



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***ESTUDO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR MODELOS MIMÉTICOS
E NÃO MIMÉTICOS: REAÇÕES DO GRUPO NITROSO E CATÁLISE
POR CICLODEXTRINAS***

Tese apresentada por **JACIR DAL
MAGRO** ao curso de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal
de Santa Catarina para obtenção de
Grau de Doutor em Química Orgânica

Orientador: PROF. Dr. ROSENDO A . YUNES
Co-Orientadora: PROF^a. Dr^a. MARIA DA GRAÇA DO NASCIMENTO

Florianópolis – 2000

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

Esta Tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador, co-orientadora e banca examinadora

Prof. Dr. Valdir Soldi
Coordenador

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes
Orientador

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
Co-Orientadora

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes
Orientador (UFSC-SC)

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
Co-Orientadora(UFSC-SC)

Prof. Dr. Valdir Soldi
(UFSC-SC)

Prof. Dr. José Paulo Moran
(UNICAMP – SP)

Profa. Dra. Antônia do Amaral
(USP-SP)

Prof. Dr. José Carlos Gesser
(UFSC-SC)

Florianópolis
Santa Catarina - Brasil
Dezembro de 2000

**“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu tamanho
original”.**

(Albert Einstein)

Aos meus pais Luiz e Ana, e toda
minha família pela certeza de sempre
poder contar com eles.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Rosendo Yunes, meu orientador desde o início de minha formação acadêmica, seu profundo conhecimento científico, sua amizade e seu exemplo estão e continuarão presentes em minha vida. Meu muito obrigado.

À professora Maria da Graça do Nascimento, minha co-orientadora, meus sinceros agradecimentos, pela dedicação e importante contribuição, principalmente na etapa final deste trabalho.

Aos professores Francisco Meijide del Rio e José Vazquez Tato, meus orientadores na Universidade de Santiago de Compostela, agradeço pela orientação, confiança e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, uma oportunidade que permitiu conhecer e conviver com pessoas que jamais esquecerei.

À professora Rozangela Curi Pedroza pelo incentivo, colaboração, amizade e cobrança em finalizar este trabalho.

Aos meus colegas e amigos Niro e Cechinel pela amizade, incentivo e convivência em toda este período.

Aos colegas de laboratório Ricardo, Tiago, Rosane, Rosania, Berenice, Renata, Míriam, Guedes, Angela, Obúlio, Marize, Tânia, João, Christiane, Valquíria, Paula, Julieta pela convivência e amizade. Também meu especial agradecimento aos amigos dos outros laboratórios: Paulo, Santiago, Passarinho, Jair, Edson, Arilson, Cláudio, Neide, Elisane, Evandro, Sandra, Karine, Jaime, Verinha, Sônia e outros.

Meus colegas do laboratório de Lugo e Universidade de Santiago de Compostela, Emílio, Laura, Pedro, Montze, Alex, Juan Carlos, Aida, Merce,

Agostin, Orti, José Traseira, Anand, Haidee, Minerva, entre outros, que fizeram com que minha passagem por lá se tornasse muito mais agradável e produtiva.

Aos funcionários e demais professores do Departamento de Química muito obrigado.

Ao CNPq, CAPES e CYTED pelo auxílio financeiro aqui e na Espanha.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	6
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	6
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
CAPÍTULO 3 - ESTUDO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR MODELOS NÃO MIMÉTICOS: REAÇÕES DE TRANSNITROSAÇÃO. NITROSAÇÃO DA 2-HIDROXIETILPIPERIDINA	8
3.1 - RELEVÂNCIA E CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS	09
3.1.1 - Estudo de Reações de Transnitrosação	09
3.1.2 - Reações de Nitrosação.....	10
3.1.3 - Reações de Nitrosação em Meio Ácido	13
3.1.4 - Reação de Nitrosação da Tiomorfolina (TM)	14
3.2 - PARTE EXPERIMENTAL.....	18
3.2.1 - Reagentes e Equipamentos.....	18
3.2.2 - Síntese do Nitroso composto.....	18
3.2.3 – Método Cinético	21
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.3.1 - Determinação da Absortividade Molar	23
3.3.2 - Estudo cinético e mecanismo da reação de nitrosação	28

CAPÍTULO 4 - ESTUDO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR MODELOS NÃO MIMÉTICOS: REAÇÕES DO GRUPO NITROSO. REAÇÃO DO NITROSOBENZENO COM N-METILHIDROXILAMINA	47
4.1 - RELEVÂNCIA E CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	48
4.2 - PARTE EXPERIMENTAL.....	52
4.2.1 - Materiais e Equipamentos	52
4.2.2 - Métodos Cinéticos	52
4.2.3 - Análise do Produto	54
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
CAPÍTULO 5 - ESTUDO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR MODELOS MIMÉTICOS: HIDRÓLISE DO ANIDRIDO BENZÓICO NA PRESENÇA DE DIFERENTES CICLODEXTRINAS	67
5.1 - RELEVÂNCIA E CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	68
5.1.1- CICLODEXTRINAS: DEFINIÇÃO, ORIGEM E ESTRUTURA.....	69
5.1.2. AS CICLODEXTRINAS COMO DE MODELOS ENZIMÁTICOS	74
5.2 - PARTE EXPERIMENTAL.....	80
5.2.1 - Reagentes e Equipamentos.....	80
5.2.2 - Procedimento Cinético e Determinação das Constantes de Equilíbrio.....	81
5.2.3 - Determinação da Estequiometria e das Constantes de Equilíbrio de Formação dos Complexos por RMN ¹ H.....	81
5.2.4 - Determinação da Estequiometria dos Complexos	82

5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES.....	103
BIBLIOGRAFIA.....	105

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Absortividade molar da 2-EP, HNO ₂ e 2EP-NO a 231,7nm.....	27
Tabela 2. Valores das velocidades iniciais a diferentes concentrações da 2-EP	33
Tabela 3. Valores das velocidades iniciais a diferentes concentrações de nitrito	35
Tabela 4. Valores das velocidades iniciais a diferentes concentrações de ácido	37
Tabela 5. Valores de velocidades iniciais e das constantes de velocidades a diferentes temperaturas para a reação de nitrosação da 2-EP. [2-EP]= 4x10 ⁻³ Mol/L, [HClO ₄]=0,05 Mol/L e [NaNO ₂]=5x10 ⁻⁴ Mol/L	45
Tabela 6. Constante de velocidade para a catálise ácida geral (k _{AH}) e básica geral (k _B) na formação de 2-oxima-1-metil-2-fenildiazeno a partir da reação entre a N-metilhidroxilamina e nitrosobenzeno	60
Tabela 7. Máximos de Job para alguns complexos de inclusão.....	84
Tabela 8: Logaritmos das constantes catalíticas por diferentes oxiânions para a reação de hidrólise do anidrido benzóico em água	98

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Espectro de UV-VIS do nitrosocomposto ($8,2 \times 10^{-4}$ Mol/L) sintetizado a partir da 2-EP, em água, força iônica de 0,5 Mol/L, pH=1,5 e 25°C. 20
- Figura 2.** Dependência da absorvância (A) em relação a concentração de 2-EP em água, $[\text{HClO}_4] = 0,075$ Mol/L, força iônica de 0,5 Mol/L (NaClO_4) à 25°C em $\lambda=231,7$ nm. 24
- Figura 3.** Dependência da absorvância (A) em relação a concentração de HNO_2 , em água, $[\text{HClO}_4] = 0,075$ Mol/L, força iônica de 0,5 Mol/L (NaClO_4) à 25°C e $\lambda=231,7$ nm. 25
- Figura 4.** Dependência da absorvância(A) em relação a concentração do nitrosocomposto da 2-EP em água, $[\text{HClO}_4] = 0,075$ Mol/L, força iônica de 0,5 Mol/L (NaClO_4) à 25°C em $\lambda=231,7$ nm. 26
- Figura 5.** Gráfico da dependência do pH (o) e condutividade (\square) em função do volume de HClO_4 , para a 2-EP com concentração de $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L, a 25°C29
- Figura 6.** Gráfico da dependência do pD (o) e condutividade (\square) em função do volume de HClO_4 , para a 2-EP, com concentração de $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L, à 25°C31
- Figura 7.** Dependência da Velocidade Inicial para a Reação da 2-EP com o Ácido Nitroso, com Relação a Concentração da 2-EP, $[\text{HClO}_4]=0,05$ mol/L e $[\text{NaNO}_2] = 5 \times 10^{-4}$ mol/L à 25°C34

Figura 8. Dependência da velocidade inicial para a reação da 2-EP com o ácido nitroso, com relação a concentração de nitrito, $[\text{HClO}_4]=0,05\text{M}$, $[2\text{-EP}] = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$ à 25°C .	36
Figura 9. Dependência da velocidade inicial para a reação da 2-EP com o ácido nitroso, a diferentes concentrações de ácido Perclórico, $[\text{NaNO}_2] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ e $[2\text{-EP}] = 6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ à 25°C .	38
Figura 10. Gráfico dos valores de $\ln k \times 1/T$ para a reação de nitrosação da 2-EP. $[2\text{-EP}]= 4 \times 10^{-3} \text{ Mol/L}$, $[\text{HClO}_4]=0,05 \text{ Mol/L}$ e $[\text{NaNO}_2]=5 \times 10^{-4} \text{ Mol/L}$	45
Figura 11. Dependência das constantes de velocidades (k_2) em função do pH para a reação da fenilhidroxilamina com nitrosobenzeno.	51
Figura 12. Espectro de UV-VIS do nitrosobenzeno ($6,67 \times 10^{-5} \text{ Mol/L}$) em água, força iônica de $1,0 \text{ Mol/L}$ (KCl), $\text{pH}=7$ à 25°C	54
Figura 13. Cromatogramas da reação entre N-metilhidroxilamina ($0,1 \text{ Mol/L}$) e nitrosobenzeno ($0,1 \text{ Mol/L}$) em metanol para diferentes tempos de reação: 5a. 3 Minutos; 5b. 30 Minutos e 5c. 60 Minutos.	55
Figura 14: Espectro de massas do nitroso benzeno, feito a partir das análises de cromatografia.	56
Figura 15: Espectro de massas do produto da reação, obtido a partir das análises cromatográficas (Figura 13) (tempo de reação = 60 minutos).	56

Figura 16: Variação do logaritmo da constante de velocidade de segunda ordem em função do pH para a reação de N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno em água, à 25°C e força iônica 1 Mol/L (KCl)..	59
Figura 17: Gráfico de Brønsted para a etapa de desidratação da reação entre N-metilhidroxilamina e nitrosobenzeno por catálise ácida geral, em água, à 25°C e força iônica 1M (KCl) $\alpha = 0,34$ ($r = 0,99$).	61
Figura 18: Gráfico de Brønsted para a etapa de desidratação da reação entre N-metilhidroxilamina e nitrosobenzeno por catálise básica geral, em água, à 25°C e força iônica 1M (KCl) $\beta = 0,20$ ($r = 0,98$).	62
Figura 19: Formação das ciclodextrinas por ligações α -(1,4) da glicose	69
Figura 20. Dimensões moleculares e estrutura das ciclodextrinas	69
Figura 21. Estrutura cônica das ciclodextrinas.	70
Figura 22. Molécula de ciclodextrina, indicando a orientação dos grupos OH dos carbonos 2, 3 e 6.	70
Figura 23. Esquema da estrutura funcional da ciclodextrina.	71
Figura 24: Esquema da formação de um complexo de inclusão.	72
Figura 25: Principais tipos de complexos de inclusão.	73
Figura 26 . Estrutura de uma enzima artificial formada por β -CD	75
Figura 27. Estratégia empregada para mimetizar a função dos resíduos carregados positivamente na Cu,Zn-SOD por formação de complexos de inclusão de derivados de CD com sais de amônio quaternários.	76

Figura 28. Metaloenzima artificial descrita em 1970 por Breslow.	77
Figura 29. Complexo de Zn^{2+} com a mono-6-dietilentriamino-6-deoxi- β -CD.....	78
Figura 30. Sistema mimético do citocromo P-450 baseado em um derivado tetramérico da β -ciclodextrina ligada a uma metaloporfirina	79
Figura 31. Espectro do anidrido benzóico ($3,33 \times 10^{-5}M$) em em água a 25 °C, força iônica de 0,5M (NaCl)	80
Figura 32. Representação de Job segundo a fração molar de ciclodextrina (esquerda) e hóspede (direita), para uma estequiometria n:m	83
Figura 33: Espectro de 1H -RMN (300MHz) da β -ciclodextrina em $D_2O/MeOD$ 50%	85
Figura 34: Espectro de 1H -RMN (300MHz) do anidrido benzóico em $D_2O/MeOD$ 50%.....	86
Figura 35: Variação da constante de velocidade de primeira ordem em função do pH para a reação de hidrólise do anidrido benzóico em água, à 25°C e força iônica 0,5M (KCl).	87
Figura 36: Variação de k_{obs} em função da concentração de benzoato de sódio para a reação de hidrólise do AnB, à 25 °C, pH=7,0, força iônica de 0,5M (NaCl) e $[AnB] = 3,33 \times 10^{-5} Mol/L$	89

Figura 37: Gráfico de $[1 / (k_{obs} - k_{un})]$ em função de diferentes concentrações crescentes de $1/[\beta\text{-CD}]$, 25°C , $\mu=0,5\text{ Mol/L}$ (KCl), para a reação de hidrólise do AnB.....	91
Figura 38: Variação das constantes de velocidade pseudo-primeira ordem k_{obs} menos k_{un} $[1 / (k_{obs} - k_{un})]$ em função do inverso da concentração de $\beta\text{-CD}$ sulfatada para a reação de hidrólise do AnB, à 25°C , $\mu=0,5\text{ Mol/L}$ (KCl).	92
Figura 39: Representação de Job obtidos através dos valores de deslocamentos químicos dos átomos H-3, H-5 e H-6 da $\beta\text{-CD}$. Os pontos correspondem aos valores experimentais. A linha cheia corresponde ao ajuste teórico de um complexo 1:1.....	93
Figura 40: - Representação do complexo $\beta\text{-ciclodextrina-anidrido benzóico}$	94
Figura 41: - Representação de Job obtidos através dos deslocamentos químicos dos átomos H-2, H-3 e H-4 da AnB. Os pontos correspondem aos valores experimentais. A linha corresponde ao ajuste teórico de um complexo 1:1	95
Figura 42: - Representação de Job obtidos através dos deslocamentos químicos do átomo H-4, H-3 e H-2 do AnB na presença de $\beta\text{-CD}$ sulfatada. Os pontos correspondem aos valores experimentais. A linha corresponde ao ajuste teórico de um complexo 1:1	96
Figura 43: Representação esquemática do complexo $\beta\text{-ciclodextrina sulfatada-anidrido benzóico}$	97
Figura 44: Gráfico de Bronsted para a reação de hidrólise do anidrido benzóico na presença de diferentes bases oxigenadas e $\beta\text{-CD}$ e $\beta\text{-CD}$ sulfatada em água, 25°C e força iônica $0,5\text{M}$ (KCl).....	99

ABREVIATURAS

CD: ciclodextrina

β -CD : β -ciclodextrina

CDS: β -ciclodextrina sulfatada

2-EP: 2-etilpiperidina

TM: Tiomorfolina

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

NB: Nitrosobenzeno

EDV: Etapa determinante da velocidade

AnB: Anidrido benzóico

SOD: Superóxido dismutase

CI: Complexo de Inclusão

ANC: anidrase carbônica

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se como modelo não mimético de enzima reações do grupo nitroso e como mimético a hidrólise do anidrido benzóico na presença de diferentes ciclodextrinas.

A reação de nitrosobenzeno com N-metilhidroxilamina foi estudada em uma faixa de pH de 0 a 12 em água. A reação acontece em duas etapas; primeiro ocorre o ataque da amina sobre o grupo nitroso para formar um intermediário tetraédrico e a seguir a desidratação deste, formando os produtos. Pelo perfil de pH observa-se uma quebra de linearidade entre pH 0,5 e 3,0 causada pela mudança da etapa determinante da velocidade (EDV) da reação, sendo que a pH baixo a EDV é o ataque do nucleófilo, e para pH acima de 3 a EDV, é a desidratação do intermediário tetraédrico. Este comportamento é diferente do apresentado pela reação entre a fenilhidroxilamina e nitrosobenzeno, que mostra um mecanismo de reação com a desidratação do intermediário tetraédrico como única EDV, confirmando o comportamento especial da fenilhidroxilamina como nucleófilo.

O mecanismo da reação de nitrosação da 2-etilpiridina (2-EP) foi estudado em meio ácido (0,05-0,30 Mol/L HClO_4) aquoso. A reação é de primeira ordem com relação ao nitrito, amina e independente do pH. O estudo da reação em D_2O , mostrou um efeito isotópico de 1,97. O valor para energia de ativação de 42,23KJ/Mol pode ser explicado em termos do mecanismo no qual a transferência do grupo nitroso e a perda simultânea de um próton constitui a EDV da reação. Uma comparação com a nitrosação da tiomorfolina (TM) e com a nitrosação por alquil nitrito, é discutida.

A hidrólise do anidrido benzóico (AnB) na presença de β -ciclodextrina (β -CD) e β -ciclodextrina sulfatada (CDS) foi também estudada. Esta reação, foi catalisada pela CDS e β -CD. Os dados sugerem que a catálise é nucleofílica, e é devido aos grupos hidroxilas secundários no caso da β -ciclodextrina, e aos grupos SO_3^- no caso da β -ciclodextrina sulfatada. A correlação de Brønsted de diferentes bases oxigenadas, mostrou que o valor obtido para a CDS foi de 6 unidades de logaritmo acima do valor correspondente ao seu pKa, na linha de correlação. Um

aumento de 10^6 vezes na constante de velocidade de hidrólise do AnB, pode ser considerado como equivalente à catálise enzimática ($10^6 - 10^{12}$ vezes).

ABSTRACT

In this work, it was studied as enzymatic non mimetic model, reactions of nitroso group and as mimetic the hydrolysis of benzoic anhydride in the presence of β -cyclodextrines.

The reaction of nitrosobenzene with N-methylhydroxylamine was studied. The pH-rate profile exhibits a negative break between pH 0.5 and 3.0, that is considered to be caused by a change of the rate-determining step of the reaction from the attack of the amine on nitrosobenzene at low pH, to the dehydration of an addition intermediate previously formed between the reagents at higher pH. This behavior was different from that of the reaction between N-phenylhydroxylamine and nitrosobenzene where, in over all pH range, the only rate-determining step was the dehydration of the addition intermediate. This fact confirms the special behavior of phenylhydroxylamine as a nucleophile as was observed in the reaction with aromatic aldehydes.

The reaction mechanism of 2-hydroxyethylpiperidine (2-EP) nitrosation has been studied in acid ($0.05\text{-}0.30 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$) aqueous media. The reaction rate was first order with respect to nitrite and amine and independent of acid. From studies in D_2O , an isotopic effect of 1.97 for the rate determining step was obtained. These facts, together with the value of $42,23 \text{ KJ mol}^{-1}$ for the activation energy, can be explained in terms of a mechanism in which the internal nitroso group transfer (from an O-nitroso intermediate) and the simultaneously loss of a proton, constitutes the rate limiting step. A comparison with thiomorpholine(TM) nitrosation and with that of amines by alkyl nitrites in basic media was also discussed.

The hydrolysis of benzoic anhydride in the presence of β -cyclodextrin (β -CD) and sulfated β -cyclodextrin (CDS) have also been studied. This reaction, was catalysed by CDS and β -CD. The data suggested that the catalysis was nucleophilic, and was due to secondary hydroxyl groups in the case of β -cyclodextrin and SO_3^- in the case of sulfated β -cyclodextrin. Brønsted correlation, which correlates the logarithm of rate constant vs different oxygenated bases pKa's,

showed that the obtained value for CDS was about 6 units above the corresponding pKa. An increase of 10^6 times in the rate constant for AnB hydrolysis, can be considered as na equivalent for enzymatic catalysis ($10^6 - 10^{12}$)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Em sistemas naturais as reações raramente ocorrem na ausência de catalisadores. Estes catalisadores são proteínas denominadas de enzimas que possuem alta especificidade e poder para aumentar a velocidade das reações.

O alto poder catalítico das enzimas em condições suaves de temperatura e pH tem despertado interesse dos cientistas não meramente acadêmico, mas com a possibilidade de utilizá-las em inúmeras aplicações industriais, como síntese de diferentes produtos e planejamento sintético de fármacos.¹

Estes estudos também podem permitir obtenção de catalisadores não protéicos que possam ser usados em sínteses industriais em condições nas quais uma enzima é degradada.^{2,3,4}

O poder de catálise efetuada pelas enzimas está condicionado a três fatores principais: 1) Proximidade, onde através de interações não covalentes estabelecidas com o substrato, as enzimas conseguem estabilizá-lo numa posição onde o centro catalítico encontra uma posição adequada para o ataque; 2) Distorção, onde a enzima faz com que o substrato atinja uma conformação parecida com o estado de transição, fazendo com que a energia da reação seja diminuída e 3) Efeito do meio, onde o substrato sofre uma mudança de solvatação quando no sítio ativo da enzima, considerado geralmente como um meio apolar, provoca um aumento na nucleofilicidade de certos grupos reativos como hidroxilas em que polaridades adequadas fornecem grande catálise para reação.

Os estudos do mecanismo de reação enzimática são realizados através de dois modelos simples: 1) não mimético, que consiste no estudo de mecanismos de reações orgânicas que se correspondem com os mecanismos enzimáticos como catálise ácida e/ou básica geral, catálise nucleofílica, catálise intramolecular, etc. 2) mimético, que é feito usando compostos que apresentam características semelhantes às enzimas tais como ciclodextrinas, polímeros, calixarenos, etc.

Não há dúvidas de que o conhecimento do mecanismo de catálise enzimática passa pelo estudo de mecanismos de reações orgânicas simples em solução, como por exemplo, os mecanismos de catálise ácida ou básica geral, catálise nucleofílica, catálise intramolecular, etc.^{5,6}

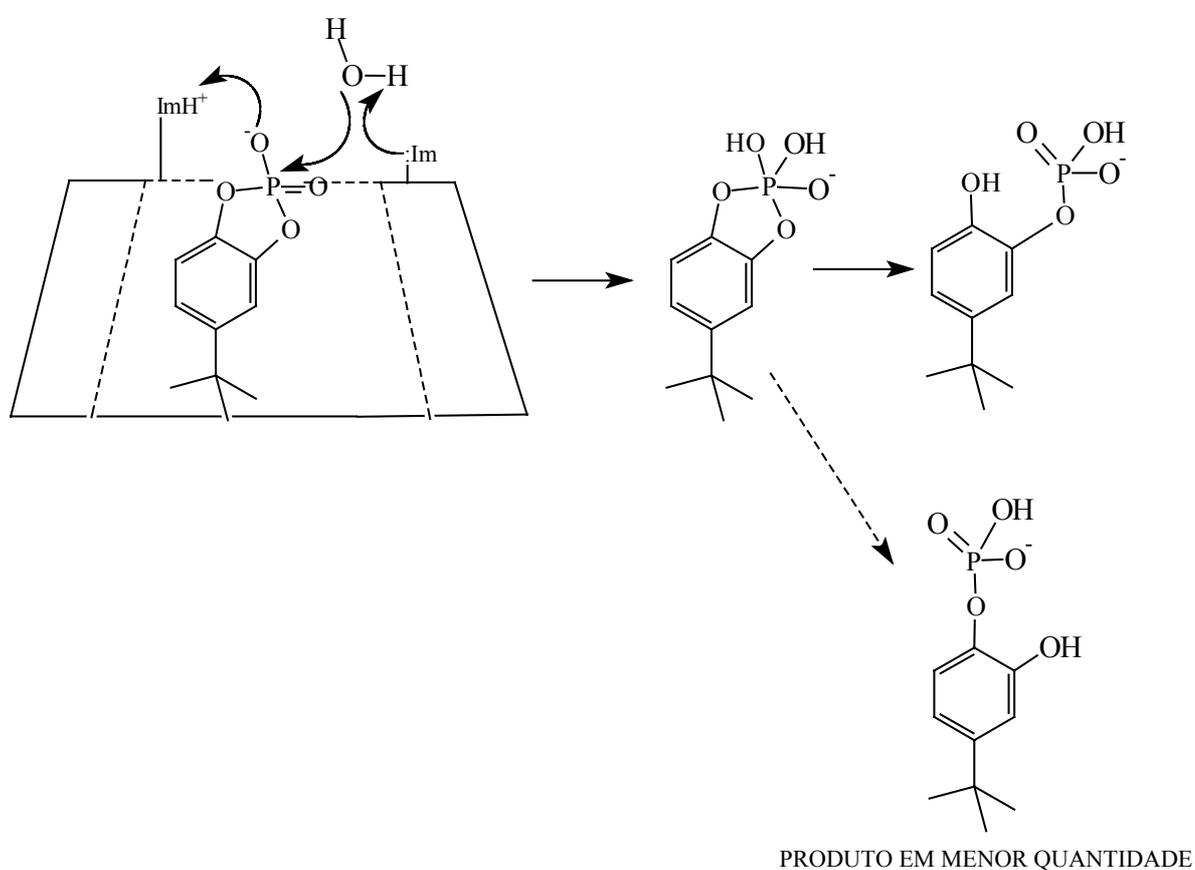
As ciclodextrinas (CDs) tem sido largamente utilizadas como modelos miméticos de enzimas principalmente porque possuem alta solubilidade em água, e versatilidade de realização de estudos com o composto hóspede. A sua estrutura molecular é bem conhecida e os grupos hidroxilas que geralmente atuam como “sítio ativo” da catálise encontram-se próximos a cavidade. Pode-se ainda introduzir uma enorme variedade de grupos funcionais nas ciclodextrinas através de reações com os grupos hidroxilas.⁶

Logo após terem sido descobertas, as atividades catalíticas das CDs foram reconhecidas.⁷ Bender e colaboradores realizaram estudos detalhados e sistemáticos da hidrólise de acetatos de fenilas na presença de CDs, encontrando significativa especificidade das ciclodextrinas pelos substratos.^{8,9}

As amidas são moléculas relativamente estáveis e de difícil hidrólise na ausência de enzimas naturais, requerendo condições de reação muito ácidas ou básicas. As ciclodextrinas tem sido pouco efetivas na catálise deste tipo de reação. Nem mesmo seus derivados orgânicos tem alcançado sucesso. Entretanto, Komiyama e Bender em seus estudos observaram que as CDs são efetivas para a hidrólise de anilidas ativadas, tais como, 2,2,2-trifluoracetanilidas.¹⁰ A proposta de mecanismo, é que os íons alcóxidos formados a partir dos grupos hidroxilas secundários fazem um ataque nucleofílico no substrato introduzido na cavidade da CD, e formando um intermediário tetraédrico que seria decomposto posteriormente através de catálise ácida de outro grupo hidroxila da CD. Dipeptídeos e tripeptídeos foram eficientemente hidrolisados pela combinação de íon cério (Ce^{IV}) e γ -CD.¹¹

Breslow estudou modelos de enzimas artificiais para a hidrólise de RNA com CDs modificadas. Ele propôs um modelo em que combinações ideais de catalisador-substrato formou um único produto, simulando com sucesso o sítio ativo da ribonuclease.¹²

Foram usados três isômeros de β -CDs funcionalizadas com dois grupos imidazóis em diferentes unidades de glicose, mostrando que quando o substrato está colocado em posição geométrica adequada e em pH ótimo, um grupo imidazol neutro atua como catalisador básico enquanto que o outro protonado funciona simultaneamente como catalisador ácido, simulando o sítio ativo de uma enzima (**Esquema 1**).

**ESQUEMA 1**

Neste trabalho, estudaram-se modelos miméticos e não miméticos de catálise enzimática. Foram estudadas reações do grupo nitroso e transnitrosação (Capítulos 3 e 4) como modelo não mimético e a de hidrólise

do anidrido benzóico na presença de duas ciclodextrinas (CDs) como modelo mimético(Capítulo 5).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Estudar a catálise enzimática por modelos miméticos e não miméticos através de reações do grupo nitroso e catálise por ciclodextrinas.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1- Estudo de reações transnitrosação

Nitrosação da 2-hidroxiethylpiperidina avaliando os seguintes itens:

- Determinação do pKa da 2-hidroxiethylpiperidina em H₂O e D₂O;
- Estudo da reação em meio de ácido perclórico aquoso;
- Efeito isotópico;
- Estudo da influência da temperatura.

2- Estudo do mecanismo da reação da N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno avaliando os seguintes itens:

- Perfil da velocidade da reação em função do pH;
- Estudo da catálise ácida e básica geral em relação a diferentes catalisadores;
- Equação de Brønsted.

3- Estudo do mecanismo da hidrólise do anidrido benzóico em meio aquoso alcalino avaliando os seguintes aspectos:

- Perfil da velocidade de hidrólise em relação ao pH;
- Mecanismo de catálise para reação;
- Catálise da hidrólise da reação frente a diferentes bases oxigenadas;
- Catálise de hidrólise do AnB na presença da β-ciclodextrina nativa e β-ciclodextrina sulfatada, em H₂O e D₂O;
- Comparação das catálises por diferentes bases oxigenadas com as efetuadas pela β-CD e CDS respectivamente, através da Equação de Brønsted.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR MODELOS NÃO MIMÉTICOS: REAÇÕES DE TRANSNITROSAÇÃO. NITROSAÇÃO DA 2-HIDROXIETILPIPERIDINA.

3.1 – RELEVÂNCIA E CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

3.1.1 - Estudo de Reações de Transnitrosação

Compostos N-nitroso devem ser considerados como potencialmente cancerígenos para o homem. Isto tem levado a estudar determinados aspectos como possíveis vias de exposição a estes compostos. As vias pelas quais o homem se expõe a estes compostos químicos são fundamentalmente quatro: ingestão, inalação, contato dérmico e formação *in vivo*. No que se refere ao último ponto, vários autores têm comprovado a formação de N-nitrosocompostos *in vivo* ao administrar em diversos animais de laboratório seus precursores imediatos (aminas aromáticas e alifáticas, aminoácidos, amidas, etc.) e agentes nitrosantes portadores do grupo nitroso.^{13,14}

Os compostos precursores estão presentes em alimentos como peixes ou naqueles em que são obtidos por fermentação microbiana, como no caso das verduras. O precursor mais abundante de tais agentes é o nitrito de sódio que como mencionado, é produzido por alimentos principalmente na redução microbiana de nitratos em verduras, e também pode ser utilizado como bactericida (contra o *Clostridium botulinum*) em embutidos derivados de carne.

Normalmente hortaliças como alface e espinafre possuem concentração relativamente alta de nitratos nos tecidos de suas folhas. A alface quando cultivada por sistema de hidroponia chega a atingir um nível de nitrato de até 4 vezes superior à cultivada de maneira convencional, dependendo da quantidade de nitrogênio utilizada na solução utilizada em seu cultivo. Na Europa, têm-se estabelecido valores máximos permissíveis para a concentração de nitratos em hortaliças, sendo que os limites tolerados para a alface por exemplo, varia de 3,500 a 4,500 mg de nitrato por quilograma de peso fresco.¹⁵

O nitrato quando ingerido junto aos alimentos, no trato digestivo pode ser reduzido a nitrito que por sua vez produz principalmente nitrosaminas ou entra na corrente sangüínea oxidando o átomo de ferro da hemoglobina ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) tornando-a inativa ao transporte de oxigênio (metahemoglobina).¹⁵

Além de alta concentração de nitrito e nitrato, nas folhas de espinafre são encontrados diversos compostos nitrosoaromáticos que são de conhecida atividade carcinogênica.¹⁶

A alquilação do DNA é considerada como sendo a principal etapa na indução do câncer para muitos compostos químicos. Estudos revelaram que derivados do aminoácido glicina nitrosados tem este efeito quando em contato com DNA *in vitro*, o que pode explicar a freqüente detecção destes no DNA gastrointestinal.¹⁷

Em geral, sempre tem-se considerado que a formação de N-nitrosocompostos requer necessariamente condições ácidas como a do estômago, ignorando-se por este motivo sua formação em condições básicas e neutras.

Nas pesquisas com intenção de modelar *in vitro* os processo biológicos, também tem-se ignorado que determinados grupos químicos podem atuar como receptores iniciais do grupo nitroso e em uma etapa posterior como verdadeiros agentes nitrosantes. Estes tipos de compostos, podem ser denominados de transportadores do grupo nitroso.

