

Daiane Gobatto de Liz

**EFEITO SUPRAMOLECULAR DE MACROCICLOS NA  
DEGRADAÇÃO DE ÉSTERES DE FOSFATOS**

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

Florianópolis

2017

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

Liz, Daiane Gobatto de  
Efeito Supramolecular de Macrocielos na  
Degradação de Ésteres de Fosfato / Daiane Gobatto de  
Liz ; orientador, Faruk José Nome Aguilera, 2017.  
133 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis,  
2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. Pilar[5]arenos. 3. Catálise  
Supramolecular. 4. Ésteres de Fosfato. I. José Nome  
Aguilera, Faruk. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.  
Título.

Daiane Gobatto de Liz

**EFEITO SUPRAMOLECULAR DE MACROCICLOS NA  
DEGRADAÇÃO DE ÉSTERES DE FOSFATOS.**

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, 24 de Julho de 2017.

---

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.  
Coordenador do Programa

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Faruk José Nome Aguilera, Dr  
Orientador  
UFSC

---

Prof. Marcelo de Freitas Lima, Dr  
Relator  
UNESP

---

Prof. René Alfonso Nome Silva, Dr  
UNICAMP

---

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr  
UFSC

---

Prof. Ricardo Ferreira Affeldt, Dr  
UFSC



## AGRADECIMENTOS

A toda minha família, pela educação, incentivo, apoio, paciência, companheirismo e carinho. Pai, Mãe e irmãs amo vocês!

Aos professores Faruk Nome e Haidi Fiedler, pela oportunidade e orientação e principalmente exemplo de comprometimento à pesquisa.

Aos professores Marcelo de Freitas Lima, René Alfonso Nome Silva, Gustavo Amadeu Micke e Ricardo Ferreira Affeldt pela avaliação deste trabalho e participação na banca examinadora.

Ao professor Luis Garcia, e a professora Vanessa do Nascimento pela contínua disponibilidade de substratos. E ao professor Rodrigo Montecinos pela contribuição com os cálculos computacionais.

Aos colegas de laboratório, que me proporcionaram inúmeras situações de aprendizagem e descontração. Em especial, agradeço à Michelle Medeiros, Alex Molina e Eduardo Wandelind pela contribuição direta neste trabalho.

Ao meu querido namorado Sergio Murilo Hey por todo apoio carinho, e paciência.

As minhas companheiras de casa, Luana, Gislayne e Thaise obrigado pelas conversas, apoio e incentivo de vocês.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Departamento de Química, à Central de Análises e ao Programa de Pós-graduação em Química, pela infra-estrutura.

Aos servidores técnico-administrativos da UFSC, em especial aos funcionários da secretaria de Pós-graduação em Química, Graça Hoeller e Jadir Carminatti, pela dedicação e competência.

Ao INCT-Catálise, CNPq, CAPES e FAPESC, pela infra-estrutura e apoio financeiro.



## RESUMO

O presente trabalho reporta reações de desfosforilação do monoéster 2,4-dinitrofenilfosfato (**DNPP**) e de uma série de diésteres; bis (2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**), o 2,4-dinitrofenilfenilfosfato (**DNPPP**), e o etil 2,4 dinitrofenilfosfato (**EDNPP**) por diferentes macrociclos de pila[5]arenos. O primeiro estudo referiu-se a reação de desfosforilação do **DNPP** na presença de pilar[5]areno catiônico **P5A**, apresentando um aumento de cerca de 10 vezes em comparação com a reação somente em água. As constantes de velocidade e de associação entre o **P5A** e o substrato **DNPP** foram determinadas com êxito, através da técnica de UV-VIS. Enquanto que, a inserção do substrato na cavidade do receptor pode ser acompanhada por técnica de RMN e por cálculos de dinâmica molecular. Além disso, sintetizou uma nova molécula de pilar[5]areno, a fim de estudar a catálise supramolecular de uma série de diésteres de fosfatos. As reações apresentaram um aumento de 1000 vezes para o **BDNPP**, 100 vezes para o **DNPPP** e 10 vezes para **EDNPP**, em comparação com a reação somente em água, assim o **P5I** atuou como um catalisador supramolecular específico ao substrato **BDNPP**. Assim sistemas supramoleculares de pila[5]arenos favorecem a inserção de ésteres de fosfatos em sua cavidade, promovendo um aumento significativo na velocidade de reação de desfosforilação, devido principalmente ao seu caráter hidrofóbico em conjunto com o efeito eletrostático.

**Palavras-chave:** Pilar[5]arenos. Catálise supramolecular. Ésteres de fosfato.



## ABSTRACT

The present work reports the dephosphorylation reactions of the monoester 2,4-dinitrophenylphosphate (**DNPP**) and of a series of diesters; bis (2,4-dinitrophenyl) phosphate (**BDNPP**), 2,4-dinitrophenyl phenylphosphate (**DNPPP**), and ethyl 2,4-dinitrophenylphosphate (**EDNPP**) by different Pilla[5]arenes macrocycles. The first study referred to the dephosphorylation reaction of **DNPP** in the presence of a cationic pillar[5]arene **P5A**, showing an increase of about 10-fold in comparison to the spontaneous hydrolysis of the **DNPP**. The reactions rate and association constants between **P5A** and **DNPP** substrate were determined successfully by the UV-VIS technique. The formation of the supramolecular complex between phosphate ester and **P5A** has been studied by **NMR** showing complexation-induced upfields proton shifts indicative of aromatic ring inclusion in the pillar[5]arene cavity. In addition, it synthesized a new molecule of pillar[5]arene in order to study the supramolecular catalysis of a series of phosphate diesters. The reactions showed a 1000-fold increase for **BDNPP**, 100 fold for **DNPPP** and 10 fold for **DEDNPP**, compared to the water-only reaction, so **P5I** served as a supramolecular catalyst specific for the **BDNPP** substrate. Thus supramolecular systems of the pillar[5]arenes favor the insertion of phosphate esters in their cavity, promoting a significant increase in the rate of dephosphorylation reaction, mainly due to its hydrophobic character together with the electrostatic effect.

**Keywords:** Pilla[5]arenes. Supramolecular catalysis. Phosphate esters.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de compostos contendo o átomo fósforo e suas aplicações. ....	24
Figura 2 – Diagrama de energia para uma reação enzimática ( $k_{cat}$ ) e não-enzimática ( $k_{non}$ ), onde $\Delta G_{non}$ corresponde à barreira energética para reação não catalisada e $\Delta G_{cat}$ se refere à reação catalisada por enzima. ....	27
Figura 3 – Classificação das estruturas gerais de ésteres de fosfato. ....	35
Figura 4 – Diagrama de More O`Ferrall-Jencks de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila. ....	40
Figura 5 – Estruturas dos diésteres de fosfato derivados do naftol. ....	46
Figura 6 – Representação esquemática da formação do complexo entre Pilar[5]areno e 1-octonosulfonato de sódio. ....	56
Figura 7 – Representação estrutural do Pilar[n]areno. ....	58
Figura 8 – Estrutura de Raio-X do Dimetoxipilar[5]areno. ....	59
Figura 9 – Estruturas quirais R e S do Pilar[5]areno. ....	60
Figura 10 – Estrutura do calix[6]areno catiônico responsável pelo hidrólise do DNPP. ....	64
Figura 11 – Representação esquemática do objetivo geral. ....	65
Figura 12 – Absorvância vs. comprimento de onda para a reação entre DNPP [ $5 \times 10^{-5}$ M] e P5A [ $2 \times 10^{-3}$ M] a $25^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 13$ . ....	79
Figura 13 – Influência da concentração de P5A na constante de velocidade observada, $k_{obs}$ , para hidrólise de DNPP [ $5 \times 10^{-5}$ M], em soluções aquosas a $\text{pH} = 7$ (tampão Bis-Tris) e $25,0^{\circ}\text{C}$ . ....	80
Figura 14 – Perfil de pH da hidrólise do DNPP na presença de P5A [ $2 \times 10^{-3}$ M] (■) e em solução aquosa (●). ....	82

Figura 15 – Gráfico de Eyring para reação de DNPP com P5A, em pH=10. ....	86
Figura 16 – Estruturas do pilar[5]areno carregado positivamente (P5A) e do 2,4-dinitrofenilfosfato (DNPP). .....	89
Figura 17 – Espectro de <sup>1</sup> H RMN (D <sub>2</sub> O, 298 K, 200 MHz) de DNPP [19,3 mM] na presença de concentrações crescentes de P5A [mM]: (a) 0,00, (b) 0,7, (c) 3,5 e (d) 16. Os sinais marcados como L correspondem ao contra-íon de 2,6-lutidínio. ....	89
Figura 18 – Espectro de <sup>1</sup> H RMN (D <sub>2</sub> O, 298 K, 200 MHz) (a) P5A [17 mM]; (B) [17 mM] de P5A e [17 mM] de DNPP, (c) [17 mM] de DNPP. L corresponde ao contra-íon 2,6-lutidínio. ....	90
Figura 19 – O lado esquerdo mostra a configuração inicial, com o DNPP na representação de CPK e o pilar[5]areno na representação de vara. Os carbonos são cor cianos, os hidrogênios são brancos, os nitrogênios são azuis e os oxigênios são vermelhos. Brometo e sódio são cinza e verde, respectivamente. Para simplificar, as moléculas de água são azul claro na representação de linha. O lado direito mostra um gráfico de distância entre o centro da cavidade P5A e o carbono na posição 4 do DNPP, em função do tempo de cálculo e do complexo formado 1: 1, após atingir o equilíbrio. ....	91
Figura 20 – A- Ilustração do complexo formado 2:1, onde o P5A é representado em varas e as duas moléculas de DNPP estão em CPK. Para simplificar, as moléculas de água e os ions foram removidos. B- Distância entre o centro da cavidade P5A e o carbono na posição-4 para cada DNPP, em função do tempo de cálculo. ....	93
Figura 21 – Espectro de <sup>1</sup> H NMR, do composto P5I em MeOD a 200 MHz. ...	96
Figura 22 – Espectro de <sup>13</sup> C NMR, do P5I em MeOD a 200 MHz. ....	97
Figura 23 – Espectro de massas de alta resolução do P5I. ....	98

Figura 24 – Perfil de pH da hidrólise do BDNPP na presença de PI [ $5 \times 10^{-4}$ M] (■) e em solução aquosa (●). .....	100
Figura 25 - Influência da concentração de [P5I] na constante de velocidade observada, $k_{obs}$ , para hidrólise de BDNPP [ $3 \times 10^{-5}$ M], em soluções aquosas pH = 9 (tampão Bicarbonato) a 25,0 ° C. ....	104
Figura 26 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ obtido para (A) BDNPP [ $2,94 \times 10^{-5}$ M] e espectros sucessivos após adição de P5I [ $1,6 \times 10^{-5}$ M] registrados em: (B) 5 min; (C) 15 min; (D) 25 min; (E) 35 min; (F) 45 min; (G) 55 min; (H) 1h 5min; (I) 1h 15min; (J) 1h 25min; (K) 4h 40min; a 25°C, em D <sub>2</sub> O com 30% de MeOD e pH 9,5. ....	108
Figura 27 – Ampliação da região 6-9 ppm dos sucessivos espectros de RMN da figura 26. ....	108
Figura 28 – Espectros sucessivos de RMN $^{31}\text{P}$ obtidos para a reação P5I [ $1,6 \times 10^{-5}$ M] com BDNPP [ $2,94 \times 10^{-5}$ M]: (a) 5 min; (b) 15 min; (c) 35 min; (d) 45 min; (e) 55 min e (f) 1h 5min, a 25°C, em D <sub>2</sub> O com 30% de MEOD e pH 9,5. ....	109
Figura 29 – Perfil de pH da hidrólise do BDNPP (■), DNPPP (▲) e EDNPP (●) na presença de PI [ $5 \times 10^{-4}$ M]. ....	112



## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Imidazol como ácido e base .....	31
Esquema 2 – Mecanismos propostos para a atuação do sítio ativo da enzima RNase A.....	33
Esquema 3 – Esquema de reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.....	37
Esquema 4 – Representação dos mecanismos associativo, concertado e dissociativo para a substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.....	39
Esquema 5 – Catálise ácida e básica geral em reações de desfosforilação. ....	43
Esquema 6 – Mecanismo de catálise ácida geral do fosfato de 8-dimetil amino naftila.....	44
Esquema 7 – Mecanismo de catálise do diânion do fosfato de <i>p</i> -nitro fenila na presença de imidazol.....	46
Esquema 8 – Mecanismo nucleofílico intramolecular para a geração do fosfoimidazol.....	47
Esquema 9 – Mecanismos propostos para a hidrólise do BMIPP.....	48
Esquema 10 – Esquema ilustrativo da catálise supramolecular em ésteres de fosfato envolvendo CDs.....	63
Esquema 11 – Rota de síntese para obtenção do 1,4 bis (2-Bromoetoxi) benzeno (1):.....	69
Esquema 12 – Rota de síntese para obtenção Pilar[5]areno bromado (2).....	70
Esquema 13 – Rota de síntese para obtenção Pilar[5]areno catiônico P5A: ....	71
Esquema 14– Rota de síntese para obtenção Pilar[5]areno Imidazol P5I:.....	72
Esquema 15 – Rota de síntese para obtenção do bis (2,4-dinitrofenil fosfato) – BDNPP:.....	73

Esquema 16 – Possíveis caminhos para a hidrólise do DNPP. ....	83
Esquema 17 – Esquema geral da quebra do BDNPP promovida pelo P5I .....	99
Esquema 18 – Possíveis caminhos para a hidrólise do BDNPP. ....	101

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1– Parâmetros cinéticos e constantes de equilíbrio para a reação do DNPP com P5A obtidas pelos ajustes dos valores experimentais mostrado na Figura 14 pelas equações 4-7.....	84
Tabela 2 – Parâmetros termodinâmicos para a reação entre P5A [ $2 \times 10^{-3}$ M] e o DNPP [ $5 \times 10^{-5}$ M], em pH 10. ....	87
Tabela 3 – Parâmetros cinéticos e constantes de associação e equilíbrio obtidos pelos ajustes dos dados da figura 24 para a reação do P5I com BDNPP. ....	102
Tabela 4 - Parâmetros de ativação termodinâmicos para a reação entre P5I [ $5 \times 10^{-4}$ M] e o BDNPP [ $3 \times 10^{-5}$ M], em pH 9. ....	106
Tabela 5 – Deslocamentos $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}$ RMN das substâncias puras envolvidas na reação de hidrólise do BDNPP. ....	109



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-TBCP- 4- Terc-butilcatecol fosfato

Abs – Absorvância

A<sub>N</sub> – Mecanismo Associativo

A<sub>N</sub>D<sub>N</sub> – Mecanismo Concertado

ATP- Trifosfato de adenosina

BDNPP – bis (2,4-dinitrofenil fosfato)

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

D<sub>N</sub> – Mecanismo Dissociativo

DEDNPP – dietil 2,4-dinitrofenolato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNP – 2,4-dinitrofenolato

DNPP –2,4-dinitrofenil fosfato

EDNPP – etil 2,4-dinitrofenil fosfato

E. T. – Estado de Transição

HIST- Histadina

IMZ - Imidazol

$k_{\text{obs}}$  – constante de velocidade observada

LaCFI – Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais

$pK_a$  –logaritmo da constante de dissociação de uma espécie ácida

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – ácido ribonucléico

RNase – Ribonuclease A

S<sub>N</sub>2 – Substituição NucleofílicaBimolecular

$t_{1/2}$  – Tempo de meia vida

TS – TransitionState (“Estado de Transição”)

UV-Vis – Ultra-Violeta Visível



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 JUSTIFICATIVA: DA QUÍMICA DOS ORGANOFOSFORADOS À CATÁLISE SUPRAMOLECULAR .....	23
1.2 CATÁLISE ENZIMÁTICA .....	26
<b>1.2.1 A função catalítica do grupo imidazol em reações enzimáticas</b> .....	<b>30</b>
<b>1.2.2 Ribonucleases</b> .....	<b>32</b>
1.3 REAÇÕES DE DESFOSFORILAÇÃO .....	35
<b>1.3.1 Mecanismos de hidrólise em ésteres de fosfato</b> .....	<b>37</b>
<b>1.3.2 Reações inter e intramolecular envolvendo catálise em ésteres de fosfato</b> .....	<b>41</b>
1.3.2.1 Catálise ácida-básica geral .....	42
1.3.2.2 Catálise Nucleofílica .....	44
<b>1.3.3 Reações de desfosforilação Inter e Intramolecular envolvendo Catálise promovida por grupos imidazóis</b> .....	<b>46</b>
1.4 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR .....	50
<b>1.4.1 Reconhecimento e Estrutura molecular</b> .....	<b>54</b>
1.4.1.1 Reconhecimento supramolecular.....	54
1.4.1.2 Pilararenos.....	57
<b>1.4.2 Catálise Supramolecular</b> .....	<b>61</b>
1.4.2.1 Modelos miméticos envolvidos na catálise supramolecular de ésteres de fosfato .....	62
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>65</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	65
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	66

<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
3.1 EQUIPAMENTOS .....	68
3.2 REAGENTES .....	68
3.3 SÍNTESE DOS MACROCICLOS DE PILAR[5]ARENOS E DOS SUBSTRATOS ...	69
<b>3.3.1 Síntese dos pilar[5]arenos .....</b>	<b>69</b>
<b>3.3.2 Síntese dos substratos .....</b>	<b>73</b>
3.4 MEDIDAS CINÉTICAS .....	75
3.5 ESTUDOS POR RMN DE $^1\text{H}$ E $^{31}\text{P}$ .....	76
3.6 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS .....	77
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
4.1 REAÇÕES DE MONOÉSTERES NA PRESENÇA DE PILAR[5]ARENO (P5A) ...	78
<b>4.1.1 Estudos Cinéticos .....</b>	<b>79</b>
<b>4.1.2 Parâmetros de ativação .....</b>	<b>86</b>
<b>4.1.3 Estudo de RMN <math>^1\text{H}</math> .....</b>	<b>88</b>
<b>4.1.4 Cálculo computacional .....</b>	<b>91</b>
4.2 REAÇÕES DE DIÉSTER NA PRESENÇA DE PILARARENO IMIDAZOL .....	94
<b>4.2.1 Síntese do P5I .....</b>	<b>95</b>
<b>4.2.2 Estudos cinéticos .....</b>	<b>98</b>
<b>4.2.3 Parâmetros de ativação .....</b>	<b>106</b>
<b>4.2.4 Estudo <math>^1\text{H}</math> e <math>^{31}\text{P}</math> RMN.....</b>	<b>107</b>
<b>4.2.5 Estudos comparativos com outros substratos .....</b>	<b>111</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>122</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 JUSTIFICATIVA

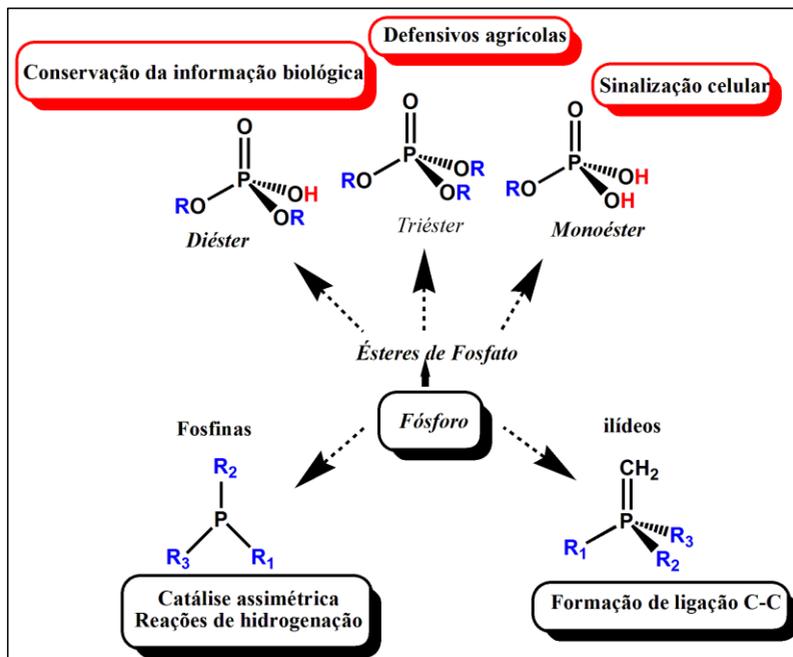
### DA QUÍMICA DOS ORGANOFOSFORADOS À CATÁLISE SUPRAMOLECULAR

Substâncias que contém o átomo de fósforo tem sido foco de estudo em diversas áreas da química, principalmente na físico-química orgânica. Grandes avanços nessa área ocorreram nos últimos 50 anos, que resultaram em uma enorme evolução nos campos acadêmicos e tecnológicos. Dentro desse contexto, enfatizam-se os compostos organofosforados que apresentam, além da vasta aplicabilidade sintética e catalítica, importantes papéis nas áreas farmacêuticas e agro-industriais. E compostos derivados do ácido fosfórico, os ésteres de fosfato, participam de inúmeros processos biológicos, como os monoéster na sinalização celular e os diéster na conservação da informação genética, Figura 1(CORBRIDGE, 1985).

Em contrapartida, a partir da segunda guerra mundial algumas substâncias organofosforados foram utilizadas como potentes agentes químicos de guerra, classificados como organofosforados neurotóxicos, ou “agentes dos nervos”, e isso se deve a seu potencial tóxico, provocando lesões irreversíveis ao corpo. Por isso, destaca-se a importância de estudos em sistemas eficientes para a degradação química, bem como para a destruição e manuseio desses compostos (PROCKOP, 2006). Contudo, para a realização de tais estudos, é necessário o conhecimento da natureza e estrutura química e,

principalmente, da reatividade dos organofosforados (KIRBY e NOME, 2015).

Figura 1 – Exemplos de compostos contendo o átomo fósforo e suas aplicações.



Fonte: desenvolvida pela autora.

Assim, de acordo com os trabalhos desenvolvidos no grupo do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI), surge o interesse em desenvolver novos sistemas catalíticos, que tornem as reações envolvendo os compostos organofosforados mais eficientes, enfatizando as reações de degradação de ésteres de fosfato. (GIUSTI, MEDEIROS, FERREIRA et al., 2014).

Por outro lado, concebem-se como exemplos de sistemas extremamente eficientes em catalisar reações, as enzimas. Sua extraordinária eficiência catalítica permite que reações possam ocorrer em questão de milissegundos. As reações de hidrólise de ésteres de fosfatos e carboxilatos são aceleradas por enzimas com efeitos catalíticos na ordem de  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes. Consequentemente, esses catalisadores se tornaram fonte de interesse e inspiração para o desenvolvimento de novas moléculas catalisadoras que possam simular o ambiente enzimático.

A química supramolecular, associada aos conceitos da catálise enzimática, emerge como uma alternativa eficaz no campo da catálise, sendo empregada principalmente na sua concepção central de reconhecimento molecular (LEHN, 1994).

Nessa química os efeitos catalíticos poderão ser mais pronunciados devido às interações químicas (ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ ) envolvidas no sistema. Ou seja, os sistemas supramoleculares favorecem a inserção de substratos em cavidades onde experimentam ambientes químicos diferenciados e propícios à catálise (LEHN, 1993).

Tendo visto as importantes aplicações e a quantidade de reações descritas na literatura sobre organofosforados, o presente trabalho tem como principal foco a utilização de sistemas supramoleculares inéditos na tentativa de propor novos sistemas catalíticos ou ainda que sejam modelos miméticos, mais eficientes e seletivos, como as enzimas, nas reações de desfosforilação.

## 1.2 CATÁLISE ENZIMÁTICA

Atualmente, a catálise representa um dos métodos mais esperançosos para o desenvolvimento acadêmico e para a inovação tecnológica (COLLINS, 2001; ZECCHINA, GROPPORBORDIGA, 2007). Como resultado tem-se a publicação de artigos científicos, a síntese de novos fármacos, bem como a otimização dos processos físico-químicos (CHEN, DINGERDISSEN, KRAUTER et al., 2005).

Dessa forma, de uma maneira geral e simplificada a catálise é definida como um fenômeno físico-químico capaz de acelerar a velocidade reação, sem alterar a energia global de Gibbs, por meio de um catalisador que é regenerado ao término do processo.

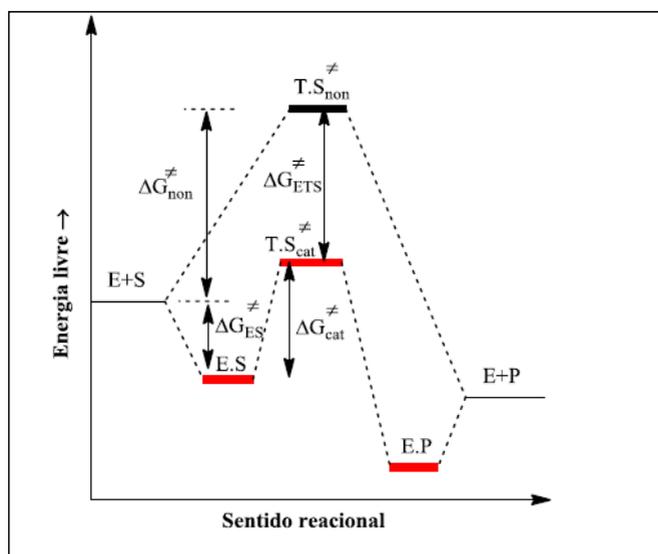
Em sistemas biológicos e naturais as reações raramente ocorrem na ausência de catalisadores. Esses catalisadores são proteínas denominadas de enzimas que possuem alta especificidade e são extremamente eficientes em catalisar as reações ( $10^6$  a  $10^{23}$  vezes). Nesse sentido, as enzimas têm recebido notória ênfase, não somente por sua eficiência catalítica, mas também por sua complexidade estrutural (KRAUT e CARROLLHERSCHLAG, 2003).

