



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

**Estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e
um triéster de fosfato: caracterização de produtos e
intermediários**

Michelle Medeiros

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Florianópolis

2009

Michelle Medeiros

**Estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e
um triéster de fosfato: caracterização de produtos e
intermediários**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química (área de concentração: Química Orgânica) da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Florianópolis

2009

Michelle Medeiros

Estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e um triéster de fosfato: caracterização de produtos e intermediários

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de fevereiro de 2009.

Prof. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Orientador

Prof. Dr. José Carlos Gesser
UFSC

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz
UFSC

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes
UFSC

AGRADECIMENTOS

Com carinho, agradeço aos meus pais, pelos valores e pela educação exemplar que recebi. E, especialmente, pelo amor e por todo apoio que me oferecem sempre. Pai e mãe, muito obrigada!

Agradeço ao meu namorado Thiago, por seu companheirismo, sua contínua paciência e, principalmente, por seu amor.

Ao longo dos últimos anos tive a sorte de trabalhar no grupo de pesquisa do professor Faruk Nome e da professora Haidi Fiedler. No grupo, tenho convivido com alunos inteligentes, criativos e generosos. O trabalho que realizei e cada palavra que escrevi tiveram, de alguma forma, a influência da criatividade e dedicação dessas pessoas. Gostaria de agradecer a alguns colegas que contribuíram muito para a realização deste trabalho: Bruno Souza, Jacks Priebe e Alex Manfredi. Além de tudo, fiz grandes amigos no grupo, entre eles, Elisa Orth, uma pessoa que tem energia e entusiasmo incessantes. Em especial, agradeço ao Professor Faruk Nome pela oportunidade de ingressar nesse grupo de pesquisa, e homenageá-lo por sua extraordinária motivação, curiosidade e amor à pesquisa. Muito obrigada a todas as pessoas do grupo, é um privilégio trabalhar com vocês!

Não poderia deixar de agradecer a todos os funcionários da UFSC, principalmente, Graça Hoeller e Jadir Carminatti, da secretaria de pós-graduação no Departamento de Química.

Por fim, agradeço a CAPES, CNPq e UFSC, pelo apoio financeiro e infraestrutura.

"Qualquer homem pode alcançar o êxito se dirigir os seus pensamentos numa direção e insistir neles até que faça alguma coisa."

Thomas Edison

RESUMO

Na intenção de contribuir para a compreensão das diferentes possibilidades de ataque nucleofílico da hidroxilamina nas reações com ésteres de fosfato, o presente trabalho aborda o estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e o dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**). O trabalho compreende estudos de reatividade, interpretação de relações lineares de energia livre e, especialmente, a caracterização de intermediários e produtos da reação, utilizando técnicas de UV-Vis, RMN ^{31}P , RMN ^1H e CG-MS. O β_{nuc} obtido no gráfico de Brønsted associado a valores de carga efetiva disponíveis na literatura, indicam que a ligação entre o oxigênio e o átomo de fósforo está aproximadamente 60% formada no estado de transição, sugerindo um caminho reacional do tipo associativo. Foram estudadas também as reações do **DEDNPP** com diferentes derivados metilados da hidroxilamina (MeNHOH , Me_2NOH e NH_2OMe) e os resultados mostram claramente que a O-metilhidroxilamina, nucleófilo que não pode reagir via átomo de oxigênio, apresenta um desvio significativo de velocidade em relação às outras hidroxilaminas. Experimentos de identificação de produtos e intermediários permitiram concluir que na reação com **DEDNPP** o ataque nucleofílico da hidroxilamina ocorre via átomo de oxigênio fornecendo o produto O-fosforilado, o qual rapidamente é convertido em diimina. Esta reage com outra diimina, gerando $\text{N}_{2(\text{g})}$ e hidrazina. Os resultados são coerentes com aquilo que tem sido proposto recentemente para fosfatos orgânicos e, sobretudo, adicionam uma evidência concreta à literatura de que provavelmente o átomo de oxigênio da forma zwitteriônica da hidroxilamina é responsável pelo ataque nucleofílico nesses compostos.

Palavras-chave: ésteres de fosfato, hidroxilamina, mecanismos.

ABSTRACT

In this study, the reaction of hydroxylamine with diethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (**DEDNPP**) was evaluated mechanistically, as an attempt to contribute in the understanding of the different possibilities for the nucleophilic attack of hydroxylamine in reactions with phosphate ester. Reactivity and free linear energy relationships studies were carried out, as well as, characterization of the intermediates and products, using ^{31}P NMR, ^1H NMR, UV-Vis and CG-MS. The β_{nuc} value obtained from the Brønsted plot, when related with effective charge values available in the literature, indicate that the bond between the oxygen and the phosphorus atom is roughly 60% formed in the transition state, suggesting an associative reaction path. We also studied the reactions of **DEDNPP** with different methylated hydroxylamine's (MeNHOH, Me₂NOH and NH₂OMe) and the results clearly show that O-methylhydroxylamine, a nucleophile that cannot react via the oxygen atom, presents a significant rate decrease, compared to the other hydroxylamine's. Experiments to identify products and intermediaries indicated that in the reaction with **DEDNPP**, the nucleophilic attack of hydroxylamine occurs via the oxygen atom, leading to the O-phosphorylated product, which is rapidly converted into diimine. This species then reacts with another diimine, generating N_{2(g)} and hydrazine. The results are consistent with what has been proposed recently for organophosphates and above all, corroborates that it is the oxygen atom from the zwitterionic species of hydroxylamine that is responsible for the nucleophilic attack of these compounds.

Keywords: phosphate esters, hydroxylamine, mechanisms.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks para a substituição nucleofílica de uma espécie Y^- por uma X^- em um monoéster de fosfato diânionico. 19
- Figura 2** – Diagrama de energia livre padrão para o efeito de um substituinte elétron-retirador na dissociação do ácido benzóico em água. 26
- Figura 3** – Gráfico de Brønsted para (A) mecanismo concertado e (B) mecanismo via intermediário tetraédrico. 29
- Figura 4** – Espectro de RMN 1H para **DEDNPP** em $CDCl_3$ a 400 MHz. 35
- Figura 5** – Espectro de RMN 1H ampliado da região 7,80 – 8,80 para **DEDNPP**. 35
- Figura 6** – Espectros sucessivos de UV-Vis da reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina (0,03 M) a 25°C, $\mu = 1,0$ M (KCl) e pH = 8,50. 39
- Figura 7** – Constantes de velocidade observadas (k_{obs}) em função da concentração de hidroxilamina nas reações com o **DEDNPP** a 25°C, $\mu = 1,0$ M (KCl) e pH = 8,50. 40
- Figura 8** – Logaritmo da constante de velocidade observada (k_{obs}) em função do pH, para a reação entre **DEDNPP** e $[NH_2OH]_0 = 0,03$ M, a 25,0 °C e $\mu = 1,0$ M (KCl). A linha corresponde ao ajuste teórico de acordo com a **Equação 8**. 41
- Figura 9** – Gráfico de $\ln(k_{obs}/T)$ vs T^{-1} para reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina (0,01M) em pH 8,50 e $\mu=1,0$ (KCl). 44
- Figura 10** – Constantes de velocidade observadas, k_{obs} , em função da concentração de nucleófilo para as reações com o **DEDNPP**, (■) NH_2OMe , (●) $MeNHOH$, e (▲) Me_2NOH a 25°C, pH = 8,50 e $\mu=1,0$ M (KCl). 45
- Figura 11** - Gráfico de Brønsted para a reação do **DEDNPP** com hidroxilamina e derivados metilados. 47
- Figura 12** - Diagrama de More O’Ferrall-Jencks para a reação do **DEDNPP** com hidroxilaminas. 50
- Figura 13** – Espectro de RMN ^{31}P dos produtos da reação entre hidroxilamina e o diéster EDNPP. A numeração está de acordo com o **Esquema 31**. 53
- Figura 14** – Espectro de RMN ^{31}P para **DEDNPP** na (A) hidrólise em meio ácido, pH=2,6; (B) hidrólise em meio básico, pH=13 e (C) reação com hidroxilamina, pH=7. 54

Figura 15 – Espectro de UV-Vis da hidrazona formada pela reação entre <i>p</i> -dimetilaminobenzaldeído e os produtos da reação entre hidroxilamina e DEDNPP	54
Figura 16 - Espectro de UV-Vis dos produtos da reação entre hidroxilamina e DEDNPP , na presença de ácido fumárico.	57
Figura 17 – (A) Espectro de RMN ¹ H dos produtos da mistura reacional entre hidroxilamina e DEDNPP , 0,2 M de ácido fumárico e 0,1 M de hidroxilamina em pD=7,25; (B) Espectro de RMN ¹ H contendo hidroxilamina, ácido fumárico e ácido succínico. Os deslocamentos químicos e suas respectivas atribuições estão na Tabela 6 e numerados de acordo com o Esquema 33	58
Figura 18 – Cromatograma dos produtos da reação entre hidroxilamina e o triéster de fosfato na presença de ácido fumárico. Os ácidos succínico (SA) e fumárico (FA) silanizados foram identificados através do padrão de fragmentação obtido, representado na Figura 20	59
Figura 19 – Cromatograma ampliado dos produtos da reação entre hidroxilamina e o triéster de fosfato na presença de ácido fumárico. Ácido succínico (SA), ácido fumárico (FA) e dietil fosfato (DEP) silanizados foram identificados através do padrão de fragmentação obtido.	60
Figura 20 – Cromatograma da solução padrão: ácido fumárico (FA) e ácido succínico (SA) silanizados.	60
Figura 21 – Fragmentograma do ácido succínico silanizado.	62
Figura 22 – Fragmentograma do ácido fumárico silanizado.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Magnitude do efeito alfa da hidroxilamina nas reações com derivados dos ésteres de fosfato: 1 (2,4-dinitrofenila) e 2 (8-dimetilamina-1-naftol).	21
Tabela 2 – Valores de K_a , k_0 e k_2 utilizados do ajuste não linear dos dados cinéticos da Figura 8 , através da Equação 8	42
Tabela 3 – Constantes de velocidade observada em função da temperatura para a reação entre DEDNPP e hidroxilamina (0,01 M), pH 8,50 e $\mu = 1,0$ (KCl).	43
Tabela 4 – Constantes de velocidade de segunda ordem para as reações entre DEDNPP e hidroxilaminas a 25°C, pH = 8,50 e $\mu=1,0$ M (KCl).	46
Tabela 5 – Coeficientes de Brønsted para as reações entre oxianions e derivados dos ésteres de 8-dimetilamino-1-naftol. ^{20, 21, 65}	48
Tabela 6 – Deslocamentos químicos e suas respectivas atribuições para o experimento de identificação do ácido succínico na reação entre hidroxilamina e DEDNPP , na presença de ácido fumárico.	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LaCFI - Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais

DEDNPP - dietil 2,4-dinitrofenil fosfato

EDNPP - etil 2,4-dinitrofenil etil fosfato

BDNPP - bis-(2,4-dinitrofenil) fosfato

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

BHA - ácido benzohidroxâmico

DNPP- 2,4-dinitrofenil fosfato

DEP - dietil fosfato

DNP- 2,4-dinitrofenolato

SA - ácido succínico

FA - ácido fumárico

DNA - ácido desoxirribonucléico

RNA - ácido ribonucléico

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ³¹P - ressonância magnética nuclear de fósforo

t_{1/2} - tempo de meia-vida

β_{nuc} - constante de Brønsted para nucleófilo

β_{g} - constante de Brønsted para grupo de saída

μ - força iônica

S_N1 - substituição nucleofílica unimolecular

S_N2 - substituição nucleofílica bimolecular

ε - carga efetiva

Abs - absorvância

k - constante de velocidade

K - constante de equilíbrio

χ - fração molar

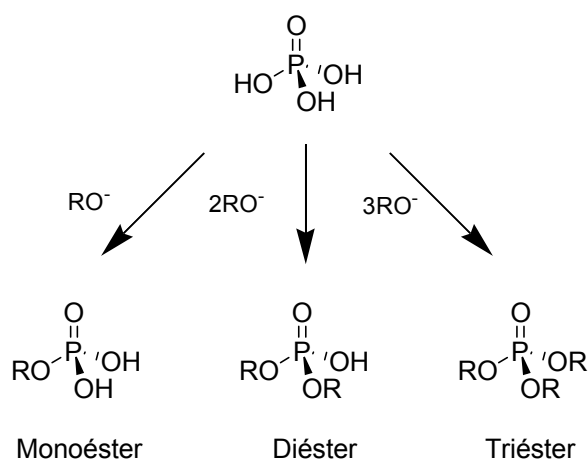
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Ésteres de fosfato	13
1.1.1 Reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato	17
1.2 Nucleófilos alfa	20
1.3 Relações lineares de energia livre	25
1.3.1 A Equação de Hammett	25
1.3.2 Equação de Brönsted	27
1.3.3 Carga efetiva	29
2 OBJETIVOS.....	32
3 PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1 Equipamentos	33
3.2 Reagentes	34
3.3 Síntese do dietil 2,4-dinitrofenil fosfato - DEDNPP	34
3.4 Identificação de produtos e intermediários	36
3.4.1 Identificação de hidrazina.....	36
3.4.2 Identificação de diimina	36
3.4.3 Identificação de ácido succínico.....	36
3.5 Medidas cinéticas	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Reação do DEDNPP com hidroxilamina.....	39
4.1.1 Efeitos termodinâmicos da temperatura.....	43
4.2 Reação de DEDNPP com hidroxilaminas metiladas.....	45
4.2.1 Relação linear de energia livre e carga efetiva	47
4.3 Identificação de intermediários e produtos da reação	51
4.3.1 Identificação de hidrazina.....	54
4.3.2 Identificação da diimina.....	56
4.3.3 Identificação do ácido succínico.....	57
5 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ésteres de fosfato

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



Esquema 1

Os mono- e diésteres fosfóricos são essenciais aos sistemas biológicos e estão largamente distribuídos na natureza. Os diésteres de fosfato, por exemplo, estão presentes em diversas coenzimas e nas estruturas do DNA e do RNA, onde são responsáveis pelas ligações entre nucleotídeos e pela origem da informação genética. Já os monoésteres estão presentes em diversos processos de sinalização e regulação da atividade biológica. Além disso, anidridos fosfóricos e compostos orgânicos contendo ligações N-P servem como principal reserva de energia, tais como, trifosfato de adenosina (ATP), creatina fosfato, acetilfosfato (AcP), fosfoenolpiruvato e polifosfato inorgânico.²⁻⁵

Além da importância que representam nos processos ligados à vida, os ésteres de fosfato possuem inúmeras aplicações industriais. Por exemplo, eles são

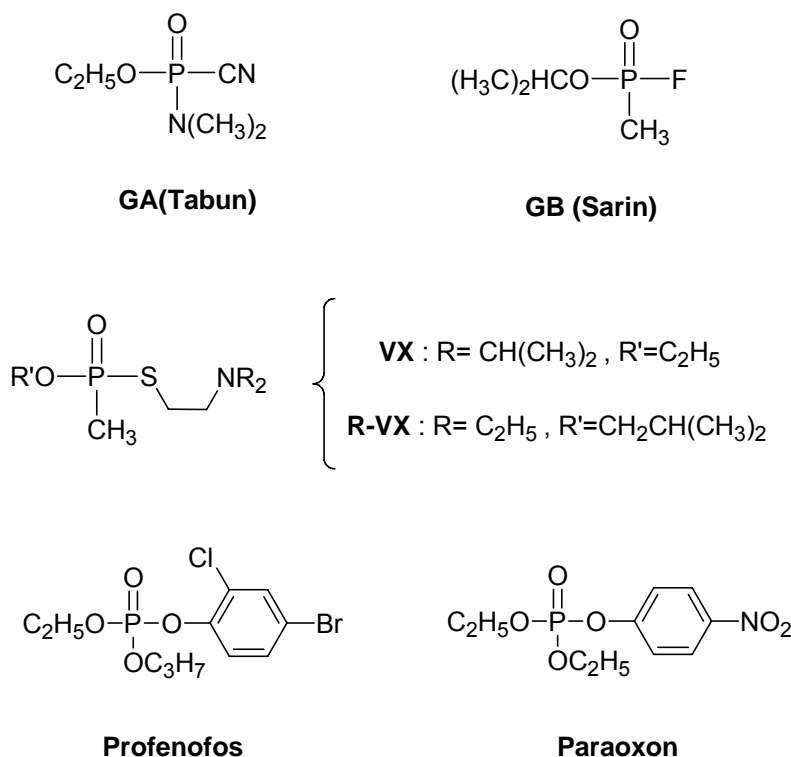
utilizados como reagentes na preparação de polímeros, plastificantes e complexantes para a extração de cátions de metais pesados.⁶

A importância dos ésteres fosfóricos na natureza está intimamente relacionada à estabilidade da ligação P-O. Por exemplo, o tempo de meia-vida para a hidrólise espontânea do difenilfosfato é de 180 anos a 100°C,⁷ e esse valor pode chegar à ordem de bilhões de anos para o DNA. Tal estabilidade é coerente com o papel do DNA na preservação da informação genética.⁸

Vale ressaltar que a propriedade de ionização dos fosfatos é extremamente importante no meio biológico. Os metabólitos fosfatados, retidos no interior das células, encontram-se carregados negativamente, o que faz diminuir a possibilidade de ataque nucleofílico ao grupo fosfato.^{9, 10} Além disso, a evolução dos seres vivos teria favorecido metabólitos que pudessem ser conservados dentro da membrana celular. Moléculas eletricamente neutras possuem alguma solubilidade em lipídios e atravessam a membrana, enquanto moléculas que permanecem ionizadas podem seguramente ser mantidas dentro da membrana.¹¹

Entretanto, essa alta estabilidade das ligações P-O que fez com que a natureza encontrasse condições ideais para garantir a perpetuação dos seres vivos, também foi responsável pela escolha dos compostos organofosforados para o desenvolvimento de pesticidas, inseticidas e compostos tóxicos utilizados em armas de guerra. As ligações P-O são ideais para tal, pois a sua estabilidade confere-lhes resistência à ação do ar, água e solo.¹

Em 1915, na cidade francesa de Ypres, as tropas alemãs utilizaram pela primeira vez o gás cloro como uma arma química.¹² A partir daí, surgiu uma corrida voltada à produção de armas químicas, que culminou com o aparecimento dos agentes neurotóxicos organofosforados. No **Esquema 2** estão apresentadas as estruturas de alguns desses compostos, dentre eles estão os agentes neurotóxicos do tipo G e do tipo V e, ainda, alguns pesticidas e inseticidas.¹³ Esses compostos inibem a ação de enzimas, principalmente a ação da acetilcolinesterase - enzima que catalisa a hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor. E, na ausência de acetilcolinesterase, a acetilcolina liberada acumula-se nas sinapses das células nervosas, levando a um colapso do sistema nervoso central.¹⁴

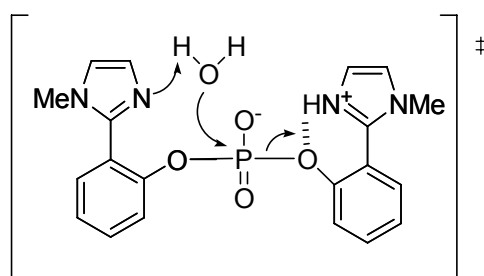


Esquema 2

O processo de degradação desses compostos consiste na remoção do seu caráter tóxico por meio de reações relativamente simples, rápidas e com uso de reagentes estáveis, de baixo custo e baixa massa molecular.¹⁵ Além disso, é necessário considerar que os intermediários e produtos gerados pelo processo de descontaminação não apresentem toxidez. Diferentes métodos tem sido empregados ao longo dos anos, mas nenhum com eficiência que permita produzir resíduos sem efeitos adversos para o meio ambiente. Um exemplo desse problema está no VX, o qual apresenta diferentes possibilidades de ataque nucleofílico à sua estrutura, com geração de vários produtos. Em pH 8, o produto principal da hidrólise do VX (EA 2192, ácido S-(2-diisopropilaminoetil)-metilfosfonotioico) é muito persistente no meio ambiente e apresenta significativa atividade anticolinesterase.¹⁶ Nesse contexto, reações de substituição nucleofílica com uso de nucleófilos detentores do efeito alfa, os quais produzem clivagem quantitativa da ligação P-O, representam uma alternativa promissora para degradação dessas estruturas. O efeito alfa será discutido detalhadamente no item 1.2.