A nitrosação da tiomorfolina, é um exemplo claro da transferência do grupo NO do primeiro centro nucleofílico, o átomo de enxofre até o átomo de nitrogênio para formar o N-nitrosocomposto.¹⁸

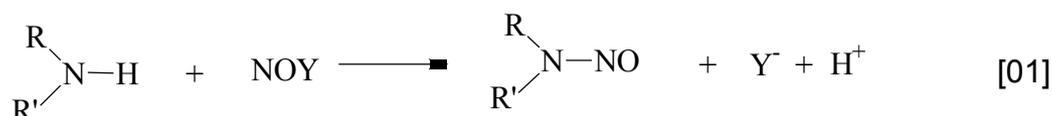
A transnitrosação, que é o principal interesse deste trabalho, será analisado em detalhes neste estudo. A transferência interna do grupo nitroso que ocorre através de um intermediário, requer uma conformação especial com uma série de implicações no mecanismo da reação.

3.1.2- Reações de nitrosação

A nitrosação pode ser definida como o processo de trocar um átomo de hidrogênio em uma molécula pelo grupo nitroso. As reações de nitrosação que se conhecem ocorrem com os átomos de carbono, oxigênio, enxofre e

nitrogênio, denominando-se respectivamente, C-, O-, S- e N-nitrosação, sendo esta última a que mais interessa neste trabalho.

De forma esquemática, as reações de nitrosação de aminas secundárias podem ser representadas pela Equação 1;



onde o primeiro reagente é uma amina secundária (que recebe o nome de substrato nitrosável) e NOY é o agente nitrosante.

Os agentes nitrosantes devem ser substâncias capazes de transferir a espécie NO^+ , e podem ser classificadas em dois grupos principais; inorgânicos e orgânicos. Dentro do grupo dos agentes nitrosantes inorgânicos tem-se, sais do íon nitrosonium como o NO^+BF_4^- ; ¹⁹ trióxido de dinitrogênio N_2O_3 , na fase gasosa ^{20,21} e em soluções orgânicas ²² ou aquosas, ^{23,24} tetróxido de dinitrogênio N_2O_4 , na fase gasosa, ^{21,25} em soluções orgânicas ou aquosas, ²⁶ haletos de nitrosilo como NOF, NOCl, NOBr e NOI em soluções aquosas e orgânicas. ^{27,28} Complexos de nitrosilo como o $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$, ²⁹ e monóxido de nitrogênio, NO, na presença de catalisadores, também são consideradas agentes nitrosantes. ²⁴

Os principais agentes nitrosantes orgânicos são; N-nitrosaminas e N-nitrosamidas que participam de reações que podem transferir o grupo nitroso a outros substratos. Estas reações são conhecidas como trans-nitrosação. ^{24,30,31} Outros agentes nitrosantes são; nitritos e tionitritos de alquila, RONO e RSNO, em solventes orgânicos e em água, ²⁴ e nitrocompostos, RNO_2 . ³²

Os nitrosocompostos são os principais produtos que resultam do processo de nitrosação e seu estudo é de considerável importância em áreas como a química, medicina e biologia. O interesse médico e biológico reside no fato de que um grande número de N-Nitrosocompostos encontrados em várias espécies animais, ^{33,34,35,36,37,38,39} incluindo os primatas ⁴⁰ são fortemente carcinogênicos. Além disto, uma série de experimentos em animais permitiram

observar que estes compostos exercem seu efeito diretamente no local da aplicação,⁴⁰ e que as nitrosaminas agem em órgãos específicos.⁴¹ Baseando-se nestes fatos, definem-se as primeiras como carcinogênicos primários e as segundas como carcinogênicos secundários.

O interesse no estudo de N-nitrosocompostos apresentou maior importância quando se demonstrou que uma doença rara do fígado em ruminantes e bisões, investigada na Noruega no período de 1957-1962, estava relacionada com a alimentação destes animais. Esta alimentação baseada em farinhas de peixe, havia sido conservada em nitrito sódico, e a substância tóxica foi identificada como sendo uma N-nitrosamina,^{42,43} formada pela interação do nitrito de sódio com as aminas presentes nos peixes.

Levando-se em conta as considerações anteriores, deduz-se que pode haver perigo para o homem por duas vias;

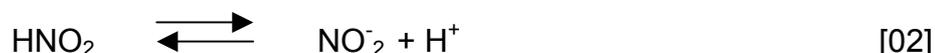
- Por ingestão de N-nitrosocompostos formados no ambiente; por exemplo em muitos alimentos e tabacos,⁴⁴ e
- Por síntese *in vivo* de N-nitrosocompostos, a partir de nitritos e substâncias nitrosáveis, ingeridas como aditivos ou constituintes naturais dos alimentos ou medicamentos (comprovada através de estudos *in vivo* no suco gástrico animal e humano).⁴⁵

Do ponto de vista dos mecanismos de reação, os agentes nitrosantes são substâncias eletrofílicas, e as aminas nucleofílicas. Algumas destas últimas, com seu átomo de nitrogênio protonado, podem ter um segundo centro nucleofílico, que sofre nitrosação e o N-nitrosocomposto pode ser obtido depois de uma transferência do grupo NO para o átomo de nitrogênio. Este segundo centro nucleofílico pode ser por exemplo um anel aromático; na nitrosação de aminas aromáticas com alta acidez,^{46,47,48,49} um átomo de oxigênio, na reação ácido nitroso – hidroxilamina com alta acidez;^{50,51} um átomo de nitrogênio, pela reação com o ácido nitroso – hidrazina;^{52,51} ou um átomo de enxofre na nitrosação da tioprolina.⁵³

Este comportamento também pode ocorrer quando o átomo de nitrogênio não protonado é menos nucleofílico que os outros na molécula; como na nitrosação de amidas e uréias,^{54,55,56} tiuréias⁵⁷ e triptofano.⁵⁵

3.1.3 - Reações de Nitrosação em Meio Ácido

Em solução aquosa de ácidos minerais, os sais do íon nitrito formam ácido nitroso segundo o equilíbrio ácido-base mostrado nas Equação 2;



Sendo a constante de equilíbrio expressa pela Equação 3;

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{NO}_2^-]}{[\text{HNO}_2]} \quad [03]$$

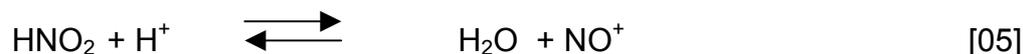
O pK_a para este ácido fraco, é de 3,4.⁵⁸

Em solução aquosa, o ácido nitroso se encontra em equilíbrio com outras espécies, tais como o trióxido de dinitrogênio, N₂O₃, íon NO⁺ e espécies na forma NOX, onde o X pode ser um haleto, um alcóxido RO⁻ ou uma molécula neutra como um tiocomposto, resultando neste caso em um derivado catiônico.

A protonação do ácido nitroso pode gerar duas espécies (Equações 4 e 5);

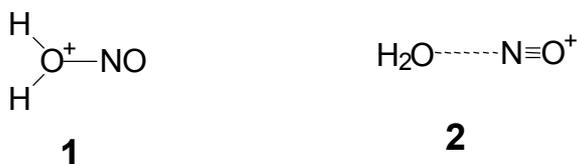


ou



denominadas respectivamente de íon nitrosacídico e nitrosônio.

O íon nitrosacídico pode assumir duas formas limites, **1** e **2**:⁵⁹



Nestas duas formas, existe um deslocamento da forma **1** para **2** quando altera-se de soluções aquosas ácidas diluídas para concentradas. Isto é, para soluções com pH relativamente baixos a ligação entre a molécula de água e o íon nitrosônio é fraca e em meios ácidos diluídos é forte.⁶⁰

3.1.4 - Reação de Nitrosação da Tiomorfolina (TM)

As experiências feitas para esta reação demonstram que a equação de velocidade pode ter duas expressões diferentes, de acordo com a acidez do meio onde a mesma é efetivada. Duas equações de velocidade são indicadas, junto com o mecanismo de reação proposto em cada caso.¹⁸

a) Alta acidez (pH=1.05 - 0,31 M):

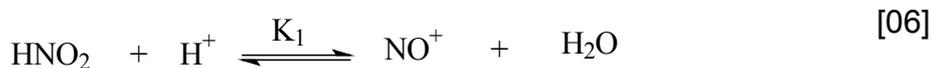
A equação de velocidade obtida foi:

$$v_0 = k_{(\text{H}_2\text{O})} \cdot [\text{nitrito}]_0 \cdot [\text{TM}]_0$$

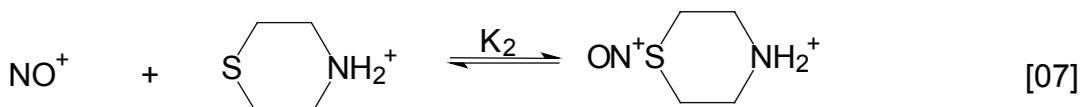
sendo $k_{(\text{H}_2\text{O})} = (5,70 \pm 0,18) \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

O mecanismo de reação que justifica este valor engloba as seguintes etapas:

1. Formação do íon nitrosônio (efetivo agente nitrosante):



2. Formação do intermediário S-nitroso em equilíbrio com os reagentes NO^+ e tiomorfolina protonada:



Deve-se ressaltar que a tiomorfolina protonada está presente no meio em uma concentração muito superior a livre, em virtude do valor de pKa elevado, que é 8,48.

3. Equilíbrio ácido-base do intermediário S-nitroso com sua forma desprotonada:



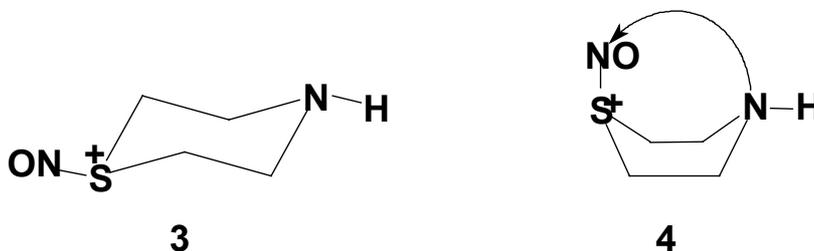
4. Etapa lenta, formação do N-nitroso composto:



Para determinar como ocorreu a etapa lenta, a reação foi estudada em D₂O. Concluiu-se, que esta engloba uma reordenação e perda simultânea de próton já que o efeito isotópico observado não foi elevado;

$$k_H / k_D = 1,67 \pm 0,11 \quad [10]$$

Estes estudos, demonstraram que a conformação termodinâmica mais favorável para o intermediário S-nitroso na forma desprotonada, possui o grupo nitroso em posição equatorial (**3**). Entretanto, a transferência interna do grupo nitroso do átomo de S até o átomo de N exige uma conformação de barco (**4**):



A passagem da conformação de cadeira para barco requer uma energia suficientemente elevada para controlar simultaneamente a perda do próton e a

velocidade da reação. Para o ciclohexano, a diferença de energia entre ambas as conformações é de $30\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, e a energia de ativação de um processo análogo é de $46\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Como estes dados correspondem a um anel de seis membros, pode-se esperar valores semelhantes para a diferença de energia entre as conformações (3) e (4) da tiomorfolina. O valor médio para a energia de ativação foi de $86\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

b) **Baixa acidez (pH= 2,3 – 3,6):**

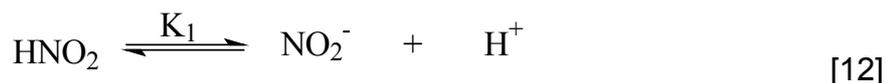
A equação de velocidade 11, foi obtida em baixa acidez;

$$v_0 = \frac{k_{(H_2O)} \cdot [\text{nitrito}]_0^2 \cdot [\text{TM}]_0 \cdot [\text{H}^+]}{(K_a + [\text{H}^+])^2} \quad [11]$$

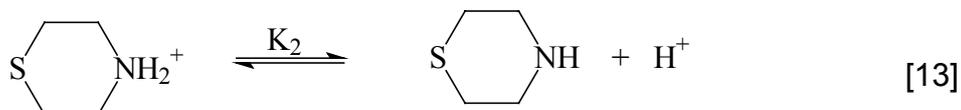
sendo $k_{(H_2O)} = (6,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

O mecanismo de reação proposto apresenta-se com duas etapas:

1. O equilíbrio ácido-base entre o ácido nitroso e sua forma desprotonada;



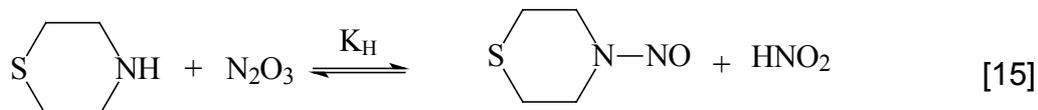
2. O equilíbrio ácido-base entre a tiomorfolina e sua forma desprotonada;



3. Formação do trióxido de dinitrogênio (efetivo agente nitrosante);



4. Etapa lenta, formação do N-nitrosocomposto;



A diferença dos meios de maior e menor acidez é que na última, a reação ocorre por nitrosação direta no átomo de nitrogênio da tiomorfolina sem estar protonada. Este mecanismo de reação é típico de outras aminas que não possuem um segundo centro nucleofílico.

Assim, propõe-se estudar a nitrosação da 2-hidroxiethylpiperidina. Esta amina possui um segundo centro nucleofílico, um átomo de oxigênio, que poderia reagir inicialmente com o agente nitrosante. Mas este átomo se encontra em uma cadeia lateral flexível, e assim espera-se que a transferência do grupo nitroso desta até o átomo de nitrogênio não encontre grandes impedimentos, e não precise de conformações especiais. Propõe-se estudar detalhadamente a reação em condições experimentais de temperatura, acidez e força iônica similares às utilizadas na nitrosação da tiomorfolina. Este estudo inclui também, efeito isotópico de solvente.

Da análise comparativa dos resultados de nitrosação de ambos substratos nitrosáveis poderão surgir interessantes discussões sobre o mecanismo de nitrosação de aminas com um segundo centro nucleofílico. Para que os objetivos possam ser alcançados, o substrato escolhido apresenta estrutura favorável para que a transferência interna possa ser comprovada.

3.2 - PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 - Reagentes e Equipamentos

As medidas de condutividade e de pH foram feitas em um aparelho CRISON 525 com eletrodo de platina SCHOTT modelo CG825.

As cinéticas foram realizadas em um aparelho de marca VARIAN modelo CARY/1E.

Os reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente e estão citados a seguir: 2-(hidroxiethyl)piperidina 97%, $C_7NH_{14}OH$ (ALDRICH), Nitrito de sódio, $NaNO_2$ (PANREAC, seco em estufa), Ácido perclórico 70%, $HClO_4$ (PANREAC), perclorato sódico mono-hidratado, $NaClO_4 \cdot H_2O$ (PANREAC), éter de petróleo 40-60°C (PANREAC), éter dietílico, $C_2H_5OC_2H_5$ (PANREAC), Sulfato de sódio anidro, Na_2SO_4 (PROBUS), H_2O de qualidade milli-Q, Água deuterada > 99,9%, $\rho = 1,11 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D_2O .

3.2.2 - Síntese do Nitrosocomposto

0,5 g de 2-EP (3,87 mmols), foram colocados em um balão de fundo redondo de 50 mL e adicionou-se aproximadamente 10 mL de água.

O $NaNO_2$ é adicionado em excesso (10 vezes) porque parte dele se decompõe em meio ácido e parte reage com a amina. Para isso, paralelamente, pesou-se 2,67 g de $NaNO_2$ ($3,87 \cdot 10^{-2}$ mols) e dissolveu-se em 5 mL de água. As duas misturas foram feitas e colocadas em um balão de fundo redondo sobre agitação constante em agitador magnético. A seguir, foram adicionados à mistura 3mL de $HClO_4$ a 70% para se obter um pH=1-2, deixando-se reagir por um dia a temperatura ambiente.

A mistura reacional foi extraída 3 vezes com éter de petróleo (100mL) e a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em rotaevaporador. O produto seco foi armazenado.

O produto obtido, foi caracterizado por espectroscopia UV-Vis, dissolvendo-o em água suficiente para obter uma concentração de $8,22 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Foram observados dois valores máximos de absorbância em 231,7 e 365 nm. O aparecimento destes dois máximos é indicativo que o produto obtido é o nitrosocomposto da 2-EP(**Figura 1**).⁶¹

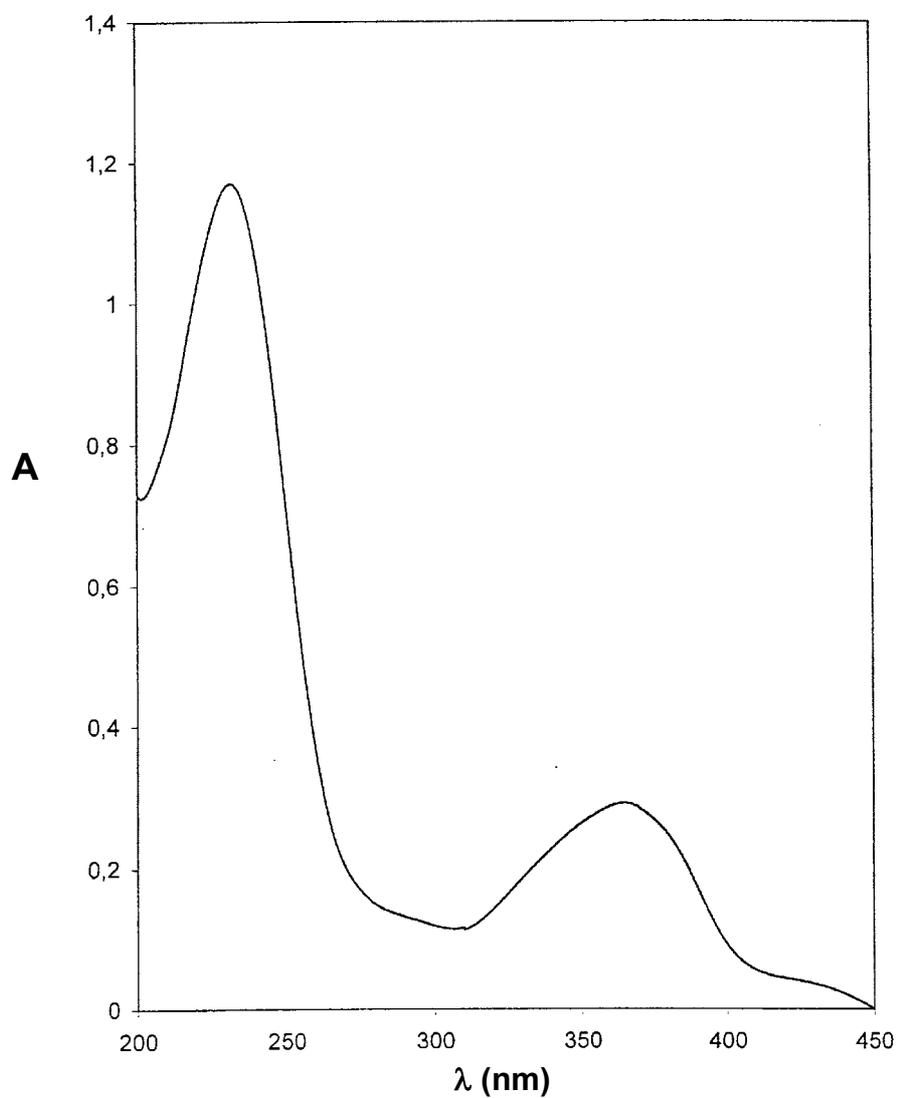


FIGURA 1. Espectro de UV-VIS do nitroso composto ($8,2 \times 10^{-4}$ Mol/L) sintetizado a partir da 2-EP, em água a, força iônica de 0,5 mol/L, pH=1,5 e 25 °C.

3.2.3- Método Cinético

O estudo da cinética destas reações pode ser efetuado empregando-se um dos seguintes métodos:

- 1) O método das velocidades iniciais
- 2) O método integral

Neste trabalho, foi empregado o primeiro procedimento principalmente pela conhecida periculosidade do produto nestas reações.

As reações estudadas tem a estequiometria mostrada na Equação 16.



A velocidade da reação foi definida como a variação da concentração de nitrosocomposto com o tempo:

$$v = d[\text{nitrosocomposto}] / dt \quad [17]$$

O método das velocidades iniciais permitirá determinar os valores destas ordens e da constante cinética segundo a Lei de Lambert-Beer (Equação 18).⁵⁹

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad [18]$$

A absorvância observada é devido a amina, ao nitrito e ao nitrosocomposto, e é fornecida pela Equação 19:

$$A = A_{\text{amina}} + A_{\text{nit}} + A_{\text{R-NO}} \quad [19]$$

Aplicando a Lei de Beer na Equação 19, e fazendo-se o tratamento matemático adequado obtêm-se a Equação 20:

$$v_0 = \frac{\left(\frac{dA}{dt}\right)_{t=0}}{\Delta\epsilon \cdot l} \quad [20]$$

Portanto, é necessário conhecer $\Delta\epsilon$, que é a diferença entre a absorvidade molar do produto e dos reagentes no comprimento de onda em que se trabalha, normalmente no máximo de absorção do composto formado.

Todas as medidas cinéticas deste trabalho, foram feitas a 25°C com força iônica de 0,5 mol/L de NaClO₄.

3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 - Determinação da Absortividade Molar

Através da observação do espectro na região de UV/VIS do produto, acompanhou-se a reação através de medidas de absorbância a 231,7 nm, onde o nitroso composto apresenta absorção máxima (**Figura 1**). Torna-se necessário determinar a absortividade molar dos reagentes e do nitroso composto. Para isto preparam-se soluções em diferentes concentrações e mediu-se a absorbância em 231,7 nm. Os dados foram analisados através da equação de Lambert-Beer.⁶²

As medidas foram feitas em meio ácido, força iônica 0,5 mol/L (NaClO₄) e temperatura de 25⁰C, ou seja, exatamente nas mesmas condições das medidas cinéticas. Desta forma, as absortividades molares determinadas referem-se à amina protonada, ácido nitroso (HNO₂) e ao nitroso composto.

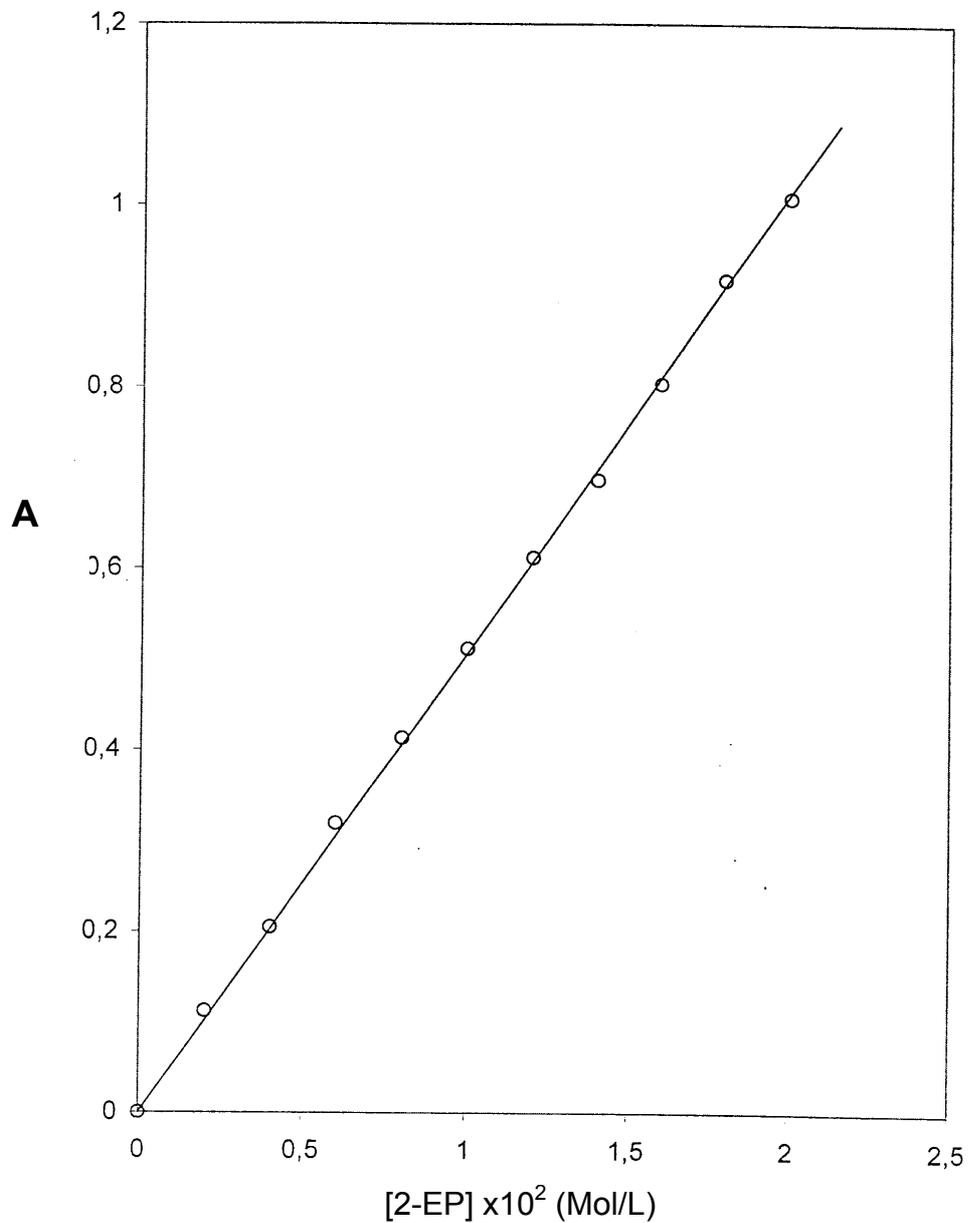


FIGURA 2. Dependência da absorvância (A) em relação a concentração de 2-EP em água, [HClO₄] = 0,075 Mol/L, força iônica de 0,5 Mol/L (NaClO₄) à 25⁰C em $\lambda=231,7$ nm.

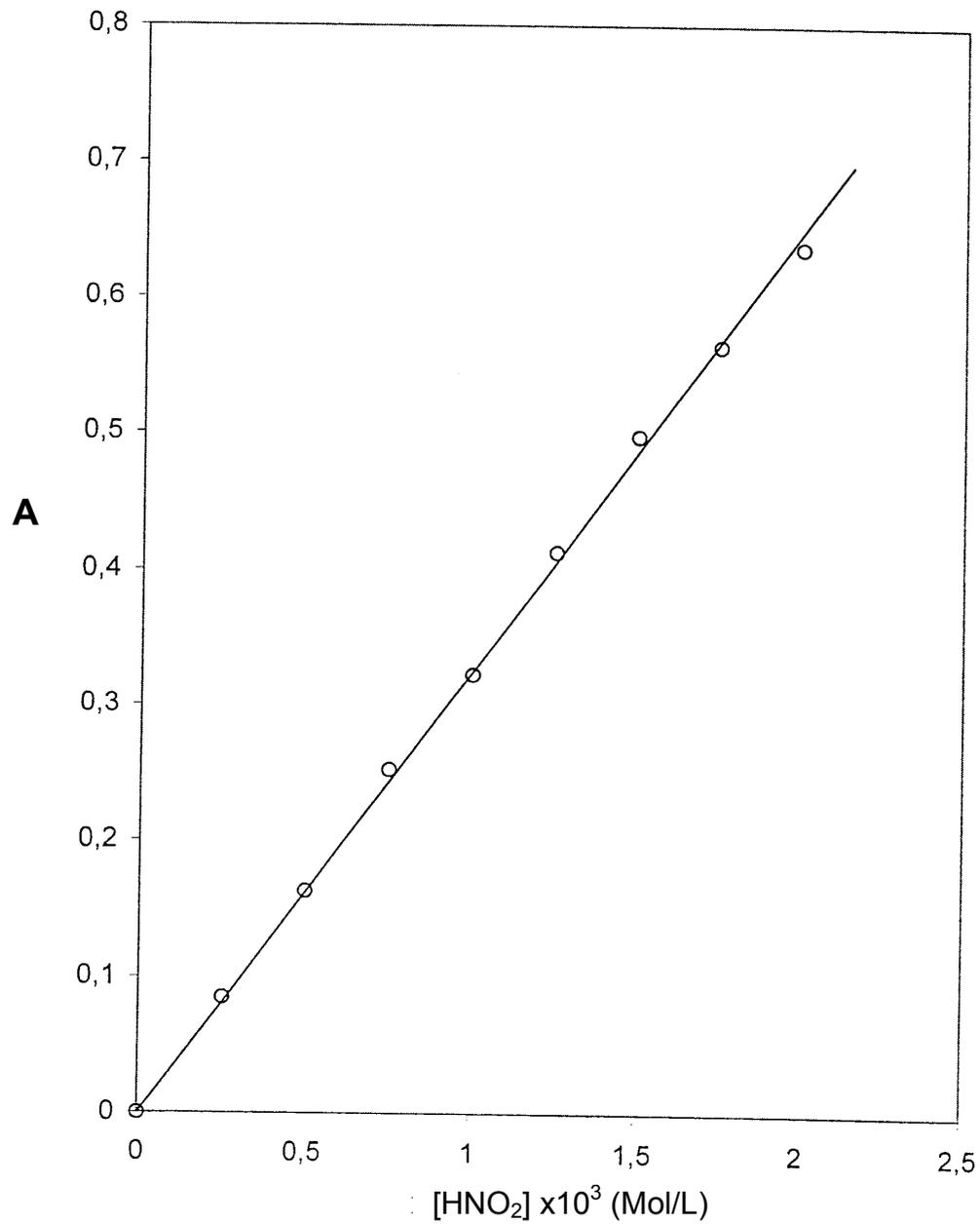


FIGURA 3. Dependência da absorvância (A) em relação a concentração de HNO₂, em água, [HClO₄] = 0,075 Mol/L, força iônica de 0,5 Mol/L (NaClO₄) à 25⁰C e $\lambda=231,7$ nm.

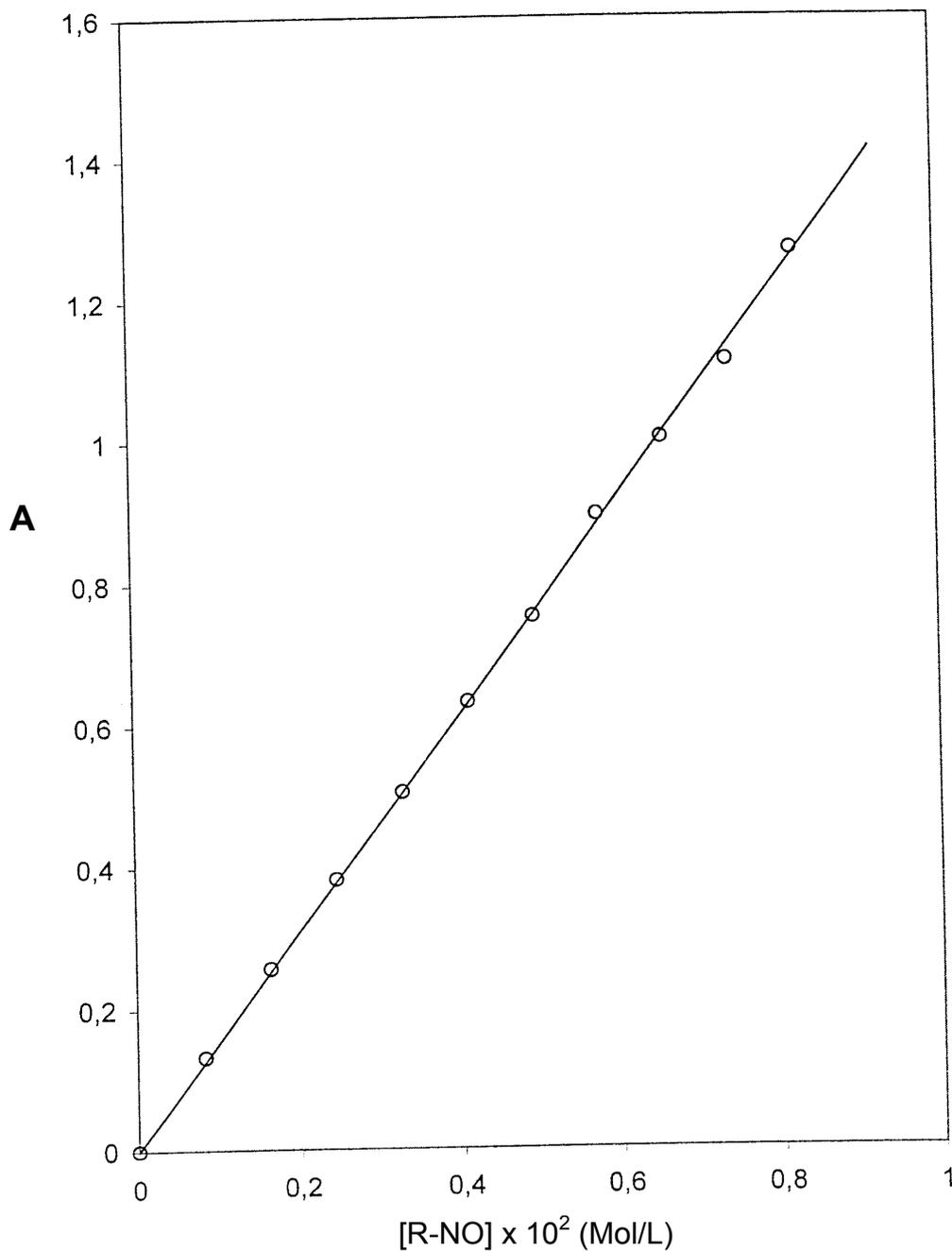


FIGURA 4. Dependência da absorvância(A) em relação a concentração do nitrosocomposto da 2-EP em água, $[HClO_4] = 0,075$ Mol/L, força iônica de $0,5$ Mol/L ($NaClO_4$) à $25^{\circ}C$ em $\lambda=231,7$ nm.

