



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

**TRANSFERÊNCIA DO GRUPO SULFURILA: HIDRÓLISE DO
8-*N,N*-DIMETILAMINO-1-NAFTILSULFATO DE POTÁSSIO E
RELAÇÕES ESTRUTURA-REATIVIDADE.**

Jacks Patrick Priebe

Florianópolis / SC – Brasil

2005

JACKS PATRICK PRIEBE

**TRANSFERÊNCIA DO GRUPO SULFURILA: HIDRÓLISE DO
8-*N,N*-DIMETILAMINO-1-NAFTILSULFATO DE POTÁSSIO E
RELAÇÕES ESTRUTURA-REATIVIDADE.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química 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 / SC – Brasil

2005

JACKS PATRICK PRIEBE

**Transferência do Grupo Sulfurila: Hidrólise do 8-*N,N*-
Dimetilamino-1-Naftilsulfato de Potássio e Relações
Estrutura-Reatividade.**

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação aprovada em 14 de fevereiro de 2005 como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química, Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. A banca examinadora foi formada pelos professores:

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Orientador

Prof. Dr. Hugo A. Gallardo Olmedo

UFSC

Prof. Dr. José Carlos Gesser

UFSC

Prof^a. Dra. Maria da Graça Nascimento

UFSC

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Faruk Nome pela orientação e amizade.

Aos Professores Maria da Graça Nascimento, José Carlos Gesser, e Hugo A.

Gallardo Olmedo, por terem aceitado participar da banca.

Ao Professor Antony Kirby pela doação do DANOL, à colega Amanda G.

Damasceno pela síntese do *p*NPS e ao Prof. Adailton J. Bortoluzzi pela coleta dos dados e resolução da estrutura cristalina do *p*NPS.

À minha família e namorada, pela paciência, compreensão, carinho e amor, os quais dedico mais esta etapa da minha vida.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório, em especial ao Tiago Brandão e Davi da Silva, pelas sugestões, correções e discussões de temas relacionados a este trabalho, e principalmente pelos momentos agradáveis de convivência.

Aos meus amigos, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFSC.

A UFSC e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A reação de hidrólise do 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftilsulfato de potássio (DMANS) foi estudada como um modelo não-mimético de reação de transferência do grupo sulfurila em reações enzimáticas. A hidrólise do DMANS foi independente do pH na região entre 3 e 6, região de pH que corresponde à reação de hidrólise da espécie dipolar iônica do substrato, onde se observou uma catálise intramolecular através da ligação de hidrogênio do grupo amônio vizinho ao oxigênio fenólico do sulfato. Na região abaixo de pH 3, observou-se um aumento na constante de velocidade de reação devido ao equilíbrio de protonação do grupo sulfato. O valor de 4,76, calculado para o pK_a efetivo do grupo de saída, indica que o DANOL é um grupo de saída 10^5 vezes mais efetivo que o naftilsulfato. Este efeito concordou com os dados de entropia e efeito isotópico, nos quais observou-se uma menor participação das moléculas de solvente (água) no estado de transição. Os dados cristalográficos do *p*-nitrofenilsulfato de potássio (*p*NPS) revelaram que cada cátion de potássio (K^+) está coordenado por oito átomos de oxigênio de seis diferentes ânions de *p*NPS. A comparação dos dados do *p*NPS com outros sulfatos orgânicos, permitiu propor uma relação estrutura-reatividade para sulfatos orgânicos. Nesta relação se observa o aumento do comprimento da ligação S-O_{LG} e o respectivo encurtamento C-O com a diminuição do pK_a do grupo fenólico, demonstrando que nos compostos mais reativos o maior comprimento da ligação S-O_{LG} tende a fazer com que o estado de transição seja mais parecido com o estado fundamental.

ABSTRACT

The hydrolysis of the potassium salt of 8-(dimethylamino)-naphthyl-1-sulfate (DMANS) was studied as a non-mimetic model of sulfuryl transfer in enzymatic reactions. The hydrolysis rate constants of DMANS was pH-independent between pH 3 and 6, region that corresponds to the hydrolysis of the zwitterionic form of the substrate, where an intramolecular catalysis was observed through a hydrogen bond of the ammonium neighbouring group to the phenol oxygen of the sulfate. In the region of $\text{pH} < 3$, the rate constant increased due to protonation of the sulfate anion. The value of 4.76 calculated for the effective pK_a of the leaving group indicates that DMANS is 10^5 times more reactive than naphthylsulfate. This effect agrees with the activation entropy and isotope effect, which showed a lower participation of the solvent molecules (water) in the transition state. The crystallographic data of the potassium *p*-nitrophenylsulfate (pNPS) revealed that each potassium cation (K^+) is coordinated to eight oxygen atoms of six different pNPS anions. Comparing the data of the pNPS with other organic sulfates, a structure-reactivity relationship was obtained for organic sulfates. In this relationship, an increase of the S-O_{LG} bond length is compensated by a decrease in the C-O bond length as the pK_a of the phenol group decreases. The results show that in the more reactive compounds, a larger S-O_{LG} bond length is observed and the transition state is closer to the ground state.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Diagrama de energia livre hipotético para uma reação; onde ΔG_0^\ddagger e ΔG_c^\ddagger são respectivamente, as energias livres de ativação para a reação na ausência e presença de catalisador.....	16
Figura 02. Constante de velocidade observada em função do pH para a reação de hidrólise do <i>o</i> -nitrofenilsulfato de potássio a 100°C.....	25
Figura 03. Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo sulfurila entre os grupos axiais X e Y.....	26
Figura 04. Mecanismo de formação de <i>p</i> -nitrofenilsulfato por β -arilsulfotransferase.....	29
Figura 05. Sítio Ativo da β -fosfoglucomutase obtido por raio-X, onde se pode observar um átomo de fósforo pentacoordenado (intermediário oxifosforano) da reação de isomerização da β -glicose-1-fosfato para β -glicose-6-fosfato.....	30
Figura 06. Desenho da estrutura molecular do <i>p</i> NPS, com 40% de probabilidade.....	39
Figura 07. Desenho do arranjo molecular entorno do cátion K^+	41
Figura 08. Estruturas de alguns monoésteres de sulfato reportadas no CCDC.....	42
Figura 09. Dependência do comprimento de ligação C-O e S-O _{LG} com o pK_a de monoésteres de sulfato. A soma dos dois comprimentos de ligação é efetivamente constante, com correlação angular igual a zero pelo gráfico de $(l_{C-O}+l_{S-O})/2$ conforme observado na linha média.	44
Figura 10. Espectros de UV/Vis para o DMANS em solução aquosa em função da variação de pH 4,0 – 10,0, a 25°C.....	47
Figura 11. Variação da absorbância do DMANS em solução aquosa em função do aumento do pH, $\lambda = 330$ nm e 25 °C, $Abs_{MIN} = 0,063 \pm 0,001$ e $Abs_{MAX} = 0,172 \pm 0,002$	48

Figura 12. Espectros sucessivos de UV/Vis, da reação de hidrólise do DMANS em pH 5,22, $\mu = 1,0$ e 60°C.....	49
Figura 13. Cinética típica em água da reação de hidrólise do DMANS em pH 5,22, a 60°C e $\mu = 1,0$. A linha corresponde a um ajuste teórico considerando uma reação de primeira-ordem.....	50
Figura 14. Variação da k_{obs} para a hidrólise do DMANS em função do aumento do pH, a $\mu = 1,0$ e a 60°C. A linha corresponde ao ajuste teórico de acordo com as Equações 8 e 9.....	51
Figura 15. Variação da k_{obs} para a hidrólise do DMANS em função do aumento da concentração do HCl e DCl, a $\mu = 1,0$ e 60°C.....	56
Figura 16. Variação da k_{obs} para a hidrólise do DMANS em função da diminuição da temperatura, a $\mu = 1,0$ e pH 4,50.....	58
Figura 17. Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo sulfurila entre os grupos axiais X e Y. Em pontilhado apresenta-se uma trajetória mecanística qualitativa da hidrólise de sulfatos orgânicos tradicionais (A), do DMANS (B) e de diânions de fosfato (C).....	59
Figura 18. Estado de transição da espécie dipolar iônica do DMANS.....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01. Dados cristalográficos e parâmetros do refinamento da estrutura do <i>p</i> NPS.....	35
Tabela 02. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) para o <i>p</i> NPS.....	40
Tabela 03. Parâmetros geométricos selecionados das estruturas cristalinas dos monoésteres de sulfato pesquisados.....	43
Tabela 04. Constantes de velocidade observada para a hidrólise do DMANS em função do pH, a $\mu = 1,0$ e 60°C.....	52
Tabela 05. Parâmetros calculados para a hidrólise do DMANS em função do aumento do pH, a $\mu = 1,0$ e a 60°C.....	54
Tabela 06. Constantes de velocidade observada para a hidrólise do DMANS na presença de concentrações crescentes de ácido clorídrico, a 60°C e a $\mu = 1,0$	55
Tabela 07. Constantes de velocidade observada para a hidrólise do DMANS na presença de concentrações crescentes de ácido clorídrico deuterado, a 60°C e a $\mu = 1,0$	55
Tabela 08. Constantes de velocidade observada para a hidrólise do DMANS em diferentes valores de temperatura, a $\mu = 1,0$ e pH 4,50.....	57
Tabela 09. Parâmetros de ativação para a hidrólise do DMANS, a $\mu = 1,0$ e pH 4,50.....	58

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
β_{LG}	beta do grupo de saída
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Center
CHNS	análise química elementar de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre.
°C	graus centígrados
DMANS	8- <i>N,N</i> -dimetilamino-1-naftilsulfato de potássio
DANOL	8- <i>N,N</i> -dimetilamino-1-naftol
ΔG	Energia livre
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia
δ	deslocamento químico
E_a	Energia de ativação de Arrhenius
E.T.	estado de transição
h	constante de Planck
IV	espectroscopia de infravermelho
K	constante de equilíbrio
k_B	constante de Boltzmann
k	constante da velocidade de reação
λ	comprimento de onda
MHz	megaHertz
M	molar = mol.L ⁻¹
μ L	microlitro
nm	nanômetro
pD	Medida da concentração de íons deutério
pH	Medida da concentração de íons hidrogênio
pK	Medida da constante de equilíbrio
p.f.	ponto de fusão
pNPS	<i>p</i> -nitrofenilsulfato de potássio
R	constante universal dos gases
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano
UV/Vis	espectroscopia de ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Justificativa	11
1.2. Objetivos	13
1.3. Revisão Bibliográfica	14
1.3.1. Catálise Química.....	15
1.3.2. Catálise Enzimática.....	19
1.3.3. Catálise Intramolecular.....	21
1.3.4. Mecanismo de Transferência do Grupo Sulfurila.....	24
1.3.5. Cristalografia de Raios-X: Relações entre Estrutura e Reatividade....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1. Equipamentos	32
2.2. Reagentes	32
2.3. Sínteses	33
2.3.1. Síntese do 8- <i>N,N</i> -dimetilamino-1-naftilsulfato de pótassio (DMANS)..	33
2.3.2. Síntese do <i>p</i> -nitrofenilsulfato de pótassio (<i>p</i> NPS).....	33
2.4. Difractometria de Raios-X	34
2.5. Medidas Cinéticas	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1. Estudo dos Dados Cristalográficos de Monoésteres de Sulfato	38
3.1.1. Estrutura Cristalina do <i>p</i> -nitrofenilsulfato de potássio (<i>p</i> NPS).....	38
3.1.2. Correlações entre Comprimentos de Ligação de Estruturas Cristalinas de Monoésteres de Sulfato.....	41
3.2. Determinação do pK_a do DMANS por Espectroscopia no UV/Vis	47
3.3. Estudo da Hidrólise do 8-<i>N,N</i>-dimetilamino-1-naftilsulfato de potássio (DMANS)	49
3.3.1. Efeito do pH sobre a reação de hidrólise do DMANS.....	50
3.3.2. Determinação do efeito isotópico da reação de hidrólise do DMANS.	54
3.3.3. Determinação dos Parâmetros de Ativação.....	56
3.4. Considerações Finais	60
4. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ARTIGOS PUBLICADOS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. JUSTIFICATIVA

O crescente interesse na compreensão dos detalhes mecânicos de reações químicas, especialmente de interesse biológico, tem promovido o desenvolvimento de uma variedade de técnicas, entre elas, podemos citar as que envolvem ressonância magnética nuclear, difração de raios-X, eletroforese, e modificação estrutural. Todas desenvolvidas com o objetivo de auxiliar a modelagem do sítio ativo e o entendimento de como ocorrem os estados de transição nas reações catalisadas por enzimas.¹

Acredita-se que a estrutura molecular do estado de transição de uma reação catalisada por enzimas é determinada por fatores eletrostáticos e estruturais, que aceleram a conversão dos reagentes a produtos diminuindo a energia do estado de transição ou aumentando a energia do estado reagente. Um interesse prático muito importante é o fato que análogos do estado de transição podem ser inibidores potentes de reações enzimáticas, o que tem sido considerado uma meta crucial para a síntese de novos fármacos. Isto contudo, é limitado pelos poucos aspectos da química das enzimas que são realmente compreendidos, havendo um interesse crescente no estudo destes sistemas.¹

Neste sentido, a química dos ésteres de fosfato e sulfato possuem uma grande importância em sistemas biológicos, onde sua hidrólise e formação são catalisadas com grande eficiência por enzimas conhecidas por fosfatases e sulfatases, que aumentam a velocidade destas reações em milhões de vezes, quando comparadas às reações não catalisadas.²

As reações de transferência do grupo sulfurila, por exemplo, possuem um papel biológico crucial na desintoxicação de xenobióticos. E ainda, os monoésteres esteroidais do sulfato são intermediários chaves na biossíntese de esteróides, onde o grupo sulfato permite que estes intermediários sejam mantidos na circulação sanguínea como precursores de hormônios. Monoésteres de sulfato também estão entre todas as classes de produtos naturais, incluindo nucleotídeos, peptídeos e proteínas, polissacarídeos, esteróides e lipídeos.³

Embora, estes compostos possuam grande importância biológica, a química dos ésteres de sulfato ainda é pouco explorada. Assim, o presente trabalho visa contribuir com trabalhos voltados a modelar o funcionamento de enzimas, em particular aquelas envolvidas em reações de transferência do grupo sulfurila, com o propósito de uma melhor compreensão sobre o seu mecanismo de ação.

1.2. OBJETIVOS

A importância da química do átomo de enxofre por si só justificaria o estudo de seus compostos. O fato de que os compostos sulfatados fazem parte de muitos processos biológicos, dão aos ésteres de sulfato um papel fundamental para o desempenho de muitas funções vitais nos organismos vivos. Além disso, os aspectos de transferência de próton, orientação e catálise são especialmente importantes neste trabalho e podem contribuir para o entendimento de diversos sistemas enzimáticos.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho é investigar os aspectos da transferência do grupo sulfurila a partir da hidrólise do 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftilsulfato de potássio (DMANS), bem como correlacionar os comprimentos de ligação de diversos ésteres de sulfato com suas reatividades. Aumentando assim, o conhecimento na área de mecanismos de reações orgânicas e dos diferentes fatores que contribuem para a catálise enzimática através de estudos de modelos não-miméticos.

Os objetivos específicos são:

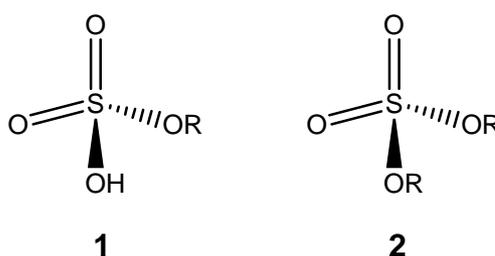
- 1) sintetizar e caracterizar os sulfatos obtidos a partir do *p*-nitrofenol e 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftol;
- 2) determinar as constantes de equilíbrio e cinéticas da hidrólise do DMANS em diferentes concentrações de ácido e de temperaturas;
- 3) correlacionar os dados cristalográficos de monoésteres de sulfato com a sua reatividade em reações de transferência do grupo sulfurila;
- 4) propor um mecanismo para a reação, visando contribuir para a elucidação do mecanismo de ação enzimática.

1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O enxofre é um elemento essencial para os seres vivos, atuando direta ou indiretamente em funções bioquímicas. Este elemento é amplamente encontrado na natureza sob a forma de sulfeto de hidrogênio, dióxido de enxofre, sulfatos de cálcio e magnésio e também na forma de sulfetos minerais metálicos. Compostos contendo enxofre em sua estrutura são amplamente utilizados na indústria numa variedade de produtos e processos que incluem: (i) fabricação de fertilizantes; (ii) fabricação de isolantes de equipamentos elétricos; (iii) solventes; (iv) processos de vulcanização da borracha e plastificantes.

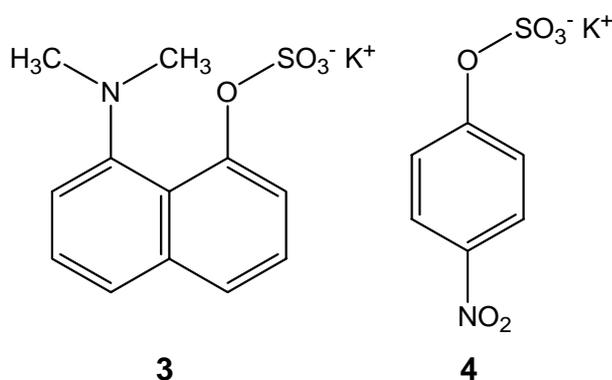
O enxofre pode estar presente em seqüências de ligações (–S–S–), sendo esta uma característica muito importante para manter a função catalítica das enzimas, nas quais as ligações de dissulfeto entre os resíduos de cisteína permite a estabilização da estrutura tridimensional.

Em geral, ésteres de sulfato podem ser classificados em duas categorias de acordo com o número de radicais alquílas e/ou arilas presentes: (i) monoésteres (**1**) apresentam apenas um substituinte orgânico, e (ii) diésteres (**2**), tal como o nome sugere, dois substituintes. O primeiro tipo de composto pode estar na forma de sal ou como um monoéster do ácido sulfúrico, no qual o grupo hidroxila apresenta uma funcionalidade de ácido monoprótico forte.



O presente trabalho concentra-se em entender os aspectos mecanísticos da quebra e/ou formação de ligações de monoésteres de sulfato. Assim, considerando a necessidade de desenvolvimento de modelos de ação enzimática em reações químicas e em consonância com as linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI), este trabalho contém o estudo da hidrólise do 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftilsulfato de potássio (DMANS). O

DMANS (**3**), em particular apresenta interessantes características de um modelo não-mimético da catálise enzimática, no qual se observa que o ataque nucleofílico sobre o enxofre do grupo sulfato é assistido por catálise intramolecular, efeitos há muito tempo conhecidos como de extrema importância na catálise por enzimas. Além disso, dentro do objetivo deste trabalho, a obtenção dos dados cristalográficos de raios-X do *p*-nitrofenilsulfato de potássio (*p*NPS) (**4**), permite uma análise geral de uma relação entre estrutura e reatividade para este tipo de monoésteres de sulfato. As relações estrutura reatividade têm sido utilizadas pelos grupos de Dunitz⁴, Kirby⁵ e outros, fornecendo dados únicos sobre a reatividade de diferentes compostos.



Assim, nesta introdução apresenta-se inicialmente uma visão geral sobre catálise química, enzimática, e intramolecular, como também uma abordagem dos processos de substituição nucleofílica em ésteres de sulfato. Por fim, os aspectos de estudos cristalográficos nos permitem uma visão elegante com relação ao estudo mecanístico.

1.3.1. Catálise Química

A velocidade de uma reação química pode ser aumentada na presença de uma substância, comumente conhecida como catalisador, a qual deve possuir algumas características essenciais, tais como: (i) aumentar a velocidade da reação quando presente em pequenas quantidades; (ii) deve ser regenerado no final da reação, mantendo-se quimicamente inalterado, embora observa-se em alguns casos que pode ser consumido pelos produtos da reação; e por fim, (iii) não pode alterar as

variações de entalpia e de energia livre de equilíbrio ou seja, o valor da constante de equilíbrio da reação mantém-se inalterado. Em geral, um catalisador atua na etapa determinante da velocidade, diminuindo a energia livre de ativação em relação à etapa determinante de uma reação não-catalisada⁶ (**Figura 1**).

