



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Bruno Surdi Oliveira

**Investigação do mecanismo de clivagem de amidas: catálise  
bifuncional**

Florianópolis

2019

Bruno Surdi Oliveira

**Investigação do mecanismo de clivagem de amidas: catálise  
bifuncional**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Affeldt

Coorientador: Dr. Leandro Scorsin

Florianópolis

2019

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

Surdi Oliveira , Bruno  
Investigação do mecanismo de clivagem de amidas :  
catálise bifuncional / Bruno Surdi Oliveira ;  
orientador, Ricardo Ferreira Affeldt, coorientador,  
Leandro Scorsin, 2019.  
142 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Catálise Bifuncional. 3. Clivagem de  
Amidas. 4. Catálise Intramolecular. 5. Cinética química. I.  
Ferreira Affeldt, Ricardo . II. Scorsin, Leandro. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Química. IV. Título.

Bruno Surdi Oliveira

**Investigação do mecanismo de clivagem de amidas: catálise  
bifuncional**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.<sup>a</sup> Michelle Medeiros, Dra.  
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Josiel Domingos, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Adriana Passarella Gerola, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão  
que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em química.

---

Prof. Marcus Mandolesi Sá, Dr.  
Coordenador do Programa

---

Prof. Ricardo Ferreira Affeldt, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 19 de setembro de 2019.

Em memória de meu mentor Faruk Nome e de minha amada avó Amabile Surdi.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Juares e Salete e irmão Victor, meus exemplos de vida, honestidade, trabalho e carinho. Agradeço não só por tudo o que vocês fizeram/fazem, mas sim por terem insistido e por terem visto um futuro dentro de mim, por nunca terem desistido e nunca pouparam esforços para que seus filhos pudessem estudar e ir além da graduação. Agradeço por sempre estarem ao meu lado, mesmo eu não sendo o melhor do mundo, vocês nunca me viraram as costas. Sou o que sou hoje por vocês e por mais ninguém. Aos outros membros da família que sempre estiveram ao meu lado e estavam torcendo por mim, agradeço imensamente também. Aos meus avós paternos e parentes, mesmo distantes, agradeço pelas orações que aposto que devo sempre estar incluso e pela torcida.

Um agradecimento especial ao professor e amigo Ricardo Ferreira Affeldt por ter embarcado comigo nesse projeto e por ter me aceito a ser seu primeiro aluno de pós-graduação. Agradeço pela orientação, pelo incentivo e pelo conhecimento passado. Todo o conhecimento adquirido no laboratório foi de grande importância para meu amadurecimento estudantil e profissional.

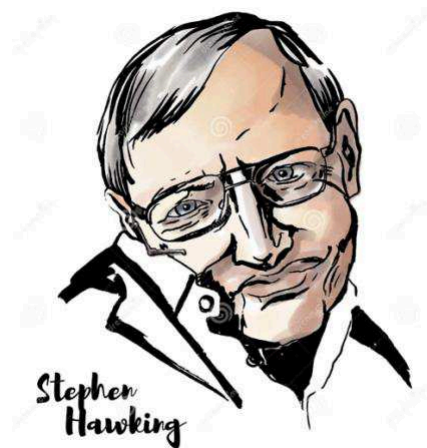
Às pessoas especiais do grupo LACFI do laboratório 312 e 203 que me acolheram nesse ano e sempre estiveram dispostos a me ajudar. Agradecimento especial ao Leandro Scorsin, meu coorientador e amigo, pelas conversas e pela ajuda ativa nesse projeto.

Agradeço à melhor pessoa desse mundo, Luan Felipe Sievers, pelo apoio, por ter lavado as louças enquanto eu escrevia a dissertação ou tinha que estudar e nunca esqueça que “you are my person”. Gostaria de agradecer a todos os meus amigos e colegas que fiz nesses anos de graduação e de pós, que me proporcionaram memórias incríveis, festas, parcerias e risadas. Vocês fazem parte de uma das frações mais importantes da minha vida e graças a vocês foi inesquecível. Aos queridos que sempre vou guardar comigo (e me matariam se eu não os incluísse aqui): Thamara, minha irmã de vida e de alma; Nathaly, uma pessoa incrível que eu quero sempre do meu lado; Catiunaiara, a mais maluquinha do lab e também a amizade mais sincera; Patrícia, a amiga com a melhor energia e positividade; MarianY, a migues das Europa e que eu sempre errava o nome (I miss you so much); e também ao Paulo, uma grande amizade que fiz esse ano. Nesse

momento não existem palavras para descrever o quanto sou grato a vocês. Enfim, fiquem sempre comigo, vamos ser amigos para todo o sempre. Obrigado.

Aos professores do curso de graduação e pós-graduação de química por todos os ensinamentos que recebi nesse período, e também aqueles que de algum modo transmitiram seu conhecimento e me ensinaram grande parte do que sei hoje.

Agradeço à UFSC pela infraestrutura e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de formação e por todos os funcionários, como cozinheiros do RU, agentes de limpeza e manutenção, funcionários da biblioteca, dentre outros que contribuem para a existência e continuidade desta instituição. Por fim, ao Governo Federal, CNPq e demais órgãos de fomento por fizeram possível a execução deste trabalho.



