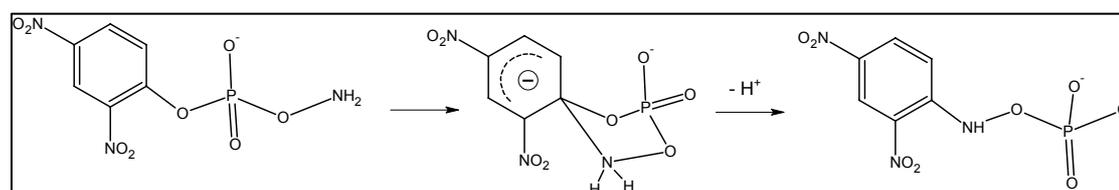
O composto **F** se forma através de um rearranjo, semelhante ao de Smiles, do composto **E**. Inicialmente acontece o ataque do grupo NH_2 terminal do composto **E** sobre o carbono aromático, formando um intermediário cíclico que se decompõe para formar **F**, **Esquema 15**.⁵⁷



Esquema 15

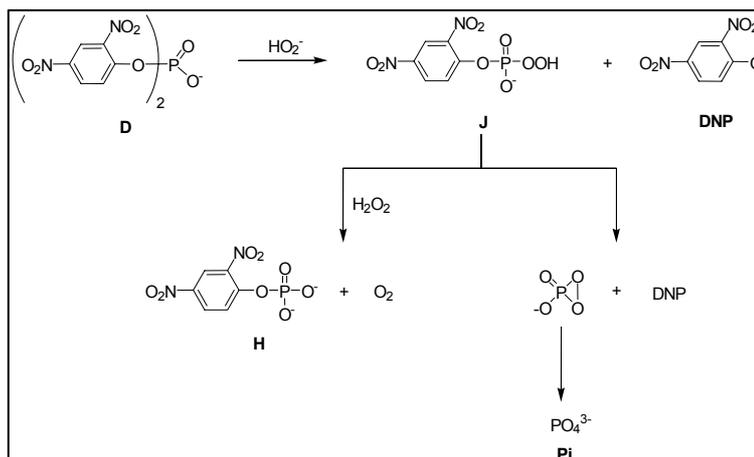
Para a reação do BDNPP com Hidroxilamina, **Esquema 16**, e peróxido de hidrogênio, **Esquema 17**, foi proposto um esquema de reação similar.

No estudo da reação do BDNPP com Hidroxilamina foi dada ênfase na elucidação do sítio nucleofílico para o ataque ao átomo de fósforo do BDNPP e, 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 $\text{RMN } ^{31}\text{P}$ e **ESI-MS**.



Esquema 16

Para a reação do HO_2^- com o BDNPP inicialmente forma o intermediário **J**. Numa segunda etapa, a decomposição de **J** pode acontecer através da reação com H_2O_2 que resulta na formação de DNPP, **H**, ou através da clivagem intramolecular, que gera um segundo equivalente de íon DNP (**Esquema 17**).⁵⁷



As reações do BDNPP com diferentes nucleófilos alfa ocorrem para formar produtos de hidrólise, mostrando uma reatividade muito superior daquela observada para nucleófilos normais (**Figura 9**). Em linhas gerais, observa-se que nucleófilos alfa como hidroxilamina, atacam preferencialmente o átomo de P através do oxigênio. Ataque via N pode acontecer no P ou no anel aromático. Comparativamente, examinando os resultados obtidos para ataque no P por esses nucleófilos alfa, mostra que o ataque pelo O é mais eficiente que o ataque pelo N.

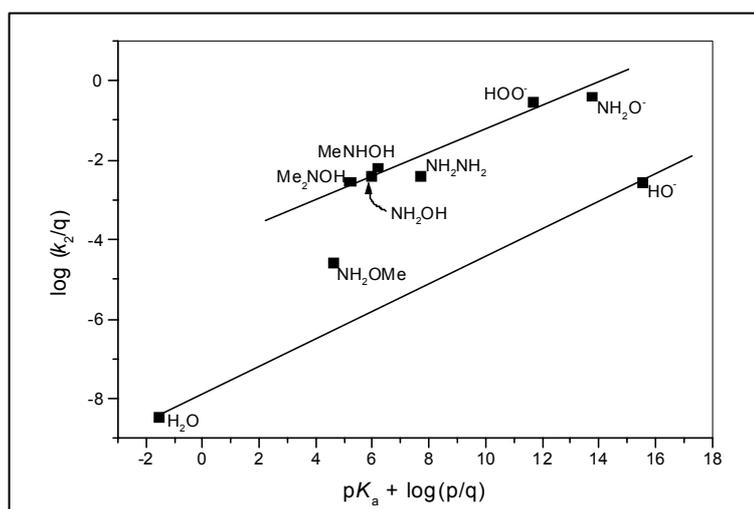
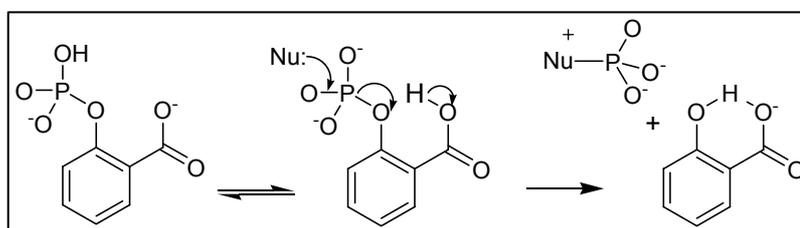


Figura 9. Relação entre o logaritmo da constante de velocidade e o pK_a de nucleófilos para a desfosforilação do BDNPP. As constantes de velocidade e valores de pK_a são corrigidos estatisticamente.

2.6. Catálise em reações intramoleculares

São inúmeras as possibilidades de se empregar moléculas-modelo no estudo de determinados sítios catalíticos enzimáticos, dentre eles podemos destacar o salicil fosfato, que em reações de transferência de grupo fosforila, mostra uma eficiente catálise ácida geral intramolecular ao ataque de água e de aminas nucleofílicas neutras ao átomo de fósforo. Porém, a reação com o salicilfosfato é limitada com nucleófilos de amínicos, porque a pH menor que 4, reações com oxiânions como o acetato não são detectadas, **Esquema 18**.



Esquema 18

Outros modelos importantes são: o monoéster 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato (1), MANEP (composto em estudo neste trabalho), diéster 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-etilfosfato (2) DANMEP e o triéster 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-dietilfosfato (3), TANEP, **Figura 10**.

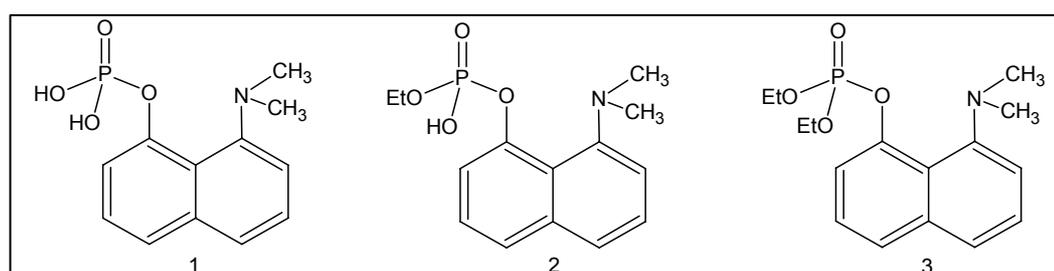


Figura 10. Estruturas dos compostos: MANEP (1), DANMEP (2) e TANEP (3).

No caso do 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-dietilfosfato, TANEP⁵⁸, observa-se que a constante de velocidade de hidrólise é constante na região de pH entre 0 e 4,6, **Figura 11**, consistente com uma aceleração na constante de velocidade da ordem de 10^6 vezes, quando comparada a estrutura sem o grupo catalisador ácido geral dimetilamônio.

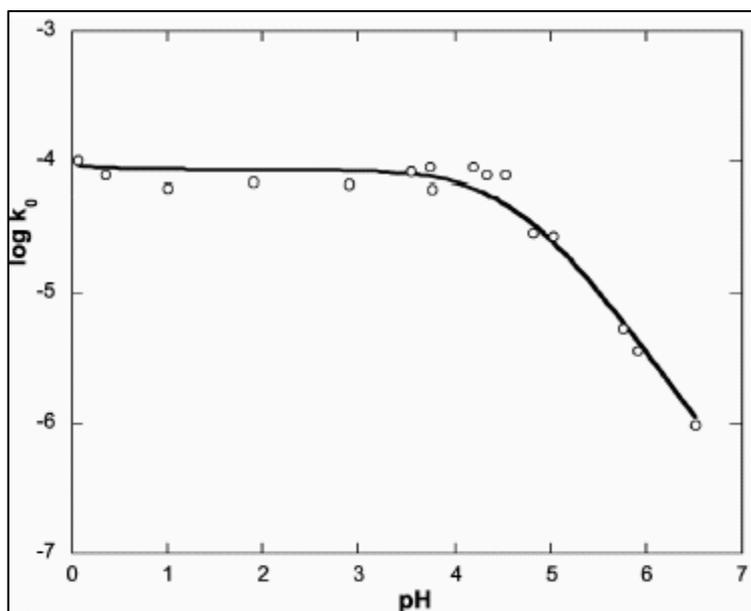
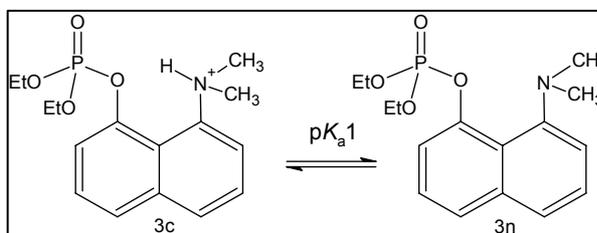


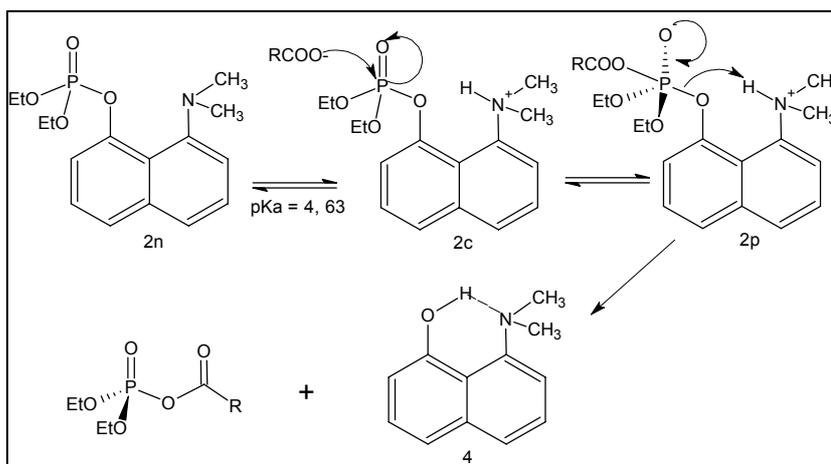
Figura 11. Perfil pH de hidrólise do TANEP, a 60°C, e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ (KCl).

O patamar observado em pH < 4,6 está associado à reação da forma cationica 3c do TANEP que é a espécie reativa, **Esquema 19**, onde o grupo dimetilamônio ($pK_{a1} = 4,63$) atua como catalisador ácido geral.



Esquema 19

Na reação do TANEP com um grupo de oxiânions, foi postulado um mecanismo que sugere a presença de um intermediário pentacovalente. O **Esquema 20** mostra o equilíbrio de protonação do TANEP e a sua reação de decomposição na presença de carboxiânions.



Esquema 20

Uma catálise mais detalhada de reações de diésteres com nucleófilos alfa foi realizada por Lima⁵⁹, o qual estudou o 8-*N,N*-dimetilaminonafil-1-metilfosfato, DANMEP como modelo de catálise enzimática do tipo ácida geral intramolecular, visando compreender como a quebra da ligação O—P pode ser facilitada por um grupo dimetilamônio vizinho ao grupo fosfato na molécula, na presença de nucleófilos normais ou de nucleófilos alfa.

Na reação de hidrólise do DANMEP a constante de velocidade para a reação de hidrólise espontânea permite calcular um fator catalítico da ordem de $2,56 \times 10^6$ a 60°C na região de pH entre 1 e 7, **Figura 12**.

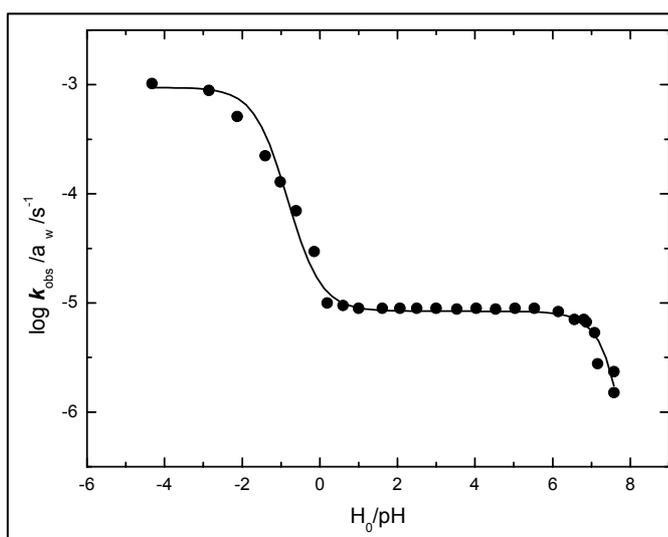
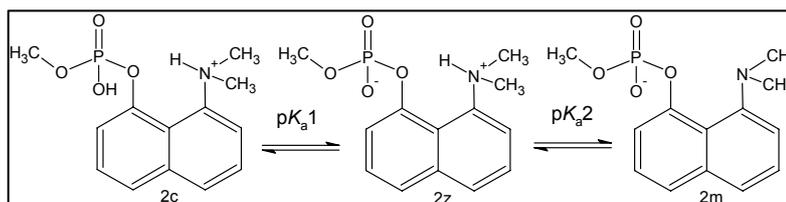


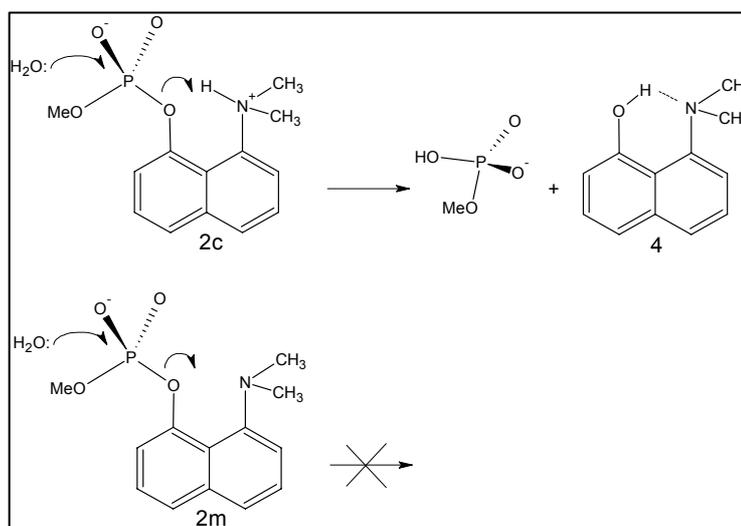
Figura 12. Perfil cinético completo para hidrólise do DANMEP $1,0 \times 10^{-4}$ mol.dm⁻³, força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl e a 60°C .

Na **Figura 12** observa-se que este efeito está associado à reação da forma íon dipolar 2z do DANMEP, **Esquema 21**, onde o grupo dimetilamônio ($pK_{a2} = 7,06 \pm 0,06$) atua como catalisador ácido geral. Em presença de HCl de 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 2c do **DANMEP** é a espécie reativa nessa região de elevada acidez.



Esquema 21

O mecanismo mais simples possível, consistente com o perfil de pH na região entre os valores de pH 2 e 8, é mostrado no **Esquema 22**.



Esquema 22

Percebe-se que o esquema reacional proposto no **Esquema 22** é consistente com os dados experimentais sobre a hidrólise do DANMEP que sugerem que a reatividade da forma mono aniônica é muito baixa.

Na reação entre α -nucleófilos e **DANMEP**, a constante de velocidade é cerca de 70 vezes maior que a reação de hidrólise. Este aumento na constante de velocidade é resultante do efeito alfa dos nucleófilos cujo centro nucleofílico é o

oxigênio. Para o caso da NH_2OMe , a reatividade acaba por ser comparável a uma amina alifática de mesmo valor de $\text{p}K_a$.

A correlação entre as constantes de velocidade para diferentes nucleófilos e o $\text{p}K_a$ do DANMEP encontram-se na **Figura 13**.

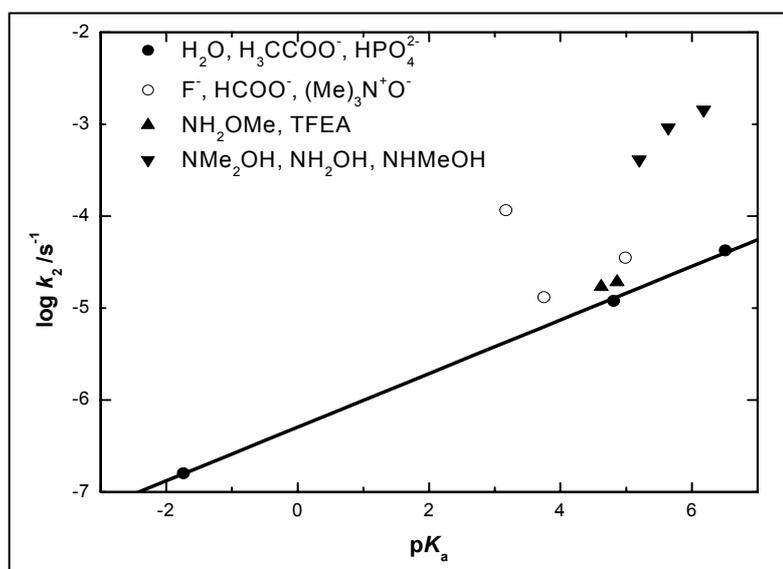


Figura 13. Gráfico de correlação de Brønsted para a reação do DANMEP, com diferentes nucleófilos em solução aquosa a 60°C .

O coeficiente angular das linhas paralelas da **Figura 13** é o coeficiente de Brønsted β ; para a reação com oxianions é de 0,29. Este valor é igual, dentro do erro experimental, que o valor observado para as reações com 2,4-dinitrofenil metilfosfato.⁶⁰

2.7. 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 incluir 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 2**).

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

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, **Figura 14** (situação impossível de ser analisada via modelos implícitos).

Entretanto, solvatar explicitamente um soluto, implica 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 molecular⁶¹, daí a necessidade de se utilizar tanto o modelo de solvatação implícito (grande precisão, pouca exatidão) ilustrado na **Figura 14A**, quanto do modelo explícito (pouca precisão, razoável exatidão), **Figura 14B**, para se construir um modelo misto que possa ajudar a elucidar a estrutura geométrica da molécula.

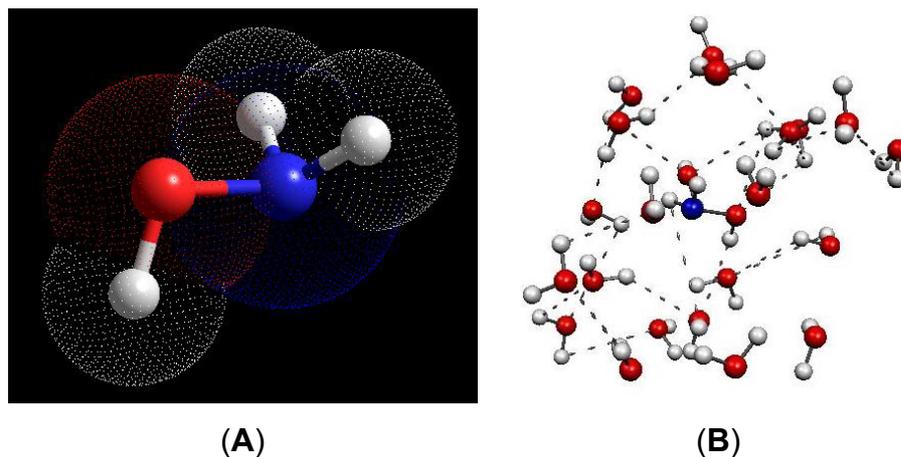


Figura 14. Hidroxilamina em (A) Modelo implícito onde o substrato se encontra numa cavidade (superfície interseccional pontilhada) circundada pelo contínuo dielétrico (superfície negra com constante dielétrica constante). (B) Solvatação explícita da hidroxilamina por moléculas de água.

Outros estudos tornam-se viáveis com a utilização de cálculos computacionais, por exemplo, Iché-Tarrat e colaboradores⁶², 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 Nancy⁶³) e D-PCM (formulação original do Polarizable Continuum Model, criado por Tomasi⁶⁴) para estudar os perfis de energia livre para a hidrólise alcalina dos triésteres e diésteres de fosfato apresentados na **Figura 15**.

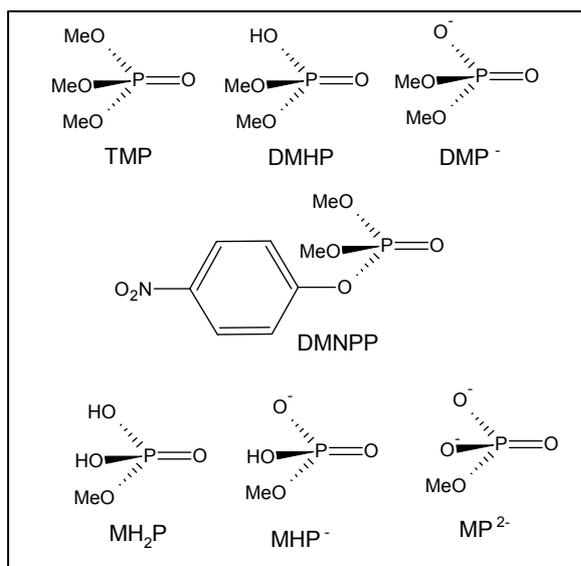


Figura 15. Diésteres e triésteres de fosfato utilizados nos estudos de Iché-Tarrat *et al.*

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

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

A possibilidade de empregar moléculas-modelo no estudo de determinados sítios enzimáticos catalíticos, podemos destacar o presente trabalho, em que foi utilizado o 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato de sódio, **MANEP**, mimetizando 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 fosfato, dependendo das condições do meio reacional, mas principalmente, do equilíbrio de protonação da molécula.

3.2. Objetivos específicos

Os ésteres fosfóricos vem sendo estudados desde 1950, e este trabalho visa contribuir com a literatura existente sobre os estudos mecanísticos de reações de monoésteres de fosfato, através de técnicas experimentais e teóricas, postulando um mecanismo de reação que leve ao entendimento do papel desempenhado pelo grupo catalítico dimetilamônio nas reações de substituição nucleofílica em monoésteres de fosfato.

- Sintetizar e caracterizar monoésteres fosfóricos para utilizar como substratos;
- Determinar o pKa do MANEP, por espectrometria de UV-Vis;
- Obter e analisar as constantes de velocidade para a reação do **MANEP** com diferentes nucleófilos, pH, temperatura e efeito isotópico do solvente;
- Correlacionar as constantes catalíticas com o pKa de cada nucleófilo;
- Otimizar a estrutura do **MANEP** com simulação do solvente água pela metodologia Polarizable Continuum Model (modelo implícito) e com

agregados explícitos de água (modelo explícito) de solvatação e comparar com os resultados de cada modelo separado;

- Buscar o estado de transição mais provável para a reação do **MANEP** com nucleófilo;
- Determinar os possíveis intermediários na reação de decomposição do **MANEP**;
- Comparar as estruturas e estabilidades relativas frente a estabilidade da ligação ArO—P obtidas para o **MANEP** com o diéster **DANMEP**;
- Utilizar todos os resultados obtidos para propor um esquema de reação para a decomposição do **MANEP**, via catálise ácida geral intramolecular.

4. Parte experimental

4.1. Reagentes

Os reagentes sólidos utilizados nesse trabalho foram de qualidade P.A. ou superior e foram empregados sem tratamento prévio. O solvente padrão para todos os experimentos realizados foi água, sendo ela destilada através de um destilador elétrico e deionizada por um sistema de resina de troca iônica do tipo Milli-Q Water System, e a condutividade específica da água era menor que $0,1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Nos experimentos feitos para avaliação do efeito isotópico do solvente a D_2O utilizada foi proveniente da Cambridge Isotope Laboratories, com grau de pureza rotulado em 99,9% e o DCI usado foi da marca Aldrich®.

