

Eduardo Hillmann Wanderlind

**CINÉTICA E MECANISMO DE HIDRÓLISE DO TRIÉSTER  
DIETIL 2,4-DINITROFENIL FOSFATO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wanderlind, Eduardo Hillmann

Cinética e mecanismo de hidrólise do triéster dietil 2,4-  
dinitrofenil fosfato / Eduardo Hillmann Wanderlind ;  
orientador, Faruk José Nome Aguilera - Florianópolis, SC,  
2014.

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.  
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

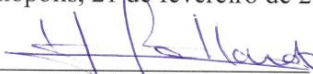
1. Química. 2. Triéster de fosfato. 3. Desfosforilação.  
4. Catálise. 5. Efeito de solvente. I. Nome Aguilera,  
Faruk José. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Eduardo Hillmann Wanderlind


**CINÉTICA E MECANISMO DE HIDRÓLISE DO TRIÉSTER  
DIETIL 2,4-DINITROFENIL FOSFATO**

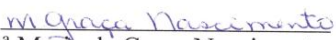
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.


Florianópolis, 21 de fevereiro de 2014.

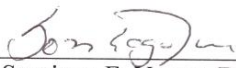
  
Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

  
Prof. Faruk José Nome Aguilera, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Prof.<sup>a</sup> Maria da Graça Nascimento, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Prof.<sup>a</sup> Elisa S. Orth, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Santiago F. Yunes, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

À minha família, pela educação, incentivo, apoio, paciência, companheirismo e carinho.

Aos professores Faruk Nome e Haidi Fiedler, pela oportunidade de ingressar no grupo de pesquisa, pela orientação e exemplo de comprometimento à pesquisa.

Aos professores Maria da Graça Nascimento, Elisa S. Orth e Santiago F. Yunes, pela avaliação deste trabalho e participação na banca examinadora.

Aos colegas de laboratório, que me proporcionaram inúmeras situações de aprendizagem e descontração. Em especial, agradeço à Michelle Medeiros e ao José R. Mora, pela contribuição direta neste trabalho e pelos ensinamentos, discussões, críticas e esclarecimento de dúvidas.

Ao professor Gustavo A. Micke, ao Alex Micke e à doutoranda Melina Heller, pelas análises de ESI-MS e pela contínua disponibilidade e assistência.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Departamento de Química, à Central de Análises e ao Programa de Pós-graduação em Química, pela infra-estrutura.

Aos servidores técnico-administrativos da UFSC, em especial aos funcionários da secretaria de Pós-graduação em Química, Graça Hoeller e Jadir Carminatti, pela dedicação e competência.

Ao INCT-Catálise, CNPq, CAPES e FAPESC, pela infra-estrutura e apoio financeiro.



## RESUMO

Neste trabalho estudou-se a reação de hidrólise do triéster de fosfato dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**). As reações foram acompanhadas por espectrofotometria de UV-Vis pela formação do produto 2,4-dinitrofenol. Os resultados mostram que **DEDNPP** possui uma constante de hidrólise de  $8,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} \sim 24$  horas), a  $25^\circ\text{C}$ , e que a reação procede essencialmente via ataque da água sobre o átomo de fósforo, havendo quebra da ligação P–O e consequente substituição do 2,4-dinitrofenol. O caminho reacional foi proposto com base na caracterização de produtos por espectrometria de massas (ESI-MS), utilizada para avaliar a incorporação de oxigênio isotopicamente marcado ( $^{18}\text{O}$ ). Dados de efeito isotópico cinético de solvente (SKIE) de  $2,68 \pm 0,17$  e parâmetros de ativação,  $\Delta H^\ddagger = 12,9 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$  e  $\Delta S^\ddagger = -38,7 \pm 0,4 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , são consistentes com um mecanismo associativo em duas etapas ou concertado, em que há presença de catálise básica geral na etapa determinante. Cálculos computacionais ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d) mostram que a reação descrita procede por um mecanismo concertado, em presença de duas moléculas de água discretas com funções bem definidas (nucleófilo e catalisador básico geral). A plausibilidade do mecanismo proposto é sustentada pela boa concordância entre os valores teórico e experimental de energia livre de Gibbs de ativação: 24,2 e 24,4 kcal/mol, respectivamente. O mecanismo concertado é confirmado por cálculos de coordenada intrínseca de reação (IRC), que conectam o estado de transição aos reagentes e produtos. Por fim, a hidrólise de **DEDNPP** foi acompanhada em misturas binárias de água e dimetilsulfóxido (DMSO), e as constantes de segunda-ordem crescem em função da concentração do solvente orgânico. Os resultados são consistentes com o aumento gradual da basicidade da água em presença de DMSO, que contribui para a maior disponibilidade dos pares de elétrons da água para o ataque nucleofílico.

**Palavras-chave:** Triéster de fosfato. Hidrólise. Desfosforilação. Catálise básica geral. Efeito de solvente.





## ABSTRACT

This work reports the hydrolysis of phosphate triester diethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (**DEDNPP**). The reactions were followed spectrophotometrically by the appearance of the product 2,4-dinitrophenol. The results show that **DEDNPP** is hydrolyzed with a rate constant  $k_0$  of  $8.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} \sim 24$  hours), at  $25^\circ\text{C}$ , and the reaction is proposed to proceed via nucleophilic attack of water on phosphorus atom with consequent 2,4-dinitrophenol substitution. The reaction pathway was proposed by evaluating the incorporation of  $^{18}\text{O}$  isotope in the products, which were characterized by mass spectrometry (ESI-MS). The solvent kinetic isotope effect (SKIE) of  $2.68 \pm 0.17$  and the thermodynamic activation parameters,  $\Delta H^\ddagger = 12.9 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$  and  $\Delta S^\ddagger = -38.7 \pm 0.4 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , are consistent with either concerted or stepwise associative mechanism, with general base catalysis in the rate limiting step. Theoretical calculations at the B3LYP/6-31+G(d) level of theory show that the hydrolysis of **DEDNPP** proceeds through a concerted mechanism in presence of two discrete water molecules with well defined functions (nucleophile and general base catalyst). The plausibility of the proposed mechanism is supported by the excellent agreement between theoretical and experimental values of Gibbs free energy of activation: 24.2 and 24.4 kcal/mol, respectively. The concerted mechanism is further sustained by intrinsic reaction coordinate calculations (IRC), which show that the optimized transition state connects with reactants and products in a single step process. Also, the hydrolysis of **DEDNPP** was followed in binary mixtures of water and dimethyl sulfoxide (DMSO), and second order rate constants increase with increasing organic solvent fraction. The results are consistent with the gradually higher basicity of water in presence of increasing amounts of DMSO, which turns the lone pairs of electrons of water more available for nucleophilic attack upon the phosphate triester.

**Keywords:** Phosphate triester. Hydrolysis. Dephosphorylation. General base catalysis. Solvent effect.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de More O'Ferrall-Jencks para reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato. 23
- Figura 2.** Gráfico de Brønsted para a hidrólise dos triésteres **1a-d** (**Esquema 5**), a 39°C. Para fins didáticos, as estruturas dos grupos de saída são mostradas. 25
- Figura 3.** Gráficos de Brønsted referentes aos grupos de saída arílicos (OAr) para a hidrólise de três séries de triésteres de fosfato, obtidas a 25°C ou, para a série de triésteres **1**, normalizada a 25°C. As estruturas para as novas correlações e os valores de  $pK_a$  dos grupos de saída são mostrados no **Esquema 7**. 28
- Figura 4.** Gráficos de Brønsted referentes ao somatório dos  $pK_a$ 's dos grupos espectadores, para a hidrólise de triésteres de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenol e grupos espectadores arílicos (símbolos não-preenchidos) e grupos espectadores alquílicos (símbolos preenchidos), com dados obtidos (ou estimados) a 25°C. Para fins didáticos, são mostradas as estruturas dos grupos espectadores. 29
- Figura 5.** Estrutura geral do estado de transição da etapa determinante na hidrólise dos triésteres do **Esquema 8**, exemplificada com um triéster triarílico. 32
- Figura 6.** Conjunto de espectros sucessivos da hidrólise de **DEDNPP**  $2,2 \times 10^{-5} M$ , em pH 7,0 (BISTRIS 0,01M),  $I=1M$  (KCl), a 25°C. No detalhe, perfil de absorvância em função do tempo para dados em 360 nm. 40
- Figura 7.** Perfil de pH da reação de hidrólise de **DEDNPP**, a 25°C e  $I=1M$  (KCl). 43
- Figura 8.** (A) Principais possibilidades de caminhos reacionais na hidrólise de **DEDNPP** e incorporação esperada de  $^{18}O$  aos centros eletrofílicos em cada caso: fósforo e carbono aromático. (B) Representação gráfica dos picos normalizados correspondentes aos ânions do dietil fosfato e 2,4-dinitrofenol, e abundância relativa dos picos M+1 e M+2. Os dados foram obtidos do espectro de ESI(-)-MS dos produtos da hidrólise de **DEDNPP**, em pH 5, em presença de 22,2% (v:v) de água isotopicamente marcada ( $H_2O^{18}$ ). 45

**Figura 9.** Gráfico de Eyring da hidrólise de **DEDNPP**, em pH 6,5, a 25°C e  $I=1M$  (KCl). 47

**Figura 10.** (A) Estado de transição para a hidrólise de **DEDNPP** com duas moléculas de água discretas, acompanhada da numeração atômica, e (B) respectiva estrutura otimizada. 51

**Figura 11.** Coordenada de reação intrínseca (IRC) para a hidrólise de **DEDNPP** com duas moléculas de água. 52

**Figura 12.** Alterações percentuais nas cargas de Hirshfeld no estado de transição, em relação aos reagentes, na hidrólise de **DEDNPP** com duas moléculas de água, para os átomos diretamente envolvidos na reação. 54

**Figura 13.** (A) Valores de  $k_{\text{obs}}$  em função da  $\chi_{\text{H}_2\text{O}}$  para as reações de hidrólise de **DEDNPP** em misturas binárias H<sub>2</sub>O-DMSO, a 25°C, e (B) dados expressos como constantes de segunda ordem (i.e.,  $k_{\text{obs}}/[\text{H}_2\text{O}]$ ) em função da concentração de água. Por motivos didáticos, o eixo x é expresso em ordem decrescente. Em ambos os gráficos, as linhas não representam ajustes teóricos. 57

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores teóricos de energia livre de Gibbs de ativação para hidrólise de **DEDNPP** em função do número de moléculas de água, calculados ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d). 50
- Tabela 2.** Parâmetros estruturais para reagentes (R), estado de transição (TS) e produtos (P) na hidrólise de **DEDNPP**, calculados ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d). 53
- Tabela 3.** Cargas NBO e Hirshfeld para reagentes (R), estado de transição (TS) e produtos (P) para hidrólise de **DEDNPP**, calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d). 54
- Tabela 4.** Índices de ligação de Wiberg ( $B_i$ ) para reagentes (R), estado de transição (TS) e produtos (P) na hidrólise de **DEDNPP**, ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d). 55



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LaCFI – Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
ATP – adenosina trifosfato  
DEDNPP – dietil 2,4-dinitrofenil fosfato  
DMPNPP – dimetil 4-dinitrofenil fosfato  
EDNPP – etil 2,4-dinitrofenil fosfato  
TPP – *tris*-2-piridil fosfato  
DPP<sup>-</sup> – espécie aniônica do diéster *bis*-2-piridil fosfato  
DNP – 2,4-dinitrofenolato  
Im – imidazol  
BHA – ácido benzohidroxâmico  
 $pK_a$  – logaritmo da constante de dissociação ácida de uma espécie  
 $pK_w$  – logaritmo da constante de auto-protólise da água  
 $k_{obs}$  – constante de velocidade observada  
 $k_B$  – constant de Boltzmann  
 $h$  – constant de Planck  
R – constante molar dos gases  
SKIE – efeito isotópico cinético de solvente  
 $\Delta H^\ddagger$  – Entalpia de ativação  
 $\Delta S^\ddagger$  – entropia de ativação  
 $\Delta G^\ddagger$  – energia livre de Gibbs de ativação  
ESI-MS – espectrometria de massas com ionização por *electrospray*  
RMN – ressonância magnética nuclear  
CID – dissociação induzida por colisão  
 $\beta_{LG}$  – sensibilidade ao grupo de saída  
 $\beta_{NLG}$  – sensibilidade ao grupo espectador  
DFT – Teoria do Funcional da Densidade  
PCM – *Polarizable Continuum Model*  
SMD – *Solvation Model Density*  
IRC – *Intrinsic Reaction Coordinate*  
 $B_i$  – índice de ligação de Wiberg,  
 $\delta B_i$  – variação relativa de  $B_i$  para uma dada ligação ao longo da coordenada de reação  
 $\delta B_{av}$  – média das variações relativas dos índices de ligação ( $\delta B_i$ )  
%Ev – porcentagem da variação relativa de  $B_i$





## SUMÁRIO

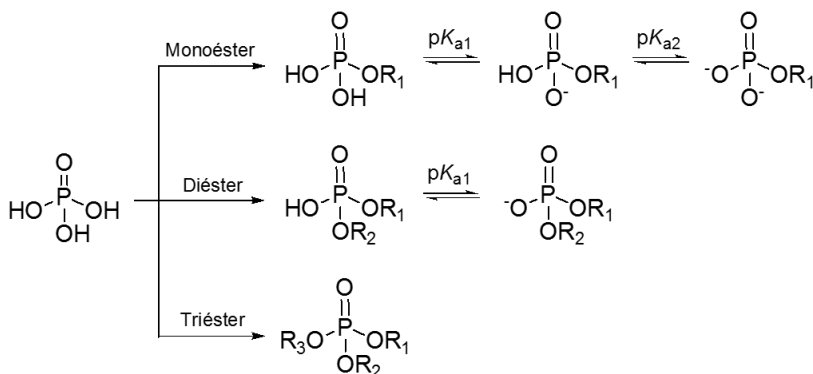
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
1.1 ÉSTERES DE FOSFATO	19
1.2 MECANISMOS DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA EM ÉSTERES FOSFÓRICOS	21
1.3 HIDRÓLISE DE TRIÉSTERES DE FOSFATO	23
1.4 REAÇÕES DE TRIÉSTERES DE FOSFATO COM NUCLEÓFILOS	33
<b>2. OBJETIVOS</b>	37
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	39
3.1 REAGENTES	39
3.2 MEDIDAS CINÉTICAS	39
3.3 CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS	41
3.4 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	43
4.1 RESULTADOS CINÉTICOS E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS	43
4.2 EFEITO ISOTÓPICO E PARÂMETROS DE ATIVAÇÃO	46
4.3 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS	49
4.4 EFEITO DE SOLVENTE	56
<b>5. CONCLUSÕES</b>	61
<b>REFERÊNCIAS</b>	63
<b>APÊNDICES</b>	71



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ÉSTERES DE FOSFATO

Os ésteres de fosfato englobam uma classe de compostos derivados do ácido fosfórico, em que os grupos hidróxido são substituídos por grupos alcóxido ou arilóxido e, de acordo com o número de substituições, são classificados em mono-, di- ou triésteres de fosfato, **Esquema 1**. Ressalta-se que os mono- e diésteres podem apresentar-se sob diferentes espécies, descritas através dos equilíbrios de dissociação ácida dos grupos hidróxido em meio aquoso, **Esquema 1**.

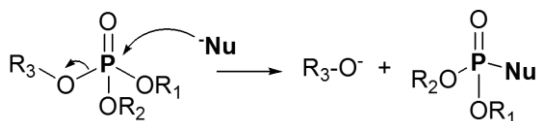


**Esquema 1**

Os ésteres de fosfato compreendem uma variedade extremamente abrangente de estruturas e ocorrem em sistemas diversos. Por exemplo, os mono- e diésteres de fosfato constituem grupos funcionais importantes em biomoléculas, sendo o exemplo mais recorrente o ácido desoxirribonucleico (DNA), responsável pelo armazenamento e transmissão da informação genética.<sup>1-3</sup> Já os triésteres fosfóricos não são encontrados naturalmente em sistemas biológicos e foram desenvolvidos para aplicação industrial como retardadores de chamas, agroquímicos, entre outros. Ainda, os triésteres foram empregados como armas químicas, o que foi motivado pela elevada toxicidade desses compostos a sistemas humanos, já que inibem enzimas atuantes em processos de neurotransmissão e podem levar inclusive a um colapso do sistema nervoso central.<sup>4</sup>

Mono- e diésteres de fosfato são conhecidos por serem estáveis, já que a presença de cargas negativas nas espécies iônicas inibe o ataque de nucleófilos no átomo de fósforo. Por exemplo, a espécie aniônica do difenil fosfato ( $R_1=H$  e  $R_2=R_3=-C_6H_5$ , **Esquema 1**) tem tempo de meia-vida estimado em 180 anos, a  $100^\circ\text{C}$ .<sup>2, 4</sup> Já os triésteres, ainda que estáveis, apresentam reatividade substancialmente maior que os demais ésteres.<sup>4</sup>

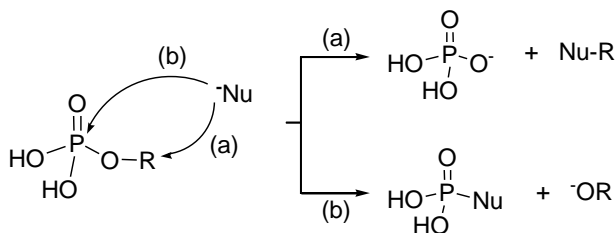
A reatividade dos ésteres fosfóricos está relacionada principalmente à quebra da ligação P–O em reações de substituição nucleofílica, conforme exemplifica o **Esquema 2** para a reação de um triéster, onde um nucleófilo  $\text{Nu}^-$  substitui um dos grupos alcóxido ou arilóxido do substrato. Em sistemas biológicos, tais reações ocorrem com o envolvimento de enzimas, sistemas catalíticos altamente eficientes.<sup>5</sup> No entanto, os processos bioquímicos são complexos, e muitos ainda não foram totalmente elucidados, o que atrai interesse para o estudo de reações modelo entre fosfatos orgânicos e nucleófilos em solução, que podem mimetizar diversos caminhos reacionais e diferentes particularidades dos sistemas enzimáticos. Ainda, o planejamento de sistemas artificiais é uma ferramenta para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes para casos de contaminação por triésteres. Nesse sentido, uma grande quantidade de estudos foi realizada nas últimas décadas englobando reações de substituição nucleofílica em mono-, di- e triésteres de fosfato em solução aquosa, com foco no detalhamento dos mecanismos reacionais, visando estender as conclusões aos sistemas biológicos reais. Dentro de um conjunto de estratégias utilizadas para o estudo mecanístico de sistemas modelo, destacam-se: (i) investigação da cinética das reações, (ii) caracterização minuciosa dos produtos, e (iii) avaliação do efeito estrutural de substratos e nucleófilos.<sup>6-8</sup> Mais recentemente, houve avanço expressivo no âmbito da físico-química orgânica com o aperfeiçoamento dos modelos teóricos e das ferramentas da química computacional, que complementam os resultados experimentais. Com base em extensos estudos iniciados nas décadas de 60 e 70 do século passado, serão revisados na seção seguinte os mecanismos básicos que governam as reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.



