



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

CATÁLISE INTRAMOLECULAR NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE ÉSTERES NAFTÓICOS: RELAÇÃO ENTRE A CONFORMAÇÃO E O EFEITO DO GRUPO CARBOXILATO

Bruno Silveira de Souza

Florianópolis

2008

Bruno Silveira de Souza

**CATÁLISE INTRAMOLECULAR NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE
ÉSTERES NAFTÓICOS: RELAÇÃO ENTRE A CONFORMAÇÃO E O
EFEITO DO GRUPO CARBOXILATO**

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

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Florianópolis

2008

Bruno Silveira de Souza

**CATÁLISE INTRAMOLECULAR NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE
ÉSTERES NAFTÓICOS: RELAÇÃO ENTRE A CONFORMAÇÃO E O
EFEITO DO GRUPO CARBOXILATO**

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

Florianópolis, 19 de Fevereiro de 2008.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Orientador

Prof. Dr. José Carlos Gesser
UFSC

Prof. Dr. Ademir Neves
UFSC

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes
UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, exemplos de honestidade, trabalho e carinho, que nunca pouparam esforços para que seus filhos pudessem estudar e ir além da graduação. Com certeza a maior parte do que fizemos e estamos fazendo é apenas um reflexo da educação que por eles nos foi passada.

Ao Prof. Faruk, que há cinco anos fez o convite para juntar-me ao seu grupo de pesquisa, e que hoje ainda demonstra o mesmo entusiasmo e curiosidade de um profissional de início de carreira. Espero um dia poder compartilhar do mesmo nível de conhecimento e experiência.

Ao futuro Prof. Tiago Brandão, um amigo e ex-colega de laboratório de extrema valia, que me ensinou as bases que utilizei para realizar esse projeto. Sua dedicação ao estudo e pesquisa é contagiante.

Aos Professores Ricardo L. Longo da Universidade de Pernambuco e Josefredo R. Pliego Jr. da Universidade de São João del-Rei por toda colaboração e ensinamentos na realização dos estudos teóricos.

À minha namorada Mônica, que durante esses dois anos fez de tudo para me ajudar a passar pelos momentos cansativos e que sempre esteve disposta a tentar entender sobre meu trabalho.

Aos colegas dos Laboratórios 210 e 203, pelos ótimos momentos de descontração que tornaram o clima sempre tão agradável, principalmente quando volta e meia alguém levava um bolo ou lanche para completar o cafezinho.

A todos os funcionários da UFSC como cozinheiros do Restaurante Universitário, onde fiz a maior parte de meus almoços, agentes de limpeza e manutenção, funcionários da Biblioteca e principalmente à Graça e Jadir, que sempre nos ajudaram na secretaria da pós-graduação.

Ao apoio financeiro do CNPq e FAPESC e à infra-estrutura da UFSC.

"We cannot ignore possibilities"

Manmohan L. Satnami

RESUMO

No presente trabalho foram estudadas as reações de hidrólise dos ácidos 1-acetóxi 2-naftóico (**1Ac**), 2-acetóxi 1-naftóico (**2Ac**), 3-acetóxi 2-naftóico (**3Ac**) e 8-acetóxi 1-naftóico (**8Ac**). Exceto para o **2Ac**, em todos os casos a forma aniônica é hidrolisada mais rapidamente que a neutra e a reação chega a ser 430 vezes mais rápida do que a do acetato de fenila em pH 7,0. A partir de estudos de efeito isotópico do solvente, incorporação de oxigênio 18 e dos parâmetros termodinâmicos de ativação avaliou-se que nesses sistemas o grupo COO^- desempenha funções diferenciadas: no caso de **2Ac** e **3Ac** atua como base geral catalisando o ataque de uma molécula de água; no caso de **1Ac** e **8Ac** atua como nucleófilo, atacando a carbonila do éster e gerando um intermediário anidrido que é rapidamente degradado. O ataque nucleofílico oferece um incremento na constante de velocidade superior ao da catálise básica geral. A geometria dos ésteres otimizada utilizando o nível de cálculo B3LYP/6-31+g(d)/SCRF-PCM possibilitou avaliar a relação entre o mecanismo de hidrólise e parâmetros geométricos, como a distância e o ângulo formado entre os grupos reativos. Para o **1Ac** e **3Ac** foram obtidas, no mesmo nível de cálculo e em vácuo, as superfícies de energia potencial em função dos ângulos diedros formados entre os grupos carboxilato e éster e o plano médio do anel. A partir dessas análises, ficou evidente que no **1Ac** o grupo éster tem a rotação impedida por interação repulsiva com o H_α do anel lateral, aumentando a probabilidade de permanecer em uma posição que favorece o ataque nucleofílico intramolecular. No caso do **3Ac** a rotação do grupo éster é praticamente desimpedida e não há uma preferência conformacional acentuada. Ainda, foi obtida a estrutura cristalina do **1Ac**, possibilitando a comparação dos dados teóricos com os valores reais no estado sólido, o que permite a corroboração das conclusões. No caso dos ésteres naftóicos estudados, os fatores pertinentes ao estado reagente são determinantes do mecanismo e velocidade da reação. Tais fatores, juntamente com outros, foram e continuam sendo selecionados ao longo de milhões de anos pela evolução, fazendo com que os extraordinários níveis de complexidade das reações enzimáticas sejam atingidos.

Palavras-chave: hidrólise de éster, efeito do estado reagente, catálise intramolecular.

ABSTRACT

In this work it was studied the hydrolysis of 1-acetoxy-2-naphtoic (**1Ac**), 2-acetoxy-1-naphtoic (**2Ac**), 3-acetoxy-2-naphtoic (**3Ac**) and 8-acetoxy-1-naphtoic acid (**8Ac**). Except for **2Ac**, the anionic form is hydrolyzed faster than the neutral one and the intramolecular assistance shows an effect of 430 when one compares the hydrolysis of phenyl acetate at pH 7,0. From solvent isotopic effect, incorporation of labeled oxygen and activation parameters results we concluded two kinds of mechanism: in **2Ac** and **3Ac** the carboxylate group acts as a general base, activating an water molecule; in **1Ac** and **8Ac** it acts as a nucleophile, attacking the ester carbonyl to give the anhydride intermediate which is then decomposed to products. The nucleophilic mechanism is more efficient when compared to the general base way. The optimized geometry (B3LYP/6-31+g(d)/SCRF-PCM) provided the information necessary to correlate the structural parameters and the mechanism and efficiency of catalysis. Also, for esters **1Ac** and **3Ac** it was constructed the potential energy surface as a function of the dihedral between the ester and ring and carboxylate and ring planes showing that there is a high energy cost for ester group spin in **1Ac**, which is absent in **3Ac**. Thus, in the **1Ac** system the ester stays more time in a suitable position for the intramolecular attack. The crystal structure of **1Ac** shows a shorter distance between the reactive groups when compared to the aspirin one, a close related compound, corroborating our conclusions. In the case of the naphthoic system, the ground state parameters are of prior importance for the mechanism and efficiency of the intramolecular assistance. Nature had millions of years to select and pass on the most efficient traits in enzymatic catalysis. By no doubt, one of these abilities is the appropriated accommodation of the substrate by non-covalent forces in the active site maximizing the probability of the reaction to occur.

Keywords: ester hydrolysis, ground state effect, intramolecular catalysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa de reação para transferência de acila mostrando o mecanismo com formação do íon acílio (A), intermediário tetraédrico (T) e concertado (C) 16
- Figura 2** – Mecanismo de ação da quimotripsina 20
- Figura 3** – Modelo de ribonuclease onde a catálise básica e ácida geral ocorrem simultaneamente no estado de transição..... 23
- Figura 4** – (a) Definição de NAC, mostrando que a distância entre os centros reativos deve ser menor que 3.2\AA e que o ângulo de aproximação do nucleófilo deve estar numa região de 30° com o eixo a 15° da normal do plano da carbonila; (b) Plote do logaritmo da constante de velocidade relativa para a formação do anidrido a partir dos ésteres de fenila vs a probabilidade (P) para a formação de um NAC. ^{41,44} 25
- Figura 5** – Modelo de peptidase onde a proximidade dos grupos reativos justifica a alta reatividade de hidrólise..... 25
- Figura 6** – Espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do 1Ac a 45°C , $\mu=1$, pH 5,00 (a) e 2,60 (b). 42
- Figura 7** – Plote da absorvância vs tempo para a reação de hidrólise do 1Ac, $\mu=1$ e 45°C em pH 5,00 (a) e pH 2,60 (b). 42
- Figura 8** – Espectro de UV-VIS da (a) reação de hidrólise do 1Ac a 45°C , $\mu=1$, pH 2,60 e $t=5000$ min e (b) α -Naftol em pH 2,00, 25°C 43
- Figura 9** – Espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do 2Ac a 45°C , $\mu=1$, pH 8,50 (a) e 0,50 (b). 44
- Figura 10** – Plote da absorvância vs tempo para a reação de hidrólise do 2Ac, $\mu=1$ e 45°C em pH 8,50 (a) e pH 0,51 (b). 44
- Figura 11** – (a) Espectros de UV-VIS da reação de hidrólise do 2Ac em pH 0,50, 45°C após 900min; (b) espectro de UV-VIS do β -Naftol em pH 2,00..... 44
- Figura 12** – Espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do 3Ac a 45°C , $\mu=1$, pH 4,40 (a) e 0 (b). 45
- Figura 13** – Espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do 8Ac a 45°C , $\mu=1$, pH 6,30 (a) e 2,60 (b). 45
- Figura 14** – Plote da absorvância vs tempo para a reação de hidrólise do 8Ac, $\mu=1$ e 45°C em pH 2,60 (a) e pH 6,30 (b). 46
- Figura 15** – Espectro de ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) da 8NL obtida a partir da reação de hidrólise do 8Ac após 13 hrs, pH 6,00 e 45°C 47
- Figura 16** – Curvas de titulação fluorimétricas do (a) 1OH, (b) 2OH, (c) 3OH e espectrofotométrica do 8OH (d). 49
- Figura 17** – *Input* do 2Ac para o programa G03 com a opção *modred*. 52
- Figura 18** – Gráfico da constante de velocidade observada para a hidrólise dos ésteres 1Ac, 2Ac, 3Ac e 8Ac em função do pH, 45°C e $\mu=1$. As linhas teóricas foram traçadas utilizando a Eq. 4. 53
- Figura 19** – Gráfico de $\ln(k_{\text{obs}}/T)$ vs T^{-1} para a reação de hidrólise dos ésteres 1Ac, 2Ac, 3Ac e 8Ac em pH 6,00, $\mu=1$ (KCl) e tampão fosfato 0,01 mol/l. Abaixo da figura está a equação de Eyring utilizada para calcular os parâmetros de ativação. 56
- Figura 20** – Plote de k_{obs} para reação de hidrólise do **1Ac** vs pH da solução (■) e vs a

concentração da anilina em pH 6,00 (Δ). Resultados a 45°C e $\mu=1$	58
Figura 21 – Espectro de massas do produto de hidrólise do 1Ac após 5t _{1/2} , pH 4,80 e 45°C. Barras pretas correspondem à reação em água normal. Barras hachuradas correspondem à reação em água marcada.....	62
Figura 22 - Espectro de massas do produto de hidrólise do 3Ac após 5t _{1/2} , pH 4,80 e 45°C. Barras pretas correspondem à reação em água normal. Barras hachuradas correspondem à reação em água marcada.....	62
Figura 23 – Estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM dos ésteres 1Ac (a), 2Ac (b), 3Ac (c) e 8Ac (d). Os átomos de carbono e oxigênio estão representados pelas cores cinza claro e escuro, respectivamente.....	65
Figura 24 – Ângulo de 124,64° entre os carbonos do carboxilato, α e terciário devido à interações repulsivas no 8Ac.....	66
Figura 25 – Superfície de energia potencial do 1Ac em função dos ângulos diedros do grupo éster e carboxilato em relação ao plano do anel. As energias são relativas à energia do mínimo global e correspondem à diferença de energia eletrônica.....	68
Figura 26 – Superfície de energia potencial do 1Ac. (a) Vista superior; (b) curvas de nível com regiões indicadas no texto.....	69
Figura 27 – Confôrmeros do 1Ac representativos das regiões A, B e C da Fig. 24b	69
Figura 28 – (a) Superfície de energia potencial e (b) curvas de nível do 3Ac em função dos ângulos diedros do grupo éster e carboxilato em relação ao plano do anel. As energias são relativas à energia do mínimo global e correspondem à diferença de energia eletrônica.....	70
Figura 29 – Confôrmero do 3Ac representativo da região A da Fig. 26b	70
Figura 30 – (a) Estrutura cristalina do 1Ac. As elipsóides estão apresentadas com uma probabilidade de 40%. (b) Estrutura cristalina do ácido acetilsalicílico com esquema de numeração semelhante ao do anel substituído do 1Ac.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dependência da velocidade de formação do diácido em relação à restrição rotacional para a reação de eliminação de <i>p</i> -bromo fenol.....	24
Tabela 2 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento para a estrutura do 1Ac. ...	50
Tabela 3 – Constantes cinéticas para a hidrólise dos ésteres naftóicos a 45°C e $\mu=1$ (KCl) calculadas a partir da Eq. 4.....	55
Tabela 4 – Parâmetros de ativação e efeito isotópico do solvente (55°C) para a reação de hidrólise dos ésteres naftóicos, pH 6,00 e $\mu=1$ (KCl).....	57
Tabela 5 – Valores de pK_{a1} e pK_{a2} dos ácidos hidróxi-naftóicos determinados por titulação espectrofotométrica a 25°C e $\mu=1$ (KCl).....	63
Tabela 6 – Parâmetros geométricos principais das estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM dos ésteres naftóicos.	65
Tabela 7 – Comprimentos e ângulos de ligação selecionados da estrutura cristalina do 1Ac e AAS a 25°C.	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Reações de hidrólise de ésteres.....	12
1.2 – Reações Intramoleculares como Modelos de Ação Enzimática.....	18
1.2.1 α -Quimotripsina	20
1.2.2 Proteases Aspárticas.....	21
1.3 Relação Entre a Conformação do Estado Reagente e a Velocidade da Reação	24
1.4 Catálise Básica <i>versus</i> Nucleofílica: A Hidrólise da Aspirina	26
1.5 Cálculos Computacionais: Funcional da Densidade.....	29
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Equipamentos e Sistemas Computacionais	35
3.2 Reagentes	37
3.2.1 Síntese do Ácido 8-Acetóxi-1-Naftóico	37
3.2.2 Síntese do Ácido 2-Acetóxi-1-Naftóico	38
3.2.3 Síntese do Ácido 3-Acetóxi-2-Naftóico	39
3.2.4 Síntese do Ácido 1-Acetóxi-2-Naftóico	39
3.3 Medidas Cinéticas	41
3.3.1 Hidrólise do Ácido 1-Acetóxi-2-Naftóico	41
3.3.2 Hidrólise do Ácido 2-Acetóxi-1-Naftóico	43
3.3.3 Hidrólise do Ácido 3-Acetóxi-2-Naftóico	45
3.3.4 Hidrólise do Ácido 8-Acetóxi-1-Naftóico	45
3.4 Estudo de Incorporação de H_2O^{18}	48
3.4 Estudo de Incorporação de H_2O^{18}	48
3.5 Titulações Espectrofotométricas.....	48
3.6 Cristalografia de Raios-X	50
3.7 Metodologias Computacionais.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Reação de Hidrólise dos Ésteres Carboxi-Naftóicos.....	53
4.2 Estudo de Marcação Isotópica.....	61
4.3 Titulações Espectroscópicas.....	63
4.4 Cálculos Computacionais.....	64
4.4.1 Análise do Mínimo Global.....	65
4.4.2 Análise da Superfície de Energia Potencial	67
4.5 Análise da Estrutura Cristalina.....	72
5 CONCLUSÕES	74

1 INTRODUÇÃO

As reações envolvendo a transferência do grupamento acila abrangem uma série de compostos extremamente importantes dos pontos de vista sintético e biológico. Nos organismos vivos, tais reações são encontradas em diversos processos enzimáticos relacionados à formação das membranas celulares, envolvendo a coenzima A, na hidrólise de proteínas e peptídeos, além de estarem presentes no mecanismo de ação de diversas drogas.^{1, 2} Dentre os compostos que possuem o grupamento acila, destacam-se as amidas e ésteres, sendo que ésteres de cadeia curta não possuem atividade biológica conhecida.³

Os mecanismos envolvidos nas reações de hidrólise de ésteres e amidas já foram vastamente estudados e justamente devido a esse conhecimento e à grande importância biológica destes compostos, eles têm sido utilizados em diversas pesquisas para elucidar os mecanismos de ação enzimática.

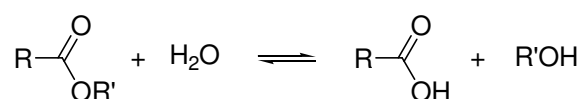
Esse campo de estudo existe a pelo menos 50 anos e utiliza os conhecimentos e ferramentas da química para o entendimento dos processos biológicos. O entendimento é geralmente alcançado com a utilização de modelos moleculares sintetizados em laboratório, possibilitando avaliar cada um dos diversos parâmetros variáveis que operam simultaneamente em um sistema biológico.⁴

Nas próximas páginas será feita uma breve revisão sobre os mecanismos de transferência do grupo acila, especialmente em ésteres de carbonila, e sobre reações intramoleculares como modelos não miméticos de catálise enzimática.

1.1 Reações de hidrólise de ésteres

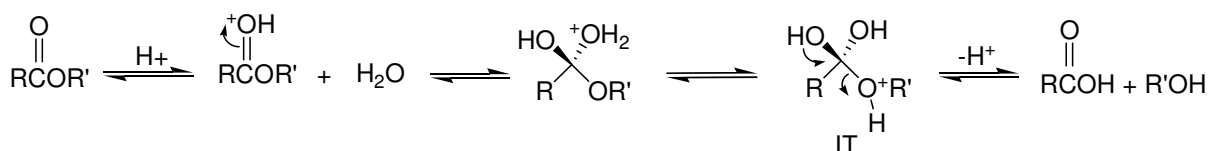
O mecanismo de hidrólise de compostos carbonilados derivados de ácidos carboxílicos já foi vastamente estudado. Uma excelente revisão escrita por Bender⁵ e diversos livros de química orgânica contêm os principais aspectos em relação às reações desses derivados na presença de diferentes catalisadores e condições. Dessa forma, aqui serão apresentadas apenas as informações fundamentais para que o leitor possa ser inserido no contexto do trabalho.

A reação de hidrólise de ésteres pode ser escrita como no **Esquema 1**. A constante de equilíbrio dessas reações é geralmente entre 0,1 e 10 a temperaturas normais, então, a princípio, a reação pode ser deslocada para qualquer direção com a escolha apropriada das condições experimentais. Porém, a catálise é essencial para que o equilíbrio seja atingido com velocidades razoáveis.⁶ A temperatura ambiente e condições neutras de pH, a velocidade de hidrólise para a maioria dos ésteres é extremamente lenta. Citamos como exemplo o $t_{1/2}$ para a hidrólise não-catalisada do acetato de etila em água a 25°C, o qual é de aproximadamente 89 anos.⁷



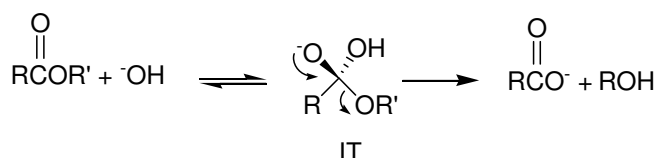
Esquema 1

Em soluções ácidas, a reação é catalisada nas duas direções pelo ácido agregado e a posição do equilíbrio depende somente das concentrações relativas da água e do álcool (**Esquema 2**). Neste caso, o mecanismo é do tipo $A_{AC}2$, que indica uma reação bimolecular, catalisada por ácido e com quebra da ligação acil-oxigênio. A reação $A_{AC}2$ é classificada como uma catálise ácida específica.



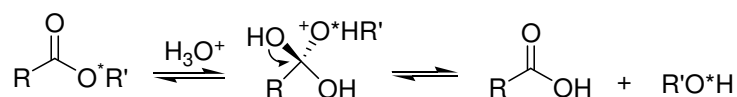
Esquema 2

Em soluções alcalinas, a hidrólise destes compostos é essencialmente irreversível e promovida pela base, haja vista que o íon hidróxido não é regenerado no término da reação (**Esquema 3**). A designação mecanística dessa reação é $B_{AC}2$, onde o termo “B” deve-se à reação promovida pela base e as outras designações tem o mesmo significado anterior, e a reação é classificada como promovida por base.



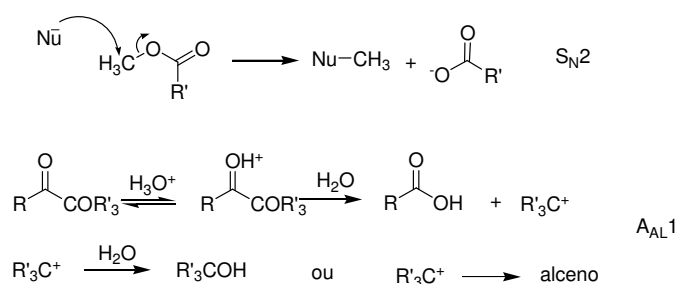
Esquema 3

Dentre as evidências que comprovam os mecanismos de catálise ácida e promoção básica específica estão os estudos cinéticos que mostram a dependência esperada em relação à concentração do íon hidrônio ou hidróxido e estudos de marcação isotópica em ésteres que provam que é a ligação acil-oxigênio, não a alquil oxigênio, que é normalmente quebrada durante a hidrólise (**Esquema 4**).⁵



Esquema 4

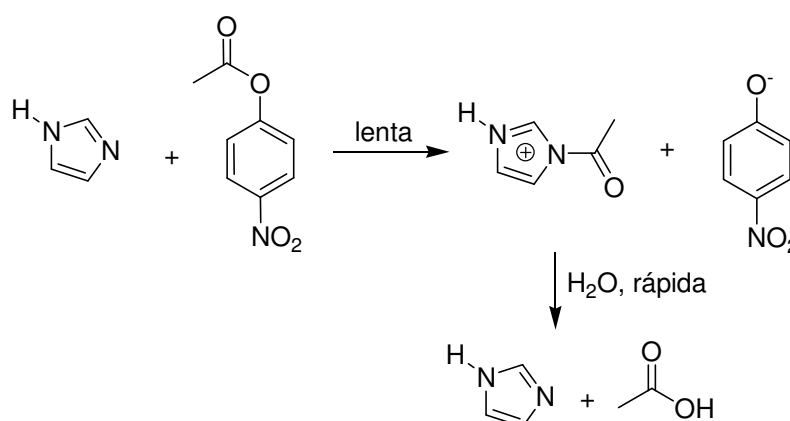
A quebra da ligação alquil-oxigênio, sem formação do intermediário tetraédrico (IT), é apenas viável em dois casos: i) mecanismo tipo S_N2 , possível para grupos que sofrem ataque nucleofílico facilmente, como metil e benzil na presença de um nucleófilo forte, como RS^- ou RSe^- ; ii) mecanismo tipo $A_{AL}1$ que é semelhante ao mecanismo S_N1 de haletos e álcoois saturados, possível no caso da formação de um carbocátion terciário estável em meio fortemente ácido (**Esquema 5**).⁸



Esquema 5

Na reação de hidrólise de ésteres a catálise geral é extremamente importante pois possibilita a transferência de prótons em condições neutras. Em processos enzimáticos, os resíduos do sítio ativo desempenham o papel de catalisadores gerais, estabilizando grupos de saída ruins, aumentando a reatividade de carbonilas pouco eletrofílicas e ainda ativando moléculas de água presentes.⁹⁻¹¹ Além disso, em muitos casos, nesses sistemas as catálises ácida e básica geral atuam simultaneamente.

Além das catálises básica e ácida, os ésteres podem ser hidrolisados por catálise nucleofílica. Neste caso, um dos componentes do sistema com maior poder nucleofílico que a água ou hidróxido ataca a carbonila formando um intermediário que a seguir é hidrolisado numa velocidade maior que o éster inicial. Um exemplo clássico desse tipo de mecanismo é a hidrólise de ésteres derivados de álcoois relativamente ácidos, como *p*-nitro fenol, na presença de imidazol^{12, 13}. (**Esquema 8**).



Esquema 8

As reações de adição-eliminação via intermediários tetraédricos é o mecanismo principal de transferência de grupo acila, porém outros são conhecidos. No mapa da **Figura 1**, o intermediário tetraédrico (**T**) localiza-se no vértice direito inferior, onde, partindo-se do reagente, ocorre a adição de **Y⁻**. O mapa mostra que também é possível a existência de outro tipo de mecanismo em etapas, que também leva ao produto da reação. Na primeira etapa desse mecanismo, o grupo de saída é eliminado antes que o nucleófilo comece a se ligar. Isso corresponde ao eixo esquerdo do mapa, onde no topo há a formação do intermediário catiônico acílio (**A**). Numa segunda etapa, o íon acílio é capturado pelo nucleófilo **Y⁻**, o que corresponde ao progresso na coordenada horizontal superior, da esquerda para direita do mapa.¹⁴

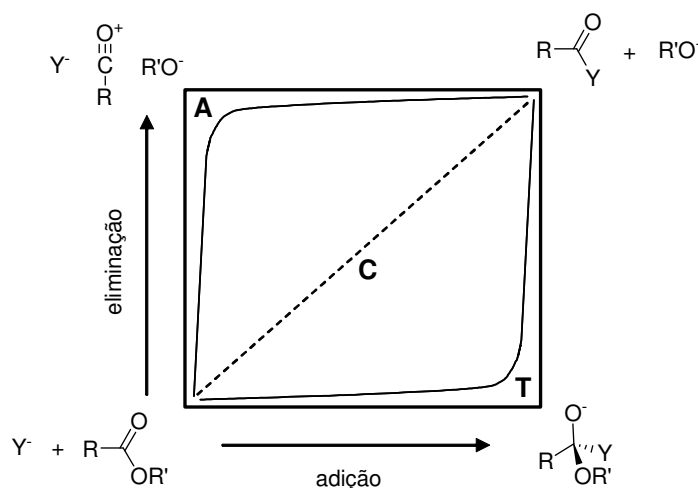


Figura 1 – Mapa de reação para transferência de acila mostrando o mecanismo com formação do íon acílio (A), intermediário tetraédrico (T) e concertado (C)

A formação do íon acílio acontece somente quando há a existência de um excelente grupo de saída, um nucleófilo fraco e ainda um grupo R que estabilize o cátion acílio. Um exemplo é a reação de hidrólise do fluoreto de *p*-dimetilamino benzoila, onde o grupo dimetilamino estabiliza o íon acílio por ressonância.¹⁴

No mapa da **Figura 1** ainda está incluído uma reta tracejada que une os reagentes aos produtos, sem passar por nenhuma das diagonais (**C**). Isso corresponde a um mecanismo de uma única etapa, onde a formação da ligação com o nucleófilo e a quebra da ligação com o grupo de saída ocorrem simultaneamente. Esse mecanismo, chamado de *concertado*, envolve a formação de apenas um estado de transição e ocorre mais raramente do que o mecanismo em etapas.

O mecanismo concertado acontece quando, por exemplo, ésteres de arila reagem com íons fenolato^{15, 16} ou ainda quando piridinas substituídas reagem com íons N-acil piridínicos.¹⁷ Cleland e colaboradores,^{18, 19} através de estudos de marcação isotópica, demonstraram que *p*-nitrofenil acetato reage com nucleófilos oxigenados e sulfurados através de um mecanismo concertado. Além disso, a reação de hidrólise enzimática do mesmo substrato com quimotripsina, anidrase carbônica, papaína e protease ácida de *Aspergillus* também ocorre através da transferência concertada.

A mudança de estabilidade do grupo de saída ou da força do nucleófilo pode fazer com que o mecanismo sofra uma variação dentro de uma série análoga de ésteres ou de nucleófilos. Além disso, somente a variação da estabilidade do grupo de saída pode fazer com que a etapa determinante deixe de ser bimolecular, e o

mecanismo passe a ser do tipo eliminação-adição, semelhante ao de carbocátions, onde grupos de saída estabilizados são expelidos num processo unimolecular.²⁰

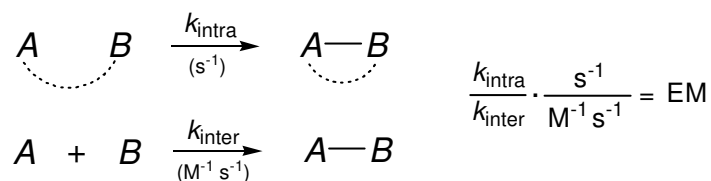
As enzimas podem utilizar qualquer um dos modos de catálise mencionados acima, além de outros, para acelerar uma reação química em particular. Por exemplo, o anel imidazol de um resíduo histidina da enzima α -quimotripsina funciona como um catalisador básico-geral²¹⁻²³, enquanto que esse mesmo resíduo na fosfatase ácida pode funcionar como catalisador básico ou como nucleófilo²⁴⁻²⁶. Na verdade, as enzimas empregam mais de um fator catalítico no curso da reação e por isso podem ser consideradas catalisadores complexos, onde os processos de ligação de hidrogênio e transferência de prótons, funcionam de forma extremamente eficiente. A ligação do substrato à enzima e a orientação do mesmo em relação aos resíduos de aminoácidos para que a reação de transacilação ocorra é realizada por ligações não-covalentes que atuam de forma sinérgica com a transferência de prótons. Além disso, as enzimas estabilizam o estado de transição baixando sua energia²⁷. Todos esse fatores contribuem para acelerações que podem chegar a ordem de 10^{19} vezes.²⁸

1.2 – Reações Intramoleculares como Modelos de Ação Enzimática

Uma das maneiras de estudar o mecanismo de ação enzimática é através de modelos que imitem uma ou mais peculiaridades do sítio ativo de determinada enzima. Nesse contexto, um destaque tem sido dado aos modelos não miméticos de catálise intramolecular, isto é, aqueles em que apenas algumas características do sítio ativo de determinada enzima são replicadas.²⁹ O objetivo fundamental desta metodologia de estudo da catálise enzimática é entender de forma quantitativa os diferentes aspectos e fatores que contribuem para a eficiência catalítica observada, mesmo que tais modelos não tenham relação direta com algum processo enzimático conhecido.³⁰ Em outros tipos de estudos, também se mimetizam as interações não-covalentes enzima-substrato utilizando-se ciclodextrinas³¹, calixarenos³² e éteres de coroa³³, por exemplo. No presente trabalho o enfoque será dado aos modelos intramoleculares, principalmente aqueles em que fatores como a transferência de prótons e orientação são importantes.

