

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

Alex Molina Manfredi

**REAÇÕES DE TRANSFERÊNCIA DO GRUPO FOSFORILA
CATALISADAS POR OXIMAS E ÍONS Cu^{2+}
EM MEIO MICELAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Florianópolis
2012

Alex Molina Manfredi

REAÇÕES DE TRANSFERÊNCIA DO GRUPO FOSFORILA
CATALISADAS POR OXIMAS E ÍONS Cu^{2+}
EM MEIO MICELAR

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 16 de fevereiro de 2012.

Prof. Almir Spinelli, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Faruk J. Nome Aguilera
Orientador
QMC/CFM/UFSC

Prof. Dr. Santiago J. Nunes
QMC/CFM/UFSC

Prof.^a Dra. Maria da G. Nascimento
QMC/CFM/UFSC

Prof. Gustavo A. Micke
QMC/CFM/UFSC

Aos meus pais, Sônia e Gilmar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof^o Faruk Nome e à Prof^a Haidi Fiedler pela orientação e sabedoria transmitida durante os anos de nossa convivência. Tenho grande respeito pelos trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório e pretendo continuar colaborando com os projetos durante o doutorado. Aos meus queridos colegas dos laboratórios 312 e 203 (Departamento de Química, UFSC), que diversas vezes estiveram ao meu lado para me apoiar e descontraír. Um agradecimento especial à Michelle Medeiros, que participa de maneira intensiva em meu trabalho e proporciona uma amizade incontestável. Ao Pedro Oliveira pela colaboração na parte de síntese e pelos ensinamentos para a futura manipulação do equipamento de RMN. Ao meu grande amigo Bruno S. Souza pelo auxílio nas discussões e procedimentos experimentais. À Elisa S. Orth, que mesmo à distância disponibilizou-se a apoiar e a colaborar com meu trabalho. À minha amiga Franciane Dutra, que compartilhou conhecimentos na disciplinas realizadas durante o mestrado.

Agradeço também ao Prof^o Gustavo Micke (UFSC) e aos alunos Daniel Spudeit, Giovanna Bataglion e Jorge Alberto Pedro pela realização em conjunto do experimento de eletroforese capilar. Ao Prof^o Anthony Kirby (Cambridge University), pela contribuição na discussão e futuros tratamentos de dados. Ao Prof^o Ângelo da Cunha Pinto (UFRJ), por enviar as oximas aqui estudadas e disponibilizar-se para compartilhar idéias para o desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca, Maria da Graça Nascimento, Gustavo Amadeu Micke e Santiago Francisco Yunes pelo aceite ao convite para correção e colaboração nessa dissertação de mestrado. Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação em Química (UFSC), Grace Hoeller e Jadir Carminatti, sempre disponíveis para o auxílio na questões acadêmicas.

À minha família, que me proporcionou o conforto necessário para que eu pudesse realizar meus estudos e que colaboraram de forma individual para o meu bem-estar. Espero poder retribuir da melhor maneira possível.

Aos órgãos de fomento, INCT-Catálise, CNPq, CAPES, FAPESC e FAPESP, pelo auxílio financeiro e a UFSC por todo o amparo acadêmico.

O pessimista se queixa do vento,
o otimista espera que ele mude
e o realista ajusta as velas.”

(William George Ward)

RESUMO

Na intenção de se construir modelos bio-inspirados baseados nas características de fosfoesterases, o presente trabalho relata o desenvolvimento de novos modelos teóricos com o intuito de explicar a eficiência catalítica de oximas e de íons Cu^{2+} nas reações de ésteres de fosfato, principalmente devido à sua importância em sistemas biológicos e também na degradação de compostos organofosforados tóxicos. Nesse sentido, as oximas mostraram ser nucleófilos muito eficientes na reação com o diéster bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) quando realizada em meio micelar catiônico (**CTABr**). Essa reação foi descrita com êxito utilizando-se o modelo de pseudo-fase e troca iônica, e permitiu o ajuste eficiente dos dados experimentais. Tendo em vista a reação de hidrólise espontânea do **BDNPP** em pH 10, onde o tempo de reação pode chegar a 40 dias, observou-se que a reação é acelerada significativamente e ocorreu em apenas 9 minutos. Avaliou-se também a reação de hidrólise do triéster *tris*-2-piridil fosfato (**2-TPP**), na presença de diferentes íons metálicos divalentes, sendo que a reação realizada em meio micelar aniônico (**SDS**), promoveu um efeito catalítico de até 6400 vezes na presença de íons Cu^{2+} , quando comparado com a reação feita em água. Salienta-se que a reação de hidrólise do *tris*-3-piridil fosfato (**3-TPP**) apresentou um efeito catalítico muito inferior ao observado para o isômero **2-TPP**, em relação às reações realizadas em água pura. Este resultado indicou que a posição do átomo de nitrogênio no anel aromático possui um papel fundamental como centro de coordenação para os íons Cu^{2+} no estado de transição.

Palavras Chaves: alfa-nucleófilo, oxima, catálise micelar, ésteres de fosfato.

Abstract

In order to build bio-inspired models based on characteristics of phosphoesterases, the present work reports the development of some new theoretical models in order to explain the catalytic efficiency of oximes and metal ions in the hydrolysis reactions of phosphate esters, mainly due to its importance in biological systems and also in the degradation of toxic organophosphorus compounds. Thus, oximes proved to be very efficient nucleophiles in hydrolysis reaction with the diester bis (2,4-dinitrophenyl) phosphate (**BDNPP**) when realized in a cationic micellar medium (**CTABr**). This reaction was successfully described using the pseudo-phase ion exchange model, which allowed to fit the experimental data efficiently. Considering the spontaneous hydrolysis reaction of **BDNPP** at pH 10, where the reaction time can reach 40 days, the reaction was accelerated significantly and occurred in stunning 9 minutes. In addition, the hydrolysis reaction of the triester tris-2-pyridyl phosphate (**2-TPP**) was evaluated in the presence of different divalent metal ions, and when an anionic micellar medium (**SDS**) was used, a catalytic effect up to 6400 times in the presence of Cu^{2+} ions was observed when compared with the same reaction in water. The hydrolysis reaction of the tris-3-pyridyl phosphate (**3-TPP**) showed a much lower catalytic effect than that observed for the isomer **2-TPP**, for the reactions in pure water. These results indicated that the position of the nitrogen atom in the aromatic ring had a key role as a coordinating center for the Cu^{2+} ions in the transition state.

Keywords: alpha-nucleophile, oxime, micellar catalysis, phosphate esters.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação estrutural dos ésteres de fosfato.	20
Figura 2 – Representação estrutural dos agentes neurotóxicos tipo V e de alguns pesticidas.	22
Figura 3 – Detoxificação do agente neurotóxico VX.	22
Figura 4 – Mecanismos de transferência do grupo fosforila.	23
Figura 5 – Formação do íon metafosfato.	24
Figura 6 – Ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico.	24
Figura 7 - Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila.	25
Figura 8 – Pré-equilíbrio de transferência de próton.	26
Figura 9 – Representação de uma micela esférica.	28
Figura 10 – Reação em meio micelar catiônico e aniônico.	30
Figura 11 – Representação estrutural de alguns nucleófilos com efeito alfa.	32
Figura 12 – Estabilização do estado de transição.	32
Figura 13 – Gráfico de $\log k_{\text{obs}}$ versus pH para o ataque nucleofílico da NH_2OH sobre o BDNPP (■) e da hidrólise espontânea do BDNPP à 25°C (♦). ⁴⁴	33
Figura 14 – Espécie ativa da Pralidoxima.	35
Figura 15 – Representação simplificada da clivagem do DNA pela ação da enzima exonuclease 3'-5': (A) incluindo um centro metálico M^{2+} ; e (B) incluindo dois centros metálicos (M_A^{2+} e M_B^{2+}).	37
Figura 16 – Modelos propostos para o ataque nucleofílico da água ou íon hidróxido (Nu:) na reação de hidrólise dos ésteres de fosfato (4c). ⁶⁰	38
Figura 17 – Espectros para determinação de pKa das oximas 5 (A) e 6 (B), à 25°C e (1×10^{-4} M) para cada oxima, em água.	46
Figura 18 (A) Dados experimentais da titulação espectrofotométrica da oxima 5 (1×10^{-4} M); e (B) distribuições de espécies neutra e ionizada da oxima 5 em função do pH, à 25°C.	48
Figura 19 (C) Dados experimentais da titulação espectrofotométrica da oxima 6 1×10^{-4} M; e (D) distribuições de espécies neutra e ionizada da oxima 6 em função do pH, à 25°C.	49
Figura 20 – Incorporação de BDNPP e oximas 5 e 6 (2×10^{-4} M) em CTABr - pH 10, dados a 25°C.	51
Figura 21 – (A) Espectros sucessivos típicos de UV-Vis para a hidrólise do BDNPP ($1,33 \times 10^{-5}$ M), na presença da oxima 5 (5×10^{-5} M) a 25°C,	

pH = 10 e $\mu = 1,0 \text{ M (KCl)}$; (B) Gráfico de absorvância em função do tempo de reação em $\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$ para a cinética ilustrada na Figura 21 (A)..... 52

Figura 22 – Efeito da concentração de CTABr na constante de velocidade observada (k_{obs}) para a reação do BDNPP com: (A) oxima 5 ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$); e (B) oxima 6, à 25°C , pH 10 e $1,33 \times 10^{-5} \text{ M}$ de BDNPP. 54

Figura 23 – (A) Espectros sucessivos de UV-Vis. (B) Gráfico de absorvância em função do tempo de reação em $\lambda_{\text{máx}} = 294 \text{ nm}$. Dados para a reação entre 2-TPP ($5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) e Cu^{2+} ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$) a 25°C e pH = 6. 59

Figura 24 – Variação de k_{obs} em função do pH para a hidrólise do 2-TPP ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) em : H_2O (■)⁵⁹; Cu^{2+} , $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ (▲); SDS, $8 \times 10^{-3} \text{ M}$ (●) e SDS + Cu^{2+} (▼), à 25°C 60

Figura 25 – Isoterma de Langmuir para a incorporação de 2-TPP ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) em SDS, pH 6, dados a 25°C 62

Figura 26 - Perfil de concentração para a hidrólise do 2-TPP ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) em : SDS (●) e SDS + Cu^{2+} ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$) (■), à 25°C e pH 6. 63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Representação estrutural de algumas classes de surfactantes.	29
Tabela 2 – Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 22, para as reações do BDNPP com as oximas 5 e 6 na presença de CTABr.....	57
Tabela 3 – Efeito da catálise micelar para a reação de hidrólise do 2-TPP na presença de íons Cu^{2+} em pH 6, à 25°C.....	64
Tabela 4 – Efeito da catálise micelar para a reação de hidrólise do 3-TPP na presença de íons Cu^{2+} em pH 6, à 25°C.....	65

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2PAM – Pralidoxima

2-TPP - *tris*-2-piridil fosfato

3-TPP - *tris*-3-piridil fosfato

ATP – trifosfato de adenosina

CMC – concentração micelar crítica

CTABr – brometo de cetilmetil amônio

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNP – 2,4-dinitrofenol

EA 2192 - ácido S-(2-diisopropilaminoetil)-metilfosfonotioico

k₀ – constante de velocidade de segunda ordem para a reação espontânea

k₂ – constante de velocidade de segunda ordem

k_{2m} – constante de velocidade de segunda ordem na fase micelar

k_{2w} – constante de velocidade de segunda ordem na faz aquosa

K_N – constante de incorporação do nucleófilo na fase micelar

k_N – constante de velocidade de segunda ordem nucleofílica

k_{obs} – constante de velocidade observada

k_{OH} – constante de velocidade de segunda ordem para reação com hidróxido

K_s – constante de incorporação do substrato na fase micelar

K_{xy} – constante de troca iônica

NH₂OH – hidroxilamina

pKa – logaritmo da constante de dissociação de uma espécie ácida

PNPDPP - p-nitrofenil difenil fosfato

RNA – ácido ribonucléico

SDS – dodecilsulfato de sódio

t_{1/2} – tempo de meia-vida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	ÉSTERES DE FOSFATO.....	20
1.1.1	<i>Mecanismos de Transferência do Grupo Fosforila.....</i>	<i>23</i>
1.2	MICELAS.....	28
1.2.1	<i>Catálise Micelar.....</i>	<i>30</i>
1.3	NUCLEÓFILOS COM EFEITO ALFA.....	31
1.3.1	<i>Reações de Oximas com Ésteres de Fosfato.....</i>	<i>34</i>
1.4	REAÇÕES DE ÉSTERES DE FOSFATO NA PRESENÇA DE ÍONS METÁLICOS.....	36
2	OBJETIVOS.....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	REAGENTES.....	42
3.2	SÍNTESE DO <i>TRIS</i> -3-PIRIDIL FOSFATO (3-TPP).....	42
3.3	MEDIDAS CINÉTICAS.....	43
3.4	TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....	43
3.5	MEDIDAS DE ELETROFORESE CAPILAR.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	REAÇÕES DE OXIMAS COM ÉSTERES DE FOSFATO.....	45
4.1.1	<i>Titulação Espectrofotométrica das Oximas 5 e 6.....</i>	<i>45</i>
4.2	DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INCORPORAÇÃO DAS OXIMAS 5 E 6 EM MICELAS CATIÔNICAS POR ELETROFORESE CAPILAR.....	49
4.3	ESTUDOS CINÉTICOS DA REAÇÃO DO BDNPP COM AS OXIMAS 5 E 6 EM MEIO MICELAR CATIÔNICO (CTABr).....	51
4.4	ESTUDOS CINÉTICOS DAS HIDRÓLISES DO 2-TPP E 3-TPP NA PRESENÇA DE ÍONS Cu^{2+} EM MEIO MICELAR ANIÔNICO ...	58
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	66
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÉSTERES DE FOSFATO

Os ésteres de fosfato estão incluídos em uma classe de compostos extremamente numerosos e são classificados em três categorias distintas: **(i)** monoésteres; **(ii)** diésteres; e **(iii)** triésteres, de acordo com o número de radicais alquila e/ou arila substituindo os hidróxidos do ácido fosfórico (**Figura 1**). Além disso, os mono- e diésteres de fosfato apresentam hidrogênios ionizáveis, o que confere aos mesmos reatividades diferenciadas em função do pH.¹

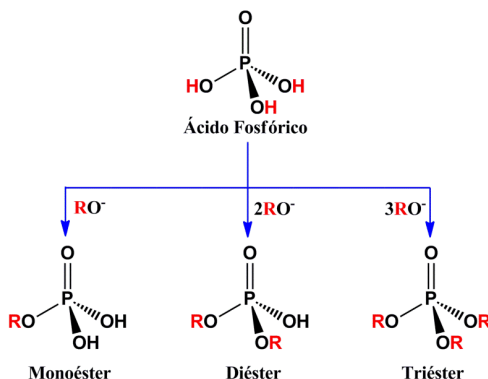


Figura 1 – Representação estrutural dos ésteres de fosfato.

