

Eduardo Hillmann Wanderlind

**HIDRÓLISE DE ÉSTERES DE FOSFATO NOS ESTADOS
FUNDAMENTAL E EXCITADO. EFEITOS
SUPRAMOLECULARES EM REATIVIDADE E ACIDEZ**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome
Aguilera
Coorientadora: Prof. Dr.^a Haidi D.
Fiedler

Florianópolis
2018

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

Wanderlind, Eduardo Hillmann
Hidrólise de ésteres de fosfato nos estados
fundamental e excitado. Efeitos supramoleculares em
reatividade e acidez. / Eduardo Hillmann Wanderlind
; orientador, Faruk José Nome Aguilera,
coorientadora, Haidi Dálida Fiedler, 2018.
153 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Ésteres de fosfato. 3. Catálise
supramolecular. 4. Fotoquímica orgânica. 5.
Equilíbrios de protonação. I. Aguilera, Faruk José
Nome. II. Fiedler, Haidi Dálida. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Química. IV. Título.

Eduardo Hillmann Wanderlind

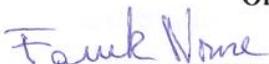
**HIDRÓLISE DE ÉSTERES DE FOSFATO NOS ESTADOS
FUNDAMENTAL E EXCITADO. EFEITOS
SUPRAMOLECULARES EM REATIVIDADE E ACIDEZ**

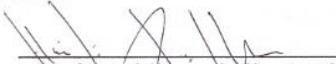
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Química Orgânica” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 06 de abril de 2018.


Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Curso

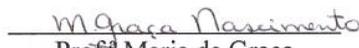
Orientadores:

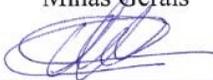

Prof. Faruk José Nome
Aguilera, Dr.
Orientador
Universidade Federal de
Santa Catarina


Prof.^a Haidi D. Fiedler, Dr.^a
Coorientadora
Universidade Federal de
Santa Catarina

Banca Examinadora:


Prof. Tiago Antônio
da Silva Brandão, Dr.
Relator
Universidade Federal de
Minas Gerais


Prof.^a Maria da Graça
Nascimento, Dr.^a
Universidade Federal de
Santa Catarina


Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.
Universidade Federal de
Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais.

Aos Professores Faruk Nome e Haidi Fiedler, pela orientação e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI), e ao Professor Luis García Río, da Universidade de Santiago de Compostela, pela orientação durante meu estágio de doutorado sanduíche.

Aos Professores da banca examinadora, Prof. Tiago A. S. Brandão, Prof.^a Maria da Graça Nascimento e Prof. Gustavo Micke, pela avaliação deste trabalho.

Aos Professores colaboradores do LaCFI: Anthony Kirby (University of Cambridge), Fredric Menger (Emory University), Rodrigo Montecinos (Pontificia Universidad Católica de Chile) e René Nome (UNICAMP).

Aos colegas da UFSC que contribuíram diretamente para a execução dos trabalhos relacionados a essa tese, quer seja experimentalmente, quer seja pelos ensinamentos e discussões: Daiane de Liz, Adriana P. Gerola, Prof. Ricardo F. Affeldt, Vanessa Nascimento, Lizandra Bretanha, Leandro Scorsin, Alexandra Lindner e Prof. Gustavo A. Micke.

Aos colegas com quem tive a oportunidade de trabalhar em outras colaborações no LaCFI: Alex M. Manfredi, Prof. Bruno S. Souza, Catiunaiara R. Bittencourt, Elisa S. Orth, Gizelle I. Almerindo, José R. Mora, Lucas M. Nicolazi, Luciano A. Giusti, Michelle Medeiros, Pedro de Oliveira, Patrícia Sangaletti, Priscila Bueno, Raphael Moreira, Suelen Buratto, Yasmin S. Gomes e Willian Demos.

E, além dos colegas acima, a todos os outros que também sempre se mostraram solícitos e proporcionaram um ambiente agradável: Bruno Surdi, Eduardo Vieira, Elder Leopoldino, Elvis Nishida, Franciane D. Souza, Juliana Bastos, Paulo F. A. Costa, Roberta R. Campedelli, e tantos outros que fazem ou fizeram parte do laboratório.

Aos colegas da Universidade de Santiago de Compostela, por haverem me recebido tão bem durante meu estágio de doutorado sanduíche: Alba Pereira, Álvaro Alonso, Ángel Acuña, Beatriz Fariña, Borja Gómez, Karen Góñez, Lucas Martínez, Lucia Barbera, María Figueira, Mariña

Castro, Josefa Fernández (Pepita), Roberto Colunga e Ronald Nelson.
Em especial, agradeço ao Ángel Acuña pela colaboração experimental e
por todo o conhecimento transmitido.

Ao Alex Micke e ao César Giacomozzi pelo suporte técnico prestado ao
LaCFI.

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

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

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

RESUMO

Esta tese está centrada em três tópicos, englobando química supramolecular e fotoquímica orgânica. Primeiramente, avaliou-se a atividade catalítica e a seletividade promovidas por um pilarareno funcionalizado com anéis imidazóis, o 1,4-bis(2-(1*H*-imidazol-1-il)etóxi) pilar[5]areno (P5IMD), na degradação dos diésteres de fosfato bis-2,4-dinitrofenil fosfato (BDNPP), fenil 2,4-dinitrofenil fosfato (PDNPP) e etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EtDNPP). Foram obtidos incrementos nas velocidades de reação de até 10^4 vezes em comparação com a hidrólise espontânea dos substratos. O efeito catalítico resulta da formação de complexos hóspede-hospedeiro em que os substratos estão apropriadamente inseridos na cavidade de P5IMD através do grupo espectador, permanecendo o grupo de saída voltado para o solvente e na mesma direção que os anéis imidazol, propiciando um mecanismo nucleofílico do tipo $S_N2(P)$ concertado. A seletividade obtida na decomposição dos substratos foi de 1 : 7 : 520 para EtDNPP : PDNPP : BDNPP, e resulta da formação de complexos hóspede-hospedeiro não produtivos no caso dos diésteres assimétricos, nos quais o grupo de saída está inserido na cavidade de P5IMD. Após, investigou-se a fotodegradação da espécie dianiônica do monoéster *p*-nitrofenil fosfato ($pNPP^{2-}$) em meio aquoso utilizando fotólise por pulso de laser e HPLC-DAD. Após a excitação do substrato com laser de 266 nm, observa-se a formação do produto *p*-nitrofenolato em uma janela cinética menor que 10 ns, o que indica uma reação pelo menos 10^{16} vezes mais rápida que a hidrólise da mesma espécie no estado fundamental. Entretanto, o rendimento da reação é substancialmente baixo, o que explica as afirmações recorrentes na literatura de que a luz não promove aceleração na hidrólise de $pNPP^{2-}$ em comparação com a reação no escuro. Por fim, apresentada na forma de apêndice, encontra-se a terceira parte, realizada durante estágio de doutorado-sanduíche no exterior, em que avaliou-se o efeito provocado pelo *p*-sulfonatocalix[4]areno nos equilíbrios de protonação da sonda 4-(2-piridilazo)-*N,N*-dimetil anilina (PADA). Constatou-se que as cargas negativas do calixareno provocam deslocamentos positivos de $\sim 1,5$ e $\sim 2,0$ para pK_{a1} e pK_{a2} , respectivamente, devido a interações favoráveis com as espécies protonadas da sonda.

Palavras-chave: Diéster de fosfato. Pilarareno. Catálise supramolecular. Sulfonatocalixareno. Equilíbrios de protonação. Monoéster de fosfato. Fotossolvólise.

ABSTRACT

This thesis is focused on three subjects, covering the areas of supramolecular chemistry and organic photochemistry. Firstly, the catalytic activity and selectivity of a pillararene substituted with imidazole rings, the 1,4-bis(2-(1*H*-imidazol-1-yl)etoxy) pillar[5]arene (P5IMD), were evaluated in the decomposition of the phosphate diesters bis-2,4-dinitrophenyl phosphate (BDNPP), phenyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (PDNPP) and ethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (EtDNPP). The rate enhancements obtained were up to 10^4 -fold, in comparison with the spontaneous hydrolysis of the substrates. Catalytic effect arises from the formation of host:guest complexes in which the substrates are properly encapsulated in the P5IMD cavity through the spectator group, with the leaving group direct towards the solvent and in the same direction of the imidazole ring, allowing for a nucleophilic concerted $S_N2(P)$ mechanism. The selectivity obtained in the decomposition of the substrates was 1 : 7 : 520 for EtDNPP : PDNPP : BDNPP, resulting from the formation of non-productive host:guest complexes in the case of the asymmetric substrates, with the leaving group positioned inside the P5IMD cavity. Later, the photodecomposition of the dianionic species of the phosphate monoester *p*-nitrophenyl phosphate ($pNPP^{2-}$) in aqueous medium was investigated by laser flash photolysis and HPLC-DAD. After the excitation of the substrate with a 266 nm laser, it is observed the formation of the product *p*-nitrophenolate in a kinetic window shorter than 10 ns, indicating a reaction at least 10^{16} -fold faster than the ground state hydrolysis of the same species. However, the yield of the reaction is substantially low, which explains the recurring affirmations in the literature that light promotes no acceleration in the substrate hydrolysis in comparison with the dark reaction. Lastly, the third part, developed during an internship at the University of Santiago de Compostela/Spain and presented as an appendix, focused on the investigation of the effect of *p*-sulfonatocalix[4]arene in the protonation equilibria of 4-(2-pyridylazo)-*N,N*-dimethylaniline (PADA). It was observed that the negative charges of the calixarene promote positive shifts of ~ 1.5 and ~ 2.0 in pK_{a1} and pK_{a2} , respectively, due to favorable interactions with the protonated species of the probe.

Keywords: Phosphate diester. Pillararene. Supramolecular catalysis. Sulfonatocalixarene. Protonation equilibria. Phosphate monoester. Photosolvolysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks para reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato, exemplificado com um diânion de monoéster. A_N , D_N , e $A_N D_N$ designam etapas associativa, dissociativa e concertada, respectivamente, segundo a nomenclatura IUPAC.⁹ 25
- Figura 2 – Gráficos de Brønsted para grupo de saída para as reações de hidrólise de três séries de triésteres de fosfato, conforme indicado na figura. Valores de pK_a^{HA} referem-se ao ácido conjugado do grupo de saída ArO^- . Dados de k_0 para as séries $(CF_3CH_2O)_2P(O)OAr$ e $(ArO)_3P=O$ foram obtidos a 25°C, e os dados para a série de triésteres derivados do 1,3-propanodiol foram extrapolado para 25°C.¹² 28
- Figura 3 – Triésteres de fosfato cujas reações de hidrólise foram investigadas por Kirby e colaboradores.¹⁴ 30
- Figura 4 – Gráficos de Brønsted para grupo espectador na hidrólise da série de triésteres $(RO)_2P(O)OpNP$ (estrutura e grupos espectadores são indicados na figura), a 25°C. Valores de sensibilidade ao grupo espectador (β_{NLG}) são -0,28 e -0,60 para as retas considerando substituintes arílicos e alquílicos, respectivamente.¹⁴ 31
- Figura 5 – Posições de substituição isotópica comuns para estudos de KIE, exemplificadas com um monoéster de fosfato com grupo de saída *p*-nitrofenolato.¹⁹ 34
- Figura 6 – Gráfico de Brønsted reportado por Kirby e Younas para a hidrólise dos ânions $(RO)_2PO_2^-$ (estruturas são apresentadas no Esquema 7), a 100°C.²³ 37
- Figura 7 – Gráfico de Brønsted para grupo espectador para a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato, a 100°C.²⁹ 41
- Figura 8 – Estruturas de ânions de diésteres de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenolato.²⁴ 41
- Figura 9 – Estado de transição para a hidrólise de um ânion de diéster de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenolato, envolvendo três moléculas de água discretas.²⁴ 42
- Figura 10 – Dependência das constantes de hidrólise de ânions de diésteres de fosfato e de triésteres de fosfato em relação ao pK_a^{HA} do grupo espectador. Para a série de diésteres $RO(PO_2^-)OpNP$, valores de ΔG^\ddagger são teóricos e calculados para 25°C, considerando três moléculas de água discretas;²⁴ para a série de diésteres com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato, dados são experimentais a 100°C,²⁹ e para a série de

triésteres, dados são teóricos, para 25°C, de Mora e colaboradores. ¹⁵ Figura adaptada da referência 24.	43
Figura 11 – Gráfico de Brønsted para grupo de saída para a hidrólise de diânions de monoésteres de fosfato, a 39°C. ³² Os dados representados em ○ foram obtidos por Di Sabato e Jencks ³⁶ para a hidrólise de uma série de diânions de monoésteres de benzoíla. Os demais dados foram obtidos por Kirby e Varvoglis ³² : (▲) monoésteres sem substituintes em posição <i>orto</i> ; (■) monoésteres com substituintes –NO ₂ em posição <i>orto</i> ; e (□) monoésteres com substituintes –Cl em posição <i>orto</i>	46
Figura 12 – Diferentes mecanismos de catálise promovida pelo imidazol.	53
Figura 13 – Bolsos hidrofóbicos formados pela agregação entre PAIM e monômeros de CTAB favorecem a reação entre o substrato DEDNPP e os grupos funcionais carboxilato e imidazol do polímero. Figura adaptada da referência 65.	59
Figura 14 – Estrutura geral de um calixareno (à esquerda), e representações genéricas de calixarenos com 4 e 6 unidades.	60
Figura 15 – Conformações possíveis para calix[4]arenos em meio aquoso.	61
Figura 16 – À esquerda, unidade genérica de um pilarareno, e exemplos de estruturas formadas por cinco unidades.	61
Figura 17 – O composto 7 é um representante dos compostos azo cujos equilíbrios de protonação foram investigados por Bakirci em presença de SC4. A estrutura SC4:7H ⁺ representa a estrutura do complexo hóspede:hospedeiro entre SC4 e a espécie protonada de 7. ⁷⁴	63
Figura 18 – Diagrama de Jablonski, representando os principais processos fotofísicos que podem ocorrer com uma molécula orgânica em solução.	65
Figura 19 – Processos fotoquímicos primários.	67
Figura 20 – Diagrama de estado de energia genérico que considera processos fotofísicos e fotoquímicos para uma molécula orgânica em solução.	68
Figura 21 – Coordenadas de reação de um estado singlete nos estados fundamental e excitado.....	70
Figura 22 – Representação simplificada do espectrômetro de fotólise por pulso de laser LKS80 da Applied Photophysics.	83
Figura 23 – Estruturas do P5IMD e dos diésteres de fosfato estudados.....	86
Figura 24 – Titulação potenciométrica de P5IMD em H ₂ O:MeOH 65:35 (v/v), a 25°C, utilizando KOH 0,08366 M. No detalhe, a quantidade	

adicionada de base é apresentada na forma da razão “a”, isto é, mmol de base adicionada por mmol de P5IMD.	87
Figura 25 – Gráficos de distribuição de espécies de P5IMD em função do pH, considerando os cinco valores de pK_a determinados pela titulação potenciométrica.	88
Figura 26 – Deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos de P5IMD (conforme numeração na figura) em função do pD, em $D_2O:CD_3OD$ 65:35 (v/v), a 25°C.....	89
Figura 27 – Espectros de RMN 1H (200 MHz) de P5IMD 1,5 mM em diferentes concentrações de BDNPP, conforme indicado na figura, em $D_2O:CD_3OD$ 65:35 (v/v), pD 5,5, a 25°C. O espectro inferior foi obtido na ausência de BDNPP. A numeração dos prótons $H_1 - H_4$ é a mesma da Figura 26.	90
Figura 28 – Perfil de absorvância (360 nm) em função do tempo na reação de BDNPP com P5IMD. Condições: P5IMD 5,41 mM, BDNPP $2,19 \times 10^{-5}$ M, pH 7,4, em $H_2O:MeOH$ 65:35 (v/v), a 25°C.....	91
Figura 29 – Perfis de concentração de P5IMD na reação com BDNPP ($2,19 \times 10^{-5}$ M), em $H_2O:MeOH$ 65:35 (v/v), a 25 °C, em pH = 8,8 e 4,3. As linhas sólidas representam ajustes através da equação 1..	93
Figura 30 – Valores de k_{obs} em função do pH na reação de BDNPP ($2,19 \times 10^{-5}$ M) com P5IMD 5 mM em $H_2O:MeOH$ 65:35 (v/v), a 25 °C. A linha tracejada corresponde ao perfil de hidrólise espontânea de BDNPP, obtida a partir de dados da literatura. ¹⁰⁵	95
Figura 31 – Perfis de concentração de P5IMD nas reações com os diésteres de fosfato BDNPP, PDNPP e EtDNPP, em $H_2O:MeOH$ 65:35 (v/v), a 25 °C e pH 8,8.....	97
Figura 32 – Espectros de RMN 1H (200 MHz) de P5IMD 1,5 mM em diferentes concentrações de PDNPP, conforme indicado na figura, em $D_2O:CD_3OD$ 65:35 (v/v), pD 5,5, a 25°C. O espectro inferior foi obtido na ausência de PDNPP. A designação dos prótons de P5IMD é a mesma da Figura 26.....	100
Figura 33 – Imagens dos complexos hospede:hospedeiro 1:1 entre os diésteres de fosfato e P5IMDH $_6^{6+}$. Em (A), inserção de BDNPP em P5IMDH $_6^{6+}$; em (B) e (C), inserção de PDNPP em P5IMDH $_6^{6+}$ através dos fragmentos 2,4-dinitrofenil e fenil, respectivamente e em (D), inserção de EtDNPP em P5IMDH $_6^{6+}$ através dos fragmentos 2,4-dinitrofenil e etil, respectivamente. Átomos são representados pelas cores: carbono em azul claro, hidrogênio em branco, nitrogênio em azul escuro, fósforo em marrom, e oxigênio em vermelho. Para simplificação, os fragmentos inseridos na cavidade de P5IMDH $_6^{6+}$ são representados em verde, e as moléculas de água e os íons Br^- e Na^+ foram omitidos.	102

Figura 34 – Imagens instantâneas de P5IMDH₆⁶⁺ e BDNPP (mostrado em verde) em função da distância de interação. Para simplificação, as moléculas de água e os íons foram omitidos. A legenda das cores é a mesma empregada na Figura 33. 103

Figura 35 – Valores de ΔG em função da distância de interação entre o centro da cavidade de P5IMDH₆⁶⁺ e dos ânions dos diésteres de fosfato BDNPP, EtDNPP e PDNPP, na formação dos diferentes complexos hóspede-hospedeiro da Figura 33. Para computar as distâncias, foram tomados como referência nos substratos: o centro de massa do grupo nitro no fragmento 2,4-dinitrofenil (DN), o carbono em posição 4 no fragmento fenil (Ph), e o centro de massa da metila no fragmento etil (Et). 103

Figura 36 – Cromatogramas de HPLC-DAD de amostras de *p*NPP²⁻ submetidas a um número crescente de pulsos de laser de 266 nm (18,3 mJ/pulso), conforme indicado na figura. O eixo y corresponde à absorbância em 320 nm. As amostras encontravam-se equilibradas ao ar, e continham 0,23 mM de *p*NPP²⁻ em 9,0, a 25 °C. 107

Figura 37 – Em (A) e (B), espectros de UV/Vis das espécies eluídas em 2,70 e 8,30 min na análise de HPLC da Figura 36, isto é, *p*NPP e *p*-nitrofenol, respectivamente (são mostrados dados até 650 pulsos de laser). Em (C), respectivos valores de absorbância em função do número de pulsos de laser, em 294 nm para o *p*NPP, e 318 nm para o *p*-nitrofenol. 108

Figura 38 – Espectro de fotólise por pulso de laser obtido após a irradiação de uma amostra equilibrada ao ar de *p*NPP²⁻ 0,1 mM em pH 7,0 com pulso de laser de 266 nm (26 mJ/pulso), a 25°C. 109

Figura 39 – Perfis transientes em 400 nm obtidos após irradiação de amostra de *p*NPP²⁻ 0,2 mM em pH 7,0 com laser de 266 nm em diferentes temperaturas: 16,3 (a), 25,0 (b), 40,0 (c), e 55,0 °C (d). No detalhe, expansão dos primeiros 10 ns. 110

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Definição e classificação dos ésteres de fosfato....	23
Esquema 2 – Reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.....	24
Esquema 3 – Hidrólise de triésteres de fosfato derivados do 1,3-propanodiol. ¹¹	27
Esquema 4 – Mecanismo proposto por Khan e Kirby para a hidrólise de triésteres de fosfato. ¹¹	28
Esquema 5 – Mecanismo proposto inicialmente para a hidrólise do triéster TPP. ¹³	29
Esquema 6 – Mecanismo proposto para a hidrólise dos triésteres (RO) ₂ P(O)OpNP, exemplificado com OR = OPh. ¹⁵	32
Esquema 7 – Hidrólise de ânions de diésteres de fosfato. ²³	36
Esquema 8 – Propostas mecanísticas para a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato. ²³	38
Esquema 9 – Reações dos ésteres monoalquílicos da uridina 3`-fosfato em meio aquoso. ^{25,26}	39
Esquema 10 – Mecanismo proposto para a hidrólise da espécie aniônica de 2. ²⁸	40
Esquema 11 – Reações de hidrólise de monoésteres de fosfato reportadas por Kirby e Varvoglis. ³²	45
Esquema 12 – Mecanismo proposto inicialmente para a hidrólise de diânions de monoésteres de fosfato. ³²	47
Esquema 13 – Propostas mecanísticas para a hidrólise de monoânions de monoésteres de fosfato. ³²	47
Esquema 14 – Reações de hidrólise de monoânions de monoésteres de fosfato. ³²	48
Esquema 15 – Mecanismo para hidrólise de monoânion de monoéster de fosfato. ³²	48
Esquema 16 – Mecanismos plausíveis para a hidrólise de monoânions e diânions de monoésteres de fosfato. ¹⁰	50
Esquema 17 – Mecanismo proposto para RNase A. ^{58,59}	54
Esquema 18 – Mecanismo de catálise promovida por imidazóis na família de enzimas fosfolipase D. ⁶⁰	54
Esquema 19 – Mecanismos de decomposição da espécie dipolar iônica do diéster BMIPP. ^{61,62}	55
Esquema 20 – Reações dos ésteres de fosfato EtDNPP e DEDNPP com imidazol. ³¹	56
Esquema 21 – Decomposição de BDNPP por imidazol. ³¹	57

Esquema 22 – Reação de DEDNPP com BIm nos meios micelares de CTAB e SDS. ⁶³	57
Esquema 23 – Polímero PAIM e seus equilíbrios de dissociação ácida. ⁶⁴	58
Esquema 24 – Hidrólise de diéster de fosfato catalisada por β -ciclodextrinas funcionalizadas com imidazol. ⁶⁶	60
Esquema 25 – Reação de hidrólise do diânion do monoéster DNPP em presença de P5A. ⁷²	62
Esquema 26 – Reação de desproteção fotoquímica do ATP. ⁸¹ ..	73
Esquema 27 – Fotólise do dibenzil fosfato. ⁸⁴	73
Esquema 28 – Fotólise do <i>m</i> -nitrofenil fosfato em meio aquoso. ⁷⁹	74
Esquema 29 – Fotólise de fosfatos dietil benzílicos. ^{93,94}	75
Esquema 30 – Marcação isotópica na fotólise do dietil benzil fosfato. ^{93,94}	75
Esquema 31 – Fotólise do <i>S</i> (-)-dietil 1-feniletil fosfato. ^{93,94}	75
Esquema 32 – Fotólise de triésteres de fosfato contendo um grupo 5-hexenil. ^{79,95}	77
Esquema 33 – Representação simplificada dos equilíbrios de dissociação ácida dos anéis imidazólicos de P5IMD.....	88
Esquema 34 – Reação de BDNPP com P5IMD.	92
Esquema 35 – Ciclo catalítico proposto para a degradação de BDNPP por P5IMD.	96
Esquema 36 – Reação entre um anel imidazol de P5IMD e BDNPP no complexo hóspede:hospedeiro. DNPO ⁻ representa 2,4-dinitrofenolato.	99
Esquema 37 – A reação entre um anel imidazol de P5IMD e o substrato PDNPP ocorre somente no complexo hóspede:hospedeiro da esquerda.	99
Esquema 38 – Fotólise do diânion de <i>p</i> NPP.	105
Esquema 39 – Esquema simplificado da fotohidrólise de <i>p</i> NPP ²⁻	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores típicos de KIE para a hidrólise de ésteres de fosfato. Para diésteres e triésteres, os dados referem-se à hidrólise alcalina. ^{a,b}	35
Tabela 2 – Constantes de velocidade observadas para a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato e diferentes grupos espectadores, conforme mostrado na reação abaixo, a 100°C, reportadas por Kirby e colaboradores. ²⁹	40
Tabela 3 – Constantes de velocidade e de equilíbrio para a reação de BDNPP com P5IMD, em H ₂ O:MeOH 65:35 (v/v), a 25°C. ^a	94
Tabela 4 – Constantes de velocidade e de equilíbrio para as reações dos diésteres de fosfato BDNPP, PDNPP e EtDNPP com P5IMD, em H ₂ O:MeOH 65:35 (v/v), a 25°C.	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – acetilcolinesterase
ATP – trifosfato de adenosina
BDNPP – bis-2,4-dinitrofenil fosfato
BIm – 3,5-bis((1*H*-imidazol-1-il)metil)anilina
bis-tris – bis(2-hidroxi)etilamino-tris(hidroxi)metilmetano
BMIPP – bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ino-2-il)fenil) fosfato
CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio
DEDNPP – dietil 2,4-dinitrofenil fosfato
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNPO⁻ – 2,4-dinitrofenolato
DPP – di-2-piridil fosfato
EtDNPP – etil 2,4-dinitrofenil fosfato
IMZ – imidazol
LaCFI – Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais
Nd:YAG – Neodímio : Ítrio-Alumínio-Granada
P5A – pilarareno funcionalizado com grupos trimetilamônio
P5IMD – 1,4-bis(2-(1*H*-imidazol-1-il)etóxi)pilar[5]areno
PADA – 4-(2-piridilazo)-*N,N*-dimetil anilina
PAIM – poli(ácido acrílico) funcionalizado com 1-(3-aminopropil)imidazol
P_i – fosfato inorgânico, espécies H₃PO₄, H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻, PO₄³⁻
PDNPP – fenil 2,4-dinitrofenil fosfato
p*K*_a – logaritmo da constante de dissociação ácida de uma espécie
PME – *particle-mesch Ewald*
PMF – Potencial de Força Média
pNPP – 4-nitrofenil fosfato
RNA – ácido ribonucléico
RNAse A – ribonuclease A
SC4 – *p*-sulfonatocalix[4]areno
SDS – dodecil sulfato de sódio
SPC – *single point charge*
T3CIPP – tris-3-clorofenil fosfato
tris – tris(hidroxi)metilaminometano
TPP – tris-2-piridil fosfato
β_{LG} – sensibilidade ao grupo de saída
β_{NLG} – sensibilidade ao grupo espectador
β_{nuc} – sensibilidade ao nucleófilo

SUMÁRIO

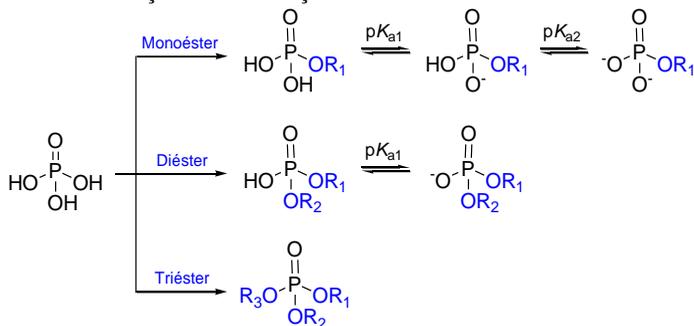
1	INTRODUÇÃO	23
1.1	DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ÉSTERES DE FOSFATO, E REATIVIDADE NO ESTADO FUNDAMENTAL	23
1.1.1	Hidrólise de triésteres de fosfato	27
1.1.2	Hidrólise de diésteres de fosfato	36
1.1.3	Hidrólise de monoésteres de fosfato	44
1.1.4	Catálise e efeitos supramoleculares na hidrólise de ésteres de fosfato	53
1.2	FOTOFÍSICA E FOTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS EM SOLUÇÃO	64
1.2.1	Fotoquímica de ésteres de fosfato.....	72
2	OBJETIVOS	79
2.1	OBJETIVOS GERAIS	79
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	80
3	MATERIAIS E MÉTODOS	81
3.1	DEGRADAÇÃO DE DIÉSTERES DE FOSFATO POR P5IMD	81
3.2	FOTÓLISE DO MONOÉSTER <i>p</i> NPP.....	82
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1	DEGRADAÇÃO DE DIÉSTERES DE FOSFATO POR P5IMD	85
4.2	FOTÓLISE DO MONOÉSTER <i>p</i> NPP.....	105
5	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS	117
	APÊNDICE A – DADOS CINÉTICOS E DE RMN ¹H	131
	APÊNDICE B – DADOS DE FOTÓLISE POR PULSO DE LASER	135
	APÊNDICE C – DOUTORADO-SANDUÍCHE	137
	ANEXO A – DADOS DE RMN ³¹P	151
	LISTA DE PUBLICAÇÕES DE 2014–2018	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ÉSTERES DE FOSFATO, E REATIVIDADE NO ESTADO FUNDAMENTAL

Os ésteres de fosfato compreendem uma classe de compostos derivados do ácido fosfórico, onde um ou mais dos grupos hidróxido encontram-se substituídos por grupos alcóxido ou arilóxido. Assim, os ésteres de fosfato podem ser classificados em mono-, di-, ou triésteres de acordo com o número de substituições, Esquema 1. Ressalta-se que o grupo fosfato em mono- e diésteres fosfóricos possui hidrogênios ionizáveis, de modo que os equilíbrios de dissociação ácida levam à formação de diferentes espécies na região de pH (Esquema 1).^{1,2}

Esquema 1 – Definição e classificação dos ésteres de fosfato.

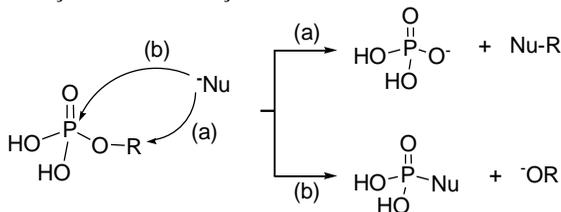


Os mono- e diésteres fosfóricos estão largamente presentes em sistemas biológicos, constituindo grupos funcionais importantes em biomoléculas, e participando de processos bioquímicos fundamentais para a manutenção da vida, a exemplo da produção de energia a partir da hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP).³⁻⁵

Diferentemente, os triésteres de fosfato não são encontrados naturalmente e foram produzidos para emprego industrial como retardadores de chamas e agroquímicos, por exemplo.^{1,6} Porém, ainda que industrialmente importantes, destaca-se que os triésteres de fosfato em geral exibem elevada toxicidade a humanos, isso porque inibem enzimas do sistema nervoso central, especialmente a acetilcolinesterase (AChE), responsável por catalisar a hidrólise da acetilcolina. Nesses casos, se não aplicado um antídoto em tempo hábil, a inibição da AChE torna-se irreversível, podendo levar à morte dependendo do grau de intoxicação.^{7,8}

Buscando compreender as reações enzimáticas de transferência do grupo fosforila em sistemas biológicos, foram iniciados a partir da década de 1950 estudos extensos sobre a cinética e os mecanismos de tais reações na ausência de catalisadores. O conhecimento adquirido ao longo das décadas seguintes até os dias atuais permitiu elaborar um paradigma sobre as reações de transferência da fosforila através de mecanismos de substituição nucleofílica. Nesses casos, dois caminhos reacionais são em geral observados, conforme exemplificado no Esquema 2 com um monoéster de fosfato. No caminho (a) do Esquema 2, o ataque nucleofílico ocorre no átomo de carbono do grupo alcóxido ou arilóxido, havendo a substituição do fosfato como grupo de saída. Nesses casos, as reações são governadas pelos mecanismos de substituição em carbono alifático ou aromático. A outra possibilidade, caminho (b) no Esquema 2, corresponde ao ataque nucleofílico no fósforo com a consequente substituição de um grupo alcóxido ou arilóxido.¹

Esquema 2 – Reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.

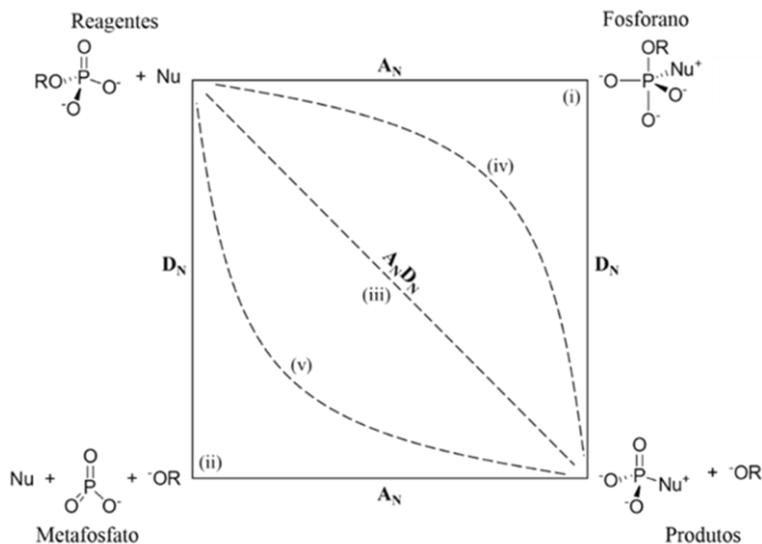


Considerando as reações que acontecem via ataque nucleofílico no fósforo, os mecanismos que as descrevem são análogos àqueles observados em reações de substituição em compostos carbonilados, e podem ser representados através de um diagrama de More-O'Ferrall-Jencks, conforme exemplificado na Figura 1 com um monoéster de fosfato.

Na Figura 1, os vértices representam reagentes, produtos ou intermediários de reação, as arestas horizontais correspondem a etapas de formação de ligação, as arestas verticais representam etapas de rompimento de ligação, e trajetórias que não passam pelas arestas designam mecanismos concertados sem formação de intermediários. Assim, partindo-se do canto superior esquerdo, o caminho (i) representa o mecanismo associativo ($A_N + D_N$), em que o ataque nucleofílico ocorre em uma primeira etapa, levando à formação de um intermediário fosforano, e a eliminação do grupo de saída ocorre na segunda etapa. Já o caminho (ii) indica um mecanismo dissociativo ($D_N + A_N$), onde a

eliminação do grupo de saída ocorre na primeira etapa, com a consequente formação de um intermediário metafosfato, ao qual o nucleófilo se adiciona na segunda etapa. Por sua vez, o mecanismo (iii) designa um caminho concertado ($A_N D_N$), onde o ataque nucleofílico e a eliminação do grupo de saída ocorrem de forma simultânea, passando por um único estado de transição e sem a formação de intermediários. Dependendo do grau de sincronicidade, os mecanismos concertados podem apresentar maior caráter associativo, e a reação passa por trajetórias mais assemelhadas àquela descrita por (iv), onde a formação da ligação entre o fósforo e o nucleófilo é adiantada para formação do estado de transição. Semelhantemente, mecanismos concertados de caráter dissociativo ocorrem por caminhos semelhantes ao (v), em que o estado de transição apresenta maior grau de rompimento da ligação entre o fósforo e o grupo de saída em comparação ao grau de formação da ligação com o nucleófilo.¹

Figura 1 – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks para reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato, exemplificado com um diânion de monoéster. A_N , D_N , e $A_N D_N$ designam etapas associativa, dissociativa e concertada, respectivamente, segundo a nomenclatura IUPAC.⁹



Ressalta-se que não é possível categorizar rigorosamente os ésteres de fosfato de acordo com os mecanismos expostos acima, já que a reatividade observada dependerá de diversos fatores, por exemplo, a

estrutura do substrato, a habilidade do grupo de saída, e o efeito dos grupos espectadores. No entanto, observa-se como tendência geral de que as reações de substituição nucleofílica com ataque no fósforo ocorrem por mecanismos concertados de caráter dissociativo em monoésteres de fosfato, e mecanismos concertados de caráter associativo em diésteres fosfóricos.¹⁰ Já os triésteres de fosfato reagem preferencialmente via mecanismos associativos ou concertados de caráter associativo.¹⁰

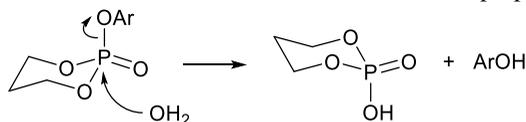
A cinética e o mecanismo de reações de transferência do grupo fosforila ainda representa um campo vasto e contínuo de pesquisa, pois pode amparar a compreensão detalhada de processos biológicos importantes e ainda não totalmente elucidados. Além disso, ainda existem grandes estoques de organofosforados neurotóxicos, e o entendimento dos mecanismos de degradação de triésteres de fosfato pode auxiliar no desenvolvimento de métodos eficientes para a destruição de tais estoques. Por fim, mas não menos importante, a investigação mecanística de reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato é importante para nortear o desenvolvimento de antídotos para casos de contaminação de humanos, quer através de armas químicas, que por defensores agrícolas, bem como para a remediação ambiental de áreas contaminadas por agroquímicos.

Nas subseções seguintes, serão revisados os mecanismos de hidrólise de tri-, di- e monoésteres de fosfato: as reações de hidrólise de tais substratos são de fato as reações não-catalisadas de uma série de enzimas, e compreender a reação não-catalisada é ponto fundamental para desenvolver novos sistemas catalíticos biomiméticos. A maior parte da revisão está focada no trabalho desenvolvido por Kirby e colaboradores,¹⁰ que continua sendo até o momento uma das mais extensas coleções de dados de estrutura-reatividade para a hidrólise de ésteres de fosfato simples. A revisão será complementada com estudos de outros grupos especializados na investigação mecanística de reações de substituição em ésteres de fosfato. Em conjunto, diversos grupos colaboraram para a construção do conhecimento acerca dos mecanismos de hidrólise de ésteres de fosfato, baseando-se em uma série de evidências cinéticas, dados de relações lineares de energia livre (LFERs), análises de carga efetiva, efeitos isotópicos, análises estereoquímicas, cálculos teóricos, etc. Em seguida, serão apresentados diversos exemplos recentes de sistemas catalíticos para reações de hidrólise de ésteres de fosfato desenvolvidos no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI).

1.1.1 Hidrólise de triésteres de fosfato

Entre os primeiros estudos mecanísticos sistemáticos sobre a hidrólise de triésteres de fosfato, destaca-se o trabalho de Khan e Kirby.¹¹ Os autores reportam em 1970 as reações de hidrólise a 39°C de uma série de triésteres cíclicos derivados do 1,3-propanodiol, Esquema 3, convenientemente escolhidos porque os grupos ArO⁻ fornecem os únicos grupos de saída possíveis em meio aquoso, além de serem facilmente observados espectrofotometricamente. A hidrólise do substrato com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato enriquecido com ¹⁸O indicou a quebra quantitativa da ligação P–¹⁸O, confirmando que as reações apresentadas no Esquema 3 procedem via ataque nucleofílico da água no fósforo.¹¹

Esquema 3 – Hidrólise de triésteres de fosfato derivados do 1,3-propanodiol.¹¹



ArOH:

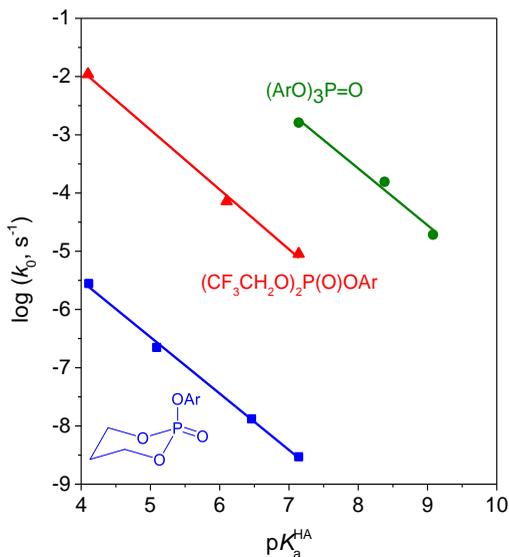
- 2,4-dinitrofenol ($pK_a = 4,11$),
- 4-acetil-2-nitrofenol ($pK_a = 5,09$),
- 4-cloro-2-nitrofenol ($pK_a = 6,46$),
- 4-nitrofenol ($pK_a = 7,14$)

Ao relacionar as constantes de hidrólise com o pK_a do ácido conjugado do grupo de saída, os autores obtiveram um gráfico de Brønsted, extrapolado para 25°C na Figura 2, que forneceu o valor da sensibilidade ao grupo de saída (β_{LG}) de $-0,99$, indicativo de uma reação sensível à basicidade do grupo de saída. Com base também em valores de efeitos isotópicos cinéticos de solvente e parâmetros termodinâmicos de ativação, ficou estabelecido na literatura que o mecanismo mais plausível para a hidrólise de triésteres de fosfato seria do tipo associativo-dissociativo, Esquema 4. Na primeira etapa, ocorre o ataque nucleofílico da água, assistido por catálise básica-geral por uma ou mais moléculas de água, e a segunda etapa corresponde à quebra do intermediário de fósforo pentacoordenado.¹¹

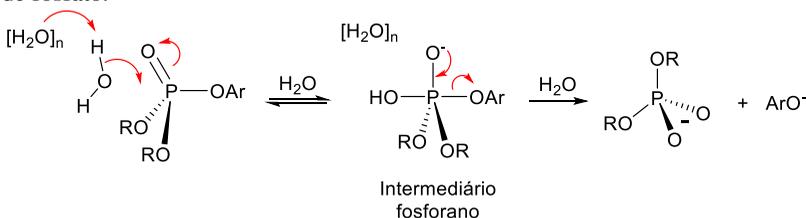
Até a década de 2000, a correlação de Khan e Kirby¹¹ (dados representados por ■ na Figura 2) ficou bem estabelecida na literatura por relacionar de maneira geral a reatividade de triésteres de fosfato à basicidade do grupo de saída, permitindo prever a constante de hidrólise de um novo substrato conhecido tão somente o pK_a^{HA} do grupo de saída.