**Esquema 2**

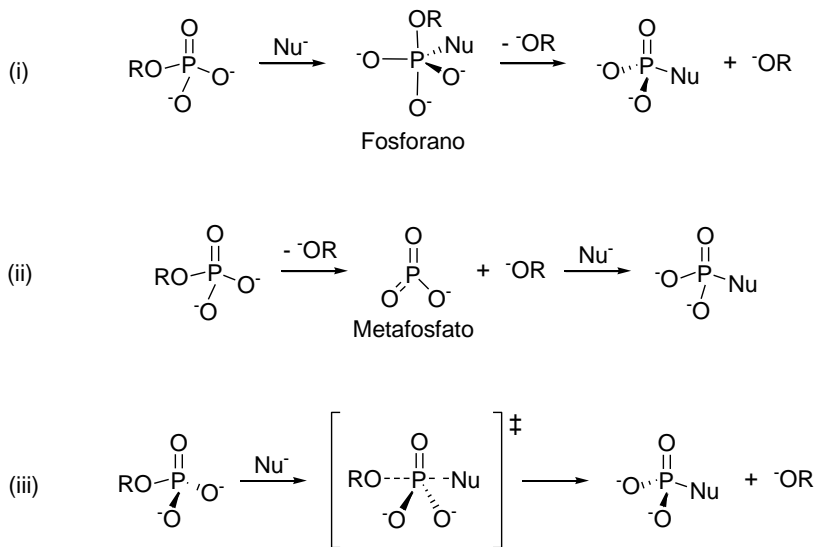
## 1.2 MECANISMOS DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA EM ÉSTERES FOSFÓRICOS

Em ésteres de fosfato, existem dois grandes grupos de reações de substituição nucleofílica, representados no **Esquema 3**.<sup>4</sup> O grupo (a) compreende as reações em que o ataque nucleofílico ocorre sobre o átomo de carbono de um dos substituintes alcóxido ou arilóxido, havendo a substituição do grupo fosfato pelo nucleófilo. Já no grupo (b), o ataque nucleofílico ocorre sobre o átomo de fósforo e há quebra da ligação P-O, com conseqüente substituição de um dos grupos alcóxido ou arilóxido pelo nucleófilo.



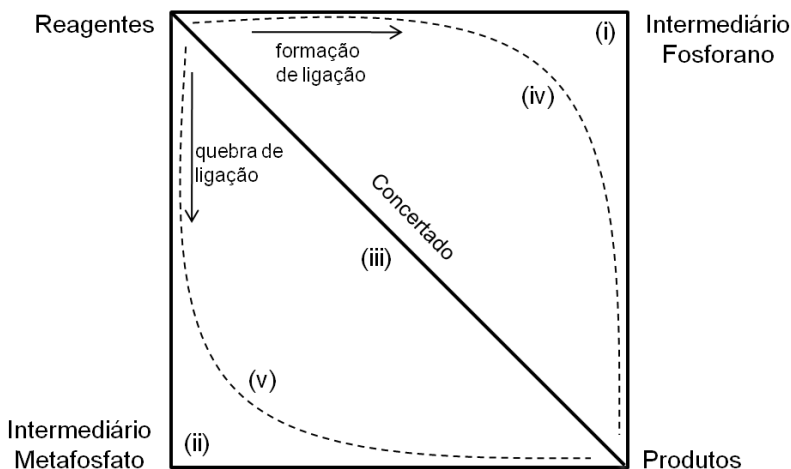
**Esquema 3**

Considerando as reações que procedem via ataque nucleofílico no átomo de fósforo, destacam-se três principais mecanismos, **Esquema 4**.<sup>4</sup> O mecanismo (i) corresponde ao mecanismo associativo, em que o ataque nucleofílico ocorre em uma primeira etapa, levando à formação de um intermediário fosforano, e a eliminação do grupo de saída ocorre em uma segunda etapa. O mecanismo (ii) é denominado dissociativo e também ocorre em duas etapas, sendo que a primeira corresponde à eliminação do grupo de saída, havendo a formação de um intermediário metafosfato, ao qual o nucleófilo é adicionado na segunda etapa. Por fim, as reações podem proceder ainda pelo mecanismo (iii), concertado, em que o ataque nucleofílico e a eliminação do grupo de saída ocorrem de forma simultânea, havendo a formação de um único estado de transição.



**Esquema 4**

Os mecanismos descritos podem ser sumarizados em um diagrama de More O’Ferrall-Jencks,<sup>8</sup> **Figura 1**, onde o vértice superior esquerdo representa os reagentes, o vértice inferior direito, os produtos, e as arestas correspondem aos processos de formação e quebra de ligação. Os intermediários metafosfato e fosforano estão localizados nos demais vértices do diagrama. Assim, o mecanismo associativo é representado pelo caminho que percorre as arestas do diagrama passando pelo vértice em (i). O mecanismo dissociativo é descrito pelo caminho que passa pelo vértice em (ii). O caminho diagonal (iii) representa o mecanismo concertado, em que formação e quebra de ligação são sincrônicos, sem que haja formação de intermediários e, portanto, não alcança nenhum vértice. O digrama ilustra ainda outros mecanismos possíveis, (iv) e (v), que também não passam por intermediários, mas que variam no grau de sincronicidade para formação do estado de transição. Em (iv), a formação da ligação com o nucleófilo ocorre antecipadamente à quebra da ligação com o grupo de saída, ao passo que (v) representa um caminho concertado onde a quebra da ligação com o grupo de saída é favorecida.



**Figura 1.** Diagrama de More O'Ferrall-Jencks para reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.

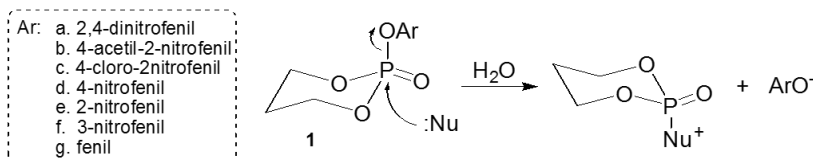
Assim, observam-se diversas possibilidades mecanísticas em reações de desfosforilação. Em geral, a rota preferencial depende de diversas variáveis, em particular da estrutura do substrato e das habilidades do nucleófilo e do grupo de saída. Por isso, não é possível estabelecer um padrão rigoroso de reatividade de ésteres de fosfato frente a reações de substituição nucleofílica. Ainda assim, observa-se uma tendência geral de que monoésteres de fosfato reagem via mecanismos concertados de caráter dissociativo,<sup>9, 10</sup> ao passo que diésteres de fosfato mostram uma preferência por caminhos concertados de caráter associativo.<sup>11, 12</sup> A reatividade dos triésteres será discutida em detalhes na seção seguinte, através da revisão dos primeiros resultados sobre a hidrólise de triésteres, que datam de 1970, e dos avanços recentes reportados pelo Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI).

### 1.3 HIDRÓLISE DE TRIÉSTERES DE FOSFATO

Estudos detalhados de reações de substituição nucleofílica em triésteres de fosfato foram inicialmente estudados sistematicamente por Khan e Kirby. Os autores reportaram em 1970 as reações de uma série de triésteres derivados do 1,3-propanodiol com diversos nucleófilos, incluindo a água, **Esquema 5**.<sup>13</sup> Os substratos diaquil arílicos foram

convenientemente escolhidos porque a liberação do grupo de saída arílico é favorecida na faixa de pH, em detrimento dos substituintes alquílicos, e facilmente acompanhada por espectrofotometria de UV-Vis. As reações de hidrólise foram estudadas com Ar = a-d (**Esquema 5**), e experimentos de marcação isotópica confirmam que as substituições em (1) procedem via quebra de ligação P–O.

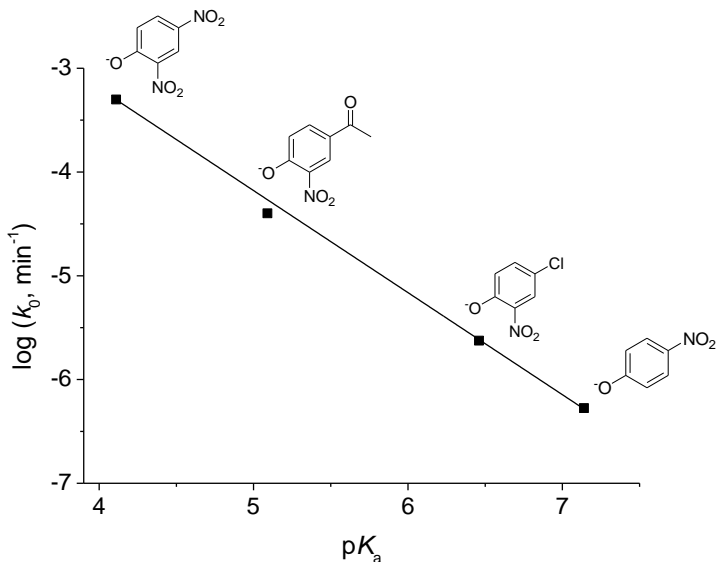
Nas reações de hidrólise de (1), as constantes de velocidade ( $k_0$ ) aumentam à medida que os substratos tornam-se mais reativos, isto é, com melhores grupos de saída, e a sensibilidade de  $k_0$  em relação ao  $pK_a$  do grupo de saída foi avaliada em termos de uma correlação de Brønsted para grupo de saída, a 39°C:  $\log k_0 = -0,82 - 0,99 pK_a (\text{min}^{-1})$ , **Figura 2**.<sup>13</sup> Embora essa correlação tenha sido obtida para uma série de triésteres diaquil arílicos, ela foi utilizada por décadas para estimar a constante de hidrólise de novos triésteres, independentemente da natureza dos grupos espectadores, já que a reatividade nas reações de transferência do grupo fosforila era principalmente avaliada em função das habilidades do nucleófilo e do grupo de saída.



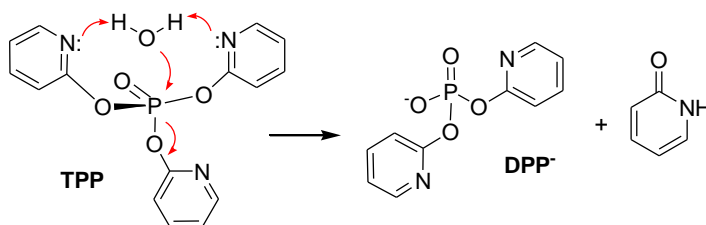
**Esquema 5**

De fato, a correlação de 1970 foi utilizada para estimar a constante de velocidade de hidrólise do triéster *tris*-2-piridil fosfato (**TTP**) em 2009, **Esquema 6**, considerando o  $pK_a$  de 9,09 para o grupo de saída 2-hidroxipiridina.<sup>14</sup> No entanto, o valor experimental obtido ( $k_0 = 2,35 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , a 25°C) é aproximadamente  $10^8$  vezes maior que o valor previsto. Inicialmente, a reatividade atípica do substrato foi racionalizada através de um mecanismo eficiente de catálise básica geral intramolecular promovida pelos grupos piridínicos espectadores, que assistem o ataque nucleofílico da água no átomo de fósforo (**Esquema 6**).<sup>14</sup> O valor bastante negativo de entropia de ativação e resultados de efeito isotópico cinético de solvente, incluindo um estudo de inventário de prótons, sustentam um mecanismo com a transferência de dois prótons para a formação de um estado de transição cíclico.





**Figura 2.** Gráfico de Brønsted para a hidrólise dos triésteres **1a-d** (Esquema 5), a 39°C.<sup>13</sup> Para fins didáticos, as estruturas dos grupos de saída são mostradas.

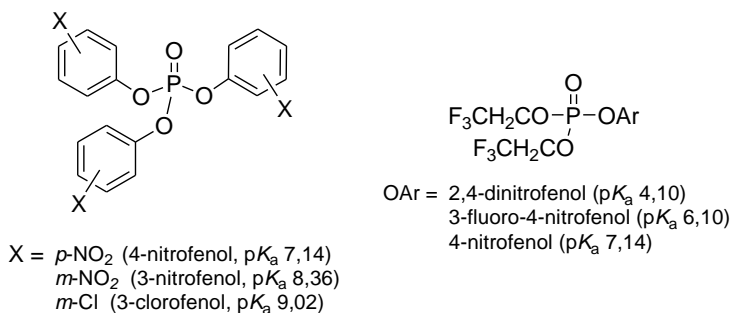


**Esquema 6**

No entanto, resultados complementares mostraram que a hidrólise do **TPP** é sensível à presença de tampões, isto é, a hidrólise do substrato sofre catálise básica geral promovida por bases externas em reações intermoleculares.<sup>15</sup> Tais resultados contestam o mecanismo inicialmente proposto, já que em geral reações intermoleculares não competem com reações intramoleculares altamente eficientes, que exibem vantagens como proximidade e geometria apropriada entre grupos funcionais reativos. De fato, considerando a baixa basicidade do nitrogênio do grupo piridínio espectador ( $pK_a^{HA} = -0,22$ ), uma contribuição mínima do mecanismo do **Esquema 6** deve ser esperada.

Além da catálise por tampão, outros resultados indiretos colocaram em cheque o mecanismo de catálise intramolecular na hidrólise do **TPP**. Por exemplo, obteve-se uma constante de hidrólise de mesma magnitude que a do **TPP** para o triéster *tris*-3-clorofenil fosfato, cujo grupo de saída possui  $pK_a = 9,02$ , próximo ao da 2-hidroxipiridina ( $pK_a = 9,09$ ).<sup>15</sup> Considerando que o *tris*-3-clorofenil fosfato não dispõe de grupos funcionais catalíticos, os resultados sugeriram que as constantes de hidrólise substancialmente maiores de tais triésteres, comparado aos valores estimados pela correlação de Khan e Kirby para triésteres com grupos de saída de  $pK_a \sim 9$ , são consequência direta de efeitos eletrônicos dos substituintes espectadores arílicos.

Nesse sentido, investigou-se a hidrólise de novas séries de triésteres fosfóricos, cujas estruturas mais representativas são mostradas no **Esquema 7**, e comprovou-se em 2011 que as constantes de hidrólise são significativamente influenciadas pela natureza dos grupos espectadores (alquílicos ou arílicos).<sup>15</sup> Consequentemente, concluiu-se que o **TPP** não possui constante de hidrólise maior do que a esperada para um triéster com grupo de saída de  $pK_a = 9,09$ , isso porque o valor de  $k_0$  foi equivocadamente estimado por uma correlação para triésteres diaquil arílicos, já que o efeito dos grupos espectadores era desconhecido e, portanto, negligenciado até então.

