



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

**ÁCIDO POLI(ACRÍLICO) FUNCIONALIZADO COMO  
NANOREATOR NA DEGRADAÇÃO DE ÉSTERES**

**Doutorando: Luciano Albino Giusti**

**Orientador: Prof. Faruk J. Nome Aguilera**

**Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Haidi D. Fiedler Nome**

**Florianópolis, março de 2014.**

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

Luciano Albino Giusti

**ÁCIDO POLI(ACRÍLICO) FUNCIONALIZADO COMO  
NANOREATOR NA DEGRADAÇÃO DE ÉSTERES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientado: Prof. Faruk J. Nome Aguilera  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Haidi D. Fiedler Nome

**Florianópolis**

**2014**

# Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da Universidade Federal de Santa Catarina

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Giusti, Luciano Albino  
Ácido Poli(acrílico) Funcionalizado como Nanoreator na  
Degradação de Ésteres / Luciano Albino Giusti ; orientador,  
Faruk Nome ; coorientador, Haidi Fiedler. - Florianópolis,  
SC, 2014.  
131 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.  
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Ésteres de fosfato e ésteres carboxílicos.  
3. Promiscuidade Catalítica. 4. Polímeros biomiméticos. 5.  
Imidazol. I. Nome, Faruk. II. Fiedler, Haidi. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Química. IV. Título.

Luciano Albino Giusti

**ÁCIDO POLI(ACRÍLICO) FUNCIONALIZADO COMO  
NANOREATOR NA DEGRADAÇÃO DE ÉSTERES**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutorado em Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de março de 2014.

---

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.

Coordenador do programa

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Faruk José Nome Aguilera,  
Dr. Orientador UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Haidi D. Fiedler Nome,  
Dra. Coorientadora UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Elisane Longhinotti, Dra.  
Relatora UFC

---

Prof.<sup>a</sup> Elisa Souza Orth, Dra.  
UFPR

---

Prof.<sup>a</sup> Vera Lúcia Azzolin  
Frescura Bascuñan, Dra. UFSC

---

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.  
UFSC

---

Prof. Antonio Luiz Braga, Dr.  
UFSC

*Aos meus pais, à minha noiva e a Deus.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha noiva pelo apoio e paciência.

Ao professor Dr. Faruk Nome e à professora Dra Haidi D. Fiedler pela oportunidade concedida a mim de ingressar no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais, da orientação e principalmente do conhecimento.

Ao professor Dr. Gustavo Amadeu Micke (UFSC) e à doutoranda Melina Heller pelas análises de LC-MS/MS e Eletroforese capilar.

A Dra. Michelle Medeiros pela ajuda, paciência e dedicação direta no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. José Ramón Mora pela colaboração dedicada no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Alex Molina Manfredi e Dr. Pedro S. M. de Oliveira pelas análises de NMR.

Aos colegas do LACFI pelo companheirismo, Prof. Dr. Bruno S. Souza (UFSC), Daiane de Liz, Eduardo H. Wanderlind, Elder Leopoldino, Franciane Dutra, Dra. Gizelle Almerindo, Dra. Lizandra Zimmermann.

Aos funcionários do departamento de Química da UFSC, principalmente, à Graça Hoeller e ao Jadir Carminatti, pela dedicação à secretaria, aos professores e aos alunos da Pós-Graduação do Departamento de Química.

A professora que foi relatora desta tese e prontamente aceitou o convite Dra. Elisane Longhinotte.

Aos membros da banca examinadora.

Ao INCT-Catálise, CNPq, CAPES, UFSC, pelo apoio financeiro e infraestrutura.

## RESUMO

Esta tese está focada na funcionalização do ácido poli(acrílico) (**PAA**) com 1-(3-aminopropil)-imidazol, na caracterização do produto da funcionalização, o polímero **PAIM**, e seu emprego na degradação de ésteres. Na caracterização do produto funcionalizado (**PAIM**) foi fundamental o emprego da técnica de eletroforese capilar e titulação potenciométrica, que permitiram determinar o grau de funcionalização do **PAIM**, e este concorda com o valor do peso molecular ponderal médio obtido por **GFC/SEC**. A estrutura anfotérica do **PAIM** assemelha-se aos *polysoaps*, que constituída dos grupos funcionais imidazol e carboxilato, permite ao polímero funcionalizado atuar como nanoreator, acelerando reações de desacilação e desfosforilação. Os grupos carboxilatos e imidazóis deprotonados estão ambos disponíveis para atuar como nucleófilos ou base-geral na catálise. O **PAIM** tem sua estrutura inspirada em enzimas com atividade catalítica atribuída aos aminoácidos de resíduos carboxilato e imidazol. A síntese foi designada para posicionar os dois grupos próximos um do outro, permitindo a cooperatividade. A eficiência catalítica do polímero foi avaliada para a quebra hidrolítica do dietil-2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), *p*-nitrofenil acetato (**PNPA**) e *p*-nitrofenil caprilato (**PNPC**). O **PAIM** foi eficiente e promiscuo aumentando a velocidade de todas as reações até  $10^7$  vezes, estendendo ainda a faixa catalítica para região de menor pH, frente ao imidazol livre, na reação com **DEDNPP**. O **PAIM** foi então alquilado com 1-bromododecano, o que aumentou a velocidade das reações em até  $10^8$  vezes. Os estudos cinéticos das reações do polímero com **DEDNPP** apontam para dois caminhos distintos, um nucleofílico do tipo  $S_N2(P)$  e outro básico geral como sugerem o baixo valor do efeito isotópico do solvente e os valores de entalpia e entropia de ativação.

**Palavras-chave:** éster de fosfato, éster carboxílicos, polímero, catálise, hidrólise.

## ABSTRACT

This thesis is focused on the functionalization of polyacrylic acid (**PAA**) with 1-(3-aminopropyl)-imidazole, in the product characterization (**PAIM**), and its use in the degradation of esters. Amphoteric **PAIM** is like to polysoaps, and the functional groups imidazole and carboxylic acid act as a nanoreactor to accelerate deacylation and dephosphorylation reactions. The synthesis was planned to position the two functional groups next to each other, allowing cooperativity. The catalytic efficiency of the polymer was evaluated for the hydrolytic cleavage of diethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (**DEDNPP**), *p*-nitrophenyl acetate (**PNPA**) and *p*-nitrophenyl caprylate (**PNPC**). **PAIM** was efficient and promiscuous, increasing the rates of all reactions up to  $10^7$ -fold, and its reaction with **DEDNPP** has expanded catalytic activity to lower pH ranges, when compared with free imidazole. **PAIM** was alkylated with 1-bromododecane to increase hydrophobicity (**PAIM-12**), and it increased the rates of reactions up to  $10^8$ -fold. For the reaction of **PAIM** with **DEDNPP** in a pH-region where the imidazole groups are mostly neutral, it was obtained a low solvent deuterium isotope effect, and large and negative entropies of activation, consistent with simultaneous nucleophilic and general-base pathways.

**KEYWORDS:** Phosphate esters, carboxylate esters, polymers, catalysis, hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gráfico de valores de  $k_{\text{cat}}$  e  $k_{\text{non}}$  em escala logarítmica para reação de hidrólise e hidratação a 25°C para as enzimas: *Staphylococcal* nuclease (STN),  $\beta$ -amilase (GLU), fumarase (FUM), uréase (URE), cloroacrilato dehalogenase (CAA), citidina deaminase (CDA), fosfotriesterase (PTE), diidroorotase (DHO) e anidrase carbônica (CAN)..... 22
- Figura 2.** Representação gráfica de  $k_{\text{cat}}/k_m$  e  $k_{\text{non}}$  para reação de hidrólise e hidratação a 25°C para as enzimas: STN, GLU (●), FUM (●), URE, CAA, CDA, PTE, DHO e CAN..... 23
- Figura 3.** Diagrama de energia para uma reação enzimática (–) e não-enzimática ( - ), onde  $\Delta G_{\text{cat}}$  corresponde à barreira energética para a reação catalisada e  $\Delta G_{\text{non}}$  se refere à reação não-catalisada..... 24
- Figura 4.** Estrutura geral para monoésteres, diésteres e triésteres de fosfatos..... 33
- Figura 5.** Estruturas de agentes neurotóxicos fosforados utilizados como pesticidas ou armas químicas.....36
- Figura 6.** Três possíveis caminhos para a reação de substituição em ésteres de fosfato.....39
- Figura 7.** Diagrama de More–O’Ferrall–Jencks para a transferência de grupo fosforila de fosfomonoésteres, diésteres e triésteres..... 41
- Figura 8.** Modelos de reações intramoleculares de ésteres de fosfatos..... 48

**Figura 9.** Estrutura do PEI funcionalizada com grupos metileno imidazol como sítio catalítico e dodecil como sítio hidrofóbico.52

**Figura 10.** Funcionalização aleatória da poli(alilamina) com diferentes ácidos carboxílicos.....57

**Figura 11.** Representação das reações: (a) funcionalização do PAA com 1-(3-Aminopropil)-imidazol e (b) alquilação do PAIM com 1-bromododecano.....62

**Figura 12.** Foto do sistema de extração líquido-líquido ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ ) em processo de purificação do polímero..... 63

**Figura 13.** Espectros sucessivos de UV-VIS típicos da degradação em água de (a) DEDNPP em função do tempo em pH 8 a 25°C ( $\lambda_{\text{máx}} = 360$  nm), (b) PNPA em pH 9,5 ( $\lambda_{\text{máx}} = 400$  nm), (c) PNPA em pH 4,5 ( $\lambda_{\text{máx}} = 317$  nm), a 25°C.....70

**Figura 14.** Espectros de IV (KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): (a) Espectro do reagente PAA; (b) espectro do reagente 1-(3-aminopropil)-imidazol; (c) espectro do produto PAIM..... 73

**Figura 15.** Espectro de  $^1\text{H}$  NMR obtido do (a) PAIM e (b) PAIM-12. ....74

**Figura 16.** Curva analítica para GFC, Peso molecular vs volume de eluição do padrão (polietileno glicol)..... 76

**Figura 17.** Espectros de ESI-MS (+) do PAIM com diferença de massas de 72 e 179  $\text{g mol}^{-1}$  entre os picos correspondentes ao PAA e ao PAA funcionalizado.....77

**Figura 18.** Espectro de ESI/MS/MS (+) do monômero do PAIM de  $m/z$  610..... 78

**Figura 19.** Titulação potenciométrica do PAIM (■). (a) Distribuição das espécies ( $\text{PAIM}^+$  e  $\text{PAIM}^-$ ) em equilíbrio vs. pH, a 25°C; (b) Estimativa

do ajuste do programa FITEQL 4.0 (Goodness of Fit).....80

**Figura 20.** Efeito da mobilidade eletroforética do PAIM vs pH.  
..... 82

**Figura 21.** Número de grupos vs pH para o PAIM. (–) número de grupos  $\text{-COO}^-$  e (–) número de grupos  $\text{IMZ}^+$  ..... 83

**Figura 22.** Estrutura proposta para o  $\text{PAIM}^{13-}$  ..... 84

**Figura 23.** Variação da tensão superficial com a concentração do PAIM a  $25^\circ\text{C}$ . ..... 86

**Figura 24.** Perfil de pH para a reação de degradação do DEDNPP a  $25^\circ\text{C}$ , (●) na presença do PAIM ( $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ). (□) hidrólise espontânea do substrato,  $I = 1,0$  (KCl) e (■) na presença do PAA ( $8,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ). ..... 87

**Figura 25.** Perfil de pH para a reação do PAIM ( $6,11 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  de imidazóis livres) com DEDNPP, dados em  $k_{\text{obs}}/[\text{Grupo imidazol}] (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$  a  $25^\circ\text{C}$ . Concentração local de grupos imidazolil para (●) PAIM e <sup>a</sup>comparativos obtidos da referência 5: reação com imidazol livre ( $1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) (▲) e (□) a <sup>a</sup>hidrólise espontânea do substrato a  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl). ..... 89

**Figura 26.** Perfil de pH para a reação de degradação do DEDNPP, a  $25^\circ\text{C}$ , em água com: (●) PAIM-12 ( $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  em 20% MeCN);<sup>a</sup> (o) PAIM ( $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) e (□) a hidrólise espontânea do substrato com  $I = 1,0$  (KCl). ..... 92

**Figura 27.** Perfil de concentração  $k_{\text{obs}}$  vs concentração do PAIM para a reação de degradação do DEDNPP; tampão bicarbonato ( $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ), pH 9,00,  $25^\circ\text{C}$ . ..... 945

**Figura 28.**  $\ln k_{\text{obs}}$  vs  $1/T$  para a reação do PAIM com DEDNPP, em pH 9.0. .... 97

**Figura 29.**  $\ln [k_{\text{Obs}} h (k_{\text{B}} T)^{-1}]$  vs  $1/T$  para a reação do PAIM com DEDNPP, em pH 9.0..... 97

**Figura 30.** Perfil de pH para a reação de degradação do PNPA: (●) PAIM ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), (□) hidrólise espontânea do substrato sob as mesmas condições (25°C, 20% MeCN), e (■) na presença do PAA ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) contendo apenas grupos carboxilatos..... 100

**Figura 31.** Perfil de pH para a reação de degradação do PNPA em água com: (●) PAIM-12 ( $1,7 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ )<sup>a</sup>; (■) PAIM ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), e (□) a hidrólise espontânea do substrato..... 103

**Figura 32.** Perfil de pH para a reação de degradação do PNPC em água com: (●) PAIM-12 ( $1,7 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ )<sup>a</sup>; (■) PAIM (monômero  $1,6 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), e (□) a hidrólise espontânea do substrato a 25°C..... 103

**Figura 33.** Gráfico  $k_{\text{obs}}$  vs concentração do PAIM-12 para a reação de degradação: (●) PNPC; (●) PNPA..... 104

## LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros cinéticos obtidos dos ajustes das curvas  $k_{obs}$  vs pH obtidos experimentalmente da reação do **DEDNPP** em água na presença e na ausência do **PAIM**. ..... 88
- Tabela 2.** Constantes de velocidade observada para a reação do **DEDNPP** com **PAA**, **PAIM** e **PAIM-12**, bem como a hidrólise espontânea, em pH 6,5 a 25°C. .... 93
- Tabela 3.** Constantes de velocidade observadas em diferentes temperaturas para a hidrólise do **DEDNPP** catalisada pelo **PAIM**. . 96
- Tabela 4.** Parâmetros termodinâmicos da ativação calculados para as reações do **DEDNPP** na presença do **PAIM** bem como na presença de imidazol. .... 98
- Tabela 5.** Parâmetros cinéticos obtidos dos ajustes das curvas  $k_{obs}$  vs pH obtidos experimentalmente das reações com: **PNPA** e **PNPC** em água na presença e na ausência do **PAIM**. .... 101

## LISTAS DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**AChE** – Acetilcolinesterase

**Asp** – Aspartato

**ATP** – Trifosfato de adenosina

**BDNPP** – *Bis*-(2,4-dinitrofenil) fosfato

**BMIPP** – *Bis*-(2-(1-metil-1*H*-imidazolil)-fenil) fosfato

**BNP** – *Bis*-(4-nitrofenil) fosfato

$\beta_g$  – Constante de Brønsted para grupo de saída

$\beta_{nuc}$  – Constante de Brønsted para nucleófilo

**CAA** – Cloroacrilato dehalogenase

**CAN** – Anidrase carbônica

**CDA** – Citidina deaminase

**CDH** – Celobiose dehidrogenase

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** – Diclorometano

**DHO** – Diidroorotase

**DMF** – Dimetilformamida

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DEDNPP** – Dietil-2,4-dinitrofenil fosfato

$\Delta G_{cat}$  – Variação de energia livre de Gibbs para reação catalisada

$\Delta G_{non}$  – Variação de energia livre de Gibbs para reação não catalisada

**EDNPP** – Etil-2,4-dinitrofenil fosfato

**EMPA** – Ácido etil-metilfosfônico

**FUM** – Fumarase

**GLU** –  $\beta$ -amilase

**hCE1** – Carboxilesterase 1

**His** – Histidina

**IGAC** – Catálise ácida geral intramolecular

**IGBC** – Catálise base-geral intramolecular

**IV** – Infravermelho

$k_{\text{cat}}$  – Constante de velocidade da reação catalisada

$K_m$  – Constante de Michaelis-Menten

$k_{\text{non}}$  – Constante de velocidade da reação não catalisada

$k_{\text{obs}}$  – Constante de velocidade observada de primeira ordem

**LDH** – Lactato desidrogenase

**Lys** – Lisina

**ME** – Molaridade efetiva

**MIPs** – Polímeros molecularmente impressos

**NUC** – Catálise nucleofílica

**OMP** – Orotidina-5'-fosfato

**PAA** – Ácido poli(acrílico)

**PAIM** – Ácido poli(acrílico) funcionalizado com 1-(3-aminopropil)-imidazol

**PAIM-12** – Ácido poli(acrílico) funcionalizado com 1-bromododecano

**PHA** – poli(hidroxicinâmico) alcanoato

**PLD** – Fosfolipases D

**PNPA** – 4-nitrofenil acetato

**PNPC** – 4-nitrofenil caprilato

**PNPP** – 4-nitrofenil fosfato

**PEI** – poli(etilenoimina)

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**P-N** – Ligação fósforo-nitrogênio

**P-O** – Ligação fósforo-oxigênio

**P-S** – Ligação fosforo-enxofre

**PTE** – Fosfotriesterase

**P1VIm** – Poli(1-vinilimidazol)

**P4VIm** – Poli(4-vinilimidazol)

**NMR** – Ressonância Magnética Nuclear

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RNAse A** – Ribonuclease A

s – Segundo

**STN** – *Staphylococcal* nuclease

$t_{1/2}$  – Tempo de meia-vida

**URE** - Urease

**UV-vis** – Ultravioleta e visível

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1.	Enzimas: Exímios catalizadores.....	21
1.2.	Catálise enzimática: A evolução das hipóteses.....	24
1.3.	Promiscuidade Catalítica.....	26
1.4.	Atividade catalítica enzimática promovida por imidazol.	27
1.4.1.	Fosfolipase D.....	28
1.4.2.	Serina protease.....	29
1.4.3.	Acetilcolinesterase.....	29
1.4.4.	Ribonuclease A.....	31
1.5.	Ésteres de fosfatos.....	32
1.5.1.	Agentes neurotóxicos organofosforados.....	34
1.5.2.	Substituição nucleofílica em ésteres de fosfatos.....	37
1.6.	Reações envolvendo catálise Inter- e Intramolecular.....	43
1.7.	Catálise ácida e básica.....	45
1.8.	Catálise nucleofílica.....	48
1.9.	Polímeros como catalisadores biomiméticos.....	51
1.9.1.	Polímeros molecularmente impressos.....	56
1.9.2.	Polímeros desenvolvidos via química orgânica combinatória.....	57
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>60</b>
<b>3.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>61</b>
3.1.	Reagentes.....	61
3.2.	Síntese do PAIM e PAIM-12.....	61
3.3.	Métodos.....	64

3.3.1.	Estudos por espectroscopia de IV.....	64
3.3.2.	Estudos de NMR <sup>1</sup> H.....	65
3.3.3.	Estudos de GFC/SEC.....	65
3.3.4.	Estudos de espectrometria de massas – ESI-MS/MS.....	66
3.3.5.	Titulação potenciométrica.....	67
3.3.6.	Estudos de eletroforese capilar.....	67
3.3.7.	Estudos de Tensiometria.....	68
3.3.8.	Estudos cinéticos.....	68
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
4.1.	Caracterização do polímero PAIM.....	72
4.1.1.	Estudos de IV e NMR <sup>1</sup> H.....	72
4.1.2.	Determinação do peso molecular do PAIM.....	75
4.1.3.	Estudos de espectrometria de massas do PAIM.....	77
4.1.4.	Titulação potenciométrica.....	78
4.1.5.	Mobilidade eletroforética.....	81
4.1.6.	Estrutura do PAIM.....	83
4.1.7.	Formação de sistemas homogêneos organizados.....	85
4.2.	Estudos cinéticos dos polímeros PAIM e PAIM-12 com os substratos DEDNPP, PNPA e PNPC.....	86
4.2.1.	Hidrólise do DEDNPP.....	86
4.2.1.1	Parâmetros termodinâmicos – PAIM / DEDNPP.....	96
4.2.2.	Hidrólise de éster de carboxila – PNPA e PNPC.....	99
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>105</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXO – 1 .....</b>	<b>125</b>
7.1.	ANEXO – 2 .....	127
7.2.	ANEXO – 3 .....	131

## 1. INTRODUÇÃO

A Natureza ao longo de seus 4,5 bilhões de anos sintetizou ao acaso inúmeros compostos e de modo seletivo escolheu as enzimas como catalisadores na busca do próprio aprimoramento.<sup>1</sup> O processo catalítico executado por enzimas permaneceu por um longo tempo como um mistério. Grandes progressos foram feitos, e embora extensamente estudadas, não são completamente entendidas em nível molecular. As reações de hidrólise de ésteres de fosfatos e carboxilatos, como exemplo, são aceleradas por enzimas com efeitos catalíticos na ordem de  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes. Efeitos dessa ordem são geralmente atribuídos a: *i*) estabilidade do estado de transição; *ii*) concentração do substrato em sítios hidrofóbicos e *iii*) grande cooperatividade entre grupos no sítio ativo.<sup>2</sup>

Ésteres de fosfatos participam em vários processos biológicos. As fosfohistidinas são importantes intermediários nos processos de sinalização biológica e, geralmente, são detectadas em reações de fosforilação.<sup>3</sup> Recentemente foi discutido a participação do imidazol na hidrólise do fosfodiéster Bis-(2-(1-metil-1*H*-imidazolil)-fenil) fosfato (BMIPP) que contem dois grupos imidazois na estrutura.<sup>4,5</sup> Os monoésteres existem como intermediários no metabolismo, os fosfodiésteres estão presentes no armazenamento e transmissão de informação genética, como ácidos desoxirribonucleico e ácido ribonucleico (**DNA** e **RNA**). Já os triésteres são compostos artificiais tóxicos e, não ocorrem naturalmente em moléculas biológicas. Contudo, a classe de enzimas conhecidas como paroxonases apareceram naturalmente em insetos com a função de hidrolisar esses ésteres.<sup>6,7</sup>

O incrível poder catalítico das enzimas permite que reações enzimáticas possam ocorrer em questão de milissegundos. Entretanto, a mesma reação na ausência de catalisador pode proceder com tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de centenas ou milhares de anos.<sup>8</sup> Por essa razão, esses exímios catalisadores se tornaram fonte de interesse e inspiração para o desenvolvimento de novas moléculas catalisadoras que possam simular o ambiente enzimático.<sup>9,10</sup> Uma alternativa encontrada, foi o emprego de polímeros sintéticos que pudessem ser funcionalizados para tornar-se miméticos as enzimas.<sup>1,9-17</sup> Em 1971, Irving Klotz e colaboradores<sup>17</sup> reportaram um dos primeiros polímeros sintéticos com atividade catalítica semelhante à das enzimas. Klotz, funcionalizou a

poli(etilenoimina) (**PEI**) com grupos dodecil, aumentando a hidrofobicidade e como sítio catalítico utilizou grupos metilenoimidazol ancorados à cadeia da **PEI**.

O imidazol, como resíduo constituinte da histidina, com  $pK_a$  próximo de 7, pode atuar como ácido geral, base-geral ou nucleófilo, tendo ainda como habilidade adicional a capacidade de atuar como base de Lewis e assim, fixar e ativar cátions metálicos no sítio ativo da enzima. Como consequência, possuem papel fundamental nas serina proteases<sup>3</sup> e nas enzimas que promovem a transferência de fosforila.<sup>18-20</sup>

Estudos cinéticos comparativos envolvendo a **PEI** funcionalizada e a enzima  $\alpha$ -quimotripsina e utilizando nitrofenil ésteres como substratos, forneceram constantes catalíticas semelhantes. Assim, o termo *synzyme* surge para descrever enzimas sintéticas. Os estudos de Klotz prosseguem e um ano depois utilizando **PEI** funcionalizado com os mesmos grupos mencionados acima, reporta um aumento da velocidade de hidrólise do 2-hidroxi-5-nitrofenil sulfonato a 4-nitrocatecol, da ordem de  $10^{12}$  vezes quando comparado ao imidazol livre e de  $10^2$  vezes em relação à enzima aril sulfatase.<sup>15</sup>

O desenvolvimento *via* Química Orgânica Combinatória de catalisadores orgânicos miméticos da enzima fosfatase, foi a estratégia sugerida por Menger e colaboradores.<sup>1</sup> Menger ateve-se ao acaso, bem como na Natureza, e em um único passo ácidos carboxílicos com diferentes grupos funcionais foram ancorados à cadeia da polialquilamina e posteriormente, metais como  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$  foram complexados ao polímero. Estes catalisadores foram empregues na hidrólise de *p*-nitrofenil fosfato (**PNPP**) e bis-*p*-nitrofenil fosfato (**BPNNP**).

A catálise biomimética vem se destacando como uma nova área de pesquisa na organocatálise. Uma ampla variedade de reações orgânicas vem sendo catalisada por enzimas miméticas.<sup>9,10</sup> Sendo, de interesse construir macromoléculas hábeis à simular um ambiente enzimático<sup>17,21,22</sup> assim como, o trabalho introduzido por Klotz que utilizou a PEI para degradar ésteres de ácidos carboxílicos com grupo de saída ativado, muitos exemplos vêm sendo reportado na literatura, incluindo centro metálicos, ionenos e nucleófilos *alfa*,<sup>17,21,23-25</sup> onde macromoléculas têm a habilidade de formar ativos e interessantes nanoreatores catalíticos homogêneos.

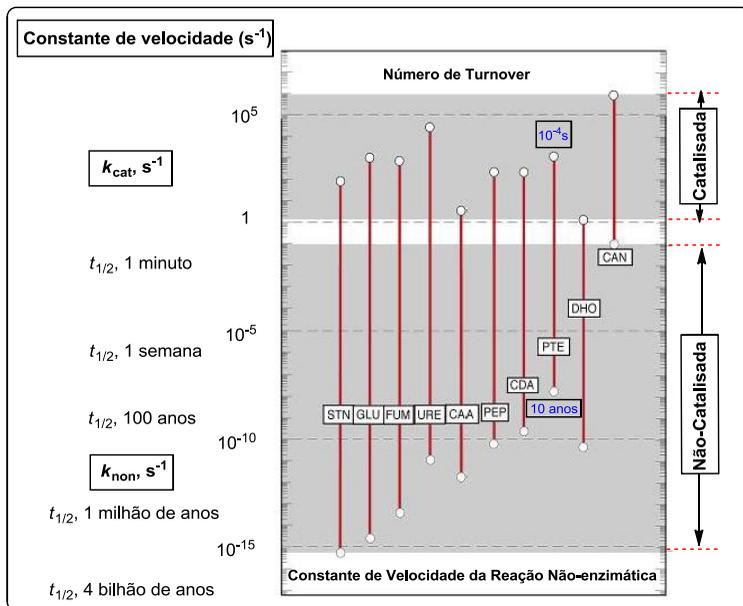
Grupos carboxilato e imidazol têm mostrado importantes efeitos cooperativos nos sítios ativos da família das fosfolipases D.<sup>26</sup> Assim sendo, esta tese tem como interesse avaliar as reações desses dois grupos nucleofílicos ancorados sobre a estrutura de nanoreatores poliméricos em reações de hidrólise de ésteres de fosfatos e carboxilatos.

Uma breve revisão bibliográfica é apresentada a seguir em que será discutida reações de hidrólise de ésteres fosfóricos, a eficiência e evolução das enzimas, mecanismos, bem como mostrados exemplos de polímeros catalíticos biomiméticos.

### 1.1. Enzimas: Exímios catalisadores

A magnitude do poder catalítico das enzimas pode ser avaliada quando comparamos as constantes de velocidade para reações biológicas na presença de enzimas ( $k_{\text{cat}}$ ) com as respectivas constantes na ausência de catalisador ( $k_{\text{non}}$ ). A vida média ( $t_{1/2}$ ) de reações da enzima fosfotriesterase (**PTE**) passa de 10 anos (não catalisada) para  $10^{-4}$  s (catalisada). Como ilustra o gráfico da **Figura 1**, o incremento da velocidade expresso pela razão  $k_{\text{cat}}/k_{\text{non}}$  ultrapassa de  $10^{17}$  vezes para a  $\beta$ -amilase.<sup>27</sup> A descarboxilação da orotidina-5'-fosfato (**OMP**), passo final na biossíntese da pirimidina, é uma reação muito importante na síntese dos ácidos nucleicos e procede com  $t_{1/2}$  de  $17 \times 10^{-3}$  s no sítio ativo da **OMP** decarboxilase. A mesma reação em solução neutra e na ausência da enzima, procede com  $t_{1/2}$  de 78 milhões de anos.<sup>8</sup>

**Figura 1** – Gráfico de valores de  $k_{cat}$  e  $k_{non}$  em escala logarítmica para reação de hidrólise e hidratação a 25°C para as enzimas: *Staphylococcal* nuclease (STN),  $\beta$ -amilase (GLU), fumarase (FUM), uréase (URE), cloroacrilato dehalogenase (CAA), citidina deaminase (CDA), fosfotriesterase (PTE), diidroorotase (DHO) e anidrase carbônica (CAN). Os valores de  $t_{1/2}$  servem como referência da escala de tempo. Figura adaptada da referência (27).

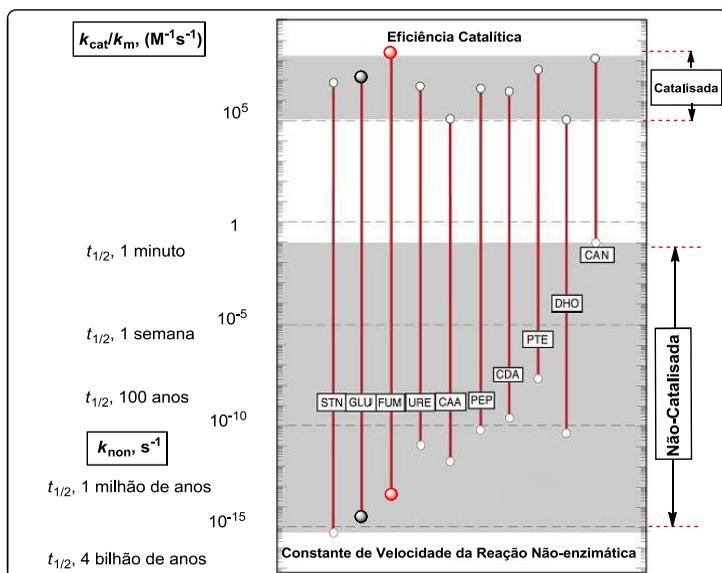


A capacidade catalítica de uma enzima pode ser melhor avaliada quando divide-se a constante de velocidade de segunda ordem aparente  $k_{cat}/K_m$  ( $M^{-1} s^{-1}$ ), pela constante de velocidade da reação não catalisada em água  $k_{non}$  ( $s^{-1}$ ). Onde,  $k_{cat}$  é simplesmente a constante de velocidade de primeira ordem para a reação de conversão do complexo enzima substrato (E.S) à produtos e  $K_m$  representa a constante de Michaelis de dissociação do complexo (E.S). Quando todos os sítios catalíticos da enzima estiverem ocupados é atingido a velocidade limite, a cinética é definida como sendo de Michaelis-Menten. Já, quando a concentração do substrato é muito pequena  $k_{cat}/K_m$  é definida como a constante de

segunda ordem para a reação global. Dessa forma, a capacidade da enzima em baixar a barreira de ativação junto ao substrato em solução pode ser medida. A proficiência de uma enzima expressa em unidades de concentração ( $k_{cat}/K_m/k_{non}$  ( $M^{-1}$ )) representa o limite inferior da afinidade da enzima pelo substrato no estado de transição.<sup>8</sup> Assim, enzimas com maior afinidade para ligar o substrato no estado de transição (valores grandes de  $k_{cat}/K_m/k_{non}$ ), que apresentam significativos aprimoramentos nas velocidades são alvos importantes no desenvolvimento de novos inibidores ou fármacos.<sup>27</sup>

O gráfico da **Figura 2** ilustra a eficiência catalítica de algumas enzimas comparando  $k_{cat}/K_m$  com a reação espontânea ( $k_{non}$ ). A enzima **FUM** apresenta maior eficiência catalítica, mais específica em relação aos substratos, enquanto a **GLU** é um pouco menos eficiente, contudo possui maior capacidade para acelerar reações lentas.