O composto 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato 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 Dr. Christo D. Roussev, sendo então um composto inédito na literatura.

4.2. Instrumentação

Os espectros de UV/Vis e os dados cinéticos foram obtidos em um espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 de diodo-array, ou em um espectrofotômetro Varian Cary 50, ambos utilizando celas de quartzo de 3 mL de capacidade e 1 cm de caminho ótico, sendo termostatizadas com um banho de fluxo contínuo da Microquímica modelo MQBTC 99-20.

Um equipamento de FTIR (BOMEM) foi usado para a obtenção de espectros de IV em pastilhas de KBr. Os espectros de RMN de ^1H e RMN ^{31}P obtidos em solvente D_2O sob resolução de 250 MHz foram registrados em um aparelho Bruker Avance AM 250 a 300 K, tendo como referência interna tetrametilsilano e externa o

H₃PO₄ 85% . Os espectros de massas foram registrados por meio de ionização por spray de elétrons, ESI-MS (ESI+) em um espectrofotômetro da marca Fisons Instrument VG Plataform II.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho de chapa quente tipo Fisher-Johns, modelo APF 301 da Microquímica, e não foram corrigidos. Todos os valores de pH foram medidos através de um pHmetro de bancada de marca HANNA Instruments®, modelo pH 200, com sensor de temperatura e mantendo-se a temperatura constante com a ajuda de um banho termostático conectado ao sistema.

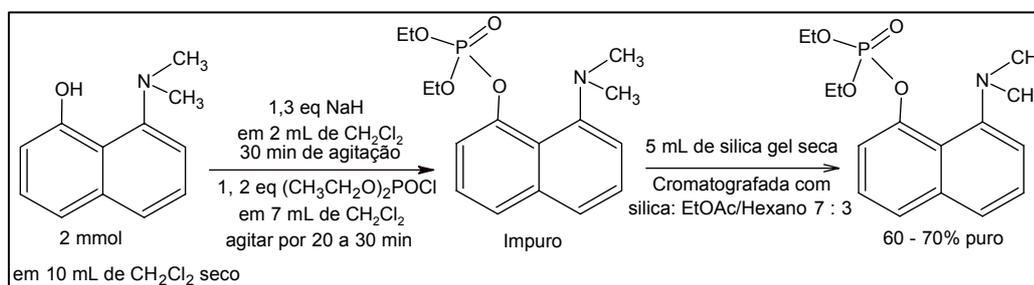
4.3. Preparação do substrato

O 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato de sódio **MANEP** foi sintetizado inicialmente preparado por Christo Roussev, Cambridge em duas etapas, (A) e (B), utilizando-se o seguinte procedimento abaixo e em Florianópolis em uma única etapa conforme (C) a partir do 8-*N,N*-dimetilaminonaftol **DANOL** com PCL₅:

A) Obtenção do triéster 8-dimetilaminonaftil-1-dietilfosfato.

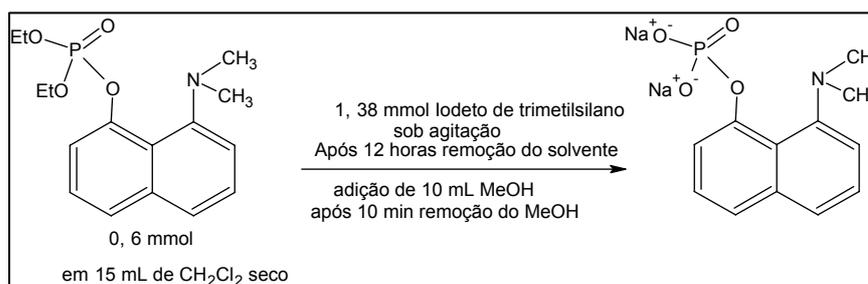
A reação foi realizada de acordo com a metodologia do **Esquema 23**. A uma solução de 2 mmol de 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftol, em 10 mL de diclorometano seco sob agitação, foram adicionados 1,3 equivalentes de hidreto de sódio em diclorometano. Depois de 30 minutos foram adicionados à suspensão resultante, gota a gota, 1,2 equivalentes de dietil fosforocloridrato em 7 mL de diclorometano e a mistura foi agitada por 20 – 30 minutos até completar a reação, que foi 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-d₆, 250 MHz): 7,74 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz), 7,54 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7,44 (q, 2H, *J* = 3 e 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, OCH₃), 2,74 (s, 6H, N(CH₃)₂). ESI-MS (ESI+): calculado

para $C_{14}H_{18}NO_4P$ [M] 295,27, encontrado: 295,8 (100%), 317,8 (81,6%, na forma de sal de sódio +Na) e 613,1 (35,7%, dimerizado).



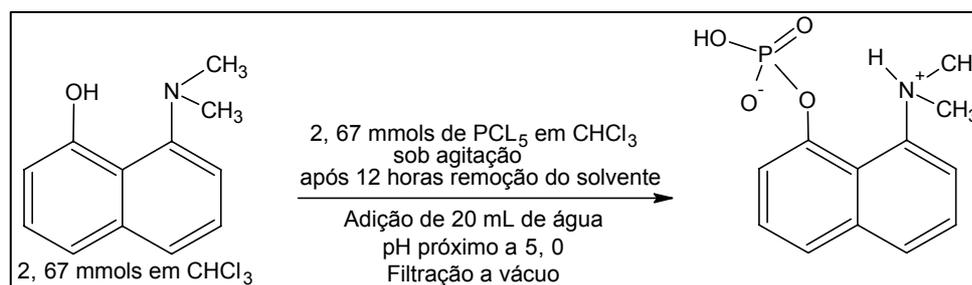
B) Obtenção do monoéster 8-dimetilaminonaftil-1-fosfato (MANEP)

O **Esquema 24** descreve a metodologia de preparação do MANEP. O iodeto de trimetilsilano (0,28 g, 1,38 mmol) foi adicionado com agitação a uma solução de 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-dietilfosfato (0,2 g, 0,6 mmol) em diclorometano (15 cm^3) a temperatura ambiente. Após 12 h o solvente foi removido à pressão reduzida dando um sólido amarelo. Foram adicionados ao sólido 10 mL de metanol, e após 10 min de agitação, o solvente foi removido sob vácuo restando um pó marrom com rendimento de 50 % e ponto de fusão de $106\text{-}107^\circ\text{C}$, $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3690-3448 (br, OH), 1654 e 1610 (ArH), 1459 (CH_3), 1255 ($\text{P}=\text{O}$); RMN- ^1H , δ_{H} (200 MHz; D_2O) 7,97 (1H, dd, J 0,8 e 8,3), 7,65 (1H, dd, J = 0,9 e 7,8), 7,72 (1H, dd, J = 2,0 e 7,32) 7,55 (3H, dt, J = 1,5 e 7,4), 3,41 (6H, s); RMN- ^{13}C , δ_{C} (200 MHz; D_2O) 145,71, 138,41, 135,96, 130,07, 127,16, 125,92, 124,92, 123,99, 120,40, 119,14, 46,90. RMN- ^{31}P , δ_{P} (250 MHz; MeOD) 1,81. m/z (+ve FAB) 268,0760 (99,2 %, MH^+) $C_{12}H_{15}NO_4P$, M = 268,0739).



C) Obtenção do monoéster 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato (**MANEP**)

O **MANEP** foi obtido como segue. Uma solução de 8-*N,N*-dimetilaminonaftol **DANOL** (500 mg, 2,67 mmols) em CHCl_3 (15 mL) foi gotejada lentamente sobre uma solução de PCl_5 (556 mg, 2,67 mmols) em CHCl_3 (15 mL) sob banho de gelo. A mistura foi agitada por uma hora, em seguida foi adicionado excesso de água (0,25 mL) e deixado reagir por mais 12 horas à temperatura ambiente, e após o solvente foi removido utilizando um evaporador rotatório obtendo-se um óleo amarelo queimado, (o qual com adição de acetona (20 mL) e água (5 mL) não levou à formação imediata de um precipitado), o solvente foi removido novamente sob pressão reduzida obtendo-se o óleo. Este óleo resultante foi dissolvido em água (20 mL), e o pH ajustado próximo a 5,0, ocorrendo precipitação imediata do **MANEP**, que foi separado por filtração, restando um pó marrom (rendimento de 40 %) com ponto de fusão de 103-106°C e análise de Infravermelho, Ressonância Magnética



Nuclear e Massa, com resultados semelhantes aqueles descrito anteriormente.

Esquema 25

4.4. Estudos cinéticos

As cinéticas das reações do **MANEP** com água e outros nucleófilos, foram acompanhadas para cada corrida cinética adicionando-se, em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico, 50 μ L da solução estoque aquosa do substrato ($6,66 \times 10^{-3}$ M) em 3mL da mistura reacional, que continha um grande excesso do nucleófilo (até 1,0M), assegurando condições cinéticas estritamente de primeira-ordem para o ataque nucleofílico no substrato. Todas as reações foram realizadas a 60,0°C, pelo menos cinco tempos de meia-vida, monitorando o aparecimento de 8-N,N-dimetilamino-1-naftol em um comprimento de onda de 320nm, em um espectrofotômetro Varian Cary 50 ou um Hewlett-Packard 8453 espectrofotometro de diodo-array, ambos equipados com celas termostatizadas.

O pH da mistura de reação foi medido no início e ao término de cada experimento cinético a 60,0°C, e o ajuste dos valores de pH das soluções analisadas foram realizados da seguinte maneira: as massas necessárias, do nucleófilo, KCl e tampão, para atingir as respectivas concentrações desejadas nas soluções finais, 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 constante), com agitação magnética contendo em seu interior água destilada para dissolver a mistura de solutos, o pH era então ajustado ao valor desejado pela adição de soluções de HCl ou KOH diluídas. Uma vez ajustado o pH, a solução era então transferida para balão volumétrico e completado o volume, com água destilada.

Para assegurar que o valor de pH não fosse sofrer alterações durante todo o experimento cinético, foram utilizados diferentes tampões, para as diferentes faixas de pH de acordo com seu pK_a , foi adotado o padrão de utilizar a solução tampão numa faixa, 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. As seguintes soluções tampões foram utilizadas: HCOOH/HCOO⁻ ($3,0 < \text{pH} < 4,5$) a partir do ácido fórmico da Vetec[®]; H₃CCOOH/H₃CCOO⁻ ($4,0 < \text{pH} < 5,5$) a partir do acetato de sódio da marca Riedel-deHaën[®]; H₂PO₄⁻/HPO₄⁼ ($6,5 < \text{pH} < 8,0$) a partir do fosfato monobásico de potássio da marca Vetec[®] (99,7%); H₃BO₃/H₄BO₄⁻ ($8,0 < \text{pH} < 9,5$) a partir do ácido Bórico Vetec[®]; HCO₃⁻/CO₃⁼ ($9,5 < \text{pH} < 11,0$) da Vetec[®]. As concentrações das soluções tampão utilizadas foram de $1,0 \times 10^{-2}$ mol.dm⁻³. Para

valores de pH menores que 2,5 e maiores que 11,0 foram utilizadas soluções diluídas de HCl (Aldrich®) e KOH (Vetec®), respectivamente.

As soluções do nucleófilo cloridrato de hidroxilamina eram auto-tamponadas entre pH 5.5 e 7.0, preparadas pela adição do padrão de NaOH (0,1M; Merck) na solução aquosa do cloridrato de hidroxilamina.

As constantes de velocidade observadas de primeira-ordem (k_{obs}) foram calculadas fazendo um ajuste não linear da variação de absorvância em função do tempo (com o uso do software UV-Visible ChemStation da Hewlett-Packard ou pelo programa do Cary 50). Os coeficientes de correlação sempre eram melhores que 0.999.

Para o cálculo dos parâmetros de ativação foram determinadas as constantes de velocidade da reação do **MANEP** com fluoreto de potássio em temperaturas diferentes.

A equação de Eyring⁶⁵ pode ser expressa na forma da **Equação 3**.

$$\ln(k_{obs}h/k_B T) = \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT \quad (3)$$

De acordo com esta equação, k_{obs} representa a constante de velocidade, h a constante de Planck, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura em Kelvin e R a constante universal dos gases. ΔS^\ddagger é a entropia de ativação e a entalpia de ativação é dada por ΔH^\ddagger . Um gráfico de Eyring de $\ln(k_{obs}h/k_B T)$ em função do recíproco da temperatura em Kelvin deve fornecer uma correlação linear onde $\Delta S^\ddagger/R$ é igual ao coeficiente linear e $-\Delta H^\ddagger/RT$ representa o coeficiente angular.

A **Equação 4** fornece a energia de ativação de Arrhenius (E_a), enquanto que a energia livre de ativação (ΔG^\ddagger) pode ser calculada pela **Equação 5**.

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (4)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (5)$$

As constantes de velocidade de primeira-ordem observadas em função da concentração do nucleófilo e de segunda-ordem, e os parâmetros termodinâmicos foram calculados utilizando no Origin 5.0-Microcal Software(LaCFI –Lab 210). um programa de regressão linear e não linear de acordo com nas equações teóricas para cada experimento, apresentando coeficientes de correlação $r \geq 0,99$.

4.5. Estudo computacional

4.5.1. Equipamentos

O computador utilizado nesse trabalho foi 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 visualização dos resultados, no computador 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.

3.5.2. Programas

Os programas utilizados para os cálculos dos orbitais moleculares fazem parte do pacote GAMESS (General Atomic and Molecular Electronic Structure System) obtido gratuitamente da página na internet do projeto (<http://www.msg.ameslab.gov/GAMESS/GAMESS.html>, versão utilizada de dezembro de 2002), hospedada pelo grupo de pesquisa do Professor Gordon Ames, Iowa State University e também do programa Jaguar⁶⁶.

Para a construção, visualização e renderização dos dados obtidos para as moléculas foi utilizado o programas MOlecular DENsity (MOLDen)⁶⁷ (versão 4.1), mantido por Gijs Schaftenaar do Center for Molecular and Biomolecular Informatics da Radboud University, na Holanda.

3.5.3. Metodologia para os cálculos

Os cálculos de otimização de geometria foram executados em nível Hartree-Fock com a utilização de funções de base 6-31G(d), e também utilizando a teoria do funcional da densidade (DFT) em nível B3LYP. Todos os resultados que incluíram solvatação por modelo implícito foram obtidos com o método Polarizable Continuum Model (PCM).

5. Resultados e discussão

Com a finalidade de contribuir com a literatura científica na área de modelos de catálise enzimática envolvendo ésteres fosfóricos, vários experimentos cinéticos em diferentes valores de pH e meios reacionais foram realizados para obter dados da reação entre o 8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato de sódio, MANEP e água, além de outros nucleófilos e solventes. A maior dificuldade encontrada foi o relativo longo tempo de monitoramento para coleta de medidas a 60°C. Para análise dos resultados experimentais e comparação de reatividade dos diferentes nucleófilos, os dados cinéticos obtidos com o MANEP, sempre que possível, foram comparados com dados semelhantes para o diéster e triéster de fosfato correspondentes (**Esquema 18** e **Esquema 19**).

5.1. Determinação do pKa do MANEP

A **Figura 16** mostra alguns espectros de UV do MANEP em função do pH. Este tipo de espectro permite realizar a titulação espectrofotométrica utilizando os valores de absorbância em 330nm, comprimento de onda escolhido devido maior variação espectral observada, o que permite uma análise quantitativa dos dados.

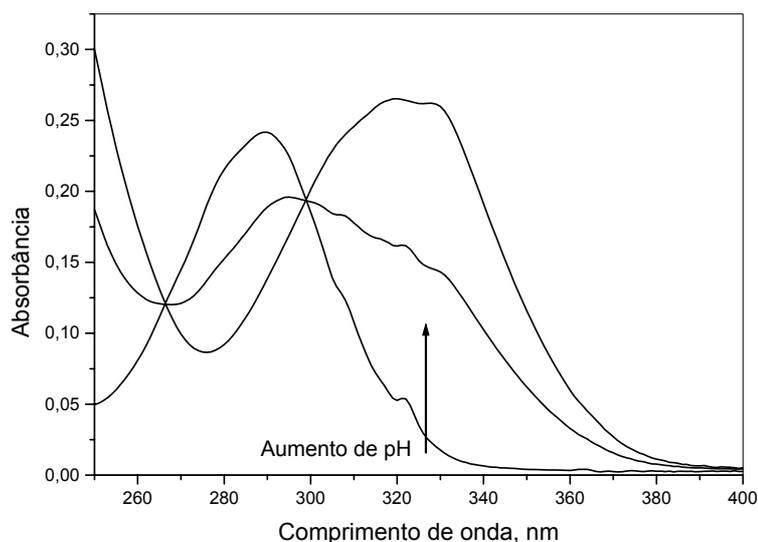


Figura 16. Variação espectral do MANEP ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) em soluções aquosas, a pH 3,0, 6,0 e 9,5, a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de KCl.

Os espectros mostrados na **Figura 16** permitem verificar algumas das principais modificações ocasionadas na estrutura do composto quando o pH do meio é alterado. Observa-se que a absorvância para comprimentos de onda na faixa entre 270 e 295 nm diminui na medida em que o pH das soluções aumenta, e na região de 295 e 350 nm há um aumento na absorvância e a partir de pH 9,0 com uma grande variação espectral, devido à conjugação do par de elétrons isolado do nitrogênio com o sistema π do anel aromático.

A seqüência de espectros da **Figura 16** permite visualizar dois 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 absorvância fixo sob toda faixa de pH estudada. Em geral, o comprimento de onda que corresponde ao ponto isobéstico pode ser utilizado como referência para uma análise mais minuciosa da qualidade das medidas realizadas, já que se espera que a absorvância seja constante. Desta forma, a partir dos valores de absorvância a 330 nm, **Tabela 2**, em função do pH nos quais os experimentos foram realizados, foi gerado o gráfico da **Figura 17**.

Tabela 2. Valores de absorvância em 330 nm em função do pH para o MANEP.^a

pH	ABS, 330nm
0,3	0,1446
3,0	0,1536
4,0	0,1807
5,0	0,2257
6,0	0,2491
7,0	0,2401
8,0	0,2563
9,0	0,3428
9,5	0,4474
10,0	0,5321

^a [MANEP] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl.

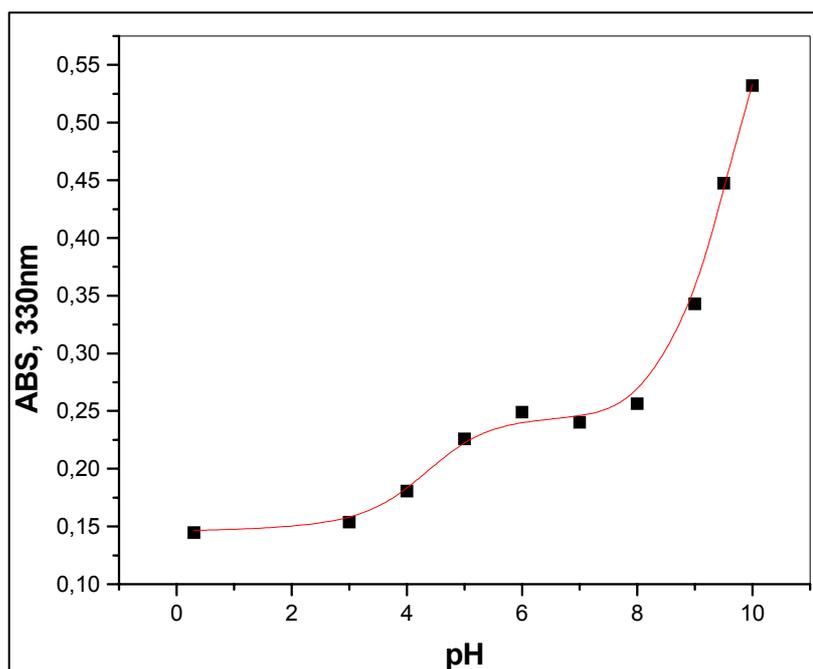
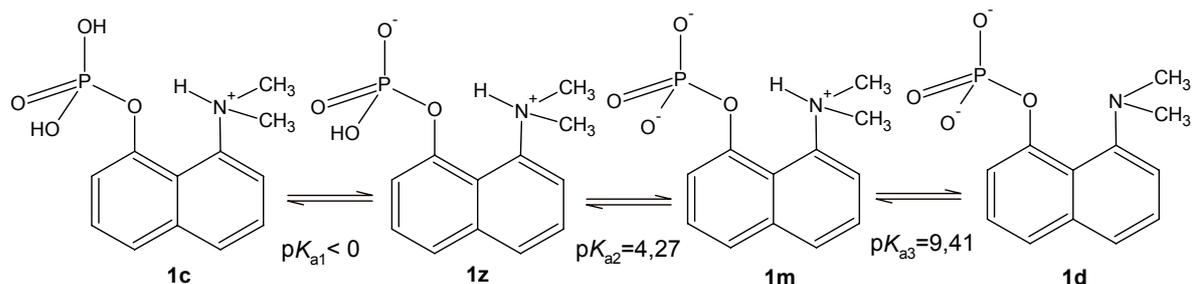


Figura 17. Valores da absorvância a 330nm das soluções aquosas de MANEP ($1,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) em função do pH, a 60°C e força iônica $1,0$ mol. dm^{-3} de KCl.

O gráfico da **Figura 17** mostra os dados experimentais em termos de variação de absorvância em função do pH, de acordo com os valores de $\text{p}K_{a2}$ e de $\text{p}K_{a3}$ e teoricamente é consistente com a **Equação 6**.

$$ABS = ABS_1 \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{10^{-\text{p}K_2}}{10^{-\text{pH}}}\right)} \right] + ABS_2 \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{p}K_1}}\right)} \right] \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{10^{-\text{p}K_2}}{10^{-\text{pH}}}\right)} \right] + ABS_3 \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{p}K_1}}\right)} \right] \quad (6)$$

Na **Equação 6**, ABS_1 corresponde à absorvância inicial, ABS_2 à absorvância no patamar e ABS_3 é a absorvância final. Esta equação é uma função de ajuste não linear para os dados obtidos na titulação espectrofotométrica, **Figura 17**, e permite a determinação dos valores de $\text{p}K_a$ do MANEP, utilizando os valores de ABS_1 , ABS_2 e ABS_3 do experimento e as frações molares das espécies **1m** e **1d**, mostradas no equilíbrio de protonação do MANEP (**Esquema 26**). Valores de $\text{p}K_{a2} = 4,27 (\pm 0,10)$ e de $\text{p}K_{a3} = 9,41 (\pm 0,04)$, foram obtidos através do ajuste não-linear dos dados, utilizando a **Equação 6**.



O **Esquema 26** mostra as principais espécies presentes em soluções aquosas do MANEP, sendo que a espécie **1c** – forma catiônica, predomina em concentrações elevadas de ácido ($[HCl] > 1\text{ M}$), a espécie **1z** forma dipolar predomina na região de pH entre os valores de zero e pK_{a1} ; a espécie **1m**, forma monoaniônica, predomina para valores de pH entre pK_{a2} e pK_{a3} e, a forma dianiônica **1d** predomina quando $pH > pK_{a3}$. As espécies mostradas no esquema 25 foram utilizadas para tratar os dados experimentais do estudo cinético e mecanístico da reação do MANEP.

Os resultados observados mostram que o grupo dimetilamônio diminui significativamente o valor do primeiro pK_a do grupo fosforila. Da mesma forma, há um efeito muito forte do fosfato, na forma dianiônica, no valor de pK_a do grupo dimetilamônio, o qual aumenta significativamente devido ao efeito do grupo vizinho. Este tipo de efeito deve ter uma importância especial para cadeias aminoácidas laterais catiônicas no sítio ativo de enzimas, como fosfatases e quinases que catalisam a transferência de grupos fosforila, já que afetam tanto a capacidade catalítica dos grupos presentes na enzima, quanto aqueles do substrato.

5.2. Reação do MANEP com água acompanhada por Uv-Vis

As reações do MANEP com água foram monitoradas acompanhando os espectros de absorvância em função do tempo, na faixa de pH de 2 a 10. Como pode ser observada na **Figura 18**, a variação espectral para a reação do MANEP em água mostra que a absorvância diminui entre os comprimentos de onda 295 e 250nm e aumenta na região entre 340 e 295nm, o que permite acompanhar a

cinética do processo. As constantes de velocidade foram calculadas utilizando o aumento da absorbância a 320nm, **Figura 18**. Em todos os casos as reações foram claramente de primeira ordem e houve a formação de DANOL como principal produto orgânico da reação.

