

Alex Molina Manfredi

**DESFOSFORILAÇÃO DO DIETIL-2,4-DINITROFENIL
FOSFATO E DO PESTICIDA PARAOXON METÁLICO POR
OXIMAS: REAÇÕES EM MEIO AQUOSO E
CATÁLISE MICELAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Silveira de Souza

Florianópolis
2016

Alex Molina Manfredi

**DESFOSFORILAÇÃO DO DIETIL-2,4-DINITROFENIL
FOSFATO E DO PESTICIDA PARAOXON METÁLICO POR
OXIMAS: REAÇÕES EM MEIO AQUOSO E
CATÁLISE MICELAR**

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 4 de Março de 2016.

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Faruk José
Nome Aguilera, Dr.
Orientador – QMC/UFSC

Prof. Marcelo de Freitas
Lima, Dr.
Relator - UNESP/IBILCE-SJRP

Prof. Gustavo Amadeu
Micke, Dr. QMC/UFSC

Prof. René Alfonso Nome Silva,
Dr. QMC/UNICAMP

Prof. Thiago Ferreira da
Conceição, Dr.
QMC/UFSC

Adriana Passarella Gerola, Dra.
QMC/UFSC

Marcelo Volpato Marques, Dr.
Suplente – QMC/UFSC

Aos meus pais, Sônia e Gilmar, e meu irmão Caio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof^o Faruk Nome e à Prof^a Haidi Fiedler pela orientação e sabedoria transmitida durante os anos de nossa convivência. Aos meus queridos colegas dos laboratórios 312 e 203 (Departamento de Química, UFSC), que diversas vezes estiveram ao meu lado para me apoiar e descontraír. Um agradecimento especial à Michelle Medeiros, que participa de maneira intensiva em meu trabalho. Ao meu grande amigo e co-orientador Bruno S. Souza pelo auxílio nas discussões e procedimentos experimentais.

Aos membros da banca, Marcelo de Freitas Lima, Gustavo Amadeu Micke, René Alfonso Nome Silva, Adriana Passarella Gerola, Thiago Ferreira da Conceição e Marcelo Volpato Marques pelo aceite ao convite para correção e colaboração nessa tese de doutorado. Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação em Química (UFSC), Grace Hoeller e Jadir Carminatti, sempre disponíveis para o auxílio nas questões acadêmicas.

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

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

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

(William George Ward)

RESUMO

O presente trabalho reporta as reações de desfosforilação dos triésteres dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) e dimetil 4-nitrofenil fosfato (**Paraoxon metílico**) pela oxima 2-hidróxi-*N*-fenilacetamida (**8**), pralidoxima (**2-PAM**), diacetilmonoxima (**DAM**) e dimetilglioxima (**DMG**) em meio aquoso e meio micelar catiônico, utilizando-se o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (**CTAB**) como agente tensoativo. Um aumento de cerca de 10 milhões de vezes para a desfosforilação do **DEDNPP** e **Paraoxon** foi obtido na presença da oxima (**8**) em meio aquoso, em comparação com a reação dos triésteres somente em água, e seus principais produtos de reação foram identificados por meio de diferentes técnicas. Além disso, as micelas de **CTAB** facilitam o encontro dos reagentes e promovem um aumento significativo da velocidade de reação, devido principalmente ao seu caráter hidrofóbico em conjunto com o efeito eletrostático entre a interface catiônica micelar e o ânion oximato. As constantes de velocidade e de ligação entre os reagentes e a micela foram determinadas com êxito por meio do modelo da pseudo fase e troca iônica, elucidando os conhecimentos dos efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos no planejamento de nanoreatores para a efetiva decomposição de compostos organofosforados tóxicos na presença de alfa-nucleófilos, assim como na elaboração de novos antídotos contra a intoxicação por agentes neurotóxicos.

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

Abstract

The present work reports the dephosphorylation reactions of the triesters diethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (**DEDNPP**) and dimethyl 4-nitrophenyl phosphate (**methyl Paraoxon**) by the oxime 2-hydroxyimino-*N*-phenylacetamide (**8**), pralidoxime(**2-PAM**), diacetylmonoxime (**DAM**), dimethylglyoxime (**DMG**) in aqueous and cationic micellar media, using cetyltrimethylammonium bromide (**CTAB**) as a surfactant. A rate enhancement of 10 million-fold in the dephosphorylation of **DEDNPP** and **Paraoxon** was obtained in the presence of the oxime (**8**) in aqueous medium, in comparison to the spontaneous hydrolysis of the triesters, and the key products of the reactions were identified by various techniques. Besides, the micelles of **CTAB** show to facilitate the encounter of the reactants and promote a significant rate enhancement of the reactions, due to their hydrophobic characters in addition to the electrostatic effect between the cationic surfactant and the anionic oximate. The reactions rate and binding constants of the reactants in the micelle were obtained using the pseudophase and ionic exchange model, enlightening the exploitation of hydrophobic and electrostatic effects in the planning of nanoreactors for the effective decomposition of organophosphates by alpha-nucleophiles, as well as into the development of more generally applicable antidotes for human poisoning by neurotoxic agents.

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

Índice de Figuras

Figura 1 - Estruturas e nomes (IUPAC) dos agentes químicos do tipo G e V (em ordem de desenvolvimento).....	28
Figura 2 - Estruturas e nomes de alguns compostos organofosforados mais conhecidos.	29
Figura 3 - Classificação dos ésteres de fosfato de acordo com o grau de substituição dos átomos de hidrogênio por grupo alquílicos ou arílicos.	30
Figura 4 - Molécula de água atuando como nucleófilo e base geral na reação de hidrólise de um triéster de fosfato.	31
Figura 5 - Estrutura do fosforano pentacoordenado em equilíbrio isomérico entre o estado sólido e líquido, caracterizado por Raio-X (1A) e RMN (1B).....	32
Figura 6 - Representação geral no ataque nucleofílico nos triésteres de fosfato derivados do 1,3-propanodiol (2).	33
Figura 7 - Gráfico de Bronsted para os diferentes grupos de saída para a hidrólise dos derivados do triéster 1,3-propanodiol (2), a 39°C.....	34
Figura 8 - Mecanismo inicialmente proposto para a hidrólise do triéster <i>tris</i> -2-piridil fosfato (2-TPP).	36
Figura 9 - Estruturas dos diferentes triésteres de fosfato investigados, em função dos grupos de saída e grupos espectadores.....	37
Figura 10 - Correlação de Bronsted para a série de triésteres de fosfato estudadas, em conjunto com a correlação obtida por Khan e Kirby em 1970 (em azul).....	38
Figura 11 - Gráfico de Bronsted para as velocidades das reações de hidrólise dos triésteres com grupo de saída 4-nitrofenol, em função do somatório dos pKa's dos grupos espectadores.	39
Figura 12 - Diagrama de More O`Ferrall-Jencks de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila.....	41
Figura 13 - Reação em água marcada com ^{18}O para identificação da quebra no átomo de fósforo ou carbono.	42
Figura 14 - Representação estrutural dos alfa-nucleófilos mais comuns para as reações com ésteres de fosfato.	44

Figura 15 - Diagrama de energia dos orbitais de alfa-nucleófilos e nucleófilos normais.	45
Figura 16 - Mecanismo sugerido para o ataque nucleofílico da hidroxilamina pelo átomo de oxigênio na reação com um diéster de fosfato.	46
Figura 17 - Mecanismo sugerido para a transferência efetiva do grupo fosforila para o átomo de oxigênio da hidroxilamina.....	47
Figura 18 - Reação entre o ácido benzohidroxâmico BHA ⁻ e o triéster DEDNPP, indicando dois caminhos reacionais distintos.....	48
Figura 19 - Estruturas das oximas mais conhecidas como antídotos para destoxificação por agente organofosforados.	49
Figura 20 - Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase AChE.	50
Figura 21 - Mecanismo de inibição da enzima acetilcolinesterase AChE, envelhecimento e reativação por oximas.	51
Figura 22 - Nomes, estruturas e classificação de alguns surfactantes...	53
Figura 23 - Representação estrutural de surfactantes, micelas, micelas reversas, lipídeos, bicamada lipídica e vesículas.	54
Figura 24 - Formação de micelas acima da concentração micelar crítica (CMC).	55
Figura 25 - Formação de micelas acima da concentração micelar crítica (CMC).	56
Figura 26 - Modelo da pseudofase e troca iônica para as reações em meio micelar com contra-íons Br ⁻ , em pH alcalino.	56
Figura 27 - Efeito da concentração de CTAB na reatividade entre 4-nitrofenil difenilfosfato com os íons 4-nitrobenzaldoximato (●) e 2-quinolinaldoximato (○).	58
Figura 28 - Equilíbrio de dissociação entre a espécie protonada (Ox) e a forma desprotonada (Ox ⁻).	68
Figura 29 - (A) Espectro de abs vs. comprimento de onda em função do pH. (B) Gráficos de abs vs. pH obtidos para: oxima 8 (5 x 10 ⁻⁴ M) em H ₂ O (■) e na presença de CTAB (0,01 M) (○), em 280 nm, a 25°C.....	68

Figura 30 - Reação de degradação do triéster de fosfato DEDNPP mediada por oximas.	70
Figura 31 – Abs vs. comprimento de onda para a reação entre DEDNPP (5×10^{-5} M) e oxima 8 (0,001 M) a 25°C e pH = 10.	71
Figura 32 - Gráfico de abs vs. tempo para a reação entre DEDNPP (5×10^{-5} M) e a oxima 8 (0,001M) em 400 nm, a 25°C e pH 10.	71
Figura 33 - Perfil de pH para as reações do DEDNPP com DMG (▼), DAM (▲), 2-PAM (●), 8 (◆) e BHA (■), a 25°C. Os dados para a reação em H ₂ O (□), obtidos da literatura (ORTH et al., 2011), foram inseridos para comparação.	72
Figura 34 - Representação da reação entre o triéster DEDNPP com a água, íon hidróxido e nucleófilos.	73
Figura 35 - Gráfico de k_{obs} vs. $[Ox^-]$ para as reações do DEDNPP com 8 (◆), 2-PAM (●) e DAM (▲), a 25°C, pH 10,5, $[Oximas] = 0,001$ M e $[DEDNPP] = 5 \times 10^{-5}$ M.	74
Figura 36 - Gráfico de $\ln k_{obs}/T$ vs. $1/T$ para a reação da oxima 8 com o triéster DEDNPP, em pH 10,5.	75
Figura 37 - Gráfico de Bronsted para a reação do DEDNPP com 8, pralidoxima (2-PAM), diacetilmonoxima (DAM), imidazol (IMZ) e outros nucleófilos comuns, a 25°C.	77
Figura 38 - Espectros sucessivos de RMN ¹ H obtidos para a reação da oxima 8 (0,04 mol L ⁻¹) com DEDNPP (0,01 mol L ⁻¹): (a) DEDNPP; (b) 8; (c) 5 min; (d) 15 min; (e) 30 min; (f) 1h; (g) 1h30; (h) 7 dias, a 25°C, em D ₂ O com 30% de CD ₃ CN e pH 10,3.	79
Figura 39 - Espectros sucessivos de RMN ³¹ P obtidos para a reação da oxima 8 (0,04 mol L ⁻¹) com DEDNPP (0,01 mol L ⁻¹): (a) 5 min; (b) 15 min; (c) 35 min; (d) 55 min; e (e) 24 h, a 25°C, em D ₂ O com 30% de CD ₃ CN e pH 10,3.	80
Figura 40 - Estruturas detectadas por RMN de ¹ H e ³¹ P em função do tempo de reação entre DEDNPP e 8, em pH 10,3 a 25°C.	81
Figura 41 - Cromatograma de HPLC de intensidade relativa (%) em função do tempo (min) realizado ao final da reação entre 8 e DEDNPP em 90 minutos, pH 10,3 e 25°C.	82

Figura 42 - Espectro de ESI-MS(+) do pico em 2 min, em (i), do cromatograma da Figura 37, após o término da reação entre 8 e DEDNPP em 90 min, pH 10,3 a 25°C.	83
Figura 43 - Espectro de ESI-MS(+) do pico em 4 min, em (ii), do cromatograma da Figura 41, após o término da reação entre 8 e DEDNPP em 90 min, pH 10,3 a 25°C.	84
Figura 44 - Espectro de ESI-MS(+) do pico em 13 min, em (iii), do cromatograma da Figura 41, após o término da reação entre 8 e DEDNPP em 90 min, pH 10,3 a 25°C.	85
Figura 45 - Cromatograma de CG-MS de intensidade relativa (%) em função do tempo (min) realizado ao final da reação entre 8 e DEDNPP em 90 minutos, pH 10,3 e 25°C.	86
Figura 46 - Espectro de CG-MS do pico em 10 min, em (i), do cromatograma da Figura 45, após o término da reação entre 8 e DEDNPP em 90 min, pH 10,3 a 25°C.	87
Figura 47 - Espectro de CG/MS do pico em 10,7 min, em (ii), do cromatograma da Figura 45, após o término da reação entre 8 e DEDNPP em 90 min, pH 10,3 a 25°C.	88
Figura 48 - Espectro de CG/MS do pico em 11,5 min, em (iii), do cromatograma da Figura 45, após o término da reação entre 8 e DEDNPP em 90 min, pH 10,3 a 25°C.	89
Figura 49 - Estrutura do estado de transição (TS) em conjunto com as estruturas encontradas em – 15,0 Bohr (A) e 20,0 Bohr (B) para o ataque nucleofílico da oxima 8 ao DEDNPP.	90
Figura 50 - Coordenada de reação intrínseca para o ataque nucleofílico de 8 ao DEDNPP, a 25°C.	91
Figura 51 - Reação entre 8 e DEDNPP na presença do surfactante catiônico CTAB.	93
Figura 52 - Gráfico de k_{obs} em função do pH para a reação do DEDNPP ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com: $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ de 8 em meio aquoso (●), e $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 8 na presença de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de CTAB (▲). Os dados para a reação de hidrólise de DEDNPP foram incluídos para comparação (ORTH et al., 2011).	94
Figura 53 - Gráfico de k_{obs} vs. [CTAB] para a reação do DEDNPP com 8, em pH 10 e 25°C.	95

Figura 54 - Gráfico de k_{obs} vs. [8] para a reação com DEDNPP em meio micelar de CTAB 0,01 mol L ⁻¹ , em pH 10, a 25°C.	96
Figura 55 - Representação do modelo da pseudofase e troca iônica para a reação entre 8 e DEDNPP.	97
Figura 56–Gráficos de (A) abs vs. comprimento de onda e (B) abs vs. tempo para a reação entre paraoxon metílico (5 x 10 ⁻⁵ M) e oxima 8 (0,001 M), a 25°C e pH = 10.	100
Figura 57 - Gráfico de k_{obs} em função da concentração de CTAB, na reação entre 0,001 mol L ⁻¹ de 8 com paraoxon metílico (5 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹), em pH 10 e 25°C.	101
Figura 58 - Gráfico de k_{obs} em função da concentração de 8 em meio aquoso na reação com paraoxon metílico (5 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹), a 25°C e pH 10,50.	102
Figura 59 - Gráfico de k_{obs} em função da concentração de 8 em meio micelar de CTAB (0,01 mol.L ⁻¹) na reação com paraoxon metílico (5 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹), a 25°C e pH 10,00.	103
Figura 60 - Espectros sucessivos de RMN ¹ H obtidos para a reação da oxima 8 (0,04 mol L ⁻¹) com paraoxon metílico (0,01 mol L ⁻¹): (a) paraoxon metílico; (b) 5 min; (c) 25 min; (d) 45 min; (e) 85 min; (f) 24h; a 25°C, em D ₂ O com 30% de CD ₃ CN e pH 10,3.	104
Figura 61 - Espectros sucessivos de RMN ³¹ P obtidos para a reação da oxima 8 (0,04 mol L ⁻¹) com paraoxon metílico (0,01 mol L ⁻¹): (a) 5 min; (b) 25 min; (c) 45 min; (d) 85 min; (f) 24h; a 25°C, em D ₂ O com 30% de CD ₃ CN e pH 10,3.	105
Figura 62 - Mecanismo de degradação do DEDNPP e paraoxon metílico passando por um intermediário fosforilado.	106

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Valores das constantes de velocidade para a hidrólise dos derivados do triéster 1,3-propanodiol (2), a 39°C e força iônica 1,0 M.	34
Tabela 2 - Valores de pK_a de 8 determinados espectrofotometricamente em água e na presença de surfactante CTAB 0,01 mol L ⁻¹ .	69
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos calculados para as reações entre as oximas (0,001 M) e o triéster DEDNPP (5 x 10 ⁻⁵ M), a 25°C.	73
Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos para a reação entre a oxima 8 (0,001 M) e o triéster DEDNPP (5 x 10 ⁻⁵ M), em pH 10,5.	76
Tabela 5 - Constantes de segunda ordem (k_2) e valores de pK_a para as reações de diferentes nucleófilos com o DEDNPP, a 25°C.	78
Tabela 6 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e ³¹ P dos produtos na reação entre 8 e DEDNPP, conforme Figura 40.	80
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 53, para a reação do DEDNPP com 8, na presença de CTAB, a 25°C. ^{a,b}	99
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da Figura 53, para a reação do paraoxon metílico com 8, em água e na presença de CTAB, a 25°C. ^{a,b}	102
Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e ³¹ P dos produtos na reação entre 8 e paraoxon metílico.	105

Índice de Abreviaturas e Símbolos

2-PAM – Pralidoxima

2-TPP – *tris*-2-piridil-fosfato

4-NP – 4-nitrofenol

Abs – Absorvância

AChE – Acetilcolinesterase

A_N – Mecanismo Associativo

A_ND_N – Mecanismo Concertado

BHA – Ácido Benzohidroxâmico

CMC – Concentração Micelar Crítica

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

DAM – Diacetilmonoxima

DEDNPP – dietil 2,4-dinitrofenil fosfato

DEP – dietil fosfato

DFT – DensityFunctionalTheory (“Teoria do Funcional de Desidade”)

DMG – Dimetilglioxima

DMP – dimetil fosfato

D_N – Mecanismo Dissociativo

DNP – 2,4-dinitrofenolato

E. T. – Estado de Transição

HI-6 – Asoxima

IEF – Integral Equation Formalism

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

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

k₂ – constante de velocidade de segunda ordem

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

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

K_{DEDNPP} – constante de incorporação do substrato na fase micelar

k_{normal} – Constante de Velocidade para Nucleófilos sem Efeito Alfa

k_{obs} – constante de velocidade observada

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

K_{Ox} – constante de incorporação do nucleófilo na fase micelar

$k_{\alpha\text{-nuc}}$ – Constante de Velocidade para Alfa-Nucleófilos

LaCFI – Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais

LH-6 – Obidoxima

ME – Molaridade Efetiva

NH₂OH – Hidroxilamina

OMS – Organização Mundial de Saúde

Ox⁻ - OximaDesprotonada

OxH – OximaProtonada

PCM – PolarizableContinuumModel

pKa – logaritmo da constante de dissociação de uma espécie ácida

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

S_N2 – Substituição NucleofílicaBimolecular

TMB-4 – Trimedoxima

TS – TransitionState (“Estado de Transição”)

UV-Vis – Ultra-Violeta Visível

β_{LG} – sensibilidade do grupo de saída

β_{NLG} – sensibilidade do grupo espectador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	AGENTES ORGANOFOSFORADOS, UM BREVE HISTÓRICO.....	27
1.2	HIDRÓLISE DE TRIÉSTERES DE FOSFATO	31
1.3	SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA EM ÉSTERES DE FOSFATO ...	40
1.4	NUCLEÓFILOS COM EFEITO ALFA	43
1.4.1	<i>Reações de triésteres de fosfato com alfa-nucleófilos</i>	46
1.5	SURFACTANTES E CATÁLISE MICELAR.....	52
2	OBJETIVOS.....	59
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1	REAGENTES	61
3.2	TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA	63
3.3	MEDIDAS CINÉTICAS	63
3.4	ESTUDOS POR RMN DE ^1H E ^{31}P	64
3.5	CÁLCULOS COMPUTACIONAIS.....	64
3.6	ESTUDOS POR ESI-MS E HPLC	65
3.7	ESTUDOS POR CG/MS	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1	TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS	67
4.2	REAÇÕES ENTRE DEDNPP E OXIMAS EM MEIO AQUOSO.....	70
4.3	PARÂMETROS DE ATIVAÇÃO E EFEITO ISOTÓPICO	75
4.4	RELAÇÃO DE BRONSTED E REATIVIDADE DE NUCLEÓFILOS	77
4.5	ESTUDOS DE RMN DE ^1H E ^{31}P	79
4.6	ESTUDOS DE HPLC / ESI-MS.....	82
4.7	ESTUDOS POR CG/MS	86
4.8	CÁLCULO COMPUTACIONAL.....	90
4.9	REAÇÕES EM MEIO MICELAR	93
4.10	APLICAÇÃO: DEGRADAÇÃO DO PESTICIDA PARAOXON METÁLICO.....	1007
4.11	ESTUDO DE RMN DE ^1H E ^{31}P (PARAOXON)	104
5	CONCLUSÕES.....	107
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
7	APÊNDICE	117

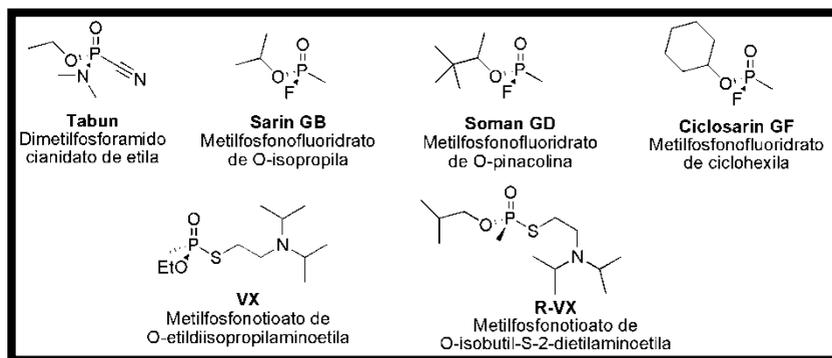
1 Introdução

1.1 Agentes organofosforados, um breve histórico.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os agentes químicos de guerra são substâncias caracterizadas de acordo com os efeitos tóxicos provocados nos seres humanos, nos animais e nas plantas (SILVA, G. R. et al., 2012). A utilização de agentes químicos remonta à Antiguidade, no entanto foi na segunda metade do século XIX, com o estabelecimento das indústrias químicas, que seu uso foi disseminado como arma de destruição em massa. Embora não terem sido efetivamente empregados durante a Segunda Guerra Mundial, foi nesse período que se registrou o desenvolvimento dos mais potentes agentes químicos de guerra, classificados como organofosforados neurotóxicos, ou “agentes dos nervos”, os quais foram sintetizados pelos alemães em 1997 (HOLSTEGE; KIRK; SIDELL, 1997).