Os princípios sob os quais se fundamentam tais modelos estabelecem que os mesmos parâmetros físico-químicos que governam a reatividade entre dois grupamentos funcionais em uma reação intramolecular, também estão presentes para estes mesmos grupamentos quando constituem o sítio ativo da enzima.³⁰ A idéia de utilizar reações intramoleculares para estudar a catálise enzimática é atrativa e extensivamente explorada³⁴ principalmente devido a dois fatores: (a) grandes acelerações geralmente acontecem quando uma reação intermolecular é convertida em sua respectiva reação intramolecular; (b) uma enzima reagindo com seu substrato é semelhante a uma reação orgânica intramolecular.³⁵

As vantagens de uma reação intramolecular em relação à sua correspondente reação intermolecular são diversas. Kirby introduziu o termo *Molaridade Efetiva* (EM) para expressar a concentração teórica do catalisador necessária para que a reação intermolecular possua a mesma constante de velocidade da reação intramolecular (**Esquema 9**)³⁶. Por exemplo, para que a velocidade de hidrólise do acetato de fenila catalisada por acetato tenha a mesma velocidade da reação de hidrólise da aspirina, seria necessária uma concentração teórica de 13M de acetato.³⁷



Esquema 9

Page e Jencks propuseram que a origem do efeito catalítico devia-se em grande parte a fatores entrópicos sugerindo que na formação do complexo enzima-substrato há perda de graus de liberdade do substrato, que seriam compensados da energia total utilizada para alcançar o estado de transição³⁸. Além disso, esses autores mostraram que numa reação bimolecular, na formação do estado de transição, há diminuição da entropia, pois graus de liberdade translacionais e rotacionais estariam sendo perdidos, o que não ocorreria numa reação intramolecular.

Bruice tem sugerido que a origem da catálise enzimática e a maior velocidade das reações intramoleculares devem-se mais a fatores entálpicos do que a entrópicos³⁹ demonstrando que numa série de reações intramoleculares a velocidade da reação está diretamente relacionada à entalpia e não à entropia de ativação.⁴⁰ A comparação dos parâmetros de ativação de reações catalisadas por enzimas em relação à mesma reação em água para o rearranjo da corismato para preferato (em água $\Delta H^\ddagger = 20.5$ kcal/mol, $-T\Delta S^\ddagger = 3.9$ kcal/mol; com *B. subtilis* mutase, $\Delta H^\ddagger = 12.7$ kcal/mol, $-T\Delta S^\ddagger = 2.7$ kcal/mol; com *Escherichia coli* mutase, $\Delta H^\ddagger = 16.3$ kcal/mol, $-T\Delta S^\ddagger = 0.9$ kcal/mol) demonstra que a diminuição dos valores de ΔG^\ddagger tem, de uma forma geral, maior contribuição do termo entálpico.⁴¹

A estrutura enzimática está em constante movimento.⁴² Através da técnica de dinâmica molecular é possível observar que esse movimento também está presente no substrato e na enzima durante a existência do complexo formado entre esses reagentes e também ao longo da coordenada de reação que leva a formação do estado de transição.⁴¹ Logo, a perda de movimentos torsionais nas reações enzimáticas é menos importante do que proposto por Page e Jencks. Além disso, o número de movimentos relacionados às frequências abaixo de 1000 cm^{-1} no estado reagente e de transição são os mesmos.⁴³

A quebra de ligações peptídicas de uma proteína ou de peptídeos é um dos processos biológicos de maior importância. Essa reação, na ausência de enzimas, é

extremamente lenta sendo o $t_{1/2}$, em condições neutras e a 25°C, de 400 anos.⁴⁴ Dentre os fatores que participam da quebra das ligações peptídicas podem-se citar: o aumento do ataque nucleofílico; a estabilização do intermediário tetraédrico; a estabilização do estado de transição; o aumento do poder de “fuga” do grupo de saída.⁴⁵ Todos esses fatores estão presentes no mecanismo de ação da α -quimotripsina.

Nos próximos tópicos serão apresentadas algumas características de duas enzimas naturais envolvidas na quebra de ligações peptídicas. Em ambos os casos, os conceitos apresentados acima são de extrema importância e fica evidente que a catálise por transferência de prótons é um processo de extrema importância nos sistemas biológicos.

1.2.1 α -Quimotripsina

A α -quimotripsina é uma das peptidases mais estudadas até hoje. No fim da década de 1969, com a obtenção da estrutura de raios-x desta enzima, foi possível revelar o aparato catalítico do sítio ativo, onde três resíduos, His-57, Asp-102 e Ser-195, estão presentes num arranjo que foi chamado de tríade catalítica²¹⁻²³ (**Figura 2**).

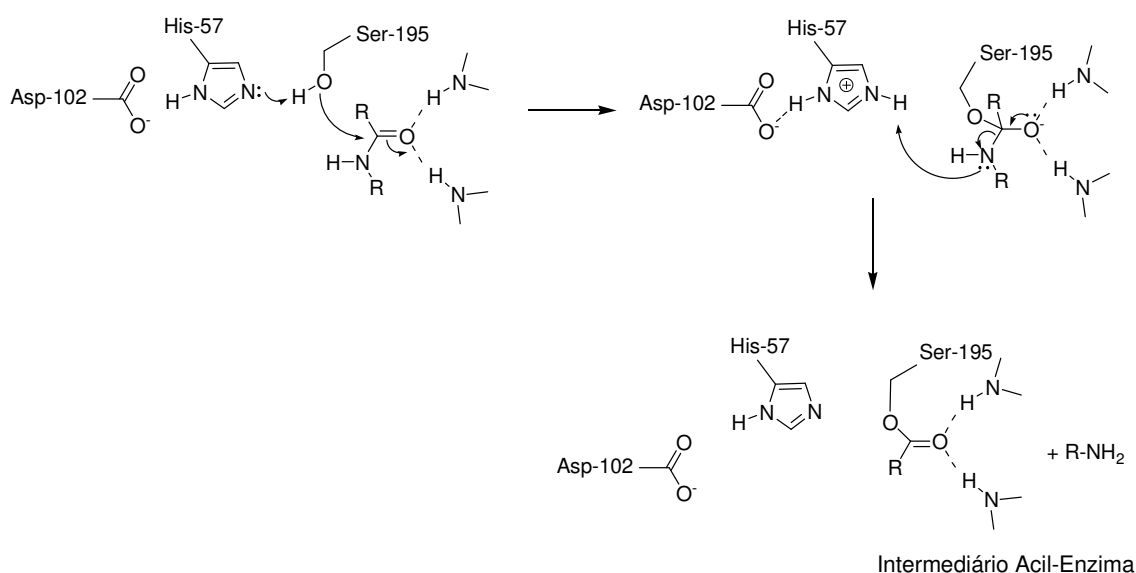
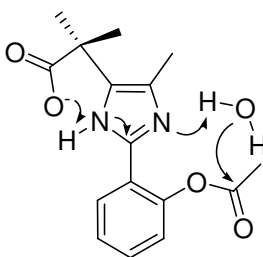


Figura 2 – Mecanismo de ação da quimotripsina

O ataque nucleofílico da serina é efetuado com ajuda de catálise básica geral pelo grupo imidazol da histidina, que é ainda assistido pelo resíduo de aspartato.

Logo, o ataque nucleofílico é aumentado pela energia de interação favorável do par iônico formado e a partida do grupo de saída é catalisada pelo ácido geral imidazólio formado na primeira etapa da reação.

Bruice e Rogers desenvolveram um modelo sintético para estudar a hipótese da tríade catalítica (**Esquema 10**).⁴⁶ Nesse modelo, o grupo carboxilato não apresenta importância significativa na catálise, oferecendo um aumento de apenas 3 vezes na velocidade da reação em relação aos modelos sem o grupo carboxilato.



Esquema 10

Na verdade, nesse sistema a perda de entropia causada pela restrição rotacional, exigida para efetuar a atividade catalítica pelo grupo carboxilato, é muito alta e pouco favorável, isto é, o correto alinhamento do grupo carboxilato, imidazol, éster e água é energeticamente custoso. Porém, na estrutura enzimática, os resíduos que estão participando na atividade catalítica estão posicionados de maneira a evitar esse excesso de rotação, situando-se assim numa geometria perfeita para o substrato. Dessa forma, é interessante o estudo de modelos que se aproximem o máximo possível de situações onde a restrição rotacional é alta.

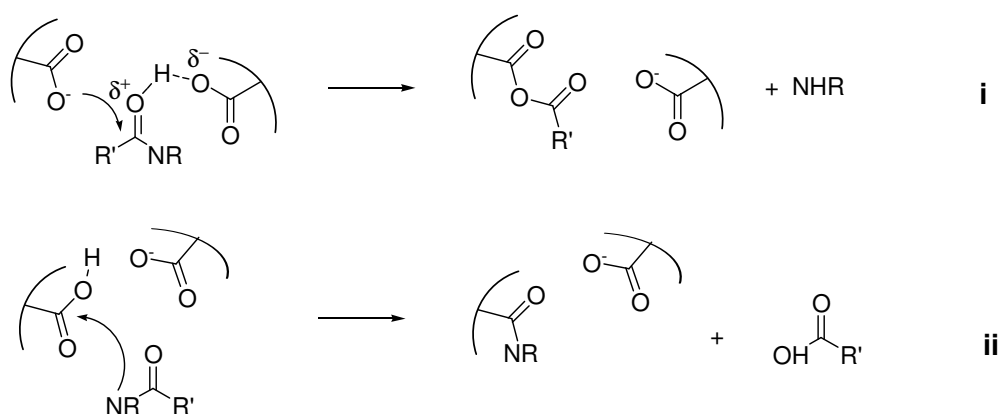
1.2.2 Proteases Aspárticas

As enzimas da família das proteases aspárticas constituem um grande número de enzimas consideradas homólogas, como pepsina, quimosina, catepsina, penicilopepsina, entre outras⁴⁷. As estruturas estudadas apresentam dois resíduos de ácido aspártico no sítio ativo, sendo esses essenciais à atividade catalítica.

Por muitos anos, o mecanismo de ação dessas enzimas permaneceu um mistério, sendo tema de diversas publicações. A descoberta dos resíduos de ácido aspártico foi realizada através da incorporação de reagentes específicos que reagem com o grupo carboxilato na forma aniônica ou na forma protonada⁴⁸⁻⁵¹. Na faixa de pH ótimo, entre 2 e 3, um dos grupos aspartato apresenta-se na forma ionizada

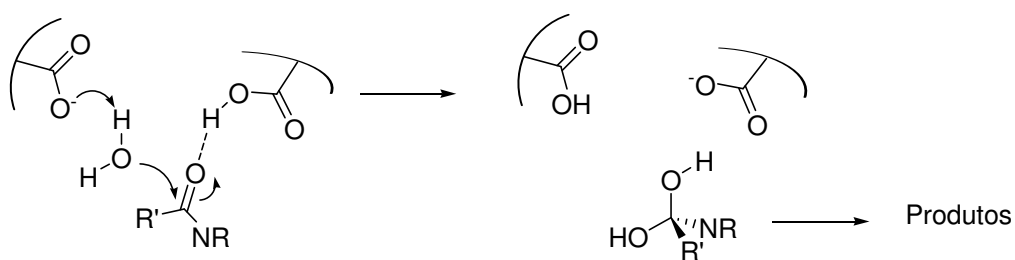
enquanto o outro apresenta-se neutro⁵².

A partir dessas observações, dois mecanismos foram propostos envolvendo a formação de um intermediário acil-enzima ou amino-enzima que precederiam os produtos. O primeiro seria derivado do ataque nucleofílico do grupo carboxilato sobre a carbonila do substrato catalisado pelo ácido geral vizinho (**Esquema 11i**) e o segundo seria formado a partir do ataque nucleofílico do peptídeo sobre o resíduo de ácido aspártico do sítio ativo (**Esquema 11ii**).



Esquema 11

Porém, estudos posteriores utilizando H_2O^{18} e transpeptidação indicaram que tais intermediários não poderiam fazer parte do curso reacional.⁴⁷ Somente em 1982⁵³, com a obtenção da estrutura de raios-X do complexo formado entre a enzima e um inibidor específico, ficou claro que os mecanismos propostos não eram consistentes com a realidade e que um mecanismo muito mais simples, onde a catálise ácida e básica atuam de forma simultânea estaria acontecendo (**Esquema 12**).



Esquema 12

O mecanismo de ação das proteases aspárticas ainda não possui um modelo intramolecular análogo para a hidrólise de ésteres, provavelmente porque é necessário construir um sistema com a elevada rigidez e baixa entropia necessárias para que catálise básica e ácida geral aconteçam de forma concertada. Porém, a estrutura enzimática é altamente específica e relativamente organizada, possibilitando que fatores como distância e orientação permitam que a seqüência de quebra e formação de ligações aconteça de forma simultânea.^{54, 55}

Nome e colaboradores recentemente desenvolveram um modelo de ribonuclease, uma família de enzimas que quebram RNA, onde a catálise ácida e básica ocorre simultaneamente no estado de transição (**Figura 3**).⁵⁶ Nesse composto, o grupo imidazol atua como catalisador básico geral ativando uma molécula de água enquanto que o próton do grupo imidazólico estabiliza o grupo de saída aril-óxido. O nucleófilo e o grupo de saída devem ocupar posições apicais e opostas.

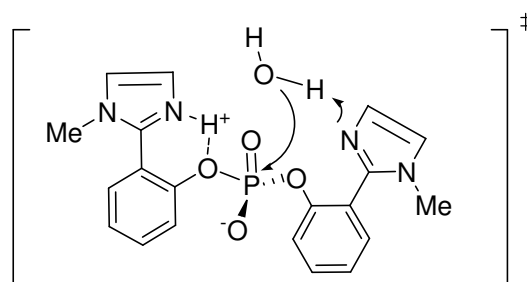


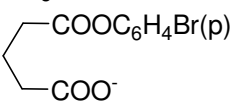
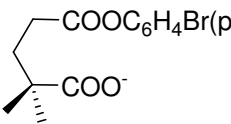
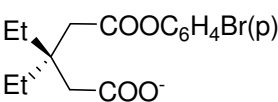
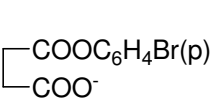
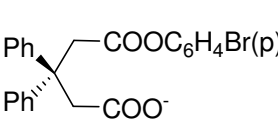
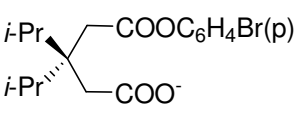
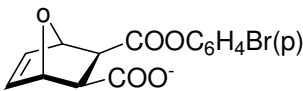
Figura 3 – Modelo de ribonuclease onde a catálise básica e ácida geral ocorrem simultaneamente no estado de transição.

1.3 Relação Entre a Conformação do Estado Reagente e a Velocidade da Reação

Grande parte dos modelos enzimáticos propostos busca mimetizar os resíduos de aminoácidos envolvidos diretamente no sítio ativo da enzima, utilizando os diferentes modos de ativação e estabilização dos grupos envolvidos para acelerar a reação, como discutido acima. Porém, muitas vezes fatores como distância e conformação do estado reagente ficam de fora, apesar de terem um papel extremamente importante tanto em reações intramoleculares como enzimáticas.³⁹

Um exemplo clássico de tais fatores foi estudado por Bruice e colaboradores na reação intramolecular de eliminação de *p*-bromo fenol de uma série de ésteres (**Tabela 1**),⁵⁷ onde a etapa determinante da reação é a formação do anidrido.

Tabela 1 - Dependência da velocidade de formação do diácido em relação à restrição rotacional para a reação de eliminação de *p*-bromo fenol.

	k_{relativo}
I $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{Br}(p)$ 	1,0
II 	$\sim 1 \times 10^3 \text{ M}$
III 	$\sim 3,6 \times 10^3 \text{ M}$
IV 	$\sim 1,8 \times 10^5 \text{ M}$
V 	$\sim 2,3 \times 10^5 \text{ M}$
VI 	$\sim 2,7 \times 10^5 \text{ M}$
VII 	$\sim 1,3 \times 10^6 \text{ M}$
	$\sim 8 \times 10^7 \text{ M}$

A remoção de apenas um grau de liberdade rotacional aumenta a velocidade da reação por um fator de aproximadamente 200. Com moléculas rígidas, os grupos reativos podem ser alinhados mais especificamente para a reação, tornando a velocidade muito maior. O resultado é uma consequência direta do efeito de proximidade dos grupos reacionais, que passam mais tempo numa conformação adequada para o ataque intramolecular. Bruice e colaboradores definiram essa geometria particular como NAC (Near Attack Conformation) (**Figura 4a**). Logo, para que a reação ocorra com velocidades razoáveis, determinado composto deve residir nessa NAC por longos períodos, sendo a velocidade da reação diretamente proporcional à probabilidade dessa conformação ser adotada (**Figura 4b**).^{40, 43}

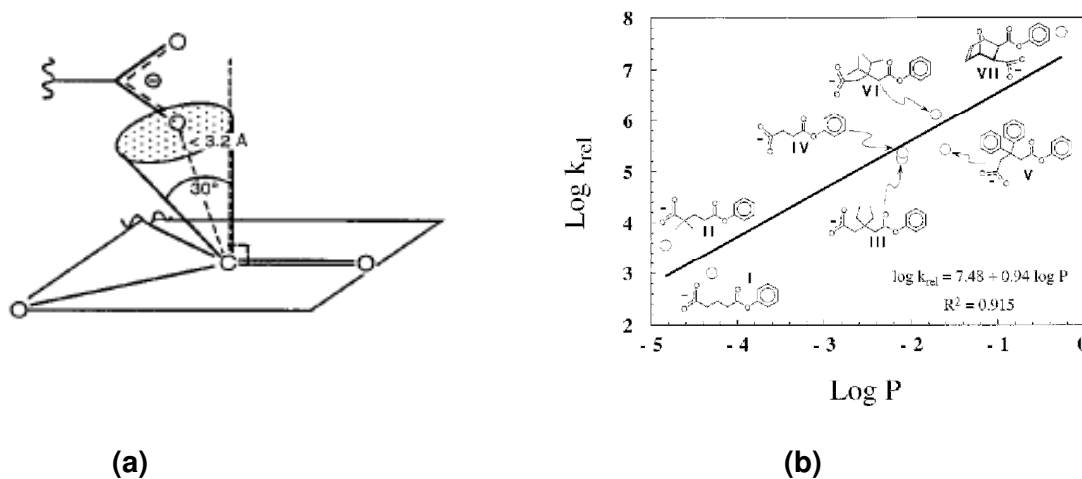


Figura 4 – (a) Definição de NAC, mostrando que a distância entre os centros reativos deve ser menor que 3.2Å e que o ângulo de aproximação do nucleófilo deve estar numa região de 30° com o eixo a 15° da normal do plano da carbonila; (b) Plote do logaritmo da constante de velocidade relativa para a formação do anidrido a partir dos ésteres de fenila vs o logarítmo da probabilidade (P) para a formação de um NAC.^{40, 43}

Outro exemplo da importância dos fatores de orientação e proximidade é a reação de hidrólise da amida da **Figura 5**, onde a proximidade da carbonila do O_a em relação ao C_b promove a quebra da carbonila amídica numa velocidade nunca antes observada para tais compostos em pH 7.⁵⁸

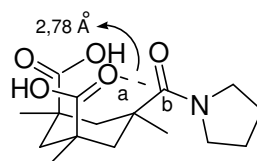
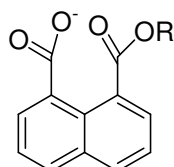


Figura 5 – Modelo de peptidase onde a proximidade dos grupos reativos justifica a alta reatividade de hidrólise.

Yunes e colaboradores⁵⁹ demonstraram que na reação de hidrólise de monoésteres derivados do ácido 1,8-naftálico, a molaridade efetiva do grupo carboxilato chega à ordem de 10^{13} . Nesse modelo fica claro que a pequena distância que separa os grupos reativos leva à uma maior dessolvatação e que ainda o alívio na deformação do anel no produto em relação ao estado reagente aumenta a ressonância, acelerando ainda mais a reação.



Dessa forma a eficiência das reações intramoleculares é muito dependente da posição dos grupos reativos⁶⁰, do tempo que os mesmos residem na distância apropriada para a reação⁶¹ e da conformação do estado reagente.

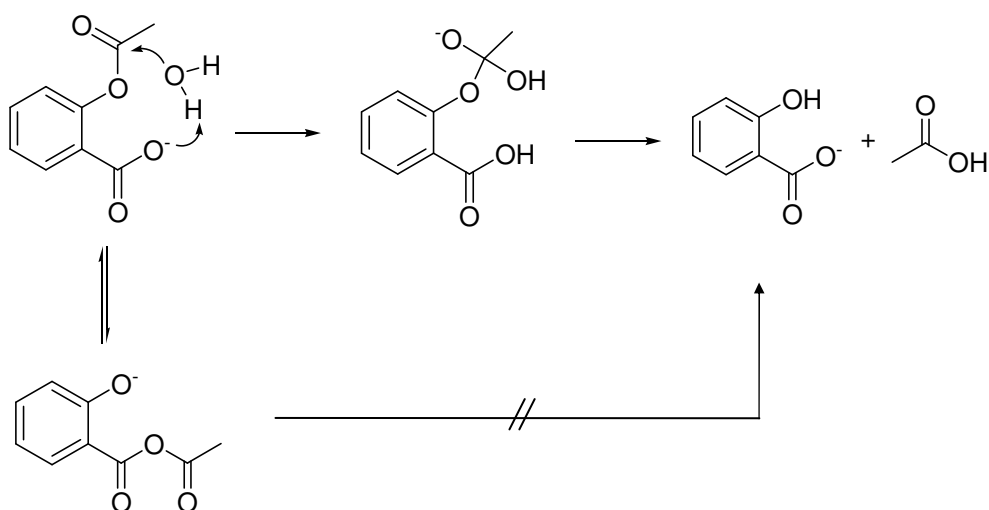
As reações enzimáticas mais eficientes devem ter um valor alto de constante de equilíbrio para a formação do complexo enzima-substrato, a fração molar desse complexo presente na forma de um NAC próxima da unidade e a energia livre do TS significativamente estabilizada por interações eletrostáticas com os resíduos presentes no sítio ativo.³⁹

Bruice e Lightstone³⁹ demonstraram através de métodos semiempíricos aliados à dinâmica molecular que na reação S_N2 de decomposição do 1,2-dicloroetano catalisada pela haloalcano desidrogenase (*Xanthobacter autotrophicus*), que acontece com ataque do Asp-124, que o conceito de NAC é extremamente importante. Dessa forma, a conformação do estado reagente também deve ser considerada em sistemas enzimáticos.

1.4 Catálise Básica versus Nucleofílica: A Hidrólise da Aspirina

Um exemplo clássico de catálise básica geral intramolecular é a reação de hidrólise da aspirina, onde o grupo carboxilato vizinho ao grupo éster ativa uma molécula de água na etapa determinante da velocidade da reação^{37, 62} (**Esquema 13**). Embora experimentos de marcação isotópica demonstraram que o anidrido

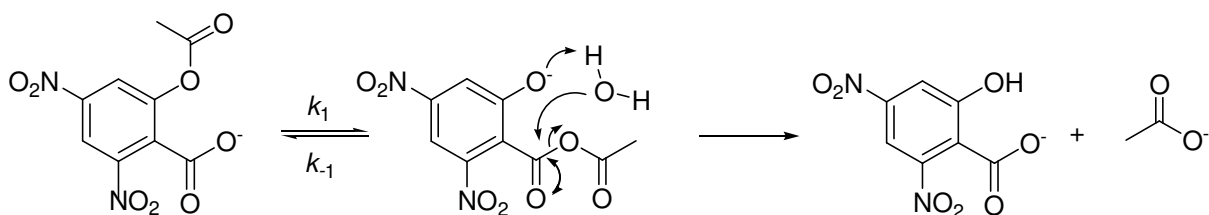
derivado do ataque intramolecular do carboxilato também é formado⁶³, essa não constitui uma rota adequada para a formação dos produtos.



Esquema 13

Dentre as evidências que suportam esse mecanismo podem-se citar a ausência de incorporação de oxigênio marcado, um efeito isotópico normal (k_{H_2O}/k_{D_2O} 2,3) e o envolvimento de apenas um próton na etapa limitante da reação,⁶⁴ avaliado pela técnica de inventário de prótons.

A reação de hidrólise da 2,4-dinitro aspirina envolve o grupo carboxilato atuando como catalisador nucleofílico (**Esquema 14**).⁶⁵ Segundo Fersht e Kirby, esse mecanismo só acontece porque a diferença de pK_a do grupo de saída e o do nucleófilo é menor do que 6-7 unidades. Logo, no esquema abaixo, k_{-1} é muito menor do que k_1 e a reação prossegue para a direita. Isso está de acordo com Gold e colaboradores⁶⁶, que observaram que a catálise nucleofílica na reação do íon acetato com acetatos de arila só acontece quando a diferença entre os pK_a 's do grupo de saída e nucleófilo é de no máximo 3 unidades.



Esquema 14

Assim, pode-se concluir que neste tipo de sistema, o mecanismo de catálise pelo grupo carboxilato é altamente dependente dos efeitos eletrônicos. O mecanismo de hidrólise de derivados da aspirina envolvendo o ataque nucleofílico só é importante nos casos onde o grupo de saída é ativado. Já a catálise básica geral ativa significativamente a molécula de água,⁶⁷ tornando o ataque muito mais efetivo.

1.5 Cálculos Computacionais: Funcional da Densidade

Um sistema molecular em um estado estacionário pode ser completamente caracterizado pela solução de Θ para a equação de Schrödinger de um sistema com múltiplos elétrons (**Equação 1**),

$$H_T \cdot \Theta = E_T \cdot \Theta \quad (1)$$

onde, Θ é uma função de onda que depende das coordenadas eletrônicas e nucleares e H_T é o operador Hamiltoniano da molécula e E_T é a energia do sistema.

Uma aproximação útil é considerar os núcleos deste sistema fixos no espaço (aproximação de Born-Oppenheimer), o qual é equivalente a considerar que o movimento dos elétrons é muito superior ao dos núcleos, neste caso a equação de Schrödinger pode ser reduzida para a **Equação 2**,

$$H \cdot \Psi = E \cdot \Psi \quad (2)$$

onde E é a energia potencial da molécula em coordenadas nucleares fixas e H é o operador Hamiltoniano da molécula com a energia cinética dos núcleos omitida e Ψ é a função de onda eletrônica que depende das coordenadas dos elétrons.⁶⁸

A energia do sistema pode ser calculada por meio da aproximação do campo auto-consistente de Hartree-Fock (SCF-HF, SCF do inglês, *Self-Consistent Field*), onde para cada molécula pode-se atribuir uma configuração eletrônica baseada em orbitais moleculares, os quais são resultantes da combinação linear de orbitais atômicos. Na resolução da equação secular de HF (**Equação 3**) deve-se satisfazer duas condições, a primeira consiste em aplicar o método variacional, no qual as funções de onda são modificadas de modo a se obter a energia mínima do sistema. E, na segunda condição, chamada de auto-consistência, as funções de onda resultantes devem ser consistentes com as funções usadas para gerá-las.⁶⁸

$$E = \frac{\int \Psi^* H \Psi d\tau}{\int \Psi^* \Psi d\tau} \quad (3)$$

O tempo requerido para um cálculo HF é proporcional a N^4 , onde N é o número de funções de base. Entretanto, utilizando algoritmos eficientes o tempo pode ser reduzido para ser proporcional a N^2 , e em sistemas muito grandes (>1000

átomos), pode aumentar linearmente com N . Todavia, o método de Hartree-Fock negligencia a correlação eletrônica, visto que supõe que todos os elétrons se movem independentemente dos demais e de acordo com sua função de onda. Esta suposição é falha, pois os elétrons interagem e se movimentam de tal modo a estarem o mais afastado possíveis uns dos outros, em um movimento sincronizado que diminui a repulsão intereletrônica e, conseqüentemente, a energia total do sistema. Este fato, embora não produza grandes diferenças na geometria espacial de uma dada molécula é muito importante na definição da energia do sistema e pode provocar erros grosseiros.^{68, 69}

Diversos métodos foram criados considerando a correlação eletrônica e vêm sendo rotineiramente aplicados, Møller e Plesset, por exemplo, introduziram a correlação eletrônica através de um novo conceito, o teorema da perturbação, no qual o operador Hamiltoniano pode ser descrito através da **Equação 4**,

$$H = H^{(0)} + \lambda V \quad (4)$$

onde, V é um operador de perturbação e λ é um parâmetro adimensional que varia de 0 a 1. De acordo com este conceito, as auto-funções e os auto-valores podem ser expandidos em relação ao parâmetro λ como demonstrado nas **Equações 5 e 6**,

$$\psi_0 = \psi_0^{(0)} + \lambda \cdot \psi_0^{(1)} + \lambda^2 \cdot \psi_0^{(2)} + \lambda^3 \cdot \psi_0^{(3)} + \dots \quad (5)$$

$$a_0 = a_0^{(0)} + \lambda \cdot a_0^{(1)} + \lambda^2 \cdot a_0^{(2)} + \lambda^3 \cdot a_0^{(3)} + \dots \quad (6)$$

onde, $a_0^{(0)}$ é o auto-valor para $\psi_0^{(0)}$, o qual é uma auto-função de $H^{(0)}$, e os expoentes (n) são as ordens (n) de correções. A correção de primeira-ordem de Møller-Plesset (MP1) não conduz a uma correção na energia de HF, entretanto, a correção de segunda-ordem (MP2) torna-se mais importante para dar uma estimativa da energia de correlação, enquanto que MP3 não leva a resultados muito melhores, e uma correção em quarta-ordem (MP4), por sua vez, conduz a 95-98% da energia de correlação.⁶⁸ Outros métodos de correlação que introduzem maior precisão incluem o método de agrupamentos acoplados (coupled-cluster) CCSD(T), a aproximação multireferencial MCSCF, e a teoria perturbacional de segunda-ordem considerando o espaço ativo completo (CASPT2). Especialmente, CCSD(T) produz dados de alta precisão, mas requerem bases elevadas e aumenta o tempo de cálculo na ordem de

N^6 , o que o torna um método utilizado com pequenas moléculas (< 20 átomos).^{68, 69}

A despeito do grande sucesso destes métodos, a uma função de onda é um termo complicado, depende do spin e de três coordenadas espaciais (assumindo posições fixas dos núcleos), não é particularmente intuitiva para sistemas com mais de um elétron e deriva da aproximação matemática da Equação de Schrödinger. Além disso, o custo computacional tende a ser elevado para uma descrição precisa de um dado sistema. Estes fatos levaram a considerar uma forma mais simples de tratar estes problemas, a teoria do funcional da densidade (DFT).