Com exceção dos triésteres, os ésteres de fosfato apresentam uma função vital nos sistemas biológicos e estão presentes em alguns processos extremamente importantes, como por exemplo, no armazenamento e transmissão da informação genética (**DNA** e **RNA**),² nos processos de sinalização e regulação da atividade celular,³ bem como no fornecimento de energia através de anidridos fosfóricos altamente energéticos, como o **ATP**.⁴⁻⁵

Contudo, além de sua importância em processos biológicos, os ésteres de fosfato apresentam diversas aplicações na indústria. Dentre essas aplicações, pode-se citar: **(i)** fabricação de plastificantes; **(ii)**

utilização como reagentes na preparação de polímeros organofosforados; (iii) complexantes de metais pesados e (iv) produção de inseticidas e compostos tóxicos utilizados em armas de guerra.⁶

Sabe-se que a importância biológica dos ésteres de fosfato está inerentemente relacionada à alta estabilidade da ligação P-O, que pode levar milhões de anos para ser quebrada.⁷ Dessa forma, a solução encontrada pela natureza para assegurar a perpetuação dos seres vivos, deu-se pela utilização dessas ligações para formar os fosfodiésteres **DNA** e **RNA**. Um exemplo clássico estudado por Kirby e colaboradores, mostrou que o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a hidrólise espontânea do difenilfosfato é de 180 anos a 100°C.⁸ Tal estabilidade é coerente com o papel fundamental do **DNA** na preservação da informação genética.

Nesse contexto, a escolha desses compostos organofosforados para a fabricação de pesticidas e outros compostos tóxicos, deu-se pela relativa estabilidade da ligação P-O presente nos triésteres de fosfato, tornando-os resistentes à ação da água, do solo e do ar, podendo assim atingir o seu alvo sem sofrer alterações químicas.⁶

Dentre esses compostos, destacam-se os agentes neurotóxicos do **tipo V**, bem como alguns inseticidas e pesticidas representados estruturalmente na **Figura 2**.⁹ Esses compostos são capazes de inibir a ação de algumas enzimas, principalmente a acetilcolinesterase, a qual é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Sendo assim, na ausência da acetilcolinesterase, a acetilcolina fica acumulada nas células e pode levar a um colapso do sistema nervoso central.¹⁰

Embora muitas reações químicas possam ser empregadas para detoxificar agentes químicos de guerra, somente algumas na prática podem ser utilizadas em uma neutralização, sendo que estas reações precisam ser simples e os reagentes empregados devem ser estáveis, baratos e de baixa massa molar.¹¹

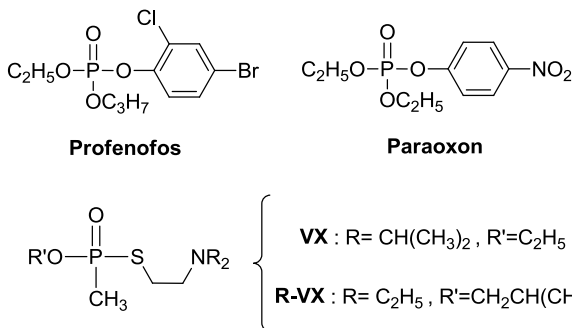


Figura 2 – Representação estrutural dos agentes neurotóxicos tipo V e de alguns pesticidas.

Durante a detoxificação do agente neurotóxico **VX**, por exemplo, pode haver a formação do produto de hidrólise **EA 2192** (ácido S-(2-diisopropilaminoetil)-metilfosfonotioico), que é persistente no meio ambiente e apresenta significativa atividade anticolinesterase, **Figura 3**.¹² Sendo assim, uma estratégia alternativa consiste no uso de nucleófilos mais eficientes, que produzam clivagem quantitativa da ligação P-O. Dentro desta alternativa, a utilização de nucleófilos detentores do efeito alfa (discutido no **item 1.3**) parece constituir uma estratégia bastante vantajosa.

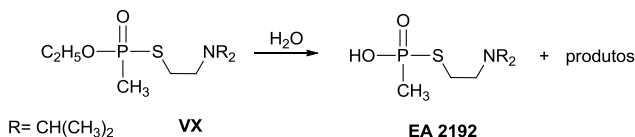


Figura 3 – Detoxificação do agente neurotóxico VX.

Nesse sentido, o grupo de pesquisa do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais (**LaCFI**) tem um grande interesse pela química dos ésteres de fosfato, principalmente no que se refere à compreensão dos mecanismos, da identificação dos intermediários formados, e da modelagem da estrutura do estado de transição (E.T.). Dentre os mais variados sistemas estudados, este trabalho tem como pontos centrais as

reações que utilizam nucleófilos detentores do efeito alfa, estudos em meio micelar, e a hidrólise na presença de centros metálicos.

1.1.1 Mecanismos de Transferência do Grupo Fosforila

As transferências do grupo fosforila são reações de substituição nucleofílica, cujos mecanismos são conhecidos e podem ocorrer: (i) com o ataque do nucleófilo ao átomo de carbono da ligação P-O-C e com a quebra da ligação C-O, onde o grupo fosfato é substituído pelo nucleófilo e; (ii) com o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo central, deslocando o álcool ou alcóxido via quebra da ligação P-O (**Figura 4**).

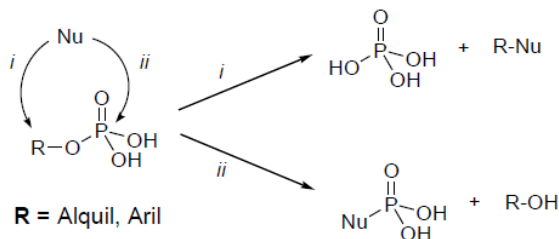


Figura 4 – Mecanismos de transferência do grupo fosforila.

O mecanismo *via* quebra da ligação C-O ocorre preferencialmente em pHs mais baixos, em que o grupo de saída formado é o ácido fosfórico neutro. Já em pHs mais altos, quando o grupo fosfato do substrato possui pelo menos uma carga negativa, a hidrólise ocorre com a quebra da ligação P-O, podendo seguir três caminhos: dissociativo, associativo e concertado.¹⁶ O mecanismo dissociativo também conhecido como S_N1 para a química do carbono, ocorre em duas etapas: a formação do íon metafosfato e o ataque do nucleófilo sobre o íon formado na etapa anterior (**Figura 5**).

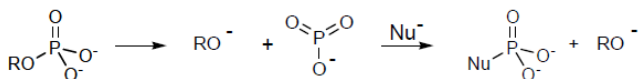


Figura 5 – Formação do íon metafosfato.

O mecanismo associativo, conhecido como $\text{S}_{\text{N}}2$ para a química do carbono, apresenta-se em duas etapas, adição e eliminação. Inicialmente, ocorre o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico levando à formação de um intermediário ou estado de transição pentacoordenado, conforme mostrado no **Figura 6**.

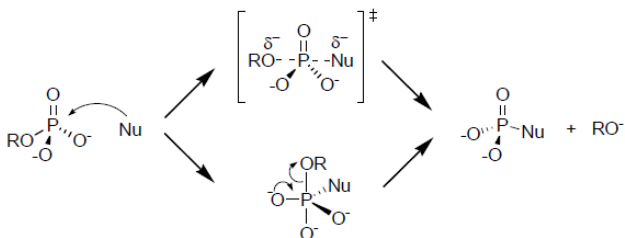


Figura 6 – Ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico.

Uma maneira muito útil para visualizar os mecanismos é através do diagrama simplificado de coordenada de reação de More O’Ferrall-Jencks, conforme mostrado na **Figura 7**. Neste diagrama, observa-se uma coordenada na qual o progresso do ataque nucleofílico é representado pelo eixo “distância P-X”, e uma segunda coordenada, referente à eliminação do grupo de saída, representada pelo eixo “distância P-Y”.

Observa-se que os mecanismos com mais de uma etapa de reação seguem os caminhos que acompanham as bordas do diagrama, enquanto que os mecanismos concertados seguem caminhos no interior do diagrama. Assim, os intermediários das reações que seguem os caminhos pelas bordas do diagrama correspondem ao átomo de fósforo pentacoordenado, com geometria tipo bipirâmide trigonal (ii) e a espécie trigonal (iii) que é o íon metafosfato.

A separação entre esses mecanismos é somente instrucional, pois normalmente as reações são concertadas. Geralmente, os estados de

transição envolvidos nas reações de triésteres e diésteres fosfóricos estão localizados entre o mecanismo associativo e concertado, e os envolvidos nas reações de monoésteres estão entre o mecanismo dissociativo e concertado.

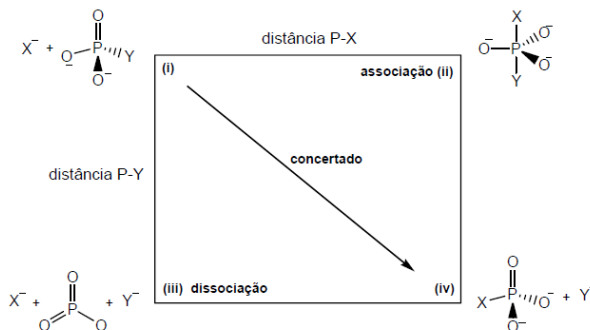
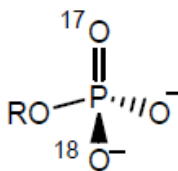


Figura 7 - Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila.

Inicialmente acreditava-se que o mecanismo de hidrólise de monoésteres de fosfato em pHs neutros ou alcalinos era puramente dissociativo, semelhante ao tipo S_N1 para a química do carbono, onde a etapa determinante da velocidade de reação é a formação do ânion instável metafosfato (**Figura 5**).¹⁷ O ânion metafosfato só existe como espécie estável na fase gasosa onde é surpreendentemente pouco reativo¹⁸ e, como nunca foi identificado em meio aquoso, há forte discordância em relação à ocorrência do mecanismo puramente dissociativo, principalmente depois que foi observada uma certa dependência entre a constante de velocidade de reação com a basicidade dos nucleófilos, o qual indica um estado de transição levemente associado.¹⁹ Além disso, a observação da inversão da configuração de um éster quiral como **1**, em vez da racemização esperada para um mecanismo do tipo S_N1 , tem apontado um mecanismo parcialmente associativo como candidato mais provável em meio aquoso.²⁰



1

Outros estudos confirmam o mecanismo dissociativo, principalmente quando a reação de transferência do grupo fosforila é realizada em solventes não aquosos, onde o íon metafosfato passa a ser beneficiado, devido a pequena interação que ele e o grupo fosfato dianiônico tem com o solvente.²¹ Ainda, existe a hipótese de um pré-equilíbrio inicial, onde o próton de uma molécula de água é transferido para a forma dianiônica e, posteriormente, aconteceria o ataque nucleofílico do íon hidróxido formado (**Figura 8**).

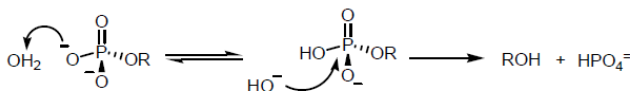
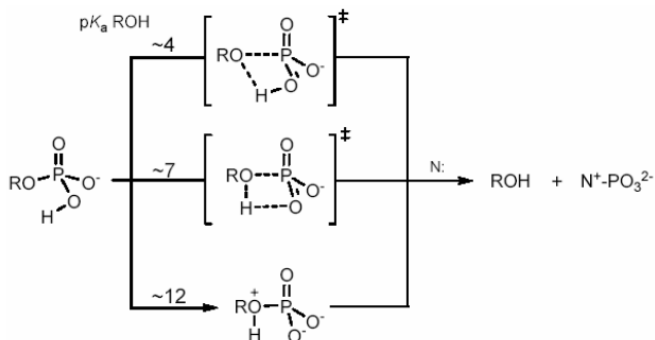


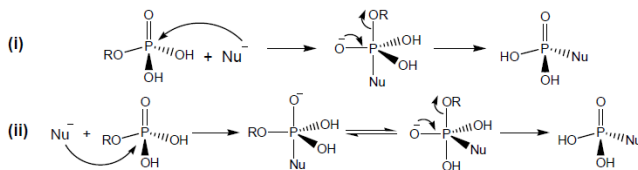
Figura 8 – Pré-equilíbrio de transferência de próton.

Este mecanismo envolve a transferência intramolecular de um próton para o grupo de saída como mostrado no **Esquema 1**.²² No estado de transição, a transferência intramolecular do próton é pouco importante em substratos com $pK_a(\text{grupo de saída})$ mais baixos, onde a quebra da ligação P-O parece estar mais avançada. À medida que o $pK_a(\text{grupo de saída})$ aumenta, o comprimento da ligação P-O se torna mais curto e a transferência do próton é antecipada até a formação de um intermediário dipolar, no qual a decomposição à produtos passa a ser a etapa determinante da velocidade da reação.²³ Em geral, a possibilidade de formação de um intermediário metafosfato não é descartada, pois a hidrólise do monoânion de fenil fosfato procede com inversão da estereoquímica, o qual indica que há um mecanismo concertado ou pré-associativo que passa por um intermediário metafosfato.



Esquema 1

Os mecanismos de transferência do grupo fosforila em triésteres e diésteres de fosfatos são mais associativos que em monoésteres, de forma que tanto os nucleófilos quanto os grupos de saída ocupam as posições apicais, visto que estas ligações são mais longas e lábeis (**Esquema 2**).



Esquema 2

Assim, dois mecanismos de ataque são conhecidos: **(i)** o ataque “em linha”, que ocorre quando a espécie pentacoordenada apresenta o nucleófilo e o grupo de saída nas posições apicais e; **(ii)** o ataque “adjacente”, em que o nucleófilo ataca pela face do grupo de saída e o intermediário formado deve rotar para deslocar o nucleófilo para a posição equatorial e deixar o grupo de saída na posição apical, na qual pode sair com maior facilidade.²⁴⁻²⁵

Portanto, os mecanismos de transferência do grupo fosforila dificilmente seguem um caminho puramente associativo ou dissociativo, mas um deles é favorecido dependendo de fatores como nucleofilicidade do grupo que ataca, impedimentos eletrostáticos e estéreos, pK_a do

grupo de saída, pH do meio, entre outros. De modo geral, di- e triésteres apresentam um mecanismo mais associativo que monoésteres de fosfato, cujo mecanismo tem características mais dissociativas.

A seguir serão abordados alguns conceitos em relação as micelas (**item 1.2**) e catálise micelar (**item 1.2.1**), de fundamental importância para o entendimento dos sistemas utilizados neste trabalho.