**Figura 2** – Representação gráfica de  $k_{cat}/k_m$  e  $k_{non}$  para reação de hidrólise e hidratação a 25°C para as enzimas: STN, GLU (●), FUM (●), URE, CAA, CDA, PTE, DHO e CAN. Os valores de  $t_{1/2}$  servem como referência da escala de tempo. Figura adaptada da referência (28).

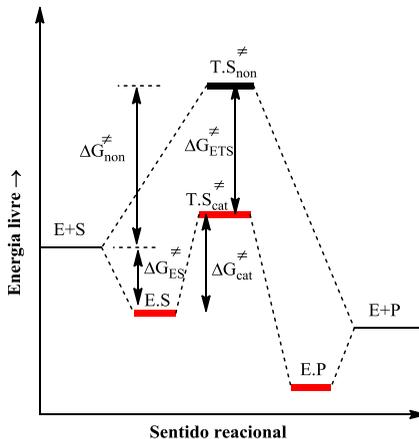


## 1.2. Catálise enzimática: A evolução das hipóteses

Uma das primeiras hipóteses oferecidas com o intuito de solucionar o mistério da catálise enzimática foi o ‘*princípio da chave e da fechadura*’ descrito por Emil Fischer em 1894.<sup>28</sup> Fisher propunha que o tamanho, a forma e a posição dos sítios de ligações dentro do sítio ativo da enzima (fechadura) são ideais para o reconhecimento de substratos (chave) específicos. Mais tarde, surge a hipótese de que ocorra a pré-organização do sítio ativo (fechadura) assim, “a chave não muito se ajustaria a fechadura de forma ideal, mas exerceria uma certa tensão sobre ela” desestabilizando dessa forma o estado fundamental. Imaginava-se que a enzima pudesse ligar-se a uma forma ativada do substrato, ou induzir sua ativação.<sup>29</sup>

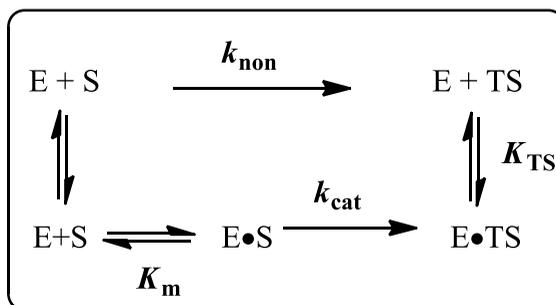
Com o avanço da teoria do estado de transição, Linus Pauling em 1946 propôs que o sítio ativo de uma enzima (E) liga-se ao estado de transição (TS) preferencialmente ao substrato (S) ou produto (P), estabilizando o TS e dessa forma baixando a energia de ativação, o que origina a catálise, como ilustra a **Figura 3**.<sup>30</sup>

**Figura 3** – Diagrama de energia para uma reação enzimática (–) e não-enzimática (—), onde  $\Delta G_{\text{cat}}$  corresponde à barreira energética para a reação catalisada e  $\Delta G_{\text{non}}$  se refere à reação não-catalisada.



A estabilização do estado de transição está diretamente relacionada com o potencial catalítico da enzima. Fatores como dessolvatação e conformação do substrato, forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações com metais, contribuem para essa estabilização.<sup>31</sup> As velocidades das reações têm sido empregadas para calcular a constante de equilíbrio ( $1/K_{TS}$ ) para essas hipotéticas ligações dos vários estados de transições a suas respectivas enzimas. Para isso, um ciclo pseudo-termodinâmico (**Esquema 1**) vem sendo empregado para diversas interpretações.<sup>32</sup> O **Esquema 1** compara a reação enzimática com a correspondente reação não catalisada na presença da enzima embora, não envolvida e também ilustra as ligações no estado fundamental e de transição.

**Esquema 1**



No **Esquema 1**, o valor calculado para  $K_{TS} = (k_{\text{non}}K_m)/k_{\text{cat}}$  leva em consideração todos os fatores na reação enzimática comparados com a mesma reação em solução na ausência da enzima, o que permite determinar valores que descrevem a eficiência da enzima. Em outras palavras, a eficiência da reação enzimática pode ser explicada pela ligação preferencial da enzima ao estado de transição (TS) em relação ao solvente.<sup>30</sup>  $K_{TS}$  é formalmente a constante de dissociação da enzima no estado de transição e seu inverso é chamado de proficiência catalítica e este, avalia o TS em termos de constante de ligação. O que permite comparar a afinidade do solvente para se ligar ao TS (reação não catalisada) em relação à enzima (reação catalisada). Deve ainda ser

ressaltado em relação a proposta de Pauling para E•TS, onde a enzima não alteraria o substrato, no TS, não é sempre verdadeira. Para algumas enzimas uma pequena distorção do substrato, no TS, resulta em uma maior eficiência na catálise.<sup>27,29,32,33</sup>

### 1.3. Promiscuidade Catalítica

As enzimas são reconhecidas pela sua eficiência e pela sua especificidade. Acreditava-se que essa especificidade fosse exclusivamente para um único substrato. Contudo, evidências vêm mostrando a adaptabilidade evolucionária de algumas enzimas que catalisam diferentes reações e/ou transformar outros substratos, como demonstrado em eventos associados à resistência a fármacos<sup>34</sup> e à degradação de produtos sintéticos como inseticidas e herbicidas.<sup>35,36</sup> A propriedade mostrada por enzimas, onde seu sítio ativo facilita a catálise de diferentes classes de substratos envolvendo construção ou quebra de diferentes tipos de ligações, é conhecido como *promiscuidade catalítica*.<sup>37</sup>

A hipótese da ampla especificidade ou promiscuidade existente como função em enzimas foi formulada por Jensen em 1976.<sup>38</sup> Jensen propôs que as enzimas primitivas possuíam múltiplas especificidades, diferentes das enzimas modernas. Esta especificidade ampla, atuou sobre múltiplos substratos para formar uma variada série de capacidades metabólicas que pudessem manter os organismos primitivos. A formação de enzimas especializadas *via* duplicação, mutação e seleção, levou a atual diversidade de enzimas e ao aumento da eficiência metabólica.

Jensen<sup>38</sup> e mais tarde O'Brien e Herschlag<sup>39</sup> sugerem que a evolução das proteínas se dá em boa parte pelo importante papel desempenhado pela promiscuidade catalítica e que essa evolução se processa pela duplicação do gene, na qual a segunda cópia torna-se livre da seletividade e assim pode acumular mutações que eventualmente conduziriam à enzima com uma nova função. Contudo, estudos têm mostrado que a promiscuidade catalítica pode ser aprimorada com poucas mutações, sem fazer com que a enzima perca a sua atividade

natural nativa, mesmo antes da duplicação do gene,<sup>40</sup> sendo este um processo lento que levaria milhões de anos.<sup>41</sup>

As recentes evoluções de algumas proteínas têm ocorrido em questão de meses ou anos, o que reforça a ideia de que mutações promovem pequenos efeitos sobre a atividade nativa de uma enzima (sem duplicação do gene) e grandes efeitos sobre suas funções promíscuas.<sup>42</sup> Ou seja, a proteína não precisa dispensar-se da sua função nativa para sofrer rápidas mutações e, como exemplo, facilitar a resistência a fármacos.

A degradação de produtos sintéticos como inseticidas e herbicidas<sup>35,36</sup> pela paraoxanase, uma fosfotriesterase bacteriana, faz parte de uma classe de enzimas com capacidade de hidrolisar fosfotriésteres como o antropogênico inseticida paraoxon.<sup>42-44</sup> Estudos da carboxilesterase humana 1 (**hCE1**) mutante, homóloga da acetilcolinesterase (**AChE**), têm demonstrado aumentos na velocidade de defosforilação de agentes neurotóxicos como Sarin, Soman e Ciclosarin de cinco, vinte e mais de trinta mil vezes, respectivamente, que a **hCE1** nativa.<sup>45</sup>

A promiscuidade catalítica tem despertado interesse industrial, seja nas sínteses de novos compostos e/ou na detoxicação de compostos recalcitrantes,<sup>44,46-48</sup> bem como estimulando o interesse de pesquisadores que exploram modelos enzimáticos que possam mimetizar as funções dessas enzimas.<sup>49</sup>

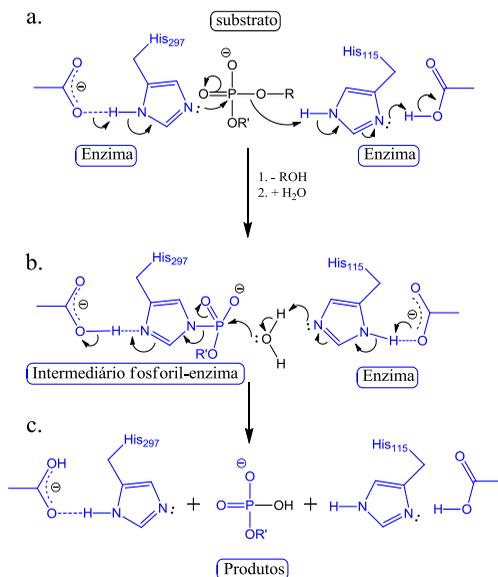
#### **1.4. Atividade catalítica enzimática promovida por imidazol**

O imidazol, na forma de resíduo constituinte da histidina, é de grande relevância nas atividades catalíticas de algumas enzimas relacionadas a reações de desfosforilação, hidrólise de ligação peptídica e tantas outras. Algumas dessas enzimas serão brevemente apresentadas.

### 1.4.1. Fosfolipases D

As superfamílias das fosfolipases D (**PLD**) têm em comum sequências de aminoácidos, HisXLys(X)<sub>4</sub>Asp(X)<sub>6</sub>GlySerXAsn, a qual ocorre duas vezes (duplo domínio) nas holoenzimas. Isto permite que as superfamílias das fosfolipases D façam uso de dois resíduos ativos distintos de histidina como sítios catalíticos para catalisar a clivagem de fosfodiésteres não reativos. O resíduo nucleofílico da proteína, que é o imidazol da histidina, forma uma ligação covalente ao grupo fosfato do substrato formando um intermediário fosforil-enzima. Esse intermediário covalente é subsequentemente destruído via ataque nucleofílico por uma molécula de água liberando os produtos da hidrólise (**Esquema 2**).<sup>4,26</sup>

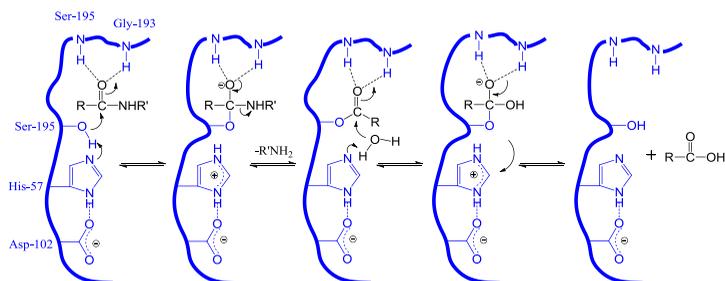
**Esquema 2**



### 1.4.2. Serina proteases

Serina proteases correspondem a quase um terço das proteases e apresentam, em seu sítio catalítico, o resíduo da serina (Ser) que reage como nucleófilo. O primeiro sítio catalítico de uma protease revelado por cristalografia de raios-X foi o da  $\alpha$ -quimotripsina. O clássico mecanismo da  $\alpha$ -quimotripsina mostra a presença do trio catalítico Asp-His-Ser.<sup>50,51</sup> Esse trio é extremamente importante em serina proteases, onde há uma ligação de hidrogênio entre aspartato (Asp) e o imidazol da histidina (His),<sup>52</sup> o que faz com que o imidazol aumente sua basicidade. Em reações catalisadas, o grupo imidazol atua como uma base retirando um próton do oxigênio da serina, formando um nucleófilo poderoso para atacar o grupo carbonílico do substrato (**Esquema 3**).<sup>53</sup>

**Esquema 3** – Mecanismo aceito para a hidrólise de peptídeos catalisada por serina proteases, adaptado da referência 53.

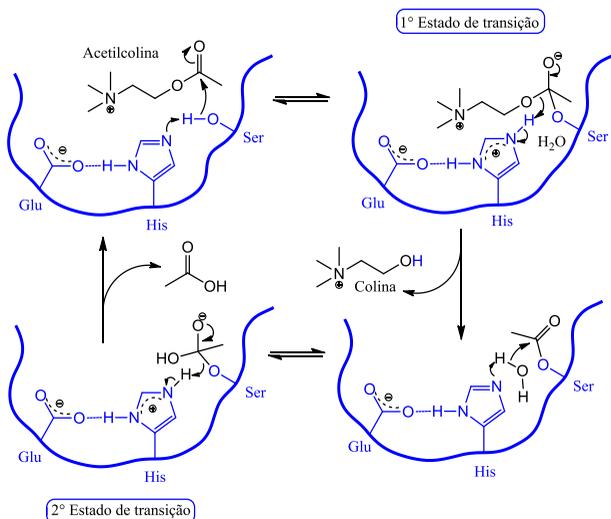


### 1.4.3. Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (**AChE**) é a serina protease responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na sinapse das células

nervosas. A inibição da acetilcolinesterase leva ao acúmulo de acetilcolina, o que resulta na saturação permanente dos receptores muscarínicos e nicotínicos, provocando a crise colinérgica do sistema.<sup>54,55</sup> O sítio ativo da **AChE** é constituído do trio catalítico Ser-His-Glu, responsável por catalisar a hidrólise da acetilcolina em um mecanismo de dois passos: (1) o grupo imidazol do resíduo histidina aumenta o potencial nucleofílico do oxigênio da Ser, o qual ataca a acetilcolina, para formar um estado de transição tetraédrico o qual colapsa à acetil-enzima com liberação da colina; (2) na segunda etapa, uma molécula de água ativada, pela histidina, ataca a acetilserina levando a formação do segundo estado de transição tetraédrico, que libera a enzima livre e ácido acético (**Esquema 4**).

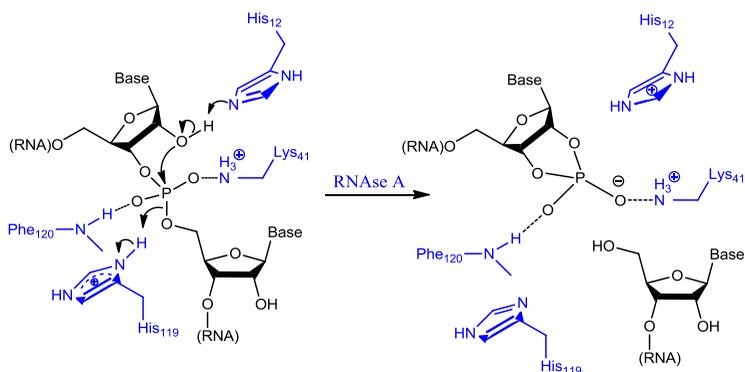
**Esquema 4** – Mecanismo aceito para a hidrólise de acetilcolina catalisada pela AChE, adaptado da referência 54.



#### 1.4.4. Ribonuclease A

A ribonuclease A (**RNase A**) tem sido a enzima mais estudada no século vinte<sup>18</sup> e tem como papel catalisar a quebra da ligação P-O do RNA. Os três resíduos mais importantes para exercer a catálise são: His12, His119 e Lys41.<sup>56,57</sup> A degradação do **RNA (Esquema 5)** é iniciada com o imidazol do resíduo da His12 que atua como uma base-geral e abstrai um próton do oxigênio-2' do substrato facilitando, dessa forma, o ataque sobre o átomo de fósforo. O íon imidazólio do resíduo His119 atua como um ácido geral e protona o oxigênio-5' do substrato o que facilita a sua saída para formar o 2', 3'-ciclo-fosfato.<sup>58</sup> Os resíduos da Lys41 e Phe120 devem estabilizar o excesso de cargas negativas por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio.<sup>57</sup>

**Esquema 5** – Mecanismo para a quebra da ligação P-O do RNA catalisada pela ribonuclease A.



O imidazol como resíduo constituinte da histidina é um dos mais versáteis grupos catalíticos disponíveis em enzimas. Em pH fisiológico (7,3) o imidazol está 50% protonado.<sup>59</sup> Tal peculiaridade confere ao imidazol o poder de atuar como ácido-geral, base-geral e nucleófilo. Como base de Lewis, fixa e ativa cátions metálicos. Consequentemente,

essa versatilidade é fundamental no sítio ativo das serinas proteases<sup>60</sup> e das enzimas que promovem a transferência de fosforila.<sup>19,20,61</sup>

### 1.5. Ésteres de fosfatos

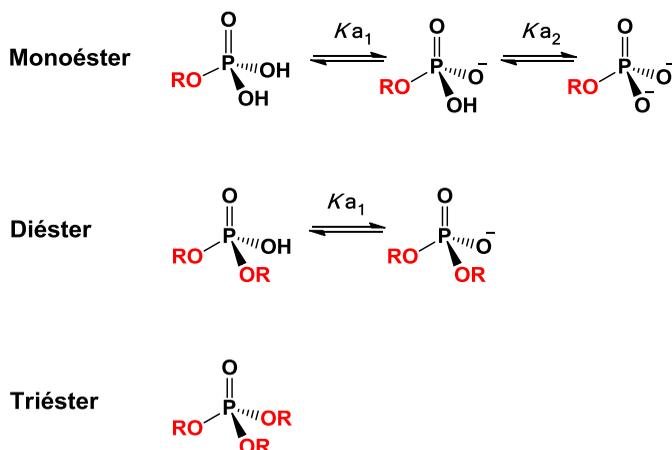
A natureza ao longo do seu desenvolvimento ateu-se aos ésteres de fosfatos, para desempenhar uma variedade de processos biológicos, seja no metabolismo (intermediários monofosforilados), bem como no armazenamento e transmissão de informação genética (**DNA** e **RNA**). Já os triésteres são compostos que não têm sido identificados como ocorrendo naturalmente em sistemas biológicos.<sup>6</sup>

A seleção pelas ligações P–O ou P–N realizada pela natureza, por mais casual que seja, parece justificada. Moléculas com esse tipo de ligação apresentam estabilidade significativa em reações de hidrólise. Assim, são moléculas resistentes à ação da água, do solo e do ar, permitindo que **DNA** e **RNA** possam armazenar informações. O trifosfato de adenosina (**ATP**), possui uma ligação tipo anidrido, que permite sua atuação como moeda de troca de energia.<sup>62,63</sup> Por razões semelhantes, pesticidas, inseticidas e gases de guerra podem atingir seus locais de ação biológica sem serem destruídos.<sup>64</sup>

Algumas moléculas eletricamente neutras apresentam solubilidade em lipídios e desta forma podem atravessar a membrana celular. No entanto, moléculas ionizadas são insolúveis. Esta regra não pode ser tomada como absoluta, visto que compostos polihidroxilados como açúcares podem ser lipofóbicos sem sofrerem ionização. Da mesma forma moléculas extremamente insolúveis em água como esteroides podem conservar-se no interior da célula.<sup>62</sup> Certamente, moléculas ionizadas podem ser mantidas com maior facilidade no interior da célula. Os grupos fosfodiésteres do **DNA** e **RNA** são carregados negativamente, o que os torna mais resistentes a hidrólise, sendo o  $t_{1/2}$  para a reação espontânea da hidrólise do **DNA** estimado em 200 milhões de anos.<sup>65</sup>

Os ésteres de fosfatos são classificados como mono-, di e triésteres, dependendo do número de grupos ésteres presentes (**Figura 4**). Os monoésteres e diésteres de ácido fosfórico contêm grupos hidroxila na sua estrutura, o que lhes conferem uma funcionalidade adicional, que equivale à de ácidos dipróticos e monopróticos, respectivamente.<sup>64</sup>

**Figura 4** – Estrutura geral para monoésteres, diésteres e triésteres de fosfato.



O primeiro  $pK_a$  para mono- e diésteres de fosfato está em torno de 1-2, o que permite sua ionização em pH fisiológico, já o segundo  $pK_a$  para monoéster alquílico é em torno de 7.<sup>62,66</sup> Carregados negativamente, os ésteres de fosfatos estão menos propícios ao ataque nucleofílico no átomo de fósforo. Nucleófilos e/ou íons hidróxidos, são repelidos por cargas negativas e, dessa forma, a reação é mais lenta com ânions do que com substratos neutros em solução alcalina. No entanto, em soluções ácidas devido a influência dos íons hidrônio, o fósforo aumenta sua carga positiva, facilitando reações com espécies nucleofílicas, como a água.<sup>67</sup> Tais peculiaridades são coerentes com o papel fundamental do **DNA** na preservação da informação genética e

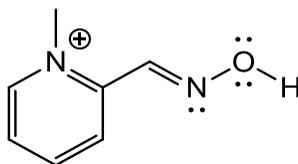
explicam porque a natureza escolheu os ésteres de fosfatos para exercer essa função.<sup>62,64</sup>

### 1.5.1. Agentes neurotóxicos organofosforados

O gás cloro foi usado por tropas alemãs como arma química durante a Primeira Guerra Mundial em abril de 1915<sup>68</sup> na cidade de Ypres (Bélgica) contabilizando aproximadamente 91 mil mortes.<sup>69</sup> Tal evento desencadeou a corrida em busca de novas armas químicas, que culminou com a chegada dos agentes neurotóxicos organofosforados. Vale ressaltar que ao redor do mundo, principalmente em áreas rurais, o envenenamento provocado por pesticidas organofosforados tem provocado a morte de mais de 200 mil pessoas ao ano.<sup>70</sup>

A toxicidade dos agentes organofosforados resulta da inibição irreversível da enzima acetilcolinaesterase (**AChE**) via fosforilação de um resíduo hidroxílico de serina no sítio ativo da enzima. A inibição irreversível da **AChE** causa o acúmulo de acetilcolina na sinapse das células nervosas conduzindo à superestimulação dos receptores colinérgicos, convulsões, parada respiratória e morte.<sup>54,71</sup>

O tratamento moderno para o envenenamento com agentes neurotóxicos organofosforados, combina o uso de atropina (antimuscarínico), diazepam (anticonvulsivo) e um reativador da **AChE** da família das oximas (nucleófilos detentores do *efeito alfa*) como a pralidoxima (1).<sup>54,55,72</sup>



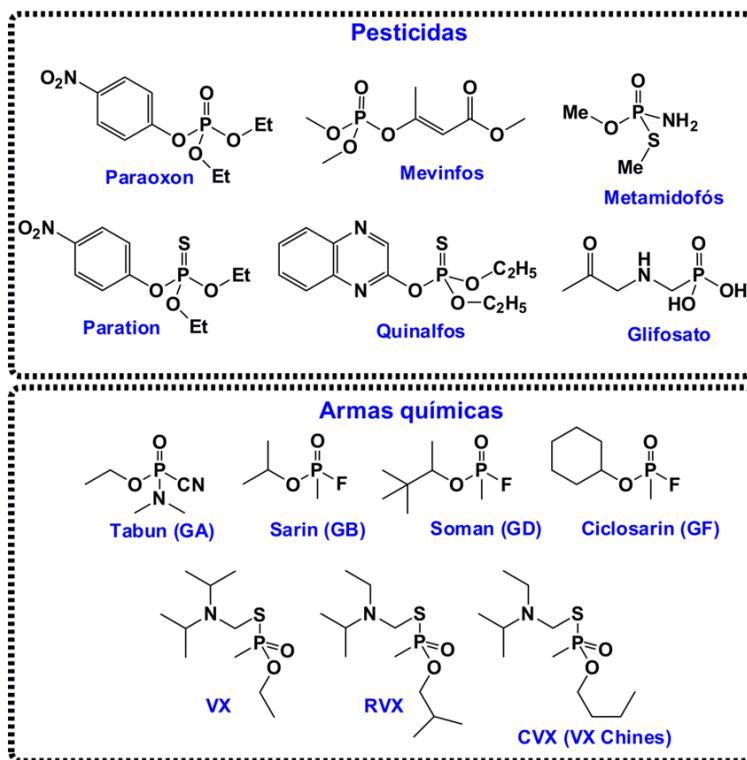
(1)

A primeira geração dos agentes neurotóxicos organofosforados, chamados de agentes G, foram desenvolvidos na Alemanha durante a Segunda Guerra Mundial, no final de 1930 e na década de 1940. Dentre eles estão o cianofosforoamidato Tabun (GA) e os metilfluorofosfatos Sarin (GB), Soman (GD) e Ciclosarin (GF). A segunda geração utiliza metilfosfotioatos chamados de agentes V (*Venomouins agents*) e, surge pós-guerra no início de 1950 com o VX, desenvolvido na Grã-Bretanha; o isômero RVX na Rússia; e o isômero CVX na China (**Figura 5**). Os agentes V diferem dos agentes G por sua persistência. Isto é, não sofrem hidrólise rápida e não apresentam volatilidade, garantindo uma maior persistência após sua aplicação.<sup>54,69,71</sup>

Esses agentes foram produzidos em milhares de toneladas, com quantidades enormes estocadas em países como Estados Unidos da América e Rússia. Em 29 de abril de 1997 entrou em vigor um tratado discutido na Convenção Internacional Mundial sobre a Proibição do Desenvolvimento, Produção, Armazenamento e Uso de Armas Químicas (**CPAQ**). O trabalho estabeleceu entre outros objetivos, a total destruição e detoxificação dessas armas pelos países detentores.<sup>64</sup> No entanto, recentemente jornais do mundo todo reportaram o conflito na Síria, na manhã do dia 21 de agosto de 2013,<sup>73</sup> onde grupos de rebeldes refugiados no subúrbio da capital Damasco foram atacados com misseis contendo gás Sarin o que levou a morte de centenas de pessoas.

Embora, já tenham decorridos 16 anos do tratado da CPAQ, o desenvolvimento de novas técnicas de detoxificação desses agentes não é tão simples e continuam sem uma solução adequada.

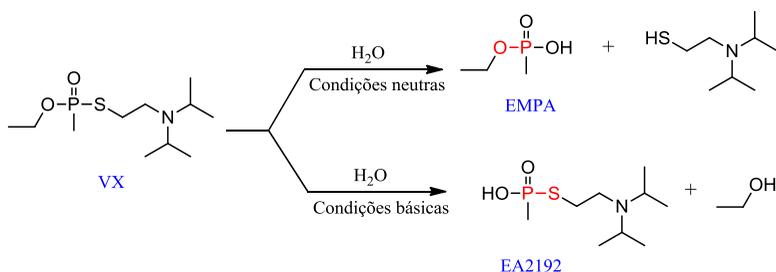
**Figura 5** – Estruturas de agentes neurotóxicos fosforados utilizados como pesticidas ou armas químicas.