Tabela 1. Absortividades Molares de Cada Composto em 231,7nm .

COMPOSTO	ϵ (L. mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
2-EP	50,7 \pm 0,2
HNO ₂	324,6 \pm 2,0
2EP-NO	1532,2 \pm 5,8

Portanto, o valor da diferença entre a absortividade molar do produto e a dos reagentes em 231,7 nm é:

$$\Delta\epsilon = (1156,9 \pm 6,1)\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

3.3.2 - Estudo Cinético e Mecanismo da Reação de Nitrosação

Pelo fato de não ter sido encontrado na literatura os pKas das aminas estudadas, foi necessário determiná-las experimentalmente mediante dupla titulação, potenciométrica e condutimétrica.

Adicionou-se HClO₄ 0,2 Mol/L em 0,1L de uma solução de 2-EP 5.10⁻³ Mol/L, sendo anotado o valor do pH e a condutividade cada vez que se adicionou determinado volume de ácido. O resultados estão apresentados na **Figura 5**.

A relação entre os dados de volume e condutividade se ajustam a duas retas de inclinações diferentes, correspondendo a retas anterior e posterior ao ponto de equivalência.

O cálculo do pKa foi feito sabendo-se que para um volume adicionado igual a metade do ponto de equivalência, o pH é igual ao pKa. O ponto de equivalência é o ponto de inflexão da curva do pH, ou seja, o ponto de interseção das duas retas de condutividade.

As equações de reta que se ajustam aos dados de condutividade e volume são as 21 e 22:

$$\kappa (\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}) = -(225,61 \pm 2,89) + (118,81 \pm 2,09) \cdot V (\text{mL}) \quad [21]$$

e

$$\kappa (\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}) = -(1697,45 \pm 63,95) + (849,00 \pm 22,41) \cdot V (\text{mL}) \quad [22]$$

Igualando-se as equações 21 e 22 obtem-se um valor de pK_a = 10,21 ± 0,05 (K_a = 6,17 (± 0,65) .10⁻¹¹ M) para o volume de equivalência de 2,63 (± 0,12) mL.

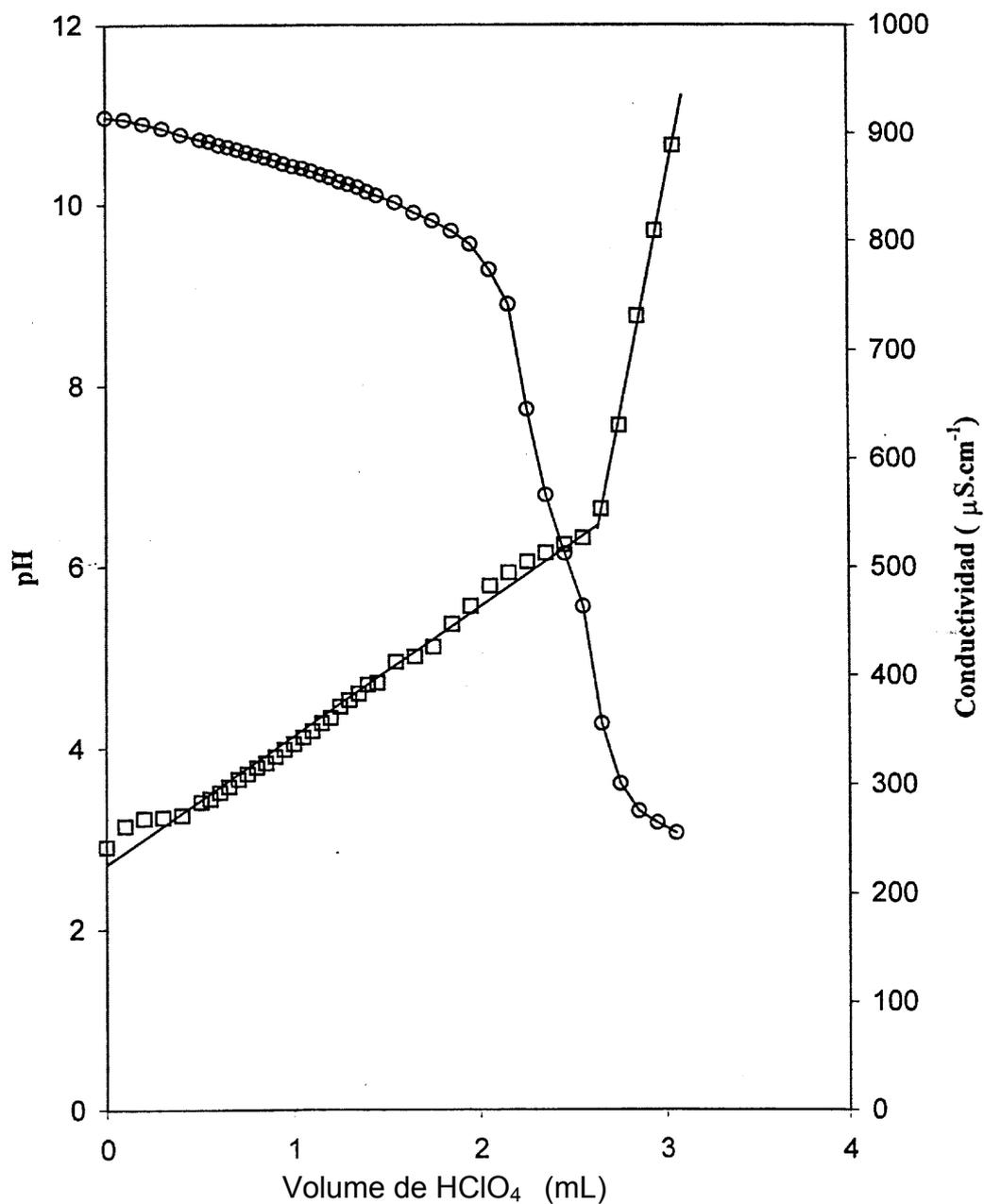


FIGURA 5. Gráfico da dependência do pH (o) e condutividade (□) em função do volume de HClO_4 , para uma solução de 2-EP $5\cdot 10^{-3}$ mol/L, a 25°C .

A partir destas equações, obteve-se as 23 e 24 que permitiram obter os valores de V_{eq} e pK_a .

Assim os valores obtidos foram:

$$V_{eq} = (2,63 \pm 0,12). \text{ mL} \quad [23]$$

e

$$pK_a = (10,21 \pm 0,05) \Rightarrow K_a = (6,17 \pm 0,65).10^{-11} \text{ mol/L} \quad [24]$$

Foram utilizadas soluções preparadas em D_2O , e adicionadas $HClO_4$ 0,125 Mol/L em 25 mL de uma solução de concentração 5×10^{-3} Mol/L de 2-EP.

Na **Figura 6**, é mostrado o gráfico da dependência do pD e condutividade em função do volume de $HClO_4$, para a 2-EP afim de se determinar o pK_a da 2-EP em D_2O .

O pD foi calculado a partir das medidas realizadas em um pH-metro utilizando a seguinte expressão:^{63,64}

$$pD = pH + 0,4.$$

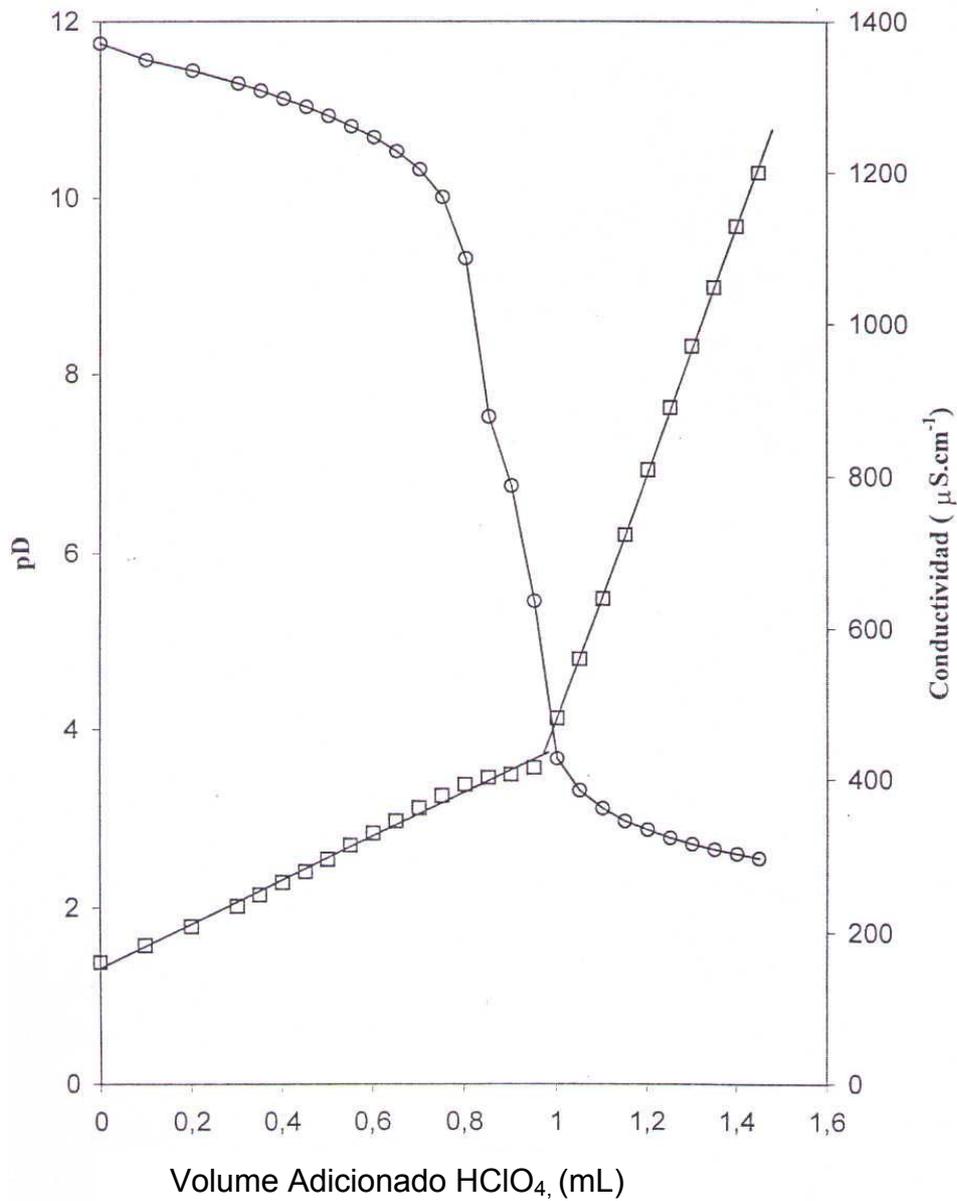


FIGURA 6. Gráfico da dependência do pD (○) e condutividade (□) em função do volume de HClO₄, para uma solução $5\cdot 10^{-3}$ mol/L de 2-EP, à 25^oC.

As equações das retas que se ajustam aos dados condutividade – volume são as 25 e 26, respectivamente.

$$k (\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}) = (153,98 \pm 3,40) + (287,35 \pm 5,68) \cdot V (\text{mL}) \quad [25]$$

e

$$k (\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}) = -(1133,86 \pm 11,39) + (1615,15 \pm 9,24) \cdot V (\text{mL}) \quad [26]$$

A partir destas equações, obteve-se as 27 e 28, que permitem obter os valores de V_{eq} e pK_a .

Assim, os valores obtidos foram:

$$V_{\text{eq}} = (0,97 \pm 0,01) \cdot \text{mL} \quad [27]$$

e

$$\text{pK}_d = (10,56 \pm 0,01) \Rightarrow K_d = (2,75 \pm 0,08) \cdot 10^{-11} \text{ mol/L} \quad [28]$$

A seguir, determinou-se a ordem da reação com relação a cada um dos reagentes. Para cada um deles, estudou-se a reação empregando concentrações constantes de todos os reagentes menos para aquele cuja ordem da reação está sendo determinada.

Para cada caso, estão detalhados nas Tabelas e nas correspondentes Figuras, os dados das velocidades iniciais obtidas para diferentes concentrações de reagente, calculadas mediante a **Equação 18**. A ordem da reação é, para todos os reagentes, obtida a partir do gráfico $v_0 \times [\text{reagente}]^n$, onde n é a ordem da reação.

Tabela 2. Valores das velocidades iniciais para a reação da 2-EP e do ácido nitroso a diferentes concentrações da 2-EP.

$10^3 \cdot [2\text{-EP}] \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}$	$10^9 \cdot v_0 \text{ (mol.L}^{-1}\text{.s}^{-1}\text{)}$
2,00	$8,170 \pm 0,05$
4,00	$13,62 \pm 0,12$
6,00	$18,16 \pm 0,12$
10,0	$28,84 \pm 0,15$
12,0	$36,39 \pm 0,19$
14,0	$44,81 \pm 0,24$
16,0	$54,07 \pm 0,32$
20,0	$58,21 \pm 0,35$

$[\text{HClO}_4] = 0,05 \text{ M}$, $[\text{NaNO}_2] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ e $t = 25^\circ\text{C}$.

A equação da reta, que mostra a dependência da concentração de 2-EP obtida no ajuste é a 29;

$$v_0 \text{ (mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)} = (3,09 \pm 0,08) \cdot 10^{-6} \cdot [2\text{-EP}]_0 \quad [29]$$

Assim, deduziu-se que a ordem com relação a 2-EP é igual a “um”, já que foi observado uma dependência linear com todos os dados (**Figura 7**).

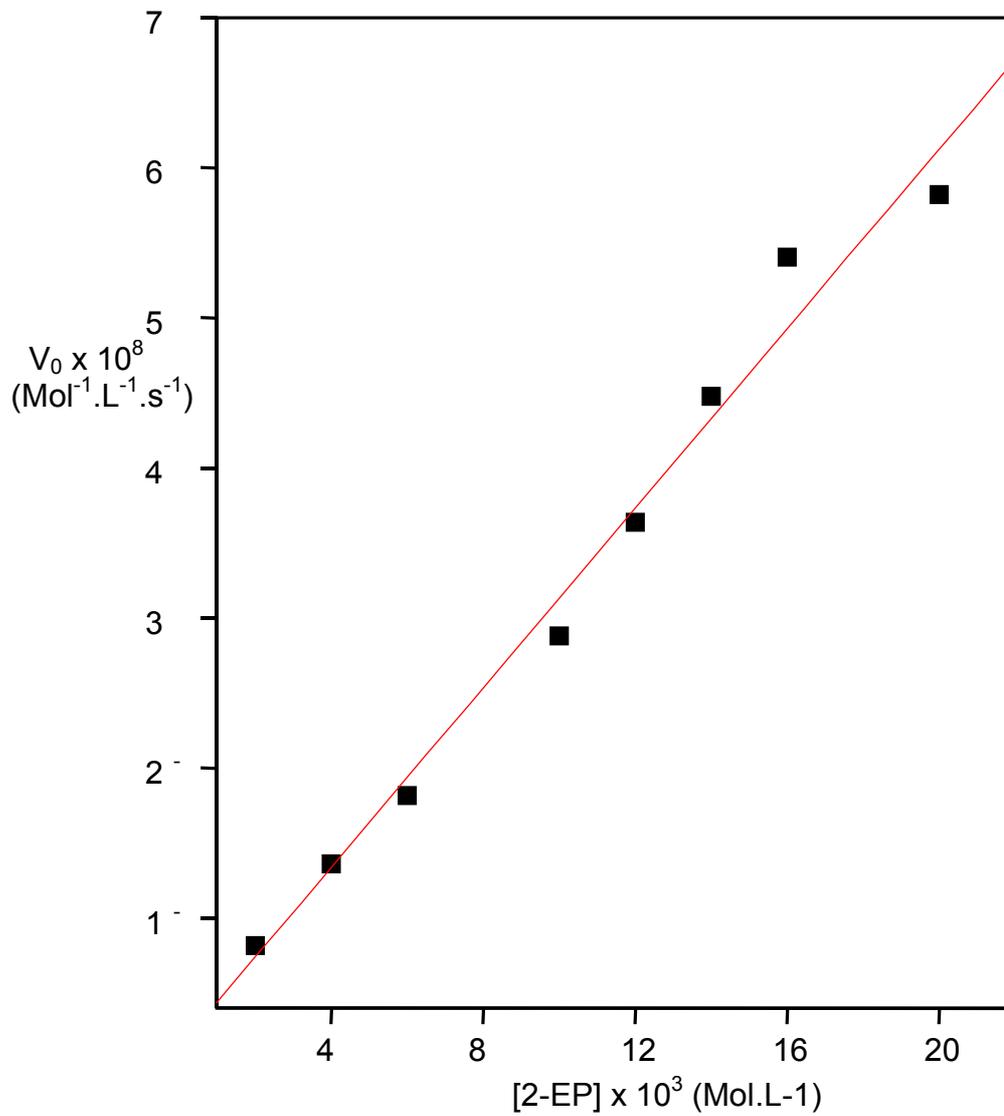


FIGURA 7. Dependência da velocidade inicial para a reação da 2-EP com o ácido nitroso, com relação a concentração da 2-EP, $[\text{HClO}_4]=0,05$ mol/L, $\mu=0,5$ Mol/L (NaClO_4) e $[\text{NaNO}_2] = 5 \times 10^{-4}$ mol/L à 25°C.

Tabela 3. Valores das Velocidades Iniciais Para a Reação de 2-EP com o Ácido Nitroso a Diferentes Concentrações de Nitrito.

$10^4 \cdot [\text{NaNO}_2]$ (mol/L)	$10^9 \cdot v_0$ (M . s ⁻¹)
2,50	6,650 ± 0,07
5,00	11,43 ± 0,09
7,50	19,92 ± 0,18
10,0	28,01 ± 0,19
12,5	35,01 ± 0,51
15,0	45,38 ± 0,35
17,5	56,66 ± 0,33
20,0	62,71 ± 0,41

[HClO₄] = 0,1 mol/L, [2-EP] = 4.10⁻³ mol/L e t= 25°C.

A equação da reta obtida pela dependência da velocidade inicial e a concentração de nitrito no ajuste é:

$$v_0 \text{ (Mol . s}^{-1}\text{)} = (3,03 \pm 0,08) \cdot 10^{-5} \cdot [\text{NaNO}_2]_0 \quad [30]$$

Assim, deduziu-se que a ordem da reação com relação ao NaNO₂ é “um”, o que pode ser explicado considerando que existe uma dependência linear com os dados obtidos (**Figura 8**).

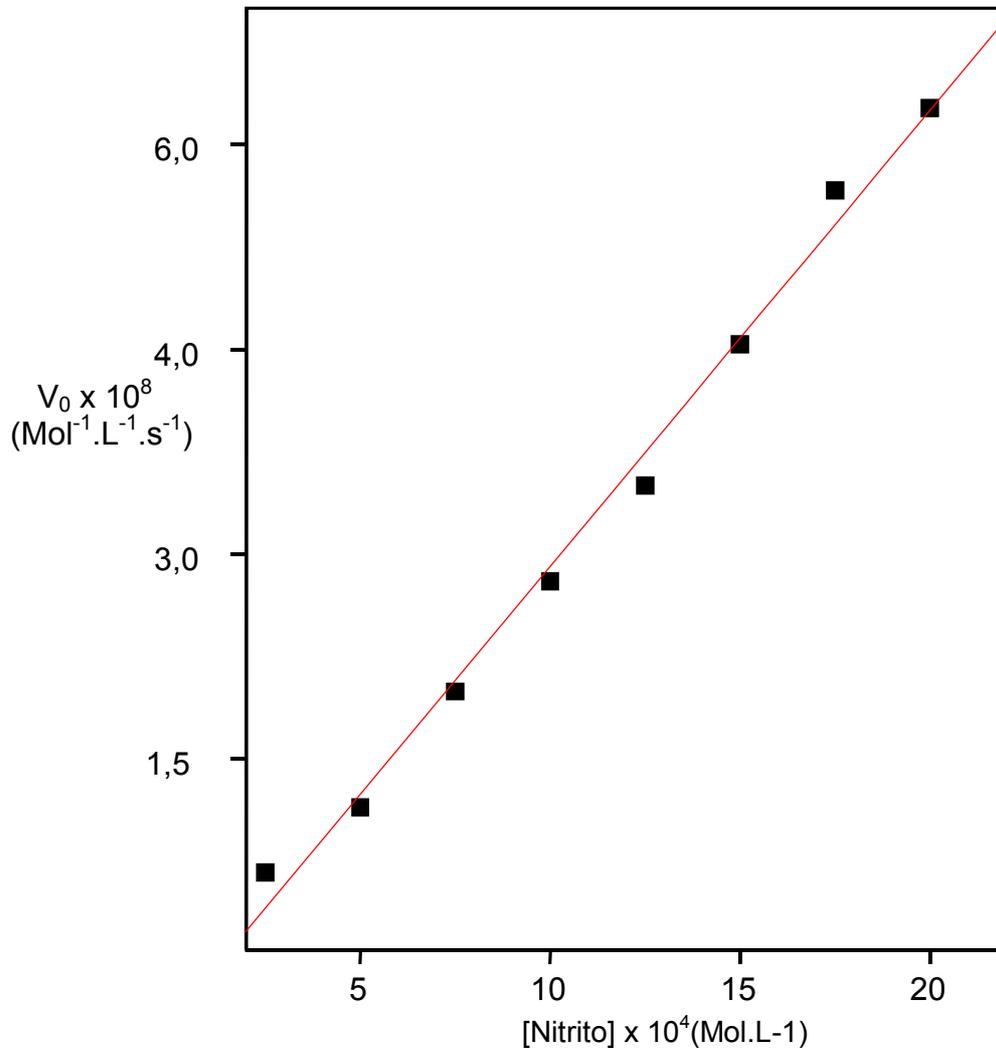


FIGURA 8. Dependência da velocidade inicial para a reação da 2-EP com o ácido nitroso, com relação a concentração de nitrito, $[\text{HClO}_4]=0,05\text{M}$, $\mu=0,5\text{Mol/L}$ (NaClO_4), $[2\text{-EP}] = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$ à 25°C .

Tabela 4. Valores das Velocidades Iniciais Para a Reação da 2-EP com o Ácido Nitroso a Diferentes Concentrações de Ácido Perclórico.

$[\text{HClO}_4]$ (mol . L ⁻¹)	$10^9 \cdot v_o$ (mol . L ⁻¹ . s ⁻¹)
0,05	18,34 ± 0,10
0,10	16,93 ± 0,12
0,15	16,50 ± 0,12
0,20	17,50 ± 0,13
0,25	17,23 ± 0,20
0,30	17,48 ± 0,15

$[\text{NaNO}_2] = 5 \cdot 10^{-4}$ M, $[2\text{-EP}] = 6 \cdot 10^{-3}$ M e $t=25^\circ\text{C}$.

Finalmente, a equação 31 mostra a dependência entre a velocidade da reação e concentração do ácido.

$$v_o = (1,73 \pm 0,04) \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad [31]$$

Neste caso, a ordem da reação é zero porque a velocidade não depende da concentração de HClO_4 .

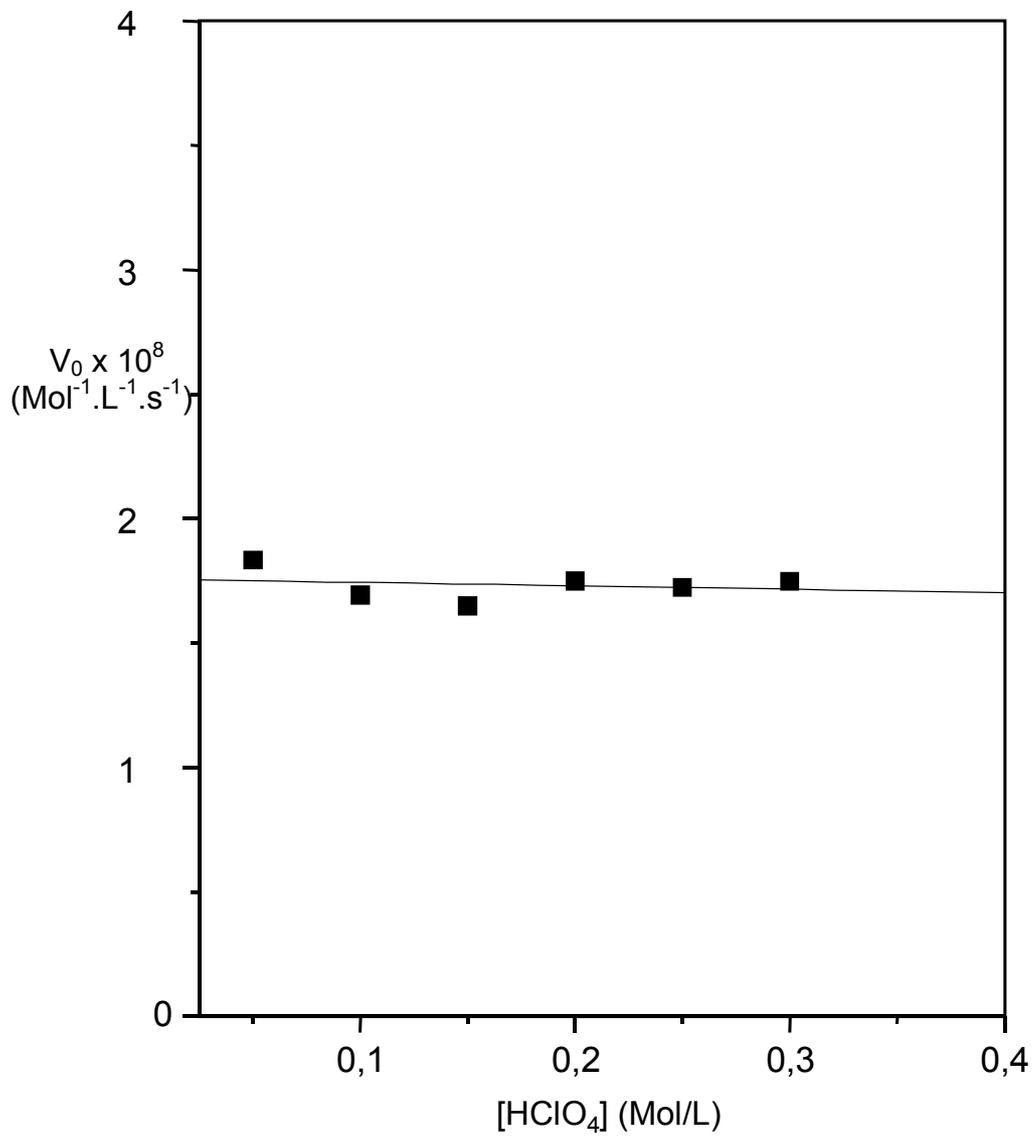


FIGURA 9. Dependência da Velocidade Inicial Para a Reação da 2-EP com o Ácido Nitroso, a Diferentes Concentrações de Ácido Perclórico, $[NaNO_2] = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $\mu = 0,5$ Mol/L ($NaClO_4$) e $[2-EP] = 6 \cdot 10^{-3}$ mol/L à 25°C.

Uma vez determinada a ordem da reação para cada um dos reagentes, estabeleceu-se a equação de velocidade correspondente (Equação 32);

$$V_o = k_H \cdot [2-EP]_o \cdot [\text{nitrito}]_o \quad [32]$$

onde k_H é a constante de velocidade em meio aquoso.

O valor da constante de velocidade k_H foi obtida baseando-se nas equações de velocidade para se determinar a ordem de reação com relação a cada reagente. Obteve-se o valor médio de:

$$k_H = (6,51 \pm 0,03) \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

Finalmente, a expressão definitiva para a equação de velocidade correspondente ao processo de nitrosação da 2-EP, a 25°C, à $[H^+] = 0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ tem demonstrado que a reação é de primeira ordem em relação à 2-EP e ao nitrito. Por outro lado, foram investigados o efeito da concentração constante de amina e nitrito e a influência da acidez na velocidade da reação, mostrando que é de ordem zero com relação a concentração de H^+ . Utilizando todos estes dados, foi obtida a equação de velocidade 33;

$$v_o (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) = (6,51 \pm 0,03) \cdot 10^{-3} \cdot [2-EP]_o \cdot [\text{nitrito}]_o \quad [33]$$

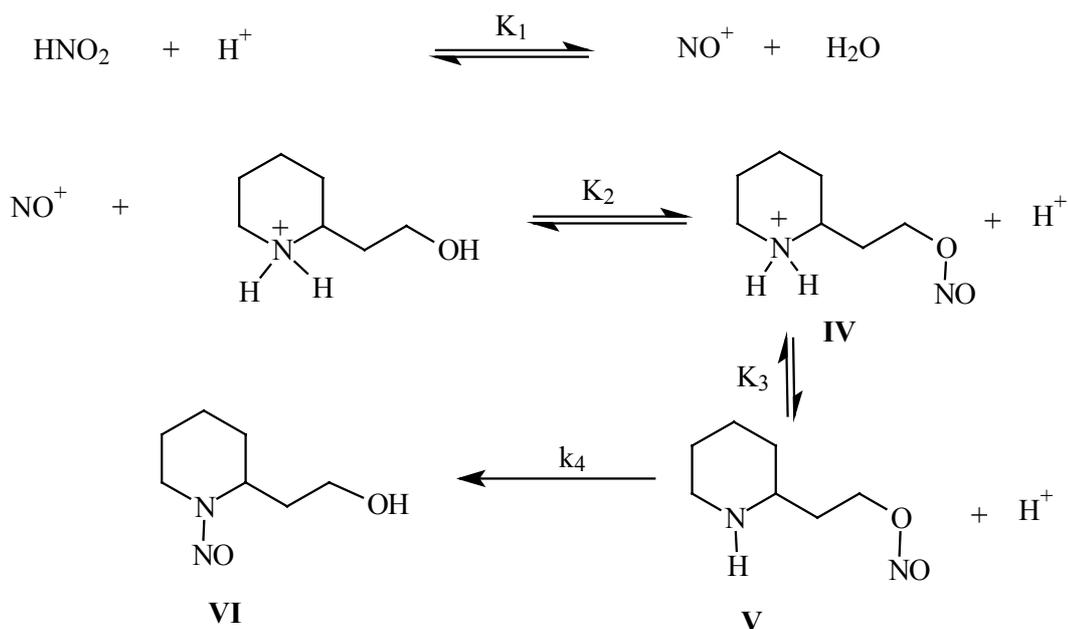
Esta equação de velocidade é compatível com o mecanismo no qual a etapa limitante da velocidade (k_2) é o ataque do íon nitrosonium ou amina livre. O agente nitrosante é formado pela protonação do ácido nitroso com uma constante de equilíbrio $K_1 = 3 \times 10^{-7} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$.⁶² Utilizando estas condições, a seguinte relação foi deduzida;

$$k_H = K_a K_1 k_2 \quad [34]$$

onde K_a é a constante de acidez de 2-EP.

O valor de K_a obtido neste trabalho foi de $10^{-10,2}$ Mol.L. Isto implica em um valor de $k_2=1,6 \times 10^{17}$ Mol⁻¹.L.s⁻¹, que excede em muito os valores aceitos para processos controlados por difusão.⁶⁵ Portanto, este mecanismo deve ser descartado.