Existe um interesse crescente do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI) pela química dos ésteres de fosfato, principalmente no que se

refere à compreensão das reações que envolvem a quebra das ligações que constituem esses ésteres.¹⁷⁻²² As reações estudadas envolvem, além de substituição nucleofílica utilizando nucleófilos α , o entendimento de alguns processos biológicos. Recentemente, Orth e colaboradores estudaram a reação de hidrólise do diéster bis(2-(1-metil-1H-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato, em que os efeitos de catálise ácida e básica ocorrem simultaneamente (**Esquema 3**). De acordo com os autores, o diéster se mostrou um eficiente modelo bifuncional da Ribonuclease A, enzima que media a clivagem do RNA. Nesse composto, o grupo imidazol atua como catalisador básico geral ativando uma molécula de água enquanto que o próton do grupo imidazólio estabiliza o grupo de saída aril-óxido.^{23, 24}

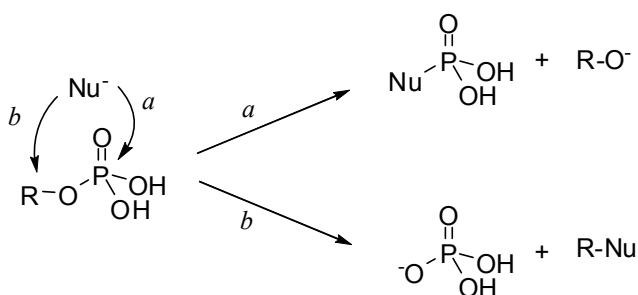


Esquema 3

Enfim, o interesse na detoxificação dos triésteres fosfóricos, juntamente com a importância biológica dos mono- e diésteres, faz com que seja de fundamental importância a investigação de qualquer reação que envolva a química dos ésteres de fosfato.

1.1.1 Reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato

Os dois mecanismos conhecidos para a reação de substituição nucleofílica de ésteres de fosfato envolvem: (a) quebra da ligação P-O, que acontece quando o nucleófilo ataca o átomo de fósforo central e desloca o álcool ou alcóxido; ou (b) quebra da ligação C-O, em que o átomo de carbono da ligação P-O-C do éster é o eletrófilo, e todo o grupo fosfato é substituído pelo nucleófilo mantendo a ligação P-O intacta (**Esquema 4**).

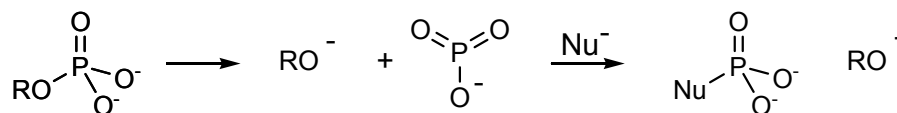


Esquema 4

O mecanismo de quebra da ligação C-O somente é o caminho principal em pH baixo, em que o grupo de saída é o ácido fosfórico neutro. Já em pH maiores, em que o grupo de saída fosfato possui pelo menos uma carga negativa, a hidrólise deve ocorrer preferencialmente via mecanismos de clivagem da ligação P-O.²⁵

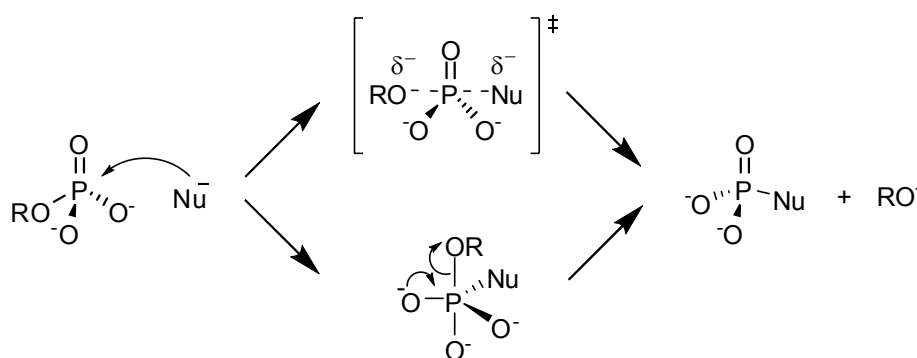
As reações de substituição com quebra da ligação P-O são consideradas mecanisticamente análogas àquelas envolvendo substituição no carbono tetraédrico, do tipo S_N1 ou S_N2. Esses mecanismos são descritos na literatura como dissociativo e associativo, respectivamente.²⁶

O mecanismo dissociativo acontece em duas etapas, a primeira etapa é determinante da velocidade de reação e leva à formação do íon metafosfato hidratado (PO₃⁻.nH₂O); a segunda, é o ataque de um nucleófilo sobre o íon formado na etapa anterior (**Esquema 5**).



Esquema 5

O mecanismo associativo ocorre também em duas etapas, adição e eliminação, em que o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico leva à formação de uma espécie pentacoordenada, sendo esta um intermediário ou estado de transição (**Esquema 6**).



Esquema 6

Os mecanismos dessas reações podem ser visualizados claramente no diagrama de More O'Ferrall-Jencks (**Figura 1**). Nesse diagrama, os mecanismos com mais de uma etapa seguem os caminhos ao longo das bordas, enquanto os mecanismos concertados desviam das bordas do diagrama. Sendo que, os mecanismos dissociativos seguem a coordenada R→S→P (D_N + A_N na nomenclatura IUPAC)²⁷, e os mecanismos associativos seguem a coordenada R→Q→P (A_N + D_N).

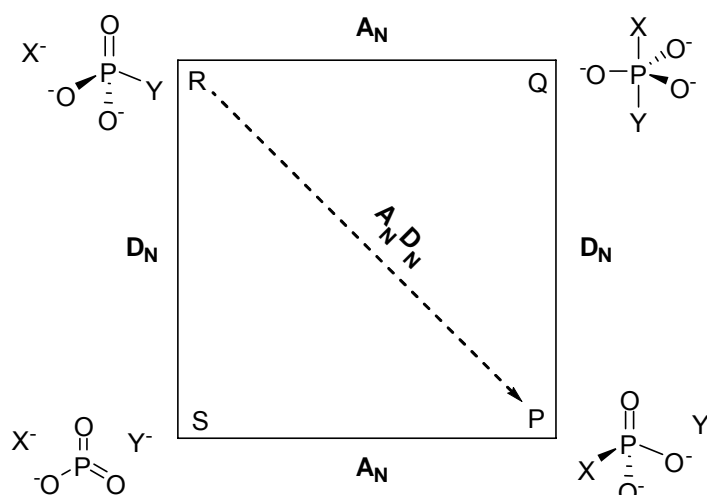


Figura 1 – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks para a substituição nucleofílica de uma espécie Y^- por uma X^- em um monoéster de fosfato diânionico.

As evidências experimentais da existência da espécie pentacoordenada do átomo de fósforo (canto Q), comprovam que muitos mecanismos de reações de substituição apresentando mais de uma etapa envolvem essas espécies como intermediários. Já o envolvimento do íon metafosfato (ou derivado substituído), no canto S do diagrama, ainda não foi demonstrado experimentalmente em um processo de substituição apresentando mais de uma etapa em solução aquosa. Nesse caso, tem-se observado que a etapa determinante envolve principalmente a quebra da ligação do grupo de saída com pequena formação da ligação com o nucleófilo. Em termos do diagrama na **Figura 1**, esse mecanismo envolve caminhos de reação que se aproximam do canto S, mas não o alcança.²⁸⁻³¹

Enfim, é difícil afirmar que os mecanismos de transferência do grupo fosforila sigam estritamente o caminho associativo ou o dissociativo. Na verdade, é mais sensato afirmar que, dependendo de fatores como a força do nucleófilo, pK_a do grupo de saída e pH da solução, um dos dois processos deve ser favorecido. Em linhas gerais, di- e triésteres fosfóricos seguem um caminho com caráter associativo, com estados de transição situados entre o estado de transição sincrônico $A_N D_N$ e o canto Q, enquanto que os monoésteres seguem um mecanismo com característica mais dissociativa, com estados de transição situados no lado oposto do diagrama.

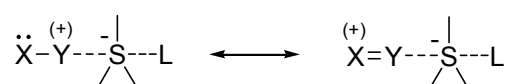
1.2 Nucleófilos alfa

O efeito α é a reatividade especial mostrada por um centro nucleofílico que está vizinho a um átomo contendo um par de elétrons livres e que, como consequência, mostra uma reatividade superior daquela esperada para um nucleófilo com o mesmo valor de pK_a .³² A hidroxilamina, o íon hidroperóxido, os ácidos hidroxâmicos e a hidrazina são alguns exemplos de nucleófilos que apresentam o efeito α (**Esquema 7**).³³⁻³⁵

Nucleófilos com efeito α	$\ddot{X}-Y:$
Hidroxilamina	H_2N-OH
Hidroperóxido	$HO-O^{\ominus}$
Ácidos Hidroxâmicos	$\begin{array}{c} O \\ \\ RC-NHOH \end{array}$
Hidrazina	H_2N-NH_2

Esquema 7

Diferentes fatores tem sido atribuídos à origem do efeito alfa: (i) os pares de elétrons sobre os átomos na posição α aumentam a nucleofilicidade pelo aumento da densidade eletrônica no centro de reação; (ii) no caminho que leva ao estado de transição, a deficiência eletrônica causada pela doação de elétrons do centro nucleofílico para o substrato é compensada pela doação de elétrons do átomo adjacente por ressonância (**Esquema 8**);³⁶



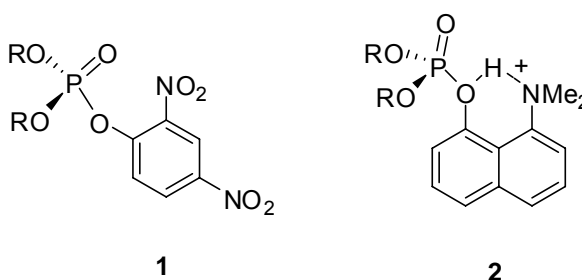
Esquema 8

(iii) e, ainda, em termos da teoria dos orbitais moleculares, a idéia mais aceita seria que o estado fundamental do nucleófilo é desestabilizado pela repulsão dos orbitais ocupados $p\pi$ dos átomos adjacentes e isso acarreta em um aumento na energia do orbital ocupado de maior nível (HOMO) que participa da reação. Como resultado, o orbital (HOMO) do nucleófilo interagiria fortemente com o centro eletrofílico, levando a uma diminuição da repulsão entre orbitais $p\pi$ e um conseqüente aumento da reatividade.³⁷

A magnitude do efeito alfa é dependente da eletrofilicidade e da reatividade intrínseca do substrato. Como mostra a **Tabela 1**, que relata a magnitude do efeito alfa para reações de hidroxilamina com duas diferentes classes de ésteres de fosfato. Como se pode observar os derivados de 8-dimetilamino-1-naftol (**2**) apresentam efeitos menores em relação aos derivados de 2,4-dinitrofenil (**1**). Vale ressaltar que a seqüência de reatividade usualmente observada para fosfatos depende da natureza dos grupos substituintes (**Esquema 9**).³⁸

Tabela 1 – Magnitude do efeito alfa da hidroxilamina nas reações com derivados dos ésteres de fosfato: **1** (2,4-dinitrofenila) e **2** (8-dimetilamina-1-naftol).

Éster	Fosfatos 1	Fosfatos 2
ArO-PO_3^{2-}	< 10	3
$\text{ArO-PO}_2\text{OR}^-$	70	5
ArO-PO(OR)_2	700	100



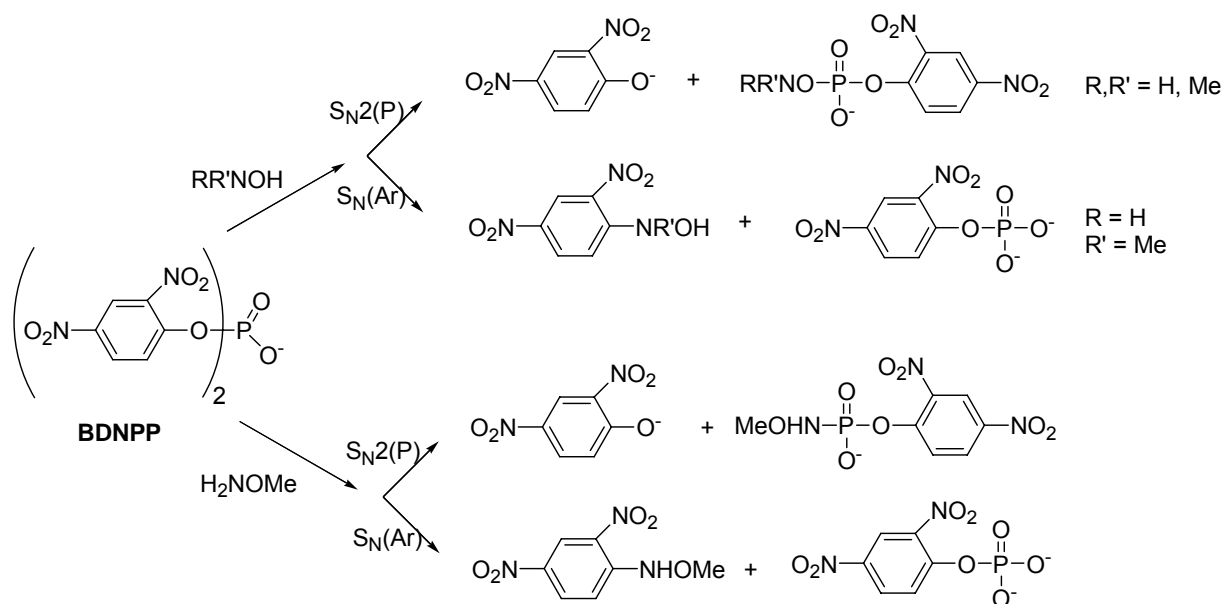
Esquema 9

Devido à reatividade extraordinária apresentada pelos nucleófilos detentores do efeito α , eles tem sido largamente utilizados na clivagem de compostos extremamente estáveis. A clivagem do diéster bis-(2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) vem sendo estudada em reações de substituição nucleofílica na presença de diferentes nucleófilos alfa. Diversos produtos são formados nessas reações,

dependendo do nucleófilo, mas em todos os casos, a reatividade é extremamente superior à observada para os nucleófilos não detentores do efeito α .

Domingos e colaboradores²² estudaram a desfosforilação do BDNPP por diferentes hidroxilaminas metiladas (MeHNOH, Me₂NOH e NH₂OMe). A hidrólise do BDNPP é extremamente lenta, com um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de aproximadamente 43 dias em pH 7, mas na presença de hidroxilamina a clivagem tem um incremento na velocidade em aproximadamente 10³ vezes, apresentando um $t_{1/2}$ de aproximadamente 1 hora.¹⁷

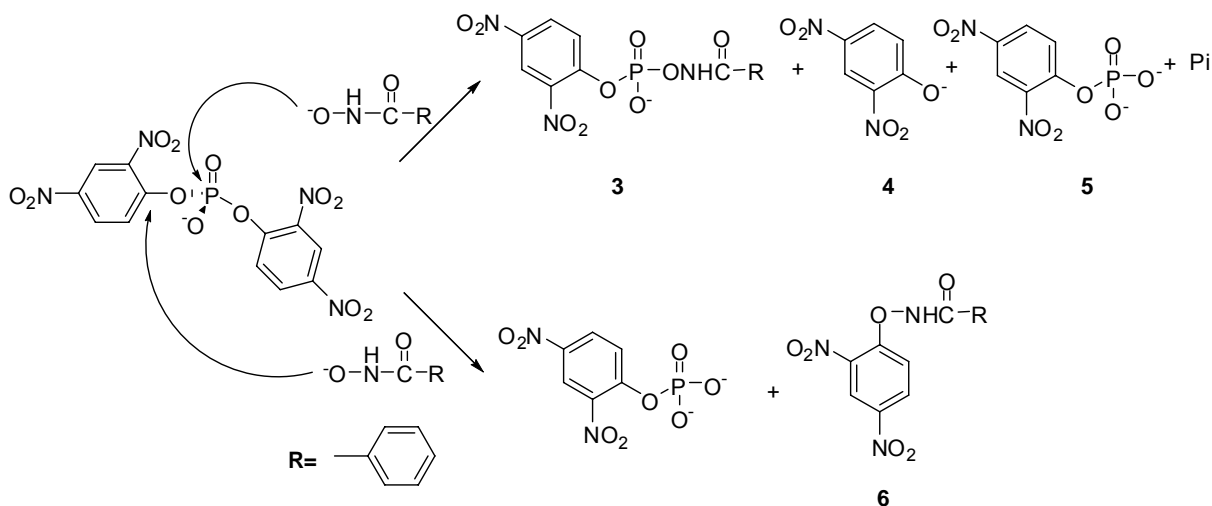
Segundo os autores, a *N*-metilação da hidroxilamina causa um pequeno efeito na etapa inicial da reação. Nesse caso, apenas as reações secundárias são afetadas, devido à estabilidade dos intermediários formados na primeira etapa. No entanto, quando o átomo de oxigênio é metilado, o ataque inicial sobre o fosfato é fortemente inibido, e então o ataque nucleofílico sobre o anel aromático passa a contribuir significativamente (**Esquema 10**).



Esquema 10

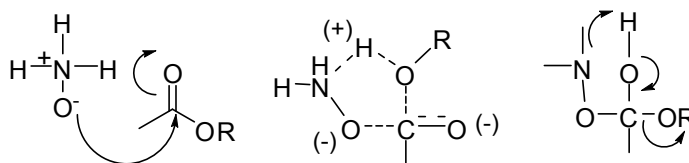
Estudos para a reação do BDNPP com ácido benzohidroxâmico (BHA) também foram realizados pelo grupo LaCFI³⁹, evidenciou-se um ataque nucleofílico simultâneo do BHA no anel aromático e no fósforo, tal como apresentado no **Esquema 11**. Resultados de ESI-MS e CG-MS permitiram detectar os produtos **4**, **5** e **6**. Além disso, os resultados mostraram que o intermediário **3**, que se forma pelo

ataque no fósforo, sofreu um rearranjo de Lossen formando produtos como isocianato, uréia, amina e ácido carbâmico, que também foram detectados. Essas reações de substituição nucleofílica mostraram-se aproximadamente 100 vezes mais rápidas que as respectivas reações em água.¹⁷



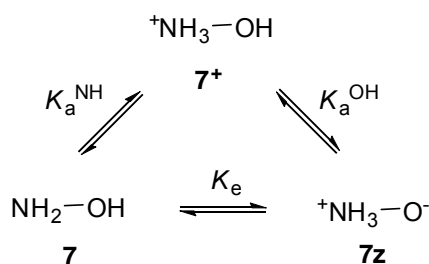
Dentre esses nucleófilos de reatividade inusitada destacam-se os estudos que envolvem o mecanismo de ataque nucleofílico da hidroxilamina, principalmente porque a seletividade por um de seus centros nucleofílicos (N vs O) é dependente do tipo de substrato. As reações de alquilação ocorrem via átomo de nitrogênio, enquanto que, em reações envolvendo ésteres de acila^{40, 41} e fosforila¹⁷ o ataque nucleofílico acontece preferencialmente pelo átomo de oxigênio, mesmo o átomo de nitrogênio sendo consideravelmente mais básico.

Segundo Jencks⁴², a extraordinária reatividade da hidroxilamina mostra que o oxigênio aniônico da hidroxilamina é a verdadeira espécie nucleofílica reativa. E ainda, de acordo com o autor, essa reatividade excepcional deve-se a uma catálise intramolecular (ácida ou básica), em que a hidroxilamina reage pelo átomo de oxigênio com assistência de transferência intramolecular do próton para substrato, como por exemplo, nas estruturas representadas no **Esquema 12**. Provavelmente, por esse motivo, a O-alquilação não é observada, já que a catálise não é possível nesse caso.