1.2 MICELAS

No ano de 1913, foi postulado que soluções diluídas de sais de ácidos graxos formam espontaneamente, segundo McBain e colaboradores,²⁶ agregados dinâmicos chamados de *micelas*, **Figura 9**. A agregação pode ocorrer de maneira cooperativa em soluções de compostos anfifílicos sintéticos ou naturais.

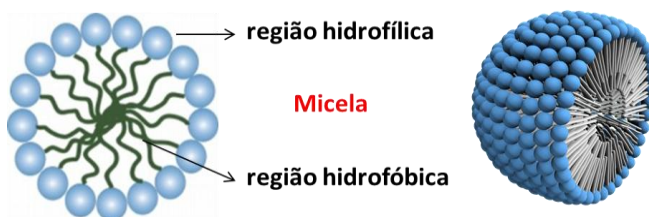


Figura 9 – Representação de uma micela esférica.

Estes compostos, também chamados de detergentes, agentes tensoativos ou surfactantes, possuem cadeias de hidrocarbonetos (região *hidrofóbica*) conectadas à grupos iônicos ou polares (região *hidrofílica*), sendo denominadas como moléculas *anfifílicas*. Ainda, dependendo da estrutura dos grupos polares, os surfactantes podem ser classificados como aniônicos, catiônicos, neutros ou zwitteriônicos. A porção apolar desses compostos pode divergir no comprimento, na presença de insaturações e/ou consistir de duas ou mais cadeias carbônicas.²⁷

Além disso, uma súbita mudança nas propriedades físicas das soluções de surfactantes em água pode ocorrer em um estreito limite de concentrações. Essa transição corresponde à formação de agregados e é denominada como **Concentração Micelar Crítica (CMC)**. Quando a solução consegue saturar a superfície (abaixo da **CMC**), as moléculas

do surfactante buscam uma organização que permita diminuir a energia livre do sistema. É neste ponto onde ocorre a formação dos agregados.²⁸⁻

³⁰ Graças à essa capacidade de modificar o meio reacional, os surfactantes podem ser utilizados em diversas áreas da química, permitindo a solubilização de espécies insolúveis, além de promover um meio capaz de modificar a velocidade das reações químicas.²⁹

Os surfactantes normalmente utilizados são os que possuem cadeia única, tais como o aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS), os catiônicos cloreto e brometo de cetiltrimetilamônio (CTACl e CTABr), além dos surfactantes neutros e zwitteriônicos (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Representação estrutural de algumas classes de surfactantes.

Tipo	Nome	Estrutura
Catiônico	CTA Br	
Aniônico	SDS	
Neutro	Triton X-100	
Zwitteriônico	SB3- 12	

Por fim, as micelas podem agir como “microreatores”, concentrando ou separando os reagentes e alterando as constantes de velocidade e constantes de equilíbrio das reações químicas.²⁷ Estes conceitos serão abordados no item a seguir.

1.2.1 Catálise Micelar

A busca por sistemas que mimetizam as reações catalisadas por enzimas tem estimulado pesquisas recentes na área de reações orgânicas catalisadas em meio micelar.³¹⁻³² Esses sistemas fornecem um meio mais simples para estudo e compreensão de reações orgânicas que acontecem em sistemas biológicos. De maneira geral, a capacidade das micelas de acelerar as reações químicas está intimamente relacionada com as interações entre os substratos e o meio micelar, por forças *hidrofóbicas* e *eletrostáticas*,³³ sendo que esta última é favorecida pela presença de reagentes iônicos que possuam cargas opostas ao da micela, conforme ilustrado na **Figura 10**.

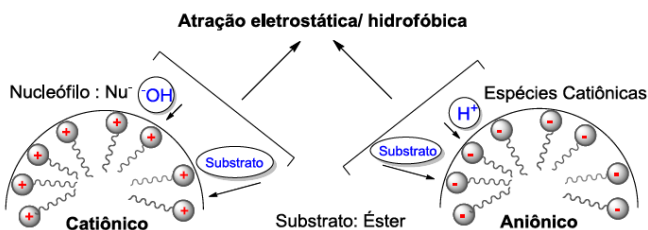


Figura 10 – Reação em meio micelar catiônico e aniônico.

Sendo assim, diversos estudos foram realizados para avaliar o efeito da catálise micelar em reações envolvendo ésteres de fosfato, e micelas catiônicas mostraram um efeito bastante significativo em reações de hidrólise em meio básico.³⁴⁻³⁶ Por exemplo, na reação de hidrólise em meio alcalino do bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) na presença do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (**CTABr**), observou-se um aumento na constante de velocidade da reação próximo à 30 vezes (pH 8), comparando com a reação em água, nas mesmas condições.³⁵

Na tentativa de descrever o sistema catalítico em meio micelar, alguns modelos foram desenvolvidos e aprimorados, sendo que o tratamento dos dados envolve conceitos matemáticos complexos com várias variáveis utilizadas para descrever o aumento de constante de velocidade. Um modelo bastante utilizado e que ajuda a diferenciar as reações em meio aquoso e micelar, é o baseado na teoria de **pseudofase**

esse efeito estão as hidroxilaminas, ácidos hidroxâmicos, hidrazinas, hidroperóxidos, nitritos, sulfitos e oximas,⁶ **Figura 11**.

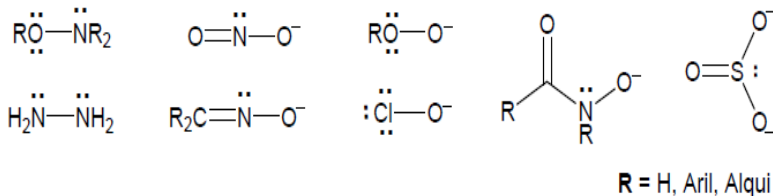


Figura 11 – Representação estrutural de alguns nucleófilos com efeito alfa.

De maneira geral, a excepcional reatividade atribuída a esses nucleófilos pode ser explicada de diversas formas: **(i)** a deficiência de elétrons do átomo Y no estado de transição, **Figura 12**, que ocorre em decorrência da formação da ligação com o centro eletrofílico, é compensada e estabilizada por ressonância;³⁸ **(ii)** o aumento da reatividade é devido a repulsão eletrostática entre os elétrons do centro nucleofílico e do átomo adjacente, o que torna o nucleófilo alfa instável e, como conseqüência, desestabiliza o estado fundamental;³⁹ **(iii)** a transferência de elétrons pode estabilizar o estado de transição e torná-lo mais adiantado, ou seja, as ligações entre o nucleófilo e o substrato estão mais avançadas no estado de transição que aquelas formadas pelos nucleófilos normais.⁴⁰

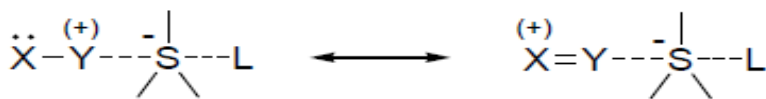


Figura 12 – Estabilização do estado de transição.

A magnitude do efeito alfa tem sido vastamente discutida na literatura,⁴¹⁻⁴³ e a hidroxilamina (**NH₂OH**) destaca-se tanto por sua elevada reatividade, quanto, principalmente, pelo seu caráter

ambidentado. Isto é, o centro de ataque nucleofílico pode ser tanto pelo átomo de oxigênio quanto pelo átomo de nitrogênio. Um exemplo da magnitude dos efeitos observados pode ser visualizado na variação da constante de velocidade de primeira ordem em função do pH do meio, para a reação do bis-(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) com a hidroxilamina, **Figura 13**.⁴⁴ Na região entre pH = 6,5 e 10,5 a reação da espécie neutra, mostra uma constante de velocidade de reação independente do pH e que apresenta uma constante de velocidade 1000 vezes maior que a constante de velocidade da reação espontânea da água.

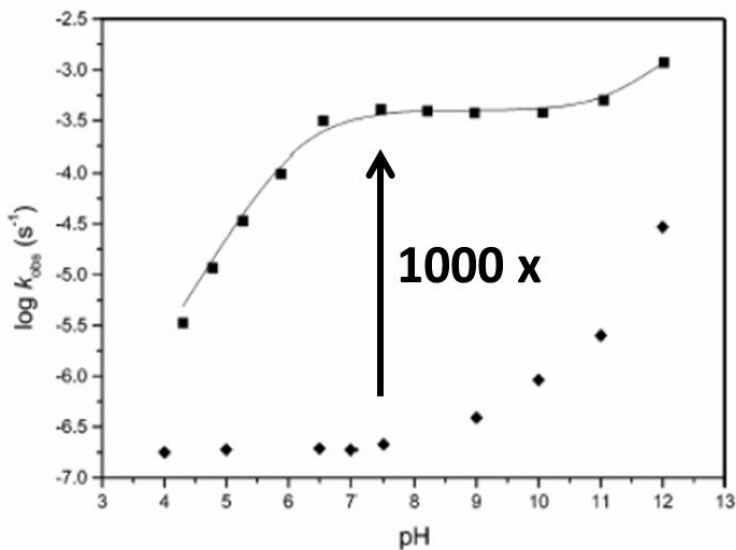


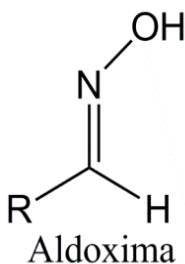
Figura 13 – Gráfico de $\log k_{obs}$ versus pH para o ataque nucleofílico da NH_2OH sobre o BDNPP (■) e da hidrólise espontânea do BDNPP à 25°C (◆).⁴⁴

Apesar da grande quantidade de reações descritas na literatura, os mecanismos das reações de transferência de grupos fosforila de mono, di- e triésteres de fosfato ainda não estão totalmente esclarecidos do ponto de vista mecanístico. Nesse sentido, com a aquisição de novos equipamentos, o grupo de pesquisa **LaCFI** vem contribuindo ao longo

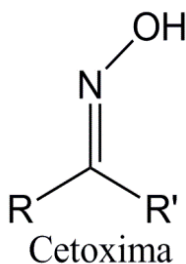
dos anos para a identificação experimental de intermediários e produtos de algumas dessas reações.

1.3.1 Reações de Oximas com Ésteres de Fosfato

As oximas são compostos orgânicos que possuem fórmula geral $RR'C=NOH$. Quando os grupos R e R' representam cadeias orgânicas, as oximas são classificadas como *cetoximas*, e quando R ou R' representa um átomo de hidrogênio, são classificadas como *aldoximas*. Além disso, elas podem ser encontradas sob duas formas geométricas distintas, a forma E (isômero *trans*) e a forma Z (isômero *cis*).⁴⁵

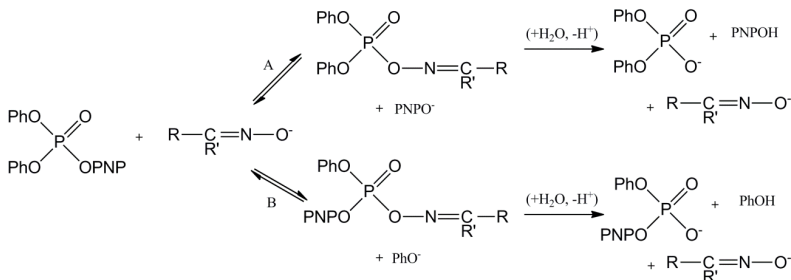


2



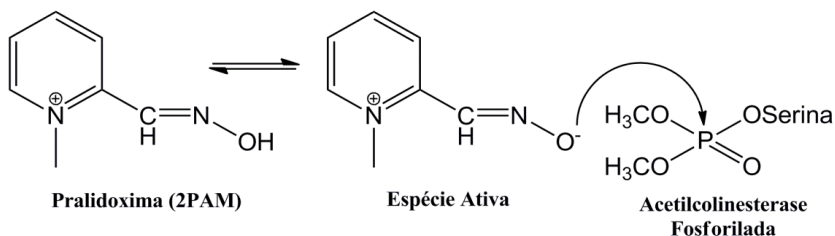
3

Os íons oximato são nucleófilos alfa muito poderosos,⁴⁶ e agentes extremamente eficientes na detoxificação de ésteres organofosforados tanto *in vitro* como *in vivo*. O **Esquema 4** mostra a reação de formação e quebra da oxima fosforilada formada como intermediário na reação de hidrólise catalisada por oximas.



O **Esquema 4** mostra que a decomposição do fosfato de difenil *p*-nitrofenila (**PNPDPP**) na presença dos íons oximato pode ocorrer por dois caminhos (**A** e **B**). A reação pode ser acompanhada pela formação do produto colorido *p*-nitrofenóxido (**PNPO⁻**) em 400 nm (caminho **A**), sendo que o caminho **B**, onde ocorre a formação do íon fenóxido (**PhO⁻**), possui pouca contribuição para a reação, já que o grupo *p*-nitrofenolato é um grupo de saída muito melhor.⁴⁷

Por serem excelentes nucleófilos, as oximas são consideradas ótimos agentes detoxificantes e são utilizadas como antídotos contra o envenenamento por agentes neurotóxicos.⁴⁸ Por exemplo, a Pralidoxima (**2PAM**), um antídoto muito utilizado, possui sua forma ativa desprotonada e reage diretamente com a enzima fosforilada, restabelecendo o centro ativo da Acetilcolinesterase, **Figura 14**.



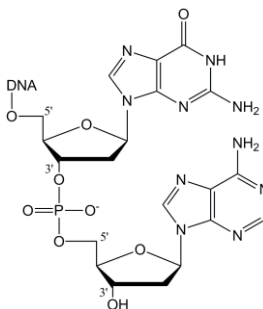
É importante notar que o meio reacional deve ter a capacidade de dissolver os reagentes e promover a reação desejada. Isso não ocorre

com facilidade na reação entre fosfato de difenil *p*-nitrofenila (PNPDPP) e **Pralidoxima**, uma vez que esses reagentes possuem características hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente. Portanto, em muitos casos, as oximas em água não podem degradar e realizar a decomposição rápida para ésteres de compostos organofosforados estáveis e tóxicos, como o Paration e o VX.⁵⁹ Contudo, é conhecido na literatura,⁵⁰⁻⁵² que a velocidade das reações entre oximas e ésteres de fosfato é aumentada significativamente na presença de surfactantes catiônicos.⁵³

Sendo assim, dependendo da solubilidade dos reagentes nas micelas, as constantes de velocidade aumentam notavelmente acima da CMC, chegando a um máximo e, então, decrescendo. Esse comportamento pode ser explicado pelo modelo da pseudofase e troca iônica, que descreve uma competição pela interface da micela entre o nucleófilo oximato e os contra-íons não reativos do surfactante.⁵⁴⁻⁵⁵ Esse modelo será utilizado para o estudo e os ajustes dos gráficos no **item 4.3**.

