

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

Elisa Souza Orth

**REAÇÕES NUCLEOFÍLICAS DE DESFOSFORILAÇÃO COM  
IMIDAZOL E HIDROXAMATO: MODELAGEM EM SISTEMAS  
INTRA- E INTERMOLECULAR, POLIMÉRICO E MICELAR**

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

Orientador: Prof. Faruk José Nome Aguilera. PhD

Florianópolis

2011

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

077r Orth, Elisa Souza

Reações nucleofílicas de desfosforilação com imidazol e hidroxamato [tese] : modelagem em sistemas intra- e intermolecular, polimérico e micelar / Elisa Souza Orth ; orientador, Faruk José Nome Aguilera. - Florianópolis, SC, 2011.

215 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Química. 2. Imidazóis. 3. Ésteres. 4. Fosfatos. 5. Ácidos hidroxâmicos. I. Nome Aguilera, Faruk José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. III. Título.

CDU 54

Elisa Souza Orth

REAÇÕES NUCLEOFÍLICAS DE DESFOSFORILAÇÃO COM  
IMIDAZOL E HIDROXAMATO: MODELAGEM EM SISTEMAS  
INTRA- E INTERMOLECULAR, POLIMÉRICO E MICELAR

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de  
“Doutora em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa  
de Pós-Graduação em Química

Florianópolis, 19 de julho de 2011.

---

Prof. Almir Spinelli, Dr.  
Coordenador do Programa

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Faruk José Nome Aguilera, Dr  
Orientador  
UFSC

---

Prof. Omar Abou El Seoud, Dr  
Relator  
USP/SP

---

Prof. Adriano Lisboa Monteiro, Dr  
UFRGS

---

Prof. Gustavo Amadeu Micke,  
Dr - UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Maria da Graça Nascimento,  
Dr<sup>a</sup> - UFSC

---

Prof. Ricardo José Nunes, Dr  
UFSC



À minha mãe Ângela, ao meu pai  
Afonso e ao meu companheiro Alceu.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> Faruk Nome e à Prof<sup>a</sup> Haidi Fiedler, pela orientação, amizade e toda sabedoria transferida durante os nove anos de convivência. Com certeza, foram fundamentais no meu amadurecimento acadêmico e incitação pela pesquisa científica. Tenho grande admiração e carinho por eles e cultivarei sempre as boas lembranças. Aos colegas do laboratório 312 e 203 (Departamento de Química, UFSC), que alegraram de inúmeras formas meu cotidiano no laboratório, principalmente ao Eduardo H. Wanderlind, o qual teve grande participação na parte experimental deste trabalho, se mostrando sempre extremamente dedicado e competente. À Michelle Medeiros, que além de uma colega de trabalho extraordinária, que contribuiu ativamente na parte experimental, se mostrou uma grande amiga. Ao Bruno S. Souza e Pedro S. M. Oliveira pelas importantes colaborações nos resultados de cálculos computacionais e RMN, além das discussões proveitosas. Ao Alex M. Manfredi que contribuiu significativamente na parte experimental. Aos ex-colegas, Renata Mello e Daniel Walker, que colaboraram nas discussões, e ao Tiago Brandão, que além de ajudar na parte experimental, acompanhou minha trajetória acadêmica desde a graduação, influenciando diretamente, sempre positivamente.

As colaborações acadêmicas foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, assim agradeço ao Prof<sup>o</sup> Gustavo Micke (UFSC), sempre disposto a propor experimentos e discutir resultados e a seus alunos Luciano Vitali e Melina Heller que realizaram os experimentos de eletroforese e ESI-MS. Ao Prof<sup>o</sup> Hernán Terenzi (UFSC) e seu aluno Tiago Bortolotto pelas análises com DNA, fundamentais neste trabalho. Ao Prof<sup>o</sup> Marcos Eberlin (UNICAMP) e seu aluno Boniek G. Vaz pelas análises de ESI-MS (/MS). Ao Prof<sup>o</sup> Josefredo Pliego (UFSJ) pela colaboração na parte de cálculos computacionais. Ao Prof<sup>o</sup> Hugo Gallardo (UFSC) e seus alunos Eduard Westphal e Deise M.P.O. Santos, que sintetizaram e forneceram um importante composto utilizado neste trabalho. Agradeço especialmente ao Prof<sup>o</sup> Anthony Kirby (Cambridge University) que contribuiu expressivamente na discussão dos resultados deste trabalho, sempre instigando o desenvolvimento de química de qualidade.

Cabe aqui, agradecer também, todos os professores que ajudaram no desenvolvimento do trabalho, seja em discussões informais em congressos ou questionamentos em apresentações orais. Aos funcionários da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, em especial ao Angelo e Eliane, sempre dispostos a realizar os laboriosos experimentos de RMN deste trabalho. Ao INCT-Catálise que

permeou a pesquisa de qualidade, consolidando a área de catálise no âmbito nacional, e disponibilizou equipamentos e reagentes, fundamentais para realização deste trabalho. Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES, FAPESC e FAPESP, pelo auxílio financeiro. A UFSC por todo amparo acadêmico e de infra-estrutura.

Aos membros da banca, Omar A. El Seoud, Adriano L. Monteiro, Maria da Graça Nascimento, Ricardo J. Nunes e Gustavo A. Micke, que se prontificaram em ler este trabalho, discuti-lo e contribuir para sua concretização como tese de doutorado.

Aos queridos amigos, Grace Hoeller e Jadir Carminatti, da Secretaria da Pós-Graduação em Química (UFSC), que sempre foram muito prestativos na resolução de assuntos acadêmicos, mas acima disso se tornaram grandes amigos, de índoles admiráveis. Prezarei por nossa amizade sempre.

A minha família, pela educação exemplar, sempre propiciando as melhores condições para meu bem-estar e à melhor formação acadêmica possível. À minha mãe, a qual agradeço inifitamente pelo amor incondicional e por sempre me apoiar e incentivar, me guiando e dando forças nas horas difíceis, mas também nas muitas horas boas, suscitando lembranças inesqueíveis. Ao meu pai, pelo carinho constante e por acreditar no meu potencial e sempre me instigar a dar o melhor de mim. À toda minha família, em especial à Luizita, Neiva e João, que foram sempre compreensíveis comigo.

Ao meu noivo Alceu, minha grande inspiração, que além de um companheiro incrível, teve grande importância na minha trajetória acadêmica. Além de encarar correções textuais dos meus trabalhos, sempre me estimulou a batalhar e encarar os desafios e me amparou em todos os momentos. “Never never gonna give you up..Cause I've found what the world is searching for...”

“You look at science (or at least talk of it) as some sort of demoralizing invention of man, something apart from real life, and which must be cautiously guarded and kept separate from everyday existence. But science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation of life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment...I agree that faith is essential do success in life...In my view, all that is necessary for faith is the belief that by doing our best we shall come nearer to success and that success in our aims (the improvement of the lot of mankind, present and future) is worth attaining.”

Rosalind Franklin  
foi quem primeiro descobriu a estrutura de raios-x do DNA, mas morreu 4 anos antes de Crick e Watson ganharem o Prêmio Nobel pela descoberta do DNA.

“Não é o bastante ver que um jardim é bonito sem ter que acreditar também que há fadas escondidas nele?”

Douglas Adam



## RESUMO

Este trabalho detalha, por estudos de UV-Vis, <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P RMN, ESI-MS/MS e cálculos computacionais, algumas reações de interesse biológico, de desfosforilação com grupos nucleofílicos de reatividade excepcional: o hidroxamato e o imidazol, em diversos tipos de sistemas: intra- e intermolecular, polimérico, micelar e DNA plasmídico. Nas reações dos ésteres de fosfato (DEDNPP, EDNPP), confirmou-se a alta reatividade do benzohidroxamato BHO<sup>-</sup>, que envolve um ataque nucleofílico suicida, onde o nucleófilo de partida é destruído durante a reação, por um rearranjo de Lossen, formando produtos de baixa nucleofilicidade. O fármaco desferoxamina DFO, com três grupos hidroxamatos, também mostrou atividade nucleofílica na reação com BDNPP, que envolve intermediários fosforilados. Ainda, o DFO, amplamente utilizado para fins terapêuticos, foi ativo na quebra do DNA plasmídico em pH fisiológico, justificando a preocupação do uso deste fármaco. Outro interesse desse trabalho foi estudar reações com o grupo imidazol. A reação de hidrólise do diéster bis-imidazolil BMIPP foi estudada em detalhe, onde se corroborou a catálise bifuncional intramolecular nucleofílica-ácida-geral pelos grupos imidazol, envolvendo um intermediário fosforilado cíclico. Nas reações intermoleculares do imidazol IMZ com os ésteres de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol (DNPP, BDNPP, EDNPP, DEDNPP), se evidenciou o alto poder nucleofílico do IMZ. Foram detectados os intermediários fosforilados das reações estudadas, potenciais análogos das fosfohistidinas, e avaliadas suas estabilidades, que podem levar até 43 dias para quebrar. O nucleófilo bis-imidazolil BIMZ também se mostrou um bom nucleófilo na reação com DEDNPP, com os grupos imidazol atuando como catalisadores nucleofílicos. Ainda, os resultados confirmam o potencial catalítico do grupo imidazol ancorado na cadeia polimérica do polivinilimidazol PVI, nas reações com BDNPP e DEDNPP. PVI atua como uma enzima artificial, onde os grupos imidazol reagem por catálise nucleofílica ou bifuncional, por catálise nucleofílica-ácida geral. As reações com BIMZ e PVI foram estudadas na presença de micelas, a fim de avaliar efeitos de aproximação, recorrente nos sistemas enzimáticos, e os resultados mostram uma pronunciada catálise micelar, que surpreendentemente, ocorre tanto com micela catiônica (CTABr) quanto aniônica (SDS). Baseado no modelo de pseudofase propõe-se que os reagentes podem se incorporar na fase micelar por forças eletrostáticas e hidrofóbicas.



## ABSTRACT

This work presents thorough studies of UV-Vis,  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR, ESI-MS/MS and computational calculations, concerning some biologically important reactions, of dephosphorylation with the exceptionally reactive nucleophilic groups: hydroxamate and imidazole, in various systems: intra- and inter-molecular, polymeric, micellar and plasmid DNA. In the reactions with phosphate esters (DEDNPP, EDNPP), an extraordinary reactivity of benzohydroxamate  $\text{BHO}^-$  was confirmed, which involves a suicide nucleophilic attack, where the starting nucleophile is destroyed during the reaction, by a lossen rearrangement, forming weak nucleophilic products. The drug deferoxamine DFO, with three hydroxamates groups, also showed activity in the nucleophilic reaction with BDNPP, involving phosphorylated intermediates. In addition, DFO, widely used for therapeutic purposes, was active in cleaving plasmid DNA at physiological pH, justifying the concern with additional, possibly, critical side effects of this drug. Another target of this work was to study reactions with the imidazole group. The hydrolysis reaction of the bis-imidazolyl diester BMIPP was studied in detail, which confirmed an intramolecular bifunctional nucleophilic-general acid catalysis by the imidazole groups, involving a cyclic phosphorylated intermediate. The intermolecular reactions of imidazole IMZ with the phosphate esters derived from 2,4-dinitrophenol (DNPP, BDNPP, EDNPP, DEDNPP), evidenced the high nucleophilic power of IMZ. In the reactions studied, phosphorylated intermediates were detected, potential phosphohistidines analogues and their stabilities were evaluated, which can take up to 43 days to decompose. The bis-imidazolyl nucleophile BIMZ also acts as a good nucleophile in the reaction with DEDNPP, with the imidazole groups behaving as nucleophilic catalysts. Further, results confirm the catalytic potential of imidazole groups anchored on the polymeric backbone of polyvinylimidazole PVI, in reactions with BDNPP and DEDNPP. Thus, PVI acts as an artificial enzyme, where the imidazole groups react by nucleophilic catalysis or bifunctionally by general acid-nucleophilic catalysis. Dephosphorylation reactions with BIMZ and PVI were studied in the presence of micelles in order to evaluate approximation effects, and the results show a pronounced micellar catalysis, which, surprisingly, occurs with cationic (CTABr) and anionic (SDS) micelles. Based on the pseudophase model, it is proposed that the reagents can be incorporated in the micellar phase by hydrophobic and electrostatic forces.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de algumas reações biológicas não-catalisadas, em solução neutra a 25°C.<sup>18</sup> ..... 30
- Figura 2** – Escala logarítmica de (A)  $k_{cat}$  e  $k_{non}$ , com  $t_{1/2}$ ; (B)  $k_{cat}/K_m$  e  $k_{non}$ , para algumas reações catalisadas pelas enzimas: nuclease (STN),  $\beta$ -amilase (GLU), fumarase (FUM), urease (URE), cloroacrilato dehalogenase (CAA), citidina deaminase (CDA), fosfotriesterase (PTE), diidroorotato desidrogenase (DHO) e anidrase carbônica (CAN).<sup>18</sup> ..... 31
- Figura 3** – Diagrama de energia para uma reação enzimática ( $k_{cat}$ ) e não-enzimática ( $k_{non}$ ), onde  $\Delta G_{non}$  corresponde à barreira energética para reação não catalisada e  $\Delta G_{cat}$  se refere à reação catalisada por enzima.<sup>26</sup> ..... 32
- Figura 4** – (A) Caminhos possíveis para o ataque nucleofílico de  $Nu^-$  sobre ésteres de fosfato, no caso está exemplificado para um monoéster;<sup>47</sup> (B) Diagrama de More O’Ferrall-Jencks de coordenada de reação correspondente aos caminhos ilustrados em (a), sendo que  $A_N$ ,  $D_N$ , e  $A_N D_N$  correspondem aos caminhos associativo, dissociativo e concertado.<sup>49</sup>  $R$ ,  $P$ ,  $I_{fosf}$  e  $I_{met}$  correspondem ao reagente, produto, intermediário pentacoordenado fosforano e intermediário metafosfato, respectivamente. .... 36
- Figura 5** – Representação da catálise micelar por micela catiônica e aniônica..... 47
- Figura 6** – Diagrama representativo de um típico “sistema de dois componentes” em bactérias.<sup>99</sup> ..... 53
- Figura 7** – Aplicações e potencialidades inerentes no estudo de processos biológicos..... 59
- Figura 8** – Funcionamento da nuclease “dedo de zinco”, como ferramenta na terapia genética..... 61
- Figura 9** – Espectros de UV-Vis típicos dos ésteres estudados para reação do IMZ, com (A) BDNPP (B) DEDNPP (C) EDNPP e (D) DNPP, pH 8,5 a 25°C e  $I=1,0$  (KCl). .... 69

**Figura 10** – Perfil de pH para as reações do BHA (0,05M) (■) com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) e (B) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M), a 25°C,  $I = 1.0$  (KCl). As linhas sólidas correspondem ao ajuste pela Equação 1. As respectivas reações de hidrólise espontânea (□) estão mostradas para fins comparativos: dados para EDNPP foram estimados pela reação de hidrólise do metil 2,4-dinitrofenil fosfato<sup>73</sup> e dados para DEDNPP foram obtidos experimentalmente (Ver Apêndice). ..... 72

**Figura 11** – Espectros sucessivos de <sup>1</sup>H RMN obtidos para reação do BHO<sup>-</sup> (0,15M) com EDNPP (0,016M), pH 10 em D<sub>2</sub>O a 25°C. .... 76

**Figura 12** – Espectros sucessivos de <sup>1</sup>H RMN obtidos para reação do BHO<sup>-</sup> (0,03M) com DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}$ M), pH 10 em D<sub>2</sub>O a 25°C. .... 76

**Figura 13** – Espectros sucessivos de <sup>1</sup>H RMN para reação do BHO<sup>-</sup> (0,184M) com CDNB ( $6 \times 10^{-3}$ M) em D<sub>2</sub>O, pH 10, 25°C. .... 78

**Figura 14** – Gráfico da concentração relativa vs tempo para as espécies ilustradas nos Esquemas 17-18 obtidos pelos espectros sucessivos de <sup>1</sup>H RMN para as reações de BHO<sup>-</sup> (0,105M) com (A) DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}$ M) e (B) EDNPP (0,016M), em pH 10 a 25°C. .... 79

**Figura 15** – Espectro de ESI-MS (-) para após 2 minutos de reação do BHO<sup>-</sup> (0,105M) com DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}$ M) em pH 10,5, a 25°C. .... 83

**Figura 16** – Espectro de ESI-MS/MS (-) para o derivado carbamílico 13 de m/z 255, nas reações do BHO<sup>-</sup> (0,105M) com DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}$ M, pH 10 a 25 °C). .... 84

**Figura 17** – Perfil de pH ( $k_2$  em  $M^{-1} s^{-1}$ ) para reação do BHO<sup>-</sup> (-▲-) e DFO (-■-) com BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$ M), a 25°C e  $I = 1.0$  M (KCl). Os dados com DFO foram ajustados pela Equação 11 e com BHO<sup>-</sup>, com a Equação 1.<sup>166</sup> ..... 86

**Figura 18** – ESI-MS (-) após 30 minutos de reação do DFO ( $1 \times 10^{-3}$ M) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em meio aquoso, em pH 10 e 25°C. .... 89

**Figura 19** – ESI-MS/MS do reagente DFO de m/z 559, obtido na reação do DFO ( $1 \times 10^{-3}$ M) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 a 25°C. .... 90

- Figura 20** – ESI-MS/MS do intermediário aniônico fosforilado de m/z 805, na reação do DFO ( $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) em pH 10 a  $25^\circ \text{C}$ . ..... 91
- Figura 21** – ESI-MS/MS do intermediário aniônico fosforilado de m/z 885, na reação do DFO ( $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) em pH 10 a  $25^\circ \text{C}$ . ..... 92
- Figura 22** – Perfil de pH dos produtos para reação de clivagem do DNA após 24h a  $37^\circ \text{C}$ . (A) Experimento controle com apenas tampão; (B) Experimento controle com  $\text{Zn}^{2+} 1 \times 10^{-4} \text{M}$ ; (C) Reação com DFO  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ; (D) Reação com DFO e  $\text{Zn}^{2+}$ , ambos 10 mM. FI, FII e FIII correspondem as formas de super-hélice, circular aberta e linear do DNA pBSK II, respectivamente. Experimento realizado por Tiago Bortolotto sob supervisão do Professor Hernán Terenzi. .... 95
- Figura 23** – Resumo dos estudos realizados com o fármaco DFO em reações com um diéster de fosfato modelo (BDNPP) e com o DNA plasmídico. .... 96
- Figura 24** – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para a reação de hidrólise do BMIPP (A) hidrólise do BMIPP em pH=6,8; (B) hidrólise do intermediário monoéster Me-IMPP em pH=1,1, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ \text{C}$ . ..... 99
- Figura 25** – Espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN para a reação de hidrólise do BMIPP (pH 6,8 de 5 min a 5,5 horas) e Me-IMPP (pH 1,1 de 5,5 horas a 7,5 dias), em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ \text{C}$ . .... 99
- Figura 26** – Gráfico de concentração relativa das espécies vs tempo, calculado pelos espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN, para hidrólise do BMIPP em pH 6,8 e Me-IMPP em pH 1,1, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ \text{C}$ ; ( $\square$ ) BMIPP, ( $\bullet$ ) Me-IMPP e ( $\triangle$ )  $\text{P}_i$ . .... 101
- Figura 27** – Estruturas otimizadas para BMIPP e  $\text{BMIPP}^\pm$  obtida ao nível B3LYP em fase gasosa. .... 102
- Figura 28** – Estruturas otimizadas de TS.GB e TS.NUC, obtida ao nível B3LYP em fase gasosa. .... 103

- Figura 29** – Variação da energia livre com a coordenada de reação envolvendo TS.GB e TS.NUC. Energias calculadas relativo à BMIPP<sup>±</sup>.w..... 105
- Figura 30** – Estruturas otimizada de TS.NUC2, obtida ao nível B3LYP em fase gasosa..... 106
- Figura 31** – Variação das distâncias das ligações e energias ( $\Delta$ ) ao longo do IRC para a reação de hidrólise intramolecular nucleofílica de BMIPP via TS.NUC2..... 107
- Figura 32** – ESI(+) FT-ICR MS da hidrólise do BMIPP após 10 min de reação em meio aquoso, pH 6,5 e 60°C..... 108
- Figura 33** – Resumo das novas evidências para hidrólise do BMIPP: “pesca” de estados de transições, intermediários e produtos..... 109
- Figura 34** – Perfil de pH para as reações do IMZ (1M) com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M); (B). BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M), (C) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e (D) DNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), a 25°C,  $I = 1.0$  (KCl). As linhas sólidas correspondem ao ajuste pela Equação 12. As reações respectivas de hidrólise espontânea ( $\square$ ) estão mostradas para fins comparativos: dados para BDNPP e DNPP são diretamente da literatura;<sup>189,190</sup> dados para EDNPP foram estimados da reação de hidrólise do metil 2,4-dinitrofenil fosfato<sup>73</sup> e dados para DEDNPP foram obtidos experimentalmente (Ver Apêndice). ..... 111
- Figura 35** – Gráfico de Brønsted de  $\log k_N$  vs  $pK_a$  para reações de diferentes nucleófilos com BDNPP.<sup>85,166</sup> ..... 116
- Figura 36** – Gráfico de Brønsted de  $\log k_N$  vs  $pK_a$  para reações de diferentes nucleófilos com EDNPP.<sup>63</sup> ..... 116
- Figura 37** – Gráfico de Brønsted de  $\log k_N$  vs  $pK_a$  para reações de diferentes nucleófilos com DEDNPP.<sup>87</sup> ..... 116
- Figura 38** – Espectros sucessivos de <sup>1</sup>H RMN para reação do IMZ (0,6M) com EDNPP (0,03M), em pH 8,5, em D<sub>2</sub>O, 25°C..... 119
- Figura 39** – Espectros sucessivos de <sup>1</sup>H RMN para reação do IMZ (0,048M) com BDNPP ( $5 \times 10^{-3}$ M), em pH 8,5, em D<sub>2</sub>O, 25°C..... 119

- Figura 40** – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para reação do IMZ (0,07M) com DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ . ..... 120
- Figura 41** – Espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN para reação do IMZ (0,45M) com EDNPP (0,03M), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$  e padrão interno  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%..... 122
- Figura 42** – Espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN para reação do IMZ (0,6M) com BDNPP (0,017M), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$ , 10%  $\text{CD}_3\text{CN}$ , a  $25^\circ\text{C}$ , e padrão interno  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%..... 124
- Figura 43** – Espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN para reação do IMZ (0,23M) com DNPP ( $9 \times 10^{-3}\text{M}$ ), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ . O padrão interno  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% está mostrado apenas no primeiro espectro, para melhor visualizar o desaparecimento do DNPP..... 125
- Figura 44** – Gráficos de concentração relativa vs tempo obtidos por RMN para reação do IMZ (pH 8,5) com (A) DEDNPP  $^1\text{H}$  RMN; (B) EDNPP  $^{31}\text{P}$  RMN; (C) BDNPP  $^1\text{H}$  RMN e (D) BDNPP  $^{31}\text{P}$  RMN. As espécies estão dadas nos Esquemas 28-30 e para os ajustes dos dados foram utilizadas as Equações 6 e 13-15, cujos parâmetros estão dados na Tabela 17. .... 127
- Figura 45** – ESI-MS (+) após 2 minutos de reação do DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ . .... 130
- Figura 46** – ESI-MS (-) após 3 horas de reação do EDNPP ( $2 \times 10^{-4}\text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ . .... 130
- Figura 47** – ESI-MS (-) após 8 minutos de reação do BDNPP ( $8 \times 10^{-5}\text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ ..... 131
- Figura 48** – ESI-MS/MS (+) do intermediário 15, de m/z 205, interceptado da reação do DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ . .... 131
- Figura 49** – ESI-MS/MS (-) do intermediário 16, de m/z 175, interceptado da reação do EDNPP ( $2 \times 10^{-4}\text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ . .... 132

**Figura 50** – ESI-MS/MS (-) do intermediário 17, de m/z 313, interceptado da reação do BDNPP ( $8 \times 10^{-5} \text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a 25°C..... 132

**Figura 51** – ESI-MS/MS (-) do intermediário 18, de m/z 197, interceptado após dois dias de reação do BDNPP ( $8 \times 10^{-5} \text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a 25°C..... 133

**Figura 52** – Resumo dos resultados obtidos para as reações dos ésteres de fosfato com IMZ e perfil ilustrativo da estabilidade dos intermediários detectados..... 134

**Figura 53** – Dados da titulação potenciométrica do BIMZ ( $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ) (A) na ausência e (B) na presença de CTABr (0,01M), com KOH 0,1M a 25°C e  $I=1,0$ . A linha sólida vermelha corresponde ao ajuste do programa BEST7. A distribuição das espécies dadas no Esquema 34 também está mostrada. .... 136

**Figura 54** – Perfil de pH para a reação do BIMZ com DEDNPP: (A) BIMZ, (0,01M) (-■-); (B) dado em  $k_{\text{obs}}/[\text{grupo imidazol}] (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$  (-■-), concentração local de grupos imidazolil e comparativo com a respectiva reação com IMZ 1M (-▲-). Dados para reação espontânea, obtidas experimentalmente (ver Apêndice) estão mostrados para fins comparativos (-□-). Todas as reações com  $I=1\text{M}$  (KCl), a 25°C. A linha sólida para reação com BIMZ corresponde ao ajuste pela Equação 16. .... 137

**Figura 55** – ESI-MS (+) após 1 hora de reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ), pH 8,5 a 25°C..... 140

**Figura 56** – ESI-MS/MS (+) da espécie de m/z 429, da reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ), pH 8,5 a 25°C. .... 141

**Figura 57** – Isotermas de Freundlich-Langmuir para a incorporação em CTABr do (A) DEDNPP ( $2 \times 10^{-4} \text{M}$ ) e (B) BIMZ ( $2 \times 10^{-4} \text{M}$ ), pH 8,5 a 25°C..... 143

- Figura 58** – Perfis de pH para as reações de DEDNPP: (i) espontânea ( $H_2O$ ) (-□-); (ii) CTABr (0,01M) (-★-), (iii) SDS (0,01M) (-●-), (iv) BIMZ (0,01M) (-■-); (v) BIMZ (0,01M) na presença de CTABr (0,01M) (-▲-) e (vi) BIMZ 0,01M na presença de SDS (0,01M) (-○-), à 25°C. Ajustes pelas Equações 26-29..... 144
- Figura 59** – Dependência de  $k_{obs}$  com a concentração de CTABr, para a reação do DEDNPP em água (-□-) e com BIMZ (0,01M) (-■-), pH 8,5 a 25°C. Ajustes pelas Equações 26-28..... 148
- Figura 60** – Dados da titulação potenciométrica do PVI ( $6 \times 10^{-3}M$ ) (-■-) e IMZ ( $1 \times 10^{-3}M$ ) (-□-), com KOH (0,1M) a 25°C. .... 152
- Figura 61** – Perfis de pH para a reação do PVI ( $6 \times 10^{-3}M$ ) (-■-) com (A) BDNPP e (B) DEDNPP, em água, a 25°C. Considerando a concentração do monômero 1-vinilimidazol (0,156M), tem-se os perfis de pH em função de uma constante de segunda ordem, que está mostrado juntamente com a respectiva reação com IMZ 1M (-★-) para (C) BDNPP e (D) DEDNPP. As reações espontâneas também estão mostradas para fins comparativos (-□-).<sup>64</sup> ..... 153
- Figura 62** – Perfis de pH para a reação do PVI ( $6 \times 10^{-3}M$ ) na presença de CTABr (0,01M) (-▲-) e SDS (0,01M) (-■-) com (A) BDNPP e (B) DEDNPP, em água, a 25°C. As respectivas reações apenas com PVI (-□-) também estão mostradas para fins comparativos. .... 157
- Figura 63** – Representação da interação do polímero PVI com micelas que justifica a reatividade nas reações de desfosforilação..... 158



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Constantes de segunda ordem ( $k_2$ ) para reações nucleofílicas com diversos ésteres derivados de 2,4-dinitrofenil fosfato.\*<sup>a</sup> ..... 42
- Tabela 2** – Magnitude do efeito alfa em reações da  $\text{NH}_2\text{OH}$  com derivados do 2,4-dinitrofenol e 8-dimetilamônio-1-naftol.<sup>63</sup> \*<sup>a</sup> ..... 44
- Tabela 3** – Eficiência catalítica de diferentes catalisadores na reação de hidrólise de ésteres de nitrofenila..... 58
- Tabela 4** – Parâmetros cinéticos, termodinâmicos de ativação e isotópicos calculados para as reações do BHA com DEDNPP, BDNPP e EDNPP.<sup>a</sup> ..... 73
- Tabela 5** – Deslocamentos de  $^1\text{H}$  RMN para as espécies dadas nos Esquemas 17-18, envolvidas na reação do  $\text{BHO}^-$  com os DEDNPP e EDNPP, em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 10 a  $25^\circ\text{C}$ . ..... 77
- Tabela 6** – Constantes de segunda ordem ( $k_N$ ) para reação do  $\text{BHO}^-$  com DEDNPP e EDNPP, considerando percentual <sup>a</sup> de ataque no átomo de fósforo e carbono. Dados com BDNPP são mostrados para fins comparativos.<sup>166</sup> ..... 80
- Tabela 7** – Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 14 com as Equações 6-10 para as reações do  $\text{BHO}^-$  com DEDNPP e EDNPP.<sup>a</sup> 82
- Tabela 8** – Parâmetros cinéticos obtidos para reação do DFO com BDNPP, pelo ajuste dos dados da Figura 17 com a Equação 11.<sup>a</sup> ..... 87
- Tabela 9** – Efeito de metais na reação do DFO (0,01M) com BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}\text{M}$ )..... 88
- Tabela 10** – Deslocamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN para as espécies envolvidas na reação de hidrólise do BMIPP, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ\text{C}$ . ..... 100
- Tabela 11** – Distâncias ( $\text{Å}$ ) e ângulos ( $^\circ$ ) mais relevantes das estruturas otimizadas de  $\text{BMIPP}^\pm$ , TS.GB, TS.NUC e TS.NUC2. <sup>a</sup> ..... 104
- Tabela 12** – Valores experimentais<sup>157</sup> e calculados (B3LYP) para as variações de energias de ativação de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ), entalpia ( $\Delta H^\ddagger$ ) e entropia ( $\Delta S^\ddagger$ ) para as estruturas de TS.GB e TS.NUC. <sup>a</sup> ..... 105

<b>Tabela 13</b> – Parâmetros cinéticos, termodinâmicos de ativação e isotópicos calculados para as reações do DEDNPP, BDNPP, EDNPP e DNPP com IMZ. <sup>a</sup> .....	112
<b>Tabela 14</b> – Efeito da força iônica [KCl] em $k_{obs}$ para reação do DNPP com IMZ (1M), pH 9,0, 25°C. <sup>a</sup> .....	114
<b>Tabela 15</b> – Deslocamentos de <sup>1</sup> H RMN para as espécies envolvidas na reação do IMZ com BDNPP, EDNPP e DEDNPP, .....	120
<b>Tabela 16</b> – Deslocamentos de <sup>31</sup> P RMN para as espécies envolvidas na reação do IMZ com BDNPP e DNPP, .....	126
<b>Tabela 17</b> – Parâmetros calculados pelo ajuste dos dados da Figura 44 as com Equações 13-15, para formação e quebra dos intermediários fosforilados 15-19. <sup>a</sup> .....	128
<b>Tabela 18</b> – Parâmetros cinéticos, termodinâmicos de ativação e isotópicos calculados para a reação do BIMZ com DEDNPP. <sup>a</sup> .....	138
<b>Tabela 19</b> – Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 58-59 para as reações do DEDNPP com BIMZ na presença de CTABr. <sup>a</sup> .....	147
<b>Tabela 20</b> – Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 61A-B, para as reações do PVI com BDNPP e DEDNPP. <sup>a</sup> ....	154

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

\* Foram utilizadas siglas e números para designar as estruturas químicas. Para espécies reagentes ou produtos, que são recorrentes no texto, foram utilizadas abreviaturas de seu nome na forma de siglas. Para intermediários, que se decompõem, foi preferida a designação numérica.

DNA – ácido desoxirribonucléico

RNA – ácido ribonucléico

ATP – trifosfato de adenosina

FDA – agência reguladora de medicamentos e alimentos (Food and Drug Administration)

GFP – proteína verde fluorescente

HIV – vírus da imunodeficiência humana

NH<sub>2</sub>OH – hidroxilamina

RNase A – ribonuclease A

His – histidina

IMPDH – inosina 5'-monofosfato desidrogenase

PEI – polietilenoimina

IMPP – 2-(2'-imidazolil)fenil fosfato

4-TBCP – 4-terc-butilcatecol fosfato

MANEP – 8-dimetilamônio-1-naftil fosfato

DANEP – metil- 8-dimetilamônio-1-naftil fosfato

TANEP – dietil- 8-(*N-N*-dimetilamônio-1-naftil) fosfato

2Ac – 2-acetóxi-2-naftóico

3Ac – 3-acetóxi-2-naftóico

2-CPP – 2-carboxifenil fosfato

MBNA – 4,4'-metilenobis(2-hidroxi-2-naftóico ácido)

1-PPHIS – 1-fosfohistidina

3-PPHIS – 3-fosfohistidina

1-HIS – 1-histidina

3-HIS – 3-histidina

DNPP – 2,4-dinitrofenil fosfato

EDNPP – etil 2,4-dinitrofenil fosfato

BDNPP – bis(2,4-dinitrofenil) fosfato

DEDNPP – dietil 2,4-dinitrofenil fosfato

PVI - polivinilimidazol

DNP – 2,4-dinitrofenol

IMZ – imidazol

BHA – ácido benzohidroxâmico

BHO – benzohidroxamato

DFO – desferoxamina

BMIPP – bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato  
BIMZ – bis ((1*H*-imidazol-1-il)metil) anilina  
CTABr – brometo de cetiltrimetil amônio  
SDS – dodecilsulfato de sódio  
CDNP – 1-cloro-2,4-dinitro-fenil  
Me-2 – 2-(1-metil-2'-imidazolíneo)fenil fosfato  
Me-3 – 1-metil-2-(2'-hidroxifenil)imidazol  
Pi – fosfato inorgânico  
 $t_{1/2}$  – tempo de meia-vida  
 $\Delta S^\ddagger$  – variação de entropia de ativação  
 $\Delta G^\ddagger$  – variação de energia livre de Gibbs de ativação  
 $\Delta H^\ddagger$  – variação de entalpia de ativação  
 $pK_a$  - logaritmo da constante de dissociação de uma espécie ácida ( $K_A$ )  
 $K_m$  – constante de Michaelis-Menten  
 $k_{obs}$  – constante de velocidade observada  
 $k_2$  – constante de velocidade de segunda ordem  
 $k_N$  – constante de velocidade de segunda ordem nucleofílica  
 $k_0$  – constante de velocidade de primeira ordem para reação espontânea  
 $k_{OH}$  – constante de velocidade de segunda ordem para reação com hidróxido  
 $k_{non}$  – constante de velocidade da reação não-enzimática  
 $k_{cat}$  – constante de velocidade da reação enzimática  
 $k_{2m}$  – constante de velocidade de segunda ordem na fase micelar  
 $k_{2w}$  – constante de velocidade de segunda ordem na fase aquosa  $K_s$  – constante de incorporação do substrato na fase micelar  
 $K_N$  – constante de incorporação do nucleófilo na fase micelar  
 $K_{xy}$  – constante de troca iônica da fase aquosa com a fase micelar  
 $k_H/k_D$  – efeito cinético isotópico de solvente  
 $\beta_{nuc}$  – constante de Brønsted para nucleófilo  
 $\beta_{lig}$  – constante de Brønsted para grupo de saída  
UV-Vis – ultravioleta – visível  
IV – infravermelho  
ESI-MS – espectrometria de massas por ionização de elétronspray  
RMN – ressonância magnética nuclear  
MALDI – ionização/dessorção de matriz assistida por laser  
GPC – cromatografia de permeação em gel  
LTQ FT-ICR MS – espectrometria de massas de ultra alta resolução  
PIPES – piperazina-1,4-bis(ácido 2-etano sulfônico)  
HEPES – ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico  
CHES – ácido 2-(ciclohexilamino) etano sulfônico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	29
1.1 ENZIMAS: UMA LIÇÃO DE CATÁLISE	29
1.1.1 Fatores determinantes na catálise enzimática	31
<b>1.2 REAÇÕES DE DESFOSFORILAÇÃO</b>	33
1.2.1 Mecanismos de hidrólise de ésteres de fosfato	35
1.2.2 Catálise inter- e intramolecular	38
1.2.3 Reações com alfa-nucleófilos	43
1.2.4 Catálise micelar	46
1.3 A QUÍMICA DO IMIDAZOL E SUA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA	48
1.3.1 Ribonucleases	49
1.3.2 Fosfohistidinas	51
1.3.3 Modelos miméticos contendo grupo imidazol	56
1.4 APLICAÇÕES E POTENCIALIDADES DOS ESTUDOS COM ENFOQUE NOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS	58
<b>2 OBJETIVOS</b>	63
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	65
3.1 REAGENTES	65
3.2 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA	66
3.3 ESTUDOS DE ESI-MS (/MS) E ELETROFORESE CAPILAR	66
3.4 ESTUDOS DE RMN	67
3.5 ESTUDOS TEÓRICOS	68
3.6 ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO DE PLASMÍDEO DE DNA POR DFO	68
3.7 MEDIDAS CINÉTICAS	69
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	71
4.1 ATAQUE NUCLEOFÍLICO SUICIDA DO ÁCIDO BENZOHI-DROXÂ-MICO EM REAÇÕES COM ÉSTERES DE FOSFATOS: REARRANJO DE LOSSEN	71
4.1.1 Estudos cinéticos	71
4.1.2 Estudos de <sup>1</sup> H RMN	74
4.1.3 Análise de espectrometria de massas	82
4.1.4 Conclusões parciais	84
4.2 REAÇÕES DE DESFOSFORILAÇÃO COM O FÁRMACO DESFERROXAMINA: EFEITO NA QUEBRA DO DNA	85
4.2.1 Estudos cinéticos	86
4.2.2 Análise de espectrometria de massas	88
4.2.3 Reação do DFO com DNA plasmídico	93
4.2.4 Conclusões parciais	96

4.3 REAÇÃO INTRAMOLECULAR DE HIDRÓLISE DE UM DIÉSTER DE FOSFATO BIS-IMIDAZOLIL: NOVAS EVIDÊNCIAS MECANÍSTICAS	97
4.3.1 Estudos de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}$ RMN	98
4.3.2 Cálculos computacionais	102
4.3.3 Análise de espectrometria de massas de alta resolução	107
4.3.4 Conclusões parciais	108
4.4 REAÇÕES DE ÉSTERES DE FOSFATOS DERIVADOS DO 2,4-DINITROFENOL COM IMIDAZOL	110
4.4.1 Estudos cinéticos	110
4.4.1.2 Comparação da reatividade do imidazol: gráficos de Brønsted	114
4.4.2 Estudos de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}$ RMN	117
4.4.3 Análise de espectrometria de massas	129
4.4.4 Conclusões parciais	133
4.5 REAÇÃO DE ÉSTER DE FOSFATO COM UM NUCLÉOFILO BIS-IMIDAZOLIL E EFEITO DA CATÁLISE MICELAR	135
4.5.1 Titulação do nucleófilo bis-imidazolil na presença e ausência de micela	135
4.5.2 Estudos cinéticos na ausência de micela	136
4.5.3 Análises de espectrometria de massas	140
4.5.4 Estudos cinéticos na presença de micela	141
4.5.4.1 Análises de eletroforese capilar	142
4.5.4.2 Modelagem cinética: efeito do pH e da concentração micelar	143
4.5.5 Conclusões parciais	149
4.6 REAÇÕES DE DESFOSFORILAÇÃO COM POLIVINILIMIDAZOL E EFEITO DA CATÁLISE MICELAR	150
4.6.1 Titulação potenciométrica do polivinilimidazol	151
4.6.2 Estudos cinéticos na ausência de micela	152
4.6.3 Estudos cinéticos na presença de micela	156
4.6.4 Conclusões parciais	158
5 CONCLUSÕES GERAIS	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
APÊNDICE	189
Índice do conteúdo do apêndice	189

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ENZIMAS: UMA LIÇÃO DE CATÁLISE

A catálise constitui uma área em crescente ascensão no meio científico, visto representar uma das ferramentas mais promissoras na solução de diversos problemas do mundo moderno,<sup>1</sup> tais como a terapia genética,<sup>2,4</sup> a obtenção de combustíveis de fontes renováveis,<sup>5-7</sup> a obtenção de novos fármacos,<sup>8,9</sup> otimização dos processos de beneficiamento na química fina,<sup>10,11</sup> entre outros. Além disso, a catálise tem contribuído significativamente em processos que visam o desenvolvimento sustentável e a proteção ambiental,<sup>12</sup> dentro do conceito de Química Verde.<sup>13</sup> A catálise também ampara a nanociência na inovação tecnológica,<sup>14-16</sup> um constante desafio no desenvolvimento de um país.<sup>17</sup> De maneira simplificada, a catálise descreve o fenômeno de acelerar eficientemente a velocidade de uma reação por meio de um catalisador, que é regenerado ao término do processo.

Nesse contexto, as enzimas têm recebido notório destaque, em especial pela lição de catálise que jaz na compreensão do modo de ação desses exímios catalisadores biológicos. Sua extraordinária eficiência aliada à alta complexidade estrutural torna sua compreensão mecanística intrigante, e tem inspirado o desenvolvimento de promissores sistemas catalíticos sintéticos. As enzimas atuam acelerando reações vitais para o funcionamento do ser vivo, que na sua ausência seriam inviáveis de ocorrer. Na Figura 1 estão ilustrados os tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de diversas reações essenciais que ocorrem nos sistemas biológicos,<sup>18</sup> que podem levar até bilhões de anos para acontecer espontaneamente e as enzimas conseguem acelerar essas reações com efeitos catalíticos na ordem de  $10^6$  a  $10^{23}$  vezes.<sup>19</sup>

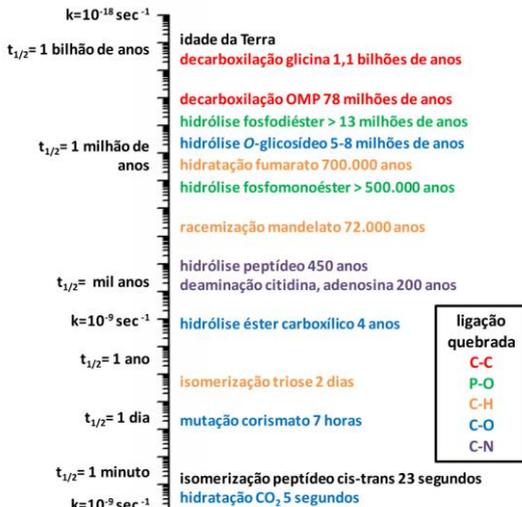


Figura 1 – Tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de algumas reações biológicas não-catalisadas, em solução neutra a 25°C.<sup>18</sup>

Uma análise comparativa bastante interessante da eficiência de algumas enzimas está ilustrada na Figura 2A-B,<sup>18</sup> onde são mostradas as constantes de velocidades das reações catalisadas por enzimas ( $k_{\text{cat}}$ ) e as respectivas reações espontâneas ( $k_{\text{non}}$ ), juntamente com os  $t_{1/2}$  (Figura 2A). O gráfico da Figura 2B apresenta a razão  $k_{\text{cat}}/K_m$  ( $\text{s}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ), definida como eficiência catalítica, que corresponde a uma constante de segunda-ordem aparente que se refere às propriedades e reações da enzima livre com o substrato livre, e mede a especificidade com diferentes substratos.<sup>20</sup> De fato, os efeitos da catálise enzimática são surpreendentes: (i) a razão  $k_{\text{cat}}/k_{\text{non}}$  observada passa de  $10^{17}$ , como a  $\beta$ -amilase (GLU); e (ii) o  $t_{1/2}$  das reações passam de milhões de anos (não catalisadas) para segundos (catalisadas), como com a nuclease (STN). Outra informação importante que a Figura 2 fornece é que dependendo dos parâmetros avaliados contemplam-se potencialidades diferentes das enzimas. Por exemplo, analisando os valores de  $k_{\text{cat}}/K_m$ , a enzima fumarase possui maior eficiência catalítica, no entanto, a enzima  $\beta$ -amilase apresenta o maior incremento na velocidade de reação ( $k_{\text{cat}}/k_{\text{non}}$ ). Isto significa que a fumarase é mais específica com os substratos enquanto a  $\beta$ -amilase consegue acelerar reações extremamente desfavoráveis a ocorrer espontaneamente, e ambas as peculiaridades das enzimas são fundamentais na catálise enzimática.

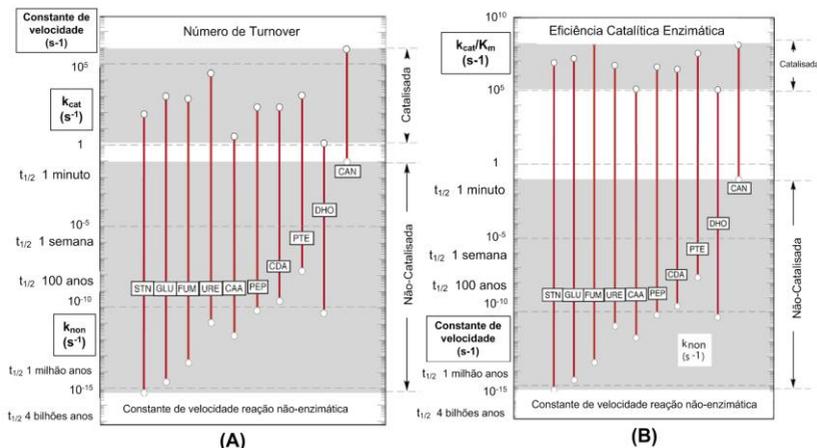


Figura 2 – Escala logarítmica de (A)  $k_{cat}$  e  $k_{non}$ , com  $t_{1/2}$ ; (B)  $k_{cat}/K_m$  e  $k_{non}$ , para algumas reações catalisadas pelas enzimas: nuclease (STN),  $\beta$ -amilase (GLU), fumarase (FUM), urease (URE), cloroacrilato dehalogenase (CAA), citidina deaminase (CDA), fosfotriesterase (PTE), diidroorotato desidrogenase (DHO) e anidrase carbônica (CAN).<sup>18</sup>

### 1.1.1 Fatores determinantes na catálise enzimática

A efetividade catalítica das enzimas, de maneira geral, pode ser atribuída a diversos fatores como sua alta especificidade na natureza dos substratos e no tipo de reações, bem como a estereoespecificidade. Além disso, a multifuncionalidade das enzimas pode conferir múltiplas catálises, como intramolecular ácida/básica e eletrostática. Assim, essas interações eletrostáticas e de ligações de hidrogênio, juntamente com outros fatores, como liberação da água do sítio ativo enzimático, podem explicar as contribuições entálpicas e entrópicas nas reações enzimáticas.<sup>21</sup>

Para explicar detalhadamente a origem da catálise enzimática, muitas hipóteses já foram formuladas, entre as quais a do modelo chave-fechadura. Ela contempla aspectos como proximidade e orientação do substrato e dos grupos catalíticos.<sup>22</sup> Todavia, esse modelo foi posteriormente modificado, onde se concluiu que a chave (substrato) não encaixa perfeitamente na fechadura (enzima), mas sim exerce certa “tensão” nele, ou seja, desestabiliza o estado reagente.<sup>23</sup> Essas considerações foram então aprimoradas por Linus Pauling<sup>24</sup> que justificou a eficiência da catálise enzimática em termos da maior afinidade da enzima (E) em se ligar com o estado de transição (S<sup>‡</sup>) do

que com o substrato (S) ou produto (P), o que diminui a energia de ativação da reação, Figura 3. De fato, essa abordagem é a mais difundida para a explicação da diminuição da barreira energética nas reações enzimáticas.<sup>25</sup> Portanto, o poder catalítico das enzimas parece residir na estabilização do estado de transição, o qual pode ser determinado por diversos fatores como interações de ligação de hidrogênio, eletrostáticas e outras.

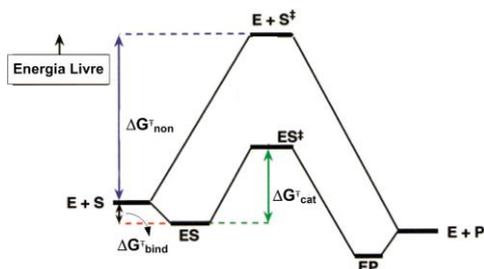


Figura 3 – Diagrama de energia para uma reação enzimática ( $k_{cat}$ ) e não-enzimática ( $k_{non}$ ), onde  $\Delta G_{non}^{\ddagger}$  corresponde à barreira energética para reação não catalisada e  $\Delta G_{cat}^{\ddagger}$  se refere à reação catalisada por enzima.<sup>26</sup>

As interações por ligações de hidrogênio são importantes quando grupos com mudanças na acidez ou basicidade participam no sítio ativo. Como consequência, a formação de uma ligação de hidrogênio diminui a energia do complexo no estado de transição, em relação ao estado reagente.<sup>27,28</sup> No entanto, as interações eletrostáticas também são essenciais na catálise enzimática e sua importância vem sendo corroborada, principalmente por cálculos computacionais,<sup>29</sup> que prevê que a preorganização de carga da proteína enzimática determina uma reorganização eletrostática favorável para solvatar o estado de transição.<sup>30</sup>

A compreensão mecanística de reações enzimáticas vem sendo esclarecida para diversas enzimas, porém elas possuem outra particularidade que alimenta o interesse no seu estudo, continuamente, que é a versatilidade catalítica.<sup>31</sup> Apesar de serem conhecidas pela especificidade, as enzimas possuem a habilidade de catalisar transformações químicas diferentes, através de pequenas mutações. Isso não afeta significativamente sua função inicial, mas torna-a versátil a realizar outras funções, não exercidas antes. E assim, as enzimas podem evoluir com mutações que lhes convém benéficas para sobrevivência do organismo, mantendo sua atividade original intacta.<sup>32</sup> Por exemplo, a

paraoxonase é uma classe de enzimas conhecida por hidrolisar lactonas, mas observou-se que ela também catalisa a hidrólise de organofosfatos não-naturais nos sistemas biológicos. Isso sugere que essa enzima evoluiu para catalisar substâncias químicas que foram produzidas pelo homem, há alguns anos, usadas como inseticidas e gases de guerra.<sup>35</sup>

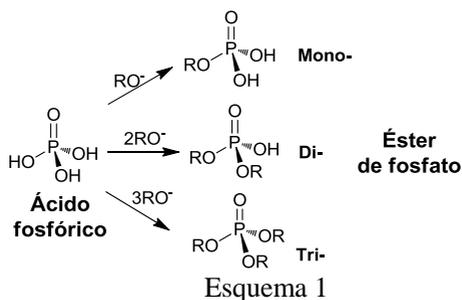
O estudo detalhado e continuado da química das enzimas é fundamental em diversos aspectos e tem potencial para nortear inúmeros avanços tecnológicos: (i) as enzimas, por si só, são uma lição de catálise, portanto podem ensinar formas de aumentar os rendimentos catalíticos em sistemas sintéticos;<sup>34</sup> (ii) muitas doenças e disfunções biológicas podem ser contornadas terapeuticamente compreendendo quais enzimas tem participação efetiva e como ocorrem;<sup>35</sup> (iii) a evolução da versatilidade catalítica pode esclarecer como ocorrem as mutações que levam a resistência de medicamentos;<sup>36</sup> (iv) com a biocatálise, cada vez mais, as enzimas estão apresentando aplicações na produção de diversas substâncias, como fármacos, cosméticos e substâncias de interesse agrícola.<sup>37</sup>

## 1.2 REAÇÕES DE DESFOSFORILAÇÃO

As reações de desfosforilação são extremamente importantes, pois governam vários processos biológicos, como o armazenamento e transmissão de informação genética (DNA e RNA),<sup>38</sup> processos de sinalização e regulação da atividade celular,<sup>39</sup> bem como no provimento de energia através de anidridos fosfóricos altamente energéticos, como ATP.<sup>40,41</sup> As reações envolvendo ATP são centrais para fornecer energia para inúmeros processos biológicos, como a síntese de proteína, o transporte ativo, os movimentos musculares e a transmissão de impulsos nervosos, entre outros.<sup>41</sup>

Nesse contexto, destaca-se a química dos ésteres de fosfato, pois constituem a classe de moléculas mais representativa envolvida nas reações biológicas de desfosforilação.<sup>42</sup> Os ésteres de fosfato apresentam grupos alcóxido ou arilóxido substituindo os grupos hidróxido do ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), podendo ser classificados em mono-, di- ou tri-ésteres de acordo com o número de substituições, Esquema 1. Os mono- e di-ésteres ocorrem naturalmente no meio biológico, enquanto os triésteres não. Ainda, os mono- e di-ésteres de fosfato apresentam hidrogênios ionizáveis, conferindo às diferentes espécies iônicas, reatividades diferenciadas. Essa ionização compete funções essenciais nos sistemas biológicos, pois não permite a passagem pela membrana celular de metabólitos fundamentais no meio celular e,

além disso, a carga negativa repele nucleófilos e confere resistência à hidrólise destrutiva.<sup>39</sup>



A importância biológica dos ésteres de fosfato está intrinsecamente relacionada à alta estabilidade da ligação P-O, que pode levar milhões de anos para ser quebrada, conforme ilustrada na Figura 1.<sup>21</sup> Por exemplo, estimou-se que  $t_{1/2}$  para a hidrólise espontânea de um diéster de fosfato (presente na estrutura do DNA e RNA) ultrapassa 13 milhões de anos e esse valor pode chegar à ordem de bilhões de anos<sup>43</sup> para o DNA, superior à idade da terra. Aliás, precisar o tempo das reações de hidrólise de ésteres de fosfato tem sido um desafio, o qual Wolfenden e colaboradores publicaram estudos detalhados<sup>18,44</sup> e estimaram que o monoânion do monoéster metil fosfato tem um  $t_{1/2}$  de 93 anos, enquanto o diéster análogo, o dimetil fosfato aniônico tem  $t_{1/2}$  estimado de mais de 30 milhões de anos. Já o triéster trimetil fosfato é mais reativo, com  $t_{1/2}$  de 11 anos. A capacidade das enzimas de acelerar reações tão desfavoráveis, no entanto, fundamental à sobrevivência humana, justifica o fascínio por esses catalisadores biológicos.

Por outro lado, foram essas altas estabilidades que permearam a projeção de inseticidas, pesticidas e gases de guerra com estruturas similares aos triésteres de fosfato, tornando-os resistentes à ação da água, do solo e do ar, e podendo assim, atingir seu alvo sem alteração química.<sup>42</sup> Esses agentes podem acumular nos tecidos e provocar danos aos seres vivos. De fato, muitos gases de guerra são neurotóxicos e atuam inibindo diversas enzimas, principalmente a acetilcolinesterase. Ela é fundamental no controle da transmissão de impulsos nervosos, e na presença de agentes neurotóxicos, pode provocar um colapso no sistema nervoso central, perda da coordenação muscular, convulsões e morte.<sup>45,46</sup>

Para uma melhor compreensão das particularidades das reações de desfosforilação nos sistemas biológicos é importante estudar elas separadamente em reações não-enzimáticas usando moléculas-modelos com grupos ésteres de fosfato ancorados. E dessa forma, compreender mecanisticamente as reações de desfosforilação desses modelos com água (hidrólise) e diferentes nucleófilos, bem como estudar as diferentes formas de catálise inter- e intramolecular com grupos ácidos e básicos, em sistemas moleculares simples, até mais complexos, como poliméricos e micelares.

### 1.2.1 Mecanismos de hidrólise de ésteres de fosfato

As reações de hidrólise de ésteres de fosfato podem ocorrer por dois caminhos: (i) no primeiro, o átomo de carbono da ligação P-O-C do éster pode servir como eletrófilo, e o grupo fosfato é substituído por um nucleófilo ( $H_2O$ ), ocorrendo assim, quebra da ligação C-O; (ii) outro mecanismo é quando o nucleófilo ataca o átomo de fósforo central e desloca o álcool ou alcóxido via quebra da ligação P-O.

Os mecanismos via quebra de ligação C-O são favorecidos com melhores grupos de saída e ocorrem preferencialmente em pH baixo, onde o grupo de saída é o ácido fosfórico. Já em pH maiores, onde o grupo de saída possui pelo menos uma carga negativa, a hidrólise ocorre preferencialmente com quebra da ligação P-O. Esse mecanismo segue os mesmos caminhos observados nas reações de substituição nucleofílicas em ésteres de fosfato: concertado, associativo e dissociativo (Figura 4A).<sup>47</sup> Correlacionado os esquemas reacionais na Figura 4A com o diagrama de More O'Ferrall-Jencks representado na Figura 4B, observa-se que os mecanismos de substituição nucleofílica para hidrólise de ésteres fosfóricos ( $R \rightarrow P$ ) podem seguir, de maneira geral, três caminhos:

- (i) um associativo que ocorre em duas etapas, de adição e eliminação ( $A_N + D_N$ ), formando um intermediário pentacoordenado fosforano ( $I_{fosf}$ ). Nesse caminho, a formação de ligação com o nucleófilo é a etapa determinante;
- (ii) um dissociativo em duas etapas ( $D_N + A_N$ ),<sup>48</sup> liberando inicialmente o intermediário metafosfato hidratado ( $I_{met}$ ), e após, reagindo com o nucleófilo. Essencialmente, é a natureza do grupo de saída que rege esse caminho, visto ser determinante a quebra de ligação;
- (iii) um concertado sincrônico ( $A_N D_N$ ) onde não há formação de intermediário, e a adição do nucleófilo e eliminação do grupo

de saída são simultâneas, levando a um estado de transição sincrônico.

Todavia, sob certas condições, algumas reações podem não seguir estritamente os caminhos (i), (ii) e (iii), e apresentar variações, como:

- (iv) um caminho concertado de caráter associativo, onde não se observa um intermediário fosforano, e sim um estado de transição com maior grau de ligação com o grupo de saída do que com o nucleófilo;
- (v) um caminho concertado de caráter dissociativo, que passa por um estado de transição “mais solto”, onde a quebra da ligação com o grupo de saída está mais adiantada que a formação da ligação com o nucleófilo.<sup>42</sup>

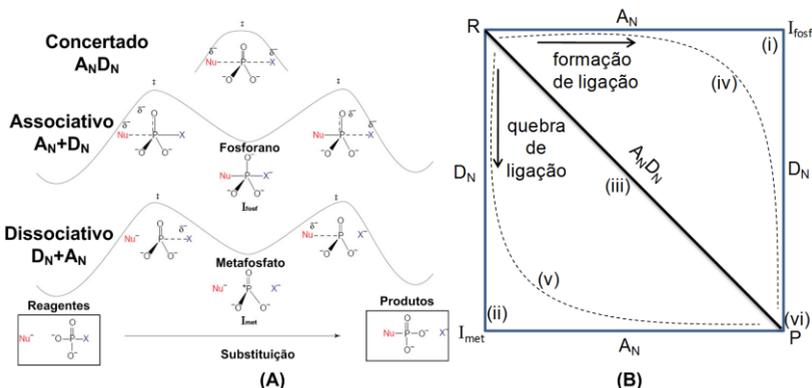


Figura 4 – (A) Caminhos possíveis para o ataque nucleofílico de  $Nu^-$  sobre ésteres de fosfato, no caso está exemplificado para um monoéster;<sup>47</sup> (B) Diagrama de More O’Ferrall-Jencks de coordenada de reação correspondente aos caminhos ilustrados em (a), sendo que  $A_N$ ,  $D_N$ , e  $A_N D_N$  correspondem aos caminhos associativo, dissociativo e concertado.<sup>49</sup>  $R$ ,  $P$ ,  $I_{fosf}$  e  $I_{met}$  correspondem ao reagente, produto, intermediário pentacoordenado fosforano e intermediário metafosfato, respectivamente.

A conceituação abordada na Figura 4 é fundamental na compreensão da química dos ésteres de fosfato. Ela permite estudar a natureza do estado de transição e/ou intermediários, variando condições reacionais, como diferentes grupos de saída e nucleófilo.<sup>20</sup> Como seria de se esperar, os mecanismos também variam quando se trata de um monoéster, diéster ou triéster de fosfato.