Dentro da evolução na ciência, mais propriamente na área biológica, são várias as teorias que visam explicar a catálise enzimática. Primeiramente, toma-se por base o modelo mais antigo e familiarizado como “chave-fechadura”, o qual propõe que a ligação entre o substrato e o sítio ativo da enzima depende da conformação reativa do substrato. Esse modelo considera apenas aspectos como proximidade e orientação do substrato aos grupos catalíticos (KOOLMAN e RÖHM, 2005).

Entretanto, a noção atual sobre o funcionamento das enzimas foi aperfeiçoada e organizada por Linus Pauling, o qual justificou a

eficiência catalítica enzimática ( $k_{\text{cat}}$ ), em termos de maior afinidade. A enzima (E) se liga especificamente ao substrato (S) estabilizando preferencialmente o estado de transição ( $\text{T.S}_{\text{cat}}^{\ddagger}$ ), e por consequência resulta no decréscimo da energia de ativação da reação ( $\Delta G_{\text{ETS}}^{\ddagger}$ ), Figura 2. (SCHOWEN, 2003).

Figura 2 – Diagrama de energia para uma reação enzimática ( $k_{\text{cat}}$ ) e não-enzimática ( $k_{\text{non}}$ ), onde  $\Delta G_{\text{non}}$  corresponde à barreira energética para reação não catalisada e  $\Delta G_{\text{cat}}$  se refere à reação catalisada por enzima.



Fonte: desenvolvida pela autora.

Logo, de acordo com vários autores, a estabilização do estado de transição, que ocorre entre o substrato e a enzima, promove a eficiência catalítica da enzima. Em outras palavras, à enzima se liga muito mais fortemente ao estado de transição do que aos reagentes do estado fundamental. E são fatores como as forças eletrostáticas, efeitos

estéricos, ligação de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e efeitos de solventes que contribuem potencialmente para essa estabilização (KRAUT e CARROLLHERSCHLAG, 2003).

Conforme sustentada a eficiência enzimática pode ser conferida a três principais fatores:

a) Proximidade e orientação: as enzimas por meio de interações não-covalentes estabelecidas com o substrato conseguem orientá-lo em uma posição adequada para dar início à reação e estabilizar do estado de transição;

b) Distorção: a enzima faz com que o substrato atinja uma conformação parecida com o estado de transição, promovendo uma diminuição da demanda energética;

c) Efeito do meio: no sítio ativo da enzima o substrato sofre uma mudança de solvatação, que consiste geralmente em um meio de menor polaridade com interações dipolares mais eficientes. Por exemplo, o efeito do meio pode provocar um aumento na nucleofilicidade de certos grupos reativos, tais como hidroxilas e aminas, e torna as ligações de hidrogênio mais fortes resultando na alteração de seu potencial catalítico (GAO, MA, MAJOR et al., 2006).

Além de todas as características fundamentais, as enzimas ainda são capazes de catalisar distintas transformações químicas. Então se pode afirmar que uma enzima é promíscua ao realizar além da sua função original, diferentes funções químicas não exercidas antes, demonstrando o potencial como um novo biocatalisador (GUPTA, 2016). Isso ocorre porque com a evolução as enzimas passam por algumas mutações estruturais, as quais resultam em pequenos efeitos

sobre a atividade da enzima, mas não afetando sua função inicial (GUPTA e TAWFIK, 2008).

Sabe-se que desde o século passado há o interesse científico em descobrir minuciosamente o mecanismo de ação enzimática, as razões de seu alto poder catalítico e sua estereoespecificidade. Porém, os grandes números de variáveis encontradas ao se trabalhar com sistemas tão complexos dificultam a formulação de reações modelos que possam descrever exatamente as transformações ocorridas (KRAUT, 1988).

A fim de estudar as reações enzimáticas foram adotadas reações modelos, as quais evoluem miméticos, que correspondem aos modelos que tentam imitar o sítio ativo das enzimas como um todo, e os não-miméticos (GESSER, YUNES, CLEMENTIN et al., 1997).

Os estudos dos modelos não-miméticos seguem duas linhas de pesquisa: uma voltada para os estudos que engloba a química supramolecular (AMABILINO e GALE, 2017), que modelam as interações enzima-substrato, como por exemplo, mais recentemente os pilar[5]arenos (XUE, YANG, CHI et al., 2012), calixarenos (GUTSCHE e BAUER, 1985) e as ciclodextrinas (VENTURINI, NICOLINI, MACHADO et al., 2008), e outra voltada para as reações inter- e intramoleculares orgânicas e os princípios físico-químicos que governam as reações no sítio ativo, tais como catálise ácida, básica, nucleofílica e por íons metálicos (GESSER, YUNES, CLEMENTIN et al., 1997).

Contudo, a procura incessante desse entendimento sobre as enzimas ainda motiva importantes áreas de pesquisa, visando interpretar o processo, o desenvolvimento e a síntese de compostos que mimetizem as funções enzimáticas. Mesmo cientes com os últimos avanços nessa

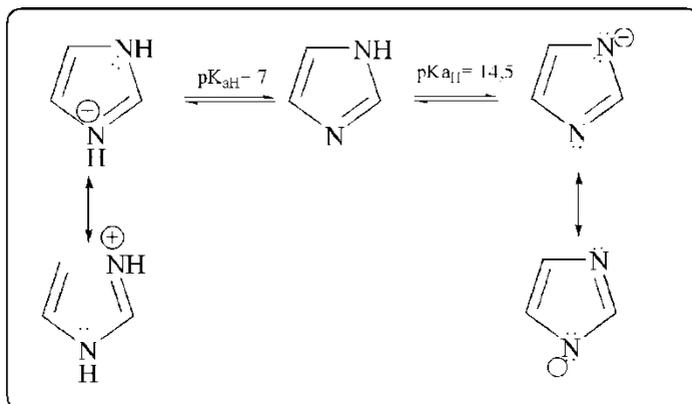
área de conhecimento ainda se tem muito a pesquisar, a estudar e a entender sobre a catálise enzimática (GUPTA, 2016).

### **1.2.1 A função catalítica do grupo imidazol em reações enzimáticas**

A compreensão do desempenho do imidazol em reações enzimáticas como resíduo do aminoácido histidina torna-se um aspecto de fundamental importância para a química biológica. Seu comportamento químico está diretamente ligado aos processos biológicos, como a sinalização e regulação celular, a clivagem do RNA e a produção de ATP.

O imidazol é uma amina aromática composta por um anel planar de 5 membros com dois átomos de nitrogênio. Caracterizado por suas propriedades químicas versáteis, o imidazol pode atuar como base ou ácido dependendo do ambiente químico em que se encontra, apresentando o primeiro  $pK_a$  em torno de 7 e o segundo  $pK_a$  próximo de 11. Então em meio neutro, o imidazol se encontra 50% na forma protonada, e com um par de elétrons deslocalizado entre os dois átomos de nitrogênio, como representado no Esquema 1 (CLAYDEN, 2001).

Esquema 1 – Imidazol como ácido e base



Fonte: desenvolvida pela autora.

Essa peculiaridade, ácido-base, confere ao imidazol diferentes funções nas reações de desfosforilação biológicas. Isso porque atua de três formas: como catalisador básico, quando está neutro ou desprotonado auxiliando o ataque de um nucleófilo; como catalisador ácido, quando está protonado assistindo o grupo de saída (ADMIRAAL, SCHNEIDER, MEYER et al., 1999) e nucleófilo, atacando diretamente o átomo de fósforo, levando a formação de intermediários fosforamidato (RAINES, 1998).

Enfim, existem enzimas como as ribonucleases e as fosfohistidinas, entre outras, que utilizam de modo específico a versatilidade do grupo imidazol. Contudo, devido ao propósito desta tese para não estender o trabalho e sim a importância das ribonucleases, será descrito o papel catalítico do imidazol apenas sobre elas.

### 1.2.2 Ribonucleases

As ribonucleases foram às enzimas mais estudadas do século vinte, isto se deveu a vasta literatura e os numerosos estudos relacionados a esta enzima (RAINES, 1998). Além disso, foi à primeira enzima a ter seus aminoácidos apresentados e seqüenciados bem como seus sítios catalíticos identificados. Convém relatar que a principal forma de atuação da RNAase A está diretamente relacionada aos resíduos de Hist 12 e His119 localizados no sítio ativo principal.

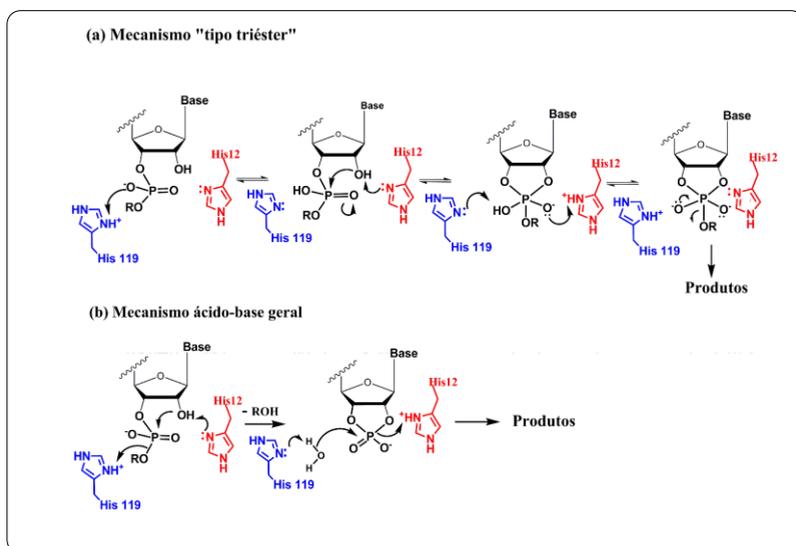
O mecanismo de catálise dessa enzima vem sendo evidenciado por diversos estudos, e depende principalmente de dois grupos imidazóis existentes nos resíduos de aminoácidos localizados no seu sítio ativo. Sendo que duas hipóteses já foram reportadas na literatura para tal catálise Esquema 2.

O primeiro mecanismo Esquema 2a envolve a formação de um intermediário pentacoordenado, mecanismo tipo 'triéster' (ANSLYN e BRESLOW, 1989). Nesse mecanismo, a His 119 atua como catalisador ácido geral e a His 12 como base geral. Na etapa subsequente, de quebra da ligação, ocorre uma mudança na função catalítica das histidinas, ou seja, a Hist 119 ativa o ataque da água por meio de uma catálise básica geral e a His 12 atua como ácido geral protonando e favorecendo a saída do grupo abandonador.

Enquanto que no segundo mecanismo, tipo catálise ácido-base geral Esquema 2b, as histidinas atuam da mesma forma. Porém, a histidina ativa uma molécula de água do meio para promover a hidrólise sem passar pela formação do intermediário pentacoordenado (KIRBY e MARRIOTT, 2002).

Sabe-se que os estudos científicos são contínuos a respeito desses mecanismos, consequentemente os autores traçam algumas evidências experimentais sobre estes dois plausíveis mecanismos enzimáticos. A proposta do mecanismo tipo triéster é baseada em dados cristalográficos, uma vez que ilustra a direção e os ângulos dos resíduos de histidina no sítio ativo, enquanto o mecanismo ácido-base geral pode ser avaliado por estudos cinéticos de efeito isotópico. Segundo essa análise, os efeitos causados na constante de velocidade da reação pela quebra da ligação com o  $^{18}\text{O}$  mostrou-se inconsistentes com o mecanismo tipo triéster (SOWA e HENGGELELAND, 1997).

Esquema 2 – Mecanismos propostos para a atuação do sítio ativo da enzima RNase A.



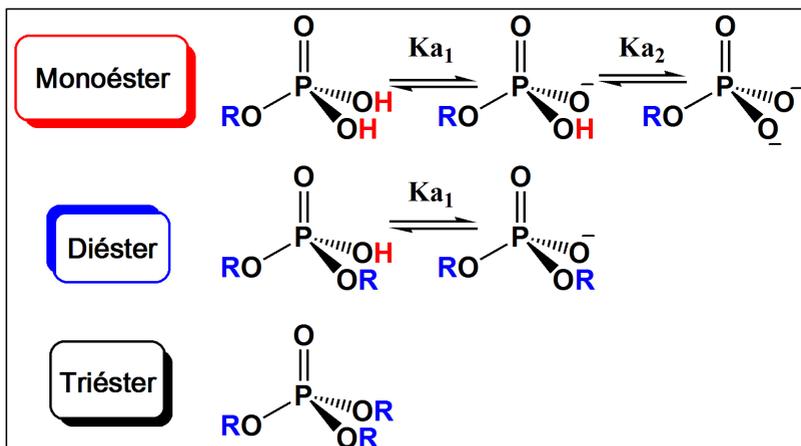
Fonte: desenvolvida pela autora.

A título de exemplo alguns autores descreveram um modelo mimético proposto para o mecanismo da RNase A que envolve o estudo de grupos imidazóis ancorados na  $\beta$ -ciclodextrina, o qual será discutido na seção 1.4.2.1.

### 1.3 REAÇÕES DE DESFOSFORILAÇÃO

Os ésteres de fosfato possuem fórmula molecular  $(RO)_3P=O$  e são classificados em três categorias distintas: (1) monoésteres; (2) diésteres; e (3) triésteres, de acordo com o número de grupos alquila e/ou arilas (grupos R) que substituem os hidróxidos do ácido fosfórico (Figura 3). Além disso, destacam-se os monoésteres e diésteres, por conter grupos hidroxilas que conferem diferentes reatividades em função do pH.

Figura 3 – Classificação das estruturas gerais de ésteres de fosfato.



Fonte: desenvolvida pela autora.

O primeiro  $pK_a$  para a dissociação ácida dos mono- e diésteres de fosfato está entre 1 e 2, enquanto que o segundo  $pK_a$  de monoésteres alquílicos é de aproximadamente 7. Quando desprotonados, os ésteres de fosfatos estão menos propícios a ataques nucleofílicos no átomo de fósforo, uma vez que existe repulsão entre as cargas negativas. No

entanto, em soluções suficientemente ácidas ( $\text{pH} < \text{pK}_a$ ), a carga negativa é parcialmente neutralizada, ocorrendo uma diminuição na densidade eletrônica no sítio eletrofílico, aumentando a reatividade para o ataque do nucleófilo (BENTLEY, 1949).

Sob o ponto de vista biológico, ressalta-se que os ésteres de fosfato estejam presentes em funções essenciais tais como: no armazenamento e transmissão da informação genética (DNA e RNA), nos processos de sinalização e regulação da atividade celular (WESTHEIMER, 1987), e no fornecimento de uma elevada quantidade de energia através de anidridos fosfóricos, como o ATP (MACHADO e NOME, 1999).

Por essas razões, o contexto biológico está diretamente associado com o contexto químico. E a importância dos ésteres de fosfato está inerentemente relacionada à alta estabilidade da ligação P-O. De acordo com resultados de Kirby e colaboradores, o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) calculado para a hidrólise espontânea do difenilfosfato é de 180 anos a  $100^\circ \text{C}$  (KIRBY e YOUNAS, 1970). Dessa maneira, com a utilização dessas ligações para formar os fosfodiésteres DNA e RNA, a natureza pode assegurar a perpetuação dos seres vivos, através da preservação e transmissão da informação genética por um longo período.

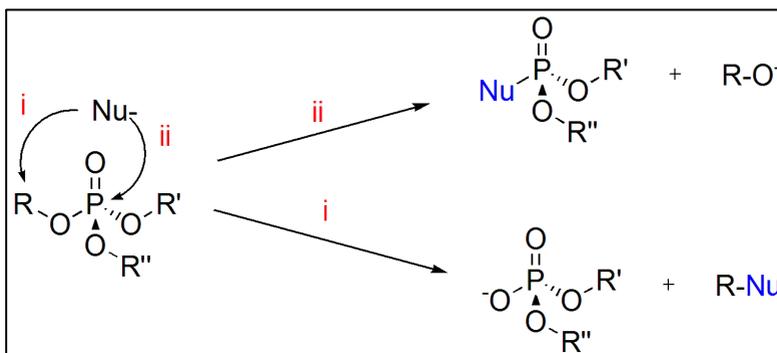
A fim de se obter uma melhor compreensão dos mecanismos das reações de desfosforilação em sistemas biológicos, é importante pesquisar, analisar e compreendê-las em água (hidrólise) e na presença de diferentes nucleófilos. Bem como estudar as diferentes formas de catálise inter e intramolecular com grupos ácidos e básicos, em sistemas moleculares simples e mais complexos, como os supramoleculares.

### 1.3.1 Mecanismos de hidrólise em ésteres de fosfato

As reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato podem ocorrer por dois caminhos 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 devido ao ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo central. Em geral, as reações que seguem o mecanismo (i) são favorecidas em meio ácido, já aquelas que seguem o mecanismo (ii) ocorrem preferencialmente em meio alcalino (COX e RAMSAY, 1964; DOMINGOS, LONGHINOTTI, MACHADO et al., 2003).

Esses mecanismos são facilmente distinguidos através de experimentos de marcação isotópica, utilizando  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  para a hidrólise do éster. Neste caso, observa-se a formação dos produtos com  $^{18}\text{O}$ , e por consequência, os produtos formados indicam onde houve a quebra da ligação (COX e RAMSAY, 1964).

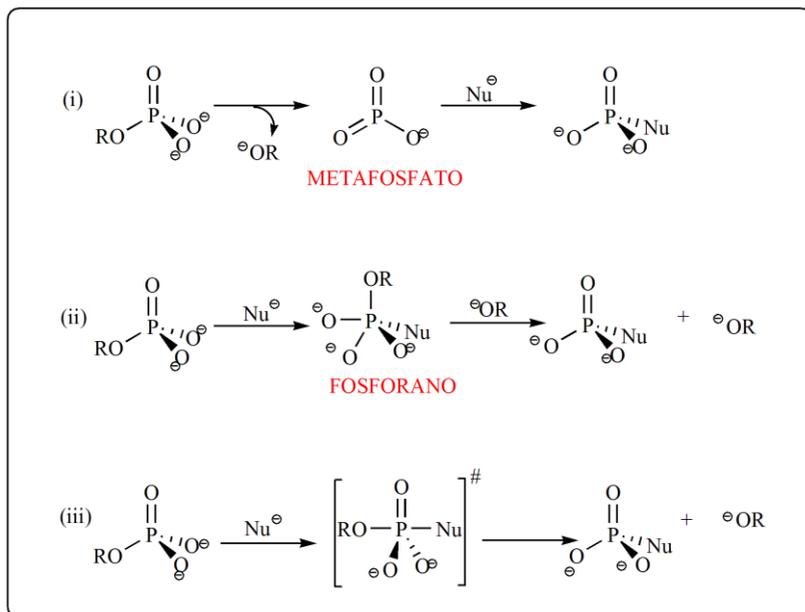
Esquema 3 – Esquema de reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.



Fonte: desenvolvida pela autora.

O mecanismo da reação via quebra da ligação P-O pode ocorrer por três caminhos distintos: dissociativo, associativo e concertado Esquema 4. O mecanismo (i) dissociativo ( $D_N + A_N$ ) ocorre em duas etapas, inicialmente, a etapa mais lenta, com a dissociação do substrato e a formação do íon metafosfato, seguido de um ataque nucleofílico sobre esse íon formado. No caso do mecanismo (ii) associativo ( $A_N + D_N$ ), a reação ocorre com ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico (adição), levando à formação de um intermediário pentacoordenado e, na segunda etapa acontece à quebra da ligação com a eliminação do grupo de saída (eliminação). Por fim, o mecanismo (iii) concertado ( $A_N D_N$ ), no qual não há formação de intermediário, a reação passa por um estado de transição que pode ter um caráter mais próximo do mecanismo associativo ou dissociativo. Ou seja, refere-se à sincronicidade entre a ligação formada com o nucleófilo e a ligação quebrada com o grupo de saída.

Esquema 4 – Representação dos mecanismos associativo, concertado e dissociativo para a substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.



Fonte: desenvolvida pela autora.

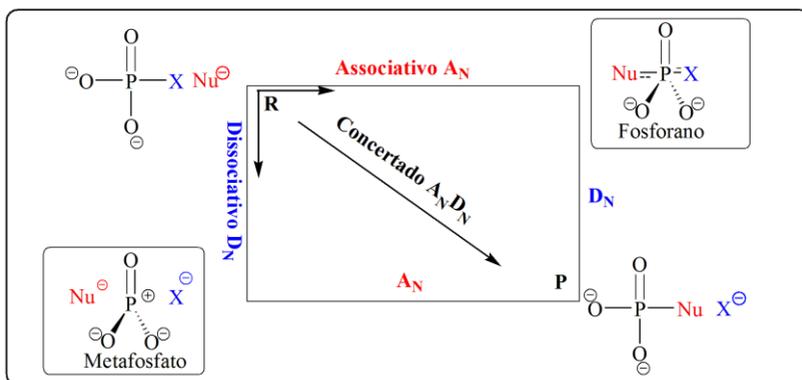
Os mecanismos descritos anteriormente podem ser sumarizados em um diagrama de More O’Ferrall-Jencks, Figura 4, onde o vértice superior esquerdo representa os reagentes (R), o vértice inferior direito, os produtos (P), e as arestas correspondem aos processos de formação e quebra de ligação. Os intermediários metafosfato e fosforano estão localizados nos demais vértices do diagrama.

Assim, o mecanismo associativo é representado pelo caminho que percorre as arestas do diagrama passando pelo vértice em ( $A_N$ ). O mecanismo dissociativo é descrito pelo caminho que passa pelo vértice em ( $D_N$ ). O caminho diagonal ( $A_N D_N$ ) representa o mecanismo

concertado, em que formação e quebra de ligação são sincrônicos, sem que haja formação de intermediários e, portanto, não alcança nenhum vértice.

O diagrama pode ilustrar ainda outros mecanismos possíveis que não passam por intermediários. E a formação do estado de transição irá depender do grau de sincronicidade da ligação formada ou quebrada. Esses caminhos seriam designados como concertado de caráter associativo (mecanismo que ocorre entre a coordenada de reação do mecanismo associativo e do concertado), onde o estado de transição se aproxima aos reagentes, ou seja, há um maior grau de ligação com o grupo de saída. E o caminho concertado de caráter dissociativo, o qual o estado de transição se aproxima do produto, ou seja, com maior ligação com o nucleófilo (DOMINGOS, LONGHINOTTI, MACHADO et al., 2003).

Figura 4 – Diagrama de More O'Ferrall-Jencks de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila.



Fonte: desenvolvida pela autora.

Na realidade, observam-se diversas possibilidades mecánísticas em reações de desfosforilação. Em geral, não existe uma rota preferencial a ser seguida, isto depende de vários fatores, tais como nucleofilicidade do grupo que ataca, impedimentos eletrostáticos e estéreos,  $pK_a$  e estabilidade do grupo de saída, pH do meio, e por fim a reatividade do substrato. Por isso não é possível estabelecer um padrão rigoroso de reatividade de ésteres de fosfato frente às reações de substituição nucleofílica.

Ainda assim, observa-se uma tendência, em que os monoésteres de fosfato reagem via mecanismos concertados de caráter dissociativo (KIRBY e VARVOGLIS, 1967), ao passo que diésteres de fosfato mostram uma preferência por caminhos concertados de caráter associativo (KIRBY e YOUNAS, 1970).

### **1.3.2 Reações inter e intramolecular envolvendo catálise em ésteres de fosfato**

As reações inter e intramolecular surgem como uma alternativa de reações modelos simples para auxiliar na elucidação de mecanismos biológicos enzimáticos, e em reações de desfosforilação.

A principal distinção entre as reações inter e intra está na localização dos grupos funcionais reativos. Dessa forma as reações intramoleculares descrevem processos de transferência (de átomos, grupos, elétrons, etc.) ou interações entre diferentes partes dentro da mesma entidade molecular.

A eficiência catalítica nas reações intramoleculares é maior que nas reações intermoleculares, devido considerar fatores como ângulo,

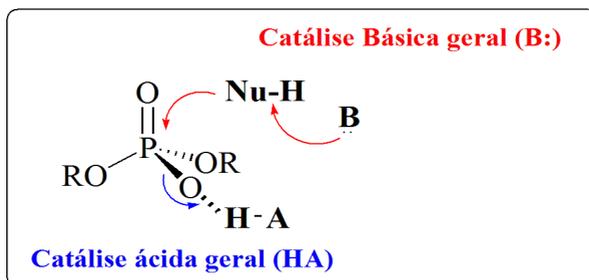
entropia e proximidade conforme a teoria espaço-temporal de Menger. Ela ainda por ser medida por meio da molaridade efetiva do grupo catalítico.

A Molaridade Efetiva do grupo catalítico ( $ME = k_{1(\text{intra})} / k_{2(\text{inter})}$ ), corresponde à razão da constante de velocidade de primeira ordem para a reação intramolecular ( $k_{1(\text{intra})}$ ) e a constante de velocidade de segunda ordem para a reação intermolecular ( $k_{2(\text{inter})}$ ). Ambas as reações devem proceder pelo mesmo mecanismo e condições experimentais. A ME expressa em mol L<sup>-1</sup> é definida como a concentração do grupo catalítico (nucleófilo ou eletrófilo) necessária no processo intermolecular para igualar a constante de velocidade da reação intramolecular (GESSER, YUNES, CLEMENTIN et al., 1997).