A detoxificação de armas químicas consiste na remoção do caráter tóxico. A hidrólise desses compostos pode ser considerada um método base para detoxificação. Contudo, intermediários e produtos gerados não devem ser tóxicos, e também, não deve ser possível a partir deles formar novamente armas químicas. A degradação do VX<sup>74</sup> está ilustrada no **Esquema 6**, mostrando várias possibilidades de ataque nucleofílico. Conseqüentemente, há possibilidade de formar diferentes produtos, um dos quais retêm significante toxidez (**EA 2192**). Assim, é importante estudar os diferentes mecanismos envolvidos em reações de detoxificação de organofosforados. Em condições neutras, a hidrólise do VX (**Esquema 6**) conduz a quebra seletiva da ligação P–S produzindo o ácido etil-metilfosfônico (**EMPA**) de toxidez desprezível. Entretanto,

em meio básico a quebra da ligação P–O e P–SR competem cineticamente com a quebra da ligação P–O favorecida (uma diferença de 3,2 kcal mol<sup>-1</sup> foi estabelecida por cálculos computacionais) levando ao produto EA 2192 que é significativamente tóxico.<sup>75</sup> Dentre as reações de substituição nucleofílica promovidas via os conhecidos nucleófilos detentores do *efeito alfa*, as oximas vêm provando sua eficiência na hidrólise seletiva de organofosforados do tipo V. Desta forma, representam uma alternativa promissora para a detoxificação dessas estruturas.<sup>72,76</sup>

**Esquema 6**



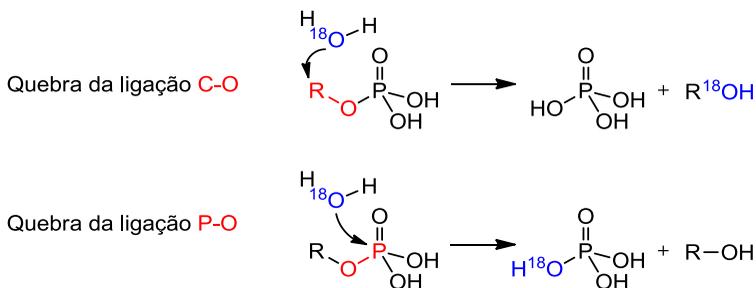
### 1.5.2. Substituição nucleofílica em ésteres de fosfatos

As reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfatos acontecem *via* dois mecanismos conhecidos: *(i)* o primeiro envolve a quebra da ligação carbono-oxigênio, com o átomo de carbono da ligação P–O–C atuando como eletrófilo. Esta reação resulta na substituição do grupo fosfato pelo nucleófilo, mantendo intacta a ligação P–O; *(ii)* o segundo mecanismo acontece com quebra da ligação fosforo-oxigênio. O nucleófilo ataca o átomo de fósforo central, liberando o álcool ou alcóxido *via* quebra da ligação P–O, mantendo a ligação O–C.<sup>64</sup>

Os mecanismos podem ser facilmente distinguidos em reações de hidrólise: quando o éster fosfórico é hidrolisado na presença de água

rica em  $O^{18}$ , já que a localização do átomo de  $O^{18}$  nos produtos indica o local de ataque sobre o substrato (**Esquema 7**).<sup>77</sup>

### Esquema 7



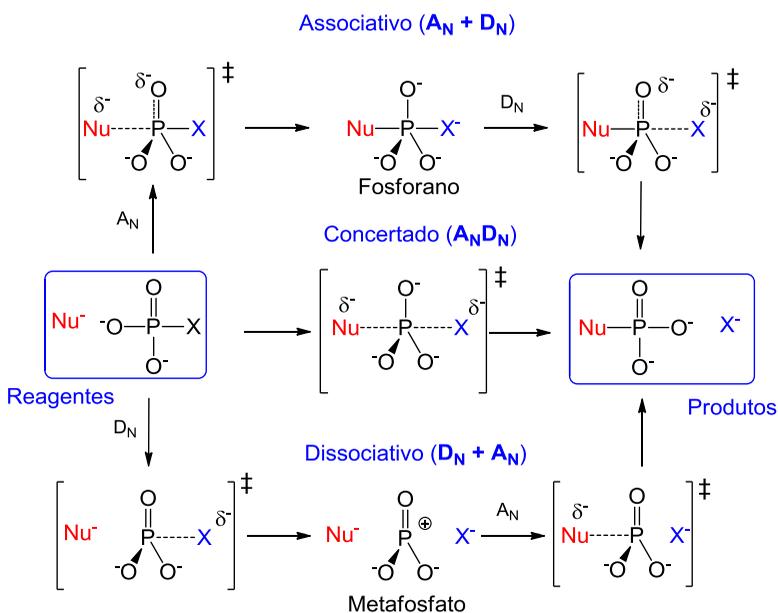
O mecanismo que envolve a quebra da ligação C-O em ésteres de fosfato pode ser favorecido em pH baixo, quando o ácido fosfórico é o melhor grupo de saída. Já em valores de pH maiores, onde o grupo de saída possui carga negativa, a hidrólise ocorre preferencialmente *via* quebra da ligação P-O.<sup>77,78</sup>

Em geral o mecanismo das reações de substituição com quebra da ligação P-O pode proceder através de três caminhos distintos: dissociativo, associativo e concertado (**Figura 6**).<sup>77,79</sup>

O mecanismo dissociativo ocorre em duas etapas, descritas pela IUPAC como  $D_N + A_N$ .<sup>80</sup> Inicialmente, na etapa determinante da velocidade da reação, ocorre a dissociação do substrato, com liberação do ânion metafosfato hidratado ( $PO_3^-$ ). Na segunda etapa, o átomo de fósforo é atacado pelo nucleófilo. O mecanismo associativo, também ocorre em duas etapas, adição e eliminação ( $A_N + D_N$ ), em uma reação que é muitas vezes descrita como  $S_N2(P)$ . A etapa limitante da velocidade é o ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo tetraédrico, o que leva a formação do intermediário pentacoordenado (fosforano) ou a um estado de transição com geometria do tipo bipirâmide trigonal. No mecanismo concertado ( $A_N D_N$ ) não há formação de intermediário e a adição e a eliminação ocorrem em uma única etapa.<sup>6</sup> Assim, o mecanismo concertado pode ser classificado como dissociativo ou

associativo dependendo do sincronismo entre a ligação que está sendo formada com a ligação que está sendo quebrada, como pode ser visualizado na **Figura 6**. Os estados de transição para estes dois caminhos percorridos (dissociativo e associativo) diferem no quanto o grupo de saída está afastado do átomo de fósforo e quanto o nucleófilo está próximo do átomo de fósforo, respectivamente.<sup>81</sup>

**Figura 6** – Três possíveis caminhos para a reação de substituição em ésteres de fosfato: ataque do nucleófilo ( $\text{Nu}^-$ ) sobre o éster de fosfato, exemplificado para o monoéster, mostrando os caminhos: associativo ( $\text{A}_\text{N}$ ), concertado ( $\text{A}_\text{N}\text{D}_\text{N}$ ) e dissociativo ( $\text{D}_\text{N}$ ), respectivamente. Figura adaptada da referência 79.



Os fosfomonoésteres podem existir na forma neutra, monoaniônica ou dianiônica, dependendo do pH. A forma neutra existe apenas em condições muito ácidas ( $\text{pH} < 1$ ), o que tem feito que essa

espécie seja muito pouco estudada. A forma monoaniônica tem sua concentração elevada em  $\text{pH} \sim 4$ ,<sup>82</sup> sofrendo hidrólise mais rapidamente que a forma dianiônica dos monoésteres. Os monoésteres somente existem na forma dianiônica em pHs neutros e alcalinos, sendo mais reativos do que os monoaniônicos quando o grupo de saída é melhor, como por exemplo o 2,4-dinitrofenil fosfato. Isto acontece porque, em geral, a natureza dissociativa de uma reação é favorecida com melhores grupos de saída.<sup>82</sup>

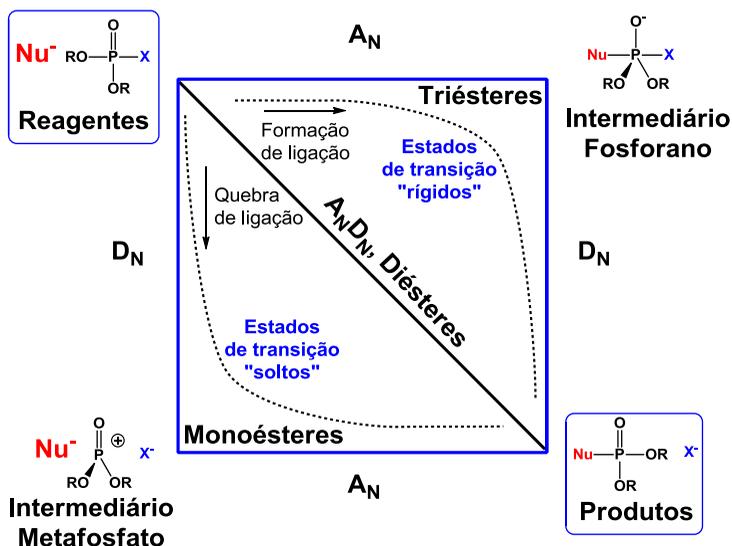
Acreditava-se que os monoésteres dianiônicos reagissem por um mecanismo puramente dissociativo do tipo  $\text{S}_{\text{N}}1$  ( $\text{D}_{\text{N}} + \text{A}_{\text{N}}$ ), com a liberação do ânion metafosfato na etapa determinante da velocidade da reação. Contudo, não há evidências da formação do intermediário metafosfato em água e a constante de hidrólise demonstra uma fraca, mas perceptível dependência da basicidade do reagente nucleofílico,<sup>83</sup> indicando uma possível participação no estado de transição. Essas evidências são indicativas de que a reação segue um mecanismo concertado, com um estado de transição mais “solto”, que passa mais perto do caminho dissociativo. Isto significa que a quebra da ligação com o grupo de saída está mais adiantada que a formação da ligação com o nucleófilo (**Figura 7**, desvio da diagonal traçada entre reagentes e produtos). Na **Figura 7**, estão descritos como estados de transição “solto”, aqueles localizados no canto inferior do diagrama, onde a quebra da ligação do grupo de saída está adiantada frente ao ataque do nucleófilo. Um estado de transição “rígido”, corresponde aquele localizado no canto superior do diagrama, onde o nucleófilo está adiantado em relação ao grupo de saída

Estes estudos foram realizados com monoésteres de fosfato arílicos, já que monoésteres alquílicos reagem muito mais lentamente. Uma recente investigação da hidrólise da espécie dianiônica do monoéster metil fosfato, mostrou que a constante de velocidade poderia ser estimada em  $2 \times 10^{-20} \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ .<sup>6</sup> Essa velocidade é próxima da velocidade prevista pela extrapolação do gráfico de Brønsted obtido para monoésteres dianiônicos arílicos, sugerindo um mecanismo similar para ésteres alquílicos e arílicos.

Já o triéster tris-2-piridil fosfato (TPP) o qual apresenta alta velocidade de hidrólise espontânea, tem a quebra da ligação P – OAr explicada pelo efeito ativante dos grupos vizinhos ao grupo de saída.<sup>84</sup> O efeito dos grupos vizinhos ao grupo de saída pode ser igualmente

significante à reatividade do nucleófilo e do grupo que se despede. Esse efeito é considerável, para a hidrólise espontânea e significativamente pequeno para reações com bons nucleófilos. Ou seja, a velocidade da quebra de um triéster de fosfato depende de ambos os grupos, o que se despede e os vizinhos deste. A hidrólise espontânea do TPP envolve o mecanismo concertado do tipo  $S_N2(P)$ , com todos os grupos, nucleófilo, grupo de saída e grupo vizinho ao grupo de saída contribuindo, em grau diferente, para estabilizar o estado de transição.

**Figura 7** – Diagrama de More-O’Ferrall-Jencks para a transferência de grupo fosforila de fosfomonoésteres, diésteres e triésteres. As coordenadas  $A_N$  e  $D_N$  correspondem à distância entre o nucleófilo ( $Nu^-$ ) e o átomo de fósforo e a distância do átomo de fósforo e o grupo de saída ( $X$ ).



A forma monoaniônica dos monoésteres também deve seguir o mecanismo concertado. Contudo há indícios de existência de um discreto intermediário metafosfato, o que indica um mecanismo

preassociativo.<sup>85</sup> Um valor pequeno do parâmetro de Brønsted para grupos de saída, representado como  $\beta_{lg}$  (-0,27),<sup>82</sup> indica pouca alteração na carga efetiva sobre o grupo de saída no estado de transição. Este resultado é consistente com a transferência de próton do grupo fosforila para o grupo de saída, formando uma espécie zwitteriônica com participação de uma ou mais moléculas de água. A basicidade do grupo de saída é dependente da transferência de próton, e isso indica um estado de transição dependente dessa basicidade.<sup>6</sup> Logo, monoésteres monoaniônicos podem ser hidrolisados através de mecanismos concertado ou preassociativo. Em ambos casos, o grupo de saída é auxiliado por uma reação de transferência de próton intramolecular.

Valores de coeficientes de Brønsted para o nucleófilo ( $\beta_{nuc}$ ) e para o grupo de saída ( $\beta_{lg}$ ), bem como os resultados de efeito isotópico cinético indicam que fosfodiésteres aniônicos sofrem ataque direto pelo nucleófilo na etapa limitante da velocidade, de acordo com um mecanismo concertado ( $A_ND_N$ ) com estados de transição intermediários entre os estados de transição “soltos” para as reações com monoésteres e os estados de transição “rígidos” para as reações de triésteres (**Figura 7**). Fosfodiésteres monoaniônicos com grupos de saída bons, seguem um mecanismo bimolecular associativo com caráter concertado, sem formação de intermediário onde o estado de transição assemelha-se a um fosforano dianiônico.<sup>6</sup> Um mecanismo no qual há transferência de próton é uma alternativa plausível em valores de pH menores, onde as espécies neutras sejam predominantes.<sup>86</sup>

Os triésteres são os ésteres fosfóricos mais reativos. Em geral, triésteres acíclicos seguem um mecanismo concertado com alto caráter associativo e um estado de transição cuja natureza “rígida” aumenta com o aumento da basicidade do grupo de saída.<sup>6</sup>

Estudos de relações lineares de energia livre, efeito isotópico cinético e cálculos teóricos têm ajudado a identificar mecanismos das reações de mono, di e triésteres de fosfatos. Em geral, pode ser concluído que: (i) a reação de hidrólise de um monoéster ocorre via estado de transição “solto” na qual a quebra da ligação do grupo de saída está adiantada e a participação do nucleófilo na etapa limitante da velocidade é pequena; (ii) diésteres acíclicos e triésteres com bons grupos de saída sofrem hidrólises por mecanismo concertado passando por estado de transição com uma maior participação do nucleófilo; (iii) em reações de diésteres, o ataque nucleofílico e a despedida do grupo de saída estão de

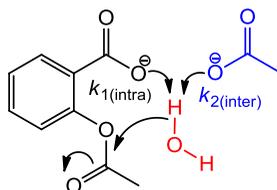
certa forma em sincronia em um mecanismo do tipo concertado  $A_ND_N$ ; (iv) em reações de triésteres, não se observa a formação do intermediário pentacoordenado (fosforano), mas sim um estado de transição “rígido” com o nucleófilo adiantado em relação ao grupo de saída.<sup>87</sup>

## 1.6. Reações Envolvendo Catálise Inter- e Intramolecular

As reações intramoleculares geralmente ocorrem com maior eficiência que reações intermoleculares. Isso tem sido justificado pela teoria espaço-temporal desenvolvida por Menger,<sup>88</sup> que considera fatores como ângulo, entropia e proximidade. A eficiência da catálise intramolecular é definida em termos da Molaridade Efetiva (**ME**) do grupo catalítico ( $ME = k_{1(\text{intra})} / k_{2(\text{inter})}$ ), que corresponde a razão da constante de velocidade de primeira ordem para a reação intramolecular ( $k_{1(\text{intra})}$ ) e a constante de velocidade de segunda ordem para a reação intermolecular ( $k_{2(\text{inter})}$ ). Ambas reações devem proceder pelo mesmo mecanismo e condições experimentais. A **ME** expressa em  $\text{mol L}^{-1}$  é definida como a concentração do grupo catalítico (nucleófilo ou eletrófilo) necessária no processo intermolecular para igualar a constante de velocidade da reação intramolecular.<sup>89</sup>

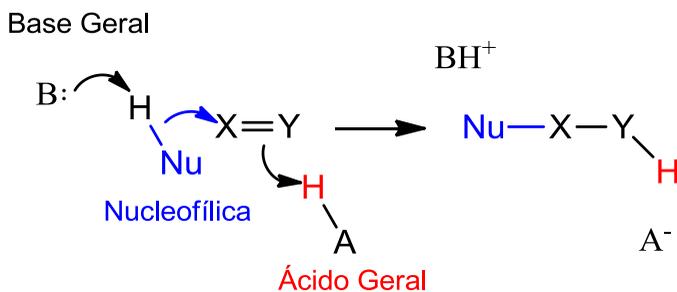
Reações inter- e intramoleculares podem ser diferenciadas de forma simples. Em uma reação intermolecular os grupos fazem parte de moléculas distintas já, para uma reação intramolecular, os grupos reativos estão ancorados à mesma molécula como pode ser observado no **Esquema 8**, no qual é apresentada esquematicamente a catálise básica geral observada na reação de hidrólise da aspirina.<sup>90</sup>

**Esquema 8.** Rotas mecanísticas definidas para a hidrólise da aspirina via catálise básica geral intramolecular ( $k_{1(\text{intra})}$ ) e para a reação intermolecular ( $k_{2(\text{inter})}$ ).



O fato das reações intramoleculares apresentar maior velocidade que as reações bimoleculares, têm feito destas, modelo simples para explicar a magnitude catalítica das enzimas em sistemas biológicos. Um mecanismo para a quebra de uma ligação X–Y combinando catálise básica geral, nucleofílica e ácido geral pode ser visualizado no **Esquema 9**. Embora, o custo entrópico para a reação do **Esquema 9** é muito grande em soluções homogêneas, não é problema no sítio ativo de uma enzima, onde o substrato e grupos catalíticos estão em estreita proximidade. Assim, é conveniente desenvolver modelos em que os grupos funcionais estejam em estreita proximidade em uma mesma molécula.<sup>91</sup>

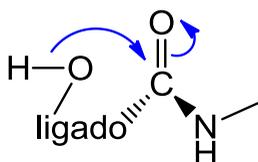
**Esquema 9**



A catálise nucleofílica intramolecular que ocorre no sítio catalítico das serinas proteases, **Esquema 3**, pode ser modelada pela lactonização de uma hidroxiamida (**Esquema 10**), a qual pode ser muito mais rápida do que a hidrólise neutra de amidas não ativadas. A

formação de ciclos termodinamicamente favoráveis pode conduzir a sistemas catalíticos simples e assim, compostos derivados de amidas, glicosídeos e ésteres de fosfatos, que são muito estáveis (com tempos de meia vida de milhões de anos em pH próximo a 7) podem ser clivadas em segundos.<sup>91</sup>

### Esquema 10



### Modelo para Catálise Nucleofílica

A catálise inter- e intramolecular é uma ferramenta importante para identificar o mecanismo pelo qual determinada reação ocorre. Isto porque, reações que procedem por catálise nucleofílica intramolecular são muito mais eficientes que aquelas que ocorrem por *catálise básica geral* (em geral com **ME** < 80). Assim, é fundamental conhecer o valor da **ME**.<sup>89</sup>

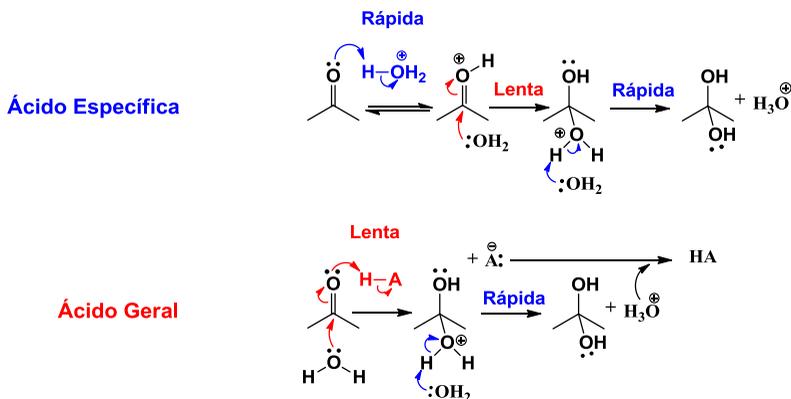
## 1.7. Catálise ácida e básica

A catálise ácida e básica pode ser geral ou específica. A catálise geral é detectada através das medidas das velocidades de uma reação em pH constante, na presença de diferentes concentrações do tampão. Quando as constantes de velocidade são independentes da concentração do tampão, a catálise específica está envolvida. Para a catálise ácida específica a constante de velocidade é dependente da concentração do íon hidrônio ( $H_3O^+$ ) e os componentes do tampão não têm efeito sobre a velocidade da reação. Por outro lado, se a velocidade aumenta com o aumento da concentração do tampão em pH constante, a constante de

velocidade da reação é dependente da concentração dos componentes do tampão, quer seja a forma ácida HA ou a forma básica A<sup>-</sup>. A dependência da constante de velocidade de uma reação catalisada por ácidos ou bases de Brønsted em relação à concentração de tampão, num pH constante, é indicativa de catálise ácida ou básica-geral.

É importante notar que na catálise ácida específica o reagente está em equilíbrio com seu ácido conjugado e a transferência de prótons não faz parte da etapa determinante da velocidade. Já, na catálise ácida geral a transferência de prótons faz parte da etapa determinante da velocidade (**Esquema 11**). O termo “*geral*” refere-se ao fato de que qualquer ácido ou base que for adicionado à solução afetará a velocidade da reação. O termo “*específica*” refere-se ao fato que apenas um ácido ou base, que faz parte do solvente afeta a velocidade (hidrônio ou hidróxido, quando o solvente é água).<sup>92,93</sup>

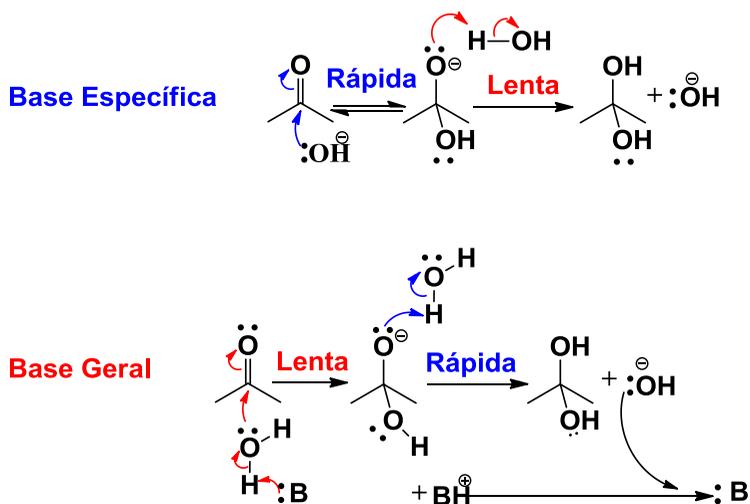
**Esquema 11** – Mecanismos da catálise ácida geral e específica na hidratação da acetona.



As catálises básicas (**Esquema 12**) seguem princípios semelhantes daqueles discutidos na catálise ácida. Na *catálise básica específica* o equilíbrio envolve íon hidróxido na primeira etapa da reação e a base não está envolvida no passo determinante da velocidade. Na *catálise básica geral* a base está envolvida no passo determinante da

velocidade participando, por exemplo, para desprotonar a água que está sendo adicionada ao substrato.<sup>92</sup> Os **Esquemas 11** e **12** representam possíveis mecanismos para a hidratação da carbonila e ilustram discussões aqui propostas, sendo assim, não devem ser tomados como o cenário mecanístico mais correto.<sup>92</sup>

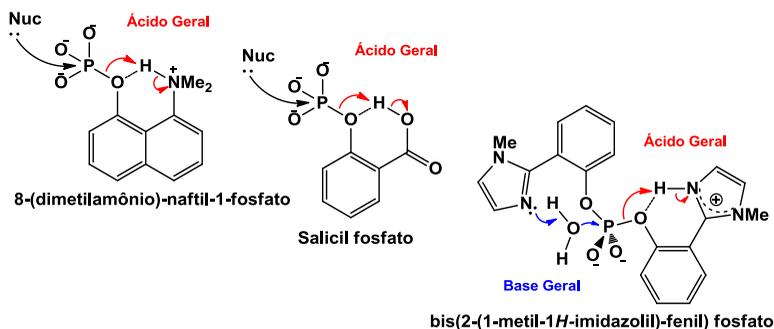
**Esquema 12** – Possível mecanismo envolvendo catálise básica geral e específica para a hidratação da acetona.



Em sistemas biológicos os grupos de saída não são sempre bons e a hidrólise da ligação P–O em ésteres de fosfatos depende da assistência de eletrófilos apropriadamente posicionados. Isto geralmente é feito por um cátion metálico, ou por um ácido geral em enzimas que não fazem uso de metal no sítio ativo e, em geral, a catálise ácido-base geral é muito eficiente nos sítios ativos das enzimas. Assim, os modelos apresentados na **Figura 8** são estudados para aprimorar nossos conhecimentos sobre catálise intramolecular na reação de transferência do grupo fosforila ( $\text{PO}_3^-$ ).<sup>4,94,95</sup> A transferência de fosforila do 8-(dimetilamônio)-naftil-1-fosfato ocorre através da catálise ácida geral do grupo vizinho  $\text{NH}^+$ , a reação é acelerada em torno de  $10^6$  vezes<sup>96</sup> e a

ligação de hidrogênio intramolecular é fundamental na catálise observada.

**Figura 8** – Modelos de reações intramoleculares de ésteres de fosfatos, que incluem possíveis catálises ácido geral (em vermelho) e base-geral (em azul). Na reação do *bis*-(2-(1-metil-1H-imidazolil)-fenil) fosfato, deve ser levada em consideração evidências que apontam para uma possível catálise nucleofílica intramolecular, não representada na figura.<sup>4</sup>



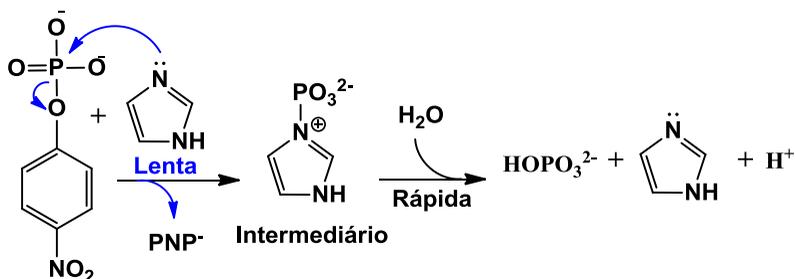
## 1.8. Catálise nucleofílica

A catálise nucleofílica pode ser definida como uma reação na qual o nucleófilo reage muito mais rapidamente que qualquer outra espécie e liga-se de forma covalente com um dos reagentes, gerando um intermediário mais reativo do que o reagente de partida, aumentando a velocidade da reação. Os mecanismos de catálise básica geral e catálise nucleofílica são cineticamente equivalentes. A catálise nucleofílica pode ser caracterizada rapidamente quando se consegue identificar ou capturar o intermediário formado. A não identificação do intermediário não significa que não haja catálise nucleofílica mas, já que o intermediário pode ser instável. Outras estratégias para distinguir os

mecanismos podem ser a determinação dos efeitos isotópicos e a análise do gráfico de Brønsted. Assim várias evidências podem ser utilizadas para apontar para um mecanismo de forma mais convincente e conclusiva.<sup>91</sup>

A transferência não enzimática de fosforila do ATP para aminas, tem sido estudada como base para o entendimento de reações enzimáticas. O estudo comparativo entre as reações com nucleófilos como oxigênio ou nitrogênio, permite sugerir que a reação do ATP com um nucleófilo com oxigênio, pode ser acelerada utilizando uma amina nucleofílica, com o subsequente colapso do intermediário amino fosforilado. Em geral, as reações com aminas são de 30 a 100 vezes mais rápidas do que as reações com nucleófilos com oxigênio em temperatura fisiológica (37°C).<sup>97</sup> Essa comprovação é consistente com a participação do imidazol do resíduo histidina na transferência de fosforila em sistemas biológicos. Como exemplo, a hidrólise do *p*-nitrofenil-fosfato diânion<sup>98</sup> catalisada por imidazol ocorre 200 vezes mais rápida que a reação não catalisada (**Esquema 13**) e, procede com ataque do imidazol no átomo de fósforo, seguido da hidrólise do fosforilimidazol.<sup>97</sup>

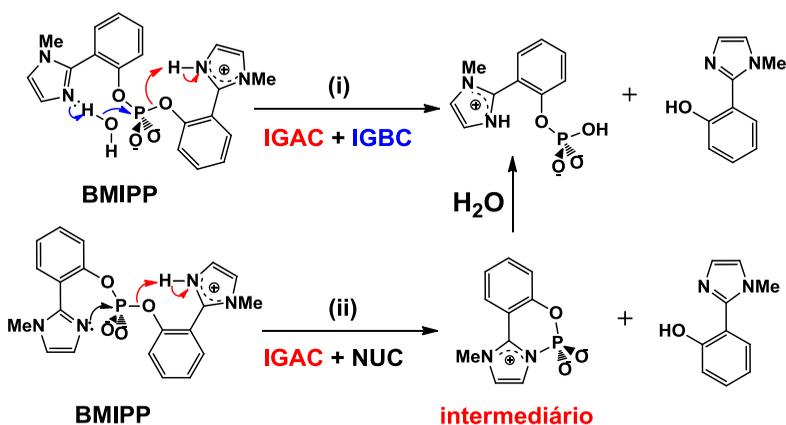
### Esquema 13



Em 2008, Orth e col.<sup>3</sup> estudaram a reação do diéster de fosfato **BMIPP** (bis(2-(1-metil-1*H*-imidazolil)-fenil) fosfato) que contém dois grupos imidazóis com capacidade de atuar como catalisadores ácido-base geral, como modelo da ribonuclease A. No entanto, estudos teóricos e espectrometria de massas, mostraram que a reação podia

proceder por dois mecanismos cineticamente equivalentes (**Esquema 14**).<sup>4</sup> Os mecanismos propostos envolvem: *i*) catálise ácida geral intramolecular (**IGAC**) e catálise base-geral intramolecular (**IGBC**), como no caso de uma ribonuclease A; e *ii*) catálise nucleofílica intramolecular (**NUC**) assistida por catálise ácida geral intramolecular, como acontece na família das fosfolipases D. As investigações para a hidrólise do **BMIPP** permitiram identificar o intermediário imidazol fosforilado, embora este intermediário tenha um tempo de vida muito curto. Provavelmente, os dois mecanismos atuam de forma competitiva na reação descrita no **Esquema 14**, com o maior destaque para o mecanismo que envolve a catálise nucleofílica.

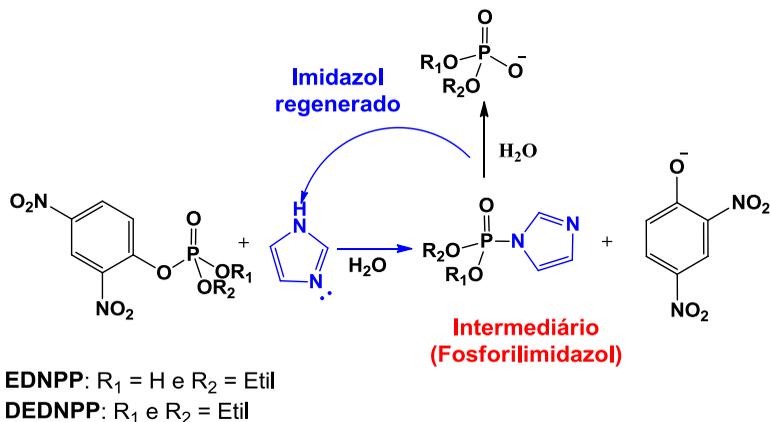
**Esquema 14**



Intermediários de imidazóis fosforilados mais estáveis foram detectados nos estudos da degradação dos diésteres, bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) e etil-2,4-dinitrofenil fosfato (**EDNPP**) e do triéster dietil-2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**).<sup>92</sup> Os intermediários fosforilados, relativamente estáveis, foram detectados por espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (**NMR**). As reações com ésteres de fosfatos derivados do 2,4-dinitrofenol (**EDNPP** e **DEDNPP**) catalisadas por imidazol em meio aquoso (**Esquema 15**) acontecem *via* catálise nucleofílica, sendo o imidazol regenerado após

ataque exclusivo ao átomo de fosforo, que leva à formação do éster de fosfato correspondente.

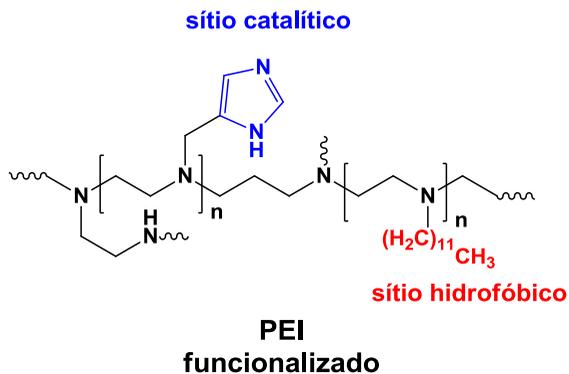
**Esquema 15**



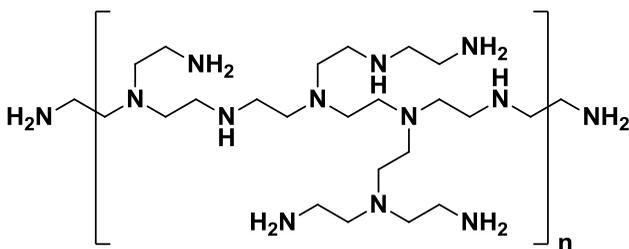
## 1.9. Polímeros como catalisadores biomiméticos

Klotz e colaboradores na década de 1970 reportaram um dos primeiros trabalhos em que polímeros sintéticos foram empregados como modelos miméticos de enzimas. Os estudos tiveram como base a hidrólise de ésteres derivados do nitrofenol<sup>17</sup> e o 2-hidroxi-5-nitrofenil sulfonato<sup>15</sup> catalisadas por polietilenoimina (**PEI**) modificada com grupos dodecil e metileno imidazol ancorados na cadeia polimérica (**Figura 9**). Estudos cinéticos comparativos envolvendo o **PEI** funcionalizado e a enzima  $\alpha$ -quimotripsina com o éster derivado do nitrofenol forneceram constantes catalíticas semelhantes. O aumento da velocidade da reação de hidrólise do 2-hidroxi-5-nitrofenil sulfonato foi da ordem de  $10^{12}$  vezes em comparação ao imidazol livre e  $10^2$  vezes em relação à enzima aril sulfatase.<sup>15</sup>

**Figura 9** – Estrutura do **PEI** funcionalizada com grupos metileno imidazol como sítio catalítico e dodecil como sítio hidrofóbico.