Para monoésteres de fosfato, em pHs neutros e alcalinos, onde prevalece a espécie dianiônica, acreditava-se em um mecanismo puramente dissociativo, onde a etapa determinante da velocidade de

reação é a formação do ânion metafosfato ( $I_{\text{met}}$ , Figura 4), que é instável e planar. Evidências mais recentes,<sup>50</sup> como a não detecção do metafosfato livre e a dependência da constante de hidrólise com a basicidade,<sup>51</sup> apontam para um mecanismo de caráter concertado com um estado de transição “mais solto”, se aproximando da aresta dissociativa, caminho (v), da Figura 4B. A natureza dissociativa da reação é favorecida com melhores grupos de saída.<sup>52</sup>

A hidrólise da espécie monoaniônica de monoésteres de fosfato também deve seguir um caminho concertado, no entanto, se beneficia de uma transferência intramolecular de um próton para auxiliar o grupo de saída. Em geral ocorre por um mecanismo concertado ou pré-associativo, com um estado de transição que vai depender da basicidade do grupo de saída, determinante no grau de ligação do próton com o oxigênio do grupo de saída.<sup>52</sup>

Diferente dos monoésteres, a hidrólise de diésteres de fosfato aniônicos ocorre por um mecanismo concertado de caráter associativo, passando por um estado de transição mais sincrônico, evidenciado por diversos estudos cinéticos.<sup>50</sup> Sugere-se que reações de hidrólise de diésteres de fosfato com bons grupos de saída (derivados de fenóis com baixos  $pK_a$ ) devem seguir um mecanismo bimolecular associativo com caráter concertado, levando a formação de um estado de transição com natureza semelhante a um fosforano dianiônico, sem formar um intermediário.<sup>53</sup> Em pH menor, onde predomina a espécie neutra do diéster, a reação de hidrólise segue por um mecanismo envolvendo transferência de próton, com um estado de transição altamente hidratado.<sup>54</sup>

Já em estudos preliminares com as reações de hidrólise dos triésteres de fosfato, os resultados favorecem um mecanismo em duas etapas, com a formação de um intermediário fosforano ( $I_{\text{fosf}}$ , Figura 4).<sup>55</sup> Estudos mais aprofundados indicam que a hidrólise de um triéster de fosfato tende a ser concertado com alto caráter associativo, caminho (iv) na Figura 4B, formando um estado de transição “mais firme” que nas reações com diésteres de fosfato.<sup>50</sup> Isso porque essas reações dependem fortemente da natureza do grupo de saída, bem como dos nucleófilos. Ainda, o caráter associativo aumenta com o aumento da basicidade do grupo de saída.<sup>54</sup> Apesar das evidências, a formação do intermediário pentacoordenado fosforano não é totalmente descartada, podendo ocorrer em alguns casos especiais envolvendo triésteres cíclicos.<sup>50</sup>

Assim, apesar de não haver consenso absoluto, os resultados sugerem que em geral, baseado na Figura 4B, os monoésteres de fosfato seguem um caminho concertado com caráter dissociativo, pelo caminho

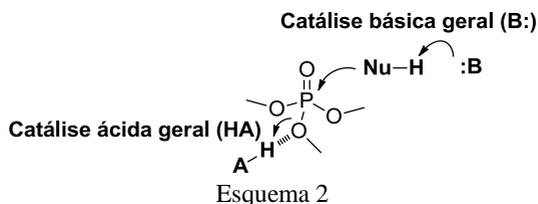
(v). Já os di- e triésteres de fosfato preferem um mecanismo concertado de caráter associativo, no entanto, a natureza associativa é maior nos triésteres, caminho (iv), enquanto os diésteres tendem por um caminho mais sincrônico, entre (iii) e (iv).<sup>42</sup>

## 1.2.2 Catálise inter- e intramolecular

Muitas reações de desfosforilação ocorrem com auxílio de múltiplas catálises, como nucleofílica e ácida-básica geral. Os modelos de reações inter- e intramoleculares constituem ferramentas interessantes para esclarecer essas formas de catálise. A distinção entre elas está na localização dos grupos funcionais reativos, isto é, em reações intramoleculares, os grupos reativos estão ancorados na mesma molécula, enquanto nas reações intermoleculares, os grupos funcionais específicos reagem através de moléculas diferentes.<sup>56</sup> Em geral, reações intramoleculares são mais eficientes que as intermoleculares, justificado principalmente pela teoria espaço-temporal de Menger,<sup>57</sup> que atribui fatores como ângulo, entropia e proximidade para a eficiência catalítica intramolecular.

### 1.2.2.1 Catálise ácida-básica geral

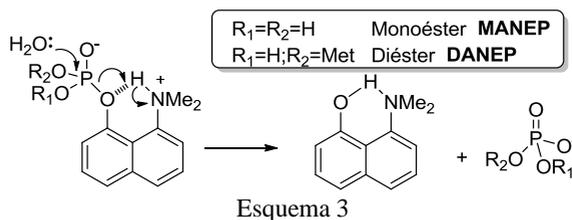
As catálises ácida e básica geral podem aumentar surpreendentemente as velocidades das reações de desfosforilação, Esquema 2. Elas estão presentes em quase todos os sítios ativos de enzimas, em geral, exercida pelos diferentes resíduos de aminoácidos.<sup>58</sup> Na catálise básica-geral, uma base (B:) assiste o ataque de um nucleófilo (Nu-H) sobre o fósforo, abstraindo um próton e assim, aumenta a nucleofilicidade. Já na catálise ácida-geral, uma espécie ácida (HA) ativa o grupo de saída transferindo um próton, tornando-o um melhor grupo de saída.



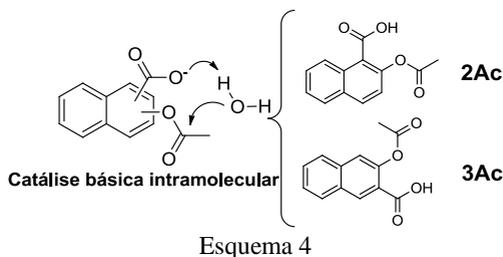
A catálise básica geral pode ocorrer em reações intermoleculares, tal como observado nas reações de hidrólise dos diésteres e triésteres de diaril fosfatos.<sup>53,55</sup> Valores negativos de entropia ( $\Delta S^\ddagger \sim -30$  e.u.) associados a significativos efeitos isotópicos de solvente ( $k_H/k_D \sim 2.0$ ) indicam, que por exemplo, o ataque da água sobre o diéster bis-(2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) é assistido por uma segunda molécula de água, mecanismo esperado quando a base que catalisa tem menor basicidade que o grupo de saída.<sup>53</sup>

Exemplos mais expressivos de catálise ácido-básica geral em reações de desfosforilação estão baseados em modelos intramoleculares, que aproximam eficientemente os grupos reativos.<sup>59</sup> De fato, observar o efeito da transferência de próton, principalmente na catálise ácida, é facilitado em sistemas intramoleculares, como por exemplo, no bis-2-carboxifenil fosfato<sup>60</sup> ou nos derivados de 8-dimetilamino-naftil-1-fosfato.<sup>61</sup>

A catálise ácida nos derivados de 8-dimetilamino-naftil-1-fosfato (MANEP e DANEP do Esquema 3) está entre os maiores efeitos reportados na literatura para modelos de catálise ácida intramolecular.<sup>61</sup> Isso se deve pela forte ligação de hidrogênio formada entre o grupo vizinho  $\text{NH}^+$  e o grupo de saída, facilitando sua saída e causando incrementos na reação de hidrólise de até  $10^6$  vezes, comparada com a reação na ausência do catalisador ácido.



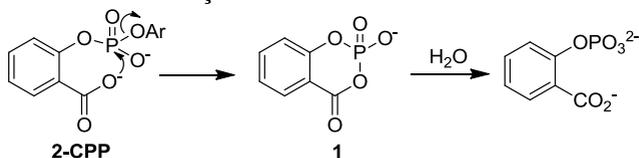
Outros modelos elegantes de catálise básica intramolecular são os ésteres derivados de ácidos hidróxi-naftóicos, 2-acetóxi-2-naftóico (2Ac) e 3-acetóxi-2-naftóico (3Ac), Esquema 4.<sup>62</sup> Nesses, observou-se incrementos significativos de até 430 vezes, do efeito da catálise intramolecular, comparado com o acetato de fenila.



### 1.2.2.2 Catálise nucleofílica

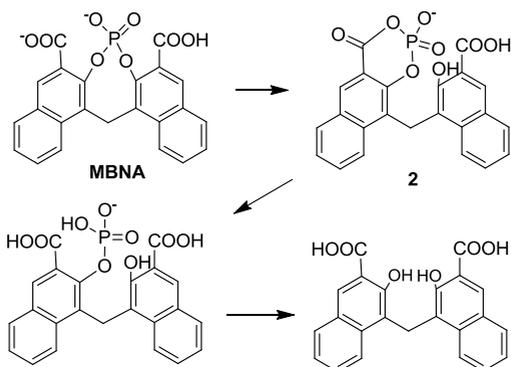
Diversos estudos de reações intra- e intermoleculares de ésteres de fosfato com agentes nucleofílicos têm sido reportados.<sup>55,61,63-66</sup> No entanto, um dos maiores desafios para compreender mecanisticamente esses tipos de reações é a detecção de intermediários fosforilados suficientemente estáveis.<sup>51</sup> Os mecanismos dessas reações também podem ser descritas pelo diagrama de More O'Ferrall-Jencks (Figura 5). Seu caráter concertado, associativo ou dissociativo são determinados pela dependência das reações com a natureza do grupo de saída ( $\beta_{lg}$ ) e do nucleófilo ( $\beta_{nuc}$ ).<sup>67,68</sup> É importante salientar que nem todas as reações de desfosforilação com nucleófilos podem ser classificadas como catálise nucleofílica, como normalmente ocorre nos sistemas enzimáticos, pois na catálise, o catalisador nucleofílico deve se regenerar ao fim da reação, o que nem sempre é observado em estudos de reações modelos.

Modelos clássicos de catálise nucleofílica envolvem reações intramoleculares com o grupo carboxilato. Por exemplo, na reação de hidrólise do 2-carboxifenil fosfato (2-CPP, Esquema 5),<sup>66</sup> o grupo carboxilato causa incrementos na velocidade de até  $10^7$  vezes, comparado com a reação na sua ausência. Os resultados sugerem que a reação deve passar por um intermediário cíclico (1), sendo sua quebra a etapa determinante da reação.



Esquema 5

Existem modelos que podem combinar catálise nucleofílica e ácida-geral, por exemplo, a reação de hidrólise do 4,4'-metilenobis(ácido 2-hidróxi-2-naftóico), MBNA, ilustrado no Esquema 6.<sup>65</sup> Neste caso, observou-se que enquanto um carboxilato ataca nucleofílicamente o fósforo, formando o intermediário cíclico 2, o outro carboxilato atua como catalisador ácido que pode auxiliar de duas formas: (i) formar ligação de hidrogênio com o oxigênio aniônico do grupo fosfato, facilitando o ataque nucleofílico no fósforo; ou (ii) assistir o grupo de saída, através de uma transferência de próton. Essas formas de atuação vão depender se no estado de transição a etapa crítica, é o ataque nucleofílico ou a liberação do grupo de saída, o que ainda não está totalmente elucidado. Apesar disso, os incrementos de velocidade causado pelos dois grupos carboxilatos impressionam:  $10^4$  e  $10^9$  vezes, comparado com o análogo com um carboxilato e com o difenil fosfato, respectivamente.<sup>69</sup>



Esquema 6

Reações intermoleculares que exibem catálise nucleofílica são dificilmente distinguidas, pois exigem uma detecção minuciosa de intermediários e produtos, que é amparada e, conseqüentemente limitada pela evolução nas técnicas de detecções. Poucos estudos de fato efetivaram tais detecções, se atendo mais a hipóteses mecanísticas. Por exemplo, reações de diversos ésteres de fosfato com diferentes aminas estão reportados na literatura,<sup>55,70-72</sup> e alguns dados para derivados do 2,4-dinitrofenil fosfato estão resumidos na Tabela 1. Comparar as reações de desfosforilação com aminas não é fácil. Observou-se que algumas aminas, preferencialmente as secundárias, atacam majoritariamente o carbono aromático, levando aos produtos derivados



aminas formam produtos fosforilados pouco estáveis,<sup>72</sup> podendo se decompor e regenerar o nucleófilo de partida ou ainda, levar a outros caminhos reacionais (item 1.2.3). Além disso, o ataque nucleofílico pode ocorrer simultaneamente no fósforo ou no carbono aromático, e alguns estudos estimaram a porcentagem de quebra P-O, baseados em estudos colorimétricos de absorvidade,<sup>72,75</sup> ou ainda em estudos com etileno glicol,<sup>72</sup> que não são totalmente conclusivos, pois podem apresentar alta imprecisão ou gerar produtos indesejados paralelamente.<sup>76</sup> Não obstante, estudos mais detalhados são necessários para esclarecer mecanisticamente estas reações.

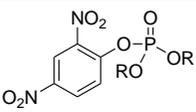
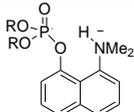
### 1.2.3 Reações com alfa-nucleófilos

As reações de desfosforilação com nucleófilos detentores do efeito alfa tem sido largamente estudados devido a sua peculiar e elevada reatividade, comparada com aminas de mesma basicidade. De maneira geral,  $\alpha$ -nucleófilos representam a classe de moléculas que apresentam pares de elétrons livres no átomo adjacente ao átomo que ataca nucleofilicamente, por exemplo, hidroxilamina, hidrazina e ácido hidroxâmico.<sup>42</sup> Os incrementos de velocidade causados pelos  $\alpha$ -nucleófilos podem chegar a  $10^8$  vezes, comparada com a respectiva reação em água.<sup>64</sup> As causas para essa excepcional reatividade são complexas e ainda não estão totalmente esclarecidas. Elas têm sido interpretadas principalmente em função da: (i) desestabilização do estado fundamental, onde a repulsão eletrostática entre os elétrons do átomo adjacente e centro nucleofílico torna o  $\alpha$ -nucleófilo instável e portanto mais reativo;<sup>77</sup> (ii) estabilização do estado de transição, causado pela transferência de elétron, catálise intramolecular e maior polarizabilidade do  $\alpha$ -nucleófilo. Sugere-se um estado de transição mais adiantado, onde a ligação nucleófilo-substrato está mais avançada do que com nucleófilos normais;<sup>78</sup> (iii) maior estabilidade termodinâmica do produto;<sup>79</sup> (v) efeito do solvente na magnitude do efeito alfa<sup>80</sup>. Algumas reações não são facilmente explicadas pelos fatores descritos acima, e assim, com estudos computacionais mais recentes, outro fator mostrou-se determinante na magnitude do efeito alfa, a energia de deformação, definida como a energia eletrônica necessária para transformar os reagentes no estado de transição.<sup>81</sup>

As reações com hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) estão entre as reações nucleofílicas mais descritas na literatura,<sup>61,63,64,82,83</sup> principalmente pelo seu caráter ambidentado, apresentando dois sítios nucleofílicos: os

átomos de oxigênio e nitrogênio. Nas reações de desfosforilação, normalmente o oxigênio é fosforilado, visto que as reações via ataque “O” são favorecidas com centros eletrofílicos mais duros, tal o fósforo.<sup>63</sup> A magnitude do efeito alfa da NH<sub>2</sub>OH (comparado com aminas primárias de mesmo pK<sub>a</sub>) para algumas reações de desfosforilação estão resumidas na Tabela 2,<sup>63</sup> que mostram que a reatividade é dependente da natureza do substrato. Espera-se que os derivados de 8-dimetilamônio-1-naftol apresentem uma menor reatividade, todavia, eles apresentam um efeito alfa pronunciado e comparável aos derivados de 2,4-dinitrofenol, que pode ser justificado pela eficiente catálise ácida promovida pelo grupo dimetilamônio.<sup>83</sup> No entanto, justificar a menor magnitude do efeito alfa nos derivados do 8-dimetilamônio-1-naftol não parece simples, visto que os derivados apresentados na Tabela 2 possuem pK<sub>a</sub> de grupo de saída similares (~4), e essa diferença pode se dever à importante catálise intramolecular que pode ofuscar efeitos alfa pronunciados. Ainda assim, para todos os derivados apresentados, o efeito alfa cresce na ordem triéster>diéster>monoéster, reflexo do aumento na dureza do centro eletrofílico, que depende da natureza dos substituintes.

Tabela 2 – Magnitude do efeito alfa em reações da NH<sub>2</sub>OH com derivados do 2,4-dinitrofenol e 8-dimetilamônio-1-naftol.<sup>63</sup> \*<sup>a</sup>

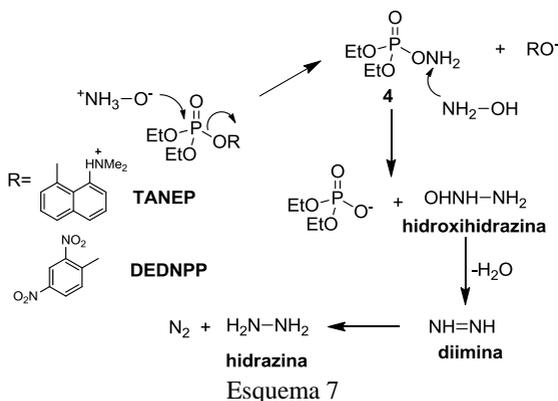
		
Monoéster	<10	3
Diéster* <sup>b</sup>	70	25
Triéster* <sup>c</sup>	700	100

\*<sup>a</sup> Estimativas baseadas na comparação com reações análogas com aminas primárias de mesmo pK<sub>a</sub>; \*<sup>b</sup> ArO-PO<sub>2</sub>OMe; \*<sup>c</sup> ArO-PO<sub>2</sub>(OEt)<sub>2</sub>

A atuação nucleofílica de NH<sub>2</sub>OH preferencialmente pelo átomo de oxigênio nas reações de desfosforilação, está fortemente embasada por diversas evidências cinéticas,<sup>61,84,85</sup> além da detecção de intermediários chaves. Ainda, a caracterização do cristal zwitteriônico de óxido de amônia obtida de uma solução de (NH<sub>2</sub>OH). HCl confirma que a espécie <sup>+</sup>NH<sub>3</sub>O<sup>-</sup> deve ser a forma reativa da hidroxilamina.<sup>86</sup> Essa espécie, apesar de não constituir teoricamente um □-nucleófilo, pode acelerar as reações pela transferência de próton do grupo <sup>+</sup>NH<sub>3</sub>, favorecendo assim, termodinamicamente, a reação.

Vale ressaltar que para a série de ésteres derivados do 8-dimetilamônio-1-naftol, o ataque nucleofílico da  $\text{NH}_2\text{OH}$  ocorre exclusivamente no átomo de fósforo,<sup>83</sup> enquanto para os derivados do 2,4-dinitrofenol, observa-se um percentual considerável do ataque nucleofílico no carbono aromático (por exemplo, na reação com etil-2,4-dinitrofenil fosfato EDNPP, tem-se 60% de ataque no átomo de fósforo).<sup>63</sup>

Para complementar a discussão do mecanismo das reações mostradas na Tabela 2, um estudo metuculoso utilizando técnicas de RMN, UV-Vis e cálculos computacionais para reações de triésteres de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol (dielil 2,4-dinitrofenil fosfato, DEDNPP)<sup>82</sup> e 8-dimetilamônio-1-naftol (dielil 8-(*N,N*-dimetilamino)-1-naftil fosfato (TANEP)<sup>83</sup> com  $\text{NH}_2\text{OH}$  evidenciou o caminho reacional resumido no Esquema 7. Observou-se que essas reações ocorrem com ataque exclusivo no fósforo pela espécie  $^+\text{NH}_3\text{O}^-$ , formando um produto fosforilado (4) que não foi detectado pois é atacado por outra molécula de  $\text{NH}_2\text{OH}$  formando hidroxihidrazina que rapidamente forma a diimina, a qual reage formando hidrazina e  $\text{N}_2$ . Essa interpretação reacional é consistente com a detecção da diimina através da redução do ácido fumárico para succínico e pela identificação da hidrazina pelo método de Watt e Chrisp.<sup>87</sup> Cálculos computacionais complementam esse estudo e apontam favoravelmente para um estado de transição assistido por uma transferência de próton do grupo  $^+\text{NH}_3$ .<sup>83</sup>



Uma forma interessante de aplicar os conhecimentos envolvendo reações de desfosforilação com  $\text{NH}_2\text{OH}$  é na mutagênese do DNA,<sup>88</sup> e estudos mostram que  $\text{NH}_2\text{OH}$  é um agente mutagênico altamente específico,<sup>89</sup> sendo um dos reagentes mais utilizados na obtenção de genes mutantes. Isso tem sido aplicado no mapeamento genético de bactérias, na tentativa em decifrar os mecanismos da resistência a drogas que as bactérias adquirem.

### 1.2.4 Catálise micelar

Dentro do contexto de buscar ferramentas reacionais que aceleram eficientemente reações de desfosforilação, a catálise micelar tem norteado grande potencial nesta área. As micelas constituem agregados supramoleculares, formadas por moléculas que apresentam uma cadeia apolar ligada a uma cabeça polar, e que podem se auto-organizar, levando a diferentes estruturas micelares, dependendo da polaridade do meio (solvente). Por exemplo, em meio aquoso, usualmente tem-se a micela na forma esférica. As micelas podem ser classificadas como catiônica, aniônica, zwitteriônica ou neutra, que vai depender da natureza do grupo polar das unidades micelares. Assim, quando o grupo polar é trimetilamônio ou sulfato, tem-se uma micela catiônica ou aniônica, respectivamente. De maneira geral, os sistemas micelares são considerados homogêneos. Entretanto, autores têm descrito este tipo de sistema como microheterogêneo, contendo duas pseudofases, aquosa e micelar.<sup>90</sup>

As estruturas organizadas micelares constituem uma espécie de “microreator”, que pode acelerar significativamente a velocidade de algumas reações. Isto porque, devido à peculiar química da micela, ela consegue atrair reagentes por forças hidrofóbicas e eletrostáticas,<sup>91</sup> e esta aproximação mais eficaz dos reagentes, torna a reação em questão mais eficiente.<sup>92</sup> O interesse nos estudos com micelas é avaliar o quanto a aproximação dos reagentes influencia a velocidade da reação estudada, e assim mimetizar o efeito de proximidade das enzimas naturais. Isto porque, o vínculo entre catálise micelar e enzimática está baseado na presença de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas em ambas as estruturas, supramolecular e macromolecular, que se beneficiam de efeitos catalíticos regidos por aproximação hidrofóbica e eletrostática.<sup>90</sup> A Figura 5 ilustra uma representação simples de como pode ocorrer a catálise micelar, no caso de micela catiônica e aniônica. Em ambos os casos, os reagentes podem ser atraídos por forças hidrofóbicas e, adicionalmente, pode ocorrer uma atração eletrostática das espécies

iônicas do meio. Esta atração eletrostática favorece reações que envolvem reagentes iônicos que possuem carga oposta ao da micela.

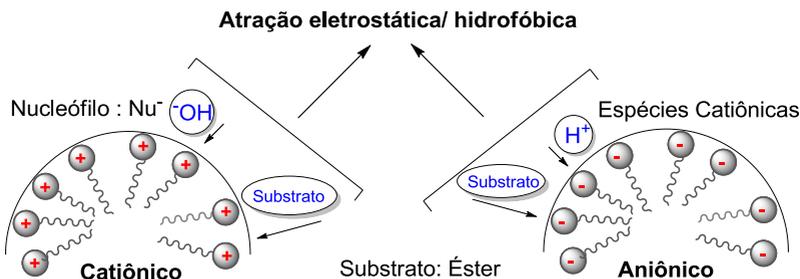
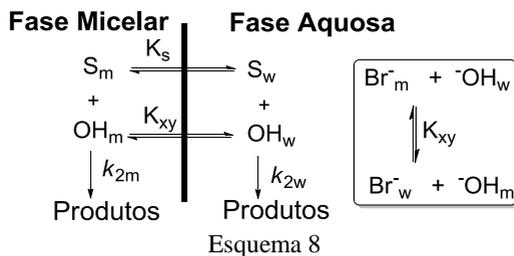


Figura 5 – Representação da catálise micelar por micela catiônica e aniônica.

Como seria de se esperar, inúmeros estudos tem focado em avaliar o efeito da catálise micelar em reações de desfosforilação.<sup>93</sup> Diversos autores têm evidenciado uma catálise micelar bastante significativa em reações de hidrólise alcalina de alguns ésteres de fosfato.<sup>94-96</sup> Os incrementos observados nas velocidades das reações geralmente não ultrapassam 50 vezes, mas se mostram excepcionalmente significativos por se tratar de um efeito de apenas aproximação, sem envolver quebra e/ou formação de ligações.<sup>94</sup> Por exemplo, na reação do BDNPP com hidróxido, com brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr), tem-se um incremento na velocidade que chega a 30 vezes, comparado com a reação em água.<sup>95</sup>

Diversos modelos cinéticos têm sido propostos para descrever a catálise micelar, que geralmente envolvem um tratamento matemático complexo, com inúmeras variáveis. Entre eles, tem-se o modelo cinético baseado na teoria de pseudofase com troca iônica,<sup>97</sup> que por exemplo, descreve elegantemente as reações de hidrólise alcalina de ésteres de fosfato na presença de micela catiônica. Esse modelo se baseia na partição dos reagentes na pseudofase aquosa e micelar, tal mostrado no Esquema 8, onde se deve considerar duas reações distintas: (i) uma na fase aquosa ( $k_{2w}$ ); e (ii) outra na fase micelar ( $k_{2m}$ ). O substrato é incorporado na fase micelar dado pelo equilíbrio  $K_s$  e os íons hidróxidos trocam com os contra-íons da micela (no caso, o brometo  $Br^-$ ), que depende do equilíbrio  $K_{xy}$ . As constantes  $K_s$  e  $K_{xy}$  são distintas para cada tipo de reação e natureza da micela e seu contra-íon.<sup>98</sup> Desta forma, aliando as implicações descritas no Esquema 8 com as equações tradicionais de cinética química, é possível deduzir todas as equações de

velocidade que descrevem este tipo de reações, que serão integralmente apresentadas e discutidas no item 4.5.

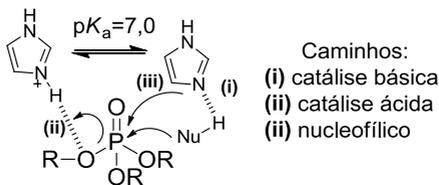


### 1.3 A QUÍMICA DO IMIDAZOL E SUA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

A atraente química do imidazol, tão explorada em diversos processos biológicos na forma do resíduo histidina, tem permeado crescente interesse em seu estudo em reações de desfosforilação. A participação do grupo imidazol é fundamental em processos de sinalização e regulação celular,<sup>99</sup> quebra do RNA,<sup>100</sup> obtenção de energia envolvendo ATP,<sup>101</sup> entre outros.<sup>50</sup>

O imidazol constitui uma amina aromática com dois nitrogênios, sendo que um contribui com o par de elétrons na aromaticidade, e o outro pode ionizar com  $pK_a$  em torno de 7,0, menos básico que o análogo não aromático, imidazolina ( $pK_a^{+NH} = 11$ ), no entanto, mais básico que piridina ( $pK_a^{+NH} = 5,5$ ) ou pirrol ( $pK_a^{+NH} = -4$ ). A aromaticidade é conhecida por diminuir a basicidade de aminas devido ao seu caráter retirador de elétrons (*e.g.* piperidina tem  $pK_a$  11,2, maior que piridina). Já a crescente basicidade na ordem imidazol>piridina>pirrol pode ser explicada da seguinte maneira: (i) no pirrol, o menor  $pK_a$  é devido a deslocalização do par de elétrons livre do nitrogênio no anel aromático deixando-o deficiente em elétrons e assim, mais ácido; (ii) a maior acidez da piridina se deve por esta apresentar apenas um nitrogênio para estabilizar a carga positiva.<sup>102</sup> Assim, em meio neutro aquoso, o imidazol está 50% protonado, consequência de sua capacidade em deslocalizar a carga igualmente entre os dois nitrogênios.<sup>103</sup> Essa peculiaridade confere ao imidazol uma multifuncionalidade nas reações de desfosforilação biológicas (Esquema 9), pois pode atuar como (i) catalisador básico, quando está desprotonado e auxilia o ataque de um nucleófilo; (ii) catalisador ácido, quando está protonado e assiste o grupo de saída;<sup>100</sup> e ainda (ii)

nucleófilo, atacando diretamente o fósforo, levando a formação de um fosforamidato.<sup>99</sup>

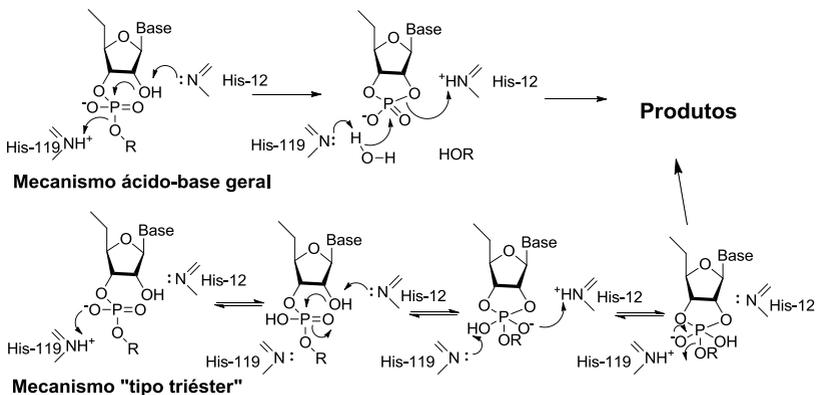


Esquema 9

### 1.3.1 Ribonucleases

A histidina exerce papel fundamental no ciclo catalítico das ribonucleases (RNase A), responsáveis pela quebra do RNA. A RNase A, uma enzima pequena com cerca de 100-150 aminoácidos,<sup>100</sup> cuja importância é demonstrada pelo fato de ser a primeira enzima que teve seus aminoácidos seqüenciados,<sup>104</sup> bem como seus sítios catalíticos identificados. A forma de atuação da RNase A está principalmente relacionada aos resíduos His12 e His119 no sítio ativo principal.

O mecanismo catalítico das RNase A vem sendo evidenciado por diversos estudos e duas formas de catálise são propostas para a RNase A envolvendo os grupos imidazol, um mecanismo ácido-base geral concertado ou por um mecanismo “tipo triéster”, formando um intermediário tipo fosforano, Esquema 10. No mecanismo clássico ácido-base geral,<sup>100</sup> a reação ocorre em duas etapas, de transfosforilação, seguida da hidrólise do intermediário cíclico. Na primeira etapa, a His-12 atua como catalisador básico geral, enquanto His-119 como ácido-geral. Na etapa da hidrólise, o papel das histidinas é reverso, His-119 ativa o ataque da água por catálise básica geral e a His-12, como ácido geral, protona o grupo de saída. Diversas evidências fundamentam esse mecanismo, como perfil de pH em forma de sino, e dados cristalográficos, mas outros aspectos sugerem um mecanismo “tipo triéster”. Nesse mecanismo, acredita-se que a geometria dos grupos imidazol favorecem a protonação do oxigênio da fosforila levando a um estado de transição similar (ou intermediário) semelhante ao de reações de triésteres.<sup>105</sup>



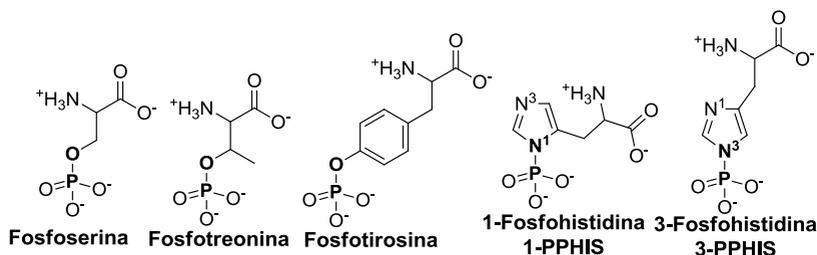
Esquema 10

Existe uma grande discussão<sup>100,106</sup> em torno da forma de atuação das RNase A, no entanto, o mecanismo clássico ácido-base geral é o mais aceito e bem fundamentado. Por exemplo, análises de tio-efeitos,<sup>106</sup> com a substituição do oxigênio da fosforila por enxofre não apresenta o efeito esperado, de reduzir a velocidade de reação, como nas reações de triésteres de fosfato. Ainda, efeitos cinéticos isotópicos da clivagem com <sup>18</sup>O são inconsistentes com o mecanismo “tipo tríéster”.<sup>107</sup>

Descobertas recentes mostram que as RNase A também podem ser utilizadas no diagnóstico e tratamento de muitas doenças, como câncer. Resultados mostram que na presença de uma doença, quantidades de RNases aumentam significativamente nos fluidos humanos, ou extratos de células, e a presença das mesmas pode ser regulada por ativadores ou inibidores. Assim, muitas dessas moléculas regulatórias podem amparar o desenvolvimento de novas drogas para tratar doenças.<sup>108</sup> Por exemplo, a citotoxicidade das RNase A às células cancerígenas tem grande potencial como agente terapêutico, pois além de causar menores efeitos colaterais que os agentes quimioterápicos comumente utilizados, como onconase, também tem melhor aceitação biológica, pelo fato de serem naturais.<sup>3</sup>

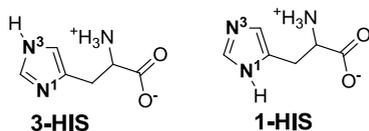
### 1.3.2 Fosfohistidinas

As reações de fosforilação e desfosforilação com proteínas são componentes chaves em inúmeros processos de sinalização e regulação celular<sup>109</sup> onde participam duas classes de enzimas, as (i) kinases, responsáveis pela transferência do grupo fosforila de moléculas altamente energéticas, como ATP; e (ii) fosfatases, que catalisam a hidrólise de monoésteres de fosfato.<sup>50</sup> Essa classificação pode ser subdividida pela natureza dos intermediários fosforilados, de acordo com os aminoácidos envolvidos, naqueles com *O*-fosforilação, gerando monoésteres de fosfato, como fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina, e *N*-fosforilação. Esta última leva a um fosforamidato, como a 1-fosfohistidina (1-PPHIS) e 3-fosfohistidina (3-PPHIS), Esquema 11.<sup>110</sup>



Esquema 11

Implícito pela química do imidazol,<sup>102</sup> a histidina pode assumir duas formas tautoméricas distintas, 3-histidina (3-HIS) e 1-histidina (1-HIS) tal mostrado no Esquema 12. Isto porque apresenta um substituinte, que definirá qual nitrogênio será fosforilado, sendo que a fosforilação dos isômeros 3-HIS e 1-HIS levam a 1-PPHIS e 3-PPHIS, respectivamente (Esquema 11).<sup>111</sup> Estudos mostram que o isômero 3-HIS é preferido nos sistemas biológicos,<sup>112</sup> todavia, existem casos onde o isômero 1-HIS é favorecido.<sup>113</sup> Concomitante a estas observações, relatos acerca da síntese e caracterização da 1-PPHIS e 3-PPHIS mostram que a 1-PPHIS é menos estável e pode se converter na 3-PPHIS.<sup>114</sup> A preferência nos sistemas biológicos pelo isômero 3-HIS, que leva a instável 1-PPHIS faz jus ao papel das fosfohistidinas de promover reações de fosforilações reversíveis e rápidas.



Esquema 12

Estudos esclarecendo o envolvimento mecanístico dos aminoácidos *O*-fosforilados em sistemas biológicos está vastamente reportado na literatura,<sup>115</sup> enquanto o interesse pelos *N*-fosforilados só surgiu mais recentemente com o advento de técnicas que permitissem detectar os fosforamidatos.<sup>116</sup> Apesar de estudos mostrarem que 50% dos fosfoaminoácidos nos vertebrados estão presentes na forma *O*-fosforilada, análises mais recentes evidenciam que 6% de todos os fosfoaminoácidos estão presentes na forma de fosfohistidinas,<sup>110</sup> justificando a importância dos aminoácidos *N*-fosforilados.

Termodinamicamente, as fosfohistidinas apresentam um  $\Delta G^\circ$  de hidrólise bem negativo (-12 a -14 kcal/mol), favorecendo o equilíbrio na direção do estado não fosforilado. Assim, a ligação fosforamidato é altamente energética e tende sempre em transferir o grupo fosforila para outras moléculas, peça chave em processos de sinalização.<sup>111</sup> Fosfohistidina livre é altamente instável em meio ácido, por exemplo, em solução HCl 1M, 1-PPHIS tem  $t_{1/2}$  de 18 s, enquanto que em pH 7 e 8, o  $t_{1/2}$  chega a 1min e 34 min, respectivamente.<sup>117</sup>

Por muito tempo as fosfohistidinas eram indetectáveis devido à alta labilidade da ligação P-N em solução ácida, meio reacional mais habitual nas análises de fosforilação de proteínas. Os aminoácidos *O*-fosforilados são resistentes ao tratamento ácido, no entanto, relativamente instáveis em meio básico, visto que em contraste com a hidrólise básica, a hidrólise ácida das ligações P-O é mais lenta que das ligações peptídicas. O quadro é inverso para os fosforamidatos, pois estes são mais estáveis em meio básico. Assim, para separar e identificar concretamente os diferentes fosfoaminoácidos, novas técnicas usando cromatografia em camada delgada, resina de troca iônica, cromatografia em fase reversa, <sup>31</sup>P RMN e marcação com <sup>32</sup>P em proteínas, foram sendo implementadas,<sup>118</sup> e vem evidenciando a presença da fosfohistidinas. Nesse contexto, técnicas modernas como espectrometria de massas ESI-MS e MALDI-TOF-MS também têm se revelado importantes ferramentas.<sup>99</sup>

Estudos pioneiros de reações biológicas envolvendo fosfohistidinas foram reportados em processos de sinalização nas bactérias que ocorrem através de reações consecutivas de fosforilação, causadas por estímulos externos como mudanças osmóticas e de temperatura ou também no nível de oxigênio, nitrogênio e fósforo.<sup>118</sup> Um dos processos mais compreendidos é o elegante “sistema de dois componentes” ilustrado na Figura 6, onde duas proteínas principais compõem sua estrutura, uma histidina kinase/sensor e uma proteína reguladora de resposta.<sup>99</sup> Essa forma de sinalização inicia com um estímulo externo que é detectado por um sítio sensorial que ativa o sítio da kinase para fosforilar uma histidina no sítio da dimerização, usando ATP como doador do grupo fosforila. A fosfohistidina transfere facilmente o grupo fosforila para um resíduo de aspartato do sítio regulatório da outra proteína reguladora de resposta, que então ativa seu sítio de efeito, responsável pela resposta celular, como mudança no movimento dos flagelos ou na transcrição.<sup>118</sup> Visto o pH ácido no meio intracelular e a natureza lábil das fosfohistidinas, sua desfosforilação não requer uma fosfatase e pode funcionar como um dispositivo de ligar/desligar.<sup>99</sup> O “sistema de dois componentes” também foi observado em alguns seres eucariontes, como plantas e leveduras, mas não há evidências de sua ocorrência em vertebrados, deste modo, seu estudo pode ser um potencial alvo no desenvolvimento de antibióticos.<sup>119</sup>

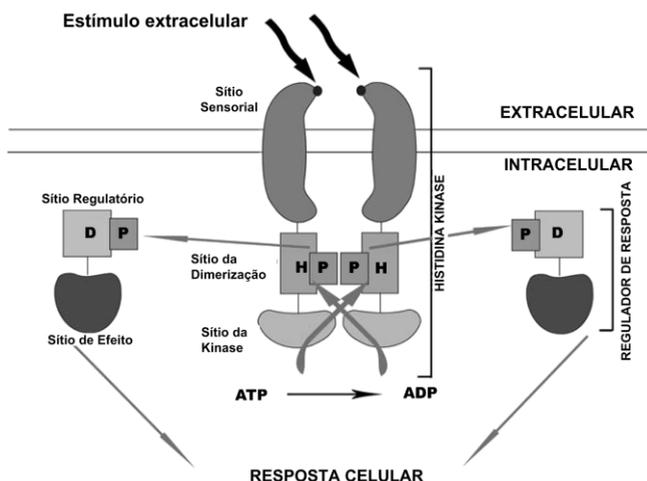
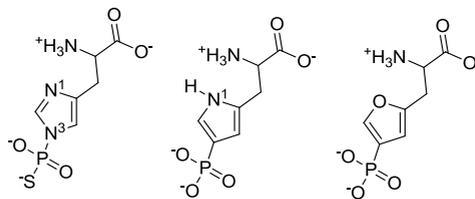


Figura 6 – Diagrama representativo de um típico “sistema de dois componentes” em bactérias.<sup>99</sup>

Análogo ao “sistema de dois componentes”, sistemas de multi-componentes também estão citados na literatura, que ocorrem com múltiplas e consecutivas fosforilações, cuja participação das fosfohistidinas é fundamental,<sup>120</sup> visto a formação da fosfohistidina ser altamente reversível, comparado com outros fosfoaminoácidos.<sup>121</sup>

Apesar de nas bactérias, a função das fosfohistidinas estarem bem esclarecidas, a compreensão do seu papel nos vertebrados, é enigmático, cujo esclarecimento tem alcançado sucesso apenas nas últimas décadas.<sup>99,109</sup> Nos vertebrados, a primeira enzima onde se detectou a participação da 1-PPHIS e 3-PPHIS foi a difosfato nucleosídeo kinase em 1968,<sup>122</sup> mas foi em meados de 1990 que se postulou que a formação e quebra de fosfohistidinas nos vertebrados estaria efetivamente envolvida em processos de sinalização importantes, *e.g.* G-proteínas.<sup>123</sup> Ainda assim, foi só em 2003 que se confirmou esse postulado, pela caracterização estrutural da kinase e fosfatase, envolvidas no processo.<sup>124</sup> Portanto, a ciência da fosfohistidina é relativamente recente e requer muita reflexão e esclarecimento, principalmente no que se refere às reações que ocorrem em nossos sistemas biológicos (*i.e.* vertebrados). Não obstante, os mecanismos de sinalização via reações de fosforilações consecutivas de proteínas parecem ser universais, ocorrendo tanto em seres inferiores (*e.g.* procariontes e eucariontes) bem como nos vertebrados, o que pode complementar estudos quanto a evolução do ser humano, e como nos adaptamos a essa herança ancestral de sistemas regulatórios.<sup>125</sup>

Uma importante ferramenta de pesquisa na química das fosfohistidinas é obter essas moléculas sinteticamente e estudá-las detalhadamente. A síntese da 1-PPHIS e 3-PPHIS está relatada na literatura, porém os resultados mostram que a 1-PPHIS se forma e rapidamente é convertida para 1,3-difosfohistidina que após (1-2 dias) forma a 3-PPHIS, isômero mais estável.<sup>114,117</sup> A dificuldade em obter esses isômeros e estudá-los individualmente é reflexo da instabilidade da ligação de fosforamidato e assim, pesquisadores tem procurado sintetizar análogos de fosfohistidinas mais estáveis, onde se tem procurado trocar a instável ligação P-N por P-C ou P-S, tal mostrado no Esquema 13.<sup>99</sup> Estes análogos são consideravelmente mais estáveis que a fosfohistidina, no entanto possuem limitações para serem aplicados *in vivo*.<sup>99</sup>



Esquema 13

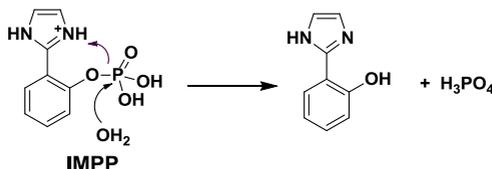
Anticorpos de fosfoaminoácidos representam importantes ferramentas na elucidação mecânica de sinalização celular, e já vem sendo reportados para fosfotirosina, mas, devido à instabilidade de fosforamidados, o desenvolvimento de anticorpos anti-fosfohistidina tem alcançado pouco avanço e continua um desafio.<sup>110</sup> Idealmente, dois anticorpos deverão ser projetados para discriminar entre 1-PPHIS e 3-PPHIS.<sup>99</sup>

A fosforilação reversível de proteínas regula muitos aspectos na vida celular, porém, uma fosforilação anormal pode ser causa ou consequência de muitas doenças, o que inspira projetar inibidores específicos como alvos no tratamento de câncer e doenças inflamatórias crônicas.<sup>126</sup> Nesse contexto, inibidores de quinase histidina tem atraído crescente interesse pois estudos mostram que a fosforilação da histidina está envolvida em vários processos de formação de câncer, por exemplo, a quinase histona H4 constitui um indicador de desenvolvimento de câncer no fígado.<sup>120</sup> Alguns supressores de quinases vêm sendo testados, todavia, a ausência de anticorpos de fosfohistidina atrasa significativamente os avanços nessa área.<sup>127</sup> A aplicação de inibidores de quinases também apresenta potencial no desenvolvimento de agentes antibacteriais e na compreensão do mecanismo de resistência a antibióticos das bactérias. De fato, estudos mostram que o “sistema de dois componentes” nas bactérias está envolvido na sinalização celular para interrupção de drogas e regula fatores de resistência, e vários inibidores promissores desses sistemas tem sido reportados.<sup>128</sup> Apesar desses relatos representarem testes laboratoriais, eles permeiam os alicerces para terapia bacteriana, cujo potencial já vem sendo reconhecido e testado pelas empresas farmacêuticas.<sup>127</sup>

### 1.3.3 Modelos miméticos contendo grupo imidazol

Dentro da área de estudo de moléculas que mimetizam particularidades enzimáticas, destacam-se os modelos contendo o grupo imidazol. Estes podem estar baseados em uma arquitetura molecular simples e pequena ou mais complexa, como sistemas macromoleculares. A modelagem com moléculas químicas simples constitui uma ferramenta importante na elucidação de mecanismos enzimáticos, por ser uma forma eficiente de estudar separadamente as diferentes catálises promovidas pelas enzimas.<sup>56</sup>

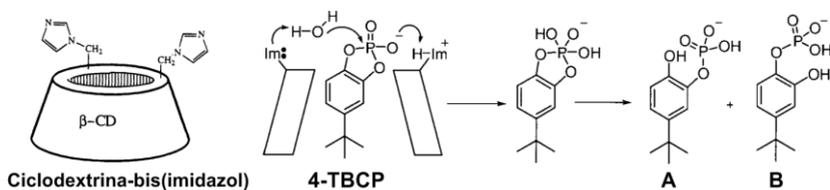
Neste contexto, tem-se estudado moléculas que aproximem o grupo fosforila ao grupo imidazol por interações intramoleculares, destacando-se, por exemplo, o monoéster 2-(2'-imidazolil)fenil fosfato (IMPP), Esquema 14. Resultados evidenciam que a hidrólise do IMPP é eficientemente amparada pelo grupo imidazol protonado, que atua como catalisador ácido, assistindo o grupo de saída.<sup>129</sup> O efeito da catálise ácida em IMPP chega até  $10^6$  vezes comparado com a hidrólise do análogo sem o catalisador imidazolil. Essa eficiência catalítica é similar à observada em outros sistemas intramoleculares com os derivados de 8-dimetilamônio-1-naftol 8-(*N,N*-dimetilamino)naftol,<sup>61</sup> no entanto, deve-se considerar que nesses sistemas o  $pK_a^{lg}$  do grupo de saída é 3,76, em contraste com o  $pK_a^{lg}$  de 7,85 para IMPP.



Esquema 14

Modelos enzimáticos baseados em macromoléculas, conhecidos como enzimas artificiais (synzymes), têm despertado grande interesse por mimetizar aspectos multifuncionais e geométricos das enzimas naturais.<sup>130</sup> Isto porque, a estrutura macromolecular permite ancorar vários grupos reativos, que cooperam com a funcionalidade hidrofóbica e altamente seletiva de suas cavidades.<sup>131</sup> Muitas enzimas artificiais descritas na literatura se beneficiam da estrutura de polímeros e ciclodextrinas.<sup>130</sup>

Um interessante modelo de RNase A foi proposto por Breslow e colaboradores,<sup>131,132</sup> onde grupos imidazol foram ancorados na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina, originando a ciclodextrina-bis(imidazol), Esquema 15. Evidências cinéticas para a hidrólise do 4-terc-butilcatecol fosfato (4-TBCP) na presença da ciclodextrina, sugerem que o mecanismo dessa reação deve prosseguir por uma catálise bifuncional ácido-básica geral dos grupos imidazol, tal ilustrado na Esquema 15.<sup>133</sup> Foi observada uma catálise de 120 vezes para a reação com a ciclodextrina funcionalizada, além de uma alta seletividade, maior que 99:1 para o isômero A (Esquema 15), em comparação com a hidrólise básica que leva a uma mistura dos dois produtos.<sup>105</sup>



Esquema 15

Outra classe interessante de modelos miméticos engloba os polímeros,<sup>130</sup> que apresentam inúmeras variáveis que podem repercutir em mudanças estruturais, que conseqüentemente afeta sua eficiência catalítica. Isto é, variações no peso molecular, na polidispersidade, na hidrofobicidade ou no grau de “cross-linking” de polímeros devem afetar diretamente sua forma de atuação,<sup>134</sup> e assim, otimizando esses parâmetros, torna-se mais fácil idealizar e projetar enzimas artificiais com propriedades específicas.<sup>135</sup> Por outro lado, como os métodos de síntese de polímeros e sua relação com os parâmetros citados acima não são completamente dominados, o emprego e a compreensão de enzimas artificiais poliméricas têm sido um desafio.

Klotz, I. M. e colaboradores<sup>136</sup> empregaram pela primeira vez a palavra “snyzyme” para uma classe de polímeros com grupos imidazol e dodecil ancorados na cadeia da polietilenoimina (PEI). Na Tabela 3 estão resumidos a eficiência catalítica da enzima artificial proposta na reação de hidrólise de ésteres de nitrofenila, e comparados com as constantes catalíticas da enzima natural  $\alpha$ -quimotripsina e do imidazol. O efeito observado para o polímero contendo grupos imidazolínios é 270 vezes maior que o observado para a reação com apenas imidazol. Isso está de acordo com o esperado, quando se compara a reatividade de grupos reativos independentes com eles ancorados em uma cadeia

polimérica, pois o polímero consegue aumentar a reatividade, devido a alguns efeitos, como a hidrofobicidade, que atrai reagentes para a vizinhança do grupo reativo.

Tabela 3 – Eficiência catalítica de diferentes catalisadores na reação de hidrólise de ésteres de nitrofenila.

	Constante catalítica $k$ ( $M^{-1} \text{min}^{-1}$ )
$\alpha$ -quimotripsina	10 000
Imidazol	10
PEI, 10% dodecil, 15% imidazol	2700

Algumas propriedades das macromoléculas biológicas são negligenciadas nos modelos artificiais poliméricos, como a monodispersidade, característica de macromoléculas que possuem unidades moleculares uniformes em termos de massas moleculares. Desta forma, obter modelos poliméricos catalíticos monodispersos tem sido o maior desafio.

#### 1.4 APLICAÇÕES E POTENCIALIDADES DOS ESTUDOS COM ENFOQUE NOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS

O estudo e compreensão da ação enzimática permeiam inúmeras aplicações e potencialidades na resolução de problemas da vida moderna e potencializam os avanços na biotecnologia, algumas das quais já foram brevemente delineadas anteriormente. Estudos que nos permitam entender os mecanismos de defesa, ação e sinergia do sistema biológico, sem dúvida, são armas poderosas para enfrentar diversos problemas, como doenças genéticas, resistência bacterial a antibióticos,<sup>26</sup> entre outros. Por outro lado, a forma como as enzimas agem tão eficientemente em condições tão amenas, tem inspirado sua aplicação na “química verde” em processos industriais. Dentro do contexto da proposta desse trabalho, na Figura 7 estão resumidos alguns tópicos relacionados às aplicações e potencialidades advindas com o estudo de modelos enzimáticos. Todos esses tópicos estão intimamente relacionados ao progresso no conhecimento profundo dos processos biológicos e o desenvolvimento de modelos miméticos.

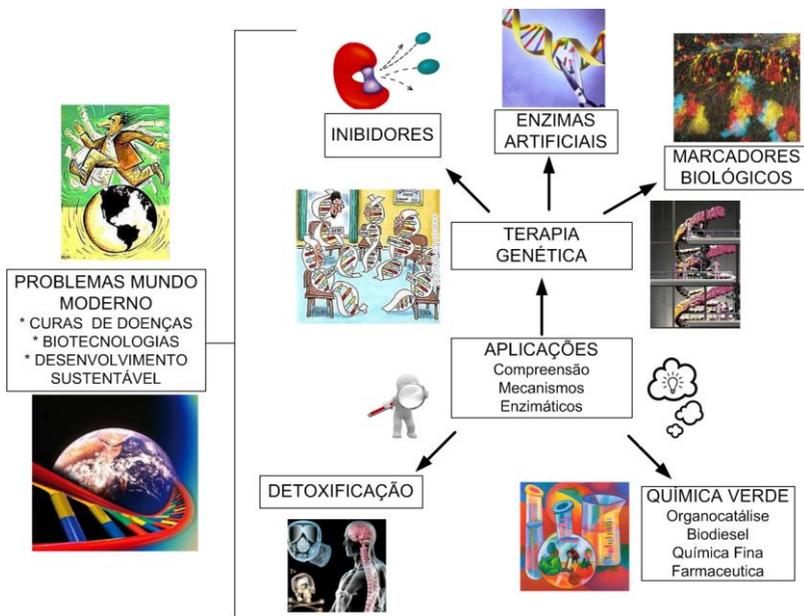


Figura 7 – Aplicações e potencialidades inerentes no estudo de processos biológicos.

A terapia genética engloba a área que trata radicalmente doenças humanas através da reparação genética dos genes danificados para promover as desejadas finalidades terapêuticas, preventivas ou diagnósticas. Com o sucesso do Projeto Genoma Humano, se tornou possível identificar concretamente todos os genes e mutações por trás de muitas desordens genéticas, e a correção precisa dessas anomalias é a maior meta dos pesquisadores interessados na terapia genética.<sup>137</sup> Ensaio clínicos usando terapia genética têm evidenciado sucesso no tratamento de imunodeficiências em mais de vinte crianças<sup>138</sup> e melhora na visão de pacientes com cegueira aguda.<sup>139</sup> Não obstante, apesar de muito atraente a terapia genética, sua aplicação está muito limitada, e ainda não está aprovada pelo FDA para uso clínico, pois em alguns tratamentos, pacientes adquiriram leucemia, levando até a morte.<sup>140</sup> Falta conhecer os reais efeitos colaterais dessa terapia, principalmente em longo prazo ou seja, avaliar como o corpo humano se adapta a essas mutações genéticas forçadas, e quão randômicas podem ser. Por outro lado, o sucesso na terapia genética deve crescer concomitantemente ao progresso na compreensão global dos fenômenos biológicos humanos e sua interação com agentes externos.

Dentro da área de terapia genética, vale ressaltar os recentes avanços na engenharia de proteínas, como os marcadores fluorescentes.<sup>141</sup> A importância de marcadores fluorescentes contemplou o Prêmio Nobel de Química 2008 aos pesquisadores Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Y. Tsien que descobriram e decifraram a proteína verde fluorescente (GFP), presente na água-vida. Mostraram a aplicação de marcadores derivados da GFP como ferramenta no monitoramento espaço-temporal de inúmeros fenômenos nos organismos vivos, como expressão genética, localização de proteína, dinâmica e interações entre proteínas, divisão celular, organização e replicação cromossômica, transporte intracelular, entre outros.<sup>142</sup>

A inibição enzimática é outra ferramenta essencial na terapia genética, haja vista que a eficiência enzimática está relacionada diretamente com a afinidade da enzima pelo estado de transição, portanto, a projeção de análogos de estado de transição tem sido explorado como hábeis inibidores de diversos processos enzimáticos.<sup>18</sup> A inibição enzimática tem se mostrado um interessante aparato em remediar/curar doenças, central na terapia genética, pois permite bloquear específicas reações indesejadas. Por exemplo, a descoberta que a enzima inosina 5'-monofosfato dehidrogenase (IMPDH) é amplificada em tumores e na proliferação cancerígena em tecidos, tornou essa enzima como interessante alvo no desenvolvimento de drogas inibidoras.<sup>143</sup> Inclusive, muitos inibidores de IMPDH têm sido utilizados comercialmente como imunossupressores e na quimioterapia antiviral, e estudos recentes tem evidenciado sua aplicação como drogas microbiais.<sup>144</sup>

Evidentemente, as enzimas artificiais também acrescentam inúmeras perspectivas na terapia genética. Elas podem atuar como tesouras moleculares para cortar, por exemplo, o DNA em sítios específicos, e assim eliminar pedaços genéticos danificados, que podem estar vinculadas a doenças ou anomalias.<sup>2</sup> Um tipo de tesoura molecular que tem mostrado muito potencial é a nuclease “dedo de zinco”, contendo uma nuclease ligada a uma estrutura molecular contendo cerca de 30 aminoácidos unida por um íon de zinco.<sup>2</sup> Seu funcionamento (Figura 8) se baseia na quebra do DNA de um gene específico danificado pela nuclease. Em seguida, uma sequência genética é fornecida pelo “dedo de zinco” permitindo que a célula regenere a tira cortada.<sup>145</sup> Usando essa abordagem, pesquisadores tem mostrado sucesso na modificação de genes em plantas e alguns insetos e mais recentemente as nucleases “dedos de zinco” se mostraram eficiente em testes com ratos no tratamento de HIV,<sup>146</sup> e inclusive os primeiros testes

clínicos em pacientes humanos com HIV iniciaram no primeiro semestre de 2009.<sup>147</sup> Ressalta-se que resultados positivos tem sido obtido em testes clínicos preliminares com pacientes portadores de diabetes.<sup>148</sup>

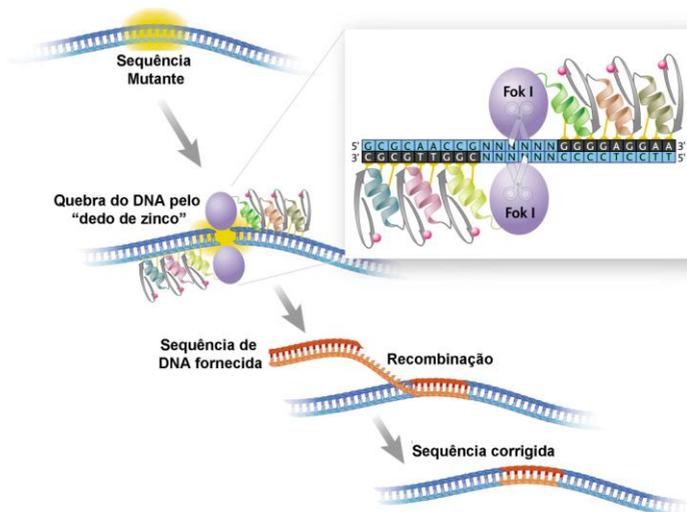


Figura 8 – Funcionamento da nuclease “dedo de zinco”, como ferramenta na terapia genética.

Outra aplicabilidade do conhecimento do funcionamento enzimático é a Química Verde. A Química Verde postula 12 princípios que devem ser seguidos no desenvolvimento de um processo químico, como por exemplo, (i) uso de reagentes catalíticos; (ii) economia de átomos e (iii) eficiência de energia, entre outros.<sup>9</sup> Algumas características idealizadas pela Química Verde estão contemplados nos sistemas enzimáticos, reafirmando sua importância e compreensão. Isto porque, as enzimas são catalisadores extremamente poderosos, que promovem elevada seletividade aliada a uma alta eficiência catalítica, onde se tem altos rendimentos reacionais, pois todos os reagentes são consumidos. Ainda, as enzimas atuam sob condições extremamente amenas (meio fisiológico), procurando sempre pelo caminho reacional que requer menor energia e ainda, gera produtos (resíduos) que podem ser reciclados e regenerados em outras etapas reacionais. Essa analogia, ainda que muito prematura, permite delinear vínculos da Química Verde com a catálise enzimática e exprime que as enzimas, além de uma lição de catálise são uma lição para a tecnologia limpa e o desenvolvimento sustentável. Ou seja, os benefícios que buscamos com a química limpa

estão expressas nas enzimas e como elas permeiam o “nosso” desenvolvimento sustentável.

Aliada aos alicerces da Química Verde, a área de enzimas artificiais também tem inspirado aplicações na síntese orgânica, pois permitem desenhar catalisadores com propriedades distintas para promover diversas reações orgânicas, muitas de interesse industrial. Usando enzimas artificiais, reações que exigem métodos sintéticos laboriosos podem ser poupados. Ainda, a projeção de funcionalidades, muitas vezes difíceis de obter por meios sintéticos usuais, como estereoseletividade é extremamente importante para o desenvolvimento da química assimétrica, que tem aplicabilidade nos setores industrial farmacêutico, agroquímico, química fina, entre outros.<sup>149</sup> Outra abordagem ousada com a Química Fina é na obtenção de biodiesel,<sup>150</sup> sendo que a produção deste combustível renovável por métodos enzimáticos<sup>151</sup> tem mostrado inúmeras vantagens, no entanto, sua aplicação industrial está limitada principalmente ao seu alto custo.<sup>152</sup>

Outra importante vertente inerente aos estudos de processos biológicos envolvendo reações de desfosforilação é a detoxificação química. Uma das grandes ameaças do mundo moderno são as armas químicas, destacando os agentes neurotóxicos, e a compreensão de sua forma de atuação e meios de combate constituem um dos maiores desafios nessa área. Os agentes neurotóxicos atuam fosforilando ou fosforilando a hidroxila de um resíduo de serina no sítio ativo da acetilcolinesterase, desativando-a. Essa enzima é responsável pela hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor, e seu acúmulo leva a um colapso no sistema nervoso.<sup>153</sup> De maneira geral, o processo de detoxificação química pode ocorrer pela degradação do agente neurotóxico, removendo seu caráter tóxico e formando intermediários e produtos menos tóxicos ou ativando a enzima, revertendo a fosforilação de seu resíduo.<sup>46</sup> A degradação de agentes neurotóxicos tem sido amplamente estudado, no entanto, sua aplicação está limitada ao conhecimento profundo das inúmeras reações paralelas que ocorrem e da obtenção de produtos sem toxicidade.<sup>153</sup> A ativação enzimática é outro recurso importante, principalmente como medida profilática e exemplos bem sucedidos envolvem reativação enzimática por oximas e derivados, todavia, sua aplicação terapêutica depende de compreender detalhadamente as interações das oximas no sítio enzimático e a possível reinibição enzimática por oximas fosforiladas.<sup>46</sup>

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral

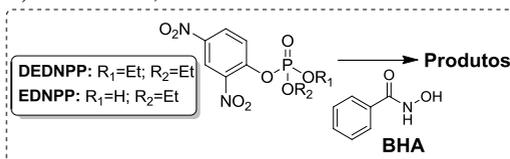
A proposta deste trabalho tem como objetivo geral estudar detalhadamente reações de desfosforilação nucleofílicas em sistemas modelos, usando moléculas químicas pequenas e estendendo seu mecanismo para uma arquitetura macromolecular, com foco para o grupo imidazol e o poderoso  $\alpha$ -nucleófilo, hidroxamato. Nesse contexto, pretende-se elucidar as catálises nucleofílica e ácida-básica-geral, importantes nos mecanismos enzimáticos.