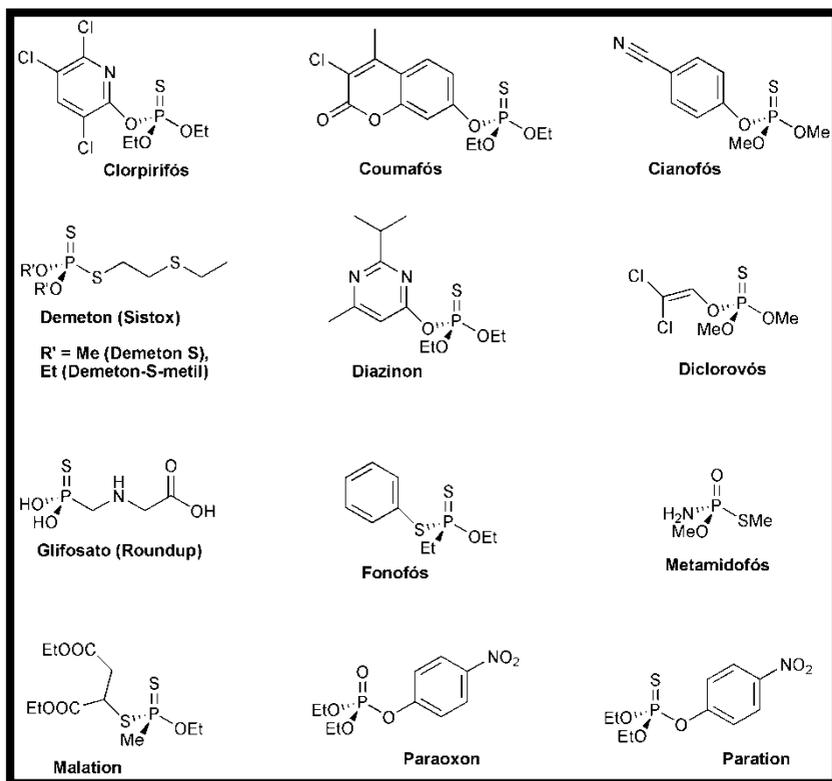
Com o fim da Segunda Guerra Mundial, os compostos organofosforados passaram a ser alvos de organizações terroristas, devido principalmente ao seu baixo custo e fácil manufatura. Nesse sentido, algumas nações adotaram medidas de armazenamento e desenvolvimento de pesquisas voltadas à degradação de armas químicas (PROCKOP, 2006). Alguns exemplos de agentes neurotóxicos são apresentados na **Figura 1**.

Figura 1 - Estruturas e nomes (IUPAC) dos agentes químicos do tipo G e V (em ordem de desenvolvimento).



O desenvolvimento de agentes neurotóxicos de guerra está intimamente relacionado com a preparação de agrotóxicos utilizados no ambiente rural para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas (ETO, 1974). Essa relação caracteriza-se tanto pela semelhança estrutural quanto pela sua toxicidade, entretanto os agrotóxicos são considerados menos perigosos e por esse motivo são utilizados em larga escala. Nesse contexto, estima-se que a exposição acidental a agroquímicos organofosforados seja de cerca de um milhão de casos anuais, sendo a maior incidência em países subdesenvolvidos (CAVALIERE et al., 1996).

Figura 2 - Estruturas e nomes de alguns compostos organofosforados mais conhecidos.

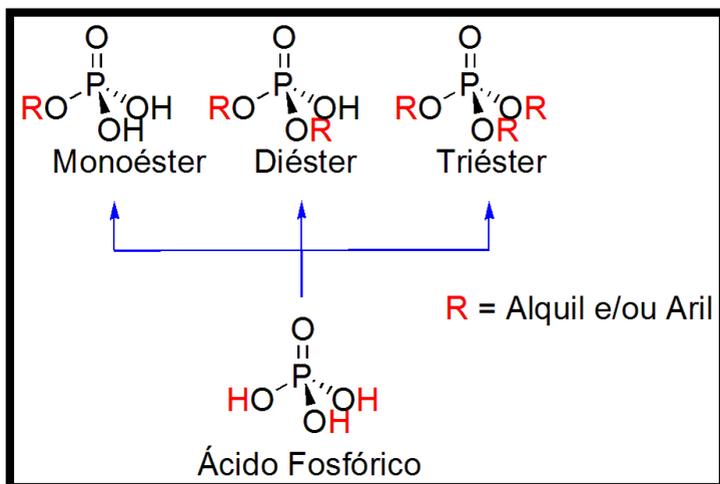


Sendo assim, vale ressaltar a importância dos estudos e desenvolvimento de sistemas eficientes para a destoxificação química por agentes neurotóxicos, destruição e manuseio seguro de pesticidas e armas químicas. Para que se possam realizar tais estudos, é necessário que se tenha conhecimento da reatividade dos ésteres de fosfato estudados até o momento. Dentre as estratégias seguidas, destacam-

se: experimentos cinéticos, caracterização de produtos e intermediários, assim como estabelecimento de relações entre estrutura e reatividade (KIRBY; NOME, 2015).

Nesse sentido, o nosso grupo de pesquisa dedicou-se ao longo dos anos aos estudos mecanísticos de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato, que em geral são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, e diferem-se no grau de substituição dos átomos de hidrogênio por grupos alquílicos ou arílicos, **Figura 3**.

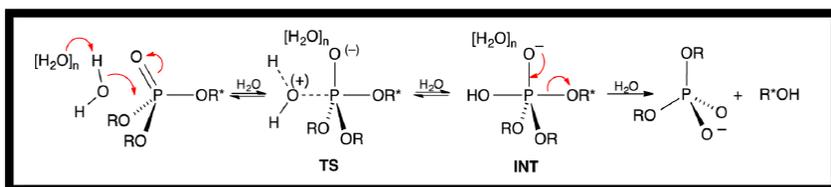
Figura 3 - Classificação dos ésteres de fosfato de acordo com o grau de substituição dos átomos de hidrogênio por grupos alquílicos ou arílicos.



1.2 Hidrólise de Triésteres de Fosfato

O estudo das reações envolvendo os triésteres de fosfato tornou-se amplamente divulgado justamente pela necessidade de manusear o enorme estoque de armas químicas, herbicidas e pesticidas de maneira segura (KIM et al., 2011). Paralelamente, a natureza surge como grande aliada nesse desafio através da evolução das enzimas fosfotriesterases (BIGLEY; RAUSHEL, 2013). Sendo assim, tanto em sistemas artificiais quanto em naturais, o propósito seria potencializar as reações de transferência do grupo fosforila para a água ou outros nucleófilos, e assim converter o triéster tóxico em moléculas menos reativas e/ou nocivas, **Figura 4**.

Figura 4 - Molécula de água atuando como nucleófilo e base geral na reação de hidrólise de um triéster de fosfato.

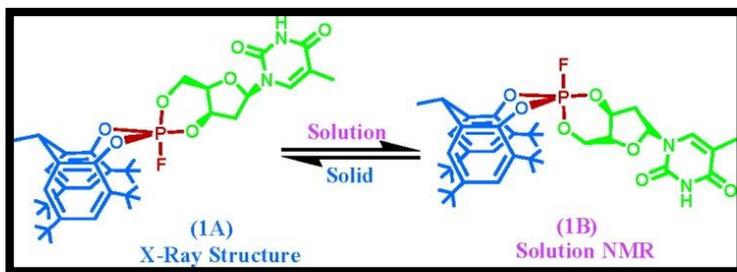


Fonte: (KIRBY; NOME, 2015).

O mecanismo de hidrólise dos triésteres de fosfato assemelha-se ao mecanismo de transferência do grupo acila para os derivados de ácidos carboxílicos, no sentido da formação de um intermediário fosforano pentacoordenado no átomo de fósforo, **Figura 4**. Nesse contexto, há um interesse crescente na obtenção e caracterização desses intermediários

no estado sólido (**Figura 5**), para que se possa elucidar os mecanismos envolvidos nos sítos ativos enzimáticos que participam de atividades biológicas importantes (TIMOSHEVA; CHANDRASEKARAN; HOLMES, 2005).

Figura 5 - Estrutura do fosforano pentacoordenado em equilíbrio isomérico entre o estado sólido e líquido, caracterizado por Raio-X (**1A**) e RMN (**1B**).



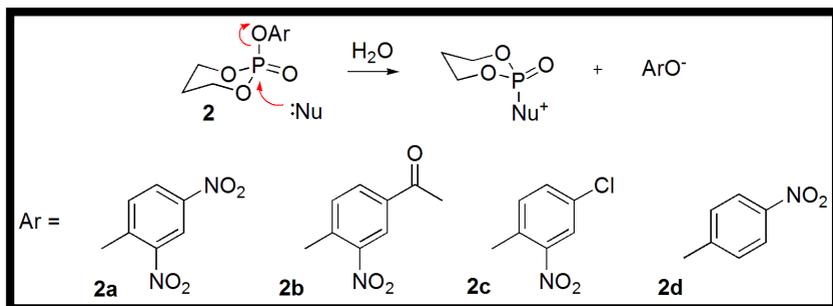
Fonte: (TIMOSHEVA et al., 2005).

Os avanços recentes nos estudos teóricos da hidrólise dos triésteres de fosfato (MORA; KIRBY; NOME, 2012) indicaram que a reatividade e estabilidade do intermediário fosforano dependem significativamente dos grupos espectadores presentes (grupo OR na **Figura 4**), sendo que a presença de grupos espectadores retiradores de elétrons promovem um aumento significativo da velocidade de reação (KIRBY et al., 2011).

Para compreensão dos progressos nas elucidações mecânicas em reações de substituição nucleofílica em triésteres de fosfato, destaque-se os trabalhos iniciados por Khan e Kirby em 1970, relatando o estudo

cinético da reatividade de uma ampla série de nucleófilos com uma variedade de triésteres de fosfato derivados do 1,3-propanodiol (**2**) ilustrados na **Figura 6** (KHAN; KIRBY, 1970).

Figura 6 - Representação geral no ataque nucleofílico nos triésteres de fosfato derivados do 1,3-propanodiol (**2**).

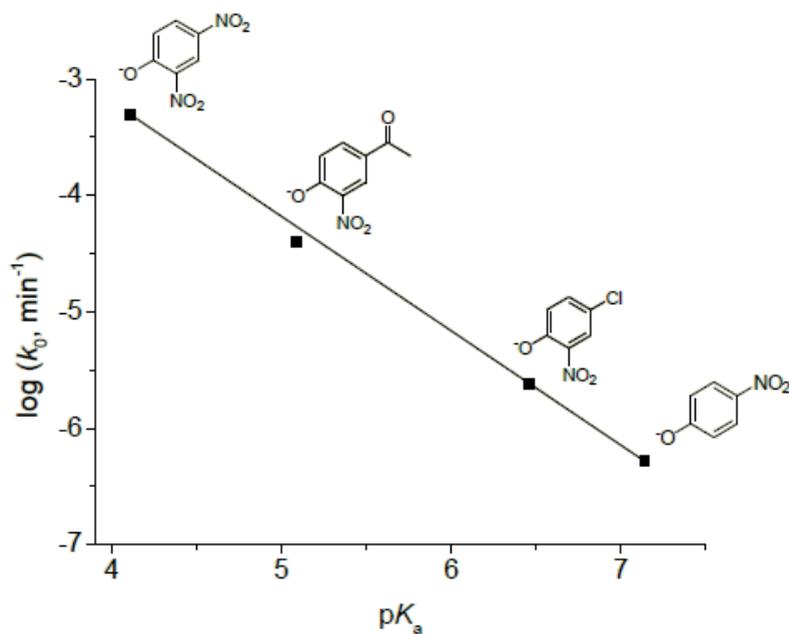


De acordo com os dados, a reação de desfosforilação do 1,3-propanodiol (**2**) mostrou-se sensível ao tipo de nucleófilo, assim como ao grau de basicidade do grupo de saída, ou seja, a velocidade de hidrólise do triéster (k_0) depende do pK_a do grupo de saída e pode ser relacionada através do gráfico de Bronsted por meio da equação $\log k_0 = -0,82 - 0,99 \text{ pK}_a (\text{min}^{-1})$. Os valores de k_0 e pK_a para os diferentes substituintes (Ar) estão apresentados na **Tabela 1** (KHAN; KIRBY, 1970).

Tabela 1 - Valores das constantes de velocidade para a hidrólise dos derivados do triéster 1,3-propanodiol (**2**), a 39°C e força iônica 1,0 M.

Grupo de Saída, Ar	p <i>K</i> _a	<i>k</i> ₀ (min ⁻¹)
2,4-dinitrofenil	4,07	6,86 x 10 ⁻³
4-acetil-2-nitrofenil	5,09	4,29 x 10 ⁻⁴
4-cloro-2-nitrofenil	6,36	2,30 x 10 ⁻⁵
4-nitrofenil	7,15	3,78 x 10 ⁻⁶

Figura 7 - Gráfico de Bronsted para os diferentes grupos de saída para a hidrólise dos derivados do triéster 1,3-propanodiol (**2**), a 39°C.

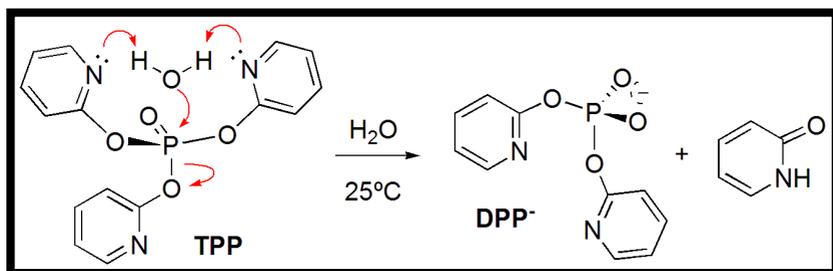


Fonte:(KHAN; KIRBY, 1970).

O gráfico de Bronsted da **Figura 7** serviu por muito tempo como modelo para determinar as constantes de velocidade de alguns triésteres, levando em consideração somente a natureza do nucleófilo e grupo de saída, sem considerar a possível influência dos grupos espectadores, sendo que estes não estão diretamente envolvidos na quebra e formação das ligações. Tal relação foi utilizada para a estimativa da velocidade de reação para a hidrólise do triéster *tris*-2-piridil fosfato (**2-TPP**), de acordo com o valor de pK_a do grupo de saída próximo a de um triéster derivado de um fenol (pK_a 9,01), com $k_0 = 1,5 \times 10^{-10} \text{ min}^{-1}$, a 39°C. No entanto, o valor experimental de k_0 obtido para tal reação aproxima-se de $2,35 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a 25°C, ou seja, cerca de 10^8 vezes maior do que o estimado, baseando-se na relação da **Figura 7** (KIRBY; MEDEIROS; et al., 2009).

O mecanismo inicialmente proposto para a hidrólise do **2-TPP** envolve o ataque nucleofílico da água ativada pelos grupos piridínicos, que atuam por meio de uma catálise básica geral intramolecular muito eficiente, com formação de um estado de transição cíclico com seis membros (KIRBY; MEDEIROS; et al., 2009), sugerido por meio dos valores de entropia de ativação e efeito isotópico, **Figura 8**.

Figura 8 - Mecanismo inicialmente proposto para a hidrólise do triéster *tris*-2-piridil fosfato (**2-TPP**).

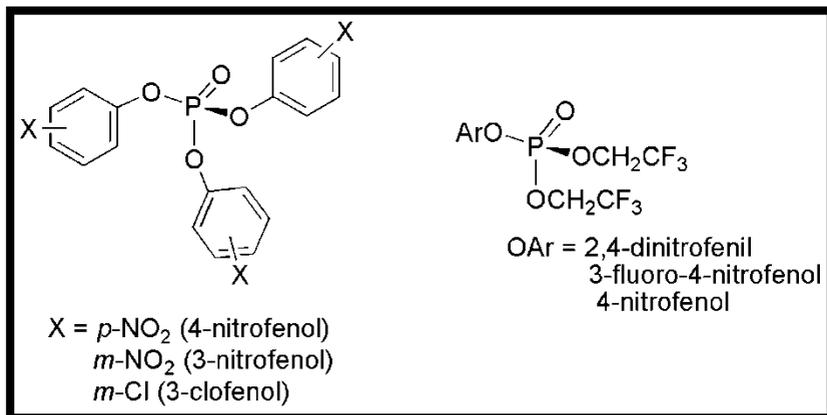


Fonte: (KIRBY; MEDEIROS; et al., 2009).

A catálise intramolecular altamente eficiente sugerida para a hidrólise do **2-TPP** envolveria um valor de molaridade efetiva (ME) tão alto que os reagentes externos não poderiam competir significativamente na reação (GRAAFLAND; KIRBY; ENGBERTS, 1981). No entanto, resultados posteriores de estudos cinéticos da hidrólise do **2-TPP** indicaram um aumento da velocidade da reação promovida pelo aumento da concentração de tampão (KIRBY et al., 2011). Baseado nessa evidência, o mecanismo de catálise básica geral intramolecular inicialmente proposto teria uma contribuição mínima, considerando-se ainda o baixo grau de basicidade do átomo de nitrogênio do grupo piridínico espectador ($pK_a = 13,78$).

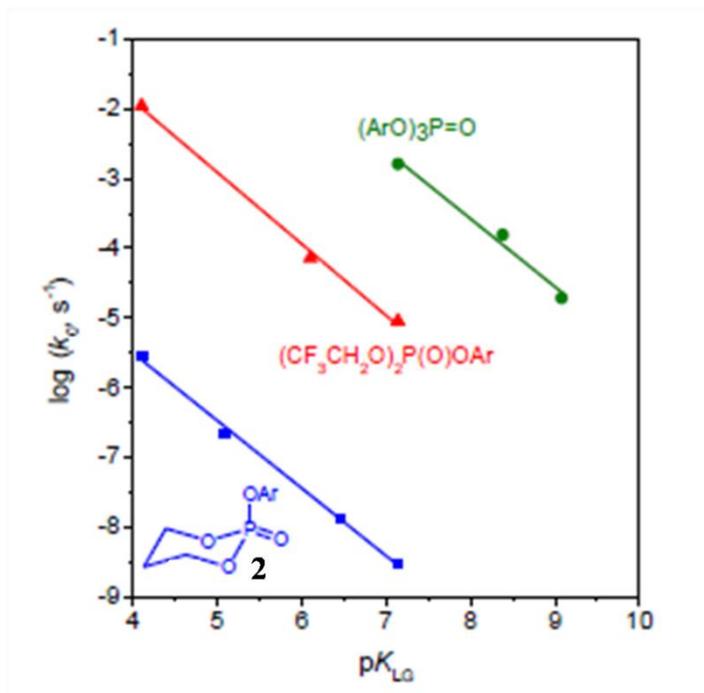
Em decorrência desses novos resultados, uma série de triésteres fosfóricos com diferentes valores de pK_a dos grupos de saída e grupos espectadores foram estudados (**Figura 9**), e os resultados indicaram uma notável influência dos grupos espectadores (alquílicos ou arílicos) nas constantes de velocidade das reações de hidrólise (KIRBY et al., 2011).

Figura 9 - Estruturas dos diferentes triésteres de fosfato investigados, em função dos grupos de saída e grupos espectadores.



Duas novas correlações lineares de energia livre foram obtidas com a finalidade de quantificar o efeito dos grupos espectadores, e através dessas correlações observou-se que as retas obtidas possuem inclinações semelhantes às retas da correlação linear de Khan e Kirby em 1970, porém com valores de k_0 muito maiores, **Figura 10**.

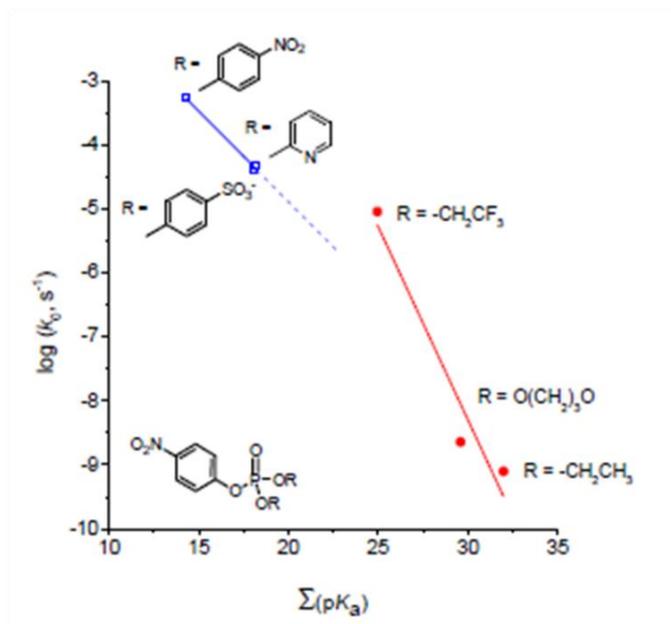
Figura 10 - Correlação de Bronsted para a série de triésteres de fosfato estudadas, em conjunto com a correlação obtida por Khan e Kirby em 1970 (em azul).



Embora o coeficiente angular da reta para a série de triésteres triarílicos seja igual ao coeficiente angular dos triésteres derivados do 1,3-propanodiol (**2**), a inclinação da reta para o sistema triarílico pode ser função tanto da sensibilidade do grupo de saída, representado pelo termo β_{LG} , quanto da sensibilidade do grupo espectador, representado pelo termo β_{NLG} (KIRBY et al., 2011).

Dessa maneira, através do estudo de hidrólise dos triésteres de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenol (**4-NP**) e diferentes grupos espectadores, foi possível obter duas correlações entre os valores de k_0 e os respectivos somatórios dos pK_a 's dos grupos espectadores, e confirmam que esses grupos exercem um forte efeito nas constantes de velocidade (KIRBY et al., 2011), **Figura 11**.

Figura 11 - Gráfico de Bronsted para as velocidades das reações de hidrólise dos triésteres com grupo de saída 4-nitrofenol, em função do somatório dos pK_a 's dos grupos espectadores.

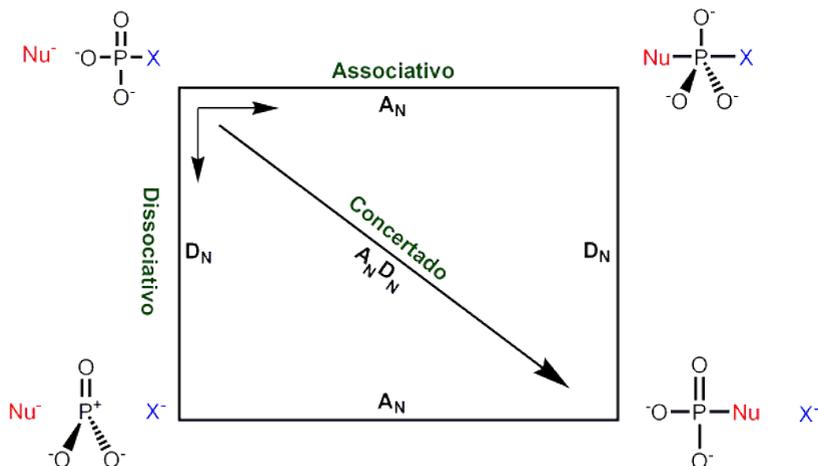


Sendo assim, o quadro atual para a hidrólise desses triésteres indica que os parâmetros de sensibilidade para os termos β_{LG} e β_{NLG} possuem valores de - 0,42 e - 0,28 para sistemas triarílicos, respectivamente, e para os sistemas dialquilarílicos $\beta_{LG} = - 0,99$ e $\beta_{NLG} = - 0,61$ (KIRBY; MORA; NOME, 2013).