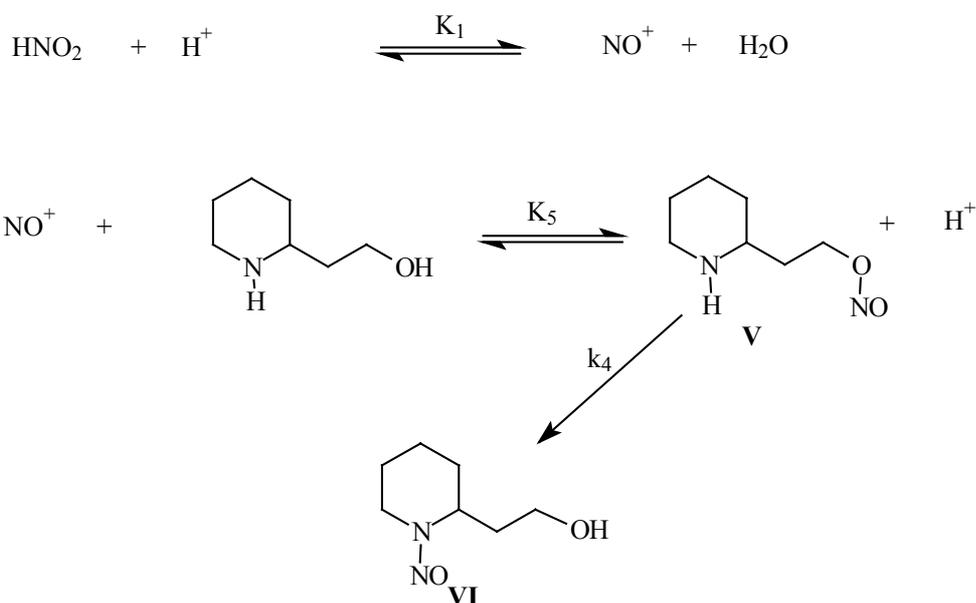
As outras duas possibilidades mecanísticas estão mostradas nos **Esquemas 3 e 4**.



Esquema 3

No primeiro, o agente nitrosante reage com o átomo de oxigênio da amina protonada. O O-nitroso intermediário então formado (**IV**) promove a transferência do NO e a perda do próton (**V**). Este mecanismo conduziu a relação mostrada na equação 35.

$$k_H = K_1 K_2 K_3 k_4 \quad [35]$$



Esquema 4

No **Esquema 4**, o NO⁺ ataca o átomo de oxigênio da amina formando o intermediário (**V**). O intermediário V estabelece um equilíbrio ácido-base rápido para formar o **VI**. A etapa final é a mesma mostrada no **Esquema 3**. Este mecanismo permite obter a equação 36.

$$k_H = K_1 K_a K_5 k_4 \quad [36]$$

Tendo em vista que no pH estudado a amina estaria completamente protonada, o mecanismo descrito no **Esquema 3** demonstra ser o mais correto. A constante de equilíbrio K₂ deve ser pequena, porque não houve evidências

espectrofotométricas da formação do composto O-nitroso (IV) carregado positivamente, e este é o mesmo argumento é apontado para a reação com a tiomorfolina.¹⁸

Como foi mencionado na introdução, a etapa limitante da velocidade de reação, k_4 , pode ser considerada como uma das várias possibilidades. Para distinguir este resultado, estudou-se a reação em D_2O .

Os resultados foram obtidos modificando algumas condições experimentais. Verificou-se que a equação de velocidade e o mecanismo permaneceu o mesmo que em H_2O .

A constante cinética obtida foi de $k_D = (3,76 \pm 0,01) \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, o que implica em um efeito isotópico cinético igual a;

$$k_H / k_D = 1,73$$

Para o efeito isotópico na formação do NO^+ uma razão $K_{1D}/K_{1H} = 2,55$ foi proposta.⁶⁶ O equilíbrio no qual (IV) é formado pela reação do NO^+ e a amina protonada (definida por K_2), não deve exibir efeito isotópico, isto é, $K_{2H}/K_{2D} = 1$.

Finalmente, pode-se estimar a razão K_{3H}/K_{3D} se for aceito um efeito semelhante para o efeito isotópico na constante de acidez tanto da nitrosamina (VI) quanto da amina.

Experimentos feitos (não mostrados) forneceram um valor para $K_{3D} = 10^{10,56} \text{ mol.L}^{-1}$, e como descrito acima para a H_2O pode-se obter a razão $k_{4H}/k_{4D} = 1,97$. Os valores não são tão baixos quanto aos obtidos para a nitrosação da tiomorfolina, $k_{4H}/k_{4D} = 1,67$, na qual a perda do próton do composto (IV) simultaneamente com a migração do grupo NO controla a velocidade da reação.

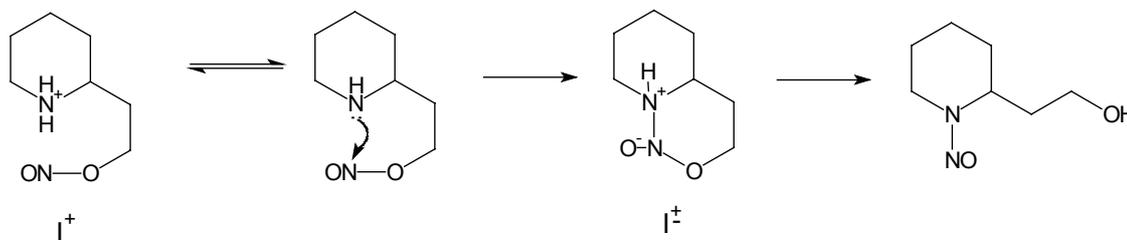
O efeito isotópico no caso da 2-EP indica que a transferência do próton, após o ataque do grupo nitroso no átomo de nitrogênio da amina, é a etapa determinante da velocidade. Isto pode ser explicado considerando que a conformação especial no caso da tiomorfolina não é necessária para a 2-EP,

onde a cadeia lateral do grupo O-NO é suficientemente flexível para permitir a aproximação do átomo de nitrogênio.

A etapa determinante da velocidade foi considerada como sendo a perda do próton do intermediário I^\ddagger formado após o ataque do grupo nitroso no nitrogênio da piperidina (**Esquema 5**) porque sua basicidade é aproximadamente 5 ± 1 unidades maior do que o intermediário I^+ .

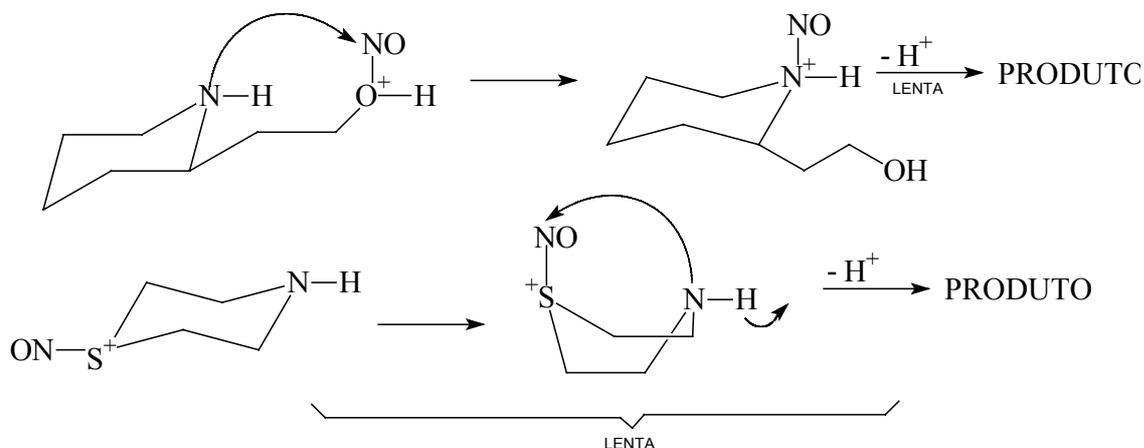
Este fato é assumido considerando-se um caso semelhante, que é a reação entre a metoxiamina com o p-clorobenzaldeído.⁶⁷

A basicidade do nitrogênio do grupo amônio muda de $pK_a \cong 2,0$ até $pK_a \cong 7,3$ quando no T^\ddagger (intermediário tetraédrico) o grupo hidroxila ligado ao mesmo átomo de carbono o qual é ligado ao grupo amônio e perde seu átomo de hidrogênio formando um oxigênio negativamente carregado. Pode-se considerar que a transferência da carga negativa do I^\ddagger deve ser parecida com a do intermediário formado com átomo de carbono, e neste caso pelo átomo de nitrogênio do grupo nitroso (**Esquema 5**).



Esquema 5

O cálculo da energia de ativação desta reação pode contribuir para a fundamentação do mecanismo comparando com o caso da nitrosação da tiomorfolina, considerando que a transferência do grupo nitroso do O até N não requer uma conformação especial, como observado com a tiomorfolina (forma de barco), pelo fato da cadeia lateral ser flexível.



Esquema 6

A medida que a conformação de barco deve contribuir apreciavelmente para a energia de ativação da reação de nitrosação da tiomorfolina, que tem sido determinada como 86 KJ/Mol, espera-se-ia que a correspondente energia de ativação para a nitrosação da 2-EP seja substancialmente mais baixa.

Para fins comparativos, é importante a determinação da energia de ativação para esta reação. Esta foi feita baseando-se na equação de Arrhenius, a partir dos dados de constantes de velocidades em função da temperatura;⁶⁸

$$k=A.e^{-E_a/R.T} \quad [37]$$

onde k é a constante cinética, A é o fator de frequência, E_a é a energia de ativação, R é a constante dos gases e T é a temperatura.

Aplicando-se os logaritmos neperianos em ambos os lados da equação anterior, obtém-se a Equação 38, que é utilizada para o cálculo da energia de ativação. A **Tabela 5** mostra as velocidades iniciais e as constantes de velocidades a diferentes temperaturas para a reação.

$$\ln k=\ln A - E_a/R.T \quad [38]$$

Tabela 5: Valores de velocidades iniciais (v_0) e as constantes de velocidades (k) a diferentes temperaturas para a reação de nitrosação da 2-EP. $[2\text{-EP}] = 4 \times 10^{-3} \text{ Mol/L}$, $[\text{HClO}_4] = 0,05 \text{ Mol/L}$ e $[\text{NaNO}_2] = 5 \times 10^{-4} \text{ Mol/L}$.

$10^9 \cdot v_0$ ($\text{Mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$10^4 \cdot k$ ($\text{Mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$\ln k$	T (K)	$10^3 \cdot 1/T$ (K^{-1})
$10,35 \pm 0,07$	$50,87 \pm 0,34$	$-5,28 \pm 0,01$	294	3,401
$11,35 \pm 0,08$	$54,20 \pm 0,31$	$-5,22 \pm 0,01$	296	3,378
$12,98 \pm 0,10$	$64,88 \pm 0,51$	$-5,04 \pm 0,01$	298	3,356
$14,52 \pm 0,16$	$72,58 \pm 0,83$	$-4,93 \pm 0,01$	300	3,333
$15,82 \pm 0,19$	$79,11 \pm 0,96$	$-4,84 \pm 0,01$	302	3,311

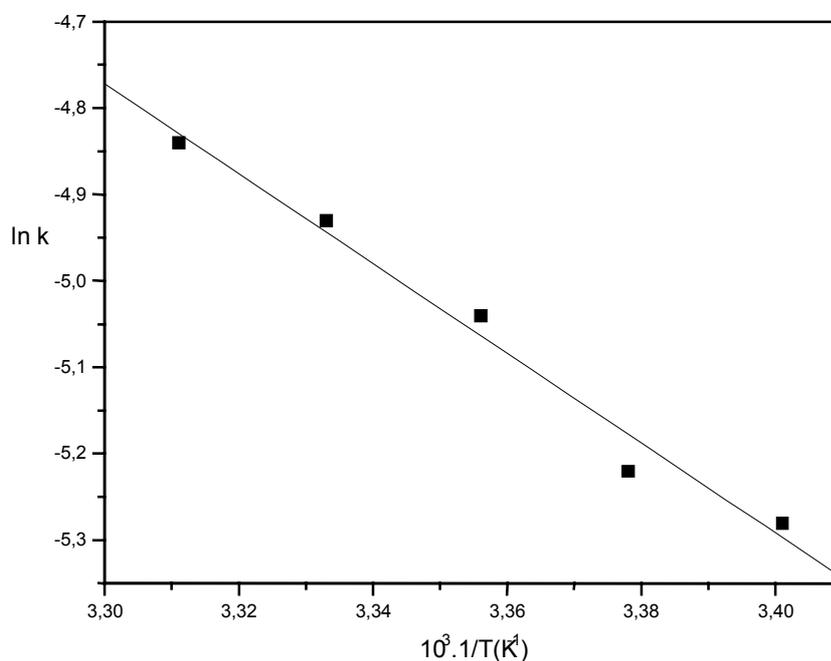


FIGURA 10: Gráfico dos valores de $\ln k$ em função do inverso de diferentes temperaturas para a reação de nitrosação da 2-EP. $[2\text{-EP}] = 4 \times 10^{-3} \text{ Mol/L}$, $[\text{HClO}_4] = 0,05 \text{ Mol/L}$ e $[\text{NaNO}_2] = 5 \times 10^{-4} \text{ Mol/L}$ ($r = 0,9894$).

Pela equação obtida do gráfico anterior, combinada com a 38, obtêm-se o valor da energia de ativação:

Fazendo-se o tratamento matemático adequado aos dados da **Figura 10**, obteve-se a Equação 39:

$$\ln k = (12,39) - (5,2 \times 10^3) / T \quad [39]$$

a partir da qual determina-se a energia de ativação, sendo de:

$$E_a = 43,23 \text{ KJ/Mol.}$$

Este valor corresponde a energia total de ativação do processo, sendo a soma das energias dos equilíbrios das etapas anteriores com a energia de ativação da etapa determinante da velocidade, sendo esta a última da reação. Se for considerado que as etapas que antecedem a determinante não são muito diferentes para a tiomorfolina e 2-EP, a diferença entre ambos (86 e 43 KJ/Mol) é governada fundamentalmente pela energia de ativação da etapa lenta.

Desta forma se justificam as afirmações mencionadas anteriormente, sendo esta mais uma evidência para o mecanismo proposto.

CAPÍTULO 4

ESTUDO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR MODELOS NÃO MIMÉTICOS: REAÇÕES DO GRUPO NITROSO. REAÇÃO NITROSOBENZENO COM N-METILHIDROXILAMINA

4.1 – RELEVÂNCIA E CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

Nosso grupo de pesquisa, historicamente tem se dedicado ao entendimento mais aprofundado do mecanismo de reações enzimáticas através de modelos não miméticos. Estes modelos são as reações do grupo nitroso e carbonila com aminas.^{69,70,71,72,73,74} Tem-se também trabalhado com modelos miméticos empregando ácido bórico em reações de adição de aminas à carbonila.^{75,74}

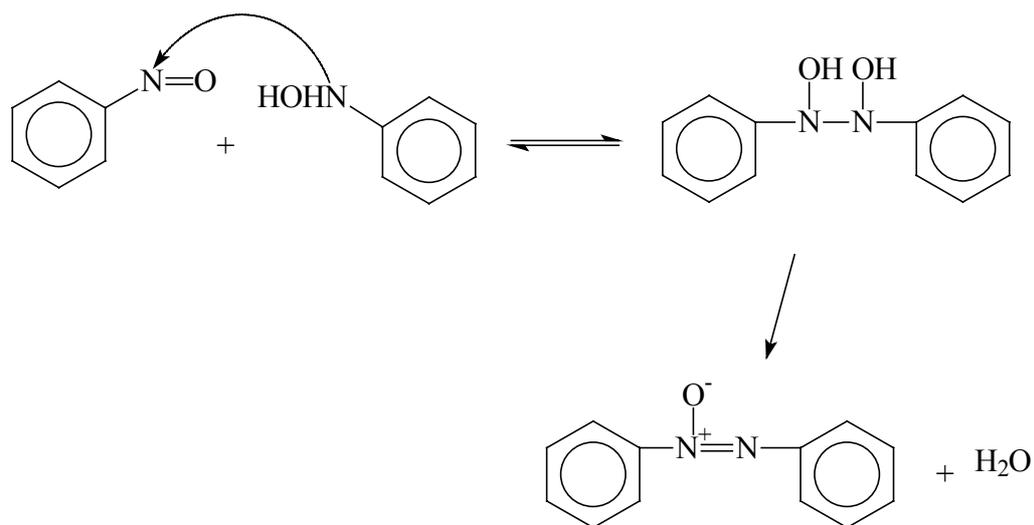
O estudo de catálise ácido-básica da condensação de grupos nitrosos com hidroxilaminas em meio aquoso tamponado é relevante, considerando sua importância potencial na elucidação de mecanismos de desintoxicação de arilhidroxilaminas carcinogênicas que podem ocorrer por este caminho.¹⁴

Nitrosobenzenos podem ser formados em sistemas biológicos e em condições fisiológicas podem reagir com vários nucleófilos. Eles podem ser formados como intermediários reativos. Sua formação pode ocorrer pela N-oxidação de aminas aromáticas ou pela redução de compostos nitroaromáticos introduzidos no organismo na forma de toxinas.^{76,77}

Nos últimos anos, têm-se estudado com detalhe o mecanismo de adição de aminas aromáticas ao nitrosobenzeno em meios ácido e básico. O mecanismo é semelhante ao de compostos carbonílicos frente a nucleófilos nitrogenados, que ocorre em duas etapas, uma de ataque da amina ao grupo nitroso formando um intermediário de adição através de um rápido equilíbrio, e uma segunda de desidratação deste intermediário levando ao produto.^{69,70,71,72,73,74,75}

A reação entre fenilhidroxilamina e nitrosobenzeno para formar azoxibenzeno entre pH 1 e 11, foi estudada com detalhes por Yunes e colaboradores.⁷¹ A reação apresenta catálise ácida geral ($\alpha=0,29$), básica geral ($\beta=0,15$) e base específica pelo íon hidróxido. O mecanismo proposto é aquele no qual a reação ocorre em duas etapas. Inicialmente, ocorre o ataque da fenilhidroxilamina sobre o grupo nitroso formando um intermediário

tetraédrico através de um equilíbrio rápido, com posterior desidratação para formar do azóxi-composto (**Esquema 7**);



ESQUEMA 7

O gráfico de log das constantes de velocidade em função do pH, mostra que a reação possui somente uma etapa determinante da velocidade em toda faixa de pH estudada (**Figura 11**).

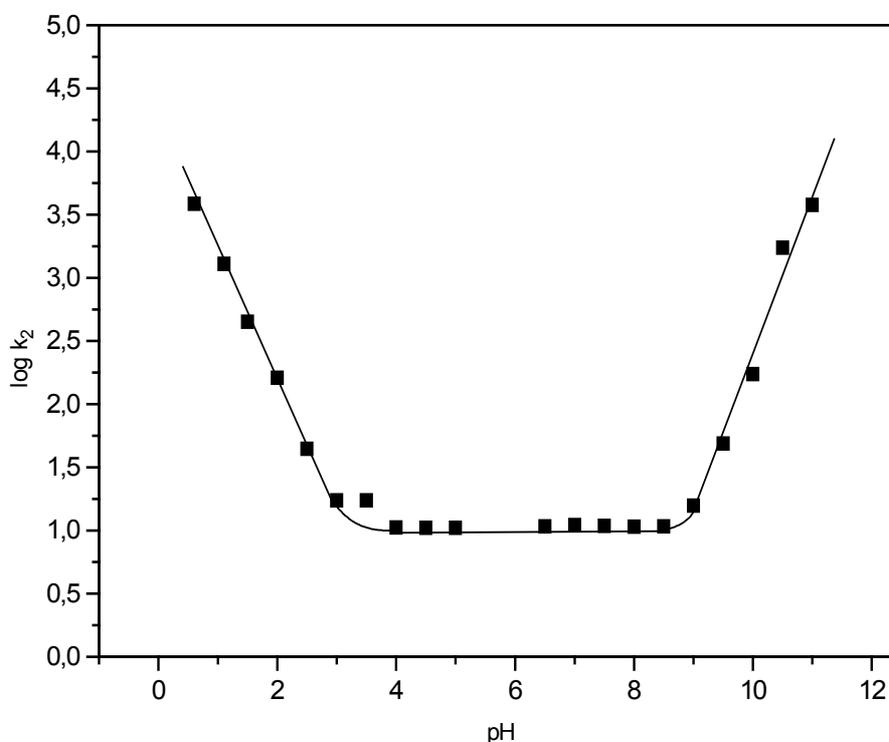
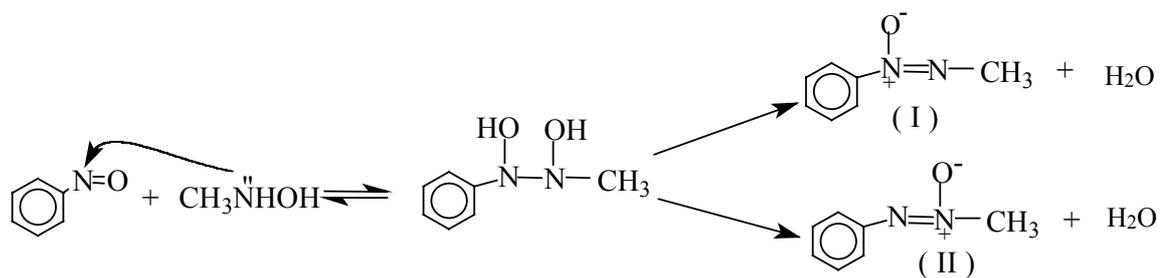


FIGURA 11: Dependência das constantes de velocidades (k_2) em função do pH para a reação da fenilhidroxilamina com nitrosobenzeno.⁷¹

É importante observar que a reação de N-fenilhidroxilamina com nitrosobenzeno não mostra um desvio negativo no gráfico de $\log k_2$ em função do pH, o qual deve ser considerado que não há mudança na etapa determinante da velocidade da reação em todo intervalo de pH estudado, sendo que a EDV é a desidratação do intermediário de adição, formado entre os reagentes.⁵

Este trabalho deteve-se fundamentalmente no estudo do mecanismo de reação da N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno. Nesta reação, conforme observado por outros autores, existe a possibilidade de formação de dois produtos.⁷⁶

**ESQUEMA 8**

Este estudo, têm por objetivo a identificação de qual é o produto formado através de técnicas de espectroscopia de UV e CG-EM e da elucidação do mecanismo através do estudo da reação frente a diversos catalisadores (Gráfico Brönsted) e do perfil de pH.

4.2 - PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 - Materiais e Equipamentos

O nitrosobenzeno foi sintetizado e purificado por sublimação, conforme descrito na literatura p.f. exp. = 68°C e p.f. teo=68°C.⁷⁸ O espectro de ultravioleta do mesmo é apresentado na **Figura 12**, sendo que as análises em cromatografia gasosa e massas são apresentados nas **Figuras 13 e 14**, respectivamente. A N-metilhidroxilamina foi obtida da Aldrich e purificada através de recristalização em etanol.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro da Shimadzu-CGMS-QP-2000 conectado a um modelo 14B Shimadzu GC.

O equipamento utilizado na realização do estudo cinético foi um espectrofotômetro UV-VIS Hitachi modelo U-2000.

4.2.2 - Método Cinético

As reações foram acompanhadas por medidas de absorbância, monitorando a formação do produto a 250 nm, a 25°C. As reações feitas em água e força iônica 1.0 M (KCl). As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e desgaseificadas com nitrogênio. As concentrações iniciais foram de 8.33×10^{-5} Mol/L e 10^{-3} Mol/L, para o nitrosobenzeno e N-metilhidroxilamina, respectivamente.

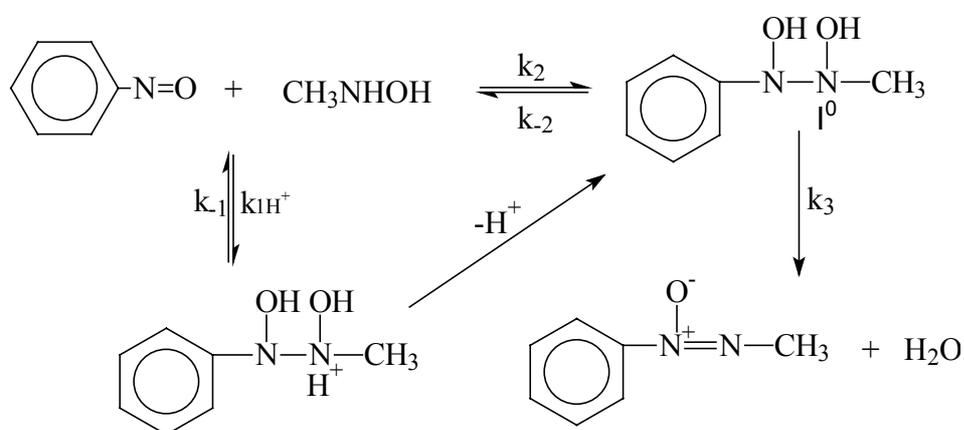
As reações foram acompanhadas por um tempo de três meia-vidas sob condições de pseudo-primeira ordem. As constantes de velocidades de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram calculadas através de um programa da empresa Microquímica de Florianópolis, SC. As constantes de velocidade de segunda ordem foram calculadas dividindo-se k_{obs} pela concentração de N-metilhidroxilamina livre, e as aparente (k_{2ap}) foram calculadas dividindo-se k_{obs} pela concentração do amina livre;

$$k_{2ap} = (k_{obs}/[Nu])fc \quad [40]$$

onde $fc = 1 + K_{ad} [Nu]$; quando $[Nu] K_{ad}$ é muito pequeno, $fc=1$.

A concentração da amina livre foi calculada através da equação de Henderson-Hasslbalch.⁷⁹

O tratamento matemático da reação mostrado no **Esquema 9** leva as equações 41, 42 e 43:



Esquema 9

$$k_{ad} = k_{1H^+} + k_2 \quad [41]$$

$$k_{deh} = k_3 k_{ad} [H^+] / (1 + k_3 k_{ad} [H^+]) \quad [42]$$

Estas equações consideram que a etapa determinante da velocidade da reação é a formação do intermediário neutro (I^0) e (k_{ad}) e a desidratação (k_{deh}) respectivamente. k_{2ap} foi calculada empregando a Equação 43;

$$k_{2ap} = k_{ad} k_{deh} / k_{ad} + k_{deh} \quad [43]$$

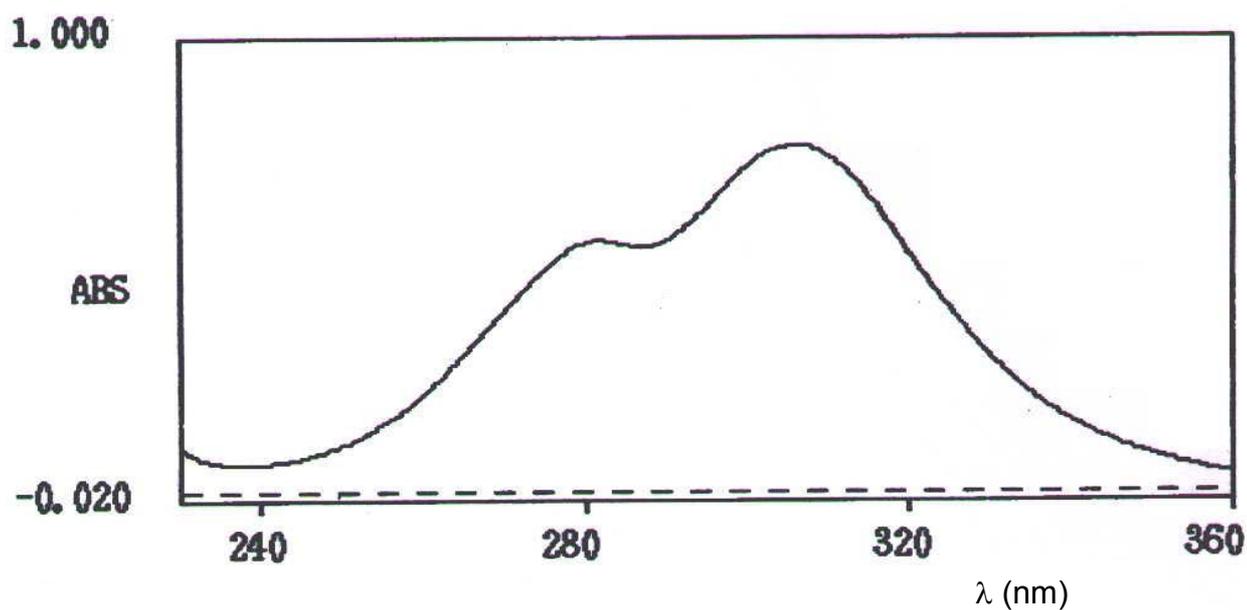


FIGURA 12. Espectro de UV-VIS do nitrosobenzeno ($6,67 \times 10^{-5}$ Mol/L) em água a, força iônica de 1,0 mol/L (KCl), pH=7 à 25 °C.

4.2.3 - Análise do Produto

A formação do produto, foi verificada através de análise de CG em um aparelho Shimatzu CG modelo 14A equipado com um detector de ionização de chama(FID). A coluna capilar utilizada foi de 0.25 mm x 25m sílica fundida OV-1. A temperatura foi programada para aumentar 5 °C / min de 40 °C a 190 °C. O hidrogênio foi usado como gás carreador.

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, serão apresentados os resultados obtidos através das análises de CG-EM para a reação da N-metilhidroxilamina e nitrosobenzeno.

A **Figura 13** mostra os cromatogramas da reação feita em metanol para diferentes tempos (5min, 30min e 60min), onde observou-se no primeiro cromatograma o pico do nitrosobenzeno, no segundo (30min) a diminuição de intensidade mesmo já com o aparecimento claro do pico do produto. No último cromatograma (60 min), observa-se o quase completo desaparecimento do reagente e o aparecimento do produto. Os espectrogramas de massas são apresentados nas **Figuras 14 e 15**.

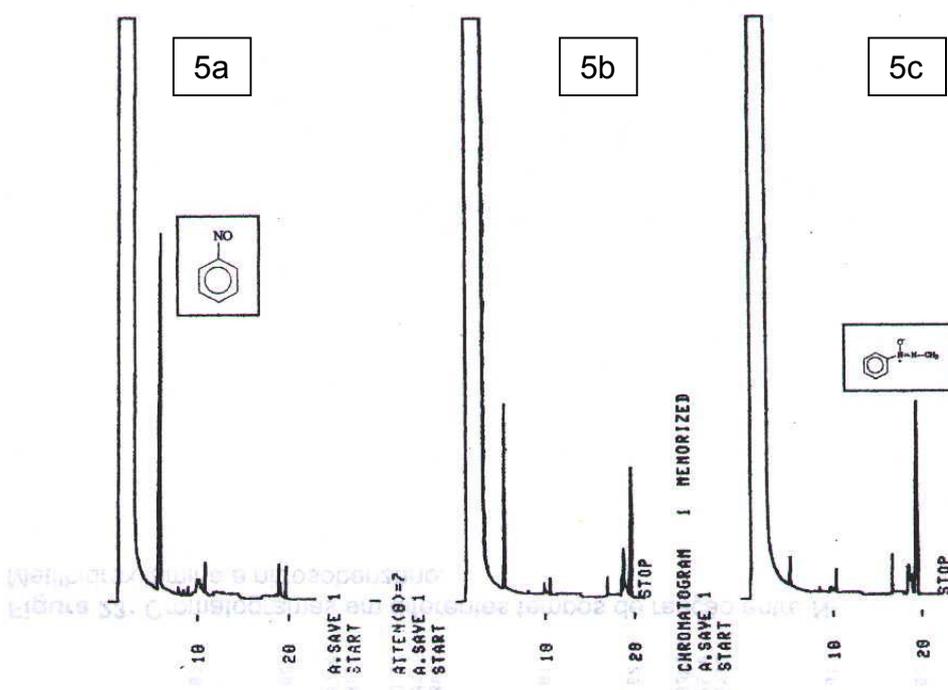


FIGURA 13: Cromatogramas para a reação entre N-metilhidroxilamina (0,1 mol/L) e nitrosobenzeno (0,1 mol/L) em metanol para diferentes tempos de reação: 5a. 3 minutos; 5b. 30 minutos e 5c. 60 minutos.