The greatest enemy of knowledge is not ignorance; It is the illusion of knowledge.



## RESUMO

As amidas apresentam grande importância sintética e biológica ocorrendo em muitos processos enzimáticos relacionados a formação de membranas celulares e estão presentes no mecanismo de ação de diversas drogas. As clivagens de amidas normalmente exigem condições rigorosas para ocorrer. A presença de grupos ácidos carboxílicos na estrutura da amida é um fato que auxilia este tipo de reação, acelerando assim a clivagem de amidas em sistemas intramoleculares. No presente trabalho foram estudadas as reações de clivagem dos ácidos ftalanílico (**PA**), 2-(benzamida)benzoico (**2BBA**), 2-carboxiftalanílico (**2CPA**), *N*-fenilnaftalanílico (**NPNA**) e *N*-Naftalantranílico (**NNAA**) com a finalidade de estudar o efeito do grupo ácido carboxílico na clivagem da amida. Para o **PA**, a forma neutra ( $k_1$ ) é clivada mais rapidamente que a forma aniônica ( $k_2$ ). Comprovou-se que a reação de clivagem ocorre de modo intramolecular e nesse sistema o grupo carboxilato desempenhou uma função não colaborativa para a reação. Para o **2CPA**, a forma aniônica **2CPA<sup>-</sup>** ( $k_2$ ) foi clivada mais rapidamente que a espécie neutra **2CPA** ( $k_1$ ) e ao diânion **2CPA<sup>2-</sup>** ( $k_3$ ). Isso se deve a espécie aniônica apresentar um grupo carboxilo e um carboxilato, agindo como um ácido geral e um nucleófilo, respectivamente. O perfil de sino, nos estudos de efeito do pH do meio, encontrado para **2CPA** é uma evidência de uma catálise bifuncional. O impressionante efeito catalítico (por exemplo, uma amida que quebra com um tempo de meia vida de 8 minutos) ocorre devido uma catálise bifuncional ácida/básica provida pelas duas entidades carboxilas, principalmente comparando-a com uma amida sem grupos carboxílicos, como a benzamida, onde a mesma reação não ocorre nas mesmas condições estudadas. A geometria das amidas otimizadas utilizando o nível de cálculo DFT-PCM/ $\omega$ B97X-D/6-311++G(d,p) possibilitou avaliar a relação entre o mecanismo da clivagem e parâmetros geométricos. Foram então obtidas as superfícies de energia potencial em função dos ângulos diedros formados entre os planos médios do anel aromático e o grupo amida, conseguindo assim desvendar alguns mistérios relacionados com o mecanismo de clivagem.

**Palavras-chave:** Clivagem de amida. Cinética química. Catálise bifuncional.

## ABSTRACT

Amides have great synthetic and biological importance occurring in many enzymatic processes related to the formation of cell membranes and it is present in the mechanism of action of several drugs. Amide cleavages usually require strict conditions to occur. The presence of carboxylic groups is a factor that helps this kind of reaction, thus accelerating the cleavage of amides in intramolecular systems. In this work it was studied the cleavage of phthalanilic acid (**PA**), 2-(Benzamido)benzoic acid (**2BBA**), 2-carboxy-phthalanilic acid (**2CPA**), *N*-Phenylnaphthalinic acid (**NPNA**) and *N*-Naphthalanthranilic acid (**NNAA**) to study the effect of the carbonylic group on amide cleavage. For **PA**, the neutral form ( $k_1$ ) is cleaved faster than the anionic form ( $k_2$ ). The cleavage reaction has been shown to occur in intramolecular way and in this system the carboxylate group played a non-collaborative function for the reaction. **2CPA**, unlike **PA**, the anionic form **2CPA<sup>-</sup>** ( $k_2$ ) was cleaved more rapidly than the neutral species **2CPA** ( $k_1$ ) and the dianionic species **2CPA<sup>2-</sup>** ( $k_3$ ). This is because the anionic species has a carboxyl group and a carboxylate acting as a general acid and a nucleophile, respectively. The bell profile in pH effect studies found for **2CPA** is an evidence of a bifunctional catalysis. The impressive catalytic effect (for example, an amide that cleaves with a half-life of 8 minutes) occurs due to a bifunctional acid/basic catalysis provided by the two carboxyl entities, mainly comparing it to a simple amide, in the absence of carboxylic groups, such as benzamide, where the same reaction does not occur under the same conditions studied. The optimized amide geometry using the DFT- PCM/ $\omega$ B97X-D/6-311++G(d,p) calculation level made it possible to evaluate the relationship between the cleavage mechanism and geometric parameters. The potential energy surfaces were then obtained as a function of the dihedral angles formed between the middle planes of the aromatic ring and the amide group, thus unraveling some mysteries related to the cleavage mechanism.