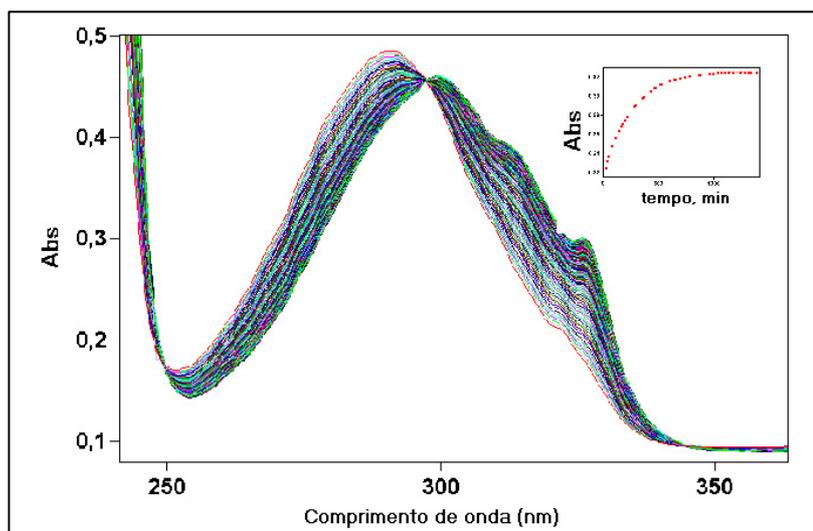


Figura 18. Variação espectral da reação do MANEP ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) com H_2O a pH 7,0, 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Inserido, o perfil cinético em $\lambda = 320\text{nm}$.

A seqüência de espectros da **Figura 18** permite visualizar um ponto isobéstico bem definido, o que pode ser utilizado como indicativo de que trata-se de uma reação simples, onde o produto é estável e garante a qualidade das medidas realizadas.

As cinéticas da reação de hidrólise do MANEP ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) em diferentes valores de pH, a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, resultaram nos valores de k_{obs} que são apresentados na **Tabela 3**. Os valores da **Tabela 3** correspondem ao perfil de pH para a hidrólise do MANEP (8-*N,N*-dimetilaminonaftil-1-fosfato de sódio), que permite analisar a dependência da constante de velocidade observada em relação às espécies presente em solução (**Esquema 26**). Os dados mostram que o MANEP é rapidamente hidrolisado (tempo de meia-vida 72 minutos, 60°C) entre pH 4 - 9, **Figura 19**.

Tabela 3. Valores de k_{obs} para as cinéticas da reação de hidrólise do MANEP ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) em diferentes pH a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

pH MANEP	$\log k_{obs} / \text{s}^{-1}$	pH MANEP	$\log k_{obs} / \text{s}^{-1}$	pH MANEP	$\log k_{obs} / \text{s}^{-1}$
0,3	-4,18	3,0	-4,48	7,7	-3,81
0,5	-4,29	3,3	-4,35	8,2	-3,84
0,8	-4,48	3,7	-4,19	8,5	-3,86
1,2	-4,65	4,0	-4,03	8,8	-3,91
1,5	-4,74	4,4	-3,92	9,1	-3,99
1,7	-4,76	4,8	-3,87	9,3	-4,05
1,9	-4,78	5,2	-3,84	9,5	-4,12
2,2	-4,76	5,5	-3,82	9,6	-4,20
2,5	-4,70	6,2	-3,81	9,8	-4,30
2,8	-4,60	6,7	-3,81	10,0	-4,42

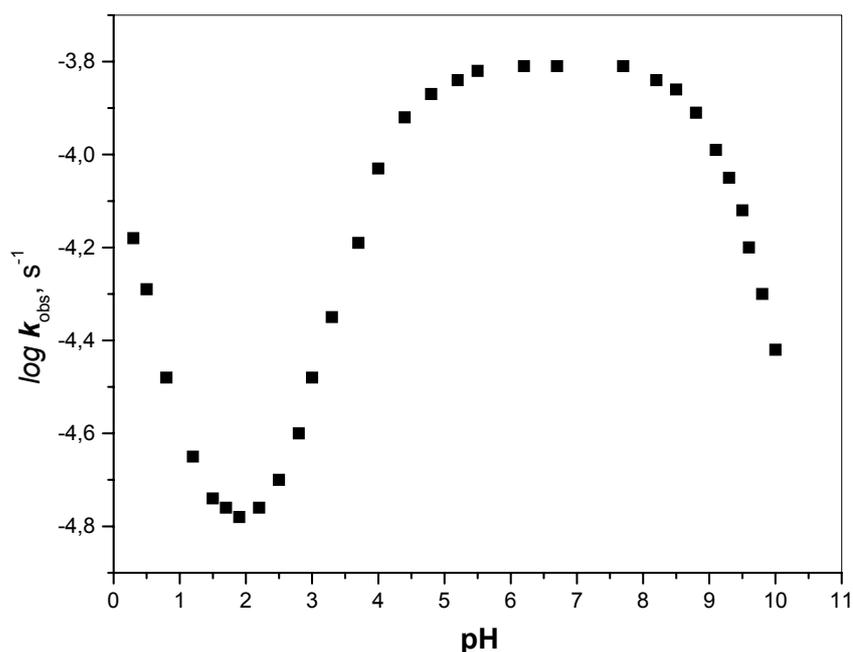
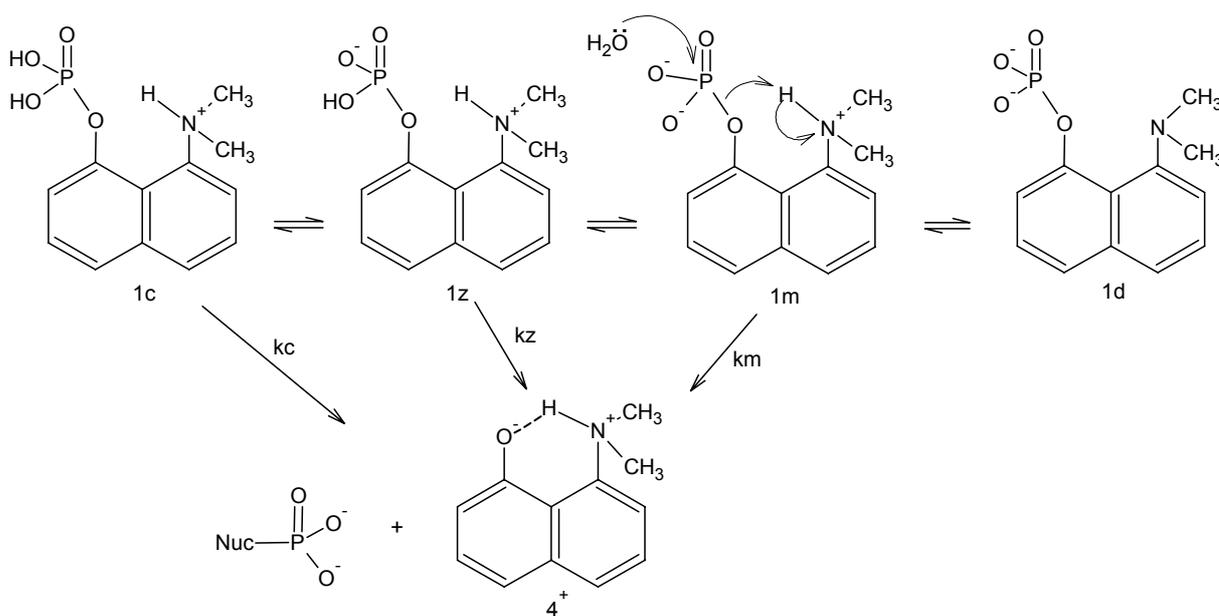


Figura 19. Perfil de pH para a hidrólise do MANEP ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (KCl) com soluções tamponadas em: pH < 2,0 HCl; pH 3,0-4,0 formiato; 4,0-5,5 acetato; 5,5-7,0 bis-tris; 7,5-9,0 tris; 9,0-10,0 borato; pH > 10,0 NaOH.

As constantes de velocidade mostradas na **Figura 19** para a reação de hidrólise do MANEP em função do pH mostram uma região de catálise ácida entre

pH 0,3 e 2,0, seguida de um patamar entre 4,8 e 8,5 que é consistente com uma participação importante das formas mono catiônica (**1c**), dipolar (**1z**) e mono aniônica (**1m**) na reação, em diferentes regiões de pH. Assim, os dados dos valores experimentais da **Figura 19**, permitem propor o **Esquema 27**, do qual podemos derivar a **Equação 7** que é consistente com perfil de constantes de velocidades observadas.

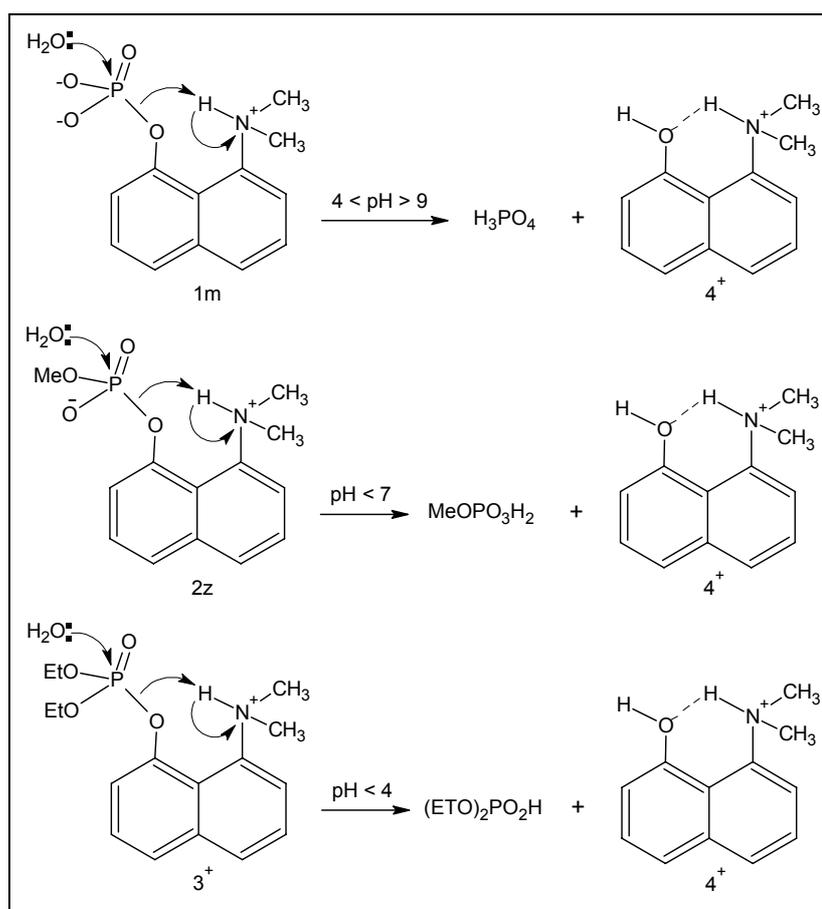


$$k_{obs,w} = k_c \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{10^{-pK_1}}{10^{-pH}}\right)} \right] \times 10^{-pH} + k_z \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{10^{-pK_1}}{10^{-pH}}\right)} \right] + k_m \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_1}}\right)} \right] \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{10^{-pK_2}}{10^{-pH}}\right)} \right] \quad (7)$$

As constantes de velocidade e as constante de dissociação ácida incluídas na **Equação 7** são consistentes com o **Esquema 27**. De fato, utilizando a **Equação 7**, permitem calcular as constantes de equilíbrio e velocidade para as diferentes reações mostradas no **esquema 26** de reação. Os valores obtidos para as constantes de dissociação ácida do MANEP, foram $pK_{a2} = 3,94 \pm 0,06$ e, $pK_{a3} = 9,31 \pm 0,05$.

As constantes de velocidade consistentes com o perfil cinético observado foram $k_m = 1,60 \pm 0,06 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para a contribuição referente à hidrólise do monoânion **1m**, sendo que região de pH entre 1,5 e 4 permite calcular $k_z = 1,0 \pm 0,33 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para a hidrólise espontânea do íon dipolar **1z** e, em pH inferior a 1,5 o início de uma reação catalisada por ácido mostra um valor de $k_c = 9,0 \pm 2,0 \times 10^{-5} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para reação de catálise ácida específica aparente. O diânion **1d** não reage a uma velocidade que possa ser medida nessas condições.

O patamar do perfil de pH mostrado na **Figura 19** está definido pela duas ionizações, identificadas, por espectroscopia UV-visível como a segunda dissociação do fosfato (pK_a 3,94 aparente) e o grupo dimetilamônio NH^+ (pK_a 9,31 aparente). Este valor de pK_a do grupo dimetilamônio está deslocado, comparado com grupos semelhantes, DANMEP e TANEP. O pK_a do dimetilamônio NH^+ é maior por 2,3 e 4,7 unidades em comparação com o pK_a aparente de 7,06 no diéster DANMEP⁵⁹ e 4,63 para o triéster TANEP⁵⁸ respectivamente, **Esquema 28**.



Esquema 28

É conveniente lembrar que a basicidade do oxigênio de POAr , **Esquema 28**, é significativamente maior no dianion de fosfato ArOPO_3^{2-} , fato que resulta em uma

ligação de hidrogênio bastante forte entre o N^+H e este oxigênio em **1m**, em contraste com o efeito pequeno ou nulo que pode ser observado para a presença do oxigênio (menos básico) dos grupo POAr do diéster **2z** e triéster **3⁺** de fosfatos correspondentes.

Os valores de k_{obs} versus pH obtidos na reação de hidrólise do MANEP, DANMEP e TANEP, são apresentados na **Figura 20** para fins comparativos. Todas as cinéticas foram obtidos em soluções aquosas, a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl.

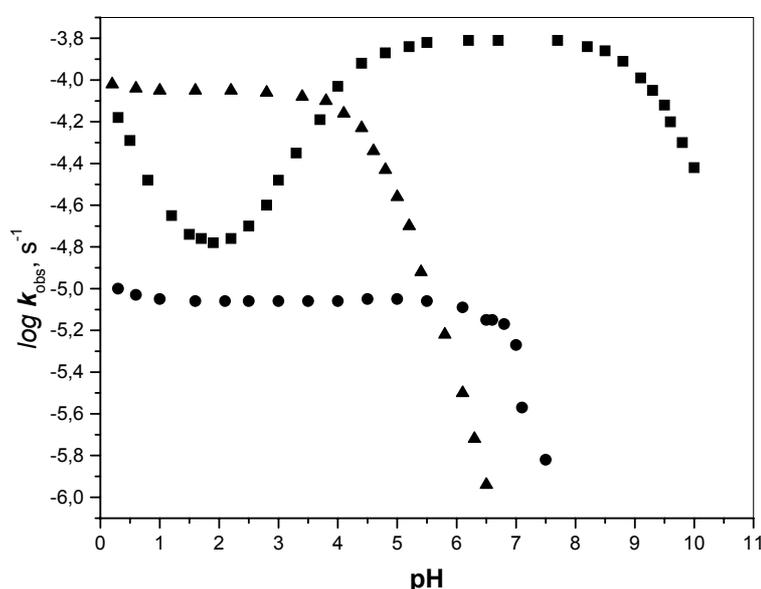


Figura 20 - Perfil de hidrólise do MANEP (■) ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$), comparado aos seus análogos DANMEP (●) ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) e TANEP (▲) ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$), a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$.

Na **Figura 20** podemos analisar o comportamento cinético da reação de hidrólise do MANEP comparativamente com aquelas do DANMEP e TANEP. A região do patamar para o MANEP está entre os valores de $pK_{a2} = 3,94 \pm 0,06$ e $pK_{a3} = 9,31 \pm 0,05$. Esses valores de pK_{a2} e pK_{a3} estão substancialmente deslocados e, identificamos como correspondentes ao segundo equilíbrio de dissociação do grupo fosfato e a constante de dissociação ácida do grupo dimetilamônio, respectivamente.

Para a reação do DANMEP observa-se um patamar na região entre pH 1 e 7, definido por um pK_a de $7,06 \pm 0,06$ que define a transição entre as espécies dipolar **2z** e a forma mono aniônica **2m** (**Esquema 21**, p. 32). No caso do DANMEP,

observa-se que a espécie dipolar **2z** é mais reativa, tendo uma constante de velocidade na região do patamar comparável com a reatividade da forma dipolar do MANEP, para a qual observou-se que $k_z = 1,0 \pm 0,33 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, valor este praticamente idêntico com aquele observado para o DANMEP na região do patamar.

No perfil de constante de velocidade de hidrólise em função do pH para o TANEP, observa-se que a espécie catiônica (**Esquema 28**) como única espécie reativa, resultando num patamar na região entre pH 1 e 4. A reatividade do TANEP é consideravelmente maior daquela observada para o DANMEP.

É importante verificar que a forma da curva cinética do MANEP é diferente daquelas observadas para DANMEP e TANEP que são bastante similares, essas se diferenciando-se apenas na maior reatividade para o TANEP. Tanto para o DANMEP quanto para o TANEP, a reatividade é interrompida pela desprotonação do grupo dimetilamônio de acordo com os equilíbrios de dissociação ácida mostrados nos **Esquemas 18** (p.29) e **20** (p.31).

Em termos de reatividade, a hidrólise do MANEP é apenas 18 vezes mais rápida do que a do DANMEP. Em geral, diésteres de fosfato são consideravelmente menos reativos que seus derivados monoésteres. Por exemplo, a hidrólise espontânea do diânion de fosfato 2,4-dinitrofenila (composto que mostra uma reatividade similar aquela do monoéster **1**) é cerca de 1000 vezes mais rápida do que a reação correspondente do diéster metilfosfato 2,4-dinitrofenila.³⁹ Comparando, a diferença observada entre MANEP e DANMEP é muito menor, o que pode ser explicado por uma eficiente catálise ácida geral intramolecular, que torna-se muito mais importante no caso do DANMEP. De fato, a aceleração devido à catálise ácida geral pelo grupo dimetilamônio de **2** é $2,56 \times 10^6$ a 60°C, valor de maior ordem de magnitude que a aceleração encontrada para o monoéster **1** ($2,4 \times 10^5$ a 60°C). Com valor do pK_a efetivo do grupo de saída de 3,6, similar ao valor estimado para o triéster **3**. Uma maior efetividade catalítica do grupo dimetilamônio está relacionada intrinsecamente, com a natureza da reação, já que no caso do MANEP o estado de transição deve estar muito mais avançado em termos de coordenada de reação, com uma pequena contribuição do nucleófilo.

5.3. Reação do MANEP com água acompanhada por ESI-MS e ESI-MS/MS

A técnica de ESI(+)-MS (Electrospray positivo-MS) ou ESI(-)-MS (Electrospray negativo-MS) e as fragmentações por ESI(+)-MS/MS ou ESI(-)-MS/MS permitem corroborar para a elucidação das estruturas das espécies envolvidas nas reações.

As massas das moléculas positivamente carregadas (M^+) determinadas por ESI(+)-MS (Electrospray positivo-MS) e as fragmentações por ESI(+)-MS/MS para a reação do MANEP com água, resulta na formação do DANOL, **Esquema 29**.

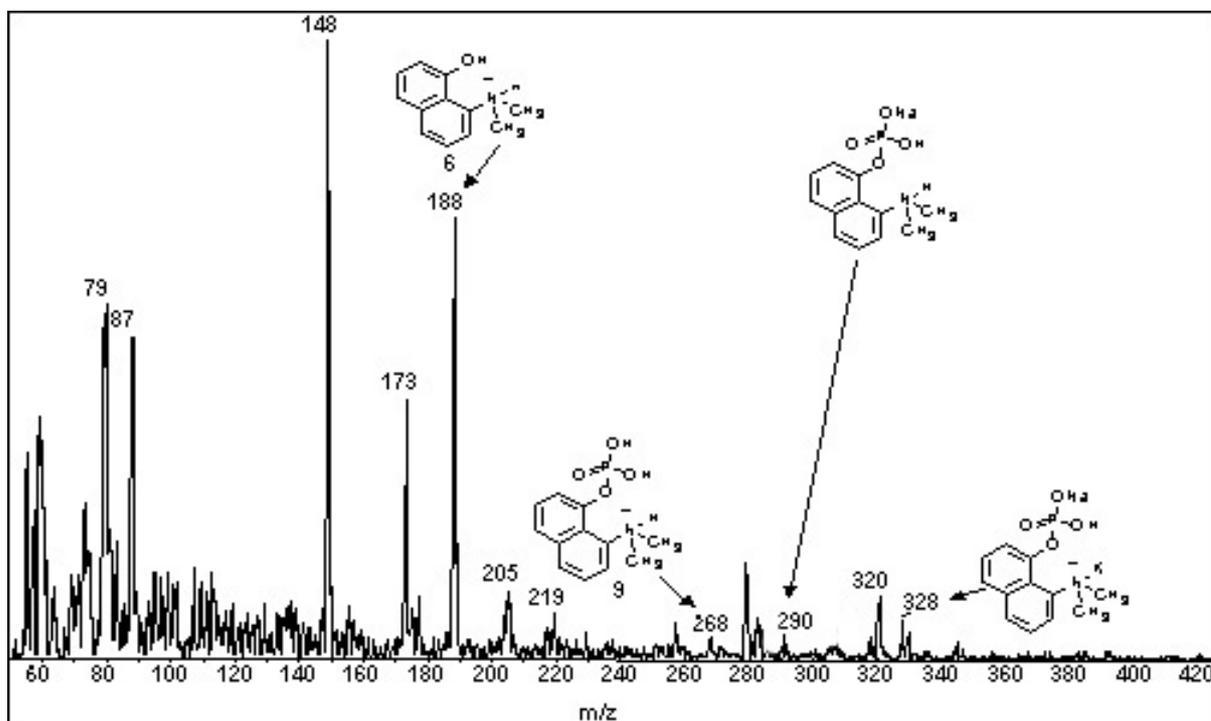
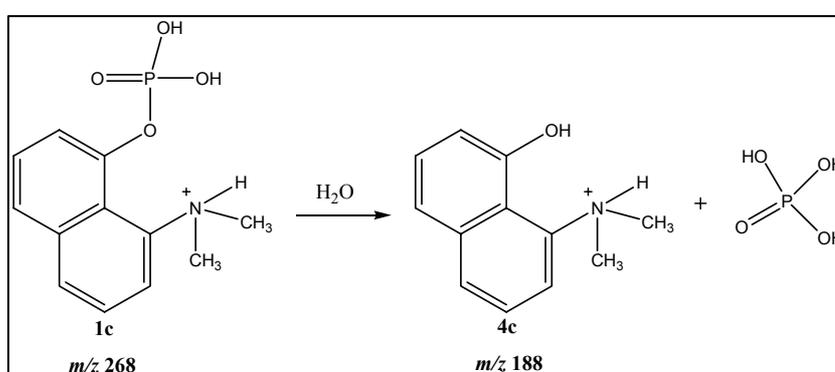


Figura 21. Análise ESI-MS(+) da reação de hidrólise do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, a 25°C , força iônica $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ de KCl.

A **Figura 21** revela vários íons positivamente carregados que foram detectados, dentre eles os compostos **9** (m/z 268), **6** (m/z 188), $[\mathbf{9} + \text{Na} - \text{H}]^+$ (m/z 290) e $[\mathbf{9} + \text{Na} + \text{K} - 2\text{H}]^+$ (m/z 328) os quais foram identificados e caracterizados por experimentos de ESI(+)-MS/MS. O espectro de ESI(+)-MS/MS para o composto de m/z 268 é ilustrado na **Figura 22**.