Kohn e Sham⁷⁰ demonstraram que é possível um método alternativo para obter a energia potencial E da **Equação 3** utilizando outra propriedade molecular sem resolver a Ψ da **Equação 2**. Conhecido como Teoria do Funcional da Densidade, este método foi baseado no teorema de Hohenberg-Kohn,⁷¹ no qual o estado de energia E pode ser determinado unicamente pela densidade eletrônica ρ , a qual para um sistema com n elétrons pode ser expressa através de n orbitais de Kohn-Sham (**Equação 6**),

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^n \varphi_i^*(r) \cdot \varphi_i(r) \quad (7)$$

onde, os orbitais KS são expressos como uma combinação linear de funções de base (**Equação 8**),

$$\varphi_i(r) = \sum_{k=1}^{k=m} C_{ik} \cdot \chi_k(r) \quad (8)$$

No esquema de otimização da energia no método de DFT, os coeficientes dos orbitais C_{ik} são determinados de tal modo a minimizar a energia, a qual pode ser expressa tal como representado na **Equação 9**.

$$E \cdot \rho(r) = (T + V_{NE} + V_{EE} + E_{xc}) \cdot \rho(r) \quad (9)$$

onde, T corresponde a energia cinética dos elétrons, V_{NE} ao termo de energia potencial da interação elétron-núcleo e V_{EE} ao termo repulsão elétron-elétron. O último termo da **Equação 9**, a energia de troca e correlação, E_{xc} , está relacionado com a diferença entre a repulsão eletrônica na mecânica clássica e quântica, e também inclui a diferença de energia cinética entre um sistema onde não há interação eletrônica (fictício) e um sistema real.

Em termos práticos, o termo E_{xc} como uma função de ρ é tudo que deve ser conhecido, e no início, diversos funcionais foram desenvolvidos. Kohn⁷⁰ sugeriu apenas escrever E como um funcional de ρ , que ficou conhecido como aproximação local da densidade (LDA, do inglês, *Local Density Approximation*), onde o valor da E_{xc} a uma dada posição r é computado exclusivamente do valor de ρ naquela posição, ou seja, envolve somente os valores das densidades dos spins eletrônicos.

O LDA embora leva a geometrias razoavelmente corretas, tende a sobreestimar as energias de ligação. Uma alternativa mais adequada foi proposta por Becke,⁷² Perdew⁷³ e outros⁷⁴ que na década de 1980 formularam outro tratamento, que ficou conhecido como aproximação generalizada do gradiente (GGA, do inglês, *Generalized Gradient Approximation*), o qual depende do valor da densidade local e também da extensão pelo qual esta densidade esta mudando localmente. Isto é, envolve os valores das densidades dos spins eletrônicos e seus gradientes. Os métodos GGA, tais como PW91,⁷⁵ B95⁷⁶ e LYP,⁷⁴ permitiram uma melhora considerável em relação ao método LDA nos valores de energias calculadas.⁶⁹

Uma terceira geração de funcionais que surgiram nos últimos anos são conhecidos como funcionais híbridos e são o produto da combinação de diferentes funções, sendo que os funcionais mais utilizados são B3PW91,⁷⁷ B3LYP⁷⁸ e PBE0.⁷⁹ Na **Equação 10** está representada a forma de combinação do funcional B3LYP, o mais utilizado atualmente,

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1-a).E_x^{LSDA} + a.E_x^{HF} + b.\Delta E_x^B + (1-c).E_c^{LSDA} + c.E_c^{LYP} \quad (10)$$

onde, a , b e c são valores otimizados para 0,20, 0,72 e 0,81, respectivamente.

Logicamente, a aplicação correta da teoria, que considera rapidez e qualidade dos resultados, depende de como os orbitais moleculares são tratados. Assim, uma base de dados, que é a forma como uma função de onda é construída da combinação linear de funções de onda atômicas, deve possuir o menor número possível de integrais, para uma maior rapidez do cálculo. Além disso, a escolha da função de base deve ter representação química, ou seja, a função deve ter grande amplitude em regiões do espaço onde a densidade eletrônica é alta, e pequena amplitude onde a densidade é baixa. As funções de base que originam destas escolhas são classificadas em primitivas e contraídas. As funções primitivas ditam a simetria dos orbitais, enquanto que as funções contraídas são uma combinação

linear de funções primitivas para dar precisão a representação do orbital. Obviamente, quanto mais funções são utilizadas, mais precisa é a função contraída e os resultados obtidos.⁶⁸

A combinação de funções primitivas e contraídas na descrição do orbital de valência origina uma nova classificação: (i) ξ -simples (ou mínima), uma função para cada orbital atômico ocupado, ex. STO-3G e MINI; (ii) ξ -dupla, duas funções para cada orbital ocupado de valência, ex. 6-31G, 3-21G, DZ e cc-PVDZ; e, (iii) ξ -tripla, três funções para cada orbital ocupado, ex. 6-311G, TZ e cc-PVTZ.⁶⁸

Uma observação importante é que existe uma distinção entre orbitais atômicos e funções de base em cálculos moleculares. Em geral, as posições no espaço dos núcleos de orbitais moleculares requerem uma flexibilidade maior do que a dos próprios átomos. Esta flexibilidade pode ser adicionada na forma de funções de base que correspondem a um número quântico de momento angular mais alto do que aquele que os próprios orbitais de valência possuem. Por exemplo, para um átomo de nitrogênio, a função, chamada de polarização, a ser adicionada é a d , enquanto para um átomo de hidrogênio é uma função p . As funções passam a ser notadas agora entre parênteses, como nos exemplos a seguir, 6-31G(d), 6-311G(d,p), DZ(d,p).⁶⁸

Outra função importante, para terminar a descrição das funções de base, é a função difusa, que permite que os elétrons mais fracamente ligados possam popular regiões eletronicamente menos densas. Isto possui grande importância, como pode ser previsto, em orbitais moleculares de alta energia de ânions, estados eletrônicos excitados e complexos supramoleculares. A nova notação agora pode ser representada nos seguintes exemplos, 6-31+G(d), 6-311++G(d), onde o + na primeira função indica que foi utilizada função difusa s e p , e na segunda a adição de um segundo + indica adição de mais uma função s .⁶⁸

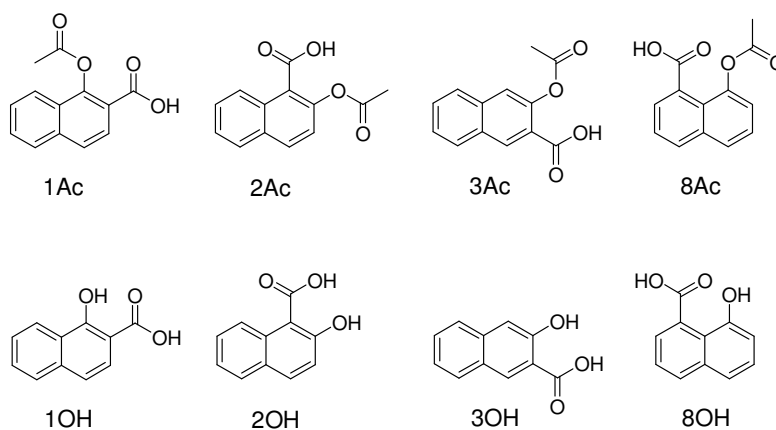
2 OBJETIVOS

De acordo com o interesse geral na área de reações intramoleculares como modelos de reações enzimáticas, os **objetivos gerais** da dissertação de mestrado foram avaliar:

- i. a reação de hidrólise de ésteres derivados de ácidos hidróxi-naftóicos;
- ii. o efeito da conformação do estado reagente no mecanismo das reações em questão.

Dentro de um conjunto de estratégias específicas para atingir estes objetivos, destaca(m)-se:

- i as sínteses e caracterizações dos ácidos 1-acetóxi-2-naftóico (**1Ac**), 2-acetóxi-1-naftóico (**2Ac**), 3-acetóxi-2-naftóico (**3Ac**), 8-hidróxi-1-naftóico (**8OH**) e 8-acetóxi-1-naftóico (**8Ac**), incluindo a obtenção da estrutura cristalina;
- ii o estudo da hidrólise dos ésteres acima em diferentes pHs e em D₂O, a avaliação de incorporação de oxigênio isotopicamente marcado, a determinação dos parâmetros de ativação das reações em questão;
- iii a determinação das constantes de equilíbrio de dissociação ácida dos ácidos 1-hidróxi-2-naftóico (**1OH**), 2-hidróxi-1-naftóico (**2OH**), 3-hidróxi-2-naftóico (**3OH**) e 8-hidróxi-1-naftóico (**8OH**);
- iv a obtenção da superfície de energia potencial eletrônica para os isômeros de rotação do **1Ac** e **3Ac** em nível DFT utilizando a função de base 6-31+G(d) e a obtenção do mínimo global de cada molécula com a função de base 6-311++g(d,p).



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos e Sistemas Computacionais

Os espectros de UV/VIS e as medidas cinéticas para acompanhar a reação de hidrólise dos compostos foram realizadas em um espectrofotômetro Cary 50 (Varian) acoplado a um banho termostático da Microquímica, modelo MQBTC99-20, e a um microcomputador contendo o sistema de aquisição e tratamento de dados Cary WinUV 3.00. Desde que em todas as medidas foram estudadas mudanças na região do UV, foram utilizadas cubetas de quartzo de capacidade 3,5 ml e 1,0 cm de caminho ótico.

As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro digital Hanna, calibrado à temperatura ambiente com soluções padrões pHs 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlo Erba), utilizando a compensação de temperatura, em cela acoplada a um banho termostático da Microquímica. As titulações espectroscópicas foram realizadas num fluorímetro Cary Eclipse (Varian) e no espectrofotômetro Cary 50. Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho da marca Büchi modelo B-540.

As medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas a 25,0 °C em um espectrômetro Mercury 400 MHz com transformada de Fourier.

Os espectros de Infravermelho (IV) foram realizados à temperatura ambiente de 25±2 °C em um espectrômetro Varian modelo Excalibur 3100 com transformada de Fourier equipado com um detector do tipo MCT acoplado a um microcomputador contendo um sistema de aquisição e tratamento de dados. As amostras foram preparadas utilizando KBr para infravermelho (marca Sigma).

Os espectros de massa dos ésteres naftóicos e dos produtos provenientes dos experimentos de incorporação isotópica foram realizados em um Cromatógrafo Líquido acoplado a um Espectrômetro de Massa da marca Shimadzu, modelo 2010 EV operando no modo ESI negativo, com temperatura da interface, CDL e bloco em 250, 250 e 200 °C, respectivamente. O detector foi mantido a 1.50 KV, o fluxo de N₂ em 1.5 L min⁻¹ e a fase móvel era constituída de H₂O/CH₃CN 1:9. Como o objetivo era determinar apenas a massa dos compostos, não foi utilizada a coluna de separação. A concentração das amostras era de aproximadamente 10⁻⁵ mol/l. No experimento de *trapping* com anilina foi utilizado um cromatógrafo gasoso marca

Shimadzu modelo QP-5050A equipado com uma coluna do tipo DB-5.

Na coleta de dados para a obtenção da estrutura cristalina foi utilizado um difratômetro automático de raios-X para monocristais ENRAF-NONIUS modelo CAD-4. Para a resolução e refinamento da estrutura cristalina foram empregados os programas SIR97⁸⁰ e SHELXL97⁸¹, respectivamente. A estrutura molecular foi construída usando o programa ORTEP3⁸².

As regressões não-lineares foram realizadas com o programa de computação ORIGIN versão 7.5 (OriginLab, 2003) utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt para encontrar o mínimo da soma dos quadrados.

3.2 Reagentes

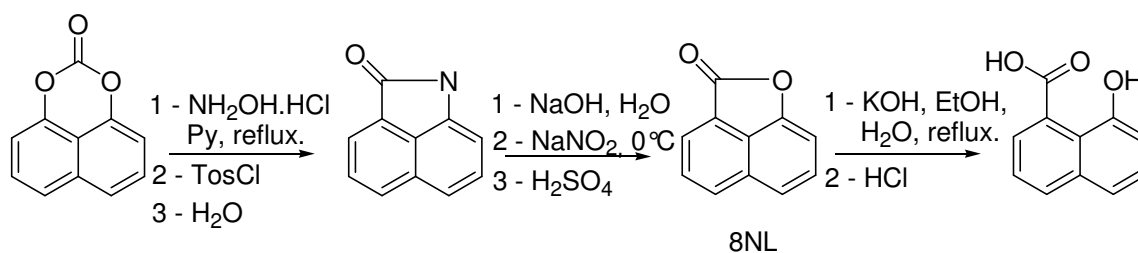
Os ácidos 1-hidróxi-2-naftóico, 2-hidróxi-1-naftóicos e 3-hidróxi-2-naftóico foram adquiridos da Aldrich e utilizados como recebidos (pureza 99%). O anidrido acético, piridina, benzeno, cloridrato de hidroxilamina, cloreto de tosila e demais solventes foram adquiridos comercialmente (Aldrich, Carlo Erba, Acros, Vetec e F.Maia) e tratados com técnicas adequadas⁸³ quando necessário.

Todos os experimentos para medidas cinéticas utilizaram água destilada como solvente e as titulações foram realizadas em água destilada e deionizada (condutividade < 17,3 $\mu\text{S cm}$) por um sistema de troca iônica Nanopure D-4700. A água deuterada (D_2O) e a água enriquecida com ^{18}O foram adquiridas da Cambridge Isotope, e o NaOD (40%) e o DCI (37%) foram adquiridos da Aldrich, sendo utilizados como recebidos.

3.2.1 Síntese do Ácido 8-Acetóxi-1-Naftóico - 8Ac

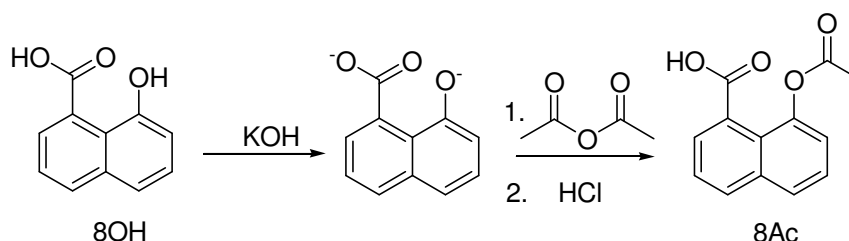
A síntese do ácido 8-acetóxi-1-naftóico foi realizada utilizando anidrido acético e ácido 8-hidróxi-1-naftóico (**8OH**) em meio alcalino. Como o **8OH** não é disponível comercialmente, primeiramente preparou-se, como descrito abaixo, a 1,8-naftolactona (**8NL**) que foi hidrolisada formando o ácido 8-hidróxi-naftóico, como descrito abaixo.

10,32 g de 1,8-naftolactona preparada segundo método da literatura⁸⁴ foram dissolvidos em 30 ml de etanol, adicionando-se em seguida 30 ml de uma solução KOH 25%. A reação foi mantida em refluxo durante 6 h (**Esquema 15**). Com a adição de HCl concentrado houve a formação de um sólido amarelo que foi caracterizado sem purificação extra. PF: 167,0-168,0°C (lit. 168,0-169,5°C). R. 91,5%. δ_{H} (400 MHz, Acetona d_6): 8,06 (1H, d, $J = 8,24$); 7,97 (1H, d, $J=7,24$); 7,55-7,48(2H, m); 7,43 (1H, t, $J = 7,76$), 7,02 (1H, d, $J = 7,42$). δ_{C} (100,6 MHz, Acetona d_6): 109,99; 112,64; 120,38; 124,86; 127,50; 128,45; 128,88; 132,85; 136,19; 153,46; 172,87 (**Apêndice A**).



Esquema 15

A síntese do ácido 8-acetóxi-1-naftóico (**8Ac**) foi realizada por adaptação do método de Chattaway⁸⁵, adicionando-se 2,1 eq de KOH para uma solução de 2,24 g do 8OH em 100 ml de água/gelo. Após a dissolução do material, foram adicionados rapidamente 1,25 eq de anidrido acético (**Esquema 17**). Após adição de HCl (pH 2) ocorreu a precipitação de um sólido marrom que foi então filtrado, dissolvido em acetonitrila e novamente filtrado para remover as impurezas. Dessa forma foram obtidos 1,31 g do **8Ac** (R. 45%), composto inédito. P.f.: 123-125°C. δ_{H} (400 MHz, Acetona d_6): 8,07 (1H, d, $J = 7,69$); 7,90 (1H, d, $J = 8,43$); 7,64 – 7,57 (3H,); 7,37 (1H, d, $J = 7,33$); 2,32 (3H, s). δ_{C} (100,6 MHz, Acetona d_6): 20,85; 110,60; 121,70; 123,75; 126,25; 126,64; 126,88; 126,99; 130,58; 135,89; 146,39; 169,26; 171,48. ν_{max} (KBr) 3060-2822 (deformação axial de OH, dímero), 1770 (deformação axial de C=O do éster aromático), 1685 (deformação axial de C=O do ácido, dímero), 1290 (deformação axial de C—O do ácido, dímero) e 1207cm^{-1} (deformação C(=O)—O de acetato). $m/z = 270$ (16%, M-H⁺ + CH₃CN), 229 (25%, M - H⁺), 187 (100%, M) (**Apêndice B e C**).



Esquema 17

3.2.2 Síntese do Ácido 2-Acetóxi-1-Naftóico - 2Ac

Procedeu-se de maneira análoga à síntese do ácido **8Ac** (Seção 3.2.1). A purificação foi realizada dissolvendo-se o material em etanol e adicionando-se água lentamente até o turvamento da solução, gerando um sólido branco amorfo, que

funde a 101,7-102,6°C. R. 60,0% δ_{H} (400 MHz, Acetona d_6): 8,16 (1H, d, $J = 8,39$); 8,07 (1H, d, $J = 8,78$); 8,03 (1H, d, $J = 8,05$); 7,91 (1H, d, $J = 8,60$); 7,70 (1H, t, $J = 7,43$); 7,65 (1H, t, $J = 7,51$), 2,46 (3H, s). δ_{C} (100,6 MHz, Acetona d_6): 20,42; 94,76; 119,48; 123,13; 125,70; 126,65; 127,45; 127,91; 128,06; 128,93; 136,76; 148,91; 165,39; 169,07. ν_{max} (KBr) 3068-7075 (deformação axial de OH, dímero), 1766 (deformação axial de C=O do éster com insaturação adjacente), 1684 (deformação axial de C=O do ácido, dímero), 1294 (deformação axial de C—O do ácido, dímero) e 1206 cm^{-1} (deformação C(=O)—O de acetato). $m/z = 270$ (14,50%, M - H⁺ + CH₃CN), 229 (25%, M - H⁺), 187 (100%, M). (**Apêndice D e E**).

3.2.3 Síntese do Ácido 3-Acetóxi-2-Naftóico - 3Ac

Procedeu-se de maneira análoga ao método de Bergeron *et al*⁸⁶. Uma gota de ácido sulfúrico concentrado foi adicionada à uma mistura em refluxo de 2,50g de ácido 3-hidróxi-2-naftóico e 2,38 ml de anidrido acético. Após 5 minutos, a mistura foi resfriada, o sólido formado foi filtrado e recristalizado em uma mistura de etanol/água, como descrito para síntese do **2Ac**, obtendo-se assim pequenos cristais amarelados e finos que fundem a 183-184 °C (lit⁸⁶ 184-185°C). R. 87,5%. δ_{H} (400 MHz, Acetona d_6): 8,69 (1H, s); 8,11 (1H, d, $J = 8,43$); 7,96 (1H, d, $J = 8,43$); 7,69 (1H, t, $J = 6,69$); 7,67 (1H, s); 7,61 (1H, t, $J = 7,49$), 2,30 (3H, s). δ_{C} (100,6 MHz, Acetona d_6): 21,03; 110,60; 121,76; 127,40; 127,95; 129,75; 129,86; 131,47; 134,30; 136,55; 148,18; 165,80; 170,20. ν_{max} (KBr) 3084-2800 (deformação axial de OH, dímero), 1764 (deformação axial de C=O do éster com insaturação adjacente), 1700 (deformação axial de C=O do ácido, dímero), 1294 (deformação axial de C—O do ácido, dímero) e 1207 cm^{-1} (deformação C(=O)—O de acetato). $m/z = 270$ (17,80%, M - H⁺ + CH₃CN), 229 (25%, M - H⁺), 187 (100%, M). (**Apêndice F e G**).

3.2.4 Síntese do Ácido 1-Acetóxi-2-Naftóico - 1Ac

A síntese do ácido 1-acetóxi-2-naftóico foi realizada seguindo o procedimento descrito para a preparação do **3Ac** (**Seção 3.2.3**). A purificação foi feita em etanol/água, gerando cristais opacos que foram filtrados e submetidos à difratometria de raios-X. P.f. 138-139°C. R. 75,5%. δ_{H} (400 MHz, Acetona d_6): 8,16 (1H, d, $J = 8,20$); 8,07 (1H, d, $J = 8,78$); 8,03 (1H, d, $J = 7,62$); 7,91 (1H, d, $J = 8,79$);

7,70 (1H, t, $J = 7,43$); 7,65 (1H, t, $J = 7,65$), 2,46 (3H, s). ν_{\max} (KBr) 3080-2600 (deformação axial de OH, dímero), 1766 (deformação axial de C=O do éster com insaturação adjacente), 1683 (deformação axial de C=O do ácido, dímero), 1296 (deformação axial de C—O do ácido, dímero) e 1207 cm^{-1} (deformação C(=O)—O de acetato). $m/z = 270$ (4,60%, $M - H^+ + CH_3CN$), 229 (32,5%, $M - H^+$), 187 (100%, M). (Apêndice H e I).

3.3 Medidas Cinéticas

As reações foram iniciadas pela adição de alíquotas de 20 μL da solução estoque dos substratos (0,01 M em acetonitrila e estocadas em freezer) em 3 ml da solução tampão no pH desejado, de modo que a concentração inicial dos substratos em solução foi igual a 66,6 μM . Na faixa de pH 2 a 11 foram utilizados tampões orgânicos e inorgânicos (ácido cloro-acético/cloro-acetato de potássio, ácido acético/acetato de potássio, hidrogenofosfato de potássio/fosfato de potássio, hidrogenocarbonato de potássio/carbonato de potássio). Abaixo e acima desses valores foram utilizadas soluções de HCl e KOH padronizados. A força iônica foi mantida em 1 em todas as medidas cinéticas com a adição de KCl. O pH foi verificado no final de cada corrida cinética.

Para obtenção dos parâmetros de ativação a pH 6 utilizou-se o tampão $\text{HPO}_4^-/\text{PO}_4^{2-}$ pois o mesmo possui pK_a próximo de 6 numa faixa ampla de temperatura⁸⁷.

O aparecimento dos produtos foi acompanhado em comprimentos de ondas específicos (veja abaixo) por no mínimo 5 $t_{1/2}$. A partir dos gráficos de absorbância em função do tempo e utilizando a **Equação 11** foi possível determinar o valor das constantes de velocidade.

$$A_t = A_o + (A_\infty - A_o)e^{-kt} \quad (11)$$

onde A_o , A_∞ e A_t representam absorbância inicial, final e no tempo t , respectivamente.

Para a medida do efeito isotópico do solvente a 45 °C o pH foi mantido em 6 utilizando a **Equação 12**⁸⁸.

$$pD = pH - 0,30 \quad (12)$$

3.3.1 Hidrólise do Ácido 1-Acetóxi-2-Naftóico

Na **Figura 6a** e **b** estão apresentados os espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do **1Ac** em pH 5,00 e pH 2,60, respectivamente. As constantes cinéticas foram obtidas em dois comprimentos de onda: 344 nm para reações acima de pH 3,40; 314 nm para reações abaixo desse pH. Pode-se

observar que os espectros sucessivos em pH 2,60 (**Figura 6b**) indicam que duas ou mais reações ocorrem consecutivamente e devido a isso os pontos isobstéticos não aparecem de forma clara.

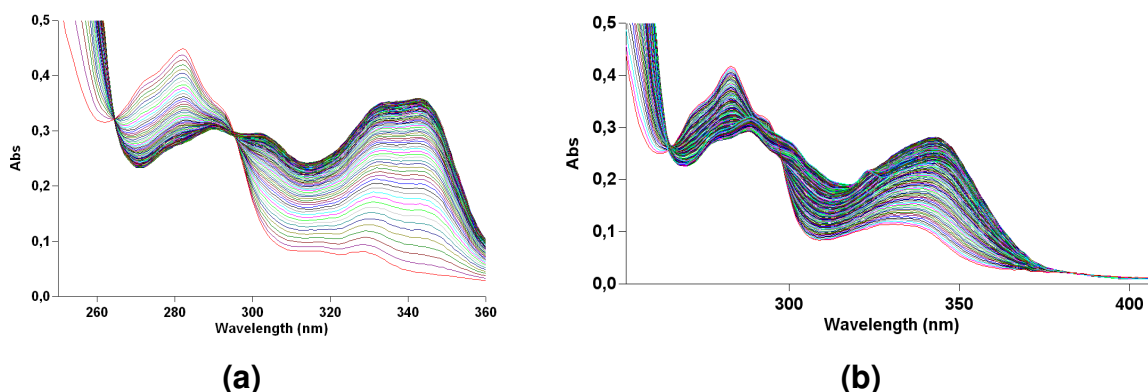


Figura 6 – Espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do **1Ac** a 45 °C, $\mu=1$, pH 5,00 **(a)** e 2,60 **(b)**.

Na faixa de pH acima de 3,40 o gráfico de absorvância vs tempo corresponde perfeitamente ao de uma reação de primeira-ordem (**Figura 7a**). Porém, abaixo de pH 3,40 a hidrólise do **1Ac** é seguida de uma reação de descarboxilação (**Esquema 18**) comum em ácidos carboxílicos. Na faixa ácida o produto reacional é instável, o que fica evidente no gráfico de absorvância vs tempo em 344 nm e a fim de se obter a constante de velocidade, deve-se acompanhar a reação em 321 nm, que corresponde ao ponto isobstético da reação de descarboxilação (**Figura 7b**).