### Objetivos específicos

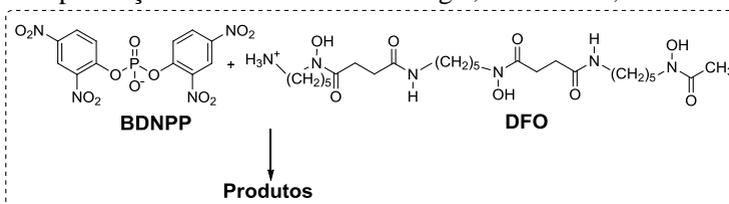
As estratégias específicas utilizadas para alcançar o objetivo geral deste trabalho estão subdivididas pelos estudos com (i) grupo hidroxamato e (ii) grupo imidazol, e apresentadas a seguir:

#### I. Grupo hidroxamato

- Sintetizar o  $\alpha$ -nucleófilo ácido benzohidroxâmico (BHA) e avaliar a reação de desfosforilação dos ésteres de fosfato dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (DEDNPP) e etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EDNPP) com BHA;



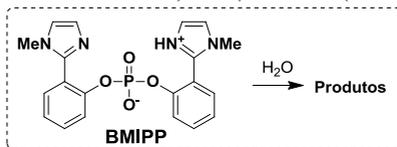
- Estudar a reação do diéster bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) com o fármaco desferoxamina (DFO), que possui três sítios de hidroxamatos, e avaliar seu poder nucleofílico, na presença e ausência dos metais  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ ;



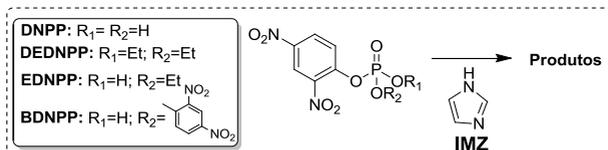
- Avaliar o potencial nucleofílico do DFO na quebra do DNA plasmídico e efeito sinérgico de  $Zn^{2+}$  na reação;

## II. Grupo imidazol

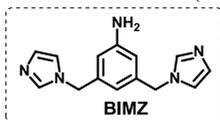
- Consoliar o mecanismo da reação de hidrólise bifuncional intramolecular de um diéster de fosfato bis-imidazolil: bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato (BMIPP).



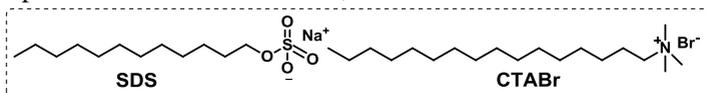
- Estudar as reações do imidazol (IMZ) com a série de ésteres de fosfato: o monoéster 2,4-dinitrofenilfosfato (DNPP), os diésteres BDNPP e EDNPP e o triéster DEDNPP e avaliar a estabilidade dos intermediários fosforilados formados;



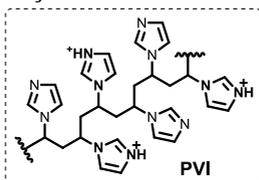
- Obter as constantes de equilíbrio ( $pK_a$ 's) do bis-imidazolil, bis((1*H*-imidazol-1-il)metil)anilina (BIMZ) na presença e ausência de brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr);



- Avaliar a reação do BIMZ com DEDNPP na presença e ausência das micelas brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr) e dodecilsulfato de sódio (SDS), e aplicar o modelo de pseudofase com troca iônica;



- Avaliar o potencial catalítico do polímero polivinilimidazol ( $M_w=3500\text{g/mol}$ ) PVI nas reações com os ésteres DEDNPP e BDNPP, na presença e ausência das micelas CTABr e SDS.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

A síntese do ácido benzohidroxâmico (BHA) segue o procedimento descrito por C. R. Hauser e W.B. Renfrow Jr.<sup>154</sup>. Dissolveu-se cloridrato de hidroxilamina (0,21 mol) em metanol a quente (75 mL) e adicionou-se uma solução metanólica de KOH quente (0,313 mol, 45 mL), e após foi precipitado KCl. Após permanecer em banho de gelo por 5 min, a solução foi filtrada e lavada com metanol gelado. Benzoato de metila (0,103 mol) foi adicionado à solução filtrada sob forte agitação e após 4 dias de repouso filtrou-se os cristais obtidos. Em seguida, dissolveu-se os cristais em uma solução de ácido acético (1,25 M, 45 mL) quente e após repouso à temperatura ambiente e banho de gelo, cristais precipitaram e foram separados. Para recristalização, foi utilizado acetato de etila e os cristais recristalizados foram lavados com benzeno, com rendimento de 71%. A caracterização do BHA foi confirmada pelo ponto de fusão de 125-128°C<sup>154</sup> e espectro de IV (ver Apêndice), encontrados na literatura.<sup>155</sup>

O remédio desferoxamina (DFO) foi obtido comercialmente na forma de sal de mesilato (500mg) da empresa Novartis. Já o polímero polivinilimidazol comercial (PVI) foi obtido pela empresa GFS Chemicals, com peso molecular 3500 g/mol. Os surfactantes utilizados, brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr) e dodecilsulfato de sódio (SDS), foram obtidos comercialmente (Aldrich).

O nucleófilo estudado imidazol (IMZ), foi obtido comercialmente (Aldrich). Já o bis ((1H-imidazol-1-il)metil)anilina (BIMZ) foi sintetizado por Eduard Westphal e Deise M.P.O. Santos do Laboratório de Cristais Líquidos, coordenado pelo Prof. Hugo Gallardo do Departamento de Química da UFSC.

Os ésteres 2,4-dinitrofenil fosfato (DNPP), bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP), dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (DEDNPP) e etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EDNPP), obtidos por métodos descritos na literatura,<sup>87,156</sup> foram disponibilizados no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI, sintetizado por Michelle Medeiros, Bruno S. Souza e Tiago A. S. Brandão) e Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (sintetizado por Tiago Pacheco, orientando do Prof. Ademir Neves) do Departamento de Química da UFSC. O éster bis(2-(1-metil-1H-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato (BMIPP) também foi

estudado, sendo que sua síntese e caracterização já foi detalhadamente descrita anteriormente como Dissertação de Mestrado.<sup>157</sup>

Para estudos de efeito isotópico e experimentos de RMN foi utilizada água deuterada (D<sub>2</sub>O), da Cambridge Isotope e NaOD (40%) e DCI (37%) da Aldrich.

Os demais reagentes utilizados são de qualidade P.A., procedentes da Aldrich, Carlo Erba, Acros e Vetec, e foram previamente purificados quando necessário.

### 3.2 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

A técnica da titulação potenciométrica foi utilizada para estudar os equilíbrios do BIMZ e PVI. As titulações foram realizadas em uma célula de vidro, de parede dupla, com capacidade de 150 mililitros. Esse sistema foi mantido fechado, com a temperatura controlada por um banho termostaticado a 25°C, agitação magnética e fluxo contínuo de nitrogênio que foi previamente borbulhado em uma solução de KOH para retirar as impurezas, e a força iônica foi mantida constante em 0,1 com KCl. A base utilizada foi bombeada para a célula de vidro através de um DOSIMAT 765 e o pH medido através de um equipamento METROHM (modelo 713).

O tratamento dos resultados experimentais foi feito com os programas BEST7 e SPECIES,<sup>158</sup> que permitem determinar as constantes de dissociação e distribuição de espécies, respectivamente.

### 3.3 ESTUDOS DE ESI-MS (/MS) E ELETROFORESE CAPILAR

Os experimentos de ESI-MS e ESI-MS/MS foram realizados em duas etapas, no Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas na UNICAMP e mais recentemente no equipamento adquirido pelo INCT-Catálise (LACFI), com auxílio do Prof. Gustavo Micke e a doutoranda Melina Heller. No Laboratório ThoMSon, os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas ESI-QqTof com resolução de massa de 5000 e 50 ppm de exatidão no analisador TOF. Pelo INCT-Catálise, os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas LC/MS/MS triplo-quadrupolo, QTrap 3200 com resolução unitária. Os aparelhos foram operados no modo do íon negativo e positivo e espécies individuais foram submetidas à dissociação por colisão induzida (CID) com nitrogênio (MS/MS). Por esta técnica se pretende caracterizar intermediários e produtos e acompanhar seu desaparecimento/aparecimento, de forma qualitativa.

No caso da reação do diéster BMIPP, como o intermediário cíclico fosforilado é muito instável, foi necessário utilizar um aparelho de maior precisão, o espectrômetro de massas LTQ FT-ICR MS de ultra alta resolução, que combina a mais avançada tecnologia em captura de íon (“Ion Trap”) e ressonância ciclotrônica de íons e transformada de Fourier (“Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance”). As condições foram: pressão de gás de 0.3 psi e voltagem de capilar de 1.55 kV e uma velocidade de fluxo de 250 nl min<sup>-1</sup>.

Os experimentos de eletroforese capilar foram realizados pelo doutorando Luciano Vitali, sob a orientação do Prof. Gustavo Micke. Os experimentos foram realizados em um sistema Agilent CE<sup>3D</sup> com detector de arranjo de diodos. As amostras foram introduzidas por injeção hidrodinâmica de 50mbar/5s e foi utilizado capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies) com comprimento total de 48,5 cm e 40 cm até o detector, a temperatura foi mantida a 25°C. O sistema foi operado com polaridade invertida, -30 kV. O tempo de migração da micela foi obtido a partir do tempo de migração do pireno  $t_{\text{pireno}}$  (1 mM) e o tempo de migração do fluxo eletrosmótico pelo tempo de migração da acetona  $t_{\text{osm}}$  (0,1%). A constante ( $K_m$ ) de interação analito-micela com o composto de interesse foi obtida utilizando a Equação 17 (item 4.5.4.1).

### 3.4 ESTUDOS DE RMN

Para acompanhar os produtos e intermediários das reações de maneira qualitativa e quantitativa foi utilizada a técnica de <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P RMN, através dos aparelhos de 200MHz e 400MHz disponibilizados pela Central de Análise do Departamento de Química da UFSC. As soluções dos substratos e nucleófilos foram preparados em D<sub>2</sub>O, com pH fixo e quando necessário com tampão 0.01M. O pD das soluções foram corrigidos considerando  $pD = pH_{\text{lido}} + 0,4$  a 25°C. Foram obtidos espectros sucessivos das reações estudadas e os deslocamentos observados foram atribuídos às respectivas espécies, pela comparação com os espectros dos compostos puros, obtidos experimentalmente ou comparado com dados da literatura, quando disponível. Para obter o gráfico quantitativo das reações, foram calculadas as áreas dos deslocamentos de cada espécie analisada, e esta área foi normalizada por um padrão interno (ácido fumárico ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%, para <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P, respectivamente). A área foi corrigida pelo número de hidrogênio (no caso do <sup>1</sup>H RMN) e então relacionada a uma concentração relativa, considerando a soma total das espécies. Nos estudos com BMIPP, os

espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN (300MHz) foram obtidos na Utah State University pelo Tiago A. S. Brandão.

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

### 3.5 ESTUDOS TEÓRICOS

Os cálculos computacionais para BMIPP foram realizados pelo doutorando Bruno S. Souza e Prof<sup>o</sup> Josefredo R. Pliego,<sup>159</sup> através da metodologia B3LYP (nível DFT) no programa Gaussian 03<sup>160</sup> para Linux. Os mínimos globais foram obtidos através da variação contínua da estrutura molecular e otimizados utilizando o modelo PCM com o contínuo dielétrico da água. O estado de transição da reação de hidrólise do BMIPP foi otimizado em fase gasosa devido à alta demanda computacional. Todos os átomos foram descritos por uma função de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa para os átomos de O, N e P. As otimizações de geometria foram realizadas na fase gasosa e a energia livre de solvatação em água ( $\Delta G^{\text{solv}}$ ) foram estimadas usando PCM.

### 3.6 ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO DE PLASMÍDEO DE DNA POR DFO

As análises de degradação de plasmídeo de DNA por DFO foram realizadas pelo Tiago Bortolotto sob a orientação do Professor Hernán Terenzi, do Departamento de Bioquímica da UFSC. O procedimento experimental para amplificar, extrair e purificar o plasmídeo de DNA seguiu protocolos adotados no laboratório<sup>161</sup> baseados nas metodologias descritas por Ausubel, F.M. e colaboradores.<sup>162</sup>

A habilidade do DFO de quebrar o DNA na presença e ausência de  $\text{Zn}^{2+}$  foi avaliado acompanhando a conversão de pBSK II da forma super-hélice de DNA (F I) para a forma circular aberta (F II) e linear (F III) usando eletroforese em gel para separar os produtos de clivagem. Em geral, 400 ng do pBSK II DNA foi reagido com DFO (0.01 M), na faixa de pH de 7-10 (auto-tamponado), na presença e ausência de  $\text{Zn}^{2+}$  (0.01 M) por 24 h a 37 °C; Reações controles sem DFO também foram realizadas para fins comparativos usando tampões (10mM) piperazina-1,4-bis(ácido 2-etano sulfônico) (PIPES): 7.0-7.5; ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)1-piperazinil]-etanossulfônico (HEPES) 8.0; ácido 2-(ciclohexilamino) etano sulfônico (CHES) 8.5-9.5; na presença e

ausência de  $\text{Zn}^{2+}$  0,01 M. Os géis resultantes das reações foram visualizadas e digitalizadas usando DigiDoc-It e as proporções de DNA plasmidial das bandas observadas foram quantificadas usando KODAK Molecular Imaging Software 5.0.

### 3.7 MEDIDAS CINÉTICAS

O estudo cinético foi realizado em um espectrofotômetro de UV/VIS Cary 50 e HP5483, onde foram avaliados os efeitos de: (i) pH; (ii) concentração do nucleófilo e/ou micela; (iii) isotópico; (iv) temperatura. As reações foram iniciadas com a adição de uma alíquota (10  $\mu\text{L}$ ) de uma solução estoque do substrato em  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0,01 M para EDNPP, DEDNPP, DNPP;  $4 \times 10^{-3}\text{M}$  para BDNPP), mantido no freezer, em 3 mL de mistura reacional. As constantes de velocidade observadas ( $k_{\text{obs}}$ ) foram calculadas pelo aparecimento do produto fenólico 2,4-dinitrofenolato (DNP) em 400 nm, Figura 9. A temperatura da cubeta foi mantida constante com banho termostatizado e a força iônica foi mantida constante em 1,0 com KCl. O pH das medidas cinéticas foi mantido com tampões (0,01M): ácido cloroacético (pH 2-3); ácido cítrico (pH 3-5,5); ácido acético (pH 4-5,5); dihidrogenofosfato de sódio (pH 5,5-7,8); bicarbonato de sódio (pH 8-9,5); tris (pH 7-9); bis-tris (pH 9-10,5). Nas reações com os nucleófilos, na faixa de  $\text{pH} \pm 1$  do  $\text{pK}_a$  dos nucleófilos, não foi necessário utilizar tampão.

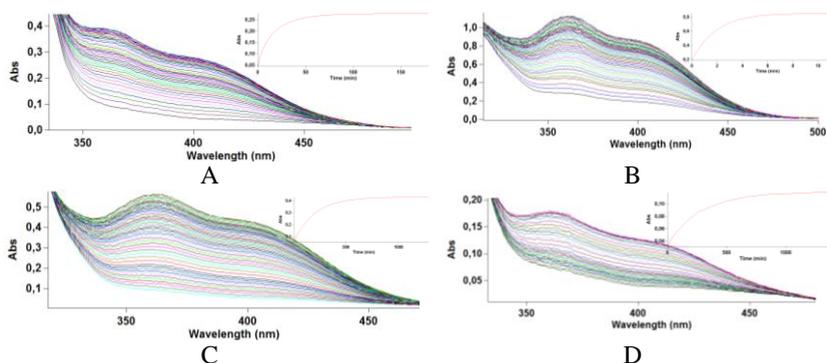


Figura 9 – Espectros de UV-Vis típicos dos ésteres estudados para reação do IMZ, com (A) BDNPP (B) DEDNPP (C) EDNPP e (D) DNPP, pH 8,5 a 25°C e  $I=1,0$  (KCl).

As reações foram monitoradas seguidas por no mínimo três tempos de meia-vida. Os valores de  $k_{\text{obs}}$  foram calculados pelo ajuste iterativo dos gráficos lineares de  $\ln (A_{\infty}-A_t)$  contra o tempo, sendo que para todas as medidas, os coeficientes de correlações ( $r$ ) foram superiores a 0,999.

As regressões não-lineares foram realizadas com o programa de computação ORIGIN versão 8.0 utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt para encontrar o mínimo da soma dos quadrados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ATAQUE NUCLEOFÍLICO SUICIDA DO ÁCIDO BENZOHIDROXÂMICO EM REAÇÕES COM ÉSTERES DE FOSFATOS: REARRANJO DE LOSSEN

Muitos estudos de desfosforilação com ácidos hidroxâmicos vêm sendo estudados,<sup>96,163-165</sup> devido ao seu potente caráter nucleofílico. Todavia, foi apenas recentemente<sup>166</sup> que se propôs para a reação do BDNPP, um mecanismo do tipo “ataque suicida” que envolve ataque nucleofílico no átomo de fósforo, seguido de um rearranjo de Lossen, onde os produtos finais são nucleófilos fracos (como anilina, fenilsocianato, difenilurea; *vide infra*). Neste contexto, estudamos detalhadamente por UV-Vis, <sup>1</sup>H RMN e ESI-MS, algumas reações de ésteres de fosfato com BHA para avaliar se o mecanismo do tipo “ataque suicida” ocorre para outra série de ésteres de fosfato. Em seguida ampliamos este estudo para uma molécula de interesse farmacêutico, a desferoxamina (item 4.2).

#### 4.1.1 Estudos cinéticos

Foram realizados estudos cinéticos por UV-Vis para reação do BHA com o diéster EDNPP e o triéster DEDNPP e os perfis de pH obtidos estão mostrados na Figura 10, juntamente com as respectivas reações em água. Observa-se que BHA é um nucleófilo muito reativo, sendo que em pH 10 (BHA 0,05M) tem-se incrementos de  $10^4$  vezes em  $k_{obs}$  para DEDNPP e EDNPP, comparado com as respectivas reações espontâneas.

Os dados da Figura 10 foram ajustados pela Equação 1, que foi deduzida baseada no Esquema 16, onde se considera a reação do substrato com água ( $k_0$ ), hidróxido ( $k_{OH}$ ) e o nucleófilo desprotonado benzohidroxamato ( $BHO^-$ ) ( $k_N$ ). De fato, o perfil de pH obtido mostra que a espécie reativa do BHA é a forma desprotonada  $BHO^-$  ( $pK_a=9,16$ ), pela formação do patamar em  $pH>9,5$ .<sup>166</sup> Os parâmetros cinéticos obtidos estão apresentados na Tabela 4, juntamente com os parâmetros termodinâmicos de ativação (calculados pelas Equações 2-4), efeitos isotópicos de solvente e constante de segunda ordem ( $k_N^L$ ) calculada pela relação linear de  $[BHO^-]$  vs  $k_{obs}$  (Equação 5). Os gráficos lineares que permitiram calcular os parâmetros termodinâmicos de ativação e  $k_N^L$  estão mostrados no Apêndice.

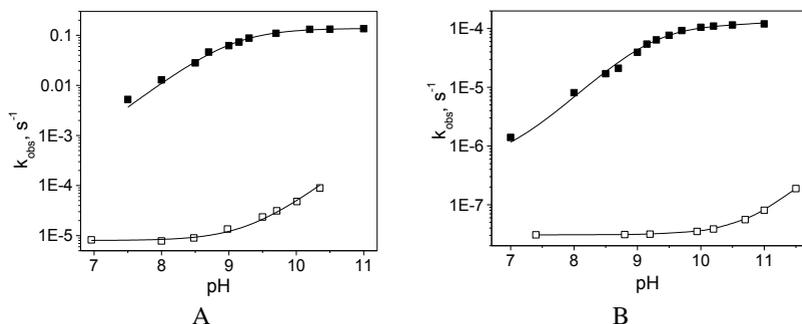
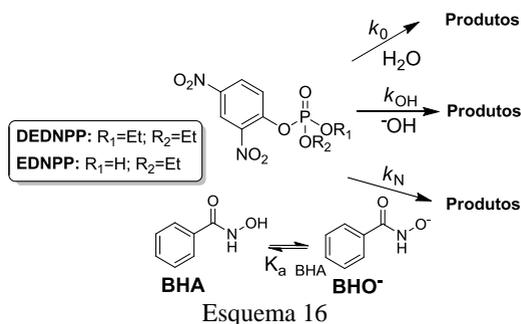


Figura 10 – Perfil de pH para as reações do BHA (0,05M) (■) com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) e (B) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), a  $25^\circ \text{C}$ ,  $I = 1.0$  (KCl). As linhas sólidas correspondem ao ajuste pela Equação 1. As respectivas reações de hidrólise espontânea (□) estão mostradas para fins comparativos: dados para EDNPP foram estimados pela reação de hidrólise do metil 2,4-dinitrofenil fosfato<sup>73</sup> e dados para DEDNPP foram obtidos experimentalmente (Ver Apêndice).



Esquema 16

$$k_{obs} = k_0 + k_{OH} [OH] + k_N [BHA] \cdot \chi_{BHO^-} \quad 1$$

$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = \left[ \ln\left(\frac{k_b}{\hbar}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right] - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad 2$$

$$\Delta G^\ddagger = \ln\left(\frac{k_{obs} \hbar}{k_B T}\right) \times RT \quad 3$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad 4$$

$$k_{obs} = k_0 + k_N^L [BHO^-] \quad 5$$

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos, termodinâmicos de ativação e isotópicos calculados para as reações do BHA com DEDNPP, BDNPP e EDNPP.<sup>a</sup>

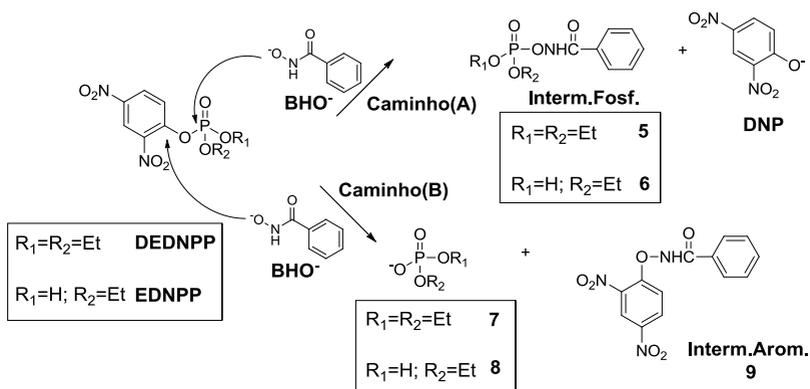
	DEDNPP	EDNPP <sup>b</sup>	BDNPP <sup>c</sup>
$k_0, s^{-1}$	$(8,0 \pm 0,50) \times 10^{-6}$	$(3,60 \pm 0,60) \times 10^{-8}$	$1,90 \times 10^{-7}$
$k_{OH}, M^{-1} s^{-1}$	$(4,20 \pm 0,20) 10^{-1}$	$(4,90 \pm 0,50) \times 10^{-5}$	$2,90 \times 10^{-3}$
$k_N, M^{-1} s^{-1}$	$2,74 \pm 0,03$	$(2,70 \pm 0,04) \times 10^{-3}$	$(2,61 \pm 0,03) \times 10^{-1}$
$pK_a$ (BHA) <sup>c</sup>	9,16		
$k_N^L, M^{-1} s^{-1d}$	$2,45 \pm 0,05$	$(2,56 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	-
$\Delta H^\ddagger,$ kcal. mol <sup>-1</sup> e	$+8,89 \pm 0,20$	$+16,70 \pm 0,80$	-
$\Delta S^\ddagger,$ e.u. e	$-33,10 \pm 0,70$	$-20,50 \pm 2,60$	-
$\Delta G^\ddagger,$ kcal.mol <sup>-1</sup> e	18,75	22,78	-
$k_{H_2O}/k_{D_2O}$ e	1,14	1,08	-

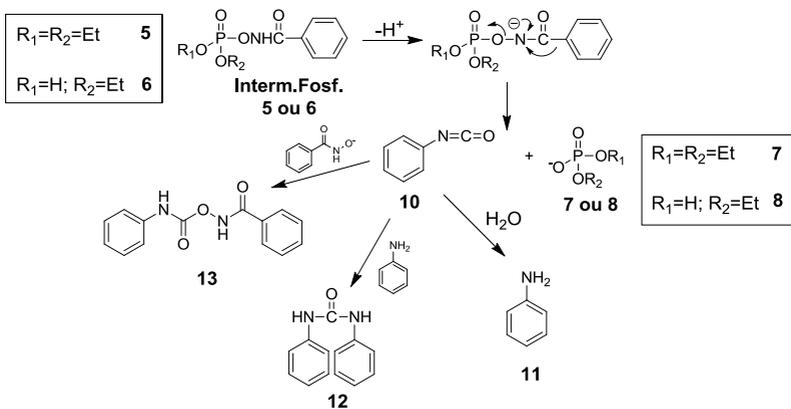
<sup>a</sup> Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste da Figura 10 com Equação 1. <sup>b</sup> Resultados consistentes com resultados preliminares obtidos por Tiago A.Silva.<sup>167</sup> <sup>c</sup> Resultados da literatura.<sup>166</sup> <sup>d</sup> Obtido pelo ajuste linear de  $[BHO^-]$  vs  $k_{obs}$ , em pH 10,5, Equação 5. <sup>e</sup> Calculados com  $BHO^-$  (0,05M), pH 10,5, pelas Equações 2-4 e  $\Delta G^\ddagger$  a 25°C.

Os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 4 mostram que na reação com  $BHO^-$ , o triéster DEDNPP é mais reativo que os diésteres BDNPP e EDNPP, tal esperado.<sup>83</sup> Comparando  $k_N$  com  $k_0$ , tem-se incrementos de (i)  $3 \times 10^5$  vezes para DEDNPP e (ii)  $8 \times 10^4$  vezes para EDNPP, típicos de reações nucleofílicas. Resultados publicados para BDNPP mostram um incremento de  $10^6$  vezes para a mesma razão ( $k_N/k_0$ ). Estes resultados evidenciam a alta reatividade do  $BHO^-$  em reações de desfosforilação e estão de acordo como o comportamento esperado de  $\alpha$ -nucleófilos que mostram incrementos na velocidade na ordem de  $10^3$ - $10^6$  vezes.<sup>61,63,64,83</sup> Os parâmetros termodinâmicos de ativação obtidos, com valor de entropia bem negativo, juntamente com o baixo efeito isotópico de solvente são consistentes com o mecanismo de ataque nucleofílico do  $BHO^-$  nos ésteres avaliados.<sup>73</sup> O interesse é estudar detalhadamente, por RMN e ESI-MS, o mecanismo dessas reações para avaliar se o nucleófilo ataca o átomo de fósforo e/ou o átomo de carbono aromático, e que tipo de intermediários e produtos são formados. De fato, os  $\alpha$ -nucleófilos são conhecidos por também atacar o carbono aromático<sup>168</sup> e é importante medir qual porcentagem da reação total corresponde à reação de desfosforilação, para poder comparar com outros nucleófilos, bem como para poder assimilar com sítios enzimáticos específicos, que ocorrem prioritariamente no átomo de fósforo.

### 4.1.2 Estudos de $^1\text{H}$ RMN

Nas reações do BHA com EDNPP e DEDNPP, espera-se que ocorra o mesmo mecanismo de ataque nucleofílico suicida, evidenciado na reação do BHO $^-$  com BDNPP, um diéster derivado da mesma família do EDNPP e DEDNPP (2,4-dinitrofenol). Desta forma, os Esquemas 17 e 18 apresentam os caminhos reacionais possíveis para as reações estudadas, onde o nucleófilo reativo BHO $^-$  pode atacar: (i) o átomo de carbono aromático levando ao intermediário aromático (9), liberando o éster de fosfato menos reativo (7 ou 8), caminho B do Esquema 17; e/ou (ii) o átomo de fósforo formando um intermediário fosforilado (5 ou 6) e liberando o grupo de saída fenólico 2,4-dinitrofenolato (DNP), caminho A do Esquema 17. O intermediário fosforilado (5, 6) rapidamente sofre um rearranjo de Lossen, tal mostrado no Esquema 18, formando fenilisocianato (10), o qual pode hidrolisar formando anilina (11). Ainda, o fenilisocianato pode reagir com uma molécula de anilina e BHO $^-$  formando difenilurea (12) e um derivado carbamílico (13), respectivamente. Portanto, o rearranjo de Lossen forma como produtos, nucleófilos fracos, como anilina, comparado com o nucleófilo altamente reativo BHO $^-$ , justificando desta forma, a designação “ataque suicida” para esse mecanismo.





Esquema 18

Para quantificar os intermediários e produtos propostos nos Esquemas 17-18, foram realizados experimentos de  $^1\text{H}$  RMN. Foram obtidos espectros de  $^1\text{H}$  RMN sucessivos do meio reacional onde continha 0,105 M de  $\text{BHO}^-$  e  $5 \times 10^{-3}$  M do éster (EDNPP ou DEDNPP) em pH 10. A designação dos deslocamentos dos intermediários e produtos foi feita pela comparação com dados da literatura<sup>168</sup> ou quando na sua ausência, com os deslocamentos obtidos dos espectros das substâncias puras. Alguns produtos foram difíceis de detectar (como 10,12 e 13), pois se formam em pouca quantidade e, além disso, seus deslocamentos são sobrepostos pelos deslocamentos do  $\text{BHO}^-$  em excesso.<sup>155</sup> Não obstante, os dados obtidos permitiram acompanhar o comportamento reacional quantitativamente de intermediários e produtos chaves, que concordam com o mecanismo proposto. Os espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN obtidos em função do tempo estão mostrados nas Figuras 11-12 e os deslocamentos das espécies detectadas estão apresentados na Tabela 5.

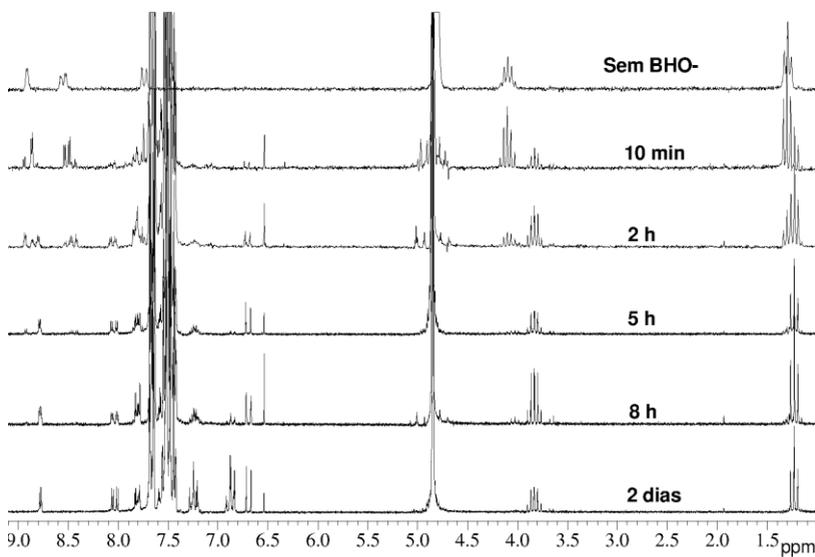


Figura 11 – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN obtidos para reação do BHO<sup>-</sup> (0,15M) com EDNPP (0,016M), pH 10 em D<sub>2</sub>O a 25°C.

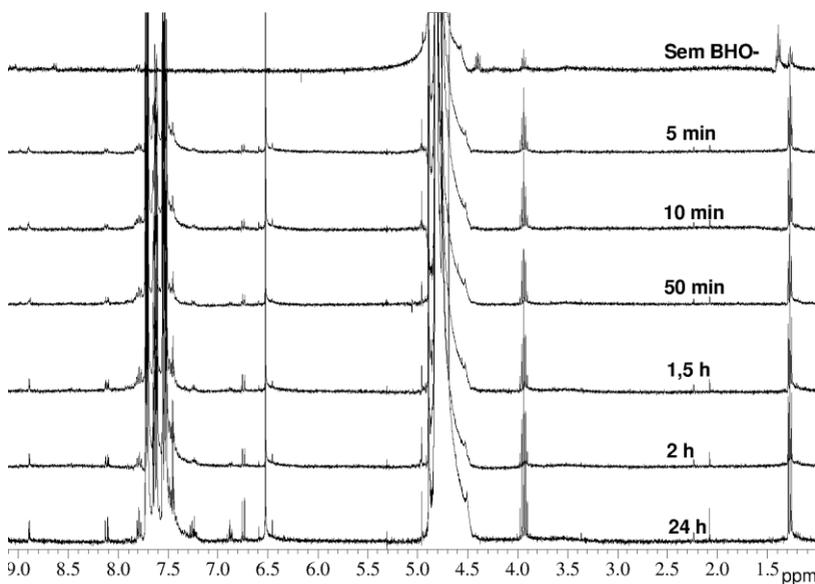


Figura 12 – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN obtidos para reação do BHO<sup>-</sup> (0,03M) com DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ), pH 10 em D<sub>2</sub>O a 25°C.

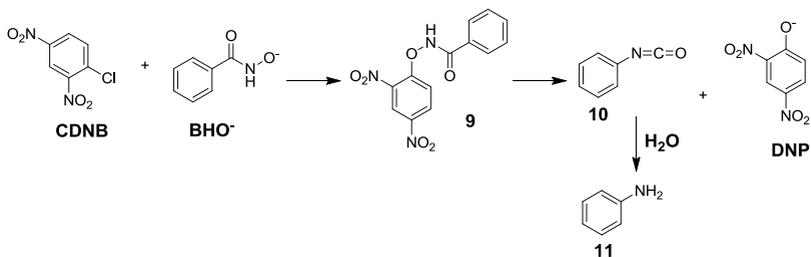
Tabela 5 – Deslocamentos de  $^1\text{H}$  RMN para as espécies dadas nos Esquemas 17-18, envolvidas na reação do  $\text{BHO}^-$  com os DEDNPP e EDNPP, em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 10 a  $25^\circ\text{C}$ .

Composto	$\delta$ (ppm)
$\text{BHO}^-$ <sup>a</sup>	7,54 (t,2H,Ar), 7,64 (t,1H,Ar), 7,72 (dd,2H,Ar)
EDNPP <sup>a</sup>	1,29 (t,3H,CH <sub>3</sub> ), 4,1 (q,2H,CH <sub>2</sub> )*, 7,71(dd,1H,Ar), 8,52(dd,1H,Ar), 8,89 (d,1H,Ar)
DEDNPP <sup>a</sup>	1,38 (t,6H,CH <sub>3</sub> ), 4,39 (q,4H,CH <sub>2</sub> )*, 7,80 (dd,1H,Ar), 8,64 (dd,1H,Ar), 9,03 (dd,1H,Ar)
DNP	6,75 (d,1H,Ar)*, 8,09 (dd,1H,Ar), 8,83 (d,1H,Ar)
7 <sup>a</sup>	1,26 (t,6H,CH <sub>3</sub> ), 3,93 (q,4H,CH <sub>2</sub> )*
8 <sup>a</sup>	1,22 (t,3H,CH <sub>3</sub> ), 3,83 (q,2H,CH <sub>2</sub> )*
9 <sup>b</sup>	7,85 (dd,1H,Ar), 8,47(dd,1H,Ar)*, 8,98(d,1H,Ar)
11 <sup>a</sup>	7,25 (t,2H,Ar)*, 6,87 (m,2H,Ar)
CDNB <sup>a</sup>	8,91 (d,1H,Ar); 8,51 (d,1H,Ar); 8,0 (d,1H,Ar)

<sup>a</sup> Confirmados com espectros das substâncias puras em  $\text{D}_2\text{O}$  e com dados da literatura, mostrados nas Figuras 11-12 (na ausência de  $\text{BHO}^-$ ) e Apêndice.<sup>63,82,166,168</sup> Adicionalmente, por não haver dados na literatura do EDNPP e 8, para comparar nas mesmas condições (pH, solvente), foram obtidos os espectros sucessivos da reação da hidrólise básica do EDNPP (ver Apêndice), que confirmam os deslocamentos observados na reação com  $\text{BHO}^-$ . Os picos com asteriscos correspondem ao pico utilizado na obtenção da Figura 14<sup>b</sup> Confirmado pela reação do  $\text{BHO}^-$  com 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno, (CDNB). Demais picos aromáticos ficam cobertos pelos  $\text{BHO}^-$  em excesso.

Os espectros obtidos para reação do  $\text{BHO}^-$  com DEDNPP e EDNPP mostram claramente a formação de algumas espécies importantes dos Esquemas 17-18, como o intermediário aromático 9, produto fenólico DNP, anilina 11 e o éster de fosfato menos reativo (7 ou 8). As Figuras 11 e 12 ilustram que (i) o EDNPP foi praticamente todo consumido até 5 h de reação evidenciado, por exemplo, pela ausência do pico em 4,1 ppm do quarteto (se refere ao grupo  $\text{CH}_2$  do EDNPP); enquanto (ii) o DEDNPP foi todo consumido já nos primeiros 5 min de reação (ausência dos picos característicos na região de 1-4,5 ppm). Vale ressaltar que no caso do DEDNPP, foram obtidos espectros de pior resolução, que se deve principalmente à baixa solubilidade do substrato em  $\text{D}_2\text{O}$ , todavia, foi evidente a formação das espécies citadas.

Para confirmar o caminho reacional onde ocorre ataque nucleofílico no carbono aromático, foi acompanhado por  $^1\text{H}$  RMN a reação do  $\text{BHO}^-$  com 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno CDNB (Esquema 19), no qual é formado apenas o intermediário aromático 9, como ilustrado no Esquema 19. Vale ressaltar que o intermediário 9 também pode levar a formação de 11.



Esquema 19

Os espectros sucessivos obtidos para a reação do BHO<sup>-</sup> com CDNB estão mostrados na Figura 13, sendo que os deslocamentos observados estão apresentados na Tabela 5. Observa-se que a reação do BHO<sup>-</sup> com CDNB é extremamente favorável, ocorrendo rapidamente: em 5 minutos, todo o CDNB foi consumido, formando **9** (7,85; 8,47 e 8,98 ppm), que se quebra completamente em até 24 horas de reação, levando a DNP e **11**.

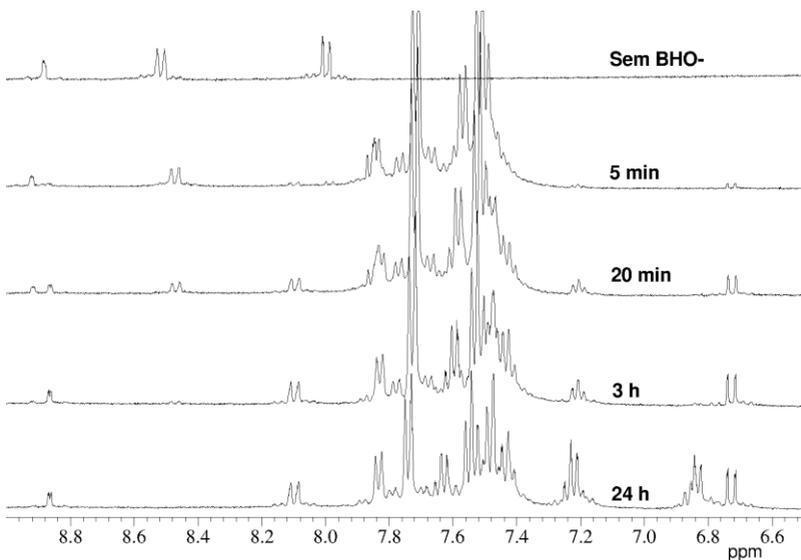


Figura 13 – Espectros sucessivos de <sup>1</sup>H RMN para reação do BHO<sup>-</sup> (0,184M) com CDNB (6x10<sup>-3</sup>M) em D<sub>2</sub>O, pH 10, 25°C.

Relacionando a intensidade dos picos das espécies mais importantes das Figuras 11-12, com um padrão interno (ácido fumárico em 6,53 ppm), obteve-se uma relação de concentração relativa das espécies detectadas em função do tempo para as reações do  $\text{BHO}^-$  com DEDNPP e EDNPP, Figura 14A-B, respectivamente. Vale ressaltar que para obter a concentração relativa de cada espécie, foi considerado seu pico mais intenso e limpo (sem sobreposição), que está identificado com um asterisco na Tabela 5. A Figura 14 mostra o consumo do éster de fosfato de partida, e a formação do intermediário 9 seguido de sua decomposição. Ainda, o DNP se forma inicialmente e continua a se formar durante a reação, que acompanha a quebra do intermediário 9. Conforme esperado, nenhum intermediário fosforilado (5, 6) foi detectado por ser muito instável. No entanto, a formação inicial do DNP indica que ocorre ataque no fósforo (caminho A, Esquema 17), pois DNP é o grupo de saída na reação do ataque no fósforo. A formação de 11 também é importante na confirmação do mecanismo proposto, e no caso do DEDNPP, 11 começa ser consumida após os 10 min de reação. Esse comportamento não é observado para o EDNPP, onde 11 continua se formando até o término da reação.

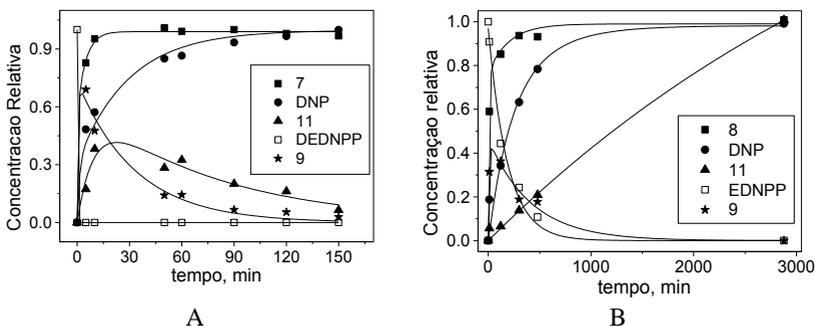


Figura 14 – Gráfico da concentração relativa vs tempo para as espécies ilustradas nos Esquemas 17-18 obtidos pelos espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para as reações de  $\text{BHO}^-$  (0,105M) com (A) DEDNPP ( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) e (B) EDNPP (0,016M), em pH 10 a  $25^\circ\text{C}$ .

É possível estimar a porcentagem de ataque do  $\text{BHO}^-$  no átomo do fósforo e carbono analisando o início da reação, onde se acredita que o DNP detectado vem apenas do ataque no fósforo. Deste modo, calculou-se para (i) EDNPP, aos 10 minutos de reação, que 66% da reação é devido ao ataque no átomo de fósforo, enquanto 34% é no

átomo de carbono; (ii) DEDNPP, aos 5 minutos de reação, que 55% da reação é devido ao ataque no átomo de fósforo, enquanto 45% é no átomo de carbono. Esses resultados estão de acordo com o esperado para o ataque de  $\alpha$ -nucleófilos no átomo de fósforo e carbono<sup>63,166</sup> e são dados extremamente importantes, pois permitem separar a constante de velocidade cinética (UV-Vis, item 4.1.1) em duas constantes,  $k_N^C$  e  $k_N^P$ , que se referem ao ataque no anel aromático e fósforo, respectivamente, Tabela 6.

Tabela 6 – Constantes de segunda ordem ( $k_N$ ) para reação do BHO<sup>-</sup> com DEDNPP e EDNPP, considerando percentual<sup>a</sup> de ataque no átomo de fósforo e carbono. Dados com BDNPP são mostrados para fins comparativos.<sup>166</sup>

	DEDNPP	EDNPP	BDNPP <sup>d</sup>
% N <sup>Cb</sup>	45	34	76
% N <sup>Pb</sup>	55	66	24
$k_N^C, M^{-1}s^{-1c}$	1,23	$9,18 \times 10^{-4}$	0,198
$k_N^P, M^{-1}s^{-1c}$	1,51	$1,78 \times 10^{-3}$	0,062

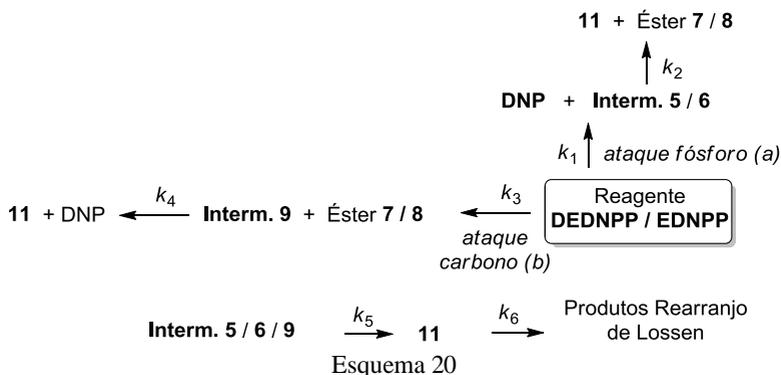
<sup>a</sup> Calculado nos primeiros 5 e 10 minutos de reação para DEDNPP e EDNPP, respectivamente.

<sup>b</sup> % N<sup>C</sup> e % N<sup>P</sup> correspondem ao ataque nucleofílico no carbono e fósforo, respectivamente. <sup>c</sup> Calculados utilizando  $k_N$  da Tabela 4. <sup>d</sup> Resultados da literatura.<sup>166</sup>

Os dados da Figura 14 foram ajustados por equações que regem cinéticas de reações consecutivas, fornecendo parâmetros cinéticos acerca dos caminhos reacionais estudados. O Esquema 20 resume as etapas reacionais que foram consideradas na dedução das equações de ajuste, onde se tem a reação nucleofílica no átomo de fósforo, no átomo de carbono e as respectivas reações de decomposição dos intermediários formados. Ainda, o perfil de concentração de 11 foi ajustado considerando uma constante de formação global, que provém do intermediário fosforilado e aromático e após tem-se sua decomposição, levando aos demais produtos do rearranjo de Lossen. As Equações 6-10 ajustadas estão apresentadas abaixo, onde na Equação 6, “reagente” é o éster de fosfato de partida (EDNPP ou DEDNPP) e “ $k$ ” é uma constante global de decomposição do reagente, *i.e.*, uma soma das constantes  $k_1$  e  $k_3$ . Os fatores “a” e “b” correspondem ao percentual da reação que ocorre pelo caminho reacional com ataque no fósforo e carbono, respectivamente, de acordo com a Tabela 6.

Vale ressaltar, que 7, 8 e DNP podem se formar nos dois caminhos reacionais com ataque no fósforo com carbono. Assim, na equação considerada, tem-se uma soma das equações que definem o comportamento cinético de cada espécie em cada caminho reacional (*i.e.*

como reagente, intermediário, produto). Por exemplo, o DNP se forma diretamente do reagente de partida pelo ataque no fósforo e também da quebra do intermediário 9. Maiores detalhes com relação à dedução das equações utilizadas em cada etapa (reagente, produto, intermediário) podem ser encontrados no livro de McQuarrie, D.A. e Simon, J.D.<sup>169</sup> Os parâmetros obtidos pelo ajuste com as Equações 6-10 estão apresentados na Tabela 7.



$$[\text{Reagente}] = [\text{Reagente}]_0 \times e^{-k \times \text{tempo}} \quad 6$$

$$[\text{Interm. 9}] = b \times \left\{ \frac{k_3}{k_4 - k_3} \times (e^{-k_3 \times \text{tempo}} - e^{k_4 \times \text{tempo}}) \right\} \quad 7$$

$$[\text{Éster 7 ou 8}] = a \times \left\{ 1 + \frac{(k_2 \times e^{-k_1 \times \text{tempo}} - k_1 \times e^{k_2 \times \text{tempo}})}{k_1 - k_2} \right\} + b \times \{1 - e^{-k_3 \times \text{tempo}}\} \quad 8$$

$$[\text{DNP}] = b \times \left\{ 1 + \frac{(k_4 \times e^{-k_3 \times \text{tempo}} - k_3 \times e^{k_4 \times \text{tempo}})}{k_3 - k_4} \right\} + a \times \{1 - e^{-k_1 \times \text{tempo}}\} \quad 9$$

$$[11] = \frac{k_5}{k_6 - k_5} \times (e^{-k_5 \times \text{tempo}} - e^{k_6 \times \text{tempo}}) \quad 10$$

Tabela 7 – Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 14 com as Equações 6-10 para as reações do BHO<sup>-</sup> com DEDNPP e EDNPP.<sup>a</sup>

	DEDNPP	EDNPP
$k_1, M^{-1} s^{-1}$	0,439±0,3	$(5,9±2,2) \times 10^{-4}$
$k_2, s^{-1}$	$(3,5±0,3) \times 10^{-3}$	$(8,3±3,4) \times 10^{-4}$
$k_3, M^{-1} s^{-1}$	1,03±0,9	$(6,20±0,7) \times 10^{-3}$
$k_4, s^{-1}$	$(5,0±0,3) \times 10^{-4}$	$(4,0±0,8) \times 10^{-5}$
$k_5, s^{-1}$	$(1,8±0,5) \times 10^{-3}$	$(3,3±1,7) \times 10^{-6}$
$k_6, s^{-1}$	$(2,0±0,6) \times 10^{-4}$	-

<sup>a</sup> A designação dos parâmetros considerados está dada no Esquema 20.

Os ajustes dos dados da Figura 14 com as Equações 6-10 foram bem sucedidos, visto a boa correlação da linha teórica com os dados experimentais. Alguns parâmetros calculados apresentaram um erro significativo (Tabela 7), o que é esperado, devido ao número de variáveis. Ainda assim, o ajuste é válido, pois os parâmetros são consistentes com resultados cinéticos (UV-Vis), considerando que a soma de  $k_1$  e  $k_3$  ( $k_1 + k_3$  é 1,47 e  $6,7 \times 10^{-3} M^{-1} s^{-1}$  para DEDNPP e EDNPP, respectivamente), que corresponde ao ataque nucleofílico global da reação, está na mesma ordem de grandeza da constante de segunda ordem ( $k_N$ ) obtida pelos estudos cinéticos ( $2,74$  e  $2,7 \times 10^{-3} M^{-1} s^{-1}$  para DEDNPP e EDNPP, respectivamente). Outra informação interessante obtida pelos dados da Tabela 7, é o  $t_{1/2}$  do intermediário aromático que é de 23 min e 5 h para DEDNPP e EDNPP, respectivamente. No caso do intermediário fosforilado, é pouco confiável calcular seu tempo de meia-vida baseado em  $k_2$ , visto que esta espécie não foi detectada.

Em síntese, os resultados de <sup>1</sup>H RMN obtidos confirmam o mecanismo proposto do ataque suicida do BHO<sup>-</sup> no átomo de fósforo dos ésteres de fosfato estudados e norteia uma maior compreensão do ataque no carbono aromático, recorrente em reações de desfosforilação com nucleófilos. O comportamento cinético observado para as espécies detectadas por RMN (concentração relativa vs tempo) permite estimar os parâmetros cinéticos importantes, que complementam os dados cinéticos por UV-Vis.

#### 4.1.3 Análise de espectrometria de massas

Para complementar os estudos, foram realizados experimentos de ESI-MS(/MS), com o intuito de detectar os intermediários e produtos formados nas reações estudadas. Na Figura 15 está apresentado um espectro de ESI-MS (-) obtido após 2 minutos da reação de BHO<sup>-</sup>

(0,05M) com DEDNPP ( $8 \times 10^{-5}$  M) em pH 10. Esses resultados estão de acordo com o mecanismo reacional proposto (Esquemas 17-18), onde foram detectadas as espécies: (i) o intermediário 9 desprotonado de m/z 302; (ii) o dímero do BHO<sup>-</sup> de m/z 273; (iii) o derivado carbamílico 13 desprotonado, que se forma no rearranjo de Lossen, de m/z 255; (iv) o produto fenólico aniônico DNP de m/z 183; (v) o reagente BHO<sup>-</sup> aniônico de m/z 136; e (vi) a anilina (11) desprotonada de m/z 92. As mesmas espécies foram observadas na reação do BHO<sup>-</sup> (0,05M) com EDNPP, e o espectro está apresentado no Apêndice.

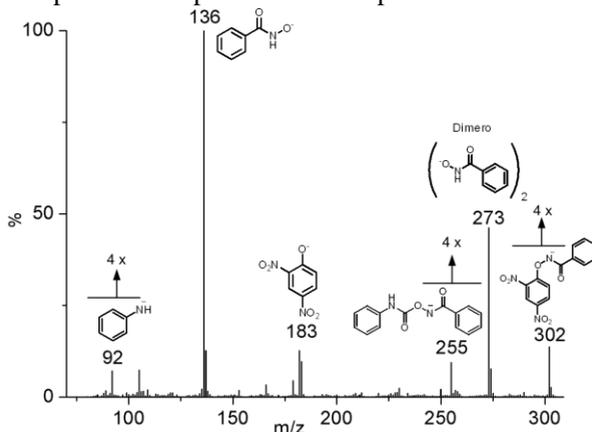


Figura 15 – Espectro de ESI-MS (-) para após 2 minutos de reação do BHO<sup>-</sup> (0,105M) com DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}$  M) em pH 10,5, a 25°C.

A atribuição das espécies detectadas foi confirmada por ESI-MS/MS pela sua dissociação por colisão induzida (CID). O espectro de ESI-MS/MS(-) para a espécie 13 de m/z 255 está mostrado na Figura 16, que evidencia sua dissociação para BHO<sup>-</sup> de m/z 136, e o ânion anilínio de m/z 92. Os espectros de ESI-MS/MS das outras espécies detectadas nas reações do BHO<sup>-</sup> com DEDNPP e EDNPP estão apresentados no Apêndice. É importante destacar, que o estudo de ESI-MS foi fundamental, pois permitiu detectar uma espécie não detectada por RMN, o derivado carbamílico (13).

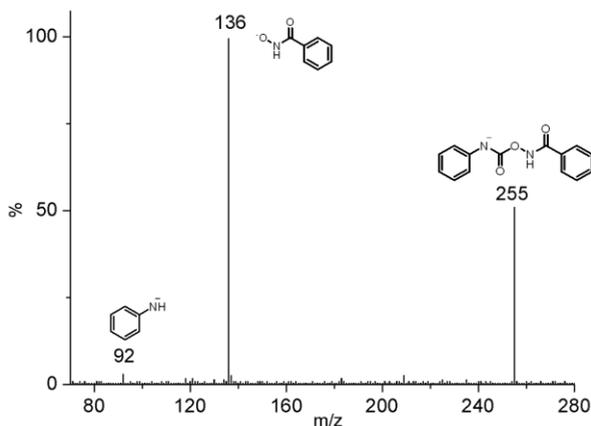


Figura 16 – Espectro de ESI-MS/MS (-) para o derivado carbamílico 13 de m/z 255, nas reações do  $\text{BHO}^-$  (0,105M) com DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}$ M, pH 10 a 25 °C).

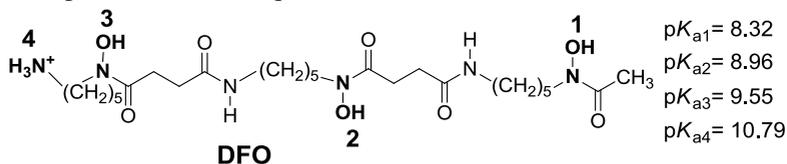
#### 4.1.4 Conclusões parciais

Os estudos de UV-Vis, RMN e ESI-MS mostrados para a reação do  $\text{BHO}^-$  com a série de ésteres de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol evidenciam a complexidade das reações de desfosforilação com ácidos hidroxâmicos, e legitima o termo “ataque nucleofílico suicida”. O alto poder nucleofílico do reagente, ao passar por um rearranjo de Lossen, é destruído, formando produtos que são fracos nucleófilos. O rearranjo de Lossen já foi detectado em outras reações com ácidos hidroxâmicos, por exemplo, com haletos de sulfonila e fosfonila,<sup>170-172</sup> mas este trabalho, juntamente com os dados recém publicados para BDNPP,<sup>166</sup> são as primeiras evidências deste tipo de rearranjo em reações de desfosforilação.<sup>166</sup> O desafio é estudar o comportamento de grupos nucleofílicos altamente reativos dentro do sistema biológico e avaliar se ocorre a quebra do DNA. Curiosamente, existem alguns fármacos que possuem grupos hidroxamatos, tal a desferoxamina, que possui três grupos hidroxamatos reativos.

## 4.2 REAÇÕES DE DESFOSFORILAÇÃO COM O FÁRMACO DESFERROXAMINA: EFEITO NA QUEBRA DO DNA

A desferroxamina (DFO) é um quelante de metais,<sup>173</sup> encontrando na natureza, que possui grupos hidroxamatos, e tem sido amplamente utilizada para fins terapêuticos em desordens de excesso de ferro<sup>174</sup> e alumínio.<sup>175</sup> Por mais de 40 anos, tem sido um tratamento padrão para pacientes que recebem transfusões de sangue.<sup>176</sup> Esse tratamento possui inúmeros efeitos colaterais,<sup>177</sup> que incluem a inibição da síntese de DNA em linfócitos humanos,<sup>178</sup> o que ampliou a aplicação do DFO, no uso clínico como uma droga antiproliferativa na quimioterapia do câncer.<sup>179</sup> De fato, vários estudos têm evidenciado que DFO possui atividade antitumoral no tratamento do neuroblastoma, leucemia, bexiga e carcinoma hepatocelular, e câncer no cérebro.<sup>180</sup> DFO pode também ser utilizado para suprimir a oxidação do DNA, através da captura de ferro na forma não-reativa.<sup>181</sup>

DFO é um sideróforo bacteriano que contém três grupos de ligantes bidentados, que possuem átomo de oxigênio que podem quelar adequadamente cátions metálicos como íon férrico.<sup>182</sup> Todavia, estes ligantes bidentados contendo oxigênio constituem em sua essência, grupos de ácido hidroxâmico, e sabe-se que seus ânions são poderosos nucleófilos, principalmente frente ao centro de átomo de fósforo em ésteres de fosfato. A estrutura do DFO, juntamente com os seus  $pK_{a,s}$ <sup>183</sup> estão apresentados no Esquema 21.



Esquema 21

Estudos mostrados acima (item 4.1) evidenciam que o  $BHO^-$ , que possui apenas um grupo hidroxamato, é um nucleófilo extremamente poderoso, acelerando reações de desfosforilação em até  $10^5$  vezes, comparado com as respectivas reações espontâneas. Portanto, em princípio, os grupos hidroxamato do DFO, que é usado terapêuticamente em concentrações relativamente elevadas (dose diária geralmente entre 20-80 mg/kg), poderia promover a clivagem de qualquer éster de fosfato e talvez até mesmo cortar a fita de DNA. Neste contexto, foram realizados estudos detalhados para reação do DFO com o BDNPP, um éster de fosfato modelo, incluindo análises cinéticas de UV-Vis, de  $^1H$

RMN e espectrometria de massas. Adicionalmente, testes com DNA plasmídico foram realizados.

#### 4.2.1 Estudos cinéticos

A reação do DFO com BDNPP foi acompanhada por UV-Vis e o perfil de pH obtido está apresentado na Figura 17, juntamente com os dados com  $\text{BHO}^-$ , para fins comparativos.<sup>166</sup> O perfil de pH obtido para DFO mostra um patamar acima de pH 10, que está de acordo com a formação das espécies reativas de hidroxamato até pH~9,6 ( $>pK_{a3}$ ). Ainda, o grupo amina do DFO não se mostra reativo, pois a espécie formada no seu  $pK_a$  em 10,79, não causa incrementos significativos em  $k_{\text{obs}}$ . Surpreendentemente, o incremento global do DFO (0,01M em pH 10,5) na reação do BDNPP chega a  $10^3$  vezes, comparado com a reação em água.

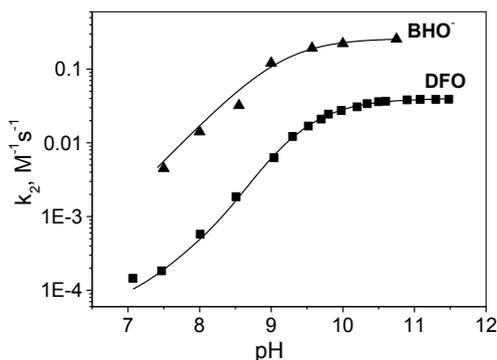


Figura 17 – Perfil de pH ( $k_2$  em  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) para reação do  $\text{BHO}^-$  (-▲-) e DFO (-■-) com BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), a  $25^\circ\text{C}$  e  $I = 1.0 \text{M}$  (KCl). Os dados com DFO foram ajustados pela Equação 11 e com  $\text{BHO}^-$ , com a Equação 1.<sup>166</sup>

Na Figura 17, os dados com  $\text{BHO}^-$  seguem o comportamento descrito pela Equação 1 e os dados com DFO foram ajustados pela Equação 11, onde  $\chi_M$ ,  $\chi_D$  e  $\chi_T$  correspondem às frações molares dos ânions mono, di- e tri hidroxamatos do DFO (baseado nos  $pK_a$ s do Esquema 21), e  $k_1, k_2$  e  $k_3$ , são as constantes de velocidade das reações das respectivas espécies com BDNPP. Os parâmetros cinéticos calculados estão apresentados na Tabela 8.