1.3 Substituição Nucleofílica em Ésteres de Fosfato

De acordo com as reações de transferência do grupo fosforila estudadas até então, pode-se sugerir dois caminhos mecanísticos distintos: (i) quebra da ligação C-O, deslocando o grupo fosfato devido ao ataque do nucleófilo no átomo de carbono da ligação P-O-C; e (ii) quebra da ligação P-O, deslocando o grupo O-R pelo ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo central. Além disso, os mecanismos das reações de substituição nucleofílica no átomo central de fósforo podem ser classificados como associativo, dissociativo ou concertado (COX; RAMSAY, 1964), e podem ser ilustrados por meio do diagrama de More O`Ferrall-Jencks (ANSLYN, 2005), **Figura 12**.

Figura 12 - Diagrama de More O`Ferrall-Jencks de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila.

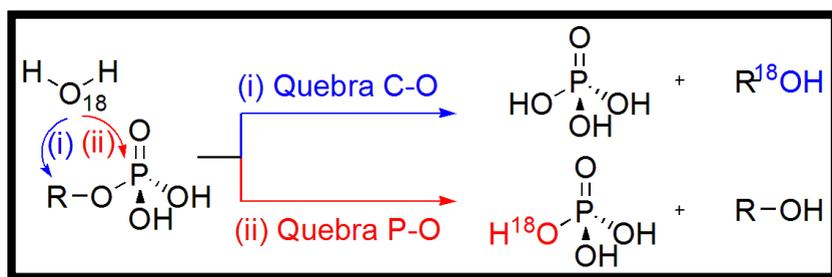


De acordo com a **Figura 12**, o mecanismo dissociativo ($D_N + A_N$), também conhecido como S_N1 para a química do carbono, pode ocorrer em duas etapas: **(i)** a formação do íon metafosfato, sendo essa a etapa determinante da velocidade da reação, e **(ii)** o ataque do nucleófilo sobre o íon formado. No caso do mecanismo associativo ($A_N + D_N$), conhecido como S_N2 para a química do carbono, pode ocorrer inicialmente o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico (adição), levando à formação de um intermediário pentacoordenado, seguido pela quebra da ligação com o grupo de saída (eliminação). Por fim, o mecanismo concertado ($A_N D_N$), no qual passa por um estado de transição onde o grau de ligação do nucleófilo e do grupo de saída define um caminho com caráter mais próximo ao mecanismo associativo ou dissociativo.

No entanto, a separação entre esses mecanismos é meramente instrucional, pois normalmente as reações são concertadas e não seguem caminhos totalmente dissociativos ou associativos. De maneira geral, os estados de transição (**ET**) envolvidos nas reações de triésteres e diésteres de fosfato estão localizados entre os mecanismos com caráter mais associativo, e os **ET** envolvidos nas reações de monoésteres estão localizados entre os mecanismos com caráter mais dissociativo (CLELAND; HENGGE, 2006).

Como mencionado no início deste item, o ataque de um nucleófilo pode ocorrer tanto no átomo de fósforo central quanto no átomo de carbono vizinho ao oxigênio do grupo fosfato. Nesse sentido, uma estratégia para diferenciar ambos os mecanismos seria realizar a reação em água marcada com isótopo ^{18}O (COX; RAMSAY, 1964), **Figura 13**.

Figura 13 - Reação em água marcada com ^{18}O para identificação da quebra no átomo de fósforo ou carbono.

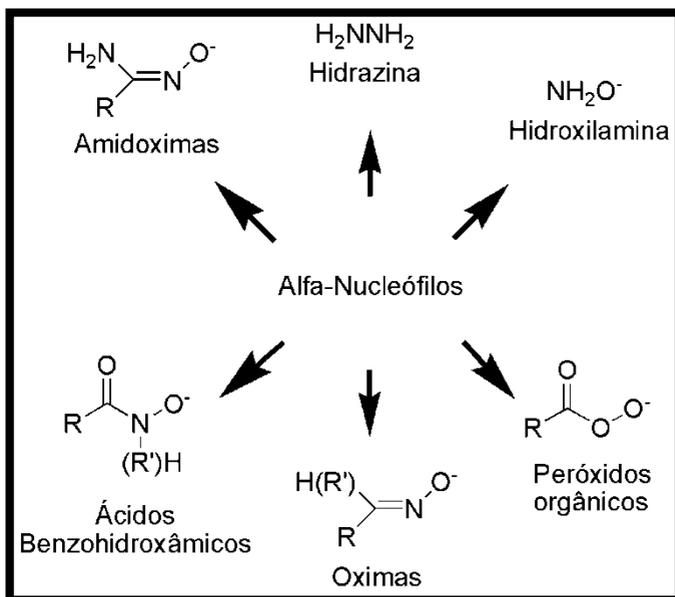


Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa possui um grande interesse pela química dos ésteres de fosfato, principalmente no que se refere à compreensão dos mecanismos, identificação dos intermediários e produtos formados e interpretação das estruturas dos estados de transição envolvidos nessas reações. Dentre os mais variados sistemas estudados, o presente trabalho abrange como ponto central as reações que utilizam nucleófilos detentores do efeito alfa, assim como os estudos realizados em meio micelar, os quais serão discutidos adiante.

1.4 Nucleófilos com Efeito Alfa

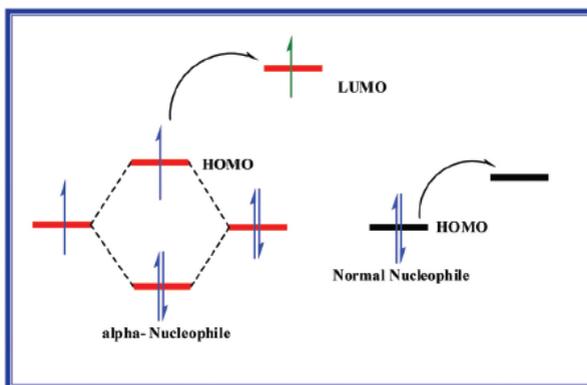
Com base na necessidade de se aperfeiçoar os métodos de degradação de ésteres de fosfato, os nucleófilos detentores do efeito alfa, ou alfa-nucleófilos, surgem como uma alternativa eficiente para tal objetivo (DOMINGOS et al., 2004; HERSCHLAG; JENCKS, 1990). Os alfa-nucleófilos são comumente denominados nucleófilos que possuem pares de elétrons não ligantes no átomo adjacente ao centro nucleofílico, e apresentam reatividade superior à dos nucleófilos de mesma basicidade. Essa reatividade distinta caracteriza os alfa-nucleófilos como supernucleófilos, e alguns exemplos estão apresentados na **Figura 14**.

Figura 14 - Representação estrutural dos alfa-nucleófilos mais comuns para as reações com ésteres de fosfato.



A origem do efeito alfa pode ser explicada com o auxílio do diagrama de orbital molecular apresentado na **Figura 15**, também conhecido como modelo de Hoz para o efeito alfa (HOZ; BUNCEL, 1985). O diagrama representa a energia de estabilização na medida em que dois elétrons preenchem os orbitais ligantes e apenas um elétron preenche o orbital anti-ligante.

Figura 15 - Diagrama de energia dos orbitais de alfa-nucleófilos e nucleófilos normais.



Fonte: (SINGH et al., 2015).

Os nucleófilos com características radiculares no estado de transição irão se estabilizar de tal forma que não ocorre com nucleófilos normais, dando origem ao efeito alfa (UM et al., 2005). Os fatores que podem ser citados para o aumento significativo da reatividade de alfa-nucleófilos são: a repulsão eletrônica entre os pares de elétrons, a catálise intramolecular, a estabilização do estado de transição, além de efeitos de solvatação (SIMANENKO et al., 2002).

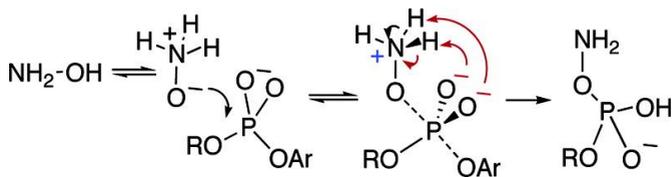
As principais características das reações envolvendo alfa-nucleófilos incluem: **(i)** os alfa-nucleófilos apresentam um desvio positivo no gráfico de Bronsted construído para nucleófilos “normais” (BUNCEL; CHUAQUI; WILSON, 1980); **(ii)** o efeito alfa pode ser medido pela comparação direta entre as constantes $k_{\alpha\text{-nuc}}/k_{\text{normal}}$ para nucleófilos com o mesmo valor de pKa, com magnitudes em torno de

10^3 vezes (FOUNTAIN et al., 2003); (iii) o efeito alfa depende do pK_a do grupo de saída (UM et al., 2005); (iv) as constantes de Hammett para a reatividade de alfa-nucleófilos são menores do que para nucleófilos “normais” (UM et al., 2006).

1.4.1 Reações de triésteres de fosfato com alfa-nucleófilos

Conforme descrito no item anterior, os nucleófilos detentores do efeito alfa constituem uma classe de compostos notáveis em relação à sua reatividade, o que possibilita a sua utilização na degradação de ésteres de fosfato de maneira efetiva (HERSCHLAG; JENCKS, 1990). Um exemplo de alfa-nucleófilo que apresenta esta reatividade peculiar é a hidroxilamina (NH_2OH), a qual possui dois centros nucleofílicos capazes de reagir de maneira seletiva, ou seja, fazendo com que o ataque ocorra preferencialmente pelo átomo de nitrogênio nas reações de alquilação ou via átomo de oxigênio para as reações de transferência do grupo acila e fosforila, **Figura 16**, ainda que o átomo de nitrogênio apresente um caráter mais básico (KIRBY et al., 2006).

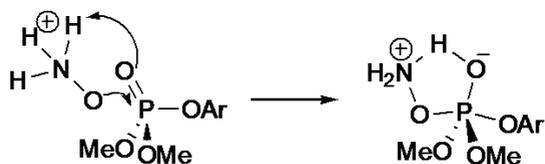
Figura 16 - Mecanismo sugerido para o ataque nucleofílico da hidroxilamina pelo átomo de oxigênio na reação com um diéster de fosfato.



Fonte: (KIRBY et al., 2006).

De acordo com a **Figura 16**, o mecanismo proposto envolve o ataque da hidroxilamina pelo átomo de oxigênio no diéster de fosfato, sendo que a espécie mais reativa consiste na forma dipolar iônica, que representa 20% em solução aquosa próxima à pH 7, de acordo com dados cristalográficos e teóricos (KIRBY et al., 2010). Além disso, os estados de transição calculados para a reação da hidroxilamina na forma zwitteriônica envolve a transferência de próton do grupo NH_3^+ do nucleófilo para o oxigênio do grupo fosforila, o que seria um forte indício da preferência para tal forma, **Figura 17**.

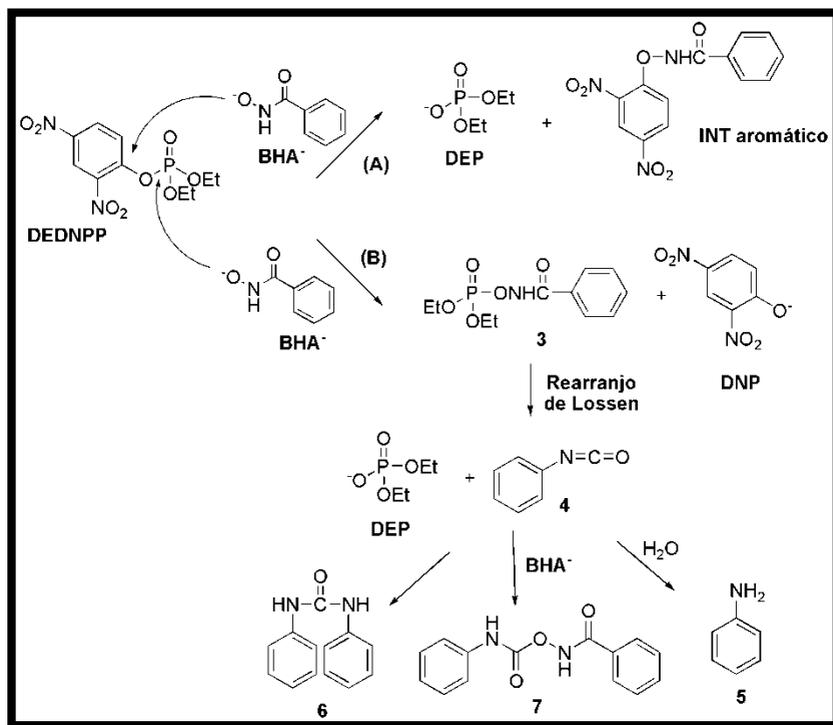
Figura 17 - Mecanismo sugerido para a transferência efetiva do grupo fosforila para o átomo de oxigênio da hidroxilamina.



Fonte: (KIRBY et al., 2010).

Além das hidroxilaminas, os ácidos benzohidroxâmicos possuem reatividades excepcionais frente ao ataque em ésteres de fosfato. Na reação do ácido benzohidroxâmico (**BHA**) e o triéster **DEDNPP**, estudos de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas indicaram dois caminhos reacionais principais, **Figura 18**.

Figura 18 - Reação entre o ácido benzohidroxâmico BHA^- e o triéster DEDNPP , indicando dois caminhos reacionais distintos.



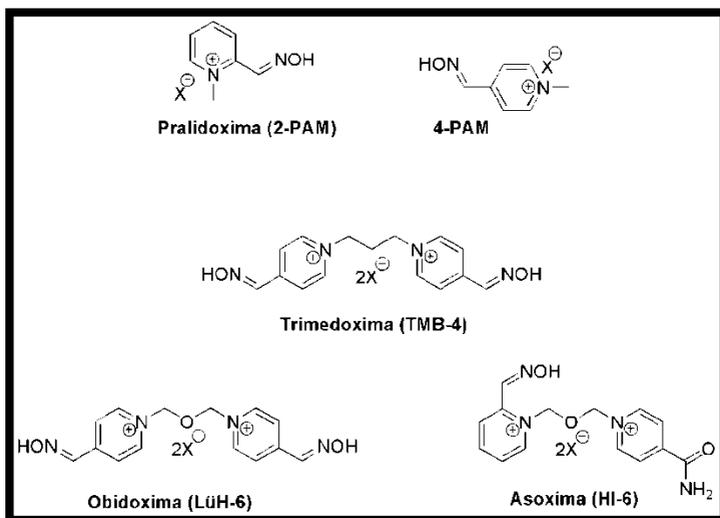
Fonte: (ORTH et al., 2009).

O caminho (A) na **Figura 18** representa o ataque nucleofílico do BHA^- no átomo de carbono aromático, com a formação do diéster dietil fosfato e o intermediário aromático. O caminho (B) envolve o ataque no átomo de fósforo central e a eliminação do grupo de saída 2,4-dinitrofenolato (DNP), seguido da formação do intermediário fosforilado (3) que sofre rearranjo de Lossen e degrada-se em isocianato de fenila (4), o qual produz anilina (5). Além disso, outros

produtos como difenilureia (6) e o derivado carbamílico (7) podem ser detectados (MEDEIROS, M. et al., 2012).

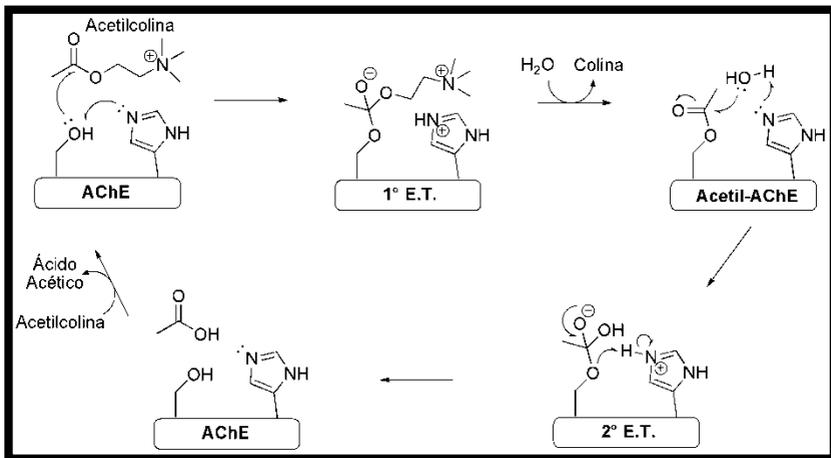
Na mesma linha dos alfa-nucleófilos, as oximas apresentam uma reatividade extraordinária em reações de substituição nucleofílica bimolecular (TARKKA; BUNCEL, 1995). Com base nisso, diversas oximas são empregadas na destoxificação por agentes organofosforados, através da reativação da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, que por sua vez pode causar um colapso no sistema nervoso central quando acumulada no organismo (RIBEIRO et al., 2012). As estruturas das oximas mais conhecidas estão apresentadas na **Figura 19**.

Figura 19 - Estruturas das oximas mais conhecidas como antídotos para destoxificação por agente organofosforados.



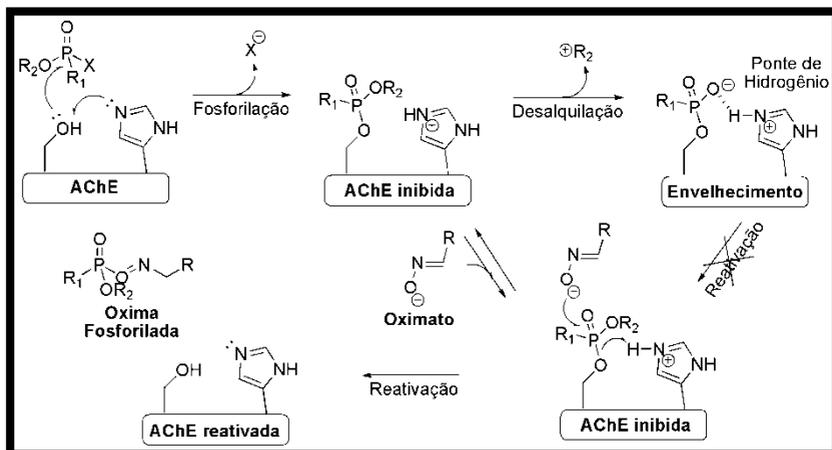
Durante o funcionamento normal da enzima **AChE**, a tríade catalítica localizada no sítio ativo da enzima, catalisa a hidrólise da acetilcolina (MERCEY et al., 2012). O mecanismo envolve basicamente duas etapas: **(i)** o ataque nucleofílico da serina na acetilcolina com formação de um estado de transição tetraédrico, seguido da eliminação da colina e a total transferência do grupo acetil para a enzima; e **(ii)** ativação de uma molécula de água pelo grupo vizinho histidina, seguido pelo ataque à serina acetilada com formação de um segundo estado de transição tetraédrico, eliminação de ácido acético e total regeneração da enzima, **Figura 20**. Esse mecanismo de hidrólise é altamente eficiente, sendo que a **AChE** hidrolisa cerca de 10^4 moléculas de acetilcolina por segundo (QUINN, 1987).

Figura 20 - Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase **AChE**.



O mecanismo de inibição da **AChE** por agentes organofosforados (**OP**) assemelha-se à etapa inicial do mecanismo de hidrólise discutido acima. Assim que os **OP** atingem o sítio ativo enzimático, ocorre o ataque nucleofílico do aminoácido serina no átomo de fósforo, com formação de um estado de transição bipyramidal, seguido pela eliminação do grupo de saída e formação da serina fosforilada, **Figura 21**. No entanto, a presença do grupo fosforil dificulta a ativação da água pela histidina, e em decorrência disso a reação de hidrólise espontânea torna-se mais lenta, e pode variar entre algumas horas para o dimetil fosforil (WOREK; DIEPOLD; EYER, 1999), à até alguns dias para os agentes do Tipo-V (TROVASLET-LEROY et al., 2011).

Figura 21 - Mecanismo de inibição da enzima acetilcolinesterase **AChE**, envelhecimento e reativação por oximas.



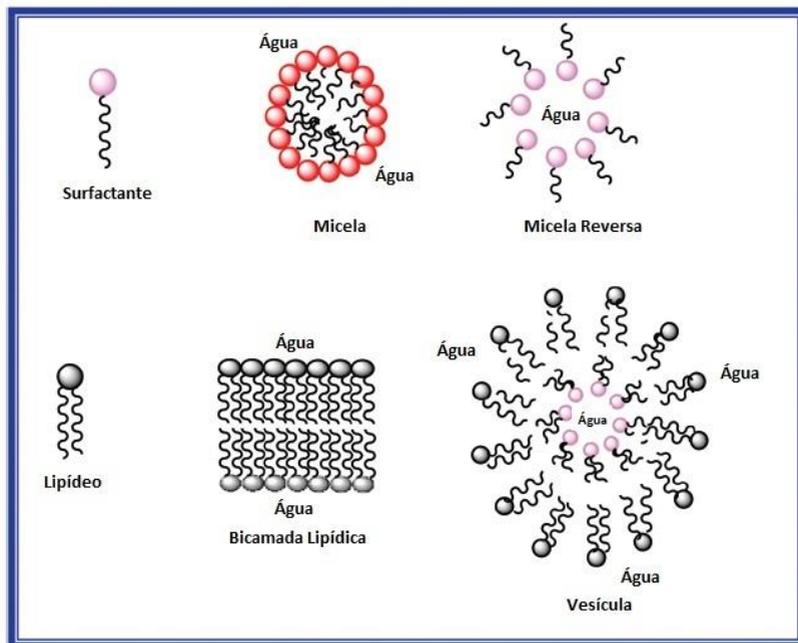
A etapa de envelhecimento da **AChE** envolve geralmente a perda de um grupo alquila do substituinte alcoxi presente no átomo de fósforo, **Figura 21**. O oxianion resultante forma uma ponte de hidrogênio com a histidina protonada, e dificulta o ataque no átomo de fósforo por um nucleófilo negativamente carregado, e impossibilita a reativação enzimática pela oxima. (SEGALL et al., 1993).

1.5 Surfactantes e Catálise Micelar

A busca por sistemas que mimetizem as reações catalisadas por enzimas tem estimulado os estudos na área de reações orgânicas realizadas em meio micelar (FARIA et al., 2008). Esses sistemas fornecem um meio interessante para a análise e compreensão das reações orgânicas que ocorrem em sistemas biológicos.

De maneira geral, os surfactantes (ou tensoativos) são compostos que apresentam longas cadeias carbônicas (hidrofóbicas) conectadas a uma extremidade polar (hidrofílica). A região hidrofóbica pode divergir no comprimento, na presença de insaturações e/ou consistir de duas ou mais cadeias carbônicas. Além disso, dependendo da estrutura da região hidrofílica, os surfactantes podem ser classificados como aniônicos, catiônicos, neutros ou zwitteriônicos, **Figura 22** (FINEAN, 1983).

Figura 23 - Representação estrutural de surfactantes, micelas, micelas reversas, lipídeos, bicamada lipídica e vesículas.