#### 1.3.2.1 Catálise ácida-básica geral

A hidrólise de ésteres admite catálise por ácidos e por bases, como mostra o Esquema 5. Tanto na catálise ácida quanto na básica geral ocorre um incremento nas constantes de velocidades das reações de desfosforilação. Na catálise básica-geral, uma base (B:) assiste o ataque de um nucleófilo (Nu-H) sobre o fósforo, abstraindo um próton e assim, aumenta sua nucleofilicidade. Enquanto que na catálise ácida-geral, uma espécie ácida (HA) ativa o grupo de saída transferindo um próton, tornando-o um melhor grupo abandonador.

Esquema 5 – Catálise ácida e básica geral em reações de desfosforilação.



Fonte: desenvolvida pela autora.

A catálise básica geral pode ocorrer em reações intermoleculares, tal como observado nas reações de hidrólise dos diésteres e triésteres de diaril fosfatos (KHAN e KIRBY, 1970; KIRBY e YOUNAS, 1970).

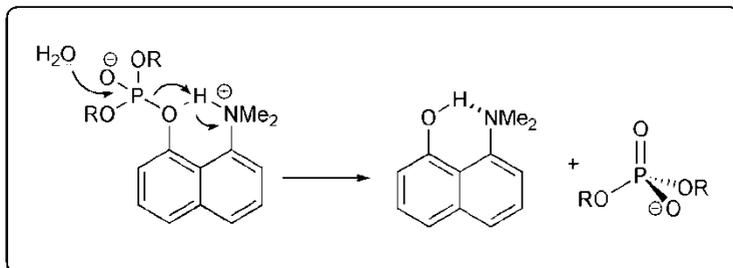
Contudo, os exemplos mais pertinentes reportados na literatura de catálise ácido-básica geral estão baseados principalmente nas reações intramoleculares, resultante da proximidade dos grupos reativos (ABELL e KIRBY, 1983).

Entre tantos artigos envolvendo reações de desfosforilação em catálise, destaca-se o trabalho desenvolvido por Kirby e colaboradores, o qual promoveu a catálise ácida de derivados de fosfato 8-dimetilamino naftila Esquema 6. O destaque deve-se porque os autores obtiveram um dos mais pronunciados efeitos catalíticos já reportados na literatura para modelos de catálise ácida intramolecular, devido principalmente a formação da ligação de hidrogênio.

De acordo com o artigo, a interação da ligação de hidrogênio entre o grupo vizinho  $\text{NH}^+$  e o grupo de saída, facilitou a saída do fosfato, provocando incrementos na velocidade da reação de até  $10^6$

vezes, quando comparada com a reação ausente de catalisador (KIRBY, LIMA, DA SILVA et al., 2006).

Esquema 6 – Mecanismo de catálise ácida geral do fosfato de 8-dimetil amino naftila.



Fonte: desenvolvida pela autora.

### 1.3.2.2 Catálise Nucleofílica

Já a catálise nucleofílica é definida como uma reação na qual o nucleófilo reage muito mais rapidamente que qualquer outra espécie, ligando-se covalentemente com um dos reagentes, gerando assim um intermediário reativo e ao final da reação o catalisador é regenerado.

Inúmeros artigos descrevem reações intra- e intermolecular de ésteres de fosfato com diferentes nucleófilos, destaca-se para nucleófilos de aminas. Contudo, deve-se esclarecer que existe uma grande dificuldade em compreender e principalmente diferenciar estes mecanismos reacionais em razão da complexidade de detectar e analisar os intermediários formados, que muitas vezes são instáveis durante o progresso da reação.

Atualmente existem alternativas e técnicas experimentais para buscar diferenciar esses mecanismos, tais como a determinação dos

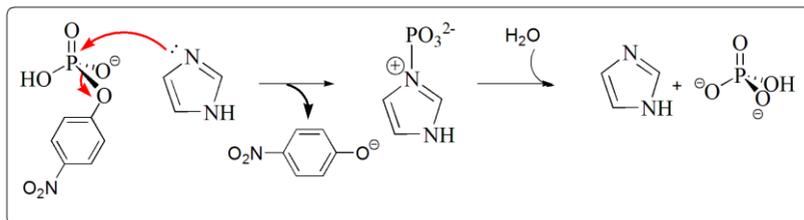
efeitos isotópicos, a análise do gráfico de Brønsted e ainda a captura de intermediários.

Um exemplo de catálise nucleofílica foi reportado em 1999, onde Suzanne e Daniel realizaram um estudo comparativo entre nucleófilos de nitrogênio e de oxigênio, utilizando reações modelo. Ou melhor, utilizou o diânion do fosfato de *p*-nitro fenila como molécula modelo do ATP, na presença de nucleófilos de nitrogênio (ADMIRAAL e HERSCHLAG, 1999). Esses experimentos sugeriram que a hidrólise do ATP pode ser acelerada utilizando uma amina nucleofílica. Em geral, as reações com aminas são de 30 a 100 vezes mais rápidas do que as reações com nucleófilos de oxigênio em temperatura fisiológica (37°C).

Ainda tais estudos auxiliaram na comprovação consistente em que há participação do grupo imidazol, presente no resíduo histidina, na transferência do grupo fosforila em sistemas biológicos. A catálise do substrato por imidazol ocorre 200 vezes mais rápido que a reação não catalisada Esquema 7 e procede com ataque do imidazol no átomo de fósforo, seguido da hidrólise do fosforilimidazol.

Entretanto, vale destacar que a hidrólise do diânion de fosfato de *p*-nitrofenila catalisada por diferentes nucleófilos já tinha sido reportada por Kirby em 1965 (KIRBY e JENCKS, 1965).

Esquema 7 – Mecanismo de catálise do diânion do fosfato de *p*-nitro fenila na presença de imidazol.

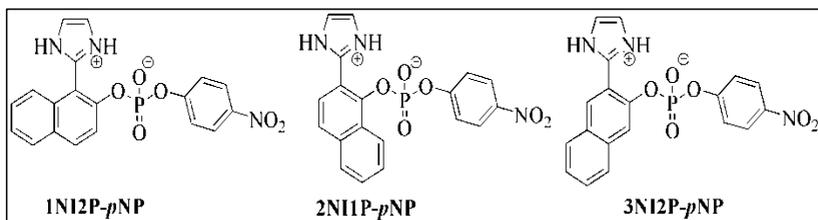


Fonte: desenvolvida pela autora.

### 1.3.3 Reações de desfosforilação Inter e Intramolecular envolvendo Catálise promovida por grupos imidazois.

Recentemente, Mozart e colaboradores (PEREIRA, MURTA, OLIVEIRA et al., 2016) estudaram reações envolvendo isômeros constitucionais de diésteres de fosfato, estruturas representadas na Figura 5. Inicialmente avaliaram a influência e a proximidade do imidazol na catálise nucleofílica intramolecular e por seguinte analisaram a reação de hidrólise desses substratos.

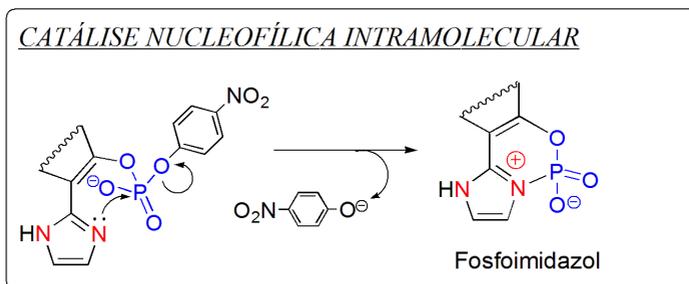
Figura 5 – Estruturas dos diésteres de fosfato derivados do naftol.



Fonte: desenvolvida pela autora.

Dessa forma, através de evidências obtidas por RMN e espectrometria de massas, os autores puderam observar a formação de um intermediário fosfoimidazol, obtido pelo ataque nucleofílico do grupo imidazol sobre o átomo de fósforo Esquema 8. Ainda, no trabalho foram realizados estudos cinéticos, efeitos isotópicos, e cálculos computacionais, que comprovaram o tipo de catálise envolvida no sistema reacional.

Esquema 8 – Mecanismo nucleofílico intramolecular para a geração do fosfoimidazol.



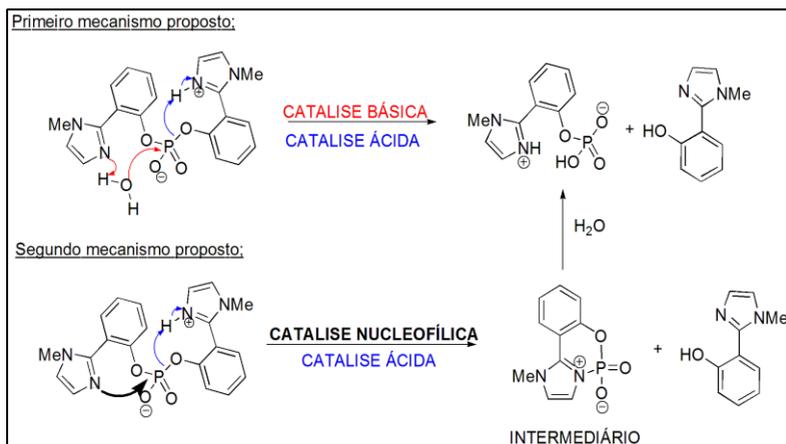
Fonte: desenvolvida pela autora.

Um dos estudos primordiais da mimetização da enzima fosfolipase D (ORTH, BRANDAO, SOUZA et al., 2010), ou ainda das ribonucleases A (ORTH, BRANDÃO, MILAGRE et al., 2008), foi descrito por Orth e colaboradores que investigaram a reação intramolecular do diéster de fosfato BMIPP (bis(2-(1-metil-1H-imidazolil)-fenil) fosfato). O BMIPP destaca-se por apresentar dois grupos imidazois, conferindo a este composto a capacidade de atuar como diferentes catalisadores, ácido, básico ou ainda nucleofílico.

Conforme os dados obtidos por estudos teóricos, cinéticos e espectrometria de massas, os autores elucidaram que a reação podia proceder via dois mecanismos cineticamente equivalentes Esquema 9. O primeiro mecanismo proposto seria a catálise ácida geral intramolecular (representado pelas setas curvas azuis no Esquema 9) seguido de uma catálise básica-geral intramolecular (representado pelas setas curvas vermelhas), como ocorre em um mecanismo de uma enzima ribonuclease A.

Já o segundo, ocorre através uma catálise nucleofílica intramolecular (representado pela seta curva preta), assistida por catálise ácida geral intramolecular (representado pelas setas curvas azuis), como acontece na família das fosfolipases D.

Esquema 9 – Mecanismos propostos para a hidrólise do BMIPP.



Fonte: desenvolvida pela autora.

Como exemplo de catálise intermolecular, pode-se citar o estudo das reações do imidazol IMZ com uma classe de ésteres de fosfatos derivados do 2,4-dinitrofenol, o monoéster DNPP, os diésteres BDNPP e EDNPP e o triéster DEDNPP. Durante os estudos, foi observada a formação de intermediários fosforilados, relativamente estáveis, detectados por espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (RMN). De acordo com as evidências cinéticas, as reações com diésteres e triéster de fosfatos derivados do 2,4-dinitrofenol (EDNPP e DEDNPP) catalisadas por imidazol em meio aquoso acontecem *via* catálise nucleofílica, sendo o imidazol regenerado após ataque exclusivo ao átomo de fósforo. Ao passo que na hidrólise do monoéster, acontece *via* catálise básica geral, ou seja, o imidazol não atua como nucleófilo e sim como uma base geral (ORTH, WANDERLIND, MEDEIROS et al., 2011).

## 1.4 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

As interações moleculares são o fundamento de processos muito específicos de reconhecimento, reação, transporte e regulação que ocorrem na biologia. Citam-se como exemplos, a ligação de um substrato a uma proteína receptora, as reações enzimáticas, a associação imunológica antígeno-anticorpo, a leitura, a tradução e a transcrição intermoleculares do código genético, a entrada de um vírus em uma célula, a indução de sinais pelos neurotransmissores, o reconhecimento celular e assim por diante (LEHNINGER e NELSONCOX, 2000).

A concepção de sistemas miméticos requer projetar estruturas com propriedades energéticas, estereoquímicas e sob atuação de forças intermoleculares não covalentes adequado ao sistema mimetizado. Ao fazer isso o químico ganha inspiração na essência dos processos biológicos e encorajamento na demonstração de tais eficiências, tais seletividades e tais velocidades que podem ser alcançadas.

A química supramolecular é um domínio científico interdisciplinar que cobre as características químicas, físicas e biológicas de substâncias de maior complexidade, ligadas entre si e organizadas por interações intermoleculares. Essa área é relativamente nova no sentido de ser não totalmente compreendida. As suas raízes mergulham na química orgânica e nos procedimentos sintéticos, na química de coordenação e nos complexos metal-ligante, na físico-química e no estudo experimental e teórico de interações, na bioquímica e nos processos biológicos que são fundamentados no reconhecimento molecular (LEHN, 1993).

Em muitos campos da ciência, a novidade está relacionada ao passado, mas a questão é onde se encontram as raízes da química

supramolecular. Os químicos por muito tempo tentaram entender a natureza em nível puramente molecular, considerando apenas estruturas e ligações covalentes fortes. Contudo, quando Emil Fischer em 1894, sugeriu novos mecanismos em processos biológicos através do modelo “chave fechadura”, entre as enzimas e os substratos, ele estava efetivamente propondo que as estruturas químicas formadas são agregados mantidos por interações secundárias e não somente ligações covalentes.

O modelo “chave-fechadura” descrito por Fischer levou a uma nova direção nos estudos químicos das moléculas, que culminaram com o estabelecimento de dois princípios fundamentais da química supramolecular: (i) reconhecimento molecular e, (ii) função molecular. A partir de então a química supramolecular, designada por Lehn, pode ser definida como “a química além das moléculas,” e descreve um estudo de sistemas que contêm mais que uma molécula e tem como principal foco de estudo entender a estrutura, função e propriedades destes conjuntos. Contudo, o conceito e o termo de química supramolecular foram introduzidos somente em 1978 com o desenvolvimento e generalização de trabalhos anteriores (LEHN, 1988).

Nesta área de pesquisa, um dos desafios mais importantes para os químicos foi à concepção e a síntese de receptores moleculares, que podem de alguma forma mimetizar os naturais, as enzimas, através de um conjunto de interações fracas. O precursor destas moléculas que mimetizam os sistemas naturais foi a descoberta das ciclodextrinas, as quais foram observadas pela primeira vez por Villiersem 1891, no entanto sua descrição, preparação e isolamento deve-se a Schardinger (SZEJTLI, 1998).

Atualmente, tem-se desenvolvido numerosos tipos macrocíclicos sintéticos, contendo vários grupos orgânicos e funções polares, que complexa substratos orgânicos com ou sem carga. A sinergia dos efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos pode ocorrer em receptores anfífilos que combinam seus sítios polares carregados aos resíduos orgânicos dos substratos, protegendo os sítios polares da solvatação e aumentando as forças eletrostáticas.

Embora os resultados obtidos descrevam uma “simples ligação,” mais do que um reconhecimento, forneceram um grande número de dados que tornou possível as análises das características básicas da complexação molecular e das propriedades dos fragmentos estruturais a serem usados na concepção de receptores (YU e JIEHUANG, 2015).

As espécies supramoleculares são caracterizadas simultaneamente pelo arranjo espacial dos seus componentes e pela natureza das ligações intermoleculares que os unem. Elas possuem propriedades estruturais, conformacionais, termodinâmicas, cinéticas e dinâmicas bem definidas. Pode-se distinguir vários tipos de interações que apresentam diferentes intensidades, dependências da distância e dos ângulos; forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, atrações iônicas e polares, interações de Van der Waals e interações hidrofílicas-hidrofóbicas.

Contudo, as forças intermoleculares são em geral mais fracas que as ligações covalentes, de tal modo que as os compostos supramoleculares são termodinamicamente menos estáveis, cineticamente mais lábeis, e dinamicamente mais flexíveis que as moléculas.

As estruturas supramoleculares são compostas pela repetição de unidades pequenas formando sistemas auto-organizados de maior complexidade que exibem propriedades interessantes para a investigação de fenômenos biológicos.

Em geral, as unidades básicas são conectadas de tal forma que podem gerar cavidades nas quais provêm ambientes micro-heterogêneos com características diferenciadas e favoráveis para o alojamento e transformação química de moléculas pequenas.

Neste contexto, uma série de exemplos de sucesso tem sido relatada na literatura, dentre eles, éteres coroa (GOKEL e LEEVYWEBER, 2004), as ciclodextrinas (MALENKOVSKAYA e VASYANINAGRACHEV, 2015), cucurbiturilas (BHASIKUTTAN e PALMOHANTY, 2011), calixarenos (KIM, LEE, MUTIHAC et al., 2012) e, mais recentemente, pilararenos (OGOSHI, SHIGA, HASHIZUME et al., 2011).

Com base no que foi exposto, podemos verificar que existem inúmeras possibilidades de atuação da Química Supramolecular, e está de acordo com os interesses da química em nível molecular. Em particular no entendimento detalhado de fenômenos interfaciais largamente presentes em sistemas biológicos, que incluem a mimetização de elementos importantes de reconhecimento molecular e de sistemas enzimáticos eficientes, juntamente com as reações de desfosforilação.

## 1.4.1 Reconhecimento e Estrutura molecular

### 1.4.1.1 Reconhecimento supramolecular

Define-se reconhecimento molecular como a energia e a informação envolvida na ligação e seleção de um substrato por uma dada molécula receptora. É importante ressaltar que o reconhecimento não consiste numa mera ligação, e sim num conjunto de interações intermoleculares bem definidas. As ligações formam um complexo caracterizado pela sua estabilidade (termodinâmica e cinética) e seletividade (LEHN, 1988).

Assim, o reconhecimento molecular implica no armazenamento e na leitura da informação molecular. Essa informação é armazenada na estrutura do receptor e nos seus sítios ativos de ligação, onde pode ser lida a velocidade de formação e dissociação do complexo. Então podemos dizer que o receptor é caracterizado pela sua estrutura, ou melhor seu tamanho, dimensionalidade, conectividade, conformação, quiralidade e sua dinâmica, mas também através dos sítios de ligação, onde são identificadas as propriedades eletrônicas como carga, polaridade, polarizabilidade, atração e repulsão de van der Waals etc..

Os receptores moleculares são definidos como estruturas orgânicas, que são capazes de se ligar seletivamente a diferentes tipos de substratos através de ligações intermoleculares, levando a associação de duas ou mais supermolécula, isto é, são moléculas hospedeiras. A concepção de receptores é a expressão de princípios do reconhecimento molecular numa molécula orgânica.

Um bom reconhecimento por parte de uma molécula receptora em relação ao substrato envolvem alguns fatores fundamentais como,

complementaridade estereoquímica, isto é, forma e tamanho; complementaridade de interação, ou seja, a presença de sítios ativos de ligação complementares (forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio e van der Waals) na disposição correta entre receptor e substrato. Além de extensas áreas de contato entre ambos, múltiplos sítios de interação, uma vez que, ligações não covalentes são fracas quando comparadas com as covalentes, ligação global forte e ainda deve-se considerar os efeitos do meio (LEHN, 1990).

É sabido que um complexo é definido pelas suas características geométricas, termodinâmicas (estabilidade, entalpia e entropia de formação) e cinéticas (velocidade de formação e de dissociação), formando assim um agregado com características espectroscópicas, fotoquímicas e fotofísicas distintas e bem estabelecidas..

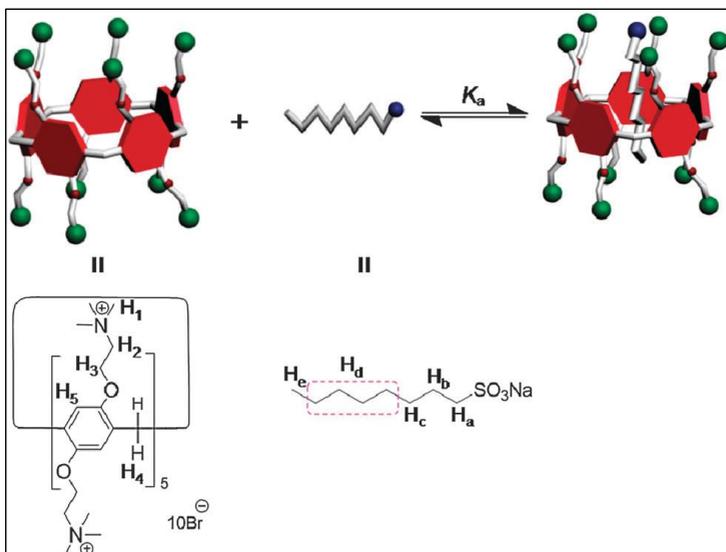
Para determinar essas propriedades, os químicos estão se concentrando no desenvolvimento de experimentos para quantificar as origens dessas interações não covalentes, através da utilização de técnicas como espectroscopia de RMN, espectroscopia Raman, calorimetria de titulação isotérmica, tensão superficial e UV-Vis. Onde os dados experimentais obtidos são quantificados e explicados por meio de análise de constantes de ligação ( $Ka$ ), energia livre Gibbs ( $\Delta G_o$ ), entalpia ( $\Delta H_o$ ) e entropia ( $\Delta S_o$ ) (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006; THORDARSON, 2011).

Dentro das técnicas citadas acima, destaca-se a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que além de ser um dos métodos espectroscópicos mais utilizados na síntese orgânica, atualmente tornou-se uma ferramenta de fundamental importância para os estudos na química supramolecular, já que é capaz de elucidar as estruturas dos

agregados formados e ainda propor a estequiometria do complexo formado (PASTOR e MARTÍNEZ-VIVIENTE, 2008).

Em 2011 Ma e colaboradores (MA, JI, XIANG et al., 2011) descreveram a síntese de pilar[5]arenos catiônicos e estudaram o reconhecimento molecular entre o macrociclo e o substrato (1-octanosulfonato de sódio). Através da interpretação e dos ajustes dos dados experimentais obtidos pela técnica de RMN obtiveram informações úteis sobre a constante de formação do receptor-substrato ( $K_a$ ) de  $1,33 \pm 0,94 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  e uma estequiometria de 1:1 Figura 6.

Figura 6 – Representação esquemática da formação do complexo entre Pilar[5]areno e 1-octonosulfonato de sódio.



Fonte: Ma, Ji, Xiang et al. (2011).

Ainda em 2011, Ogoshi e colaboradores (OGOSHI, DEMACHI, KITAJIMA et al., 2011) investigaram a complexação de pilar[5]arenos com *n*-alcanos utilizando a técnica de RMN. Os autores notaram mudanças significativas nos deslocamentos químicos das estruturas estudadas, resultado provocado pela inserção do substrato na cavidade do receptor. Assim, foi possível calcular as constantes de associação para cada complexo formado, juntamente com a estequiometria de complexação. Sendo que, para o *n*-hexano obteve-se uma constante de  $k_1 = 98 \pm 12 \text{ M}^{-1}$ , e para o *n*-octano de  $k_1 = 62 \text{ M}^{-1}$ , e a estequiometria em ambos os casos foi de 1:1.

Atualmente tem sido concebidos e investigados receptores de tipos estruturais extremamente variados. Muitos deles são do tipo macrociclo sintético, que contem vários grupos orgânicos e funções polares, que complexam substratos orgânicos com ou sem carga. Em função do objetivo deste trabalho descreveremos as propriedades químicas, algumas características e aplicações dos pilararenos.

#### 1.4.1.2 Pilararenos

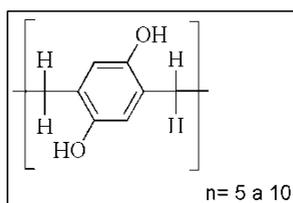
Os pilararenos descritos em 2008 por Ogoshi e colaboradores (OGOSHI, KANAI, FUJINAMI et al., 2008) são uma nova classe de macrociclos derivados dos paraciclofanos, formados a partir de 5 a 10 anéis de hidroquinonas ligadas por pontes de metileno na posição *para*, Figura 7.

Devido às suas principais aplicações no reconhecimento molecular, síntese e estabilização de nanopartículas (MONTES-GARCÍA, FERNÁNDEZ-LÓPEZ, GÓMEZ et al., 2014), síntese de

líquidos iônicos (OGOSHI, UESHIMA, YAMAGISHI et al., 2012), aplicações biomédicas (SI, CHEN, HU et al., 2011; YU, ZHOU, ZHANG et al., 2012), e em sensores fluorescentes, atuam na interface de várias áreas de pesquisa.

Suas propriedades físico-químicas, como sua estrutura peculiar, atenderam ao interesse dos químicos, uma vez que, diferentemente de outros macrociclos tradicionais, são altamente simétricos e rígidos, resultando em maior seletividade na complexação de moléculas, melhor dizendo, um seletivo reconhecimento molecular. Ainda, são facilmente funcionalizados e capazes de apresentar diferentes características com relação à solubilidade em água e em solventes orgânicos (OGOSHI e YAMAGISHI, 2013).

Figura 7 – Representação estrutural do Pilar[n]areno.