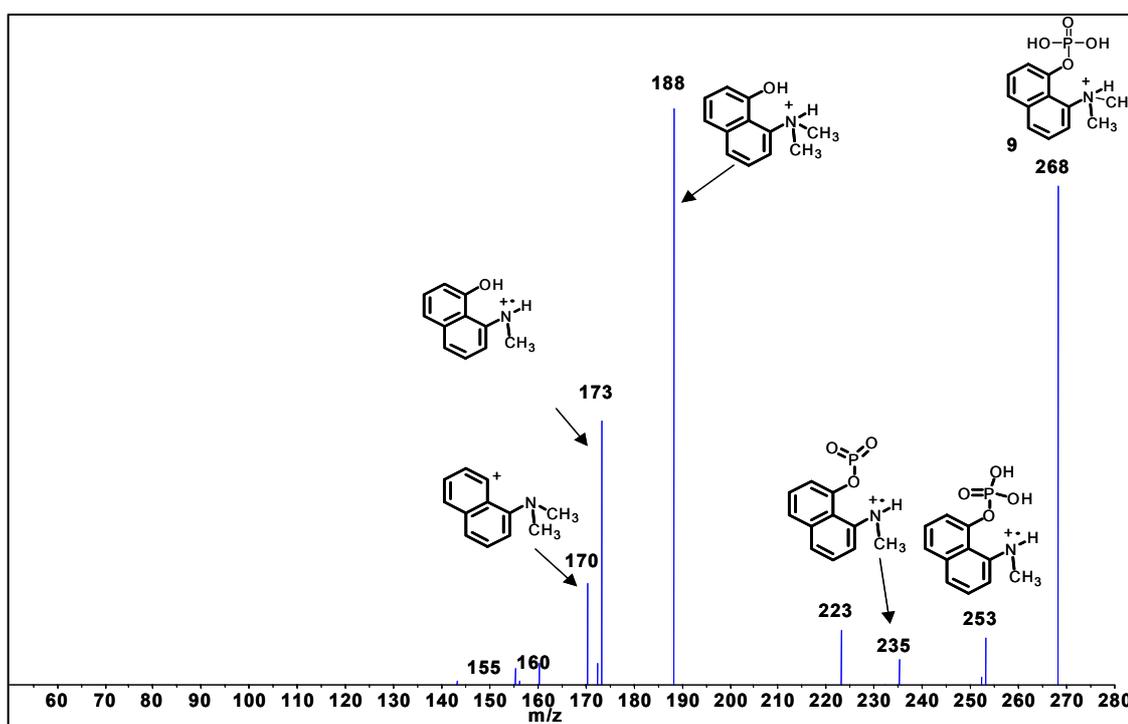


Figura 22. Espectro de ESI(+)-MS/MS para o íon protonado **9** (m/z 268) da **Figura 21**.

Observa-se na **Figura 22** que o íon **9** (MH^+ , m/z 268) dissocia-se principalmente formando os fragmentos iônicos de m/z 253 por perda de radical metila, e o produto de hidrólise identificado pela formação do íon de m/z 188 através da perda de HPO_3 neutro. Ainda, o íon de m/z 188 fragmenta-se por perda de CH_3^\bullet (formando o cátion radicalar de m/z 173) e perda de H_2O (formando o íon de m/z 170).

Os adutos de sódio $\{[\mathbf{9} + \text{Na}]^+, m/z 290\}$ e o aduto de sódio e potássio $\{[\mathbf{9} - \text{H} + \text{Na} + \text{K}]^+, m/z 328\}$ mostraram no processo de dissociação estruturas coerentes com as mostradas na **Figura 21**. Estes resultados corroboram os produtos propostos na reação de hidrólise do MANEP.

5.4. Reação de hidrólise do MANEP sob influência de forte acidez

A hidrólise do MANEP em soluções fortemente ácidas, com concentrações de HCl e DCl entre 0,5 e 12 mol.dm⁻³, mostram um perfil de constantes de velocidade qualitativamente semelhante a hidrólise em meio ácido de muitos ésteres e amidas. As constantes de velocidades aumentam até um máximo ao redor de 7 mol.dm⁻³ de HCl ou DCl, e logo diminuem paulatinamente em concentrações de ácido mais altas.

Este comportamento é esperado para um substrato no qual a espécie reativa é a forma de um ácido totalmente protonado em alta concentração de ácido. O motivo pelo qual a velocidade da reação decresce é que, em concentrações mais altas do ácido, a atividade da água é fortemente diminuída, e sendo ela o nucleófilo da reação de hidrólise, a diminuição da atividade provoca uma diminuição da constante de velocidade observada.

Os dados da reação de hidrólise do MANEP 1,0x10⁻⁵ mol.dm⁻³ sob a influência de forte acidez do HCl e DCl, a 60°C são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de k_{obs} para a reação de hidrólise do MANEP em função das concentrações de DCl e HCl.^a

[HCl]	10 ³ k_{obs} , s ⁻¹	[DCl]	10 ³ k_{obs} , s ⁻¹	[HCl]	10 ³ k_{obs} , s ⁻¹	[DCl]	10 ³ k_{obs} , s ⁻¹
0,5	0,045	0,5	0,0617	5	1,35	5	1,673
1	0,132	1	0,1867	5	1,32	7	1,99
1,5	0,258	1,5	0,335	6	1,498	8	1,79
2	0,455	2	0,527	7	1,583	10	1,33
2,5	0,552	2,5	0,722	8	1,492	12	7,92
3	0,703	3	0,918	9	1,383		
3,5	0,868	3,5	1,163	10	1,225		
4	1,06	4	1,372	12	0,77		
4,5	1,22	4,5	1,558				

^a [MANEP] = 1,0x10⁻⁵ mol dm⁻³.

Os dados da **Tabela 4** são mostrados na **Figura 23**, que apresenta os gráficos de k_{obs} em função da concentração de DCl e HCl para a reação de hidrólise do MANEP em meio de forte acidez.

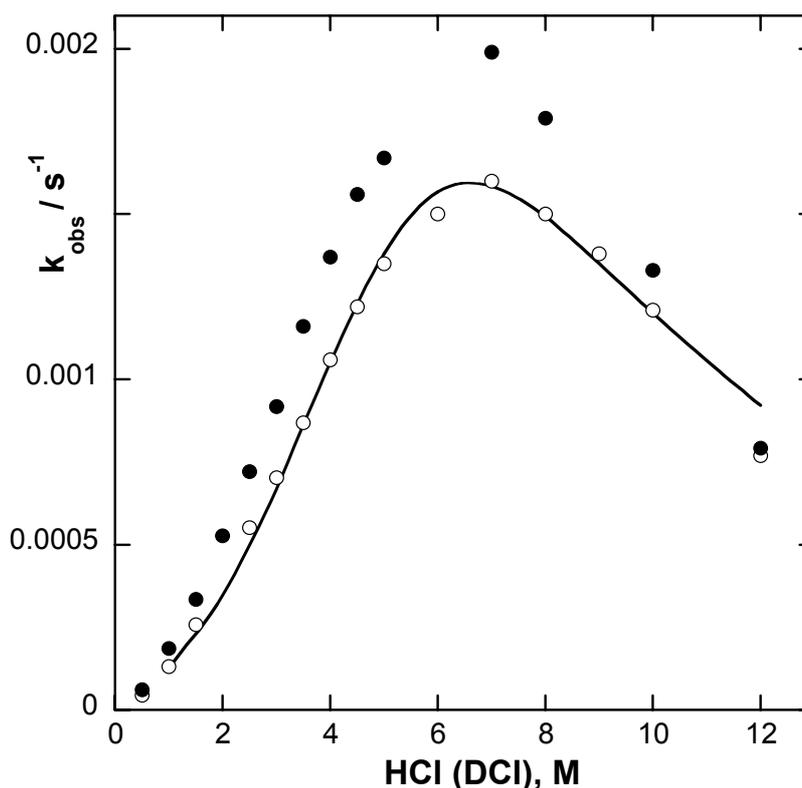


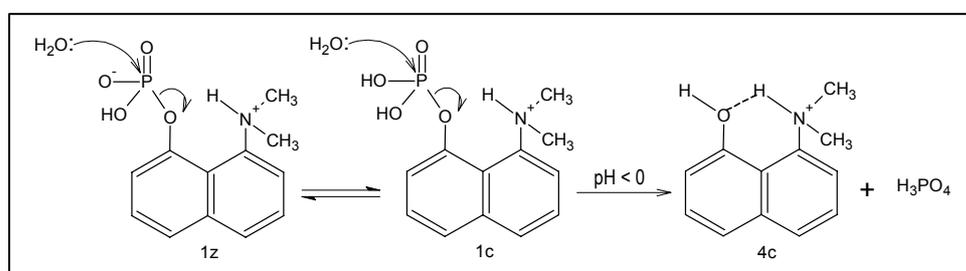
Figura 23. Valores das constantes de velocidade para a hidrólise do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol. dm^{-3} sob a influência de forte acidez: HCl (O) e DCI (●), a 60°C .

Observa-se na **Figura 23** que os valores de k_{obs} para a reação de hidrólise na presença de HCl são menores do que para o DCI, caracterizando um efeito isotópico inverso e serão discutidos posteriormente. Os dados dos valores de constante de velocidade calculada para a reação de hidrólise em presença de HCl na **Figura 23**, foram calculados utilizando os dados experimentais e a atividade da água na **Equação 8**.

$$k_{obs} = k_c a_w \chi_{1c} = k_c a_w a_H / (a_H + K_a) \quad (8)$$

A **Equação 8**, permite calcular uma constante catalítica $k_c = 2,92 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; considerando que a fração molar (χ_{1c}) do substrato pode ser calculada usando um pK_a de $-1,47$, que corresponde a concentração de HCl de $4,3 \text{ mol}.\text{dm}^{-3}$, e que as atividades para água (a_w) e HCl (a_H) correspondem aquelas reportadas por Randall e Young.⁶⁸

É importante salientar que a reação de hidrólise do zwitterion **1z** catalisada por ácido, na verdade representa a cinética de hidrólise espontânea equivalente do cátion **1c**, pelo mecanismo mostrado no **Esquema 30**. No ajuste dos dados foi adicionado um termo $[a_H].[1c]$, entretanto, este termo não melhora o ajuste observado na **Equação 8**. Este resultado é razoável já que a espécie **1c**, não deve ser protonada no grupo fosfato, devido ao efeito do grupo carregado positivamente (grupo dimetilamônio) numa posição muito próxima. De fato, seria necessária uma condição ácida muito forte para realizar esta protonação já que, o pK_a calculado é normalmente 5 - 6 unidades abaixo do pK_a da forma catiônica. Em termos de reatividade **1c** é, efetivamente, um triéster ativado.



Esquema 30

A aceleração calculada para a hidrólise de **1c**, comparando a constante de velocidade com um fosfato de dialquila⁶⁰ derivado de um naftol de pK_a 9.4, é de aproximadamente 10^8 a 60°C . Este efeito é substancialmente maior que o aumento da constante de velocidade calculado para a reação de hidrólise do monânion **1m**. Isto é esperado, porque há uma estabilização pequena ou nula da ligação de hidrogênio do reagente quando o grupo fosfato é neutro, como indicado pelo pK_a observado = 4,63 do grupo Me_2NH^+ do dietiléster **3c**.⁵⁸ Ainda, a constante de velocidade para a reação de **1c** é 33,6 vezes mais rápida que a reação correspondente do DANEP. Isto é atribuído a uma combinação do efeito estéricos e eletrônicos resultantes da substituição dos dois prótons do OH de **1c** por grupos etila.

5.5. Efeito isotópico do Deutério.

A substituição isotópica é a menor mudança em um sistema ordenado que fornece informações sobre o mecanismo das reações. A distribuição eletrônica, a carga nuclear e a energia potencial permanecem inalteradas e as reações ocorrem na mesma superfície de potencial.⁶⁹

Como a única diferença é a massa, as propriedades que distinguem as diferentes espécies isotópicas são: a energia translacional da molécula como um todo e as energias rotacionais e vibracionais das ligações dos isótopos. A energia vibracional no estado padrão de uma ligação depende da massa reduzida dos átomos que formam a ligação e diminuem com o aumento da massa reduzida.⁷⁰

Para ajudar a determinar o mecanismo da reação do MANEP e as possíveis estruturas do estado de transição, seguimos as reações com água normal e deuterada, ácido clorídrico e cloreto de deutério, pois as velocidades das reações serão diferentes e os valores experimentais de efeito isotópico podem ser obtidos dessas reações.

5.5.1. Sob influência de forte acidez

Para observar o efeito isotópico na reação de hidrólise do MANEP, foram determinadas as constantes de velocidade em função da concentração de DCI e de HCl. Os resultados dos experimentos da reação de hidrólise do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm⁻³ com DCI e HCl, a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl, encontram-se na **Tabela 4**.

Os dados da **Tabela 4** permitem construir gráficos de k_{obs} em função da concentração de DCI e HCl na reação de hidrólise do **MANEP** entre 0,5 e 5 mol.dm⁻³ de ácido, que mostram uma dependência aproximadamente linear, **Figura 24**, devido ao efeito ainda pequeno na atividade da água.

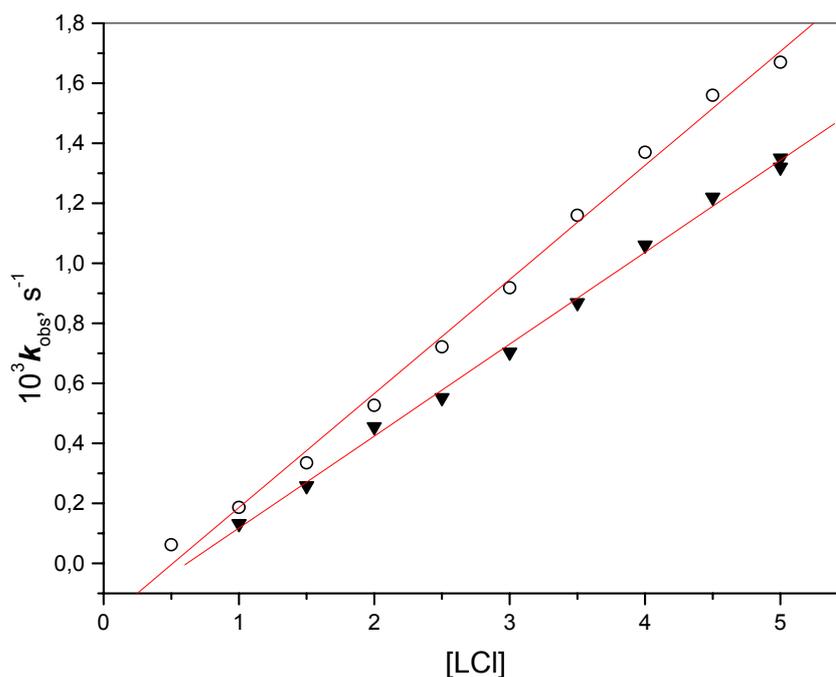


Figura 24. Efeito da concentração de DCI (○) e HCl (▼) na hidrólise do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm⁻³, a 60°C.

Observa-se na **Figura 24** que os valores de k_{obs} aumentam em função da concentração de HCl e DCI e que os valores de k_{obs} para o DCI são maiores do que para o HCl. Os dados experimentais da **Figura 24** permitem calcular as constantes de velocidade (k_0 e k_1) usando a **Equação 9** que correlaciona k_{obs} e a concentração de ácido.

$$k_{obs} = k_0 + k_1 * [LCI] \quad (9)$$

Na **Equação 9** [LCI] representa a concentração em mol.dm⁻³ de DCI e HCl. Para o DCI obtêm-se uma constante $k_1 = 3,8 \times 10^{-4}$ mol⁻¹.dm⁻³.s⁻¹ e para o HCl uma constante $k_1 = 3,0 \times 10^{-4}$ mol⁻¹.dm⁻³.s⁻¹, resultando num efeito isotópico inverso do solvente de valor $k_H/k_D = 0,78$, consistente com o mecanismo do **Esquema 30**.

Neste tipo de mecanismo é esperado um efeito isotópico inverso, para o equilíbrio de protonação, o qual deve ser parcialmente compensado por um efeito isotópico cinético normal (pequeno) para o ataque de água como um nucleófilo em **1c** acompanhado de transferência de próton intramolecular.

5.5.2. Reação de hidrólise do MANEP em misturas de D₂O e H₂O

A constante de velocidade observada para a reação de hidrólise do MANEP em várias frações molares de D₂O (n), foi determinada com a finalidade de se obter informações sobre o número de prótons envolvidos no estado de transição (técnica de inventário de prótons) para esta reação. As constantes determinadas e mostradas na **Tabela 5** foram obtidas, variando a concentração do D₂O, a 60°C, pH 8,0 (tampão fosfato 10⁻² mol.dm⁻³) e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ (KCl) e.

Tabela 5. Valores de k_{obs} para a reação de hidrólise do MANEP 1,0x10⁻⁵ mol.dm⁻³ em função da fração molar de D₂O, a 60°C, pH 8,0 e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ (KCl)^a

n	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$
0	1,708
0	1,7487
0,25	1,5761
0,25	1,6072
0,5	1,4536
0,5	1,4345
0,75	1,3251
0,75	1,3374
1	1,1678
1	1,1842

^a) [MANEP] = 1,0x10⁻⁵ mol.dm⁻³, pH 8,0 e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ (KCl)

Os valores da **Tabela 5** são consistentes com um efeito isotópico normal e indicam que há transferência de prótons na etapa determinante da velocidade. Os dados são ilustrados graficamente na **Figura 25** que mostram a dependência de k_{obs} em função da fração molar de D₂O, um formalismo gráfico utilizado na técnica de inventário de prótons na análise e interpretação mecânica da participação do solvente na reação do MANEP.

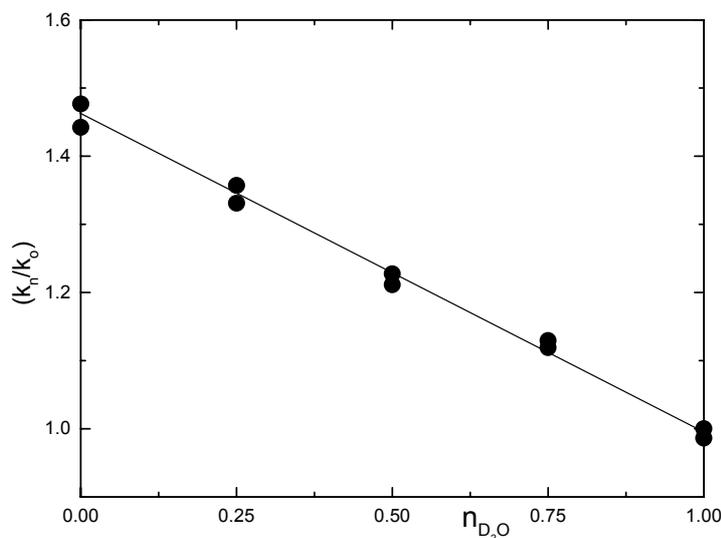


Figura 25. Gráfico de inventário de próton para a hidrólise do MANEP ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$) em função da fração molar de D_2O , a 60°C , pH 8,0 e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ (KCl)

Os valores de k_{obs} da **Tabela 5** permitem calcular a relação k_n/k_o e analisar a dependência em relação à fração n do átomo de deutério. Observa-se na **Figura 25** que os valores de k_n/k_o diminuem linearmente com o aumento da fração molar de D_2O . Este resultado é consistente com a equação de Gross-Butler em sua forma simplificada, indicando que apenas um próton é transferido no estado de transição na reação envolvida (**Equação 10**).

$$k_n/k_o = 1 + n (\Phi^T - 1) \quad (10)$$

O efeito isotópico k_{H_2O}/k_{D_2O} observado para a reação de hidrólise da espécie **1m** do MANEP é relativamente pequeno ($k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1,47$) e, consistente com uma reação na qual há um grau pequeno de transferência de próton do grupo de NH^+ no estado de transição. O coeficiente angular $(\Phi^T - 1) = -0,47$ permite calcular um fator de fracionamento para o estado de transição $\Phi^T = 0,53$ que é consistente com um estado de transição atingido com pequeno avanço na coordenada de reação. Outros diésteres, como fosfato de 2,4-dinitrofenila, mostram também um efeito isotópico relativamente pequeno.³⁹

A magnitude do efeito isotópico observado indica que trata-se de uma reação que é pouco sensível ao ataque do nucleófilo e indicativa de baixos valores para o β_{nuc} de Brønsted, um fato esperado na hidrólise de fosfatos ativados, onde o estado de transição inclui uma pequena contribuição da formação de ligação com o nucleófilo. Os resultados do estudo de inventário de próton forneceram informações importantes, consistente com a interpretação mecanística do **Esquema 27**.

5.6. Efeito do solvente

A influência que o solvente exerce sobre as reações químicas é bastante conhecida.⁷¹ As propriedades comumente mais correlacionadas à reatividade são a constante dielétrica, o momento dipolar, a acidez e a basicidade. Esta questão do efeito do solvente sobre a reatividade química tem sido tratada de dois modos:

a) O mais comum utiliza a teoria do estado de transição e considera a solvatação relativa dos estados inicial e de transição.⁷² A solvatação de uma espécie em um determinado estado diminui sua energia livre, aumentando sua estabilidade. As interações intermoleculares, que podem ser polares e apolares, são responsáveis pela solvatação.

b) A outra maneira de tratar a questão, tem como principal fator a coesão das moléculas do solvente com as espécies envolvidas na reação. A teoria eletrostática, de Hughes⁷³ e Ingold,⁷⁴ assume que estas espécies reagentes geralmente alteram sua distribuição de carga quando passam ao estado de transição. Assim, nas reações entre íons e naquelas em que se produzem íons a partir de moléculas neutras, o solvente exercerá grande influência. Se o estado de transição⁷⁵ contém mais carga iônica que o estado inicial, a reação será favorecida por solventes de alta polaridade. Os solventes menos polares aumentam a velocidade de reação em que o estado de transição é menos carregado que o estado inicial, conferindo-lhes assim uma maior estabilidade. Nas reações em que reagentes e os produtos são neutros, o efeito do solvente é geralmente menos importante.⁷⁴

Para avaliar a influência do solvente sobre a reatividade do MANEP, foi estudada a reação de hidrólise de **1m** em misturas binárias de água e dimetilsulfóxido (DMSO), (DIOX) e 1,4-dioxano metanol (MeOH).

Este estudo foi realizado acompanhando-se espectroscopicamente o aparecimento da banda de absorção correspondente ao DANOL, para a reação de hidrólise do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$, em diferentes misturas binárias, com concentrações crescentes de DMSO, DIOXANO e MeOH. Em todos os casos a fração aquosa correspondia a uma solução de pH 8,0 (tampão fosfato $0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$, força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ (KCl)). Os valores das constantes de velocidade observadas k_{obs} , determinados a $60,0^\circ\text{C}$ são mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valores das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação de hidrólise do **MANEP**, em diferentes concentrações de DMSO, MeOH e DIOX.

% Solv	$10^6 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$ MeOH	$10^3 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) MeOH	$10^6 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$ Diox	$10^3 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) Diox	$10^6 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$ DMSO	$10^3 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) DMSO
40	-	-	-	-	6,993	0,6468
60	1,535	0,2129	5,769	0,8005	64,75	8,98
80	18,93	5,25	16,786	18,83	-	-
85	24,815	9,18	-	-	373,6	138,23
90	30,208	16,77	1773	98,84	953,1	528,97
95	39,407	43,74	1808	200,69	-	-

^a Valores de k_{obs} corrigidos pela molaridade da água

Os dados experimentais contidos na **Tabela 6** mostram que para a reação de hidrólise do MANEP (**1m**) há um efeito significativo do solvente e que, em geral, a efetividade do solvente segue a ordem DMSO > DIOXANO > MeOH. Como a mudança de composição do solvente resulta numa diminuição da concentração de água, é conveniente calcular os valores de constantes de velocidade de segunda ordem para comparar quantitativamente os dados experimentais. Esta correção pode resultar em erros significativos no caso do metanol, onde o solvente orgânico pode também ser o nucleófilo. No entanto, nos casos de DMSO e DIOXANO o solvente não participa efetivamente da reação. Assim, na **Tabela 6**, estão incluídos os valores de constantes de velocidade de segunda ordem, sem correção da atividade da água, e que podem ser comparados diretamente. Os efeitos específicos do solvente são melhor visualizados na **Figura 26**, que mostra claramente a diferença entre os diferentes solventes estudados.

