

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

***O PAPEL DA ÁGUA (OU A SUA AUSÊNCIA) NA FORMAÇÃO
DE COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA NOS SISTEMAS
BIOLÓGICOS***

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SANTA CATARINA COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
QUÍMICA

VANDERLEI GAGEIRO MACHADO

**FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA - BRASIL
ABRIL DE 1997**

**O PAPEL DA ÁGUA (OU A SUA AUSÊNCIA) NA FORMAÇÃO DE
COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA NOS
SISTEMAS BIOLÓGICOS**

VANDERLEI GAGEIRO MACHADO

Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo Orientador
e membros da Banca Examinadora



Prof. Dr. Faruk Nome

Orientador



Prof. Dr. Adilson José Curtius

Coordenador

Banca Examinadora



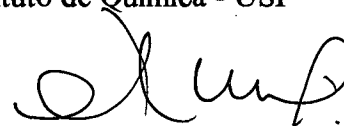
Prof. Dr. Faruk Nome

UFSC



Prof. Dr. Omar A. El Seoud

Instituto de Química - USP



Prof. Dr. César Zucco

UFSC

M. Graça Nascimento
Prof^ª Dr^ª Maria da Graça Nascimento

UFSC

Sônia Maria Hickel Probst
Prof^ª Dr^ª Sônia Maria Hickel Probst

UFSC

*“Quando é que em vez de rico, bandido,
polícia, pivete, serei cidadão?”*

Caetano Veloso

*Aos meus pais, Iêda e Lourival,
e à Leticia*

AGRADECIMENTOS

É tão extensa a lista de agradecimentos que desde já peço desculpas aos que foram esquecidos. A lista começa pelo professor Faruk Nome, pela orientação, incentivo, e acima de tudo pela oportunidade oferecida. Não posso ainda deixar de esquecer um importante agradecimento à professora Maria da Graça Nascimento por gentilmente haver cedido o seu laboratório para a realização de boa parte da experimentação aqui contida e o microcomputador no qual esta tese foi digitada. Agradeço ainda ao professor Marcos Caroli Rezende pela orientação eficiente da primeira parte deste trabalho. Estendo ainda meus agradecimentos aos professores Antônio Carlos Joussef e Valdir Rosa Correia por haverem permitido que eu pudesse utilizar o seu laboratório para a consecução de várias experiências, incluindo aí a quase totalidade das corridas cinéticas. Também agradeço ao professor Dino Zanette e à professora Dilma Marconi.

Um agradecimento é destinado ao professor Leopoldo de Meis (UFRJ), o relator deste trabalho, e aos professores Omar El Seoud (USP) e Pedro Volpe (UNICAMP) por haverem aceitado o convite para compor a banca examinadora. Vai outro agradecimento ao professor César Zucco e às professoras Sônia Probst e Maria da Graça Nascimento, por haverem aceitado o convite para tomarem parte na banca examinadora.

Agradeço aos professores Christian Reichardt e Hugo Gallardo, e ao colega Cláudio de Lima, por haverem cedido alguns reagentes importantes para a realização deste trabalho.

À toda a turma dos laboratórios 301 e 305 cabe o meu agradecimento.

É impossível ainda deixar de agradecer a todos os amigos conquistados ao longo deste período. Vai um abraço especial para Paulo, Jair, Pedro, Milton, Jaime, Donizete, Claudemir, Luiz Carlos, Fábio, Jacir, Clodoaldo, Arilson e Márcio. E outro ainda mais especial para Flávia, Elsie, Marlene, Rita, Santusa, Luisiane, Iane e Vera.

Um parágrafo especial é destinado à Letícia, pela amizade e amor compartilhados, pelo apoio concedido nos momentos difíceis e pela correção de parte do manuscrito.

Finalmente, cabe o meu agradecimento ao CNPq pela bolsa concedida e a PADCT/FINEP pelo suporte financeiro.

ÍNDICE GERAL

APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - UMA INTERPRETAÇÃO PARA O HALOCROMISMO DOS PIRIDINIOFENOLATOS	3
1.1. INTRODUÇÃO	
1.1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1.1.1. Emprego de compostos solvatocrômicos na investigação de soluções salinas.....	5
1.1.1.2. Halocromismo de piridiniofenolatos.....	7
1.1.1.3. Compostos cromoionóforos.....	10
1.1.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	13
1.2. PARTE EXPERIMENTAL	15
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1.3.1. RESULTADOS.....	17
1.3.2. DISCUSSÃO.....	17
1.4. CONCLUSÕES	28
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 2 - SOLVATAÇÃO PREFERENCIAL DE UM CORANTE β- SENSITIVO EM MISTURAS BINÁRIAS CONTENDO UM SOLVENTE APRÓTICO E OUTRO HIDROXILADO	42

2.1. INTRODUÇÃO	
2.1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	43
2.1.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	45
2.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	47
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
2.3.1. RESULTADOS.....	49
2.3.2. DISCUSSÃO.....	49
2.4. CONCLUSÕES.....	59
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO 3 - SOBRE O PAPEL DA ÁGUA NA ACUMULAÇÃO DE ENERGIA NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	64
3.1. INTRODUÇÃO	
3.1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	65
3.1.1.1. Propriedades e mecanismos das F_0F_1 -ATPases.....	68
3.1.1.2. Compostos ricos em energia.....	70
3.1.1.3. Influência da água nas energias de hidrólise dos compostos ricos em energia.....	74
3.1.1.4. Modelagem enzimática na hidrólise e síntese de compostos ricos em energia.....	77
3.1.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	80
3.2. PARTE EXPERIMENTAL	
3.2.1. MATERIAIS.....	82
3.2.2. MÉTODOS.....	83
3.2.3. ESTUDOS DOS PRODUTOS	

3.2.3.1. Estudos de infravermelho.....	84
3.2.3.2. Identificação quantitativa do acetil-fosfato.....	85
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.3.1. Um problema crucial: a solubilização de íons fosfato em acetonitrila.....	86
3.3.2. A reação de acetato de 2,4-dinitrofenila (DNPA) com íons n-decilsfosfato dessorvatados.....	88
3.3.3. Influência da água nas constantes de velocidade observadas.....	94
3.3.4. Parâmetros de ativação.....	95
3.3.5. Influência da água no curso da reação entre o éster e o íon n- decilsfosfato.....	97
3.3.6. Sobre o papel da água na formação de compostos ricos em energia.....	99
3.4. CONCLUSÕES.....	111
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
APÊNDICE.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. VARIÇÕES DOS VALORES DE $E_T(30)$ DE SOLUÇÕES ALCOÓLICAS DE IODETO DE SÓDIO COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO SAL.....	23
1.2. VARIÇÕES DOS VALORES DE $E_T[(SO_2Me)_3]$ DE SOLUÇÕES DE IODETO DE SÓDIO COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO SAL.....	24
1.3. VARIÇÕES DOS VALORES DE $E_T[(SO_2Me)_3]$ DE SOLUÇÕES ALCOÓLICAS DE IODETO DE SÓDIO COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO SAL.....	25
1.4. VARIÇÕES DOS VALORES DE $E_T(30)$ DE SOLUÇÕES DE IODETO DE SÓDIO COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO SAL.....	26
1.5. ESPECTROS DE UM PIRIDINIOFENOLATO EM ACETONITRILA NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE PERCLORATO DE LÍTIO.....	27
2.1. VARIÇÕES DE \bar{v}_{max} DO CORANTE 1 EM MISTURAS BINÁRIAS ACETONA-SOLVENTES PRÓTICOS COM A FRAÇÃO MOLAR DO COMPONENTE HIDROXILADO.....	54

2.2. VARIACOES DE \bar{v}_{\max} DO CORANTE 1 EM MISTURAS BINARIAS ACETONITRILA-SOLVENTES PROTICOS COM A FRAO MOLAR DO COMPONENTE HIDROXILADO.....	55
2.3. VARIACOES DE \bar{v}_{\max} DO CORANTE 1 EM MISTURAS BINARIAS DMF-SOLVENTES PROTICOS COM A FRAO MOLAR DO COMPONENTE HIDROXILADO.....	56
3.1. ESTRUTURAS DE ALGUNS COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA.....	66
3.2. MUDANAS ESPECTRAIS DECORRENTES DA REAO ENTRE DNPA E ION n-DECILFOSFATO EM ACETONITRILA ANIDRA  TEMPERATURA DE 40C.....	90
3.3. GRÁFICO DE $\log (A_{\text{inf}} - A_t)$ EM FUNO DO TEMPO PARA A REAO ENTRE DNPA E n-DECILFOSFATO  TEMPERATURA DE 40C.....	90
3.4. GRÁFICO DE k_{obs} EM FUNO DA CONCENTRAO DE n-DECILFOSFATO PARA A REAO COM O DNPA EM ACETONITRILA ANIDRA.....	91
3.5. GRÁFICO DE k_{obs} EM FUNO DA CONCENTRAO DE N-DECILFOSFATO PARA A REAO COM O DNPA EM ACETONITRILA COM CONCENTRAO DE ÁGUA IGUAL A 0,20 M.....	91
3.6. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA REAO DO ACETATO DE 2,4-DINITROFENILA E n-DECILFOSFATO DE BENZILTRIMETIL-AMONIO EM ACETONITRILA ANIDRA.....	92
3.7. CURVA PARA A DETERMINAO DE ACETIL-FOSFATO.....	93

3.8. INIBIÇÃO PROVOCADA PELA ADIÇÃO DE ÁGUA NA REAÇÃO DE DNPA COM BTAP	95
3.9. GRÁFICOS DE $\ln k_{obs}$ VS. $1/T$ PARA A REAÇÃO DE DNPA EM ACETONITRILA ANIDRA E EM ACETONITRILA COM 1% DE ÁGUA	96
3.10. GRÁFICOS DE $\ln k_{obs}$ VS. $1/T$ PARA A REAÇÃO DE DNPA EM ACETONITRILA COM 0,75%, 0,46%, 0,25% E 0,13% DE ÁGUA	96
3.11. GRÁFICO DO RENDIMENTO DE ACETIL-FOSFATO FORMADO E DE ÉSTER HIDROLISADO NA REAÇÃO DE DNPA COM BTAP EM DIVERSAS MISTURAS ACETONITRILA-ÁGUA	98
3.12. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO PARA AS REAÇÕES DE DNPA COM KH_2PO_4 NA PRESENÇA DE 18-COROA-6	109
3.13. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO DE DNPA EM ACETONITRILA COM 10% DE TAMPÃO TRIS (pH=8,0): (A) COM BTAP; (B) COM KH_2PO_4 NA PRESENÇA DE 18-COROA-6; (C) COM n-DECILFOSFATO DE SÓDIO NA PRESENÇA DE 15-COROA-5	110

ÍNDICE DE TABELAS

- 2.1.** VALORES DOS COEFICIENTES a , b , c E d NA EQUAÇÃO POLINOMIAL $\bar{v}_{\max} = a + bX + cX^2 + dX^3$ PARA CADA MISTURA BINÁRIA..... 57
- 2.2.** PERCENTAGEM MOLAR ESTIMADA DO COMPONENTE HIDROXILADO ROH NA CAMADA DE SOLVATAÇÃO DO CORANTE 1, PARA UMA MISTURA BINÁRIA COM UMA COMPOSIÇÃO MOLAR 1:1..... 58
- 3.1.** ENERGIAS LIVRES PADRÕES PARA AS HIDRÓLISES DE ALGUNS COMPOSTOS FOSFATADOS (pH 7,0)..... 67
- 3.2.** REAÇÕES DE HIDRÓLISE DO PIROFOSFATO..... 73
- 3.3.** ENERGIAS DE HIDRÓLISE DE ATP E PP_i EM DIVERSOS MEIOS REACIONAIS, À TEMPERATURA DE 25°C..... 75
- 3.4.** INFLUÊNCIA DA ÁGUA NOS VALORES DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE DE SEGUNDA ORDEM PARA A REAÇÃO ENTRE BTAP E DNPA EM ACETONITRILA..... 101
- 3.5.** INIBIÇÃO DA REAÇÃO DE DNPA COM n -DECILFOSFATO PELA ADIÇÃO DE ÁGUA..... 102

- 3.6. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NAS VELOCIDADES DA REAÇÃO DE DNPA COM BTAP EM ACETONITRILA ANIDRA E COM ÁGUA ADICIONADA..... 103**
- 3.7. PARÂMETROS DE ATIVAÇÃO PARA A REAÇÃO DE DNPA COM n-DECILFOSFATO..... 105**
- 3.8. RENDIMENTOS EM ACETIL-FOSFATO FORMADO E DE ÉSTER HIDROLISADO PARA A REAÇÃO DE DNPA COM BTAP EM DIVERSAS MISTURAS ACETONITRILA-ÁGUA..... 106**
- 3.9. REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACETIL-FOSFATO FORMADO NA REAÇÃO ENTRE DNPA E BTAP..... 107**
- 3.10. REAÇÕES DE FORMAÇÃO DE ACETIL-FOSFATO A PARTIR DA REAÇÃO DE DNPA COM KH_2PO_4 NA PRESENÇA DE 18-COROA-6 EM DIVERSAS MISTURAS ACETONITRILA-ÁGUA..... 108**

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcP = acetil-fosfato

ADP = difosfato de adenosina

AMP = monofosfato de adenosina

ATP = trifosfato de adenosina

β = habilidade elétron-doadora do meio

BTAP = n-decilfosfato de benziltrimetilamônio

c_c = concentração do corante

c_s = concentração do sal

ΔE_T = variações dos valores de E_T

ΔG = variação de energia livre padrão

$\Delta G^\#$ = energia livre de ativação

$\Delta H^\#$ = entalpia padrão de ativação

$\Delta \lambda_{\max}$ = variação no máximo do comprimento de onda de um corante

DMA = dimetilacetamida

DMF = dimetilformamida

DMSO = dimetil sulfóxido

DNA = ácido deoxirribonucleico

DNPA = acetato de 2,4-dinitrofenila

$\Delta S^\#$ = entropia padrão de ativação

ϵ = constante dielétrica

E_T = energia de transição

F_0F_1 -ATPase = trifosfato de adenosina sintase

F_1 = fator 1 de acoplamento

h = constante de Planck

HLADH = álcool desidrogenase do fígado do cavalo

k_B = constante de Boltzmann

k_2 = constante de velocidade de segunda ordem

K_m = constante de Michaelis-Menten

k_{obs} = constante de velocidade observada de primeira ordem

λ_{max} = comprimento de onda máximo

μ = momento dipolar

MeCN = acetonitrila

$\bar{\nu}_{max}$ = número de onda máximo do corante

NADH = nicotinamida adenina dinucleotideo

ND = número doador

PEP = fosfo-enolpiruvato

P_i = fosfato inorgânico

PP_i = pirofosfato

R = constante universal dos gases

RNA = ácido ribonucleico

ROH = componente hidroxilado

T = temperatura em Kelvin

TC = transferência de carga

tris = tris(hidroximetil)aminometano

X = fração molar do componente mais polar da mistura

RESUMO

Uma das questões mais fascinantes que já foram levantadas pelos pesquisadores nas últimas décadas refere-se ao estudo dos compostos ricos em energia, tais como o ATP e o acetil-fosfato (AcP). A maioria das teorias que tratam da formação desta classe de compostos tem fugido da demonstração experimental. O objetivo principal dessa tese é apresentar um modelo não enzimático, para a síntese do AcP, que considere o aspecto da dessolvatação do nucleófilo em reações de transferência de acila. A fim de se buscar uma melhor compreensão sobre este modelo, tornou-se necessária a realização de um estudo mais aprofundado de efeitos de solventes e/ou eletrólitos sobre compostos orgânicos e sobre um sal inorgânico.

Deste modo, a primeira parte do trabalho descreve o comportamento halocrômico dos piridíniofenolatos na presença de iodeto de sódio para vários solventes próticos e apróticos. Sugere-se que os deslocamentos halocrômicos observados refletem principalmente perturbações no microambiente da porção doadora fenolato dos corantes, causadas pela proximidade dos cátions solvatados. O halocromismo dos piridíniofenolatos é interpretado à luz destas interações. A adição de um cátion à solução do corante leva à competição entre o solvente e a parte doadora do corante para os cátions adicionados. Esta competição depende da interação do corante com o solvente. Três casos extremos foram considerados neste modelo proposto: (i) uma interação forte entre o solvente e o grupo fenolato; (ii) uma interação forte (solvatação) entre o solvente e o cátion; (iii) interações fracas solvente-fenolato e solvente-cátion.

Na segunda parte da tese, a solvatação preferencial do corante solvatocrômico perclorato de N,N,N',N' -tetrametiletildenodiaminoacetilacetato cobre (II), $[Cu(tmen)(aca)]^+ClO_4^-$, foi estudada em diversas misturas binárias contendo um solvente hidroxilado (água, metanol, etanol ou 2-propanol) e um cossolvente aprótico (acetona, acetonitrila ou dimetilformamida). A solvatação preferencial é discutida e interpretada através de efeitos de ligações de hidrogênio que alteram a habilidade elétron-doadora "intrínseca" do solvente hidroxilado.

Finalmente, descreve-se a síntese do AcP, estudada em acetonitrila, à temperatura de $40^\circ C$, reagindo-se acetato de 2,4-dinitrofenila (DNPA) com n-decilsfosfato de

benziltrimetilamônio. O produto foi identificado por uma adaptação do método de Lipmann para a determinação de acil-fosfatos e por IV.

A reação do DNPA com o n-decilsfosfato mostra uma grande dependência do meio aprótico. A adição de pequenas quantidades de água reduz enormemente a magnitude das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem. Um estudo realizado demonstrou que o rendimento em AcP diminui com a adição de água, enquanto a percentagem de éster hidrolisado aumenta proporcionalmente. Demonstra-se desta forma que o íon n-decilsfosfato dessolvatado atua eficazmente como nucleófilo em reações de transferência de fosfato. A sua eficiência enquanto nucleófilo diminui com a adição de água, porque ela dificulta a sua aproximação do centro reacional. Neste caso, ele pode atuar de maneira mais eficiente como catalisador básico geral, promovendo a hidrólise do éster.

ABSTRACT

Most theories of the formation of energy-rich compounds, such as ATP and acyl phosphate residues, have eluded experimental demonstration. Here, we describe a system which allows the facile formation of acetyl phosphate derivatives, by means of restricting the quantities of water available in the reacting system. In order to obtain a better understanding of this model, it was made a study more detailed of the solvent effects and/or electrolytes on organic dyes and a inorganic salt.

The first part of this work describes the halochromic behaviour of some pyridiniophenoxide dyes in the presence of sodium iodide which is described in a variety of protic and aprotic solvents. It is suggested that the observed halochromic shifts mainly reflect perturbations in the microenvironment of the phenoxide moiety of the dyes, caused by the proximity of solvated cations. The halochromism of the pyridiniophenoxide dyes is interpreted in the light of these interactions. The addition of a cation to a solution of the dye establishes a competition between the solvent and phenoxide end of the dye for the positively charged added species. This competition is itself dependent on the dye-solvent interaction. Three extreme cases were considered in this proposed model: (i) a strong interaction between the solvent and the phenoxide group; (ii) a strong interaction (solvation) between the solvent and the cation; (iii) weak solvent-phenoxide and solvent-cation interactions.

In the second part of this thesis, the preferential solvation of the solvato-chromic dye N,N,N',N' -tetramethylethylenediaminoacetylacetonatocopper (II) perchlorate (1), $[\text{Cu}(\text{tmen})(\text{aca})]^+\text{ClO}_4^-$, in binary mixtures comprising one hydroxylic component (water, methanol, ethanol or 2-propanol) and a non-protic co-solvent (acetone, acetonitrile or dimethylformamide) is discussed and interpreted in terms of hydrogen-bonding effects which alter the 'intrinsic' electron-donating ability of the hydroxylic solvent.

Finally, the synthesis of acetyl phosphate (AcP) was studied in anhydrous acetonitrile at 40°C by reaction between 2,4-dinitrophenyl acetate (DNPA) and benzyltrimethylammonium n-decylphosphate. The formation of AcP was followed by an adaptation of Lipmann method for determination of acyl phosphates and by I.R.

The rate of the reaction under consideration shows a dramatic dependence on the water content of the aprotic solvent. The add of little amounts of water reduces dramatically the magnitude of the pseudo-first order rate constants. It was showed that the AcP yield diminishes with the water addition while the yield of ester hydrolyzed proportionally increases. The main reason by which water promotes the inhibition of the acyl transfer reaction is the fact that solvation of the phosphate anion chemically decreases the nucleophilic ability of this compound, allowing simultaneously the appearance of the capability of this compound to act as a general base in the hydrolytic reaction.

APRESENTAÇÃO

Uma das questões mais fascinantes que já foram levantadas pelos pesquisadores nas últimas décadas refere-se ao estudo dos compostos ricos em energia, tais como o trifosfato de adenosina (ATP) e o acetil-fosfato (AcP). Embora as reações de hidrólise destes compostos já tenham sido estudadas exaustivamente na literatura, modelos não enzimáticos que visem mimetizar *in vitro* a síntese enzimática destes compostos têm sido muito pouco explorados.

As idéias principais sobre como as células utilizam compostos fosfatados como moeda de troca de energia foram lançadas inicialmente por Lipmann e tiveram larga aceitação pela comunidade científica até recentemente. Pensava-se até há algum tempo atrás que a energia de hidrólise dos compostos fosfatados seria determinada somente pela natureza química da ligação entre o grupo fosfato e o restante da molécula, independentemente do fato do composto estar no citossol ou no sítio ativo da enzima. Com o composto ligado à enzima, dar-se-ia a sua hidrólise e a energia resultante da quebra da ligação de fosfato seria empregada pela enzima para realizar trabalho. Na seqüência, os produtos seriam dissociados da enzima.

Resultados obtidos nos últimos anos por diversos grupos de pesquisa levaram a diferentes conclusões sobre o assunto, após descobrir-se que as energias de hidrólise de compostos fosfatados diferentes variam grandemente dependendo do fato de eles se encontrarem em solução ou na superfície da enzima. De acordo com a nova corrente, a síntese de compostos fosfatados como o ATP ou o AcP pode acontecer na superfície enzimática, sem a necessidade de energia, em um sítio hidrofóbico da enzima. A seguir, uma mudança conformacional da proteína aumenta a atividade de água no sítio catalítico, levando ao aumento dos valores das constantes de equilíbrio para a hidrólise destes compostos. Assim, as constantes de equilíbrio, para a hidrólise de compostos ricos em energia, dependem da atividade de água e da composição iônica: a valor alto para a constante de equilíbrio em solução aquosa e um valor pequeno na superfície enzimática. De acordo com esta conceituação, a reversibilidade destas reações pode ser alcançada em laboratório, sob condições apropriadas.

O objetivo principal da tese é apresentar um modelo não enzimático para a síntese dos compostos ricos em energia, considerando o aspecto não explorado da dessolvatação do nucleófilo em reações de transferência de acila.

Para a consecução do objetivo ambicionado, tornou-se necessária a realização de um estudo mais aprofundado dos efeitos de solventes e/ou de eletrólitos sobre compostos orgânicos. O fenômeno da solvatação preferencial de um sal também foi estudado. Um conhecimento maior deste assunto resultou de extrema importância para a montagem do modelo não enzimático a ser explorado, já que este modelo compreende a interação da água com um solvente aprótico adequado. Esta mistura binária, por sua vez, irá interagir com os reagentes e os produtos da síntese do composto rico em energia.

Deste modo, a tese encontra-se disposta em três capítulos. Na primeira parte, faz-se um estudo do efeito de sais sobre uma classe de corantes, os piridíniofenolatos. O segundo capítulo trata do importante fenômeno da solvatação preferencial de um sal em misturas binárias contendo um solvente aprótico e outro hidroxilado. No terceiro capítulo encontra-se finalmente a discussão do papel da água (ou a sua ausência) na formação de compostos ricos em energia nos sistemas biológicos.

CAPÍTULO 1

UMA INTERPRETAÇÃO PARA O HALOCROMISMO DOS PIRIDINIOFENOLATOS

1.1. INTRODUÇÃO

1.1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A adição de sais em um meio reacional pode alterar a velocidade e até mesmo o curso de muitos processos químicos. Estes efeitos salinos são explicados em geral como resultantes de mudanças da polaridade do meio pela adição de espécies iônicas.

Entretanto, o conceito de polaridade, embora seja facilmente compreendido de forma qualitativa (basta aqui lembrar uma regra bastante conhecida: “semelhante dissolve semelhante”), não pode ser definido quantitativamente com precisão por propriedades físicas como a constante dielétrica (ϵ) e o momento dipolar (μ). Tal constatação decorre do fato de que embora parâmetros como ϵ e μ definam o solvente como um todo, não levam em conta as interações específicas das moléculas do soluto com o solvente.^{1,2} Estas interações intermoleculares incluem as coulômbicas entre íons, as direcionais entre dipolos, as indutivas de dispersão e as ligações de hidrogênio, além das interações por transferência de carga e solvofóbicas.

A complexidade das interações soluto-solvente é ainda maior quando um determinado sal é adicionado em um sistema composto pelo meio e um soluto.

Um dos métodos mais extensivamente utilizados na química do estudo de soluções consiste na utilização de compostos solvatocrômicos para o estudo do efeito do solvente em nível microscópico-molecular. Estes compostos apresentam mudanças pronunciadas na posição (e algumas vezes na intensidade) de uma banda de absorção UV/Vis quando a polaridade do meio é alterada (solvatocromismo).^{3,4} Muitos compostos exibem este tipo de comportamento. Compostos solvatocrômicos podem sofrer mudanças nos seus espectros de absorção quando sais são adicionados às suas soluções. Este fenômeno é chamado de halocromismo.

A utilização de compostos halocrômicos com o intuito de se investigar a polaridade de soluções salinas começou a ser feita na década de 60. Gordon verificou em um estudo envolvendo diversas soluções aquosas de merocianinas, na ausência e presença de sais de Na^+ ,

Mg²⁺ e de tetraalquilamônio que aqueles compostos são halocrômicos.⁵ Kosower pôde demonstrar que a polaridade do solvente puro aumenta quando a ele é adicionado um determinado sal.⁶ Provou isto adicionando ao meio uma sonda solvatocrômica, o iodeto de 1-etil-4-carbometoxipiridínio, que tem a sua banda solvatocrômica mudada quando a polaridade do meio muda. Davidson e Jencks estudaram as mudanças espectrais que ocorrem em soluções aquosas de uma merocianina na presença de diversos sais.⁷ Entretanto, os estudos envolvendo halocromismo ganharam grande impulso somente nos anos oitentas, com a utilização principalmente dos piridiniofenolatos como sondas solvatocrômicas.⁸⁻¹⁰

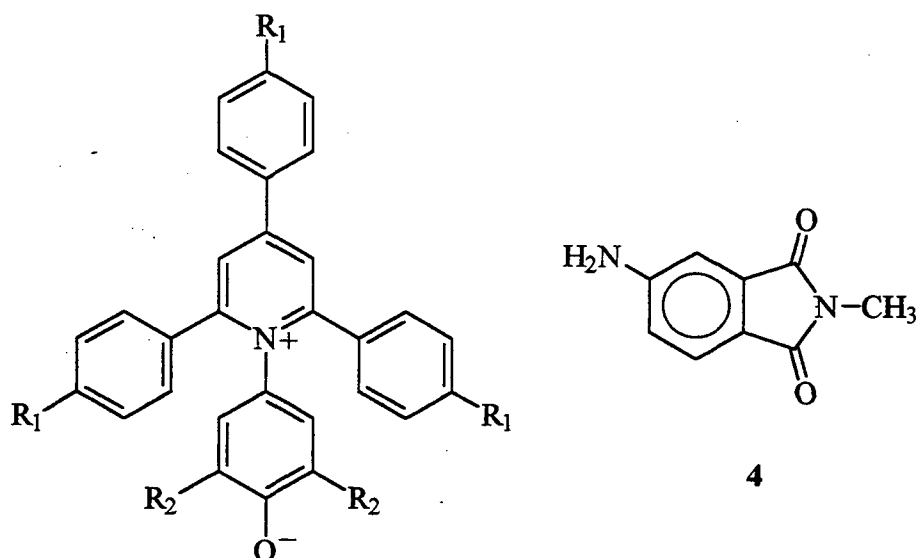
O objetivo desta revisão será abordar trabalhos que tratam do fenômeno do halocromismo. Será dado um enfoque especial sobre o halocromismo dos piridiniofenolatos. Mostrar-se-á ainda como os compostos halocrômicos aqui descritos podem ser empregados como unidades cromóforas na síntese de compostos cromofóforos, que constituem uma classe de compostos muito importante dentro da química supramolecular.

1.1.1.1. EMPREGO DE COMPOSTOS SOLVATOCRÔMICOS NA INVESTIGAÇÃO DE SOLUÇÕES SALINAS

Dentre os exemplos mais conhecidos de compostos solvatocrômicos, pode-se citar a classe dos piridiniofenolatos (e.g., compostos 1-3). Estes corantes começaram a ser investigados por Dimroth e col.¹¹ há três décadas. Eles apresentam uma grande sensibilidade para pequenas mudanças no meio e para a adição de sais em um solvente determinado.³ De acordo com a feliz analogia criada por Reichardt,² a sensibilidade destes compostos pode ser comparada à da princesa do conto de Andersen¹² “A princesa e o grão de ervilha”, que era capaz de perceber um grão de ervilha debaixo de vinte colchões e vinte acolchoados.

O piridiniofenolato mais conhecido é o composto 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenilpiridínio)-1-fenolato (composto 2), que foi popularizado pelo seu emprego na confecção da escala de polaridade E_T(30) (refs. 13-15) e que é comercialmente disponível atualmente.¹⁶

A idéia de se medir a polaridade de soluções salinas utilizando-se piridiniofenolatos solvatocrômicos como sondas foi testada para uma variedade de solventes e eletrólitos, empregando-se como corante a betaína 1.¹⁷ Inspirando-se no tratamento originalmente

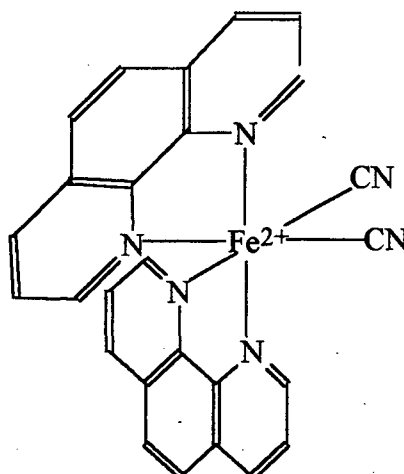


- 1: R₁ = H; R₂ = H
 2: R₁ = H; R₂ = Ph
 3: R₁ = SO₂Me; R₂ = Ph

proposto por Langhals¹⁸ para expressar a polaridade de misturas líquidas binárias, em função da concentração do componente mais polar, trataram-se as soluções salinas como misturas binárias onde o sal solvatado era o cossolvente mais polar. Desta maneira foi possível obter uma equação simples, ajustável a uma variedade de processos químicos que exibiam efeitos salinos.^{19,20} Este tratamento foi estendido a soluções salinas contendo um corante solvatocrômico,¹⁷ resultando um estudo sistemático sobre a polaridade de soluções alcoólicas de eletrólitos, utilizando-se o piridíniofenolato 2 como sonda.²¹ A equação resultante relacionava a polaridade da solução salina, dada pelo correspondente valor de $E_T(30)$, com a concentração molar do sal presente, para vinte combinações sal/solvente.

Posteriormente, a mesma equação foi testada com sucesso por Langhals²² para soluções de LiClO₄ em ácido acético, sistema este que havia sido utilizado anteriormente por Winstein e col. em estudos de formação de pares iônicos.²⁵ Langhals empregou como corante solvatocrômico uma imida (composto 4), base da escala empírica S de Zelinskii.²⁴

Ficava claro assim que outras sondas solvatocrômicas eram capazes de registrar variações de polaridade em soluções salinas, a exemplo do que havia sido feito com as betaínas de Reichardt. Uma destas sondas, o corante dicianobis(1,10-fenantrolina) ferro (II) (composto 5) de fácil obtenção,²⁵ exibiu um comportamento solvatocrômico que se correlacionava bem com a escala $E_T(30)$.²⁶



5

Além disso, o corante **5** exibiu um comportamento redox reversível, o que o fazia especialmente interessante como sonda em estudos por voltametria cíclica de soluções salinas. Gráficos da variação do potencial de **5** em função da concentração de sal adicionado forneceram curvas que tenderam para um patamar.²⁷ A aplicação de um modelo teórico,²⁸ derivado de outros processos eletroquímicos, envolvendo associações com cátions²⁹⁻³³ resultaram em um tratamento que corroborava a equação empírica anteriormente obtida.²¹

1.1.1.2. HALOCROMISMO DE PIRIDINIOFENOLATOS

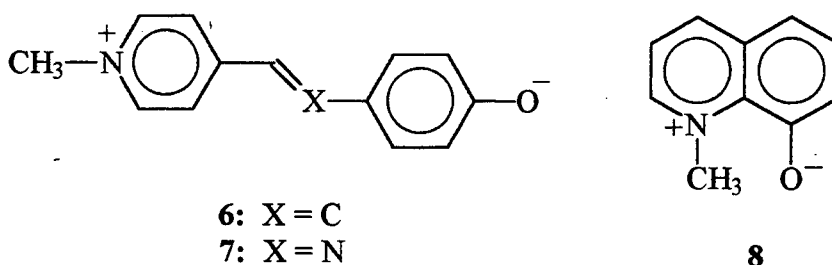
A análise sistemática dos resultados das medidas de polaridade de soluções salinas, através de sondas solvatocrômicas, colocou em evidência a falácia deste propósito. O que se mede não é uma propriedade macroscópica da solução salina, mas simplesmente a interação da sonda com o eletrólito. No caso de piridíniofenolatos, esta interação se dá entre o cátion presente e o fragmento fenolato doador do corante.³⁴⁻³⁹ Observa-se por exemplo que a adição de KI, NaI, LiI, BaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$ e $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ em soluções do composto **2**, em acetonitrila, causa deslocamentos hipsocrômicos variados na sua banda de transferência de carga (TC) intramolecular.³⁴ Este deslocamento aumenta com o aumento da carga efetiva do cátion (carga do íon/raio do íon), ou seja, $\text{Cs}^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Ba}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$.^{21,38,40,41} Um gráfico do deslocamento hipsocrômico induzido pelo sal ($E_T(30)$) em função das cargas

efetivas dos cátions dos sais adicionados em acetonitrila mostra uma correlação linear bastante boa ($r = 0,989$).^{40,41} Os ânions têm pouca influência no halocromismo destes compostos.²¹

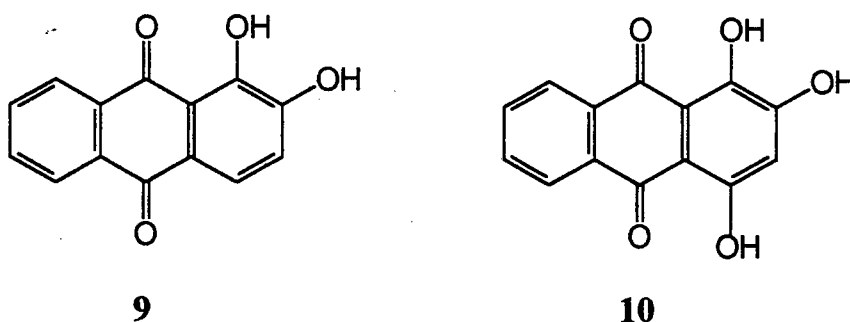
Reichardt sugeriu inicialmente para este tipo de efeito salino a utilização do termo halocromismo negativo (positivo) para o deslocamento hipsocrômico (batocrômico) da banda de absorção UV/Vis de um composto dissolvido com o aumento da concentração do sal.³⁴ Esta definição foi criada por analogia com a definição de solvatocromismo¹ e recebeu bastante aceitação.⁴² De acordo com Reichardt, o halocromismo das betáinas 1-3 constitui o que foi chamado por ele de “halocromismo genuíno ou verdadeiro”,^{8,9} o qual é diferente do halocromismo primeiramente descrito por Baeyer e Villiger⁴³ no início do século. O termo introduzido por estes pesquisadores diz respeito à mudança de coloração de um composto dissolvido pela adição de ácido ou base. Neste caso, uma reação química transforma o composto incolor em um colorido. No halocromismo dos piridíniofenolatos, este deslocamento não é causado por alterações químicas do cromóforo. Reichardt e col. sugeriram então o termo “halocromismo negativo (positivo) verdadeiro”⁴⁴ a fim de que seja feita a diferenciação do halocromismo introduzido por Baeyer e Villiger,⁴³ do qual inúmeros exemplos⁴⁵⁻⁵³ são conhecidos.

A banda de absorção na região visível do espectro das betáinas 1-3 resulta de uma transferência de carga intramolecular da parte doadora (fenolato) para o anel piridínio elétron-aceptor da molécula não-planar.⁵⁴ A posição desta banda TC depende da energia de ionização da parte elétron-doadora e da afinidade eletrônica da porção aceptora da molécula.⁵⁵ Pela adição de um sal a uma solução do piridíniofenolato, o cátion, ao interagir eletrostaticamente com a parte elétron-doadora da molécula, aumenta a energia de ionização do grupo fenolato enquanto a afinidade eletrônica da parte aceptora do corante permanece inalterada.^{9,41} Esta é a explicação para o deslocamento hipsocrômico da banda TC que é observado em soluções salinas destes compostos.

Outros corantes solvatocrômicos que incorporam o grupo doador fenolato também exibem um comportamento halocrômico, como é o caso de merocianinas como os compostos 6 (ref. 56) e 7 (ref. 57), além da betáina 8 (ref. 58), proposta por Ueda e Schelly como uma sonda pequena para o estudo de sistemas micelares.⁵⁹



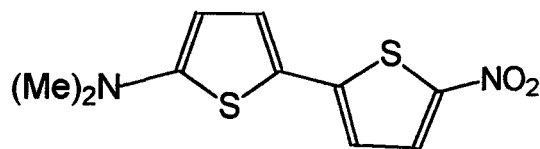
Corantes halocrômicos que poderiam ser incluídos nesta família são a alizarina **9** e a purpurina **10**, de especial interesse histórico pela sua utilização, desde a antiguidade, como bases de inúmeros pigmentos.



Bergerhoff e Wunderlich⁶⁰ isolaram em forma cristalina uma série de complexos metálicos dos correspondentes fenolatos, determinando suas estruturas por difração de raios-X. A variedade de cores obtidas para estes cristais, associada ao conhecimento inequívoco de suas estruturas, ilustram sobejamente a importância do fenômeno do halocromismo, registrado já por Vitruvius e Plínio na Roma antiga.

Cabe finalmente a pergunta quanto a generalidade do comportamento halocrômico. Corantes solvatocrômicos que não possuem um grupo fenolato, capaz de complexação com um cátion, podem ainda exibir um comportamento halocrômico? A resposta é afirmativa. Complexos inorgânicos como **5** têm seus espectros alterados pela adição de cátions ao meio. O complexo quadrado planar bis(tetrametiletilenodiamino)bis(acetilacetato) cobre (II) registra deslocamentos em sua banda solvatocrômica na região visível em presença de sais. Neste caso, entretanto, é a complexação com o ânion a responsável por estas alterações espectroscópicas, o que nos leva a uma distinção entre dois tipos de halocromismo, catiônico como em **2** e **5**, e aniônico.⁵⁶

Finalmente, mesmo quando uma complexação com um sal não parece óbvia, a adição de um eletrólito a uma solução de um corante solvatocrômico pode eventualmente provocar alterações espectrais importantes. Isto pode ser demonstrado para o corante **11**, introduzido recentemente por Effenberger^{61,62} como indicador para medidas de dipolaridade-polarizabilidade π^* de solventes.



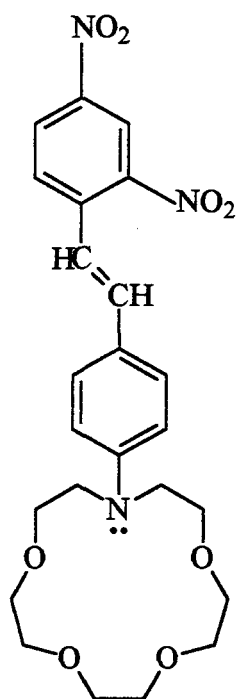
11

A adição de iodeto de sódio a soluções de **11**, em n-butanol, desloca batocromicamente a banda de transferência de carga, o que pode ser justificado pela estabilização crescente do estado excitado mais polar do corante pela presença do eletrólito.⁶³

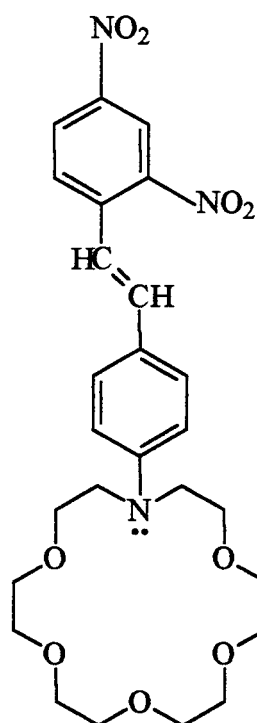
1.1.1.3. COMPOSTOS CROMOIONÓFOROS

A descoberta, por Pedersen, dos éteres coroa e os estudos relacionados com a sua habilidade em formar complexos^{64,65} levaram ao florescimento da química supramolecular.⁶⁶ Os éteres coroa fazem a complexação seletiva de cátions e podem ainda realizar a complexação enantiosseletiva de substratos opticamente ativos.⁶⁷ A idéia de se adicionar uma unidade cromofórica à estrutura dos éteres coroa levou ao surgimento de uma nova classe de corantes conhecidos como cromoionóforos.⁶⁸ Com estes corantes, a complexação seletiva de cátions pode ser acompanhada visualmente por uma mudança de cor na mesma molécula. Diferentes íons alcalinos e alcalino-terrosos causam mudanças de cor diferentes, sendo normalmente observados efeitos significativos com cátions que se ajustam seletivamente dentro das unidades éteres coroa.⁶⁹⁻⁷² Assim, por exemplo, o cromoionóforo **12**, em acetonitrila, sofre deslocamento hipsocrômico e abaixamento da absorvidade molar de sua banda solvatocrômica na presença de íons alcalinos e alcalino-terrosos.⁷³ Entre os íons metálicos alcalinos, o Na^+ provoca um deslocamento maior ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 30,5 \text{ nm}$).⁷³ Com o cromoionóforo **13** em acetonitrila, observa-se que o deslocamento hipsocrômico mais pronunciado entre os

íons alcalinos acontece com o íon K^+ ($\Delta\lambda_{\max} = 95 \text{ nm}$).⁷³ Os íons alcalino-terrosos sempre conduzem a deslocamentos mais pronunciados que os íons alcalinos. Conclui-se que o ajuste do cátion à cavidade do éter coroa, e a interação do íon com o cromóforo, são juntamente importantes na determinação da magnitude dos deslocamentos espectrais que ele induz.^{69-72,74}

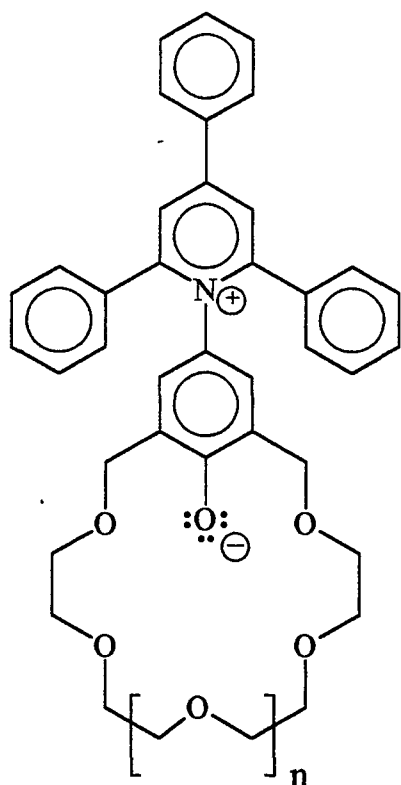


12



13

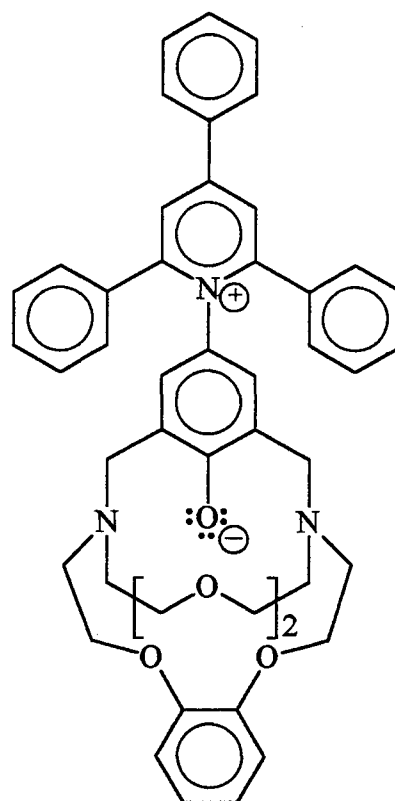
Reichardt e col. recentemente separaram o halocromismo apresentado pelos piridíniofenolatos em dois tipos: halocromismo geral, mostrado pelos compostos 1-3 e o halocromismo cátion-seletivo.^{44,75} A síntese da série de betaínas 14a-c demonstrou que cada um dos compostos da série complexa preferencialmente com um cátion, ou seja, a complexação depende do raio iônico do cátion que melhor se ajusta ao éter coroa.⁴⁴ Assim, por exemplo, a solução violeta da betaína 14b, em acetonitrila, toma uma coloração vermelha carmim se a ela é adicionado iodeto de potássio, ou seja, ocorre um deslocamento hipsocrômico de 59 nm (ref. 75). Como as mudanças de cor induzidas pelos cátions podem ser facilmente verificadas pelo olho humano, os autores sugeriram o uso destes cromoionóforos como indicadores de cátions.



14a ($n = 0$): [15]-coroa-4-betáina

14b ($n = 1$): [18]-coroa-5-betáina

14c ($n = 2$): [21]-coroa-6-betáina



15

Dolman e Sutherland prepararam um piridíniofenolato contendo uma unidade criptante fenólica,⁷⁶ o composto **15**, que mostrou alta seletividade para o Na^+ . Kubo e col. recentemente desenvolveram um novo tipo de cromoionóforo, com a substituição do éter coroa por um calix-4-areno funcionalizado com funções éster.⁷⁷ O corante mostrou uma alta seletividade para o Na^+ . Kirschke e col.⁷⁸ sintetizaram recentemente compostos cromoionofóricos do tipo arilazobutenoato que são seletivos para o Li^+ .