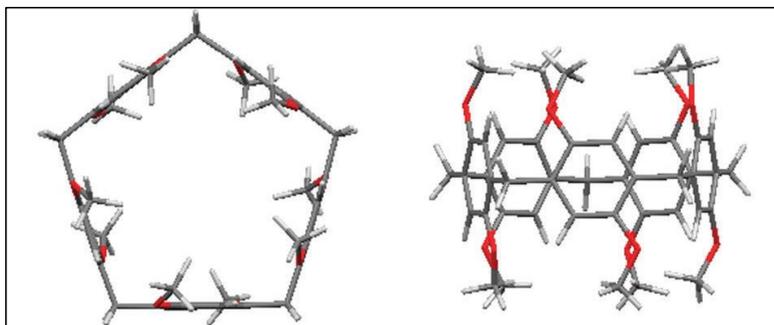


Fonte: desenvolvida pela autora.

Convém notar que diversos artigos descrevem a síntese e o isolamento dos pilararenos como ciclo pentâmeros, com bons a excelentes rendimentos. Contudo, quando se trata de pilararenos maiores, exige-se uma síntese mais elaborada, portanto os rendimentos reacionais geralmente são menores. Por exemplo, em 2009 Cao e colaboradores (CAO, KOU, LIANG et al., 2009) sintetizaram ciclohexâmeros com 8 a 11% de rendimento.

Acredita-se que a diferença nos rendimentos entre os diferentes tamanhos de pilararenos reside na estrutura intrínseca do pilar[5]areno. A evidência cristalográfica mostra que o ângulo médio para a ponte de metileno em dimetoxipilar[5]areno é  $111,3^\circ$ , muito perto do ângulo ideal  $109,5^\circ$  para os carbonos híbridos do tipo  $sp^3$  Figura 8. Semelhantemente, o ciclotetrâmero apresentaria um ângulo de ligação  $Ar-CH_2-Ar$  de  $90^\circ$ , enquanto que o ciclohexâmero seria de  $120^\circ$ . Diante destes fatos, é possível constatar que o ciclopentâmero forma uma estrutura onde há uma menor tensão quando comparada à outros pilararenos resultando no principal produto mediante a reação de macrociclicização (CRAGG e SHARMA, 2012).

Figura 8 – Estrutura de Raio-X do Dimetoxipilar[5]areno.



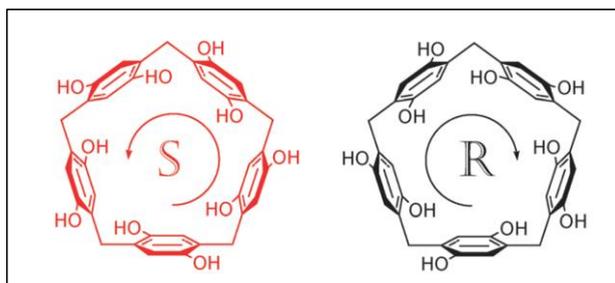
Fonte: Cragg e Sharma (2012).

Outro fator instigante é que, contrariamente ao caso dos calixarenos, que são geralmente preparados por condensação entre compostos fenólicos e paraformaldeído catalisada em meio básico, a síntese de pilararenos requer a presença de um ácido de Lewis como catalisador. No entanto, o uso de ácidos de Lewis inapropriados, tal

como  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{TiCl}_4$  e  $\text{SnCl}_4$  pode resultar no isolamento de produtos indesejados, tal como o dimetoxipilar[5]areno, e uma mistura de polímeros.

Por fim, os pilararenos, mais especificamente os pilar[5]arenos, apresentam duas propriedades geométricas interessantes. A primeira delas seria a presença de substituintes nas posições 1 e 4, que conduzem à dois estereoisômeros planares quirais  $R_p$  e  $S_p$  possíveis, como mostrado na **Figura 9**, que surgem do arranjo espacial dos substituintes fora de plano. A segunda seria a rotação de um ou mais anéis aromáticos, gerando isômeros conformacionais. Assim, é possível prever conformêmeros com todos os anéis na mesma orientação, um anel invertido, dois anéis adjacentes invertidos, e dois anéis não-invertidos adjacentes.

Figura 9 – Estruturas quirais R e S do Pilar[5]areno.



Fonte: Cragg e Sharma (2012).

### 1.4.2 Catálise Supramolecular

Dentro do intuito de buscar catalisadores eficientes para reações de desfosforilação, os macrociclos, como ciclodextrinas, calixarenos e principalmente os pilararenos surgem como uma alternativa para alcançar esse objetivo.

Estas estruturas altamente organizadas formam uma espécie de “microreator”, que pode acelerar significativamente a velocidade de algumas reações ou ainda aumentar consideravelmente o rendimento do produto reacional. Isto porque, devido às suas características químicas, conseguem atrair os substratos por forças intermoleculares e ou eletrostáticas, resultando numa melhor interação e aproximação, demonstrando a eficiência catalítica dos compostos supramoleculares (BIEDERMANN e NAUSCHNEIDER, 2014; RAYNAL, BALLESTER, VIDAL-FERRAN et al., 2014).

O interesse nos estudos da catálise supramolecular é avaliar o quanto a aproximação ou a inserção na cavidade dos reagentes afeta a velocidade da reação estudada. Isto porque o vínculo entre catálise supramolecular e enzimática está baseado na presença de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas nas estruturas supramoleculares, que se beneficiam de efeitos catalíticos regidos por aproximação hidrofóbica e eletrostática.

Modelos enzimáticos baseados em macromoléculas, conhecidos como enzimas artificiais, têm despertado grande interesse por mimetizar aspectos multifuncionais e geométricos das enzimas naturais. Isto porque, a estrutura macromolecular permite ancorar vários grupos reativos, que cooperam com a funcionalidade hidrofóbica e altamente seletiva de suas cavidades.

Dentro deste propósito citarão rapidamente alguns modelos miméticos que serviram de inspiração para o desenvolvimento de novos modelos enzimáticos baseados em macromoléculas nas reações de hidrólise de ésteres de fosfato.

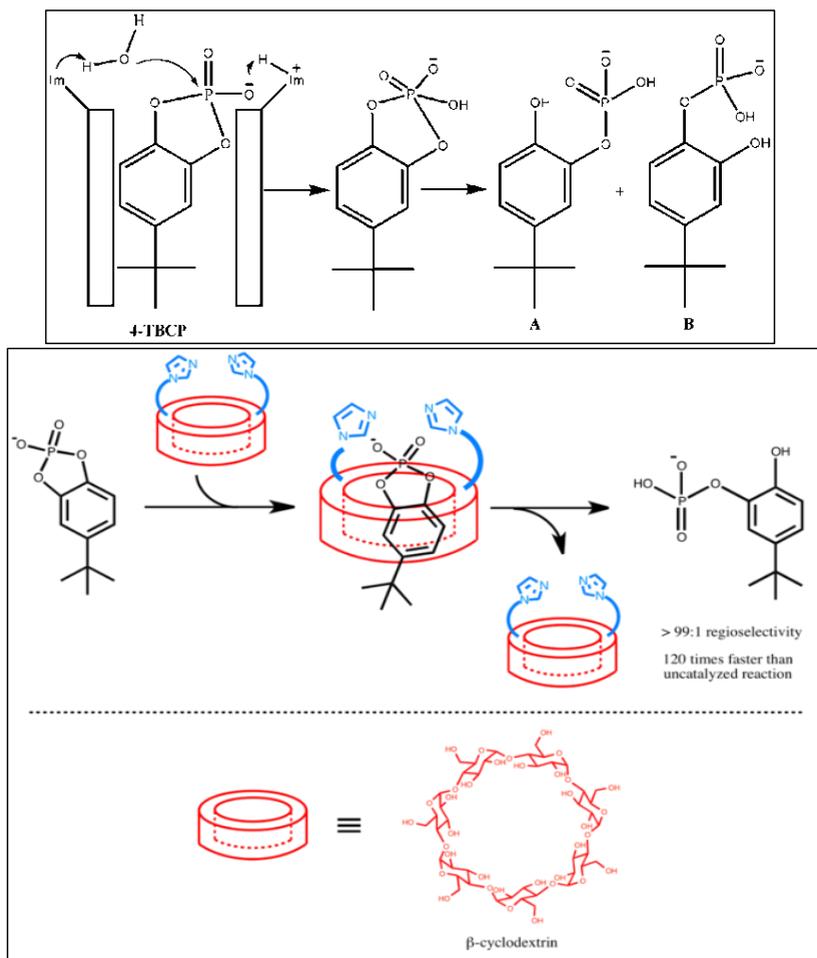
#### 1.4.2.1 Modelos miméticos envolvidos na catálise supramolecular de ésteres de fosfato

Um dos trabalhos pioneiros no desenvolvimento de sistemas miméticos baseados em macromoléculas foi proposto Breslow e colaboradores. Seu trabalho consiste na funcionalização das  $\beta$ -ciclodextrinas, a fim de promover a catálise supramolecular de ésteres de fosfato cíclicos (BRESLOW, DOHERTY, GUILLOT et al., 1978; BRESLOW, 1995).

Os autores adicionaram dois grupos imidazóis na cavidade superior da  $\beta$ -ciclodextrina, originando assim ciclodextrina-bis(imidazol), e então avaliaram a atividade catalítica na hidrólise do fosfato de 4-terc-butilcatecol (4-TBCP). Através de evidências cinéticas a hidrólise do 4-TBCP passaria por um mecanismo de catálise bifuncional ácido-básica geral beneficiada pelos imidazóis ancorados na  $\beta$ -ciclodextrina, tal como ilustrado no Esquema 10.

O autor ainda relata uma eficiência catalítica 120 vezes maior, e seletividade para a formação do produto A quando comparada a ciclodextrina não funcionalizada (BRESLOW e SCHMUCK, 1996).

Esquema 10 – Esquema ilustrativo da catálise supramolecular em ésteres de fosfato envolvendo CDs.

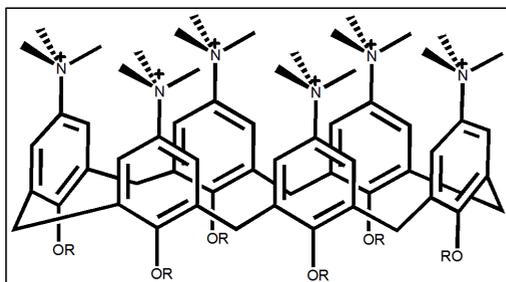


Fonte: Breslow e Schmuck (1996).

Outro exemplo envolvendo catálise supramolecular foi descrito em 1989, por Shinkai e colaboradores (SHINKAI, SHIRAHAMA, TSUBAKI et al., 1989). Autores relataram a utilização de calixarenos catiônicos para promover a hidrólise do diânion do fosfato de 2,4-dinitrofenila (DNPP). Figura 10

Shinkai sugere a inserção do substrato DNPP a cavidade no calix[6]areno provocado pela atração eletrostática entre as cargas negativas do substrato e as cargas positivas do calix[6]areno, resultando em um aumento na constante de velocidade de reação de hidrólise do substrato.

Figura 10 – Estrutura do calix[6]areno catiônico responsável pelo hidrólise do DNPP.



Fonte: desenvolvida pela autora.

Assim com o propósito de situar os leitores foram abordados através das diversas literaturas pertinentes ao assunto uma breve introdução.

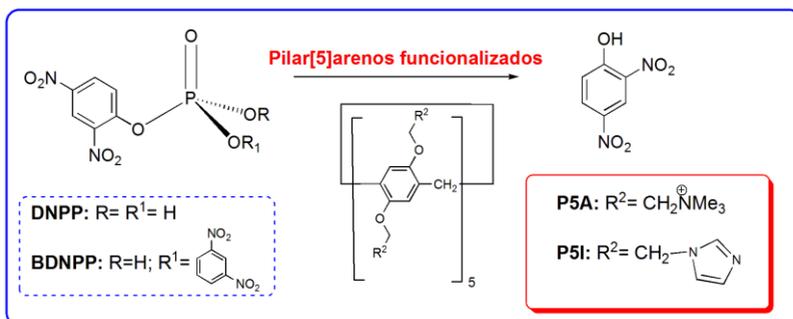
## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e funcionalizar os macrociclos de pilar[5]arenos, verificando em reações de desfosforilação como modelos miméticos enzimáticos.

Desta forma, pretende-se compreender mecanisticamente as reações de hidrólise do monoéster 2,4- dinitrofenil fosfato (DNPP) e do diéster bis (2,4- dinitrofenil) fosfato (BDNPP), bem como estudar as diferentes formas de catálise e as interações químicas que ocorrem nos sistemas supramoleculares de pilar[5]arenos conforme ilustra a Figura 11.

Figura 11 – Representação esquemática do objetivo geral



Fonte: desenvolvida pela autora.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As estratégias para atingir os objetivos deste trabalho estão subdivididas pelos estudos utilizando dois catalisadores supramoleculares: (i) pilar[5]areno catiônico (P5A), e (ii) pilar[5]areno neutro (P5I), e envolveram os seguintes objetivos específicos:

### I. Pilar[5]arenoCatiônico (P5A):

- Sintetizar e caracterizar do Pilar[5]areno catiônico (P5A);
- Estudar os efeitos de concentração do P5A nas constantes de velocidades da reação de hidrólise do DNPP;
- Avaliar o efeito da acidez nas constantes velocidade das reações de desfosforilação do monoéster DNPP;
- Estudar os parâmetros de ativação termodinâmicos da reação de hidrólise de DNPP em presença de e P5A;
- Avaliar o efeito de inclusão do substrato DNPP no P5A através da técnica de RMN;
- Realizar cálculos de dinâmica molecular a fim de se obter informações sobre a inserção, ou ainda, a ligação do DNPP ao P5A.

## II. Pilar[5]areno Neutro (P5I)

- Sintetizar e caracterizar do Pilar[5]areno Neutro (P5I);
- Determinar o perfil de pH das reações de BDNPP com P5I para avaliar o comportamento reacional de diferentes espécies iônicas em solução;
- Estudar os efeitos de concentração do P5I nas constantes de velocidades nas reações com BDNPP;
- Estudar os parâmetros de ativação termodinâmicos da reação de hidrólise do diéster BDNPP em presença de P5I;
- Realização de estudos de efeitos isotópicos de solvente ( $H_2O/D_2O$ ) para avaliar a ocorrência de transferência de prótons até a etapa determinante da velocidade de reação;
- Avaliar o efeito de inclusão do substrato BDNPP no P5I através da técnica de RMN;
- Cinética e Identificação dos principais produtos da reação de BDNPP com P5I pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN  $^1H$  e  $^{31}P$ ).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 EQUIPAMENTOS

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro de 200 MHz Bruker DPX 200 interfaciado com um programa operacional topspin. Para os experimentos de UV-Vis e cinéticas utilizou-se o equipamento da marca Varian modelo Cary 50 acoplado a um banho termostático, interfaciado com o programa CarywinUV. As medidas de pH foram feitas com pHmetro Hanna modelo *pH200* calibrado de acordo com a faixa de leitura desejada com soluções padrões de pH 4,00, 7,00, 10,00 (Synth).

#### 3.2 REAGENTES

Os macrociclos de pilar[5]arenos e os substratos foram sintetizados conforme descrito na sessão 3.3. Para a síntese dessas substâncias utilizou reagentes de qualidade P.A. adquiridos comercialmente (Aldrich, *Synth*, Vetec).

Água deuterada ( $D_2O$ ), metanol deuterado (MeOD), clorofórmio deuterado ( $CDCl_3$ ) da Cambridge Isotope e NaOD (40%) e DCl (37%) da Aldrich foram empregados para as análises de RMN.

Os demais reagentes e solventes utilizados foram adquiridos comercialmente, provenientes da Aldrich, Carlo Erba, Acros e Vetec.

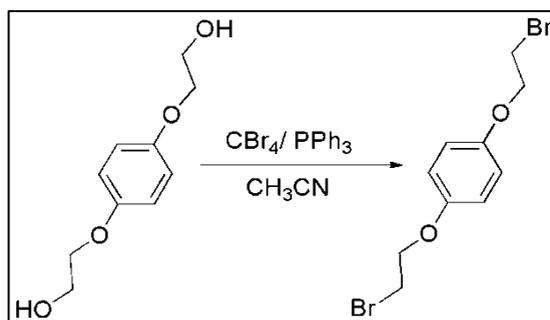
### 3.3 SÍNTESE DOS MACROCILOS DE PILAR[5]ARENOS E DOS SUBSTRATOS

#### 3.3.1 Síntese dos pilar[5]arenos

A seguir estão descritas as sínteses dos macrociclos utilizados nesta tese, o pilar[5]areno catiônico (MA, JI, XIANG et al., 2011) e o pilar[5]areno neutro de Imidazol.

Ao passo que descreveu a síntese, purificação e caracterização com dados de RMN de hidrogênio, carbono e espectrometria de massas de alta resolução detalhadamente do pilar[5]areno-Imidazol por tratar-se de um composto inédito.

Esquema 11 – Rota de síntese para obtenção do 1,4 bis (2-Bromoetoxi) benzeno (1):



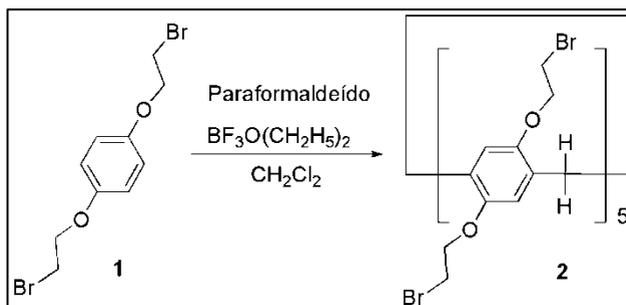
Fonte: desenvolvida pela autora.

**Síntese do 1,4 bis (2-Bromoetoxi) benzeno (1):** Sob atmosfera de argônio, em uma solução de 20 mL de acetonitrila seca contendo 5 mmol de 1,4 bis (2-hidroxietoxi) benzeno, e 12 mmol de trifenilfosfina, adicionou-se lentamente pequenas porções de tetrabrometo de carbono ( $\text{CBr}_4$ ) a  $0^\circ\text{C}$ . Após o período de 4 horas acrescentou 20 mL de água gelada, que resultou na precipitação de um sólido branco. O precipitado foi coletado por filtração e lavado com uma mistura 60:40 de metanol e água e então recristalizado em metanol. O derivado bromado foi obtido com 85% de rendimento.

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  1,57 (s, água de clorofórmio);  $\delta$  3,61 (t, 4H,  $J = 6,3$  Hz,  $\text{CH}_2$ );  $\delta$  4,24 (t, 4H,  $J = 6,3$  Hz,  $\text{CH}_2$ );  $\delta$  6,89 (s, 4H, Ar).

$^{13}\text{CRMN}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 29,4; 68,8; 116,2; 152,9.

Esquema 12 – Rota de síntese para obtenção Pilar[5]areno bromado (2)



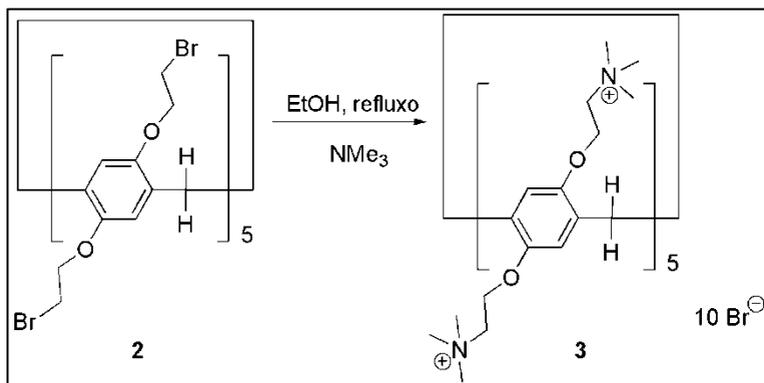
Fonte: desenvolvida pela autora.

**Síntese do Pilar[5]areno bromado (2):** Em uma solução contendo 30 mmol de 1,4 bis (2-Bromoetoxi) benzeno em diclorometano (230 mL) foram adicionados sob atmosfera de argônio, paraformaldeído (30 mmol) e trifluoreto de boro-dietil-eterato (30 mmol). A mistura reacional foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente, onde com o decorrer do tempo tornou-se verde. A mistura foi lavada com água, solução saturada de bicarbonato de sódio e solução saturada de cloreto de sódio. Na sequência, o solvente foi removido e o produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel (27:23 diclorometano:hexano). Rendimento de 70% como um sólido branco.

$^1\text{HRMN}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3,63 (t, 20H,  $J = 4$  Hz);  $\delta$  3,84 (s, 10H);  $\delta$  4,23 (t, 20H,  $J = 2$  Hz);  $\delta$ : 6,91 (s, 10H).

$^{13}\text{C RMN}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ : 29,5; 30,9; 69,1; 116,2; 129,2; 149,8.

Esquema 13 – Rota de síntese para obtenção Pilar[5]areno catiônico P5A:

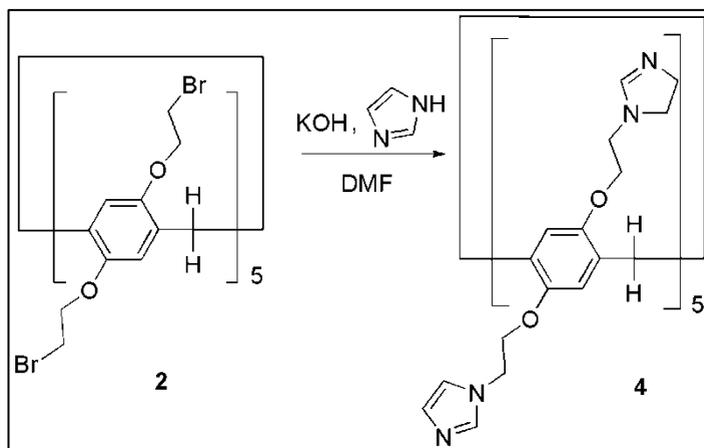


Fonte: desenvolvida pela autora.

**Síntese do Pilar[5]areno catiônico P5A (3):** Em uma solução do composto **2** (1 mmol) solubilizado em etanol (100 mL), foi adicionada trimetilamina (48 mmol). A reação foi mantida por 24h sob refluxo. Após esse período, filtrou-se o produto a vácuo, lavou-se com etanol. Rendimento de 95% como um sólido branco.

$^1\text{H RMN}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  3,3 (s, 90H);  $\delta$  3,8 (sl, 20H);  $\delta$  3,9 (sl, 10H);  $\delta$  4,46 (sl, 20H);  $\delta$  6,9 (sl, 10H).

Esquema 14– Rota de síntese para obtenção Pilar[5]areno Imidazol P5I:



Fonte: desenvolvida pela autora.

**Síntese do Pilar[5]areno-Imidazol P5I (4):** Em um balão reacional foram adicionados KOH (16 mmol), DMF (8,4 mL) e imidazol (4 mmol) e a mistura foi agitada por 30 minutos. Após, adicionou-se uma solução do composto **2** (0,336 mmol) em DMF (8,4 mL). A mistura reacional foi agitada por 24 horas à temperatura ambiente. Adicionou-se água e deixou-se na geladeira por 24 horas. Filtrou-se e secou-se o produto a vácuo. Rendimento de 50% como um sólido amarelo pálido.

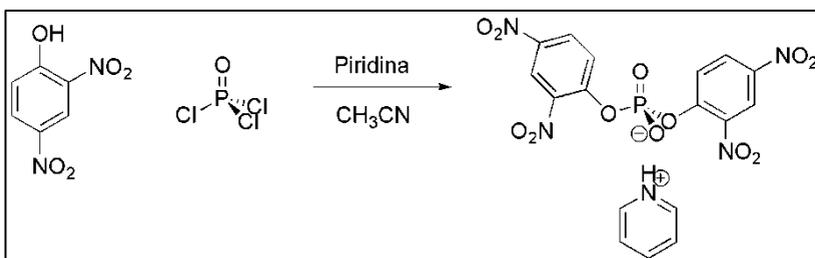
$^1\text{H RMN}$ (200 MHz, MeOD):  $\delta$  3,5 (s, 10H);  $\delta$  3,8 (s, 20H);  $\delta$  4,2 (s, 20H);  $\delta$  6,5 (s, 10H);  $\delta$  7,0 (s, 10H);  $\delta$  7,1 (s, 10H);  $\delta$  7,7 (s, 10H).

$^{13}\text{CRMN}$ (50 MHz, MeOD)  $\delta$ : 30,3; 47,9; 69,9; 116,7; 117,2; 121,1; 129,3; 130,7; 138,9; 151,3; 154,2.

### 3.3.2 Síntese dos substratos

As sínteses dos ésteres de fosfatos bis (2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) e 2,4-dinitrofenil fosfato (DNPP) foram realizados por métodos já descritos na literatura (BUNTON e FARBER, 1969; RAWJI e MILBURN, 1981); o 2,4- dinitrofenilfenil fosfato (DNPPP) foi sintetizado por Tiago Pacheco e Michelle Medeiros de acordo com a literatura (KIRBY, MEDEIROS, MORA et al., 2013).

Esquema 15 – Rota de síntese para obtenção do bis (2,4-dinitrofenil fosfato) – BDNPP:



Fonte: desenvolvida pela autora.

**Síntese do bis (2,4-dinitrofenil fosfato) – BDNPP** Em uma solução de 2,4-dinitrofenol (DNP), previamente recristalizado em clorofórmio (30 mmol), em 50 mL de acetonitrila, adicionou-se 62 mmol de piridina. Em seguida a reação foi resfriada a 0°C e adicionou-

se gota a gota 11 mmol de  $\text{POCl}_3$  ao sistema. A mistura reacional foi agitada por 20 min e vertida em 200 mL água destilada gelada e levada ao freezer. Após 1-2 horas notou-se a formação de um precipitado o qual foi separado por filtração, e lavado várias vezes com água destilada gelada para remover o excesso de piridina.