No entanto, a correlação não levava em consideração possíveis efeitos eletrônicos promovidos pelo substituinte “espectador” $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{O}-$ cíclico.

Figura 2 – Gráficos de Brønsted para grupo de saída para as reações de hidrólise de três séries de triésteres de fosfato, conforme indicado na figura. Valores de $\text{p}K_a^{\text{HA}}$ referem-se ao ácido conjugado do grupo de saída ArO^- . Dados de k_0 para as séries $(\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{OAr}$ e $(\text{ArO})_3\text{P}=\text{O}$ foram obtidos a 25°C, e os dados para a série de triésteres derivados do 1,3-propanodiol foram extrapolado para 25°C.¹²



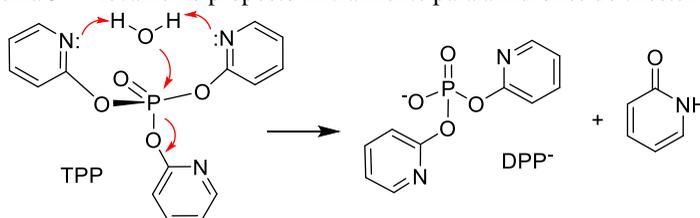
Esquema 4 – Mecanismo proposto por Khan e Kirby para a hidrólise de triésteres de fosfato.¹¹



De fato, baseando-se na correlação de 1970, Kirby e colaboradores descreveram em 2009 que a constante de hidrólise da espécie neutra do substrato tris-2-piridil fosfato (TPP, $k_0 = 2,35 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a 25°C), Esquema

5, era aproximadamente 10^8 vezes mais rápida que o esperado considerando o pK_a de 9,09 para o grupo de saída 2-hidroxipiridina. Para justificar a reatividade em princípio atípica de TPP, os autores propuseram um mecanismo de catálise básica-geral promovida pelos nitrogênios piridínicos dos grupos espectadores, Esquema 5.¹³

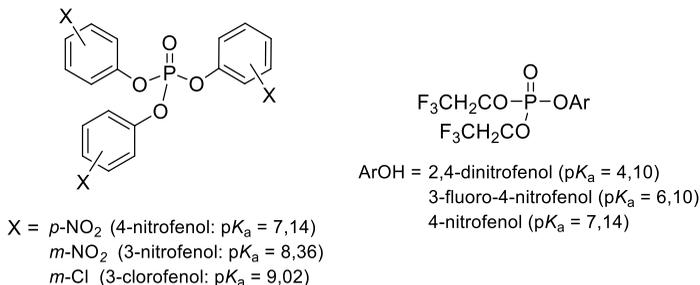
Esquema 5 – Mecanismo proposto inicialmente para a hidrólise do triéster TPP.¹³



No entanto, tal mecanismo foi questionado diante de novos resultados experimentais obtidos por Kirby e colaboradores em 2011.¹⁴ Por exemplo, constatou-se que a constante de velocidade de hidrólise do TPP era de mesma magnitude àquela do substrato tris-3-clorofenil fosfato (T3CIPP), o qual possui grupo de saída com pK_a^{HA} semelhante (9,02) ao da 2-hidroxipiridina, mas não apresenta nos anéis aromáticos nenhuma funcionalidade especial capaz de conferir um mecanismo eficiente de catálise intramolecular. Além disso, constatou-se que a hidrólise do TPP sofre catálise básica-geral promovida por tampões, o que coloca em cheque a eficiência da catálise intramolecular proposta inicialmente.

Assim, ponderou-se que a reatividade diferenciada dos substratos TPP e T3CIPP em relação ao esperado baseando-se na correlação de 1970 deveria estar relacionada à alteração da natureza dos substituintes espectadores: de alquílicos no caso do substrato derivado do 1,3-propanodiol, para arílicos, no caso do TPP e T3CIPP. Nesse sentido, Kirby e colaboradores reportaram em 2011 o estudo sistemático das reações de hidrólise de duas séries de triésteres de fosfato,¹⁴ Figura 3, ambas com grupo de saída fenólico, mas cada uma delas com substituintes espectadores de uma natureza: arílico ou alquílico. Os valores das constantes de hidrólise dos substratos da Figura 3 em função dos valores de pK_a^{HA} do grupo de saída são mostrados na Figura 2 juntamente com a correlação de 1970.

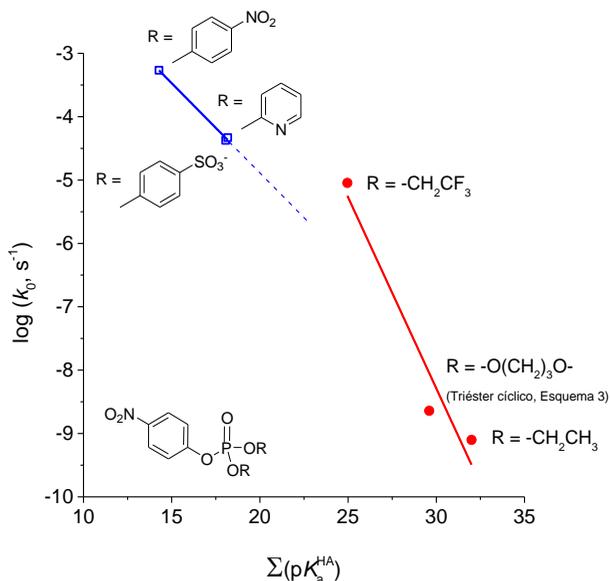
Figura 3 – Triésteres de fosfato cujas reações de hidrólise foram investigadas por Kirby e colaboradores.¹⁴



Na Figura 2, observa-se que os três gráficos de Brønsted possuem a mesma inclinação, dentro dos erros experimentais, mas englobam constantes de velocidade que variam em várias ordens de magnitude. Tal efeito é particularmente evidente ao comparar os valores de k_0 para os substratos que possuem o mesmo grupo de saída 4-nitrofenolato ($pK_a^{\text{HA}} = 7,14$) mas com diferentes grupos espectadores: os valores variam na proporção $1 : 3 \times 10^3 : 5 \times 10^5$ alterando-se os grupos espectadores de $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{O}-$ para $(-\text{OCH}_2\text{CF}_3)_2$ para $(p\text{-nitrofenóxido})_2$. Então, para cada série de triésteres estudada, as constantes de hidrólise aumentam juntamente com a acidez do ácido conjugado do grupo de saída, sendo igualmente dependente da acidez/basicidade do grupo espectador. E ao se comparar os substratos com grupo de saída p -nitrofenolato acima, os resultados sugerem que as constantes de hidrólise aumentam com o caráter elétron-retirador do grupo espectador.

A fim de detalhar e quantificar o efeito dos grupos espectadores na hidrólise de triésteres de fosfato, Kirby e colaboradores avaliaram uma série maior de substratos $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{OpNP}$ com grupo de saída p -nitrofenolato $^-\text{OpNP}$ e diferentes grupos espectadores $-\text{OR}$. A quantificação do efeito do grupo espectador foi realizada através de gráficos de Brønsted para grupo espectador, isto é, lançando-se em gráfico o logaritmo das constantes de velocidade de hidrólise em função do somatório dos valores de pK_a^{HA} dos grupos espectadores. A estrutura dos substratos e os gráficos de Brønsted obtidos estão apresentados na Figura 4, que mostra que as constantes de hidrólise de fato aumentam com a acidez do ácido conjugado do grupo espectador, e a sensibilidade das constantes de hidrólise é dependente da natureza do grupo espectador, sendo maior para substituintes alquílicos.¹⁴

Figura 4 – Gráficos de Brønsted para grupo espectador na hidrólise da série de triésteres $(RO)_2P(O)OPNP$ (estrutura e grupos espectadores são indicados na figura), a 25°C. Valores de sensibilidade ao grupo espectador (β_{NLG}) são $-0,28$ e $-0,60$ para as retas considerando substituintes arílicos e alquílicos, respectivamente.¹⁴

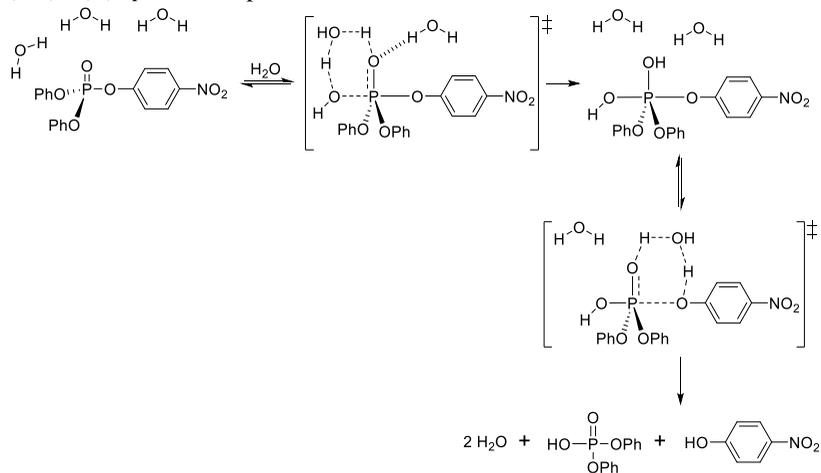


Mora e colaboradores¹⁵ realizaram cálculos teóricos para modelar o mecanismo das reações de hidrólise dos triésteres investigados por Kirby, bem como compreender a origem do efeito do grupo espectador. Os autores investigaram a superfície de energia potencial para localizar reagentes, intermediários e estados de transição, utilizando um modelo contínuo do solvente aquoso para considerar a presença implícita de moléculas de água e os efeitos de solvatação, e introduziram moléculas de água discretas com funções específicas para considerá-las como reagentes. Cálculos com diferentes números de moléculas de água foram realizados, e os resultados teóricos de energia livre de Gibbs foram comparados com os valores experimentais. Ressalta-se que os autores modelaram inicialmente os dois mecanismos cineticamente equivalentes: concertado e associativo-dissociativo, sendo que todas as tentativas de se modelar um mecanismo concertado apontaram para a formação de um intermediário fosforano. Assim, os cálculos consecutivos foram realizados com base em um mecanismo de duas etapas, sendo os

resultados teóricos compatíveis com os valores experimentais quando foram consideradas três moléculas de água discretas.¹⁵

O Esquema 6 apresenta o mecanismo proposto, exemplificado para o substrato difenil 4-nitrofenil fosfato. A primeira etapa é a determinante da velocidade de reação, e nela ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água no fósforo, assistido pela segunda molécula de água, que simultaneamente abstrai um próton da água nucleofílica e transfere um próton para o oxigênio fosforílico, levando à formação de um intermediário fosforano através de um estado de transição cíclico de seis membros. A terceira molécula de água estabiliza a densidade de carga negativa sobre o oxigênio fosforílico através de uma ligação de hidrogênio intermolecular. A segunda etapa corresponde à quebra do intermediário fosforano através da eliminação do grupo de saída, passando novamente por um estado de transição cíclico de seis membros, com a participação de uma molécula de água que abstrai o próton do grupo –OH equatorial e transfere um próton para o oxigênio do grupo de saída.

Esquema 6 – Mecanismo proposto para a hidrólise dos triésteres $(RO)_2P(O)OPNP$, exemplificado com $OR = OPh$.¹⁵

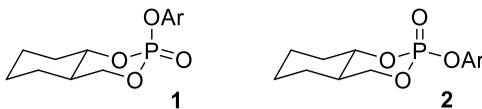


Uma análise detalhada de cargas, comprimentos de ligação, e ordem de ligação no mecanismo do Esquema 6 para os quatro triésteres com grupos espectadores arílicos permitiu concluir principalmente que: (i) a eletrofilicidade do fósforo aumenta com o caráter elétron-retirador dos grupos espectadores; (ii) o catalisador básico-geral e o solvente são

os principais responsáveis pela dispersão das cargas negativas desenvolvidas para formação do estado de transição da etapa determinante; (iii) os comprimentos das ligações entre o fósforo e os átomos de oxigênio da água nucleofílica e do grupo de saída diminuem no estado de transição da etapa determinante à medida que o caráter elétron-retirador do grupo espectador aumenta (menores pK_a^{HA}), e (iv) tal encurtamento das ligações em posição axial é acompanhado por um alongamento das ligações entre o fósforo e os átomos de oxigênio dos grupos espectadores em posição equatorial.¹⁵

A análise quantitativa dos resultados teóricos também confirma que o intermediário fosforano possui tempo de vida insignificante (para os triésteres investigados por Mora e colaboradores¹⁵), o que permite a comparação do estado de transição da etapa determinante com aquele proposto para a hidrólise de diésteres de fosfato através de um mecanismo concertado, conforme será discutido na seção seguinte. No caso dos diésteres, a densidade de carga negativa distribuída entre os substituintes em posição equatorial torna um intermediário fosforano altamente instável, ao passo que em triésteres a sua formação é favorecida e influenciada pelos grupos espectadores. Foi observado que quanto maior o caráter elétron-retirador destes, maior é a estabilização do intermediário e do estado de transição que leva à sua formação.^{10,12,15}

Ainda que para a hidrólise dos triésteres acima (Esquema 6) seja proposto um mecanismo associativo, ressalta-se que há na literatura diferentes propostas para reações de substituição em triésteres de fosfato com uma diversidade de nucleófilos (incluindo a água), alternando entre os mecanismos concertado e associativo. Por exemplo, Rowell e Gorenstein¹⁶ estudaram as reações dos substratos cíclicos 1 e 2 com uma série de nucleófilos em misturas binárias água:dioxano 70:30 (v/v), e os dados experimentais sugerem que ambos os mecanismos são possíveis dependendo da escolha do nucleófilo e do grupo de saída.



ArOH = *p*-metóxfenol; fenol; *p*-nitrofenol; 2,4-dinitrofenol

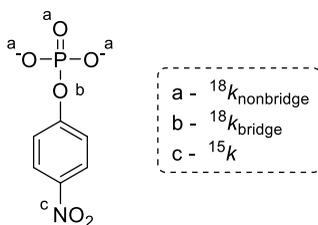
O mesmo se aplica a muitas reações de substituição em triésteres acíclicos com grupos de saída arílicos. Ba-Saif e colaboradores¹⁷ propuseram que as reações de uma série de fenolatos substituídos com os

substratos difenil 4-nitrofenil fosfato e dietil 4-nitrofenil fosfato provavelmente ocorre através de um mecanismo concertado. Similarmente, o mesmo mecanismo é proposto para as reações de fenolatos substituídos com triésteres difenílicos com diferentes grupos de saída arílicos.¹⁸

Informações mecanísticas relevantes podem ser extraídas a partir de dados de efeito isotópico cinético (KIE) de átomos pesados. Em geral, as mudanças nas constantes de velocidade advindas da substituição isotópica de carbono, nitrogênio e oxigênio não ultrapassam ~8%. Por isso, a medição dos efeitos isotópicos nesses casos deve ser extremamente precisa e conta com a utilização de equipamentos sofisticados. Ainda assim, e considerando também que a síntese de substratos isotopicamente marcados em geral não é simples, a literatura de reações de transferência do grupo fosforila conta com uma quantidade expressiva de dados de KIE.^{2,19}

A Figura 5 exemplifica as posições de substituição isotópica comuns para o estudo de KIE em um monoéster de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenolato. A possibilidade de substituir todos os átomos de oxigênio do grupo fosfato é interessante porque permite obter informações relevantes sobre alterações das ligações do fósforo com o grupo de saída e com o grupo fosforila para formação do estado de transição.¹⁹

Figura 5 – Posições de substituição isotópica comuns para estudos de KIE, exemplificadas com um monoéster de fosfato com grupo de saída *p*-nitrofenolato.¹⁹



Conforme mostra a Figura 5, $^{18}k_{\text{bridge}}$ designa o efeito isotópico cinético primário que fornece informações relativas ao grau de rompimento da ligação entre o fósforo e o oxigênio do grupo de saída no estado de transição. Já ^{15}k refere-se ao efeito isotópico cinético secundário pela marcação isotópica de nitrogênio no grupo de saída, cujo valor é informativo acerca da distribuição de carga no estado de transição resultante do rompimento da ligação P–O e/ou da transferência de próton

ao grupo de saída na etapa determinante. Embora nem sempre a densidade de carga negativa formada no átomo de oxigênio do grupo de saída esteja deslocalizada no estado de transição, $^{18}k_{\text{bridge}}$ e ^{15}k em geral estão relacionados, esperando-se valores de KIE normais para ambos quando há rompimento significativo da ligação P–O no estado de transição.¹⁹

Já $^{18}k_{\text{nonbridge}}$ designa o efeito isotópico cinético secundário, que fornece informações acerca da ordem de ligação dos demais átomos de oxigênio com o fósforo e, portanto, sugere sobre o grau de associação/dissociação do estado de transição. Isso porque as ligações P–O_{nonbridge} devem ser tanto mais fracas no estado de transição quanto mais forte for a ligação entre o fósforo e o nucleófilo.² Assim, são esperados para $^{18}k_{\text{nonbridge}}$ valores normais para mecanismos associativos e concertados de caráter associativo, ao passo que valores inversos são atribuídos para mecanismos dissociativos ou concertados de caráter dissociativo. Ressalta-se que $^{18}k_{\text{nonbridge}}$ pode ser igualmente influenciado por modos vibracionais, mas a ordem de ligação tem se mostrado o fator dominante para cálculos de $^{18}k_{\text{nonbridge}}$ nas reações de hidrólise de ésteres de fosfato.¹⁹

A Tabela 1 apresenta valores típicos de KIE para reações de hidrólise de ésteres de fosfato disponíveis na literatura. Observam-se para os triésteres de fosfato valores normais de ^{15}k , $^{18}k_{\text{bridge}}$ e $^{18}k_{\text{nonbridge}}$, consistentes com o enfraquecimento significativo da ligação entre o fósforo e o oxigênio do grupo de saída para formação do estado de transição, através de um mecanismo concertado de caráter associativo ou de um mecanismo associativo, de acordo com as propostas mecanísticas discutidas acima.^{2,19}

Tabela 1 – Valores típicos de KIE para a hidrólise de ésteres de fosfato. Para diésteres e triésteres, os dados referem-se à hidrólise alcalina.^{a,b}

	^{15}k	$^{18}k_{\text{bridge}}$	$^{18}k_{\text{nonbridge}}$
<i>p</i> NPP, diânion, 95°C ^c	1,0028(2)	1,0189(5)	0,9994(5)
<i>p</i> NPP, monoânion, 35°C ^c	1,0005(1)	1,0094(3)	1,0199(3)
Diésteres	1,0007–1,0016	1,0042–1,0063	1,0028–1,0056
Triésteres	1,0007	1,0063	1,0063–1,0250

^a Os dados em parênteses correspondem aos desvios-padrões na última casa decimal. ^b Dados extraídos da referência 19. ^c *p*NPP refere-se ao *p*-nitrofenil fosfato.

É importante ressaltar que a magnitude dos valores de KIE para os triésteres de fosfato varia significativamente de acordo com o grupo de saída, sugerindo que há uma grande gama de possibilidades de estados de transição nas reações de substituição em triésteres, variando entre os mecanismos concertado e associativo, e dependendo do grau de sincronicidade em cada um deles.^{2,19,20} Os valores de KIE para diésteres e monoésteres serão discutidos nas seções seguintes.

1.1.2 Hidrólise de diésteres de fosfato

Até o final da década de 1960, havia poucos estudos reportados sobre os mecanismos de reações de substituição nucleofílica em diésteres de fosfato, principalmente devido à elevada estabilidade de tais substrato, dificultando o acompanhamento cinético das reações, exceto em condições experimentais mais drásticas (por exemplo, em meios bastante ácidos).^{21,22} Diante desse cenário, Kirby e Younas reportaram em 1970 um estudo da hidrólise de ânions de diésteres de fosfato diarílicos simples,²³ $(RO)_2PO_2^-$, a 100°C, Esquema 7, já que as espécies aniônicas predominam em quase toda faixa de pH (valores de pK_a para a dissociação ácida de diésteres de fosfato alquílicos são tipicamente menores que 2). Os autores selecionaram como substratos ésteres de fenóis relativamente ácidos, de modo a fornecer grupos de saída suficientes bons para que as reações pudessem ser avaliadas cineticamente a 100°C pelo método das velocidades iniciais e, para os substratos mais reativos, por até três tempos de meia-vida. Experimentos com água isotopicamente marcada com ^{18}O mostraram que a reação apresentada no Esquema 7 procede exclusivamente via ataque no átomo de fósforo em meio neutro.

Esquema 7 – Hidrólise de ânions de diésteres de fosfato.²³

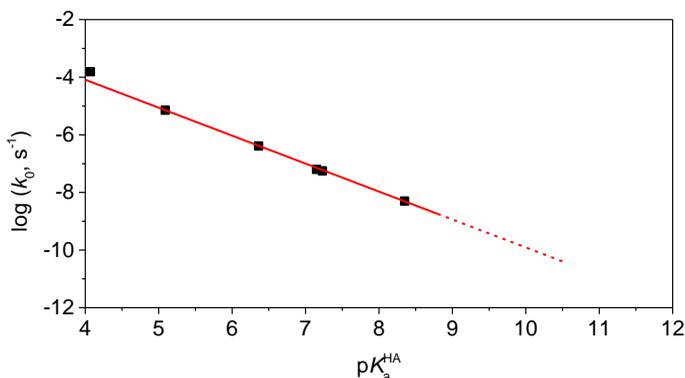


ArOH = 2,4-dinitrofenol ($pK_a = 4,07$), 4-acetil-2-nitrofenol ($pK_a = 5,09$),
4-cloro-2-nitrofenol ($pK_a = 6,36$), 4-nitrofenol ($pK_a = 7,15$),
2-nitrofenol ($pK_a = 7,23$), 3-nitrofenol ($pK_a = 8,35$)

A partir dos valores de k_0 obtidos para as reações apresentadas no Esquema 7, os autores obtiveram um gráfico de Brønsted para grupo de saída (apresentado na Figura 6 com dados de k_0 em s^{-1}), cujo ajuste linear fornecer o valor de $\beta_{LG} = -0,97$, indicando, portanto, uma sensibilidade elevada da hidrólise de ânions de diésteres com relação à basicidade do

grupo de saída. A linha tracejada na Figura 6 apresenta a extrapolação do gráfico de Brønsted até valores de pK_a^{HA} maiores, evidenciando que os valores das constantes de hidrólise passam a ser imensuráveis experimentalmente mesmo a 100°C. De fato, o valor estimado para o tempo de meia-vida do ânion do difenil fosfato a 100°C pela correlação obtida é de 180 anos, e não por acaso as reações de hidrólise de tal substrato e do ânion do bis-*p*-metóxfenil fosfato não puderam ser acompanhadas pelos autores (valores de pK_a do fenol e do *p*-metóxfenol são 9,99 e 10,26, respectivamente).²³

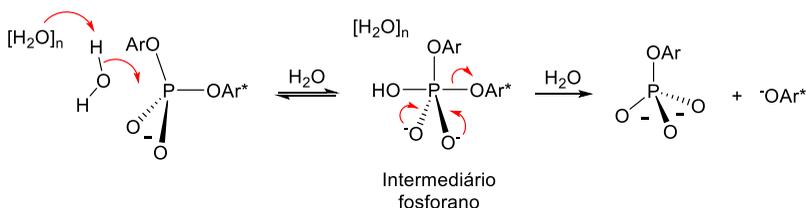
Figura 6 – Gráfico de Brønsted reportado por Kirby e Younas para a hidrólise dos ânions $(RO)_2PO_2^-$ (estruturas são apresentadas no Esquema 7), a 100°C.²³



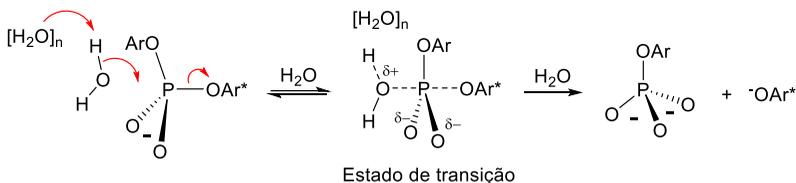
O efeito isotópico cinético de solvente obtido para a hidrólise do ânion do bis-2,4-dinitrofenil fosfato (entre 1,45 e 1,55 dependendo da temperatura), bem como os valores dos parâmetros termodinâmicos de ativação, são consistentes tanto com um mecanismo associativo em duas etapas quanto concertado, ambos envolvendo assistência de catálise básica-geral do solvente, Esquema 8. No entanto, os dados experimentais não exigem a consideração de um mecanismo de duas etapas, e o mecanismo concertado permaneceu na literatura como o mais plausível para reações de substituição em ânions de diésteres de fosfato.²³ De fato, conforme argumentado por Kirby posteriormente,²⁴ a presença das duas cargas negativas em posição equatorial no intermediário fosforano do Esquema 8 tornaria tal estrutura muito instável e implicaria o rompimento das ligações em posição axial em velocidades mais rápidas que o limite difusional.

Esquema 8 – Propostas mecanísticas para a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato.²³

Mecanismo associativo-dissociativo



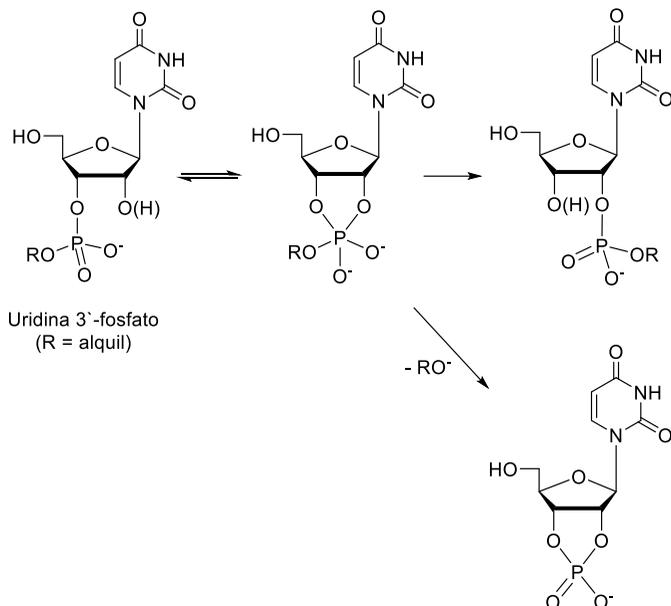
Mecanismo concertado



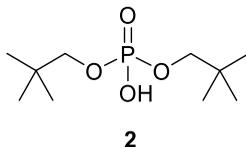
De acordo com o mecanismo concertado do Esquema 8 estão os valores de KIE obtidos para a hidrólise alcalina de diésteres de fosfato (Tabela 1). Os valores normais de KIE para $^{18}k_{\text{bridge}}$ e ^{15}k são consistentes com o rompimento da ligação entre o fósforo e o grupo de saída através de um único estado de transição, o qual deve possuir as ligações P-O_{nonbridge} enfraquecidas, tal sugerido pelos valores normais de $^{18}k_{\text{nonbridge}}$.^{2,19}

Em alguns casos, mecanismos associativos têm sido propostos para reações de substituição em diésteres de fosfato. Por exemplo, Lönnberg e colaboradores²⁵ estenderam estudos iniciais²⁶ da reatividade em meio aquoso dos ésteres monoalquílicos da uridina 3'-fosfato (Esquema 9). Em pH ácido, ambas as reações de isomerização ao derivado 2'-fosfato e a formação do diéster cíclico são observadas, ao passo que somente a formação deste é observada em pH alcalino. Com base principalmente na quebra de um gráfico de Brønsted para grupo de saída, os autores propuseram um mecanismo associativo para a formação do diéster cíclico, passando por um intermediário fosforano dianiônico. Isso explicaria porque os substratos não sofrem isomerização em meio alcalino: o tempo de vida de um intermediário fosforano dianiônico seria insuficiente para permitir a pseudo-rotação necessária para formação do derivado 2'-fosfato.

Esquema 9 – Reações dos ésteres monoalquílicos da uridina 3'-fosfato em meio aquoso.^{25,26}



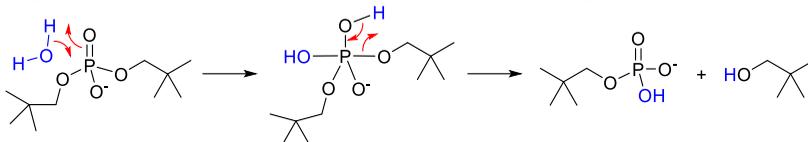
Similarmente, o mecanismo associativo foi proposto no estudo da hidrólise do diéster **2**. Primeiramente, Schroeder e colaboradores²⁷ reportaram os dados cinéticos de **2**, sendo o valor obtido para a constante de hidrólise espontânea da espécie aniônica de $7 \times 10^{-16} \text{ s}^{-1}$ (extrapolado para 25°C). Tal dado é consistente com o valor publicado de $\sim 1 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ para a hidrólise do ânion do dimetil fosfato, valor em geral considerado na literatura como limite superior para a constante de hidrólise de ânions de diésteres alquílicos através da quebra da ligação P–O.



Posteriormente, Kamerlin e colaboradores²⁸ realizaram cálculos computacionais para as diferentes possibilidades mecanísticas na hidrólise das espécies neutra e aniônica de **2** através do mapeamento das superfícies de energia potencial. Dentre os diversos aspectos levantados

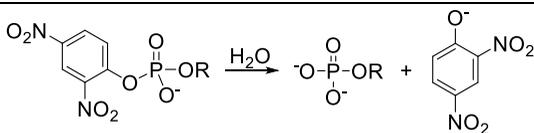
pelos autores, cita-se a proposta de um mecanismo associativo para a hidrólise da espécie aniônica, em que a fosforila atua como “ponte” para a transferência de um próton da água para o grupo de saída, Esquema 10.

Esquema 10 – Mecanismo proposto para a hidrólise da espécie aniônica de 2.²⁸



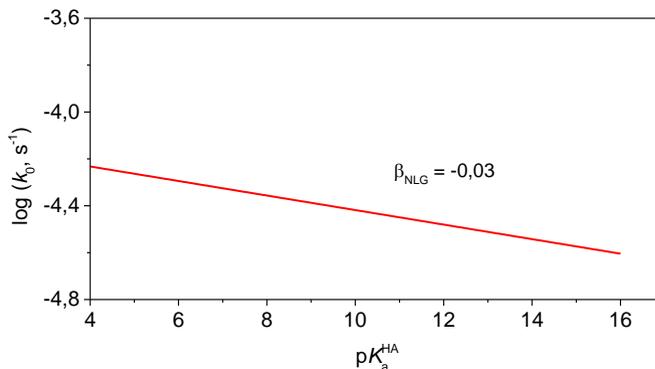
Mais recentemente, após a investigação do efeito de grupos espectadores em triésteres de fosfato,¹² a dúvida de qual seria o efeito do grupo espectador na reatividade intrínseca dos ânions de diésteres surgiu naturalmente. Assim, em um primeiro momento, Kirby e colaboradores²⁹ investigaram como variavam os valores experimentais das constantes de hidrólise a 100°C de uma série de ânions de diésteres com o mesmo grupo de saída 2,4-dinitrofenolato, porém com diferentes grupos espectadores: 2,4-dinitrofenil, 4-nitrofenil, fenil e metil. A Tabela 2 apresenta os dados experimentais reportados pelos autores, e a Figura 7 representa o gráfico de Brönsted para grupo espectador obtido a partir de tais dados, sendo o valor calculado de $\beta_{NLG} = -0,03 \pm 0,001$.²⁹

Tabela 2 – Constantes de velocidade observadas para a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato e diferentes grupos espectadores, conforme mostrado na reação abaixo, a 100°C, reportadas por Kirby e colaboradores.²⁹



ROH =	pK _a de ROH	k ₀ , s ⁻¹
2,4-Dinitrofenol	4,07	5,72 x 10 ⁻⁵
4-Nitrofenol	7,14	4,72 x 10 ⁻⁵
Fenol	9,95	3,87 x 10 ⁻⁵
Metanol	15,54	4,20 x 10 ⁻⁵

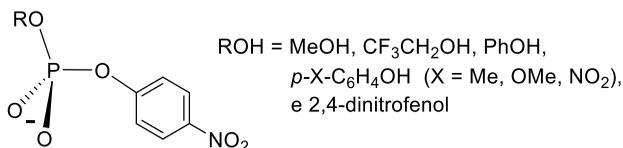
Figura 7 – Gráfico de Brønsted para grupo espectador para a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato, a 100°C.²⁹



O valor obtido de β_{NLG} (Figura 7) é considerado “mínimo” e descreve um efeito pouco significativo da basicidade dos grupos espectadores sobre as constantes de velocidade de hidrólise, o que pode indicar, no contexto de um mecanismo do tipo $S_N2(P)$ concertado, que o grupo espectador exerce efeito estereoeletrônico similar nos níveis de energia tanto do reagente quanto do estado de transição. Além disso, é razoável pensar que o efeito de um grupo espectador –OR seja mínimo em competição ao efeito promovido pela elevada densidade de carga negativa distribuída entre os dois oxigênios em posição equatorial no estado de transição bipiramidal.

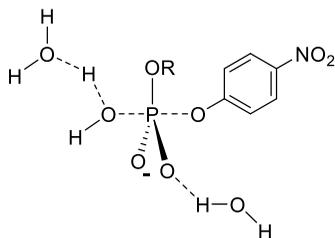
Posteriormente, Kirby e colaboradores²⁴ estenderam a investigação do efeito dos grupos espectadores avaliando-se a hidrólise de uma série de ânions de diésteres $RO(PO_2^-)OpNP$, com grupo de saída 4-nitrofenolato (^-OpNP) e diferentes grupos espectadores (^-OR), Figura 8. No novo estudo, as reações foram investigadas teoricamente, calculando-se valores de energia livre de Gibbs de ativação para a temperatura padrão de 25°C, já que as cinéticas de quase todos os substratos não podem ser acompanhadas experimentalmente.

Figura 8 – Estruturas de ânions de diésteres de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenolato.²⁴



Os autores adotaram os mesmos procedimentos realizados para a investigação teórica da hidrólise dos triésteres de fosfato, isto é, avaliaram a plausibilidade dos mecanismos associativo e concertado através da computação das energias livres de Gibbs em cada caso, variando-se também o número de moléculas de água explícitas em até quatro moléculas. Os autores destacam que nenhum cálculo indicou a formação de um intermediário fosforano, e para todos os diésteres da Figura 8 foram obtidos estados de transição que designam um mecanismo concertado, o que foi também confirmado por cálculos de IRC que mostraram a conexão de tais estados de transição com os reagentes e produtos através de uma única barreira de ativação. Os melhores resultados foram obtidos com duas ou três moléculas de água explícitas, sendo a primeira, o nucleófilo, e a segunda, um catalisador básico-geral assistindo ao ataque nucleofílico. Nos casos em que a terceira molécula de água contribui para a diminuição do ΔG^\ddagger , tal molécula interage com os oxigênios equatoriais no estado de transição através de interações intermoleculares de hidrogênio, contribuindo para a dispersão da elevada densidade de carga negativa. A Figura 9 representa o estado de transição com três moléculas de água.²⁴

Figura 9 – Estado de transição para a hidrólise de um ânion de diéster de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenolato, envolvendo três moléculas de água discretas.²⁴

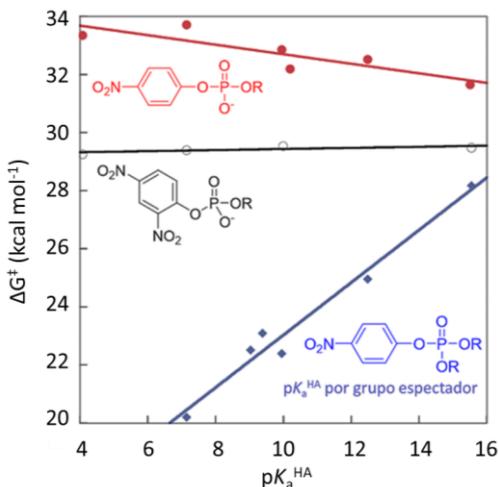


No estado de transição, o comprimento de ligação entre o fósforo e o oxigênio da água nucleofílica é menor que aquele entre o fósforo e o oxigênio do grupo de saída, o que descreve um mecanismo essencialmente governado pela eliminação do grupo de saída. Interessantemente, os comprimentos de tais ligações diminuem à medida que são adicionadas moléculas de água, o que pode ser racionalizado através da dispersão da densidade de carga negativa.²⁴

Ao relacionar os valores de ΔG^\ddagger obtidos para a série de ânions de diésteres à basicidade do grupo espectador, há duas observações

relevantes: (i) o ajuste do gráfico de Brønsted para grupo espectador fornece o valor de β_{NLG} de $0,16 \pm 0,08$ que, apesar de baixo, possui magnitude consideravelmente maior que aquela obtida experimentalmente para ânions de diésteres com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato a 100°C (Figura 7), o que pode ser decorrente da diferença de temperatura e/ou do grupo de saída, e (ii) a tendência de reatividade observada é inversa àquela observada para os ânions de diésteres com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato a 100°C , bem como para os triésteres com grupo de saída 4-nitrofenolato a 25°C . Tais observações são ilustradas na Figura 10, que mostra claramente que o ânion de diéster com grupo espectador metil é o mais reativo para a série $\text{RO}(\text{PO}_2^-)\text{OpNP}$, ao passo que o mesmo grupo espectador fornece o substrato menos reativo na série de triésteres $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{OpNP}$.²⁴

Figura 10 – Dependência das constantes de hidrólise de ânions de diésteres de fosfato e de triésteres de fosfato em relação ao $\text{p}K_a^{\text{HA}}$ do grupo espectador. Para a série de diésteres $\text{RO}(\text{PO}_2^-)\text{OpNP}$, valores de ΔG^\ddagger são teóricos e calculados para 25°C , considerando três moléculas de água discretas;²⁴ para a série de diésteres com grupo de saída 2,4-dinitrofenolato, dados são experimentais a 100°C ;²⁹ e para a série de triésteres, dados são teóricos, para 25°C , de Mora e colaboradores.¹⁵ Figura adaptada da referência 24.