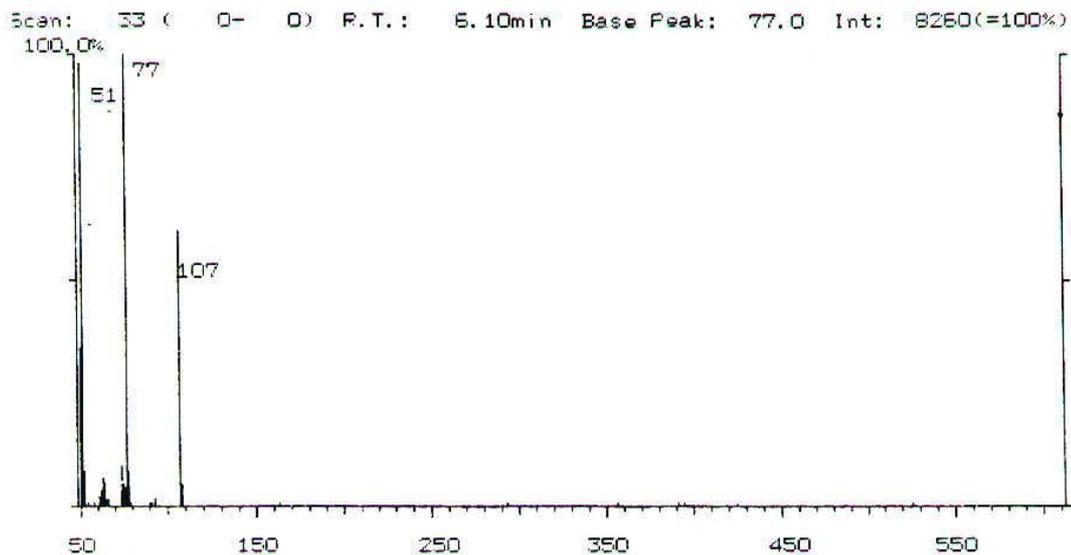


FIGURA 14: Espectro de massas do nitroso benzeno, feito a partir das análises cromatográficas (Figura 12).

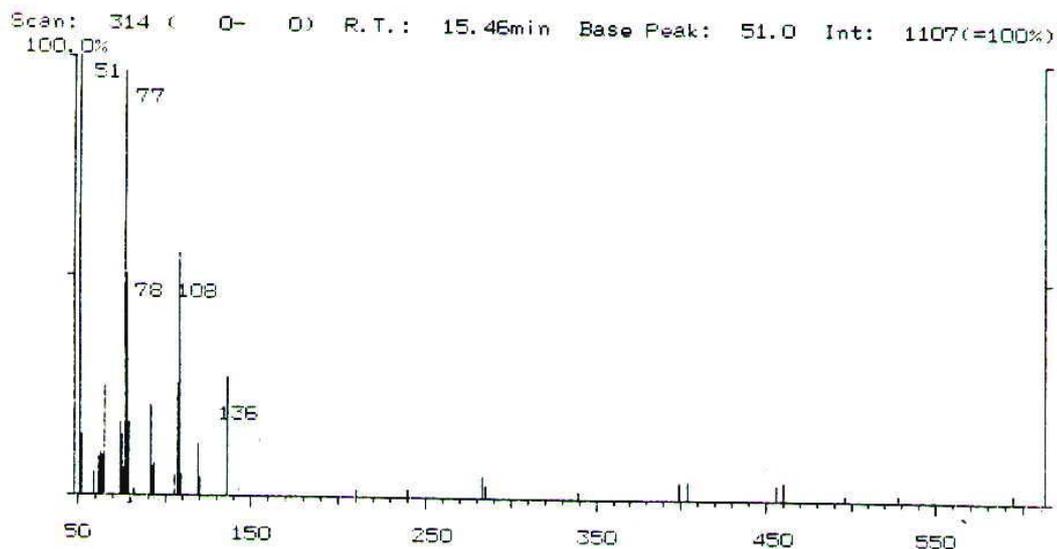
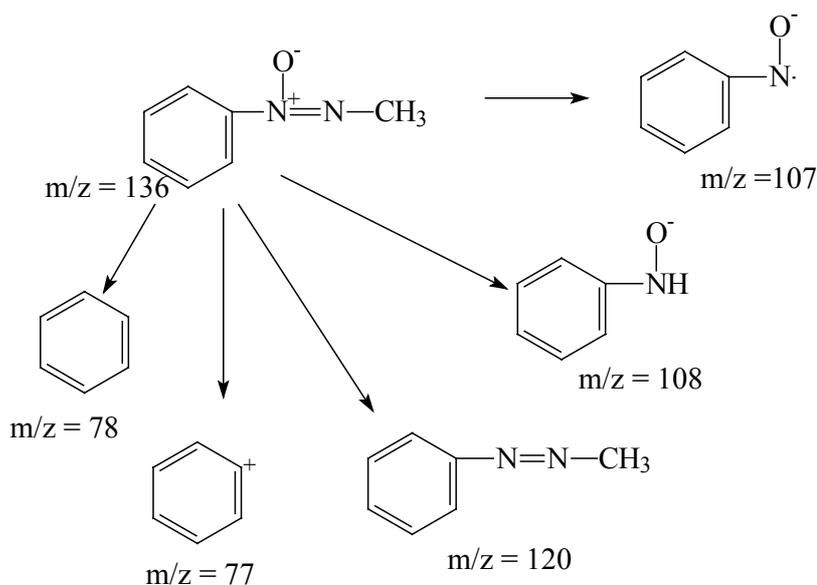


FIGURA 15: Espectro de massas do produto da reação, obtido a partir das análises cromatográficas (Figura 12) (tempo de reação = 60 minutos).

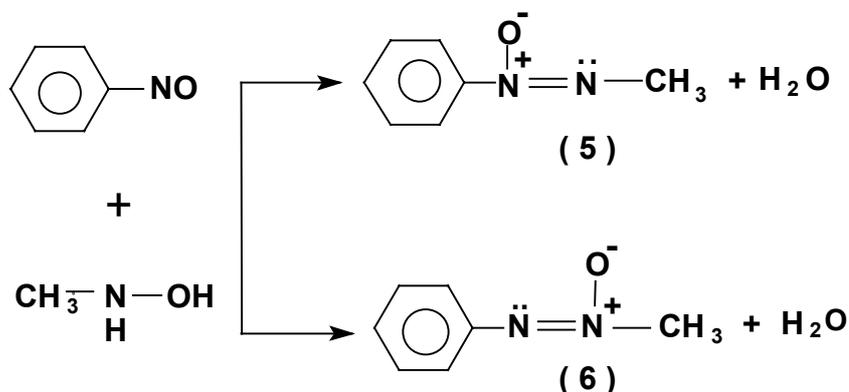
O espectro de massas mostrou um pico que corresponde ao íon molecular a m/z 136 e fragmentos principais em 120 (M-16), 108 (M-28), 78 (M-58) e 77 (M-59), correspondente ao produto (N-metil, N'-fenil-N'-óxido diazeno) (**Esquema 10**).



Esquema 10

A reação da N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno foi estudada na faixa de pH de 0 - 12 em água com concentração de N-metilhidroxilamina em quantidade suficiente para se obter condições de pseudo-primeira ordem.

A reação de N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno pode formar dois produtos diferentes de acordo com o **Esquema 11**. Análises dos produtos da reação por CG-EM indicaram que o composto (**5**) é o único formado na reação, conforme observado previamente por Freeman,⁸⁰ e também pelas análises de CG-EM mostradas e discutidas anteriormente.



Esquema 11

A dependência das constantes de velocidade de segunda-ordem (k_{2ap}) extrapoladas para concentrações de tampão zero em função do pH é mostrada na **Figura 16**. Entre pH 0 e 5, é observado um desvio não linear. Este desvio negativo geralmente é causado por uma troca na etapa determinante de velocidade, como observado na reação de formação de nitrona do p-clorobenzaldeído e N-metilhidroxilamina,⁸¹ e entre p-nitrosobenzeno e anilina.⁷²

Desta forma, assume-se que o mecanismo de reação da N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno ocorre por um processo de duas etapas; na primeira, ocorre o ataque do nucleófilo no nitrosobenzeno para formar o N,N'- dihidroxi intermediário (**Equação 46**), e a seguir uma segunda (determinante da velocidade) que envolve a desidratação deste intermediário para formar os produtos (**Equação 47**). Na primeira, a etapa determinante é observada entre pH 3,0 e 0; e na segunda entre 3,0 e 12,0.

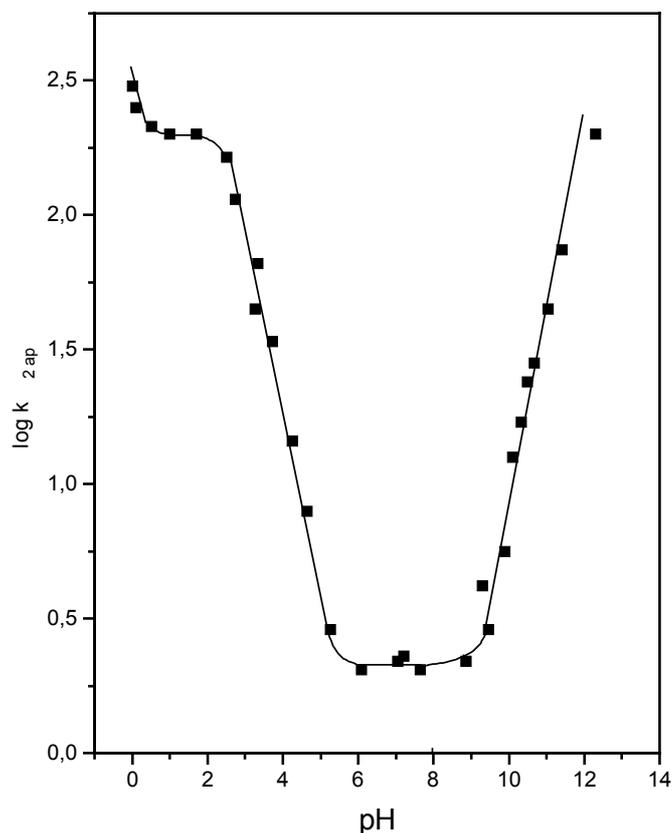
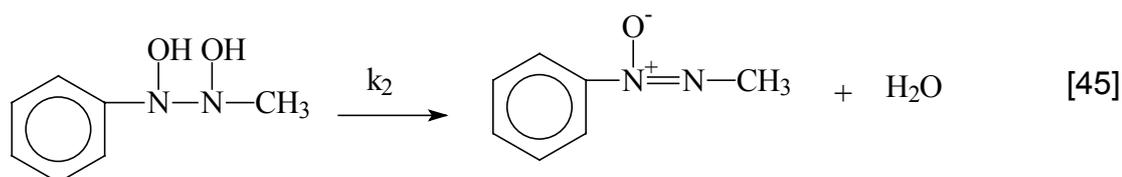
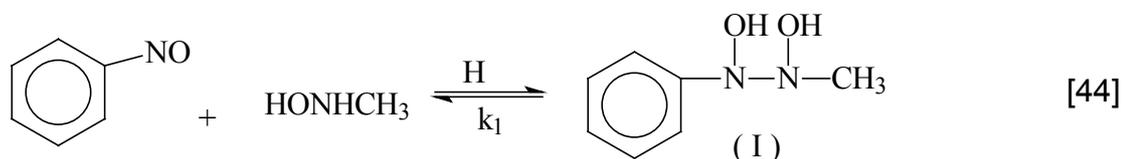


FIGURA 16. Variação do logaritmo da constante de velocidade de segunda ordem em função do pH para a reação de N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno em água, à 25°C e força iônica 1 Mol/L (KCl).



A constante de velocidade de terceira-ordem, determinada na presença de vários tampões, foi graficada em função da fração molar do ácido livre para várias concentrações. O intercepto direito fornece a constante catalítica para o componente ácido do tampão (k_{AH}), e o intercepto esquerdo fornece a constante catalítica para o componente básico do tampão (k_B), (**Tabela 6**).

Tabela 6. Constantes de velocidade para a formação de 2-oxido-1-metil-2-fenildiazeno da N-metilhidroxilamina e nitrosobenzeno por catálise ácida geral (k_{AH}) e básica geral (k_B)^(a)

Catalisador	pK _a	logk _{AH}	Logk _B
H ₃ O ⁺	-1.70	5.14	-
HCO ₂ H	3.69	2.94	-
CH ₃ CO ₂ H	4.67	2.57	2.17
CH ₂ (CO ₂ H) ₂	5.48	2.90	2.16
H ₂ PO ₄ ⁻	6.78	2.68	2.41
Imidazolio	7.02	2.03	2.65
Morfolínio	8.87	1.41	2.80
H ₂ O	15.70	-1.44	4.94

(a) N-metilhidroxilamina 10⁻³ M, nitrosobenzeno 8,33x10⁻⁵ M, em água, à 25°C e força iônica 1,0M (KCl).

A constante de velocidade catalítica para diferentes ácidos seguiu a equação de Brønsted (**Figura 17**) e forneceu o valor de $\alpha = 0,34$ ($r = 0,99$).

Experiências com diferentes concentrações de ácido acético a pH = 3,0, mostraram que estes valores concordam com os obtidos a partir de um gráfico das constantes de velocidade de terceira ordem em função da fração molar do ácido livre, indicando que o mecanismo realmente apresenta catálise ácida geral. Os pontos correspondentes ao íon oxônio como um catalisador ácido com uma correlação satisfatoriamente linear, é esperado para um mecanismo

concertado com participação do próton na formação ou ruptura de ligações de átomos pesados no estado de transição. O ponto correspondente à água, também está na linha de Brønsted, mostrando que esta molécula participa do mecanismo como um catalisador ácido geral.

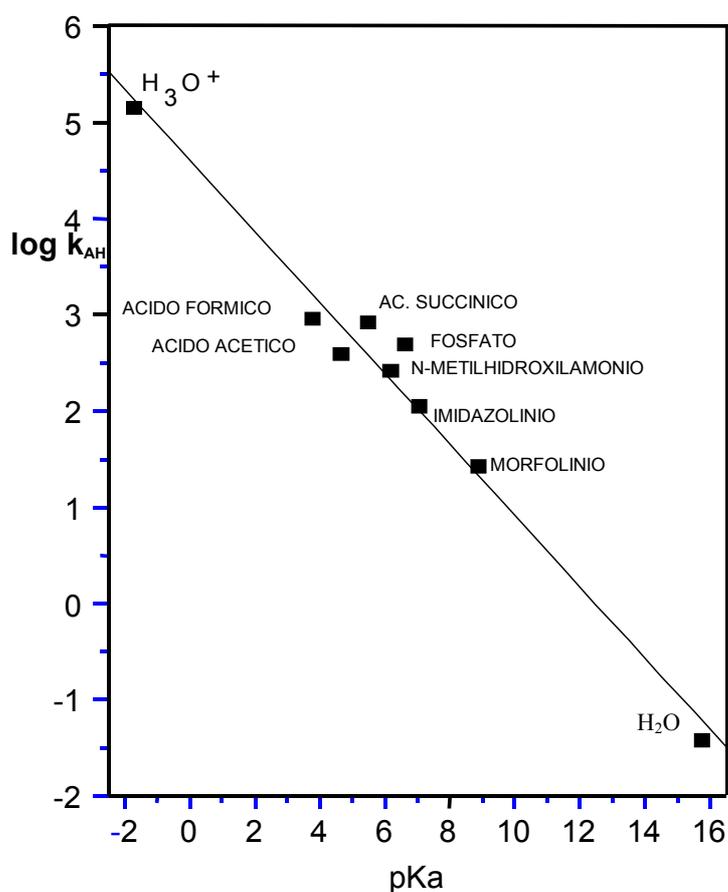


FIGURA 17. Gráfico de Brønsted para a etapa de desidratação da reação da N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno por catálise ácida geral em água, à 25°C e força iônica 1M (KCl) $\alpha = 0,34$ ($r = 0,99$).

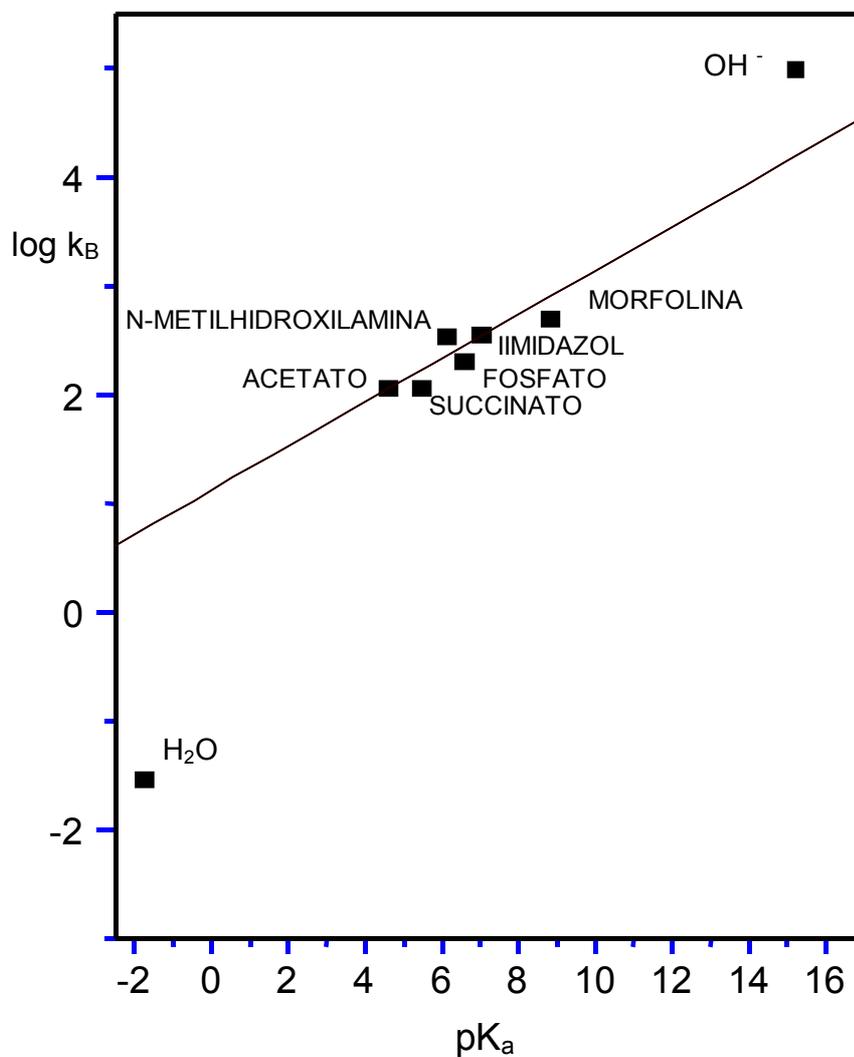


FIGURA 18. Gráfico de Brønsted para a etapa de desidratação da reação entre N-metilhidroxilamina e nitrosobenzeno por catálise básica geral, em água, à 25°C e força iônica 1M (KCl) $\beta = 0,20$ ($r = 0,98$).

A constante catalítica para as diferentes bases fornece o gráfico de Brønsted com $\beta = 0,20$ ($r = 0,98$) (Figura 18).

É importante observar que o ponto correspondente para o íon hidróxido mostra um desvio positivo de dez vezes. Este fato, foi também verificado nas reações de N-fenilhidroxilamina com nitrosobenzeno, e é considerado como uma forte evidência para catálise básica específica por este íon.⁷¹

A linha evidencia o pK_a da primeira ionização de um grupo hidroxila do intermediário N,N'-dihidroxi da reação. Para o pK_a de um intermediário similar da reação de nitrosobenzeno e N-fenilhidroxilamina, o qual é calculado como 11,61,⁷¹ é possível calcular a diferença introduzida pela troca de um grupo fenila por um metila.

O efeito retirador de elétrons do grupo fenila pode ser calculado como sendo σ^* (0,75)⁸² e a equação $-\Delta pK_a = 0,06 + 0,63\sigma^*$, como $-0,59$.⁸² Contudo, desde que o grupo fenila está ligado ao grupo funcional, este efeito assumindo condições normais, deverá ser $-0,53/0,4 = -1,32$. O efeito do grupo metila, no qual apresenta $\sigma^* = 0,00$, é de $+0,06$. Portanto, o pK_a do intermediário N,N'-dihidroxi como um ácido deverá ser $11,61 + 0,06 - (-1,32) = 12,87$. Sempre com um erro de cálculo de uma unidade de pK_a do intermediário N,N'-dihidroxi é menor do que naquele do íon hidróxido, suportando a idéia de que o mecanismo é via catálise básica específica, considerando que atua como um verdadeiro catalisador geral, os valores de pK_a do catalisador devem estar entre aqueles sítios de substratos inicial e final.⁸³

A condensação entre N-metilhidroxilamina e nitrosobenzeno fornece como produto o 2-óxido-1-metil-2-fenildiazeno (**5**), mas não 1-óxido-1-metil-2-fenildiazeno (**6**); isto é, considerando o efeito de ressonância, o produto mais estável. Evidentemente a reação é cineticamente controlada porque uma saída do grupo 1-hidróxido é favorável com relação ao grupo 2-hidróxido para os efeitos indutivos dos grupos metila e fenila.

É interessante observar os seguintes fatos. A reação de N-metilhidroxilamina com nitrosobenzeno mostra um desvio negativo no gráfico de $\log k_2$ versus pH, o qual deve ser considerado como uma evidência por uma mudança na etapa determinante da velocidade de desidratação do intermediário de adição formado entre os reagentes em pHs altos, para o

ataque do nucleófilo no grupo nitroso a pHs baixos.⁵ A reação da N-fenilhidroxilamina com nitrosobenzeno não apresenta este tipo de desvio.⁷¹ A constante de velocidade da desidratação catalisada pelo íon hidroxônio na reação entre N-fenilhidroxilamina com nitrosobenzeno ($k_{H^+} = 1,44 \times 10^4 \text{ dm}^{-6} \text{ mol}^{-2} \text{ min}^{-1}$) é seis vezes maior do que a constante de velocidade de ataque concertado com a catálise do íon hidroxônio, a N-metilhidroxilamina no nitrosobenzeno ($k_{H^+} = 2,23 \times 10^3 \text{ dm}^{-6} \text{ mol}^{-2} \text{ min}^{-1}$) entre $\text{pH} \approx 0,5$ a $\text{pH} \approx 0$, e oito vezes maior do que a constante de velocidade de ataque, não catalisado, da N-metilhidroxilamina no nitrosobenzeno ($k_2 = 1,77 \times 10^2 \text{ dm}^{-6} \text{ mol}^{-2} \text{ min}^{-1}$) entre $\text{pH} \approx 3,0$ a $\text{pH} \approx 1,5$ (**Fig. 16**) anida que a N-fenilhidroxilamina é aproximadamente 10^4 vezes menos básico. Estes fatos, mostram que a reação de ataque da N-fenilhidroxilamina no nitrosobenzeno segue um mecanismo especial como foi mostrado por uma reação semelhante da N-fenilhidroxilamina com benzaldeído.⁷³

Ogata e colaboradores,⁸⁴ observaram que a reação de p-cloronitrosobenzeno e N-fenilhidroxilamina leva a formação de quatro azoxi-compostos. Eles sugerem que um pré-equilíbrio redox rápido com uma transferência de próton é estabilizada e que a condensação de todos os pares possíveis de reagentes conduz aos produtos observados(Eq.46):

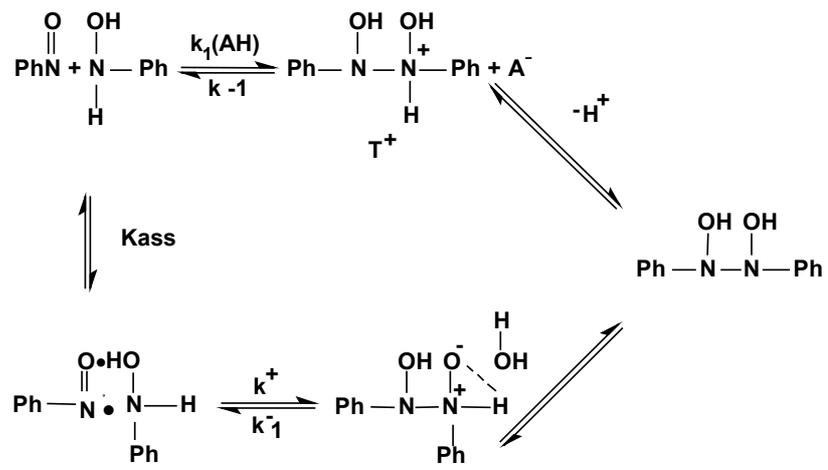


Darchen e Moinet,⁸⁵ tem sugerido um mecanismo via radicais livres através da formação de um intermediário N-hidróxi-N'-óxido que foi demonstrado não estar correto.⁷¹ No estudo da reação do nitrosobenzeno para substituído com N-alkil-N-arilhidroxilaminas, Knight e Loadman sugeriram que a reação ocorre via um intermediário com a formação de um par de radicais nitroxila por um mecanismo de transferência de elétrons.⁸⁶ Entretanto, evidências para um intermediário simétrico N,N'-dihidroxi formado através de um rápido equilíbrio foi sugerido por Shemyakin e colaboradores⁸⁷ através de

estudos de ^{15}N . Os estudos utilizando ^{18}O forneceram mais evidências da formação de um intermediário simétrico formado por um rápido equilíbrio na reação entre nitrosobenzeno e N-fenilhidroxilamina.

Neste trabalho, foi demonstrado que o perfil de pH para a reação entre nitrosobenzeno e N-metilhidroxilamina é muito semelhante ao apresentado pela reação da N-metilhidroxilamina com p-clorobenzaldeído,⁸¹ o que também evidencia um mesmo mecanismo para ambas as reações. Por todas estas razões, não existindo evidências de que a reação ocorre por um mecanismo via radical livre, sugere-se que esta ocorre por um mecanismo iônico semelhante ao de formação da oxima.⁸⁸

Os resultados aqui apresentados não podem excluir a existência de um mecanismo por radicais livres como um caminho de reação com formação de azoxibenzeno, mas permite considerar um mecanismo alternativo com a existência de uma pré-associação entre o nitrosobenzeno e a N-fenilhidroxilamina formado em duas etapas. Na primeira, ocorre uma ligação entre o grupo hidroxila da N-fenilhidroxilamina e o oxigênio do grupo nitrosil; e na segunda ocorre o ataque do nitrogênio nucleofílico da N-fenilhidroxilamina sobre o nitrogênio eletrofílico do nitrosobenzeno. Este “complexo” apresenta um arranjo estérico e eletrônico especial, que não apresentado pela reação entre nitrosobenzeno e N-metilhidroxilamina que segue um mecanismo concertado de ataque do nucleófilo sobre o nitrosobenzeno catalisado por ácido (**Esquema 12**).



Esquema 12

CAPÍTULO 5

**ESTUDO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR MODELOS
MIMÉTICOS: HIDRÓLISE DO ANIDRIDO BENZÓICO NA
PRESENÇA DE DIFERENTES CICLODEXTRINAS**

5.1 - RELEVÂNCIA E CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

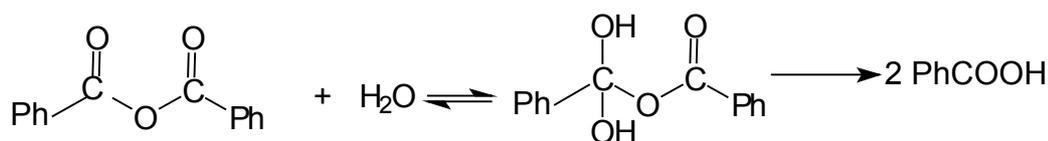
As ciclodextrinas tem sido usadas como modelo de enzimas em inúmeras reações, tais como hidrólise de alquilnitrosaminas,⁸⁹ hidrólise de RNAs,⁹⁰ entre muitas outras.

As ciclodextrinas (CDs), despertaram interesse no estudo como modelos enzimáticos devido ao fato de as mesmas formarem complexos de inclusão com substratos hidrofóbicos em solventes polares.⁹¹ Este comportamento é comparável ao de formação do complexo enzima-substrato levando à aceleração ou inibição competitiva e seletiva em reações com as ciclodextrinas.

A hidrólise de ésteres em meio aquoso na presença de CDs tem sido extensivamente estudada.^{92,93} Vários tipos de ésteres foram estudados, e seu comportamento em presença de CDs variou de acordo com suas estruturas.

Diferentes mecanismos têm sido sugeridos para a reação de hidrólise básica de ésteres e anidridos em meio aquoso, todos via catálise básica geral ou catálise nucleofílica.⁹⁴

Porém, a reação de hidrólise do anidrido benzóico(AnB) ainda não tem sido estudada em presença de CDs.



Esquema 13

Neste trabalho, estudou-se o mecanismo de catálise na reação de hidrólise do AnB em meio aquoso, bem como a eficiência de catálise da β -ciclodextrina nativa e sulfatada (CDS) em relação a diferentes catalisadores oxigenados (Gráfico de Brønsted), bem como determinou-se a estequiometria e constante de formação dos complexos do AnB com β -CD e CDS por métodos cinéticos e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H).

5.1.1 CICLODEXTRINAS: Definição, Origem e Estrutura

As ciclodextrinas são um conjunto de moléculas cíclicas, constituídas por unidades de glicose unidas entre si por ligações glucosídicas $\alpha(1,4)$. São moléculas de origem natural obtidas mediante degradação enzimática do amido pela ação da enzima glucosiltransferase (CGT amilase, produzida pelo *Bacillus macerans*) que, mediante reação intramolecular elimina uma molécula de água levando à ciclização da cadeia da glicose (**Figura 19**).

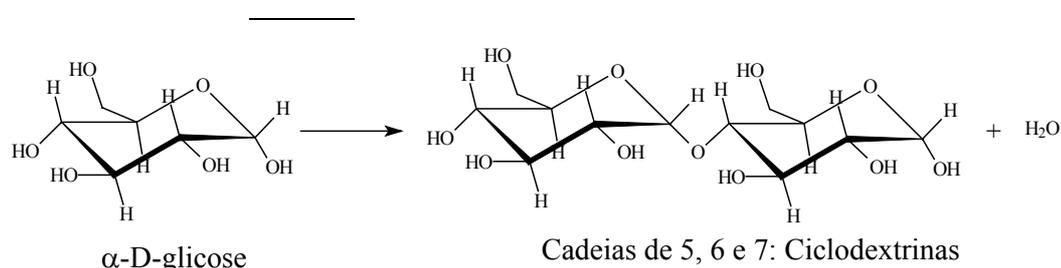


Figura 19: Formação das ciclodextrinas por ligações α -(1,4) da D-glicose.

A **Figura 20**, mostra as dimensões moleculares e estruturas das α , β e γ -CD.

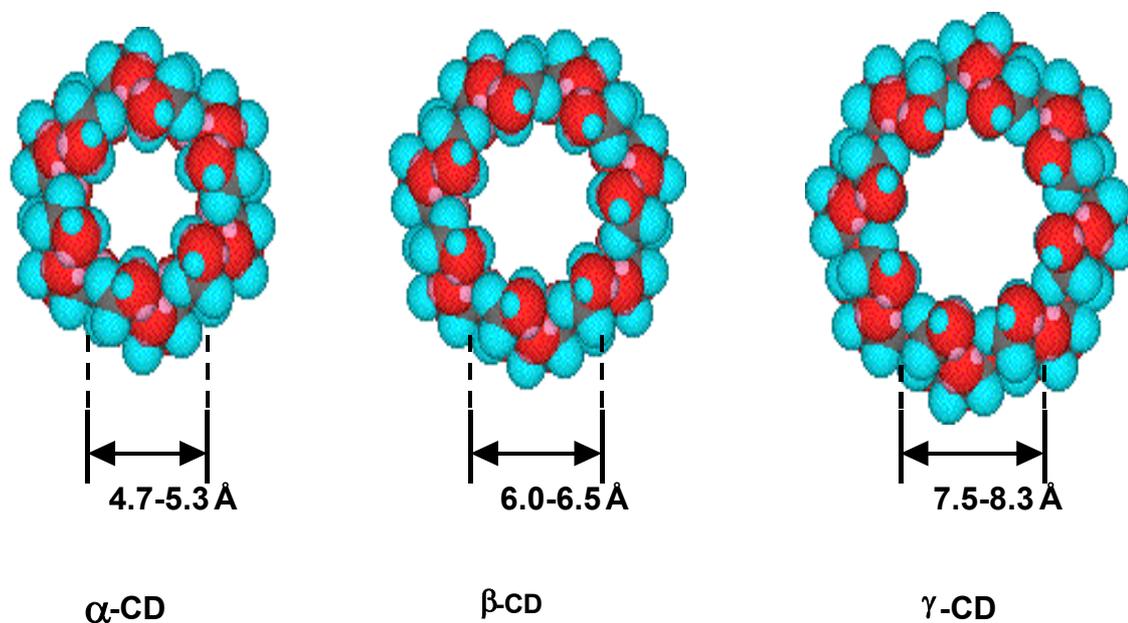


Figura 20. Dimensões moleculares e estruturas das ciclodextrinas.