$^1\text{H RMN}$  (MeOD, 200 MHz):  $\delta$  7,94 (d, 1H, Ar);  $\delta$  8,48 (dd, 1H, Ar),  $\delta$  8.87 (d, 1H, Ar).

$^{31}\text{P RMN}$  (MeOD, 81 MHz);  $\delta$  -13,95.

**Síntese do 2,4-dinitrofenil fosfato – DNPP:** Inicialmente o **BDNPP** é solubilizado em metanol, e eluido em uma coluna de resina de troca iônica, onde o íon piridínio será substituído pelo íon sódio.

Em uma solução de hidróxido de sódio 0,3M (45 mL), adicionou o diéster (BDNPP) previamente seco, deixado por 1h até atingir o pH 13,5. O sistema foi resfriado a  $0^\circ\text{C}$  e acrescentou ácido clorídrico 5M (15 mL) rapidamente, o precipitado 2,4 dinitrofenol, subproduto da reação formado, foi filtrado do meio. A solução aquosa contendo o monoéster foi evaporada. O sólido obtido foi solubilizado em éter etílico, e acrescentado lentamente 2,6 lutidina até a formação de uma suspensão. Após a adição da 2,6 lutidina (3 mL), a mistura foi deixada sob agitação por 10 min e levada ao freezer por 6h. O produto obtido foi filtrado e lavado com éter até a solução ficar límpida.

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 200 MHz):  $\delta$  7,88 (d, 1H, Ar) ,  $\delta$  8,52 (dd, 1H, Ar),  $\delta$  8,82 (d, 1H, Ar). Os demais picos no espectro são referentes aos hidrogênios da lutidina.

$^{31}\text{P RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 81 MHz);  $\delta$  0,54

### 3.4 MEDIDAS CINÉTICAS

As reações estudadas com o substrato DNPP foram iniciadas com adição de alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque ( $5 \times 10^{-3}$  M, em acetonitrila) em 3 mL de uma solução aquosa tamponada no pH desejado contendo P5A ( $2 \times 10^{-3}$  M) em uma cubeta de quartzo, atingindo uma concentração final de  $5,0 \times 10^{-5}$  M.

Enquanto que as reações estudadas com o substrato BDNPP foram iniciadas com adição de alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque ( $3 \times 10^{-3}$  M, em acetonitrila) em 2 mL de uma solução aquosa tamponada com 30% de MeOH no pH desejado contendo o P5I ( $5 \times 10^{-4}$  M) em uma cubeta de quartzo, a fim de atingir uma concentração final de  $3,0 \times 10^{-5}$  M.

Ambos os estudos foram acompanhados monitorando-se o aparecimento da banda em 350nm ou 400nm respectivo ao produto reacional 2,4-dinitrofenolato (DNP). As constantes de velocidade observadas foram calculadas através do ajuste da curva de absorvância em função do tempo pelo programa Scanning KineticsWinUV através uma cinética de primeira ordem para o substrato DNPP. Enquanto que, as constantes de velocidade observadas para BDNPP foram calculadas por uma equação de uma reação consecutiva.

Para os experimentos de efeito isotópico, o ajuste do valor de pD das soluções foi corrigidos considerando  $\text{pD} = \text{pH}_{\text{lido}} + 0,4$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Os tampões utilizados foram: ácido cloroacético (pH 2,0-3,0), acetato de sódio (pH 4,0-5,0), BIS-TRIS, (pH 6,5-7,5), TRIS, (pH 8,0-9,0), bicarbonato de sódio, (pH 9,5-11,0).

### 3.5 ESTUDOS POR RMN DE $^1\text{H}$ E $^{31}\text{P}$

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  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  $^1\text{H}$  e ácido fosfórico 85% como referência externa para RMN de  $^{31}\text{P}$ . 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  $25^\circ\text{C}$  (MIKKELSEN e NIELSEN, 1960). Os espectros adquiridos foram manipulados no software MestrReNova versão 6.0.2.

### 3.6 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

Os cálculos de dinâmica supramolecular foram realizados pelo Prof. Rodrigo Montecinos, onde as simulações de Dinâmica Molecular foram realizadas utilizando o pacote de programas Gromacs versão 4.6.5.(PRONK, PÁLL, SCHULZ et al., 2013). O Pilar[5]areno e o DNPP foram construídos com parâmetros do campo de força GROMOS96 54A7 (SCHMID, EICHENBERGER, CHOUTKO et al., 2011) e solvatados com água usando o modelo SPC (BERENDSEN e GRIGERASTRAATSMA, 1987). As condições de contorno periódico foram aplicadas em todas as três dimensões e todas as simulações foram realizadas no conjunto isotérmico-isobárica. Onde a temperatura foi mantida a 300 K utilizando pilar[5]areno\_DNPP, e íons de água acoplados independentemente com uma constante de acoplamento igual a 0,1 ps. Enquanto a pressão foi mantida a 1 bar utilizando o barostato de Berendsen com uma constante de acoplamento de 1,0 ps.

O algoritmo LINCS (HESS e BERENDSENFRAAIJE, 1997) foi usado para restringir os comprimentos de ligação do pilar[5]areno e DNPP e SETTLE (MIYAMOTO e KOLLMAN, 1992) para restringir a estrutura das moléculas de água. Utilizou-se um corte de 1,2 nm para as interações de Van der Waals. As interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas através do algoritmo Ewald de partículas (PME) (DARDEN e YORKPEDERSEN, 1993). Um passo de tempo de 2 fs foi usado em todas as simulações. A lista de vizinhos foi atualizada a cada 10 etapas de tempo. Ambos os sistemas foram equilibrados por 300 ps. Foram calculadas trajetórias de 50 ns para cada sistema.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 REAÇÕES DE MONOÉSTERES NA PRESENÇA DE PILAR[5]ARENO (P5A)

Os Pilararenos podem reconhecer seletivamente substratos em solventes orgânicos, devido apresentar uma cavidade rica em elétrons que resultam na formação de interações. O interessante desses macrociclos é que o reconhecimento molecular também pode ocorrer em meios aquosos, simulando reações enzimáticas (STRUTT, ZHANG, GIESENER et al., 2012).

A solubilidade em água deste tipo de macrociclo pode ser conseguida através da sua funcionalização, isto é, pela inserção de grupos carboxílicos ou amônio nas margens dos macrociclos. Recentemente, foi relatado um pilar[5]areno funcionalizado com grupos alquilamônio (P5A), totalmente solúvel em água e capaz de formar complexos de inclusão muito estáveis com ânions orgânicos (GOMEZ, FRANCISCO, FERNANDEZ-NIETO et al., 2014).

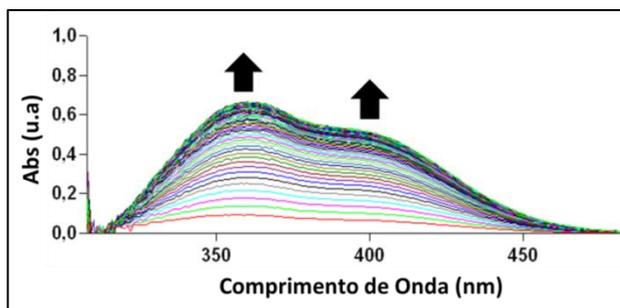
Com base nessa capacidade de reconhecimento em meio aquoso decidi estudar a reação de transferência de fosfato na presença de pilarareno.

### 4.1.1 Estudos Cinéticos

A reação do monoéster (DNPP) com o P5A foi acompanhada 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 reacional 2,4-dinitrofenolato (DNP).

Na Figura 12 estão representados os espectros sucessivos de UV-Vis típicos para a reação entre DNPP e P5A. As cinéticas apresentaram comportamentos típicos de primeira ordem em relação ao substrato orgânico em todas as reações estudadas.

Figura 12 – Absorvância vs. comprimento de onda para a reação entre DNPP [ $5 \times 10^{-5}$  M] e P5A [ $2 \times 10^{-3}$  M] a  $25^{\circ}\text{C}$  e  $\text{pH} = 13$ .

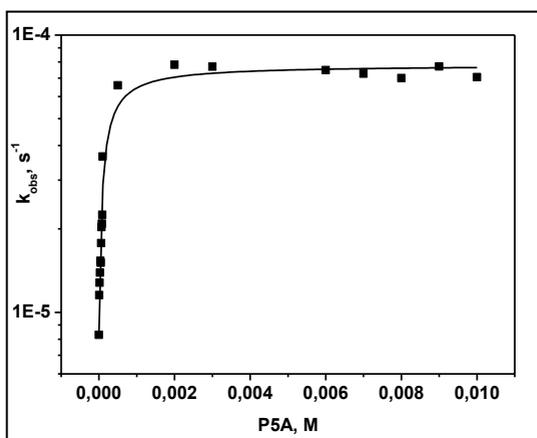


Fonte: desenvolvida pela autora

Estudou a hidrólise de DNPP em soluções aquosas em  $\text{pH} 7,0$  (tampão Bis-Tris) em função da concentração de P5A. A partir dos dados obtidos experimentalmente esboçou o gráfico das constantes de velocidade observadas em função da concentração de P5A.

Na Figura 13 observou-se que há um incremento na constante de velocidade com o aumento da concentração de P5A até atingir um patamar. A constante de velocidade observada aumenta quase dez vezes ao aumentar a concentração de pilarareno atingindo um valor limitante para  $[P5A] > 0,002$  M.

Figura 13 – Influência da concentração de P5A na constante de velocidade observada,  $k_{obs}$ , para hidrólise de DNPP [ $5 \times 10^{-5}$  M], em soluções aquosas a pH= 7 (tampão Bis-Tris) e 25,0 ° C.



Fonte: desenvolvida pelo autora

Ainda ressalta-se que de acordo com a literatura o DNPP, em solução aquosa neutra, encontra-se completamente desprotonado e convertido nas espécies dianiônicas, devido a seu  $pK_{a2} = 4,62$ . Dessa forma, assumiu que existam apenas a espécie dianiônica formada no meio reacional (KIRBY e VARVOGLIS, 1967).

Portanto o efeito catalítico pode ser explicado pela incorporação do diânion DNPP na cavidade do pilarareno,  $k_{(D, P5A)}$ , e a

hidrólise em água,  $k_{(D,w)}$ . Ambos os processos ocorrem simultaneamente. Assim a constante de velocidade observada é dada pelas constantes de velocidade em ambos os meios ponderados pela fração molar de diânion de monoéster. (Equação 1)

$$k_{\text{obs}} = k_{D,w}\chi_{D,w} + k_{D,P5A}\chi_{D,P5A} \quad \text{Equação (1)}$$

$$\chi_{D,w} = \frac{1}{1+K_{\text{ass,D}}[P5A]} \quad \text{Equação (2)}$$

$$\chi_{D,P5A} = \frac{K_{\text{ass,D}}[P5A]}{1+K_{\text{ass,D}}[P5A]} \quad \text{Equação (3)}$$

Os dados experimentais foram ajustados às equações (1-3), ver linha contínua na Figura 13, permitindo obter a constante de ligação para associação do diânion ao pilarareno,  $K_{(\text{ass}, D)} = [5150 \pm 660] \text{ M}^{-1}$ , bem como a constante de velocidade dentro da sua cavidade,  $k_{(D, P5A)} = (7,80 \pm 0,22) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .

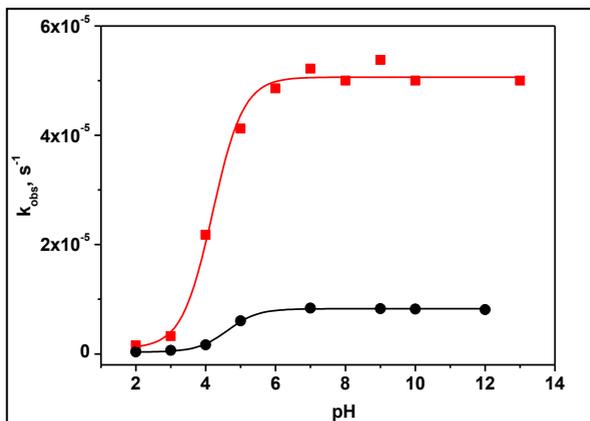
Logo, constatou-se que o valor da constante de velocidade observada é consideravelmente maior quando comparada com a constante observada apenas em água,  $k_{(D,w)} = 8,27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  evidenciando um efeito catalítico de quase dez vezes.

Enfim, definidos os primeiros resultados e ajustes, seguiu para analisar o efeito do pH na taxa de hidrólise de DNPP, considerando o

equilíbrio ácido-base entre diânion e o monoânion do monoéster de fosfato.

Avaliou o efeito do pH na constante da taxa de hidrólise de DNPP tanto na presença e ausência de macrociclo e está apresentado na Figura 14. As constantes de velocidade observadas foram obtidas no intervalo de pH 2-13 na presença de P5A a 25<sup>0</sup>C. A concentração de P5A foi definida como  $[2 \times 10^{-3} \text{ M}]$  para garantir a total incorporação do DNPP na cavidade do Pilarareno.

Figura 14 – Perfil de pH da hidrólise do DNPP na presença de P5A  $[2 \times 10^{-3} \text{ M}]$  (■) e em solução aquosa (●).



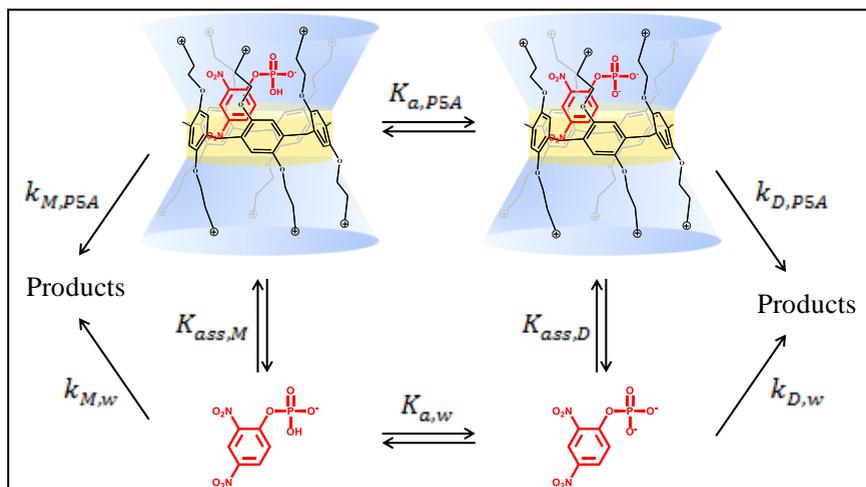
Fonte: desenvolvida pela autora.

Conforme o esperado, a desprotonação do monoânion, para a formação da espécie dianiônica do DNPP alcança um patamar acima de pH 5, onde o DNPP é totalmente convertido a diânion. A Figura 14 também indica um significativo efeito catalítico para a reação na presença de P5A.

Além disso, por tratar-se de um sistema complexo, deve considerar que a hidrólise do monoéster ocorre através de quatro caminhos simultaneamente: (i) monoânion em água,  $k_{(M, w)}$ , (ii) monoânion ligado ao pilarareno,  $k_{(M, P5A)}$ , (iii) diânion em água  $k_{(D, w)}$ , e (iv) diânion ligado à cavidade do pilarareno,  $k_{(D, P5A)}$ .

Conhecendo os quatro caminhos de hidrólise do DNPP mencionados acima, os dados da Figura 14 puderam ser ajustados (linha vermelha contínua) pelas Equações 4-7, deduzidas a partir do Esquema 16.

Esquema 16 – Possíveis caminhos para a hidrólise do DNPP.



Fonte: desenvolvida pela autora.

A equação para a constante de velocidade observada (equação 4) pode ser obtida assumindo que  $k_{obs}$  seja igual à soma das constantes de velocidade individuais ponderadas pelas correspondentes frações molares de monoéster.

$$k_{obs} = k_{M,w}\chi_{M,w} + k_{D,w}\chi_{D,w} + k_{M,P5A}\chi_{M,P5A} + k_{D,P5A}\chi_{D,P5A} \quad (4)$$

$$\chi_{M,w} = \frac{[H^+]}{K_{ass,M}[P5A] + [H^+] + K_{a,w}(1 + K_{ass,D}[P5A])} \quad (5)$$

$$\chi_{D,w} = \frac{K_{a,w}}{K_{ass,M}[P5A] + [H^+] + K_{a,w}(1 + K_{ass,D}[P5A])} \quad (6)$$

$$\chi_{M,P5A} = \frac{K_{ass,M}[P5A][H^+]}{K_{ass,M}[P5A] + [H^+] + K_{a,w}(1 + K_{ass,D}[P5A])} \quad (7)$$

Utilizando os valores reportados na literatura para a acidez do monoéster em água, bem como as constantes de velocidade em água para o monoânion e diânion, obteve-se as constantes de velocidade e de equilíbrio mostrados na tabela 1 (BUNTON, FENDLER, FENDLER et al., 1967).

Tabela 1– Parâmetros cinéticos e constantes de equilíbrio para a reação do DNPP com P5A obtidas pelos ajustes dos valores experimentais mostrado na Figura 14 pelas equações 4-7.

$K_{ass,M} / M^{-1}$	$K_{ass,D} / M^{-1}$	$k_{M,P5A} / s^{-1}$	$k_{D,P5A} / s^{-1}$
$774 \pm 35$	$(5150 \pm 660)$	$1.44 \times 10^{-6}$	$(7.80 \pm 0.22) \times 10^{-5}$
$pK_{a,w} = 4.62; k_{M,w} = 3.36 \times 10^{-7} s^{-1}; e k_{D,w} = 8.27 \times 10^{-6} s^{-1}$			

A constante de equilíbrio para a incorporação de diânion em P5A é 5,4 vezes maior do que a observada para o monoânion, esse efeito pode ser explicada pela maior interação eletrostática sendo a principal força motriz para a complexação entre o receptor e o substrato.

Ainda a partir do Esquema 16 e dos dados apresentados na Tabela 1 pode ser calculado um valor de  $pK_{a(P5A)} = (4,16 \pm 0,12)$  para a acidez do monoânion de DNPP dentro da cavidade de pilarareno. Através da comparação de  $pK_{a(P5A)}$  e  $pK_{a(w)}$ , percebeu-se que a acidez do monoânion aumenta 3 vezes, consequência da sua complexação ou inserção ao receptor. Este resultado pode ser atribuído à estabilização do diânion através da interação eletrostática com as cargas positivas de pilarareno.

Ainda com o intuito de expandir o trabalho foram realizados estudos cinéticos com P5A frente a outro substrato, no caso o diéster BDNPP, nas mesmas condições cinéticas otimizadas para o DNPP. Entretanto estudos iniciais não evidenciaram efeito catalítico do P5A para a hidrólise do BDNPP. Pode-se chegar a algumas evidências, mas nada comprovada cientificamente, como: pouca interação eletrostática, uma vez que o BDNPP não é tão carregado quanto o DNPP, e por questões de estrutura e dimensão.

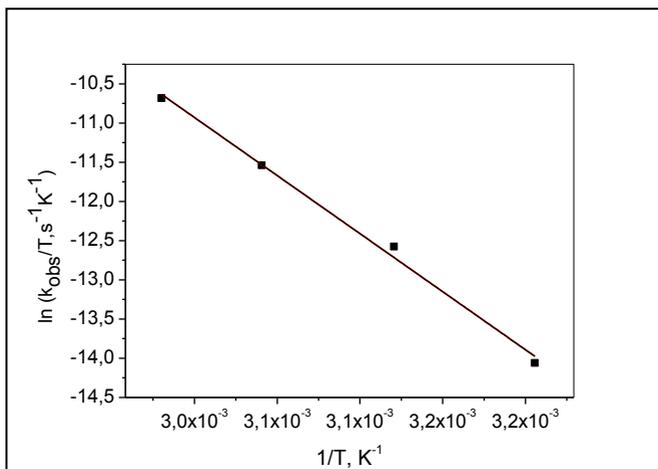
#### 4.1.2 Parâmetros de ativação

A dependência das velocidades de reações com a temperatura nos dá uma informação valiosa sobre as constantes de velocidade. A observação qualitativa é que as reações acontecem mais rapidamente como o aumento da temperatura.

Com a finalidade de adquirir informações sobre essas constantes de velocidade, foram obtidos os parâmetros de ativação termodinâmicos da reação entre o P5A e o monoéster DNPP.

As constantes de velocidade observadas foram determinadas em diferentes temperaturas, na faixa entre 35 e 65°C, em pH 10. Então, os valores de  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  e  $\Delta H^\ddagger$  foram determinados através dos dados experimentais da Figura 15 e de acordo com as Equações 8, 9 e 10, e seus respectivos valores estão apresentados na Tabela 2.

Figura 15 – Gráfico de Eyring para reação de DNPP com P5A, em pH=10.



Fonte: desenvolvida pela autora.

$$\ln \left( \frac{k_{obs}}{T} \right) = \left[ \ln \left( \frac{k_b}{h} \right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right] - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left( \frac{1}{T} \right) \quad (8)$$

$$\Delta G^\ddagger = \ln \left( \frac{k_{obs} h}{k_b T} \right) RT \quad (9)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad (10)$$

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 2 – Parâmetros termodinâmicos para a reação entre P5A [ $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ] e o DNPP [ $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ], em pH 10.

Parâmetros	Valores
$\Delta H^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	24,5
$\Delta S^\ddagger$ (cal.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	4,03
$\Delta G^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	23,3

### 4.1.3 Estudo de RMN $^1\text{H}$

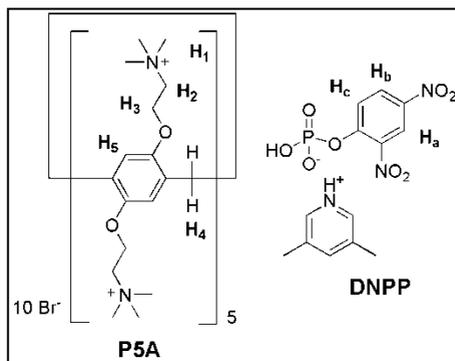
Com intuito de compreender o processo de complexação ocorrida entre o P5A e o substrato DNPP foram realizados estudos de  $^1\text{H}$  RMN, que com base nos deslocamentos químicos dos prótons diretamente envolvidos na incorporação do substrato fornecem importantes informações sobre a complexação.

O P5A contém, além de uma cavidade rica em elétrons, possui dez cargas positivas (5 em cada aro), que promove a fácil incorporação do DNPP dianiônico. As estruturas químicas dos compostos P5A e DNPP juntamente com a identificação dos respectivos prótons estão ilustradas na Figura 16.

A partir de uma titulação de RMN, em que se adicionou crescentes concentrações de P5A a uma solução de DNPP 19,3 mM (Figura 17), pode-se observar uma significativa alteração nos deslocamentos químicos dos prótons resultante do processo de complexação.

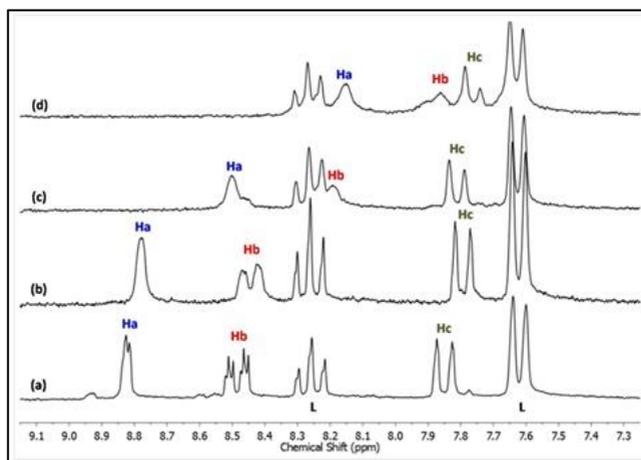
As mudanças nos sinais dos prótons do DNPP estão na seguinte ordem  $\text{Ha} \cong \text{Hb} \gg \text{Hc}$ , e isso é um forte indício que os prótons Ha e Hb sofrem maior efeito de blindagem provocado pela cavidade do P5A. Enquanto que o efeito de blindagem sobre Hc é muito pequeno.

Figura 16 – Estruturas do pilar[5]areno carregado positivamente (P5A) e do 2,4-dinitrofenilfosfato (DNPP).



Fonte: desenvolvida pela autora.

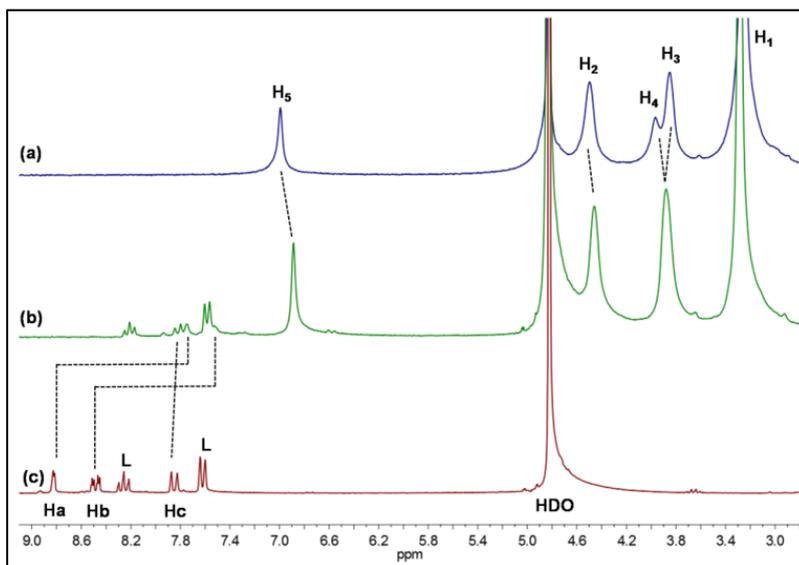
Figura 17 – Espectro de <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 298 K, 200 MHz) de DNPP [19,3 Mm] na presença de concentrações crescentes de P5A [mM]: (a) 0,00, (b) 0,7, (c) 3,5 e (d) 16. Os sinais marcados como L correspondem ao contra-íone de 2,6-lutidínio.