A tendência obtida pelos cálculos teóricos para a série de ânions $\text{RO}(\text{PO}_2^-)\text{OpNP}$ é consistente com um mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$ concertado descrito anteriormente e governado pela eliminação do grupo de saída: as interações no estado de transição dos elétrons não-ligantes dos átomos de

oxigênio em posição equatorial com o orbital antiligante da ligação entre o fósforo e o oxigênio do grupo de saída ($n_{O}-\sigma^*_{P-O_pNP}$) são as principais responsáveis pela eliminação do grupo de saída, sendo mais proeminentes aquelas advindas dos oxigênios negativamente carregados em detrimento do oxigênio do grupo espectador. De fato, observa-se que os comprimentos de ligação entre o fósforo e os oxigênios em posição equatorial no estado de transição bipiramidal são levemente menores que os comprimentos correspondentes no estado reagente, ao passo que tais ligações possuem comprimentos aumentados à medida que a pentacovalência é desenvolvida na hidrólise dos triésteres correspondentes.²⁴

Assim, a compreensão atual do mecanismo de hidrólise de ânions de diésteres de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenolato é de que as reações procedem via mecanismo $S_N2(P)$ concertado, e as constantes de hidrólise são incrementadas com o aumento da basicidade do grupo espectador. Tal comportamento é diferente àquele observado com os triésteres de fosfato com mesmo grupo de saída, em que as constantes de velocidade de hidrólise aumentam com o caráter elétron-retirador dos grupos espectadores, o que é resultado da diferença de mecanismo reacional entre as duas classes de fosfato.¹⁰ Além disso, a magnitude do efeito é muito menor no caso dos ânions de diésteres, já que o efeito eletrônico advindo do grupo espectador no estado de transição compete fracamente com duas cargas negativas distribuídas entre dois oxigênios em posição equatorial.¹⁰

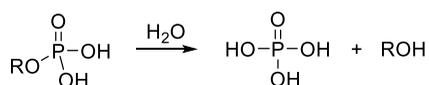
É interessante ressaltar que a baixa magnitude do efeito espectador em reações de substituição em ânions de diésteres também é observada com outros nucleófilos além da água, como aminas. Por exemplo, ainda em 1970, Kirby relatou que as constantes de segunda ordem das reações de piridinas substituídas com o ânion do metil 2,4-dinitrofenil fosfato diferem em menos de 3 vezes em comparação àquelas das reações correspondentes com o ânion do bis-2,4-dinitrofenil fosfato,³⁰ sendo a diferença de valores de pK_a^{HA} dos grupos espectadores de aproximadamente 11 unidades. De modo análogo, Orth e colaboradores reportaram as reações do imidazol com os ânions do etil 2,4-dinitrofenil fosfato e bis-2,4-dinitrofenil fosfato, e as constantes de segunda ordem das reações diferem somente em cerca de 7 vezes.³¹

1.1.3 Hidrólise de monoésteres de fosfato

Kirby e Varvoglis publicaram um dos primeiros trabalhos de estudo sistemático sobre a hidrólise de monoésteres de fosfato, em que os

autores reportam a hidrólise de uma série de monoésteres com diferentes grupos de saída fenólicos.³² Os autores investigaram a hidrólise de dez monoésteres a 39°C, sendo a estrutura dos substratos e os valores de pK_a^{HA} dos grupos de saída mostrados no Esquema 11. Ao avaliar toda a faixa de pH, a reatividade de ambas as espécies monoaniônica e dianiônica podem ser avaliadas, já que o primeiro pK_a para o equilíbrio de dissociação ácida de um monoéster é tipicamente menor que 2, ao passo que o segundo pK_a está geralmente na faixa 6–7.¹⁰

Esquema 11 – Reações de hidrólise de monoésteres de fosfato reportadas por Kirby e Varvoglis.³²



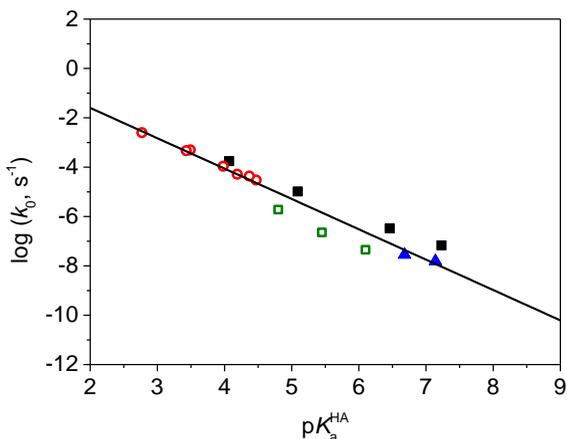
ROH = Fenol ($pK_a = 9,99$)
 2-Nitrofenol ($pK_a = 7,23$)
 4-Nitrofenol ($pK_a = 7,14$)
 3,5-Dinitrofenol ($pK_a = 6,68$)
 2-Nitro-4-clorofenol ($pK_a = 6,36; 6,46$)
 2,4,6-Triclorofenol ($pK_a = 6,1$)
 2-Cloro-4-nitrofenol ($pK_a = 5,45$)
 2-Nitro-4-acetilfenol ($pK_a = 5,09$)
 Pentaclorofenol ($pK_a = 4,8$)
 2,4-Dinitrofenol ($pK_a = 4,07$)

Os autores descreveram que as constantes de hidrólise de ambos monoânion e diânion aumentam à medida que o pK_a^{HA} do grupo de saída diminui, sendo a dependência da habilidade do grupo de saída maior na hidrólise dos diânions. Assim, por exemplo, as constantes de velocidade das reações de hidrólise dos monoânions (k_M) do 4-nitrofenil fosfato ($pK_a^{HA} = 7,14$) e do 2,4-dinitrofenil fosfato ($pK_a^{HA} = 4,07$) são $1,07 \times 10^{-6}$ e $5,07 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Por sua vez, as constantes de velocidade de hidrólise dos diânions (k_D) são $1,55 \times 10^{-8}$ e $1,75 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para 4-nitrofenil fosfato e 2,4-dinitrofenil fosfato, respectivamente. Os autores ressaltam que monoésteres com grupo de saída com pK_a^{HA} maior que ~5,5 possuem monoânions mais reativos que diânions frente à reação de hidrólise, ao passo que os diânions são os mais reativos no caso de monoésteres com grupos de saída com pK_a^{HA} menor que ~5,5. Conforme apresentado acima, $k_M > k_D$ no caso do 4-nitrofenil fosfato e $k_D > k_M$ no caso do 2,4-dinitrofenil fosfato.³²

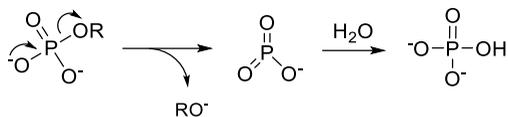
As observações de Kirby e Varvoglis são consistentes com relatos anteriores de outros autores que descreveram que os monoânions de monoésteres são mais reativos em comparação aos diânions frente à reação de hidrólise para grupos de saída com pK_a^{HA} elevado. Kumamoto e Westheimer,³³ por exemplo, estudaram a hidrólise do monobenzil fosfato a 75,6 °C e, ao passo que as cinéticas do monoânion puderam ser seguidas por UV/Vis pela formação do álcool benzílico, nenhuma reatividade foi detectada para a espécie dianiônica. Similarmente, Butcher e Westheimer,³⁴ e Bunton e colaboradores³⁵ reportaram o mesmo padrão de reatividade para fosfatos monoalquílicos.

A Figura 11 apresenta o gráfico de Brønsted para grupo de saída reportado por Kirby e Varvoglis referente à hidrólise das espécies dianiônicas de monoésteres de fosfato. Na Figura 11, a linha sólida representa o ajuste linear dos dados, sendo o valor obtido de $\beta_{LG} = -1,23$, e os autores argumentaram que a elevada sensibilidade das constantes de hidrólise dos diânions em relação ao pK_a^{HA} do grupo de saída é um forte indício de que a quebra da ligação P–O está avançada no estado de transição da etapa determinante, sugerindo que a reação deve ocorrer através de um mecanismo dissociativo, cujo intermediário é o ânion do metafosfato monomérico, Esquema 12.

Figura 11 – Gráfico de Brønsted para grupo de saída para a hidrólise de diânions de monoésteres de fosfato, a 39°C.³² Os dados representados em \circ foram obtidos por Di Sabato e Jencks³⁶ para a hidrólise de uma série de diânions de monoésteres de benzoíla. Os demais dados foram obtidos por Kirby e Varvoglis³²: (\blacktriangle) monoésteres sem substituintes em posição *orto*; (\blacksquare) monoésteres com substituintes $-\text{NO}_2$ em posição *orto*; e (\square) monoésteres com substituintes $-\text{Cl}$ em posição *orto*.



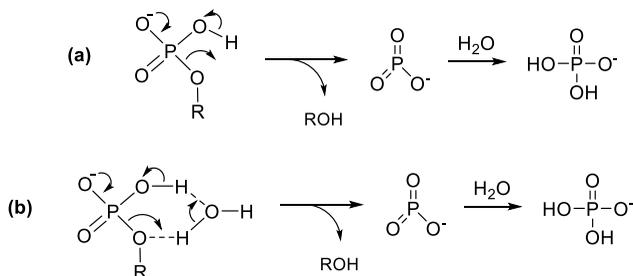
Esquema 12 – Mecanismo proposto inicialmente para a hidrólise de diânions de monoésteres de fosfato.³²



O mecanismo do Esquema 12 foi proposto também com base nos valores baixos e positivos de entropias de ativação e efeitos isotópicos cinéticos de solvente insignificantes. Ainda, tal mecanismo é consistente com a observação de que o diânion do 2,4-dinitrofenil fosfato é hidrolisado mais rapidamente que o monoânion: a presença de duas cargas negativas no diânion deve tornar o fósforo menos eletrofílico, e a reatividade do diânion deveria ser menor no caso de um mecanismo do tipo associativo.³²

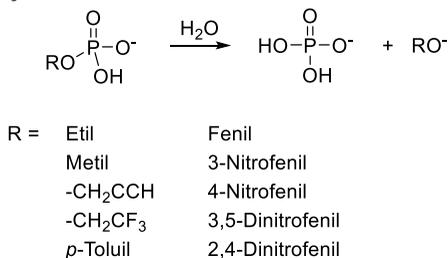
Com relação aos monoânions de monoésteres, a observação de que estes são hidrolisados mais rapidamente que os diésteres correspondentes na faixa de pH ~4, onde a concentração de monoânions é máxima, e considerando que é pouco provável a eliminação de um alcóxido nessa região de pH, sugere o envolvimento do próton do grupo hidróxido não-dissociado do monoânion no mecanismo da reação. Assim, dois mecanismos de catálise ácida geral intramolecular foram inicialmente delineados, (a) e (b) no Esquema 13, em que há uma transferência parcial de próton do hidróxido não-dissociado para o grupo de saída através de um estado de transição cíclico. No mecanismo (a), a transferência do próton ocorre diretamente ao grupo de saída, passando por um ciclo de quatro membros, ao passo que um ciclo de seis membros é formado na proposta (b) ao considerar o envolvimento de uma molécula de água do solvente, sendo esta proposta mais plausível energeticamente.

Esquema 13 – Propostas mecanísticas para a hidrólise de monoânions de monoésteres de fosfato.³²

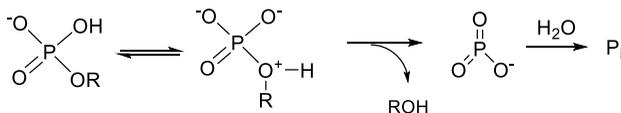


No entanto, as entropias de ativação obtidas para as reações de hidrólise dos monoânions de uma série de monoésteres a 100°C (Esquema 14), são próximas de zero e em torno de 20 unidades entrópicas mais positivas do que o tipicamente observado em reações bimoleculares de solvólise, de modo que os mecanismos (a) e (b) do Esquema 13 não podem ser usados para explicar a hidrólise de todos os monoânions de monoésteres. Nesse sentido, os autores propõem também o mecanismo cineticamente equivalente de catálise ácida específica do diânion, Esquema 15, envolvendo um pré-equilíbrio anterior à etapa determinante da velocidade da reação.³²

Esquema 14 – Reações de hidrólise de monoânions de monoésteres de fosfato.³²



Esquema 15 – Mecanismo para hidrólise de monoânion de monoéster de fosfato.³²



No Esquema 15, a transferência de próton, embora desfavorável ($K_a \sim 10^{-11}$), leva à formação de uma espécie em que o grupo fosfato é dianiônico e o grupo de saída encontra-se protonado, e a hidrólise dessa espécie pode ser até 10^{20} vezes mais rápida que a hidrólise do diânion equivalente sem a protonação do grupo de saída. Com base em efeitos isotópicos cinéticos de solvente, os autores sugerem que monoânions de monoésteres com grupos de saída com pK_a^{HA} maior que $\sim 9,5$ devem ser hidrolisados pelo mecanismo do Esquema 14, sendo que grupos de saída gradualmente menos básicos ($pK_a^{\text{HA}} < \sim 9,5$) devem favorecer uma contribuição maior da transferência de próton na etapa determinante, portanto, uma contribuição maior dos mecanismos (a) e (b) do Esquema 13 pode ocorrer. A contribuição maior dos mecanismos do Esquema 13 para a hidrólise de monoânions com melhores grupos de saída deve-se

também ao fato que, no gráfico de Brønsted para a hidrólise dos monoânions do Equema 14 ($\beta_{LG} = -0,27$), os pontos referentes aos substratos com grupo de saída com $pK_a^{HA} < \sim 9,5$ apresentam um desvio negativo.³²

A proposta de Kirby e Varvoglis de mecanismos dissociativos para a hidrólise dos monoânions e diânions dos monoésteres de fosfato baseou-se também na avaliação dos produtos das reações em misturas binárias de solventes. Considerando que intermediários altamente reativos devem reagir de forma não-seletiva em uma mistura de dois solventes de nucleofilidades semelhantes, a proporção dos produtos deve ser aproximadamente igual à razão molar dos solventes. Assim, os autores mostram que a solvólise do monoânion e do diânion do 4-nitrofenil fosfato à 100°C em misturas binárias metanol-água leva à formação dos produtos metil fosfato e fosfato inorgânico em proporções equivalentes às razões molares dos solventes. Isso constituiria uma evidência da formação do intermediário metafosfato monomérico e, portanto, dos mecanismos dissociativos. Resultados semelhantes foram observados com o monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato.³²

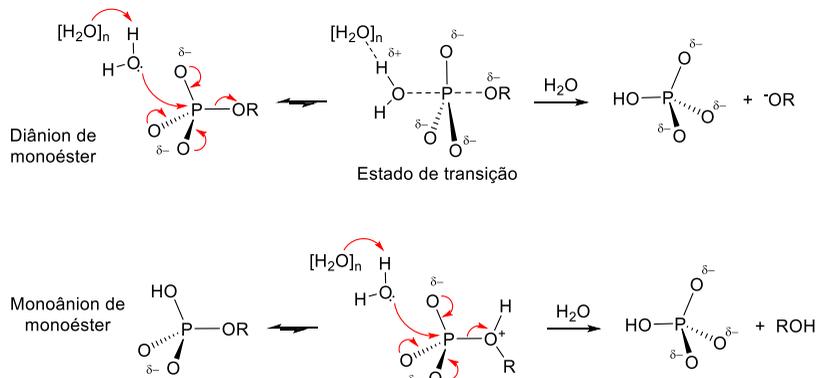
No entanto, ainda que os resultados de Kirby e Varvoglis e de outros estudos contemporâneos³⁷⁻³⁹ a este indicassem a formação do intermediário metafosfato na hidrólise de fosfomonoésteres, parte dos resultados era igualmente consistente com um mecanismo concertado. De fato, houve intenso debate na literatura pelas décadas subsequentes à luz de novos resultados acerca da hidrólise de monoésteres. Gradualmente, evidências que favoreciam um mecanismo concertado foram acumulando na literatura.^{2,10,20}

Por exemplo, Buchwald e colaboradores⁴⁰ avaliaram a composição dos produtos da metanólise dos diânions do fenil [(*R*)-¹⁶O,¹⁷O,¹⁸O]fosfato e do 2,4-dinitrofenil [(*R*)-¹⁶O,¹⁷O,¹⁸O]fosfato, observando que há inversão completa da configuração do fósforo. Nesse sentido, os autores propuseram que a reação procede através de um mecanismo concertado ou, em caso de um mecanismo dissociativo, que o intermediário metafosfato não possui tempo de vida suficiente em solvente prótico para difundir e levar a uma mistura racêmica de produtos.⁴⁰ Os relatos na literatura de formação de um intermediário metafosfato com tempo de vida significativo para difundir restringem-se a reações de transferência do grupo fosforila em solventes orgânicos, especialmente favorecidas quando os nucleófilos são volumosos e/ou os grupos de saída são muito lábeis.² Por exemplo, Friedman e colaboradores^{41,42} reportaram a racemização do produto na transferência da fosforila de monoésteres arílicos para o álcool *t*-butílico em acetonitrila ou *t*-butanol.

A plausibilidade do mecanismo dissociativo para substituição em monoésteres de fosfato em meio aquoso foi questionada também pela constatação de que a transferência do grupo $-\text{PO}_3^{2-}$ é sensível à basicidade de uma grande gama de aminas nucleofílicas e de nucleófilos oxigenados.⁴³⁻⁴⁹ Mais especificamente, a não-constatação de mudanças nos mecanismos reacionais para monoânions e diânions (mudança de etapa determinante da velocidade de reação, por exemplo) constituiu forte evidência de que não ocorre a formação de um intermediário metafosfato ao longo das coordenadas de reação.

Assim, a literatura acumulou evidências experimentais e, mais recentemente, teóricas, que favorecem um mecanismo concertado para a transferência da fosforila a partir de monoésteres de fosfato em meio aquoso. Por exemplo, cálculos teóricos mostram que o metafosfato monomérico, embora tenha sido detectado em fase gasosa,⁵⁰ deve possuir um tempo de vida muito pequeno em meio aquoso para que possa ser considerado um intermediário solvatado.⁵¹ Nesse sentido, o mecanismo mais plausível considerado atualmente para descrever a hidrólise de monoésteres de fosfato é um mecanismo concertado de caráter dissociativo. No caso dos diânions, o estado de transição é “solto”, com as ligações do fósforo ao nucleófilo e ao grupo de saída alongadas e enfraquecidas, Esquema 16.¹⁰ E em relação aos monoânions, em particular aqueles com substituintes alquílicos, a reação conta com um pré-equilíbrio levando à protonação do grupo de saída, Esquema 16.¹⁰

Esquema 16 – Mecanismos plausíveis para a hidrólise de monoânions e diânions de monoésteres de fosfato.¹⁰



Nos mecanismos do Esquema 16, as duas cargas negativas no grupo fosfato encontram-se deslocalizadas de tal modo que existem três

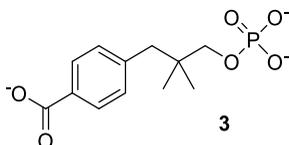
ligações P–O electrón-doadoras equivalentes, sendo que as três doações $n_{\text{O}}-\sigma^*_{\text{P-OR}}$ estão de acordo com a dependência das constantes de velocidade de hidrólise de monoésteres de fosfato em relação à habilidade do grupo de saída (em termos de $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{HA}}$). Assim, as ligações do fósforo com o oxigénio da água e com o oxigénio do grupo de saída são alongadas no estado de transição da hidrólise do diânion do 4-nitrofenil fosfato: com um grupo de saída relativamente bom, a sua eliminação é favorecida pelas três doações $n_{\text{O}}-\sigma^*_{\text{P-OR}}$, ao passo que a aproximação do nucleófilo ainda tem pouco efeito, e o fortalecimento da ligação entre o fósforo e a água ocorrerá com o avanço da coordenada de reação até a formação do fosfato inorgânico com configuração inversa à do substrato.

Valores de KIE obtidos para a hidrólise do monoânion e do diânion do *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) estão de acordo com a proposta de um mecanismo concertado de carácter dissociativo. Comparativamente, conforme mostra a Tabela 1, os valores de $^{18}k_{\text{bridge}}$ e ^{15}k são maiores para o diânion, já que nesse caso o grupo de saída é eliminado na forma de ânion (Esquema 16). Já no caso dos monoânions, $^{18}k_{\text{bridge}}$ é menor porque o rompimento da ligação P–O_{bridge} é compensado pela formação da ligação com o próton transferido do grupo fosfato. Em particular, ^{15}k para os monoânions é negligenciável, indicando que o grupo de saída se encontra essencialmente neutro no estado de transição. Com relação ao $^{18}k_{\text{nonbridge}}$, observa-se que é inverso para os diânions, indicativo de um estado de transição “solto”, ao passo que o valor é normal para os monoânions, resultante da transferência de próton do grupo fosfato.¹⁹

Destaca-se que as reações de hidrólise de monoésteres alquílicos têm recebido mais atenção nas últimas duas décadas, já que os estudos iniciais englobaram substratos tipicamente arílicos. Por exemplo, Wolfenden e colaboradores⁵² investigaram em maiores detalhes a hidrólise do monoéster metil fosfato, complementando os dados reportados inicialmente por Bunton e colaboradores³⁵. As reações foram realizadas em temperaturas elevadas (> 100 °C) em tubos de quartzo selados, e as cinéticas foram monitoradas acompanhando-se a formação dos produtos por RMN. Os autores atribuíram a reatividade observada na faixa de pH entre ~2,0–5,0 ao monoânion, ao passo que a menor reatividade observada no patamar em pH > 10 foi atribuída à espécie dianiônica. No entanto, a extrapolação da constante de velocidade observada para a espécie dianiônica para 39°C levou a um valor de $\sim 5 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$, muito acima do valor de $2 \times 10^{-19} \text{ s}^{-1}$ previsto pela correlação de Kirby para um grupo de saída com $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{HA}} = 15,5$ (Figura 11).^{52,53}

A fim de averiguar tal discrepância, novas cinéticas foram realizadas por Lad e colaboradores⁵⁴ com o metil fosfato, bem como o

substrato correlato 3, que possui grupo de saída com mesmo pK_a^{HA} , e com a vantagem de possuir o carbono estericamente impedido para quebra da ligação C–O. Nos novos estudos, os autores realizaram as cinéticas em recipientes de politetrafluoroetileno, e constataram que os resultados obtidos anteriormente foram influenciados pela lixiviação de ácido silícico das cubetas de quartzo devido ao meio alcalino.⁵⁴



A constante de velocidade observada para 3 em 1M de KOH, extrapolada para 39°C, foi de $2 \times 10^{-17} \text{ s}^{-1}$,⁵⁴ em maior consonância com o valor previsto pela LFER de Kirby.³² Para o metil fosfato, o valor da constante de hidrólise para a espécie dianiônica, extrapolado para 25°C, foi de $2 \times 10^{-20} \text{ s}^{-1}$,⁵⁴ também de acordo com o estimado pelos dados de Kirby,³² e consistente com estimativas anteriores de Guthrie.⁵⁵ Ressalta-se que os valores de k_{obs} mostraram-se sensíveis à variação do pH, e os autores propuseram que a reação envolva catálise ácida e que a espécie monoaniônica é a espécie cineticamente ativa.⁵⁴

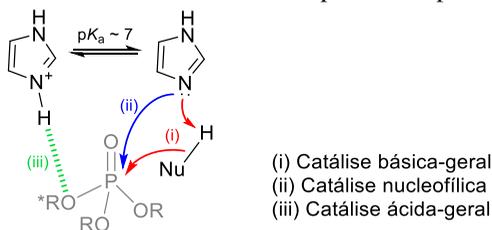
Mais recentemente, Duarte e colaboradores⁵⁶ propuseram que a hidrólise de espécies dianiônicas de monoésteres de fosfato com grupos de saída alcóxidos pode ocorrer igualmente através: (i) de um mecanismo associativo, em que o oxigênio fosforílico atua como ponte para a transferência de um próton da água nucleofílica ao grupo de saída, de maneira similar ao proposto no Esquema 10, ou (ii) de um mecanismo concertado, sem transferência de próton ao substrato. Isso mostra que, ainda que os mecanismos do Esquema 16 sejam geralmente bem aceitos para a descrição dos mecanismos de hidrólise de monoésteres na ausência de catalisadores, outras possibilidades mecanísticas podem ser plausíveis dependendo das características específicas dos substratos e das condições experimentais. Por isso, e de maneira geral para toda a classe de ésteres de fosfato, deve-se tomar cautela para propostas mecanísticas, que são tanto mais adequadas quanto melhor o suporte e a combinação de resultados experimentais e teóricos.

1.1.4 Catálise e efeitos supramoleculares na hidrólise de ésteres de fosfato

Conforme mencionado anteriormente, inúmeros processos biológicos são governados por reações de transferência do grupo fosforila envolvendo mono- e diésteres de fosfato. Devido à estabilidade destes compostos em meio aquoso, conforme descrito acima, as reações de transferência de fosfato contam com o auxílio de enzimas altamente eficientes. Dada a complexidade dos sistemas enzimáticos, inúmeros sistemas miméticos têm sido desenvolvidos ao longo das últimas décadas, a fim de elucidar os diversos fatores que explicam a origem da catálise enzimática e os mecanismos das reações. Essa abordagem é fundamental porque permite a projeção de sistemas catalíticos artificiais com aplicação, por exemplo, no desenvolvimento de fármacos, bem como para a destruição de estoques de organofosforados neurotóxicos.

Diversos grupos de pesquisa têm dedicado atenção ao estudo da reatividade do imidazol, devido ao seu envolvimento em reações enzimáticas de transferência do grupo fosfato na forma de resíduo da histidina. O imidazol livre possui um pK_a^{HA} de 7,0 em meio aquoso, sendo o valor de 6,5 para o imidazol histidínico,⁵⁷ o que significa que em valores de pH perto da neutralidade ele está presente tanto na forma protonada quanto neutra, podendo atuar com catalisador através de diferentes mecanismos, conforme mostra a Figura 12. Quando neutro, o imidazol pode atuar como nucleófilo, atacando diretamente o átomo de fósforo ou, alternativamente, pode atuar como base e assistir o ataque nucleofílico de uma outra espécie. Já a espécie protonada do imidazol pode atuar como ácido geral através da transferência de um próton ao substrato.

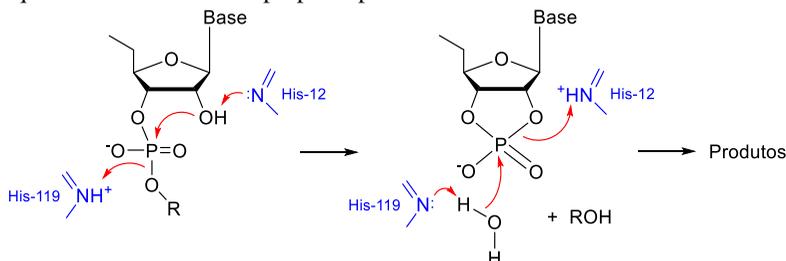
Figura 12 – Diferentes mecanismos de catálise promovida pelo imidazol.



A título de exemplo, cita-se a Ribonuclease A (RNase A), enzima responsável pela clivagem do ácido ribonucléico (RNA) e que conta com a atuação de dois imidazóis dos resíduos de histidina 12 e 119. O

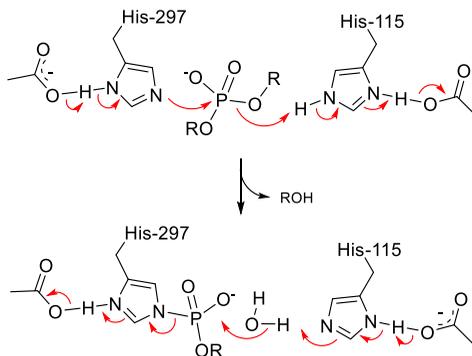
mecanismo de catálise ácido-básica geral é o mais bem aceito na comunidade acadêmica para a reação, Esquema 17, em que o imidazol da His-12 atua como base, abstraindo um próton do grupo –OH nucleofílico e, simultaneamente, o imidazólido da His-119 assiste à eliminação do grupo de saída, levando a formação de um intermediário cíclico. A hidrólise do intermediário ocorre sequencialmente e também conta com catálise ácido-básica geral, sendo que o imidazol da His-119 atua como base, e o imidazólio da His-12, como ácido geral.^{58,59}

Esquema 17 – Mecanismo proposto para RNase A.^{58,59}



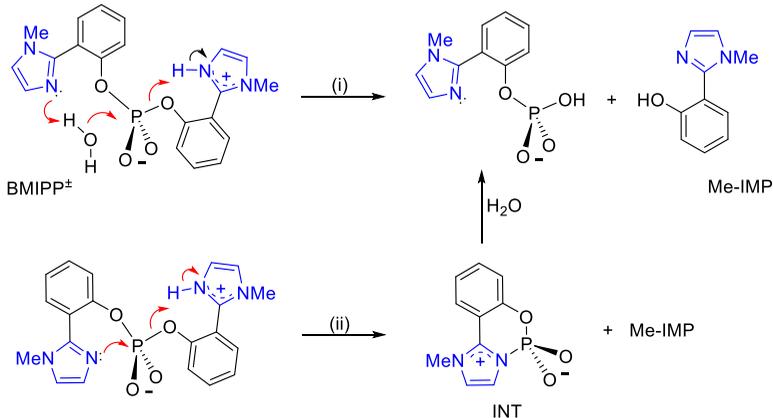
Diferentemente, propõe-se que os imidazóis histidínicos reagem via mecanismo de catálise nucleofílica e ácido-geral na família de enzimas fosfolipase D, conforme delineado no Esquema 18, em que o imidazol neutro da His-297 ataca o fósforo, assistido por catálise básica geral de um grupo aspartato, concomitantemente à catálise ácido-geral promovida pelo imidazólio da His-115. Em seguida, o intermediário de histidina fosforilada é clivado via reação de hidrólise, assistida pelo imidazol da His-115 e pelo ácido aspártico.⁶⁰

Esquema 18 – Mecanismo de catálise promovida por imidazóis na família de enzimas fosfolipase D.⁶⁰



Baseando-se na reatividade do imidazol em sistemas biológicos, diversos autores investigaram os mecanismos e efeitos catalíticos promovidos pelo imidazol em reações simples de transferência do grupo fosfato. Por exemplo, Orth e colaboradores^{61,62} investigaram a reação de hidrólise do diéster bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato (BMIPP), Esquema 19, que possui dois anéis imidazóis e um estrutura flexível que permite a rotação dos substituintes do diéster.

Esquema 19 – Mecanismos de decomposição da espécie dipolar iônica do diéster BMIPP.^{61,62}

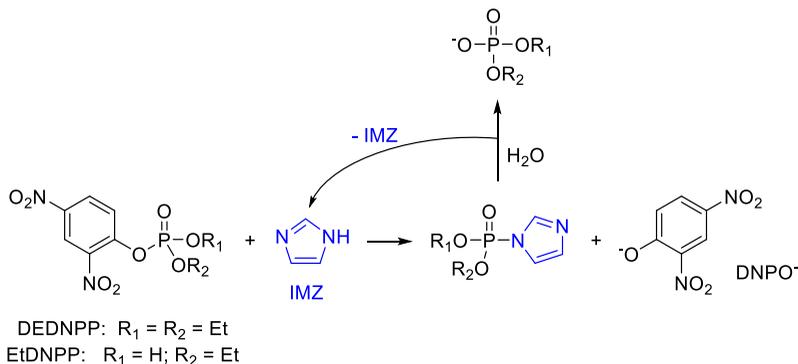


Os autores reportaram que a espécie mais reativa é a dipolar iônica, em que há um anel imidazol neutro e um protonado, e propõe-se que a reação ocorre por dois mecanismos paralelos cineticamente equivalentes: caminho (i), de catálise ácido-básica geral intramolecular em que o ataque da água é assistido pelo imidazol neutro, e a eliminação do grupo de saída é assistida pelo imidazólio, e caminho (ii), de catálise nucleofílica intramolecular, combinada com catálise ácido-geral intramolecular, em que o imidazol neutro ataca diretamente o fósforo, com a eliminação do grupo de saída assistida pelo anel imidazólio, levando à formação de um intermediário cíclico que é rapidamente hidrolisado. Os caminhos apresentados no Esquema 19 foram propostos com base em uma extensa série de experimentos cinéticos, de caracterização de produtos e cálculos computacionais. Em particular, destaca-se que o caminho (ii) é confirmado pela detecção por espectrometria de massas de alta resolução do intermediário INT. Ao comparar a constante de hidrólise da espécie dipolar iônica de BMIPP a 60°C àquela estimada para o ânion do difenil fosfato, isto é, o substrato estruturalmente semelhante sem os grupos

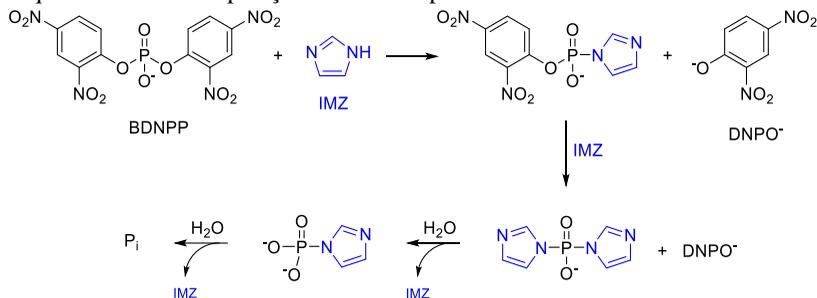
imidazóis, calcula-se um efeito catalítico de 10^6 , evidenciado a eficiência do mecanismo cooperativo dos imidazóis na decomposição do diéster.^{61,62}

Posteriormente, Orth e colaboradores³¹ reportaram as reações intermoleculares do imidazol (IMZ) com uma série de ésteres de fosfato derivados do 2,4-dinitrofenol em meio aquoso, a 25°C , conforme exemplificado no Esquema 20 com o diéster etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EtDNPP) e o triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (DEDNPP). Em comparação com as reações de hidrólise espontânea dos substratos, as reações com imidazol são até 7500 vezes mais rápidas, e em todos os casos as reações são de natureza nucleofílica, havendo a formação de diferentes fosforoamidatos. Ressalta-se que o acompanhamento das cinéticas por RMN ^1H e ^{31}P permitiu quantificar a formação e decomposição dos intermediários fosforoamidatos, constatando-se a regeneração do catalisador nucleofílico de partida.³¹

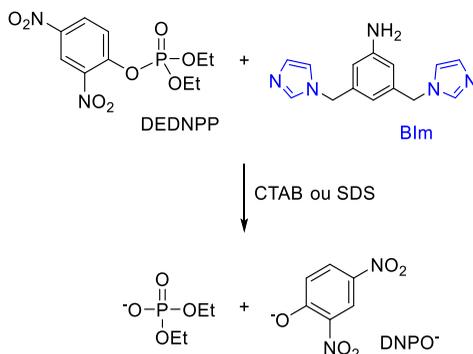
Esquema 20 – Reações dos ésteres de fosfato EtDNPP e DEDNPP com imidazol.³¹



No caso da reação do imidazol com o substrato bis-2,4-dinitrofenil fosfato (BDNPP), constatou-se que ocorrem duas reações consecutivas de substituição, do primeiro e segundo equivalentes de 2,4-dinitrofenolato, de maneira que uma série de intermediários fosforoamidatos foram detectados no processo global, Esquema 21. Nesse caso, os intermediários são hidrolisados e o produto final é o fosfato inorgânico (P_i).³¹

Esquema 21 – Decomposição de BDNPP por imidazol.³¹

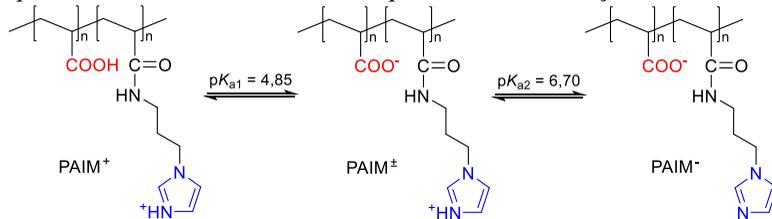
Considerando as diversas particularidades dos sistemas enzimáticos, que englobam, por exemplo, efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos, a reatividade do imidazol foi posteriormente avaliada pelo LaCFI em sistemas microheterogêneos, envolvendo sistemas micelares, poliméricos e agregados supramoleculares de polímeros e surfactantes. Nesse sentido, reportou-se a reação do DEDNPP com o nucleófilo 3,5-bis((1*H*-imidazol-1-il)metil)anilina (BIm) em meios micelares, Esquema 22. A reação foi acelerada em até 1700 vezes tanto por micelas catiônicas de brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) quanto por micelas aniônicas de dodecil sulfato de sódio (SDS), e tal efeito foi explicado devido à natureza hidrofóbica e neutra de ambos DEDNPP e BIm.⁶³

Esquema 22 – Reação de DEDNPP com BIm nos meios micelares de CTAB e SDS.⁶³

Giusti e colaboradores reportaram um polímero inédito obtido funcionalizando o poli(ácido acrílico) com 1(3-aminopropil)imidazol. O polímero resultante (PAIM) contém os grupos funcionais ácido carboxílico e imidazol em proporção aproximada de 1:1. O Esquema 23

apresenta a estrutura do polímero e os seus equilíbrios de dissociação ácida. Resultados de titulação potenciométrica permitiram determinar os valores de pK_a de 4,85 e 6,70 para o ácido carboxílico e para o imidazólio, respectivamente, e resultados cinéticos mostraram que o PAIM é reativo frente ao triéster DEDNPP, acelerando a sua hidrólise em até 10^7 vezes quando o polímero se encontra negativamente carregado.⁶⁴

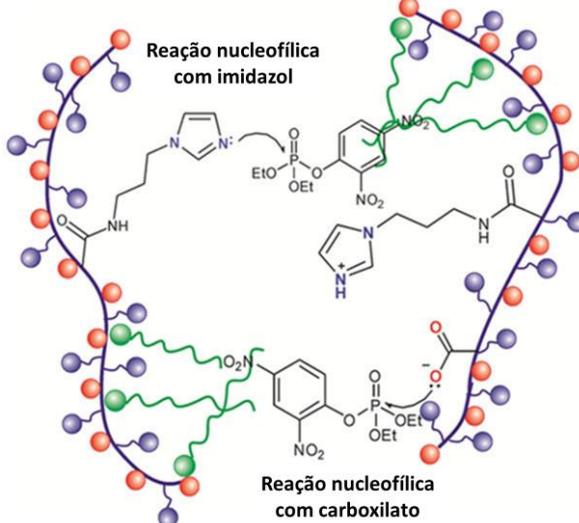
Esquema 23 – Polímero PAIM e seus equilíbrios de dissociação ácida.⁶⁴



A reatividade de PAIM frente a DEDNPP pode ser otimizada pela agregação com o surfactante catiônico CTAB, conforme ilustra a Figura 13. Gerola e colaboradores⁶⁵ mostraram que a adição de CTAB a soluções aquosas contendo PAIM leva à formação de diferentes agregados supramoleculares, os quais criam cavidades hidrofóbicas que favorecem a aproximação entre o substrato DEDNPP e os grupos funcionais carboxilato e imidazol. Ressalta-se que as concentrações necessárias de CTAB para a formação dos agregados são significativamente menores que a concentração micelar crítica (cmc). Os incrementos nas constantes de velocidade podem alcançar valores da ordem de 10^6 vezes, em comparação com a hidrólise espontânea do substrato, dependendo da concentração de polímero e surfactante, e da distribuição de espécies do polímero, sendo os maiores efeitos observados quando PAIM encontra-se negativamente carregado.⁶⁵

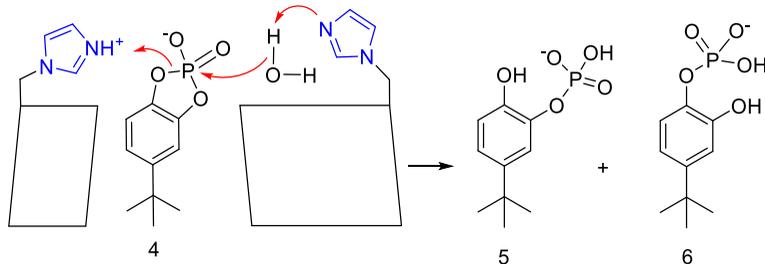
Outra estratégia adotada para mimetizar a reatividade de sistemas biológicos e sintetizar sistemas artificiais com atividade catalítica pronunciada reside na exploração da química supramolecular baseada na formação de complexos hospede-hospedeiro.^{66,67} Nesse sentido, diversos macrociclos com grupos funcionais específicos ancorados já foram reportados, sendo que a associação dos substratos permite a aproximação dos reagentes, levando aos aumentos de velocidade observados.

Figura 13 – Bolsos hidrofóbicos formados pela agregação entre PAIM e monômeros de CTAB favorecem a reação entre o substrato DEDNPP e os grupos funcionais carboxilato e imidazol do polímero. Figura adaptada da referência 65.