**Keywords:** Amide Cleavage. Chemical Kinetics. Bifunctional Catalysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação estrutural em relação a classificação das amidas.....	16
<b>Figura 2</b> – (a) Representação simplificada da síntese de proteínas por ribossomos; (b) Representação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos. ....	17
<b>Figura 3</b> – Principais compostos farmacêuticos que apresentam ligações amidas (A) benzilpenicilina; (B) lisinopril; (C) valsartana; e (D) diltiazem. ....	19
<b>Figura 4</b> – Esquema representativo de catálise do tipo ácida geral e específica. ....	22
<b>Figura 5</b> – Esquema representativo de catálise do tipo básica geral e específica. ....	23
<b>Figura 6</b> – Esquema representativo de catálise do tipo nucleofílica em ésteres de fosfato caracterizadas como reações do tipo intramolecular com o grupo carboxilato. (ABELL; KIRBY, 1983).....	24
<b>Figura 7</b> – Amidas que apresentam grupos carboxílicos e foram utilizados para estudos de reações de clivagem de amidas em sistemas intramoleculares; (1) ácido ftálico; (2) ácido <i>N</i> -metilmaleico; (3) triácido de Kemp. ....	29
<b>Figura 8</b> – Representação de uma protease HIV-1 com detalhe do sítio ativo com o substrato.....	30
<b>Figura 9</b> – Compostos usados por Souza e colaboradores para o estudo de clivagem de amidas.....	32
<b>Figura 10</b> – Constantes de velocidades observadas em primeira ordem ( $k_{obs}$ ) vs. pH para a decomposição dos compostos <b>4</b> e <b>5</b> em 35 °C (valores menores que pH 0 correspondem à função $H_0$ ). ....	33
<b>Figura 11</b> – Catálise bifuncional onde um grupo carboxilo está atuando como uma base geral. ....	34
<b>Figura 12</b> – Amidas estudadas por Morawetz e estados de protonação do composto <b>6</b> de acordo com seus valores de $pK_a$ .....	35
<b>Figura 13</b> – Constantes de velocidade de primeira ordem ( $\log k$ ) vs. pH para a decomposição dos compostos <b>6</b> , <b>7</b> e <b>9</b> em 25 °C. (MORAWETZ; ORESKES, 1958). ....	36
<b>Figura 14</b> – Representação esquemática das amidas e naftamidas obtidas. ....	38
<b>Figura 15</b> – Gráfico de absorvância para as espécies envolvidas na reação de clivagem do composto <b>2CPA</b> , a 25 °C e pH 3,5.....	48

<b>Figura 16</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das regiões de $\delta$ 14,4-10,9 ppm, dando ênfase à presença e ausência do hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio dos compostos <b>2CPA</b> e <b>2PIB</b> , respectivamente.....	49
<b>Figura 17</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das regiões de $\delta$ 180-153 ppm, dando ênfase aos carbonos carbonílicos dos compostos <b>PA</b> , <b>2BBA</b> e <b>2CPA</b> , respectivamente. ....	50
<b>Figura 18</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das regiões de $\delta$ 180-153 ppm, dando ênfase aos carbonos carbonílicos dos compostos <b>PA</b> e <b>2BBA</b> , respectivamente. ....	51
<b>Figura 19</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das regiões de $\delta$ 171-165 ppm, dando ênfase aos carbonos carbonílicos dos compostos <b>NPNA</b> e <b>NNAA</b> , respectivamente.....	52
<b>Figura 20</b> – Gráfico de absorvância vs. comprimento de onda para a reação de clivagem do composto <b>PA</b> , a 45 °C e pH 2,0.....	54
<b>Figura 21</b> – Gráfico das absorvâncias obtidas em 260 nm vs. tempo, na reação de clivagem do composto <b>PA</b> , a 45 °C e pH 2,0.....	54
<b>Figura 22</b> – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH 2,0-7,0 nas reações de clivagem do composto <b>PA</b> em água à 25 °C. ....	55
<b>Figura 23</b> – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH/pD 2,0-7,0 nas reações de clivagem de <b>PA</b> à 25 °C. ....	57
<b>Figura 24</b> – Gráfico das constantes de velocidade observadas em função do pH (2,0-5,0) nas reações de clivagem do composto <b>PA</b> de 25 à 55 °C. ....	58
<b>Figura 25</b> – Gráfico de absorvância vs. comprimento de onda para a reação de clivagem do composto <b>2CPA</b> , a 25 °C e pH 3,5.....	59
<b>Figura 26</b> – Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda 330 nm em função do tempo na reação de clivagem do composto <b>2CPA</b> , a 25 °C e pH 3,5. ....	60
<b>Figura 27</b> – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH 2,0-7,0 na reação de clivagem do composto <b>2CPA</b> à 25 °C.....	61
<b>Figura 28</b> – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH/pD nas reações de clivagem de <b>2CPA</b> à 25 °C.....	63
<b>Figura 29</b> – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH 2,0-5,0 nas reações de clivagem do composto <b>2CPA</b> de 25 à 55 °C.....	64
<b>Figura 30</b> – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH 2,0-7,0 nas reações de clivagem dos compostos <b>PA</b> e <b>2CPA</b> à 25 °C.....	65
<b>Figura 31</b> – Superfície de energia potencial para <b>2CPA-a</b> (esquerda) e <b>2CPA-b</b> (direita). A energia é dada em kcal.mol <sup>-1</sup> e é relativa à estrutura mais estável.....	67