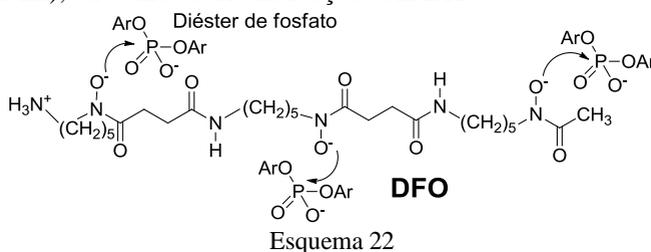
$$k_{obs} = k_0 + k_{OH} [OH] + (k_1 \chi_M + k_2 \chi_D + k_3 \chi_T) \times [DFO] \quad (11)$$

Tabela 8 – Parâmetros cinéticos obtidos para reação do DFO com BDNPP, pelo ajuste dos dados da Figura 17 com a Equação 11.<sup>a</sup>

$k_0, s^{-1}$	$k_{OH}, M^{-1}s^{-1}$	$k_1, M^{-1}s^{-1}$	$k_2, M^{-1}s^{-1}$	$k_3, M^{-1}s^{-1}$
$1,9 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-3}$	$1,15 \times 10^{-3}$	$1,69 \times 10^{-3}$	$3,95 \times 10^{-2}$

<sup>a</sup> As constantes de dissociação do DFO consideradas estão dadas no Esquema 21.<sup>183</sup>

Os resultados são evidentes e reveladores. Estudos anteriores mostram que o BHO<sup>-</sup> é um dos nucleófilos mais poderosos conhecidos, frente a diésteres de fosfato como BDNPP ( $k_{BHO} = 0,108 M^{-1} s^{-1}$ ).<sup>166</sup> Já a reação do DFO com BDNPP é muito similar, evidenciado pelos perfis de pH da Figura 17 e suas velocidades de reação são apenas 1 ordem de magnitude menor (7-14 vezes) que BHO<sup>-</sup>. De fato, o rígido centro nucleofílico do BHO<sup>-</sup> é mais exposto, enquanto no DFO, os grupos hidroxamatos são cercados por uma extensa estrutura conformacionalmente móvel, que pode oferecer um efeito estérico significativo. Isto pode ser devido ao nitrogênio vizinho ao oxigênio reativo ser primário no caso do BHA e secundário para DFO, dificultando formas ressonantes que poderiam estabilizar estados de transição, e impossibilitando um rearranjo de Lossen. Ainda assim, os dados da Tabela 8 confirmam a maior reatividade dos centros mais básicos (maior  $pK_a$ ). Propõe-se um mecanismo onde estes centros básicos atacam o átomo de fósforo do éster, Esquema 22 (Ar=2,4-dinitrofenil), tal como ocorre na reação com BHO<sup>-</sup>.



Foram selecionados alguns metais que estão facilmente disponíveis nos sistemas biológicos, como  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , e avaliado o efeito sinérgico que podem ter na reação do DFO com BDNPP. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos e evidenciam um efeito significativo dos metais, que potencializam a ação fosforolítica do DFO em pH 7,5, tal como no meio fisiológico. Ressalta-se que os mesmos

metais nas respectivas concentrações não tiveram efeito na velocidade da reação com BHA.

Para fins comparativos, na Tabela 9 estão mostrados as razões  $k_{\text{Me-DFO}}/k_0$  e  $k_{\text{Me-DFO}}/k_{\text{DFO}}$ , onde  $k_0$ ,  $k_{\text{DFO}}$ ,  $k_{\text{Me-DFO}}$  são as constantes  $k_{\text{obs}}$  (pH 7,5) para reação do BDNPP espontânea, na presença de DFO (0,01M) e na presença de DFO+Me<sup>2+</sup> (0,01M), respectivamente. Observa-se que Zn<sup>2+</sup> é o metal que possui maior efeito na reação com DFO e BDNPP: causa incrementos em  $k_{\text{obs}}$  de 59 e 4 vezes, comparados com as reações, espontânea do BDNPP e na presença de apenas DFO (0,01 M em pH 7,5), respectivamente. Estes resultados são preliminares e não permitem indicar o mecanismo que ocorre, mas são importantes pois indicam que o poder nucleofílico do fármaco DFO pode ser significativamente superior, quando combinado a metais que estão disponíveis no meio biológico, como Zn<sup>2+</sup> e esta sinergia na quebra fosforolítica pode ser mais importante no estudo com DNA, onde se sabe que ocorrem inúmeras interações com metais que podem influenciar diversos aspectos, como a conformação.

Tabela 9 – Efeito de metais na reação do DFO (0,01M) com BDNPP (1,33x10<sup>-5</sup>M).

[M <sup>2+</sup> ], M	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	$k_{\text{Me-DFO}}/k_0^a$	$k_{\text{Me-DFO}}/k_{\text{DFO}}^a$
Mg, 0,01M	7,5	$2,9 \times 10^{-6}$	~15	~1
Ni, 0,01M	7,5	$2,27 \times 10^{-6}$	~12	~1
Zn, 0,01M	7,5	$1,12 \times 10^{-5}$	~59	~4

<sup>a</sup>  $k_0$ ,  $k_{\text{DFO}}$ ,  $k_{\text{Me-DFO}}$  são as constantes  $k_{\text{obs}}$  (pH 7,5) para reação do BDNPP espontânea ( $k_0=1,9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ),<sup>64</sup> na presença de DFO (0,01M) e na presença de DFO+Me<sup>2+</sup> (0,01M), respectivamente.

#### 4.2.2 Análise de espectrometria de massas

A técnica de espectrometria de massas ESI-MS(/MS) foi utilizada para monitorar a reação do DFO com BDNPP, com o objetivo de detectar espécies iônicas de produtos e intermediários que permitam indicar o mecanismo da reação, tal realizado em estudos similares.<sup>166,184</sup>

Desta forma, foram obtidos espectros no modo positivo e negativo após 30 minutos de reação do DFO com BDNPP em meio aquoso, pH 10 e 25°C. No modo negativo, foram observadas diversas espécies (Figura 18) e mesmo considerando a complexidade da reação avaliada, foi possível detectar e caracterizar algumas espécies aniônicas importantes. No espectro de ESI-MS (-) apresentado na Figura 18 observa-se: (i) o reagente DFO de m/z 559; (ii) o reagente BDNPP de m/z 429 e (iii) o produto fenólico DNP de m/z 183. Ainda, foram identificados dois

intermediários fosforilados de  $m/z$  805 e 885, que são consistentes com o ataque no fósforo do BDNPP pelos grupos hidroxamatos do DFO.

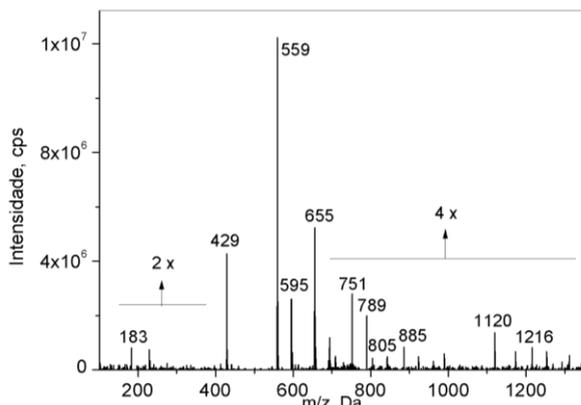


Figura 18 – ESI-MS (-) após 30 minutos de reação do DFO ( $1 \times 10^{-3}$  M) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em meio aquoso, em pH 10 e  $25^\circ\text{C}$ .

As espécies identificadas na Figura 18 foram caracterizadas por ESI-MS/MS via dissociação induzida por colisão e os espectros de ESI-MS/MS estão mostrados nas Figuras 19-21. A dissociação do reagente BDNPP está de acordo com resultados anteriores,<sup>85,166</sup> onde se formam fragmentos a partir da perda de -N, -NO, -NO<sub>2</sub>, -O e quebra do anel aromático, levando aos fragmentos indicados no Esquema 23 (espectro ESI-MS/MS do BDNPP está apresentado no Apêndice). Já o reagente DFO, de natureza grande e complexa, dissocia levando a vários fragmentos, que se devem basicamente à quebra da ligação do nitrogênio com o carbono da carbonila, nos grupos hidroxamatos. O espectro de ESI-MS/MS para o DFO está mostrado na Figura 19 e os respectivos assinalamentos estruturais de fragmentos majoritários estão mostrados no Esquema 23.

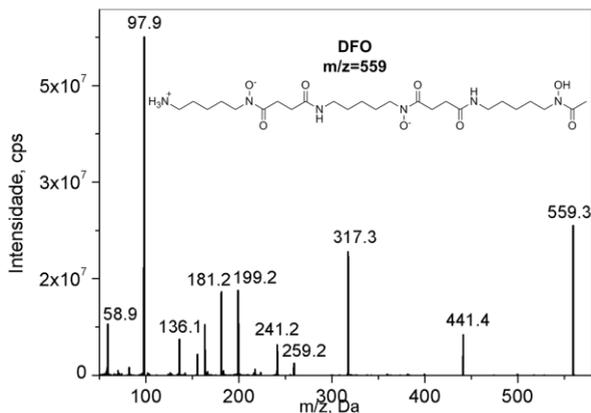
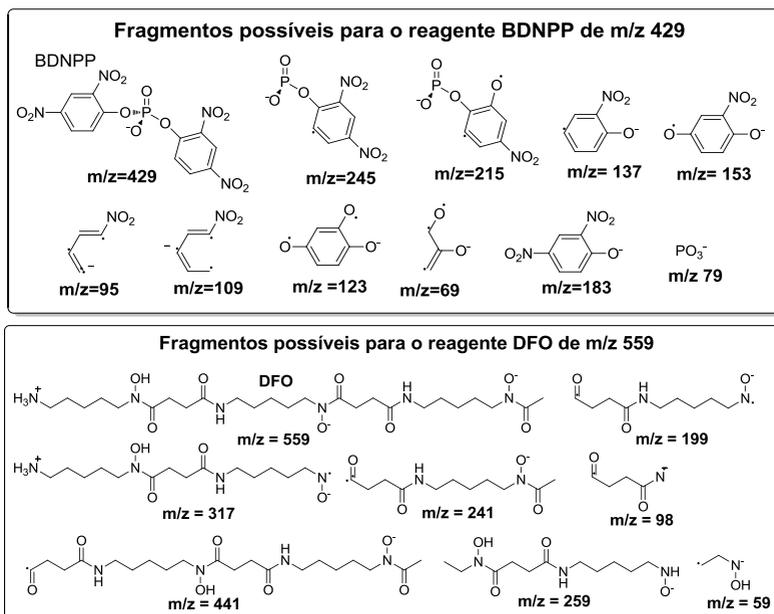


Figura 19 – ESI-MS/MS do reagente DFO de m/z 559, obtido na reação do DFO ( $1 \times 10^{-3}$  M) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 a  $25^\circ\text{C}$



Esquema 23

Nas Figuras 20 e 21 estão mostrados os espectros de ESI-MS/MS dos intermediários fosforilados de  $m/z$  805 e 885, que apontam para ambos intermediários, a formação do fragmento de  $m/z$  95, que se origina da clivagem do anel aromático do BDNPP. Ressalta-se que o fragmento de  $m/z$  95 provém do BDNPP (espectro ESI-MS/MS apresentado no Apêndice) e não está presente no ESI-MS/MS do DFO, o que corrobora a natureza fosforilada dos intermediários de  $m/z$  805 e 885. Ainda, o ânion de  $m/z$  805 (Figura 20) dissocia para o fragmento de  $m/z$  559, que é o próprio DFO. A designação estrutural proposta para os fragmentos observados no ESI-MS/MS dos ânions de  $m/z$  805 e 885 está dada no Esquema 24. No caso do ânion intermediário de  $m/z$  885, os fragmentos observados de  $m/z$  789 e 655 também foram observados no espectro de ESI-MS (-) da reação (Figura 18), dos quais também foram obtidos os espectros de ESI-MS/MS (ver Apêndice), que são consistentes com a estrutura proposta.

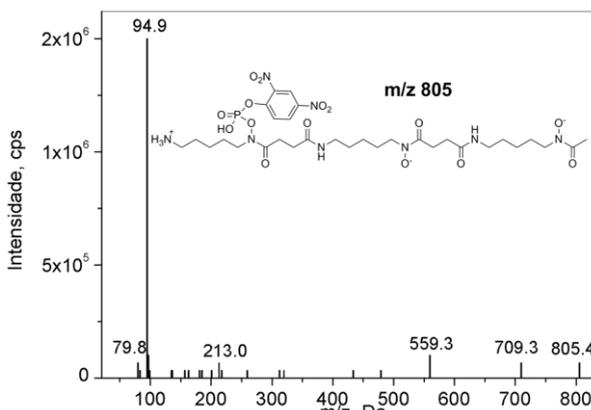


Figura 20 – ESI-MS/MS do intermediário aniônico fosforilado de  $m/z$  805, na reação do DFO ( $1 \times 10^{-3}$  M) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 a 25°C.

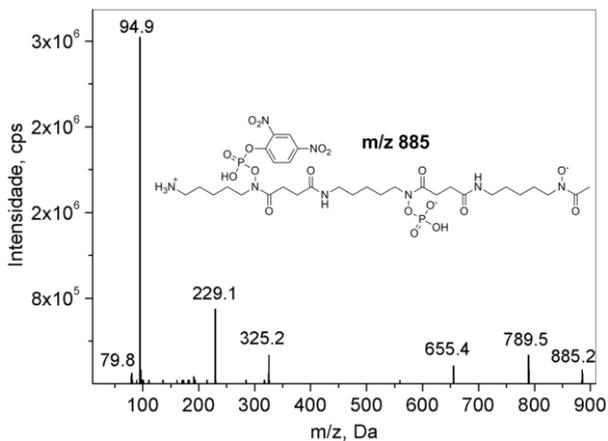
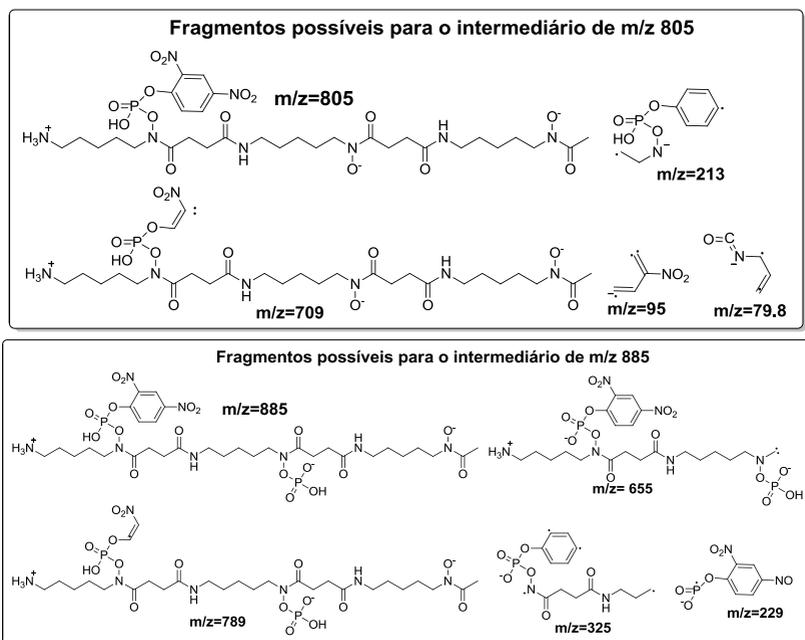


Figura 21 – ESI-MS/MS do intermediário aniônico fosforilado de m/z 885, na reação do DFO (1x10<sup>-3</sup>M) com BDNPP (1x10<sup>-5</sup>M) em pH 10 a 25°C.



Esquema 24

Em síntese, os resultados apresentados de ESI-MS(MS) são esclarecedores e sustentam solidamente o mecanismo nucleofílico proposto para a reação do DFO com BDNPP, sendo que a detecção dos intermediários fosforilados foi determinante. Vale ressaltar que nas reações do BHO<sup>-</sup> com os ésteres de fosfato BDNPP,<sup>166</sup> EDNPP e DEDNPP, nenhum intermediário fosforilado foi detectado. Outras espécies detectadas no espectro de ESI-MS(-) (Figura 18) também foram designadas e caracterizadas, como os ânions de m/z 1216, 751 e 595, constituindo basicamente espécies aniônicas radiculares que advêm de espécies intermediárias, *i.e.*, se formam a partir da quebra de outros intermediários fosforilados maiores. Os espectros de ESI-MS/MS estão mostrados no Apêndice.

Experimentos de <sup>1</sup>H RMN foram realizados, todavia, os resultados obtidos são pouco conclusivos, devido à complexidade da reação que, como mostram os dados de ESI-MS, formam diversas espécies intermediárias. Os espectros sucessivos de <sup>1</sup>H RMN (apresentado no Apêndice) para a reação do DFO (0,07 M) com BDNPP (7x10<sup>-3</sup>M) em pH 10 mostram a formação de diversas espécies que apresentam sinais na região dos aromáticos (8,0-9,5 ppm) até os 120 minutos de reação, que se quebram, pois desaparecem os respectivos sinais. Após, de 120 minutos até 2 dias de reação, tem-se basicamente o aumento nos sinais do fenolato DNP (ver Apêndice).

#### 4.2.3 Reação do DFO com DNA plasmídico

O elevado poder nucleofílico do DFO evidenciado na reação com BDNPP, comparável a um ácido hidroxâmico simples (BHO<sup>-</sup>), não é sem precedentes, mas resta avaliar se o DFO é nucleofilicamente ativo frente a um diéster de fosfato muito menos reativo, por exemplo, o DNA. Desta forma, utilizou-se o DNA plasmídico, um substrato mais conveniente, e acompanhamos sua reação com DFO na presença e ausência de Zn<sup>2+</sup>. Este metal, que mostrou maior efeito catalítico nos testes cinéticos com BDNPP, é um dos metais mais abundante nas células. Essas análises foram realizadas no Centro de Biologia Molecular no Departamento de Bioquímica da UFSC pelo aluno Tiago Bortolotto sob a supervisão do Professor Hernán Terenzi.

As reações do DNA com DFO foram acompanhadas por 24h a 37°C na faixa de pH de 7-9,5 e os dados obtidos estão resumidos na Figura 22. Ressalta-se que não foi observada nenhuma reatividade na reação do DNA com o nucleófilo quimicamente mais reativo, BHO<sup>-</sup> (ver Apêndice). Analisando a Figura 22, observa-se que não ocorre nenhuma

mudança significativa nas reações nas condições de controle, no entanto, na presença de DFO 0,01M, praticamente 40% da forma circular aberta do DNA (FII) é formada, em pH 7 e 9,5. Ainda, a presença de  $Zn^{2+}$  na reação do DFO potencializa a clivagem do DNA de maneira bastante expressiva, sendo que em pH 7, o tempo de meia vida do plasmídeo é cerca de 16 horas, com ~65% do DNA clivado, na forma circular aberta (FII) e linear (FIII). A forma linear do DNA plasmídico é dificilmente obtida nas reações típicas de clivagem de DNA, o que reafirma o peculiar poder nucleofílico do fármaco DFO nos sistemas biológicos, e incita inúmeras dúvidas acerca do seu uso farmacológico e quão indiscriminado pode ser sua ação nucleofílica no DNA.

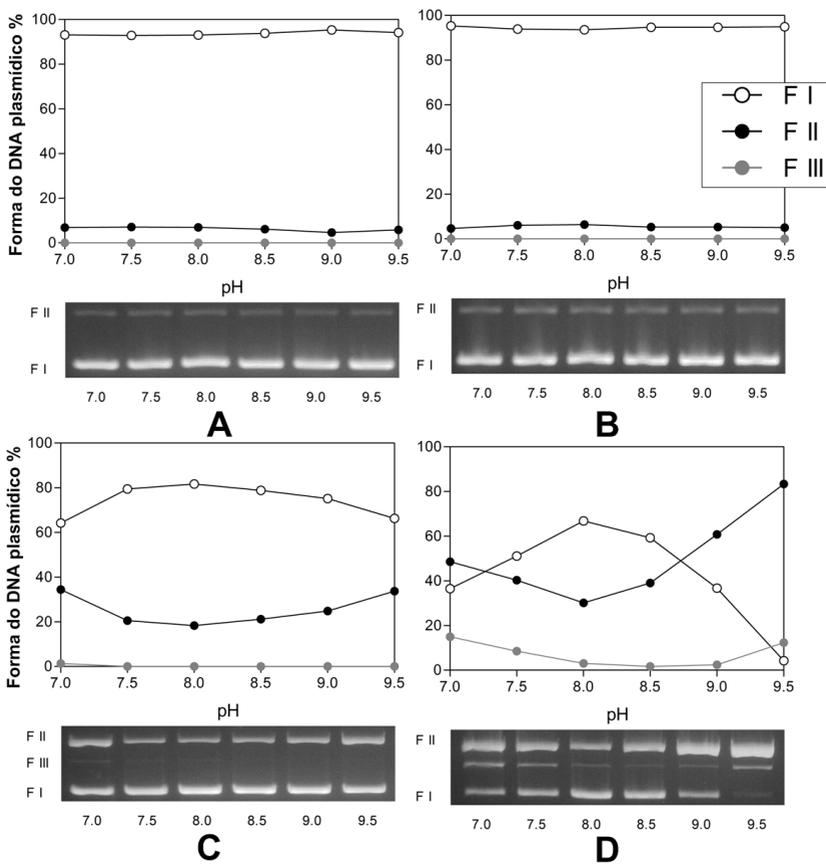


Figura 22 – Perfil de pH dos produtos para reação de clivagem do DNA após 24h a 37°C. (A) Experimento controle com apenas tampão; (B) Experimento controle com  $Zn^{2+} 1 \times 10^{-4} M$ ; (C) Reação com DFO  $1 \times 10^{-4} M$ ; (D) Reação com DFO e  $Zn^{2+}$ , ambos 10 mM. FI, FII e FIII correspondem as formas de super-hélice, circular aberta e linear do DNA pBSK II, respectivamente. Experimento realizado por Tiago Bortolotto sob supervisão do Professor Hernán Terenzi.

A importante atividade fosforolítica evidenciada na Figura 22 indica que deve ocorrer uma significativa interação de associação do DFO com a cadeia polinucleotídica aniônica do DNA. Essa interação deve envolver os grupos amônios primários, múltiplas ligações de hidrogênio e o metal catiônico, e ainda mostrar certa especificidade.

#### 4.2.4 Conclusões parciais

Em síntese (Figura 23), o estudo apresentado com DFO é extremamente relevante e certamente poderá ter grande impacto no meio científico. Inicialmente, o estudo detalhado da reação modelo com BDNPP, por UV-Vis e ESI-MS, permitiu postular o mecanismo solidamente. Após, análises com DNA evidenciaram que o fármaco DFO, que é largamente utilizado para fins terapêuticos, possui atividade química de nuclease, acima do esperado de ácidos hidroxâmicos simples, e essa atividade é aumentada na presença de  $Zn^{2+}$ . Isto significa que a utilização do DFO para fins terapêuticos deve ser seriamente reavaliada, onde se deve ponderar quais os reais efeitos colaterais que este fármaco pode causar e quais interações (destrutivas, associativas, complexantes, etc.) predominam no sistema biológico. Esses fatores certamente irão definir o impacto do uso do DFO (curto/longo prazo), como por exemplo, a quebra indiscriminada do DNA que pode levar ao câncer.

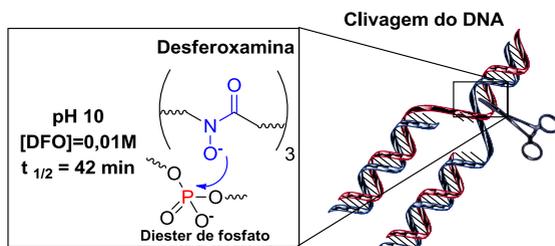
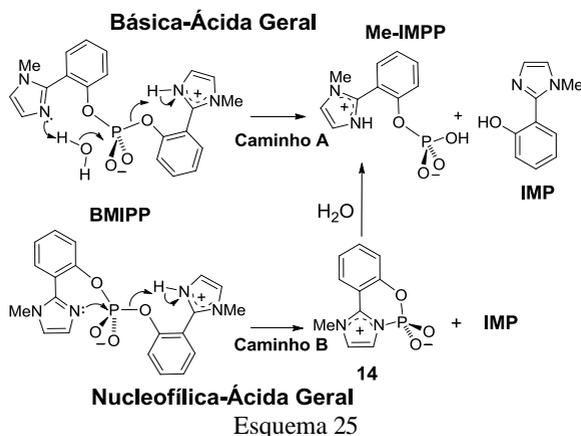


Figura 23 – Resumo dos estudos realizados com o fármaco DFO em reações com um diéster de fosfato modelo (BDNPP) e com o DNA plasmídico.

### 4.3 REAÇÃO INTRAMOLECULAR DE HIDRÓLISE DE UM DIÉSTER DE FOSFATO BIS-IMIDAZOLIL: NOVAS EVIDÊNCIAS MECANÍSTICAS

Além do grupo hidroxamato (no BHO<sup>-</sup> e DFO), outro grupo nucleofílico que se tem interesse em estudar em reações de desfosforilação é o imidazol, devido a sua peculiar natureza química e importância biológica. Assim, foi realizado um estudo completo de reações intramoleculares e intermoleculares, com o grupo imidazol. Inicialmente, estudou-se a reação de hidrólise do diéster bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-íneo-2-il)fenil) fosfato (BMIPP). Na verdade, um estudo cinético bastante completo relacionado à hidrólise do diéster bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-íneo-2-il)fenil) fosfato (BMIPP) já foi reportado (resultados detalhados no Apêndice),<sup>157</sup> mostrando que sua hidrólise é 10<sup>11</sup> vezes mais rápida que a hidrólise do difenil fosfato. No entanto, se comparar com a hidrólise de um diaril fosfato simples com grupo de saída de p*K*<sub>a</sub> similar ao BMIPP (~7,85), a hidrólise do BMIPP é cerca de 10<sup>7</sup> vezes mais rápida, um incremento muito significativo. Para justificar esta alta reatividade do BMIPP, se propôs um mecanismo envolvendo catálise básica geral de um imidazol desprotonado e uma catálise ácida geral de outro imidazol protonado (Caminho A, Esquema 25), se tornando assim um interessante modelo do sítio ativo da ribonuclease A.<sup>185</sup>



Entretanto, a alta reatividade do BMIPP também poderia ser explicada por uma catálise nucleofílica de um grupo imidazolil neutro, concertado com uma catálise ácida geral por outro grupo imidazolil protonado (Caminho B, Esquema 25), um mecanismo cineticamente equivalente à catálise básica-ácida geral. A primeira hipótese mecanística para a hidrólise do BMIPP foi de uma catálise básica-ácida geral, pois se acreditava que a reação por um caminho nucleofílico envolveria um intermediário (14) bastante instável. De fato, experimentos de espectrometria de massas (ESI-MS) não indicaram a presença de nenhum intermediário.

A fim de confirmar o mecanismo de hidrólise do BMIPP novos experimentos foram realizados, incluindo  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN, cálculos computacionais e espectrometria de massas em um aparelho de alta resolução. Os novos dados evidenciam que o mecanismo mais provável para hidrólise do BMIPP é a catálise intramolecular nucleofílica-ácida geral (Caminho B, Esquema 25).<sup>159</sup>

#### 4.3.1 Estudos de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}$ RMN

A reação de hidrólise do BMIPP foi acompanhada por  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  NMR em pH 6,8 e em seguida ajustou-se o pH para 1,1, para monitorar a reação de hidrólise do monoéster formado, 1-metil-2-(2'-imidazolil) fenil fosfato (Me-IMPP), mais reativo em pH menor, Esquema 25. Os espectros sucessivos obtidos estão apresentados na Figura 24 e 25. Três espécies foram observadas: BMIPP, que forma o produto fenólico 1-metil-2-(2'-hidroxifenil)imidazol (IMP) e o monoéster Me-IMPP, como intermediário. Me-IMPP, por sua vez, é hidrolisado formando outra molécula de IMP e fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ). Os deslocamentos das espécies detectadas por RMN estão mostrados na Tabela 10.

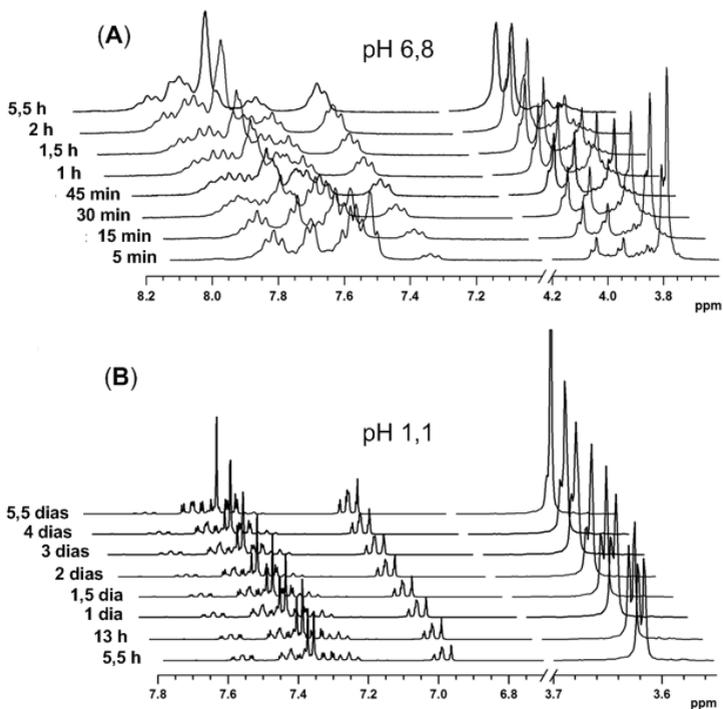


Figura 24 – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para a reação de hidrólise do BMIPP (A) hidrólise do BMIPP em pH=6,8; (B) hidrólise do intermediário monoéster Me-IMPP em pH=1,1, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ\text{C}$ .

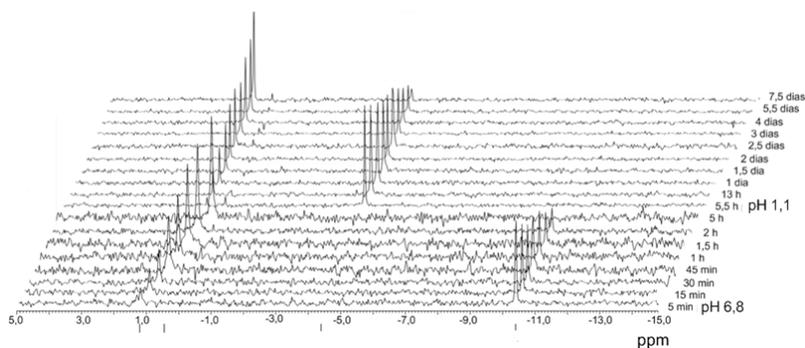


Figura 25 – Espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN para a reação de hidrólise do BMIPP (pH 6,8 de 5 min a 5,5 horas) e Me-IMPP (pH 1,1 de 5,5 horas a 7,5 dias), em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ\text{C}$ .

Nos espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 24) foram observadas mudanças significativas na região do N-metil, sendo que em pH=6,8, o pico de 3,79 ppm do BMIPP desaparece, acompanhado do aparecimento de dois picos em 4,03 e 3,97, referente ao Me-IMPP e IMP, respectivamente. Em pH=1,1, os picos do Me-IMPP e IMP são deslocados para aproximadamente 3,62 ppm e a hidrólise do Me-IMPP resulta em apenas um pico, referente ao produto final IMP. Os assinalamentos dos hidrogênios aromáticos são mais complexos devido a sobreposição dos picos. Todavia, o espectro em pH 6,8 mostra claramente o aparecimento dos picos de 7,88 e 7,34 ppm para Me-IMPP e IMP, respectivamente. Tal ocorre na região dos alifáticos, em pH=1,1, estes picos (em pH 6,8) também são deslocados, e a hidrólise do Me-IMPP é acompanhada pelo desaparecimento do pico de 7,56 e aparecimento do pico em 6,99, referente ao IMP.

Os espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN obtidos mostram de forma mais clara a hidrólise do BMIPP e os produtos formados (Figura 25). Em pH=6,8, o pico do BMIPP em -10,4 ppm desaparece com o tempo, levando ao Me-IMPP em 1,22 ppm. Este pico é deslocado para -4,30 ppm em pH=1,1, e a hidrólise do Me-IMPP forma fosfato inorgânico em 0,57 ppm.

Tabela 10 – Deslocamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN para as espécies envolvidas na reação de hidrólise do BMIPP, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ\text{C}$ .

Composto	$^1\text{H}$ -RMN $\delta$ (ppm)	$^{31}\text{P}$ -RMN $\delta$ (ppm)
BMIPP (pH=6,8)	3,79 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 7,5-7,6 (m, 8H, Ar), 7,70 (d, 2H, Ar), 7,81 (t, 2H, Ar)	-10,38
Me-IMPP (pH=6,8)	4,03 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,5-7,8 (m, 5H, Ar), 7,88 (t, 1H, Ar)	1,22
Me-IMPP (pH=1,1)	3,62 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,5-7,8 (m, 5H, Ar), 7,56 (t, 1H, Ar)	-4,30
IMP (pH=6,8)	3,97 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,3-7,4 (m, 2H, Ar), 7,5-7,8 (m, 4H, Ar)	
IMP (pH=1,1)	3,62 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 6,9-7,0 (m, 2H, Ar), 7,30 (d, 1H, Ar), 7,34 (s, 2H, Ar), 7,41 (t, 1H, Ar)	
$\text{P}_i$		0,57

Relacionando a área dos picos dos espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN, é possível obter um gráfico de concentração relativa das espécies em função do tempo, que está apresentado na Figura 26. As linhas sólidas correspondem ao ajuste pela Equação 6, que descreve o decréscimo da concentração de reagente em função do tempo, segundo o modelo de reações consecutivas.<sup>169</sup> Na Equação 6, a constante de velocidade calculada  $k$ , corresponde à hidrólise da espécie analisada. As constantes obtidas pelo ajuste dos dados da Figura 26 foram  $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para hidrólise do BMIPP em pH=6,8 e  $2,6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  para hidrólise do Me-IMPP em pH 1,1, que estão de acordo com as constantes obtidas cineticamente por espectrometria UV-Vis (BMIPP em pH 6,8:  $k_{\text{obs}}=3,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ; Me-IMPP em pH 1:  $k_{\text{obs}}=3,7 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>157</sup>

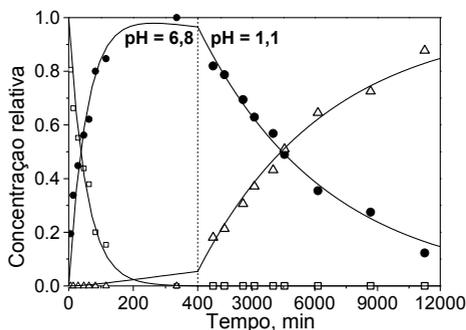


Figura 26 – Gráfico de concentração relativa das espécies vs tempo, calculado pelos espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN, para hidrólise do BMIPP em pH 6,8 e Me-IMPP em pH 1,1, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ\text{C}$ ; ( $\square$ ) BMIPP, ( $\bullet$ ) Me-IMPP e ( $\triangle$ )  $\text{P}_i$ .

Vale ressaltar que os dados de RMN não permitiram detectar nenhum intermediário que indicasse o caminho nucleofílico. Ainda assim, a catálise nucleofílica não pode ser descartada, pois os produtos finais da reação pelo caminho nucleofílico são os mesmos que os que advêm do caminho de catálise básica-geral, Esquema 25. O intermediário 14 que provém da catálise nucleofílica pode ser instável, ou estar em concentrações muito baixas, para ser detectado por RMN.

### 4.3.2 Cálculos computacionais

Outra ferramenta muito importante na elucidação mecanística de reações é o cálculo computacional, pois fornece informações fundamentais acerca da energia das espécies envolvidas (incluindo estados de transições) e indica os caminhos reacionais mais favoráveis. Desta forma, foram realizados cálculos computacionais para comparar os dois mecanismos propostos para a reação de hidrólise do BMIPP (Esquema 25), e assim compreender a natureza e comportamento das estruturas dos reagentes, estados de transições e intermediários, nos caminhos reacionais da hidrólise do BMIPP.

Inicialmente obteve-se a estrutura da espécie do BMIPP reativa, onde o grupo fosfato está solvatado pelo solvente água. Este complexo fosfato-água  $\text{BMIPP}^{\pm}.\text{w}$  está mostrado na Figura 27, onde se observa uma interação favorável da molécula de água com os átomos N1 do grupo imidazol e O2 da fosforila, com uma energia  $\Delta G_{\text{eq}}$  de  $-2,78 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Assim, para calcular as estruturas prováveis dos estados de transições, o reagente de partida considerado foi  $\text{BMIPP}^{\pm}.\text{w}$ . Vale ressaltar que todas as estruturas e parâmetros termodinâmicos de ativação foram determinados no estado gasoso, a fim de simplificar os cálculos computacionais. Isto porque alguns cálculos adicionais usando PCM indicaram resultados muito similares aos obtidos no estado gasoso.

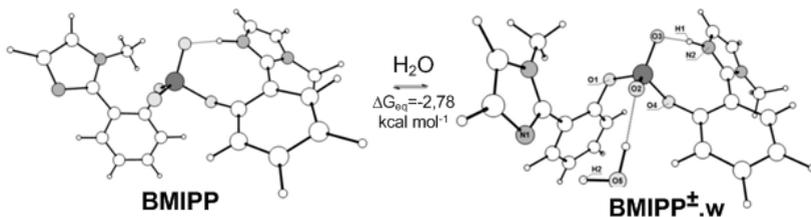


Figura 27 – Estruturas otimizadas para BMIPP e  $\text{BMIPP}^{\pm}.\text{w}$  obtida ao nível B3LYP em fase gasosa.

Partindo da estrutura de  $\text{BMIPP}^{\pm}.\text{w}$ , os dois caminhos reacionais propostos no Esquema 25 foram avaliados: (i) ativação da água coordenada para agir como o nucleófilo e (ii) ataque nucleofílico direto do átomo N1 no átomo de fósforo. Os estados de transições otimizados envolvidos nos dois mecanismos foram denominados TS.GB e TS.NUC, respectivamente e estão mostrados na Figura 28.

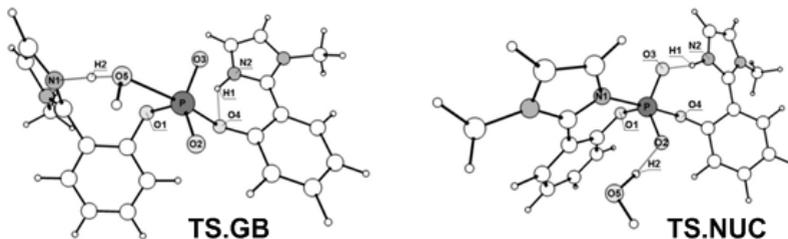


Figura 28 – Estruturas otimizadas de TS.GB e TS.NUC, obtida ao nível B3LYP em fase gasosa.

As distâncias e ângulos das ligações mais relevantes nas estruturas otimizadas estão mostradas na Tabela 11. Para TS.GB, tem-se um ataque O5-P, com quebra simultânea da ligação O4-P e há uma leve ativação da molécula de água por N1. Tem-se uma catálise ácida geral significativa pelo grupo imidazol, onde H1 estabiliza o grupo de saída com a distância O4-H1 de 1,66 Å e o sistema aromático está quase planar ao arilimidazol ( $O1-P-O3-O2 = -176,67^\circ$ ). Ainda, a forte ligação O3-H1 em BMIPP<sup>±.w</sup> não é observada em TS.GB devido a forte ligação de hidrogênio O4-H1.

No caso do ataque nucleofílico direto do imidazol, a estrutura do TS.NUC mostra um estado de transição avançado com um maior grau de ligação formada entre N1-P (1,90 Å) comparado com O5-P em TS.GB (2,20 Å). A estabilização do grupo de saída fenóxido pela ligação de hidrogênio O4-H1 observado em TS.GB não ocorre em TS.NUC, pois se tem uma estabilização preferida da carga negativa de O3 por H1 (O3-H1=1.68 Å), tal ocorre em BMIPP<sup>±.w</sup>. Ao comparar as estruturas de TS.NUC e BMIPP<sup>±.w</sup>, não considerando a formação e quebra no centro de fósforo, a maior diferença estrutural é a torção do anel imidazolínio para proporcionar um posicionamento de N2 favorável ao ataque no fósforo.

Tabela 11 – Distâncias (Å) e ângulos (°) mais relevantes das estruturas otimizadas de BMIPP<sup>±</sup>.w, TS.GB, TS.NUC e TS.NUC2.<sup>a</sup>

	BMIPP <sup>±</sup> .w	TS.GB	TS.NUC	TS.NUC2
O3-H1	1,50	2,56	1,68	1,67
O4-P	1,70	2,32	2,32	2,32
O4-H1	2,50	1,66	2,26	2,27
O5-P	4,02	2,20	3,78	-
N1-H2	2,19	1,73	2,76	-
N1-P	4,46	3,94	1,90	1,94
N2-H1	1,09	1,05	1,05	1,05
O1-P-O3-O2	131,40	-176,67	-162,67	-165,21

<sup>a</sup> BMIPP<sup>±</sup>.w corresponde à estrutura otimizada do complexo BMIPP com água. TS.GB e TS.NUC correspondem às estruturas otimizadas para os estados de transições via catálise básica-geral e nucleofílica (caminho A e B, Esquema 25), respectivamente. TS.NUCS se refere a estrutura otimizada do estado de transição que parte do BMIPP sem água solvatada, via o caminho nucleofílico.

Através das energias da estruturas otimizadas calculou-se as energias de entalpia, entropia e Gibbs, dadas na Tabela 12. Apesar de os caminhos reacionais A e B (Esquema 25) serem cineticamente equivalentes, a energia calculada  $\Delta G^\ddagger$  é 9,5 kcal.mol<sup>-1</sup> menor para TS.NUC comparado com TS.GB, o que indica que o mecanismo nucleofílico é mais favorável para a reação estudada. Ainda, o valor de  $\Delta G^\ddagger$  para TS.NUC é apenas 2,79 kcal.mol<sup>-1</sup> menor que o valor experimental obtido (Tabela 12) e o valor de  $\Delta H^\ddagger$  é ainda mais parecido, com uma diferença de apenas 0,44 kcal.mol<sup>-1</sup> do valor experimental. A maior diferença observada entre o valor de  $\Delta S^\ddagger$ , experimental e calculada está provavelmente associada à reorganização das moléculas de solventes (não considerado nos cálculos computacionais na fase gasosa), entretanto o valor está de acordo com o esperado para reações intramoleculares.

Tabela 12 – Valores experimentais<sup>157</sup> e calculados (B3LYP) para as variações de energias de ativação de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ), entalpia ( $\Delta H^\ddagger$ ) e entropia ( $\Delta S^\ddagger$ ) para as estruturas de TS.GB e TS.NUC.<sup>a</sup>

	$\Delta G^\ddagger/\text{kcal.mol}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger/\text{kcal.mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger/\text{cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
Experimental	$21,7 \pm 1,4^b$	$19,0 \pm 1,2$	$-9,0 \pm 0,5$
TS.GB	28,37	29,16	2,67
TS.NUC	18,91	18,56	-1,17

<sup>a</sup>Energias calculadas em relação ao BMIPP<sup>±.w</sup>, em 298.15 K. TS.GB e TS.NUC correspondem às estruturas otimizadas para os estados de transições via catálise básica-geral e nucleofílica (caminho A e B, Esquema 25), respectivamente.

As estruturas dos produtos da reação Me-IMPP e IMP também foram otimizadas e assim foi possível relacionar as energias das estruturas com a coordenada de reação para todas as espécies mais relevantes da reação estudada, tal mostrada na Figura 29. Assim, BMIPP leva ao estado reativo BMIPP<sup>±.w</sup> que pode levar aos ET TS.GB e TS.NUC, que se decompõe levando aos produtos IMP e Me-IMPP, passando pelo intermediário 14 (no caso de TS.NUC). O caminho reacional envolvendo TS.NUC é mais eficiente e resulta na formação de Me-IMPP + INT que é  $7,16 \text{ kcal mol}^{-1}$  maior em energia que os produtos finais (IMP + Me-IMPP). De fato, o intermediário fosforano 14 não foi detectado por RMN, e os cálculos indicam que 14 pode se decompor rapidamente sob condições amenas.

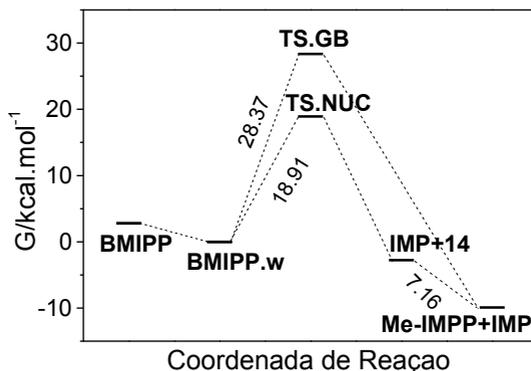


Figura 29 – Variação da energia livre com a coordenada de reação envolvendo TS.GB e TS.NUC. Energias calculadas relativo à BMIPP<sup>±.w</sup>.

Os resultados mostram que em TS.NUC, a molécula de água do complexo BMIPP<sup>±</sup>.w não está envolvida diretamente nas interações de formação e quebra de ligação, portanto a reação nucleofílica do imidazol também foi modelada sem considerar a assistência da água, partindo da espécie zwitteriônica de BMIPP. A estrutura otimizada do estado transição que provém da espécie reativa BMIPP sem água foi designada como TS.NUC2 (Figura 30 e dados das distâncias e ângulos relevantes estão dados na Tabela 11). Os resultados para TS.NUC2 foram muito similares aos obtidos para TS.NUC, sendo que o  $\Delta G^\ddagger$  calculado para o ataque de N1 neste caso é 19,57 kcal.mol<sup>-1</sup>, muito próximo dos dados experimentais.

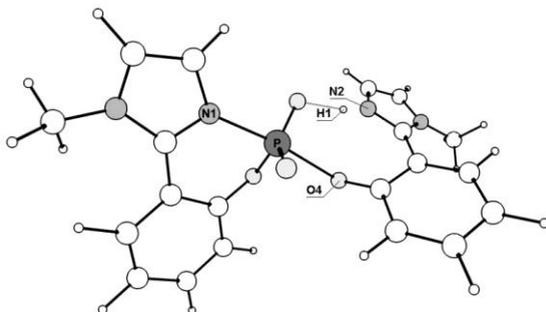


Figura 30 – Estrutura otimizada de TS.NUC2, obtida ao nível B3LYP em fase gasosa.

Foi realizada análise IRC da estrutura de TS.NUC2 (exige menos processamento computacional), que delinea claramente todas as mudanças nas distâncias das ligações mais relevantes na estrutura do estado de transição, Figura 31. A Figura 31 evidencia que a aproximação de N1 do grupo imidazol ao átomo de fósforo (N1-P) é concertada com a eliminação do grupo de saída (O4-P), enquanto H1 é transferido para O3 (O3-H1), estabilizando o grupo de saída.

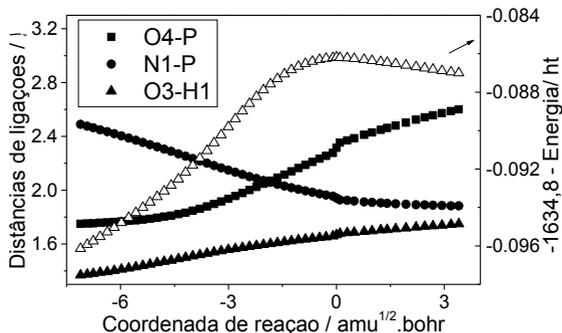


Figura 31 – Variação das distâncias das ligações e energias ( $\Delta$ ) ao longo do IRC para a reação de hidrólise intramolecular nucleofílica de BMIPP via TS.NUC2.

### 4.3.3 Análise de espectrometria de massas de alta resolução

Outra ferramenta fundamental na elucidação mecanística é a espectrometria de massas, pois permite detectar intermediários e produtos e caracterizá-los. Experimentos de ESI-MS-(/MS) já foram realizados anteriormente para a reação de hidrólise do BMIPP que permitiram detectar e caracterizar as espécies: BMIPP de  $m/z$  409, Me-IMP de  $m/z$  253 e IMP de  $m/z$  173 (Ver Apêndice). No entanto, por essa técnica não foi possível detectar (no modo positivo e negativo) o intermediário cíclico 14, importante para consolidar o mecanismo intramolecular nucleofílico como mais favorável, na reação de hidrólise do BMIPP. Para explorar mais a fundo a existência do intermediário 14, foi utilizada a espectrometria de massas LTQ FT-ICR MS de ultra alta resolução, que combina a mais avançada tecnologia em captura de íon (“Ion Trap”) e ressonância ciclotrônica de íons e transformada de Fourier (“Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance”). A reação de hidrólise do BMIPP foi acompanhada por LTQ FT-ICR MS no modo positivo e negativo, após 10 minutos de reação em pH 6,5 a 60°C.

No modo negativo, foram observados os mesmos ânions identificados anteriormente por Q-TOF. Surpreendentemente, no modo positivo (Figura 32), o íon de  $m/z$  237 foi interceptado e designado como o intermediário cíclico 14. De fato, o programa Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific, vinculado ao equipamento), que calcula a composição molecular com exatidão de 0,4ppm, identificou a espécie  $C_{10}H_{10}O_3N_2P_1$  como a composição mais provável para o íon de  $m/z$  237,14. Deste modo, esses resultados permitem postular com maior

credibilidade que a hidrólise do BMIPP ocorre por um mecanismo de catálise intramolecular nucleofílica-ácida geral pelos grupos imidazolil.

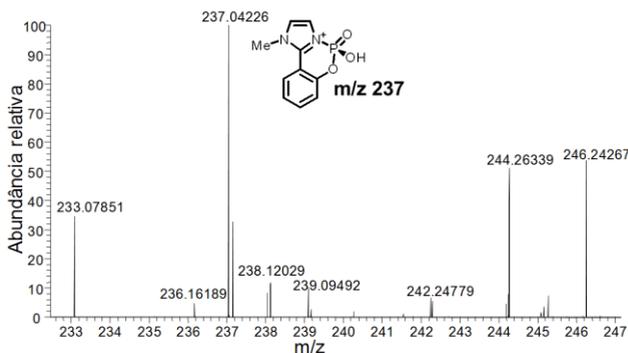


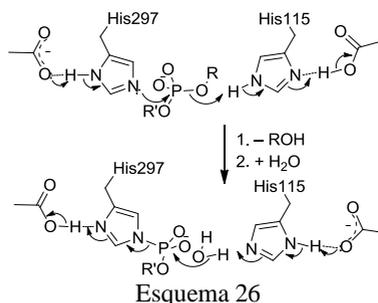
Figura 32 – ESI(+) LTQ-FT-ICR MS da hidrólise do BMIPP após 10 min de reação em meio aquoso, pH 6,5 e 60°C.

#### 4.3.4 Conclusões parciais

As novas evidências apresentadas para a reação de hidrólise do BMIPP são extremamente fundamentais, pois amparam com resultados mais conclusivos a hipótese mecanística de catálise intramolecular nucleofílica. Apesar da reação do BMIPP já ter sido estudada detalhadamente,<sup>157</sup> ainda não era possível atribuir qual hipótese mecanística ocorria de fato. Agora, com as recentes descobertas mostradas aqui, têm-se evidências suficientes para atribuir com maior confiança qual mecanismo ocorre.<sup>184</sup> Os resultados cinéticos indicam catálise bifuncional na hidrólise do BMIPP, envolvendo dois grupos imidazolil, um como base livre e outro como ácido conjugado. As evidências sustentam que a alta eficiência catalítica observada em BMIPP se deve a um mecanismo de natureza nucleofílica assistida por uma catálise ácido-geral, no entanto, o mecanismo de catálise básica-geral não pode ser totalmente descartado, podendo ainda ocorrer em alguma proporção.

A dificuldade em detectar o intermediário 14, que exige uma técnica de alta resolução (LTQ FT-ICR MS), não é sem precedentes, pois sabe-se que a ligação fosforil-imidazolínio (P-N<sup>+</sup>) é instável<sup>99</sup>. A identificação do intermediário fosforilado 14 (conhecido com instável) encorajou estudos subsequentes (*vide infra*) de reações intermoleculares com o imidazol a fim de detectar intermediários e avaliar a reatividade de uma série de derivados que possuem ligação (P-N<sup>+</sup>).

Assim, BMIPP é um modelo mais adequado da enzima fosfolipase D, que atua na clivagem de diésteres pouco reativos presentes no sistema biológico, onde um grupo histidina atua como nucleófilo, que é assistido por outra molécula de histidina, Esquema 26. Por exemplo, as topoisomerases que atuam em processos de replicação e empacotamento do DNA, formam um intermediário de diéster da tirosina com a cadeia do DNA, que é catalisada pela fosfolipase.<sup>186</sup>



As novas evidências acerca da reação de hidrólise do BMIPP estão claramente ilustradas na Figura 33, que em essência, mostram que as técnicas utilizadas permitiram “pescar” estados de transições, intermediários e produtos, que melhor fundamentam o mecanismo de catálise intramolecular nucleofílica-ácida-geral. Este tipo de abordagem é muito interessante, pois permeia perspectivas no design de análogos de estados de transições e intermediários enzimáticos. Arelado a estes fatos, está o interesse em estudar os diferentes tipos de reações que podem ocorrer com o imidazol, em meio micelar, em cadeia polimérica e com substratos diferentes. E também detectar possíveis intermediários fosforilados com o grupo imidazolil.

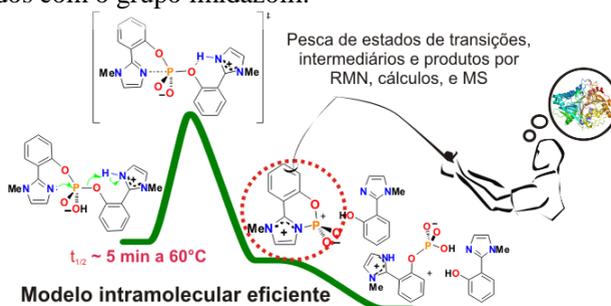


Figura 33 – Resumo das novas evidências para hidrólise do BMIPP: “pesca” de estados de transições, intermediários e produtos.

## 4.4 REAÇÕES DE ÉSTERES DE FOSFATOS DERIVADOS DO 2,4-DINITROFENOL COM IMIDAZOL

Baseado nas evidências da reação intramolecular do BMIPP e sua repercussão mecanística, *i.e.*, que pode existir em solução intermediários de imidazol fosforilados estáveis o suficiente, foram estudadas as reações intermoleculares de desfosforilação com o imidazol. Apesar das reações de ésteres de fosfato com imidazol parecer simples e já terem sido reportado na literatura (com alguns ésteres),<sup>55,71,72</sup> nenhum estudo as detalhou mecanisticamente, pelo desafio em detectar e caracterizar os intermediários de imidazol fosforilados, que podem ajudar a esclarecer a importância das fosfohistidinas. Autores já mostraram que fosforilimidazol e fosforil-*N*-metilimidazol, obtidos pela síntese de fosforamido de potássio com a respectiva base, são relativamente estáveis e podem ser usados como poderosos agentes fosforilantes.<sup>76,187</sup>

Neste contexto, estudou-se as reações do imidazol IMZ com uma classe de ésteres de fosfatos derivados do 2,4-dinitrofenol, o monoéster DNPP, os diésteres BDNPP e EDNPP e o triéster DEDNPP. Foram realizados estudos por UV-Vis, RMN e espectrometria de massas que evidenciam que o IMZ atua como eficiente catalisador intermolecular nucleofílico, o qual é regenerado ao fim da reação. Além disso, foi possível detectar os intermediários fosforilados e avaliar suas reatividades.

### 4.4.1 Estudos cinéticos

Os resultados cinéticos mostram que IMZ é um potente nucleófilo, e os perfis de pH obtidos para as reações estudadas estão apresentados na Figura 34, juntamente com as respectivas reações em água, para fins comparativos. Observa-se que as reações na presença do IMZ (1M, pH 8,5), causa incrementos em  $k_{\text{obs}}$  de até  $10^4$  vezes, comparado com a reação espontânea em água. Os dados da Figura 34 foram ajustados pela Equação 12, que foi deduzida baseada no Esquema 27, onde se considera a reação do substrato com água ( $k_0$ ), hidróxido ( $k_{\text{OH}}$ ), IMZ ( $k_{\text{N}}$ ) e  $\chi_{\text{IMZ}}$  representa a fração molar da espécie neutra. O IMZ apresenta um equilíbrio de dissociação com  $\text{p}K_{\text{a}}=7,10$ ,<sup>188</sup> determinante em sua efetividade catalítica e o patamar observado em  $\text{pH}>8$  indica que a espécie neutra é mais reativa. Os parâmetros obtidos pelo ajuste cinético da Figura 34 estão apresentados na Tabela 13. Na Tabela 13 também estão apresentados os parâmetros termodinâmicos de ativação (calculados pelas Equações 2-4), efeitos isotópicos de solvente

e constante de segunda ordem ( $k_N^L$ ) calculada pela relação linear de  $[\text{IMZ}]$  vs  $k_{\text{obs}}$  (análoga a Equação 5). Os gráficos lineares que permitiram calcular os parâmetros termodinâmicos de ativação e  $k_N^L$  estão mostrados no Apêndice.

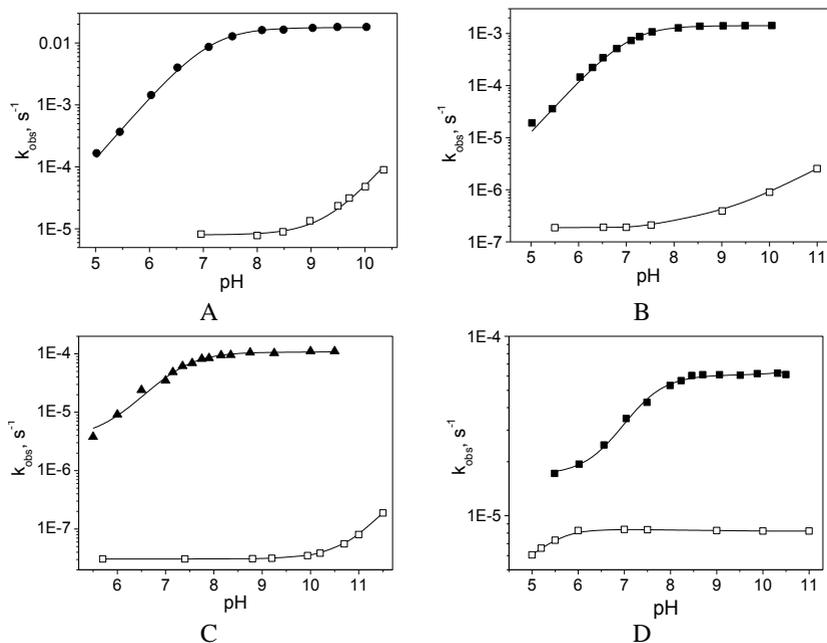
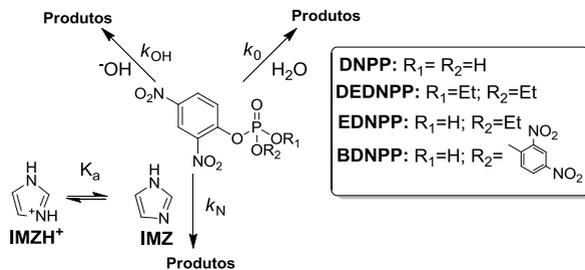


Figura 34 – Perfil de pH para as reações do IMZ (1M) com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M); (B) BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M), (C) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e (D) DNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), a  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1.0$  (KCl). As linhas sólidas correspondem ao ajuste pela Equação 12. As reações respectivas de hidrólise espontânea ( $\square$ ) estão mostradas para fins comparativos: dados para BDNPP e DNPP são diretamente da literatura;<sup>189,190</sup> dados para EDNPP foram estimados da reação de hidrólise do metil 2,4-dinitrofenil fosfato<sup>73</sup> e dados para DEDNPP foram obtidos experimentalmente (Ver Apêndice).