As ciclodextrinas foram descobertas em 1891 por Villiers, sendo que as primeiras etapas para sua preparação sintética e purificação foram descritas por Schardinger em 1903.⁹⁵

Segundo o número de unidades de glicose (de 6 até 8), as principais ciclodextrinas são denominadas, α -, β - e γ - ciclodextrina, respectivamente. Suas estruturas e dimensões foram determinadas por difração de raios X e de neutrons.

As unidades de glicose estão unidas de tal forma que as ciclodextrinas formam um “cone” em que todos os grupos –OH primários (carbono 6) das unidades de glicose situam-se na parte mais estreita e todos os grupos –OH secundários (carbonos 2 e 3) na parte mais larga (**Figuras 21 e 22**).

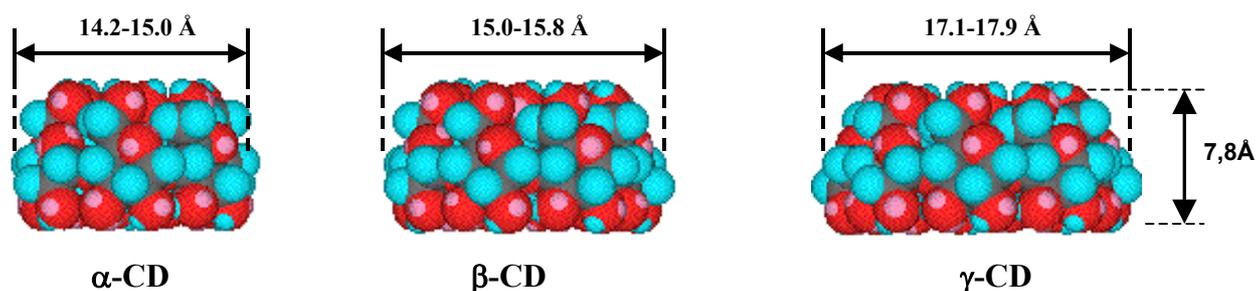


Figura 21. Estrutura cônica das ciclodextrinas.

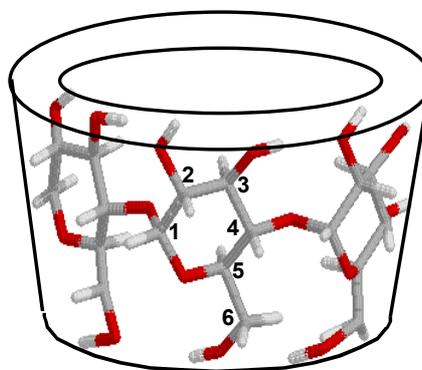


Figura 22. Molécula de ciclodextrina, indicando a orientação dos OH dos carbonos 2, 3 e 6.

No interior da cavidade estão orientados os átomos de hidrogênio e os oxigênios que ligam as moléculas de glicose umas nas outras (carbonos 1 e 4), conferindo um caráter hidrofóbico e com alta densidade eletrônica (**Figura 23**).⁹⁶

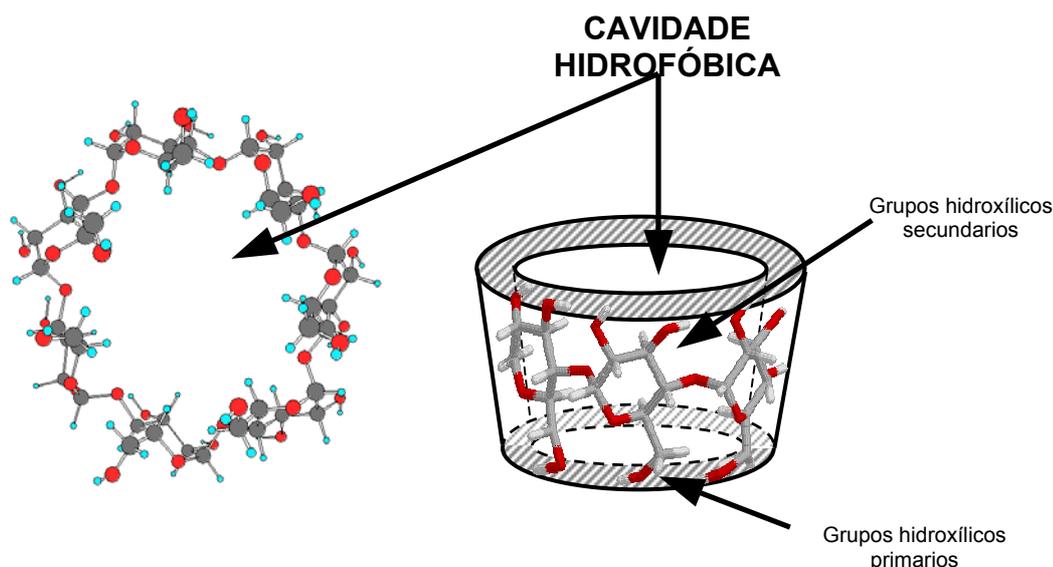


Figura 23. Esquema da estrutura funcional da ciclodextrina.

O átomo de oxigênio do grupo OH do carbono 2 de uma unidade de glicose pode formar uma ponte de hidrogênio com o próton do grupo OH do carbono 3 da unidade de glicose adjacente. Os grupos hidroxilas secundários OH(2) e OH(3), encontram-se em posição equatorial. O grupo OH(2) está orientado para o interior da cavidade, e o grupo OH(3) encontra-se orientado para fora, do mesmo modo que as hidroxilas primárias OH(6). Isto faz com que as ciclodextrinas tenham um grande momento de dipolo.

As ciclodextrinas são praticamente insolúveis na grande maioria dos solventes orgânicos.⁹⁵ A β -ciclodextrina é a menos solúvel em água das três ciclodextrinas de origem natural, sendo de 1,85 g/100mL a 25°C. As solubilidades da α e γ -CD são 14,5g/100mL e 23,2g/100mL, respectivamente. A solubilidade das ciclodextrinas varia de forma importante com a temperatura.⁹⁷

Estas propriedades físico-químicas conferem grande importância para estes compostos, que se traduzem em múltiplas aplicações nos mais variados campos como química, farmácia, indústria de alimentos, etc.⁹⁵

A propriedade fundamental das ciclodextrinas é a formação de complexos de inclusão com diversas moléculas hóspedes, seguindo, formas estequiométricas variadas, apresentando propriedades físicas e químicas diferentes da ciclodextrina e hóspede separados. As forças intermoleculares que levam o composto a complexar-se com uma ciclodextrina vai desde forças de Van der Waals até formação de pontes de hidrogênio. As moléculas orientam-se de forma que alcançam a máxima concordância entre as características de polaridade da ciclodextrina, hóspede e solvente.

A **Figura 24** representa esquematicamente como um complexo pode ser formado.

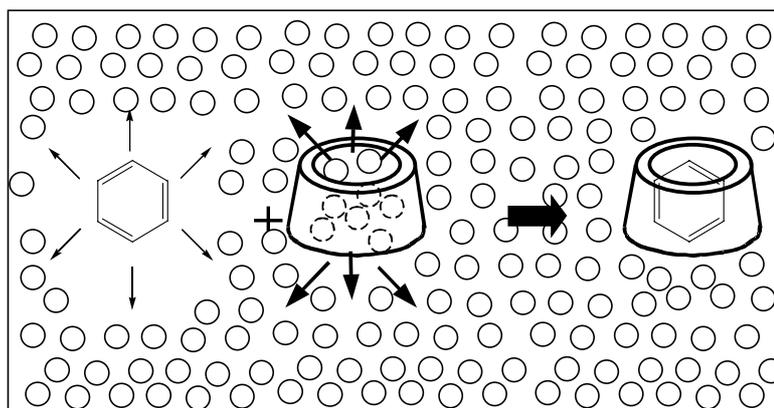


Figura 24: Esquema da Formação de um Complexo de Inclusão.

Vários complexos podem ser formados em diferentes formas de complexação: a) *Completa*, b) *Parcial*, c) *Axial*: d) *Tipo sandwich* estequiometria 2:1 e e) *Complexos com diversas estequiometrias*, ou seja, várias moléculas entram em uma ou em várias ciclodextrinas (“c” a “e”) ou uma molécula hóspede forma complexo com ciclodextrinas(**Figura 25** a-e, respectivamente).

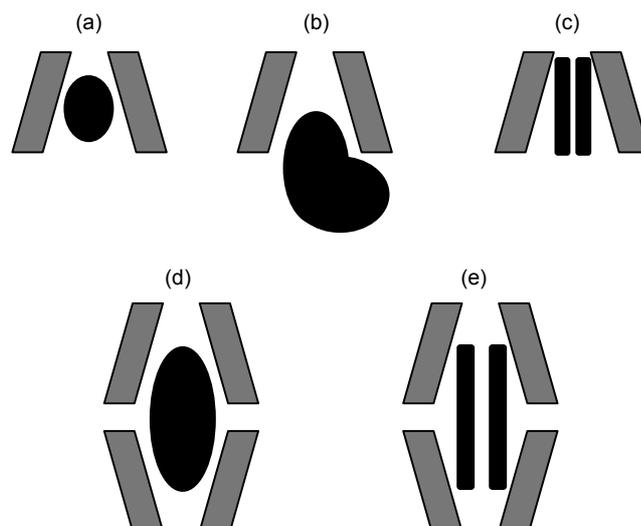


Figura 25. Principais tipos de complexos de inclusão.

Como a formação de complexos depende da polaridade do hóspede, somente são interessantes aquelas moléculas que possuem polaridade inferior a da água. As moléculas de alta polaridade são muito solúveis e pouco efetivas, já que o interior da ciclodextrina é apolar. Geralmente, a estabilidade de um complexo é proporcional ao caráter hidrofóbico dos hóspedes ou substituintes.

As propriedades das ciclodextrinas acima expostas as tornam alvo como moléculas modelos de enzimas artificiais na busca de um melhor entendimento de seu mecanismo. Tornou-se possível desenvolver catalisadores industriais com maior atividade e seletividade e regular bioreações artificialmente, entre muitas outras.⁹⁸

5.1.2 - Ciclodextrinas como Modelos Enzimáticos.

As enzimas são proteínas que possuem a propriedade de acelerar *in vivo* diversas reações com eficiência e alta especificidade. Embora as enzimas sejam moléculas muito complexas, seu poder de catalisar uma reação pode ser atribuído a uma região pequena da molécula em forma de cavidade onde o substrato penetra, e é transformado pelos grupos catalíticos. Esta região é chamada de *sítio ativo*.

A idéia de obter enzimas artificiais surgiu nos últimos anos da década de 1960 como resultado da procura de sistemas artificiais capazes de catalisar uma reação com uma eficiência semelhante às enzimas naturais e com maior estabilidade. Estes estudos também contribuíram em grande parte ao esclarecimento do mecanismo de ação das enzimas naturais.

Uma enzima artificial é um sistema que pode reproduzir a natureza do sítio ativo de uma enzima natural. As ciclodextrinas são moléculas muito visadas na busca deste tipo de catalisador, considerando propriedades intrínsecas mencionadas anteriormente. A **Figura 26** apresenta um modelo de estearase a partir da β -ciclodextrina modificada, mostrando as diferentes partes da enzima artificial idealizado por Bender e D'Souza.⁹⁸ A estratégia consiste em unir à cavidade um ou vários grupos que atuam como centro ativo. O exemplo apresentado é o da quimiotripsina artificial baseado em um derivado da β -CD.

Esta esterase artificial hidrolisa o acetato de m-terc-butilfenilo com uma eficiência comparável a da quimiotripsina natural, e é muito mais estável frente a temperatura que sua análoga natural.

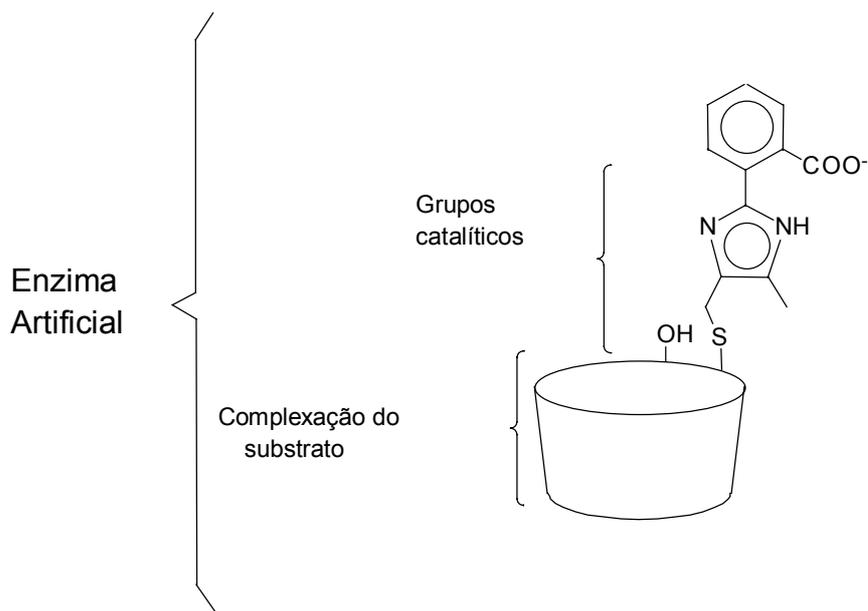
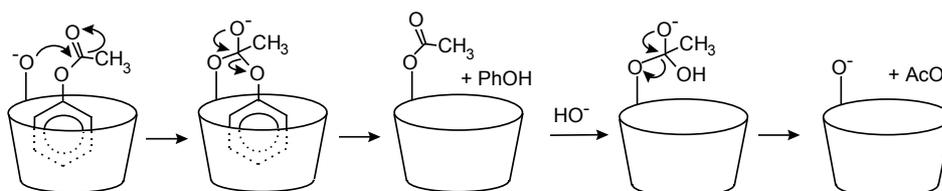


Figura 26: Estrutura de uma enzima artificial formada por β -CD.

A literatura especializada é abundante em exemplos de modelos de proteases,⁹⁹ esterases,^{9,100-102} transaminases,¹⁰³ ribonucleases,^{104,105} descarboxilases,¹⁰⁶ metaloenzimas,^{101,107-114} flavoenzimas,¹¹⁵⁻¹¹⁷ e outras.¹¹⁸⁻¹²⁰ Ciclodextrinas sem substituintes podem acelerar a hidrólise de ésteres derivados de diversos ácidos, como os que possuem grupos hidrofóbicos tal como anéis benzênicos ou cadeias alquílicas longas, sendo portanto modelos de esterases. O exemplo mais simples é a hidrólise do acetato de fenila pela β -CD⁹ de acordo com um mecanismo de transacetilação, sendo obtido um derivado mono-acetilado que é então hidrolisado para regenerar a β -CD (Esquema 14).



Esquema 14

Em pH=10,2 e em presença de β -CD, esta reação é acelerada 25 vezes com relação à hidrólise na presença de tampão. Numerosos estudos realizados com outros substratos tem demonstrado que a primeira etapa do mecanismo é sempre a complexação da molécula na cavidade e em casos favoráveis foi isolado o intermediário mono-acilado, comprovando-se assim o mecanismo proposto.¹⁰²

Recentemente, Frago¹²¹ simulou com sucesso a enzima superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima que possui uma função muito importante no organismo por ser encarregada de proteger a célula de danos oxidativos provocados por excesso de radicais superóxido. Neste trabalho, foi determinado a atividade de tipo SOD dos sistemas Cu(II)-ciclodextrina na presença de moléculas portadoras de cargas positivas capazes de formar complexos de inclusão na cavidade da ciclodextrina. Foram estudadas a variação da atividade catalítica, as constantes de inclusão e a influência da magnitude da carga positiva na atividade do tipo SOD (**Figura 27**).

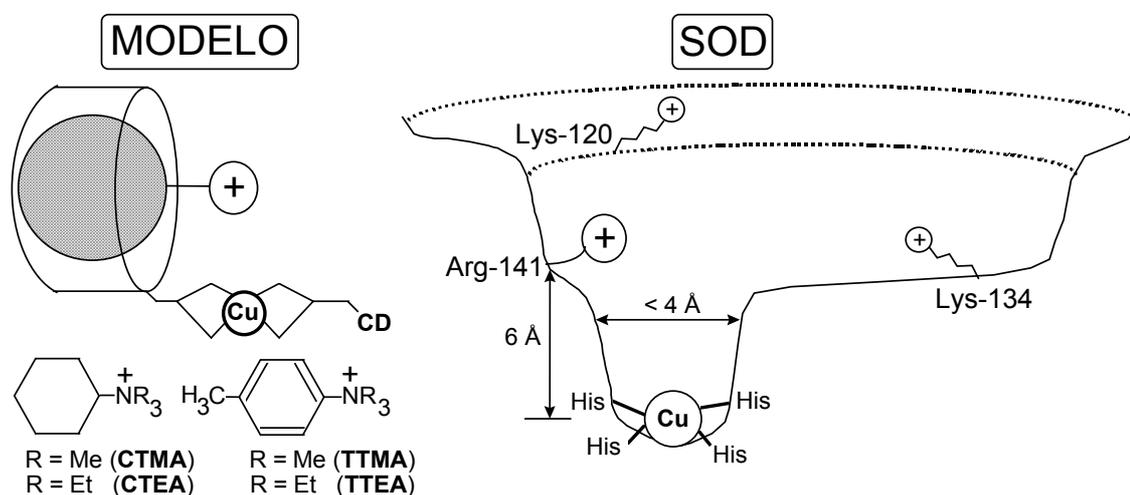


Figura 27: Estratégia empregada para a mimetização da função dos resíduos carregados positivamente na Cu,Zn-SOD por formação de complexos de inclusão de derivados de CD com sais de amônio quaternários.

Outros modelos de metaloenzima são conhecidos no qual o substituinte possui um átomo metálico coordenado que pode ter diversas funções. Entre outras funções, o metal presente pode provocar deslocamentos eletrônicos que resultam no enfraquecimento de ligações O-H na água ou em grupos hidroxílas, aumentando sua basicidade e, portanto o seu poder hidrolítico. O metal também pode ajudar a fixação do substrato na posição mais favorável para a reação ou favorecendo a ação dos grupos catalíticos.

A primeira metaloenzima artificial foi descrita em 1970 por Breslow.¹⁰⁹ Com o objetivo de melhorar as propriedades hidrolíticas da β -CD Breslow substituiu um grupo hidroxíla por um complexo de Ni(II). Este complexo acelera a hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila em 1000 vezes com relação a β -CD sem substituinte. A causa deste comportamento, é que o átomo de oxigênio do grupo oxima possui maior mobilidade e pode efetuar o ataque nucleofílico no substrato com mais facilidade que um grupo hidroxíla secundário da β -CD, o que provoca um aumento da velocidade da reação (**Figura 28**).

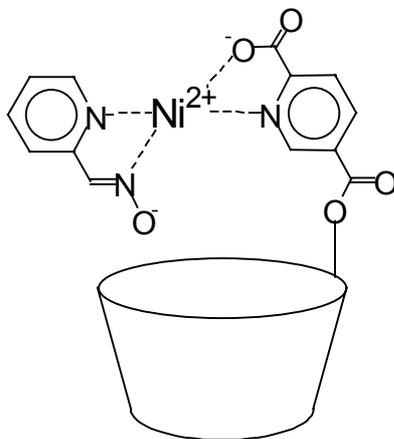


Figura 28: Metaloenzima artificial descrita em 1970 por Breslow.

A anidrase carbônica (ANC) é uma enzima que contém zinco e está associada ao metabolismo do CO₂. Esta enzima foi modelada empregando um complexo de Zn²⁺ de um derivado di-histamínico da β -CD que catalisa eficientemente a hidratação do CO₂ em pH básico.¹¹³

A hidrólise de fosfatos cíclicos também tem sido estudada na presença de complexo de Zn^{2+} com a mono-6-dietilentriamino-6-deoxi- β -CD.¹¹² Este complexo catalisa a abertura do 2'-3'-monofosfato cíclico de adenosina, assim como de dímeros de ribonucleotídeos com uma alta eficiência e regioselectividade (**Figura 29**).

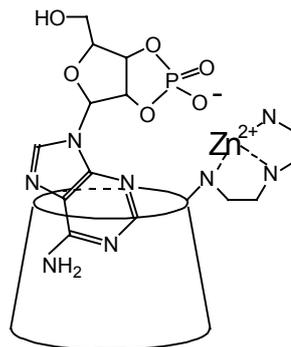


Figura 29: Complexo de Zn^{2+} com a mono-6-dietiltri-6-deoxi- β -CD.

O Sistema dimérico de CD, complexo de La^{3+} do dímero 4,4'-(6-deoxi-6-tio- β -CD)-2,2'-bipiridilo catalisa a hidrólise a pH=7 de fosfodiésteres aromáticos na presença de H_2O_2 , e é 10^8 vezes mais rápido que o complexo sem CD.¹⁰¹ Assume-se neste caso que ambos os anéis de CD fixam o substrato cooperativamente junto e permitem o ataque de uma molécula de H_2O_2 .

Outro exemplo recentemente publicado apresenta um modelo mimético do citocromo P-450, uma família de enzimas que participam em reações de hidroxilação de carbonos saturados ou catalisam a oxidação de duplas ligações. Estes sistemas foram modelados empregando um catalisador formado por um complexo de Mn(III) com uma porfirina ligada a quatro ciclodextrinas (**Figura 28**).¹¹⁴ Como substratos, foram estudados derivados do estilbeno e dihidroestilbeno que possuem resíduos hidrofóbicos como o terc-butilfenílico. Nestas reações, o centro metálico de Mn(III) aceita um átomo de oxigênio do iodosobenzeno que é transferido ao substrato. Os anéis de CD têm a função de complexar o substrato pelos resíduos terc-butilfenílicos, dispondo a ligação a ser transformada sobre o centro metálico.

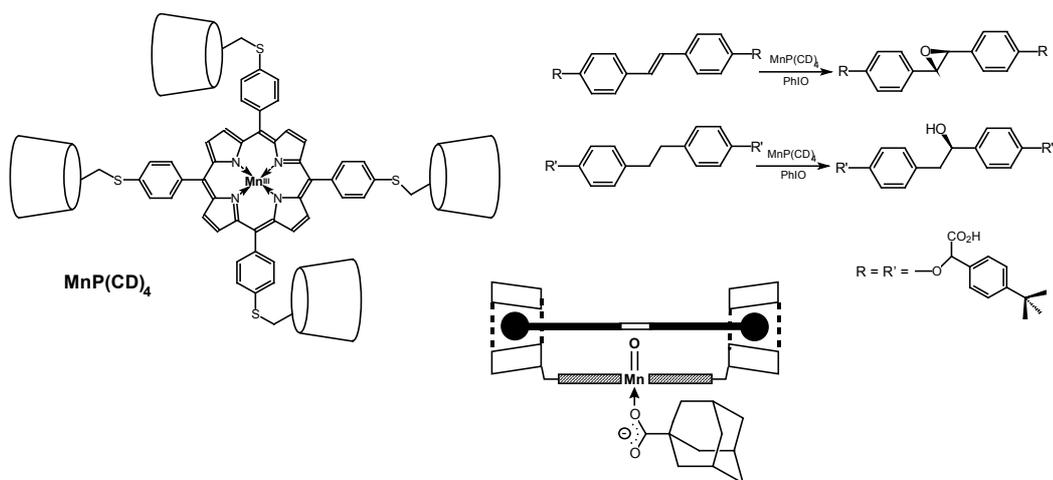


Figura 30: Sistema mimético do citocromo P-450 baseado em um derivado tetramérico da β -ciclodextrina ligada a uma metaloporfirina.

Os exemplos citados demonstram a grande importância da cooperação entre o substituinte e a cavidade da CD para obter melhores propriedades catalíticas e uma alta seletividade nas enzimas artificiais. O grande interesse teórico e prático destes estudos justifica que um número crescente de grupos de pesquisa dediquem seus esforços neste campo fascinante. A versatilidade de modificações químicas possíveis nas CDs oferece possibilidades ilimitadas no desenvolvimento de sistemas catalíticos cada vez mais eficientes e seletivos no estudo de fenômenos cada vez mais complexos.

5.2 - PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1 - Reagentes e Equipamentos

Todos os reagentes foram adquiridos comercialmente, com grau de pureza P. A., com exceção do anidrido benzóico que foi sintetizado de acordo com procedimentos descritos na literatura,⁷⁸ e caracterizado por técnicas de NMR ¹H e UV com ponto de fusão de 42°C.

A **Figura 31** apresenta o espectro de ultravioleta do anidrido benzóico nas condições da reação. As CDs foram doadas pela empresa Cerestar, E.U.A.. O equipamento utilizado para a realização dos estudos cinéticos foi um espectrofotômetro UV-VIS Hitachi modelo U-2000.

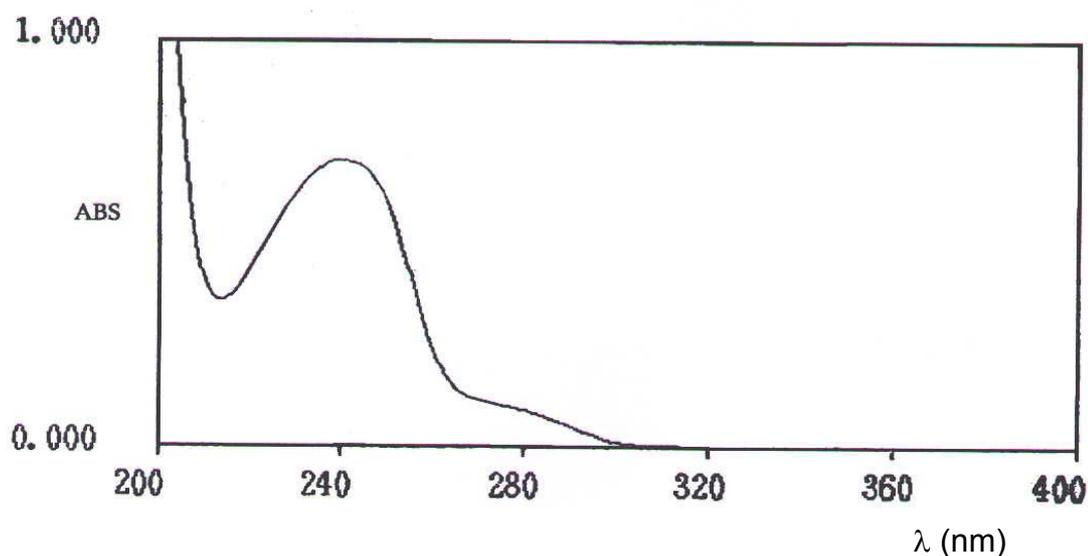


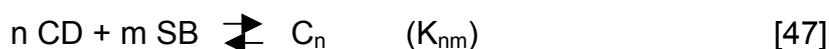
Figura 31. Espectro do anidrido benzóico ($3,33 \times 10^{-5} \text{M}$) em em água a 25 °C, força iônica de 0,5M (NaCl).

5.2.2 - Procedimento Cinético e Determinação das Constantes de Equilíbrio

As reações foram acompanhadas por método espectrofotométrico na região de UV por medidas de absorvância em 245 nm devido ao consumo de anidrido benzóico ($3,33 \times 10^{-5} \text{M}$) a 25°C , força iônica de 0,5M (NaCl).

5.2.3 - Determinação da Estequiometria e das Constantes de Equilíbrio de Formação Complexos por RMN ^1H

Em solução aquosa, a formação de um complexo entre uma molécula de ciclodextrina e de hóspede (SB) pode ser representada através do equilíbrio mostrado na **Equação 47**;



onde K_{nm} é constante de formação do complexo formado entre a CD e SB.

Experimentalmente, se obtém um sinal no espectro que será uma média do produzido pela ciclodextrina livre e complexada. O mesmo raciocínio é verdadeiro para a molécula hóspede.

Assim;

$$\delta_{\text{obs}} = f_{\text{CD}} \delta_{\text{CD}} + f_{\text{comp}} \delta_{\text{comp}} \quad [48]$$

onde f_{CD} e f_{COMP} representam a fração em massa de ciclodextrina livre e complexada, e δ_{CD} e δ_{COMP} representam os deslocamentos químicos correspondente a um determinado átomo de ciclodextrina livre ou complexada, respectivamente.

Considerando que;

$$f_{CD} + f_{COMP} = 1 \quad [49]$$

e combinando as equações [47] e [48], obtém-se;

$$\Delta\delta_{obs} = f_{comp} \Delta\delta_m = \frac{[Comp]}{[CD]_0} \Delta\delta_m \quad [50]$$

onde $\Delta\delta_{obs}$ representa a diferença ($\delta_{obs} - \delta_{CD}$) e $\Delta\delta_m$ representa a diferença ($\delta_{comp} - \delta_{CD}$).

Desta forma, existe uma relação direta entre o deslocamento observado no espectro de NMR ao se formar um complexo com a molécula hóspede.¹²²

5.2.4 - Determinação da Estequiometria dos Complexos

Para determinar a estequiometria dos complexos formados, usou-se representação de Job, que se baseia no fato de que qualquer função que seja diretamente proporcional a concentração de complexos apresenta um máximo no ponto correspondente a estequiometria do complexo formado.¹²²

Neste trabalho, a quantidade de ciclodextrina e hóspede é variável já que o que se mantém constante é a quantidade total de ciclodextrina e hóspede ($[CD]_0 + [SB]_0 = cte$). Multiplicando-se ambos os lados desta expressão, apresentada na Equação 50 pela fração molar da espécie observada, obtém-se outra expressão na qual o parâmetro $\Delta\delta_{obs} X_{CD}$ é diretamente proporcional à concentração do complexo (**Equação 51**);

$$\Delta\delta_{obs} \cdot X_{CD} = \frac{\Delta\delta_m}{[CD]_0 + [SB]_0} \cdot [C_n] \quad [51]$$

A formação de um complexo de estequiometria n:m, segundo a equação 51 leva a uma representação de Job que apresentará um máximo nas posições X relativo a estequiometria do complexo (**Figura 32 e Tabela 7**):

$$(X_{CD})_{\max} = \frac{n}{n+m} \quad ; \quad (X_H)_{\max} = \frac{m}{n+m} \quad [52]$$

Desta forma, através da posição do máximo do gráfico de Job obtém-se de forma simples a estequiometria dos complexos formados.

Tabela 7. Máximos de Job para alguns complexos de inclusão.

Complexo	n	m	$(X_{CD})_{\max}$	$(X_H)_{\max}$
CD ₁ H ₁	1	1	0,50	0,50
CD ₂ H ₁	2	1	0,67	0,33
CD ₁ H ₂	1	2	0,33	0,67
CD ₂ H ₂	2	2	0,50	0,50

A determinação da estequiometria é muito importante para caracterização dos complexos de inclusão de ciclodextrinas, porque os modelos matemáticos empregados para analisar os dados depende destes resultados.

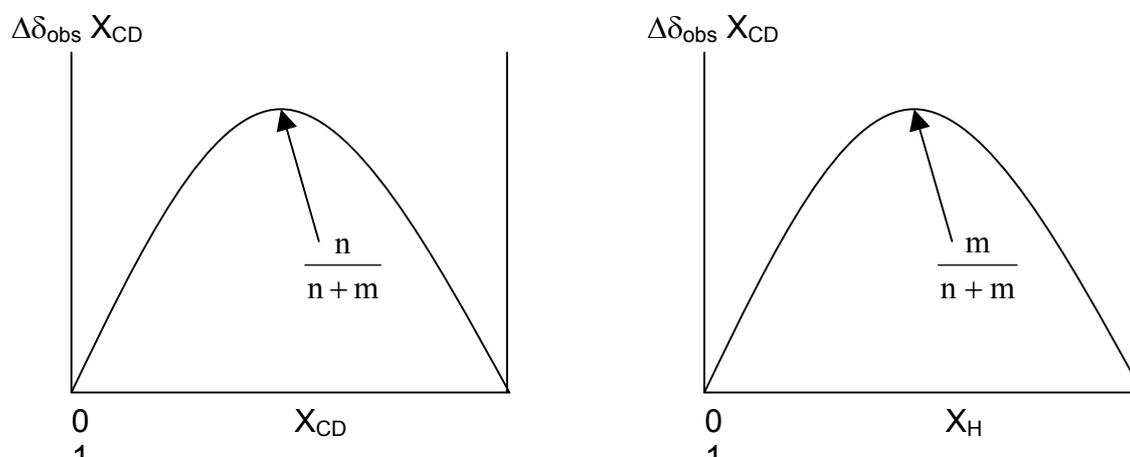


Figura 32 . Representação de Job segundo a fração molar de ciclodextrina (esquerda.) e hóspede (direita), para uma estequiometria n:m.