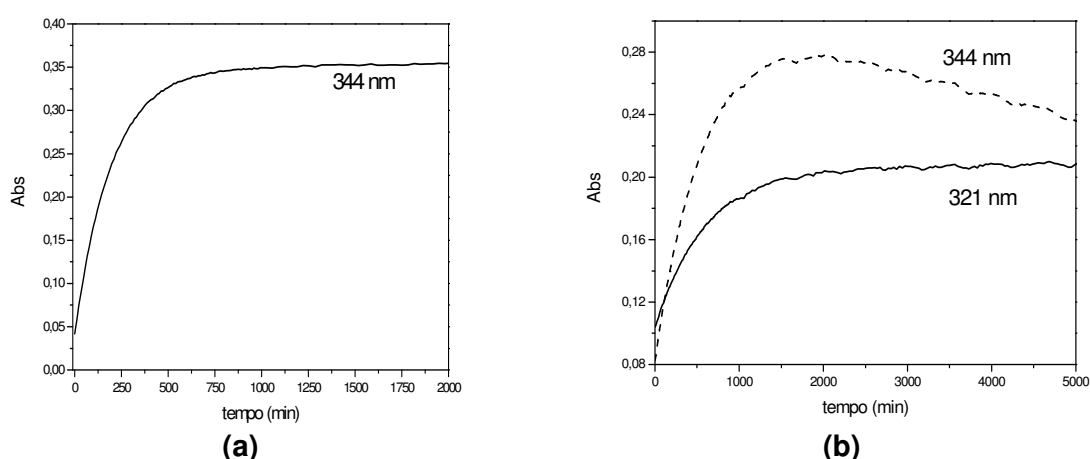
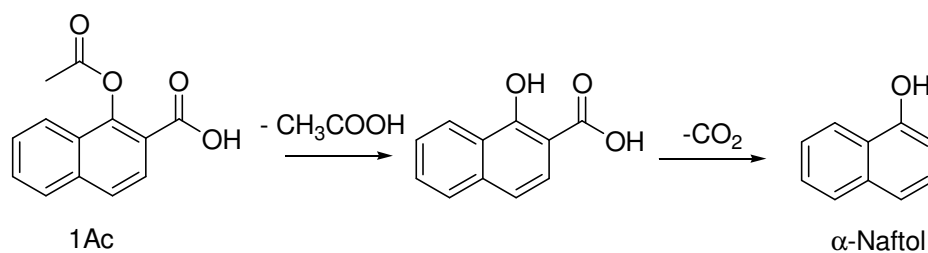


Figura 7 – Plote da absorvância vs tempo para a reação de hidrólise do **1Ac**, $\mu=1$ e 45 °C em pH 5,00 **(a)** e pH 2,60 **(b)**.



Esquema 18

O **Esquema 18** pôde ser deduzido pelo fato de que após 5000 minutos de reação a pH 2,60 e 45°C o espectro de UV-VIS observado apresenta uma banda em 322 nm, num espectro idêntico ao do α -naftol (**Figura 8**).

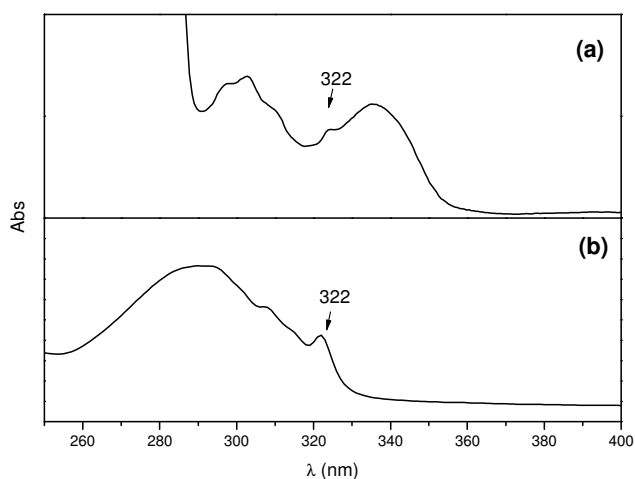


Figura 8 – Espectro de UV-VIS da (a) reação de hidrólise do **1Ac** a 45°C, $\mu=1$, pH 2,60 e $t=5000$ min e (b) α -Naftol em pH 2,00, 25°C.

3.3.2 Hidrólise do Ácido 2-Acetóxi-1-Naftóico

De forma semelhante ao **1Ac**, em pH ácido a reação de hidrólise do **2Ac** é seguida da liberação de CO_2 , dessa forma nos espectros sucessivos de UV-VIS os pontos isobésticos aparecem de forma clara apenas acima de pH 3 (**Figura 9a**) e a reação pode ser acompanhada em 333 nm. Na faixa abaixo desse pH o comprimento de onda mais adequado para seguir a reação é 328 nm, que corresponde ao ponto isobéstico da segunda reação (**Figura 9b**).

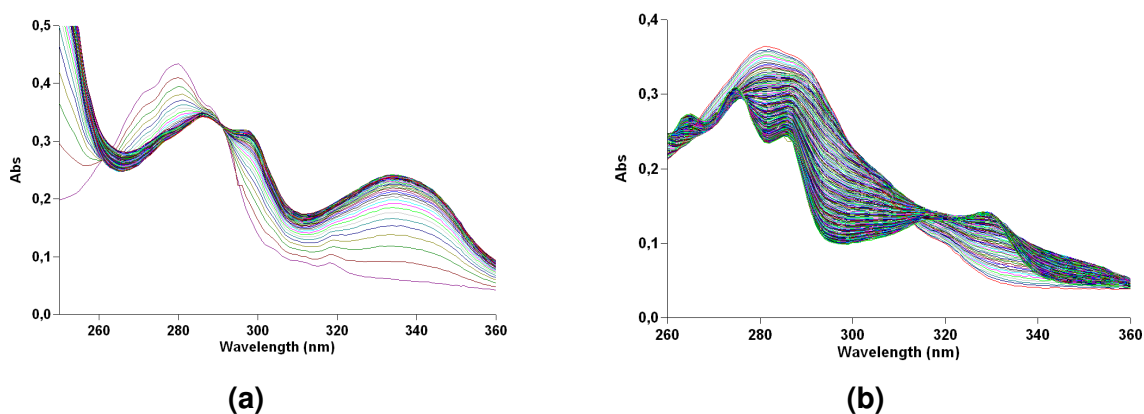


Figura 9 – Espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do **2Ac** a 45°C, $\mu=1$, pH 8,50 (a) e 0,50 (b).

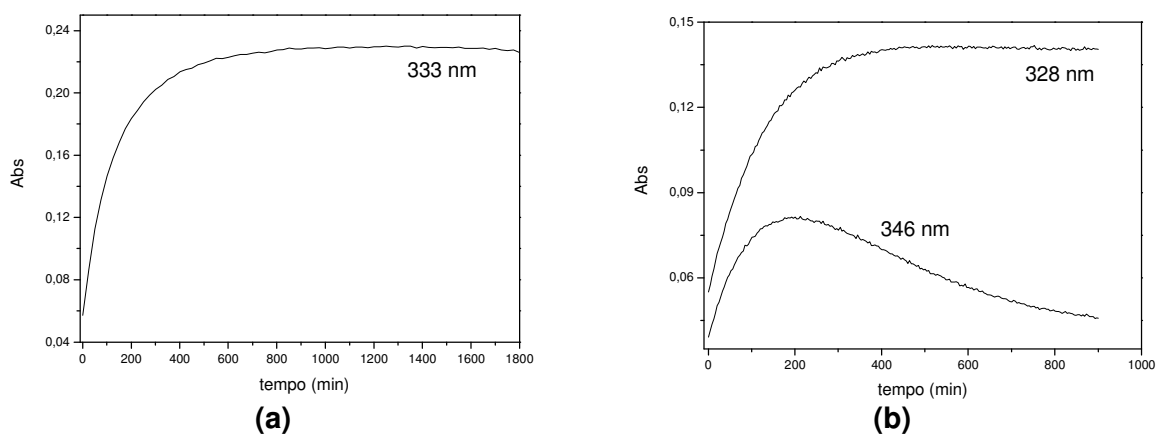


Figura 10 – Plote da absorbância vs tempo para a reação de hidrólise do **2Ac**, $\mu=1$ e 45°C em pH 8,50 (a) e pH 0,51 (b).

O espectro da reação após 900 min a 45°C e pH 0,50 corresponde ao do β -naftol, produto da descarboxilação do ácido 2-hidróxi-1-naftóico (**Figura 11**).

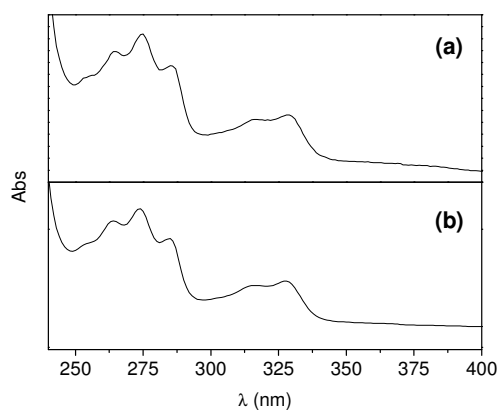


Figura 11 – (a) Espectros de UV-VIS da reação de hidrólise do **2Ac** em pH 0,50, 45°C após 900min; (b) espectro de UV-VIS do β -Naftol em pH 2,00.

3.3.3 Hidrólise do Ácido 3-Acetóxi-2-Naftóico

Nas reações de hidrólise do **3Ac** não foram observadas reações consecutivas. Na faixa de pH menor que 3,00 o aparecimento do produto foi acompanhado em 362nm (**Figura 12a**). Acima desse valor utilizou-se o comprimento de onda de 352nm (**Figura 12b**).

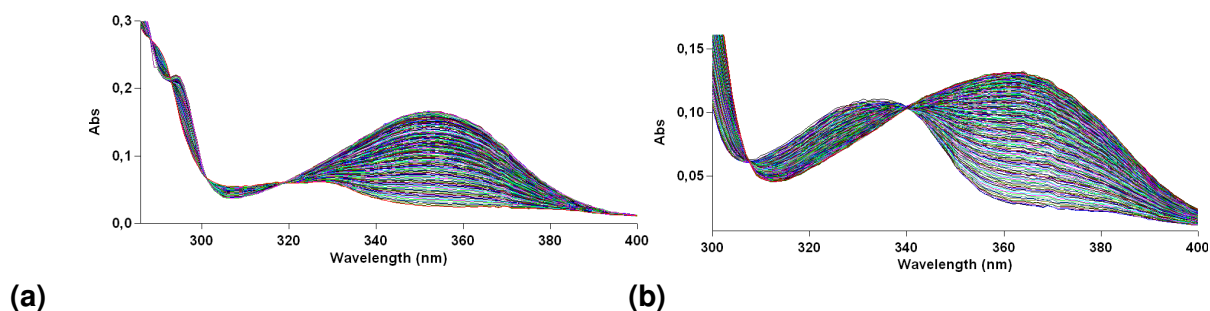


Figura 12 – Espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do **3Ac** a 45°C, $\mu=1$, pH 4,40 (a) e 0 (b).

3.3.4 Hidrólise do Ácido 8-Acetóxi-1-Naftóico

Os espectros sucessivos de UV-VIS da reação de hidrólise do **8Ac** apresentaram um comportamento semelhante ao do **1Ac** e **2Ac**, com a existência de duas reações consecutivas e ausência de pontos isobésticos claros em todas as faixas de pH (**Figura 13a e b**).

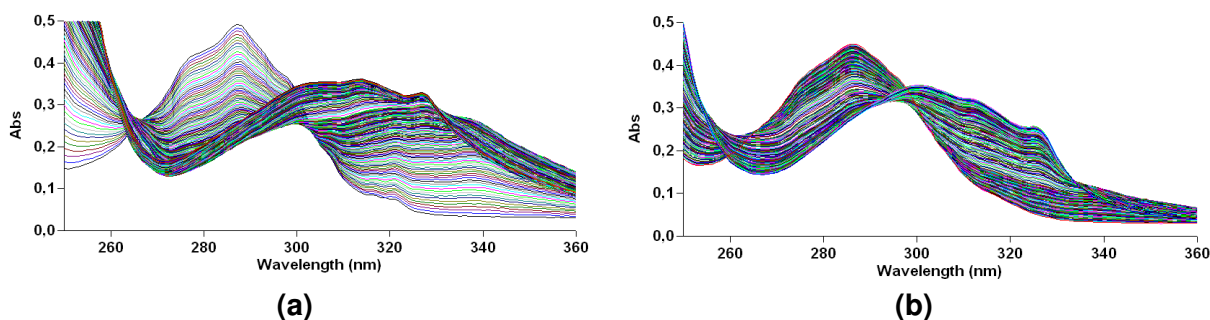
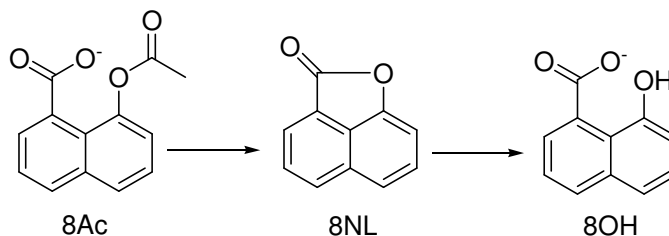


Figura 13 – Espectros sucessivos de UV-VIS para a reação de hidrólise do **8Ac** a 45°C, $\mu=1$, pH 6,30 (a) e 2,60 (b).

A primeira reação observada corresponde à formação da 1,8-Naftolactona (**8NL**) e a segunda sua hidrólise para formar o ácido 8-hidróxi-1-naftóico (**8OH**) (**Esquema 19**). O aparecimento do produto (**8NL**) pôde ser acompanhado seguindo

a reação nos pontos isobésticos da segunda reação. Dessa forma, em pH inferior a 2,60 a reação foi seguida em 330 nm (**Figura 14a**) e acima desse valor de pH as medidas foram realizadas em 326 nm (**Figura 14b**).



Esquema 19

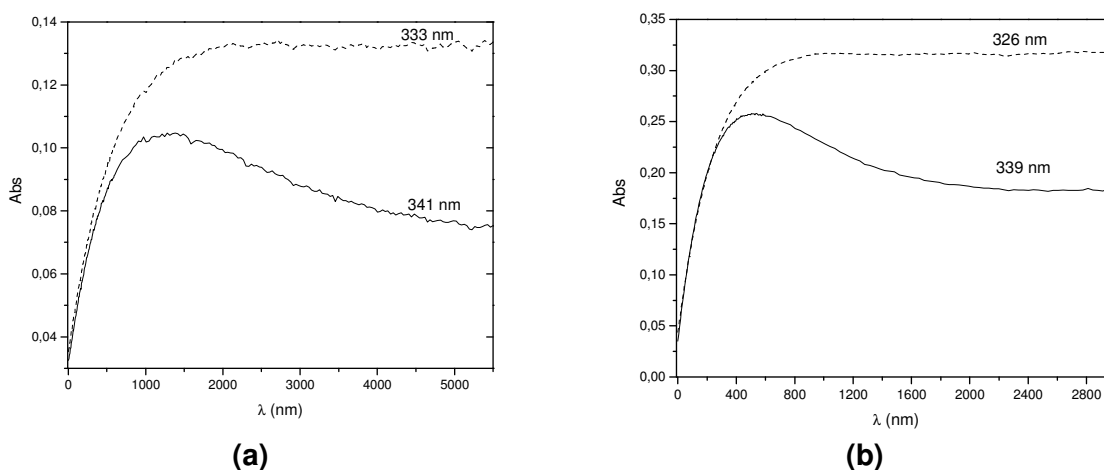


Figura 14 – Plote da absorvância vs tempo para a reação de hidrólise do **8Ac**, $\mu=1$ e 45 °C em pH 2,60 (**a**) e pH 6,30 (**b**).

A identificação da lactona pôde ser feita através de espectrometria de UV-VIS, ^1H RMN, IV (ν_{max} 1780, 1230 cm^{-1}) e cromatografia de camada delgada após 800 minutos de reação a pH 6,00, onde, segundo a **Figura 14b**, a concentração da **8NL** é máxima. Para a espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, IV e cromatografia em camada delgada procedeu-se da seguinte forma: tomou-se 20 mg do reagente (**8Ac**) em 5 ml de solução tamponada em pH 6,00 e 2 ml de THF; a reação foi aquecida a 45 °C por 13 horas e a seguir extraída com 2 porções de 10 ml acetato de etila. O solvente foi evaporado e o resíduo submetido às análises correspondentes. Na **Figura 15** está apresentado o espectro de ^1H RMN onde os valores de δ encontrados estão cerca de 0,10 ppm deslocados para um campo mais alto em relação aos reportados na literatura⁸⁴ (7,06; 7,46; 7,58; 7,70;

8,05; 8,07, CDCl_3) provavelmente devido ao fato de que em sistemas aromáticos a ocorrência de *pi stacking* pode deslocar os sinais em função da concentração da amostra⁸⁹.

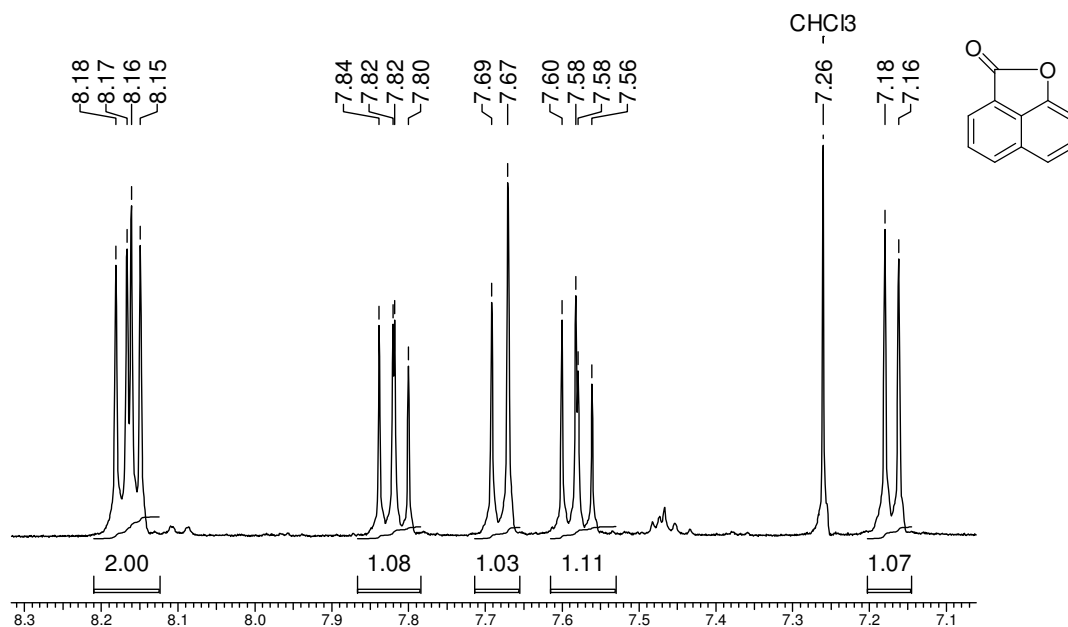


Figura 15 – Espectro de ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) da **8NL** obtida a partir da reação de hidrólise do **8Ac** após 13 hrs, pH 6,00 e 45°C.

3.4 Estudo de Incorporação de H₂O¹⁸

O procedimento realizado foi semelhante ao de Fersht e Kirby³⁷. Em uma ampola de vidro com capacidade para 1 ml foram dissolvidos 5 mg do éster e 82 mg de acetato de sódio em 0.6 ml de H₂O¹⁸ 20%, 0.1 ml de HCl 1M e 0.2 ml de THF. A ampola foi lacrada e incubada a 45°C por no mínimo 5 t_{1/2} utilizando o valor das constantes cinéticas a pH 4,80. Após esse período a solução foi diluída e submetida à análise de LCMS. Para o éster **2Ac**, o procedimento também foi realizado utilizando-se solução de HCl 0,05M (pH 1,30).

Como controle, o mesmo procedimento foi repetido utilizando os respectivos hidróxi ácidos utilizados na síntese dos ésteres naftóicos.

3.5 Titulações Espectrofotométricas

As determinações de absorvância para o **8OH** e intensidade de fluorescência para o **1OH**, **2OH** e **3OH** foram realizadas em função dos pHs de soluções 66,6 µM, sendo a temperatura mantida em 25°C, a força iônica em 1 com adição de KCl e o pH modificado com adição de pequenas alíquotas de HCl ou KOH na faixa de pH 2 a 12. Acima de pH 12 e abaixo de pH 2, foram preparadas soluções dos compostos em KOH ou HCl padronizado, respectivamente.

A determinação dos valores dos equilíbrios para a primeira e segunda dissociação foi realizada a partir do gráfico da absorvância ou intensidade de fluorescência vs pH ajustando-se a curva teórica obtida a partir da **Equação 13** (**Figura 16**).

$$P = A\chi_A + B\chi_B + C\chi_C \rightarrow P = A\left(\frac{[H^+]}{K_{a1} + [H^+]}\right) + B\left(\frac{K_1}{K_{a1} + [H^+]}\right) + C\left(\frac{K_{a2}}{K_{a2} + [H^+]}\right) \quad (13)$$

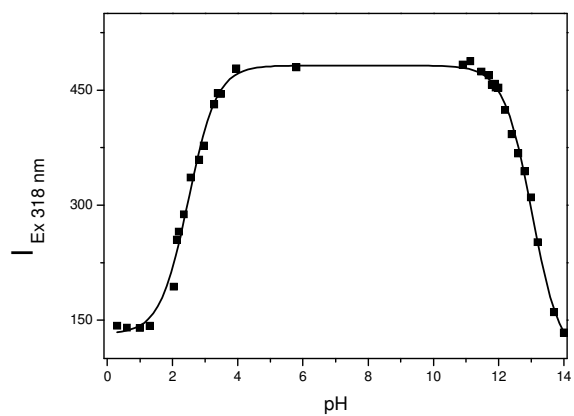
onde,

P: propriedade observada;

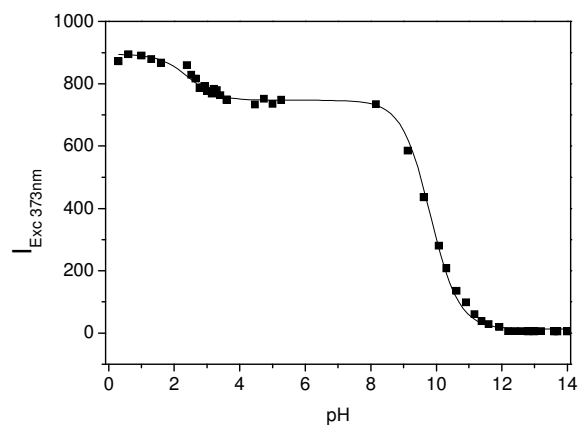
χ_i : fração molar da espécie "i"

A, B, C: constantes;

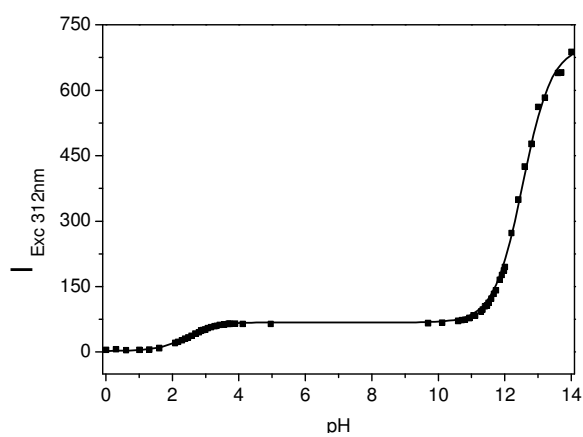
K_{a1} e K_{a2} : constantes de dissociação ácida considerando o equilíbrio a seguir;



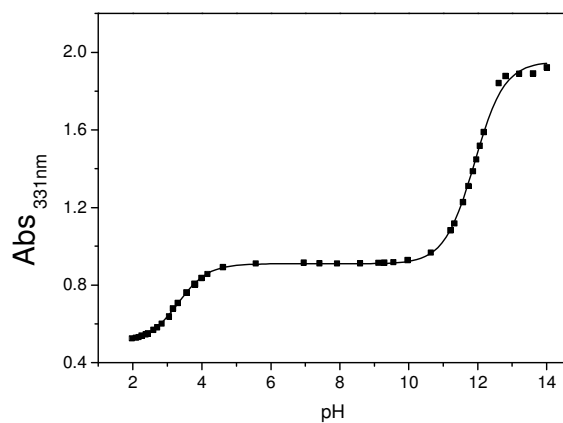
(a)



(b)

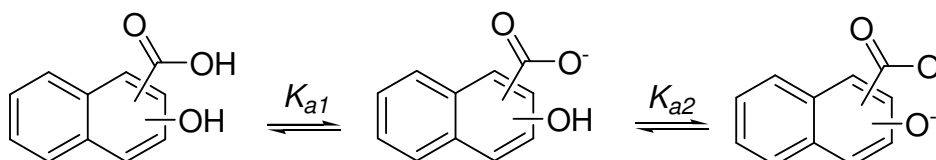


(c)



(d)

Figura 16 – Curvas de titulação fluorimétricas do (a) 1OH, (b) 2OH, (c) 3OH e espectrofotométrica do 8OH (d).



3.6 Cristalografia de Raios-X

A estrutura cristalina do **1Ac** foi obtida a temperatura ambiente (293 K), utilizando-se a radiação K_{α} do Mo ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) obtida através de um monocromador de grafite. Os átomos de H ligados aos carbonos foram adicionados segundo as suas posições calculadas, com distância C-H de $0,96 \text{ \AA}$ (CH_3) ou $0,93 \text{ \AA}$ (CH_{Ar}) e $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2U_{\text{eq}}(\text{C})$ ou $1,5 U_{\text{eq}}(\text{C})$ para grupo metila. O átomo de H do grupo ácido foi localizado pelo mapa de Fourier e tratado com $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2U_{\text{eq}}(\text{O})$.

Os parâmetros da cela unitária foram determinados por 25 medidas com reflexões centradas na região de $5,4$ a $16,9^\circ$ e refinadas pelo método de mínimo-quadrados. A técnica de varredura ω - 2θ foi utilizada na coleta de 2667 reflexões, que foram contidas em $1/8$ da esfera de Ewald. O controle da intensidade foi realizado utilizando três reflexões padrões, as quais foram medidas a intervalos regulares, possibilitando assegurar que não houve perda significativa de intensidade durante a coleta dos dados. As intensidades coletadas foram corrigidas para efeitos de polarização e Lorentz.⁹⁰ A estrutura foi resolvida por métodos diretos⁸⁰ e foi refinada pelo método de mínimo-quadrados.⁸¹ Outras informações relevantes foram dadas na seção de equipamentos ou estão na **Tabela 2**. As tabelas de coordenadas atômicas fracionais e de parâmetros de deslocamento isotrópico ou equivalente, parâmetros de deslocamento atômicos, parâmetros geométricos e de geometria de ligação de hidrogênio podem ser encontradas na ref.⁹¹ recentemente publicada.

Tabela 2 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento para a estrutura do 1Ac.

Fórmula empírica	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_4$
Peso molecular	230,21
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	$0,71073 \text{ \AA}$
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
Dimensões da cela unitária	$a = 7,569(1) \text{ \AA}$; $b = 8,498(1) \text{ \AA}$; $c = 8,892(1) \text{ \AA}$
Volume	$560,27(12) \text{ \AA}^3$
Z, Densidade calculada	2, $1,365 \text{ g/cm}^3$
Coefficiente de absorção	$0,275 \text{ mm}^{-1}$
F(000)	240,0
Tamanho do cristal	$0,50 \times 0,23 \times 0,13 \text{ mm}^3$
Intervalo de θ	$5,4 - 16,9^\circ$
Intervalo dos índices h, k, l	$-9 \leq h \leq 9$; $-9 \leq k \leq 10$; $-10 \leq l \leq 0$
Reflexões coletadas/únicas	2124/1987 ($R_{\text{int}} = 0,0291$)

Correção de absorção	Nenhum
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz completa em F^2
Reflexões com $I > 2\sigma(I)$	1516
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$	0,038
$wR(F^2)$	0,116

3.7 Metodologias Computacionais

Os cálculos teóricos foram realizados com o programa Gaussian 03 (G03) implementado para sistemas Linux.⁹² Para construção da superfície de energia potencial (SEP) os critérios de convergência foram definidos para “opt=loose” (força para um RMS de 0,0017 u.a. e deslocamento máximo de 0,01 u.a.). Para a obtenção dos mínimos globais foi utilizado o critério de otimização normal (força para um RMS de 0,00030 u.a. e deslocamento máximo de 0,0018 u.a.) e após a otimização em fase gasosa a estrutura foi re-otimizada utilizando o método de solvatação (água) do continuum polarizado (PCM)⁹³ com as opções padrões do programa.

Para obtenção do mínimo global e construção da SEP foi utilizado o funcional de densidade híbrido B3LYP utilizando a função de base 6-31G, adicionando uma função difusa e uma função de polarização aos átomos de C e O (6-31+G(d) (5D)). Ainda em relação à obtenção da SEP, foi utilizada a opção *modred*. Dessa forma pode-se variar constantemente a geometria de entrada da molécula, definindo o número de vezes que determinado incremento será feito a um parâmetro estrutural.

No presente trabalho foram variados simultaneamente dois ângulos diedros da estrutura molecular, com incrementos de 7 a 12°, obtendo-se assim aproximadamente 600 rotâmeros por composto. Abaixo está um exemplo de *input* (arquivo de entrada para cálculo) para obtenção da SEP (**Figura 17**). As duas últimas linhas requisitam que os diedros formados entre os átomos 8, 7, 11, 13 e 8, 14, 15, 17 sofram 10 e 12 rotações de 5 e 10°, respectivamente, no sentido positivo. Maiores informações em relação à opção utilizada encontram-se no manual do programa, disponível no endereço www.gaussian.com.

```
#p b3lyp/6-31+G* opt=(loose,modred)
```

```
2Ac - Scan
```

```
-1 1  
C 3.605979 1.119592 0.435311  
C 2.258059 1.320842 0.221573  
C 1.382871 0.227157 -0.043500  
C 1.947401 -1.093858 -0.103233  
C 3.343124 -1.264715 0.120126  
C 4.158089 -0.185855 0.387638  
C -0.026849 0.417913 -0.234366  
C -0.787895 -0.706538 -0.490614  
C -0.248699 -2.005874 -0.585469  
C 1.100634 -2.198837 -0.389172  
C -0.691730 1.815222 -0.151794  
O -1.649454 1.899458 0.659587  
O -0.196870 2.693820 -0.899239  
O -2.158801 -0.532905 -0.737417  
C -3.022138 -0.657264 0.316481  
C -4.284484 0.116139 0.045433  
O -2.791628 -1.315983 1.306296  
H 4.253669 1.970771 0.636249  
H 1.833393 2.318848 0.225130  
H 3.756735 -2.271730 0.076801  
H 5.223124 -0.332948 0.558365  
H -0.915078 -2.836811 -0.799627  
H 1.530220 -3.197557 -0.444902  
H -5.073139 -0.196711 0.733549  
H -4.035813 1.172576 0.204551  
H -4.605274 -0.005102 -0.994423
```

```
8 7 11 13 S 10 5.0  
8 14 15 17 S 12 10.0
```

Figura 17 – *Input* do 2Ac para o programa G03 com a opção *modred*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os casos estamos interessados na reação de hidrólise dos ésteres dos ácidos acetoxi naftóicos e, primeiramente serão discutidos os resultados cinéticos para então dar prosseguimento aos estudos de marcação isotópica, titulações espectrofotométricas, análise cristalográfica e finalmente cálculos teóricos.

