

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***HIDRÓLISE INTRAMOLECULAR DE AMIDAS COMO
MODELO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA***

Mestrando: FABIANA MORTIMER AMARAL

Professor Orientador: JOSÉ CARLOS GESSER

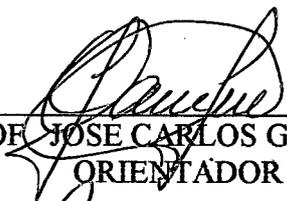
FLORIANÓPOLIS - SC

Janeiro - 1999

HIDRÓLISE INTRAMOLECULAR DE AMIDAS COMO MODELO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA

Fabiana Mortimer Amaral

ESTA TESE FOI JULGADA E APROVADA NA SUA FORMA
FINAL PELO ORIENTADOR E PELOS MEMBROS DA
BANCA EXAMINADORA



PROF. JOSÉ CARLOS GESSER, Dr.
ORIENTADOR



PROF. VALDIR SOLDI, Dr.
COORDENADOR

BANCA EXAMINADORA:



PROF. JOSÉ CARLOS GESSER, Dr.



PROF. FARUK JOSÉ NOME AGUILERA, Dr.



PROF^ª. SÔNIA MARIA HICKEL PROBST, Dr.^ª.

*Aos meus pais, Cleomir e
Suely meu irmão Gustavo e
ao meu namorado, Gean pelo
apoio e estímulo.*

AGRADECIMENTOS

- Ao professor José Carlos Gesser pela amizade e ensinamentos na orientação.
- Aos professores Faruk Nome, Dino Zanette e Miguel Caro pela cooperação no desenvolvimento deste trabalho.
- Aos demais professores do departamento de química que contribuíram para a minha formação.
- Aos companheiros de trabalho dos laboratórios QMC 303 e 305: Rose, Ângelo, Sandro, Cláudio, Alex, Elisane, Josiel, Dilma, Vera, Jaime, Santiago, Gean, Evandro, Adriano, Sônia e Renata pelo companheirismo.
- Aos colegas de curso pela amizade.
- Aos funcionários do departamento de química pela prestatividade.
- À banca examinadora.
- Aos amigos Olivar, Regina, Christian, Willian e Fabrício pela ajuda e estímulo.
- A Deus.

ÍNDICE GERAL

I - INTRODUÇÃO

| | |
|---|-----------|
| I.1 - Enzimas - Catalisadores Biológicos | 01 |
| I.1.2 - Estrutura | 02 |
| I.2 - Catálise Enzimática | 08 |
| I.2.1 - Reações Catalisadas por Enzimas | 10 |
| I.3 - Aplicações Industriais | 15 |
| I.3.1 - Indústria Agro-Alimentícia | 16 |
| I.3.2- Tratamento de Dejetos Industriais | 18 |
| I.3.3 - Novas Aplicações Industriais | 18 |
| I.4 - Reações Intramoleculares como Modelos de Catálise Enzimática | 19 |
| I.4.1 Diercionamento de Orbitais | 20 |
| I.4.2 - Controle Estéreo-Populacional | 26 |
| I.4.3 - Teoria Espaço-Temporal | 30 |
| I.5 - Objetivos | 36 |
| I.5.1 - Objetivo Geral | 36 |
| I.5.2 - Objetivos Específicos | 36 |

II -PARTE EXPERIMENTAL

| | |
|-------------------------|-----------|
| II.1- Materiais | 38 |
| II.1.1 - Reagentes | 38 |
| II.1.2 - Instrumentação | 39 |
| II.2-Métodos | 40 |

| | |
|---|-----------|
| II. 2.1 - Síntese da amida derivada do anidrido | |
| 4-cloro-1,8-naftálico com a dipropilamina | 40 |
| II.2.2 - Síntese da amida derivada do anidrido | |
| 4-bromo-1,8-naftálico com a dipropilamina | 41 |
| II.2.3 - Síntese da amida derivada do anidrido | |
| 4-nitro-1,8-naftálico com a dipropilamina | 42 |
| II.2.4 - Síntese de amida derivada do anidrido | |
| 4-amino-1,8-naftálico com a dipropilamina | 43 |
| II.3 - Estudos Cinéticos | 44 |

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

| | |
|---|-----------|
| III.1 - Caracterização dos Produtos de Reação | 45 |
| III.1.1 - Caracterização da amida derivada do anidrido | |
| 4-cloro-1,8-naftálico com a dipropilamina | 45 |
| III.1.2 - Caracterização da amida derivada do anidrido | |
| 4-bromo-1,8-naftálico com a dipropilamina | 54 |
| III.1.3 - Caracterização da amida derivada do anidrido | |
| 4-nitro-1,8-naftálico com a dipropilamina | 60 |
| III.1.4 - Amida derivada do anidrido-4-amino-1,8-naftálico | |
| com a dipropilamina | 65 |
| III.2 - Estudos Cinéticos | 66 |
| III.2.1-Reações de hidrólise intramolecular das amidas derivada | |
| do anidrido 1,8-naftálico substituído na posição 4 | 66 |

CONCLUSÕES - IV

| | |
|------------------------|-----------|
| IV - Conclusões | 77 |
|------------------------|-----------|

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - V

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| V - Referências Bibliográficas | 78 |
|---------------------------------------|-----------|

ANEXOS - VI**I- Espectro de irradiação de próton da amida derivada do anidrido**

| | |
|------------------------------|-----------|
| 4-cloro-1,8-naftálico | 85 |
|------------------------------|-----------|

II- Estruturas canônicas para o anidrido

| | |
|------------------------------|-----------|
| 4-nitro-1,8-naftálico | 94 |
|------------------------------|-----------|

III- Estruturas canônicas para o anidrido

| | |
|------------------------------|-----------|
| 4-amino-1,8-naftálico | 95 |
|------------------------------|-----------|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| <i>Figura 01: Modelos de proteína globular.</i> | 02 |
| <i>Figura 02: Peptídeo e localização das ligações peptídicas.</i> | 03 |
| <i>Figura 03: Seqüência de aminoácidos, estrutura primária.</i> | 03 |
| <i>Figura 04: Ângulo que determina a conformação da cadeia polipeptídica.</i> | 04 |
| <i>Figura 05: Estrutura terciária da α-lactoglobulina determinada por RMN.</i> | 05 |
| <i>Figura 06: Desnaturação proteica .</i> | 06 |
| <i>Figura 07: Estrutura da hemoglobina.</i> | 07 |
| <i>Figura 08: (a) Energia livre de reação, (b) Reação na presença de catalisador.</i> | 08 |
| <i>Figura 09: Sítio ativo da lizozimas.</i> | 10 |
| <i>Figura 10: Representação estrutural da quimotripsina.</i> | 13 |
| <i>Figura 11: Especificidade de enzimas proteolíticas: tripsina quimotripsina e carboxipeptidase.</i> | 14 |
| <i>Figura 12: Alteração no direcionamento de orbitais quando OH(A) e substituídos por SH(B)</i> | 23 |
| <i>Figura 13: Representação de um grupo de simetria esférica.</i> | 22 |
| <i>Figura 14: Espectro de U.V-Visível do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico .</i> | 45 |
| <i>Figura 15: Espectro de U.V-Visível da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico.</i> | 46 |
| <i>Figura 16: Espectro de infravermelho da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico em pastilha de KBr.</i> | 48 |
| <i>Figura 17: Espectro de RMN - ^1H da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico em CDCl_3.</i> | 49 |
| <i>Figura 18: Espectro de Cosy 45 da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico em CDCl_3.</i> | 50 |
| <i>Figura 19: Espectro de NOE da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico.</i> | 51 |
| <i>Figura 20: Espectro de RMN - ^{13}C da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico em CDCl_3.</i> | 52 |

| | |
|---|----|
| <i>Figura 21: Espectro de massa da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-cloro-1,8-naftálico | 53 |
| <i>Figura 22: Espectro de U.V-Visível do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico.</i> | 56 |
| <i>Figura 23: Espectro de U.V-Visível da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-bromo-1,8-naftálico. | 56 |
| <i>Figura 24: Espectro de infravermelho da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-bromo-1,8-naftálico em pastilha de KBr | 57 |
| <i>Figura 25: Espectro de RMN - ¹H da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-bromo-1,8-naftálico em CDCl ₃ | 58 |
| <i>Figura 26: Espectro de RMN - ¹³C da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-bromo-1,8-naftálico em CDCl ₃ | 59 |
| <i>Figura 27: Espectro de U.V-Visível da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-nitro-1,8-naftálico | 61 |
| <i>Figura 28: Espectro de infravermelho da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-nitro-1,8-naftálico em pastilha de KBr. | 62 |
| <i>Figura 29: Espectro de RMN - ¹H da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-nitro-1,8-naftálico em CDCl ₃ 4-cloro-1,8-naftálico | 63 |
| <i>Figura 30: Espectro de RMN - ¹³C da amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-nitro-1,8-naftálico em CDCl ₃ | 64 |
| <i>Figura 31: Cinética da reação de hidrólise da amida derivada do</i> | |
| anidrido 4-cloro-1,8-naftálico | 67 |
| <i>Figura 32: Valores de k_{obs} em função do pH para a reação de hidrólise do anidrido</i> | |
| 4-cloro-1,8-naftálico | 67 |
| <i>Figura 33: Valores de k_{obs} em função do pH para a reação de hidrólise do anidrido</i> | |
| 4-bromo-1,8-naftálico | 68 |
| <i>Figura 34: Perfil de velocidade vs. pH para a amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-cloro-1,8-naftálico | 69 |
| <i>Figura 35: Perfil de velocidade vs. pH para a amida derivada do anidrido</i> | |
| 4-cloro-1,8-naftálico | 70 |
| <i>Figura 36: Perfil de velocidade para amida derivada dos anidridos</i> | |
| 1,8-naftálico substituídos na posição 4 (cloro, bromo e hidrogênio) | 71 |

Figura 37: Valores graficados de σ vs. $-\log k_{obs}$, das amidas derivadas dos anidridos 1,8-naftálicos substituídos nos pHs -1,5 e 3,5 _____ 74

Figura 38: Efeito do substituinte na constante de dissociação do ácido benzóico, do ácido naftálico e na reação de hidrólise do naftalato de etila _____ 76

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----------|
| <i>Tabela 01: Comparação entre a velocidade de reações enzimáticas e a velocidade de reações intermoleculares.</i> | 11 |
| <i>Tabela 02: Enzimas usadas na indústria alimentícia.</i> | 16 |
| <i>Tabela 03: Efeito do componente orientacional sobre a velocidade de lactonização de ácidos χ-hidróxicarboxílicos.</i> | 21 |
| <i>Tabela 04: Efeito do componente orientacional sobre a velocidade de lactonização de ácidos χ-sulfidrilcarboxílicos.</i> | 22 |
| <i>Tabela 05: Efeito da estrutura sobre a velocidade de lactonização de hidroxiácidos catalisada por ácido a 25°C .</i> | 25 |
| <i>Tabela 06: Efeito da substituição de hidrogênio por metila sobre a velocidade relativa de ciclização de XII, XIII e XIV. quimotripsina e carboxipeptidase.</i> | 27 15 |
| <i>Tabela 07: Constantes físicas e espectroscópicas do produto da reação anidrido 4-cloro-1,8-naftálico.</i> | 41 |
| <i>Tabela 08: Constantes físicas e espectroscópicas do produto da reação anidrido 4-bromo-1,8-naftálico.</i> | 42 |
| <i>Tabela 09: Costantes físicas e espectroscópicas do produto da reação anidrido 4-nitro-1,8-naftálico.</i> | 43 |

RESUMO

O poder catalítico que as enzimas apresentam, tem chamado a atenção dos cientistas, no sentido de buscar explicações mecanísticas para a ação enzimática⁵. Devido a grande complexidade estrutural destas biomoléculas, surge a necessidade de criar modelos mais simples, para que através destes possamos compreender os fatores responsáveis pelo poder catalítico destas macromoléculas.

Neste trabalho, monoamidas derivadas dos anidridos 1,8-naftálicos substituídos na posição 4 foram sintetizadas e caracterizadas, posteriormente estudou-se hidrólises intramolecular destas monoamidas como modelo de catálise enzimática e o efeito do grupo substituinte na velocidade das reações.

Os estudos cinéticos propõem que as reações de hidrólise das amidas ocorrem intramolecularmente com a participação do grupamento carboxílico na sua forma não dissociada. O efeito do substituinte 4-cloro e 4-bromo nas reações de hidrólise das amidas, parece não causar grandes mudanças na velocidade de reação e no mecanismo reacional proposto quando comparados a respectiva amida não substituída.

Verificou-se que os derivados 4-nitro e 4-amino do anidrido naftálico 1,8 naftálico, causam mudanças extremas na reatividade e na estabilidade destes sistemas, resultando em dificuldades na síntese e caracterização, ou ainda nos estudos cinéticos de reações.

I- INTRODUÇÃO

I.1- ENZIMAS - CATALISADORES BIOLÓGICOS

As células podem ser consideradas indústrias químicas. São capazes de realizar rapidamente, eficientemente e indefinidamente um grande número de reações complexas e específicas. Podem regular e utilizar uma quantidade considerável de energia para realização dos processos metabólicos¹.

As enzimas são produzidas pelas células vivas com uma função muito específica de catalisar reações bioquímicas². Normalmente, altas temperaturas e pressões são requeridas para que uma catálise inorgânica seja efetiva, no entanto, as reações de catálise nas células ocorrem na temperatura corporal e no pH dos fluidos corporais.

A compreensão dos fatores responsáveis pela grande eficiência catalítica das enzimas é dificultada pela complexidade estrutural desta macromoléculas.

I.1.2- ESTRUTURA

Existem três tipos de biopolímeros essenciais aos processos vitais das células, os polissacarídeos, os ácidos nucleicos e as proteínas.

Com exceção de alguns ácidos ribonucleicos (RNAs) que catalisam a sua própria formação, todas enzimas são proteínas globulares, solúveis em água e apresentam uma estrutura complexa e compacta (Figura 01)².

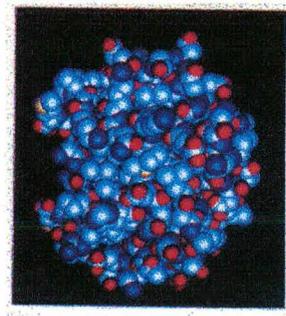
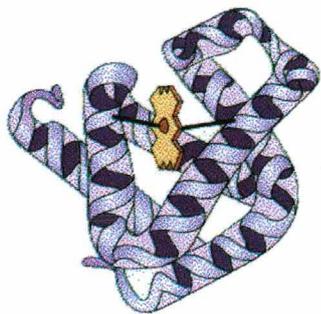


Figura 01: Modelos de proteína globular.

As proteínas são polímeros formados por unidades de aminoácidos unidos covalentemente por ligações chamadas de peptídicas (Figura 02); na verdade polipeptídeos, moléculas bastante complexas.

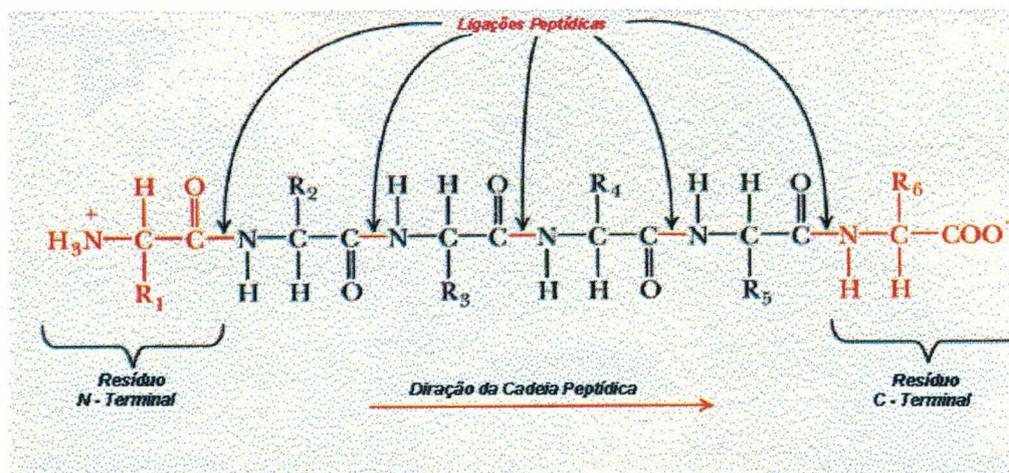


Figura 02: Peptídeo e a localização das ligações peptídicas.

Os polipeptídeos naturais são capazes de executar suas funções biológicas graças à seqüência especificamente ordenada dos amino-ácidos (Figura 03), e a um arranjo tridimensional bem determinado².

A primeira etapa do estudo de uma proteína é a determinação da seqüência de amino-ácidos, a chamada estrutura primária.

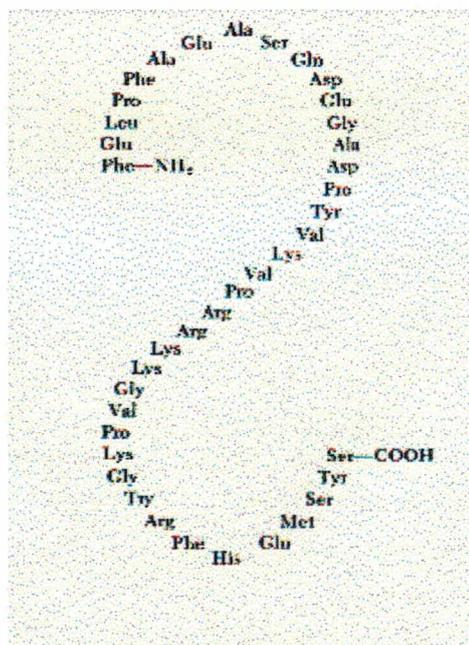


Figura 03: Seqüência de aminoácidos, estrutura primária.

O arranjo, no espaço, dos átomos da cadeia peptídica determina a estrutura secundária da proteína. Deve-se ressaltar que a ligação carbono-nitrogenio do grupo amida tem 40% de caráter de ligação dupla em consequência da ressonância¹. Isto dificulta a livre rotação da ligação carbono-nitrogênio. As rotações entre o grupo amino e o carbono α e entre o carbono α e o carbono da carboníla são livres, permitindo a existência de muitas conformações para a mesma proteína (Figura 04).

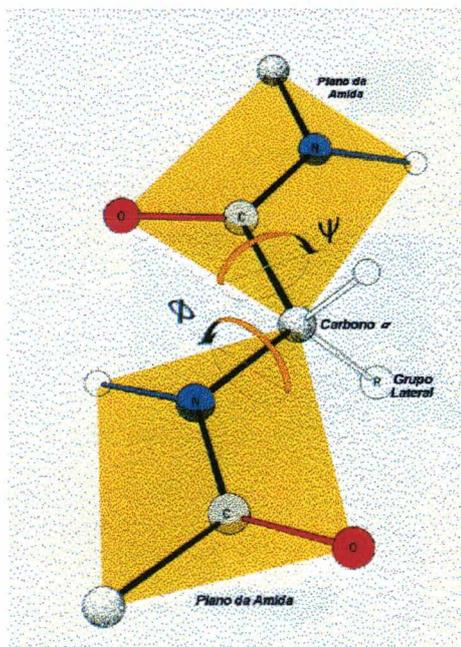


Figura 04: Ângulos que determinam a conformação da cadeia polipeptídica

Com o aparecimento de técnicas mais sofisticadas como cristalografia de Raio-X e RMN 2D, novas informações estruturais, de relações mais complexas, puderam ser observados. Estas incluem o arranjo tridimensional de todos os átomos da molécula, as relações espaciais de

aminoácidos próximos, bem como a conformação da cadeia lateral e a posição dos grupos prostéticos, definidos pela estrutura terciária (Figura 05).

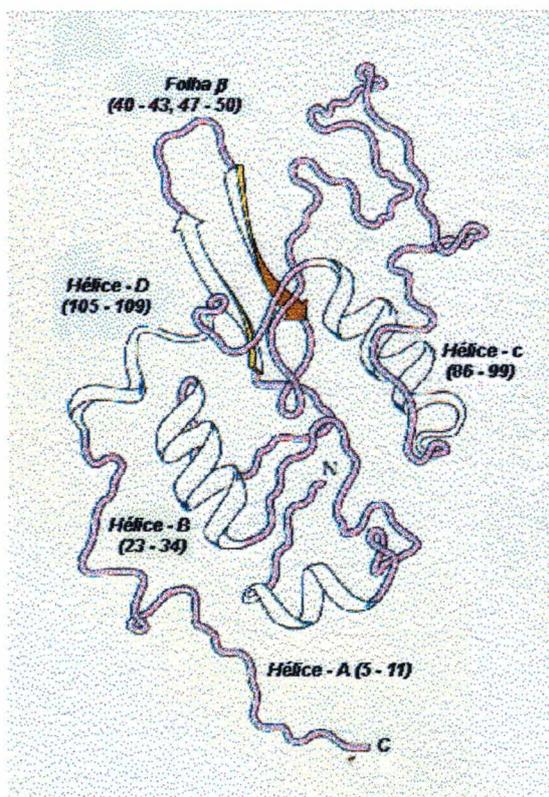


Figura 05: Estrutura terciária da α -lactoglobulina determinada por RMN

Uma mesma proteína pode ter várias conformações tridimensionais mas apenas uma tem atividade biológica, o que justifica a fácil perda desta atividade ocasionada por fatores externos como variação de pH e temperatura, este processo é chamado de desnaturação (Figura 06).

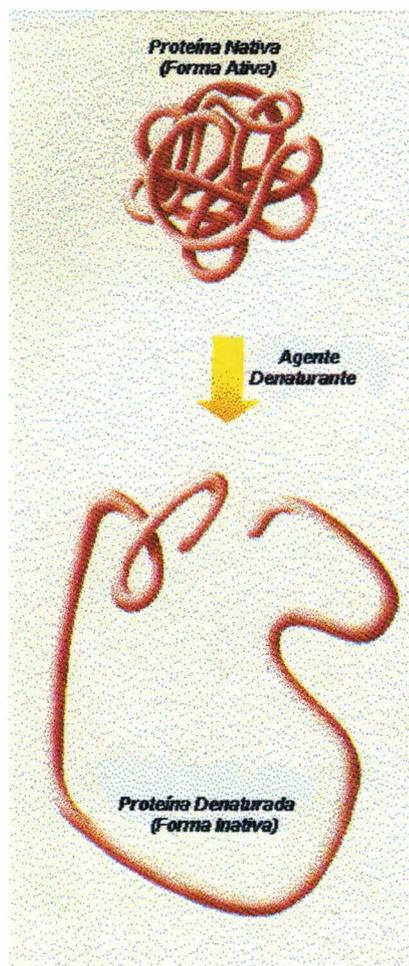


Figura 06 : Desnaturação proteica.

A estrutura quaternária é uma propriedade das proteínas formadas por mais de uma cadeia de polipeptídeos, que interagem uma com as outras não covalentemente. Uma mesma proteína pode apresentar mais de doze cadeias polipeptídicas e estas podem ser iguais ou diferentes. A hemoglobina, por exemplo (Figura 07), apresenta quatro cadeias polipeptídicas².

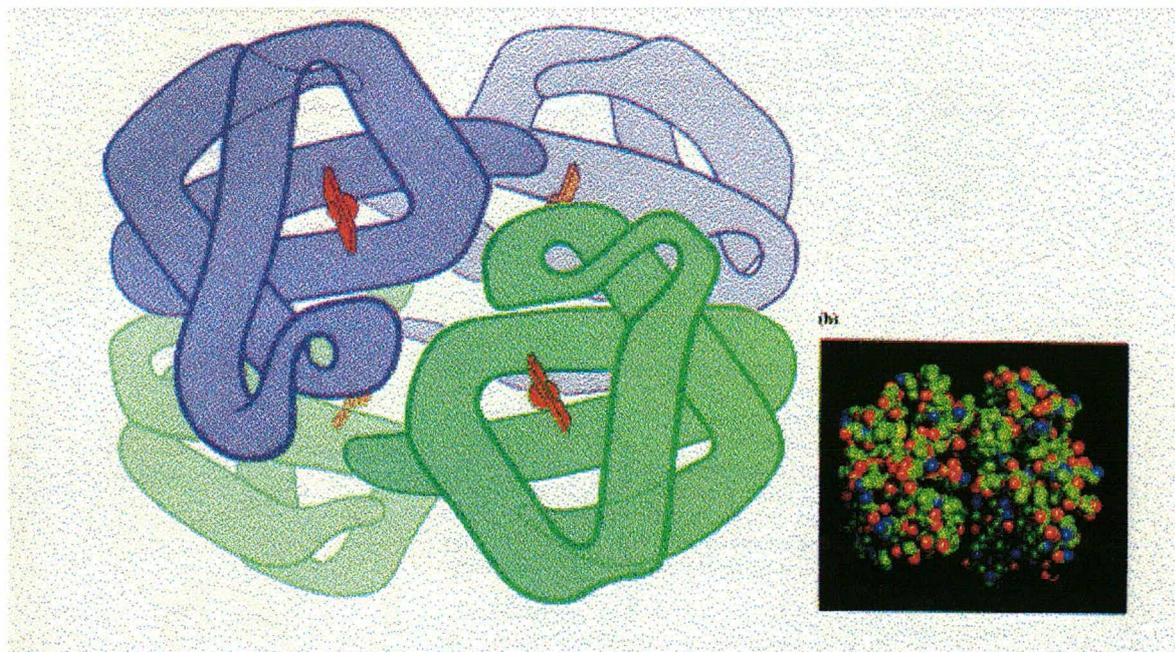


Figura 07: Estrutura de hemoglobina

Tendo em vista os vários fatores que determinam a estrutura das proteínas, pode-se agora entender melhor a correlação entre a estrutura e a capacidade das enzimas de catalisar, com especificidade extraordinária, certas reações químicas.

I.2.- CATÁLISE ENZIMÁTICA

A alta eficiência das enzimas em catalisar reações químicas, se deve ao fato desta biomoléculas diminuírem a energia do estado de transição ΔG^\ddagger ou seja, a energia de ativação necessária para que se inicie a reação. A diferença entre a energia dos reagentes e dos produtos é definida como energia livre padrão, ΔG° . A relação entre ΔG^\ddagger e ΔG° , é mostrado graficamente na figura 08.

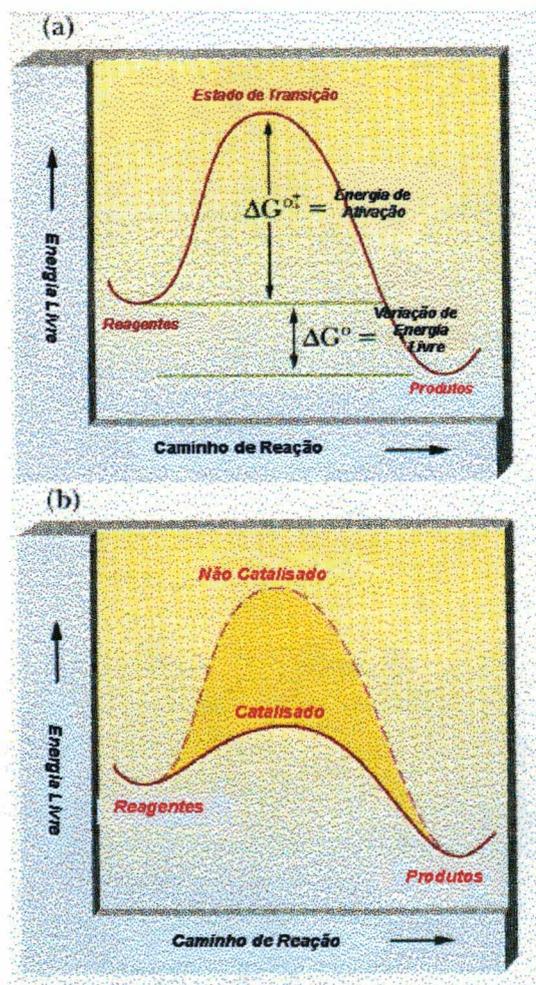
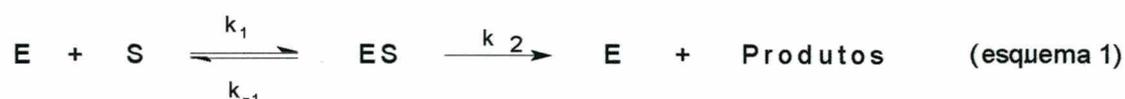


Figura 08: (a) Energia livre de uma reação, (b) reação na presença de catalisador.