Muitos cromoionóforos estão sendo sintetizados com o objetivo de serem testados como sensores de íons metálicos alcalinos em fibras ópticas.^{79,80} Estes compostos devem, entre outros requisitos, apresentar alta seletividade para o cátion a ser detectado, comparativamente com outros cátions comumente presentes em amostras a serem analisadas.⁸⁰

1.1.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A década passada assistiu a um crescente interesse pelo fenômeno do halocromismo de corantes, o qual é aparentado com o comportamento mais bem estudado do solvatocromismo destes compostos. Paralelamente a uma melhor compreensão daquele fenômeno, aplicações interessantes começaram a ser descritas, relacionadas com o tema mais amplo da química de sais em solução. A possibilidade de acompanhamento visual de processos químicos envolvendo espécies iônicas, através de sua interação com corantes, oferece um amplo leque de aplicações. Assim, desde a simples detecção específica de íons metálicos⁷⁴⁻⁸⁰ passando pela síntese de novos condutores orgânicos,⁸¹ ou pelo desenvolvimento de corantes que proporcionem a distinção visual de íons amônio opticamente ativos,⁸²⁻⁸⁶ ou de espécies quirais associadas a íons alcalinos,⁸⁷ toda uma gama de pesquisas excitantes vem se desenvolvendo, relacionadas com os comportamentos aqui descritos. No campo biológico ou mecanístico, o desenvolvimento de modelos que reproduzam o papel dos cátions alcalinos ou alcalino-terrosos, pela sua capacidade de induzir transformações químicas,⁸⁸⁻⁹³ encontra paralelo no desenvolvimento, na pesquisa de novos materiais, de corantes ionóforos cujo fotocromismo pode ser controlado por cátions em solução.⁹⁴ A descoberta de novos sistemas halocrômicos e sua utilização em uma variedade de processos constitui assim uma área de pesquisa com amplas ramificações e aplicações futuras.

A natureza das soluções químicas e das interações soluto-solvente e solvente-solvente tem sido estudada extensivamente, conforme nos mostra a grande variedade de trabalhos sobre o assunto. Entretanto, muitos pontos permanecem obscuros e outros aspectos foram poucos estudados.

Um, dentre os aspectos a que nos referimos, trata das propriedades halocrômicas dos piridíniofenolatos. A elucidação deste problema importante é muito difícil pelo fato de que diferentemente de um estudo solvatocrômico simples, que se faz com um sistema constituído por um solvente e o corante, neste caso tem-se três componentes (o solvente, o corante e o sal). As descrições existentes na literatura acerca do comportamento halocrômico da família dos compostos 1-3 mostram-nos que o assunto merece ser melhor explorado.^{21,36,37,95}

O objetivo do presente estudo será buscar um modelo geral para o halocromismo dos piridíniofenolatos que interprete o fenômeno do halocromismo como decorrente de interações

do corante com o seu microambiente, ou seja, com a camada de solvente que o circunda em solução.

1.2. PARTE EXPERIMENTAL

O composto 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1-piridínio)-1-fenolato (composto 2) foi preparado segundo procedimento descrito na literatura.^{11,14} O composto 3 (ref. 35) nos foi gentilmente cedido pelo professor Christian Reichardt.

Perclorato de lítio (Fluka) e iodeto de sódio (Merck) foram secos por 12 horas em estufa a vácuo antes de serem empregados e foram guardados em dessecador.

Os solventes analiticamente puros foram purificados e secos por meio de procedimentos descritos na literatura.⁹⁶

Todas as medidas espectrais foram efetuadas em três espectrofotômetros, modelos Shimadzu 210A, Beckman DU-65 e Aminco DW-200, que estavam equipados com compartimentos para cubeta termostatizados para $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Os espectros sempre foram obtidos à temperatura de 25°C .

As concentrações dos corantes, em todos os casos, foram iguais a 5×10^{-4} M. Os valores de E_T para os corantes 2 e 3 foram obtidos dos máximos para os comprimentos de onda (λ_{max}), em nanômetros, das bandas de transferência de carga dos corantes na região visível do espectro,¹³ em um dado solvente, através da equação:

$$E_T = 28591 / \lambda_{\text{max}}$$

A seguir, os valores foram transformados para variações de E_T (ΔE_T), de acordo com a equação abaixo:

$$\Delta E_T = E_T - E_T^0$$

onde E_T^0 e E_T representam as energias de transição para a banda de transferência de carga do corante na região visível do espectro na ausência e na presença do eletrólito, respectivamente.

O procedimento descrito a seguir pode ser generalizado para todos os experimentos realizados. Prepararam-se 100 mL de uma solução 5×10^{-4} M em corante. A solução resultante foi então dividida em dois volumes iguais. Pela adição de uma quantidade determinada do sal, prepararam-se 50 mL de uma solução salina. Desta solução estoque foram então retiradas quantidades determinadas (e.g., 1, 2, 3, 4 mL), que foram transferidas para balões volumétricos de 5 e/ou 10 mL. Os volumes destes pequenos balões foram a seguir completados com a solução do corante sem sal. Todas as soluções preparadas foram agitadas em ultrassom por um minuto, e imediatamente colocadas em uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico a fim de se fazer os espectros.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. RESULTADOS

Foram realizadas medidas espectroscópicas dos piridíniofenolatos **2** e **3** em vários solventes orgânicos na presença de concentrações crescentes de iodeto de sódio e perclorato de lítio. O corante **2** foi utilizado em uma série de álcoois (metanol, etanol, 2-propanol, 1-butanol e 2-butanol), sendo os resultados obtidos empregados para a racionalização do fenômeno do halocromismo em solventes próticos. O corante **3** foi empregado no estudo dos solventes próticos metanol, etanol e 1-butanol. Estudos em soluções salinas de 2-propanol e 2-butanol com este corante não puderam ser realizados por causa da sua pequena solubilidade nestes solventes.

Foram utilizados os dois corantes nas medidas espectroscópicas de soluções de NaI nos solventes apróticos dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), acetonitrila e acetona.

As variações dos valores de E_T para as várias soluções de NaI estão mostradas nas figuras 1.1 e 1.3 para solventes próticos e nas figuras 1.2 e 1.4 para solventes apróticos. Conforme se pode observar pelas figuras, todas as curvas após um aumento inicial nos valores de E_T com a adição do sal tendem ou chegam a um platô para concentrações salinas mais altas. A quase linearidade observada nas curvas para os solventes metanol (curva e da figura 1.1) e DMSO (curva d das figuras 1.2 e 1.4) deve ser vista como um caso à parte.

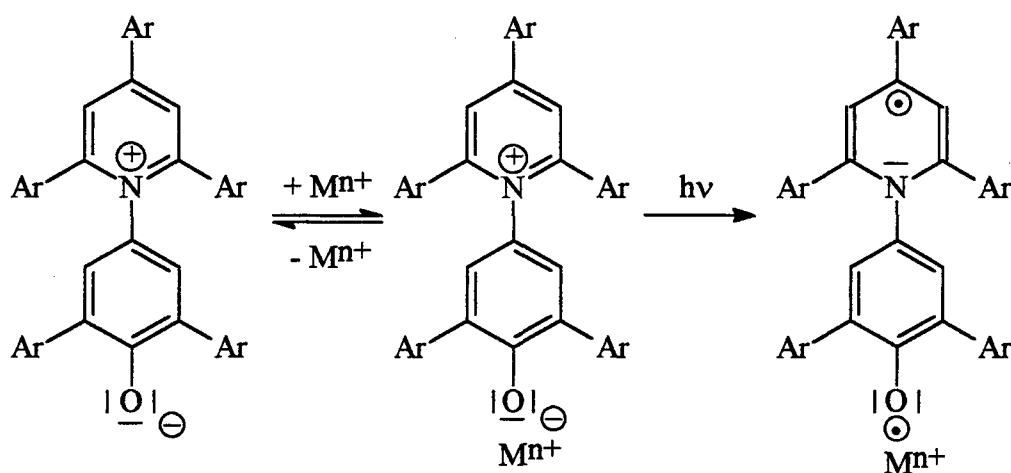
1.3.2. DISCUSSÃO

Há duas correntes na literatura que buscam elucidar o halocromismo de corantes solvatocrômicos. A primeira corrente afirma que os deslocamentos halocrômicos são observados quando um sal é adicionado ao meio, e que resultam de alterações na estrutura do solvente. Estas variações são então traduzidas por mudanças no espectro do corante.

Variações em propriedades do solvente (e.g., mudanças na força iônica ou no campo elétrico do solvente associado), provocadas pela adição do eletrólito ao meio, explicariam o fenômeno observado.^{36,95} Estes efeitos não-específicos não excluem necessariamente efeitos específicos. O estudo destas interações é levantado pela segunda abordagem: o espectro do corante deve refletir as mudanças em seu microambiente, cujas propriedades são diferentes das do solvente como um todo. Esta heterogeneidade foi apontada por pesquisas envolvendo a solvatação preferencial de piridíniofenolatos em diversas misturas de solventes.⁹⁷⁻⁹⁹

Embora seja difícil de se proceder à escolha sem ambigüidades de uma das duas abordagens,¹⁰⁰ porque ambos os efeitos (específicos e inespecíficos) operam naqueles sistemas, neste trabalho buscar-se-á enfatizar o halocromismo como resultando de mudanças no microambiente do corante através da adição de sal.

Estudos envolvendo a solvatação preferencial de piridíniofenolatos em misturas binárias de solventes mostraram que o espectro do corante deve refletir as mudanças em seu microambiente, que apresenta propriedades diferentes das do meio como um todo.⁹⁷⁻⁹⁹ Assim, o halocromismo negativo dos piridíniofenolatos pode ser ilustrado pela formação de um par iônico entre o grupo fenolato elétron-doador carregado negativamente e o cátion do sal adicionado, conforme o diagrama abaixo.⁴¹



$$2: \lambda_{\max} = 626 \text{ nm} (\text{CH}_3\text{CN})^{41}$$

$$3: \lambda_{\max} = 509 \text{ nm} (\text{H}_2\text{O})^{35}$$

$$\lambda_{\max} = 413 \text{ nm} [\text{CH}_3\text{CN} + \text{Mg}(\text{ClO}_4)_2]^{41}$$

$$\lambda_{\max} = 480 \text{ nm} [\text{H}_2\text{O} + \text{Mg}(\text{ClO}_4)_2]^{35}$$

O halocromismo de piridíniofenolatos como o composto 2 se deve portanto à especial sensibilidade do grupo fenolato a espécies ou grupos eletrofílicos em solução. Sabe-se, por

exemplo, que estes compostos são indicadores da capacidade doadora por pontes de hidrogênio do meio.^{101,102} Em soluções de piridíniofenolatos nas quais são adicionados fenóis observa-se uma supressão incompleta da banda de transferência de carga, a qual é explicada pela transferência de próton incompleta do fenol para o grupo fenolato.¹⁰¹ Observou-se também que os valores de $E_T(30)$ aumentam bruscamente quando pequenas quantidades de nitrato de etilamônio são dissolvidas em soluções do corante **2** com diversos solventes.¹⁰³ Um outro trabalho recente¹⁰⁴ relata medidas espectrofotométricas de ligações de hidrogênio entre o composto **2** e água, álcoois ou fenóis empregando-se acetonitrila como solvente. Diversas constantes de associação para os complexos 1:1 formados por ligação de hidrogênio foram obtidas.¹⁰⁴ Esta banda também pode ser suprimida em um solvente bastante apolar pela presença de cátions (e.g., Li^+).^{105,106} A adição de pequenas quantidades de LiClO_4 em uma solução etérea do composto **2** causou um decréscimo da banda em 826 nm, ao qual seguiu-se o aparecimento de uma banda em 555 nm, devido à formação de um complexo corante-cátion.¹⁰⁶ Foi também observado que a adição de sais de amônio quaternários (Bu_4NClO_4 e Bu_4NBr) em uma solução do composto **2** em benzeno leva à formação de complexos fortemente associados entre a betaína e os cátions tetraalquil-amônio.³⁷ Os complexos são evidenciados pelo decréscimo gradual da intensidade da banda de absorção em $\lambda_{\text{max}} \approx 820$ nm até a sua ausência total, simultaneamente ao aparecimento de uma nova banda de absorção ($\lambda_{\text{max}} = 650\text{-}660$ nm). Esta banda deve corresponder ao aparecimento do complexo cátion-corante.³⁷

O efeito halocrômico dos piridíniofenolatos assemelha-se aos deslocamentos análogos observados quando se adiciona um solvente mais polar às soluções dos corantes em solventes orgânicos puros.³⁸ Em ambos os casos ocorre o deslocamento hipsocrômico da banda de transferência de carga do corante sem grandes mudanças na sua forma. As curvas das figuras 1.1-1.4, dos deslocamentos hipsocrômicos induzidos pelo sal em um dado solvente, após um aumento inicial do valor do deslocamento com a adição do sal, tendem ou chegam a um patamar para concentrações salinas mais altas, em conformidade com outros resultados da literatura.^{27, 107}

Variações da banda de transferência de carga do composto **3** em acetonitrila, em concentrações crescentes de LiClO_4 , são mostradas na figura 1.5. As variações espectrais observadas concordam bem com as observações de Pocker e Ciula de que há a formação de um complexo corante-cátion.³⁹ Para concentrações do sal (c_s) menores que a concentração do

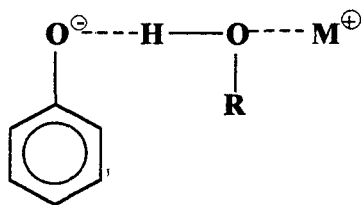
corante (c_c), em solução, a banda de transferência de carga em 700 nm, que resulta da interação entre o corante e o solvente puro, decresce em intensidade com um deslocamento hipsocrômico moderado após a adição do sal (figura 1.5, curvas 1 e 2). Quando $c_s \simeq c_c$, a banda de transferência de carga alarga-se e um grande deslocamento hipsocrômico ocorre quando o sal é adicionado (curva 3). Uma segunda banda bem definida aparece em um comprimento de onda máximo aproximadamente em 610 nm (curva 4), que se desloca hipsocromicamente com um decréscimo na intensidade após uma quantidade maior de sal ser adicionada (curva 5). É necessário entretanto, para isto acontecer, que quantidades muito grandes de sal sejam adicionadas.

As duas bandas aqui mencionadas devem corresponder a duas formas diferentes de interação do corante com o cátion. A primeira banda ocorre em soluções salinas muito diluídas e deve refletir interações do corante com o solvente, que são perturbadas na presença de cátions vizinhos. Pode-se dizer que aqui ocorre a formação de um par cátion-corante fracamente interligado, com o cátion estando separado do átomo de oxigênio fenólico por camadas do solvente. Esta situação evolui para um par cátion-corante ligado mais fortemente após mais sal ser adicionado. O cátion solvatado agora se liga mais fortemente ao grupo fenolato do composto 3. Este par cátion-corante é ainda sensível à adição do sal, mas por causa da forte interação do cátion com o corante, quantidades muito grandes do sal são requeridas para induzir deslocamentos maiores.

Explicadas estas interações, pode-se agora interpretar o comportamento dos compostos 2 e 3 em vários solventes, mostrado nas figuras 1.1-1.4. Após um sal ser adicionado a uma solução do piridíniofenolato, estabelece-se uma competição entre o solvente e o corante (na sua metade fenólica) pelo cátion adicionado. A competição depende da interação do corante com o solvente. Pode-se então considerar três casos extremos no modelo proposto:

- 1) uma interação forte do solvente com o grupo fenolato;
- 2) uma interação forte do solvente com o cátion;
- 3) interações fracas solvente-fenolato e solvente-cátion.

O primeiro caso aplica-se a solventes próticos polares como a água ou metanol. O cátion adicionado substitui com dificuldade moléculas de solvente da camada de solvatação do grupo fenolato. Ainda assim, o cátion, ao ser solvatado pelas moléculas do solvente, torna-o mais ácido, conforme o esquema abaixo:



Este efeito, que aumenta com o aumento da concentração do sal, explica o halocromismo observado nestes sistemas como correspondentes a mudanças estruturais de pares cátion-corante separados por moléculas do solvente. Este efeito do solvente sobre o cátion adicionado decresce com a diminuição de sua habilidade em formar ligações de hidrogênio. Em solventes menos polares como 2-propanol e 2-butanol, este efeito é grandemente diminuído, conforme pode ser visto na figura 1.1, com a formação de pares cátion-corante ligados fortemente em concentrações pequenas do eletrólito.

O segundo caso pode ser exemplificado nas figuras 1.2 e 1.4 pelo halocromismo dos piridíniofenolatos em soluções de iodeto de sódio em DMSO e em DMA. Como se sabe, o DMSO é um solvente aprótico que solvata muito bem cátions a ele adicionados. Como resultado da forte solvatação de Na^+ pelo solvente, a perturbação do corante exercida pelo cátion é fraca.

No terceiro caso inclui-se um solvente como a acetona (ver novamente as figuras 1.2 e 1.4). Como as interações acetona-corante e acetona- Na^+ são fracas, a curva atinge o seu platô em concentrações do sal relativamente pequenas. O grau de halocromismo deste sistema é governado pelos fatores descritos nos dois primeiros casos. Acetona tem um valor de $E_T(30)$ ($42,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) menor que o da acetonitrila ($45,6 \text{ kcal mol}^{-1}$).¹ Isto significa que a interação da acetona com o corante é mais fraca que com a acetonitrila como solvente. Levando em consideração o segundo caso, ou seja, a interação do solvente com o cátion, devemos esperar um grau de solvatação maior por parte da acetona (número doador, $\text{ND}=17 \text{ kcal mol}^{-1}$ em oposição à acetonitrila, $\text{ND}=14,1 \text{ kcal mol}^{-1}$).¹⁰⁸ Os deslocamentos halocrômicos observados para estes solventes nas figuras 1.2 e 1.4 indicam que a interação corante-solvente predomina sobre a interação solvente-cátion, determinando desta forma o grau de halocromismo nos dois solventes.

A adição de sais inorgânicos em solventes orgânicos na presença de um corante piridíniofenolato sempre causa um deslocamento hipsocrômico. O mesmo fenômeno ocorre em soluções aquosas de sais inorgânicos.^{36,39} Entretanto, o inverso acontece em soluções

aquosas de muitos sais orgânicos. Quando brometos de tetraalquilfosfônio são adicionados em soluções aquosas do corante **2**, são observados deslocamentos batocrômicos da banda de transferência de carga,⁹⁵ que confirmam resultados obtidos anteriormente.¹⁷ A explicação que se dá ao fenômeno, de que ele ocorre devido a mudanças na força iônica do meio, não é satisfatória, haja visto que a mesma causa (o aumento na força iônica do meio pela adição do sal inorgânico) leva a deslocamentos opostos no espectro do corante.

Uma explicação melhor é fundamentada na heterogeneidade do sistema. Os piridíniofenolatos são compostos essencialmente hidrofóbicos. É bem conhecido que em misturas de solventes aquosos com um cossolvente orgânico, o corante **2** é solvatado preferencialmente pelo último.^{35,97} Utilizando-se estes argumentos, pode-se concluir que a adição de um cátion orgânico volumoso ao meio gradualmente faz a troca de moléculas de água na camada de solvatação do corante por espécies orgânicas apróticas e carregadas. O microambiente no qual o corante se encontra torna-se menos polar e o deslocamento batocrômico é observado.

Concluindo, apresenta-se aqui um modelo que explica o fenômeno do halocromismo dos piridíniofenolatos considerando-se essencialmente interações em nível microscópico. Efeitos halocrômicos não-específicos resultantes de mudanças induzidas pelo sal adicionado na estrutura do solvente, no entanto, não podem ser inteiramente excluídos. Pode-se afirmar ainda que é difícil estabelecer uma fronteira nítida entre estas duas abordagens mencionadas. Parece entretanto seguro afirmar, pelos resultados aqui apresentados e por outros que abundam na literatura, que o fenômeno do halocromismo de piridíniofenolatos reflete praticamente efeitos específicos de associação corante-cátion. O trabalho recente de Kreevoy e Binder,¹⁰⁹ por exemplo, tenta quantificar esta associação entre Li^+ e a betáina **2** em acetonitrila, mediante uma análise matemática dos espectros do corante na presença de quantidades crescentes de sal em solução.

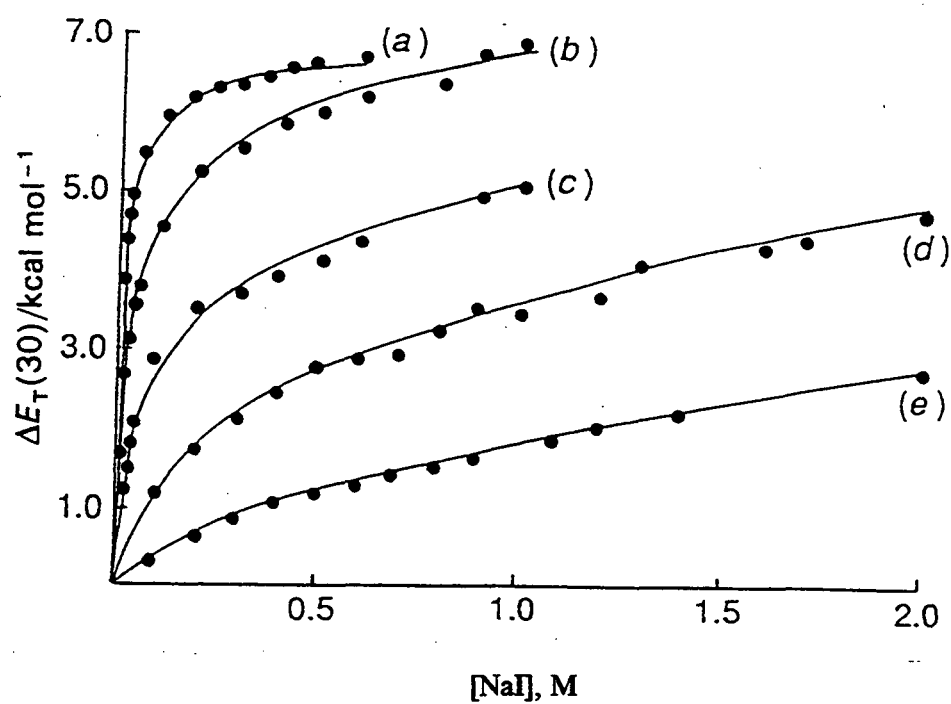


Figura 1.1. Variações dos valores de $E_T(30)$ de soluções alcoólicas de iodeto de sódio com o aumento da concentração do sal. A concentração do corante 2 foi 5×10^{-4} M em todos os casos. As curvas mostradas são para as soluções de NaI em: (a) 2-butanol; (b) 2-propanol; (c) 1-butanol; (d) etanol; (e) metanol.

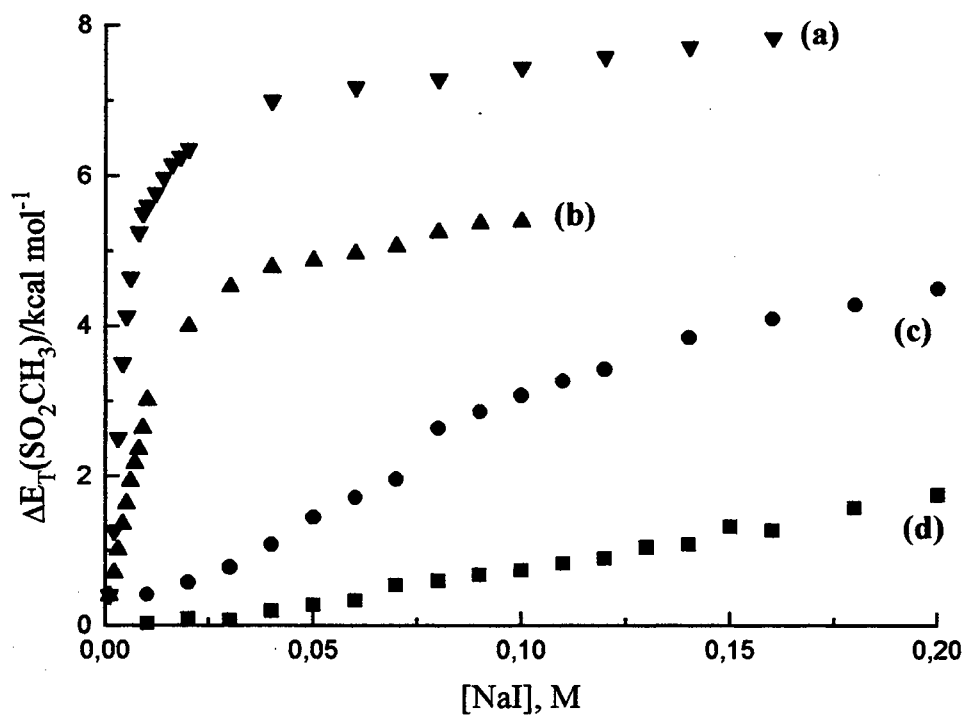


Figura 1.2. Variações dos valores de $E_T[(\text{SO}_2\text{Me})_3]$ de soluções de iodeto de sódio com o aumento da concentração do sal. A concentração do corante **3** foi $5 \times 10^{-4} \text{M}$ em todos os casos. As curvas mostradas são para as soluções de NaI em: (a) acetona; (b) acetonitrila; (c) dimetilacetamida; (d) dimetil sulfóxido.

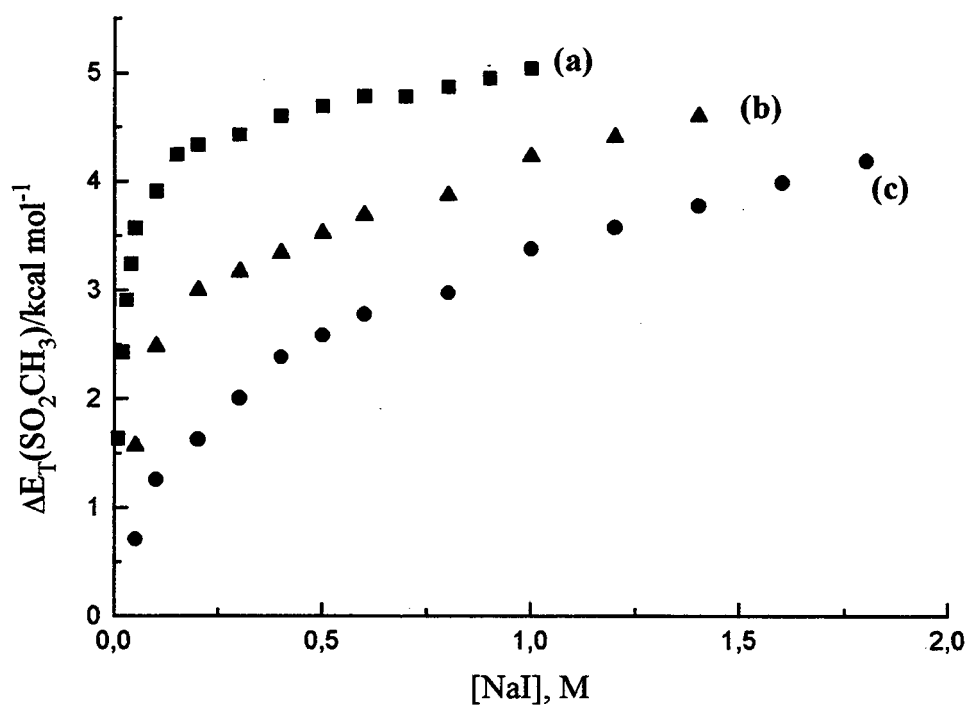


Figura 1.3. Variações dos valores de $E_T[(\text{SO}_2\text{Me})_3]$ de soluções alcoólicas de iodeto de sódio com o aumento da concentração do sal. A concentração do corante **3** foi 5×10^{-4} M em todos os casos. As curvas mostradas são para as soluções de NaI em: (a) 1-butanol; (b) etanol; (c) metanol.

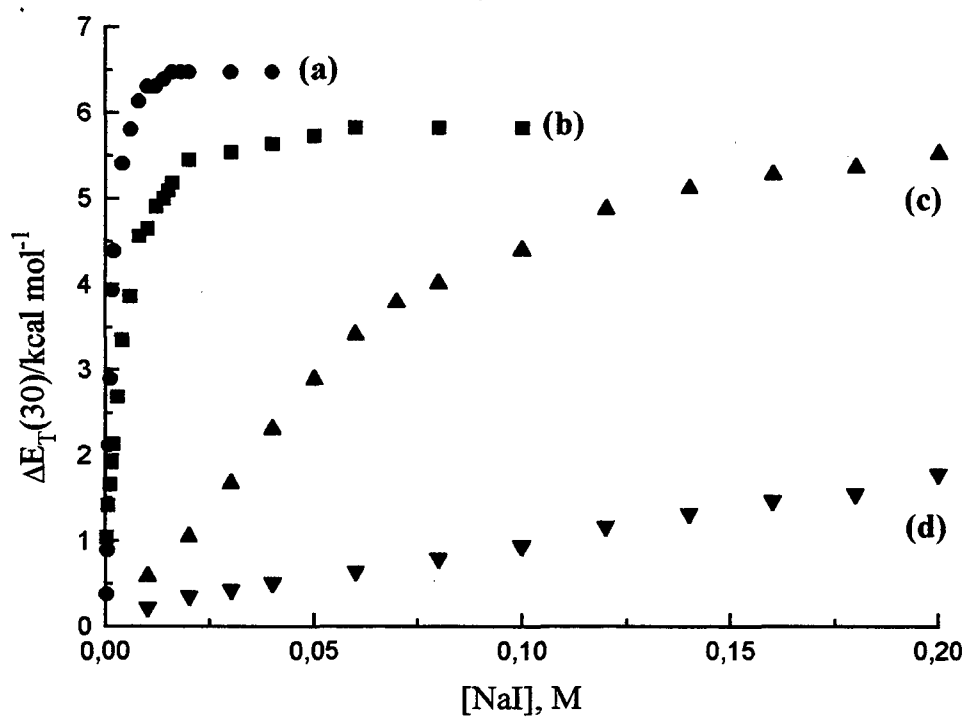


Figura 1.4. Variações dos valores de $E_T(30)$ de soluções de iodeto de sódio com o aumento da concentração do sal. A concentração do corante **2** foi 5×10^{-4} M em todos os casos. As curvas mostradas são para as soluções de NaI em: (a) acetona; (b) acetonitrila; (c) dimetilacetamida; (d) dimetil sulfóxido.

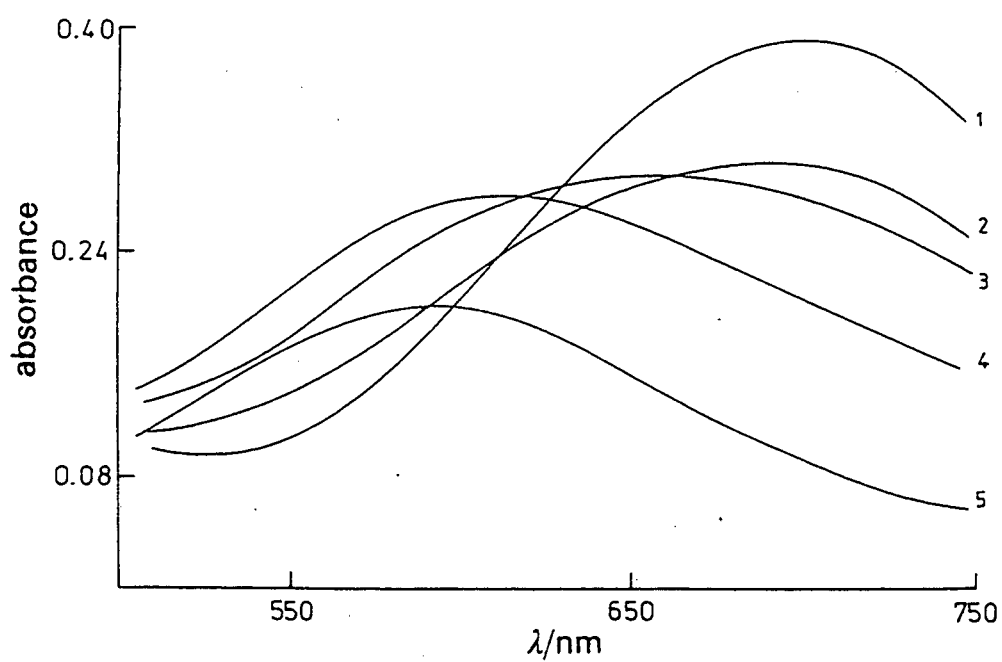


Figura 1.5. Espectros do corante 3 em acetonitrila ($c_{\text{corante}} = 5 \times 10^{-4}$ M) na presença de concentrações crescentes de perclorato de lítio. As concentrações do sal foram 4×10^{-5} M (1), 3×10^{-4} M (2), 4×10^{-4} M (3), 6×10^{-4} M (4) e 2×10^{-3} M (5).

1.4. CONCLUSÕES

O halocromismo dos piridíniofenolatos deve refletir perturbações induzidas pelo sal em nível microscópico, ou seja, na porção doadora fenólica da betaína. Estabelecemos neste trabalho um modelo de halocromismo para as soluções salinas dos piridíniofenolatos. Este modelo leva em consideração o fato de que é estabelecida uma competição entre o solvente e o corante (na sua metade fenólica) pelo cátion após um sal ser adicionado em uma solução do piridíniofenolato.

A competição depende da interação das três espécies presentes. Três casos extremos podem ser considerados: a) uma interação forte do solvente com o grupo fenolato (aplica-se quando o solvente é prótico polar, como a água ou o metanol); b) uma interação forte do solvente com o cátion (pode ser aplicado quando o solvente é prótico e solvata muito bem cátions); e c) interações fracas do solvente com o grupo fenolato e do solvente com o cátion (aplica-se para um solvente como a acetona).

A interpretação do halocromismo da classe dos piridíniofenolatos que aqui foi apresentada, pode ser aplicada para outros compostos halocrômicos devido às semelhanças estruturais que existem entre eles, tais como a proximidade das metades doadora e aceptora ligadas uma a outra por ligações conjugadas.¹¹⁰ Como os grupos doadores em muitos corantes são fenolatos, pode-se esperar um comportamento semelhante destes compostos com o dos piridíniofenolatos. Assim, as conclusões deste trabalho podem também ser aplicadas em um grande número de compostos halocrômicos. Diversos resultados que vêm sendo obtidos recentemente para outros sistemas halocrômicos têm demonstrado a generalidade do modelo aqui apresentado.⁵⁶⁻⁵⁸

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. REICHARDT, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; VCH Verlagsgesellschaft; Weinheim, p. 339-405, 1988.
2. REICHARDT, C. "Empirical Parameters of Solvent Polarity as Linear Free-Energy Relationships". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 18, p. 98-110, 1979.
3. REICHARDT, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; VCH Verlagsgesellschaft; Weinheim, p. 285-338, 1988.
4. FABIAN, J., ZAHRADNÍK, R. "The Search for Highly Colored Organic Compounds". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28, p. 677-828, 1989.
5. GORDON, J. E. "Transition Energies for a Merocyanine Dye in Aqueous Electrolyte Solutions. Solvent Polarity Indicator Transition Energy-Internal Pressure Relations". *J. Phys. Chem.* 70, p. 2413-2416, 1966.
6. MOHAMMAD, M., KOSOWER, E. M. "Solvent Polarity in Electrochemical and other Salt Solution Studies". *J. Phys. Chem.* 74, p. 1153-1154, 1970.
7. DAVIDSON, S. J., JENCKS, W. P. "The Effect of Concentrated Salt Solutions on a Merocyanine Dye, a Vinylogous Amide". *J. Am. Chem. Soc.* 91, p. 225-234, 1969.
8. REICHARDT, C. "Solvatochromism, Thermochromism, Piezochromism, Halochromism, and Chiro-Solvatochromism of Pyridinium N-Phenoxide Betaine Dyes". *Chem. Soc. Rev.* p. 147-153, 1992.
9. REICHARDT, C. "Solvatochromic Dyes as Empirical Indicators of Solvent Polarity". *Chimia* p. 322-324, 1991.

10. REICHARDT, C. *et al.* "Solute/Solvent Interactions and their Empirical Determination by Means of Solvatochromic Dyes". *Pure & Appl. Chem.* 65, p. 2593-2601, 1993.
11. DIMROTH, K. *et al.* "Über Pyridinium-N-Phenol-Betaine und Ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln". *J. Liebigs Ann. Chem.* 661, p. 1-37, 1963.
12. ANDERSEN, H. C. *Contos de Andersen*; trad. por Guttorm Hanssen; Paz e Terra; São Paulo, 1988.
13. A energia de transição $E_T(30)$ é definida como: $E_T(30)/\text{kcal.mol}^{-1} = hc\nu N_A = 28591/\lambda_{\text{max}}$ (nm), cf. referências 1 e 11.
14. REZENDE, M. C., RADETSKI, C. M. "An Improved Preparation of the $E_T(30)$ Betaine". *Química Nova* 11, p. 353-354, 1988.
15. KESSLER, M. A., WOLFBEIS, O. S. "An Improved Synthesis of the Solvatochromic Dye $E_T(30)$ ". *Synthesis* p. 635-636, 1988.
16. ALDRICH CHEMICAL COMPANY; Milwaukee/EUA; *Aldrichimica Acta* 20, 59, 1987 (Catálogo da Aldrich 1990/1991, nº de ordem 27, 244-2).
17. REZENDE, M. C., DAL SASSO, L. I. "Polarity of Salt Solutions: a General Empirical Equation". *Rev. Roum. Chim.* 31, p. 323-326, 1986.
18. LANGHALS, H. "Polarity of Binary Liquid Mixtures". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21, p. 724-733, 1982.
19. REZENDE, M. C., ZANETTE, D., ZUCCO, C. "A General Empirical Equation for Salt Effects". *Tetrahedron Lett.* 25, p. 3423-3424, 1984.

20. REZENDE, M. C., ZUCCO, C., ZANETTE, D. "Polarity and Salt Effects: a General Empirical Relationship". *Tetrahedron* 41, p. 87-92, 1985.
21. REZENDE, M. C. "The Polarity Of Alcoholic Electrolyte Solutions. A Systematic Study". *Tetrahedron* 44, p. 3513-3522, 1988.
22. LANGHALS, H. "The Polarity of Solutions of Electrolytes". *Tetrahedron* 43, p. 1771-1774, 1987.
23. WINSTEIN, S., KLINEDINST, P. E., ROBINSON, C. G. "Salt Effects and Ion Pairs in Solvolysis and Related Reactions. XVII. Induced Common Ion Rate Depression and the Mechanism of the Special Salt Effect". *J. Am. Chem. Soc.* 83, p. 885, 1960.
24. ZHMYREVA, I.A. *et al.* "Universal Scale for the Action of Solvents on the Electron Spectra of Organic Compounds". *Dokl. Akad. Nauk. S. S. S. R.* 129, 1089-1092, 1959 [C.A. (1961), 55, 26658e].
25. SOUKUP, R. W., SCHMID, R. "Metal Complexes as Color Indicators for Solvent Parameters". *J. Chem. Educ.* 62, p. 459-462, 1985.
26. BURGESS, J. "Solvent Effects on Visible Absorption Spectra of bis-(2,2'-bipyridyl)biscyanoiron (II), bis-(1,10-phenanthroline)biscyanoiron (II), and Related Compounds". *Spectrochim. Acta Part A* 26, p. 1369-1374, 1970.
27. RODRIGUES, C. A., STADLER, E., REZENDE, M. C. "Electrochemical Approach to Halochromism: Effect of Salts upon the Oxidation Potential of $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{Phen})_2$ ". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87, p. 701-705, 1991.
28. PEOVER, M. E., DAVIES, J. D. "The Influence of Ion-Association on the Polarography of Quinones in Dimethylformamide". *J. Electroanal. Chem.* 6, p. 46-53, 1963.

29. KRYGOWSKI, T. M., FAWCETT, W. R. "Complementary Lewis Acid-Base Description of Solvent Effects. I. Ion-Ion and Ion-Dipole Interactions". *J. Am. Chem. Soc.* 97, p. 2143-2148, 1975.
30. RYAN, M. D., EVANS, D. H. "Effect of Metal Ions on the Electrochemical Reduction of Benzil in Non-Aqueous Solvents". *J. Electroanal. Chem.* 67, p. 333-357, 1976.
31. LESNIEWSKA-LADA, E., KALINOWSKI, M. K. "Solvent Effect on the Association Equilibria of 1,4-Benzosemiquinone-Li⁺ System". *Electrochim. Acta* 28, p. 1415-1419, 1983.
32. KRYGOWSKI, T. M. "An Empirical Equation Describing Solvation Effects on the Polarographic Reduction of 1,2- and 1,4-Naphtoquinones in the Presence of Ion Pairing Phenomena". *J. Electroanal. Chem.* 35, p. 436-439, 1972.
33. DESBENE-MONVERNAY, A. *et al.* "Ion-Pair Effects on the Electroreduction and Electrochromic Properties of ortho-Chloranil in Dipolar Aprotic Solvents". *J. Electroanal. Chem.* 216, p. 203-212, 1987.
34. REICHARDT, C., HARBUSCH-GÖRNERT, E., SCHÄFER, G. "Herstellung und UV/VIS-spektroskopische Eigenschaften eines wasserlöslichen Carboxylat-substituierten Pyridinium-N-phenolat-Betainfarbstoffs". *Liebigs Ann. Chem.* p. 839-844, 1988.
35. REICHARDT, C., MILART, P., SCHÄFER, G. "Synthese und UV/VIS-Spektroskopische Eigenschaften Solvatochromer und Halochromer Methansulfonyl-Substituierter Pyridinium-N-Phenolat-Betain Farbstoffe". *Collect. Czech. Chem. Commun.* 55, p. 97-118, 1990.
36. KOPPEL, I. A., KOPPEL, J. B. "E_T-Parameters of Aqueous Solutions of Some Strong Electrolytes". *Org. React. (USSR)* 21, p. 98-123, 1984 [C.A., 1985, 103, 37044p].

37. KOPPEL, I. A., KOPPEL, J. B., PIHL, V. O. "The Influence of Strong Electrolytes on E_T -Parameters of Some Nonaqueous Solvents". *Org. React. (USSR)* 21, p. 144-159, 1984 [C.A., 1985, 103, 12232k].
38. HOLLMANN, G., VÖGTLE, F. "Kationen-Selektivität neuer Chromoiono-phore mit stark lösungsmittelabhängiger Lichtabsorption. Zur optischen Enantiomeren-Differenzierung mit chiralen Chromoiono-phoren". *Chem. Ber.* 117, p. 1355-1363, 1984.
39. POCKER, Y., CIULA, J. C. "Electrostatic Catalysis by Ionic Aggregates. 7. Interactions of Dipolar Indicator Molecules with Ionic Clusters". *J. Am. Chem. Soc.* 111, p. 4728-4735, 1989.
40. BOCK, H., HERRMANN, H. F. "Einelektronen-Redoxreaktionen von 4-(1-Pyridinio)phenolat-Betain: ESR/ENDOR-Charakterisierung seiner Radikationen und 'Batterie-Effect'". *Helv. Chim. Acta* 72, p. 1171-1185, 1989.
41. REICHARDT, C., ASHARIN-FARD, S., SCHÄFER, G. "Pyridinium N-Phenoxide Betaines and their Application to the Characterization of Solvent Polarities. XIX. The Halochromism of Pyridinium N-Phenoxide Betaine Dyes in Acetonitrile Solution". *Chem. Ber.* 126, p. 143-148, 1993.
42. MULLER, P. "Glossary of Terms used in Physical Organic Chemistry". *Pure & Appl. Chem.* 66, p. 1077-1184, 1994.
43. BAEYER, A., VILLIGER, V. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 35, p. 1189, 1902.
44. REICHARDT, C., ASHARIN-FARD, S. "Chromoionophoric Pyridinium-N-phenolate Betaine Dyes". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, p. 558-559, 1991.
45. RUPE, H., HAGENBACH, H., COLLIN, A. "p-Dimethylamino-benzal-chinaldin. Ein Beitrag zur Kenntnis der Wirkung chromophorer und auxochromer Gruppen". *Helv. Chim. Acta* 18, p. 1395-1413, 1935.

46. BROOKER, L. G. S., SPRAGUE, R. H. "Color and Constitution. III. Absorption of 2-p-Dimethylaminostyrylquinoline and Its Salts. The Effect on Absorption of a Benzene Ring in the Chromophoric Chain of Dyes". *J. Am. Chem. Soc.* 63, p. 3203, 1941.
47. STEFANYE, D. "Halochromism Studies on Prodigiosin". *J. Org. Chem.* 25, p. 1261-1262, 1960.
48. IMAFUKU, K., MATSUMURA, H. "Synthesis and Halochromism of 4- and 6-Styryl-2-aminotropones". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 46, p. 199-203, 1973.
49. HELLRUNG, B., BALLI, H. "Halochrome Molekeln. Thermodynamische und kinetische Untersuchungen zum acidobasischen Verhalten substituierter 6,6-Diphenyl-6H-chromeno [4,3-b]indole". *Helv. Chim. Acta* 63, p. 1284-1293, 1980.
50. HALLAS, G. *et al.* "The Effects of Cyclic Terminal Groups in 4-Aminoazobenzene and Related Azo Dyes. Part 1. Electronic Absorption Spectra of Some Monoazo Dyes derived from N-Phenylpyrrolidine and Phenylpiperidine". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* p. 149-153, 1984.
51. GUNZENHAUSER, S., BALLI, H. "Halochrome Molekeln. Synthese substituierter 6H-Chromeno[4,3-b]indolizine und ihrer Aza-analogen". *Helv. Chim. Acta* 68, p. 56-71, 1985.
52. MORI, A., LI, Z. H., TAKESHITA, H. "An Exceptionally-Large Negative Halochromism in 2-(4-Ethoxycarbonylphenyl)-2,3-dihydro-3,3-dimethyl-5,6-cycloheptapyrazole-dione, a Hinopurpurin Derivative". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 62, p. 3029-3030, 1989.
53. GUNZENHAUSER, S., BALLI, H. "Halochrome Moleküle. Substituierte 6,11-Dihydrospiro[[1]benzopyrano[4,3-b]indol-6,9'-9'H-xanthen]-2',6'-diamine und ihre Aza-analogen: Neue Chromogene für schwarze Farbbilder". *Helv. Chim. Acta* 73, p. 359-379, 1990.