Fonte: desenvolvida pela autora.

É interessante notar ainda que, os sinais de prótons do P5A (H5, H4 e H2) mostram uma pequena alteração nos deslocamentos químicos (veja a Figura 18) enquanto, os prótons H1 e H3 experimentam-se desblindados na presença de DNPP, como evidenciado pelo desvio de campo observado para estes sinais. Além disso, os prótons (H4, H3) tendem a ser sobrepostos. Todos os espectros encontram-se ilustrados no apêndice desta tese.

Figura 18 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K, 200 MHz) (a) P5A [17 mM]; (B) [17 mM] de P5A e [17 mM] de DNPP, (c) [17 mM] de DNPP. L corresponde ao contra-íon 2,6-lutidínio.

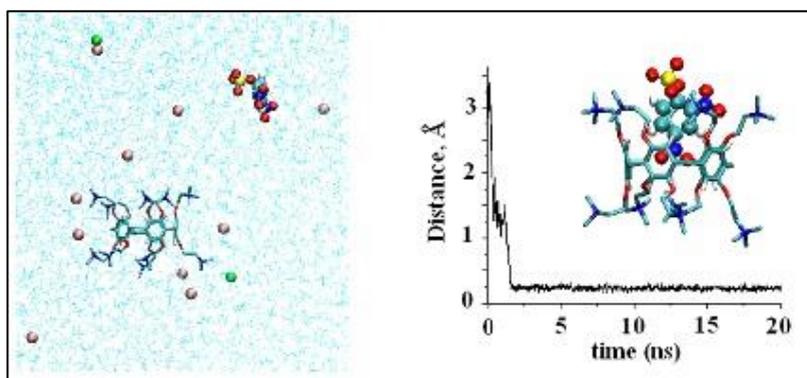


Fonte: desenvolvida pela autora.

#### 4.1.4 Cálculo computacional

Para explorar as estruturas mais prováveis formadas pelas interações entre DNPP e pilar[5]areno foram realizadas simulações de dinâmica supramolecular. O lado esquerdo da Figura 19 mostra o ponto inicial para os cálculos, formado a partir de sistema de 1 molécula de DNPP e 2 íons de sódio incorporados a um sistema em pré-equilíbrio contendo 1 molécula de pilar[5]areno e 10 contra-íons de brometo solvatados com 4200 SPC moléculas de água.

Figura 19 – O lado esquerdo mostra a configuração inicial, com o DNPP na representação de CPK e o pilar[5]areno na representação de vara. Os carbonos são cor cianos, os hidrogênios são brancos, os nitrogênios são azuis e os oxigênios são vermelhos. Brometo e sódio são cinza e verde, respectivamente. Para simplificar, as moléculas de água são azul claro na representação de linha. O lado direito mostra um gráfico de distância entre o centro da cavidade P5A e o carbono na posição 4 do DNPP, em função do tempo de cálculo e do complexo formado 1: 1, após atingir o equilíbrio.



Fonte: desenvolvida pela autora.

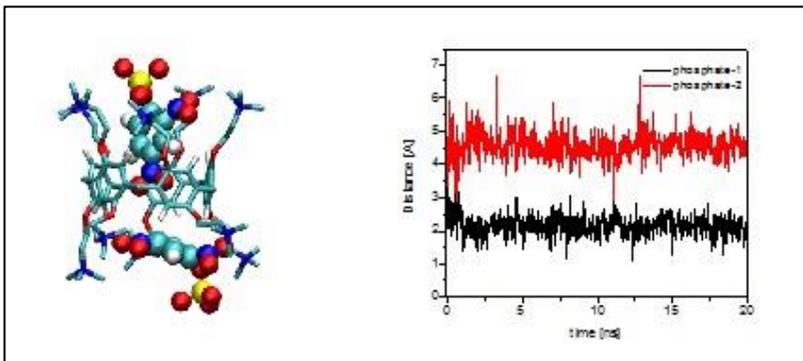
Ainda o sistema mostrado na Figura 19 corresponde a uma estequiometria de ligação 1:1, o que provavelmente é uma representação adequada para a condição cinética experimental realizada nos estudos onde  $[DNPP] \ll [P5A]$ . O modelo ilustrado exibe uma interação eletrostática inicial entre o grupo fosfato e os grupos alquilamônios do P5A.

A inclusão do substrato dentro da cavidade do pilar[5]areno é observada após 1000 ps de trajetória (lado direito da Figura 20) e a configuração do complexo supramolecular e a distância entre P5A e DNPP não se alteram durante o último 19 ns de cálculo, evidenciando a formação do complexo interno estável.

É interessante observar que nas condições experimentais em que o DNPP está em excesso quando comparado a concentração de P5A permite a formação de um complexo supramolecular entre 2 moléculas de DNPP e 1 molécula de pilar[5]areno. A fim de acelerar o cálculo, a configuração inicial partiu com 2 moléculas de DNPP dentro da cavidade do P5A.

Contudo, o modelo evoluiu rapidamente para uma estrutura onde uma molécula de DNPP é mantida dentro da cavidade, formando um complexo interno. Enquanto a segunda molécula está localizada no local oposto que interage com o grupo amônio formando um complexo externo (Figura 20) e as distâncias entre o centro da cavidade P5A e o carbono na posição 4 de cada molécula do DNPP são estáveis em função do tempo de cálculo, que evidencia a estabilidade dos complexos internos e externos.

Figura 20 – A- Ilustração do complexo formado 2:1, onde o P5A é representado em varas e as duas moléculas de DNPP estão em CPK. Para simplificar, as moléculas de água e os ions foram removidos. B- Distância entre o centro da cavidade P5A e o carbono na posição-4 para cada DNPP, em função do tempo de cálculo.



Fonte: desenvolvida pela autora.

Assim, de acordo com estes resultados, as amostras de DNPP com um excesso de pilar[5]areno interagem favorecendo uma estrutura preferencial 1: 1 através da formação de um complexo interno.

## 4.2 REAÇÕES DE DIÉSTER NA PRESENÇA DE PILARARENO IMIDAZOL

A inspiração para a síntese de uma nova série de pilar[5]arenos contendo imidazóis surgiu como uma consequência dos resultados obtidos da reação de hidrólise do DNPP com P5A descrito na seção anterior. O importante efeito observado, analisado juntamente com os inúmeros estudos já reportados na literatura das reações de desfosforilação promovidas por imidazol, foram suficientes para indicar a necessidade de sintetizar pilar[5]arenos contendo imidazóis.

A escolha dos pilar[5]arenos deve-se ao seu desempenho no reconhecimento molecular e sua fácil síntese e funcionalização. Entretanto, a escolha pela funcionalização colocando um conjunto de grupos imidazóis deve-se a versatilidade química mostrada pelo imidazol na catálise de um variado conjunto de reações orgânicas, e seu conhecido potencial catalítico nas reações de desfosforilação (ORTH, WANDERLIND, MEDEIROS et al., 2011).

Contudo, por tratar-se de um estudo inédito e inovador, o sistema supramolecular utilizado para as reações de desfosforilação é complexo e desafiador, e envolve observar, analisar e o estudo minucioso de vários parâmetros reacionais.

### 4.2.1 Síntese do P5I

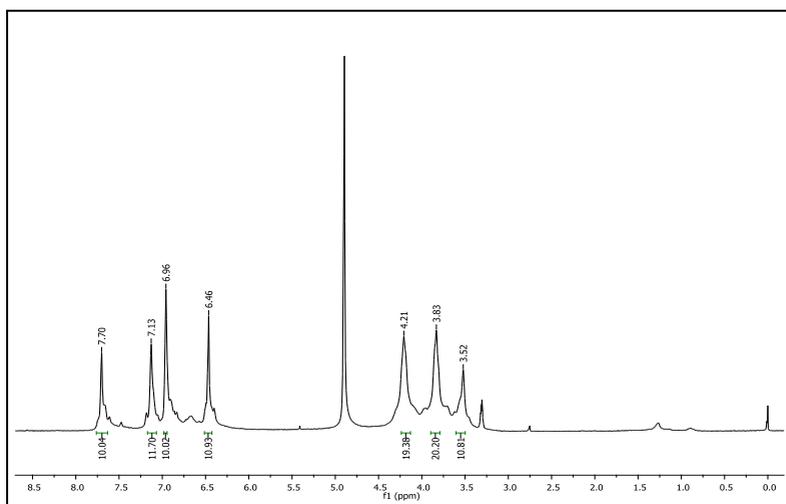
De modo a se obter uma nova estrutura de pilar[5]areno, com o intuito de modificar as características cinéticas-químicas dos compostos descritos até então, decidiu-se funcionalizá-lo com substituinte de imidazol. Sendo assim, a obtenção do produto P5I deu-se através da reação entre o brometo 2 com imidazol, na presença de hidróxido de potássio e DMF como solvente. O rendimento obtido, após 24 horas de reação à temperatura ambiente, foi de 50% (Esquema 14) na seção 3.3 experimental.

Na sua grande maioria os materiais de partida e os pilar[5]arenos sintetizados apresentaram boa estabilidade química, não sendo observado decomposição dos mesmos, ainda que armazenados em temperatura ambiente durante períodos superiores a 2-3 meses. As moléculas sintetizadas, mesmo aquelas que não são inéditas, foram devidamente caracterizadas através de técnicas de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR e, no caso do pilar[5]areno imidazol inédito, realizou-se também, o massas de alta resolução, conforme os dados descritos abaixo.

A título de exemplo, discutem-se as atribuições dos sinais nos espectros de NMR do composto inédito, como representante da classe de moléculas sintetizadas. A Figura 21 apresenta o espectro de  $^1\text{H}$  NMR, obtido na frequência de 200 MHz e utilizando MeOD como solvente. Na região compreendida entre 7,70-6,96 ppm se observa 3 sinais, sendo eles singletos largos, com integral de 10 hidrogênios cada um, referentes aos hidrogênios do anel imidazólico. Em 6,46 ppm, verifica-se um singlete largo com integral relativa a 10 hidrogênios referentes aos hidrogênios do anel aromático. Os hidrogênios ligados ao carbono mais próximo do oxigênio se encontram no sinal de 4,21 ppm.

Em 3,83 ppm, verifica-se um singlete largo que apresenta integral relativa a 20 hidrogênios, correspondentes aos hidrogênios ligados diretamente ao átomo de carbono próximo do nitrogênio. Com deslocamento de 3,55 ppm, encontra-se um singlete com integral relativa a 10 hidrogênios, referentes aos hidrogênios ligados ao carbono metilênico.

Figura 21 – Espectro de  $^1\text{H}$  NMR, do composto P5I em MeOD a 200 MHz.

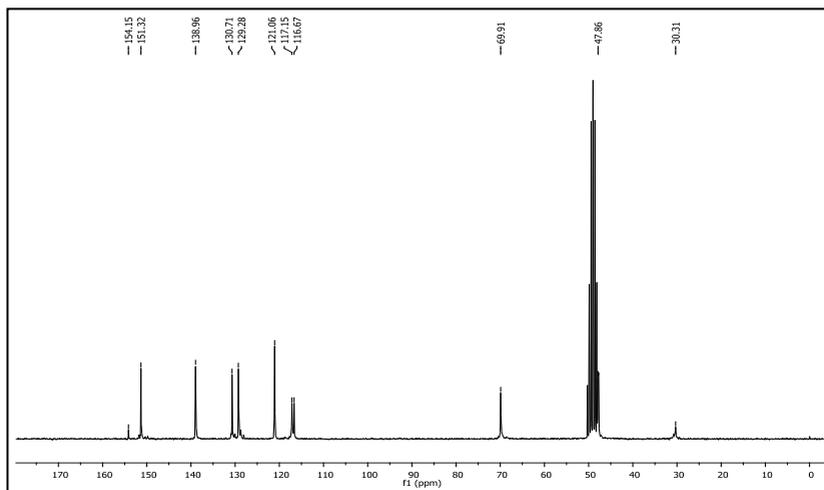


Fonte: desenvolvida pela autora

No espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR (Figura 22) obtido na frequência de 50 MHz e utilizando MeOD como solvente, observam-se os sinais correspondentes aos átomos de carbono desse composto. O total de carbonos de um monômero da molécula é dezessete, porém alguns se sobrepõem. Na região compreendida entre 154,1 e 116,7 verificam-se os sinais referentes aos carbonos do anel aromático e do anel imidazólico. Em campo mais alto notam-se os sinais referentes aos

carbonos alifáticos. Em deslocamento químico de 69,9 ppm encontra-se o carbono diretamente ligado ao oxigênio. Com deslocamento de 47,9 ppm se registra o sinal referente ao carbono ligado ao nitrogênio. Em 30,3 ppm se encontra o sinal do carbono metilênico que faz a ponte entre as unidades de hidroquinonas.

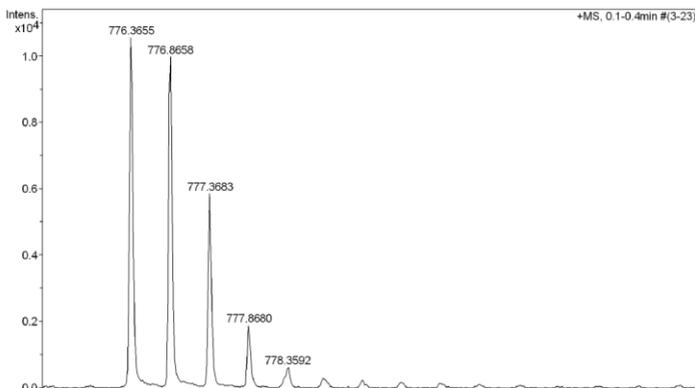
Figura 22 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR, do P5I em MeOD a 200 MHz.



Fonte: desenvolvida pela autora.

A Figura 23 mostra o espectro de massas do composto. Para a fórmula  $\text{C}_{85}\text{H}_{90}\text{N}_{20}\text{O}_{10}$  a razão  $m/z$  encontrada do  $[\text{M}+2\text{H}]$  foi de 776,3655, e o valor calculado foi de 776,8663.

Figura 23 – Espectro de massas de alta resolução do P5I.



Fonte: desenvolvido pela autora.

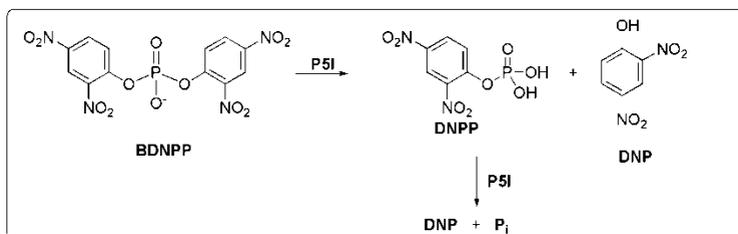
#### 4.2.2 Estudos cinéticos

A reação do diéster BDNPP com o P5I foi acompanhada 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), da mesma maneira que nos estudos cinéticos apresentados na seção 4.1.1.

No esquema 17 mostra a reação de hidrólise do BDNPP promovida pelo P5I. Inicialmente temos a clivagem do BDNPP para o monoéster DNPP e o fenolato (DNP). Já na etapa seguinte ocorre a quebra do DNPP, ressaltando que ambas as etapas ocorrem consecutivamente. O mecanismo proposto é consistente com o formato das curvas de absorvância em função do tempo obtidas experimentalmente. Desta forma, os valores das constantes de

velocidade observadas foram obtidas utilizando uma equação de reações consecutivas para realizar o ajuste das curvas de aumento de absorvância em função do tempo.

Esquema 17 – Esquema geral da quebra do BDNPP promovida pelo P5I

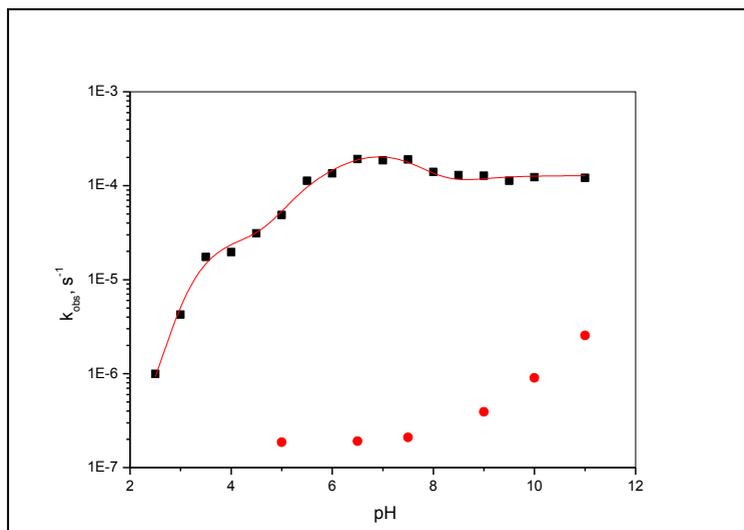


Fonte: desenvolvida pela autora.

Analisou-se o efeito do pH na constante da taxa de hidrólise do BDNPP tanto na presença e ausência de macrociclo e está apresentado na Figura 24. As constantes de velocidade observadas foram obtidas no intervalo de pH 2-12 na presença de  $[5 \times 10^{-4} \text{ M}]$  P5I a  $25^\circ\text{C}$ .

O perfil de pH obtido para a reação do P5I com o BDNPP, apresentado na Figura 24, mostrou que o P5I consegue acelerar a reação de desfosforilação do BDNPP comparado com sua hidrólise espontânea. Por exemplo, em pH 7 o P5I  $[5 \times 10^{-4} \text{ M}]$  causa incrementos em  $k_{\text{obs}}$  de até 1000, comparando com a reação somente em água.

Figura 24 – Perfil de pH da hidrólise do BDNPP na presença de PI [ $5 \times 10^{-4}$  M] (■) e em solução aquosa (●).

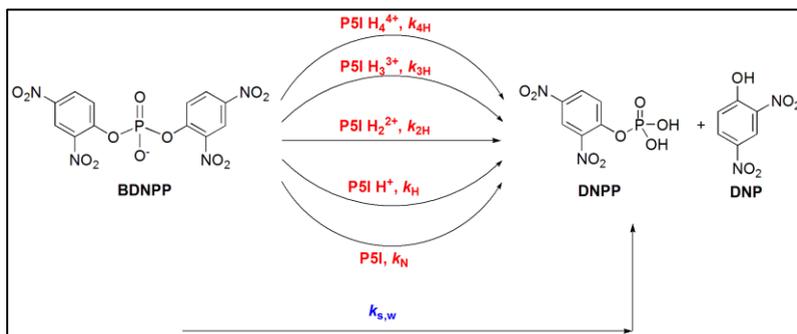


Fonte: desenvolvida pela autora

A reação de desfosforilação do BDNPP na presença do P5I, permite inicialmente a incorporação do diéster na cavidade do pilarareno. Sendo que a hidrólise pode ocorrer com a reação do diéster em água,  $k_{(S,w)}$ , e com as somas das contribuições de diferentes formas de P5I, onde há cinco equilíbrios de desprotonação dos imidazóis,  $k_{(S,P5I)}$ , representado no esquema 18.

Ainda o esquema 18, simplifica as complexas reações que podem ocorrer na interação entre o BDNPP e o P5I, mas que de uma maneira geral permite descrever os incrementos das constantes de velocidade observada em função do pH.

Esquema 18 – Possíveis caminhos para a hidrólise do BDNPP.



Fonte: desenvolvida pela autora

No esquema 18, as constantes de velocidade  $k_N$ ,  $k_H$ ,  $k_{2H}$ ,  $k_{3H}$  e  $k_{4H}$  representam respectivamente as reações do P5I com os grupos imidazóis totalmente desprotonados ( $k_N$ ), com quatro grupos imidazóis livres ( $k_H$ ), três grupos não protonados ( $k_{2H}$ ), dois imidazóis não protonados ( $k_{3H}$ ) e finalmente apenas um grupo imidazol livre ( $k_{4H}$ ).

A partir do conhecimento dos possíveis caminhos de hidrólise do BDNPP mencionados acima, os dados da Figura 24 puderam ser ajustados (linha vermelha contínua) pela Equação 11, deduzidas a partir do Esquema 18, onde os parâmetros obtidos pelos ajustes cinéticos calculados estão apresentados na Tabela 3.

Na Tabela 3 também estão apresentados as constantes de associação e as respectivas constantes de dissociação ácida do P5I, e os parâmetros de efeitos isotópicos de solvente.

$$k_{\text{obs}} = k_{s,w}x_{s,w} + k_{4H}x_{4H}x_{s,4H} + k_{3H}x_{3H}x_{s,3H} + k_{2H}x_{2H}x_{s,2H} + k_{1H}x_{1H}x_{s,1H} + k_Nx_Nx_{s,N} \quad (11)$$

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos e constantes de associação e equilíbrio obtidos pelos ajustes dos dados da figura 24 para a reação do P5I com BDNPP.

Constantes de velocidade e de associação		Constantes de dissociação ácida	
$k_{s,w}, s^{-1}$	$1,90 \times 10^{-7}$	P5I	
$k_{s,4H}, s^{-1}$	$2,37 \times 10^{-6}$	$pK_{a1}$	2,85
$k_{s,3H}, s^{-1}$	$3,30 \times 10^{-5}$	$pK_{a2}$	3,40
$k_{s,2H}, s^{-1}$	$2,25 \times 10^{-4}$	$pK_{a3}$	5,50
$k_{s,H}, s^{-1}$	$3,29 \times 10^{-4}$	$pK_{a4}$	6,40
$k_{s,N}, s^{-1}$	$4,20 \times 10^{-4}$	$pK_{a5}$	7,85
$K_{S,4H}, M^{-1}$	$2,50 \times 10^4$		
$K_{S,3H}, M^{-1}$	$2,00 \times 10^4$	Efeito isotópico de solvente, pH 8,5	
$K_{S,2H}, M^{-1}$	$1,30 \times 10^4$	$k_{H_2O}, s^{-1}$	$1,30 \times 10^{-4}$
$K_{S,H}, M^{-1}$	$8,80 \times 10^3$	$k_{D_2O}, s^{-1}$	$1,18 \times 10^{-4}$
$K_{S,N}, M^{-1}$	$8,73 \times 10^2$	$k_{H_2O}/k_{D_2O}$	1,10

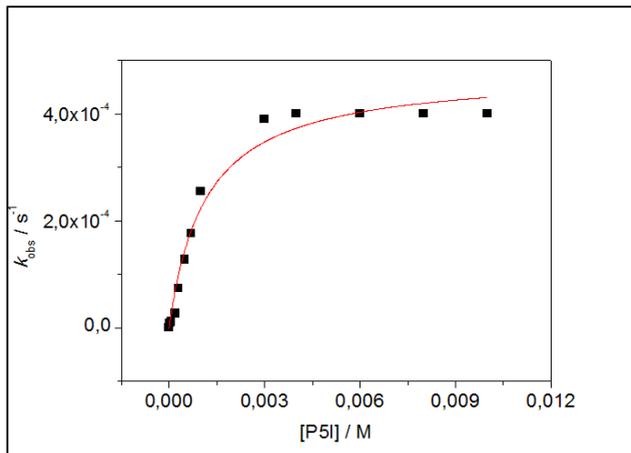
Assim analisando a Figura 24, juntamente como os parâmetros cinéticos apresentados na tabela 3, notou-se um leve comportamento de um sino no perfil de pH na região de 6-8. Esse tipo de perfil pode indicar diferentes comportamentos envolvidos; (i) uma catálise bifuncional promovida pelo Pilarareno imidazol P5I, ou (ii) pode indicar que há constantes de associação levemente maiores quando há carga positiva no macrociclo, o que pode resultar numa curva em forma de sino que está relacionado com afinidade e não com reatividade, já que o P5I neutro assume-se que seja a espécie mais reativa no processo catalítico, fato consistente como o efeito isotópico de 1,10 apresentado na tabela 3, o qual é indicativo de uma catálise nucleofílica.

Ainda estruturalmente o pilarareno possui 10 substituintes imidazois, onde 5 estão ancorados na parte superior e os outros 5 na parte inferior. E para realizar o ajuste mostrado na figura 24, e os valores apresentados na tabela 3 foram considerados que os anéis formados na parte superior e inferior do P5I eram totalmente equivalentes, por isso utilizou-se apenas cinco valores de  $pK_a$  para o P5I, que correspondem aos respectivos equilíbrios de desprotonação dos imidazois.

Esses valores de  $pK_{as}$  foram estimados cineticamente e são válidos para o ajuste da curva cinética, contudo deveriam ser confirmados através de um estudo mais detalhado visto a complexidade do sistema. Esses equilíbrios auxiliaram na explicação inicial da eficiência catalítica observada.

Ainda estudou a hidrólise de BDNPP em soluções aquosas em pH 9,0 em função da concentração de P5I e os dados obtidos experimentalmente estão mostrados na Figura 25.

Figura 25 - Influência da concentração de [P5I] na constante de velocidade observada,  $k_{\text{obs}}$ , para hidrólise de BDNPP [ $3 \times 10^{-5}$  M], em soluções aquosas pH = 9 (tampão Bicarbonato) a 25,0 ° C.