Esquema 27

$$k_{obs} = k_0 + k_{OH} [OH] + k_N [IMZ] \chi_{IMZ}$$

12

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos, termodinâmicos de ativação e isotópicos calculados para as reações de DEDNPP, BDNPP, EDNPP e DNPP com IMZ.<sup>a</sup>

	DEDNPP	BDNPP	EDNPP	DNPP
$k_0, s^{-1b}$	(8,0±0,50) x10 <sup>-6</sup>	(1,90±0,40) x10 <sup>-7</sup>	(3,60±0,60) x10 <sup>-8</sup>	(1,69±0,07) x10 <sup>-5</sup>
$k_{OH}, s^{-1b}$	(4,2±0,20) x10 <sup>-1</sup>	(2,90±0,11) x10 <sup>-3</sup>	(4,90±0,50) x10 <sup>-5</sup>	(8,24±0,20) x10 <sup>-3</sup>
$k_N, M^{-1}s^{-1}$	(1,77±0,01) x10 <sup>-2</sup>	(1,42±0,03) x10 <sup>-3</sup>	(1,03±0,04) x10 <sup>-4</sup>	(4,41±0,09) x10 <sup>-5</sup>
$pK_a$ (IMZ) <sup>c</sup>	7,10±0,20			
$k_N^L,$ $M^{-1}s^{-1d}$	(1,52±0,07) x10 <sup>-2</sup>	(1,27±0,01) x10 <sup>-3</sup>	(9,57±0,14) x10 <sup>-5</sup>	(3,47±0,05) x10 <sup>-5</sup>
$\Delta H^\ddagger,$ kcal mol <sup>-1e</sup>	+9,90±0,30	+10,2±0,05	+12,6±0,15	+20,3±1,1
$\Delta S^\ddagger,$ e.u. <sup>e</sup>	-33,8±1,30	-37,9±0,16	-34,69±0,53	-10,2±3,70
$\Delta G^\ddagger,$ kcal mol <sup>-1e</sup>	19,99	21,45	22,98	23,31
$k_{H_2O}/k_{D_2O}$	1,25	1,24	1,14	1,09

<sup>a</sup> Parâmetros cinéticos obtido pelo ajuste dos dados da Figura 34 com a Equação 12, baseado no Esquema 27. <sup>b</sup> Consistente com valores da literatura <sup>c</sup> Valor determinado por titulação potenciométrica a 25°C, I=1, ver Apêndice. <sup>d</sup> Constante de segunda ordem obtida em pH 8,5, pelo ajuste linear de [IMZ] vs  $k_{obs}$ , análoga a Equação 5. <sup>e</sup> Parâmetros calculados com IMZ (1M), pH 8,5, pelas Equações 2-4 e  $\Delta G^\ddagger$  a 25°C.

Analisando os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 13, observa-se que para a classe de ésteres de fosfato avaliados, a reatividade é tal esperado: o triéster DEDNPP é mais reativo, seguido dos diésteres BDNPP e EDNPP e por fim tem-se monoéster DNPP como menos reativo. Comparando  $k_N$  com  $k_0$ , tem-se incrementos de (i) 2-3000 vezes para DEDNPP e EDNPP; (ii) 7500 vezes para BDNPP; e (iii) 3 vezes para DNPP. A diferença de reatividade entre os diésteres BDNPP e EDNPP pode ser explicado pelo efeito estéreo dos grupos ligados ao fosfato. Já para o monoéster DNPP, a pequena reatividade está de acordo com dados da literatura para reações de nucleófilos com DNPP, onde postula-se uma baixa reatividade do DNPP com nucleófilos, devido a repulsão eletrostática.<sup>71,191</sup>

Baseado em estudos anteriores envolvendo reações nucleofílicas com ésteres de fosfato,<sup>73</sup> e considerando os resultados cinéticos obtidos, é provável que as reações estudadas com IMZ envolvam um mecanismo  $S_N2(P)$ , exceto para o monoéster DNPP. As entropias de ativação calculadas são grandes e negativas, que seria consistente com catálise nucleofílica ou básica geral, mas os baixos efeitos isotópicos de solvente indicam que as reações são essencialmente de natureza nucleofílica.<sup>73</sup> Evidências de RMN e espectrometria de massas, apresentadas a seguir, fundamentam esta hipótese.

No caso do DNPP, pode estar ocorrendo uma catálise nucleofílica ou básica geral, mas a baixa reatividade do IMZ é característica de catálise básica geral. Vale notar a importante contribuição da força iônica na reação. Em geral, os monoésteres apresentam um efeito significativo da força iônica (mais específica para cátions)<sup>190</sup> na velocidade da reação e inclusive os dados para a hidrólise espontânea do DNPP na Figura 34 são na ausência de força iônica. Autores reportam que com força iônica 1,0 (NaCl), em pH 9,  $k_{obs}$  é  $1,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , cerca de 2 vezes maior que na ausência de KCl ( $k_{obs} = 8,28 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>190</sup> Nesse contexto, foi avaliado o efeito da força iônica na reação do IMZ com DNPP, para analisar o real efeito nucleofílico do IMZ na reação com o monoéster. Os valores de  $k_{obs}$  com o aumento da força iônica ([KCl]) mostraram uma relação linear e estão mostrados na Tabela 14, onde evidenciam uma importante contribuição da força iônica na reação estudada, isto é, tem-se um aumento na velocidade da reação com o aumento de [KCl], que pode ser explicada pela estabilização eletrostática. Ainda assim, IMZ tem um efeito catalítico significativo na ausência de força iônica, comparada com a respectiva reação espontânea. Apesar de os dados cinéticos não permitirem uma especulação sólida do mecanismo da reação, propõe-se que a reação do

DNPP com IMZ ocorre via uma catálise básica-geral assistindo a reação de hidrólise, diferente do mecanismo proposto para os demais ésteres avaliados. Para a reação de hidrólise do DNPP, se postula que o mecanismo tem maior caráter dissociativo, e envolve a formação inicial do metafosfato, mas na reação com IMZ deve prevalecer um mecanismo concertado.

Tabela 14 – Efeito da força iônica [KCl] em  $k_{\text{obs}}$  para reação do DNPP com IMZ (1M), pH 9,0, 25°C.<sup>a</sup>

[KCl], M	$k_{\text{obs}}$ , s <sup>-1</sup>	[KCl], M	$k_{\text{obs}}$ , s <sup>-1</sup>
0	$3,0 \times 10^{-5}$	0,8	$5,35 \times 10^{-5}$
0,2	$3,58 \times 10^{-5}$	1,0	$6,11 \times 10^{-5}$
0,4	$3,97 \times 10^{-5}$	1,2	$6,53 \times 10^{-5}$
0,6	$4,69 \times 10^{-5}$		

<sup>a</sup> Para a reação de hidrólise do DNPP apenas em água, tem-se com força iônica 1,0 (NaCl), em pH 9,  $k_{\text{obs}}=1,8 \times 10^{-5}$  s<sup>-1</sup>; E sem força iônica, tem-se  $k_{\text{obs}}=8,28 \times 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>.<sup>190</sup>

#### 4.4.1.2 Comparação da reatividade do imidazol: gráficos de Brønsted

Uma comparação bastante interessante que permite avaliar a reatividade do IMZ em relação a outros nucleófilos, em reações com os ésteres estudados, é o gráfico de Brønsted, que relaciona o logaritmo da constante de segunda ordem da reação nucleofílica ( $\log k_N$ ) vs o  $pK_a$  do nucleófilo. Geralmente, para reações concertadas, espera-se um perfil linear para  $\log k_N$  vs  $pK_{a \text{ Nu}}$ , e o coeficiente angular ( $\beta_{\text{nuc}}$ ) pode fornecer informações importantes quanto a natureza dissociativa ou associativa do estado de transição da reação.<sup>87</sup> De fato, estudos anteriores já descreveram detalhadamente as reações dos ésteres de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol com diversos nucleófilos, incluindo os  $\alpha$ -nucleófilos.<sup>63,85,87</sup> Todavia, é interessante ilustrar como o IMZ, que não é um nucleófilo detentor do efeito alfa, possui reatividade muito próxima de típicos  $\alpha$ nucleófilos. Nas Figuras 35-37, estão apresentados os gráficos de Brønsted para as reações nucleofílicas com BDNPP,<sup>85</sup> EDNPP<sup>63</sup> e DEDNPP,<sup>87</sup> que incluem os dados com IMZ e também BHO<sup>-</sup>, apresentados anteriormente no item 4.1 (Tabela 6). No caso do DNPP, que é pouco reativo frente a nucleófilos, a reação com IMZ não parece envolver ataque nucleofílico do IMZ, o qual deve atuar como um catalisador básico geral na hidrólise, justificando assim a irrelevância do gráfico de Brønsted nesta reação (o gráfico de Brønsted considera apenas o ataque nucleofílico direto da espécie básica avaliada).

Vale ressaltar que nos gráficos de Brønsted apresentados nas Figuras 35-37, as constantes de velocidades referem-se apenas ao ataque nucleofílico no átomo de fósforo. Isto porque se sabe que nas reações dos ésteres derivados do 2,4-dinitrofenol, é muito comum o ataque nucleofílico ocorrer no átomo do carbono aromático (e.g.  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{BHO}^-$ ), ainda que em menor proporção que no fósforo (~40%).<sup>63,166</sup> Curiosamente, para a série de ésteres estudados com IMZ, não ocorre ataque nucleofílico no carbono. Essa peculiaridade do IMZ é importante no estudo de reações de desfosforilação, pois permite delimitar precisamente a reação dos grupos reativos de interesse, que pode se tornar uma tarefa difícil em reações mais complexas que envolvem paralelamente, o indesejado ataque no anel aromático. Esse ataque nucleofílico no carbono não ocorre facilmente em outros ésteres, tais como nos menos reativos, encontrados nos sistemas biológicos, e assim quando se estuda reações que procuram modelar aspectos mecanísticos de reações de interesse biológicos, torna-se difícil as analogias, quando há muitas reações paralelas. Por isto, a química do IMZ surpreende e reafirma a importância de estudar sua reatividade nucleofílica, postular mecanismos e estabilidade de intermediários fosforilados.

A ausência do ataque nucleofílico do IMZ no anel aromático foi confirmado pela a reação do CDNB com IMZ (formaria apenas o produto com ataque no anel aromático), que foi acompanhado por UV-Vis e  $^1\text{H}$  RMN (Ver Apêndice). Nos estudos de UV-Vis, foi acompanhado a reação do CDNB com IMZ (1M) nos pHs 6,56; 7,55 e 8,49, por aproximadamente 24h e não foi observado nenhuma mudança no espectro inicial do reagente. Estas observações foram confirmadas por  $^1\text{H}$  RMN, onde os espectros sucessivos obtidos até 24h de reação não mostraram nenhuma mudança significativa (maiores detalhes no item 4.4.2).

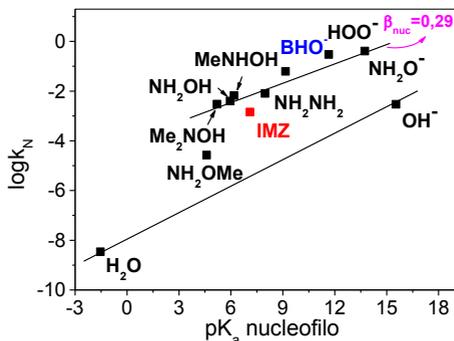


Figura 35 – Gráfico de Brønsted de  $\log k_N$  vs  $pK_a$  para reações de diferentes nucleófilos com BDNPP.<sup>85,166</sup>

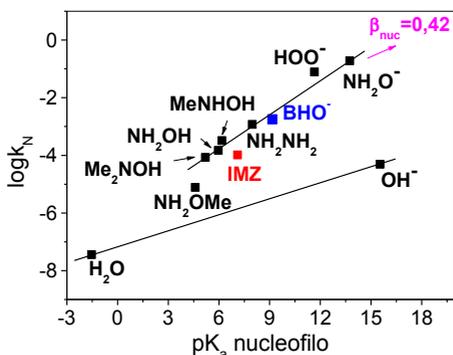


Figura 36 – Gráfico de Brønsted de  $\log k_N$  vs  $pK_a$  para reações de diferentes nucleófilos com EDNPP.<sup>63</sup>

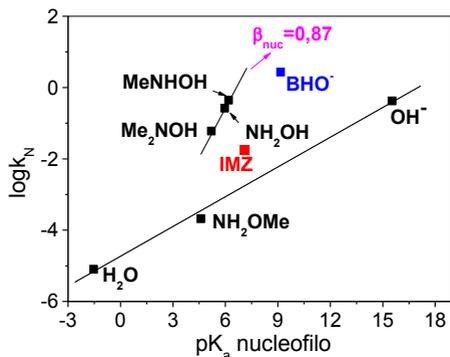


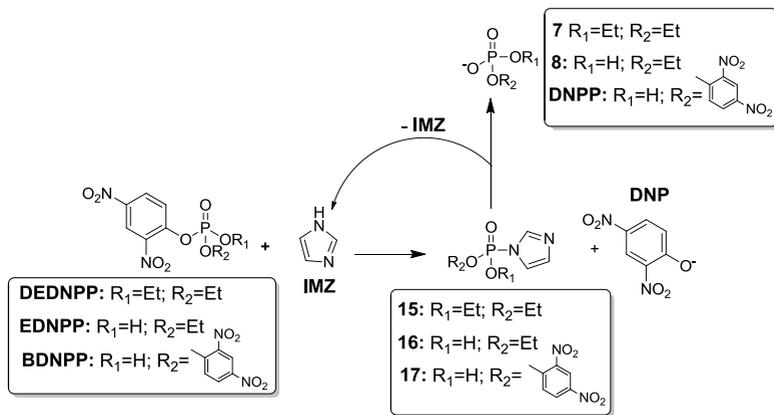
Figura 37 – Gráfico de Brønsted de  $\log k_N$  vs  $pK_a$  para reações de diferentes nucleófilos com DEDNPP.<sup>87</sup>

Os gráficos de Brønsted apresentados confirmam a excepcional reatividade do IMZ nas reações de desfosforilação, muito similar a dos  $\alpha$ -nucleófilos. No caso do BDNPP e EDNPP (Figura 35 e 36), o IMZ acompanhou o comportamento linear dos  $\alpha$ -nucleófilos que atacam pelo átomo de oxigênio, que possuem  $\beta_{\text{nuc}}$  de 0,29 e 0,41 para BDNPP e EDNPP, respectivamente. Nas reações nucleofílicas com DEDNPP (Figura 37), tem-se um comportamento diferente, que talvez leve a conclusões prematuras visto que foram avaliados poucos nucleófilos. Ainda assim, observa-se claramente que o IMZ possui reatividade inferior na reação com DEDNPP, comparado com os  $\alpha$ -nucleófilos que possuem  $\beta_{\text{nuc}}$  de 0,87. Resumidamente, os  $\beta_{\text{nuc}}$  mostrados para os ésteres estudados indicam um mecanismo concertado que possui um estado de transição com maior caráter associativo que segue a ordem DEDNPP>EDNPP>BDNPP. Todavia, os dados obtidos não são suficientes para indicar a natureza do estado de transição das reações estudadas com IMZ, mas acredita-se que o IMZ poderia estabilizar substancialmente um estado de transição de caráter associativo, pela capacidade de deslocalizar carga.

Os dados apresentados nas Figuras 36-37 com  $\text{BHO}^-$ , também foram obtidos neste trabalho (discutido anteriormente no item 4.1) e por constituir um poderoso  $\alpha$ -nucleófilo, mostra uma boa correlação com os demais nucleófilos da mesma classe, exceto para o DEDNPP.<sup>82</sup>

#### 4.4.2 Estudos de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}$ RMN

Considerando que as reações estudadas do BDNPP, DEDNPP e EDNPP com IMZ sejam de caráter nucleofílico, conforme indicado pelos resultados cinéticos de UV-Vis obtidos, logo essas reações devem envolver a formação de um intermediário de imidazol fosforilado 15-17, tal ilustrado no Esquema 28. No caso da reação do BMIPP, a reação nucleofílica intramolecular não pôde ser confirmada por RMN, visto que o intermediário cíclico fosforilado é relativamente instável, para ser detectado. Todavia, os resultados mostram que os intermediários de imidazol fosforilado acíclicos (15-17, Esquema 28) das reações intermoleculares estudadas puderam ser detectados por RMN, confirmando certa estabilidade. Para a reação do DNPP com IMZ, a natureza de catálise básica-geral da reação também foi confirmada RMN.



Esquema 28

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN sucessivos obtidos em função do tempo das reações do IMZ (0,4M) com BDNPP, DEDNPP e EDNPP estão mostrados nas Figuras 38-40. Ressalta-se que o DEDNPP é pouco solúvel em  $\text{D}_2\text{O}$ , repercutindo na baixa intensidade observada (Figura 40), principalmente na região dos hidrogênios aromáticos, mas ainda assim é possível distinguir as espécies mais relevantes e na análise quantitativa (*vide infra*) foram considerados os hidrogênios do grupo etila que fornecem uma maior intensidade.

Os deslocamentos das espécies do Esquema 28, detectadas por  $^1\text{H}$  RMN estão apresentadas na Tabela 15, todos em relação ao padrão interno TMS. Os deslocamentos foram designados baseados nos espectros das substâncias puras, no entanto alguns picos ficaram cobertos pelo sinal do IMZ em excesso. Ainda assim, os picos observados são suficientes para sustentar o mecanismo nucleofílico proposto no Esquema 28. Os deslocamentos observados para IMZ, EDNPP, BDNPP, DEDNPP, DNP, DNPP, 7 e 8 (Esquema 29) foram confirmados com dados da literatura.<sup>63,82,166,168</sup>

É importante observar que o intermediário 16 mostra deslocamento de  $^1\text{H}$  RMN junto com o éster 8, que foi confirmado por experimentos de  $^{31}\text{P}$  RMN, *vide infra*. Assim, no caso da reação do EDNPP com IMZ, não foi possível distinguir claramente, por  $^1\text{H}$  RMN, o intermediário fosforilado formado, mas sim as demais espécies envolvidas (EDNPP, DNP). Já no caso dos intermediários fosforilados 15-17, não foi encontrado nenhum relato na literatura para 16-17, mas para 15, tem-se dados de  $^1\text{H}$  RMN reportado na literatura<sup>192</sup>, consistente com os assinalamentos deste trabalho.

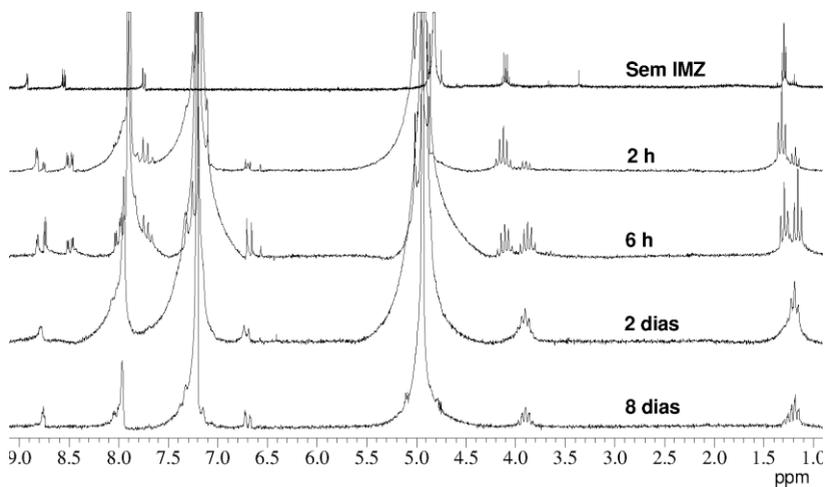


Figura 38 – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para reação do IMZ (0,6M) com EDNPP (0,03M), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$ , 25°C.

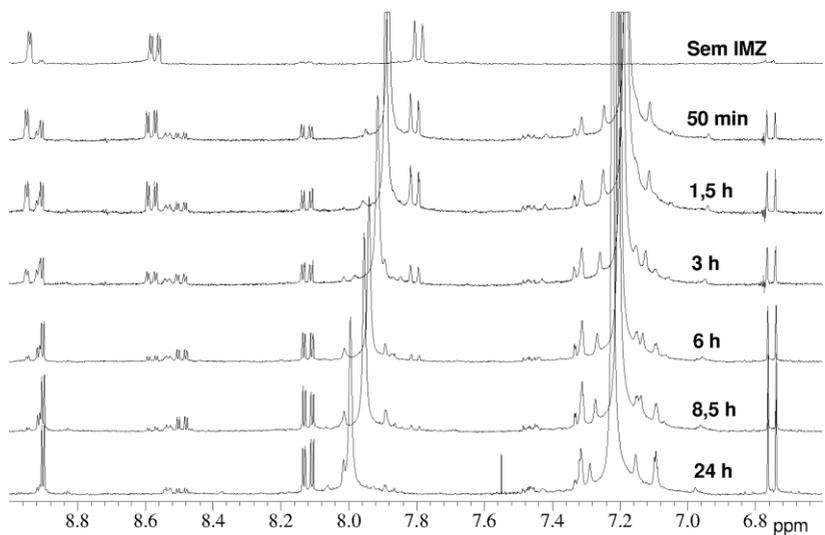


Figura 39 – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para reação do IMZ (0,048M) com BDNPP ( $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$ , 25°C.

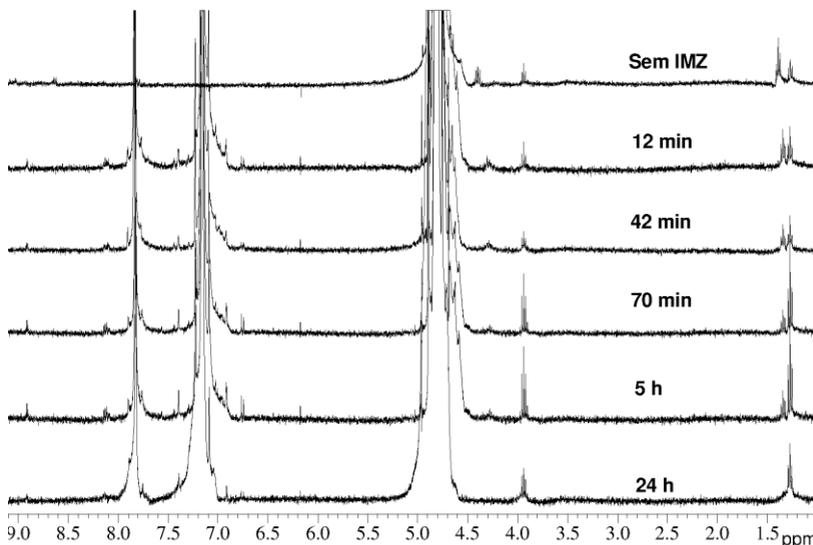


Figura 40 – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para reação do IMZ (0,07M) com DEDNPP ( $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Tabela 15 – Deslocamentos de  $^1\text{H}$  RMN para as espécies envolvidas na reação do IMZ com BDNPP, EDNPP e DEDNPP, pH 8,5 em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ .<sup>a</sup>

Composto	$\delta$ (ppm)
IMZ	7,86 (1H,Ar), 7,16 (2H,Ar)
EDNPP	1,29 (t,3H,CH <sub>3</sub> ), 4,1 (q,4H,CH <sub>2</sub> ), 7,71 (dd,1H,Ar), 8,52(dd,1H,Ar), 8,89(d,1H,Ar)
BDNPP	7,80 (d,1H,Ar), 8,58 (dd,1H,Ar)*, 8,95 (d,1H,Ar)
DEDNPP	1,38(t,6H,CH <sub>3</sub> ), 4,39 (q,4H,CH <sub>2</sub> )*, 7,80(dd,1H,Ar), 8,64 (dd,1H,Ar), 9,03 (d,1H,Ar)
DNP	6,75 (d,1H,Ar)*, 8,09 (dd,1H,Ar), 8,83 (d,1H,Ar)
15	1,33 (t,6H,CH <sub>3</sub> ), 4,30 (t,4H,CH <sub>2</sub> )*
16	1,17 (t,3H,CH <sub>3</sub> ), 3,89-3,83 (t,2H,CH <sub>2</sub> )
17	7,90 (d,1H,Ar), 8,48 (dd,1H, Ar)*, 8,91 (d,1H,Ar)
DNPP	7,88 (d,1H,Ar), 8,52 (dd,1H,Ar)*, 8,82 (d,1H,Ar)
7	1,26 (t, 6H,CH <sub>3</sub> ), 3,93 (q,4H,CH <sub>2</sub> )*
8	1,22 (t, 3H,CH <sub>3</sub> ), 3,83 (q,2H,CH <sub>2</sub> )

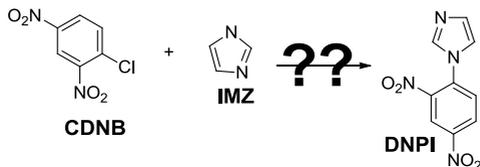
<sup>a</sup> Os espectros estão apresentados nas Figuras 38-40. Os deslocamentos observados para IMZ, EDNPP, BDNPP, DEDNPP, DNP, DNPP, 7 e 8 foram confirmados pelo espectro dos respectivos compostos puros (ver espectros na ausência de IMZ nas Figuras 38-40), e/ou com o reportado na literatura.<sup>63,82,166,168</sup> Os deslocamentos das espécies EDNPP, DEDNPP, DNP, 7 e 8, conferem com os observados nas reações com BHO, que também foram detectados por  $^1\text{H}$  RMN (item 4.1.2). Os picos desconhecidos observados nos espectros foram designados aos

intermediários 15-17 (multiplicidade e intensidade estão de acordo com as estruturas propostas), que foi confirmado por ESI-MS/(MS), *vide infra*. Deslocamentos para o intermediário 15 está de acordo com o reportado na literatura,<sup>192</sup> mas para as espécies 16 e 17, não há relatos. Os picos com asteriscos correspondem ao pico utilizado na obtenção da Figura 44.

Note que os resultados mostrados são em pH 8,5, onde o grupo imidazolínio é o grupo de saída mais favorável (exceto na reação com BDNPP, *vide infra*), pois está quase que exclusivamente na forma de base livre, visto que seu  $pK_a$  nos intermediários 15-17 deve ser menor que 7.<sup>76</sup> Ainda, analisando os espectros de <sup>1</sup>H RMN (Figura 38-40), observa-se, acompanhando a mudança espectral do deslocamento dos intermediários fosforilados 15 e 17, Esquema 28 (por exemplo, pelo pico de 4,30 e 8,48 ppm para 15 e 17, respectivamente), que estes são formados e logo se decompõem, regenerando o nucleófilo de partida. Para o intermediário 16, esse comportamento também foi confirmado por <sup>31</sup>P RMN, *vide infra*. Assim, o IMZ constitui um autêntico catalisador nucleofílico, reportado em reações de desacilação,<sup>193</sup> que é incomum com nucleófilos de reatividade similar, como o BHO<sup>-</sup> e NH<sub>2</sub>OH, os quais não são regenerados nas reações com ésteres de fosfato.<sup>166,168</sup> Essa importante observação está de acordo com a versatilidade multifuncional do grupo imidazol do resíduo histidina nos sistemas biológicos, que permeia a reversibilidade em reações de fosforilação da histidina. Portanto, esses resultados refletem as primeiras tentativas concretas bem sucedidas de isolar intermediários de imidazol fosforilados, em reações de desfosforilação que modelam diversos aspectos enzimáticos que envolvem as fosfohistidinas.

Conforme argumentado anteriormente na discussão dos gráficos de Brønsted, também se acompanhou por <sup>1</sup>H RMN a reação do IMZ com CDNB (formaria apenas o produto com ataque no anel aromático), Esquema 29. Nos espectros sucessivos obtidos (IMZ 0,4M; CDNB 6x10<sup>-3</sup>M; pH 8,5, 25°C), não foi observada nenhuma mudança espectral (Ver Apêndice), portanto conclui-se que o *N*-2,4-dinitrofenilimidazol (DNPI, Esquema 29) não se forma facilmente. Assim, o ataque nucleofílico do IMZ em ésteres de fosfato ocorre exclusivamente no átomo do fósforo, sem contribuição de ataque no carbono aromático. Isto reafirma a legitimidade dos caminhos reacionais do Esquema 28, e elimina a possibilidade de reações paralelas indesejadas, *i.e.*, que não ocorrem diretamente no átomo de fósforo (como ocorre com BHO<sup>-</sup>). Realmente, o ataque nucleofílico do IMZ no carbono aromático parece extremamente desfavorável em meio aquoso e autores descrevem a síntese do DNPI usando solventes orgânicos por rotas sintéticas mais

complexas e advertem sobre a sensibilidade a luz destes compostos.<sup>194,195</sup>



Conforme indicado anteriormente, a detecção do intermediário 16 (Esquema 28) da reação do EDNPP com IMZ foi possível apenas por <sup>31</sup>P RMN. Os espectros sucessivos obtidos estão apresentados na Figura 41 e os deslocamentos das espécies detectadas estão na Tabela 16. A Figura 41 mostra que o EDNPP (-4,9 ppm) desaparece completamente apenas após 2 dias de reação, que leva ao intermediário 16 (-7,21 ppm), e este por sua vez se decompõe formando o éster 8 (4,28 ppm), consistente com o caminho reacional proposto no Esquema 28.

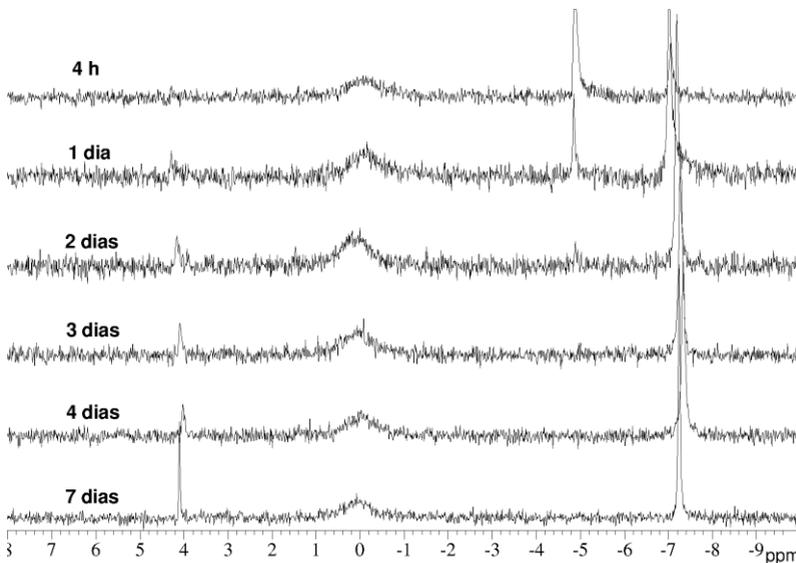
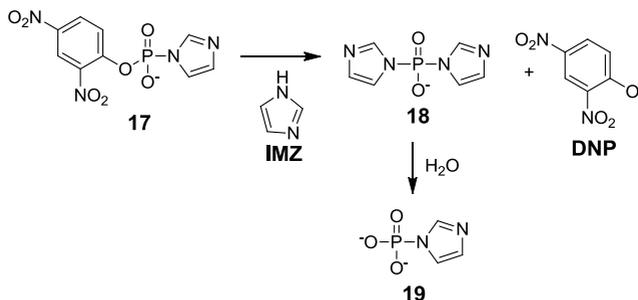


Figura 41 – Espectros sucessivos de <sup>31</sup>P RMN para reação do IMZ (0,45M) com EDNPP (0,03M), em pH 8,5, em D<sub>2</sub>O a 25°C e padrão interno H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%.

Adicionalmente, as reações do BDNPP e DNPP com IMZ, que podem formar espécies difíceis de identificar por  $^1\text{H}$  RMN, também foram acompanhadas por  $^{31}\text{P}$  RMN. No caso do BDNPP, o intermediário 17, formado inicialmente, deve perder o grupo 2,4-dinitrofenil, um melhor grupo de saída do que o grupo imidazolínio. Para os intermediários 15 e 16, o grupo imidazolínio é o grupo de saída mais favorável (ver Esquema 28). Inclusive, a quebra do intermediário 17 pela perda do grupo imidazolínio, tal mostrado no Esquema 29, formaria o monoéster DNPP. Todavia, os espectros de  $^1\text{H}$  RMN para reação do BDNPP com IMZ indicam apenas uma pequena quantidade de DNPP na meio reacional (pode ser impureza, que provém da hidrólise do BDNPP), que não segue um comportamento ascendente para acompanhar a quebra do 17. Portanto, na reação do BDNPP com IMZ, o intermediário 17 pode levar a outros intermediários fosforilados, 18 e 19, mostrados no Esquema 30, que foram detectados por  $^{31}\text{P}$  RMN. O ataque nucleofílico do IMZ sobre o intermediário 17 leva à espécie 18, que por sua vez por hidrolisar, levando à espécie 19. Os espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN obtidos na reação do BDNPP com IMZ (0,4M, pH 8,5) estão apresentados na Figura 42, e os deslocamentos das espécies detectadas estão na Tabela 16.



Esquema 30

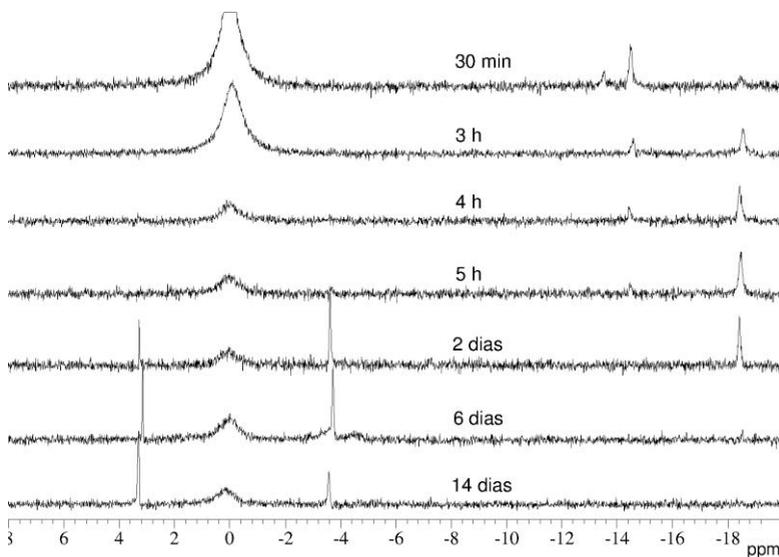


Figura 42 – Espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN para reação do IMZ (0,6M) com BDNPP (0,017M), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$ , 10%  $\text{CD}_3\text{CN}$ , a  $25^\circ\text{C}$ , e padrão interno  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%.

A Figura 42 mostra que o BDNPP (-13,56 ppm) desaparece rapidamente, em 3 h de reação, levando ao intermediário 17 (-14,53 ppm), e este, por sua vez, se decompõe formando outra espécie fosforilada, que, através de análises de ESI-MS (item 4.5.3), curiosamente indica ser o intermediário 18 (-18,54 ppm). Esse intermediário se quebra levando à outra espécie fosforilada (-3,7 ppm), que foi designado ao fosforilimidazol (19), confirmado pelo espectro da espécie 19 pura, dado na literatura.<sup>196</sup> O pico em 3,2 ppm refere-se ao fosfato inorgânico,<sup>197</sup> formado na hidrólise do intermediário 19. Esses resultados são interessantes, pois confirmam a formação de outras espécies intermediárias fosforiladas (18 e 19), não previstas por  $^1\text{H}$  RMN.

A reação do DNPP com IMZ também foi acompanhada por  $^{31}\text{P}$  RMN, para avaliar os possíveis caminhos reacionais apresentados no Esquema 31. Os dados cinéticos de UV-Vis apresentados indicam que na reação com DNPP, o IMZ não deve atuar como nucleófilo (caminho A, Esquema 31). Espera-se que nenhum intermediário de imidazol fosforilado (20) seja detectado, e que se acompanhe apenas a hidrólise do DNPP (caminho B, Esquema 31) onde o IMZ pode atuar como base-geral. A Figura 43 apresenta os espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN

obtidos na reação do DNPP com IMZ (0,4M, pH 8,5), e os deslocamentos estão na Tabela 16. Por  $^1\text{H}$  RMN não seria possível detectar claramente os possíveis produtos formados, mostrados no Esquema 31, pois  $\text{P}_i$  não é observado por  $^1\text{H}$  RMN e no caso do intermediário 20, seus deslocamentos seriam sobreposto pelo IMZ em excesso. Os espectros da Figura 42 mostram apenas o desaparecimento do DNPP e aparecimento do fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ), sendo que a não detecção do intermediário 20 (Esquema 31) confirma a hipótese de que o IMZ não atua como nucleófilo na reação com DNPP.

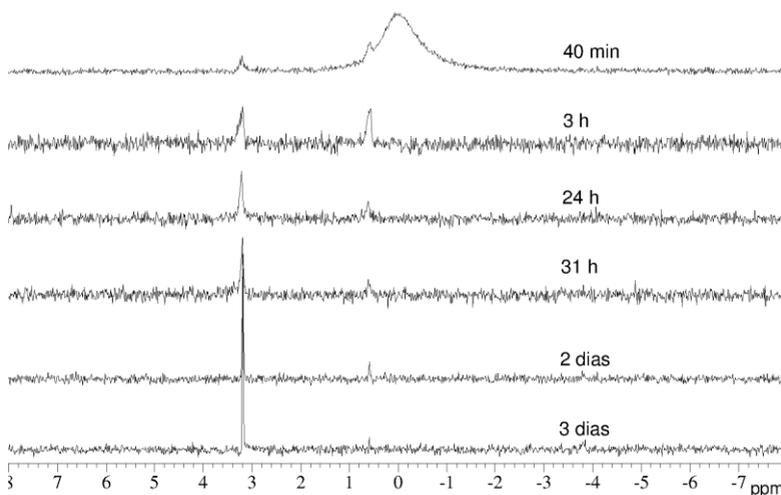
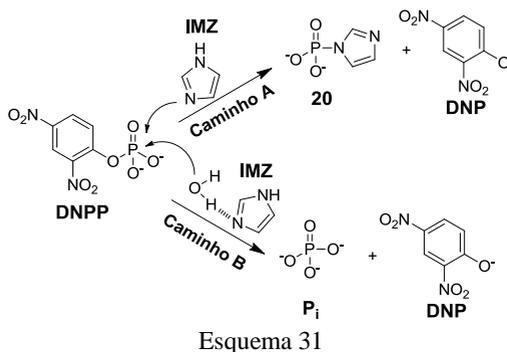


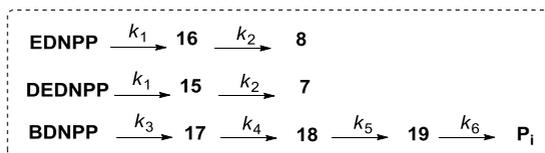
Figura 43 – Espectros sucessivos de  $^{31}\text{P}$  RMN para reação do IMZ (0,23M) com DNPP ( $9 \times 10^{-3}\text{M}$ ), em pH 8,5, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ . O padrão interno  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% está mostrado apenas no primeiro espectro, para melhor visualizar o desaparecimento do DNPP.

Tabela 16 – Deslocamentos de  $^{31}\text{P}$  RMN para as espécies envolvidas na reação do IMZ com BDNPP e DNPP, pH 8,5 em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ .<sup>a</sup>

Composto	$\delta$ (ppm)	Composto	$\delta$ (ppm)
BDNPP	-13,56	17	-14,53
DNPP	0,56	18	-18,54
EDNPP	-4,90	19	-3,7
8	4,28	Pi	3,2
16	-7,21		

<sup>a</sup> Os deslocamentos observados têm como referência  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%. Os picos para as espécies BDNPP, DNPP, EDNPP, 8, 19 e Pi estão de acordo com o reportado na literatura.<sup>85,168,196</sup> Os picos designados aos intermediários 16-18, que não foram encontrados na literatura, concordam com o deslocamento esperado e com dados de ESI-MS/(MS), *vide infra*.

Para avaliar a estabilidade dos intermediários fosforilados detectados por  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN, obteve-se o gráfico da concentração relativa vs tempo para as espécies mais relevantes observadas por RMN, correlacionando as áreas dos seus picos com um padrão interno (picos avaliados estão dados na Tabela 16 e na Tabela 15, com asteriscos) e tabela 16. Assim, a Figura 44A-D ilustra o comportamento quantitativo das espécies envolvidas nas reações do DEDNPP, EDNPP e BDNPP com IMZ estudadas. Os dados da Figura 44 foram ajustados pelas equações cinéticas que descrevem reações consecutivas de primeira-ordem<sup>169</sup> Equações 6 e 13-15 (similares às equações utilizadas nos ajustes das reações com  $\text{BHO}^-$ , item 4.1.2., desconsiderando o ataque no carbono aromático), considerando a designação dada no Esquema 32 (e Esquemas 28-30). Os parâmetros calculados estão mostrados na Tabela 17. Os perfis de desaparecimento dos ésteres de partida (BDNPP, EDNPP, DEDNPP) foram ajustados com a Equação 6 (item 4.1.2), onde “ $k$ ” corresponde a “ $k_1$ ” do Esquema 32. O comportamento dos intermediários fosforilados (15-19) foi descrito pela Equação 13, que está dada em termos das constantes de formação ( $k_{\text{formação}}$ ) e de quebra ( $k_{\text{quebra}}$ ) da espécie, e a distinção numérica dessas constantes na Tabela 17 está de acordo com a numeração do Esquema 32. Já para os produtos do éster menos reativo (7, 8) e DNP foram utilizadas as Equações 14 e 15, respectivamente.



Esquema 32

$$[\text{Interm}] = \frac{k_{\text{formação}}}{k_{\text{quebra}} - k_{\text{formação}}} \times \left( e^{-k_{\text{formação}} \times \text{tempo}} - e^{k_{\text{quebra}} \times \text{tempo}} \right) \quad 13$$

$$[\text{Éster7ou8}] = 1 + \frac{(k_2 \times e^{-k_1 \times \text{tempo}} - k_1 \times e^{k_2 \times \text{tempo}})}{k_1 - k_2} \quad 14$$

$$[\text{DNP}] = 1 - e^{-k_1 \times \text{tempo}} \quad 15$$

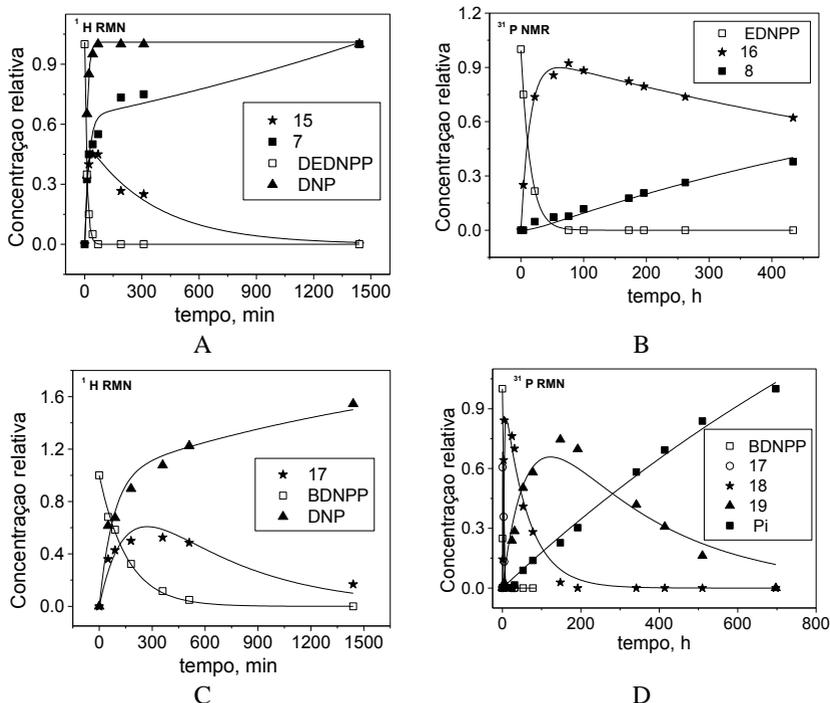
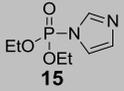
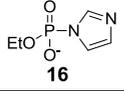
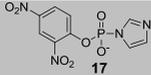
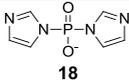


Figura 44 – Gráficos de concentração relativa vs tempo obtidos por RMN para reação do IMZ (pH 8,5) com (A) DEDNPP  $^1\text{H RMN}$ ; (B) EDNPP  $^{31}\text{P RMN}$ ; (C) BDNPP  $^1\text{H RMN}$  e (D) BDNPP  $^{31}\text{P RMN}$ . As espécies estão dadas nos Esquemas 28-30 e para os ajustes dos dados foram utilizadas as Equações 6 e 13-15, cujos parâmetros estão dados na Tabela 17.

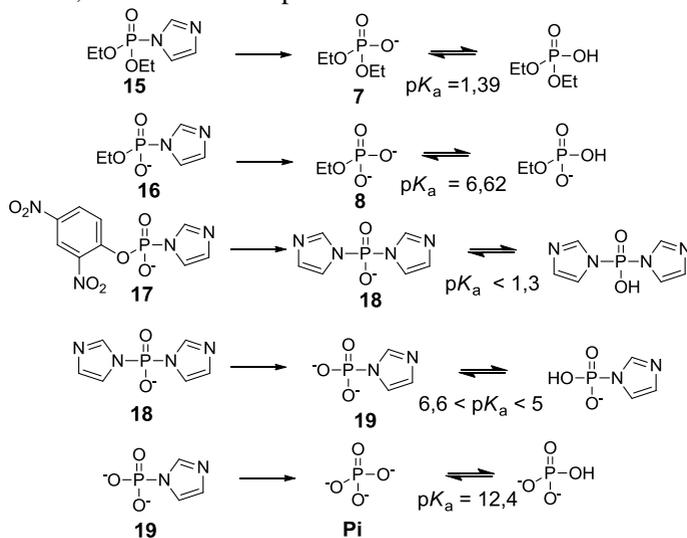
Tabela 17 – Parâmetros calculados pelo ajuste dos dados da Figura 44 as com Equações 13-15, para formação e quebra dos intermediários fosforilados 15-19.<sup>a</sup>

Substrato	Intermediário	$k_{\text{formação}}^b$	$k_{\text{quebra}}^b$ ( $t_{1/2}$ )
DEDNPP	 <b>15</b>	$k_1 = 1,56 \times 10^{-2}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_2 = 3,33 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ( $t_{1/2} = 5,78 \text{ h}$ )
EDNPP	 <b>16</b>	$k_1 = 4,13 \times 10^{-5}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_2 = 3,44 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ( $t_{1/2} = 23,3 \text{ dias}$ )
BDNPP	 <b>17</b>	$k_3 = 1,07 \times 10^{-3}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_4 = 1,16 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ( $t_{1/2} = 1,7 \text{ h, IMZ 1M}$ )
	 <b>18</b>	$k_4 = 1,16 \times 10^{-4}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_5 = 4,52 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ( $t_{1/2} = 1,77 \text{ dias}$ )
	 <b>19</b>	$k_5 = 4,52 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$k_6 = 8,33 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ( $t_{1/2} = 9,63 \text{ dias}$ )

<sup>a</sup> Ajuste pelas Equações 13-15,<sup>169</sup> considerando Esquema 32 (designação estrutural dada nos Esquemas 28-30). <sup>b</sup> Os erros intrínsecos das constantes acima não passam de  $\pm 0,05$  da sua magnitude.

Os parâmetros apresentados na Tabela 17 são consistentes com os resultados cinéticos obtidos por UV-Vis, onde  $k_1$  para DEDNPP e EDNPP, e  $k_3$  para BDNPP, são similares às constantes de segunda ordem  $k_N$  obtidas ( $1,77 \times 10^{-2}$ ;  $1,03 \times 10^{-4}$  e  $1,42 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , para DEDNPP, EDNPP e BDNPP, respectivamente). Ainda, foi possível distinguir as estabilidades dos intermediários fosforilados. A ordem de reatividade (considerando  $k_{\text{quebra}}$ ) dos intermediários fosforilados segue a ordem crescente  $17 > 15 > 18 > 19 \sim 16$  está de acordo com a ordem decrescente dos  $pK_a$ 's para as espécies formadas após a quebra (Esquema 33). Os  $pK_a$ 's das espécies 7, 8 e Pi apresentados no Esquema 33 foram obtidos da literatura,<sup>188,198</sup> enquanto os de 18 e 19, são estimativas. Quanto menor o  $pK_a$  do éster formado, mais favorável é sua formação e conseqüentemente mais instável é o intermediário (15-19) que leva ao respectivo éster. Curiosamente, para os intermediários 16 e 19, essa explicação não se aplica, onde o intermediário 16 mostrou-se excepcionalmente estável, incomum em fosforamidatos dessa natureza. A alta estabilidade do intermediário 19 está de acordo com dados da literatura, onde Jencks, W.P. e colaboradores<sup>76</sup> confirmam que sua hidrólise é substancialmente lenta ( $k_{\text{obs}}$  de  $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , pH 8, 39°C). Para

os demais intermediários (15-18), não há relatos quanto a sua estabilidade, reafirmando a importância deste estudo.



Esquema 33

#### 4.4.3 Análise de espectrometria de massas

Seguindo o instinto investigativo, foram realizados estudos por ESI-MS(/MS) das reações dos ésteres de fosfato com IMZ, onde foi monitorado o curso das reações em pH 8,5 com IMZ (1M a 25°C), no modo positivo e negativo. Os reagentes, intermediários e produtos foram transferidos diretamente da solução reacional para fase gasosa, detectados por ESI-MS e caracterizados por ESI-MS/MS pela sua dissociação unimolecular característica. As Figuras 45-47 apresentam os espectros de ESI-MS obtidos para o BDNPP, EDNPP e DEDNPP, onde foi possível detectar as espécies mais relevantes que confirmam o caminho reacional do Esquema 28, incluindo os intermediários fosforilados 15 de m/z 313, 16 de m/z 175 e 17 de m/z 205. Nas reações do IMZ com DEDNPP, o espectro de ESI-MS(-) também detectou DNP e fosfatos inorgânicos, mas só está apresentado o espectro no modo positivo (Figura 45), onde foi possível detectar o intermediário de interesse de m/z 205. Outros ânions majoritários nas Figuras 46 e 47 foram identificados como: BDNPP m/z 429, EDNPP m/z 291, DNP m/z 183 e fosfatos inorgânicos  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{PO}_3^-$ , de m/z 97 e 79, respectivamente.

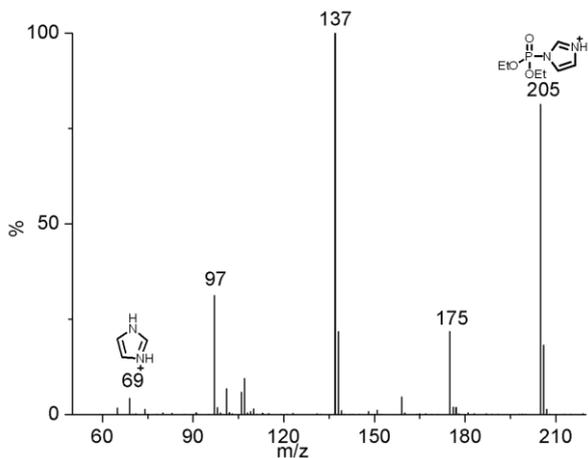


Figura 45 – ESI-MS (+) após 2 minutos de reação do DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}$  M) com IMZ (1M), pH 8,5 a 25°C.

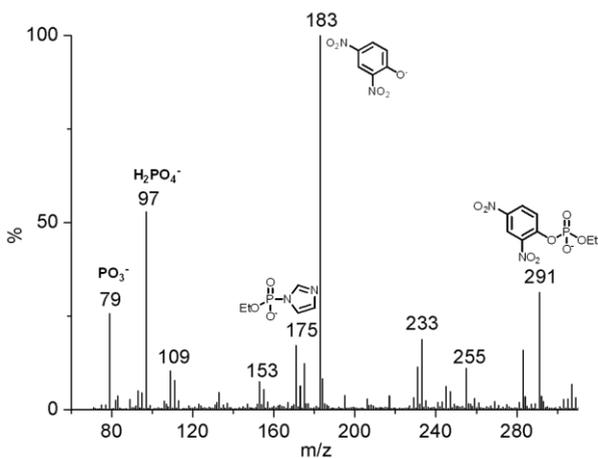


Figura 46 – ESI-MS (-) após 3 horas de reação do EDNPP ( $2 \times 10^{-4}$  M) com IMZ (1M), pH 8,5 a 25°C.

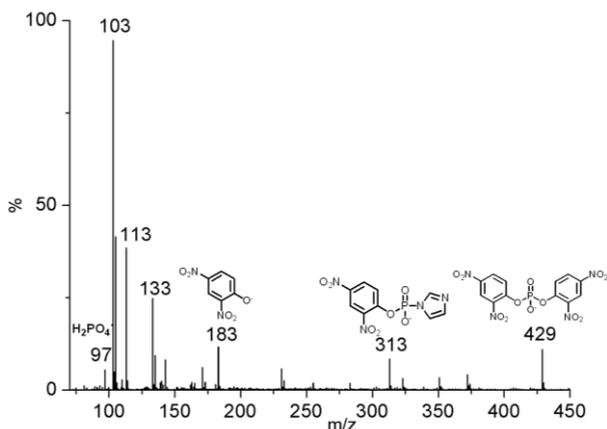


Figura 47 – ESI-MS (-) após 8 minutos de reação do BDNPP ( $8 \times 10^{-5}$  M) com IMZ (1M), pH 8,5 a 25°C.

ESI-MS/MS foi utilizado para caracterizar os intermediários 15-17, e seus espectros estão apresentados nas Figuras 48-50, que confirmam sua atribuição estrutural. A dissociação do íon positivo de m/z 205 (intermediário 15, Esquema 28), Figura 48, leva às espécies de: (i) m/z 177 e m/z 149, devido a perda de um e dois grupos etila, respectivamente; (ii) m/z 137, perda do grupo imidazol e (iii) m/z 69, o próprio imidazol protonado.

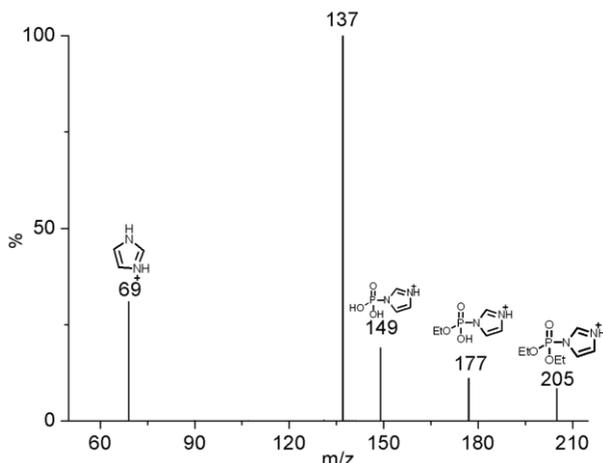


Figura 48 – ESI-MS/MS (+) do intermediário 15, de m/z 205, interceptado da reação do DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}$  M) com IMZ (1M), pH 8,5 a 25°C.

Já a Figura 49 evidencia que o ânion de  $m/z$  175 (intermediário 16, Esquema 28), dissocia para fragmento de  $m/z$  147, devido à perda de um grupo eteno e forma ainda o fosfato inorgânico  $\text{PO}_3^-$  de  $m/z$  79.

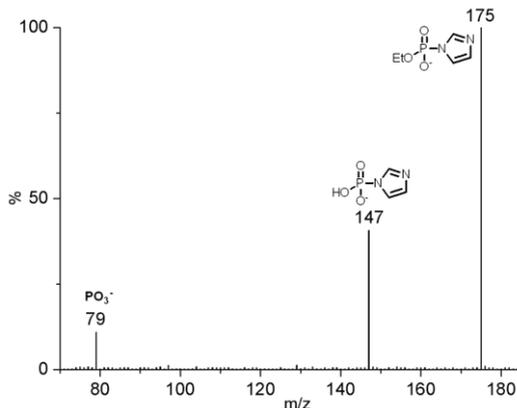


Figura 49 – ESI-MS/MS (-) do intermediário 16, de  $m/z$  175, interceptado da reação do EDNPP ( $2 \times 10^{-4} \text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ .

No caso do ânion de  $m/z$  313 (intermediário 17, Esquema 28), Figura 50, sua dissociação unimolecular leva ao DNP de  $m/z$  183, que pode perder seqüencialmente dois radicais NO, formando os fragmentos de  $m/z$  153 e  $m/z$  123. DNP também pode perder  $\text{NO}_2$ , em seguida NO, levando aos fragmentos de  $m/z$  137 e 109, respectivamente.

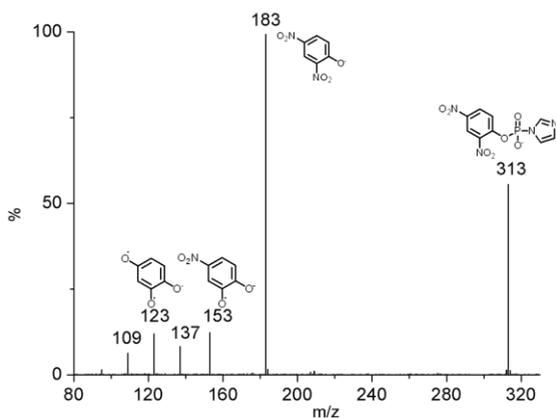


Figura 50 – ESI-MS/MS (-) do intermediário 17, de  $m/z$  313, interceptado da reação do BDNPP ( $8 \times 10^{-5} \text{M}$ ) com IMZ (1M), pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ .

Conforme indicado pelos resultados anteriores de  $^{31}\text{P}$  RMN, na reação do IMZ com BDNPP, outras espécies fosforiladas além do intermediário 17 ( $m/z$  313) são formadas e de fato, o espectro obtido do meio reacional após 1 dia evidencia a presença do intermediário 18 de  $m/z$  197. Sua identificação foi confirmada por ESI-MS/MS (-), Figura 51, que dissocia levando fragmento de  $m/z$  129, devido a perda de um grupo imidazol. Já o intermediário 19, de  $m/z$  147, não foi identificado por ESI-MS, o que não descarta a sua presença no meio reacional, visto que o problema pode estar associado à difícil ionização da espécie (adequação das energias e uso de aditivos). De qualquer forma, o deslocamento observado por  $^{31}\text{P}$  RMN confirma essa espécie no meio, baseado em dados da literatura.<sup>196</sup>

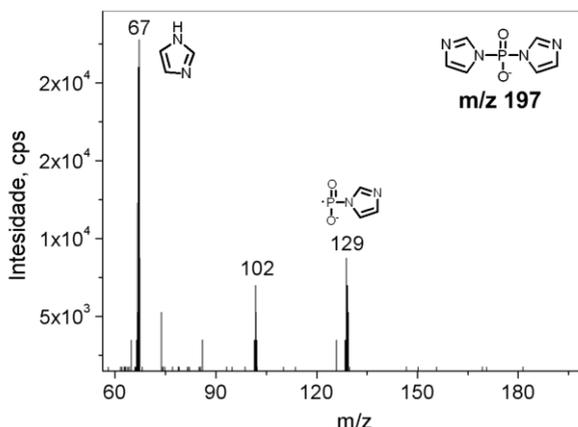


Figura 51 – ESI-MS/MS (-) do intermediário 18, de  $m/z$  197, interceptado após dois dias de reação do BDNPP ( $8 \times 10^{-5}$  M) com IMZ (1M), pH 8,5 a 25°C.

#### 4.4.4 Conclusões parciais

Resumindo, os resultados apresentados para as reações de desfosforilação com IMZ apontam que os intermediários de imidazol fosforilado 15-19 são espécies razoavelmente estáveis para serem detectadas ( $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN, ESI-MS), em meio aquoso. Em geral, autores reportam a dificuldade em obter análogos da fosfohistidina, devido à instabilidade.<sup>99</sup> Ainda que alguns dos intermediários detectados neste trabalho já tenham sido reportados,<sup>192,196,199,200</sup> pouca informação se tem da sua reatividade e estabilidade (exceto para 1-fosforilimidazol 19<sup>76</sup>). No entanto, é consenso entre autores que o “imidazol é um

reagente muito eficiente para fosforilar e transfosforilar outros reagentes.<sup>192,199</sup> Assim, os dados obtidos neste trabalho são reveladores, e mostram que o tempo para quebrar ( $5 t_{1/2}$ ) os intermediários detectados pode levar: (i) 4 meses para 16; (ii) 48 dias para 19; (iii) 9 dias para 18; (iv) 1 dias para 15 e (v) 9 horas para 17, tal resumido na Figura 52.

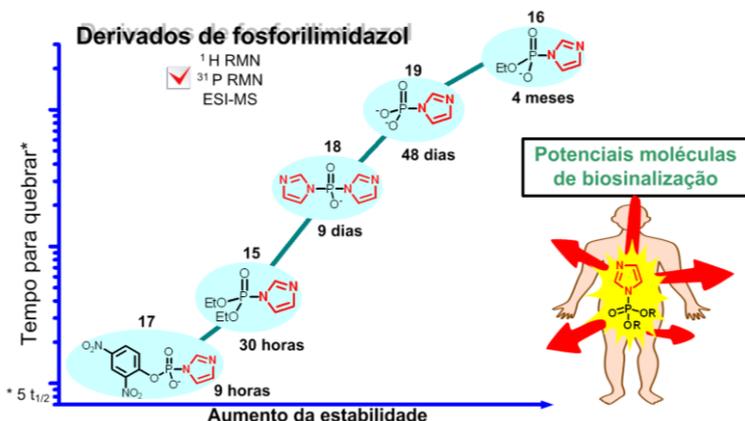


Figura 52 – Resumo dos resultados obtidos para as reações dos ésteres de fosfato com IMZ e perfil ilustrativo da estabilidade dos intermediários detectados.

A elucidação da diferença nas reatividades dos intermediários de imidazol fosforilado é de extrema relevância (e pouco explorado na literatura) e permite ajudar numa compreensão mais concreta da dinâmica de análogos das fosfohistidinas, moléculas de sinalização dos sistemas biológicos. Dependendo da estrutura, esses intermediários podem ser relativamente estáveis, que vão depender do eficiente sistema enzimático para levar às rápidas reações de desfosforilação e fosforilação (mecanismo básico das reações de sinalizações).<sup>99</sup> Essas reatividades distintas dos intermediários de imidazol fosforilado são evidências que podem ser utilizadas como ferramenta no design de análogos das fosfohistidinas, podendo permear até aplicação terapêutica como moléculas biosinalizadores.