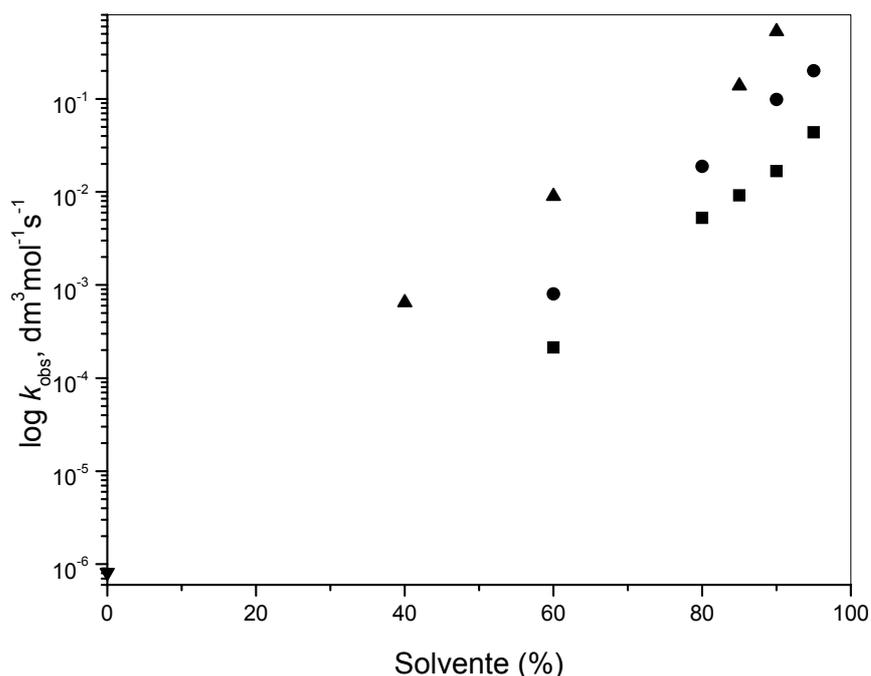


Figura 26. Constantes de velocidades para a hidrólise de **1m** em função da (%) de DMSO (▲), MeOH (■) e DIOXANO (●). (▼) é o valor calculado para água a 25°C.

O gráfico na **Figura 26** mostra que a constante de velocidade (k_{obs}) aumenta com o aumento da concentração do solvente, efeito este que era esperado já que se trata de uma reação onde há dispersão/diminuição de carga no estado de transição. Os efeitos observados são significativos e, qualitativamente, semelhantes daqueles observados com outros ésteres de fosfato em presença de solventes miscíveis em água. De fato, a hidrólise de **1m** é semelhante à reação de hidrólise de monoésteres de fosfato dianiônicos com bons grupos de saída, com a diferença significativa da participação importante da ligação de hidrogênio intramolecular, a qual está presente ao longo da reação. Este fato não acontece em reações bimoleculares, onde o ácido geral pode ser solvatado separadamente. Por exemplo, a quebra hidrolítica de monoéster de fosfato diânion com bom grupo de saída é em princípio fortemente acelerada pela adição de solvente dipolar aprótico no meio aquoso.^{39,50} Os resultados são claramente indicativos de uma reação de hidrólise de **1m**, que envolve neutralização de carga no estado de transição, fato que explica a magnitude do efeito observado na reatividade.

5.7. Reações do MANEP com outros nucleófilos

A elevada reatividade do monoéster MANEP em reações de hidrólise indica ser possível detectar reações de catálise nucleofílica com reagentes neutros e negativamente carregados e, de forma semelhante aos casos anteriores, o acompanhamento dessas reações foi por espectroscopia UV-Vis.

5.7.1. Perfil de pH da reação do MANEP com hidroxilamina

A reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ com NH_2OH em concentrações de 0,6 e 1,0 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ foi acompanhada na faixa de pH 1,7 a 10,0 a $60,0^\circ\text{C}$ e força iônica 1,0 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (KCl). Os elevados valores das constantes de velocidade de primeira ordem observados para esta reação, são consistentes com a elevada eficiência da catálise por este nucleófilo de efeito α , **Tabela 7**.

Tabela 7. Valores de k_{obs} para a reação de MANEP com NH_2OH em diferentes pH.

pH	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$ [NH_2OH] 0,6 M	pH	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$ NH_2OH 1,0 M
1,7	0,256	3,0	0,43
2,2	0,227	3,6	0,688
3,7	0,44	4,5	1,61
4,2	0,913	5,5	3,05
4,7	1,66	5,8	3,30
5,2	2,07	6,5	4,30
6,1	2,69	7,5	4,35
6,5	2,94	7,8	4,34
7,1	3,18	8,5	4,34
7,6	3,17	8,7	4,26
8	3,36	9,3	3,23
8,3	3,41	9,7	0,106
8,5	3,17	10	0,229
8,7	3,39	-	-
8,8	3,17	-	-
8,8	3,28	-	-
9,3	2,6	-	-
9,7	9,85	-	-

Os valores de constantes de velocidade da **Tabela 7** são apresentados graficamente na **Figura 27**, mostrando um perfil de pH para a reação do MANEP com NH_2OH que indica que a reatividade depende substancialmente do pH, fato já reportado para outras reações de hidroxilamina com mono, di, e triésteres de fosfato⁷⁶.

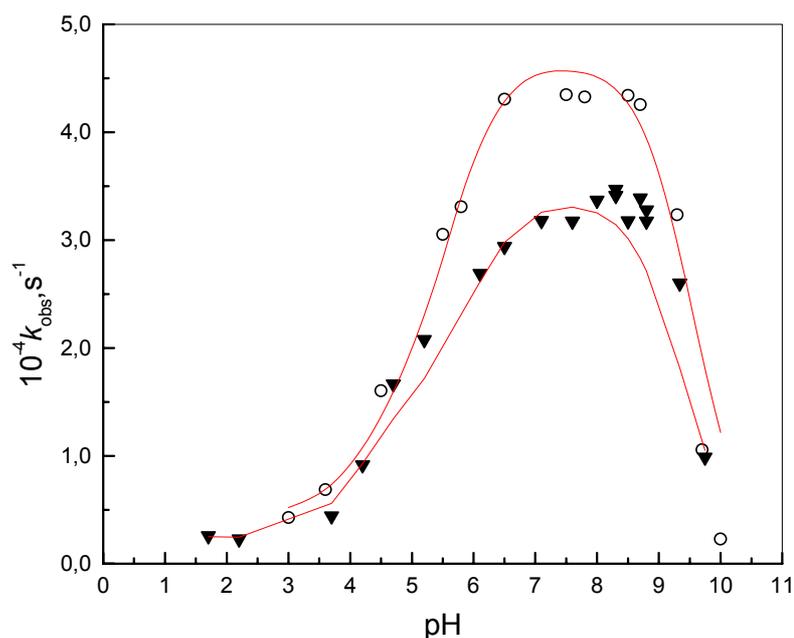


Figura 27. Perfil de pH da reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ com NH_2OH $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (▼) e $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (O), a 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (KCl).

Observa-se na **Figura 27** que o perfil de pH da reação mostra a forma de sino, com um máximo no valor da constante de velocidade na região onde o nucleófilo (**Nü**) está presente como base livre e o substrato se encontra predominantemente na forma do monoânion **1m**, com o grupo NMe_2 protonado, de acordo com a **equação 11**.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{obs,w}} + k_{1\text{m}}(\text{Nu}) \chi_{\text{NH}_2\text{OH}} \chi_{1\text{m}} \quad (11)$$

Nesta equação, o termo $k_{1\text{m}}(\text{Nü})$ corresponde à constante de velocidade de segunda ordem para a reação do monoânion **1m** com hidroxilamina neutra e os termos $\chi_{\text{NH}_2\text{OH}}$ e $\chi_{1\text{m}}$ são as frações molares das duas espécies reativas. As curvas

contínuas mostradas na **Figura 29** foram calculadas fazendo uma correlação dos dados experimentais com a **Equação 11**.

Os melhores valores de constantes de velocidade calculadas utilizando a **Equação 11** fornecem os valores da constante de velocidade de segunda ordem $k_{1m}(\text{Nü}) = 2,5 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e os valores de $\text{pK}_a = 5,6 \pm 0,2$ para o ácido conjugado da hidroxilamina ($^+\text{NH}_3\text{OH}$) e o $\text{pK}_a(2)$ de $9,31 \pm 0,03$ para o MANEP.

5.7.2. Reação do MANEP com hidroxilamina em D₂O e H₂O

A reação de degradação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, também foi seguida em H₂O e D₂O a pH (pD) 7,0, em diferentes concentração de hidroxilamina a 60 °C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de KCl. Os valores experimentais das constantes de velocidades observadas (k_{obs}) encontram-se na **Tabela 8** e são mostrados na **Figura 28** como gráficos de k_{obs} em função da concentração de NH₂OH em D₂O e H₂O para fins de análise do efeito isotópico na reação do MANEP.

Tabela 8. Valores de k_{obs} para a reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ em função da concentração de NH₂OH em H₂O e D₂O a pH (pD) 7,0, a 60 °C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de KCl.

[NH ₂ OH] H ₂ O	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$	[NH ₂ OH] D ₂ O	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$
0,1	2,1	0	1,28
0,2	2,42	0,2	1,58
0,4	2,85	0,4	1,92
0,6	3,35	0,6	2,17
0,8	3,83	0,8	2,48
1	4,3	1	2,72

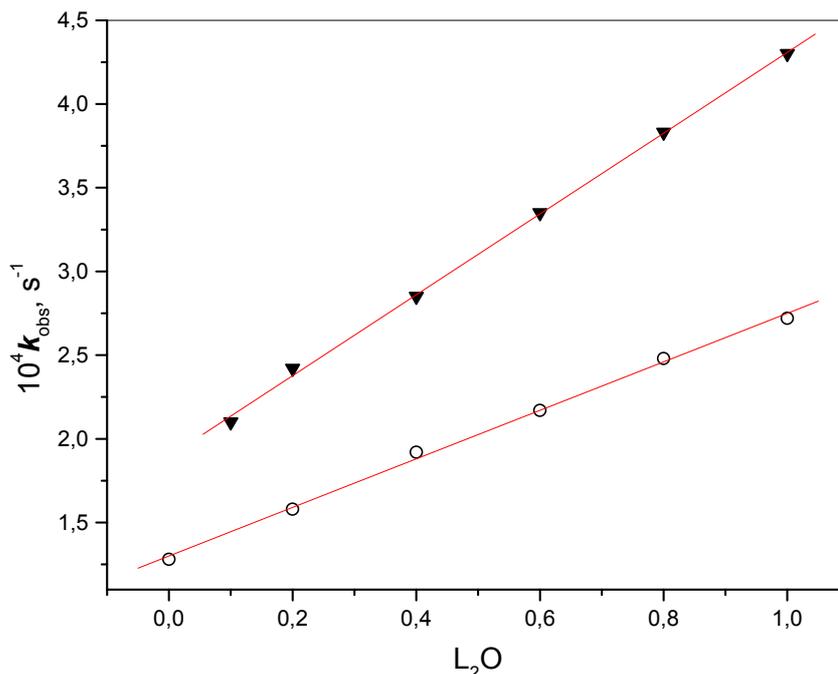


Figura 28 - Efeito da concentração de NH₂OH na reação do MANEP (1,0x10⁻⁵ mol.dm⁻³) em D₂O (○) e H₂O (▼) a pH (pD) 7,0, a 60 °C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl, L representa os átomos de D e H.

Na **Figura 28**, observa-se que os valores de k_{obs} aumentam com o aumento da concentração da hidroxilamina e são maiores em H₂O do que em D₂O, resultando num efeito isotópico normal do solvente.

Os dados dos valores calculados na **Figura 28** foram calculados a partir dos dados experimentais utilizando a **Equação 12**.

$$k_{obs} = k_0 + k_L * [NH_2OH] \quad (12)$$

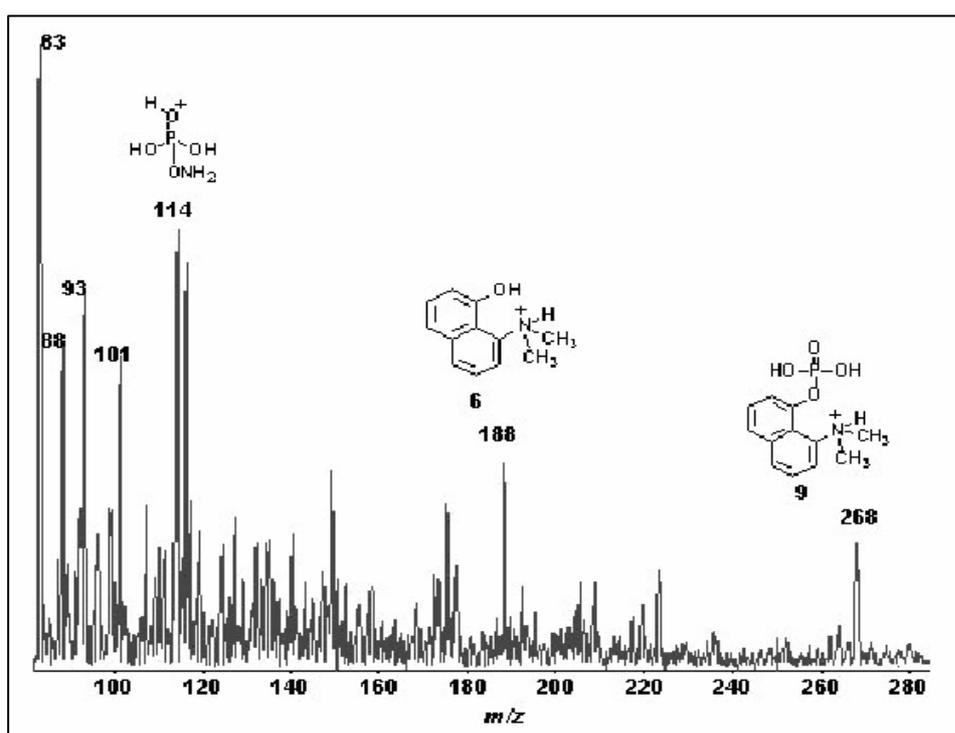
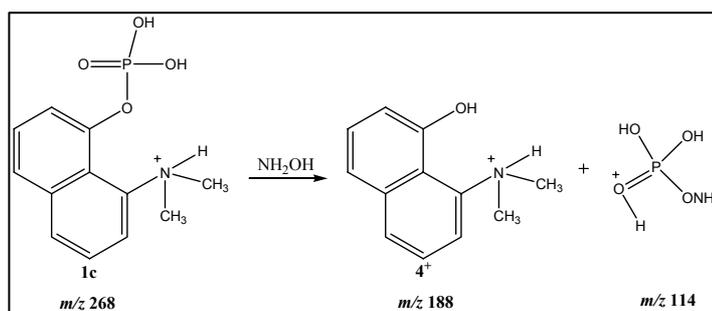
Na **Equação 12**, k_L representa a constante de velocidade de segunda ordem em água (L=H) e água deuterada (L=D) para a reação do MANEP com NH₂OH em H₂O e D₂O. O ajuste dos dados permite calcular que $k_H = 2,41 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ e $k_D = 1,45 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$.

A razão entre as constantes k_H e k_D , representa o efeito isotópico cinético para as reações de **1m** com NH₂OH ($k_H/k_D = 1,67 \pm 0,05$), valor este levemente superior daquele observado para a reação de substituição nucleofílica da água ($k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1,46 \pm 0,04$). Os resultados são consistentes com ataque nucleofílico em **1m** em ambos os casos e o efeito isotópico cinético é razoavelmente pequeno, um

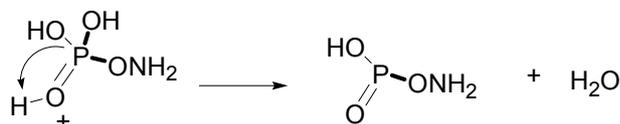
fato consistente com outros dados disponíveis na literatura para reações de hidrólise de monoéster de fosfato na forma dianiônica.³⁹

5.7.3. Reação do MANEP com hidroxilamina monitorada por ESI-MS

O acompanhamento da reação do MANEP com hidroxilamina é consistente com o **Esquema 31** e, por ESI(+)-MS, conforme **Figura 29**, foram identificados: o íon **1c** m/z 268, o íon **4⁺** de m/z 188 foi identificado e caracterizado e o íon de m/z 114 correspondente a estrutura $[\text{H}_2\text{PO}_3\text{ONH}_2\text{H}]^+$ foi observado, corroborando os dados cinéticos, que a reação acontece através do ataque da hidroxilamina ao fósforo de **1c**.



Os experimentos de MS/MS para o DANOL são idênticos daqueles mostrados anteriormente para a reação de hidrólise. O íon de m/z 114 não mostra um espectro de CID elucidativo, talvez devido a possível perda de duas moléculas neutras num processo dissociativo com redução do fósforo (P^{IV}/P^{III}) conforme mostrado no **Esquema 32**.



m/z 114

Esquema 32

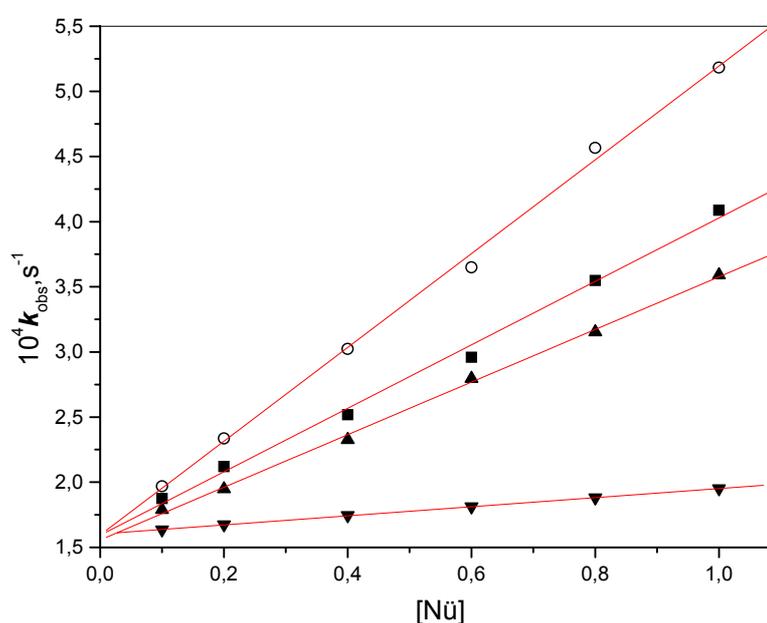
5.7.4. Efeito da concentração de α -nucleófilos na reação do MANEP

O acompanhamento das reações do MANEP com os α -nucleófilos hidroxilamina (NH_2OH), N-metil hidroxilamina ($MeNH_2OH$), N,N-dimetil hidroxilamina (Me_2NOH) e O-metil hidroxilamina ($MeONH_2$), foi realizado acompanhando as mudanças espectrais na região do UV-Vis, visando fundamentalmente comparação de reatividades e a elucidação do mecanismo da reação do MANEP com este tipo de nucleófilos. Essencialmente, procura-se mudar sistematicamente os substituintes nos átomos de O e N para verificar os efeitos cinéticos frente a reações de substituição nucleofílica em ésteres fosfóricos.

A reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ com α -nucleófilos foi acompanhada na região do patamar a pH 7,0, tamponado, em função de concentração de α -nucleófilo (entre 0,1 e 1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), em H_2O , a $60^\circ C$ e força iônica 1,0 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (KCl). Os valores das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação encontram-se na **Tabela 9** e são apresentados graficamente na **Figura 30** onde pode ser visualizado que os valores de k_{obs} aumentam linearmente em função da concentração do α -Nü em H_2O .

Tabela 9. Valores de k_{obs} da reação de **1m** em função da concentração do α -Nü.

[Nu]	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$ NH ₂ OH	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$ MeNHOH	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$ Me ₂ NOH	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$ MeONH ₂
0,1	1,875	1,969	1,789	1,635
0,2	2,120	2,336	1,948	1,674
0,4	2,518	3,023	2,326	1,744
0,6	2,959	3,649	2,795	1,812
0,8	3,549	4,566	3,153	1,881
1,0	4,087	5,183	3,591	1,951

**Figura 30** - Efeito da concentração do α -Nü na velocidade de reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm⁻³, MeONH₂ (▼), Me₂NOH (▲), NH₂OH (■) e MeNHOH (○), em H₂O a pH 7,0, a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl.

Os valores teóricos da **Figura 30** foram calculados correlacionando a curva teórica com os dados experimentais utilizando a **Equação 13**.

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{Nu}}[\text{Nu}] \quad (13)$$

Os valores de k_{Nu} correspondem as constantes de velocidade segunda ordem para a reação do MANEP com os diferentes nucleófilos de efeito- α em estudo, os quais são mostrados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Constantes de velocidade de segunda ordem para a reação do MANEP com α -nucleófilos em estudo.

Nucleófilo	$10^5 k_{Nü} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
MeONH ₂	3,50
Me ₂ NOH	20,2
NH ₂ OH	24,3
MeNHOH	36,0

Basicamente, os resultados indicam que a ordem de reatividade é MeNHOH > NH₂OH > Me₂NOH > MeONH₂, um fato que sugere que a reatividade via ataque pelo átomo de oxigênio é maior daquela mostrada pelo nitrogênio. Este resultado é consistente com os resultados observados na reação de hidrólise do bis(2-4-dinitrofenil)fosfato na presença destes nucleófilos, onde foi demonstrado que o ataque via oxigênio é favorecido para este tipo de nucleófilos.

5.7.5. Reação do MANEP com Fosfato

O efeito que o nucleófilo fosfato exerce sobre a hidrólise do MANEP, depende muito da espécie reativa presente em solução, a qual é basicamente controlada pelo pH e as respectivas constantes de dissociação ácida. Para verificar o efeito, foi estudada a reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ com diferentes concentrações de fosfato em H₂O a 60°C, pH 7,0 e 8,0, em H₂O, 60°C e força iônica $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (KCl). Os valores de k_{obs} obtidos são mostrados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores das constantes de velocidade de primeira ordem para o reação do MANEP com fosfato em H₂O a 60°C e força iônica 1,0 de KCl.

$[\text{PO}_4^{-2}]$	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1} \text{ pH } 7,0$	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1} \text{ pH } 8,0$
0,197	1,669	1,724
0,388	1,705	1,915
0,572	1,796	2,080
0,752	1,815	2,264
0,918	1,961	2,494

Os valores das constantes de velocidade observadas de primeira ordem, **Tabela 11**, geram os gráficos de k_{obs} versus [Fosfato] apresentados na **Figura 31**.

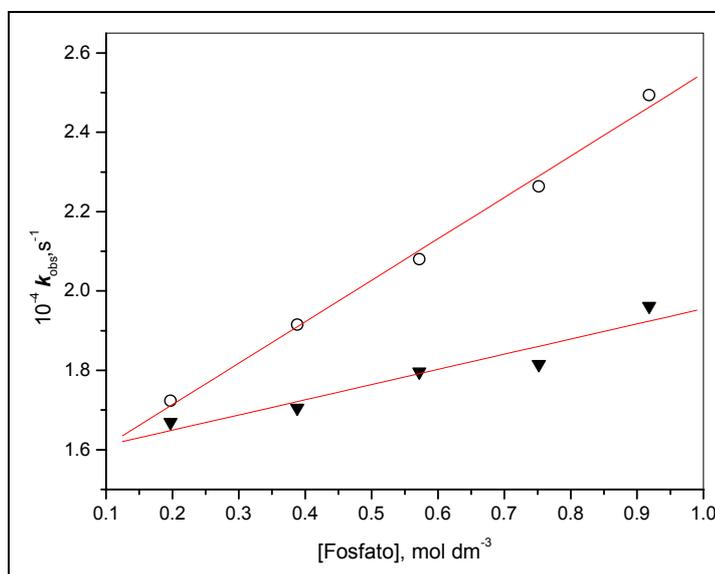


Figura 31. Efeito da concentração de fosfato a pH 7,0 (▼) e 8,0 (○) na velocidade de reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm⁻³ em H₂O, a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl.

Observa-se na **Figura 31**, que o aumento das constantes de velocidade observada k_{obs} em função da concentração de PO_4^{2-} , é mais acentuado a pH 8,0.

Os valores teóricos da **Figura 31** são calculados correlacionando os dados experimentais e a **Equação 13**. O coeficiente angular das retas mostra que há um aumento considerável de reatividade com o aumento do pH, fato que indica que a espécie HPO_4^{2-} é consideravelmente mais reativa que a forma monoaniônica H_2PO_4^- , o que resulta em constantes de segunda ordem de $1,3 \times 10^5$ dm³.mol⁻¹.s⁻¹ (pH 7,0) e $10,4 \times 10^5$ dm³.mol⁻¹.s⁻¹ (pH 8,0) para a reação de hidrólise do MANEP **1m**.