1.4 REAÇÕES DE ÉSTERES DE FOSFATO NA PRESENÇA DE ÍONS METÁLICOS

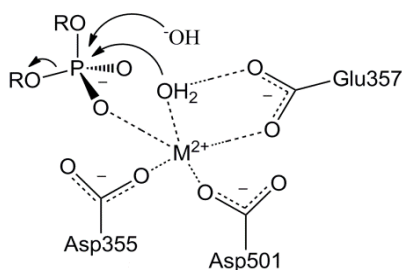
A clivagem das ligações em diésteres de fosfato ocorre pela ação enzimática das fosfodiesterases, que aceleram a quebra destas ligações por fatores superiores a 10^{17} vezes em relação às reações não catalisadas.⁵⁶ O interesse nessas reações deve passar por um conhecimento aprofundado dos mecanismos empregados por fosfatases e principalmente na construção de sistemas dotados de eficiência comparável com aquelas observadas em reações enzimáticas. A estrutura simplificada do DNA, mostrada abaixo, mostra claramente que um diester de fosfato é essencial para manter a estrutura e preservar a informação que será transmitida.



Neste sentido, surge um grande interesse pelas reações catalisadas por fosfatases dependentes de metais, tais como a exonuclease 3'-5' e outras enzimas similares. Estudos experimentais e teóricos indicam que as reações catalisadas por essas enzimas requerem fortemente a presença de íons metálicos divalentes como Mg(II), Ca(II), Mn(II), Zn(II) e Cu(II), os quais podem coordenar o nucleófilo e o substrato orientando-os.⁵⁷

Na **Figura 15 (A)**, a natureza do nucleófilo ainda não está completamente estabelecida. No entanto, sugere-se que pode ser um íon hidróxido ou uma molécula de água da esfera de coordenação do íon metálico que ataca o átomo de fósforo eletrofílico. Na **Figura 15 (B)**, há um íon hidróxido coordenado ao íon metálico no sítio A que atua como nucleófilo durante a quebra da ligação P-O do fosfodiéster. A expulsão do grupo de saída pode ser auxiliada pelo metal localizado no sítio B.⁵⁸

(A)



(B)

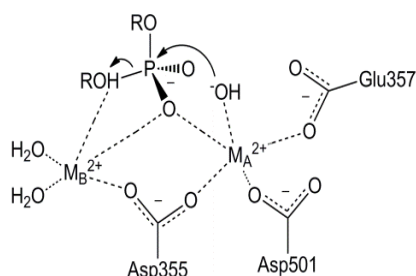
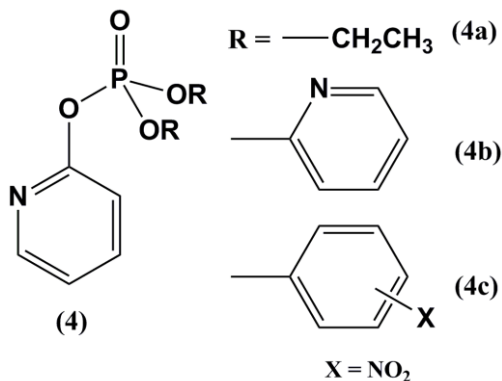


Figura 15 – Representação simplificada da clivagem do DNA pela ação da enzima exonuclease 3'-5': (A) incluindo um centro metálico M^{2+} ; e (B) incluindo dois centros metálicos (M_A^{2+} e M_B^{2+}).

Os modelos são baseados nos ésteres de fosfato derivados da 2-hidroxipiridina (**1**), os quais, por serem estruturalmente mais simples, possibilitam um estudo detalhado das características das reações de hidrólise em diferentes condições experimentais.⁵⁹



Esses ésteres de fosfato apresentam um átomo de nitrogênio piridínico e átomos de oxigênio no fosfato que podem formar um sítio para a coordenação de íons metálicos, que por sua vez auxiliam na hidrólise dos ésteres. Além disso, os ésteres assimétricos (**4c**) permitem uma análise mais aprofundada do mecanismo de catálise, sendo que de acordo com a natureza do íon metálico ou do grupo de saída, apresenta caminhos diferenciados para a quebra da ligação P-O (**Figura 16**).

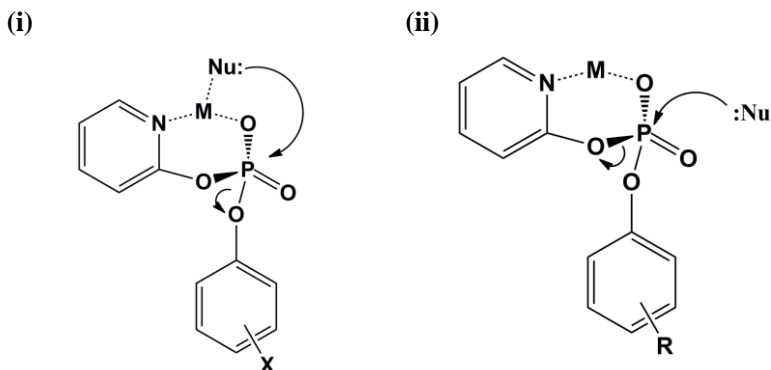


Figura 16 – Modelos propostos para o ataque nucleofílico da água ou íon hidróxido (Nu:) na reação de hidrólise dos ésteres de fosfato (**4c**).⁶⁰

Na **Figura 16 (i)**, o nucleófilo está coordenado ao íon metálico e o ataque nucleofílico em linha ao átomo de fósforo leva a quebra da ligação P-O do fenol. Em **(ii)**, o ataque de um nucleófilo não coordenado leva a quebra da ligação P-O da 2-hidroxipiridina.

Estes dois caminhos possíveis para a quebra da ligação P-O são relevantes para uma melhor compreensão dos mecanismos usados por enzimas de restrição. Essas endonucleases sítio específicas são dependentes de metais e clivam as ligações presentes nos ésteres de fosfato do **DNA** nas posições P-O5' ou P-O3'. Esta regiosseletividade ocorre porque a clivagem da ligação P-O é controlada pela conformação assumida pelo grupo de saída durante o ataque do nucleófilo.⁶⁰ Exemplos de modelos enzimáticos com tais características não são atualmente conhecidos, mas os substratos derivados da 2-hidroxipiridina podem satisfazer tais condições.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

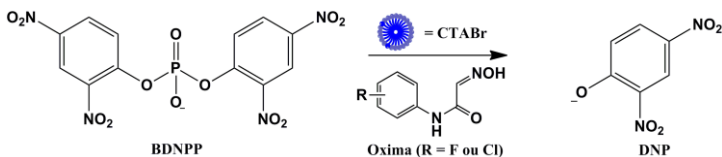
De acordo com o interesse do grupo de pesquisa **LaCFI**, esta dissertação de mestrado visa à construção de modelos bioinspirados nas características de fosfoesterases. O objetivo geral desta proposta é desenvolver novos modelos teóricos para explicar a eficiência catalítica de nucleófilos e de íons metálicos nas reações com ésteres de fosfato.

Objetivos Específicos

As metas específicas que foram utilizadas para atingir o objetivo geral deste trabalho foram divididas em duas partes: **(i) catálise nucleofílica** e **(ii) catálise por íons metálicos**:

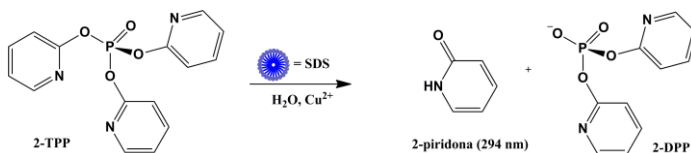
I. Catálise Nucleofílica

- Avaliar as reações das oximas **5** e **6** (estruturas no **item 3.1**) com o diéster **BDNPP** na presença e ausência do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (**CTABr**).
- Variar a concentração do surfactante e aplicar o modelo de pseudofase e troca iônica;

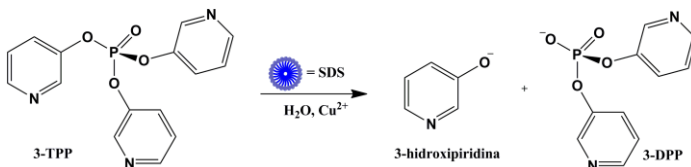


II. Catálise por Íons Cu^{2+}

- Estudar as reações de hidrólise do triéster *tris*-2-piridil fosfato (**2-TPP**), na presença e ausência do surfactante dodecilsulfato de sódio (**SDS**), com foco nas reações na presença de íons Cu^{2+} .
- Variar a concentração do surfactante SDS na presença e ausência de íons Cu^{2+} .



- Sintetizar e estudar a reação de hidrólise do composto *tris*-3-piridil fosfato (**3-TPP**), com a finalidade de avaliar a questão estrutural do substrato com relação à posição do átomo de nitrogênio como possível centro de coordenação dos íons Cu^{2+} .

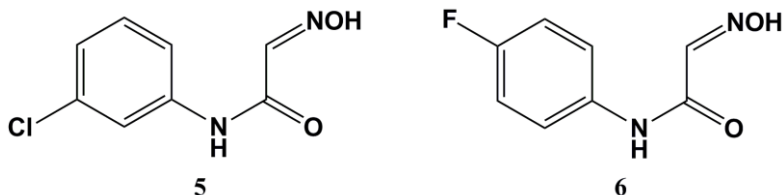


3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os ésteres bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (**BDNPP**) e o *tris*-2-piridil fosfato (**2-TPP**), foram obtidos por métodos descritos na literatura^{59, 61} e disponibilizados no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais.

As oximas **5** e **6** (estruturas abaixo, *pf* = 135°C e 140°C) são substâncias inéditas sintetizadas e disponibilizadas pelo Prof. Ângelo da Cunha Pinto, professor do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (**UFRJ**) e, foram utilizadas sem tratamento prévio.



Os sais CuSO_4 (Vetec, 98%), ZnCl_2 (Vetec, 99%), MgCl_2 (Vetec, 99%) e CaCl_2 (Vetec, 99%) foram desidratados sob baixa pressão em forno de aquecimento e armazenados em dessecador, sob vácuo, na presença de sílica gel previamente ativada. Os surfactantes brometo de cetiltrimetilamônio (**CTABr**, 99%) e dodecilsulfato de sódio (**SDS**, 98%), foram obtidos comercialmente pela Aldrich.

3.2 SÍNTESE DO *TRIS*-3-PIRIDIL FOSFATO (3-TPP)

A síntese do *tris*-3-piridil fosfato (**3-TPP**) foi realizada com o auxílio do doutorando Pedro Oliveira, seguindo um método análogo ao triéster *tris*-2-piridil fosfato (**2-TPP**) já descrito na literatura.⁵⁹ Porém, nesse caso, utilizou-se como reagente de partida a 3-hidróxipiridina (Sigma Aldrich) e a pureza do produto de reação foi confirmada comparando-se os espectros de RMN com os do **2-TPP**.

3.3 MEDIDAS CINÉTICAS

Os estudos cinéticos foram realizados em espectrofotômetros de UV/Vis Cary 50 e HP5483, com sistema de aquisição de dados Cary WinUV 3.00. As reações foram iniciadas com a adição de alíquotas das soluções estoque (10 μL , **BDNPP**) e (30 μL , **2-TPP** e **3-TPP**) a 3 mL da mistura reacional tamponada, em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. As soluções estoque foram mantidas no freezer em CH_3CN , sendo $1,33 \times 10^{-5}$ M no caso do **BDNPP** e 5×10^{-3} M, para os substratos **2-TPP** e **3-TPP**.

Os pHs das medidas cinéticas foram mantidos com os seguintes tampões: ácido cloroacético (ClCH_2COOH , pH 2,00-3,00); ácido acético (CH_3COOH , pH 4,00-5,50); ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES) ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$, pH 6,00-7,00) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , pH 10). As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro digital Hanna, calibrado com soluções padrões pHs 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlo Erba).

As reações foram monitoradas por no mínimo três tempos de meia-vida e as constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas a partir da variação de absorbância em função do tempo, sob condições cinéticas de primeira ordem, de acordo com a **Equação 1**.⁶²

$$A_t = A_0 e^{-(k t)} \quad (1)$$

Onde A_t é a absorbância medida em cada tempo (t), A_0 é a mudança total de absorbância na reação e k é a constante de velocidade. As regressões não-lineares foram realizadas com o programa de computação ORIGIN Versão 8.0, utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt para encontrar o mínimo da soma dos quadrados.

3.4 TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

A técnica da titulação espectrofotométrica foi realizada utilizando o pHmetro Hanna e um espectrofotômetro de UV/Vis modelo HP5483, e permitiu estudar os equilíbrios de desprotonação das oximas **5** e **6**. Um conjunto de medidas foram obtidas para acompanhar a variação espectral das diferentes espécies em função do pH, em uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho ótico, após a adição de

microlitros de KOH (1 M) à uma solução estoque de 50 mL contendo as oximas (4×10^{-4} M, 25°C em água).

3.5 MEDIDAS DE ELETROFORESE CAPILAR

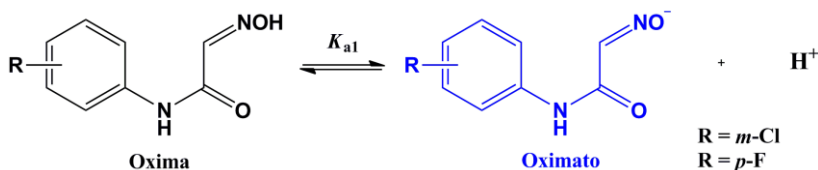
Os experimentos de eletroforese capilar foram realizados pelo mestrando Daniel Spudeit, sob a orientação do Prof. Gustavo Micke. Os experimentos foram realizados em um sistema Agilent CE^{3D} com detector de arranjo de diodos. As amostras foram introduzidas por injeção hidrodinâmica de 50mbar/5s e, como coluna, foi utilizado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies) com comprimento total de 48,5 cm e 40 cm do ponto de injeção até o detector. A temperatura foi mantida a 25°C e o sistema foi operado com polaridade invertida, -30kV. O tempo de migração da micela CTABr foi obtido a partir do tempo de migração do pireno t_{pireno} (1 mM) e o tempo de migração do fluxo eletrosmótico pelo tempo de migração da acetona t_{osm} (0,1%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REAÇÕES DE OXIMAS COM ÉSTERES DE FOSFATO

4.1.1 Titulação Espectrofotométrica das Oximas 5 e 6

Como etapa prévia às medidas cinéticas, é necessário saber como as concentrações das diferentes espécies de uma solução variam de acordo com o pH. Para isso, foram realizadas as titulações espectrofotométricas das oximas **5** e **6** na presença de **CTABr** (0,01 M), tendo em vista que os equilíbrios de ionização definem espécies iônicas que possuem reatividades diferentes. Esta titulação foi facilitada porque os espectros de absorção das espécies protonadas e desprotonadas são suficientemente diferentes para permitir o uso do método espectrofotométrico com a finalidade de determinar os valores aparentes de pK_a das oximas, em meio micelar. A constante de dissociação ácida das oximas estudadas está descrita no equilíbrio ácido-base mostrado no **Esquema 5**.