<b>Figura 32</b> – Estruturas otimizadas com PCM/ $\omega$ B97X-D/6-311++G(d,p) do composto <b>2CPA</b> - em suas estruturas de mínimos locais e global. ....	68
<b>Figura 33</b> – Estrutura de mínimo global para o composto <b>2CPA-H<sub>2</sub>O</b> . ....	69
<b>Figura 34</b> – Coordenada intrínseca de reação (IRC) e as estruturas correspondentes dos estados de transição envolvidos na decomposição do <b>2CPA</b> - via N-protonação intramolecular. Os estados de transição estão localizados em 0 bohr. Os valores em parênteses são as energias livres de Gibbs. ....	72

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Representação de duas moléculas separadas inicialmente pelo solvente, gerando um complexo como intermediário e formando numa segunda etapa o produto. ....	27
<b>Esquema 2</b> – Representação da transferência intramolecular de hidreto em alcoxicetonas. ....	28
<b>Esquema 3</b> – Mecanismos propostos para a clivagem de peptídeos catalisados por protease HIV-1. (A) mecanismo de proteólise em uma única etapa; (B) mecanismo através da formação de um intermediário oxianion; e (C) mecanismo através de um intermediário diol geminal. (KRZEMIŃSLA; MOLINER; ŚWIDEREK, 2016; adaptado). ....	31
<b>Esquema 4</b> – Espécies relevantes envolvidas na reação de clivagem do ácido 2-carboxi- <i>N,N</i> -dietilnaftalâmico. ....	34
<b>Esquema 5</b> – Esquema geral de clivagem da ligação C-N em um grupo de amidas estudadas. ....	37
<b>Esquema 6</b> – Reação de síntese do <b>PA</b> a partir da formação do precursor <b>NPPI</b> . ....	42
<b>Esquema 7</b> – Reação de síntese do <b>2BBA</b> . ....	44
<b>Esquema 8</b> – Reação de síntese do <b>2CPA</b> . ....	45
<b>Esquema 9</b> – Reação de síntese do <b>NPNA</b> . ....	46
<b>Esquema 10</b> – Reação de síntese do <b>NNAA</b> . ....	47
<b>Esquema 11</b> – Representação dos estados de protonação da amida <b>PA</b> de acordo com o seu valor de pKa e suas constantes de equilíbrio e velocidade. ....	56
<b>Esquema 12</b> – Representação dos estados de protonação da amida <b>2CPA</b> de acordo com seu valor de pKa e as constantes cinéticas obtidas na reação de clivagem da ligação C-N. ....	62
<b>Esquema 13</b> – Espécies aniônicas do <b>2CPA</b> . ....	66
<b>Esquema 14</b> – Esquemas dos estados de transição e energias para a decomposição do <b>2CPA</b> - envolvendo uma molécula nucleofílica de água com a assistência simultânea de uma base geral e um ácido geral aos átomos de oxigênio (TS <sub>O-H<sub>2</sub>O</sub> ) ou nitrogênio (TS <sub>N-H<sub>2</sub>O</sub> ). ....	69
<b>Esquema 15</b> – Decomposição do <b>2CPA</b> - envolvendo um mecanismo em duas etapas. Para TS <sub>O-2a</sub> a referência é o mínimo global <b>2CPA</b> -, enquanto para TS <sub>O-2b</sub> a referência é <b>2CPA</b> -.H <sub>2</sub> O. ....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Esquemas comumente encontrados na literatura para síntese de amidas. Os produtos podem ser obtidos a partir dos (a) cloretos de ácidos; (b) anidridos; (c) ésteres; (d) rearranjo de aldoximas (KIM et al. 2009); e (e) hidratação de nitrilas (WU et al. 2014).....	18
<b>Tabela 2</b> – Valores de Molaridade Efetiva (ME) para reações que procedem por catálise intra e intermolecular realizadas por Kirby. (KIRBY, 1980).....	25
<b>Tabela 3</b> – Valores obtidos através do ajuste da Equação 6 e o equilíbrio acima para a reação de clivagem do <b>PA</b> .....	56
<b>Tabela 4</b> – Valores dos parâmetros de ativação obtidos pelo plot de Eyring para os valores de $k_1$ e $k_2$ . ....	58
<b>Tabela 5</b> – Valores obtidos através do ajuste da Equação 7 e o equilíbrio acima. ....	62
<b>Tabela 6</b> – Valores dos parâmetros de ativação obtidos pelo plot de Eyring. ....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**2CPP:** 2-Carboxifenil Fosfato