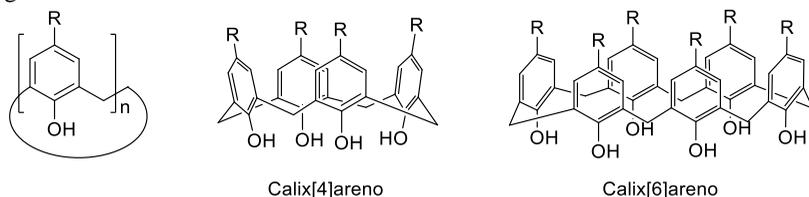
Um exemplo bastante pertinente foi reportado por Breslow e colaboradores,^{66,68-70} em que os autores investigaram a hidrólise do substrato cíclico 4 do Esquema 24, derivado do 4-*tert*-butilcatecol, em presença de β -cliclodextrinas contendo dois substituintes imidazol ancorados. Os perfis cinéticos obtidos foram típicos de saturação, indicando a ligação do substrato à cavidade do hospedeiro, e obteve-se um perfil de pH de sino para a reação, indicando a atuação cooperativa dos substituintes imidazol na reação. Os autores propuseram um mecanismo de catálise ácido-básica geral, tal proposto para o mecanismo da RNase A. O mecanismo bifuncional também foi evidenciado através da avaliação do efeito do número de monômeros do macrociclo e nas posições relativas entre os grupos imidazóis: o macrociclo com menor número de unidades e com os grupos imidazóis mais próximos entre si levou ao melhor efeito catalítico. Além disso, os autores destacam a seletividade do catalisador supramolecular, que leva à formação de 5 com seletividade de 99:1 em relação a 6 (Esquema 24), ao passo que a hidrólise básica de 4 resulta na formação de quantidades equivalentes dos isômeros.⁶⁶

Esquema 24 – Hidrólise de diéster de fosfato catalisada por β -ciclodextrinas funcionalizadas com imidazol.⁶⁶



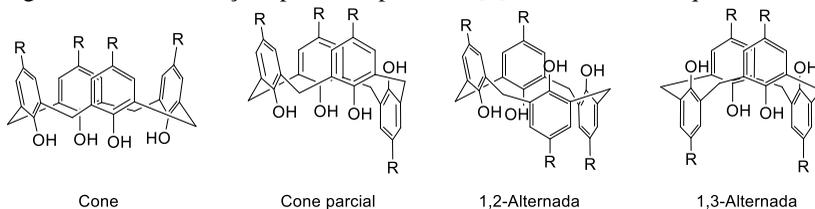
Outros tipos de macrociclo já foram avaliados como catalisadores para reações de hidrólise de ésteres de fosfato. Destacam-se aqui dois tipos: os calixarenos e os pilararenos. Os calixarenos são macrociclos formados pela repetição de unidades fenólicas conectadas por pontes de metileno, geralmente possuindo substituintes em posição *para* ao grupo hidróxido. A Figura 14 apresenta a estrutura genérica do monômero de um calixareno, juntamente com exemplos de estruturas macrocíclicas formadas com 4 e 6 unidades. Ressalta-se que é possível funcionalizar os grupos hidróxidos no anel inferior do calixareno, por exemplo, com grupos alquilas.

Figura 14 – Estrutura geral de um calixareno (à esquerda), e representações genéricas de calixarenos com 4 e 6 unidades.



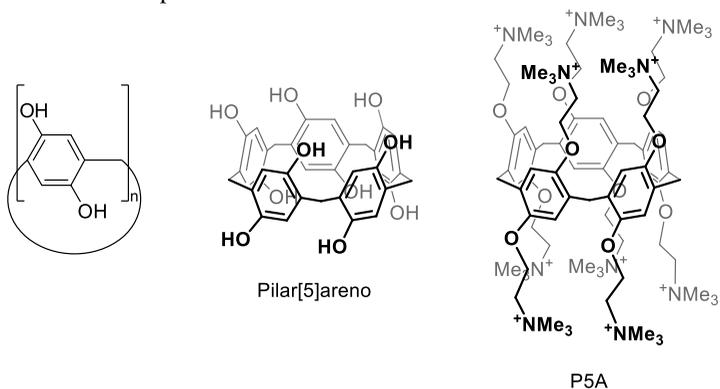
Devido às pontes de metileno flexíveis, os calixarenos podem adquirir diversas conformações em solução, conforme mostra a Figura 15 para um calix[4]areno, sendo a conformação cone preferida para o calix[4]areno em solução aquosa quando não-substituído no anel inferior. Isso ocorre devido à ionização do primeiro grupo $-OH$, havendo a geração de uma carga negativa que pode ser estabilizada por ligações intermoleculares de hidrogênio com os grupos $-OH$ vizinhos, fixando o calixareno nessa conformação.

Figura 15 – Conformações possíveis para calix[4]arenos em meio aquoso.



Já os pilararenos constituem uma classe de macrociclos mais recente, cuja síntese foi reportada pela primeira vez em 2008 por Ogoshi e colaboradores.⁷¹ São formados pela repetição de unidades de hidroquinona conectadas por pontes de metileno nas posições 2 e 5, Figura 16, sendo que diferentes estruturas podem ser obtidas quando os grupos –OH encontram-se funcionalizados. A principal diferença entre os pilararenos e os calixarenos é a maior simetria dos pilararenos, levando à formação de uma estrutura com forma de “pilar”, mais rígida, ao passo que os calixarenos possuem estrutura em forma de “cálice” (quando na conformação cone), mais flexível. A maior rigidez da estrutura dos pilararenos é interessante do ponto de vista da complexação de moléculas hóspede com maiores constantes de associação e maior seletividade.

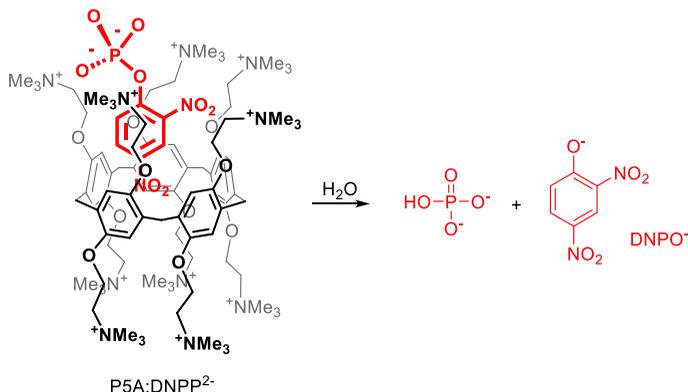
Figura 16 – À esquerda, unidade genérica de um pilarareno, e exemplos de estruturas formadas por cinco unidades.



Recentemente, Liz e colaboradores⁷² reportaram a catálise promovida pelo P5A (estrutura mostrada na Figura 16) na hidrólise do monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato (DNPP), Esquema 25. Experimentos

de RMN confirmam a inclusão do substrato na cavidade do pilarareno através do anel aromático, permanecendo o grupo fosfato voltado para o exterior, portanto, com as cargas negativas do substrato em contato com as cargas positivas dos grupos trimetilamônio. O efeito catalítico obtido foi de ~10 vezes para a espécie dianiônica do substrato, constituindo a primeira publicação acerca da utilização dos pilararenos como novos catalisadores para a hidrólise de ésteres de fosfato.

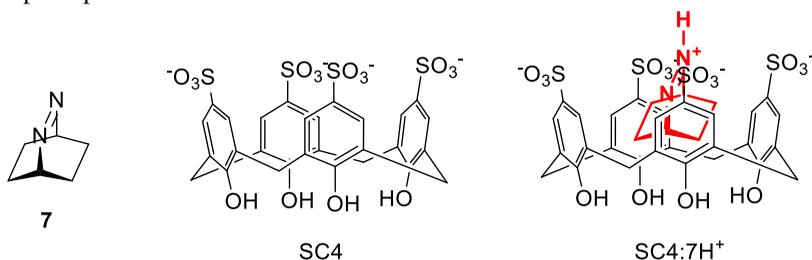
Esquema 25 – Reação de hidrólise do diânion do monoéster DNPP em presença de P5A.⁷²



É interessante ressaltar que a formação de complexos do tipo hóspede-hospedeiro mimetiza outros aspectos relevantes de sistemas enzimáticos, a saber, as diferentes forças intermoleculares responsáveis pela ligação de substratos a sítios ativos, e mudanças de pK_a devido ao ambiente diferenciado ao qual o substrato é exposto no sítio ativo.⁷³ Como exemplo, cita-se o estudo de Bakirci e colaboradores⁷⁴, que investigaram as mudanças de pK_a dos equilíbrios de protonação de uma série de compostos azo induzidas pela associação ao *p*-sulfonatocalix[4]areno (SC4), Figura 17. Assim, a presença das cargas negativas dos grupos sulfonato favorece a formação das espécies positivamente carregadas dos compostos azo, de maneira que os valores de pK_a das sondas são aproximadamente 2 unidades maiores quando associados aos calixareno. Os autores comparam as mudanças de pK_a com outros sistemas reportados na literatura, esclarecendo uma tendência geral de que as interações íon-íon entre a sonda e o receptor estão entre as mais fortes e, portanto, são as mais prováveis de induzir mudanças significativas de pK_a em moléculas orgânicas. Diferentemente, a associação de sondas somente

por componentes hidrofóbicas, por exemplo, pode promover deslocamentos negativos de pK_a , já que ambientes hidrofóbicos em geral desfavorecem a formação de espécies iônicas. Já interações do tipo íon-dipolo devem em geral influenciar os equilíbrios de protonação de maneira intermediária.⁷⁴

Figura 17 – O composto 7 é um representante dos compostos azo cujos equilíbrios de protonação foram investigados por Bakirci em presença de SC4. A estrutura SC4:7H⁺ representa a estrutura do complexo hóstede:hospedeiro entre SC4 e a espécie protonada de 7.⁷⁴



Os exemplos apresentados acima ilustram uma série de aspectos relevantes para o desenvolvimento de sistemas artificiais que mimetizem aspectos importantes de sistemas enzimáticos, incluindo reações de transferência do grupo fosforila. Por exemplo, o emprego de surfactantes, puros ou em conjunto com polímeros, mostra claramente que microambientes de caráter orgânico são propícios para o alojamento de substratos de arquitetura molecular hidrofóbica. De maneira semelhante, efeitos eletrostáticos podem contribuir sobremaneira para aumentar quantitativamente a associação de moléculas orgânicas a tais microambientes, sejam eles microdomínios de agregados supramoleculares ou cavidades de macrociclos hospedeiros. Além da reatividade, equilíbrios de protonação também podem ser influenciados significativamente por interações intermoleculares em agregados e complexos supramoleculares.

Nesse sentido, inspirando-se em sistemas biológicos, a química supramolecular constitui um campo fértil para a exploração de uma grande variedade de interações intermoleculares na formação de complexos entre uma grande variedade de substratos e macrociclos disponíveis. Não por acaso, o desenvolvimento de novos sistemas artificiais para a mimetização das particularidades dos sistemas enzimáticos continua sendo foco de estudo de muitos grupos de pesquisa,

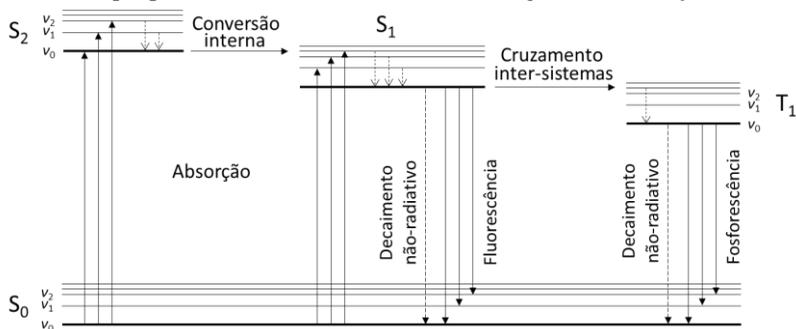
com avanços cada vez mais importantes em aspectos como os efeitos catalíticos e os de seletividade.

1.2 FOTOFÍSICA E FOTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS EM SOLUÇÃO

Uma molécula orgânica pode possuir diferentes configurações eletrônicas, que são distribuições específicas dos seus elétrons nos orbitais moleculares disponíveis. Quando a ocupação dos orbitais é tal que leva à configuração de menor energia, diz-se que a molécula está no estado fundamental. O ganho de energia por um elétron, que pode ocorrer através de diversos processos, térmicos ou por absorção de luz, pode levá-lo a ocupar orbitais de maior energia e as configurações eletrônicas nesses casos geram os chamados estados eletronicamente excitados. Um estado singlete (spins antiparalelos, $\uparrow\downarrow$) é representado por S_n , $n \geq 0$, onde o subscrito 0 designa o estado fundamental, e valores de $n = 1, 2, \dots$ designam estados excitados de energia gradualmente maior, sendo o estado excitado singlete de menor energia representado por S_1 . Um estado triplete (spins paralelos, $\uparrow\uparrow$) é representado por T_n , $n \geq 1$, onde n representa o nível de energia, e o estado excitado triplete de menor energia é representado por T_1 .^{75,76}

O fornecimento de energia para a promoção de um elétron a um estado excitado pode ocorrer de diversas formas, por exemplo, através da absorção de fótons. Quando uma molécula orgânica eletronicamente excitada retorna ao estado fundamental pela emissão de luz, fala-se em um processo fotofísico, caracterizado por manter a identidade da molécula, ou seja, o número e tipo de átomos e a conectividade entre eles. Ainda, é possível que a desativação de um estado eletronicamente excitado ocorra sem a emissão dos fótons absorvidos, embora na prática tais processos também sejam incluídos na definição de fotofísica, já que não há alteração da constituição química da molécula. Assim, os diversos processos fotofísicos que podem ocorrer quando uma molécula orgânica em solução absorve radiação em comprimento de onda específico podem ser representados esquematicamente através do diagrama de Jablonski, Figura 18.^{75,76}

Figura 18 – Diagrama de Jablonski, representando os principais processos fotofísicos que podem ocorrer com uma molécula orgânica em solução.



Na Figura 18, uma molécula no estado fundamental S₀ pode absorver luz e adquirir energia suficiente para ser promovida a um estado eletronicamente excitado singlete S_n (n = 1, 2, ...), mantendo-se a multiplicidade de spin, sendo que em cada estado singlete há diversos níveis vibracionais v. Os choques sofridos por uma molécula excitada levam a uma perda de energia (relaxação), de modo que a molécula decai para níveis vibracionais de menor energia dentro de um dado estado singlete, e transitam de um estado singlete superior para um inferior até alcançar o menor nível vibracional em S₁. Então, a molécula pode voltar ao estado fundamental S₀ através da emissão de luz, processo denominado fluorescência, ou através de um processo térmico não-radiativo, denominado conversão interna, ambos seguidos de relaxamento vibracional.^{75,76}

Ainda, é possível que a sonda excitada apresente alteração da sua multiplicidade de spin, passando a um estado triplete por um processo denominado cruzamento inter-sistemas (Figura 18). Novamente, a relaxação conduz a sonda a níveis vibracionais de menor energia até que alcance o estado triplete de menor energia, podendo a partir daí retornar ao estado fundamental S₀ com emissão de luz, processo denominado fosforescência, ou por processo térmico não-radiativo (também referido como cruzamento inter-sistemas), ambos seguidos de relaxamento vibracional. Já que a transição de S₀ ← T₁ é proibida por spin, tais processos são mais lentos em relação àqueles da transição S₀ ← S₁. Ressalta-se que é possível que o primeiro estado triplete seja alcançado a partir de absorção de luz em S₀ (processo omitido no diagrama da Figura 8).^{75,76}

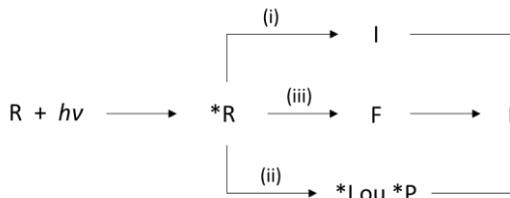
O diagrama de Jablonski é um diagrama de estado de energia, ou seja, uma representação gráfica dos níveis relativos de energia dos estados fundamental e excitados, e das transições possíveis entre tais estados. Note que, embora o eixo y represente a energia relativa, o eixo x de um diagrama de estado de energia não possui significado físico. Considerando uma molécula orgânica, é interessante notar que os números e tipos de átomos, bem como a conectividade entre eles, são os mesmos nos diferentes níveis de energia, diferindo apenas na configuração eletrônica e na configuração de spin. Portanto, os estados excitados S_n e T_n são isômeros de S_0 e isômeros entre si: isômeros eletrônicos possuem o mesmo número de elétrons ocupando orbitais diferentes, e isômeros de spin possuem elétrons em mesmos orbitais, mas com orientações de spin diferentes.⁷⁶

Ressalta-se que a observação experimental do retorno ao estado fundamental a partir de estados singlete ou triplete de ordens superiores a S_1 ou T_1 são extremamente incomuns, já que os processos de desativação de tais estado até S_1 ou T_1 são mais rápidos em comparação aos demais processos ilustrados na Figura 18 (Regra de Kasha). Por isso, os processos observados experimentalmente de desativação de uma sonda excitada, por processos radiativos ou não, correspondem a transições $S_0 \leftarrow S_1$ ou $S_0 \leftarrow T_1$. Assim, considerando os processos de absorção e emissão de luz em particular, uma molécula pode alcançar níveis de energia superiores de acordo com o comprimento de onda da radiação absorvida, apresentando mais de uma banda de absorção, mas observa-se em geral somente uma banda de emissão de fluorescência ($S_0 \leftarrow S_1$) e uma banda de emissão de fosforescência ($S_0 \leftarrow T_1$), ambas com valores de λ_{\max} superiores ao(s) λ_{\max} de excitação. O deslocamento dos valores de λ_{\max} de fluorescência e fosforescência para maiores comprimentos de onda em relação ao λ_{\max} de excitação é denominado deslocamento de Stokes, e a sua ocorrência deve-se à perda de energia que ocorre nos processos, sendo que quanto maior o deslocamento de Stokes, maior será a perda de energia. É interessante notar que, uma vez que os processos radiativos de desativação de uma sonda excitada ocorrem a partir de S_1 e T_1 , as bandas de emissão de fluorescência e fosforescência são independentes do comprimento de onda de excitação da amostra, e no caso do fenômeno da fluorescência, os espectros de excitação e emissão são em geral simétricos, já que se referem à mesma transição eletrônica.^{75,76}

Os processos referidos acima e representados no diagrama de Jablonski correspondem a processos físicos, ou seja, não alteram o número, tipo e conectividade dos átomos. No entanto, moléculas orgânicas podem reagir quando eletronicamente excitadas, levando à

formação de moléculas diferentes e caracterizando processos fotoquímicos. A Figura 19 apresenta os três caminhos reacionais que podem ser observados na conversão de um reagente eletronicamente excitado a um produto, denominados processos fotoquímicos primários.

Figura 19 – Processos fotoquímicos primários.

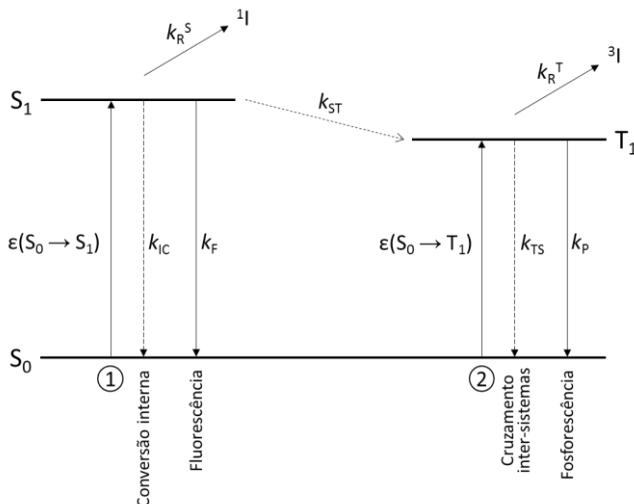


Na Figura 19, a absorção de luz por uma molécula orgânica R a leva ao estado excitado (*R), que pode retornar ao estado fundamental por processos fotofísicos (omitidos na Figura 19), ou que pode sofrer uma transformação química. Em (i), *R é convertido ao produto P passando por um intermediário reativo I, não excitado, cuja estrutura é em geral de natureza radicalar ou iônica, ao passo que em (ii), a reação leva à formação de estruturas eletronicamente excitadas, um intermediário *I ou um produto *P, sequencialmente desativados ao estado fundamental. Já o caminho (iii) representa um processo onde *R é convertido ao produto através de um “funil”, representado por F no esquema, que corresponde a uma interseção cônica das superfícies de energia potencial do estado excitado e do estado fundamental e que será discutida posteriormente. Ressalta-se que o caminho (i) é o processo fotoquímico primário mais observado em reações fotoquímicas de moléculas orgânicas, e geralmente o intermediário é um par radicalar (RP), um biradical (BR) ou uma espécie dipolar iônica (Z), enquanto que o caminho (ii) é raramente observado.⁷⁶ Exemplos específicos de reações fotoquímicas serão apresentados na seção seguinte, em que serão apresentados processos fotoquímicos de ésteres de fosfato. Nesse momento, apresentar-se-á somente o formalismo da fotoquímica orgânica mecanística necessário para o entendimento dos processos fotoquímicos possíveis para uma molécula orgânica em solução.

Considerando o processo fotoquímico primário $\text{*R} \rightarrow \text{I} \rightarrow \text{P}$, um diagrama de estado de energia mais completo e que inclui as diferentes possibilidades de processos fotofísicos e fotoquímicos que podem ocorrer com uma molécula orgânica a partir da absorção de luz é representado na

Figura 20.⁷⁶ Foram considerados na Figura 20 somente os níveis vibracionais de menor energia dos estados singlete e triplete.

Figura 20 – Diagrama de estado de energia genérico que considera processos fotofísicos e fotoquímicos para uma molécula orgânica em solução.



Na Figura 20, tem-se que:

- (i) a absorção de luz por uma sonda no estado fundamental em (1) a leva ao primeiro estado singlete, sendo os fenômenos de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$) e conversão interna ($S_1 \rightarrow S_0 + \text{calor}$) permitidos por spin e governados por constantes de velocidade de primeira ordem k_F e k_{IC} , respectivamente;
- (ii) a absorção de luz pela sonda em (2) a leva ao primeiro estado excitado triplete, sendo os processos de desativação ao estado fundamental por fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$) e conversão inter-sistema ($T_1 \rightarrow S_0 + \text{calor}$) proibidos por spin e governados pelas constantes de velocidade de primeira ordem k_P e k_{TS} , respectivamente;
- (iii) a conversão inter-sistema entre S_1 e T_1 ($S_1 \rightarrow T_1 + \text{calor}$) é proibida por spin e descrita pela constante de velocidade de primeira ordem k_{ST} ;
- (iv) uma reação de *R em S_1 levando à formação de um intermediário reativo 1I é governada por uma constante de velocidade k_R^S , e uma reação de R^* em T_1 levando à formação do intermediário reativo 3I , por k_R^T . Tais reações

são denominadas reações fotoquímicas primárias. As reações que levam ^1I e ^3I aos produtos ocorrem no estado fundamental e são denominadas reações secundárias térmicas.

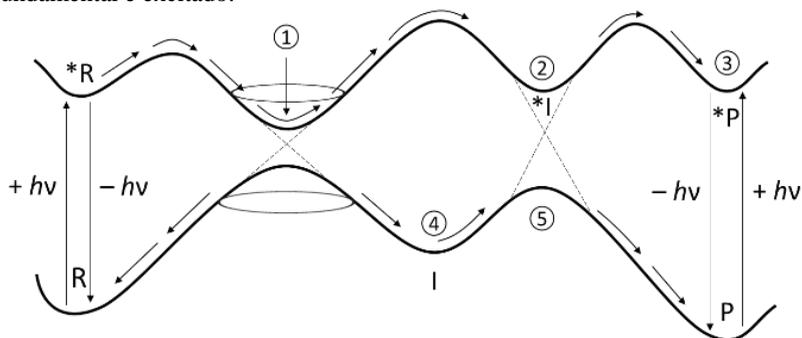
Dois conceitos empregados rotineiramente em fotoquímica são o tempo de vida de um estado excitado (τ) e o rendimento quântico de fluorescência (Φ). O rendimento quântico de fluorescência corresponde à razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos e, portanto, corresponde a um valor entre zero e a unidade que pode ser calculado através da razão entre a constante de velocidade de fluorescência e a soma das constantes de velocidade de todos os processos de desativação do primeiro estado singleto, ou seja, $\Phi = k_F/(k_F + k_{IC} + k_{ST})$, onde os termos possuem os mesmos significados anteriores. Um rendimento quântico alto implica a desativação de S_1 majoritariamente por um processo radiativo, ao passo que valores pequenos de Φ indicam maior perda de energia e maior deslocamento de Stokes. O tempo de vida, por sua vez, corresponde ao tempo médio que uma molécula permanece no estado excitado antes de decair ao estado fundamental e é dado por $\tau = 1/(k_F + k_{IC} + k_{ST})$ ou por $\tau = 1/(k_T + k_{ST})$, para espécies em S_1 e T_1 , respectivamente, onde os termos possuem os mesmos significados anteriores.⁷⁵

O diagrama de estado de energia da Figura 20 representa um paradigma fundamental da fotoquímica molecular moderna, apresentando de forma sistemática todas as *possibilidades* de processos fotofísicos e fotoquímicos que podem ocorrer com uma molécula orgânica e que conectam S_0 , S_1 e T_1 , juntamente com uma descrição qualitativa dos níveis de energia relativos entre tais estados. A observação de um ou mais fenômenos fotofísicos e/ou fotoquímicos depende das constantes de velocidade de cada processo, pois os processos descritos pelo diagrama são competitivos. Por exemplo, uma molécula em S_1 eficientemente desativada por fluorescência apresenta baixa probabilidade de reagir fotoquimicamente, mesmo que existam caminhos reacionais possíveis de acordo com a sua estrutura e as condições experimentais. Diferentemente, se a transição de uma molécula em S_1 para S_0 ou T_1 é lenta, a probabilidade de se observar uma reação fotoquímica pode ser maior. Naturalmente, um conhecimento da estrutura das moléculas orgânicas envolvidas e das possibilidades dos processos fotofísicos e fotoquímicos em diferentes condições experimentais permite ao experimentalista investigar e modular os fenômenos competitivos da Figura 20.⁷⁶

Conforme mencionado anteriormente, as reações que conduzem os intermediários reativos ^1I e ^3I aos produtos ocorrem no estado

fundamental, não constituindo processos fotoquímicos e, por isso, não são incluídas no diagrama de estado de energia. Assim, uma abordagem qualitativa simplificada para a compreensão global de uma reação fotoquímica $R + h\nu \rightarrow P$ e que inclui as etapas no estado fundamental é baseada em superfícies de energia potencial nos estados fundamental e excitado, mais especificamente, em coordenadas de reação, isto é, os caminhos de reação de menor energia nas superfícies.⁷⁶ A Figura 21 exemplifica duas coordenadas de reação: a curva inferior representa as transformações possíveis de um reagente R no estado fundamental, ao passo que a curva superior representa os processos correspondentes no estado excitado. Neste exemplo, as duas curvas referem-se a estados singlete.

Figura 21 – Coordenadas de reação de um estado singlete nos estados fundamental e excitado.



Considerando um reagente R no estado fundamental, a absorção e emissão de luz pode ocorrer, caracterizando um processo fotofísico, já que R e *R apresentam geometrias nucleares similares (posições próximas no eixo x), diferentemente do que ocorre com o deslocamento gradual no sentido da direita ao longo das curvas de energia potencial, o que representa uma alteração na geometria nuclear e, portanto, uma transformação química. A representação do processo fotofísico da Figura 21 está de acordo com o princípio de Franck-Condon, de que absorção e emissão de luz ocorrem em pontos onde ambas as superfícies de energia dos estados fundamental e excitado são próximas de mínimos. *R pode adquirir energia suficiente para ultrapassar pequenas barreiras e alcançar posições de menor energia, como a região 1 da Figura 21. Eventualmente, as curvas de energia potencial dos estados fundamental e excitado podem ser próximas em energia em determinados pontos, particularmente em

regiões de mínimo da curva do estado excitado e pontos máximo da curva do estado fundamental, representando pontos de geometria nuclear semelhante. Nesse caso, *R em 1 pode “saltar” para a curva de energia potencial do estado fundamental com a liberação de calor, o que constitui uma conversão interna. A região 1 na curva de energia potencial do estado excitado é chamada de funil ou interseção cônica, e permite uma transição muito rápida para a curva do estado fundamental, sendo tanto mais eficiente quanto maior a proximidade das curvas. Após o “salto”, caso R desloque-se do máximo para a esquerda, retornará ao estado inicial, ao passo que o deslocamento para a direita conduzirá à formação de um intermediário no estado fundamental. Eventualmente, o intermediário alcançará energia suficiente para superar a barreira 5 e formará P no estado fundamental.⁷⁶

A Figura 21 mostra ainda outras possibilidades, ainda que raramente observadas. Por exemplo, *R na região 1 pode adquirir energia suficiente para formar um intermediário excitado *I em 2, sequencialmente convertido ao produto excitado *P em 3, o qual decai ao estado fundamental. Ressalta-se que um eventual “salto” da região 2 para o máximo em 5 na curva do estado fundamental deve ser menos eficiente em comparação ao descrito para a região 1, pois a diferença de energia entre as curvas de energia potencial é maior. O fenômeno de conversão observado em 1 é referido como cruzamento fracamente evitado, conforme representam as linhas pontilhadas, e uma mudança de uma molécula da curva do estado excitado àquela do estado fundamental é mais provável, ao passo que em 2 tem-se um cruzamento fortemente evitado, representado pelas linhas pontilhadas, que indicam uma região onde as curvas de energia potencial se repelem mutuamente, resultando em uma diferença de energia considerável e tornando a passagem de 2 para 5 pouco provável.⁷⁶

Reações fotoquímicas podem ser estudadas de diversas maneiras, por exemplo, através da realização das reações em reatores fotoquímicos, e acompanhamento da formação de intermediários e produtos por métodos espectroscópicos. Tipicamente, uma amostra contendo o substrato em solução é submetida a irradiação e alíquotas são retiradas em intervalos de tempo regulares, sendo os intermediários e produtos identificados e quantificados, por exemplo, por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/MS).

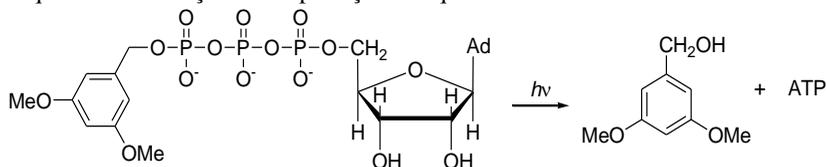
Outra técnica utilizada para a investigação de reações fotoquímica é a fotólise por pulso de laser. Diferentemente do que ocorre no experimento descrito anteriormente, em que toda a amostra é irradiada com luz, nessa técnica um pulso de laser de pequena duração e com

comprimento de onda definido é tipicamente incidido em uma parte da amostra (em uma cubeta de quartzo), resultando na rápida promoção de uma população do analito ao estado excitado. Em direção perpendicular à direção do feixe do laser, uma lâmpada pulsada de UV/Vis registra variações de absorvância em um comprimento de onda selecionado, permitindo acompanhar assim a variação da concentração de espécies transientes. Assim, a fotólise por pulso de laser é extremamente vantajosa na investigação mecanística de reações fotoquímicas, porque permite obter constantes de velocidade de formação e/ou consumo de espécies transientes de forma direta.⁷⁵⁻⁷⁸

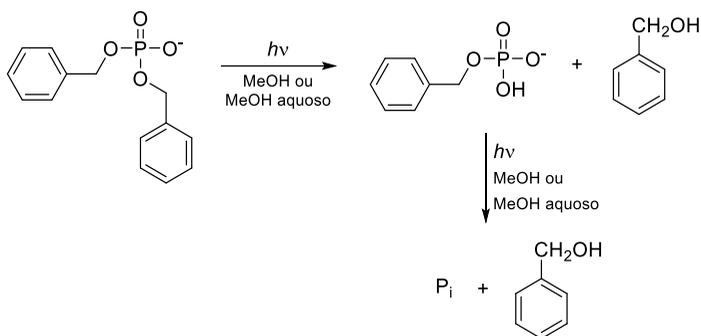
1.2.1 Fotoquímica de ésteres de fosfato

Em paralelo aos estudos mecanísticos das reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato no estado fundamental, uma série de estudos foi reportada a partir da década de 1950 com foco em reações fotoquímicas de ésteres de fosfato e outros organofosforados. No entanto, o padrão de reatividade de ésteres de fosfatos eletronicamente excitados com substituintes arílicos difere consideravelmente em relação ao observado em reações térmicas, já que a absorção da radiação ocorre por grupos aromáticos em posição alfa ao grupo fosfato, de modo que o fosfato em muitos casos atua como nucleófilo e não como o centro reacional propriamente.⁷⁹

O interesse inicial na investigação da fotoquímica de ésteres de fosfato esteve intrinsecamente relacionado a aplicações biológicas, visando, por exemplo, o estudo de processos bioquímicos de oligonucleotídeos *in vitro*. Para esse tipo de estudo, faz-se necessário a inserção dos substratos com o grupo fosfato protegido em um meio biológico. Utilizando uma fonte que realize um disparo de luz com tempo de pulso curto, e utilizando grupos protetores com características específicas, é possível excitar o grupo protetor rapidamente e promover a quebra da ligação com o grupo fosfato de maneira rápida, de modo que haja a liberação instantânea do oligonucleotídeo na amostra, conforme exemplifica o Esquema 26. Após, os processos bioquímicos de interesse devem acontecer numa escala de tempo maior. Não por acaso, o estudo de grupos protetores para biomoléculas se expandiu grandemente, visando a obtenção de grupos com características ótimas, por exemplo, que possuam uma ligação com o grupo fosfato facilmente rompida no excitado excitado e que não apresentem atividade biológica, sendo inertes ao processo bioquímico estudado.^{79,80}

Esquema 26 – Reação de desproteção fotoquímica do ATP.⁸¹

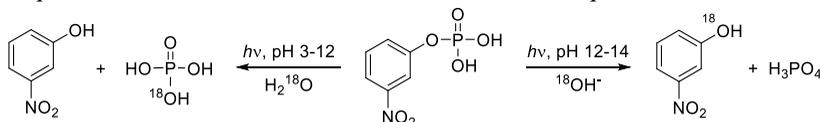
Os primeiros estudos de desproteção fotoquímica de compostos fosfatados envolveram protetores benzílicos (porque estes já eram utilizados anteriormente, mas removidos através de outros processos), sendo os estudos estendidos para substituintes fenílicos.^{79,82,83} Entre as primeiras publicações com foco na reatividade de ésteres de fosfato benzílicos e fenílicos no estado excitado, destacam-se os trabalhos de Arris e colaboradores⁸⁴ e de Havinga e colaboradores⁸⁵. Arris investigou a liberação induzida pela luz de grupos benzílicos a partir de dibenzil fosfato e tetrabenzil fosfato, Esquema 27, mostrando que os substratos eram convertidos a fosfato inorgânico ou pirofosfato a partir de processos sequenciais de liberação de grupos benzílicos em soluções etanólicas irradiadas com luz.⁸⁴

Esquema 27 – Fotólise do dibenzil fosfato.⁸⁴

Os trabalhos liderados por Havinga iniciaram a partir da observação casual de que monoésteres de fosfato fenólicos eram degradados aos fenóis correspondentes em soluções expostas à luz ambiente.⁸⁶ Os autores reportaram que as reações de hidrólise dos monoésteres *o*-, *m*- e *p*-nitrofenil fosfatos eram aceleradas pela exposição à radiação ultravioleta e visível, levando à formação de fosfato inorgânico e do nitrofenol correspondente, sendo a reatividade do isômero *meta* maior.⁸⁵⁻⁸⁷ Estudos complementares com água marcada ($H_2^{18}O$)

mostraram que a degradação do *m*-nitrofenil fosfato ocorre através de uma reação de fotossolvólise na faixa de pH 3-12, com ataque nucleofílico da água no substrato excitado, ao passo que uma reação de substituição nucleofílica aromática fotoinduzida (S_NAr^*) ocorre na faixa de pH 12-14, havendo o ataque nucleofílico do hidróxido no carbono aromático *ipso* de *R , Esquema 28.⁸⁸ Em meio metanólico, observa-se ataque nucleofílico no fósforo. Atribuiu-se a reatividade dos substratos ao primeiro estado excitado singlete, baseando-se no efeito pequeno observado na supressão da fotossolvólise do *m*-nitrofenil fosfato pela presença de íons cloreto ou brometo.⁸⁵ Os autores relatam ainda que a dependência da velocidade de formação dos produtos em relação à temperatura é levemente negativa e praticamente negligenciável.⁸⁵

Esquema 28 – Fotólise do *m*-nitrofenil fosfato em meio aquoso.⁷⁹

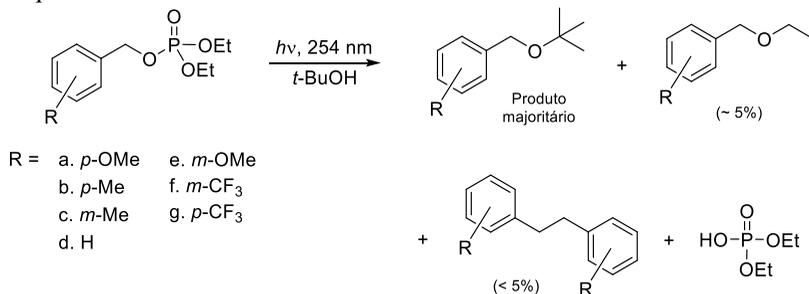


É interessante observar que Havinga e colaboradores reportaram maior reatividade do isômero *meta* na fotólise da série de monoésteres com substituintes *o*-, *m*-, e *p*-nitrofenil. Tal resultado é contrário ao observado em reações solvolíticas no estado fundamental, onde os efeitos mesoméricos e de ressonância de substituintes em posições *orto* e *para* é mais pronunciado em comparação aos mesmos substituintes em posição *meta*.⁷³ Assim, Havinga e colaboradores reportaram um dos primeiros exemplos do que foi posteriormente denominado por Zimmermann de *efeito meta*,^{89,90} isto é, a inversão do efeito de substituintes em reações de solvólise no estado excitado em relação ao efeito promovido nas reações correspondentes no estado fundamental. O efeito *meta* foi extensivamente estudado por Zimmermann e colaboradores, que realizaram estudos experimentais e teóricos de reações fotoquímicas com outros grupos funcionais, por exemplo, éteres e acetatos,^{91,92} relacionando a reatividade fotoquímica observada à estrutura eletrônica do estado excitado, e mostrando que tal efeito é de fato observado em uma variedade de reações fotoquímicas.^{89,90}

Outros exemplos de estudos realizados sobre a reatividade fotoquímica de ésteres de fosfato vêm do grupo de Givens, que reportaram, por exemplo, uma abordagem clássica de físico-química orgânica no estudo do mecanismo de fragmentação de ésteres de fosfato dietil benzílicos no estado excitado, Esquema 29.⁹³⁻⁹⁵ Ao irradiar os

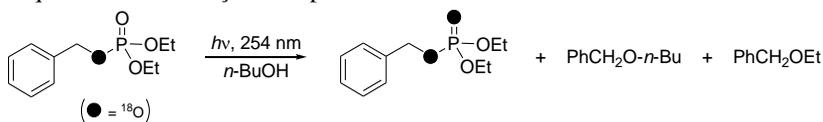
substratos de a-g em *t*-butanol com luz de 254 nm, foram obtidos como produtos majoritários os éteres *t*-butil-benzílicos substituídos, e a utilização de outros solventes, por exemplo, outros álcoois, acetonitrila úmida e benzeno, levou à formação dos produtos correspondentes, isto é, também se observou o comportamento do grupo fosfato como nucleófilo, havendo a sua substituição pelo solvente.