Fonte: desenvolvida pela autora

Na Figura 25 pode-se observar que há um incremento na constante de velocidade com o aumento da concentração de P5I até atingir um patamar. A constante de velocidade observada aumenta quase 1000 vezes ao aumentar a concentração de pilarareno atingindo um valor limitante para valores de  $[P5A] > 0,006\text{M}$ .

A linha sólida corresponde ao ajuste com a equação 12, onde as frações molares de BDNPP em água e no P5I foram calculadas com as equações 13 e 14, respectivamente. O tratamento dos dados permitiu calcular valores de  $k_{\text{S,P}} = 4,79 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  e  $K_{\text{SP}} = 8,73 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ . O valor utilizado para  $k_{\text{s,w}}$  ( $3,92 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ) em pH = 9 foi obtido da literatura (KIRBY e YOUNAS, 1970).

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{S,w}}x_{\text{S,w}} + k_{\text{2S,P}}[\text{P5I}]x_{\text{S,P}} \quad (12)$$

$$x_{\text{S,w}} = \frac{1}{1+K_{\text{S,P}}[\text{P5I}]} \quad (13)$$

$$x_{\text{S,P}} = \frac{K_{\text{S,P}}[\text{P5I}]}{1+K_{\text{S,P}}[\text{P5I}]} \quad (14)$$

Portanto o pronunciado efeito catalítico é consistente com um efeito supramolecular onde ocorre a incorporação do BDNPP na cavidade do pilarareno, e acontecem reações de hidrólise no complexo supramolecular formado ( $k_{(\text{S,P}, \text{P5I})}$ ), bem como a reação de hidrólise em água,  $k_{(\text{S,w})}$ . Ambos processos ocorrem simultaneamente e a predominância de um ou outro, depende da incorporação do BDNPP na cavidade do P5I.

A molaridade efetiva relaciona uma reação intramolecular de primeira ordem, com uma reação intermolecular de segunda ordem. Assim quando se propõe relacionar a reatividade catalítica do P5I com apenas o grupo imidazol em reações de desfosforilação não é uma simples comparação, pois refere-se a distintos eventos químicos.

Assim, quando comparar as reações de desfosforilação deve-se considerar alguns aspectos; como a concentração livre de imidazol, uma vez que tem-se um composto supramolecular P5I ancorados com 5 grupos imidazóis em cada face.

### 4.2.3 Parâmetros de ativação

As constantes de velocidade observadas foram determinadas em diferentes temperaturas, na faixa entre 35 e 65°C, em pH 9. Então, os valores de  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  e  $\Delta H^\ddagger$  foram determinados através dos dados experimentais, de acordo com as Equações 8, 9 e 10, descritas durante a seção 4.2.1 e então seus respectivos valores estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros de ativação termodinâmicos para a reação entre P5I [ $5 \times 10^{-4}$  M] e o BDNPP [ $3 \times 10^{-5}$  M], em pH 9.

Parâmetros	Valores
$\Delta H^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	13,78
$\Delta S^\ddagger$ (cal.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	-38.79
$\Delta G^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	25.35

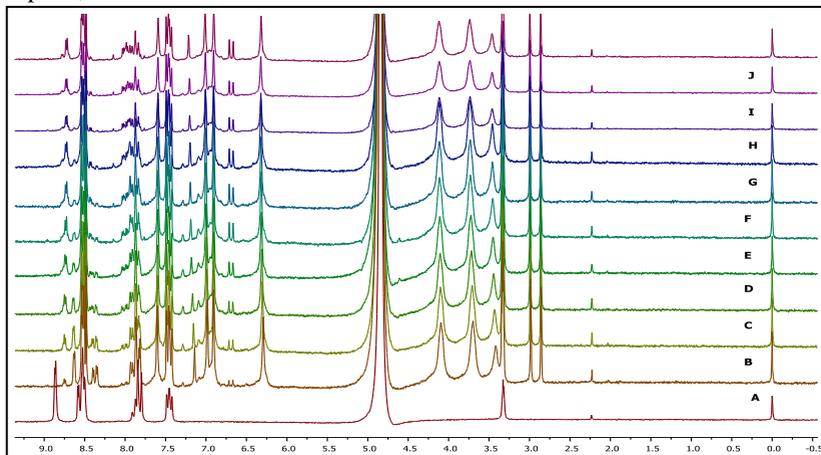
#### 4.2.4 Estudo $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}$ RMN

Considerando que a reação estudada do BDNPP com P5I é típica de catálise supramolecular, com indícios de um efeito que pode ser uma reação nucleofílica, ou até bifuncional, conforme indicado pelos resultados cinéticos, fez-se um estudo de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  da reação.

Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN obtidos em função do tempo da reação do P5I com BDNPP estão mostrados nas Figuras 26-28. Cabe destacar que o composto P5I não é muito solúvel em água em valores de pH onde os imidazóis estão na forma neutra. Assim, tratando-se de um sistema complexo teve-se que realizar uma série de tentativas até encontrar a concentração ideal do substrato e do receptor, onde não tivesse precipitação e, ao mesmo tempo, garantisse a identificação das diferentes espécies química presentes nos espectros. Na melhor condição encontrada, os espectros de RMN ainda apresentaram uma baixa resolução e baixa intensidade, principalmente na região dos hidrogênios aromáticos, mas ainda assim foi possível avaliar o aparecimento e desaparecimento das espécies mais relevantes.

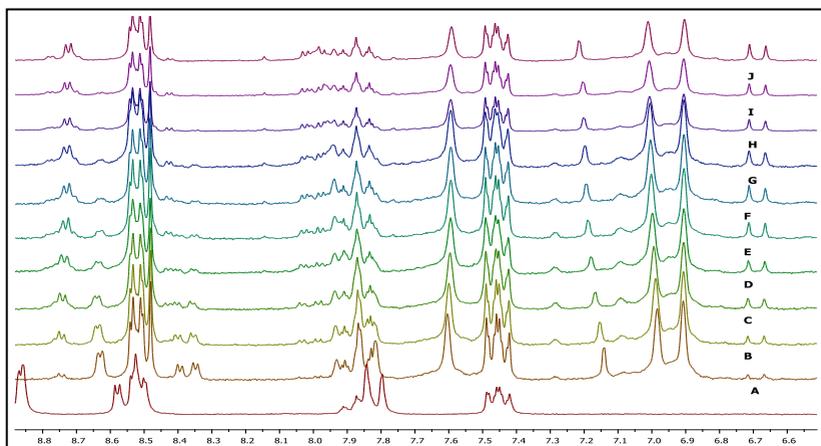
Os deslocamentos químicos das espécies envolvidas estão apresentados da tabela 5 e foram baseados nos espectros das substâncias puras. Outro ponto que deve ser considerado é que as reações do BDNPP com P5I podem formar espécies difíceis de serem identificadas por RMN, por isso há a necessidade de um estudo mais detalhado.

Figura 26 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido para (A) BDNPP [ $2,94 \times 10^{-5}$  M] e espectros sucessivos após adição de P5I [ $1,6 \times 10^{-5}$  M] registrados em: (B) 5 min; (C) 15 min; (D) 25 min; (E) 35 min; (F) 45 min; (G) 55 min; (H) 1h 5min; (I) 1h 15min; (J) 1h 25min; (K) 4h 40min; a  $25^\circ\text{C}$ , em  $\text{D}_2\text{O}$  com 30% de MeOD e pH 9,5.



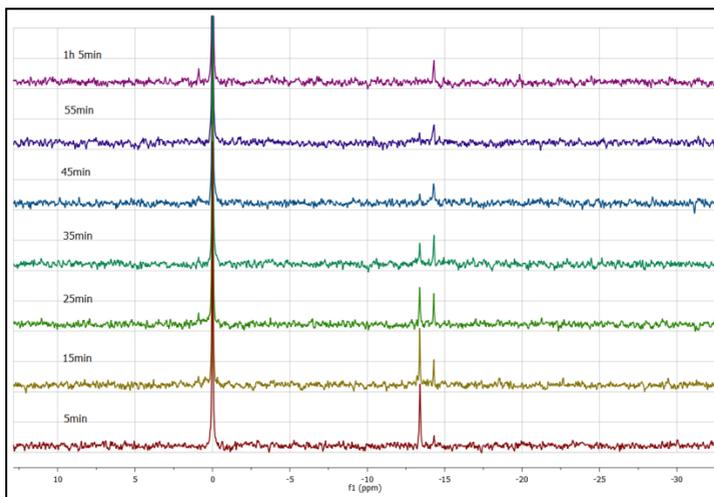
Fonte: desenvolvida pela autora.

Figura 27 – Ampliação da região 6-9 ppm dos sucessivos espectros de RMN da figura 26.



Fonte: desenvolvida pela autora.

Figura 28 – Espectros sucessivos de RMN  $^{31}\text{P}$  obtidos para a reação P5I [ $1,6 \times 10^{-5}$  M] com BDNPP [ $2,94 \times 10^{-5}$  M]: (a) 5 min; (b) 15 min; (c) 35 min; (d) 45 min; (e) 55 min e (f) 1h 5min, a  $25^\circ\text{C}$ , em  $\text{D}_2\text{O}$  com 30% de MEOD e pH 9,5.



Fonte: desenvolvida pela autora.

**Tabela 5** – Deslocamentos  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN das substâncias puras envolvidas na reação de hidrólise do BDNPP.

Composto	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm)	RMN $^{31}\text{P}$ ( $\delta$ , ppm)
<b>BDNPP</b>	$\delta$ 7,8 (d, 1H, Ar); $\delta$ 8,50 (dd, 1H, Ar), $\delta$ 8,86 (d, 1H, Ar)	-13,9
<b>DNP</b>	$\delta$ 6,75 (d, 1H, Ar), $\delta$ 8,09 (dd, 1H, Ar) $\delta$ 8,83 (d, 1H, Ar)	--
<b>P5I</b>	$\delta$ 7,7 (s, 10H); $\delta$ 7,1 (s, 10H); $\delta$ 7,0 (s, 10H); $\delta$ 6,5 (s, 10H); $\delta$ 4,2 (s, 20H); $\delta$ 3,8 (s, 20H); $\delta$ 3,5 (s, 10H).	-

Nas análises dos espectros de hidrogênio e fósforo obtidos da reação do BDNPP com P5I (Figura 26-28) foi possível observar algumas mudanças nos deslocamentos químicos, juntamente com o aparecimento e desaparecimento dos picos.

Por exemplo, no espectro  $^1\text{H}$  RMN foi observada a região compreendida entre 8,9 ppm e 6,6 ppm onde percebeu o aparecimento gradual dos sinais em 8,7 ppm e 6,7 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos do DNP, produto formado durante o progresso da reação. E também verificou o desaparecimento gradual dos sinais em 8,6 ppm e 8,4 ppm referentes ao BDNPP.

Ainda na figura 27, através dos respectivos espectros (A) BDNPP e (B) BDNPP + P5I, foi possível observar uma mudança no deslocamento químico referente ao hidrogênio aromático do BDNPP, o qual deslocou de 8,9 ppm para 8,75 ppm, considerando um forte indício da inserção do BDNPP na cavidade do P5I.

Já a figura 28 ilustrou o desaparecimento em aproximadamente 1h do sinal em -13,5 ppm referente ao sinal de fósforo característico do BDNPP. Verificou também o aparecimento de um sinal em -14 ppm, intermediário reacional, não muito estável, formado a partir dos imidazóis.

Entretanto, devido à complexidade do sistema e a baixa resolução do espectro, há necessidade de um estudo mais detalhado. Como por exemplo, realizar estudos de espectrometria de massa a fim de identificar de forma definitiva os intermediários presentes na reação.

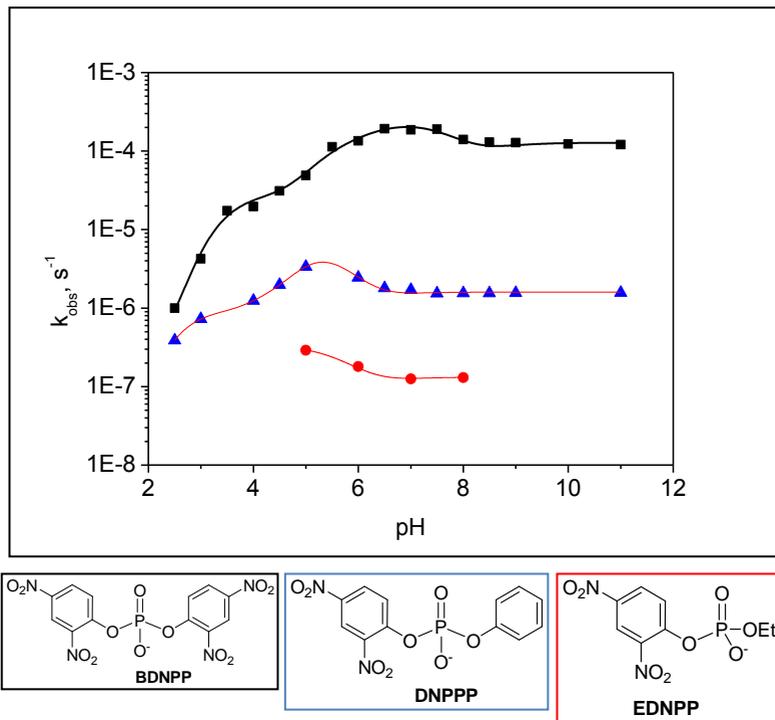
#### **4.2.5 Estudos comparativos com outros substratos**

A fim de avaliar a capacidade catalítica supramolecular do P5I, resolveu estudar a reação de desfosforilação frente a diferentes diésteres de fosfato, o DNPPP e o EDNPP.

Os estudos cinéticos foram realizados da mesma maneira que os experimentos apresentados na seção 4.1.1.

Na Figura 29 tem-se o perfil de pH obtido para as reações de desfosforilação do P5I com o BDNPP, o DNPPP e o EDNPP. As reações apresentaram um incremento nas constantes de velocidade de 1000 vezes para o BDNPP, 100 vezes para o DNPPP e 10 vezes para EDNPP, em comparação com a reação somente em água, assim o P5I atuou como um catalisador supramolecular específico ao substrato BDNPP.

Figura 29 – Perfil de pH da hidrólise do BDNPP (■), DNPPP (▲) e EDNPP (●) na presença de PI [ $5 \times 10^{-4}$  M].



## 5 CONCLUSÃO

Para o estudo da hidrólise no monoéster DNPP em presença do P5A; os resultados por RMN indicaram a inserção do substrato ao macrociclo. A partir de cálculos de dinâmica molecular permitiu-se avaliar a estequiometria do complexo formado, resultando na formação de complexos 1:1. Através dos estudos cinéticos pode-se avaliar a catálise supramolecular, apresentando um incremento de cerca de 10 vezes em comparação com a reação somente em água, obtendo uma constante de velocidade igual  $k_{(D, P5A)} = (7,80 \pm 0,22) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  e uma constante de associação igual a  $5150 \text{ M}^{-1}$  para o diânion do monoéster.

Esses resultados inspirou para a síntese de uma nova molécula de pilar[5]areno contendo 10 grupos imidazois ancorados. Assim o PI foi sintetizado e caracterizado por técnicas de RMN e massa com 50% de rendimento. As reações de desfosforilação com P5I apresentaram um aumento de 1000 vezes para o BDNPP em comparação com a reação somente em água. Através dos estudos cinéticos pode-se avaliar a catálise supramolecular como bifuncional ou ainda nucleofílica, resultando em uma constante de velocidade igual à  $k_{S,P} = 4,79 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  e uma constante de associação igual a  $K_{SP} = 8,73 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ . Os resultados por RMN também indicaram a inserção do substrato BDNPP ao macrociclo PI.

Ainda utilizou diferentes diésteres (substratos) para avaliar a catálise promovida pelo pilarareno imidazol, onde o PI apresentou um aumento de 100 vezes para o DNPPP e 10 vezes para EDNPP, em comparação com a reação somente em água, então o P5I atuou como um catalisador supramolecular específico e mais eficiente ao substrato BDNPP.

Portanto os sistemas supramoleculares de pila[5]areno favorecem a inserção de ésteres de fosfatos em sua cavidade, promovendo um aumento significativo nas constantes de velocidade de reação de desfosforilação, devido principalmente ao seu caráter hidrofóbico em conjunto com o efeito eletrostático.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abell, K. W. Y. e Kirby, A. J. (1983). "Intramolecular general acid catalysis of intramolecular nucleophilic catalysis of the hydrolysis of a phosphate diester." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*(8): 1171-1174.
- Admiraal, S. J. e Herschlag, D. (1999). "Catalysis of phosphoryl transfer from atp by amine nucleophiles." *Journal of the American Chemical Society* **121**(25): 5837-5845.
- Admiraal, S. J., Schneider, B., et al. (1999). "Nucleophilic activation by positioning in phosphoryl transfer catalyzed by nucleoside diphosphate kinase." *Biochemistry* **38**(15): 4701-4711.
- ADMIRAAL, S. J. S., B.; MEYER, P.; JANIN, J.; VÉRON, M.; DEVILLE-BONNE, D.; HERSCHLAG, D. (1999). "Nucleophilic activation by positioning in phosphoryl transfer catalyzed by nucleoside diphosphate kinase." *Biochemistry* **38**(15): 4701-4711.
- Amabilino, D. B. e Gale, P. A. (2017). "Supramolecular chemistry anniversary." *Chemical Society reviews* **46**(9): 2376-2377.
- Anslyn, E.e Breslow, R. (1989). "Geometric evidence on the ribonuclease model mechanism." *Journal of the American Chemical Society* **111**(15): 5972-5973.
- Anslyn, E. V.e Dougherty, D. A. (2006). *Modern physical organic chemistry*. Sausalito, CA, University Science.
- Benkovic, S. J.e Hammes-Schiffer, S. (2003). "A perspective on enzyme catalysis." *Science* **301**(5637): 1196-1202.
- Bentley, R. (1949). "The mechanism of hydrolysis of acetyl dihydrogen phosphate." *Journal of the American Chemical Society* **71**(8): 2765-2767.
- Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., et al. (1987). "The missing term in effective pair potentials." *Journal of Physical Chemistry* **91**(24): 6269 - 6271.
- Bhasikuttan, A. C., Pal, H., et al. (2011). "Cucurbit[n]uril based supramolecular assemblies: Tunable physico-chemical properties and their prospects." *Chemical communications* **47**(36): 9959 - 9971.
- Biedermann, F., Nau, W. M., et al. (2014). "The hydrophobic effect revisited—studies with supramolecular complexes imply high-energy water as a noncovalent driving force." *Angewandte Chemie International Edition* **53**(42): 11158-11171.
- Breslow, R. (1995). "Biomimetic chemistry and artificial enzymes: Catalysis by design." *Accounts of chemical research* **28**(3): 146-153.

- Breslow, R., Doherty, J. B., et al. (1978). ".Beta.-cyclodextrinylbisimidazole, a model for ribonuclease." *Journal of the American Chemical Society* **100**(10): 3227-3229.
- Breslow, R. e Schmuck, C. (1996). "Goodness of fit in complexes between substrates and ribonuclease mimics: Effects on binding, catalytic rate constants, and regiochemistry." *Journal of the American Chemical Society* **118**(28): 6601-6605.
- Bunton, C. A. e Farber, S. J. (1969). "Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate." *The Journal of organic chemistry* **34**(4): 767-772.
- Bunton, C. A., Fendler, E. J., et al. (1967). "The hydrolysis of dinitrophenyl phosphates." *Journal of the American Chemical Society* **89**(5): 1221-1230.
- Cao, D., Kou, Y., et al. (2009). "A facile and efficient preparation of pillararenes and a pillarquinone." *Angewandte Chemie International Edition* **48**(51): 9721-9723.
- Chen, B., Dingerdisen, U., et al. (2005). "New developments in hydrogenation catalysis particularly in synthesis of fine and intermediate chemicals." *Applied Catalysis A: General* **280**(1): 17-46.
- Clayden, J. (2001). *Organic chemistry*. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- Corbridge, D. E. C. (1985). *Phosphorus: An outline of its chemistry, biochemistry, and technology*, Elsevier Science Publishers.
- Cox, J. R. e Ramsay, O. B. (1964). "Mechanisms of nucleophilic substitution in phosphate esters." *Chemical Reviews* **64**(4): 317-352.
- Cragg, P. J. e Sharma, K. (2012). "Pillar[5]arenes: Fascinating cyclophanes with a bright future." *Chemical Society reviews* **41**(2): 597-607.
- Darden, T., York, D., et al. (1993). "Particle mesh ewald: An  $n^*\log(n)$  method for ewald sums in large systems." *Journal of Chemical Physics* **98**(12): 10089 - 10092.
- Domingos, J. B., Longhinotti, E., et al. (2003). "A química dos ésteres de fosfato." *Quimica Nova* **26**: 745-753.
- Gao, J., Ma, S., et al. (2006). "Mechanisms and free energies of enzymatic reactions." *Chemical Reviews* **106**(8): 3188-3209.
- Gesser, J. C., Yunes, S., et al. (1997). "Reações intramoleculares como modelos não miméticos de catálise enzimática." *Quimica Nova* **20**: 631-637.
- Giusti, L. A., Medeiros, M., et al. (2014). "Polymers containing imidazole groups as nanoreactors for hydrolysis of esters." *Journal of Physical Organic Chemistry* **27**(4): 297-302.

- Gokel, G. W., Leevy, W. M., et al. (2004). "Crown ethers: Sensors for ions and molecular scaffolds for materials and biological models." *Chemical Reviews* **104**(5): 2723-2750.
- Gomez, B., Francisco, V., et al. (2014). "Host-guest chemistry of a water-soluble pillar[5]arene: Evidence for an ionic-exchange recognition process and different complexation modes." *Chemistry* **20**(38): 12123-12132.
- Gupta, R. D. (2016). "Recent advances in enzyme promiscuity." *Sustainable Chemical Processes* **4**(1): 2.
- Gupta, R. D. e Tawfik, D. S. (2008). "Directed enzyme evolution via small and effective neutral drift libraries." *Nature Methods* **5**(11): 939 - 942.
- Gutsche, C. D. e Bauer, L. J. (1985). "Calixarenes. 13. The conformational properties of calix[4]arenes, calix[6]arenes, calix[8]arenes, and oxacalixarenes." *Journal of the American Chemical Society* **107**(21): 6052-6059.
- Hess, B. B., Berendsen, H. J. C., et al. (1997). "3 lincs: A linear constraint solver for molecular simulations." *Journal of Computational Chemistry* **18**(12): 1463-1472.
- Khan, S. A. e Kirby, A. J. (1970). "The reactivity of phosphate esters. Multiple structure-reactivity correlations for the reactions of triesters with nucleophiles." *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*(0): 1172-1182.
- Kim, H. J., Lee, M. H., et al. (2012). "Host-guest sensing by calixarenes on the surfaces." *Chemical Society reviews* **41**(3): 1173-1190.
- Kirby, A. J. e Jencks, W. P. (1965). "The reactivity of nucleophilic reagents toward the p-nitrophenyl phosphate dianion." *Journal of the American Chemical Society* **87**(14): 3209-3216.
- Kirby, A. J., Lima, M. F., et al. (2006). "Efficient intramolecular general acid catalysis of nucleophilic attack on a phosphodiester." *Journal of the American Chemical Society* **128**(51): 16944-16952.
- Kirby, A. J. e Marriott, R. E. (2002). "General base catalysis vs. Medium effects in the hydrolysis of an rna model." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*(3): 422-427.
- Kirby, A. J., Medeiros, M., et al. (2013). "Intramolecular general base catalysis in the hydrolysis of a phosphate diester. Computational guidance to a choice of mechanism." *Journal of Organic Chemistry* **78**(4): 1343 - 1353.
- Kirby, A. J. e Nome, F. (2015). "Fundamentals of phosphate transfer." *Accounts of chemical research* **48**(7): 1806-1814.
- Kirby, A. J. e Varvoglis, A. G. (1967). "The reactivity of phosphate esters. Monoester hydrolysis." *Journal of the American Chemical Society* **89**(2): 415-423.

- Kirby, A. J. e Younas, M. (1970). "The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis." *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*(0): 510-513.
- Kirby, A. J. e Younas, M. (1970). "The reactivity of phosphate esters. Reactions of diesters with nucleophiles." *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*(0): 1165-1172.
- Koolman, J. e Röhm, K.-H. (2005). *Color atlas of biochemistry*. Stuttgart ; New York, Thieme.
- Kraut, D. A., Carroll, K. S., et al. (2003). "Challenges in enzyme mechanism and energetics." *Annual review of biochemistry* **72**(1): 517-571.
- Kraut, J. (1988). "How do enzymes work?" *Science* **242**(4878): 533-540.
- Lehn, J.-M. (1988). "Supramolecular chemistry—scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices (nobel lecture)." *Angewandte Chemie International Edition in English* **27**(1): 89-112.
- Lehn, J.-M. (1990). "Perspectives in supramolecular chemistry—from molecular recognition towards molecular information processing and self-organization." *Angewandte Chemie International Edition in English* **29**(11): 1304-1319.
- Lehn, J.-M. (1993). "Supramolecular chemistry." *Science* **260**(5115): 1762-1764.
- Lehn, J. M. (1994). *Perspectives in supramolecular chemistry: From molecular recognition towards self-organisation*. Pure and Applied Chemistry. **66**: 1961.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., et al. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*. New York, Worth Publishers.
- Ma, Y., Ji, X., et al. (2011). "A cationic water-soluble pillar[5]arene: Synthesis and host-guest complexation with sodium 1-octanesulfonate." *Chemical communications* **47**(45): 12340-12342.
- Machado, V. G.eNome, F. (1999). "Compostos fosfatados ricos em energia." *Quimica Nova* **22**: 351-357.
- Malenkovskaya, Vasyanina, et al. (2015). "Nmr spectroscopy study of complex formation between dimeric derivative of beta-cyclodextrine and some pharmacologically important compounds." *Russian Journal of General Chemistry* **85**(7): 1681 - 1685.
- Mikkelsen, K. e Nielsen, S. O. (1960). "Acidity measurements with the glass electrode in h2o-d2o mixtures." *The Journal of Physical Chemistry* **64**(5): 632-637.
- Miyamoto, S. e Kollman, P. A. (1992). "Settle: An analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models." *Journal of Computational Chemistry* **13**(8): 952-962.