4.1 Reação de Hidrólise dos Ésteres Carboxi-Naftóicos

Na **Figura 18** estão apresentados os resultados cinéticos da reação de hidrólise dos compostos **1Ac**, **2Ac**, **3Ac** e **8Ac** a 45°C e $\mu=1$. Em todos os casos pôde-se observar efeitos catalíticos correspondentes à catálise ácida específica e à promoção básica específica. Na região entre pH 2 e pH 8, o éster **2Ac** é o único em que a forma protonada do éster é a mais reativa. Para o restante dos compostos, o aumento da velocidade a partir de pH próximo de 2,00 indica que o grupo carboxilato atua como catalisador da reação, apesar da forma protonada do éster apresentar a carbonila mais ativada por efeitos eletrônicos.

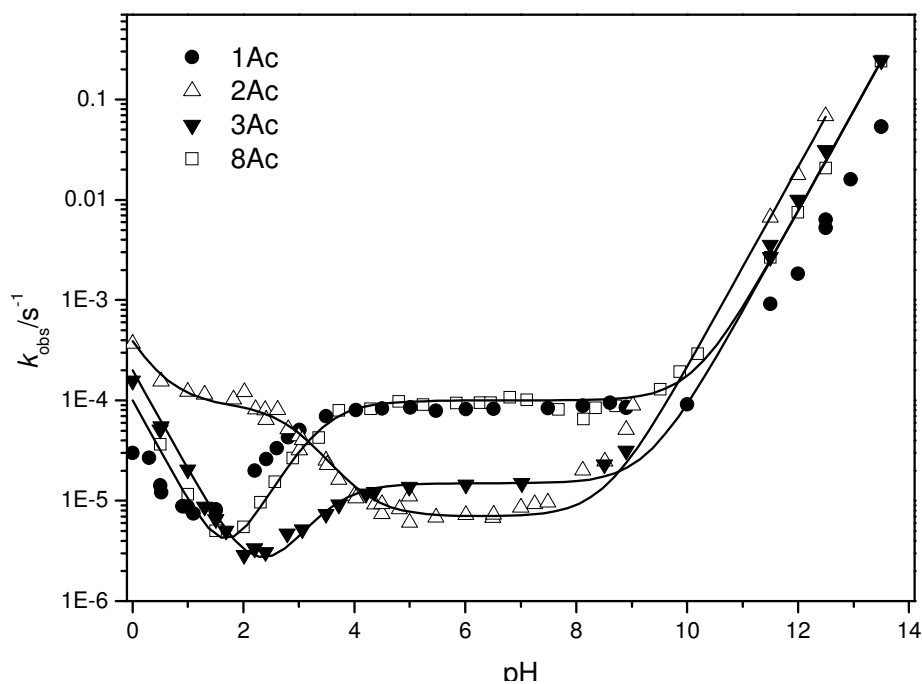
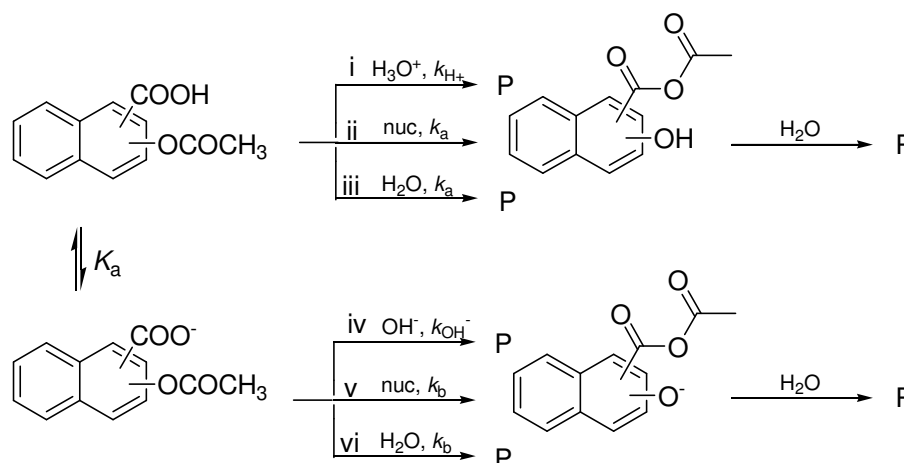


Figura 18 – Gráfico da constante de velocidade observada para a hidrólise dos ésteres **1Ac**, **2Ac**, **3Ac** e **8Ac** em função do pH, 45°C e $\mu=1$. As linhas teóricas foram traçadas utilizando a **Eq. 4**.

A partir dos resultados cinéticos, o seguinte esquema reacional pode ser proposto, onde o grupo COO^- pode atuar como catalisador básico geral ou catalisador nucleofílico e o grupo COOH pode atuar como catalisador ácido geral ou catalisador nucleofílico (**Esquema 20**). No presente trabalho a discussão será centrada na região de hidrólise espontânea da forma aniônica, isto é, nos valores de k_b .



Esquema 20

Para o cálculo das constantes k_b , k_a , k_{H^+} e k_{OH^-} foi utilizada a **Equação 14**, derivada do esquema reacional acima.

$$k_{obs} = k_{H^+} [H^+] + k_{OH^-} [OH^-] + k_B \chi_B + k_A \chi_A \quad (14)$$

onde,

k_{H^+} : constante para a catálise ácido específica, caminho **i** (**Esquema 20**);

k_{OH^-} : constante para a catálise básico específica, caminho **iv**;

k_a : constante para a catálise ácido geral ou nucleofílica, para o ataque do COOH , caminhos **ii** ou **iii**;

k_b : constante para a catálise básico geral ou nucleofílica para o ataque do COO^- ; caminhos **v** ou **vi**;

χ_A e χ_B : fração molar da espécie neutra ou aniônica do éster, respectivamente.

Na **Tabela 3** estão as constantes calculadas bem como as constantes de dissociação do grupo ácido dos ésteres naftóicos. Os valores de pK_a encontrados foram obtidos utilizando a **Eq. 14** através do ajuste não linear dos dados.

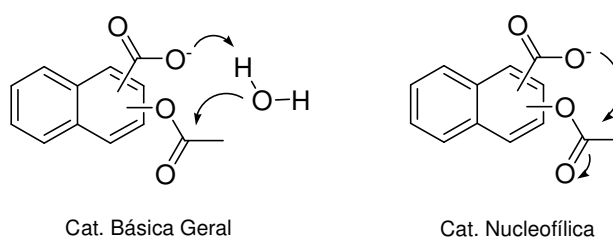
Tabela 3 – Constantes cinéticas para a hidrólise dos ésteres naftóicos a 45 °C e $\mu=1$ (KCl) calculadas a partir da Eq. 4 (valores encontrados apresentaram um erro menor do que 5%).

Éster	$\text{pK}_a^{\text{COOH}}$	k_a/s^{-1}	k_b/s^{-1}	$k_{\text{OH}^-}/\text{l.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$	$k_{+\text{H}}/\text{l.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$
1Ac	2,82	-	8×10^{-5}	0.17	4×10^{-5}
2Ac	2,96	9×10^{-5}	7×10^{-6}	2.12	3×10^{-4}
3Ac	3,54	-	2×10^{-5}	0.77	2×10^{-4}
8Ac	3,36	-	10^{-4}	0.76	10^{-4}

Exceto para o **2Ac**, os valores de k_{OH^-} são inferiores ao do acetato de fenila ($k_{\text{OH}^-} = 1,26 \text{ l.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$) indicando que a carbonila do éster está menos ativada, provavelmente devido ao efeito eletrônico do grupo COO^- vizinho.⁹⁴ Porém, para todos os compostos estudados, as constantes de velocidade da reação em pH próximo à neutralidade são superiores ao valor para a hidrólise do acetato de fenila. No caso do **2Ac**, composto que apresenta o menor valor de k_b , a reação é em torno de 44 vezes mais rápida do que no caso do acetato de fenila⁵⁵ e para o **1Ac** a reação é cerca de 430 vezes mais rápida. Fica evidente que o grupo COO^- desempenha um papel fundamental para a catálise na reação de hidrólise dos ésteres naftóicos.

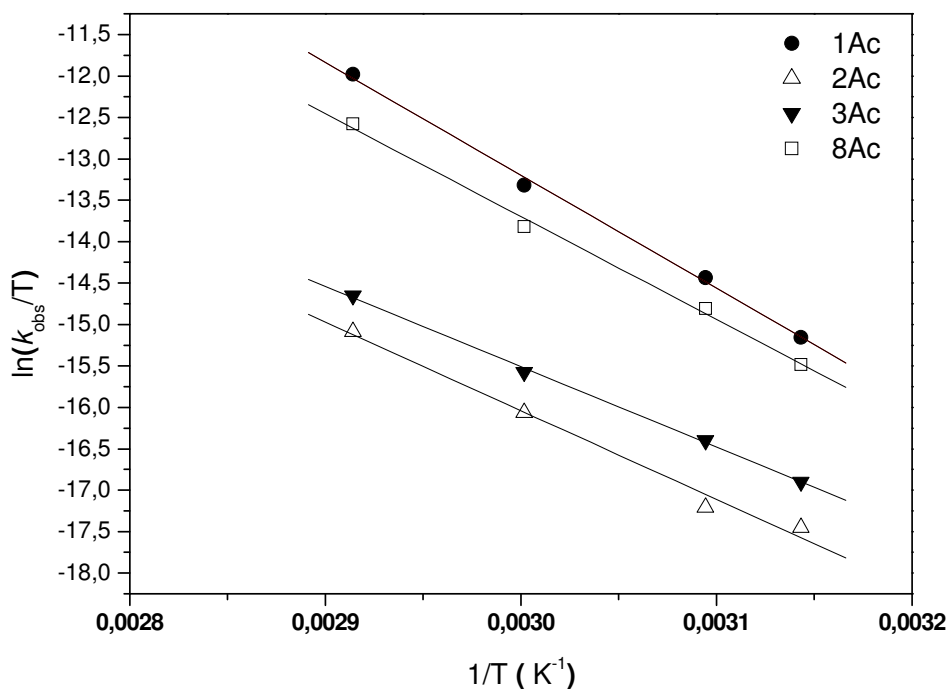
No caso do éster **2Ac**, a forma ácida é quase 13 vezes mais reativa que a forma básica. Esses resultados indicam que existem grandes diferenças no mecanismo de hidrólise desses ésteres, e a origem dessas diferenças podem ser provenientes de efeitos eletrônicos ou de conformação.

Como proposto no **Esquema 20**, nos sistemas estudados o grupo COO^- pode atuar de duas maneiras distintas, ativando uma molécula de água no estado de transição ou ainda atuando como um catalisador nucleofílico (**Esquema 21**). Esses mecanismos são cineticamente indistinguíveis, porém devem possuir entropias de ativação (ΔS^\ddagger) e valores distintos de efeito isotópico do solvente ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$).



Esquema 21

Dessa forma, foram determinadas as constantes de velocidade para reação de hidrólise na região do patamar (pH 6,00) em diferentes temperaturas (**Figura 19**). Os parâmetros de ativação foram calculados utilizando-se a equação de Eyring e encontram-se na **Tabela 4** juntamente com os valores de efeito isotópico do solvente.



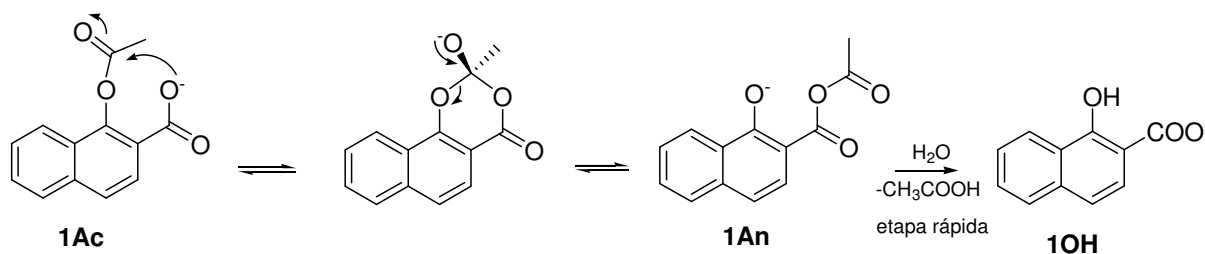
$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = -\left(\frac{\Delta H^{\ddagger}}{R}\right)\frac{1}{T} + \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right)$$

Figura 19 – Gráfico de $\ln(k_{obs}/T)$ vs T^{-1} para a reação de hidrólise dos ésteres 1Ac, 2Ac, 3Ac e 8Ac em pH 6,00, $\mu=1$ (KCl) e tampão fosfato 0,01mol/l. Abaixo da figura está a equação de Eyring utilizada para calcular os parâmetros de ativação.

Tabela 4 – Parâmetros de ativação e efeito isotópico do solvente (55 °C) para a reação de hidrólise dos ésteres naftóicos, pH 6,00 e $\mu=1$ (KCl).

Éster	ΔH^\ddagger , kJ/mol	ΔS^\ddagger , J/mol.K	ΔG^\ddagger , kJ/mol (25 °C)	k_{H_2O}/k_{D_2O}
1Ac	112,36 ± 3,89	29,89 ± 11,79	103,45 ± 7,40	1,16
2Ac	83,31 ± 3,93	-81,14 ± 11,95	107,50 ± 7,49	2,31
3Ac	80,05 ± 1,75	-86,27 ± 5,39	105,77 ± 3,36	2,42
8Ac	103,12 ± 3,88	-1,80 ± 13,38	103,66 ± 7,88	1,16

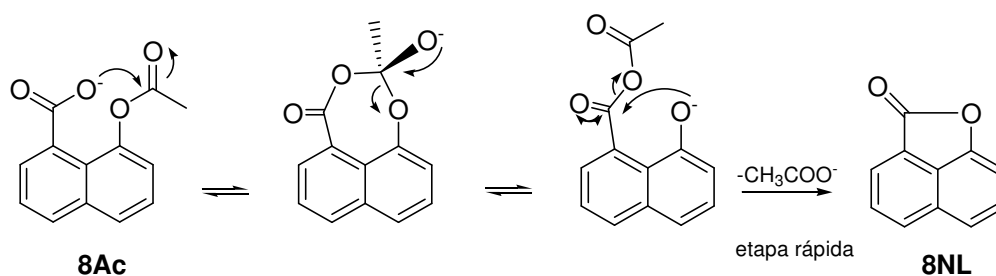
Os valores de entropia de ativação obtidos indicam que nos sistemas estudados, os compostos **1Ac** e **8Ac** podem ser caracterizados com entropias de ativação baixas em relação ao **2Ac** e **3Ac**, indicando que provavelmente nessas reações o solvente não participa diretamente e o efeito da solvatação é o mesmo no estado reagente e estado de transição. Além disso, os valores encontrados sugerem uma reação do tipo unimolecular, onde o grupo COO^- atua como nucleófilo (**Esquema 22**). No caso do **1Ac** e **8Ac** a etapa lenta pode ser tanto a formação quanto a decomposição do intermediário tetraédrico, porém essa distinção só pode ser feita utilizando ferramentas do tipo relações lineares de energia livre, o que está além do escopo do presente trabalho. Além disso, a existência de tal intermediário ainda é motivo de muita discussão e o mecanismo pode ainda seguir o mecanismo do tipo concertado. Alguns resultados de nosso laboratório indicam que na reação de hidrólise da aspirina catalisada por α -nucleófilos o estado de transição é do tipo concertado, com ligação do nucleófilo simultânea à quebra da ligação carbonila-oxigênio.



Esquema 22

O mecanismo de ataque nucleofílico intramolecular para os ésteres **1Ac** e **8Ac** está de acordo com o efeito isotópico observado. O valor de 1,16 indica ausência de transferência de prótons no estado de transição. Além disso, como discutido no item 3.3.4, a hidrólise do **8Ac** leva à formação da **8NF**, confirmando a

proposta de catálise nucleofílica. A partir dos resultados obtidos, o mecanismo de hidrólise do **8Ac** está apresentado no esquema abaixo.



Esquema 23

A proposta de que a hidrólise do anidrido **1An** formado a partir do **1Ac** (**Esquema 22**) é a etapa rápida poderia ser comprovada pela adição de anilina que reage com o anidrido misto e forma acetanilida, sem alterar significativamente a velocidade da reação em pH 6,00 (**Figura 20**). Já a adição de anilina na reação de hidrólise do anidrido acético acelera a reação significativamente, com um valor de k_{An} (coeficiente angular de k_{obs} vs [anilina]) de $18,1 \text{ l.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$.⁹⁵ No caso do **1Ac** esse valor é de $2,8 \times 10^{-4} \text{ l.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$, muito próximo do valor de $1,5 \times 10^{-4} \text{ l.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para a reação da piperidina com aspirina.⁹⁶ Logo o valor encontrado refere-se à aceleração devido à catálise básica geral na hidrólise do **1Ac** e não da catálise nucleofílica sobre o **1An** (**Esquema 24**).

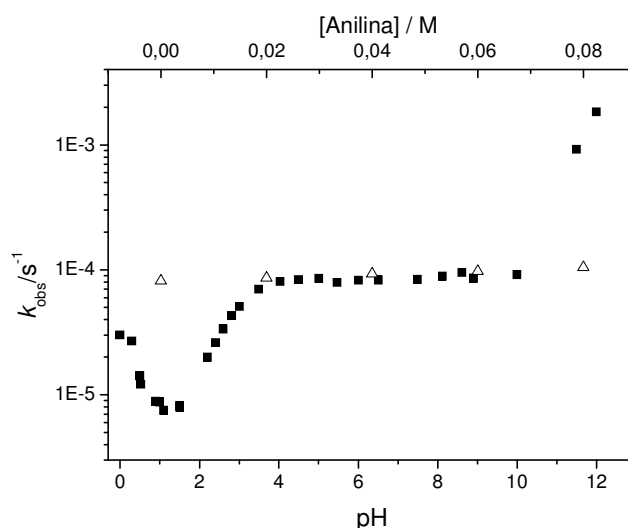
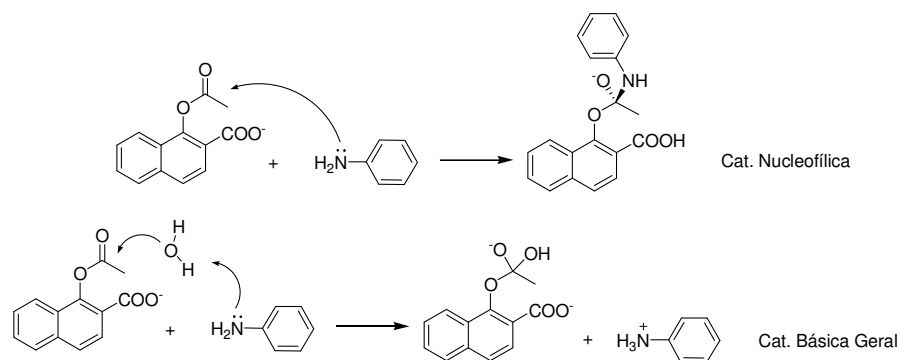


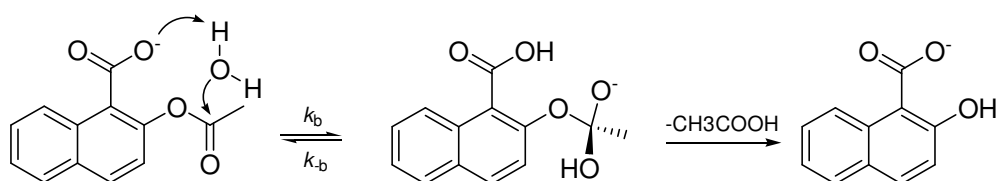
Figura 20 – Plote de k_{obs} para reação de hidrólise do **1Ac** vs pH da solução (■) e vs a concentração da anilina em pH 6,00 (△). Resultados a 45 °C e $\mu=1$.



Esquema 24

Como prova de que a anilina reage com o anidrido **1An** formado, a reação foi repetida em escala semi-preparativa (10 mg do **1An**) em água e na presença de 0,02 mol/l de anilina a pH 6,00 (tampão fosfato). Após a completa hidrólise do **1Ac** os produtos foram extraídos e analisados por GC-MS. Como produtos foram encontrados, entre outros, a acetanilida que é proveniente do ataque nucleofílico da anilina sobre o anidrido **1An**. No **Apêndice J** estão apresentados os espectros de massas da acetanilida proveniente da reação (tempo de retenção 14,9 a 15,7 min) e da acetanilida padrão (mesmo tempo de retenção).

Os valores de entropia de ativação calculados para a reação de hidrólise dos ésteres **2Ac** e **3Ac** correspondem a uma reação onde no estado de transição há uma maior organização em relação ao estado reagente, provavelmente refletindo o envolvimento de solvente. Os valores de ΔS^\ddagger e ΔH^\ddagger na Tabela 4 para a hidrólise dos ésteres **2Ac** e **3Ac**, são muito similares daqueles descritos para a reação de hidrólise da aspirina³⁷ os quais são de -94,05 J/mol.K e 76,75 kJ/mol. Além disso, o valor do efeito isotópico do solvente em torno de 2,3-2,4 é típico de reações que acontecem via catálise básica geral na etapa limitante da velocidade da reação (**Esquema 25**). De fato, no caso da aspirina, o valor encontrado foi de 2,2.³⁷

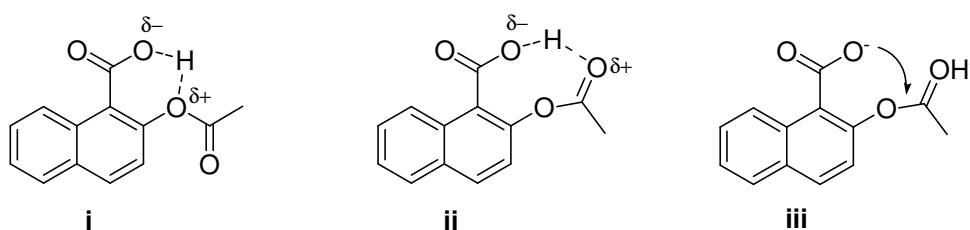


Esquema 25

Apesar da interpretação das entalpias de ativação não ser algo simples e direto, pode-se dizer que os valores encontrados refletem interações não-ligantes⁹⁷.

Como será visto mais adiante, os sistemas **1Ac** e **8Ac** são mais rígidos devido a peculiaridades estruturais. Dessa forma, a orientação necessária para atingir o estado de transição demanda uma maior energia em relação aos ésteres **2Ac** e **3Ac**, porém esse desfavorecimento entálpico é compensado pela pequena perda entrópica.

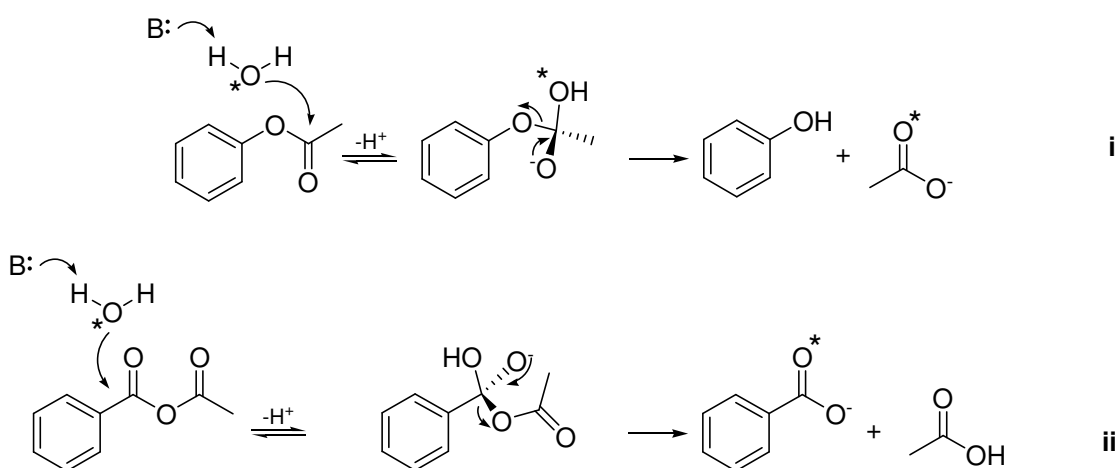
Ainda no caso do **2Ac**, o grupo COOH possui papel importante em regiões ácidas, atuando como um catalisador ácido geral ou ainda nucleofílico. O mecanismo nesse caso não foi completamente estudado no presente trabalho, porém três propostas podem ser sugeridas: estabilização do grupo de partida (**i**); ativação da carbonila (**ii**); catálise ácido geral seguida de ataque nucleofílico (**iii**) (**Esquema 26**). Os experimentos de marcação isotópica excluem a possibilidade de ataque nucleofílico (Seção 4.2) deixando em aberto os mecanismos **i** e **ii**.



Esquema 26

4.2 Estudo de Marcação Isotópica

De acordo com o discutido anteriormente, as moléculas de água do solvente desempenham papéis diferentes em cada um dos sistemas estudados. Para confirmar os mecanismos propostos, foram realizados experimentos em soluções aquosas contendo aproximadamente 20% (m:m) de H_2O^{18} . A incorporação de oxigênio marcado indica a formação de algum anidrido durante o curso reacional. No esquema está ilustrado o caso da hidrólise do acetato de fenila e do anidrido fenil acético. No primeiro caso (i), o produto de hidrólise não apresentaria incorporação de ^{18}O , já a hidrólise do anidrido pode levar à incorporação (ii) (**Esquema 27**).



Esquema 27

Na **Figura 21** está apresentado o espectro de massas do produto de hidrólise do **1Ac** após aproximadamente $5t_{1/2}$, pH 4,80 e 45°C . Em água normal, o pico de massa 189 apresenta-se com abundância de 1,8%. Já a reação na presença de O^{18} eleva a abundância desse fragmento para 22,4%. Dessa forma a incorporação de O^{18} confirma a formação do anidrido derivado do **1Ac** (**Esquema 22**).

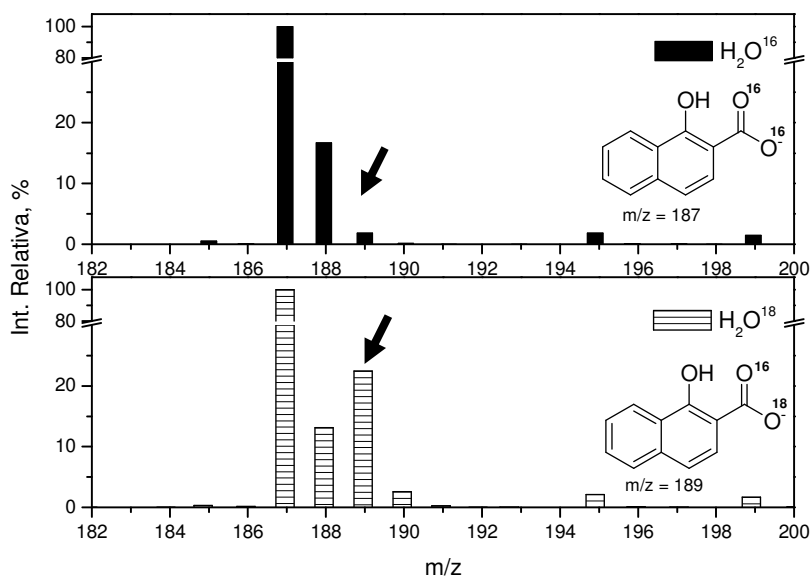


Figura 21 – Espectro de massas do produto de hidrólise do 1Ac após $5t_{1/2}$, pH 4,80 e 45°C . Barras pretas correspondem à reação em água normal. Barras hachuradas correspondem à reação em água marcada.

Na **Figura 22** está o espectro de massas do produto de hidrólise do **3Ac**, nas mesmas condições da **Figura 19**. A abundância do pico de massa 189 é praticamente a mesma em água normal ou marcada. Dessa forma fica praticamente excluída a participação do grupo carboxilato como nucleófilo na reação de hidrólise do **3Ac**. Devido às semelhanças nos parâmetros de ativação e efeito isotópico do solvente, a mesma afirmação é válida para o éster **2Ac**.