O **PEI** é obtido através da polimerização da etilenoimina e possuem a etilamina como unidade repetida. A estrutura do **PEI (2)** é constituída por 25% de aminas primárias, 50% de aminas secundárias e 25% de aminas terciárias. Os nitrogênios terciários são os pontos de bifurcação no esqueleto polimérico. O microambiente policatiónico é fornecido pelas cargas positivas depositadas sobre os átomos de nitrogênios da cadeia polimérica onde, na faixa de pH entre 3 e 13 coexistem as aminas protonadas e deprotonadas.<sup>99,100</sup> Isto faz com que o **PEI** possa atuar como catalisador ácido-base geral e/ou nucleofílico.<sup>101</sup>



2

Sendo assim, a construção de enzimas sintéticas deve levar em consideração vários fatores que facilitam a eficiência catalítica, dentre estes:

(i) Alta afinidade para a formação da ligação enzima-substrato, resultante de um sítio ativo na enzima, que é complementar à forma e distribuição de cargas ao substrato, como também de ligações hidrofóbicas do substrato ao sítio catalítico. O sítio ativo, geralmente hidrofóbico contém resíduos catalíticos ativos (e.g. o trio catalítico: serina, aspartato e histidina).

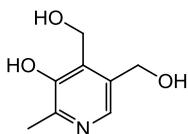
(ii) O processo de difusão do substrato no sítio ativo deve ser rápido. Os substratos devem ser termodinamicamente neutros. Substratos ou produtos fortemente ligados ao estado de transição reduzem a eficiência catalítica;

(iii) A proximidade dos grupos catalíticos no sítio ativo de uma enzima pode reduzir o custo entrópico de uma reação, tornando-a termodinamicamente favorável;

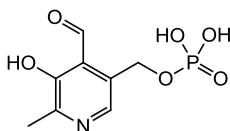
(iv) Alta velocidade de reação e alto número de ciclos catalíticos, o qual ocorre porque a enzima tem afinidade maior pelo estado de transição que pelos reagentes ou produtos e assim estabiliza o estado de transição e diminui a energia de ativação para a reação global.<sup>12</sup>

A estrutura do **PEI** pode ser funcionalizada por alquilação ou acilação dos nitrogênios. Assim, o **PEI** e seus derivados têm sido usados na preparação de enzimas sintéticas.<sup>100</sup>

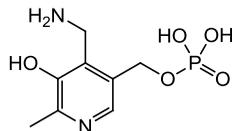
A vitamina B<sub>6</sub> (**3**) e compostos derivados são essenciais para a manutenção dos processos vitais e uma ampla variedade de enzimas faz uso da vitamina B<sub>6</sub> como cofator. Reações de transaminação e outras transformações de aminoácidos são realizadas com piridoxal-fosfato (forma ativa da vitamina B<sub>6</sub>) (**4**) e piridoxamina-fosfato (**5**) como coenzimas.<sup>102</sup>



(3)



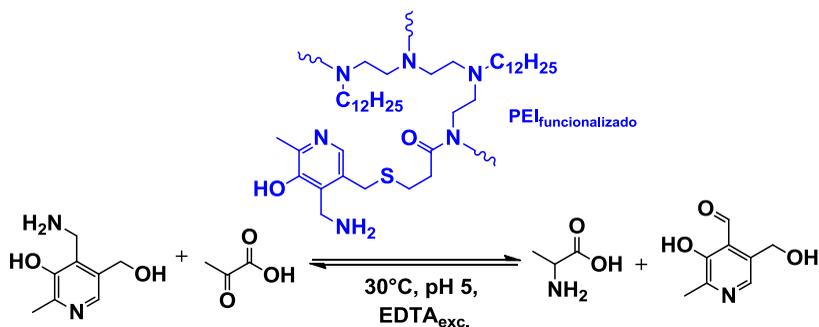
(4)



(5)

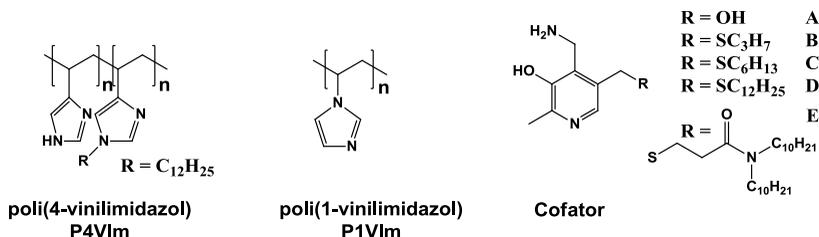
A transaminação entre um aminoácido e um cetoácido é, provavelmente, a mais importante forma de transferência de nitrogênio em sistemas biológicos. A reação acontece com a piridoxamina-fosfato reagindo com o cetoácido para formar piridoxal-fosfato e o aminoácido correspondente. Liu e Breslow<sup>101</sup> utilizaram o **PEI** funcionalizado como transaminase mimética e a piridoxamina como cofator para promover a transaminação do ácido pirúvico (**Esquema 16**). A constante de velocidade para a reação com **PEI** funcionalizado e a piridoxamina foi 6.700 vezes maior que a reação da piridoxamina livre. A reação de transaminação envolve vários passos em que há catálise ácida e básica geral. A eficiência da catálise tem sido atribuída aos nitrogênios não protonados, os quais são suficientemente básicos para promover *catálise básica geral*. Da mesma forma, aminas protonadas são suficientemente ácidas para participar na *catálise ácida geral* e ambos processos catalíticos são possíveis com **PEI**, principalmente pela proximidade dos nitrogênios na cadeia polimérica.

**Esquema 16**



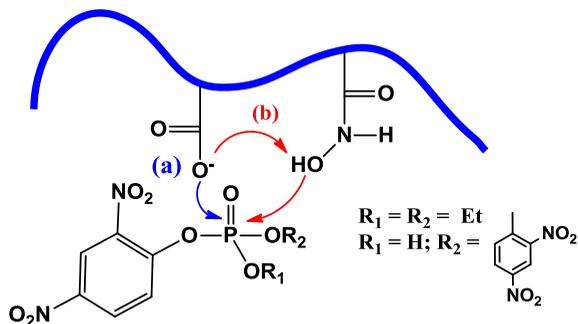
Breslow e colaboradores em 2009, utilizaram poli(vinilimidazóis) como transaminase mimética.<sup>103</sup> Os estudos foram realizados com os polímeros poli(4-vinilimidazol) (**P4VIm**) e poli(1-vinilimidazol) (**P1VIm**) na reação de transaminação de ácidos pirúvicos na presença de diferentes piridoxaminas como cofatores (**Esquema 17**). A aceleração da aminação do ácido fenilpirúvico pelo polímero **P4VIm** com 4,5% de monômero dodecil na presença do cofator **E** é de quase 2 milhões de vezes. Sob as mesmas condições, o ácido indol pirúvico foi convertido a triptofano com aceleração de 4 milhões de vezes.<sup>103</sup>

### Esquema 17



Esforços importantes vêm sendo realizados para verificar a importância dos efeitos cooperativos na catálise. Com esse intuito o polímero poli(acrilamida) foi funcionalizado com o grupo hidroxamato juntamente com carboxilato para formar o poli(hidroxâmico) alcanoato (**PHA**) onde foram detectados efeitos cooperativos entre os respectivos grupos reativos.<sup>25</sup> O polímero **PHA** se mostrou eficiente na degradação do diéster e do triéster de fosfato **BDNPP** e **DEDNPP**, respectivamente. Em ambas reações a velocidade aumentou por um fator maior que 10<sup>6</sup> vezes. O mecanismo sugerido para a defosforilação com **PHA** depende do pH. Na faixa de pH em que a espécie monoaniônica é predominante, o mecanismo deve ocorrer através do ataque do grupo carboxilato sobre o **BDNPP** e/ou através da catálise básica com o oxigênio do grupo carboxilato assistindo o ataque do hidroxamato e aumentando sua nucleofilicidade na reação com o **BDNPP** (**Esquema 18**). Em pH mais elevado, o hidroxamato pode atacar diretamente o substrato, podendo ou não ser assistido por uma catálise básica geral intramolecular do grupo carboxilato adjacente.

## Esquema 18 – Mecanismos sugerido para a defosforilação com PHA.



### 1.9.1. Polímeros molecularmente impressos

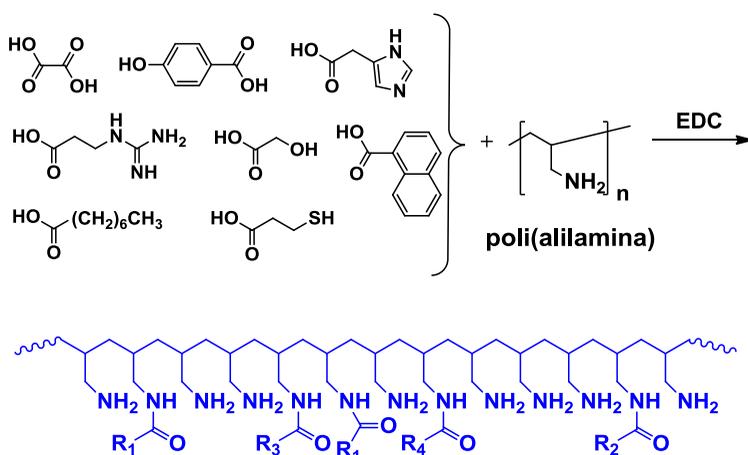
Outra classe de catalisadores biomiméticos são os polímeros molecularmente impressos (**MIPs**, do inglês *molecularly imprinted polymers*). Os **MIPs** foram sintetizados com o objetivo de tornar os sítios ativos na cadeia polimérica muito mais miméticos a certos fatores que possam contribuir para uma elevada atividade catalítica. Para isso, grupos polimerizáveis são fixados a uma molécula modelo, a qual é copolimerizada com grande excesso do agente que promova a formação de ligações cruzadas, na presença de um solvente inerte. O modelo após a copolimerização deve ser cuidadosamente removido, o que faz com que ocorra a formação de um polímero altamente poroso com cavidades bem definidas que podem atuar como sítios catalíticos artificiais.<sup>12</sup>

Os **MIPs** têm-se demonstrado eficientes para mimetizar o sítio ativo de enzimas naturais, como também possibilitam introduzir grupos catalíticos eficientes junto ao sítio ativo em uma orientação predeterminada. Grupos que não existem na natureza podem ser introduzidos por essa técnica.

## 1.9.2. Polímeros desenvolvidos via química orgânica combinatória

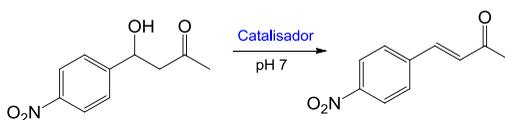
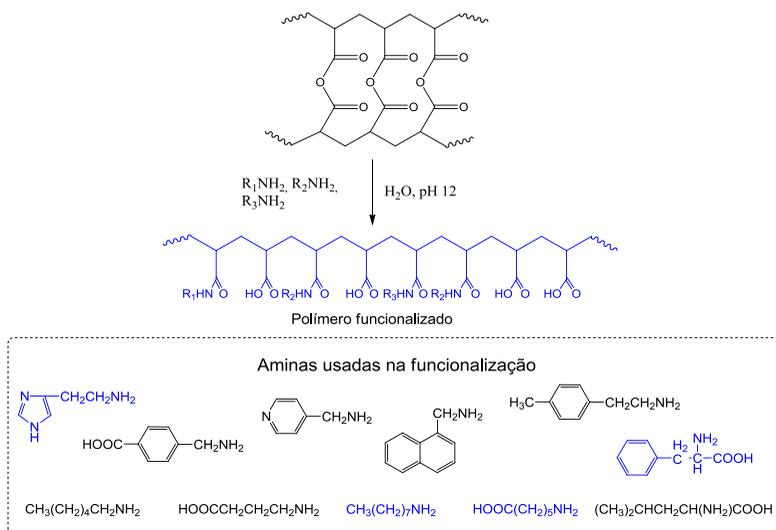
A química combinatória pode, em geral ser definida como o método que permite, de forma simultânea, sintetizar um grande número de compostos utilizando uma variedade de materiais de partida.<sup>104</sup> Um exemplo do emprego da química orgânica combinatória é o trabalho desenvolvido por Menger e colaboradores<sup>1</sup> em que o foco foi a funcionalização da poli(alilamina) com diferentes ácidos carboxílicos em um único passo (**Figura 10**), com o objetivo de obter polímeros que pudessem catalisar a degradação do diéster bis(p-nitrofenil) fosfato (**BNPP**) de forma análoga a uma fosfodiesterase. Os estudos da degradação do **BNPP** foram conduzidos em pH 7 em temperatura ambiente na presença de um dos três íons metálicos ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ). O maior incremento na velocidade foi de 31.400 quando na presença de íons  $Fe^{3+}$ .

**Figura 10** – Funcionalização aleatória da poli(alilamina) com diferentes ácidos carboxílicos. Os grupos R no polímero, representam vários grupos funcionais.



Outro estudo realizado por Menger também amparado na química orgânica combinatória, foi a polimerização do anidrido acrílico seguida de reação com diferentes aminas, para desenvolver um catalisador capaz de promover a desidratação de uma  $\beta$ -hidroxicetona (**Esquema 19**).<sup>105</sup> As reações de eliminação são encontradas também em sistemas biológicos onde citratos são desidratados a aconitatos e malatos a fumaratos, por enzimas individuais. A melhor desidratação observada apresentou um fator catalítico de 920 (23°C) próximo do valor de 1.200, observado para a desidratação do mesmo substrato por anticorpos catalíticos a 37°C, em pH 7.

**Esquema 19** – O poli(anidridoacrílico) foi funcionalizado simultaneamente com três ou quatro aminas de onze aminas. As aminas em azul fazem parte do polímero funcionalizado com maior fator catalítico na reação de eliminação.



A química orgânica combinatória aplicada no desenvolvimento de catalisadores têm-se mostrado eficiente. É uma forma rápida de testar diferentes grupos como sítios catalíticos em uma única molécula, embora, a predefinição dos grupos na estrutura polimérica é definida ao acaso, o que torna muito difícil a reprodutibilidade do catalisador.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo desta tese de doutorado é desenvolver nanoreatores através da funcionalização do ácido poli(acrílico) (**PAA**) com grupos imidazóis e avaliar a eficiência catalítica do mesmo em reações de degradação de ésteres de fosfato e carboxilato.

Para atingir os objetivos desta tese estratégias foram definidas dentre as quais, destacam-se:

1. Funcionalizar o **PAA** com 1-(3-aminopropil)-imidazol utilizando carbodiimida;

2. Caracterizar e propor a estrutura do polímero funcionalizado (**PAIM**) através de técnicas de:

- a) Infravermelho,
- b) NMR  $^1\text{H}$ ,
- c) Espectrometria de massas,
- d) Cromatografia por filtração em gel,
- e) Titulação potenciométrica, e
- f) Eletroforese capilar.

3. Aumentar a hidrofobicidade do polímero **PAIM** via alquilação com 1-bromododecano levando ao produto **PAIM-12**.

4. Avaliar a eficiência catalítica dos polímeros **PAIM** e **PAIM-12** na degradação dos ésteres de fosfato dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) e de carboxilato acetato de 4-nitrofenila (**PNPA**) e caprilato de 4-nitrofenila (**PNPC**).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

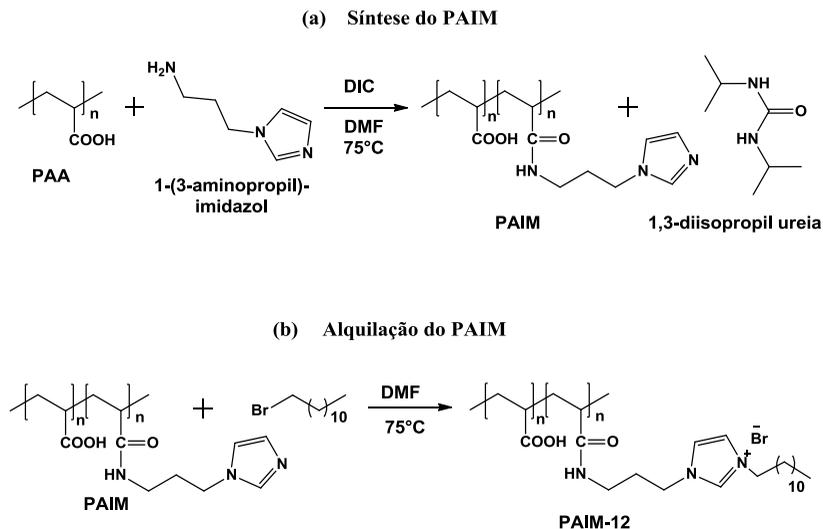
#### 3.1. Reagentes

O ácido poli(acrílico) (**PAA**) de massa molar  $1.800 \text{ g mol}^{-1}$ , *N,N'*-diisopropilcarbodiimida 98% (**DIC**) e 1-(3-Aminopropil)-imidazol 98% foram obtidos da Sigma Aldrich e foram usados como recebidos. O solvente *N,N* – Dimetilformamida (**DMF**) (P.A. Vetec) foi seco com peneira molecular 3Å ativada e o diclorometano (P.A. Vetec) foi usado como recebido. A água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) foi adquirida da Cambridge Isotope Laboratories (99,9%). Os substratos acetato de 4-nitrofenila (**PNPA**) e caprilato de 4-nitrofenila (**PNPC**) foram procedentes da Aldrich, já o triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) foi disponibilizado pelo Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais e seu preparo está bem definido na literatura.<sup>106</sup> Os demais reagentes foram procedentes da Aldrich, Carlos Erba e Vetec, sendo utilizados sem tratamento prévio.

#### 3.2. Síntese do PAIM e PAIM-12

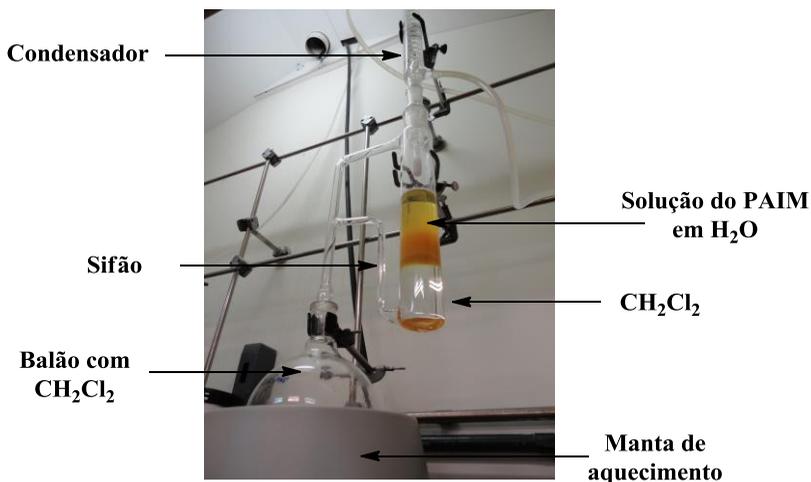
A síntese do **PAIM** parte da funcionalização do **PAA** através da reação com o agente de acoplamento *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (**DIC**)<sup>107</sup> de acordo com a **Figura 11 a**.

**Figura 11** – Representação das reações: (a) funcionalização do **PAA** com 1-(3-Aminopropil)-imidazol e (b) alquilação do **PAIM** com 1-bromododecano.



Foram diluídos em um balão de 250 mL 1,5 g (20,0 mmols do monômero) do **PAA** em 30 mL de **DMF** a 60°C, em seguida foi adicionado sob agitação 20,0 mmol do agente de acoplamento (DIC) diluído em 10 mL de DMF. Após 30 minutos, com agitação constante, foram adicionado gota-a-gota 20,0 mmols de 1-(3-aminopropil)-imidazol diluídos em 10 mL de DMF. A temperatura foi elevada e mantida a 75°C por quatro dias. No final desse período a solução foi mantida em repouso até o sistema atingir temperatura ambiente. Após o período de repouso o precipitado *N,N'*-diisopropilureia foi removido por filtração e o DMF rotaevaporado a 75°C e pressão negativa de 15 torr. A solução contendo o polímero foi diluída em água deionizada e a ureia remanescente foi removida em um extrator líquido-líquido utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (**Figura 12**).

**Figura 12** – Foto do sistema de extração líquido-líquido ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ ) em processo de purificação do polímero.



**Fonte:** próprio autor.

A ureia, mais solúvel no solvente orgânico, pode ser extraída da solução aquosa de polímero em aproximadamente 48 horas de extração. Durante o processo, o solvente ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) é mantido em ebulição e seus vapores são lentamente condensados, novamente na forma líquida o solvente orgânico gota-a-gota atravessa a solução aquosa carregando a ureia remanescente da solução PAIM/ $\text{H}_2\text{O}$ . Através do dispositivo sifão a solução  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /ureia é conduzida ao balão, o solvente é recuperado e o ciclo mantido. Finalmente, a fase aquosa contendo o polímero solubilizado foi concentrada em rotaevaporador e posteriormente liofilizada. O produto é um sólido amorfo de cor amarelada. O polímero foi caracterizado de acordo com o item 3.3. (resultados e discussão **item 4**).

O polímero **PAIM** foi alquilado<sup>108</sup> com 1-bromododecano para levar ao produto **PAIM-12** de acordo com a **Figura 11 b**. A reação foi realizada em um balão de 50 mL, onde foram adicionados 1,96 g do **PAIM** e 20 mL de DMF. O sistema foi homogeneizado, logo após adicionou-se, a temperatura ambiente, lentamente 0,5 mL (2,1 mmols)

do 1-bromododecano só então, a temperatura foi elevada para 70°C e o sistema mantido por quatro dias. No final desse período, o aquecimento foi desligado e o sistema resfriado a temperatura ambiente. Posteriormente, o solvente foi rotaevaporado a 75°C e pressão de 15 torr. O produto foi solubilizado em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e extraído com H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. O polímero solubilizado em água foi concentrado em rotaevaporador e posteriormente liofilizado. **IV** e **NMR <sup>1</sup>H** ver resultados e discussão **item 4.1.1**.

### **3.3. Métodos**

O **PAA** funcionalizado foi caracterizado através das técnicas de infravermelho (**IV**), **NMR <sup>1</sup>H**, espectrometria de massas com ionização por eletronebulização (**ESI/MS**, do inglês *Electrospray ionization – Mass Spectrometry*), titulação potenciométrica, cromatografia por filtração em gel ou exclusão de tamanho, (**GFC/SEC**, do inglês *Gel Filtration Chromatography / Size Exclusion Chromatography*) e Eletroforese Capilar.

#### **3.3.1. Estudos por espectroscopia de IV**

As análises de **IV** foram realizadas em um espectrômetro Varian modelo Excalibur 3100 com transformada de Fourier equipado com um detector do tipo MCT. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr.

### 3.3.2. Estudos de NMR $^1\text{H}$

As análises de NMR  $^1\text{H}$  foram realizadas no aparelho de ressonância magnética nuclear de 200 MHz disponível na Central de Análise do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As soluções foram preparadas e analisadas a 25°C contendo 10 mg mL<sup>-1</sup> do polímero em água D<sub>2</sub>O/TMS. Os espectros foram manipulados pelo programa MestreC.

### 3.3.3. Estudos de GFC/SEC

Os estudos para determinação da massa molecular do polímero funcionalizado foram realizados por GFC/SEC em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Varian, modelo Pro Star, com uma bomba Varian 210 e detector de índice de refração Varian 356-LC. As corridas foram feitas a 35°C em 1,0×10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,4 (fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>) em uma coluna Varian PLaquagel –OH Mixed –H (8 μm, 300 x 7,5 mm). O peso molecular foi calculado com base na curva de calibração obtida através de padrões de poli(etilenoglicol) (PEG) de diferentes pesos moleculares (26.840, 20.360, 4.000 e 1.500 g mol<sup>-1</sup>). O peso molecular numérico médio ( $\bar{M}_n$ ), o peso molecular ponderado médio ( $\bar{M}_M$ ) e a dispersidade da massa molar (de acordo com a IUPAC<sup>109</sup> – molar-mass dispersity,  $E_M$ ) foram calculados utilizando as **Equações 1 a 3** respectivamente,<sup>110</sup> em que  $h_l$  é a altura do cromatograma no tempo  $l$  e  $M_l$  é a massa do polímero no tempo  $l$ .

$$\bar{M}_n = \frac{\sum h_l}{\sum h_l / M_l} \quad (1)$$

$$\bar{M}_M = \frac{\sum h_1 M_1}{\sum h_1} \quad (2)$$

$$E_M = \frac{\bar{M}_M}{M_n} \quad (3)$$

### 3.3.4. Estudos de espectrometria de massas – ESI-MS/MS

Os estudos foram realizados com o objetivo de revelar a composição elementar do íon molecular através de valores exatos da razão massa carga ( $m/z$ ) e/ou fragmentos que possam ser utilizados como impressão digital na análise composicional do polímero. Os polímeros foram submetidos a análise de ESI-MS e ESI-MS/MS

Os experimentos de ESI-MS/MS foram conduzidos sob supervisão do Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke e doutoranda Melina Heller no laboratório LACFI.

As análises de **ESI/MS** foram realizadas em um espectrômetro de massas LC/MS/MS triplo-quadrupolo Applied Biosystems modelo 3.200 Q Trap com resolução unitária. O aparelho foi operado no modo íon positivo, espécies individuais foram submetidas à dissociação por colisão induzida (CID) com nitrogênio como gás de colisão. Por essa técnica foi possível detectar a razão massa/carga do monômero do polímero **PAIM**, assim como suas respectivas quebras. As amostras foram preparadas em água/0,1% de ácido fórmico 10 ppm e injetadas diretamente com fluxo de 20,0  $\mu\text{L min}^{-1}$ . As condições operacionais da fonte foram de 5.500 Volts para o íon-spray; Nitrogênio foi utilizado como cortina de gás de dessolvatação (Curtain Gas<sup>TM</sup>) a 10 psi, como gás de nebulização (GS1) foi utilizado argônio a 18 psi. Os dados foram tratados utilizando o software Analyst (versão 1.5.1; Applied Biosystems).

### 3.3.5. Titulação potenciométrica

As medidas de titulação potenciométrica foram realizadas em um sistema automatizado com um titulador Metrohm, modelo 765 Dosimat e pHmetro Metrohm, modelo 827 pHlab, em uma célula de vidro com capacidade para 150 mL. A solução contendo o polímero funcionalizado foi titulada com pequenos incrementos de solução padronizada de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> sob atmosfera de nitrogênio e força iônica controlada. Os dados obtidos experimentalmente foram tratados através do programa FITEQL 4.0, com a finalidade de determinar os pK<sub>as</sub> dos grupos carboxilato e imidazólico os quais esperam ser encontrados na cadeia do polímero funcionalizado e assim determinar a eficiência da funcionalização.

### 3.3.6. Estudos de Eletroforese Capilar

Os experimentos foram conduzidos sob supervisão do Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke e doutoranda Melina Heller. As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar modelo HP<sup>3D</sup>CE da marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, E.U.A.) equipado com um detector de arranjo de diodos ajustado em 280 nm (acetona, marcador do fluxo eletrosmótico 1) e 410 nm (tiouréia, marcador do fluxo eletrosmótico 2), respectivamente. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o programa HP Chemstation.

As soluções contendo os marcadores de fluxo e o polímero foram introduzidas pela extremidade mais afastada do detector (“inlet”) e injetadas hidrodinamicamente sob pressão de 50 mbar (50 mbar = 4996.2 Pa), conforme o método utilizado (Williams & Vigh).<sup>111</sup> A

tensão aplicada para a separação foi de 10 kV por 0,75 min, com polaridade positiva no lado da injeção.

Todas as medidas foram realizadas a 25°C em um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida (32 cm × 50 µm D. I. × 375 µm D. E.) adquirido da Polymicro (São Paulo, Brasil). O capilar foi, primeiramente, condicionado com hidróxido de sódio 1,0 mol L<sup>-1</sup> e água deionizada por 30 min cada e com cada eletrólito de corrida por 10 min. Entre as corridas, o capilar foi condicionado durante 1 min com o eletrólito de corrida.

### **3.3.7. Estudos de Tensiometria**

A concentração micelar crítica (CMC) do PAIM foi determinada por tensiometria, as medidas das tensões superficiais foram realizadas usando o método de placa de Wilhelmy<sup>112</sup> em um Tensiômetro EasyDyne da KRÜSS. As medidas foram feitas a 25°C e o ponto zero foi obtido em água deionizada como sendo de 71,7 mN m<sup>-1</sup> ( $\gamma_{\text{H}_2\text{O}} = 71,9 \text{ mN m}^{-1}$ , a 25°C)<sup>113</sup>, seguiu-se então com sucessivas adições de 25 µL de uma solução estoque de  $5,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  do PAIM em água.

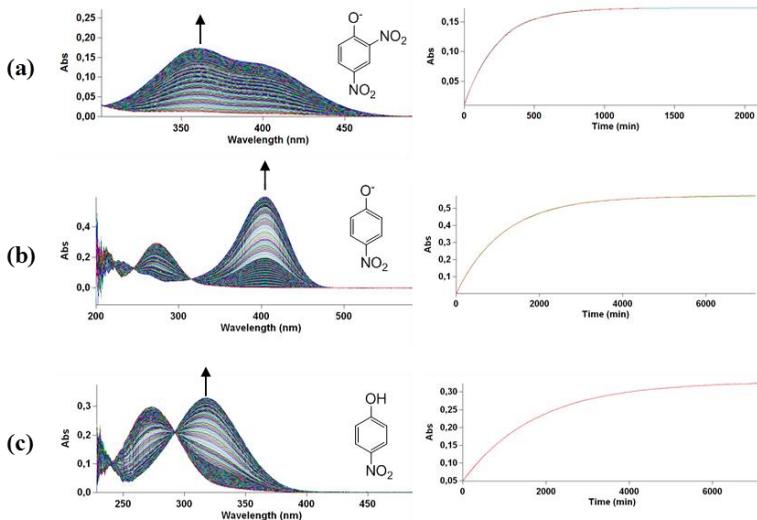
### **3.3.8. Estudos cinéticos**

As medidas cinéticas foram realizadas em um espectrofotômetro de UV/VIS Cary 50, o qual está acoplado a um computador, onde está disponível o sistema de aquisição e tratamento de dados Cary WinUV 3.00. Em todas as medidas foram utilizadas cubetas de quartzo com capacidade de 3,5 ml e 1,0 cm de caminho ótico. As reações foram

iniciadas pela adição de uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da solução estoque do substrato em  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $5,1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  para **DEDNPP** e  $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  para **PNPA** e **PNPC**) (estocada em freezer) a 3 mL de uma solução do polímero funcionalizado previamente tamponada e com compensação de temperatura em cela acoplada a um banho termostático. As constantes de velocidades observadas ( $k_{\text{obs}}$ ) foram medidas seguindo o aumento das absorbâncias no comprimento de onda correspondente ao aparecimento do produto fenólico em função do tempo. Os pHs das medidas cinéticas foram mantidos com os seguintes tampões:  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH 4,00-5,00), BIS-TRIS (pH 6,00-7,00) e TRIS (pH 8,00-9,00) e bicarbonato (9,50-10,50), todos a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro digital Hanna, calibrado com soluções padrões pHs 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlo Erba). Todas as medidas foram realizadas com compensação de temperatura, em cela acoplada a um banho termostático operando com temperatura mínima de  $25^\circ\text{C}$  e máxima de  $55^\circ\text{C}$  ambos com variação de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . As medidas realizadas em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) tiveram os valores de potencial de deutério (pD) corrigidos considerando  $\text{pD} = \text{pH}_{\text{lido}} + (4,29 \times 10^2 / T) - 1,04$  onde T é a temperatura em Kelvin.<sup>114</sup>

As medidas cinéticas foram acompanhadas pela formação dos produtos fenólicos: (i) 2,4-dinitrofenolato comprimento de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) em 360 nm, produto observado da degradação do **DEDNPP**; (ii) 4-nitrofenolato ( $\lambda_{\text{máx}} = 400$  nm) produto observado da degradação do **PNPA** e do **PNPC**, em  $\text{pH} < 7$  o produto 4-nitrofenol foi acompanhado em comprimento de onda de 317 nm. Os espectros sucessivos de UV-VIS representados na **Figura 13** são típicos da degradação em água do (a) **DEDNPP** em função do tempo em pH 8 a  $25^\circ\text{C}$ , (b) **PNPA** e **PNPC** acima do pH 7, (c) **PNPA** e **PNPC** abaixo do pH 7, a  $25^\circ\text{C}$ .