54. ALLMANN, R. "Die Kristallstruktur des 2,6-Diphenyl-4-(4-bromphenyl)-N-(p-oxy-m,m'-diphenyl)-phenyl-pyridinium-betain-monoäthanolats". *Z. Kristallogr.* 128, p. 115-132, 1969.
55. FOSTER, R. "Electron Donor-Acceptor Complexes". *J. Phys. Chem.* 84, p. 2135-2141, 1980.
56. REZENDE, M. C. *et al.* "Cationic and Anionic Halochromism". *J. Phys. Org. Chem.* 6, p. 637-641, 1993.
57. MACHADO, C., NASCIMENTO, M. G., REZENDE, M. C. "Solvato- and Halochromic Behavior of Some 4-[(N-methylpyridinium)-methylideneamino]phenolate Dyes". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, p. 2539-2544, 1994.
58. MACHADO, V. G., NASCIMENTO, M. G., REZENDE, M. C. *Livro de Resumos da 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, FQ-074, 1995.
59. UEDA, M., SCHELLY, Z. A. "Reverse Micelles of Aerosol-OT in Benzene. 4. Investigation of the Micropolarity Using 1-Methyl-8-oxyquinolinium Betaine as a Probe". *Langmuir* 5, p. 1005-1008, 1989.
60. WUNDERLICH, C.-H., BERGERHOFF, G. "Constitution and Color of Alizarin and Purpurin Dyes". *Chem. Ber.* 127, p. 1185-1190, 1994.
61. EFFENBERGER, F., WUERTHNER, F. "5-Dimethylamino-5'-nitro-2,2'-bithiophene - a New Dye with Pronounced Positive Solvatochromism". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32, p. 719-721, 1993.
62. EFFENBERGER, F., WUERTHNER, F. "Synthesis and Solvatochromic Properties of Donor-Acceptor Substituted Oligothiophenes". *J. Org. Chem.* 60, p. 2082-2091, 1995.

63. RAMIREZ, C. B., CARRASCO, N., REZENDE, M. C. "Halochromic and Solvatochromic of a π^* Probe in Binary Solvent Mixtures". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 91, p. 3839-3842, 1995.
64. PEDERSEN, C. J. "Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts". *J. Am. Chem. Soc.* 89, p. 2495-2496, 1967.
65. PEDERSEN, C. J. "Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts" *J. Am. Chem. Soc.* 89, p. 7017-7036, 1967.
66. LEHN, J.-M. "Supramolecular Chemistry - Scope and Perspectives. Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture)". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, p. 89-112, 1988.
67. VÖGTLE, F., KNOPS, P. "Dyes for Visual Distinction between Enantiomers: Crown Ethers as Optical Sensors for Chiral Compounds". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, p. 958-960, 1991.
68. DIX, J. P., VÖGTLE, F. "Ionenselektive Kronenether-Farbstoffe". *Angew. Chem.* 90, p. 893-894, 1978.
69. WEBER, E. "Progress in Crown Ether Chemistry (Part IV E): New Applications of Crown Compounds in Chemical Analysis". *Kontakte (Darmstadt)* 1, p. 26-43, 1984.
70. TAKAGI, M., UENO, K. "Crown Compounds as Alkali and Alkaline Earth Metal Ion Selective Chromogenic Reagents". *Top. Curr. Chem.* 121, p. 39-65, 1984.
71. LÖHR, H.-G., VÖGTLE, F. "Chromo- and Fluoroionophores. A New Class of Dye Reagents". *Acc. Chem. Res.* 18, p. 65-72, 1985.
72. KANEDA, T. "Metal Ion-Selective Coloration with Crown Ether Dyes". *Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi* 46, p. 96-107, 1988 [C.A., 1988, 108, 160414q].

73. DIX, J. P., VÖGTLE, F. "Ionenselektive Farbstoffkronenether". *Chem. Ber.* 113, p. 457-470, 1980.
74. JONKER, S. A., ARIESE, F., VERHOEVEN, J. W. "Cation Complexation with Functionalized 9-Arylacridinium Ions: Possible applications in the Development of Cation-Selective Optical Probes". *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 108, p. 109-115, 1989.
75. REICHARDT, C., ASHARIN-FARD, S., SCHÄFER, G. "Synthesis, Solvatochromism, and Halochromism of Chromoionophoric Crown Ether-Substituted Pyridinium N-Phenolate Betaine Dyes". *Liebigs Ann. Chem.* p. 23-34, 1993.
76. DOLMAN, M., SUTHERLAND, I. O. "A Novel Pyridinium Betaine Derivative of a Phenolic Cryptand". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p.1793-1795, 1993.
77. KUBO, Y. *et al.* "New Chromoionophores Based on Indoaniline Dyes Containing Calix[4]arene". *Tetrahedron Lett.* 32, p. 7419-7420, 1991.
78. KIRSCHKE, K. *et al.* "Lithium-selektive Chromoionophore vom Arylazobutenoat-Typ". *Liebigs Ann. Chem.*, p. 265-268, 1994.
79. SHOLL, A. F., SUTHERLAND, I. O. "Selective Chromogenic Reagents base upon Phenolic Cryptands". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 1716-1718, 1992.
80. SANDANAYAKE, K. R. A. S., SUTHERLAND, I. O. "Chromoionophores with Lithium and Sodium Selectivity". *Tetrahedron Lett.* 34, p. 3165-3168, 1993.
81. KIMURA, K., YAMASHITA, T., YOKOYAMA, M. "Photochemical Switching of Ionic Conductivity in Composite Films Containing a Crowned Spirobenzopyran". *J. Phys. Chem.* 96, p. 5614-5617, 1992.

82. KANEDA, T. *et al.* "Synthesis, Coloration, and Crystal Structure of the 'Dibasic' Chromoacerand-Piperazine 1:1 Salt Complex". *J. Am. Chem. Soc.* 110, p. 2970-2972, 1988.
83. KANEDA, T., HIROSE, K., MISUMI, S. "Chiral Azophenolic Acerands: Color Indicators to Judge the Absolute Configuration of Chiral Amines". *J. Am. Chem. Soc.* 111, p. 742-743, 1989.
84. MISUMI, S. "Amine Selective Coloration with Chromoacerands". *Pure & Appl. Chem.* 62, p. 493-498, 1990.
85. NISHI, T. *et al.* "Detection of Chirality by Colour". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 339-341, 1991.
86. MISUMI, S. "Recognitory Coloration of Cations with Chromoacerands". *Top. Curr. Chem.* 165, p. 165-192, 1993.
87. SHINKAI, S., NISHI, T., MATSUDA, T. "Chirality Recognition by a Color Change in Crowned Cholesteric Liquid Crystals". *Chem. Lett.* p. 437-440, 1991.
88. INOUE, M. *et al.* "Alkali Metal Recognition Induced Isomerization of Spiropyrans". *J. Am. Chem. Soc.* 112, p. 8977-8979, 1990.
89. KIMURA, K., YAMASHITA, T., YOKOYAMA, M. "Cation-specific Isomerization of Crowned Spirobenzopyrans". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 147-148, 1991.
90. KIMURA, K., YAMASHITA, T., YOKOYAMA, M. "Syntheses, Cation Complexation, Isomerization and Photochemical Cation-binding Control of Spirobenzopyrans Carrying a Monoazacrown Moiety at the 8-Position". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* p. 613-619, 1992.

91. INOUE, M., UENO, M., KITAO, T. "Transmission of Recognition Information to Other Sites in a Molecule: Proximity of Two Remote Sites in the Spirobenzopyran by Recognition of Alkali-Metal Cations". *J. Org. Chem.* 57, p. 1639-1641, 1992.
92. INOUE, M. *et al.* "Alkali-Metal Cation Recognition Induced Isomerization of Spirobenzopyrans and Spironaphthoxazins Possessing a Crown Ring as a Recognition Site: Multifunctional Artificial Receptors". *J. Org. Chem.* 57, p. 5377-5383, 1992.
93. INOUE, M., NOGUCHI, Y., ISAGAWA, K. "Sensitive and Selective Coloration of Cryptand-Type Crown Spirobenzopyrans for Alkaline-Earth Metal Cations". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, p. 1163-1166, 1994.
94. KIMURA, K. *et al.* "Cation Complexation, Photochromism, and Reversible Ion-Conducting Control of Crowned Spironaphthoxazine". *J. Org. Chem.* 59, p. 1251-1256, 1994.
95. HARROD, W. B., PIANTA, J. "Solvent Polarity Scales. 1. Determination of E_T and π^* Values for Phosphonium and Ammonium Melts". *J. Phys. Org. Chem.* 3, p. 534-544, 1990.
96. VOGEL, A. I. *Textbook of Practical Organic Chemistry*, London: Longman, 1989.
97. DAWBER, J. G., WARD, J., WILLIAMS, R. A. "A Study in Preferential Solvation using a Solvatochromic Pyridinium Betaine and its Relationship with Reaction Rates in Mixed Solvents". *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 84, p. 713-727, 1988.
98. BECKETT, M. A., DAWBER, J. G. "A Computer Simulation of the Solvation of a Solvatochromic Pyridinium Betaine". *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 85, p. 727-733, 1989.

99. DAWBER, J. G. "Relationship between Solvatochromic Solvent Polarity and Various Thermodynamic and Kinetic Data in Mixed Solvent Systems". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 86, p. 287-291, 1990.
100. ZASLAVSKY, B. Y. *et al.* "Solvent Polarity of Aqueous Polymer Solutions as measured by the Solvatochromic Technique". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 86, p. 519-524, 1990.
101. SPANGE, S. *et al.* "Bestimmung der empirischen Lösungsmittelpolaritäts-Parameter $E_T(30)$ und NA für 55 substituierte Phenole". *Liebigs Ann. Chem.*, p. 323-329, 1991.
102. MARCUS, Y., MIGRON, Y. "Polarity, Hydrogen Bonding Ability of Some Binary Aqueous-Organic Mixtures". *J. Phys. Chem.* 95, p. 400-406, 1991.
103. HERFORT, I. M., SCHNEIDER, H. "Spectroscopic Studies of the Solvent Polarities of Room-Temperature Liquid Ethylammonium Nitrate and Its Mixtures with Polar Solvents". *Liebigs Ann. Chem.* p. 27-31, 1991.
104. COLEMAN, C. A., MURRAY, C. J. "Hydrogen Bonding between a N-Pyridinium Phenolate Betaine and O-H Donors in Acetonitrile". *J. Org. Chem.* 57, p. 3578-3582, 1992.
105. BRAUN, R., SAUER, J. "Die Polarität etherischer Lithiumperchlorat-Lösungen". *Chem. Ber.* 119, p. 1269-1274, 1986.
106. POCKER, Y., CIULA, J. C. "Electrostatic Catalysis by Ionic Aggregates. 7. Interactions of Dipolar Indicator Molecules with Ionic Clusters". *J. Am. Chem. Soc.* 111, p. 4728-4735, 1989.

107. OLIVEIRA, C. C. L., REZENDE, M. C. "Pyridiniophenolate Dyes as Probes for Selective Cation Solvation in Binary Solvent Mixtures". *J. Braz. Chem. Soc.* 2, p. 21-24, 1991.
108. MARCUS, Y. "The Effectivity of Solvents as Electron Pair Donors". *J. Sol. Chem.* 13, p. 599-624, 1984.
109. BINDER, D.A., KREEVOY, M.M. "Interaction of Li⁺ with Phenoxide Ions in Acetonitrile". *J. Phys. Chem.* 98, p. 10008-10016, 1994.
110. BUNCEL, E., RAJAGOPAL, S. "Solvatochromism and Solvent Polarity Scales". *Acc. Chem. Res.* 23, p. 226-231, 1990.

CAPÍTULO 2

**SOLVATAÇÃO PREFERENCIAL DE UM CORANTE β -
SENSITIVO EM MISTURAS BINÁRIAS CONTENDO UM
SOLVENTE APRÓTICO E OUTRO HIDROXILADO**

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As misturas de solventes são de extrema importância para o estudo de processos químicos. Dentre a larga variedade de utilizações, pode-se citar o seu uso em separações cromatográficas, em síntese orgânica, em estudos mecanísticos para reações em solução e também em hidrometalurgia. Em alguns casos, misturas de líquidos são obtidas da natureza, como no exemplo do petróleo ou dos extratos de óleos essenciais. Vários exemplos podem ainda ser encontrados, na literatura, de misturas de solventes que foram selecionadas por suas propriedades químicas, a fim de melhorar a solubilidade de um dado substrato, e para afetar a velocidade de formação e o rendimento de produtos desejados, pelo aumento e supressão de reatividade.^{1,2}

Corantes solvatocrômicos têm sido empregados freqüentemente na investigação das propriedades de misturas de solventes. O fato de que o seu comportamento em solução reflete principalmente interações específicas com o seu microambiente (ver o capítulo 1) tem feito deles sondas apropriadas para estudos de misturas binárias. As pesquisas realizadas nesta área envolvem freqüentemente o campo das misturas de solventes prótico-aprótico, devido não somente ao largo uso daqueles meios em processos químicos, como também pela sua complexidade, com atrações dipolo-dipolo fortes ocorrendo lado a lado com interações por ligações de hidrogênio.

Quando uma molécula do corante é colocada em uma mistura de dois solventes, a composição local da mistura é, em geral, diferente da sua concentração como um todo. Tal fato pode ser demonstrado pela não-linearidade do deslocamento solvatocrômico da absorção UV/VIS do corante e/ou do seu espectro de emissão. Este comportamento não linear pode ser melhor visualizado por gráficos das energias de transição do soluto em função da fração molar do solvente mais polar.³⁻⁵ A este fenômeno dá-se o nome de solvatação preferencial.

Os corantes podem ser classificados em α - ou β -sensitivos, de acordo com a sua sensibilidade às propriedades do meio. Deste modo, os corantes que são predominantemente sensitivos às propriedades elétron-aceptoras de um solvente recebem a denominação de α -sensitivos, enquanto os corantes β -sensitivos refletem principalmente as propriedades doadoras do meio. Esta classificação originou-se dos estudos de solventes através de equações multiparamétricas, desenvolvidas por Kamlet, Taft e col.^{1, 6-14} que podem ser representadas pela forma geral mostrada abaixo:

$$XYZ = XYZ_0 + s\pi^* + a\alpha + b\beta + d\delta$$

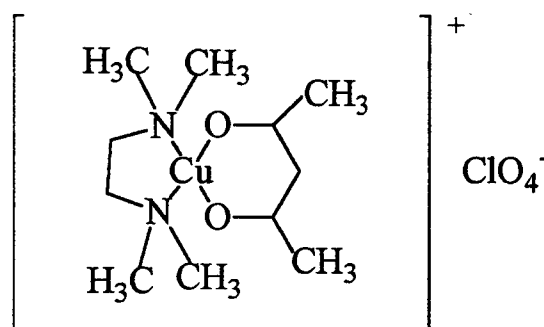
onde XYZ representa uma medida espectroscópica do efeito do solvente, π^* mede a polaridade/polarizabilidade do solvente, α mede a sua habilidade para doar um átomo de hidrogênio para formar uma ligação de hidrogênio e β a sua tendência para doar um par de elétrons para formação da ligação de hidrogênio. O parâmetro δ modifica o efeito da polarizabilidade medida por π^* para certas classes de solventes.

Os corantes β -sensitivos 4-nitrofenol e 4-nitrobenzamina são sensíveis para π^* e β , conforme foi mostrado por regressões lineares de variáveis múltiplas.^{15,16} Já o corante de Dimroth e Reichardt, 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1-piridínio)fenolato (ver o Capítulo 1), e o complexo de ferro dicianobis(1,10-fenantrolino)ferro (II) são dois ótimos corantes α -sensitivos, conforme foi demonstrado por Marcus.¹⁷

A larga variedade de corantes solvatocrômicos empregados nos estudos de misturas binárias de solventes prótico-aprótico tem em comum o fato de que eles são geralmente fortemente sensíveis à habilidade aceptora do meio por ligações de hidrogênio.¹⁸⁻²³ Desta forma, os desvios do comportamento ideal em misturas compreendendo solventes próticos são geralmente explicados como decorrentes de ligações de hidrogênio do solvente com o corante.

Pouquíssimos estudos empregando corantes que são sensíveis somente à capacidade elétron-doadora do meio foram realizados. Entre estes corantes, a série de sais de etilenodiaminoacetilacetato cobre (II), preparados primeiramente por Fukuda e Sone,²¹ são exemplos importantes de corantes que não são sensíveis à habilidade elétron-aceptora do meio, e são considerados sondas exclusivas para a habilidade doadora do solvente.¹⁷ Foi

demonstrado que a cor das soluções de um deles, o complexo quadrado planar perclorato de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiaminoacetilacetonato cobre (II) (corante 1), em diversos solventes relaciona-se linearmente com a capacidade doadora do meio.²⁴ A sua banda solvatocrômica pode ser interpretada como uma banda de transição d-d que ocorre devido à interação do solvente doador com o íon metálico do complexo.²⁵ Marcus e Migron recentemente empregaram o composto 1 na determinação do parâmetro β de Kamlet e Taft para alguns solventes e misturas de solventes.^{17, 26, 27} Um estudo do solvatocromismo do corante 1 em misturas de dimetilformamida (DMF) com nitrometano foi publicado recentemente.²⁸



composto 1

2.1.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Decidiu-se no presente trabalho estender o estudo solvatocrômico para misturas de solventes prótico-aprótico por algumas razões. Primeiramente, deseja-se detectar algum comportamento peculiar nestas misturas, com o propósito de se tentar explicar o seu comportamento não-ideal, observado em diversos trabalhos da literatura quando são utilizados corantes sensíveis à habilidade do meio em doar ligações de hidrogênio, ou seja, corantes α -sensitivos.^{19,20,22} Além disso, deve-se observar que o comportamento de misturas de solventes contendo componentes próticos é imprevisível. Métodos diferentes empregados na obtenção dos valores de ND (número doador) dos solventes levam a resultados diferentes, que devem refletir a ação indireta das ligações de hidrogênio em solução. Assim, a capacidade doadora total nestes solventes deve ser apreciavelmente diferente dos valores de ND para as moléculas

isoladas.²⁹ As variações nos números doadores devem em princípio ser observadas em misturas binárias de composição variável nas quais o grau de ligação de hidrogênio do cossolvente prótico muda com a sua fração molar na mistura. Embora o sistema seja simplificado quando um composto puramente β -sensitivo, sem interação direta por ligações de hidrogênio do corante com o cossolvente prótico, é empregado, os desvios do comportamento normal nestas misturas de solventes continuam a ocorrer. Esta antecipação justifica portanto o estudo a ser efetuado.

2.2. PARTE EXPERIMENTAL

Os espectros do corante 1 em todas as misturas binárias foram feitos em um espectrofotômetro modelo Beckman DU-65, equipado com compartimento para cubeta termostatizados para $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Os espectros sempre foram obtidos à temperatura de 25°C . Todas as concentrações do corante empregado estiveram na faixa de 2×10^{-3} M.

O corante 1 foi preparado segundo o procedimento de Fukuda e Sone.²⁴

Água redestilada e álcoois analiticamente puros de procedência Merck foram empregados em todas as misturas. Os solventes apróticos (DMF, acetona e acetonitrila) foram purificados e secos de acordo com os métodos descritos na literatura.³⁰ Todos os solventes foram guardados sobre peneira molecular antes de sua utilização.

Os valores de $\bar{\nu}_{\text{max}}$ para o corante 1 nas diversas misturas binárias foram obtidos dos máximos para os comprimentos de onda (λ_{max}), em nanômetros, da banda de transição d-d do complexo na região visível do espectro, através da equação:

$$\bar{\nu}_{\text{max}} = 1/\lambda_{\text{max}}$$

O procedimento descrito a seguir pode ser generalizado para todos os experimentos realizados. Prepararam-se 50 mL de uma solução 2×10^{-3} M em corante no solvente aprótico. Outra solução, de mesma concentração em corante, foi preparada desta vez usando-se o solvente prótico. Desta solução estoque retiraram-se quantidades determinadas (e.g., 1, 2, 3, 4 mL), que foram transferidas para balões volumétricos de 5 e/ou 10 mL. Os volumes destes pequenos balões foram a seguir completados com a solução do corante no solvente aprótico. Todas as soluções preparadas foram agitadas em ultrassom por um minuto, e imediatamente colocadas em uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico a fim de se fazer os espectros. Os volumes dos solventes das soluções empregadas na realização das diversas misturas binárias foram transformados para massas, através das densidades conhecidas. Após

a transformação nos números de moles correspondentes, foram obtidos os diversos valores das frações molares para os componentes mais polares (X).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. RESULTADOS

O comportamento solvatocrômico do composto **1** em misturas binárias envolvendo um solvente aprótico e outro hidroxilado (ROH) foi estudado neste trabalho. Foram utilizados como solventes apróticos a acetona, a acetonitrila e dimetilformamida (DMF). Os solventes próticos empregados foram a água, o metanol, o etanol e o 2-propanol. Os dados estão todos mostrados nas figuras 2.1-2.3, na forma de gráficos das variações nos máximos dos números de onda, $\bar{\nu}_{\max}$, em função da fração molar do componente mais polar (X). Na figura 2.1 são mostradas as variações obtidas para as misturas acetona-água (curva (a)), acetona-metanol (b), acetona-etanol (c) e acetona-2-propanol (d). Na figura 2.2, as curvas mostradas são para as misturas de acetonitrila com água (a), com metanol (b), com etanol (c) e com 2-propanol (d). A figura 2.3 foi montada para as curvas de DMF com água (a) e com etanol (b).

Os dados dispostos na forma de gráficos (figuras 2.1-2.3) foram ajustados para equações polinomiais de terceira ordem por meio de um método de mínimos quadrados. Com exceção do comportamento observado para as misturas água-acetona, a equação geral $\bar{\nu}_{\max} = a + bX + cX^2 + dX^3$ reproduziu todos os dados experimentais com muita precisão, conforme mostrado nas figuras. Os valores dos coeficientes a, b, c e d para cada mistura binária estão mostrados na tabela 2.1. Os valores de $\bar{\nu}_{\max}$ nas misturas acetona-água foram constantes e iguais a $16,86 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ para frações molares de água maiores que 0,13. Para as misturas binárias mais ricas em acetona, os valores de $\bar{\nu}_{\max}$ observados foram os seguintes [$10^{-3} \bar{\nu}_{\max}$ (X)]: 17,51 (0), 17,12 (0,03), 17,01 (0,05), 16,92 (0,075), 16,89 (0,1).

2.3.2. DISCUSSÃO

Pretende-se aqui inicialmente fazer uma distinção entre as misturas binárias contendo um solvente doador aprótico relativamente fraco, como a acetona e a acetonitrila e aquelas nas quais o solvente é o DMF, fortemente doador. Enquanto no último caso o corante **1** é

solvatado sempre pelo DMF, nos sistemas acetona-ROH e acetonitrila-ROH a solvatação preferencial é mudada do componente hidroxilado para o cossolvente aprótico quando se passa da água para o 2-propanol.

O grau de solvatação do complexo pelo cossolvente hidroxilado, em cada mistura binária, pode ser compreendido melhor através dos dados da tabela 2.2. Os dados ali mostrados representam a percentagem molar estimada do componente hidroxilado ROH na camada de solvatação do corante 1 para cada mistura binária de composição molar 1:1. As percentagens de ROH foram obtidas pela utilização das equações polinomiais de terceira ordem dadas na tabela 2.1, por meio da expressão:

$$\text{ROH (\%)} = \frac{(\bar{v}_{0,5} - \bar{v}_0)}{(\bar{v}_1 - \bar{v}_0)}$$

onde os subscritos 0,5, 0, e 1 referem-se aos valores de \bar{v}_{\max} calculados para as soluções nas quais $X = 0,5, 0$ e 1 , respectivamente. De acordo com esta tabela, em uma mistura acetona-água 1:1 (mol/mol), o complexo está rodeado exclusivamente por moléculas de água, enquanto em uma mistura envolvendo acetona e 2-propanol há 37% de moléculas do álcool na camada de solvatação do corante.

Os dados mostrados nas figuras e na tabela 2.2 para a acetona e acetonitrila nos mostram que o último solvente é mais eficiente na competição com o solvente hidroxilado para a solvatação do complexo. Observa-se que ocorre a solvatação preferencial por parte da acetonitrila em todas as misturas binárias com os álcoois. A situação somente é revertida quando o cossolvente prótico é a água (figura 2.2). Nas misturas binárias com a acetona observa-se a solvatação preferencial do complexo pela água e pelo metanol, enquanto as misturas acetona-etanol mostram um comportamento próximo da idealidade, com as frações molares dos solventes nas misturas muito semelhantes às distribuições do solvente no microambiente que circunda o complexo (figura 2.1).

A maior eficiência da acetonitrila quando comparada à da acetona para solvatar o complexo reflete provavelmente uma associação maior do primeiro solvente com o íon macio Cu (II), através de mais fortes interações π do grupo -CN com o complexo planar.^{28,31}

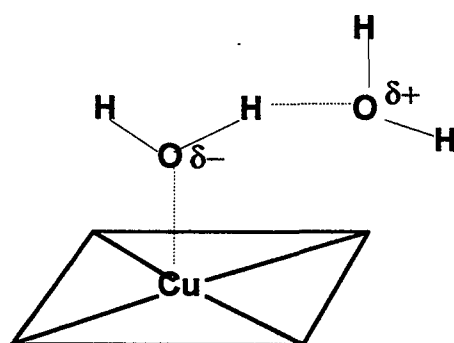
A solvatação preferencial do corante 1 pelo DMF em misturas nitrometano-DMF foi atribuída à maior capacidade doadora do DMF.²⁸ Quando um dos solventes é hidroxilado, entretanto, a situação é mais difícil de ser explicada.

Os valores de \bar{v}_{\max} do corante 1 em solventes puros foram empregados para se medir a capacidade doadora do meio.²⁴ Uma correlação razoavelmente boa foi obtida entre \bar{v}_{\max} e valores dos números doadores de Gutmann para vários solventes.²¹ Seguindo estes resultados, as capacidades doadoras da água e de álcoois como o metanol, etanol e 2-propanol não devem diferir apreciavelmente e são maiores que as capacidades doadoras da acetona e acetonitrila. Isto é evidenciado pelos deslocamentos batocrômicos observados para a banda mais longa na região visível do $[\text{Cu}(\text{tmen})(\text{aca})]^+\text{ClO}_4^-$ em acetona ou acetonitrila quando um solvente hidroxilado é adicionado. Entretanto, a solvatação preferencial do complexo pelo melhor cossolvente doador não é sempre observada (ver as figuras 2.1 (c-d) e 2.2 (b-d)). Os desvios anotados devem refletir interações indiretas do solvente, desde que ligações de hidrogênio do solvente com o soluto não podem ocorrer com o composto 1. A explicação destas interações indiretas é facilitada se considerarmos valores de ND diferentes para os cossolventes hidroxilados. Estas capacidades doadoras diferentes devem refletir ligações de hidrogênio entre as moléculas do solvente, que alteram a capacidade doadora das moléculas do solvente na esfera de solvatação do soluto.

A figura 2.2 mostra que o complexo de cobre é melhor solvatado pela acetonitrila que pelos álcoois, embora o valor de \bar{v}_{\max} seja maior para a acetonitrila. Isto deve ocorrer devido à natureza macia do íon Cu (II), levando-o a se associar melhor à acetonitrila que aos álcoois.

Esta situação muda completamente quando o cossolvente hidroxilado é a água. Comparações entre as figuras 2.1 (a) e 2.1 (d) e 2.2 (a) e 2.2 (d) mostram que a água solvata o corante 1 com maior eficiência que o 2-propanol. O oposto deveria ser verdadeiro, porque o grupo alquila em um álcool deveria tornar o grupo hidroxila mais básico que em água. O maior grau de solvatação do complexo pela água em comparação com o 2-propanol deve refletir diferenças de capacidade doadora através de ligações de hidrogênio nos dois solventes.

Em misturas binárias o solvente prótico deve afastar o cossolvente aprótico da camada de solvatação do corante. Ele deve também estabilizar e reforçar, através de ligações de hidrogênio, outras moléculas hidroxiladas presentes na camada de solvatação do corante. O soluto deve então apresentar o seu microambiente bastante hidrofílico, com o cossolvente hidrofóbico sendo expelido gradualmente da sua camada de solvatação. Isto é acompanhado por uma capacidade doadora aumentada dos ligantes ROH axiais, por causa de ligações de hidrogênio com outras moléculas de ROH, conforme o esquema abaixo.



Embora a capacidade doadora das moléculas de ROH ligadas ao complexo de cobre macio seja fraca, os efeitos mencionados se opõem a ela, e no caso do solvente melhor doador de ligações de hidrogênio, a água, fazem-na mais hábil para superar a maior afinidade do complexo pela acetonitrila (figura 2.2 (a)).

Torna-se interessante, neste estágio, comparar as observações aqui discutidas com estudos similares já publicados envolvendo misturas binárias aquosas. Os dados aqui mostrados concordam muito bem com os valores de \bar{v}_{\max} encontrados na literatura para o corante 1 em solventes puros.¹⁷ Os valores para β , a tendência elétron-doadora do meio, foram publicados anteriormente para várias misturas aquosas.^{26,27,32}

Migron e Marcus empregaram o corante 1 como um indicador β e seus dados para as misturas água-acetonitrila²⁶ concordam bastante com os resultados apresentados aqui, se a equação $\bar{v}_{\max} = 18,76 - 2,793\beta$, obtida pelos mesmos autores,¹⁷ é usada para converter \bar{v}_{\max} em valores de β . Assim, foi obtido um valor de $16,86 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ para o número de onda de absorção de 1 em água, um valor muito similar aos valores correspondentes em metanol ($16,89 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), etanol ($16,87 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) e 2-propanol ($17,00 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Isto corresponde a

um valor de β para a água igual a 0,68, que é praticamente o mesmo relatado pelos autores (0,67) em seu estudo de misturas água-acetonitrila.¹⁷

Krygowski e col. realizaram estudos com várias misturas binárias aquosas, empregando como sondas solvatocrômicas 4-nitroanilina e N,N-dietil-4-nitroanilina,³² e obtiveram resultados que variam dos mostrados neste trabalho. A variação pode ser explicada pelo uso de indicadores que não são puramente β -sensitivos.²⁷ Os resultados daqueles autores levam a um valor muito baixo de capacidade elétron-doadora para a água ($\beta = 0,19$), muito menor que os valores obtidos para metanol (0,62), etanol (0,77) ou 2-propanol (0,88). Estes valores foram essencialmente os mesmos que aqueles obtidos anteriormente por Taft e col.,³³ que os listaram entre colchetes como incertos.

Pode-se então concluir que na competição entre ROH e o cossolvente aprótico para a solvatação preferencial do complexo 1, ROH é grandemente favorecido à medida que ele se torna um melhor doador de ligação de hidrogênio. As conclusões concordam com as observações das figuras 2.1 e 2.2 e da tabela 2.2. A mudança do componente aprótico para um cossolvente melhor doador como o DMF leva a uma alteração na preferência de solvatação do complexo (figura 2.3 (a)): em misturas binárias aquosas não é solvatado preferencialmente pela água, mas pelo DMF (o solvente melhor doador). Entretanto, uma comparação entre as figuras 2.3 (a) e 2.3 (b) mostra que o comportamento geral também é mantido aqui: a água solvata o corante nas misturas DMF-H₂O melhor que o etanol.

A discussão acima apresentada mostra as dificuldades para a obtenção dos valores de capacidade doadora inequívoca para os solventes hidroxilados. As ligações de hidrogênio são interações muito importantes que afetam o valor das capacidades doadoras no microambiente do soluto e conseqüentemente na associação dele com o solvente. As figuras 2.1-2.3 demonstram a importância destas interações específicas para vários solventes hidroxilados. Estas interações são de tal maneira importantes que fazem a água compensar a sua fraca tendência intrínseca a se associar ao complexo. Tais interações tornam-se menos importantes para os álcoois, na ordem metanol > etanol > 2-propanol.

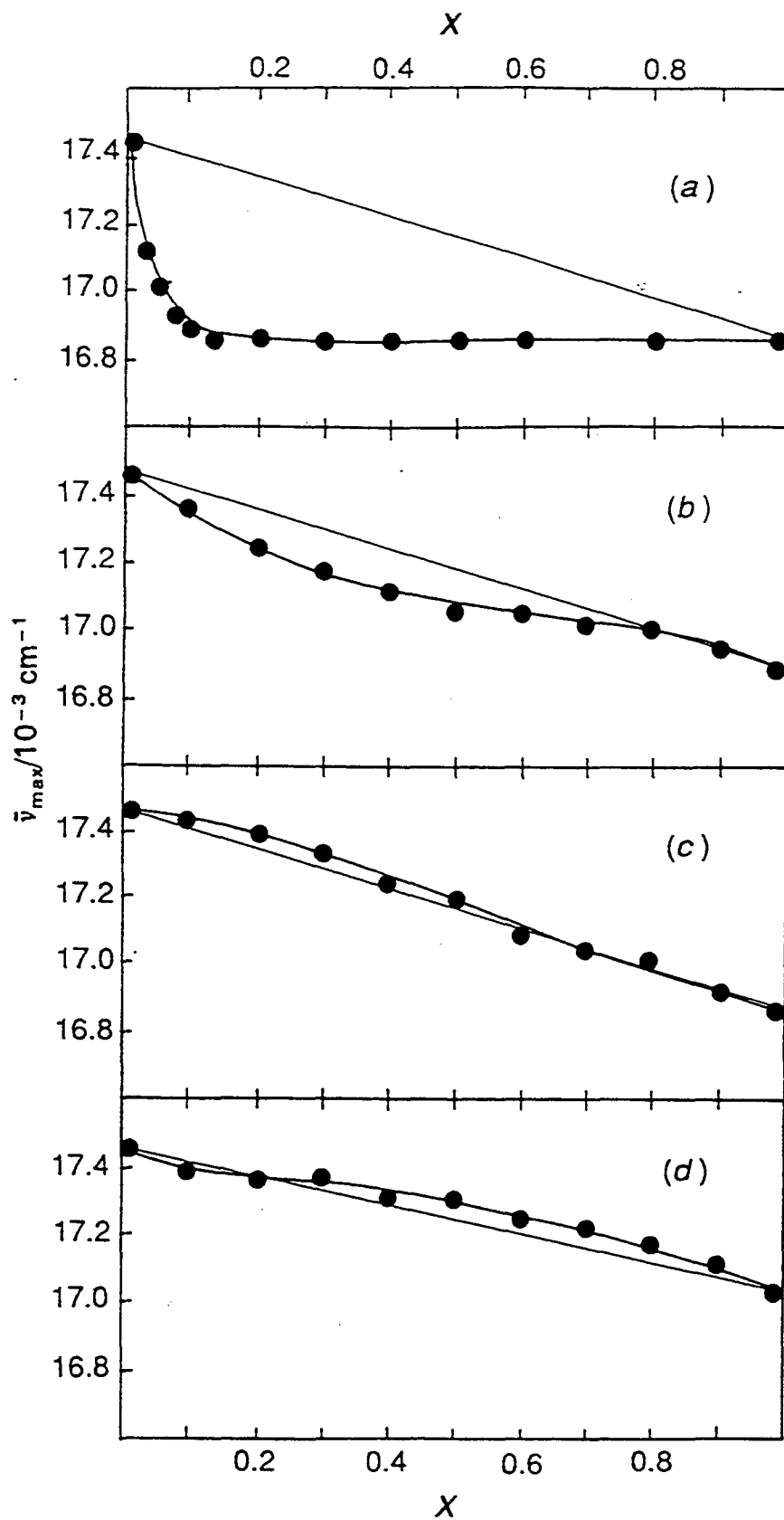


Figura 2.1. Variações de \bar{v}_{max} do corante 1 em misturas binárias com a fração molar do componente hidroxilado (X). (a) acetona-água; (b) acetona-metanol; (c) acetona-etanol; (d) acetona-2-propanol.

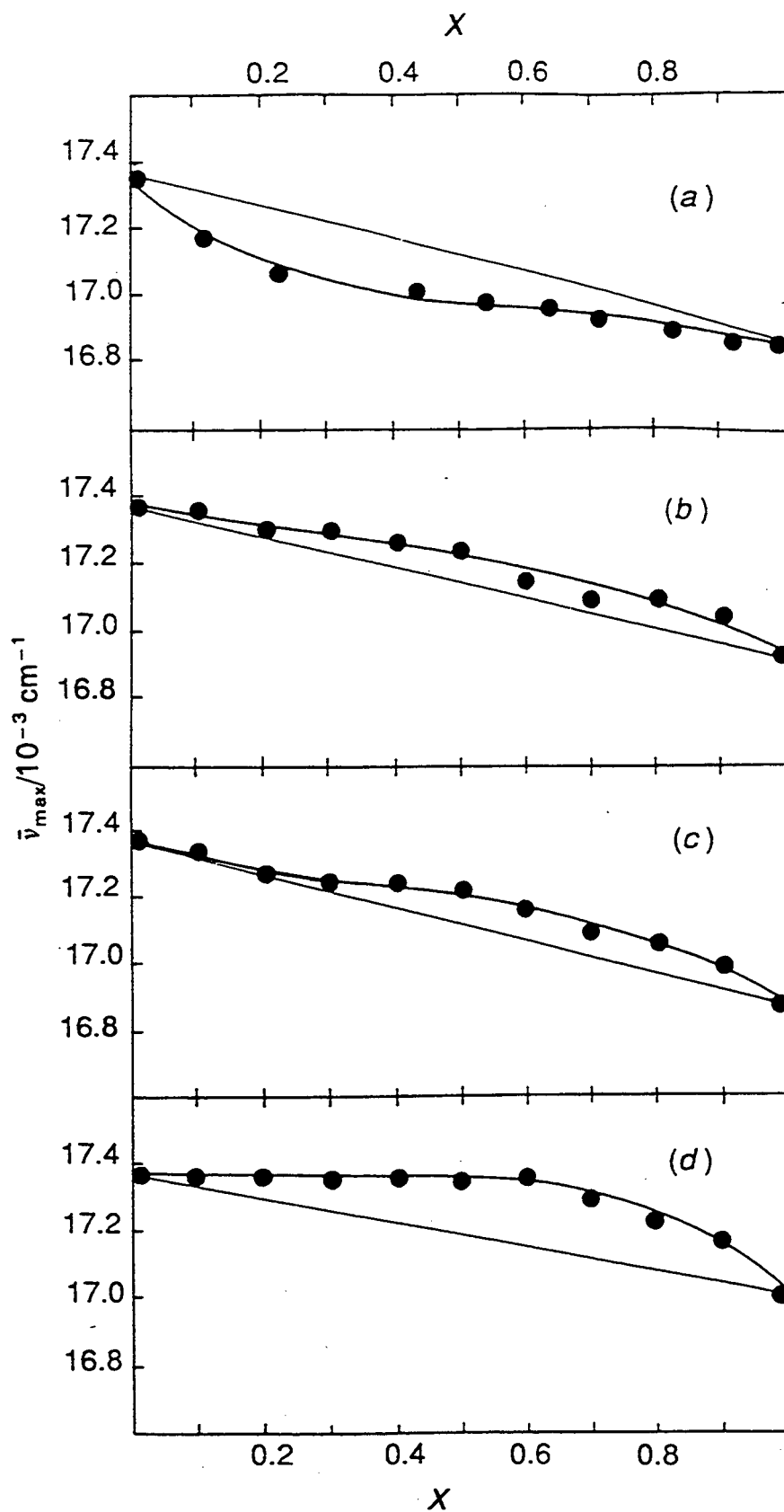


Figura 2.2. Variações de \bar{v}_{\max} do corante 1 em misturas binárias com a fração molar do componente hidroxilado (X). (a) acetonitrila-água; (b) acetonitrila-metanol; (c) acetonitrila-etanol; (d) acetonitrila-2-propanol.

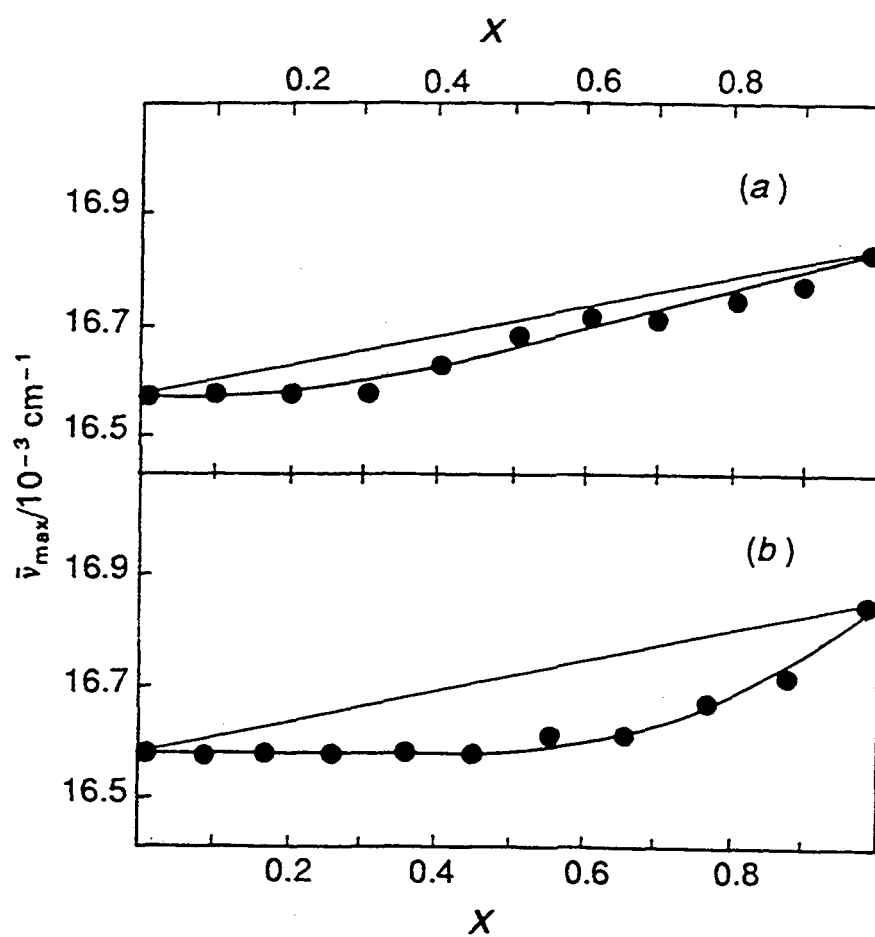


Figura 2.3. Variações de \bar{v}_{\max} do corante 1 em misturas binárias com a fração molar do componente hidroxilado (X). (a) DMF-água; (b) DMF-etanol.

Tabela 2.1. Valores dos coeficientes a, b, c e d na equação polinomial $\bar{v}_{\max} = a + bX + cX^2 + dX^3$ para cada mistura binária.

mistura binária	Coeficientes/10 ³			
	a	b	c	d
acetona-MeOH	17,51	-1,37	1,64	-0,84
acetona-EtOH	17,51	-0,30	-0,68	0,39
acetona-2-PrOH	17,51	-0,55	0,81	-0,69
acetonitrila-H ₂ O	17,30	-1,56	2,22	-1,16
acetonitrila-MeOH	17,30	-0,24	0,01	-0,22
acetonitrila-EtOH	17,30	-0,53	0,74	-0,71
acetonitrila-2-PrOH	17,30	-0,21	0,89	-1,04
DMF-H ₂ O	16,58	-0,03	0,49	-0,19
DMF-EtOH	16,58	0,12	-0,56	0,72

Tabela 2.2. Percentagem molar estimada do componente hidroxilado ROH na camada de solvatação do corante 1, para uma mistura binária com uma composição molar 1:1.

		Cossolvente aprótico			
		ROH	Acetona	Acetonitrila	DMF
componente hidroxilado (%)	H₂O	~100		74	30
	MeOH	66		33	-
	EtOH	46		34	4
	2-PrOH	37		3	-

2.4. CONCLUSÕES

O estudo aqui apresentado demonstra a dificuldade em se utilizar o conceito de capacidade doadora para solventes hidroxilados. Quando são obtidas medidas espectroscópicas do complexo 1 em água e em pequenos álcoois alifáticos, os valores de ND são semelhantes. A explicação para o comportamento diferente quando a solvatação do corante 1 ocorre nas misturas binárias pode ser dada através de efeitos indiretos de ligações de hidrogênio. Estes efeitos explicam a ordem seletiva de eficiência do cossolvente ROH na solvatação preferencial do complexo. Esta eficiência aumenta na ordem 2-propanol < etanol < metanol < H₂O, a mesma ordem crescente relativa para a habilidade destes solventes em formar ligações de hidrogênio.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. REICHARDT, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1988.
2. MARCUS, Y. "Use of Chemical Probes for the Characterization of Solvent Mixtures. Part 1. Completely Non-aqueous Mixtures". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* p. 1015-1021, 1994.
3. HOSHINO, M., KOIZUMI, M. "Order of Quencher Participation in Photochemistry. I. Proton Transfer from the Excited p-Hydroxybenzophenone in Mixed Solvents of Cyclohexane and Alcohols". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 45, p. 2731-2736, 1972.
4. MIDWINTER, J.E., SUPPAN, P. "Spectral Shifts in Solvent Mixtures". *Spectrochim. Acta, Part A* 25, p. 953-958, 1969.
5. LANGHALS, H. "Quantitative Description of Polarity of Binary Mixtures Using Different Polarity Scales". *Chem. Ber.* 114, p. 2907-2913, 1981.
6. KAMLET, M. J., ABBOUD, J.-L.M., TAFT, R.W. "An Examination of Linear Solvation Energy Relationships". *Prog. Phys. Org. Chem.* 13, p. 485-630, 1981.
7. TAFT, R.W., KAMLET, M.J. "Linear Solvation Energy Relationships. Part 4. Correlations with and Limitations of the α Scale of Solvent Hydrogen Bond Donor Acidities". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, p. 1723-1729, 1979.
8. CHAWLA, B., *et. al.* "Use of Carbon-13 Substituent Chemical Shifts to Scale Non-Hydrogen Bonding Dipolar Interactions of Protonic Solvents". *J. Am. Chem. Soc.* 103, p. 6924-6930, 1981.