Esquema 12

Recentemente foram publicados resultados determinantes nessa discussão, que mostraram através de estudos computacionais e cristalográficos, que a forma zwitteriônica **7z** é preferida no cristal de $(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{HCl}$ (**Esquema 13**). Apesar de **7z** não ser um alfa nucleófilo como usualmente definido, ele é preferido em algumas reações devido à transferência de próton do grupo H_3N^+ para uma carga negativa no substrato, por exemplo, o átomo de oxigênio em ésteres de acila e fosforila, confirmando a proposta de Jencks.⁴³



Esquema 13

O grupo LaCFI tem estudado uma proposta a respeito da verdadeira espécie reativa da hidroxilamina, as reações de substituição nucleofílica de diferentes ésteres de fosfato já foram estudadas na presença de hidroxilamina. E ainda neste trabalho, estão mostrados os esforços de se provar que a sua forma zwitteriônica é a verdadeira espécie reativa na clivagem de fosfatos orgânicos.

1.3 Relações lineares de energia livre

A mudança na velocidade de uma reação devido à alteração de substituintes em um reagente, por exemplo, com a substituição de um hidrogênio por um grupo nitro em um anel aromático, é facilmente avaliada de forma qualitativa. Já as relações lineares de energia livre permitem a compreensão quantitativa dos efeitos de substituintes sobre um centro reacional, constituindo uma ferramenta extremamente informativa no estudo de mecanismos de reações químicas.⁴⁴

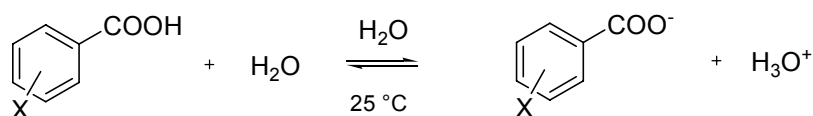
Dentre essas relações⁴⁵⁻⁴⁸ estão a equação de Hammett e a equação estendida de Brønsted, que correlacionam, respectivamente, o efeito de diferentes grupos de saída e nucleófilos em uma reação, permitindo uma compreensão aproximada do estado de transição.

1.3.1 A Equação de Hammett

A equação de Hammett faz a correlação entre velocidades das reações de derivados de fenila *para* e *meta* substituídos e os valores de σ , em que ρ é o parâmetro de similaridade (**Equação 1**). Os valores de σ são definidos em relação às constantes de acidez de ácidos benzóicos substituídos (**Esquema 14**), sendo uma medida da habilidade que o substituinte tem de modificar a acidez do ácido benzóico, conforme a **Equação 2**.⁴⁷ Um valor positivo de σ indica que o substituinte tem efeito retirador de elétrons, enquanto que, um valor negativo indica efeito doador de elétrons.

$$\log k^X = \rho \sigma + \log k^H \quad (1)$$

onde, k^X refere-se à constante de velocidade para reações dos compostos *para* e *meta* substituídos e k^H , ao composto não substituído.



Esquema 14

$$\sigma = pK_a^H - pK_a^X \quad (2)$$

onde, K_a^H e K_a^X referem-se às constantes de dissociação ácida do ácido benzóico; e dos seus derivados substituídos em posições *para* ou *meta*, respectivamente.

O efeito provocado na energia padrão de dissociação do ácido benzóico devido à substituição do hidrogênio por um substituinte elétron-retirador pode ser explicado com a **Figura 2**. A relação entre a constante de dissociação e a energia livre padrão de uma reação é dada pela **Equação 3**. A introdução de um substituinte elétron-retirador provoca efeitos sobre o ácido não dissociado e também sobre seu ânion. No entanto, o efeito sobre o ânion deve ser maior, e como consequência a energia livre padrão de dissociação do ácido benzóico substituído deve ser menos positiva, ou seja, a dissociação deve ser mais favorável. Por exemplo, o K_a do ácido benzóico passa de $6,3 \times 10^{-5}$ para um valor de $3,2 \times 10^{-4}$, na presença de um substituinte 3-NO₂.⁴⁹

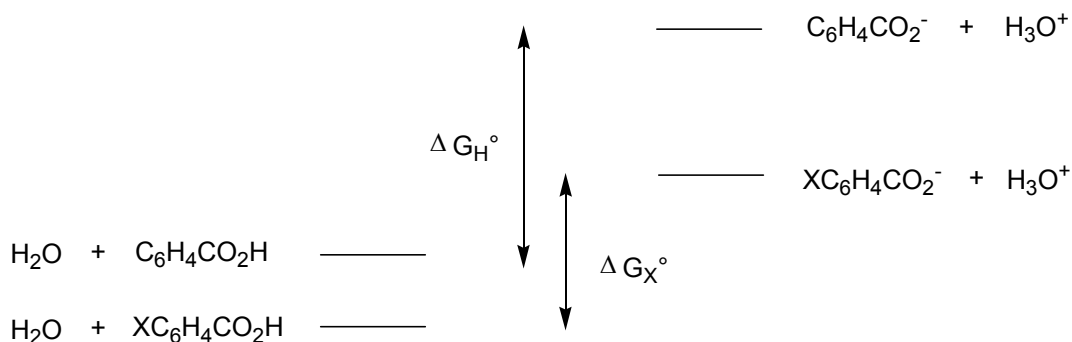
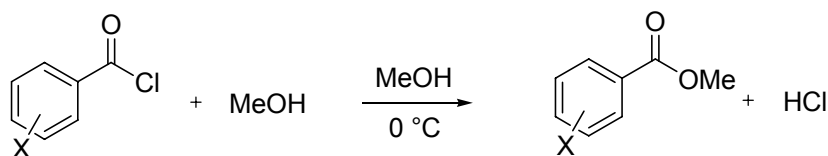


Figura 2 – Diagrama de energia livre padrão para o efeito de um substituinte elétron-retirador na dissociação do ácido benzóico em água.

$$-\Delta G^\circ = RT \ln K_a \quad (3)$$

A aplicação da relação de Hammett pode ser exemplificada com a reação de metanólise de cloretos de aroila substituídos (**Esquema 15**). O valor positivo de ρ (1,42), obtido para essas reações, mostra que a presença de substituintes retiradores de elétrons no anel aromático provoca um aumento na velocidade da reação, descartando o mecanismo dissociativo. Ou seja, o valor positivo de ρ é compatível com um estado de transição em que há um aumento da densidade

eletrônica no carbono ligado ao anel, o que é consistente com um mecanismo de adição-eliminação, com formação ou decomposição do intermediário tetraédrico como etapa determinante da velocidade da reação.⁴⁹

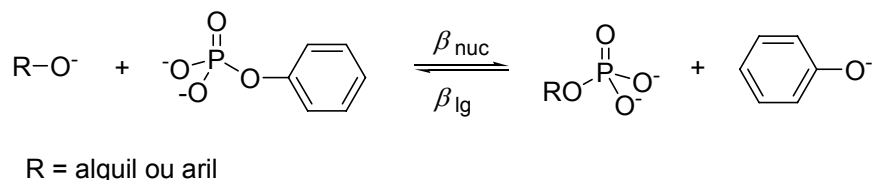


Esquema 15

É importante lembrar que nas relações de Hammett deve haver similaridade, em ressonância e em indutividade, com relação ao equilíbrio padrão definido em relação aos ácidos benzóicos. Assim, nos casos que envolvem conjugação eletrônica direta, tais como fenóis, a descrição deve ser realizada em função de σ^- , o qual é definido em relação às constantes de acidez de fenóis substituídos.

1.3.2 Equação de Brönsted

A equação de Brönsted é conceitualmente similar à de Hammett, no entanto, aborda o equilíbrio de forma diferente, relacionando as constantes de velocidade com o pK_a do nucleófilo, em que pK_a refere-se à constante de dissociação ácida do nucleófilo. Por exemplo, na reação de monoésteres de fosfato, no **Esquema 16**, os parentes são os respectivos álcoois ou fenóis substituídos.



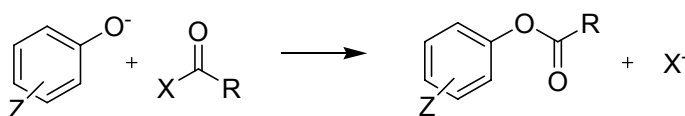
Esquema 16

De acordo com o **Esquema 16**, nas relações de Brönsted a coordenada que vai da esquerda para a direita é descrita pela **Equação 4**, em que β_{nuc} é o coeficiente de similaridade. Enquanto que, a reação no sentido contrário é descrita pela **Equação 5**, em que o coeficiente de similaridade é β_{lg} .

$$\log k_{\text{nuc}} = \beta_{\text{nuc}} \text{p}K_{\text{a}} \quad (4)$$

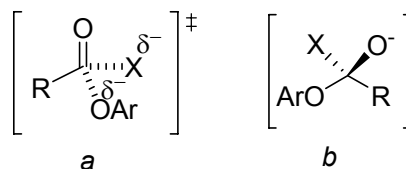
$$\log k_{\text{lg}} = \beta_{\text{lg}} \text{p}K_{\text{a}} \quad (5)$$

Uma aplicação bastante interessante para a equação de Brønsted pode ser mostrada pelo exemplo a seguir. No **Esquema 17** está apresentada uma família de reações em que fenolatos substituídos reagem com um derivado de acila.



Esquema 17

Essas reações podem envolver um mecanismo concertado, em que a substituição de X^- pelo fenolato ocorre via uma estrutura de transição “a”, ou ainda, um mecanismo em etapas com a formação de um intermediário tetraédrico “b” (**Esquema 18**).



Esquema 18

Então, se o mecanismo é do tipo concertado, os substituintes Z terão efeitos paralelos sobre a afinidade dos fenolatos pelo centro eletrofílico do derivado de acila. Conseqüentemente, espera-se um gráfico de Brønsted linear, como apresentado na **Figura 3A**. Caso contrário, ou seja, se o mecanismo da reação envolver a formação de um intermediário tetraédrico, a etapa determinante depende da natureza do substituinte e pode ser a formação ou a decomposição do intermediário. Nesse caso, o gráfico de Brønsted apresenta a forma geral representada pela **Figura 3B**.

É necessário destacar que a ausência de uma inflexão no gráfico de Brønsted somente exclui o mecanismo por etapas, caso o estudo seja feito em uma faixa

representativa de nucleófilos, ou seja, abranja o ponto em que deve ocorrer a mudança de coeficiente angular.⁵⁰⁻⁵³

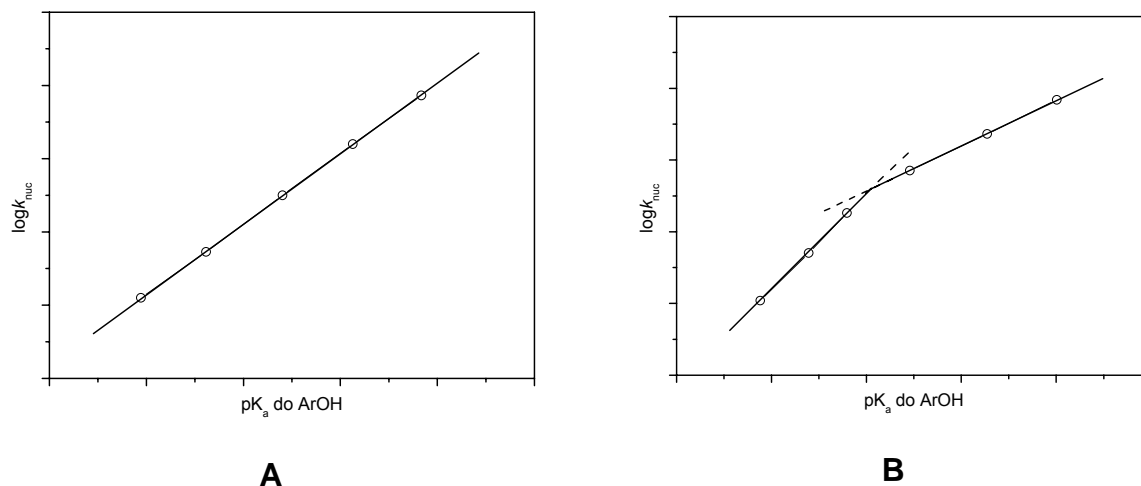


Figura 3 – Gráfico de Brønsted para (A) mecanismo concertado e (B) mecanismo via intermediário tetraédrico.

1.3.3 Carga efetiva

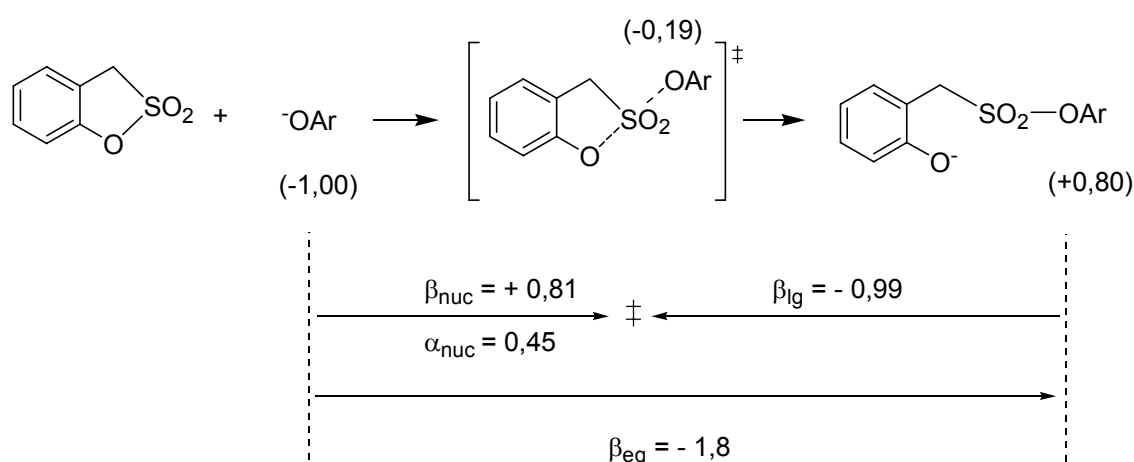
As mudanças de cargas eletrônicas estão profundamente relacionadas às ordens de ligações das espécies envolvidas em uma reação, consistindo em um parâmetro extremamente importante na descrição de mecanismos. O conceito de carga efetiva simplifica a interpretação dos coeficientes angulares das relações lineares de energia livre, os quais estão relacionados às mudanças de carga ou dipolo quando os reagentes seguem através de estados de transição para produtos. Em alguns casos, um mapa de carga efetiva pode ser construído, mostrando as mudanças das ligações mais relevantes, no qual o conceito de carga efetiva permite estabelecer conectividade entre reagentes e produtos e a indicação da posição aproximada do estado de transição na coordenada de reação.^{44, 54}

A carga efetiva é definida como a carga hipotética requerida para dar o efeito do substituinte observado no equilíbrio padrão, onde a carga está definida. Ela pode ser definida nos estados reagente, transição e produto (**Equação 6**). Através dos valores de β_{nuc} , por exemplo, pode ser obtida a carga efetiva no estado de transição de uma dada reação.

$$\beta_{\text{eq}} = \frac{(\varepsilon_{\text{p}} - \varepsilon_{\text{r}})}{(\varepsilon_{\text{ps}} - \varepsilon_{\text{rs}})} \quad (6)$$

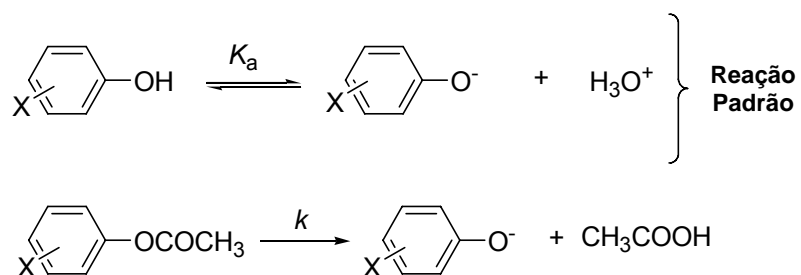
onde, ε_{rs} e ε_{ps} são, respectivamente, as cargas efetivas para reagente e produto do equilíbrio padrão.

Na reação apresentada no **Esquema 19**, por exemplo, as cargas no átomo de oxigênio arílico no estado inicial e final são conhecidas e iguais a -1 e +0,8, respectivamente. Então, a mudança total na carga efetiva (β_{eq}) dos reagentes até os produtos deve ser -1,8. Em relação ao estado de transição dessa reação, em que o átomo de oxigênio arílico sofre mudanças eletrônicas consideráveis em relação aos substituintes polares, a carga efetiva pode ser interpretada de forma relativamente simples. Sendo que a reação exibe um β_{nuc} de +0,81, e similarmente a **Equação 6**, utilizando a relação $\beta_{\text{nuc}} = (\varepsilon_{\text{ET}} - \varepsilon_{\text{r}}) / (\varepsilon_{\text{ps}} - \varepsilon_{\text{rs}})$, é possível calcular o valor de carga efetiva sobre o oxigênio arílico no estado de transição, que deve ser de -0,19.⁵⁵



Esquema 19

É importante salientar que a carga efetiva não corresponde ao valor real da densidade eletrônica sobre um determinado átomo, sendo apenas uma medida da sensibilidade de uma reação desconhecida às mudanças eletrônicas em relação a uma reação padrão. Por exemplo, na hidrólise do acetato de fenila, apresentado no **Esquema 20**, a sensibilidade às mudanças eletrônicas em relação aos substituintes polares deve ser comparada à dissociação do fenol. Ou seja, não se comparam cargas, mas sim mudanças relativas de carga em relação a uma reação padrão.

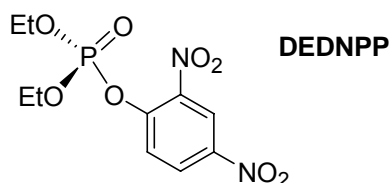


Esquema 20

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

De acordo com o interesse geral do grupo de pesquisa LaCFI em mecanismos de reações orgânicas, principalmente naquelas que envolvem a química dos ésteres de fosfato, foi selecionado o triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) com o objetivo de fazer um estudo mecanístico detalhado do ataque nucleofílico da hidroxilamina em ésteres de fosfato (**Esquema 21**).



Esquema 21

Dentro de um conjunto de estratégias específicas para atingir o objetivo geral deste trabalho, destacam-se:

- Sintetizar e caracterizar o dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**);
- Determinar as constantes de velocidade da reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina utilizando a técnica de espectroscopia UV-Vis;
- Determinar as constantes de velocidade da reação entre **DEDNPP** e hidroxilaminas metiladas utilizando a técnica de espectroscopia no UV-Vis, a fim de comparar reatividades;
- Aplicar os conceitos de correlações lineares de energia livre, bem como de carga efetiva no estudo do mecanismo da reação, com a finalidade de conhecer a estrutura aproximada do estado de transição;
- Identificar produtos e possíveis intermediários da reação utilizando técnicas de espectroscopia UV-Vis, RMN ^1H , RMN ^{31}P e CG-MS.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

Os espectros de UV-Vis e as medidas cinéticas foram realizados em um espectrofotômetro HP 8453. Já as medidas cinéticas mais lentas, foram realizadas em um aparelho Cary 50. Ambos equipamentos foram acoplados a banhos termostáticos da Microquímica, modelo MQBTC99-20, e a microcomputadores, contendo sistemas de aquisição e tratamento de dados HP ChemStation versão A.02.05 e Cary WinUV 3.00, respectivamente. Em todas as medidas foram utilizadas cubetas de quartzo com capacidade de 3,5 ml e 1,0 cm de caminho ótico.

As regressões lineares e não-lineares para ajustes de dados cinéticos foram realizadas com o programa de computação ORIGIN versão 7.5 (OriginLab, 2003).

As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro digital Hanna, calibrado a 25°C com soluções padrões pHs 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlo Erba). Em experimentos acima de 25°C, as medidas foram realizadas com compensação de temperatura, em cela acoplada a um banho termostático da Microquímica. Para as medidas em D₂O a 25°C, os valores de pD foram corrigidos considerando a **Equação 7**.⁵⁶

$$pD = pH + 0,4 \quad (7)$$

As medidas de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ³¹P foram realizadas a 25,0 °C, em D₂O a 400 e 162 MHz, respectivamente, em um espectrômetro Varian Mercury Plus 400-MHz. Utilizou-se 3-(trimetilsil) propionato de sódio (TSP) como referência interna para RMN ¹H e ácido fosfórico 85% como referência externa para RMN ³¹P.