Dois tipos gerais de classificação de catálise são encontrados: a heterogênea e a homogênea.⁷ Na catálise homogênea os reagentes se apresentam na mesma fase da mistura reacional e na heterogênea em fases diferentes, de modo que na catálise homogênea não se observam efeitos de superfície, e a velocidade de reação independe da natureza das paredes do recipiente e/ou da razão entre a área superficial e o volume. A catálise homogênea subdivide-se em ácida e base específica, ácida e base geral, nucleofílica e eletrofílica.^{8, 9} A seguir é apresentada uma breve revisão sobre estes tipos de catálise.

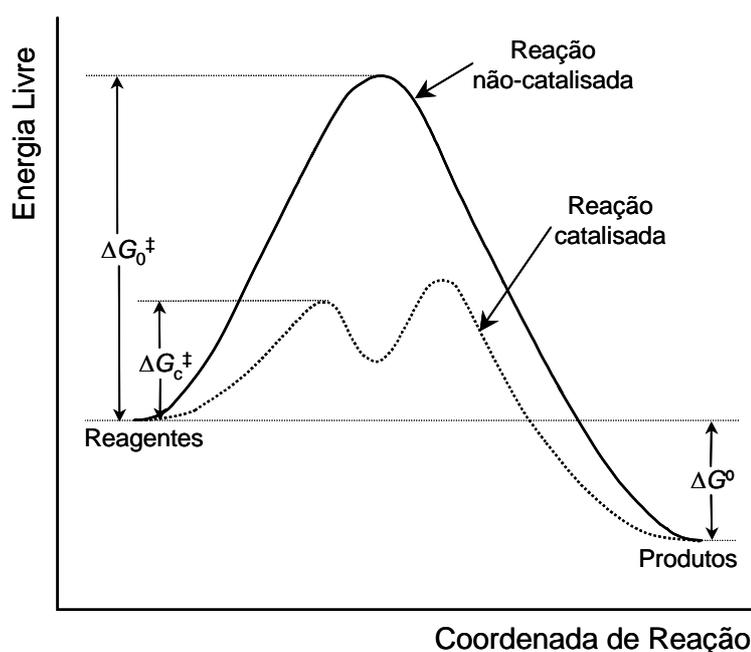
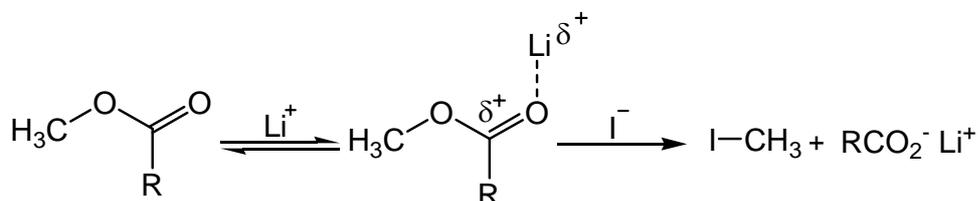


Figura 1. Diagrama de energia livre hipotético para uma reação; onde ΔG_0^\ddagger e ΔG_c^\ddagger são respectivamente, as energias livres de ativação para a reação na ausência e presença de catalisador.¹⁰

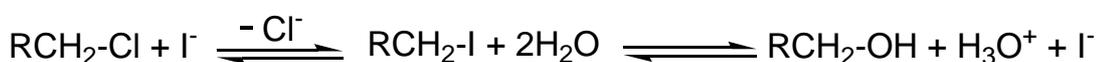
Na catálise eletrofílica, um eletrófilo (ácido de Lewis) como Li^+ , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , age complexando alguns centros de maior densidade eletrônica, formando uma estrutura mais deficiente de elétrons, possibilitando um aumento da velocidade de um ataque nucleofílico ou de uma decomposição unimolecular. Um exemplo

destas reações pode ser observado na clivagem de ésteres metílicos na presença de iodeto de lítio (**Esquema 1**)⁹.



Esquema 1

A catálise nucleofílica de uma reação ocorre inicialmente por substituição do grupo de saída, formando um intermediário mais reativo que a molécula inicial (**Esquema 2**). Em geral, os catalisadores utilizados para estas reações são melhores nucleófilos que aqueles presentes no meio. Desta forma, o intermediário formado é um melhor nucleófilo que a molécula inicial. Mostra-se abaixo um exemplo de catálise nucleofílica que ocorre em reações de hidrólise de haletos de alquilas primárias, a qual ocorrem muito lentamente sob condições não-catalisadas.⁹

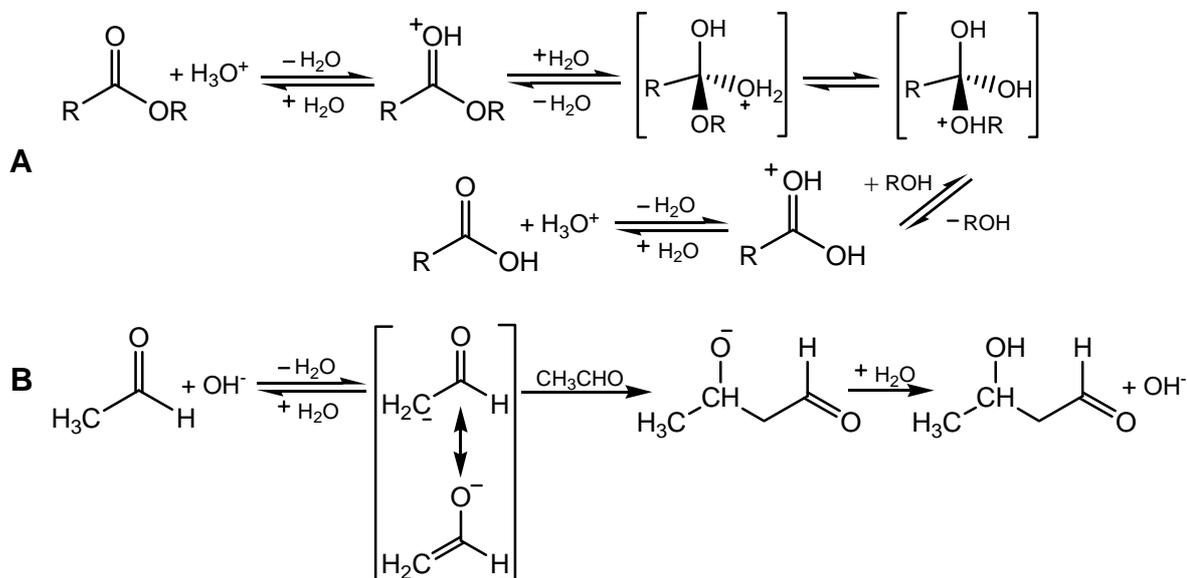


Esquema 2

A catálise ácido-base envolve a transferência de próton durante a reação. No caso da catálise ácida o substrato é quem recebe o próton e na básica a própria base retira um próton do substrato. A catálise ácido-base é classificada em geral ou específica, dependendo do mecanismo e das espécies envolvidas. A catálise do tipo específica é dependente do equilíbrio de protonação dos reagentes, que precede a etapa determinante da reação, onde não ocorre a transferência de próton. Estas reações são governadas somente pela concentração dos íons hidrônio e hidróxido, conforme indicado na equação de velocidade apresentada na **Equação 1**, em que o k_{obs} , k_0 , k_{H} e k_{OH} são as constantes de velocidade observada, da reação espontânea induzida pelo solvente, e das reações dos íons hidrônio e hidróxido, respectivamente. As reações de hidrólise de ésteres simples (**A**) e a reação de

condensação aldólica de acetaldeídos em meio básico diluído (**B**), são exemplos que apresentam catálise ácida e básica específica, respectivamente (**Esquema 3**).⁹

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] \quad (1)$$

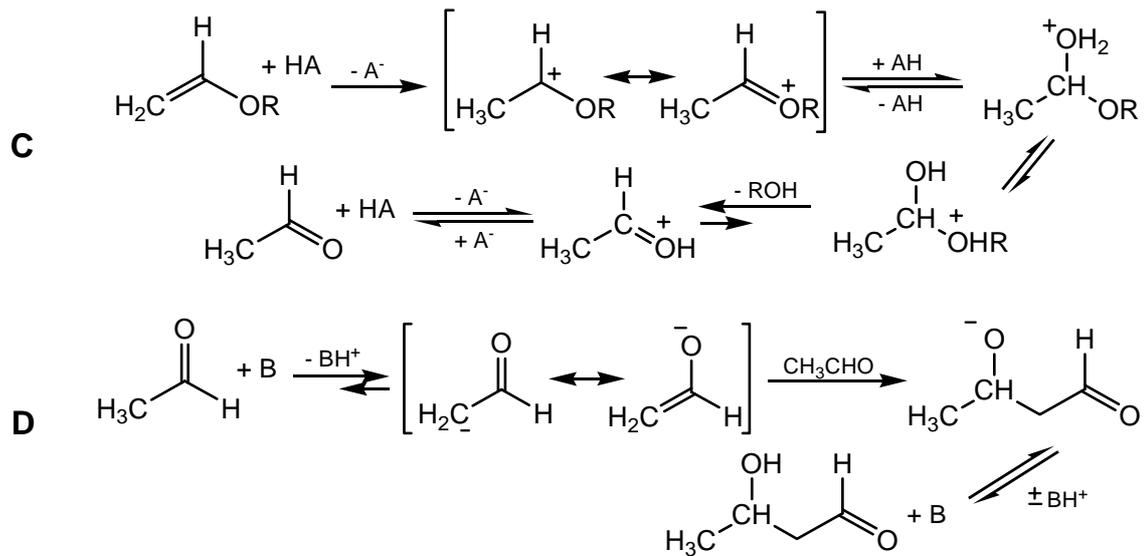


Esquema 3

A catálise ácido-base geral não depende exclusivamente das concentrações dos íons hidrônio (H^+) e hidróxido (OH^-), mas de todas as bases (A^-) e ácidos conjugados (AH) presentes no meio, no qual a contribuição de cada uma destas espécies está relacionada a sua respectiva concentração e força como ácido ou base. Neste mecanismo, a transferência de próton ocorre na etapa determinante da velocidade de reação e a equação que descreve a constante de velocidade está apresentada na **Equação 2**, onde k_{AH} , e o k_{A} , representam as constantes catalíticas do ácido e da base conjugada, respectivamente.⁹

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + \sum k_{\text{AH}}[\text{AH}] + \sum k_{\text{A}}[\text{A}^-] \quad (2)$$

Exemplos de catálise ácida geral e básica geral são observadas na hidrólise de éteres vinílicos em meio ácido (**C**) e na reação aldólica do etanal (**D**), respectivamente (**Esquema 4**).



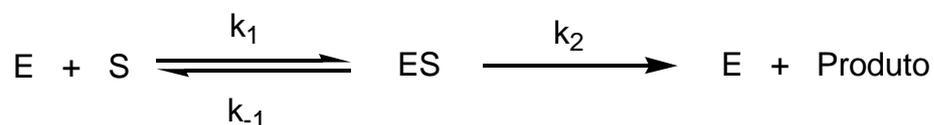
Esquema 4

1.3.2. Catálise Enzimática

A participação de enzimas em reações biológicas são vitais para a sobrevivência de um ser vivo. As enzimas em sua maioria são de natureza protéica, exceto em alguns casos, como de certas moléculas de RNA que também atuam como catalisadores, e apresentam ainda estruturas tridimensionais extremamente complexas que invariavelmente possuem diversas funções que podem operar conjuntamente.¹¹

Embora as enzimas e os catalisadores químicos sejam governados pelas mesmas leis naturais, as enzimas apresentam diferenças em vários aspectos, entre elas, uma excepcional especificidade para com certos substratos que proporciona uma mínima formação de subprodutos. Ainda, as condições de reação enzimática, são mais brandas, com baixas temperaturas, pH neutro e em pressão atmosférica, diferentemente da catálise química que freqüentemente exige condições mais drásticas. Cabe salientar, que estudos *in vitro* têm descrito algumas enzimas, cujas condições ótimas de ação ocorrem em meios ácidos ou básicos e em temperaturas mais elevadas que as observadas nos organismos vivos. Isso tem despertado um grande interesse no estudo e na aplicação destas enzimas em diferentes processos industriais.¹²

A reação enzimática ocorre num local específico dentro da enzima, conhecido como sítio ativo. Dentro deste sítio, o substrato (S) liga-se por complexação não covalente com a enzima (E), formando um complexo enzima-substrato (ES), o qual reage liberando os produtos, conforme mostrado no **Esquema 5**.^{11, 13}



Esquema 5

As velocidades observadas para as reações enzimáticas estão diretamente relacionadas com a formação e estabilidade do complexo ES. Dados da literatura relatam uma grande aumento de velocidade nas reações catalisadas por enzimas que pode chegar até 10^{17} vezes. Este aumento de velocidade foi observado na catálise pela enzima oritidine 5'-monofosfato decarboxilase (ODCase) na etapa final da biossíntese da uridina monofosfato.¹⁴

Pode-se atribuir as altas velocidades de reação a três fatores primordiais: (i) as interações que a enzima faz com o substrato, as quais podem ocorrer podendo ser por ligações de hidrogênio ou atração eletrostática, por exemplo, estabelecendo assim uma adequada aproximação e orientação com os grupos responsáveis pela catálise no sítio ativo; (ii) pela mudança de conformação que a enzima adquire após a complexação com o substrato, o qual obriga o substrato a atingir uma conformação mais parecida com o estado de transição, diminuindo assim a energia de ativação da reação; e (iii) aumento da nucleofilicidade de algumas espécies quando presentes no sítio ativo, já que em muitos casos o centro apolar da enzima faz com que o nucleófilo perca sua camada de solvatação e torne-se mais reativo.

Historicamente, o interesse em descobrir qual é o mecanismo de ação enzimática, iniciou-se em meados do século passado. O grande número de variáveis encontradas, devido a complexidade das enzimas e as limitações técnicas, dificultavam a formulação de reações modelo que podiam descrever as transformações ocorridas, principalmente, no sítio ativo. Hoje, muitas técnicas são empregadas, como a cristalografia de raios-X, a ressonância magnética nuclear, e o dicroísmo circular, na busca de desvendar a estrutura tridimensional da enzima e entender o seu funcionamento¹⁵, facilitando assim, a formulação de modelos que possam imitar as características das enzimas.

Dentro dos muitos modelos existentes, pode-se citar os miméticos que tentam imitar o sítio ativo das enzimas como um todo, e os não-miméticos que tentam caracterizar determinada ação enzimática.^{16, 17} Os estudos dos modelos não-miméticos seguem duas linhas de pesquisa: um voltado para os estudos dos complexos de inclusão¹⁸, que modelam as interações enzima-substrato, como por exemplo os calixarenos, os éteres de coroa e as ciclodextrinas^{19, 20}, e o outro voltado para os princípios físico-químicos que governam as reações no sítio ativo, tais como, as reações intramoleculares que serão abordadas a seguir.

1.3.3. Catálise Intramolecular

As reações intramoleculares ocorrem entre grupos reativos próximos ligados na estrutura de uma mesma molécula e diferem das reações intermoleculares que ocorrem entre grupos reativos de moléculas diferentes. Em geral, as reações intramoleculares são mais rápidas que as reações intermoleculares, devido a fatores como proximidade dos grupos reacionais, dessolvatação, interações entre ligantes, tensão angular e estérea, entre outras.²¹⁻²⁴

As reações intramoleculares são modelos conceitualmente simples e por isso têm sido muito estudadas para melhor compreender o alto poder catalítico das enzimas em sistemas biológicos. A relação direta com as enzimas é possível pois as leis que regem a reatividade dos grupos envolvidos nas reações intramoleculares são as mesmas que estão presentes no sítio ativo da enzima.²⁵

O estudo de várias reações intramoleculares tais como, lactonização, hidrólise de ésteres e amidas, contribuiu para o surgimento de várias teorias que relacionam a catálise intramolecular com suas respectivas reações bimoleculares. Dentre os diferentes modelos e parâmetros, encontram-se a molaridade efetiva, o controle estereopopulacional, o direcionamento dos orbitais e a teoria espaço-temporal, entre outros. Vários efeitos entre os grupos reagentes foram observados a partir destes experimentos e foram relacionados como efeitos estéreo, de proximidade, de orientação, de graus de liberdade, que possibilitaram um melhor esclarecimento com relação aos fatores que promovem as altas velocidades das reações enzimáticas e intramoleculares.²⁵⁻²⁸ A seguir estas teorias serão sucintamente apresentadas.

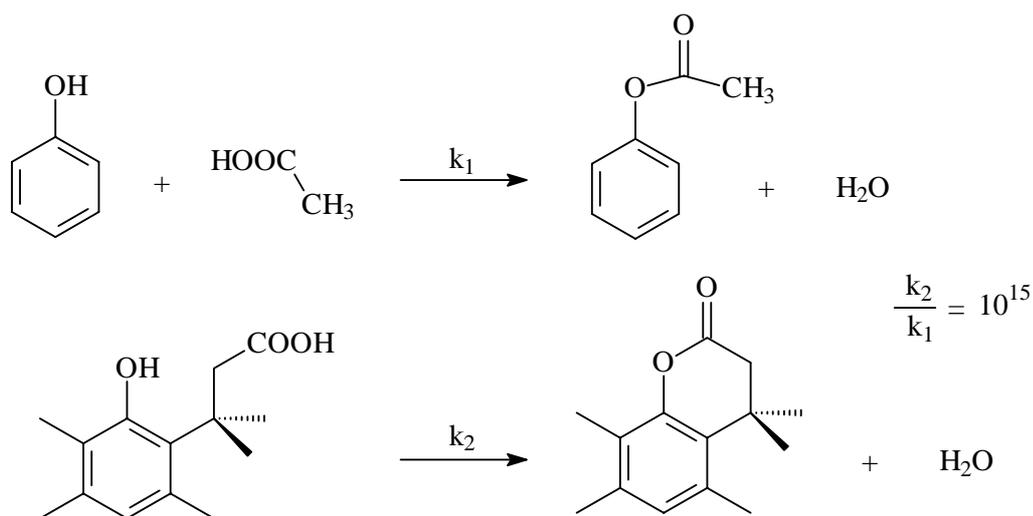
Segundo W. P. Jencks, um fator importante são as contribuições entrópicas, as quais explicam que em uma reação bimolecular a entropia é diminuída quando forma o estado de transição (ET), desde que diminui o número de espécies independentes no meio reacional devido à perda de graus de liberdade translacionais e rotacionais. Segundo Jencks, esta perda de entropia não ocorre em reações intramoleculares ou no sítio ativo de uma enzima, explicando assim o alto valor das constantes de velocidade.²⁹

O conceito da molaridade efetiva (ME) foi introduzido por Kirby, e o valor de ME é calculado pela razão entre a constante de velocidade de primeira-ordem (reação intramolecular) com a constante de velocidade de segunda-ordem (reação intermolecular), obtida de reações que seguem o mesmo mecanismo e com as mesmas condições reacionais (**Equação 3**).

$$ME = \frac{k_{\text{intramolecular}} (\text{s}^{-1})}{k_{\text{intermolecular}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})} \quad (3)$$

A molaridade efetiva indica a concentração de catalisador (nucleófilo ou eletrófilo), necessário para que a velocidade de reação bimolecular seja igual a intramolecular. Um exemplo bem conhecido é a reação de esterificação realizada por Fersht e Kirby³⁰, a qual envolve a reação entre um fenol e um ácido carboxílico, e neste caso a velocidade da reação intramolecular é 10^{15} vezes maior que a reação bimolecular (**Esquema 6**).