9. KAMLET, M.J., TAFT, R.W. "Linear Solvation Energy Relationships. Part 1. Solvent Polarity-Polarizability Effects on Infrared Spectra". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, p. 337-341, 1979.
10. KAMLET, M. J., TAFT, R.W. "The Solvatochromic Comparison Method. I. The β -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities". *J. Am. Chem. Soc.* 98, p. 377-383, 1986.
11. TAFT, R.W., ABOUD, J.-L.M., KAMLET, M.J. "Linear Solvation Energy Relationships. 12. The $d\delta$ Term in the Solvatochromic Equations". *J. Am. Chem. Soc.* 103, p. 1080-1086, 1981.
12. KAMLET, M.J., *et al.* "Linear Solvation Energy Relationships. 46. An Improved Equation for Correlation and Prediction of Octanol/Water Partition Coefficients of Organic Nonelectrolytes (Including Strong Hydrogen Bond Donor Solutes)". *J. Phys. Chem.* 92, p. 5244-5255, 1988.
13. TAFT, R.W., *et al.* "The Molecular Properties Governing Solubilities of Organic Nonelectrolytes in Water". *Nature (London)* 313, p. 384-386, 1985.
14. SADEK, P.C., *et al.* "Study of Retention Processes in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography by the Use of the Solvatochromic Comparison Method". *Anal. Chem.* 57, p. 2971-2978, 1985.
15. KAMLET, M. J., JONES, M. E., TAFT, R.W. "Linear Solvation Energy Relationships. Part 2. Correlations of Electronic Spectral Data for Aniline Indicators with Solvent π^* and β Values". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, p. 342-348, 1979.
16. KAMLET, M.J., ABOUD, J.-L.M., TAFT, R.W. "The Solvatochromic Comparison Method. 6. The π^* Scale of Solvent Polarities". *J. Am. Chem. Soc.* 99, p. 6027-6038, 1977.

17. MIGRÓN, Y., MARCUS, Y. "Two Reintroduced Solvatochromic Indicators for Hydrogen Bond Donation and Acceptance". *J. Phys. Org. Chem.* 4, p. 310-314, 1991.
18. DAWBER, J.G., WARD, J., WILLIAMS, R.A. "A Study in Preferential Solvation using a Solvatochromic Pyridinium Betaine and its Relationship with Reaction Rates in Mixed Solvents". *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 84, p.713-727, 1988.
19. CHATTERJEE, P., BAGCHI, S. "Preferential Solvation in Mixed Binary Solvents by Ultraviolet-Visible Spectroscopy: N-Ethyl-4-Cyanopyridinium Iodide in Alcohol-Acetone Mixtures". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87, p. 587-589, 1991.
20. CHATTERJEE, P., LAHA, A., BAGCHI, S. "Preferential Solvation in Mixed Binary Solvents: Ultraviolet-Visible Spectroscopy of N-Alkylpyridinium Iodides in Mixed Solvents containing Cyclic Ethers". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88, p. 1675-1678, 1992.
21. BOSCH, E., ROSÉS, M. "Relationships between E_T Polarity and Composition in Binary Solvent Mixtures". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88, p. 3541-3546, 1992.
22. LERF, C., SUPPAN, P. "Hydrogen Bonding and Dielectric Effects in Solvatochromic Shifts". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88, p. 963-969, 1992.
23. DUTKIEWICZ, E., JAKUBOWSKA, DUTKIEWICZ, M. "Spectroscopic Study of Solvent Polarity in Binary Liquid Mixtures". *Spectrochim. Acta, Part A* 48, p. 1409-1414, 1992.
24. FUKUDA, Y., SONE, K. "Studies on Mixed Chelates. I. Mixed Copper (II) Chelates with N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine and a Bidentate Ligand". *Bull. Chem. Soc. Japn.* 45, p. 465-469, 1972.

25. SOUKUP, R.W. and SCHMID, R. "Metal Complexes as Color Indicators for Solvent Parameters". *J. Chem. Educ.* 62, p. 459-462, 1985.
26. MARCUS, Y., MIGRON, Y. Polarity, Hydrogen Bonding and Structure of Mixtures of Water and Cyanomethane. *J. Phys. Chem.* 95, p. 400-406, 1991.
27. MIGRON, Y., MARCUS, Y. "Polarity and Hydrogen Bonding Ability of Some Binary Aqueous-Organic Mixtures". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87, p. 1339-1343, 1991.
28. BOURDIN, D.L. *et al.* "Strong Thermochromic and Solvatochromic Effects of Ni(II) and Cu(II) Complexes in DMF/Nitromethane Mixtures: A Probe for Investigation of Binary Solvents". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63, p. 2985-2990, 1990.
29. MARCUS, Y. "The Effectivity of Solvents as Electron Pair Donors". *J. Chem. Sol.* 13, p. 599-624, 1984.
30. VOGEL, A.I. *Textbook of Practical Organic Chemistry*, London: Longman, p. 410, 1989.
31. ZANOTTO, S.P. *et al.* "Cationic and Anionic Halochromism". *J. Phys. Org. Chem.* 6, p. 637-641, 1993.
32. KRYGOWSKI, T.M. *et al.* "Empirical Parameters of Lewis Acidity and Basicity for Aqueous Binary Solvent Mixtures". *Tetrahedron* 41, p. 4519-4527, 1985.
33. KAMLET, M.J. *et al.* "Linear Solvation Energy Relationships. 23. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters, π , α , and β , and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation". *J. Org. Chem.* 48, p. 2877-2887, 1983.

CAPÍTULO 3

SOBRE O PAPEL DA ÁGUA NA ACUMULAÇÃO DE ENERGIA NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os organismos vivos precisam de energia para que possam desempenhar uma série de funções ligadas à vida, tais como o crescimento, movimento e reprodução. Alguns organismos são classificados como autótrofos: eles obtêm a energia de que necessitam do sol, através do processo de fotossíntese,¹⁻³ sintetizando desta forma os seus nutrientes. Os nutrientes, verdadeiros estoques de energia sob a forma de ligações químicas, são empregados por outros organismos (denominados heterótrofos) que não podem realizar o processo de fotossíntese, a fim de poderem manter seus processos biológicos. Os alimentos são oxidados por um conjunto de catalisadores específicos e de alta eficiência, as enzimas, que utilizam a energia liberada durante o processo oxidativo para sintetizar compostos organofosfatados, que são empregados pelas células em seus diferentes processos.⁴ É esta a classe de compostos, dos quais o trifosfato de adenosina (ATP) é de longe o mais importante, que as células aproveitam quando precisam de energia para executar, por exemplo, a síntese de proteínas, o transporte ativo, os movimentos e a transmissão de impulsos nervosos.⁵

Os ésteres derivados do ácido fosfórico são muito numerosos e muitos deles são extremamente importantes por exercer um papel fundamental nos processos ligados à vida. É impossível imaginar-se uma rota metabólica sem a participação desta categoria de compostos. Os materiais genéticos DNA e RNA, por exemplo, são fosfodiésteres. Similarmente, a maior parte das coenzimas apresentam em sua estrutura grupos fosfato (P_i) e pirofosfato (PP_i). De extrema importância bioquímica, o ATP, o fosfo-enolpiruvato (PEP), a fosfocreatina e os resíduos acilfosfatados são fosfatos que constituem as moedas de troca de energia nos processos vitais (figura 3.1).

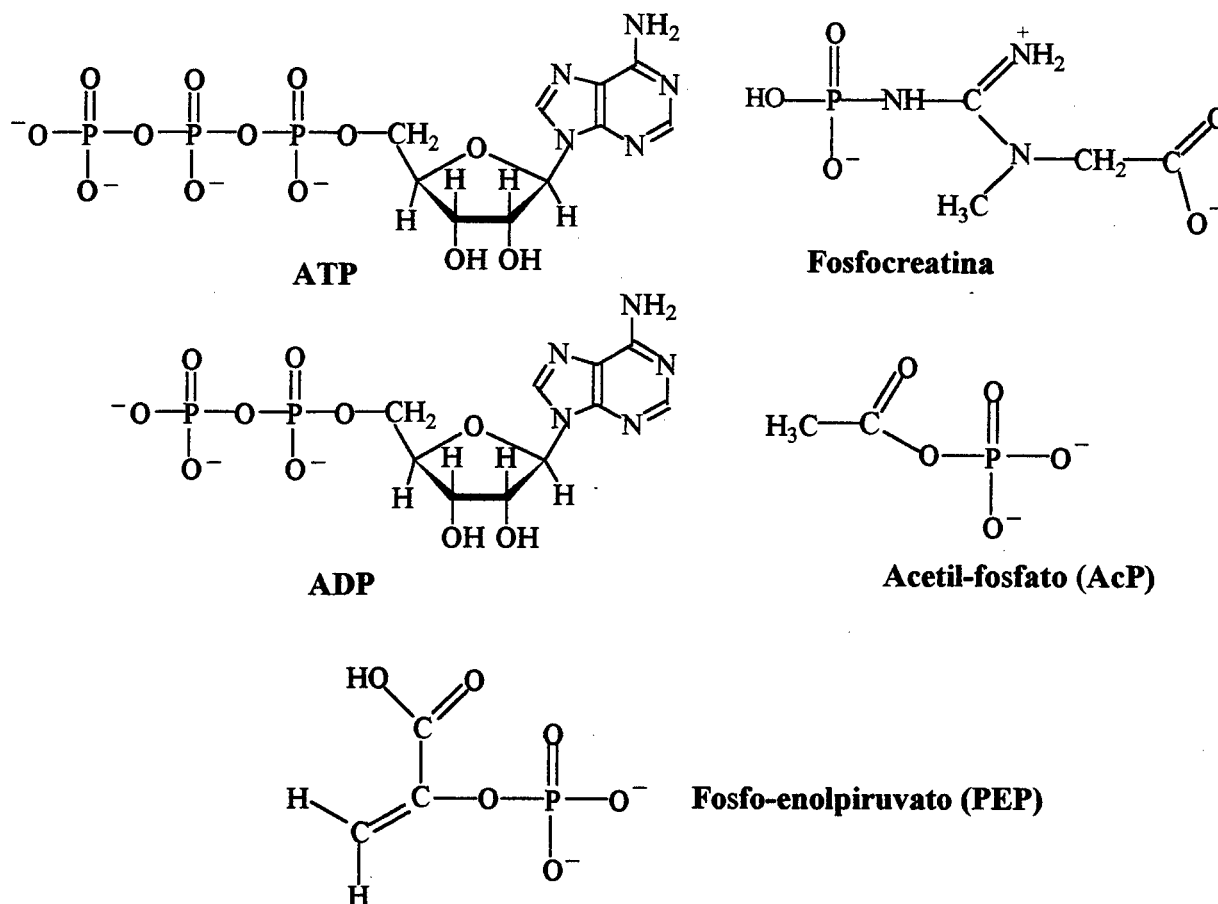


Figura 3.1. Estruturas de alguns compostos ricos em energia.

As energias liberadas nas reações de hidrólise das ligações P-O são normalmente de pequena magnitude. Assim, por exemplo, nas reações de hidrólise de glicose-6-fosfato, monofosfato de adenosina (AMP) e glicerol- α -fosfato, ocorre uma diminuição nos valores das energias livres padrões em cerca de 2-3 kcal/mol (tabela 3.1),⁶ que são valores que não encerram nada de especial. Entretanto, as reações de hidrólise nas ligações P-O ou P-N do ATP, difosfato de adenosina (ADP), acetil-fosfato (AcP), fosfocreatina e PEP apresentam altas energias livres padrões de hidrólise, variando entre -7 e -15 kcal/mol.^{5,6} Por sua alta instabilidade termodinâmica, esta pequena classe de compostos recebe a denominação de “compostos ricos em energia” e diz-se que as suas ligações P-O ou P-N são “ligações fosfatadas de alta energia”.⁷ Esta terminologia não é muito feliz por dar idéia errônea de que as ligações são muito fortes; na verdade, o conceito refere-se à alta capacidade termodinâmica do composto para reagir.

Tabela 3.1. Energias livres padrões para as hidrólises de alguns compostos fosfatados (pH 7,0).^a

composto fosfatado	ΔG (kcal mol ⁻¹)
Fosfo-enolpiruvato	-14,80
Fosfocreatina	-10,30
Acetil-fosfato	-10,10
ATP (para ADP)	-7,30
AMP (para adenosina)	-2,20
Glicose-6-fosfato	-3,30
Glicerol- α -fosfato	-2,20

^a Todos os valores foram extraídos da ref. 5

Cabe-nos neste momento repetir a pergunta formulada anteriormente por Westheimer:⁸ “por que a Natureza escolheu os fosfatos?” De acordo com o mesmo autor, os fosfatos representam a mais perfeita adaptação para desempenhar este papel por alguns motivos.⁸ Eles podem, por exemplo, ligar dois nucleotídeos e ainda sofrer ionização em pH próximo à neutralidade (pH fisiológico). A ionização é extremamente importante em meio biológico do ponto de vista da estabilidade cinética: a carga negativa sobre o grupo fosfato repele eventuais nucleófilos e protege o composto da hidrólise.^{9,10}

Além disso, há um motivo ligado à evolução dos organismos primitivos, evocado por Davis¹¹ em 1958. Segundo este pesquisador, a evolução favoreceu metabólitos que podiam conservar-se dentro da membrana celular. Como a maioria das moléculas neutras tem alguma solubilidade em lipídios, podendo por este motivo atravessar a membrana, e a maior parte das moléculas ionizadas são lipofóbicas, as últimas foram as favorecidas. Os fosfatos estão na forma ionizada em valores de pH fisiológico e desta forma podem ser convenientemente guardados no interior das células. O princípio de Davis pode ser aplicado para inúmeros processos bioquímicos. Exemplos interessantes podem ser visualizados através da biossíntese dos aminoácidos essenciais.^{12,13} Nestes processos, todas as etapas envolvem a participação de espécies intermediárias carregadas negativa ou positivamente.

Conforme mencionou-se há pouco, as cargas negativas protegem os anidridos fosfóricos ricos em energia do ataque nucleofílico pela água e outras espécies, conferindo-lhes uma grande estabilidade cinética em solução aquosa,¹⁰ não obstante o fato de eles serem termodinamicamente instáveis. Esta contraposição é importantíssima na natureza, porque garante que após a sua síntese, o composto não sofrerá hidrólise, esperando o momento certo para ser utilizado nos processos bioenergéticos. Mesmo assim, nestas condições, o uso destes compostos nos processos químicos que ocorrem nos sistemas biológicos seria inviável, não fosse o fato de as células terem a sua disposição as enzimas como catalisadores.

Pode-se observar, portanto, que o estudo dos compostos ricos em energia, em especial o ATP, representa uma das questões mais fascinantes das que vêm sendo estudadas nas últimas décadas, e será este o objeto desta revisão. Inicialmente, far-se-á uma rápida abordagem sobre a síntese e a hidrólise enzimáticas do ATP. A seguir, serão mostrados trabalhos que buscam elucidar o significado bioquímico dos compostos ricos em energia. Finalmente, serão apresentados trabalhos recentes que tratam da modelagem enzimática envolvendo esta classe de compostos.

3.1.1.1. PROPRIEDADES E MECANISMOS DAS F_0F_1 -ATPases

Muitos artigos de revisão já foram escritos sobre o funcionamento e os aspectos mecanísticos desta enzima.¹⁴⁻²⁰ Interessa-nos tão somente aqui apresentar uma visão geral sobre o assunto com a finalidade de facilitar a compreensão dos temas que serão apresentados em seguida.

Trifosfato de adenosina sintase ou ATP sintase ou F_0F_1 -ATPase é a principal enzima que opera realizando transdução de energia nas mitocôndrias, cloroplastos e bactérias. Ela foi isolada primeiramente por Penefsky e col.²¹ em 1960. A enzima F_0F_1 -ATPase usa a energia derivada de um gradiente eletroquímico de prótons, gerado através da membrana por um fluxo de elétrons, para realizar a síntese endergônica do ATP a partir do ADP e fosfato inorgânico (P_i).^{12,13,22-24} Sabe-se isto porque preparações de F_0F_1 muito purificado, incorporado no interior de micelas fosfolipídicas e acoplado a uma conveniente fonte de energia, catalisa a síntese do ATP.²⁵ O complexo F_0F_1 pode ser separado em uma porção hidrofílica solúvel F_1 e em uma parte hidrofóbica encaixada na membrana, F_0 , que funciona como um canal de prótons. F_0 é composto por 3 subunidades, a, b e c das quais a subunidade b atravessa F_1 , permanecendo

com F_0 após a separação do complexo.²⁶ F_1 contém 5 subunidades (α , β , γ , δ e ϵ) e os sítios catalíticos, localizados nas subunidades β , que são responsáveis pela síntese do ATP. A desconexão de F_1 do canal de prótons, que pode ser interpretado como a sua fonte de energia, transforma-o em uma ATPase ativa. Além de ser bastante hábil em hidrolisar o ATP, F_1 também catalisa uma troca entre os átomos de oxigênio da água e os oxigênios dos grupos γ -fosforila do ATP, durante a reação de hidrólise,²⁷ assim como a troca entre os oxigênios da água e os do P_i .²⁸⁻³⁰

A estequiometria das subunidades do complexo F_0F_1 -ATPase da *Escherichia coli* é $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{9-12}$. Modelos apresentados mostram um agregado assimétrico, composto por $\gamma\delta\epsilon ab_2$, no interior de um complexo cilíndrico externo composto por $\alpha_3\beta_3c_{9-12}$.^{17,19,31} Dados estruturais recentes para F_1 de *Escherichia coli*,³² obtidos por microscopia eletrônica, demonstraram que as subunidades α e β são alongadas e que formam um arranjo hexagonal. Neste arranjo, as subunidades ocupam posições equivalentes e alternadas. Bianchet e col.³³ apresentaram recentemente uma estrutura de raios-X com resolução de 3,6 Å para a F_1 -ATPase mitocondrial. Os resultados demonstraram que as dimensões da enzima são 120 Å X 120 Å X 74 Å e que as subunidades existem como arranjos triméricos. Todos os dados estruturais concordaram com os resultados obtidos por microscopia eletrônica.

Uma estrutura de raios-X de alta-resolução (2,8 Å) para a F_1 -ATPase mitocondrial bovina foi apresentada recentemente³⁴ por Abrahams e col. Um dos grandes méritos deste trabalho é o de que seus resultados apresentam boa concordância com uma hipótese que vem sendo usada largamente nas últimas duas décadas para explicar a síntese do ATP pelas F_0F_1 -ATPases: o mecanismo de mudança de ligação ("binding change mechanism"). Esta hipótese foi desenvolvida inicialmente por Boyer e col.²⁸ em 1973 e estabelece que a síntese do ATP ocorre espontaneamente no sítio catalítico da enzima e que energia é necessária somente para soltar o ATP formado. A ligação dos substratos ao sítio catalítico também foi considerada uma etapa que requer energia.³⁵ Isto deve decorrer do fato de que as interações proteína-ligante devem contribuir para a ligação muito firme do ATP. Ainda de acordo com a hipótese, a ligação dos substratos, a formação de ATP firmemente ligado à proteína e a liberação do produto ocorrem simultaneamente nos três sítios catalíticos, que interagem entre si permanecendo sempre 120° fora de fase durante o ciclo catalítico. Usando outras palavras, durante a síntese do ATP as estruturas dos três sítios catalíticos são diferentes, mas cada um deles passa ciclicamente de uma conformação na qual ADP e P_i estão frouxamente ligados ao

sítio catalítico para uma outra na qual os substratos estão firmemente ligados, ocorrendo neste momento a síntese espontânea do ATP. Finalmente o sítio catalítico abre-se, soltando o produto. As inúmeras evidências que são consistentes com o mecanismo da mudança de ligação foram revisadas recentemente por Boyer.¹⁸

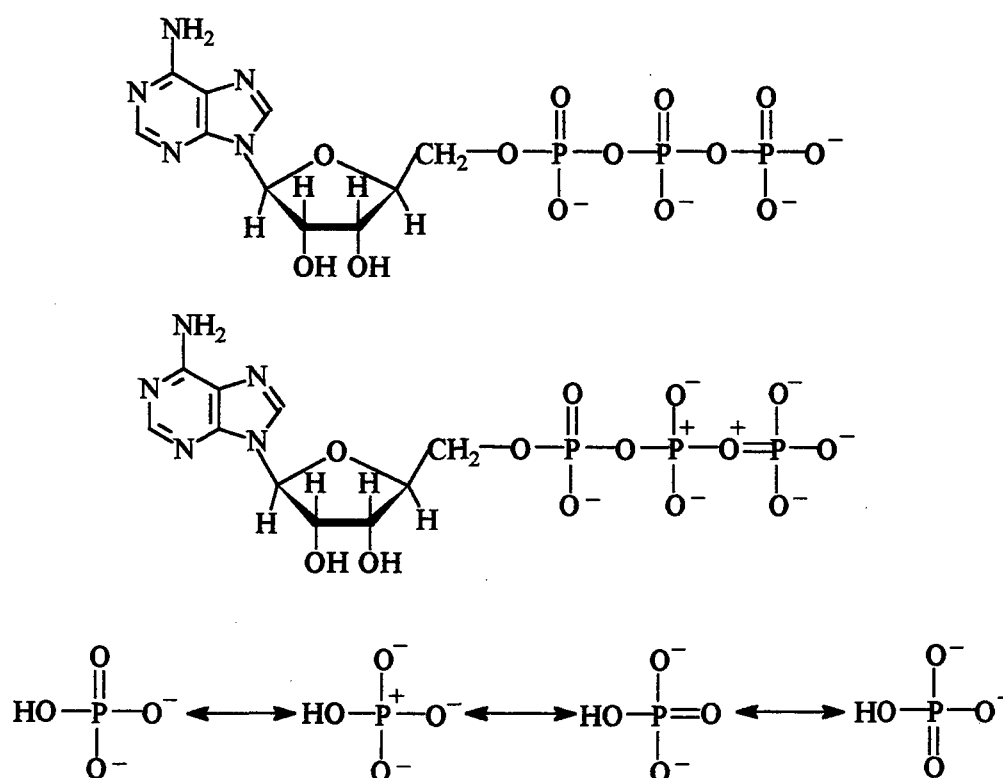
O outro ponto principal do mecanismo da mudança de ligação refere-se à sugestão de que o ciclo catalítico ocorre devido ao movimento de rotação do agregado assimétrico de subunidades $\gamma\delta\epsilon ab_2$ em relação às subunidades $\alpha_3\beta_3 c_{9-12}$. Esta rotação deveria levar a mudanças conformacionais nas subunidades catalíticas. Estas mudanças seriam responsáveis pelo ciclo catalítico que conduz à síntese do ATP.³⁶ Este movimento de rotação seria similar ao que ocorre no motor flagelar das bactérias, que também é alimentado por um gradiente de prótons através da membrana.^{37,38} Experimentos realizados, com o objetivo de se confirmar a sugestão, deram resultados negativos.¹⁸ Entretanto, foram colhidas evidências de que ocorrem movimentos nas subunidades γ , δ e ϵ no espaço central entre o arranjo hexamérico de subunidades α e β na F_1 -ATPase da *Escherichia coli*, e que estes movimentos são dependentes da presença dos nucleotídeos.^{39,40} Também foram colhidas evidências de que ocorre movimento nas subunidades da F_1 -ATPase dos cloroplastos.⁴¹ A estrutura de raios-X de alta resolução apresentada por Abrahams e col.³⁴ é compatível com a idéia da rotação do agregado assimétrico. Entre as observações extraídas que suportam esta hipótese, está a de que as diferenças entre os três sítios catalíticos são correlacionadas com a posição assimétrica da subunidade γ .³⁴ Embora os resultados apresentados sugiram que isto possa ser verdadeiro, trabalhos adicionais serão ainda necessários para a perfeita elucidação desta questão e de outras, como por exemplo, a forma como se dá a conexão entre F_0 e F_1 e a solução da estrutura de raio-X de alta resolução para F_0 .¹⁹

3.1.1.2. COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA

O conceito de compostos fosfatados ricos em energia foi idealizado inicialmente por Lipmann⁶ em meados deste século. As suas idéias sobre como as células utilizam compostos fosfatados como moedas de troca de energia foram aceitas até recentemente. De acordo com este autor, a energia de hidrólise de diferentes compostos fosfatados seria determinada somente pela natureza química da ligação entre o grupo fosfato e o restante da molécula, independentemente do fato de o composto encontrar-se em solução ou ligado ao sítio ativo da

enzima. Uma vez que o composto fosfatado estivesse ligado à enzima, ele seria hidrolisado e a energia derivada da quebra da ligação de fosfato seria absorvida pela enzima para realizar trabalho. A seguir, os produtos dissociar-se-iam da enzima.

Nesta mesma época, Kalckar discutiu as ligações de alta energia como decorrentes da estabilização relativa, por ressonância, dos produtos da hidrólise dos compostos fosfatados em relação aos reagentes.⁴² Assim, ADP e P_i possuem mais estruturas de ressonância que o ATP, além do fato de o ATP apresentar estruturas de ressonância de contribuição muito pequena, com átomos de oxigênio apresentando três ligações e carga positiva adjacente ao átomo de fósforo, carregado positivamente (ver abaixo).



Hill e Morales⁴³ sugeriram que, juntamente com os efeitos de ressonância, há um efeito eletrostático nos compostos ricos em energia como o ATP, ADP e PEP contribuindo para a sua instabilidade termodinâmica. No ATP, por exemplo, ocorre uma repulsão eletrostática muito forte devido à proximidade das cargas negativas sobre os átomos de oxigênio vizinhos. Esta repulsão pode ser reduzida quando o ATP é hidrolisado para ADP e P_i . Esta sugestão de que a energia livre “eletrostática” no ATP pode ser transformada em energia para ser utilizada

em outros eventos foi exemplificada com o trabalho de Riseman e Kirkwood.⁴⁴ Estes pesquisadores sugeriram que a relaxação da actomiosina envolve a transferência de P_i do ATP para grupos alcoólicos da enzima. A cadeia da actomiosina é estendida pela repulsão entre cargas negativas dos grupos que estão interagindo, levando a enzima a guardar energia livre. A remoção do grupo fosfato carregado negativamente provoca a contração, com a enzima retornando ao seu estado original. A energia livre guardada é convertida em trabalho.

Estudos teóricos empregando a teoria π -eletrônica dos orbitais moleculares foram realizados, nos anos cinqüentas, por Pullman e Pullman⁴⁵ para os compostos ricos em energia. Estes pesquisadores concluíram que a hipótese de Kalckar juntamente com a de Hill e Morales desempenham um papel muito importante nas reações de hidrólise do ATP, ADP, PEP e acetil-fosfato. Na década seguinte, Boyd e Lipscomb,⁴⁶ por meio de cálculos das estruturas de compostos ricos em energia empregando Hückel estendido, também chegaram à mesma conclusão.

Conforme podemos notar, todos os trabalhos que discutiram o conceito dos compostos ricos em energia, desde o trabalho original de Lipmann até o final da década de 60, abordam a questão do ponto de vista exclusivamente teórico. A interação do reagente e do produto com o meio reacional era sempre descartada porque acreditava-se, erroneamente, que o solvente não interferia nos valores das constantes de equilíbrio para as reações hidrolíticas dos compostos fosfatados. Esta questão é no entanto de grande importância porque a água interage fortemente com o composto fosfatado por meio de ligações de hidrogênio, acarretando alterações nas suas propriedades físico-químicas.

No início dos anos setentas, George e col.⁴⁷ publicaram um trabalho que tornou-se um marco no estudo desta classe de compostos. Analisando os aspectos termodinâmicos das reações de hidrólise, em diversos valores de pH para vários compostos ricos em energia, eles concluíram que os efeitos intramoleculares analisados acima têm importância secundária se comparados com a interação de reagentes e produtos com o solvente. Os autores analisaram, por exemplo, uma série de reações de hidrólise envolvendo pirofosfatos (tabela 3.2). O pirofosfato é o mais simples composto fosfatado de alta energia. Foi mostrado que em fase aquosa, o pirofosfato completamente protonado ($H_4P_2O_7$) tem uma entalpia de hidrólise 4 kcal mol^{-1} mais negativa que a espécie $P_2O_7^{4-}$. Estes resultados demonstram que a interação do pirofosfato com o solvente compensa muito bem a repulsão intramolecular muito forte da espécie completamente desprotonada. De acordo com esta nova proposta, a energia de

hidrólise de um composto fosfatado é determinada pelas diferenças nas energias de solvatação de reagentes e produtos. Quanto mais solvatado se encontra o composto, mais estável (i.e., menos reativo) ele é. Um valor alto para a constante de equilíbrio de hidrólise do composto significa uma maior solvatação dos produtos da reação em relação aos reagentes.

Tabela 3.2. Reações de hidrólise do pirofosfato.^a

Reação	ΔH° (kcal mol ⁻¹)
$H_4P_2O_7 + H_2O \rightarrow H_3PO_4 + H_3PO_4$	- 7,6
$H_3P_2O_7^- + H_2O \rightarrow H_2PO_4^- + H_3PO_4$	- 7,3
$H_2P_2O_7^{2-} + H_2O \rightarrow H_2PO_4^- + H_2PO_4^-$	- 6,8
$HP_2O_7^{3-} + H_2O \rightarrow HPO_4^{2-} + H_2PO_4^-$	- 5,8
$P_2O_7^{4-} + H_2O \rightarrow HPO_4^{2-} + HPO_4^{2-}$	- 3,7

^a Valores extraídos da ref. 46

Diversos estudos mecânico-quânticos já foram realizados com o objetivo de se buscar entender a química dos compostos ricos em energia. Hayes, Kenyon e Kollman⁴⁸ estudaram as reações hidrolíticas desta classe de compostos em fase gasosa empregando cálculos *ab initio* e estabeleceram que, embora os efeitos intramoleculares mencionados acima dêem grande contribuição para as energias de hidrólise de algumas destas reações, as energias relativas de solvatação de reagentes e produtos representam o fator de contribuição mais importante para as energias de hidrólise destes processos. As conclusões do trabalho, portanto, concordam com os resultados propostos anteriormente por George e col.⁴⁷ Um outro trabalho realizado recentemente,⁴⁹ em que são empregados cálculos *ab initio* para se determinar as energias de compostos fosfatados, que têm em sua estrutura a ligação P-O-P, chegou a conclusões bastante semelhantes.

A hidrólise do pirofosfato é um problema difícil para ser resolvido por métodos *ab initio* porque todas as espécies envolvidas na reação se encontram bastante desprotonadas em pH fisiológico. A maior parte dos trabalhos que buscam fazer previsões sobre a entalpia reacional tem sido realizada para as espécies completamente protonadas em fase gasosa com o objetivo de estabelecer se a reação dessolvatada é endotérmica ou exotérmica. Mesmo assim, os dados obtidos são bastante controversos, com entalpias de hidrólise em fase gasosa variando entre - 0,4 e -13,4 kcal mol⁻¹.⁴⁸⁻⁵¹ A busca de informações mais detalhadas e precisas

acerca da hidrólise do pirofosfato levou Colvin e col.⁵² a efetuar cálculos *ab initio* da entalpia da reação em fase gasosa. Os cálculos demonstraram que, em fase gasosa, a hidrólise do pirofosfato completamente protonado é desfavorecida em 5 kcal mol⁻¹. Isto resulta da formação de um par de ligações de hidrogênio intramoleculares que unem os dois grupos fosfato da molécula. A presença de ligações de hidrogênio intramoleculares, no pirofosfato, em estudos *ab initio*, em fase gasosa, também foi observada recentemente em outro trabalho.⁵³ Observou-se ainda no trabalho de Colvin⁵² que, para as formas aniônicas do pirofosfato, correspondentes ao pH neutro, as energias de hidrólise em fase gasosa apresentam valores altamente negativos, que foram atribuídos à repulsão eletrostática. Foram ainda feitas previsões das energias de hidrólise para os estados desprotonados de pirofosfatos, por meio de vários métodos, fundamentados no modelo do contínuo dielétrico do solvente aquoso, com o intuito de se efetuar estimativas das energias de solvatação dos reagentes e produtos. Observou-se que a solvatação aquosa age no sentido de cancelar esta repulsão intramolecular por meio de interações eletrostáticas. Os resultados sugerem que a hidrólise destes compostos pode ser melhor descrita como um compromisso entre a repulsão intramolecular e as interações intermoleculares com o solvente.

3.1.1.3. INFLUÊNCIA DA ÁGUA NAS ENERGIAS DE HIDRÓLISE DOS COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA

O trabalho de Lipmann,⁶ discutido na seção anterior, determinou a maneira como os pesquisadores viam a síntese e a hidrólise dos compostos ricos em energia pelos próximos trinta anos, até o início da década de 70. A partir desta época, vários resultados, obtidos por muitos grupos de pesquisa, levaram a outras conclusões sobre o assunto, após descobrir-se que as energias de hidrólise de compostos fosfatados diferentes variam grandemente, dependendo do fato de eles estarem em solução ou no sítio ativo da enzima. O assunto foi revisado amplamente por de Meis.^{54,55} Diversos estudos, dos ciclos catalíticos de várias enzimas, indicam que a energia torna-se disponível para a enzima realizar trabalho antes da quebra do composto fosfatado. De acordo com esses resultados, a enzima, após ligar-se ao composto fosfatado, realiza trabalho sem o composto sofrer hidrólise. Neste processo, dá-se um decréscimo no nível energético do composto fosfatado; a sua presença permite à enzima seguir para uma outra conformação e nesta transição o trabalho pode ser realizado. Os

produtos dissociam-se da enzima após o composto fosfatado ser hidrolisado, em um processo que envolve uma mudança de energia relativamente pequena. Na reação reversa, como seria de se esperar, compostos fosfatados como o ATP ou o AcP podem ser sintetizados na superfície enzimática, sem a necessidade de energia, em um sítio hidrofóbico da enzima. Uma mudança conformacional leva à entrada de água no sítio catalítico. Neste retorno ao meio aquoso, as constantes de equilíbrio para a hidrólise destes compostos voltam a ganhar valores muito altos.

De acordo com de Meis,⁵⁴ são muitas as evidências experimentais que demonstram a importância da água nos processos de transdução de energia. Em primeiro lugar, as energias de hidrólise de PP_i ou ATP, em misturas aquosas de diversos solventes orgânicos, são similares àquelas medidas na presença das enzimas, ou seja, são muito menores que aquelas medidas em soluções totalmente aquosas. Pode-se apreciar alguns destes resultados em exposição na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Energias de hidrólise de ATP e PP_i em diversos meios reacionais, à temperatura de 25°C.

Composto fosfatado	Condições reacionais	ΔG° (kcal mol ⁻¹)
ATP	solução aquosa diluída	-4,9 a -10,7 ^a
ATP	F ₁ -ATPase, miosina	+0,4 ^b
ATP	clorofórmio com vestígios de água	+0,3 ^c
PP _i	solução aquosa diluída, pH ~ 7	-2,7 a -6,5 ^d
PP _i	pirofosfatase inorgânica	-0,9 ^e
PP _i	clorofórmio com vestígios de água	-1,8 ^e
PP _i	50% de etileno glicol, pH 7,2	-1,8 ^f
PP _i	50% de poli(etilenoglicol) 8000, pH 7,2	+0,2 ^f

a) Refs. 47, 56-60; b) Ref. 53; c) Ref. 59; d) Refs. 59, 61-65 e) Refs. 66-68; f) Ref. 63

Outra grande evidência experimental é conseguida pela observação de que a síntese de compostos ricos em energia, no sítio ativo das enzimas, é bastante facilitada na presença de solventes orgânicos. Este efeito é obtido porque um decréscimo da concentração de água no

sítio catalítico conduz a um decréscimo no valor do K_m aparente para P_i , ou seja, ocorre um grande aumento da afinidade da enzima por P_i . Isto é semelhante ao que ocorre, por exemplo, na ATP sintase mitocondrial quando um gradiente eletroquímico é gerado. Assim, por exemplo, o valor de K_m para P_i na reação de formação de ATP, ligado firmemente ao sítio ativo da F_1 -ATPase mitocondrial, em meio totalmente aquoso, na ausência de um gradiente de prótons, encontra-se acima de 0,4 M. Quando o gradiente de prótons é gerado, o valor de K_m é abaixado para 10^{-3} M. Um efeito semelhante é obtido se DMSO é adicionado ao meio: 40% deste solvente reduz o valor de K_m para a mesma faixa de 10^{-3} M.⁵⁴ Sakamoto⁶⁹ observou que a concentração de P_i necessária para a formação da metade da quantidade máxima de ATP aumenta de 0,7 para 11 mM após a concentração de DMSO no meio reacional ser diminuída de 40% para 10%. A habilidade de F_1 em hidrolisar ATP é inibida quando solventes orgânicos, que facilitam a formação do ATP, são adicionados ao meio. A reversão deste efeito é facilmente alcançada pela diluição do solvente orgânico.^{70,71}

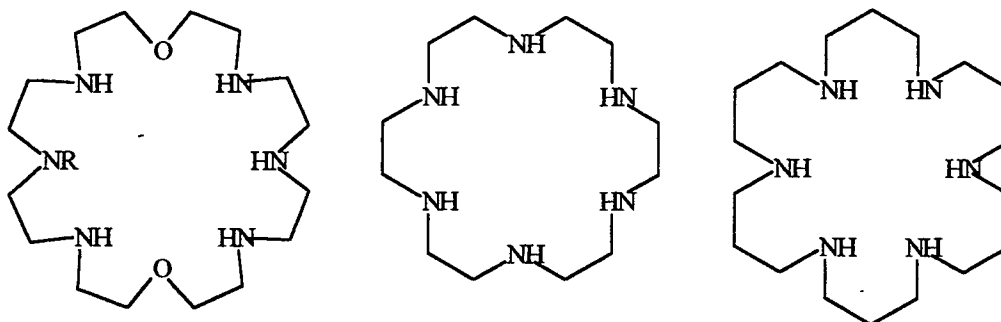
Concluindo, as energias para as reações de hidrólise e síntese do ATP e de compostos relacionados, variam bastante, dependendo da composição do meio em que eles se encontram. A conceituação clássica de Lipmann para os compostos organofosfatados padeceu de uma revisão, realizada recentemente por de Meis.^{54,55} De acordo com ele, a variação nos valores das constantes de equilíbrio de hidrólise de compostos como o ATP e aparentados, possuindo uma ligação do tipo fosfoanidrido está relacionada às mudanças de entropia em solução.⁵⁵ Ele propôs então uma redefinição para o conceito dos compostos fosfatados ricos em energia. De acordo com a nova conceituação, "*ATP e outros compostos possuindo ligações do tipo fosfoanidrido são moléculas que permitem o uso de energia entrópica*".⁵⁵ Em oposição a esta classe de compostos estão os outros compostos organofosfatados, como glicose-6-fosfato e glicerol- α -fosfato, que apresentam uma contribuição muito pequena em entropia para as suas reações de hidrólise. Nesta situação, as energias de hidrólise quase não variam com as mudanças de pH, concentrações de sais e da composição do meio. Estes fosfoésteres de baixa energia podem portanto ser redefinidos simplesmente como compostos que não permitem o uso de energia entrópica.⁵⁵

3.1.1.4 MODELAGEM ENZIMÁTICA NA HIDRÓLISE E SÍNTESE DE COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA

A mimetização das reações biológicas de transferência do grupo fosforila, tem representado um dos maiores desafios para os químicos nas últimas três décadas. A transferência do grupo fosforila para a água vem a ser a mais simples das correspondentes reações *in vitro*. O mecanismo e a catálise da hidrólise do acetil-fosfato, assim como de compostos relacionados, já foram bastante estudados.⁷²⁻⁷⁹ Da mesma forma, vários trabalhos, envolvendo estudos mecanísticos da hidrólise de ésteres fosfatados, forneceram contribuições muito importantes para a compreensão do papel biológico destes compostos.⁸⁰⁻⁸³ Também já foram realizados numerosos estudos do mecanismo de hidrólise do ATP.^{10,84-86} Considerando-se que íons metálicos tomam parte nos processos biológicos, onde ocorre a transferência de fosforila,⁸⁷⁻⁸⁹ a hidrólise não-enzimática do ATP, promovida por íons metálicos, em especial por cátions divalentes, tem sido bastante investigada.⁹⁰⁻⁹⁶ Acelerações grandes de velocidade foram obtidas, particularmente com íons Co^{3+} coordenados.⁹⁷⁻⁹⁹

O desenvolvimento da química de coordenação de ânions tornou possível o planejamento de receptores de ânions capazes de realizar catálise molecular em reações, envolvendo substratos de interesse químico e biológico, tais como o acetil-fosfato e o ATP. Nos últimos anos, vários trabalhos nos quais é realizada a hidrólise do ATP, utilizando-se moléculas orgânicas como catalisadores, têm representado um grande avanço no conhecimento dos fatores que controlam a hidrólise enzimática do ATP.

Várias poliaminas biológicas, como a putrescina, a espermidina, a espermina e a cadaverina, apresentam a interessante propriedade de complexar AMP, ADP e ATP,¹⁰⁰ mas praticamente não influenciam nos valores das constantes de velocidade do ATP. Suzuki e col.,^{101,102} no entanto, verificaram que o composto pentaetilenohexamina catalisa a hidrólise do ATP com um pequeno aumento de velocidade. Lehn e col.¹⁰³ tiveram então a idéia de utilizar várias poliaminas macrocíclicas, tais como os compostos mostrados abaixo, na catálise molecular da hidrólise do ATP. Foram obtidos deste modo grandes aumentos na sua velocidade de hidrólise, que foram acompanhados por meio de espectroscopia de RMN de ^{31}P . A maior aceleração de velocidade foi obtida para o macrociclo [24]- N_6O_2 , que complexa fortemente o ATP e catalisa a sua hidrólise para ADP e P_i .

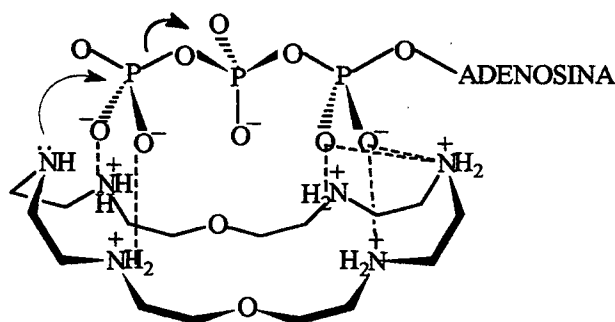


[24]-N₆O₂, R=H

intermediário

fosforamidato, R=PO₃²⁻

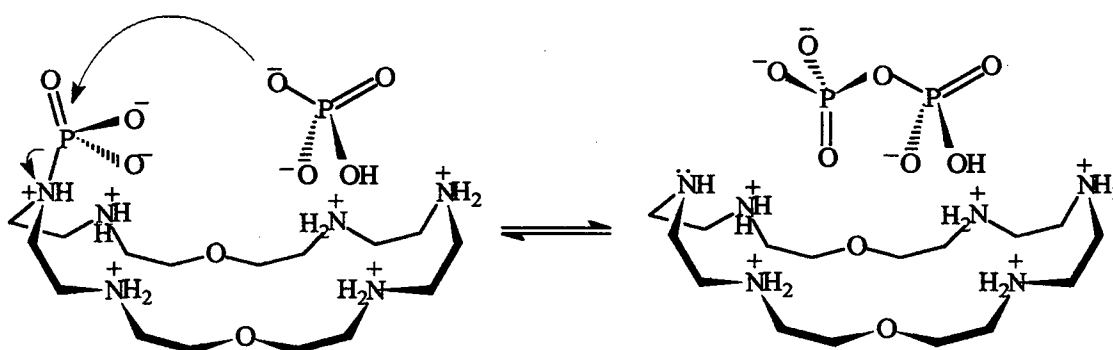
A catálise funciona sobre uma faixa bastante larga de pH (de 2,5 a 8,5). Além disso, a reação apresenta cinética de 1ª ordem e é catalítica com renovação (“turnover”) da poliamina. Lehn e col.¹⁰³ discutiram o mecanismo desta reação da seguinte forma: inicialmente ocorre a formação de um complexo entre o ATP e o macrociclo protonado, que pode ser representado conforme o esquema mostrado abaixo. Em seguida, ocorre uma reação no próprio complexo, que deve envolver uma combinação de catálises ácida, básica e nucleofílica.



Um intermediário fosforamidato é formado por fosforilação do macrociclo e é, a seguir, hidrolisado, com a recuperação do catalisador. A poliamina [24]-N₆O₂ funciona portanto como uma ATPase, e recebeu de Lehn a denominação de protoenzima.^{104,105}

Embora uma grande variedade de modelos enzimáticos tenha sido criada com o objetivo de se estudar reações, nas quais ocorre a quebra de ligações químicas, modelos enzimáticos nos quais se dá a catálise da formação de ligações químicas, entre dois substratos, têm sido muito pouco estudados. A dificuldade resulta de vários fatores, tais como a presença de grupos reativos e de grupos responsáveis pela complexação das espécies químicas, situados

em posições estratégicas na estrutura do receptor empregado como modelo. O processo pelo qual moléculas correceptoras aproximam os substratos e cofatores, via complexação, mediando as reações entre eles, dentro da estrutura supramolecular, foi denominado por Lehn como cocatálise.¹⁰⁶ Mertes e col.¹⁰⁷ verificaram a ocorrência de cocatálise na reação de hidrólise do ATP, catalisada pelo macrociclo [24]-N₆O₂ e por íons metálicos (Ca²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺), na presença de íons fosfato. Após a formação do intermediário fosforamidato, ocorre a complexação do íon fosfato da solução ao macrociclo protonado. Em seguida, ocorre a transferência de fosforila, do fosforamidato para o fosfato, com a formação de pirofosfato. A descomplexação do produto recupera o catalisador para um novo ciclo. Um trabalho semelhante foi realizado simultaneamente por Hosseini e Lehn,¹⁰⁸ no qual foi explorado o princípio da cocatálise para a síntese do pirofosfato, a partir do acetil-fosfato, empregando-se como catalisador o composto [24]-N₆O₂.



O mesmo macrociclo foi utilizado em seguida no estudo da catálise da fosforilação de ADP pelo acetil-fosfato, sintetizando-se o ATP via intermediário fosforamidato.¹⁰⁹ Também foi observado que os íons Ca²⁺ ou Mg²⁺ exercem um grande efeito sobre a formação de ATP.¹¹⁰ Enquanto em uma mistura de 5 equivalentes de [24]-N₆O₂, ADP e acetil-fosfato, em solução aquosa e pH neutro, somente 7,5% de ATP foi obtido, a adição de 1 equivalente de Mg²⁺ ao meio reacional, elevou o rendimento para 24,7% em ATP.¹¹⁰ Os autores sugeriram que as espécies reativas podem estar agrupadas na forma de um complexo ternário, envolvendo o intermediário fosforamidato, o ADP e o íon metálico. Neste complexo, o cátion divalente funciona como uma ponte, ligando o grupo fosforila do intermediário ao grupo fosforila terminal do ADP, ligado ao macrociclo.¹¹⁰ O cátion tem assim a importante função de conservar as espécies reagentes próximas, facilitando desta maneira a fosforilação.