As reações catalisadas por enzimas, ocorrem através da formação de um complexo transitório enzima substrato, que dá origem ao estado de transição, o qual por sua vez, leva a formação dos produtos⁴ (Esquema 1).



A natureza do estado de transição em reações enzimáticas é um largo campo de estudo. O substrato se liga não covalentemente a uma pequena porção da enzima chamada de sítio ativo (Figura 09), próximo e com uma correta orientação ao átomo com o qual vai reagir. Ambos efeitos proximidade e orientação contribuem para a velocidade da reação.

Sendo a enzima uma macromolécula orgânica, o sítio ativo em muitos casos pode ser considerado como sendo um meio apolar. Assim, grupos reativos como a hidroxila sofrem um aumento enorme na sua nucleofilicidade (reatividade) ao passar do meio aquoso para o meio orgânico. Polaridades adequadas fornecem também uma grande força diretora para a reação.

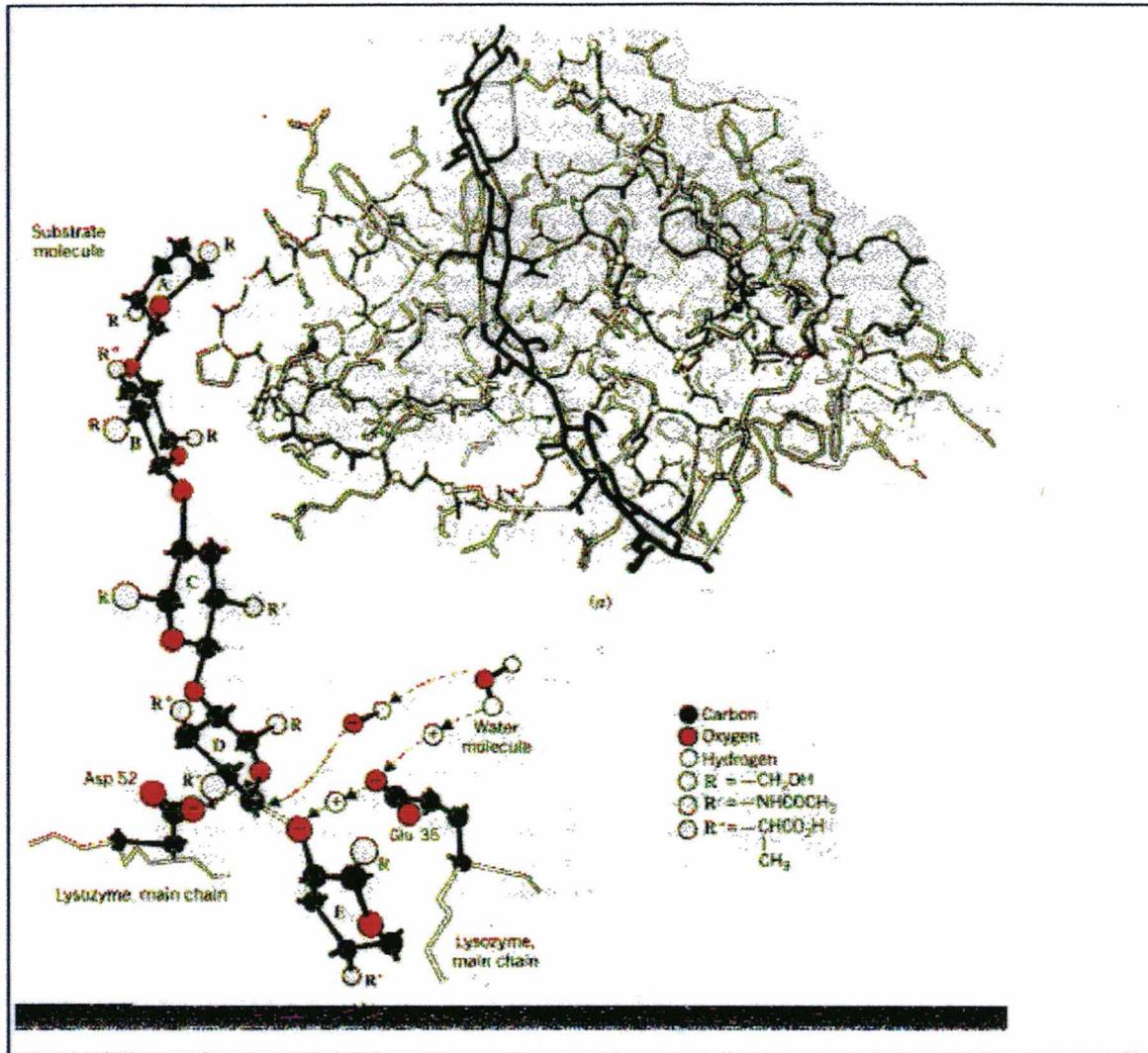


Figura 09: Sítio ativo da Lisozima

I.2.1- REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS

Em linhas gerais, a natureza dos processos biológicos catalisados pelas enzimas é bastante complexo; fundamentalmente porém, está dentro tanto do campo da química orgânica, quanto da química inorgânica, e incluem reações eliminação, substituição, adição, oxidação e redução.

As reações enzimáticas, quando comparadas a reações intermoleculares, são mais eficientes², apresentando um poder catalítico na ordem de 10^{20} vezes. Em contraste, a catálise não enzimática aumenta a velocidade de reações da ordem de apenas 10^2 a 10^4 vezes (Tabela 01).

Tabela 01: Comparação entre a velocidade de reações enzimáticas e a velocidade de reações intermoleculares.

| Enzima | Análogo não enzimático | Velocidade enzimática ($V_e.s^{-1}$) | Velocidade não enzimática ($V_o.s^{-1}$) | V_e/V_o |
|---------------|--|--|--|--------------------|
| Lisozima | Hidrólise de acetais catalisada por base geral | 5×10^{-1} | 3×10^{-9} | 2×10^8 |
| Quimotripsina | Hidrólise de amidas catalisadas por base geral | 4×10^{-2} | 1×10^{-5} | 4×10^3 |
| Fumarase | Hidratação de alcenos catalisada por ácido geral | 5×10^2 | 3×10^{-9} | 2×10^{11} |

Em sistemas biológicos, as enzimas atuam em condições brandas de pH e temperatura. São altamente específicas³ sendo capazes de fazer distinção entre esteroisômeros de um dado composto. Acredita-se que para cada reação exista uma enzima específica².

O poder catalítico que as enzimas apresentam, tem chamado a atenção dos cientistas, no sentido de buscar explicações mecanísticas para a ação enzimática⁵. Contudo, a grande complexidade destas biomoléculas, surge a necessidade de criar-se sistemas mais simples, para que através destes possa-se buscar uma explicação mecanística para a ação enzimática e, conseqüentemente, compreender os fatores responsáveis pelo poder catalítico destas moléculas.

As enzimas e as reações que elas catalisam podem ser estudadas efetivamente usando-se os princípios mecanísticos que formam a base da físico química orgânica, pois durante o desenvolvimento deste ramo da química em 1930s e 1940s, alguns químicos e enzimologistas, viram a possibilidade de conectar-se a físico química orgânica e a enzimologia⁴. Um exemplo de modelo para o estudo do mecanismo de reações enzimáticas é o uso da enzima quimotripsina (Figura 10)², uma das enzimas proteolíticas, cuja função é de hidrolizar ligações peptídicas com especificidade para resíduos que contenham uma cadeia lateral aromática (Figura 11).

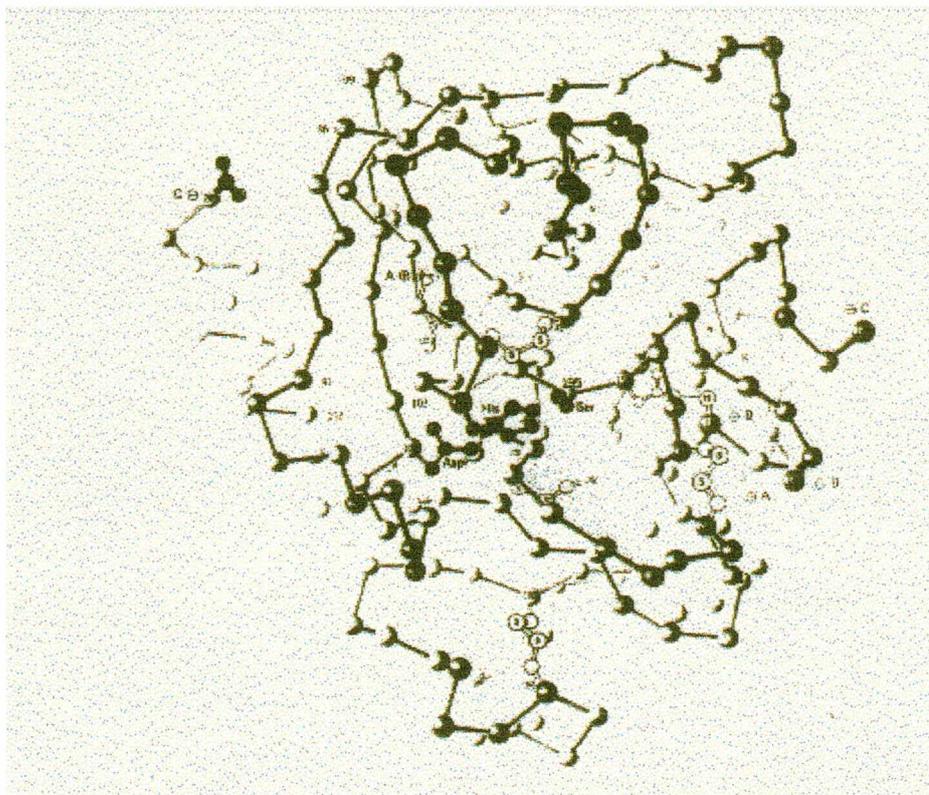


Figura 10: Representação estrutural da quimotripsina

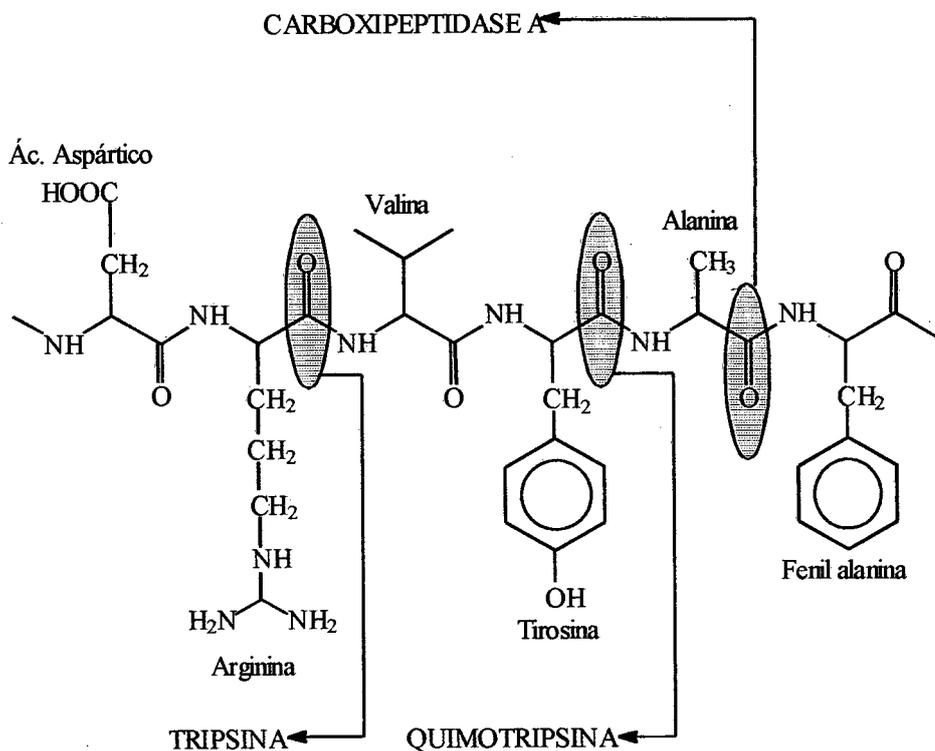


Figura 11: Especificidade de enzimas proteolíticas: tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase

Algum tempo antes que a estrutura tridimensional da quimotripsina tivesse sido determinada, imaginou-se que alguns amino-ácidos formariam o “centro ativo” da enzima².

Experimentos usando substratos específicos para determinados amino-ácidos (serina, fenil-alanina) a fim de inativá-los; relações de pH e pK de amino-ácidos (histidina); e estudos de catálise geral ácido-base (efeito isotópico) demonstraram quais as condições e os amino-ácidos que fazem parte do processo catalítico². Os experimentos realizados ilustram os procedimentos usados na investigação do mecanismo de ação de uma enzima.

A análise de raio-X⁶ mostra que o centro ativo está colocado perto da superfície da molécula. A grande especificidade da enzima é aparentemente determinada por dois peptídeos, constituídos de amino-ácidos não polares, que formam uma espécie de bolsa, onde o substrato aromático seria retido. Próximo encontram-se resíduos de histidina, serina e um de ácido aspártico que facilita a protonação do anel da histidina. Estes amino-ácidos não são consecutivos, eles estão separados linearmente um dos outros por muitos amino-ácidos. A conformação através do raio-X da possibilidade do mecanismo proposto, é um exemplo marcante da necessidade da existência de linhas de pesquisa diferentes e complementares em um mesmo problema.

I.3- APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Entender o alto poder catalítico das enzimas significa poder aplicar estes fatores em processos industriais e manipular-las no sentido de se obter a cura de certos males que atacam o organismo humano, num sentido mais amplo, é entender a química dos seres vivos.

No que diz respeito a utilização industrial, as enzimas têm sido usadas para substituir processos térmicos e mecânicos.

Os principais domínios industriais da utilização das enzimas são a transformação do amido, na fabricação de detergentes e na indústria alimentícia. Nestas aplicações, é de primordial importância obter-se enzimas com alta eficiência e preço acessível.

O desenvolvimento da utilização das enzimas em nível industrial efetua-se em duas direções: na continuação e melhoramento dos processos

antigos e na emergência de novas aplicações, como a análise com eletrodos de enzimas.

I.3.1- INDÚSTRIA AGRO-ALIMENTÍCIA

A indústria alimentícia utiliza mais de 20 diferentes enzimas na fabricação de alimentos e bebidas, (Tabela 06).

Tabela 02: Enzimas usadas na indústria alimentícia

| Enzimas | Fonte de Obtenção | Aplicação |
|-------------------|---|--|
| Amilase | <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus spp.</i> | Xarope de glicose Produção de cerveja |
| Celulase | <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma reesei</i> | Processamento de frutas Produção de flavorizantes |
| Dextranase | <i>Penicillium spp.</i> <i>Chaetomium spp.</i> | Processamento de açúcar |
| Glucanase | <i>Bacillus subtilis</i> <i>Penicillium emersonii</i> | Produção de cerveja |
| Glucose isomerase | <i>Bacillus coagulans</i> <i>Arthrobacter</i> | Produção de xarope com alta concentração de frutose a partir da hidrólise do amido |
| Glucose oxidase | <i>Aspergillus niger</i> | Remoção do oxigênio de produtos alimentícios |
| Lipase | <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida spp.</i> <i>Mucor spp.</i> | Produção de favorizantes Enzima modificadora de queijo Modificação da gordura Síntese de emulsificantes |
| Protease | Animal, tripsina Vegetal, papaína <i>Aspergillus spp.</i> <i>Bacillus spp.</i> | Hidrolisados de proteínas Panificação |

Muitas indústrias agro-alimentares utilizam a proteólise, hidrólise de proteínas, para realizar transformações organolépticas e físico-químicas a fim de melhorar a qualidade ou a fabricação dos produtos finais, como diminuir a viscosidade, melhorar a filtrabilidade, clarificar e estabilizar líquidos.

A extração da sacarose a partir da beterraba ou da cana de açúcar, é realizada a partir dos processos de difusão, filtração, concentração e cristalização, que tradicionalmente não implica na utilização de enzimas. Mas nos 2 casos a enzima pode vir a ser usada para facilitar a operação de extração e refinagem, como a melibiase que realiza a hidrólise da rafinose composto que atua como um anticristalisante da sacarose e que pode existir como contaminante.

A hidrólise parcial ou total da sacarose, quando utilizada para a fabricação de outros produtos, pode ocasionar vantagens como a higroscopicidade mais elevada, atividade de água mais baixa e elevação do poder adoçante.

Na indústria de bebidas, as enzimas permitem o melhoramento do rendimento e a qualidade dos produtos, a hidrólise da celulose melhora o processo de solubilização das frutas para a fabricação de sucos.

A conversão do amido a diferentes produtos comerciais, como xaropes de glicose e maltose e preparados de dextrina, representou para a indústria alimentícia \$100 milhões em 1988, e da produção de queijo e produtos com baixo teor de lactose obteve-se um faturamento de \$65 milhões neste mesmo ano.

I.3.2- TRATAMENTO DE DEJETOS INDUSTRIAIS

Muitas indústrias, ao fim de seus processo de fabricação obtém lixos que contém grande quantidade de material orgânico, tais compostos devem ser tratados por microorganismos, antes de serem eliminados. O uso de enzimas associado ao uso de microorganismos, tem melhorado o tratamento do lixo industrial, como a degradação prévia de polímeros complexos, pela enzimas, facilitando a degradação microbiológica. E em outros casos as enzimas servem para eliminar substâncias inibidoras da ação dos microorganismos

I.3.3- NOVAS APLICAÇÕES INDUSTRIAS

Além da indústria alimentícia, as enzimas vem adquirindo importância na indústria têxtil, de papel e farmacêutica. Nesta, as enzimas são utilizadas para produção e modificação de antibióticos e transformação de esteróides.

I.4- REAÇÕES INTRAMOLECULARES COMO MODELOS DE CATÁLISE ENZIMÁTICA

As enzimas apresentam um sistema bastante complexo que envolve muitas interações, por este fato são desenvolvidos modelos que tentam imitar as mais diversas características das enzimas e quanto mais semelhantes esses forem, das características físico-químicas da enzima em questão, mais informações poderão ser obtidas do mecanismo como atuam estes catalisadores biológicos.

Os modelos existentes podem ser divididos em duas categorias: aqueles que tentam imitar e modelar o sítio ativo como um todo, conhecidos como modelos miméticos, e aqueles que procuram entender melhor as características intrínsecas do sistema e determinar os principais parâmetros físico-químicos da catálise, conhecidos como modelos não miméticos⁷.

Os modelos não miméticos podem ser subdivididos em:

i) aqueles que analisam a interação entre o substrato e a enzima, no complexo enzima-substrato, dando origem aos estudos dos compostos de inclusão, formados essencialmente por ciclodextrinas e éteres coroa.

ii) os direcionados para os princípios físico-químicos, que governam as modificações nos sítios ativos das enzimas, abordados mais freqüentemente por reações intramoleculares.

As reações intramoleculares freqüentemente exibem um aumento extraordinário de velocidade, estas, têm sido apresentadas como modelos simples, a partir dos quais se tem buscado explicações para o grande poder catalítico das enzimas em sistemas biológicos. Os princípios

sob o qual fundamentam-se tais modelos, estabelecem que os mesmos parâmetros físico-químicos que governam a reatividade entre dois grupamentos funcionais em uma reação intramolecular, também estão presentes para os mesmos grupamentos que constituem o sítio ativo da enzima.

Com o estudo de reações intramoleculares de lactonização, hidrólise de ésteres e hidrólise de amidas, os modelos não miméticos deram origem a teorias como: Direcionamento de Orbitais⁸, Controle Estereopopulacional⁹, e a Teoria Espaço-Temporal¹⁰. Estas teorias tentam definir e quantificar a influência de cada um destes fatores na velocidade das reações intramoleculares e estabelecem uma analogia com os fatores que determinam os enormes efeitos catalíticos exercidos pelas enzimas. No entanto, cada uma destas teorias não explicam por si só a catálise enzimática, mas reivindicam a primazia dos efeitos de aumento de velocidade observados em sistemas biológicos, quando comparados às reações intermoleculares similares.

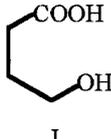
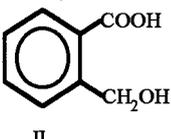
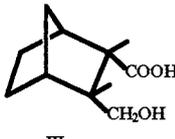
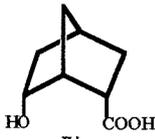
I.4.1- DIRECIONAMENTO DE ORBITAIS

A proposta da teoria do direcionamento do orbital, foi feita por Koshland através de estudos da velocidade de esterificação e de gama-lactonização intramolecular de γ -hidróxiácidos⁸.

Quando comparada à velocidade de esterificação entre o ácido acético e etanol, a reação de ciclização intramolecular pode ocorrer até 10^6 vezes mais rapidamente que na reação intermolecular, mesmo depois que todas as correções presumidamente razoáveis já estejam feitas; como o efeito proximidade aplicável a um sistema intermolecular, o efeito

torcional, devido ao anel e o número de isômeros conformacionais no fechamento do anel em reações intramoleculares (Tabela 03).

Tabela 03: Efeito do componente orientacional sobre a velocidade de lactonização de ácidos γ -hidroxicarboxílicos.

| Composto | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ + CH_3COOH |  I |  II |  III |  IV |
|-----------------------------|--|--|---|---|---|
| $V_{\text{rel.}}$ | 1 | 79 | 305 | 6630 | 1.027.000 |
| $V_{\text{rel. corrig.}}^a$ | 1 | 413 | 17 | 1660 | 18.700 |

(a) velocidades relativas corrigidas, conforme referência 08

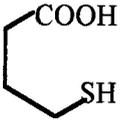
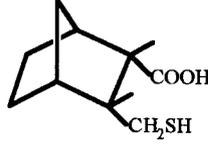
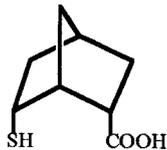
Koshland sugere que a justaposição dos átomos reacionais não é suficiente para a reação ocorrer, ele aborda que durante a formação dessas estruturas cíclicas, o ataque do oxigênio hidroxílico sobre o carbono carbonílico, tem uma orientação limitada, se comparada às orientações das colisões que ocorrem ao acaso em processos bimoleculares.

Este fator orientacional, determinado pelos componentes angulares de seus orbitais atômicos representado por $1/\theta$, onde θ é o ângulo definido pela fração da superfície sólida, de um átomo de simetria esférica, sujeita à reação ao longo de um caminho selecionado na coordenada de reação, pode fornecer uma estimativa do aumento de velocidade observada em reações enzimáticas, devido à otimização da orientação dos orbitais dos átomos reacionais em questão.

Para comprovar estes dados, Koshland, substitui os grupamentos hidroxilas por sulfidrilas¹¹, e observa que a tiolactonização

para I, II e III mostra uma acentuada variação nas velocidades relativas quando comparada à lactonização destes compostos (Tabela 04).

Tabela 04: Efeito da componente orientacional sobre a velocidade de tiolactonização de ácidos γ -sulfidrilcarboxílicos.

| Composto |  |  |  |
|---------------------------------------|---|--|---|
| | V | VI | VII |
| V _{rel.} | 384 | 90 | 821.000 |
| V _{rel. corrig.^a} | 2020 | 5 | 15.000 |

(a) velocidade relativa corrigida, conforme referência 11.

A estrutura dos orbitais e os comprimentos de ligação diferentes para o grupo sulfidril, alteraria a orientação entre os grupos reacionais, como mostra a figura 12, o que pode explicar a diminuição da velocidade de lactonização para os compostos tioanálogos, pois um desvio desfavorável nos ângulos de ligação, provoca um desalinhamento dos orbitais, o que causa uma diminuição da velocidade e reatividade destes compostos.

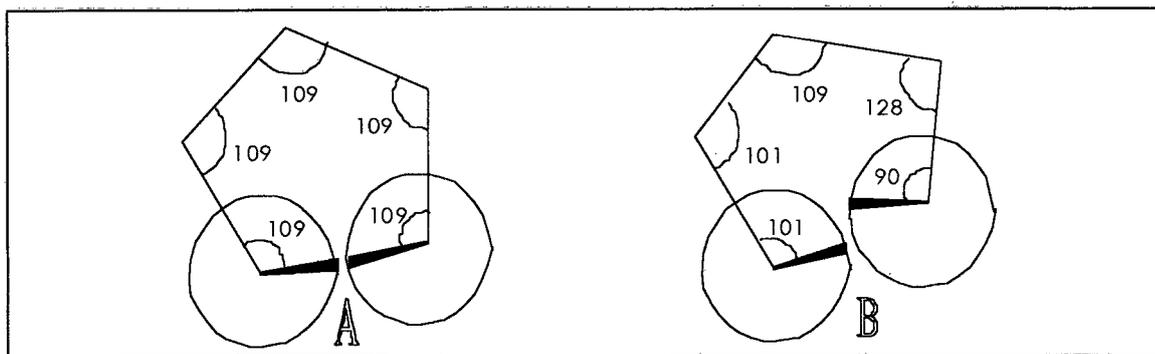


Figura 12: Alteração no direcionamento de orbitais quando OH (A) é substituído por SH (B).

A partir destes resultados preliminares, Koshland parte para cálculos baseados na teoria do estado de transição¹² e conclui, a partir de , que uma aceleração de velocidade na ordem de 10^3 a 10^5 pode ser obtida, quando se tem uma reação otimamente orientada, relativa a mesma reação molecular onde há uma orientação aleatória dos átomos.

Portanto, direcionamento de orbitais pode ser definido como a situação em que os átomos que participam da reação interagem ao longo de um caminho selecionado. Tais restrições podem ser impostas na ligação do substrato ao sítio ativo da enzima pois, segundo Koshland, o que enzima faz é colocar os grupos reagentes no ponto onde a reação ocorre, ou seja, direciona os orbitais dos grupos reagentes.

Thomas C. Bruice¹³ em 1971, refuta esta teoria demonstrando que para se obter uma razão de velocidade $k_{\text{intra}}/k_{\text{inter}} = 10^6$ para grupos reagentes de simetria esférica, é necessário uma orientação crítica de $0,1^\circ$ no ângulo entre os orbitais dos átomos reagentes (Figura 13). Logo, qualquer desvio de orientação desta magnitude deveria ser refletida na velocidade observada.

Sabe-se que as vibrações angulares em uma molécula na temperatura ambiente são da ordem de 5° a 10° , não há como explicar o aumento observado de velocidade ao se aumentar a temperatura do sistema,

pois este fato quando aplicado a teoria de Kosland, presume que a velocidade de uma reação química diminua com o aumento da temperatura.

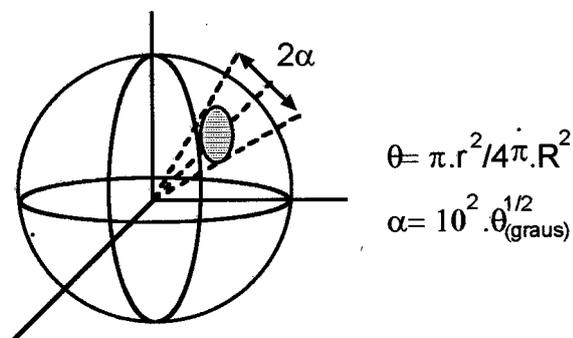
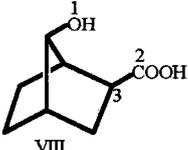
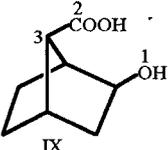
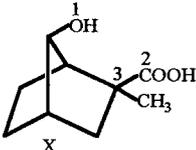
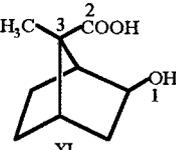


Figura 13: Representação de um grupo de simetria esférica, onde somente uma pequena porção de sua superfície (área sombreada) é reativa..

Menger, crítica à teoria de Koshland, baseado num sistema experimental. Afim de comprovar a dependência angular, ele examinou a reatividade numa reação de lactonização intramolecular, onde os grupos funcionais se encontravam ancorados numa estrutura carbônica rígida, com ângulos e distância bem definidos¹⁴ (Tabela 05).

Tabela 05: Efeito da estrutura sobre a velocidade de lactonização de hidroxiácidos catalisada por ácido a 25 °C.

| Composto |  |  |  |  |
|---|---|---|--|---|
| Velocidade Relativa ^a | 1 | 1,2 | 36 | 22 |
| ângulo $\text{O}_1\text{C}_2\text{C}_3(^{\circ})^b$ | 70 | 80 | 76 | 85 |
| Distância O-C (Å) ^c | 2,83 | 2,81 | 2,69 | 2,69 |

a) velocidade relativa da lactonização catalisada por ácido; b) ângulo entre o oxigênio hidroxílico, o carbono carbonílico e o carbono α , determinado por cálculos de campo de força; c) distância entre o oxigênio hidroxílico e o carbono carbonílico.