## 4.5 REAÇÃO DE ÉSTER DE FOSFATO COM UM NUCLÉOFILO BIS-IMIDAZOLIL E EFEITO DA CATÁLISE MICELAR

IMZ, por si só, mostrou-se um nucleófilo excepcional, com reatividade similar aos  $\alpha$ -nucleófilos, e os resultados apresentados consolidam seu papel mecanístico em reações de desfosforilação. Ainda, inspirado na modelagem de sítios enzimáticos tem-se interesse em ancorar o grupo imidazol em estruturas moleculares maiores e avaliar o efeito de interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas. Inicialmente, estudou-se a reação de desfosforilação (do triéster DEDNPP) na presença do nucleófilo bis ((1H-imidazol-1-il)metil)anilina (BIMZ), que possui dois grupos imidazolil. Desta forma, pretende-se avaliar a cooperatividade, se existir, dos grupos reativos, e estudar o efeito da catálise micelar na reação. De fato, a catálise micelar é uma importante ferramenta para compreender algumas interações enzimáticas de aproximação,<sup>90</sup> e acredita-se que na reação com o nucleófilo BIMZ, que é substancialmente mais hidrofóbico que IMZ, deva prevalecer uma catálise micelar pronunciada. Curiosamente, os resultados mostram que a reação do BIMZ com DEDNPP é catalisada tanto por micela catiônica quanto aniônica, uma rara exceção para este tipo de reação. Vale ressaltar que o BIMZ é um composto inédito.

### 4.5.1 Titulação do nucleófilo bis-imidazolil na presença e ausência de micela

Certamente, os equilíbrios de ionização do BIMZ definem espécies iônicas que possuem reatividades distintas, portanto, inicialmente, determinou-se os  $pK_a$ s do BIMZ. Para isto, foi realizada titulação potenciométrica do BIMZ foi realizada na ausência e na presença da micela catiônica CTABr (0,01M). Os dados experimentais foram ajustados utilizando o programa BEST7,<sup>158</sup> que estão mostrados na Figura 53, juntamente com a distribuição das espécies dadas no Esquema 34. O ajuste teórico obtido forneceu os valores de  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  de (i)  $6.06 \pm 0.07$  e  $7.25 \pm 0.07$ , na ausência de micela; e (ii)  $6.04 \pm 0.08$  e  $7.10 \pm 0.08$ , na presença de micela (CTABr). Esses valores de  $pK_a$  são típicos de grupos imidazolínios,<sup>201</sup> sendo que a primeira desprotonação tem valor de  $pK_a$  levemente inferior ao valor encontrado para o imidazol ( $pK_a=7,0$ ),<sup>188</sup> provavelmente devido ao efeito retirador de elétrons do grupo ligado ao anel imidazolínio. A segunda desprotonação mostra um valor de  $pK_a$  normal de imidazol, visto não haver mais grupo vizinho protonado. Os valores de  $pK_a$ 's do BIMZ na presença de CTABr foram

muito próximos dos valores obtidos na ausência de micela, sendo que se observou uma diferença maior no valor do  $pK_{a2}$ . Isto pode ocorrer porque a espécie neutra de BIMZ, que é formada no equilíbrio do  $pK_{a2}$  é mais fortemente atraída pela micela catiônica, que as demais espécies, favorecendo assim o equilíbrio, e consequentemente diminuindo o  $pK_{a1}$ .

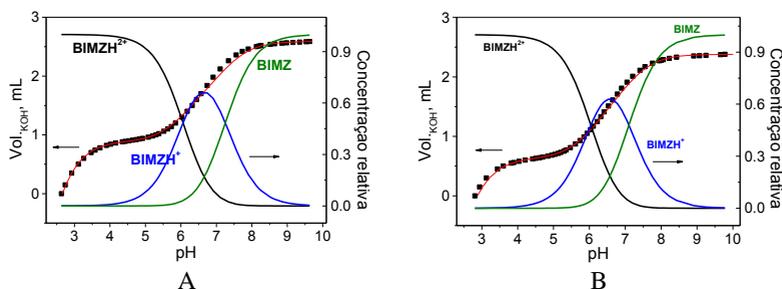
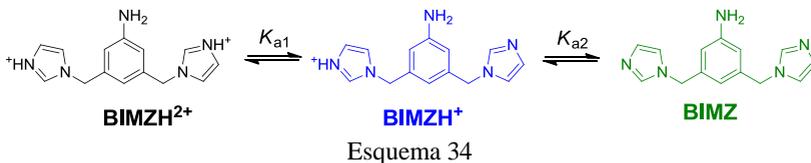


Figura 53 – Dados da titulação potenciométrica do BIMZ ( $1 \times 10^{-3} M$ ) (A) na ausência e (B) na presença de CTABr (0,01M), com KOH 0,1M a  $25^{\circ}C$  e  $I=1,0$ . A linha sólida vermelha corresponde ao ajuste do programa BEST7. A distribuição das espécies dadas no Esquema 34 também está mostrada.

#### 4.5.2 Estudos cinéticos na ausência de micela

O perfil de pH obtido para reação do BIMZ com DEDNPP, apresentado na Figura 54, mostram que o nucleófilo BIMZ consegue acelerar a desfosforilação do DEDNPP, comparado com a sua hidrólise espontânea. Por exemplo, em pH 8,5, BIMZ (0,01M) causa incrementos em  $k_{obs}$  de até 20 vezes, comparado com a reação em água. A baixa concentração do nucleófilo utilizada é devido a sua difícil solubilização. Comparar diretamente a reatividade do BIMZ com IMZ não é simples, pois se deve considerar a concentração local do grupo imidazol, visto que BIMZ possui dois centros reativos. Assim, a Figura 54B ilustra o comparativo das reações do DEDNPP com IMZ e BIMZ, considerando a razão de  $k_{obs}$  pela concentração do grupo imidazolil. Os resultados apontam que, considerando a concentração local do grupo imidazolil, BIMZ causa incrementos em  $k_{obs}$  de 444 vezes (pH 8,5), comparado

com a reação espontânea, um incremento apenas 5 vezes menor que o provocado pelo IMZ.

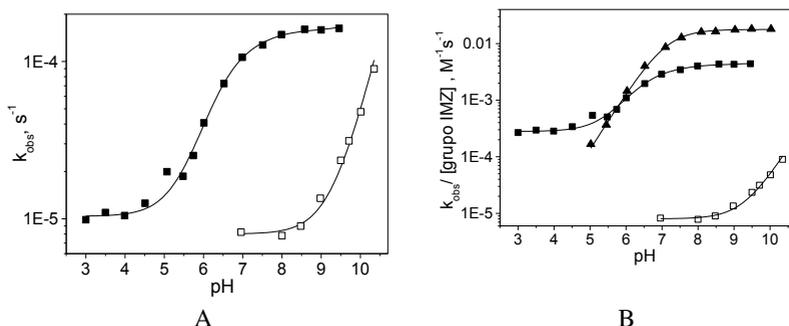
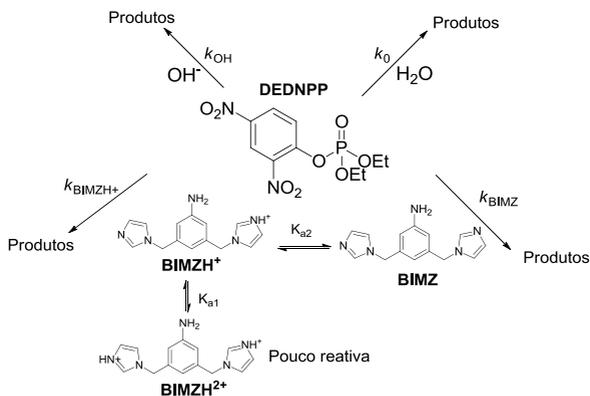


Figura 54 – Perfil de pH para a reação do BIMZ com DEDNPP: (A) BIMZ, (0,01M) (-■-); (B) dado em  $k_{\text{obs}}/[\text{grupo imidazol}]$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (-■-), concentração local de grupos imidazolil e comparativo com a respectiva reação com IMZ 1M (-▲-). Dados para reação espontânea, obtidas experimentalmente (ver Apêndice) estão mostrados para fins comparativos (-□-). Todas as reações com  $I=1\text{M}$  (KCl), a  $25^\circ\text{C}$ . A linha sólida para reação com BIMZ corresponde ao ajuste pela Equação 16.

Os dados da Figura 54A foram ajustados pela Equação 16, que foi deduzida baseada no Esquema 35, que considera a reação do substrato com água ( $k_0$ ), hidróxido ( $k_{\text{OH}}$ ) e com as duas espécies reativas: monoprotionada ( $\text{BIMZH}^+$ ,  $k_{\text{BIMZH}^+}$ ) e neutra ( $\text{BIMZ}$ ,  $k_{\text{BIMZ}}$ ). Conforme detalhado anteriormente (item 4.1), o BIMZ possui três  $\text{p}K_{\text{a}}$ s, referente aos centros básicos: amina ( $\text{p}K_{\text{a}0}=2,53$ ) e imidazol ( $\text{p}K_{\text{a}1}=6,06$ ;  $\text{p}K_{\text{a}2}=7,25$ ). O perfil de pH obtido (Figura 54A) indica que o grupo amino não influencia a reação, portanto, na discussão foram considerados apenas os  $\text{p}K_{\text{a}}$ s dos grupos imidazolínicos. A Tabela 18 apresenta os parâmetros obtidos pelo ajuste cinético dos dados da Figura 54, bem como os parâmetros termodinâmicos de ativação (calculados pelas Equações 2-4), efeitos isotópicos de solvente e constante de segunda ordem ( $k_{\text{N}}^{\text{L}}$ ) calculada pela relação linear de  $[\text{BIMZ}]$  vs  $k_{\text{obs}}$  (Equação 5). No Apêndice, estão dados todos gráficos lineares utilizados para calcular os parâmetros termodinâmicos de ativação e  $k_{\text{N}}^{\text{L}}$ .



Esquema 35

$$k_{obs} = k_0 + k_{OH}[OH^-] + [BIMZ]_T \times (k_{BIMZH^+} \chi_{BIMZH^+} + k_{BIMZ} \chi_{BIMZ}) \quad (16)$$

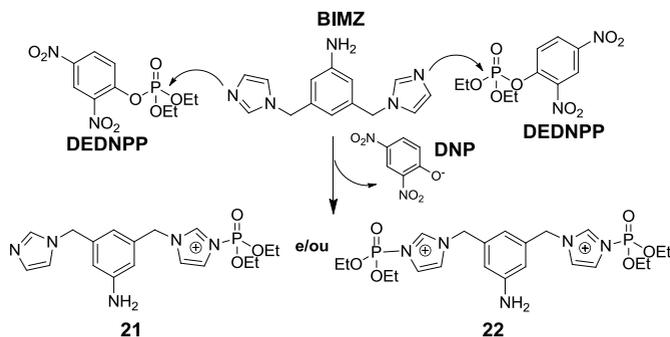
Tabela 18 – Parâmetros cinéticos, termodinâmicos de ativação e isotópicos calculados para a reação do BIMZ com DEDNPP.<sup>a</sup>

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
$k_0, s^{-1}$	$8,5 \times 10^{-6}$	$k_N^L, s^{-1} M^{-1} c$	$(1,53 \pm 0,01) \times 10^{-2}$
$k_{OH}, M^{-1} s^{-1}$	0,42	$\Delta G^\ddagger / kcal.mol^{-1} d$	+22,59
$pK_{a1}^b$	6,06	$\Delta S^\ddagger, eu^d$	-40,31 ± 1,50
$pK_{a2}^b$	7,25	$\Delta H^\ddagger, kcal.mol^{-1} d$	+10,58 ± 0,45
$k_{BIMZH^+}, M^{-1} s^{-1}$	$(6,6 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$k_{H_2O} / k_{D_2O}^d$	0,996
$k_{BIMZ}, M^{-1} s^{-1}$	$(1,49 \pm 0,02) \times 10^{-2}$		

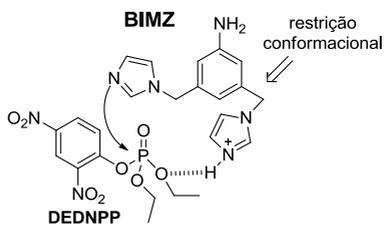
<sup>a</sup> Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste da Figura 54A pela Equação 16. <sup>b</sup> Valor determinado por titulação potenciométrica a 25°C,  $I=1$ . <sup>c</sup> Constante de segunda ordem obtida em pH 8,5, pelo ajuste linear de  $[BIMZ]$  vs  $k_{obs}$ , análoga à Equação 5. <sup>d</sup> Parâmetros calculados com BIMZ (0,01M), pH 8,5, pelas Equações 2-4 e  $\Delta G^\ddagger$  a 25°C.

Comparando as constantes de segunda ordem do BIMZ com  $k_0$  (Tabela 18), tem-se incrementos de (i) 820 vezes para  $k_{BIMZH^+}$ ; e (ii) 1700 vezes para  $k_{BIMZ}$ , indicando que a espécie neutra BIMZ é mais reativa. Essa maior reatividade deve estar relacionada à maior disponibilidade dos grupos básicos reativos neutros, que no caso do BIMZ possui dois enquanto BIMZH<sup>+</sup>, apenas um. Considerando uma constante de segunda ordem global para BIMZ ( $k_{BIMZH^+} + k_{BIMZ}$ ), a razão  $k_N/k_0$  chega a 2700, superior à razão observada na reação do IMZ com DEDNPP(2000), indicando que o BIMZ é um potente nucleófilo.

Sugere-se que a reação do BIMZ com DEDNPP envolva um mecanismo de natureza nucleofílica  $S_N2(P)$ , tal ocorre com IMZ, consistente com os parâmetros de ativação obtidos e o efeito isotópico de solvente praticamente nulo. O BIMZ pode, potencialmente, promover o ataque nucleofílico por dois sítios imidazolil, fosforilando-os, e formando os possíveis intermediários 21 e 22, tal ilustrado no Esquema 36. Outro mecanismo possível para a reação do BIMZ com DEDNPP seria uma catálise bifuncional, mostrado no Esquema 37, onde um grupo imidazol protonado atuaria como catalisador ácido geral, assistindo o grupo de saída, enquanto outro grupo imidazol neutro poderia atuar como nucleófilo (ou base). No entanto, esse mecanismo bifuncional foi descartado, pela espécie neutra se mostrar mais reativa, e devido a ausência de perfil de pH (Figura 54) em forma de sino, característico de reações bifuncionais,<sup>184</sup> o que seria acompanhado por um efeito isotópico mais pronunciado ( $\sim 1,5$  ou maior).<sup>61,83,202</sup> Deve-se considerar também a restrição conformacional necessária para aproximar os grupos reativos imidazolil adequadamente para promover eficientemente uma catálise bifuncional.



Esquema 36



Esquema 37

### 4.5.3 Análises de espectrometria de massas

A fim de confirmar o mecanismo da reação do BIMZ com DEDNPP, delineado no Esquema 36, foram realizadas análises de ESI-MS(/MS) no modo positivo, para interceptar possíveis intermediários chave. A Figura 55 apresenta o espectro de ESI-MS(+) obtido, após 1 hora da reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}$ M) em pH 8,5 a 25°C, que mostra algumas espécies relevantes: (i) BIMZ monoprotonado de m/z 254; (ii) BIMZ neutro com potássio, m/z 292; (iii) DEDNPP neutro com potássio, m/z 359; e (iv) um possível intermediário fosforilado (21, Esquema 36) com potássio de m/z 429.

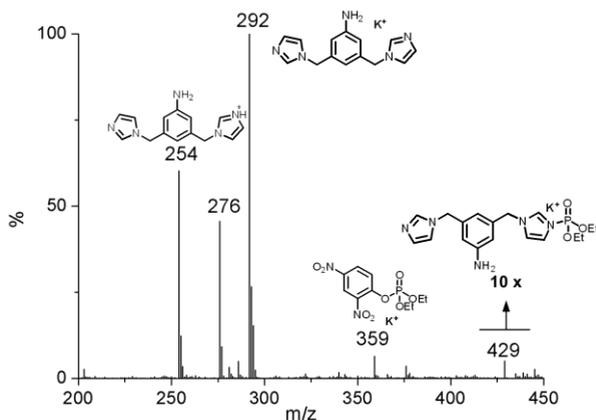


Figura 55 – ESI-MS (+) após 1 hora de reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}$ M), pH 8,5 a 25°C.

A espécie de m/z 429, designada como o sal de potássio do intermediário fosforilado 21, foi caracterizada pela sua dissociação unimolecular e o espectro de ESI-MS/MS(+) obtido está mostrado na Figura 56. Observa-se que o íon de m/z 429 dissocia formando os fragmentos de (i) m/z 292, denotado com o sal de potássio do BIMZ; e (ii) m/z 276, devido a perda do grupo amino. O espectro de ESI-MS/MS (+) do reagente BIMZ de m/z 254 também confirmou a designação estrutural (espectro está dado no Apêndice): se dissocia para o fragmento de m/z 186, pela perda de um grupo imidazolil, que em seguida perde o grupo amino, levando ao fragmento de m/z 171. Este por sua vez, leva ao fragmento de m/z 145, pela quebra do anel imidazolil.

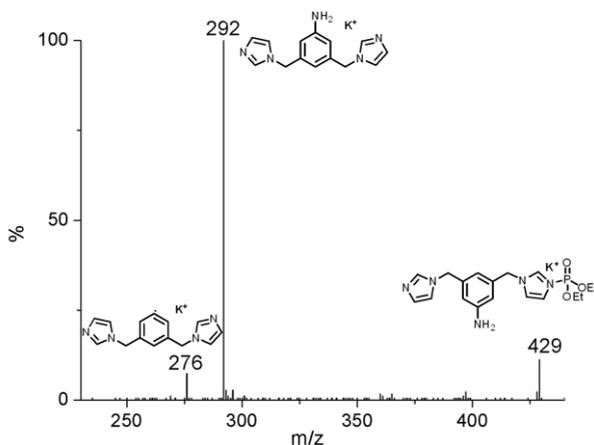


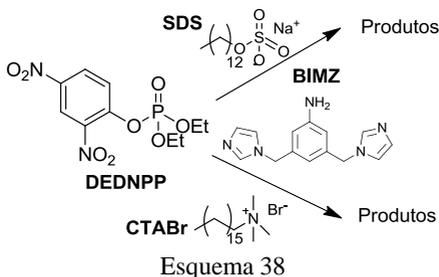
Figura 56 – ESI-MS/MS (+) da espécie de  $m/z$  429, da reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}$ M), pH 8,5 a 25°C.

Os resultados apresentados para a reação do BIMZ com DEDNPP estão de acordo com o esperado, baseado nos estudos anteriores com IMZ, onde se tem expressivos efeitos catalíticos, que advêm de um ataque nucleofílico do grupo imidazolil do BIMZ, no átomo de fósforo do DEDNPP. A detecção do intermediário mono-fosforilado 21 (Esquema 36), é consistente com esse mecanismo, mas não se descarta a formação de outra espécie intermediária di-fosforilada 22, que pode ser instável para ser detectada por ESI-MS.

#### 4.5.4 Estudos cinéticos na presença de micela

De fato, o estudo apresentado para a reação do BIMZ com DEDNPP são suficientemente surpreendentes, todavia, as estruturas relativamente hidrofóbicas do BIMZ e DEDNPP incitam interesse no possível potencial da catálise micelar nessas reações. Assim, avaliou-se o efeito da micela catiônica brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr) e aniônica dodecilsulfato de sódio (SDS), Esquema 38. Vale ressaltar que foram realizados experimentos para a reação do IMZ com DEDNPP em meio micelar (CTABr 0,01M, dados mostrados no Apêndice), que não mostrou nenhum efeito micelar significativo, comparado com a reação na ausência de micela (incremento discreto de 1,5 vezes em  $k_{obs}$ , em pH 8,5). Isto é consistente com a alta solubilidade do IMZ em água, que,

consegue se aproximar do reagente tão eficientemente em meio não-micelar quanto micelar.



#### 4.5.4.1 Análises de eletroforese capilar

Para amparar os estudos cinéticos na presença de micela, foram realizados estudos por eletroforese capilar, uma técnica que permite calcular as constantes de associação de moléculas com micelas. Assim, é possível indicar se a incorporação dos reagentes da reação estudada é favorável, e quantificar pelas constantes  $K_N$  e  $K_S$ , que se referem ao BIMZ e DEDNPP na micela, respectivamente. Na análise de eletroforese capilar, se aplica um campo elétrico e ocorre a separação dos solutos pela diferença entre suas mobilidades eletroforéticas. Assim, para calcular a constante de incorporação dos solutos no meio micelar, obtêm-se dados da variação da concentração da micela ( $C$ ) em função dos tempos de retenções na micela do (i) analito de interesse ( $t_r$ ); (ii) soluto que não retém, no caso acetona ( $t_0$ ); e (iii) soluto que é totalmente retido, no caso pireno ( $t_m$ ). Uma forma direta de calcular a constante de incorporação é pela isoterma de Langmuir e Freudlich-Langmuir.<sup>203</sup> A Equação 17 descreve a isoterma de Freudlich-Langmuir, onde a constante de Langmuir  $K_{FL}$  corresponde à constante de incorporação de interesse,  $Q_{FL}$  corresponde à uma constante relacionada a energia de incorporação e  $n$  é uma medida da intensidade da incorporação.

$$\frac{(t_r - t_0)}{(t_m - t_0)} = \frac{Q_{FL} \times K_{FL} \times C^n}{1 + Q_{FL} \times C^n} \quad (17)$$

Os dados obtidos com a micela catiônica CTABr foram ajustados pela isoterma de Freudlich-Langmuir e estão mostrados na Figura 57, onde foi possível calcular os valores de  $K_s=102$  (DEDNPP) e  $K_N=11,26$

(BIMZ). Desta forma, o DEDNPP é mais incorporado à micela catiônica que o BIMZ. Foram aplicadas outras relações matemáticas mais complexas, deduzida por autores para calcular constantes de incorporação em micelas,<sup>204,205</sup> e em todos os casos obteve-se valores de constantes próximas dos valores encontrados. Também obteve-se valores similares pelo ajuste segundo a isoterma de Langmuir.

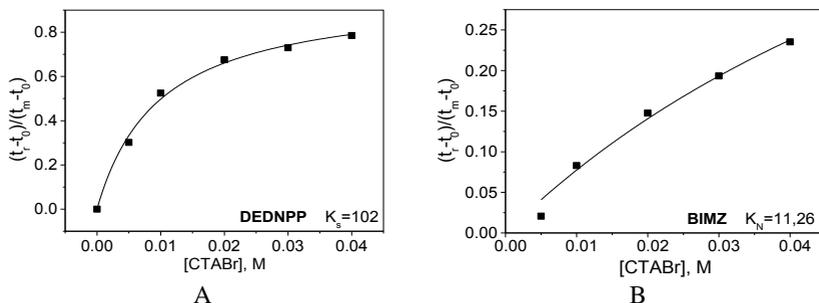


Figura 57 – Isotermas de Freundlich-Langmuir para a incorporação em CTABr do (A) DEDNPP ( $2 \times 10^{-4}$  M) e (B) BIMZ ( $2 \times 10^{-4}$  M), pH 8,5 a 25°C.

#### 4.5.4.2 Modelagem cinética: efeito do pH e da concentração micelar

Foi avaliado o efeito do pH nas reações do BIMZ com DEDNPP, na presença das micelas CTABr e SDS, e os perfis obtidos estão apresentados na Figura 58. Ainda, como se sabe que o DEDNPP é fortemente atraído pela micela, obteve-se os perfis de pH para a reação de hidrólise do DEDNPP, apenas na presença de micela, SDS e CTABr. Na Figura 57 também estão mostrados os perfis de pH para a reação espontânea do DEDNPP em água e na presença de BIMZ, para fins comparativos. Nas reações com SDS, problemas com precipitação impossibilitam obter dados em valores menores de pH.

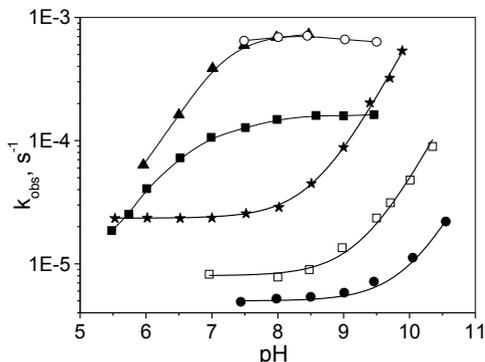


Figura 58 – Perfis de pH para as reações de DEDNPP: (i) espontânea (H<sub>2</sub>O) (-□-); (ii) CTABr (0,01M) (-★-), (iii) SDS (0,01M) (-●-), (iv) BIMZ (0,01M) (-■-); (v) BIMZ (0,01M) na presença de CTABr (0,01M) (-▲-) e (vi) BIMZ 0,01M na presença de SDS (0,01M) (-○-), à 25°C. Ajustes pelas Equações 26-29.

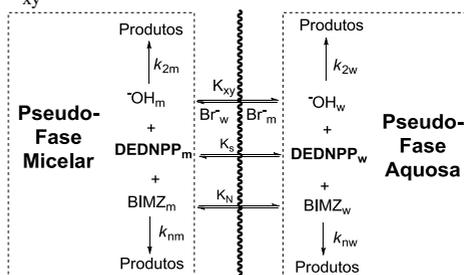
Os resultados mostrados na Figura 58 corroboram que a reação do BIMZ com DEDNPP é eficientemente catalisada por micela catiônica e aniônica. Comparando com a reação espontânea do DEDNPP em água em pH 8, tem-se incrementos em  $k_{obs}$  de: (i) 8 vezes na presença de CTABr; (ii) 155 vezes na presença de BIMZ+CTABr e (iii) 155 vezes na presença de BIMZ+SDS. Assim, ao comparar com a reação apenas na presença de BIMZ, as micelas causam incrementos em  $k_{obs}$  de 5 vezes, um efeito bastante expressivo e típico de catálise micelar,<sup>92,95</sup> considerando que se trata apenas de uma interação de aproximação, não envolvendo interações covalentes.

Avaliando a efeito micelar apenas na hidrólise do DEDNPP, observa-se que o CTABr consegue catalisar significativamente a reação, enquanto a micela aniônica SDS, inibe a reação, cerca de 2 vezes. Estas observações estão de acordo com o esperado pelo modelo de pseudofase com troca iônica (discutido no item 1.2.4), onde na reação de hidrólise alcalina avaliada, além da incorporação do DEDNPP, dominada por forças hidrofóbicas, tem-se a incorporação dos íons hidróxidos, que são atraídos por forças eletrostáticas. Essa aproximação dos íons hidróxidos pela micela catiônica CTABr é favorável, mas no caso do SDS, deve ocorrer uma repulsão, devido a carga negativa da micela.

Em geral, as reações catalisadas por micelas catiônicas reportadas na literatura,<sup>94,95,206</sup> são inibidas por micelas aniônicas. Por isto, a catálise micelar evidenciada na reação do BIMZ com DEDNPP é

surpreendente e bastante peculiar, que se deve provavelmente ao fato que além do DEDNPP se incorporar na fase micelar, a espécie nucleofílica reativa é a forma neutra do BIMZ e, sua arquitetura relativamente hidrofóbica, permite que se incorpore eficientemente no meio micelar.

Para compreender detalhadamente a catálise micelar observada, foi aplicado o modelo de pseudofase com troca iônica,<sup>97,98</sup> resumido no Esquema 39. Propõe-se que o DEDNPP e BIMZ podem estar na fase aquosa ( $\text{DEDNPP}_w$ ,  $\text{BIMZ}_w$ ) ou micelar ( $\text{DEDNPP}_m$ ,  $\text{BIMZ}_m$ ), regido por um equilíbrio dado por  $K_S$  e  $K_N$ , respectivamente (determinados por eletroforese capilar, *vide supra*). Assim, a reação dessas espécies pode ocorrer na fase aquosa ( $k_{nw}$ ) ou micelar ( $k_{nm}$ ). De maneira análoga, se descreve a reação do hidróxido com DEDNPP, definida pelas constantes  $k_{2m}$  e  $k_{2w}$ , na fase micelar e aquosa, respectivamente. Adicionalmente, os íons hidróxidos do meio aquoso trocam com os íons brometos, dado pelo equilíbrio  $K_{xy}$ .



Esquema 39

Através do modelo ilustrado no Esquema 39 é possível deduzir as Equações 18-29. Na Equação 18, tem-se a contribuição da reação com íons hidróxidos, dados pelos termos que estão multiplicados pela sua concentração total ( $[\text{OH}]_T$ ) e a reação com BIMZ, definidos pelos termos que estão multiplicados pela sua concentração total ( $[\text{BIMZ}]_T$ ). Como ambas as reações podem ocorrer nas pseudofases micelar ( $k_{2m}$ ,  $k_{nm}$ ) e aquosa ( $k_{2w}$ ,  $k_{nw}$ ), considera-se a fração molar das espécies em cada fase (subscrito S=DEDNPP, n=BIMZ) que são definidas pelas Equações 19-25. Substituindo as Equações 19-25 na Equação 18, obtêm-se a Equação 26, sendo que para os termos que se referem à reação com hidróxido, foram necessárias considerações adicionais. Isto porque, na reação com hidróxido deve-se considerar a troca iônica ( $K_{xy}$ ) dos íons brometo da micela ( $\text{Br}_m^-$ ) pelos íons hidróxidos do meio aquoso ( $\text{OH}_w^-$ ), Equação 21, que implica em deduções algébricas mais

complexas envolvendo resolução de polinômios. Simplificando, o termo que se refere à concentração de hidróxido na micela ( $[OH]_m$ ) é dado pelas Equações 27-28 (soluções de Bháskara),<sup>97</sup> onde  $V_M$  é o volume molar da micela, CMC é a concentração micelar crítica onde ocorre a micelização,  $[C_d]$ , a concentração de surfactante micelizado ([CTABr]-CMC),  $\alpha$  é dissociação micelar e  $K_{xy}$  é a constante de troca iônica. Ressalta-se que os termos  $k_{2m}$  e  $k_{nm}$  se referem à constante de segunda ordem dentro da micela, por isso são divididos por  $V_M \times C_d$ .

$$k_{obs} = \left( k_{2w} \chi_{sw} \chi_{OHw} + \frac{k_{2m}}{V_M \times C_d} \chi_{sm} \chi_{OHm} \right) \times [OH]_T \quad (18)$$

$$+ \left( k_{nw} \chi_{sw} \chi_{nw} + \frac{k_{nm}}{V_M \times C_d} \chi_{sm} \chi_{nm} \right) \times [BIMZ]_T$$

$$\chi_{OHm} = \frac{[OH]_m}{[OH]_T} \quad (19) \quad \chi_{OHw} = 1 - \chi_{OHm} \quad (20)$$

$$[OH]_m = K_{xy} \times \frac{[OH]_w [X]_m}{[X]_w} \quad (21)$$

$$\chi_{sm} = \frac{K_s C_d}{1 + K_s C_d} \quad (22)$$

$$\chi_{sw} = 1 - \chi_{sm} \quad (23)$$

$$\chi_{nm} = \frac{K_N C_d}{1 + K_N C_d} \quad (24)$$

$$\chi_{nw} = 1 - \chi_{nm} \quad (25)$$

$$k_{obs} = \frac{k_{2w} \cdot [OH]_w + \left( \frac{k_{2m}}{V_M} \right) \cdot K_s \cdot [OH]_m}{1 + K_s \cdot [C_d]} + \quad (26)$$

$$\left( k_{nw} \times \frac{1}{C_d \left( \frac{1}{C_d} + K_N + K_s + K_N K_s C_d \right)} + \frac{k_{nm}}{V_M \times C_d} \times \frac{K_N K_s}{\left( \frac{1}{C_d} + K_N + K_s + K_N K_s C_d \right)} \right) \times [BIMZ]_T$$

$$[OH]_m = \frac{-A_2 + \sqrt{(A_2)^2 + 4 \times K_{xy} \times [OH]_w \times C_d \times (1 - \alpha)}}{2} \quad (27)$$

$$A_2 = \alpha \times C_d + CMC + K_{xy} [OH]_w \quad (28)$$

$$\chi_{BIMZ} = \frac{K_{a1} K_{a2}}{[H^+]^2 + K_{a1} [H^+] + K_{a1} K_{a2}} \quad (29)$$

Os perfis de pH para reação de hidrólise do DEDNPP em meio micelar (Figura 58) foram ajustados pelas Equações 26-28, desconsiderando os termos referente à reação com BIMZ ( $k_{nw}$ ,  $k_{nm}$ ). Já o perfil obtido da reação do BIMZ com DEDNPP na presença de CTABr foi ajustado pelas Equações 26-29, onde na Equação 26, o termo  $[BIMZ]_T$  foi multiplicado pela fração molar da espécie neutra de BIMZ ( $\chi_{BIMZ}$ ), Equação 29. Isto porque no perfil de pH, deve-se considerar o

equilíbrio para formar a espécie neutra, definido pelos  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$ , determinados anteriormente por titulação potenciométrica. A boa correlação dos dados experimentais com os ajustes teóricos obtidos (Figura 58) demonstra que o modelo de pseudofase proposto descreve com sucesso os resultados obtidos. Os parâmetros cinéticos calculados pelos ajustes da Figura 58, para as reações com CTABr estão apresentados na Tabela 19, onde os parâmetros  $V_M$ , CMC,  $K_{xy}$  e  $\square$  são obtidos da literatura<sup>92</sup> e  $K_S$  e  $K_N$  foram obtidos por eletroforese capilar. Vale notar que as reações com SDS não foram ajustadas pelas equações dadas que descrevem o modelo de pseudofase, por apresentar poucos dados experimentais, e problemas com precipitação dificultam explorar mais a fundo estas reações (como variar [SDS]). De qualquer forma, os dados apresentados para SDS são suficientes para confirmar uma proficiente catálise por micela aniônica nas reações do DEDNPP com BIMZ.

Tabela 19 – Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 58-59 para as reações do DEDNPP com BIMZ na presença de CTABr.<sup>a</sup>

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
$a^b$	0,25	$pK_{a1}^d$	$6,04 \pm 0,07$
$K_{xy}^b$	0,09	$pK_{a2}^d$	$7,10 \pm 0,07$
$K_s^c$	102	$k_{2m}, M^{-1}s^{-1}^e$	$0,166 \pm 0,01$
$K_N^c$	11,26	$k_{2w}, M^{-1}s^{-1}^e$	$7,04 \pm 0,35$
$V, M^{-1}^b$	0,39	$k_{nm}, M^{-1}s^{-1}^f$	$(5,03 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
CMC, M <sup>b</sup>	$9,0 \times 10^{-4}$	$k_{nw}, M^{-1}s^{-1}^f$	$0,026 \pm 0,002$

<sup>a</sup> Ajustes pelas Equações 26-29, considerando o Esquema 39. <sup>b</sup> Constantes intrínsecas para o CTABr, obtidos da literatura. <sup>c</sup> Determinados por eletroforese capilar. <sup>d</sup> Determinado por titulação potenciométrica para BIMZ (0,01M), CTABr (0,01M) a 25°C. <sup>e</sup> Obtidos para o perfil de pH da reação de hidrólise do DEDNPP com CTABr 0,01M, e confirmados pelo ajuste do perfil de  $k_{obs}$  vs [CTABr], pH 8,5, Figura 59. <sup>f</sup> Obtidos para o perfil de pH da reação do DEDNPP com BIMZ (0,01M) na presença de CTABr (0,01M), e confirmados pelo ajuste do perfil de  $k_{obs}$  vs [CTABr] com BIMZ 0,01M, pH 8,5, Figura 59.

No caso do CTABr, avaliou-se o efeito da concentração da micela em  $k_{obs}$  para a reação de hidrólise do DEDNPP e para a reação com BIMZ 0,01M, em pH 8,5, Figura 59. O perfil de saturação (Figura 59) obtido é típico de reações com catálise micelar. Observa-se que os incrementos catalíticos ocorrem em concentrações acima da CMC ( $CMC_{CTABr} = 9 \times 10^{-4} M$ ).<sup>92</sup> Os dados da Figura 59 foram ajustados pelas Equações 26-28, e mostram uma boa correlação teórica com os dados experimentais, e as constantes calculadas concordam com os parâmetros

calculados pelo perfil de pH das respectivas reações (Figura 58) dados na Tabela 19.

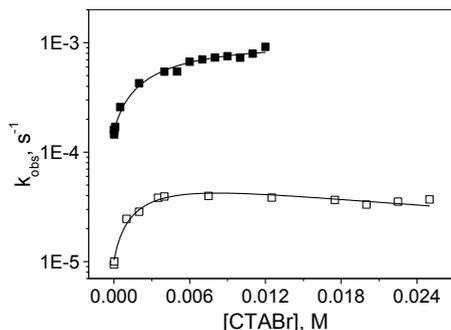


Figura 59 – Dependência de  $k_{obs}$  com a concentração de CTABr, para a reação do DEDNPP em água (-□-) e com BIMZ (0,01M) (-■-), pH 8,5 a 25°C. Ajustes pelas Equações 26-28.

Analisando os parâmetros calculados pelos ajustes dos perfis apresentados nas Figuras 57-58, dados na Tabela 19, tem-se que (i) as constantes  $V_M$ , CMC,  $K_{xy}$ ,  $\alpha$ ,  $K_S$ ,  $K_N$ ,  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$ , obtidas corroboram o modelo proposto, pois suas grandezas concordam com os valores que foram determinadas por técnicas específicas (dado na literatura<sup>92</sup> e determinados experimentalmente por eletroforese capilar e titulação potenciométrica); (ii) para a reação de hidróxido com DEDNPP na presença de CTABr, obteve-se o valor de  $k_{2w}$ , que multiplicado pela concentração aproximada de hidróxido na fase aquosa (pH 8,5 ;  $[OH]_T=3 \times 10^{-6}$  M), leva a constante de primeira ordem  $\sim 2 \times 10^{-5} s^{-1}$ , consistente com os dados para a reação espontânea do DEDNPP em água; (iii) para a reação do BIMZ com DEDNPP na presença de CTABr, obteve-se um valor de  $k_{nw}$ , que é consistente com os dados para a reação apenas em água ( $k_{obs}=1,6 \times 10^{-4} s^{-1}$ , pH 8,5), considerando a concentração local do BIMZ ( $\sim 0,01M$ ); (iv) a relação  $k_{2w} > k_{2m}$  e  $k_{nw} > k_{nm}$ , é comum em reações similares catalisadas por micelas,<sup>98,207-209</sup> cuja interpretação não é trivial, pois as constantes  $k_{2m}$  e  $k_{nm}$  não podem ser facilmente comparadas por serem uma constante de segunda ordem dentro da micela<sup>94</sup> (foi considerado  $V_M$ ), *i.e.*, com o BIMZ e/ou com os íons hidróxidos, dentro da micela ( $\chi_{nm}$ ,  $\chi_{OHm}$ , respectivamente).

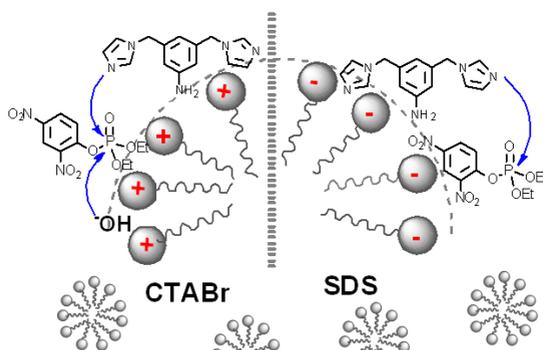
É importante notar que, no modelo considerado, apesar de não ser possível uma comparação palpável com os parâmetros  $k_{2m}$  e  $k_{nm}$ , os demais parâmetros considerados, estão de acordo com o esperado,

provando que o modelo de pseudofase com troca iônica,<sup>94,97,98</sup> descreve com rigor as reações estudadas.

#### 4.5.5 Conclusões parciais

O estudo cinético obtido para as reações do BIMZ com DEDNPP evidenciam que o BIMZ é um nucleófilo muito reativo, e sua forma de atuação está associada aos grupos imidazolil presentes, que devem atuar atacando o átomo de fósforo do éster DEDNPP. De fato, análise de ESI-MS detectou o intermediário monofosforilado em um dos grupos imidazolil. Desta forma, acredita-se que o BIMZ promove uma eficiente catálise nucleofílica de desfosforilação, tal observado com IMZ.

A fim de avaliar efeitos de aproximação, recorrente nos sistemas enzimáticos, estudou-se a reação do BIMZ com DEDNPP na presença de micelas. Foi observado uma pronunciada catálise micelar, que surpreendentemente, ocorre tanto com micela catiônica (CTABr) quanto aniônica (SDS), que conseguem atrair os reagentes,<sup>206</sup> tal mostrado no Esquema 40. A incorporação de BIMZ e DEDNPP (natureza neutra) nas micelas é dominada por forças hidrofóbicas, sendo que DEDNPP é mais incorporado em CTABr que BIMZ, consistente com a expressiva catálise por CTABr na reação espontânea do DEDNPP. Inclusive, na reação de hidrólise alcalina do DEDNPP em água, CTABr catalisa a reação, devido a atração eletrostática dos íons negativos hidróxidos, que no caso do SDS é repelido, justificando a inibição pela micela aniônica.



Esquema 40

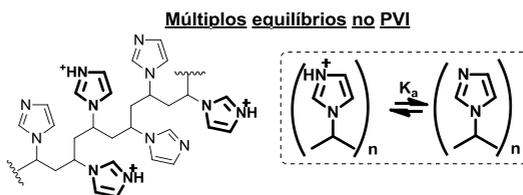
O modelo de pseudofase com troca iônica descreveu com sucesso os sistemas micelares estudados. Sendo que, a elegância dos ajustes teóricos obtidos está nas equações complexas utilizadas, que chegam a envolver doze parâmetros diferentes, uma tarefa bastante laboriosa, mas que validam a adequação do modelo. Resumindo, o estudo apresentado com micelas é fundamental, pois além de legitimar a importância dos efeitos de proximidade nas reações, detalha com sucesso a modelagem teórica de um sistema complexo. A aproximação dos reagentes pode ser explorada mais a fundo, ancorando grupos reativos em um sistema macromolecular polimérico, cuja maior natureza relativamente hidrofóbica pode ajudar acelerar ainda mais significativamente a reação de interesse.

#### 4.6 REAÇÕES DE DESFOSFORILAÇÃO COM POLIVINILIMIDAZOL E EFEITO DA CATÁLISE MICELAR

Os resultados apresentados até então, para as reações de desfosforilação na presença do grupo imidazol, permitiram delinear detalhadamente a natureza mecanística das reações, esclarecendo sobre as formas de catálise (nucleofílica, ácida- e básica-geral) do imidazol e também o efeito da catálise micelar. Assim, buscando uma aproximação mais realística na modelagem de sítios enzimáticos, estudou-se a reação de desfosforilação na presença de um polímero que possui grupos imidazolil ancorados. Desta forma, pretende-se explorar as notórias particularidades enzimáticas: de hidrofobicidade, aproximação dos reagentes e da multifuncionalidade simultânea dos grupos reativos. Para este fim, foi utilizado o polímero poli(1-vinilimidazol) PVI na reação com os ésteres BDNPP e DEDNPP e após avaliado o efeito de micela aniônica e catiônica. PVI foi obtido comercialmente, com o peso molecular  $M_w=3500\text{g/mol}$ . Foi realizada a síntese do PVI através da polimerização do 1-vinilimidazol,<sup>210</sup> no qual aparentemente foi obtido um polímero que também apresentou reatividade, mas devido a problemas de caracterização como determinação do peso molecular, este não foi estudado em detalhe. É importante salientar que, tipicamente, para polímeros do PVI, são reportados valores de polidispersidade em torno de 2,73, um valor relativamente alto.<sup>211</sup> Como os biopolímeros que regem reações enzimáticas são conhecidos pela natureza monodispersa uniforme, o design de modelos requer a maior aproximação dessa uniformidade. Apesar disso, estudos com polímeros catalíticos continuam sendo muito promissores.

#### 4.6.1 Titulação potenciométrica do polivinilimidazol

Para avaliar os equilíbrios de protonação do polímero PVI, foi realizada uma titulação potenciométrica e a curva obtida está apresentada na Figura 60, juntamente com os dados para IMZ, para fins comparativos. Os resultados de titulação evidenciam que o PVI tampona em uma faixa grande de pH (2-8), diferente do IMZ que tampona entre pH 6-8. Sabe-se que uma espécie iônica tampona na faixa de  $\text{pH} \pm 1$  de seu  $\text{pK}_a$ , o que concorda com  $\text{pK}_a$  determinado do IMZ (7,10). Já no caso do PVI, que possui inúmeros grupos iônicos imidazolil, devem ocorrer múltiplos equilíbrios de desprotonação, regido por vários  $\text{pK}_a$ 's, tal ilustrado no Esquema 41. Esses  $\text{pK}_a$ 's não são facilmente determinados, visto que a desprotonação de um grupo deve influenciar o equilíbrio do grupo vizinho, assim podem existir infinitos  $\text{pK}_a$ 's, não-estáticos. A conclusão mais importante da titulação potenciométrica do PVI é que este possui uma média de  $\text{pK}_a$  dos grupos imidazolínicos em torno de 5,8 (dado pela derivada), bem abaixo do  $\text{pK}_a$  do IMZ sozinho (7,1). Foi utilizado o programa BEST7 para calcular os  $\text{pK}_a$ 's, no entanto, para simplificar o tratamento, foram considerados apenas 2 sítios principais de equilíbrios. Assim, determinou-se os  $\text{pK}_a$ 's de  $4.5 \pm 0.06$  e  $6.4 \pm 0.06$ .



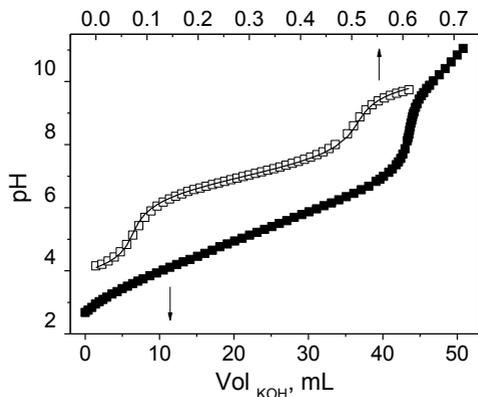


Figura 60 – Dados da titulação potenciométrica do PVI ( $6 \times 10^{-3} \text{M}$ ) (-■-) e IMZ ( $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ) (-□-), com KOH (0,1M) a 25°C.

O equilíbrio proposto para o PVI está de acordo com dados da literatura, onde autores reportam que os grupos imidazol apresentam uma média de  $pK_a=6$  em polímeros de *N*-vinilimidazol.<sup>212</sup> Vários estudos evidenciam a complexidade dos equilíbrios de poli(*N*-vinilimidazol),<sup>213,214</sup> por exemplo, foi observado que a mudança de pH também leva a mudanças conformacionais na cadeia polimérica, que influencia diretamente na protonação do polímero. Foi mostrado que o polímero se contrai inicialmente e depois se expande, durante os estágios de protonação, que está intimamente ligado às ligações de hidrogênio entre os anéis imidazolil protonado e desprotonado.<sup>215</sup> Mesmo complexo, esses equilíbrios dinâmicos podem justificar a reatividade catalítica do polímero e possível natureza enzima artificial.

#### 4.6.2 Estudos cinéticos na ausência de micela

Foram realizados estudos cinéticos para a reação do diéster BDNPP e triéster DEDNPP com PVI, e os perfis de pH obtidos estão apresentados na Figura 61A-B, respectivamente. Nos gráficos da Figura 61C-D, estão mostrados os perfis de pH considerando a concentração local do imidazol ( $k_{obs}/[\text{monômero}]$ ), e comparado com as respectivas reações com IMZ (1M) e em água. Os resultados mostram incrementos expressivos em  $k_{obs}$  para as reações de desfosforilação na presença de PVI: 1500 vezes para BDNPP e 50 vezes para DEDNPP, comparado com as respectivas reações espontâneas em pH 8. Na reação com DEDNPP, tem-se um patamar que indica um caminho nucleofílico, mas

com BDNPP, observa-se um sutil perfil em forma de sino, indicando um caminho bifuncional. Ao comparar com as reações com IMZ, e considerando a concentração do monômero (Figura 60C-D), tem-se (i) com BDNPP, PVI é mais reativo (~5 vezes) que IMZ em  $\text{pH} < 7,5$ , mas possui reatividade similar em  $\text{pH} > 7,5$ ; (ii) com DEDNPP, IMZ é mais reativo (~7 vezes) que PVI em quase toda faixa de  $\text{pH}$ , exceto em  $\text{pH} < 5,5$ , onde as reatividades são semelhantes.

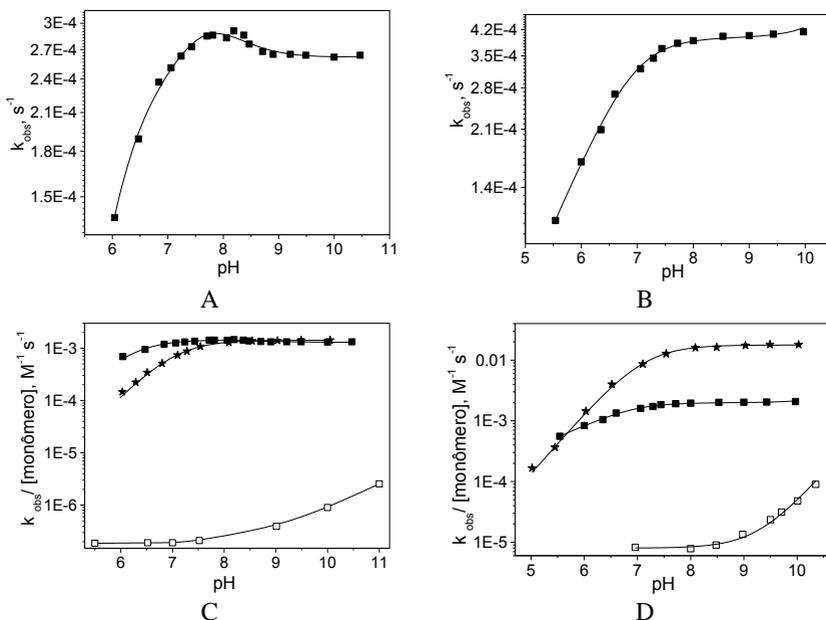
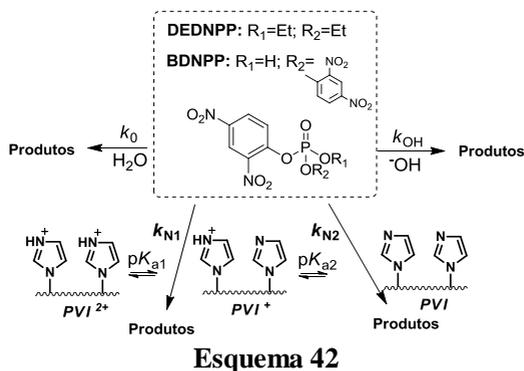


Figura 61 – Perfis de pH para a reação do PVI ( $6 \times 10^{-3} \text{M}$ ) (-■-) com (A) BDNPP e (B) DEDNPP, em água, a  $25^\circ\text{C}$ . Considerando a concentração do monômero 1-vinilimidazol (0,156M), tem-se os perfis de pH em função de uma constante de segunda ordem, que está mostrado juntamente com a respectiva reação com IMZ 1M (-★-) para (C) BDNPP e (D) DEDNPP. As reações espontâneas também estão mostradas para fins comparativos (-□-).<sup>64</sup>

Os dados da Figura 61A-B foram ajustados pela Equação 30, de acordo com o Esquema 42. O Esquema 42 simplifica as complexas reações que podem ocorrer com PVI, em apenas duas principais: (i) a reação com o grupo imidazolil neutro ( $k_{N2}$ ); e (ii) a reação bifuncional com um grupo imidazolil neutro e outro protonado ( $k_{N1}$ ), que foi considerado genericamente, por uma espécie bipolar ( $\text{PVI}^+$ ), presente na cadeia polimérica. Esta abordagem, apesar de muito simplista, se

adequou para descrever os incrementos em  $k_{obs}$  em função do pH, visto a boa correlação dos dados com o ajuste teórico. Os parâmetros cinéticos calculados estão mostrados na Tabela 20, sendo que as constantes de segunda ordem  $k_{N1}$  e  $k_{N2}$  estão mostradas em função da concentração total do polímero e do monômero ( $k_{N1}^m$ ,  $k_{N2}^m$ ).



$$k_{obs} = k_0 + k_{OH}[OH^-] + [PVI]_T \times (k_{N1}\chi_{PVI^+} + k_{N2}\chi_{PVI}) \quad (30)$$

Tabela 20 – Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 61A-B, para as reações do PVI com BDNPP e DEDNPP.<sup>a</sup>

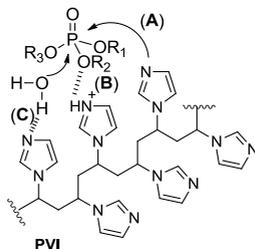
	BDNPP	DEDNPP
$k_0, s^{-1}$	$1,90 \times 10^{-7}$	$8,0 \times 10^{-6}$
$k_{OH}, M^{-1}s^{-1}$	$2,90 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^{-1}$
$k_{N1}, M^{-1}s^{-1}, [polímero]^b$	0,037	0,018
$k_{N1}^m, M^{-1}s^{-1}, [monômero]^c$	$1,43 \times 10^{-3}$	$7,10 \times 10^{-4}$
$k_{N2}, M^{-1}s^{-1}, [polímero]^b$	0,043	0,065
$k_{N2}^m, M^{-1}s^{-1}, [monômero]^c$	$1,67 \times 10^{-3}$	$2,49 \times 10^{-3}$
$pK_{a1}^d$	5,89	5,20
$pK_{a2}^d$	7,50	6,60

<sup>a</sup> Ajuste pela Equação 30, baseada no Esquema 42. <sup>b</sup> Considerando  $[polímero] = 6 \times 10^{-3} M$ . <sup>c</sup> Considerando  $[monômero] = 0,156$ . <sup>d</sup> Valores de  $pK_a$ 's cinéticos.

Analisando as Figuras 61A-B, juntamente com os parâmetros da Tabela 20 tem-se: (i) para BDNPP, uma contribuição significativa da reação com a espécie bipolar ( $k_{N1}$ ), consistente com o leve comportamento em forma de sino do perfil de pH (Figura 61A) para BDNPP, inexistente no perfil do DEDNPP. A razão  $k_{N2}/k_{N1}$  de 1,16 e 3,6, para BDNPP e DEDNPP, respectivamente, confirma que a reação

com a espécie neutra (PVI) é mais rápida do que com a espécie bipolar (PVI<sup>+</sup>), para DEDNPP. Com BDNPP, ambas espécies têm praticamente a mesma eficiência catalítica; (ii) Comparando com a reação em água ( $k_0$ ),  $k_{N1}$  e  $k_{N2}$  são  $10^5$  e  $10^3$  vezes maior, para BDNPP e DEDNPP, respectivamente. Em contraste, se comparar com a constante de segunda ordem do monômero,  $k_{N1}^m$  e  $k_{N2}^m$  são  $10^3$  e 100 vezes maior, para BDNPP e DEDNPP, respectivamente. Os incrementos observados para as reações com IMZ são  $10^3$  para ambos os ésteres, indicando que PVI tem uma reatividade especial, especialmente na reação com BDNPP; (iii) os valores de  $pK_a$  cinéticos calculados diferem levemente nas reações com DEDNPP e BDNPP, o que está de acordo com a natureza complexa do PVI, que pode sofrer mudanças conformacionais na presença do éster neutro (DEDNPP) ou aniônico (BDNPP), influenciando diretamente nos seus sítios de protonação.

Propõe-se que a reação de desfosforilação com PVI pode ocorrer por três caminhos, mostrados no Esquema 43: (i) catálise nucleofílica pelo grupo imidazolil neutro no átomo de fósforo, assistido por uma catálise ácida-geral por outro grupo imidazolil protonado, ativando o grupo de saída (caminhos A+B, Esquema 43); (ii) catálise básica geral de um imidazol neutro sobre uma molécula de água que ataca o átomo de fósforo, juntamente com uma catálise ácida-geral (Caminhos B+C, Esquema 43); e (iii) somente uma catálise nucleofílica pelo grupo imidazolil neutro (Caminho A, Esquema 43). Baseados nos modelos intra-e intermoleculares detalhados anteriormente com o grupo imidazolil, acredita-se que na reação do PVI com BDNPP, deva ocorrer simultaneamente, a reação de catálise nucleofílica e a bifuncional de catálise nucleofílica-ácida-geral, pois no polímero podem existir regiões onde predominam a espécie bipolar e/ou a neutra. A catálise básica-geral não foi considerada importante no mecanismo, visto que os incrementos catalíticos são típicos de reações nucleofílicas. Já no caso da reação do PVI com DEDNPP, deve predominar apenas o mecanismo de catálise nucleofílica. A proposta de catálise nucleofílica pelo PVI está em consonância com a química favorável de fosforilação e desfosforilação do imidazol.



Esquema 43

A maior reatividade catalítica do PVI na reação com BDNPP pode estar relacionada à estrutura molecular do BDNPP que é mais hidrofóbica que DEDNPP, podendo ser mais atraído pela estrutura hidrofóbica do polímero. Ainda, a carga negativa do BDNPP, alia efeito de aproximação eletrostática pela carga positiva dos grupos protonados do polímero. Assim, o polímero PVI teria atributos de micelas, com propriedades especiais de incorporar reagentes, e, além disso, exercer papel funcional catalítico. Esse curioso comportamento de incorporação já é conhecido para polieletrólitos funcionais,<sup>216-218</sup> como PVI, e com este estudo pode se mostrar muito interessante, pois englobaria em uma reação-modelo, múltiplos aspectos de catálise enzimática: aproximação hidrofóbica e eletrostática, e multifuncionalidade.

#### 4.6.3 Estudos cinéticos na presença de micela

A reação do PVI com DEDNPP e BDNPP foi estudada na presença da micela catiônica CTABr e aniônica SDS, e os perfis de pH obtidos estão apresentados na Figura 62A-B. No caso do diéster aniônico BDNPP, observa-se que sua reação com PVI na presença de CTABr (0,01M), inibe até 13 vezes para  $\text{pH} < 8,5$ , mas com SDS (0,01M), acelera, ainda que sutilmente, 2 vezes, comparado com a respectiva reação com apenas PVI. Para a mesma reação na presença de CTABr, para  $\text{pH} > 8,5$  tem-se valores de  $k_{\text{obs}}$  próximos dos observados para a reação na ausência de micela. Na reação do triéster neutro DEDNPP com PVI, observa-se uma catálise micelar com comportamento mais peculiar. Na presença de CTABr (0,01M), para  $\text{pH} > 7,5$ , tem-se incrementos em  $k_{\text{obs}}$  de até 3 vezes e com SDS (0,01M), esses incrementos chegam 14 vezes, comparado com a respectiva reação com apenas PVI. Os incrementos catalíticos observados são típicos de catálise micelar,<sup>92,95</sup> mas mostram-se peculiares, pois, tal como ocorre

na reação com BIMZ (item 4.5), no caso do DEDNPP, há uma eficiente catálise tanto por micela catiônica quanto micela aniônica.

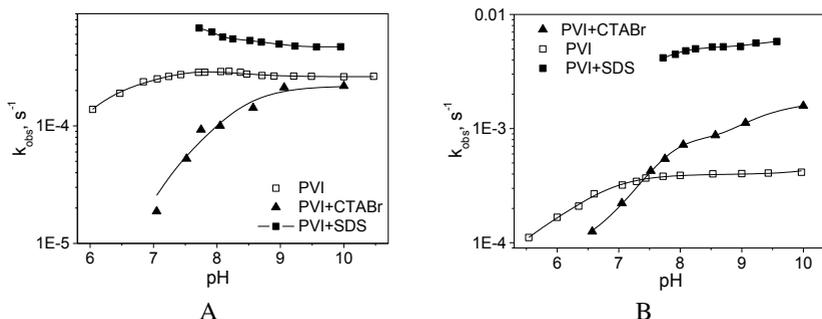


Figura 62 – Perfis de pH para a reação do PVI ( $6 \times 10^{-3}$  M) na presença de CTABr (0,01M) (-▲-) e SDS (0,01M) (-■-) com (A) BDNPP e (B) DEDNPP, em água, a 25°C. As respectivas reações apenas com PVI (-□-) também estão mostradas para fins comparativos.

A micela catiônica CTABr inibe fortemente as reações em pH menor, provavelmente devido à protonação dos grupos reativos de imidazolil, que irão se repelir eletrostaticamente da micela catiônica. Ao predominar grupos neutros de imidazolil na cadeia polimérica, o CTABr deve atuar mais eficientemente, mas só se observa catálise micelar com DEDNPP. Isto pode ser explicado pelo fato da reação bifuncional pelo PVI (por uma espécie bipolar) ser expressivo no caso do BDNPP, o qual é pouco sujeito a uma catálise por micelas catiônicas. Para DEDNPP, a reação do PVI é predominantemente regida pela espécie neutra dos grupos reativos, portanto, o CTABr consegue catalisar significativamente, devido às atrações hidrofóbicas dos reagentes. Curiosamente, SDS promove catálise micelar na reação do BDNPP com PVI, que deve atrair regiões do polímero onde predominam a espécie bipolar, mas que a esperada repulsão do BDNPP pelo SDS, não chega a inibir a reação, comparado com a reação apenas com PVI. Na reação com DEDNPP, SDS promove uma catálise micelar mais eficiente, tal esperado, pela atração hidrofóbica dos reagentes neutros.