Fonte: (SINGH et al., 2015).

Em virtude da capacidade de modificar o meio reacional, os surfactantes podem ser utilizados em diversas áreas da química, permitindo a solubilização de espécies insolúveis, além de promover um meio capaz de modificar a velocidade das reações químicas. Dessa forma, as micelas podem agir como “nanoreatores”, concentrando e alterando as constantes de velocidade das reações químicas (GHOSH et al., 2006).

À medida que a concentração de surfactante aumenta em solução, as moléculas buscam uma nova forma de organização que permita diminuir a energia livre do sistema, fazendo com que ocorra uma súbita mudança nas propriedades físicas das soluções. É neste ponto, conhecido como concentração micelar crítica (**CMC**), onde há a formação dos agregados denominados micelas, **Figura 24**. Esses agregados possuem uma característica peculiar, ou seja, são capazes de aumentar as velocidades das reações bimoleculares, pela incorporação e concentração dos reagentes na região próxima à interface micelar, na qual pode ser tratada como uma região distinta da fase aquosa, denominada pseudofase (DWARS; PAETZOLD; OEHME, 2005).

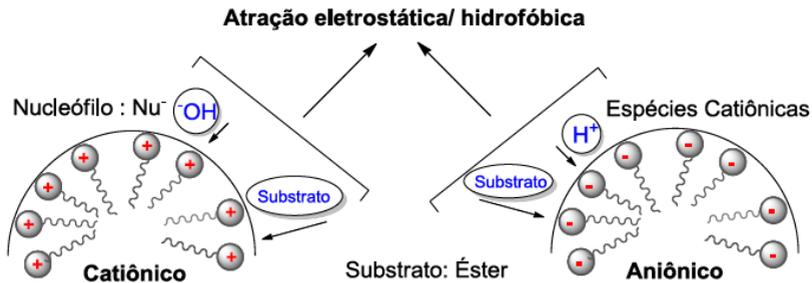
Figura 24 - Formação de micelas acima da concentração micelar crítica (**CMC**).



A capacidade das micelas de acelerar as reações químicas está intimamente relacionada com as interações entre os substratos e o meio micelar, por meio de forças *hidrofóbicas* e *eletrostáticas*, sendo que esta última é favorecida pela presença de reagentes com caráter iônico, os

quais possuem cargas opostas à superfície da micela, conforme ilustrado na **Figura 25**.

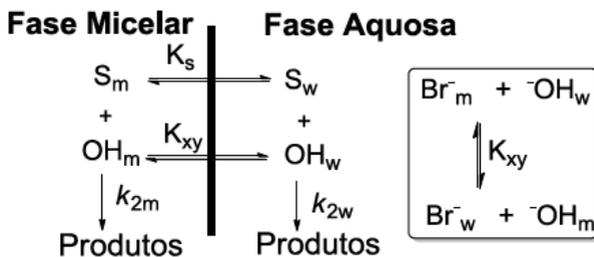
Figura 25 – Representação de reação em meio micelar catiônico e aniônico.



Fonte: (ORTH, 2011).

O modelo da pseudofase e troca iônica permite o tratamento matemático para quantificar as velocidades das reações nas quais os reagentes encontram-se particionados entre as pseudofases aquosa e micelar (QUINA; CHAIMOVICH, 1979), **Figura 26**.

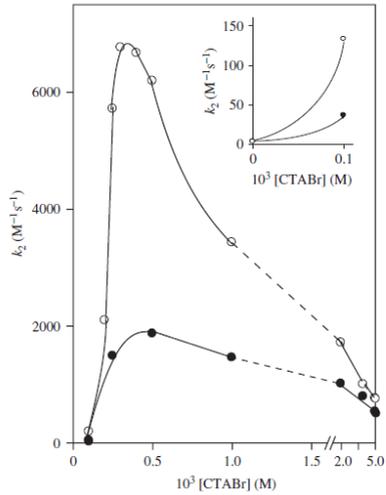
Figura 26 - Modelo da pseudofase e troca iônica para as reações em meio micelar com contra-íons Br⁻, em pH alcalino.



De acordo com a **Figura 26**, os termos K_s e K_{xy} representam a distribuição do substrato e dos íons Br^- e HO^- entre as fases aquosa e micelar, respectivamente. As velocidades das reações bimoleculares entre as pseudofases aquosa e micelar são representadas pelos termos k_{2m} e k_{2w} , sendo que o aumento das velocidades está relacionado com os seguintes fenômenos: **(i)** ao aumento da concentração local dos reagentes na interface micelar; **(ii)** a estabilização do estado de transição da reação; e **(iii)** polarizabilidade, microviscosidade e efeitos de carga no interior da micela (MARIN et al., 1995).

A introdução de micelas catiônicas em solução, tais como cetiltrimetilamônio com contra-íons aniônicos (CTA^+X^-), podem aumentar significativamente a velocidade de decomposição de compostos organofosforados, em conjunto com os alfa-nucleófilos (HAN et al., 2006). Por exemplo, o perfil de velocidade para a reação envolvendo oximatos e o 4-nitrofenil difenil fosfato ilustrado na **Figura 27** indica um aumento inicial da velocidade de reação, passando por um máximo próximo à concentração micelar crítica (CMC), e em seguida a velocidade sofre um declínio (BUNTON; IHARA, 1977).

Figura 27 - Efeito da concentração de **CTAB** na reatividade entre 4-nitrofenil difenilfosfato com os íons 4-nitrobenzaldoximato (●) e 2-quinolinaldoximato (○).



Fonte:(BUNTON; IHARA, 1977).

2 Objetivos

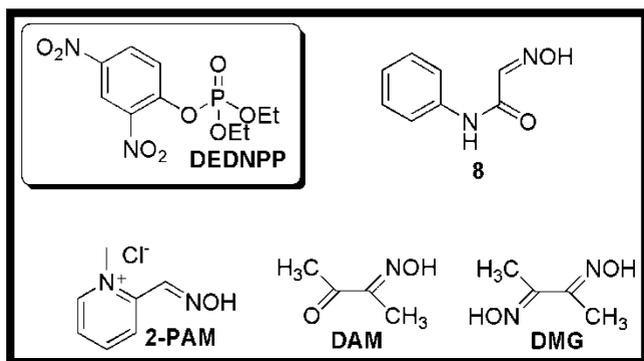
Objetivos

Os objetivos desta tese de doutorado foram: (i) estudar detalhadamente as reações de desfosforilação do triéster 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) na presença de oximas, em meio aquoso e micelar; e (ii) estender os estudos para a degradação do pesticida dimetil-4-nitrofenil fosfato (**paraoxon metílico**).

Estratégias

As estratégias para atingir os objetivos deste trabalho envolveram as seguintes etapas:

- i. Avaliação do efeito do pH na velocidade das reações de desfosforilação do **DEDNPP** com as oximas: 2-hidróxi-*N*-fenilacetamida (**8**), pralidoxima (**2-PAM**), diacetilmonoxima (**DAM**) e dimetilglioxima (**DMG**).



- ii.* Estudos dos efeitos de concentração das oximas **8**, **2-PAM**, e **DAM** nas velocidades das reações com o **DEDNPP**.
- iii.* Comparação das reatividades das oximas com outros alfa-nucleófilos nas reações de degradação do **DEDNPP**, através da correlação de Bronsted.
- iv.* Estudo de efeito isotópico do solvente (H_2O/D_2O) e parâmetros de ativação da reação entre **8** e **DEDNPP**.
- v.* Realização de cálculos teóricos para a reação entre **8** e **DEDNPP**.
- vi.* Identificação dos principais produtos da reação entre **8** e **DEDNPP** pelas técnicas de Ultravioleta-Vísivel (UV-Vis), Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H e ³¹P), Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS).
- vii.* Realização das reações entre as oximas e **DEDNPP** na presença do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (**CTAB**).
- viii.* Estudo da degradação do pesticida comercial **paraoxon metílico** pela oxima **8**, em meio aquoso e micelar, e identificação dos principais produtos.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

A seguir estão descritas as sínteses da oxima **8** e **DEDNPP**. O pesticida **paraoxon metílico** e as oximas **2-PAM**, **DAM** e **DMG** foram adquiridas comercialmente.

Síntese do dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (DEDNPP): o triéster foi sintetizado conforme metodologia descrita na literatura (MOSS; IHARA, 1983). De acordo com a metodologia, 10 mmol de 2,4-dinitrofenol seco (**DNP**), 10 mmol de dietilclorofosfato (**DECIP**) e 11 mmol de trietilamina(**Et₃N**) foram dissolvidos em 50 mL de benzeno (seco em peneira molecular de 4Å). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por aproximadamente 9 horas, a 70-80°C. Ao final da reação a solução foi filtrada, lavada com água (5 x 100 mL), a fase orgânica seca com MgSO₄, e em seguida o benzeno foi removido sob pressão reduzida até a obtenção de um óleo amarelado. ¹H RMN (CDCl₃, 200 MHz): δ 1,40 (t, 6H, *J* = 6,96 Hz, CH₃); δ 4,31 (“quinteto”, 4H, *J* = 6,96 Hz, CH₂); δ 7,86 (dd, 1H, *J*_{bc} = 9,16 Hz e *J*_{ac} = 1,10 Hz, Ar); δ 8,46 (dd, 1H, *J*_{bc} = 9,16 Hz e *J*_{ab} = 2,93 Hz, Ar), δ 8,81 (dd, 1H, *J*_{ab} = 2,93 Hz e *J*_{ac} = 1,10 Hz, Ar). ³¹P RMN (CDCl₃, 81 MHz); δ -7,64. Os espectros estão representados no Apêndice.

Síntese da oxima (8): a oxima foi sintetizada de acordo com metodologia descrita na literatura (DA SILVA et al., 2010). Em um balão de 500 mL, foram adicionados 130 g de sulfato de sódio (0,915 mol), 120 mL de água destilada, 18 g de hidrato de cloral (0,109 mol) e 13 g de sulfato de hidroxilamina (0,079 mol) dissolvidos em 50 mL de água destilada, 0,1 mol de anilina em 60 mL de água destilada e 8,6 mL de ácido clorídrico concentrado. O banho de óleo foi aquecido gradualmente até 70°C, com posterior adição de 100 mL de álcool etílico. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética e refluxo durante 4 horas, Após esse período, a mistura foi vertida em banho de gelo, filtrada em funil de Büchner, à pressão reduzida, e lavada com água destilada. **P.f.** 173-175°C. **IV** (cm⁻¹): 3303, 3272, 3149, 1664, 1610, 1560, 1251, 1004, 904, 794, 694. **¹H RMN** (CDCl₃-DMSO-d₆, 200 MHz) δ 7,05 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H1 e H5), δ 6,67 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H2 e H4), δ 6,45 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H3), δ 9,08 (s, 1H, NH), δ 11,39 (sl, 1H, NOH). **¹³C RMN** (CDCl₃-DMSO-d₆, 50 MHz) δ 159,1, 142,4, 136,7, 127,2, 122,5, 118,6.

3.2 Titulação espectrofotométrica

As titulações foram realizadas em um espectrofotômetro de UV-visível modelo HP-8453 acoplado a um banho termostático. Os valores de pK_a em água e em meio micelar de **CTAB** foram obtidos à $25^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ e todos os valores de pH foram medidos utilizando-se um pHmetro modelo Hanna Instruments pH 200. Uma solução de 100 mL de oxima (5×10^{-4} M) foi preparada com água deionizada, e o pH da solução foi ajustado para o valor desejado através da adição de hidróxido de potássio diluído. Após cada ajuste do pH, a solução foi transferida para uma cubeta de quartzo com capacidade para 3 mL e com 1 cm de caminho óptico, e os valores de absorvância foram obtidos do espectro.

3.3 Medidas cinéticas

As reações foram conduzidas em espectrofotômetros de UV-Vis modelo Varian Cary 50 ou HP-8453, acoplados a banhos termostáticos. As reações foram iniciadas pela adição de 20 μL de uma solução estoque de substrato (5×10^{-3} M, em acetonitrila) à 2 mL de uma solução tamponada em uma cubeta de quartzo, para atingir uma concentração final de $5,0 \times 10^{-5}$ M. As reações foram acompanhadas monitorando-se o aparecimento dos produtos 2,4-dinitrofenolato (**DNP**) ou 4-nitrofenolato (**4-NP**), de acordo com cada substrato. As reações foram seguidas no comprimento de onda adequado, por no mínimo 5 tempos de meia-vida. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas através do ajuste da curva de absorvância em função do tempo pelo programa Scanning Kinetics WinUV. Os coeficientes de

correlação foram maiores que 0,998. Os tampões utilizados foram: $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ (pH 6,5-7,5); TRIS (pH 8,0-9,0) e carbonato (pH 9,5-11,0).

3.4 Estudos por RMN de ^1H e ^{31}P

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{31}P foram obtidos através de um equipamento de 200 MHz modelo Bruker AC 200, disponibilizado pela Central de Análises no Departamento de Química da UFSC. Em todas as medidas utilizou-se o 3-(trimetilsilil) propionato de sódio (TMSP) como referência interna para RMN de ^1H e ácido fosfórico 85% como referência externa para RMN de ^{31}P . Todas as soluções foram preparadas com solventes deuterados. Os valores de pD para as soluções aquosas foram ajustados de acordo com a equação: $\text{pD} = \text{pH}_{\text{lido}} + 0,4$, a 25°C (FIFE; BRUICE, 1961). Os espectros adquiridos foram manipulados no software MestrReNova versão 6.0.2.

3.5 Cálculos computacionais

Os cálculos computacionais para o ataque nucleofílico da oxima **8** no triéster de fosfato **DEDNPP** foram realizados por meio da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com metodologia B3LYP/6-11+G(d,p), utilizando-se o programa Gaussian 09 implementado para o sistema operacional Linux. O sistema aquoso foi simulado através do método PCM (“Polarizable Continuum Model”) com a versão IEF (“Integral Equation Formalism”) em conjunto com o modelo de solvatação SMD. Os parâmetros de convergência padrões foram utilizados para

todos os cálculos. Os cálculos de frequência foram realizados a 1 atm e 25°C. Os reagentes e produtos foram identificados pela ausência de frequências imaginárias, enquanto que o estado de transição apresentou apenas uma frequência imaginária. As coordenadas de reação intrínsecas (IRC) (FUKUI, 1981) foram computadas no sentido de se confirmar o caminho reacional. Na conversão do estado padrão de 1 atm para 1 M o valor de ΔG^\ddagger foi corrigido subtraindo-se 1,90 kcal.mol⁻¹ do valor originalmente calculado, de acordo com a reação $A + B \rightarrow C$ (BENSON, 1968; RASTELLI; BAGATTI; GANDOLFI, 1995).

3.6 Estudos por LC-MS/MS

Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados com a supervisão do Prof. Gustavo Amadeu Micke e com o auxílio do doutorando Daniel Spudeit.

Os experimentos foram realizados em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) modelo 1200, equipado com bomba quaternária e amostrador automático com controle de temperatura e forno para coluna analítica. A coluna de separação utilizada foi da marca Agilent modelo Zorbax Eclipse XDB-C8 com 150 mm de comprimento, diâmetro interno de 2,1 mm e tamanho da partícula de 3,5 μm , a 30°C. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e em todas as análises o volume injetado foi de 10 μL com tempo de análise de 20 min.

O cromatógrafo líquido foi devidamente acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray (3200 Qtrap, AppliedBiosystems/MDS Sciex, Concord, Canada). As análises

foram realizadas no modo positivo com os parâmetros a seguir: a interface íon-spray foi mantida em 400°C; voltagem do íon-spray de 4500 V; cortina de gás de dessolvatação (CurtainGasTM) com 10 psi; gás nebulizante (GS1) com 40 psi; gás secante (GS2) com 40 psi e nitrogênio com gás de colisão.

3.7 Estudos por CG-MS

Os experimentos foram realizados em um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo CG-17a, equipado com uma coluna DB-5 (Agilent) de 30 metros de comprimento, interfaciado a uma estação de trabalho com sistema de aquisição e tratamento de dados CGMS solution versão 1.20 (LabSolution, 2004). O sistema é equipado com um detector de massa quadrupolo (Shimadzu), modelo QP5050A, cuja fonte de íons de 70 eV opera em modo de impacto de elétrons (EI). O cromatógrafo gasoso foi programado com um fluxo constante de gás de arraste (He) em 1,0 mL/min, sendo que 2,5 % deste fluxo é direcionado para a coluna e o restante purgado do sistema (razão de split de 40/1). As temperaturas do injetor e da interface foram mantidas em 280 e 300°C, respectivamente. A temperatura do forno iniciou em 80°C por 5 min, e em seguida foi elevada com uma taxa constante de 10°C/min, até atingir 300°C, a qual foi mantida por mais 5 min.

4 Resultados e Discussão

4.1 Titulações espectrofotométricas

O grau de ionização das moléculas em solução varia conforme os diferentes valores de pH, e pode ser representado por um parâmetro definido como constante de acidez (pK_a) (KARA; ALKAN, 2000). As aplicações das constantes de acidez dos compostos orgânicos são inúmeras, e representam um papel fundamental nos sistemas biológicos e em diversos procedimentos analíticos. Além disso, muitas das fundamentações teóricas da química orgânica moderna baseiam-se nas correlações entre as estruturas moleculares e os equilíbrios entre as espécies protonadas e desprotonadas, **Figura 28** (BELTRAN et al., 2003).

As constantes de acidez para a oxima **8**, em meio aquoso e micelar, foram determinadas através de titulação espectrofotométrica, sendo esta uma técnica simples e vastamente utilizada (NIAZI et al., 2006). De acordo com a **Figura 29A**, duas bandas de absorção na região do ultravioleta (UV) foram observadas: *(i)* em 220 nm, referente à espécie protonada da oxima (**Ox**), e *(ii)* em 280 nm, referente à espécie desprotonada da oxima (**Ox⁻**). Os valores de pK_a foram obtidos pela variação de absorvância em função do pH (**Figura 29B**), e a curva sigmoidal obtida confirma a existência do equilíbrio de dissociação ácido-base representado na **Figura 28**.

Figura 28 - Equilíbrio de dissociação entre a espécie protonada (**Ox**) e a forma desprotonada (**Ox⁻**).

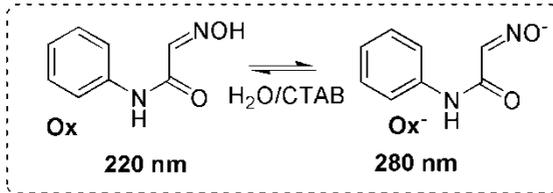
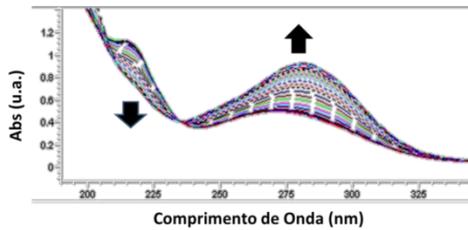
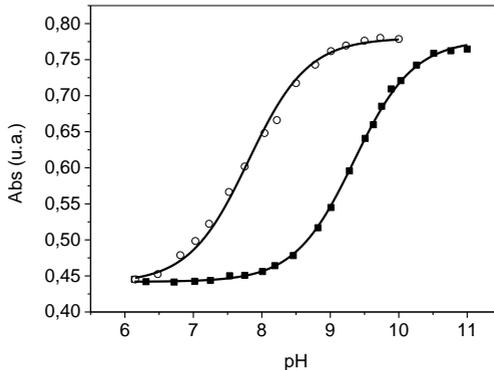


Figura 29 - (A) Espectro de abs vs. comprimento de onda em função do pH. (B) Gráficos de abs vs. pH obtidos para: oxima **8** (5×10^{-4} M) em H_2O (■) e na presença de **CTAB** (0,01 M) (○), em 280 nm, a 25°C.

(A)



(B)



As curvas na **Figura 29B** representam o melhor ajuste realizado de acordo com a **Equação 1**, onde os termos $Abs_{Ox} \chi_{Ox}$ e $Abs_{Ox^-} \chi_{Ox^-}$ representam as absorvâncias multiplicadas pelas frações molares da oxima protonada e desprotonada, respectivamente.

$$Abs = (Abs_{Ox} \chi_{Ox}) + (Abs_{Ox^-} \chi_{Ox^-}) \quad \mathbf{1}$$

Os valores de pKa das oximas podem ser alterados na presença de surfactantes (NIAZI; ZOLGHARNEIN; DAVOODABADI, 2008), através da combinação de fatores eletrostáticos e hidrofóbicos (POURREZA; RASTEGARZADEH, 2005). Com isso, a interação da oxima com a interface micelar faz com que o equilíbrio seja deslocado no sentido de formação da espécie aniônica, diminuindo os valores de pKa, **Figura 29B** e **Tabela 2**.

Tabela 2 - Valores de pKa de **8** determinados espectrofotometricamente em água e na presença de surfactante **CTAB** 0,01 M.

	pKa
H₂O	9,35
CTAB	7,81

4.2 Reações entre DEDNPP e oximas em meio aquoso

As reações de degradação do triéster de fosfato **DEDNPP** mediadas pelas oximas **8**, pralidoxima (**2-PAM**), diacetilmonoxima (**DAM**) e dimetilglioxima (**DMG**), **Figura 30**, foram acompanhadas por meio da técnica de espectroscopia de UV/Vis.

Os espectros sucessivos de UV-Vis permitiram visualizar o aparecimento das bandas em 360 e 400 nm, que representam a formação do produto 2,4-dinitrofenolato (**DNP**). Na **Figura 31** estão os espectros sucessivos de UV-Vis típicos para a reação entre **DEDNPP** e oxima **8**. O produto **DNP** foi caracterizado também por experimentos de RMN de ^1H e CG/MS.

Figura 30 - Reação de degradação do triéster de fosfato **DEDNPP** mediada por oximas.