Cálculos computacionais, realizados sobre a série de compostos VIII, IX, X e XI, revelam que estes têm calores de formação e a distância entre o oxigênio hidroxílico e o carbono carbonílico similares. Observa-se na tabela 05 que tanto os compostos VIII e IX como X e XI apresentam uma diferença no ângulo de 10° , entre si. No entanto, observa-se que no par VIII e IX e no par X e XI as velocidades relativas são semelhantes em magnitude, mas diferem quando compara-se os dois pares entre eles.

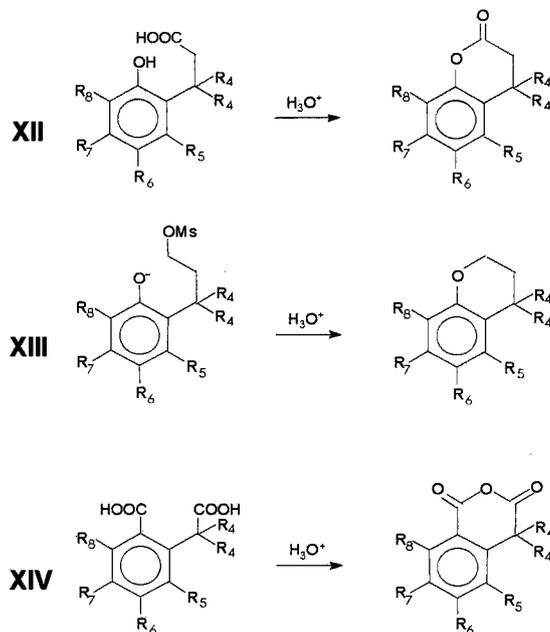
Como, pela teoria de direcionamento de orbital, uma variação de 10° no ângulo entre os orbitais dos átomos reacionais deveria produzir uma variação de 10^4 , na velocidade da reação, o que não é observado neste estudo, tal experimento coloca em dúvida o rigor do direcionamento de orbitais como fator determinante da alta reatividade de processos biológicos controlados por enzimas. Menger prefere referir-se ao direcionamento de orbital como uma janela de reação, onde o requerimento angular não é tão restrito.

I.4.2- CONTROLE ESTEREOPOPULACIONAL

Para que a enzima catalise uma reação, o substrato deve se ligar ao sítio ativo da enzima a fim de formar o complexo enzima-substrato. Acredita-se que a enzima, limite o substrato, a uma única conformação, possivelmente aquela mais favorável ao desempenho de sua atividade catalítica. Tais modificações estruturais, podem ser impostas por meio de ligações de hidrogênio, atração ou repulsão eletrostática, repulsão de van der Waals, repulsão do tipo par não compartilhado e outras.

Esta restrições impostas ao substrato, podem ser análogas a alterações químicas que estão presentes em compostos orgânicos, a fim de restringir a distribuição da população reacional reativa, eliminando os isômeros não reativos. Este fenômeno, caracterizado pelo aumento considerável da população do conformero mais reativo, foi designado de Controle Estereopopulacional.

Milstien e Cohen estudaram a lactonização catalisada por ácido dos ácidos orto hidroxicinâmicos XII⁹, a ciclização dos mesilatos de 3-(o-hidroxifenil)-1-propila XIII¹⁵ e a formação de anidridos cíclicos nos ácidos homoftálicos XIV¹⁶ (Esquema 2), para quantificar o aumento da velocidade, devido as restrições conformacionais (Tabela06).



Esquema 2

Tabela 06: Efeito da substituição de hidrogênio por metila sobre a velocidade relativa de ciclização de XII, XIII e XIV.

| R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ | R ₈ | XII | XII ^a | XIII | XIII ^a | XIV | XIV ^a |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| H | H | H | H | H | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| H | H | H | H | CH ₃ | --- | --- | --- | --- | 10 | --- |
| H | H | H | CH ₃ | CH ₃ | --- | --- | 3,5 | --- | --- | --- |
| H | CH ₃ | H | CH ₃ | CH ₃ | 6,8 | --- | 7 | --- | --- | --- |
| H | CH ₃ | H | H | H | --- | 1 | --- | 1,6 | 52 | 1 |
| H | CH ₃ | H | H | CH ₃ | --- | --- | --- | --- | 50 | --- |
| CH ₃ | H | H | H | H | 4.440 | 4.440 | 3.100 | 3.100 | 82.000 | 82.000 |
| CH ₃ | H | H | H | H | 16.700 | --- | --- | --- | --- | --- |
| CH ₃ | H | H | CH ₃ | CH ₃ | --- | --- | 10.46 | --- | --- | --- |
| | | | | | | | 4 | | | |
| CH ₃ | CH ₃ | H | CH ₃ | H | 8x10 ¹⁰ | --- | --- | --- | --- | --- |
| CH ₃ | CH ₃ | H | H | CH ₃ | 3x10 ¹¹ | --- | --- | --- | --- | --- |
| CH ₃ | CH ₃ | H | CH ₃ | CH ₃ | 3x10 ¹¹ | --- | 9x10 ⁴ | --- | --- | --- |
| CH ₃ | --- | --- | --- | 2x10 ⁵ | 8x10 ⁵ | --- |
| CH ₃ | CH ₃ | H | H | H | --- | 5x10 ¹⁰ | --- | --- | --- | 16.000 |

^a velocidades relativas corrigidas

Através dos dados apresentados na tabela 06, observa-se um grande aumento de velocidade da reação quando R_4 e R_5 são grupamentos metilas. A aceleração da velocidade da ordem de 10^{11} , para as reações de lactonização, merece especial atenção, pois começa a aproximar-se do poder catalítico das enzimas.

Milstein e Cohen⁹ atribuíram este fator de aceleração de velocidade a uma fixação pelos grupos metilas, a qual produz um congelamento conformacional da cadeia lateral, dando origem a um composto cuja configuração seja a mais produtiva para a reação. O valor da aceleração de velocidade derivadas da restrição conformacional, foram fixadas como sendo aproximadamente 10^3 . No entanto, Milstein e Cohen não atribuem todo o aumento de velocidade observado à restrição conformacional, mas sugerem que a restrição seja o fator primário.

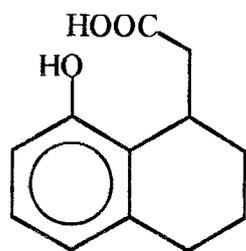
Comparando as reações apresentadas na tabela 06, nota-se aumentos de velocidades da ordem de 10^5 e 10^4 , para substituição nucleofílica intramolecular **XIII** e a formação do anidrido cíclico **XIV** respectivamente, quando conformacionalmente restritas pelo posicionamento dos três grupos metilas.

Estes valores podem representar um fator de aumento de velocidade típico para a restrição conformacional, contudo os dados para a reação de lactonização **XII**, cujo aumento de velocidade é da ordem de 10^{11} , pode ser explicado através de fatores orientacionais (segundo Koshland uma orientação ótima levaria a um aumento de velocidade de 10^4 , e isto acoplado com um fator de 10^5 para o congelamento conformacional ofereceria um fator líquido de 10^9).

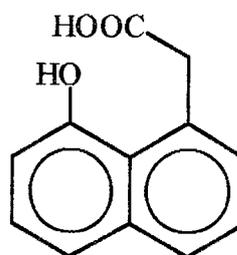
Outra possibilidade é de que uma orientação ótima para a reação tenha sido atingida para a lactonização mas, não para a reação de substituição nucleofílica ou formação do anidrido. Ou ainda, que os fatores orientacionais são menos importantes e que o fator de aumento de velocidade pelo controle estereopopulacional é muito maior que 10^5 .

Críticas ao modelo usado por Cohen no desenvolvimento de sua teoria são feitas por Karle e Karle¹⁷, onde estes, através do estudo cristalográfico de raio-X, determinaram que para o composto XII, no qual $R_4=R_5=R_7=R_8=CH_3$, existe um desvio significativo dos ângulos de ligação do anel benzênico, do ângulo ideal de 120° , para poder acomodar os grupamentos metilas nas posições R_4 e R_5 . Esses desvios foram grandes o bastante para permitir a rotação da cadeia lateral, contendo o grupo dimetil, levando-se a acreditar que o alívio da tensão do estado fundamental contribua para o aumento da velocidade na reação de lactonização. A partir desses dados, pode-se concluir que o alívio da tensão estérica no estado fundamental é a força diretora da reação.

As velocidades de lactonização dos compostos XV e XVI, foram estudadas por Danforth e Nicholson¹⁸. Nestas estruturas a tensão angular não é o fator determinante da velocidade. As acelerações de velocidades observadas, foram de 150 a 21000 vezes mais rápido, respectivamente. Calcula-se a partir destes dados, que o valor máximo para o aumento de velocidade, resultante do congelamento conformacional, é da ordem de 10^3 a 10^4 .



XV



XVI

Outros pesquisadores, como Winans e Wilcox¹⁹ atribuíram um fator de 10^7 ao alívio da tensão e 10^4 a restrição conformacional, assim, uma aceleração de velocidade de 10^{11} foi encontrada devido à conjugação dos dois fatores. Em resumo, reações intramoleculares em sistemas modelos, nos quais os grupos reacionais são conformacionalmente restritos, mostram consideráveis aumentos de velocidades.

I.4.3 - TEORIA ESPAÇO-TEMPORAL

Menger, procurando entender qual é o efeito cinético em uma reação bimolecular do tipo $A+B \rightarrow C$, quando A está totalmente rodeado por B, ou seja, quando a proximidade entre A e B é máxima, estudou reações bimoleculares S_N2 entre o iodeto de metila e piridina²⁰.

Neste experimento, Menger observou um aumento pouco significativo na velocidade, cerca de 12 vezes, quando a concentração do nucleófilo é aumentada de 1% para 100%, concluindo que somente a proximidade não é suficiente para explicar o aumento da velocidade em várias reações intramoleculares.

Comparando seus dados experimentais, sobre as velocidades de reações intra e intermoleculares, com resultados de outros autores,

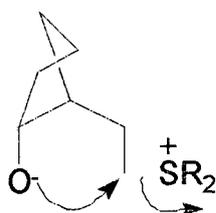
Menger conclui que: “efeitos de proximidade manifestam-se em reações intramoleculares mas não em reações intermoleculares”.

A partir de cálculos teóricos, em cima da reação de dimerização de Diels-Alder de ciclopentadieno em fase gasosa, Page e Jencks²¹, demonstram que uma reação intramolecular pode ser 10^8 vezes mais rápida que uma reação intermolecular, e atribuem o aumento da velocidade em reações intramoleculares e enzimáticas aos efeitos entrópicos. Isto é, a perda de entropia translacional e rotacional quando os reagentes são mantidos juntos, como no sítio ativo de uma enzima.

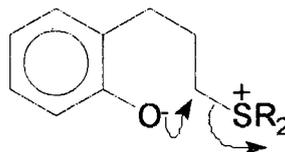
O congelamento de um grau de liberdade rotacional de uma ligação química gera um aumento de 5 vezes na velocidade da reação; porém há casos onde o congelamento de uma simples rotação leva a valores de aumento de velocidade muito maiores do que este.

Para os processos de ciclização seriam esperados elevados valores de molaridade efetiva ($ME = k_{\text{intramol.}} / k_{\text{intermol.}}$), no entanto, valores de ME abaixo da unidade são descritos na literatura²² e os teoremas entrópicos falham ao explicá-los.

Um exemplo de tal fato é apresentado no esquema 3, onde duas reações intramoleculares, análogas, não possuem relação da entropia de ativação com a velocidade de ciclização²³.



$$\Delta S^*_{H_2O} = -3,7 \text{ eu}$$



$$\Delta S^*_{H_2O} = +14 \text{ eu}$$

Esquema 3

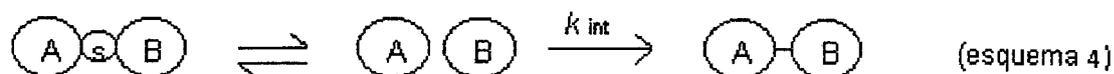
A avaliação dos parâmetros de ativação em reações de ciclização do tipo $S_N2^{24,25}$, não estabelecem qualquer relação entre a entropia de ativação e a reatividade do sistema.

Dafor e Koshland²⁶, refutam a teoria sobre a influência dos fatores entrópicos de Page e Jencks²⁷. Fundamentados na reação radicalar de $Br\bullet$ para a formação de Br_2 como modelo, encontraram valores teóricos para ME de 10^2 , ou seja, 10^6 vezes menores do que os encontrados por Page e Jencks.

Menger conclui que fatores como a entropia, proximidade e orientação não explicam suficientemente o grande aumento da velocidade observado nas reações intramoleculares e nas catálises enzimáticas. Sugere no entanto, que dois novos fatores, tempo e distância, também devam ser levados em consideração, criando a Teoria Espaço-Temporal, a qual postula que: “A velocidade de reação entre dois grupamentos funcionais A e B é proporcional ao tempo que A e B permanecem a uma distância crítica menor ou igual a soma dos raios de van der Waals dos grupos que participam da reação”.

O postulado “espaço-temporal” também pode ser visto em termos do formalismo do equilíbrio. Onde os reagentes A e B que se encontram separados pelo solvente, geram um complexo em que os

componentes residem a uma distância crítica que impede a solvatação. O produto é formado numa segunda etapa caracterizada por uma constante de velocidade intrínseca, k_{int} .

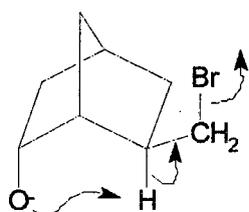


A hipótese da pré-associação é suportada e relações entre distância e velocidade foram descritas por Benesi²⁸ que conclui que “as moléculas não tem que ser separadas muito longe, ou por muito tempo, para ficarem perdidas”. Se A e B, dentro de um complexo, “se posicionam” a uma distância maior do que 1,37 vezes a soma de seus raios de van der Walls, eles escapam um do outro para sempre.

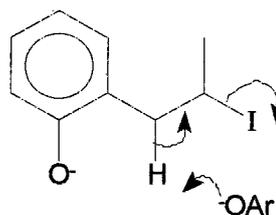
Em termos energéticos, Pritchard²⁹ e Polanyi²³, sugerem que as reações acontecem por uma ativação vibracional e não translacional. Isto significa que a reação entre A e B, dentro do complexo, aconteceria no momento que o complexo adquirisse energia vibracional suficiente para vencer a barreira de ativação. Portanto, quanto maior o tempo em que A e B forem mantidos em uma posição favorável à reação, maior será a velocidade desta reação, uma vez que aumenta a probabilidade de alcançar a ativação térmica.

Schiner, através de cálculos computacionais, verificou que a barreira energética necessária para a transferência do próton do íon hidrônio para a água, era igual a 1.4, 7.5, e 16.8 kcal/mol para a distância de O-O de 2.55, 2.75, e 2.95 Å, respectivamente. Concluindo que a diminuição da distância O-O de 2,75 para 2.55 Å aumenta a velocidade 10^4 vezes, enquanto que a diminuição de 2.95 para 2.55Å aumenta a velocidade 10^{11} vezes.

Menger³⁰, suporta as conclusões de Scheiner, estudando a reação de eliminação do tipo E2 dos compostos XVII e XVIII, descobriu que o composto XVII reage exclusivamente por um mecanismo intramolecular, enquanto que o composto XVIII reage por um mecanismo intermolecular. A diferença entre estes compostos está na distância entre o oxigênio e o hidrogênio, que é de 2.2 Å para o composto XVII e de 2.9 Å para o composto XVIII. Esta distância excede a necessária para uma transferência de próton intramolecular eficiente neste sistema.

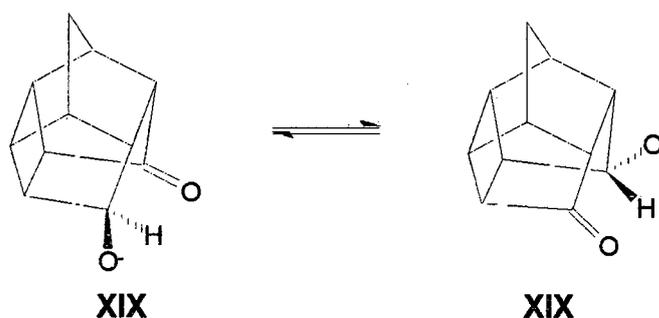


XVII



XVIII

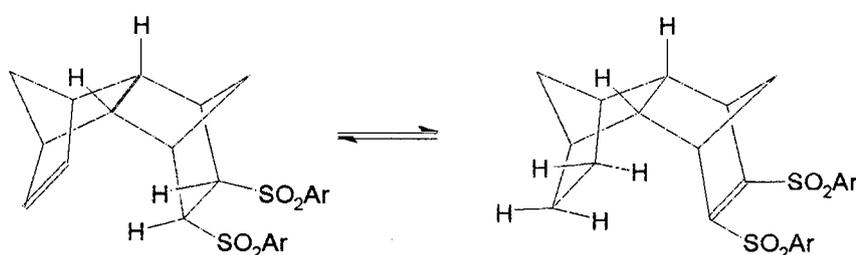
Menger, utilizando cálculos computacionais³¹ através do programa AMPAC, para a transferência intramolecular do hidreto no composto XIX (Esquema 5), calcula que há necessidade de fornecer uma energia global no processo de 18 kcal/mol. Os cálculos mostram que a molécula gasta 13 kcal/mol para distorcer a estrutura carbônica, para lançar o hidrogênio para perto da carbonila, ou seja, posicionar os grupos reacionais para que uma distância crítica de 1.6 Å seja alcançada e apenas 5 kcal/mol são usados para a transferência do hidreto.



Esquema 5

Menger, estudando a reação de hidrólise da amida derivada do triácido de Kemp³² obtém uma alta velocidade de hidrólise ($t_{1/2} = 8$ min; $ME \approx 10^{12}$ M). Através de cálculos computacionais prediz que a hidroxila do grupamento amida está a uma distância igual à soma do raio de van der Waals, (2,80 Å) dos grupos em questão, confirmando a relação tempo-distância.

Ao estudar reações de transisomerização (Esquema 6), Leo Paquette³³, concorda com as teorias de Menger. Ele observa uma grande dependência entre a velocidade e a distância média da intracavidade. Uma mudança de $0,1 \text{ \AA}$ no tamanho da intracavidade, resulta em uma variação da velocidade na ordem de 10^4 .



Esquema 6

Continuando seus estudos, tendo como base a mesma reação, mas utilizando uma gama maior de compostos, Leo Paquette³⁴ em 1991,

observa diversas correlações, algumas positivas e outras negativas, entre a distância e a velocidade observada. Conclui, então, que outros fatores além da distância, como janela de reação, efeitos eletrônicos, energia torsional, também contribuem na reatividade da reação.

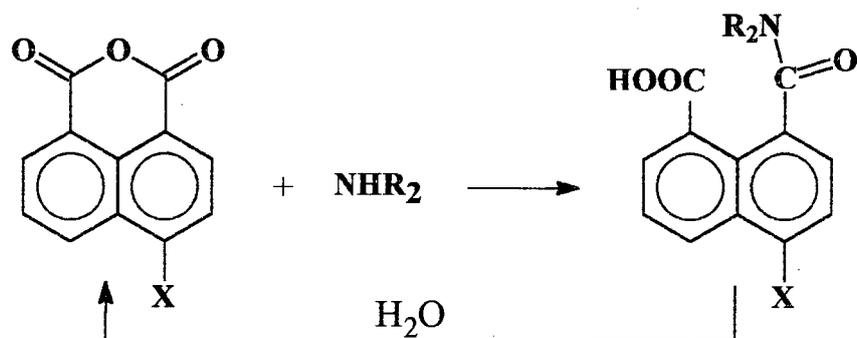
I.5-OBJETIVOS

I.5.1-OBJETIVO GERAL

Compreender e descrever os fatores responsáveis pelo alto poder catalítico das enzimas, utilizando para tanto o estudo da reação de hidrólise intramolecular de monoamidas derivadas do anidrido 1,8-naftálico, substituídos na posição 4 do anel naftálico, como um modelo de catálise enzimática.

I.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização de monoamidas derivadas do anidrido 1,8 naftálico, com diferentes substituintes na posição 4 do anel naftálico.
- Estudo da hidrólise intramolecular das monoamidas sintetizadas, Esquema 7, por métodos espectroscópicos



$\text{X} = \text{NH}_2, \text{Cl}, \text{Br}, \text{NO}_2$

$\text{R}_2 = (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$

Esquema 7

- Interpretação dos dados cinéticos experimentais, para as reações de hidrólise destas amidas, como modelos teóricos para uma maior compreensão da catálise enzimática.

II- PARTE EXPERIMENTAL

II.1- MATERIAIS

II.1.1- REAGENTES

Nas reações de síntese foram utilizados: anidridos 4-cloro, 4-bromo, 4-amino, 4-nitro-1,8-naftálicos (Aldrich), dietilamina (Sigma) e acetonitrila (Merck) como solvente.

Os anidridos 1,8-naftálicos, foram purificados através da técnica de sublimação sob pressão reduzida de 2mm de Hg. Os anidridos purificados foram caracterizados por espectroscopia de UV e IV.

Na secagem da acetonitrila, 30 gramas de peneira molecular foram previamente secas durante 10 minutos em forno de microondas, na potência de 250W. Este procedimento foi efetuado por duas vezes consecutivas. A peneira molecular foi transferida para um frasco de vidro no qual continha 100ml de acetonitrila e este vedado.

As soluções, cuja função de acidez (H_o) tinham valores entre -2,12 e 0,5, foram preparadas usando-se HCl 0,1M a 6,0M .

No preparo das soluções tampões entre pH 0,50 e 1,00, usou-se ácido clorídrico (Merck); entre 1,25 e 3,50, ácido cloroacético; entre pH 3,75 e 4,75 ácido acético (Merck), e entre pH 5,00 e 6,00 ácido succínico (Sigma).

As soluções tampões tinham concentração de 0,1M e seus pHs foram ajustados usando-se NaOH e HCl.

II.1.2- INSTRUMENTAÇÃO

Os espectros de UV-Visível e as medidas cinéticas foram obtidos em um espectrofotômetro Hewlett-Packard com arranjo de diodo modelo HP 8452A, utilizando-se celas de quartzo de 1ml de capacidade e 1cm de caminho ótico.

Um equipamento FTIR BOMEM foi usado para a obtenção de espectros de IV em pastilha de KBr.

As absorções de RMN de ^1H e ^{13}C foram registradas em um aparelho Bruker AW-200, tendo como referência o tetrametilsilano, e como solventes clorofórmio deuterado e dimetilsufóxido deuterado.

Uma coluna capilar de destilação, Ace Glass, com 62 pratos teóricos foi usada para a purificação da N,N-dipropilamina.

A análise de C.H.N. foi realizada em um aparelho da Perkin-Elmer.

O ponto de fusão foi obtido em um equipamento de chapa quente tipo Fisher-Johns modelo APF 301 da Microquímica.

A temperatura das soluções tampões foi mantida no valor desejado por um banho termostatizado Microquímica modelo MQBTZ 99-20.

Na determinação dos pHs, das soluções tampões, foi usado um pH-metro Beckman 71 equipado com um eletrodo combinado da Corning.

Para a secagem da peneira molecular utilizou-se um forno de microondas Continental 2001/250 W (2,45 GHz).

A água utilizada na preparação das soluções tampões foi destilada e deionizada utilizando-se um aparelho Millipore modelo Milli-Q Water System.

II.2- MÉTODOS

II.2.1- SÍNTESE DA AMIDA DERIVADA DO ANIDRIDO 4-CLORO-1,8-NAFTÁLICO COM A DIPROPILAMINA.

Em um balão de 50ml adicionou-se 25ml de acetonitrila, 0,25g (0,01mol) do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico e 0,323ml (0,02mloles) da dipropilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação a temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por espectroscopia de UV-visível através da retirada de alíquotas

Após o término da reação, observou-se a formação de um precipitado branco, o qual foi isolado por filtração à vácuo, pesando 0,1790g (rend. 71,6%). O sólido foi deixado sob vácuo de 7mm de Hg durante 12 horas.

O produto isolado foi caracterizado pelo ponto de fusão, por espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 (Tabela 07), CHN e espectrometria de massa .

Tabela 07: Constantes físicas e espectroscópicas do produto da reação do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico com dipropilamina.

| $P_f(^{\circ}\text{C})$ | UV- Vis, $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ | IV, $\nu(\text{cm}^{-1})^a$ | RMN ^1H , $\delta(\text{ppm})^b$ | RMN ^{13}C , $\delta(\text{ppm})^c$ |
|-------------------------|---|--|--|--|
| 97-100 217-219 | 300 | 3 500-2 500 amônio, 1630 (C=O), 770 (C-Cl). | 0,67 (m, 6H, $\text{CH}_3(\text{amida})$) 0,95 (t, 6H, $\text{CH}_3(\text{amônio})$) 1,53 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amida})$) 1,95(m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amônio})$) 2,65 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-(NC=O)}$) 3,11 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2^+$) 3,60 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2^+$); 7,55 (m, 3H, Ar) 7,70 (br s, 2H, $^+\text{NH}_2$) 8.39 (m, 2H, Ar). | 11,95 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$ (amônio) 12.49 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2(\text{amida})$) 21,09 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amônio})$) 21.62 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amida})$) 22,50 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amida})$) 48,73 ($\text{CH}_2\text{-N(C=O)}$) 50,29 ($\text{NH}_2^+\text{-CH}_2$) 53,30 ($\text{CH}_2\text{-N(C=O)}$) 128(C_{ar}), 171,90 (C=O) 173,90 (COO^-). |

a) em acetonitrila

b) amostra na forma de pastilha de KBr

c) em CDCl_3 , com TMS como referência

II.2.2- SÍNTESE DA AMIDA DERIVADA DO ANIDRIDO 4-BROMO-1,8-NAFTÁLICO COM A DIPROPILAMINA.

Em um balão de 50ml adicionou-se 25ml de acetonitrila, 0,2g ($7,218 \times 10^{-4}$ moles) de anidrido 4-bromo 1,8-naftálico e 0,2177ml (1.444×10^{-3} moles) da dipropilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação a temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada através de espectros de UV-Visível.

Após o término da reação, observou-se a formação de um precipitado branco o qual foi isolado por filtração à vácuo, pesando 0,1250g (rend. 62,5%). O sólido foi deixado sob vácuo de 7mm de Hg durante 24 horas.

O produto isolado foi caracterizado pelo ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 (Tabela 08).

O produto isolado foi caracterizado pelo ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 (Tabela 08).

Tabela 08: Constantes físicas e espectroscópicas do produto da reação do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico com dipropilamina.

| <i>Pf</i> (°C) | <i>UV-Vis</i> , λ_{max} (nm) | <i>IV</i> , ν (cm ⁻¹) ^a | <i>RMN</i> ¹ H, δ (ppm) ^b | <i>RMN</i> ¹³ C, δ (ppm) ^c |
|----------------|--------------------------------------|--|---|---|
| 110-113 | 304 | 3500-3000 amônio, 1630 (C=O), 890 (C-Br). | 0,70 (m, 6H, CH ₃ (amida)) 0,92 (t, 6H, CH ₃ (amônio)) 1,51 (m, 4H, CH ₂ -CH ₃ (amida)) 1,79 (m, 4H, CH ₂ -CH ₃ (amônio)) 2,60 (m, 4H, CH ₂ -(NC=O)) 3,10 (m, 3H, CH ₂ -NH ₂ ⁺) 3,61 (m, 1H, CH ₂ -NH ₂ ⁺) 6,41 (br s, 2H, ⁺ NH ₂) 7,45 (m, 5H, Ar) 8,30 (m, 2H, Ar) | 11,18 (CH ₃ -CH ₂ a0mônio) 11,80 (CH ₃ -CH ₂ (amida)) 19,50 (CH ₂ -CH ₃ (amônio)) 20,95 (CH ₂ -CH ₃ (amida)) 21,83 (CH ₂ -CH ₃ (amida)) 48,02 (CH ₂ -N(C=O)) 48,40 (NH ₂ ⁺ -CH ₂) 52,50 (CH ₂ -N(C=O)) 128 (C _{ar}) 171,93 (C=O) 173,48 (COO ⁻) |

a) em acetonitrila

b) amostra na forma de pastilha de Kbr

c) em CDCl₃, com TMS como referência

II.2.3- SÍNTESE DA AMIDA DERIVADA DO ANIDRIDO 4-NITRO-1,8-NAFTÁLICO COM A DIPROPILAMINA.