A teoria de direcionamento de orbitais proposta por Koshland, sugere que a alta velocidade das reações catalisada por enzimas é devida ao perfeito direcionamento dos ângulos de aproximação dos orbitais dos grupos reacionais, sendo que um pequeno desvio nestes ângulos provocaria uma diminuição na velocidade de reação. O termo utilizado para estimar a catálise de uma reação, em relação a catálise enzimática é a relação $1/\theta$. O ângulo θ é definido pela fração da superfície sólida de um átomo esférico que participaria da reação.³¹



Esquema 6

A teoria de direcionamento de orbitais proposta por Koshland, sugere que a alta velocidade das reações catalisada por enzimas é devida ao perfeito direcionamento dos ângulos de aproximação dos orbitais dos grupos reacionais, sendo que um pequeno desvio nestes ângulos provocaria uma diminuição na velocidade de reação. O termo utilizado para estimar a catálise de uma reação, em relação a catálise enzimática é a relação $1/\theta$. O ângulo θ é definido pela fração da superfície sólida de um átomo esférico que participaria da reação.³¹

Já a teoria denominada de controle estereopopulacional, proposta por Milstien e Cohen³², é caracterizada pelo aumento da concentração do confôrmero reativo dentre as várias possibilidades que uma molécula pode assumir. Assim, a rigidez conformacional pode ajudar explicar o aumento da velocidade e modelar o sítio ativo de uma enzima, a qual impõe ao substrato uma conformação específica perfeitamente adequada para a catálise, através de ligações de hidrogênio, atração e repulsão eletrostática e de van der Waals, entre outras.

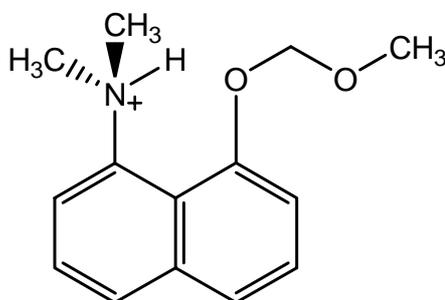
A proposta de Menger³³, denominada teoria espaço-temporal, sugere que o aumento da velocidade em reações intramoleculares e enzimáticas é proporcional ao tempo em que os grupos funcionais reagentes A e B permanecem próximos a uma distância tal que impede que as moléculas de solventes esteja entre os grupos reativos. Este postulado está representado no **Esquema 7**, em que mostra os reagentes separados por uma molécula de solvente em equilíbrio com um complexo ativado. O complexo ativado apresenta uma distância A e B crítica sem a presença

de moléculas solvente entre eles, e assim pode reagir rapidamente levando a formação dos produtos. Este modelo também ajuda na compreensão de mecanismos enzimáticos, já que as enzimas também buscam a dessolvatação e uma menor distância de contato para catalisar as reações.



Esquema 7

Outro efeito importante, envolve uma ligação de hidrogênio que pode estar conjugada intramolecularmente ativando o substrato e aumentando a velocidade de reação. Kirby²⁶ observou que na hidrólise do 8-*N,N*-dimetilamino-1-metoximetoxinaftaleno (5) a velocidade de reação é superior a hidrólise bimolecular do grupo cetala na ordem de 10⁶ vezes, demonstrando assim a importância deste efeito em reações enzimáticas.



5

Dentro das teorias citadas, algumas são mais aceitas que outras, mas o fato é que provavelmente todos os fatores aqui mencionados devem contribuir de alguma forma para o aumento da velocidade das reações intramoleculares e enzimáticas.

1.3.4. Mecanismo de Transferência do Grupo Sulfurila

As ligações RO-S e RO-P, encontradas em monoésteres de sulfato e fosfato em geral são muito estáveis e apresentam uma reatividade similar em reações de hidrólise. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a hidrólise de alguns ésteres pode ultrapassar a milhares de anos, como por exemplo, a hidrólise espontânea do DNA em solução neutra, que é tão lenta que se desconhece a constante velocidade.³⁴ Já outras reações podem ocorrer em segundos, como é o caso da hidrólise espontânea do 2,4-dinitrofenilsulfato, um éster de sulfato ativado, em que o valor do $t_{1/2}$ é 187 segundos à 75°C.³⁵

Em geral, a hidrólise de ésteres de sulfato apresenta diferentes efeitos dependendo da região de pH em que a reação está sendo estudada. A **Figura 2** mostra o perfil de pH obtido por Fendler³⁵ para a hidrólise do *o*-nitrofenilsulfato de potássio a 100°C. Observam-se três regiões diferentes, em termos de variação da constante de velocidade em função do pH: (i) catálise ácida para valores de pH < 4; a constante de velocidade da reação aumenta proporcionalmente à concentração de íons hidrônio no meio; (ii) hidrólise espontânea entre pH 4 e 12; região na qual a constante de velocidade para a reação de hidrólise independe da concentração de íons hidrônio e hidróxido; e (iii) catalise básica para valores de pH > 12, onde o efeito catalítico é proporcional ao aumento na concentração do íon hidróxido.

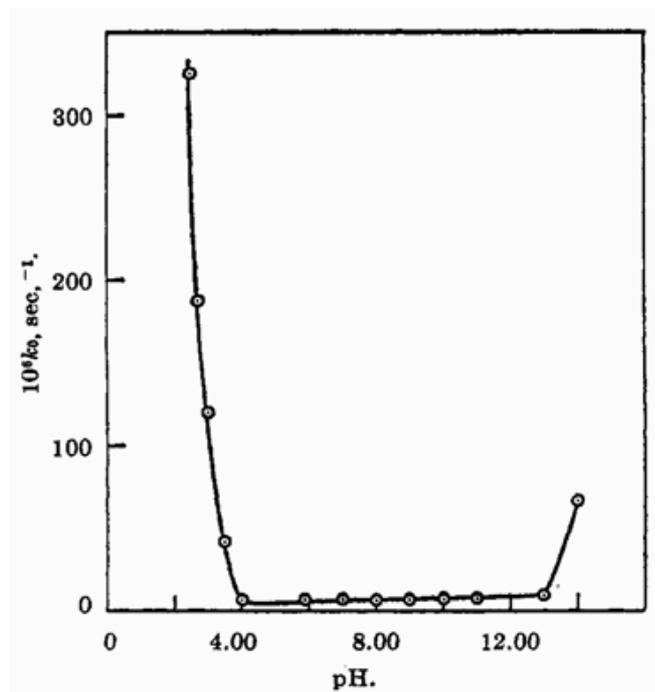


Figura 2. Constantes de velocidade observada em função do pH para a reação de hidrólise do *o*-nitrofenilsulfato de potássio a 100°C.³⁵

Os mecanismos de substituição nucleofílica de ésteres de sulfato são complexos devido ao possível envolvimento de diversas espécies. Dependendo do pH, o substrato corresponde a uma mistura do éster neutro e a forma monoaniônica. Na catálise ácida, o mecanismo sugerido na literatura para as reações de hidrólise de monoalquil e monoaril sulfatos, compreende processos do tipo A1 e A2³⁵⁻³⁷, os quais são análogos àqueles envolvendo substituição no carbono tetraédrico, do tipo S_N1 e S_N2. Estes mecanismos podem ser classificados como dissociativo (A1) e associativo (A2).^{2, 38-40}

Uma maneira bastante útil para visualizar os mecanismos dissociativo e associativo é através de um diagrama simplificado de coordenada de reação, conforme mostrado na **Figura 3**. Neste diagrama, observa-se uma coordenada no qual o progresso do ataque do nucleofílico é representado pelo eixo “distância S-X”, e outra referente a saída do nucleóforo representada pelo eixo “distância S-Y”.

Observa-se que os mecanismos com mais de uma etapa de reação seguem os caminhos pelas bordas do diagrama, enquanto que os mecanismos concertados seguem caminhos no interior do diagrama. Assim, os intermediários envolvidos nas reações por etapas são átomo de enxofre pentacoordenado (ii) e a espécie trigonal (iii) que é o trióxido de enxofre.

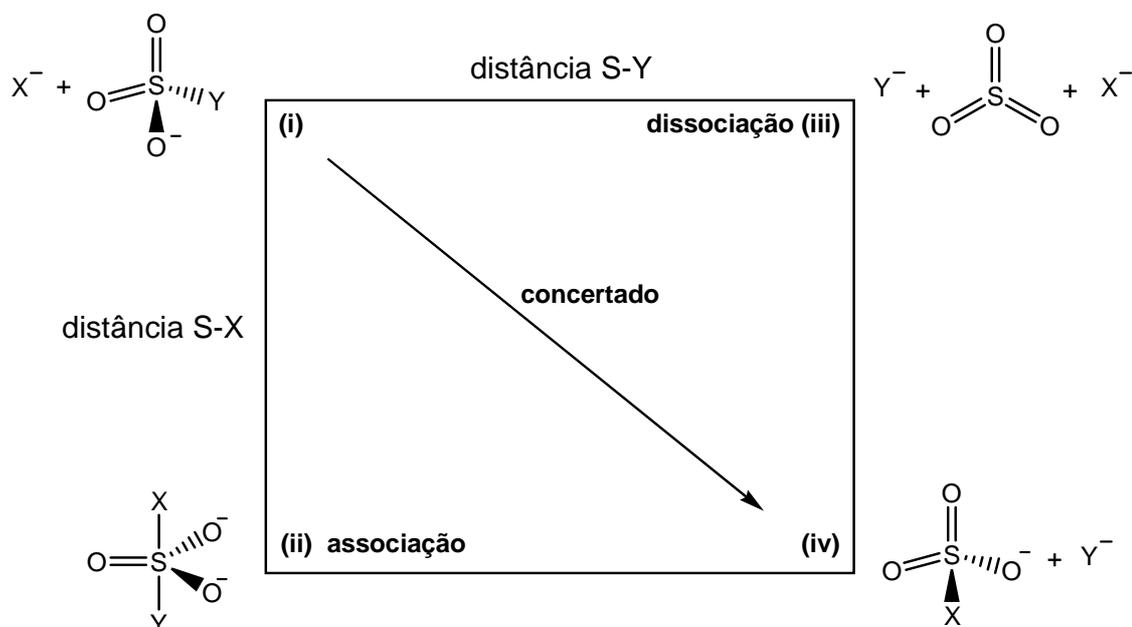
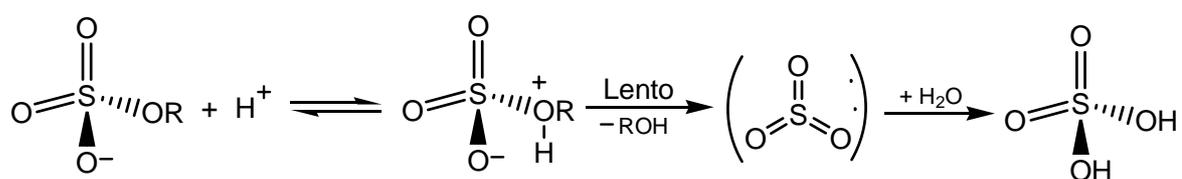


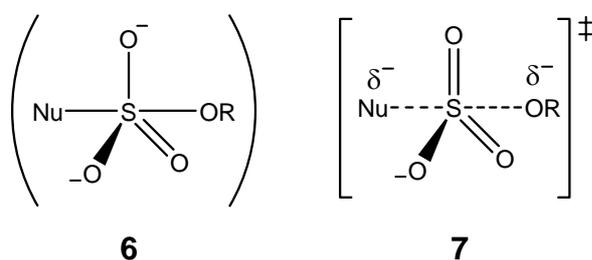
Figura 3. Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo sulfúrico entre os grupos axiais X e Y.

O mecanismo dissociativo ocorre através da formação do trióxido de enxofre (SO_3) (**Figura 3 – iii**), sendo análogo ao processo $\text{S}_{\text{N}}1$ na química do carbono. O trióxido de enxofre é uma espécie trigonal e pode ser atacado pelo nucleófilo por ambas as faces. No mecanismo do tipo A1, observa-se inicialmente um equilíbrio de protonação, em que o átomo de oxigênio do grupo de saída é protonado, em seguida este decompõe lentamente para formar os produtos da reação de acordo com um processo dissociativo. Contudo, é importante notar que a espécie livre SO_3 pode ser formada, mas nunca foi comprovada³⁹ (**Esquema 8**).

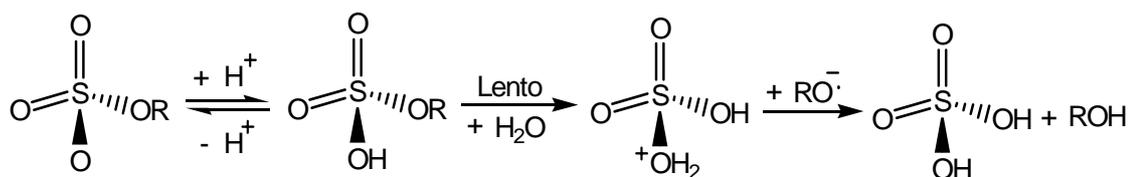


Esquema 8

O mecanismo associativo (**Figura 3 – ii**) é análogo ao mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ para substituição no átomo de carbono, ocorrendo com a inversão de configuração. A espécie formada pelo ataque do nucleófilo sobre o átomo de enxofre é pentacoordenada, colocando o nucleófilo e o grupo de saída em posições apicais em geometria do tipo bipirâmide trigonal. Este tipo de espécie pode ser tanto um intermediário (**6**) como um estado de transição (**7**).



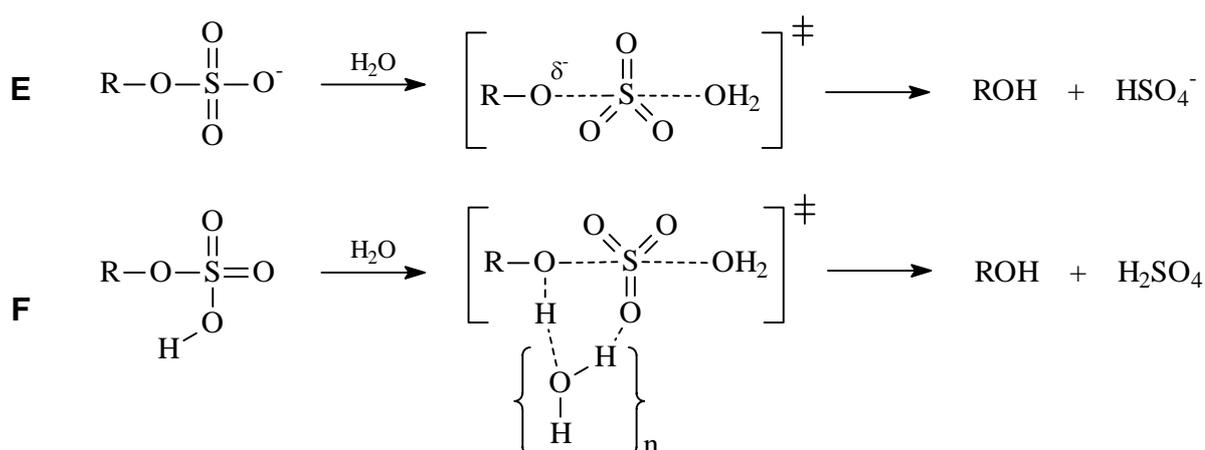
Nas reações de hidrólise de sulfatos catalisadas por ácido que seguem o mecanismo do tipo A2, observa-se inicialmente um equilíbrio de protonação, com um posterior ataque do nucleófilo formando um intermediário pentacoordenado de acordo com um mecanismo associativo (**Esquema 9**).



Esquema 9

O ponto de vista atual com relação às reações de hidrólise e de transferência do grupo sulfurila de ésteres de sulfato em solução considera que a espécie neutra e a monoaniônica do monoéster de sulfato seguem um mecanismo com características dissociativas. Esta reação procede sem que o trióxido de enxofre livre seja formado como intermediário, mas o E.T. da etapa determinante envolve principalmente a quebra da ligação do grupo de saída com pequena formação da ligação com o nucleófilo.^{2, 38, 39}

Em termos do diagrama na **Figura 3**, este mecanismo passa por caminhos de reação que se aproximam da aresta ocupada pelo intermediário trigonal, mas sem chegar a formá-lo. Assim, é proposto dois mecanismos concertados para a hidrólise espontânea e catalisada por ácido para as espécies aniônica e neutra do éster de sulfato (**Esquema 10**).^{2, 38, 39} Na hidrólise espontânea a espécie mais importante é a aniônica (**E**), enquanto que na hidrólise catalisada por ácido a espécie predominante é a neutra (**F**).



Esquema 10

Este mecanismo também é observado nas reações de transferência do grupo sulfurila do PAPS (3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato) para o *p*-nitrofenol (**8**),

formando o *p*-nitrofenilsulfato (**9**), em um processo catalisado pela β -arilsulfotransferase IV. Observa-se que a estrutura do estado de transição envolve uma histidina (His-104) que abstrai um próton do nucleófilo, enquanto o grupo de saída fosfato é assistido por uma Lisina (Lis-102) (**Figura 4**).^{41, 42}

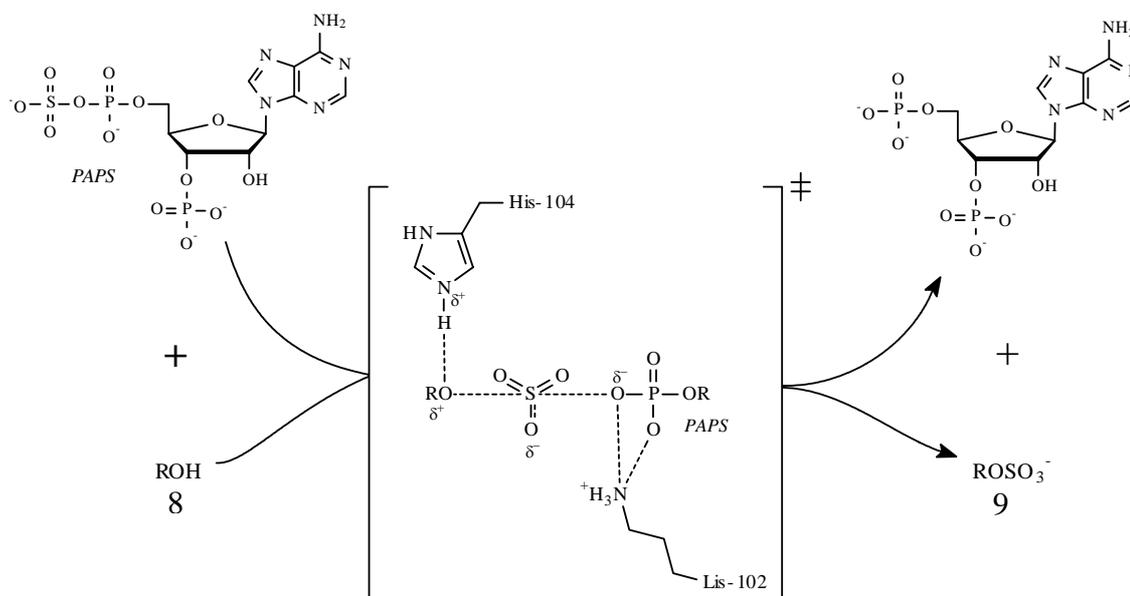


Figura 4. Mecanismo de formação de *p*-nitrofenilsulfato por β -arilsulfotransferase.

1.3.5. Cristalografia de Raios-X: Relações entre Estrutura e Reatividade

Desde a década de 60, a técnica de difração de raios-X vem se difundindo rapidamente. Hoje é possível encontrar uma variedade enorme de estruturas resolvidas, muitas das quais de enzimas⁴³, que possibilitaram uma gama de informações que têm sido utilizadas na elucidação de mecanismos de reações.

Em relação aos sistemas enzimáticos, esta técnica possibilita uma visão espacial do sítio ativo, a qual pode ser utilizada no entendimento de como as interações entre substrato e enzima ocorrem. Um exemplo recente foi obtido por Lahiri e col.⁴⁴, os quais observam um átomo de fósforo pentacoordenado (intermediário oxifosforano) da reação de isomerização da β -glicose-1-fosfato para β -glicose-6-fosfato catalisada pela β -fosfoglucomutase (**Figura 5**).