Outros trabalhos interessantes no gênero foram realizados, empregando-se o composto [24]-N₆O₂ como mimetizador da enzima N¹⁰-formiltetrahidrofolato sintetase,¹¹¹ no acoplamento da síntese supramolecular do ATP com sistemas enzimáticos consumidores de ATP (ref. 112) e também como um modelo enzimático com atividade de enolase.¹¹³

3.1.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Embora a hidrólise dos compostos ricos em energia, tais como o ATP e o acetil-fosfato, já tenha sido estudada exaustivamente na literatura, modelos bioorgânicos que visem mimetizar *in vitro*, a síntese enzimática destes compostos têm sido muito pouco explorados (seção 3.1.1.4). Deve-se ainda ressaltar que, não obstante o fato de que inúmeros grupos de pesquisa, em todo o mundo, já se dedicaram ou se dedicam ao estudo dos compostos ricos em energia, desconhece-se modelos enzimáticos que busquem explicar a síntese destes compostos, amparados na hipótese do mecanismo de mudança de ligação, para a síntese do ATP (seção 3.1.1.1) e nos recentes trabalhos encontrados na literatura sobre a influência da água na síntese dos mesmos compostos (seção 3.1.1.3).

Vários estudos cristalográficos de raios-X já demonstraram que os sítios ativos de muitas enzimas contêm regiões hidrofóbicas, indicando que o meio no qual se processam muitas das reações nucleofílicas, catalisadas por enzimas, é essencialmente aprótico.¹¹⁴⁻¹¹⁸ Da mesma maneira, foram obtidas diversas evidências experimentais que confirmam que as constantes dielétricas “efetivas”, nos sítios ativos de muitas enzimas são reduzidas, se comparadas com a situação em água pura.¹¹⁹⁻¹²³

Este aspecto muito importante da catálise enzimática foi demonstrado em muito poucos trabalhos da literatura envolvendo modelos bioorgânicos em meio aprótico dipolar ou apolar.^{117,124-131} Recentemente, foi demonstrado por Frescura e col.¹³² que a nucleofilicidade dos íons dodecanoato, em reações de hidrólise de ésteres, pode ser aumentada se a eles é misturada uma determinada concentração micelar de sulfobetáinas ($C_nH_{2n+1}N^+Me_2(CH_2)_3SO_3^-$, n = 10, 12, 14, 16). Este efeito resulta da dessolvatação do nucleófilo e do pareamento dos íons dodecanoato nas micelas mistas. As conclusões deste trabalho permitiram a realização, com sucesso, do estudo da catálise nucleofílica da reação de hidrólise de ésteres em micelas mistas de sulfobetáinas com n-decilsulfato de sódio.¹³³ Estes trabalhos demonstraram mudanças significativas na reatividade dos nucleófilos e no modo pelo qual os substituintes

afetam as velocidades das reações, quando se comparam os processos em meio aquoso e não-prótico.

Em um outro trabalho recente, realizado por Kanski e Murray,¹³⁴ foi empregado o indicador solvatocrômico 4-carbamidopiridínio ciclopentadienilídeo para sondar a polaridade do sítio ativo de uma álcool desidrogenase (HLADH), levando-se em consideração a ligação fraca da enzima com benzamidas substituídas.¹³⁵ Foram medidos os máximos nos comprimentos de onda (λ_{max}) para a banda solvatocrômica do composto, em diversos solventes, a fim de se evidenciar o seu solvatocromismo negativo. Assim, mudando-se de água ($\lambda_{\text{max}} = 519 \text{ nm}$) para benzeno ($\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$), a banda solvatocrômica sofre um deslocamento de 42 nm. O mais largo deslocamento, entretanto, foi obtido para a solução do corante (1 mM) em água, na presença de 1mM de NADH e 100 μM de HLADH ($\lambda_{\text{max}} = 597 \text{ nm}$). Os autores concluíram que o enorme deslocamento observado para a banda solvatocrômica do corante deve-se à sua ligação ao sítio ativo bastante hidrofóbico da enzima.

Considerando-se todos os aspectos enumerados acima, o objetivo principal deste trabalho compreende a realização do estudo de um modelo enzimático para a síntese de um composto rico em energia, o acetil-fosfato, considerando-se o problema da dessolvatação do nucleófilo. Avaliando-se que o modelo estudado poderá ser estendido para a questão da síntese do ATP, tentar-se-á encontrar conexões entre os resultados obtidos e os trabalhos da literatura que buscam explicar a síntese enzimática do ATP.

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

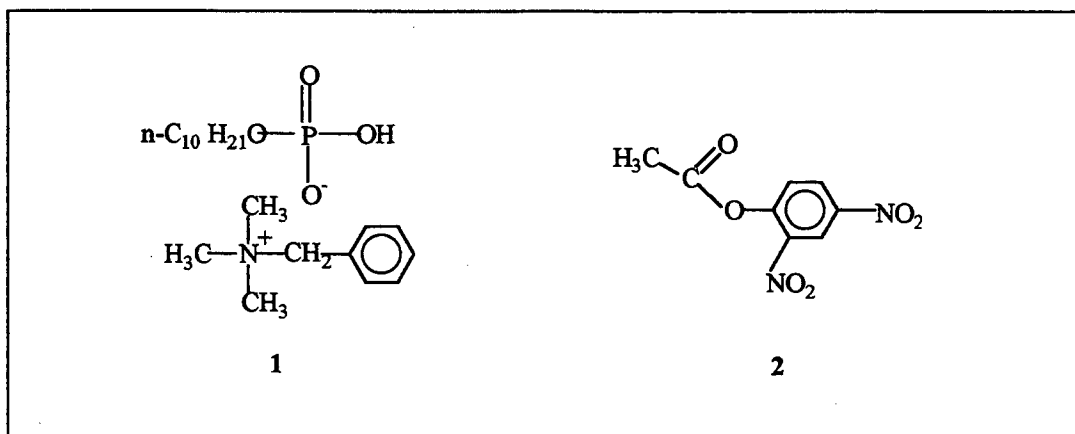
3.2.1. MATERIAIS

Dihidrogenofosfato de potássio (Reagen), tris(hidroximetil)aminometano, tris (Aldrich), 15-coroa-5 (Aldrich) e 18-coroa-6 (Aldrich) foram usados sem purificação prévia. A água foi destilada e purificada pela passagem por um sistema de troca iônica do tipo Milli-Q Water System, com condutividade específica menor que $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$. A acetonitrila utilizada, de grau HPLC (Aldrich), foi seca com hidreto de cálcio (Aldrich), destilada e guardada sobre peneira molecular (Aldrich 4 Å), conforme descrição da literatura.¹³⁶

O sal n-decilsfosfato de benziltrimetilamônio (composto 1; BTAP) foi preparado pela adição de uma quantidade equimolecular de hidróxido de benziltrimetilamônio (40% em massa; Aldrich) em uma solução aquosa de ácido n-decilsfosfórico. A mistura foi agitada por uma hora. Após este período, o solvente foi evaporado em um evaporador rotatório. O sal fundido obtido foi seco sob pressão reduzida com P_2O_5 (Aldrich) e estocado sobre P_2O_5 . Uma solução aquosa de BTAP com concentração igual a $5,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ apresentou pH 5,54.

O ácido n-decilsfosfórico foi preparado de acordo com metodologia já descrita¹³⁷ e foi gentilmente cedido por Cláudio de Lima.

O acetato de 2,4-dinitrofenila (composto 2; DNPA) foi preparado reagindo-se 2,4-dinitrofenol com anidrido acético, através de procedimento já descrito na literatura.¹³⁸ O produto foi recristalizado em etanol absoluto e seco a vácuo. O ponto de fusão obtido foi 72°C (lit.¹³⁸ $72-73^\circ\text{C}$).



3.2.2. MÉTODOS

Todos os espectros foram obtidos com um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 2S e com um espectrofotômetro modelo HPUV 8452-A com arranjo de diodo, ambos equipados com compartimentos para cubeta termostatizados para $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Os mesmos instrumentos foram empregados na obtenção dos dados cinéticos.

As medidas de pH foram determinadas com um pHmetro Hanna modelo HI 9318.

As corridas cinéticas foram efetuadas sob condições de primeira ordem com um excesso de BTAP de no mínimo 20 vezes. A solução estoque do éster foi 0,01 M em acetonitrila anidra. Todas as reações foram iniciadas misturando-se 9 μL de uma solução estoque do éster dentro da solução de BTAP equilibrada termicamente em uma cubeta de quartzo de 3 mL hermeticamente fechada e com 10 mm de caminho óptico. A concentração de DNPA na cubeta foi 3×10^{-5} M. As velocidades de transferência de acetila foram medidas seguindo-se o aumento nas absorbâncias em 363 nm (produção de 2,4-dinitrofenolato). Todas as misturas reacionais apresentaram estritamente cinéticas de primeira ordem para mais de cinco meias-vidas. As constantes observadas de primeira ordem (k_{obs}) puderam ser reproduzidas na faixa de $\pm 0,1\%$.

Para todas as cinéticas em acetonitrila anidra, e com até 1% de água, os valores de k_{obs} mostraram comportamento linear sobre a concentração do BTAP na faixa de $8,0 \times 10^{-4}$ M a $2,0 \times 10^{-3}$ M (i.e., até o limite de solubilidade do sal fosfatado). As constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) foram obtidas destes gráficos lineares, com desvios-padrão relativos em k_2 menores que 2%. Em todas as misturas de solventes foi empregado tampão tris ($5,0 \times 10^{-2}$ M; pH 8,0), exceto acima de 90% de acetonitrila, porque a solução tamponada se mostrou insolúvel.

O cálculo dos parâmetros de ativação foi feito através dos valores de k_{obs} para as reações de transferência de acetila em seis temperaturas diferentes, variando entre 25 e 50°C . Para o cálculo, foi empregada a equação de Eyring,¹³⁹ representada abaixo (eq. 3.1), na qual k_{obs} representa a constante de velocidade observada de primeira ordem, h a constante de Planck, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura em Kelvin e R a constante universal dos gases. ΔS^\ddagger é a entropia padrão de ativação e ΔH^\ddagger é a entalpia padrão de ativação. Um gráfico de Eyring de $\ln(k_{\text{obs}} h / k_B T)$ como função do recíproco da temperatura absoluta forneceu uma correlação linear na qual $\Delta S^\ddagger/R$ é igual ao intercepto e $-\Delta H^\ddagger/R$ representa o coeficiente

angular. As energias de ativação (E_a) foram fornecidas através da equação 3.2 enquanto as energias livres de ativação (ΔG^\ddagger) foram calculadas a partir da equação 3.3.

$$\ln(k_{\text{obs}} h / k_B T) = \Delta S^\ddagger / R - \Delta H^\ddagger / RT \quad (\text{eq. 3.1})$$

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (\text{eq. 3.2})$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (\text{eq. 3.3})$$

Um programa de tratamento de dados fundamentado nas equações 3.1-3.3 foi utilizado na obtenção dos parâmetros de ativação. Todos os coeficientes de correlação situaram-se acima de 0,99, com os desvios-padrão abaixo de 4×10^{-2} .

3.2.3. ESTUDOS DOS PRODUTOS

3.2.3.1. ESTUDOS DE INFRAVERMELHO

Todos os espectros de infravermelho foram feitos em um instrumento Perkin Elmer modelo 2000 FTIR. O procedimento descrito a seguir, para um determinado experimento, pode ser generalizado para todos os testes realizados. Uma solução do composto 1 ($4,68 \times 10^{-5}$ mol) dissolvida em 25 mL de acetonitrila foi agitada em um balão fechado à temperatura de 25°C. Uma pequena quantidade de uma solução estoque 0,105 M do éster em acetonitrila ($1,17 \times 10^{-5}$ mol) foi adicionada e a mistura reacional foi agitada. Após a reação haver terminado, o solvente foi removido em um evaporador rotatório e o resíduo foi solubilizado com 1 mL de acetonitrila. A observação direta do acetil-fosfato foi feita transferindo-se uma amostra da solução do produto para uma cela de NaCl. O espaçador utilizado para a cela apresentou a espessura de 0,5 mm. O espectro de infravermelho obtido mostrou uma banda de carbonila em 1754 cm^{-1} , ausente no espectro dos reagentes e consistente com a presença de acetil-fosfato.¹²⁹⁻¹³¹

3.2.3.2. IDENTIFICAÇÃO QUANTITATIVA DO ACETIL-FOSFATO

O acetil-fosfato pôde ser identificado quantitativamente por uma modificação do método para a determinação de acil-fosfatos de Lipmann e Tuttle.¹⁴⁰ Neste caso, o procedimento foi o mesmo detalhado acima (ver seção 3.2.3.1). Após o fim da reação o solvente foi removido e 1 mL de água foi adicionado ao resíduo. Esta solução foi adicionada para uma mistura de 1 mL de solução de hidroxilamina (todas as soluções descritas aqui foram preparadas de acordo com a literatura¹⁴⁰) e 1 mL de tampão acetato. A mistura reacional foi deixada repousar por 10 minutos. Após esse tempo, 1 mL de solução de ácido clorídrico e 1 mL de solução de cloreto férrico foram adicionados. A solução resultante foi filtrada. Foi observado o desenvolvimento de cor púrpura, em 500 nm, devido à complexação do ácido hidroxâmico formado quantitativamente com Fe^{3+} . Na região entre 480 e 540 nm a solução de cloreto férrico não absorve. É interessante observar que hidroxilamina também reage com DNPA. Assim, foi necessário seguir a reação de formação do acetil-fosfato até o final por estudos de infravermelho e ultravioleta antes se de fazer o experimento de determinação do acetil-fosfato.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. UM PROBLEMA CRUCIAL: A SOLUBILIZAÇÃO DE ÍONS FOSFATO EM ACETONITRILA

Antes de se começar a apresentação dos resultados e a sua discussão, achou-se importante discutir brevemente sobre as expectativas iniciais quanto ao estudo do melhor modelo para a síntese de compostos ricos em energia, assim como os fatos que levaram à abordagem do assunto aqui apresentada.

De acordo com de Meis,^{54,55} a constante de equilíbrio para a hidrólise de compostos ricos em energia, tais como o acetil-fosfato e o ATP, depende da atividade da água e da composição iônica, alcançando um valor alto da constante de equilíbrio em solução aquosa e um valor baixo no sítio ativo da enzima. Assim, a definição de compostos ricos em energia está intrinsecamente relacionada com o ambiente no qual a reação está ocorrendo. Uma reação que é espontânea em meio aquoso não necessariamente o será na superfície enzimática, em uma região hidrofóbica. Foi justamente destas considerações que nasceu a idéia de se estudar um sistema modelo no qual um composto rico em energia, o acetil-fosfato, seria formado em um meio aprótico, que mimetizaria o sítio hidrofóbico da enzima. A adição de água ao sistema deveria dificultar ou mesmo impedir a formação do produto desejado.

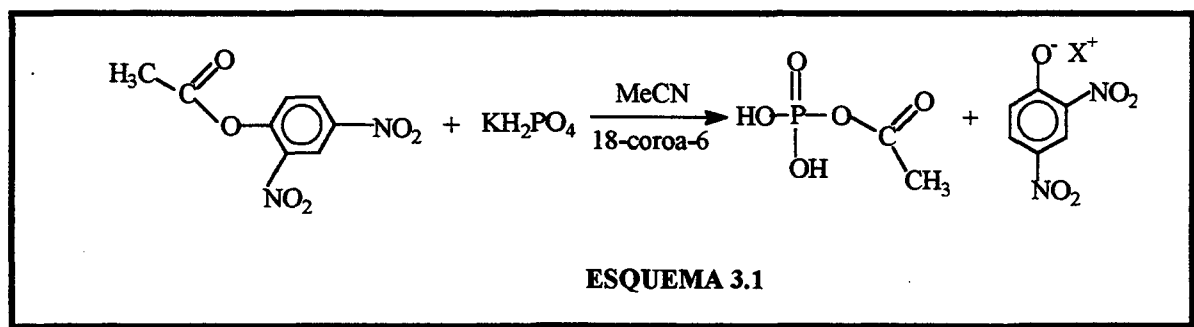
A primeira questão importante que surgiu foi a da escolha do solvente aprótico. Optou-se por um solvente dipolar aprótico, a acetonitrila (MeCN), um bom meio para se realizar os estudos cinéticos por motivos que já foram elencados por Haake e col.^{131,142} Este solvente tem uma constante dielétrica alta que é similar àquela dos sítios ativos das enzimas.¹¹⁹⁻¹²² Ele apresenta um momento de dipolo bastante alto, de aproximadamente 4 D, que o habilita a interagir com os solutos de forma a mimetizar a interação dipolar das ligações amídicas altamente dipolares das proteínas com os substratos. Para completar, acetonitrila apresenta a vantagem de ser uma base e um ácido muito fracos, o que se pode traduzir pela baixa capacidade para doar e receber ligações de hidrogênio. Isto significa que todas as

ligações de hidrogênio com o substrato e o estado de transição devem advir da água presente no meio.

Outro problema, bem mais importante, com o qual se defrontou no laboratório foi o de encontrar-se um sal de fosfato que fosse solúvel em acetonitrila com um teor mínimo de água e em uma concentração suficiente para realizar-se o estudo da reação-modelo.

A idéia mais simples seria a de solubilizar KH_2PO_4 em acetonitrila, com o auxílio de éteres coroa, aproveitando os resultados positivos de Kovach¹⁴³ e de Hajdu e Smith,^{129,130} que solubilizaram acetato de potássio em acetonitrila com 18-coroa-6 a fim de realizar estudos cinéticos de reações de transferência de acila. Hajdu e Smith^{129,130} demonstraram que a adição de acetato de potássio, em uma solução do éter coroa em acetonitrila anidra, permite aos íons acetato dessolvatados reagirem facilmente com o-toluidos de p-nitrofenila por meio de adição nucleofílica direta, levando à produção de acetato de o-toluidila. A reação representou um exemplo de conversão intermolecular, de um éster em um anidrido altamente reativo, por meio de um nucleófilo carboxilato. Os resultados obtidos pelos autores providenciaram um modelo físico-químico orgânico para o possível mecanismo de reações de transferência de acila catalisadas por enzimas, que envolvem a participação catalítica de um resíduo carboxilato dessolvatado.

O êxito alcançado por estes pesquisadores levou à busca de um modelo físico-químico orgânico semelhante, no qual dihidrogenofosfato de potássio, solubilizado em acetonitrila anidra, com 18-coroa-6, reagiria com acetato de 2,4-dinitrofenila, conforme o esquema 3.1. O produto resultante seria um composto rico em energia, o acetil-fosfato. O meio dipolar aprótico simularia o sítio ativo hidrofóbico da enzima, essencial para a síntese dos compostos ricos em energia. A adição de água ao sistema reacional deveria dificultar o avanço da reação de síntese do composto, e mesmo modificar o curso do processo.



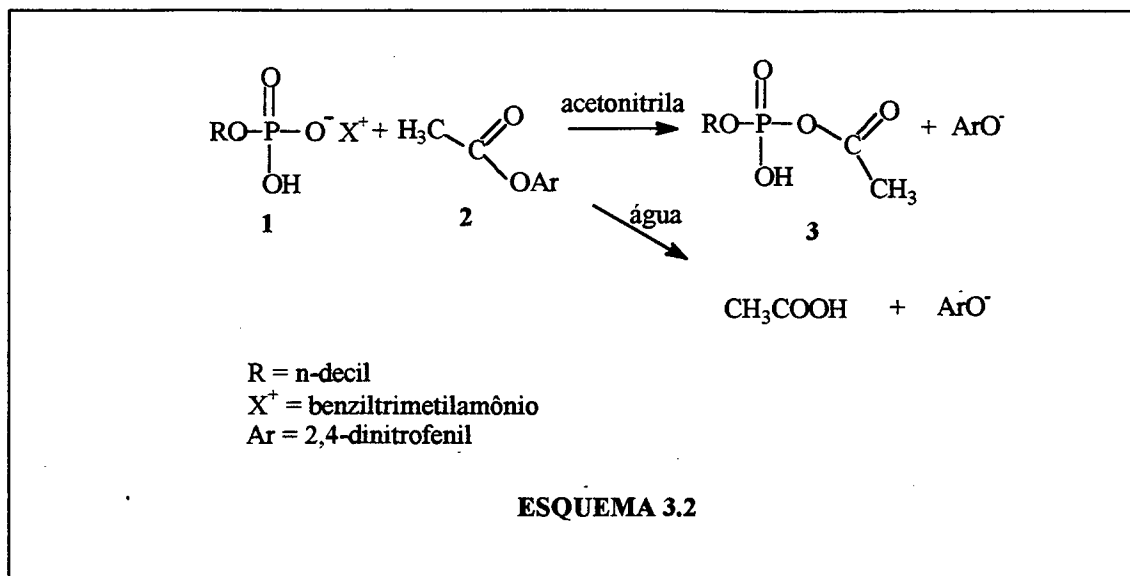
No entanto, quando se buscou a solubilização do fosfato empregando os métodos descritos na literatura por Pedersen para a preparação de complexos envolvendo outros sais e éteres coroa,¹⁴⁴ chegou-se a um problema importante. O dihidrogenofosfato, aparentemente insolúvel em acetonitrila, também o era na presença de 18-coroa-6, nas mais diversas proporções. Mesmo a adição de até 10% de água não foi suficiente para a solubilização do sal em uma concentração eficiente para se fazer as cinéticas. A dificuldade possivelmente deve-se à alta energia do retículo cristalino do KH_2PO_4 .

Uma outra tentativa realizada foi a utilização de n-decilsfosfato de sódio. Pensou-se que este sal, mais hidrofóbico que o primeiro, deveria ser solúvel em acetonitrila na presença de 15-coroa-5. A tentativa revelou-se infrutífera mas, dessa vez, o sal insolúvel em acetonitrila com 10% de água adicionada, tornou-se solúvel pela adição do éter coroa. Foi um resultado importante e encorajador que levou à troca do íon metálico do sal por um cátion orgânico. A reação de ácido fosfórico com hidróxido de benziltrimetilamônio levou à obtenção de fosfato de benziltrimetilamônio, que se revelou também insolúvel em acetonitrila.

Finalmente, a reação de hidróxido de benziltrimetilamônio com ácido n-decilsfosfórico forneceu o sal n-decilsfosfato de benziltrimetilamônio (BTAP), que mostrou uma solubilidade razoável em acetonitrila anidra. Foram obtidas, desta maneira, soluções do sal em acetonitrila na ordem de $1,2 \times 10^{-3}$ M, suficientes para a realização dos estudos. A adição de pequenas quantidades de água levaram a uma melhor solubilidade do sal em acetonitrila, conforme será mostrado adiante.

3.3.2. REAÇÃO DE ACETATO DE 2,4-DINITROFENILA (DNPA) COM ÍONS N-DECILFOSFATO DESSOLVATADOS

A adição de n-decilsfosfato de benziltrimetilamônio (BTAP) (1) em acetonitrila anidra permite aos íons n-decilsfosfato deessolvatados reagirem facilmente com o éster (2), por meio de adição nucleofílica à carbonila (esquema 3.2). Acetil-n-decilsfosfato (3) é produzido e 2,4-dinitrofenolato é liberado. Em solução aquosa, o fenolato continua a ser produzido, mas o outro produto é o ácido acético (esquema 3.2).



A reação entre BTAP dessolvatado e DNPA foi realizada em acetonitrila e em diversas misturas acetonitrila-água à temperatura de 40°C com rendimento quantitativo (figura 3.2). As constantes de velocidade para a reação foram determinadas pelo acompanhamento da formação de 2,4-dinitrofenolato em 363 nm (figuras 3.2 e 3.3). Todos os gráficos das constantes de velocidade observadas (k_{obs}) como uma função da concentração de BTAP são lineares e apresentam intercepto próximo a zero (figuras 3.4 e 3.5). As reações apresentam portanto cinéticas estritamente de segunda ordem. Gráficos como os mostrados nas figuras 3.4 e 3.5 foram usados para a determinação das constantes de velocidade de segunda ordem para uma série de misturas de solventes (ver tabela 3.4). Não foi observado comportamento de saturação, ou seja, a dependência linear da velocidade com a concentração do n-decilsfosfato foi mantida até o limite de solubilidade do sal no meio empregado. A reação aconteceu até todo o éster ser consumido; para cada equivalente do DNPA consumido, 1 equivalente de 2,4-dinitrofenolato foi produzido.

A estequiometria da reação foi determinada comparando-se o espectro de absorção da mistura reacional após a reação ter chegado ao fim com o espectro de 2,4-dinitrofenolato preparado independentemente em uma solução de BTAP de igual concentração. A análise de espectros de infravermelho ao final da reação (ver a Parte Experimental) revelou a inexistência da carbonila do éster, que deveria ter aparecido em 1786 cm^{-1} .

A formação do acetil-fosfato (3) foi confirmada pelo espectro de infravermelho dos produtos da reação em acetonitrila. A presença da banda de carbonila em 1754 cm^{-1} ,

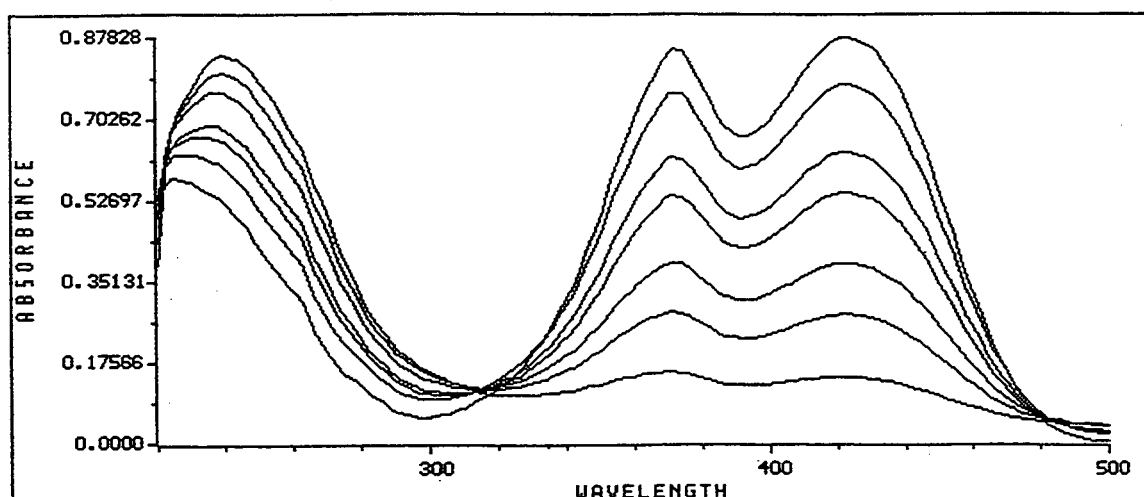


Figura 3.2. Mudanças espectrais decorrentes da reação entre DNPA (3×10^{-5} M) e íon n-decilsulfato ($1,1 \times 10^{-3}$ M) em acetonitrila anidra à temperatura de 40°C . Os espectros de absorção da mistura reacional são mostrados começando em 10 s, 30 s, 59 s, 120 s, 150 s e 270 s após os reagentes terem sido misturados. A curva final mostra o espectro dos produtos da reação.

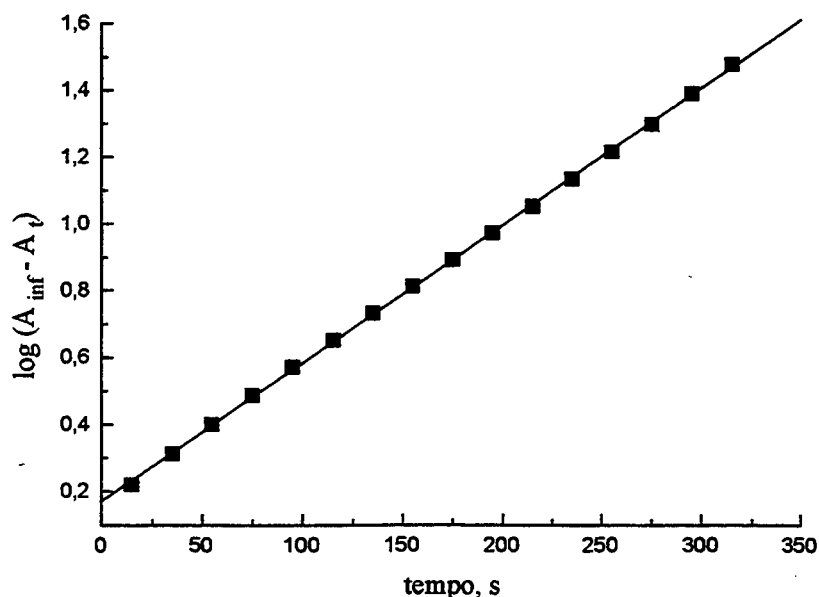


Figura 3.3. Gráfico de $\log(A_{\text{inf}} - A_t)$ em função do tempo para a reação entre DNPA (3×10^{-5} M) e n-decilsulfato ($1,1 \times 10^{-3}$ M) à temperatura de 40°C . As absorbâncias foram extraídas para o $\lambda_{\text{max}} = 363$ nm (aparecimento do 2,4-dinitrofenolato).

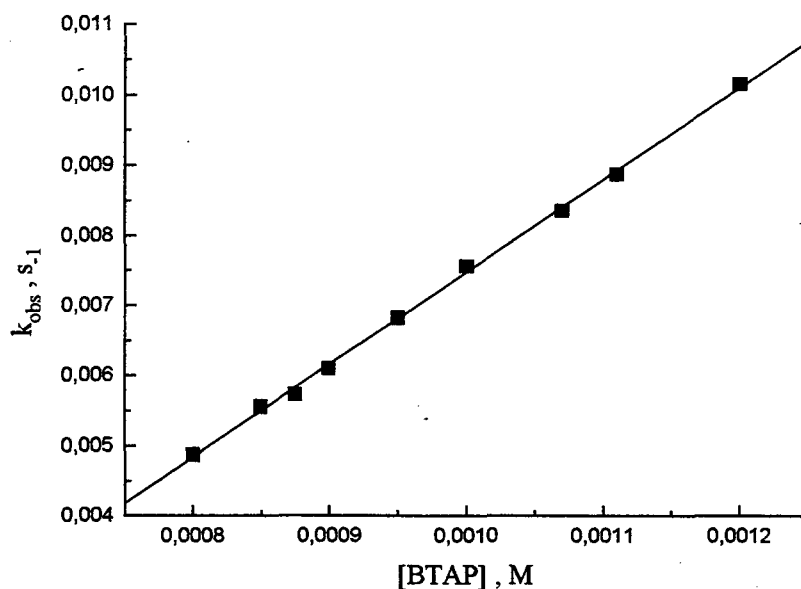


Figura 3.4. Gráfico de k_{obs} em função da concentração de n-decilsulfato para a reação com o DNPA em acetonitrila anidra.

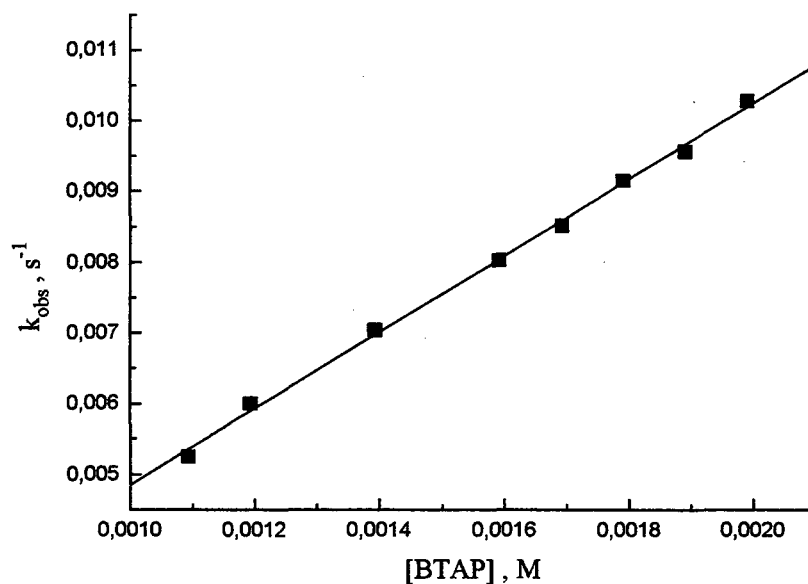


Figura 3.5. Gráfico de k_{obs} em função da concentração de n-decilsulfato para a reação com o DNPA em acetonitrila com concentração de água igual a 0,20 M.

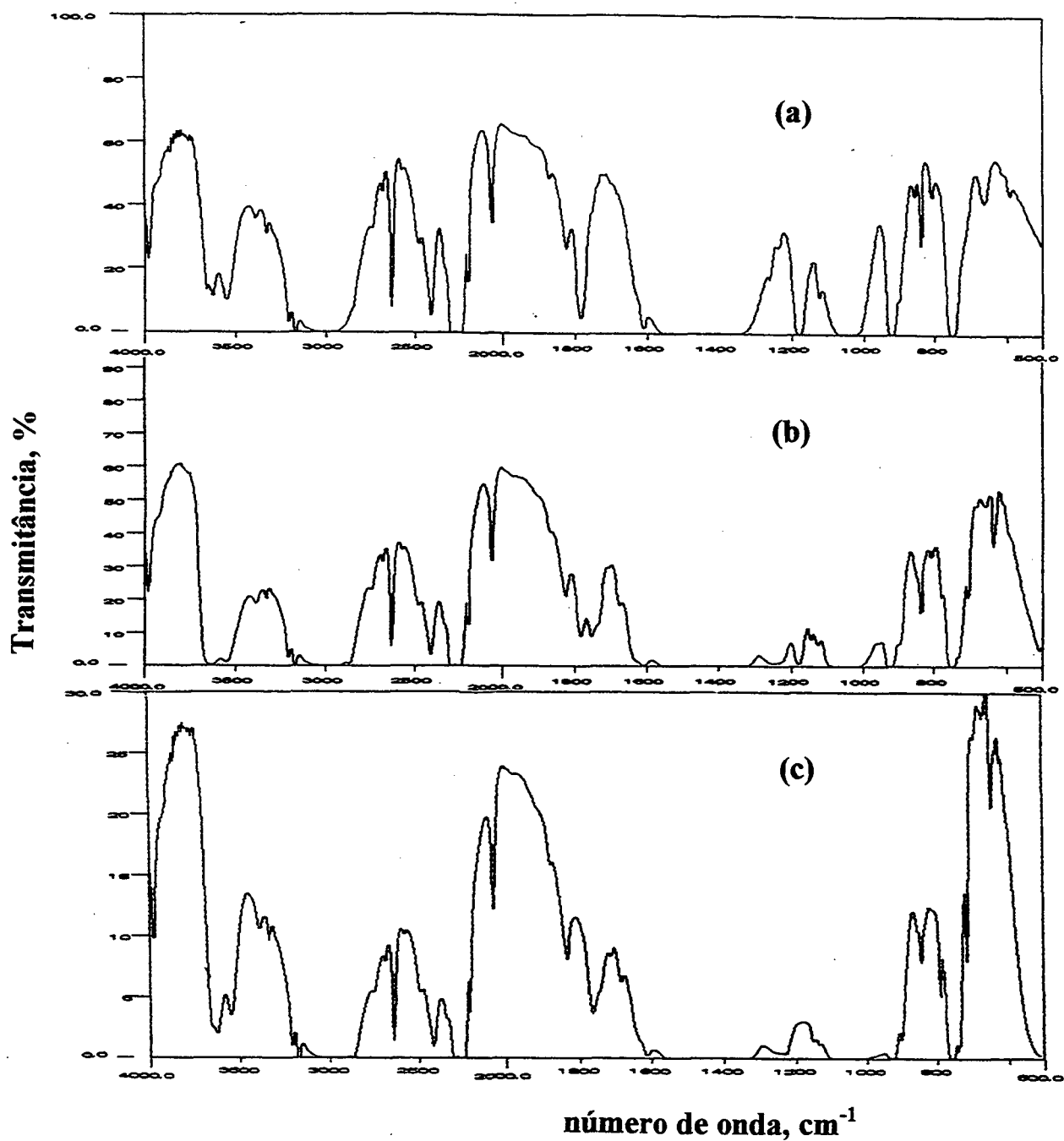


Figura 3.6. Espectros de infravermelho da reação do acetato de 2,4-dinitrofenila e *n*-decilfosfato de benziltrimetilamônio em acetonitrila anidra. (a) espectro dos reagentes; (b) espectro realizado após 30 minutos de reação; (c) após o final da reação. A reação foi realizada à temperatura de 25°C utilizando-se 2 equivalentes do fosfato para 1 equivalente do éster.

inexistente nos espectros dos materiais de partida, fornece forte evidência para a presença de acetil-fosfato (ver a Parte Experimental). A análise de diversos momentos da reação revelou que enquanto a banda de carbonila do éster de partida vai decrescendo com o tempo, a banda correspondente ao produto, em 1754 cm^{-1} vai aumentando em intensidade, até o final da reação (figura 3.6).

Outra maneira que se encontrou para se determinar a formação do acetil-fosfato foi através do teste de Lipmann e Tuttle para a determinação de acil-fosfatos.¹⁴⁰ Neste caso, a obtenção ao final do teste de uma solução apresentando cor púrpura, com λ_{max} em 500 nm forneceu outra grande evidência de que o composto 3 foi formado. Foi determinada a absorvidade molar para o complexo Fe^{3+} -ácido hidroxâmico formado ($\epsilon_{\text{max}} = 924,85\text{ M}^{-1}$) aplicando-se o teste de Lipmann para o DNPA (figura 3.7). A equação obtida foi empregada para se determinar o rendimento dos produtos para a reação em acetonitrila anidra. Verificou-se que nesta situação o rendimento em acetil-fosfato é quantitativo.

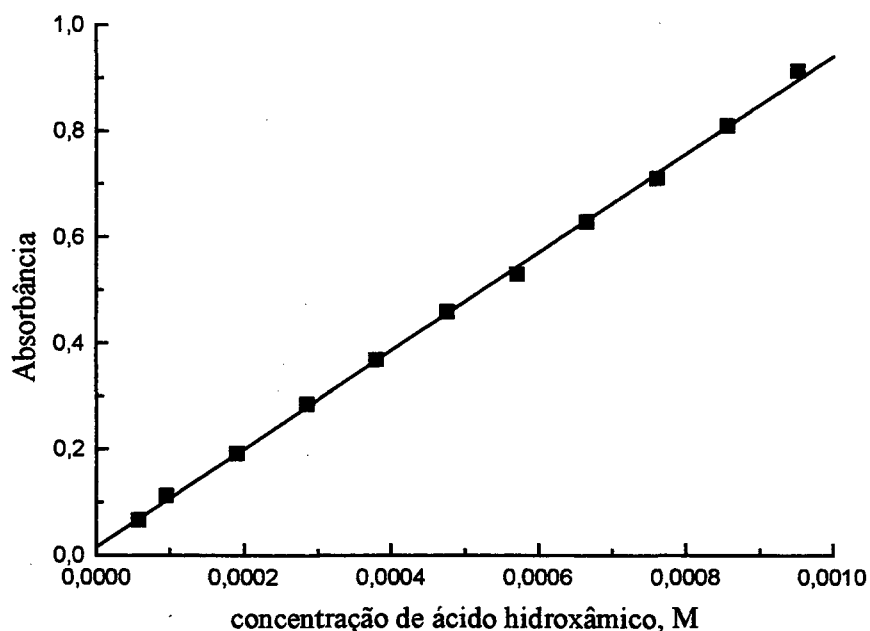


Figura 3.7. Curva para a determinação de acetil-fosfato. As absorbâncias foram coletadas em $\lambda_{\text{max}} = 500\text{ nm}$. Obteve-se a seguinte equação: $Y = 0,01644 (\pm 0,0048) + 924,85 (\pm 8,53) X$ que foi empregada nos cálculos dos rendimentos das reações.

3.3.3. INFLUÊNCIA DA ÁGUA NAS CONSTANTES DE VELOCIDADE OBSERVADAS

Conforme já foi apresentado no item anterior (ver tabela 3.4), a adição de pequenas quantidades de água acarreta sensíveis mudanças nos parâmetros cinéticos da reação de DNPA com n-decilsfosfato. Os dados cinéticos apresentados na tabela 3.5 e dispostos na forma de um gráfico das constantes de velocidade observadas como função da quantidade de água adicionada (figura 3.8) corroboram os resultados já apresentados e indicam que a reação sob estudo é fortemente inibida pela adição de água. Observa-se um decréscimo de 68 vezes no valor da constante de velocidade para a reação quando adiciona-se à acetoneitrila anidra 6% de água (para fornecer uma concentração igual a 2,65 M), o que corresponde a uma mudança no tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a reação de 46 s para 3136 s. Da mesma forma, a adição de 10% de tampão tris (pH 8,0) ao meio provoca uma inibição da ordem de 274 vezes na magnitude da constante de velocidade. Considerando a reação com 10% de água, a inibição sobe para a ordem de 660 vezes. Estes resultados demonstram claramente o papel primordial da água neste equilíbrio particular. Provavelmente, a razão fundamental pela qual a água promove a inibição do processo reside no simples fato de que a solvatação preferencial do ânion fosfato pela água decresce quimicamente a sua habilidade nucleofílica, ao mesmo tempo em que permite, simultaneamente, que ele aja como um catalisador básico geral na reação hidrolítica.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ A solvatação preferencial de íons pela água em misturas binárias acetoneitrila-água tem sido vastamente documentada na literatura (ver o capítulo 2). A literatura registra ainda vários exemplos que ilustram sobejamente a importância da solvatação específica de íons em solventes dipolares apróticos.^{129-131,141}

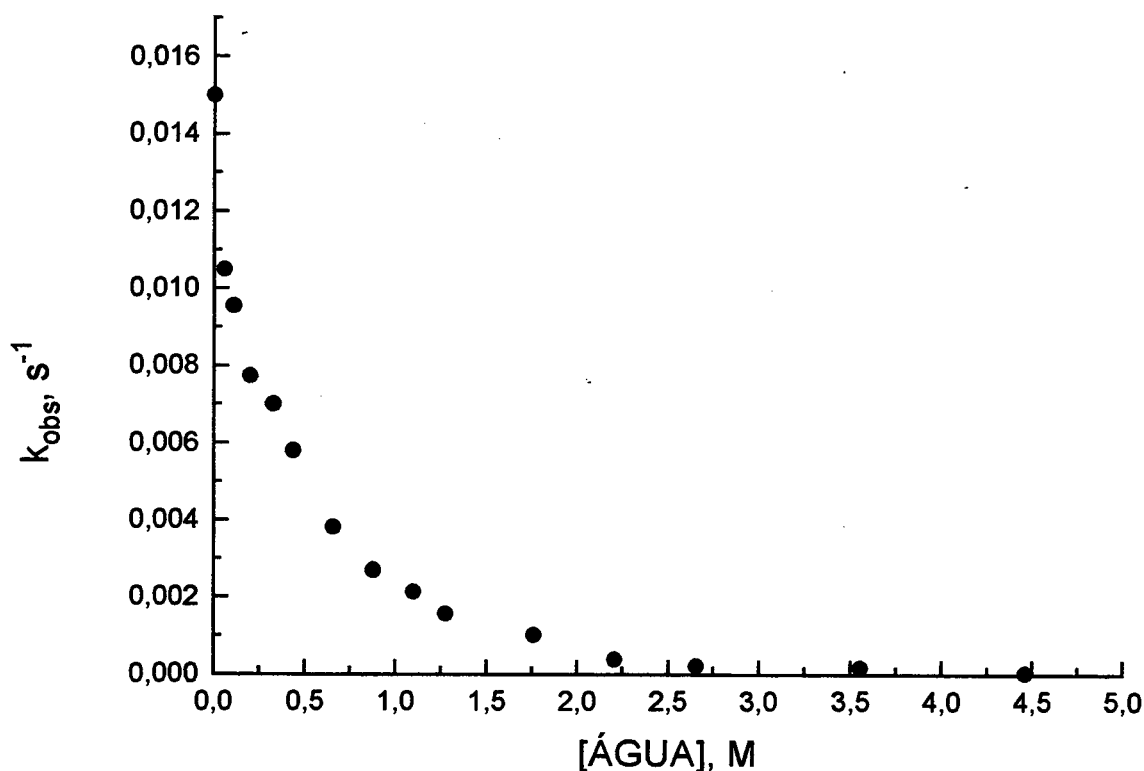


Figura 3.8. Inibição provocada pela adição de água na reação de DNPA com BTAP. Foi empregada em todos os casos uma concentração igual a $1,57 \times 10^{-3}$ M de nucleófilo (ver tabela 3.5).

3.3.4. PARÂMETROS DE ATIVAÇÃO

Os parâmetros de ativação foram calculados para várias concentrações de água em acetonitrila por gráficos de $\ln k_{obs}$ em função de $1/T$ (K) (figuras 3.9 e 3.10) e através da equação de Eyring, utilizando-se um programa de mínimos quadrados.¹³⁹ Os valores finais de ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger foram calculados para 25° C. Todos esses dados estão mostrados nas tabelas 3.6 e 3.7. Observa-se que os valores de ΔH^\ddagger crescem com o aumento da concentração de água no meio reacional, refletindo a maior dificuldade do íon n-decilsulfato para atuar como nucleófilo quando a água está presente. As mudanças em ΔS^\ddagger também são bastante significativas: os valores são bastante altos em magnitude ($-40,37$ e $-50,38$ cal $K^{-1} mol^{-1}$ para 99% e 100% de acetonitrila, respectivamente). Os valores de ΔS^\ddagger negativos sugerem um

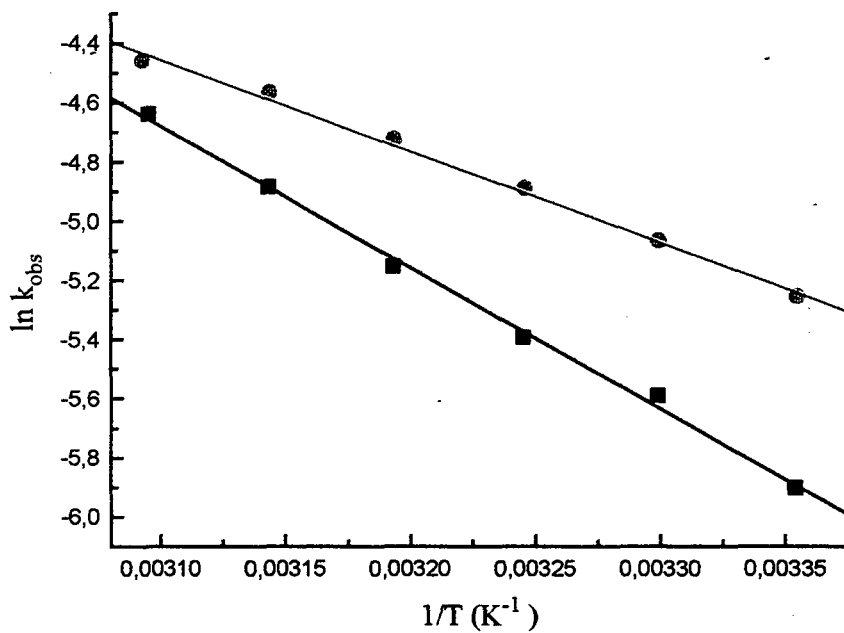


Figura 3.9. Gráficos de $\ln k_{\text{obs}}$ vs. $1/T$ para a reação de DNPA em acetonitrila anidra (●) e em acetonitrila com 1% de água (■).