Em um balão de 50ml adicionou-se 25ml de acetonitrila, 0,25g (1,028x10⁻³ moles) do anidrido 4-nitro 1,8-naftálico e 0,3102ml (2,26x10⁻³ moles) de dipropilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação durante 14 horas a uma temperatura de -5°C. A reação foi acompanhada por espectro de UV-Visível.

Observou-se a formação de um sólido branco amarelado, o qual foi separado por filtração à vácuo, a baixa temperatura, pesando 0,103g (rend. 41,2%). O produto isolado, apresentava-se instável a temperatura ambiente.

O produto foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho e análises elementares, como ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 para a caracterização do produto foram realizadas a baixa temperatura (Tabela 09).

Tabela 09: Constantes físicas e espectroscópicas do produto da reação do anidrido 4-nitro-1,8-naftálico com dipropilamina.

| $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})^a$ | $\nu(\text{cm}^{-1})^b$ | $\text{RMN}^1\text{H}, \delta(\text{ppm})^c$ | $\text{RMN}^{13}\text{C}, \delta(\text{ppm})^c$ |
|-------------------------------------|---|---|--|
| 300 | 3500-3000 amônio 1638 e 1618 C=O, 1150 (NO ₂ -C _{ar}) | 0,80 (m, 6H, CH ₃ (amida)) 0,98 (t, 6H, CH ₃ (amônio)) 1,51 (m, 4H, CH ₂ -CH ₃ (amida)) 1,80 (m, 4H, CH ₂ (amônio)) 2,70 (m, 4H, CH ₂ -(NC=O)) 3,40 (m, 4H, CH ₂ -NH ₂ ⁺) 4,55 (m, 2H, ⁺ NH ₂) 7,52 (m, 3H, Ar) 8,45 (m, 2H, Ar) | 11,21 (CH ₃ -CH ₂ (amônio)) 11,77 (CH ₃ -CH ₂ (amida)) 19,50 (CH ₂ -CH ₃ (amônio)) 21,00 (CH ₂ -CH ₃ (amida)) 21,79 (CH ₂ -CH ₃ (amida)) 48,02 (CH ₂ -N(C=O)) 48,39 (NH ₂ ⁺ -CH ₂) 52,76 (CH ₂ -N(C=O)) 125 (C _{ar}) 172,02 (C=O) 173,98 (COO ⁻) |

a) em acetonitrila.

b) amostra na forma de pastilha de KBr.

c) em CDCl₃, com TMS como referência.

II.2.4- SÍNTESE DA AMIDA DERIVADA DO ANIDRIDO 4-AMINO-1,8-NAFTÁLICO COM A DIPROPILAMINA.

Em um balão de 20ml adicionou-se 0,25g ($1,170 \times 10^{-3}$ moles) do anidrido 4-amino 1,8-naftálico e 0,300ml ($2,34 \times 10^{-3}$ moles) de dipropilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação durante 24 horas a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por espectro de UV-Visível, onde não foi observada mudanças nos espectros obtidos durante o decorrer da reação.

O mesmo procedimento foi realizado a uma temperatura de -5°C não havendo resultado, repetiu-se o procedimento em refluxo por 48 horas utilizando excesso de amina e ainda a própria amina como solvente, em todos os casos não houve mudanças visuais e espectroscópicas.

II.3- ESTUDOS CINÉTICOS

As cinéticas de hidrólise das amidas derivadas dos anidridos 4-cloro e 4-bromo foram efetuadas em condição de primeira ordem mantidas a uma temperatura constante de $35 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, sendo a velocidade da reação acompanhada espectrofotometricamente pela formação do anidrido a 340nm por um período superior a 5 tempos de meia vida.

Em cada corrida cinética, 250 leituras de absorbância, em média, foram efetuadas e processadas por um programa HP 8452A, que forneceu constantes de velocidade com desvios-padrões 10^{-3} vezes menores que a constante de velocidade.

As soluções estoques apresentavam uma concentração final do produto de 10^{-3}M , adicionou-se $15\mu\text{l}$ desta solução, da respectiva amida, a 1ml de solução tampão (0,1M) do pH desejado, em uma cubeta termostaticada.

III- RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1- CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE REAÇÃO

III.1.2- CARACTERIZAÇÃO DA AMIDA DERIVADA DO ANIDRIDO 4-CLORO-1,8-NAFTÁLICO COM A DIPROPILAMINA

Na preparação da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico, observou-se o deslocamento hipsocrômico do $\lambda_{\text{máx}}$ de 337nm para 300nm entre os espectros de UV-Visível do anidrido e do produto obtido (Figuras 14 e 15).

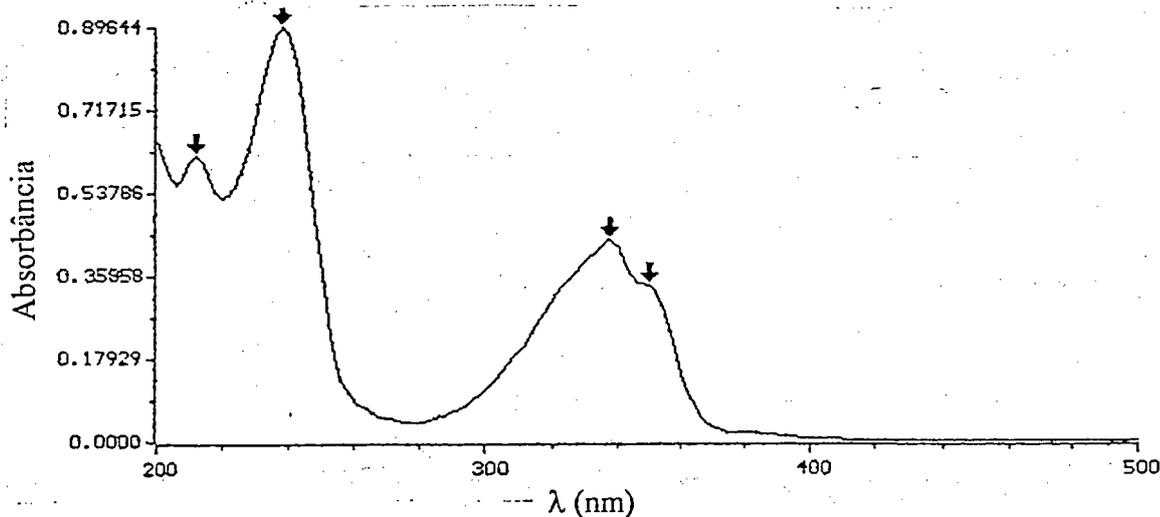


Figura 14: Espectro de U. Vvisível do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico.

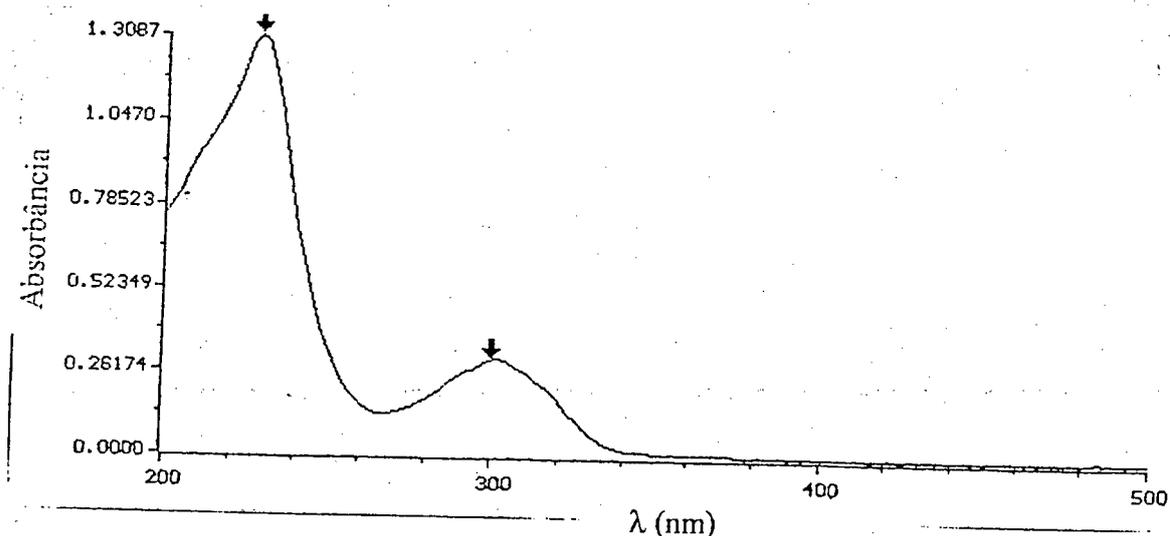


Figura 15: Espectro de U.V. visível da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico.

A higroscopicidade, instabilidade e as dificuldades inerentes ao isolamento das amidas derivadas do anidrido 1,8-naftálico, já foram relatadas^{32,35}. Através da análise do ponto de fusão acompanhado por espectroscopia de UV-Visível, observou-se uma grande termolabilidade do produto isolado (Figura 16), pois este apresenta ponto de decomposição de 97-100°C, levando ao, o qual posteriormente funde-se a 217 - 219°C.

No estudo do espectro de I.V. do composto, as bandas exibidas, identificam os principais grupos funcionais presentes na molécula. Na região de 3500 a 3000cm⁻¹ as bandas são características de sal de amônio. O deslocamento da banda da ligação C=O do anidrido, de 1700cm⁻¹ para 1630cm⁻¹ no produto, demonstra a formação da amida e a banda forte em 770cm⁻¹ representa estiramento Cl-C_(ar) (Figura 16).

A análise da multiplicidades dos sinais e da integração de área do RMN - ¹H (Figura 17), permite a atribuição dos sinais assim discriminados: $\delta = 0,67$ (m, 6H, CH₃(amida)); $\delta = 0,95$ (t, 6H, CH₃(amônio)); $\delta =$

1,53 (m, 4H, CH₂-CH₃(amida)); δ =1.95 (m, 4H, CH₂-CH₃(amônio)); δ = 2,65 (t, 4H, CH₂-(NC=O)); δ = 3,11 (m, 3H, CH₂-NH₂⁺); δ = 3,60 (m, 1H, CH₂-NH₂⁺); δ =7,55 (m, 3H, Ar); δ =7,70 (br s, 2H, ⁺NH₂); δ =8.39 (m, 2H, Ar).

A série de espectros obtidos nos experimentos de irradiação de próton (deslocamento spin-spin), possibilitou a atribuição dos sinais dos prótons correspondentes aos grupos CH₂ e CH₃, mas não foi ainda possível estabelecer a correlação entre esses grupos devido a sobreposição dos sinais (Anexo I).

Através da técnica Cosy 45 e NOE (Figura 18 e 19) foi possível determinar quais os sinais correspondentes a amida e quais os referentes ao sal de amônio. Desta forma ficaram totalmente atribuídos os sinais do espectro no RMN de próton.

O espectro de RMN - ¹³C (Figura 20), identifica os picos nas seguintes regiões: δ = 11,95 (2C, CH₃-CH₂ (amônio)); δ = 12.49 (2C, CH₃-CH₂(amida)); δ = 21,09 (2C, CH₂-CH₃(amônio)); δ = 21.62 (1C, CH₂-CH₃(amida)); δ = 22,50 (1C, CH₂-CH₃(amida)); δ = 48,73 (1C, CH₂-N(C=O)); δ =50,29 (2C, NH₂⁺- CH₂); δ = 53,30 (1C, CH₂-N(C=O)); δ = 125,71 (C₃, C₁₀H₆); δ = 126,27 (C₂, C₁₀H₆), δ = 126,46 (C₆, C₁₀H₆); δ = 126,73(C₇, C₁₀H₆); δ = 127,43(C₄, C₁₀H₆); δ = 127,64(C₅, C₁₀H₆); δ = 127,77 (C₁, C₁₀H₆); δ = 128.18 (C₁₀, C₁₀H₆); δ = 128,66 (C₉, C₁₀H₆); δ = 130,00 (C₈, C₁₀H₆); δ = 171,90 (C=O) e δ = 173,90 (COO⁻).

Através da análise de CHN para o composto C₂₄H₃₅O₃Cl, obteve-se os valores de C 64,28%, H 8,27%, N 6,26%, sendo os valores teóricos de C 66,3%, H% 8,06 e N 6,44 % .

Transmitância (%)

cloro

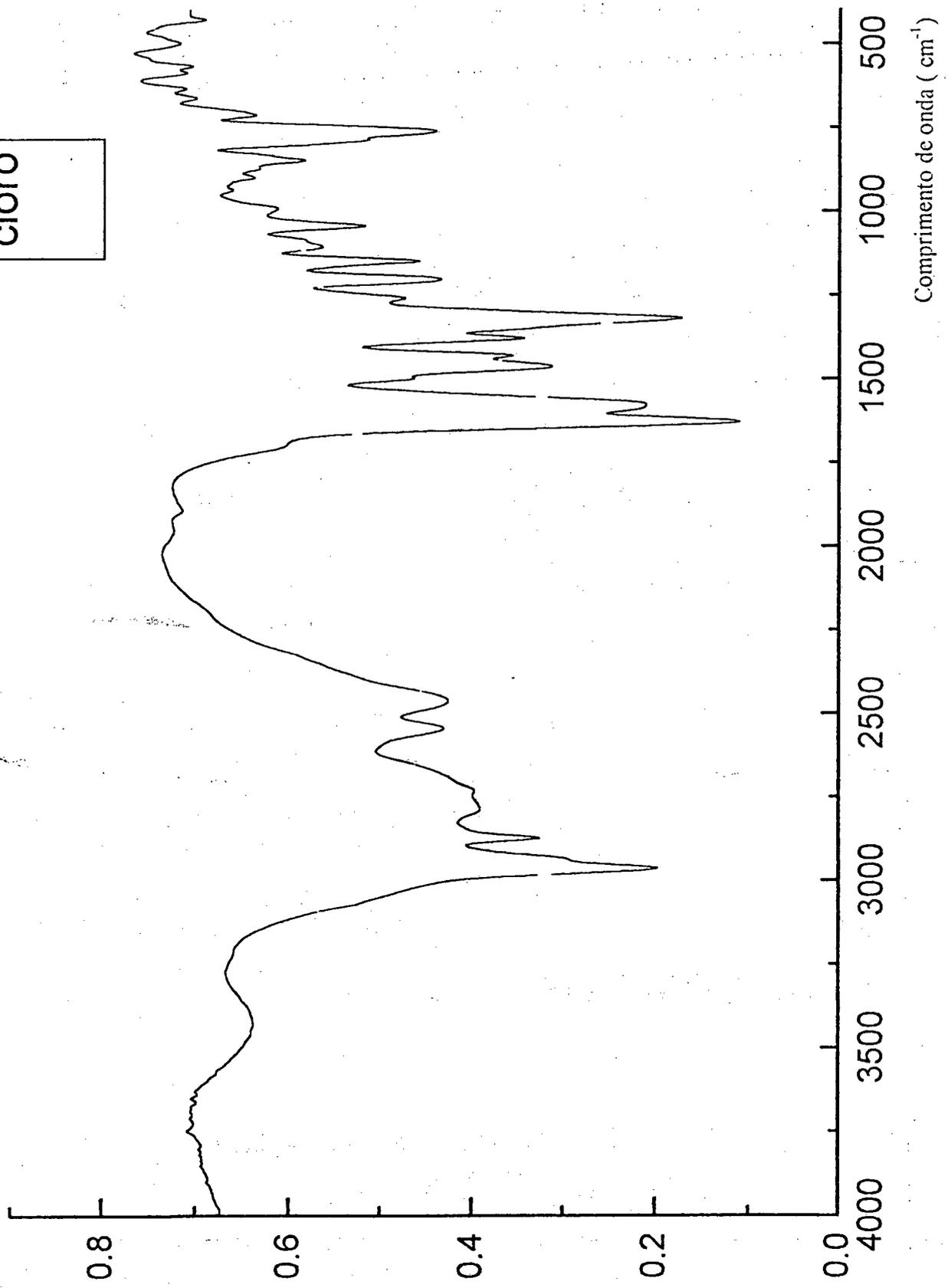


Figura 16: Espectro de infravermelho da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico em pastilha de KBr.

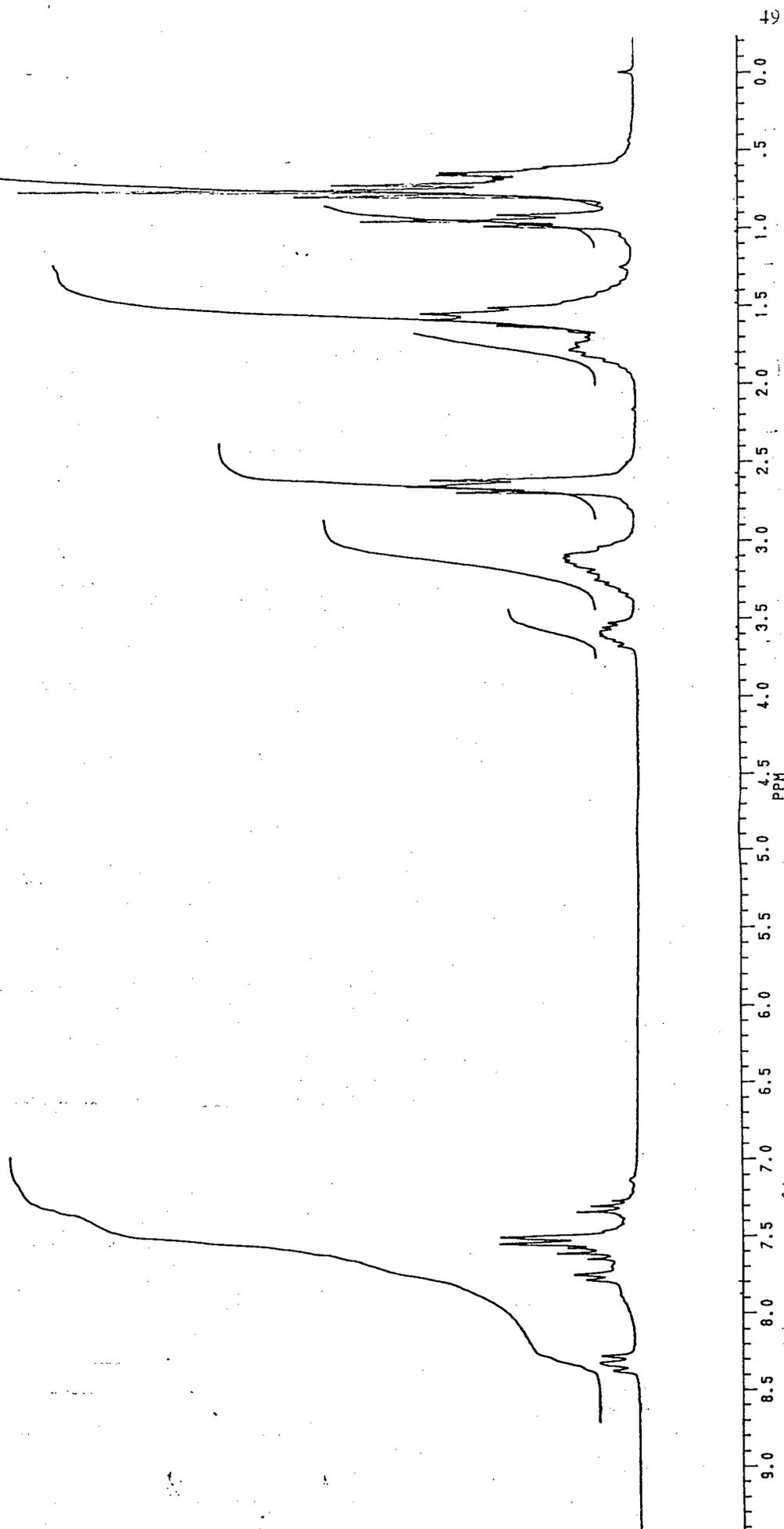
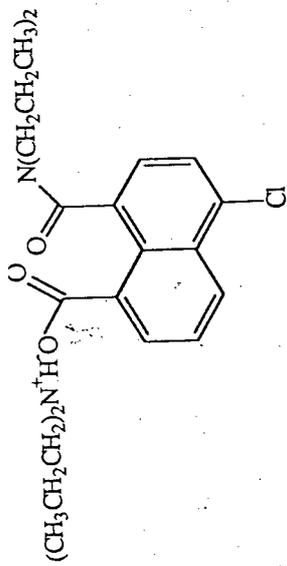


Figura 17: Espectro de RMN - ^1H da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico em

CDCl_3

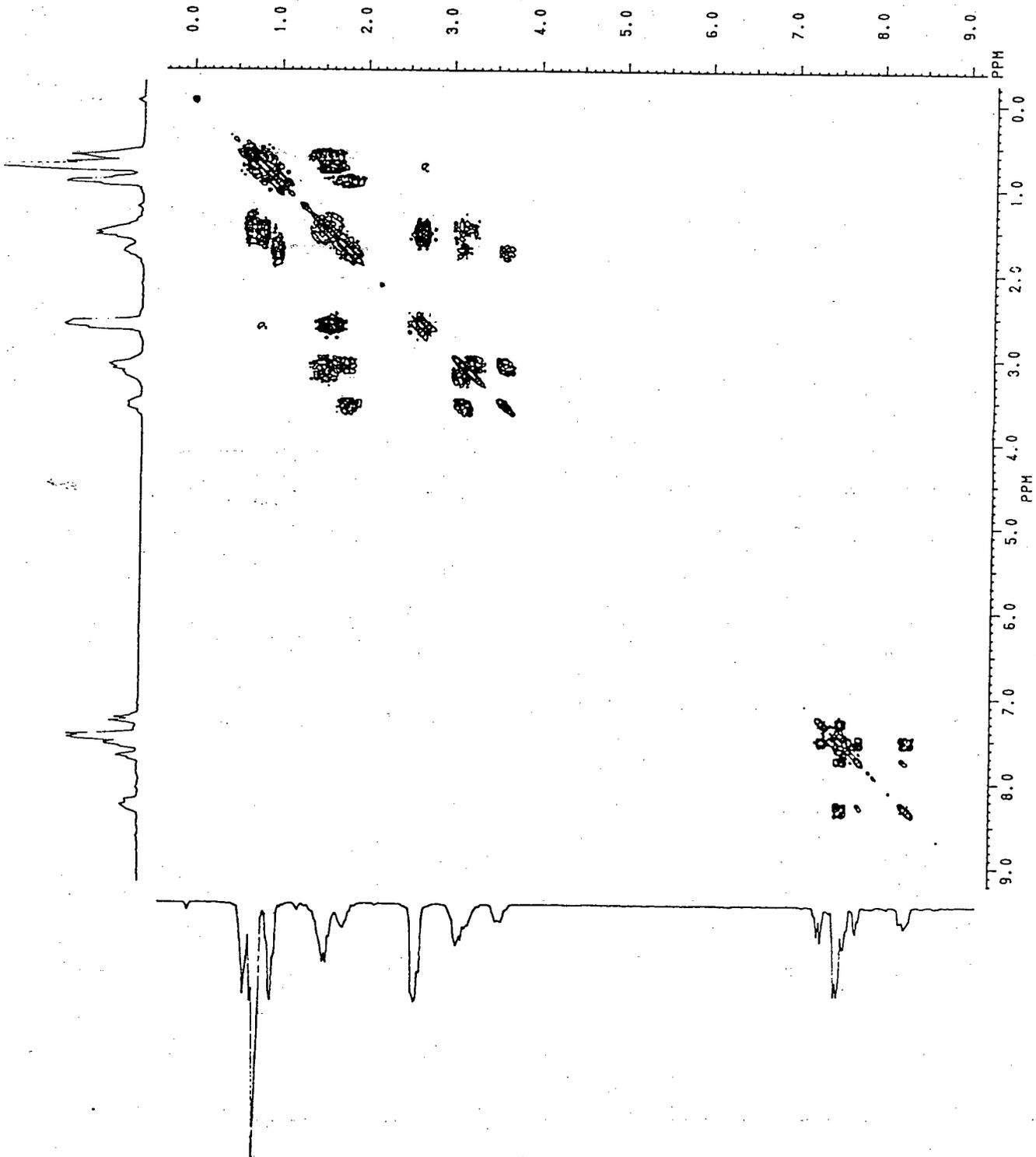


Figura 18: Espectro de Cosy 45 da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico em CDCl_3

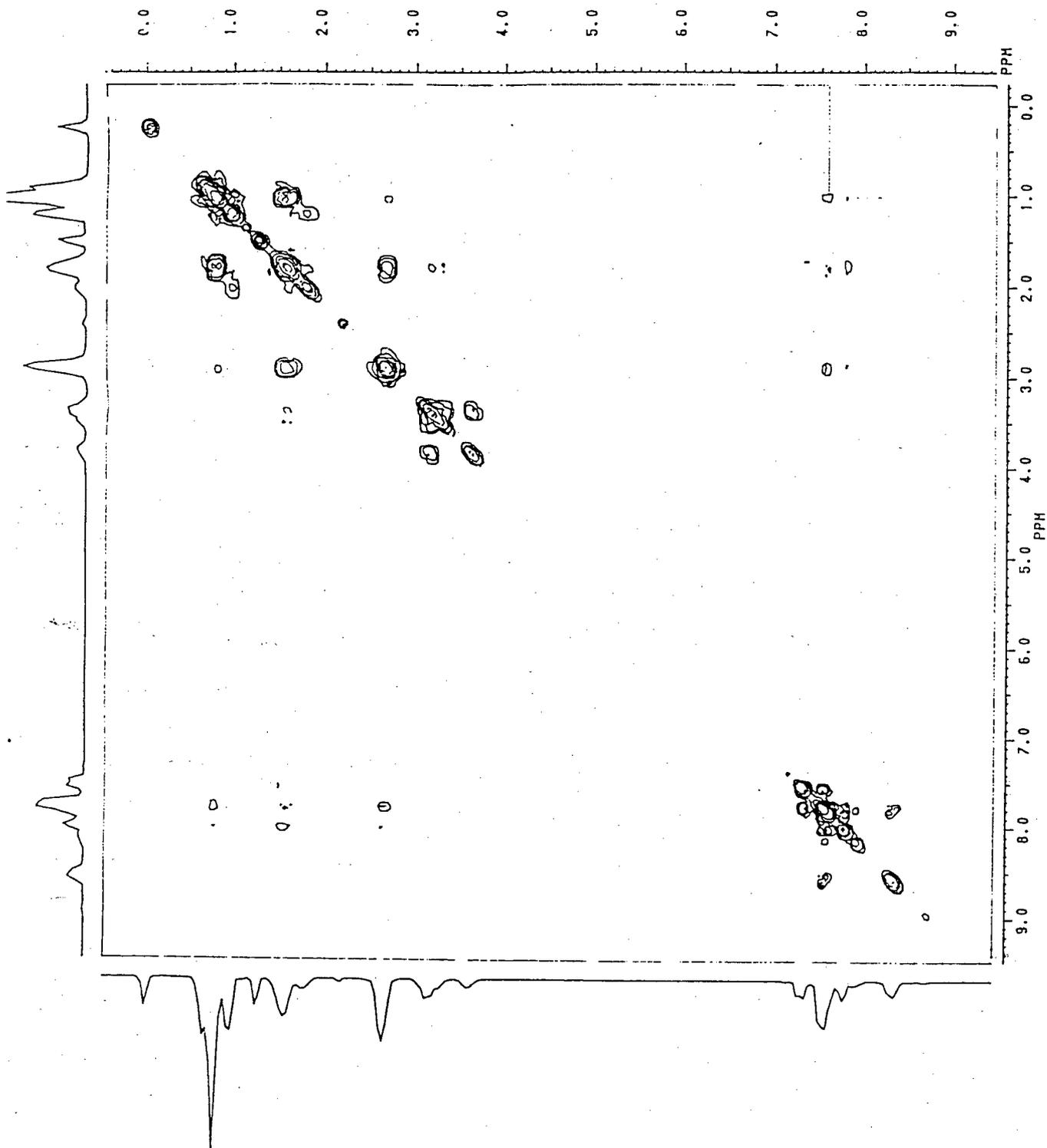


Figura 19: Espectro de NOE da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico

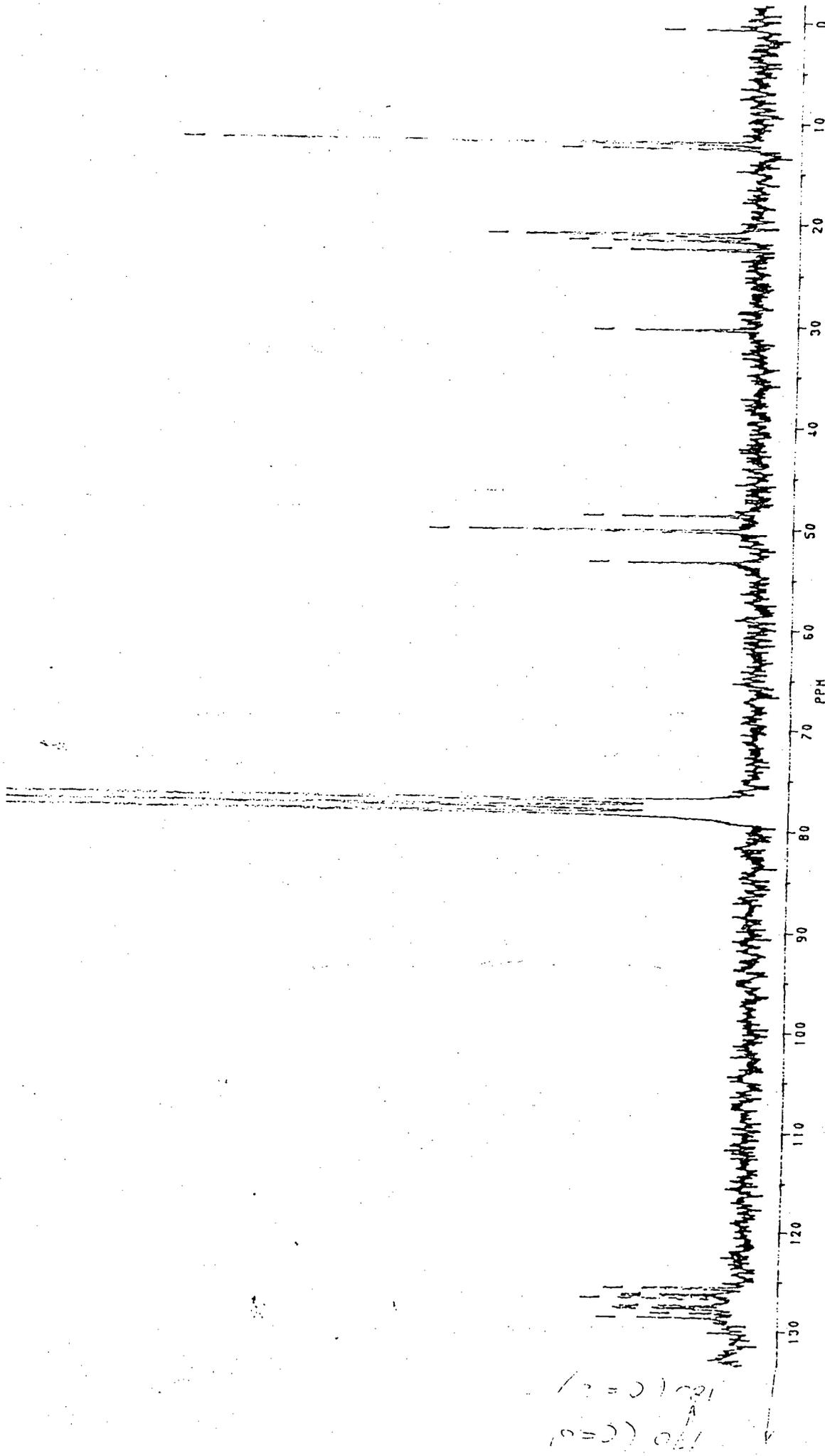


Figura 20: Espectro de RMN - ^{13}C da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico em CDCl_3

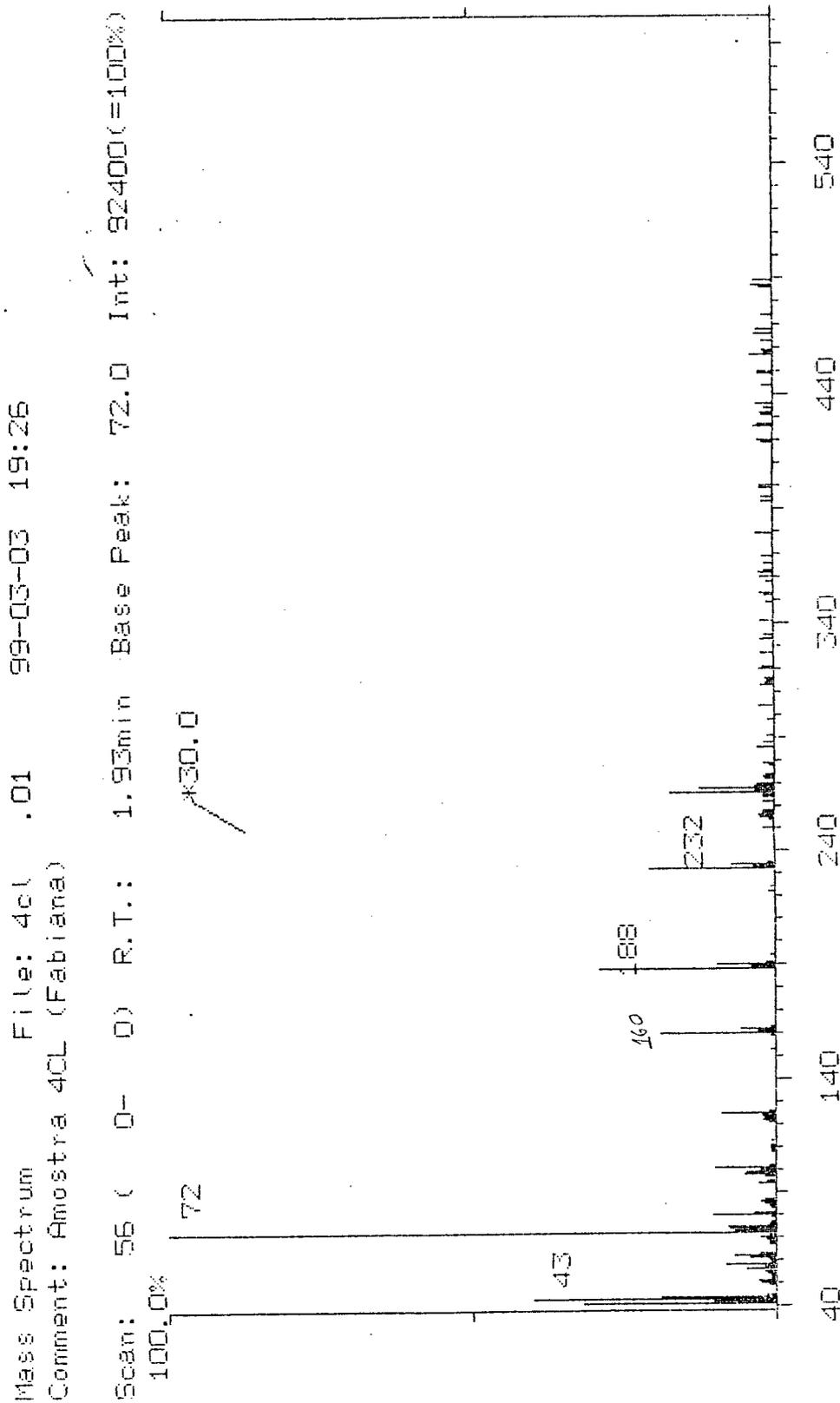


Figura 21: Espectro de massa da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico

O espectro de massa (Figura 21) proporcionou a confirmação da estrutura do composto, onde pode-se observar os picos em $m/z = 43, 72, 101, 160, 188, 232, 266$ e 434 . O pico de $m/z = 434$ refere-se ao íon molecular M^+ que indica o peso molecular do composto, isto é, 434g/mol .

II.1.2- CARACTERIZAÇÃO DA AMIDA DERIVADA DO ANIDRIDO BROMO-1,8-NAFTÁLICO COM A DIPROPILAMINA

Nos espectros de UV-Visível do anidrido e do produto observou-se o deslocamento hipsocrômico do $\lambda_{\text{máx}}$ de 337nm para 304nm .

Através da análise do ponto de fusão acompanhado por espectroscopia de UV-Visível, observou-se que o produto funde-se a temperatura de $110 - 113^\circ\text{C}$. O composto formado apresentou-se termicamente mais estável que o análogo cloro-derivado (Figura 22 e 23).

As bandas exibidas no espectro de infravermelho, na região de 3500 a 3000cm^{-1} são características de sal de amônio. O deslocamento da banda da ligação $\text{C}=\text{O}$ do anidrido, de 1700cm^{-1} para 1630cm^{-1} no produto, demonstra a formação da amida. A banda de média absorção em 890cm^{-1} , representa estiramento $\text{Br}-\text{C}_{(\text{ar})}$ (Figura 24).

Analogamente ao derivado 4-cloro, o estudo de RMN - ^1H para o composto 4-bromo, mostra picos de absorção na região de: $\delta = 0,70$ (m, 6H, $\text{CH}_3(\text{amida})$); $\delta = 0,92$ (t, 6H, $\text{CH}_3(\text{amônio})$); $\delta = 1,51$ (m, 4H, $\text{CH}_2-\text{CH}_3(\text{amida})$); $\delta = 1,79$ (m, 4H, $\text{CH}_2-\text{CH}_3(\text{amônio})$); $\delta = 2,60$ (m, 4H, $\text{CH}_2-(\text{NC}=\text{O})$); $\delta = 3,10$ (m, 3H, $\text{CH}_2-\text{NH}_2^+$); $\delta = 3,61$ (m, 1H, $\text{CH}_2-\text{NH}_2^+$); $\delta = 6,41$ (br s, 2H, $^+\text{NH}_2$); $\delta = 7,45$ (m, 5H, Ar); $\delta = 8,30$ (m, 2H, Ar) (Figura 25).

O espectro de RMN - ^{13}C apresentou sinais de absorção na região de: $\delta= 11,18$ (2C, $\underline{\text{CH}_3}\text{-CH}_2$ (amônio)); $\delta= 11,80$ (2C, $\underline{\text{CH}_3}\text{-CH}_2$ (amida)); $\delta= 19,50$ (2C, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_3$ (amônio)); $\delta= 20,95$ (1C, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_3$ (amida)); $\delta= 21,83$ (1C, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_3$ (amida)); $\delta= 48,02$ (1C, $\underline{\text{CH}_2}\text{-N(C=O)}$); $\delta=48,40$ (2C, $\text{NH}_2^+\text{-CH}_2$); $\delta= 52,50$ (1C, $\underline{\text{CH}_2}\text{-N(C=O)}$); $\delta= 124,52$ (C₃, C₁₀H₆); $\delta= 125,87$ (C₂, C₁₀H₆), $\delta= 126,24$ (C₆, C₁₀H₆); $\delta= 126,91$ (C₇, C₁₀H₆); $\delta= 127,21$ (C₄, C₁₀H₆); $\delta= 127,89$ (C₅, C₁₀H₆); $\delta= 128,80$ (C₁, C₁₀H₆); $\delta= 129,78$ (C₁₀, C₁₀H₆); $\delta= 132,36$ (C₉, C₁₀H₆); $\delta= 135,65$ (C₈, C₁₀H₆); $\delta= 171,93$ (C=O) e $\delta= 173,48$ (COO⁻) (Figura 26).

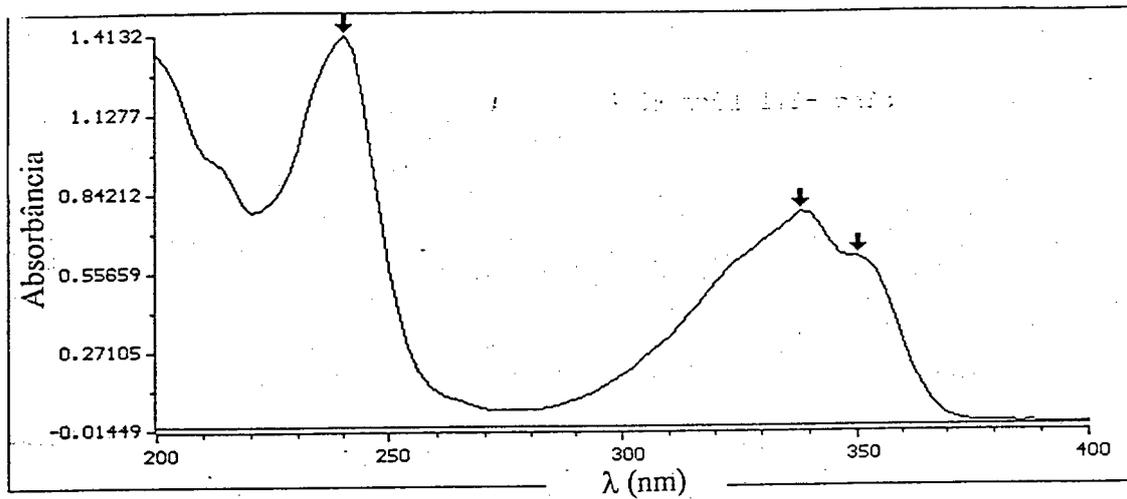


Figura 22: Espectro de U.V-Visível do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico.

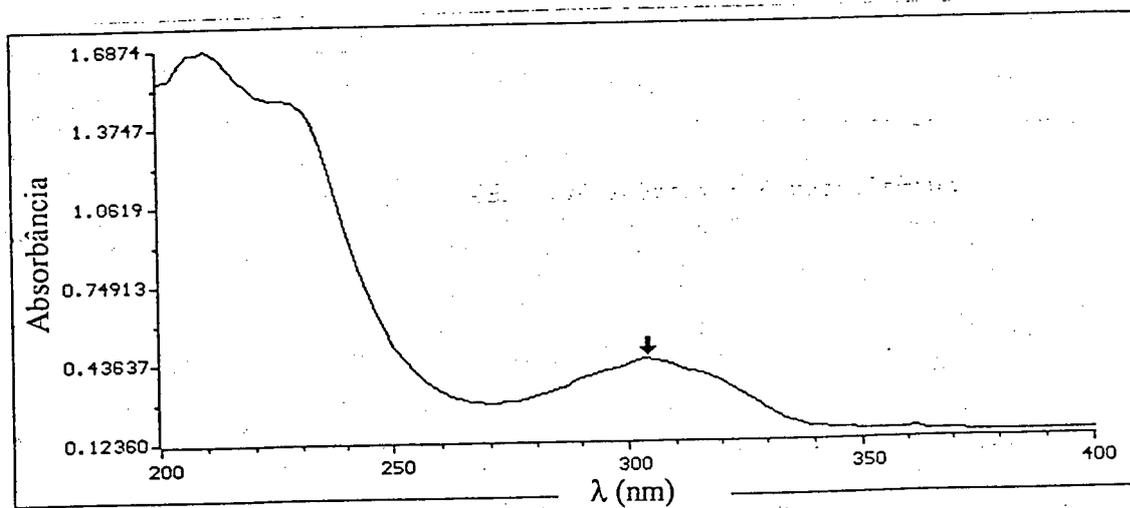


Figura 23: Espectro de U.V-Visível da amida derivada do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico.

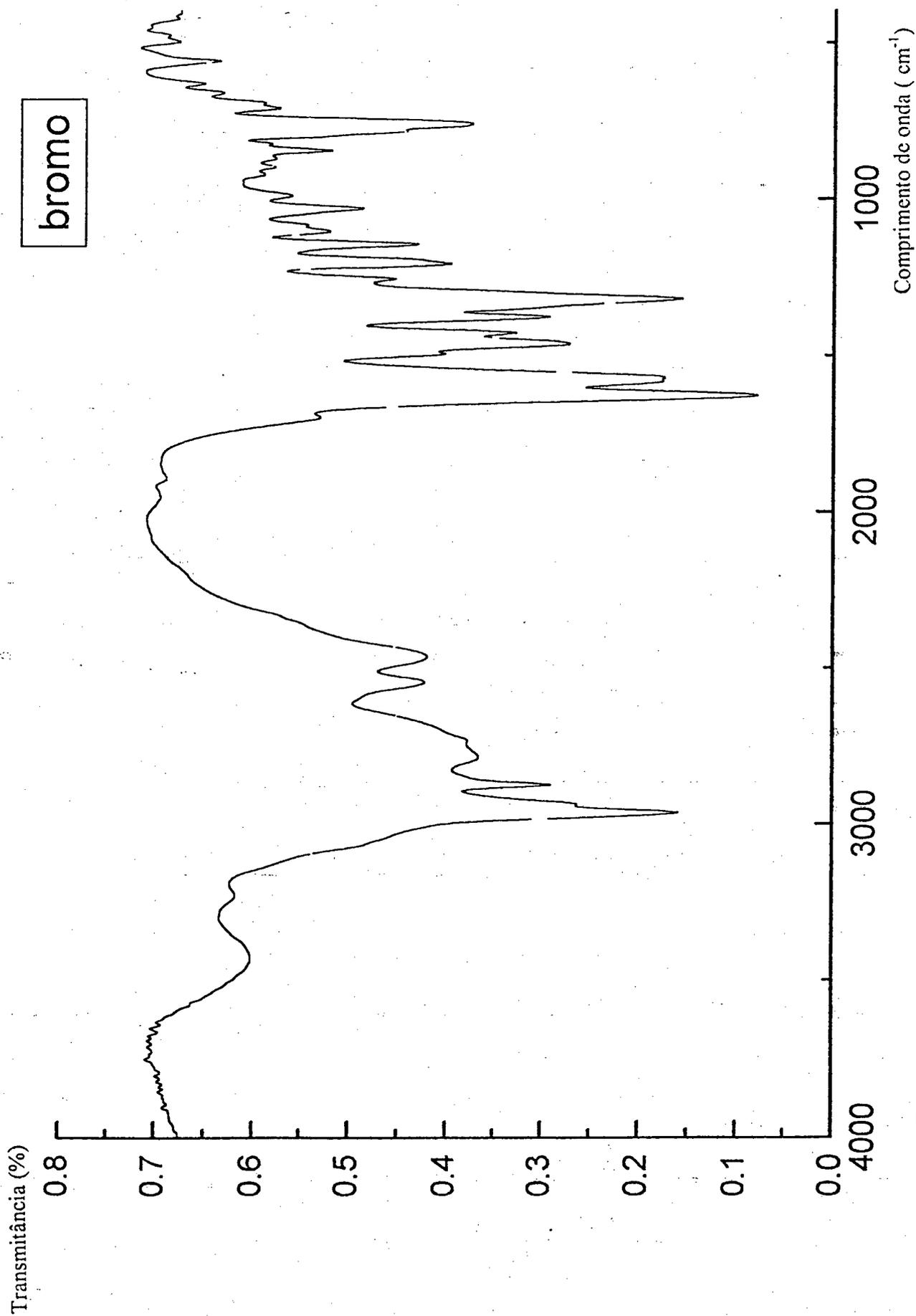


Figura 24: Espectro de infravermelho da amida derivada do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico em pastilha de KBr.

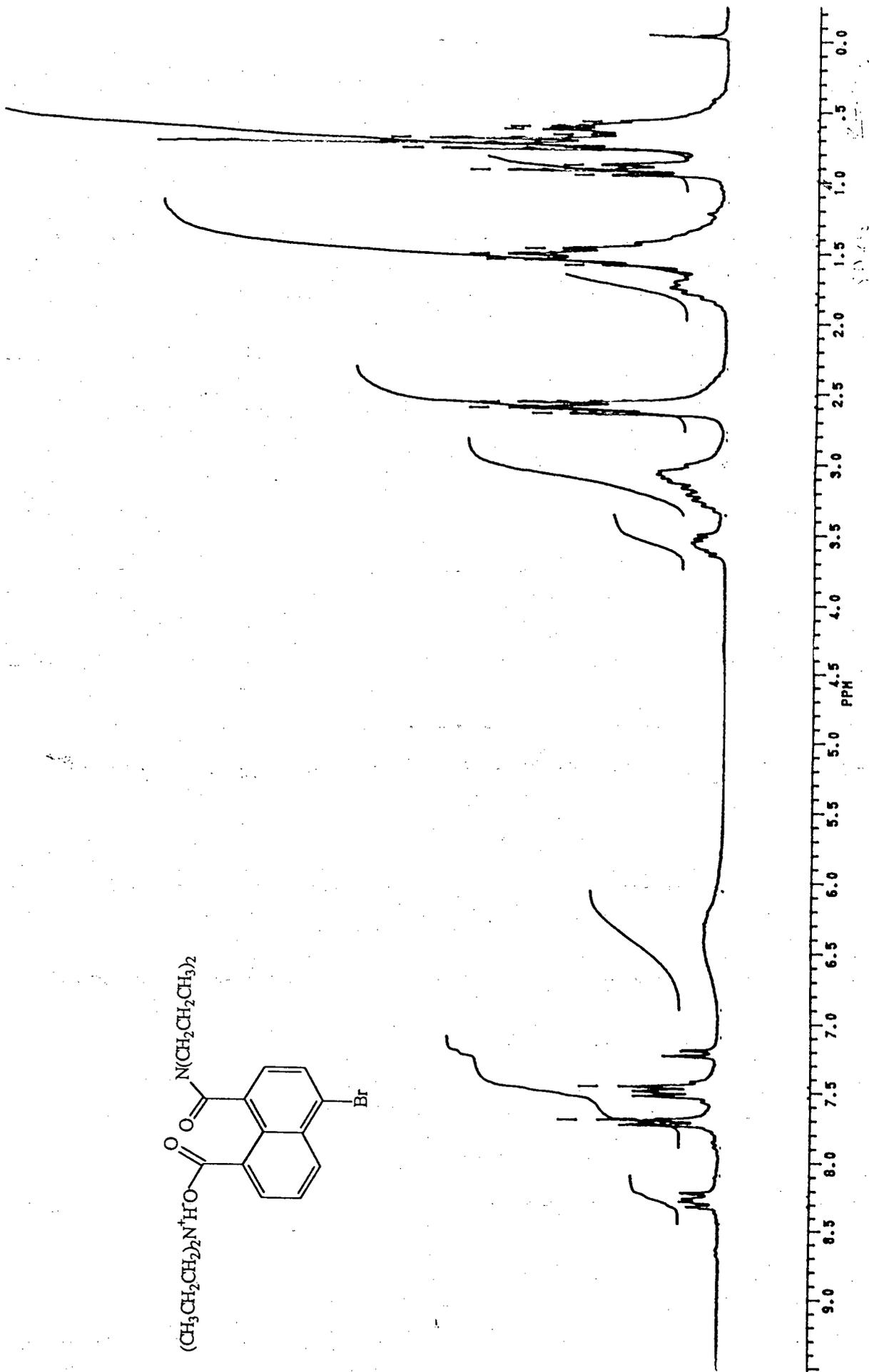
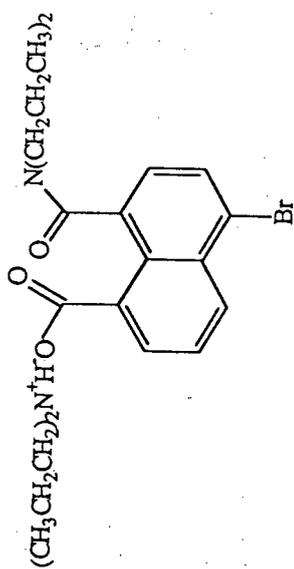


Figura 25: Espectro de RMN - ^1H da amida derivada do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico em CDCl_3

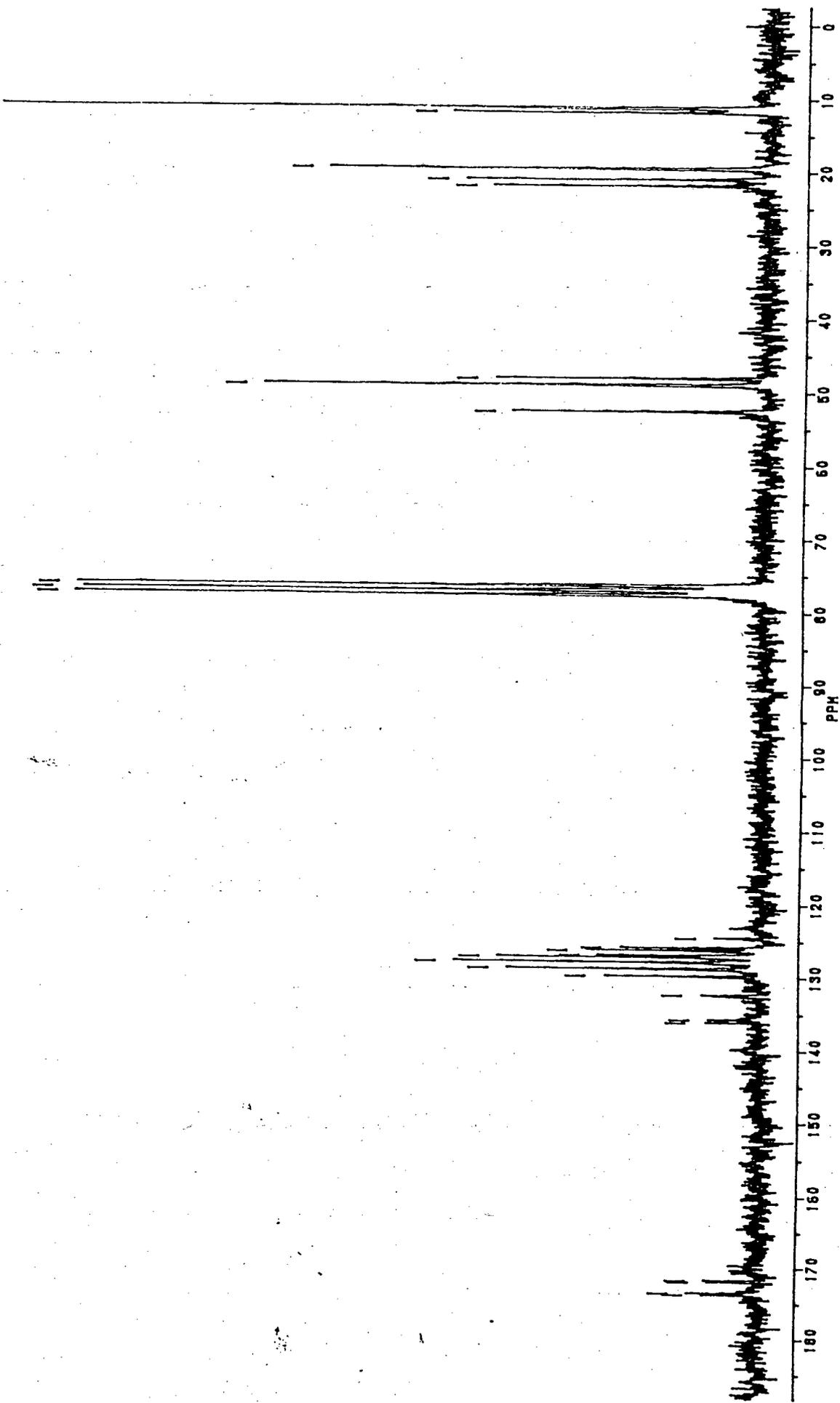


Figura 26: Espectro de RMN - ^{13}C da amida derivada do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico em CDCl_3

III.1.3- CARACTERIZAÇÃO DA AMIDA DERIVADA DO ANIDRIDO 4-NITRO 1,8-NAFTÁLICO COM A DIPROPILAMINA.

No espectro de UV-Visível do produto não foi possível observar um grande deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$, apenas um aumento da absorvância entre o comprimento de onda de 260 a 290nm e uma diminuição da absorvância no $\lambda_{\text{máx}}$ de 342nm. (Figura 27).

As bandas exibidas no espectro de infravermelho na região de 3500 a 3000 cm^{-1} são características de sal de amônio. O deslocamento da banda da ligação C=O do anidrido, de 1700 cm^{-1} para 1638-1618 cm^{-1} no produto, demonstra a formação da amida, banda de absorção forte em 1150 cm^{-1} , representa estiramento $\text{NO}_2\text{-C}_{(\text{ar})}$ (Figura 28).

Por analogia, os sinais do espectro de RMN - ^1H foram determinados: $\delta= 0,80$ (m, 6H, $\text{CH}_3(\text{amida})$); $\delta= 0,98$ (t, 6H, $\text{CH}_3(\text{amônio})$); $\delta= 1,51$ (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amida})$); $\delta=1,80$ (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{amônio})$); $\delta= 2,70$ (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-(NC=O)}$); $\delta= 3,40$ (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2^+$); $\delta=4,55$ (m, 2H, $^+\text{NH}_2$); $\delta=7,52$ (m, 5H, Ar); $\delta=8,45$ (m, 2H, Ar) (Figura 29).