**Figura 13** – Espectros sucessivos de UV-VIS típicos da degradação em água de (a) **DEDNPP** em função do tempo em pH 8 a 25°C ( $\lambda_{\text{máx}} = 360$  nm), (b) **PNPA** em pH 9,5 ( $\lambda_{\text{máx}} = 400$  nm), (c) **PNPA** em pH 4,5 ( $\lambda_{\text{máx}} = 317$  nm), a 25°C. A esquerda está representada respectivamente os gráficos de absorvância em função do tempo.



As corridas cinéticas foram efetuadas sob condições de primeira ordem e monitoradas por no mínimo três tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ), os valores da constante de velocidade observada de primeira ordem ( $k_{\text{obs}}$ ) foram obtidos graficamente empregando a **Equação 4**, na qual  $A_t$  representa a absorvância no tempo  $t$  qualquer,  $A_{\text{inf}}$  o valor da absorvância em tempo infinito e  $A_0$  representa a absorvância para o tempo  $t$  igual a zero. Um gráfico de  $\ln(A_{\text{inf}} - A_t)$  em função do tempo forneceu uma correlação linear na qual  $\ln(A)_0$  é igual ao intercepto e  $k_{\text{obs}}$  representa o coeficiente angular. No entanto, reações com  $t_{1/2}$  superior a 3.000 horas foram monitoradas por velocidades iniciais ( $V_0$ ) e os coeficientes angulares dos gráficos de absorvância vs o tempo, foram divididos pelas absorvâncias finais calculadas.

Os cálculos dos parâmetros de ativação foram feitos através dos valores de  $k_{\text{obs}}$  pelo emprego da equação de Eyring, representada abaixo

**(Equação 5).** Um gráfico de Eyring de  $\ln [k_{obs}h (k_B T)^{-1}]$  como função do recíproco da temperatura termodinâmica forneceu uma correlação linear na qual  $\Delta S^\ddagger R^{-1}$  é igual ao intercepto e  $\Delta H^\ddagger R^{-1}$  representa o coeficiente angular. As energias de ativação ( $E_a$ ) foram fornecidas através da **Equação 6** enquanto as variações de energia livre de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) foram calculadas a partir da **Equação 7**.

$$\ln(A_\infty) - A_t) = -k_{obs} t + \ln A_0 \quad (4)$$

$$\ln\left(\frac{k_{obs} h}{k_B T}\right) = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (5)$$

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (6)$$

$$\Delta G^\ddagger = \ln\left(\frac{k_{obs} h}{k_B T}\right) \times RT \quad (7)$$

Os ajustes dos dados cinéticos foram realizados com o programa ORIGIN versão 8, sendo que para todas as medidas os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) foram superiores a 0,998 com os desvios-padrões abaixo de  $2 \times 10^{-3}$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

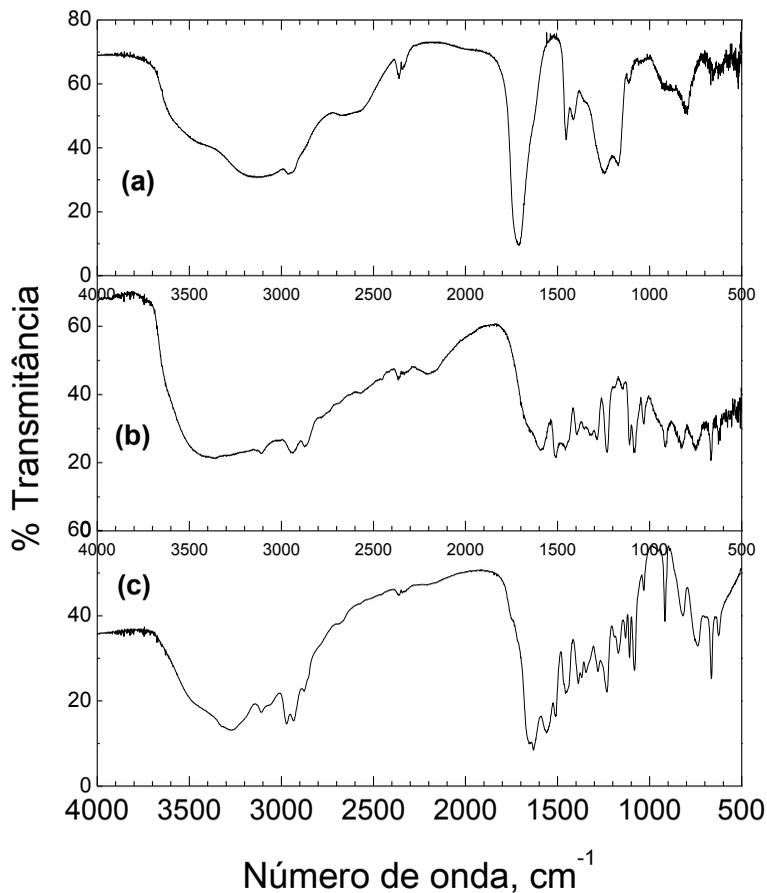
### 4.1. Caracterização do polímero PAIM

A funcionalização do **PAA** à **PAIM** ocorreu via a conversão de parte dos grupos ácidos do **PAA** em reativos agentes acilantes, e para isso foi utilizado como agente de acoplamento uma carbodiimida (DIC). Carbodiimidas são amplamente empregadas na síntese de polipeptídios e amino ácidos. A espécie reativa é o *O*-acilo-isourea, esse grupo é altamente reativo, porque o nitrogênio é susceptível à protonação e a quebra da ligação *O*-acilo converte a ligação dupla C=N da isourea em um grupo carbonila, mais estável.<sup>115</sup>

#### 4.1.1. Estudos de IV e NMR <sup>1</sup>H

O espectro de **IV** do **PAIM** quando comparado com o espectro do **PAA**, é observado o desaparecimento dos estiramentos de C=O do **PAA** e o aparecimento de uma forte banda em  $1.645\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de C=O da amida que sobrepõe o dobramento de N-H em  $1.556\text{ cm}^{-1}$  (**Figura 14 a & c**). No entanto, em ambos, é observado os estiramentos de O-H em  $3.455\text{ cm}^{-1}$  e de C-O em  $1.260\text{ cm}^{-1}$  referente a resíduos do ácido poliacrílico. A banda de  $3.100\text{ cm}^{-1}$ , referente à Harmônica de  $1.550\text{ cm}^{-1}$ , pode ser observada nos espectros do 1-(3-aminopropil)-imidazol (reagente) como do **PAIM** (**Figura 14 b & c**). Ainda pode ser observado no espectro do **PAIM** (**Figura 14 c**) uma única banda por volta de  $3.300\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de N-H de amida secundária.

**Figura 14** – Espectros de IV (KBr,  $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): (a) Espectro do reagente **PAA**; (b) espectro do reagente 1-(3-aminopropil)-imidazol; (c) espectro do produto **PAIM** após o final da reação.



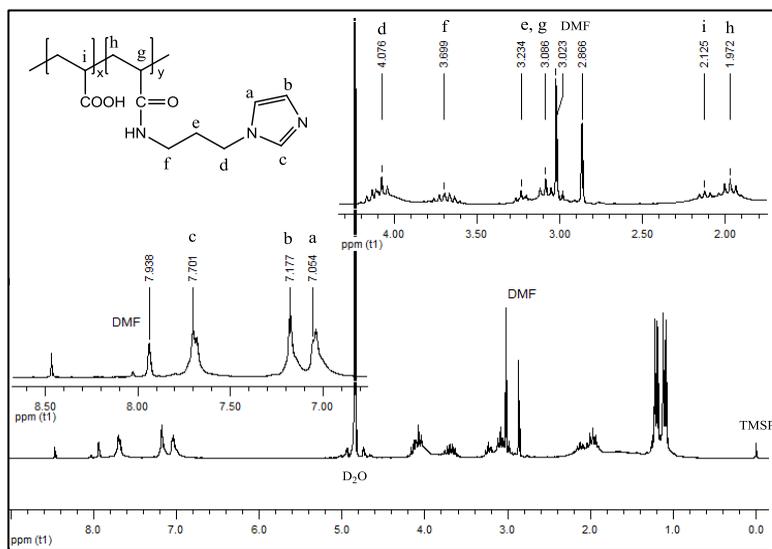
Os resultados obtidos por IV concordam com a estrutura esperada para o **PAIM** indicando a presença da função ácido carboxílico e amida, o que sugere uma parcial funcionalização do **PAA**. O estudo de NMR <sup>1</sup>H realizado consolida a estrutura proposta (**Figura 15 a**). NMR <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) ppm: os picos 7.05 1H (**a**), 7.17 1H (**b**), 7.70 e 1H (**c**) são referentes aos hidrogênios aromáticos do imidazol; já os picos 4.07,

2H (d), 3.234 2H (e) e 3.699 2H (f) são referentes as absorções dos metilenos da amida substituída; e os picos 3.086 1H (g), 1.972 2H (h) e 2.125 1H (i) são referente aos hidrogênios dos grupos metino e metileno da espinha dorsal da cadeia polimérica.

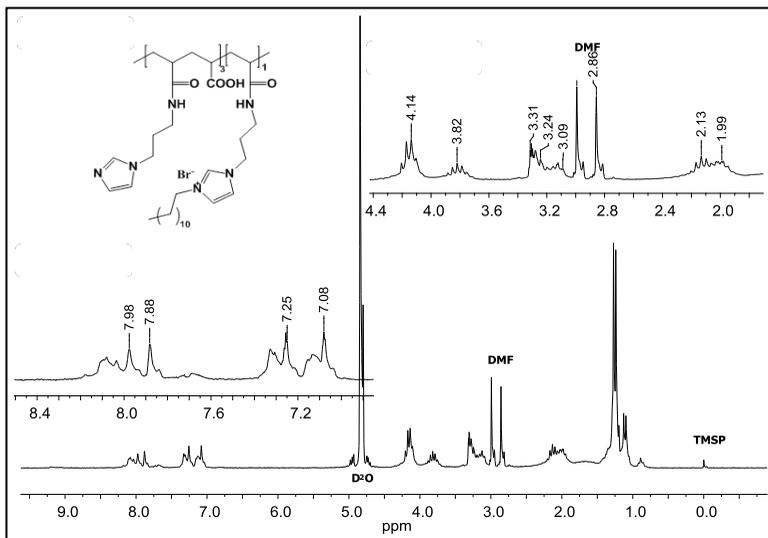
O espectro  $^1\text{H}$  NMR obtido do **PAIM-12** (Figura 15 b) é consistente com o espectro do **PAIM** como esperado. Assim como, o aumento dos picos referentes aos hidrogênios metilênicos em que resulta e evidencia a alquilação do imidazol.

**Figura 15** – Espectro de  $^1\text{H}$  NMR obtido do (A) **PAIM** e (B) **PAIM-12** em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

(A) Espectro em 200 MHz do **PAIM** (ppm); 7.05, 1H (a); 7.17, 1H (b); 7.70, 1H (c); 4.07, 2H (d); 3.23 2H(e); 3.69 2H (f); 3.09 1H (g); 1.97 2H (h); 2.12 1H (i).



(B) Espectro em 200 MHz do **PAIM-12** (ppm); 7.08, 1H; 7.25, 1H; 7.88, 1H; 4.14, 2H; 3.31 2H; 3.82 2H; 3.09 1H; 1.99 2H; 2.13 1H.

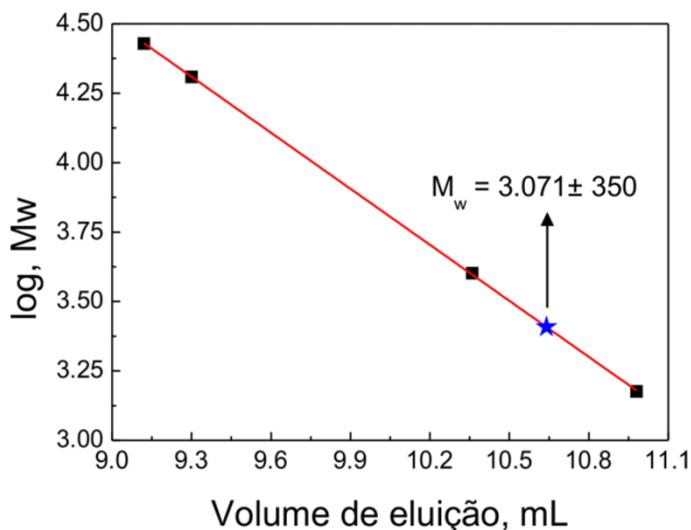


#### 4.1.2. Determinação do peso molecular do PAIM

O peso molecular e dispersidade do **PAIM** foram estimados por **GFC/SEC**. Essa técnica é amplamente utilizada na caracterização de polímeros<sup>116</sup>, peptídeos e proteínas,<sup>117</sup> consiste em separar moléculas de acordo com o volume hidrodinâmico ocupado. O volume de eluição depende do tamanho do analito, moléculas maiores que o tamanho médio dos poros do recheio da coluna (*maior volume hidrodinâmico*), não serão difundidas e o caminho percorrido será menor do que o caminho percorrido por moléculas menores (*menor volume hidrodinâmico*), estas sim serão difundidas.<sup>110,116</sup> Consequentemente, o volume de eluição será menor para moléculas com maior volume hidrodinâmico e maior para

moléculas com menor volume hidrodinâmico, como pode ser visto na **Figura 16**, a medida que o peso molecular do polietileno glicol é aumentado, o volume de eluição diminui (Ver cromatograma no anexo I Figura A3).

**Figura 16** – Curva analítica para GFC, Peso molecular vs volume de eluição do padrão (polietileno glicol);  $r^2 = 0,999$ ;  $Y = 10,562(\pm 0,031) - 0,672(\pm 0,003) X$  (■); Volume de eluição do **PAIM** aponta para o  $M_w = 3.071 \pm 350$  g mol<sup>-1</sup>.

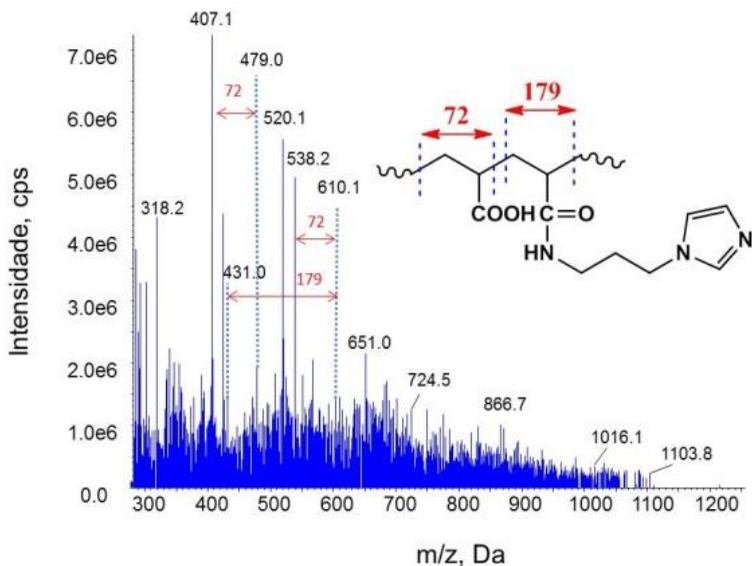


O peso molecular numérico médio ( $\bar{M}_n = 2.859$  g mol<sup>-1</sup>), o peso molecular ponderal médio ( $\bar{M}_M = 3.071 \pm 350$  g mol<sup>-1</sup>) e a dispersibilidade da massa molar ( $E_M = 1,07$ ) foram determinados através da **Figura 16** sob o volume de eluição de 10,6 mL para o **PAIM**. A  $E_M$  com valor próximo de um (1) indica a estreita dispersidade do **PAIM**,<sup>109</sup> esse valor é consistente, visto que a reação foi de funcionalização do **PAA**.

### 4.1.3. Estudos de espectrometria de massas do PAIM

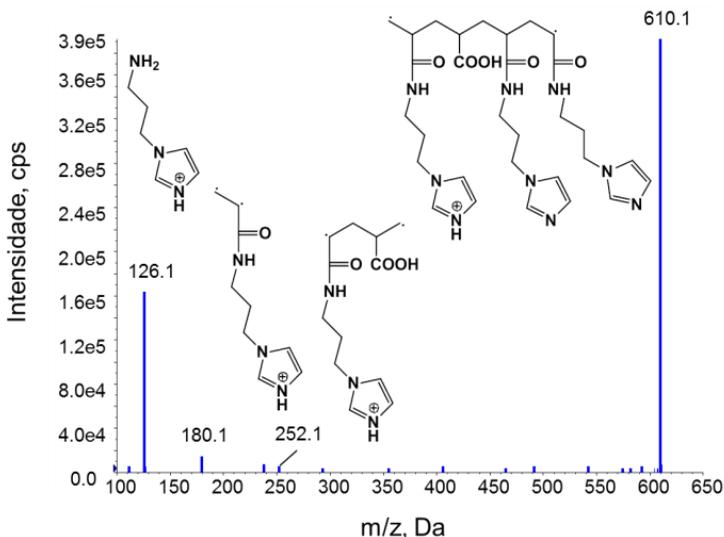
As análises de ESI-MS e ESI-MS/MS foram empregadas para obter informações a respeito do grau de funcionalização do **PAA**. Nos espectros de ESI(+)-MS (**Figura 17**) pode ser observado picos com diferença de  $72 \text{ g mol}^{-1}$  e  $179 \text{ g mol}^{-1}$  como indicado. Esses valores correspondem ao peso molecular do monômero do **PAA** e do 1-(3-aminopropil)-imidazol, respectivamente, e como resultado indica que o **PAA** não foi completamente funcionalizado.

**Figura 17** – Espectros de ESI-MS (+) do **PAIM** com diferença de massas de  $72$  e  $179 \text{ g mol}^{-1}$  entre os picos correspondentes ao **PAA** e ao **PAA** funcionalizado.



O espectro de fragmentação ESI(+)-MS/MS do íon com  $m/z$  610 (Figura 18), o qual contém três unidades de imidazol e uma de ácido carboxílico, mostra que o 1-(3-aminopropil)-imidazol é efetivamente incorporado ao polímero.

**Figura 18** – Espectro de ESI/MS/MS (+) do monômero do PAIM de  $m/z$  610.



#### 4.1.4. Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica foi explorada para determinar as constantes de dissociação  $K_{a1}$  e  $K_{a2}$  do equilíbrio ácido-base do PAIM. Os dados experimentais foram ajustados com o programa FITEQL 4.0, utilizando como modelo o ácido húmico<sup>118</sup>, conforme é mostrado na curva de titulação do PAIM (1,14 g dm<sup>-3</sup>) Figura 19. O ajuste da curva

pode ser observado na **Figura 19 b**, o valor observado da soma ponderada dos quadrados divididos por graus de liberdade (WSOS/DF, do inglês *weighted sum of squares divided by degrees of freedom*) foi igual a 7,91. De acordo com a referência 118, esse valor quando entre 0.1 e 20 é indicativo de um ajuste razoavelmente bom.

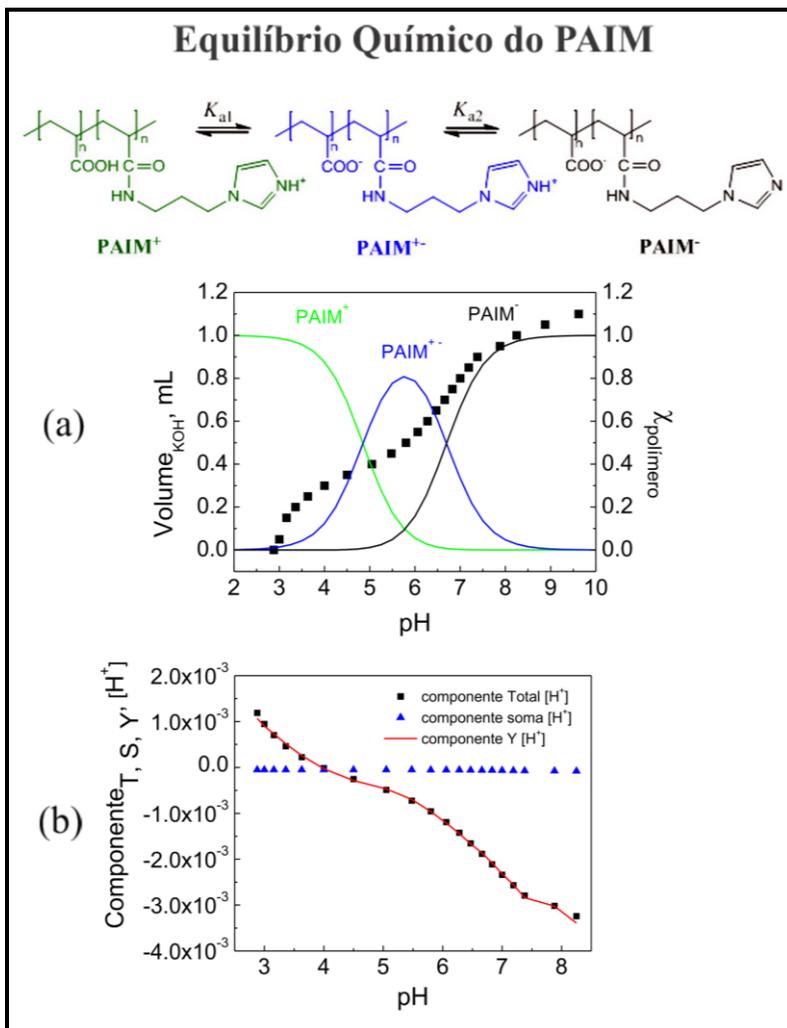
O valor do WSOS/DF é obtido pelo programa FITEQL através da **Equação 8** em que  $Y_{II}^P$  é a diferença das concentrações analítica da componente  $[H^+]$  calculada e experimental ( $Y = T_H^{calc.} - T_H^{exp.}$ ), conhecidas para todos os pontos (P).  $S_Y$  é a estimativa do erro experimental associado com a função  $Y$ , já  $n_p$ ,  $n_{II}$  e  $n_u$  são os números: de pontos titulados, de grupos com dois componentes e de parâmetros ajustáveis. Na **Figura 19 b** estão representadas as componentes  $Y$ , a concentração total ( $T$ ) experimental de  $[H^+]$  e a concentração total calculada ( $S$ ) (componente soma), sendo este valor a soma da concentração de  $[H^+]$  para todas as espécies envolvidas.<sup>118</sup>

$$WSOS/DF = \frac{\sum \left( \frac{Y_{II}^P}{S_Y} \right)^2}{n_p \times n_{II} - n_u} \quad (8)$$

O ajuste da curva de titulação forneceu os valores de  $pK_a$  para os grupos carboxilato e imidazol ( $4,85 \pm 0,13$  e  $6,70 \pm 0,04$ ) respectivamente. Esses valores são consistentes com os valores obtidos para o ácido acrílico monomérico ( $pK_a = 4,76$ )<sup>119</sup> e para o imidazol.<sup>5</sup>

Na **Figura 19 a** estão representadas as distribuições de espécies para o **PAIM** em função do pH. Os valores abaixo do pH 4,85 a espécie predominante em solução é o **PAIM<sup>+</sup>**, enquanto acima do pH 6,70 a espécie que predomina é o **PAIM<sup>-</sup>**, entre esses pHs a espécie que prevalece é a espécie neutra **PAIM**. As espécies foram determinadas através do equilíbrio expresso por  $K_{a1}$  e  $K_{a2}$  (**Figuras 19**). Essas espécies podem estar distribuídas em diferentes proporções e a diferença está relacionada com o grau da funcionalização do **PAA**.

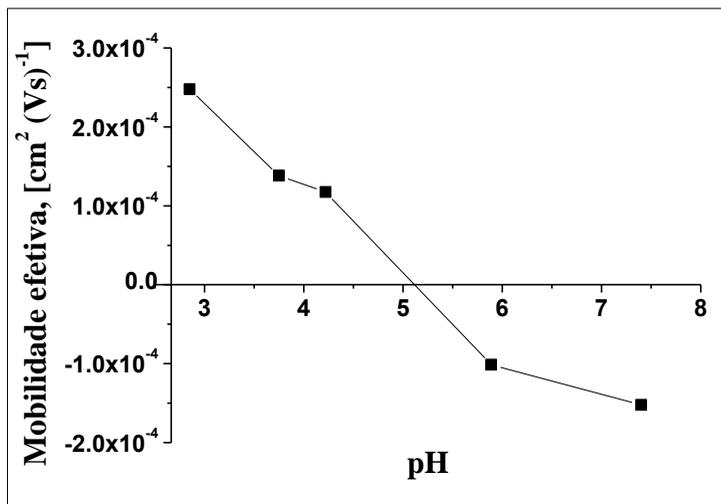
**Figura 19** – Titulação potenciométrica de  $1,14 \text{ g dm}^{-3}$  do PAIM (■). (a) Distribuição das espécies (PAIM<sup>+</sup> e PAIM<sup>-</sup>) em equilíbrio vs. pH, a 25°C; (b) Estimativa do ajuste do programa FITEQL 4.0 (Goodness of Fit).



#### 4.1.5. Mobilidade eletroforética

A estrutura do **PAIM** é constituída por íons carboxilatos, imidazois e imidazois protonados. Essa duplicidade de cargas foi revelada quando se mediu a mobilidade eletroforética do **PAIM** (**Figura 20**), a mobilidade muda de positiva passando pelo ponto zero indo para negativa à medida que o pH é elevado. O ponto zero pode ser identificado como o ponto isoelétrico do **PAIM** que se encontra entre os pHs 5 e 6, o que reflete a característica anfotérica do polímero. Os valores acima do ponto isoelétrico, parte superior positiva da **Figura 20**, são principalmente atribuídos aos carboxilatos protonados, já a parte inferior negativa abaixo do ponto isoelétrico, são valores sobretudo conferidos aos imidazois. Esses dados concordam com os valores de  $pK_{as}$  obtidos para os grupos carboxilato e imidazol do **PAIM**. Polímeros com múltiplas cargas são classificados como polieletrólito. Polieletrólitos são estruturas muito importantes quando se busca a construção de moléculas que possam complexar DNA e de sistemas de liberação controlada de fármacos.<sup>120,121</sup> O DNA tem caráter multianiónico o que dificulta a permeação através da membrana celular, para facilitar essa permeação polímeros catiónicos vem sendo amplamente investigados.<sup>121-123</sup>

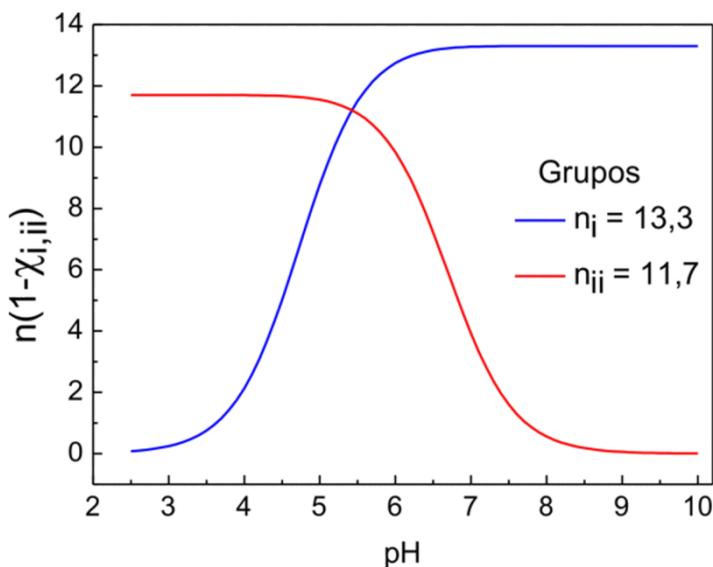
**Figura 20** – Efeito da mobilidade eletroforética do **PAIM** vs pH. As corridas foram realizadas de acordo com o método de Willians & Vigh.<sup>111</sup> Ver Anexo I.



Com base nos equilíbrios  $K_{a1}$  e  $K_{a2}$  e o ponto isoelétrico do polímero foi possível simular as frações das espécies **PAIM** e **PAIM<sup>+</sup>** contidas na estrutura do polímero. Os resultados obtidos estão representados na **Figura 21**. A interseção das curvas, o ponto isoelétrico teórico obtido para o **PAIM**, permite quantificar o grau da funcionalização do **PAA** através do número de grupos carboxilatos e imidazóis  $n_i$  e  $n_{ii}$  respectivamente. Os valores ( $n_i = 13,3$  e  $n_{ii} = 11,7$ ) foram obtidos através do ajuste teórico para o ponto isoelétrico em pH 5,41 (**Figura 21**) levando em consideração os  $pK_{as}$  de  $4,85 \pm 0,13$  e  $6,70 \pm 0,04$  experimentais desses grupos. O ponto isoelétrico teórico está dentro do valor medido experimentalmente, entre os  $pK_{as}$  5 e 6, através da mobilidade eletroforética do polímero. Os dados sugerem como a espécie predominante, abaixo do ponto isoelétrico, o polímero contendo aproximadamente 13 cargas negativas (**PAIM<sup>13-</sup>**) e acima deste, a espécie predominante é o polímero carregado com aproximadamente 12 cargas positivas (**PAIM<sup>12+</sup>**) (**Figura 21**). O **PAA** ( $M_w = 1.800 \text{ g mol}^{-1}$ ) é constituído de 25 unidades monoméricas visto que, os dados obtido pelo ajuste do gráfico da **Figura 21** indicam aproximadamente 13 unidades

monoméricas e 12 unidades monoméricas funcionalizadas ou seja, aproximadamente 47% do **PAA** foi funcionalizado com 1-(3-aminopropil)-imidazol com razão de aproximadamente 1:1. Quando esses dados são convertidos em massa molar teórica do **PAIM** o valor obtido é de  $3.052 \text{ g mol}^{-1}$  muito próximo do valor obtido por GFC ( $\bar{M}_M = 3.071 \pm 350 \text{ g mol}^{-1}$ ).