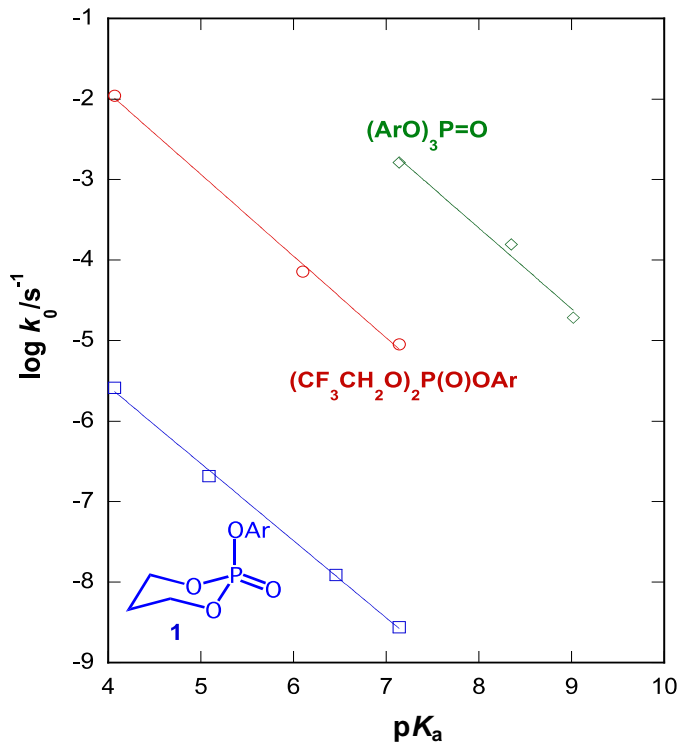


### Esquema 7

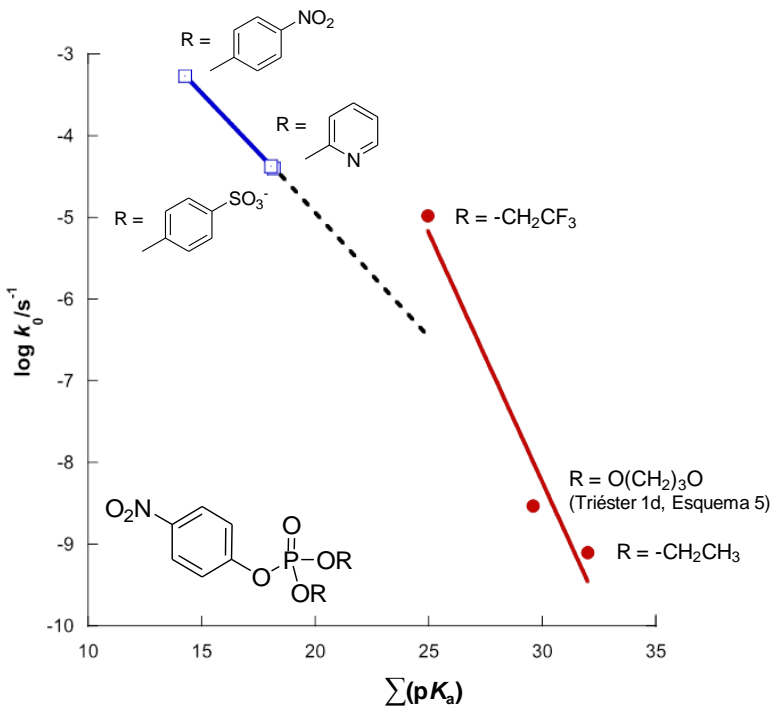
A fim de quantificar o efeito dos grupos espectadores, novas correlações foram obtidas para a hidrólise de triésteres de fosfato, considerando ambos valores de  $pK_a$ : do grupo de saída e dos grupos espectadores. A **Figura 3** apresenta duas novas relações lineares de energia livre para grupo de saída (arílico), juntamente com a correlação de 1970.<sup>13, 15</sup> Observa-se que as retas apresentam inclinações

semelhantes, mas, para um dado grupo de saída, os valores de  $k_0$  das novas correlações são maiores em várias ordens de magnitude em comparação com a correlação dos triésteres 1. Essa observação é bastante evidente para o *p*-nitrofenol como grupo de saída ( $pK_a = 7,14$ ). Os resultados indicam que a reatividade dos triésteres frente à reação de hidrólise cresce com o caráter elétron-retirador dos substituintes, que elevam o nível de energia dos reagentes e estabilizam a densidade de carga negativa sobre o átomo de fósforo no estado de transição. Em particular, para a série de triésteres triarílicos, a inclinação da reta deve ser função de dois termos, a sensibilidade ao grupo de saída ( $\beta_{LG}$ ) e a sensibilidade ao grupo espectador ( $\beta_{NLG}$ ), e, portanto, deve corresponder à soma  $\beta_{LG} + 2\beta_{NLG}$ , embora o coeficiente angular obtido seja coincidentemente igual ao reportado para a série de triésteres 1.<sup>16</sup>

A sensibilidade aos grupos espectadores ( $\beta_{NLG}$ ) foi avaliada através dos dados de hidrólise de uma série de triésteres de fosfato com grupo de saída arílico constante (4-nitrofenol) e diferentes grupos espectadores. A **Figura 4** mostra que são obtidas duas correlações entre os valores de  $k_0$  e o somatório dos  $pK_a$ 's dos grupos espectadores, indicando maior sensibilidade das constantes de hidrólise a substituintes alquílicos (sistemas dialquil arílicos) em comparação aos substituintes arílicos (sistemas triarílicos). Em outras palavras, confirma-se que grupos espectadores exercem efeito substancial na hidrólise de triésteres, comparável ao efeito do grupo de saída, e os resultados mostram reatividade diferenciada dos substratos para a série com grupo de saída arilóxido constante, e com grupos espectadores dialquílicos ou diarílicos. Assim, no panorama mais recente da hidrólise de triésteres fosfóricos, os parâmetros de sensibilidade para os sistemas triarílicos são  $\beta_{LG} = -0,42$  e  $\beta_{NLG} = -0,28$ , e para os sistemas dialquil arílicos,  $\beta_{LG} = -0,99$  e  $\beta_{NLG} = -0,61$ .<sup>16</sup>



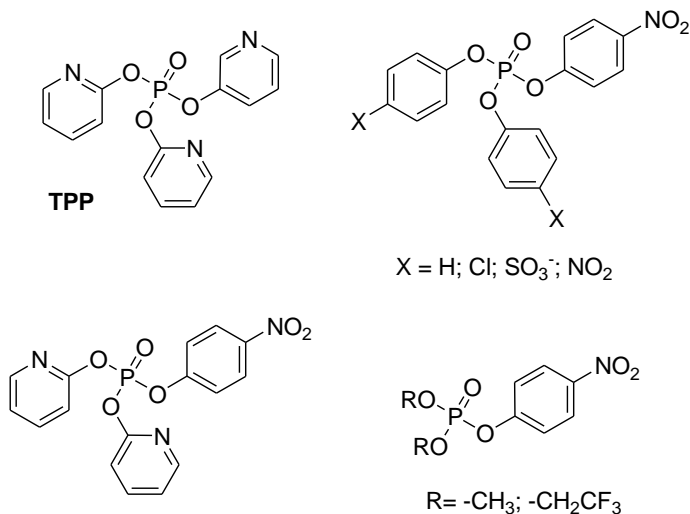
**Figura 3.** Gráficos de Brønsted referentes aos grupos de saída arílicos ( $OAr$ ) para a hidrólise de três séries de triésteres de fosfato, obtidas a  $25^\circ C$  ou, para a série de triésteres **1**, normalizada a  $25^\circ C$ .<sup>16</sup> As estruturas para as novas correlações e os valores de  $pK_a$  dos grupos de saída são mostrados no **Esquema 7**.



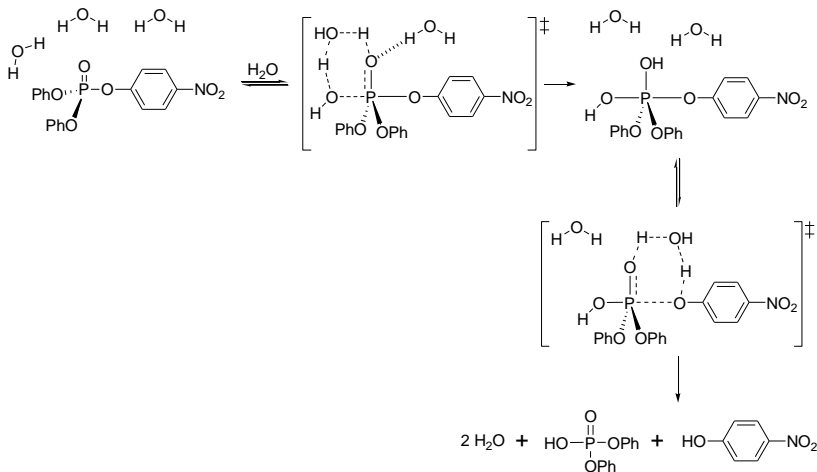
**Figura 4.** Gráficos de Brønsted referentes ao somatório dos  $pK_a$ 's dos grupos espectadores, para a hidrólise de triésteres de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenol e grupos espectadores arílicos (símbolos não-preenchidos) e grupos espectadores alquílicos (símbolos preenchidos), com dados obtidos (ou estimados) a 25°C.<sup>15</sup> Para fins didáticos, são mostradas as estruturas dos grupos espectadores.

Sequencialmente, as reações de hidrólise do **TPP** e de uma série de triésteres cujo grupo de saída é o 4-nitrofenol ( $pK_a = 7,14$ ), **Esquema 8**, foram estudadas através de cálculos computacionais, com a finalidade de investigar o mecanismo de hidrólise e detalhar o efeito dos grupos espectadores.<sup>17</sup> Os autores utilizaram a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d), e avaliaram a Superfície de Energia Potencial a fim de localizar reagentes, estados de transição, intermediários e produtos, e obter valores teóricos de parâmetros de ativação, que foram comparados com dados experimentais previamente obtidos. Para todos os triésteres investigados, os autores propuseram um mecanismo associativo de duas etapas, passando por um intermediário fosforano, conforme

exemplificado no **Esquema 9** para um triéster triarílico, e observa-se excelente concordância entre os valores teóricos e experimentais de energia livre de Gibbs de ativação quando são consideradas três moléculas de água discretas com papéis bem definidos. Na primeira etapa, determinante da velocidade de reação, ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água sobre o átomo de fósforo, assistido por uma segunda molécula de água, que permite a transferência simultânea de dois prótons para a formação de um intermediário fosforano neutro através de um estado de transição cíclico de seis membros. Através de uma ligação de hidrogênio intermolecular, uma terceira molécula de água estabiliza a densidade de carga negativa desenvolvida no oxigênio fosforílico para formação do estado de transição. Na segunda etapa, ocorre a quebra do intermediário fosforano, novamente assistida por uma molécula de água via um estado de transição cíclico, **Esquema 9**.<sup>17</sup> O mecanismo do **Esquema 9** é coerente com dados experimentais previamente reportados (entropias de ativação bastante negativas e expressivos valores de efeito isotópico cinético de solvente).

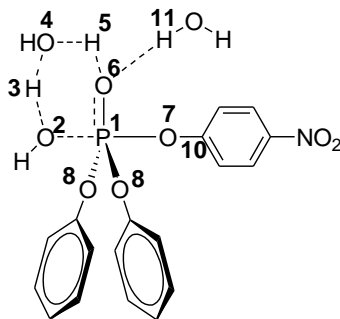


**Esquema 8**



Esquema 9

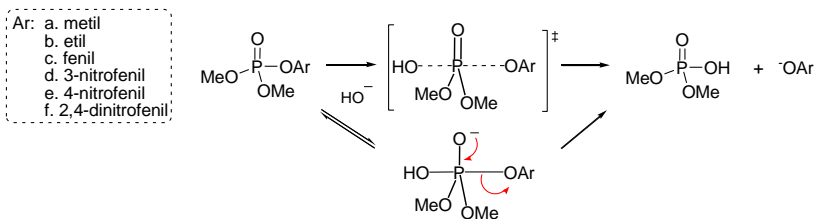
Ainda, a investigação teórica da hidrólise dos triésteres forneceu informações detalhadas dos efeitos dos substituintes espectadores sobre o mecanismo do **Esquema 9**. Dentro de um grupo de quatro triésteres representativos derivados do 4-nitrofenol, foram observados no estado de transição da etapa determinante, para cada substrato, valores quase idênticos de comprimentos de ligação entre o fósforo e os átomos de oxigênio do nucleófilo e do grupo de saída (ligações em posição axial,  $\text{P}_1-\text{O}_2$  e  $\text{P}_1-\text{O}_7$ , **Figura 5**). Verificou-se que tais comprimentos de ligação diminuem gradualmente com a diminuição do  $\text{p}K_a$  do grupo espectador, isto é, o aumento do caráter elétron-retirador dos grupos espectadores promove um encurtamento gradual das ligações  $\text{P}-\text{O}$ , o que contribui para a estabilização do estado de transição. Naturalmente, a diminuição dos comprimentos de ligação das posições axiais é acompanhada de um alongamento das ligações em posição equatorial ( $\text{P}_1-\text{O}_8$ , **Figura 5**), com exceção da ligação com o oxigênio fosforílico, que possui certo caráter de dupla ligação. A análise de distribuição de cargas, além de comprovar que a eletrofilicidade do fósforo aumenta com a diminuição do  $\text{p}K_a$  dos substituintes, mostra que o catalisador básico geral e o solvente são os principais responsáveis pela dispersão da carga desenvolvida para formação do estado de transição.<sup>17</sup>



**Figura 5.** Estrutura geral do estado de transição da etapa determinante na hidrólise dos triésteres do **Esquema 8**, exemplificada com um triéster triarílico.

Assim, observa-se que a descrição dos mecanismos de substituição nucleofílica em triésteres de fosfato sofreu significativa evolução recentemente, complementando os estudos clássicos realizados nas décadas de 60 e 70 do século passado. Nesse sentido, destaca-se a importância e o aprimoramento gradual das metodologias computacionais, que contribuem sobremaneira para a discussão detalhada dos dados experimentais, conforme antecipado por Breslow ao descrever as perspectivas da comunidade acadêmica sobre o campo da físico-química orgânica no século XXI.<sup>18</sup> De fato, inúmeros estudos recentes têm mostrado aspectos extremamente relevantes sobre mecanismos de transferência do grupo fosforila, que indicam um campo amplo e ainda não totalmente conhecido. Por exemplo, Tarrat reportou recentemente um estudo teórico da hidrólise alcalina de uma série de triésteres de fosfato onde foram mantidos constantes os grupos espectadores ( $-\text{OCH}_3$ ) e variou-se o grupo de saída, **Esquema 10**.<sup>19</sup> Os resultados mostraram que o mecanismo associativo de duas etapas alterna-se para um mecanismo concertado com melhores grupos de saída ( $\text{p}K_{\text{a}} < 8$ ). Tais resultados, aliados ao progresso recente do LaCFI e de outros grupos de pesquisa, mostram um avanço expressivo no entendimento em detalhes dos mecanismos das reações de transferência do grupo fosforila, cujas nuances representam objetos de investigação atual e de perspectivas futuras.<sup>16, 20-24</sup> Certamente, será possível alcançar no futuro um nível de sofisticação elevado na descrição de reações orgânicas de interesse biológico e industrial.



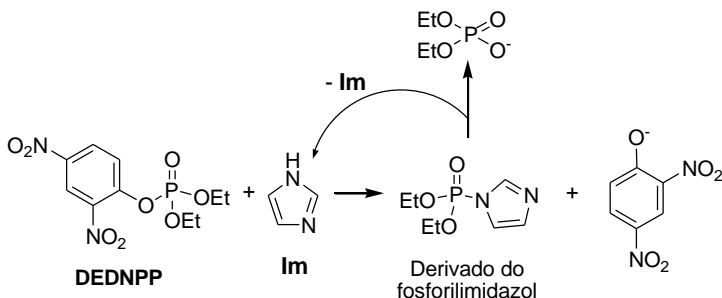


**Esquema 10**

## 1.4 REAÇÕES DE TRIÉSTERES DE FOSFATO COM NUCLEÓFILOS

Conforme mencionado anteriormente, o entendimento de processos biológicos de transferência do grupo fosforila é amparado pelo estudo de reações modelo, que buscam efeitos catalíticos elevados e o detalhamento mecanístico das reações. Nesse sentido, parte dos esforços do LaCFI compreende o estudo de reações entre ésteres de fosfato e nucleófilos em solução aquosa. Por exemplo, foram reportadas recentemente as reações de nucleófilos com uma série de mono-, di- e triésteres de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol.<sup>25-39</sup> Tais substratos tem sido utilizados por possuírem um bom grupo de saída (2,4-dinitrofenol,  $pK_a = 4,07$ ), o que torna o acompanhamento cinético das reações experimentalmente conveniente, em particular com triésteres, os substratos geralmente mais reativos da série.

Investigou-se, por exemplo, as reações em meio aquoso do imidazol (**Im**) com di- e tri-ésteres derivados do 2,4-dinitrofenol, conforme exemplificado no **Esquema 11** com o triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**).<sup>35</sup> Os resultados mostram que o imidazol promove incrementos de até 7500 vezes na desfosforilação dos substratos, em comparação com as reações de hidrólise espontânea. As reações, de natureza nucleofílica, ocorrem via ataque do imidazol exclusivamente sobre o átomo de fósforo, resultando na formação de diferentes espécies derivadas do fosforilimidazol, estáveis o suficiente em meio aquoso para detecção direta no meio reacional por métodos espectroscópicos. Observou-se ainda que os derivados do fosforilimidazol são hidrolisados e regeneram o imidazol, caracterizando o ciclo do **Esquema 11** como catálise nucleofílica.

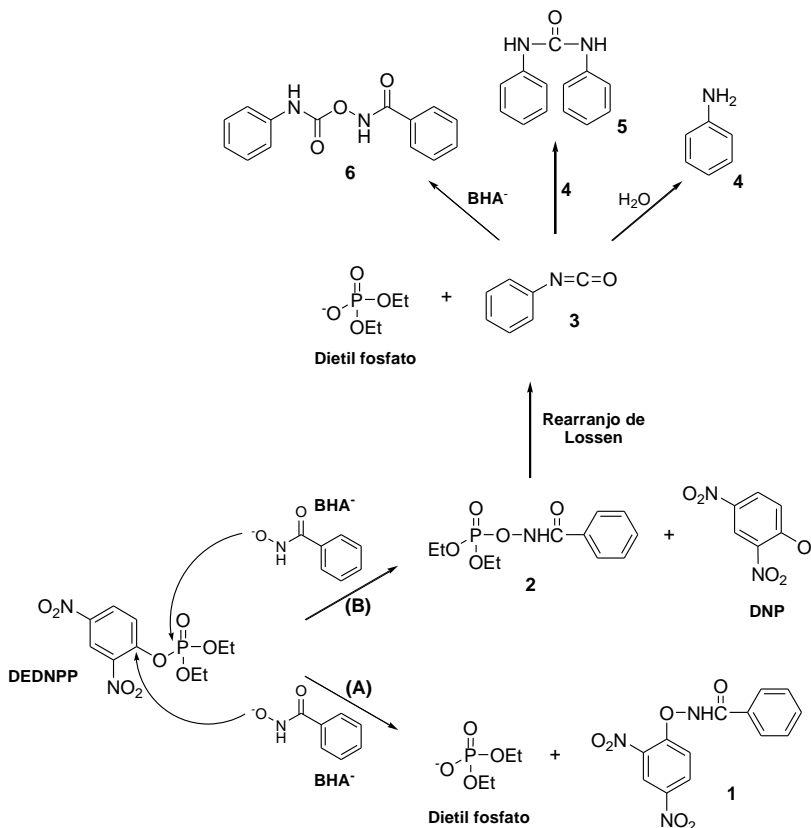


**Esquema 11**

Diferentemente das reações do imidazol, as reações do ácido benzohidroxâmico (**BHA**) com os mesmos substratos não podem ser classificadas como catálise, já que diversos produtos são formados a partir do ataque da forma aniônica do nucleófilo (**BHA<sup>-</sup>**), sem que haja regeneração do nucleófilo original.<sup>39</sup> Ainda, ressalta-se que dois caminhos reacionais paralelos são observados, havendo ataque sobre ambos os átomos de fósforo e carbono aromático, conforme exemplificado no **Esquema 12** com o triéster **DEDNPP**. No caminho (A), o ataque sobre o carbono aromático leva à formação do diéster dietil fosfato e do intermediário aromático 1. Já no caminho (B), o ataque sobre o átomo de fósforo desloca o 2,4-dinitrofenolato (**DNP**) e gera o intermediário de benzohidroximato fosforilado 2, que sofre um rápido rearranjo de Lossen e produz isocianato de fenila (3), sequencialmente hidrolisado à anilina (4). Ainda, observa-se a formação de difenil uréia (5) e do derivado carbamílico 6, a partir das respectivas reações do isocianato de fenila com a anilina gerada e **BHA<sup>-</sup>** (este, em excesso no meio reacional). Os caminhos do **Esquema 12** foram propostos com base em uma análise detalhada de produtos por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P) e espectrometria de massas.