O espectro de NMR - ^{13}C apresentou sinais de absorção na região de: $\delta= 11,21$ (2C, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ (amônio)); $\delta= 11,77$ (2C, $\text{CH}_3\text{-CH}_2(\text{amida})$); $\delta= 19,50$ (2C, $\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amônio})$); $\delta= 21,00$ (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amida})$); $\delta= 21,79$ (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_3(\text{amida})$); $\delta= 48,02$ (1C, $\text{CH}_2\text{-N(C=O)}$); $\delta=48,39$ (2C, $\text{NH}_2^+\text{-CH}_2$); $\delta= 52,76$ (1C, $\text{CH}_2\text{-N(C=O)}$); $\delta= 121,62$ (C_3 , C_{10}H_6); $\delta= 122,49$ (C_2 , C_{10}H_6); $\delta= 122,94$ (C_6 , C_{10}H_6); $\delta= 123,88$ (C_7 , C_{10}H_6); $\delta= 124,15$

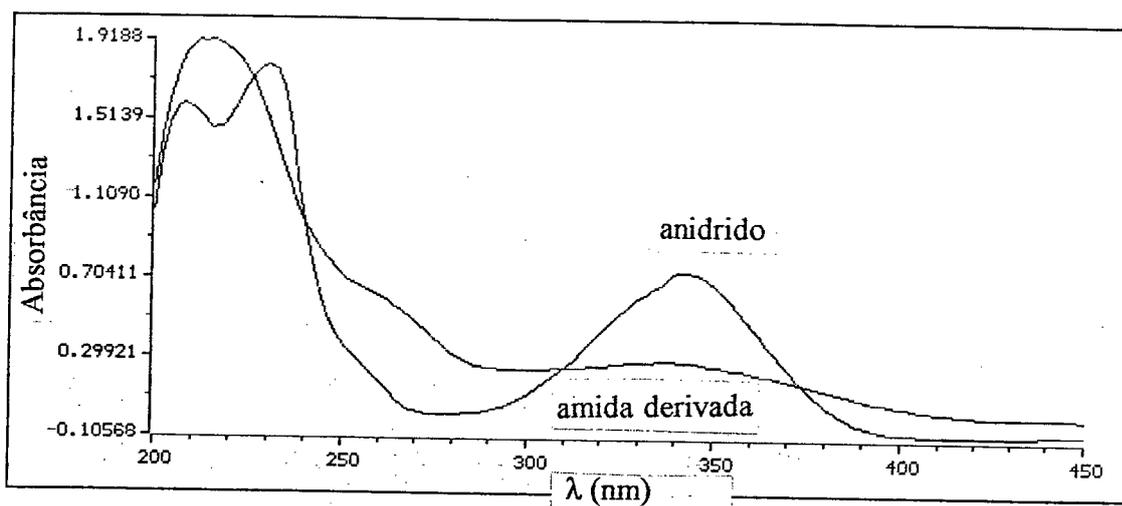


Figura 27: Espectro de U. Visível da amida derivada do anidrido 4-nitro-1,8-naftálico.

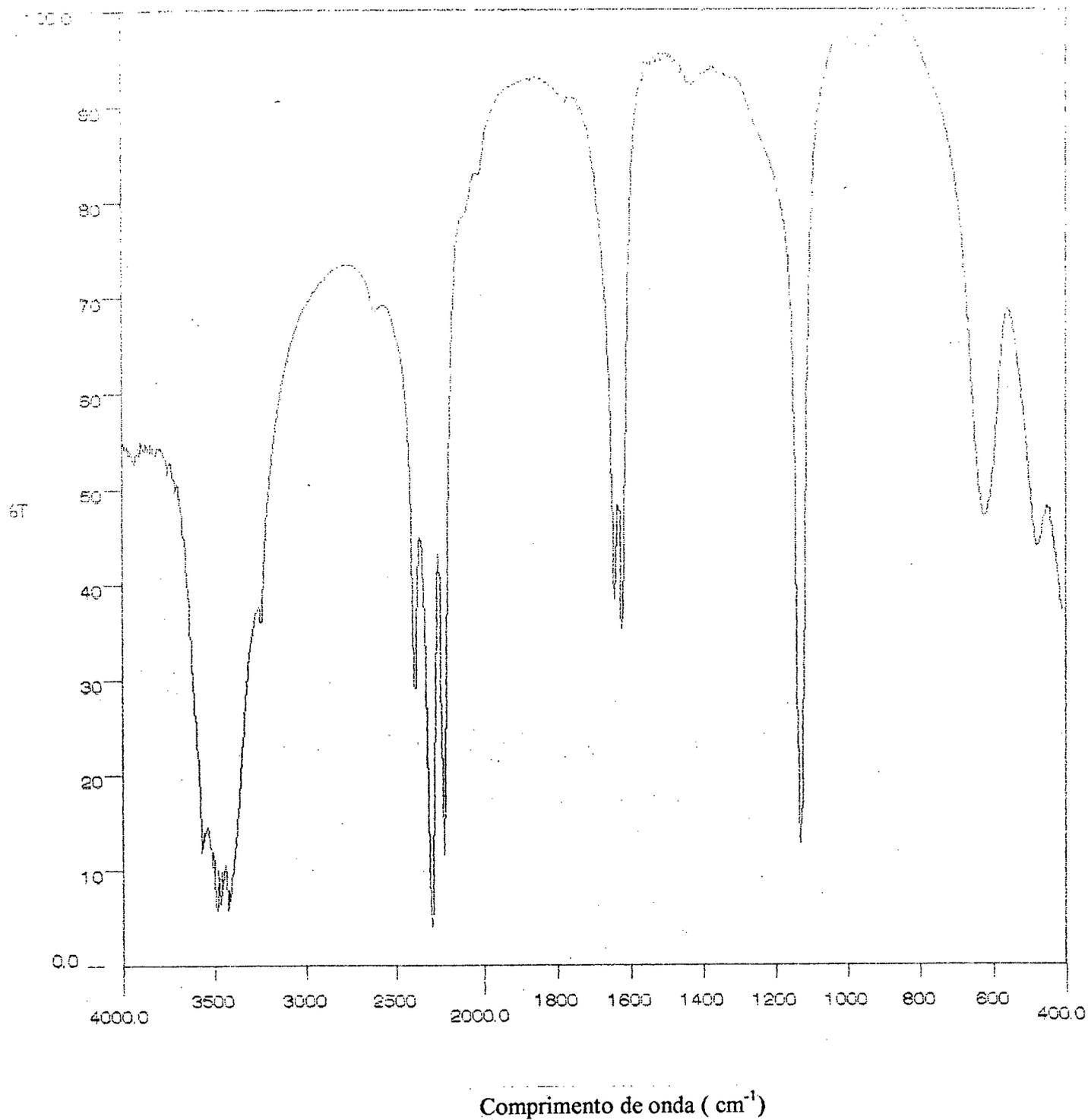


Figura 28: Espectro de infravermelho da amida derivada do anidrido 4-nitro-1,8-naftálico em pastilha de KBr.

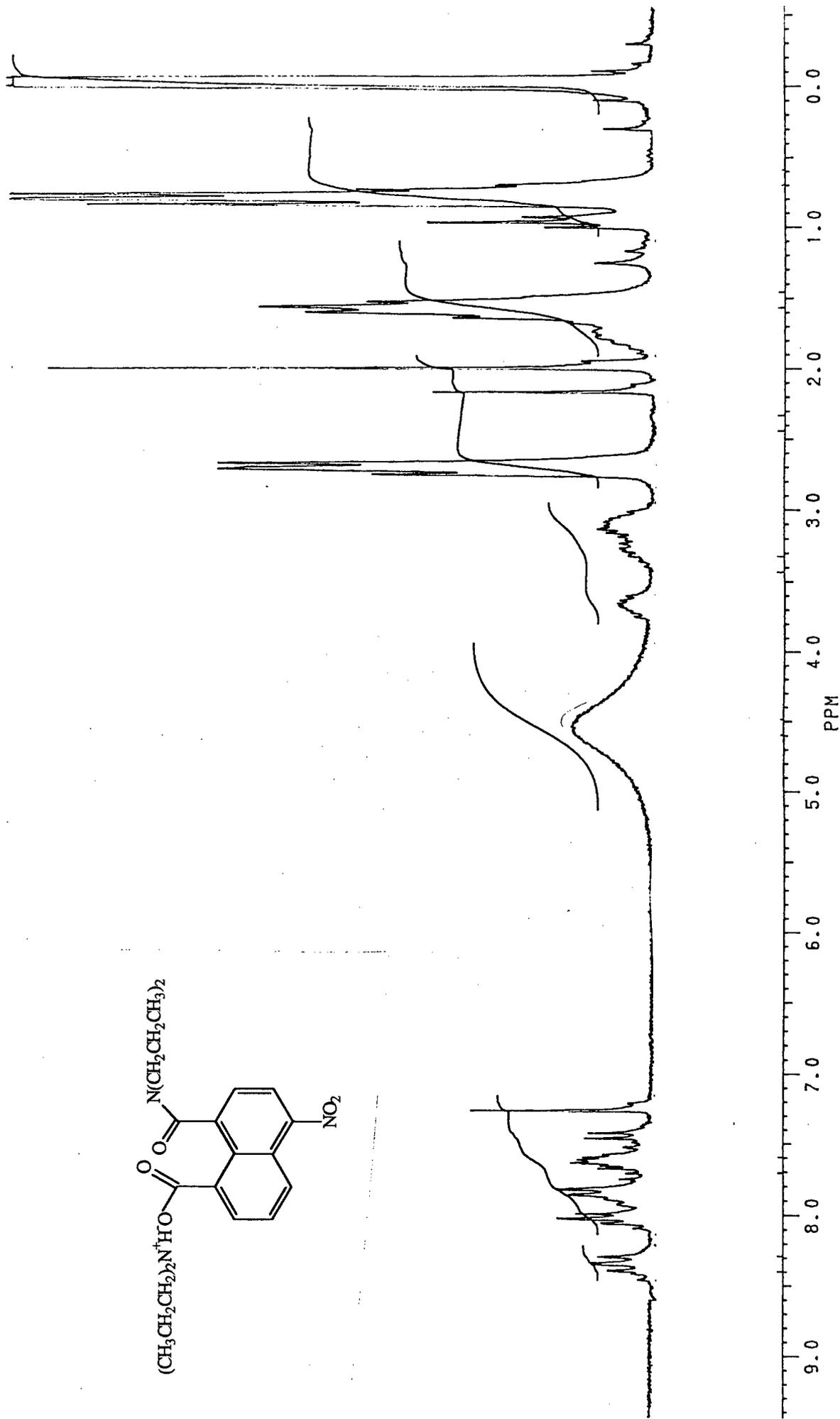
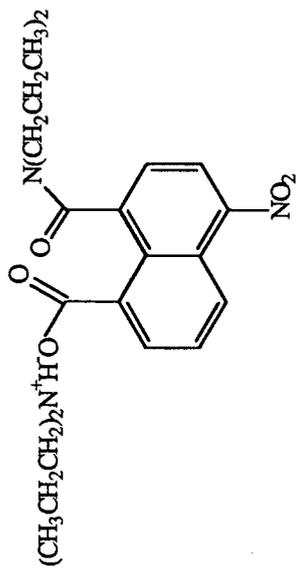


Figura 29: Espectro de RMN - ^1H da amida derivada do anidrido 4-nitro-1,8-naftálico em

CDCl_3

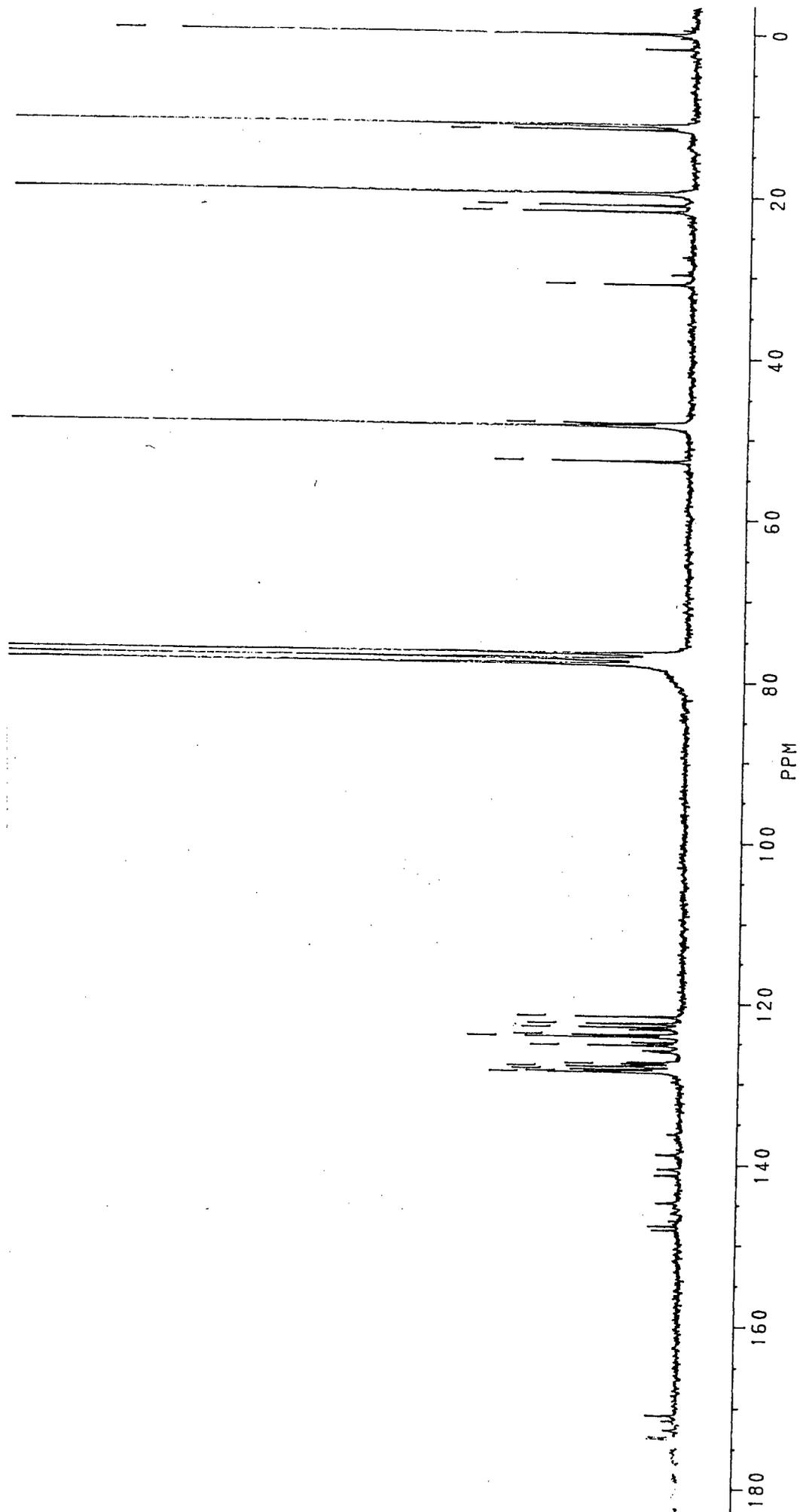


Figura 30: Espectro de RMN – ^{13}C da amida derivada do anidrido 4-nitro-1,8-naftálico em CDCl_3

(C₄, C₁₀H₆); δ = 125.22 (C₅, C₁₀H₆); δ = 127.90 (C₁, C₁₀H₆); δ = 128.25 (C₁₀, C₁₀H₆); δ = 128.48 (C₉, C₁₀H₆); δ = 128.62 (C₈, C₁₀H₆); δ = 172.02 (C=O) e δ = 173,98 (COO⁻) (Figura 30).

A síntese deste composto apresentou grande dificuldade devido ao fato do produto ser instável a temperatura ambiente, fazendo-se necessário que tanto a reação, quanto as análises para a caracterização fossem realizadas a baixas temperaturas.

III.1.4- AMIDA DERIVADA DO ANIDRIDO 4-AMINO- 1,8-NAFTÁLICO COM A DIPROPILAMINA.

Na síntese da amida derivada do anidrido 4-amino-1,8-naftálico, realizada sob várias condições reacionais, não foi obtido o produto. Durante o processo de síntese todas as alíquotas retiradas e submetidas a inspeção de espectroscopia de UV-Visível não apresentaram alteração de $\lambda_{\text{máx}}$. quando comparada ao respectivo anidrido usado como reagente.

Realizou-se a síntese sob refluxo de duas maneiras distintas: mantendo-se as mesmas proporções de reagentes e utilizando a própria amina como solvente da reação. Em ambos os casos não foi observado a formação do produto pretendido. As análises elementares de IV, UV-Visível e RMN – ¹H e RMN – ¹³C da amostra isolada das misturas reacionais demonstraram que se tratava do anidrido, com isto acredita-se que este seja pouco reativo, impossibilitando assim a síntese da amida pelos métodos propostos.

III.2- ESTUDOS CINÉTICOS

O interesse no estudo de reações de hidrólise de amidas derivadas do anidrido 1,8-naftálico substituídos na posição 4, surgiu em virtude de uma análise conformacional destes compostos, os quais possuem um grupo nucleófilo ancorado numa estrutura carbônica rígida, a uma proximidade adequada para o ataque ao grupo eletrófilo.

Este é um bom modelo, onde poderíamos observar uma catálise intramolecular, que poderia contribuir na elucidação dos efeitos responsáveis pela catalise apresentada pelas enzimas. A partir deste modelo poderíamos então ir ao encontro, ou não, de uma das teorias que tem sido lançadas para explicar a alta reatividade das reações enzimáticas.

III.2.1- AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE INTRAMOLECULAR DAS AMIDAS DERIVADAS DO ANIDRIDOS 1,8-NAFTÁLICO SUBSTITUÍDOS NA POSIÇÃO 4

As cinéticas das reações de hidrólise das amidas foram estudadas acompanhando-se o aparecimento do anidrido a 340nm. Verificou-se a partir de curvas de absorbância vs. tempo que em determinadas regiões de pH o anidrido, depois de formado, também sofre hidrólise (Figura 31).

Este experimento caracteriza um esquema de reações consecutivas para as reações alvo de análise (Esquema 8); entretanto, em nenhum valor de pH, sob o qual a reação foi investigada, a velocidade de hidrólise do anidrido (Figura 32 e 33) é maior que a velocidade de hidrólise da amida³⁷.

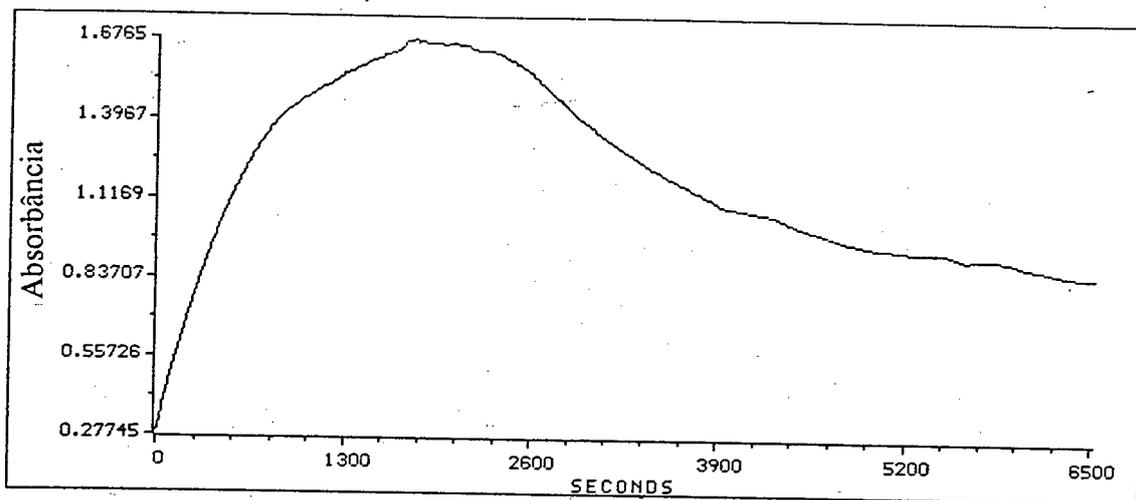


Figura 31: Cinética da reação de hidrólise da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8 naftálico e pH 2,0.

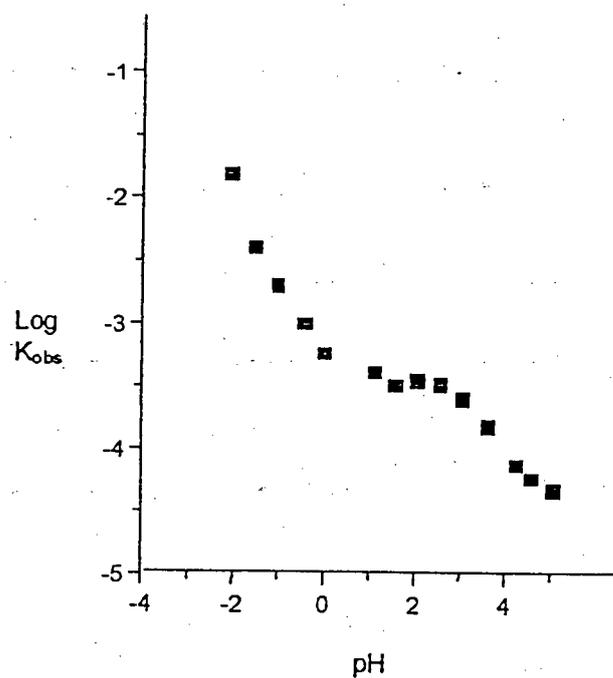


Figura 32: Valores de k_{obs} em função do pH para a reação de hidrólise do anidrido 4-cloro 1,8-naftálico.

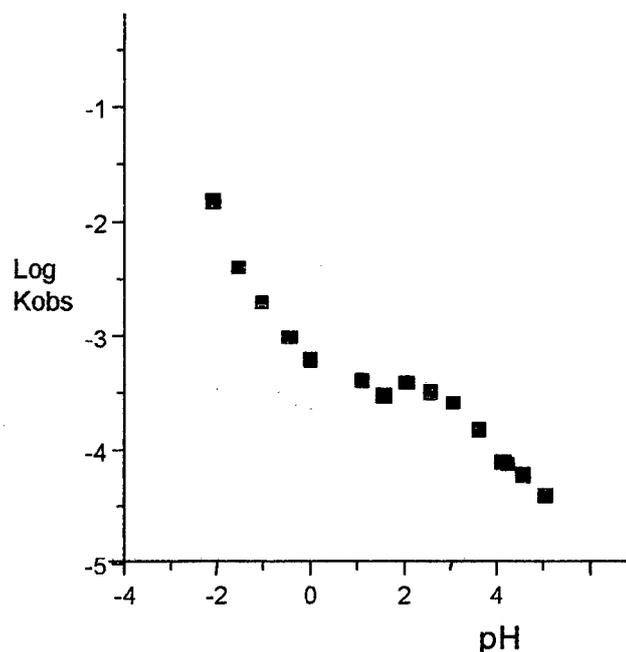
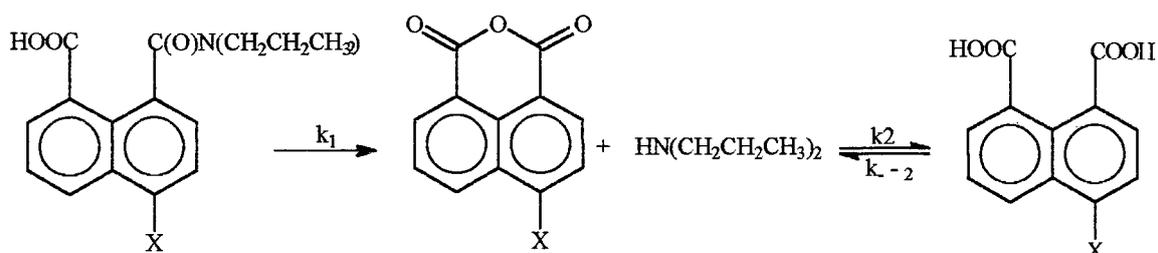


Figura 33: Valores de log kobs em função do pH para a reação de hidrólise do anidrido 4-bromo 1,8-naftálico.



Esquema 8

O perfil de velocidade vs. pH para a amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico, mostra que a velocidade de hidrólise aumenta com o aumento da acidez da solução e em que diferentes regiões da curva dois efeitos distintos sobre a reação são evidenciados: numa determinada região o processo ocorre independentemente do pH (patamares) e na outra a catálise específica é detectada (Figura 34).

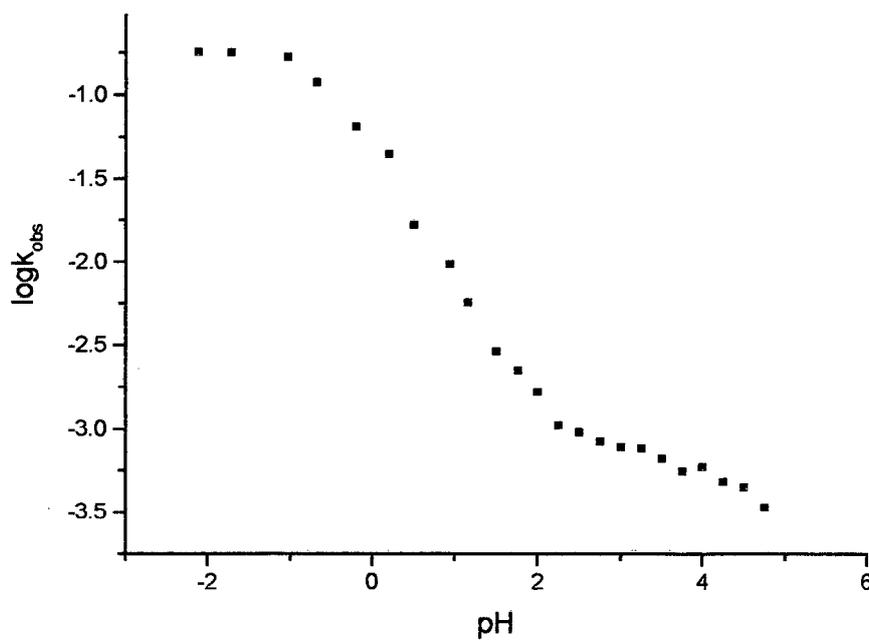


Figura 34: Perfil de velocidade vs. pH para a amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8-naftálico.

O mesmo tipo de perfil foi observado para a amida derivada do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico (Figura 35).

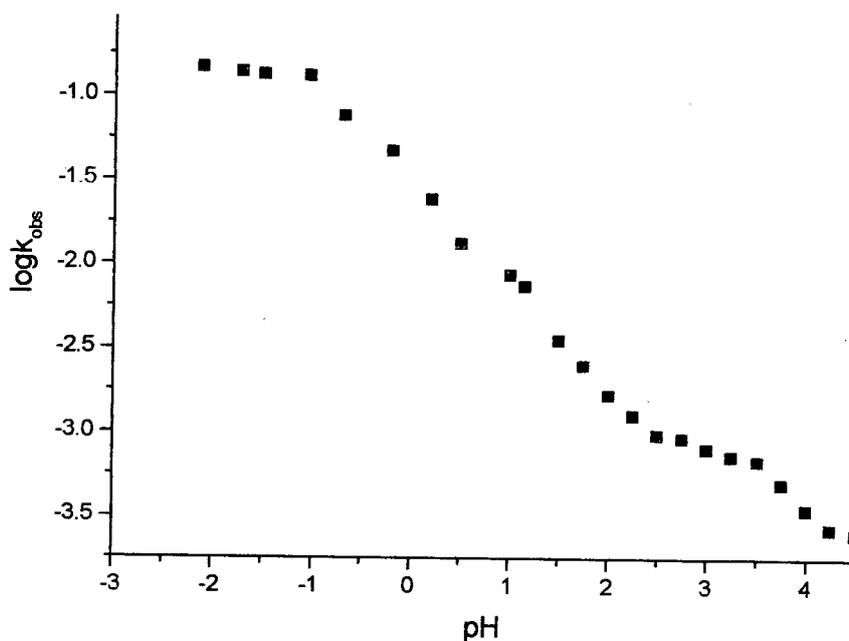


Figura 35: Perfil de velocidade vs. pH para a amida derivada do anidrido 4-bromo-1,8-naftálico.

Estudos já realizados sobre a hidrólise da dipropilamida derivada do anidrido 1,8-naftílico³⁵ demonstraram também a presença de dois patamares.

Para valores de pH 2,5 a 3,5 (Figura 36) a reação de hidrólise das amidas derivadas dos anidridos substituídos na posição 4, ocorre intramolecularmente, com a participação do grupo carboxílico em sua forma não dissociada³⁵, caminho A (Esquema 09).