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**ME:** Molaridade Efetiva

**S<sub>N</sub>2:** Substituição Nucleofílica Bimolecular

**k<sub>obs</sub>:** Constante de Velocidade observada

**2CPA:** Ácido 2-carboxiftanílico

**2BBA:** Ácido 2-(Benzamida)benzoico

**PA:** Ácido Ftalanílico

**NNAA:** Ácido *N*-Naftalantranílico

**NPNA:** Ácido *N*-fenilnaftalanílico

**2NIBA:** Ácido 2-(1,8-naftalimido)benzoico

**LACFI:** Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais

**NPPI:** *N*-fenilftalimida

**2PIB:** Ácido 2-ftalimidobenzóico

**AA:** Ácido antranílico

**AP:** Anidrido ftálico

**λ:** Comprimento de onda

**k<sub>H</sub>:** Constante de velocidade observada utilizando H<sub>2</sub>O como solvente

**k<sub>D</sub>:** Constante de velocidade observada utilizando D<sub>2</sub>O como solvente

**EIS:** Efeito isotópico de solvente

**K<sub>a</sub>:** Constante de equilíbrio

**E<sub>0</sub>:** Energia de vibração zero

**RMN:** Ressonância nuclear magnética

**A<sub>0</sub>:** Absorvância inicial

**A<sub>∞</sub>:** Absorvância no infinito

**A<sub>t</sub>:** Absorvância final no tempo *t*

**t<sub>1/2</sub>:** Tempo de meia vida

**R:** Constante universal dos gases perfeitos

**k<sub>b</sub>:** Constante de Boltzmann

**h:** Constante de Planck

**2CPA-:** Espécie aniônica do Ácido 2-carboxiftanílico



**2CPA<sub>2</sub>**: Espécie dianiônica do Ácido 2-carboxiftanílico

**2CPA-a**: Primeira forma aniônica do Ácido 2-carboxiftanílico

**2CPA-b**: Segunda forma aniônica do Ácido 2-carboxiftanílico

**PA**: Espécie aniônica do Ácido Ftalanílico

**DFT**: Teoria do funcional da densidade

**PES**: Superfície de energia potencial

**PCM**: Modelo contínuo polarizável

**SMD**: Densidade do modelo de solvatação

**IRC**: Coordenada intrínseca de reação

**TS<sub>O-H<sub>2</sub>O</sub>**: Estado de transição com próton transferido ao átomo de oxigênio carbonil

**TS<sub>N-H<sub>2</sub>O</sub>**: Estado de transição com próton transferido ao átomo de nitrogênio

**INT1**: Intermediário 1 com estrutura do tipo lactona de 5 membros

**TS<sub>O-1</sub>**: Estado de transição da primeira etapa – formação da lactona

**TS<sub>O-2a</sub>**: Estado de transição da segunda etapa – anel de quatro membros

**TS<sub>O-2b</sub>**: Estado de transição da segunda etapa – anel de seis membros (assistência de H<sub>2</sub>O)

**TS<sub>N-1</sub>**: Estado de transição da primeira etapa – transferência de próton do ácido carboxílico para o nitrogênio da amida

**INT3**: Intermediário 3 com estrutura formada após a transferência do próton carboxílico para o nitrogênio da amida

**TS<sub>N-2</sub>**: Estado de transição da segunda etapa – quebra do INT3 para a formação dos produtos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	QUÍMICA DAS AMIDAS .....	16
1.1.1	<b>Síntese e obtenção das amidas</b> .....	<b>16</b>
1.1.2	<b>Uso de amidas para reações modelos para catálise enzimática</b> .....	<b>20</b>
1.2	CATÁLISE.....	21
1.2.1	<b>Catálise Intramolecular</b> .....	<b>24</b>
1.2.2	<b>Teoria Espaço Temporal</b> .....	<b>26</b>
1.3	APERFEIÇOAMENTO NA VELOCIDADE DE REAÇÃO DE CLIVAGEM DE AMIDAS.....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIAS.....	37
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1	EQUIPAMENTOS.....	39
3.2	METODOLOGIA .....	40
3.2.1	<b>Cinética Química</b> .....	<b>40</b>
3.2.2	<b>Cálculos Computacionais</b> .....	<b>41</b>
3.2.3	<b>Síntese dos substratos modelo</b> .....	<b>42</b>
3.2.3.1	Síntese do Ácido 2-[(Fenilamino)carbonil]benzóico ( <b>PA</b> ) .....	42
3.2.3.2	Síntese do Ácido 2-(Benzamido)benzóico ( <b>2BBA</b> ) .....	43
3.2.3.3	Síntese do Ácido 2-[(2-carboxibenzoil)amino]benzóico ( <b>2CPA</b> ).....	44
3.2.3.4	Síntese do ácido <i>N</i> -fenilnaftalanílico ( <b>NPNA</b> ).....	45
3.2.3.5	Síntese do ácido <i>N</i> -Naftalantranílico ( <b>NNAA</b> ).....	46
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>48</b>
4.1	DADOS ESPECTROSCÓPICOS QUE EVIDENCIAM MUDANÇAS ESTRUTURAIS.....	49
4.2	MEDIDAS CINÉTICAS .....	53

4.2.1	Reação de clivagem da amida PA.....	53
4.2.2	Reação de clivagem do 2CPA .....	59
4.3	CÁLCULOS COMPUTACIONAIS .....	65
4.3.1	Superfície de Energia Potencial .....	66
4.3.2	Análise dos Mínimos de Energia.....	67
4.3.3	Análise dos Intermediários e Estados de Transição .....	68
5	CONCLUSÃO .....	73
6	REFERÊNCIAS .....	76
	APÊNDICE .....	80



## 1 INTRODUÇÃO

As reações que englobam a transferência do grupamento acila abrangem uma série de compostos extremamente importantes dos pontos de vista sintético e biológico. As mesmas apresentam funções importantes nos organismos vivos, são encontradas em diversos processos enzimáticos relacionados a formação de membranas celulares, envolvendo a coenzima A, na hidrólise de proteínas e peptídeos, além de estarem presentes no mecanismo de ação de diversas drogas. Dentre os compostos que possuem grupamento acila, destacam-se as amidas.