Esquema 29 – Fotólise de fosfatos dietil benzílicos.^{93,94}

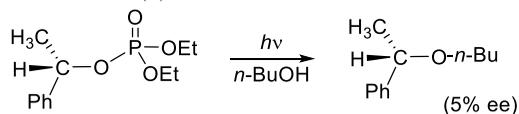


A natureza do processo fotoquímico primário foi avaliada através da irradiação do dietil benzil fosfato marcado isotopicamente com ¹⁸O em *n*-butanol até 77% de conversão do substrato, e posterior recuperação e análise isotópica do substrato remanescente, Esquema 30. A presença de ¹⁸O nos grupamentos benzilóxido e fosforílico em proporções equivalentes sugere a formação de um par iônico a partir do substrato eletronicamente excitado, observando-se a interconversão dos referidos oxigênios no ânion do dietil fosfato. Tal proposta é sustentada indiretamente ao se observar que o éter resultante da irradiação do *S*(-)-dietil 1-feniletil fosfato em *n*-butanol retém a configuração do centro quiral com 5% ee, Esquema 31.^{93,94}

Esquema 30 – Marcação isotópica na fotólise do dietil benzil fosfato.^{93,94}



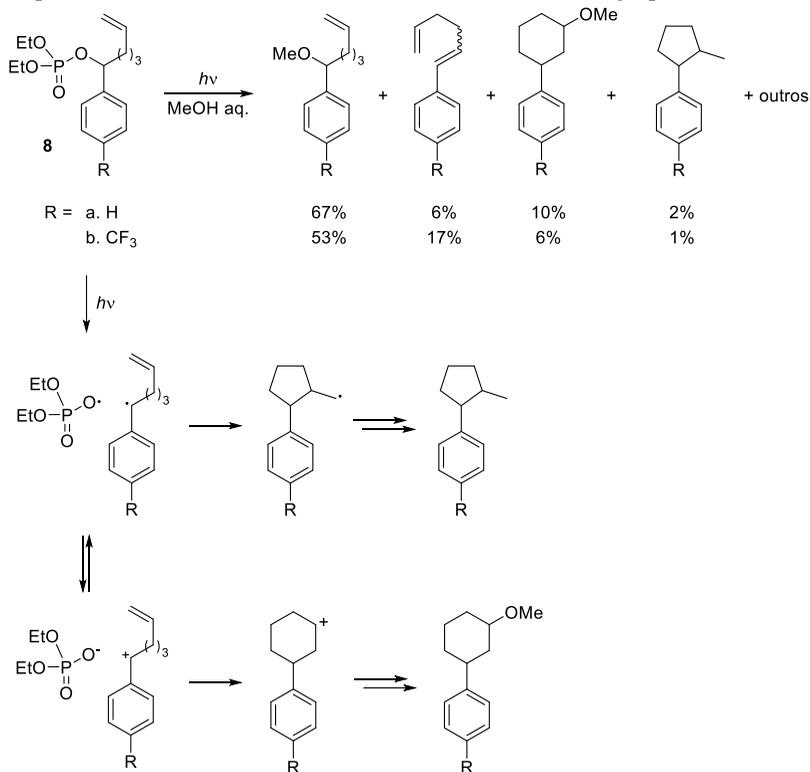
Esquema 31 – Fotólise do *S*(-)-dietil 1-feniletil fosfato.^{93,94}



O processo observado é atribuído à espécie excitada no estado singleto, já que não se observa supressão da reatividade do substrato (a) (Esquema 29) por trans-piperileno. Ainda, a sensitização dos substratos (a), (d) e (g) (Esquema 29) por acetona leva à formação dos mesmos produtos com eficiências quânticas substancialmente menores, indicando uma reatividade modesta do estado excitado tripleto.⁹⁴

Através de um tratamento matemático que considerou os diversos processos fotofísicos e fotoquímicos primários e secundários, conforme descrito na seção anterior, os autores obtiveram as constantes de velocidade de formação do par iônico para os substratos do Esquema 29, e o efeito do substituinte na reação foi investigado através de uma correlação de Hammett, utilizando as constantes de velocidade obtidas e o parâmetro σ para os substituintes no estado fundamental. À exceção do substrato (e) (*m*-Me), obteve-se uma relação linear com um valor de ρ de $-0,90$, indicativo de formação de um centro deficiente de elétrons no processo de fragmentação para formação do par iônico. Um valor de ρ similar ($-0,86$) é obtido ao relacionar os rendimentos de formação do produto de substituição aos parâmetros σ . No entanto, os autores ressaltam que outras interpretações mecanísticas são possíveis, por exemplo, a formação de um par radicalar através de uma quebra homolítica da ligação C–O seguida de uma transferência de elétrons.⁹⁴

Para testar essa hipótese, Givens e Singh⁹⁵ irradiaram os substratos 8 do Esquema 32 em metanol aquoso e avaliaram a formação dos produtos. A formação de um anel de cinco membros é esperada no caso de quebra homolítica da ligação C–O, ao passo que um anel de seis membros deve ser obtido no caso de formação de um carbocátion por um processo heterolítico. A distribuição dos produtos com X = H, conforme mostra o Esquema 32, é tal que o produto de substituição é majoritário e o produto com anel de seis membros é predominante em relação ao produto obtido por via radicalar, o que sugere que os substratos dietil benzílicos investigados são clivados heteroliticamente para formação de um par iônico constituído de um cátion benzílico e um ânion de fosfato, ou que haja uma transferência de elétrons muito rápida para a transformação de um par radicalar em um par iônico. No caso de X = CF₃, o produto majoritário também é o de substituição, porém a sua proporção diminui em comparação à X = H concomitantemente ao aumento da quantidade do produto de eliminação, indicando que o substituinte exerce um efeito desestabilizante no centro carbocatiônico, tornando-o mais reativo e, portanto, menos seletivo. A formação predominante do produto de eliminação é observada ao se irradiar o substrato com X = H em benzeno, o que é consistente com a baixa nucleofilicidade deste.⁹⁵

Esquema 32 – Fotólise de triésteres de fosfato contendo um grupo 5-hexenil.^{79,95}

Assim, os autores propõem que o estado singleto dos substratos dietil benzílicos em meio alcoólico são clivados mais provavelmente de forma heterolítica, e a reação de substituição ocorre através do ataque nucleofílico do solvente no carbocátion benzílico. A clivagem homolítica do estado excitado singlete deve ser minoritária ou, caso ocorra, uma rápida transferência de elétron conduz à formação de um par iônico. Evidência indireta de formação radicalar é observada pela formação dos produtos derivados do 1,2-difenil etano (Esquema 29), a qual não é influenciada significativamente pela natureza dos substituintes.^{94,95}

Além dos exemplos mostrados acima, muitos trabalhos foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas relacionados à fotoquímica de ésteres de fosfato, incluindo substratos somente com substituintes alquílicos e outros organofosforados em geral.^{80,80,96–104} No entanto, existem aspectos ainda não totalmente compreendidos no que se refere aos mecanismos de degradação fotoquímica de ésteres de fosfato e que

são de interesse para a comunidade acadêmica. Por exemplo, há uma quantidade maior de publicações envolvendo substratos possuindo substituintes benzílicos e carbonílicos em comparação à substituintes fenílicos. Além disso, embora as reações de substituição em ésteres de fosfato no estado fundamental tenham sido vastamente investigadas em sistemas microheterogêneos, por exemplo, micelares e supramoleculares, existem poucos estudos sobre os mecanismos de reações fotoquímicas de ésteres fosfóricos em tais meios.

Assim, observa-se que existem diversas possibilidades de investigação de reações fotoquímicas de ésteres de fosfato com potencial de aplicação em diversas áreas do conhecimento, e o entendimento mecanístico de tais processos é de grande valia, podendo auxiliar, por exemplo: (i) na obtenção de novos grupos protetores para biomoléculas contendo grupos fosfatos; (ii) na avaliação dos danos ambientais provocados pelos produtos de fotodegradação de resíduos de organofosforados empregados como retardadores de chama e agroquímicos; (iii) no desenvolvimento de sistemas para a degradação rápida e eficiente de estoques de organofosforados neurotóxicos; (iv) no entendimento de como sistemas organizados (micelas, agregados poliméricos, etc), podem ser utilizados para a modulação da reatividade fotoquímica de ésteres de fosfato, e (v) no entendimento da reatividade de ésteres de fosfato no estado fundamental, já que os substratos eletronicamente excitados podem ser por vezes considerados como substratos com grupos de saída com maior acidez/basicidade.

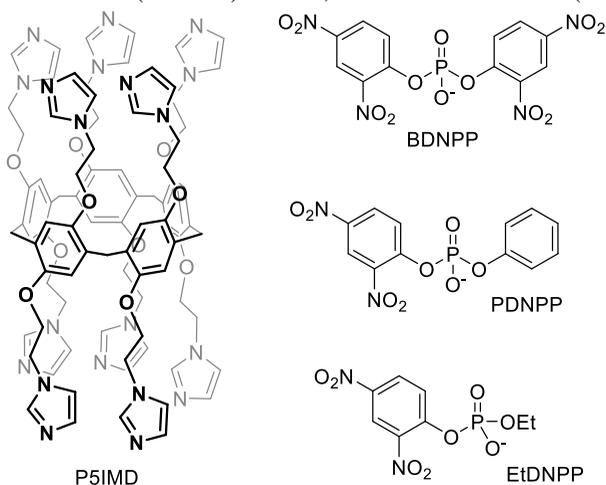
Nesse sentido, um dos objetivos dessa tese é contribuir para o entendimento detalhado dos mecanismos de degradação fotoquímica de fosfatos orgânicos em solução, o pode ser convenientemente realizado através do estudo da fotólise de substratos arílicos simples em meio aquoso, pois constituem sistemas com menor probabilidade de múltiplos processos paralelos, facilitando a compreensão global dos fenômenos envolvidos.

2 OBJETIVOS

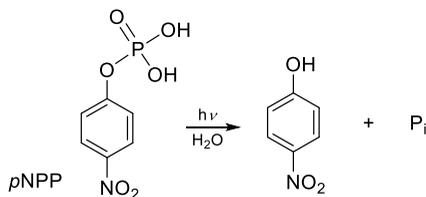
2.1 OBJETIVOS GERAIS

Esta tese de doutoramento está dividida em duas partes com conteúdos distintos, cujos objetivos gerais são:

- 1) Avaliar o efeito catalítico e a seletividade do pilarareno 1,4-bis(2-(1*H*-imidazol-1-il)etóxi) pilar[5]areno (P5IMD) na degradação dos diésteres de fosfato bis-2,4-dinitrofenil fosfato (BDNPP), fenil 2,4-dinitrofenil fosfato (PDNPP) e etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EtDNPP):



- 2) Estudar a degradação fotoquímica do monoéster *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) em meio aquoso utilizando a técnica de fotólise por pulso de laser:



2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentro de cada um dos temas acima, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1-) Degradação de diésteres de fosfato por P5IMD:

- Titular P5IMD por potenciometria e RMN ^1H a fim de avaliar a distribuição de espécies em função do pH;
- Acompanhar as cinéticas de degradação dos substratos em presença de P5IMD em diferentes condições experimentais por espectrofotometria de UV/Vis;
- Determinar constantes de velocidade e constantes de associação;
- Avaliar a formação de complexos hóspede-hospedeiros entre os diésteres de fosfato e P5IMD por RMN ^1H ;
- Realizar cálculos de mecânica molecular para avaliar os diferentes modos de complexação dos substratos ao P5IMD.

2-) Fotólise do monoéster *p*NPP:

- Caracterizar os produtos da fotólise da espécie dianiônica de *p*NPP por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV/Vis (HPLC-DAD);
- Acompanhar a cinética de degradação da espécie dianiônica de *p*NPP através de fotólise por pulso de laser em diferentes condições experimentais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Por motivos de clareza, os procedimentos experimentais empregados nesta tese encontram-se divididos abaixo conforme a divisão de temas estabelecida nos objetivos gerais.

3.1 DEGRADAÇÃO DE DIÉSTERES DE FOSFATO POR P5IMD

Materiais

O pilarareno P5IMD e os ésteres de fosfato BDNPP, PDNPP e EtDNPP foram disponibilizados no laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI), sendo que tais compostos foram sintetizados conforme descrito na literatura.^{29,105-107}

Titulação potenciométrica

Os valores de pK_a dos equilíbrios de dissociação ácida dos anéis imidazólios de P5IMD foram determinados por titulação potenciométrica. Titulou-se 20 mL de amostra contendo 0,01 mmol de P5IMD em H₂O:MeOH 65:35 (v/v), previamente acidificada com 10 equivalentes de HCl padrão 0,1078 M, utilizando-se base padronizada KOH 0,08366 M (também contendo 35% de MeOH). Utilizou-se um eletrodo HI 1330 da Hanna conectado a um pH-metro pH 200 da Hanna. Os dados de pH *vs.* Vol_{KOH} foram tratados utilizando-se o software gratuito CurTiPot.¹⁰⁸

Medidas cinéticas

As cinéticas foram acompanhadas pela formação do produto 2,4-dinitrofenol por espectrofotometria de UV/Vis utilizando-se um equipamento Cary50 da Varian. Tipicamente, uma reação era iniciada através da adição de uma alíquota de 10 μ L de uma solução estoque do substrato em acetonitrila (estocada em congelador) a 3 mL de solução contendo P5IMD em uma cubeta de quartzo, resultando na concentração desejada de substrato. Devido à solubilidade limitada de P5IMD em água pura, as reações foram realizadas em presença de 35% de MeOH. O pH das soluções foi mantido constante com 10 mM dos tampões: citrato (pH 3,00 – 6,50), acetato (pH 4,00 – 6,00), bis-tris (bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano; pH 6,9), fosfato (pH 7,4) e tris (tris(hidroximetil)metano; pH 8,8). A temperatura foi controlada através da utilização de um banho termostático acoplado ao espectrofotômetro. Dados de absorbância em função do tempo foram tratados segundo equações que descrevem cinéticas de pseudoprimeira ordem através do

software Origin (OriginLab Corporation). No caso das cinéticas com BDNPP, observou-se a liberação do segundo equivalente de 2,4-dinitrofenolato em um processo consecutivo significativamente mais lento que a reação inicial, de modo que o tratamento da primeira etapa foi realizado individualmente.

Experimentos de RMN ^1H

Espectros de RMN ^1H foram obtidos utilizando-se um espectrômetro da Bruker de 200 MHz. Foram utilizados solventes deuterados provenientes da Cambridge Isotope Laboratories ou Sigma-Aldrich.

Cálculos teóricos

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas pelo Prof. Dr. Rodrigo Montecinos, da Pontificia Universidad Católica de Chile. Utilizou-se o pacote do programa Gromacs, versão 4.6.5.¹⁰⁹ P5IMD, BDNPP, PDNPP e EtDNPP foram construídos com parâmetros a partir do campo de força GROMOS96 54A7¹¹⁰ e solvatados usando o modelo aquoso SPC (do inglês, *single point charge*).¹¹¹ Condições de fronteira periódicas foram aplicadas nas três dimensões e todas as simulações foram realizadas em condição isotérmica-isobárica (1 bar, 300 K).¹¹² Um filtro de 1,2 nm foi usado para interações de Van der Waals. Interações eletrostáticas a longa distância foram calculadas usando o algoritmo PME (do inglês, *particle-mesh Ewald*).¹¹³ Os sistemas foram equilibrados por 300 ps, com intervalos de tempo de 2 fs; trajetórias de 25 ns foram calculadas para cada sistema.

3.2 FOTÓLISE DO MONOÉSTER *p*NPP

Materiais

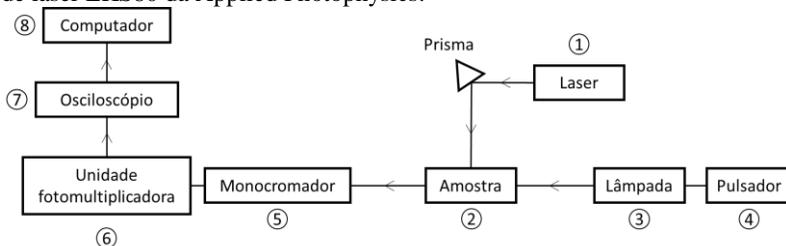
O monoéster *p*-nitrofenil fosfato foi obtido comercialmente como sal dissódico hexahidratado (Sigma-Aldrich).

Medidas de fotólise por pulso de laser

Utilizou-se um espectrômetro de fotólise por pulso de laser da Applied Photophysics, modelo LKS80, equipado com: (i) um laser pulsado classe 4 de Nd:YAG (Neodímio : Ítrio-Alumínio-Granada) da Quantel (modelo Brilliant), (ii) uma lâmpada pulsada de xenônio de 150 W para detecção por UV/Vis, e (iii) um osciloscópio digital DPO 3032 da Tektronix para aquisição e digitalização dos dados a partir do fotomultiplicador.

A Figura 22 ilustra de maneira simplificada o arranjo do espectrômetro de fotólise por pulso de laser utilizado. Na Figura 22, (1) representa a fonte do laser Nd:YAG, que pode gerar o seu comprimento de onda natural de 1064 nm, ou os harmônicos de 532, 355, 266 e 213 nm. O porta-amostra (2) possui capacidade para acomodar uma cubeta com quatro faces de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e acessório para acoplar banho termostático. O laser possui uma resolução de nanosegundos, de modo que um pulso de laser incidido na amostra é capaz de gerar rapidamente uma concentração significativa de espécies transientes (radicais, espécies excitadas, etc). A reatividade das espécies transientes geradas é monitorada por UV/Vis através de uma lâmpada pulsada de xenônio de 150 W (3 e 4), posicionada de modo perpendicular ao feixe do laser. Um monocromador seleciona os sinais da luz UV/Vis transmitidos pela amostra em um comprimento de onda específico (5), detectados, multiplicados e convertidos a valores de absorbância por uma unidade fotomultiplicadora (6), sendo os dados digitalizados por um osciloscópio (7) e transferidos para um computador (8).

Figura 22 – Representação simplificada do espectrômetro de fotólise por pulso de laser LKS80 da Applied Photophysics.



A fotólise do *p*NPP foi realizada em meio aquoso, em pH 7,0, tamponado com 10 mM de carbonato. Utilizou-se o harmônico gerador de comprimento de onda de 266 nm (tempo de pulso de 4 ns, e energia máxima de 65 mJ/pulso). Tipicamente, uma cinética transiente em um comprimento de onda específico foi registrada a partir de quatro disparos de laser de 266 nm sobre amostras aquosas de *p*NPP. A temperatura foi mantida constante utilizando-se um banho termostático acoplado ao porta-amostra.

Caracterização de produtos

Para caracterização dos produtos da reação, empregou-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de

diodos (HPLC-DAD), utilizando-se um sistema de cromatografia da Agilent Technologies (Série 1200) acoplado a um detector G1315D. Foram preparadas amostras aquosas de *p*NPP submetidas a números crescentes de pulsos de laser de 266 nm, sendo em seguida submetidas à análise cromatográfica para separação e identificação das espécies. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Synergi™ Polar-RP 80Å da Phenomenex (comprimento de 150 mm; diâmetro interno de 2,0 mm; tamanho de partícula de 4 µm), a 30°C, com um fluxo isocrático da fase móvel de 0,25 mL min⁻¹. Constituição da fase móvel: (A) 75% água e (B) 25% metanol/água (95:5, v/v).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

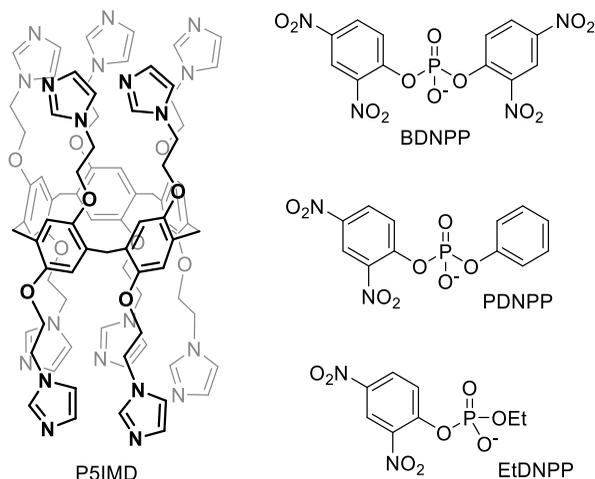
4.1 DEGRADAÇÃO DE DIÉSTERES DE FOSFATO POR P5IMD

Conforme apresentado anteriormente, o desenho de macrociclos para a construção de modelos miméticos e não-miméticos de catálise enzimática tem sido uma estratégia recorrente nas últimas décadas, visando a elucidação detalhada dos diferentes fatores que contribuem para os incríveis incrementos catalíticos observados em sistemas biológicos. Naturalmente, desde a primeira publicação da síntese de pilararenos, uma nova classe de macrociclos, foram iniciados estudos por diversos grupos de pesquisa visando a utilização destes como catalisadores para diversos tipos de reação, entre elas, a hidrólise de ésteres de fosfato.

Após a publicação de Liz e colaboradores⁷² que evidenciou o efeito catalítico ~10 vezes promovido por P5A na hidrólise da espécie dianiônica do monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato (Esquema 25), surgiu de maneira natural a idéia de funcionalizar pilararenos com grupos distintos de trimetil amônio e que podem atuar como nucleófilos, e ácidos ou bases gerais. Considerando o envolvimento do imidazol, na forma de resíduo da histidina, em diversas reações biológicas de transferência do grupo fosforila através de mecanismos de catálise ácida/básica geral e nucleofílica, Liz e colaboradores sintetizaram um pilarareno inédito, o 1,4-bis(2-(1*H*-imidazol-1-il)etóxi) pilar[5]areno (P5IMD)¹⁰⁷, Figura 23, em que o anel imidazol foi ancorado em um macrocilo de pilarareno através do nitrogênio.

Estudos iniciais de Liz e colaboradores¹⁰⁷ mostraram que P5IMD apresentou atividade catalítica na degradação do diéster de fosfato bis-2,4-dinitrofenil fosfato (BDNPP, Figura 23) em meio aquoso. De fato, o acompanhamento cinético da degradação de BDNPP por P5IMD através de RMN ³¹P (dados são mostrados no Anexo A) mostra a diminuição da intensidade do sinal de BDNPP (-13,4 ppm) concomitantemente ao aumento da intensidade de um sinal em -14,3 ppm, consistente com a formação de uma espécie de fosforoamidato. A intensidade deste, por sua vez, posteriormente diminui de maneira simultânea ao aparecimento do sinal em 0,89 ppm, indicativo da formação do diânion do 2,4-dinitrofenil fosfato.¹⁰⁷

Figura 23 – Estruturas do P5IMD e dos diésteres de fosfato estudados.

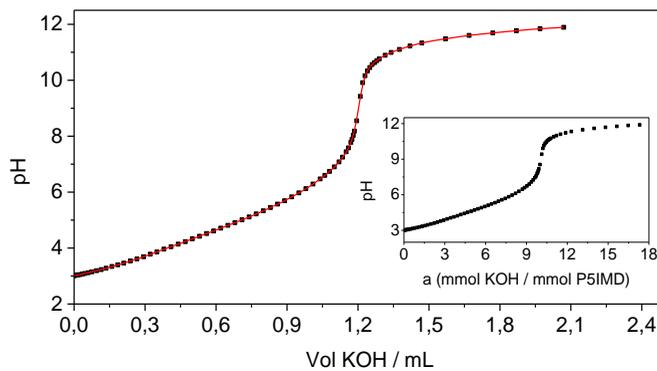


Nesse sentido, pretende-se aqui expandir os estudos da atividade catalítica de P5IMD na hidrólise dos diésteres de fosfato BDNPP, fenil 2,4-dinitrofenil fosfato (PDNPP) e etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EtDNPP), Figura 23. Considerando que o pilarareno possui grupos imidazóis que podem ser protonados, diferentes espécies catiônicas podem existir em função do pH, as quais podem atuar como receptores eficientes para os ânions dos diésteres de fosfato.

Para compreender a distribuição de espécies de P5IMD em função do pH, procedeu-se a uma titulação ácido-base em meio aquoso contendo 35% de MeOH (essa porcentagem de solvente foi utilizada para reproduzir as mesmas condições experimentais em que foram realizadas as cinéticas, conforme será discutido posteriormente). Assim, preparou-se uma solução 0,5 mM de P5IMD à qual foram adicionados 10 equivalentes de HCl padronizado, de modo que o pH inicial da solução foi de 3,01. Em seguida, titulou-se 0,01 mmol de P5IMD com KOH padronizado, e o gráfico de pH vs. volume adicionado de titulante, Figura 24, mostra que há uma região expressiva de tamponamento na faixa de pH de 3 a 7, indicando a presença de múltiplos equilíbrios de dissociação ácida dos grupos imidazólicos. No detalhe da Figura 24, o eixo x é representado pela razão “a” do número de mmol de base adicionada com relação ao número de mmol do titulado, que indica um ponto de inflexão (derivada primeira) para $a = 10,08$, indicando que foram consumidos 10 equivalentes de base para desprotonar os 10 anéis de imidazólio de P5IMD. É interessante observar que a acidez aparente de um imidazólio

aumenta consideravelmente, diminuindo em várias unidades os valores de pK_a , em comparação ao valor de 6,5–7,0 reportado para o imidazol protonado em meio aquoso, provavelmente devido às repulsões eletrostáticas entre várias cargas positivas vizinhas.

Figura 24 – Titulação potenciométrica de P5IMD em H₂O:MeOH 65:35 (v/v), a 25°C, utilizando KOH 0,08366 M. No detalhe, a quantidade adicionada de base é apresentada na forma da razão “a”, isto é, mmol de base adicionada por mmol de P5IMD.



A linha sólida na Figura 24 corresponde a um ajuste considerando cinco equilíbrios de dissociação ácida consecutivos e independentes, realizado através do software CurTiPot.¹⁰⁸ Tal aproximação foi realizada devido à simetria de P5IMD, de modo que os anéis superior e inferior foram considerados equivalentes e, portanto, para cada valor de pK_a no anel superior há um valor de pK_a coincidente no anel inferior. Assim, os equilíbrios de protonação de P5IMD podem ser simplificados conforme ilustra o Esquema 33, e foram obtidos os valores de $pK_a = 3,41 \pm 0,03$; $4,19 \pm 0,03$; $4,40 \pm 0,03$; $4,65 \pm 0,03$ e $5,91 \pm 0,02$. Considerando tais valores, gráficos de distribuição de espécies podem ser gerados, Figura 25, que mostram que PIMD encontra-se totalmente protonado em $pH < \sim 3$ e totalmente desprotonado em $pH > \sim 7,5$.

Esquema 33 – Representação simplificada dos equilíbrios de dissociação ácida dos anéis imidazólios de P5IMD.

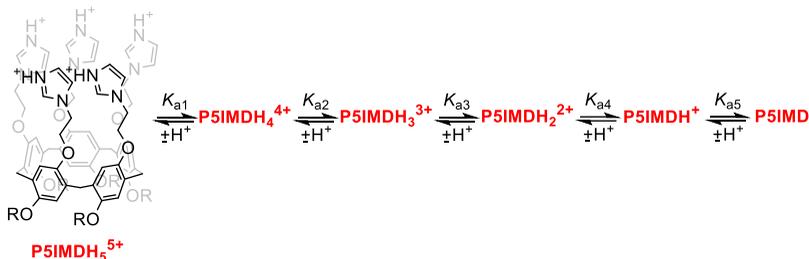
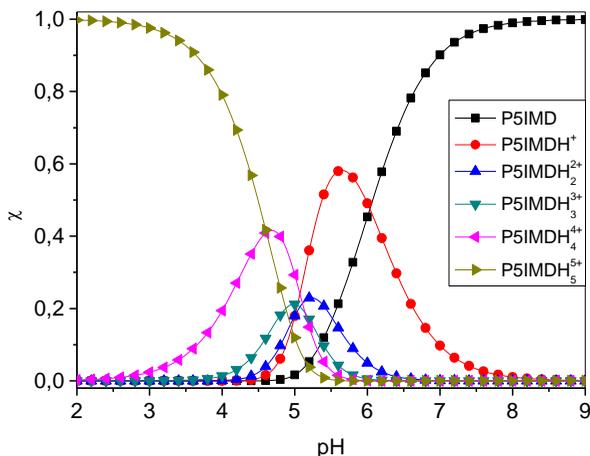
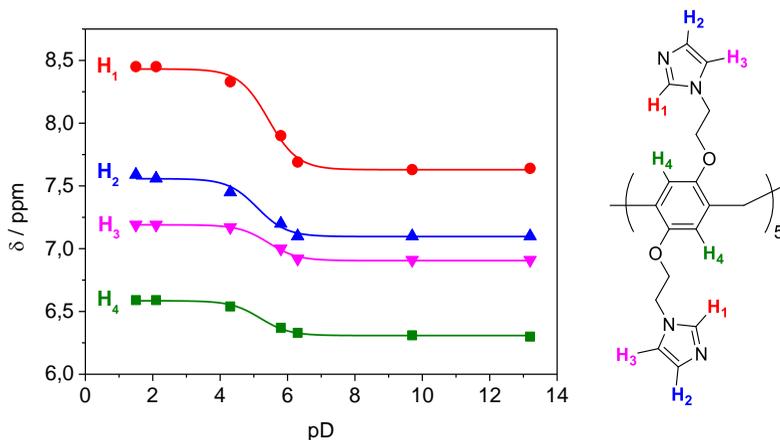


Figura 25 – Gráficos de distribuição de espécies de P5IMD em função do pH, considerando os cinco valores de pK_a determinados pela titulação potenciométrica.



Os equilíbrios de dissociação dos grupos imidazólios são também evidentes analisando-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios de P5IMD por RMN ¹H em função do pD. Conforme mostra a Figura 26, há um deslocamento para campo alto de H₁ – H₄ em uma faixa de pD de 3 a 7, coincidente com a faixa de tamponamento da titulação ácido/base da Figura 24, com valores de deslocamento constantes em pD < 3 e pD > 7.

Figura 26 – Deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos de P5IMD (conforme numeração na figura) em função do pD, em D₂O:CD₃OD 65:35 (v/v), a 25°C.

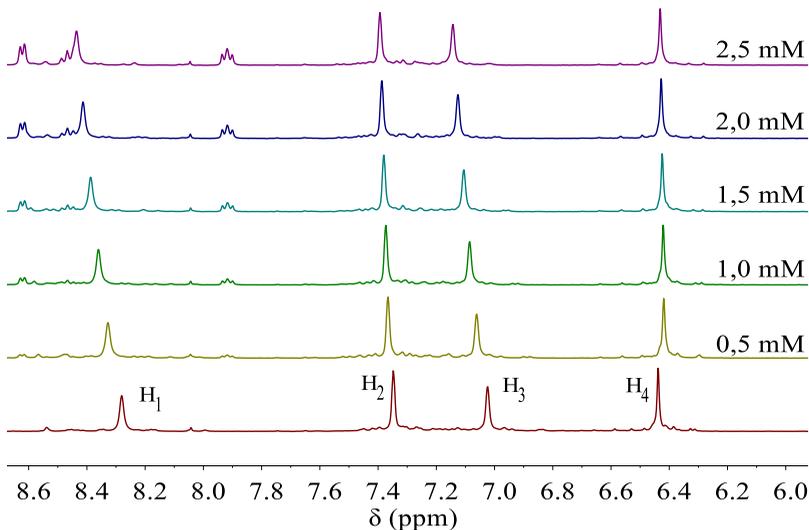


Considerando que as cargas positivas de P5IMD devem exercer efeito para complexação com a espécie aniônica de BDNPP (predominante em $\text{pH} > 0$; $\text{p}K_a^{\text{HA}} \sim -1,5$)¹⁰⁵, foram obtidos espectros de RMN ¹H de P5IMD na presença de diferentes concentrações de BDNPP em pD 5,5, quando o P5IMD possui frações molares significativas de espécies positivamente carregadas. A Figura 27 mostra um deslocamento para campo baixo dos sinais de H₁, H₂ e H₃ (hidrogênios do anel imidazol), indicando a inclusão do hospede na cavidade do pilarareno. Nota-se que o deslocamento de H₄ não sofre mudança significativa com a adição de BDNPP, sugerindo uma proximidade maior do substrato dos anéis imidazóis no complexo hospede-hospedeiro, em detrimento dos anéis benzênicos centrais de P5IMD.

De maneira similar, a inclusão de BDNPP em P5IMD pode ser avaliada qualitativamente através dos deslocamentos dos hidrogênios do substrato no mesmo conjunto de espectros da Figura 27. A Figura 1 do Apêndice A mostra uma ampliação da faixa de ~8,0 a 8,7 ppm, e ainda que os sinais dos hidrogênios de BDNPP sejam pouco intensos, é possível observar um deslocamento para campo baixo do hidrogênio posicionado entre os grupos nitro, indicando que a inclusão de BDNPP à cavidade de P5IMD deve ocorrer através de um dos grupos aromáticos, de maneira que o segundo substituinte arílico deve estar voltado para fora da cavidade. Na Figura 27, nota-se ainda que não há alteração de deslocamento dos sinais em 8,62, 8,47 e 7,92 ppm, referentes ao contra-

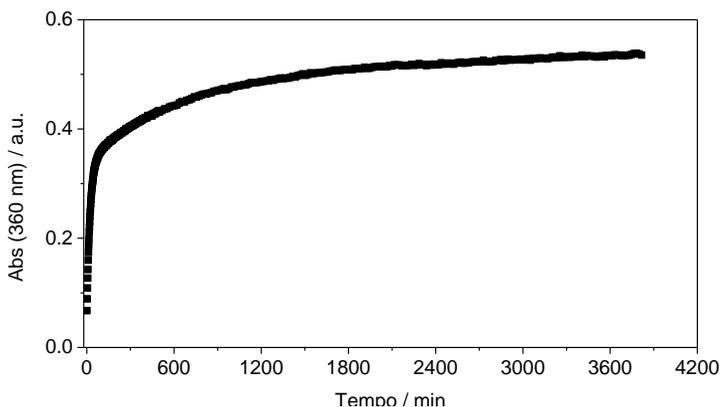
ion piridínio do diéster, indicando que não há interferência deste na complexação do diéster com o pilarareno.

Figura 27 – Espectros de RMN ^1H (200 MHz) de P5IMD 1,5 mM em diferentes concentrações de BDNPP, conforme indicado na figura, em $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$ 65:35 (v/v), pD 5,5, a 25°C. O espectro inferior foi obtido na ausência de BDNPP. A numeração dos prótons $\text{H}_1 - \text{H}_4$ é a mesma da Figura 26.



Assim, uma vez que se conhece a distribuição de espécies de P5IMD em função do pH e tem-se comprovada a inclusão de BDNPP na cavidade do pilarareno, foram realizados estudos cinéticos detalhados da reação de BDNPP com P5IMD. Por questões de solubilidade, as reações foram realizadas em meio aquoso contendo 35% de MeOH, sendo as cinéticas acompanhadas por UV/Vis pela formação do produto 2,4-dinitrofenolato. A Figura 28 apresenta um perfil típico de absorvância em função do tempo, em que se observam duas etapas consecutivas de liberação de 2,4-dinitrofenolato e que ocorrem em escalas de tempo bastante distintas, o que permite o tratamento quantitativo da primeira etapa de maneira independente.

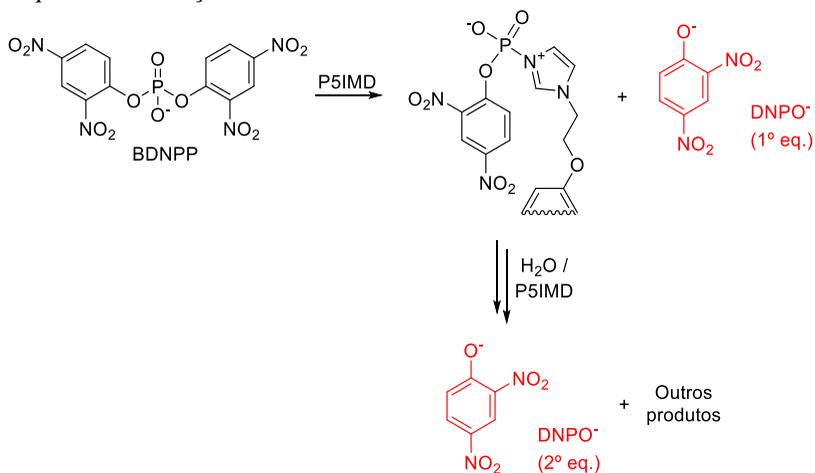
Figura 28 – Perfil de absorvância (360 nm) em função do tempo na reação de BDNPP com P5IMD. Condições: P5IMD 5,41 mM, BDNPP $2,19 \times 10^{-5}$ M, pH 7,4, em H₂O:MeOH 65:35 (v/v), a 25°C.



Naturalmente, a primeira etapa corresponde à reação de BDNPP com um anel imidazol do receptor, levando à liberação do primeiro equivalente de 2,4-dinitrofenolato. A primeira etapa observada na Figura 28 é aproximadamente 3000 vezes mais rápida que a hidrólise espontânea do substrato ($k_0 = 1,9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, a 25°C)³¹, o que é um forte indicativo de uma reação de natureza nucleofílica. De fato, tal incremento está na faixa reportada para efeitos catalíticos promovidos por reagentes nucleofílicos em reações de hidrólise de ésteres, e é muito maior que o limite de ~80 vezes assumido para efeitos promovidos por catálise básica-geral.¹¹⁴

Assim, um caminho reacional pode ser inicialmente proposto para a reação de BDNPP com P5IMD, como mostra o Esquema 34, em que o ataque nucleofílico do imidazol no fósforo de BDNPP leva à formação de um intermediário fosfoamidato, observado por Liz e colaboradores por RMN ³¹P (Anexo A), e cuja hidrólise deve ser responsável pela formação do produto 2,4-dinitrofenil fosfato (DNPP). Sequencialmente, a reação de hidrólise do DNPP deve levar à liberação do 2º equivalente de 2,4-dinitrofenolato. A decomposição de DNPP pode também ser catalisada por P5IMD, mas o efeito catalítico sobre essa reação deve ser consideravelmente menor, e provavelmente por um mecanismo de catálise básica geral. A investigação quantitativa da formação do segundo equivalente de 2,4-dinitrofenolato está fora do escopo deste trabalho.

Esquema 34 – Reação de BDNPP com P5IMD.

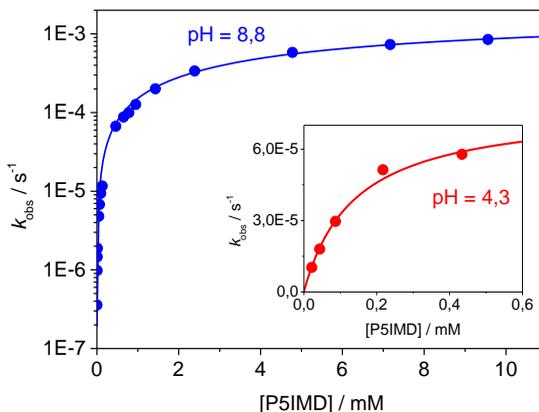


Conforme mencionado anteriormente, o BDNPP encontra-se exclusivamente como monoânion em toda faixa de pH em meio aquoso, o que também é esperado quando esteja incluído na cavidade de P5IMD, já que é o pK_a aparente do hospedeiro deve ser menor devido à presença das cargas positivas do hospedeiro. Assim, avaliou-se o efeito da concentração de P5IMD na reação com o ânion do BDNPP em diferentes pHs, de maneira a mensurar tanto os efeitos de atração eletrostática das diferentes espécies de P5IMD para inclusão do ânion de BDNPP, quanto a atividade catalítica do hospedeiro. A Figura 29 apresenta dois perfis de concentração de P5IMD, em pHs 4,3 e 8,8, e observa-se em ambos os casos típicos perfis de saturação, em que as constantes de velocidade observadas aumentam até atingir um patamar, indicando, portanto, a ligação de BDNPP a P5IMD.

No entanto, há dois aspectos distintos nos perfis da Figura 29: (i) as concentrações de P5IMD necessárias para atingir a saturação são significativamente diferentes: $[P5IMD] > 0,5 \text{ mM}$ e 3 mM para pHs 4,3 e 8,8, respectivamente, o que indica uma constante de ligação do BDNPP ao P5IMD maior em pHs mais ácidos, quando o hospedeiro encontra-se positivamente carregado, e (ii) os valores de k_{obs} quando os perfis atingem a saturação diferem em quase duas ordens de magnitude, sendo maior em pH 8,8, o que é consistente com o fato de que o número de imidazóis neutros disponíveis para o ataque nucleofílico no fósforo é maior com o aumento do pH. Portanto, observam-se efeitos compensativos, ou seja, a ligação de BDNPP a P5IMD é favorecida quando os grupos imidazóis

encontram-se protonados, porém a atividade catalítica é maior quando os imidazóis de P5IMD encontram-se neutros. Assim, dependendo do pH, os valores de k_{obs} no patamar podem alcançar incrementos de até 10^4 vezes, em comparação com a hidrólise espontânea do substrato.

Figura 29 – Perfis de concentração de P5IMD na reação com BDNPP ($2,19 \times 10^{-5}$ M), em H₂O:MeOH 65:35 (v/v), a 25 °C, em pH = 8,8 e 4,3. As linhas sólidas representam ajustes através da equação 1.



O efeito da concentração de P5IMD na reação com BDNPP foi avaliado em outros três valores de pH (5,6; 6,9 e 7,4) e perfis de saturação também foram observados, com comportamentos intermediários àqueles observados em pH 4,3 e 8,8 (gráficos de k_{obs} vs. [P5IMD] são apresentados na Figura 2 do Apêndice A).

Os dados cinéticos foram ajustados iterativamente através da equação 1, que corresponde a um modelo típico de ligação 1:1, em que k_0 representa a constante de hidrólise espontânea do substrato livre, k_p , a constante de velocidade de primeira ordem da reação de BDNPP com P5IMD no complexo hóspede:hospedeiro, e K_{ass} , a constante de associação de BDNPP a P5IMD. Os parâmetros obtidos são apresentados na Tabela 3.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0 + k_p K_{\text{ass}} [\text{P5IMD}]}{1 + K_{\text{ass}} [\text{P5IMD}]} \quad (1)$$

Tabela 3 – Constantes de velocidade e de equilíbrio para a reação de BDNPP com P5IMD, em H₂O:MeOH 65:35 (v/v), a 25°C.^a

pH	$k_p K_{\text{ass}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$K_{\text{ass}} / \text{M}^{-1}$	k_p / s^{-1}
8,8	0,164 ± 0,005	86 ± 7	1,91 x 10 ⁻³
7,4	0,169 ± 0,006	94 ± 8	1,80 x 10 ⁻³
6,9	0,131 ± 0,002		
5,6	0,13 ± 0,01		
4,3	0,558 ± 0,001	7170 ± 26	7,78 x 10 ⁻⁵

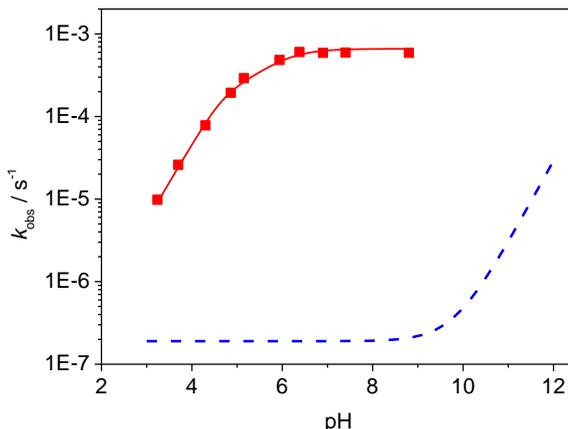
^a $k_0 = 1,9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.³¹

Os dados da Tabela 3 confirmam que as constantes de ligação de BDNPP a P5IMD de fato aumentam com a acidez do meio e que a atividade catalítica é menor em pHs menores, com incrementos catalíticos variando entre 400 e 10⁴ vezes entre pH 4,3 e 8,8. A magnitude da constante de ligação em pH 4,3 é consistente com àquela reportada previamente para o diânion do monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato ao P5A.