Os exemplos acima contemplam diversos aspectos relevantes para o entendimento de reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato. Por exemplo, a reação de **DEDNPP** com imidazol mostra ser uma catálise nucleofílica com ataque exclusivo do nucleófilo sobre o fósforo,<sup>35</sup> ao passo que o **DEDNPP** sofre ataque em dois centros eletrofílicos na reação com **BHA<sup>-</sup>**, o qual se comporta como um nucleófilo auto-destrutivo e, portanto, não se comporta como um

catalisador, ainda que a desfosforilação por  $\text{BHA}^-$  seja cerca de  $10^5$  vezes mais rápida que a hidrólise espontânea do substrato.<sup>39</sup>

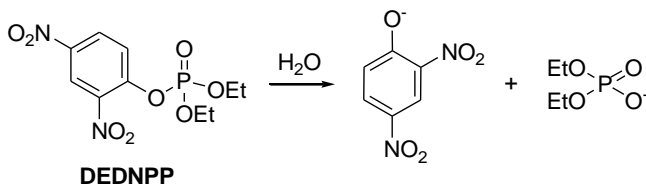


Conforme exposto acima, o triéster **DEDNPP** tem sido utilizado em nosso grupo de pesquisa como um substrato representativo para a investigação de mecanismos de reações de transferência do grupo fosforila, e também para a avaliação da potencialidade de nucleófilos na busca de protótipos mais eficientes para detoxificação química. No entanto, a hidrólise do **DEDNPP** não foi investigada em detalhes, e a elucidação desse mecanismo reacional é de interesse, pois pode contribuir para um maior entendimento das reações-modelos investigadas, já que a reatividade depende de ambos: substratos e

nucleófilos. Ainda, tal estudo pode complementar o conhecimento sobre os padrões de reatividade de triésteres de fosfato e os mecanismos de substituição nucleofílica nessa classe de compostos.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo cinético e mecanístico da hidrólise do triéster fosfórico dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), conforme mostrado abaixo.



Para alcançar o objetivo geral, foram adotadas as seguintes estratégias:

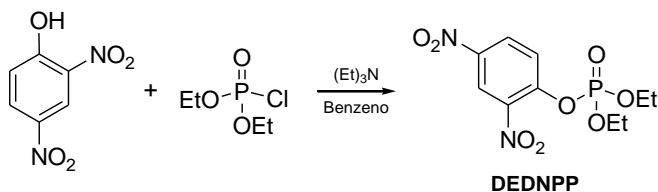
- I. Acompanhamento da hidrólise do **DEDNPP** por espectrofotometria de UV-Vis, através da formação do produto 2,4-dinitrofenolato, e avaliação do efeito de diferentes parâmetros sobre as constantes de velocidade: pH, temperatura e meio deuterado;
- II. Caracterização dos produtos da reação por espectrometria de massas (ESI-MS);
- III. Realização de cálculos computacionais da hidrólise de **DEDNPP**;
- IV. Avaliação do efeito de solvente orgânico (dimetilsulfóxido) na reação.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

O triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) foi sintetizado de acordo com procedimentos descritos na literatura, através da reação entre dietil cloro fosfato e 2,4-dinitrofenol, **Esquema 13**.<sup>29, 40</sup> A caracterização de **DEDNPP** foi realizada por RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, referência interna TMS): 1.40 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 4.31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 7.87 (dd, 1H, Ar), 8.47 (dd, 1H, Ar), 8.81 (dd, 1H, Ar).



**Esquema 13**

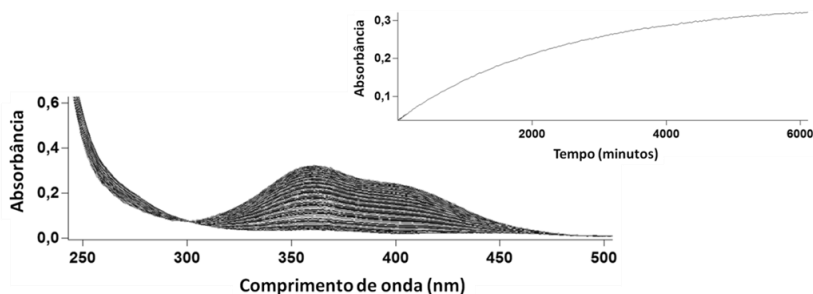
Os demais reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente, provenientes da Aldrich, Carlo Erba, Acros e Vetec, e foram utilizados sem prévia purificação. Os solventes e reagentes deuterados (D<sub>2</sub>O, DCl e NaOD), bem como água com oxigênio isotopicamente marcado (95% <sup>18</sup>O) foram provenientes da Aldrich ou Cambridge Isotopes Laboratories.

#### 3.2 MEDIDAS CINÉTICAS

As cinéticas foram acompanhadas por espectrofotometria de UV-Vis, utilizando um espectrofotômetro Varian Cary 50, que contém *software* próprio para aquisição e tratamento de dados, Cary WinUV v. 3.00. As reações foram realizadas em cubetas de quartzo, com capacidade para 3,5 mL e caminho óptico de 1,0 cm. A temperatura foi mantida constante durante as reações utilizando um banho termostático acoplado ao espectrofotômetro. O pH das soluções foi ajustado através de pHmetro digital Hanna, e no caso de solvente aquoso deuterado (D<sub>2</sub>O), o valor de pD foi corrigido pela relação  $pD = pH_{\text{lido}} + 0,4$  (a 25°C).<sup>41</sup>

Para o acompanhamento cinético das reações, foram preparadas soluções aquosas nas condições experimentais desejadas (pH, temperatura e força iônica, por exemplo), que foram transferidas para cubetas onde as reações foram iniciadas pela adição de pequenas

alíquotas de solução estoque de **DEDNPP** em  $\text{CH}_3\text{CN}$ , mantida em freezer, resultando na concentração final de  $2,2 \times 10^{-5} \text{M}$  de **DEDNPP** no meio reacional. As reações foram acompanhadas por espectrofotometria de UV-Vis através da formação do produto 2,4-dinitrofenol, e as constantes de velocidade observadas ( $k_{\text{obs}}$ ) foram calculadas pelo ajuste iterativo das curvas de absorbância em função do tempo por equações que descrevem cinéticas de primeira ordem,<sup>42</sup> conforme exemplificado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Conjunto de espectros sucessivos da hidrólise de **DEDNPP**  $2,2 \times 10^{-5} \text{M}$ , em pH 7,0 (BISTRIS 0,01M),  $I=1 \text{M}$  (KCl), a  $25^\circ\text{C}$ . No detalhe, perfil de absorbância em função do tempo para dados em 360 nm.

Foram avaliados diversos parâmetros na reação de hidrólise de **DEDNPP**: pH, temperatura, efeito isotópico cinético de solvente, e efeito do solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO). O pH das soluções foi mantido fixo utilizando 0,01M dos tampões:  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$  (pH 4,0-5,0), BISTRIS (pH 6,0-7,0), TRIS (pH 8,0-9,0) e  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  (pH 9,5-11,0). Manteve-se a força iônica constante em 1M com a adição de KCl. Para a obtenção do efeito isotópico cinético de solvente (SKIE), a reação de hidrólise foi acompanhada em meio deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ) e a constante de velocidade obtida foi comparada ao valor em água ( $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ ), em mesmas condições experimentais. Avaliou-se o efeito de solvente acompanhando as reações de hidrólise em dimetilsulfóxido (DMSO) aquoso. As misturas binárias foram preparadas a  $25^\circ\text{C}$ , considerando os valores de massa dos solventes e o volume total da mistura. Utilizou-se solvente de grau espectroscópico, e a quantidade de água presente no DMSO foi determinada por titulação Karl Fischer e corrigida para a definição da composição das misturas.



### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS

Baseado em experimento reportado por Fersht e Kirby,<sup>43</sup> a hidrólise de **DEDNPP** foi realizada em presença de água enriquecida com o isótopo  $^{18}\text{O}$ , e os produtos foram caracterizados por espectrometria de massas com ionização por *electrospray*, ESI-MS(/MS). Realizou-se a reação de hidrólise em meio aquoso com 22,2% (v:v) de  $\text{H}_2\text{O}^{18}$  (95%  $^{18}\text{O}$ , Cambridge Isotope Laboratories), em presença de 10% (v:v) de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , em pH 5 (tampão acetato  $6,6 \times 10^{-3}$  M), a 25°C. Após cinco tempos de meia-vida, os produtos foram identificados por ESI(-)-MS e sequencialmente caracterizados por ESI(-)-MS/MS, através de dissociação induzida por colisão (CID) com nitrogênio.

Utilizou-se o espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* 3200 Qtrap (Applied Biosystems/MDS Sciex), operado no modo negativo, utilizando os seguintes parâmetros da fonte: voltagem do íon-spray de -4500 V; cortina de gás de dessolvatação (Curtain Gas<sup>TM</sup>) a 10 psi; gás nebulizante (GS1) a 16 psi; gás secante (GS2) a 40 psi, e gás de colisão (CAD Gas<sup>TM</sup>) médio. Ar sintético foi utilizado como GS1 e GS2 e nitrogênio foi empregado como gás de colisão. A aquisição e tratamento de dados foram realizados através do software Analyst (versão 1.5.1; Applied Biosystems).

### 3.4 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

Cálculos computacionais foram realizados para modelar a reação de hidrólise do **DEDNPP**. Os cálculos foram realizados utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d) utilizando o programa Gaussian 09, implementado para sistema operacional Linux.<sup>44</sup> Avaliou-se a superfície de energia potencial a fim de localizar reagentes, estados de transição, intermediários e produtos, que foram identificados e caracterizados por cálculos de frequência a 1 atm a 25°C. Os caminhos reacionais foram confirmados através de cálculos de coordenada intrínseca de reação (IRC, do inglês, *Intrinsic Reaction Coordinate*). O ambiente aquoso foi considerado através dos modelos implícitos de solvatação PCM (do inglês, *Polarizable Continuum Model*) e SMD (do inglês, *Solvation Model Density*).<sup>45-47</sup> Moléculas de água discretas foram incluídas nos cálculos, a fim de avaliar as funções específicas de nucleófilo e catalisador ácido/básico geral, por exemplo. A distribuição de cargas ao longo da reação foi avaliada através de cálculos de cargas NBO e de Hirshfeld em cada estágio da reação.<sup>48-50</sup> A quebra e formação de

ligações foram avaliadas em termos de índices de ligação de Wiberg ( $B_i$ ), estimados a partir de análise de população natural (NPA)<sup>51-54</sup> e, ainda, quantificou-se o parâmetro de sincronicidade (Sy), proposto por Moyano *et al.*<sup>55</sup> e descrito pela **Equação 1**.

$$Sy = 1 - \left[ \sum_{i=1}^n |\delta B_i - \delta B_{av}| / \delta B_{av} \right] / 2n - 2 \quad (1)$$

onde  $n$  é o número de ligações diretamente envolvidas na formação do estado de transição da etapa determinante,  $\delta B_i$  corresponde à variação relativa de  $B_i$  para uma dada ligação ao longo da reação, e  $\delta B_{av}$  é a média de  $\delta B_i$ , conforme descrito pelas **Equações 2 e 3**. Os sobrescritos R, TS e P referem-se aos reagentes, estado de transição e produtos da determinantes, respectivamente.

$$\delta B_i = [B_i^{TS} - B_i^R] / [B_i^P - B_i^R] \quad (2)$$

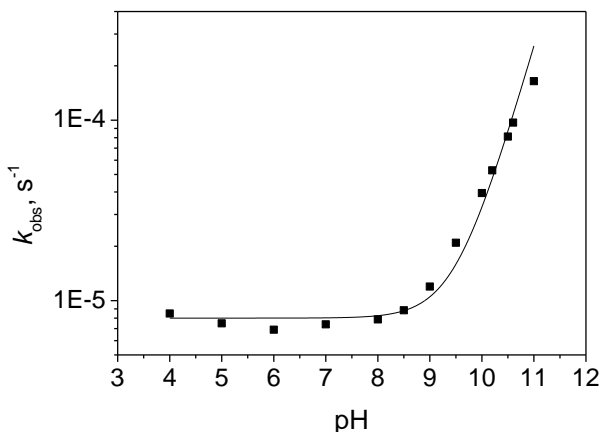
$$\delta B_{av} = 1/n \sum_{i=1}^n \delta B_i \quad (3)$$

A evolução da formação/quebra de uma dada ligação ao longo da coordenada de reação é explicitada em termos da porcentagem da variação relativa de  $B_i$ , ou seja, %Ev=  $\delta B_i \times 100$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RESULTADOS CINÉTICOS E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS

A hidrólise de **DEDNPP** foi acompanhada espectrofotometricamente, através da formação do produto 2,4-dinitrofenolato, e as constantes de velocidade observadas ( $k_{\text{obs}}$ ) foram calculadas pelo ajuste iterativo dos perfis de absorbância em função do tempo em 360 ou 400 nm, de acordo com uma cinética de primeira ordem. A hidrólise do **DEDNPP** foi acompanhada na faixa de pH 5-11, a 25°C, e a **Figura 7** apresenta os valores de  $k_{\text{obs}}$  em função do pH. Observa-se a presença de um patamar na região de pH neutro e levemente ácido, indicativa da reação do triéster com a água, e o aumento de  $k_{\text{obs}}$  em pHs alcalinos mostra a presença de catálise básica específica, isto é, a reação do triéster com o hidróxido. Ressalta-se que os valores de  $k_{\text{obs}}$  em pHs alcalinos foram corrigidos, subtraindo as contribuições da catálise por tampão exercida pelas espécies bicarbonato e carbonato de potássio (os dados completos são mostrados no Apêndice A). Os demais tampões utilizados não demonstraram efeito significativo sobre  $k_{\text{obs}}$ .



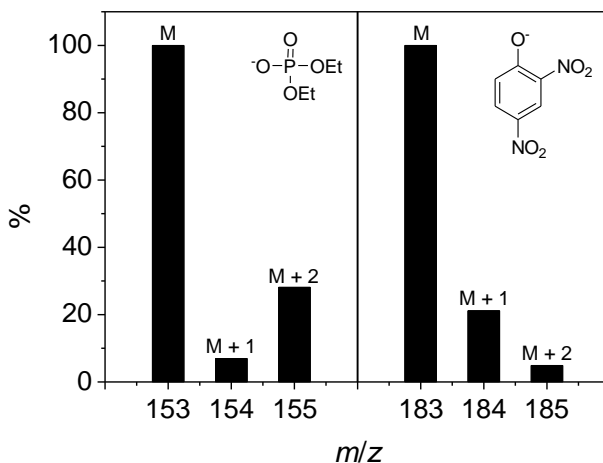
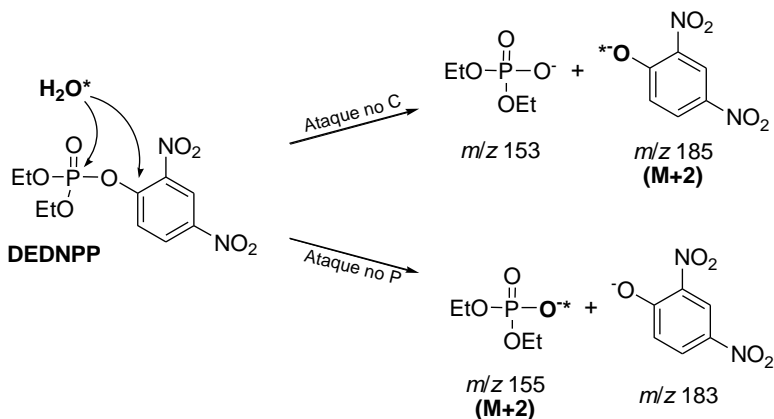
**Figura 7.** Perfil de pH da reação de hidrólise de **DEDNPP**, a 25°C e  $I=1M$  (KCl).