**Figura 21** – Número de grupos vs pH para o **PAIM**. (—) número de grupos  $\text{-COO}^-$  e (—) número de grupos  $\text{IMZ}^+$ . Os dados foram ajustados levando em consideração os  $\text{pK}_{\text{as}}$  de  $4,85 \pm 0,13$  e  $6,70 \pm 0,04$  obtidos experimentalmente.

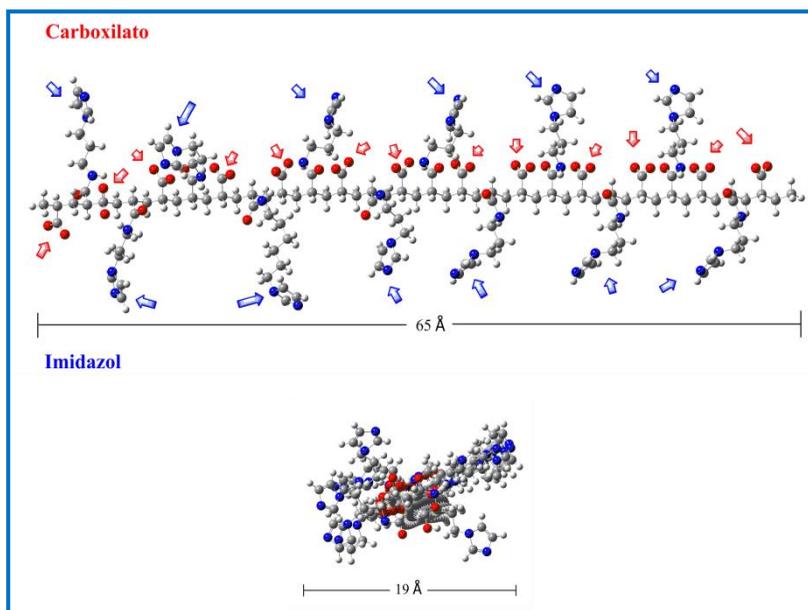


#### 4.1.6. Estrutura do PAIM

Com base nos estudos de GFC/SEC, espectrometria de massas e eletroforese, pode-se propor através do peso molecular médio e do grau de funcionalização, a estrutura do **PAIM** (**Figura 22**). A estrutura é

composta de 13 grupos carboxilatos e 12 grupos imidazóis distribuídos em 12 unidades monoméricas medindo 65Å de comprimento por 19Å de altura, consistente com os dados experimentais onde cada monômero é constituído por um grupo carboxilato e um grupo imidazol. A estrutura proposta é a forma mais reativa esperada para o polímero **PAIM** na hidrólise de ésteres discutida no item 4.2, pois apresenta grupos carboxilatos e imidazóis deprotonados, ambos disponíveis para atuar como nucleófilos<sup>5</sup> ou base-geral<sup>4</sup> na catálise.

**Figura 22** – Estrutura proposta para o **PAIM**<sup>13-</sup> com perfil de 65 Å e face de 19 Å, construída utilizando o programa GAUSSVIEW 3.0.<sup>124</sup> A flechas na cor vermelha apontam para os grupos carboxilatos e as flechas em azul para os grupos imidazóis.



Estruturas que combinam diferentes funcionalidades, características de polieletrólitos e micelas, vem sendo de interesse no planejamento de nanoreatores de altíssima eficiência baseados no mimetismo de reações enzimáticas.<sup>24</sup> A eficiência catalítica das micelas

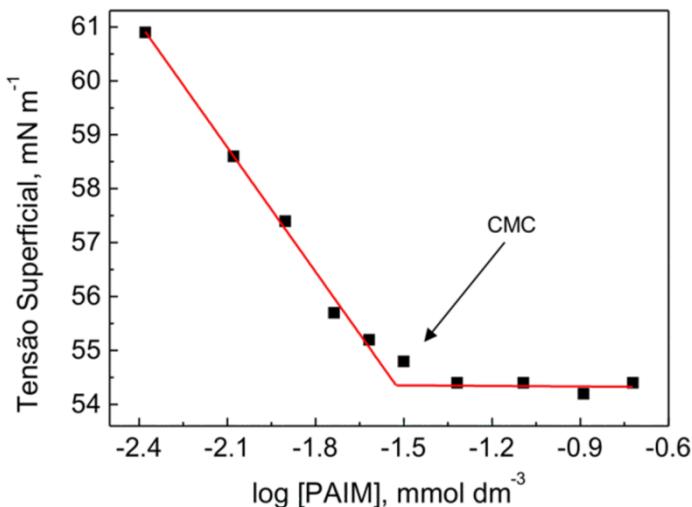
é bem estabelecida e depende da habilidade de compartimentar reagentes. Polímeros e moléculas anfífilas podem formar domínios com características semelhantes a micelas, incluindo a capacidade de solubilização e de formar ligações iônicas.<sup>21</sup>

#### 4.1.7. Formação de sistemas homogêneos organizados

Os resultados até então apresentados, com respeito a estrutura do **PAIM**, apontam para um sistema com diferentes funcionalidades que se assemelha aos *polysoaps*. *Polysoaps* são classes de polímeros que compreende recursos de polieletrólitos e micelas, formando estruturas bem organizadas dependentes de forças eletrostáticas e hidrofóbicas que permitem a ligação de reagentes iônicos e substratos orgânicos.<sup>24</sup> Uma forma simples para caracterizar sistemas homogêneos organizados é através de sucessivas medidas da tensão superficial ( $\gamma$ ) em diferentes concentrações do agente (e.g. surfactantes, polímeros), esses valores são representados na forma gráfica da  $\gamma$  ( $\text{mM m}^{-1}$ ) vs o log [agente]. A organização do sistema é evidenciada pela quebra de linearidade, o que indica a formação de micelas.<sup>125</sup> Micelas são agregados moleculares auto-organizados formados em solução acima da concentração micelar crítica (CMC) com regiões hidrofóbica e hidrofílica na mesma estrutura.<sup>126</sup> A agregação ocorre acima de  $2,98 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  para o sistema **PAIM/H<sub>2</sub>O** determinada por extrapolação e mostrada na **Figura 23**. Vale salientar que todas as corridas cinéticas foram realizadas acima da concentração de agregação do **PAIM** assim, todos os sistemas estudados podem ser constituídos de sistemas bem organizados.

Essa agregação do **PAIM** pode levar à formação de microdomínios de maior hidrofobicidade. Esses microdomínios atuam como nanoreatores que concentram os reagentes e favorecem a catálise.<sup>21,24</sup>

**Figura 23** – Variação da tensão superficial com a concentração do **PAIM** a 25°C. A CMC de  $2,98 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> foi determinada por extrapolação das duas retas.



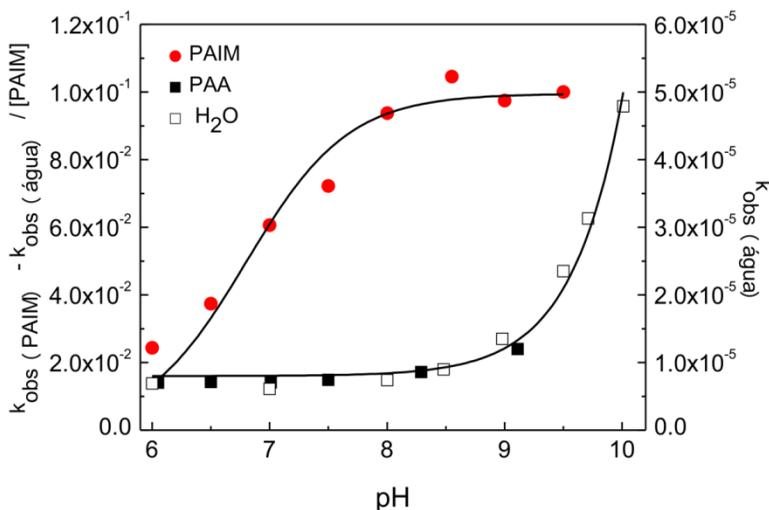
## 4.2. Estudos cinéticos do polímero **PAIM** com os substratos **DEDNPP**, **PNPA** e **PNPC**

### 4.2.1. Hidrólise do **DEDNPP**

A avaliação do perfil de pH para o efeito do **PAIM** sobre a reação de desfosforilação do **DEDNPP** em água é mostrada na **Figura 24**. A constante de velocidade de segunda ordem ( $k_2$ ), com base na concentração do polímero ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>), foi comparada com o  $k_2$  obtido para análoga reação do **DEDNPP** com imidazol livre (1 mol dm<sup>-3</sup>).

Os resultados (**Tabela 1**) mostram que o aprimoramento da velocidade na reação de desfosforilação para o imidazol livre é de aproximadamente 2.200 vezes, comparado à hidrólise espontânea do substrato. Contudo, quanto  $k_2$  é dado em função da concentração total do **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ;  $M_M = 3.071$ ), o aprimoramento da velocidade pode chegar a 12.000 vezes e pela relação  $k_2/(k_0/55.5)$  o efeito catalítico pode chegar a 667.000, indicando o **PAIM** como um importante catalisador na degradação do **DEDNPP**. A reação de degradação do **DEDNPP** na presença do polímero de partida, anteriormente a funcionalização (**PAA**), não apresentou atividade catalítica relevante como pode ser observado na **Figura 24** com valores de  $k_{\text{obs}}$  próximos aos valores da hidrólise espontânea (**Ver anexo II tabela b1**).

**Figura 24** – Perfil de pH para a reação de degradação do **DEDNPP** a 25°C, (●) na presença do **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ). (□) hidrólise espontânea do substrato,  $I = 1,0$  (KCl) e (■) na presença do **PAA** ( $8,2 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) contendo apenas grupos carboxilatos.



**Tabela 1** – Parâmetros cinéticos obtidos dos ajustes das curvas  $k_{\text{obs}}$  vs pH obtidos experimentalmente da reação do **DEDNPP** em água na presença<sup>a</sup> e na ausência<sup>b</sup> do **PAIM**.

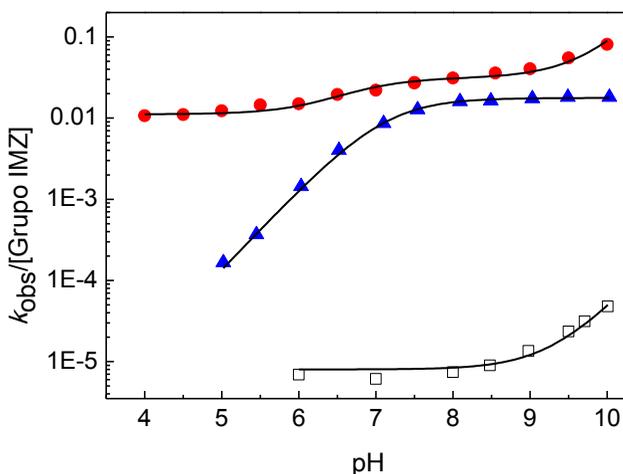
<b>Parâmetro Cinéticos</b>	
$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1} [\text{IMZ}]^b$	$(1,77 \pm 0,10) \times 10^{-2}$
$k_0, \text{s}^{-1} b$	$(8,0 \pm 0,50) \times 10^{-6}$
$k_{\text{OH}}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1} b$	0,42
$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1} [\text{PAIM}_{\text{mon.}}]^{a; c}$	$(0,73 \pm 0,06) \times 10^{-2}$
$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1} [\text{PAIM}_{\text{pol.}}]^{a; d}$	$(9,03 \pm 0,57) \times 10^{-2}$
$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1} [\text{PAIM-12}_{\text{pol.}}]^{c; f}$	$(16,2 \pm 1,2) \times 10^{-2}$
$\text{p}K_{\text{a}(\text{IMZ})}^e$	$6,70 \pm 0,04$

<sup>a</sup> Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste da **Figura 24**. <sup>b</sup> Valores obtidos das referências 5 e 25. <sup>c</sup> Considerando  $[\text{polímero}] = 1,7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ; <sup>d</sup> Considerando  $[\text{polímero}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ; <sup>e</sup> Valor obtido por titulação potenciométrica a 25°C. <sup>f</sup> Valor do  $\text{p}K_{\text{aIMZ}} = 6,17 \pm 0,092$  e  $k_0, \text{s}^{-1} = (5,1 \pm 0,48) \times 10^{-6}$  obtido pelo ajuste da **Figura 26**. Todos os ajustes foram feitos através das **Equações 8 e 9**.

Quando comparada diretamente a reatividade do **PAIM** com imidazol livre deve-se levar em consideração a concentração local do grupo imidazol, visto que o **PAIM** possui aproximadamente doze grupos imidazois ( $\text{PAIM}_{[\text{IMZ}]} = 6,11 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Assim, considerando a razão de  $k_{\text{obs}}$  pela concentração do grupo imidazolil (**Figura 25**), os incrementos em  $k_{\text{obs}}$  promovidos pelo **PAIM** são de 3.837 vezes (pH 8,5), comparado com a reação espontânea. O incremento é na ordem de 2,1 vezes maior quando comprado com imidazol livre 1.637 vezes mais concentrado. No entanto, o maior incremento frente ao imidazol livre em pH 5 é de 74 vezes, o que pode ser atribuído ao grupo carboxilato contido no **PAIM**. Desta forma o **PAIM** se mostrou eficiente para catalisar a degradação do **DEDNPP** estendendo a faixa catalítica para regiões mais baixas de pH, onde os

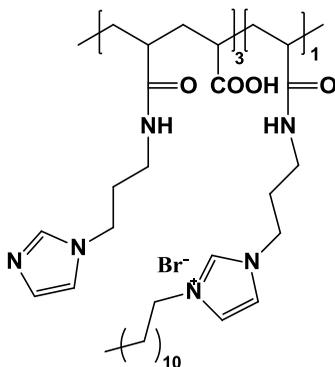
grupos carboxilatos do PAA e os grupos imidazois livres não o foram eficientes quando avaliados de forma individual.

**Figura 25** – Perfil de pH para a reação do **PAIM** ( $6,11 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  de imidazois livres) com **DEDNPP**, dados em  $k_{\text{obs}}/[\text{Grupo imidazol}]$  ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) a  $25^\circ\text{C}$ . Concentração local de grupos imidazolil para (●) **PAIM** e <sup>a</sup>comparativos obtidos da referência 5: reação com imidazol livre ( $1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) (▲) e (□) a <sup>a</sup>hidrólise espontânea do substrato a  $25^\circ\text{C}$ ,  $I = 1,0$  (KCl).



O incremento promovido pelo **PAIM**, com tão baixa concentração de grupos imidazois, pode ser atribuído a regiões na estrutura polimérica com maior hidrofobicidade. O efeito hidrofóbico refere-se à tendência que os compostos orgânicos apolares apresentam ao se afastar da água para formar agregados, estes de diferentes tamanhos com tempo de vida curto bem definidos ou não (e.g. micelas e vesículas). Essa hidrofobicidade favorece a aproximação do substrato, o que faz aumentar a concentração e a velocidade do número de colisões nos sítios catalíticos.<sup>21</sup> Assim, com o objetivo de aumentar a

hidrofobicidade do polímero **PAIM**, reagiu-se o mesmo com 1-bromododecano (3:1) levando ao polímero **PAIM-12** com imidazol alquilado (ver parte experimental item 3.2).



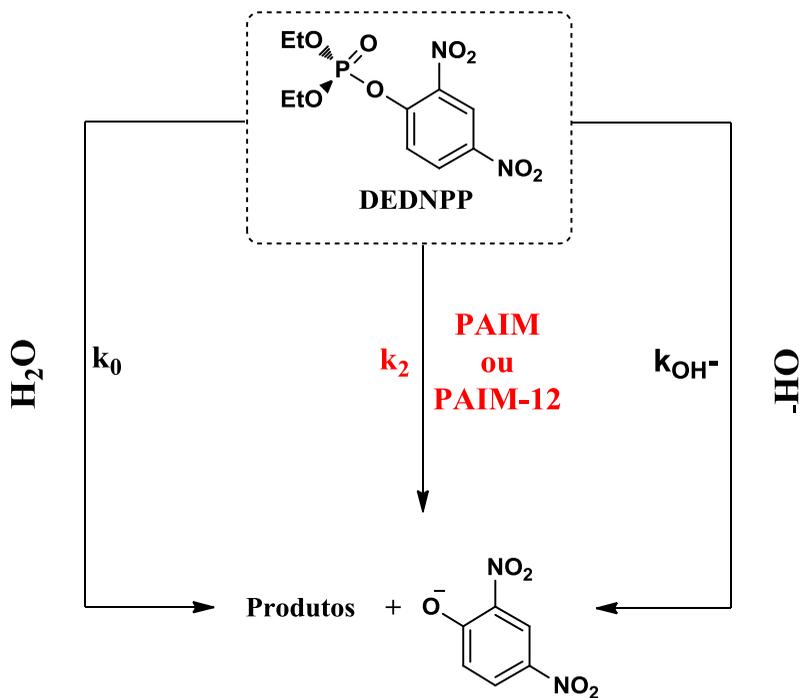
**PAIM-12**

O perfil de pH para a reação do **DEDNPP** em água, na presença do **PAIM** e na presença do **PAIM-12** é mostrado na **Figura 26**, também pode ser observado o limite da solubilidade do **PAIM-12** em pH 6,5. Os resultados (**Tabela 1**) para o polímero mais hidrofóbico (**PAIM-12**) revelam o aprimoramento na velocidade de degradação do substrato de até 31.183 vezes quando comparado com a reação espontânea. Esses resultados corroboram uma maior concentração do substrato nos sítios catalíticos do polímero. Os dados experimentais foram ajustados pelas **Equação 9** para a reação com a água e **Equação 10** para a reação com **PAIM**, desenvolvidas com base no **Esquema 20**, onde  $k_0$  e  $k_{\text{OH}}$  são as constantes de velocidade para a hidrólise espontânea do substrato e sua reação com  $\text{OH}^-$  respectivamente,  $k_{2\text{PAIM}}$  é a constante de velocidade para a reação com a forma deprotonada do **PAIM**, e  $\chi_{\text{IMZ}}$  é a fração molar do **PAIM** deprotonado, que representa a espécie neutra reativa do imidazol ( $\text{p}K_a = 6,70$ ).

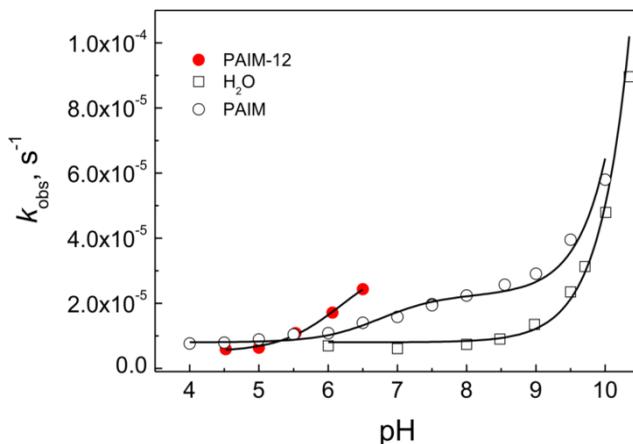
$$k_{\text{obs(DEDNPP)}} = k_0 + k_{\text{OH}} [\text{OH}^-] \quad (9)$$

$$k_{2\text{PAIM-DEDNPP}} = (k_{\text{obs(PAIM-DEDNPP)}} - k_{\text{obs(DEDNPP)}}) / [\text{PAIM}] \cdot \chi_{\text{PAIM}} \quad (10)$$

**Esquema 20**



**Figura 26** – Perfil de pH para a reação de degradação do **DEDNPP**, a 25°C, em água com: (●) **PAIM-12** ( $1,7 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> em 20% MeCN),<sup>a</sup> (○) **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) e (□) a hidrólise espontânea do substrato com  $I = 1,0$  (KCl) obtido da referência 9. <sup>a</sup> Solubilidade limitada ao pH 6,5.



Os estudos cinéticos para a degradação do **DEDNPP** na presença dos polímeros **PAIM** e **PAIM-12** revelaram uma diferença no aprimoramento na velocidade de degradação do substrato de mais de 19.000 vezes para o **PAIM-12** em relação ao **PAIM**, o que foi atribuído à maior capacidade para concentrar o substrato nos sítios catalíticos do polímero. As constantes de velocidade observadas para a reação do **DEDNPP** frente aos polímeros **PAA**, **PAIM** e **PAIM-12** em pH 6,5 estão na **Tabela 2**. O pH de 6,5 é o limite da solubilidade do **PAIM-12** na concentração de  $1,7 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> em 20% MeCN a 25°C.

Não houve necessidade do emprego de força iônica nos estudos cinéticos, tendo em vista que os substratos se encontram livres de cargas, o que minimiza a repulsão eletrostática com o polímero. Nucleófilos e/ou íons hidróxidos, são repelidos por substratos com cargas negativas o que não ocorre com substratos neutros.

A solução reacional em 20% MeCN pode ainda ter reduzido o efeito catalítico para as reações com o polímero. Estudos reportados para a degradação do **PNPA** com nucleófilos em mistura de MeCN/H<sub>2</sub>O tiveram decréscimos nas constantes de velocidades, a média que a concentração de MeCN aumenta em até 30%.<sup>127</sup> Esse efeito foi atribuído a capacidade da MeCN para formar complexos com a água. As interações eletrostáticas dipolar iônica da MeC<sup>+δ</sup>N<sup>-δ</sup> abaixo de 30% com a água pode desestabilizar o estado de transição aumentando a energia de ativação e consequentemente diminuindo a velocidade da reação.<sup>128</sup> O estado de transição pode em princípio, existir em qualquer ponto ao longo da coordenada da reação.<sup>129</sup> Essa posição muda com a transferência de solvente e assim, a velocidade pode aumentar, como reportado,<sup>127</sup> acima de 30% MeCN. Desta forma, deve ser levado em consideração um aprimoramento ainda mais relevante para as reações do polímero sob esta condição.

**Tabela 2** – Constantes de velocidade observada para a reação do **DEDNPP** com **PAA**, **PAIM** e **PAIM-12**, bem como a hidrólise espontânea, em pH 6,5 a 25°C.

	$10^{-6} k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$
<b>Hidrólise espontânea</b>	8,01	1442
<b>PAA</b>	7,11	1625
<b>PAIM</b>	14,0	825
<b>PAIM-12</b>	24,3	475

Concentrações dos polímeros: **PAA** ( $8,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); **PAIM-12** ( $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  em 20% MeCN).

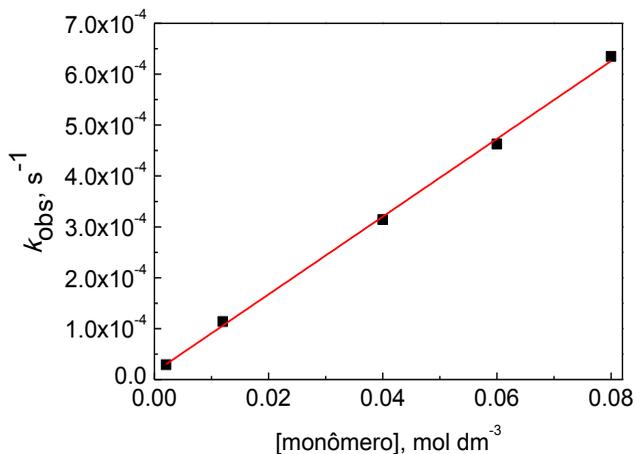
O valor de  $k_2$  do **PAIM** dado na **Tabela 1**, foi obtido pelo ajuste (**Equação. 9, Figura 24**) é consistente com estudos recentes que mostram que a desfosforilação de ésteres em reações com imidazol envolvem o mecanismo do tipo S<sub>N</sub>2(P).<sup>5</sup> Na **Figura 27** pode ser visto a linearidade do ajuste para o gráfico  $k_{\text{obs}}$  vs [PAIM<sub>monômero</sub>] com coeficiente angular de acordo com  $k_2$ , o que confirma a dependência de primeira ordem, o ajuste linear obtido para o polímero **PAIM-12** pode ser visto no **Anexo 2 Figura B1**. A reação do **PAIM** com **DEDNPP** na

região de pH em que os grupos imidazois estão na sua maior parte neutro, apresentou um baixo valor do efeito isotópico cinético do solvente ( $k^H/k^D = 1,59$ ), consistente com dois caminhos: nucleofílico e base-geral, que atuam de forma simultânea (**Esquema 21**).

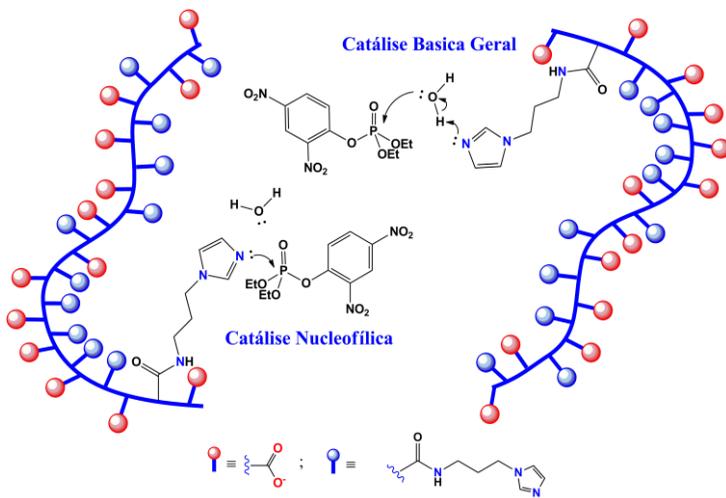
A razão  $k^H/k^D$  para a reação do **DEDNPP** na presença de imidazois livres em pH 8,5 é reportado como sendo de 1,25,<sup>5</sup> e indica que a reação ocorre pelo menos inicialmente via mecanismo nucleofílico. Isso foi confirmado através de identificações espectroscópicas (NMR de <sup>1</sup>H e de <sup>31</sup>P e ESI-MS) do intermediário forforilimidazol. O efeito isotópico cinético do solvente apresentado para a reação do **DEDNPP** não é suficientemente baixo ( $k^H/k^D < 1$ ) para que a reação ocorra exclusivamente via mecanismo nucleofílico, e nem suficientemente alto ( $k^H/k^D > 2$ ) para seguir exclusivamente via base-geral e assim, sugere-se que os dois mecanismos possam ocorrer de forma simultânea e independente.

O baixo valor de  $k^H/k^D$  observado ocorre quando há uma grande diferença entre os  $pK_{as}$  do doador e do acceptor de prótons, resultando em um estado de transição mais adiantado ou tardio para a transferência de prótons.<sup>85</sup> O que pode explicar o maior valor para a razão  $k^H/k^D$  da reação do **DEDNPP** com o PAIM, quando comparado com a mesma reação na presença de imidazol livre. Onde, o doador é a água ( $pK_a = 15,7$ ) e o acceptor é o PAIM ( $pK_{a1} = 4,85$  e  $pK_{a2} = 6,70$ ) ou o imidazol livre ( $pK_a = 7,10$ ). Ou seja, o valor observado de 1,59 para a razão  $k^H/k^D$  é consistente com a sugerida dependência desta razão com o  $pK_a$  da base geral.<sup>130</sup> Assim, a reação do **DEDNPP** na presença do PAIM ocorrer preferivelmente (não unicamente) via catálise básica-geral.

**Figura 27** – Perfil de concentração  $k_{\text{obs}}$  vs concentração do **PAIM** para a reação de degradação do **DEDNPP**; tampão bicarbonato (0,01 mol dm<sup>-3</sup>), pH 9,00, 25°C,  $r^2 = 0.998$ ;  $a = (1,45 \pm 0,73) \times 10^{-5}$ ;  $b = (7,64 \pm 0,15) \times 10^{-3}$ .



**Esquema 21.**



#### 4.2.1.1. Parâmetros termodinâmicos – PAIM / DEDNPP

A influência da temperatura para a reação do **DEDNPP** com **PAIM** pode ser observada na **Tabela 3**. A medida que a temperatura do sistema aumenta é observado um aumento na velocidade de degradação do **DEDNPP**, podendo chegar ao  $t_{1/2}$  de 43,4 minutos à 55°C. Os parâmetros de ativação foram calculados a 25, 35, 45 e 55°C para a reação do **DEDNPP** com **PAIM**. As constantes de velocidade foram determinadas em pH 9, região em que é alcançado o patamar no gráfico de perfil de pH.

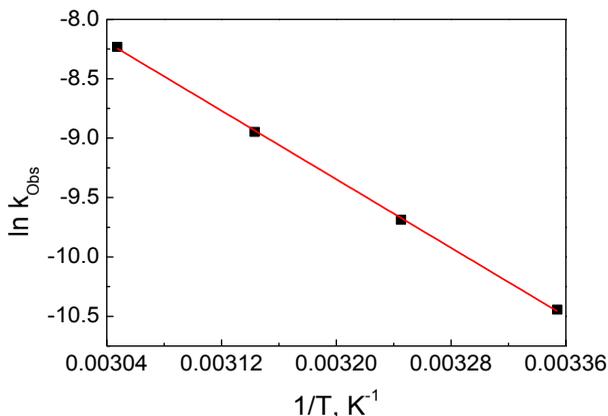
Por meio de gráfico de Arrhenius (**Figura 28**) foi determinado o valor de  $E_a$  ( $14,3 \pm 0,08$  kcal mol<sup>-1</sup>). O gráfico de Eyring (**Figura 29**) foi usado para a obtenção dos valores de  $\Delta H^\ddagger$  e de  $\Delta S^\ddagger$ , em que  $k_B$  e  $h$  referem-se às constantes de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23}$  J K<sup>-1</sup>) e de Planck ( $6,63 \times 10^{-34}$  J s) respectivamente.<sup>92</sup> O valor de  $\Delta G^\ddagger$  foi obtido através da **Equação 7** (ver parte experimental). Todos os gráficos fornecem uma excelente relação linear com  $r^2$  de 0,999.

**Tabela 3** – Constantes de velocidade observadas em diferentes temperaturas para a hidrólise do **DEDNPP** catalisada pelo **PAIM**.

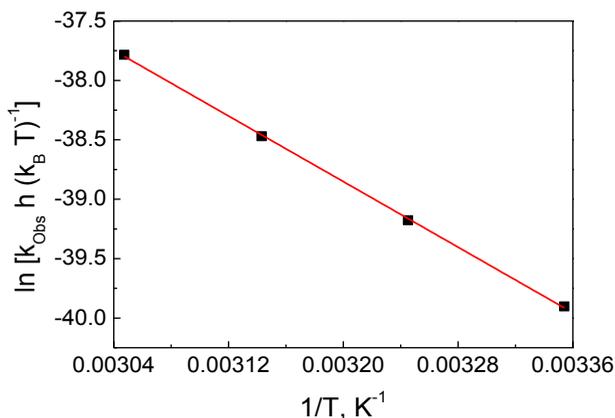
T (°C)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
25	$2,91 \times 10^{-5}$	397
35	$6,21 \times 10^{-5}$	186
45	$1,30 \times 10^{-4}$	88,9
55	$2,66 \times 10^{-4}$	43,4

Todas as corridas cinéticas foram realizadas em pH 9,0 (tampão bicarbonato de potássio 0,01 mol dm<sup>-3</sup>).