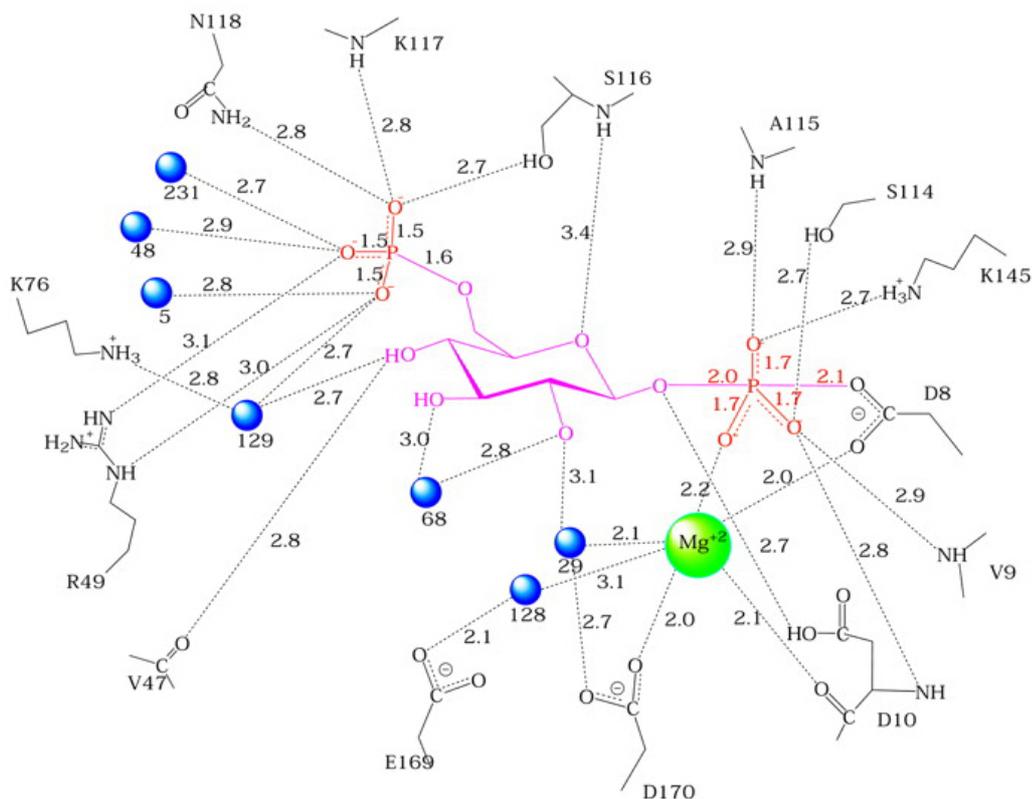


Figura 5. Sítio ativo da β -fosfoglucomutase obtido por raios-X, onde se pode observar um átomo de fósforo pentacoordenado (intermediário oxifosforano) da reação de isomerização da β -glicose-1-fosfato para β -glicose-6-fosfato.⁴⁴

Além da elucidação estrutural, o estudo sistemático de estruturas cristalinas possibilita uma informação complementar e valiosa com relação aos estudos mecanísticos. O pioneirismo de Dunitz e seu grupo, por exemplo, têm produzido um forte impacto no modo de pensar sobre a forma de como os caminhos reacionais acontecem. Eles mapearam a trajetória de ataque de um nucleófilo sobre um grupo carbonila, observando um ângulo de ataque sobre o carbono carbonílico de 110° .⁴⁵

O grupo de Kirby, por sua vez, tem defendido que as verdadeiras relações entre estrutura-reatividade devem relacionar dados estruturais (comprimento de ligação, ângulos, entre outros) com dados que se referem à reatividade, como pK_a e constantes de velocidade de reações. Este tipo de relação é diferente daquela que químicos freqüentemente chamam relações estrutura-reatividade, as quais relacionam pK_a e constantes de velocidade de reações, e que deveriam ser conhecidas apenas como relações reatividade-reatividade.⁵

Um exemplo interessante de relação estrutura-reatividade foi aplicado para um maior entendimento do mecanismo de transferência do grupo fosforila de monoésteres de fosfato (Ar-O-PO_3^-). Observou-se que um menor comprimento da ligação P-OC é acompanhado com uma ligação PO-C maior e a ligação P-OC é maior a medida que aumenta o $\text{p}K_a$ do grupo de saída.⁵

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. EQUIPAMENTOS

Os espectros de UV/Vis e os dados cinéticos foram obtidos em um espectrofotômetro VARIAN modelo CARY 50, acoplado a um microcomputador, contendo um sistema de aquisição e tratamento de dados cinéticos CARY WINUV 3.00. Foram utilizadas celas de quartzo de 3 mL de capacidade e 1 cm de caminho ótico. O espectrofotômetro era acoplado a um banho termostático da MICROQUÍMICA, modelo MQBTC 99-20.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em espectrômetros de ressonância magnética nuclear VARIAN modelo MERCURY PLUS 400 MHz utilizando TMS como referência interna.

O ponto de fusão foi determinado em um aparelho de chapa quente tipo FISHER-JOHNS, modelo MQAPF 301 da MICROQUÍMICA, e não foram corrigidos. As medidas de pH nos procedimentos cinéticos foram realizadas em um pHmetro digital HANNA modelo pH 200, calibrado previamente com soluções padrão pHs 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlo Erba).

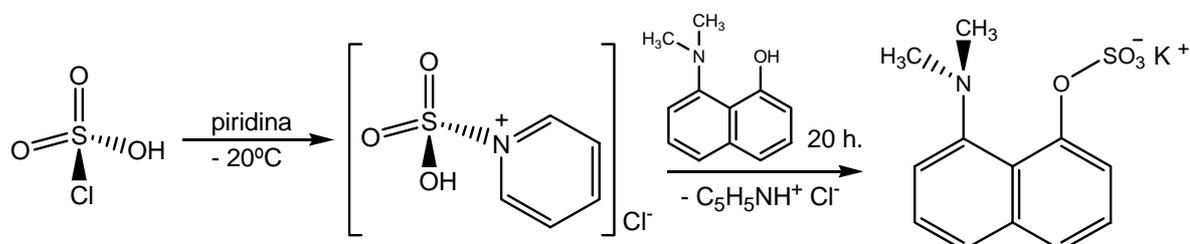
2.2. REAGENTES

Os solventes usados para as reações de síntese foram purificados conforme a literatura.^{46, 47} Os tampões e sais utilizados na preparação das soluções e misturas reacionais foram utilizados sem qualquer tratamento prévio, sendo procedentes da Nuclear, Vetec, Carlo Erba, Merck e Aldrich.

O ácido clorídrico deuterado (37% em D_2O) e a água deuterada (99,9%) foram procedentes da Aldrich e Cambridge Isotope Laboratories. O *p*-nitrofenilsulfato de potássio foi sintetizado em nossos laboratórios conforme descrito na literatura.⁴⁸ O composto 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftol foi sintetizado pelo grupo do Prof. Anthony J. Kirby⁴⁹ e gentilmente cedido ao nosso grupo de pesquisa. O 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftilsulfato de potássio foi preparado conforme descrito na literatura.^{35, 50}

2.3. SÍNTESES

2.3.1. Síntese do 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftilsulfato de pótassio (DMANS)



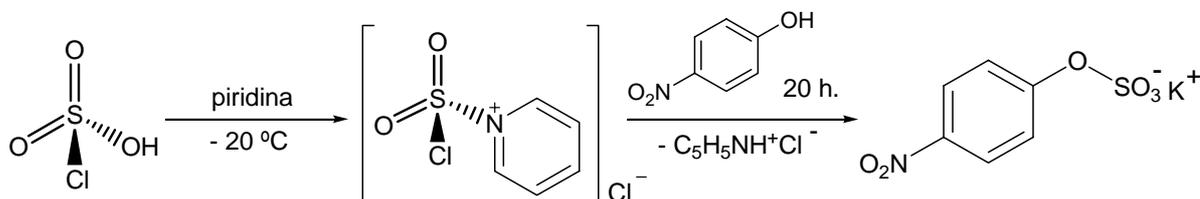
Esquema 11

O DMANS foi sintetizado de acordo com o método de Ragan⁵⁰ e purificado segundo o método de Fendler³⁵ (**Esquema 11**). Em um balão de fundo redondo com 5 mL de piridina seca foi adicionado lentamente e com cautela 1,13 mL (17,05 mmol) de ácido clorosulfônico. A mistura reagiu sob agitação à temperatura de -20 °C por alguns minutos, então se adicionou de uma só vez uma mistura de 3 mL de piridina seca e 2,85 g (15,22 mmol) de 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftol previamente seco, a mistura resultante foi agitada por 20 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a piridina foi retirada em um evaporador rotatório sob temperatura inferior a 35 °C. Adicionou-se água para 30 mL e o pH foi ajustado com hidróxido de potássio para próximo de 8 sob agitação, em seguida rotaevaporou-se a securo sob temperatura inferior a 40 °C. O resíduo sólido foi misturado em acetonitrila seca e centrifugado e o sobrenadante foi rotaevaporado e o sólido obtido foi dissolvido em etanol à quente, resfriado e filtrado a vácuo. p.f. > 250 °C. UV/Vis: $\lambda_{\text{máx}}^{\text{Água}} = 300\text{nm}$. RMN ¹H 400 MHz (D₂O): δ 7,75 (d, 1H, 5,5Hz); 7,54 (d, 1H, 5,5Hz); 7,52 (d, 1H, 5,5Hz); 7,44 (t, 1H, 5,5Hz); 7,41 (t, 1H, 5,5Hz); 7,15 (d, 1H, 5,5Hz); 2,74 (s, 6H).

2.3.2. Síntese do *p*-nitrofenilsulfato de pótassio (*p*NPS)

O *p*NPS foi sintetizado pela colega Amanda G. Damasceno, de acordo com o método de Ragan⁵⁰ descrito na síntese anterior, utilizando-se 0,75 mL (11,32 mmol)

de ácido clorosulfônico, 1,39 g (9,79 mmol) de *p*-nitrofenol e 8,00 mL de piridina. (Esquema 12).



Esquema 12

O resíduo sólido resultante foi dissolvido em etanol à quente, purificado com carvão ativo e filtrado a vácuo. A solução foi deixada em repouso por um dia, havendo a formação de cristais amarelos que foram filtrados sob vácuo. p.f. 246-249 °C, lit.⁵¹ 246-250 °C. Rendimento obtido foi de 10%. UV/Vis: $\lambda_{\text{máx}}^{\text{Água}} = 280\text{nm}$. IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 1054 (C-O-S), 1248-1282 (S=O), 727 e 872 (sal éster de sulfato), 696 cm^{-1} (monosulfato). RMN ^1H 200 MHz (D_2O): δ 8,31 (d, 2H); 7,48 (d, 2H). Análise de difratometria de raios-X resolveu a estrutura do *p*NPS que apresentou interessantes características que serão relatadas no capítulo de resultados e discussão.

2.4. DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

A coleta de dados para a obtenção da estrutura cristalina foram realizados em 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 SHELXS-97⁵² e SHELXL-97⁵³, respectivamente. A estrutura molecular e o meio de coordenação do íon de potássio (K^+) foram produzidos usando os programas ORTEP3⁵⁴ e ZORTEP⁵⁵, respectivamente. Tanto a coleta de dados como a resolução da estrutura, foram realizadas pelo Professor Adailton J. Bortoluzzi do Departamento de Química da UFSC.

A estrutura cristalina do *p*-nitrofenilsulfato de potássio foi resolvida primeiramente por Sieroslowski⁵⁶, mas nossos resultados também foram

depositados no Cambridge Crystallographic Data Center – CCDC* com o nº 249356⁴⁸ por apresentar diferenças nos valores de angulação e de comprimento de ligação de alguns átomos. Os dados cristalográficos bem como os parâmetros de refinamento da estrutura estão contidos na **Tabela 1**.

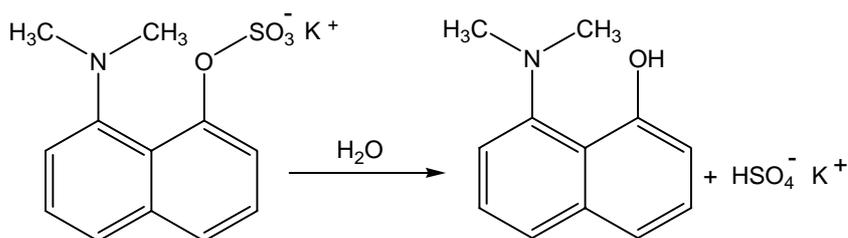
Tabela 1. Dados cristalográficos e parâmetros do refinamento da estrutura do *p*NPS.

Fórmula empírica	C ₆ H ₄ KN ₂ O ₆ S
Peso molecular	257,26
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0,71069 Å
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	Pbca
Dimensões da cela unitária	a = 6,990(1) Å b = 13,130(1) Å c = 19,180(1) Å
Volume	1760,3(3) Å ³
Z, Densidade calculada	8, 1,941 g/cm ³
Coefficiente de absorção	0,849 mm ⁻¹
F(000)	1040
Tamanho do cristal	0,40 x 0,40 x 0,33 mm
Intervalo de θ	2,12 a 26,46°
Intervalo dos índices h, k, l	-8 ≤ h ≤ 0 0 ≤ k ≤ 16 0 ≤ l ≤ 24
Reflexões coletadas/únicas	1819/1819 (R _{int} = 0,0000)
Correção de absorção	Psi-scan
Máx e min. de transmissão	0,968 e 0,729
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz completa em F ²
Dados/restrições/parâmetros	1819 / 0 / 137
GOOF em F ²	1,090
Índice final de R[I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0492, wR ₂ = 0,1398
Índice R (todos os dados)	R ₁ = 0,0560, wR ₂ = 0,1453
Coefficiente de extinção	0,0025(13)
Densidade eletrônica residual	0,559 e -0,605 e.Å ⁻³

* Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC), 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK. Email: deposit@ccdc.cam.ac.uk e site: www.ccdc.cam.ac.uk.

2.5. MEDIDAS CINÉTICAS

As determinações das constantes cinéticas para a reações de hidrólise foram realizadas em solução aquosa e acompanhadas por espectrometria de UV/Vis pela formação do 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftol em três comprimentos de onda 304 nm, 316 nm e 320 nm (**Esquema 13**). Para a determinação do pK_a , todos os espectros foram corrigidos para a linha base na região de comprimento de onda de 500 nm, a fim de apresentar pontos isobésticos bem definidos. O pH durante as corridas cinéticas foi mantido com os seguintes tampões: ácido clorídrico (pH < 3,0); ácido acético/acetato de potássio (pH 4,00-5,25); fosfato de potássio (pH 5,5-7,5); e ácido bórico/borato (pH 7,75-9,00). Nas cinéticas realizadas com D_2O a $60^\circ C$, o pD foi corrigido considerando que $pD = pH + 0,25$.⁵⁷



Esquema 13

Para cada cinética foram adicionados em uma cela de quartzo, 2,5 mL de uma solução de KCl com força iônica 1,0 contendo o tampão na concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, as quais foram deixadas termostatar na temperatura desejada. A reação foi iniciada pela adição de uma alíquota de $50 \mu\text{L}$ da solução estoque de DMANS em água na concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, assim a concentração na cela foi de $2,45 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. As reações foram acompanhadas por no mínimo três tempos de meia vida com uma média de 280 leituras de absorbância. As constantes de velocidade foram calculadas com erros inferiores a 1%, sendo que o valor de k_{obs} representa a média do cálculo de k_{obs} nos três comprimentos de onda estudados.

Para obter os parâmetros de ativação, foram determinadas as constantes de velocidade da hidrólise do DMANS em sete temperaturas diferentes e os dados foram tratados pela equação de Eyring⁹ (**Equação 4**).

$$\ln\left(\frac{k_{\text{obs}}}{T}\right) = \left[\ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right] - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \left(\frac{1}{T}\right) \quad (4)$$

onde, k_{obs} representa a constante de velocidade, T a temperatura em Kelvin, ΔS^\ddagger a entropia de ativação, e ΔH^\ddagger a entalpia de ativação. Os valores das constantes de Boltzmann (k_B), Planck (h) e universal dos gases (R) foram iguais a $1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$, $6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$, e $8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, respectivamente.⁵⁸

A **Equação 5** foi utilizada para fornecer a energia de ativação de Arrhenius (E_a),

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (5)$$

e a energia livre de ativação (ΔG^\ddagger) foi calculada a partir da **Equação 6**.

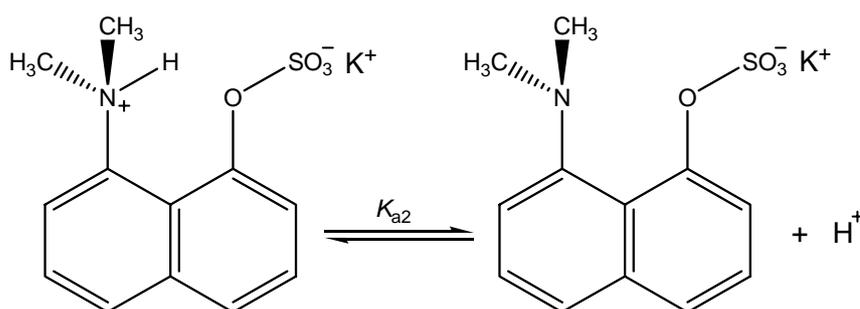
$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (6)$$

As regressões lineares e não lineares foram realizadas com o programa de computador ORIGIN versão 7.0 (Microcal Software, 2002), obtendo-se coeficientes de correlação $r \geq 0,99$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir será apresentado o estudo dos dados cristalográficos de monoésteres de sulfato, iniciando com os resultados da estrutura cristalina do *p*-nitrofenilsulfato de potássio (**4**), o qual possibilitou uma correlação estrutura-reatividade entre os comprimentos de ligação (C-O-S) do grupo de saída de vários monoésteres de sulfato com o respectivo pK_a do fenol.

Também serão apresentados os resultados do estudo com o 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftilsulfato de potássio (**3**), o qual se determinou a constante de dissociação do grupo amônio (**Esquema 14**); o efeito na constante de velocidade de hidrólise (k_{obs}) com a variação na concentração de ácido no meio; o efeito isotópico; e os parâmetros de ativação (E_a , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger).



Esquema 14

3.1. ESTUDO DOS DADOS CRISTALOGRAFÍCOS DE MONOÉSTERES DE SULFATO

3.1.1. Estrutura Cristalina do *p*-nitrofenilsulfato de potássio (*p*NPS)

Na **Tabela 2** estão representados todos os comprimentos de ligação e ângulos para o *p*NPS. A estrutura molecular está representada na **Figura 6** com o esquema de numeração atômica.

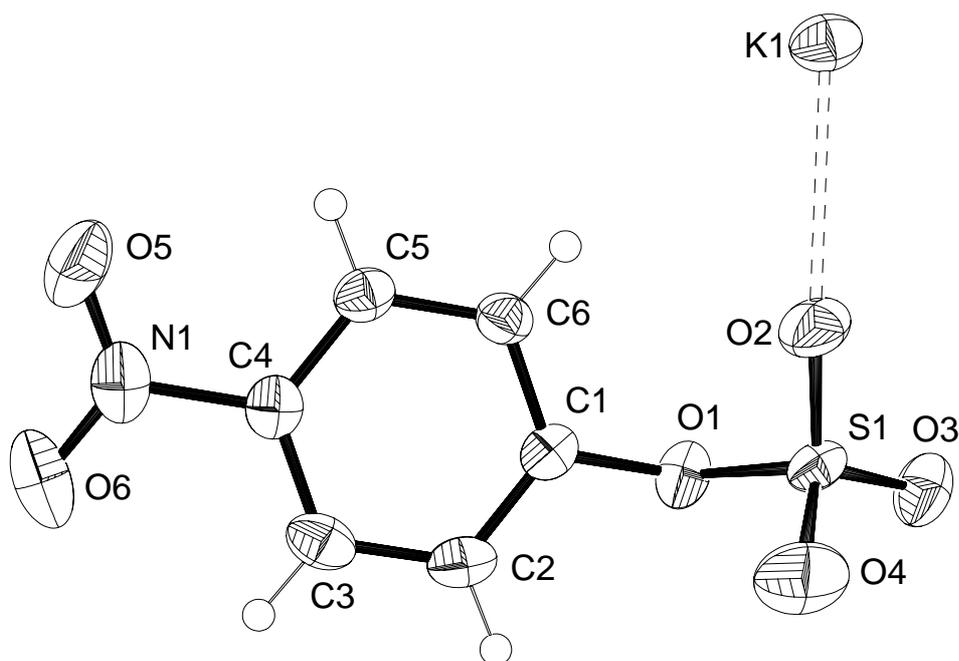


Figura 6. Desenho da estrutura molecular do *p*NPS, com 40% de probabilidade.