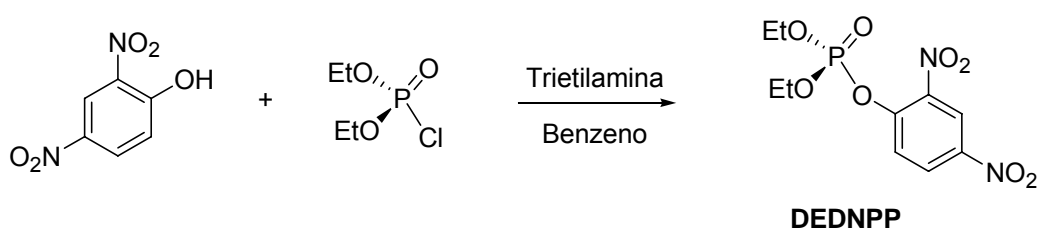
Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-5050A, acoplado a um espectrômetro gasoso Shimadzu GC-17A, operando com uma coluna DB-5 (Agilent) e He como gás de arraste. A temperatura do injetor e interface foram 280 e 300 °C, respectivamente. A rampa de aquecimento do forno foi mantida a 80 °C por 5 min e, em seguida a temperatura foi elevada, com uma taxa constante de 10 °C/min, a 300 °C e mantida por 5 min.

3.2 Reagentes

A água deuterada (D_2O) foi adquirida da Cambridge Isotope Laboratories, com grau de pureza rotulado em 99,9%. O NaOD (40%) e o DCl (37%) foram adquiridos da Aldrich, sendo utilizados como recebidos. Os demais reagentes eram de qualidade P.A. (procedentes da Aldrich, Carlo Erba, Acros e Vetec) e foram tratados com técnicas adequadas quando necessário.

3.3 Síntese do dietil 2,4-dinitrofenil fosfato - DEDNPP

O dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Moss e Ihara, como segue.⁵⁷ Em 25 ml de benzeno foram dissolvidos 2,4-dinitrofenol (5 mmol), dietilclorofosfato (5 mmol) e trietilamina (5,5 mmol). Com exceção do dietilclorofosfato, todos os demais reagentes foram previamente purificados. A mistura foi deixada sob refluxo por aproximadamente 10 horas, a 70-80°C. Após esse tempo, a solução foi filtrada e o filtrado extraído 6 vezes com aproximadamente 50 ml de água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada e evaporada rotatoriamente até a obtenção de um óleo amarelo (**Esquema 22**).



Esquema 22

A caracterização do produto foi realizada por RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$ e referência interna TMS): δ 1,40 (t, 6H, $J = 6,96$ Hz, CH_3); δ 4,31 (“quinteto”, 4H, $J = 6,96$ Hz, CH_2); δ 7,86 (dd, 1H, $J_{bc} = 9,16$ Hz e $J_{ac} = 1,10$ Hz, Ar); δ 8,46 (dd, 1H, $J_{bc} = 9,16$ Hz e $J_{ab} = 2,93$ Hz, Ar), δ 8,81 (dd, 1H, $J_{ab} = 2,93$ Hz e $J_{ac} = 1,10$ Hz, Ar), conforme as **Figuras 4 e 5**.

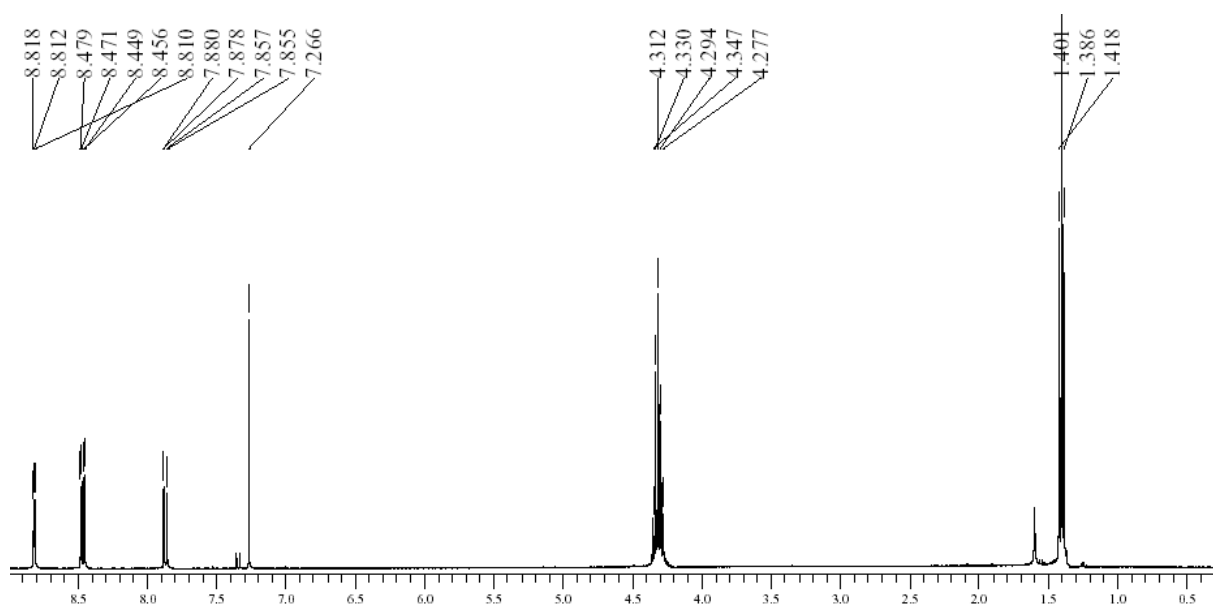


Figura 4 – Espectro de RMN ^1H para **DEDNPP** em CDCl_3 a 400 MHz.

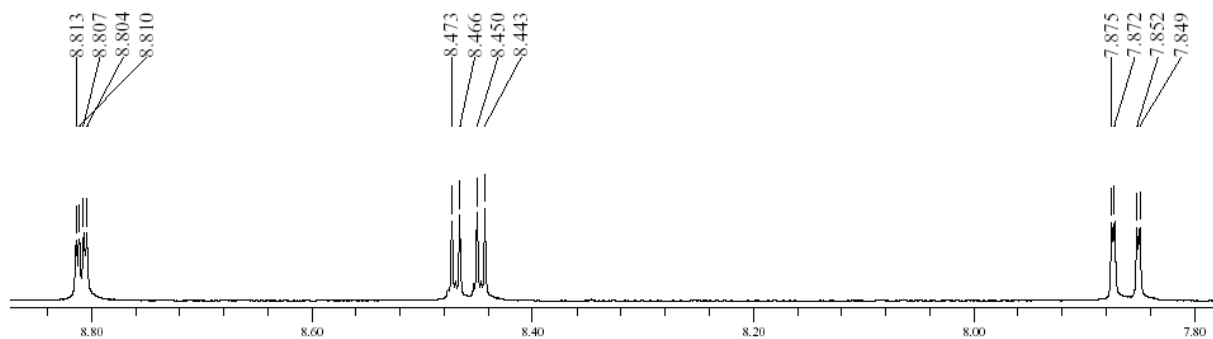


Figura 5 – Espectro de RMN ^1H ampliado da região 7,80 – 8,80 para **DEDNPP**.

3.4 Identificação de produtos e intermediários

3.4.1 Identificação de hidrazina

A hidrazina foi identificada através da reação com *p*-dimetilaminobenzaldeído, conforme descrito por Watt e Chrisp.⁵⁸ O procedimento foi realizado como segue: 50 µl de uma solução 0,01 M de **DEDNPP** em acetonitrila foram adicionados a 1 ml de uma solução de hidroxilamina 0,05 M, em pH 8,50 (0,01 M de TRIS). Ao fim da reação, a 25°C, uma alíquota de 100 µl da mistura reacional foi adicionada em 2 ml da solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (0,05 M em HCl 1M). O produto, hidrazona de *p*-dimetilaminobenzaldeído, foi identificado por espectroscopia UV-Vis ($\lambda_{\text{max}}=454\text{nm}$, $\epsilon=59000^3$). Um controle experimental foi realizado utilizando uma solução preparada pelo processo descrito acima, na ausência de **DEDNPP**, e não foi detectada absorvância significativa em 454 nm.

3.4.2 Identificação de diimina

A identificação de diimina foi realizada em condições similares à identificação de hidrazina: 50 µl de uma solução 0,01 M de **DEDNPP** em acetonitrila foram adicionados a 1 ml de uma solução de hidroxilamina 0,05 M, em pH 8,50 (0,01 M de TRIS), contendo 0,2 M de ácido fumárico. Ao fim da reação, a 25°C, uma alíquota de 100 µl da mistura reacional foi adicionada em 2 ml da solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído: espectros de UV-Vis não apresentaram absorvância significativa em 454 nm.

3.4.3 Identificação de ácido succínico

A identificação de ácido succínico, produto da reação da diimina e ácido fumárico, foi realizada através RMN ¹H e espectrometria de massas, como descrito abaixo.

3.4.3.1 Experimento de RMN ^1H

Com pequenas alíquotas de NaOD, 5 ml de uma solução de D_2O contendo 0,1 M de hidroxilamina e 0,2 M de ácido fumárico foi levada a $\text{pD}=7,25$. Uma alíquota de 1 ml dessa solução foi adicionada à 3,6 mg de **DEDNPP**. Depois de 16 horas sob agitação e atmosfera de argônio, o espectro de RMN ^1H foi obtido.

Foi obtido ainda, para fins comparativos, um espectro de RMN ^1H de uma solução contendo: 0,05 M de hidroxilamina, 0,2 M de ácido fumárico e 0,01 M de ácido succínico, em 1 ml de D_2O .

3.4.3.2 Experimento de espectrometria de massas

A solução utilizada no experimento de RMN ^1H foi extraída com 13 ml de acetato de etila, com o objetivo de remover o excesso de fenol. Após a separação de fases, foi adicionado 1 ml de HCl 1 M à fase aquosa e então novamente foram adicionados 10 ml de acetato de etila para extrair os ácidos succínico e fumárico. O solvente orgânico foi removido sob fluxo de argônio e derivatizada com 30 μl de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida, a fim de aumentar a volatilidade e diminuir a polaridade dos ácidos. Depois de 1 hora a 80°C , a mistura foi seca sob fluxo de argônio, dissolvida em 2 ml de clorofórmio e analisada por espectrometria de massas.

Uma amostra padrão, contendo 2,8 mg de ácido succínico e 2,6 mg de ácido fumárico, foi preparada e analisada sob as mesmas condições descritas acima.

3.5 Medidas cinéticas

As reações foram iniciadas pela adição de uma alíquota de 20 μL da solução estoque 0,01 M de **DEDNPP** em acetonitrila (estocada em freezer) a 3 ml da solução tamponada contendo um largo excesso do nucleófilo (0,01 M - 0,06 M) em uma cela de quartzo, as quais foram deixadas termostatar na temperatura desejada. Dessa forma, a concentração inicial do substrato nas reações foi igual a 66,7 μM , assegurando condições de pseudo-primeira ordem. Os pHs das medidas cinéticas foram mantidos com os seguintes tampões: ClCH_2COOH (pH 2,00-3,00); CH_3COOH (pH 4,00-5,00); NH_2OH (pH 6,00-7,00); e TRIS (pH 8,00-9,00). A força iônica foi mantida em 1,0 M em todas as medidas cinéticas pela adição de quantidades adequadas de solução de KCl.

As reações entre **DEDNPP** e hidroxilaminas foram acompanhadas pelo aparecimento do 2,4-dinitrofenolato (DNP) em 360nm. Em todos os casos, foram registrados espectros de UV-Vis durante aproximadamente cinco tempos de meia-vida ($t_{1/2}$). A partir dos gráficos de absorvância em função do tempo, foram determinadas as constantes de velocidade observadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reação do DEDNPP com hidroxilamina

As reações entre **DEDNPP** e hidroxilamina foram acompanhadas pelo aparecimento do produto DNP (**Esquema 23**), conforme indicado pela seta em 360 nm na **Figura 6**, a qual representa um conjunto típico de espectros de UV-Vis para essas reações.

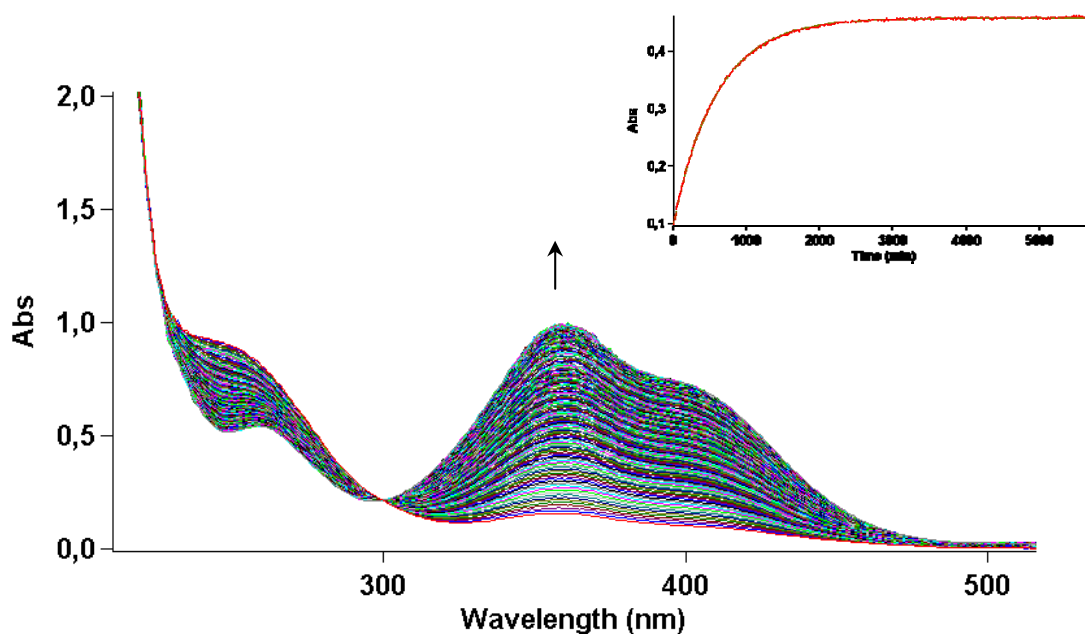
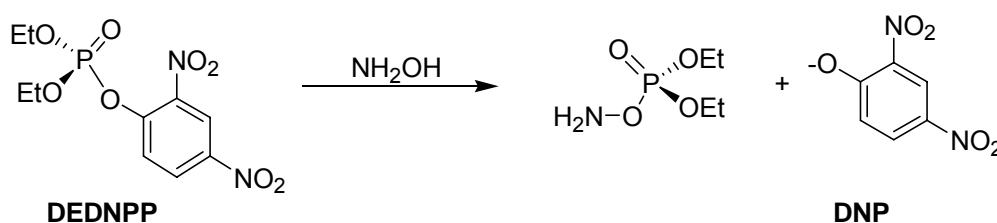


Figura 6 – Espectros sucessivos de UV-Vis da reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina (0,03 M) a 25°C, $\mu = 1,0$ M (KCl) e pH = 8,50.

Em todas as reações observou-se apenas um tipo de comportamento cinético, ou seja, as cinéticas foram sempre típicas de primeira ordem em relação à concentração de substrato orgânico. A figura inserida no canto superior direito da **Figura 6** representa o aumento de absorvância em função do tempo, típico de cinéticas de primeira ordem, devido à formação de DNP que absorve no comprimento de onda de 360 nm.

Na **Figura 7** estão apresentados os efeitos da concentração de hidroxilamina sobre as constantes de velocidade observadas (k_{obs}) para as reações com **DEDNPP**. Como se pode observar, a reação é linearmente dependente da concentração de nucleófilo. Os valores de k_{obs} correspondem basicamente à reação do **DEDNPP** com hidroxilamina, que depende da concentração de hidroxilamina.

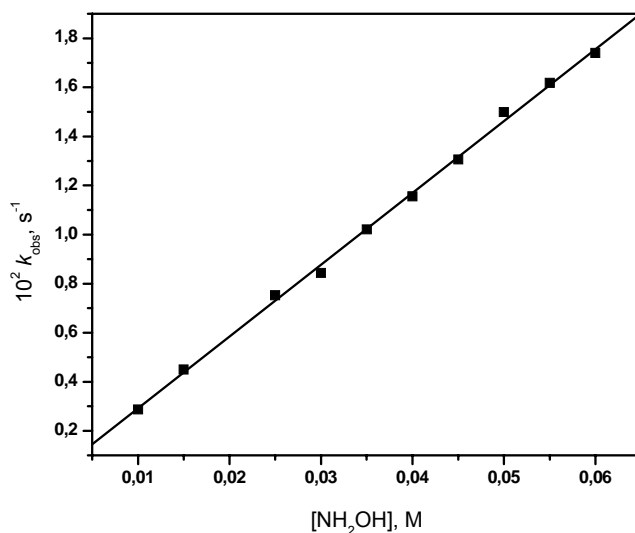
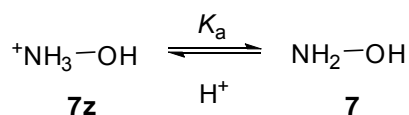


Figura 7 – Constantes de velocidade observadas (k_{obs}) em função da concentração de hidroxilamina nas reações com o **DEDNPP** a 25°C, $\mu = 1,0$ M (KCl) e pH = 8,50.

Na **Figura 8** está apresentado a curva de perfil de pH para as reações entre **DEDNPP** e hidroxilamina, entre os pHs 2,0 e 9,0. Esse perfil pode ser dividido em duas regiões distintas de acordo com a constante de dissociação da forma protonada da hidroxilamina ($pK_a = 6,06$)⁵⁹, **Esquema 24**: (i) entre pH 7,0 e 9,0, região de patamar, em que a concentração da espécie neutra da hidroxilamina é máxima; e (ii) entre 2,0 e 7,0, em que a concentração da espécie neutra da hidroxilamina diminui e a reação passa a exibir o perfil da reação somente em água.



Esquema 24

A curva sólida traçada na **Figura 8** foi obtida do ajuste não-linear utilizando a **Equação 8**, que descreve os dados experimentais em termos de constantes de velocidade e da fração molar de hidroxilamina neutra. A equação leva em consideração a hidrólise espontânea do **DEDNPP** (k_0) e a reação com a forma neutra hidroxilamina (k_2), de acordo com **Esquema 25**.

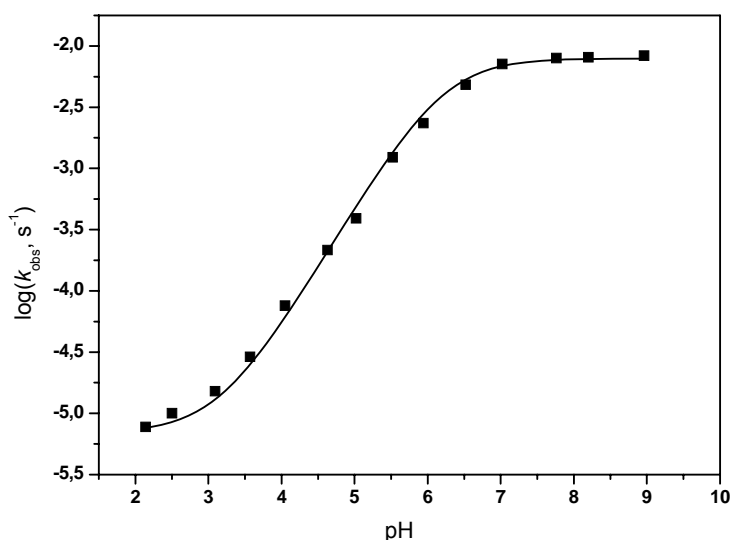
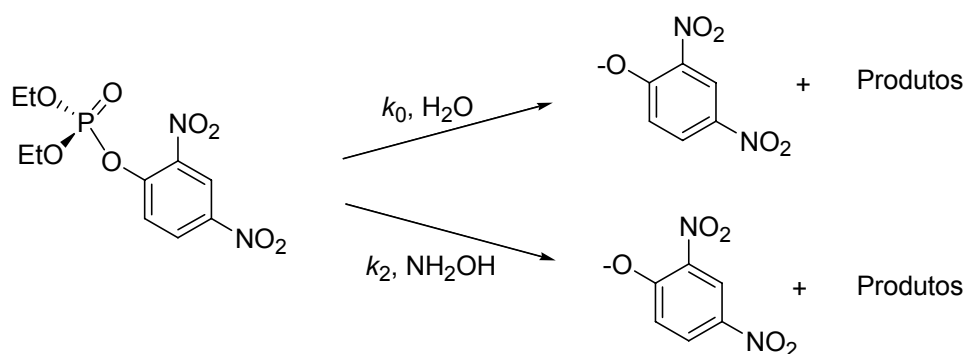


Figura 8 – Logaritmo da constante de velocidade observada (k_{obs}) em função do pH, para a reação entre **DEDNPP** e $[\text{NH}_2\text{OH}]_0 = 0,03 \text{ M}$, a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\mu = 1,0 \text{ M}$ (KCl). A linha corresponde ao ajuste teórico de acordo com a **Equação 8**.