Esquema 5

A titulação foi realizada acompanhando-se o consumo das espécies protonadas das oximas **5** e **6** na região espectral com $\lambda_{\text{máx}}$ próximo a 220 nm, e pela formação das espécies desprotonadas na região de 282 nm. Os espectros de absorbância em função do comprimento de onda e do pH, são mostrados na **Figura 17**.

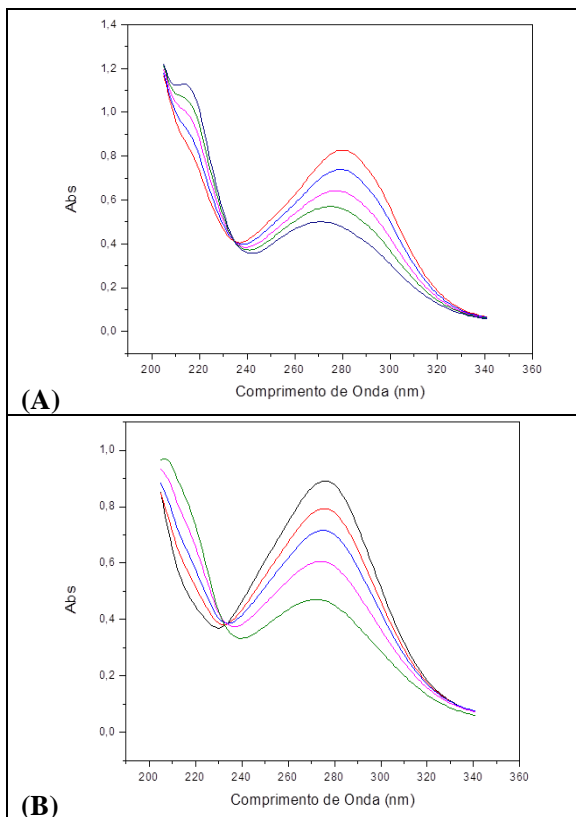


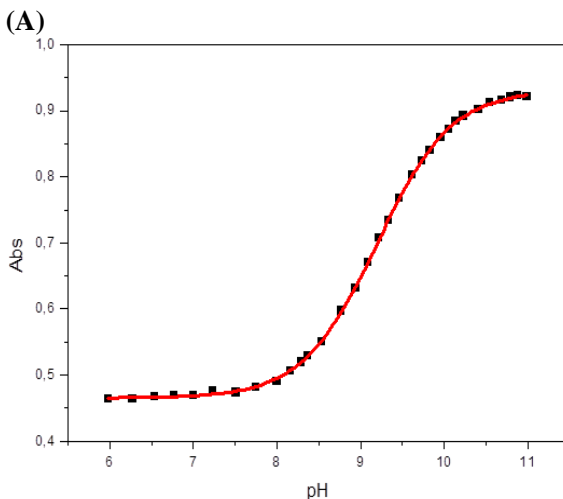
Figura 17 – Espectros para determinação de pKa das oximas 5 (A) e 6 (B), à 25°C e $(1 \times 10^{-4} \text{M})$ para cada oxima, em água.

Os dados experimentais de absorbância em função do pH estão mostrados na **Figura 17** e foram tratados teoricamente utilizando o programa ORIGIN 8.0 e a **Equação 2**. Onde Abs_{OxH} e Abs_{Ox^-} representam, respectivamente, as absorbâncias das oximas nas formas protonadas e desprotonadas, e K_a representa a constante de dissociação ácida.

$$Abs = \left(Abs_{OxH} * \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \right) + \left(Abs_{Ox^-} * \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \right) \quad (2)$$

O ajuste teórico obtido forneceu os valores aparentes de pK_a para as oximas em meio micelar. É importante esclarecer que os valores foram considerados como aparentes porque em soluções de CTABr, o pH na superfície da micela é diferente daquele medido pelo pHmetro, que reflete a concentração hidrogeniônica na fase aquosa. Assim, os valores obtidos são importantes para poder examinar os dados cinéticos e possuem apenas valor comparativo. Os valores obtidos para a Oxima **5** ($pK_a = 9,19 \pm 0,01$) e Oxima **6** ($pK_a = 9,13 \pm 0,01$) são consideravelmente inferiores aos valores encontrados na literatura para oximas similares ($pK_a \sim 15$),⁶³ provavelmente devido a deslocalização de elétrons pelo anel aromático juntamente com o grupo carbonila, que ajudam a estabilizar a carga negativa do ânion gerado e, pela concentração de íon hidróxido na superfície micelar.

Como pode ser observado nas **Figuras 18 e 19**, as mudanças de absorbância são extremamente significativas para ambas oximas e, na presença de micelas catiônicas há uma fração significativa da espécie monoaniônica em valores de pH na faixa entre 8 e 10, em ambos casos.



(B)

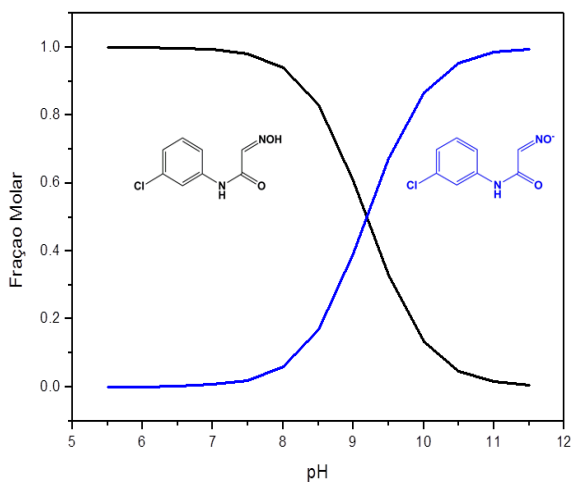
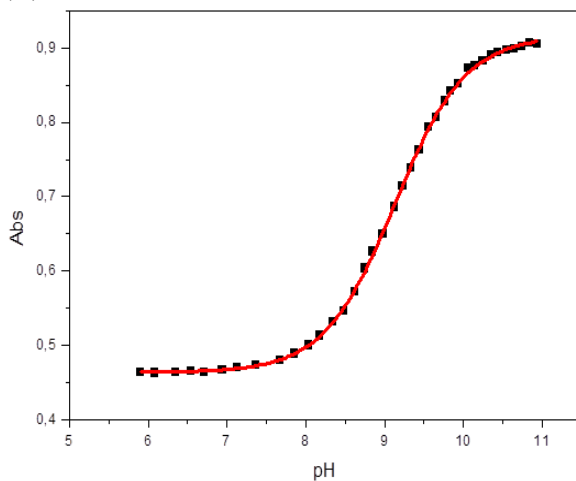


Figura 18 (A) Dados experimentais da titulação espectrofotométrica da oxima 5 (1×10^{-4} M); e (B) distribuições de espécies neutra e ionizada da oxima 5 em função do pH, à 25°C.

(C)



(D)

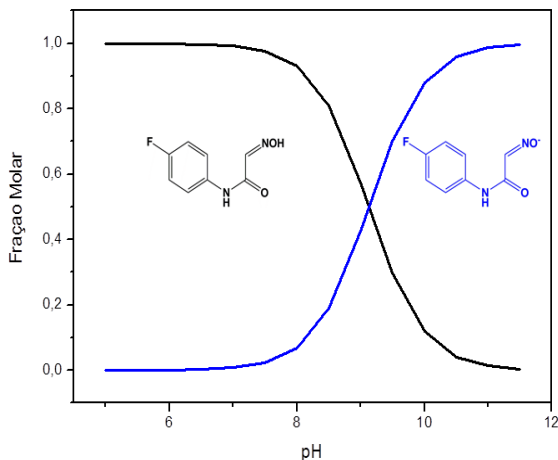


Figura 19 (C) Dados experimentais da titulação espectrofotométrica da oxima 6 1×10^{-4} M; e (D) distribuições de espécies neutra e ionizada da oxima 6 em função do pH, à 25°C.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INCORPORAÇÃO DAS OXIMAS 5 E 6 EM MICELAS CATIÔNICAS POR ELETROFORESE CAPILAR

Com o objetivo de auxiliar nos estudos cinéticos realizados em meio micelar, a técnica de eletroforese capilar foi utilizada porque possibilita calcular as constantes de associação de moléculas em micelas. Nesse sentido, com a quantificação das constantes K_N (referente as oximas **5** e **6**) e K_S (referente ao substrato **BDNPP**), é possível avaliar se a incorporação dos reagentes na micela é favorável.

Com base na diferença de mobilidade eletroforética, os solutos podem ser separados quando se aplica um campo elétrico. Sendo assim, com os dados do efeito da concentração micelar nos tempos de retenção da substância de interesse (t_r) e possível avaliar as constantes de associação do substrato com a micela (**Equação 3**). Assim, esta técnica permite medir de forma direta a constante de incorporação K_L que

descreve a associação do substrato com a micela e, que será aqui denominada de constante de Langmuir.

$$\frac{(t_r - t_0)}{(t_m - t_0)} = \frac{k \times K_L \times C}{1 + K_L \times C} \quad (3)$$

Nesta equação, como compostos de referência são utilizados um soluto que não é retido, no caso acetona (t_0); um soluto que é totalmente retido, no caso o pireno (t_m). O termo C representa a concentração de surfactante micelizado e k uma constante de proporcionalidade. Utilizando os dados experimentais, é possível calcular a isoterma de adsorção⁶⁴ que descreve a ligação do substrato na micela.

Os dados experimentais obtidos utilizando a micela catiônica (CTABr). Tanto para **BDNPP** como para os nucleófilos (oxima **5** e **6**), os experimentos em meio micelar catiônico (CTABr), mostram que os valores de K_{BDNPP} , K_{OxI} e K_{OxII} são muito elevados. Isto pode ser verificado porque os dados experimentais para o tempo de retenção do analito de interesse foram constantes, **Figura 20**, e iguais ao tempo de retenção do pireno.

Este resultado indica que esses compostos possuem atrações hidrofóbicas e eletrostáticas muito fortes, e para efeito do ajuste eficiente dos gráficos do **item 4.3**, para todas as constantes K_{BDNPP} , K_{OxI} e K_{OxII} foram atribuídos valores elevados e próximos a 1000.

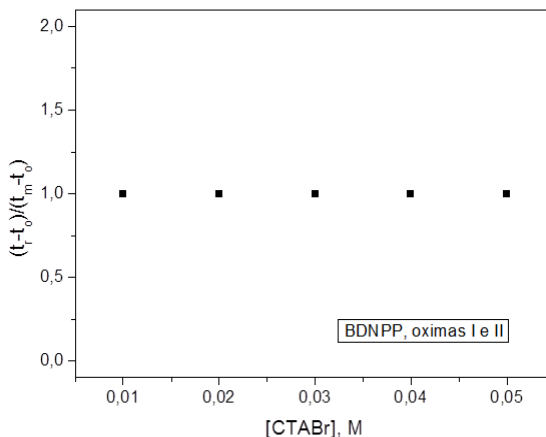


Figura 20 – Incorporação de BDNPP e oximas 5 e 6 (2×10^{-4} M) em CTABr - pH 10, dados a 25°C.

4.3 ESTUDOS CINÉTICOS DA REAÇÃO DO BDNPP COM AS OXIMAS 5 E 6 EM MEIO MICELAR CATIONICO (CTABr)

As reações entre **BDNPP** e as oximas **5** e **6** foram monitoradas utilizando-se a técnica de espectroscopia de UV/Vis, onde um conjunto de espectros sucessivos permitiu verificar a formação do produto de reação 2,4-dinitrofenolato (**DNP**) em 360 nm, **Figura 21 (A)**. As reações mostram um comportamento típico de reações de primeira ordem em relação ao substrato orgânico, conforme ilustrado na **Figura 21 (B)**.

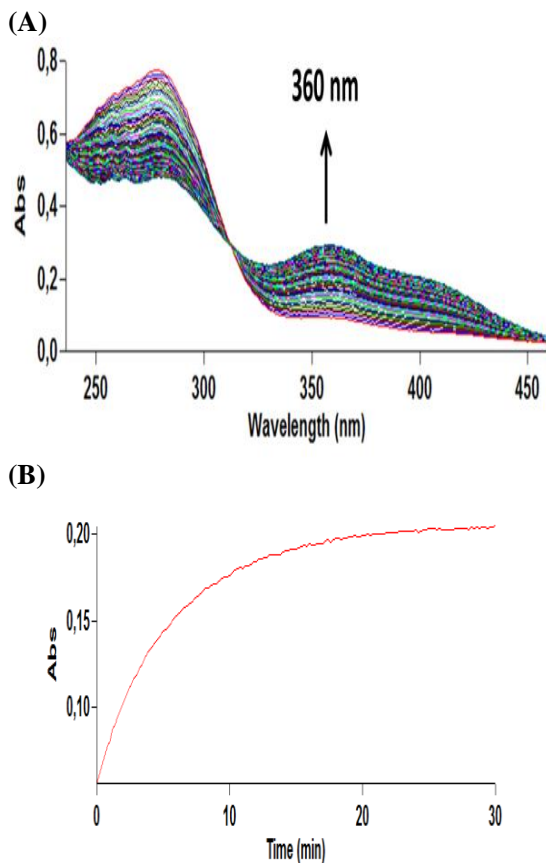
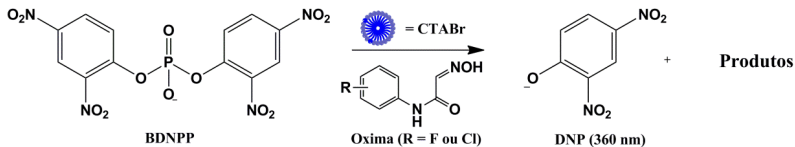


Figura 21 – (A) Espectros sucessivos típicos de UV-Vis para a hidrólise do BDNPP ($1,33 \times 10^{-5}$ M), na presença da oxima **5** (5×10^{-5} M) a 25°C , $\text{pH} = 10$ e $\mu = 1,0$ M (KCl); (B) Gráfico de absorvância em função do tempo de reação em $\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm para a cinética ilustrada na Figura 21 (A).

Nas reações estudadas entre **BDNPP** e as oximas **5** e **6**, o único produto detectado foi o 2,4-dinitrofenolato (**DNP**), conforme ilustrado no **Esquema 6**.