Estes resultados demonstram que os comprimentos de ligação e os ângulos entre os átomos do anel aromático não apresentam alterações significantes e podem ser considerados normais. O plano do anel e o plano do grupo nitro apresentam uma torção entre si de $12,2(2)^\circ$ e o empacotamento cristalino possui interações muito fortes que deslocam a ligação C1-O1 para fora do plano do anel por $5,6^\circ$.

A natureza iônica do grupo sulfato é observada pelos três comprimentos de ligação entre os átomos S1-O2, S1-O3 e S1-O4, que apresentam o mesmo valor de $1,432(3) \text{ \AA}$, os quais são similares aos encontrados para outros monoésteres de sulfato (**Tabela 3**). O comprimento da ligação S1-O1 é relativamente longo, com um valor de $1,629(2) \text{ \AA}$, assim como, a ligação C1-O1 que apresenta um comprimento de ligação de $1,398(3) \text{ \AA}$, sendo mais longa que a observada no fenol⁵⁹ de $1,351(16) \text{ \AA}$, e $1,347(2) \text{ \AA}$ no *p*-nitrofenol.^{60, 61}

Tabela 2. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos ($^{\circ}$) para o pNPS.

S1-O3	1.431(2)	K1-O1 ⁱⁱ	3.071(2)
S1-O4	1.432(2)	N1-O6	1.212(4)
S1-O2	1.432(2)	N1-O5	1.224(4)
S1-O1	1.629(2)	N1-C4	1.466(4)
K1-O2	2.679(2)	O1-C1	1.398(3)
K1-O3 ⁱ	2.763(2)	C1-C2	1.373(4)
K1-O3 ⁱⁱ	2.790(2)	C1-C6	1.385(4)
K1-O5 ⁱⁱⁱ	2.951(2)	C2-C3	1.384(4)
K1-O2 ^{iv}	3.031(2)	C3-C4	1.386(4)
K1-O6 ^v	3.035(3)	C4-C5	1.384(4)
K1-O4 ^{iv}	3.038(3)	C5-C6	1.382(4)
O3-S1-O4	114.73(15)	O5 ⁱⁱⁱ -K1-O1 ⁱⁱ	61.55(6)
O3-S1-O2	116.08(14)	O2 ^{iv} -K1-O1 ⁱⁱ	118.01(6)
O4-S1-O2	111.47(15)	O6 ^v -K1-O1 ⁱⁱ	148.78(7)
O3-S1-O1	99.62(11)	O4 ^{iv} -K1-O1 ⁱⁱ	121.14(7)
O4-S1-O1	106.76(14)	O6-N1-O5	123.6(3)
O2-S1-O1	106.69(11)	O6-N1-C4	118.1(3)
O2-K1-O3 ⁱ	135.77(7)	O5-N1-C4	118.3(3)
O2-K1-O3 ⁱⁱ	78.65(7)	C1-O1-S1	119.63(15)
O3 ⁱ -K1-O3 ⁱⁱ	100.18(6)	C1-O1-K1 ⁱⁱ	143.06(14)
O2-K1-O5 ⁱⁱⁱ	138.94(7)	S1-O1-K1 ⁱⁱ	97.31(8)
O3 ⁱ -K1-O5 ⁱⁱⁱ	82.83(7)	S1-O2-K1	154.22(15)
O3 ⁱⁱ -K1-O5 ⁱⁱⁱ	81.18(7)	S1-O2-K1 ^{iv}	96.28(11)
O2-K1-O2 ^{iv}	74.35(7)	K1-O2-K1 ^{iv}	105.65(7)
O3 ⁱ -K1-O2 ^{iv}	105.04(6)	S1-O3-K1 ^{vi}	114.87(12)
O3 ⁱⁱ -K1-O2 ^{iv}	151.68(6)	S1-O3-K1 ⁱⁱ	116.17(11)
O5 ⁱⁱⁱ -K1-O2 ^{iv}	114.36(7)	K1 ^{vi} -O3-K1 ⁱⁱ	110.61(7)
O2-K1-O6 ^v	71.03(8)	S1-O4-K1 ^{iv}	96.00(13)
O3 ⁱ -K1-O6 ^v	70.74(8)	N1-O5-K1 ^{vii}	114.96(19)
O3 ⁱⁱ -K1-O6 ^v	117.43(7)	N1-O6-K1 ^{viii}	151.4(2)
O5 ⁱⁱⁱ -K1-O6 ^v	149.57(8)	C2-C1-C6	122.3(2)
O2 ^{iv} -K1-O6 ^v	61.04(7)	C2-C1-O1	118.2(2)
O2-K1-O4 ^{iv}	120.10(7)	C6-C1-O1	119.3(2)
O3 ⁱ -K1-O4 ^{iv}	75.05(7)	C1-C2-C3	119.4(2)
O3 ⁱⁱ -K1-O4 ^{iv}	157.88(7)	C2-C3-C4	118.3(2)
O5 ⁱⁱⁱ -K1-O4 ^{iv}	76.81(7)	C5-C4-C3	122.3(2)
O2 ^{iv} -K1-O4 ^{iv}	45.91(6)	C5-C4-N1	119.0(2)
O6 ^v -K1-O4 ^{iv}	81.89(7)	C3-C4-N1	118.7(2)
O2-K1-O1 ⁱⁱ	78.70(6)	C6-C5-C4	118.9(2)
O3 ⁱ -K1-O1 ⁱⁱ	132.08(6)	C5-C6-C1	118.7(2)
O3 ⁱⁱ -K1-O1 ⁱⁱ	46.78(5)		

Códigos de Simetria: ⁱ -x+1/2, y+1/2, z; ⁱⁱ -x+1, -y, -z+2; ⁱⁱⁱ x, -y+1/2, z+1/2; ^{iv} -x, -y, -z+2; ^v x-1/2, y, -z+3/2; ^{vi} -x+1/2, y-1/2, z.

O ângulo de $99,62^\circ$ entre as ligações O1-S1-O3 é relativamente pequeno quando comparado com os outros ângulos O-S-O que variam entre $106,69^\circ$ e $116,08^\circ$. Isto provavelmente ocorre devido a um efeito estérico, onde a ligação C1-O1 é *anti* a ligação S1-O3 e *gauche* as outras ligações S-O. Estes mesmos padrões são observados em todos os monoésteres de sulfato e diânions de monoésteres de fosfato isostéricos encontrados no CCDC, um com ângulo menor de $100,5(7)^\circ$ e todos os outros maiores em torno de 105° .

O padrão encontrado no cristal, revela que ao redor de cada cátion de potássio (K^+) estão coordenados oito átomos de oxigênio de seis diferentes ânions de *p*NPS. A estrutura é estabilizada por um amplo sistema de pontes salinas, envolvendo seis átomos de oxigênio de grupos sulfato, sendo que um deles é um oxigênio ligado diretamente ao anel, e dois outros átomos de oxigênio dos grupos nitro. A **Figura 7** apresenta o arranjo molecular em torno do cátion de potássio (K^+).

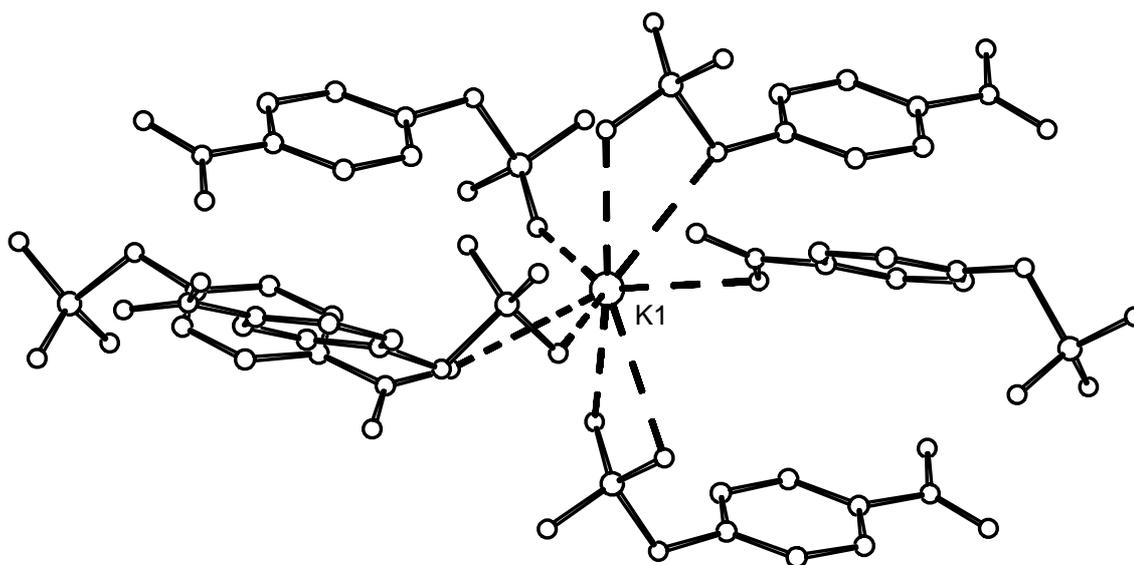


Figura 7. Desenho do arranjo molecular entorno do cátion K^+ .

3.1.2. Correlações entre Comprimentos de Ligação de Estruturas Cristalinas de Monoésteres de Sulfato

Na **Figura 8** estão representadas as estruturas de alguns monoésteres de sulfato que foram resolvidas por raios-X e depositadas no CCDC com um índice final (R) inferior a 0,05: **(10)** ácido 8-hidroxiquinolina-*o*-sulfúrico⁶², **(11)** ácido 8-

hidroxiquinolina-*o*-sulfúrico monohidratado⁶², **(12)** bufotionina⁶³, **(4)** 4-nitrofenilsulfato de potássio⁴⁸, **(13)** 4-epinina-*O*-sulfato⁶⁴, **(14)** 3-epinina-*O*-sulfato hidratado⁶⁴, **(15)** 4-nitrocatecolsulfato dihidratado⁶⁵, **(16)** 4-dopamina-*O*-sulfato⁶⁶, **(17)** 3-dopamina-*O*-sulfato⁶⁶, **(18)** L-tirosina-*O*-sulfato dihidratada⁶⁷, e **(19)** metilsulfato de 10-metilacridínio.⁶⁸ Os dados de comprimento de ligação entre os átomos C-O, S-O e S-O_{LG}, como também o ângulo entre os átomos C-O-S estão apresentados na **Tabela 3**.

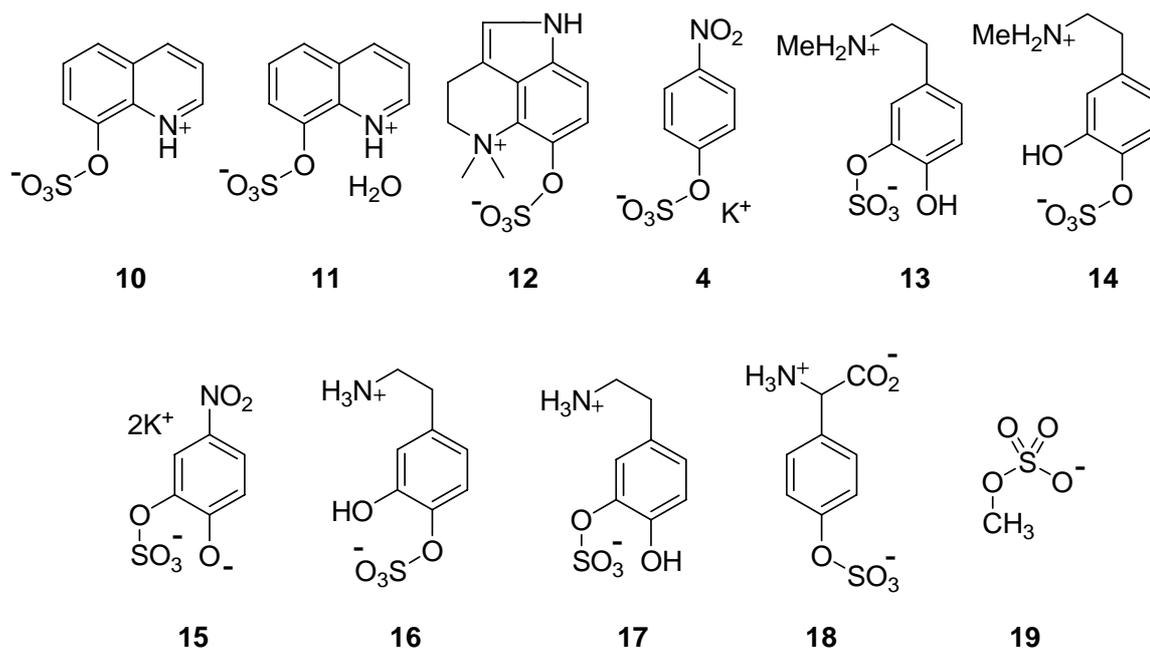


Figura 8. Estruturas de alguns monoésteres de sulfato reportadas no CCDC.^{48, 62-68}

Tabela 3. Parâmetros geométricos selecionados das estruturas cristalinas dos monoésteres de sulfato pesquisados.

Composto	Comprimentos de Ligação (Å)					Ângulo (°)
	C-O	S-O _{LG}		S-(O ₃) ⁻	C-O-S	
10	1,374	1,653	1,437	1,422	1,433	117,91
11	1,384	1,648	1,428	1,424	1,424	117,29
12	1,392	1,649	1,427	1,451	1,443	118,42
04	1,398	1,629	1,431	1,432	1,432	119,63
13	1,402	1,623	1,430	1,440	1,429	117,78
14	1,402	1,627	1,444	1,442	1,431	117,77
15	1,408	1,620	1,441	1,451	1,448	118,94
16	1,409	1,622	1,445	1,440	1,434	116,94
17	1,410	1,620	1,438	1,443	-	115,57
18	1,409	1,611	1,444	1,433	1,449	118,77
19	1,422	1,599	1,438	1,430	1,436	116,73

Estes dados cristalográficos possibilitaram varias relações estrutura-estrutura, nas quais apenas a relação entre os comprimentos das ligações C-O e S-O_{LG} apresentaram uma relação linear (**Figura 9**). Observa-se que o alongamento do comprimento da ligação C-O causa um encurtamento proporcional do comprimento da ligação S-O_{LG}, e pode ser notado que a soma destes comprimentos de ligação são efetivamente constantes em 3,027(15) Å para todos os sulfatos selecionados. Esta relação também sugere que um aumento do comprimento da ligação S-O_{LG} tende a favorecer a transferência do grupo sulfato e, correlacionam linearmente com o pK_a do grupo de saída. É interessante notar que os resultados aqui apresentados correspondem a primeira evidencia de correlação entre a estrutura e reatividade de monoésteres de sulfato.

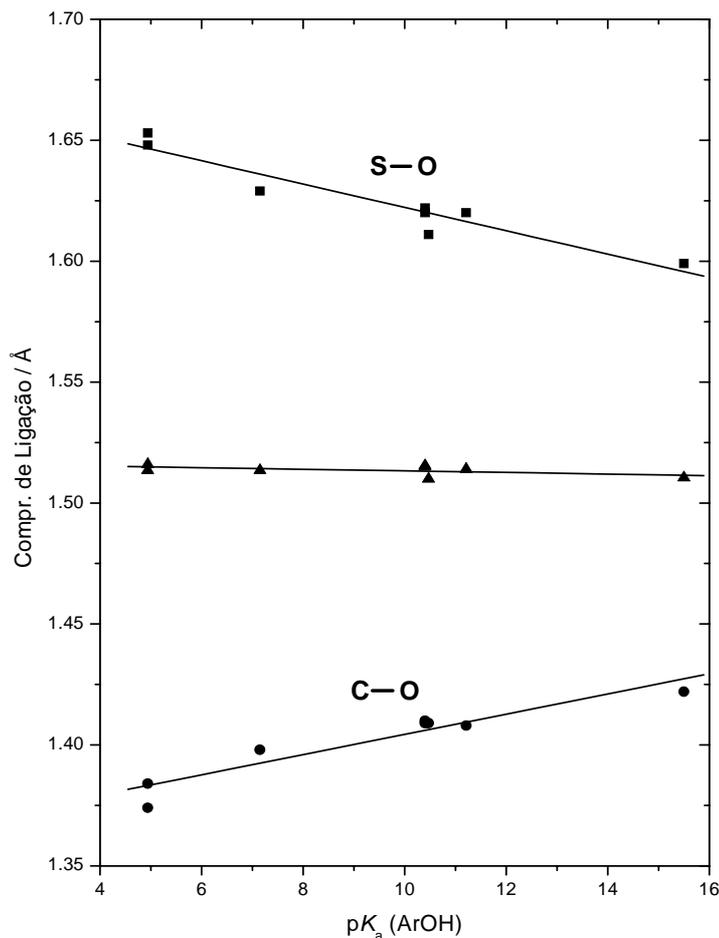
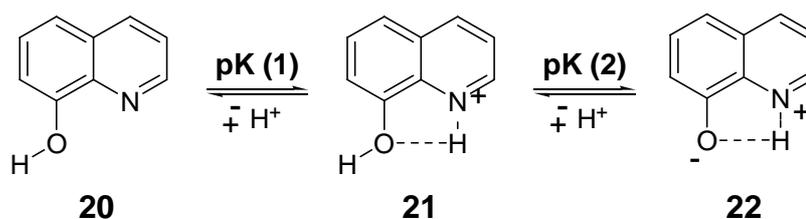


Figura 9. Dependência do comprimento de ligação C-O e S-O_{LG} com o pK_a de monoésteres de sulfato. A soma dos dois comprimentos de ligação é efetivamente constante, com correlação angular igual a zero pelo gráfico de $(l_{C-O} + l_{S-O})/2$ conforme observado na linha média.

É interessante notar que o pK_a de 4,94 utilizado para a 8-hidroxiquinolina (**10** e **11**, na **Figura 8**) pertence ao grupo NH^+ (**Esquema 15**) e não ao grupo OH ($pK_a = 9,63$). Contudo, existe uma boa razão para supor que os dois pK_a s não são muito diferentes. O pK_a de 9,63 do fenol da 8-hidroxiquinolina (**20**), o qual não é diretamente acessível considerando a estrutura (**22**), diminui para 6,81 para o cátion *N*-metilquinolínio. De fato, espera-se que o pK_a do fenol de **20** deve ser mais baixo que o valor reportado para o cátion *N*-metilquinolínio⁶⁹, já que existe um nitrogênio protonado fazendo ligação de hidrogênio com o oxigênio vizinho (**21**).



Esquema 15

Como notado por Popek e Lis⁶², os efeitos das ligações de hidrogênio são evidentes nas estruturas cristalinas **10** e **11** (**Fig. 8**). A ligação C-O do anel é deslocada em 4° a 5° em direção ao hidrogênio da ligação N⁺-H afetando simultaneamente a reatividade do monoéster de sulfato e o comprimento da ligação S-O_{LG}.