5.7.6. Reação do MANEP com acetato e formiato

Para verificar o efeito de outros nucleófilos que atacam via oxigênio foram analisados os efeitos de ânions do tipo (RCOO^-) sobre a hidrólise do MANEP, estudando as reações do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm⁻³ com diferentes concentrações de acetato e formiato em água a 60°C, pH 7,0 e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl. Os valores de k_{obs} obtidos encontram-se mostrados na **Tabela 12** resultando na **Figura**

32 que mostra os gráficos de k_{obs} versus $[\text{RCOO}^-]$, onde é verificado que o aumento na concentração do nucleófilo, provoca um aumento linear no valor da constante de velocidade observada.

Tabela 12. Valores k_{obs} para reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ com acetato e formiato em água, a 60°C , pH 7,0 e força iônica 1,0 de KCl.

$[\text{RCOO}^-]$	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$
	Acetato	Formiato
0,1	1,678	1,669
0,2	1,736	1,724
0,4	1,942	1,837
0,6	2,068	1,958
0,8	2,219	2,113
1,0	2,381	2,221

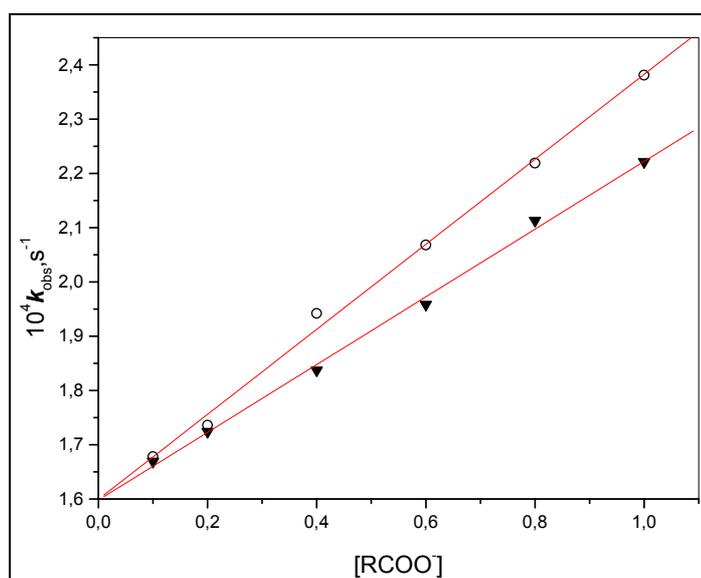


Figura 32. Efeito da concentração de acetato (\blacktriangledown) e formiato (\circ) na velocidade de reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ em água, a 60°C , pH 7,0 e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl

Observa-se na **Figura 32**, que o aumento das constantes de velocidade observadas, k_{obs} , em função da concentração de RCOO^- , é maior no caso do formiato do que para o acetato nas mesmas condições, um resultado que favorece um mecanismo de catálise nucleofílica .

De forma semelhante aos casos anteriores, os valores teóricos representados pelas linhas na **Figura 32** são calculados correlacionando os dados experimentais com a **Equação 13**. Os coeficientes angulares das retas da **Figura 32** permitem calcular as constantes de velocidade de segunda ordem de 7,8 (formiato) e 6,2 (acetato) $\times 10^{-5} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o efeito destes ânions na reação de hidrólise do MANEP 1m.

5.7.7. Reação do MANEP com fluoreto de potássio (KF)

5.7.7.1. Acompanhamento da reação do MANEP com KF por UV-Vis

A reação do MANEP com fluoreto foi estudada devido ao fato de que o fluoreto geralmente acelera as velocidades das reações de hidrólise de fosfato e, este tipo de efeito está relacionado com a elevada estabilidade da ligação P-F, o que resulta num efeito catalítico significativo.

A reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, foi acompanhada na região do patamar a pH 7,0, tamponado, em função de concentração de fluoreto (entre 0,2 e 1 mol dm^{-3}) em H_2O , a 60°C , pH 7,0 e força iônica 1,0 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de KCl, obtendo-se os valores das constantes de velocidade observadas de primeira ordem, apresentadas na **Tabela 13**.

Tabela 13. Valores das constantes de velocidade de primeira ordem para o reação do MANEP com fluoreto em H_2O a 60°C e força iônica 1,0 de KCl.

[F ⁻]	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$
0,2	1,68
0,2	1,7
0,4	1,74
0,4	1,76
0,6	1,76
0,6	1,80
0,8	1,84
0,8	1,89
1,0	1,93
1,0	1,93

Os valores experimentais da **Tabela 14** resultam na **Figura 33**, apresentando os gráficos de k_{obs} em função da variação da concentração do nucleófilo em H_2O na reação com o MANEP.

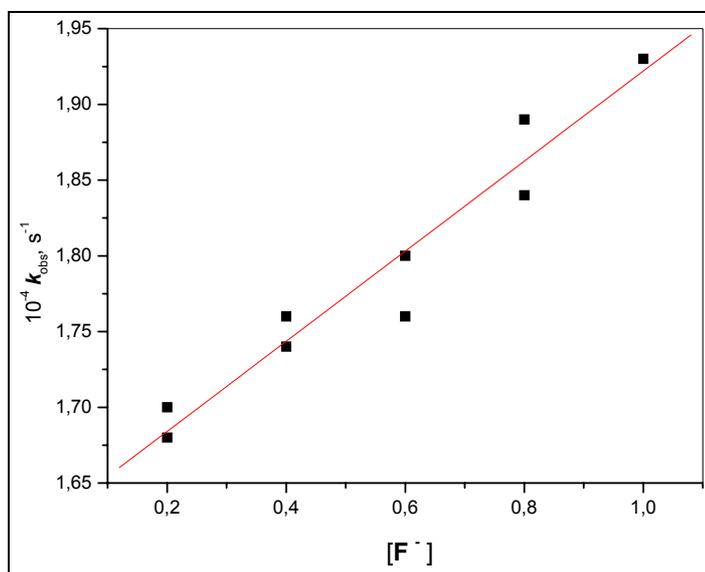
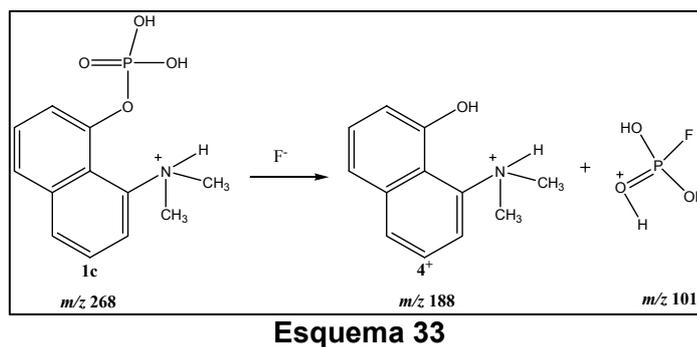


Figura 33. Efeito da concentração do fluoreto na velocidade de reação do MANEP $1,0 \times 10^{-5}$ mol.dm⁻³ em H_2O , a pH 7,0 a 60°C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl

Observa-se na **Figura 33** que os valores das constantes de velocidades observadas aumentam com o aumento da concentração do fluoreto, e que a reação é muito sensível nestas condições. Os valores teóricos da **Figura 33** foram calculados correlacionando os dados experimentais com a **Equação 13**. O coeficiente angular da reta corresponde a uma constante de velocidade de segunda ordem de $2,97 \times 10^{-5}$ dm³mol⁻¹s⁻¹ para a reação.

5.5.7.2. Acompanhamento da reação do MANEP com KF por ESI-MS e ESI-MS/MS

As massas das moléculas protonadas (MH^+) determinadas por ESI(+)-MS (Electrospray positivo-MS) e as fragmentações por ESI(+)-MS/MS para a reação do MANEP com F^- , apresentaram resultados importantes a respeito da formação dos produtos de reação, as quais são concordantes com as estruturas propostas, **Esquema 33** e os espectros observados são os relacionados na **Figura 34**.



Os íons 9 (m/z 268) e 6 (m/z 188) foram identificados e caracterizados por experimentos de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS respectivamente (**Figura 34**).

Os espectros de MS/MS dos íons de m/z 101, 188 e, 268 estão de acordo com o esperado. O íon de m/z 101 corresponde à espécie catiônica $\text{H}_3\text{PO}_3\text{F}$. Estes resultados corroboram o mecanismo proposto para a hidrólise do MANEP na presença de KF.

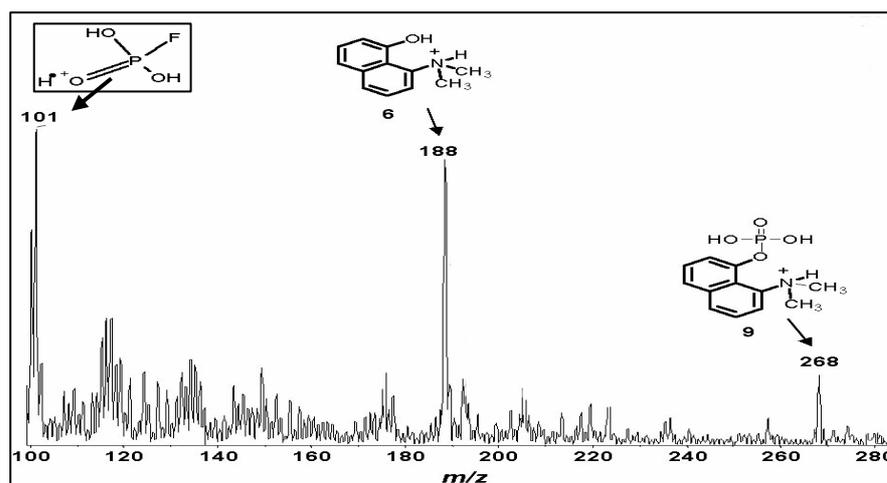


Figura 34. Espectro de ESI(+)-MS para a reação do MANEP com fluoreto

5.8. Correlação de Brønsted da reação do MANEP com nucleófilos

A correlação de Brønsted mostra a relação entre as constantes de velocidade de segunda ordem para a reação do **MANEP** com diferentes nucleófilos e o pKa dos mesmos, permitindo analisar as mudanças de reatividade em função da estrutura e contribuindo na elucidação do mecanismo da reação.

Os nucleófilos estudados no item **4.5. Reações de 8-dimetilaminonaftil-1-fosfato com outros nucleófilos**, mostraram reatividades dependentes da estrutura dos mesmos e as constantes de velocidade de segunda ordem e valores de pKa são mostrados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Valores das constantes de velocidade de segunda ordem para a reação do MANEP com diferentes nucleófilos.

Nucleófilo	pKa	$10^5 k_{\text{Nü}} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
H ₂ O	-1,74	0,288
H ₂ PO ₄ ⁻	1,9	1,3
Fluoride	3,1	2,97
Formate	3,81	7,8
MeONH ₂	4,62	3,5
Acetate	4,81	6,2
Me ₂ NOH	5,20	20,2
NH ₂ OH	5,64	24,3
MeNHOH	6,18	36,0
HPO ₄ ²⁻	6,51	10,4

Os valores da **Tabela 15** permitem construir um gráfico de Brønsted (**Figura 35**), que mostra a correlação entre o log $k_{\text{Nü}}$ para a reação dos diferentes nucleófilos com o MANEP e os correspondentes valores do pK_a dos nucleófilos estudados.

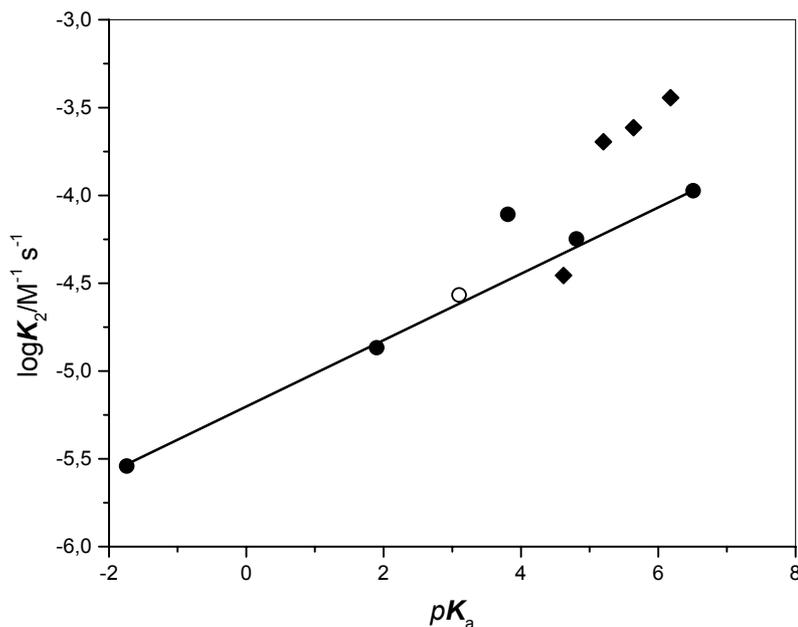


Figura 35. Gráfico de Brønsted para catálise da hidrólise de **1m** por nucleófilos, em solução aquosa a 60°C. Os valores experimentais são para água, fosfato mono e diânion, formiato e acetato (●), fluoreto (○) e hidroxilamina e derivados metilados (◆).

No gráfico de Brønsted da **Figura 35** a linha contínua mostra o efeito da estrutura de nucleófilos que atacam via oxigênio, passando pelos pontos referentes aos ataques pela água, acetato e fosfato na forma de mono e dianions.

Os pontos dos nucleófilos de efeito α , hidroxilamina e seus derivados N-metil, N,N-dimetil mostram um aumento moderado, de acordo com o efeito esperado para reações com monoésteres de fosfato na forma de diânion. Somente a NH_2OMe que só pode reagir pelo N não mostrou uma reatividade superior daquela esperada em função da sua basicidade e, a constante de velocidade para a reação da mesma com MANEP é levemente inferior daquela observada na presença de nucleófilos normais atacando via oxigênio. O efeito catalítico observado é consistente com o mecanismo de ataque pelo oxigênio para outras hidroxilaminas.

Neste ponto é importante salientar que o ataque de oxianions no centro eletrofílico ao átomo de fósforo central de um monoéster de fosfato na forma de diânion, geralmente esta reação não é detectada entre oxianions nucleofílicos e diânions de monoésteres de fosfato ativado. Nós presumimos que a repulsão eletrostática normalmente desfavorece a reação do diânion, sendo que este efeito eletrostático, de acordo com Herschlag,⁷⁷ pode chegar a ser de aproximadamente 50 vezes na constante de velocidade do ataque pelo fluoreto no diânion de fosfato de p-

nitrofenila, conforme demonstrado em experimentos com força iônica alta em água a 95°C.

O coeficiente de Brønsted β_{nuc} (coeficiente angular da reta na **Figura 35**) calculado para a reação dos oxiânions é de $0,19\pm 0,01$. Este valor é menor, como esperado, que os valores de 0,29 e 0,50 medido para as reações do diéster 8-*N,N*-dimetilaminanafil-1-metilfosfato (**2c**) e para o triéster do 8-*N,N*-dimetilaminanafil-1-dietilfosfato (**3c**), respectivamente. Entretanto, o valor é significativamente maior do que o efeito zero observado para as reações do diânion do monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato, um composto que reage com nucleófilos neutros,⁷⁵ e que é hidrolisado com uma constante de velocidade semelhante daquela observada para **1m**, **Figura 36**.

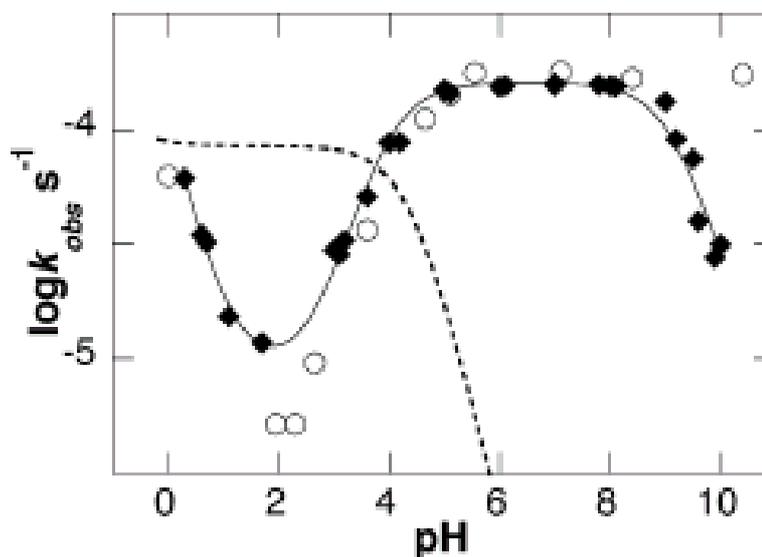


Figura 36. Perfil de pH para a hidrólise do **MANEP**, a 60° C e força iônica 1,0 mol.dm⁻³ de KCl. Os dados da curva principal e o ajuste para **MANEP** (◆, 60°C): a curva pontilhada é o perfil de pH para a hidrólise do **TANEP** (também a 60°C). Os círculos abertos (○) são os dados para fosfato de 2,4-dinitrofenila à 39°C, para comparação.

Ainda, o coeficiente de Brønsted β_{nuc} para reações do MANEP com oxiânions é idêntico ao $\beta_{nuc} = 0,19\pm 0,01$ observado para o ataque nucleofílico de piridinas substituída em salicil fosfato na forma de diânion.⁷⁸

Estes resultados sugerem que a catálise ácida geral intramolecular na reação de transferência de PO_3^- envolve um estado de transição mais rígido do que para as reações intermoleculares correspondentes. Este comportamento difere daquele observado para reações com o acetal do 8-*N,N*-dimetilamônio-1-metoxinaftaleno,

que mostra um comportamento semelhante entre as reações catalisadas intra ou intermolecularmente por diferentes nucleófilos. Provavelmente, a reatividade de alguns dos oxiânions com **1m** esteja relacionada com o efeito de carga do grupo dimetilamônio que neutraliza efetivamente a blindagem normalmente observada.

5.9. Parâmetros de ativação

A partir do tratamento dos dados experimentais de acordo com a Teoria do Estado de Transição é possível obter os parâmetros de ativação ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger , os quais refletem diretamente sobre a cinética das possíveis reações entre o MANEP e diferentes reagentes nucleofílicos. Os parâmetros foram obtidos experimentalmente, medindo-se as constantes de velocidade da reação em função da temperatura para um conjunto de nucleófilos.

Para fins de cálculos dos parâmetros de ativação, foram realizados experimentos cinéticos para as reações do MANEP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$, com água, fluoreto, formiato e acetato a 60, 70 e 80°C, em água a pH 7,0 e força iônica $1,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ (KCl). Os dados experimentais obtidos para estas reações em função da mudança da temperatura para diferentes nucleófilos, mantendo uma concentração correspondente a 1 mol dm^{-3} em todos os casos, são mostrados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Constantes de velocidade observadas para as reações do MANEP com vários nucleófilos em água e temperaturas diferentes.

Nucleófilo	t, °C	$k_{\text{obs}} \times 10^4, \text{ s}^{-1}$
Água	60,0	1,60
	70,0	5,86
	80,0	22,30
Acetato	60,0	2,38
	70,0	7,96
	80,0	32,4
Formiato	60,0	2,21
	70,0	7,45
	80,0	28,5
Fluoreto	60,0	1,93
	70,0	10,7
	80,0	66,0

Por simples verificação dos dados da **Tabela 15**, nota-se que há uma variação pequena para as reações do MANEP com água, acetato, formiato, e que as constantes de velocidade observadas aumentam exponencialmente com o aumento da temperatura, um comportamento esperado em termos da **Equação 3** de Eyring,⁶⁵ (p.43) o que permite tratar os dados como mostrado no gráfico da **Figura 37**. Entretanto, como as reações de acetato e formiato não são significativamente maiores do que aquelas observada para a reação da água, os dados não foram utilizados para cálculos de parâmetros de ativação.

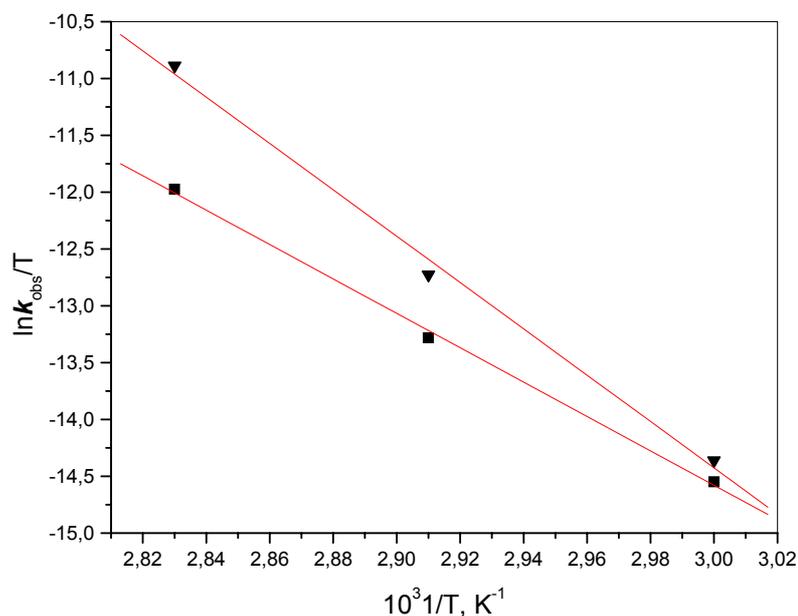


Figura 37. Influência da temperatura na reação de hidrólise do MANEP em H₂O (■) e F⁻ (▼).

Observa-se na **Figura 37** que os valores de $\ln k_{obs}/T$ em função de $1/T$, fornecem uma reta com excelente correlação para cada conjunto de nucleófilos, com coeficientes de correlação $> 0,99$ em todos os casos.

Os valores experimentais da **Figura 37** foram calculados correlacionando os dados experimentais com a **Equação 13**, o que permite calcular o coeficiente angular da reta como sendo o igual a $-\Delta H^\ddagger/R$ e utilizando os valores das constantes de Boltzmann e de Planck calcular o valor de $\Delta S^\ddagger/R$ a partir do coeficiente linear.

Os parâmetros de ativação ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger e E_a foram assim calculados utilizando as **Equações 3-5**, para as reações do MANEP com diferentes nucleófilos em H₂O. Os parâmetros de ativação obtidos para as reações da água e fluoreto, com MANEP são mostrados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Parâmetros de ativação para a hidrólise do MANEP com diferentes nucleófilos.

Nucleófilos	E_a , kJ mol ⁻¹	ΔH^\ddagger , kJ mol ⁻¹	ΔS^\ddagger , J K ⁻¹ mol ⁻¹	ΔG^\ddagger , kJ K ⁻¹ mol ⁻¹
Água	128,6	125,8(± 3,3)	59,0 (± 9,9)	106,14
Fluoreto	172,2	169,4(± 2,9)	176 (± 9)	58,46

Observa-se na **Tabela 16**, que os valores dos parâmetros de ativação para as reações do MANEP com acetato e formiato não são mostrados devido aos valores das variações de entalpia de ativação (ΔH^\ddagger) serem relativamente pequenos para os compostos nos quais há ataque via oxigênio (água, acetato e formiato como nucleófilos). Um fenômeno semelhante é observado para as entropias de ativação que são fortemente positivas e semelhantes em todos os casos de nucleófilos atacando via oxigênio. No caso do fluoreto há uma entalpia de ativação substancialmente superior que é compensada com uma forte variação na entropia de ativação.

A hidrólise de 1m segue o padrão habitual, sendo controlado pelo termo entálpico, $\Delta H^\ddagger = 125,8 \pm 3,3$ kJ (30,06 ± 0,80 kcal) mol⁻¹, com uma entropia positiva de ativação, $\Delta S^\ddagger = 59,0 \pm 9,9$ J (14,1 ± 2,3 cal) K⁻¹ mol⁻¹. É esperado que o envolvimento do ácido geral não tenha nenhum efeito significativo na entropia de ativação, já que a transferência de próton acontece junto a uma ligação de hidrogênio que permanece forte ao longo da coordenada de reação.