A avaliação do efeito do pH na reação de P5IMD com BDNPP quando o hóspede se encontra majoritariamente ligado ao hospedeiro é consistente com as conclusões obtidas a partir dos perfis de concentração. A Figura 30 apresenta valores de k_{obs} obtidos para a reação em função do pH, comparado ao perfil de hidrólise espontânea do BDNPP, onde se observa um aumento da reatividade com o aumento do pH até atingir um patamar em pH > 6. O aumento da reatividade é consistente com a faixa de tamponamento observada na titulação potenciométrica e, de fato, o perfil pode ser ajustado utilizando os cinco valores de pK_a de P5IMD determinados anteriormente. É interessante notar que a reatividade da espécie neutra é 2,5; 7,3; 9,4 e 50 vezes maior que as espécies contendo 1, 2, 3 e 4 anéis imidazóis protonados. Maiores detalhes sobre o ajuste são apresentados na Tabela 1 do Apêndice A.

Baseando-se nos resultados cinéticos, de caracterização dos produtos, e na reação de BDNPP com imidazol livre em água,³¹ é possível propor um mecanismo global para a reação de BDNPP com P5IMD, conforme mostra o Esquema 35. Assim, a incorporação de BDNPP na cavidade de P5IMD leva à formação de um complexo hóspede:hospedeiro no qual ocorre o ataque nucleofílico de um dos anéis imidazol no fósforo do substrato, liberando um dos substituintes 2,4-dinitrofenolato e levando à formação do fosforoamidato P5IMD-1.

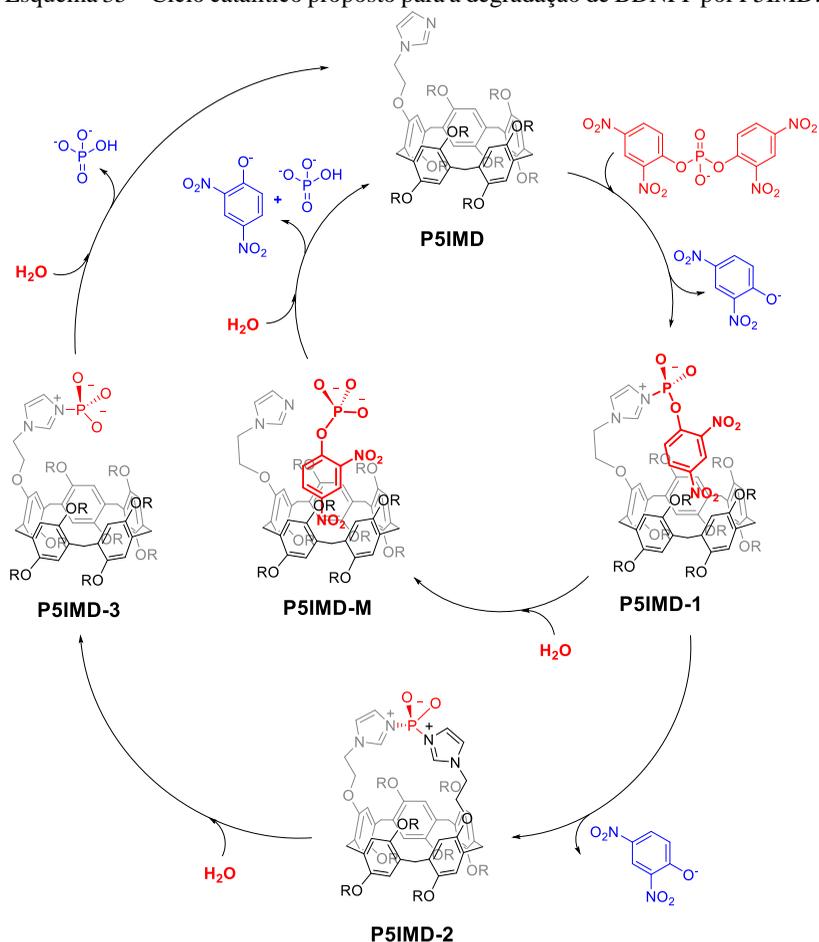
Figura 30 – Valores de k_{obs} em função do pH na reação de BDNPP ($2,19 \times 10^{-5}$ M) com P5IMD 5 mM em H₂O:MeOH 65:35 (v/v), a 25 °C. A linha tracejada corresponde ao perfil de hidrólise espontânea de BDNPP, obtida a partir de dados da literatura.¹⁰⁵



No Esquema 35, considerando que o substituinte 2,4-dinitrofenolato em P5IMD-1 é também um bom grupo de saída, em comparação a um *N*-alquilimidazólio, o ataque nucleofílico de um segundo imidazol de P5IMD sobre o átomo de fósforo pode levar à liberação do segundo equivalente de 2,4-dinitrofenolato e à formação do intermediário P5IMD-2. Nesse caso, em duas etapas sequenciais de hidrólise a partir de P5IMD-2, passando por P5IMD-3, deve ocorrer a formação de fosfato inorgânico e regeneração do catalisador nucleofílico. No entanto, ressalta-se que experimentos detalhados que avaliem a formação e reatividade de P5IMD-2 e P5IMD-3 não foram realizados.

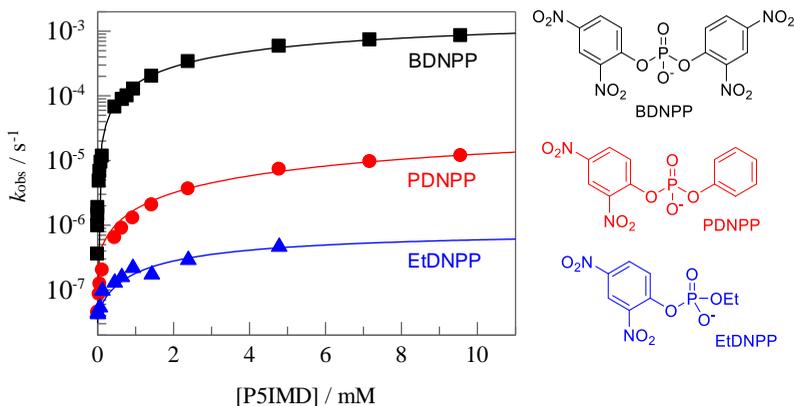
Ainda, conforme discutido anteriormente e mostrado no Esquema 35, considera-se também o caminho em que a hidrólise de P5IMD-1 leva à formação do monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato. Nesse caso, espera-se a formação do complexo de inclusão P5IMD-M, já que em $\text{pH} > 4$ a espécie dianiônica do monoéster deve prevalecer e a constante de ligação a P5IMD contendo anéis imidazólios deve ser elevada. A hidrólise do monoéster, por sua vez, deve ser responsável pela formação do segundo equivalente de 2,4-dinitrofenolato e de fosfato inorgânico, e a reação deve proceder por um mecanismo de catálise básica-geral promovida por um imidazol neutro, já que em geral espécies aniônicas de monoésteres de fosfato são pouco reativas frente a nucleófilos.²

Esquema 35 – Ciclo catalítico proposto para a degradação de BDNPP por P5IMD.



A reatividade de P5IMD também foi avaliada frente a outros dois diésteres de fosfato, o fenil 2,4-dinitrofenil fosfato (PDNPP) e o etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EtDNPP), Figura 31, o que permitiu investigar efeitos de seletividade de P5IMD para diferentes diésteres de fosfato. Do mesmo modo que para o BDNPP, as cinéticas foram acompanhadas espectrofotometricamente pela formação do 2,4-dinitrofenolato em meio aquoso com 35% de MeOH, e foram obtidos perfis de concentração de P5IMD em pH 8,8, que são mostrados na Figura 31 juntamente com os dados de BDNPP no mesmo pH, para fins comparativos.

Figura 31 – Perfis de concentração de P5IMD nas reações com os diésteres de fosfato BDNPP, PDNPP e EtDNPP, em H₂O:MeOH 65:35 (v/v), a 25 °C e pH 8,8.



Na Figura 31, são observados para os três diésteres perfis de saturação, porém com valores de k_{obs} no patamar que diferem em várias ordens de magnitude, com incrementos na proporção de 1 : 7 : 520 para EtDNPP : PDNPP : BDNPP. Tendo em vista que as constantes de velocidade de hidrólise dos três substratos na ausência de catalisador diferem em no máximo 5 vezes, tal resultado mostra que P5IMD é um catalisador seletivo para hidrólise de ânions de diésteres de fosfato, o que pode ser racionalizado através da formação competitiva de complexos de inclusão não-produtivos, conforme será discutido em seguida. Os dados para EtDNPP e PDNPP também foram ajustados com a equação 1, e os resultados para os três diésteres são apresentados em conjunto na Tabela 4, onde se observa que as constantes de ligação dos três substratos ao P5IMD neutro são de mesma ordem de magnitude, mas há uma variação grande nos valores de k_p .

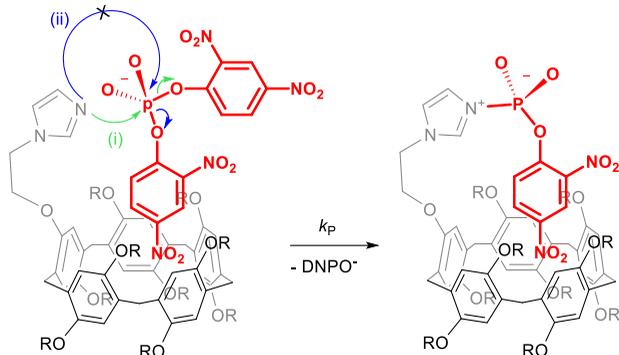
Tabela 4 – Constantes de velocidade e de equilíbrio para as reações dos diésteres de fosfato BDNPP, PDNPP e EtDNPP com P5IMD, em H₂O:MeOH 65:35 (v/v), a 25°C.

Éster	pH	k_0 / s^{-1}	$k_p K_{\text{ass}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$K_{\text{ass}} / \text{M}^{-1}$	k_p / s^{-1}
BDNPP	8,8	$1,9 \times 10^{-7}$	$0,164 \pm 0,005$	86 ± 7	$1,91 \times 10^{-3}$
PDNPP	8,8	$3,58 \times 10^{-8}$	$(167 \pm 7) \times 10^{-1}$	35 ± 7	$4,77 \times 10^{-5}$
EtDNPP	8,8	$3,1 \times 10^{-8}$	$(27 \pm 3) \times 10^{-3}$	56 ± 21	$4,82 \times 10^{-6}$

Conforme revisado na introdução, é proposto na literatura que as reações de substituição nucleofílica em ânions de diésteres de fosfato simples ocorrem por um mecanismo do tipo $S_N2(P)$ concertado, passando por um estado de transição bipirâmide trigonal em que o nucleófilo e o grupo de saída encontram-se em posições apicais, e o grupo espectador e os átomos de oxigênio, em posições equatoriais. Em diésteres assimétricos, o grupo espectador é aquele que possui menor habilidade como grupo de saída, e a variação da basicidade do grupo espectador exerce efeito mínimo sobre as constantes de hidrólise para diésteres com bom grupo de saída como o 2,4-dinitrofenolato. Assim, é esperado que as constantes de velocidade das reações de um dado nucleófilo com diésteres de fosfato com mesmo grupo de saída, mas diferentes grupos espectadores, não apresentem variações significativas. De fato, as constantes de segunda ordem reportadas para as reações do imidazol neutro com BDNPP e EtDNPP em meio aquoso diferem somente em cerca de 7 vezes.³¹ No entanto, observa-se que os valores de k_P da Tabela 4 diferem em mais de uma ordem de magnitude, indicando que a seletividade de P5IMD frente aos diferentes diésteres tem maior relação quanto às diferentes conformações dos complexos supramoleculares em detrimento de efeitos estereoeletrônicos no mecanismo reacional, conforme discutido a seguir.

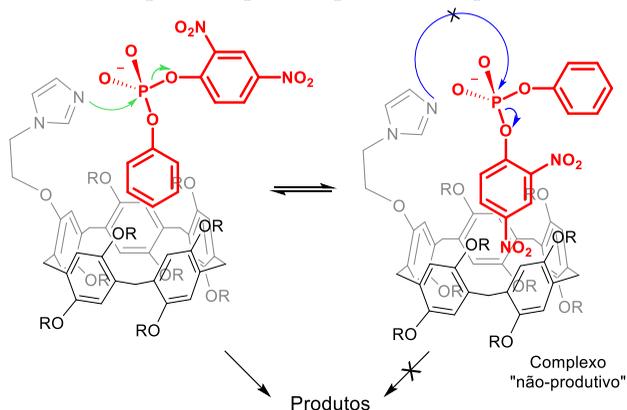
O substrato BDNPP possui dois substituintes 2,4-dinitrofenil equivalentes, de maneira que os complexos hóspede:hospedeiro resultantes da incorporação do substrato por qualquer um dos dois substituintes são equivalentes. No âmbito de um mecanismo do tipo $S_N2(P)$ concertado, e considerando que os átomos de nitrogênio dos anéis imidazol de P5IMD estão voltados para o solvente, a reação de um dado anel imidazol do pilarareno com BDNPP deve ocorrer através da seta (i) no Esquema 36, já que nessa configuração o nucleófilo e o grupo de saída encontram-se alinhados em posições opostas, diferentemente do que mostra a seta (ii), um caminho pelo qual a formação de ligação N-P não é permitida. Assim, observa-se que o grupo de saída é aquele voltado para o exterior da cavidade do pilarareno, permanecendo o grupo espectador encapsulado.

Esquema 36 – Reação entre um anel imidazol de P5IMD e BDNPP no complexo hôte:hospedeiro. DNPO⁻ representa 2,4-dinitrofenolato.



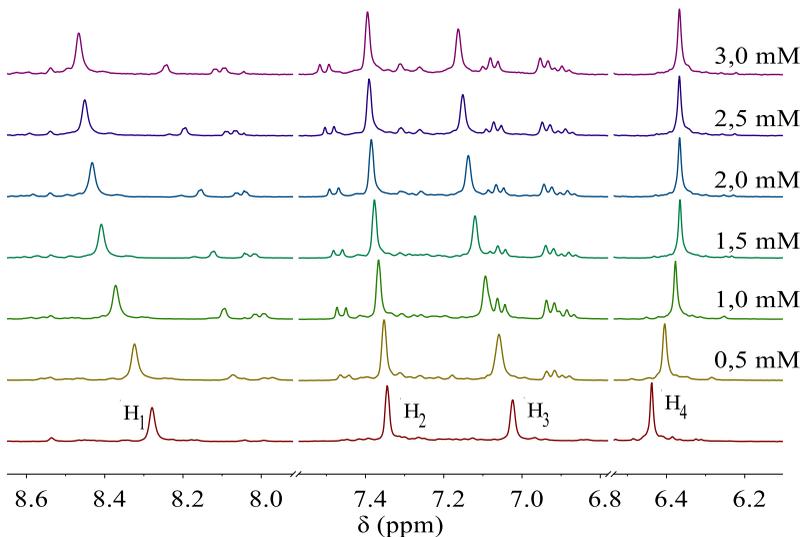
Para cada um dos diésteres PDNPP e EtDNPP, os substituintes não são equivalentes, de maneira que há para cada substrato duas formas de associação ao pilarareno: através da inclusão do grupo de saída ou do grupo espectador na cavidade do macrociclo, conforme exemplificado no Esquema 37 com o substrato PDNPP. A consequência é a formação competitiva de complexos “não-produtivos”, isto é, aqueles em que o grupo de saída se encontra encapsulado na cavidade de P5IMD e o grupo espectador está voltado para o exterior. Como mostra o Esquema 37, a formação de ligação N–P não é favorecida nos complexos não-produtivos, o que explica os menores valores de k_p observados para EtDNPP e PDNPP em relação àquele obtido para BDNPP.

Esquema 37 – A reação entre um anel imidazol de P5IMD e o substrato PDNPP ocorre somente no complexo hôte:hospedeiro da esquerda.



Dados de RMN ^1H obtidos para o substrato PDNPP confirmam a sua inclusão em P5IMD através dos dois substituintes arílicos. A Figura 32 apresenta um conjunto de espectros obtidos com P5IMD 1,5 mM e diferentes concentrações de PDNPP. A ligação de PDNPP a P5IMD é evidenciada pelo deslocamento para campo baixo dos hidrogênios do anel imidazol, particularmente o NCHN em $\sim 8,4$ ppm, e pelo deslocamento para campo alto do hidrogênio benzênico de P5IMD ($\sim 6,4$ ppm). Com relação aos sinais do substrato, destaca-se que há um deslocamento para campo baixo dos hidrogênios do substituinte 2,4-dinitrofenil entre $\sim 7,4 - 8,2$ ppm, bem como uma alteração dos deslocamentos dos hidrogênios do substituinte fenil entre $\sim 6,9 - 7,1$ ppm, indicando a inclusão competitiva do substrato na cavidade de P5IMD através dos dois substituintes.

Figura 32 – Espectros de RMN ^1H (200 MHz) de P5IMD 1,5 mM em diferentes concentrações de PDNPP, conforme indicado na figura, em $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$ 65:35 (v/v), pD 5,5, a 25°C . O espectro inferior foi obtido na ausência de PDNPP. A designação dos prótons de P5IMD é a mesma da Figura 26.



Cálculos de dinâmica molecular foram realizados a fim de avaliar a formação de complexos hóspede:hospedeiro 1:1 entre os diésteres de fosfato e P5IMD e, em particular no caso dos diésteres assimétricos, para detalhar a competição na ligação do substrato através da inserção do grupo de saída ou do grupo espectador na cavidade do pilarareno. Portanto, foram realizadas cinco simulações, uma para o BDNPP, e duas

para cada um dos diésteres assimétricos. As simulações foram realizadas com P5IMDH₆⁶⁺, espécie esperada para pH ~ 4, em sistemas contendo 2028 moléculas de água (SPC), e seis Br⁻ e um Na⁺ para manter a eletroneutralidade. A estabilidade dos complexos de inclusão foi avaliada calculando-se a distância entre o centro da cavidade de P5IMDH₆⁶⁺ e o carbono na posição 4 dos substituintes arílicos (2,4-dinitrofenil e fenil) ou o centro de massa da metila no caso do substituinte etil do EtDNPP. A Figura 33 apresenta imagens dos complexos de inclusão após 15 ns de simulação, que correspondem a estruturas esperadas em condições experimentais em que [P5IMD] > [hóspede]. Em todos os casos, constatou-se que há uma interação eletrostática dos grupos imidazólios de P5IMDH₆⁶⁺ com o grupo fosfato dos substratos, e também com o grupo nitro na posição 2 do substituinte 2,4-dinitrofenil, sendo que ambas as interações devem contribuir para a formação e estabilização dos complexos.

Foram realizados ainda cálculos de Potencial de Força Média (PMF) para cada um dos complexos da Figura 33, a fim de determinar valores de energia livre de Gibbs. Nesse procedimento, os valores de PMF foram obtidos para cada sistema variando-se as distâncias entre o macrociclo e o hóspede partindo-se da estrutura do complexo de inclusão em equilíbrio até que o hóspede e o hospedeiro se encontrem suficientemente afastados e não apresentem interações ($\Delta G = 0$). Foram simulados complexos 1:1, em sistemas contendo P5IMDH₆⁶⁺, seis Br⁻ e um Na⁺, e 4520 moléculas de água. Foram calculados valores de PMF a cada 0,1 nm de distância entre o hóspede e o hospedeiro (foram calculados 10 ns para cada estrutura). A Figura 34 apresenta algumas imagens instantâneas do sistema contendo P5IMDH₆⁶⁺ e BDNPP em diferentes distâncias.

A Figura 35 apresenta os valores de ΔG computados para cada sistema em função da distância de interação. Observa-se que os valores de ΔG são negativos para os cinco complexos no ponto zero, indicando uma interação favorável entre hóspede e hospedeiro, o que também é evidente quando se analisa a queda abrupta nos valores de ΔG quando P5IMDH₆⁶⁺ e cada um dos substratos são aproximados a menos de 0,5 nm. A natureza da interação é essencialmente eletrostática, haja vista que os grupos fosfato tendem a estar voltados para os anéis imidazólios positivamente carregados e para o solvente ao final das simulações.

Figura 33 – Imagens dos complexos hóspede:hospedeiro 1:1 entre os diésteres de fosfato e $P5IMDH_6^{6+}$. Em (A), inserção de BDNPP em $P5IMDH_6^{6+}$; em (B) e (C), inserção de PDNPP em $P5IMDH_6^{6+}$ através dos fragmentos 2,4-dinitrofenil e fenil, respectivamente e em (D), inserção de EtDNPP em $P5IMDH_6^{6+}$ através dos fragmentos 2,4-dinitrofenil e etil, respectivamente. Átomos são representados pelas cores: carbono em azul claro, hidrogênio em branco, nitrogênio em azul escuro, fósforo em marrom, e oxigênio em vermelho. Para simplificação, os fragmentos inseridos na cavidade de $P5IMDH_6^{6+}$ são representados em verde, e as moléculas de água e os íons Br^- e Na^+ foram omitidos.

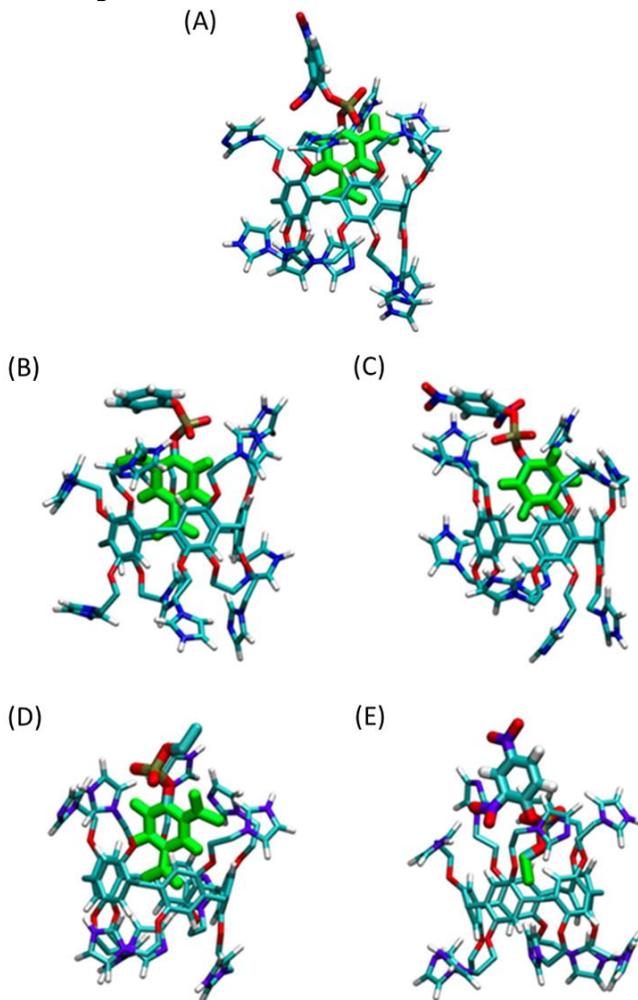


Figura 34 – Imagens instantâneas de $P5IMDH_6^{6+}$ e BDNPP (mostrado em verde) em função da distância de interação. Para simplificação, as moléculas de água e os íons foram omitidos. A legenda das cores é a mesma empregada na Figura 33.

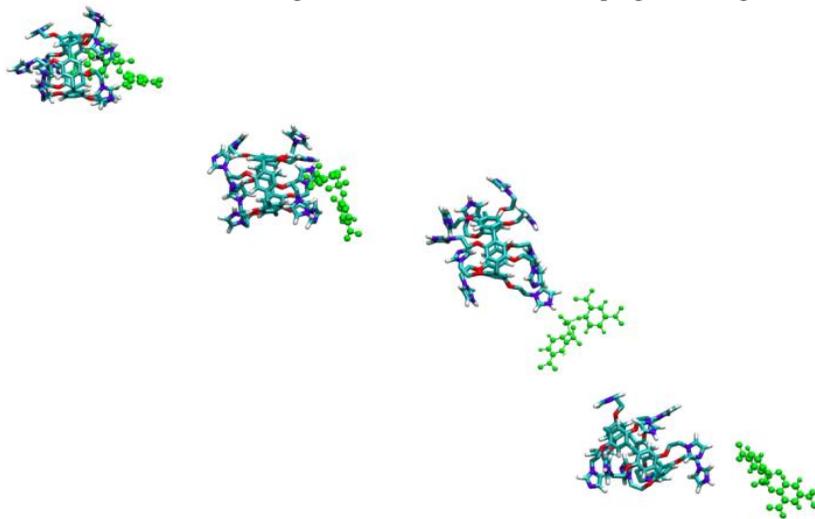
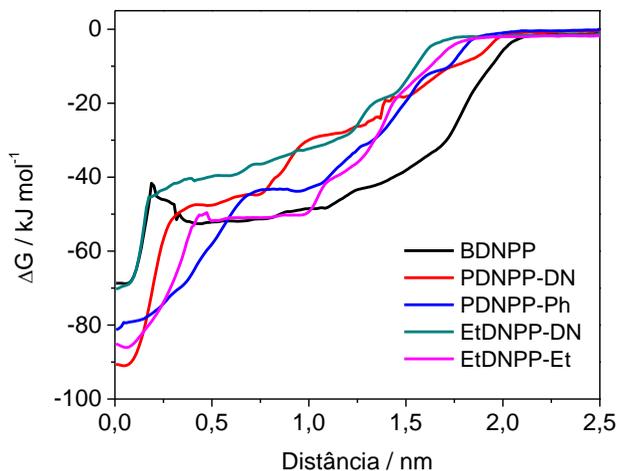


Figura 35 – Valores de ΔG em função da distância de interação entre o centro da cavidade de $P5IMDH_6^{6+}$ e dos ânions dos diésteres de fosfato BDNPP, EtDNPP e PDNPP, na formação dos diferentes complexos hóstede-hospedeiro da Figura 33. Para computar as distâncias, foram tomados como referência nos substratos: o centro de massa do grupo nitro no fragmento 2,4-dinitrofenil (DN), o carbono em posição 4 no fragmento fenil (Ph), e o centro de massa da metila no fragmento etil (Et).



Na Figura 35, considerando os dois complexos possíveis entre P5IMDH₆⁶⁺ e PDNPP, observa-se que a inclusão do substrato através do fragmento 2,4-dinitrofenil leva a uma estrutura aproximadamente 10 kJ mais estável em comparação ao complexo formado pela inclusão através do fragmento fenil. Isso explica porque a reatividade de PDNPP é menor em comparação àquela observada para BDNPP: o tempo de residência de PDNPP na cavidade do pilarareno com o grupo de saída posicionado no interior da cavidade deve prevalecer, competindo significativamente com a formação do complexo produtivo.

No caso do diéster EtDNPP, a Figura 35 mostra que a inclusão do substrato pelo fragmento etil é favorecida, de modo que a reatividade esperada para esse substrato seria em princípio semelhante àquela observada para BDNPP. No entanto, uma análise mais detalhada dos modos de complexação entre EtDNPP e P5IMDH₆⁶⁺ mostra que o substrato se posiciona 0,2 nm mais perto do centro da cavidade do pilarareno quando da inclusão pelo fragmento etil, de modo que o centro eletrofílico permanece mais blindado e, portanto, o ataque de um anel imidazol é desfavorecido. Assim, observa-se que para o substrato EtDNPP, ainda que a formação do completo produtivo seja favorecida, a seletividade é também dependente do posicionamento do substrato no complexo de inclusão. Diferentemente, o fósforo está posicionado a distâncias semelhantes do centro da cavidade do pilarareno para o substrato PDNPP em ambos os seus modos de inclusão.

Assim, o pilarareno P5IMD, funcionalizado com grupos imidazóis, mostrou-se altamente reativo frente a diésteres de fosfato, com incrementos de até 10⁴ vezes, em comparação com as constantes de hidrólise espontânea dos substratos. O efeito catalítico obtido resulta da formação de complexos hôte:huésped, nos quais ocorre uma interação persistente entre os grupos funcionais do substrato e do nucleófilo. No entanto, ressalta-se que a orientação do substrato é fundamental para a reatividade, sendo que o grupo espectador deve estar inserido na cavidade do P5IMD, e o grupo de saída, voltado para o exterior: tal orientação permite o alinhamento necessário entre o nucleófilo e o grupo de saída para uma reação do tipo S_N2(P) concertada. A seletividade de P5IMD, que exige a inserção do substrato na cavidade de P5IMD por uma conformação específica para que haja reatividade, permite nomear P5IMD como uma enzima artificial. O ciclo catalítico completo conta com a formação de um intermediário fosfoamidato, cuja hidrólise regenera o catalisador de partida. No caso do diéster simétrico BDNPP, devido à presença de um substituinte 2,4-dinitrofenil no intermediário fosfoamidato, é possível que haja a sua substituição por

do diânion $p\text{NPP}^{2-}$ a um laser de Nd:YAG operado no harmônico de 266 nm, e os resultados mostram que o diânion do monoéster é de fato rapidamente hidrolisado quando encontra-se no estado excitado, porém o rendimento da reação é baixo.

A caracterização dos produtos da reação de fotohidrólise de $p\text{NPP}^{2-}$ foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Para isso, foram preparadas amostras equilibradas ao ar de $p\text{NPP}^{2-}$ 0,23 mM em pH 9,0 submetidas a um número crescente de pulsos de laser de 266 nm (energia de 18,3 mJ/pulso), e alíquotas das amostras foram submetidas à análise cromatográfica de HPLC-DAD para separação e caracterização do reagente e produtos. Considerando que o *p*-nitrofenol pode perder o grupo nitro quando exposto à radiação de 266 nm, trabalhou-se com volumes pequenos de amostra, de maneira que uma dada amostra se encaixa em sua totalidade dentro do diâmetro do feixe do laser, e eventuais processos fotoquímicos consecutivos podem ser designados com confiança.

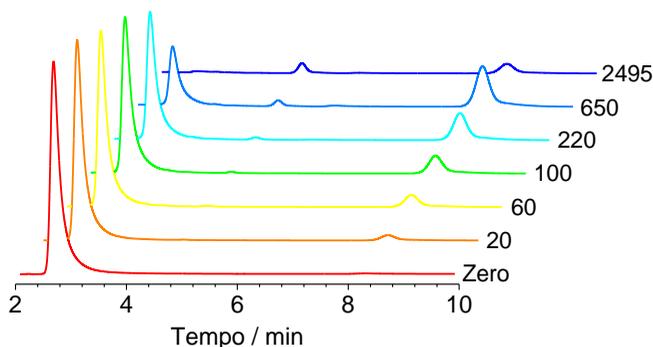
A análise cromatográfica foi realizada com fase móvel constituída de 75% água e 25% metanol/água (95:5, v/v) com fluxo isocrático. Portanto, o pH da fase móvel é distinto àquele das cinéticas, e já que os espectros UV/Vis dependem do estágio de ionização das diferentes espécies, os comprimentos de onda para detecção por HPLC-DAD serão distintos àqueles utilizados para análise das cinéticas transientes mais adiante.

Ao selecionar o detector de DAD em 320 nm, o conjunto de cromatogramas mostrado na Figura 36 é observado, sendo o primeiro obtido de uma amostra de substrato puro (sem ser exposto à radiação), e os demais cromatogramas referem-se a amostras submetidas a um número crescente de pulsos de laser de 266 nm. Assim, os dados da Figura 36 mostram que a intensidade do sinal do substrato, que possui tempo de retenção de 2,70 min, diminui em função do número de pulsos de laser, concomitantemente ao aumento da intensidade do sinal de uma espécie mais hidrofóbica com tempo de retenção de 8,30 min. Tal tempo de retenção e o espectro UV/Vis coincidem com uma análise independente de um padrão de *p*-nitrofenol sob mesmas condições cromatográficas, confirmando a formação de *p*-nitrofenol/*p*-nitrofenolato como produto inicial da fotohidrólise de $p\text{NPP}^{2-}$.

Na Figura 36, o aumento do sinal em 4,62 min mostra a formação de fenol a partir da quebra fotoquímica do produto inicial *p*-nitrofenol exposto aos pulsos de laser (o tempo de retenção e o espectro UV/Vis coincidem com os dados obtidos de uma amostra de fenol puro em mesmas condições cromatográficas). De fato, o último cromatograma da

Figura 36, obtido após um número exaustivo de quase 3000 pulsos de laser, mostra uma diminuição do sinal em 8,30 min concomitante ao aumento da intensidade do sinal em 4,62 min. Porém, ressalta-se que o fenol é formado em quantidades significativas somente após a incidência de uma quantidade significativa de pulsos de laser, o que mostra que *p*-nitrofenol é o único produto aromático inicial resultante da fotohidrólise do *p*NPP²⁻. De fato, o fenol não é detectado no cromatograma obtido após a incidência de apenas 20 pulsos de laser, por exemplo.

Figura 36 – Cromatogramas de HPLC-DAD de amostras de *p*NPP²⁻ submetidas a um número crescente de pulsos de laser de 266 nm (18,3 mJ/pulso), conforme indicado na figura. O eixo y corresponde à absorbância em 320 nm. As amostras encontravam-se equilibradas ao ar, e continham 0,23 mM de *p*NPP²⁻ em 9,0, a 25 °C.



Os espectros de UV/Vis completos das espécies eluídas em 2,70 e 8,30 min em função do número de pulsos de laser, bem como os dados de absorbância no λ_{max} em função do número de pulsos de laser, são apresentados na Figura 37, e assim como os dados da Figura 36, também evidenciam o consumo do substrato e a formação de *p*-nitrofenol.

Para a análise dos perfis de transientes, escolheu-se o meio aquoso neutro (pH = 7,0), já que nessa condição o monoéster encontra-se exclusivamente na forma dianiônica e são evitadas as reações do substrato com o ácido e base conjugados do solvente. Em um experimento típico para obtenção de perfis de transientes, uma amostra de *p*NPP em pH 7,0 e 25°C equilibrada ao ar foi irradiada com quatro pulsos consecutivos de laser de 266 nm, e obteve-se uma média de quatro perfis de absorbância em função do tempo em um dado comprimento de onda. Ao se registrar uma série de perfis de transientes em diferentes comprimentos de onda,

podem ser obtidos espectros típicos de fotólise por pulso de laser, como mostrado em três dimensões na Figura 38.

Figura 37 – Em (A) e (B), espectros de UV/Vis das espécies eluídas em 2,70 e 8,30 min na análise de HPLC da Figura 36, isto é, *p*NPP e *p*-nitrofenol, respectivamente (são mostrados dados até 650 pulsos de laser). Em (C), respectivos valores de absorvância em função do número de pulsos de laser, em 294 nm para o *p*NPP, e 318 nm para o *p*-nitrofenol.

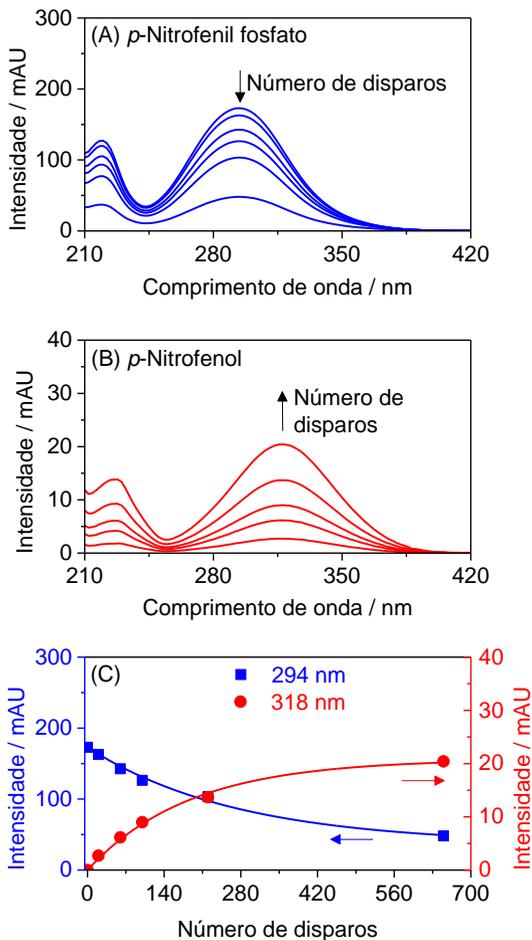
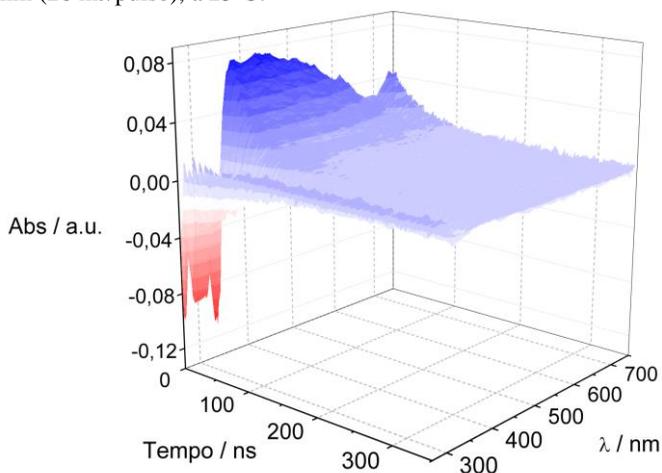


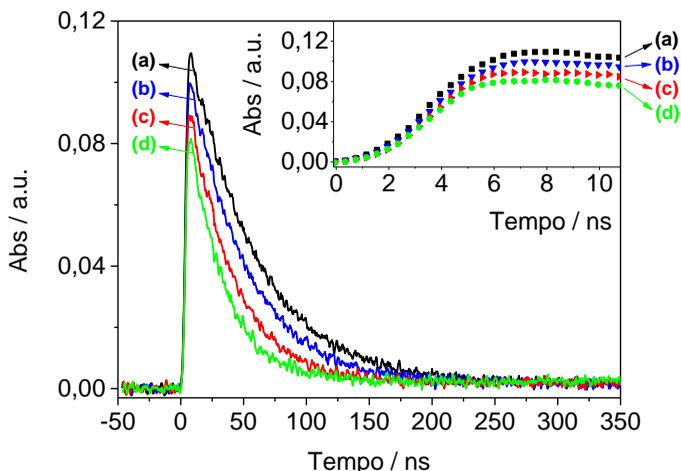
Figura 38 – Espectro de fotólise por pulso de laser obtido após a irradiação de uma amostra equilibrada ao ar de $p\text{NPP}^{2-}$ 0,1 mM em pH 7,0 com pulso de laser de 266 nm (26 mJ/pulso), a 25°C.



A Figura 38 fornece um panorama completo da cinética a partir do estado excitado de $p\text{NPP}^{2-}$, fornecendo informações de concentrações de transientes em função do tempo e do comprimento de onda. Assim, pode-se avaliar na Figura 38 como a absorvância varia em função do tempo para um comprimento de onda específico (por exemplo, 400 nm) ou, alternativamente, em que comprimentos de onda ocorre absorção ou depleção em um dado intervalo de tempo. Nesse sentido, a Figura 38 mostra que, após a incidência de radiação de 266 nm, são observadas variações de absorvância negativas em comprimentos de onda menores que 350 nm, ao passo que variações positivas são registradas em comprimentos de onda maiores, havendo um máximo em 400 nm. Em ambos os casos, de depleção ou absorção, os valores de absorvância retornam a valores próximos de zero em até 300 ns. Considerando que, em pH 7,0, o espectro UV/Vis de $p\text{NPP}^{2-}$ possui uma banda com máximo em ~ 320 nm e a espécie p -nitrofenolato absorve em 400 nm, os dados da Figura 38 sugerem que a depleção provavelmente está relacionada a transformações do substrato eletronicamente excitado, ao passo que as variações positivas de absorvância em 400 nm referem-se à formação do produto p -nitrofenolato. As variações de absorvância em comprimentos de onda maiores que 550 nm podem estar relacionadas à ejeção de elétrons a partir do substrato eletronicamente excitado e/ou à formação de espécies radiculares ao longo da reação.