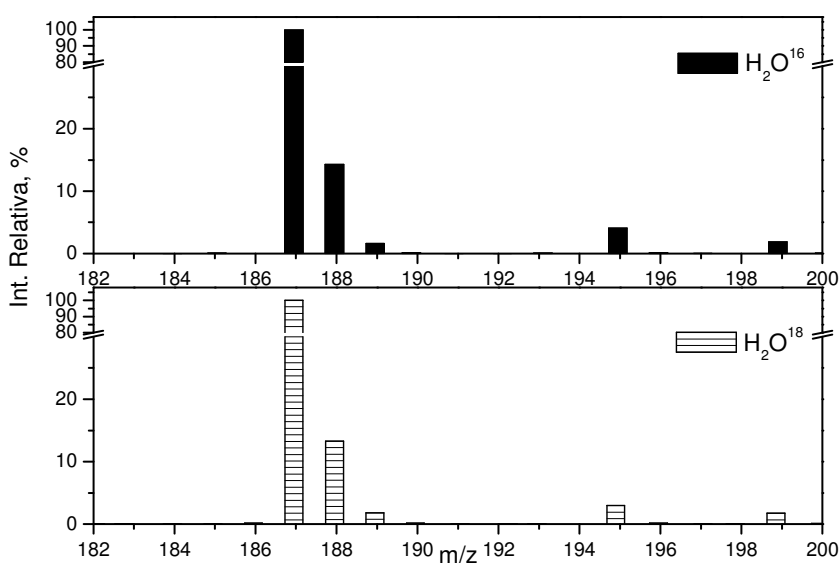


Figura 22 - Espectro de massas do produto de hidrólise do 3Ac após $5t_{1/2}$, pH 4,80 e 45°C . Barras pretas correspondem à reação em água normal. Barras hachuradas correspondem à reação em água marcada.

4.3 Titulações Espectroscópicas

Como discutido na introdução do trabalho, o efeito eletrônico do grupo de saída pode ser fundamental nos mecanismos de reações de hidrólise. No caso da hidrólise da aspirina, o mecanismo de catálise nucleofílica não ocorre devido ao alto pK_a do grupo de saída. Na **Tabela 5** estão os valores de pK_{a1} e pK_{a2} dos ácidos hidróxi-naftóicos determinados utilizando espectrometria de UV-VIS ou de fluorescência.

Tabela 5 – Valores de pK_{a1} e pK_{a2} dos ácidos hidróxi-naftóicos determinados por titulação espectrofotométrica a 25 °C e $\mu=1$ (KCl).

Ácido	pK_{a1}	pK_{a2}
1OH	2,48 ± 0,01	13,02 ± 0,02
2OH	2,69 ± 0,05	9,83 ± 0,02
3OH	2,36 ± 0,06	12,52 ± 0,01
8OH	3,32 ± 0,04	11,90 ± 0,02

É importante notar os altos valores de pK_{a2} para os ácidos **1OH**, **8OH** e **3OH** e o valor relativamente baixo no caso do **2OH**. Apesar das determinações terem sido realizadas a 25 °C, a tendência observada pode ser utilizada para a análise à temperaturas mais elevadas. Dessa forma, seguindo as observações de Gold⁶⁶, provavelmente o **2Ac** deveria ser hidrolisado segundo o mecanismo de ataque nucleofílico devido ao maior poder de fuga do grupo de saída. Tomando o mesmo raciocínio, a hidrólise do **1Ac** provavelmente seguiria o mecanismo de catálise básica geral. Porém esses não foram os resultados observados.

O mecanismo de hidrólise dos ésteres estudados não apresenta correlação direta com a estabilidade do grupo de saída, provavelmente em função de que os valores elevados de pK_a devem-se a um efeito típico de esponja de prótons e não a efeitos eletrônicos. Como será visto adiante, a dependência maior do mecanismo das reações reside nos efeitos conformacionais de orientação e a probabilidade dessa orientação ser adotada.

4.4 Cálculos Computacionais

A eficiência das reações intramoleculares tem alta dependência com a posição relativa dos grupos que reagem⁶⁰ e do tempo que esses grupos permanecem numa distância própria para a reação.⁶¹ Para avaliar esses dois efeitos foram realizados dois tipos de cálculos distintos: no primeiro foi obtida a estrutura do confôrmero mais estável em fase aquosa (PCM); no segundo foi realizado o mapeamento energético de todas as conformações possíveis para o **1Ac** e **3Ac** em função dos ângulos diedros formados entre o plano do anel e os planos da carbonila do éster e carbonila do grupo carboxilato.

O uso do modelo do continuum polarizado é importante no caso de moléculas carregadas. Átomos carregados em fase gasosa são muito menos estáveis do que em fase aquosa, logo a geometria molecular pode ser bastante distinta nesses dois ambientes. Apesar do PCM não descrever interações específicas entre o soluto e as moléculas de água da primeira camada de solvatação, o modelo mostra-se de fácil e prática implementação, fazendo com que os resultados teóricos aproximem-se um pouco mais do resultado “real” em solução.⁹⁸

4.4.1 Análise do Mínimo Global

Na **Figura 23** estão dispostas as estruturas do mínimo global em nível DFT-B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para uma maior clareza. Os principais parâmetros geométricos calculados estão dispostos na **Tabela 6**.

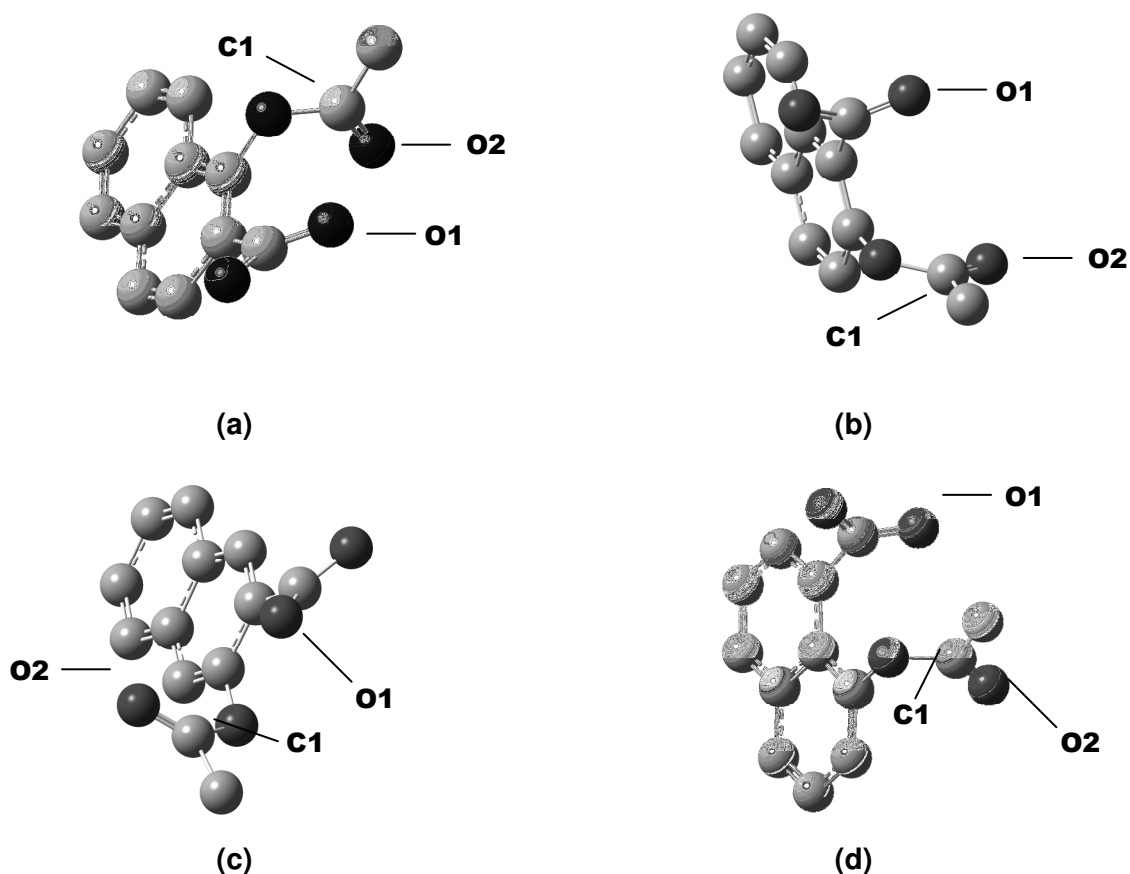


Figura 23 – Estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM dos ésteres 1Ac (a), 2Ac (b), 3Ac (c) e 8Ac (d). Os átomos de carbono e oxigênio estão representados pelas cores cinza claro e escuro, respectivamente.

Tabela 6 – Parâmetros geométricos principais das estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM dos ésteres naftílicos.

Parâmetro	1Ac	2Ac	3Ac	8Ac
O_1-C_1 , Å	2,94	3,60	3,04	3,07
$O_1-C_2-O_2$, °	96,13	91,00	95,07	102,27

A **Tabela 6** mostra uma distância O_1-C_2 para o **2Ac** muito superior à do éster **1Ac**. Segundo Bruice³⁹, em um NAC essa distância deve ser menor do que 3,2 Å. Logo este fator pode ser o responsável pela distinção no mecanismo de hidrólise dos ésteres **1Ac** e **2Ac**. Além disso, o ângulo formado entre os átomos O_1 , C_2 e O_3 indica um favorecimento para o ataque nucleofílico no caso do **1Ac**, que está dentro do cone de mais ou menos 15° em relação aos 110° definidos por Bürgi e Dunitz.⁹⁹

No caso do éster **3Ac**, o ângulo $O_1-C_2-O_3$ está no limite dos 15° e a distância O_1-C_2 é 0,10 Å maior do que para o éster **1Ac**. Apesar dessa distância ser de 3,07 Å no **8Ac**, o ângulo $O_1-C_2-O_3$ está muito próximo do ângulo ideal previsto de 110°.⁹⁹ O valor observado pode também ser correlacionado ao ângulo de 105° definido para um NAC (**Figura 3**).

Como mencionado na introdução, nos sistemas do tipo 1,8-naftálicos geralmente ocorre grande interação repulsiva entre os grupos ancorados ao anel. No caso do **8Ac**, este efeito pode ser observado no ângulo formado entre o carbono **a**, **b** e **c** (**Figura 24**). O ângulo esperado para um carbono de hibridação sp^2 é de 120°, porém o ângulo observado foi 124,64°. Além disso, o oxigênio ligado ao anel está 0,08 Å fora do plano médio do anel. Essas deformações podem aumentar a energia da molécula devido à uma diminuição da ressonância em relação ao produto **8NL**, que é um sistema com alta planaridade, aumentando assim a reatividade para a reação de ataque intramolecular.

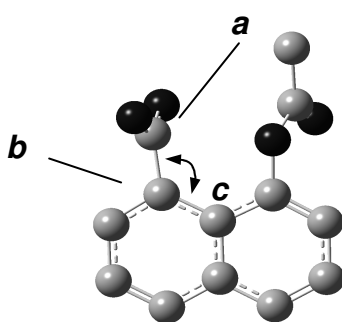
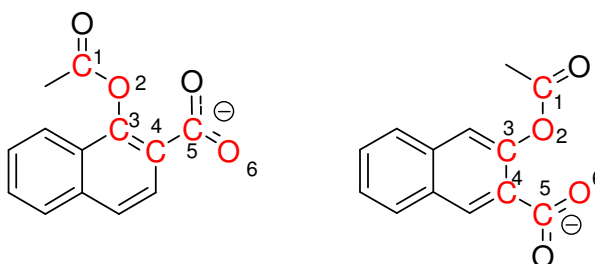


Figura 24 – Ângulo de 124,64° entre os carbonos do carboxilato, α e terciário devido à interações repulsivas no **8Ac**.

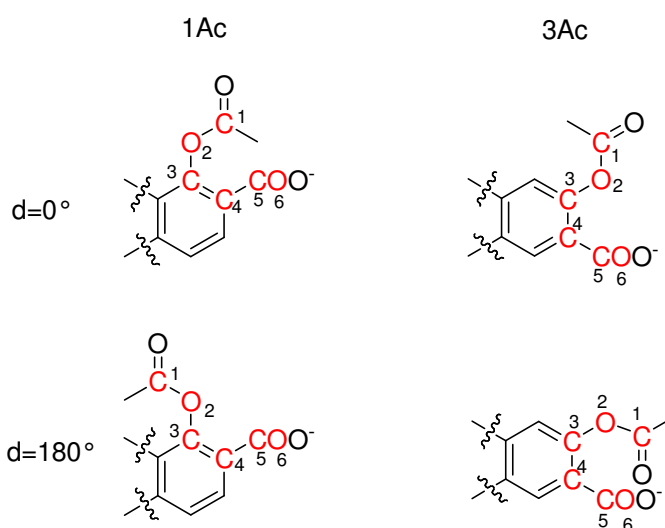
4.4.2 Análise da Superfície de Energia Potencial

O procedimento para a construção da superfície de energia potencial foi realizado com os ésteres **1Ac** e **3Ac**, que representam os dois tipos de mecanismos observados: catálise nucleofílica e básica geral. Nos gráficos de superfície de energia, os valores de ângulos negativos ou positivos referem-se apenas ao sentido da rotação em relação ao plano do anel, sendo no entanto equivalentes. Assim, um diedro de -10° possui a mesma energia de um diedro de $+10^\circ$.

No **Esquema 28** estão representadas as estruturas das moléculas juntamente com a numeração utilizada nos gráficos de energia potencial. Os diedros formados pelos átomos 1,2/3,4 (diedro éster) e 3,4/5,6 (diedro carboxilato) foram variados de 0 a 180° . No **Esquema 29** estão apresentadas as estruturas dos compostos com o diedro éster em 0 e 180° . No caso do grupo carboxilato, o ângulo de 0 e 180° correspondem à planaridade total do grupo em relação ao plano do anel.



Esquema 28



Esquema 29

Na **Figura 25** está apresentada a superfície de energia potencial do **1Ac** em nível B3LYP/6-31+G(d) na ausência de solvente. As energias são relativas à energia do mínimo global e correspondem a um ΔE eletrônico, haja vista que não foram feitas as correções para as energias de repulsão nuclear do ponto zero, o que seria um “ato heróico” devido ao acréscimo acentuado no tempo de cálculo.

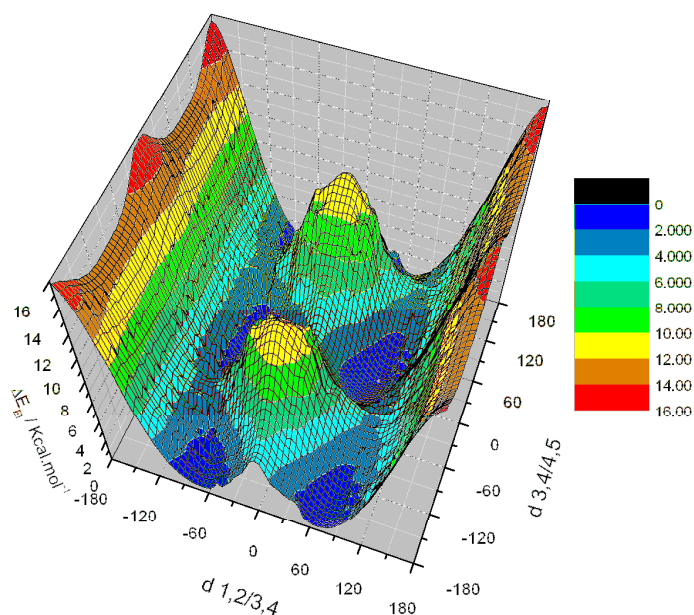


Figura 25 – Superfície de energia potencial do 1Ac em função dos ângulos diedros do grupo éster e carboxilato em relação ao plano do anel. As energias são relativas à energia do mínimo global e correspondem à diferença de energia eletrônica.

Na **Figura 26a** e **b** estão dispostas a vista superior em cores e em curvas de nível, respectivamente, da superfície de energia potencial do **1Ac**. Na **Figura 26b** os picos na região *A* correspondem a 12 kcal/mol e devem-se à forte interação repulsiva experimentada pelo grupo éster em contato com um dos oxigênios do grupo carboxilato. Além desses picos de energia, existe uma grande região de alta energia (maior que 8 kcal/mol) *B* que é independente do diedro do carboxilato e que deve-se à interação do grupo éster com o hidrogênio α do anel vizinho. Quando $d_{1,2/3,4} = 180^\circ$ a energia chega a 16 kcal/mol. A região *C* é a mais estável, com a energia chegando no máximo a 4 kcal/mol. Aqui a energia total da molécula também é praticamente independente do diedro do grupo carboxilato. Na **Figura 27** estão dispostas três estruturas que são representativas das regiões *A*, *B* e *C*.

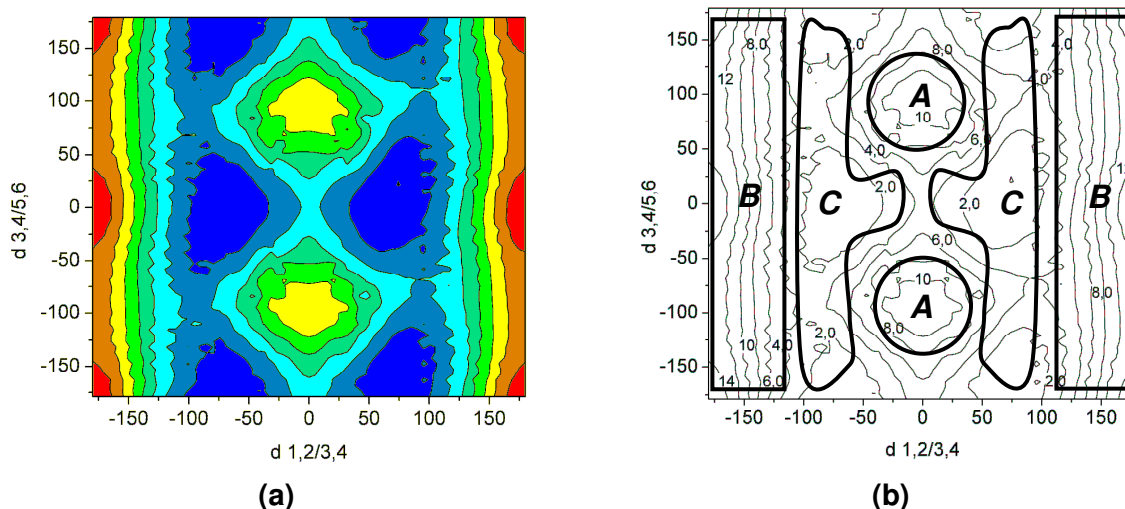


Figura 26 – Superfície de energia potencial do 1Ac. (a) Vista superior; (b) curvas de nível com regiões indicadas no texto.

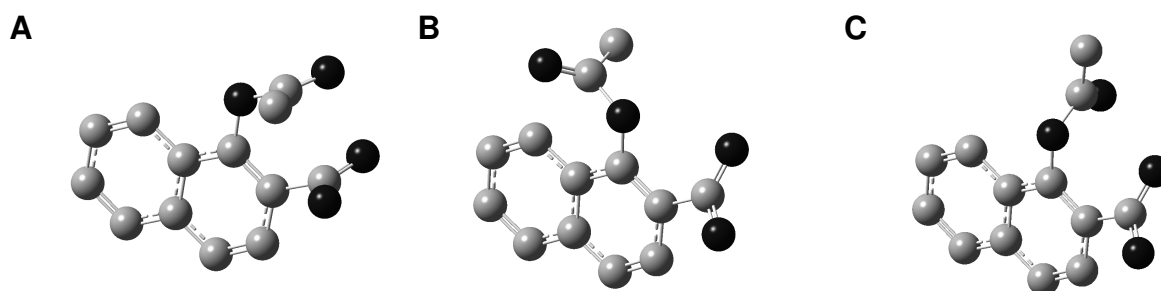


Figura 27 – Confôrmers do 1Ac representativos das regiões A, B e C da Fig. 24b.

Os confôrmers da região C apresentam uma estabilidade acentuada devido à profundidade dessa região em relação às outras. O diedro do grupo éster mantém-se entre 50 e 100° aproximadamente, enquanto que o grupo carboxilato tem a rotação praticamente desimpedida. Assim, a carbonila do éster permanece numa orientação adequada para o ataque intramolecular do grupo carboxilato.

Na **Figura 28a** está apresentada a superfície de energia potencial do **3Ac** em função dos diedros dos grupos éster e carboxilato em relação ao plano do anel. Como na superfície de energia potencial do **1Ac**, na região A, onde o diedro do grupo éster ($d_{1,2/3,4}$) está em torno de 0° e o diedro do carboxilato ($d_{3,4/5,6}$) está a 90°, a energia chega a 11 kcal/mol devido à repulsão experimentada por esses grupos (**Figura 29**). Essa região está indicada na **Figura 28b** de forma mais clara. Todo o restante da superfície está abaixo de 6 kcal/mol.

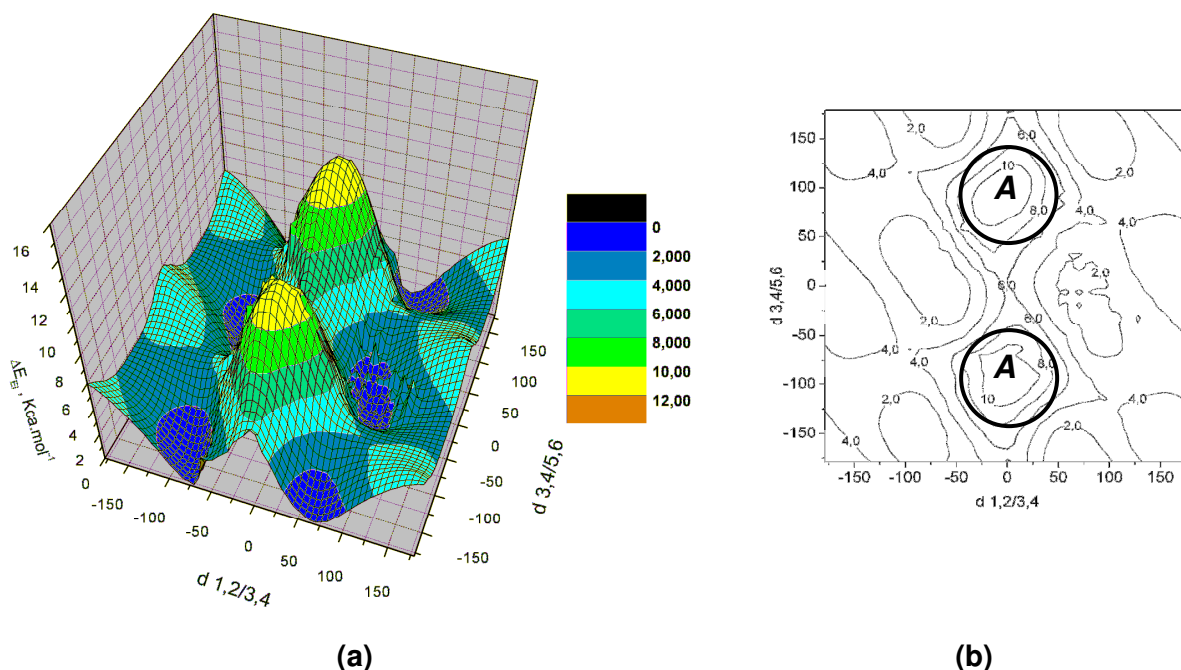


Figura 28 – (a) Superfície de energia potencial e (b) curvas de nível do 3Ac em função dos ângulos diedros do grupo éster e carboxilato em relação ao plano do anel. As energias são relativas à energia do mínimo global e correspondem à diferença de energia eletrônica.

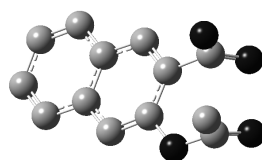


Figura 29 – Confômero do 3Ac representativo da região A da Fig. 26b.

A diferença fundamental entre os ésteres **1Ac** e **3Ac** é o fato de no último não ocorrerem interações repulsivas entre o grupo éster e o hidrogênio α do anel. Assim, a superfície de energia potencial do **3Ac** é muito mais achatada em relação ao **1Ac**. Esse fato deixa os grupos reativos menos restringidos e menos orientados ao ataque intramolecular, fazendo com que a reação intermolecular de catalise básica geral seja o caminho reacional de menor energia para o **3Ac**. Em um nível de energia térmica de 5 kcal 75% da área da Fig. 26b é coberta, ou seja, 75% de todas as conformações dos grupos éster e carboxilato podem ser ocupadas para o **3Ac**. No caso do **1Ac**, a área coberta da Fig. 28 é de apenas 48%.

Ainda, utilizando a distribuição de Boltzmann (**Eq. 15**) e a energia de todas as conformações calculadas, chega-se ao resultado de que a probabilidade da distância entre o oxigênio do carboxilato e a carbonila do éster a 25°C ser menor que 3Å é aproximadamente 50% no caso do **1Ac** e 38% no caso do **3Ac**. Porém, no caso do **3Ac**, esse valor pode ser ainda menor se o efeito do solvente for incluído, pois essa distância aumenta em 0,38 Å indo da fase gasosa para aquosa (PCM). No caso do **1Ac**, esse aumento é de 0,28 Å.

$$P_i = \frac{e^{-\beta E_i}}{\sum_j^N e^{-\beta E_j}} \quad (15)$$

onde,

P_i = probabilidade de uma dada conformação i ;

E_i = energia em Joules da conformação i ;

N = número total de conformações calculadas;

$\beta = (kT)^{-1}$, k é a cte. Boltzmann e T é a temperatura.

Segundo a **Tab. 6**, a geometria do estado reagente no sistema 1,8 naftálico (**8Ac**) favorece o ataque intramolecular e devido à interação repulsiva a rotação dos grupos carboxilato e éster é impedida. Logo, como no caso do **1Ac** os grupos reativos permanecem por mais tempo em uma configuração que favorece o ataque intramolecular. Tais restrições rotacionais provavelmente estão ausentes no **2Ac** devido à grande distância entre o oxigênio do carboxilato e o H_α do anel vizinho. Além disso, a distância O_1-C_1 é grande demais para permitir o ataque intramolecular.

4.5 Análise da Estrutura Cristalina

Na **Figura 30a** está apresentada a estrutura cristalina do **1Ac**⁹¹. Os parâmetros geométricos selecionados do **1Ac** juntamente com os parâmetros equivalentes para o ácido acetilsalicílico¹⁰⁰ na mesma temperatura (295K) estão contidos na **Tabela 7**. Para uma maior simplificação, a numeração utilizada para o ácido acetilsalicílico (**AAS**) é a mesma do anel substituído do **1Ac** (**Figura 30b**).

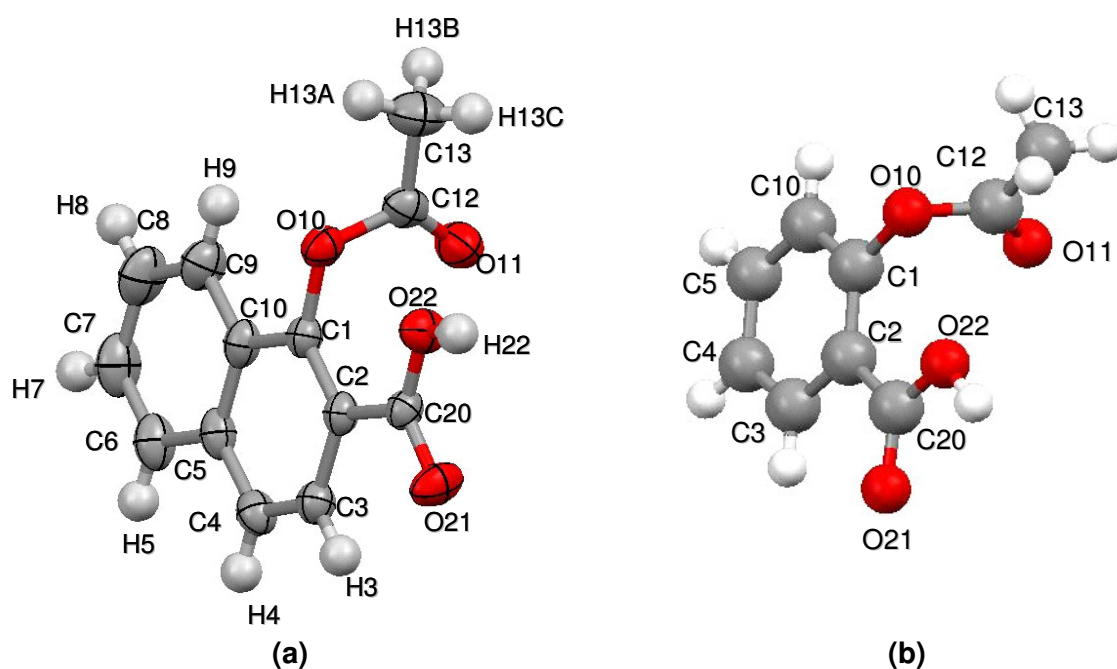


Figura 30 – (a) Estrutura cristalina do 1Ac. As elipsóides estão apresentadas com uma probabilidade de 40%. (b) Estrutura cristalina do ácido acetilsalicílico com esquema de numeração semelhante ao do anel substituído do 1Ac.

Tabela 7 – Comprimentos e ângulos de ligação selecionados da estrutura cristalina do 1Ac e AAS a 25,0 °C.

Éster	O22-C12 (Å)	O22-C12-O11 (°)	C2-C1-O10-C12 (°)	C1-C2-C20 (°)
1Ac	2,86	84,21	80,92	123,76
AAS ^a	2,94	98,54	85,23	125,06

^a Ref. ¹⁰⁰.

A estrutura do AAS foi selecionada devido à grande semelhança com o **3Ac**. Dessa forma, podem ser feitas comparações diretas haja vista que a única diferença estrutural é o outro anel aromático fundido ausente no AAS, o que provavelmente não alteraria de forma significativa a geometria dos grupos funcionais em questão,

salvo o caso do empacotamento cristalino apresentar-se de forma diferente e determinante da geometria molecular.