Como comparação, salientamos que as entalpias de ativação observadas para a hidrólise dos diânions do fenil¹⁹ e 2,4-dinitrofenil fosfato³⁹ são 38 ± 2 e 26 kcal/mol, respectivamente. Os mesmos compostos mostrando entropias semelhantes, positivas de ativação de ~7 cal K⁻¹.mol⁻¹. No caso da hidrólise de salicil fosfato **2** $\Delta H^\ddagger = 23,5$ kcal.mol⁻¹, com $\Delta S^\ddagger = -1,2$ cal⁷⁸. Assim, em geral a reatividade é controlada em todos os casos principalmente pela entalpia; sendo que a entropia de ativação indica que o envolvimento da água como nucleófilo nestas reações é comparável ao seu envolvimento na esfera de solvatação do reagente fosfato na forma de diânion. Presumivelmente, o envolvimento relativamente fraco da água como reagente nucleofílico, é equilibrado pela liberação de moléculas de água do grupo PO₃²⁻ que está inicialmente fortemente solvatado e que deve sofrer diminuição da densidade de carga no caminho ao estado de transição.

Os parâmetros termodinâmicos para a reação com ânion fluoreto mostram efeitos estéricos mínimos e, a sua baixa basicidade faz com que seja necessário medir as constantes de velocidade de segunda ordem a temperaturas relativamente elevadas (60, 70 e 80°C), na presença de uma reação de hidrólise relativamente rápida. Neste intervalo, os resultados são fortemente sugestivos. O entalpia de ativação ΔH^\ddagger é maior que aquela da reação da água $169,4 \pm 2,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ($41,1 \pm 0,7 \text{ kcal}$), um fato provavelmente com o elevado custo entálpico referente à dessolvatação do fluoreto, que possui uma elevada densidade de carga. Este efeito é substancialmente compensado por uma entropia de ativação positiva muito grande, $\Delta S^\ddagger = 176 \pm 9 \text{ J K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ($42,0 \pm 2,9 \text{ kcal}$). Em termos físicos, o aumento de 10 kcal.mol^{-1} em ΔH^\ddagger comparado com o ataque pela água é consistente com a repulsão eletrostática que desfavorece a reação do ânion fluoreto. A liberação da água envolvida contribui para um aumento considerável na entropia de ativação que compensa o efeito entálpico.

Em condições práticas, o efeito global desta combinação incomum de parâmetros termodinâmicos faz que a reação do fluoreto substancialmente mais sensível a temperatura do que as outras reações em questão, e torna a reação mais importante a elevadas temperaturas.

5.10. Cálculos *ab initio*

Duas questões fortemente relacionadas com o mecanismo sugerido no **Esquema 25** (p.48) são: i) os valores de pKa alterados dos dois grupos fosfato e dimetilamônio que sofrem ionização na região de pH em estudo; e ii) o mecanismo pelo qual o grupo dimetilamônio catalisa efetivamente a transferência do grupo fosforila, especialmente para nucleófilos negativamente carregados. Nós sugerimos que a principal causa dos efeitos observados é a ligação de hidrogênio intramolecular e, para conhecer mais sobre a estrutura do MANEP e a influência dos efeitos estereoeletrônicos envolvidos nos diferentes efeitos observados, foram feitos cálculos *ab initio* para definir a estrutura **1m** e o produto da reação de forma mais detalhada.

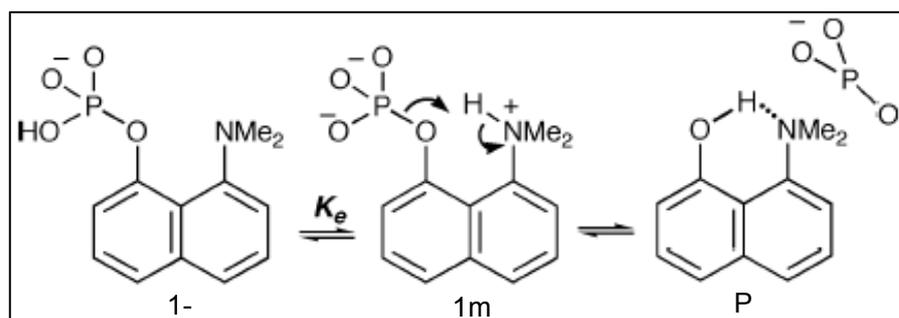
Os resultados dos cálculos de estruturas na fase gasosa, provavelmente pouco descrevem adequadamente a estrutura real do íon dipolar em solução aquosa e, por esta razão, realizamos os cálculos utilizando dois métodos diferentes para modelar o solvente aquoso. Os cálculos da estrutura do MANEP com o modelo de água como um contínuo (PCM) foi executada utilizando o programa Jaguar, e o nível de cálculo utilizado foi B3LYP/6-31G++**, computando a polarização para níveis p e d (asteriscos) e funções difusas (**). Nos cálculos onde foram adicionados um número de quinze moléculas de água de forma explícita, para permitir a representação da camada interna de solvatação do grupo PO_3^- , o nível de cálculo utilizado foi Hartree-Fock restrito, com funções de bases HF/6-31G*.

Para maior validade dos dados, os efeitos de solvatação foram incluídos durante todos os processos de otimização de geometria e avaliação da energia. 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 PCM, atualmente utilizado para os cálculos realizados com o pacote GAMESS e Jaguar. Uma vez calculados, os dados obtidos foram transformados em estruturas visualizáveis através dos programas normais de visualização.

5.10.1. Otimização da estrutura do MANEP

As tentativas de otimização das estruturas do MANEP em fase gasosa não resultaram em estruturas estáveis, já que normalmente é observada a expulsão do grupo metafostato, formando como produto o DANOL.

Assim, o estudo envolvendo MANEP foi realizado com a participação de um meio externo (solvente). Nesse estágio, a molécula de MANEP foi modelada de acordo com a forma mais reativa deste composto que é a estrutura **1m** (hidrogênio ligado ao nitrogênio), que prevalece entre pH 5 e 9. Esta forma apresenta três densidades eletrônicas de carga, situadas ao redor do átomo de fósforo (duas densidade negativa) e sobre o átomo de nitrogênio (densidade positiva), fazendo com que a carga total da molécula seja negativa.



Esquema 34

Os valores obtidos por cálculos *ab initio* em nível HF (B3LYP/6-31++G**) em fase aquosa, para as estruturas otimizadas do **Esquema 34** encontram-se nas **Tabelas 17,18 e 19** (em Anexo, p. 104 - 109), resultando nas **Figuras 38, 39 e 40**.

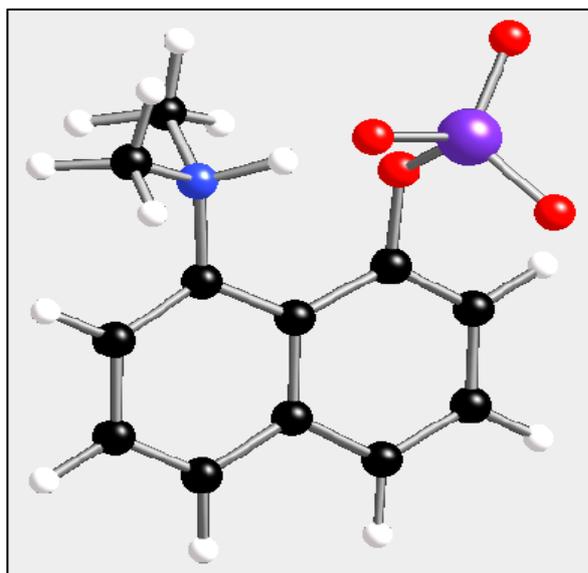


Figura 38. Estrutura otimizada por cálculos *ab initio* em fase aquosa, para o composto **1m**.

Observa-se na **Figura 38** que o hidrogênio do grupo dimetilamônio está direcionado para o oxigênio arílico, de acordo com a estrutura proposta na forma **1m**, **Esquema 33**. Esta estrutura corresponde a forma de menor energia (-1162,39540886729 Hartrees, 0 kJ mol⁻¹), consistente com a evidência experimental que o próton está ligado ao nitrogênio do grupo dimetilamônio e não ao grupo fosfato, que permanece na forma de diânion de fosfato.

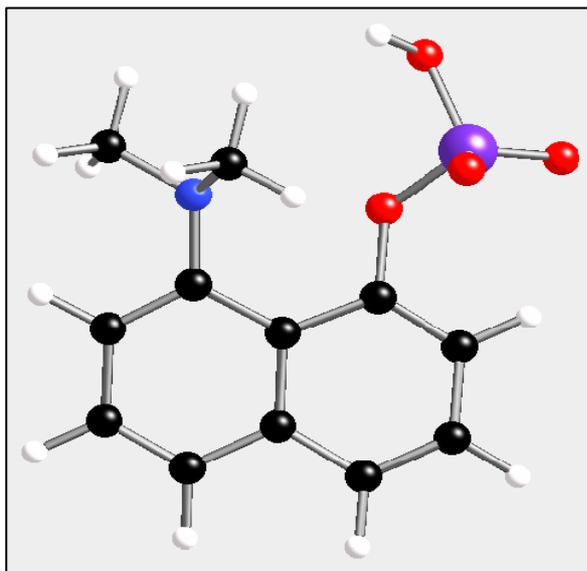


Figura 39 - Estrutura otimizada por cálculos *ab initio* em fase aquosa, para o composto 1-.

Observa-se na **Figura 39** que a estrutura otimizada do MANEP na qual o hidrogênio do grupo dimetilamônio é transferido para o grupo fosfato, é de menor estabilidade que a forma **1m**. Esta estrutura corresponde ao tautômero **1-**, **Esquema 29**, que possui uma maior energia (-1162,38747900614 Hartrees) que corresponde aproximadamente a 21 kJ mol^{-1} , um valor razoável já que pode ser comparado com o ΔpK_a experimental, onde a diferença observada de 3,3 unidades, corresponde a aproximadamente 19 kJ mol^{-1}).

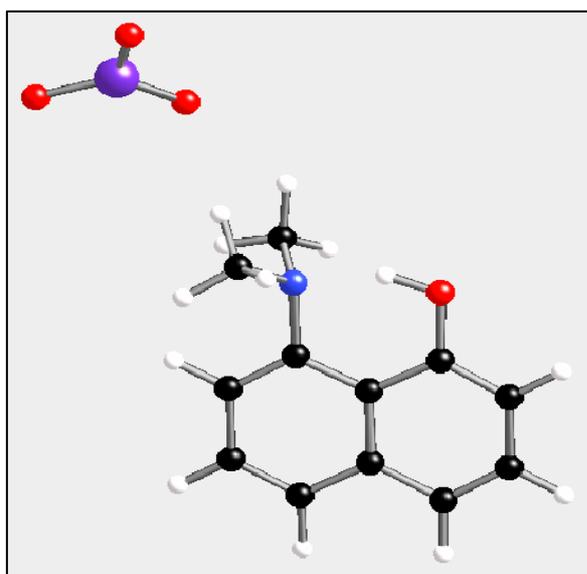


Figura 40. Estrutura otimizada por cálculos *ab initio* em fase aquosa, para **P**.

Observa-se ainda um terceiro mínimo, mostrado na **Figura 40** que corresponde a formação dos produtos metafosfato e o naftol 4, sendo este mínimo

encontrado com um valor da energia de $-1162,36806384593$ Hartrees, o que corresponde a 72 kJ mol^{-1} . Estes valores de energia podem ser comparados com aqueles necessários para a quebra da ligação (P—O) na decomposição de **1m**, sendo que o valor experimental para o ΔH^\ddagger da reação de hidrólise de **1m** é de $126 \text{ kJ (30,06}\pm\text{0.80 kcal) mol}^{-1}$. É importante salientar que a geometria calculada para o produto DANOL, é totalmente consistente com a estrutura cristalina do mesmo, onde se verifica que o próton está totalmente transferido do nitrogênio para o oxigênio.

5.10.2. Estrutura do MANEP e o efeito da solvatação

A segunda metodologia utilizada para avaliar a influência do efeito do solvente na estrutura de moléculas orgânicas, foi realizando os cálculos (programa GAMESS,⁷⁹ HF/6-31G(d) nível *) com o MANEP interagindo com uma quantidade de 15 moléculas de água discretas. Este número de moléculas de água pretende representar a camada interna de solvatação do grupo do PO_3^- ; e os resultados foram comparados com as formas dianiônicas de metil fosfato e naftil fosfato, que possuem cargas semelhantes sem a presença do grupo de dimetilamônio. A minimização resultou na estrutura **1m**, sem a necessidade de nenhum tipo de restrição geométrica quando água era o solvente utilizado. Os resultados dos cálculos são mostrados em detalhes nas **Tabelas 20, 21 e 22** (em Anexo, p. 110 - 122), que geram as **Figuras 41 (a), 41 (b) e 41 (c)**.

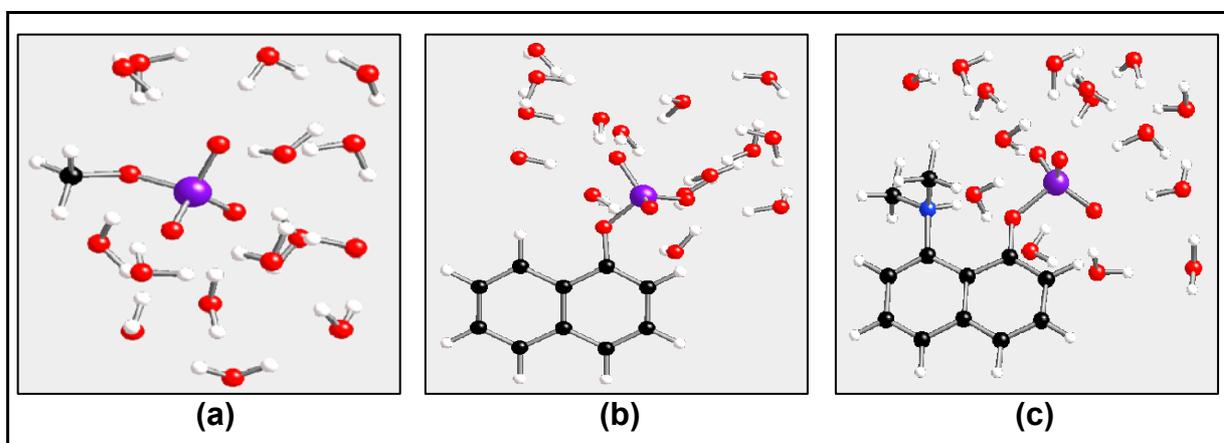


Figura 41. Geometria otimizada do diânion de metil fosfato **(a)**, diânion de naftil fosfato **(b)** e do composto **1m (c)**, com 15 moléculas de água, B3LYP/6-31(d). $-2297,1981424105$ Hartrees.

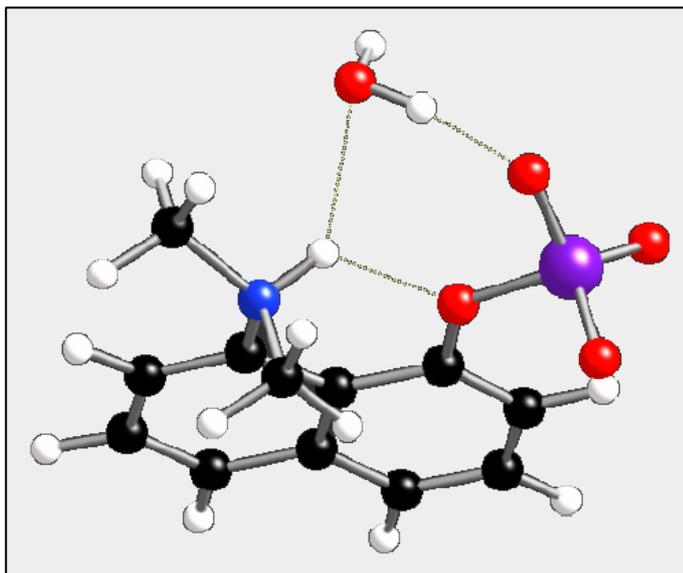


Figura 42. Detalhes da ligação de hidrogênio intramolecular do composto **1m** com 15 moléculas de água.

A estrutura com menor energia encontrada usando o modelo de 15 moléculas de água discretas corresponde a forma monoaniônica **1m**, o que concorda com as evidências experimentais que indicam que o próton está ligado ao nitrogênio do grupo dimetilamônio e não ao diânion do grupo fosfato.

Nos dois sistemas de cálculo utilizados, foi encontrado que a ligação P—O(C) é alongada significativamente com valores de 1,702Å utilizando o modelo contínuo e, 1,693Å utilizando 15 moléculas de água. Estas distâncias são significativamente maiores que os valores de 1,667 e 1,648Å que foram calculados para as formas dianiônicas de naftil fosfato e metil fosfato.

A **Figura 43** mostra as estruturas calculadas usando o modelo contínuo (A) e moléculas de água discretas (B). No composto **1m**, o próton do grupo amônio está envolvido numa ligação de hidrogênio bifurcada com o oxigênio da ligação P—O(C) adjacente e com um segundo centro mais básico. No modelo contínuo, na ausência de moléculas de água discretas a ligação de hidrogênio é mais forte com uma distância N—H...O de 2,479 Å (ângulo da ligação é 169,7°, o ângulo de torção CCNH é -43,4°) é com uma ligação muito forte de N⁺H para o grupo (P)O⁻, o que provoca uma alongação da ligação P—O⁻ para 1,558 Å quando comparada com os outros dois P—O⁻ onde os valores da distância de ligação P—O⁻ são de 1,515 ±

0,001 Å. A carga no grupo N^+H é ainda efetivamente distribuída por uma ligação de hidrogênio mais fraca ($N-H \dots O$ 2,805Å, com ângulo da ligação é 105,8°) para o oxigênio do grupo de saída.

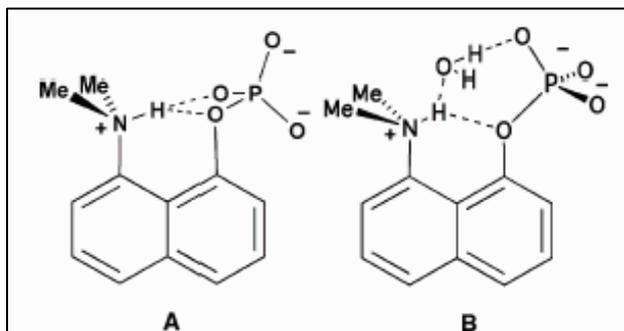


Figura 43. Estruturas calculadas usando o modelo contínuo (A) e moléculas de água discretas (B).

Na presença de moléculas de água discretas cada um dos três centros $P-O$ aniônicos estão fortemente solvatados por ligação de hidrogênio por duas ou três moléculas de água, e a ligação de hidrogênio intramolecular é mais forte ($N-H \dots O$ 2,607Å, ângulo de ligação de 123,3°). A ligação $N-H$ ainda está fora do plano do sistema aromático (ângulo de torção $CCNH$ de 38,3°), o que permite uma segunda, ligação de hidrogênio fraca ($N-H \dots O$ 3,03Å, ângulo de ligação de 136,3°) do N^+H para uma molécula de água que está solvatando um dos grupos $P-O^-$, **Figura 43**.

6. Conclusões

O MANEP foi estudado como modelo de catálise intramolecular para processos de catálise ácida geral enzimática, visando compreender a quebra da ligação O—P facilitada por um grupo dimetilamônio vizinho ao centro reacional da molécula, na presença de nucleófilos normais ou de nucleófilos alfa.

A reação do MANEP foi acompanhada cineticamente e os produtos identificados espectroscopicamente. A estrutura do MANEP, otimizada na presença de 15 moléculas de água, mostra a formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular que favorece a elevada reatividade do MANEP e modifica a acidez dos grupos presentes. A determinação do pKa do MANEP por espectroscopia de UV-Vis resultou nos valores de $pK_{a2} = 4,27 (\pm) 0,10$ e $pK_{a3} = 9,41 (\pm) 0,04$.

A forma mono aniônica **1m**, forma uma ligação de hidrogênio interna que provoca uma desestabilização, que permite o ataque de nucleófilos carregados (cargas negativas) junto ao centro eletrofílico, com uma aceleração de cerca de 10^6 vezes dessa reação, efeito raro de ser observado em condições experimentais.

A constante de velocidade para hidrólise de **1m** no patamar na região entre pH 4,5 e 9 corresponde a uma aceleração significativa, alcançada pela ação combinada de um nucleófilo externo e um grupo ácido geral interno. A sinergia envolvida não é alta, como era esperado para uma reação com uma baixa sensibilidade para o nucleófilo. Na reação do MANEP com hidroxilamina em D_2O e H_2O o efeito isotópico cinético para as reações de **1m** com água ($k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1,46 \pm 0,04$). O inventário de prótons indica um estado de transição que se encontra cedo na coordenada de reação para formação de ligação com a água e, indica a transferência de um só próton no estado de transição na reação.

Os valores das constantes de velocidades para a reação de hidrólise do MANEP sob influência de forte acidez, aumentam até aproximadamente $[HCl] = 7 \text{ mol.dm}^{-3}$ de ou DCI, e diminuindo em concentrações ácidas mais altas. Nesta região é observado um efeito isotópico inverso ($k_H/k_D = 0,78$).

A constante de velocidade (k_{obs}) para a reação de hidrólise de **1m** aumenta com o aumento da concentração dos solventes DMSO, DIOXANO e MeOH, fato que indica neutralização de carga no caminho ao estado de transição.

O perfil de pH para a reação do MANEP e hidroxilamina apresenta um perfil de pH em forma de sino. O efeito isotópico cinético para as reações de **1m** com NH_2OH ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 1,67 \pm 0,05$) é consistente com um estado de transição que se encontra cedo na coordenada de reação. A ordem de reatividade das hidroxilaminas com MANEP é , $\text{MeNHOH} > \text{NH}_2\text{OH} > \text{Me}_2\text{NOH} > \text{NH}_2\text{OMe}$, e segue à basicidade das mesmas hidroxilaminas.

As reações do MANEP com água, Fluoreto e hidroxilamina, foram acompanhadas por ESI-MS e ESI-MS/MS, e corroboram com o mecanismo proposto para a degradação do MANEP.

A estrutura do MANEP, otimizada na presença de 15 moléculas de água, mostra a estrutura do grupo fosforila com maior planaridade, do que a estrutura do DANMEP, favorecendo uma reatividade maior ao MANEP.

5. Referências

1. Corbridge, D. E. C.; Phosphorus - An Outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology; Esters and Biochemistry; 261-325; Elsevier Scientific Publishing Company; Amsterdam; 1978.
2. Westheimer, F. H.; Monomeric Metaphosphates; *Chemical Reviews*; 81(4); 313-326; 1981.
3. Westheimer, F. H.; Why Nature Chose Phosphates; *Science*; 235(4793); 1173-1178; 1987.
4. Voet, D.; Voet, J. *Biochemistry*, 2a edição, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.
5. Menger, F.M.; Ladika, M. Fast Hydrolysis of an Aliphatic Amide at Neutral pH and Ambient –Temperature – A Peptidase Model; *Journal of American Chemistry Society*. 1988, 110, 6794-6796.
6. (a) Wolfenden, R. Transition State Analogs for Enzyme Catalysis. *Nature*, 1969, 223, 704.; (b) Wolfenden, R. Analog Approaches to the Structure of the Transition State in Enzyme Reactions. *Accounts of Chemical Research*., 1972, 5, 10.; (c) Liennard, G. E. Enzymic Catalysis and Transition-State Theory. *Science*, 1973, 180, 149 –154.).
7. Mader, M. M.; Bartlett, P. A. Binding Energy and Catalysis: The Implications for Transition-State Analogs and Catalytic Antibodies. *Chemical Reviews*.,1997, 97, 1281 – 1301.
8. Nissen, P.; Hansen, N.; Moore, P. B.; Stitz, T. A. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science*, 2000, 289, 920 – 930.
9. Wolfenden, R.; Snider, M., The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. *Accounts of Chemical Research*. 2001, 34, 938-945.
10. Roughton, J. W. The Kinetics and Rapid Thermochemistry of Carbonic Acid. *Journal of the American Chemical Society*., 1941, 63, 2930-2394.
11. Snider, M.; Wolfenden, R. The Rate of Spontaneous Decarboxylation of Amino Acids. *Journal of the American Chemical Society*., 2000, 122,11507-11508.
12. Fersht, A. R. Enzyme Structure and Mechanism, 2a edição, Freeman, New York, 1985.