As clivagens de amidas, normalmente, necessitam de condições rigorosas para ocorrer, como por exemplo a benzamida, que apresenta um tempo de meia vida de 3 horas numa temperatura de 85°C em 5,9% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os mecanismos envolvidos nas reações de clivagem de amidas já foram vastamente estudados e justamente devido a esse conhecimento e à grande importância biológica destes compostos, eles têm sido bastante utilizados em diversas pesquisas para elucidar os mecanismos de ação enzimática. Um fator que auxilia esse tipo de reação, diminuindo assim a complexidade exigida pela reação, é a presença de grupos carboxílicos, que são conhecidos por acelerarem a clivagem de amidas em sistemas intramolecular, como já reportado nos casos de proteases aspárticas, que são sistemas enzimáticos que operam via dois grupos carboxílicos, através de uma catálise bifuncional, incrementando até 10<sup>10</sup> na velocidade de reação. (KRZEMIŃSLA; MOLINER; ŚWIDEREK, 2016).

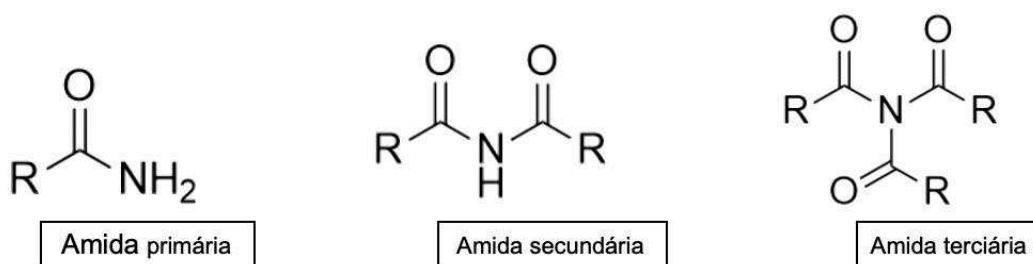
Esse campo de pesquisa para investigar os mecanismos de ações enzimáticas é de longa data estudado e utiliza os conhecimentos e ferramentas da química para o entendimento dos processos biológicos. O entendimento é geralmente alcançado com a utilização de modelos moleculares sintetizados em laboratório, possibilitando avaliar cada um dos diversos parâmetros variáveis que operam simultaneamente em um sistema biológico.

Nas próximas páginas será feita uma breve revisão sobre a química das amidas, mecanismos de clivagem do grupo acila, fatores que interferem na velocidade de clivagem e sobre reações intramoleculares como modelos não miméticos de catálise enzimática.

## 1.1 QUÍMICA DAS AMIDAS

As amidas compreendem a classe de derivados dos ácidos carboxílicos pela substituição do grupo hidroxila (-OH) pelo grupamento amino (-NH<sub>2</sub>). Sua classificação está relacionada com o número de grupos carbonil ligados ao grupo amino, sendo assim classificados quimicamente como amidas primárias, secundárias e terciárias (**Figura 1**). As amidas, assim como os ésteres, são abundantes em todos os organismos vivos em proteínas, ácidos nucleicos, dentre outros agentes farmacêuticos, que se deve a sua estabilidade nas condições aquosas encontradas nos organismos vivos. (MCMURRY; FAY, 2001).

**Figura 1** – Representação estrutural em relação a classificação das amidas.



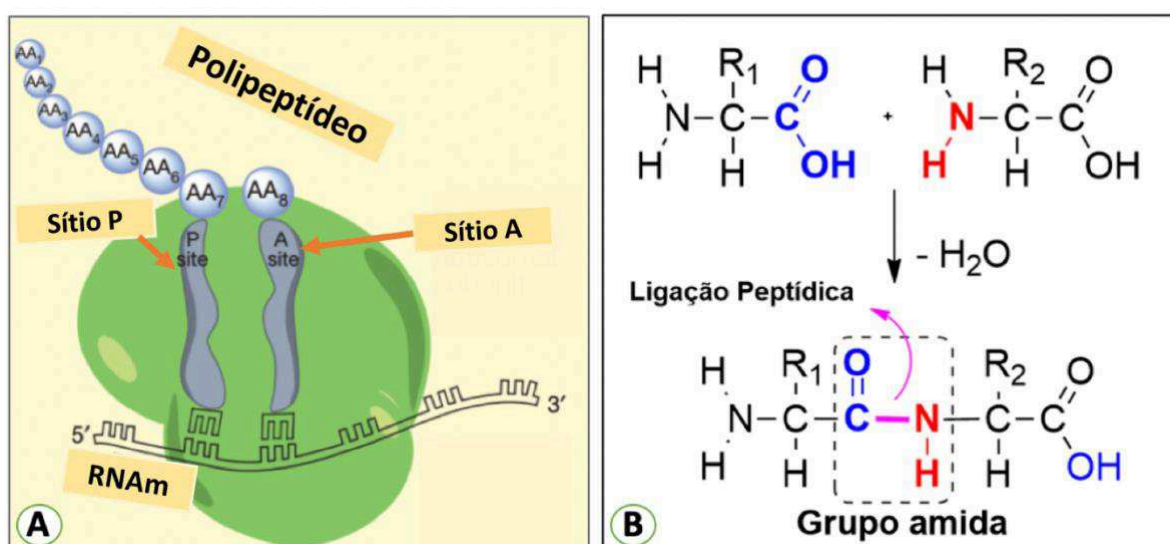
As mesmas são comumente encontradas na natureza e se destacam pela baixa reatividade em comparação com os outros derivados carboxílicos, pois formam ligações de hidrogênio altamente estáveis. (MCMURRY, 2011). Uma consequência disso são seus altos pontos de fusão e ebulição, uma vez que suas interações moleculares se tornam mais fortes devido a essas ligações. Por outro lado, amidas terciárias não formam ligações de hidrogênio e, portanto, tem pontos de fusão baixos (VALEUR; BRADLAY, 2009).