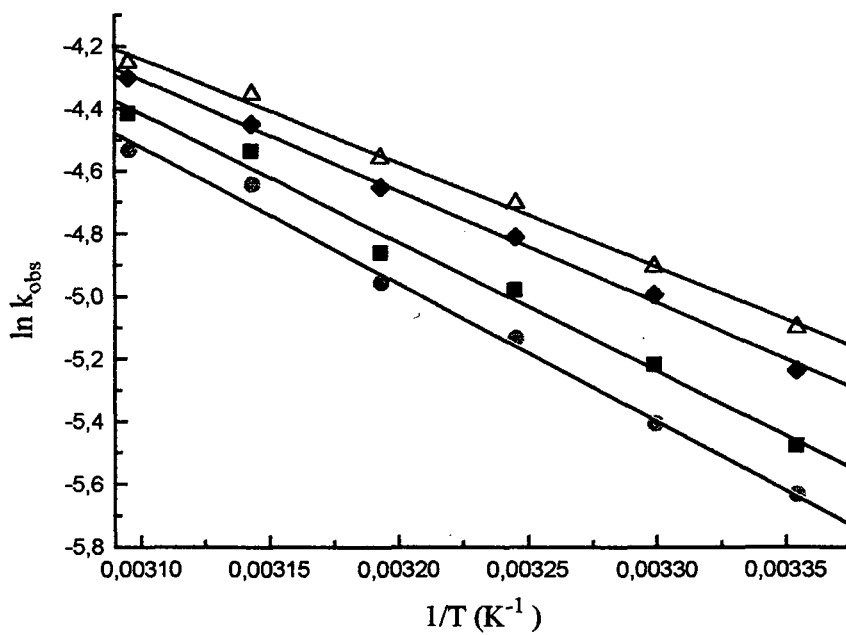


Figura 3.10. Gráficos de $\ln k_{\text{obs}}$ vs. $1/T$ para a reação de DNPA em acetonitrila com 0,75% (●), 0,46% (■), 0,25% (◆) e 0,13% (Δ) de água.

mecanismo em que no estado de transição encontram-se interagindo o éster e o íon n-decilsfosfato. Observa-se ainda que os valores das variações de entropia de ativação para o processo aumentam à medida que se adiciona água ao sistema. Estes valores devem refletir uma maior dificuldade da água em solvatar o estado de transição em relação aos reagentes, em virtude da dispersão da carga negativa do nucleófilo no estado de transição.

3.3.5. INFLUÊNCIA DA ÁGUA NO CURSO DA REAÇÃO ENTRE O ÉSTER E O ÍON n-DECILFOSFATO

A reação de DNPA com BTAP em acetonitrila anidra fornece como produto exclusivo o correspondente acetil-fosfato, com rendimento quantitativo. Em solução aquosa tamponada (pH 8,0) com KH_2PO_4 adicionado, entretanto, ocorre exclusivamente a hidrólise do éster. A fim de se verificar a influência da água no curso da reação entre o éster e o fosfato, foram determinados os rendimentos dos diferentes produtos, descritos no esquema 3.2. Os rendimentos em acetil-fosfato formado e de éster hidrolisado para a reação de DNPA com BTAP em diversas misturas acetonitrila-água são mostrados na tabela 3.8. Os dados dos rendimentos como função da concentração de água no meio foram dispostos na forma de um gráfico (ver figura 3.11). Conforme pode-se observar, os rendimentos dos produtos dependem fortemente da concentração de água no meio reacional. A adição de 5% de água ao meio dipolar aprótico promove a redução do rendimento em acetil-fosfato para a metade. A adição de mais de 20% de água faz com que não se consiga mais observar a presença do acetil-fosfato, quer pelo teste com hidroxilamina, quer por análise dos espectros de infravermelho da mistura reacional. Neste caso, somente são observados os produtos da hidrólise do éster.

Um fator que deve ser acrescentado à questão da reação do éster com n-decilsfosfato nas misturas acetonitrila-água é o de que o acetil-fosfato formado pode sofrer hidrólise, levando à diminuição dos seus rendimentos e aumentando a proporção dos produtos de hidrólise. A fim de investigar a ocorrência deste problema, foi feita a reação do DNPA com BTAP em acetonitrila anidra e após o final da reação foi adicionado água (pH 8,0 mantido com tampão tris) ao meio reacional em quantidades determinadas (ver tabela 3.9). Após 72 horas foram recolhidas alíquotas para se proceder ao teste da hidroxilamina e a análises de infravermelho. Verificou-se que, à medida que água vai sendo adicionada ao sistema, o acetil-fosfato formado mais facilmente pode ser hidrolisado. Em uma mistura de acetonitrila com

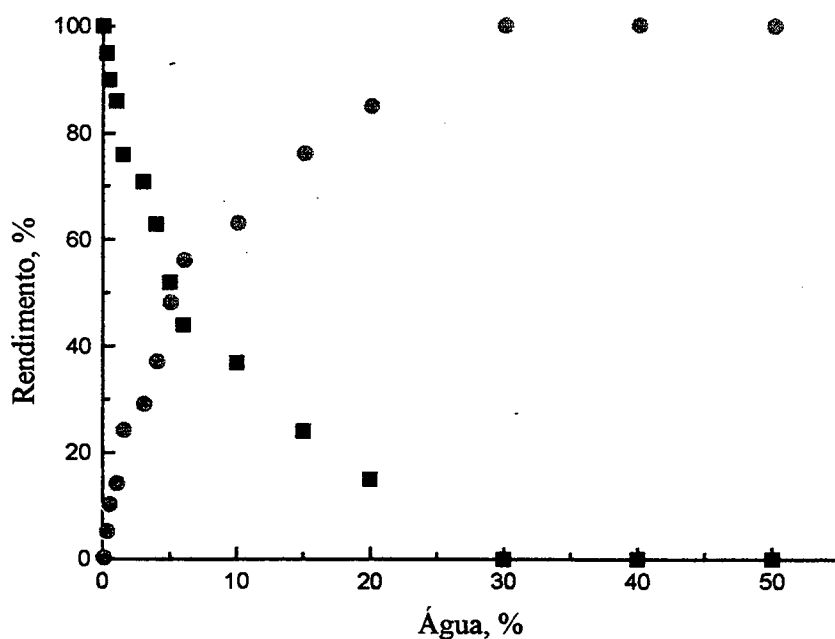


Figura 3.11. Gráfico do rendimento de acetil-fosfato formado (■) e de éster hidrolisado (●) na reação de DNPA com BTAP em diversas misturas acetonitrila-água. Todos os rendimentos foram calculados a partir da conversão do acetil-fosfato formado em ácido hidroxâmico (ver o item 3.2.3.2 da parte experimental e o item 3.3.5 dos resultados).

40% de água, por exemplo, não foi mais observado acetil-fosfato em solução após três dias de reação. Em 95% de acetonitrila, entretanto, apenas 20% do acetil-fosfato foi hidrolisado após 6 dias de reação. Como todas as reações aconteceram no período máximo de 72 horas, esta é uma limitação que deve ser colocada ao método, principalmente para as reações que foram feitas em misturas de solvente com mais de 5% de água. Entretanto, mesmo com esta limitação, é possível divisar uma boa tendência sobre a influência do meio no curso da reação.

O sal KH_2PO_4 não é solúvel em acetonitrila na presença de 18-coroa-6. Entretanto, observou-se que após fazer-se a agitação por 72 horas de uma solução de DNPA em acetonitrila na presença de 18-coroa-6 e com KH_2PO_4 adicionado, a análise do espectro de infravermelho revelou a presença de uma pequena banda em 1754 cm^{-1} (ver figura 3.12), inexistente no espectro obtido para o mesmo experimento na ausência do éter coroa. Os resultados pareceram demonstrar que o éter coroa consegue solubilizar uma quantidade

extremamente pequena do fosfato, o qual em solução, reage com o éster. A reação entretanto, parece proceder muito lentamente, inviabilizando o cálculo do rendimento da reação.

Teve-se, então, a idéia de fazer o mesmo experimento, porém adicionando-se desta vez pequenas quantidades de água (ver tabela 3.10). Observou-se novamente que, visualmente, o sal pareceu não ser solúvel nas misturas de solvente utilizadas, porém desta vez a reação aconteceu mais rapidamente. A adição de 2 e 5% de água levou à obtenção do acetil-fosfato com 60 e 50% de rendimento, respectivamente. O produto foi confirmado pelos espectros de infravermelho (figura 3.12). O rendimento em acetil-fosfato foi diminuindo com o aumento da concentração de água no meio. Com 90% de acetonitrila, o rendimento cai para 40%. Com 70% de acetonitrila não foi detectado acetil-fosfato com o teste da hidroxilamina, mas a presença da banda de carbonila no espectro de infravermelho, em 1754 cm^{-1} , revelou a presença do produto.

Fez-se ainda o mesmo experimento empregando-se n-decilsfosfato de sódio na presença de 15-coroa-5, em acetonitrila contendo 10% de tampão tris (pH 8,0). Obteve-se o produto acil-fosfatado com 45% de rendimento, que foi confirmado por infravermelho (ver figura 3.13).

1.3.6. SOBRE O PAPEL DA ÁGUA NA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA

O modelo não enzimático descrito aqui representa o primeiro sistema orgânico que “mimetiza” e fornece uma explicação simples para a síntese enzimática dos compostos ricos em energia.^{54,55} Para que ocorra a síntese de compostos ricos em energia, com rapidez, suavidade e rendimento quantitativo, faz-se necessário um microambiente anidro. No sítio ativo da enzima, se os reagentes encontram-se em uma posição adequada, uma mudança conformacional que proporcione a diminuição da atividade da água no sítio ativo certamente promoverá a reação. Os dados experimentais aqui apresentados também concordam com o mecanismo de mudança de ligação, que tem sido bastante utilizado na explanação da síntese do ATP pelas ATP sintases.¹⁴⁻¹⁹ De acordo com esta hipótese, a síntese enzimática do ATP ocorre espontaneamente nos sítios catalíticos e a energia é necessária somente para soltar o ATP produzido.

O fato experimental da reação em acetonitrila anidra diferir de maneira significativa daquela ocorrida na presença de quantidades pequenas de água, e completamente da observada em sistemas aquosos, vem a demonstrar que o estudo de reações de importância bioquímica em sistemas puramente aquosos pode, em muitas situações, não contribuir de forma adequada para a compreensão da catálise enzimática. Para as reações que ocorrem em um sítio hidrofóbico de uma enzima particular, a água não é certamente um estado padrão adequado para a comparação de constantes de equilíbrio e/ou velocidade.¹²⁹⁻¹³¹ Um exemplo típico do que se acabou de escrever é que intermediários iônicos são favorecidos algumas vezes em reações realizadas em solventes polares e são considerados de alta energia em sistemas não-polares.^{148,149} Este simples, porém altamente sofisticado, manuseio da termodinâmica de equilíbrio de reações, representa exatamente o que a enzima e a natureza empregam para promover a síntese de compostos ricos em energia.

Tabela 3.4. Influência da água nos valores das constantes de velocidade de segunda ordem para a reação entre TBAP e DNPA em acetonitrila.

$[\text{H}_2\text{O}], \text{M}^{-1}$	$k_2^{40^\circ\text{C}}, \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	número de pontos
0,44	3,80	7
0,33	4,64	6
0,20	5,41	8
0,11	6,53	8
0,06	7,29	9
0,00	13,22	9

^a Todas as corridas cinéticas foram realizadas sob condições de pseudo-primeira ordem, utilizando-se $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ de DNPA. O nucleófilo n-decilfosfato foi empregado em excesso (no mínimo 20 vezes mais em relação ao éster).

Tabela 3.5. Inibição da reação de DNPA com BTAP pela adição de água.^a

[H ₂ O], M	10 ³ k _{obs} (40 °C), s ⁻¹	t _{1/2} (s)
0,00	15,00 ^b	46,2
0,06	10,50	66,0
0,11	9,55	72,6
0,20	7,74	89,5
0,33	7,01	98,8
0,44	5,80	119,5
0,66	3,81	181,9
0,88	2,70	257,0
1,10	2,14	323,8
1,28	1,57	441,4
1,76	1,03	672,8
2,21	0,393	1763,3
2,65	0,221	3135,7
3,55	0,177	3915,2
4,46 ^c	0,0548	12646,0
4,46 ^d	0,0227	30528,6

^a Todas as medidas cinéticas foram efetuadas com 1,57×10⁻³ M de BTAP. ^b Valor extrapolado da constante de segunda ordem para a reação em acetonitrila anidra (ver tabela 1.4).

^c Cinética realizada com solução tamponada (tampão tris 5,0×10⁻² M; pH 8,0).

^d Cinética realizada sem tampão.

Tabela 3.6. Influência da temperatura nas velocidades da reação de DNPA com BTAP em acetonitrila anidra e com água adicionada.^a

[H ₂ O], M	t, °C	10 ³ k _{obs} , s ⁻¹
0,00	25,0	5,23
	30,0	6,29
	35,0	7,51
	40,0	8,87
	45,0	10,38
	50,0	11,56
0,06	25,0	6,11
	30,0	7,40
	35,0	9,07
	40,0	10,50
	45,0	12,86
	50,0	14,25
0,11	25,0	5,33
	30,0	6,78
	35,0	8,14
	40,0	9,55
	45,0	11,68
	50,0	13,57
0,20	25,0	4,19
	30,0	5,42
	35,0	6,87
	40,0	7,74

Tabela 3.6. Continuação

0,20	45,0	10,71
	50,0	12,09
0,33	25,0	3,57
	30,0	4,47
	35,0	6,16
	40,0	7,01
	45,0	9,59
	50,0	10,72
0,44	25,0	2,74
	30,0	3,74
	35,0	4,56
	40,0	5,80
	45,0	7,58
	50,0	9,69

^a Todas as corridas cinéticas foram efetuadas com concentração de n-decilsulfato de benziltrimetilamônio igual a $1,57 \times 10^{-3}$ M, exceto para a reação em acetonitrila anidra ($c = 1,1 \times 10^{-3}$ M).

Tabela 3.7. Parâmetros de ativação para a reação de DNPA com n-decilsulfato.^a

[H ₂ O], M	E _A , kcal/mol	ΔH [#] , kcal/mol	ΔS [#] , cal/K mol	ΔG [#] , kcal/mol
0,44	9,50	8,91	-40,37	20,94
0,33	8,73	8,13	-42,45	20,79
0,20	8,18	7,59	-44,00	20,70
0,11	7,02	6,43	-47,33	20,54
0,06	6,62	6,02	-48,43	20,47
0,00 ^b	6,13	5,53	-50,38	20,56

^a Todos os parâmetros foram determinados das respectivas constantes de velocidade observadas em diversas temperaturas (ver a tabela 3.6) para a reação entre o éster e $1,57 \times 10^{-3}$ M de BTAP com exceção para a reação realizada em acetonitrila anidra. ^b Parâmetros de ativação determinados com a concentração de BTAP igual a $1,1 \times 10^{-3}$ M.

Tabela 3.8. Rendimentos em acetil-fosfato formado e de éster hidrolisado para a reação de DNPA com BTAP em diversas misturas acetonitrila-água.^a

água, %	rendimento em acetil-fosfato, %	rendimento em éster hidrolisado, %
0,00	100	0
0,25	95	5
0,46	90	10
1,00	86	14
1,50	76	24
3,00	71	29
4,00	63	37
5,00	52	48
6,00	44	56
10,00	37	63
15,00	24	76
20,00	15	85
30,00	0	100
40,00	0	100
50,00	0	100

^a Todos os rendimentos foram calculados a partir da conversão do acetil-fosfato formado em ácido hidroxâmico (ver o item 3.2.3.2 da parte experimental e o item 3.3.5 dos resultados). As razões entre o n-decilfosfato e o éster foram 4:1.

Tabela 3.9. Reação de hidrólise do acetil-fosfato formado na reação entre DNPA e BTAP.^a

água, %	rendimento após 3 dias, %	rendimento após 6 dias, %
5	90	80
10	80	70
20	60	40
40	0	0

^a Todos os experimentos foram efetuados após a reação de DNPA com BTAP (na razão fosfato:éster 4:1) em acetonitrila anidra haver chegado ao seu final. Foi então adicionado tampão tris (pH = 8,0) até a concentração desejada e a reação foi acompanhada pelo teste do ácido hidroxâmico (ver a parte experimental e o item 3.3.5 dos resultados).

Tabela 3.10. Reações de formação de acetil-fosfato a partir da reação de DNPA com KH_2PO_4 na presença de 18-coroa-6 em diversas misturas acetonitrila-água.^a

água, %	tempo de reação, h	rendimento em acetil-fosfato, %	bandas no espectro de infravermelho ^b
0,0 ^c	72	-	negativo
0,0 ^d	72	-	positivo
2,0	72	60	positivo
5,0	72	48	positivo
10,0	48	40	positivo
20,0	48	-	positivo
30,0	48	-	positivo
40,0	48	-	negativo

^a Todas as reações foram efetuadas empregando-se razão 2:1 éter-coroa : KH_2PO_4 . Os rendimentos foram calculados através do teste do ácido hidroxâmico (ver a parte experimental e o item 3.3.3 dos resultados). ^b Refere-se ao aparecimento de banda de carbonila do acetil-fosfato na região de 1750 cm^{-1} . ^c Experimento realizado na ausência de éter coroa. ^d A quantidade de éster que reagiu foi muito pequena, impedindo o cálculo de rendimento pelo método utilizado.

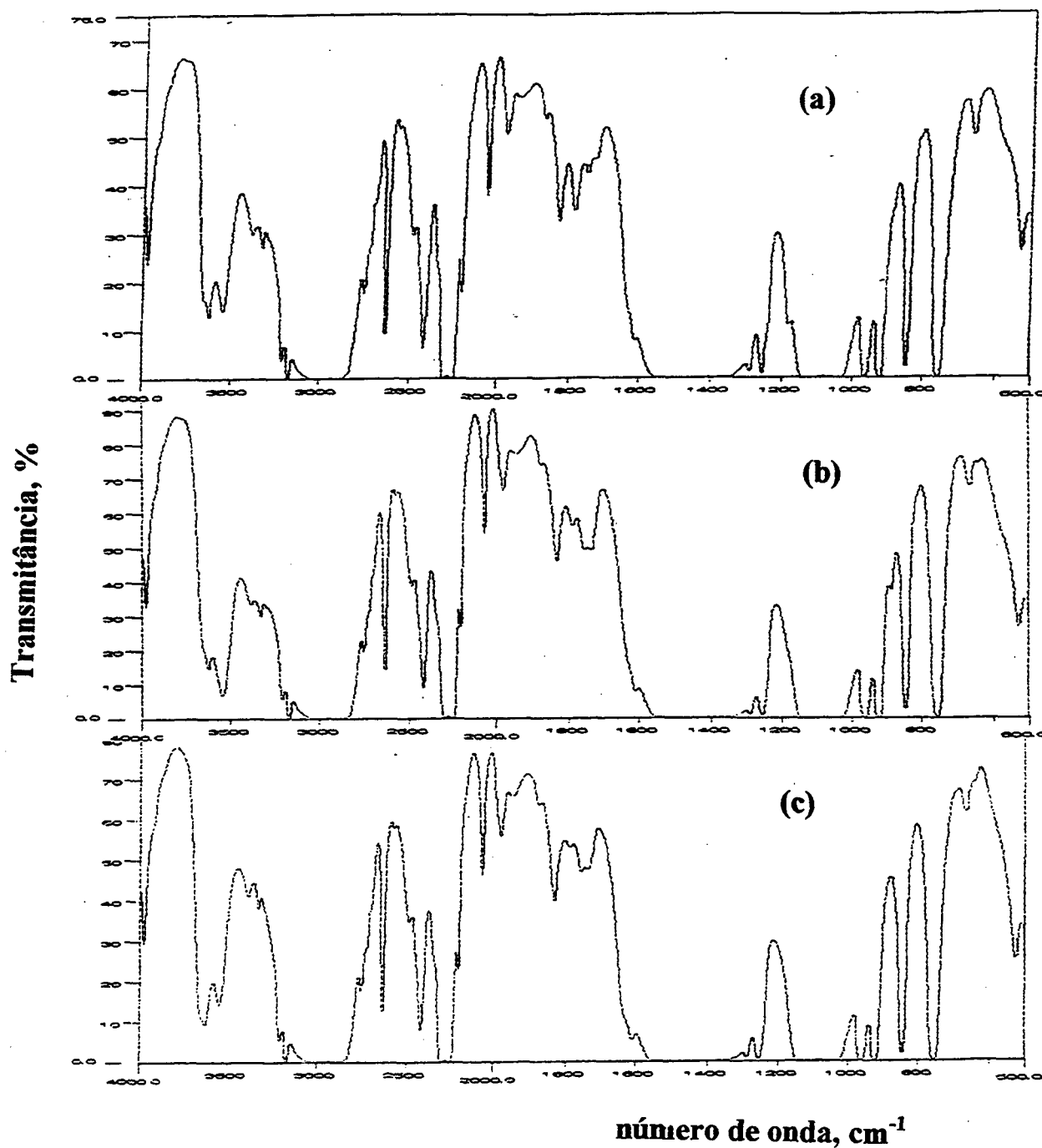


Figura 3.12. Espectros de infravermelho para as reações de DNPA com KH_2PO_4 na presença de 18-coroa-6: (a) em acetonitrila anidra após 72 horas de reação; (b) em acetonitrila com 2% de água após 48 horas de reação; (c) em acetonitrila com 5% de água após 48 horas de reação. As reações foram realizadas à temperatura de 25°C utilizando-se 4 equivalentes do fosfato para 1 equivalente do éster.

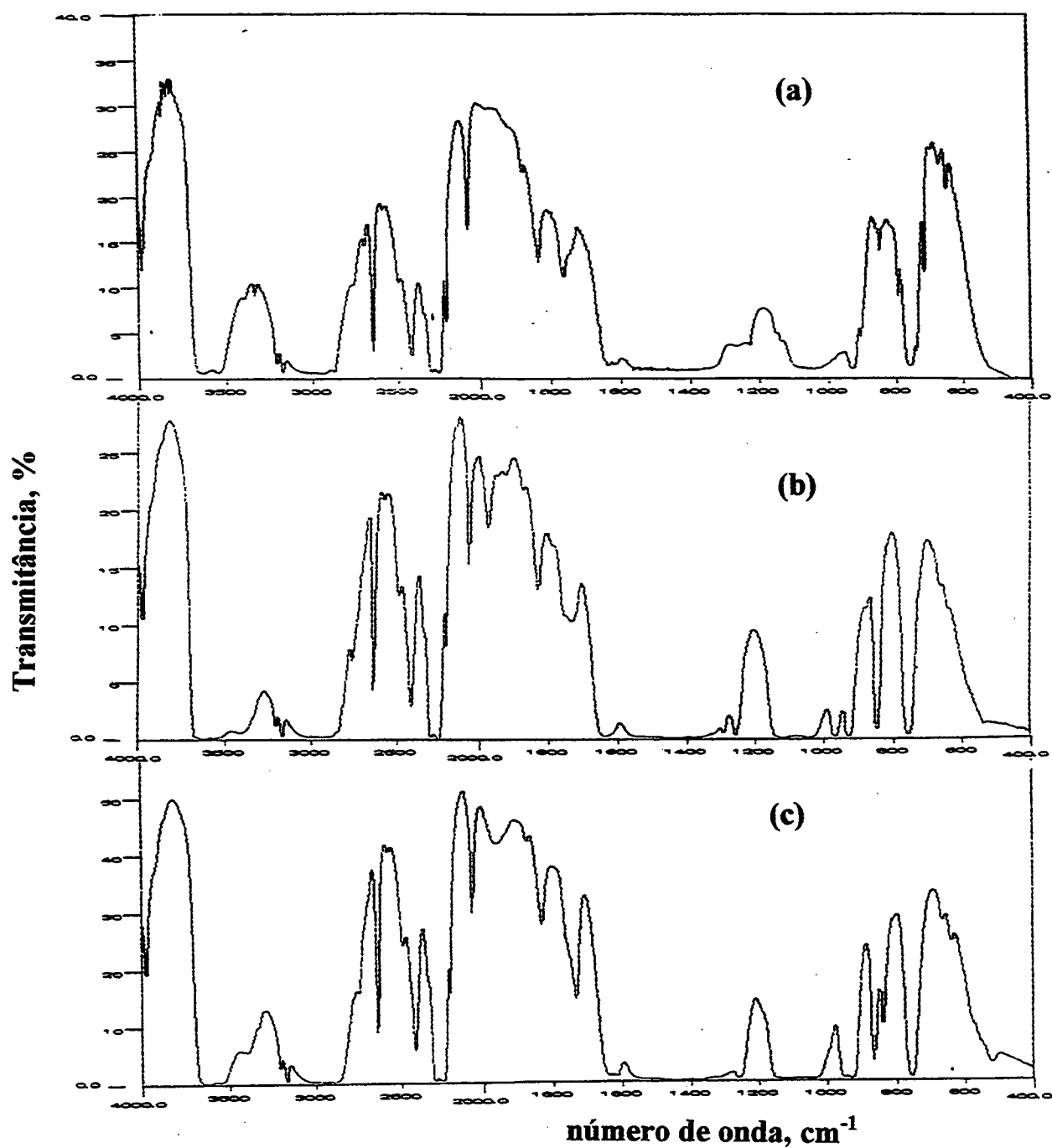


Figura 3.13. Espectros de infravermelho após 48 horas de reação de DNPA em acetonitrila com 10% de tampão tris (pH=8,0): (a) com BTAP; (b) com KH_2PO_4 na presença de 18-coroa-6; (c) com n-decilsulfato de sódio na presença de 15-coroa-5. As reações foram realizadas à temperatura de 25°C utilizando-se 4 equivalentes do fosfato para 1 equivalente do éster.

3.4. CONCLUSÕES

A questão do papel da água nos sistemas biológicos, particularmente a sua ausência, foi até o momento muito pouco explorado, não obstante o fato de saber-se que ela, por exemplo, ocupa 85% do volume total da massa cinzenta do cérebro. Trabalhos recentes têm sugerido que a água exerce um importante papel estruturador das células, através da formação de “clusters” ou agregados ordenados em tamanhos e formatos que propiciam a construção da célula.¹⁵⁰ Assim, são necessários estudos mais aprofundados com o objetivo de se descobrir que outros papéis a água pode representar nos eventos bioquímicos. Este parece ser um bom caminho para que se possa vislumbrar com maior nitidez como ocorrem os processos de transdução de energia.

A reação nucleofílica do DNPA com íons n-decilfosfato dessolvatados, descrita neste trabalho, representa o primeiro modelo bioorgânico que explica com sucesso a síntese dos compostos ditos ricos em energia, como o acetil-fosfato e o ATP. O referido modelo encontra-se em consonância com trabalhos recentes da área que fazem alusão à importância do papel da água na síntese destes compostos.^{54,55} A grande dependência da água (ou a sua ausência) sobre a formação do acetil-fosfato demonstra claramente a importância da participação deste solvente no aumento da reatividade nucleofílica e, até mesmo, na mudança do curso da reação. Os dados experimentais sugerem que a natureza do microambiente na superfície enzimática pode determinar, juntamente, acelerações de velocidade e mudanças nas constantes de equilíbrio. Essas observações concordam com as de muitos outros autores envolvidos na questão da síntese de compostos ricos em energia^{54,55} e de inúmeros dados cristalográficos de raios-X, que indicam a existência de sítios catalíticos das enzimas apresentando regiões hidrofóbicas.¹¹⁴⁻¹¹⁷

Finalmente, há que se considerar o muito a ser feito no campo da mimetização da síntese enzimática do ATP e dos outros compostos ricos em energia. Diversos modelos enzimáticos^{106,151-158} podem ser sintetizados e explorados. Eles poderão contribuir grandemente na elucidação dos diversos aspectos que compõem a química das enzimas responsáveis pela transdução de energia. Afinal, conforme escreveu Knowles,¹⁵⁹ a catálise enzimática não é diferente daquela efetuada pelos modelos miméticos: é somente melhor.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GOVINDJEE, D. *Bioenergetics of Photosynthesis*, New York: Academic Press, 1975.
2. GOVINDJEE, D., WHITMARSH, J. In *Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria*, GOVINDJEE, D., Ed., New York: Academic Press, 1982.
3. ANDREO, C. S., VALLEJOS, R. H. *Fotosíntesis*, Washington, D.C.: General Secretariat of the Organization of American States, 1984.
4. KIRSCHBAUM, J. "Biological Oxidations and Energy Conservation". *J. Chem. Educ.* 45, p. 28-37, 1968.
5. CORBRIDGE, D. E. C. *Phosphorus*, Amsterdam: Elsevier, p. 261-325, 1978.
6. LIPMANN, F. "Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy". *Adv. Enzymol.* 1, p. 99-162, 1941.
7. O símbolo P~O é comumente usado para se descrever uma ligação fosfatada de alta energia.
8. WESTHEIMER, F. H. "Why Nature Chose Phosphates?". *Science* 235, p. 1173-1178, 1987.
9. BENTLEY, R. "The Mechanism of Hydrolysis of Acetyl Dihydrogen Phosphate". *J. Am. Chem. Soc.* 71, p. 2765-2767, 1949.
10. MILLER, D. L., WESTHEIMER, F. H. "The Hydrolysis of γ -Phenylpropyl Di- and Triphosphates". *J. Am. Chem. Soc.* 88, p.1507-1511, 1966.

11. DAVIS, B. D. "On The Importance of Being Ionized". *Arch. Biochem. Biophys.* 78, p. 497-509, 1958.
12. VOET, D., VOET, J. G. *Biochemistry*, New York: John Wiley, 1990.
13. CAMPBELL, M. *Biochemistry*, Orlando: Saunders, 1995.
14. CROSS, R. L. "The Mechanism and Regulation of the Synthesis by F_1 -ATPases". *Annu. Rev. Biochem.* 50, p. 681-714, 1981.
15. AMZEL, L. M., PEDERSEN, P. L. "Proton ATPases: Structure and Mechanism". *Annu. Rev. Biochem.* 52, p. 801-824, 1983.
16. WALKER, J. E. *et al.* "Structural Aspects of Proton-Pumping ATPases". *Phil. Trans. R. Soc. London* 326, p. 367-378, 1990.
17. PENEFSKY, H. S., CROSS, R. L. "Structure and Mechanism of F_0F_1 -Type ATP Synthases and ATPases". *Adv. Enzym. Rel. Areas Molec. Biol.* 64, p. 173-214, 1991.
18. BOYER, P. D. "The Binding Change Mechanism for ATP Synthase - Some Probabilities and Possibilities". *Biochim. Biophys. Acta* 1140, p. 215-250, 1993.
19. CROSS, R. L. "Our Primary Source of ATP". *Nature* 370, p. 594-595, 1994.
20. AMZEL, L. M., BIANCHET, M. A., PEDERSEN, P. L. In *Membrane Protein Structure Experimental Approaches*, WHITE, S. H., Ed.; New York: Oxford, 1994.
21. PENEFSKY, H. S. *et al.* "Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation". *J. Biol. Chem.* 235, p. 3330-3336, 1960.

22. MITCHELL, P. "Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation". *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 41, p. 445-502, 1966.
23. FERGUSON, S. J., SORGATO, M. C. "Proton Electrochemical Gradients and Energy-Transduction Processes". *Annu. Rev. Biochem.* 51, p. 185-217, 1982.
24. MOSER, C. C. *et al.* "Nature of Biological Electron Transfer". *Nature* 355, p. 796-802, 1992.
25. KAGAWA, Y. "*E. coli* F₁-ATPase Interacts with a Membrane Protein Component of a Proton Channel". *Adv. Biophys.* 10, p. 209-269, 1978.
26. WALKER, J. E., SARASTE, M., GAY, N. J. "Escherichia coli F₁-ATPase Interacts with a Membrane Protein Component of a Proton Channel". *Nature* 298, p. 867-869, 1982.
27. CHOATE, G. L., HUTTON, R. L., BOYER, P. D. "Occurrence and Significance of Oxygen Exchange Reactions Catalyzed by Mitochondrial Adenosine Triphosphatase Preparations". *J. Biol. Chem.* 254, p. 286-290, 1979.
28. BOYER, P. D., CROSS, R. L., MOMSEN, W. "New Concept for Energy Coupling in Oxidative Phosphorylation Based on a Molecular Explanation of the Oxygen Exchange Reactions". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, p. 2837-2839, 1973.
29. BOYER, P. D. *et al.* "Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation". *Annu. Rev. Biochem.* 46, p. 955-1026, 1977.
30. BOYER, P. D. *et al.* "ATP and ADP Modulations of Catalysis by F₁ and Calcium-Magnesium ATPases". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 402, p. 65-83, 1982.
31. FOSTER, D. L., FILLINGAME, R. H. "Stoichiometric of Subunits in the H⁺-ATPase Complex of *Escherichia coli*". *J. Biol. Chem.* 257, p. 2009-2015, 1982.

32. GOGOL, E. P. *et al.* "Molecular Architecture of *Escherichia coli* F₁ Adenosinetriphosphatase". *Biochemistry* 28, p. 4709-4716, 1989.
33. BIANCHET, M. *et al.* "Mitochondrial ATP Synthase". *J. Biol. Chem.* 266, p. 21197-21201, 1991.
34. ABRAHAMS, J. P. *et al.* "Structure at 2.8 Å Resolution of F₁-ATPase from Bovine Heart Mitochondria". *Nature* 370, p. 621-628, 1994.
35. ROSING, J., KAYALAR, C., BOYER, P. D. "Evidence for Energy-Dependence Change in Phosphate Binding for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Based on Measurements of Medium and Intermediate Phosphate-Water Exchanges". *J. Biol. Chem.* 252, p. 2478-2485, 1977.
36. GRESSER, M. J., MYERS, J. A., BOYER, P. D. "Catalytic Site Cooperativity of Beef Heart Mitochondrial F₁ Adenosine Triphosphatase". *J. Biol. Chem.* 257, p. 12030-12037, 1982.
37. HINKLE, P. C., McCARTY, R. E. "How Cells Make ATP". *Sci. Amer.* 238, p. 104-123, 1978.
38. MACNAB, R. M. "Genetics and Biogenesis of Bacterial Flagella". *Annu. Rev. Genet.* 26, p. 131-158, 1992.
39. WILKENS, S., CAPALDI, R. A. "Asymmetry and Structural Changes in ECF₁ Examined by Cryoelectronmicroscopy". *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375, 43-51, 1994.
40. CAPALDI, R. *et al.* *Trends Biochem. Sci.* 19, p. 284, 1994.

41. BOEKEMA, E. J., BÖTTCHER, B. "The Structure of ATP Synthase from Chloroplasts. Conformational Changes of CF₁ Studied by Electron-Microscopy". *Biochim. Biophys. Acta* 1098, p. 131-143, 1992.
42. KALCKAR, H. M. "The Nature of Energetic Coupling in Biological Syntheses". *Chem. Rev.* 28, p. 71-178, 1941.
43. HILL, T. L., MORALES, M. F. "On 'High Energy Phosphate Bonds' of Biochemical Interest". *J. Am. Chem. Soc.* 73, p. 1656-1660, 1951.
44. RISEMAN, J., KIRKWOOD, J. G. "Remarks on the Physico-chemical Mechanism of Muscular Contraction and Relaxation". *J. Am. Chem. Soc.* 70, p. 2820-2822, 1948.
45. PULLMAN, B., PULLMAN, A. *Quantum Biochemistry*; New York: Interscience, 1963.
46. BOYD, D. B., LIPSCOMB, W. N. "Electronic Structures for Energy-Rich Phosphates". *J. Theor. Biol.* 25, p. 403-420, 1969.
47. GEORGE, P. *et al.* "Squiggle-Water. An Enquiry into the Importance of Solvation Effects in Phosphate Ester and Anhydride Reactions". *Biochim. Biophys. Acta* 223, p. 1-15, 1970.
48. HAYES, D. M., KENYON, G. L., KOLLMAN, P. A. "Theoretical Calculations of the Hydrolysis Energies of Some 'High-Energy' Molecules. 2. A Survey of Some Biologically Important Hydrolytic Reactions". *J. Am. Chem. Soc.* 100, p. 4331-4340, 1978.
49. EWIG, C. S., VAN WAZER, J. R. "Ab Initio Structures of Phosphorus Acids and Esters. 3. The P-O-P Bridged Compounds $H_4P_2O_{2n-1}$ for $n = 1$ to 4". *J. Am. Chem. Soc.* 110, p. 79-86, 1988.

50. O'KEEFE, M., DOMENGENS, B., GIBBS, G. V. "Ab Initio Molecular Orbital Calculations on Phosphates: Comparison with Silicates". *J. Phys. Chem.* 89, p. 2304-2309, 1985.
51. SAINT-MARTIN, H. *et al.* "Ab Initio Calculations of the Pyrophosphate Hydrolysis Reaction". *Biochim. Biophys. Acta* 1080, p. 205-214, 1991.
52. COLVIN, M. E., EVLETH, E., AKACEM, Y. "Quantum Chemical Studies of Pyrophosphate Hydrolysis". *J. Am. Chem. Soc.* 117, p. 4357-4362, 1995.
53. MA, B., MEREDITH, C., SCHAEFER, H. F. "Pyrophosphate Structures and Reactions: Evaluation of Electrostatic Effects on the Pyrophosphates with and without Alkali Cations". *J. Phys. Chem.* 98, p. 8216-8223, 1994.
54. DE MEIS, L. "Role of Water in the Energy of Phosphate Compounds-Energy Transduction in Biological Membranes". *Biochim. Biophys. Acta* 973, p. 333-349, 1989.
55. DE MEIS, L. "The Concept of Energy-Rich Phosphate Compounds: Water, Transport ATPases, and Entropic Energy". *Arch. Biochem. Biophys.* 306, p. 287-296, 1993.
56. ALBERTY, R. A. "Effect of pH and Metal Ion Concentration on the Equilibrium Hydrolysis of Adenosine Triphosphate to Adenosine Diphosphate". *J. Biol. Chem.* 243, p. 1337-1343, 1968.
57. ALBERTY, R. A. "Thermodynamics of the Hydrolysis of Adenosine Triphosphate". *J. Chem. Educ.* 46, p. 713-719, 1969.

58. PHILLIPS, C. R., GEORGE, P., RUTMAN, J. R. "Thermodynamic Data for the Hydrolysis of Adenosine Triphosphate As A Function of pH, Mg^{2+} Ion Concentration, And Ionic Strength". *J. Biol. Chem.* 244, p. 3330-3342, 1969.
59. WOLFENDEN, R., WILLIAMS, R. "Solvent Water And The Biological Group-Transfer Potential Of Phosphoric And Carboxylic Anhydrides". *J. Am. Chem. Soc.* 107, p. 4345-4346, 1985.
60. GAJEWSKI, E., STECKLER, D. K., GOLDBERG, R. N. "Thermodynamics of the Hydrolysis of Adenosine 5'-Triphosphate to Adenosine 5'-Diphosphate". *J. Biol. Chem.* 261, p. 12733-12737, 1986.
61. FLODGAARD, H., FLERON, P. "Thermodynamics Parameters for the Hydrolysis of Inorganic Pyrophosphate at pH 7.4 as a Function of Magnesium Ion Concentration, Potassium Ion Concentration, and Ionic Strength Determined from Equilibrium Studies of the Reaction". *J. Biol. Chem.* 249, p. 3465-3474, 1974.
62. DE MEIS, L. "Pyrophosphate of High And Low Energy". *J. Biol. Chem.* 259, p. 6090-6097, 1984.
63. DE MEIS, L. *et al.* "Contribution of Water to Free Energy of Hydrolysis of Pyrophosphate". *Biochemistry* 24, p. 7783-7789, 1985.
64. DALEY, L. A., RENOSTO, F., SEGEL, I. H. "ATP Sulfurylase-Dependent Assays for Inorganic Pyrophosphate: Applications to Determining the Equilibrium Constant and Reverse Direction Kinetics of the Pyrophosphatase Reaction, Magnesium Binding to Orthophosphate, and Unknown Concentrations of Pyrophosphate". *Anal. Biochem.* 157, p. 385, 1986.
65. ROMERO, P. J., DE MEIS, L. "Role of Water in the Energy of Hydrolysis of Phosphoanhydride and Phosphoester Bonds". *J. Biol. Chem.* 264, p. 7869-7873, 1989.

66. JANSON, C. A., DEGANI, C., BOYER, P. D. "The formation of Enzyme-Bound and Medium Pyrophosphate and the Molecular Basis of the Oxygen Exchange Reaction of Yeast Inorganic Pyrophosphatase". *J. Biol. Chem.* 254, p. 3743-3749, 1979.
67. SPRINGS, B., WELSH, K. M., COOPERMAN, B. S. "Thermodynamics, Kinetics, and Mechanism in Yeast Inorganic Pyrophosphatase Catalysis of Inorganic Pyrophosphate: Inorganic Phosphate Equilibration". *Biochemistry* 20, p. 6384-6391, 1981.
68. COOPERMAN, B. S. "The Mechanism of Action of Yeast Inorganic Pyrophosphatase". *Methods Enzymol.* 87, p. 526-548, 1982.
69. SAKAMOTO, J. "Effect of Dimethylsulfoxide on ATP Synthesis by Mitochondrial Soluble F₁-ATPase". *J. Biochem.* 96, p. 483-487, 1984.
70. SAKAMOTO, J., TONOMURA, Y. "Synthesis of Enzyme-Bound ATP by Mitochondrial Soluble F₁-ATPase in the Presence of Dimethylsulfoxide". *J. Biochem.* 93, p. 1601-1614, 1983.
71. DE MEIS, L. "Effects of Organic Solvents and Orthophosphate on the ATPase Activity of F₁ ATPase". *FEBS Lett.* 213, p. 333-336, 1987.
72. KOSHLAND, D. E., JR. "Effect of Catalysts on the Hydrolysis of Acetyl Phosphate. Nucleophilic Displacement Mechanisms in Enzymatic Reactions". *J. Am. Chem. Soc.* 74, p. 2286-2292, 1952.
73. PARK, J. H., KOSHLAND, D. E., JR. "The Hydrolytic Activity of Gliceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase". *J. Biol. Chem.* 233, p. 986-990, 1958.
74. DI SABATO, G., JENCKS, W. P. "Mechanism and Catalysis of Reactions of Acyl Phosphates. I. Nucleophilic Reactions". *J. Am. Chem. Soc.* 83, p. 4393-4400, 1961.

75. DI SABATO, G., JENCKS, W. P. "Mechanism and Catalysis of Reactions of Acyl Phosphates. II. Hydrolysis". *J. Am. Chem. Soc.* 83, p. 4400-4405, 1961.
76. HERTSCHLAG, D., JENCKS, W. P. "Pyrophosphate Formation from Acetyl Phosphate and Orthophosphate Anions in Concentrated Aqueous Salt Solutions does not Provide Evidence for a Metaphosphate Intermediate". *J. Am. Chem. Soc.* 108, p. 7938-7946, 1986.
77. PHILLIPS, D. R., FIFE, T. H. "The Acid-Catalyzed Hydrolysis of Acyl Phosphates". *J. Am. Chem. Soc.* 90, p. 6803-6809, 1968.
78. PHILLIPS, D. R., FIFE, T. H. "Polar and Steric Effects in Acyl Phosphate Monoanion and Dianion Reactions". *J. Org. Chem.* 34, p. 2710-2714, 1969.
79. LAU, H. P., GUTSCHE, C. D. "Association Phenomena. 3. Polyfunctional Catalysis of Acetyl Phosphate Decomposition". *J. Am. Chem. Soc.* 100, p. 1857-1865, 1978.
80. KIRBY, A. J., VARVOGLIS, A. G. "The Reactivity of Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis". *J. Am. Chem. Soc.* 89, p. 415-423, 1966.
81. BUNTON, C. A. *et al.* "Micellar-Catalyzed Hydrolysis of Nitrophenyl Phosphates". *J. Am. Chem. Soc.* 90, p. 5512-5518, 1968.
82. WESTHEIMER, F. H. "Monomeric Metaphosphates". *Chem. Rev.* 81, p. 313-326, 1981.
83. TSAO, B. L., PIETERS, R. J., REBEK, J., JR. "Convergent Functional Groups. 16. Hydrolysis of Phosphate Triesters by a Novel Cleft. Influence of Binding on Overall Rate Acceleration". *J. Am. Chem. Soc.* 117, p. 2210-2213, 1995.
84. BENKOVIC, S. J., SCHRAY, K. J. In *The Enzymes*, BOYER, P. D., LARDY, H., MYRBACK, Ed. New York : Academic Press, Vol. 8, 1973.

85. RAMÍREZ, F., MARECEK, J. F. "Phosphoryl Transfer from Phosphomonoesters in Aprotic and Protic Solvents". *Pure Appl. Chem.* 52, p. 1021-1045, 1980.
86. MEYERSON, S. *et al.* "Hydrolysis of Adenosine 5'-Triphosphate: an Isotope-Labeling Study". *J. Am. Chem. Soc.* 104, p. 7231-7239, 1982.
87. EICHHORN, G. L. "The Function of Metal Ions in Genetic Regulation". *Met. Ions Biol. Syst.* 10, p. 1-21, 1980.
88. WU, F. Y. H., WU, C.-W. "The Role of Zinc in DNA and RNA Polymerases". *Met. Ions Biol. Syst.* 15, p. 157-192, 1983.
89. KALBITZER, H. R. "Identification of Oxygen Ligands in Metal-Nucleotide-Protein Complexes by Observation of the Mn (II) - ^{17}O Superhyperfine Coupling". *Met. Ions Biol. Syst.* 22, p. 81-103, 1986.
90. SCHELLER-KRATTIGER, V., SIGEL, H. "Comparison of the Metal Ion Facilitated Hydrolysis for the 5'-Triphosphates of 1,N⁶-Ethenoadenosine (ϵ -ATP), Adenosine (ATP), and Cytidine (CTP). Dephosphorylation of ϵ -ATP Proceeding with Zn^{2+} and Cu^{2+} via Structurally Different Species: Evidence for a Long-Sought, Monomeric, Back-Bound Complex with Cu^{2+}/ϵ -ATP". *Inorg. Chem.* 25, p. 2628-2634, 1986.
91. SIGEL, H. "Self-Association Protonation, and Metal-Coordination of 1,N⁶-Ethenoadenine Derivatives in Comparison with their Parent Compounds Adenosine, AMP and ATP". *Chimia* 41, p. 11-26, 1987.
92. HAIGHT, G. P., JR. "Hydrolysis of Phosphate Esters and Anhydrides: Role of Metal Ions". *Coord. Chem. Rev.* 79, p. 293-319, 1987.
93. TAFESSE, F., MILBURN, R. M. "Depyrophosphorylation of Adenosine-5'-Triphosphate (ATP)". *Inorg. Chim. Acta* 135, p. 119-122, 1987.