Como pode ser visto na **Tab. 7**, a distância para o ataque intramolecular é muito favorecida para o **1Ac**, com um valor de O22—C12 igual a 2,86 Å. No caso do **AAS**, esse valor é 0,08 Å maior. Outro parâmetro extremamente importante é o ângulo diedro formado entre os planos contendo os átomos C2-C1 e O10-C12. No caso do **AAS** esse valor é de 85,23° e para o **1Ac** é de 80,92° indicando que a carbonila do éster está sendo empurrada em direção ao grupo ácido provavelmente devido à interações repulsivas com o hidrogênio α do anel vizinho. Além disso, o menor do ângulo C1-C2-O22 para o **1Ac** em relação ao **AAS** indica uma interação atrativa, do tipo ácido-base de Lewis como observado por Bürgi e Dunitz.⁹⁹

Apesar do ângulo O22-C12-O11 indicar um desfavorecimento para o ataque intramolecular para o **1Ac**, é necessário lembrar que em solução o plano do grupo carboxilato pode rotar livremente como demonstrado pela superfície de energia livre em fase gasosa. Dessa forma, esse parâmetro não é decisivo e tem um papel minoritário na reatividade da molécula em solução. Além disso, as forças de empacotamento podem distorcer essa medida haja vista que na estrutura obtida as moléculas estão organizadas na forma de dímeros, com os grupos carboxilato compartilhando os prótons por ligação de hidrogênio. Ao longo do eixo *a* os anéis aromáticos estão empilhados através do sistema π (π *stacking*).

5 CONCLUSÕES

A partir do estudo da reação de hidrólise dos ácidos 1-acetóxi 2-naftóico (**1Ac**), 2-acetóxi 1-naftóico (**2Ac**), 3-acetóxi 2-naftóico (**3Ac**) e 8-acetóxi 1-naftóico (**8Ac**) pode-se concluir que:

- i.* o grupo ácido carboxílico/carboxilato tem um papel fundamental para a reação de hidrólise desses compostos, atuando como catalisador intramolecular com um fator catalítico de até 430 vezes a condições neutras. Essa assistência pode ser dada de três formas: catálise nucleofílica, básica ou ácida geral;
- ii.* o mecanismo de catálise é independente de fatores eletrônicos como a basicidade do grupo de saída, sendo melhor relacionado com efeitos do estado reagente, isto é, com a conformação adotada e a probabilidade dessa ser mantida e adequada para favorecer a catálise;
- iii.* comparando-se a estrutura cristalina do **1Ac** com a do ácido acetilsalicílico demonstrou-se que a distância para o ataque intramolecular no primeiro é favorecida, corroborando os estudos teóricos realizados;
- iv.* por fim, pode-se concluir que o melhor sistema catalítico é aquele em que, entre outras características, os grupos reativos são mantidos em contato íntimo e, por forças atrativas ou repulsivas com o restante do sistema, por longos períodos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dooley, C. M.; Devocelle, M.; Mcloughlind, M.; Nolan, K. B.; Fitzgerald, D. J.; Sharkey, C. T., A novel family of hidroxamata-based acylating inhibitors of cicloxygenase. *Molecular Pharmacology* **2003**, 63, (2), 450-455.
2. Vane, J. R.; Botting, R. M., The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research* **2003**, 110, 255-258.
3. Patai, S., Biological formation and reactions of the -COOH and -COOR groups. *The chemistry of carboxylic acids and esters*, Ltd., John Wiley and Sons: London, UK, 1969; p 1043.
4. Dugas, H., *Bioorganic Chemistry. A Chemical Aproproach to Enzyme Action*. 3^a ed.; Springer: Boston, MA, 1996; p 700.
5. Bender, M. L., Mechanisms of catalysis of nucleophilic reactions of carboxylic acid derivatives. *Chemical Reviews* **1960**, 60, (1), 53 -113.
6. Maskill, H., *Structure and Reactivity in Organic Chemistry*. Oxford Science Publications: New York, NY, 1999; p 95.
7. Skrabal, A., The kinetics of acid and basic catalysis. *Transactions of the Faraday Society* **1928**, 24, 687-696.
8. Davies, A. G.; Kenyeon, J., Alkyl-oxygen heterolysis in carboxylic esters and related compounds. *Quarterly Reviews / Chemical Society* **1955**, 9, 203-228.
9. Anderson, B. M.; Cordes, E. H.; Jencks, W. P., Reactivity and catalysis in reactions of the serine hydroxyl group and of O-acyl serines *The Journal of Biological Chemistry* **1961**, 236, (2), 455-463.
10. Jencks, W. P.; Carriuolo, J., *Journal of Biological Chemistry*. **1959**, 234, 1280-1285.
11. Neuvonen, H., *Journal Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1990**, 669-673.
12. Bruice, T. C.; Schmir, G. L., Imidazole catalysis. I. The catalysis of the hydrolysis of phenyl acetates by imidazole. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79, (7), 1663 - 1667.
13. Bender, M. L.; Turnquest, B. W., The imidazole-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79, 1652 - 1655.
14. Maskill, H., *Mechanisms of Organic Reactions*. Oxford Science Publications: New York, NY, 1999; p 95.
15. Ba-Saif, S.; Luthra, A. K.; Williams, A., Concerted acetyl group transfer between substituted phenolate ion nucleophiles: variation of transition-state structure as a function of substituent. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, (11), 2647-2652.
16. Ba-Saif, S.; Luthra, A. K.; Williams, A., Concertedness in acyl group transfer in solution: a single transition state in acetyl group transfer between phenolate ion nucleophiles. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, 109, (21), 6362.
17. Chrystiuk, E.; Williams, A., A single transition-state in the transfer of the

methoxycarbonyl group between isoquinoline and substituted pyridines in aqueous solution *Journal of the American Chemical Society* **1987**, 109, (10), 3040-3046.

18. Cleland, W. W.; Hengee, A. C., Mechanisms of phosphoryl and acyl transfer. *Federation of American Societies for Experimental Biology* **1995**, 9, 1585-1594.

19. Hess, R. A.; Hengee, A. C.; Cleland, W. W., Isotope effects on enzyme-catalyzed acyl transfer from *p*-nitrophenyl acetate: concerted mechanisms and increased hyperconjugation in the transition state. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (12), 2703-2709.

20. Williams, A., *Free Energy Relationships in Organic and Bio-organic Chemistry*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2003.

21. Blow, D. M., The study of alpha-chymotrypsin by x-ray diffraction. The Third CIBA Medal Lecture. *Biochemistry Journal* **1969**, 112, 261 - 268.

22. Blow, D. M.; Birktoff, J. J.; Hartley, B. S., Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature (London)* **1969**, 221, 337- 340.

23. Blow, D. M.; Sigler, P. B.; Matthews, B. W.; Henderson, R., Structure of crystalline α -chymotrypsin II. A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. *Journal of Molecular Biology* **1968**, 35, 243-264.

24. Cleland, W. W.; Hengee, A. C., Enzymatic mechanism of phosphate and sulfate transfer. *Chemical Reviews* **2006**, 106, (3252-3278).

25. Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Vihko, P., Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analogs vanadate and molybdate. *Journal of Biochemistry* **1994**, 221, 139-142.

26. Ostanin, K.; van Etten, R. L., Asp(304) of Escherichia coli acid-phosphatase is involved in leaving group protonation. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 20778-20784.

27. Kirby, A. J., Efficiency of proton transfer catalysis in models and enzymes. *Accounts of Chemical Research* **1997**, 30, (7), 290-296.

28. Bruice, T. C.; Snider, M. J., The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysis. *Accounts of Chemical Research* **2001**, 34, (12), 938-945.

29. Gandour, R. D.; Showen, R. L., *Transitions States of Biochemical Process*. Plenum: New York, NY, 1978.

30. Nome, F.; Gesser, J. C.; Yunes, S.; Clementin, R. M., Reações Intramoleculares Como Modelos não Miméticos de Catálise Enzimática. *Química Nova* **1996**, 20, (6), 631-637.

31. Luzhkov, V.; Åqvist, J., Computer simulation of phenyl ester cleavage by β -cyclodextrin in solution. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (24), 6131-6137.

32. Baldini, L.; Bracchiani, C.; Cacciapaglia, R.; Casnati, A.; Mandolini, L.; Ungaro, R., Catalysis of acyl group transfer by a double-displacement mechanism: the cleavage of aryl esters catalyzed by calixcrown-Ba²⁺ complexes. *Chemistry - A European Journal* **2000**, 6, (8), 1322-1330.

33. Chao, Y.; Whisman, G. R.; Sogah, G. D. Y.; Cram, D. J., Host-guest complexation. 21. Catalysis and chiral recognition through designed complexation of transition states in transacylations of amino ester salts. *Journal of the American*

Chemical Society **1979**, 101, (17), 4948 - 4958.

34. Menger, F. M., On the source of intramolecular and enzymatic reactivity. *Accounts of Chemical Research* **1985**, 18, (5), 128-134.
35. Menger, F. M., Enzyme reactivity from an organic perspective. *Accounts of Chemical Research* **1993**, 26, 206-212.
36. Kirby, A. J., Effective molarities for intramolecular reactions. *Advances in Physical Organic Chemistry* **1980**, 17, 183-278
37. Fersht, A. R.; Kirby, A. J., Hydrolysis of aspirin. Intramolecular general base catalysis of ester hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89, (23), 4857-63.
38. Jencks, W. P., Binding energy, specificity, and enzyme catalysis: The Circe effect. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **1975**, 43, 219-410.
39. Bruice, T. C.; Lightstone, F. C., Ground state and transition state contributions to the rates of intramolecular and enzymatic reactions. *Accounts of Chemical Research* **1999**, 32, 127-136.
40. Bruice, T. C.; Lightstone, F. C., Ground state conformations and entropic and enthalpic factors in the efficiency of intramolecular and enzymatic reactions. 1. Cyclic anhydride formation by substituted glutarates, succinacet, and 3,6-endoxo- Δ -tetrahydrophthalate monophenyl esters. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, (11), 2595-2605.
41. Bruice, T. C., A view at the millennium: the efficiency of enzymatic catalysis. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35, (3), 139-148.
42. Jardtzyk, O.; Lefevre, J. F., Protein dynamics. *Federation of American Societies for Experimental Biology Letters* **1994**, 338, 246-250.
43. Bruice, T. C.; Lightstone, F. C., Separation of ground state and transition state effects in intramolecular and enzymatic reactions. 2. A Theoretical study of the formation of transition states in cyclic anhydride formation *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, (39), 9103-9113.
44. Radzicka, A.; Wolfenden, R., Rates of uncatalyzed Peptide Bond Hydrolysis in Neutral Solution and the Transition State Affinities of Proteases. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 6105-6109.
45. Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A., *Modern Physical Organic Chemistry*. Wiley & Taylor Publishing Services: Sausalito, CA, 2004; p 1095.
46. Rogers, G. A.; Bruice, T. C., Synthesis and Evaluation of a Model for the So-Called "Charge-Relay" System of the Serine Esterases. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, 96, (8), 2473 - 2481.
47. Fersht, A., *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. Nova Science, 1998; p 631.
48. Delpierre, G. R.; Fruton, J. S., Specific inactivation of pepsin by a diazo ketone. *Biochemistry* **1966**, 56, 1817-1822.
49. Delpierre, G. R.; Fruton, J. S., Inactivation of pepsin by diphenyldiazomethane. *Biochemistry* **1965**, 54, 1161-1166.

50. Hartsuck, J. A.; Tang, J., The carboxylate ion in the active center of pepsin. *The Journal of Biological Chemistry* **1971**, 247, (8), 2575-2580.
51. Lundblad, R. L.; Stein, W. H., On the reaction of diazoacetyl compounds with pepsin. *The Journal of Biological Chemistry* **1969**, 244, (1), 154-160.
52. Denburg, J. L.; Nelson, R.; Silver, M. S., The effect of pH on the rates of hydrolysis of three acylated dipeptides by pepsin. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 90, (2), 479-486.
53. Bott, R.; Subramanian, E.; Davies, D. R. Three-dimensional structure of the complex of the *Rhizopus chinensis* carboxyl proteinase and pepstatin at 2.5-Å resolution. *Biochemistry* **1982**, 21, 6956 - 6962.
54. Maugh, T.; Bruice, T. C., The role of intramolecular bifunctional catalysis of ester hydrolysis in water. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 93, (13), 3237-3248.
55. Kirby, A. J.; Lloyd, G. J., Structure and efficiency in intramolecular and enzymic catalysis: intramolecular general base catalysis. Hydrolysis of monoaryl malonates. *Journal of Chemical Society, Perkin II* **1976**, 14, 1753-1761.
56. Orth, E. Catálise Intramolecular Bifuncional em um Diéster de Fosfato: Modelando o Mecanismo da Ribonuclease. Dissertação (Mestre em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, **2008**.
57. Bruice, T. C.; Pandit, V. K., The effect of general substitution ring size and rotamer distribution on the intramolecular nucleophilic catalysis of the hydrolysis of monophyl esters of dibasic acids and the solvolysis of the intermediate anhydrides. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 85, (22), 5858-5865.
58. Menger, F. M.; Ladika, M., Fast hydrolysis of an aliphatic amide at neutral pH and ambient temperature. A peptidase model. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, 110, (20), 6794 - 96.
59. Yunes, S.; Gesser, J. C.; Chaimovich, H.; Nome, F., Mechanistically optimized intramolecular catalysis in the hydrolysis of esters. Global changes involved in molecular reactivity. *Journal of Physical Organic Chemistry* **1997**, 10, (6), 461-465.
60. Bond, A. D.; Kirby, A. J.; Rodriguez, E., Efficient intramolecular general acid catalysis: a preview from a crystal structure. *Chemical Communications* **2001**, 21, 2266-2267.
61. Menger, F. M.; Fei, Z. X., Rapid cleavage of amide linkages under mild conditions; an evolutionary approach to bioorganic catalysis. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1994**, 33, (3), 346-368.
62. Fersht, A. R.; Kirby, A. J., Structure and mechanism in intramolecular catalysis. Hydrolysis of substituted aspirins. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89, (19), 4853-4857.
63. Kemp, D. S.; Thibault, T. D., Hydrazinolysis of salicyloylsalicylic acid. Irrelevance of an anhydride intermediate. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, 90, (25), 7154-7155.
64. Minor, S. S.; Schowen, R. L., One-proton solvation bridge in intramolecular carboxylate catalysis of ester hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, 95, (7), 2279-2281.

65. Fersht, A. R.; Kirby, A. J., Intramolecular nucleophilic catalysis of ester hydrolysis by the ionized carboxyl group. The hydrolysis of 3,5-dinitroaspirin anion. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, 90, (21), 5818-5826.
66. Gold, V.; Oakenfull, D. G.; Riley, T., The acetate-catalysed hydrolysis of aryl acetates. *Journal of Chemical Society B* **1968**, 5, 515-519.
67. Martell, A. E.; Smith, Z. M.; Motekaitis, R. J. *NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database: NIST Standard Reference Database 46*, Gaithersburg, 1993.
68. Cramer, J. C., *Essentials of Computational Chemistry*. Wiley: Nova Iorque, 2002; p 542.
69. Ziegler, T.; Autschbach, J., Theoretical Methods of Potential Use for Studies of Inorganic Reaction Mechanisms. *Chemical Reviews* **2005**, 105, (6), 2695-2722.
70. Kohn, W.; Sham, L. J., Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review* **1965**, 140, (4), A1133-A1138.
71. Hohenberg, P.; Kohn, W., Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review* **1964**, 136, (3), B864-B871.
72. Becke, A. D., Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior. *Physical Review* **1988**, 38, (6), A3098-A3100.
73. Perdew, J. P., Density-Functional Approximation for the Correlation Energy of the Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review* **1986**, 33, (12), B8822-B8824.
74. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Physical Review* **1988**, 37, (2), B785-B789.
75. Perdew, J. P.; Wang, Y., Accurate and Simple Analytic Representation of the Electron-Gas Correlation Energy. *Physical Review* **1992**, 45, (23), B13244-B13249.
76. Becke, A. D., Density-Functional Thermochemistry. IV. A New Dynamical Correlation Functional and Implications for Exact-Exchange Mixing. *Journal of Chemical Physics* **1996**, 104, (3), 1040-1046.
77. Becke, A. D., Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *Journal of Chemical Physics* **1993**, 98, (7), 5648-5652.
78. Becke, A. D., A New Mixing of Hartree-Fock and Local Density-Functional Theories. *Journal of Chemical Physics* **1993**, 98, (2), 1372-1377.
79. Burke, K.; Enzerhof, M.; Perdew, J. P., The Adiabatic Connection Method: A Non-Empirical Hybrid. *Chemical Physics Letters* **1997**, 265, (1-2), 115-120.
80. Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R., SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement. *Journal of Applied Crystallography* **1999**, 32, 115-119.
81. Sheldrick, G. M., *SHELXL97: Program for the refinement of crystal structures*. University of Göttingen: Germany, 1997.
82. Farrugia, L. J., ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). *Journal of Applied Crystallography* **1997**, 30, 565.
83. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F., *Purification of Laboratory Chemicals*.

Butterworth Heinemann: Oxford, UK, 1998; p 529.

84. Cammidge, A. N.; Öztürk, O., Selective synthesis of meso-naphthylporphyrins. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, (21), 7457-7464.

85. Chattaway, F. D., Acetylation in aqueous alkaline solutions. *Journal of the Chemical Society* **1931**, 2495-2496.

86. Bergeron, R. J.; Wiegand, J.; Wollenweber, M.; McManis, J. S.; Algee, S. E.; Ratliff-Thompson, K., Synthesis and biological evaluation of naphthylidesferrithiocin iron chelators. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39, 1575-1581.

87. Partanen, J. I.; Covington, A. K., Re-evaluation of the second stoichiometric dissociation constants of phosphoric acid at temperatures from (0 to 60) °C in aqueous buffer solutions with or without NaCl or KCl. 2. Tests and use of the resulting Hückel model equations. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2005**, 50, (6), 2065-2073.

88. Fife, T. H.; Bruice, T. C., The temperature dependence of the ΔpD correction for the use of the glass electrode in D₂O. *Journal of physical Chemistry* **1961**, 65, 1079-1080.

89. Katsuyama, I.; Khalil, A. A.; Dunbar, C.; Zjawiony, J. K., Concentration-dependent variation of ¹H-NMR chemical shifts of aromatic protons in sampangine derivatives. *Spectroscopy Letters* **2003**, 36, (5&6), 477-485.

90. Spek, A. L., *HELENA: CAD-4 data reduction program*. Univ. of Utrecht: The Netherlands, 1996.

91. Souza, B. S.; Bortoluzzi, A. J.; Nome, F., 1-acetoxy-2-naphthoic acid. *Acta Crystallographica Section E* **2007**, E63, (12), o4523.

92. Frisch, G. W. T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople. *Gaussian 03*, Rev C.02; Gaussian Inc.: Pittsburgh PA, **2003**.

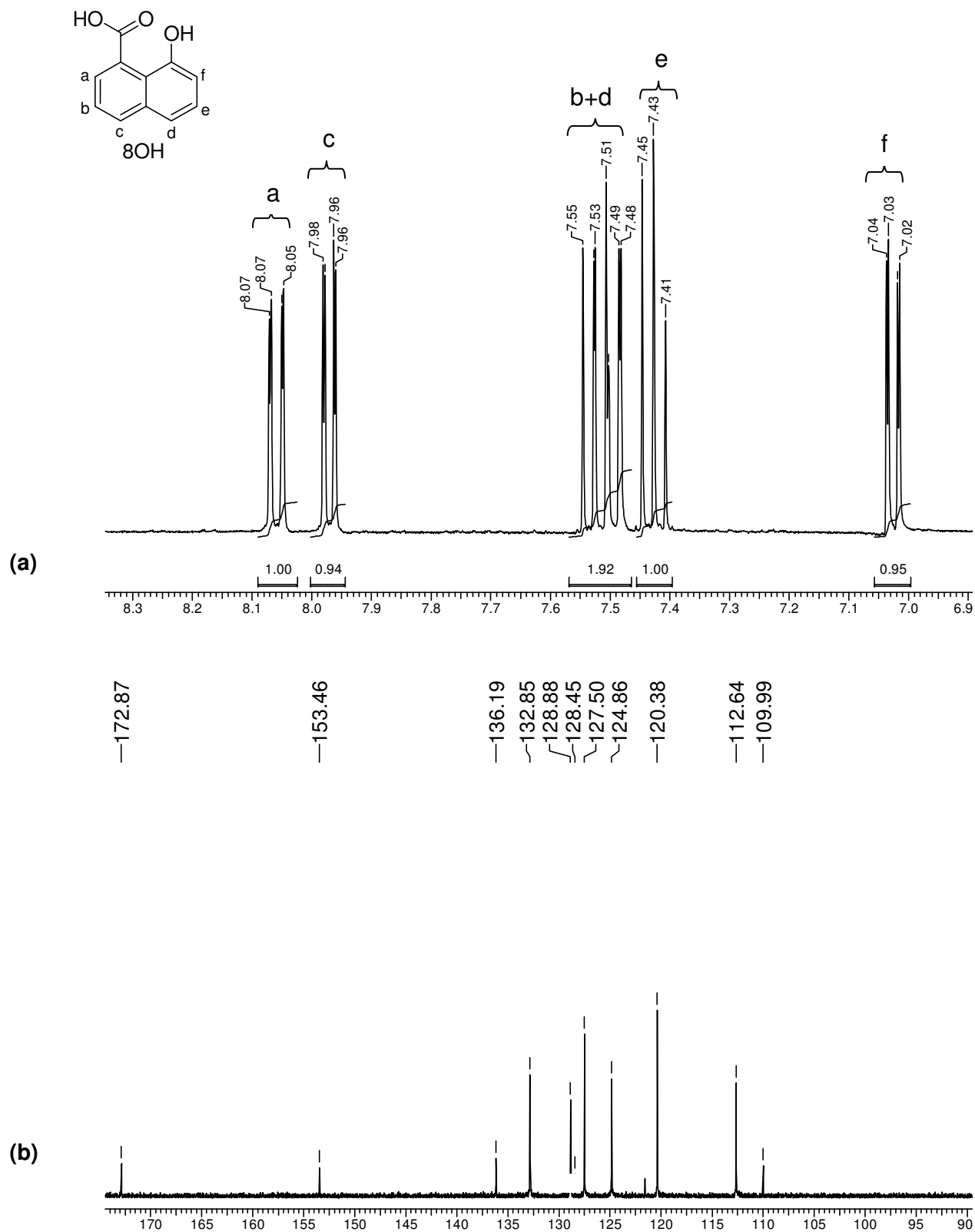
93. Cossi, M.; Barone, V.; Cammi, R.; Tomasi, J., Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model. *Chemical Physics Letters* **1996**, 225, (4), 327-335.

94. Kirsch, J. F.; Jencks, W. P., Base Catalysis of Imidazole Catalysis of Ester Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 86, (5), 833-837.

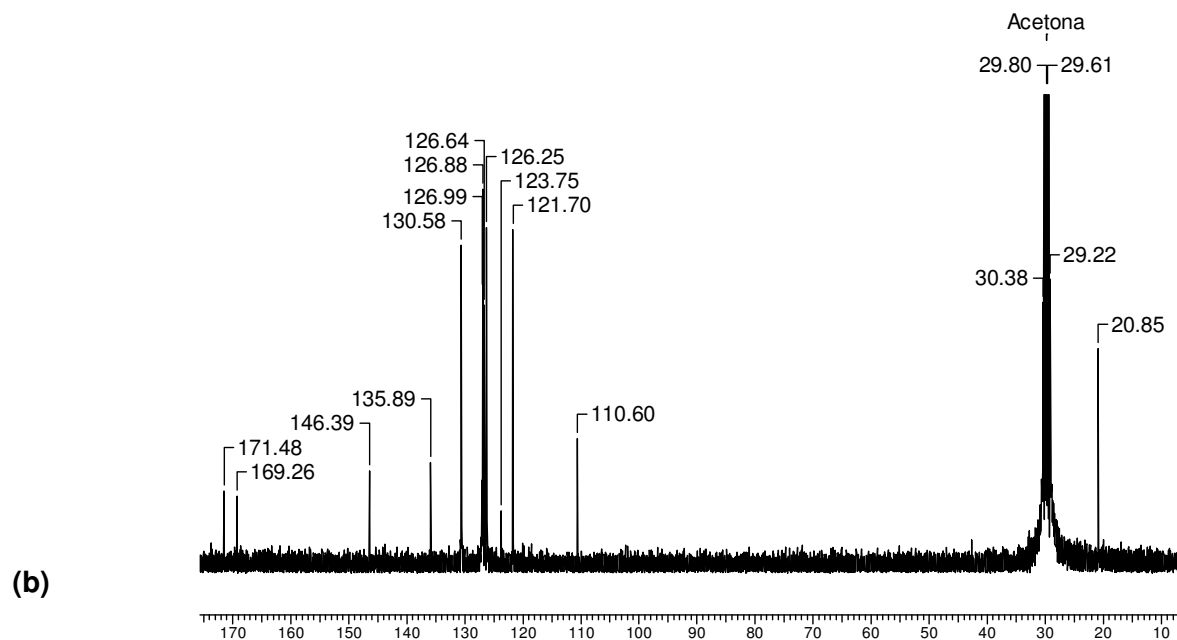
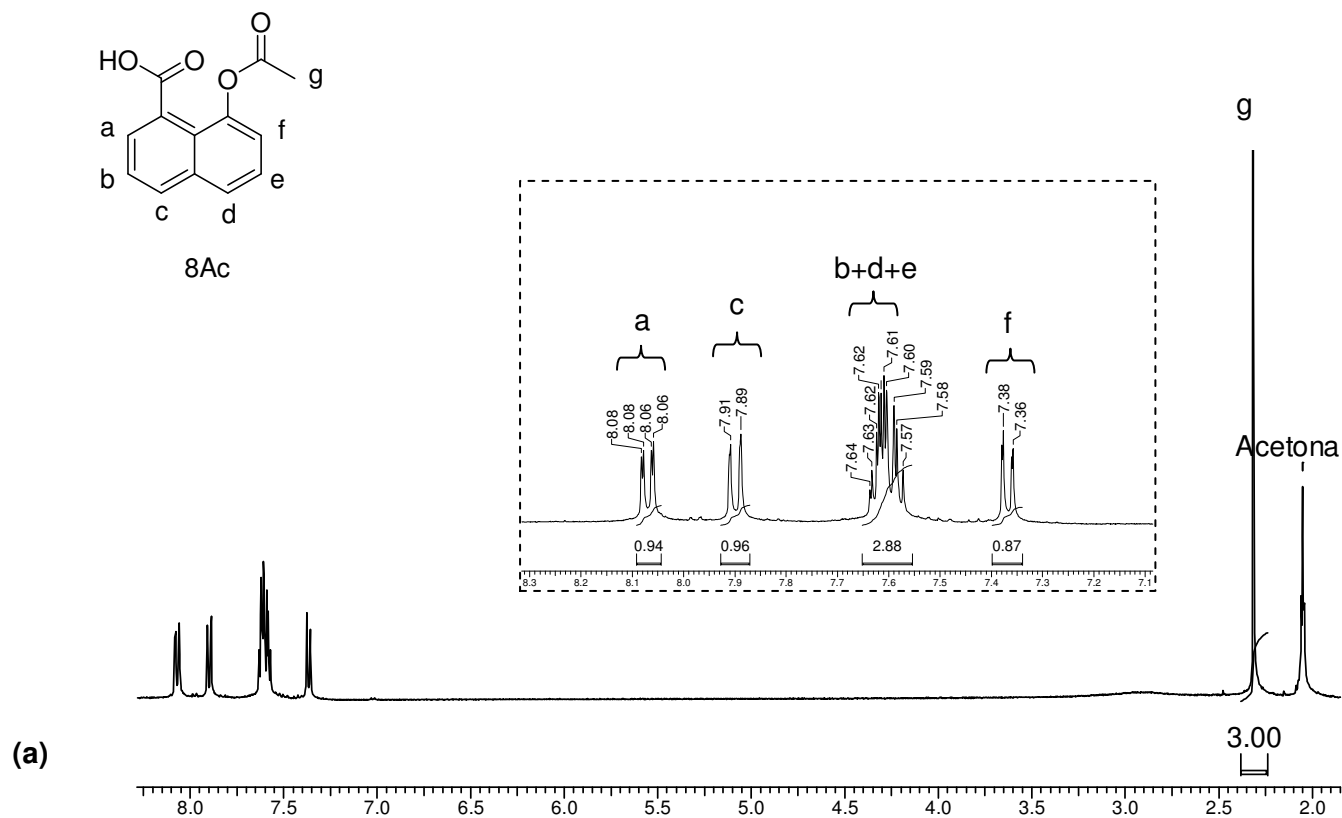
95. King, J. F.; Guo, Z. R.; Klassen, D. F., Nucleophilic attack vs general base assisted hydrolysis in the reactions of acetic anhydride with primary and secondary amines. pH-yield studies in the recognition and assessment of the nucleophilic and general base reactions. *Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59, 1095-1101.

96. Pierre, T. S.; Jencks, W. P., Intramolecular catalysis in the reactions of nucleophilic reagents with aspirin. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, 90, (14), 3817-3827.
97. Menger, F. M., Directionality of organic reactions in solution. *Tetrahedron* **1983**, 39, (7), 1013 - 40.
98. Pliego, J. R.; Riveros, J. M., The cluster-continuum model for the calculation of the solvation free energy of ionic species. *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, 105, 7241-7247.
99. Bürgi, H. B.; Dunitz, J. D.; Shefter, E., Geometrical reaction coordinates. II. Nucleophilic addition to a carbonyl group. *Journal of the American Chemical Society* **1973**, 95, (15), 5065-5067.
100. Kim, Y.; Machida, K.; Taga, T.; Osaki, K., Structure redetermination and packing analysis of aspirin crystal. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1985**, 33, (7), 2641 - 2647.