Nagasawa e Yoshidome⁷⁰ observaram que a hidrólise do 8-quinolilsulfato, o qual possui a ligação S-O_{LG} mais longa entre os sulfatos citados na **Tabela 3**, é 180 vezes mais rápida que a correspondente reação do *p*NPS³⁹ em 1% de DMSO/H₂O a 20°C. Esta diferença na constante de velocidade de reação é proporcional a uma diferença de 1,88 unidades de pK_a para o grupos de saída e, considerando o valor de β_{LG} de 1,2 obtido por Fendler and Fendler³⁵, permite estimar o valor do pK(2) em 5,26. Este valor calculado é consistente com o resultado encontrado por Murakami and Sunamoto⁷¹, os quais observaram que a hidrólise do 3-piridilfosfato é somente 1,6 vezes mais rápida que a reação correspondente do 8-quinolilfosfato a 25°C. Este resultado sugere que os valores de pK_as são similares para os grupos de saída, já que o pK_a para a dissociação do OH neutro da 3-hidroxipiridina é 8,75 e diminui para 4,81 no caso do 3-hidroxi-*N*-metilpiridínio.

Embora a correlação mostrada na **Figura 9** deva ser melhorada assim que mais dados estejam disponíveis, pode ser considerada altamente informativa. A química dos monoânions de ésteres de sulfato é mecanisticamente similar aquela de diânions de monoésteres de fosfato. Jones e Kirby⁷² mostraram que o comprimento de ligação entre os átomos de P-O_{LG} para diânions de monoésteres de fosfato RO-PO₃⁻ apresentam uma correlação com o pK_{LG} com um coeficiente angular de -8 x 10⁻³.

A correspondente correlação entre o pK_{LG} e o comprimento de ligação entre S-O_{LG} para ésteres de sulfato RO-SO₃⁻ apresenta um coeficiente angular de -5,3 x 10⁻³ (r = 0,955), sugerindo que o comprimento da ligação S-O de monoânions de sulfato é pouco sensível a basicidade do grupo de saída. Isto é consistente com a

carga efetiva do oxigênio do grupo de saída que é +0,36 para diânions de monoésteres de fosfato, sendo de +0,7 para sulfatos.⁷³

3.2. DETERMINAÇÃO DO pK_a DO DMANS POR ESPECTROSCOPIA NO UV/Vis

Os espectros de UV/Vis do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) foram obtidos em meio aquoso com KCl, mantendo-se a força iônica em 1,0 e a temperatura em 25 °C, e variando-se o pH entre 4,0 e 10,0 conforme demonstrado na **Figura 10**.

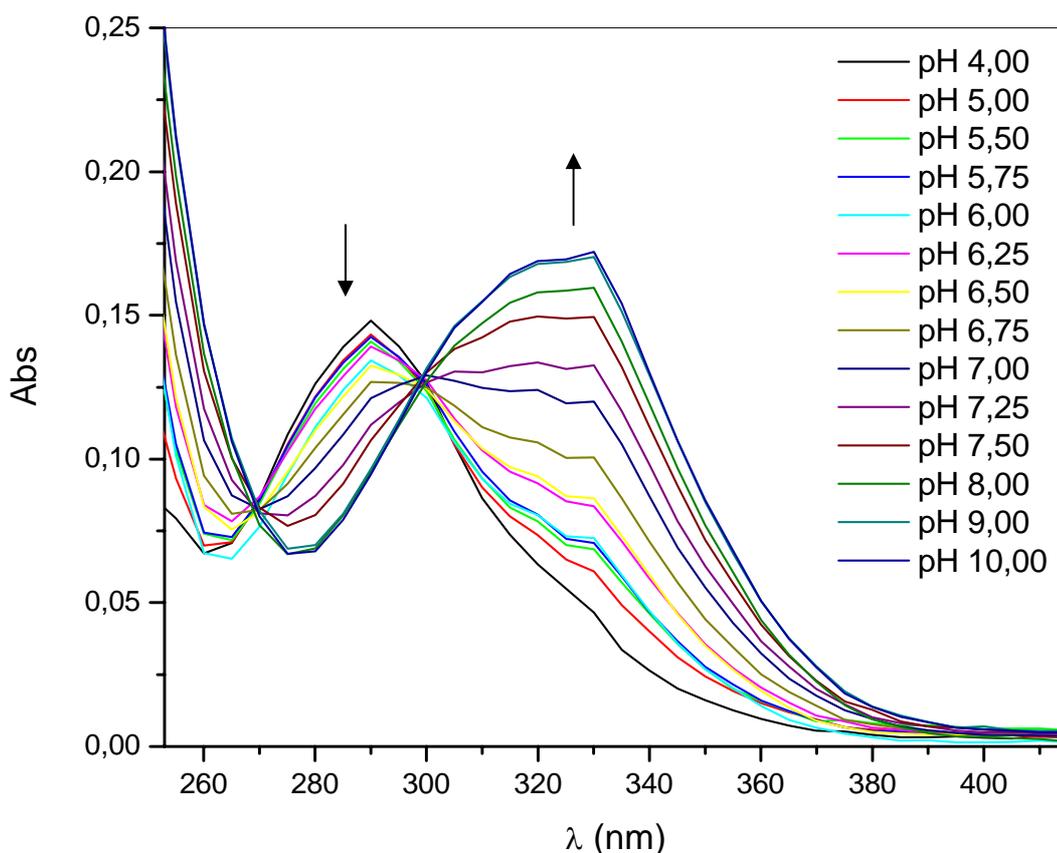


Figura 10. Espectros de UV/Vis para o DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em solução aquosa em função da variação de pH 4,0 – 10,0, a 25 °C.

Observa-se dois pontos isobésticos em 270 e 300 nm. Em pH 4,0 o espectro apresenta uma banda com $\lambda_{MÁX}$ em 290 nm, e com o aumento do pH esta banda diminui de intensidade dando origem a outra banda mais intensa com $\lambda_{MÁX}$ em 330 nm em pH 10,0, conforme indicado pelas setas.

Os dados de cada pH foram obtidos a partir da leitura da absorbância no comprimento de onda de 330 nm e o gráfico obtido a partir destes dados apresenta dois patamares: um na região entre pH 5,0 e 6,0 com absorbância no ponto mínimo

(Abs_{MIN}) de 0,061, que corresponde à espécie dipolar iônica do DMANS (**Esquema 14**), e outro entre pH 8,5 e 10,0 com absorvância no ponto máximo (Abs_{MÁX}) de 0,172, que corresponde à espécie aniônica (**Esquema 14**). Observa-se também um considerável aumento na absorvância entre os pHs 6,0 e 8,0, indicando uma maior absorvância molar da espécie aniônica em relação a dipolar iônica (**Figura 11**).

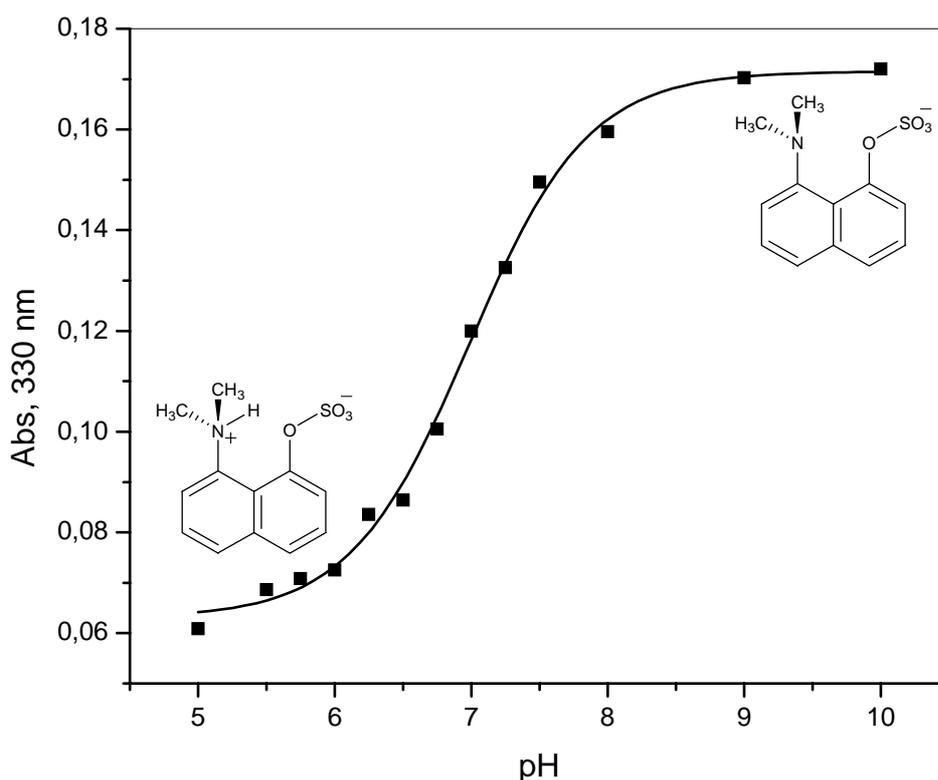


Figura 11. Variação da absorvância do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em solução aquosa em função do aumento do pH, $\lambda = 330$ nm e 25 °C, Abs_{MIN} = $0,063 \pm 0,001$ e Abs_{MÁX} = $0,172 \pm 0,002$.

A **Equação 7**, foi utilizada para fornecer o ajuste teórico para os dados da **Figura 11**, onde, K_a é a constante de dissociação do grupo amônio do DMANS, que possui um valor de pK_a ($= -\log K_a$) igual a $6,98 \pm 0,03$.

$$Abs = Abs_{\text{mínima}} \cdot \left[\frac{1}{\left(\frac{1 + K_a}{[H^+]} \right)} \right] + Abs_{\text{máxima}} \cdot \left[\frac{1}{\left(\frac{1 + [H^+]}{K_a} \right)} \right] \quad (7)$$

3.3. ESTUDO DA HIDRÓLISE DO 8-*N,N*-DIMETILAMINO-1-NAFTIL-SULFATO DE POTÁSSIO (DMANS)

Na **Figura 12** está apresentado um conjunto de espectros de UV/Vis típicos para a reação de hidrólise de DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em pH 5,22, $\mu = 1,0$ e 60 °C (**Esquema 16**). Observa-se pontos isobéticos bem definidos em 257 nm e 298 nm, e entre eles observa-se o desaparecimento da banda do DMANS e acima de 298 nm o aparecimento da banda do produto (DANOL) conforme indicado pelas setas.

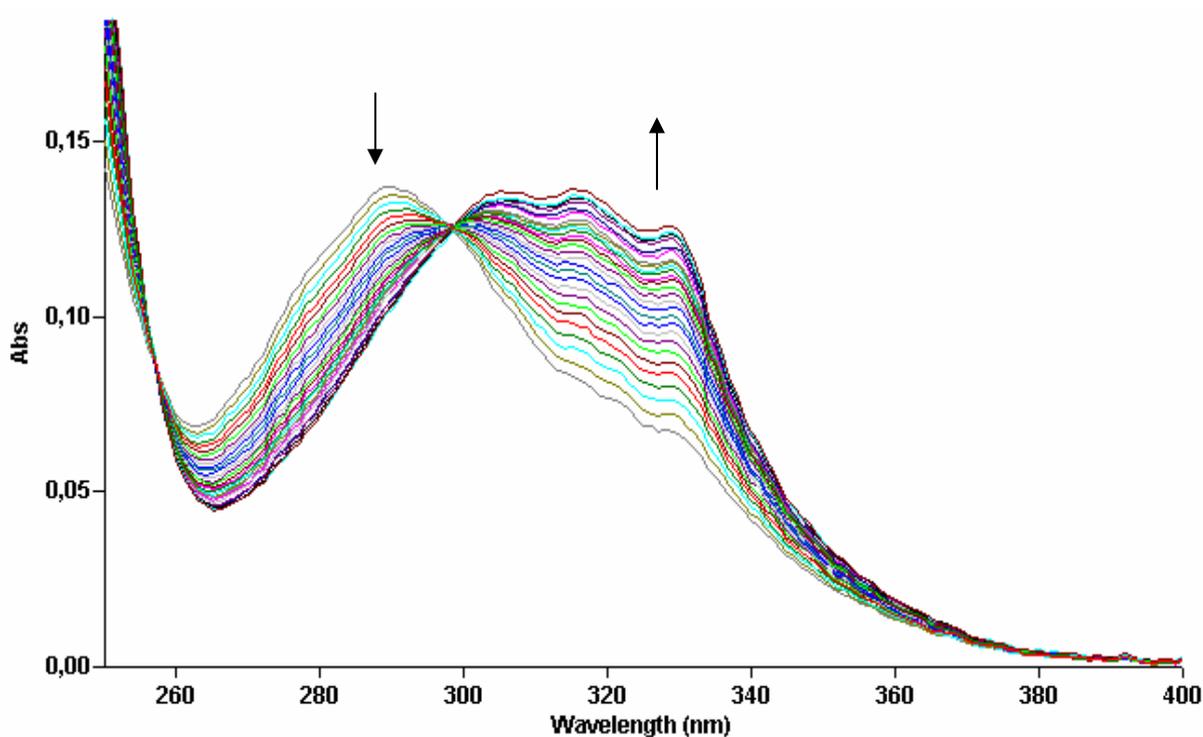
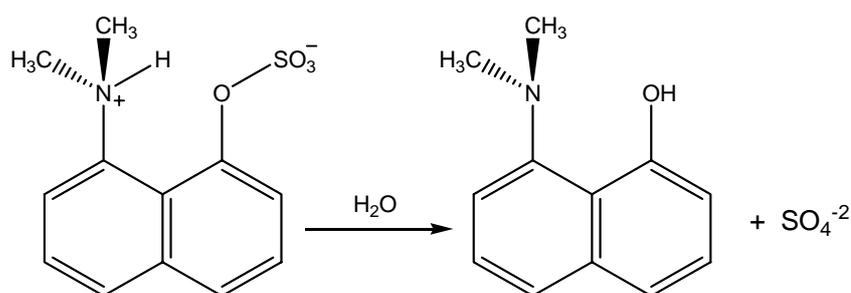


Figura 12. Espectros sucessivos de UV/Vis, da reação de hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em pH 5,22, $\mu = 1,0$ e 60 °C.



Esquema 16

Na **Figura 13** esta demonstrando uma cinética típica desta reação, no comprimento de onda de 320 nm, e se observa claramente um comportamento de reação de primeira-ordem.

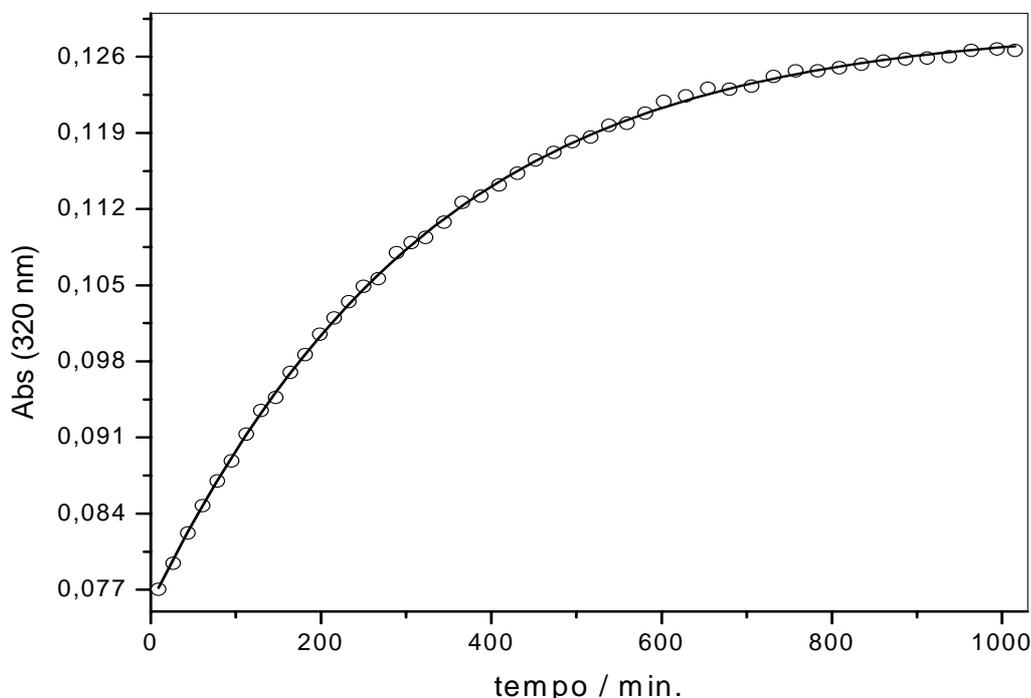


Figura 13. Cinética típica em água da reação de hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em pH 5,22, a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 1,0$. A linha corresponde a um ajuste teórico considerando uma reação de primeira-ordem.

3.3.1. Efeito do pH sobre a reação de hidrólise do DMANS

Na **Tabela 4** estão contidos os dados para a reação de hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 1,0$ entre os pHs de 0,0 e 8,0. Na **Figura 14**, mostra-se a curva de pH vs k_{obs} , o qual pode ser dividido em três regiões distintas: (i) uma região que corresponde a pH < 2,0, na qual a velocidade aumenta linearmente com o aumento da concentração de ácido e o coeficiente angular de $\log k_{\text{obs}}$ vs pH é igual a -1, indicando a catálise ácida pelo íon hidrônio; (ii) uma região de patamar entre pH 3,0 e 6,0, na qual a constante de velocidade observada independe do pH e que corresponde a região onde se observa a hidrólise espontânea; e (iii) uma região de pH > 6,5, em que a reação volta a ser dependente do pH e apresenta um gráfico de

$\log k_{\text{obs}}$ vs pH com um coeficiente angular igual a -1. Estas observações podem ser sumarizadas em termos no **Esquema 17**.