Propõe-se que a catálise micelar observada se deve às aproximações dos reagentes, onde a micela deve se aproximar dos sítios poliméricos (por força hidrofóbica e/ou eletrostático) e atrair para sua vizinhança, os ésteres de fosfato BDNPP e DEDNPP. Todavia, a modelagem teórica para descrever os perfis de pH das reações do PVI com as micelas é complexo e requer estudos mais detalhados, que

envolvam técnicas avançadas para avaliar a natureza dos agregados de polímero-micela. Diversos estudos têm sido publicados,<sup>219,220</sup> que focam apenas em detalhar as interações entre polímeros e micelas, utilizando técnicas de tensão superficial, condutância, fluorescência, eletrodo de íon-específico, microcalorimetria, e especialmente o espalhamento de luz (de raios-x), que requer um tratamento matemático laborioso.<sup>221</sup> Autores propõem até diagramas de fases tridimensionais para esses tipos de sistemas.<sup>222</sup> Esses estudos mais detalhados não foram realizados visto que o objetivo deste trabalho foi apenas ampliar o conhecimento das reações intermoleculares com imidazol para um sistema mais complexo, polimérico, e assim validar a eficiência do grupo imidazolil na cadeia macromolecular e da aproximação de reagentes, em reações de desfosforilação. Na verdade, a utilização de polímeros como catalisadores em reações de hidrólise é pouco explorada, e este trabalho elucida o potencial do PVI, como uma possível enzima artificial.

#### 4.6.4 Conclusões parciais

Os resultados apresentados para as reações de desfosforilação na presença do polímero PVI, confirmam o potencial catalítico do grupo imidazolil na cadeia macromolecular, já premeditado pelos resultados anteriores, com IMZ e BIMZ. Desta forma, o PVI atua como uma enzima artificial, pois possui atributos enzimáticos, com sítios reativos, natureza hidrofóbica e importante contribuição conformacional e de proximidade na reatividade. Adicionalmente, a catálise micelar mostrou-se importante na reação estudada, pois facilita uma aproximação mais eficaz dos reagentes, e propõe-se que essa interação ocorra tal ilustrada na Figura 63. A micela, de natureza relativamente hidrofóbica deve se aproximar do polímero, atraindo para sua vizinhança o éster de fosfato, favorecendo sua desfosforilação pelos grupos imidazolil da cadeia polimérica.

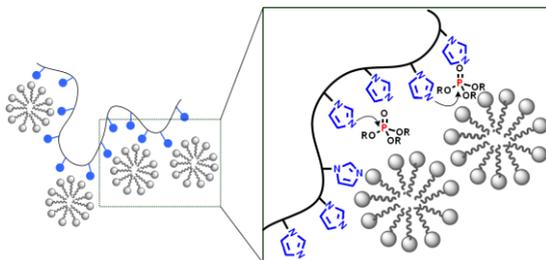


Figura 63 – Representação da interação do polímero PVI com micelas que justifica a reatividade nas reações de desfosforilação.

Na verdade, estudos com polímeros funcionais têm atraído grande interesse,<sup>130,135</sup> pois pode apresentar diversas aplicações, por exemplo, na obtenção de nanocompósitos com propriedades eletroquímicas especiais para uso como sensores<sup>223</sup> e polímeros sintéticos bioativos que apresentam propriedades terapêuticas intrínsecas, como reconhecimento e remoção de substâncias indesejadas no sistema gastrointestinal, tem mostrado potencial para tratar doenças.<sup>224</sup> Neste contexto, polímeros constituídos de grupos imidazolil e/ou imidazolínios (sais, líquidos iônicos, etc.) tem mostrado grande relevância, pois podem apresentar ação antimicrobiana, antiarrítmico e anti-metástico. E o design de polímeros imidazolílicos para fins terapêuticos ainda é relativamente recente.<sup>225</sup> Ainda, este tipo de polímero também tem apresentado características de materiais de resposta a estímulo. Entretanto, um dos maiores desafios é obter polímeros derivado do *N*-vinilimidazol, com propriedades físicas adequadas, como baixo PDI.<sup>226</sup>

Ainda que este trabalho não tenha abordado aspectos de atividade biológica e aplicações, os resultados apresentados são importantes, pois mostram que o PVI reage eficientemente com ésteres de fosfato. Estes são abundantes nos sistemas biológicos, não somente na cadeia do DNA, mas também na forma de intermediários enzimáticos e outras espécies fosforiladas (ATP, ADP), determinantes em vários processos biológicos, como sinalização. PVI constitui uma espécie de enzima artificial, i.e., é um catalisador macromolecular que se beneficia de catálises permeadas nos sistemas biológicos.



## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho detalha algumas reações de desfosforilação com grupos nucleofílicos de reatividade excepcional: o hidroxamato e o imidazol, em diversos tipos de sistemas: intra- e intermolecular, polimérico, micelar e biológico com DNA plasmídico. As conclusões gerais dos resultados apresentados estão resumidas na Figura 64, onde se tem:

### I. Grupo hidroxamato

➤ Nas reações dos ésteres de fosfato (DEDNPP, EDNPP) com BHO<sup>-</sup>, estudos de UV-Vis, RMN e ESI-MS confirmam a extraordinária reatividade do BHO<sup>-</sup>, que acelerando para ordem de segundos, reações extremamente lentas (apenas em água tem  $t_{1/2}$ =8 meses). As reações envolvem um curioso ataque nucleofílico tipo suicida, onde o nucleófilo de partida é destruído durante a reação através de um rearranjo de Lossen que forma produtos de baixa nucleofilicidade.

➤ Estendeu-se o interesse pelo grupo hidroxamato no fármaco DFO, que possui três grupos hidroxamatos reativos. A reação de um diéster de fosfato modelo (BDNPP) com DFO foi acompanhado por UV-Vis e ESI-MS, onde se provou a atividade nucleofílica do DFO e se postulou o mecanismo, pela detecção de intermediários fosforilados. Análises com DNA evidenciaram que o fármaco DFO, quebra eficientemente DNA plasmídico em pH fisiológico (em até 16 h), e esta atividade é aumentada na presença de Zn(II). Esses resultados repercutem diretamente na utilização do DFO para fins terapêuticos, onde deve-se avaliar quais os reais efeitos colaterais que este fármaco pode causar: se pode ocorrer a quebra indiscriminada do DNA que pode levar ao câncer.

### II. Grupo imidazol

➤ A reação de hidrólise do diéster de fosfato bis imidazolil BMIPP, que possui reatividade especial ( $t_{1/2}$ =5 min), foi reavaliada por novas técnicas: <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P RMN, espectrometria de alta resolução e cálculos computacionais, onde foi possível “pescar” intermediários, estados de transições e produtos chaves. As novas evidências apresentadas confirmam solidamente a hipótese mecanística de catálise intramolecular bifuncional nucleofílica-ácida geral, envolvendo dois grupos imidazolil, um como base livre e outro como ácido conjugado. A

identificação do intermediário fosforilado cíclico na reação intramolecular do BMIPP indicou que compostos de imidazol fosforilado, que são conhecidos por serem instáveis (análogos da fosfohistidina), podem ser relativamente estáveis e encorajou estudos subsequentes de reações intermoleculares com o imidazol.

➤ As reações do IMZ com a série completa de mono- di- e triésteres de fosfato (DNPP, BDNPP, EDNPP e DEDNPP) foram acompanhadas por UV-Vis e evidenciam o alto poder nucleofílico do IMZ, comparável à  $\alpha$ -nucleófilos. Observou-se que os intermediários de imidazol fosforilado das reações estudadas são espécies razoavelmente estáveis para serem detectadas ( $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN, ESI-MS), em meio aquoso, sendo que o tempo para quebrar (5 tempos de meia-vida) os intermediários detectados vai desde 1 dia até 43 dias. A elucidação das reatividades dos intermediários detectados é de extrema relevância no design de análogos estáveis das fosfohistidinas.

➤ O nucleófilo bis-imidazolil BIMZ também se mostrou um bom nucleófilo na reação com o triéster DEDNPP, onde os grupos imidazolil atuam como catalisadores nucleofílicos, sobre o átomo de fósforo do DEDNPP, confirmado por análise de ESI-MS, que detectou o intermediário monofosforilado. A reação do BIMZ com DEDNPP foi estudada na presença de micelas, a fim de avaliar efeitos de aproximação, recorrente nos sistemas enzimáticos, e os resultados mostram uma pronunciada catálise micelar, que surpreendentemente, ocorre tanto com micela catiônica (CTABr) quanto aniônica (SDS). Os resultados obtidos foram elegantemente descritos pelo modelo de pseudofase com troca iônica, onde se propõe que além do DEDNPP se incorporar na fase micelar (por forças hidrofóbicas), a espécie nucleofílica reativa é a forma neutra do BIMZ e, sua arquitetura relativamente hidrofóbica, permite que se incorpore eficientemente no meio micelar catiônico e aniônico.

➤ Ampliando os estudos para um sistema mais típico de enzimas, para avaliar o efeito de proximidade e hidrofobicidade, estudou-se as reações do polímero PVI com os ésteres BDNPP e DEDNPP. Os resultados obtidos confirmam o potencial catalítico dos grupos imidazolil ancorado na cadeia polimérica, que podem atuar como catalisador nucleofílico ou ainda, de forma bifuncional, por catálise nucleofílica-ácida geral com um grupo imidazol neutro e outro protonado na vizinhança. Assim, o PVI atua como uma enzima artificial. A catálise micelar também se mostrou importante na reação estudada com PVI, pois permeia uma aproximação mais eficaz dos reagentes, onde a micela, de natureza hidrofóbica deve se aproximar do polímero,

atraindo para sua vizinhança o éster de fosfato, favorecendo sua desfosforilação pelos grupos imidazolil da cadeia polimérica.

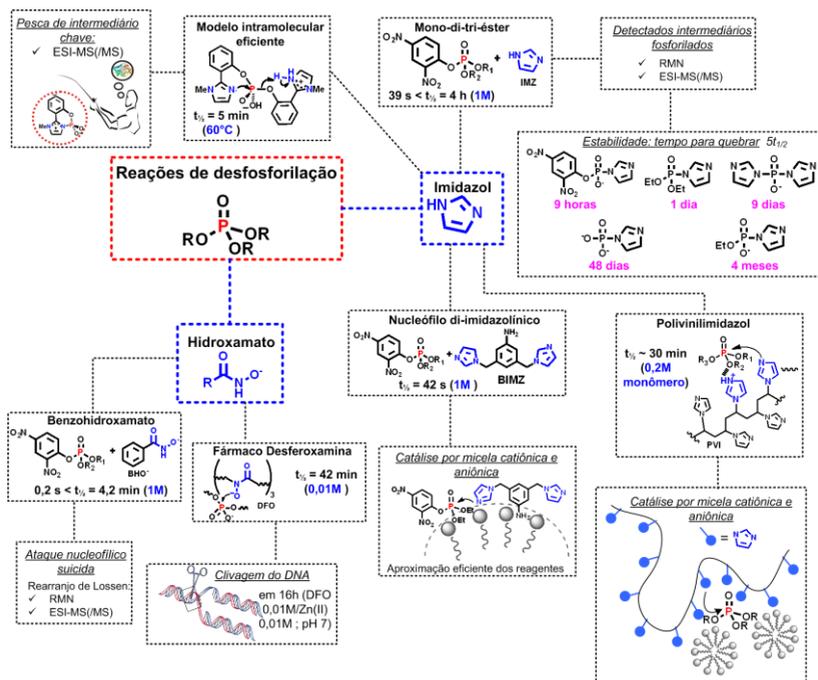


Figura 64 – Resumo das conclusões gerais dos resultados apresentados para as reações de desfosforilação com os grupos nucleofílicos, hidroxamato e imidazol, em sistemas: intra- e intermolecular, polimérico, micelar e biológico com DNA plasmídico.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. COLLINS, T. Toward sustainable chemistry. **Science**, v.291, p.48. 2001.
2. KATADA, H.; KOMIYAMA, M. Artificial restriction DNA cutters as new tools for gene manipulation. **Chembiochem**, v.10, p.1279. 2009.
3. LELAND, P. A.; RAINES, R. T. Cancer chemotherapy - ribonucleases to the rescue. **Chem. Biol.**, v.8, p.405. 2001.
4. SIGMAN, D. S.; BRUICE, T. W.; MAZUMDER, A.; SUTTON, C. L. Targeted chemical nucleases. **Acc. Chem. Res.**, v.26, p.98. 1993.
5. HOYDONCKX, H. E.; DE VOS, D. E.; A., C. S.; JACOBS, P. A. Esterification and transesterification of renewable chemicals. **Top. Catal.**, v.27, p.83. 2004.
6. NARASIMHARAO, K.; LEE, A.; WILSON, K. Catalysis in production of biodiesel: A review. **J. Biobased Mater. Bioenergy**, v.1, p.19. 2007.
7. SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformation of triglycerides into fuels, polymers and chemicals: Some applications of catalysis in oleochemistry. **Quimica Nova**, v.30, p.667. 2007.
8. CABRI, W. Catalysis: The pharmaceutical perspective. **Catal. Today** v.140, p.2. 2009.
9. FEDERSEL, H. J. Chemical process research and development in the 21st century: Challenges, strategies, and solutions from a pharmaceutical industry perspective. **Acc. Chem. Res.**, v.42, p.671. 2009.
10. ZAPF, A.; BELLER, M. Fine chemical synthesis with homogeneous palladium catalysts: Examples, status and trends. **Top. Catal.**, v.19, p.101. 2002.
11. CHEN, B.; DINGERDISSEN, U.; KRAUTER, J. G. E.; ROTGERINK, H. G. J. L.; MOBUS, K.; OSTGARD, D. J.; PANSTER,

P.; RIERMEIER, T. H.; SEEBALD, S.; TACKE, T.; TRAUTHWEIN, H. New developments in hydrogenation catalysis particularly in synthesis of fine and intermediate chemicals. **Appl. Catal., A** v.280, p.17. 2005.

12. ROTHENBERG, G. **Catalysis: Concepts and green applications**. Weinheim: WILEY-VCH. 2008. 279 p.

13. HORVATH, I. T.; ANASTAS, P. T. Innovations and green chemistry. **Chem. Rev.**, v.107, p.2169. 2007.

14. ZECCHINA, A.; GROppo, E.; BORDIGA, S. Selective catalysis and nanoscience: An inseparable pair. **Chem. Eur. J.** , v.13, p.2440. 2007.

15. MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: Current status and future prospects. **Faseb J.** , v.19, p.311. 2005.

16. DUPONT, J.; SCHOLTEN, J. D. On the structural and surface properties of transition-metal nanoparticles in ionic liquids. **Chem Soc Rev**, v.39, p.1780. 2010.

17. ZARBIN, A. J. G. (nano) materials chemistry. **Química Nova**, v.30, p.1469. 2007.

18. WOLFENDEN, R. Degrees of difficulty of water-consuming reactions in the absence of enzymes. **Chem. Rev.**, v.106, p.3379. 2006.

19. KRAUT, D. A.; CARROLL, K. S.; HERSCHLAG, D. Challenges in enzyme mechanism and energetics. **Annu. Rev. Biochem.**, v.72, p.517. 2003.

20. FERSHT, A. **Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding**. New York: W.H. Freeman and Company. 1999. p.

21. WOLFENDEN, R.; SNIDER, M. J. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. **Acc. Chem. Res.**, v.34, p.938. 2001.

22. KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. **Color atlas of biochemistry**. New York: THIEME. 2005. 467 p.
23. BENKOVIC, S. J.; HAMMES-SCHIFFER, S. A perspective on enzyme catalysis. **Science**, v.301, p.1196. 2003.
24. GARCIA-VILOCA, M.; GAO, J.; KARPLUS, M.; TRUHLAR, D. G. How enzymes work: Analysis by modern rate theory and computer simulations. **Science**, v.203, p.186. 2003.
25. SCHOWEN, R. L. How an enzyme surmounts the activation energy barrier. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.100, p.11931. 2003.
26. WOLFENDEN, R. Analog approaches to structure of transition-state in enzyme reactions. **Acc. Chem. Res.**, v.5, p.10. 1972.
27. SCHOWEN, K. B.; LIMBACH, H. H.; DENISOV, G. S.; SCHOWEN, R. L. Hydrogen bonds and proton transfer in general-catalytic transition-state stabilization in enzyme catalysis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1458, p.43. 2000.
28. CLELAND, W. W. Low barrier hydrogen bonds and enzymatic catalysis. **Biochemistry**, v.39, p.1580. 2000.
29. WARSHEL, A.; SHARMA, P. K.; KATO, M.; XIANG, Y.; LIU, H. B.; OLSSON, M. H. M. Electrostatic basis for enzyme catalysis. **Chem. Rev.**, v.106, p.3210. 2006.
30. WARSHEL, A.; SHARMA, P. K.; KATO, M.; PARSON, W. W. Modeling electrostatic effects in proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1764, p.1647. 2006.
31. BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v.43, p.6032. 2004.
32. AHARONI, A.; GAIDUKOV, L.; KHERSONSKY, O.; GOULD, S. M.; ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. The 'evolvability' of promiscuous protein functions. **Nat. Genet.**, v.37, p.73. 2005.

33. KHERSONSKY, O.; ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. Enzyme promiscuity: Evolutionary and mechanistic aspects. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.10, p.498. 2006.
34. DALKO, P. I.; MOISAN, L. In the golden age of organocatalysis. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v.43, p.5138. 2004.
35. FERSHT, A.; WINTER, G. Protein engineering. **Trends Biochem. Sci.**, v.17, p.292. 1992.
36. ARNOLD, F. H.; WINTRODE, P. L.; MIYAZAKI, K.; GERSHENSON, A. How enzymes adapt: Lessons from directed evolution. **Trends Biochem. Sci.**, v.26, p.100. 2001.
37. REYNALDO, V.; CAO, R.; FRAGOSO, A. Supramolecular chemistry of cyclodextrins in enzyme technology. **Chem. Rev.**, v.107, p.3088. 2007.
38. SAENGER, W. **Principles of nucleic acid structure**. New York: Springer. 1984. 556 p.
39. WESTHEIMER, F. H. The role of phosphorus in chemistry and biochemistry - an overview. **Acs Symposium Series**, v.486, p.1. 1992.
40. WESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. **Science**, v.235, p.1173. 1987.
41. MACHADO, V. G.; NOME, F. Energy-rich phosphate compounds. **Química Nova**, v.22, p.351. 1999.
42. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v.26, p.745. 2003.
43. LIU, C.; WANG, M.; ZHANG, T.; SUN, H. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coord. Chem. Rev.**, v.248, p.147. 2004.
44. SCHROEDER, G. K.; LAD, C.; WYMAN, P.; WILLIAMS, N. H.; WOLFENDEN, R. The time required for water attack at the

- phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.103, p.4052. 2006.
45. YANG, Y.-C.; BAKER, J.; WARD, J. R. Decontamination of chemical warfare agents. **Chem. Rev.**, v.92, p.1729. 1992.
46. DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: A review. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.20, p.407. 2009.
47. ALLEN, K. N.; DUNAWAY-MARIANO, D. Phosphoryl group transfer: Evolution of a catalytic scaffold. **Trends Biochem. Sci.**, v.29, p.495. 2004.
48. GUTHRIE, R. D.; JENCKS, W. P. Iupac recommendations for the representation of reaction mechanisms. **Acc. Chem. Res.**, v.22, p.343. 1989.
49. BRANDÃO, T. A. S. **Desenvolvimento de novos catalisadores, modelos não-miméticos de fosfatases e relações lineares de energia-livre.** (Tese(Doutor em Química)). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. 160 p.
50. CLELAND, W. W.; HENGGE, A. C. Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. **Chem. Rev.**, v.106, p.325. 2006.
51. JENCKS, W. P. When is an intermediate not an intermediate? Enforced mechanisms of general acid-base, catalyzed, carbocation, carbanion, and ligand exchange reaction. **Acc. Chem. Res.**, v.13, p.161. 1980.
52. KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. The reactivity of phosphate esters. Monoester hydrolysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v.89, p.415. 1967.
53. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis. **J. Chem. Soc. (B)**, p.510. 1970.
54. BUNTON, C. A. Hydrolysis of orthophosphate esters. **Acc. Chem. Res.**, v.3, p.257. 1970.

55. KHAN, S. A.; KIRBY, A. J. Reactivity of phosphate esters - multiple structure reactivity correlations for reactions of triesters with nucleophiles. **J. Chem. Soc. (B)**, p.1172. 1970.
56. GESSER, J. C.; YUNES, S.; CLEMENTIN, R. M.; NOME, F. Intramolecular reactions as non mimetic models of enzyme catalysis. **Quimica Nova**, v.20, p.631. 1997.
57. MENGER, F. M. On the source of intramolecular and enzymatic reactivity. **Acc. Chem. Res.**, v.18, p.128. 1985.
58. NELSON, L. N.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman. 2004. 1232 p.
59. KIRBY, A. J. Efficiency of proton transfer catalysis in models and enzymes. **Acc. Chem. Res.**, v.30, p.290. 1997.
60. KIRBY, A. J.; ABELL, K. W. Y. Intramolecular general acid catalysis of intramolecular nucleophilic catalysis of the hydrolysis of a phosphate diester. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II**, v.8, p.1171. 1983.
61. KIRBY, A. J.; LIMA, M. F.; SILVA, D.; ROUSSEX, C. D.; NOME, F. Efficient intramolecular general acid catalysis for nucleophilic attack on a phosphodiester. **J. Am. Chem. Soc.**, v.128, p.16944. 2006.
62. SOUZA, B. S.; NOME, F. Importance of equilibrium fluctuations between most stable conformers in the control of the reaction mechanism. **J. Org. Chem.**, v.75, p.7186. 2010.
63. KIRBY, A. J.; MANFREDI, A. M.; SOUZA, B. S.; MEDEIROS, M.; PRIEBE, J. P.; BRANDAO, T. A. S.; NOME, F. Reactions of alpha-nucleophiles with a model phosphate diester. **Arkivoc**, p.28. 2009.
64. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reactions of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydroxylamine. **J. Org. Chem.**, v.68, p.7051. 2003.

65. BLASKÓ, A.; BRUICE, T. C. Recent studies of nucleophilic, general-acid, and metal ion catalysis of phosphate diester hydrolysis. **Acc. Chem. Res.**, v.32, p.475. 1999.
66. KHAN, S. A.; KIRBY, A. J.; WAKSELMAN, M. Intramolecular catalysis of phosphate diester hydrolysis. Nucleophilic catalysis by the neighbouring carboxy-group of the hydrolysis of aryl 2-carboxyphenyl phosphate. **J. Chem. Soc. (B)**, p.1182. 1970.
67. JENCKS, D. A.; JENCKS, W. P. Characterization of transition-states by structure-reactivity coefficients. **J. Am. Chem. Soc.**, v.99, p.7948. 1977.
68. BOURNE, N.; WILLIAMS, A. Effective charge on oxygen in phosphoryl (-po<sub>3</sub>-2-) group transfer from an oxygen donor. **J. Org. Chem.**, v.49, p.1200. 1984.
69. BRUICE, T. C.; BLASKÓ, A.; ARASASINGHAM, R. D.; KIM, J. S. Participation of two carboxyl groups in phosphodiester hydrolysis. 2. A kinetic, isotopic, and <sup>31</sup>p nmr study of the hydrolysis of a phosphodiester with carboxyl groups fixed in an attack conformation. **J. Am. Chem. Soc.**, v.117, p.12070. 1995.
70. OSBORNE, D. W. Pyridinolysis of diaryl methyl phosphates. **J. Org. Chem.**, v.29, p.3570. 1964.
71. KIRBY, A. J.; VARVOGLI, A. G. Reactivity of phosphate esters - reactions of monoesters with nucleophiles . Nucleophilicity independent of basicity in a bimolecular substitution reaction. **J. Chem. Soc. (B)**, p.135. 1968.
72. KIRBY, A. J.; JENCKS, W. P. Reactivity of nucleophilic reagents toward p-nitrophenyl phosphate dianion. **J. Am. Chem. Soc.**, v.87, p.3209. 1965.
73. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. Reactivity of phosphate esters - reactions of diesters with nucleophiles. **J. Chem. Soc. (B)**, p.1165. 1970.
74. HALL, H. K. Correlation of the base strengths of amines. **J. Am. Chem. Soc.**, v.79, p.5441. 1957.

75. KIRBY, A. J.; JENCKS, W. P. Base catalysis of reaction of secondary amines with p-nitrophenyl phosphate . Kinetic evidence for an addition intermediate in nucleophilic aromatic substitution. **J. Am. Chem. Soc.**, v.87, p.3217. 1965.
76. JENCKS, W. P.; GILCHRIS, M. Reactions of nucleophilic reagents with phosphoramidate. **J. Am. Chem. Soc.**, v.87, p.3199. 1965.
77. DIXON, J. E.; BRUICE, T. C. Alpha-effect .5. Kinetic and thermodynamic nature of alpha-effect for amine nucleophiles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.94, p.2052. 1972.
78. HOZ, S. The alpha effect - on the origin of transition-state stabilization. **J. Org. Chem.**, v.47, p.3545. 1982.
79. PALLING, D. J.; JENCKS, W. P. Nucleophilic reactivity toward acetyl-chloride in water. **J. Am. Chem. Soc.**, v.106, p.4869. 1984.
80. UM, I. H.; BUNCEL, E. The origin of the alpha-effect: Dissection of ground-state and transition-state contributions. **J. Org. Chem.**, v.65, p.577. 2000.
81. REN, Y.; YAMATAKA, H. The alpha-effect in gas-phase s(n)2 reactions: Existence and the origin of the effect. **J. Org. Chem.**, v.72, p.5660. 2007.
82. KIRBY, A. J.; SOUZA, B. S.; MEDEIROS, M.; PRIEBE, J. P.; MANFREDI, A. M.; NOME, F. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Chemical evidence from its reaction with a phosphate triester. **Chem. Commun.**, p.4428. 2008.
83. KIRBY, A. J.; TONDO, D. W.; MEDEIROS, M.; SOUZA, B. S.; PRIEBE, J. P.; LIMA, M. F.; NOME, F. Efficient intramolecular general-acid catalysis of the reactions of alpha-effect nucleophiles and ammonia oxide with a phosphate triester. **J. Am. Chem. Soc.**, v.131, p.2023. 2009.
84. KIRBY, A. J.; LIMA, M. F.; SILVA, D.; NOME, F. Nucleophilic attack by oxyanions on a phosphate monoester dianion: The positive

effect of a cationic general acid. **J. Am. Chem. Soc.**, v.126, p.1350. 2004.

85. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDÃO, T. A. S.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reaction of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydrazine and hydrogen peroxide. Comparing o- and n- phosphorylation. **J. Org. Chem.**, v.69, p.7898. 2004.

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

87. MEDEIROS, M. **Estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e um triéster de fosfato: Caracterização de produtos e intermediários.** Programa de Pós-Graduação em Química, Mestrado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. 76 p.

88. MALOY, S. R. Localized mutagenesis. **Method. Enzymol.**, v.421, p.42. 2007.

89. FREESE, E.; FREESE, E. B. Oxygen effect on deoxyribonucleic acid inactivation by hydroxylamines. **Biochem.**, v.4, p.2419. 1965.

90. DWARS, T.; PAETZOLD, E.; OEHME, G. Reactions in micellar systems. **Angew Chem Int Edit**, v.44, p.7174. 2005.

91. EL SEOUD, O. A.; RUASSE, M. F.; POSSIDONIO, S. Ph-independent hydrolysis of 4-nitrophenyl 2,2-dichloropropionate in aqueous micellar solutions: Relative contributions of hydrophobic and electrostatic interactions. **J Phys Org Chem**, v.14, p.526. 2001.

92. FARIA, A. C.; MELLO, R. S.; ORTH, E. S.; NOME, F. Hydrolysis of benzoic anhydride mediated by ionenes and micelles. **J. Mol. Cat. A**, v.289, p.106. 2008.

93. TADA, E. B.; OUARTI, N.; SILVA, P. L.; BLAGOEVA, I. B.; EL SEOUD, O. A.; RUASSE, M. F. Nucleophilic reactivity of the ctaci-

micelle-bound fluoride ion: The influence of water concentration and ionic strength at the micellar interface. **Langmuir**, v.19, p.10666. 2003.

94. BUNTON, C. A. The dependence of micellar rate effects upon reaction mechanism. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.123-126, p.333. 2006.

95. BUIST, G. J.; BUNTON, C. A.; ROBINSON, L.; SEPULVEDA, L.; STAM, M. Micellar effects upon the hydrolysis of bis-2,4-dinitrophenyl phosphate. **J. Am. Chem. Soc.**, v.92, p.4072. 1970.

96. GHOSH, K. K.; SINHA, D.; SATNAMI, M. L.; DUBEY, D. K.; RODRIGUEZ-DAFONTE, P.; MUNDHARA, G. L. Nucleophilic dephosphorylation of p-nitrophenyl diphenyl phosphate in cationic micellar media. **Langmuir** v.21, p.8664. 2005.

97. QUINA, F. H.; CHAIMOVICH, H. Ion-exchange in micellar solutions .1. Conceptual-framework for ion-exchange in micellar solutions. **J. Phys. Chem.**, v.83, p.1844. 1979.

98. BUNTON, C. A.; NOME, F.; QUINA, F. H.; ROMSTED, L. S. Ion binding and reactivity at charged aqueous interfaces. **Acc. Chem. Res.**, v.24, p.357. 1991.

99. ATTWOOD, P. V.; PIGGOTT, M. J.; ZU, X. L.; BESANT, P. G. Focus on phosphohistidine. **Amino Acids**, v.32, p.145. 2007.

100. RAINES, R. T. Ribonuclease a. **Chem. Rev.**, v.98, p.1045. 1998.

101. ADMIRAAL, S. J.; HERSCHLAG, D. Catalysis of phosphoryl transfer from atp by amine nucleophiles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.121, p.5837. 1999.

102. SUNDBERG, R. J.; MARTIN, R. B. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition-metal ions in chemical and biological-systems. **Chem. Rev.**, v.74, p.471. 1974.

103. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHER, P. **Organic chemistry**. New York: Oxford University Press. 2001. 1512 p.

104. SMYTH, D. G.; STEIN, W. H.; MOORE, S. The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: Revisions and confirmations. **J. Biol. Chem.**, v.238, p.227. 1963.
105. BRESLOW, R.; E., A. Geometric evidence on the ribonuclease model mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, v.111, p.5972. 1989.
106. HERSCHLAG, D. Ribonuclease revisited: Catalysis via the classical general acid-base mechanism or a triester-like mechanism? **J. Am. Chem. Soc.**, v.116, p.11631. 1994.
107. SOWA, G. A.; HENGGE, A. C.; CLELAND, W. W. <sup>18</sup>O isotope effects support a concerted mechanism for ribonuclease a. **J. Am. Chem. Soc.**, v.119, p.2319. 1997.
108. SCHEIN, C. H. From housekeeper to microsurgeon: The diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. **Nat. Biotechnol.**, v.15, p.529. 1997.
109. KLUMPP, S.; KRIEGLSTEIN, J. Reversible phosphorylation of histidine residues in vertebrate proteins. **Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics**, v.1754, p.291. 2005.
110. TAN, E. L.; BESANT, P. G.; ATTWOOD, P. V. Mammalian histidine kinases: Do they really exist? **Biochem.**, v.41, p.3843. 2002.
111. PUTTICK, J.; BAKER, E. N.; DELBAERE, L. T. J. Histidine phosphorylation in biological systems. **Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics** v.1784, p.100. 2008.
112. REYNOLDS, W. F.; PEAT, I. R.; FREEDMAN, M. H.; LYERLA, J. R. Determination of tautomeric form of imidazole ring of l-histidine in basic solution by c-13 magnetic-resonance spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v.95, p.328. 1973.
113. BACHOVCHIN, W. W.; ROBERTS, J. D. N-15 nuclear magnetic-resonance spectroscopy - state of histidine in catalytic triad of alpha-lytic protease - implications for charge-relay mechanism of peptide-bond cleavage by serine proteases. **J. Am. Chem. Soc.**, v.100, p.8041. 1978.

114. HULTQUIS, D. E.; MOYER, R. W.; BOYER, P. D. Preparation and characterization of 1-phosphohistidine and 3-phosphohistidine. **Biochem.**, v.5, p.322. 1966.
115. MATTHEWS, H. R. Protein-kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins - a possible regulator of the mitogen-activated protein-kinase cascade. **Pharmac. Ther.**, v.67, p.323. 1995.
116. KIM, Y.; PESIS, K. H.; MATTHEWS, H. R. Removal of phosphate from phosphohistidine in proteins. **BBA-Mol. Cell. Res.** , v.1268, p.221. 1995.
117. HULTQUIS, D. E. Preparation and characterization of phosphorylated derivatives of histidine. **Biochim. Biophys. Acta** v.153, p.329. 1968.
118. KLUMPP, S.; KRIEGLSTEIN, J. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. **Eur. J. Biochem.**, v.269, p.1067. 2002.
119. MAEDA, T.; WURGLERMURPHY, S. M.; SAITO, H. A 2-component system that regulates an osmosensing map kinase cascade in yeast. **Nature**, v.369, p.242. 1994.
120. BESANT, P. G.; ATTWOOD, P. V. Mammalian histidine kinases. **Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics**, v.1754, p.281. 2005.
121. ROBINSON, V. L.; STOCK, A. M. High energy exchange: Proteins that make or break phosphoramidate bonds. **Structure**, v.7, p.R47. 1999.
122. WALINDER, O. Identification of a phosphate-incorporating protein from bovine liver as nucleoside diphosphate kinase and isolation of 1-32p-phosphohistidine 3-32p-phosphohistidine and n-epsilon-32-p-phospholysine from erythrocytic nucleoside diphosphate kinase incubated with adenosine triphosphate-32p. **J. Biol. Chem.**, v.243, p.3947. 1968.

123. WIELAND, T.; NURNBERG, B.; ULIBARRI, I.; KALDENBERGSTASCH, S.; SCHULTZ, G.; JAKOBS, K. H. Guanine nucleotide-specific phosphate transfer by guanine-nucleotide-binding regulatory protein beta-subunits - characterization of the phosphorylated amino-acid. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.18111. 1993.
124. CUELLO, F.; SCHULZE, R. A.; HEEMEYER, F.; MEYER, H. E.; LUTZ, S.; JAKOBS, K. H.; NIROOMAND, F.; WIELAND, T. Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer via nucleoside diphosphate kinase (ndpk)  $\beta$  and  $\gamma$  subunits - complex formation of ndpk  $\beta$  with  $\gamma$  subunit dimers and phosphorylation of his-266 in  $\gamma$  subunit. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.7220. 2003.
125. KENNELLY, P. J.; POTTS, M. Fancy meeting you here! A fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. **J. Bacteriol.**, v.178, p.4759. 1996.
126. COHEN, P. The role of protein phosphorylation in human health and disease - delivered on June 30th 2001 at the FEBS meeting in Lisbon. **Eur. J. Biochem.**, v.268, p.5001. 2001.
127. STEEG, P. S.; PALMIERI, D.; OUATAS, T.; SALERNO, M. Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer. **Cancer Letters**, v.190, p.1. 2003.
128. MATSUSHITA, M.; JANDA, K. D. Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.10, p.855. 2002.
129. 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.**, v.72, p.3800. 2007.
130. MOTHERWELL, W. B.; BINGHAM, M. J.; SIX, Y. Recent progress in the design and synthesis of artificial enzymes. **Tetrahedron**, v.57, p.4463. 2001.

131. BRESLOW, R. Biomimetic chemistry and artificial enzymes: Catalysis by design. **Acc. Chem. Res.**, v.28, p.146. 1995.
132. BRESLOW, R.; DOHERTY, J. B.; GUILLOT, G.; LIPSEY, C. B-cyclodextrinylbisimidazole, a model for ribonuclease. **J. Am. Chem. Soc.**, v.100, p.3227. 1978.
133. BRESLOW, R.; SCHMUCK, C. Goodness of fit in complexes between substrates and ribonuclease mimics: Effects on binding, catalytic rate constants, and regiochemistry. **J. Am. Chem. Soc.**, v.118, p.6601. 1996.
134. SUN, S. F. **Physical chemistry of macromolecules**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2004. 541 p.
135. VRIEZEMA, D. M.; ARAGONE'S, M. C.; ELEMANS, J. A. A. W.; CORNELISSEN, J. J. L. M.; ROWAN, A. E.; NOLTE, R. J. M. Self-assembled nanoreactors. **Chem. Rev.**, v.105, p.1445. 2005.
136. KLOTZ, I. M.; ROYER, G. P.; SCARPA, I. Synthetic derivatives of polyethyleneimine with enzyme-like catalytic activity (synzymes). **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.68, p.263. 1971.
137. MEAGER, A. **Gene therapy technologies, applications and regulations**. London: John Wiley & Sons Ltd. 1999. 428 p.
138. ANDERSON, W. F. Gene therapy - the best of times, the worst of times. **Science**, v.288, p.627. 2000.
139. KAISER, J. Gene therapy - two teams report progress in reversing loss of sight. **Science**, v.320, p.606. 2008.
140. COUZIN, J.; KAISER, J. Gene therapy - as gelsinger case ends, gene therapy suffers another blow. **Science**, v.307, p.1028. 2005.
141. VOGT, A.; LAZO, J. S. Chemical complementation: A definitive phenotypic strategy for identifying small molecule inhibitors of elusive cellular targets. **Pharmacol. Ther.**, v.107, p.212. 2005.
142. [HTTP://NOBELPRIZE.ORG/NOBEL\\_PRIZES/CHEMISTRY/LAUREATES/2008/](http://NOBELPRIZE.ORG/NOBEL_PRIZES/CHEMISTRY/LAUREATES/2008/). Acessado em Maio, 2011.

143. JACKSON, R. C.; WEBER, G.; MORRIS, H. P. Imp dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. **Nature**, v.256, p.331. 1975.
144. HEDSTROM, L. Imp dehydrogenase: Structure, mechanism, and inhibition. **Chem. Rev.**, v.109, p.2903. 2009.
145. KAISER, J. Gene therapy - putting the fingers on gene repair. **Science**, v.310, p.1894. 2005.
146. PEREZ, E. E.; WANG, J. B.; MILLER, J. C.; JOUVENOT, Y.; KIM, K. A.; LIU, O.; WANG, N.; LEE, G.; BARTSEVICH, V. V.; LEE, Y. L.; GUSCHIN, D. Y.; RUPNIEWSKI, I.; WAITE, A. J.; CARPENITO, C.; CARROLL, R. G.; ORANGE, J. S.; URNOV, F. D.; REBAR, E. J.; ANDO, D.; GREGORY, P. D.; RILEY, J. L.; HOLMES, M. C.; JUNE, C. H. Establishment of hiv-1 resistance in cd4(+) t cells by genome editing using zinc-finger nucleases. **Nat. Biotechnol.**, v.26, p.808. 2008.
147. [HTTP://WWW.SANGAMO.COM/INDEX.PHP](http://www.sangamo.com/index.php) Acessado em Maio, 2011.
148. [HTTP://WWW.CLINICALTRIALS.ORG](http://www.clinicaltrials.org) Acessado em Maio, 2011.
149. BERKESSEL, A.; GROGER, H. **Asymmetric organocatalysis**. Weinheim: Wiley-VCH. 2005. 454 p.
150. SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, v.87, p.2355. 2008.
151. GAMBA, M.; LAPIS, A. A. M.; DUPONT, J. Supported ionic liquid enzymatic catalysis for the production of biodiesel. **Adv Synth Catal**, v.350, p.160. 2008.
152. FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnol. Bioeng.**, v.102, p.1298. 2009.

153. GIUSTI, L. A.; MACHADO, V. G. Dos compostos ricos em energia aos gases de guerra: Uma revisão sobre a química dos compostos orgânicos fosfatados. **Orbital**, v.1, p.101. 2009.
154. HAUSER, C. R.; JR RENFROW, W. B. Benzohydroxamic acid. **Org. Syn. Coll.**, v.2, p.67. 1943.
155. [HTTP://RIODB01.IBASE.AIST.GO.JP/SDBS/CGI-BIN/DIRECT\\_FRAME\\_TOP.CGI](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) Acessado em Maio, 2011.
156. MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of phosphate-esters by hydroxyl-functionalized micellar and vesicular reagents. **J. Org. Chem.**, v.48, p.588. 1983.
157. ORTH, E. S. **Catálise intramolecular bifuncional em um diéster de fosfato: Modelando o mecanismo da ribonuclease.** Departamento de Química, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008. 73 p.
158. MARTELL, A. E.; HANCOCK, R. D. **Metal complexes in aqueous solutions.** New York: Plenum Press. 1996. p.
159. KIRBY, A. J.; ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; SOUZA, B. S.; PLIEGO, J. R.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Intramolecular catalysis of phosphodiester hydrolysis by two imidazoles. **J Am Chem Soc**, v.132, p.8513. 2010.
160. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; ZAKRZEWSKI, V. G.; MONTGOMERY, J. A., JR.; STRATMANN, R. E.; BURANT, J. C.; DAPPRICH, S.; MILLAM, J. M.; DANIELS, A. D.; KUDIN, K. N.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; TOMASI, J.; BARONE, V.; COSSI, M.; CAMMI, R.; MENNUCCI, B.; POMELLI, C.; ADAMO, C.; CLIFFORD, S.; OCHTERSKI, J.; PETERSSON, G. A.; AYALA, P. Y.; CUI, Q.; MOROKUMA, K.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; CIOŚŁOWSKI, J.; ORTIZ, J. V.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; GOMPERTS, R.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; GONZALEZ, C.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B. G.; CHEN, W.; WONG, M. W.;

ANDRES, J. L.; HEAD-GORDON, M.; REPLOGLE, E. S.; POPLE, J. A. Gaussian 98, revision D.01; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, , 2004.

161. TERENCEZ, H.; FERNANDES, L.; FISCHER, F. L.; RIBEIRO, C. W.; SILVEIRA, G. P.; SA, M. M.; NOME, F. Metal-free artificial nucleases based on simple oxime and hydroxylamine scaffolds. **Bioorg Med Chem Lett**, v.18, p.4499. 2008.

162. AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology**. New York: Wiley. 1999. p.

163. SIMANENKO, Y. S.; PROKOP'EVA, T. M.; POPOV, A. F.; BUNTON, C. A.; KARPICHEV, E. A.; SAVELOVA, V. A.; GHOSH, K. K. O-nucleophilicity of hydroxamate ions in reactions with ethyl 4-nitrophenyl ethylphosphonate, diethyl 4-nitrophenyl phosphate, and 4-nitrophenyl 4-toluenesulfonate. **Russ. J. Phys. Chem.**, v.40, p.1337. 2004.

164. GHOSH, K. K.; SINHA, D.; SATNAMI, M. L.; DUBEY, D. K.; SHRIVASTAVAB, A.; PALEPU, R. M.; DAFONTE, P. R. Enhanced nucleophilic reactivity of hydroxamate ions in some novel micellar systems for the cleavage of parathion. **J. Colloid Interface Sci.**, v.301, p.564. 2006.

165. GHOSH, K. K.; SATNAMI, M. L.; SINHA, D. Dephosphorylation of paraoxon by hydroxamate ions in micellar media. **Tetrahedron Lett.**, v.49, p.9103. 2004.

166. ORTH, E. S.; DA SILVA, P. L. F.; MELLO, R. S.; BUNTON, C. A.; MILAGRE, H. M. S.; EBERLIN, M. N.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Suicide nucleophilic attack: Reactions of benzohydroxamate anion with bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate. **J. Org. Chem.**, v.74, p.5011. 2009.

167. SILVA, T. S. **Estudo cinético do 2,4-dinitrofenil etil fosfato com ácido benzohidroxâmico (trabalho de conclusão de curso de graduação)**. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008. 37 p.

168. 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 methylated hydroxylamines with bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. Mass spectrometric identification of key intermediates **J. Org. Chem.**, v.69, p.6024. 2004.
169. MCQUARRIE, D. A.; SIMON, J. D. **Physical chemistry: A molecular approach**. California: University Science Books. 1997. p.
170. YALE, H. L. The hydroxamic acids. **Chem. Rev.**, v.33, p.209. 1943.
171. HURD, C. D.; BAUER, L. A novel rearrangement of hydroxamic acids using sulfonyl chlorides. **J. Am. Chem. Soc.**, v.76, p.2791. 1954.
172. SWIDLER, R.; STEINBERG, G. M. The kinetics of the reaction of isopropyl methylphosphonofluoridate (sarin) with benzohydroxamic acid. **J. Am. Chem. Soc.**, v.78, p.3594. 1956.
173. KISS, T.; FARKAS, E. Metal-binding ability of desferrioxamine b. **J Includ Phenom Mol**, v.32, p.385. 1998.
174. MAGGIO, A. Light and shadows in the iron chelation treatment of haematological diseases. **Brit J Haematol**, v.138, p.407. 2007.
175. KONTOGHIORGHES, G. J. Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminum chelating drugs. **Toxicol Lett**, v.80, p.1. 1995.
176. CAPPELLINI, M. D.; PATTONERI, P. Oral iron chelators. **Annu Rev Med**, v.60, p.25. 2009.
177. ABETZ, L.; BALADI, J. F.; JONES, P.; ROFAIL, D. The impact of iron overload and its treatment on quality of life: Results from a literature review. **Health Qual Life Out**, v.4. 2006.
178. LEDERMAN, H. M.; COHEN, A.; LEE, J. W. W.; FREEDMAN, M. H.; GELFAND, E. W. Deferoxamine - a reversible s-phase inhibitor of human-lymphocyte proliferation. **Blood**, v.64, p.748. 1984.

179. BECTON, D. L.; ROBERTS, B. Antileukemic effects of deferoxamine on human myeloid-leukemia cell-lines. **Cancer Res**, v.49, p.4809. 1989.
180. DAYANI, P. N.; BISHOP, M. C.; BLACK, K.; ZELTZER, P. M. Desferoxamine (dfo) - mediated iron chelation: Rationale for a novel approach to therapy for brain cancer. **J Neuro-Oncol**, v.67, p.367. 2004.
181. DANIELS, J. S.; GATES, K. S. DNA cleavage by the antitumor agent 3-amino-1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide (sr4233): Evidence for involvement of hydroxyl radical. **J Am Chem Soc**, v.118, p.3380. 1996.
182. MILLER, M. J. Syntheses and therapeutic potential of hydroxamic acid based siderophores and analogs. **Chem Rev**, v.89, p.1563. 1989.
183. FARKAS, E.; ENYEDY, E. A.; CSOKA, H. A comparison between the chelating properties of some dihydroxamic acids, desferrioxamine b and aceto-hydroxamic acid. **Polyhedron**, v.18, p.2391. 1999.
184. ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; SOUZA, B. S.; PLIEGO, J. R.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Intramolecular catalysis of phosphodiester hydrolysis by two imidazoles. **J Am Chem Soc**, v.132, p.8513. 2010.
185. ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; MILAGRE, H. M. S.; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Intramolecular acid-base catalysis of a phosphate diester: Modeling the ribonuclease mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, v.130, p.2436. 2008.
186. INTERTHAL, H.; POULIOT, J. J.; CHAMPOUX, J. J. Ex-ajk.Lit. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase tdp1 is a member of the phospholipase d superfamily. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.98, p.12009. 2001.
187. LLOYD, G. J.; HSU, C. M.; COOPERMA.BS. Reactivity of phosphorylimidazole, an analog of known phosphorylated enzymes. **J. Am. Chem. Soc.**, v.93, p.4889. 1971.

188. Datos de pKa compilado por R. Williams: [research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa\\_compilation.pdf](http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf).
189. BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate. **J. Org. Chem.**, v.34, p.767. 1969.
190. BUNTON, C. A.; FENDLER, E. J.; FENDLER, J. H. Hydrolysis of dinitrophenyl phosphates. **J Am Chem Soc**, v.89, p.1221. 1967.
191. ADMIRAAL, S. J.; HERSCHLAG, D. The substrate-assisted general base catalysis model for phosphate monoester hydrolysis: Evaluation using reactivity comparisons. **J Am Chem Soc**, v.122, p.2145. 2000.
192. BA-SAIF, S. A.; WILLIAMS, A. Transfer of the diethoxyphosphoryl group [ (et0)2po] between imidazole and aryloxy anion nucleophiles. **J. Org. Chem.**, v.53, p.2204. 1988.
193. EL SEOUD, O. A.; RUASSE, M. F.; RODRIGUES, W. A. Kinetics and mechanism of phosphate-catalyzed hydrolysis of benzoate esters: Comparison with nucleophilic catalysis by imidazole and o-iodosobenzoate. **J Chem Soc Perk T 2**, p.1053. 2002.
194. PIETRA, F.; DELCIMA, F. Potentially bifunctional reactants - aromatic nucleophilic substitution by imidazole or pyrazole. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p.1420. 1972.
195. DE VARGAS, E. B.; DE ROSSI, R. H. Kinetic-study of the reaction of n-(2,4-dinitrophenyl)imidazole with piperidine and n-butylamine. **J. Org. Chem.**, v.49, p.3978. 1984.
196. SILVERSMITH, R. E.; APPLEBY, J. L.; BOURRET, R. B. Catalytic mechanism of phosphorylation and dephosphorylation of chey: Kinetic characterization of imidazole phosphates as phosphodonors and the role of acid catalysis. **Biochem.**, v.36, p.14965. 1997.
197. WAZER, J. R. V.; CALLIS, C. F.; SHOOLERY, J. N.; JONES, R. C. Principles of phosphorus chemistry. 11. Nuclear magnetic resonance measurements. **J. Am. Chem. Soc.**, v.78, p.5715. 1956.

198. KUMLER, W. D.; EILER, J. J. The acid strength of mono and diesters of phosphoric acid. The n-alkyl esters from methyl to butyl, the esters of biological importance, and the natural guanidine phosphoric acids. **J. Am. Chem. Soc.**, v.65, p.2355. 1943.
199. CRAMER, F.; SCHALLER, H. Zur chemie der energiereichen phosphate .13. Phosphorylierungsreaktionen mit diestern der imidazolyl-phosphonsaure und monoestern der diimidazolylphosphinsaeure. **Chem Ber-Recl**, v.94, p.1634. 1961.
200. SCHALLER, H.; STAAB, H. A.; CRAMER, F. Zur chemie der energiereichen phosphate .12. Phosphorylierungsreaktionen mit salzen der imidazolylphosphonate und diimidazolylphosphinate. **Chem Ber-Recl**, v.94, p.1621. 1961.
201. MARTELL, A. E.; SMITH, R. M.; MOTEKAITIS, R. J. Nist critically selected stability constants of metal complexes database. Nist standard reference database 46, version 6.0. National institute of standards and technology. Gaithersburg, USA, 2001.
202. BRESLOW, R.; ANSLYN, E. Proton inventory of a bifunctional ribonuclease model. **J. Am. Chem. Soc.**, v.111, p.8931. 1989.
203. FARRUKH, M. A.; BEBER, R. C.; PRIEBE, J. P.; SATNAMI, M. L.; MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; FIEDLER, H. D.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reactivity and models for anion distribution: Specific iodide binding to sulfobetaine micelles. **Langmuir**, v.24, p.12995. 2008.
204. MICKE, G. A.; MORAES, E. P.; FARAH, J. P. S.; TAVARES, M. F. M. A ssuming the separation of neutral plant secondary metabolites by micellar electrokinetic chromatography. **J. Chromatogr. A**, v.1004, p.131. 2003.
205. GARCIA, M. A.; MARINA, M. L.; DFEZ-MASA, J. C. Determination of solute-micelle association constants for a group of benzene derivatives and polycyclic aromatic hydrocarbons with sodium dodecyl sulphate by micellar electrokinetic chromatography. **J. Chromatogr. A**, v.732, p.345. 1996.
206. POSSIDONIO, S.; SIVIERO, F.; EL SEOUD, O. A. Kinetics of the ph-independent hydrolysis of 4-nitrophenyl chloroformate in

aqueous micellar solutions: Effects of the charge and structure of the surfactant. **J Phys Org Chem**, v.12, p.325. 1999.

207. NOME, F.; RUBIRA, A. F.; FRANCO, C.; IONESCU, L. G. Limitations of the pseudofase model of micellar catalysis. The dehydrochlorination of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane and some of its derivatives. **J. Phys. Chem.**, v.86, p.1881. 1982.

208. WILK, K. Z.; BURCZYK, B. Micellar effects upon the reaction of hydroxide ion with 2-phenylethyl derivatives. **J. Phys. Chem.**, v.93, p.8219. 1989.

209. OUARTI, N.; BLAGOEVA, I. B.; EL SEOUD, O. A.; RUASSE, M. F. Optimization of micellar catalysis of nucleophilic substitution reactions in buffered solutions of cetyltrimethylammonium halide surfactants, part 2: Buffers in the ph range 7-8. **J Phys Org Chem**, v.14, p.823. 2001.

210. LI, X.; GOH, S. H.; LAI, Y. H.; WEE, A. T. S. Miscibility and interactions in blends of carboxyl-containing polysiloxane with poly(1-vinylimidazole). **Polymer**, v.42, p.5463. 2001.

211. LUCA, C.; MIHAILESCU, S.; POPA, M. Polymers containing quaternary ammonium groups based on poly(n-vinylimidazole). **Eur. Polym. J.**, v.38, p.1501. 2002.

212. ASAYAMA, S.; HAKAMATANI, T.; KAWAKAMI, H. Synthesis and characterization of alkylated poly(1-vinylimidazole) to control the stability of its DNA polyion complexes for gene delivery. **Bioconjugate Chem.**, v.21, p.646. 2010.

213. HORTA, A.; MOLINA, M. J.; GOMEZ-ANTON, M. R.; PIEROLA, I. F. The ph inside a swollen polyelectrolyte gel: Poly(n-vinylimidazole). **J. Phys. Chem. B** v.112, p.10123. 2008.

214. MASAKI, M.; OGAWA, K.; KOKUFUTA, E. Unusual behavior in light scattering experiments of poly(n-vinylimidazole) prepared by precipitation polymerization. **Colloid Polym. Sci.**, v.287, p.1405. 2009.

215. HENRICHS, P. M.; WHITLOCK, L. R.; SOCHOR, A. R.; TAN, J. S. Conformational behavior of poly(n-vinylimidazole). Potentiometric

- titration, viscosity, and proton nuclear magnetic resonance studies. **Macromolecules**, v.13, p.1375. 1980.
216. MANNING, G. S. Counterion binding in polyelectrolyte theory. **Acc. Chem. Res.**, v.12, p.443. 1979.
217. GHIMICI, L.; DRAGAN, S. Behaviour of cationic polyelectrolytes upon binding of electrolytes: Effects of polycation structure, counterions and nature of the solvent. **Colloid Polym. Sci.**, v.280, p.130. 2002.
218. CHOUCAIR, A.; EISENBERG, A. Interfacial solubilization of model amphiphilic molecules in block copolymer micelles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.125, p.11993. 2003.
219. SORCI, G. A.; REED, W. F. Electrostatic and association phenomena in aggregates of polymers and micelles. **Langmuir**, v.18, p.353. 2002.
220. HANSSON, P. Surfactant self-assembly in oppositely charged polymer networks. Theory. **J. Phys. Chem. B**, v.113, p.12903. 2009.
221. ROMANI, A. P.; GEHLEN, M. H.; ITRI, R. Surfactant-polymer aggregates formed by sodium dodecyl sulfate, poly(n-vinyl-2-pyrrolidone), and poly(ethylene glycol). **Langmuir**, v.21, p.127. 2005.
222. SVENSSON, A.; PICULELL, L.; CABANE, B.; ILEKTI, P. A new approach to the phase behaviour of oppositely charged polymers with surfactants. **J. Phys. Chem. B**, v.106, p.1013. 2002.
223. DOMINGUES, S. H.; SALVATIERRA, R. V.; OLIVEIRAB, M. M.; ZARBIN, A. J. G. Transparent and conductive thin films of graphene/polyaniline nanocomposites prepared through interfacial polymerization. **Chem Commun**, v.47, p.2592. 2011.
224. DHAL, P. K.; POLOMOSCANIKA, S. C.; AVILAA, L. Z.; HOLMES-FARLEYA, S. R.; MILLER, R. J. Functional polymers as therapeutic agents: Concept to market place. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.61, p.1121. 2009.

225. ANDERSON, E. B.; LONG, T. E. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. **Polymer**, v.51, p.2447. 2010.

226. GREEN, M. D.; ALLEN JR., M. H.; DENNIS, J. M.; SALAS-DE LA CRUZ, D.; RENLONG GAO, R.; WINEY, K. I.; LONG, T. E. Tailoring macromolecular architecture with imidazole functionality: A perspective for controlled polymerization processes. **Eur. Polym. J.**, v.47, p.486. 2011.