- Montes-García, V., Fernández-López, C., et al. (2014). "Pillar[5]arene-mediated synthesis of gold nanoparticles: Size control and sensing capabilities." *Chemistry – A European Journal* **20**(27): 8404-8409.
- Ogoshi, T., Demachi, K., et al. (2011). "Selective complexation of n-alkanes with pillar[5]arene dimers in organic media." *Chemical communications* **47**(37): 10290-10292.
- Ogoshi, T., Kanai, S., et al. (2008). "Para-bridged symmetrical pillar[5]arenes: Their lewis acid catalyzed synthesis and host-guest property." *Journal of the American Chemical Society* **130**(15): 5022-5023.
- Ogoshi, T., Shiga, R., et al. (2011). "'Clickable' pillar[5]arenes." *Chemical communications* **47**(24): 6927-6929.
- Ogoshi, T., Ueshima, N., et al. (2012). "Ionic liquid pillar[5]arene: Its ionic conductivity and solvent-free complexation with a guest." *Chemical communications* **48**(29): 3536-3538.
- Ogoshi, T. e Yamagishi, T.-a. (2013). "Pillararenes: Versatile synthetic receptors for supramolecular chemistry." *European Journal of Organic Chemistry* **2013**(15): 2961-2975.
- Orth, E. S., Brandao, T. A., et al. (2010). "Intramolecular catalysis of phosphodiester hydrolysis by two imidazoles." *Journal of the American Chemical Society* **132**(24): 8513-8523.
- Orth, E. S., Brandão, T. A. S., et al. (2008). "Intramolecular acid-base catalysis of a phosphate diester: Modeling the ribonuclease mechanism." *Journal of the American Chemical Society* **130**(8): 2436-2437.
- Orth, E. S., Wanderlind, E. H., et al. (2011). "Phosphorylimidazole derivatives: Potentially biosignaling molecules." *The Journal of organic chemistry* **76**(19): 8003-8008.
- Pastor, A. e Martínez-Viviente, E. (2008). "Nmr spectroscopy in coordination supramolecular chemistry: A unique and powerful methodology." *Coordination Chemistry Reviews* **252**(21–22): 2314-2345.
- Pereira, M. S., Murta, B., et al. (2016). "Mechanistic aspects of phosphate diester cleavage assisted by imidazole. A template reaction for obtaining aryl phosphoimidazoles." *The Journal of organic chemistry* **81**(19): 8663-8672.
- Prockop, L. D. (2006). "Weapons of mass destruction: Overview of the cbrnes (chemical, biological, radiological, nuclear, and explosives)." *Journal of the neurological sciences* **249**(1): 50-54.
- Pronk, S., Páll, S., et al. (2013). "Gromacs 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit." *Bioinformatics* **29**(7): 845-854.

- Raines, R. T. (1998). "Ribonuclease a." *Chemical Reviews* **98**(3): 1045-1066.
- Rawji, G. M.eMilburn, R. N. (1981). "2,4-dinitrophenyl dihydrogen phosphate - a new synthesis of its mono-2,6-lutidinium salt." *Journal of Organic Chemistry* **46**(6): 1205-1206.
- Raynal, M., Ballester, P., et al. (2014). "Supramolecular catalysis. Part 1: Non-covalent interactions as a tool for building and modifying homogeneous catalysts." *Chemical Society reviews* **43**(5): 1660-1733.
- Raynal, M., Ballester, P., et al. (2014). "Supramolecular catalysis. Part 2: Artificial enzyme mimics." *Chemical Society reviews* **43**(5): 1734-1787.
- Schmid, N., Eichenberger, A. P., et al. (2011). "Definition and testing of the gromos force-field versions 54a7 and 54b7." *European Biophysics Journal* **40**(7): 843.
- Schowen, R. L. (2003). "How an enzyme surmounts the activation energy barrier." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(21): 11931 - 11932.
- Shinkai, S., Shirahama, Y., et al. (1989). "Perkin communications. Cationic water-soluble calixarenes: New host molecules which catalyse basic hydrolysis of a phosphate ester." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(10): 1859-1860.
- Si, W., Chen, L., et al. (2011). "Selective artificial transmembrane channels for protons by formation of water wires." *Angewandte Chemie* **123**(52): 12772-12776.
- Sowa, G. A., Hengge, A. C., et al. (1997). "<sup>18</sup>O isotope effects support a concerted mechanism for ribonuclease a." *Journal of the American Chemical Society* **119**(9): 2319-2320.
- Strutt, N. L., Zhang, H., et al. (2012). "A self-complexing and self-assembling pillar[5]arene." *Chemical communications* **48**(11): 1647-1649.
- Szejtli, J. (1998). "Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry." *Chemical Reviews* **98**(5): 1743-1754.
- Thordarson, P. (2011). "Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry." *Chemical Society reviews* **40**(3): 1305-1323.
- Venturini, C. d. G., Nicolini, J., et al. (2008). "Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas." *Quimica Nova* **31**: 360-368.
- Westheimer, F. H. (1987). "Why nature chose phosphates." *Science & Technology Libraries* **235**(4793): 1173-1178.
- Xue, M., Yang, Y., et al. (2012). "Pillararenes, a new class of macrocycles for supramolecular chemistry." *Accounts of chemical research* **45**(8): 1294-1308.

- Yu, G., Jie, K., et al. (2015). "Supramolecular amphiphiles based on host-guest molecular recognition motifs." *Chemical Reviews* **115**(15): 7240-7303.
- Yu, G., Zhou, X., et al. (2012). "Pillar[6]arene/paraquat molecular recognition in water: High binding strength, ph-responsiveness, and application in controllable self-assembly, controlled release, and treatment of paraquat poisoning." *Journal of the American Chemical Society* **134**(47): 19489-19497.
- Zecchina, A., Groppo, E., et al. (2007). "Selective catalysis and nanoscience: An inseparable pair." *Chemistry* **13**(9): 2440-2460.

## APÊNDICE

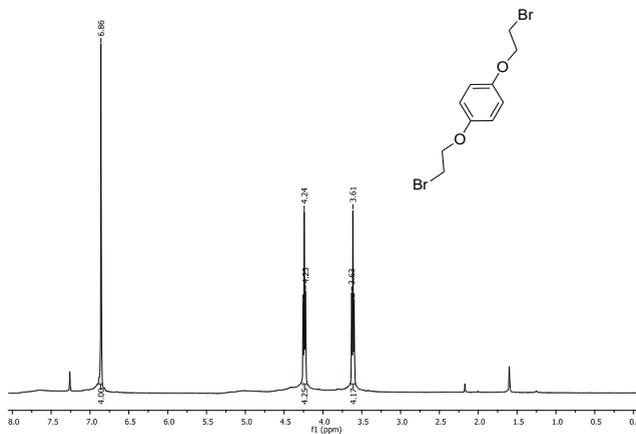
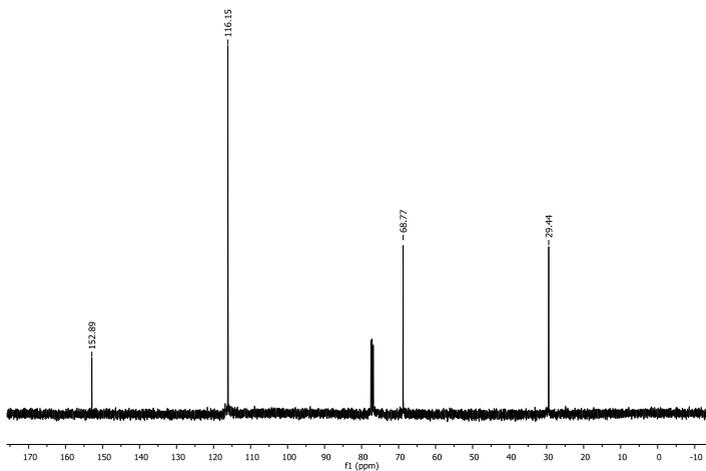
Figura A1 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) do composto 1Figura A2 -  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) do composto 1

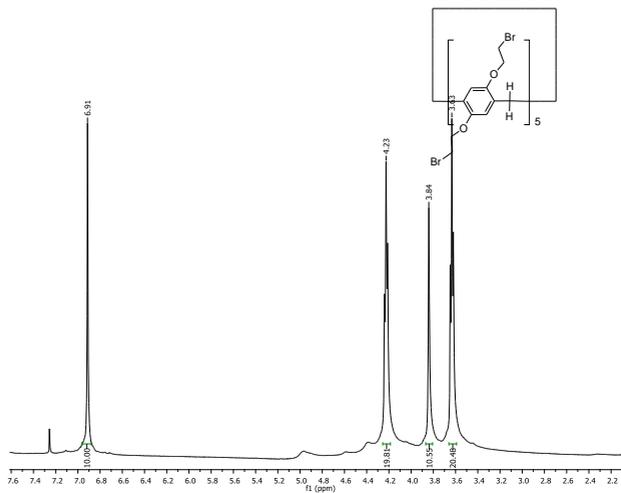
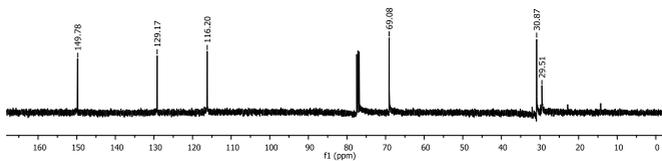
Figura A3 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) do composto 2Figura A4 -  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) do composto 2

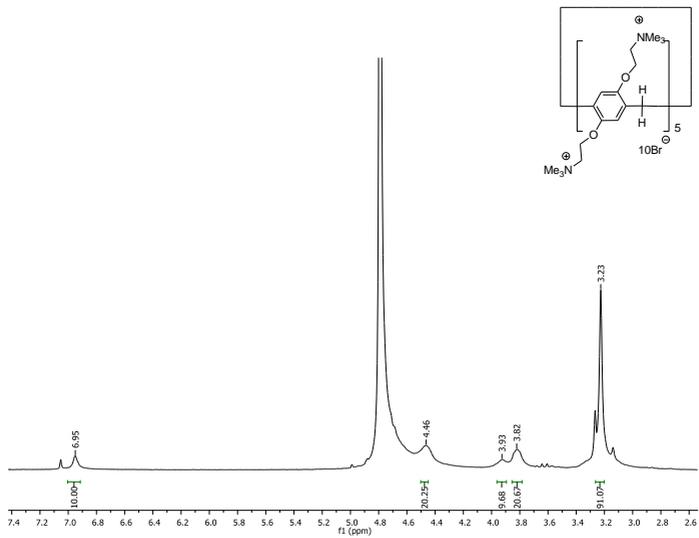
Figura A5 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 200 MHz) do composto 3

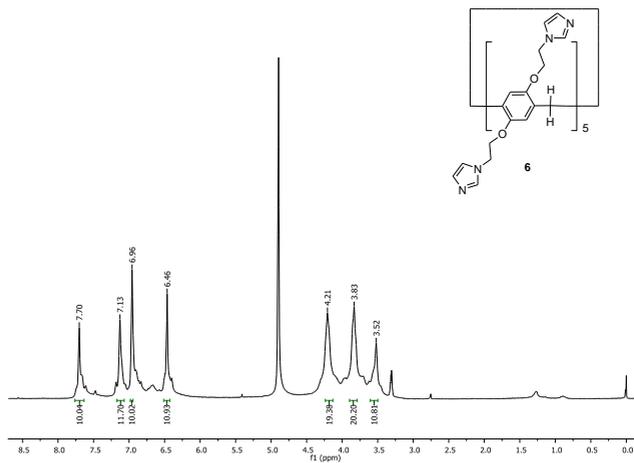
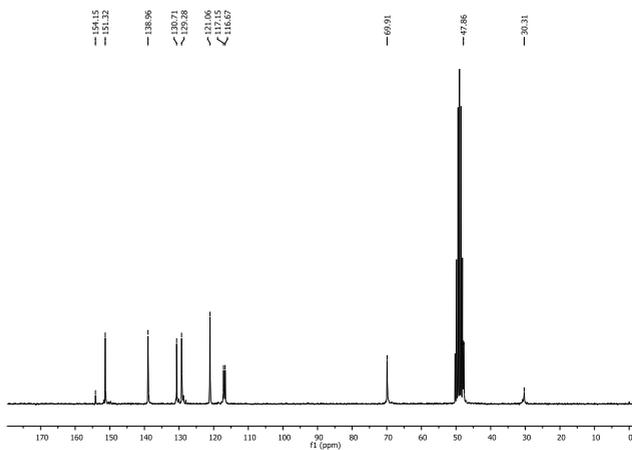
Figura A6 -  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 200 MHz) do composto 4Figura A7-  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD, 50 MHz) do composto 4

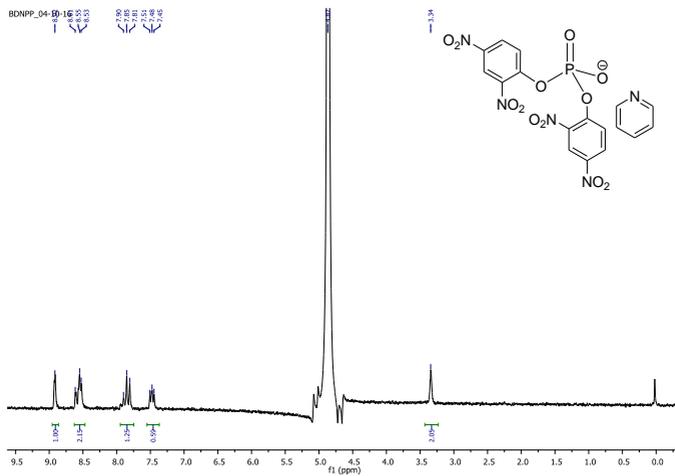
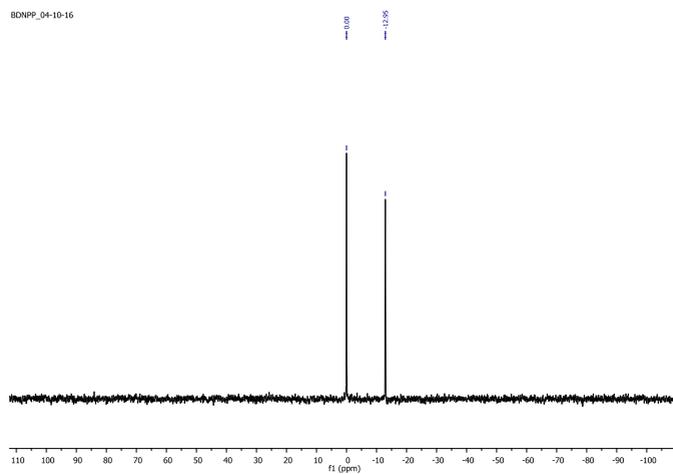
Figura A8-  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 50 MHz) do composto 5Figura A9 –  $^{31}\text{P}$  NMR (MeOD, 80 MHz) do composto 5



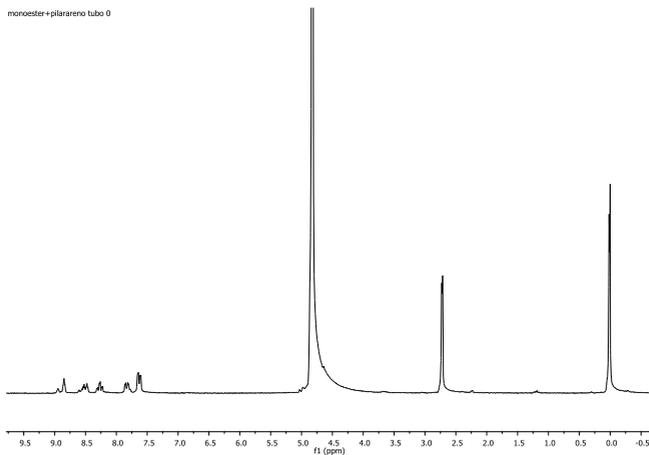
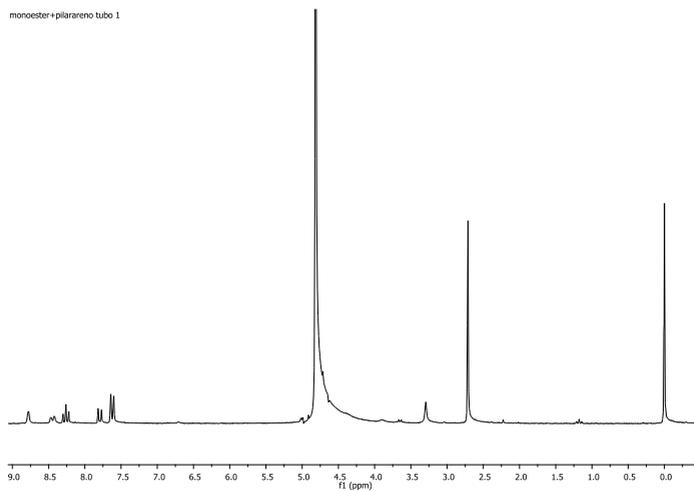
Figura A12 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) DNPP 19mMFigura A13 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) DNPP 19mM + P5A 0.7Mm

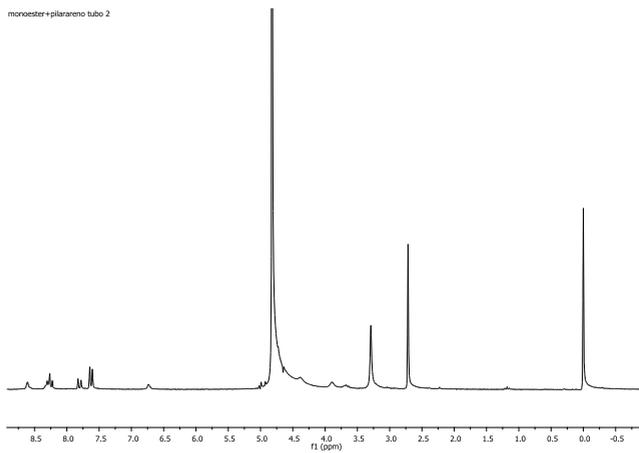
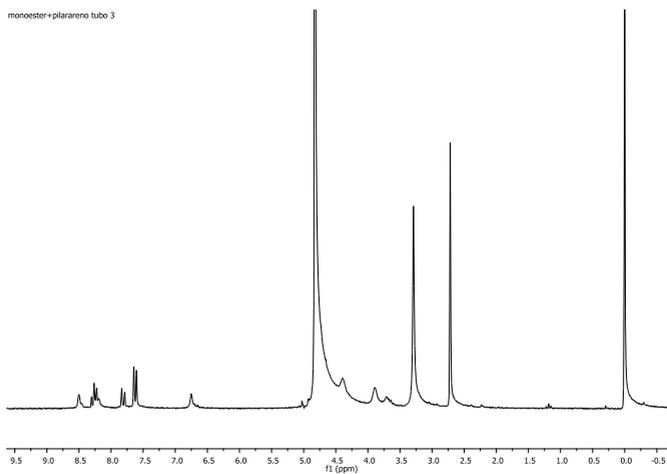
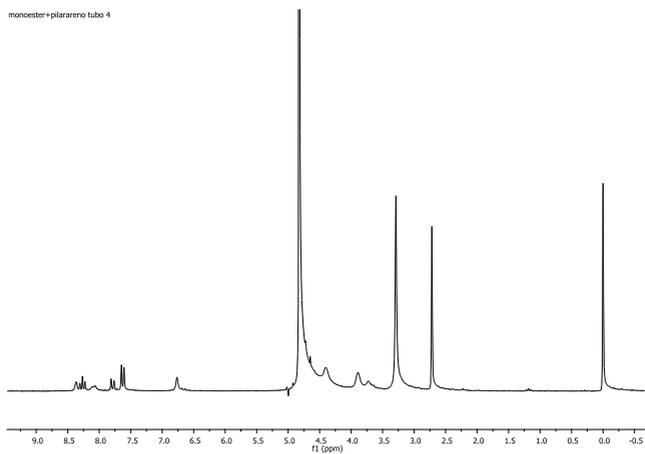
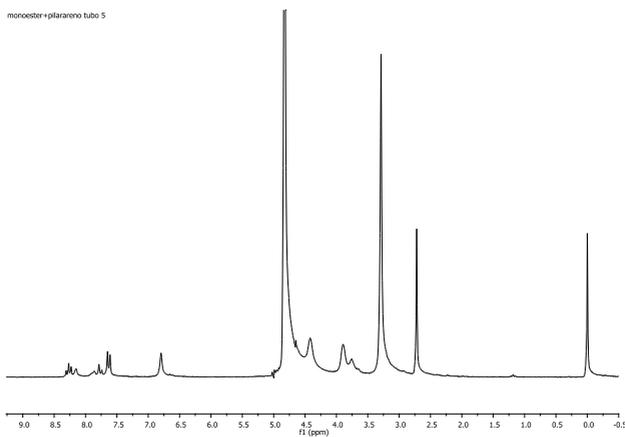
Figura A14 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) DNPP 19mM + P5A 1.5mMFigura A15 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) DNPP 19mM + P5A 2.5mM

Figura A16 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) DNPP 19mM + P5A 3.5mMFigura A17 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) DNPP 19mM + P5A 6.0mMFigura A18 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) DNPP 19mM + P5A 16mM

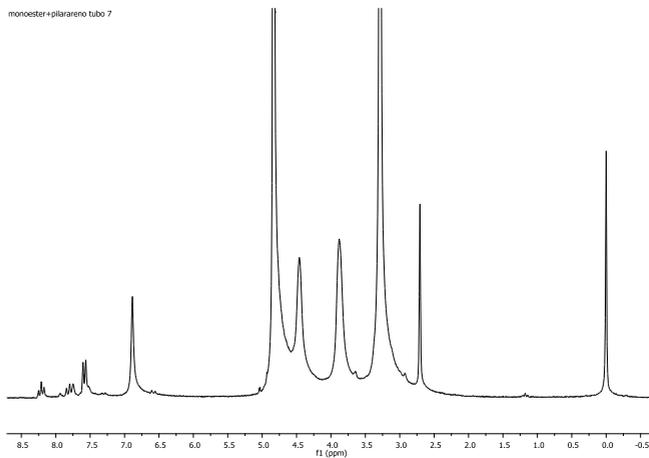


Figura A19 -  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) DNPP 19mM + P5A 25mM

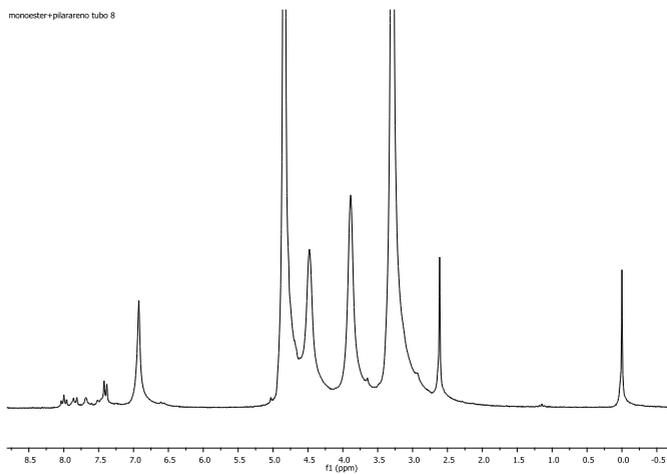


Tabela A1 - Valores de  $k_{\text{obs}}$  em relação à variação da concentração de P5A (M) para a reação com o **DNPP** ( $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ), a  $25^{\circ}\text{C}$ .

[Pilar[5]areno], M	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
0	8,3E-6
1E-5	1,155E-5
2E-5	1,28E-5
3E-5	1,392E-5
4E-5	1,534E-5
5E-5	1,511E-5
6E-5	1,776E-5
7E-5	2,03E-5
8E-5	2,087E-5
9E-5	2,249E-5
1E-4	3,648E-5
5E-4	6,592E-5
0,002	7,81E-5
0,003	7,69E-5
0,006	7,48E-5
0,007	7,26E-5
0,008	7E-5
0,009	7,7E-5
0,01	7,05E-5

Tabela A2 - Valores de  $k_{\text{obs}}$  em função do pH para a reação do **DNPP** ( $5 \times 10^{-5}$  M) com **P5A** (0,002 M) e em água, a 25°C.

<b>pH</b>	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$ , <b>P5A</b>	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$ , <b>H<sub>2</sub>O</b>
2	1,56E-6	3,68E-7
3	3,25E-6	6,32E-7
4	2,18E-5	1,65E-6
5	4,124E-5	6,05E-6
6	4,859E-5	--
7	5,22E-5	8,39E-6
8	5E-5	--
9	5,38E-5	8,28E-6
10	5E-5	--
12	5,8E-5	8,11E-6