Uma compreensão mais detalhada dos processos primários e secundários envolvidos na fotohidrólise de $p\text{NPP}^{2-}$ pode ser realizada analisando-se as cinéticas transientes em 400 nm, um comprimento de onda em que absorve o p -nitrofenolato no estado fundamental. Assim, foram obtidos perfis de transientes em 400 nm excitando-se o substrato em 266 nm em diferentes temperaturas, como mostra a Figura 39.

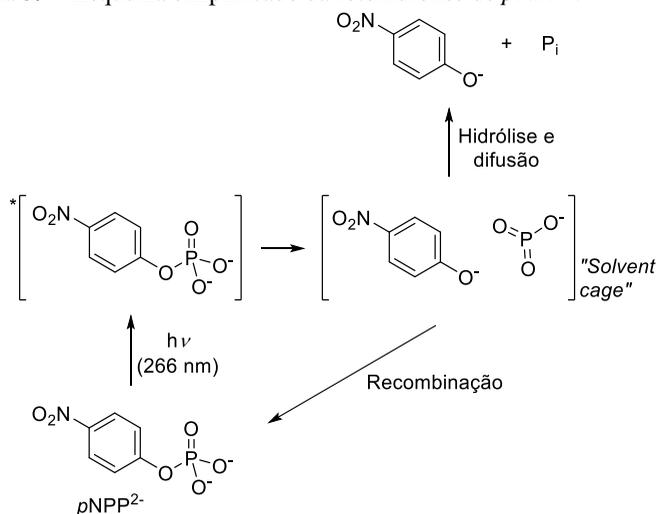
Figura 39 – Perfis transientes em 400 nm obtidos após irradiação de amostra de $p\text{NPP}^{2-}$ 0,2 mM em pH 7,0 com laser de 266 nm em diferentes temperaturas: 16,3 (a), 25,0 (b), 40,0 (c), e 55,0 °C (d). No detalhe, expansão dos primeiros 10 ns.



Na Figura 39, observa-se um aumento inicial rápido de absorbância, que alcança um máximo entre 6 e 8 ns, seguido de um decaimento exponencial em uma faixa de tempo consideravelmente maior. Considerando que o anel aromático deve ser o responsável pela absorção da radiação de 266 nm e formação de $p\text{NPP}^{2-*}$, então pode-se propor inicialmente que o produto inicial advindo da quebra da ligação O–P do substrato excitado deve ser: (i) p -nitrofenolato eletronicamente excitado, o qual deve decair ao estado fundamental considerando o tempo de vida reportado para o fenolato no primeiro estado singleto da ordem de 3,2 ns,^{75,115} ou (ii) p -nitrofenolato diretamente no estado fundamental, com a quebra da ligação O–P levando à desativação do anel aromático. Assim, os dados da Figura 39 sugerem que o aumento da absorbância em 400 nm segue basicamente a formação de p -nitrofenolato no estado fundamental, e o decaimento observado em intervalos de tempo maiores deve resultar de uma recombinação do p -nitrofenolato no estado

fundamental com o ânion metáfosfato, levando à formação do $p\text{NPP}^{2-}$ de partida. Isso explica porque não se observa a formação de um patamar em 400 nm após o aumento da absorvância, bem como porque a absorvância não retorna à zero após o decaimento exponencial. A partir dos valores de absorvância no infinito, estima-se a formação de $2,0 \times 10^{-7}$ M de p -nitrofenol após a irradiação de 0,2 mM de $p\text{NPP}^{2-}$ com laser de 266 nm, indicando que a reação de quebra do diânion de $p\text{NPP}$ é de fato muito rápida, mas que a fotohidrólise possui um rendimento muito baixo, da ordem de 0,001. O Esquema 39 representa o cenário descrito, consistindo-se uma proposta simplificada de processos primários e secundários para a fotohidrólise do $p\text{NPP}^{2-}$ com base nos resultados cinéticos.

Esquema 39 – Esquema simplificado da fotohidrólise de $p\text{NPP}^{2-}$.



Nota-se ainda na Figura 39 que a temperatura apresenta um efeito negligenciável no aumento de absorvância nos primeiros 6–8 ns, influenciando em maior extensão a etapa de decaimento exponencial em tempos maiores (isso é válido para a faixa investigada de 16,3 a 64,0 °C; o conjunto completo dos perfis obtidos em 400 nm em várias temperaturas é apresentado no Apêndice B). Esses resultados são indicativos de processos que ocorrem em escala de tempo perto do limite de difusão, em que a velocidade é mais dependente da estrutura dos reagentes e da viscosidade do meio, em relação à temperatura.

É interessante comparar os dados aqui obtidos àqueles reportados por Havinga e colaboradores, que investigaram a fotosolvólise do o -, m -

e *p*-nitrofenil fosfato.^{86,88} De acordo com os autores, o isômero *meta* era o mais reativo, e degradava-se quando soluções aquosas do substrato permaneciam expostas à luz branca difusa ou à lâmpada de Xe. O fato de ser o isômero *meta* aquele que sofre hidrólise mais rapidamente no estado excitado tornou-se interessante por mostrar um padrão de reatividade contrário ao esperado para o estado fundamental. Estudos contemporâneos aos de Havinga mostraram o mesmo padrão de reatividade em reações de fotosolvólise de outros grupos funcionais, e evidenciaram o que foi posteriormente denominado de *efeito meta*.⁹⁰ Embora seja evidente a formação de *m*-nitrofenol a partir da fotosolvólise do isômero *meta*, é curioso observar que afirmações de que o isômero *para* não é reativo no estado excitado foram reportadas repetidas vezes desde a década de 1950, explicitando-se que não há aceleração da hidrólise de tal composto no estado excitado em relação à reação no escuro.^{90,116}

Desde as primeiras investigações mecanísticas acerca das reações de substituição nucleofílica em monoésteres de fosfato, tornou-se bem estabelecido na literatura a elevada dependência em relação à acidez do grupo de saída, com $\beta_{LG} = -1,0 \pm 0,2$ para diânions de monoésteres.^{2,10} Em consonância com a baixa dependência em relação à força do nucleófilo ($\beta_{nuc} = 0,15 \pm 0,15$)², propõe-se que diânions de monoésteres são hidrolisados por um mecanismo do tipo S_N2(P) concertado, passando por um estado de transição em que nucleófilo e grupo de saída se encontram ambos fracamente ligados ao fósforo.¹⁰ Considerando que a acidez de fenóis substituídos é maior no estado excitado⁷⁵ (por exemplo, o pK_a^* do *p*-nitrofenol é aproximadamente 4,5 unidades menor que o pK_a no estado fundamental¹¹⁷), seria de se esperar que reações que procedem através de um mecanismo concertado com caráter dissociativo, ou mesmo dissociativo, para bons grupos de saída, seja mais rápida no estado excitado. Nesse sentido, seria esperado que os isômeros *o*- e *p*-nitrofenil fosfato fossem consideravelmente reativos no estado excitado frente à reação de hidrólise.

Assim, a predição de uma reatividade (ao menos modesta) de *p*NPP²⁻ no estado excitado tem fundamento, e os resultados de fotólise por pulso de laser, amparados pelos resultados de caracterização de produtos por HPLC-DAD, mostram que o diânion de *p*NPP é reativo frente à hidrólise quando no estado excitado. Porém, o rendimento da reação é baixo, dificultando a sua observação experimental utilizando fontes de luz mais fracas, por exemplo. A exposição de amostras aquosas de *p*NPP²⁻ promove de fato uma aceleração na hidrólise do substrato em relação à reação no escuro: considerando a constante de velocidade de

hidrólise no estado fundamental de $1,55 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ (a 39°C)³², a observação de uma cinética de formação de *p*-nitrofenolato em uma janela de tempo menor que 10 ns após a excitação do substrato permite estimar um aceleração de ao menos 10^{16} vezes.

5 CONCLUSÕES

As principais conclusões desta tese de doutoramento são apresentadas abaixo, conforme a divisão dos capítulos:

1-) Degradação de diésteres de fosfato por P5IMD:

- O pilarareno P5IMD mostrou-se catalítico e seletivo na degradação dos ânions dos diésteres de fosfato BDNPP, PDNPP e EtDNPP em meio aquoso, como resultado da formação de diferentes complexos hóspede-hospedeiro;
- Com BDNPP, obteve-se um efeito catalítico de até 10^4 vezes, em comparação à hidrólise espontânea do substrato;
- Com PDNPP e EtDNPP, há duas possibilidades de inclusão na cavidade de P5IMD, sendo que somente uma delas é favorável à reação, isto é, quando o substrato está incluído na cavidade de P5IMD através do grupo espectador e o grupo de saída encontra-se voltado para o exterior;
- A formação dos complexos não-produtivos no caso dos diésteres assimétricos leva a uma seletividade de P5IMD para a degradação dos substratos na proporção de 1 : 7 : 520 para EtDNPP : PDNPP : BDNPP.

2-) Fotólise do monoéster *p*NPP:

- A degradação fotoquímica da espécie dianiônica de *p*NPP foi investigada em meio aquoso através de fotólise por pulso de laser. Tipicamente, incidiu-se sobre soluções aquosas de *p*NPP²⁻ um feixe de laser de 266 nm, e acompanhou-se a reatividade decorrente da excitação do substrato através de variações de absorbância em função do tempo com uma lâmpada pulsada de Xe ortogonal ao feixe do laser;
- A caracterização de produtos por HPLC-DAD confirma que a fotólise do *p*NPP²⁻ leva à formação de *p*-nitrofenolato e fosfato inorgânico;
- Perfis de absorbância em função do tempo em 400 nm mostram a formação de *p*-nitrofenolato após a excitação de *p*NPP²⁻ em uma janela de tempo menor que 10 ns, o que indica que esse processo é pelo menos 10^{16} vezes mais rápido que a reação de hidrólise da mesma espécie no estado fundamental, sendo praticamente independente da temperatura na faixa de 16,3 a 64,0 °C;

- Os mesmos perfis sugerem a recombinação de uma fração dos produtos, levando à formação do substrato de partida. Assim, ainda que a clivagem de $pNPP^{2-}$ no estado excitado seja muito rápida, o rendimento do processo global é substancialmente baixo;
- Isso explica as afirmações recorrentes na literatura de que a luz não promove aceleração na degradação do $pNPP$ em meio aquoso, pois o baixo rendimento dificulta a investigação da reação.

No capítulo envolvendo a química supramolecular, expandiu-se estudos iniciais envolvendo a utilização de pilararenos como catalisadores para reações de transferência do grupo fosforila. Os resultados mostraram que efeitos catalíticos otimizados podem ser obtidos através da funcionalização dos macrociclos com grupos específicos, além de evidenciar efeitos de seletividade de acordo com as estruturas dos substratos. Essas conclusões contribuem para o desenho de novos catalisadores macrocíclicos baseados em pilararenos, com foco em uma maior gama de substratos e aplicações.

Por sua vez, no capítulo relacionado à fotoquímica orgânica, investigou-se a fotodegradação de um monoéster de fosfato em meio aquoso, e mostrou-se que a hidrólise no estado excitado da espécie dianiônica é pelo menos 10^{16} vezes mais rápida que a reação correspondente no estado fundamental. Esse resultado contradiz afirmações recorrentes na literatura de que tal reação não ocorre, abrindo um vasto campo de investigação sobre a degradação fotoquímica de monoésteres fosfóricos arflicos. Nesse sentido, os resultados suscitam estudos futuros detalhados de relações estrutura-reatividade na fotoquímica de ésteres de fosfato, cujos resultados podem contribuir para aplicações em diversas áreas do conhecimento, por exemplo, o desenho de novos grupos protetores para biomoléculas.

REFERÊNCIAS

- (1) DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A Química Dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 745–753, 2003.
- (2) LASSILA, J. K.; ZALATAN, J. G.; HERSCHLAG, D. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 669–702, 2011.
- (3) MACHADO, V. G.; NOME, F. Compostos Fosfatados Ricos Em Energia. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 351–357, 1999.
- (4) WESTHEIMER, F. H. Why Nature Chose Phosphates. **Science**, v. 235, n. 4793, p. 1173–1178, 1987.
- (5) KAMERLIN, S. C. L.; SHARMA, P. K.; PRASAD, R. B.; WARSHEL, A. Why Nature Really Chose Phosphate. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 46, n. 01, p. 1–132, 2013.
- (6) VENIER, M.; SALAMOVA, A.; HITES, R. A. Halogenated Flame Retardants in the Great Lakes Environment. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 7, p. 1853–1861, 2015.
- (7) DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: A Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 407–428, 2009.
- (8) KIM, K.; TSAY, O. G.; ATWOOD, D. A.; CHURCHILL, D. G. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5345–5403, 2011.
- (9) GUTHRIE, R. D.; JENCKS, W. P. IUPAC Recommendations for the Representation of Reaction Mechanisms. **Accounts of Chemical Research**, v. 22, n. 10, p. 343–349, 1989.
- (10) KIRBY, A. J.; NOME, F. Fundamentals of Phosphate Transfer. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 7, p. 1806–1814, 2015.

- (11) KHAN, S. A.; KIRBY, A. J. The Reactivity of Phosphate Esters. Multiple Structure–reactivity Correlations for the Reactions of Triesters with Nucleophiles. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, v. 0, p. 1172–1182, 1970.
- (12) KIRBY, A. J.; MORA, J. R.; NOME, F. New Light on Phosphate Transfer from Triesters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 454–463, 2013.
- (13) KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; BRANDÃO, T. A. S.; NOME, F. Activating Water: Efficient Intramolecular General Base Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Triester. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 34, p. 8475–8479, 2009.
- (14) KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; ORTH, E. S.; BRANDÃO, T. A. S.; WANDERLIND, E. H.; AMER, A.; WILLIAMS, N. H.; NOME, F. Activating Water: Important Effects of Non-Leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 52, p. 14996–15004, 2011.
- (15) MORA, J. R.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Theoretical Study of the Importance of the Spectator Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 16, p. 7061–7070, 2012.
- (16) ROWELL, R.; GORENSTEIN, D. G. Multiple Structure-Reactivity Correlations in the Hydrolysis of Epimeric 2-Aryloxy-2-Oxy-Dioxaphosphorinanes. Stereoelectronic Effects. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 19, p. 5894–5902, 1981.
- (17) BA-SAIF, S. A.; WARING, M. A.; WILLIAMS, A. Single Transition State in the Transfer of a Neutral Phosphoryl Group between Phenoxide Ion Nucleophiles in Aqueous Solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 22, p. 8115–8120, 1990.
- (18) BA-SAIF, S. A.; WARING, M. A.; WILLIAMS, A. Dependence of Transition-State Structure on Nucleophile in the Reaction of Aryl Oxide Anions with Aryl Diphenylphosphate Esters. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 0, n. 11, p. 1653–1659, 1991.

(19) HENGGE, A. C. Isotope Effects in the Study of Phosphoryl and Sulfuryl Transfer Reactions. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 2, p. 105–112, 2002.

(20) CLELAND, W. W.; HENGGE, A. C. Enzymatic Mechanisms of Phosphate and Sulfate Transfer. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3252–3278, 2006.

(21) KUMAMOTO, J.; COX, J. R.; WESTHEIMER, F. H. Barium Ethylene Phosphate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 19, p. 4858–4860, 1956.

(22) BUNTON, C. A.; MHALA, M. M.; OLDHAM, K. G.; VERNON, C. A. 660. The Reactions of Organic Phosphates. Part III. The Hydrolysis of Dimethyl Phosphate. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, v. 0, p. 3293–3301, 1960.

(23) KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. The Reactivity of Phosphate Esters. Diester Hydrolysis. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, v. 0, p. 510–513, 1970.

(24) KIRBY, A. J.; SOUZA, B. S.; NOME, F. Structure and Reactivity of Phosphate Diesters. Dependence on the Nonleaving Group. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 422–427, 2015.

(25) LÖNNBERG, H.; STRÖMBERG, R.; WILLIAMS, A. Compelling Evidence for a Stepwise Mechanism of the Alkaline Cyclisation of Uridine 3'-Phosphate Esters. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, n. 15, p. 2165–2167, 2004.

(26) KOSONEN, M.; YOUSETI-SALAKDEH, E.; STRÖMBERG, R.; LÖNNBERG, H. Mutual Isomerization of Uridine 2'- and 3'-Alkylphosphates and Cleavage to a 2',3'-Cyclic Phosphate: The Effect of the Alkyl Group on the Hydronium- and Hydroxide-Ion-Catalyzed Reactions. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 0, n. 12, p. 2661–2666, 1997.

(27) SCHROEDER, G. K.; LAD, C.; WYMAN, P.; WILLIAMS, N. H.; WOLFENDEN, R. The Time Required for Water Attack at the Phosphorus Atom of Simple Phosphodiester and of DNA. **Proceedings**

of the **National Academy of Sciences**, v. 103, n. 11, p. 4052–4055, 2006.

(28) KAMERLIN, S. C. L.; WILLIAMS, N. H.; WARSHEL, A. Dineopentyl Phosphate Hydrolysis: Evidence for Stepwise Water Attack. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 18, p. 6960–6969, 2008.

(29) KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; MORA, J. R.; OLIVEIRA, P. S. M.; AMER, A.; WILLIAMS, N. H.; NOME, F. Intramolecular General Base Catalysis in the Hydrolysis of a Phosphate Diester. Computational Guidance to a Choice of Mechanism. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1343–1353, 2013.

(30) KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. The Reactivity of Phosphate Esters. Reactions of Diesters with Nucleophiles. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, v. 0, n. 0, p. 1165-1172, 1970.

(31) ORTH, E. S.; WANDERLIND, E. H.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 19, p. 8003–8008, 2011.

(32) KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. The Reactivity of Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 2, p. 415–423, 1967.

(33) KUMAMOTO, J.; WESTHEIMER, F. H. The Hydrolysis of Mono- and Dibenzyl Phosphates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 9, p. 2515–2518, 1955.

(34) BUTCHER, W. W.; WESTHEIMER, F. H. The Lanthanum Hydroxide Gel Promoted Hydrolysis of Phosphate Esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 9, p. 2420–2424, 1955.

(35) BUNTON, C. A.; LLEWELLYN, D. R.; OLDHAM, K. G.; VERNON, C. A. 716. The Reactions of Organic Phosphates. Part I. The Hydrolysis of Methyl Dihydrogen Phosphate. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, v. 0, n. 0, p. 3574-3587, 1958.

(36) DI SABATO, G.; JENCKS, W. P. Mechanism and Catalysis of Reactions of Acyl Phosphates. II. Hydrolysis I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 21, p. 4400–4405, 1961.

(37) DI SABATO, G.; JENCKS, W. P. Mechanism and Catalysis of Reactions of Acyl Phosphates. I. Nucleophilic Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 21, p. 4393–4400, 1961.

(38) SABATO, G. D.; JENCKS, W. P.; WHALLEY, E. The Effect of Pressure on the Spontaneous Hydrolysis of Acetyl Phosphate Mono-Anion and Di-Anion and of Acetyl Phenyl Phosphate Mono-Anion. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 1220–1224, 1962.

(39) GORENSTEIN, D. G.; LEE, Y.-G.; KAR, D. Kinetic Isotope Effects in the Reactions of Aryl-¹⁸O-2,4-Dinitrophenyl Dibenzyl Phosphate and Aryl-¹⁸O-2,4-Dinitrophenyl Phosphate. Evidence for Monomeric Metaphosphate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 7, p. 2264–2267, 1977.

(40) BUCHWALD, S. L.; FRIEDMAN, J. M.; KNOWLES, J. R. Stereochemistry of Nucleophilic Displacement on Two Phosphoric Monoesters and a Phosphoguanidine: The Role of Metaphosphate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 17, p. 4911–4916, 1984.

(41) FRIEDMAN, J. M.; KNOWLES, J. R. The Quest for Free Metaphosphate in Solution: Racemization at Phosphorus in the Transfer of the Phospho Group from Phenyl Phosphate to *tert*-Butyl Alcohol in Acetonitrile. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 21, p. 6126–6127, 1985.

(42) FRIEDMAN, J. M.; FREEMAN, S.; KNOWLES, J. R. The Quest for Free Metaphosphate in Solution. Racemization at Phosphorus in the Transfer of the Phospho Group from Aryl Phosphate Monoesters to *tert*-Butyl Alcohol in Acetonitrile or in *tert*-Butyl Alcohol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 4, p. 1268–1275, 1988.

(43) KIRBY, A. J.; JENCKS, W. P. The Reactivity of Nucleophilic Reagents toward the *p*-Nitrophenyl Phosphate Dianion. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 14, p. 3209–3216, 1965.

(44) SKOOG, M. T.; JENCKS, W. P. Phosphoryl Transfer between Pyridines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 10, p. 3356–3357, 1983.

(45) BOURNE, N.; WILLIAMS, A. The Question of Concerted or Stepwise Mechanisms in Phosphoryl Group ($-\text{PO}_3^{2-}$) Transfer to Pyridines from Isoquinolin-*N*-Phosphonate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 10, p. 3357–3358, 1983.

(46) SKOOG, M. T.; JENCKS, W. P. Reactions of Pyridines and Primary Amines with *N*-Phosphorylated Pyridines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 24, p. 7597–7606, 1984.

(47) BOURNE, N.; WILLIAMS, A. Evidence for a Single Transition State in the Transfer of the Phosphoryl Group ($-\text{PO}_3^{2-}$) to Nitrogen Nucleophiles from Pyridinio-*N*-Phosphonates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 24, p. 7591–7596, 1984.

(48) HERSCHLAG, D.; JENCKS, W. P. Evidence That Metaphosphate Monoanion Is Not an Intermediate in Solvolysis Reactions in Aqueous Solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 19, p. 7579–7586, 1989.

(49) HENGGE, A. C.; EDENS, W. A.; ELSING, H. Transition-State Structures for Phosphoryl-Transfer Reactions of *p*-Nitrophenyl Phosphate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 12, p. 5045–5049, 1994.

(50) HENCHMAN, M.; VIGGIANO, A. A.; PAULSON, J. F.; FREEDMAN, A.; WORMHOUDT, J. Thermodynamic and Kinetic Properties of the Metaphosphate Anion, PO_3^- , in the Gas Phase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 5, p. 1453–1455, 1985.

(51) ZHANG, L.; XIE, D.; XU, D.; GUO, H. Reactivity of Metaphosphate and Thiometaphosphate in Water: A DFT Study. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 109, n. 49, p. 11295–11303, 2005.

(52) WOLFENDEN, R.; RIDGWAY, C.; YOUNG, G. Spontaneous Hydrolysis of Ionized Phosphate Monoesters and Diesters and the Proficiencies of Phosphatases and Phosphodiesterases as Catalysts.

Journal of the American Chemical Society, v. 120, n. 4, p. 833–834, 1998.

(53) WILLIAMS, N. H. Models for Biological Phosphoryl Transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1697, n. 1, p. 279–287, 2004.

(54) LAD, C.; WILLIAMS, N. H.; WOLFENDEN, R. The Rate of Hydrolysis of Phosphomonoester Dianions and the Exceptional Catalytic Proficiencies of Protein and Inositol Phosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5607–5610, 2003.

(55) GUTHRIE, J. P. Hydration and Dehydration of Phosphoric Acid Derivatives: Free Energies of Formation of the Pentacoordinate Intermediates for Phosphate Ester Hydrolysis and of Monomeric Metaphosphate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 12, p. 3991–4001, 1977.

(56) DUARTE, F.; BARROZO, A.; ÅQVIST, J.; WILLIAMS, N. H.; KAMERLIN, S. C. L. The Competing Mechanisms of Phosphate Monoester Dianion Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 33, p. 10664–10673, 2016.

(57) NELSON, David. L.; COX, Michael. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2008.

(58) RAINES, R. T. Ribonuclease A. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1045–1066, 1998.

(59) HERSCHLAG, D. Ribonuclease Revisited: Catalysis via the Classical General Acid-Base Mechanism or a Triester-like Mechanism? **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 26, p. 11631–11635, 1994.

(60) CHENG, Y.-C.; HSUEH, C.-C.; LU, S.-C.; LIAO, T.-H. Identification of Three Crucial Histidine Residues (His¹¹⁵, His¹³² and His²⁹⁷) in Porcine Deoxyribonuclease II. **Biochemical Journal**, v. 398, n. 2, p. 177–185, 2006.

- (61) ORTH, E. S.; BRANDÃO, T. A. S.; Milagre; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Intramolecular Acid–Base Catalysis of a Phosphate Diester: Modeling the Ribonuclease Mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 8, p. 2436–2437, 2008.
- (62) ORTH, E. S.; BRANDÃO, T. A. S.; SOUZA, B. S.; PLIEGO, J. R.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 24, p. 8513–8523, 2010.
- (63) WANDERLIND, E. H.; ORTH, E. S.; MEDEIROS, M.; SANTOS, D. M. P. O.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Aqueous Micelles as Catalytic Nanoreactors for Dephosphorylation Reactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 12, p. 2385–2391, 2014.
- (64) GIUSTI, L. A.; MEDEIROS, M.; FERREIRA, N. L.; MORA, J. R.; FIEDLER, H. D. Polymers Containing Imidazole Groups as Nanoreactors for Hydrolysis of Esters. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 297–302, 2014.
- (65) GEROLA, A. P.; WANDERLIND, E. H.; GOMES, Y. S.; GIUSTI, L. A.; GARCIA-RIO, L.; NOME, R. A.; KIRBY, A. J.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Supramolecular Polymer/Surfactant Complexes as Catalysts for Phosphate Transfer Reactions. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 3, p. 2230–2239, 2017.
- (66) BRESLOW, R. Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design. **Accounts of Chemical Research**, v. 28, n. 3, p. 146–153, 1995.
- (67) RAYNAL, M.; BALLESTER, P.; VIDAL-FERRAN, A.; VAN LEEUWEN, P. W. N. M. Supramolecular Catalysis. Part 2: Artificial Enzyme Mimics. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 5, p. 1734–1787, 2014.
- (68) BRESLOW, R.; DOHERTY, J. B.; GUILLOT, G.; LIPSEY, C. β -Cyclodextrinylbisimidazole, a Model for Ribonuclease. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, n. 10, p. 3227–3229, 1978.

(69) ANSLYN, E.; BRESLOW, R. Geometric Evidence on the Ribonuclease Model Mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 15, p. 5972–5973, 1989.

(70) ANSLYN, E.; BRESLOW, R. Proton Inventory of a Bifunctional Ribonuclease Model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 24, p. 8931–8932, 1989.

(71) OGOSHI, T.; KANAI, S.; FUJINAMI, S.; YAMAGISHI, T.; NAKAMOTO, Y. *para*-Bridged Symmetrical Pillar[5]Arenes: Their Lewis Acid Catalyzed Synthesis and Host–Guest Property. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 15, p. 5022–5023, 2008.

(72) LIZ, D. G.; MANFREDI, A. M.; MEDEIROS, M.; MONTECINOS, R.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B.; GARCIA-RIO, L.; NOME, F. Supramolecular Phosphate Transfer Catalysis by Pillar[5]Arene. **Chemical Communications**, v. 52, n. 15, p. 3167–3170, 2016.

(73) ANSLYN, Eric V.; DOUGHERTY, Dennis A. **Modern Physical Organic Chemistry**. Sausalito: University Science, 2006.

(74) BAKIRCI, H.; KONER, A. L.; SCHWARZLOSE, T.; NAU, W. M. Analysis of Host-Assisted Guest Protonation Exemplified for *p*-Sulfonatocalix[4]Arene—Towards Enzyme-Mimetic pK_a Shifts. **Chemistry - A European Journal**, v. 12, n. 18, p. 4799–4807, 2006.

(75) LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006.

(76) TURRO, Nicholas J.; RAMAMURTHY, Vaidhyathan; SCAIANO, Juan C. **Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules**. Sausalito: University Science Books, 2010.

(77) SCAIANO, J. C. Laser Flash Photolysis Studies of the Reactions of Some 1,4-Biradicals. **Accounts of Chemical Research**, v. 15, n. 8, p. 252–258, 1982.

(78) SCAIANO, J. Correspondence - Early History of Laser Flash Photolysis. **Accounts of Chemical Research**, v. 16, n. 7, p. 234–234, 1983.

- (79) GIVENS, R. S.; KUEPER, L. W. Photochemistry of Phosphate Esters. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 1, p. 55–66, 1993.
- (80) KLÁN, P.; ŠOLOMEK, T.; BOCHET, C. G.; BLANC, A.; GIVENS, R.; RUBINA, M.; POPIK, V.; KOSTIKOV, A.; WIRZ, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 1, p. 119–191, 2013.
- (81) KAPLAN, J. H.; FORBUSH, B.; HOFFMAN, J. F. Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analog: Utilization by the Sodium:Potassium Pump of Human Red Blood Cell Ghosts. **Biochemistry**, v. 17, n. 10, p. 1929–1935, 1978.
- (82) KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. Photochemical Phosphorylation. **Chemical Communications (London)**, v. 0, n. 8, p. 405–406, 1967.
- (83) KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. A Photosensitive Protecting Group for Phosphate Esters. **Chemical Communications (London)**, v. 0, n. 8, p. 406–406, 1967.
- (84) ARRIS, J.; BADDILEY, J.; BUCHANAN, J. G.; THAIN, E. M. 964. Coenzyme A. Part X. Model Experiments on the Synthesis of Pyrophosphates of *N*-Pantoylamines. New Methods for the Debenzylation of Esters of Pyrophosphoric Acid. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, v. 0, n. 0, p. 4968–4973, 1956.
- (85) HAVINGA, E.; DE JONGH, R. O. Photochemical Reactions of Nitrophenylesters and -Ethers. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 71, n. 11–12, p. 803–810, 1962.
- (86) HAVINGA, E.; DE JONGH, R. O.; DORST, W. Photochemical Acceleration of the Hydrolysis of Nitrophenyl Phosphates and Nitrophenyl Sulphates. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 75, n. 4, p. 378–383, 1956.
- (87) DE JONGH, R. O.; HAVINGA, E. Photoreactions of Aromatic Compounds. Part XV: Photosolvolysis of Some 5-Substituted 3-Nitrophenyl Phosphates and of 3-Nitrophenyl Sulfate. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 87, n. 11, p. 1327–1338, 1968.

- (88) DE JONGH, R. O.; HAVINGA, E. Photoreactions of Aromatic Compounds. Part XIV: The Mechanism of the Photosolvolysis of *m*-Nitrophenyl Phosphate. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 87, n. 11, p. 1318–1326, 1968.
- (89) ZIMMERMAN, H. E. The Meta Effect in Organic Photochemistry: Mechanistic and Exploratory Organic Photochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 35, p. 8988–8991, 1995.
- (90) ZIMMERMAN, H. E. Five Decades of Mechanistic and Exploratory Organic Photochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 12, 2006.
- (91) ZIMMERMAN, H. E.; SANDEL, V. R. Mechanistic Organic Photochemistry. II. Solvolytic Photochemical Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 7, p. 915–922, 1963.
- (92) ZIMMERMAN, H. E.; SOMASEKHARA, S. Mechanistic Organic Photochemistry. III. Excited State Solvolyses. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 7, p. 922–927, 1963.
- (93) GIVENS, R. S.; MATUSZEWSKI, B. Photochemistry of Phosphate Esters: An Efficient Method for the Generation of Electrophiles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 22, p. 6860–6861, 1984.
- (94) GIVENS, R. S.; MATUSZEWSKI, B.; ATHEY, P. S.; STONER, M. R. Photochemistry of Phosphate Esters: An Efficient Method for the Generation of Electrophiles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 16, p. 6016–6021, 1990.
- (95) GIVENS, R. S.; SINGH, R. Mechanistic Pathways in Phosphate Ester Photochemistry. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 48, p. 7013–7016, 1991.
- (96) HALMANN, M.; PLATZNER, I. 1001. The Photochemistry of Phosphorus Compounds. Part III. Photolysis of Ethyl Dihydrogen Phosphate in Aqueous Solution. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, v. 0, n. 0, p. 5380–5385, 1965.

(97) HALMANN, M.; PLATZNER, I. The Photochemistry of Phosphorus Compounds. IV. Photolysis of Sodium Hydrogen Phosphate in Aqueous Solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 7, p. 2281–2286, 1966.

(98) BENSCHOP, H. P.; HALMANN, M. Photochemistry of Phosphorus Compounds. Part IX. Photolysis of Trimethyl Phosphate in Aqueous Solution. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 0, n. 10, p. 1175–1180, 1974.

(99) OKAMOTO, Y.; IWAMOTO, N.; TAKAMUKU, S. Photochemical C–P Bond Cleavage of (*p*-Nitrophenyl)Methylphosphonic Acid. **Chemistry Letters**, v. 13, n. 12, p. 2091–2092, 1984.

(100) OKAMOTO, Y.; IWAMOTO, N.; TOKI, S.; TAKAMUKU, S. Photochemical C–P Bond Cleavage of Nitrobenzylphosphonate Ions. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 60, n. 1, p. 277–282, 1987.

(101) ELLIS-DAVIES, G. C. R. Caged Compounds: Photorelease Technology for Control of Cellular Chemistry and Physiology. **Nature Methods**, v. 4, n. 8, p. 619–628, 2007.

(102) SENADHEERA, S. N.; YOUSEF, A. L.; GIVENS, R. S. Photorelease of Phosphates: Mild Methods for Protecting Phosphate Derivatives. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 2038–2054, 2014.

(103) ŠOLOMEK, T.; WIRZ, J.; KLÁN, P. Searching for Improved Photoreleasing Abilities of Organic Molecules. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 12, p. 3064–3072, 2015.

(104) GRIESBECK, Axel; OELGEMÖLLER, Michael; GHETTI, Francesco (Eds.). **CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

(105) BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. Hydrolysis of Bis(2,4-Dinitrophenyl) Phosphate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 767–772, 1969.

(106) MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of Phosphate Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 588–592, 1983.

(107) LIZ, D. G. **Efeito Supramolecular de Macrociclos Na Degradação de Ésteres de Fosfato**. 2017. 133 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2017.

(108) Programa CurTiPot - pH e Curvas de Titulação Potenciométrica: Análise e Simulação, versão 4.2.3, GUTZ, I. G. R. 2016.

(109) PRONK, S.; PÁLL, S.; SCHULZ, R.; LARSSON, P.; BJELKMAR, P.; APOSTOLOV, R.; SHIRTS, M. R.; SMITH, J. C.; KASSON, P. M.; VAN DER SPOEL, D.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845–854, 2013.

(110) SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Definition and Testing of the GROMOS Force-Field Versions 54A7 and 54B7. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 7, p. 843–856, 2011.

(111) BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987.

(112) BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.

(113) DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993.

(114) KIRBY, A. J. Efficiency of Proton Transfer Catalysis in Models and Enzymes. **Accounts of Chemical Research**, v. 30, n. 7, p. 290–296, 1997.

(115) MIALOCQ, J.; SUTTON, J.; GOUJON, P. Picosecond Study of Electron Ejection in Aqueous Phenol and Phenolate Solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 72, n. 12, p. 6338–6345, 1980.

(116) DICHIARANTE, V.; DONDI, D.; PROTTI, S.; FAGNONI, M.; ALBINI, A. A Meta Effect in Organic Photochemistry? The Case of S_N1 Reactions in Methoxyphenyl Derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 17, p. 5605–5611, 2007.

(117) SCORSIN, L. **Reações Controladas Por Difusão e Catálise Supramolecular: Transferência de Próton Em Fenolatos e Hidrólise de Dioxolanos Em Cucurbiturilas**. 2017. 140 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2017.

APÊNDICE A – DADOS CINÉTICOS E DE RMN ¹H

Figura 1 – Espectros de RMN ¹H (200 MHz) de amostras de P5IMD 1,5 mM e BDNPP em diferentes concentrações, em D₂O:CD₃OD 65:35 (v/v), pD 5,5, a 25°C. As concentrações de BDNPP, do espectro inferior ao superior, são: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mM.

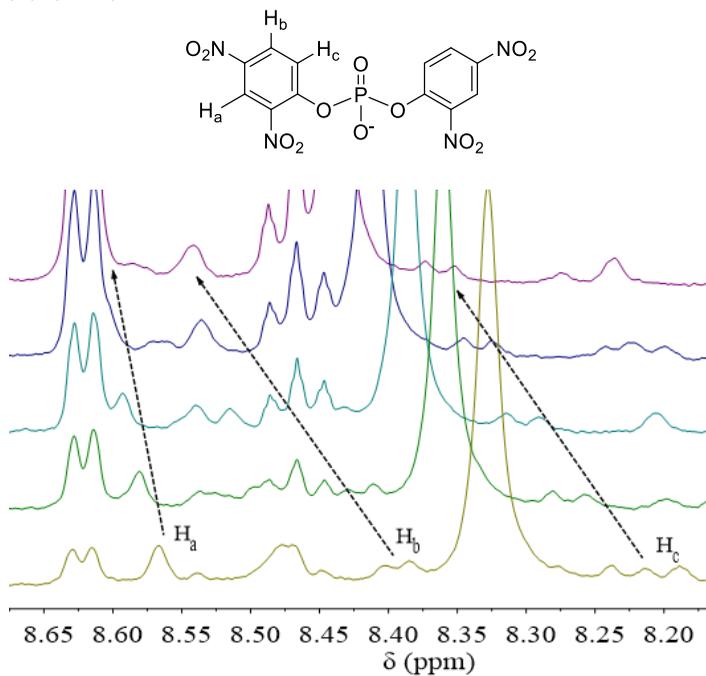


Figura 2 – Perfis de concentração de P5IMD na reação com BDNPP em diferentes valores de pH, conforme indicado na figura, em MeOH:H₂O 65:35 (v/v), a 25°C.