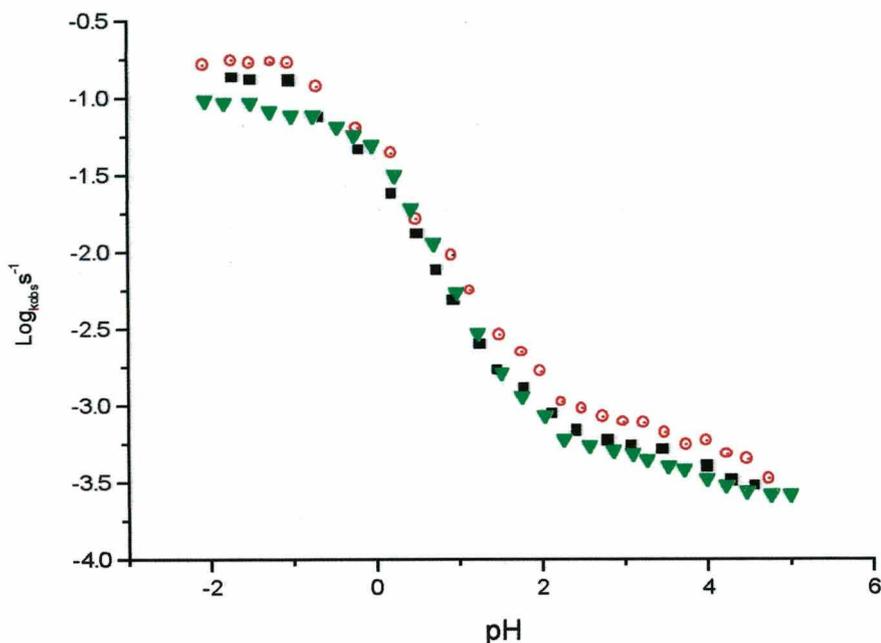


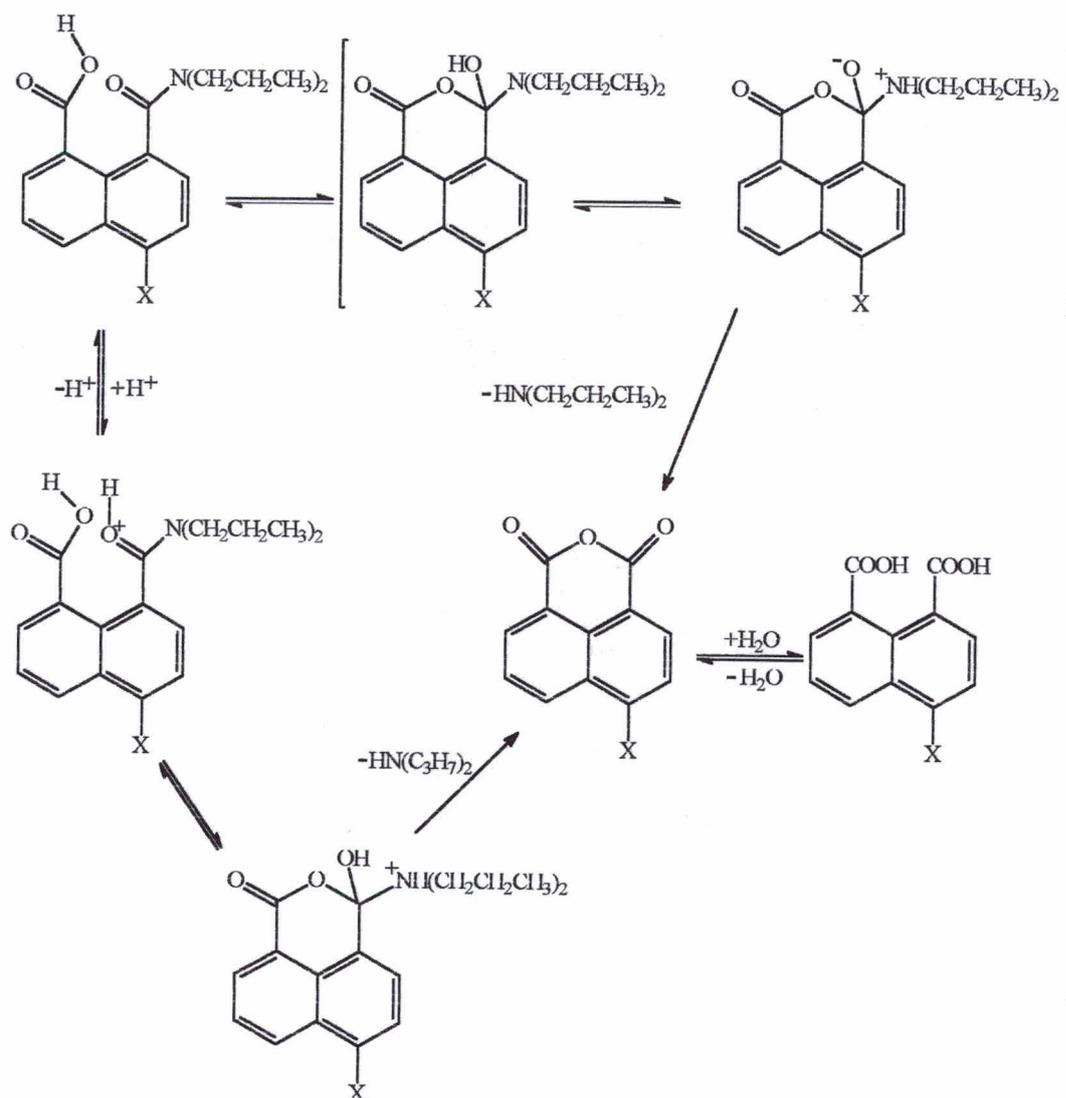
Figura 36: : Perfil de velocidade vs. pH para a amida derivada dos anidridos-1,8-naftálicos substituídos na posição 4 (○ Cloro, ■ Bromo, ▼ Hidrogênio) .

À medida que o pH diminui (região entre $H_0 = -2$ e $pH = 0$), o mecanismo passa a envolver o ataque nucleofílico sobre a amida protonada. Um substancial equilíbrio para a oxo-protonação da amida começa a ser importante^{37, 38}, caminho B (Esquema 9).

Nesta região de pH quase nenhuma N-protonação ocorre³⁹⁻⁴¹, como demonstrado pelo uso de íons N-aciltrialquilamônio na modelagem da amida N-protonada⁴², portanto, em meio altamente ácido o oxigênio carbonílico do grupo amida é protonado mais extensivamente e a reação torna-se cada vez mais rápida devido ao aumento da eletrofilicidade deste grupo.

Para a maioria das reações de hidrólise de amidas em meio ácido, a ausência da auto-troca de oxigênio⁴³ tem sido interpretada em termos da dissociação quase que exclusiva do intermediário tetraédrico por meio da quebra da ligação C-N.

Como no estado de transição o átomo de nitrogênio é o sítio mais básico, sua protonação ocorre preferencialmente e o grupo amino é eliminado na sua forma neutra. Percebe-se, a partir do perfil de pH vs. velocidade que em nenhum caso, a hidrólise das amidas pelo íon carboxilato ocorre à velocidade detectável. Portanto, nas regiões de pH superiores a zero o ataque intramolecular, pela forma não dissociada do grupamento carboxílico, caminho A, torna-se predominante.



Esquema 9

As constantes de velocidade observadas para a reação de hidrólise das amidas derivadas dos anidridos 4-cloro e 4-bromo 1,8-naftálico em pH 2,5 e 3,5, região onde a reação é em princípio exclusivamente intramolecular, são respectivamente 9.572×10^{-4} e 6.653×10^{-4} para o derivado cloro e 9.683×10^{-4} e 6.83×10^{-4} para o derivado bromo. Estes valores sugere uma molaridade efetiva (ME) na ordem de 10^{12} quando comparados a valores apresentados na literatura³³.

O esquema mecanístico proposto, demonstrou-se condizente com as investigações cinéticas realizadas³⁵.

Os fatores eletrônicos ocasionados por diferentes substituintes em uma molécula podem ser representados quantitativamente pelas constantes σ (constantes de grupo) na equação de Hammett⁴⁴ (Equação 2), onde ρ é denominada de constante de reação. Sendo que os valores de ρ dependem da natureza da reação e medem a sua susceptibilidade ao efeito polar exercido pelo anel substituído.

$$\rho\sigma = \log \frac{k}{k^0}$$

Equação 2

Graficando os valores de σ vs. $-\log k_{\text{obs}}$ para a reação alvo em pH -1,5 e 3,5, resultaram em valores de ρ de 1,15 e 0,88 respectivamente (Figura 37).

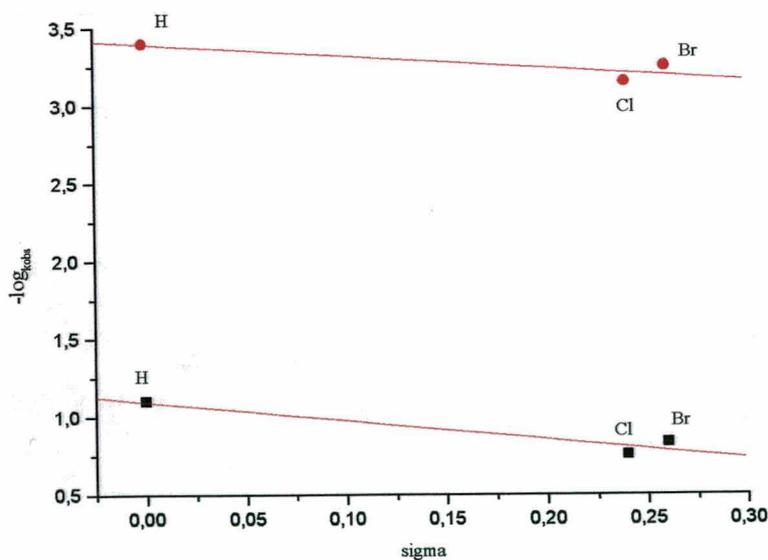


Figura 37: Valores graficados de σ vs. $-\log$ de k_{obs} (s^{-1}), das amidas derivadas dos anidridos 1,8 naftálicos substituídos nos pHs -1,5 (■) e 3,5 (●).

Os valores de positivos para ρ indicam que a reação é facilitada pela diminuição da densidade eletrônica no centro reacional, ou seja, a reação é favorecida por grupos retiradores de elétrons.

O estudo do efeito do substituinte na velocidade das reações ficou prejudicado devido a dificuldade de síntese do derivado NH_2 , e problemas de instabilidade do derivado NO_2 .

O efeito do substituinte nas reações de hidrólise das amidas derivadas do 4-cloro e 4-bromo parece não causar grandes mudanças na velocidade de reação e no mecanismo reacional proposto pois a posição dos patamares nos perfis de pH, quando comparados ao substituinte hidrogênio, não apresentou alteração de localização. Tal fato pode ser atribuído aos valores de σ para os derivados 4-cloro e 4-bromo próximos de zero.

Em outros trabalhos⁴⁵, o efeito do substituinte na constante de dissociação de ácidos e nas reações de hidrólise apresenta valores de σ extremos para os grupos NH_2 e NO_2 , ligados na posição 4 (Figura 38).

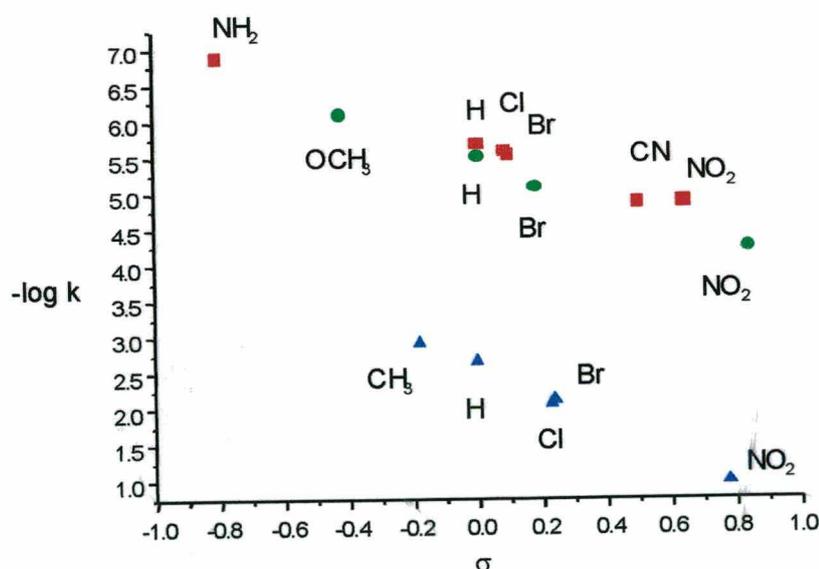


Figura 38: Efeito do substituinte (posição 4) na constante de dissociação do ácido benzóico (■), do ácido naftálico (●) e nas reações de hidrólise do naftalato de etila (▲).

Estes valores, permitem a compreensão das pequenas alterações nas velocidades de hidrólise das amidas para os substituintes cloro e bromo e do efeito dos substituintes NO_2 e NH_2 na estabilidade seja do reagente, o anidrido, ou do produto formado, devido a uma diminuição ou aumento da densidade eletrônica no centro reacional (Anexos II e III).

Um sistema reativo baseado na estrutura conformacional e eletrônica, como o modelo dos derivados do anidrido naftálico, está sujeito a mudanças extremas causadas pela simples substituição de um grupamento químico, onde as alterações na reatividade e na estabilidade destes sistemas podem resultar em dificuldades na síntese e caracterização, ou ainda nos estudos cinéticos de reações.

A escolha de uma reação modelo deve ser sempre baseada em resultados experimentais prévios e nunca em possíveis previsões puramente teóricas, assim aumentando as chances de obter experimentos bem sucedidos.

Os sistemas baseados no anidrido 1,8-naftálico substituídos na posição 4 por grupos com valores de σ fora dos extremos demonstraram-se simples e viáveis para estudos como reações modelos, onde a avaliação minuciosa do substituinte, em conjunto com técnicas experimentais e cálculos teóricos, pode revelar variações de distância, posicionamento dos grupos reativos (densidade eletrônica, comprimento de ligação) e estabelecer a importância das teorias propostas para a catálise intramolecular e enzimática.

IV - CONCLUSÕES

As reações do anidrido 1,8-naftálico substituídos na posição 4 pelos grupamentos cloro, bromo e nitro com a dipropilamida produz o respectivo sal de amônio da amida correspondente. Na reação de síntese da amida derivada do anidrido 4-amino-1,8-naftálico não obteve-se sucesso, pois acredita-se que este seja pouco reativo.

Estudos cinéticos propõem que as reações de hidrólise das amidas ocorrem intramolecularmente com a participação do grupamento carboxílico na sua forma não dissociada.

O efeito do substituinte 4-cloro e 4-bromo nas reações de hidrólise das amidas, parece não causar grandes mudanças na velocidade de reação e no mecanismo reacional proposto quando comparados a respectiva amida não substituída.

O estudo da influencia dos parâmetros de Hammett na velocidade das reações de hidrólise de amidas, ficou prejudicado devido a dificuldade de síntese do derivado NH_2 , e problemas de instabilidade do derivado NO_2 na temperatura que o estudo foi realizado.

Os derivados do anidrido naftálico, estão sujeito a mudanças extremas causadas pela substituição de um grupamento químico, que podem levar a alterações na reatividade e na estabilidade destes sistemas, resultando em dificuldades na síntese e caracterização, ou ainda nos estudos cinéticos de reações.

Os sistemas baseados no anidrido 1,8-naftálico substituídos na posição 4 por grupos com valores de σ fora dos extremos demonstram-se simples e viáveis para estudos como reações modelos.

V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCHRECK, J. O., “ *Organic Chemistry Concepts and Applications* “. Colorado : Cataloging Puplication, 1975. p. 398 – 413.
2. CAMPEBELL, M. K., “Biochemistry”. 2º edição. EUA: Saunders College Pupliching., 1991.
3. ZENER, B.; BENDER, M. L., J. Am. Chem. Soc. v. 85, p. 356, 1963.
4. ECKJ, C.; MARVEL, C. S., “ *Organic Synthesis* “. Nova Iorque: Willey, 1943. v.II. p. 374.
5. COUTOULY, G., “*Génie Enzymatique*” 6º edição. Paris: Masson., 1991.
6. BLOW, D. W., Acc. Chem. Res. v. 9, p. 145, 1976.
7. GANDOUR, R. D. “Transition States of Biochemical Process”. New York: Plenun Press. 1978. p. 535.
8. STORM, D. R.; KOSHALND, D. E., Effect of small changes in orientation on reaction rate. J. Am. Chem. Soc., v. 94, p. 5805, 1972.

9. MILSTIEN, S.; COHEN, L. A., Stereopopulation control. Rate enhancement in the lactonizations of o-hydroxyhydrocinnamic acids. J. Am. Chem. Soc., v. 94, p. 9158-9165. 1972.
10. MENGER, F. M., On the source of intramolecular and enzymatic reactivity. Acc. Chem. Res., v. 18, p. 128-134, 1985.
11. STORM, D. R.; KOSHALND, D. E., A effect os samall changes in the orientation on reaction rate. J. Am. Chem. Soc., v. 94, p. 5815-5825, 1972.
12. DAFFORN, A.; KOSHALND, D. E., Theoretical aspects of orbital steering. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 68, p. 2463-2467, 1971.
13. BRUICE, T. C.; BROWN, A ; HARRIS, D. O., On the concept of orbital steering in catalytic reactions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. v. 68, p. 658-661, 1971.
14. MENGER, F. M.; GALSS, L. E., Contributin of orbital aligment to organic enzymatic reactivity. J. Am. Chem. Soc., v. 102, p. 5404-5406, 1980.
15. BORCHARDT, R. T.; CHEN, L. A., Stereopopulation control. Rate enhancement in intramolecular nucleophilic displacement. J. Am. Chem. Soc., v. 94, p. 9166-9174, 1972.

16. HILLERY, P. S.; CHOEN, L. A., Stereopopulation control. Rate and equilibrium enhancement in the formation of homophthalic anhydrides. J. Am. Chem. Soc., v. 105, p. 2760-2770, 1983.
17. KARLE, J. M.; KARLE, L. L., Correlation of reaction rate acceleration with rotational restriction. Crystal-structure analysis of compound with a trialkyl lock. J. Am. Chem. Soc., v. 94, p. 9182-9189, 1972.
18. DANFORTH, A.W.; NICHOLSON, J. C., Steric acceleration of lactonization reactions: an analysis of "stereopopulation control". J. Am. Chem. Soc., v. 98, p. 4275-4281, 1976.
19. WINANS, R. E.; WILCOX, C. F., A comparison of stereopopulation control with conventional steric effects in lactonization of hydrocoumarinic acids. J. Am. Chem. Soc., v.98, p.4281-4285, 1976.
20. MENGER, F. M.; VENKATARAM, U. V., Proximity as a component of organic reactivity. J. Am. Chem. Soc., v. 107, p. 4706-4709, 1985.
21. PAGE, M. J.; JENCKS, W. P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA., v. 68, p. 1678, 1978.
22. KIRBY, A. J., Adv. Phys. Org. Chem., v. 17, p.183, 1980.

23. DETAR, D.F.; LUTHRA, N. P., Quantitative evaluation of steric effects in S_N2 ring closure reaction. J. Am. Chem. Soc., v. 102, p. 4505-4512, 1980.
24. BIRD, R.; STIRLING, C. J. M., J. Am. Chem. Soc., Perkin Trans. V. 2, p. 1221, 1973.
25. DAFORM, A.; KOSHALAND, D. E., Biophys. Res. Commun., v. 49, p. 940, 1972.
26. JENCKS, W.P., Acc. Chem. Res., v. 9, p. 425, 1976.
27. BENESI, A. J., Theory of elementary bimolecular reactions in liquid solution. Time spacing of recollisions between nonreactive in liquid solutions. J. Phys. Chem., v. 86, p. 4926-4930, 1982.
28. HERSHFIELD, R.; SCHMIR, G. L., Lactonization of ring-substituted coumarinic acids. Structural effects on the partitioning of tetrahedral intermediates in esterification. J. Am. Chem. Soc., v. 95, p. 7350-7369, 1973.
29. KNIPE, J. O.; COWARD, J. K., Role of buffers in methylase model reaction. General base catalysis by oxyanions vs. nucleophilic dealkylation by amines. J. Am. Chem. Soc., v. 101, p. 4339-4348, 1979.

30. MENGER, F. M., Directionality of proton transfer in solution. Three systems of known angularity. J. Am. Chem. Soc., v.105, p. 4996-5002, 1983.
31. SHERROD, M. J.; MENGER, F. M., "Delivery-control" in organic reactivity. Tetrahedron Lett., v. 31, p.459, 1990.
32. MENGER, F. M.; LADIKA, M., Fast hidrolisis of na aliphatic amide at Neutral pH and ambient temperature. A peptidase model. J. Am. Chem. Soc., v.110 p.6794, 1988.
33. PAQUETTE, L. A.; KESSELMAYER, M. ^a; ROGERS, R. D. Quantification of proximity effects on rate. A case study involving dyotropic hydrogen migration within synsesquinorbornene disulfones carrying central substituents having different spatial demands. J. Am. Chem. Soc. V. 112, p. 284-291, 1990.
34. PAQUETTE, L. A.; O'DOHERTY, G. A. Intramolecular reaction rate is not determined exclusively by the distance separating reaction center. The kinetic consequences of modulated ground state strain on dyotropic hydrogen migration in systems of very similar geometric disposition. J. Am. Chem. Soc. V.113, p. 7761-7762, 1991.
35. GESSER, J. C., Tese de Doutorado: "Reação de Hidrólise Intramolecular de Ácidos N,N-Dialquilnaftalâmicos: Um Modelo não Mimético de Catálise Enzimática". Departamento de Pós-

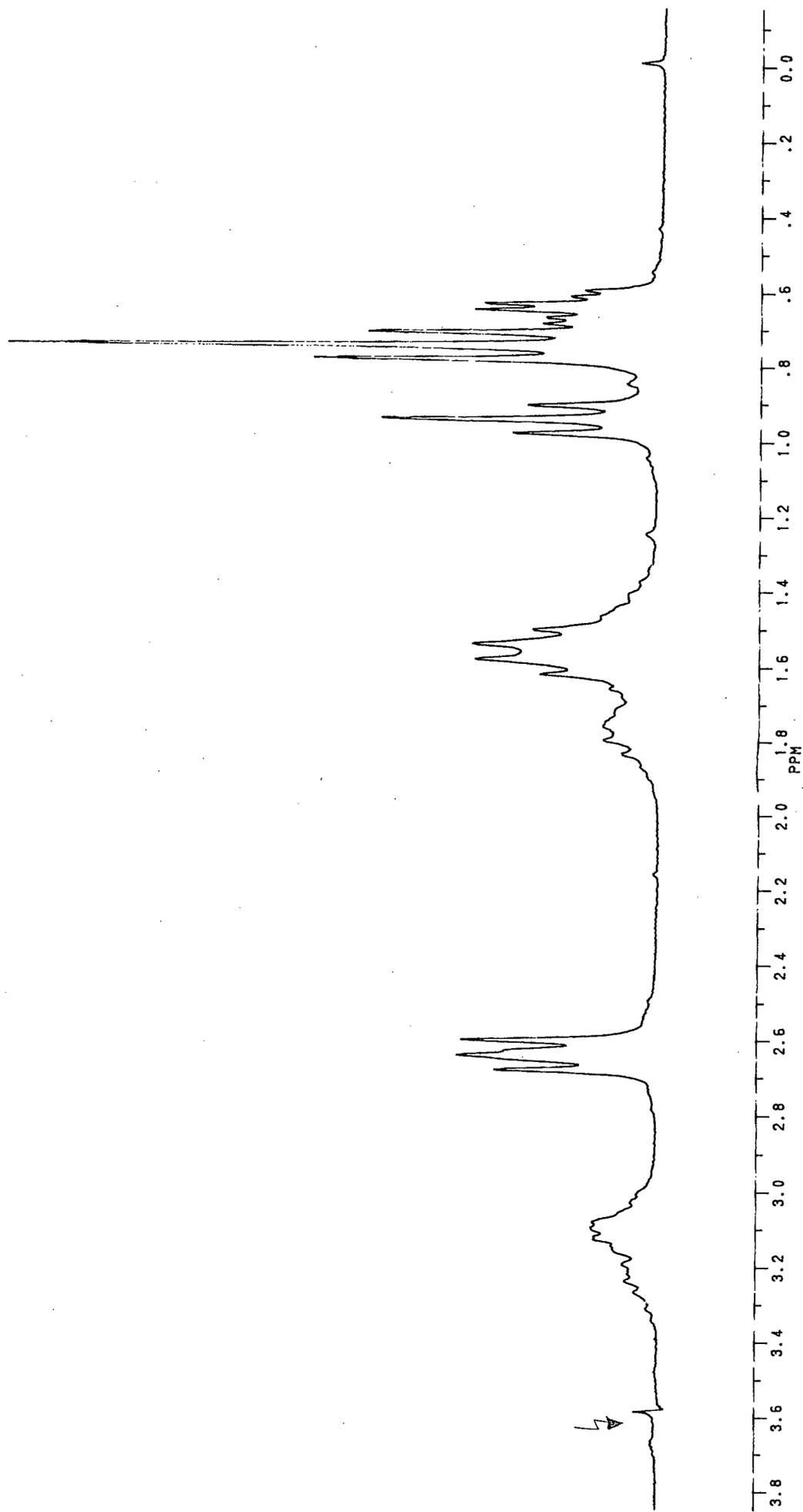
Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1997.

36. MENDONÇA, E., MARCONI, D., NOME, F., Relatório de conclusão do curso de química: Estudo de reação de hidrólise do anidrido 1,8-naftálico e seus derivados na ausência e presença de micelas. Departamento de Química, UFSC, Santa Catarina, 1997.
37. GUTHRIE, J. P., J. Am. Chem. Soc., v. 96, p. 3608, 1974.
38. ARNETT, E. M., Prog. Phys. Org. Chem., v. 83, p. 4183, 1963.
39. GILLESPIE, R. J., Can. J. Chem., 1963, 41, 148, 2642.
40. MARTIN, R. B., Chem. Commun., 1972, 793.
41. KRESGE, A. J.; FITZGERALD, P. H.; CHIANG, Y., J. Am. Chem. Soc., 1974, 96, 4698.
42. WILLIAMS, A., J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 5645.
43. McCLELLAND, R. A., J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 5281.
44. JOHNSON, C. D. *"The Hammett Equation"* Cambridge: Cambridge University Press. 1973. p. 118-121, 165.
45. BASTOS-CENEVIVA, M. P., *"Relações Lineares de Energia Livre e Atividade Farmacológica"*. Química Nova, 1984,7,141-150.

46. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C.
“*Spectrometric Identification of Organic Compounds*”. 5^o ed.
Canada: John Wiley e Sons, Inc. 1991.
47. GIL, V.; GERALDES, C. “*Ressonância Magnética Nuclear*”.
Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1987.
48. YUNES, S. F.; GESSER, J. C.; NOME, F.; Mechanistically
Optimized Intramolecular Catalysis in the Hydrolysis of Esters.
Global Changes Involved in Molecular Reactivity, *J. Phy. Org.
Chem.*, v.10, p. 461-465, 1997.

VI- ANEXOS

I - Espectros do experimento de irradiação de próton da amida derivada do anidrido 4-cloro-1,8naftálico.