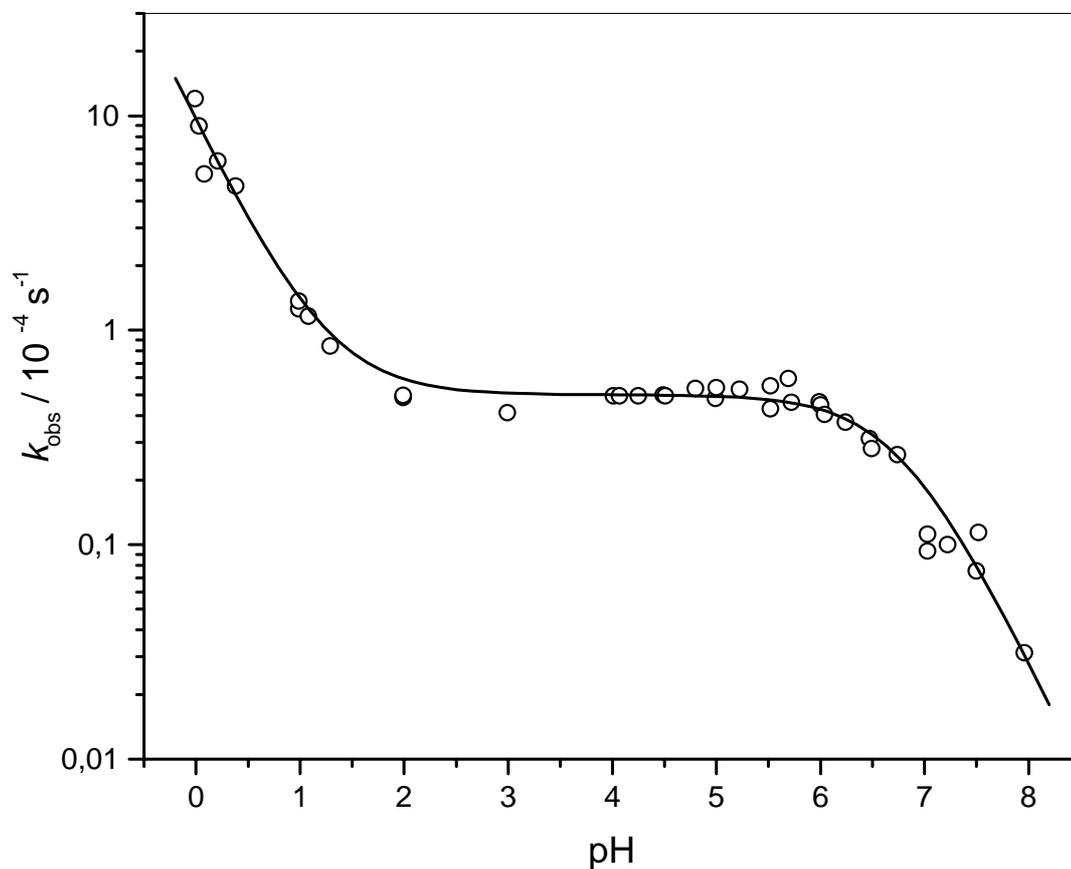
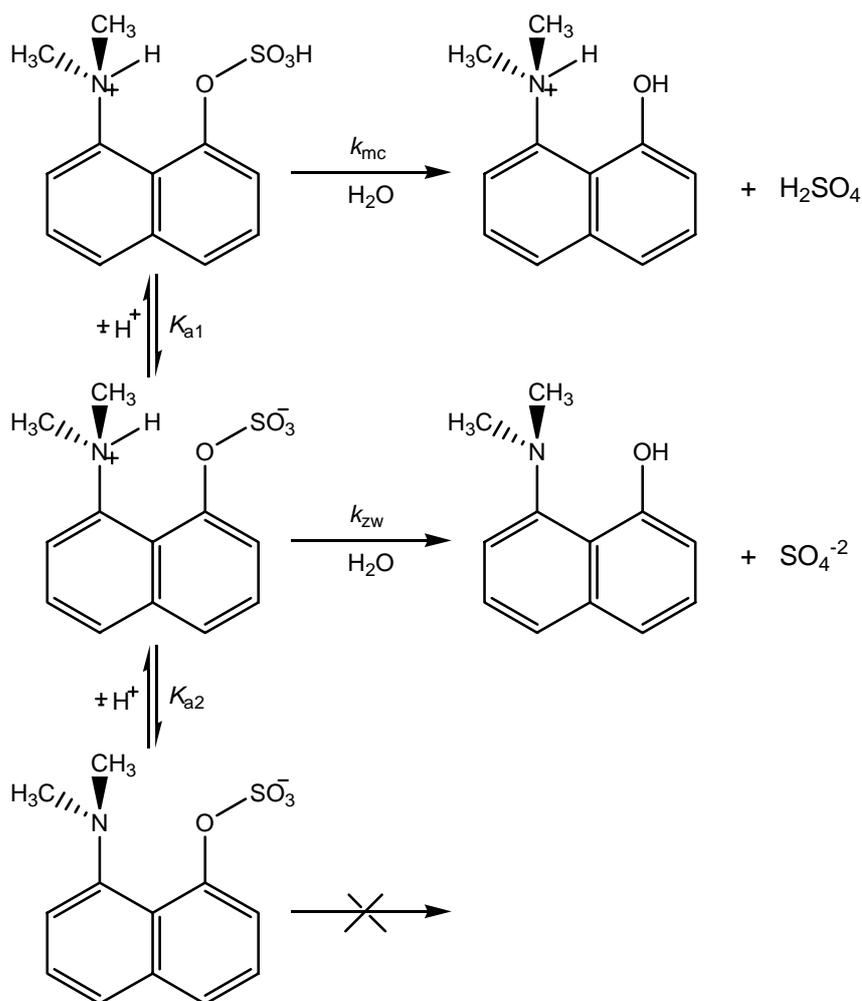


Figura 14. Variação da k_{obs} para a hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5} \text{ M}$) em função do aumento do pH, a $\mu = 1,0$ e a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. A linha corresponde ao ajuste teórico de acordo com as **Equações 8 e 9**.

Tabela 4. Constantes de velocidade observada para a hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em função do pH, a $\mu = 1,0$ e 60 °C.

pH	$k_{\text{obs}} / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}} / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
-0,01	120,0	5,00	5,39
0,03	89,6	5,22	5,29
0,08	53,5	5,52	5,50
0,21	61,6	5,52	4,31
0,38	47,0	5,69	5,95
0,99	12,6	5,72	4,62
0,99	13,7	5,99	4,64
1,08	11,6	6,00	4,49
1,29	8,42	6,04	4,05
1,99	4,86	6,24	3,72
1,99	4,97	6,47	3,12
2,99	4,13	6,49	2,80
4,01	4,95	6,74	2,63
4,07	4,95	7,03	9,35
4,25	4,95	7,03	1,12
4,49	4,98	7,22	1,00
4,51	4,94	7,50	0,753
4,80	5,35	7,52	1,14
4,99	4,81	7,96	0,314



Esquema 17

O mecanismo apresentado para a hidrólise do substrato DMANS nas diferentes faixas de pH, de acordo com o **Esquema 17**, permite derivar a **Equação 8**.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{mc}} \cdot \chi_{\text{mc}} + k_{\text{zw}} \cdot \chi_{\text{zw}} \quad (8)$$

Expressando a fração molar do substrato de acordo com sua distribuição de espécies, obtém-se a **Equação 9**.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{mc}} \cdot \frac{[\text{H}^+]}{(K_{a1} + [\text{H}^+])} + k_{\text{zw}} \cdot \frac{[\text{H}^+]}{(K_{a2} + [\text{H}^+])} \quad (9)$$

Com auxílio da **Equação 9**, o ajuste teórico dos dados da **Figura 14** forneceu os parâmetros cinéticos apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Parâmetros calculados para a hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em função do aumento do pH, a $\mu = 1,0$ e a $60\text{ }^\circ\text{C}$.

Constantes	Valores
k_{mc} / s^{-1} (a)	$> 9,20 \times 10^3$
k_{zw} / s^{-1}	$5,0 \times 10^{-5}$
$\text{p}K_{a1}$ (a)	$< -6,5$
$\text{p}K_{a2}$	6,77

(a) Os valores dependem do valor de $\text{p}K_a = -6,5$, que corresponde ao fenilsulfato.

3.3.2. Determinação do efeito isotópico da reação de hidrólise do DMANS

As reações de hidrólise do DMANS em H_2O e D_2O foram realizadas em duas regiões distintas de pH. Na região em que a concentração de ácido variou entre 0,516 e 1,063 M (**Tabelas 6** e **Tabela 7**), e outra em pH 4,55, região que corresponde ao patamar no perfil de pH e corresponde à reação de hidrólise do DMANS na forma neutra.

Os dados das **Tabelas 6** e **7** foram plotados em um gráfico de k_{obs} vs concentração do ácido [(X) Cl] (**Figura 15**) obtendo duas retas com correlações superiores de 0,994. Os coeficientes angulares para a reação de hidrólise do DMANS em HCl / H_2O e DCl / D_2O foram $1,67 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $2,06 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente, sendo que o quociente entre os coeficientes angulares destas duas retas levou a um efeito isotópico inverso ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 0,81$).

Tabela 6. Constantes de velocidade observada para a hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) na presença de concentrações crescentes de ácido clorídrico, a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $\mu = 1,0$.

[HCl] / M	$k_{\text{obs}} / 10^{-4} \cdot \text{s}^{-1}$
1,031	12,70
0,928	11,90
0,825	9,34
0,619	6,35
0,516	4,29

Tabela 7. Constantes de velocidade observada para a hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) na presença de concentrações crescentes de ácido clorídrico deuterado, a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $\mu = 1,0$.

[DCI] / M	$k_{\text{obs}} / 10^{-4} \cdot \text{s}^{-1}$
1,063	19,00
0,956	16,40
0,850	14,70
0,638	10,10

O pequeno efeito isotópico inverso está relacionado ao equilíbrio de protonação (K_{a1}) entre as espécies: dipolar iônica e monocatiônica (**Esquema 17**). A espécie monocatiônica possui o grupo sulfato protonado, sendo muito mais reativa que a dipolar iônica que possui o grupo sulfato na forma de ânion.³⁹ Desde que o equilíbrio esteja levemente mais deslocado para a espécie deuterada que para a protonada, a velocidade da reação será maior para a reação com deutério, produzindo um efeito isotópico inverso.

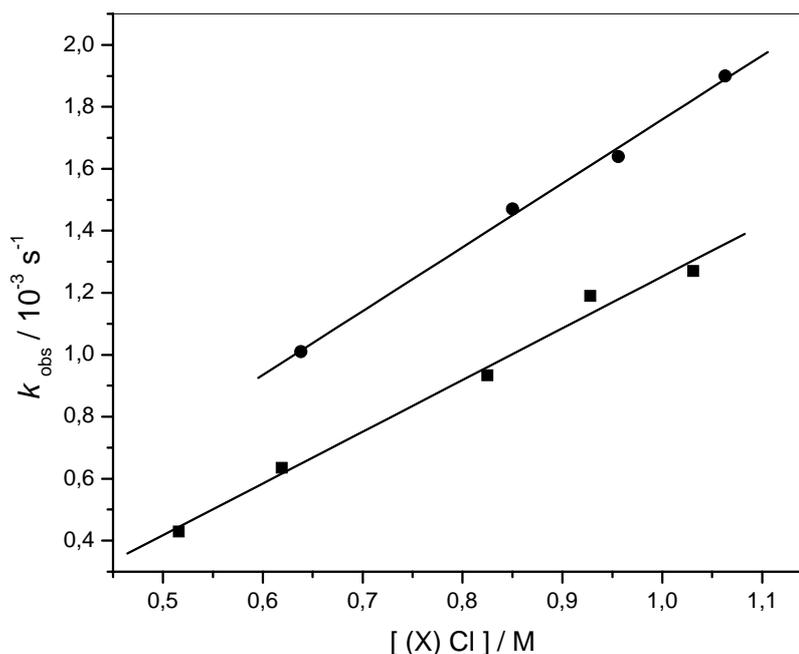


Figura 15. Variação da k_{obs} para a hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em função do aumento da concentração de (X) = HCl (■) e DCl (●), a $\mu = 1,0$ e 60 °C.

As constantes de velocidade para a hidrólise do DMANS em pH 4,55 foram calculadas a partir da média de três cinéticas da reação em H_2O e D_2O , cujos valores obtidos foram $k_{H_2O} = (5,07 \pm 1,09) \times 10^{-5} s^{-1}$ e $k_{D_2O} = (2,57 \pm 0,35) \times 10^{-5} s^{-1}$, respectivamente. Assim o efeito isotópico (k_{H_2O} / k_{D_2O}) foi de 1,97.

O valor de efeito isotópico obtido, referente à região de hidrólise independente de pH, espécie dipolar iônica (**Esquema 17**), indica que há participação de moléculas de água e transferência de átomos de hidrogênio no estado de transição. Isto pode ser é um indicativo de catálise ácido-base geral com um mecanismo mais associativo que no caso dos diânions de fosfato, porem ainda no lado dissociativo do diagrama da coordenada de reação (**Figura 3**).

3.3.3. Determinação dos Parâmetros de Ativação

Para fins de cálculo dos parâmetros de ativação, foram realizadas corridas cinéticas em triplicata para cada temperatura em 60, 65, 70, 75, 80, 85, e 90 °C para a reação de hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em pH 4,5, $\mu = 1,0$. Os dados

experimentais obtidos para esta reação em função da temperatura estão apresentados na **Tabela 8**, onde se observa um aumento nas constantes de velocidade com o aumento da temperatura.

Tabela 8. Constantes de velocidade observada para a hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em diferentes valores de temperatura, a $\mu = 1,0$ e pH 4,50.

T / °C	$k_{\text{obs}} / 10^{-5} \cdot \text{s}^{-1}$	T / °C	$k_{\text{obs}} / 10^{-5} \cdot \text{s}^{-1}$
60	5,29	75	33,1
60	5,35	80	42,3
60	5,39	80	43,5
65	13,1	80	47,2
65	13,1	85	84,7
65	11,5	85	83,8
70	19,7	85	78,7
70	22,3	90	119,0
70	22,4	90	134,0
75	37,5	90	121,0
75	33,9		

A relação entre $\ln (k_{\text{obs}} / T)$ vs $1 / T$ (**Figura 16**) é linear com um coeficiente de correlação superior a 0,99. Os parâmetros de ativação foram calculados através das **Equações 4 – 6**, e estão contidos na **Tabela 9**.

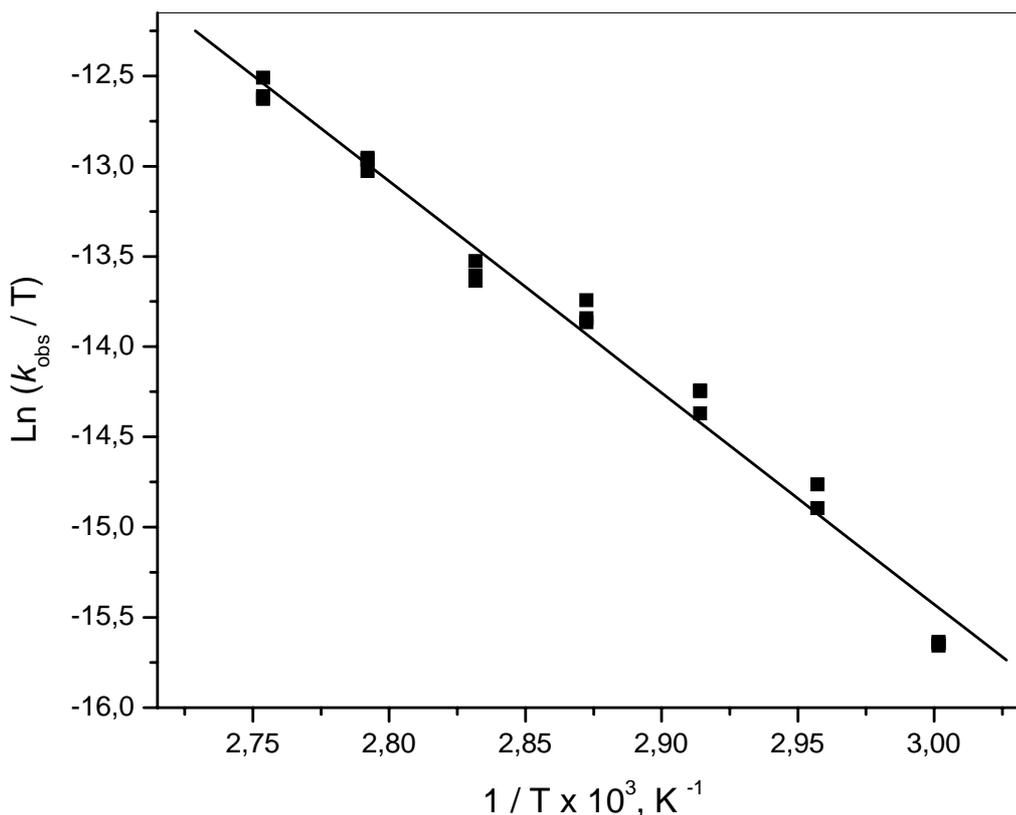


Figura 16. Variação da k_{obs} para a hidrólise do DMANS ($2,45 \times 10^{-5}$ M) em função da diminuição da temperatura, a $\mu = 1,0$ e pH 4,50.

Tabela 9. Parâmetros de ativação para a hidrólise do DMANS, a $\mu = 1,0$ e pH 4,50.

Parâmetro de Ativação	Valor Obtido
E_a (75 °C)	24,0 kcal. mol ⁻¹
ΔH^\ddagger	23,3 kcal . mol ⁻¹
ΔS^\ddagger	-8,01 eu
ΔG^\ddagger	26,1 kcal . mol ⁻¹

O valor da energia de ativação é semelhante daquele observado por Fendler para *o*-nitrofenilsulfato³⁵, e o valor negativo da entropia de ativação sugere que no estado de transição da reação de hidrólise do DMANS ocorre uma reorganização do meio em relação ao estado inicial. Este resultado indica que a carga negativa do grupo sulfato está um pouco mais dispersa no estado de transição, induzindo assim a organização de um número pequeno de moléculas de água. Entretanto, o valor de

entropia de ativação é menos negativo que os reportados para uma série de sulfatos orgânicos, 2-, 4-nitrofenilsulfato, 2,4- e 2,5-dinitrofenilsulfato, nos quais estes valores estão entre $-17,4$ e $-18,5$ eu.^{35, 39}

É importante salientar que as duas reações aqui comparadas são significativamente diferentes. No caso dos sulfatos orgânicos, há uma reação de transferência de uma carga negativa do grupo SO_3^- para o fenolato e no substrato utilizado (DMANS), a espécie dipolar iônica faz ponte de hidrogênio intramolecular reduzindo o pK_a do grupo de saída. Este efeito provocado pela estrutura rígida do substrato possibilita que o mesmo atinja mais rapidamente o estado de transição e por conseqüência com uma menor participação do solvente, explicando assim a diferença no valor da entropia de ativação em relação aos outros sulfatos orgânicos. A reação é mais dissociativa que os sulfatos orgânicos tradicionais estudados por Fendler³⁵ e menos dissociativa que diânions de fosfato, seguindo uma trajetória mecânica qualitativamente semelhante daquela mostrada na **Figura 17**.

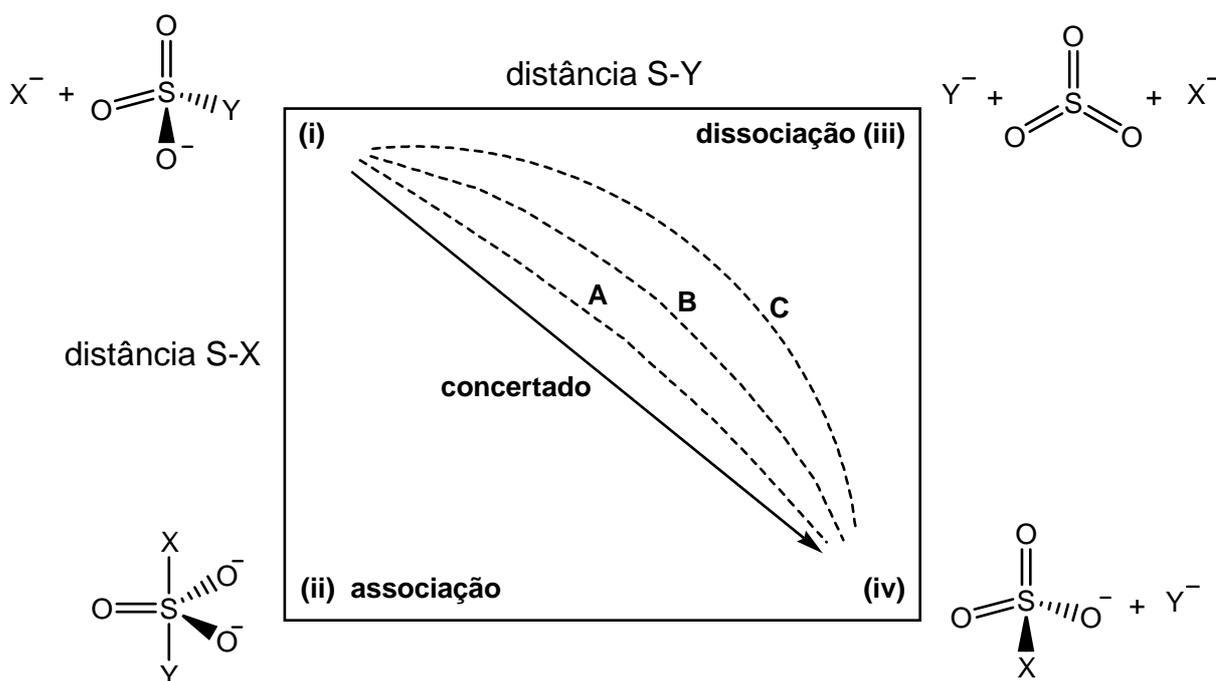


Figura 17. Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo sulfurila entre os grupos axiais X e Y. Em pontilhado apresenta-se uma trajetória mecânica qualitativa da hidrólise de sulfatos orgânicos tradicionais (A), do DMANS (B) e de diânions de fosfato (C).

3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hidrólise ácida do DMANS em 1M HCl é 25,4 vezes mais reativa que a respectiva reação na região independente do pH. A partir da relação linear de energia livre obtida por Fendler³⁵, o qual relacionou as constantes de dissociação do grupos de saída de vários sulfatos e as constantes de velocidade de hidrólise espontânea, possibilitou o cálculo do pK_a efetivo do grupo de saída DANOL em 4,76. Este valor de pK_a demonstra que o DMANS é muito mais reativo em relação ao naftilsulfato, pois o naftol apresenta um valor de pK_a aproximadamente 5 unidades maior.