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_2[\text{NH}_2\text{OH}]_0 \chi_{\text{NH}_2\text{OH}} \quad (8)$$

onde, k_0 e k_2 correspondem, respectivamente, à reação do **DEDNPP** com água e com hidroxilamina neutra, e $\chi_{\text{NH}_2\text{OH}}$ corresponde à fração molar da forma neutra da hidroxilamina.



Esquema 25

Na **Tabela 2** estão mostrados os melhores valores obtidos no ajuste não linear dos dados experimentais da **Figura 8**, através da **Equação 8**. O valor de pK_a para o ácido conjugado da hidroxilamina ($^+NH_3OH$), **Esquema 24**, foi obtido da literatura e, portanto, foi mantido invariável no ajuste da curva.

Tabela 2 – Valores de K_a , k_0 e k_2 utilizados do ajuste não linear dos dados cinéticos da **Figura 8**, através da **Equação 8**.

Constantes	
k_0	$6,962 \times 10^{-6}, s^{-1}$
k_2	$2,650 \times 10^{-1}, M^{-1}s^{-1}$
K_a^a	$8,710 \times 10^{-7}$

^a Valor obtido da literatura.⁵⁹

O elevado valor obtido para a constante de velocidade de segunda ordem (k_2), em relação à constante de velocidade da reação de hidrólise espontânea (k_0) mostra que a reação promovida pela água tem uma contribuição muito pequena. Tal fato é esperado devido à reatividade excepcional exibida por nucleófilos detentores de efeito alfa.

O perfil de pH para o **DEDNPP**, na faixa de pH estudada, é idêntico àquele para a reação entre hidroxilamina e etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EDNPP), estudada recentemente no grupo LaCFI. No entanto, o valor de k_2 para a o diéster é menor por um fator de aproximadamente 10^3 vezes.³⁸ Os resultados estão de acordo com a ordem de reatividade freqüente observada para ésteres de fosfato, ou seja, triésteres são normalmente mais reativos que diésteres de fosfato.

4.1.1 Efeitos termodinâmicos da temperatura

A fim de obter os parâmetros de ativação da reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina, as constantes de velocidade foram determinadas na região do patamar no gráfico de perfil de pH (pH 8,50) em diferentes temperaturas (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Constantes de velocidade observada em função da temperatura para a reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina (0,01 M), pH 8,50 e $\mu = 1,0$ (KCl).

Temperatura	$10^3 k_{obs}, s^{-1a}$
20 °C	2,202
30 °C	3,362
40 °C	4,894
50 °C	6,905

^a Média de três medidas experimentais.

Os valores de entropia e entalpia da reação foram calculados utilizando-se a equação de Eyring,⁶⁰ que relaciona temperatura com as constantes de velocidade. (**Equação 9 e Figura 9**).

$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = \left[\ln\left(\frac{k_b}{\hbar}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right] - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (9)$$

onde, k_b , \hbar e R referem-se às constantes de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$) e universal dos gases ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), respectivamente.⁶¹

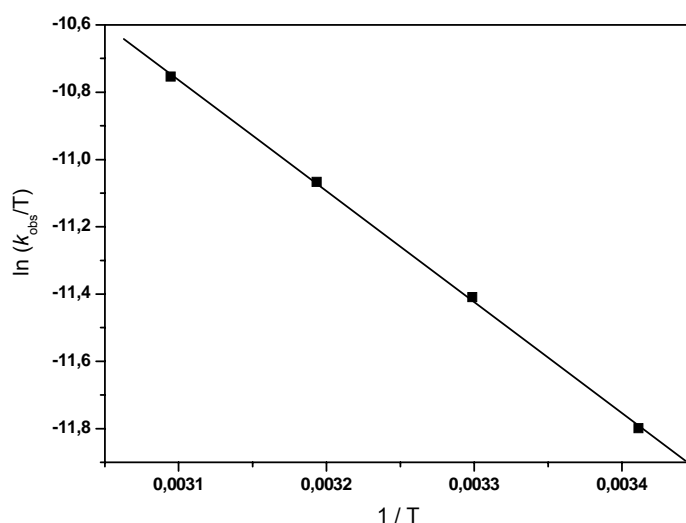


Figura 9 – Gráfico de $\ln(k_{\text{obs}}/T)$ vs T^{-1} para reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina (0,01M) em pH 8,50 e $\mu=1,0$ (KCl).

A energia livre de ativação ΔG^\ddagger foi calculado através da **Equação 10**.

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (10)$$

Os parâmetros de ativação calculados para a reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina ($\Delta G^\ddagger = 21,0$ kcal/mol, $\Delta H^\ddagger=6,56$ kcal/mol e $\Delta S^\ddagger = -48$ eu) correspondem a uma reação onde no estado de transição há um elevado grau de organização em relação ao estado reagente, provavelmente refletindo um estado de transição altamente hidratado. Valores de entropia de ativação bastante negativos também foram encontrados nas reações de hidrólise dos triésteres *p*-nitrofenil difenil fosfato ($\Delta S^\ddagger= -39$ eu)⁶² e trifenil fosfato ($\Delta S^\ddagger= -45$ eu)⁶³.

4.2 Reação de DEDNPP com hidroxilaminas metiladas

Foram estudadas ainda reações do **DEDNPP** com diferentes derivados metilados da hidroxilamina (MeNHOH , Me_2NOH e NH_2OMe), com a finalidade de comparar o efeito da metilação em ambos centros nucleofílicos sobre a reatividade na reação com o **DEDNPP**. Assim como nas reações com hidroxilamina, as reações com os derivados metilados foram acompanhadas pelo aparecimento do produto DNP em 360nm a 25°C, $\mu = 1,0 \text{ M}$ (KCl) e $\text{pH}=8,50$. Na **Figura 10** estão apresentados o efeito do aumento da concentração das hidroxilaminas metiladas nas constantes de velocidade observadas das reações com o **DEDNPP**. Os coeficientes angulares referentes aos ajustes lineares dos dados experimentais da **Figura 10** fornecem as constantes de segunda ordem das reações entre **DEDNPP** e as hidroxilaminas, que estão mostradas na **Tabela 4**.

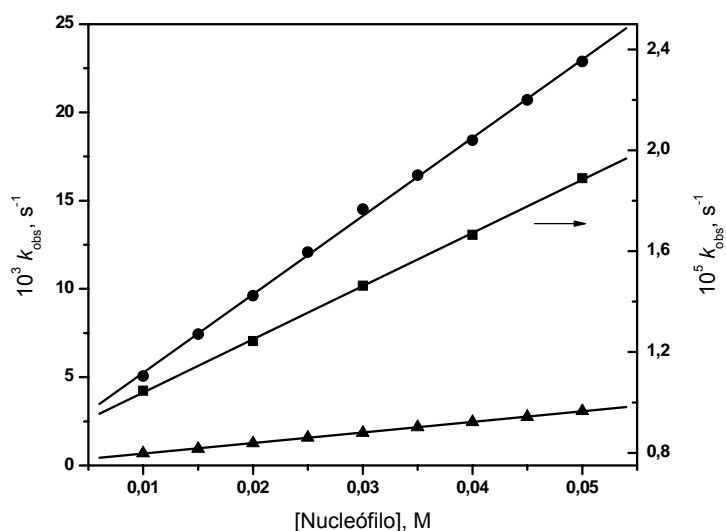


Figura 10 – Constantes de velocidade observadas, k_{obs} , em função da concentração de nucleófilo para as reações com o **DEDNPP**, (■) NH_2OMe , (●) MeNHOH , e (▲) Me_2NOH a 25°C, $\text{pH} = 8,50$ e $\mu=1,0 \text{ M}$ (KCl).

Tabela 4 – Constantes de velocidade de segunda ordem para as reações entre **DEDNPP** e hidroxilaminas a 25°C, pH = 8,50 e $\mu=1,0$ M (KCl).

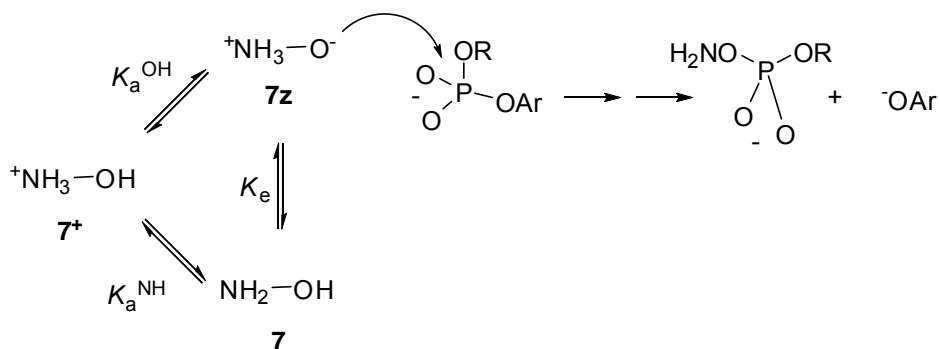
Nucleófilo	$k_2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
NH ₂ OH ^a	2,928 x 10 ⁻¹
MeNHOH	4,435 x 10 ⁻¹
NMe ₂ OH	5,997 x 10 ⁻²
NH ₂ OMe	2,108 x 10 ⁻⁴

^a Valor referente à **Figura 7**.

Os dados na **Tabela 4** mostram que a reatividade das hidroxilaminas *N*-metiladas é o reflexo do aumento na basicidade, efeito geralmente observado para aminas (secundária > primária > terciária)⁴², e também semelhante à ordem de reatividade reportada para o diéster EDNPP. No entanto, o nucleófilo que não pode reagir via átomo de oxigênio (NH₂OMe), apresenta uma diminuição significativa na velocidade da reação com o **DEDNPP** em relação às outras hidroxilaminas. A reatividade da hidroxilamina diminui por um fator de 5 vezes quando é dimetilada no nitrogênio, mas a diferença é muito maior quando a hidroxilamina é metilada no oxigênio. Em relação à hidroxilamina, o derivado *O*-metilado é aproximadamente 10³ vezes menos reativo.

No caso do triéster 8-(dimetilamino)-1-naftil-dietilfosfato (TANEP) a constante de velocidade de segunda-ordem para a reação com NMe₂OH é igual a 0,352 M⁻¹s⁻¹, enquanto que a reação com o derivado *O*-metilado é tão lenta que não pode ser medida.⁶⁴

Os resultados são coerentes com o proposto recentemente para fosfatos orgânicos, ou seja, provavelmente o átomo de oxigênio da forma zwitteriônica da hidroxilamina é responsável pelo ataque nucleofílico nesses compostos. O **Esquema 26** mostra o mecanismo sugerido para o ataque nucleofílico da hidroxilamina em diésteres de fosfato.⁴³ Essa proposta mecanística se tornou ainda mais sólida com os resultados de identificação de intermediários deste trabalho, como segue a discussão mais adiante.



4.2.1 Relação linear de energia livre e carga efetiva

Os valores de constantes de segunda ordem das reações do **DEDNPP** com hidroxilaminas foram correlacionados com a equação de Brønsted. Conforme descrito na introdução, essa equação faz a correlação entre a constante de velocidade e o pK_a dos nucleófilos (**Figura 11**). Os valores de pK_a , referem-se ao equilíbrio representado no **Esquema 24**, e foram obtidos da literatura.⁵⁹

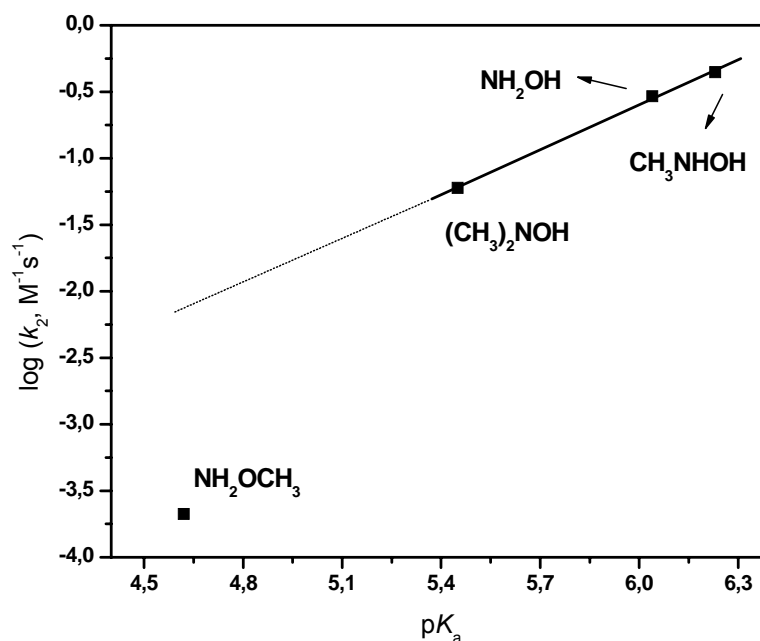
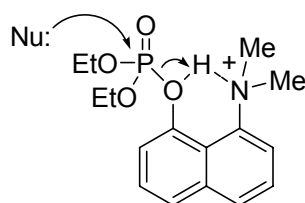


Figura 11 - Gráfico de Brønsted para a reação do **DEDNPP** com hidroxilamina e derivados metilados.

A sensibilidade da velocidade em relação à basicidade do nucleófilo, medida pelo coeficiente de Brønsted, β , é igual a 1,127. Esse é praticamente o mesmo valor daquele observado nas reações com o triéster TANEP e hidroxilaminas *N*-metiladas ($\beta_{\text{nuc}}=1,123$).⁶⁴ O coeficiente de Brønsted obtido para o **DEDNPP** pode ser comparado com os valor obtido para as reações com TANEP. Este possui reatividade similar ao **DEDNPP**, pois é ativado em virtude da catálise ácida geral intramolecular promovida pelo grupamento dimetilamônio que envolve transferência de próton para o átomo de oxigênio do grupo abandonador, o qual é inicialmente pouco reativo (**Esquema 27**).⁶⁵



Esquema 27

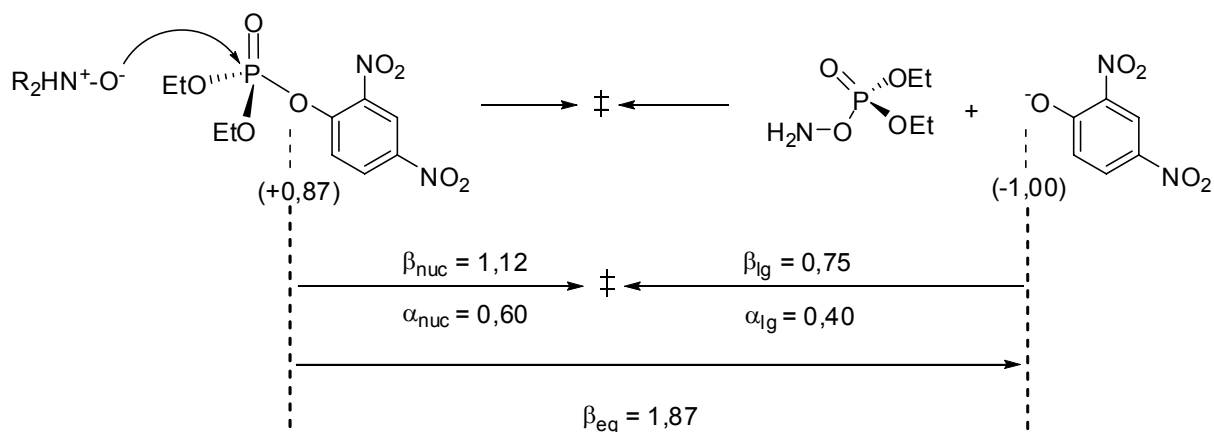
O valor de β_{nuc} deve aumentar no sentido de mono- < di- < triéster, como pode ser observado na **Tabela 5**, que mostra os coeficientes de Brønsted para as reações dos derivados de 8-dimetilamino-1-naftol com oxianions. De fato, o β_{nuc} para o **DEDNPP** é substancialmente maior que aquele observado para o diéster EDNPP ($\beta_{\text{nuc}}=0,41$)³⁸, refletindo em um estado de transição bem mais associativo.

Tabela 5 – Coeficientes de Brønsted para as reações entre oxianions e derivados dos ésteres de 8-dimetilamino-1-naftol.^{20, 21, 65}

Éster	β_{nuc}
ArO-PO ₃ ²⁻	0,19
ArO-PO ₂ OR ⁻	0,29
ArO-PO(OR) ₂	0,49

Conforme mostrado na introdução, a interpretação dos coeficientes angulares das relações lineares de energia livre pode ser simplificada pelo conceito de carga efetiva. Dessa forma, através de valores de carga efetiva, que se encontram disponíveis na literatura para uma vasta série de compostos, e o valor de β_{nuc} , obtido experimentalmente, pode ser construído um mapa de carga efetiva, mostrando as

mudanças de carga mais relevantes na reação. O coeficiente angular da reta apresentada na **Figura 11**, isto é, o coeficiente de Brønsted (β_{nuc}) é igual a 1,12. Desde que a reação exibe um β_{eq} igual a 1,87 (obtido a partir da mudança total na carga efetiva dos reagentes até os produtos), é possível calcular o valor de β_{lg} que é igual a 0,75 (**Esquema 28**).



Esquema 28

Os valores de β_{nuc} e β_{eq} permitem a construção do diagrama de More O'Ferrall-Jencks. Sendo $\alpha_{\text{nuc}} = \beta_{\text{nuc}}/\beta_{\text{eq}}$ e $\alpha_{\text{nuc}} + \alpha_{\text{lg}} = 1$, então para a reação estudada tem-se $\alpha_{\text{nuc}} = 0,60$ e $\alpha_{\text{lg}} = 0,40$, que representam os valores nas coordenadas de formação e quebra de ligação no diagrama, respectivamente (**Figura 12**).

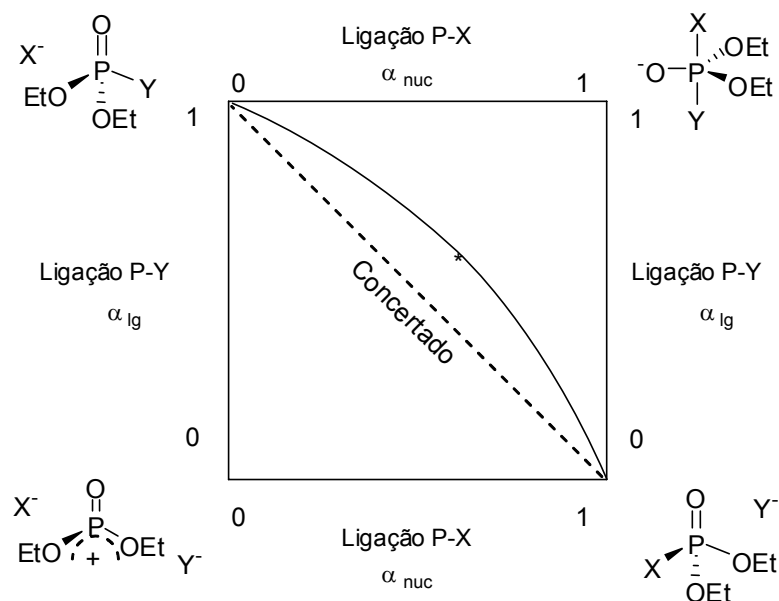
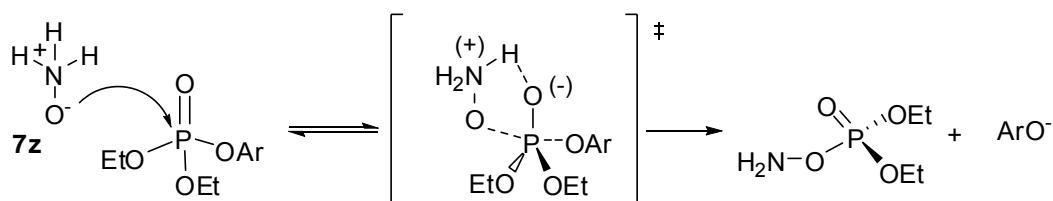


Figura 12 - Diagrama de More O'Ferral-Jencks para a reação do **DEDNPP** com hidroxilaminas.