### 1.1.1 Síntese e obtenção das amidas

As amidas são encontradas em abundância na natureza como produtos naturais (KUNG et al. 2010), proteínas e em polímeros sintéticos (GLOMB; PFAHLER, 2001). Em seres vivos, muitas vezes a ligação química formada pelo grupo amida é produzida pelos ribossomos durante o processo de tradução na

síntese de proteínas na formação da ligação peptídica (**Figura 2**). Neste processo, as proteínas são montadas pela formação da ligação amida modelada através dos aminoácidos desprotegidos que se encontram nos sítios (A e P) vizinhos dentro do ribossomo. O sítio A representa o local que tem a finalidade de ser o ponto de entrada para o RNA transportador que irá parrear com o códon subsequente, enquanto o sítio P permite o alongamento do polipeptídeo pela formação de uma nova ligação peptídica entre o aminoácido presente no mesmo sítio com o aminoácido que se encontra no sítio A. (BODE; PATTABIRAMAN, 2011).

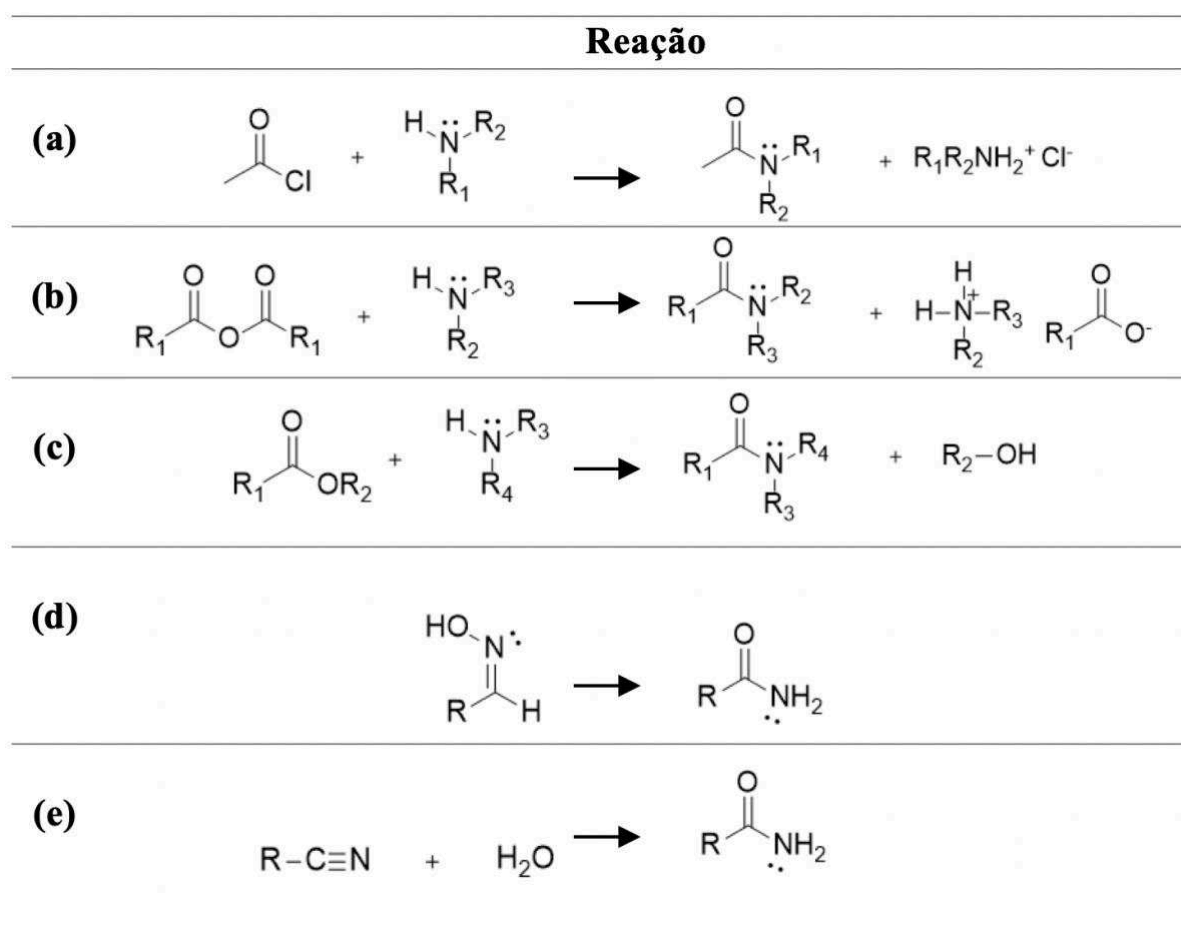
**Figura 2** – (a) Representação simplificada da síntese de proteínas por ribossomos; (BODE; PATTABIRAMAN, 2011). (b) Representação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos.