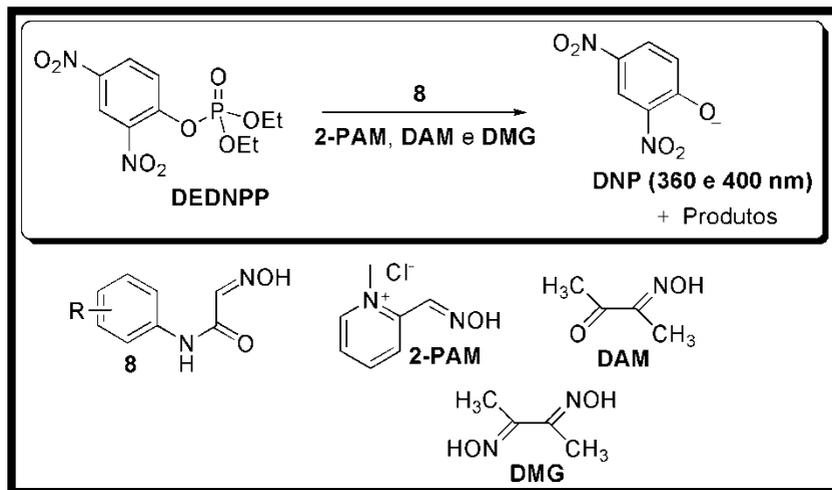
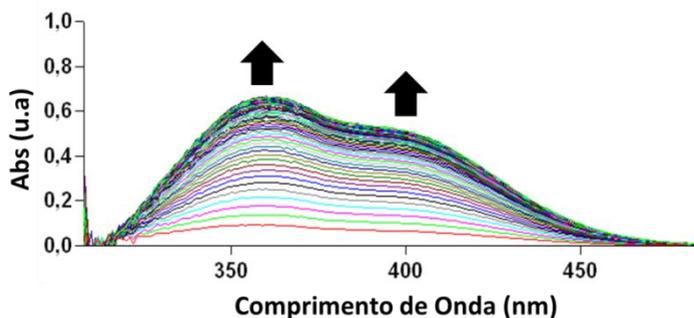
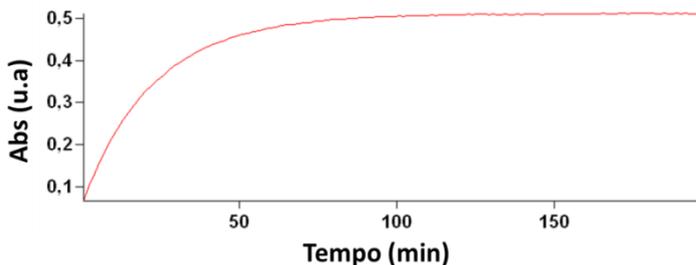


Figura 31—Abs vs. comprimento de onda para a reação entre **DEDNPP** (5×10^{-5} M) e oxima **8** (0,001 M) a 25°C e $\text{pH} = 10$.



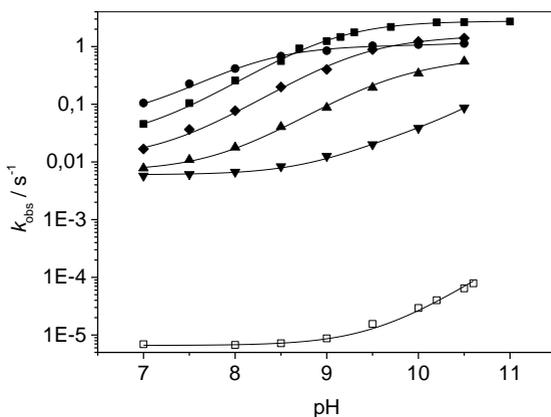
Os gráficos de absorvância em função do tempo para a formação de **DNP**, em 400 nm, foram obtidos a partir dos espectros sucessivos de UV-Vis. Na **Figura 32** está apresentado um gráfico característico de abs vs. tempo para a reação entre **DEDNPP** e **8**, em 400 nm. As cinéticas apresentaram comportamentos típicos de primeira ordem em relação ao substrato orgânico em todas as reações estudadas.

Figura 32 - Gráfico de abs vs. tempo para a reação entre **DEDNPP** (5×10^{-5} M) e a oxima **8** (0,001 M) em 400 nm, a 25°C e $\text{pH} 10$.



Na **Figura 33** estão apresentados os valores das constantes de velocidades observadas (k_{obs}) em função do pH para as reações dos nucleófilos com **DEDNPP**. Para fins comparativos, os dados da reação de hidrólise do triéster **DEDNPP** estão incluídos no gráfico. De acordo com o perfil de pH, as reações tornam-se mais rápidas a medida que o pH se eleva, o que evidencia que as espécies aniônicas dos nucleófilos são mais reativas. Os ajustes não-lineares representados pelas curvas sólidas na **Figura 33** foram realizados com a **Equação 2**. Nesta, k_0 representa a reação com a água (H_2O); k_{OH} , a reação com o íon hidróxido (HO^-); e k_{NU} , a constante de segunda ordem para as reações com os nucleófilos, conforme a **Figura 34**.

Figura 33 - Perfil de pH para as reações do **DEDNPP** com **DMG** (\blacktriangledown), **DAM** (\blacktriangle), **2-PAM** (\bullet), **8** (\blacklozenge) e **BHA**(\blacksquare), a 25°C. Os dados para a reação em H_2O (\square), obtidos da literatura (ORTH et al., 2011), foram inseridos para comparação.



$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{OH}}[\text{HO}^-] + k_{\text{NU}}[\text{Nu}]$$

Figura 34 - Representação da reação entre o triéster **DEDNPP** com a água, íon hidróxido e nucleófilos.

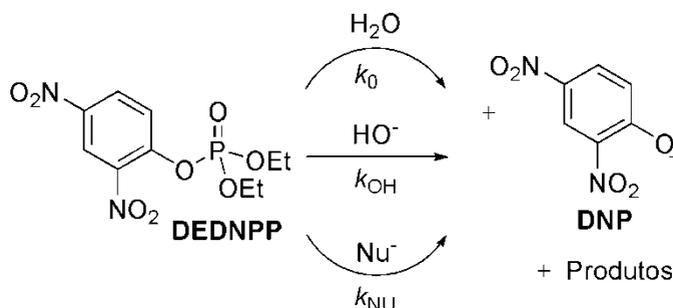
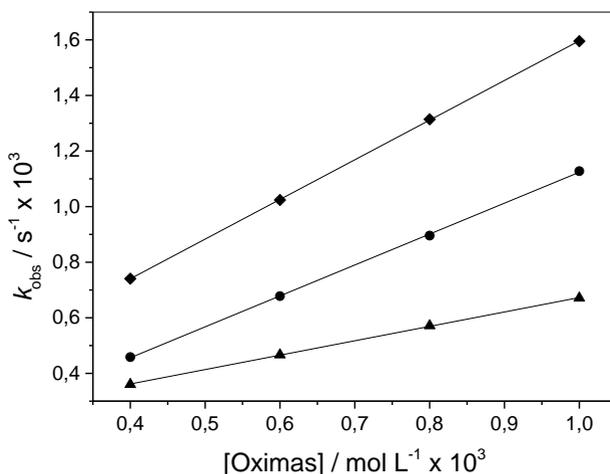


Tabela 3 - Parâmetros cinéticos calculados para as reações entre as oximas (0,001 M) e o triéster **DEDNPP** (5×10^{-5} M), a 25°C.

	8	2-PAM	DAM	DMG	BHA^f
^b k_{NU}	1,44	1,03	0,52	$1,96 \times 10^{-2}$	2,74
^c k_{NU}^{L}	1,43	1,11	0,52	--	2,45
pK_a	9,35 ^d	8,24 ^e	9,65 ^e	10,66 ^e	9,16

$k_0 = 8,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{OH}} = 0,34 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ORTH et al., 2011).^b valores obtidos pelo ajuste do perfil de pH na **Figura 33**. ^c valores obtidos pelo ajuste linear de k_{obs} vs. $[\text{Ox}^-]$, **Equação 3** e **Figura 35**. ^d valor determinado experimentalmente por titulação espectrofotométrica. ^e valores obtidos da literatura (BORDWELL; JI, 1992).^f (MEDEIROS, M. et al., 2012).

Figura 35 - Gráfico de k_{obs} vs. $[Ox^-]$ para as reações do **DEDNPP** com **8**(♦), **2-PAM** (●) e **DAM** (▲), a 25°C, pH 10,5, $[Oximas] = 0,001$ M e $[DEDNPP] = 5 \times 10^{-5}$ M.



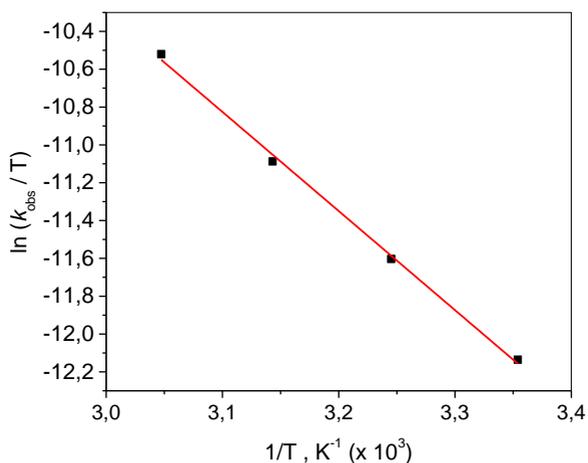
$$k_{obs} = k_{OH} + k_{NU}[Ox^-] \quad 3$$

Os resultados cinéticos apresentados na **Tabela 3** mostram que a oxima **8**, quando comparada às outras oximas estudadas, apresentou a maior reatividade na reação de degradação do **DEDNPP**. Comparando-se k_{NU}^L (oxima **8**) com k_0 , um aumento de velocidade na ordem de 10 milhões de vezes é observado, evidenciando a elevada reatividade da oxima **8** em reações de desfosforilação. Sendo que, esse comportamento está de acordo com a elevada reatividade de alfa-nucleófilos, os quais apresentam aumento na velocidade de reação na ordem de 10^3 - 10^6 (KIRBY; MANFREDI; et al., 2009; KIRBY et al., 2008).

4.3 Parâmetros de ativação e efeito isotópico

Com a finalidade de adquirir informações sobre a estrutura do estado de transição, foram obtidos os parâmetros termodinâmicos da reação entre a oxima **8** e o triéster **DEDNPP**. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram determinadas em diferentes temperaturas, na faixa entre 25 e 55°C, em pH 10,5. Os valores de ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger e ΔH^\ddagger foram determinados através dos dados experimentais da **Figura 36**, de acordo com as **Equações 4, 5 e 6**, e seus respectivos valores estão apresentados na **Tabela 5**.

Figura 36 - Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ vs. $1/T$ para a reação da oxima **8** com o triéster **DEDNPP**, em pH 10,5.



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

$$\Delta G^\ddagger = \ln\left(\frac{k_{obs}h}{k_b T}\right) RT \quad 5$$

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

Onde k_b , h e R referem-se às constantes de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$) e universal dos gases ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), respectivamente.

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos para a reação entre a oxima **8** (0,001 M) e o triéster **DEDNPP** ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$), em pH 10,5.

Parâmetros	Valores
ΔH^\ddagger (kcal.mol ⁻¹)	10,43
ΔS^\ddagger (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	- 22,88
ΔG^\ddagger (kcal.mol ⁻¹)	17,25
$k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$	1,09

Os valores dos parâmetros de ativação, apresentados na **Tabela 5**, são coerentes com reações de caráter nucleofílico. Os valores de entropia elevados e negativos ($\Delta S^\ddagger \ll 0$) indicam a possível formação de um estado de transição com grau de liberdade menor do que os reagentes (ANSLYN, 2005). Além disso, o efeito isotópico do solvente próximo a 1 (**Tabela 5**) indica que a etapa determinante da velocidade de reação não envolve diretamente a transferência de próton. Esses fenômenos podem ser comumente observados em reações bimoleculares com caráter associativo ou concertado de caráter associativo (MASKILL, 1999).

4.4 Correlação de Bronsted e reatividade de nucleófilos

A nucleofilicidade das oximas nas reações de desfosforilação do **DEDNPP** foram comparadas com aquelas de outros alfa-nucleófilos através da correlação de Bronsted, **Figura 37**. Esta relaciona o logaritmo da constante de velocidade de segunda ordem da reação nucleofílica ($\log k_N$) com os valores de pK_a dos nucleófilos. As constantes de velocidade de segunda ordem (k_{NU}) e valores de pK_a utilizados no gráfico de Bronsted estão na **Tabela 5**.

Figura 37 - Gráfico de Bronsted para a reação do **DEDNPP** com **8**, pralidoxima (**2-PAM**), diacetilmonoxima (**DAM**), imidazol (**IMZ**) e outros nucleófilos comuns, a 25°C.

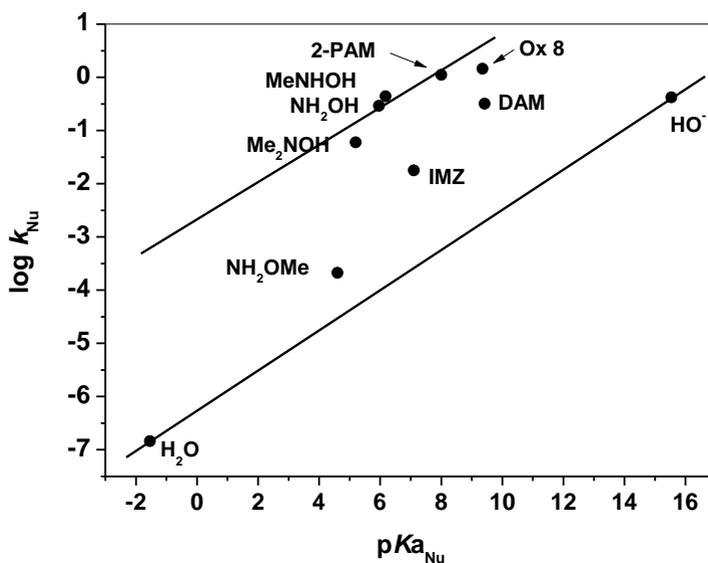


Tabela 5 - Constantes de segunda ordem (k_{NU}) e valores de pK_a para as reações de diferentes nucleófilos com o **DEDNPP**, a 25°C.

Nucleófilos	$k_{\text{NU}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	pK_a
^a H₂O , k_0	$1,44 \times 10^{-7}$	-1,54
^a HO⁻ , k_{OH}	0,34	15,54
^b NH₂OMe	$2,11 \times 10^{-4}$	4,6
^b NMe₂OH	$5,99 \times 10^{-2}$	5,20
^b NH₂OH	0,29	5,96
^b MeNHOH	0,44	6,18
^a IMZ	$1,77 \times 10^{-2}$	7,10
^c BHA	$2,45 \pm 0,05$	9,16
DAM	$0,51 \pm 0,01$	9,65
2-PAM	$1,11 \pm 0,01$	8,24
8	$1,43 \pm 0,04$	9,35

^a (ORTH et al., 2011). ^b (MEDEIROS, MICHELLE, 2009). ^c (MEDEIROS, M. et al., 2012).

Vale ressaltar que, os valores de pK_a usados na correlação de Bronsted correspondem geralmente aos ácidos conjugados nos centros reacionais. Enquanto que, aqueles para a hidroxilamina (NH₂OH) e seus derivados correspondem a protonação e desprotonação no átomo de nitrogênio. A princípio, tal informação indicaria que o nitrogênio do grupo NH₂ seria o átomo nucleofílico, no entanto, a protonação do grupo amônio leva a formação do nucleófilo dipolar iônico H₃N⁺-O⁻, aumentando significativamente a nucleofilicidade (KIRBY et al., 2008). De fato, a presença do grupo metila no átomo de oxigênio da hidroxilamina (NH₂OMe) resulta no decréscimo de aproximadamente 3 unidades logarítmicas na reatividade, em comparação com o esperado para os nucleófilos que atacam pelo átomo de oxigênio.

4.5 Estudos de RMN ^1H e ^{31}P

Foram obtidos espectros sucessivos de RMN ^1H e ^{31}P em função do tempo de reação da oxima **8** com o triéster **DEDNPP**. Os espectros de RMN de ^1H e ^{31}P estão apresentados nas **Figuras 38 e 39**, respectivamente. Além dos reagentes, foi possível identificar os sinais característicos dos produtos dietilfosfato (**DEP**) e 2,4-dinitrofenolato (**DNP**). Vale ressaltar que o **DEDNPP** possui baixa solubilidade em D_2O , e conseqüentemente, os sinais apresentam baixa intensidade. Os deslocamentos químicos das espécies observadas estão na **Tabela 6**.

Figura 38 - Espectros sucessivos de RMN ^1H obtidos para a reação da oxima **8** (0,04 M) com **DEDNPP** (0,01 M): (a) **DEDNPP**; (b) **8**; (c) 5 min; (d) 15 min; (e) 30 min; (f) 1h; (g) 1h30; (h) 7 dias, a 25°C , em D_2O com 30% de CD_3CN e pH 10,3.

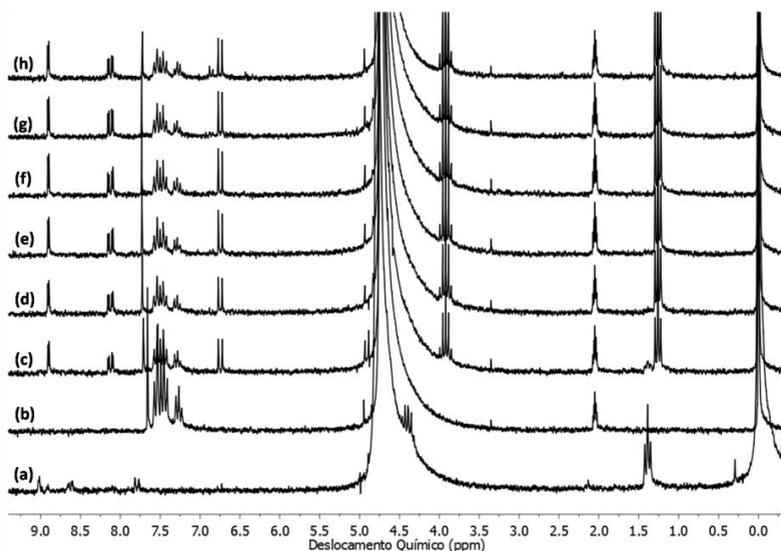


Figura 39 - Espectros sucessivos de RMN ^{31}P obtidos para a reação da oxima **8** (0,04 M) com **DEDNPP** (0,01 M): (a) 5 min; (b) 15 min; (c) 35 min; (d) 55 min; e (e) 24 h, a 25°C, em D_2O com 30% de CD_3CN e pH 10,3.

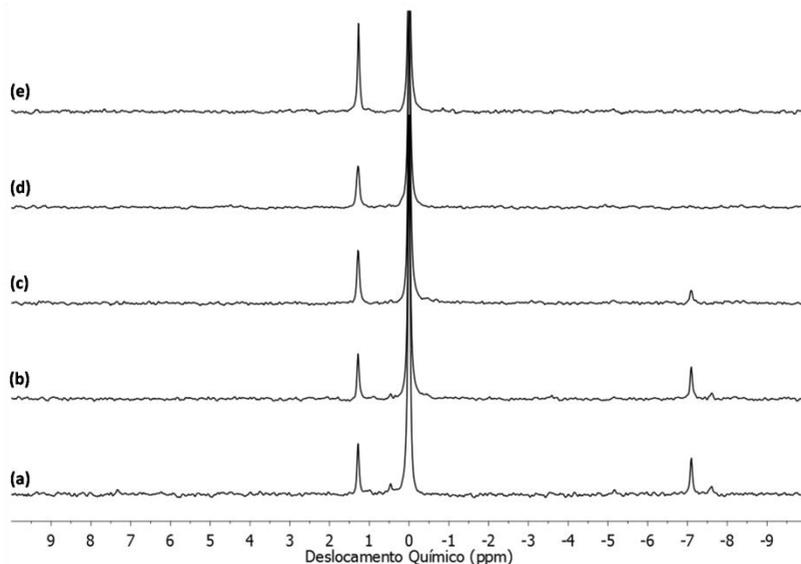
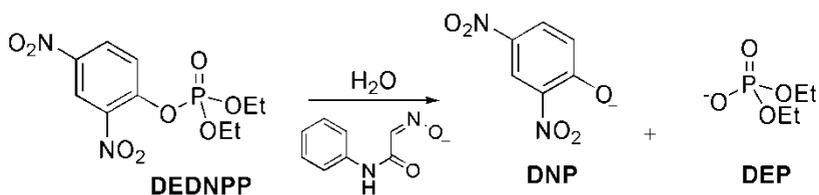


Tabela 6 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{31}P dos produtos na reação entre **8** e **DEDNPP**, conforme **Figura 40**.

Composto	RMN ^1H (δ , ppm)	RMN ^{31}P (δ , ppm)
DEDNPP	1,38 (t, 6H, CH_3), 4,39 (q, 4H, CH_2) 7,80 (d, 1H, Ar), 8,64 (dd, 1H, Ar) 9,03 (d, 1H, Ar)	-7,10
DNP	6,75 (d, 1H, Ar), 8,09 (dd, 1H, Ar) 8,83 (d, 1H, Ar)	--
DEP	1,26 (t, 6H, CH_3), 3,93 (q, 4H, CH_2)	1,28

Figura 40 - Estruturas detectadas por RMN de ^1H e ^{31}P em função do tempo de reação entre **DEDNPP** e **8**, em pH 10,3 a 25°C.

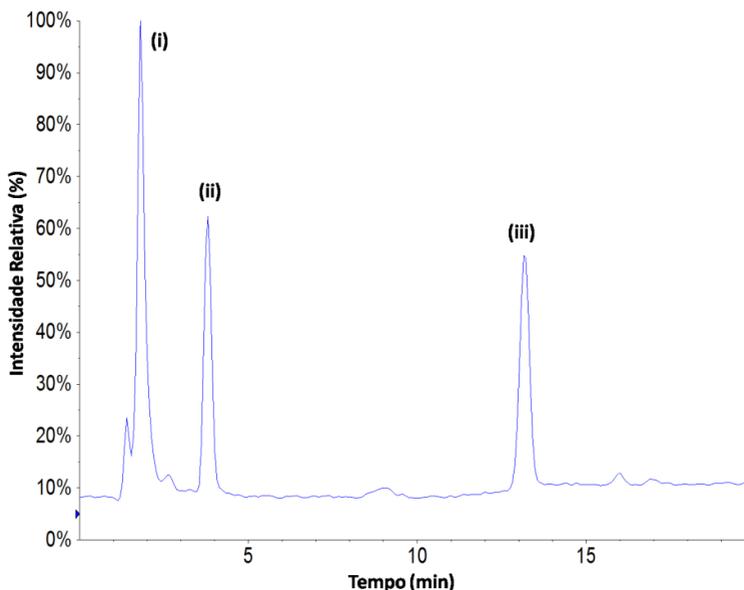


Os espectros de RMN ^1H e ^{31}P não mostraram o aparecimento de intermediários, o que indica que o possível intermediário fosforilado ou aromático é consideravelmente instável e não regenera a oxima. De fato, os experimentos cinéticos no UV-Vis com $[\mathbf{8}] < [\mathbf{DEDNPP}]$ evidenciaram que a decomposição do triéster ocorre em quantidade estequiométrica, e a completa degradação do **DEDNPP** foi observada somente quando $[\mathbf{8}] \geq [\mathbf{DEDNPP}]$.