5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As **Figuras 33** e **34**, mostram os espectros de RMN de próton para a β -ciclodextrina e anidrido benzóico em metanol/água 50%, para posteriormente serem usados para a obtenção da estequiometria dos complexos formados.

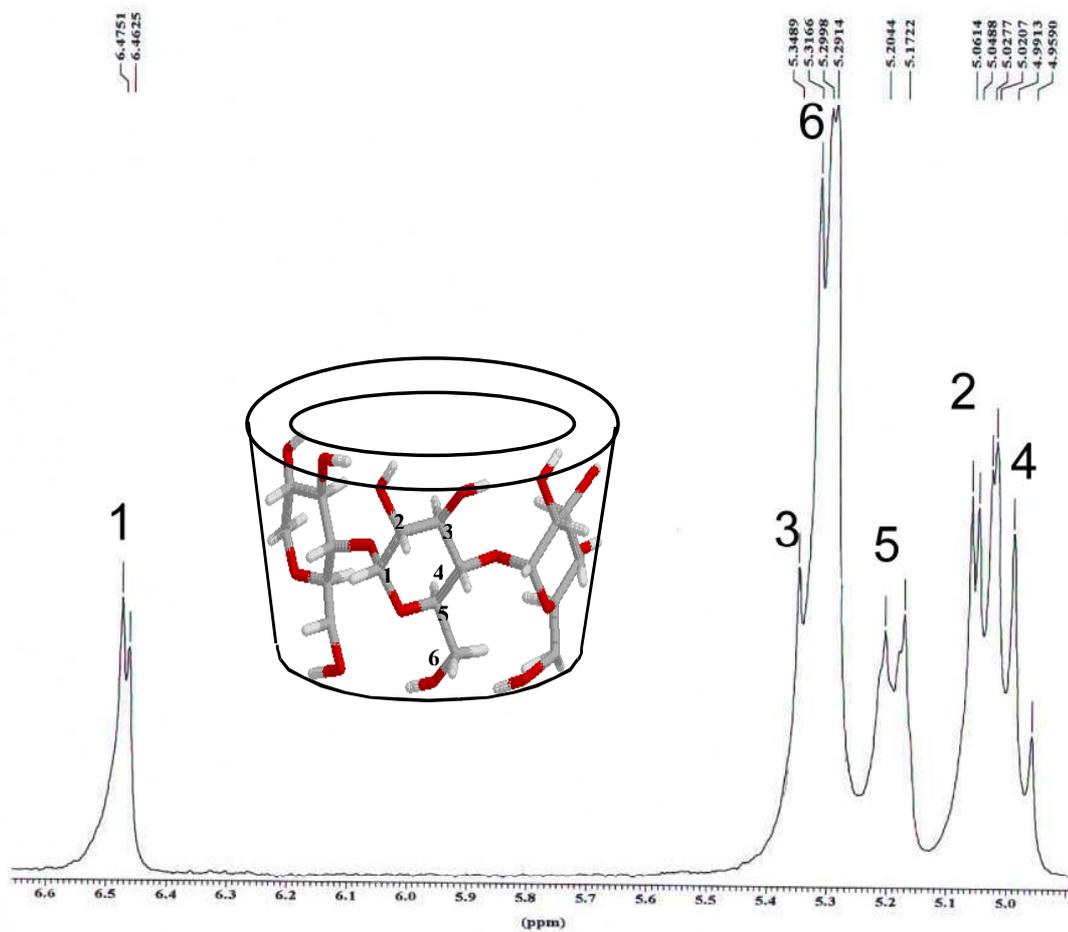


Figura 33: Espectro de ¹H-RMN (300MHz) da β-ciclodextrina em D₂O/MeOD 50%.

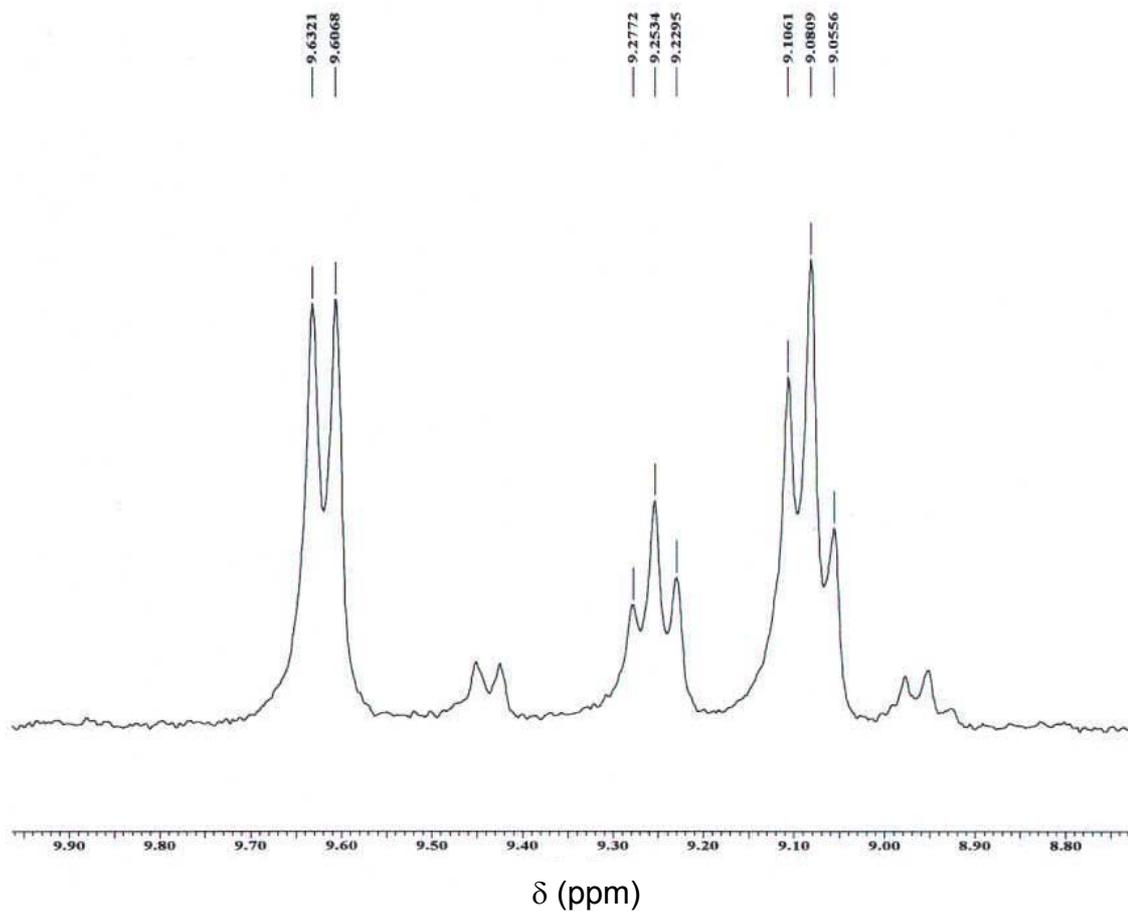


Figura 34: Espectro de ^1H -RMN (300MHz) do anidrido benzóico em $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ 50%.

A reação de hidrólise do anidrido benzóico foi estudada na faixa de pH entre 4,0 e 10,5, em água destilada.

A **Figura 35** mostra a dependência da velocidade da reação de hidrólise do anidrido benzóico com relação ao pH. Entre pHs 7,5 e 10,5, é observado catálise básica pelo íon hidróxido.

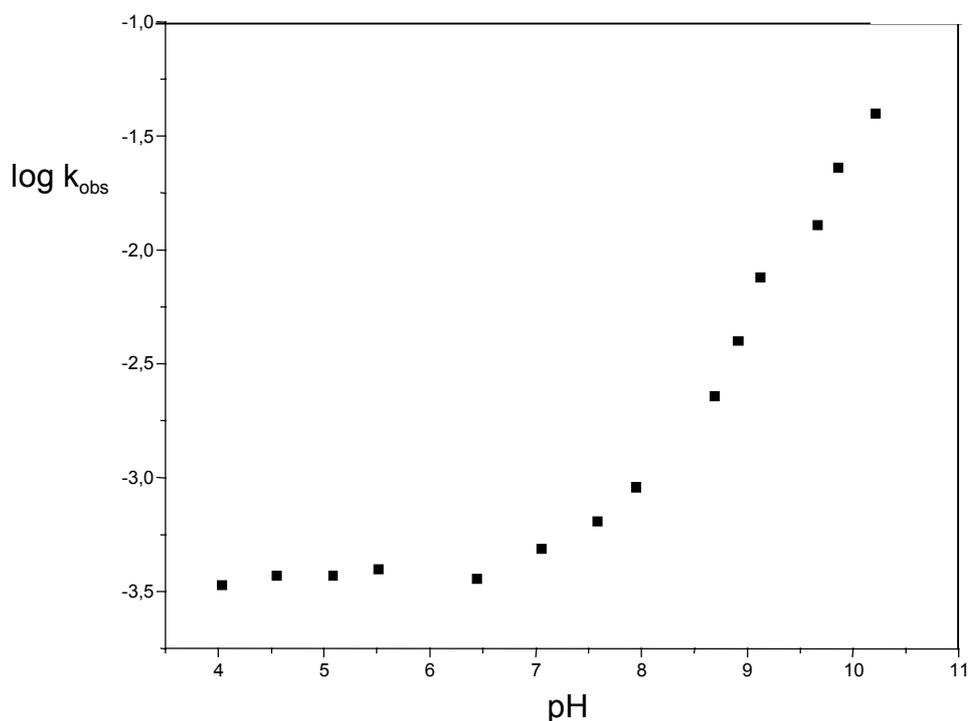
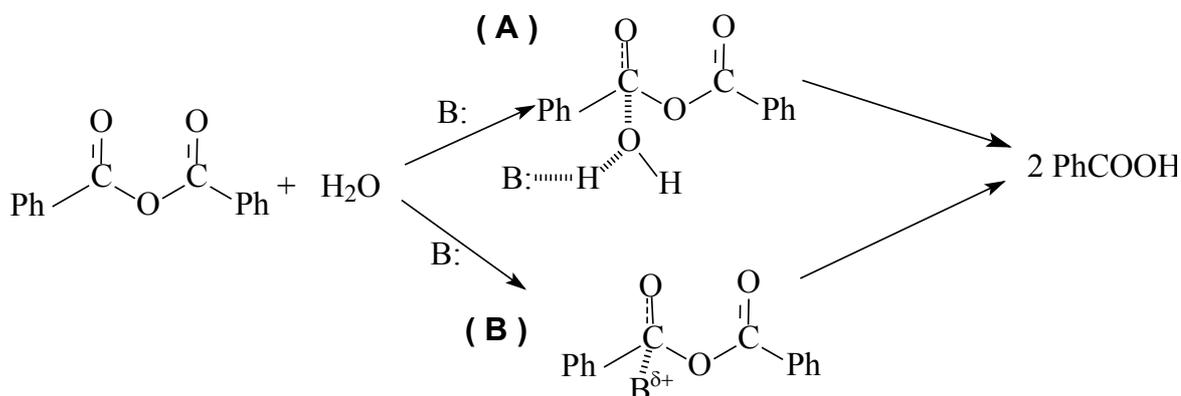


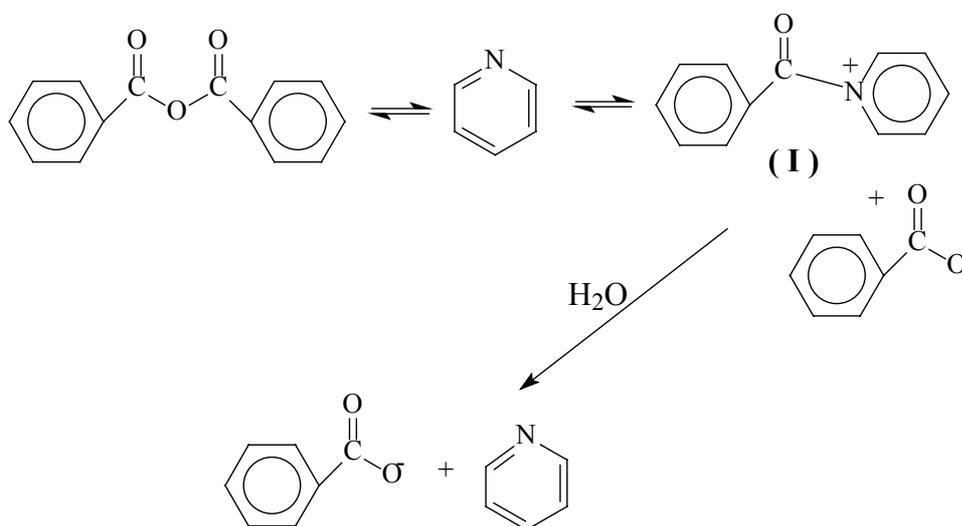
Figura 35. Variação da constante de velocidade de primeira ordem em função do pH para a reação de hidrólise do anidrido benzóico em água, à 25°C e força iônica 0,5M (KCl).

Dois mecanismos podem explicar a hidrólise do anidrido em condições básicas. Um é o ataque da água sobre uma das carbonilas, **(A)** com catálise concertada por base (básica geral), e um segundo considera o ataque direto do catalisador sobre a carbonila do anidrido **(B)** (catálise nucleofílica) (**Esquema 17**).



Esquema 17

A hidrólise do anidrido benzóico foi estudada na presença de piridina mostrando que ocorre a formação de um intermediário (I) que foi detectado por espectroscopia de UV, suportando a hipótese do mecanismo de catálise nucleofílica (**Esquema 18**).¹²³



Esquema 18

Este mecanismo, foi também confirmado neste trabalho pela ausência de catálise na reação quando a mesma foi realizada na presença de íon benzoato (**Figura 36**).

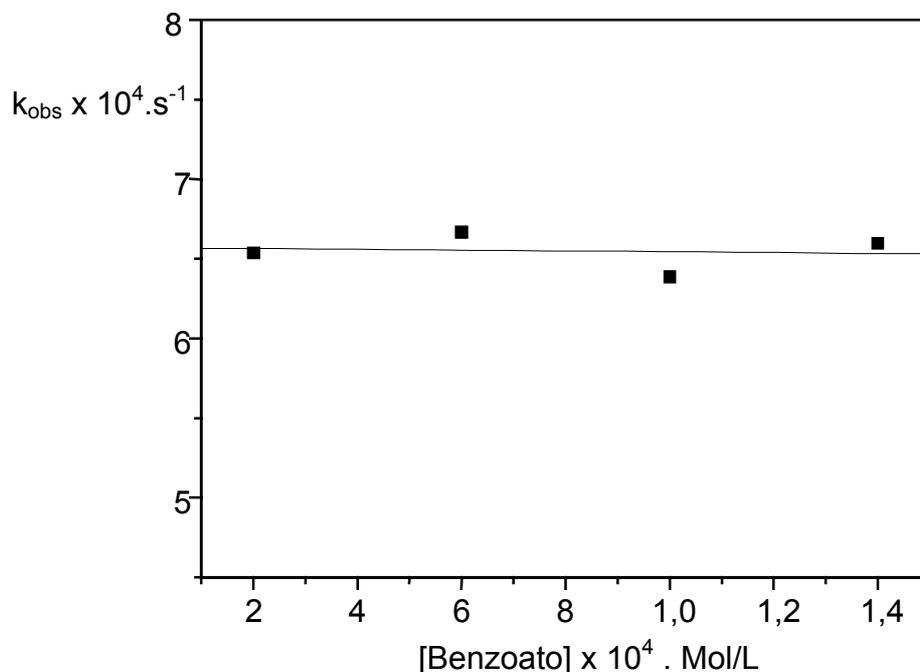
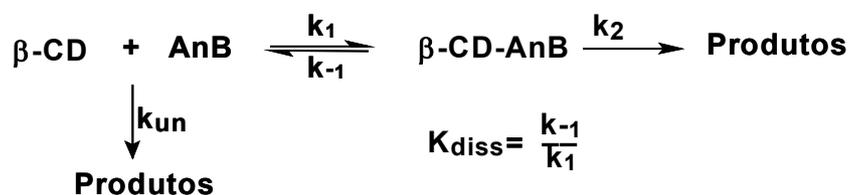


Figura 36: Variação de k_{obs} em função da concentração de benzoato de sódio para a reação de hidrólise do AnB, à 25 °C, pH=7,0, força iônica de 0,5M (NaCl) e $[AnB] = 3,33 \times 10^{-5}$ Mol/L.

A interpretação do mecanismo da reação quando realizada na presença de CDs, é frequentemente baseada na semelhança entre a catálise realizada pela β -CD e a enzimática (**Esquema 19**).



Esquema 19

Este esquema, mostra a reação de hidrólise do anidrido benzóico na presença de β -CD, onde β -CD-AnB representa o complexo “ β -ciclodextrina -

AnB, k_{un} é a constante de velocidade para a reação não catalisada, k_2 é a constante de velocidade da reação na presença de β -CD, e K_{diss} é a constante de dissociação para o complexo.

Aplicando a teoria do estado estacionário à cinética da reação, e considerando suficiente excesso de β -CD em relação ao AnB, obtém-se a equação de velocidade da reação na presença de β -CD;

$$k_{obs} = K_{un} + (k_2 - k_{un}) \beta CD / (K_{diss} + \beta CD) \quad [53]$$

Considerando o inverso, desta equação obtém-se:

$$1 / (k_{obs} - k_{un}) = K_{diss} / (k_2 - k_{un}) [C_0] + 1 / (k_2 - k_{un}) \quad [54]$$

As **Figuras 37 e 38**, mostram os gráficos do inverso das constantes de velocidade pseudo-primeira ordem k_{obs} menos k_{un} [$1 / (k_{obs} - k_{un})$] em função do inverso de diferentes concentrações crescentes de β -CD e β -CDsulfatada, respectivamente.

Considerando o valor de $k_{un} = 5,0 \times 10^{-4}$, a partir dos gráficos obtém-se aos valores da constante de velocidade da reação na presença da β -CD ($k_2=8,69 \times 10^{-4}$), β -CDsulfatada ($k_2=0,99$) com estequiometria dos complexo (1:1), bem como o valor das respectivas constantes de formação dos complexos.

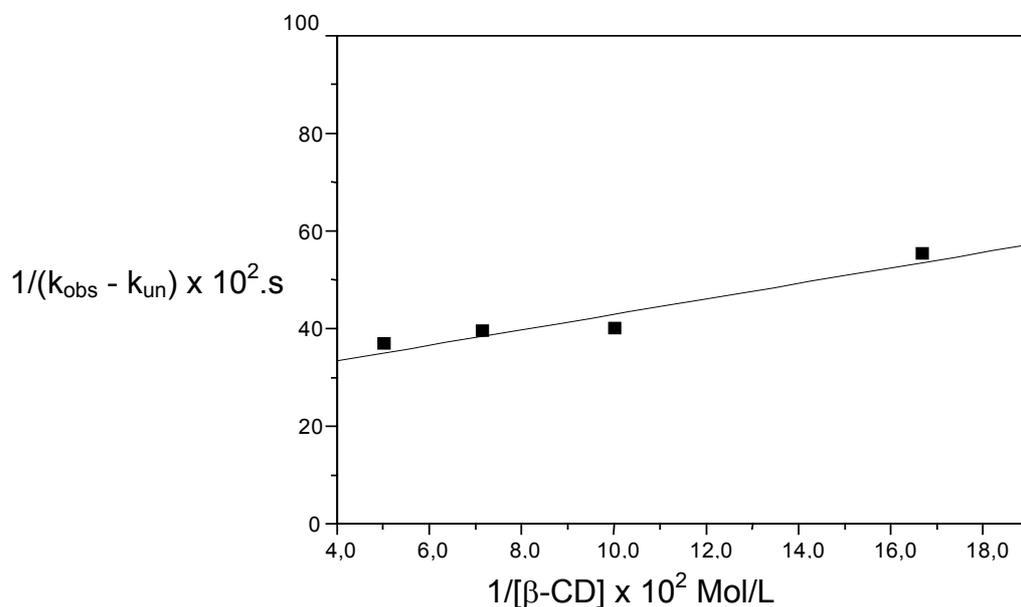


Figura 37: Gráfico do inverso das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem k_{obs} menos k_{un} [$1 / (k_{\text{obs}} - k_{\text{un}})$] em função de diferentes concentrações crescentes de β -CD, $\mu=0,5 \text{ Mol/L}$ (KCl), para a reação de hidrólise do AnB, à 25° C .

O valor da constante de associação para formação do complexo entre β -CD e anidrido benzóico calculada via experimentos cinéticos é de 1700,0 e para a β -CD sulfatada com o mesmo, é de 18,6 em H_2O e 17,6 em D_2O .

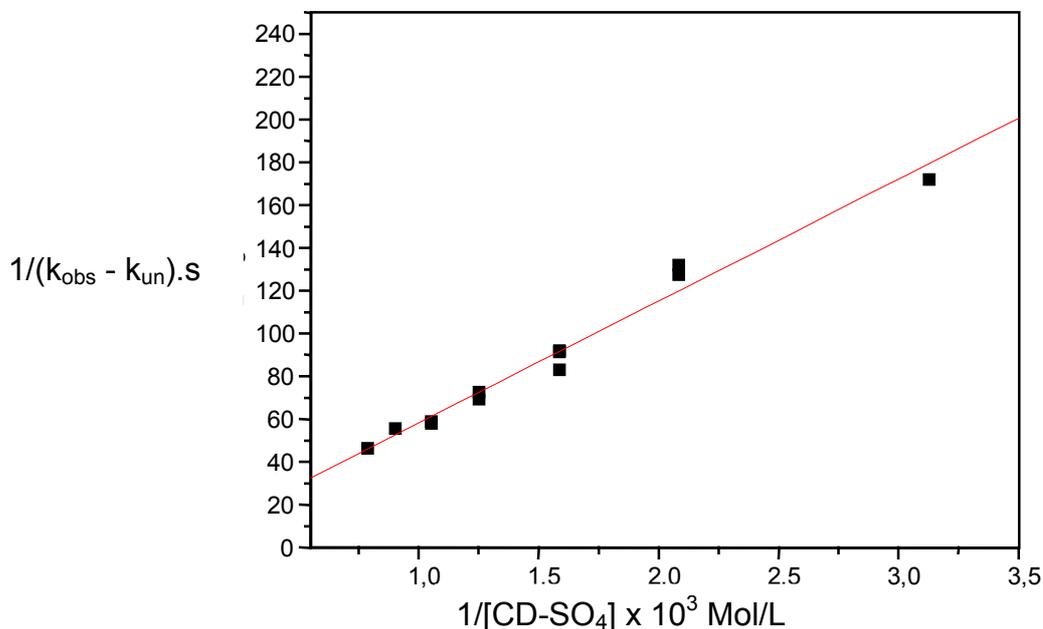


Figura 38: Variação das constantes de velocidade pseudo-primeira ordem k_{obs} menos k_{un} [$1 / (k_{\text{obs}} - k_{\text{un}})$] em função do inverso da concentração de β -CD sulfatada para a reação de hidrólise do AnB, à 25^o C, $\mu=0,5$ Mol/L (KCl).

Os estudos feitos com ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) confirmaram os resultados obtidos por medidas cinéticas. Os espectros realizados foram os de ^1H -RMN, para a β -ciclodextrina e β -ciclodextrina sulfatada observando-se os deslocamentos químicos dos sinais dos prótons das duas ciclodextrinas e do anidrido benzóico em metanol água 50/50 V/V na concentração total de 4mM.

Os prótons avaliados para análises na β -CD nativa, foram os dos carbonos 3, 5 e 6, respectivamente. Na β -CD sulfatada não foram observados deslocamentos químicos consideráveis. Para o anidrido benzóico o deslocamento químico de todos os prótons foram analisados.

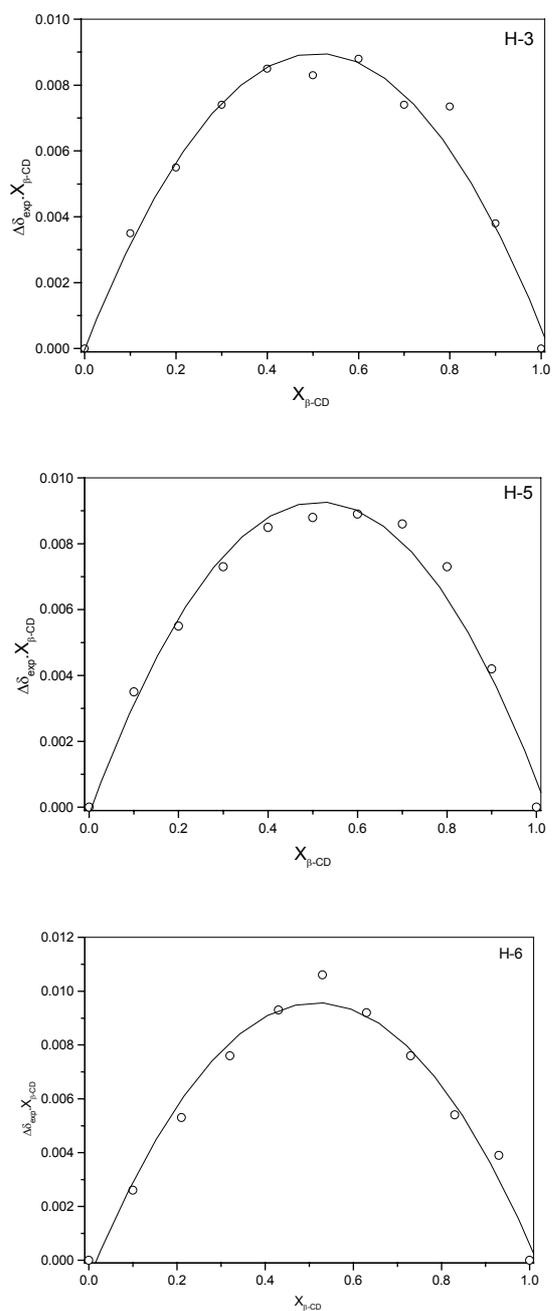


FIGURA 39. Representação de Job obtidos através dos valores de deslocamentos químicos dos átomos H-3, H-5 e H-6 da $\beta\text{-CD}$. Os pontos correspondem aos valores experimentais. A linha cheia corresponde ao ajuste teórico de um complexo 1:1.

Como foi observado, ambos os átomos H-3 e H-5 apresentaram deslocamentos semelhantes, sendo que o H-6 apresenta um deslocamento maior, sugerindo a presença do hóspede em toda extensão da β -CD, conforme demonstrado na **Figura 40** (Programa utilizado: CS Chem3D Pro(R) Version 3.5.2 © 1997, CambridgeSoft Corporation).

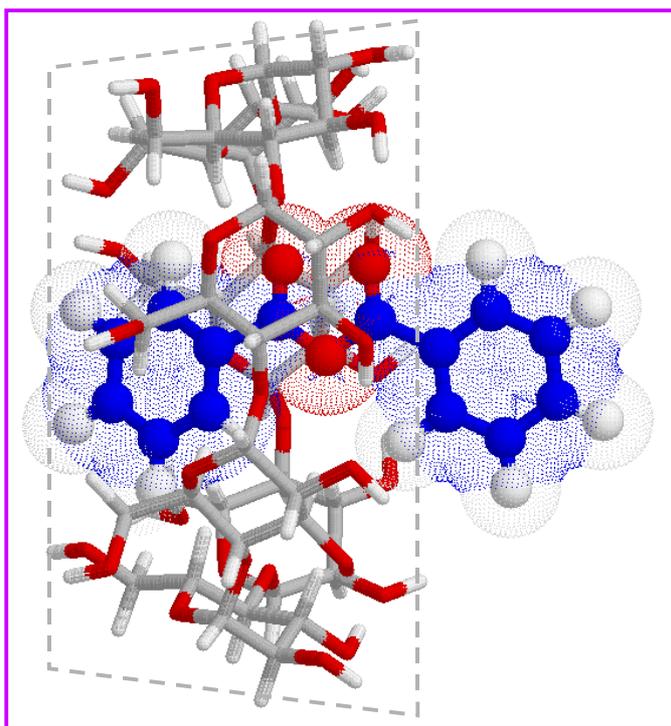


FIGURA 40- Representação do complexo β -ciclodextrina-anidrido benzóico.

O mesmo comportamento foi observado para o anidrido benzóico que apresentou diferentes deslocamentos químicos para os prótons aromáticos. Os prótons H-3 e H-4, foram os que apresentaram maiores valores de deslocamentos quando comparados ao próton H-2 ao longo do experimento. Estes resultados podem ser observados na **Figura 41**.

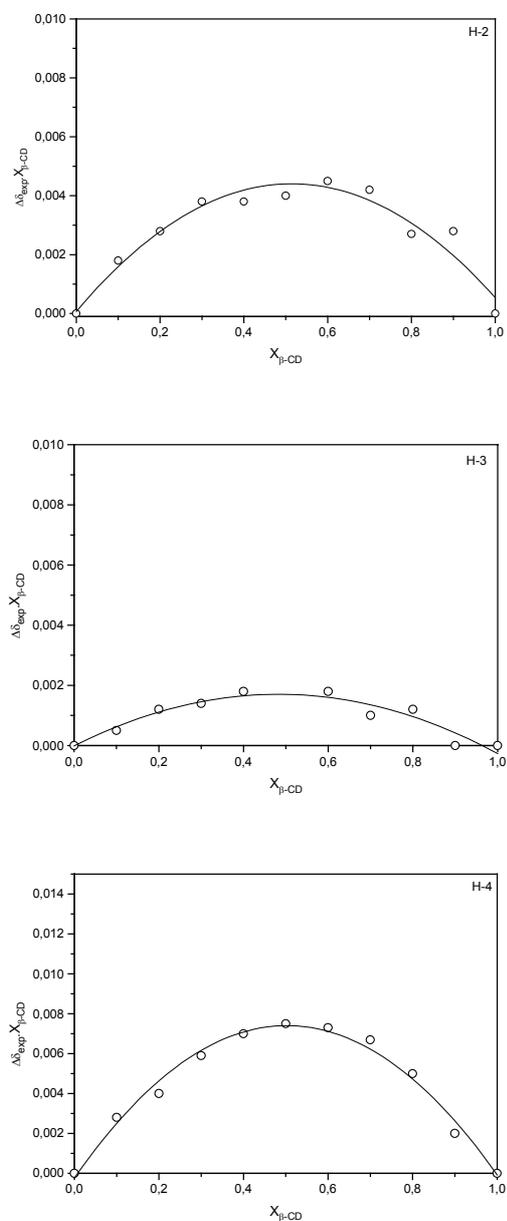


Figura 41. Representação de Job obtidos através dos deslocamentos químicos dos átomos H-2, H-3 e H-4 da AnB. Os pontos correspondem aos valores experimentais. A linha corresponde ao ajuste teórico de um complexo 1:1.

Como citado anteriormente, na β -CD sulfatada não foram observados valores de deslocamentos químicos suficientes para serem detectados por este método, provavelmente pelo fato da constante de associação ser relativamente pequena e a velocidade de troca do hóspede na cavidade ser muito alta. Porém, pode-se observar um pequeno valor de deslocamento

químico para os prótons do anidrido na presença de β -CD sulfatada conforme mostrado na **Figura 42**. Observa-se nesta figura que não houve deslocamento considerável para o próton 2 do anidrido benzóico, provavelmente pelo mesmo estar fora da cavidade da β -CD sulfatada.