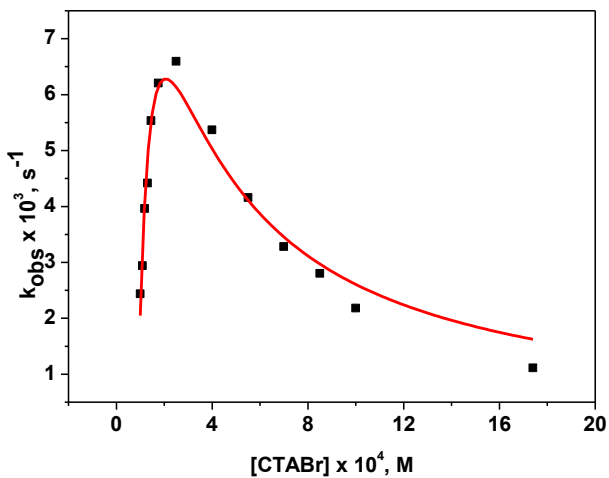


Esquema 6

Como de fato as estruturas do **BDNPP** e das oximas **5** e **6** apresentam características bastante hidrofóbicas, existe um potencial razoavelmente grande de sucesso na aplicação de catálise micelar para essas reações. Sendo assim, avaliou-se o efeito da concentração do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (**CTABr**) sobre as constantes de velocidade observadas (k_{obs}), para a reação entre **BDNPP** e as oximas **5** e **6** em pH 10. A escolha do pH está relacionada com o fato de que em valores alcalinos de pH, há uma maior concentração da forma monoaniônica, que é considerada a espécie reativa nestes tipos de reações (ver **Figuras 18** e **19**). Ainda, neste valor de pH, tanto as oximas quanto o **BDNPP** ligam-se fortemente as micelas catiônicas, conforme verificado nos experimentos de eletroforese capilar (**Figura 20**).

Para as duas oximas estudadas, a dependência da constante de velocidade em função da concentração de surfactante é semelhante e, observa-se que os valores de k_{obs} aumentaram ligeiramente abaixo da **CMC** do **CTABr** ($CMC_{CTABr} = 9 \times 10^{-4} \text{ M}$),³² passando por um máximo e, em seguida, decrescendo (**Figura 22**). É importante destacar que essas reações na ausência de micelas não foram realizadas, devido à baixa solubilidade das oximas em meio aquoso.

(A)



(B)

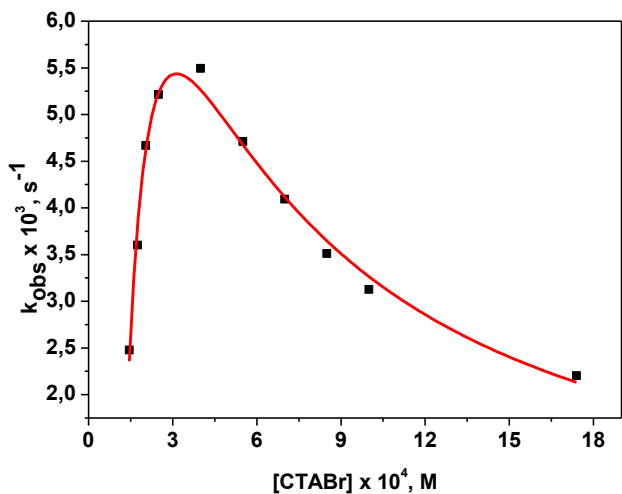
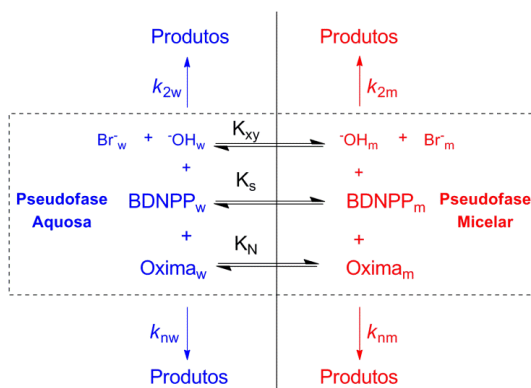


Figura 22 – Efeito da concentração de CTABr na constante de velocidade observada (k_{obs}) para a reação do BDNPP com: (A) oxima 5 ($5 \times 10^{-5} M$); e (B) oxima 6, à $25^\circ C$, pH 10 e $1,33 \times 10^{-5} M$ de BDNPP.

Tendo em vista a reação de hidrólise espontânea do **BDNPP** em pH 10 encontrada na literatura⁶⁵ (perfil de pH mostrado na introdução, **item 1.3**), onde o tempo de reação pode chegar a 40 dias, observa-se que a reação é acelerada significativamente e passa a acontecer em apenas 9 minutos. Este efeito representa um aumento em torno de 10^7 vezes na velocidade da reação, o qual é extremamente significativo e típico de nucleófilos com efeito alfa em meio micelar catiônico.⁶⁶ O efeito mostra a importância da catálise micelar neste tipo de reações, onde os reagentes aniônicos são concentrados em um reator positivamente carregado.

Com a finalidade de se investigar em detalhe a catálise micelar observada, foi aplicado o modelo da pseudofase e troca iônica,^{27, 37} representado no **Esquema 7**. Nesse caso, considera-se que o **BDNPP** e as oximas **5** e **6** permanecem em equilíbrio dinâmico entre a fase aquosa (**BDNPP_w**, **Oxima_w**) e micelar (**BDNPP_m**, **Oxima_m**). Esse equilíbrio é representado pelas constantes K_{BDNPP} (**BDNPP**) e pelo termo K_N (representando K_{OxI} e K_{OxII} para as oximas **5** e **6**), sendo que estas constantes foram estimadas pela técnica de eletroforese capilar. Como as reações dessas espécies ocorrem tanto na fase aquosa quanto na fase micelar, as constantes de velocidade para cada fase são representadas pelas constantes k_{nw} e k_{nm} , respectivamente.

De maneira similar, as reações que envolvem as reações dos íons hidróxido (OH^-) com o **BDNPP**, são definidas pelas constantes $k_{2\text{m}}$ (fase micelar) e $k_{2\text{w}}$ (fase aquosa). Por fim, a constante K_{xy} determina a troca entre os íons hidróxido (OH^-) e íons brometo (Br^-) na fase micelar e aquosa.



De acordo com o modelo ilustrado no **Esquema 7**, é possível deduzir as **Equações 4 até 12**. A **Equação 4** mostra a contribuição de duas espécies: **(i)** íons hidróxidos, dados pelos termos que estão multiplicados pela sua concentração total ($[OH^-]_T$) e **(ii)** oximas, de acordo com os termos que estão multiplicados pela sua concentração total ($[oxima]_T$).

$$k_{obs} = \left(k_{2w} \chi_{sw} \chi_{OHw} + \frac{k_{2m}}{V_M \times C_d} \chi_{sm} \chi_{OHm} \right) x [OH^-]_T + \left(k_{nw} \chi_{sw} \chi_{nw} + \frac{k_{nm}}{V_M \times C_d} \chi_{sm} \chi_{nm} \right) x [Oxima]_T \quad 4$$

Como essas reações podem ocorrer tanto na fase aquosa (k_{2w} , k_{nw}) como na fase micelar (k_{2m} , k_{nm}), deve-se considerar em cada uma dessas fases as concentrações de hidróxido e oxima.

A fração molar de íons hidróxido (**OH⁻**) na micela e na água é expressada pelas **Equações 5-7**, considerando a troca iônica (K_{xy}) com os íons brometo (Br^-);

$$\chi_{OHm} = \frac{[OH^-]_m}{[OH^-]_T} \quad (5)$$

$$\chi_{OHw} = 1 - \chi_{OHm}$$

(6)

$$[OH^-]_m = K_{xy} \times \frac{[OH^-]_w [Br^-]_m}{[Br^-]_w} \quad (7)$$

A fração molar de substrato **BDNPP** na micela e na água pode ser expressada pelas **Equações 8-9**, onde K_s corresponde a constante K_{BNNPP} .

$$\chi_{sm} = \frac{K_s C_d}{1 + K_s C_d} \quad (8)$$

$$\chi_{sw} = 1 - \chi_{sm} \quad (9)$$

Finalmente as frações molares do nucleófilo (**Oxima**) são descritas pelas **Equações 10-12**, onde K_N representa as oximas 5 e 6.

$$\chi_{nm} = \frac{K_N C_d}{1 + K_N C_d} \quad (10)$$

$$\chi_{nw} = 1 - \chi_{nm} \quad (11)$$

$$\chi_N = \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \quad (12)$$

Os parâmetros cinéticos calculados pelos ajustes da **Figura 22** estão apresentados na **Tabela 2**, onde as constantes V_M (volume molar da micela), α (dissociação micelar), CMC e K_{XY} foram obtidas da literatura e K_S e K_N foram estimados por eletroforese capilar.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 22, para as reações do BDNPP com as oximas 5 e 6 na presença de CTABr.^a

Parâmetros	oxima 5	oxima 6
α^b	0,25	0,25
K_{xy}^b	0,09	0,09
$V, M^{-1}b$	0,39	0,39
CMC, M^b	9×10^{-4}	9×10^{-4}
pK_a^d	$9,19 \pm 0,004$	$9,13 \pm 0,005$
K_s^c	> 1079	> 1025
K_N^c	> 1070	> 1024
$k_{2m}, M^{-1} \cdot s^{-1}e$	$5,00 \times 10^{-3}$	$5,00 \times 10^{-3}$
$k_{2w}, M^{-1} \cdot s^{-1}e$	$1,00 \times 10^{-2}$	$1,00 \times 10^{-2}$
$k_{nm}, M^{-1} \cdot s^{-1}$	$2,34 \times 10^{-2} \pm$ $(6,89 \times 10^{-4})$	$3,32 \times 10^{-2} \pm$ $(5,01 \times 10^{-4})$
$k_{nw}, M^{-1} \cdot s^{-1}$	$56,77 \pm (1,58)$	$70,18 \pm (0,99)$

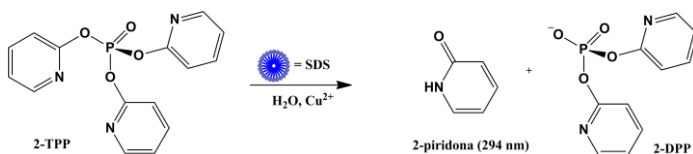
^a Ajustes pelas **Equações 4-12**, considerando o **Esquema 7**. ^b Constantes intrínsecas para o **CTABr**, obtidas da literatura.³² ^c Estimados por eletroforese capilar. ^d Determinados por titulação espectrofotométrica. ^e Obtidos da reação do **BDNPP** em meio básico (pH 10), na presença e ausência de **CTABr**.

De acordo com a análise dos parâmetros calculados pelos ajustes dos gráficos apresentados na **Figura 22**, e apresentados na **Tabela 2**, pode-se afirmar que: **(i)** as constantes V_M , CMC, K_{XY} , α , K_S , K_N e pK_a estão de acordo com o modelo proposto e com os valores determinados pelas técnicas utilizadas; **(ii)** a relação $k_{2w} > k_{2m}$ e $k_{nw} > k_{nm}$ é familiar para as reações catalisadas por micelas,⁶⁷⁻⁶⁸ e sua

interpretação ainda necessita de estudos mais detalhados. Apesar disso, os demais parâmetros evidenciam que o modelo da pseudofase com troca iônica descreve com precisão as reações aqui estudadas.

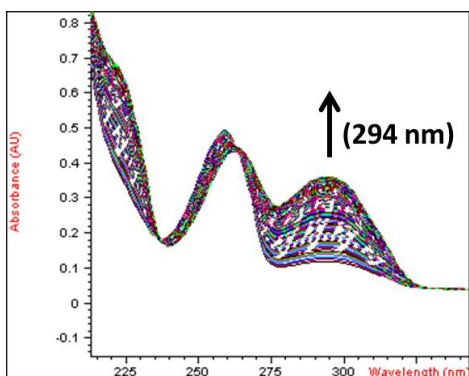
4.4 ESTUDOS CINÉTICOS DAS HIDRÓLISES DO 2-TPP E 3-TPP NA PRESENÇA DE ÍONS Cu^{2+} EM MEIO MICELAR ANIÔNICO

Assim como no **item 4.3**, as reações de hidrólise do **2-TPP** na presença de íons metálicos podem ser monitoradas por espectroscopia de UV/Vis, seguindo a formação da **2-piridona**, em 294 nm, **Figura 23 (A)**. A reação está descrita no **Esquema 8**, e apresenta um comportamento típico de primeira ordem em relação ao substrato orgânico, conforme ilustrado na **Figura 23 (B)**.



Esquema 8

(A)



(B)

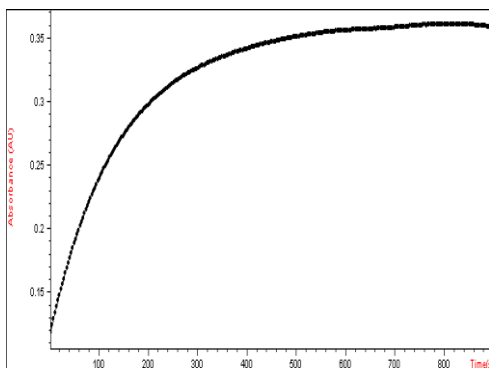


Figura 23 – (A) Espectros sucessivos de UV-Vis. (B) Gráfico de absorvância em função do tempo de reação em $\lambda_{\text{máx}} = 294 \text{ nm}$. Dados para a reação entre 2-TPP ($5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) e Cu^{2+} ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$) a 25°C e $\text{pH} = 6$.

Conforme discutido no **item 1.1**, as reações de hidrólise de compostos organofosforados tem recebido muita atenção, não somente pelas possíveis implicações biológicas das reações de transferência do grupo fosforila, mas também pelo seu alto grau de toxicidade.⁶⁹ Sendo assim, neste trabalho é reportado um modelo que apresenta um aumento excepcional na velocidade de degradação de um triéster de fosfato neutro.

A reação de hidrólise do **2-TPP** foi estudada detalhadamente na ausência de metais e os dados estão reportados na literatura.⁵⁹ Entre os íons divalentes (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+}) que foram avaliados na reação de hidrólise do *tris*-2-piridil fosfato (**2-TPP**), somente os íons Cu^{2+} promoveram um aumento significativo das constantes de velocidade das reações e, assim, tiveram uma atenção especial neste trabalho (**Figura 24**).