4.6 Estudos de LC-MS/MS

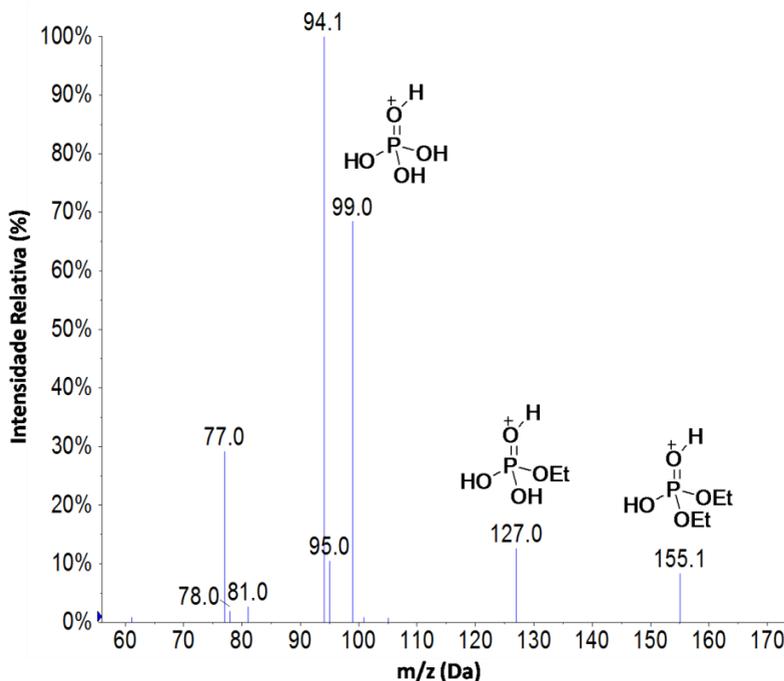
Os experimentos de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) foram realizados com o objetivo de confirmar as estruturas dos produtos discutidos no **item 4.5**. E ainda, possivelmente, identificar algum produto que não tenha sido detectado por RMN, principalmente devido à baixa solubilidade do **DEDNPP** em água. O cromatograma na **Figura 41** indica os picos dos produtos observados ao término da reação entre a oxima **8** e **DEDNPP**.

Figura 41 - Cromatograma de HPLC de intensidade relativa (%) em função do tempo (min) realizado ao final da reação entre **8** e **DEDNPP** em 90 minutos, pH 10,3 e 25°C.



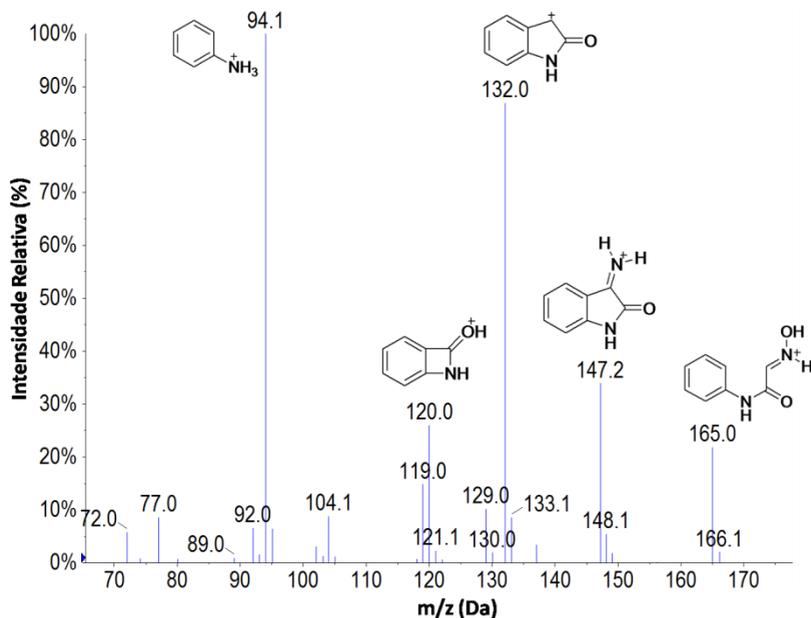
O pico mais intenso, em 2 minutos, refere-se à estrutura do produto **DEP**. O experimento foi realizado com detecção por espectrometria de massas em modo positivo, ESI-MS (+), portanto, a razão massa/carga (m/z) de 155 representa a forma protonada do **DEP**. Os valores de m/z de 127 e 99 representam a perda de um e dois grupos etila, respectivamente. Além disso, os valores de m/z de 94 e 77 indicam a possível formação de anilina como produto, com tempo de retenção próximo ao do **DEP**.

Figura 42 - Espectro de ESI-MS (+) do pico em 2 min, em (i), do cromatograma da **Figura 37**, após o término da reação entre **8** e **DEDNPP** em 90 min, pH 10,3 a 25°C.



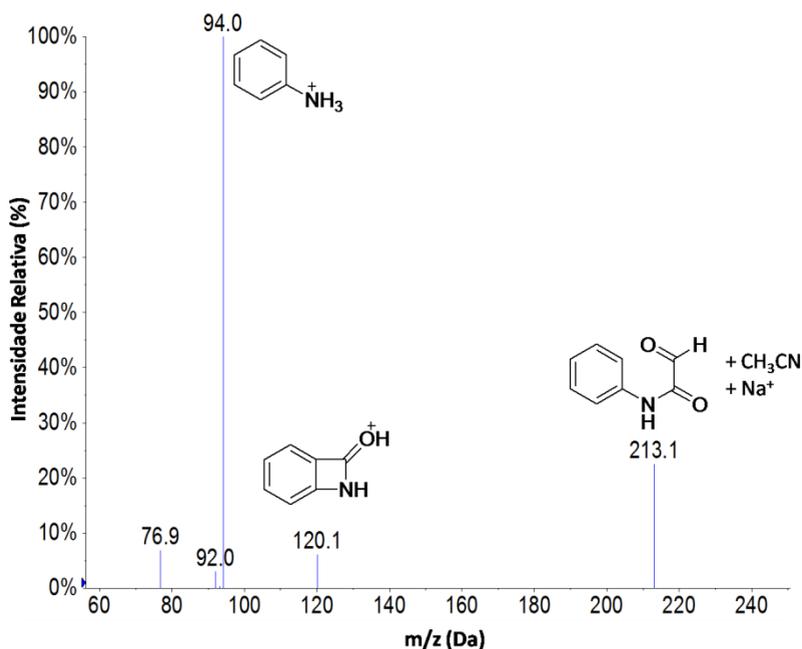
O pico em 4 minutos refere-se à estrutura da oxima **8**, em excesso, com m/z de 165 para a forma protonada. As respectivas quebras e estruturas apresentadas na **Figura 43** estão de acordo com as estruturas apresentadas no espectro de ESI-MS (+) para o estudo da reação de ciclização de Sandmeyer, em meio fortemente ácido de H_2SO_4 (SILVA, B. V. et al., 2011).

Figura 43 - Espectro de ESI-MS (+) do pico em 4 min, em (ii), do cromatograma da **Figura 41**, após o término da reação entre **8** e **DEDNPP** em 90 min, pH 10,3 a 25°C.



O pico em 13 minutos refere-se à estrutura do aldeído formado após o ataque da oxima **8** ao triéster **DEDNPP**. O valor de m/z de 213 para o aldeído é resultado da presença de acetonitrila e íon sódio como contaminantes, comuns na espectrometria de massas no modo positivo (KELLER et al., 2008).

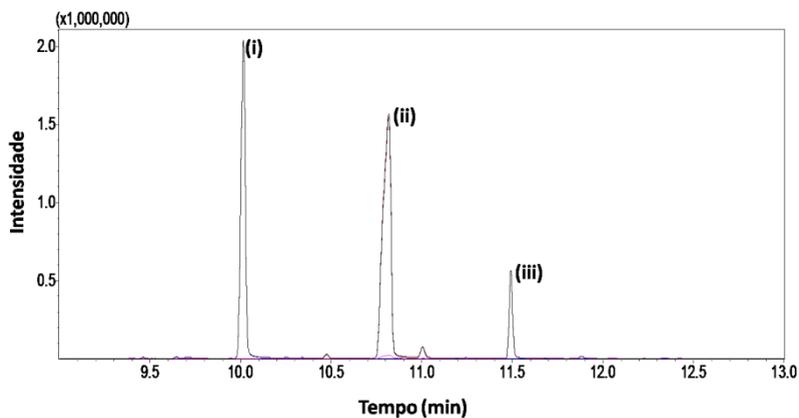
Figura 44 - Espectro de ESI-MS (+) do pico em 13 min, em (iii), do cromatograma da **Figura 41**, após o término da reação entre **8** e **DEDNPP** em 90 min, pH 10,3 a 25°C.



4.7 Estudos por CG/MS

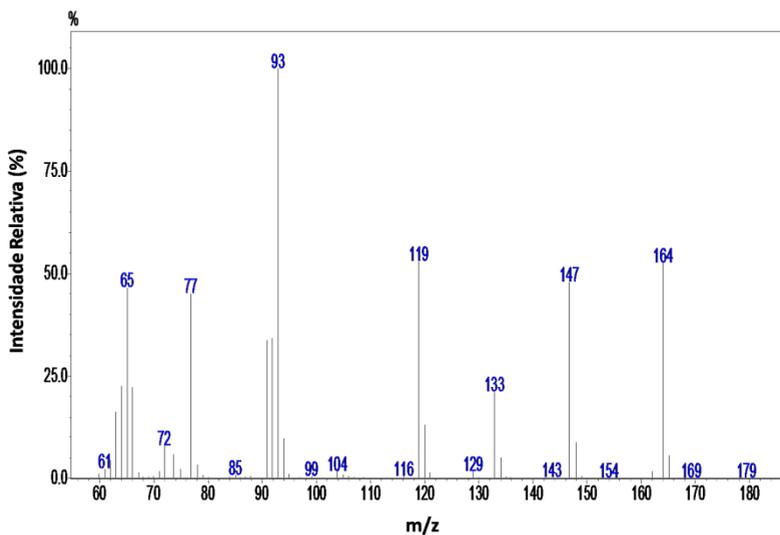
Os experimentos de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS) confirmaram a formação do aldeído na reação de degradação do **DEDNPP** pela oxima **8**. O espectro da **Figura 45** apresenta os picos principais dos produtos extraídos com acetato de etila após o término da reação em meio aquoso.

Figura 45 - Cromatograma de CG-MS de intensidade relativa (%) em função do tempo (min) realizado ao final da reação entre **8** e **DEDNPP** em 90 minutos, pH 10,3 e 25°C.



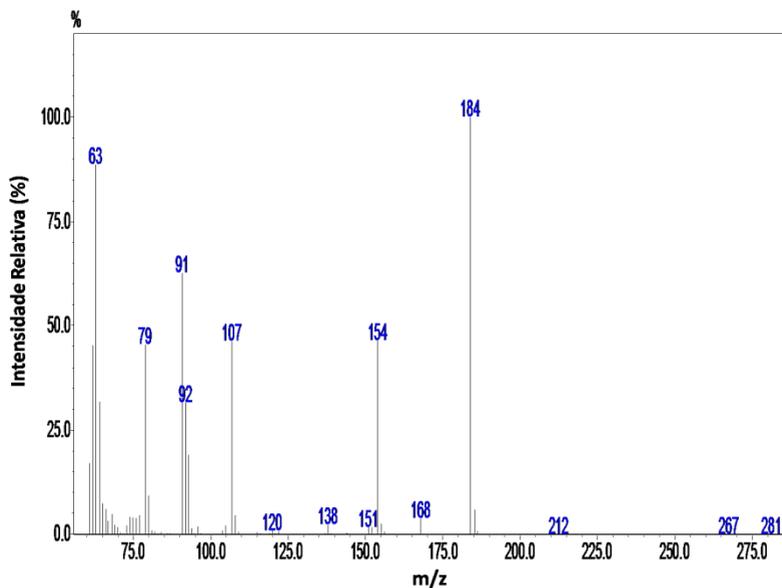
O pico mais intenso em 10 minutos refere-se à estrutura da oxima **8** em excesso, com m/z de 164 para a espécie neutra. As quebras na **Figura 46** estão de acordo com as estruturas apresentadas no espectro de ESI-MS (+) na **Figura 43**.

Figura 46 - Espectro de CG-MS do pico em 10 min, em (i), do cromatograma da **Figura 45**, após o término da reação entre **8** e **DEDNPP** em 90 min, pH 10,3 a 25°C.



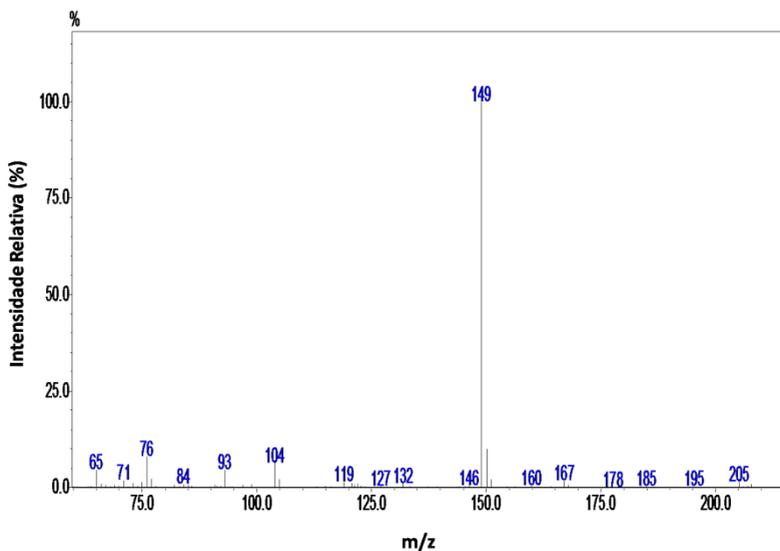
O pico em 10,7 minutos refere-se à estrutura do grupo de saída 2,4-dinitrofenol (DNP), o qual não foi detectado com a técnica de ESI/MS no modo positivo.

Figura 47 - Espectro de CG/MS do pico em 10,7 min, em (ii), do cromatograma da **Figura 45**, após o término da reação entre **8** e **DEDNPP** em 90 min, pH 10,3 a 25°C.



O pico em 11,5 minutos refere-se à estrutura do aldeído como produto de degradação do **DEDNPP** pela oxima **8**. As quebras estão de acordo com as estruturas apresentadas no espectro de ESI-MS (+) na **Figura 44**. Vale lembrar que nesta técnica os contaminantes Na^+ e acetonitrila não são observados como massas adicionais.

Figura 48 - Espectro de CG/MS do pico em 11,5 min, em (iii), do cromatograma da **Figura 45**, após o término da reação entre **8** e **DEDNPP** em 90 min, pH 10,3 a 25°C.

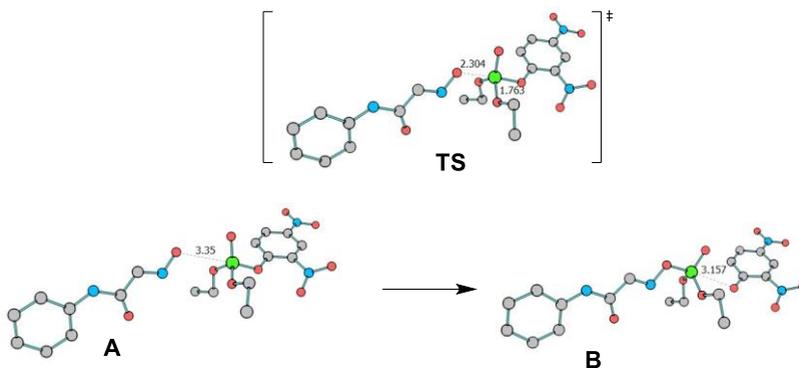


4.8 Cálculo Computacional

A modelagem da reação entre a oxima **8** e o triéster **DEDNPP**, por meio da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) usando PCM, foi realizada com o propósito de confirmar os resultados experimentais e reunir informações mais detalhadas acerca do mecanismo reacional. A **Figura 49** ilustra o estado de transição (TS) mais estável encontrado, entre outros confôrmeros, para o ataque nucleofílico do ânion oximato no átomo de fósforo central do **DEDNPP**.

O estado de transição apresenta uma única frequência imaginária, obtida através da aproximação gradual do átomo de oxigênio carregado negativamente da oxima ao átomo de fósforo do **DEDNPP**, por meio da ferramenta de scan disponível no software Gaussian 09, seguido da completa otimização do melhor TS.

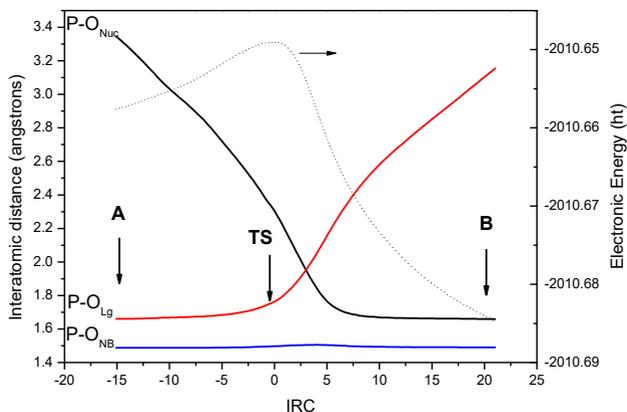
Figura 49 - Estrutura do estado de transição (TS) em conjunto com as estruturas encontradas em $-15,0$ Bohr (**A**) e $20,0$ Bohr (**B**) para o ataque nucleofílico da oxima **8** ao **DEDNPP**.



O estado de transição encontrado apresenta um arranjo aproximadamente linear dos átomos $O_{\text{NUC}}\text{-P-O}_{\text{LG}}$ com um ângulo interatômico de $4,2^\circ$. Sendo que, O_{NUC} e O_{LG} representam os átomos de oxigênio nucleofílico de **8** e do grupo de saída, respectivamente. Além disso, o átomo de fósforo apresenta uma geometria trigonal bipiramidal distorcida. Os comprimentos das ligações P-O_{Nuc} e P-O_{Lg} são de $2,30 \text{ \AA}$ e $1,76 \text{ \AA}$, respectivamente.

As estruturas representadas por **A** e **B** na **Figura 49** correspondem aquelas em $-15,0$ e $-20,0$ Bohr, as quais ilustram a coordenada de reação intrínseca (IRC) para o TS apresentado, **Figura 50**. Como pode ser observado, a eliminação do grupo de saída após o ataque nucleofílico de **8** ocorre via mecanismo concertado.

Figura 50 - Coordenada de reação intrínseca para o ataque nucleofílico de **8** ao DEDNPP, a 25°C .



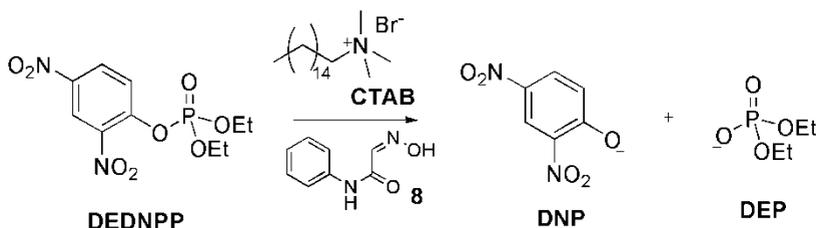
Dessa maneira, a reação pode ser classificada como uma substituição nucleofílica bimolecular clássica $S_N2(P)$, e assemelha-se ao ataque nucleofílico reportado para o ataque do imidazol e *N*-metilimidazol ao **DEDNPP** (CAMPOS et al., 2015). A energia livre de ativação calculada para a reação apresentada na **Figura 50** é de $17,43 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a 25°C , após a conversão do estado padrão de 1atm para 1 M, e corrobora com os resultados experimentais.

4.9 Reações em meio micelar

Estudos anteriores ressaltaram a importância do papel desempenhado por micelas nos processos de degradação de ésteres de fosfato. Tais surfactantes, como o brometo de cetiltrimetilamônio (**CTAB**), são conhecidos por acelerar a hidrólise de compostos organofosforados tóxicos como Paraoxon e Fenitroion (BALAKRISHNAN et al., 2004; TOULLEC; MOUKAWIM, 1996).

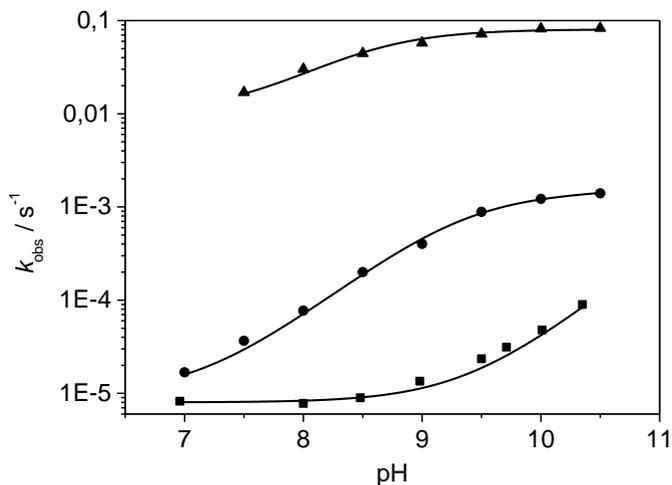
Nesse sentido, avaliou-se o efeito do surfactante catiônico **CTAB** na reação entre a oxima **8** e **DEDNPP** (**Figura 51**). Experimentos cinéticos em meio micelar foram realizados também para as oximas **2-PAM** e **DAM**, porém, não foram observados efeitos significativos nas velocidades das reações. Possivelmente, devido a elevada solubilidade dessas oximas em água.

Figura 51 - Reação entre **8** e **DEDNPP** na presença do surfactante catiônico **CTAB**.



De acordo com o perfil de pH na **Figura 52**, a reação de desfosforilação do **DEDNPP** pela oxima **8** é acelerada de maneira efetiva na presença de 0,01 M de **CTAB**. Esse tipo de comportamento é caracterizado pelas interações hidrofóbicas dos reagentes, bem como pela interação eletrostática da espécie aniônica de **8** com a interface micelar.

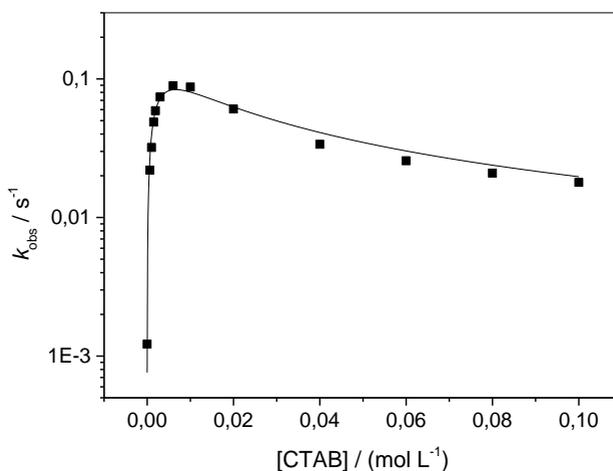
Figura 52 - Gráfico de k_{obs} em função do pH para a reação do **DEDNPP** (5×10^{-5} M) com: 0,001 M de **8** em meio aquoso (\bullet), e 5×10^{-4} M de **8** na presença de 0,01 M de **CTAB** (\blacktriangle). Os dados para a reação de hidrólise do **DEDNPP** foram incluídos para comparação (ORTH et al., 2011).



De acordo com os resultados na **Figura 52**, obteve-se um aumento na constante de velocidade observada (k_{obs}), em pH 9, de: (i) 30 vezes na presença de **8**, e (ii) 4200 vezes na presença de **8** + CTAB. Ambos em comparação com a reação de hidrólise do **DEDNPP**. Este é um efeito típico de catálise micelar, devido à concentração dos reagentes na interface (GHOSH et al., 2005).