**Figura 28** –  $\ln k_{\text{obs}}$  vs  $1/T$  para a reação do PAIM com **DEDNPP**, em pH 9.0; ( $r^2 = 0.999$ ;  $SD = 0.0185$ ;  $a = 13.7 \pm 0,25$ ;  $b = (-7.22 \pm 0.08) \times 10^3$ ;  $E_a = 14,3 \pm 0,08 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).



**Figura 29** –  $\ln [k_{\text{obs}} h (k_B T)^{-1}]$  vs  $1/T$  para a reação do **PAIM** com **DEDNPP**, em pH 9.0, ( $r^2 = 0.999$ ;  $a = -16.8 \pm 0,25$ ;  $b = (-6.90 \pm 0,08) \times 10^3$ ;  $\Delta H^\ddagger = 13.7 \pm 0.08 \text{ kcal mol}^{-1}$ ;  $\Delta S^\ddagger = -33.4 \pm 0,25 \text{ cal (Kmol)}^{-1}$ ;  $\Delta G^\ddagger = 23.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).



Os parâmetros termodinâmicos calculados para a reação do **DEDNPP** com **PAIM** bem como na presença de imidazol livre podem ser observados na **Tabela 4**. O baixo valor de entalpia de ativação, a grande e negativa entropia de ativação são valores esperados para um ataque binuclear sobre o átomo de fósforo.<sup>86</sup> Esses dados também são consistentes com a catálise básica geral.<sup>5</sup>

**Tabela 4** – Parâmetros termodinâmicos da ativação calculados para as reações do **DEDNPP** na presença do **PAIM** bem como na presença de imidazol.

Parâmetros	PAIM	Imidazol livre <sup>a</sup>
$\Delta H^\ddagger$ , kcal mol <sup>-1</sup>	13.7 ± 0.08	9,90 ± 0,30
$\Delta S^\ddagger$ , cal (Kmol) <sup>-1</sup>	- 33.4 ± 0,25	-32,1 ± 1,5
$\Delta G^\ddagger$ , kcal mol <sup>-1</sup>	23,6	19,5

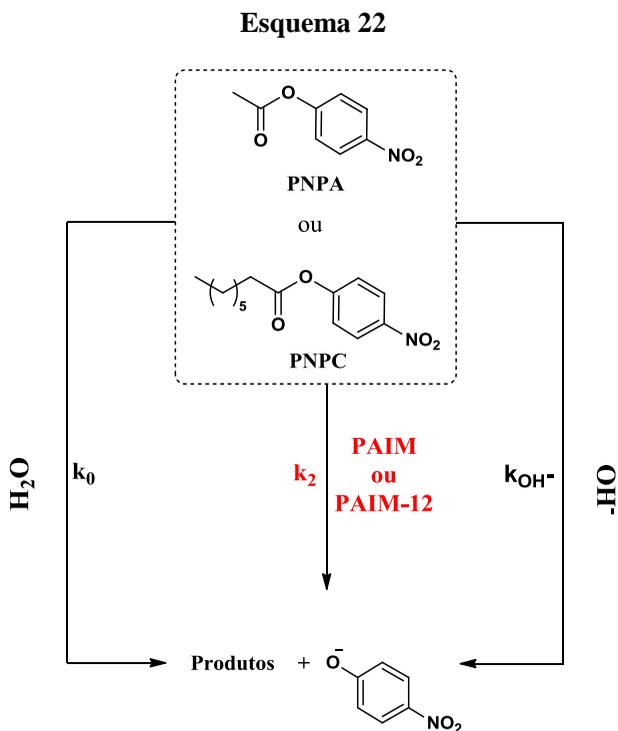
<sup>a</sup> Dados obtidos da referência 117 para imidazol livre (1mol dm<sup>-3</sup>; pH 8,5) . Parâmetros calculados com **PAIM** (1,6×10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup>; pH 9,0) pelas **Equações 5 e 7** a 25°C.

Embora não seja regra mas sim uma diretriz, valores de entropia de ativação próximos a zero é esperado para reações unimolecular, e valores próximo de -25 unidades de entropia (e.u.) são observados para reações bimoleculares.<sup>4</sup> Reações do tipo S<sub>N</sub>2, em solventes polares, apresentam baixos valores de entalpia de ativação, em consequência do desenvolvimento de cargas no estado de transição. O sistema então mais organizado pela solvatação, reflete à desfavoráveis entropias de ativação. O que permite a compensação da energia livre de Gibbs.<sup>92</sup>

A hidrólise espontânea do tris-2-piridil-fosfato (TPP)<sup>131</sup> apresenta parâmetros de ativação muito semelhantes aos obtidos para a reação catalisada do **DEDNPP** com o **PAIM**. A reação do TPP envolve a catálise básica geral intramolecular, assistida por uma molécula de água nucleofílica, que conduz a um arranjo preciso consistente com a grande e negativa entropia de ativação de -36,19 e.u.. O mecanismo proposto para o TPP é suportado pelo efeito isotópico sinético do solvente obtido de 3,15, bem superior ao obtido para o **DEDNPP** com o polímero de 1,59.

#### 4.2.2. Hidrólise de éster de carboxila – PNPA e PNPC

A hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila (**PNPA**) e caprilato de *p*-nitrofenila (**PNPC**), ésteres homólogos de moléculas bioorgânicas, foram investigadas na presença dos polímeros **PAIM** e **PAIM-12**. Os resultados são mostrados nas **Figuras 30-32** e são consistente com o **Esquema 22** e com as **Equações 11 e 12**.

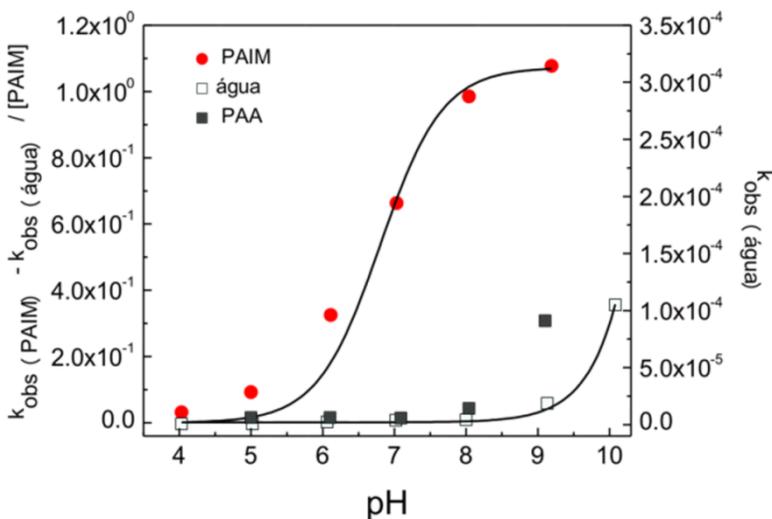


$$k_{\text{obs(PNPA)}} = k_0 + k_{\text{OH}} [\text{OH}^-] \quad (11)$$

$$k_{2\text{PAIM-PNPA}} = (k_{\text{obs(PAIM-PNPA)}} - k_{\text{obs(PNPA)}}) / [\text{PAIM}] \cdot \square_{\text{PAIM}} \quad (12)$$

As constantes de velocidade obtidas do tratamento dos dados experimentais (**Figura 30**) são dadas na **Tabela 5**. A constante de velocidade de segunda ordem ( $k_2 = 1,06 \pm 0,03$ ), com base na concentração do **PAIM** de  $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ , corresponde ao aprimoramento da velocidade da reação de desacilação de mais de 530.000 vezes, quando comparada com a hidrólise espontânea do **PNPA** e de quase 30.000.000 vezes comparada com a constante de velocidade de segunda ordem para a reação com a água ( $k_0/55,5$ ). Quando a reação ocorre na presença do imidazol livre ( $4 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $k_2 = 33 \times 10^{-2}$ )<sup>132</sup> o aprimoramento da velocidade é de 3,14 vezes menor do que a hidrólise na presença do **PAIM**.

**Figura 30** – Perfil de pH para a reação de degradação do **PNPA**: (●) **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), (□) hidrólise espontânea do substrato sob as mesmas condições (25°C, 20% MeCN), e (■) na presença do **PAA** ( $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) contendo apenas grupos carboxilatos.



A reação de hidrólise do **PNPA** na presença do polímero de partida, anteriormente a funcionalização (**PAA**), não apresentou atividade catalítica relevante como pode ser observado na **Figura 30**

com valores de  $k_{\text{obs}}$  próximos aos valores da hidrólise espontânea com máximo em pH 8, acima desse pH a hidrólise deve ser, em parte, atribuída aos íons hidróxido em solução (ver **anexo II Tabela b4**). Esses resultados permitem sugerir que o aprimoramento da velocidade da reação de hidrólise do **PNPA** é em grande parte atribuído aos grupos imidazois contidos na estrutura do **PAIM**.

**Tabela 5** – Parâmetros cinéticos obtidos dos ajustes das curvas  $k_{\text{obs}}$  vs pH obtidos experimentalmente das reações com: **PNPA** e **PNPC** em água na presença e na ausência do **PAIM**.

<b>Parâmetros Cinéticos</b>		
<b>Constantes</b>	<b>PNPA</b>	<b>PNPC</b>
$k_0, \text{s}^{-1}$	$1,99 \times 10^{-6 \text{a}}$	$(1,25 \pm 0,82) \times 10^{-6 \text{e}}$
$k_{\text{OH}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$0,91 \pm 0,10 \text{a}$	$0,66 \pm 0,06 \text{e}$
$k_2, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ [PAIM <sub>pol.</sub> ]	$1,06 \pm 0,03 \text{b}$	$(53,9 \pm 2,77) \times 10^{-2 \text{c, d}}$
$\text{p}K_{\text{a(IMZ)}}$	$6,70 \pm 0,04 \text{c}$	

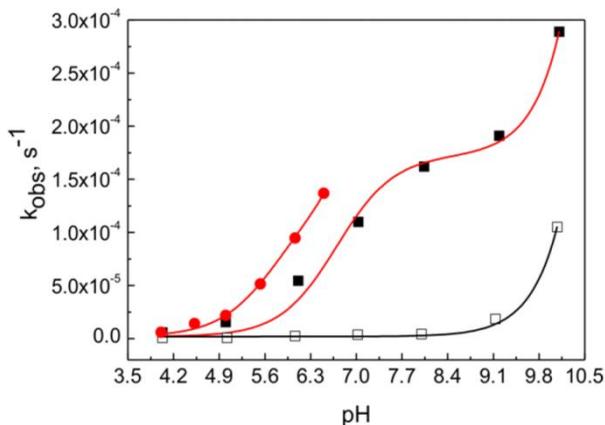
<sup>a</sup> Valores obtidos do ajuste da **Figura 31**. <sup>b</sup> Considerando [polímero] =  $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ; <sup>c</sup> Valor obtido por titulação potenciométrica a 25°C. <sup>d</sup> Ajuste obtidos com o dado de  $k_0, = (1,3 \pm 0,28) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . <sup>e</sup> Parâmetro obtido pelo ajuste da **Figura 32**. Os ajustes foram realizados utilizando as **Equações 11 e 12**.

O incremento na constante de velocidade do **PNPC** (**Tabela 5**) quando comparado com a hidrólise espontânea é de no máximo 270.000 vezes, e de quase 10.000.000 vezes comparada com a constante de velocidade de segunda ordem para a reação com a água. Os dados também mostram que o **PNPC** apresenta menor incremento em  $k_2$  frente ao **PNPA**, o que já era esperado. Estudos apontam para o efeito provocado pelo maior caráter hidrofóbico, o que leva à agregação molecular, e dificulta a aproximação do catalisador. Como exemplo, a constante  $k_2$  para a hidrólise básica do **PNPA** é 800 vezes maior, quando

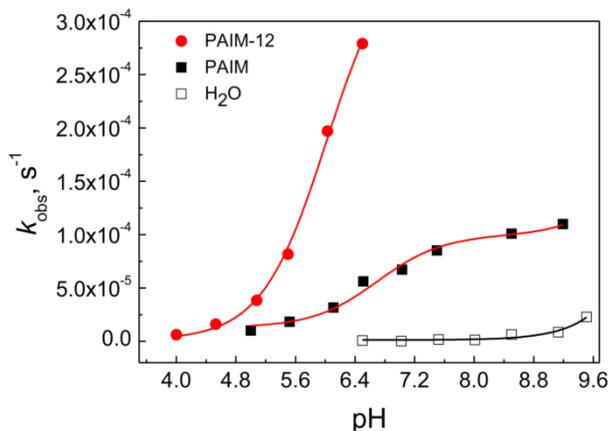
esta é comparada com o laurato de *p*-nitrofenila.<sup>133</sup> No entanto, quando a hidrofobicidade do polímero é aumentada o inverso é observado. Ou seja, o substrato mais hidrofóbico fica mais disponível para se aproximar do catalisador. Isso é observado nos estudos com o **PAIM-12**.

O substrato mais hidrofóbico **PNPC**, quando na presença do **PAIM-12**, tem sua constante de velocidade  $k_2$  de  $0,54 \pm 0,03 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  aumentada para  $2,32 \pm 0,08 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , com incremento de quase 2.000.000 vezes comparado com a hidrólise espontânea. A constante de velocidade de segunda ordem para a reação com a água chega a ser  $1 \times 10^8$  vezes menor. Já o substrato menos hidrofóbico **PNPA** ( $k_2$  de  $1,06 \pm 0,03 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), praticamente não teve  $k_2$  alterado na presença do polímero mais hidrofóbico ( $k_2 = 1,05 \pm 0,06 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $\text{p}K_{\text{a}(\text{exp.})} = 5,93 \pm 0,07$ ). O aumento na velocidade da reação com o aumento da hidrofobicidade dos ésteres de acila já foi observado frente a outros polieletrólitos sob a mesma explicativa.<sup>134</sup>

**Figura 31** – Perfil de pH para a reação de degradação do **PNPA** em água com: (●) **PAIM-12** ( $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ )<sup>a</sup>; (■) **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), e (□) a hidrólise espontânea do substrato. Todas as corridas foram realizadas em 20% de MeCN a 25°C. <sup>a</sup> Solubilidade limitada ao pH 6,5.

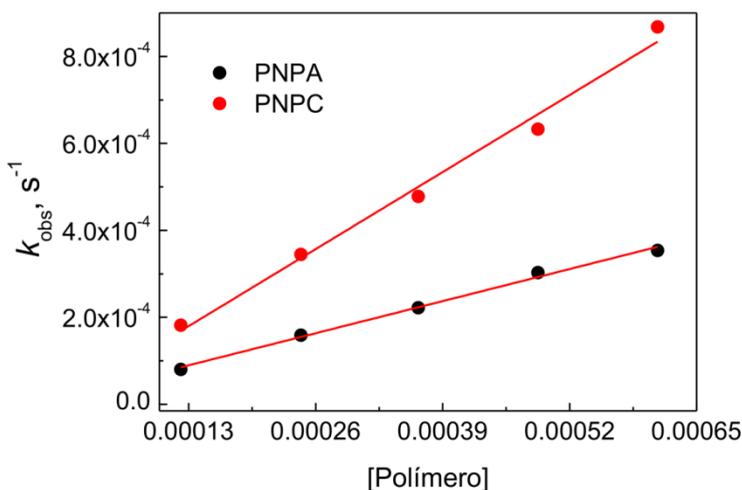


**Figura 32** – Perfil de pH para a reação de degradação do **PNPC** em água com: (●) **PAIM-12** ( $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ )<sup>a</sup>; (■) **PAIM** (monômero  $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), e (□) a hidrólise espontânea do substrato a 25°C. Todas as corridas foram realizadas em 20% de MeCN a 25°C. <sup>a</sup> Solubilidade limitada ao pH 6,5.



Embora a constante de velocidade de segunda ordem ( $k_2$ ) para a reação do **PNPA** com **PAIM-12** não diferencie da reação com **PAIM**, podem ser vistos na **Figura 30** o aumento nas  $k_{obs}$ . Esses resultados mostram que há um pequeno aumento na concentração do **PNPA** nos sítios catalíticos do **PAIM-12**. Quando a  $k_{obs}$  é apresentada em função de diferentes concentrações do **PAIM-12**, para ambos substratos (**PNPA** e **PNPC**), a diferença entre as constantes torna-se ainda mais evidentes (**Figura 33**).

**Figura 33** – Gráfico  $k_{obs}$  vs concentração do **PAIM-12** para a reação de degradação: (●) **PNPC**; (●) **PNPA**; Condição experimental: tampão BIS-TRIS (0.01 mol dm<sup>-3</sup>) pH 6.5 a 25°C e 20% de MeCN.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese foi atribuída aos estudos de: (i) funcionalização do ácido poliacrílico com 1-(3-aminopropil)-imidazol; (ii) caracterização do produto da funcionalização (**PAIM**); (iii) atividade catalítica promovida por este na hidrólise do dietil 2,4-dinitrofenil fosfato e dos ésteres acetato e octanoato derivados do 4-nitrofenol; e (iv) efeitos catalíticos exercidos quando a hidrofobicidade do **PAIM** é aumentada via alquilação com 1-bromododecano.

Os estudos de caracterização do polímero **PAIM** permite concluir que:

- (i) O polímero PAA, de peso molecular  $1.800 \text{ g mol}^{-1}$ , teve 47% dos grupos carboxilatos funcionalizados levando ao produto **PAIM** de peso molecular ponderal médio de  $3.071 \text{ g mol}^{-1}$  de baixa polidispersidade;
- (ii) Os valores de  $pK_{as}$  para os grupos carboxilatos e imidazóis estão de acordo com a literatura ( $pK_{a(\text{COO}^-)} = 4,85 \pm 0,13$ ;  $pK_{a(\text{IMZ})} = 6,70 \pm 0,04$ );
- (iii) A mobilidade eletroforética depende da estrutura do **PAIM** com ponto isoelétrico (PI) teórico em pH 5,41. Para  $\text{pH} < \text{PI}$  a carga é positiva, com os grupos carboxilatos e imidazóis protonados. Em valores de  $\text{pH} > \text{PI}$  o polímero é negativo com os carboxilatos na forma deprotonada e ao grupo imidazol neutro;
- (iv) A estrutura do **PAIM** é consistente com 13 grupos carboxilatos e 12 imidazóis com  $65\text{Å}$  de comprimento por  $19\text{Å}$  de altura; Quando esses dados são convertidos em massa molar teórica do **PAIM** o valor obtido é de  $3.051 \text{ g mol}^{-1}$  muito próximo do valor de  $3.071$  obtido por GFC;
- (v) Os dados dos estudos de tensão superficial para diferentes concentrações do **PAIM** mostram saturação na superfície em

$2,98 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , e pode ser dividida à formação de sistemas organizados.

Os estudos cinéticos para a reação de hidrólise do DEDNPP na presença do polímero PAIM mostram:

- (i) O aumento na velocidade da reação medido em termos da constante de velocidade de segunda ordem ( $k_2$ ) é de quase  $7 \times 10^5$  em relação à constante de velocidade de segunda ordem para a reação com a água. O incremento na velocidade da reação de hidrólise foi atribuído em grande parte aos grupos imidazóis do PAIM;
- (ii) A estensão da faixa catalítica para regiões mais baixas de pH;
- (iii) O mecanismo proposto para a reação indica dois caminhos: nucleofílico do tipo  $S_N2(P)$  e base-geral. Ambos atuam de forma simultânea e independente, como sugere o baixo valor do efeito cinético do solvente e os valores de entalpia e entropia de ativação.

Os estudos cinéticos para a hidrólise dos ésteres carboxílicos PNPA e PNPC na presença do PAIM mostram um aumento na constante de velocidade de segunda ordem de mais de  $5 \times 10^5$  e de  $2 \times 10^5$  vezes respectivamente, em relação à hidrólise espontânea dos mesmos.

Aumentando a hidrofobicidade do polímero (PAIM-12), o maior aumento na velocidade é obtido para o **PNPC**, com incremento na  $k_2$  de quase  $2 \times 10^6$  vezes comparada com a hidrólise espontânea, e de  $1 \times 10^8$  vezes quando comparada com a constante de velocidade de segunda ordem para a reação com a água. Na hidrólise do PNPA as constantes de velocidade observada ( $k_{\text{obs}}$ ), na presença de PAIM-12, são maiores do que na presença do PAIM. Isto pode ser devido ao aumento na concentração do substrato junto ao PAIM-12. O efeito catalítico com PAIM-12 também é observado na hidrólise do DEDNPP, onde o aumento é de  $1 \times 10^6$  vezes quando comparada com a constante de velocidade de segunda ordem para a reação com a água.

Os resultados apontam que os maiores efeitos catalíticos na presença do PAIM acontecem quando o substrato é incorporado no polímero. O PAIM e a sua forma mais hidrofóbica PAIM-12 mostraram-se como eficientes nanoreatores para as reações de hidrólise dos substratos DEDNPP, PNPA e PNPC, com acelerações entre 700 mil e 100 milhões de vezes.

## 6. REFERÊNCIAS

1. MENGER, F. M.; ELISEEV, A. V.; MIGULIN, V. A. Phosphatase Catalysis Developed Via Combinatorial Organic-Chemistry. **J. Org. Chem.**, v.60, pp 6666, 1995.
2. LIANG, C.; FRÉCHET, J. M. J. Applying key concepts from nature: transition state stabilization, pre-concentration and cooperativity effects in dendritic biomimetics. **Prog. Polym. Sci.**, v.30, pp 385, 2005.
3. ORTH, E. S.; BRANDÃO, T. A. S.; MILAGRE; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Intramolecular Acid–Base Catalysis of a Phosphate Diester: Modeling the Ribonuclease Mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, v.130, pp 2436, 2008.
4. ORTH, E. S.; BRANDÃO, T. A. S.; SOUZA, B. S.; PLIEGO, J. R.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.132, pp 8513, 2010.
5. ORTH, E. S.; WANDERLIND, E. H.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. **J. Org. Chem.**, v.76, pp 8003, 2011.
6. CLELAND, W. W.; HENGGE, A. C. Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. **Chem. Rev.**, v.106, pp 3252, 2006.
7. KHERSONSKY, O.; ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.10, pp 498, 2006.
8. RADZICKA, A.; WOLFENDEN, R. A Proficient Enzyme. **Science**, v.267, pp 90, 1995.

9. BRESLOW, R. Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes - Catalysis by Design. **Accounts Chem. Res.**, v.28, pp 146, 1995.
10. LIU, L.; ZHOU, W. J.; CHRUMA, J.; BRESLOW, R. Transamination reactions with multiple turnovers catalyzed by hydrophobic pyridoxamine cofactors in the presence of polyethylenimine polymers. **J. Am. Chem. Soc.**, v.126, pp 8136, 2004.
11. WHARTON, C. W. Synthetic polymers as models for enzyme catalysis-a review. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.1, pp 3, 1979.
12. MARCHETTI, L.; LEVINE, M. Biomimetic Catalysis. **Acc. Catal.**, v.1, pp 1090, 2011.
13. ZHOU, W. J.; LIU, L.; BRESLOW, R. Transamination by polymeric enzyme mimics. **Helv. Chim. Acta.**, v.86, pp 3560, 2003.
14. LIU, L.; ROZENMAN, M.; BRESLOW, R. Hydrophobic effects on rates and substrate selectivities in polymeric transaminase mimics. **J. Am. Chem. Soc.**, v.124, pp 12660, 2002.
15. KIEFER, H. C.; KLOTZ, I. M.; SCARPA, I. S.; CONGDON, W. I. Catalytic Accelerations of 1012-Fold by an Enzyme-Like Synthetic Polymer. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v.69, pp 2155, 1972.
16. TERASHIMA, T.; MES, T.; DE GREEF, T. F. A.; GILLISSEN, M. A. J.; BESENIUS, P.; PALMANS, A. R. A.; MEIJER, E. W. Single-Chain Folding of Polymers for Catalytic Systems in Water. **J. Am. Chem. Soc.**, v.133, pp 4742, 2011.
17. KLOTZ, I. M.; ROYER, G. P.; SCARPA, I. S. Synthetic Derivatives of Polyethyleneimine with Enzyme-Like Catalytic Activity (Synzymes). **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.68, pp 263, 1971.

18. RAINES, R. T. Ribonuclease A. **Chem. Rev.**, v.98, pp 1045, 1998.
19. STEEG, P. S.; PALMIERI, D.; OUATAS, T.; SALERNO, M. Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer. **Cancer lett.**, v.190, pp 1, 2003.
20. KIRBY, A. J.; MORA, J. R.; NOME, F. New light on phosphate transfer from triesters. **BBA - Proteins and Proteomics**, v.1834, pp 454, 2013.
21. FARIA, A. C.; MELLO, R. S.; ORTH, E. S.; NOME, F. Hydrolysis of benzoic anhydride mediated by ionenes and micelles. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, v.289, pp 106, 2008.
22. MOTHERWELL, W. B.; BINGHAM, M. J.; SIX, Y. Recent progress in the design and synthesis of artificial enzymes. **Tetrahedron**, v.57, pp 4663, 2001.
23. LIU, J. Q.; WULFF, G. Functional Mimicry of Carboxypeptidase A by a Combination of Transition State Stabilization and a Defined Orientation of Catalytic Moieties in Molecularly Imprinted Polymers. **J. Am. Chem. Soc.**, v.130, pp 8044, 2008.
24. BERLAMINO, A. T. N.; ORTH, E. S.; MELLO, R. S.; MEDEIROS, M.; NOME, F. Catalytic nanoreactors for ester hydrolysis. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, v.332, pp 7, 2010.
25. MELLO, R. S.; ORTH, E. S.; LOH, W.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Polymers Containing Hydroxamate Groups: Nanoreactors for Hydrolysis of Phosphoryl Esters. **Langmuir**, v.27, pp 15112, 2011.

26. SELVY, P. E.; LAVIERI, R. R.; LINDSLEY, C. W.; BROWN, H. A. Phospholipase D: Enzymology, Functionality, and Chemical Modulation. **Chem. Rev.**, v.111, pp 6064, 2011.
27. WOLFENDEN, R. Degrees of difficulty of water-consuming reactions in the absence of enzymes. **Chem. Rev.**, v.106, pp 3379, 2006.
28. PAUL D. BEER, P. A. G., AND DAVID K. SMITH. **Supramolecular Chemistry**. Oxford Chemistry Press. 1999. p.
29. CANNON, W. R.; SINGLETON, S. F.; BENKOVIC, S. J. A perspective on biological catalysis. **Nat. Struct. Biol.**, v.3, pp 821, 1996.
30. BRUICE, T. C. A View at the Millennium: the Efficiency of Enzymatic Catalysis. **Accounts Chem. Res.**, v.35, pp 139, 2002.
31. BRUICE, T. C.; LIGHTSTONE, F. C. Ground state and transition state contributions to the rates of intramolecular and enzymatic reactions. **Accounts Chem. Res.**, v.32, pp 127, 1999.
32. BRUICE, T. C.; BENKOVIC, S. J. Chemical basis for enzyme catalysis. **Biochemistry-U.S.**, v.39, pp 6267, 2000.
33. WOLFENDEN, R. Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions. **Accounts Chem. Res.**, v.5, pp 10, 1972.
34. WANG, X. J.; MINASOV, G.; SHOICHET, B. K. Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs. **J. Mol. Biol.**, v.320, pp 85, 2002.

35. NEWCOMB, R. D.; CAMPBELL, P. M.; OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, pp 7464, 1997.
36. WACKETT, L. P. Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment. **J. Biol. Chem.**, v.279, pp 41259, 2004.
37. OLGUIN, L. F.; ASKEW, S. E.; O'DONOGHUE, A. C.; HOLLFELDER, F. Efficient Catalytic Promiscuity in an Enzyme Superfamily: An Arylsulfatase Shows a Rate Acceleration of 10(13) for Phosphate Monoester Hydrolysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v.130, pp 16547, 2008.
38. JENSEN, R. A. Enzyme Recruitment in Evolution of New Function. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.30, pp 409, 1976.
39. O'BRIEN, P. J.; HERSCHLAG, D. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. **Chem. Biol.**, v.6, pp R91, 1999.
40. TOSCANO, M. D.; WOYCECHOWSKY, K. J.; HILVERT, D. Minimalist active-site redesign: Teaching old enzymes new tricks. **Angew. Chem. Int. Edit.**, v.46, pp 3212, 2007.
41. LYNCH, M. Genomics - Gene duplication and evolution. **Science**, v.297, pp 945, 2002.
42. AHARONI, A.; GAIDUKOV, L.; KHERSONSKY, O.; GOULD, S. M.; ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. The 'evolvability' of promiscuous protein functions. **Nat. Genet.**, v.37, pp 73, 2005.

43. ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. Shared Promiscuous Activities and Evolutionary Features in Various Members of the Amidohydrolase Superfamily†. **Biochemistry-Us**, v.44, pp 12728, 2005.
44. COPLEY, S. D. Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. **Nat. Chem. Biol.**, v.5, pp 560, 2009.
45. HEMMERT, A. C.; OTTO, T. C.; CHICA, R. A.; WIERDL, M.; EDWARDS, J. S.; LEWIS, S. L.; EDWARDS, C. C.; TSURKAN, L.; CADIEUX, C. L.; KASTEN, S. A.; CASHMAN, J. R.; MAYO, S. L.; POTTER, P. M.; CERASOLI, D. M.; REDINBO, M. R. Nerve Agent Hydrolysis Activity Designed into a Human Drug Metabolism Enzyme. **Plos One**, v.6, pp, 2011.
46. JANSSEN, D. B.; DINKLA, I. J. T.; POELARENDS, G. J.; TERPSTRA, P. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. **Environ. Microbiol.**, v.7, pp 1868, 2005.
47. KAZLAUSKAS, R. J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.9, pp 195, 2005.
48. HULT, K.; BERGLUND, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends in Biotechnology**, v.25, pp 231, 2007.
49. YAMADA, Y. M. A.; SARKAR, S. M.; UOZUMI, Y. Self-Assembled Poly(imidazole-palladium): Highly Active, Reusable Catalyst at Parts per Million to Parts per Billion Levels. **J. Am. Chem. Soc.**, v.134, pp 3190, 2012.
50. DODSON, G.; WLODAWER, A. Catalytic triads and their relatives. **Trends Biochem. Sci.**, v.23, pp 347, 1998.