## APÊNDICE

### ÍNDICE DO CONTEÚDO DO APÊNDICE

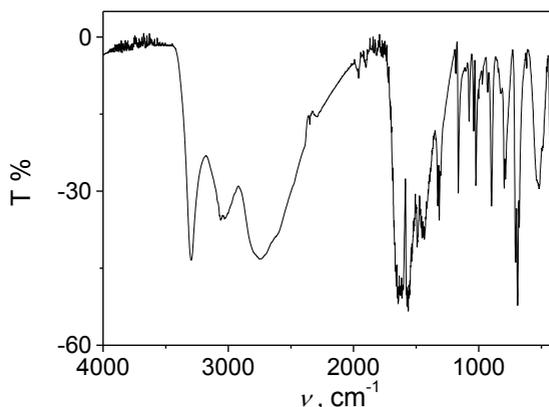
<b>Figura A 1</b> – Espectro IV do BHA (pastilha de KBr) sintetizado, que confere com dados da literatura. ....	193
<b>Tabela A 2</b> – Dados de perfil de pH para reação do BHA (0,05M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M), e EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M), $25^{\circ}\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	193
<b>Tabela A 3</b> – Dependência da concentração de $\text{BHO}^-$ com $k_{\text{obs}}$ , para reação com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) e EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M), pH 10,5, $25^{\circ}\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	193
<b>Figura A 4</b> – Gráfico de $k_{\text{obs}}$ vs $[\text{BHO}^-]$ em pH 10,5 para as reações com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) e (B) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M), a $25^{\circ}\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	194
<b>Tabela A 5</b> – Dados para a dependência da temperatura com $k_{\text{obs}}$ na reação do $\text{BHO}^-$ (0,05M) com DEDNPP( $3,33 \times 10^{-5}$ M) e EDNPP( $3,33 \times 10^{-5}$ M), pH 10,5, $I = 1,0$ (KCl), ....	194
<b>Figura A 6</b> – Plot de $\ln(k_{\text{obs}}/T)$ vs $1/T$ para reação de $\text{BHO}^-$ (0,05M) com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) e (B) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M), em pH 10,5, $I = 1,0$ (KCl). ....	194
<b>Figura A 7</b> – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz) da anilina 11 ( $1,8 \times 10^{-4}$ M) em $\text{D}_2\text{O}$ . ....	195
<b>Figura A 8</b> – Espectros sucessivos de $^1\text{H}$ RMN para reação de hidrólise alcalina do EDNPP (0,014M), $\text{D}_2\text{O}$ em pH 10, $25^{\circ}\text{C}$ . ....	195
<b>Figura A 9</b> – Espectro de ESI-MS/MS (-) para o dímero de $\text{BHO}^-$ de $m/z$ 273, observado nas reações do $\text{BHO}^-$ (0,105M) com DEDNPP e EDNPP (5 mM, pH 10 a $25^{\circ}\text{C}$ ). ....	195
<b>Figura A 10</b> – Espectro de ESI-MS/MS (-) para o intermediário aromático 9 de $m/z$ 302, nas reações do $\text{BHO}^-$ (0,105M) com DEDNPP(5 mM, pH 10 a $25^{\circ}\text{C}$ ). ....	196
<b>Tabela A 11</b> – Dados do perfil de pH para reação do DFO com BDNPP( $1,33 \times 10^{-5}$ M) a $25,0^{\circ}\text{C}$ , $I=1,0$ M (KCl). ....	196
<b>Tabela A 12</b> – Dependência de $k_{\text{obs}}$ com $[\text{DFO}]$ , na reação com BDNPP( $1,33 \times 10^{-5}$ M) a $25,0^{\circ}\text{C}$ , pH=10,0 e $I=1,0$ M(KCl). ....	196
<b>Figura A 13</b> – Dependência de $k_{\text{obs}}$ com $[\text{DFO}]$ , na reação com BDNPP a $25,0^{\circ}\text{C}$ , pH=10,0 e $I=1,0$ M(KCl). O ajuste linear fornece uma constante de segunda ordem de $k_{\text{N}} = 3,06 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , consistente com os dados do perfil de pH. ....	197

- Figura A 14** – ESI-MS/MS (-) do reagente BDNPP de  $m/z$  429, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C. As estruturas propostas para os fragmentos estão mostradas no esquema abaixo. .... 197
- Figura A 15**– ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  1216,5, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C. .... 198
- Figura A 16** – ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  789,4, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C. .... 198
- Figura A 17** – ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  751,4, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C. .... 199
- Figura A 18** – ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  655,3, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C. .... 199
- Figura A 19** – ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  595,3, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C. .... 199
- Figura A 20** – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para reação do DFO (0,07 M) com BDNPP (7 mM) em pH 10,  $\text{D}_2\text{O}$  a 25°C. Os deslocamentos das espécies mais importantes detectadas estão mostrados na Tabela A21 abaixo. .... 200
- Tabela A 21** – Deslocamentos das espécies detectadas por  $^1\text{H}$  RMN para reação do DFO (0,07 M) com BDNPP (7 mM) em pH 10,  $\text{D}_2\text{O}$  a 25°C. .... 200
- Figura A 22** – Efeito de BHA (0,01M), praticamente insignificante em função do pH na quebra do DNA plasmídico. Reação controle também foi obtido apenas na presença de tampão para fins comparativos: PIPES (pH 7,5), HEPES (pH 8,0) e CHES (pH 8,5 a 10,0). As formas FI e FII correspondem às formas de super-hélice e circular aberta, respectivamente. .... 200
- Figura A 23** – Perfil de pH para hidrólise do diéster BMIPP  $6,67 \times 10^{-5}\text{M}$  ( $\blacktriangle$ ) e monoéster Me-IMPP  $6,67 \times 10^{-5}\text{M}$  ( $\blacksquare$ ), a 60°C,  $I = 1.0$  (KCl). As linhas sólidas para BMIPP e Me-IMPP correspondem ao ajuste pela Equação A23, abaixo. A Equação A23 foi deduzida pelo Esquema A24, onde  $\chi_{1d}$ ,  $\chi_{2d}$ ,  $\chi_{3d}$  e  $\chi_{4d}$  representam a fração molar das espécies dicatiônica, moncatiônica, zwitteriônica e aniônica do BMIPP, respectivamente, que reagem segundo as constantes  $k_{1d}$ ,  $k_{2d}$ ,  $k_{3d}$  e  $k_{4d}$ .  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$  e  $K_{a3}$  são as constantes de dissociação para o grupo fosfato e grupos imidazol, respectivamente, para BMIPP (para Me-IMPP,  $K_{a2}$  e  $K_{a3}$  se referem ao grupo fosfato e imidazol). .... 201
- Esquema A 24** – Caminhos reacionais e equilíbrios envolvidos na reação de hidrólise do BMIPP e Me-IMPP. Linhas tracejadas referem-se a reações muito lentas. .... 201
- Equação A 25** – Utilizado no ajuste do perfil de pH do BMIPP ..... 202

<b>Tabela A 26</b> – Parâmetros cinéticos, termodinâmicos de ativação e efeito isotópico de solvente, obtidos para reação de hidrólise do BMIPP e Me-IMPP. ....	202
<b>Tabela A 27</b> – Eficiência da catálise intramolecular de vários modelos envolvendo hidrólise de éster de fosfato. <sup>a</sup> .....	202
<b>Figura A 28</b> – ESI-MS (-) após 25 minutos de reação do BMIPP ( $6,67 \times 10^{-5} \text{M}$ ) em solução aquosa, pH 6,5 e $60^\circ\text{C}$ . ....	204
<b>Figura A 29</b> – ESI-MS/MS (-) do ânion Me-IMPP de $m/z=253$ , para reação do BMIPP ( $6,67 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 6,5 e $60^\circ\text{C}$ . ....	204
<b>Figura A 30</b> – ESI-MS/MS (-) do IMP desprotonado de $m/z=173$ , para reação do BMIPP ( $6,67 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 6,5 e $60^\circ\text{C}$ . ....	204
<b>Tabela A 31</b> – Dados de perfil de pH para reação do IMZ (1M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ); BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) e DNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), $25^\circ\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	205
<b>Tabela A 32</b> – Dados de perfil de pH para reação de hidrólise do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), $25^\circ\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	206
<b>Figura A 33</b> – Perfil de pH para reação de hidrólise do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), $25^\circ\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl), juntamente com ajuste que fornece os parâmetros $k_0$ e $k_{\text{OH}}$ . ....	206
<b>Tabela A 34</b> – Dependência da concentração de IMZ com $k_{\text{obs}}$ , para reação com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ); BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) e DNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 8,5, $25^\circ\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	206
<b>Figura A 35</b> – Efeito da concentração do IMZ na reação com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ); (B) BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), (C) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) e (D) DNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 8,5 a $25^\circ\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	207
<b>Tabela A 36</b> – Dados para a dependência da temperatura com $k_{\text{obs}}$ na reação do IMZ (1M) com DEDNPP( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), BDNPP( $1,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), EDNPP( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) e DNPP( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 8,5, $I = 1,0$ (KCl). ....	207
<b>Figura A 37</b> – Plot de $\ln(k_{\text{obs}}/T)$ vs $1/T$ para reação do IMZ (1M) com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ); (B) BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), (C) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), e (D) DNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 8,5 a $25^\circ\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	208
<b>Figura A 38</b> – Espectros de UV-Vis para reação do IMZ (1M) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), nos pHs (A) 6,56 (B) 7,55 e (C) 8,49 a $25^\circ\text{C}$ , $I = 1,0$ (KCl). ....	209
<b>Figura A 39</b> – Espectros sucessivos de $^1\text{H}$ RMN para reação do IMZ (0,4M) com CDNB dinitrobenzeno ( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) em $\text{D}_2\text{O}$ , pH 8,5 a $25^\circ\text{C}$ . ....	209

<b>Tabela A 40</b> – Dados da titulação potenciométrica de BIMZ (4mM) com KOH (0,1M), 25°C, $I = 1,0$ (KCl).....	210
<b>Tabela A 41</b> – Dados da titulação potenciométrica de BIMZ (4mM) e CTABr (0,01M) com KOH (0,1M), 25°C. ....	210
<b>Tabela A 42</b> – Dados de perfil de pH para reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M), 25°C, $I = 1,0$ (KCl). ....	211
<b>Tabela A 43</b> – Dados para dependência da concentração de BIMZ (0,01M) na reação com DEDNPP( $3,33 \times 10^{-5}$ M), pH 8,5, 25°C, $I = 1,0$ (KCl).....	211
<b>Figura A 44</b> – Concentração de BIMZ vs $k_{obs}$ , na reação com DEDNPP( $3,33 \times 10^{-5}$ M), pH 8,5, 25°C, $I = 1,0$ (KCl). ....	211
<b>Tabela A 45</b> – Dados para dependência da temperatura na reação de BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M), pH 8,5, $I = 1,0$ (KCl). .	211
<b>Figura A 46</b> – Plot de $\ln(k_{obs}/T)$ vs $1/T$ na reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP( $3,33 \times 10^{-5}$ M), pH 8,5, 25°C, $I = 1,0$ (KCl). ....	212
<b>Figura A 47</b> – ESI-MS/MS (+) do reagente BIMZ de $m/z$ 254, após 1 hora de reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}$ M), pH 8,5 a 25°C.....	212
<b>Figura A 48</b> – Perfil de pH para reação do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) com IMZ (1M) na ausência (-■-) e presença de CTABr (0,01M) (-▲-), a 25°C.....	212
<b>Tabela A 49</b> – Dados do perfil de pH da reação do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) com IMZ (1M) na presença de CTABr (0,01M) a 25°C.....	213
<b>Tabela A 50</b> – Dados para dependência do pH na reação do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) na presença de CTABr (0,01M) e SDS (0,01M), na ausência e presença de BIMZ (0,01M) a 25°C.....	213
<b>Tabela A 51</b> – Dados para dependência da concentração de CTABr na reação do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) na ausência e presença de BIMZ (0,01M) a 25°C.....	213
<b>Tabela A 52</b> – Titulação potenciométrica do IMZ (1mM) com KOH (0,1M), 25°C, $I=1,0$ (KCl). Ajuste pelo programa BEST7 fornece um $pK_a$ de $7,10 \pm 0,2$ .....	214
<b>Tabela A 53</b> – Titulação potenciométrica do PVI (6mM) com KOH (0,1M), 25°C, $I=1,0$ (KCl). ....	214
<b>Tabela A 54</b> – Dados para dependência do pH na reação do PVI (6mM) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) e BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$ M) a 25°C. ....	215
<b>Tabela A 55</b> – Dados para dependência do pH na reação do PVI ( $6 \times 10^{-3}$ M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) e BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$ M), na presença de CTABr e SDS (0,01M) a 25°C. ....	215

**Tabela de dados dos gráficos apresentados e dados experimentais adicionais**



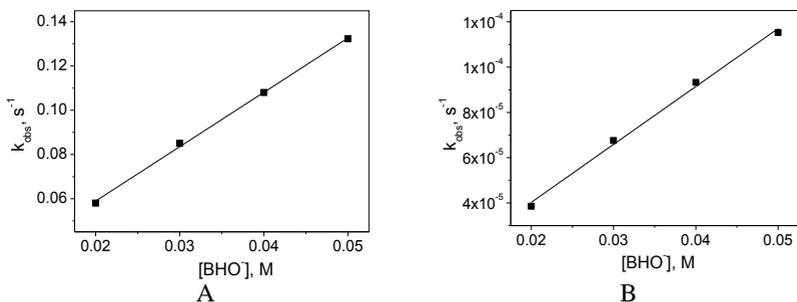
**Figura A 1** – Espectro IV do BHA (pastilha de KBr) sintetizado, que confere com dados da literatura.

**Tabela A 2** – Dados de perfil de pH para reação do BHA (0,05M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), e EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), 25°C,  $I = 1,0$  (KCl).

DEDNPP				EDNPP			
pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
7,5	0,0052	9,15	0,0732	8,7	$2,11 \times 10^{-5}$	9,7	$9,246 \times 10^{-5}$
8,0	0,0129	9,3	0,0879	9,0	$3,937 \times 10^{-5}$	10,0	$1,05 \times 10^{-4}$
8,5	0,0280	9,7	0,1094	9,15	$5,441 \times 10^{-5}$	10,2	$1,102 \times 10^{-4}$
8,7	0,0463	10,2	0,1310	9,3	$6,415 \times 10^{-5}$	10,5	$1,152 \times 10^{-4}$
9,0	0,0621	10,5	0,1323	9,5	$7,677 \times 10^{-5}$	11,0	$1,198 \times 10^{-4}$

**Tabela A 3** – Dependência da concentração de  $\text{BHO}^-$  com  $k_{\text{obs}}$ , para reação com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), pH 10,5, 25°C,  $I = 1,0$  (KCl).

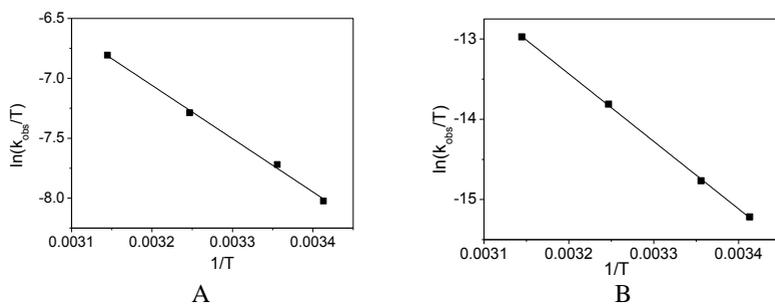
DEDNPP		EDNPP	
$[\text{BHO}^-], \text{M}$	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	$[\text{BHO}^-], \text{M}$	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
0,02	0,058	0,02	$3,86 \times 10^{-5}$
0,03	0,085	0,03	$6,76 \times 10^{-5}$
0,04	0,108	0,04	$9,32 \times 10^{-5}$



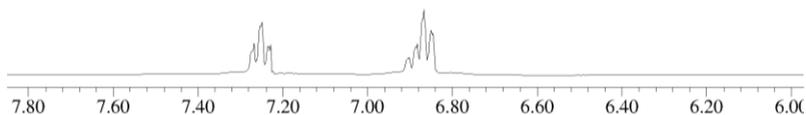
**Figura A 4** – Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  vs  $[\text{BHO}^-]$  em pH 10,5 para as reações com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e (B) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), a  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).

**Tabela A 5** – Dados para a dependência da temperatura com  $k_{\text{obs}}$  na reação do  $\text{BHO}^-$  (0,05M) com DEDNPP( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e EDNPP( $3,33 \times 10^{-5}$  M), pH 10,5,  $I = 1,0$  (KCl),

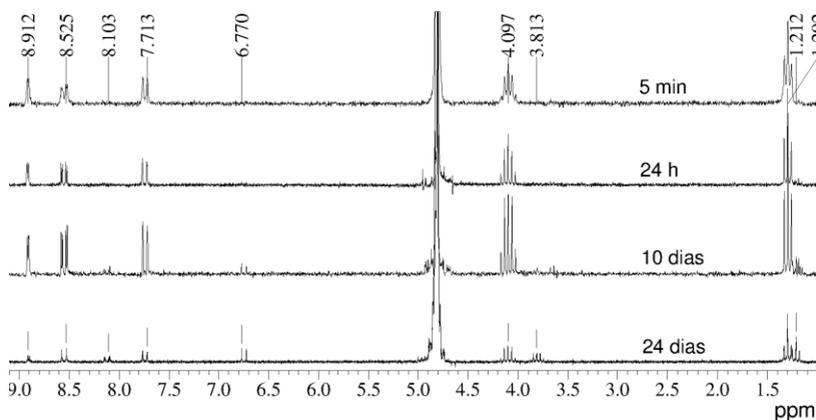
T, K	DEDNPP	EDNPP
	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	
293	0,096	$7,21 \times 10^{-5}$
298	0,1323	$1,15 \times 10^{-4}$
308	0,2106	$3,09 \times 10^{-4}$
318	0,352	$7,37 \times 10^{-4}$



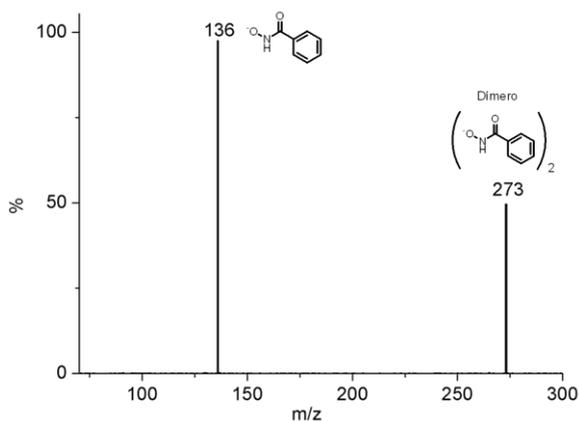
**Figura A 6** – Plot de  $\ln(k_{\text{obs}}/T)$  vs  $1/T$  para reação de  $\text{BHO}^-$  (0,05M) com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e (B) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), em pH 10,5,  $I = 1,0$  (KCl).



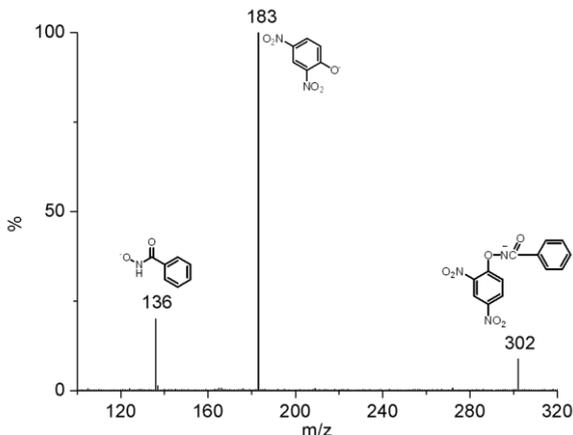
**Figura A 7** – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400MHz) da anilina  $11$  ( $1,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ) em  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura A 8** – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para reação de hidrólise alcalina do EDNPP ( $0,014\text{M}$ ),  $\text{D}_2\text{O}$  em pH 10,  $25^\circ\text{C}$ .



**Figura A 9** – Espectro de ESI-MS/MS (-) para o dímero de  $\text{BHO}^-$  de  $m/z$  273, observado nas reações do  $\text{BHO}^-$  ( $0,105\text{M}$ ) com DEDNPP e EDNPP ( $5\text{ mM}$ , pH 10 a  $25^\circ\text{C}$ ).



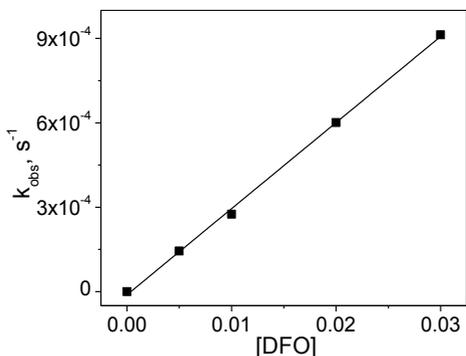
**Figura A 10** – Espectro de ESI-MS/MS (-) para o intermediário aromático 9 de  $m/z$  302, nas reações do BHO (0,105M) com DEDNPP (5 mM, pH 10 a 25°C).

**Tabela A 11** – Dados do perfil de pH para reação do DFO com BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M) a 25,0°C,  $I=1,0$  M (KCl).

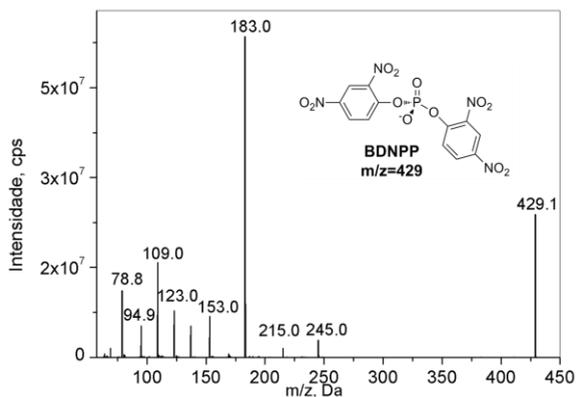
pH	$10^2 k_2, M^{-1}s^{-1}$	pH	$10^2 k_2, M^{-1}s^{-1}$
7,07	0,014	9,98	2,75
7,47	0,018	10,2	3,08
8,01	0,057	10,3	3,39
8,51	0,185	10,5	3,61
9,04	0,627	10,6	3,68
9,30	1,22	10,9	3,82
9,52	1,69	11,1	3,89
9,70	2,10	11,3	3,89
9,80	2,45	11,5	3,90

**Tabela A 12** – Dependência de  $k_{obs}$  com [DFO], na reação com BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M) a 25,0°C, pH=10,0 e  $I=1,0$  M (KCl).

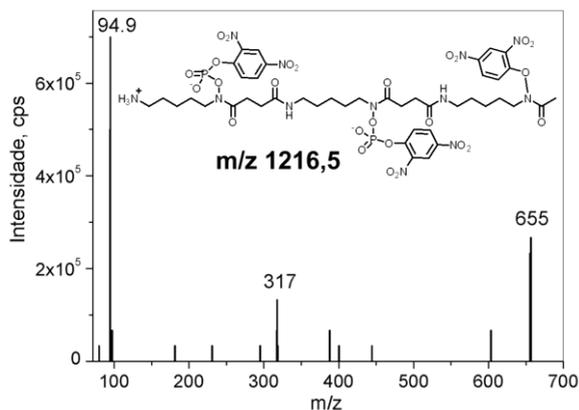
[DFO], M	$10^4 k_{obs}, s^{-1}$	[DFO], M	$10^4 k_{obs}, s^{-1}$
0,0	0,001	0,02	6,01
0,005	1,44	0,03	9,13
0,01	2,75		



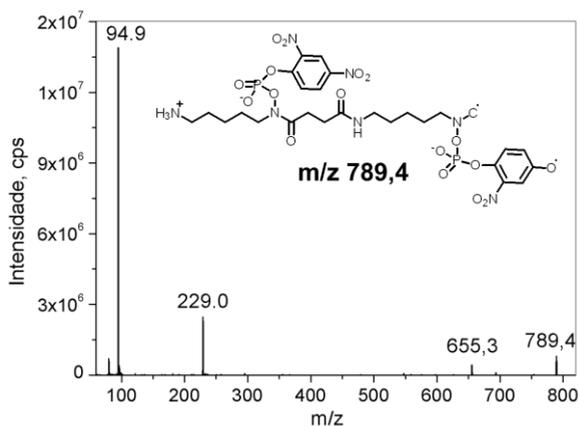
**Figura A 13** – Dependência de  $k_{obs}$  com [DFO], na reação com BDNPP a 25,0°C, pH=10,0 e  $I=1,0$  M(KCl). O ajuste linear fornece uma constante de segunda ordem de  $k_N=3,06 \times 10^{-2} M^{-1} s^{-1}$ , consistente com os dados do perfil de pH.



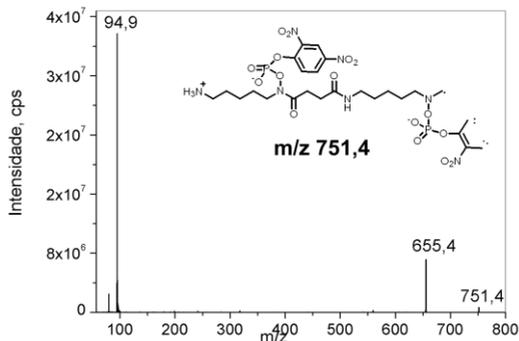
**Figura A 14** – ESI-MS/MS (-) do reagente BDNPP de  $m/z$  429, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C. As estruturas propostas para os fragmentos estão mostradas no esquema abaixo.



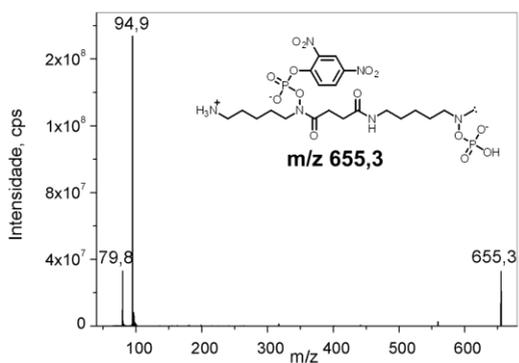
**Figura A 15**– ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  1216,5, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C.



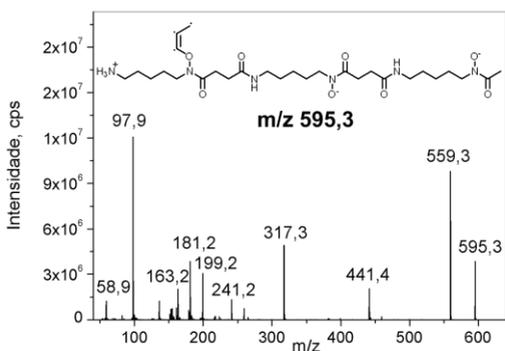
**Figura A 16** – ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  789,4, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C.



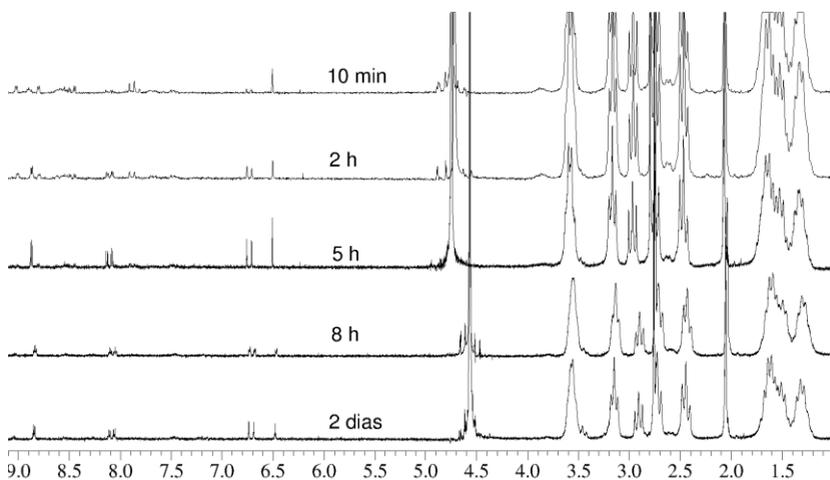
**Figura A 17** – ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  751,4, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C.



**Figura A 18** – ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  655,3, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C..



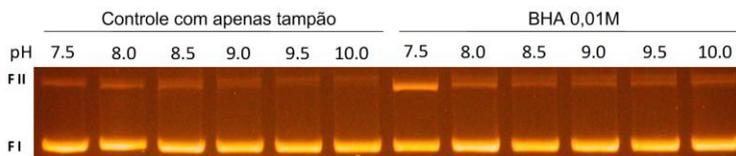
**Figura A 19** – ESI-MS/MS (-) do ânion de  $m/z$  595,3, na reação do DFO (1mM) com BDNPP ( $1 \times 10^{-5}$  M) em pH 10 e 25°C.



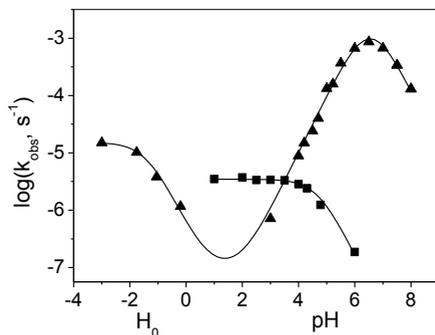
**Figura A 20** – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para reação do DFO (0,07 M) com BDNPP (7 mM) em pH 10,  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos das espécies mais importantes detectadas estão mostrados na Tabela A21 abaixo.

**Tabela A 21** – Deslocamentos das espécies detectadas por  $^1\text{H}$  RMN para reação do DFO (0,07 M) com BDNPP (7 mM) em pH 10,  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

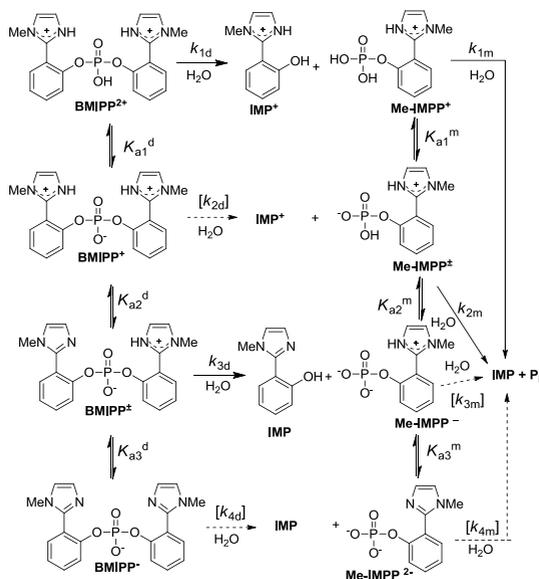
Composto	Deslocamento
BDNPP	7,80; 8,58; 8,95
DFO	1,30-1,65; 2,07; 2,48; 2,76-2,81; 2,99; 3,19; 3,59
DNP	6,75; 8,09; 8,89



**Figura A 22** – Efeito de BHA (0,01M), praticamente insignificante em função do pH na quebra do DNA plasmídico. Reação controle também foi obtido apenas na presença de tampão para fins comparativos: PIPES (pH 7,5), HEPES (pH 8,0) e CHES (pH 8,5 a 10,0). As formas FI e FII correspondem às formas de super-hélice e circular aberta, respectivamente.



**Figura A 23** – Perfil de pH para hidrólise do diéster BMIPP  $6,67 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $\blacktriangle$ ) e monoéster Me-IMP  $6,67 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $\blacksquare$ ), a  $60^\circ \text{C}$ ,  $I = 1.0$  (KCl). As linhas sólidas para BMIPP e Me-IMP correspondem ao ajuste pela Equação A23, abaixo. A Equação A23 foi deduzida pelo Esquema A24, onde  $\chi_{1d}$ ,  $\chi_{2d}$ ,  $\chi_{3d}$  e  $\chi_{4d}$  representam a fração molar das espécies dicatiónica, monocatiónica, zwitteriônica e aniônica do BMIPP, respectivamente, que reagem segundo as constantes  $k_{1d}$ ,  $k_{2d}$ ,  $k_{3d}$  e  $k_{4d}$ .  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$  e  $K_{a3}$  são as constantes de dissociação para o grupo fosfato e grupos imidazol, respectivamente, para BMIPP (para Me-IMP,  $K_{a2}$  e  $K_{a3}$  se referem ao grupo fosfato e imidazol).



**Esquema A 24** – Caminhos reacionais e equilíbrios envolvidos na reação de hidrólise do BMIPP e Me-IMP. Linhas tracejadas referem-se a reações muito lentas.

$$k_{\text{obs}} = k_{1d}\chi_{1d} + k_{2d}\chi_{2d} + k_{3d}\chi_{3d} + k_{4d}\chi_{4d}$$

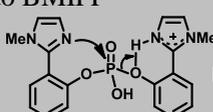
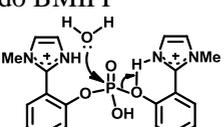
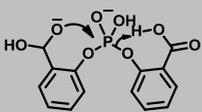
**Equação A 25** – Utilizado no ajuste do perfil de pH do BMIPP

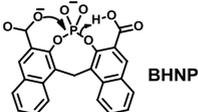
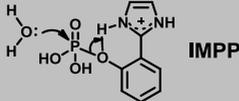
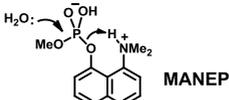
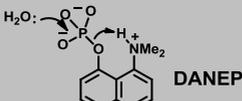
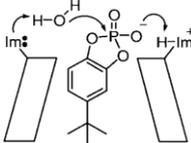
**Tabela A 26** – Parâmetros cinéticos, termodinâmicos de ativação e efeito isotópico de solvente, obtidos para reação de hidrólise do BMIPP e Me-IMPP.

Parâmetro	BMIPP	Me-IMPP	Parâmetro	BMIPP
$k_1, \text{s}^{-1}$	$(1,52 \pm 0.11) \times 10^{-5}$	----	$k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$	1,42
$k_2, \text{s}^{-1}$	----	$(3,65 \pm 0.06) \times 10^{-6}$	$\Delta H^\ddagger$	$19,0 \pm 1.2$ kcal mol <sup>-1</sup>
$k_3, \text{s}^{-1}$	$(1,98 \pm 0.13) \times 10^{-3}$	----	$\Delta S^\ddagger$	$-9,05 \pm 0.5$ e.u.
$\text{p}K_{\text{a}1}$	$-1,42 \pm 0.05^{\text{a}}$	----	$\Delta G^\ddagger$	$21,7 \pm 1.4$ kcal mol <sup>-1</sup> <sup>c</sup>
$\text{p}K_{\text{a}2}$	$6,10 \pm 0.04^{\text{b}}$	$4,52 \pm 0.03^{\text{a}}$		
$\text{p}K_{\text{a}3}$	$7,80 \pm 0.05^{\text{b}}$	----		

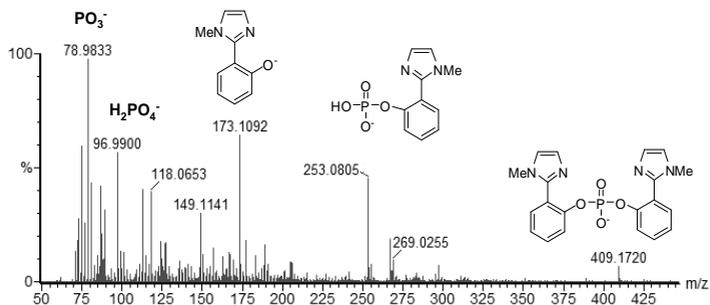
<sup>a</sup> Estimado cineticamente a 60°C. <sup>b</sup> Determinado por titulação potenciométrica a 25°C. Os valores correspondentes calculado pelo ajuste cinético são  $\text{p}K_{\text{a}2} = 6,12$  e  $\text{p}K_{\text{a}3} = 6,98$  para BMIPP. <sup>c</sup> Calculado a 25°C.

**Tabela A 27** – Eficiência da catálise intramolecular de vários modelos envolvendo hidrólise de éster de fosfato.<sup>a</sup>

Reação	$k_{\text{cat}}/k_{\text{não-cat}}$	$k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$
Catálise intramolecular bifuncional na hidrólise do BMIPP <sup>±</sup> 	$10^{11}$	1.42
Catálise intramolecular ácida-geral na hidrólise do BMIPP <sup>2+</sup> 	$10^7$	-
Catálise ácida geral intramolecular na hidrólise do bis-2-carboxifenil fosfato, BCPP 	$10^{10}$	-

<p>Catálise ácida geral intramolecular na hidrólise do 4,4'-metileno bis(3-hidroxi-2-ácido naftóico) fosfato, BHNP</p>  <p style="text-align: right;"><b>BHNP</b></p>	$10^8$	1.9
<p>Catálise ácida geral intramolecular na hidrólise do IMPP</p>  <p style="text-align: right;"><b>IMPP</b></p>	$10^9$	1.0
<p>Catálise ácida geral intramolecular na hidrólise do MANEP</p>  <p style="text-align: right;"><b>MANEP</b></p>	$10^8$	1.46
<p>Catálise ácida geral intramolecular na hidrólise do DANEP</p>  <p style="text-align: right;"><b>DANEP</b></p>	$10^9$	1.72
<p>Catálise bifuncional ácida-básica-geral pela <math>\beta</math>-ciclodextrina bis-imidazol na hidrólise do 4-terc-butilcatecol fosfato cíclico</p> 	120	2.12

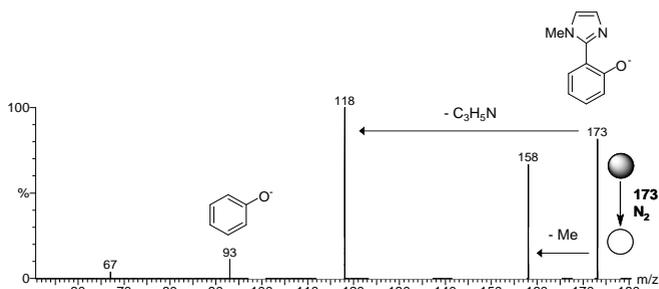
<sup>a</sup> – Eficiência ( $k_{cat}/k_{non-cat}$ ) foi calculada comparando com a hidrólise do difenil fosfato ( $k_{H_2O} = 1,54 \times 10^{-14} \text{ s}^{-1}$  a  $60^\circ\text{C}$ ). No caso da  $\beta$ -ciclodextrina bis imidazol, a eficiência foi calculada comparando com a hidrólise espontânea do 4-terc-butilcatecol fosfato cíclico. Referências das reações comparadas estão dadas na referência 185.



**Figura A 28** – ESI-MS (-) após 25 minutos de reação do BMIPP ( $6,67 \times 10^{-5} \text{M}$ ) em solução aquosa, pH 6,5 e  $60^\circ\text{C}$ .



**Figura A 29** – ESI-MS/MS (-) do ânion Me-IMP de  $m/z=253$ , para reação do BMIPP ( $6,67 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 6,5 e  $60^\circ\text{C}$ .



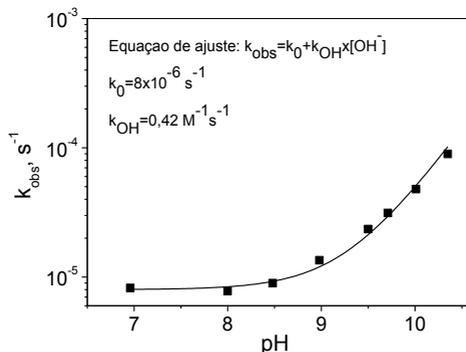
**Figura A 30** – ESI-MS/MS (-) do IMP desprotonado de  $m/z=173$ , para reação do BMIPP ( $6,67 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 6,5 e  $60^\circ\text{C}$ .

**Tabela A 31** – Dados de perfil de pH para reação do IMZ (1M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M,); BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M ), EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e DNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M),  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).

DEDNPP		BDNPP		EDNPP		DNPP	
pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
5,02	$1,66 \times 10^{-4}$	5,02	$1,90 \times 10^{-5}$	5,5	$3,78 \times 10^{-6}$	5,49	$1,72 \times 10^{-5}$
5,45	$3,66 \times 10^{-4}$	5,45	$3,59 \times 10^{-5}$	6,0	$9,15 \times 10^{-6}$	6,02	$1,94 \times 10^{-5}$
6,03	$1,44 \times 10^{-3}$	6,03	$1,46 \times 10^{-4}$	6,5	$2,39 \times 10^{-5}$	6,56	$2,48 \times 10^{-5}$
6,52	$4,0 \times 10^{-3}$	6,29	$2,23 \times 10^{-4}$	7,0	$3,46 \times 10^{-5}$	7,04	$3,48 \times 10^{-5}$
7,10	$8,61 \times 10^{-3}$	6,51	$3,43 \times 10^{-4}$	7,15	$4,86 \times 10^{-5}$	7,49	$4,28 \times 10^{-5}$
7,54	$1,27 \times 10^{-2}$	6,8	$5,13 \times 10^{-4}$	7,35	$6,18 \times 10^{-5}$	7,99	$5,32 \times 10^{-5}$
8,09	$1,60 \times 10^{-2}$	7,1	$7,37 \times 10^{-4}$	7,55	$6,95 \times 10^{-5}$	8,23	$5,66 \times 10^{-5}$
8,49	$1,63 \times 10^{-2}$	7,28	$8,7 \times 10^{-4}$	7,75	$8,19 \times 10^{-5}$	8,46	$6,04 \times 10^{-5}$
9,03	$1,74 \times 10^{-2}$	7,54	0,00108	7,90	$8,46 \times 10^{-5}$	8,7	$6,11 \times 10^{-5}$
9,49	$1,81 \times 10^{-2}$	8,09	0,00129	8,15	$9,44 \times 10^{-5}$	9,06	$6,11 \times 10^{-5}$
10,03	$1,80 \times 10^{-2}$	8,54	0,00138	8,35	$9,57 \times 10^{-5}$	9,51	$6,06 \times 10^{-5}$
		9,03	0,0014	8,75	$1,05 \times 10^{-4}$	9,88	$6,19 \times 10^{-5}$
		9,49	0,00142	9,25	$1,03 \times 10^{-4}$	10,32	$6,22 \times 10^{-5}$
		10,05	0,00142	10,0	$1,10 \times 10^{-4}$	10,5	$6,12 \times 10^{-5}$
				10,5	$1,11 \times 10^{-4}$		

**Tabela A 32** – Dados de perfil de pH para reação de hidrólise do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M),  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).

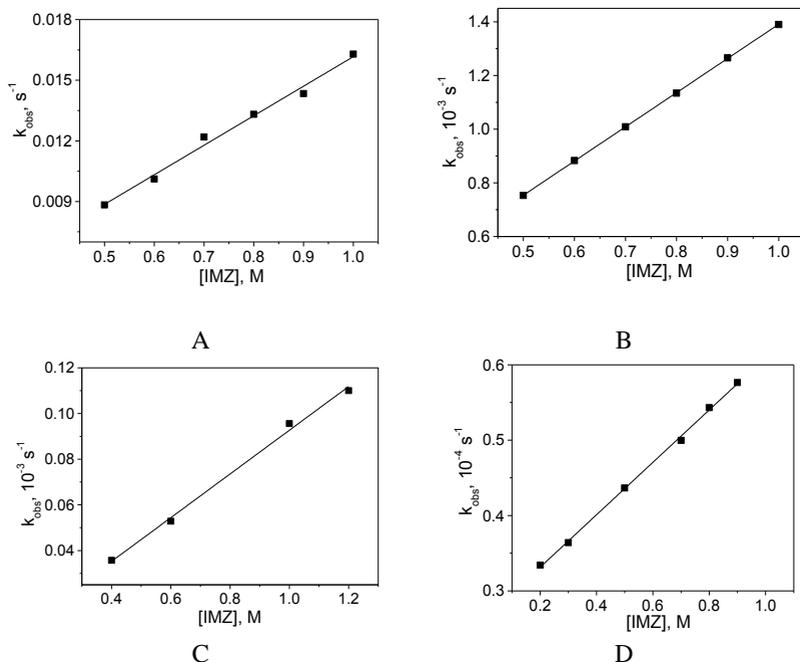
pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
6,96	$8,22 \times 10^{-6}$	9,5	$2,35 \times 10^{-5}$
8,0	$7,8 \times 10^{-6}$	9,71	$3,13 \times 10^{-5}$
8,48	$8,97 \times 10^{-6}$	10,01	$4,79 \times 10^{-5}$
8,98	$1,35 \times 10^{-5}$	10,35	$8,96 \times 10^{-5}$



**Figura A 33** – Perfil de pH para reação de hidrólise do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M),  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl), juntamente com ajuste que fornece os parâmetros  $k_0$  e  $k_{\text{OH}}$ .

**Tabela A 34** – Dependência da concentração de IMZ com  $k_{\text{obs}}$ , para reação com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M); BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M), EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e DNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), pH 8,5,  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).

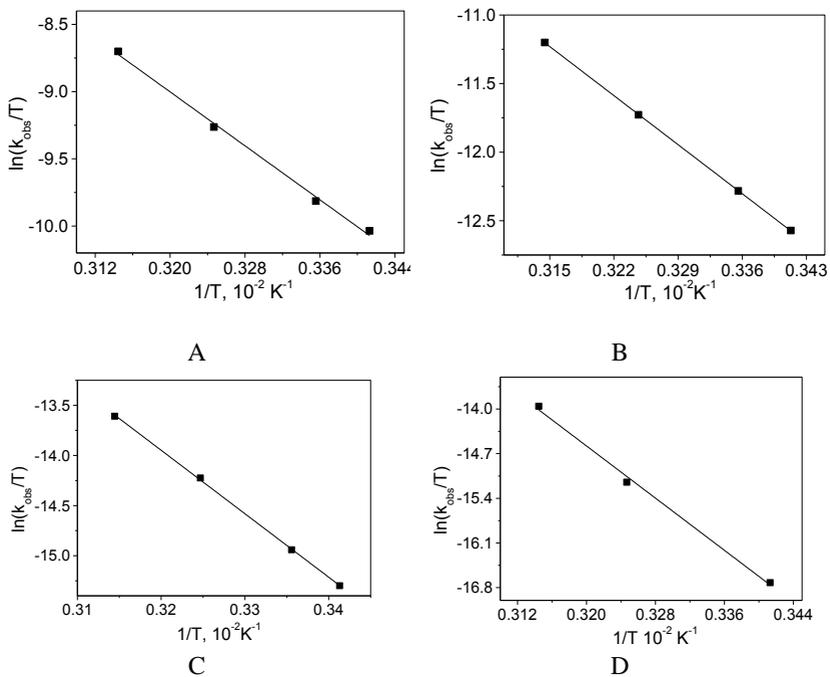
DEDNPP		BDNPP		EDNPP		DNPP	
[IMZ], M	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	[IMZ], M	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	[IMZ], M	$k_{\text{obs}}, 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	[IMZ], M	$k_{\text{obs}}, 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
0,5	0,00883	0,5	7,53	0,4	3,57	0,2	3,34
0,6	0,01011	0,6	8,83	0,6	5,28	0,3	3,64
0,7	0,01219	0,7	0,0010	1,0	9,56	0,5	4,36
0,8	0,01331	0,8	0,0011	1,2	11,0	0,7	4,99
0,9	0,01434	0,9	0,0013			0,8	5,43
1,0	0,01629	1,0	0,0014			0,9	5,76



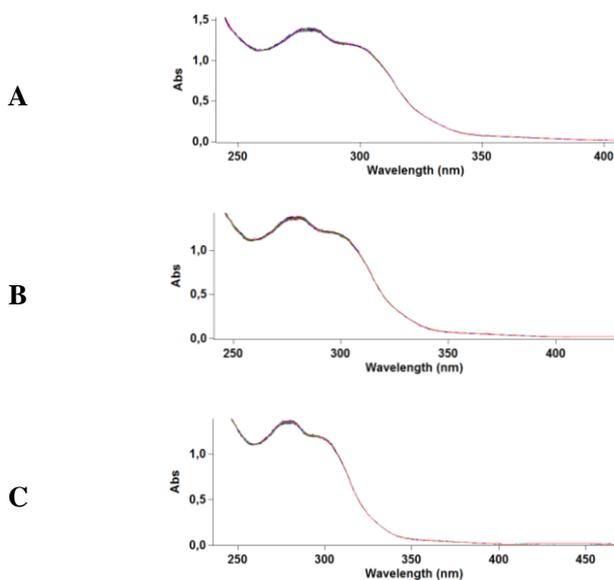
**Figura A 35** – Efeito da concentração do IMZ na reação com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M); (B) BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M), (C) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e (D) DNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), pH 8,5 a 25°C,  $I = 1,0$  (KCl).

**Tabela A 36** – Dados para a dependência da temperatura com  $k_{obs}$  na reação do IMZ (1M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M), EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M) e DNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), pH 8,5,  $I = 1,0$  (KCl).

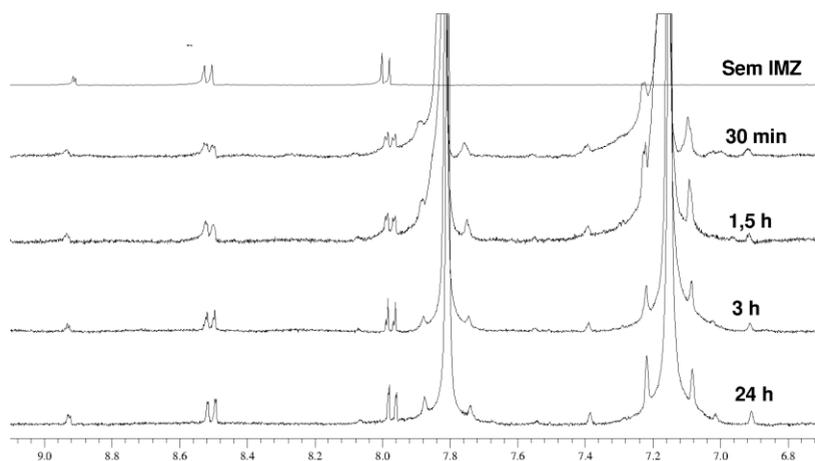
	DEDNPP	BDNPP	EDNPP	DNPP
T, K	$k_{obs}, s^{-1}$			
293	0,01283	0,00102	$6,64 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$
298	0,01629	0,00138	$9,67 \times 10^{-5}$	-
308	0,0292	0,00248	$2,04 \times 10^{-4}$	$8,13 \times 10^{-5}$
318	0,05291	0,00435	$3,90 \times 10^{-4}$	$2,76 \times 10^{-4}$



**Figura A 37** – Plot de  $\ln(k_{\text{obs}}/T)$  vs  $1/T$  para reação do IMZ (1M) com (A) DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M); (B) BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5}$  M), (C) EDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), e (D) DNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$  M), pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1.0$  (KCl).



**Figura A 38** – Espectros de UV-Vis para reação do IMZ (1M) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB,  $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), nos pHs (A) 6,56 (B) 7,55 e (C) 8,49 a  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).



**Figura A 39** – Espectros sucessivos de  $^1\text{H}$  RMN para reação do IMZ (0,4M) com CDNB dinitrobenzeno ( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 8,5 a  $25^\circ\text{C}$ .

**Tabela A 40** – Dados da titulação potenciométrica de BIMZ (4mM) com KOH (0,1M), 25°C,  $I = 1.0$  (KCl).

Vol <sub>KOH</sub> , mL	pH	Vol <sub>KOH</sub> , mL	pH	Vol <sub>KOH</sub> , mL	pH
0,0	2,63	0,94	4,92	2,26	7,34
0,15	2,74	0,96	5,08	2,36	7,56
0,35	2,92	0,98	5,2	2,42	7,73
0,5	3,11	1,0	5,3	2,46	7,9
0,6	3,26	1,02	5,38	2,5	8,13
0,7	3,47	1,06	5,52	2,51	8,19
0,74	3,58	1,1	5,63	2,52	8,26
0,78	3,72	1,14	5,73	2,54	8,52
0,82	3,9	1,2	5,85	2,55	8,64
0,84	4,02	1,3	6,03	2,56	8,85
0,86	4,16	1,4	6,18	2,566	8,98
0,88	4,35	1,5	6,32	2,572	9,16
0,89	4,43	1,6	5,85	2,578	9,35
0,9	4,53	1,7	6,57	2,584	9,53
0,91	4,64	1,84	6,74	2,588	9,63
0,92	4,74	1,98	6,91		
0,93	4,83	2,12	7,11		

**Tabela A 41** – Dados da titulação potenciométrica de BIMZ (4mM) e CTABr (0,01M) com KOH (0,1M), 25°C.

Vol <sub>KOH</sub> , mL	pH	Vol <sub>KOH</sub> , mL	pH	Vol <sub>KOH</sub> , mL	pH
0,0	2,81	0,73	4,92	1,91	7,05
0,15	2,94	0,75	5,08	2,01	7,21
0,3	3,13	0,77	5,2	2,11	7,41
0,45	3,44	0,81	5,3	2,17	7,55
0,5	3,6	0,87	5,38	2,23	7,76
0,55	3,82	0,93	5,52	2,27	7,95
0,56	3,89	0,99	5,63	2,28	8,01
0,58	4,04	1,05	5,73	2,29	8,06
0,6	4,21	1,11	6,03	2,31	8,23
0,62	4,42	1,17	6,11	2,33	8,43
0,63	4,51	1,25	6,22	2,35	8,91
0,64	4,61	1,33	6,32	2,356	9,07
0,65	4,7	1,41	6,41	2,362	9,25
0,666	4,84	1,51	6,53	2,374	9,66

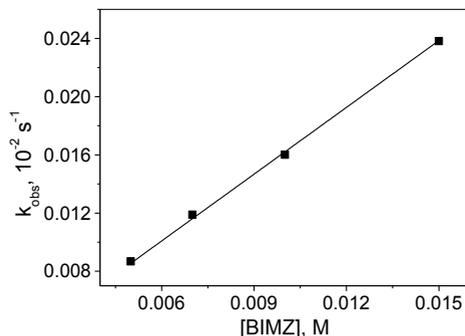
0,682	4,95	1,61	6,65	2,38	9,78
0,698	5,04	1,71	6,78		
0,714	5,13	1,81	6,9		

**Tabela A 42** – Dados de perfil de pH para reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ),  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).

pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
3,00	$9,86 \times 10^{-6}$	5,48	$1,86 \times 10^{-5}$	7,51	$1,274 \times 10^{-4}$
3,50	$1,095 \times 10^{-5}$	5,74	$2,524 \times 10^{-5}$	7,99	$1,483 \times 10^{-4}$
3,99	$1,047 \times 10^{-5}$	6,01	$4,069 \times 10^{-5}$	8,58	$1,600 \times 10^{-4}$
4,51	$1,253 \times 10^{-5}$	6,52	$7,24 \times 10^{-5}$	9,00	$1,588 \times 10^{-4}$
5,07	$1,991 \times 10^{-5}$	6,99	$1,062 \times 10^{-4}$	9,46	$1,623 \times 10^{-4}$

**Tabela A 43** – Dados para dependência da concentração de BIMZ (0,01M) na reação com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 8,5,  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).

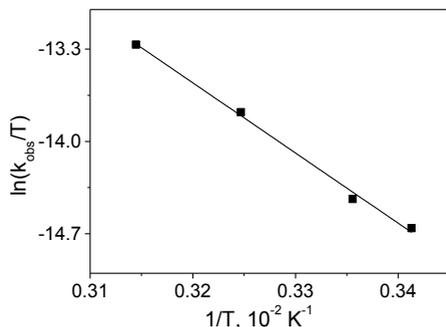
[BIMZ], M	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	[BIMZ], M	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
0,005	$8,675 \times 10^{-5}$	0,01	$1,600 \times 10^{-4}$
0,007	$1,188 \times 10^{-4}$	0,015	$2,382 \times 10^{-4}$



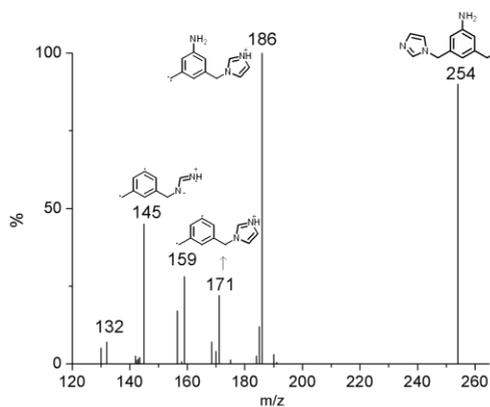
**Figura A 44** – Concentração de BIMZ vs  $k_{\text{obs}}$  na reação com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 8,5,  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).

**Tabela A 45** – Dados para dependência da temperatura na reação de BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), pH 8,5,  $I = 1,0$  (KCl).

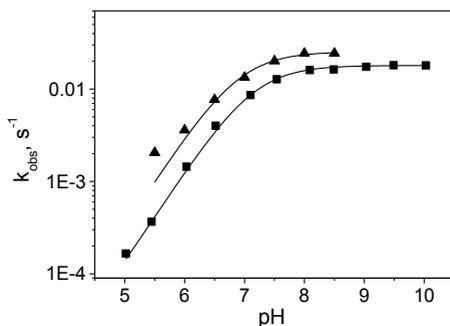
T, $^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	T, $^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
20	$1,262 \times 10^{-4}$	35	$3,195 \times 10^{-4}$
25	$1,600 \times 10^{-4}$	45	$5,510 \times 10^{-4}$



**Figura A 46** – Plot de  $\ln(k_{\text{obs}}/T)$  vs  $1/T$  na reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP( $3,33 \times 10^{-5}$ M), pH 8,5, 25°C,  $I = 1,0$  (KCl).



**Figura A 47** – ESI-MS/MS (+) do reagente BIMZ de  $m/z$  254, após 1 hora de reação do BIMZ (0,01M) com DEDNPP ( $1 \times 10^{-4}$ M), pH 8,5 a 25°C.



**Figura A 48** – Perfil de pH para reação do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5}$ M) com IMZ (1M) na ausência (■-) e presença de CTABr (0,01M) (-▲-), a 25°C.

**Tabela A 49** – Dados do perfil de pH da reação do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) com IMZ (1M) na presença de CTABr (0,01M) a  $25^\circ\text{C}$ .

pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
5,5	0,0020	7,5	0,0201
6,0	0,0035	8,0	0,0243
6,5	0,0076	8,5	0,0243
7,0	0,0133		

**Tabela A 50** – Dados para dependência do pH na reação do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) na presença de CTABr (0,01M) e SDS (0,01M), na ausência e presença de BIMZ (0,01M) a  $25^\circ\text{C}$ .

BIMZ+CTABr		CTABr		BIMZ+SDS	
pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
4,99	$2,104 \times 10^{-5}$	5,53	$2,34 \times 10^{-5}$	7,49	$6,483 \times 10^{-4}$
5,49	$2,101 \times 10^{-5}$	6,02	$2,36 \times 10^{-5}$	8,01	$6,906 \times 10^{-4}$
5,96	$6,259 \times 10^{-5}$	6,52	$2,34 \times 10^{-5}$	8,45	$7,080 \times 10^{-4}$
6,5	$1,617 \times 10^{-4}$	7,0	$2,36 \times 10^{-5}$	9,02	$6,627 \times 10^{-4}$
7,01	$3,855 \times 10^{-4}$	7,52	$2,55 \times 10^{-5}$	9,5	$6,341 \times 10^{-4}$
7,49	$5,941 \times 10^{-4}$	8,02	$2,88 \times 10^{-5}$	SDS	
7,98	$6,909 \times 10^{-4}$	8,51	$4,48 \times 10^{-5}$	pH	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
8,35	$7,592 \times 10^{-4}$	9,0	$8,82 \times 10^{-5}$	7,44	$4,60 \times 10^{-6}$
8,47	$7,272 \times 10^{-4}$	9,4	$2,03 \times 10^{-4}$	7,98	$5,22 \times 10^{-6}$
8,64	$7,818 \times 10^{-4}$	9,7	$3,22 \times 10^{-4}$	8,5	$5,43 \times 10^{-6}$
8,99	$8,489 \times 10^{-4}$	9,89	$5,36 \times 10^{-4}$	9,01	$6,60 \times 10^{-6}$
9,5	$9,19 \times 10^{-4}$			9,46	$8,25 \times 10^{-6}$
				10,05	$1,187 \times 10^{-5}$

**Tabela A 51** – Dados para dependência da concentração de CTABr na reação do DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) na ausência e presença de BIMZ (0,01M) a  $25^\circ\text{C}$ .

BIMZ+CTABr				CTABr			
CTABr, M	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{s}^{-1}$	CTABr, M	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{s}^{-1}$	CTABr, M	$k_{\text{obs}}, 10^{-5} \text{s}^{-1}$	CTABr, M	$k_{\text{obs}}, 10^{-5} \text{s}^{-1}$
0	1,60	0,005	5,442	0	0,94	0,0125	3,839
$5 \times 10^{-5}$	1,571	0,006	6,700	$2,7 \times 10^{-5}$	1,0	0,0175	3,659
$1 \times 10^{-5}$	1,452	0,007	7,020	1E-3	2,453	0,02	3,309
$5 \times 10^{-4}$	2,579	0,008	7,315	0,002	2,852	0,0225	3,527
$1 \times 10^{-4}$	1,703	0,009	7,523	0,0035	3,829	0,025	3,686
0,002	4,270	0,01	7,290	0,004	3,928	0,0125	3,839
0,004	5,426	0,011	7,923	0,0075	3,986	0,0175	3,659

**Tabela A 52** – Titulação potenciométrica do IMZ (1mM) com KOH (0,1M), 25°C,  $I=1,0$  (KCl). Ajuste pelo programa BEST7 fornece um  $pK_a$  de  $7,10 \pm 0,2$ .

Vol <sub>KOH</sub> , mL	pH						
0	4,157	0,144	6,278	0,288	6,985	0,432	7,682
0,012	4,202	0,156	6,362	0,3	7,035	0,444	7,772
0,024	4,307	0,168	6,438	0,312	7,085	0,456	7,875
0,036	4,434	0,18	6,513	0,324	7,133	0,468	7,999
0,048	4,599	0,192	6,576	0,336	7,184	0,492	8,34
0,06	4,833	0,204	6,623	0,348	7,236	0,504	8,595
0,072	5,132	0,216	6,677	0,36	7,288	0,516	8,875
0,084	5,427	0,228	6,733	0,372	7,346	0,528	9,101
0,096	5,69	0,24	6,781	0,384	7,404	0,54	9,265
0,108	5,895	0,252	6,835	0,396	7,467	0,552	9,385
0,12	6,052	0,264	6,886	0,408	7,531	0,564	9,479
0,132	6,178	0,276	6,936	0,42	7,603	0,576	9,56

**Tabela A 53** – Titulação potenciométrica do PVI (6mM) com KOH (0,1M), 25°C,  $I=1,0$  (KCl).

Vol <sub>KOH</sub> , mL	pH						
0	2,68	13,2	4,28	32,1	6,06	43,5	8,32
0,4	2,75	14,1	4,36	33,1	6,15	43,6	8,45
0,9	2,84	15,1	4,46	34,1	6,25	43,7	8,56
1,4	2,94	16,1	4,55	35,1	6,35	43,8	8,68
1,9	3,02	17,1	4,65	36,1	6,45	43,9	8,78
2,4	3,09	18,1	4,76	37,1	6,57	44	8,88
2,9	3,16	19,1	4,85	38,1	6,68	44,1	8,97
3,6	3,26	20,1	4,94	39,1	6,83	44,2	9,04
4,3	3,34	21,1	5,03	39,6	6,9	44,4	9,18
5	3,43	22,1	5,13	40,1	6,99	44,6	9,29
5,7	3,51	23,1	5,22	40,8	7,12	44,9	9,44
6,4	3,59	24,1	5,31	41,3	7,23	45,2	9,55
7,1	3,67	25,1	5,4	41,8	7,36	45,5	9,65
7,8	3,74	26,1	5,5	42,1	7,45	45,9	9,78
8,7	3,84	27,1	5,59	42,4	7,56	46,3	9,88
9,6	3,93	28,1	5,69	42,7	7,7	46,8	10,02
10,5	4,02	29,1	5,78	43	7,87	47,6	10,21
11,4	4,11	30,1	5,87	43,3	8,12	48,4	10,41
12,3	4,2	31,1	5,96	43,4	8,22	49,2	10,62

**Tabela A 54** – Dados para dependência do pH na reação do PVI (6mM) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) e BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) a  $25^\circ \text{C}$ .

DEDNPP				BDNPP			
pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
5,54	1,11	8,53	4,01	6,04	1,38	8,19	2,91
6,0	1,67	9	4,03	6,47	1,89	8,37	2,86
6,35	2,09	9,43	4,07	6,84	2,37	8,47	2,76
6,6	2,68	9,97	4,14	7,06	2,51	8,71	2,68
7,06	3,2			7,24	2,63	8,9	2,65
7,29	3,44			7,43	2,73	9,21	2,65
7,44	3,68			7,71	2,85	9,49	2,64
7,72	3,82			7,81	2,86	10	2,62
8,0	3,89			8,06	2,9	10,47	2,64

**Tabela A 55** – Dados para dependência do pH na reação do PVI ( $6 \times 10^{-3} \text{M}$ ) com DEDNPP ( $3,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ) e BDNPP ( $1,33 \times 10^{-5} \text{M}$ ), na presença de CTABr e SDS (0,01M) a  $25^\circ \text{C}$ .

DEDNPP				BDNPP			
SDS		CTABr		SDS		CTABr	
pH	$k_{\text{obs}}$	pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
7,72	0,00416	6,57	1,25	7,72	6,79	7,05	0,187
7,92	0,00447	7,05	2,22	7,92	6,29	7,52	0,525
8,09	0,00479	7,52	4,26	8,09	5,7	7,75	0,927
8,25	0,00499	7,75	5,42	8,25	5,49	8,05	1,0
8,52	0,00519	8,05	7,22	8,52	5,32	8,57	1,42
8,7	0,0052	8,57	8,73	8,7	5,16	9,06	2,12
8,98	0,00523	9,06	11,20	8,98	4,96	10	2,18
9,23	0,00561	10	15,80	9,23	4,77		
9,57	0,00578			9,57	4,7		