O diagrama de More O'Ferral-Jencks (**Figura 12**) mostra que a ligação entre o oxigênio e o átomo de fósforo está aproximadamente 60% formada no estado de transição (α_{nuc}), sugerindo um caminho reacional concertado de característica associativa, com considerável formação de ligação entre o nucleófilo e o átomo de fósforo. No estado de transição deve ainda ocorrer transferência de próton do grupo H_3N^+ ao átomo de oxigênio do substrato, que segundo Kirby e colaboradores, faz com que **7z** seja a espécie que se complementa de forma ideal para o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo nas reações de substituição em ésteres de fosfato⁴³ (**Esquema 29**).

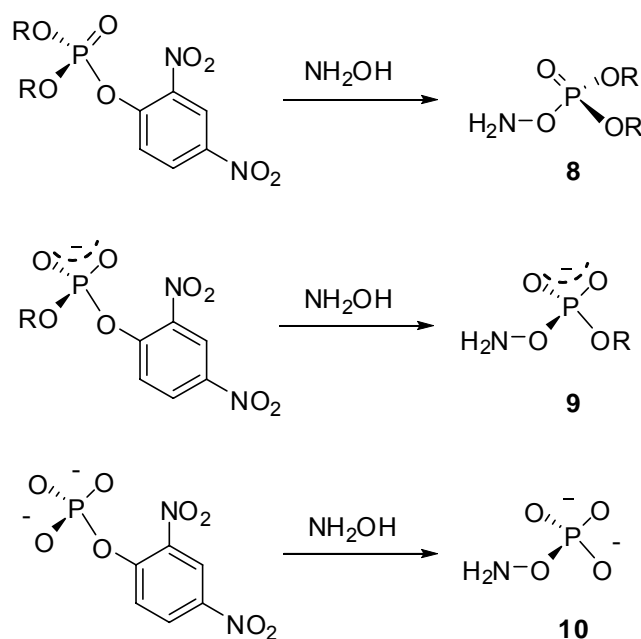


Esquema 29

4.3 Identificação de intermediários e produtos da reação

O grupo de pesquisa LaCFI tem um grande interesse no estudo de nucleófilos detentores de efeito alfa, em especial a hidroxilamina, em reações que envolvem quebra de fosfatos orgânicos. Em linhas gerais, tem-se observado que a reatividade dos derivados *N*-metilados da hidroxilamina segue o aumento da basicidade, enquanto que o derivado *O*-metilado é consideravelmente menos reativo nessas reações.^{20, 22} Nas reações com bis(2,4-dinitrofenil)fosfato, por exemplo, a hidroxilamina reage 100 vezes mais lentamente que NH_2O^- , tão reativa quanto o íon hidróxido e 150 vezes mais rapidamente que NH_2OMe . Sendo que o derivado *O*-metilado (NH_2OMe) reage necessariamente pelo átomo de nitrogênio e nas condições experimentais é apenas uma unidade de $\text{p}K_a$ menos básico.²² Isso sugere fortemente que o ataque da hidroxilamina sobre esses compostos deve proceder via átomo de oxigênio da forma zwitteriônica **7z**. Além disso, conforme enfatizado na introdução, dados de cristalografia e métodos computacionais mostram que a forma zwitteriônica da hidroxilamina é preferida no cristal de $(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{HCl}$.

Quando as reações de mono- e diésteres de fosfato são acompanhadas por RMN ^{31}P , os resultados mostram claramente que a hidroxilamina é fosforilada. No entanto, não é possível distinguir se a fosforilação ocorre no átomo de oxigênio ou nitrogênio.^{17, 38} Então, com base em argumentos de reatividade e cálculos computacionais, durante bastante tempo considerou-se que a fosforilação da hidroxilamina aconteceria no átomo de oxigênio nas reações com mono- e diésteres, levando à formação dos intermediários *O*-fosforilados **10** e **9**, respectivamente (**Esquema 30**).



Esquema 30

Recentemente estudos realizados no grupo LaCFI³⁸ mostraram, através de experimentos de RMN ³¹P, que dois produtos fosforados da reação entre hidroxilamina e o diéster EDNPP são observados em quantidades consideráveis: etil fosfato (5,47 ppm) e EtO-PO₂⁻-ONH₂ (3,68 ppm), **Figura 13**. Sendo este, um deslocamento consistente com o valor de -2,04 ppm descrito no caso do 2,4-dinitrofenil-O-PO₂-ONH₂, obtido através de uma reação similar da hidroxilamina com o BDNPP.¹⁷

Ainda, diferentemente da reação do **DEDNPP** com hidroxilamina, que não apresenta contribuição significativa de ataque no anel aromático, os sinais de RMN de ¹H para a reação do diéster EDNPP revelaram a presença de produtos derivados da substituição nucleofílica aromática. Os resultados mostraram que a hidroxilamina e seus respectivos derivados *N*-metilados (MeNHOH e NH₂OMe) produzem quantidades comparáveis de produtos de ataque no anel aromático. Os rendimentos para esses produtos foram de 40, 50 e 60% para a NH₂OH, NH₂OMe e MeNHOH, respectivamente. Já para a reação com Me₂NOH, ocorre exclusivamente a quebra da ligação P-O indicando que o átomo de N é o responsável pelo ataque no anel aromático.³⁸

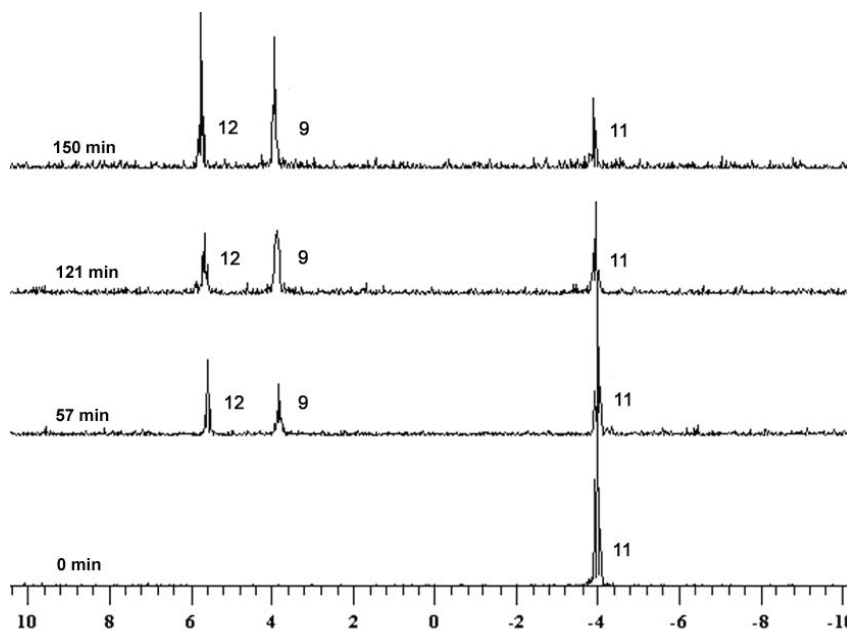
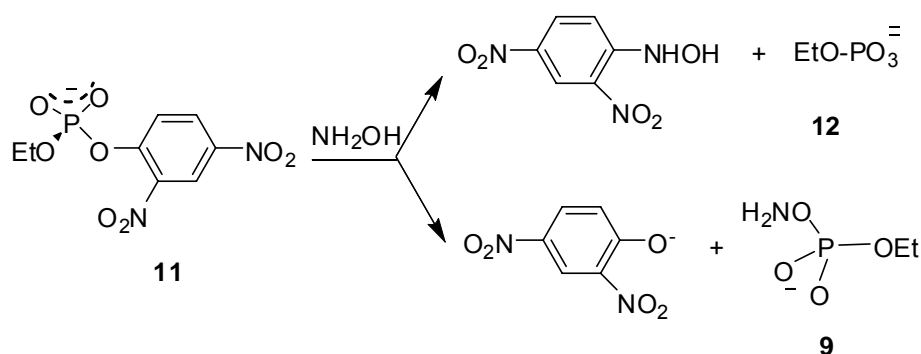


Figura 13 – Espectro de RMN ^{31}P dos produtos da reação entre hidroxilamina e o diéster EDNPP. A numeração está de acordo com o **Esquema 31**.



Uma vez que, as reações de hidroxilamina com mono- e diésteres de fosfato levam à formação dos produtos fosforilados **10** e **9** respectivamente, esperar-se-ia que a reação do triéster levasse à formação do intermediário correspondente **8** (**Esquema 30**). No entanto, o acompanhamento da reação entre hidroxilamina e **DEDNPP** por RMN ^{31}P permitiu apenas a identificação do dietil fosfato (DEP), em 0,7 ppm, como produto da reação. Esse mesmo produto foi observado na hidrólise em meio básico e, ainda, na hidrólise em meio ácido, que mostra também presença do reagente de partida **DEDNPP** (**Figura 14**). Nem mesmo a temperatura baixa (5,0°C) foi possível detectar a presença do intermediário. Esses resultados apontaram a necessidade da busca de outros métodos para a detecção de possíveis intermediários na reação.

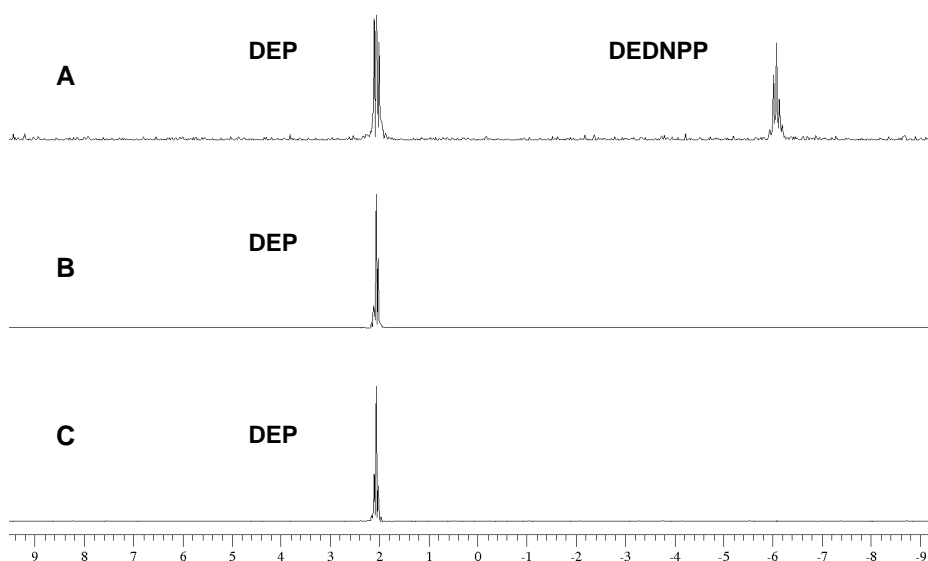


Figura 14 – Espectro de RMN ^{31}P para **DEDNPP** na (A) hidrólise em meio ácido, pH=2,6; (B) hidrólise em meio básico, pH=13 e (C) reação com hidroxilamina, pH=7.

4.3.1 Identificação de hidrazina

Utilizando o procedimento descrito por Watt e Chrisp⁵⁸, identificou-se hidrazina (NH_2NH_2) como um dos produtos da reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina. Nesse experimento, a hidrazina formada durante a reação reage com *p*-dimetilaminobenzaldeído, levando a formação da hidrazona, que absorve em aproximadamente 454 nm.⁶⁶ O espectro obtido está apresentado na **Figura 15**.

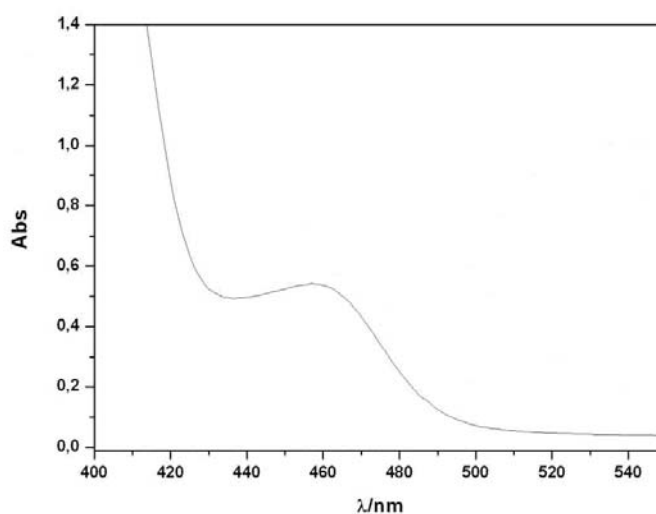
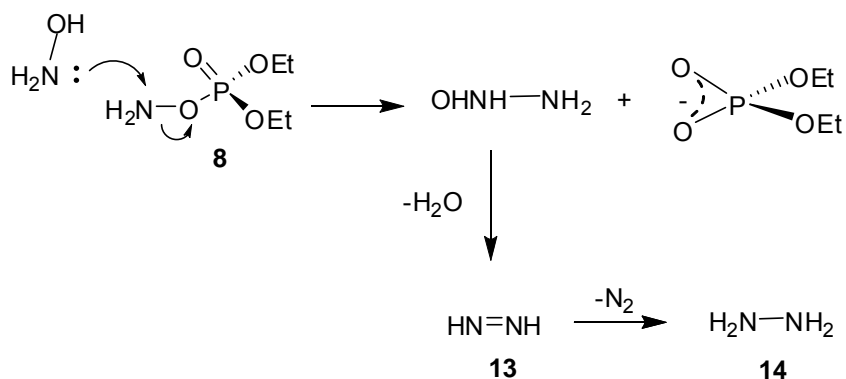


Figura 15 – Espectro de UV-Vis da hidrazona formada pela reação entre *p*-dimetilaminobenzaldeído e os produtos da reação entre hidroxilamina e **DEDNPP**.

De acordo com o descrito na literatura, hidrazina e nitrogênio são produtos de reação entre duas diiminas, as quais são produzidas a partir de um intermediário instável (HONHNH_2) presente em reações de hidrólise básica de H_2NOSO_3 .⁶⁷ Dessa maneira, a detecção de hidrazina nas reações com o triéster **DEDNPP** é um forte indicativo de um mecanismo no qual o ataque nucleofílico da hidroxilamina ocorre via átomo de oxigênio fornecendo o intermediário O-fosforilado (**8**). Este é rapidamente convertido em diimina (**13**), a qual reage com uma segunda molécula de diimina, gerando $\text{N}_{2(g)}$ e hidrazina (**14**), **Esquema 32**.

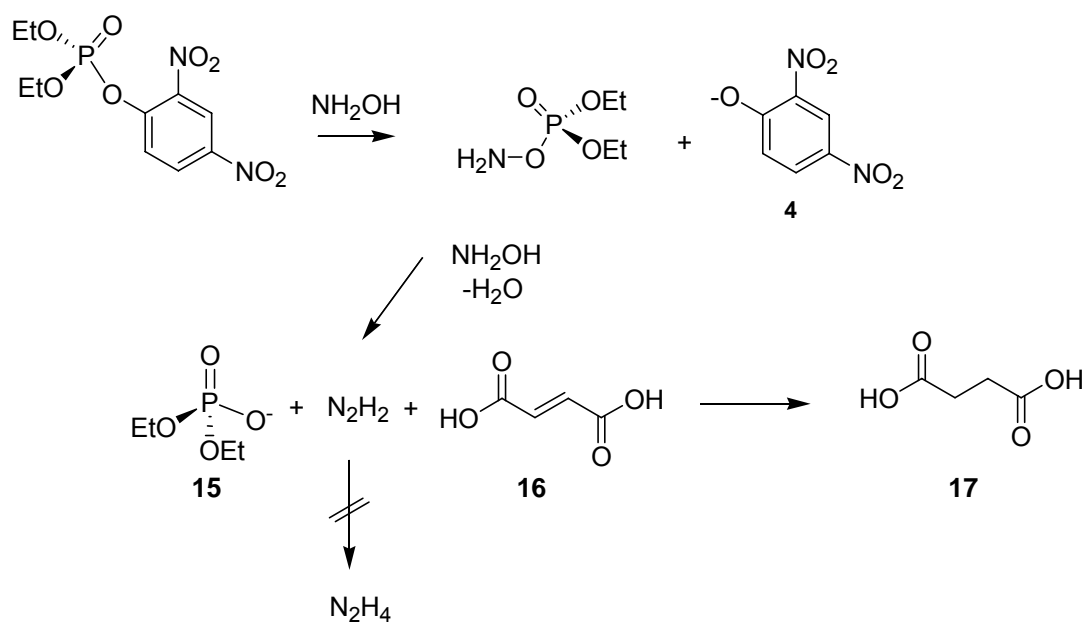


Esquema 32

Evidentemente, a alta reatividade do intermediário $\text{NH}_2\text{OPO}(\text{OEt})_2$ comparada com as reatividades de $\text{NH}_2\text{OPO}_3^{2-}$ e $\text{NH}_2\text{OPO}_2(\text{OEt})^-$, provenientes das reações dos mono- e diésteres, respectivamente, é consequência da habilidade do grupo de saída. Esta, é medida pelo pK_a do ácido conjugado do grupo de saída, e aumenta na seguinte ordem: **10** < **9** < **8** (**Esquema 30**). Conseqüentemente, a alta reatividade do intermediário formado na reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina faz com que ele reaja rapidamente com o excesso de hidroxilamina, levando à formação de diimina; e portanto, não permitindo a sua identificação em experimentos clássicos como RMN ³¹P.

4.3.2 Identificação da diimina

Conforme exposto acima, a presença de hidrazina como um dos produtos da reação é um forte indicativo da presença de um intermediário $\text{HN}=\text{NH}$ na reação. Assim como descrito previamente por Steinmetz e colaboradores⁶⁷, a presença dessa espécie no meio reacional pode ser caracterizada pela redução do ácido fumárico a succínico, devido ao seu forte caráter redutor.⁶⁸ Ou seja, se realmente a diimina está presente na reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina, quando a reação é realizada na presença de ácido fumárico, a diimina atua como agente redutor e leva à produção de ácido succínico, e conseqüentemente, à supressão da formação de hidrazina (**Esquema 33**).



Esquema 33

De fato, quando a reação entre **DEDNPP** e hidroxilamina foi realizada na presença de ácido fumárico, nenhuma banda em 454nm foi identificada (**Figura 16**), caracterizando o desaparecimento da diimina e da hidrazina, confirmando a presença do intermediário O-fosforilado.

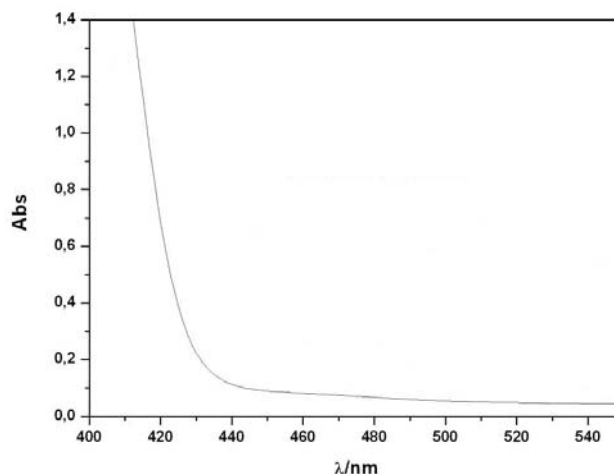


Figura 16 - Espectro de UV-Vis dos produtos da reação entre hidroxilamina e **DEDNPP**, na presença de ácido fumárico.