94. TAFESSE, F., MASSOUD, S. S., MILBURN, R. M. "Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) Hydrolysis. Promoted by the Highly Reactive Hydroxo-aquo(3,3',3'-Triaminotripropylamine)Cobalt (III) Ion. Patterns of Reactivity and Mechanistic Considerations". *Inorg. Chem.* 24, p. 2591-2593, 1985.
95. MEYER, G. R., CORNELIUS, R. "Cobalt (III)-Promoted Hydrolysis of ATP". *J. Inorg. Biochem.* 22, p. 249-258, 1984.
96. SIGEL, H., TRIBOLET, R. "Hydrolysis of Nucleoside Phosphates. 11. Synergism Between Different Metal Ions in the Dephosphorylation of Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) in Mixed Metal Ion/ATP Systems, and Influence of a Decreasing Solvent Polarity (Dioxane-Water Mixtures) on the Dephosphorylation Rate. Effects of Magnesium, Sodium, and Ammonium Ions". *J. Inorg. Biochem.* 40, p. 163-179, 1990.
97. SUZUKI, S., HIGASHIYAMA, T., NAKAHARA, A. "Nonenzymic Hydrolysis Reactions of Adenosine 5'-Triphosphate and its Related Compounds. III. Catalytic Aspects of Some Cobalt (III) Complexes in ATP-Hydrolysis". *Bioorg. Chem.* 8, p. 277-289, 1978.
98. HEDIGER, M., MILBURN, R. M. "Adenosine Triphosphate (ATP) Hydrolysis Promoted by Cobalt (III). Participation of Polynuclear Metal Complexes". *J. Inorg. Biochem.* 16, p. 165-182, 1982.
99. MILBURN, R. M. *et al.* "Comparison of the Effectiveness of Various Metal Ions on the Promoted Dephosphorylation of Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) and Uridine 5'-Triphosphate (UTP)". *J. Am. Chem. Soc.* 107, p. 3315-3321, 1985.
100. NAKAI, C., GLINSMANN, W. "Interactions between Polyamines and Nucleotides". *Biochemistry* 16, p. 5636-5641, 1977.

101. SUZUKI, S., HIGASHIYAMA, T., NAKAHARA, A. "Nonenzymic Hydrolysis Reactions of Adenosine 5'-Triphosphate and its Related Compounds. 1. Hydrolysis Reactions of ATP with some Continuous-Chain Polyamines". *Bioorg. Chem.* 2, p. 145-154, 1973.

102. SUZUKI, S., NAKAHARA, A. "Nonenzymic Hydrolysis Reactions of Adenosine 5'-Triphosphate and Related Compounds. II. Kinetic Studies of the Hydrolysis Of ATP and Related Compounds with Various Polyamines". *Bioorg. Chem.* 4, p. 250-258, 1975.

103. HOSSEINI, M. W., LEHN, J.-M., MERTES, M. P. "Efficient Molecular Catalysis of ATP-Hydrolysis by Protonated Macrocyclic Polyamines". *Helv. Chim. Acta* 66, p. 2454-2466, 1983.

104. BLACKBURN, G. M. *et al.* "Evidence for a Protophosphatase Catalysed Cleavage of Adenosine Triphosphate by a Dissociative-Type Mechanism within a Receptor-Substrate Complex". *Tetrahedron Lett.* 28, p. 2779-2782, 1987.

105. HOSSEINI, M. W. *et al.* "Supramolecular Catalysis in the Hydrolysis of ATP Facilitated by Macrocyclic Polyamines: Mechanistic Studies". *J. Am. Chem. Soc.* 109, p. 537-544, 1987.

106. LEHN, J.-M. "Supramolecular Chemistry - Scope and Perspectives. Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture)". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, p. 89-112, 1988.

107. YOHANNES, P. G., MERTES, M. P., MERTES, K. B. "Pyrophosphate Formation via a Phosphoramidate Intermediate in Polyammonium Macrocycle/Metal Ion-Catalyzed Hydrolysis of ATP". *J. Am. Chem. Soc.* 107, p. 8288-8289, 1985.

108. HOSSEINI, M. W., LEHN, J.-M. "Cocatalysis: Pyrophosphate Synthesis from Acetylphosphate Catalysed by a Macrocyclic Polyamine". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 1155-1157, 1985.
109. HOSSEINI, M. W., LEHN, J.-M. "Supramolecular Catalysis: Substrate Phosphorylations and Adenosine Triphosphate Synthesis with Acetylphosphate Catalysed by a Macrocyclic Polyamine". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 397-399, 1988.
110. HOSSEINI, M. W., LEHN, J.-M. "Supramolecular Catalysis of Adenosine Triphosphate Synthesis in Aqueous Solution Mediated by a Macrocyclic Polyamine and Divalent Metal Cations". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 451-453, 1991.
111. MERTES, M. P., MERTES, K. B. "Polyammonium Macrocycles as Catalysts for Phosphoryl Transfer: the Evolution of an Enzyme Mimic". *Acc. Chem. Res.* 23, p. 413-418, 1990.
112. FENNIRI, H., LEHN, J.-M. "Coupling of Supramolecular Synthesis of ATP with ATP-Consuming Enzyme Systems". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 1819-1821, 1993.
113. FENNIRI, H., LEHN, J.-M., MARQUIS-RIGAULT, A. "Supramolecular Catalysis of H/D Exchange in Malonate Ions by Macrocyclic Polyamines: a Model Enzyme with Enolase Activity". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, p. 337-339, 1996.
114. LIPSCOMB, W. N. *et al.* "The Structure of Carboxypeptidase A. IX. The X-Ray Diffraction Results in the Light of the Chemical Sequence". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 64, p. 28-35, 1969.
115. STEITZ, T. A., BLOW, D. M. "X-Ray Diffraction Studies of Enzymes". *Annu. Rev. Biochem.* 39, p. 63-100, 1970.
116. EISENBERG, D. In *The Enzymes*, Boyer, P., Ed. New York: Wiley, vol. 1, 1971.

117. BENDER, M. L. In *Bioorganic Chemistry*, Van Tamelen, E. E., Ed. New York: Academic Press, vol. 1, 1978.
118. VERHEIJ, H. M. *et al.* "Methylation Of Histidine-48 in Pancreatic Phospholipase A₂. Role of Histidine and Calcium Ion in the Catalytic Mechanism". *Biochemistry* 19, p. 743-750, 1980.
119. BRAND, L., GOHLKE, J. R., RAO, D. S. "Evidence for Binding of Rose Bengal and Anilidonaphthalenesulfonates at the Active Site Regions of Liver Alcohol Dehydrogenase". *Biochemistry* 6, p. 3510-3518, 1967.
120. TURNER, D. C., BRAND, L. "Quantitative Estimation of Protein Binding Site Polarity. Fluorescence of N-Arylamino-naphthalenesulphonates". *Biochemistry* 7, p. 3381-3390, 1968.
121. REES, D. C. "Experimental Evaluation of the Effective Dielectric Constant of Proteins". *J. Mol. Biol.* 141, p. 323-326, 1980.
122. ROGERS, N. K., MOORE, G. R., STERNBERG, M. J. E. "Electrostatic Interactions in Globular Proteins: Calculation of the pH Dependence of the Redox Potential of Cytochrome C₅₅₁". *J. Mol. Biol.* 182, p. 613-616, 1985.
123. SIGEL, H., TRIBOLET, R. "Synergism between Different Metal Ions in the Dephosphorylation of Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) in Mixed Metal Ion/ATP Systems, and Influence of a Decreasing Solvent Polarity (Dioxane-Water Mixtures) on the Dephosphorylation Rate. Effects of Mg²⁺, Na⁺, And NH₄⁺ Ions. *J. Inorg. Biochem.* 40, p. 163-179, 1990.
124. MENGER, F. M., SMITH, J. H. "Rate-Determining Collapse of a Tetrahedral Intermediate in Ester Aminolyses in Aprotic Solvents". *Tetrahedron Lett.* 48, p. 4163-4168, 1970.

125. MENGER, F. M., VITALE, A. C. "Anion-Catalyzed Ester Aminolyses in a Hydrocarbon Solvent". *J. Am. Chem. Soc.* 95, p. 4931-4934, 1973.
126. RIVETTI, F., TONELLATO, V. "Kinetics of Ester Imidazolysis in Benzene". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* p. 1176-1179, 1977.
127. PARKER, A. J. "Protic-Dipolar Aprotic Solvent Effects on Rates of Bimolecular Reactions". *Chem. Rev.* 69, p. 1-32, 1969.
128. MENGER, F. M. "The Aminolysis and Amidinolysis of p-Nitrophenyl Acetate in Chlorobenzene. A Facile Bifunctional Reactivity". *J. Am. Chem. Soc.* 88, p. 3081-3084, 1966.
129. HAJDU, J., SMITH, G. M. "Catalytic Mechanisms of Acyl Transfer Reactions in Dipolar Aprotic Media. 1. Desolvated Carboxylate Ion as Acyl Acceptor". *J. Am. Chem. Soc.* 102, p. 3960-3962, 1980.
130. HAJDU, J., SMITH, G. M. "Catalytic Mechanisms of Acyl Transfer Reactions in Dipolar Aprotic Media. 2. Electrophilic Activation of the Carbonyl Group by Quaternary Alkylammonium and Imidazolium Functions". *J. Am. Chem. Soc.* 103, p. 6192-6197, 1981.
131. WALLERBERG, G., HAAKE, P. "Solvation and Catalysis in Displacement at Phosphorus. Reaction of Imidazole and Benzoate Ion with P-Nitrophenyl and 2,4-Dinitrophenyl Diphenylphosphinates". *J. Org. Chem.* 46, p. 43-46, 1981.
132. FRESCURA, V. L. A. *et al.* "Effects of Sulfobetaine-Sodium Dodecanoate Micelles on Deacylation and Indicator Equilibrium". *J. Phys. Chem.* 99, p. 11494-11500, 1995.
133. LEE, B. S.; FRESCURA, V. L. A.; NOME, F. Resultados não publicados.

134. KANSKI, R., MURRAY, C. J. "Enzymochromism: Determination of the Dielectric Properties of an Enzyme Active Site". *Tetrahedron Lett.* 34 p. 2263-2266, 1993.
135. SARMA, R. H., WORONICK, C. L. "Electronic, Hydrophobic, and Steric Effects of Binding of Inhibitors to the Horse Liver Alcohol Dehydrogenase-Reduced Pyridine Coenzyme Binary Complex". *Biochemistry* 11, p. 170-179, 1972.
136. VOGEL, A. I. *Textbook of Practical Organic Chemistry*, London: Longman, p. 410, 1989.
137. IMOKAWA, G.; TSUTSUMI, H. "Surface Activity and Cutaneous Effects of Monoalkyl Phosphate Surfactants". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55, p. 839-843, 1979.
138. CHATTAWAY, F. "Acetylation in Aqueous Alkaline Solutions". *J. Chem. Soc.* p. 2495-2496, 1931.
139. MASKILL, H. *The Physical Basis of Organic Chemistry*, New York: Oxford University Press, p. 216-267, 1985.
140. LIPMANN, F.; TUTTLE, L. C. "A Specific Micromethod for the Determination of Acyl Phosphates". *J. Biol. Chem.* 159, p. 21-29, 1945.
141. KOLTHOFF, I.M., CHANTOONI, M.K., JR. "Intramolecular Hydrogen Bonding in Monoanions and Solvation of Dianions of Aromatic Dicarboxylic Acids in Acetonitrile and Dimethyl Sulfoxide". *J. Am. Chem. Soc.* 98, p. 7465-7470, 1976.
142. SHASKUS, J., HAAKE, P. "Studies in Solvation. 5. Activation Parameters for the Imidazole-catalyzed Hydrolysis of p-Nitrotrifluoroacetanilide. Entropy Control in Catalysis by Water". *J. Org. Chem.* 48, p. 2036-2038, 1983.
143. KOVACH, I.M. "Transition States of Some Acyl Transfer Reactions in Acetonitrile". *Tetrahedron Lett.* 21, p. 4309-4312, 1980.

144. PEDERSEN, C. J. "Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts". *J. Am. Chem. Soc.* 89, p. 7017-7036, 1967.
145. MENGER, F. M. In *Nucleophilicity*, HARRIS, J. M., MACMANUS, S. P., Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, p. 209-218, 1987.
146. DEWAR, M. J. S., STORCH, D. M. "Can Desolvation of an Ion be the Rate-determining Step in a Reaction?". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 94-96, 1985.
147. CHANDRASEKHAR, J., SMITH, S. F., JORGENSEN, W. L. "Theoretical Examination of the S_N2 Reaction Involving Chloride Ion and Methyl Chloride in the Gas Phase and Aqueous Solution". *J. Am. Chem. Soc.* 107, p. 154-163, 1985.
148. JENCKS, W. P. "General Acid-base Catalysis of Complex Reactions in Water". *Chem. Rev.* 72, p. 705-718, 1972.
149. DRUZIAN, J. *et al.* "Aminolysis of 2,2,2-Trichloro-1-arylethanones in Aprotic Solvents". *J. Org. Chem.* 54, p. 4767-4771, 1989.
150. WATTERSON, J. G. "A Role for Water in Cell Structure". *Biochem. J.* 248, p. 615-617, 1987.
151. THATCHER, G. R. J. *et al.* "Selective Hydrogen Bonding as a Mechanism for Differentiation of Sulfate and Phosphate at Biomolecular Receptor Sites". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 386-388, 1992.
152. CRAM, D. J. "The Design of Molecular Hosts, Guests, and their Complexes". *Science* 240, p. 760-767, 1988.

153. LEHN, J.-M. "Perspectives in Supramolecular Chemistry - From Molecular Recognition Towards Molecular Information Processing and Self-Organization". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, p. 1304-1319, 1990.
154. WOLFE, J., MUEHLDOERF, A., REBEK, J., JR. "Convergent Functional Groups Create a Microenvironment for Enolization Catalysis". *J. Am. Chem. Soc.* 113, p. 1453-1454, 1991.
155. BRESLOW, R. "Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design". *Acc. Chem. Res.* 28, p. 146-153, 1995.
156. JUBIAN, V. *et al.* "Acceleration of a Phosphate Diester Transesterification Reaction by Bis(alkylguanidinium) Receptors Containing an Appended General Base". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, p. 1237-1239, 1995.
157. KIRBY, A. J. "Enzyme Mechanisms, Models, and Mimics". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, p. 707-724, 1996.
158. MURAKAMI, Y., KIKUCHI, J., HISAEDA, Y., HAYASHIDA, O. "Artificial Enzymes". *Chem. Rev.* 96, p. 721-758, 1996.
159. KNOWLES, J. R. "Enzyme Catalysis: Not Different, Just Better". *Nature* 350, p. 121-124, 1991.

APÉNDICE

Interpretation of the Halochromism of Pyridiniophenoxide Dyes

Vanderlei Gageiro, Milton Aillon and Marcos Caroli Rezende*

Departamento de Quimica, Universidade Federal de S. Catarina, Florianópolis, SC 88049, Brasil

The halochromic behaviour of some pyridiniophenoxide dyes in the presence of sodium iodide is described in a variety of protic and aprotic solvents. It is suggested that the observed halochromic shifts mainly reflect perturbations in the microenvironment of the phenoxide moiety of the dyes, caused by the proximity of solvated cations.

Nearly three decades have elapsed since the solvatochromic properties of pyridiniophenoxide dyes were described.¹ The interest in this remarkable family of compounds was fostered by the wide range of solvatochromic shifts which they exhibit. This recommended such compounds, in particular dye 1 (see Scheme 1), as convenient polarity indicators for an ever-growing list of solvents.²

In spite of their widespread use, the solvatochromic properties of these dyes still puzzle chemists. The exact nature of the dye interaction with its environment, in pure or mixed solvents, is still a subject of current interest.^{3,4}

The halochromic properties of these compounds (their spectral changes in solution when an electrolyte is added to the medium) have been less studied.⁵⁻¹⁰ An understanding of these properties is made more difficult by the fact that here a three-component system (the dye, the solvent and the salt) intervenes. When descriptions of this halochromic behaviour have appeared,^{5,7,11} the rationalization of the observed trends often do not agree.

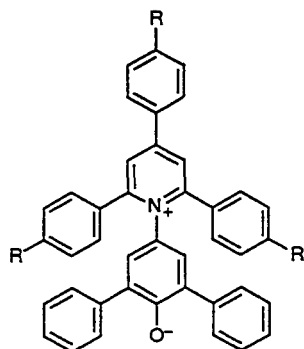
Our initial idea of utilizing pyridiniophenoxide dyes as indicators for the polarity of electrolyte solutions^{6,7} evolved to a more defined interest in their interactions with the medium.¹²

In our pursuit of a general model for the halochromism of these dyes, we now present the results of our investigations with a variety of protic and aprotic solvents. The view that emerges from our observations emphasizes the interactions of the dye with its microenvironment as the major source of all observed halochromic shifts.

Experimental

Visible spectra were recorded with Shimadzu 210A and Aminco DW-200 spectrometers.

Analytically pure solvents were purified further by following standard procedures.¹³ Betaine 1 was prepared according to a reported method;¹⁴ betaine 2¹⁵ was a gift from Professor C. Reichardt.



Scheme 1 Dye 1, R = H; dye 2, R = SO₂CH₃

The $E_T(30)$ and $E_T[(SO_2Me)_3]$ values were obtained from the λ_{max} values of the corresponding charge-transfer bands in the visible region, by means of the relationship¹ $E_T = 28590/\lambda_{max}$ kcal mol⁻¹.

Results

We employed pyridiniophenoxide dyes 1 and 2 in our measurements, utilizing solutions of sodium iodide in various organic solvents. The halochromic behaviour of dye 1 in a series of alcohols provided the basis for our rationalizations in protic solvents.

Dye 2 was employed in the measurements of sodium iodide solutions of aprotic solvents which included dimethyl sulfoxide, dimethyl acetamide, acetonitrile and acetone. The choice of a second dye was motivated by the need to avoid conclusions based on measurements with a single compound. Dyes 1 and 2 behave, in fact, quite similarly, and a linear relationship exists between $E_T(30)$ and $E_T(SO_2Me)$ values.

The variations of the E_T values of the various sodium iodide solutions with the concentration of the added salt are shown in Fig. 1 and 2 for protic and aprotic solvents, respectively. As can be seen from the curves obtained, these variations follow the same pattern in all cases. After an initial increase in the E_T values with the addition of the salt, the curves attain a plateau for higher electrolyte concentrations. The almost linear behaviour observed for solvents such as methanol (Fig. 1) or DMSO (Fig. 2) may be regarded as a particular case of that general pattern. The attainment of constant E_T values in the plateau region for those solvents should require excessively high concentrations of added salt. This situation could not be reached because of the limited solubility of the salt in these solvents and because of the

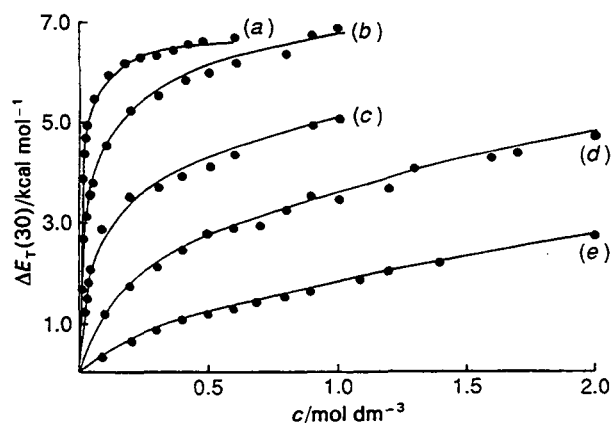


Fig. 1 Variations of the $E_T(30)$ values of alcoholic sodium iodide solutions with the salt concentration. The concentration of dye 1 in all cases was 5×10^{-4} mol dm⁻³. Curves refer to NaI solutions in (a) butan-2-ol, (b) propan-2-ol, (c) *n*-butanol, (d) ethanol, (e) methanol

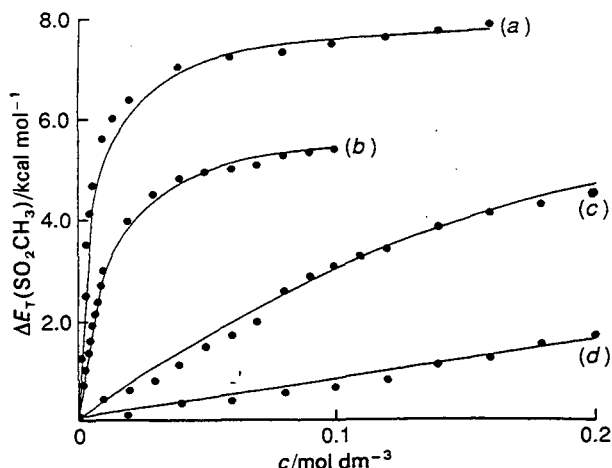


Fig. 2 Variations of the $E_T(\text{SO}_2\text{CH}_3)$ values of sodium iodide solutions with the salt concentration. The concentration of dye 2 in all cases was $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Curves refer to NaI solutions in (a) acetone, (b) acetonitrile, (c) dimethyl acetamide and (d) dimethyl sulfoxide

effect, mentioned below, of the increasing extinction of the charge-transfer band of the dye, as more salt is added to the medium.

The halochromic behaviour of dyes 1 and 2 is reminiscent of the solvatochromic shifts observed with solutions of 1 in 1,2-dichloroethane, when phenols are gradually added to the medium.¹³ A further similarity can be found if one follows the changes in the intensity of the charge-transfer band of the dye. Both hypsochromic shifts and decreases in the intensity are observed with the charge-transfer band in the visible, as the electrolyte concentration is increased. These trends are also observed in phenolic solutions of 1 in $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$.¹³

Discussion

Two distinct approaches may be found in the literature, which attempt to explain the phenomenon of halochromism of solvatochromic dyes. The first one regards the halochromic shifts observed when a solute, in particular a salt, is added to the medium, as arising from changes in the solvent structure, which are reflected in the dye spectra. One may then invoke changes in ionic strength or in the associated solvent electric field,¹¹ or regard the added salt as a structure-making or structure-breaking species which alters bulk properties of the solvent.^{5a} These non-specific effects (for short, changes in the 'polarity' of the medium) do not necessarily exclude other specific effects, which are stressed in the second approach. According to this second view, the spectra of the dye simply reflect the changes in its microenvironment, the properties of which are not equivalent to those of the bulk. This inhomogeneity has been demonstrated by studies of the preferential solvation of pyridiniophenoxide dyes in solvent mixtures.¹⁶⁻¹⁸

Although it is admittedly difficult to make an unambiguous choice between the two approaches,¹⁹ because both specific and non-specific effects are probably operating in such systems, we stress in this work the view that halochromism results from changes in the microenvironment of the dye, caused by the addition of the salt.

Following the general view that pyridiniophenoxide dyes may be regarded as indicators of the hydrogen-bond donation ability of the medium,^{13,20} we may focus our attention on the phenoxide moiety of these dyes, and their sensitivity to immediate environment changes. There are several pieces of evidence which support this view. It is well known that pro-

tonation of 1 suppresses its charge-transfer band in the visible. This suppression is not complete in dilute solutions of acidic phenols in apolar solvents, an observation which is explained by the incomplete proton transfer from the acid solute to the phenoxide group.¹³

The presence of cations like Li^+ in apolar media may also suppress this band.²¹ Addition of very small amounts of lithium perchlorate to an ethereal solution of dye 1 caused an initial decrease of the band around 826 nm, followed by the appearance of a new band at 555 nm.²² These observations were interpreted as arising from the formation of a dye-cation complex, which was no longer sensitive to polarity changes of the environment. The behaviour was very similar to that shown by dye 1 in the presence of acids.²²

Fig. 3 shows the variations of the charge-transfer band of dye 2 in acetonitrile, as increasing amounts of lithium perchlorate are added. The spectral variations agree well with the observations of Pocker and Ciula²² on the formation of a dye-cation complex. For salt concentrations lower than the amount of dye in the solution, the charge-transfer band around 700 nm, which arises from interaction between the dye and the pure solvent, undergoes a decrease in intensity and a moderate hypsochromic shift, as the salt concentration is raised (Fig. 3 curves 1 and 2). When the salt and the dye concentrations are about the same, the charge-transfer band becomes very broad and dramatic hypsochromic shifts are observed as more salt is added (Fig. 3, curve 3). A second, well defined band finally emerges around 610 nm (Fig. 3, curve 4), which undergoes a hypsochromic shift and decrease in intensity as more salt is added. These effects, however, require much larger amounts of added electrolyte.

We suggest that these two bands correspond to two different forms of dye-cation interaction. The first band, in very dilute salt solutions, reflects dye-solvent interactions that are disturbed by the presence of neighbouring cations. We may call this a 'loose' dye-cation pair, the added cations being separated from the phenoxide moiety by a cushion of solvent layers. This situation evolves to a 'tight' ion complex as more salt is added. The solvated cation now binds more firmly to the phenoxide moiety of 2. This tight dye-cation pair is still sensitive to the addition of salt, but because of its 'tightness', substantial amounts of electrolyte are required to induce further shifts.

We shall now interpret the behaviour of dyes 1 and 2 in various solvents (Fig. 1 and 2) in the light of these interactions. The addition of a cation to a solution of the pyridiniophenoxide dye establishes a competition between the

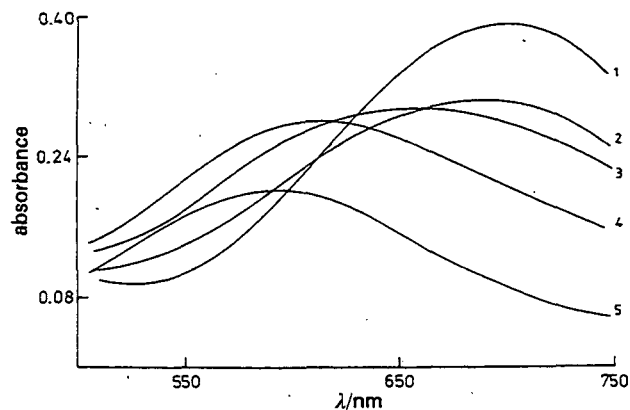
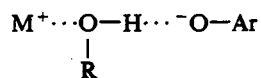


Fig. 3 Spectra of dye 2 in acetonitrile ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) in the presence of increasing concentrations of lithium perchlorate. Salt concentrations were $4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (1), $3 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (2), $4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (3), $6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (4) and $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (5)

solvent and phenoxide end of the dye for the positively charged added species. This competition is itself dependent on the dye-solvent interaction. We may then consider three extreme cases in our model, where one finds (i) a strong interaction between the solvent and the phenoxide group; (ii) a strong interaction (solvation) between the solvent and the cation; (iii) weak solvent-phenoxide and solvent-cation interactions.

Case (i) applies to polar protic solvents like water or methanol. The added cation is unable to displace the solvent molecules from the solvating shell of the phenoxide group. However, the cation is itself solvated by the solvent molecules, with the result that the proton of the solvent R-OH becomes more acidic. This indirect effect of the cation upon the dye, schematically illustrated in Scheme 2, increases with the salt concentration, as more solvent molecules experience the perturbation caused by the electrolyte. The halochromic shifts in these systems thus correspond to structural changes of loose dye-cation pairs, as described above. The damping effect of the solvent upon the charged cation decreases with its hydrogen-bond donor ability. In less polar solvents like propan-2-ol and butan-2-ol this damping effect is greatly diminished, with the consequent formation of tight dye-cation pairs at relatively dilute electrolyte solutions (Fig. 1).



Scheme 2

Case (ii) is illustrated by the halochromism of 2 in DMSO and DMA solutions of NaI (Fig. 2). DMSO is a good donor solvent which strongly solvates the sodium cation added to the medium. As a result, the dye experiences a relatively weak perturbation from the Na⁺ species. Notice that DMSO is less polar, in terms of its $E_T(30)$ value (45.1 kcal mol⁻¹), than any of the alcohols that appear in Fig. 1 [the least polar, butan-2-ol, has an $E_T(30)$ value of 47.1 kcal mol⁻¹]. In spite of this, the almost linear dependence of the $E_T(\text{SO}_2\text{CH}_3)$ values on the salt concentration, c (Fig. 2), shows a strong similarity with the halochromic behaviour of 1 in the most polar protic solvent of the series, methanol.

Case (iii) is met in a solvent system like acetone, in Fig. 2. Here, the solvent-separating layer which shields the charged Na⁺ species from the phenoxide group is relatively fragile. This solvent shielding collapses in dilute solutions of added salt. The degree of halochromism exhibited by the system results from the combination of the two trends mentioned in cases (i) and (ii). Acetone has an $E_T(30)$ value (42.2 kcal mol⁻¹) smaller than acetonitrile (45.6 kcal mol⁻¹), an indication of a somewhat weaker interaction with the dye. On the other hand, as regards the solvent-cation interaction, one would expect a greater degree of solvation by acetone (donor number, DN = 17 kcal mol⁻¹) than by the acetonitrile (DN = 14.1 kcal mol⁻¹). The halochromic shifts observed in both systems (Fig. 2) indicate that the solvent-dye is more important than the solvent-cation interaction, in determining the relative degree of halochromism in the two solvents.

In stressing the importance of specific interactions for a proper understanding of halochromism, we are aware that we cannot dismiss non-specific effects altogether. However, we should be able to show that our model is superior to other approaches which fail to give a clear explanation of observed facts.

The addition of inorganic electrolytes to organic solvents, in the presence of a pyridiniophenolate dye, always causes a hypsochromic shift of its charge-transfer band. We say that

the medium becomes 'more polar'. This also applies to aqueous solutions of inorganic salts.^{5a,23} A rather puzzling exception to this is found in aqueous solutions of large organic salts. The recent reports¹¹ of bathochromic shifts of the charge-transfer band of dye 1 in water when increasing concentrations of tetraalkylphosphonium bromides are added to the medium confirmed previous observations made by us.⁶ The offered explanation, however, which relies on changes of the ionic strength of the medium,¹¹ is not satisfactory. It is difficult to see why the same cause (an increase of the ionic strength of the medium by the addition of a salt) may bring about opposite trends in the spectra of the same dye, depending on the nature of the cation.

A better explanation is based on the inhomogeneity of the system. Although the phenoxide group of these dyes interacts strongly with hydrogen-bonding donor solvents like water, the molecule as a whole is essentially hydrophobic. This is clear from the low solubility of dyes 1 and 2 in water. It is a known fact that in aqueous solvent mixtures with an organic cosolvent, dye 1 is preferentially solvated by the latter.^{16,17} In agreement with this, the addition of a voluminous organic cation to the medium gradually replaces water molecules in the solvating shell of the dye by aprotic, charged organic species. The microenvironment which the dye experiences is less 'polar', no matter how much the formal ionic strength of the medium increases.

The interpretation of the halochromism of pyridiniophenolate dyes which we present in this paper should have a wider scope and apply to other halochromic compounds. Indeed, a common feature of these dyes is the structural proximity of donor and acceptor moieties, which may be linked by conjugated bonds.²⁵ Donor moieties in many dyes are phenoxides²⁶ and it is reasonable to expect an analogous behaviour of these compounds in the same medium. This probably accounts for the fact that polarity scales derived from structurally different dyes show good correlations. Our choice of the widely used pyridiniophenolate dyes for these studies is thus justified by the expectation that our conclusions should also apply to a large number of halochromic compounds.

We are grateful to the Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq) for financing this work. We also thank Professor Christian Reichardt for the kind gift of a few grams of dye 2.

References

- 1 K. Dimroth, C. Reichardt, T. Siepmann and F. Bohlmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1963, **661**, 1.
- 2 (a) C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 2nd edn., 1988, pp. 365-371; (b) C. Reichardt, M. Eschner and G. Schaefer, *Liebigs Ann. Chem.*, 1990, 57.
- 3 J. G. Dawber, J. Ward and R. A. Williams, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1988, **84**, 713.
- 4 J. G. Dawber, S. Etemad and M. A. Beckett, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1990, **86**, 3725.
- 5 (a) I. A. Koppel and J. B. Koppel, *Org. React. (Tartu)*, 1984, **21**, 98 (*Chem. Abst.*, 1985, **103**, 37044p); (b) I. A. Koppel, J. B. Koppel and V. O. Pihl, *Org. React. (Tartu)*, 1984, **21**, 144 (*Chem. Abst.*, 1985, **103**, 12232k).
- 6 M. C. Rezende and L. I. Dal Sasso, *Rev. Roum. Chim.*, 1986, **31**, 323.
- 7 M. C. Rezende, *Tetrahedron*, 1988, **44**, 3513.
- 8 C. A. Rodrigues, E. Stadler and M. C. Rezende, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1991, **87**, 701.
- 9 H. Langhals, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 1771.
- 10 C. Reichardt and S. Asharin-Fard, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1991, **30**, 558.
- 11 W. B. Harrod and J. Pienta, *J. Phys. Org. Chem.*, 1990, **3**, 534.

- 12 C. C. de Oliveira and M. C. Rezende, *J. Brazil. Chem. Soc.*, 1991, **2**, 21.
- 13 S. Spange, M. Lauterbach, A-K. Gyra and C. Reichardt, *Liebigs Ann. Chem.*, 1991, 323.
- 14 A. Vogel, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, Longman, London, 4th edn., 1978.
- 15 M. C. Rezende and C. M. Radetski, *Quim. Nova*, 1988, **11**, 353 (*Chem. Abst.*, 1989, **111**, 8876w).
- 16 C. Reichardt, G. Schaefer and P. Milart, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1990, **55**, 97.
- 17 J. G. Dawber, J. Ward and R. A. Williams, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1988, **84**, 713.
- 18 M. A. Beckett and J. G. Dawber, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1989, **85**, 727.
- 19 J. G. Dawber, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1990, **86**, 287.
- 20 B. Yu. Zaslavsky, L. M. Miheeva, E. A. Masimov, S. F. Djafarov and C. Reichardt, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1990, **86**, 519.
- 21 Y. Marcus and Y. Migron, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 400.
- 22 R. Braun and J. Sauer, *Chem. Ber.*, 1986, **119**, 1269.
- 23 Y. Pocker and J. C. Ciula, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 4728.
- 24 J. R. Haak and J. B. F. N. Engberts, *Recl. Trav. Chem. Pays-Bas*, 1986, **105**, 307.
- 25 E. Buncel and S. Rajagopal, *Acc. Chem. Res.*, 1990, **23**, 226.
- 26 (a) Ref. 2(a), p. 290-291; (b) M. Ueda and Z. A. Schelly, *Langmuir*, 1989, **5**, 1005; (c) M. Niedbalska and I. Gruda, *Can. J. Chem.*, 1990, **68**, 691; (d) S. Arai, K. Nagakura, M. Ishikawa and M. Hida, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1990, 1915.

Paper 1/05254C; Received 15th October, 1991

Preferential Solvation of a β -Sensitive Dye in Binary Mixtures of a Non-protic and a Hydroxylic Solvent

Marivânia Scremin, Sandra Patrícia Zanotto, Vanderlei Gageiro Machado and Marcos Caroli Rezende*

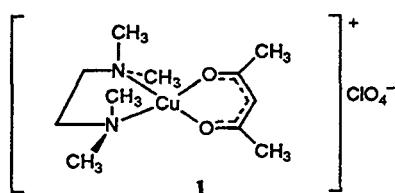
Departamento de Química, Universidade Federal de S. Catarina, Florianópolis, SC 88040-970, Brasil

The preferential solvation of the solvatochromic dye *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediaminoacetylacetonatocopper(II) perchlorate (1), $[\text{Cu}(\text{tmen})(\text{aca})]\text{ClO}_4^-$, in binary solvent mixtures comprising one hydroxylic component (water, methanol, ethanol or propan-2-ol) and a non-protic co-solvent (acetone, acetonitrile or dimethylformamide) is discussed and interpreted in terms of hydrogen-bonding effects which alter the 'intrinsic' electron-donating ability of the hydroxylic solvent.

Solvatochromic dyes have often been used in the investigation of the properties of solvents and solvent mixtures. The realization that their behaviour in solution ultimately reflects specific interactions with their microenvironment has made them ideal probes for studies of preferential solvation in binary mixtures. Research in this area is often concerned with protic-aprotic solvent mixtures, owing not only to the wide use of such media in chemical processes, but also to their complexity, with strong dipole-dipole attractions occurring side by side with equally important hydrogen-bonding interactions.

Dyes may be classified according to their sensitivity to different properties of the medium. Compounds which are predominantly sensitive to the electron-accepting properties of a solvent may be characterized as α -sensitive, whereas β -sensitive dyes mainly reflect the donor properties of the medium.

The variety of solvatochromic probes employed in such studies have in common the fact that they are, in most cases, strongly sensitive to the hydrogen-bond accepting and/or donating ability of the medium.¹⁻⁵ Thus, deviations from an ideal behaviour in mixtures comprising protic solvents are generally ascribed to hydrogen bonding of the solvent to the dye. Studies utilizing dyes which are sensitive to the electron-donating ability of the medium are much more scarce. Among these dyes, the series of salts of ethylenediaminoacetylacetonatocopper(II), first prepared by Fukuda and Sone⁶ are unique in that they are not sensitive to the electron-accepting ability of the polarizability of the medium, being considered as exclusive probes for the solvent donating ability.⁷ Thus, Marcus and Migron have employed compound 1 (Scheme 1) in the determination of Kamlet and Taft's parameter β for quite a few solvents and solvent mixtures.⁷⁻⁹



Scheme 1

A study on the solvatochromism of dye 1 in dimethylformamide (DMF)-nitromethane mixtures has been published.¹⁰ We decided in the present work to extend this study to protic-aprotic solvent mixtures for various reasons. Besides the aforementioned scarcity of such investigations, we were interested in detecting any peculiar behaviour in these

mixtures, as frequently happens when an α -sensitive dye is employed.^{2,4} In addition, and contrary to the expected behaviour of DMF-nitromethane solutions of 1, where the electron-donating abilities of the two components are well established and are very different, the donating behaviour of solvent mixtures comprising protic components is in principle unpredictable. This stems from the fact that the values for electron-donating ability of protic solvents vary widely according to the method utilized for their obtention, an effect which may reflect the indirect action of hydrogen bonding in solution. Accordingly, one may encounter values of 'bulk' electron-donating ability, which differ appreciably from donor numbers of 'isolated' molecules.¹¹ Such variations should, in principle, be found in binary mixtures of variable composition, where the degree of hydrogen bonding of the protic co-solvent changes with its mole fraction in the mixture. Thus, in spite of the simplification introduced in a system with a pure β -sensitive probe (no direct hydrogen-bonding interaction between the dye and the protic co-solvent), deviations from the 'normal' behaviour found in non-protic solvent mixtures may still occur, an anticipation which justifies the present work.

Experimental

The spectra of dye 1 in all binary mixtures were recorded on a Beckman DU-65 spectrophotometer.

The copper dye 1 was prepared following a reported procedure.⁶ Redistilled water and analytically pure alcohols were employed in all solutions. In addition, pure dimethylformamide and redistilled acetone and acetonitrile were dried over molecular sieves prior to use.

Results and Discussion

The solvatochromic behaviour of dye 1 in binary mixtures comprising one hydroxylic component is shown for acetone-ROH (Fig. 1), acetonitrile-ROH (Fig. 2) and DMF-ROH (Fig. 3). The hydroxylic solvents employed were water, methanol, ethanol and propan-2-ol.

The data plotted in Fig. 1-3, which give the variations of the wavenumber, $\bar{\nu}_{\text{max}}$, of the dye in mixtures of variable molar composition, X , were fitted to third-order polynomials by means of a least-squares method. With the exception of the water-acetone plot, the general equation $\bar{\nu}_{\text{max}} = a + bX + cX^2 + dX^3$ was found to reproduce all data rather accurately, as shown in the figures. The values of the coefficients a , b , c and d for each binary mixture are given in Table 1. Values of $\bar{\nu}_{\text{max}}$ in acetone-water mixtures were constant and equal to $16.86 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ for water mole fractions >0.13 .

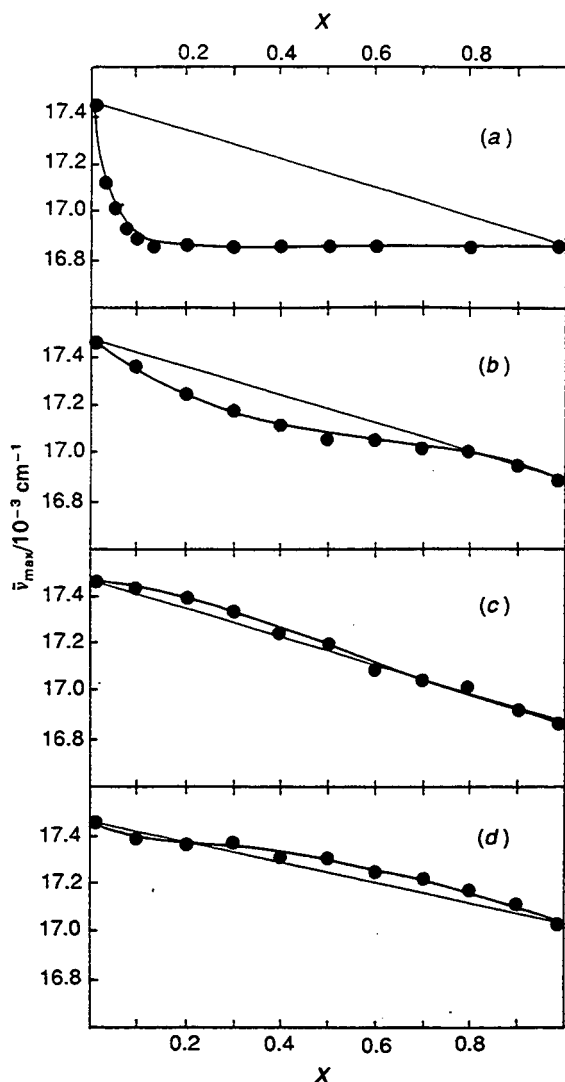


Fig. 1 Variations of \bar{v}_{\max} of dye 1 in binary mixtures with mole fraction of the hydroxylic component: (a) acetone-water; (b) acetone-methanol; (c) acetone-ethanol; (d) acetone-propan-2-ol

For binary mixtures richer in acetone, the observed \bar{v}_{\max} values were as follows [$10^{-3} \bar{v}_{\max}(X)$]: 17.51 (0), 17.12 (0.03), 17.01 (0.05), 16.92 (0.075), 16.89 (0.1).

A first distinction may be drawn between binary mixtures containing the relatively weak, non-protic donor solvents acetone and acetonitrile and those containing the strong donor DMF. Whereas in mixtures of the latter, the dye is in all cases preferentially solvated by DMF, in the acetone-

Table 1 Values of the coefficients a , b , c and d in the polynomial $\bar{v}_{\max} = a + bX + cX^2 + dX^3$ for each binary mixture

binary mixture	coefficients/ 10^{-3}			
	a	b	c	d
acetone-MeOH	17.51	-1.37	1.64	-0.84
acetone-EtOH	17.51	-0.30	-0.68	0.39
acetone-PrOH	17.51	-0.55	0.81	-0.69
acetonitrile-H ₂ O	17.30	-1.56	2.22	-1.16
acetonitrile-MeOH	17.30	-0.24	0.01	-0.22
acetonitrile-EtOH	17.30	-0.53	0.74	-0.71
acetonitrile-PrOH	17.30	-0.21	0.89	-1.04
DMF-H ₂ O	16.58	-0.03	0.49	-0.19
DMF-EtOH	16.58	0.12	-0.56	0.72

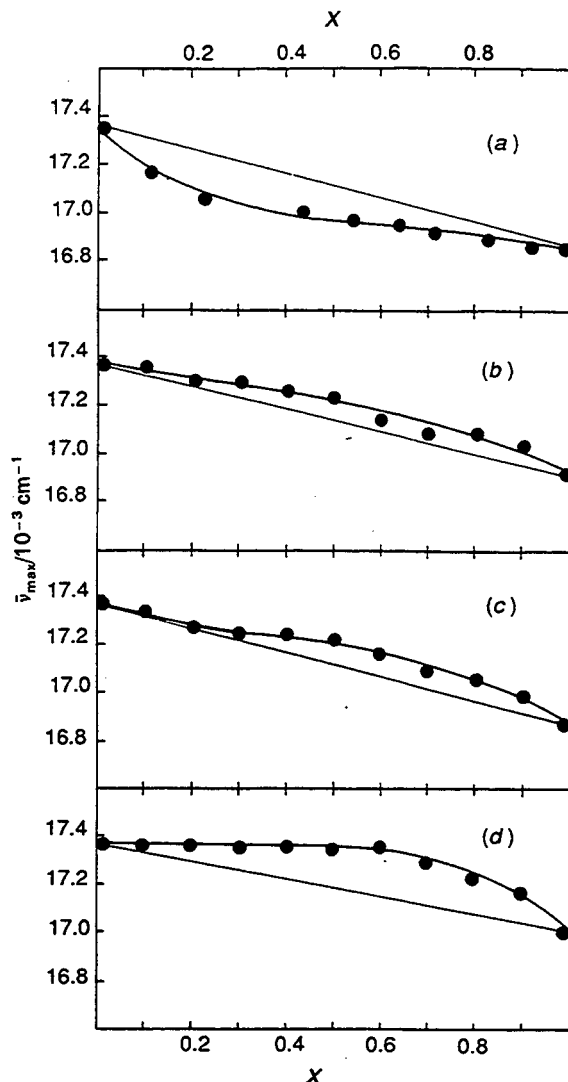


Fig. 2 Variations of \bar{v}_{\max} of dye 1 in binary mixtures with mole fraction of the hydroxylic component: (a) acetonitrile-water; (b) acetonitrile-methanol; (c) acetonitrile-ethanol; (d) acetonitrile-propan-2-ol

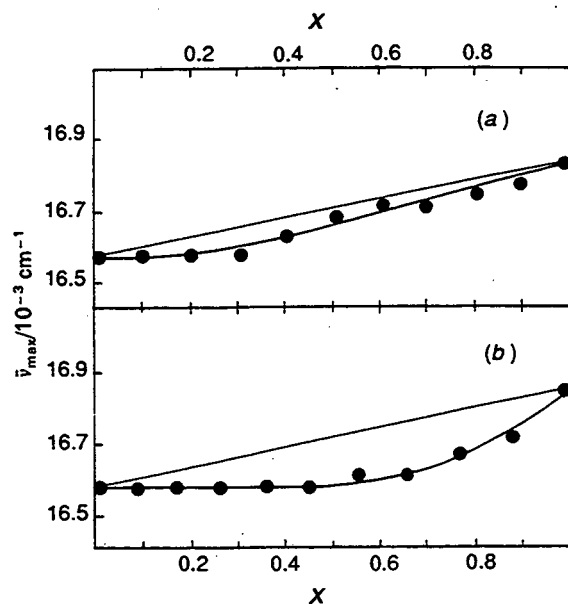


Fig. 3 Variations of \bar{v}_{\max} of dye 1 in binary mixtures with mole fraction of the hydroxylic component: (a) DMF-water; (b) DMF-ethanol

Table 2 Estimated molar percentage of the hydroxylic component, ROH, in the solvation shell of dye 1, for a binary mixture with a 1 : 1 bulk molar composition

ROH	non-protic co-solvent (%)		
	acetone	acetonitrile	DMF
H ₂ O	ca. 100	74	30
MeOH	66	33	—
EtOH	46	34	4
Pr ⁿ OH	37	3	—

ROH and acetonitrile-ROH systems, preferential solvation is shifted from the hydroxylic component to the non-protic co-solvent as we change from water to propan-2-ol.