13. Kirby, A. J. Enzyme Mimics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, 33, 551-553.
14. Gandour, R. D. Transition States of Biochemical Processes, *Plenum Press*, New York, 1978, p. 529.
15. Kirby, A. J. *Advances in Physical Organic Chemistry*. 1980, 17, 183.
16. Pierre, T. St. e Jencks, W. P. Intramolecular catalysis in reactions of nucleophilic reagents with aspirin. *Journal of the American Chemical Society*, 90:14 (1968) 3817.
17. (a) Gesser, J. C. Reação de hidrólise intramolecular de ácidos N,N-dialquilnaftalâmicos: Um modelo não mimético de catálise enzimática. Florianópolis, 1997. 97 p. Tese de Doutorado em Química - Departamento de Química, UFSC, 1997.; (b) Yunes, S. F. Assistência anquimérica pelo grupo carboxílico na hidrólise de monoalquil ésteres do ácido 1,8-naftálico. Estudo do mecanismo de reação por métodos experimentais e métodos teóricos com cálculos semi-empíricos. Florianópolis, 1997. Tese de Doutorado em Química - Departamento de Química, UFSC, 1997.; (c) Clementin, R. M. Estudo de hidrólise de amidas derivadas do anidrido 2-carbóxi-1,8-naftálico. Efeito do grupo vicinal na velocidade de reação. Florianópolis, 2000. Tese Doutorado em Química – Departamento de Química, UFSC, 2000.; (d) Yunes, S. F.; Gesser, J. C.; Chaimovich, H.; Nome, F. Mechanistically Optimized Intramolecular Catalysis in the Hydrolysis of esters. *Global Changes Involved in Molecular Reactivity. J. Phys. Org. Chem.*, 1997, 10, 461- 465.; (e) Gesser, J. C.; Yunes, S. F.; Clementin, R. M.; Nome, F. Reações Intramoleculares como Modelos não Miméticos de Catálise Enzimática. *Quím. Nova*, 1996, 15.; (f) Domingos, J.B. Reações intramoleculares de amidas e ésteres derivados da oxima do ácido 9-fluorenona-1-carboxílico. Síntese dos compostos modelo e estudo mecanísticos. Florianópolis, 1999. Dissertação de Mestrado em Química - Departamento de Química, UFSC, 1999.
18. Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science – A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company, New York, 1998.
19. Lad, C., Williams, N.H. e Wolfenden, R. The Rate of Hydrolysis of Phosphomonoester Dianions and the Exceptional Catalytic Proficiencies of Protein and Inositol Phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 10, p. 5607-5610, 2003.

20. Domingos, J.B., Longhinotti, E., Machado, V.G., Nome, F.; *Química Nova*; A Química dos Ésteres de Fosfato; 26(5); 745-753;2003.
21. Benschop, H. P., Jong, L. P. A. d.; Nerve Agent Stereoisomers - Analysis, Isolation, and Toxicology; *Accounts of Chemical Research*; 21;368-374;1988.
22. Voronov, V., Fedorov, L.; *Moscom Khim. Zh.*; *Chemical Weapons or Chemical War?*; 7;66-70; 1993.
23. Beletskaya, I. P., Novikov, S. S.; *Vestn. Ross. Akad. Nauk*; *Chemical Weapons in Russia*; 65(2); 99-104; 1995.
24. Yang, Y.-C., Szafraniec, L. L., Beaudry, W. T.; *Journal of Organic Chemistry*; Perhydrolysis of Nerve Agent VX; 58(25); 6964-6965; 1993.
25. Cremlyn, R. J.; *Agrochemicals: Preparation and mode of action*; *Synthetic Insecticides II: Organophosphorus and Carbamate Compounds*; 105-156; John Wiley & Sons Ltd.; West Sussex; 1991.
26. McWilliams, J. L., Steel, R. J.; *Gas! the Battle for Ypres, 1915*; *Vanwell Publishing Limited: Deyell Co.*; Canada; 1985.
27. Kirby, A. J., Younas, M.; The Reactivity of Phosphate Esters. Diesters Hydrolysis; *Journal of the Chemical Society B*; 6;510-513; 1970.
28. Thatcher, G. R. J., Kluger, R.; Mechanism and Catalysis of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters; *Advances in Physical Organic Chemistry*; 25;99-265; 1989.
29. Bruice, T. C., Benkovic, S. J.; *Biorganic Mechanisms*; 1-109; W. A. Benjamin; New York; 1966.
30. Cox, J. R., Ramsay, O. B.; Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters; *Chemical Reviews*; 64(4); 317-352; 1964.
31. Lum, R. C., Grabowski, J. J.; Trimethyl Phosphate: The Intrinsic Reactivity of Carbon Versus Phosphorus Site with Anionic Nucleophiles; *Journal of the American Chemical Society*; 114(22); 8619-8627; 1992.
32. Florián, J., Warshel, A.; Phosphate Ester Hydrolysis in Aqueous Solution: Associative Versus Dissociative Mechanisms; *Journal of Physical Chemistry B*; 102(4); 719-734; 1998.
33. Gillespie, P., Ramirez, F. H., Ugi, I., Marquarding, D.; Chemistry and Logical Structures .5. Displacement Reactions of Phosphorus(V) Compounds and their Pentacoordinate Intermediates; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*;12(2); 91-119; 1973.

34. Frey, P. A.; Stereochemistry of Enzymatic Reactions of Phosphates; *Tetrahedron*; 38(11); 1541-1567; 1982.
35. Buchwald, S. L., Pliura, D. H., Knowles, J. R.; Stereochemical Evidence for Pseudorotation in the Reaction of a Phosphoric Monoester; *Journal of the American Chemical Society*; 106(17); 4916-4922; 1984.
36. Bunton, C. A., Llewellyn, D. R., Oldhan, K. G., Vernon, C. A.; The Reactions of Organic Phosphates .1. The Hydrolysis of Methyl Dihydrogen Phosphate; *Journal of the Chemical Society*; 3574-3587; 1958.
37. Butcher, W. W., Westheimer, F. H.; The Lanthanum Hydroxide Gel Promoted Hydrolysis of Phosphate Esters; *Journal of the American Chemical Society*; 77(9); 2420-2424; 1955.
38. Buchwald, S. L., Friedman, J. M., Knowles, J. R.; Stereochemistry of Nucleophilic Displacement on two Phosphoric Monoesters and Phosphoguanidine: The Role of Metaphosphate; *Journal of the American Chemical Society*; 106(17); 4911-4916; 1984.
39. Kirby, A. J., Varvoglis, A. G.; The Reactivity of Phosphate Esters. Monoesters Hydrolysis; *Journal of the American Chemical Society*; 89(2); 415-423; 1967.
40. Disabato, G., Jencks, W. P.; Mechanism and Catalysis of Reactions of Acyl Phosphates. II. Hydrolysis; *Journal of the American Chemical Society*; 83(21); 4400-4405; 1961.
41. Disabato, G., Jencks, W. P.; Mechanism and Catalysis of Reactions of Acyl Phosphates. I. Nucleophilic Reactions; *Journal of the American Chemical Society*; 83(21); 4393-4400; 1961.
42. Kirby, A. J., Jencks, W. P.; The Reactivity of Nucleophilic Reagents Toward the p-Nitrophenyl Phosphate Dianion; *Journal of the American Chemical Society*; 87(14); 3209-3216; 1965.
43. Herschlag, D., Jencks, W. P.; Pyrophosphate Formation from Acetyl Phosphate and Ortho-Phosphate Anions in Concentrated Aqueous Salt-Solutions does Not Provide Evidence for a Meta-Phosphate Intermediate; *Journal of the American Chemical Society*; 108(25); 7938-7946; 1986.
44. Freeman, S., Friedman, J. M., Knowles, J. R.; Free Monomeric Metaphosphate in Protic Solution: Complete Racemization at Phosphorus in the Tert-butyl Alcoholysis of p-Nitrophenyl Phosphate; *Journal of the American Chemical Society*; 109(10); 3166-3168; 1987.

45. Westheimer, F. H.; Pseudo-Rotation in Hydrolysis of Phosphate Esters; *Accounts of Chemical Research.*; 1 (3); 70-78; 1968.
46. Aqvist, J., Kolmodin, K., Flórian, J., Warshel, A.; Mechanistic Alternatives in Phosphate Monoester Hydrolysis: What Conclusions Can Be Draw from Available Experimental Data?; *Chemistry & Biology*; 6(3); R71-R80; 1999.
47. Bunton, C. A., Faber, S. J.; The Hydrolysis of Bis(2,4-dinitrophenil) phosphate; *The Journal of Organic Chemistry*; 1969, 34(4); 767-772.
48. (a)Bailly, M. C., *Bull. Soc. Chim. France*, 1942, 9, 421. (b)Bailly, M. C., *Bull. Soc Chim. France*, 1942, 9, 340 e 405.
49. Wolfenden, R, et al; Spontaneous Hydrolysis of Ionized Phosphate Monoesters and Diesters and the Proficiencies of Phosphates and Phosphodiesteres as Catalysts; *Journal of the American Chemical Society*; 1998;120; 833-834.
50. Abell, Y. W. K., Kirby, J. A.: Acceleration of P-O Cleavage Reactions of Phosphate Monoesters Dianions in Dipolar Aprotic Solventes; *Tetrahedron Letters*; 27(9); 1986;1085-1088.
51. Edwards, J. O., Pearson, R. G.; The Factors Determining Nuclephilic Reactivities; *Journal of the American Chemical Society*; 84;16-24; 1962.
52. Gerstein, J., Jencks, W. P.; Equilibria and Rates for Acetyl Transfer Among Substituted Phenyl Acetates, Acetylimidazole, O-acylhydroxamic Acids, and Thiol Esters; *Journal of the American Chemical Society*; 86;4655-4663; 1964.
53. Um, I. -E., Buncl, H.; The Origin of the α -Effect: Dissection of Ground-State and Transition-State Contributions; *Journal of Organic Chemistry*; 65(2); 577-582; 2000.
54. Buncl, E., Hoz, S.; The Alpha-Effect - A Critical-Examination of the Phenomenon and its Origin; *Israel Journal of Chemistry*; 26(4); 313-319; 1985.
55. Tarkka, R. M., Buncl, E.; Origin of The Bell-Shaped α -Effect-Solvent Composition Plots. pKa-Solvent Dependence of the α -Effect at a Phosphorus Center; *Journal of the American Chemical Society* 117(5); 1503-1507; 1995.
56. Moss, R. A., Swarup, S., Ganguli, S.; Alpha-Effect of an Organoiodinane Oxyanion Nucleophile - Absence of an Unusual Solvent Effect; *Journal of the Chemical Society Communcation*; 11;860-862; 1987.

57. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandão, T. A. S.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N. Bunton, C. A.; Nome, F.; Reaction of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate with Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Comparison of O- and N- Phosphorylation, *Journal Organic. Chemistry*. 2004.
58. Asaad, N.; Kirby, A. J.; Concurrent nucleophilic and general acid catalysis of the hydrolysis of a phosphate triester; *Journal Chemical Society, Perkin Trans. 2*; 2002, 1708–1712
59. Lima, M. F. Estudo do efeito da catálise ácida geral intramolecular na degradação de diésteres de fosfato. Florianópolis, 2006. Tese Doutorado em Química – Departamento de Química, UFSC, 2006.
60. 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) 1172-1182.
61. Cramer, C. J. Essentials of Computational Chemistry. John Wiley & Sons, Nova York, 2002, p. 356 e 400.
62. 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.
63. 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.
64. Tomasi, J. e Persico, M. Molecular-interaction in solution – an overview of methods based on continuous distributions of the solvent. *Chemical Reviews*, 94:7 (1994) 2027-2094.
65. MASKILL, H. Rates of Simple Chemical Reactions. In: *The Physical Basis of Organic Chemistry*, New York, Oxford University Press, 1985, 216 –267.
66. Jaguar 4.2, S., Inc., 2000.
67. 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.

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. Schoew, K. B. J. Sovent hydrogen isotope effects. In: Gandur r. D.; Schowen, R. L. Transition states of biochemical processes. New York, Plenum Press, 1978.
70. March, J. Mechanisms and methods of determining chemical. *In: Advanced organic chemistry*. Tokio, McGraw-Hill kogakuska, Ltd., 1977.
71. Kamlet, M.J.; Abboud, M. L.; Taft, R. W. An Examination of Linear Solvation Energy Relationships. *Progress Physical Organic Chemistry*, 1981, 13, 485.
72. Darck, M.R.J. Solutions and Solubilities. Part II. Techniques of Chemistry, New York, vol. 3, 1976.
73. Hughes, E. D.; Ingold, C. K. Discussion of Constitutional and Solvent Effects on the Mechanism, Kinetics, Velocity and Orientation of Substitution. *Journal Chemical Society*, 1935, 244.
74. Ingold, C. K. Structure and Mechanism in Organic Chemistry. 2^a ed. Cornell, U.P., Ithaca, 1953.
75. Gould, E.S. Mechanisms and Structures in Organic Chemistry. New York, Kapelus, 1966.
76. Domingos, J. B. Longhinotti, E.; Bunton, C. A.; Nome, F. Reactions of bis-(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydroxylamine. *Journal of Organic Chemistry*, 68:18 (2003) 7051-7058.
77. Admiraal, S. J.; Herschlag, D. *Journal of the American Chemical Society*. 1999, 121, 5837-5845.
78. Bromilow, R. H.; Kirby, A. J. *Journal Chemical Society. B* 1972, 149-155.
79. Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A. B.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. *Journal Computational Chemical*. 1993, 14, 1347-1363.

ANEXO

Tabela 17. Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na **Figura 38.**

C	-1,475	0,495	-0,253
C	-0,042	0,495	-0,253
C	0,593	1,793	-0,253
C	-0,188	2,982	-0,251
C	-1,562	2,925	-0,264
C	-2,200	1,671	-0,271
C	2,197	-0,509	-0,243
C	0,826	-0,661	-0,238
C	2,012	1,895	-0,247
C	2,798	0,771	-0,247
N	0,281	-2,034	-0,182
C	-0,225	-2,536	-1,500
C	1,175	-3,059	0,445
O	-2,177	-0,685	-0,256
P	-2,665	-1,340	1,238
O	-1,424	-2,206	1,609
O	-2,890	-0,175	2,178
O	-3,880	-2,166	0,863
H	0,329	3,937	-0,236
H	-2,160	3,832	-0,258
H	-3,284	1,602	-0,266
H	2,839	-1,380	-0,234
H	2,456	2,886	-0,238
H	3,880	0,846	-0,243
H	-0,572	-2,050	0,581
H	0,615	-2,695	-2,177
H	-0,747	-3,480	-1,319
H	-0,926	-1,816	-1,914
H	2,000	-3,334	-0,215
H	1,553	-2,671	1,391
H	0,557	-3,937	0,637

Tabela 18. Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na **Figura 39.**

C	-1,044	0,520	-0,300
C	0,388	0,520	-0,300
C	1,019	1,817	-0,300
C	0,241	3,000	-0,155
C	-1,132	2,936	-0,094
C	-1,778	1,689	-0,206
C	2,582	-0,488	-0,662
C	1,231	-0,661	-0,386
N	0,695	-1,962	-0,230
P	-3,055	-1,096	0,324
O	-3,117	-2,667	-0,100
O	-2,800	-0,924	1,795
O	-4,242	-0,441	-0,326
O	-1,689	-0,680	-0,510
C	1,448	-3,079	-0,788
C	0,172	-2,286	1,100
C	2,424	1,922	-0,502
C	3,175	0,793	-0,727
H	0,755	3,957	-0,121
H	-1,729	3,840	0,002
H	-2,860	1,635	-0,250
H	3,219	-1,357	-0,766
H	-2,591	-3,245	0,475
H	2,347	-3,350	-0,207
H	0,792	-3,958	-0,808
H	1,749	-2,855	-1,815
H	0,981	-2,512	1,815
H	-0,426	-1,471	1,500
H	-0,466	-3,174	1,033
H	2,876	2,910	-0,503
H	4,242	0,870	-0,915

Tabela 19. Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na **Figura 40.**

C	-1,777	2,492	0,016
C	-0,340	2,492	0,016
C	0,335	3,761	0,016
C	-0,424	4,965	0,000
C	-1,800	4,919	-0,012
C	-2,483	3,683	-0,002
C	1,824	1,367	0,031
C	0,443	1,295	0,021
N	-0,234	0,003	-0,012
O	-2,464	1,325	0,036
C	-0,066	-0,681	-1,313
C	0,104	-0,858	1,148
C	1,755	3,785	0,032
C	2,483	2,616	0,042
H	0,102	5,915	-0,002
H	-2,377	5,839	-0,027
H	-3,569	3,647	-0,006
H	2,408	0,453	0,031
H	-1,764	0,590	0,042
H	0,971	-0,968	-1,522
H	-0,678	-1,586	-1,318
H	-0,411	-0,018	-2,111
H	1,162	-0,787	1,423
H	-0,504	-0,572	2,012
H	-0,083	-1,902	0,890
H	2,258	4,748	0,036
H	3,569	2,644	0,053
P	0,092	-5,133	1,229
O	-0,831	-5,915	2,111
O	-0,469	-4,049	0,358
O	1,561	-5,426	1,221

Tabela 20. Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na **Figura 41.**

C	1,060	-2,438	-1,452	O	0,000	3,093	-1,003
O	0,381	-2,026	-0,288	H	-0,076	2,137	-1,081
P	0,181	-0,422	0,031	H	0,729	3,213	-0,396
O	-1,118	-0,371	0,800	O	-3,981	1,503	-2,118
O	1,378	-0,010	0,879	H	-3,660	2,210	-1,559
O	0,140	0,279	-1,305	H	-3,251	1,292	-2,700
H	1,060	-3,521	-1,452	O	1,083	1,959	-3,523
H	2,083	-2,086	-1,452	H	0,864	2,677	-2,937
H	0,552	-2,080	-2,337	H	1,113	1,217	-2,922
O	-2,462	1,711	2,011	O	-1,594	0,637	-3,515
H	-3,122	1,117	2,359	H	-0,922	1,224	-3,847
H	-1,946	1,120	1,451	H	-1,183	0,293	-2,720
O	-3,610	-0,827	-0,429	O	2,347	2,677	0,661
H	-2,714	-0,621	-0,147	H	2,552	2,797	1,583
H	-3,868	-0,108	-1,007	H	2,120	1,747	0,593
O	-3,584	-0,938	2,455	O	-2,308	-3,488	-0,825
H	-3,950	-0,985	1,573	H	-2,911	-2,751	-0,860
H	-2,654	-1,068	2,289	H	-1,506	-3,103	-0,486
O	2,740	2,360	3,672	O	2,154	-3,289	1,872
H	3,033	1,456	3,624	H	2,195	-2,641	2,570
H	1,788	2,270	3,684	H	1,472	-2,967	1,289
O	2,270	-0,721	3,412	O	-2,813	3,509	-0,304
H	2,088	-0,516	2,488	H	-1,888	3,521	-0,549
H	1,472	-0,440	3,847	H	-2,832	3,030	0,522
O	3,981	-1,444	0,285	O	0,129	1,306	3,278
H	3,618	-2,184	0,760	H	-0,776	1,575	3,138
H	3,282	-0,796	0,328	H	0,388	0,927	2,438

Tabela 21. Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na **Figura 42.**

C	-1,669	-5,013	1,234	O	4,339	-1,167	-0,597
C	-1,149	-4,109	0,270	H	4,591	-0,318	-0,952
C	-2,152	-4,565	2,423	H	3,387	-1,130	-0,639
C	-2,141	-3,182	2,721	O	-2,772	2,900	-0,588
C	-1,650	-2,289	1,820	H	-3,018	2,371	-1,345
C	-1,143	-2,731	0,569	H	-1,903	2,577	-0,342
C	-0,626	-1,807	-0,396	O	2,044	2,974	1,767
C	-0,146	-2,267	-1,589	H	2,690	2,276	1,874
C	-0,151	-3,652	-1,865	H	1,265	2,520	1,444
C	-0,636	-4,556	-0,976	O	-4,117	3,024	1,896
O	-0,682	-0,514	-0,055	H	-3,512	3,647	2,283
P	0,255	0,724	-0,661	H	-3,844	2,983	0,977
O	-0,200	1,879	0,220	O	1,333	4,911	3,957
O	1,683	0,314	-0,451	H	0,400	4,805	3,803
O	-0,156	0,894	-2,103	H	1,726	4,300	3,340
H	-1,673	-6,065	1,005	O	2,833	3,359	-3,197
H	-2,543	-5,262	3,145	H	2,449	2,602	-3,644
H	-2,521	-2,837	3,666	H	2,339	3,458	-2,384
H	-1,637	-1,241	2,045	O	0,738	5,454	-3,363
H	0,225	-1,574	-2,316	H	1,523	4,985	-3,633
H	0,240	-3,984	-2,811	H	0,744	5,344	-2,416
H	-0,636	-5,610	-1,200	O	1,259	4,093	-0,811
O	-1,375	4,145	2,789	H	1,852	4,035	-0,065
H	-1,367	3,197	2,940	H	0,600	3,428	-0,600
H	-1,019	4,239	1,913	O	3,253	0,302	1,895
O	4,174	1,645	-1,137	H	3,994	-0,054	1,417
H	4,032	2,169	-1,918	H	2,539	0,198	1,264
H	3,298	1,365	-0,864	O	-1,761	1,339	2,608
O	-0,791	2,987	-3,954	H	-2,651	1,550	2,337
H	-0,476	3,875	-3,798	H	-1,249	1,302	1,800
H	-0,552	2,479	-3,177	O	-2,917	1,203	-2,992
O	1,440	1,156	-4,426	H	-2,581	1,891	-3,560
H	0,729	1,711	-4,732	H	-2,114	0,800	-2,660
H	1,083	0,811	-3,604				

Tabela 22. Coordenadas cartesianas para a posição dos átomos mostrados na **Figura 43.**

C	2,587	-4,482	0,162	H	0,665	5,223	-1,313
C	2,587	-3,060	0,162	H	1,216	3,831	-0,979
C	1,430	-5,179	0,162	O	0,556	4,431	1,826
C	0,195	-4,492	0,186	H	1,113	4,694	1,100
C	0,156	-3,136	0,183	H	0,471	3,477	1,745
C	1,361	-2,352	0,151	O	-0,285	3,271	4,774
C	1,415	-0,917	0,100	H	-1,124	3,240	4,319
C	2,617	-0,272	0,126	H	0,286	3,724	4,163
C	3,818	-1,000	0,169	O	1,577	1,393	-3,432
C	3,814	-2,359	0,174	H	1,904	2,243	-3,712
N	-1,151	-2,469	0,319	H	1,339	1,524	-2,511
C	-2,332	-3,211	-0,206	O	-3,361	0,243	3,618
C	-1,392	-2,065	1,744	H	-2,448	0,117	3,872
O	0,239	-0,286	0,009	H	-3,389	1,168	3,383
P	-0,139	1,363	0,067	O	-0,578	-0,057	-4,511
O	-1,527	1,314	-0,523	H	-1,125	0,671	-4,774
O	-0,107	1,727	1,526	H	0,232	0,359	-4,200
O	0,883	2,052	-0,779	O	-4,678	-1,188	1,406
H	3,533	-4,992	0,159	H	-4,748	-0,480	0,772
H	1,431	-6,254	0,157	H	-4,377	-0,772	2,213
H	-0,707	-5,068	0,216	O	-2,143	5,165	1,060
H	2,632	0,797	0,076	H	-1,231	4,994	1,300
H	4,748	-0,462	0,182	H	-2,345	4,590	0,324
H	4,733	-2,917	0,188	O	-1,109	6,035	-1,640
H	-1,106	-1,619	-0,231	H	-1,427	6,254	-0,771
H	-3,174	-2,544	-0,145	H	-1,669	5,310	-1,905
H	-2,143	-3,489	-1,228	O	-2,741	3,615	-1,396
H	-2,521	-4,074	0,412	H	-3,627	3,271	-1,402
H	-2,290	-1,475	1,780	H	-2,194	2,841	-1,217
H	-1,510	-2,969	2,324	O	-0,433	0,373	3,988
H	-0,552	-1,500	2,104	H	-0,267	1,121	4,557
O	-4,262	0,825	-0,729	H	-0,237	0,724	3,117
H	-4,057	0,231	-1,442	O	-2,012	-0,876	-2,118
H	-3,397	1,037	-0,376	H	-1,550	-0,819	-2,954
O	-2,426	2,858	2,835	H	-1,786	-0,057	-1,669
H	-2,606	3,683	2,390	O	2,889	4,064	-3,467
H	-1,746	2,430	2,309	H	2,412	4,445	-2,726
O	1,465	4,756	-1,069	H	3,672	3,698	-3,078