Este aumento na reatividade pode ser explicado pela presença do grupo amônio vizinho ao átomo de oxigênio do DMANS, o qual age como catalisador ácido geral, transferindo o hidrogênio intramolecularmente. Efeitos semelhantes foram observados na hidrólise espontânea do 8-*N,N*-dimetilamônio-1-naftilfosfato⁷⁴ e o 8-*N,N*-dimetilamino-1-metoximetoxinaftaleno²⁶, os quais são mais reativos na ordem de 10^6 vezes em relação a substratos onde não há ligações de hidrogênio intramoleculares.

Outro aspecto importante é que a ligação de hidrogênio intramolecular pode aumentar a reatividade do DMANS por estabilizar melhor o grupo de saída e assim a estrutura molecular mais ativada e parecida com o estado de transição (**Figura 18**). Neste caso, o comprimento de ligação S-O_{LG} deve ser maior que o comprimento da ligação C-O, como pode ser observado comparando o pK_a efetivo do grupo de saída com o comprimento destas ligações (**Figura 9**).

Os valores obtidos de efeito isotópico (1,97 na região de hidrólise espontânea) e entropia (-8,0 e.u.) estão de acordo com a reatividade do DMANS em água, sugerindo uma pequena participação do solvente no estado de transição, com uma pequena modificação das ligações de hidrogênio em relação ao estado inicial. A reação é em geral menos dissociativa que diânions de fosfatos orgânicos e mais dissociativa que sulfatos orgânicos tradicionais, com maior quebra da ligação S-O_{LG} do que formação da ligação S-OH₂ (solvente), conforme mostrado na **Figura 18**.

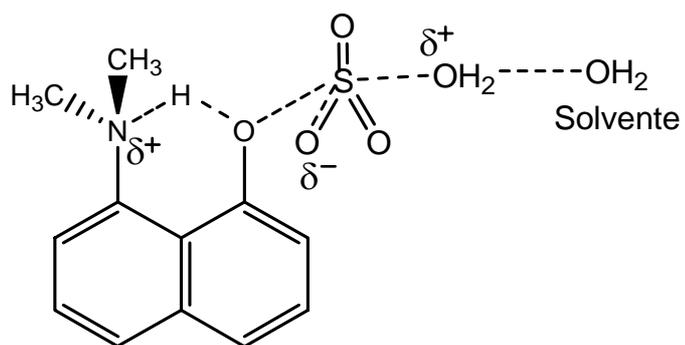


Figura 18. Estado de transição da espécie dipolar iônica do DMANS.

4. CONCLUSÃO

Em relação ao estudo da reação de hidrólise do 8-*N,N*-dimetilamino-1-naftilsulfato de potássio (DMANS) pode-se concluir que:

- i. As reações de hidrólise do DMANS ocorrem de forma mais dissociativa do que por um mecanismo concertado, onde o agrupamento amônio age intramolecularmente como um catalisador ácido geral;
- ii. A reatividade do DMANS está diretamente associada a catálise pela ligação de hidrogênio intramolecular, no qual o valor calculado para o pK_a efetivo do grupo de saída sugere uma estrutura molecular mais próxima do estado de transição. Os valores de k_{H_2O}/k_{D_2O} e entropia também sugerem esta estrutura, onde há uma pequena participação do solvente no processo de transferência do próton.

Para o estudo dos dados cristalográficos dos monoésteres de sulfato pode-se concluir que:

- i. A análise de difratometria de raios-X do *p*NPS se observa que o átomo de potássio está coordenado a 8 átomos de oxigênio sendo um deles o oxigênio ligado ao anel aromático;
- ii. Os resultados reportados aqui apresentam uma primeira evidencia de correlação linear entre as distâncias das ligações C-O e S-O_{LG} com o pK_a do grupo de saída, o que é por consequência uma relação direta de estrutura reatividade para a hidrólise de monoésteres de sulfato. Estes resultados são de interesse considerável para estudos recentes, onde se demonstra a importância da transferência de um hidrogênio intramolecularmente catalisando a reação.

Os resultados deste trabalho demonstram que as reações envolvendo o DMANS, bem como a correlação estrutura-reatividade de diversos sulfatos podem ser utilizado como modelo não-mimético de catálise, facilitando o entendimento das reações de transferência do grupo sulfurila em sistemas enzimáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ZHANG, Z. Y. Chemical and Mechanistic Approaches to the Study of Protein Tyrosine Phosphatases. *Acc. Chem. Res.* v. 36. p. 385-392. 2003.
2. HENGGE, A. C. Isotope Effects in the Study of Phosphoryl and Sulfuryl Transfer Reactions. *Acc. Chem. Res.* v. 35. p. 105-112. 2002.
3. VERDUGO, A.; CANCELLA, M. T.; GE, X.; Gray, N. S.; Chang, Y. T.; Schultz, P. G.; Negishi, M.; Leary, J. A.; Bertozzi, C. R. Discovery of Estrogen Sulfotransferase Inhibitors from a Purine Library Screen. *J. Med. Chem.* v. 44. p. 2683-2686. 2001.
4. BÜRGI, H. B.; DUNITZ, J. D. From Crystal Statics to Chemical Dynamics. *Acc. Chem. Res.* v. 16. p. 153-161. 1983.
5. KIRBY, A. J. Stereoelectronic Effects on Bond Length and Reactivity. *Pure & Appl. Chem.* v. 59. p. 1605-1612. 1987.
6. BENDER, M. L. *Mechanism of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins*. New York: Wiley, 1971.
7. ATKINS, P. W. *Físico-química*. 6 ed.; Rio de Janeiro: LTC, 1999.
8. ISAACS, N. S. *Physical Organic Chemistry*. New York: Longman, 1987. p. 170-209 and 330-374.
9. MASKIL, H. *Structure and Reactivity in Organic Chemistry*. New York: Oxford, 1999.
10. STEED, J. W.; ATWOOD, J. L. *Supramolecular Chemistry*. New York: Worth Pub., 2000. p. 641-654.
11. VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 2 ed.; New York: John Wiley & Sons, 1995.
12. HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in Industrially Important thermostable enzymes: a Review. *Bioresource Tecnology*. v. 89. p. 17-34. 2003.
13. NELSON, D.; COX, M. M. *Lehninger - Principles of Biochemistry*. 3 ed.; New York: Worth Pub., 2000.

14. APPLEBY, T. C.; KINSLAND, C.; BEGLEY, T. P.; EALICK, S. The Crystal Structure and Mechanism of Oritidine 5'-Monophosphate Decarboxylase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* v. 97. p. 2005. 2000.
15. SCHOTTE, F. M., L.; JACKSON, T. A.; SMIRNOV, A. V.; SOMAM, J.; OLSON, J. S.; PHILLIPS Jr., G. N.; WULFF, M.; ANFINRUD, P. A. Watching a Protein as it Functions with 150-ps Time-Resolved X-ray Crystallography. *Science*. v. 300. p. 1944-1947. 2003.
16. GANDOUR, R. D. *Transition States of Biochemical Processes*. New York: Plenum Press, 1978. p. 529.
17. GESSER, J. C.; YUNES, S. F.; CLEMENTIN, R. M.; NOME, F. Reações Intramoleculares como Modelos Não Miméticos de Catálise Enzimática. *Química Nova*. v. 20. p. 631-637. 1997.
18. ATWOOD, J. L.; DAVIES, J. E.; MACNICOL, D. D. E. *Inclusion Compounds*. London: Academic Press, 1984. v. 3.
19. SOTOMAYOR, M. D.; KUBOTA, L. T. *Enzymeless Biosensors: Uma Nova Área para o Desenvolvimento de Sensores Amperométricos*. *Química Nova*. v. 25. p. 123-128. 2002.
20. BRANDÃO, T. A. S.; Dal Magro, J.; Chiaradia, L. D.; Nascimento, M. D. G.; Nome, F.; Tato, J. V.; Yunes, R. A. Catalytic and Inhibitory Effects of β -Cyclodextrin on the Hydrolysis of Benzoic Anhydride. *J. Phys. Org. Chem.* v. 17. p. 370-375. 2004.
21. KOSHLAND Jr., D. E. The Comparison of Non-enzimic Reaction Velocities. *J. Theor. Biol.* v. 2. p. 75-86. 1962.
22. DELISI, C.; CROTHERS, D. M. The Contribution of Proximity and Orientation to Catalytic Reaction Rates. *Biopolymers*. v. 12. p. 1689-1704. 1973.
23. BRUICE, T. C.; BROWN, A.; HARRIS, D. O. On the Concept of Orbital Steering in Catalytic Reactions. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* v. 68. p. 658-661. 1971.
24. KARLE, J. M.; KARLE, I. L. Correlation of Reaction Rate Acceleration With Rotational Restriction. Crystal-structure Analysis of Compounds With a Trialkyl Lock. *J. Am. Chem. Soc.* v. 94. p. 1972.
25. GESSER, J. C. *Reação de Hidrólise Intramolecular de Ácidos N,N-dialquilnaftalâmicos: Um Modelo Não Mimético de Catálise Enzimática*. Florianópolis. 1997. p. 97. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina.

26. KIRBY, A. J. Efficiency of Proton Transfer Catalysis in Models and Enzymes. *Acc. Chem. Res.* v. 30. p. 290-296. 1997.
27. GESSER, J. C.; YUNES, S. F.; CLEMENTIN, R. M.; NOME, F. Mechanistically Optimized Intramolecular Catalysis in the Hydrolysis of Esters. Global Changes Involved in Molecular Reactivity. *J. Phys. Org. Chem.* v. 10. p. 461-465. 1997.
28. YUNES, S. F. *Hidrólise de Monoalquil Ésteres do Ácido 1,8-Naftálico. Estudo do Mecanismo de Reação por Métodos Experimentais e Métodos Teóricos com Cálculos Semi-Empíricos.* Florianópolis. 1996. p. 116. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina.
29. JENCKS, W. P. *Catalysis in Chemistry and Enzymology.* New York: Dover Publications, 1987. p. 836.
30. FERSHT, A. R.; KIRBY, A. J. Intermolecular Catalysis and Mechanism of Enzyme Action. *Chem. Brit.* v. 16. p. 136-142. 1980.
31. STORM, D. R.; KOSHLAND Jr., D. E. A Source for the Special Catalytic Power of Enzymes: Orbital Steering. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* v. 66. p. 445-452. 1970.
32. MILSTIEN, S.; COHEN, L. A. Rate Accelerations by Stereopopulation Control: Models for Enzyme Action. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* v. 67. p. 1143-1147. 1970.
33. MENGER, F. M. On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity. *Acc. Chem. Res.* v. 18. p. 128-134. 1985.
34. THATCHER, G. R. J.; KLUGER, R. Mechanism and Catalysis of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. *Adv. Phys. Org. Chem.* v. 25. p. 99-265. 1989.
35. FENDLER, E. J.; FENDLER, J. H. Hydrolysis of Nitrophenyl and Dinitrophenyl Sulfate Esters. *J. Org. Chem.* v. 33. p. 3852-3859. 1968.
36. BENKOVIC, S. J.; DUNIKOSKI Jr., L. K. Intramolecular Catalysis of Sulfate Ester Hydrolysis. A Model for Aryl Sulfate Sulfohydrolase. *Biochemistry.* v. 9. p. 1390-1397. 1970.
37. KICE, J. L.; ANDERSON, J. M. The Mechanism of the Acid Hydrolysis of Sodium Aryl Sulfates. *J. Am. Chem. Soc.* v. 88. p. 5242-5245. 1966.
38. BURLINGHAM, B. T.; PRATT, L. M.; DAVIDSON, E. R.; SHINER Jr., V. J.; FONG, J.; WIDLANSKI, T. S. ³⁴S Isotope Effect on Sulfate Ester Hydrolysis: Mechanistic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* v. 125. p. 13036-13037. 2003.

39. HOFF, R. H.; LARSEN, P.; HENGGE, A. C. Isotope Effects and Medium Effects on Sulfuryl Transfer Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* v. 123. p. 9338-9344. 2001.
40. HOPKINS, A.; DAY, R. A.; WILLIAMS, A. Sulfate Group Transfer Between Nitrogen and Oxygen: Evidence Consistent with an Open "Exploded" Transition State. *J. Am. Chem. Soc.* v. 105. p. 6062-6070. 1983.
41. CHAPMAN, E.; BRYAN, M. C.; WONG, C. H. Mechanistic Studies of β -Arylsulfotransferase IV. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* v. 100. p. 910-915. 2003.
42. NEGISHI, M.; PEDERSEN, L. G.; PRYTROCHENKO, E.; SHEVTSOV, S.; GOROKHOV, A.; KAKUTA, Y.; PEDERSEN, L. C. Structure and Function of Sulfotransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* v. 390. p. 149-157. 2001.
43. RCSB-PDB, Protein Data Bank In <http://www.rcsb.org/pdb>.
44. PDB ID: 1o03 and 1o08. LAHIRI, S. D.; ZHANG, G.; MARIANO, D.-D.; ALLEN, K. N. The Pentacovalent Phosphorus Intermediate of a Phosphoryl Transfer Reaction. *Science.* v. 299. p. 2067-2071. 2003.
45. DUNITZ, J. D. *X-Ray Analysis and the Structure of Organic Molecules*. Ithaca: Cornell University Press, 1979.
46. FURNISS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; SMITH, P. W. G.; TATCHEL, A. R., Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. In Logman: London, 1989; p 1514.
47. ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*. 4^a ed.; Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998. p. 529.
48. BRANDÃO, T. A. S.; PRIEBE, J. P.; DAMASCENO, A. S.; BORTOLUZZI, A. J.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Bond Length-Reactivity Correlations for Sulfate Monoesters. The Crystal Structure of Potassium 4-Nitrophenyl Sulfate, C₆H₄KNO₆S. *J. Molec. Struc.* v. 734. p. 205-209. 2005.
49. KIRBY, A. J.; PERCY, J. M. Synthesis of 8-Substituted 1-Naphthylamine Derivatives, Exceptional Reactivity of the Substituents. *Tetrahedron.* v. 44. p. 6903-6910. 1988.
50. RAGAN, M. A. Phenol Sulfate Esters: Ultraviolet, Infrared, ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Investigation. *Can. J. Chem.* v. 56. p. 2681-2685. 1978.

51. ALDRICH, C. O. *Catalog Handbook of Fine Chemicals*. Milwaukee: USA, Aldrich, 1996.
52. SHELDRIK, G. M. *SHELXS97: Program for the Solution of Crystal Structures*. Germany: University of Göttingen, 1990.
53. SHELDRIK, G. M. *SHELXL97: Program for the Solution of Crystal Structures*. Germany: University of Göttingen, 1997.
54. FARRUGIA, L. J. ORTEP-3 for Windows - a Version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). *J. Appl. Cryst.* v. 30. p. 565. 1997.
55. ZOLNAI, L. *ZORTEP, Na Interactive ORTEP Program*. University of Heidelberg. Germany: University of Heidelberg, 1997.
56. SIEROSLAWSKI, K.; POPEK, T.; LIS, T. Potassium p-Nitrophenyl Sulfate. *Acta Cryst. C*. v. 60. p. m327-329. 2004.
57. FIFE, T. H.; BRUICE, T. C. The Temperature Dependence of the ΔpD Correction for the Use of the Glass Electrode in D_2O . *J. Phys. Chem.* v. 65. p. 1079-1080. 1961.
58. LIDE, D. R. E. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 82^a ed.; Boca Raton: CRC Press, 2001-2002.
59. ALLAN, D. R.; CLARK, S. J.; DAWSON, A.; MCGREGOR, P. A.; PARSONS, S. Pressure-induced polymorphism in phenol. *Acta Cryst. B*. v. 58. p. 1018-1024. 2002.
60. COPPENS, P.; SCHMIDT, G. M. J. The Crystal Structure of the Metastable (β) Modification of p-Nitrophenol. *Acta Cryst.* v. 18. p. 654-663. 1965.
61. WOJCIK, G.; MOSSAKOWSKA, I. Polymorphs of p-nitrophenol as studied by variable-temperature X-ray diffraction and calorimetry: comparison with m-nitrophenol. *Acta Cryst. B*. v. 62. p. 143-152. 2006.
62. POPEK, T.; LIS, T. 8-Hydroxyquinoline-O-sulfuric Acid and its Monohydrate. *Acta Cryst. C*. v. 53. p. 1983-1986. 1997.
63. HONDA, K.; GOTO, M.; KURAHASHI, M.; AKIZAWA, T.; YOSHIOKA, M.; BUTLER Jr., V. P. Structure of Bufothionin. *Acta Cryst. C*. v. 47. p. 1506-1508. 1991.
64. EGGLESTON, D. S.; TICKNER, A. M.; MENDELSON, W. L. The Structures of Epinine-O-sulfates. *Acta Cryst. C*. v. 43. p. 274-278. 1987.

65. VON BULOW, R.; USON, I. The Dipotassium Salt of p-Nitrocatechol Sulfate. *Acta Cryst. C*. v. 56. p. 152-153. 2000.
66. EGGLESTON, D. S.; CHODOSH, D. F.; JAIN, T.; KAISER, C.; ACKERMAN, D. M. Sulfoconjugation of Dopamine. The Structures of Dopamine-O-sulfates, $C_8H_{11}NO_5S$. *Acta Cryst. C*. v. 41. p. 76-82. 1985.
67. FRIES, D. C.; SUNDARALINGAM, M. Molecular Structures of Amino Acids and Peptides. III. Molecular Structure and Conformation of Potassium L-Tyrosine-O-Sulfate Dihydrate. *Acta Cryst. B*. v. 27. p. 401-410. 1971.
68. MESZKO, J.; SIKORSKI, A.; HUTA, O. M.; KONITZ, A.; BLAZEJOWSKI, J. 10-Methyl - and 9,10-Dimethylacridinium Metil Sulfate. *Acta Cryst. C*. v. 58. p. 669-671. 2002.
69. MASON, S. F. The Tautomerism of N-Heteroaromatic Hydroxy Compounds. III Ionization Constants. *J. Chem. Soc.* p. 674-685. 1958.
70. NAGASAWA, K.; YOSHIDOME, H. Metal-Catalyzed Reaction of 8-Quinolyl Sulfate and Its Application to the Preparation of Biochemically Related Sulfate Esters. *J. Org. Chem.* v. 39. p. 1681-1685. 1974.
71. MURAKAMI, Y.; SUNAMOTO, J. Solvolysis of Organic Phosphates. IV. 3-Pyridyl and 8-Quinolyl Phosphates as Effected by Presence of Metal Ions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* v. 44. p. 1827-1834. 1971.
72. 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.* v. 106. p. 6207-6212. 1984.
73. WILLIAMS, A. *Free Energy Relationships in Organic and Bioorganic Chemistry*. Cambridge: RSC, 2003. p. 62.
74. KIRBY, A. J.; LIMA, M. F.; DA SILVA, D.; NOME, F. Nucleophilic Attack by Oxyanions on a Phosphate Monoester Dianion: The Positive Effect of a Cationic General Acid. *J. Am. Chem. Soc.* v. 126. p. 1350-1351. 2004.

ARTIGOS PUBLICADOS

1 - BRANDÃO, TIAGO A. S.; PRIEBE, JACKS P.; DAMASCENO, AMANDA S.; BORTOLUZZI, ADAILTON J.; KIRBY, ANTHONY, J.; NOME, FARUK. Bond Length-reactivity Correlations for Sulfate Monoesters. The Crystal Structure of Potassium 4-Nitrophenyl Sulfate, $C_6H_4KNO_6S$. *Journal of Molecular Structure*. v. 734. p. 205-209. 2005.

2 - KIRBY, ANTHONY, J.; GESSER, JOSÉ C.; HOLLFELDER, FLORIAN; PRIEBE, JACKS P.; NOME, FARUK. Intramolecular General Acid Catalysis of Sulfate Transfer - Nucleophilic Attack by Oxynions on the SO_3^- Group. *Canadian Journal of Chemistry*. v. 83. p. 1629-1636. 2005.