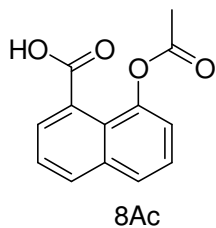
Apêndice



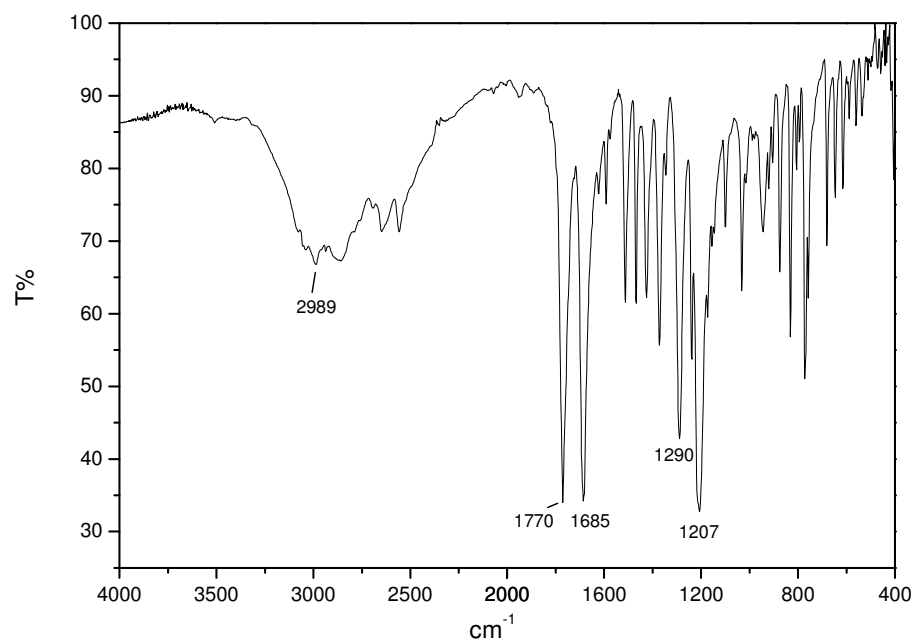
Apêndice A – Espectros de RMN de (a) ^1H (400MHz) e (b) ^{13}C (100,6MHz) do 8OH em acetona d_6 .



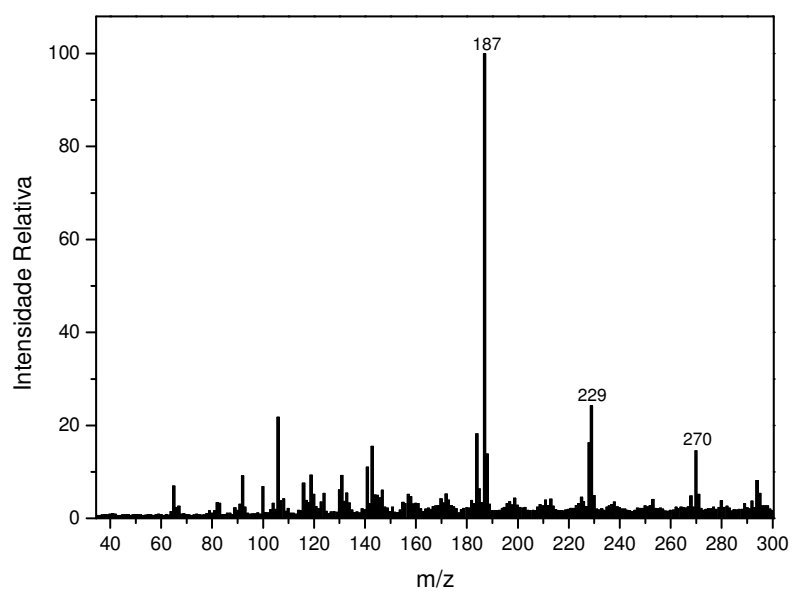
Apêndice B – Espectros de RMN de (a) ^1H (400MHz) e (b) ^{13}C (100,6MHz) do **8Ac** em acetona d_6 .



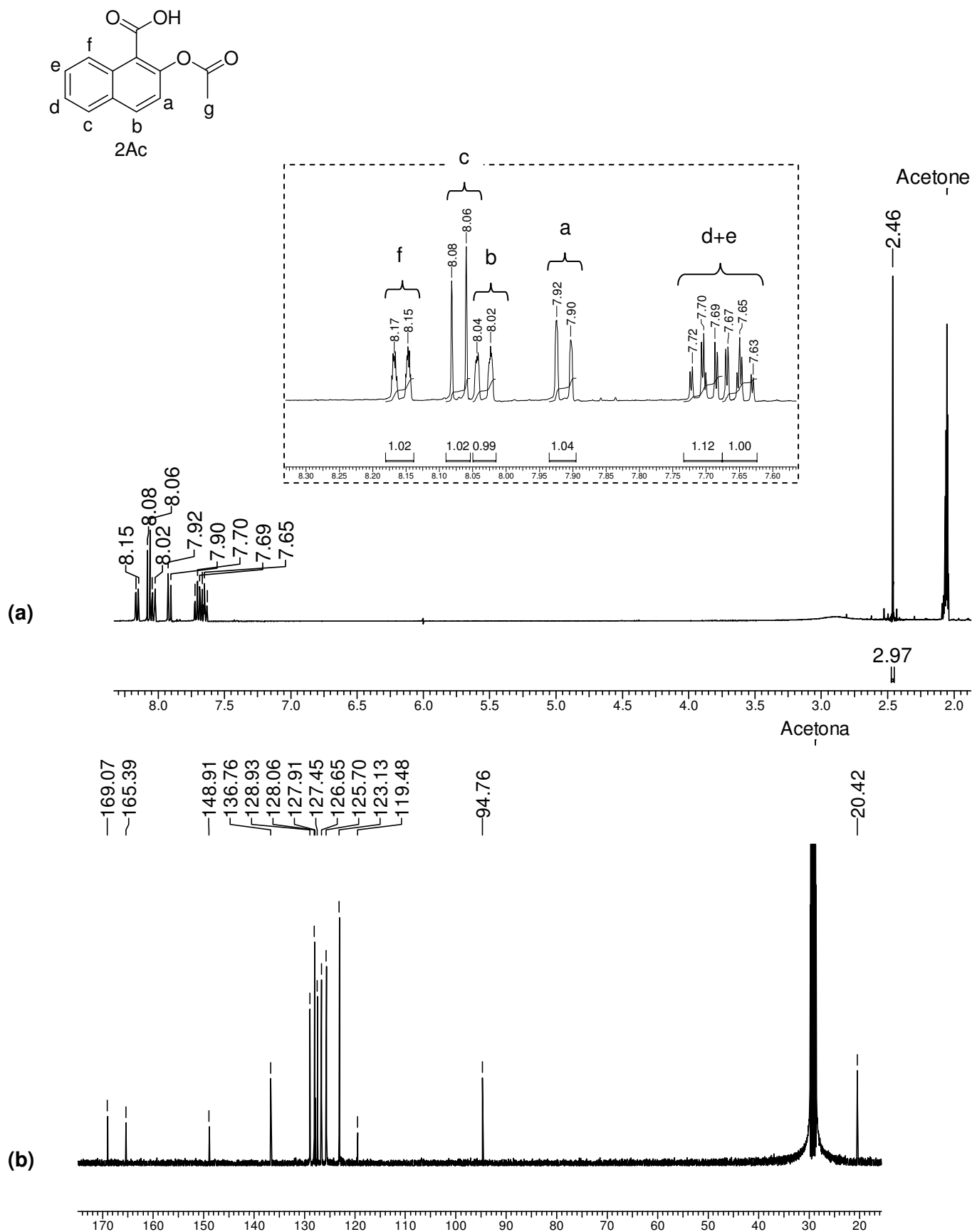
(a)



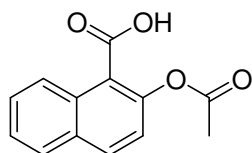
(b)



Apêndice C – Espectros de IV (a) e (b) massas no modo negativo do 8Ac.

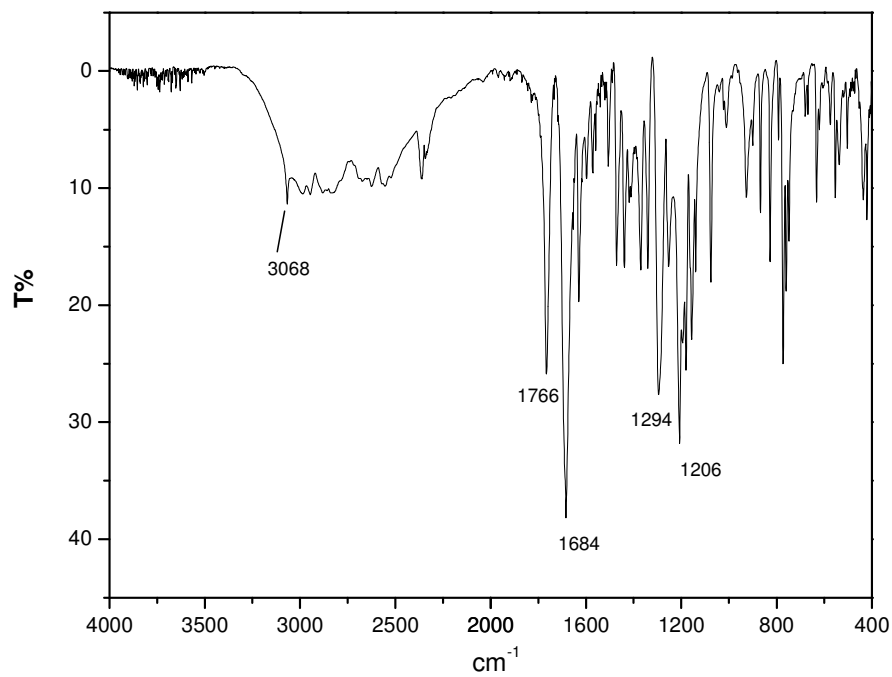


Apêndice D – Espectros de RMN de **(a)** ¹H (400MHz) e **(b)** ¹³C (100,6MHz) do **2Ac** em acetona *d*₆.

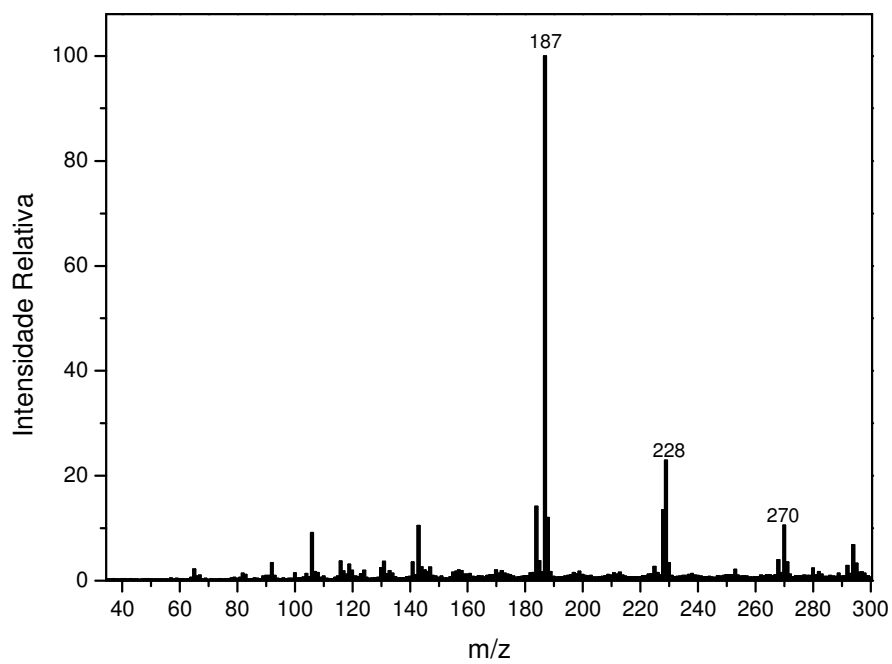


2Ac

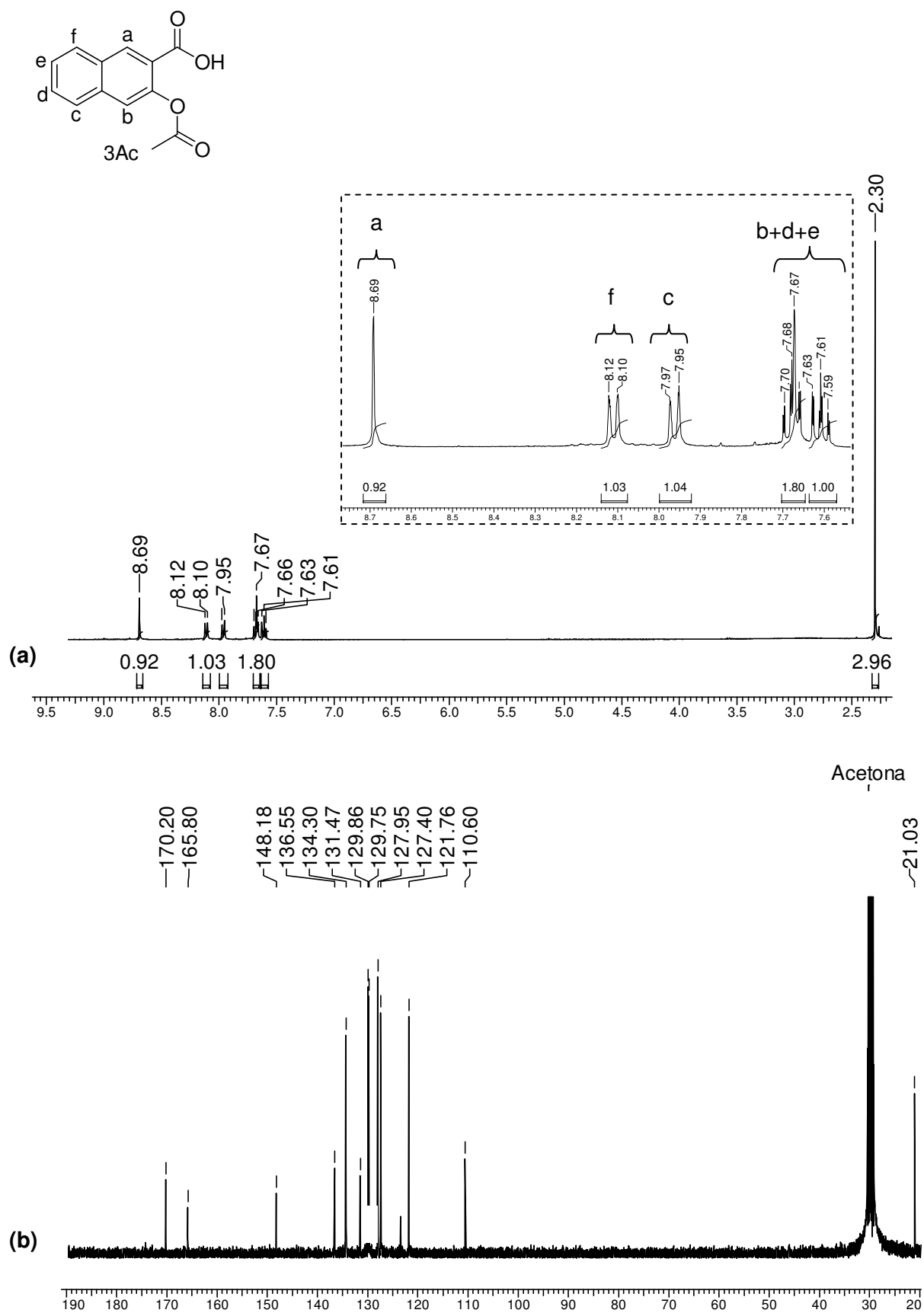
(a)



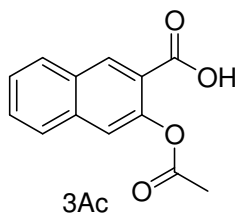
(b)



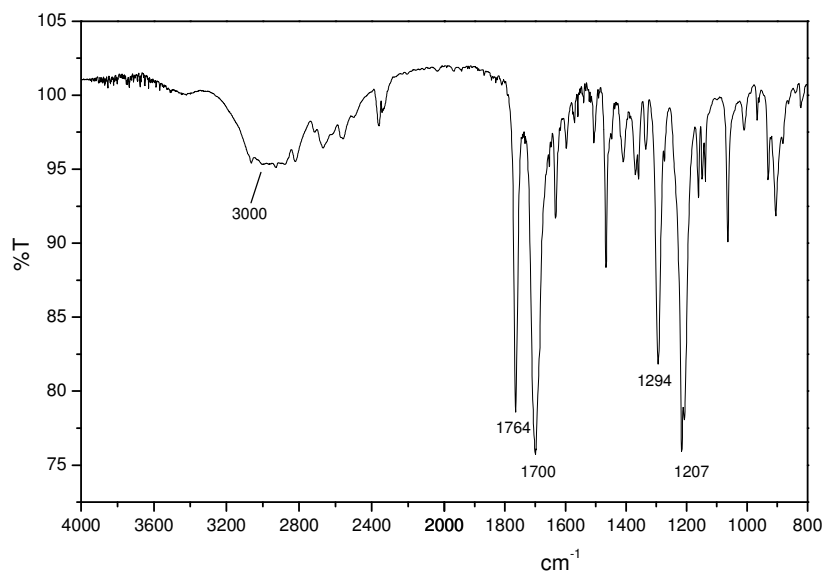
Apêndice E – Espectros de IV (a) e (b) massas no modo negativo do 2Ac.



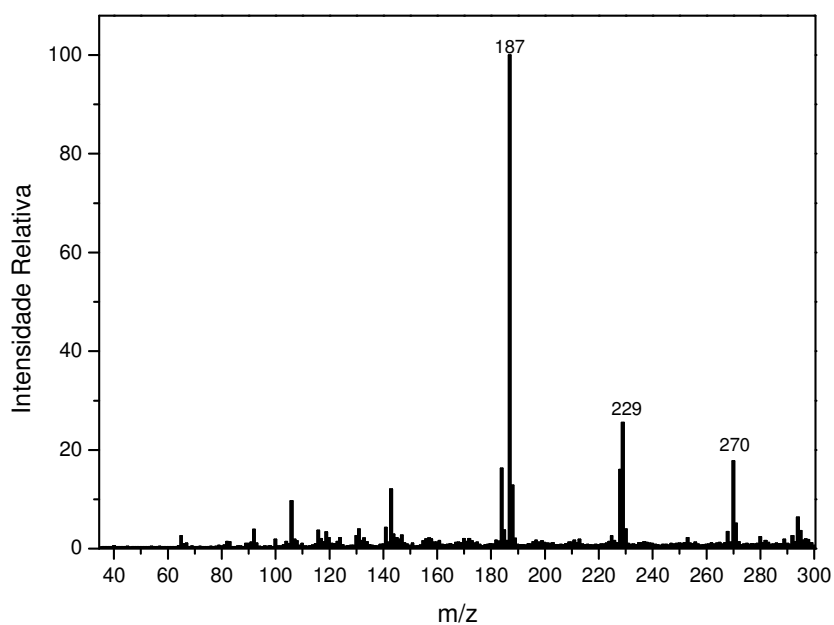
Apêndice F – Espectros de RMN de **(a)** ^1H (400MHz) e **(b)** ^{13}C (100,6MHz) do **3Ac** em acetona d_6 .



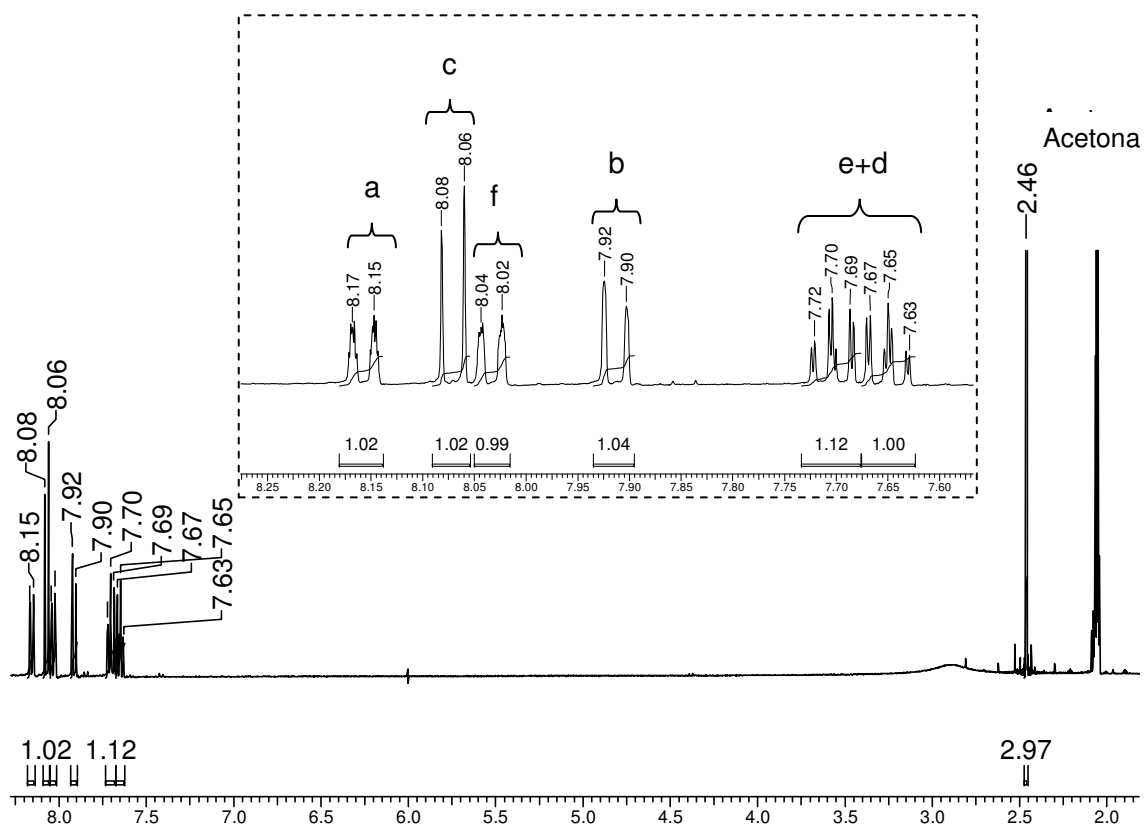
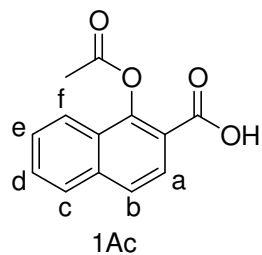
(a)



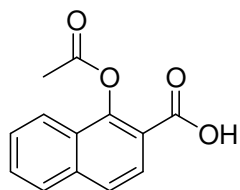
(b)



Apêndice G – Espectros de IV (a) e (b) massas no modo negativo do **3Ac**.

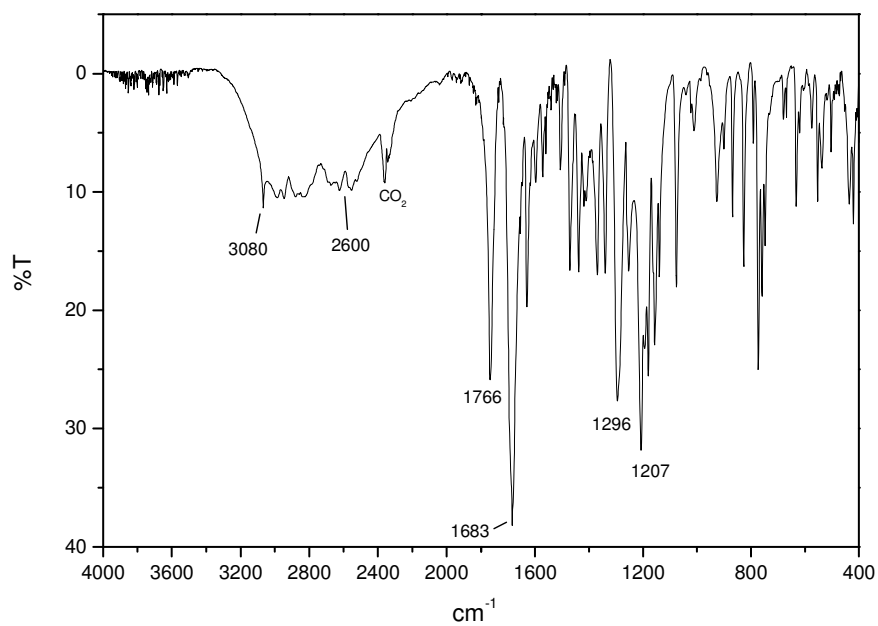


Apêndice H - Espectro de RMN de ^1H (400MHz) do **1Ac** em acetona d_6 .

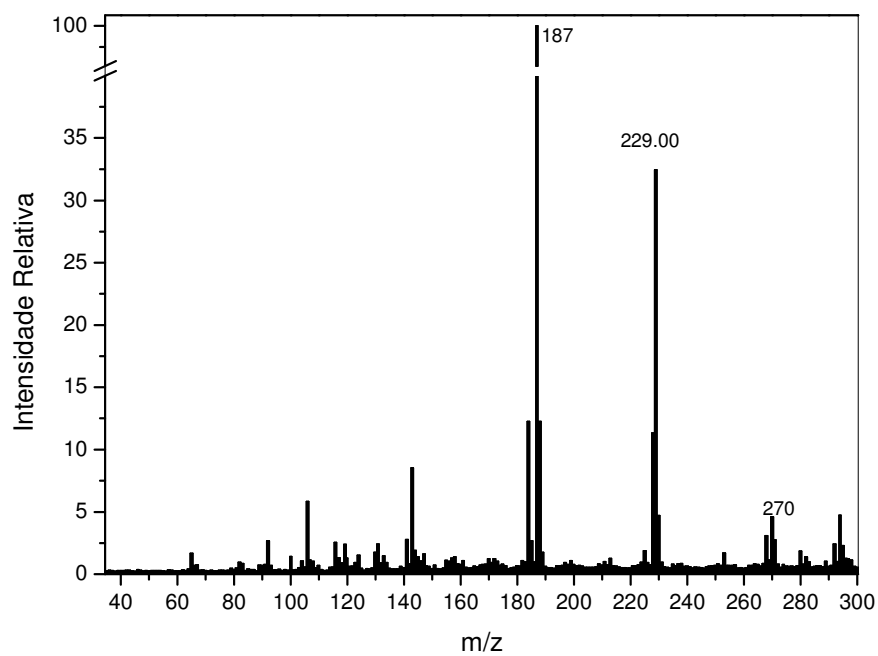


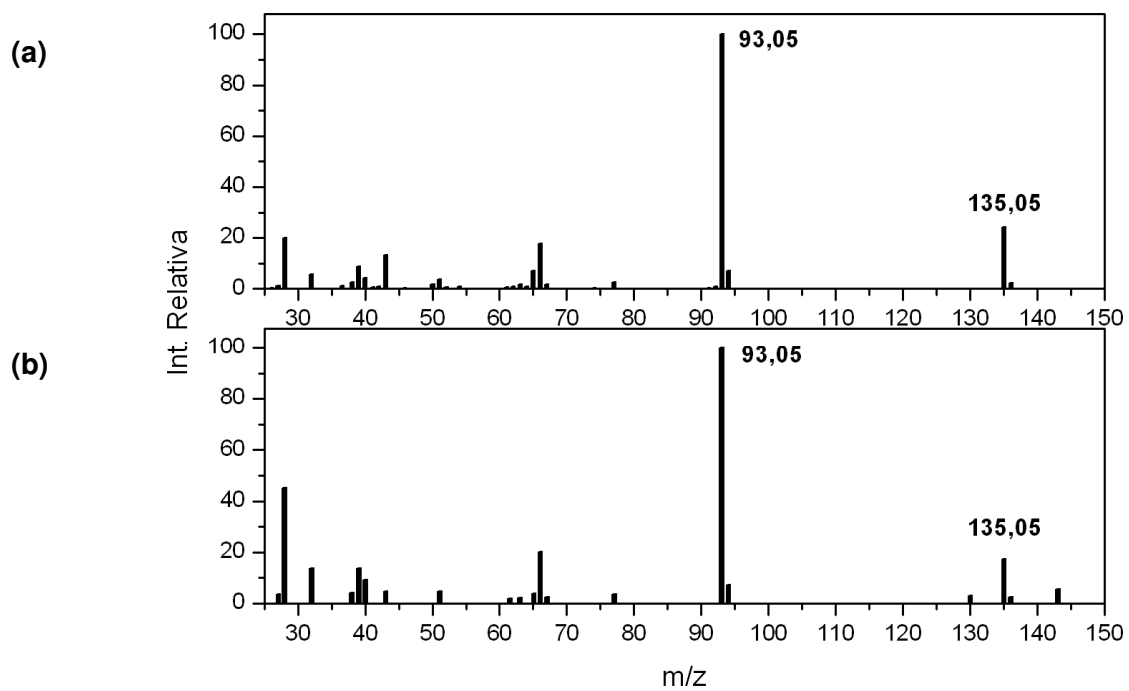
1Ac

(a)



(b)

**Apêndice I – Espectros de IV (a) e (b) massas no modo negativo do 1Ac.**



Apêndice J – Espectros de massas da (a) acetanilida padrão e (b) acetanilida proveniente da reação de hidrólise do **1Ac** na presença de anilina.