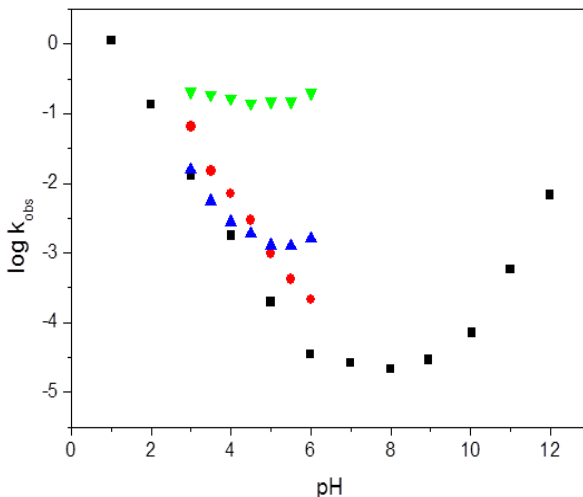


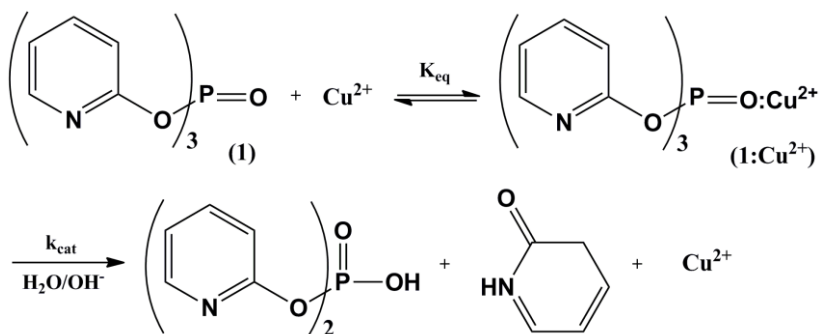
Figura 24 – Variação de k_{obs} em função do pH para a hidrólise do 2-TPP (5×10^{-5} M) em : H₂O (■)⁵⁹; Cu²⁺, 3×10^{-4} M (▲); SDS, 8×10^{-3} M (●) e SDS + Cu²⁺ (▼), à 25°C.

De acordo com os dados na **Figura 24**, a presença dos íons Cu²⁺ (3×10^{-4} M) promovem um aumento na velocidade da reação de até 47 vezes, quando comparadas com a reação em água, em pH 6. Além disso, o gráfico evidencia que os íons Cu²⁺ atingem um patamar com o aumento do pH, sendo que para valores de pHs maiores do que 6, as reações não foram possíveis de ser acompanhadas devido à precipitação de hidróxidos de Cu²⁺.

O efeito observado pode ser explicado pela presença das espécies em equilíbrio Cu(H₂O)₄²⁺ e Cu(OH)(H₂O)₃⁺ (**Equação 13**), onde K_A representa a constante de dissociação ácida da espécie metálica hidratada. Os complexos formados facilitam a dissociação ácida da água, formando uma espécie contendo OH⁻ coordenado ao centro metálico. Assim, existe a possibilidade de OH⁻ e Cu²⁺ atuar de maneira simultânea na atividade catalítica observada.⁶⁰

$$K_A = \frac{[Cu(OH)(H_2O)_3^+][H_3O^+]}{[Cu(H_2O)_4^{2+}]} \quad (13)$$

Nesse contexto, utilizando um mecanismo para um sistema análogo reportado na literatura,⁶¹ onde o autor utilizou íons Cu^{2+} como catalisador, o mecanismo da reação pode passar por um pré-equilíbrio de complexação entre o **2-TPP (1)** e os íons Cu^{2+} (**1:Cu²⁺**), o qual está representado pela constante (K_{eq}), sendo logo seguido pela reação com H_2O e/ou OH^- (k_{cat}), formando os produtos e regenerando o catalisador, conforme ilustrado no **Esquema 9**.



Esquema 9

O efeito catalítico observado no perfil de pH da **Figura 24** torna-se ainda mais surpreendente quando a reação de hidrólise do **2-TPP** na presença de íons Cu^{2+} é realizada em meio micelar, utilizando o surfactante aniônico **SDS**. A **Figura 25** mostra a incorporação de **TPP** no surfactante aniônico **SDS**, acompanhada por eletroforese capilar e que permite calcular um valor de constante de incorporação para o substrato **2-TPP** ($K_{2-TPP} = 101$). Conforme mostrado na **Figura 25**, para valores de $[SDS] > 0.03$ M, basicamente todo o substrato orgânico está concentrado na micela.

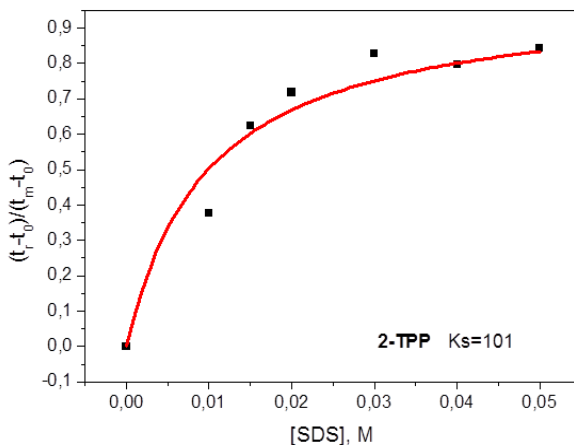


Figura 25 – Isoterma de Langmuir para a incorporação de 2-TPP (2×10^{-4} M) em SDS, pH 6, dados a 25°C .

Sendo assim, surge o interesse em avaliar o efeito da concentração da micela aniônica dodecilsulfato de sódio (SDS) sobre as constantes de velocidade observadas (k_{obs}), para a reação entre 2-TPP na ausência e presença de íons Cu^{2+} , em pH 6. Os dados da **Figura 26** mostram que, para a reação em meio micelar na presença de íons Cu^{2+} , os valores de k_{obs} aumentaram significativamente para concentrações de surfactante maiores que 0,005M, sugerindo que a CMC operacional do SDS seja menor que o valor em água, sem aditivos ($\text{CMC}_{\text{SDS}} = 8 \times 10^{-3}$ M).⁶²

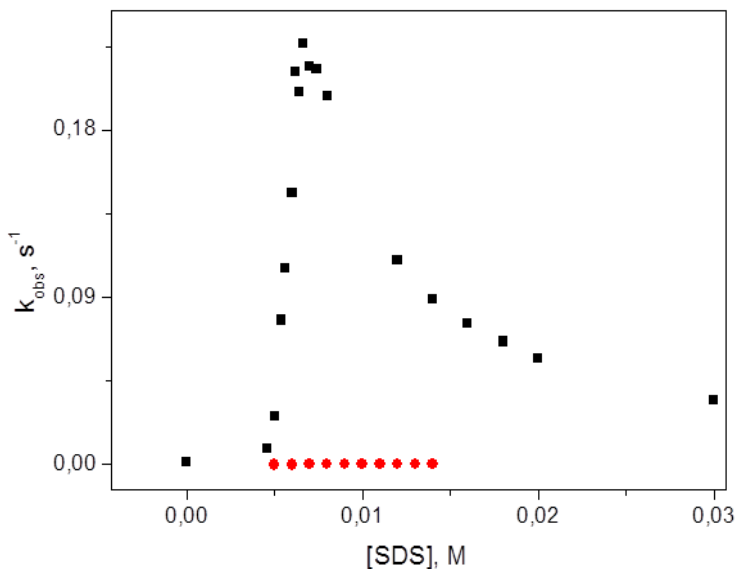


Figura 26 - Perfil de concentração para a hidrólise do 2-TPP (5×10^{-5} M) em : SDS (●) e SDS + Cu^{2+} (3×10^{-4} M) (■), à $25^{\circ}C$ e pH 6.

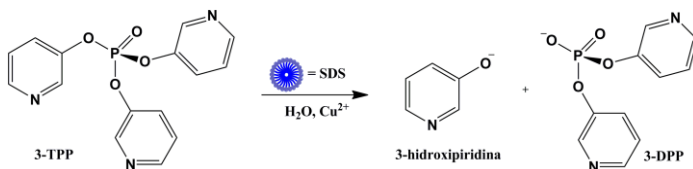
A seguir, a constante de velocidade passa por um máximo e, em seguida, decresce. Com base nos dados da **Figura 26**, o aumento da velocidade da reação pode chegar à 6400 vezes, em pH 6 (**Tabela 3**). Em outras palavras, isso significa dizer que a reação de decomposição do **2-TPP**, que em água pode levar até 27 horas para acontecer, ocorre em apenas 15 segundos na presença de 3×10^{-4} M íons Cu^{2+} em meio micelar aniônico (SDS). Vale ressaltar que, o efeito da concentração de SDS na ausência de íons Cu^{2+} , é praticamente desprezível quando comparado ao sistema na presença de Cu^{2+} .

Tabela 3 – Efeito da catálise micelar para a reação de hidrólise do 2-TPP na presença de íons Cu^{2+} em pH 6, à 25°C.

Meio Reacional	k_{obs} (s^{-1})	k_{obs}/k_0
H_2O (k_0)	$3,49 \times 10^{-5}$	-
SDS	$2,15 \times 10^{-4}$	6
Cu^{2+}	$1,64 \times 10^{-3}$	47
SDS + Cu^{2+}	0,226	6480

A catálise observada nesse sistema provavelmente surge de múltiplos efeitos: (i) a característica hidrofóbica do substrato (**2-TPP**) faz com que ele se aproxime da superfície da micela, onde o nucleófilo H_2O ou OH^- do complexo $\text{Cu}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3^+$ está localizado, simulando uma reação intramolecular muito rápida;⁷³ (ii) as moléculas de água quando ligadas aos íons Cu^{2+} apresentam um valor de pKa bem menor do que o normal, desse modo o átomo de oxigênio está mais livre para reagir em valores de pHs próximos da neutralidade; (iii) a afinidade do grupo P=O pelos íons Cu^{2+} promovem a polarização da ligação,⁷⁴ tornando o átomo de P mais eletrofílico.

Em seguida, para avaliar a natureza do substrato com relação ao possível centro de coordenação dos íons Cu^{2+} , realizou-se a reação de hidrólise do **3-TPP**, um isômero do **2-TPP**, onde a diferença encontra-se somente na posição do átomo de nitrogênio, de acordo com o **Esquema 10**.



Esquema 10

Para essa reação em particular, observou-se um aumento de apenas 50 vezes na velocidade da reação em meio micelar na presença de Cu^{2+} , quando comparada com a reação em água para o mesmo

substrato (**3-TPP**, **Tabela 4**). Esse aumento é muito inferior ao obtido na reação de hidrólise do **2-TPP**, nas mesmas condições. Uma vez que os íons Cu^{2+} não apresentam um efeito catalítico significativo para a hidrólise do **3-TPP**, propõe-se que o complexo formado no estado fundamental da reação de hidrólise do **2-TPP** na presença de Cu^{2+} , deve ter uma constante de estabilidade significativamente maior que um possível complexo com **3-TPP** e seja responsável pelo o efeito catalítico observado.

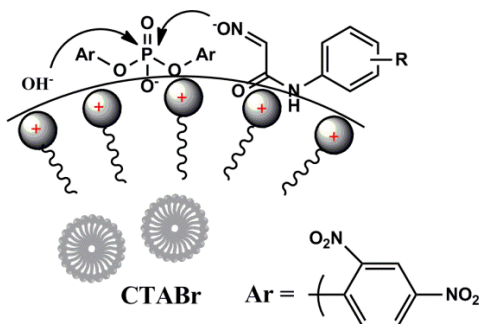
Tabela 4 – Efeito da catálise micelar para a reação de hidrólise do 3-TPP na presença de íons Cu^{2+} em pH 6, à 25°C.

Meio Reacional	k_{obs} (s^{-1})	k_{obs}/k_0
H_2O (k_0)	$2,88 \times 10^{-4}$	-
SDS	$2,13 \times 10^{-3}$	7
SDS + Cu^{2+}	$1,48 \times 10^{-2}$	50

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

i. Catálise Nucleofílica

- O estudo cinético realizado para as reações do **BDNPP** evidenciam que as oximas **5** e **6** se tornam nucleófilos muito potentes em meio micelar catiônico (**CTABr**). Esse efeito foi explicado pela natureza altamente hidrofóbica dos reagentes, conforme avaliado por eletroforese capilar, que permite a aproximação efetiva na superfície da micela, além das interações eletrostáticas entre a superfície carregada positivamente e os íons OH^- carregados negativamente (**Esquema 11**).



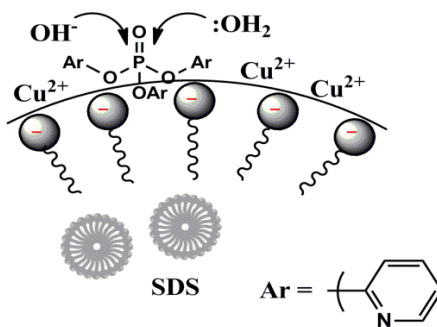
Esquema 11

- O modelo de pseudofase com troca iônica permitiu descrever com êxito as reações em sistemas micelares aqui estudados. A eficiência dos ajustes pode ser atribuído as equações envolvendo diversas variáveis, que representam a modelagem teórica desse sistema complexo.
- Em continuação à este trabalho, pretende-se realizar o estudo cinético com outras oximas análogas, porém com diferentes grupos substituintes no anel aromático, possibilitando uma

análise mais detalhada da relação entre pKa e reatividade. Além disso, serão realizados os estudos para identificação de produtos e intermediários da reação por técnicas avançadas, que permitirão investigar os mecanismos da reação de maneira mais aprofundada.

ii. Catálise por Íons Cu^{2+}

- Dentre os íons metálicos divalentes avaliados (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+}), os íons Cu^{2+} foram os que apresentaram um efeito catalítico significativo na reação de hidrólise do **2-TPP**. Além disso, esse efeito mostrou-se ainda maior quando os íons Cu^{2+} são confinados na superfície micelar aniônica do **SDS**, devido às atrações hidrofóbicas e eletrostáticas discutidas anteriormente (**Esquema 12**).



Esquema 12

- A reação de hidrólise do **3-TPP** apresentou um efeito catalítico muito inferior ao observado para o isômero **2-TPP**, em relação as reações em água. Isso indica que a posição do átomo de nitrogênio no anel aromático possui um papel fundamental como centro de coordenação para os íons Cu^{2+} no estado de transição.