4.3.3 Identificação do ácido succínico

Experimentos de RMN ^1H e espectrometria de massas foram realizados a fim de confirmar a presença de ácido succínico (**17**), produto da reação entre diimina e ácido fumárico (**16**), **Esquema 33**.

Na **Figura 17A**, está apresentado o espectro de RMN ^1H dos produtos da reação entre hidroxilamina (0,1 M) e **DEDNPP**, na presença de 0,2 M de ácido fumárico, a 25°C e pD=7,25. O espectro de RMN ^1H obtido mostra claramente a presença de ácido succínico (2,40 ppm), como produto da reação. Além disso, os picos referentes às estruturas do produto fenólico (**4**) e do dietil fosfato (**15**) também foram observadas, confirmando o mecanismo proposto para a reação (**Esquema 32**). Para fins comparativos, um espectro de RMN ^1H padrão contendo hidroxilamina, ácido fumárico e ácido succínico também foi obtido e está apresentado na **Figura 17B**. Os deslocamentos observados e suas atribuições estão apresentados na **Tabela 6**.

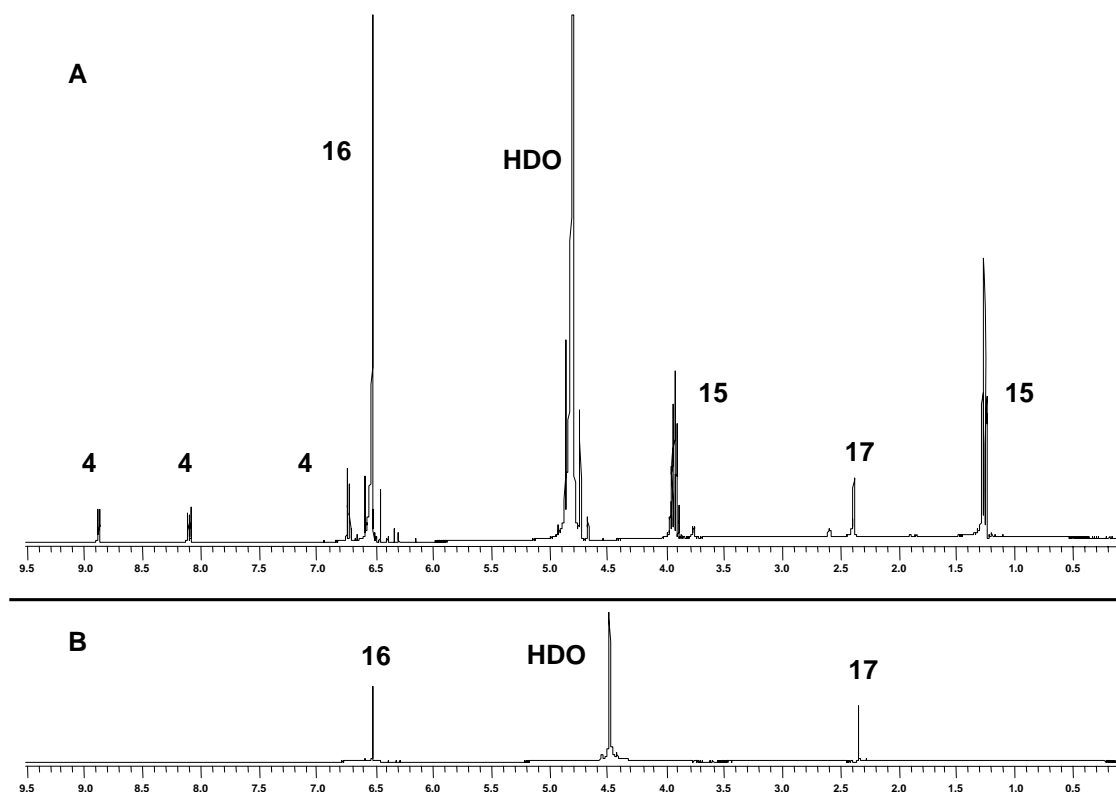


Figura 17 – (A) Espectro de RMN ¹H dos produtos da mistura reacional entre hidroxilamina e **DEDNPP**, 0,2 M de ácido fumárico e 0,1 M de hidroxilamina em pD=7,25; (B) Espectro de RMN ¹H contendo hidroxilamina, ácido fumárico e ácido succínico. Os deslocamentos químicos e suas respectivas atribuições estão na **Tabela 6** e numerados de acordo com o **Esquema 33**.

Tabela 6 – Deslocamentos químicos e suas respectivas atribuições para o experimento de identificação do ácido succínico na reação entre hidroxilamina e **DEDNPP**, na presença de ácido fumárico.

Composto ^a	RMN ¹ H δ (ppm)
4	6,74 (d, 1H, J_{ab} = 9,43 Hz, Ar), 8,11 (dd, 1H, J_{ba} = 9,43 Hz e J_{bx} = 3,10 Hz, Ar), 8,89 (d, 1H, J_{xb} = 3,10 Hz, Ar)
15	δ 1,27 (t, 6H, J = 7,02 Hz), 3,94 (quinteto, 4H, J = 7,33 Hz)
16	δ 6,53 (s, 2H)
17	δ 2,40 (s, 4H)

^aNumeração de acordo com o **Esquema 33**.

Através dos experimentos CG-MS também foi possível caracterizar a presença de ácido succínico, como mostra o cromatograma dos produtos da reação entre hidroxilamina e o triéster de fosfato na presença de ácido fumárico, na **Figura 18**. E ainda, como pode ser observado na **Figura 19**, que mostra a ampliação da **Figura 18**, dietil fosfato (DEP) foi também identificado como produto da reação.

O ácido succínico (SA) foi identificado através do cromatograma padrão obtido a partir de uma mistura equimolar de ácido succínico e ácido fumárico em D₂O, a qual foi derivatizada e analisada da mesma maneira, como está mostrado na **Figura 20**.

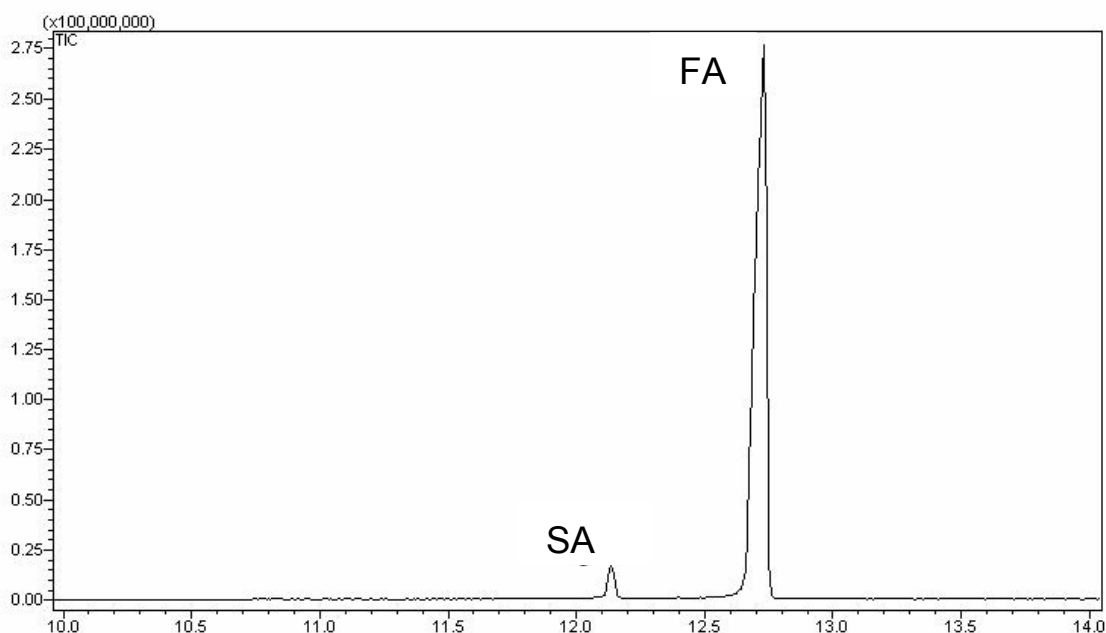


Figura 18 – Cromatograma dos produtos da reação entre hidroxilamina e o triéster de fosfato na presença de ácido fumárico. Os ácidos succínico (SA) e fumárico (FA) silanizados foram identificados através do padrão de fragmentação obtido, representado na **Figura 20**.

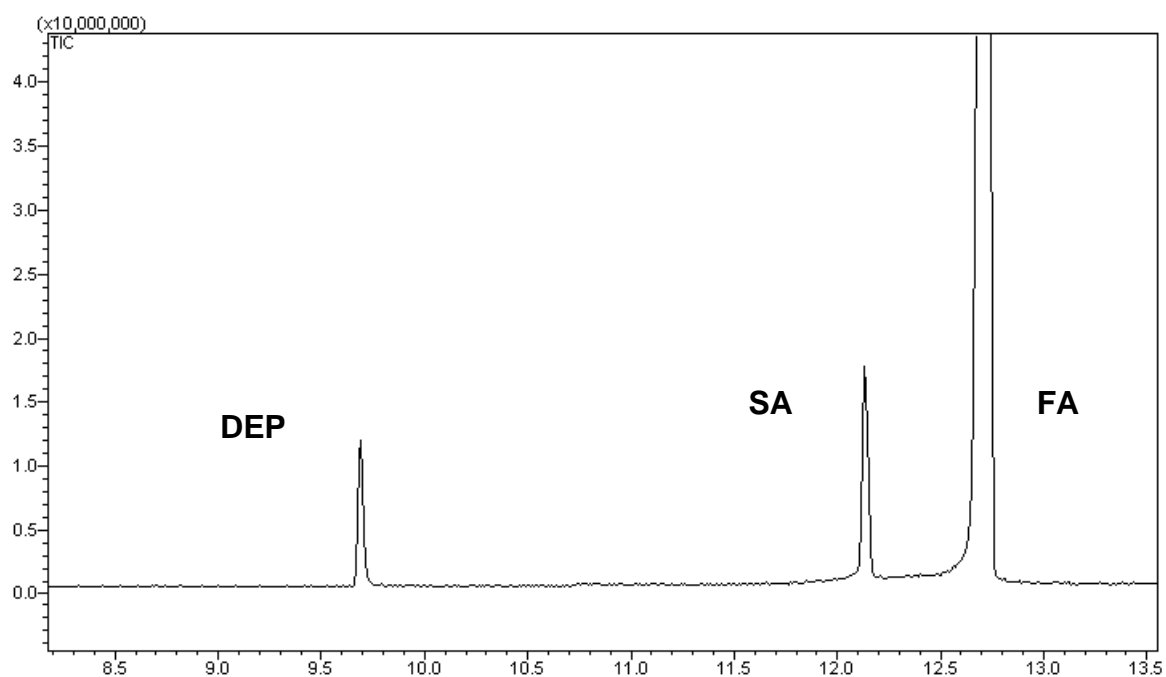


Figura 19 – Cromatograma ampliado dos produtos da reação entre hidroxilamina e o triéster de fosfato na presença de ácido fumárico. Ácido succínico (SA), ácido fumárico (FA) e dietil fosfato (DEP) silanizados foram identificados através do padrão de fragmentação obtido.

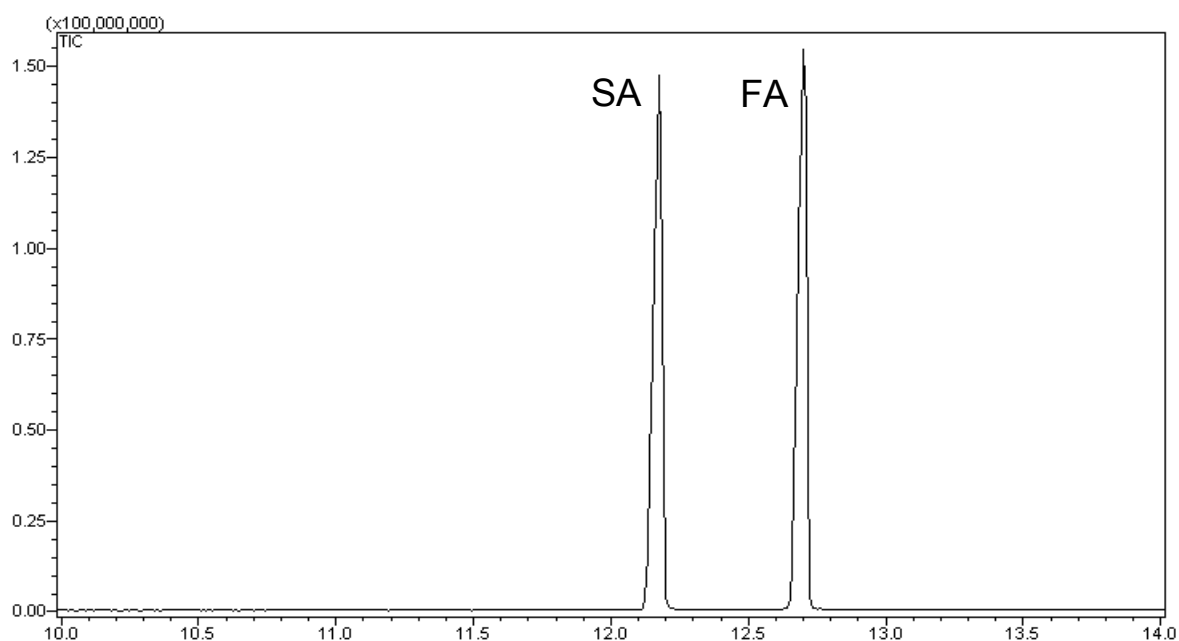


Figura 20 – Cromatograma da solução padrão: ácido fumárico (FA) e ácido succínico (SA) silanizados.

Nas **Figuras 21** e **22** estão apresentados, respectivamente, os fragmentogramas para os ácidos succínico e fumárico silanizados, com as estruturas moleculares dos picos mais relevantes. Na **Figura 21**, podem-se observar como principais picos: (i) íon molecular de m/z 264, (ii) pico base de m/z 147 e (iii) Me_3Si^+ de m/z 73. O valor em m/z 147 é consistente com a quebra heterolítica do ácido silanizado. Enquanto que, para o ácido fumárico silanizado (**Figura 22**) os picos foram caracterizados como (i) íon molecular de m/z 259, (ii) pico base de m/z 245 e (iii) Me_3Si^+ de m/z 73. E ainda, duas fragmentações importantes para o ácido fumárico silanizado estão ilustradas na **Figura 22**, referentes aos picos de m/z 147 e m/z 217.

É importante destacar que os fragmentos de ácido succínico silanizado são 2 unidades m/z maiores que o esperado para o padrão. O resultado torna o mecanismo proposto no **Esquema 33** ainda mais consistente, já que em solução de D_2O , a hidroxilamina tem seus prótons rapidamente substituídos por deutério. Logo, quando a reação é realizada em D_2O , o ácido succínico (resultado da redução do ácido fumárico pela espécie N_2D_2) deve ser produzido na forma $\text{HO}_2\text{C-CHD-CHD-CO}_2\text{H}$. Já que, de acordo com o mecanismo proposto neste trabalho, a diimina N_2D_2 é produzida pela reação de ND_2OD com o intermediário O-fosforilado.

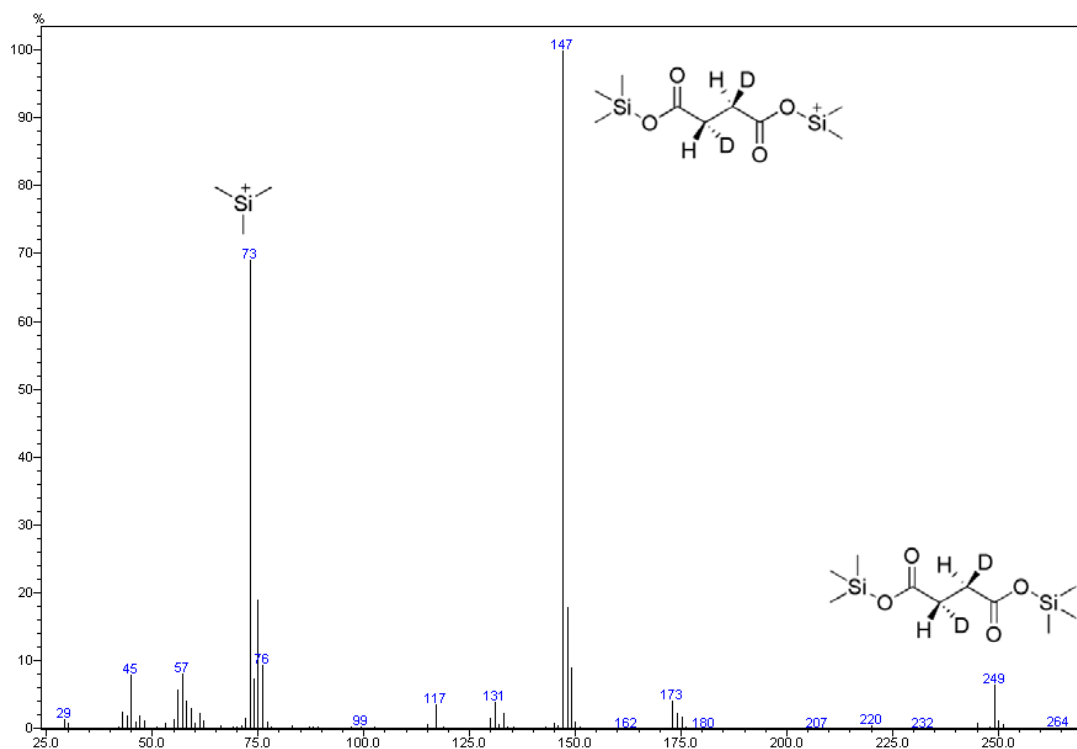


Figura 21 – Fragmentograma do ácido succínico silanizado.

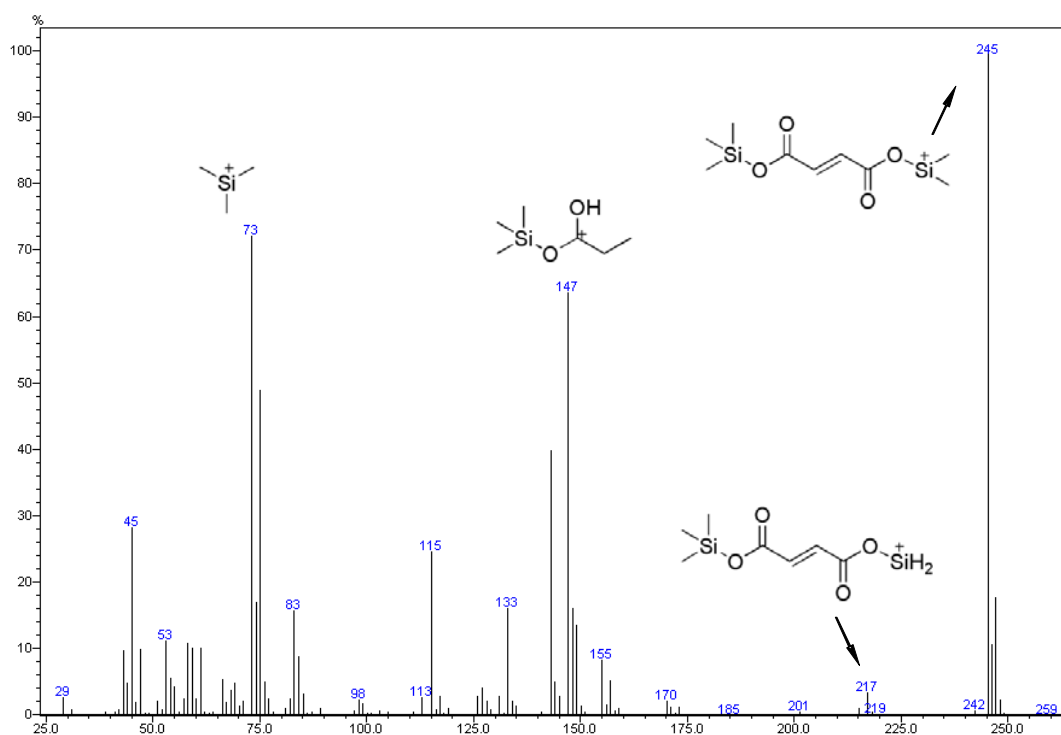
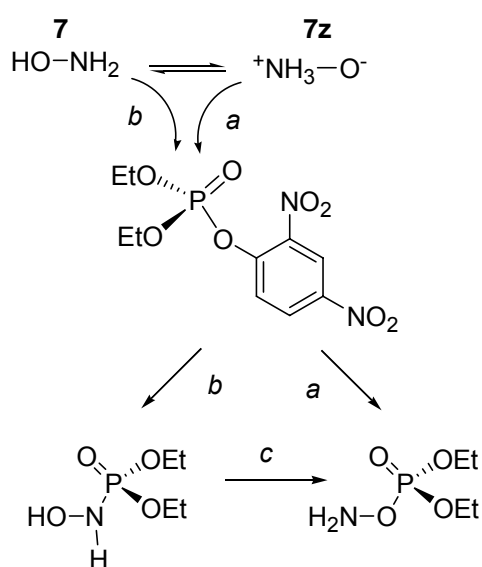


Figura 22 – Fragmentograma do ácido fumárico silanizado

Os resultados obtidos por experimentos de RMN ^1H e RMN ^{31}P , UV-Vis e CG-MS fornecem uma evidência importantíssima e principalmente, de forma substancialmente concreta, que a hidroxilamina é fosforilada no átomo de oxigênio na reação com **DEDNPP**, levando à formação de intermediários instáveis.