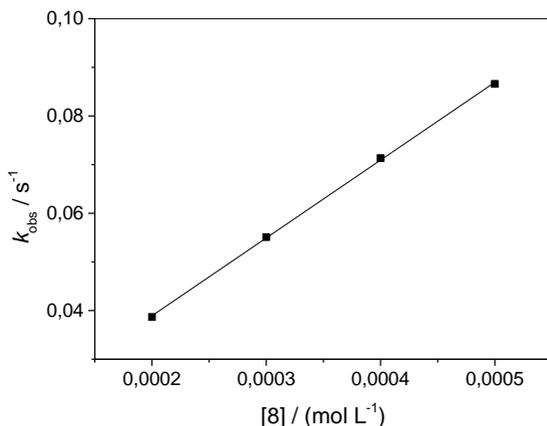
O efeito da concentração de surfactante em k_{obs} na reação da oxima **8** com **DEDNPP**, em pH 10, está apresentado na **Figura 53**. Os resultados indicam um comportamento típico de sistema bifásico onde k_{obs} atinge um máximo de velocidade, consistente com a interação entre os reagentes e a interface micelar. Em seguida, a velocidade decresce em virtude do efeito de diluição dos reagentes.

Figura 53 - Gráfico de k_{obs} vs. [CTAB] para a reação do **DEDNPP** com **8**, em pH 10 e 25°C.



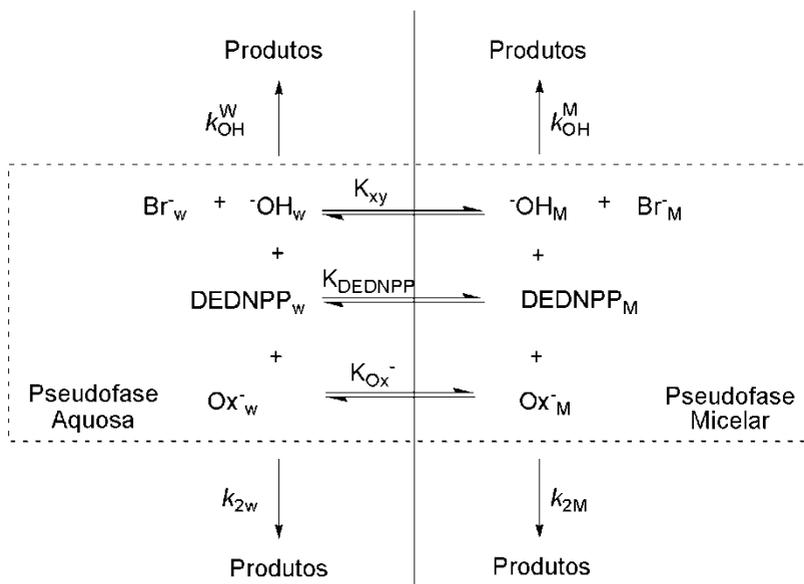
Na **Figura 54** está apresentado o efeito da concentração da oxima **8** na reação com **DEDNPP**, em presença de **CTAB** 0,01 M. Os dados mostram que k_{obs} aumenta linearmente com a concentração da oxima **8**, indicando uma reação de primeira ordem da oxima em meio micelar de **CTAB**.

Figura 54 - Gráfico de k_{obs} vs. **[8]** para a reação com **DEDNPP** em meio micelar de **CTAB** 0,01 M, em pH 10, a 25°C.



A influência das micelas catiônicas nas reações bimoleculares pode ser analisada quantitativamente pelo modelo da pseudofase e troca iônica (BUNTON et al., 1991; DRINKEL et al., 2013), **Figura 55**. Neste, as micelas e o solvente, geralmente água, formam duas pseudofases em que os reagentes estão particionados e apresentam reatividades diferentes.

Figura 55 - Representação do modelo da pseudofase e troca iônica para a reação entre **8** e **DEDNPP**.



A **Figura 55** considera a partição do substrato **DEDNPP** e do nucleófilo **8** entre as pseudofases aquosa e micelar, representada em termos de constante de associação K_{DEDNPP} e K_{Ox^-} , respectivamente. Assim, a constante de velocidade observada corresponde a soma das velocidades em cada pseudofase, **Equação 7**. O valor de K_{DEDNPP} foi determinado previamente por eletroforese capilar (WANDERLIND et al., 2014).

$$k_{\text{obs}} = \left(k_{\text{OH}}^{\text{W}} \chi_{\text{OH}}^{\text{W}} \chi_{\text{DEDNPP}}^{\text{W}} + \frac{k_{\text{OH}}^{\text{M}}}{(C_{\text{d}} V_{\text{M}})} \chi_{\text{OH}}^{\text{M}} \chi_{\text{DEDNPP}}^{\text{M}} \right) [\text{OH}]_{\text{T}} +$$

7

$$+ \left(k_{2\text{W}} \chi_{\text{Ox}^-}^{\text{W}} \chi_{\text{DEDNPP}}^{\text{W}} + \frac{k_{2\text{M}}}{(C_{\text{d}} V_{\text{M}})} \chi_{\text{Ox}^-}^{\text{M}} \chi_{\text{DEDNPP}}^{\text{M}} \right) [\text{Ox}^-]_{\text{T}}$$

Na **Equação 7**, os termos k_{OH} , k_{OH} , $k_{2\text{W}}$ e $k_{2\text{M}}$ representam as constantes de segunda ordem para as reações do **DEDNPP** com os íons hidróxido e oximato (HO^- e Ox^-) nas pseudofases aquosa (W) e micelar (M). Os termos $\chi_{\text{DEDNPP}}^{\text{W}}$, $\chi_{\text{DEDNPP}}^{\text{M}}$, $\chi_{\text{OH}}^{\text{W}}$, $\chi_{\text{OH}}^{\text{M}}$, $\chi_{\text{Ox}^-}^{\text{W}}$ e $\chi_{\text{Ox}^-}^{\text{M}}$ correspondem às frações molares do substrato, íons hidróxido e oximato em cada pseudofase, e são multiplicadas pelas suas respectivas concentrações totais, $[\text{HO}^-]_{\text{T}}$ e $[\text{Ox}^-]_{\text{T}}$. Os termos V_{M} e C_{d} representam o volume molar da micela na qual a reação ocorre e a concentração de surfactante micelizado, respectivamente. O termo C_{d} é usualmente descrito como $C_{\text{T}} - \text{CMC}$, onde C_{T} é a concentração estequiométrica de surfactante, e CMC , a concentração micelar crítica. O ajuste da curva na **Figura 53** fornece a constante de segunda-ordem para a reação entre **8** e **DEDNPP** na pseudofase micelar, e o termo $k_{2\text{M}}$ pode ser comparado com a reação na ausência de micela, **Tabela7**.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da **Figura 53**, para a reação do **DEDNPP** com **8**, na presença de **CTAB**, a 25°C.^{a,b}

Parâmetros	Valores
$k_{2w} / (\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1})^c$	1,44
$k_{2M} / (\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1})$	1,66
$K_{\text{DEDNPP}} / (\text{L mol}^{-1})^d$	117
$K_{\text{Ox}^-} / (\text{L mol}^{-1})$	195

^a Parâmetros obtidos pelo ajuste do gráfico na **Figura 53**, eq 7. ^b O valor de pK_a aparente utilizado foi de 7,81, obtido por titulação espectrofotométrica, e o valor de V_M utilizado foi de 0,37 (CORKILL; GOODMAN; WALKER, 1967). ^c Obtido pelo ajuste do perfil de pH em meio aquoso, **Figura 52**. ^d Obtido da literatura (WANDERLIND et al., 2014). Valor de CMC para o **CTAB** é 9×10^{-4} M.

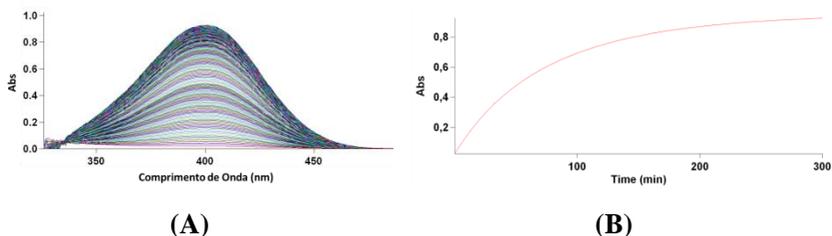
As constantes de associação na **Tabela 7** mostram que o **DEDNPP** apresenta característica moderada de hidrofobicidade, enquanto que, a oxima **8** apresenta uma estrutura mais hidrofóbica. Ou seja, a oxima apresenta uma interação mais favorável com a interface micelar. Em decorrência dessa interação, a concentração micelar crítica sofre um decréscimo, e esse comportamento pode estar intimamente relacionado com o fenômeno de agregação da oxima na interface da micela catiônica (BUNTON et al., 1991).

Em linhas gerais, as constantes de velocidade de segunda ordem para as reações na pseudofase micelar são discretamente menores que nas pseudofase aquosa (BUNTON, 2006; TASCIOGLU, 1996). No entanto, para a reação do **DEDNPP** com **8** considerou-se que os termos k_{2w} e k_{2M} possuem magnitudes muito próximas, evidenciando que o efeito micelar observado é resultado apenas do aumento da concentração dos reagentes na pseudofase micelar.

4.10 Aplicação: degradação do pesticida paraoxon metílico

Com base na evidência experimental que a oxima **8** promove um aumento significativo na velocidade da reação de decomposição do **DEDNPP**, os estudos foram estendidos para o pesticida comercial **paraoxon metílico**. Foram realizadas reações em água e em meio micelar de **CTAB**, de maneira análoga ao **DEDNPP**. As reações foram acompanhadas pelo aparecimento do produto 4-nitrofenolato (**4-NP**) em 400 nm, **Figura 56**.

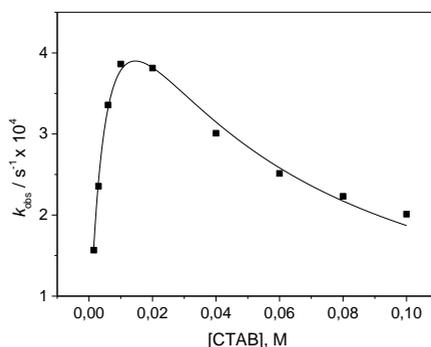
Figura 56 – Gráficos de (A) abs vs. comprimento de onda e (B) abs vs. tempo para a reação entre **paraoxon metílico** (5×10^{-5} M) e oxima **8** (0,001 M), a 25°C e pH = 10.



A **Figura 57** apresenta o efeito da concentração de **CTAB** na constante de velocidade observada (k_{obs}). O comportamento é semelhante ao da reação entre **8** e **DEDNPP** na **Figura 53**, indicando a partição dos reagentes entre as pseudofases aquosa e micelar. O ajuste do gráfico na **Figura 57** permitiu calcular as constantes de segunda ordem para a fase aquosa (k_{2W}) e micelar (k_{2M}), sendo que o valor de k_{2W} é

consistente com o valor obtido através do ajuste linear do gráfico de k_{obs} vs. [8], **Figura 58**, em pH 10,5.

Figura 57 - Gráfico de k_{obs} em função da concentração de **CTAB**, na reação entre 0,001 M de **8** com **paraoxon metílico** (5×10^{-5} M), em pH 10 e 25°C.



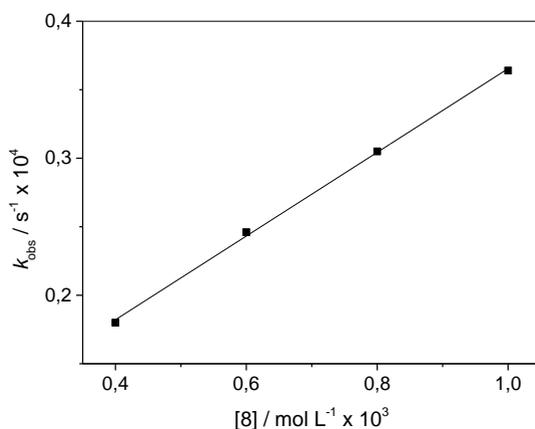
Os resultados obtidos na **Tabela 8** indicam que o ânion oximato é capaz de degradar o pesticida com um aumento na velocidade de reação na ordem de 10^7 vezes, em comparação com a reação somente em água. Sendo que, as micelas do surfactante **CTAB** são capazes de promover um aumento significativo na constante de velocidade observada (k_{obs}), com uma constante de associação de 33 L mol^{-1} .

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados da **Figura 53**, para a reação do **paraoxon metílico** com **8**, em água e na presença de **CTAB**, a 25°C.^{a,b}

Parâmetros	Valores
$k_{2W} / (\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1})$ ^c	$3,05 \times 10^{-2}$
$k_{2M} / (\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1})$	$9,68 \times 10^{-3}$
$K_{\text{DEDNPP}} / (\text{L mol}^{-1})$	33
$K_{\text{Ox}^-} / (\text{L mol}^{-1})$	130

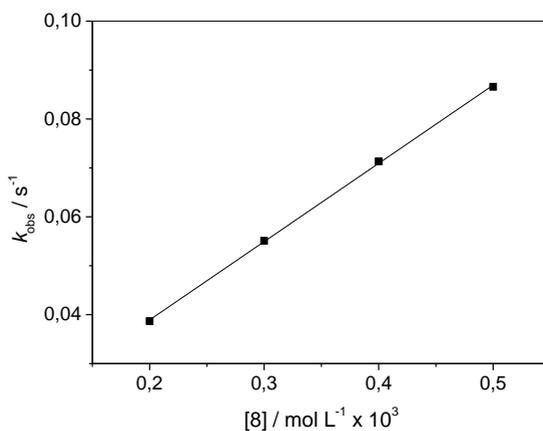
^a Parâmetros obtidos pelo ajuste do gráfico na **Figura 57**. ^b O valor de pK_a aparente utilizado foi de 7,81, obtido por titulação espectrofotométrica, e o valor de V_M utilizado foi de 0,37 (CORKILL et al., 1967). ^c Obtido pelo ajuste do gráfico de k_{obs} vs. **[8]**, **Figura 58**.

Figura 58 - Gráfico de k_{obs} em função da concentração de **8** em meio aquoso na reação com **paraoxon metílico** ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$), a 25°C e pH 10,50.



Na **Figura 59** está apresentado o efeito da concentração da oxima **8** na reação com **paraoxon metílico**, em presença de **CTAB**. As **Figuras 58 e 59** evidenciam que a reação entre **8** e **paraoxon metílico** apresentam comportamento de primeira ordem, tanto na reação em fase aquosa quanto micelar, de maneira similar às reações apresentadas no **item 4.9**. Por fim, conclui-se que o modelo da pseudofase pode ser aplicado para a degradação do **paraoxon metílico**, com as micelas de **CTAB** desempenhando a função nanoreatores que facilitam o encontro dos reagentes.

Figura 59 - Gráfico de k_{obs} em função da concentração de **8** em meio micelar de **CTAB** (0,01 M) na reação com **paraoxon metílico** (5×10^{-5} M), a 25°C e pH 10,00.



4.11 Estudo de RMN de ^1H e ^{31}P (Paraoxon)

A reação de desfosforilação do **paraoxon metílico** pela oxima **8** foi monitorada pela técnica de RMN ^1H e ^{31}P , de maneira análoga a reação entre **8** e **DEDNPP**. Os espectros de RMN ^1H e ^{31}P estão apresentados nas **Figuras 60** e **61**, respectivamente. Os deslocamentos químicos das espécies observadas estão na **Tabela 6**.

Figura 60 - Espectros sucessivos de RMN ^1H obtidos para a reação da oxima **8** (0,04 M) com **paraoxon metílico** (0,01 M): (a) **paraoxon metílico**; (b) 5 min; (c) 25 min; (d) 45 min; (e) 85 min; (f) 24h; a 25°C, em D_2O com 30% de CD_3CN e pH 10,3.

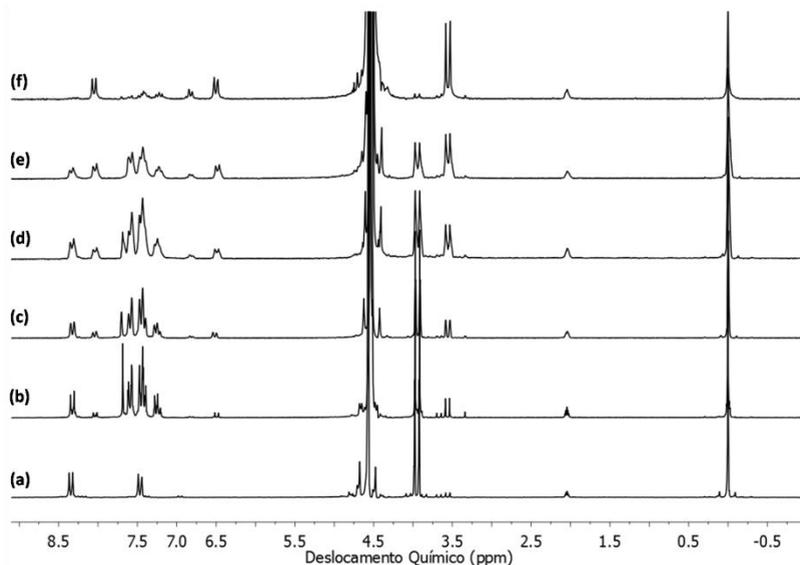


Figura 61 - Espectros sucessivos de RMN ^{31}P obtidos para a reação da oxima **8** (0,04 M) com **paraoxon metílico** (0,01 M): (a) 5 min; (b) 25 min; (c) 45 min; (d) 85 min; (f) 24h; a 25°C, em D_2O com 30% de CD_3CN e pH 10,3.

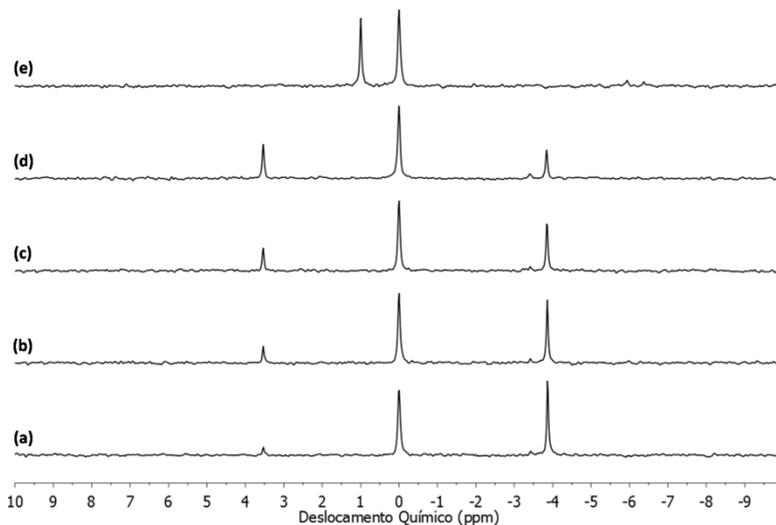
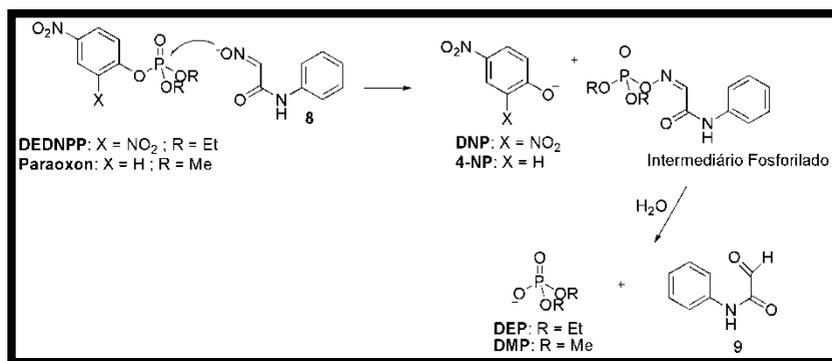


Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{31}P dos produtos na reação entre **8** e **paraoxon metílico**.

Composto	RMN ^1H (δ , ppm)	RMN ^{31}P (δ , ppm)
Paraoxon metílico	3,97 (d, 6H, CH_3), 7,49 (d, 2H, Ar) 8,37 (d, 1H, Ar)	-3,85
4-NP	6,52 (d, 1H, Ar), 8,07 (d, 2H, Ar)	--
DMP	3,98 (q, 6H, CH_3)	1,01
Int_P	--	3,54

Os espectros da **Figura 61** indicam a presença de um possível intermediário fosforilado (**Int_P**) em 3,54 ppm, que decompõe-se formando dimetil fosfato (**DMP**) em 1,01 ppm. O mecanismo reacional envolve o ataque nucleofílico da oxima **8** ao átomo de fósforo central do **paraoxon metílico** para a formação de **Int_P**. Este, sofre ataque nucleofílico da água para formar o aldeído (**9**), que foi também identificado para a reação de desfosforilação do **DEDNPP**. Sendo assim, esse mecanismo pode ser caracterizado como “ataque suicida da oxima” (ORTH et al., 2009), tendo em vista que o nucleófilo se degrada completamente em outros produtos, **Figura 62**.

Figura 62 - Mecanismo de degradação do **DEDNPP** e **paraoxon metílico** passando por um intermediário fosforilado.



5 Conclusões

Os resultados indicaram que a oxima **8** apresentou maior reatividade na clivagem do triéster **DEDNPP**, em comparação com as outras oximas estudadas, promovendo um aumento na ordem de 10 milhões de vezes na velocidade de reação, em relação à reação do **DEDNPP** somente em água.

Além disso, as micelas catiônicas de **CTAB** agem como nanoreatores na reação, concentrando os reagentes de maneira efetiva, devido ao seu caráter hidrofóbico e as interações eletrostáticas entre a espécie negativamente carregada da oxima e a interface positiva da micela.

Esses resultados contribuem para o planejamento de sistemas microheterogêneos para a decomposição de compostos organofosforados por alfa-anucleófilos, assim como para o desenvolvimento de antídotos contra o envenenamento por agentes neurotóxicos. De fato, a avaliação da reatividade da oxima **8** frente a degradação do pesticida comercial **paraoxon metílico** apresentou um excepcional aumento da velocidade de reação em água e em meio micelar.

6 Referências Bibliográficas

Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books, **2005**.

Balakrishnan, V. K.; Han, X. M.; Vanloon, G. W., et al. Acceleration of nucleophilic attack on an organophosphorothioate neurotoxin, fenitrothion, by reactive counterion cationic micelles. Regioselectivity as a probe of substrate orientation within the micelle. *Langmuir*, v. 20, n. 16, p. 6586-6593, **2004**.

Beltran, J. L.; Sanli, N.; Fonrodona, G., et al. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pK(a) values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media. *Analytica Chimica Acta*, v. 484, n. 2, p. 253-264, **2003**.

Benson, S. *Thermochemical Kinetics*. New York: John Wiley and Sons, **1968**.

Bigley, A. N.; Raushel, F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, v. 1834, n. 1, p. 443-453, **2013**.

Bordwell, F. G.; Ji, G. Z. Equilibrium Acidities and Homolytic Bond-Dissociation Energies of the H-O Bonds in Oximes and Amidoximes. *Journal of Organic Chemistry*, v. 57, n. 11, p. 3019-3025, **1992**.