51. BLOW, D. M. The tortuous story of Asp...His...Ser: Structural analysis of  $\alpha$ -chymotrypsin. **Trends Biochem. Sci.**, v.22, pp 405, 1997.
52. MOULT, J.; SUSSMAN, F.; JAMES, M. N. G. Electron-Density Calculations as an Extension of Protein-Structure Refinement - Streptomyces-Griseus Protease-a at 1.5 a Resolution. **J. Mol. Biol.**, v.182, pp 555, 1985.
53. HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chem. Rev.**, v.102, pp 4501, 2002.
54. MERCEY, G.; VERDELET, T.; RENO, J.; KLIACHYNA, M.; BAATI, R.; NACHON, F.; JEAN, L.; RENARD, P. Y. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. **Accounts Chem. Res.**, v.45, pp 756, 2012.
55. MAXWELL, D.; BRECHT, K.; KOPLOVITZ, I.; SWEENEY, R. Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds? **Arch. Toxicol.**, v.80, pp 756, 2006.
56. CUCHILLO, C. M.; NOGUES, M. V.; RAINES, R. T. Bovine Pancreatic Ribonuclease: Fifty Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism. **Biochemistry-U.S.**, v.50, pp 7835, 2011.
57. MESSMORE, J. M.; FUCHS, D. N.; RAINES, R. T. Ribonuclease A: Revealing Structure-Function Relationships with Semisynthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v.117, pp 8057, 1995.
58. THOMPSON, J. E.; RAINES, R. T. Value of General Acid-Base Catalysis to Ribonuclease-A. **J. Am. Chem. Soc.**, v.116, pp 5467, 1994.
59. WARREN, J. C. N. G. S. **Organic Chemistry**. New York: Oxford University Press. 2012. 1234 p.

60. FERSHT, A. R. **Structure and mechanism in Protein Science**. New York: Freeman. 1999. p.
61. RAINES, R. T. Ribonuclease A. **Chem. Rev.**, v.98, pp 1045, 1998.
62. WESTHEIMER, F. H. Why Nature Chose Phosphates. **Science**, v.235, pp 1173, 1987.
63. MACHADO, V. G.; NOME, F. Compostos fosfatados ricos em energia. **Quím. Nova**, v.22, pp 351, 1999.
64. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Quím. Nova**, v.26, pp 745, 2003.
65. KOMIYAMA, M.; SUMAOKA, J. Progress towards synthetic enzymes for phosphoester hydrolysis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.2, pp 751, 1998.
66. GUTHRIE, J. P. Hydration and dehydration of phosphoric acid derivatives: free energies of formation of the pentacoordinate intermediates for phosphate ester hydrolysis and of monomeric metaphosphate. **J. Am. Chem. Soc.**, v.99, pp 3991, 1977.
67. BENTLEY, R. The Mechanism of Hydrolysis of Acetyl Dihydrogen Phosphate. **J. Am. Chem. Soc.**, v.71, pp 2765, 1949.
68. FRIES, A. A. Chemical Warfare. **J. Ind. Eng. Chem**, v.12, pp 423, 1920.

69. KIM, K.; TSAY, O. G.; ATWOOD, D. A.; CHURCHILL, D. G. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. **Chem. Rev.**, v.111, pp 5345, 2011.
70. EDDLESTON, M.; DAWSON, A. H.; BUCKLEY, N. A. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning - Reply. **Lancet**, v.371, pp 2170, 2008.
71. PARRY, J. M.; JOHNSON, G.; QUICK, E.; PARRY, E. M. Investigations into the potential genotoxicity of chemicals in the low dose region as illustrated by the dyes Sudan1 and Para Red. **Toxicology**, v.240, pp 140, 2007.
72. BECKER, G.; KAWAN, A.; GUTZEIT, D.; WOREK, F.; SZINICZ, L. Direct reaction of oximes with crotylsarin, cyclosarin, or VX in vitro. **Arch. Toxicol.**, v.81, pp 415, 2007.
73. **Syria conflict: 'Chemical attacks kill hundreds:'**<<http://www.bbc.com/news/world-middle-east-23777201>>. Acesso em 21 agosto 2013.
74. MUNRO, N. B.; TALMAGE, S. S.; GRIFFIN, G. D.; WATERS, L. C.; WATSON, A. P.; KING, J. F.; HAUSCHILD, V. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. **Environ. Health. Persp.**, v.107, pp 933, 1999.
75. DANIEL, K. A.; KOPFF, L. A.; PATTERSON, E. V. Computational studies on the solvolysis of the chemical warfare agent VX. **J. Phys. Org. Chem.**, v.21, pp 321, 2008.
76. SAINT-ANDRE, G.; KLIACHYNA, M.; KODEPELLE, S.; LOUISE-LERICHE, L.; GILLON, E.; RENARD, P. Y.; NACHON, F.; BAATI, R.; WAGNER, A. Design, synthesis and evaluation of new alpha-nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents:

application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase. **Tetrahedron**, v.67, pp 6352, 2011.

77. COX, J. R.; RAMSAY, O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. **Chem. Rev.**, v.64, pp 317, 1964.

78. LUM, R. C.; GRABOWSKI, J. J. Trimethyl Phosphate - the Intrinsic Reactivity of Carbon Versus Phosphorus Sites with Anionic Nucleophiles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.114, pp 8619, 1992.

79. ALLEN, K. N.; DUNAWAY-MARIANO, D. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. **Trends Biochem. Sci.**, v.29, pp 495, 2004.

80. GUTHRIE, R. D.; JENCKS, W. P. Iupac Recommendations for the Representation of Reaction-Mechanisms. **Accounts Chem. Res.**, v.22, pp 343, 1989.

81. LOPEZ-CANUT, V.; ROCA, M.; BERTRAN, J.; MOLINER, V.; TUNON, I. Theoretical Study of Phosphodiester Hydrolysis in Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase. Environmental Effects on the Reaction Mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, v.132, pp 6955, 2010.

82. KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. The Reactivity of Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v.89, pp 415, 1967.

83. JENCKS, W. P. When is an intermediate not an intermediate? Enforced mechanisms of general acid-base, catalyzed, carbocation, carbanion, and ligand exchange reaction. **Accounts Chem. Res.**, v.13, pp 161, 1980.

84. KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; WANDERLIND, E. H.; AMER, A.;

WILLIAMS, N. H.; NOME, F. Activating Water: Important Effects of Non-leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **Chem-Eur. J.**, v.17, pp 14996, 2011.

85. GRZYSKA, P. K.; CZYRYCA, P. G.; PURCELL, J.; HENGGE, A. C. Transition state differences in hydrolysis reactions of alkyl versus aryl phosphate monoester monoanions. **J. Am. Chem. Soc.**, v.125, pp 13106, 2003.

86. BUNTON, C. A. Hydrolysis of Orthophosphate Esters. **Accounts Chem. Res.**, v.3, pp 257, 1970.

87. PURCELL, J.; HENGGE, A. C. The Thermodynamics of Phosphate versus Phosphorothioate Ester Hydrolysis. **J. Org. Chem.**, v.70, pp 8437, 2005.

88. MENGER, F. M. On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity. **Accounts Chem. Res.**, v.18, pp 128, 1985.

89. GESSER, J. C.; YUNES, S.; CLEMENTIN, R. M.; NOME, F. Reações intramoleculares como modelos não miméticos de catálise enzimática. **Quím. Nova**, v.20, pp 631, 1997.

90. FERSHT, A. R.; KIRBY, A. J. Hydrolysis of aspirin. Intramolecular general base catalysis of ester hydrolysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v.89, pp 4857, 1967.

91. KIRBY, A. J.; HOLLFELDER, F. **From Enzyme Models to Model Enzymes**. Cambridg, UK: Royal Society of Chemistry. 2009. p.

92. ANSLYN, E. V. D., DENNIS A. . **Modern Physical Organic Chemistry**.: University Science Books. 2006. p.

93. AULT, A. General acid and general base catalysis. **J. Chem. Educ.**, v.84, pp 38, 2007.
94. KIRBY, A. J.; DUTTA-ROY, N.; DA SILVA, D.; GOODMAN, J. M.; LIMA, M. F.; ROUSSEV, C. D.; NOME, F. Intramolecular General Acid Catalysis of Phosphate Transfer. Nucleophilic Attack by Oxyanions on the PO<sub>3</sub><sup>2-</sup> Group. **J. Am. Chem. Soc.**, v.127, pp 7033, 2005.
95. KIRBY, A. J.; TONDO, D. W.; MEDEIROS, M.; SOUZA, B. S.; PRIEBE, J. P.; LIMA, M. F.; NOME, F. Efficient Intramolecular General-Acid Catalysis of the Reactions of alpha-Effect Nucleophiles and Ammonia Oxide with a Phosphate Triester. **J. Am. Chem. Soc.**, v.131, pp 2023, 2009.
96. KIRBY, A. J.; LIMA, M. F.; DA SILVA, D.; ROUSSEV, C. D.; NOME, F. Efficient intramolecular general acid catalysis of nucleophilic attack on a phosphodiester. **J. Am. Chem. Soc.**, v.128, pp 16944, 2006.
97. ADMIRAAL, S. J.; HERSCHLAG, D. Catalysis of phosphoryl transfer from ATP by amine nucleophiles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.121, pp 5837, 1999.
98. KIRBY, A. J.; JENCKS, W. P. The Reactivity of Nucleophilic Reagents toward the p-Nitrophenyl Phosphate Dianion<sup>1</sup>. **J. Am. Chem. Soc.**, v.87, pp 3209, 1965.
99. LEE, H.; SON, S. H.; SHARMA, R.; WON, Y. Y. A Discussion of the pH-Dependent Protonation Behaviors of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA) and Poly(ethylenimine-ran-2-ethyl-2-oxazoline) (P(EI-r-EOz)). **J. Phys. Chem. B**, v.115, pp 844, 2011.

100. SUH, J. H.; CHO, Y. H.; LEE, K. J. Macrocyclic Metal-Complexes Built on Polyethylenimine. **J. Am. Chem. Soc.**, v.113, pp 4198, 1991.
101. LIU, L.; BRESLOW, R. A Potent Polymer/Pyridoxamine Enzyme Mimic. **J. Am. Chem. Soc.**, v.124, pp 4978, 2002.
102. MARTELL, A. E. Vitamin-B6 Catalyzed-Reactions of Alpha-Amino and Alpha-Keto Acids - Model Systems. **Accounts Chem. Res.**, v.22, pp 115, 1989.
103. SKOUTA, R.; WEI, S. J.; BRESLOW, R. High Rates and Substrate Selectivities in Water by Polyvinylimidazoles as Transaminase Enzyme Mimics with Hydrophobically Bound Pyridoxamine Derivatives as Coenzyme Mimics. **J. Am. Chem. Soc.**, v.131, pp 15604, 2009.
104. MITSCHER, L. A. D., APURBA. **Combinatorial Chemistry and Multiple Parallel Synthesis**. John Wiley e Sons, Inc. 2003. p.
105. MENGER, F. M.; DING, J.; BARRAGAN, V. Combinatorial catalysis of an elimination reaction. **J. Org. Chem.**, v.63, pp 7578, 1998.
106. MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of phosphate esters by hydroxyl-functionalized micellar and vesicular reagents. **J. Org. Chem.**, v.48, pp 588, 1983.
107. KURZER, F.; DOURAGHI-ZADEH, K. Advances in the Chemistry of Carbodiimides. **Chem. Rev.**, v.67, pp 107, 1967.
108. SOUZA, B. S.; LEOPOLDINO, E. C.; TONDO, D. W.; DUPONT, J.; NOME, F. Imidazolium-Based Zwitterionic Surfactant: A

New Amphiphilic Pd Nanoparticle Stabilizing Agent. **Langmuir**, v.28, pp 833, 2011.

109. STEPTO, R. F. T. Dispersity in polymer science (IUPAC Recommendation 2009) International union of Pure and Applied Chemistry, Polymer Division, Sub-Committee on Polymer Terminology. **Polym. Int.**, v.59, pp 23, 2010.

110. LUCAS, E. F. S., BLUMA G; MONTEIRO, ELISABETH E. C. **Caracterização de Polímeros Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais. 2001. p.

111. WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. **Anal. Chem.**, v.68, pp 1174, 1996.

112. MONTGOMERY, D. D.; ANSON, F. C. Time-resolved measurement of equilibrium surface tensions at the electrified mercury-aqueous sodium fluoride interphase by the method of Wilhelmy. **Langmuir**, v.7, pp 1000, 1991.

113. PALLAS, N. R.; HARRISON, Y. An automated drop shape apparatus and the surface tension of pure water. **Colloid Surface**, v.43, pp 169, 1990.

114. FIFE, T. H.; BRUCE, T. C. THE TEMPERATURE DEPENDENCE OF THE  $\Delta pD$  CORRECTION FOR THE USE OF THE GLASS ELECTRODE IN D<sub>2</sub>O. **J. Phys. Chem.**, v.65, pp 1079, 1961.

115. CAREY, F. A. S., RICHARD J. **Advanced Organic Chemistry Part B: Reactions and Synthesis**. New York: Springer. 2007. 1321 p.

116. NEVES, M. A. F. S.; DIAS, M. L.; COUTINHO, F. M. B. Copolímeros de estireno-divinilbenzeno para aplicação em cromatografia de exclusão por tamanho. **Polímeros**, v.7, pp 71, 1997.
117. IRVINE, G. B. High-performance size-exclusion chromatography of peptides. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.56, pp 233, 2003.
118. HERBELIN, A. L., WESTALL, J. C. FITEQL, VERSION 4.0 1999.
119. LAGUECIR, A.; ULRICH, S.; LABILLE, J.; FATIN-ROUGE, N.; STOLL, S.; BUFFLE, J. Size and pH effect on electrical and conformational behavior of poly(acrylic acid): Simulation and experiment. **Eur. Polym. J.**, v.42, pp 1135, 2006.
120. JEWELL, C. M.; LYNN, D. M. Multilayered polyelectrolyte assemblies as platforms for the delivery of DNA and other nucleic acid-based therapeutics. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.60, pp 979, 2008.
121. BECHLER, S. L.; LYNN, D. M. Characterization of Degradable Polyelectrolyte Multilayers Fabricated Using DNA and a Fluorescently-Labeled Poly( $\beta$ -amino ester): Shedding Light on the Role of the Cationic Polymer in Promoting Surface-Mediated Gene Delivery. **Biomacromolecules**, v.13, pp 542, 2012.
122. ASAYAMA, S.; NISHINOHARA, S.; KAWAKAMI, H. Zinc-Chelated Poly(1-vinylimidazole) and a Carbohydrate Ligand Polycation Form DNA Ternary Complexes for Gene Delivery. **Bioconjugate Chem.**, v.22, pp 1864, 2011.
123. ASAYAMA, S.; SUDO, M.; NAGAOKA, S.; KAWAKAMI, H. Carboxymethyl Poly(l-histidine) as a New pH-Sensitive Polypeptide To Enhance Polyplex Gene Delivery. **Mol. Pharm.**, v.5, pp 898, 2008.

124. FRISCH, M. J. T., G. W; SCHLEGEL, H. B; SCUSERIA, G. E; ROBB, M. A; CHEESEMAN, J. R; MONTGOMERY, J. A; VREVEN, JR. T; KUDIN, K. N; BURANT, J. C; MILLAM, J. M; IYENGAR, S. S; TOMASI, J; BARONE, V.; MENNUCCI, B; COSSI, M; SCALMANI, G; REGA, N; PETERSSON, G. A; NAKATSUJI, H; HADA, M; EHARA, M; TOYOTA, K; FUKUDA, R; HASEGAWA, J; ISHIDA, M; NAKAJIMA, T; HONDA, Y; KITAO, O; NAKAI, H; KLENE, M; LI, X; KNOX, J. E; HRATCHIAN, H. P; CROSS, J. B; BAKKEN, V; ADAMO, C; JARAMILLO, J; GOMPERTS, R; STRATMANN, R. E; YAZYEV, O; AUSTIN, A. J; CAMMI, R; POMELLI, C; OCHTERSKI, J. W; AYALA, P. Y; MOROKUMA, K; VOTH, G. A; SALVADOR, P; DANNENBERG, J. J; ZAKRZEWSKI, V. G; DAPPRICH, S; DANIELS, A. D; STRAIN, M. C; FARKAS, O; MALICK, D. K; RABUCK, A. D; RAGHAVACHARI, K; FORESMAN, J. B; ORTIZ, J. V; CUI, Q; BABOUL, A. G; CLIFFORD, S; CIOSLOWSKI, J; STEFANOV, B. B; LIU, G; LIASHENKO, A; PISKORZ, P; KOMAROMI, I; MARTIN, R. L; FOX, D. J; KEITH, T; AL-LAHAM, M. A; PENG, C. Y; NANAYAKKARA, A; CHALLACOMBE, M; GILL, P. M. W; JOHNSON, B; CHEN, W; WONG, M. W; GONZALEZ, C AND POPE, J. A; GAUSSIAN 03, REVISION E.01, INC., WALLINGFORD CT 2004.

125. YOSHIMURA, T.; KUSANO, T.; IWASE, H.; SHIBAYAMA, M.; OGAWA, T.; KURATA, H. Star-Shaped Trimeric Quaternary Ammonium Bromide Surfactants: Adsorption and Aggregation Properties. **Langmuir**, v.28, pp 9322, 2012.

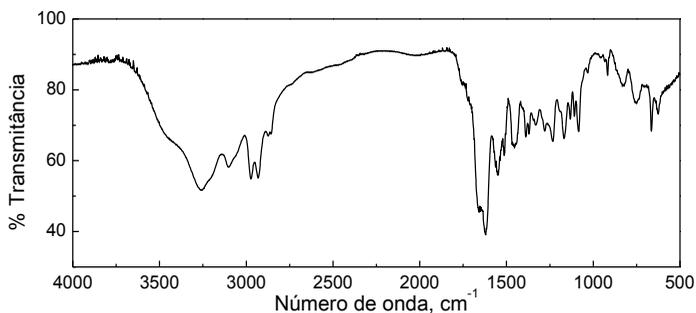
126. MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quím. Nova**, v.24, pp 87, 2001.

127. UM, I.-H.; LEE, E.-J.; BUNCEL, E. Solvent Effect on the  $\alpha$ -Effect for the Reactions of Aryl Acetates with Butane-2,3-dione Monoximate and p-Chlorophenoxide in MeCN-H<sub>2</sub>O Mixtures. **J. Org. Chem.**, v.66, pp 4859, 2001.

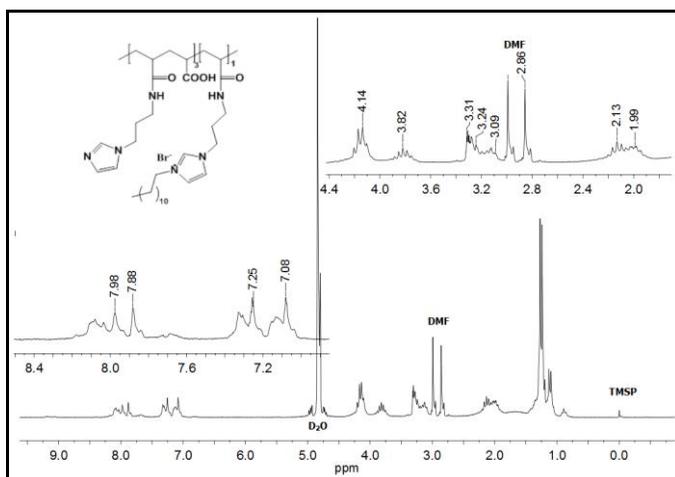
128. GHOSH, K. K.; SATNAMI, M. L.; SINHA, D.; VAIDYA, J. Solvent effects on the nucleophilic substitution reactions of p-nitrophenyl acetate with hydroxamate ions. **J. Mol. Liq.**, v.116, pp 55, 2005.
129. PARKER, A. J. Protic-dipolar aprotic solvent effects on rates of bimolecular reactions. **Chem. Rev.**, v.69, pp 1, 1969.
130. KIRBY, A. J.; LLOYD, G. J. Intramolecular general base catalysis in the hydrolysis of 3-dimethylaminopropionates. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, pp 1748, 1976.
131. KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; BRANDAO, T. A. S.; NOME, F. Activating Water: Efficient Intramolecular General Base Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Triester. **Chem-Eur. J.**, v.15, pp 8475, 2009.
132. BRUICE, T. C.; SCHMIR, G. L. Imidazole Catalysis. II. The Reaction of Substituted Imidazoles with Phenyl Acetates in Aqueous Solution. **J. Am. Chem. Soc.**, v.80, pp 148, 1958.
133. MENGER, F. M.; PORTNOY, C. E. The effect of urea and other reagents on the reactivity of associated p-nitrophenyl laurate. **J. Am. Chem. Soc.**, v.90, pp 1875, 1968.
134. OKUBO, T.; ISE, N. Alkaline hydrolyses of p-nitrophenyl esters in the presence of polyelectrolytes. **J. Org. Chem.**, v.38, pp 3120, 1973.

## 7. Anexo – 1

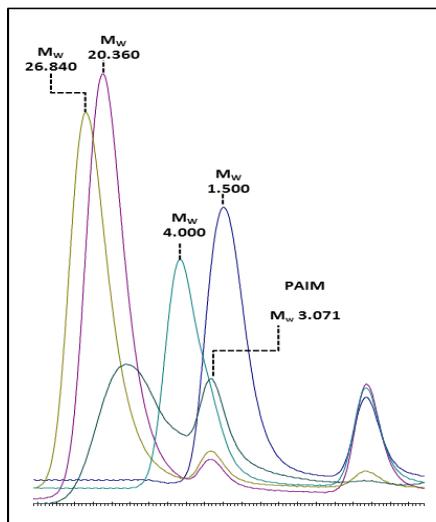
**Figura A1** – Espectros de IV (KBr,  $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): produto PAIM-12 após o final da reação com bandas em 3455 (O – H), 3300 (N – H), 3100 (harmônica de 1550), 1645 (C = O), 1558 (N – H), 1235 (C – O).



**Figura A2** – Espectro de  $^1\text{H}$  NMR obtido do PAIM-12 em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$  (ppm); 7.08, 1H; 7.25, 1H; 7.88, 1H; 4.14, 2H; 3.31 2H; 3.82 2H; 3.09 1H; 1.99 2H; 2.13 1H.



**Figura A3** – Cromatograma para padrões de PEG de diferentes pesos moleculares e do PAIM. Condições: tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pH 9,4; fluxo  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$  a  $35^\circ\text{C}$ ; coluna Varian PLaquagel –OH Mixed –H ( $8 \mu\text{m}$ ,  $300 \times 7,5 \text{ mm}$ ).



**Tabela A1** – Composição dos eletrólitos usados no cálculo da mobilidade do PAIM.

Composição do eletrólito <sup>a</sup>	pH
$\text{H}_3\text{PO}_4$ $5,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ and $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ $20,8 \text{ mmol dm}^{-3}$	2,85
HIBA $50,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ and TRIS $20,2 \text{ mmol dm}^{-3}$	3,75
HIBA $30,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ and TRIS $20,1 \text{ mmol dm}^{-3}$	4,22
MES $50,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ and TRIS $21 \text{ mmol dm}^{-3}$	5,89
MES $21 \text{ mmol dm}^{-3}$ and TRIS $24 \text{ mmol dm}^{-3}$	7,40

<sup>a</sup> HIBA = Ácido Isobutírico; TRIS = Tris(hidroximetil)aminometano; MES = Ácido 2-(N-Morfolino)etanossulfônico.

## 7.1. ANEXO – 2

**Tabela B1** – Constantes de velocidade observada em função do pH para a reação de hidrólise do **DEDNPP**: somente em água, na presença do **PAA** e na presença do **PAIM**.

<b>H<sub>2</sub>O</b>		<b>PAA</b>		<b>PAIM</b>	
<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>
-	-	-	-	4,0	7,67
-	-	4,5	7,90	4,5	7,92
-	-	5,1	7,78	5,0	8,85
-	-	5,5	7,87	5,5	10,4
6,0	6,90	6,1	7,01	6,0	10,8
-	-	6,5	7,11	6,5	14,0
7,0	6,10	7,0	7,05	7,0	15,8
-	-	7,5	7,44	7,5	19,7
8,0	7,40	8,3	8,58	8,0	22,4
8,5	8,97	-	-	8,5	25,7
8,9	13,5	9,1	12,0	9,0	29,1
9,5	23,5	-	-	9,5	39,5
9,7	31,3	-	-	-	-
10,0	47,9	-	-	-	-

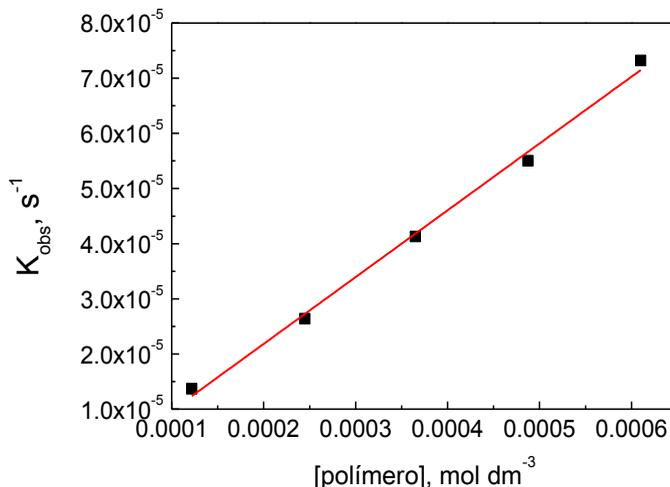
Condições experimentais: **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>); hidrólise espontânea do substrato,  $I = 1,0$  (KCl); **PAA** ( $8,2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>). Todos os dados foram realizados a 25°C em solução tamponada 0.01 mol dm<sup>-3</sup>.

**Tabela B2** – Constante de velocidade  $k_{obs}$  dependente da concentração do **PAIM**. Degradação alcalina do **DEDNPP**.

<b>DEDNPP</b>		
<b>10<sup>3</sup> [PAIM], mol dm<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>4</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>t<sub>1/2</sub>, min</b>
0,82	0,291	397
4,93	1,14	101
16,4	3,14	36,8
24,6	4,63	25,0
32,8	6,35	18,2

Condições reacionais: Tampão bicarbonato (0,01 mol dm<sup>-3</sup>), pH 9,00, 25°C.

**Figura B1** – Perfil de concentração  $k_{\text{obs}}$  vs concentração do **PAIM-12** para a reação de degradação do **DEDNPP**; Tampão BIS-TRIS (0.01 mol  $\text{dm}^{-3}$ ) pH 6.5 a 25°C e 20% de MeCN;  $r^2 = 0,995$ ;  $a = -2,4 \pm 1,76$ ;  $b = 0,121 \pm 0,004$ .



**Tabela B3** – Constante de velocidade  $k_{\text{obs}}$  dependente da concentração do **PAIM-12**. Degradação ácida do **DEDNPP**.

<b>DEDNPP</b>		
$10^3$ [PAIM-12], mol $\text{dm}^{-3}$	$10^4 k_{\text{obs}}$ , $\text{s}^{-1}$	$t_{1/2}$ , min
0,57	0,137	843
0,82	0,242	477
1,14	0,264	438
1,70	0,413	278
2,27	0,550	210
2,84	0,732	158

Condições reacionais: Tampão BIS-TRIS (0.01 mol  $\text{dm}^{-3}$ ) pH 6.5; 20% de MeCN a 25°C.

**Tabela B4** – Constantes de velocidade observada em função do pH para a reação de hidrólise do **PNPA**: somente em água e nas presenças: do **PAA**, do **PAIM** e do **PAIM-12**.

<b>H<sub>2</sub>O</b>		<b>PAA</b>		<b>PAIM</b>		<b>PAIM-12</b>	
<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>
4,0	0,78	-	-	4,0	5,88	4,0	5,95
-	-	-	-	-	-	4,5	14,2
5,0	0,78	5,0	6,22	5,0	15,6	5,0	22,0
-	-	-	-	-	-	5,5	51,6
6,1	2,52	6,1	6,24	6,1	54,6	6,1	94,7
-	-	-	-	-	-	6,5	137
7,0	3,87	7,1	5,89	7,0	110	-	-
8,0	4,34	8,0	14,2	8,0	162	-	-
9,1	18,6	9,1	91,0	9,2	191	-	-
-	-	-	-	9,5	39,5	-	-
10,1	105	-	-	10,1	289	-	-

Condições experimentais: **PAA** ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>); **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) e **PAIM-12** ( $1,7 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>), 20% de MeCN. Todos os dados foram realizados a 25°C em solução tamponada 0.01 mol dm<sup>-3</sup>.

**Tabela B5** – Constantes de velocidade observada em função do pH para a reação de hidrólise do **PNPC**: somente em água e nas presenças: do **PAIM** e do **PAIM-12**.

<b>H<sub>2</sub>O</b>		<b>PAIM</b>		<b>PAIM-12</b>	
<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>pH</b>	<b>10<sup>6</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>
-	-	-	-	4,0	6,18
-	-	-	-	4,5	16,2
-	-	5,0	10,1	5,0	38,4
-	-	5,5	18,3	5,5	81,6
-	-	6,1	61,6	6,0	197
6,5	0,70	6,5	56,2	6,5	279
7,0	0,30	7,0	67,3	-	-
7,5	1,78	7,5	85,2	-	-
8,0	1,33	-	-	-	-
8,5	6,36	8,5	101	-	-
9,1	8,63	9,2	110	-	-
9,5	22,9	-	-	-	-

Condições experimentais: **PAIM** ( $1,6 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) e **PAIM-12** ( $1,7 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>), 20% de MeCN. Todos os dados foram realizados a 25°C em solução tamponada 0.01 mol dm<sup>-3</sup>.

**Tabela B6** – Constante de velocidade k<sub>obs</sub> dependente da concentração do **PAIM-12**. Degradação ácida do **PNPA** e **PNPC**.

<b>Concentração</b> <b>10<sup>4</sup> [mol dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>PNPA</b>		<b>PNPC</b>	
	<b>10<sup>4</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>t<sub>1/2</sub>, min</b>	<b>10<sup>4</sup> k<sub>obs</sub>, s<sup>-1</sup></b>	<b>t<sub>1/2</sub>, min</b>
1,22	0,802	144	1,82	63,5
2,45	1,59	72,7	3,45	33,5
3,65	2,22	52,0	4,78	24,2
4,88	3,03	38,1	6,33	18,3
6,10	3,54	32,6	8,68	13,3

Condições reacionais: Tampão BIS-TRIS (0.01 mol dm<sup>-3</sup>) pH 6.5; 20% de MeCN a 25°C.

## 7.2. ANEXO – 3

**Figura c1** – Imagem cópia do cabeçalho do artigo referente a esta tese intitulado “Polymers containing imidazole groups as nanoreactors for hydrolysis of esters”, aceito em 16 de novembro de 2013 no Journal of Physical Organic Chemistry; DOI: 10.1002/poc.3263.

### Research Article

Journal of Physical  
Organic Chemistry

Received: 12 November 2013,

Accepted: 16 November 2013,

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/poc.3263

# Polymers containing imidazole groups as nanoreactors for hydrolysis of esters

Luciano A. Giusti<sup>a</sup>, Michelle Medeiros<sup>a</sup>, Natasha Londero Ferreira<sup>a</sup>,  
José R. Mora<sup>a</sup> and Haidi D. Fiedler<sup>a\*</sup>

A polymer (PAIM) containing the functional groups imidazole and carboxylic acid acts as a nanoreactor to accelerate deacylation and dephosphorylation reactions. The synthesis was designed to position the two functional groups next to each other, allowing cooperativity. The catalytic efficiency of the polymer was evaluated for the hydrolytic cleavage of *p*-nitrophenyl acetate (PNPA) and diethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (DEDNPP). PAIM was both efficient and promiscuous, increasing the rates of all reactions up to 10<sup>7</sup>-fold. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** carboxylate esters; catalysis; hydrolysis; phosphate esters; polymers