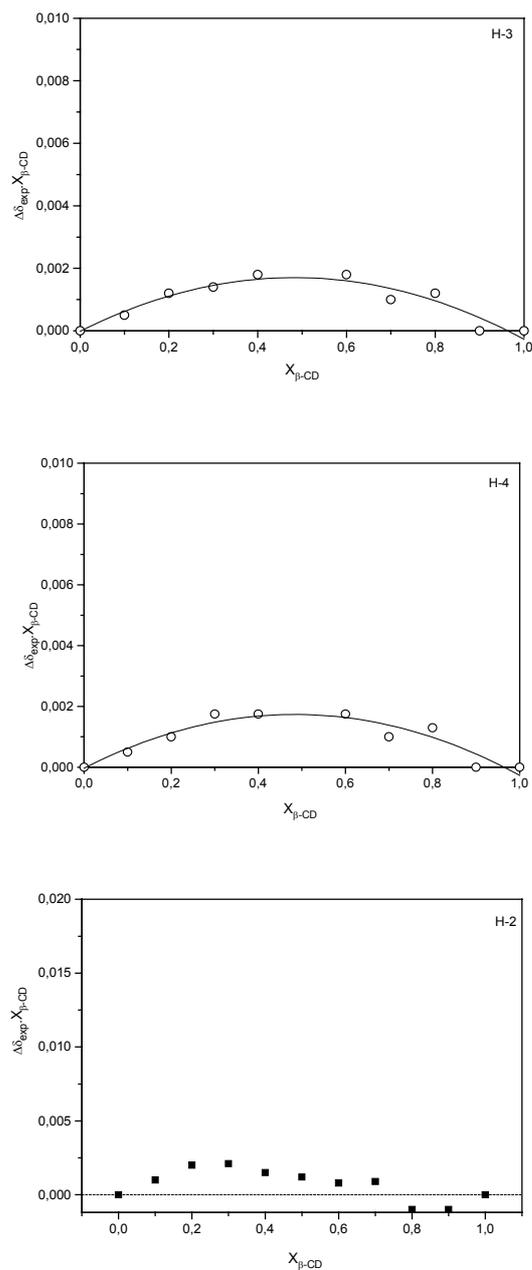


Figura 42- Representação de Job obtidos através dos deslocamentos químicos do átomo H-4, H-3 e H-2 do AnB na presença de β -CD sulfatada. Os pontos correspondem aos valores experimentais. A linha corresponde ao ajuste teórico de um complexo 1:1.

Na **Figura 43** é feita uma representação esquemática do complexo β -CD sulfatada-anidrido benzóico.

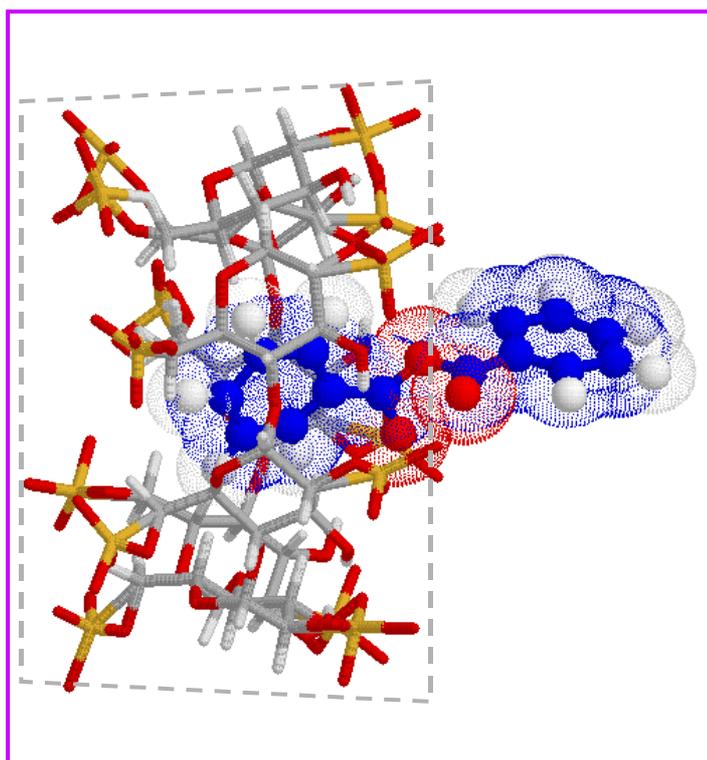


Figura 43 - Representação esquemática do complexo β -ciclodextrina sulfatada-anidrido benzóico.

A catálise por diferentes oxianions foi estudada para a reação de hidrólise do AnB. Os valores das constantes catalíticas estão mostradas na **Tabela 8**.

Tabela 8: Logaritmos das constantes catalíticas obtidas na presença de diferentes oxianions para reação de hidrólise do anidrido benzóico (AnB) em água, à 25^oC e força iônica 0,5M (KCl).

CATALISADOR	pK _a	log k _{cat}
ÁGUA	-1,75	-5.17
FORMIATO	3,75	-2.9
ACETATO	4,75	-2.12
CITRATO	5.41	-2.75
FOSFATO	7,21	-1.58
CLOROACETATO	2,86	-3,30
HIDRÓXIDO	15,75	2,67
β-CD sulfatada	-0,60	1,25
β-CD	-1,94	-3,06

A **Figura 44**, mostra o gráfico de Bronsted do logaritmo das constantes catalíticas em função do pK_a das bases oxigenadas, mostrando que a basicidade corresponde a nucleofilicidade.¹²⁴ Pode-se observar uma boa correlação (r =0,98), com β=0,44.

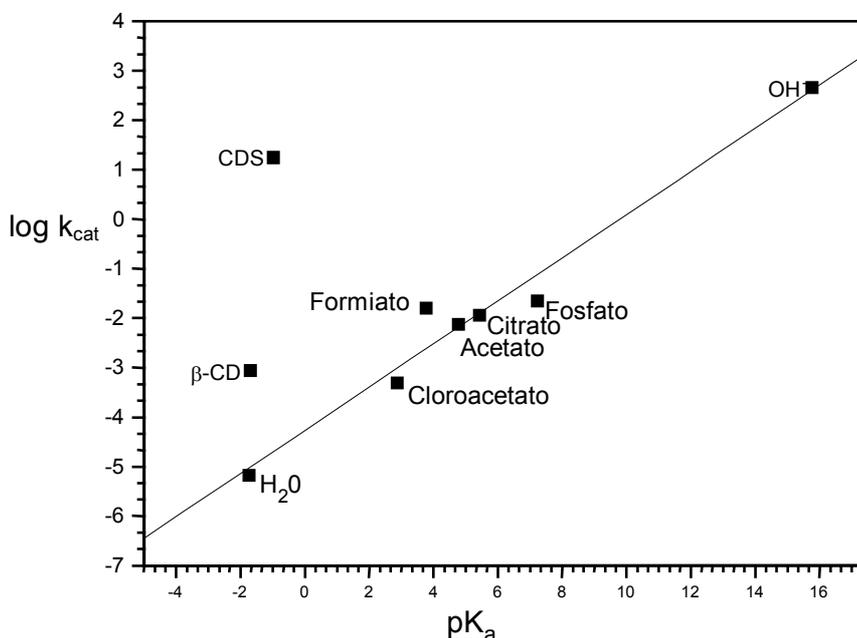


FIGURA 44 - Gráfico de Bronsted para a reação de hidrólise do anidrido benzóico na presença de diferentes bases oxigenadas e β -CD e β -CD sulfatada em água, à 25 °C e força iônica 0,5M (KCl).

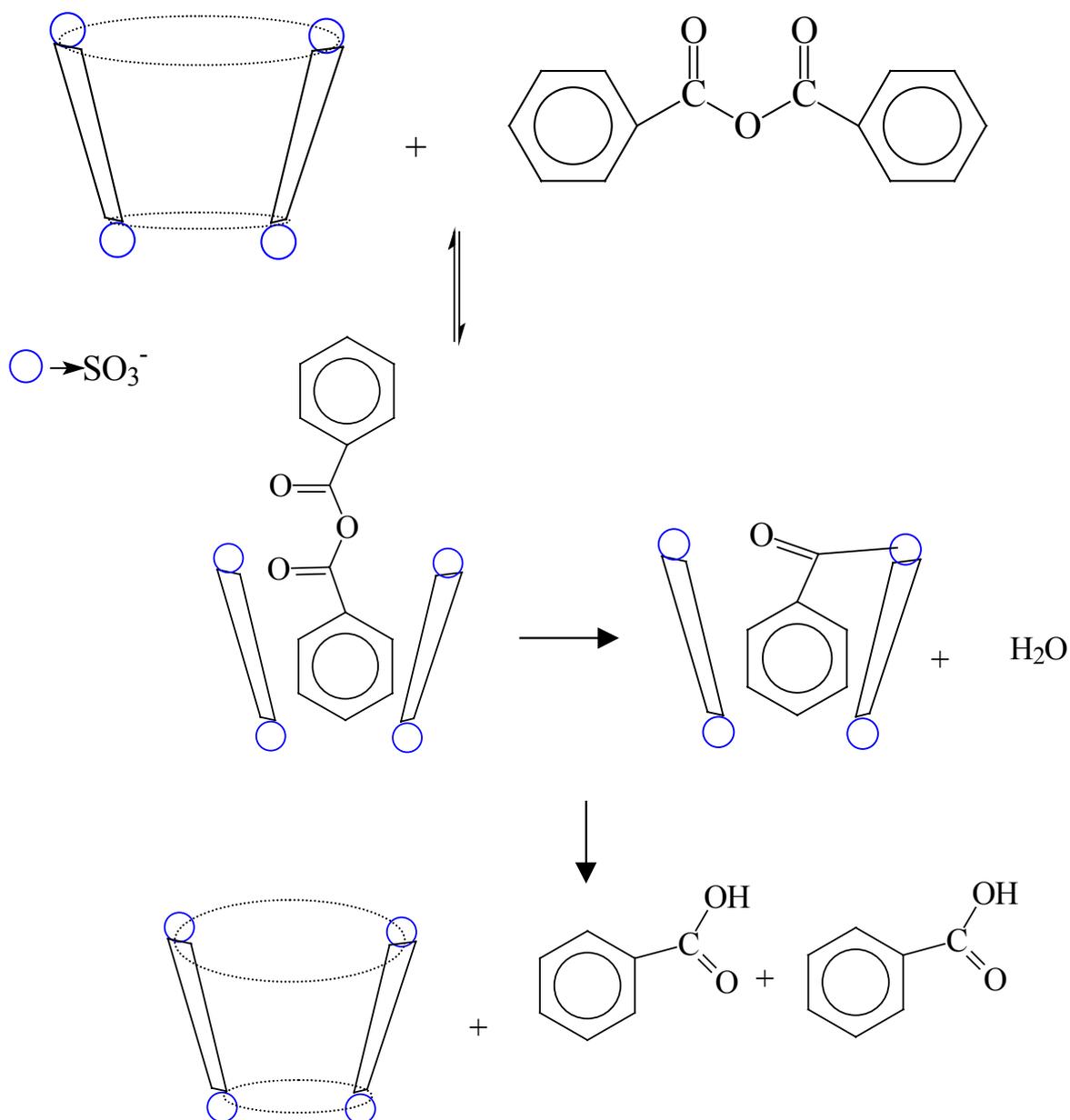
Pelo gráfico de Brønsted, pode-se observar que os pontos correspondentes a β -CD nativa e sulfatada estão fora da reta obtida para as outras bases oxigenadas. Considerando o pKa da β -CD igual a $-1,94$,¹²⁵ semelhante ao etanol, e o pKa da β -CD sulfatada $-0,6$, semelhante ao ácido metilsulfônico,¹²⁶ observou-se que ambas apresentam um desvio positivo com relação a seus respectivos pKas a partir da linha de Brønsted. Para a β -CD, o desvio é da ordem próxima a duas unidades de logaritmo, enquanto que para a β -CD sulfatada é de aproximadamente 6 unidades de logaritmo, ou seja, 10^6 vezes superior que as constantes medidas pelo gráfico de Brønsted para os pK_{as} correspondentes.

O gráfico de Brønsted mede a relação entre as constantes catalíticas e basicidade ou nucleofilicidade (neste caso são similares das bases). O desvio positivo apresentado pela β -CD sulfatada é uma medida do valor das constantes catalíticas, bem como da nucleofilicidade de seus grupos funcionais. Porém, deve-se analisar os motivos deste aumento de nucleofilicidade.

É conhecido que na formação de um complexo entre substrato e catalisador, no caso da catálise enzimática, os grupos funcionais são aproximados favorecendo muito a reação.⁵ Este fato também poderia ser sugerido no caso da catálise através de ciclodextrinas. Estudos anteriores mostraram que as CDs levam a um aumento da velocidade de hidrólise de ésteres fenílicos em meio alcalino, e que a hidrólise em meio básico de ésteres alquílicos é diminuída ou totalmente inibida pela presença de β -CD.^{9,127,128} Lach e Chin,¹²⁸ propuseram que no caso dos ésteres fenílicos, a CD promove a aproximação dos grupos funcionais favorecendo a reação. A não reatividade dos ésteres alquílicos complexados, poderia ser devido ao fato de que no complexo a carbonila do éster está localizada relativamente distante do grupo hidroxila secundário presente na cavidade da CD, e que este seria responsável pela catálise. Porém, Bender e colaboradores,^{9,127} sugeriram que esta baixa reatividade pode ser atribuída a uma quebra do intermediário tetraédrico desfavorável. O ataque do íon alcóxido da β -CD no átomo de carbono da carbonila do substrato conduziria à formação de um intermediário tetraédrico que tem o íon alcóxido da β -CD e o íon de alcóxido derivado do éster como grupos de saída potenciais, sendo o primeiro um grupo de saída melhor.

Jencks¹²⁹ e Kirby¹³⁰ demonstraram que o processo de formação do complexo enzima-substrato inclui a dessolvatação do substrato e ativação do estado fundamental. Esta observação, pode ser aplicada para o caso da β -CD sulfatada onde os grupos de sulfonatos junto as hidroxilas secundárias internas

seriam desolvatados quando o complexo de inclusão é formado pela introdução na cavidade de ciclodextrina de parte da molécula do anidrido. Esta desolvatação de grupos sulfonatos aumenta sua basicidade e conseqüentemente a nucleofilicidade, o que explica junto com a aproximação dos grupos funcionais, pelo menos parcialmente o aumento surpreendente na velocidade de hidrólise observada.¹³¹



ESQUEMA 20

Na reação de hidrólise do anidrido benzóico na presença de β -CD sulfatada, o ataque é feito por um dos grupos sulfonatos secundários e o grupo de saída é o íon carboxilato. O grupo sulfonato é um melhor grupo de saída que o carboxilato. Porém, os resultados experimentais estão mostrando claramente que o intermediário tetraédrico forma os produtos por um caminho aparentemente desfavorável de acordo com o descrito por Bender e colaboradores (**Esquema 20**).⁸

Para compreender este comportamento, deve-se considerar que a saída do grupo sulfonato ou do carboxilato não depende somente da natureza destes, mas também da estabilização por solvatação da carga formada. Considerando o efeito estérico para solvatação, está claro que a solvatação do íon carboxilato do grupo de saída do benzoato é mais fácil que os sulfonatos que estão próximos da cavidade hidrofóbica da CD. Este efeito favorável com relação ao grupo de saída, também deveria ser considerado como um fator que contribuí para o aumento surpreendente observado na constante de velocidade de hidrólise do AnB pela β -CD sulfatada.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

As principais conclusões, que podem ser obtidas neste trabalho são:

- A reação de nitrosação da 2-hidroxiethylpiperidina em meio ácido ocorre via transferência do grupo nitroso desde o O até N que não requer uma conformação especial, como observado com a tiomorfolina (TM) pelo fato da cadeia lateral ser flexível. O cálculo da energia de ativação para reação da nitrosação 2-EP foi de 43 KJ/Mol e permitiu verificar a diferença com a nitrosação da TM, que é de 86 KJ/Mol, justificando as afirmações anteriormente mencionadas. O estudo do efeito isotópico da reação demonstrou que a etapa determinante da velocidade, é a perda de um próton do nitrogênio piperidínico.

- Foi demonstrado que o perfil de pH para a reação entre N-metilhidroxilamina e nitrosobenzeno é muito semelhante ao apresentado para a reação da N-metilhidroxilamina com p-clorobenzaldeído. Este fato evidencia um mesmo mecanismo para ambas as reações. A reação forma um único produto via um intermediário de adição formado por um equilíbrio rápido. A etapa determinante da velocidade da reação é o ataque da amina ao grupo nitroso em pH abaixo de 3,0, e a desidratação do intermediário em pH maiores.

- A hidrólise do anidrido benzóico em meio básico, ocorre por um mecanismo de catálise nucleofílica. A surpreendente catálise observada na presença de ciclodextrinas, principalmente a sulfatada mostra que a reação obedece este mecanismo, onde ocorre a formação de um complexo inicial CD-AnB com a perda de um íon carboxilato e uma segunda etapa a perda do segundo íon carboxilato com a entrada da molécula de água. O aumento de velocidade na presença de β -ciclodextrina sulfatada é 10^6 vezes maior do que previsto a partir do respectivo valor de pK_a . Este resultado é semelhante ao comportamento enzimático observado pela catálise enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPBELL, M. K., *Biochemistry*, Sounders College Publishing, Second Edition, USA, (1995).
2. BRESLOW, R. e DONG, S. *Chem. Rev.* 98, 1997 (1998)
3. V. T. D'SOUZA, M. L. BENDER: *Acc. Chem. Res.*, **20**, 146-152 (1987).
4. BRESLOW, R., *Acc. Chem. Res.*, 28, 146-153 (1995).
5. JENCKS, W. P., *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, USA, (1969).
6. KHAN, A. R.; FORGO, P.; STINE, K. J. Y D'SOUZA, V. T. *Chem. Rev.* 98, 1977, (1998).
7. CRAMER, F. E DIETSCH, W., *Chem. Ver.*,92, 1739, (1959).
8. BENDER, M., KOMIYAMA, M., *Cyclodextrin Chemistry*; Springer Verlag: New York, (1978).
9. VAN ETTEN, R. L., SEBASTIAN, J. F. CLOWES, G. A., AND BENDER, M. L., *J. Am. Chem. Soc* 89, 3242(1967).
10. KOMIYAMA, M. e BENDER, M. L., *J. Am. Chem. Soc* 99, 8021(1977).
11. YASHIRO, M. et al, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*1757(1994).
12. BRESLOW, R. e ZHANG, B. *J. Am. Chem. Soc* 118, 8495 (1996).
13. ITOH, T. et all, *Chem. Pharm. Bull.* 47, 133-135(1999).
14. MIRVISH, S. S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17, 105 (1975).
15. FAQUIN, V. et all, *Produção de Alface por Hidroponia*, Minas gerais: DCS – UFLA, (1996).

16. YOSHIOKA, T. E TAKAYOSHI, U., *J. Agric. Food Chem.*, 46, 606-610 (1998).
17. HARRISON, K. L., et all, *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 106-111 (1999).
18. COELLO, A., MEIJIDE, F. e VÁZQUEZ TATO, J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1677, (1989).
19. SANDLER, S. R. e KARO, W., "Organic Funtional Group Prepar ations", Vol. II, Academic Press, New York, p.424-450,(1971).
20. NEURATH, G. B., DUNGER, M., e PEIN, F. G. "*Environmental N-Nitroso Compounds: Analysis and Formation*" (Eds. A. Walker P. Bogovski y L. Griçuite), IARC Scientific Publications N014, International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia, p. 227, (1979).
21. ROLLE, W., GEHLERT, P. e RENNER, E., *Z. Chem.*, 18, 99, (1978).
22. WHITE, E. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 6008, (1955).
23. CASADO, J., A. CASTRO e M. A. LÓPEZ QUINTELA, *Monatsh. Chem.*, 112, 1221, (1981).
24. CHALLIS B. C. e CHALLIS, J. A., "*The Chemistry of Amino, Nitroso and Nitro Compounds and their Derivatives*" Vol. II, (Ed. Saul Patai), John Wiley & Sons, Chichester- New York, p. 1151, (1982).
25. GEHLERT, P. e ROLLE, W., *Experientia*, 33, 579, (1977).
26. CHALLIS B. C. e KYRTOPOULOS, S. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 299, (1979).
27. BECKMAN, L. J., FESSLER W. A. e KISE, M. A., *Chem. Rev.*, 48, 319, (1951).

28. CASADO, J., CASTRO, LÓPEZ QUINTELA A·M. A. e RODRIGUEZ, M. F. PRIETO, *Z. Phys. Chem. Neue Folge*, 118, 43, (1979).
29. MALTZ, H., GRANT, M. A. e NAVAROLI, M.C., *J. Org. Chem.*, 36, 363, (1971).
30. BUMGARDNER, C. L., MCCALLUM, K. S. e J. P. FREEMEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 4417, (1961).
31. SINGER, S. S., LIJINSKY, W. e SINGER, G. M., *Tetrahedron Lett.*, 1613, (1977).
32. SCHMIDT, E. e SCHUMACHER, R., *Chem. Ber.*, 54, 1414, (1921).
33. MAGEE, P. N. e BARNES, J. M., *Advan. Cancer Res.*, 10, 163, (1967).
34. MAGEE, P. N., MONTESANO, R. e PREUSSMANN, R., "*Chemical Carcinogens*" (Ed. C. E. Searle), American Chemical Society, Washington, D. C., p. 491, (1976).
35. HEIDELBERGER, C., *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 79, (1975).
36. FREGUSON, L. N., *Chem. Soc. Rev.*, 4, 289, (1975).
37. RADEMACHER, P., e GILDE, H. G., *J. Chem. Educ.*, 53, 757, (1976).
38. OLAHOS, E. J., *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1, 175, (1977).
39. MONTESANO, R. e BARTSCH, H., *Mutat. Res.*, 32, 179, (1976).
40. WEISBURGER, J. H. e RAINERI, R., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 369, (1975).
41. DRUCKREY, H., *Gann. Monogr.*, 17, 107, (1975).

42. BOGOVSKI, P. "*Environmental N-Nitroso Compounds*" (Eds. E. A. Walker, P. Bogovski y i. Gričute), IARC Scientific Publications N^o 14, International Agency for Research on Cancer, Lyon, França, p. 3, (1976).
43. ENDER, F., HAVRE, G. N., HELGEBOSTAD, A., KOPPANG, MADSEN N., R. e C E H , L., *Naturwissenschaften*, 51, 637, (1964).
44. CROSBY, N. T., e SAWYER, R. *Adv. Food Res.*, 22, 1, (1976).
45. WISHNOK, J. S., *J. Chem. Educ.*, 54, 440 (1977).
46. CHALLIS, B. C. e RIDD, J. H. ,*J. Chem. Soc.*, 5208, (1962).
47. KALATZIS, E. e RIDD, J. H., *J. Chem. Soc. B*, 529, (1966).
48. FABRIZIO, E. C. R., KALATZIS, E. e RIDD, J. H, *J. Chem. Soc. B*, 533, (1966).
49. CASADO, J., CASTRO, A. IGL ESÍAS, E., PENA M. E. e VAZQUEZ TATO, J., *J. Can. Chem.*, 64, 133, (1986).
50. MORGAN, T. B. STEDMAN G. e HUGHES, M. N., *J. Chem. Soc. B*, 344, (1968).
51. PERROT, J. R., STEDMAN G. e UYSAL, N., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 274, (1977).
52. PERROT, J. R., STEDMAN G. e UYSAL, N., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 2058, (1976).
53. CASIRO, A., IGLESÍAS, E., LEIS, J. R., VÁZQUEZ TATO, J., MEIJIDE, F. e PEÑA, M. E., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 651, (1987).
54. MEIJIDE, F., VAZQUEZ TATO, J., J. CASADO, A. CASTRO e M. MOSQUERA, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1759, (1987).

55. CASTRO, A., IGLESIAS, E., LEIS, J. R, PEÑA, M. E., VÁZQUEZ TATO, J. e WILLIAMS, D. L. H., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1165, (1986).
56. CASTRO, A., GONZÁLEZ, M, MEIJIDE, F. e MOSQUERA, M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 2021, (1988).
57. MEIJIDE, F. e STEDMAN, G., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1087, (1988).
58. MARTÍ, F.B. et al, *Química Analítica Qualitativa*, Ed. Canuto, 10th ed. Madrid, (1988).
59. SCHIMID, H. E KRENMAYR, P., *Monatsh. Chem.*, 98, 423,(1967).
60. JORGENSEN, K. A. E LAWESSON, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 231, (1985).
61. LUINSKI, W., KEEFER, L. e LOO, J., *Tetrahedron*, 26, 5137-5153 (1970).
62. SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5ª Ed. John Wiley Editions, New York (1991).
63. LUMRY, R., SMITH, E. L. e R. R. GLANTZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 4330, (1951).
64. GLASE P. K., e LONG, F. A., *J. Phys. Chem.*, 64, 188, (1960).
65. RIDD, J. H., *Adv. Phys. Org. Chem.*, 16, 1, (1978).
66. CASTRO, A., MOSQUERA, M., RODRIGUEZ PRIETO, M. F., SANTABALLA, J. A. e VÁZQUEZ TATO, J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans II*, 1963, (1988).
67. ROSEMBERG, S.; SILVER S. M.; SAYER, J.M.; JENCKS, W. P.; *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 7986 (1974).

68. ATKINS, W. P., *Physical Chemistry*, 5^a Ed. Oxford University Press,(1994).
69. YUNES, R. A. , TERENZANI, A. J. e AMARAL L., *J. Am. Chem. Soc.*, 97,368 (1975).
70. SCHMITT, C. C., MORITZ, C. A., PIZZOLATTI, M. G. e YUNES, R. A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 62, 3684-3690, (1989).
71. PIZZOLATTI, M. G. e YUNES, R. A., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2*. 759-764 (1990).
72. FETT, R., SIMIONATTO, E. L. e YUNES, R. A., *J. Phys. Org. Chem.* 3, 620, (1990).
73. BRIGHENTE, I. M. C., BUDAL, R. e YUNES, R. A.. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, 1861 (1991).
74. DAL MAGRO, J. YUNES, R. A. e SIMIONATTO, E. L. *J. Phys. Org Chem.*, 7, 399 (1994).
75. SIMIONATTO, E. L., YUNES, P. R. e YUNES, R. A., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2*. 1291 (1993).
76. BECKER, A. R. e STARSON, L. A., *J. Org. Chem.*, 45, 1708 (1980).
77. ZUMAN, P., e SHAH, B. , *Chem. Rev.*, 94, 164 (1994).
78. VOGEL, A.J. "*Practical Organic Chemistry*", 3rd Ed. Logman, N.York (1956).
79. VOGEL, A., *Química Analítica Quantitativa*, 5^a Ed., Guanabara-Koogan, São Paulo, (1992)
80. FREEMAN, J. H. P., *J. Org. Chem.*,28,2508-2511 (1963).
81. REIMANN J. E. e W. P. JENCKS, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 3973 (1966).

82. PERIN, D. D., DEMPSEY, B. e SARGEANT, E. P., "*pK_a Prediction for Organic Acids and Bases*", Chapman and Hall, UK (1981).
83. JENCKS, W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 4731 (1972).
84. OGATA, Y., TSUCHIDA, M. e TAKAGI, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 3397 (1957).
85. DARCHEN, A. e MOINET, C., *Bull. Soc. Chem.*, 812 (1976).
86. KNIGHT, G. T. e LOADMAN, M. J., *J. Chem. Soc. (B)*, 2107, (1971).
87. SHEMYAKIN, M. M., MAIMIND, V. I. e VAICHUNAITE, B. K., *Izvest. Akad. nauk. S.S.S.R.*, 1260 (1957).
88. JENCKS, W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 475 (1959).
89. IGLESIAS, E., *J. Am. Chem. Soc.* 120: (50) 13057-13069, (1998).
90. BRESLOW, R. *Pure and Applied Chemistry*, 70, 267-270 (1998).
91. ATWOOD, J. L., DAVIES, J. E. e MACNICOL, D. D., *Inclusion Compounds*; Academic Press Inc Ltd., London, (1984).
92. BENDER, M., KOMIYAMA, M., *Cyclodextrin Chemistry*; Springer Verlag: New York, (1978).
93. TEE, O. S. e DU, X., *J. Am. Chem. Soc.* 114, 620-627 (1992).
94. JONES, R.A. Cambridge University Press, (1979).
95. SZEJTLI, J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer, Academic Publishers, London, (1988).
96. MATSUI, Y. e OKIMOTO, A., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 51, 3030-3034 (1978).

97. JOZWIAKOWSKI, M. J., e CONNORS, K. A., *Carbohydr. Res.* 143, 51, (1968).
98. D'SOUZA, V. T., BENDER, M. L.: *Acc. Chem. Res.*, 20, 146-152 (1987).
99. YASHIRO, M., TAKARADA T., MIYAMA S., KOMIYAMA M.; *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1757-1758 (1994).
100. BRESLOW, R., ZHANG, B.; *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5882-5883 (1992).
101. BRESLOW, R., ZHANG, B.; *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 7893-7894 (1994).
102. TEE, O. S., BOYD, M.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1237-1243 (1995).
103. BRESLOW, R., A. CZARNIK, W., LAUER, M., LEPKES, R., WINKLER, J. ZIMMERMAN, S.; *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 1969-1979 (1986).
104. KOMIYAMA, M., TAKESHIGE, Y.: *J. Org. Chem.*, 54, 4936-4940 (1989).
105. ANSLYN, E., BRESLOW, R.; *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 5972-5973 (1989).
106. TAGAKI, W., YANO, K., YAMANAKA, K., YAMAMOTO, H., MIYASAKA, T.; *Tetrahedron Lett.*, 31, 3897-3900 (1990).
107. MATSUI, Y., YOKOI, T., MOCHIDA, K.; *Chem. Lett.*, 1037-1040 (1976).
108. TABUSHI, I., KURODA, Y., MOCHIZUKI, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 1152 -1155(1980).
109. BRESLOW, R., OVERMAN, L. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, 92,1075-1079 (1970).
110. AKKAYA, E. U., CZARNIK, A. W.; *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 8553-8554 (1988).

111. ROSENTAL, M. I., CZARNIK, A. W.; *J. Inclus. Phenom. Mol. Recogn. Chem.*, 10, 119-126 (1991).
112. MATSUMOTO, Y., KOMIYAMA, M.; *J. Mol. Catal.*, 61, 129-136 (1990).
113. TABUSHI, I., KURODA, Y., MOCHIZUKI, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 1152-1153 (1980).
114. BRESLOW, R., ZHANG, X., XU, R., MALETIC, M., MERGER, R.; *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 11678-11679 (1996).
115. TABUSHI, I., KODERA, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 4734-4735 (1987).
116. YE, H., TONG, W., D'SOUZA, V. T.; *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5470-5472 (1992).
117. YE, H., TONG, W., D'SOUZA, V. T.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2431-2437 (1994).
118. DU, Y., HARADA, T., NAKAMURA, A., UENO, A., TODA, F.; *Chem. Lett.*, 2235-2238 (1990).
119. TAMAGAKI, S., NARIKAWA, J., KATAYAMA, A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, 2265-2268 (1996).
120. WANG, Y., UENO, A., TODA, F.; *Chem. Lett.*, 167-170 (1994).
121. FRAGOSO A. S., *Complejos de Cobre(II) de Derivados de Ciclodextrinas como Modelos de la Superoxido Dismutasa*, Tese de Doutorado, Departamento de Bioinorgânica, Universidade de Havana, Cuba, (2000).
122. CABRER, P. R., AZVAREZ-PARRILLA, E., MEIJIDE, F., SEIJAS, J.A., NUNEZ, E. R., e TATO, J.V., *Langmuir* 15: (17) 5489-5495 (1999).

123. JENCKS, W. P. e KIRSCH, J. F., *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 833-837 (1964).
124. BORDWELL, F. G., CRIPE, T. A. AND HUGHES, D. L, *in Nucleophilicity* J. M. Harris and S. P. McManus editors *Am. Chem. Soc USA* (1987).
125. PERDOCIN, G., SCORRANO, G. S. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 6983 (1977).
126. BROWSTEIN, *J. Phys Chem.* 63, 2061 (1959).
127. VANETTEN, R. L., CLOWES, G. A , SEBASTIAN, J. F. AND BENDER, M. L., *J. Am. Chem. Soc* 89, 3253 (1967).
128. LACH J.F., CHIN T.F, *J. Pharm. Sci.* 53,924-27, (1968).
129. JENCKS, W.P.; *Adv. Enzymology*: 37,219, (1975).
130. KIRBY, A. J.; *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 707, (1996).
131. JENCKS W. P. "Effects of Solvation on Nucleophilic Reactivity in Hydroxylic Solvents" in *Nucleophilicity*, Harris J. M., McManues S. P. Eds. ACS, USA, (1987).