Buncel, E.; Chuaqui, C.; Wilson, H. Reactivity-Selectivity Correlations .3. The Alpha-Effect at Saturated Carbon - Reactivity Studies of Methyl Phenyl Sulfates with Nucleophiles. *Journal of Organic Chemistry*, v. 45, n. 18, p. 3621-3626, **1980**.

Bunton, C. A. The dependence of micellar rate effects upon reaction mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 123, p. 333-343, **2006**.

Bunton, C. A.; Ihara, Y. Micellar Effects Upon Dephosphorylation and Deacylation by Oximate Ions. *Journal of Organic Chemistry*, v. 42, n. 17, p. 2865-2869, **1977**.

Bunton, C. A.; Nome, F.; Quina, F. H., et al. Ion Binding and Reactivity at Charged Aqueous Interfaces. *Accounts of Chemical Research*, v. 24, n. 12, p. 357-364, **1991**.

Campos, R. B.; Santos, E. H.; Oliveira, A. R. M., et al. Reactivity of Imidazole Derivatives toward Phosphate Triester in DMSO/Water Mixtures: A Comprehensive Study on the Solvent Effect. *Journal of Organic Chemistry*, v. 80, n. 15, p. 7572-7580, **2015**.

Cavaliere, M. J.; Calore, E. E.; Perez, N. M., et al. Organophosphate myotoxicity. *Revista De Saude Publica*, v. 30, n. 3, p. 267-272, **1996**.

Cleland, W. W.; Hengge, A. C. Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. *Chemical Reviews*, v. 106, n. 8, p. 3252-3278, **2006**.

Corkill, J. M.; Goodman, J. F.; Walker, T. Partial Molar Volumes of Surface-Active Agents in Aqueous Solution. *Transactions of the Faraday Society*, v. 63, n. 531P, p. 768-&, **1967**.

Cox, J. R.; Ramsay, O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. *Chemical Reviews*, v. 64, n. 4, p. 317-&, **1964**.

da Silva, B. N. M.; Bastos, R. S.; Silva, B. V., et al. Preparation of 5-Nitroisatin and 5-Chloroisatin from Isonitrosoacetanilide. *Quimica Nova*, v. 33, n. 10, p. 2279-2282, **2010**.

Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandão, T. A. S., et al. Reaction of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydrazine and hydrogen peroxide. Comparison of O- and N-phosphorylation. *Journal of Organic Chemistry*, v. 69, n. 23, p. 7898-7905, **2004**.

Drinkel, E.; Souza, F. D.; Fiedler, H. D., et al. The chameleon effect in zwitterionic micelles: Binding of anions and cations and use as nanoparticle stabilizing agents. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 18, n. 1, p. 26-34, **2013**.

Dwars, T.; Paetzol, D. E.; Oehme, G. Reactions in micellar systems. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 44, n. 44, p. 7174-7199, **2005**.

Eto, M. *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*. Cleveland: CRC Press, **1974**.

Faria, A. C.; Mello, R. S.; Orth, E. S., et al. Hydrolysis of benzoic anhydride mediated by ionenes and micelles. *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical*, v. 289, n. 1-2, p. 106-111, **2008**.

Fife, T. H.; Bruice, T. C. Temperature Dependence of Deltapd Correction for Use of Glass Electrode in D2o. *Journal of Physical Chemistry*, v. 65, n. 6, p. 1079-&, **1961**.

Finean, J. B. Membrane Mimetic Chemistry - Characterizations and Applications of Micelles, Microemulsions, Monolayers, Bilayers, Vesicles, Host Guest Systems, and Polyions - Fendler,Jh. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 8, n. 6, p. 225-225, **1983**.

Fountain, K. R.; Felkerson, C. J.; Driskell, J. D., et al. The alpha-effect in methyl transfers from S-methyldibenzothiophenium fluoroborate to substituted N-methylbenzohydroxamates. *Journal of Organic Chemistry*, v. 68, n. 5, p. 1810-1814, **2003**.

Fukui, K. The Path of Chemical-Reactions - the Irc Approach. *Accounts of Chemical Research*, v. 14, n. 12, p. 363-368, **1981**.

Ghosh, K. K.; Bal, S.; Satnami, M. L., et al. Studies of nucleophilic substitution reactions of p-nitrophenyl acetate with some dihydroxamate ions in cationic micellar media. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 27, n. 3, p. 349-355, **2006**.

Ghosh, K. K.; Sinha, D.; Satnami, M. L., et al. Nucleophilic dephosphorylation of p-nitrophenyl diphenyl phosphate in cationic micellar media. *Langmuir*, v. 21, n. 19, p. 8664-8669, **2005**.

Graafland, T.; Kirby, A. J.; Engberts, J. B. F. Intramolecular Carboxyl-Catalyzed Hydrolysis of Sulfonamide .4. Salt Effects on the Intramolecular Carboxyl-Catalyzed Hydrolysis of Sulfonamides. *Journal of Organic Chemistry*, v. 46, n. 1, p. 215-217, **1981**.

Han, X. M.; Balakrishnan, V. K. vanLoon, G. W., et al. Degradation of the pesticide fenitrothion as mediated by cationic surfactants and alpha-nucleophilic reagents. *Langmuir*, v. 22, n. 21, p. 9009-9017, **2006**.

Herschlag, D.; Jencks, W. P. Nucleophiles of High Reactivity in Phosphoryl Transfer-Reactions - Alpha-Effect Compounds and Fluoride-Ion. *Journal of the American Chemical Society*, v. 112, n. 5, p. 1951-1956, **1990**.

Holstege, C. P.; KirK, M.; SidelL, F. R. Chemical warfare - Nerve agent poisoning. *Critical Care Clinics*, v. 13, n. 4, p. 923-&, **1997**.

Hoz, S.; Buncel, E. The Alpha-Effect - a Critical-Examination of the Phenomenon and Its Origin. *Israel Journal of Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 313-319, **1985**.

Kara, D.; Alkan, M. Determination of acidity constants of acid-base indicators by second-derivative spectrophotometry. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 56, n. 14, p. 2753-2761, **2000**.

Keller, B. O.; Suj, J.; Young, A. B., et al. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 627, n. 1, p. 71-81, **2008**.

Khan, S. A.; Kirby, A. J. Reactivity of Phosphate Esters - Multiple Structure Reactivity Correlations for Reactions of Triesters with Nucleophiles. *Journal of the Chemical Society B-Physical Organic*, n. 6, p. 1172-&, **1970**.

Kim, K.; Tsay, O. G.; Atwood, D. A., et al. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. *Chemical Reviews*, v. 111, n. 9, p. 5345-5403, **2011**.

Kirby, A. J.; Davies, J. E.; Brandão, T. A. S., et al. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Structure and reactivity of ammonia oxide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 38, p. 12374-12375, **2006**.

Kirby, A. J.; Davies, J. E.; Fox, D. J., et al. Ammonia oxide makes up some 20% of an aqueous solution of hydroxylamine. *Chemical Communications*, v. 46, n. 8, p. 1302-1304, **2010**.

Kirby, A. J.; Manfredi, A. M.; Souza, B. S., et al. Reactions of alpha-nucleophiles with a model phosphate diester. *Arkivoc*, p. 28-38, **2009**.

KIRBY, A. J. Activating Water: Efficient Intramolecular General Base Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Triester. *Chemistry-a European Journal*, v. 15, n. 34, p. 8475-8479, **2009**.

Kirby, A. J.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M., et al. Activating Water: Important Effects of Non-leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. *Chemistry-a European Journal*, v. 17, n. 52, p. 14996-15004, **2011**.

Kirby, A. J.; Mora, J. R.; Nome, F. New light on phosphate transfer from triesters. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, v. 1834, n. 1, p. 454-463, **2013**.

Kirby, A. J.; Nome, F. Fundamentals of Phosphate Transfer. *Accounts of Chemical Research*, v. 48, n. 7, p. 1806-1814, **2015**.

Kirby, A. J.; Souza, B. S.; Medeiros, M., et al. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Chemical evidence from its reaction with a phosphate triester. *Chemical Communications*, n. 37, p. 4428-4429, **2008**.

Marin, M. A. B.; Nome, F.; Zanette, D., et al. Effect of Cetyltrimethylammonium Micelles with Bromide, Chloride, and Hydroxide Counterions on the Rates of Decomposition of Parasubstituted Aryl-2,2,2-Trichloroethanols in Aqueous Naoh (Vol 99, Pg 10880, 1995). *Journal of Physical Chemistry*, v. 99, n. 39, p. 14572-14572, **1995**.

Maskill, H. *Structure and Reactivity in Organic Chemistry*. Oxford University Press, **1999**.

Medeiros, M. *Estudo Mecanístico da reação entre hidroxilamina e um triéster de fosfato: Caracterização de produtos e intermediários*. **2009**. 76 (Dissertação). Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Medeiros, M.; Orth, E.; Manfredi, A. M., et al. Dephosphorylation Reactions of Mono-, Di-, and Triesters of 2,4-Dinitrophenyl Phosphate with Deferoxamine and Benzohydroxamic Acid. *Journal of Organic Chemistry*, v. 77, n. 23, p. 10907-10913, Dec 7 **2012**.

Mercey, G.; Verdet, T.; Renou, J., et al. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Accounts of Chemical Research*, v. 45, n. 5, p. 756-766, **2012**.

Mora, J. R.; Kirby, A. J.; Nome, F. Theoretical Study of the Importance of the Spectator Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. *Journal of Organic Chemistry*, v. 77, n. 16, p. 7061-7070, **2012**.

Moss, R. A.; Ihara, Y. Cleavage of Phosphate-Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents. *Journal of Organic Chemistry*, v. 48, n. 4, p. 588-592, **1983**.

Nandi, N.; Bhattacharyya, K.; Bagchi, B. Dielectric relaxation and solvation dynamics of water in complex chemical and biological systems. *Chemical Reviews*, v. 100, n. 6, p. 2013-2045, **2000**.

Niazi, A.; Ghalie, M.; Yazdanipour, A., et al. Spectrophotometric determination of acidity constants of Alizarine Red S in water, water-Brij-35 and water-SDS micellar media solutions. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 64, n. 3, p. 660-664, **2006**.

Niazi, A.; Zolgharnein, J.; Davoodabadi, M. R. Spectrophotometric determination of acidity constant of some indicators in various micellar media solutions by rank annihilation factor analysis. *Spectrochimica*

Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 70, n. 2, p. 343-349, **2008**.

Orth, E. S. *Reações Nucleofílicas De Desfosforilação Com Imidazol e Hidroxamato: Modelagem Em Sistemas Intra- e Intermoleculares, Polimérico e Micelar*. **2011**. 215 (Tese de Doutorado). Departamento de Química, UFSC, Florianópolis.

Orth, E. S.; da Silva, P. L. F.; Mello, R. S., et al. Suicide Nucleophilic Attack: Reactions of Benzohydroxamate Anion with Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate. *Journal of Organic Chemistry*, v. 74, n. 14, p. 5011-5016, **2009**.

Orth, E. S.; Wanderlind, E. H.; Medeiros, M., et al. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. *Journal of Organic Chemistry*, v. 76, n. 19, p. 8003-8008, **2011**.

Pourreza, N.; Rastegarzadeh, S. Spectrophotometric determination of the dissociation constant of 5-(p-dimethylaminobenzylidene)rhodanine in micellar media. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 50, n. 1, p. 206-210, **2005**.

Prockop, L. D. Weapons of mass destruction: Overview of the CBRNEs (Chemical, biological, radiological, nuclear, and explosives). *Journal of the Neurological Sciences*, v. 249, n. 1, p. 50-54, **2006**.

Quina, F. H.; Chaimovich, H. Ion-Exchange in Micellar Solutions .1. Conceptual-Framework for Ion-Exchange in Micellar Solutions. *Journal of Physical Chemistry*, v. 83, n. 14, p. 1844-1850, **1979**.

Quinn, D. M. Acetylcholinesterase - Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition-States. *Chemical Reviews*, v. 87, n. 5, p. 955-979, **1987**.

Rastelli, A.; Bagatti, M.; Gandolfi, R. Ab-Initio Study of Concerted Cycloadditions of Allene, Monofluoroallene, and 1,1-Difluoroallene with Diazomethane, Formonitrile Oxide, Cyclopentadiene, and Furane. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, n. 17, p. 4965-4975, **1995**.

Ribeiro, T. S.; Prates, A.; Alves, S. R., et al. The Effect of Neutral Oximes on the Reactivation of Human Acetylcholinesterase Inhibited with Paraoxon. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 7, p. 1216, **2012**.

Segall, Y.; Waysbort, D.; Barak, D., et al. Direct Observation and Elucidation of the Structures of Aged and Nonaged Phosphorylated Cholinesterases by P-31 Nmr-Spectroscopy. *Biochemistry*, v. 32, n. 49, p. 13441-13450, **1993**.

Silva, B. V.; Violante, F. A.; Pinto, A. C., et al. The mechanism of Sandmeyer's cyclization reaction by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 25, n. 3, p. 423-428, **2011**.

Silva, G. R.; Borges, I.; Figueroa-Villar, J. D., et al. Chemical Defense: History, Warfare Agent Classification and Action of Neurotoxic Agents. *Quimica Nova*, v. 35, n. 10, p. 2083-2091, **2012**.

Simanenko, Y. S.; Popov, A. F.; Prokopeva, T. M., et al. Inorganic anionic oxygen-containing alpha-nucleophiles-effective acyl group acceptors: Hydroxylamine ranks first among the alpha-nucleophile series. *Russian Journal of Organic Chemistry*, v. 38, n. 9, p. 1286-1298, **2002**.

Singh, N.; Karpichev, Y.; Sharma, R., et al. From alpha-nucleophiles to functionalized aggregates: exploring the reactivity of hydroxamate ion towards esterolytic reactions in micelles. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 13, n. 10, p. 2827-2848, **2015**.

Tarkka, R. M.; Buncel, E. Origin of the Bell-Shaped Alpha-Effect-Solvent Composition Plots - Pk(a)-Solvent Dependence of the Alpha-Effect at a Phosphorus Center. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, n. 5, p. 1503-1507, **1995**.

Tascioglu, S. Micellar solutions as reaction media. *Tetrahedron*, v. 52, n. 34, p. 11113-11152, **1996**.

Timosheva, L. V.; Chandrasekaran, A.; Holmes, R. R. Biologically relevant phosphoranes: Structural characterization of a nucleotidyl phosphorane. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 36, p. 12474-12475, **2005**.

Toullec, J.; Moukawim, M. Cetyltrimethylammonium hydroperoxide: An efficient reagent for promoting phosphate ester hydrolysis. *Chemical Communications*, n. 2, p. 221-222, **1996**.

Trovaslet-Leroy, M.; Musilova, L.; Renault, F., et al. Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents. *Toxicology Letters*, v. 206, n. 1, p. 14-23, **2011**.

Um, I. H.; Lee, J. Y.; Bae, S. Y., et al. Effect of modification of the electrophilic center on the alpha effect. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, v. 83, n. 9, p. 1365-1371, **2005**.

Um, I. H.; Shin, Y. H.; Han, J. Y., et al. Medium effects on the alpha-effect in DMSO-H₂O mixtures - Comparative studies of p-nitrophenyl benzoate and acetate - Dissection of ground-state and transition-state effects. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, v. 84, n. 11, p. 1550-1556, **2006**.

WanderlinD, E. H.; Orth, E. S.; Medeiros, M., et al. Aqueous Micelles as Catalytic Nanoreactors for Dephosphorylation Reactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 12, p. 2385-2391, **2014**.

Worek, F.; Diepold, C.; Eyer, P. Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: inhibition, reactivation, and aging kinetics. *Archives of Toxicology*, v. 73, n. 1, p. 7-14, **1999**.

7 Apêndice

Figura A1 – Espectro dos deslocamentos químicos de ^1H RMN para o dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP** 0,01 M), em CDCl_3 , 200 MHz, a 25°C .

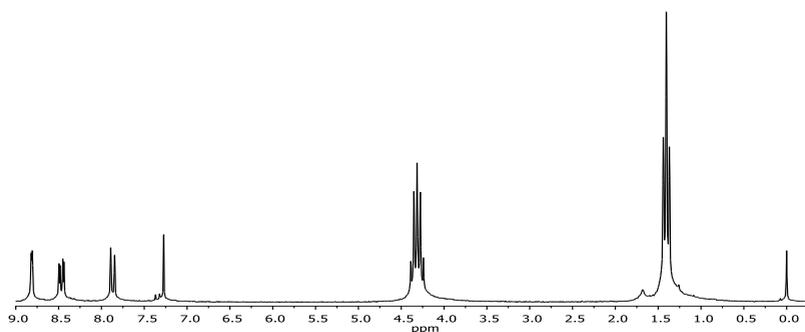


Figura A2 – Espectro dos deslocamentos químicos de ^{31}P RMN para o dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP** 0,01 M), em CDCl_3 , 80 MHz, a 25°C .

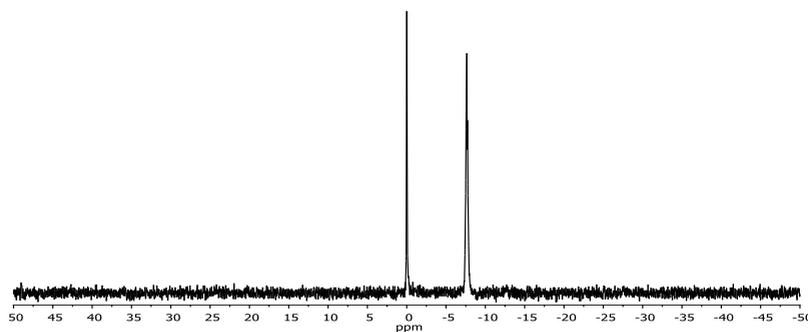


Tabela A3. Dados de titulação (Abs vs. pH) para a oxima **8** (5×10^{-4} M) em água e meio micelar de **CTAB**, em 280 nm, a 25°C.

pH	Abs _{água}	pH	Abs _{água}	pH	Abs _{CTAB}	pH	Abs _{CTAB}
6,14	0,445	9,01	0,544	6,15	0,445	9,01	0,761
6,31	0,442	9,28	0,595	6,48	0,452	9,23	0,769
6,72	0,441	9,51	0,640	6,81	0,478	9,50	0,776
7,02	0,442	9,63	0,659	7,03	0,498	9,73	0,780
7,25	0,443	9,75	0,685	7,23	0,522	10,00	0,778
7,53	0,450	9,89	0,709	7,52	0,566		
7,75	0,450	10,03	0,720	7,75	0,601		
8,01	0,456	10,26	0,742	8,04	0,648		
8,19	0,464	10,51	0,758	8,22	0,667		
8,46	0,478	10,76	0,762	8,50	0,717		
8,82	0,516	11,00	0,764	8,78	0,743		

Tabela A4. Dados de perfil de pH para as reações das oximas (0,001 M) com **DEDNPP** (5×10^{-5} M) a 25°C.

pH	8	2-PAM	DAM	DMG
10,50	1,40E-3	1,13E-3	5,52E-4	8,69E-5
10,00	1,22E-3	1,08E-3	3,42E-4	3,85E-5
9,50	8,85E-4	1,03E-3	1,94E-4	2,01E-5
9,00	4,01E-4	8,48E-4	8,72E-5	1,26E-5
8,50	1,99E-4	6,82E-4	4,05E-5	8,35E-6
8,00	7,72E-4	4,15E-4	1,79E-5	6,71E-6
7,50	3,66E-5	2,26E-4	1,09E-5	6,11E-6
7,00	1,68E-5	1,05E-4	7,78E-6	5,73E-6

Tabela A5. Valores de k_{obs} em relação à variação da concentração de oximas (M) para a reação com o **DEDNPP** (5×10^{-5} M), a 25°C .

[Ox], M	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$		
	8	2-PAM	DAM
4E-4	6,27E-4	4,58E-4	3,60E-4
6E-4	8,71E-4	6,78E-4	4,67E-4
8E-4	1,13E-3	8,96E-4	5,71E-4
1E-3	1,40E-3	1,13E-3	6,71E-4

Tabela A6. Valores de k_{obs} em função da temperatura para a reação de **8** (0,001 M) com **DEDNPP** (5×10^{-5} M), em pH 10,5.

Temperatura / K	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
298,15	1,60E-3
308,15	2,82E-3
318,15	4,87E-3
328,15	8,86E-3

Tabela A7. Valores de k_{obs} em função do pH para a reação do **DEDNPP** com **8** (0,001 M) em água e **8** (5×10^{-4} M) em meio micelar de **CTAB** (0,01 M), a 25°C.

pH	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$, H_2O	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$, CTAB
10,50	1,40E-3	8,29E-2
10,00	1,22E-3	8,17E-2
9,50	8,85E-4	7,19E-2
9,00	4,01E-4	5,75E-2
8,50	1,99E-4	4,45E-2
8,00	7,72E-5	3,01E-2
7,50	3,66E-5	1,69E-2
7,00	1,68E-5	--

Tabela A8. Valores de k_{obs} em função da concentração de **CTAB**, para a reação entre **8** (5×10^{-4} M) e **DEDNPP** (5×10^{-5} M), a 25 °C e pH 10,00.

[CTAB] / M	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	[CTAB] / M	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
0,1	1,79E-2	6,0E-3	8,91E-2
8,0E-2	2,09E-2	3,0E-3	7,41E-2
6,0E-2	2,57E-2	1,9E-3	5,89E-2
4,0E-2	3,38E-2	1,5E-3	4,88E-2
2,0E-2	6,07E-2	1,0E-3	3,19E-2
1,0E-2	8,73E-2	6,0E-4	2,19E-2

Tabela A9. Valores de k_{obs} em função da concentração de **8** na reação com o **DEDNPP** (5×10^{-5} M), em meio micelar de **CTAB** (0,01 M), a 25°C e pH 10,00.

[8], M	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
5E-4	8,66E-2
4E-4	7,13E-2
3E-4	5,51E-2
2E-4	3,87E-2

Tabela A10. Valores de k_{obs} em função da concentração de **CTAB** para a reação entre **8** (0,001 M) e **Paraoxon metílico** (5×10^{-5} M), a 25°C e pH 10,00.

[CTAB] / M	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	[CTAB] / M	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
0,1	2,01E-4	1,0E-2	3,86E-4
8,0E-2	2,23E-4	6,0E-3	3,36E-4
6,0E-2	2,51E-4	3,0E-3	2,36E-4
4,0E-2	3,01E-4	1,5E-3	1,57E-4
2,0E-2	3,81E-4	--	--

Tabela A11. Valores de k_{obs} em função da concentração de **8** para a reação com o **Paraoxon metílico** (5×10^{-5} M) em meio aquoso, em pH 10,50 e 25 °C.

[8], M	k_{obs} , s ⁻¹
1E-3	3,64E-5
8E-4	3,05E-5
6E-4	2,46E-5
4E-4	1,80E-5

Tabela A12. Valores de k_{obs} em função da concentração de **8** para a reação com o **Paraoxon metílico** (5×10^{-5} M) em meio micelar de CTAB, em pH 10,00 e 25 °C.

[8], M	k_{obs} , s ⁻¹
5E-4	8,66E-2
4E-4	7,13E-2
3E-4	5,51E-2
2E-4	3,87E-2