A linha sólida da **Figura 7** representa o ajuste não-linear segundo a **Equação 4**, que considera a reação do substrato com a água ( $k_0$ ) e com o íon hidróxido ( $k_{OH}$ ). O ajuste forneceu as constantes  $k_0 = 8,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  e  $k_{OH} = 0,25 \pm 0,02 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , o que indica que a hidrólise de **DEDNPP** tem um tempo de meia-vida de aproximadamente 24 horas. Tais dados são consistentes com resultados cinéticos preliminares para a hidrólise do substrato.<sup>35</sup>

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{OH}[\text{OH}^-] \quad (4)$$

Procedeu-se à caracterização detalhada dos produtos, a fim de avaliar se a liberação de 2,4-dinitrofenolato é proveniente do ataque nucleofílico da água no fósforo ou no carbono eletrofílico aromático. Tal procedimento é particularmente importante porque o ataque nucleofílico no anel aromático de **DEDNPP** já foi anteriormente constatado em reações com alfa-nucleófilos. A utilização de espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$ ) não se mostrou conveniente, porque ambos caminhos citados levam aos mesmos produtos. Por isso, a reação de hidrólise foi realizada em solvente aquoso com oxigênio isotopicamente marcado ( $\text{H}_2\text{O}^{18}$ ), já que a análise dos produtos da reação por espectrometria de massas permite verificar a que centro eletrofílico o oxigênio  $^{18}\text{O}$  é incorporado, **Figura 8(A)**. Utilizou-se a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS), em que espécies iônicas solvatadas são diretamente transferidas para a fase gasosa, de modo que o experimento fornece uma descrição instantânea da configuração iônica da solução. As espécies identificadas podem ser caracterizadas por ESI-MS/MS, na qual os íons detectados são submetidos à dissociação por colisão induzida (CID).

Assim, a hidrólise de **DEDNPP** foi realizada em meio aquoso com aproximadamente 22,2% (v:v) de água enriquecida com o isótopo  $^{18}\text{O}$ , em pH 5, e os produtos foram analisados por ESI-MS/(MS) no modo negativo após cinco tempos de meia-vida, a  $25^\circ\text{C}$ . A **Figura 8(B)** representa graficamente os picos normalizados que identificam a espécie aniônica do dietil fosfato ( $m/z$  153) e o 2,4-dinitrofenolato ( $m/z$  183), e as abundâncias relativas dos picos M+1 e M+2 de cada espécie. O painel à esquerda da **Figura 8(B)** mostra que o pico M+2 do ânion do dietil fosfato apresenta intensidade significativa (28,1%) em relação ao pico de  $m/z$  153, o que corresponde a um enriquecimento isotópico de 21,9%. Este valor é consistente com o ataque nucleofílico da água no átomo de fósforo e consequente incorporação do isótopo  $^{18}\text{O}$  no dietil fosfato.



**Figura 8.** (A) Principais possibilidades de caminhos reacionais na hidrólise de **DEDNPP** e incorporação esperada de  $^{18}\text{O}$  aos centros eletrofílicos em cada caso: fósforo e carbono aromático. (B) Representação gráfica dos picos normalizados correspondentes aos ânions do dietil fosfato e 2,4-dinitrofenol, e abundância relativa dos picos M+1 e M+2. Os dados foram obtidos do espectro de ESI(-)-MS dos produtos da hidrólise de **DEDNPP**, em pH 5, em presença de 22,2% (v:v) de água isotopicamente marcada ( $\text{H}_2\text{O}^{18}$ ).

Por sua vez, o painel à direita da **Figura 8(B)** mostra uma intensidade reduzida do pico M+2 em relação ao m/z 183. De fato, a intensidade relativa de tal pico não é significativamente diferente àquela

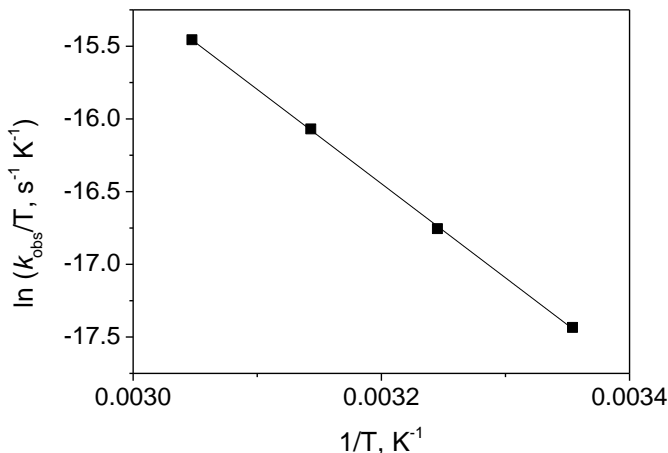
observada a partir do espectro de massas de uma solução de 2,4-dinitrofenol puro em água normal, nas mesmas condições experimentais da reação de hidrólise. Em outras palavras, a intensidade relativa do pico M+2 do 2,4-dinitrofenolato não é significativamente maior que o observado considerando a abundância isotópica natural, indicando uma contribuição negligenciável do mecanismo que procede via ataque da água no átomo de carbono aromático. Assim, os resultados mostram que **DEDNPP** é hidrolisado essencialmente via ataque da água no átomo de fósforo. Os espectros completos de ESI(-)-MS(/MS) dos produtos da reação e o espectro de ESI(-)-MS do 2,4-dinitrofenol em água normal são apresentados no Apêndice B.

Em resumo, os primeiros resultados cinéticos mostram que **DEDNPP** apresenta uma constante de hidrólise ( $k_0$ ) de  $8,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  de 24 horas), consistente com resultados preliminares da literatura, e a caracterização de produtos indica que a reação ocorre essencialmente via ataque nucleofílico da água no átomo de fósforo, havendo liberação de 2,4-dinitrofenolato.

## 4.2 EFEITO ISOTÓPICO E PARÂMETROS DE ATIVAÇÃO

A fim de detalhar o mecanismo de hidrólise do **DEDNPP**, avaliou-se o efeito da temperatura e o efeito isotópico cinético de solvente (SKIE), na região de patamar do perfil de pH (**Figura 7**). Assim, é possível obter informações acerca da estrutura do estado de transição da etapa determinante.

As reações de hidrólise foram acompanhadas em diferentes temperaturas (entre 25 e 55°C), e os valores de  $k_{\text{obs}}$  foram lançados em gráfico de acordo com a Equação de Eyring,<sup>8, 56</sup> **Figura 9** e **Equação 5**, respectivamente. Na **Figura 9**, obteve-se uma relação linear entre  $\ln(k_{\text{obs}}/T)$  e  $1/T$ , indicativa de um mecanismo constante na faixa de temperatura avaliada. Através do coeficiente angular obtido pelo ajuste linear da **Figura 9** e da **Equação 5**, obteve-se o valor de entalpia de ativação,  $\Delta H^\ddagger = 12,9 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ .



**Figura 9.** Gráfico de Eyring da hidrólise de **DEDNPP**, em pH 6,5, a 25°C e  $I=1M$  (KCl).

$$\ln\left(\frac{k_{\text{obs}}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (5)$$

onde  $k_B$  é a constant de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $h$ , a constant de Planck ( $6,63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ), e  $R$ , a constante dos gases ( $8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ).

O valor da energia livre de Gibbs de ativação foi calculado através da **Equação 6** a partir do valor de  $k_0$ , a 25°C, e obteve-se  $\Delta G^\ddagger = 24,4 \text{ kcal/mol}$ . Uma vez conhecidos entalpia e energia livre de Gibbs de ativação, a **Equação 7** permite obter a entropia de ativação, e obteve-se  $\Delta S^\ddagger = -38,7 \pm 0,4 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  para a hidrólise de **DEDNPP**.

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln\left(\frac{k_{\text{obs}} h}{k_B T}\right) \quad (6)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (7)$$

onde os termos possuem os mesmos significados da **Equação 5**.

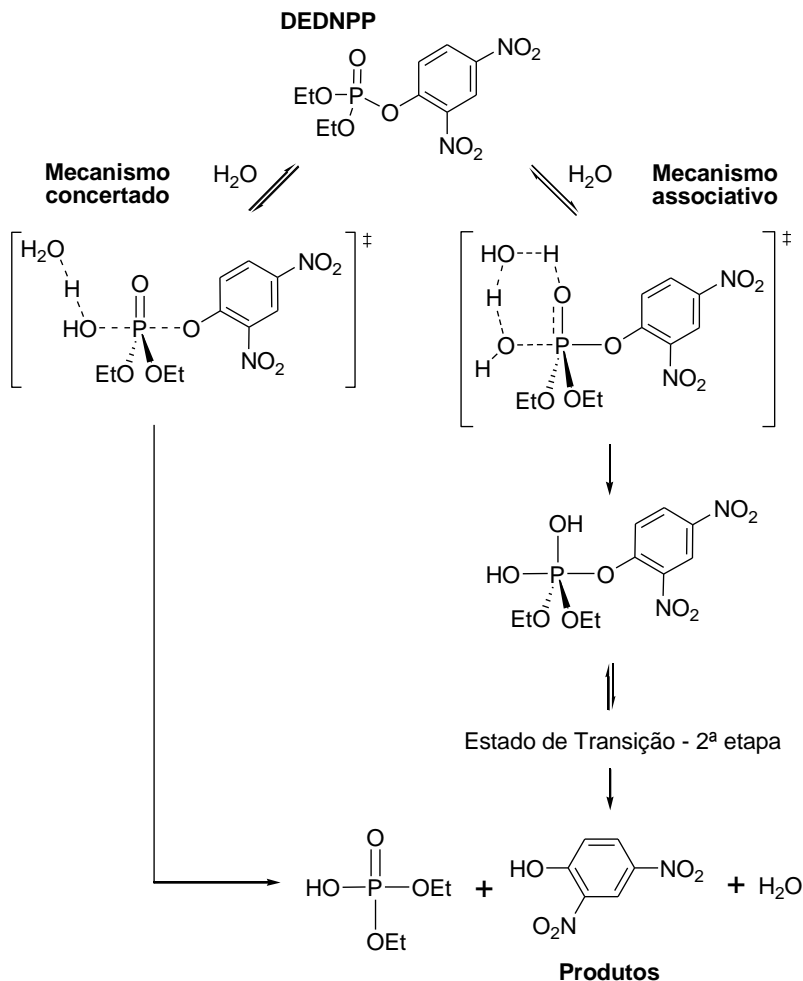
O valor de entropia de ativação é bastante elevado e negativo, o que indica a formação de um estado de transição com menores graus de liberdade em comparação com os reagentes.<sup>8</sup> Tais situações são comumente verificadas em reações bimoleculares com mecanismos

associativos ou concertados de caráter associativo.<sup>56</sup> Considerações acerca da entalpia de ativação são mais complexas, já que refletem custos energéticos de rompimento e formação de ligações de naturezas diferentes. Todavia, o valor de  $\Delta H^\ddagger$  é de magnitude próxima à de reações cujos mecanismos têm sido propostos como associativos ou concertados,<sup>13, 35, 39</sup> em que a energia necessária para rompimento de ligação é parcialmente compensada pela energia liberada na formação de novas ligações.<sup>56</sup> De fato, reações que procedem via mecanismos com etapa determinante dissociativa mostram valores de entalpia de ativação consideravelmente maiores. Além disso, propõe-se a formação de um estado de transição hidratado, onde as interações favoráveis com o solvente podem contribuir para a diminuição da entalpia de ativação. Assim, no diagrama de More O'Ferrall-Jencks (**Figura 1**), o mecanismo de hidrólise de **DEDNPP** deve estar entre os caminhos (i) e (iii).

Por fim, a hidrólise de **DEDNPP** foi acompanhada em meio aquoso deuterado ( $D_2O$ ) em pD 7, para a obtenção do efeito isotópico cinético de solvente (SKIE), que corresponde à razão entre as constantes de velocidade em meios de  $H_2O$  e  $D_2O$  ( $k_{H_2O}/k_{D_2O}$ ). Obteve-se um SKIE de  $2,68 \pm 0,17$ , o que indica a presença de transferência de próton na etapa determinante da velocidade de reação, sugerindo a participação de pelo menos uma segunda molécula de água que atua como catalisador básico geral,<sup>8, 56</sup> assistindo ao ataque nucleofílico da primeira molécula de água.

Assim, baseados nos parâmetros de ativação e no valor de SKIE, dois mecanismos podem ser delineados para a hidrólise de **DEDNPP**, **Esquema 14**: (i) mecanismo clássico  $S_N2(P)$  concertado, onde o ataque nucleofílico e a eliminação do grupo de saída ocorrem simultaneamente, e há catálise básica geral exercida por uma segunda molécula de água; (ii) mecanismo associativo em duas etapas, tal proposto recentemente para uma série de triésteres de fosfato,<sup>17</sup> em que ocorre o ataque da água assistido por catálise básica geral em uma primeira etapa, determinante da velocidade de reação, seguida pela quebra do intermediário fosforano.





Esquema 14

### 4.3 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

Conforme apresentado na seção anterior, os resultados cinéticos sugerem que a hidrólise do **DEDNPP** envolve catálise básica geral da água, e deve proceder por um mecanismo concertado ou por um caminho associativo em duas etapas. A fim de detalhar o mecanismo da reação, foram realizados cálculos teóricos ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d). A superfície de energia potencial foi investigada a fim de

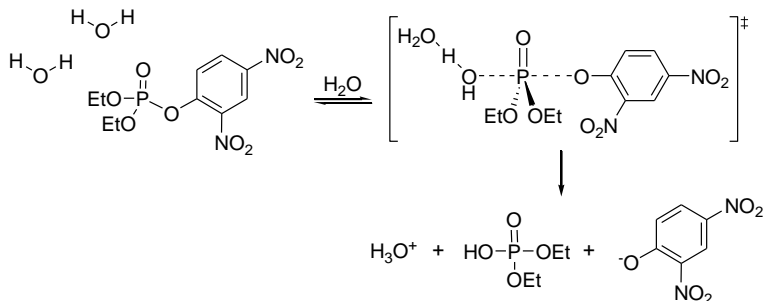
localizar pontos que caracterizam reagentes, estados de transição, intermediários e produtos, e os caminhos reacionais foram confirmados através de cálculos de coordenada intrínseca de reação. O ambiente aquoso foi considerado através dos modelos implícitos de solvatação PCM e SMD, e moléculas de água discretas foram incluídas como reagentes para avaliar as funções específicas de nucleófilo e base-geral, por exemplo. A plausibilidade dos mecanismos testados foi avaliada comparando-se os valores teóricos de energia livre de Gibbs de ativação ao valor experimental (**Tabela 1**).

Os primeiros cálculos realizados consideraram a reação entre **DEDNPP** e somente uma molécula de água (como nucleófilo) em um mecanismo  $S_N2(P)$  clássico, e obteve-se o valor teórico de  $\Delta G^\ddagger = 29,9$  kcal/mol. Sequencialmente, considerou-se uma segunda molécula de água como catalisador básico geral, e o valor teórico obtido de  $\Delta G^\ddagger$  é 24,2 kcal/mol, em boa concordância com o valor experimental de 24,4 kcal/mol. Assim, os resultados sugerem que duas moléculas de água com papéis bem definidos são suficientes para promover a desfosforilação de **DEDNPP** através de um mecanismo  $S_N2(P)$ , **Esquema 15**. Cálculos adicionais testaram ainda a estabilização do estado de transição por uma terceira molécula de água através de ligação de hidrogênio intermolecular ao oxigênio fosforílico, mas nenhuma estabilização adicional foi observada (**Tabela 1**). Ressalta-se que as tentativas de modelar um mecanismo associativo em duas etapas não foram bem sucedidas, e convergiram em estados de transição típicos de reações  $S_N2$ .

**Tabela 1.** Valores teóricos de energia livre de Gibbs de ativação para hidrólise de **DEDNPP** em função do número de moléculas de água, calculados ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d).

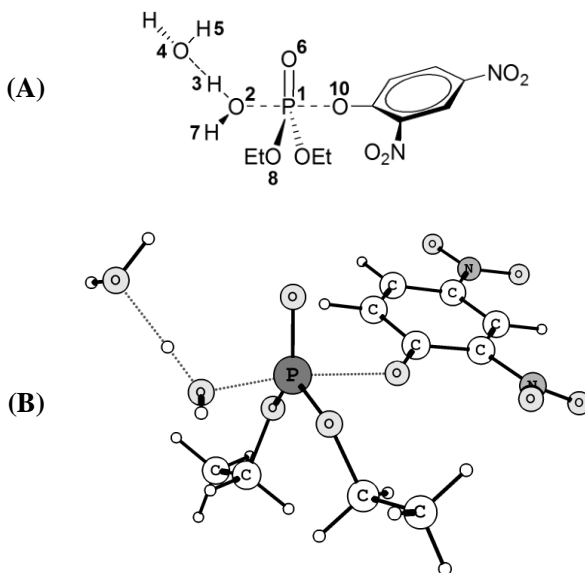
	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
1 H <sub>2</sub> O	29,9
2 H <sub>2</sub> O	24,2
3 H <sub>2</sub> O	24,2
Experimental <sup>a</sup>	24,4

<sup>a</sup> Valor experimental calculado a partir do valor de  $k_0$ , a 25°C ( $k_0=8,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ).

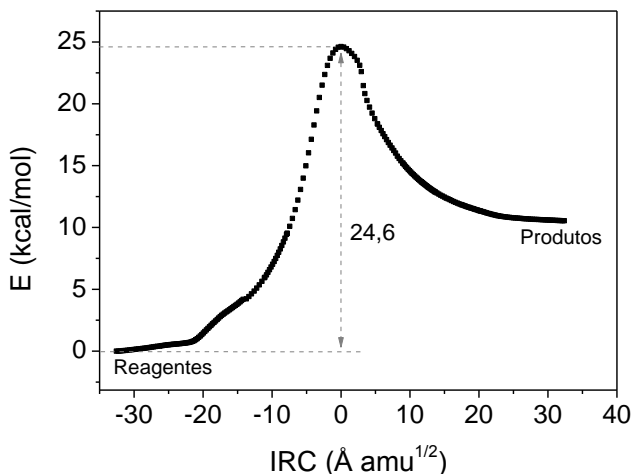


Esquema 15

O mecanismo com duas moléculas de água foi investigado em detalhes. A **Figura 10(A)** apresenta o estado de transição para esse mecanismo e a numeração atômica que será utilizada na discussão, e a **Figura 10(B)** mostra a estrutura otimizada. O mecanismo concertado é corroborado por cálculos de IRC, **Figura 11**, que mostram que o estado de transição se conecta aos reagentes e produtos em uma única etapa. As coordenadas cartesianas das estruturas otimizadas de reagentes, estado de transição e produtos são apresentadas no Apêndice C.