The degree of solvation of the dye by the hydroxylic co-solvent in each binary mixture may be more readily grasped by a comparison of the values of Table 2. These values, obtained from the curves drawn in Fig. 1-3, are estimated percentages of ROH in the solvation shell of 1 when the bulk composition of the solvent mixture is 1 : 1. By employing the third-order polynomials given in Table 1, the percentages of ROH may be obtained from the relationship $\text{ROH}(\%) = (\bar{v}_{0.5} - \bar{v}_0)/(\bar{v}_1 - \bar{v}_0)$, where the subscripts 0.5, 0 and 1 refer to the calculated \bar{v}_{\max} values for solutions where $X = 0.5, 0$ and 1, respectively. Thus, in a 1 : 1 molar acetone-water mixture, the dye is exclusively surrounded by water molecules, whereas, in acetone-propan-2-ol, the solvation shell of the dye comprises about 37% of alcohol molecules.

A comparison of the acetone and acetonitrile systems indicates a greater effectiveness of the latter solvent in competing with the hydroxylic co-solvent for the solvation of the dye. Preferential solvation by acetonitrile is verified in all binary alcoholic mixtures, a trend which is reversed only when water is the hydroxylic co-solvent (Fig. 2). In the case of acetone mixtures, water and methanol solvate the dye preferentially, whereas ethanol-acetone mixtures exhibit a nearly ideal behaviour, with bulk compositions very similar to local solvent distributions around the dye (Fig. 1).

This greater effectiveness of acetonitrile, as compared with acetone, in solvating the copper dye probably reflects a greater association of the former with the soft Cu^{II} ion, because of the stronger π interactions of the -CN group with the planar dye.^{10,12}

The preferential solvation of [Cu(tmen)(aca)]ClO₄ by DMF in nitromethane-dimethylformamide mixtures was ascribed to the greater electron-donating ability of the latter solvent.¹⁰ However, when one of the components is a hydroxylic solvent, the picture that emerges is more complex.

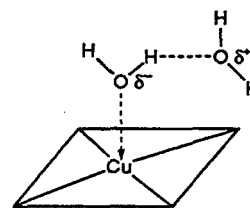
The value of \bar{v}_{\max} for 1 in a pure solvent may be assumed to be a measure of the donating ability of the medium. A reasonably good correlation was obtained between \bar{v}_{\max} and Gutmann's donor numbers (DN) for a series of solvents.⁶ Following this argument, the electron-donating abilities of water and the small aliphatic alcohols methanol, ethanol and propan-2-ol do not differ appreciably and are all greater than that of acetone or acetonitrile. This is apparent from the bathochromic shifts observed for the longest wavelength band of 1 in acetone or acetonitrile as a hydroxylic solvent is added. Nevertheless, preferential solvation of 1 by the better donor co-solvent is not always observed, as seen in Fig. 1(c), (d), Fig. 2(b), (c) and (d). Since direct solute-solvent hydrogen-bonding interactions may be excluded from our systems, the observed deviations and the progressive 'take-over' of the solvation shell by the hydroxylic component, as one changes from propan-2-ol to ethanol, methanol and water, must reflect indirect solvent interactions. The analysis of these

interactions is facilitated by the assumption of different electron-donating abilities for the hydroxylic co-solvent. Its 'bulk' donating ability reflects and incorporates the effects of extensive hydrogen bonding, which alters the 'intrinsic' donating ability of isolated molecules.

Fig. 2 shows that the copper dye 1 is better solvated by acetonitrile than by any alcohol, in spite of the larger \bar{v}_{\max} of the former. This may be due to the soft nature of the copper cation mentioned above, which associates better with acetonitrile than with any alcohol ROH. This, however, suggests that the 'intrinsic' electron-donating abilities of these alcohols are in fact smaller than their 'bulk' values, obtained in pure solvents.

This situation is reversed when water is the hydroxylic co-solvent. Comparison of Fig. 1(a) and (d), or of Fig. 2(a) and (d), shows that water solvates 1 in binary mixtures much more effectively than propan-2-ol. The reason for this is not, according to our view, that water is intrinsically a better donor solvent than propan-2-ol. The opposite should, in fact, be true. The alkyl groups in an alcohol should render the hydroxy group more basic than in water. The greater degree of dye solvation by water, than by propan-2-ol rather reflects differences in hydrogen-bond donation of these two solvents.

In binary mixtures a strong hydrogen-bonding solvent may act as a 'solvent scavenger', binding and sequestering the non-protic co-solvent from the solvation shell of the dye. It may also stabilize and reinforce, through hydrogen bonds, other hydroxylic molecules already present in the solvation shell of the dye. A hydrophilic net is woven around the dye, with the more hydrophobic co-solvent being gradually expelled from its solvation shell. This is accompanied by enhanced electron-donating ability of the axial ROH ligands, because of hydrogen bonding to other ROH molecules, as shown in Scheme 2.



Scheme 2

These effects oppose the 'intrinsic' weak electron-donating ability of the ROH molecules *vis-à-vis* the soft copper complex, and, in the case of the strongest hydrogen-bonding donor solvent water, even surpass the greater affinity of the dye for acetonitrile [Fig. 2(a)].

It is interesting, at this stage, to compare our observations with similar studies published previously involving binary aqueous mixtures. Our data agree quite well with the reported values of \bar{v}_{\max} for compound 1 in pure solvents.⁷ Values for β , the electron-pair donation tendency of the medium, have been reported previously for various aqueous mixtures.^{8,9,13}

Migron and Marcus employed compound 1 as a β indicator and their data for water-acetonitrile mixtures⁸ agree quite well with our results, if the relationship $\bar{v}_{\max} = 18.76 - 2.793\beta$, derived by the same authors,⁷ is used to convert \bar{v}_{\max} into β values. Thus, we obtained a value of $16.86 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ for the absorption wavenumber of 1 in water, a value very similar to the corresponding values in methanol (16.89×10^{-3}), ethanol (16.87×10^{-3}) and propan-2-ol ($17.00 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$). This corresponds to $\beta = 0.68$, essentially the same as that reported by the authors (0.67) in their study of water-acetonitrile mixtures.⁷

Krygowski *et al.* studied various aqueous binary mixtures, using as solvatochromic probes 4-nitroaniline and *N,N*-diethyl-4-nitroaniline,¹³ and arrived at results which are at variance with our observations. This may be due to the use of indicators which are not purely β -sensitive.⁹ In fact, their results yield a very low electron-donating ability value for water (B_{KT} or $\beta = 0.19$), much smaller than that for methanol (0.62), ethanol (0.77) or propan-2-ol (0.88). These values were essentially the same as those reported previously by Taft and co-workers,¹⁴ who listed them between brackets as 'less certain'. Accordingly, in all aqueous mixtures studied by the authors, the β indicators were preferentially solvated by the organic co-solvent, an observation which departs from our results with dye 1.

In conclusion, the present study brings to light the ambiguity of the electron-donating ability concept, when applied to hydroxylic solvents. Spectroscopic measurements of the pure β -sensitive dye 1 yield similar values of electron-donating ability for water and small aliphatic alcohols. This observation cannot explain their different behaviour in solvating compound 1 in binary mixtures. Indirect hydrogen-bonding effects explain the relative order of effectiveness of the hydroxylic co-solvent in the preferential solvation of the dye. This effectiveness increases in the order $\text{Pr}^i\text{OH} < \text{EtOH} < \text{MeOH} < \text{H}_2\text{O}$, and parallels the strength of these compounds as hydrogen-bonding donor solvents.

Grants by the Brazilian Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq) are gratefully acknowledged.

References

- 1 J. G. Dawber, J. Ward and R. A. Williams, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1988, **84**, 713.
- 2 (a) P. Chatterjee and S. Bagchi, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1991, **87**, 587; (b) 1992, **88**, 1675.
- 3 E. Bosch and M. Roses, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1992, **88**, 3541.
- 4 C. Leri and P. Suppan, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1992, **88**, 963.
- 5 E. Dutkiewicz, A. Jakubowska and M. Dutkiewicz, *Spectrochim. Acta, Part A*, 1992, **48**, 1409.
- 6 Y. Fukuda and K. Sone, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1972, **45**, 465.
- 7 Y. Migron and Y. Marcus, *J. Phys. Org. Chem.*, 1991, **4**, 310.
- 8 Y. Migron and Y. Marcus, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 400.
- 9 Y. Migron and Y. Marcus, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1991, **87**, 1339.
- 10 D. Bourdin, D. Lavabre, J. P. Beteille, G. Levy and J. C. Micheau, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1990, **63**, 2985.
- 11 Y. Marcus, *J. Solution Chem.*, 1984, **13**, 599.
- 12 M. C. Rezende, C. Machado, S. P. Zanotto and M. Scremin, *J. Phys. Org. Chem.*, 1993, **6**, 637.
- 13 T. M. Krygowski, P. W. Krona, U. Zielkowska and C. Reichardt, *Tetrahedron*, 1985, **41**, 4519.
- 14 M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, M. H. Abraham and R.W. Taft, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 2877.

Paper 3/06092F; Received 12th October, 1993

Vanderlei Gageiro Machado, Clodoaldo Machado, Maria da Graça Nascimento e Marcos Caroli Rezende
Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-970 - Florianópolis - SC

Recebido em 11/12/95; aceito em 14/3/95

HALOCHROMIC COMPOUNDS AND CHROMOIONOPHORES. The halochromic properties of pyridinium N-phenoxide betaine dyes and other solvatochromic compounds are revised. A general overview on the chemistry of chromoionophores is also presented.

Keywords: halochromism; chromoionophores; pyridinium N-phenoxide betaine dyes.

INTRODUÇÃO

A adição de sais em um meio reacional pode alterar a velocidade e até mesmo o curso de muitos processos químicos. Estes efeitos salinos são explicados em geral como resultantes de mudanças da polaridade do meio pela adição de espécies iônicas.

Entretanto, o conceito de polaridade, embora seja facilmente compreendido de forma qualitativa (basta aqui lembrar uma regra bastante conhecida: "semelhante dissolve semelhante"), não pode ser definido quantitativamente com precisão por propriedades físicas como a constante dielétrica (ϵ) e o momento dipolar (μ). Tal constatação decorre do fato de que embora parâmetros como ϵ e μ definam o solvente como um todo, não levam em conta as interações específicas das moléculas do soluto com o solvente^{1,2}. Estas interações intermoleculares incluem as coulômbicas entre íons, as direcionais entre dipolos, as indutivas de dispersão e as ligações de hidrogênio, além das interações por transferência de carga e solvofóbicas.

A complexidade das interações soluto-solvente é ainda maior quando um determinado sal é adicionado em um sistema composto pelo meio e um soluto.

Um dos métodos mais extensivamente utilizados na química do estudo de soluções consiste na utilização de compostos solvatocrômicos para o estudo do efeito do solvente em nível microscópico-molecular. Estes compostos apresentam mudanças pronunciadas na posição (e algumas vezes na intensidade) de uma banda de absorção UV/Vis quando a polaridade do meio é alterada (solvatocromismo)^{3,4}. Muitos compostos exibem este tipo de comportamento. Compostos solvatocrômicos podem sofrer mudanças nos seus espectros de absorção quando sais são adicionados às suas soluções. Este fenômeno é chamado de halocromismo.

A utilização de compostos halocrômicos com o intuito de se investigar a polaridade de soluções salinas começou a ser feita na década de 60. Gordon verificou em um estudo envolvendo diversas soluções aquosas de merocianinas na ausência e presença de sais de Na^+ , Mg^{2+} e de tetraalquilamônio, que aqueles compostos são halocrômicos⁵. Kosower pôde demonstrar que a polaridade do solvente puro aumenta quando a ele é adicionado um determinado sal⁶. Provou isto adicionando ao meio uma sonda solvatocrômica, o iodeto de 1-etil-4-carbometoxipiridínio, que tem a sua banda solvatocrômica mudada quando a polaridade do meio muda. Davidson e Jencks estudaram as mudanças espectrais que ocorrem em soluções aquosas de uma merocianina na presença de diversos sais⁷.

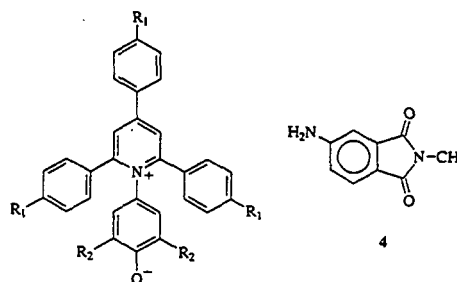
Entretanto, os estudos envolvendo halocromismo ganharam grande impulso somente nos anos oitentas, com a utilização principalmente dos piridíniofenolatos como sondas solvatocrômicas⁸⁻¹⁰.

O objetivo desta revisão será abordar trabalhos que tratam

do fenômeno do halocromismo. Será dado um enfoque especial sobre o halocromismo dos piridíniofenolatos. Mostrar-se-á ainda como os compostos halocrômicos aqui descritos podem ser empregados como unidades cromóforas na síntese de compostos cromoionóforos, que constituem uma classe de compostos muito importante dentro da química supramolecular.

EMPREGO DE COMPOSTOS SOLVATOCRÔMICOS NA INVESTIGAÇÃO DE SOLUÇÕES SALINAS

Dentre os exemplos mais conhecidos de compostos solvatocrômicos, pode-se citar a classe dos piridíniofenolatos (e.g., compostos 1-3). Estes corantes começaram a ser investigados por Dimroth e col.¹¹ há três décadas. Eles apresentam uma grande sensibilidade para pequenas mudanças no meio e para a adição de sais em um solvente determinado³. De acordo com a feliz analogia criada por Reichardt², a sensibilidade destes compostos pode ser comparada à da princesa do conto de Andersen¹² "A Princesa e o grão de ervilha", que era capaz de perceber um grão de ervilha debaixo de vinte colchões e vinte acolchoados.



- 1: $\text{R}_1 = \text{H}; \text{R}_2 = \text{H}$
2: $\text{R}_1 = \text{H}; \text{R}_2 = \text{Ph}$
3: $\text{R}_1 = \text{SO}_2\text{Me}; \text{R}_2 = \text{Ph}$

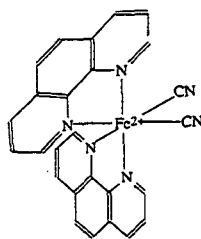
O piridíniofenolato mais conhecido é o composto 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenilpiridínio)-1-fenolato (composto 2), que foi popularizado pelo seu emprego na confecção da escala de polaridade $E_T(30)$ ^{13,14} e que é comercialmente disponível atualmente¹⁵.

A idéia de se medir a polaridade de soluções salinas utilizando-se piridíniofenolatos solvatocrômicos como sondas foi testada para uma variedade de solventes e eletrólitos, empregando-se como corante a betaína 1¹⁶. Inspirando-se no tratamento originalmente proposto por Langhals¹⁷ para expressar a polaridade de misturas líquidas binárias em função da concentração do componente mais polar, trataram-se as soluções salinas como misturas binárias onde o sal solvatado

fosse o cossolvente mais polar. Desta maneira foi possível obter uma equação simples, ajustável a uma variedade de processos químicos na literatura que exibiam efeitos salinos¹⁸. Este tratamento foi estendido a soluções salinas contendo um corante solvatocrômico¹⁶, resultando um estudo sistemático sobre a polaridade de soluções alcoólicas de eletrólitos, utilizando-se o piridíniofenolato **2** como sonda¹⁹. A equação resultante relacionava a polaridade da solução salina, dada pelo correspondente valor de $E_T(30)$, com a concentração molar do sal presente, para vinte combinações sal/solvente.

Posteriormente, a mesma equação foi testada com sucesso por Langhals²⁰ para soluções de LiClO_4 em ácido acético, sistema este que havia sido utilizado anteriormente por Winstein e col. em estudos de formação de pares iônicos²¹. Langhals empregou como corante solvatocrômico a imida **4**, base da escala empírica *S* de Zelinskii²².

Ficava claro assim que outras sondas solvatocrômicas eram capazes de registrar variações de polaridade em soluções salinas, a exemplo do que havia sido feito com as betaínas de Reichardt. Uma destas sondas, o corante dicianobis (1,10-fenantroline) ferro (II) (composto **5**), de fácil obtenção²³, exibiu um comportamento solvatocrômico que se correlacionava bem com a escala $E_T(30)$ ²⁴.



5

Além disso, o corante **5** exibiu um comportamento redox reversível, o que o fazia especialmente interessante como sonda em estudos por voltametria cíclica de soluções salinas. Gráficos da variação do potencial de **5** em função da concentração de sal adicionado forneceram curvas que tenderam para um patamar²⁵. A aplicação de um modelo teórico²⁶ derivado de outros processos eletroquímicos envolvendo associações com cátions²⁷ resultaram em um tratamento que corroborava a equação empírica anteriormente obtida¹⁹.

HALOCROMISMO DE PIRIDÍNIOFENOLATOS

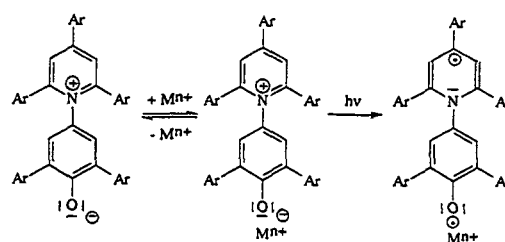
A análise sistemática dos resultados das medidas de polaridade de soluções salinas através de sondas solvatocrômicas colocou em evidência a falácia deste propósito. O que se mede não é uma propriedade macroscópica da solução salina, mas simplesmente a interação da sonda com o eletrólito. No caso de piridíniofenolatos, esta interação se dá entre o cátion presente e o fragmento fenolato doador do corante²⁸⁻³³. Observa-se por exemplo que a adição de KI , NaI , LiI , BaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$ e $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ em soluções do composto **2** em acetonitrila causa deslocamentos hipsocrômicos variados na sua banda de transferência de carga (TC) intramolecular²⁸. Este deslocamento cresce com o aumento da carga efetiva do cátion (carga do íon/raio do íon), ou seja, $\text{Cs}^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Ba}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$ ^{19,32,34,35}. Um gráfico do deslocamento hipsocrômico induzido pelo sal ($E_T(30)$) em função das cargas efetivas dos cátions dos sais adicionados em acetonitrila mostra uma correlação linear bastante boa ($r = 0,989$)^{34,35}. Os ânions têm pouca influência no halocromismo destes compostos¹⁹.

Reichardt sugeriu inicialmente para este tipo de efeito salino a utilização do termo halocromismo negativo (positivo) para o deslocamento hipsocrômico (batocrômico) da banda de absorção

UV/Vis de um composto dissolvido com o aumento da concentração do sal²⁸. Esta definição foi criada por analogia com a definição de solvatocromismo¹ e recebeu bastante aceitação³⁶. De acordo com Reichardt, o halocromismo das betaínas 1-3 constitui o que foi chamado por ele de "halocromismo genuíno ou verdadeiro"^{8,9}, o qual é diferente do halocromismo primeiramente descrito por Baeyer e Villiger³⁷ no início do século. O termo introduzido por estes pesquisadores diz respeito à mudança de coloração de um composto dissolvido pela adição de ácido ou base. Neste caso, uma reação química transforma o composto incolor em um colorido. No halocromismo dos piridíniofenolatos, este deslocamento não é causado por alterações químicas do cromóforo. Reichardt e col. sugeriram então o termo "halocromismo negativo (positivo) verdadeiro"³⁸ a fim de que seja feita a diferenciação do halocromismo introduzido por Baeyer e Villiger³⁷, do qual inúmeros exemplos^{39,40} são conhecidos.

A banda de absorção na região visível do espectro das betaínas 1-3 resulta de uma transferência de carga intramolecular da parte doadora (fenolato) para o anel piridínio elétron-aceptor da molécula não-planar⁴¹. A posição desta banda TC depende da energia de ionização da parte elétron-doadora e da afinidade eletrônica da porção aceptora da molécula⁴². Pela adição de um sal a uma solução do piridíniofenolato, o cátion, ao interagir eletrostaticamente com a parte elétron-doadora da molécula, aumenta a energia de ionização do grupo fenolato enquanto a afinidade eletrônica da parte aceptora do corante permanece inalterada^{9,35}. Esta é a explicação para o deslocamento hipsocrômico da banda TC que é observado em soluções salinas destes compostos.

Estudos envolvendo a solvatação preferencial de piridíniofenolatos em misturas binárias de solventes mostraram que o espectro do corante deve refletir as mudanças em seu microambiente, que apresenta propriedades diferentes das do meio como um todo⁴³. Assim, o halocromismo negativo de 1-3 pode ser ilustrado pela formação de um par iônico entre o grupo fenolato elétron-doador carregado negativamente e o cátion do sal adicionado⁴⁴, conforme o diagrama abaixo³⁵.



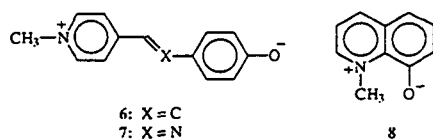
2: $\lambda_{\text{max}} = 626 \text{ nm} (\text{CH}_3\text{CN})$ ³⁵ $\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ nm} [\text{CH}_3\text{CN} + \text{Mg}(\text{ClO}_4)_2]$ ³⁵
 3: $\lambda_{\text{max}} = 509 \text{ nm} (\text{H}_2\text{O})$ ²⁹ $\lambda_{\text{max}} = 481 \text{ nm} [\text{H}_2\text{O} + \text{Mg}(\text{ClO}_4)_2]$ ²⁹

O halocromismo de piridíniofenolatos como o composto **2** se deve portanto à especial sensibilidade do grupo fenolato a espécies ou grupos eletrofilicos em solução. Sabe-se, por exemplo, que estes compostos são indicadores da capacidade doadora por pontes de hidrogênio do meio^{45,46}. Em soluções de piridíniofenolatos nas quais são adicionados fenóis observa-se uma supressão incompleta da banda de transferência de carga, a qual é explicada pela transferência de próton incompleta do fenol para o grupo fenolato⁴⁵. Observou-se também que os valores de $E_T(30)$ aumentam bruscamente quando pequenas quantidades de nitrato de etilamônio são dissolvidas em soluções do corante **2** com diversos solventes⁴⁷. Um outro trabalho recente⁴⁸ relata medidas espectrofotométricas de ligações de hidrogênio entre o composto **2** e água, álcoois ou fenóis empregando-se acetonitrila como solvente. Diversas constantes de associação para os complexos 1:1 formados por ligação de hidrogênio foram obtidas⁴⁸. Esta banda também pode

ser suprimida em um solvente bastante apolar pela presença de cátions (e.g., Li^+)^{49,50}. A adição de pequenas quantidades de LiClO_4 em uma solução etérea do composto **2** causou um decréscimo da banda em 826 nm, ao qual seguiu-se o aparecimento de uma banda em 555 nm, devido à formação de um complexo corante-cátion⁵⁰. Foi também observado que a adição de sais de amônio quaternários (Bu_4NClO_4 e Bu_4NBr) em uma solução do composto **2** em benzeno leva à formação de complexos fortemente associados entre a betaína e os cátions tetraalquil-amônio⁵¹. Os complexos são evidenciados pelo decréscimo gradual da intensidade da banda de absorção em $\lambda_{\text{max}} \approx 820$ nm até a sua ausência total, simultaneamente ao aparecimento de uma nova banda de absorção ($\lambda_{\text{max}} = 650\text{-}660$ nm). Esta banda deve corresponder ao aparecimento do complexo cátion-corante⁵¹. O efeito halocrômico dos piridínio-fenolatos assemelha-se aos deslocamentos análogos observados quando se adiciona um solvente mais polar às soluções dos corantes em solventes orgânicos puros⁵¹. Em ambos os casos dá-se o deslocamento hipsocrômico da banda de transferência de carga do corante sem grandes mudanças na sua forma. As curvas dos deslocamentos hipsocrômicos induzidos pelos diferentes sais em um dado solvente, após um aumento inicial do valor do deslocamento com a adição do sal, tendem ou chegam a um patamar para concentrações salinas mais altas^{25, 44, 52}.

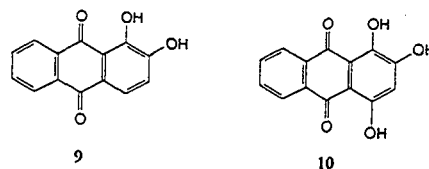
De todas estas observações conclui-se que o halocromismo dos compostos piridíniofenolatos deve refletir perturbações induzidas pelo sal em nível microscópico, ou seja, na porção doadora fenólica da betaína⁴⁴. Pôde-se então estabelecer um modelo de halocromismo para as soluções salinas dos piridínio-fenolatos. Este modelo leva em consideração o fato de que é estabelecida uma competição entre o solvente e o corante (na sua metade fenólica) pelo cátion após um sal ser adicionado a uma solução do piridíniofenolato. A competição depende da interação das três espécies presentes⁴⁴. Três casos extremos podem ser considerados: a) uma interação forte do solvente com o grupo fenolato (aplica-se quando o solvente é prótico polar, como a água ou o metanol); b) uma interação forte do solvente com o cátion (pode ser aplicado quando o solvente é prótico e solvata muito bem cátions); e c) interações fracas do solvente com o grupo fenolato e do solvente com o cátion (aplica-se para um solvente como a acetona)⁴⁴.

Vale ressaltar aqui que este modelo considera essencialmente interações em nível microscópico, mas efeitos halocrômicos não-específicos resultantes de mudanças induzidas pelo sal adicionado na estrutura do solvente não podem ser inteiramente excluídos^{30, 53}. Pode-se afirmar ainda que é difícil estabelecer uma fronteira nítida entre estas duas abordagens mencionadas⁵⁴. Parece, entretanto, seguro afirmar que o fenômeno do halocromismo de piridíniofenolatos reflete praticamente efeitos específicos de associação corante-cátion. O trabalho recente de Kreevoy e Binder⁵⁵ tenta quantificar esta associação entre Li^+ e a betaína **2** em acetonitrila, mediante uma análise matemática dos espectros do corante em presença de quantidades crescentes de sal em solução. Outros corantes solvatocrômicos que incorporam o grupo doador fenolato também exibem um comportamento halocrômico, como é o caso de merocianinas como os compostos **6**⁵⁶ e **7**⁵⁷, além da betaína **8**⁵⁸, proposta por Ueda e Schelly como uma sonda pequena para o estudo de sistemas micelares⁵⁹.



Corantes halocrômicos que poderiam ser incluídos nesta família são a alizarina **9** e a purpurina **10**, de especial interesse

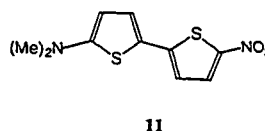
histórico pela sua utilização, desde a antiguidade, como bases de inúmeros pigmentos.



Bergerhoff e Wunderlich⁶⁰ isolaram em forma cristalina uma série de complexos metálicos dos correspondentes fenolatos, determinando suas estruturas por difração de raios-X. A variedade de cores obtidas para estes cristais, associada ao conhecimento inequívoco de suas estruturas, ilustram sobejamente a importância do fenômeno do halocromismo, registrado já por Vitruvius e Plínio na Roma antiga.

Cabe finalmente a pergunta quanto a generalidade do comportamento halocrômico. Corantes solvatocrômicos que não possuem um grupo fenolato capaz de complexação com um cátion podem ainda exibir um comportamento halocrômico? A resposta é afirmativa. Complexos inorgânicos como **5** têm seus espectros alterados pela adição de cátions ao meio. O complexo quadrado planar bis(tetrametiletilenodiamino)bis(acetilacetato) cobre (II) registra deslocamentos em sua banda solvatocrômica na região visível em presença de sais. Neste caso, entretanto, é a complexação com o ânion a responsável por estas alterações espectroscópicas, o que nos leva a uma distinção entre dois tipos de halocromismo, catiônico como em **2** e **5**, e aniônico⁵⁶.

Finalmente, mesmo quando uma complexação com um sal não parece óbvia, a adição de um eletrólito a uma solução de um corante solvatocrômico pode eventualmente provocar alterações espectrais importantes. Isto pode ser demonstrado para o corante **11**, introduzido recentemente por Effenberger⁶¹ como indicador para medidas de dipolaridade-polarizabilidade π^* de solventes.

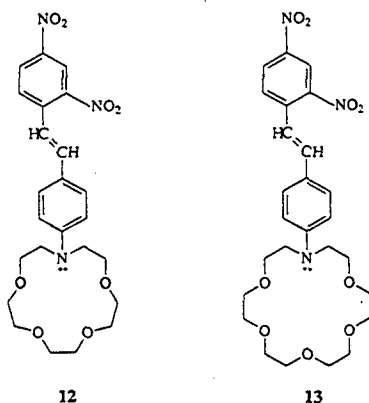


A adição de iodeto de sódio a soluções de **11** em n-butanol desloca batocromicamente a banda de transferência de carga, o que pode ser justificado pela estabilização crescente do estado excitado mais polar do corante pela presença do eletrólito⁶².

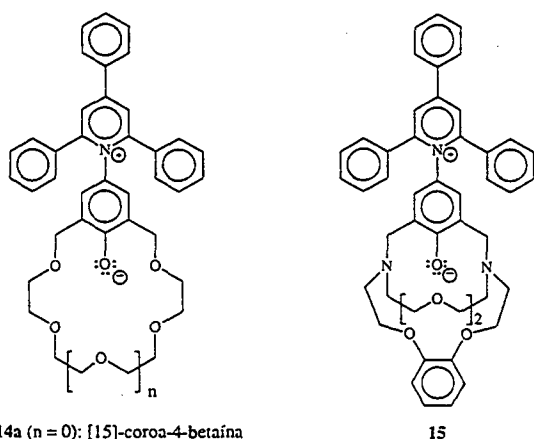
COMPOSTOS CROMOIONÓFOROS

A descoberta, por Pedersen, dos éteres coroa e os estudos relacionados com a sua habilidade em formar complexos⁶³ levaram ao florescimento da química supramolecular⁶⁴. Os éteres coroa fazem a complexação seletiva de cátions e podem ainda realizar a complexação enantiosseletiva de substratos opticamente ativos⁶⁵. A idéia de se adicionar uma unidade cromofórica à estrutura dos éteres coroa levou ao surgimento de uma nova classe de corantes conhecidos como cromoionóforos⁶⁶. Com estes corantes, a complexação seletiva de cátions pode ser acompanhada visualmente por uma mudança de cor na mesma molécula. Diferentes íons alcalinos e alcalino-terrosos causam mudanças de cor diferentes, sendo normalmente observados efeitos significativos com cátions que se ajustam seletivamente dentro das unidades éteres coroa⁶⁷. Assim, por exemplo, o cromoionóforo **12** em acetonitrila sofre deslocamento hipsocrômico e abaixamento da absorvidade

molar de sua banda solvatocrômica na presença de íons alcalinos e alcalino-terrosos⁶⁸. Entre os íons metálicos alcalinos, o Na⁺ provoca um deslocamento maior ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 30,5 \text{ nm}$)⁶⁸. Com o cromoiônóforo 13 em acetonitrila, observa-se que o deslocamento hipso-crômico mais pronunciado entre os íons alcalinos acontece com o íon K⁺ ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 95 \text{ nm}$)⁶⁸. Os íons alcalino-terrosos sempre conduzem a deslocamentos mais pronunciados que os íons alcalinos. Conclui-se que o ajuste do cátion à cavidade do éter coroa, e a interação do íon com o cromóforo, são juntamente importantes na determinação da magnitude dos deslocamentos espectrais que ele induz^{67,69}.



Reichardt e col. recentemente separaram o halocromismo apresentado pelos piridiniofenolatos em dois tipos: halocromismo geral, mostrado pelos compostos 1-3 e o halocromismo cátion-seletivo^{38,70}. A síntese da série de betaínas 14a-c demonstrou que cada um dos compostos da série complexa preferencialmente com um cátion, ou seja, a complexação depende do raio iônico do cátion que melhor se ajusta ao éter coroa³⁸. Assim, por exemplo, a solução violeta da betaína 14b em acetonitrila toma uma coloração vermelha carmim se a ela é adicionado iodeto de potássio, ou seja, ocorre um deslocamento hipso-crômico de 59 nm⁷⁰. Como as mudanças de cor induzidas pelos cátions podem ser facilmente verificadas pelo olho humano, os autores sugeriram o uso destes cromoiônóforos como indicadores de cátions.



14a (n = 0): [15]-coroa-4-betaína
14b (n = 1): [18]-coroa-5-betaína
14c (n = 2): [21]-coroa-6-betaína

Dolman e Sutherland prepararam um piridiniofenolato contendo uma unidade criptante fenólica⁷¹, o composto 15, que mostrou alta seletividade para o Na⁺. Kubo e col. recentemente desenvolveram um novo tipo de cromoiônóforo, com a substituição do éter coroa por um calix-4-areno funcionalizado com

funções éster⁷². O corante mostrou uma alta seletividade para o Na⁺. Kirschke e col.⁷³ sintetizaram recentemente compostos cromoiônóforicos do tipo arilazobutenoato que são seletivos para o Li⁺.

Muitos cromoiônóforos estão sendo sintetizados com o objetivo de serem testados como sensores de íons metálicos alcalinos em fibras ópticas^{74,75}. Estes compostos devem, entre outros requisitos, apresentar alta seletividade para o cátion a ser detectado, comparativamente com outros cátions comumente presentes em amostras a serem analisadas⁷⁵.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A década passada assistiu a um crescente interesse pelo fenômeno do halocromismo de corantes, o qual é aparentado com o comportamento mais bem estudado do solvatocromismo destes compostos. Paralelamente a uma melhor compreensão daquele fenômeno, aplicações interessantes começaram a ser descritas, relacionadas com o tema mais amplo da química de sais em solução. A possibilidade de acompanhamento visual de processos químicos envolvendo espécies iônicas através de sua interação com corantes oferece um amplo leque de aplicações. Assim, desde a simples detecção específica de íons metálicos⁶⁹⁻⁷⁵, passando pela síntese de novos condutores orgânicos⁷⁶, ou pelo desenvolvimento de corantes que proporcionem a distinção visual de íons amônio opticamente ativos⁷⁷, ou de espécies quirais associadas a íons alcalinos⁷⁸, toda uma gama de pesquisas excitantes vem se desenvolvendo, relacionadas com os comportamentos descritos nesta revisão. No campo biológico ou mecanístico, o desenvolvimento de modelos que reproduzam o papel dos cátions alcalinos ou alcalino-terrosos, pela sua capacidade de induzir transformações químicas⁷⁹, encontra paralelo no desenvolvimento, na pesquisa de novos materiais, de corantes ionóforos cujo fotocromismo pode ser controlado por cátions em solução⁸⁰. A descoberta de novos sistemas halocromicos e sua utilização em uma variedade de processos constitui assim uma área de pesquisa com amplas ramificações e aplicações futuras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FINEP, PADCT-II e CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Reichardt, C.; *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, 1988; pp 339-405.
- Reichardt, C.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 98.
- Reichardt, C.; *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, 1988; pp 285-338.
- Fabian, J.; Zahradník, R.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 677.
- Gordon, J. E.; *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 2413.
- Mohammad, M.; Kosower, E. M.; *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 1153.
- Davidson, S. J.; Jencks, W. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 225.
- Reichardt, C.; *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 147.
- Reichardt, C.; *Chimia* **1991**, 322.
- Reichardt, C.; Asharin-Fard, S.; Blum, A.; Eschner, M.; Mehranpour, A. M.; Milart, P.; Niem, T.; Schäfer, G.; Wilk, M.; *Pure & Appl. Chem.* **1993**, *65*, 2593.
- Dimroth, K.; Reichardt, C.; Siepmann, T.; Bohlmann, F.; *J. Liebigs Ann. Chem.* **1963**, *661*, 1.
- Andersen, H. C.; *Contos de Andersen*; trad. por Guttorm Hanssen; Paz e Terra: São Paulo, 1988.

13. A energia de transição $E_T(30)$ é definida como: $E_T(30)/\text{kcal.mol}^{-1} = hc\nu_{\lambda} = 28591/\lambda_{\text{max}} (\text{nm})$, cf. referências 1 e 11.
14. Rezende, M. C.; Radetski, C. M.; *Quím. Nova* **1988**, *11*, 353; Kessler, M. A.; Wolfbeis, O. S.; *Synthesis* **1988**, 635.
15. Aldrich Chemical Company; Milwaukee/EUA; *Aldrichimica Acta* **1987**, *20*, 59 (Catálogo da Aldrich 1990/1991, nº de ordem 27, 244-2).
16. Rezende, M. C.; Dal Sasso, L. I.; *Rev. Roum. Chim.* **1986**, *31*, 323.
17. Langhals, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 724.
18. Rezende, M. C.; Zanette, D.; Zucco, C.; *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3423; Rezende, M. C.; Zucco, C.; Zanette, D.; *Tetrahedron* **1985**, *41*, 87.
19. Rezende, M. C.; *Tetrahedron* **1988**, *44*, 3513.
20. Langhals, H.; *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1771.
21. Winstein, S.; Klinedinst, P. E.; Robinson, C. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *83*, 885.
22. Zhmyreva, I. A.; Zelinskii, V. V.; Kolobkov, V. P.; Krasnitskaya, N. D.; *Dokl. Akad. Nauk. S. S. S. R.* **1959**, *129*, 1089 [C.A. **1961**, *55*, 26658e].
23. Soukup, R. W.; Schmid, R.; *J. Chem. Educ.* **1985**, *62*, 459.
24. Burgess, J.; *Spectrochim. Acta* **1970**, *26A*, 1369.
25. Rodrigues, C. A.; Stadler, E.; Rezende, M. C.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1991**, *87*, 701.
26. Peover, M. E.; Davies, J. D.; *J. Electroanal. Chem.* **1963**, *6*, 46.
27. Krygowski, T. M.; Fawcett, W. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2143; Ryan, M. D.; Evans, D. H.; *J. Electroanal. Chem.* **1976**, *67*, 333; Lesniewska-Lada, E.; Kalinowski, M. K.; *Electrochim. Acta* **1983**, *28*, 1415; Krygowski, T. M.; *J. Electroanal. Chem.* **1972**, *35*, 436; Desbene-Monvernay, A.; Lacage, P. C.; Dubois, S. E.; Cherigui, A.; *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *216*, 203.
28. Reichardt, C.; Harbusch-Görnert, E.; Schäfer, G.; *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 839.
29. Reichardt, C.; Milart, P.; Schäfer, G.; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1990**, *55*, 97.
30. Koppel, I. A.; Koppel, J. B.; *Org. React. (USSR)* **1984**, *21*, 98 [C.A., **1985**, *103*, 37044p].
31. Koppel, I. A.; Koppel, J. B.; Pihl, V. O.; *Org. React. (USSR)* **1984**, *21*, 144 [C.A., **1985**, *103*, 12232k].
32. Hollmann, G.; Vögtle, F.; *Chem. Ber.* **1984**, *117*, 1355.
33. Pocker, Y.; Ciula, J. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4728.
34. Bock, H.; Herrmann, H. F.; *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1171.
35. Reichardt, C.; Asharin-Fard, S.; Schäfer, G.; *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 143.
36. Muller, P.; *Pure & Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1077.
37. Baeyer, A.; Villiger, V.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 1189.
38. Reichardt, C.; Asharin-Fard, S.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 558.
39. Rupe, H.; Hagenbach, H.; Collin, A.; *Helv. Chim. Acta* **1935**, *18*, 1395; Brooker, L. G. S.; Sprague, R. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 3203; Stefanye, D.; *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1261; Imafuku, K.; Matsumura, H.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46*, 199.
40. Hellrung, B.; Balli, H.; *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 1284; Hallas, G.; Marsden, R.; Hepworth, J. D.; Mason, D.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1984**, 149; Gunzenhauser, S.; Balli, H.; *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 56; Mori, A.; Li, Z. H.; Takeshita, H.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 3029; Gunzenhauser, S.; Balli, H.; *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 359.
41. Allmann, R.; *Z. Kristallogr.* **1969**, *128*, 115.
42. Foster, R.; *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 2135.
43. Dawber, J. G.; Ward, J.; Williams, R. A.; *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **1988**, *84*, 713; Beckett, M. A.; Dawber, J. G.; *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **1989**, *85*, 727; Dawber, J. G.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, *86*, 287.
44. Machado, V. G.; Aillon, M.; Rezende, M. C.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88*, 201.
45. Spange, S.; Lauterbach, M.; Gyra, A. K.; Reichardt, C.; *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 323.
46. Marcus, Y.; Migron, Y.; *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 400.
47. Herfort, I. M.; Schneider, H.; *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 27.
48. Coleman, C. A.; Murray, C. J.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3578.
49. Braun, R.; Sauer, J.; *Chem. Ber.* **1986**, *119*, 1269.
50. Pocker, Y.; Ciula, J. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4728.
51. Hollmann, G.; Vögtle, F.; *Chem. Ber.* **1984**, *117*, 1355.
52. Oliveira, C. C. L.; Rezende, M. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1991**, *2*, 21.
53. Harrod, W. B.; Pienta, J.; *J. Phys. Org. Chem.* **1990**, *3*, 534.
54. Zaslavsky, B. Y.; Miheeva, L. M.; Masimov, E. A.; Djafarov, S. F.; Reichardt, C.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, *86*, 519.
55. Binder, D. A.; Kreevoy, M. M.; *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 10008.
56. Zanotto, S. P.; Scremin, M.; Machado, C.; Rezende, M. C.; *J. Phys. Org. Chem.* **1993**, *6*, 637.
57. Machado, C.; Nascimento, M. G.; Rezende, M. C.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1994**, 2539.
58. Machado, V. G.; Nascimento, M. G.; Rezende, M. C.; *Livro de Resumos da 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* **1995**, FQ-074.
59. Ueda, M.; Schelly, Z. A.; *Langmuir* **1989**, *5*, 1005.
60. Wunderlich, C.-H.; Bergerhoff, G.; *Chem. Ber.* **1994**, *127*, 1185.
61. Effenberger, F.; Wuerthner, F.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 719; Effenberger, F.; Wuerthner, F.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2082.
62. Ramirez, C. B.; Carrasco, N.; Rezende, M. C.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, *91*, 3839.
63. Pedersen, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2495; Pedersen, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017.
64. Lehn, J. M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89.
65. Vögtle, F.; Knops, P.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 958.
66. Dix, J. P.; Vögtle, F.; *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 893.
67. Para consultar artigos de revisão sobre cromofóros, ver: Weber, E.; *Kontakte (Darmstadt)* **1984**, *1*, 26; Takagi, M.; Ueno, K.; *Top. Curr. Chem.* **1984**, *121*, 39; Löhr, H. G.; Vögtle, F.; *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 65; Kaneda, T.; *Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi* **1988**, *46*, 96 [C.A., **1988**, *108*, 160414q].
68. Dix, J. P.; Vögtle, F.; *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 457.
69. Jonker, S. A.; Ariese, F.; Verhoeven, J. W.; *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1989**, *108*, 109.
70. Reichardt, C.; Asharin-Fard, S.; Schäfer, G.; *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 23.
71. Dolman, M.; Sutherland, I. O.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1793.
72. Kubo, Y.; Hamaguchi, S.; Kotani, K.; Yoshida, K.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7419.
73. Kirschke, K.; Baumann, H.; Costisella, B.; Ramm, M.; *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 265.
74. Scholl, A. F.; Sutherland, I. O.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1716.
75. Sandanayake, K. R. A. S.; Sutherland, I. O.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3165.

76. Kimura, K.; Yamashita, T.; Yokoyama, M.; *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5614.
77. Kaneda, T.; Ishizaki, Y.; Misumi, S.; Kai, Y.; Hirao, G.; Kasai, N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2970; Kaneda, T.; Hirose, K.; Misumi, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 742; Misumi, S.; *Pure & Appl. Chem.* **1990**, *62*, 493; Nishi, T.; Ikeda, A.; Matsuda, T.; Shinkai, S.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 339; Misumi, S.; *Top. Curr. Chem.* **1993**, *165*, 165.
78. Shinkai, S.; Nishi, T.; Matsuda, T.; *Chem. Lett.* **1991**, 437.
79. Inouye, M.; Ueno, M.; Kitao, T.; Tsuchiya, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8977; Kimura, K.; Yamashita, T.; Yokoyama, M.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 147; Kimura, K.; Yamashita, T.; Yokoyama, M.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1992**, 613; Inouye, M.; Ueno, M.; Kitao, T.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1639; Inouye, M.; Ueno, M.; Tsuchiya, K.; Nakayama, N.; Konishi, T.; Kitao, T.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5377; Inouye, M.; Noguchi, Y.; Isagawa, K.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1163.
80. Kimura, K.; Kaneshige, M.; Yamashita, T.; Yokoyama, M.; *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1251