Não obstante, a formação do intermediário O-fosforilado ainda poderia ser questionada como resultado do rearranjo a partir do intermediário N-fosforilado, caminho “c” no **Esquema 34**. Assim como o rearranjo observado para O,S-dimetil e O,O-dimetil fosforoamidatos, por Mahajna e Casida.⁶⁹ Todavia, esse mecanismo seria pouco provável, pois certamente não seria tão rápido, uma vez que a caracterização de hidrazina foi feita imediatamente após o fim da reação.⁷⁰ Além disso, não há nenhuma evidência concreta para o caminho “b”, sendo que o ataque da forma **7z** sobre o **DEDNPP** é a explicação mais coerente para o desvio significativo da O-metilhidroxilamina no gráfico de Brønsted.

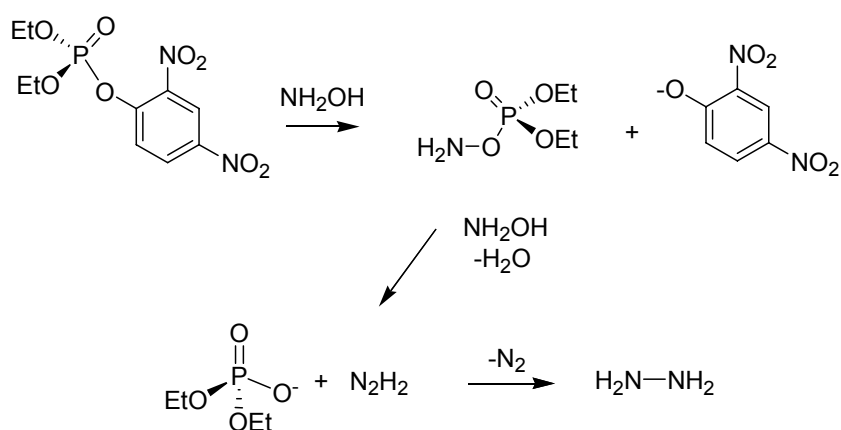


Esquema 34

5 CONCLUSÕES

A partir do estudo do mecanismo da reação entre hidroxilamina e dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), pode-se concluir:

- A reação segue um mecanismo concertado com caráter associativo, com a estrutura de transição situada entre o canto Q e estado de transição sincrônico $A_N D_N$, no diagrama de More O'Ferral-Jencks, onde a ligação entre o oxigênio da hidroxilamina e o átomo de fósforo está aproximadamente 60% formada no estado de transição;
- O derivado O-metilado, nucleófilo que não pode reagir via átomo de oxigênio, apresenta um desvio significativo de velocidade em relação às outras hidroxilaminas (NH_2OH , MeNHOH e Me_2NOH), no gráfico de Brønsted;
- O ataque nucleofílico da hidroxilamina ocorre via átomo de oxigênio fornecendo o produto O-fosforilado, e devido a sua elevada instabilidade, é rapidamente convertido em diimina. Esta reage com outra diimina, gerando $\text{N}_2(\text{g})$ e hidrazina.



Os resultados deste trabalho adicionam uma evidência química de caracterização de produtos ao que tem sido proposto na literatura para reações de hidroxilamina com ésteres de fosfato, fortalecendo a hipótese de que o átomo de oxigênio da forma zwitteriônica da hidroxilamina é responsável pelo ataque nucleofílico nesses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Machado, V. G.; Nome, F., A Química dos Ésteres de Fosfato. *Quim. Nova* **2003**, 26, 745-753.
2. Saenger, W., *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer: New York, 1984.
3. Westheimer, F. H., Why nature chose phosphates. *Science* **1987**, 235, 1173.
4. Machado, V. G.; Nome, F., Compostos Fosfatados Ricos em Energia. *Quim. Nova* **1999**, 22, 351.
5. Dugas, H., *Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action*. VCH: New York, 1996.
6. Yang, Y. C.; Baker, J.; Ward, J. R., Decontamination of chemical warfare agents *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1729.
7. Kirby, A. J.; Younas, M., The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis. *J. Chem. Soc. B* **1970**, 6, 510.
8. Thatcher, G. R. J.; Kluger, R., Mechanism and catalysis of nucleophilic substitution in phosphate esters *Adv. Phys. Org. Chem.* **1989**, 25, 99.
9. Bentley, R., The Mechanism of Hydrolysis of Acetyl Dihydrogen Phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2765.
10. Miller, D. L.; Westheimer, F. H., The Hydrolysis of 7-Phenylpropyl Di- and Triphosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1507.
11. Davis, B. D., The importance of being ionized. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, 78, 497.
12. McWilliams, J. L.; Steel, R. J., *Gas! The Battle for Ypres* Vanwell Publishing Limited: Deyell Co.: Canada, 1985.
13. Yang, Y.-C.; Szafraniec, L. L.; Beaudry, W. T., Perhydrolysis of Nerve Agent VX. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6964.
14. Cremlyn, R. J., *Em Agrochemicals: Preparation and Mode of Action*. John Wiley & Sons Ltd.: West Sussex, 1991.
15. Smith, B. M., Catalytic methods for the destruction of chemical warfare agents under ambient conditions. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 470.
16. Ghanem, E.; Li, Y.; Xu, C.; Raushel, F. M., Characterization of a Phosphodiesterase Capable of Hydrolyzing EA 2192, the Most Toxic Degradation Product of the Nerve Agent VX. *Biochemistry* **2007**, 46, 9032.

17. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Bunton, C. A.; Nome, F., Reactions of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate with Hydroxylamine. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7051.
18. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandao, T. A. S.; Santos, L. S., Reaction of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate with Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Comparison of O- and N- Phosphorylation. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7898.
19. Kirby, A. J.; Lima, M. F.; Silva, D. d.; Nome, F., Nucleophilic Attack by Oxyanions on a Phosphate Monoester Dianion: The Positive Effect of a Cationic General Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1350.
20. Kirby, A. J.; Dutta-Roy, N.; da Silva, D.; Goodman, J. M.; Lima, M. F.; Roussev, C. D.; Nome, F., Intramolecular General Acid Catalysis of Phosphate Transfer. Nucleophilic Attack by Oxyanions on the PO_3^{2-} Group. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7033.
21. Kirby, A. J.; Lima, M. F.; da Silva, D.; Roussev, C. D.; Nome, F., Efficient Intramolecular General Acid Catalysis of Nucleophilic Attack on a Phosphodiester. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16944.
22. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandão, T. A. S.; Bunton, C. A.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Nome, F., Mechanisms of Nucleophilic Substitution Reactions of MethylatedHydroxylamines with Bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. MassSpectrometric Identification of Key Intermediates. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6024-6033.
23. Orth, E. S.; Brandão, T. A. S.; Milagre, H. M. S.; Eberlin, M. N.; Nome, F., Intramolecular Acid-Base Catalysis of a Phosphate Diester: Modeling the Ribonuclease Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2436.
24. Brandão, T. A. S.; Orth, E. S.; Rocha, W. R.; Bortoluzzi, A. J.; Bunton, C. A.; Nome, F., Intramolecular General Acid Catalysis of the Hydrolysis of 2-(2'-Imidazolium)phenyl Phosphate, and Bond Length-Reactivity Correlations for Reactions of Phosphate Monoester Hydrolysis. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3800.
25. Cox, J. R.; Ramsay, O. B., Mechanisms of nucleophilic substitution in phosphate esters *Chem. Rev.* **1964**, 64, 317.
26. Florián, J.; Warshel, A., Phosphate Ester Hydrolysis in Aqueous Solution: Associative versus Dissociative Mechanisms. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 719.
27. Guthrie, R. D.; Jencks, W. P., IUPAC recommendations for the representation of reaction mechanisms. *Acc. Chem. Res.* **1989**, 22, 343.
28. Buchwald, S. L.; Pliura, D. H.; Knowles, J. R., Stereochemical Evidence for Pseudorotation in the Reaction of a Phosphoric Monoester. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4916.
29. Freeman, S.; Friedman, J. M.; Knowles, J. R., Free monomeric metaphosphate in protic solution: complete racemization at phosphorus in the tert-butanolysis of p-nitrophenyl phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3166.

30. Aqvist, J.; Kolmodin, K.; Florián, J.; Warshel, A., Mechanistic alternatives in phosphate monoester hydrolysis: what conclusions can be drawn from available experimental data? *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R71.
31. Westheimer, F. H., Pseudo-rotation in the hydrolysis of phosphate esters. *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 70.
32. Edwards, J. O.; Pearson, R. G., The Factors Determining Nucleophilic Reactivities. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 16.
33. Herschlag, D.; Jencks, W. P., Nucleophiles of High Reactivity in Phosphoryl Transfer Reactions: α -Effect Compounds and Fluoride Ion. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1951.
34. Wolfe, S.; Mitchell, D. J.; Schlegel, H.; M.C., B.; Eisenstein, O., Theoretical studies of S_N2 transition states. The alpha effect. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 615.
35. McAnoy, A. M.; Paine, M. R. L.; Blanksby, S. J., Reactions of the hydroperoxide anion with dimethyl methylphosphonate in an ion trap mass spectrometer: evidence for a gas phase α -effect. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2316.
36. Gerstein, J.; Jencks, W. P., Equilibria and Rates for Acetyl Transfer among Substituted Phenyl Acetates, Acetylimidazole, O-Acylhydroxamic Acids, and Thiol Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4655.
37. Domingos, J. B. Estudo mecanístico das reações do fosfato de bis(2,4-dinitrofenila) com alfa-nucleófilos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
38. Kirby, A. J.; Manfredi, A. M.; Souza, B. S.; Medeiros, M.; Priebe, J. P.; Brandao, T. A. S.; Nome, F., Reactions of alpha nucleophiles with a model phosphate diester. *ARKIVOC* **2008**, 28.
39. Orth, E. S.; Nome, F., In.
40. Jencks, W. P., Hydroxylamine with Activated Acyl Groups. I Formation of O-Acylhydroxylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4581.
41. Jencks, W. P.; Carriuolo, J., Reactivity of Nucleophilic Reagents toward Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1778.
42. Jencks, W. P., *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. Dover Publications: New York, 1969.
43. Kirby, A. J.; Davies, J. E.; Brandão, T. A. S.; Silva, P. F.; Rocha, W. R.; Nome, F., Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Structure and reactivity of ammonia oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12374.
44. Williams, A., *Free energy relationships*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2003.

45. Brönsted, J. N., Acid and base catalysis. *Chem. Rev.* **1928**, 5, 23.
46. Hammett, L. P., *Physical Organic Chemistry*. McGraw-Hill: New York, 1970.
47. Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W., A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chem. Rev.* **1991**, 91, 165.
48. Charton, M., Electrical effect substituent constants for correlation analysis. *Prog. Phys. Org. Chem.* **1981**, 13, 119.
49. Howard, M., *Structure and Reactivity in Organic Chemistry*. Oxford University Press: New York, 2000.
50. Cullum, N. R.; Renfrew, A. H. M.; Rettura, D.; Taylor, J. A.; Whitmore, J. M. J.; Williams, A., Effective Charge on the Nucleophile and Leaving Group during the Stepwise Transfer of the Triazinyl Group between Pyridines in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9200.
51. Williams, A., The Diagnosis of Concerted Organic Mechanisms. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, 23, 93.
52. Dietze, P. E.; Jencks, W. P., Swain-Scott correlations for reactions of nucleophilic reagents and solvents with secondary substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 4549.
53. Ba-Saif, S.; Luthra, A. K.; Williams, A., Concertedness in Acyl Group Transfer: A Single Transition State in Acetyl Transfer Between Phenolate Ion Nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6362.
54. Williams, A., Effective charge and transition-state structure in solution. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1992**, 27, 1.
55. Deacon, T.; Farrar, C. R.; Sikkil, B. J.; Williams, A., Reactions of nucleophiles with strained cyclic sulfonate esters. Bronsted relationships for rate and equilibrium constants for variation of phenolate anion nucleophile and leaving group. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 2525.
56. Fife, T. H.; Bruice, T. C., The temperature dependence of the DpD correction for the use of the glass electrode in D₂O. *J. Phys. Chem.* **1961**, 65, 1079-1080.
57. Moss, R. A.; Ihara, Y., Cleavage of Phosphate Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 588.
58. Watt, G. W.; Chrisp, J. D., A Spectrophotometric Method for the Determination of Hydrazine. *Anal. Chem.* **1952**, 24, 2006.
59. NIST Standard Reference Database 6.0, Gaithersburg, 2000. In.
60. Pross, A., *Theoretical and Physical Principles of Organic Reactivity*. Wiley-Interscience Publication: New York, 1995.

61. Lide, D. R., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 2001.
62. Bunton, C. A.; S J. Farber; Fendler, E. J., The Hydrolysis of p-Nitrophenyl Diphenyl Phosphate. *J. Org. Chem.* **1968**, 1, 29.
63. Barnard, P. W. C.; Bunton, C. A.; D. Kelierman, M. M.; Mhaia, B. S.; Vernon, C. A.; Welch, V. A., Reactions of Organic Phosphates. Part VI. The Hydrolysis of Aryl Phosphates. *J. Chem. Soc. (B)* **1966**, 227.
64. Tondo, D. W. Catálise ácida geral intramolecular: Reações de substituição nucleofílicas entre hidroxilaminas e 8-(dimetilamino)-1-naftil-dietilfosfato. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
65. Asaad, N.; Kirby, A. J., Concurrent nucleophilic and general acid catalysis of the hydrolysis of a phosphate triester *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, 10, 1708.
66. Yagil, G.; Anbar, M., The Kinetics of Hydrazine Formation from Chloramine and Ammonia. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 1797.
67. Steinmetz, W. E.; Robison, D. H.; Ackermann, M. N., Kinetics of the Alkaline Hydrolysis of Hydroxylamine- O-sulfonic Acid and Its Reactions with Hydrazine and Hydroxylamine. *Inorg. Chem.* **1975**, 14, 421.
68. Carey, F. A.; Sundberg, R. J., *Advanced Organic Chemistry*. Plenum Press, New York, 1991.
69. Mahajna, M.; Casida, J. E., Oxidative Bioactivation of Methamidophos Insecticide: Synthesis of N-Hydroxymethamidophos (A Candidate Metabolite) and Its Proposed Alternative Reactions Involving N f O Rearrangement or Fragmentation through a Metaphosphate Analogue. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 26.
70. Jr, R. W. W.; King, S. B., P-Nitrosophosphate Compounds: New N-O Heterodienophiles and Nitroxyl Delivery Agents. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8725.

ANEXOS

Anexo 1 – Constantes de velocidade observada em função da concentração de hidroxilamina na reação com **DEDNPP** a 25,0°C, pH=8,50 e $\mu=1,0$ M (KCl).

[NH₂OH], mol/L	* k_{obs}, s⁻¹
0,01	2,872 x 10 ⁻³
0,015	4,495 x 10 ⁻³
0,025	7,527 x 10 ⁻³
0,03	8,432 x 10 ⁻³
0,035	1,021 x 10 ⁻²
0,04	1,156 x 10 ⁻²
0,045	1,306 x 10 ⁻²
0,05	1,499 x 10 ⁻²
0,055	1,618 x 10 ⁻²
0,06	1,740 x 10 ⁻²

* k_{obs} é uma média de duas medidas experimentais.

Anexo 2 – Constantes de velocidade observada em função da concentração de *N*-metilhidroxilamina na reação com **DEDNPP** a 25,0°C, pH=8,50 e $\mu=1,0$ M (KCl).

[CH₃NHOH], mol/L	* k_{obs}, s⁻¹
0,01	5,067 x 10 ⁻³
0,015	7,435 x 10 ⁻³
0,02	9,608 x 10 ⁻³
0,025	1,208 x 10 ⁻²
0,03	1,452 x 10 ⁻²
0,035	1,644 x 10 ⁻²
0,04	1,842 x 10 ⁻²
0,045	2,071 x 10 ⁻²
0,05	2,288 x 10 ⁻²

* k_{obs} é uma média de duas medidas experimentais.

Anexo 3 – Constantes de velocidade observada em função da concentração de *NN*-dimetilhidroxilamina na reação com **DEDNPP** a 25,0°C, pH=8,50 e $\mu=1,0$ M (KCl).

$[(\text{CH}_3)_2\text{NOH}]$, mol/L	* k_{obs} , s^{-1}
0,01	$7,016 \times 10^{-4}$
0,015	$9,388 \times 10^{-4}$
0,02	$1,260 \times 10^{-3}$
0,025	$1,585 \times 10^{-3}$
0,03	$1,860 \times 10^{-3}$
0,035	$2,177 \times 10^{-3}$
0,04	$2,462 \times 10^{-3}$
0,045	$2,749 \times 10^{-3}$
0,05	$3,093 \times 10^{-3}$

* k_{obs} é uma média de duas medidas experimentais.

Anexo 4 – Constantes de velocidade observada em função da concentração de O-metilhidroxilamina na reação com **DEDNPP** a 25,0°C, pH=8,50 e $\mu=1,0$ M (KCl).

$[\text{NH}_2\text{OCH}_3]$, mol/L	k_{obs} , s^{-1}
0,01	$1,046 \times 10^{-5}$
0,02	$1,243 \times 10^{-5}$
0,03	$1,463 \times 10^{-5}$
0,04	$1,665 \times 10^{-5}$
0,05	$1,889 \times 10^{-5}$

Anexo 5 – Constantes de velocidade observada para as reações do **DEDNPP** com hidroxilamina em função do pH, ($[\text{NH}_2\text{OH}] + [\text{NH}_3+\text{OH}] = 0,03 \text{ M}$, $25,0^\circ\text{C}$ e $\mu=1,0 \text{ M}$ (KCl)).

pH *	** k_{obs} , s^{-1}
2,14	$7,740 \times 10^{-6}$
2,50	$1,002 \times 10^{-5}$
3,09	$1,515 \times 10^{-5}$
3,57	$2,892 \times 10^{-5}$
4,05	$7,558 \times 10^{-5}$
4,63	$2,157 \times 10^{-4}$
5,02	$3,913 \times 10^{-4}$
5,52	$1,233 \times 10^{-3}$
5,94	$2,346 \times 10^{-3}$
6,52	$4,817 \times 10^{-3}$
7,02	$7,120 \times 10^{-3}$
7,76	$7,416 \times 10^{-3}$
8,20	$8,070 \times 10^{-3}$
8,96	$8,078 \times 10^{-3}$

*Tampões utilizados: ClCH_2COOH (pH 2,14-3,57), CH_3COOH (pH 4,63-5,10), NH_2OH (pH 5,68-7,02) e TRIS (pH 7,76-8,96). ** k_{obs} é uma média de duas medidas experimentais.

Anexo 6 – Artigo publicado

Kirby, A. J.; Souza, B. S.; Medeiros, M.; Priebe, J. P.; Manfredi, A. M.; Nome, F. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Chemical evidence from its reaction with a phosphate triester. *Chemical Communications (London)*, **2008**, 4428-4429.