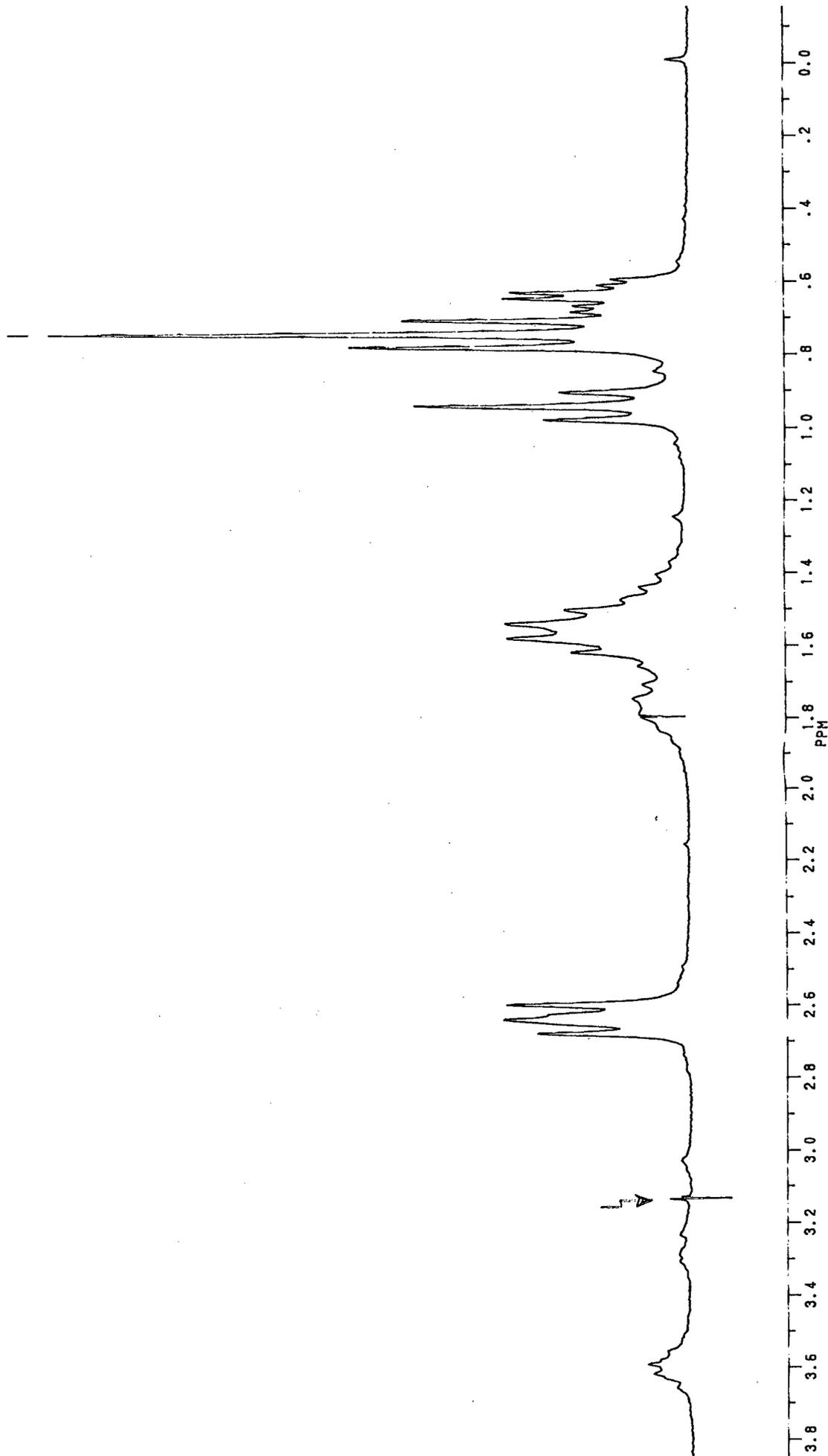


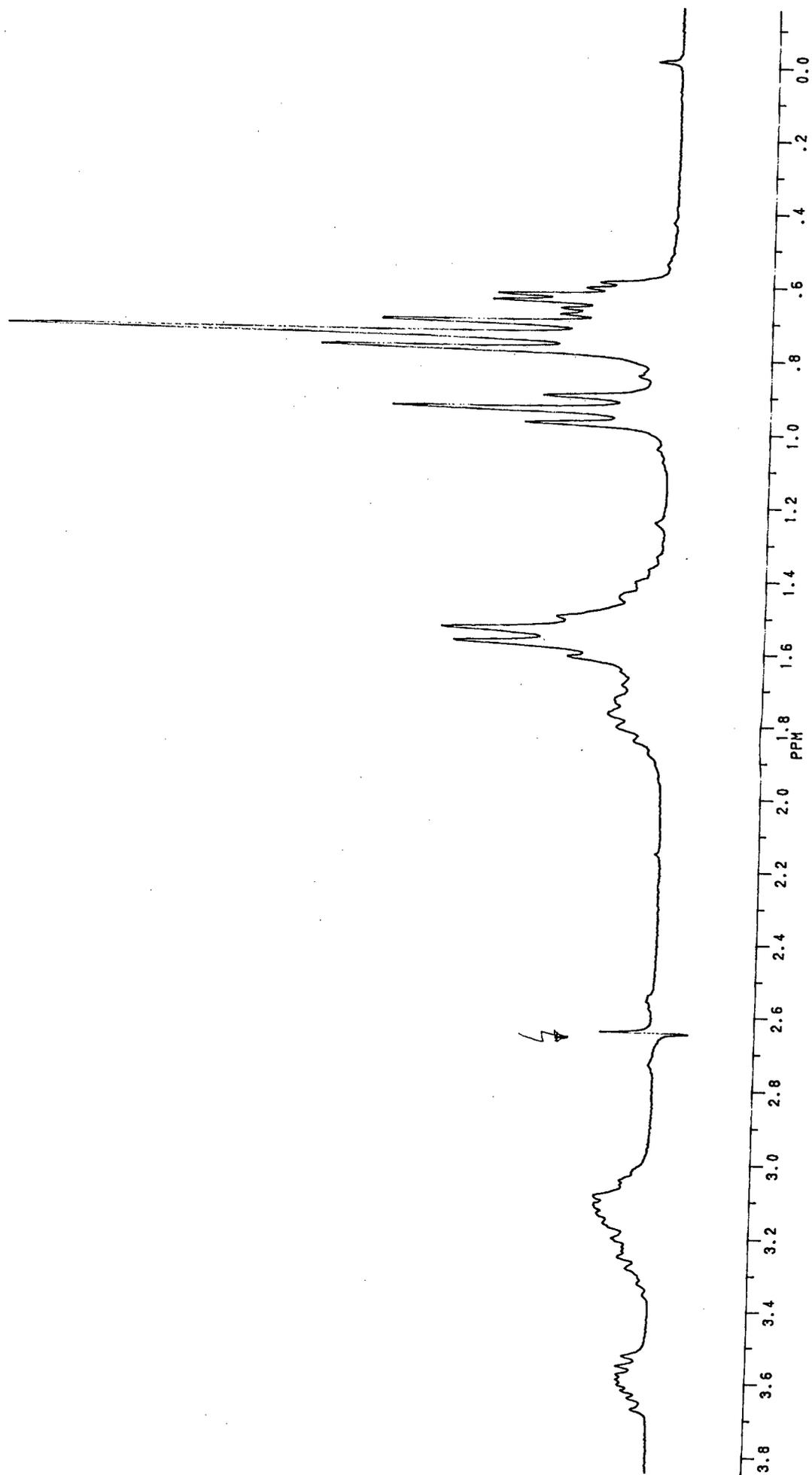
100 (10) 001

FABIANA, DI4CL E. CDCL3 / NOVE20.007

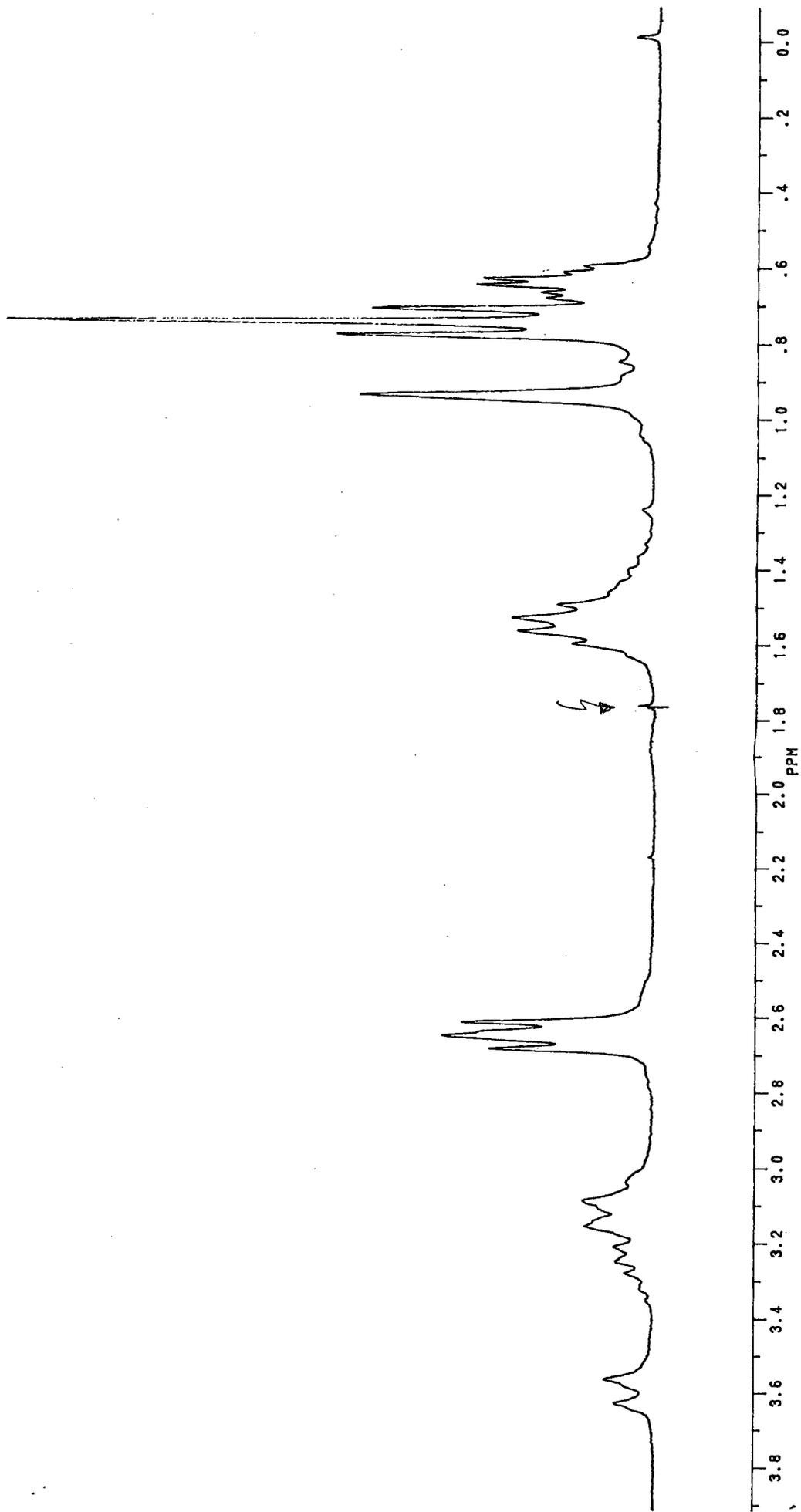
746300

PPM

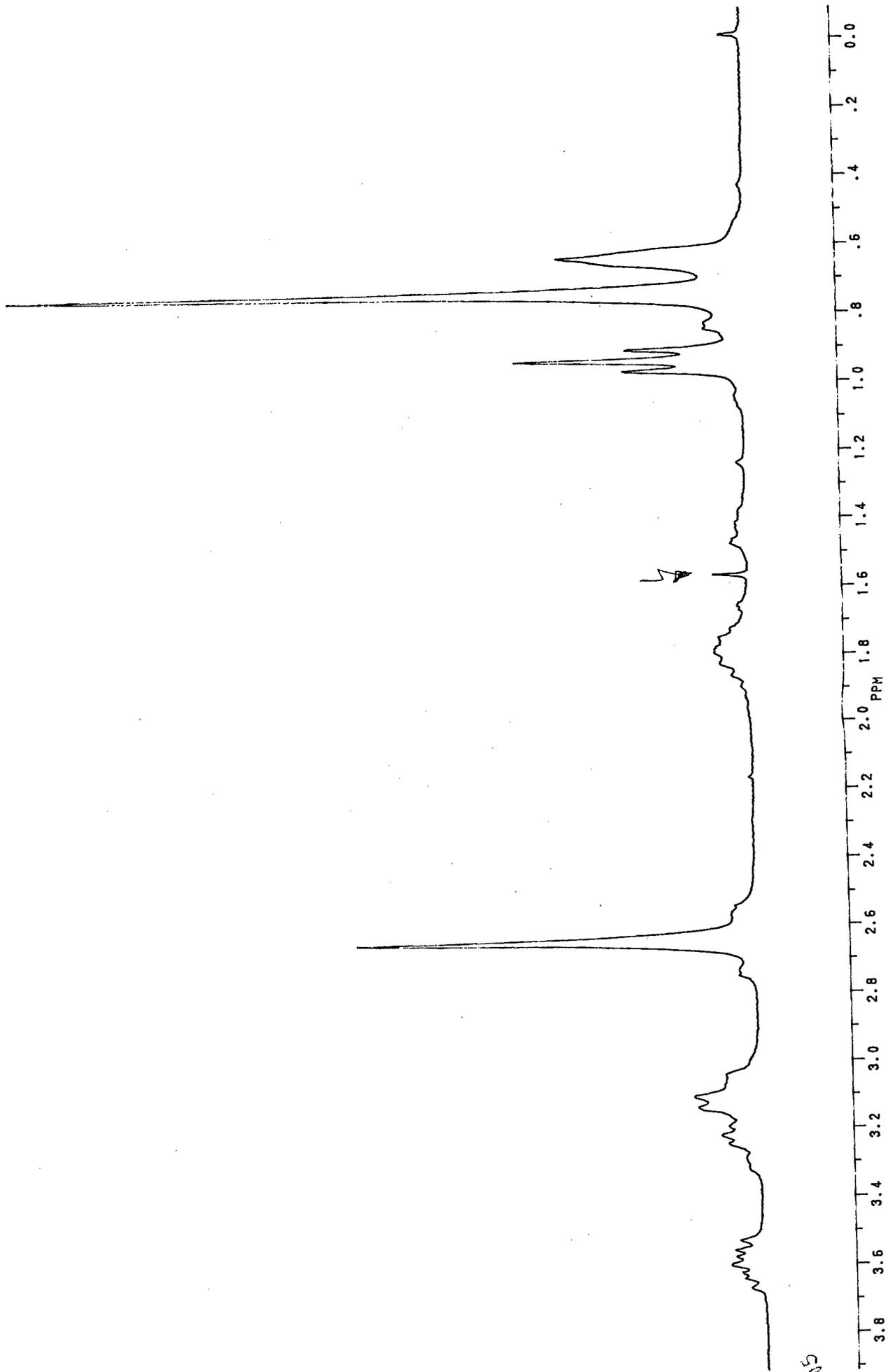




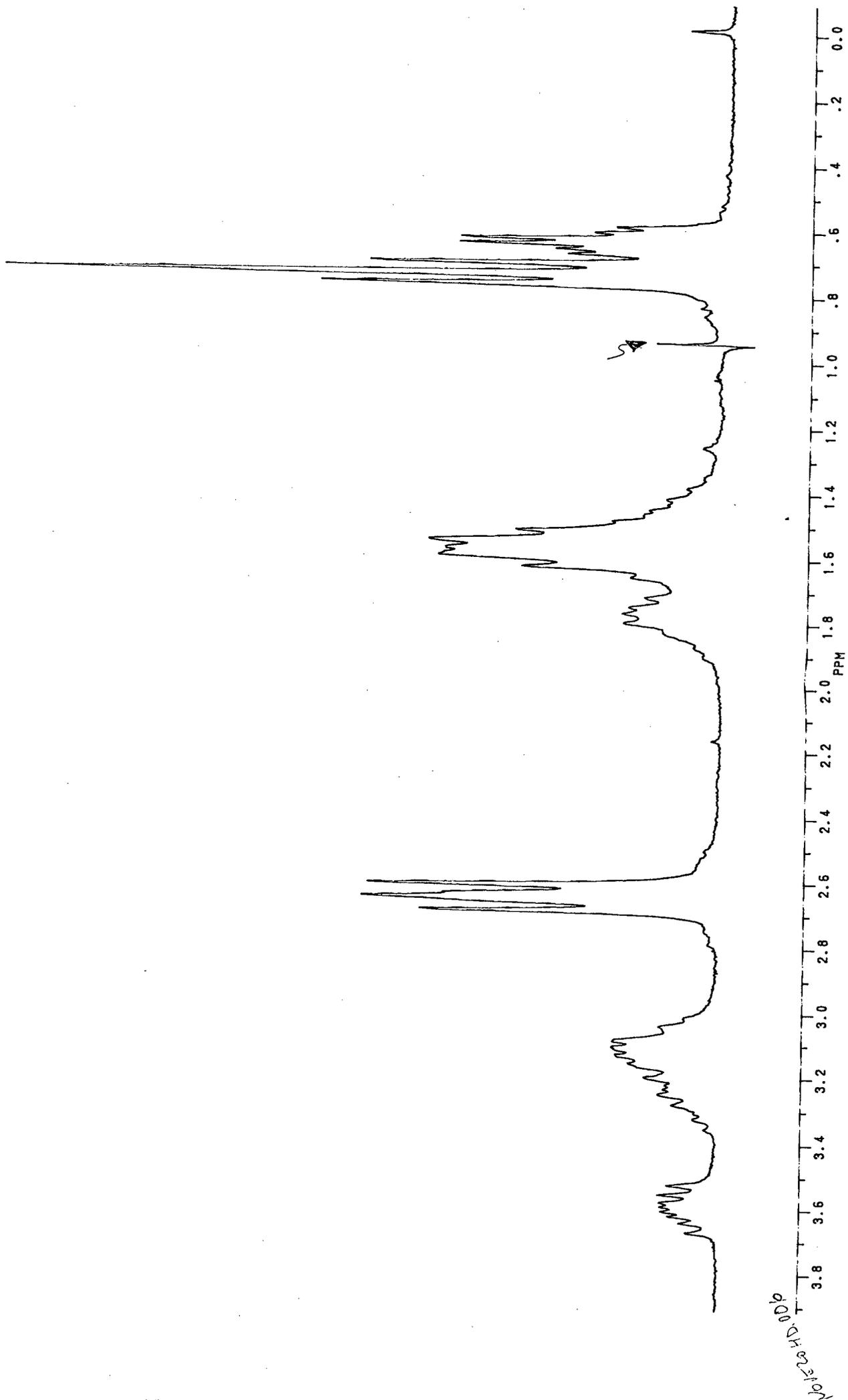
200-022



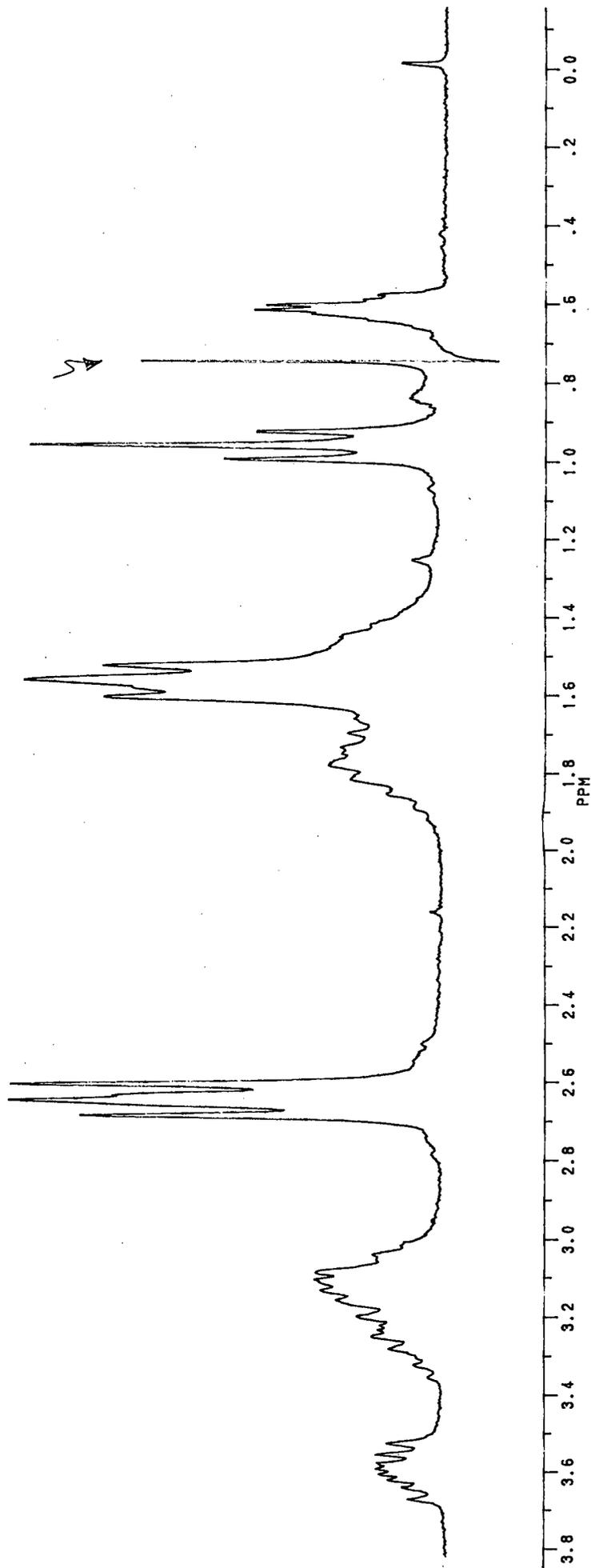
low-resolution



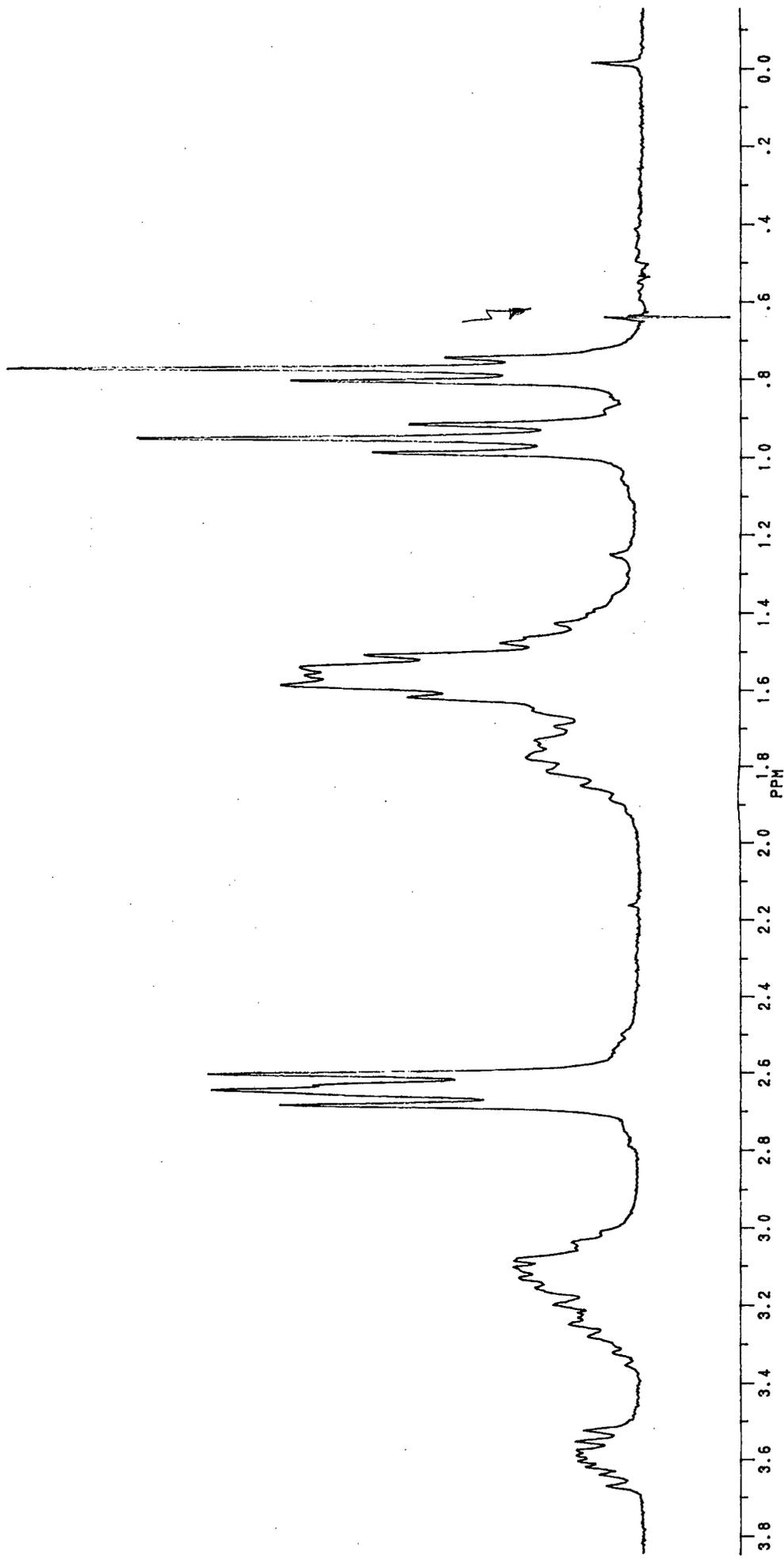
HW1000005



101520 HD.0016

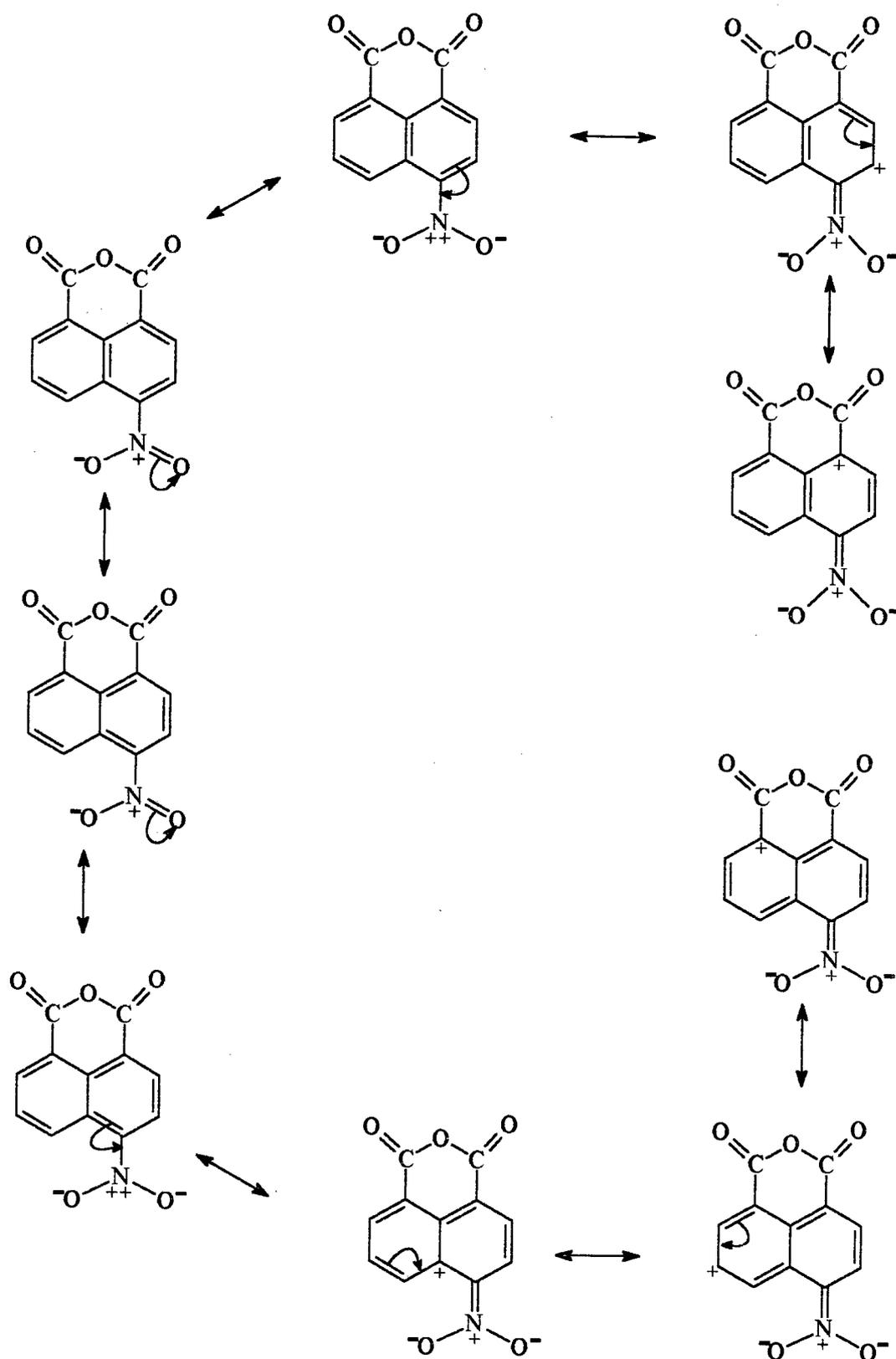


100-007



NOV 20 1968

II- Estruturas canônicas para o anidrido 4-nitro-1,8-naftálico.



III- Estruturas canônicas para o anidrido 4-amino-1,8-naftálico.