**Figura 10.** (A) Estado de transição para a hidrólise de **DEDNPP** com duas moléculas de água discretas, acompanhada da numeração atômica, e (B) respectiva estrutura otimizada.



**Figura 11.** Coordenada de reação intrínseca (IRC) para a hidrólise de **DEDNPP** com duas moléculas de água.

A **Tabela 2** apresenta os principais parâmetros geométricos dos reagentes, estado de transição e produtos para o mecanismo com duas moléculas de água. Os dados mostram a formação da ligação P<sub>1</sub>-O<sub>2</sub>, que avança de 1,87 Å no estado de transição para 1,63 Å no produto dietil fosfato, e a quebra da ligação P<sub>1</sub>-O<sub>10</sub>, que alonga de 1,64 Å no triéster para 2,22 Å no estado de transição. O ângulo O<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-O<sub>10</sub> de 170,74° no estado de transição está de acordo com o esperado para um mecanismo S<sub>N</sub>2(P). Observa-se também a transferência de próton de O<sub>2</sub> para O<sub>4</sub>, que evidencia a catálise básica geral. Ainda que a ligação O<sub>2</sub>-H<sub>3</sub> não apresente grande evolução para formação do estado de transição, em comparação com o comprimento da ligação nos reagentes, observa-se que a tal ligação avança para 1,60 Å nos produtos, valor plausível para uma ligação de hidrogênio intermolecular entre um íon hidrônio e um substituinte hidróxido. Além disso, observa-se que o comprimento de ligação H<sub>3</sub>-O<sub>4</sub> diminui de 1,85 Å nos reagentes (valor característico de ligação intermolecular de hidrogênio entre duas moléculas de água) para 1,02 Å nos produtos, valor esperado para ligação O-H no íon hidrônio. O comprimento de ligação P<sub>1</sub>-O<sub>6</sub> não apresenta variação significativa ao longo da coordenada de reação, assim como os comprimentos das ligações nos substituintes espectadores alquílicos e no anel aromático do grupo de saída.

**Tabela 2.** Parâmetros estruturais para reagentes (R), estado de transição (TS) e produtos (P) na hidrólise de **DEDNPP**, calculados ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d).

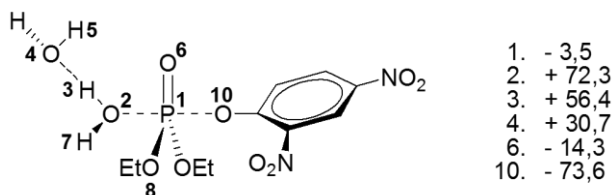
<b>Distâncias interatômicas (Å)</b>					
	P <sub>1</sub> -O <sub>6</sub>	P <sub>1</sub> -O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> -H <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> -O <sub>4</sub>	P <sub>1</sub> -O <sub>10</sub>
<b>R</b>	1,49	4,01	0,99	1,85	1,64
<b>TS</b>	1,49	1,87	1,04	1,54	2,22
<b>P</b>	1,49	1,63	1,60	1,02	4,42
<b>Ângulos diedrais em TS (graus)</b>					
P <sub>1</sub> -O <sub>2</sub> -H <sub>3</sub> -O <sub>4</sub>		O <sub>2</sub> -H <sub>3</sub> -O <sub>4</sub> -H <sub>5</sub>		H <sub>3</sub> -O <sub>4</sub> -H <sub>5</sub> -O <sub>6</sub>	
-162,89		144,71		7,01	
O <sub>4</sub> -H <sub>5</sub> -O <sub>6</sub> -P <sub>1</sub>		H <sub>5</sub> -O <sub>6</sub> -P <sub>1</sub> -O <sub>2</sub>		O <sub>6</sub> -P <sub>1</sub> -O <sub>2</sub> -H <sub>3</sub>	
2,09		-12,53		17,49	
<b>Ângulo O<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-O<sub>10</sub> em TS (graus)</b>					
170,74					
<b>Frequência imaginária (cm<sup>-1</sup>)</b>					
163,54i					

A distribuição das cargas atômicas ao longo da reação foi avaliada através dos cálculos de cargas NBO e Hirshfeld, que são apresentados na **Tabela 3** para os três estágios: reagentes, estado de transição e produtos. Os cálculos de NBO mostram que o fósforo possui uma carga positiva que é reduzida em aproximadamente 2% para formação do estado de transição, e que o oxigênio nucleofílico O<sub>2</sub> apresenta uma carga negativa reduzida em quase 9,5% para formação do estado de transição. Observa-se ainda um decréscimo aproximado de 4,3% da carga negativa do oxigênio O<sub>4</sub> da base-geral, acompanhado do aumento gradual da densidade de carga positiva do próton H<sub>3</sub> ao longo da coordenada de reação, comportamento esperado para formação do hidrônio. No entanto, as mudanças de carga em O<sub>6</sub> e O<sub>10</sub> não são bem descritas pelos cálculos de NBO, já que o caráter negativo desses átomos deve crescer ao longo da reação, em especial no oxigênio aniônico O<sub>10</sub> do grupo de saída 2,4-dinitrofenolato. De fato, tal comportamento é observado nos cálculos de cargas de Hirshfeld, que descrevem de forma mais acurada as mudanças de carga em reações de transferência do grupo fosforila.<sup>17</sup> Nesse sentido, considerando as cargas de Hirshfeld (**Tabela 3**), a carga positiva do fósforo decresce em aproximadamente 3,5% para formação do estado de transição, ao passo que a carga negativa de O<sub>2</sub> diminui cerca de 72%. Significativamente, a carga negativa do oxigênio básico geral O<sub>4</sub> diminui em torno de 30,7%

no estado de transição, comparado aos reagentes, e a carga positiva de  $H_3$  cresce correspondentemente, em pouco mais de 56%. Por fim, conforme mencionado anteriormente, espera-se que as cargas negativas de  $O_6$  e  $O_{10}$  aumentem ao longo da reação e as cargas de Hirshfeld descrevem tal comportamento: as cargas de  $O_6$  e  $O_{10}$  crescem cerca de 14% e 73%, respectivamente, para formação do estado de transição. As mudanças percentuais das cargas de Hirshfeld no estado de transição, comparadas aos reagentes, estão resumidas na **Figura 12** para os átomos diretamente envolvidos na reação.

**Tabela 3.** Cargas NBO e Hirshfeld para reagentes (R), estado de transição (TS) e produtos (P) para hidrólise de **DEDNPP**, calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d).

	$P_1$	$O_6$	$O_2$	$H_3$	$O_4$	$O_{10}$
<b>Cargas NBO</b>						
<b>R</b>	2,676	-1,145	-1,087	0,522	-1,059	-0,789
<b>TS</b>	2,619	-1,136	-0,985	0,575	-1,013	-0,713
<b>P</b>	2,656	-1,158	-1,069	0,593	-0,874	-0,727
<b>Cargas Hirshfeld</b>						
<b>R</b>	0,626	-0,405	-0,412	0,101	-0,306	-0,155
<b>TS</b>	0,604	-0,463	-0,114	0,158	-0,212	-0,269
<b>P</b>	0,602	-0,493	-0,170	0,201	0,008	-0,419



**Figura 12.** Alterações percentuais nas cargas de Hirshfeld no estado de transição, em relação aos reagentes, na hidrólise de **DEDNPP** com duas moléculas de água, para os átomos diretamente envolvidos na reação.

Cálculos de ordem de ligação foram realizados, a fim de obter índices de ligação de Wiberg ( $B_i$ ). A **Tabela 4** apresenta os dados para as ligações formadas e quebradas na hidrólise do **DEDNPP**, bem como as evoluções das ordens de ligação, calculadas como porcentagens da variação relativa de  $B_i$ . Os dados da evolução de ordem de ligação mostram que a quebra da ligação  $P_1-O_{10}$  é a mais avançada na coordenada de reação (%Ev = 65,9), seguida da formação da ligação  $P_1-$

O<sub>2</sub> (%Ev = 59,6). Interessantemente, as ligações relacionadas à transferência de próton (O<sub>2</sub>-H<sub>3</sub> and H<sub>3</sub>-O<sub>4</sub>) apresentam as menores evoluções, sendo ambas %Ev menores que 30%. Consequentemente, a evolução média nas ordens de ligação é de 43,4%, indicativa de um estado de transição estruturalmente análogo aos reagentes, apesar da contribuição significativa da eliminação do grupo de saída. Assim, acompanhado dos dados de distribuição de cargas (acima), os dados sugerem que a maior contribuição da catálise básica geral na reação refere-se à estabilização da carga em desenvolvimento no estado de transição, em detrimento da promoção do ataque nucleofílico. De fato, a boa habilidade do 2,4-dinitrofenol como grupo de saída (em termos de pK<sub>a</sub>) torna **DEDNPP** ativado frente à reações de substituição nucleofílica, aumentando a eletrofilicidade do fósforo e facilitando o deslocamento do grupo de saída quando da aproximação de nucleófilos. Por fim, baseado nos dados de ordem de ligação, calculou-se o parâmetro de sincronicidade (Sy), que varia entre zero e a unidade, referindo-se a processos assíncrono no primeiro caso, e a processos concertados síncronos no segundo. Na hidrólise do **DEDNPP** com duas moléculas de água, obteve-se Sy = 0,703 (**Tabela 4**), indicativo de mecanismo síncrono com modesto caráter assíncrono.

**Tabela 4.** Índices de ligação de Wiberg ( $B_i$ ) para reagentes (R), estado de transição (TS) e produtos (P) na hidrólise de **DEDNPP**, ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d).

	P <sub>1</sub> -O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> -H <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> -O <sub>4</sub>	P <sub>1</sub> -O <sub>10</sub>
$B_i^R$	0,0013	0,6723	0,0563	0,6161
$B_i^{TS}$	0,3999	0,5108	0,1533	0,2104
$B_i^P$	0,6697	0,1015	0,5440	0,0007
%Ev	59,6	28,3	19,9	65,9
% $\delta B_{av}$	43,4			
Sy	0,703			

Os resultados podem ser comparados com o mecanismo de hidrólise previamente reportado para uma série de triésteres de fosfato, em particular o dimetil 4-nitrofenol (**DMPNPP**),<sup>17</sup> conforme descrito na seção 1.3. Cálculos teóricos mostraram que **DMPNPP** é hidrolisado por um mecanismo em duas etapas na presença de três moléculas de água com funções bem definidas. Além das moléculas de água que atuam como nucleófilo e base-geral, o mecanismo considera uma terceira

molécula de água que estabiliza o estado de transição da etapa determinante através de uma ligação de hidrogênio intermolecular com o oxigênio fosforílico. Ainda que os substituintes espectadores  $-\text{OCH}_3$  e  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$  exerçam efeitos estereoeletrônicos ligeiramente diferentes, a maior diferença entre **DMPNPP** e **DEDNPP** é certamente o grupo de saída, muito melhor no caso do **DEDNPP** ( $\text{p}K_a$ 's do 4-nitrofenol e 2,4-dinitrofenol são 7,14 e 4,07, respectivamente). Nesse sentido, observa-se que os substratos, estruturalmente análogos, são hidrolisados por mecanismos distintos, de acordo com a habilidade do grupo de saída. Em outras palavras, melhores grupos de saída podem eventualmente ser responsáveis por diminuir o número de etapas necessárias para a hidrólise de triésteres de fosfato, alternando o mecanismo de associativo para concertado. Ainda, ressalta-se que o número de moléculas de água diminui para **DEDNPP**, em relação ao **DMPNPP**, já que não existe a formação de um intermediário pentacoordenado e, portanto, o oxigênio fosforílico não demanda fonte adicional para estabilização de carga negativa em desenvolvimento. Ressalta-se, no entanto, que a postulação de uma alternância de mecanismos em reações de hidrólise exige um estudo detalhado e comparativo de uma série de triésteres com grupos espectadores iguais, o que está além do escopo deste trabalho.

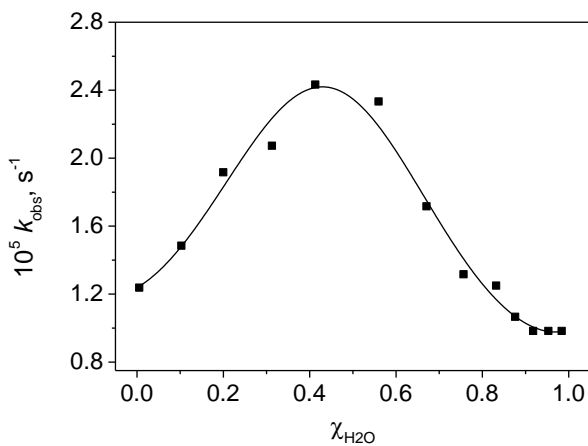
#### 4.4 EFEITO DE SOLVENTE

A avaliação de diferentes meios reacionais sobre as constantes de velocidade é uma estratégia recorrente para o estudo mecanístico de reações em solução.<sup>8, 42, 57</sup> Por exemplo, diversas reações de hidrólise de derivados de ácidos carboxílicos foram estudadas em misturas binárias de água e solventes orgânicos apróticos a fim de investigar a dependência da constante de velocidade em função da quantidade de água no meio reacional, o que consiste em uma evidência experimental indireta do número de moléculas de água envolvidas na formação do estado de transição.<sup>58</sup> Solventes orgânicos apróticos são comumente utilizados como alternativa para disponibilização de uma fração do meio reacional inerte, mas capaz de alterar decisivamente as constantes de velocidade como consequência de efeitos de solvatação e alteração de equilíbrios.<sup>42, 59</sup>

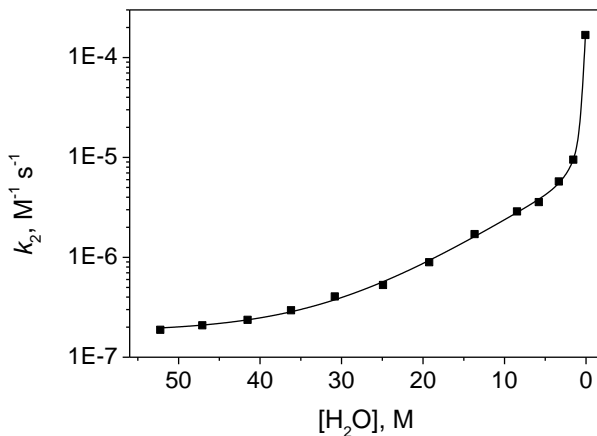
Nesse sentido, a reação de hidrólise de **DEDNPP** foi acompanhada em misturas binárias de água e DMSO, solvente orgânico aprótico e forte acceptor de ligações intermoleculares de hidrogênio. As reações foram acompanhadas por espectrofotometria de UV-Vis, e a



**Figura 13(A)** apresenta os valores de  $k_{\text{obs}}$  obtidos para diferentes misturas, a 25°C.



(A)



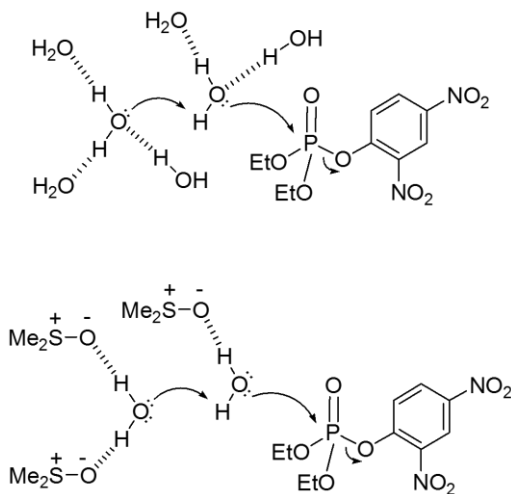
(B)

**Figura 13.** (A) Valores de  $k_{\text{obs}}$  em função da  $\chi_{\text{H}_2\text{O}}$  para as reações de hidrólise de **DEDNPP** em misturas binárias  $\text{H}_2\text{O}$ -DMSO, a 25°C, e (B) dados expressos como constantes de segunda ordem (i.e.,  $k_{\text{obs}}/[\text{H}_2\text{O}]$ ) em função da concentração de água. Por motivos didáticos, o eixo x é expresso em ordem decrescente. Em ambos os gráficos, as linhas não representam ajustes teóricos.

Na **Figura 13(A)**, a proporção entre os solventes está expressa em termos de fração molar. Com o aumento gradual da fração de DMSO, isto é, com a diminuição da  $\chi_{\text{H}_2\text{O}}$ , observa-se que os valores de  $k_{\text{obs}}$  crescem até um máximo em aproximadamente 0,4 de  $\chi_{\text{H}_2\text{O}}$ , a partir de quando os valores de  $k_{\text{obs}}$  decrescem. O aumento das constantes de velocidade que acompanha a diminuição da concentração do nucleófilo mostra um efeito substancial exercido pelo DMSO na hidrólise de **DEDNPP**, devendo alterar a solvatação dos reagentes e estado de transição de tal forma que a barreira de ativação nos meios com maior caráter orgânico seja menor que em meio aquoso puro. Em meio estritamente aquoso, uma molécula de água organiza-se estruturalmente de modo que exerce quatro ligações intermoleculares de hidrogênio, duas doadoras e duasceptoras. Em presença de DMSO, é possível que as ligações de hidrogênio doadoras de uma molécula de água ocorram com o solvente orgânico, mas as ligaçõesceptoras não podem ser substituídas, uma vez que DMSO não é doador de ligações de hidrogênio. De fato, DMSO tem uma capacidade reduzida de estabilizar pares de elétrons isolados (de moléculas neutras e aniônicas), o que altera decisivamente o equilíbrio de auto-protólise da água e diminui drasticamente a constante de equilíbrio ( $\text{p}K_{\text{w}}$  alcança valores maiores que 20).<sup>60</sup> Nesse sentido, à medida que a quantidade de DMSO aumenta nas misturas binárias, as quatro ligações de hidrogênio de uma molécula de água são gradualmente substituídas por somente duas ligações de hidrogênio com o solvente orgânico e, cineticamente, esse panorama implica uma maior disponibilidade dos pares de elétrons da água para o ataque nucleofílico. Assim, a presença de DMSO favorece a hidrólise de **DEDNPP** na medida em que aumenta expressivamente a basicidade da água nas misturas binárias. O **Esquema 16** ilustra a transição das interações intermoleculares em um meio estritamente aquoso para um meio de DMSO aquoso e as implicações na hidrólise de **DEDNPP**.