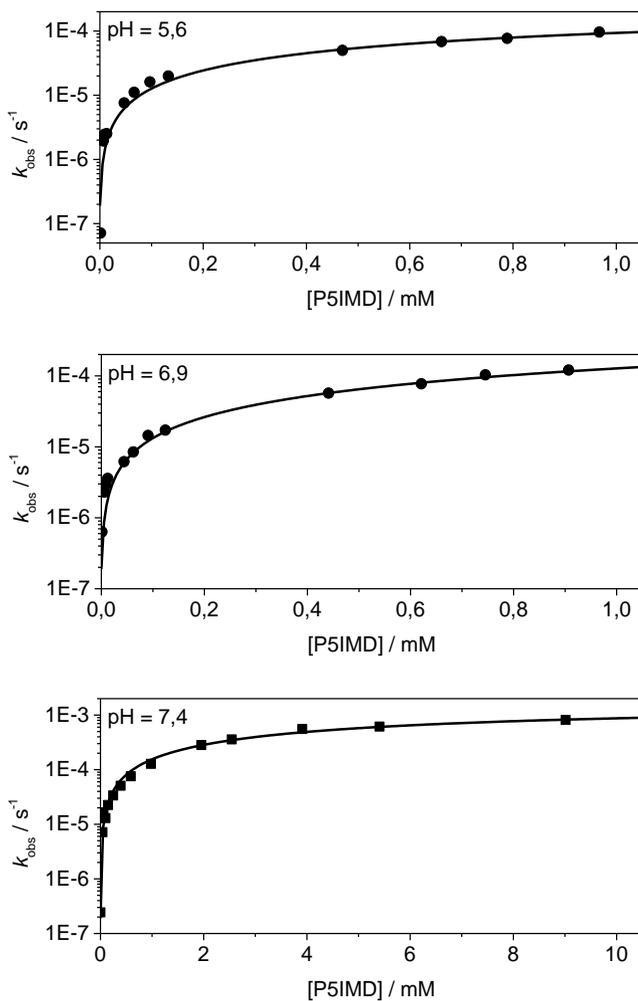
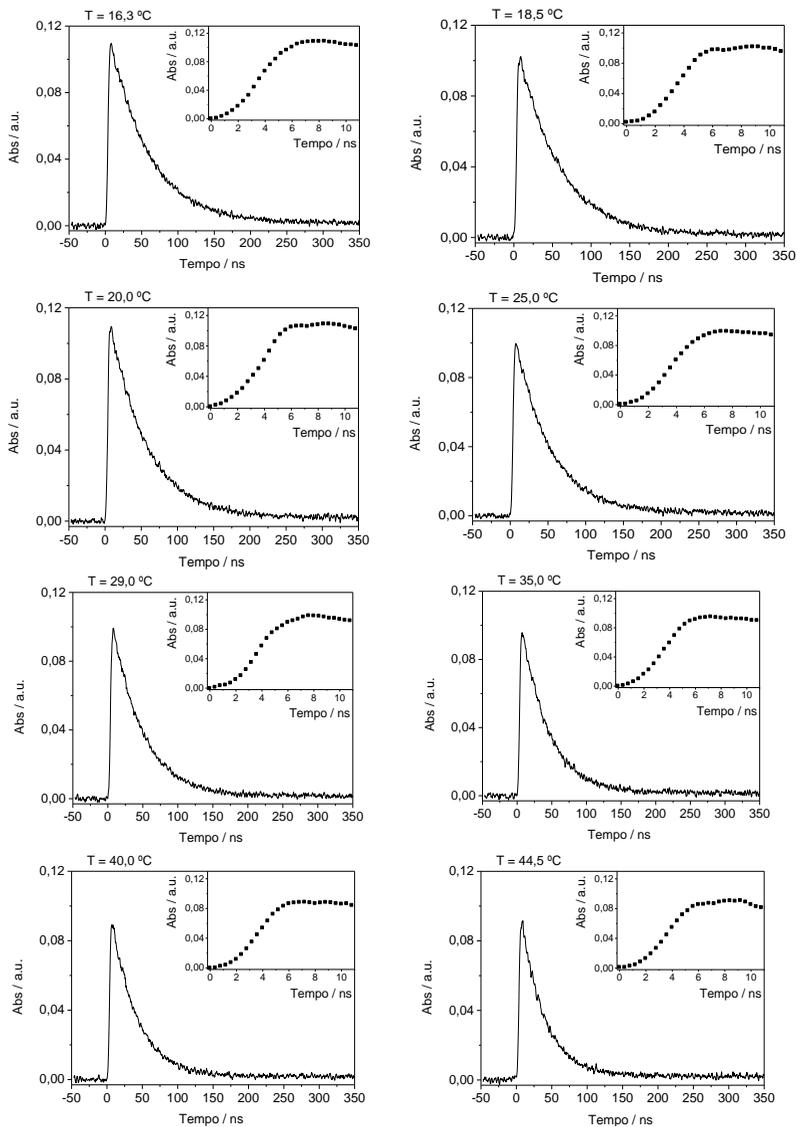


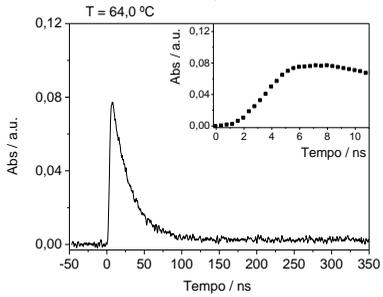
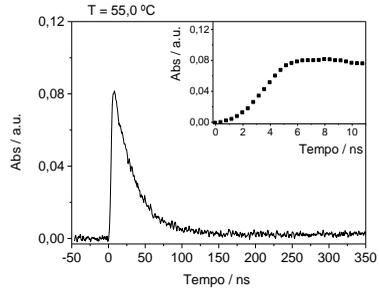
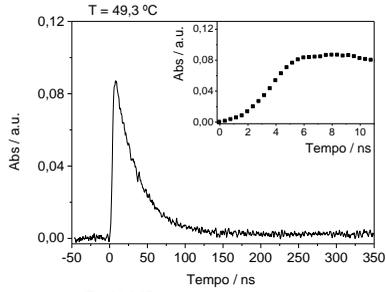
Tabela 1 – Parâmetros cinéticos obtidos com o ajuste do perfil de pH para a reação de BDNPP com P5IMD. Utilizou-se a equação $k_{obs} = k_0 + k_{4H}\chi_{4H} + k_{3H}\chi_{3H} + k_{2H}\chi_{2H} + k_H\chi_H + k_N\chi_N$, onde χ_{4H} , χ_{3H} , χ_{2H} , χ_H e χ_N representam as espécies P5IMDH₄⁴⁺, P5IMDH₃³⁺, P5IMDH₂²⁺, P5IMDH⁺ e neutra de P5IMD, respectivamente, cujas reações com BDNPP são descritas pelas constantes de primeira ordem k_{4H} , k_{3H} , k_{2H} , k_H e k_N , respectivamente. O termo k_0 refere-se à hidrólise espontânea do substrato.

k_0, s^{-1}	$1,90 \times 10^{-7}$
k_{4H}, s^{-1}	$1,30 \times 10^{-5}$
k_{3H}, s^{-1}	$7,00 \times 10^{-5}$
k_{2H}, s^{-1}	$9,00 \times 10^{-5}$
k_H, s^{-1}	$2,60 \times 10^{-4}$
k_N, s^{-1}	$6,60 \times 10^{-4}$

APÊNDICE B – DADOS DE FOTÓLISE POR PULSO DE LASER

Figura 1 – Perfis transientes em 400 nm obtidos após a irradiação de amostras equilibradas ao ar de $p\text{NPP}^{2-}$ 0,2 mM, em pH 7,0, com laser de 266 nm em diferentes temperaturas, conforme indicado na figura. Nos detalhes, expansão dos primeiros 10 ns.





APÊNDICE C – DOUTORADO-SANDUÍCHE

EFEITO SUPRAMOLECULAR DE *p*-SULFONATOCALIX[4]ARENO NA ACIDEZ DE 4-(2-PIRIDILAZO)-*N,N*-DIMETIL ANILINA

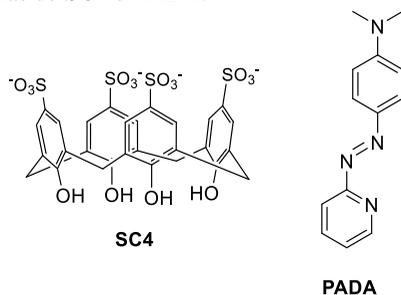
Trabalho realizado em estágio de doutorado-sanduiche no grupo de Reactividad y Catálisis, do Departamento de Química Física, do Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), da Universidade de Santiago de Compostela, em Santiago de Compostela/Espanha, sob orientação do Prof. Dr. Luis García Río

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Em sistemas biológicos, os sítios ativos enzimáticos apresentam diversas funcionalidades responsáveis por promover um somatório de interações intermoleculares importantes para o efeito catalítico. Por exemplo, a ligação de um dado substrato a uma enzima pode ser auxiliada por ligações intermoleculares de hidrogênio, bem como por interações eletrostáticas com íons metálicos. Em muitos casos, os substratos apresentam sítios de protonação e, considerando as particularidades dos ambientes disponibilizados por sítios ativos, os valores de pK_a dos equilíbrios ácido/base de um dado substrato quando ligado a um sítio enzimático são distintos àqueles em meio aquoso puro. Nesse sentido, é de interesse da comunidade acadêmica mimetizar as mudanças de pK_a induzidas por enzimas através do estudo de equilíbrios ácido/base de sondas orgânicas em diversos sistemas supramoleculares, englobando micelas, polímeros e macrociclos.

Assim, inspirando-se em sistemas biológicos, buscou-se avaliar a habilidade de um calixareno aniônico funcionalizado com grupos sulfonato no anel superior, o *p*-sulfonatocalix[4]areno (SC4), em alterar os valores de pK_a de dissociação ácida de uma sonda orgânica, a 4-(2-piridilazo)-*N,N*-dimetil anilina (PADA), Figura C1, bem como determinar as constantes de associação das diferentes espécies de PADA a SC4.

Figura C1 – Estruturas de SC4 e PADA.



SEÇÃO EXPERIMENTAL

Materiais. *p*-Sulfonatocalix[4]areno (SC4) foi sintetizado conforme descrito na literatura,¹ e a sonda PADA foi obtida comercialmente.

Titulações espectrofotométricas. Foram realizados basicamente dois tipos de titulações espectrofotométricas, utilizando um espectrofotômetro Cary50 da Varian, a fim de investigar os múltiplos equilíbrios de protonação e associação envolvendo PADA e SC4: (i) titulações variando a concentração de SC4, com [PADA] e pH constantes, e (ii) titulações em função do pH com [PADA] e [SC4] constantes. Em ambos os casos, o pH das soluções foi ajustado com adição de HCl e NaOH, a fim de evitar a adição de tampões que podem competir com PADA pela ligação a SC4.

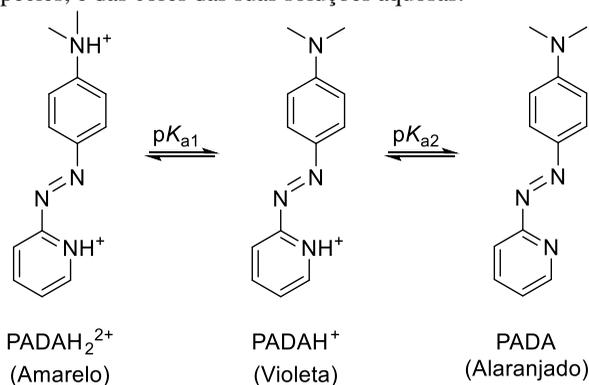
Análises de RMN ¹H. A ligação de PADA a SC4 também foi avaliada por RMN ¹H, sendo obtidos espectros em D₂O a 750 MHz, no Centro de Apoio Científico-Tecnológico (CACTUS), da Universidade de Santiago de Compostela/Espanha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se observa no Esquema C1, o PADA possui dois sítios de protonação, a saber, os átomos de nitrogênio do anel piridínico e do substituinte dimetil amina, e dada a conjugação eletrônica entre o os anéis aromáticos e o grupo azo, PADA possui elevada absorvidade molar em meio aquoso, apresentado soluções com cores bastante distintas dependendo do pH. Assim, primeiramente realizou-se uma titulação espectrofotométrica de maneira a conhecer os espectros UV/Vis das

diferentes espécies de PADA em meio aquoso, bem como para confirmar os valores de pK_a na ausência do macrociclo.

Esquema C1 – Equilíbrios de protonação de PADA em meio aquoso, designação das suas espécies, e das cores das suas soluções aquosas.



A Figura C2 apresenta o conjunto de espectros de soluções aquosas de PADA em função do pH, bem como os valores de absorvância nos comprimentos de onda de 466 e 556 nm, e o Esquema C1 acima apresenta os equilíbrios de protonação de PADA em meio aquoso com a designação das espécies de PADA. As espécies diprotonada e neutra de PADA geram soluções aquosas com cores semelhantes, sendo amarela para PADAH_2^{2+} , e alaranjada para PADA, absorvendo ambas fortemente em 466 nm, ao passo que a espécie PADAH^+ gera uma solução de cor violeta intensa, apresentando uma banda com máximo em 556 nm.

As linhas sólidas na Figura C2(B) representam ajustes segundo um modelo de ácido diprótico, que forneceram os valores de pK_{a1} e pK_{a2} de 1,46 e 4,12, respectivamente, consistentes com valores da literatura.² Nota-se que a acidez do piridínio é menor em comparação à do substituinte dimetilamônio devido à interação intramolecular do próton do piridínio com o nitrogênio do grupo azo através de um anel de cinco membros.² A Figura C3 apresenta a distribuição de espécies de PADA de acordo com os valores de pK_a obtidos.

Figura C2 – (A) Espectros UV/Vis de soluções aquosas de PADA $1,93 \times 10^{-5}$ M em função do pH, a 25°C. As setas indicam a variação da intensidade de absorbância das bandas com o aumento do pH. (B) Variações de absorbância em função do pH nos comprimentos de onda de 466 e 556 nm.

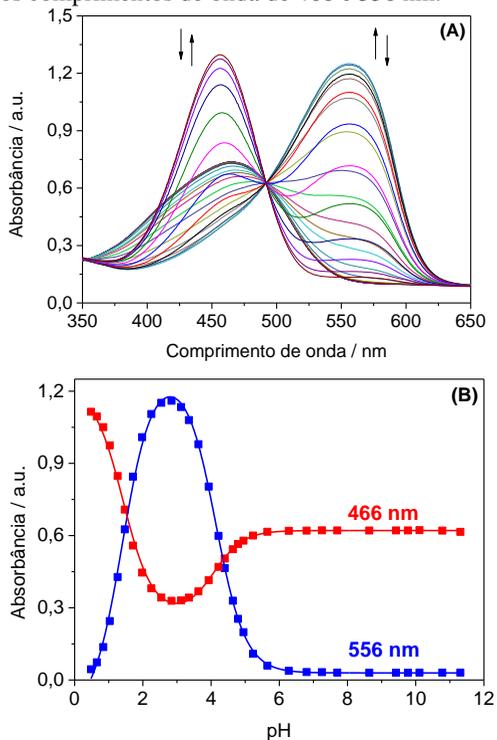
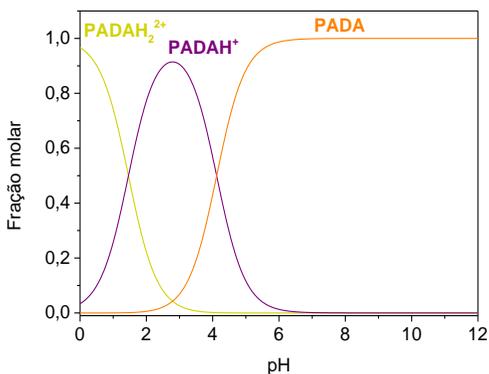
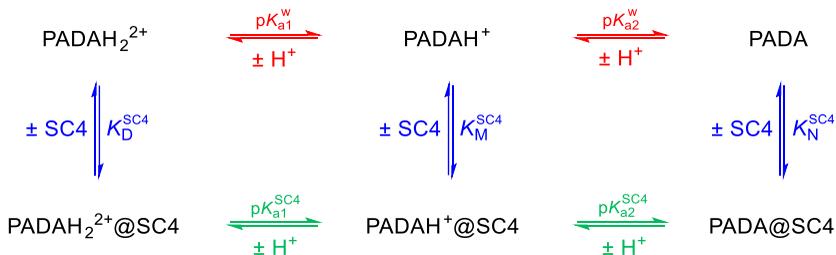


Figura C1 – Gráficos de distribuição das espécies de PADA em função do pH, a 25°C.



Dada a presença de cargas negativas em SC4, é esperado que os valores de pK_a de PADA sejam maiores quando a sonda encontra-se associada ao calixareno, e que as distintas espécies de PADA devem associar-se a SC4 com constantes de ligação diferentes. Ressalta-se que SC4 isoladamente também apresenta equilíbrios de dissociação dos prótons dos grupos $-OH$ do anel inferior, com valores reportados de $pK_{a1} = 3,28$ e $pK_{a2} = 11,50$.³ No entanto, a ionização no anel inferior de SC4 pode ser negligenciada no estudo da interação entre as três espécies de PADA e o macrocilo, sendo a mesma aproximação utilizada por outros autores⁴ em sistemas semelhantes, já que a geração de cargas negativas no anel inferior é consideravelmente distante do centro da cavidade do calixareno quando em sua conformação de cone e, portanto, também da molécula hóspede em um complexo de estequiometria 1:1. Assim, o Esquema C2 descreve os equilíbrios ácido/base e de associação esperados para PADA na presença de SC4 em meio aquoso, juntamente com a designação das constantes de acidez e de associação de cada espécie.

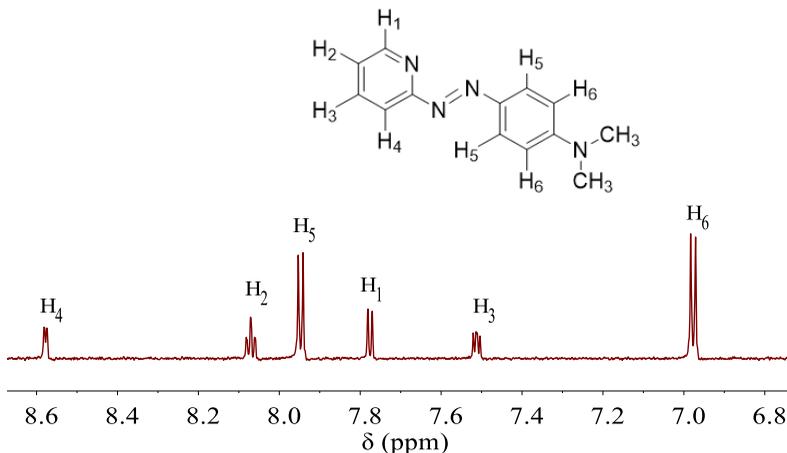
Esquema C2 – Equilíbrios de protonação de PADA e equilíbrios de associação de suas distintas espécies a SC4.



No Esquema C2, os valores de pK_a em meio aquoso já são conhecidos (conforme determinados acima, e de acordo com a literatura²). Para detalhar os demais equilíbrios, planejou-se uma série de titulações espectrofotométricas para determinar com segurança as demais constantes, conforme descrito adiante.

Antes, porém, ressalta-se que a associação de PADA ao SC4 foi confirmada através de RMN ^1H em D_2O e pD 11,0. O pD elevado foi escolhido por ser suficientemente distante dos valores de pK_a da sonda, de modo que se garante a presença somente da espécie neutra, tanto na fração livre quanto na fração associada ao calixareno. A Figura C4 mostra um espectro de RMN ^1H de PADA em D_2O em pD 11,0 e o assinalamento de seus prótons, consistente com a integral e a multiplicidade, e com base na literatura.⁵

Figura C2 – Espectro de RMN ^1H (750 MHz) de PADA em D_2O em pD 11,0 e 25°C .



A Figura C5 apresenta um conjunto de espectros obtidos em pD 11,0, sendo o espectro inferior na ausência de SC4 (correspondendo ao espectro da Figura C4), e os demais espectros foram obtidos com quantidades crescentes do calixareno. Observa-se na Figura C5 um deslocamento para campo alto dos hidrogênios de PADA com o aumento da concentração de SC4, sendo o maior deslocamento para H₆, confirmando a associação de PADA ao calixareno. A Figura C6 apresenta os valores de deslocamento de H₆ em função da [SC4], que formam uma isoterma de associação típica.

Figura C5 – Espectros de RMN ^1H (750 MHz) de PADA ($6,61 \times 10^{-5}$ M) na ausência (espectro inferior) e presença de diferentes concentrações de SC4, conforme indicado na figura, em D_2O , em pD 11,0, a 25°C . O assinalamento de H_6 está de acordo com a estrutura da Figura C4.

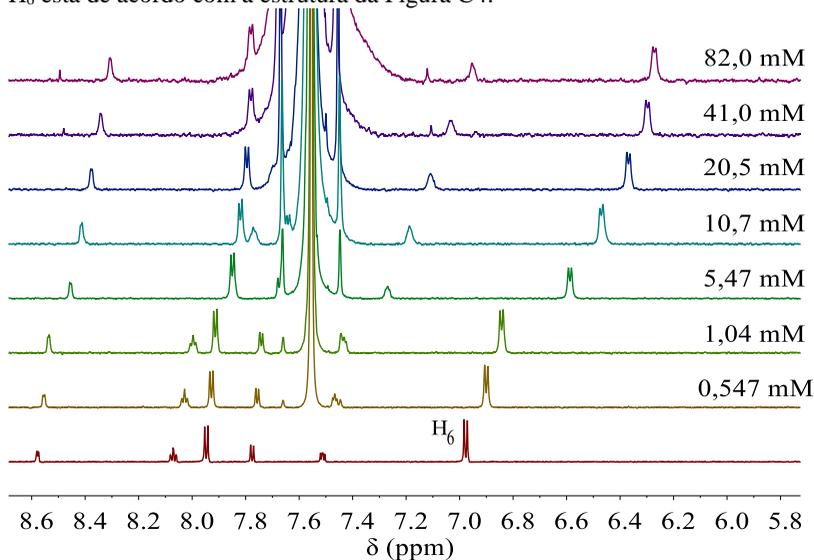
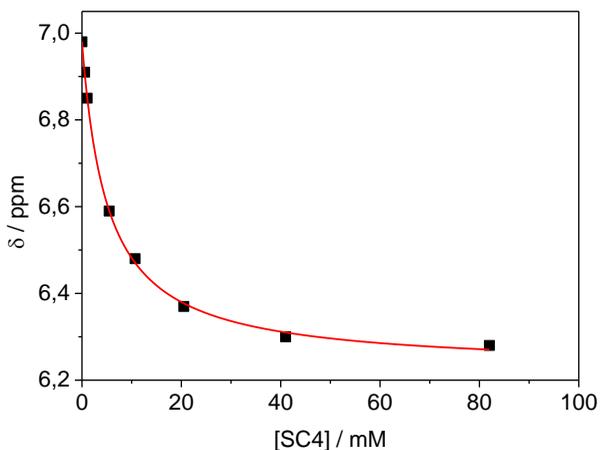


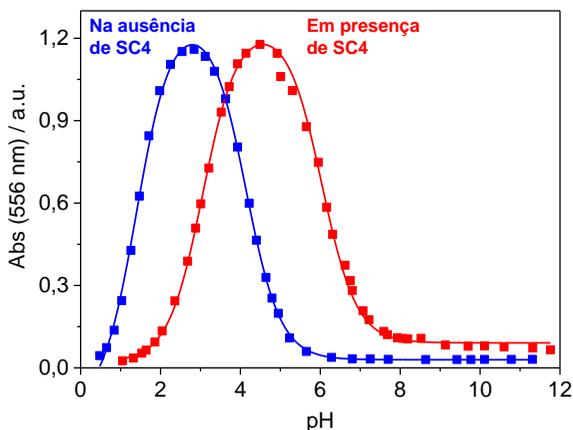
Figura C6 – Valores de deslocamento químico de H_6 de PADA ($6,61 \times 10^{-5}$ M) em função da concentração de SC4, em D_2O , pD 11,0 e 25°C .



Em meio alcalino, considerando que o complexo formado envolve um macrociclo negativamente carregado e uma sonda neutra, é possível que haja também a ligação do contra-íon sódio com a consequente formação de um complexo ternário através de um mecanismo cooperativo-competitivo, conforme reportado na literatura para o SC4.⁶ Já que em valores de pH menores que 8,0, a protonação de PADA deve passar a ser importante, e a formação de complexos ternários envolvendo dois cátions não deve ocorrer significativamente nessa faixa de pH, de maneira que os dados da Figura C6 tem como propósito fundamental comprovar a associação de PADA a SC4. Assim, a determinação das constantes de equilíbrio e associação do Esquema C2 será realizada através do tratamento quantitativo de dados de titulações espectrofotométricas, conforme descrito abaixo.

Os valores de pK_a da sonda quando associada ao calixareno (pK_{a1}^{SC4} e pK_{a2}^{SC4}) podem ser determinados através de uma titulação espectrofotométrica, obtendo-se o espectro UV/Vis de soluções de PADA $1,93 \times 10^{-5}$ M em presença de 10 mM de SC4 em diferentes valores de pH. Mais especificamente, a Figura C7 apresenta os valores de absorbância de PADA em 556 nm em função do pH, comparado ao mesmo perfil obtido na ausência de SC4.

Figura C7 – Valores de absorbância em 556 nm em função do pH de soluções aquosas de PADA $1,93 \times 10^{-5}$ M na ausência e presença de SC4 10 mM, a 25°C. O perfil na ausência de SC4 corresponde àquele da Figura C2(B).



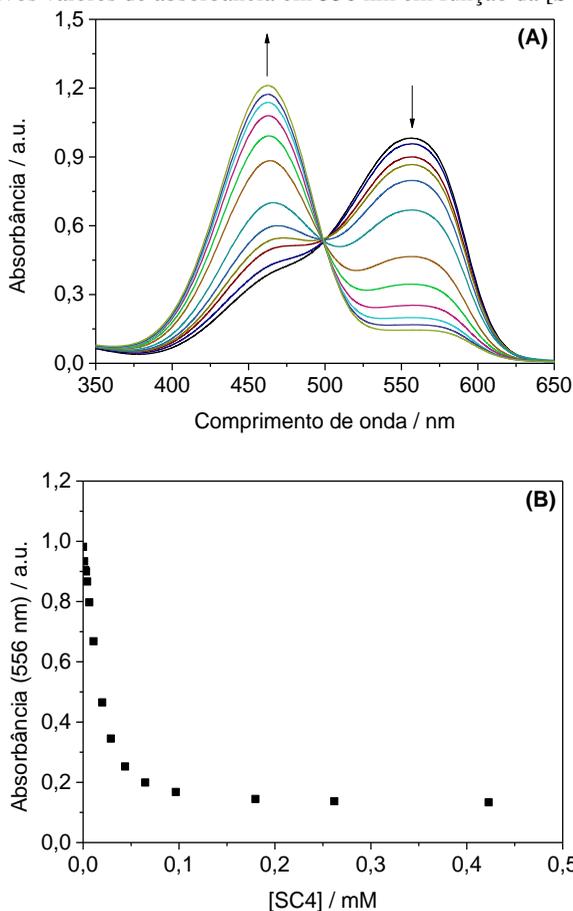
A Figura C7 mostra um comportamento semelhante para os equilíbrios de PADA em meio aquoso quando isoladamente ou quando

associado ao SC4, e o ajuste da curva de Abs vs. pH obtida em presença de 10 mM de SC4 para um sistema de ácido diprótico permite obter os valores de $pK_{a1}^{SC4} = 3,02 \pm 0,02$ e $pK_{a2}^{SC4} = 6,07 \pm 0,03$. Em comparação com os respectivos valores em água, tais dados indicam deslocamentos positivos de 1,56 e 1,95 para o primeiro e segundo equilíbrios de dissociação ácida, respectivamente. Assim, conclui-se que SC4 afeta consideravelmente os equilíbrios de protonação de PADA devido às cargas negativas dos grupos sulfonato, que estabilizam as espécies diprotonada e monoprotionada de PADA.

Uma vez conhecidos todos os valores de pK_a , as demais constantes apresentadas no Esquema C2 podem ser determinadas. Para isso, pode-se avaliar como são alterados os espectros UV/Vis de PADA em função da concentração de SC4 em pH fixo. Essa abordagem pode ser compreendida através de uma comparação dos valores de absorbância da Figura C7 na ausência e presença de SC4 para um valor fixo de pH. Em pH ~ 2 , por exemplo, a absorbância é $\sim 1,0$ na ausência do macrociclo, e espera-se que a sua adição deva promover uma diminuição gradual até alcançar o valor de $\sim 0,12$ quando em presença de 10 mM.

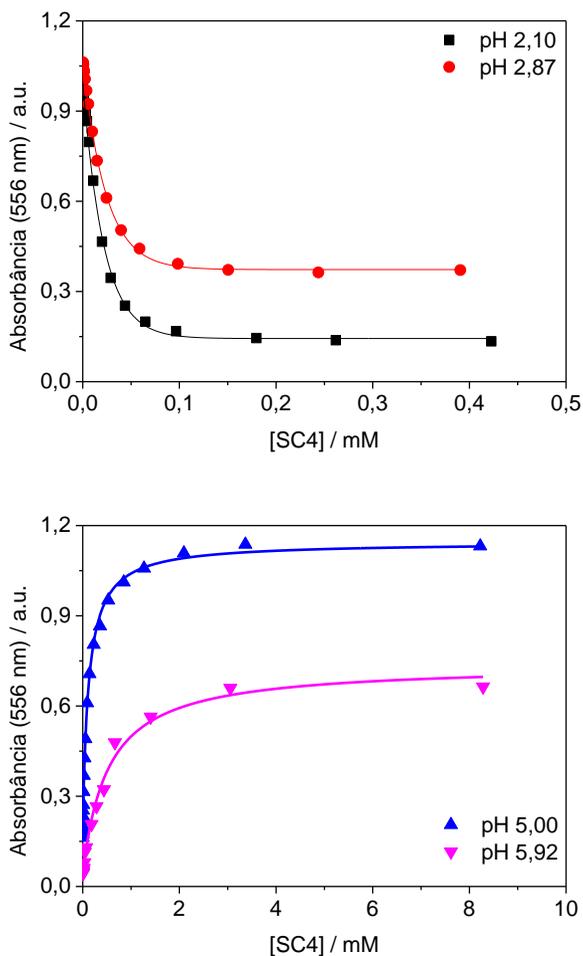
De fato, a Figura C8 ilustra um exemplo de experimento realizado em pH 2,10, em que foram obtidos espectros UV/Vis em função da adição de calixareno, e os dados de absorbância em função da [SC4] mostram um perfil típico de saturação. Assim, a Figura C8 ilustra que a adição do macrociclo promove uma alteração na distribuição das espécies de PADA em pH 2,10 devido à diferença de valores de pK_a de PADA quando na fase aquosa e quando complexado com SC4, diminuindo a fração da espécie monoprotionada e favorecendo a presença da espécie diprotonada.

Figura C8 – (A) Espectros UV/Vis representativos de soluções aquosas de PADA ($1,93 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função da concentração de SC4, em pH 2,10 e 25°C, e (B) respectivos valores de absorvância em 556 nm em função da [SC4].



Assim, foram realizadas ao total quatro titulações em função da concentração de SC4 em pHs distintos, e a Figura C9 apresenta os valores de absorvância em 556 nm vs. [SC4] nos pHs de 5,92; 5,00; 2,87 e 2,10. As linhas sólidas representam ajustes considerando as espécies presentes em cada pH, bem como a competição das espécies de PADA com os íons H_3O^+ e Na^+ pela associação ao macrociclo. Os ajustes foram realizados utilizando-se o software DynaFit,⁷ que realiza os ajustes iterativos após deduzir as equações diferenciais para descrever sistemas em reação e/ou em equilíbrio.

Figura C9 – Valores de absorvância em 556 nm de soluções aquosas de PADA ($1,93 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função da [SC4], em diferentes pHs, a 25°C.

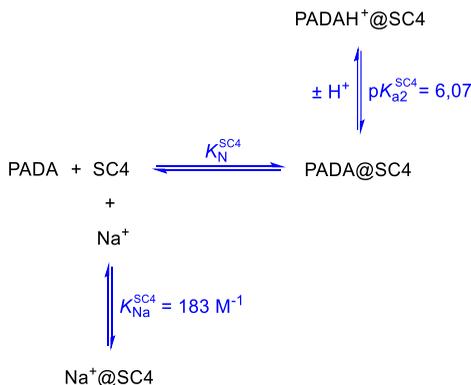


Será exemplificado a seguir o procedimento para a realização dos ajustes utilizando os dados de pH 5,92 (Figura C9). A seguir, serão apresentados e discutidos os valores globais obtidos.

Em pH 5,92, PADA encontra-se exclusivamente como a espécie neutra em água, de maneira que o aumento da absorvância em 556 nm nesse pH descreve a associação da espécie neutra seguida de sua protonação. Nesse pH, as concentrações das espécies diprotonada de

PADA e do íon H_3O^+ são negligenciáveis, e é necessário considerar somente a competição de PADA com Na^+ pela associação ao SC4. A formação do complexo $\text{Na}@SC4$ foi investigada anteriormente, e a constante de associação reportada é $K_{\text{Na}}^{\text{SC4}} = 183 \text{ M}^{-1}$.⁸ O Esquema C3 resume o panorama descrito, com base no qual ajustou-se o perfil em pH 5,92, utilizando-se os valores conhecidos para $K_{\text{Na}}^{\text{SC4}}$ e $pK_{\text{a}2}^{\text{SC4}}$, e obteve-se o valor de $K_{\text{N}}^{\text{SC4}} = 637 \text{ M}^{-1}$.

Esquema C3 – Associação de PADA a SC4, e competição com Na^+ .



Os ajustes dos dados nos outros pHs (Figura C9) foram realizados de modo semelhante, considerando a presença das diferentes espécies de PADA em cada condição, bem como de Na^+ e H_3O^+ . Utilizando os dados obtidos em cada ajuste, bem como as relações expressas pelas equações C1 e C2, deduzidas a partir do Esquema C2, foram obtidos $K_{\text{M}}^{\text{SC4}} = 5,67 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $K_{\text{D}}^{\text{SC4}} = 2,06 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

$$K_{\text{M}}^{\text{SC4}} = \frac{K_{\text{a}2}^{\text{w}} K_{\text{N}}^{\text{SC4}}}{K_{\text{a}2}^{\text{SC4}}} \quad (\text{C2})$$

$$K_{\text{D}}^{\text{SC4}} = \frac{K_{\text{a}1}^{\text{w}} K_{\text{M}}^{\text{SC4}}}{K_{\text{a}1}^{\text{SC4}}} \quad (\text{C3})$$

As constantes de associação e acidez obtidas estão sumarizadas na Tabela C1, onde se pode observar que os valores das constantes de dissociação ácida das espécies protonadas de PADA diminuem (portanto, os valores de pK_{a} aumentam) quando a sonda encontra-se ligada a SC4,

conforme discutido anteriormente, e que os valores das constantes de associação seguem a ordem $K_D^{SC4} > K_M^{SC4} > K_N^{SC4}$. Esse comportamento é esperado, já que as interações eletrostáticas das cargas negativas dos grupos sulfonatos devem ser maiores com o dicátion de PADA em comparação com o monocatión. Por fim, a espécie neutra liga-se mais fracamente ao calixareno, já que a ligação deve ser governada majoritariamente por efeito hidrofóbico.

Tabela C1 – Valores das constantes de associação das espécies de PADA a SC4, e valores das constantes de dissociação ácida em água e quando complexado a SC4.

Equilíbrios de protonação		Equilíbrios de associação	
pK_{a1}^W	1,46	K_D^{SC4} / M^{-1}	$2,06 \times 10^6$
pK_{a2}^W	4,12	K_M^{SC4} / M^{-1}	$5,67 \times 10^4$
pK_{a1}^{SC4}	3,02	K_N^{SC4} / M^{-1}	637
pK_{a2}^{SC4}	6,07		

CONCLUSÕES

O calixareno SC4 possui a habilidade de alterar os equilíbrios de dissociação ácida da sonda PADA através de interações intermoleculares. A ligação do PADA ao SC4 foi evidenciada por RMN 1H , através do deslocamento para campo alto dos hidrogênios da sonda, e os múltiplos equilíbrios envolvidos, de protonação e de associação, foram investigados através de espectrofotometria UV/Vis, já que as diferentes espécies de PADA absorvem em comprimentos de onda distintos. Foram observados deslocamentos positivos para pK_{a1} e pK_{a2} de $\sim 1,5$ e $\sim 2,0$, respectivamente, e as constantes de associação das espécies diprotonada, monoprotonada e neutra de PADA estão na faixa de ~ 600 a $\sim 10^6 M^{-1}$, aumentando juntamente com o número de cargas positivas na sonda.

REFERÊNCIAS

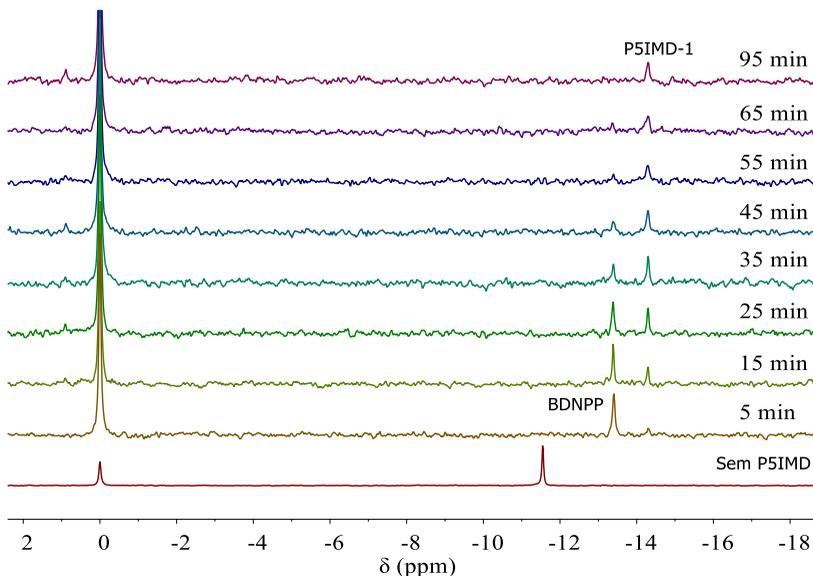
(1) FRANCISCO, V.; BASILIO, N.; GARCÍA-RÍO, L. Counterion Exchange as a Decisive Factor in the Formation of Host:Guest Complexes by *p*-Sulfonatocalix[4]Arene. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 7, p. 5308-5315, 2012.

- (2) FERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-RÍO, L.; MEJUTO, J. C.; PARAJÓ, M. Determination of Pyridine-2-Azo-*p*-Dimethylaniline Acidity Constants by Spectra Resolution Methodology. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 4-5, p. 1102-1106, 2007.
- (3) SUGA, K.; OHZONO, T.; NEGISHI, M.; DEUCHI, K.; MORITA, Y. Effect of Various Cations on the Acidity of *p*-Sulfonatocalixarenes. **Supramolecular Science**, v. 5, n. 1-2, p. 9-14, 1998.
- (4) BAKIRCI, H.; KONER, A. L.; SCHWARZLOSE, T.; NAU, W. M. Analysis of Host-Assisted Guest Protonation Exemplified For *p*-Sulfonatocalix[4]Arene - Towards Enzyme-Mimetic pK_a Shifts. **Chemistry – A European Journal**, v. 12, n. 18, p. 4799–4807, 2006.
- (5) GIORDANI, S.; CEJAS, M. A.; RAYMO, F. M. Photoinduced Proton Exchange between Molecular Switches. **Tetrahedron**, v. 60, n. 48, p. 10973–10981, 2004.
- (6) FRANCISCO, V.; BASÍLIO, N.; GARCÍA-RÍO, L. Ionic Exchange in *p*-Sulfonatocalix[4]Arene-Mediated Formation of Metal–Ligand Complexes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 17, p. 4710–4716, 2014.
- (7) KUZMIČ, P. Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase. **Analytical Biochemistry**, v. 237, n. 2, p. 260–273, 1996.
- (8) FRANCISCO, V.; PIÑEIRO, A.; NAU, W. M.; GARCÍA-RÍO, L. The “True” Affinities of Metal Cations to *p*-Sulfonatocalix[4]Arene: A Thermodynamic Study at Neutral pH Reveals a Pitfall Due to Salt Effects in Microcalorimetry. **Chemistry – A European Journal**, v. 19, n. 52, p. 17809–17820, 2013.

ANEXO A – DADOS DE RMN ^{31}P

A Figura 1 apresenta os espectros sucessivos de RMN ^{31}P , obtidos por Liz e colaboradores,¹ referentes à cinética de P5IMD com BDNPP.

Figura 1 – Espectros sucessivos de RMN ^{31}P de BDNPP na reação com P5IMD em diferentes intervalos de tempo, conforme indicado na figura. Condições: $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 70:30 (v/v), pD 9,5, 25°C.¹



1. LIZ, D. G. **Efeito Supramolecular de Macrociclos Na Degradação de Ésteres de Fosfato**. 2017. 133 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2017.

LISTA DE PUBLICAÇÕES DE 2014–2018

1. WANDERLIND, E. H.; LIZ, D. G.; GEROLA, A. P.; AFFELDT, R. F.; NASCIMENTO, V.; BRETANHA, L. C.; MONTECINOS, R.; GARCIA-RIO, L.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Imidazole-Functionalized Pillar[5]arenes: Highly Reactive and Selective Supramolecular Artificial Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 4, p. 3343-3347, 2018.
2. WANDERLIND, E. H.; BITTENCOURT, C. R.; MANFREDI, A. M.; GEROLA, A. P.; SOUZA, B. S.; FIEDLER, H.; NOME, F. Cu(II)-Catalyzed Hydrolysis of tris-2-Pyridyl Phosphate Assisted by Sodium Dodecyl Sulfate Micelles. **Journal of Physical Organic Chemistry**, 2018; e3837. DOI: 10.1002/poc.3837.
3. GEROLA, A. P.; WANDERLIND, E. H.; GOMES, Y. S.; GIUSTI, L. A.; GARCIA-RIO, L.; NOME, R.; KIRBY, A. J.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Supramolecular Polymer/Surfactant Complexes as Catalysts for Phosphate Transfer Reactions. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 3, p. 2230-2239, 2017.
4. SOUZA, B. S.; MORA, J. R.; WANDERLIND, E. H.; CLEMENTIN, R. M.; GESSER, J. C.; FIEDLER, H. D.; NOME, F.; MENGER, F. Transforming a Stable Amide into a Highly Reactive One: Capturing the Essence of Enzymatic Catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 19, p. 5345-5348, 2017.
5. ALMERINDO, G. I.; BUENO, P.; NICOLAZI, L. M.; WANDERLIND, E. H.; SANGALETTI, P.; LANDI, S. M.; SENA, L. A.; ARCHANJO, B. S.; ACHETE, C. A.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Propanolysis of Methyl Paraoxon in the Presence of Aluminum-Titanate-Supported Erbium Oxide. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 39, p. 22323-22329, 2016.
6. MANFREDI, A. M.; DEMOS, W.; WANDERLIND, E. H.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C.; SOUZA, B. S.; NOME, F. Rapid cleavage of phosphate triesters by the oxime 2-(hydroxyimino)-*N*-phenyl-acetamide. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 600-603, 2016.
7. WANDERLIND, E. H.; ORTH, E. S.; MEDEIROS, M.; SANTOS, D. M. P. O.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Aqueous Micelles as Catalytic Nanoreactors for Dephosphorylation Reactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 12, p. 2385-2391, 2014.
8. WANDERLIND, E. H.; MEDEIROS, M.; SOUZA, B. S.; FIEDLER, H.; NOME, F. Recent Advances on the Decomposition of Neurotoxic Phosphorous Triesters. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 632-652, 2014.