- Futuramente pretende-se avaliar com detalhes o efeito da concentração de íons Cu^{2+} na reação de hidrólise do **2-TTP** e **3-TTP** na ausência e presença de **SDS**. Além disso, sintetizar e realizar o estudo cinético de triésteres e diésteres assimétricos, como passos para a elucidação dos mecanismos da reação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mander, L. N. L., H.-W. Comprehensive Natural Products II : Chemistry and Biology, *Elsevier Science*, **2010**, 10.
2. Arnott, S. Principles of Nucleic-Acid Structure - Saenger,W, *Nature*, **1984**, 312, 174.
3. Westheimer, F. H. The Role of Phosphorus in Chemistry and Biochemistry - an Overview, *Acs. Symp.*, **1992**, 486, 1-17.
4. Westheimer, F. H. Why Nature Chose Phosphates, *Science*, **1987**, 235, 1173-1178.
5. Machado, V. G.; Nome, F. Energy-Rich Phosphate Compounds., *Quimica Nova*, **1999**, 22, 351-357.
6. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Machado, V. G.; Nome, F. The Chemistry of Phosphate Esters., *Quimica Nova*, **2003**, 26, 745-753.
7. Wolfenden, R.; Snider, M. J. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts, *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34, 938-945.
8. Kirby, A. J.; Younas, M. Reactivity of Phosphate Esters - Diester Hydrolysis, *J. Chem. Soc. B*, **1970**, 510.
9. Yang, Y. C. S., L. L. Perhydrolysis of Nerve Agent VX, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 6964.
10. Cremlyn, R. J. Agrochemicals: Preparation and Mode of Action, *John Wiley & Sons Ltd.: West Sussex*, **1991**.
11. Smith, B. M. Catalytic Methods for the Destruction of Chemical Warfare Agents Under Ambient Conditions, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 470-478.
12. Ghanem, E.; Li, Y. C.; Xu, C. F.; Raushel, F. M. Characterization of a Phosphodiesterase Capable of Hydrolyzing EA

2192, the Most Toxic Degradation Product of the Nerve Agent VX, *Biochemistry-U.S.*, **2007**, *46*, 9032-9040.

13. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandao, T. A. S.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Bunton, C. A.; Nome, F. Reaction of bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate with Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Comparison of O- and N-phosphorylation, *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 7898-7905.

14. Silva, M.; Mello, R. S.; Farrukh, M. A.; Venturini, J.; Bunton, C. A.; Milagre, H. M. S.; Eberlin, M. N.; Fiedler, H. D.; Nome, F. The Mechanism of Dephosphorylation of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate in Mixed Micelles of Cationic Surfactants and Lauryl Hydroxamic Acid, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 8254-8260.

15. Souza, B. S.; Brandao, T. A. S.; Orth, E. S.; Roma, A. C.; Longo, R. L.; Bunton, C. A.; Nome, F. Hydrolysis of 8-Quinolyl Phosphate Monoester: Kinetic and Theoretical Studies of the Effect of Lanthanide Ions, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 1042-1053.

16. Florian, J.; Warshel, A. Phosphate Ester Hydrolysis in Aqueous Solution: Associative Versus Dissociative Mechanisms, *J. Phys. Chem B*, **1998**, *102*, 719-734.

17. Jones, P. G.; Kirby, A. J. Simple Correlation Between Bond Length and Reactivity - Combined Use of Crystallographic and Kinetic Data to Explore a Reaction Coordinate, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 6207-6212.

18. Henchman, M.; Viggiano, A. A.; Paulson, J. F.; Freedman, A.; Wormhoudt, J. Thermodynamic and Kinetic-Properties of the Meta-Phosphate Anion, PO_3^{3-} , in the Gas-Phase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 1453-1455.

19. Jencks, W. P. When Is an Intermediate Not an Intermediate - Enforced Mechanisms of General Acid-Base Catalyzed, Carbocation, Carbanion, and Ligand-Exchange Reactions, *Acc. Chem. Res.*, **1980**, *13*, 161-169.

20. Knowles, J. R. Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer-Reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, **1980**, *49*, 877-919.
21. Hengge, A. C.; Edens, W. A.; Elsing, H. Transition-State Structures for Phosphoryl-Transfer Reactions of P-Nitrophenyl Phosphate, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 5045-5049.
22. Bianciotto, M.; Barthelat, J. C.; Vigroux, A. Reactivity of Phosphate Monoester Monoanions in Aqueous Solution. 2. A Theoretical Study of the Elusive Zwitterion Intermediates $\text{RO}^+(\text{H})\text{PO}_3^{2-}$, *J. Phys. Chem A*, **2002**, *106*, 6521-6526.
23. Grzyska, P. K.; Czyryca, P. G.; Purcell, J.; Hengge, A. C. Transition State Differences in Hydrolysis Reactions of Alkyl Versus Aryl Phosphate Monoester Monoanions, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 13106-13111.
24. Holmes, R. R. Phosphoryl Transfer Enzymes and Hypervalent Phosphorus Chemistry, *Acc. Chem. Res.*, **2004**, *37*, 746-753.
25. Ugi, I.; Marquard, D.; Klusacek, H.; Gillespi, P.; Ramirez, F. Berry Pseudorotation and Turnstile Rotation, *Acc. Chem. Res.*, **1971**, *4*, 288-+.
26. Hauser, H. R. D. D. Water/Phospholipid Interactions, *Water Relations of Food*, **1975**, 37-71.
27. Bunton, C. A.; Nome, F.; Quina, F. H.; Romsted, L. S. Ion Binding and Reactivity at Charged Aqueous Interfaces, *Acc. Chem. Res.*, **1991**, *24*, 357-364.
28. Finean, J. B. Membrane Mimetic Chemistry - Characterizations and Applications of Micelles, Microemulsions, Monolayers, Bilayers, Vesicles, Host Guest Systems, and Polyions - Fendler, Jh, *Trends Biochem Sci*, **1983**, *8*, 225-225.
29. Maniasso, N. Micellar Media in Analytical Chemistry., *Quim. Nova*, **2001**, *24*, 87-93.

30. Mukerjee, P. Salt Effects on Nonionic Association Colloids, *J. Phys. Chem-U.S.*, **1965**, *69*, 4038
31. El Seoud, O. A.; Ruasse, M. F.; Possidonio, S. pH-independent Hydrolysis of 4-nitrophenyl 2,2-dichloropropionate in Aqueous Micellar Solutions: Relative Contributions of Hydrophobic and Electrostatic Interactions, *J. Phys. Org. Chem.*, **2001**, *14*, 526-532.
32. Faria, A. C.; Mello, R. S.; Orth, E. S.; Nome, F. Hydrolysis of Benzoic Anhydride Mediated by Ionenes and Micelles, *J. Mol. Catal. A*, **2008**, *289*, 106-111.
33. Dwars, T.; Paetzold, E.; Oehme, G. Reactions in Micellar Systems, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2005**, *44*, 7174-7199.
34. Bunton, C. A. The Dependence of Micellar Rate Effects Upon Reaction Mechanism, *Adv. Colloid. Interfac.*, **2006**, *123*, 333-343.
35. Buist, G. J.; Bunton, C. A.; Robinson, L.; Sepulved.L; Stam, M. Micellar Effects Upon Hydrolysis of Bis-2,4-Dinitrophenyl Phosphate, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 4072.
36. Ghosh, K. K.; Sinha, D.; Satnami, M. L.; Dubey, D. K.; Rodriguez-Dafonte, P.; Mundhara, G. L. Nucleophilic Dephosphorylation of p-nitrophenyl diphenyl phosphate in Cationic Micellar Media, *Langmuir*, **2005**, *21*, 8664-8669.
37. Quina, F. H.; Chaimovich, H. Ion-Exchange in Micellar Solutions .1. Conceptual-Framework for Ion-Exchange in Micellar Solutions, *J. Phys. Chem-U.S.*, **1979**, *83*, 1844-1850.
38. Gerstein, J.; Jencks, W. P. Equilibria + Rates for Acetyl Transfer among Substituted Phenyl Acetates Acetylimidazole O-Acylhydroxamic Acids + Thiol Esters, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 4655.
39. Dixon, J. E.; Bruice, T. C. Alpha-Effect .5. Kinetic and Thermodynamic Nature of Alpha-Effect for Amine Nucleophiles, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 2052.

40. Hoz, S. The Alpha Effect - On The Origin of Transition-State Stabilization, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 3545-3547.
41. Kirby, A. J.; Lima, M. F.; da Silva, D.; Roussev, C. D.; Nome, F. Efficient Intramolecular General Acid Catalysis Of Nucleophilic Attack On a Phosphodiester, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 16944-16952.
42. Kirby, A. J.; Manfredi, A. M.; Souza, B. S.; Medeiros, M.; Priebe, J. P.; Brandao, T. A. S.; Nome, F. Reactions of Alpha-Nucleophiles With a Model Phosphate Diester, *Arkivoc*, **2009**, 28-38.
43. Kirby, A. J.; Souza, B. S.; Medeiros, M.; Priebe, J. P.; Manfredi, A. M.; Nome, F. Hydroxylamine As An Oxygen Nucleophile. Chemical Evidence From Its Reaction With a Phosphate Triester, *Chem. Commun.*, **2008**, 4428-4429.
44. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Bunton, C. A.; Nome, F. Reactions of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate With Hydroxylamine, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 7051-7058.
45. Cahn, R. S.; Ingold, C. K.; Prelog, V. The Specification Of Asymmetric Configuration in Organic Chemistry, *Experientia*, **1956**, *12*, 81-94.
46. Raoult, A.; Vilkas, M. Reactivity of Aromatic Aldoximes Towards P-Nitrophenyl and P-Nitrothiophenyl Acetates, *B. Soc. Chim. Fr.*, **1968**, 3315.
47. Epstein, J. K. Micellar Acceleration of Organic Phosphate Hydrolysis by Hidroxiiminomethylpyridinium Type Surfactants, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2816-2832.
48. Jokanović, M. Pyridinium Oximes As Cholinesterase Reactivators. Structure-Activity Relationship And Efficacy in the Treatment of Poisoning With Organophosphorus Compounds, *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16*, 2177.

49. Bunton, C. A.; Ihara, Y. Micellar Effects Upon Dephosphorylation and Deacylation by Oximate Ions, *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 2865-2869.
50. Dai, Q. Y.; Huang, Q. B.; Deng, Y. D. Synthesis and Reaction Of a Powerful Nucleophilic Long-Chain Imidazole-2-aldoxime, *Chinese J. Org. Chem.*, **2002**, *22*, 130-134.
51. Ghosh, K. K.; Satnami, M. L.; Sinha, D. Dephosphorylation of Paraoxon by Hydroxamate Ions in Micellar Media, *Tetrahedron Lett*, **2004**, *45*, 9103-9105.
52. Ghosh, K. K. Nucleophilic Substitution Reaction of Carboxylate and Phosphate Esters with Hydroxamate Ions in Microemulsions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Eng. Aspects*, **2006**, *274*, 125-129.
53. Couderc, S.; Toullec, J. Catalysis of Phosphate Triester Hydrolysis by Micelles of hexadecyltrimethylammonium anti-pyruvaldehyde 1-oximate, *Langmuir*, **2001**, *17*, 3819-3828.
54. Chaimovich, H.; Bonilha, J. B. S.; Politi, M. J.; Quina, F. H. Ion-Exchange in Micellar Solutions .2. Binding of Hydroxide Ion to Positive Micelles, *J. Phys. Chem-US*, **1979**, *83*, 1851-1854.
55. Menger, F. M.; Portnoy, C. E. On Chemistry of Reactions Proceeding inside Molecular Aggregates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 4698.
56. Schroeder, G. K.; Lad, C.; Wyman, P.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. The Time Required For Water Attack at the Phosphorus Atom of Simple Phosphodiester and of DNA, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 4052-4055.
57. Mitic, N.; Smith, S. J.; Neves, A.; Guddat, L. W.; Gahan, L. R.; Schenk, G. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 3338-3363.
58. Cowan, J. A. Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1067-1087.

59. Kirby, A. J.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Brandao, T. A. S.; Nome, F. Activating Water: Efficient Intramolecular General Base Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Triester, *Chem-Eur J*, **2009**, *15*, 8475-8479.
60. O'Brien, P. J. Catalytic Promiscuity and the Divergent Evolution of DNA Repair Enzymes, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 720-752.
61. Moss, R. A.; Ihara, Y. Cleavage of Phosphate-Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents, *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 588-592.
62. Logan, S. R. Fundamentals of Chemical Kinetics, *Harlow Essex: Longman*, **1996**.
63. Bordwell, F. G.; Ji, G. Z. Equilibrium Acidities and Homolytic Bond-Dissociation Energies of the H-O Bonds in Oximes and Amidoximes, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 3019-3025.
64. Farrukh, M. A.; Beber, R. C.; Priebe, J. P.; Satnami, M. L.; Micke, G. A.; Costa, A. C. O.; Fiedler, H. D.; Bunton, C. A.; Nome, F. Reactivity and Models for Anion Distribution: Specific Iodide Binding to Sulfobetaine Micelles, *Langmuir*, **2008**, *24*, 12995-13000.
65. Bunton, C. A.; Farber, S. J. Hydrolysis of Bis(2,4-Dinitrophenyl) Phosphate, *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 767.
66. Limb, J. K.; Jeon, S. E.; Lee, S. E.; Um, I. H. The Effect of Medium on the Alpha-Effect: Nucleophilic Substitution Reaction of p-nitrophenyl diphenyl phosphinate with butane-2,3-dione monoximate and Substituted Phenoxides in Cationic Micelles, *B. Kor. Chem. Soc.*, **2002**, *23*, 1263-1266.
67. Nome, F.; Rubira, A. F.; Franco, C.; Ionescu, L. G. Limitations of the Pseudophase Model of Micellar Catalysis - the Dehydrochlorination of 1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(Para-Chlorophenyl)Ethane and Some of Its Derivatives, *J. Phys. Chem-US*, **1982**, *86*, 1881-1885.

68. Wilk, K. A.; Burczyk, B. Micellar Effects Upon the Reaction of Hydroxide Ion with 2-Phenylethyl Derivatives, *J. Phys. Chem-U.S.*, **1989**, *93*, 8219-8223.
69. Cox, J. R.; Ramsay, O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters, *Chem. Rev.*, **1964**, *64*, 317.
70. Epstein, J.; Rosenblatt, D. H. Kinetics of Some Metal Ion-Catalyzed Hydrolyses of Isopropyl Methylphosphonofluoridate (Gb) at 25-Degrees, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 3596-3598.
71. Brown, R. S.; Zamkanej, M. Hydrolysis of Neutral Phosphate and Phosphonate Esters Catalyzed by Co-2+-Chelates of Tris-Imidazolyl Phosphines, *Inorg. Chim. A-Bioinor*, **1985**, *108*, 201-207.
72. Mukerjee, P. Critical Micelle Concentration of Aqueous Surfactant Systems, *US. Government Printing Office*, **1971**.
73. Menger, F. M. On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity, *Acc. Chem. Res.*, **1985**, *18*, 128-134.
74. Courtney, R. C.; Gustafson, R. L.; Westerback, S. J.; Hyytiainen, H.; Chaberek, S. C.; Martell, A. E. Metal Chelate Compounds as Catalysts in the Hydrolysis of Isopropyl Methylphosphonofluoridate and Diisopropylphosphorofluoridate, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 3030-3036.