Naturalmente, apesar do efeito positivo de DMSO sobre a reação, a diminuição de  $k_{\text{obs}}$  para  $\chi_{\text{H}_2\text{O}} < 0,4$  na **Figura 13(A)** ocorre devido à redução da concentração do nucleófilo. Ainda assim, nota-se que os valores de  $k_{\text{obs}}$  permanecem maiores que os valores em elevadas frações de água, o que é coerente com o aumento gradual dos valores de  $\text{p}K_{\text{w}}$  em função do aumento da fração molar de DMSO, chegando a 20,54 para  $\chi_{\text{DMSO}} = 0,8$ , por exemplo (a 25°C).<sup>60</sup> Assim, o aumento expressivo da basicidade da água parece compensar a diminuição da concentração de água, tornando o decréscimo de  $k_{\text{obs}}$  mais suave do que o esperado. O aumento do poder nucleofílico da água é didaticamente visualizado quando são lançados em gráfico os valores das constantes de

segunda-ordem em função da concentração de água, **Figura 13(B)**. Nesse caso, observa-se que as constantes de velocidade crescem gradualmente com a concentração de DMSO: os maiores incrementos de velocidade são verificados em misturas de caráter fortemente orgânico e chegam a cerca de 900 vezes. Ainda, os dados da **Figura 13(B)** mostram indiretamente que o aumento de  $k_2$  em função da concentração de DMSO não é linear, o que implica o envolvimento de múltiplas moléculas de DMSO na substituição das ligações de hidrogênio entre moléculas de água, conforme delineado no **Esquema 16**. No entanto, o tratamento quantitativo dos gráficos da **Figura 13** é dificultado, já que as constantes de equilíbrio de auto-protólise e a atividade da água diferem significativamente entre os pontos experimentais. Ainda, a habilidade do grupo de saída também varia entre os pontos experimentais, já que a ionização do 2,4-dinitrofenol também é influenciada pelo caráter orgânico do meio, embora a alteração do  $pK_a$  do 2,4-dinitrofenol seja notavelmente menor que a variação do  $pK_w$  da água (por exemplo,  $pK_a$  aumenta em  $\sim 0,6$  unidades quando  $\chi_{\text{DMSO}} = 0,73$ , a  $25^\circ\text{C}$ ),<sup>61</sup> configurando a solvatação dos reagentes e estado de transição e o aumento da basicidade da água como fatores majoritários para explicar o aumento observado da reatividade.



**Esquema 16**

Em resumo, observa-se que o meio orgânico exerce efeito significativo sobre a constante de hidrólise de **DEDNPP**. A presença de uma espécie inerte capaz de influenciar a reatividade de um nucleófilo esclarece a importância do meio reacional e certamente constitui um aspecto relevante para o planejamento de sistemas artificiais que mimetizam reações biológicas fundamentais. Assim, considerando a importância da estrutura do substrato frente a uma reação de hidrólise, os resultados são importantes porque ajudam a compreender a reatividade de **DEDNPP**. Ainda, fornecem meios para uma compreensão aprofundada de reações modelo já investigadas, bem como para o futuro desenvolvimento de sistemas mais eficientes e com mecanismos de atuação melhor projetados.

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudou-se a cinética e o mecanismo de hidrólise do triéster de fosfato **DEDNPP**. Os resultados mostram que:

- I. **DEDNPP** possui uma constante de velocidade para reação de hidrólise ( $k_0$ ) de  $8,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , consistente com dados preliminares da literatura, o que corresponde a um tempo de meia-vida de 24 horas;
- II. a reação ocorre essencialmente via ataque da água no fósforo, com quebra da ligação P–O e substituição do 2,4-dinitrofenolato;
- III. a reação conta com a assistência de uma molécula de água como catalisador básico geral, consistente com dados de efeito isotópico de solvente e parâmetros de ativação;
- IV. a reação procede por um mecanismo clássico do tipo  $S_N2(P)$ , onde o ataque nucleofílico é concomitante à eliminação do grupo de saída, conforme demonstrado por cálculos computacionais, que mostram ainda que duas moléculas de água com funções bem definidas, i.e., nucleófilo e catalisador básico geral, são suficientes para promover a desfosforilação de **DEDNPP**;
- V. a hidrólise de **DEDNPP** é favorecida em presença de DMSO, havendo aumento gradual das constantes de segunda-ordem de hidrólise em função da concentração do solvente orgânico, consistente com o respectivo aumento da basicidade da água.

Assim, este trabalho apresenta uma descrição detalhada do mecanismo de hidrólise de um triéster de fosfato e mostra ainda a influência significativa exercida por meios de caráter orgânico sobre as constantes de velocidade. Considerando o **DEDNPP** como substrato para avaliação do potencial catalítico de diversos nucleófilos em reações de desfosforilação, é fundamental conhecer os mecanismos das reações envolvidas. Esse tipo de conhecimento permite o planejamento de sistemas mais eficientes, que combinem reações nucleofílicas e meios de caráter orgânico e hidrofóbico.



## REFERÊNCIAS

1. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. W. H. Freeman, 2004.
2. WESTHEIMER, F. H. Why Nature Chose Phosphates. **Science**, v. 235, p. 1173, 1987.
3. MACHADO, V. G.; NOME, F. Energy-rich phosphate compounds. **Quimica Nova**, v. 22, p. 351, 1999.
4. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. The chemistry of phosphate esters. **Quimica Nova**, v. 26, p. 745, 2003.
5. KIRBY, A.; HOLLFELDER, F. **From Enzyme Models to Model Enzymes**. 1st ed. Royal Society of Chemistry, 2009.
6. MASKILL, H. **Mechanisms of Organic Reactions**. Oxford University Press, 1996. (Oxford Chemistry Primers).
7. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. 1st ed. Oxford University Press, 2001.
8. ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern Physical Organic Chemistry**. University Science Books, 2005.
9. KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. Reactivity of Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, p. 415, 1967.
10. KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. Reactivity of Phosphate Esters - Reactions of Monoesters with Nucleophiles. Nucleophilicity Independent of Basicity in a Bimolecular Substitution Reaction. **Journal of the Chemical Society B-Physical Organic**, p. 135, 1968.
11. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. Reactivity of Phosphate Esters - Diester Hydrolysis. **Journal of the Chemical Society B-Physical Organic**, p. 510, 1970.

12. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. Reactivity of Phosphate Esters - Reactions of Diesters with Nucleophiles. **Journal of the Chemical Society B-Physical Organic**, p. 1165, 1970.
13. KHAN, S. A.; KIRBY, A. J. Reactivity of Phosphate Esters - Multiple Structure Reactivity Correlations for Reactions of Triesters with Nucleophiles. **Journal of the Chemical Society B-Physical Organic**, p. 1172, 1970.
14. KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; BRANDAO, T. A. S.; NOME, F. Activating Water: Efficient Intramolecular General Base Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Triester. **Chemistry-A European Journal**, v. 15, p. 8475, 2009.
15. KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; WANDERLIND, E. H.; AMER, A.; WILLIAMS, N. H.; NOME, F. Activating Water: Important Effects of Non-leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **Chemistry-A European Journal**, v. 17, p. 14996, 2011.
16. KIRBY, A. J.; MORA, J. R.; NOME, F. New light on phosphate transfer from triesters. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1834, p. 454, 2013.
17. MORA, J. R.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Theoretical Study of the Importance of the Spectator Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 7061, 2012.
18. BRESLOW, R. What will physical organic chemistry achieve in the 21st century? **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 223, 1997.
19. TARRAT, N. Alkaline hydrolysis of phosphate triesters in solution: Stepwise or concerted? A theoretical study. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, v. 941, p. 56, 2010.
20. WILLIAMS, N. H.; TAKASAKI, B.; WALL, M.; CHIN, J. Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. **Accounts of Chemical Research**, v. 32, p. 485, 1999.



21. CLELAND, W. W.; HENGGE, A. C. Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 3252, 2006.
22. LASSILA, J. K.; ZALATAN, J. G.; HERSCHLAG, D. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 669, 2011.
23. MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P. Progress in artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v. 48, p. 5545, 2012.
24. DE SOUZA, B.; KREFT, G. L.; BORTOLOTTI, T.; TERENCEZI, H.; BORTOLUZZI, A. J.; CASTELLANO, E. E.; PERALTA, R. A.; DOMINGOS, J. B.; NEVES, A. Second-Coordination-Sphere Effects Increase the Catalytic Efficiency of an Extended Model for  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$  Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 52, p. 3594, 2013.
25. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reactions of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydroxylamine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, p. 7051, 2003.
26. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDAO, 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. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 6024, 2004.
27. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDAO, T. A. S.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reaction of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydrazine and hydrogen peroxide. Comparison of *O*- and *N*-phosphorylation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 7898, 2004.
28. KIRBY, A. J.; SOUZA, B. S.; MEDEIROS, M.; PRIEBE, J. P.; MANFREDI, A. M.; NOME, F. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Chemical evidence from its reaction with a phosphate triester. **Chemical Communications**, p. 4428, 2008.
29. MEDEIROS, M. **Estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e um triéster de fosfato: caracterização de produtos e**

**intermediários** (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

30. 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.
31. 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. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 5011, 2009.
32. SILVA, M.; MELLO, R. S.; FARRUKH, M. A.; VENTURINI, J.; BUNTON, C. A.; MILAGRE, H. M. S.; EBERLIN, M. N.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. The Mechanism of Dephosphorylation of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate in Mixed Micelles of Cationic Surfactants and Lauryl Hydroxamic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 8254, 2009.
33. MELLO, R. S.; ORTH, E. S.; LOH, W.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Polymers Containing Hydroxamate Groups: Nanoreactors for Hydrolysis of Phosphoryl Esters. **Langmuir**, v. 27, p. 15112, 2011.
34. ORTH, E. S.; MEDEIROS, M.; BORTOLOTTI, T.; TERENCEZI, H.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Dephosphorylation Reactions with Deferoxamine, A Potential Chemical Nuclease. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 10345, 2011.
35. ORTH, E. S.; WANDERLIND, E. H.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 8003, 2011.
36. ORTH, E. S. **Reações nucleofílicas de desfosforilação com imidazol e hidroxamato: modelagem em sistemas intra- e intermolecular, polimérico e micelar** (Tese). Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

37. MANFREDI, A. M. **Reações de transferência do grupo fosforila catalisadas por oximas e íons  $\text{Cu}^{2+}$  em meio micelar** (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
38. MEDEIROS, M. **Efeito de grupos espectadores na hidrólise de diésteres fosfóricos. Estudos da hidrólise do bis-2-piridil fosfato e das reações do fármaco deferoxamina com mono- e triéster de fosfato** (Tese). Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.
39. MEDEIROS, M.; ORTH, E. S.; MANFREDI, A. M.; PAVEZ, P.; MICKE, G. A.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Dephosphorylation Reactions of Mono-, Di-, and Triesters of 2,4-Dinitrophenyl Phosphate with Deferoxamine and Benzohydroxamic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 10907, 2012.
40. MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of Phosphate-Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, p. 588, 1983.
41. FIFE, T. H.; BRUCE, T. C. Temperature Dependence of  $\Delta pD$  Correction for Use of Glass Electrode in  $\text{D}_2\text{O}$ . **Journal of Physical Chemistry**, v. 65, p. 1079, 1961.
42. COX, B. G. **Modern Liquid Phase Kinetics**. Oxford University Press, 1994. (Oxford Chemistry Primers).
43. FERSHT, A. R.; KIRBY, A. J. Hydrolysis of Aspirin . Intramolecular General Base Catalysis of Ester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, p. 4857, 1967.
44. Gaussian 09, Revision A.02, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A., JR.; PERALTA, J. E.;

OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, N. J.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

45. MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Performance of SM6, SM8, and SMD on the SAMPL1 Test Set for the Prediction of Small-Molecule Solvation Free Energies. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 4538, 2009.

46. MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 6378, 2009.

47. HO, J. M.; KLAMT, A.; COOTE, M. L. Comment on the Correct Use of Continuum Solvent Models. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, p. 13442, 2010.

48. HIRSHFELD, F. L. Bonded-Atom Fragments for Describing Molecular Charge-Densities. **Theoretica Chimica Acta**, v. 44, p. 129, 1977.

49. VAN DAMME, S.; BULTINCK, P.; FIAS, S. Electrostatic Potentials from Self-Consistent Hirshfeld Atomic Charges. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, p. 334, 2009.

50. GUERRA, C. F.; HANDGRAAF, J. W.; BAERENDS, E. J.; BICKELHAUPT, F. M. Voronoi deformation density (VDD) charges: Assessment of the Mulliken, Bader, Hirshfeld, Weinhold, and VDD methods for charge analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 189, 2004.

51. LENDVAY, G. Bond Orders from Abinitio Calculations and a Test of the Principle of Bond Order Conservation. **Journal of Physical Chemistry**, v. 93, p. 4422, 1989.
52. REED, A. E.; WEINSTOCK, R. B.; WEINHOLD, F. Natural-Population Analysis. **Journal of Chemical Physics**, v. 83, p. 735, 1985.
53. REED, A. E.; CURTISS, L. A.; WEINHOLD, F. Intermolecular Interactions from a Natural Bond Orbital, Donor-Acceptor Viewpoint. **Chemical Reviews**, v. 88, p. 899, 1988.
54. WIBERG, K. B. Application of Pople-Santry-Segal Cndo Method to Cyclopropylcarbinyl and Cyclobutyl Cation and to Bicyclobutane. **Tetrahedron**, v. 24, p. 1083, 1968.
55. MOYANO, A.; PERICAS, M. A.; VALENTI, E. A Theoretical-Study on the Mechanism of the Thermal and the Acid-Catalyzed Decarboxylation of 2-Oxetanones ( $\beta$ -Lactones). **Journal of Organic Chemistry**, v. 54, p. 573, 1989.
56. MASKILL, H. **Structure and Reactivity in Organic Chemistry**. Oxford University Press, 1999. (Oxford Chemistry Primers).
57. UM, I. H.; BUNCEL, E. The origin of the alpha-effect: Dissection of ground-state and transition-state contributions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 577, 2000.
58. EL SEOUD, O. A.; SIVIERO, F. Kinetics of the pH-independent hydrolyses of 4-nitrophenyl chloroformate and 4-nitrophenyl heptafluorobutyrate in water-acetonitrile mixtures: consequences of solvent composition and ester hydrophobicity. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 19, p. 793, 2006.
59. CHIPPERFIELD, J. R. **Non-Aqueous Solvents**. Oxford University Press, 1999. (Oxford Chemistry Primers).
60. FIORDIPONTI, P.; RALLO, F.; RODANTE, F. Potentiometric Determination of the Autoprotolysis Constants of Water-Dimethylsulfoxide Mixtures at Different Temperatures and Related

Thermodynamics Quantities. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 88, p. 149, 1974.

61. SIOW, K. S.; ANG, K. P. Thermodynamics of Ionization of 2,4,-Dinitrophenol in Water-Dimethylsulfoxide Solvents. **Journal of Solution Chemistry**, v. 18, p. 937, 1989.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

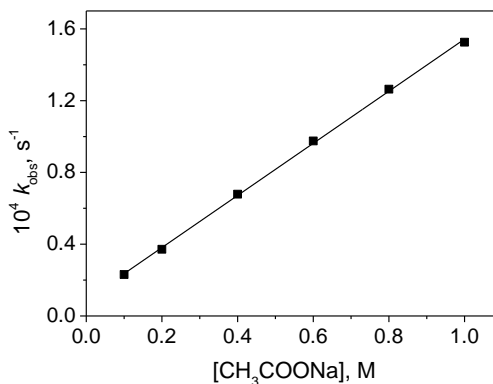
#### Efeitos de tampão e força iônica

Avaliou-se a contribuição de catálise básica geral exercida por tampões na hidrólise de **DEDNPP**, e efeito considerável foi observado com o tampão  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ , em particular com a espécie carbonato. As demais espécies (acetato, BIS-TRIS e TRIS) demonstraram efeito menos pronunciado e negligenciável nas condições experimentais das cinéticas (já que os tampões foram utilizados em 0,01M). Abaixo são mostrados os perfis de concentração das espécies básicas dos tampões para obtenção das constantes de segunda ordem. Nas cinéticas em que foi utilizado o sistema tampão  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  (em pHs alcalinos),  $k_{\text{obs}}$  foi corrigida subtraindo a contribuição das reações de ambas as bases. Buscou-se avaliar também eventual efeito de força iônica na reação de hidrólise de **DEDNPP** (em pH neutro), mas não foi observada diferença significativa entre os valores de  $k_{\text{obs}}$  na presença de 1M de KCl ( $I=1\text{M}$ ) e na presença de força iônica oriunda unicamente do tampão utilizado (a 0,01M). Os dados são mostrados abaixo.

#### 1- Acetato

*Condições experimentais:* pH 6,9,  $I=1\text{M}$  (KCl), 25°C.

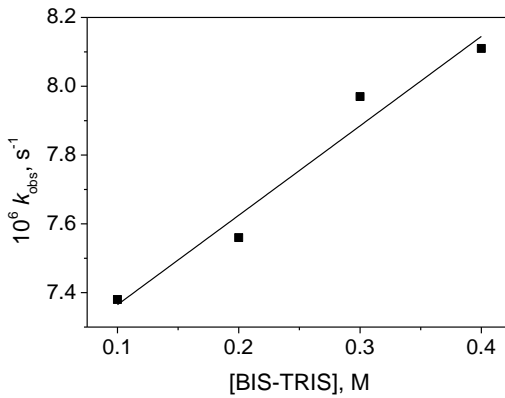
$$k_2 = 1,45 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



## 2- BIS-TRIS

Condições experimentais: pH 7,0,  $I=1\text{M}$  (KCl),  $25^\circ\text{C}$ .

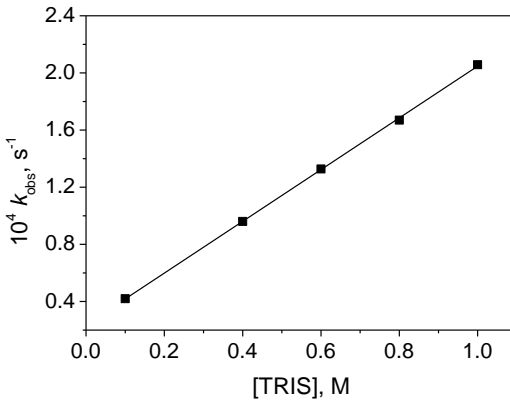
$$k_2 = 3,42 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



## 3- TRIS

Condições experimentais: pH 10,2,  $I=1\text{M}$  (KCl),  $25^\circ\text{C}$ .

$$k_2 = 1,81 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

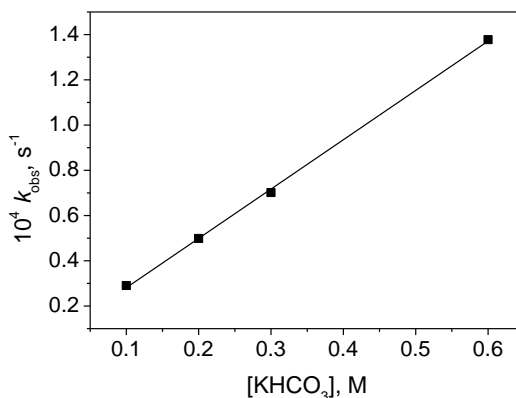




## 4- Bicarbonato

Condições experimentais: pH 9,1,  $I=1\text{M}$  (KCl),  $25^\circ\text{C}$ .

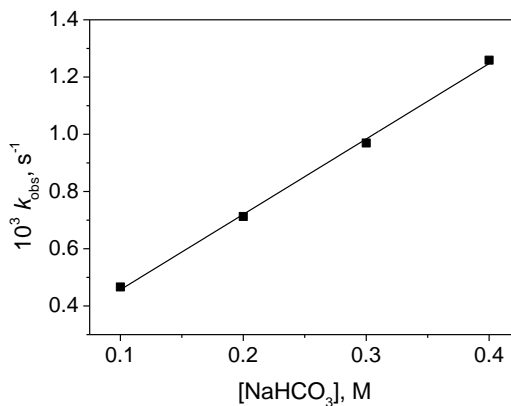
$$k_2 = 2,18 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



## 5- Carbonato

Condições experimentais: pH 11,7,  $I=1\text{M}$  (KCl),  $25^\circ\text{C}$ .

$$k_2 = 2,63 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



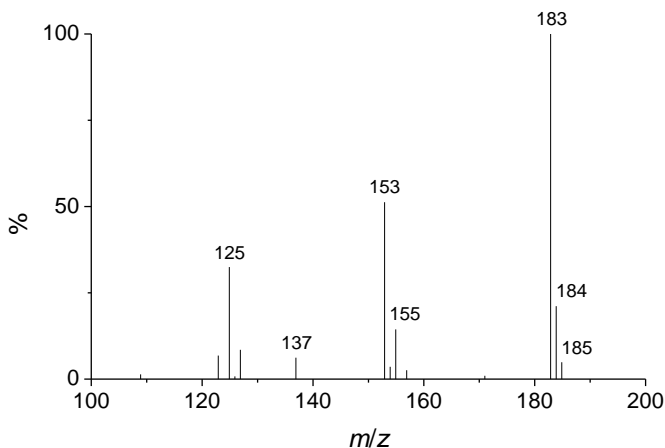
## 6- Efeito de força iônica

Condições experimentais: **DEDNPP**  $2,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ , pH 7, BIS-TRIS  $0,01\text{M}$ ,  $25^\circ\text{C}$ .

- Cinética realizada na presença de  $1\text{M}$  de KCl ( $I = 1\text{M}$ ):  
 $k_{\text{obs}} = 6,93 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
- Cinética realizada sem adição de KCl ( $I = 2,4 \times 10^{-3} \text{ M}$ , força iônica originada unicamente pelo tampão):  
 $k_{\text{obs}} = 6,70 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

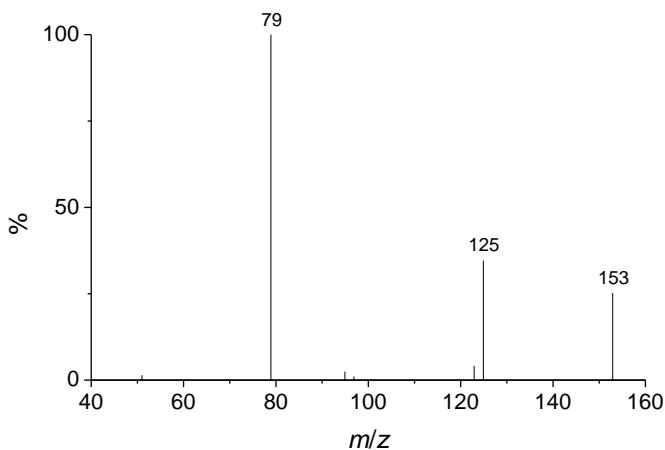
## APÊNDICE B

A **Figura B1** apresenta o espectro de ESI(-)-MS dos produtos da hidrólise de **DEDNPP**. Os picos de  $m/z$  153 e  $m/z$  183 identificam as formas aniônicas do dietil fosfato e 2,4-dinitrofenol, respectivamente. Os íons foram caracterizados via dissociação induzida por colisão (CID).

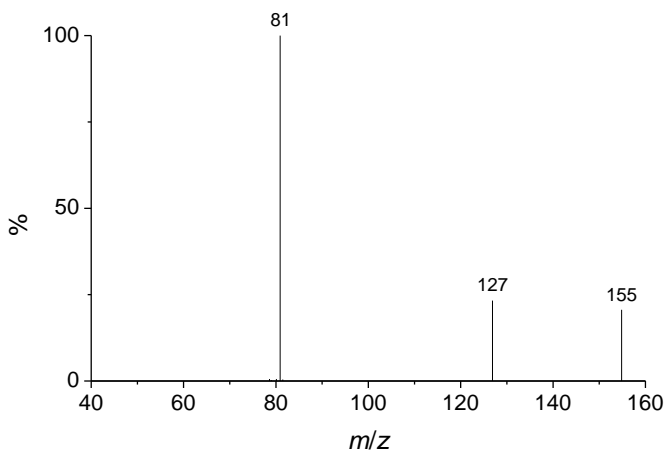


**Figura B1.** ESI(-)-MS do meio reacional da hidrólise de **DEDNPP** em presença de aproximadamente 22,2% (v:v) de  $\text{H}_2\text{O}^{18}$ , após cinco tempos de meia-vida, em pH 5, a  $25^\circ\text{C}$ .

A **Figura B2** apresenta o espectro de ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  153, que mostra que o ânion do dietil fosfato dissocia-se ao íon de  $m/z$  125 (perda de  $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ) e ao íon de  $m/z$  79 ( $\text{PO}_3^-$ ). O espectro de ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  155 (**Figura B3**) mostra que o ânion do dietil fosfato com  $^{18}\text{O}$  incorporado apresenta o mesmo padrão de fragmentação e dissocia-se às mesmas espécies do íon de  $m/z$  153, correspondentemente marcadas com  $^{18}\text{O}$ .



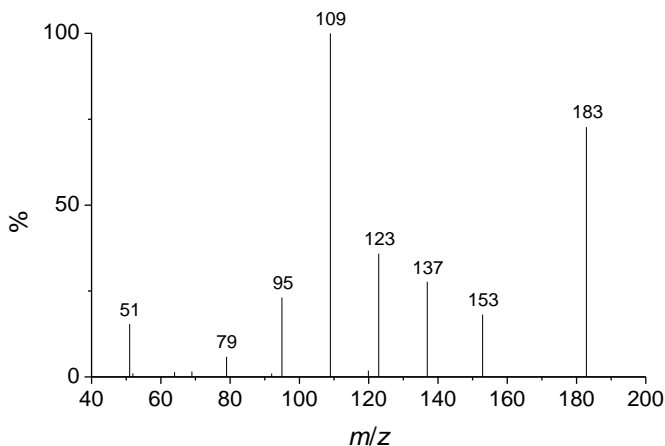
**Figura B2.** ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  153, detectado entre os produtos de hidrólise de **DEDNPP**, em pH 5, a 25°C.



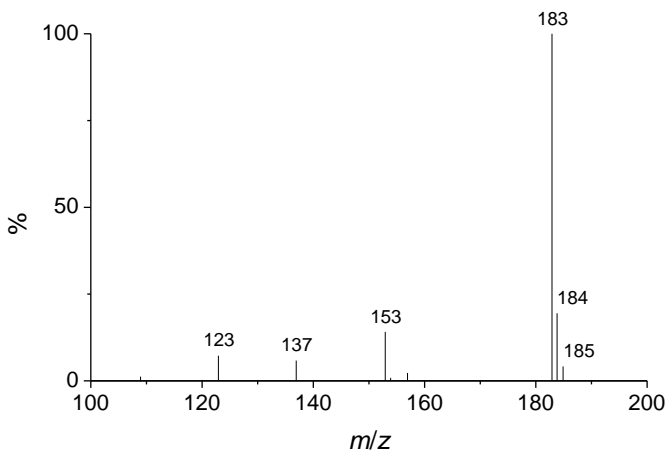
**Figura B3.** ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  155, detectado entre os produtos de hidrólise de **DEDNPP**, em presença de aproximadamente 22,2%  $\text{H}_2\text{O}^{18}$ , em pH 5, 25°C.

A **Figura B4** apresenta o espectro de ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  183, e confirma a atribuição estrutural do 2,4-dinitrofenolato. Significativamente, os dados mostram a dissociação do 2,4-dinitrofenolato pela perda sequencial de dois radicais NO para formar os respectivos íons de  $m/z$  153 e  $m/z$  123. Ainda, observa-se que o íon de

$m/z$  183 gera o íon de  $m/z$  137 pela perda de  $\text{NO}_2$ , e a eliminação dos fragmentos  $\text{NO}_2$  e  $\text{CO}$  leva à formação do íon de  $m/z$  109. A **Figura B5** apresenta o espectro de ESI(-)-MS de uma solução de 2,4-dinitrofenol em água normal, nas mesmas condições experimentais da hidrólise de **DEDNPP**.



**Figura B4.** ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  183, detectado entre os produtos de hidrólise de **DEDNPP**, em pH 5, a 25°C.



**Figura B5.** ESI(-)-MS do 2,4-dinitrofenol, obtido a partir de uma solução em água normal, em pH 5, a 25°C.

## APÊNDICE C

Abaixo são apresentadas as coordenadas cartesianas para as estruturas otimizadas em cada estágio da reação (reagentes, estado de transição e produtos), ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d), para o mecanismo concertado  $S_N2(P)$  com duas moléculas de água discretas. Em cada tabela, a primeira coluna descreve o tipo de átomo, e as demais colunas apresentam as respectivas coordenadas (x,y,z).

### Reagentes

P	1.77909000	0.32051700	-0.24354300
O	1.48068700	0.16543300	1.21531600
O	2.94186800	-0.57621800	-0.83364500
O	2.10135900	1.78236200	-0.75949500
O	0.50675100	-0.09307100	-1.18564500
C	-0.80253000	0.15311500	-0.84661700
C	-1.65688900	-0.91837100	-0.53001800
C	-2.98436400	-0.70568300	-0.17947600
C	-2.63616900	1.68730800	-0.50063300
C	-3.45571000	0.60238600	-0.18169600
H	-3.62856000	-1.53916000	0.07101100
H	-3.02842300	2.69681900	-0.49411100
C	-1.30498400	1.45520300	-0.82634600
H	-0.64587400	2.28138500	-1.06776300
N	-4.85452700	0.84027300	0.16984500
O	-5.26615200	2.00463700	0.17145600
O	-5.56148200	-0.13216200	0.45322100
O	-0.17960600	-1.52715400	2.84896200
H	-0.75932600	-2.04258300	2.26162900
H	0.35862800	-0.97942200	2.24011500
O	3.13183300	0.55843900	3.51485700
H	2.57826300	0.44995700	2.71275200
H	2.57659800	1.06691700	4.12863000
C	3.14082400	-1.97761300	-0.40222100
H	2.22826000	-2.53082000	-0.63897400
H	3.29994800	-1.96928200	0.67816600
C	3.17893400	2.59331100	-0.14970800
H	4.12913300	2.14492300	-0.45001200
H	3.07047500	2.53838100	0.93605700
N	-1.17574400	-2.29975400	-0.54006800
O	-0.42459200	-2.65546500	-1.44716000
O	-1.56306300	-3.04110500	0.37007500
C	4.33918600	-2.51400400	-1.15046100
H	4.51314200	-3.55067200	-0.83950900
H	4.16724100	-2.50342200	-2.23206700
H	5.23832000	-1.93085100	-0.92428100
C	3.02842700	4.00646600	-0.66167800
H	2.06444700	4.43241800	-0.36393800
H	3.82627500	4.62234700	-0.23055700
H	3.11581500	4.04339100	-1.75286800

## Estado de Transição

P	-2.22034300	-0.23947100	-0.43532300
O	-1.82228400	-0.89610800	-1.71095900
O	-1.83731200	-0.92949300	0.93576700
O	-2.72649100	1.25898200	-0.43003900
O	-0.23637100	0.74179900	-0.30814700
C	0.93261300	0.22781800	-0.26746900
C	2.13729300	1.03539800	-0.17149300
C	3.40609300	0.47077100	-0.07657500
C	2.40684600	-1.74899800	-0.19976100
C	3.54339300	-0.91048900	-0.09960400
H	4.27588900	1.11006500	-0.00468600
H	2.53015200	-2.82551700	-0.21746400
C	1.15595900	-1.19565800	-0.27815000
H	0.29071100	-1.84138200	-0.35379800
N	4.85183200	-1.48374800	-0.03196200
O	4.96265100	-2.72530800	-0.03736800
O	5.84557200	-0.73392500	0.02888500
O	-3.99073400	-0.84784100	-0.35891300
H	-4.18886000	-1.66089400	-0.97288500
H	-4.62924700	-0.14253700	-0.58824900
O	-4.52293200	-2.85595400	-1.87772200
H	-3.80696700	-2.88848600	-2.53829900
H	-4.42321200	-3.67852500	-1.36580400
C	-2.50606000	-0.75528300	2.24228500
H	-3.58056900	-0.67373500	2.07215300
H	-2.12516400	0.17279200	2.67244900
C	-2.60097900	2.26132500	0.64804400
H	-1.63685000	2.12185500	1.13679400
H	-3.41176000	2.06357600	1.35252400
N	2.07940100	2.47514600	-0.15066200
O	1.07144500	3.05694100	-0.57985200
O	3.06049100	3.10347100	0.29402000
C	-2.15868000	-1.95549700	3.09273800
H	-2.62791100	-1.83073500	4.07600000
H	-2.53399400	-2.88188500	2.64526300
H	-1.07635700	-2.03924000	3.23707900
C	-2.72314900	3.62667000	0.01203900
H	-3.67591900	3.73191400	-0.51799600
H	-2.68509100	4.38463900	0.80342600
H	-1.90059800	3.81351300	-0.68598500

## Produtos

P	-3.05398600	-0.34226200	-0.34634700
O	-2.44217900	-1.06775500	-1.49369200
O	-2.60483600	-0.91148500	1.06955000
O	-2.71983000	1.21340400	-0.40158000
O	0.84265800	1.72519800	-0.10155700
C	1.72811200	0.82949200	-0.14019700
C	3.17529500	1.06596900	-0.12302900
C	4.09695600	0.02109100	-0.13095100
C	2.26130000	-1.59278200	-0.20004900
C	3.65311100	-1.29431200	-0.17763600
H	5.15628300	0.24018900	-0.11717500
H	1.93322700	-2.62509600	-0.23486800
C	1.35352400	-0.57451500	-0.17873100
H	0.28817700	-0.78450600	-0.19465700
N	4.60621100	-2.35013300	-0.20923500
O	4.19611500	-3.53053200	-0.24476500
O	5.82745900	-2.08376700	-0.20036000
O	-4.67984100	-0.49104700	-0.41784800
H	-5.40267000	-0.95613400	-1.77251200
H	-5.20499700	0.13580200	0.12012600
O	-5.85425000	-1.26759700	-2.63405700
H	-5.19576900	-1.17357500	-3.35949300
H	-6.04233800	-2.22844300	-2.54204900
C	-3.46533900	-1.07732300	2.25646900
H	-4.30961900	-1.70669900	1.96628000
H	-3.82901200	-0.09088500	2.55439000
C	-2.99677700	2.15589700	0.69600300
H	-2.42237900	1.83043200	1.56647800
H	-4.06654800	2.10848500	0.92268300
N	3.71792800	2.39132200	-0.08002800
O	2.99078600	3.36658000	-0.34168900
O	4.92356400	2.54330600	0.21667600
C	-2.62823600	-1.71851300	3.33911200
H	-3.25225700	-1.85542900	4.23002100
H	-2.25778600	-2.69970600	3.02329700
H	-1.77655000	-1.08512500	3.60936800
C	-2.58664600	3.53543700	0.23400400
H	-3.15700700	3.84363400	-0.64892200
H	-2.78742100	4.24949700	1.04133200
H	-1.51749500	3.57007100	0.00035200