Devido essa ocorrência generalizada em modernos compostos ativos biologicamente, a formação da ligação química formada pelo grupo amida é normalmente esquecida como um desafio sintético na atualidade. Em contrapartida, os métodos existentes estão atingindo seus limites inerentes e a preocupação em relação aos tratamentos de seus resíduos e os altos custos para as sínteses das mesmas estão se agravando, pois devido a resistência de formação de amidas simples, há a necessidade do uso de reagentes exóticos e cada vez mais caros. (BODE; PATTABIRAMAN, 2011).

Os processos de síntese das amidas são de extrema importância, pois além de se tratar de uma espécie que é responsável pela conexão química de proteínas, as amidas são a base para muitos polímeros sintéticos amplamente utilizados e ainda essa reação de formação se encontra entre as mais executadas na química orgânica. (BODE; PATTABIRAMAN, 2011). Alguns métodos estão descritos na literatura para a síntese das amidas, como por exemplo, através de reações de aminas com o cloreto de acila, anidridos, ésteres, ou então através de rearranjo de aldoximas (KIM et al. 2009) e também através da hidratação de nitrilas (WU et al. 2014) como pode-se observar no **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Esquemas comumente encontrados na literatura para síntese de amidas. Os produtos podem ser obtidos a partir dos (a) cloretos de ácidos; (b) anidridos; (c) ésteres; (d) rearranjo de aldoximas (KIM et al. 2009); e (e) hidratação de nitrilas (WU et al. 2014).

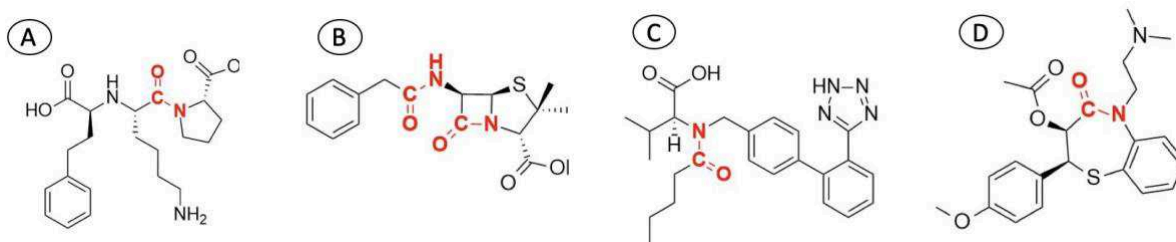




Em 2011 a acilação de aminas com ácidos carboxílicos ativados era a reação mais comum realizada no desenvolvimento de modernos farmacêuticos, contando com 16% de todas as reações. (BODE; PATTABIRAMAN, 2011). Esta e outras metodologias utilizadas para a reação de formação de amidas vem sendo frequentemente utilizadas na química medicinal. (BROWN; BOSTROM, 2015).

As funções amidas não estão apenas limitadas a sistemas biológicos, mas também são encontradas em uma vasta gama de moléculas sintéticas, incluindo diversos medicamentos comercializados. De acordo com os relatórios estatísticos das principais empresas farmacêuticas, aproximadamente 25% das drogas contêm uma unidade de ligação amida (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999). Muitos compostos farmacêuticos populares apresentam pelo menos uma ligação com o grupo amida, por exemplo, alguns fármacos como benzilpenicilina (penicilina G), um antibiótico de estreito espectro de ação (WRIGHT, 1999), o lisinopril, inibidor de enzima conversora de angiotensina, valsartana, bloqueio dos receptores de angiotensina-II, e diltiazem, bloqueador do canal de cálcio utilizado no tratamento da angina e hipertensão. (VALEUR; BRADLAY, 2009).

**Figura 3** – Principais compostos farmacêuticos que apresentam ligações amidas (A) benzilpenicilina; (B) lisinopril; (C) valsartana; e (D) diltiazem.



As amidas mais simples são solúveis em água e pouco solúveis em solventes apolares como o n-hexano. Em geral são bastante solúveis em éter. Possuem pontos de fusão e ebulição muito elevados, até mais que os dos ácidos carboxílicos de massas molares correspondentes. Possuem caráter básico muito fraco, sendo até mais fraco que o da água, pois o oxigênio do grupo carbonila atrai os elétrons para si, por conjugação, diminuindo a densidade eletrônica do nitrogênio.

As amidas não substituídas são amplamente usadas como intermediários industriais, solventes em sínteses orgânicas, preparação de medicamentos, estabilizadores, agentes de fabricação para plásticos, surfactantes, repelentes para insetos; também são utilizadas na fabricação do nylon. (BODE; PATTABIRAMAN, 2011).

Ainda, algumas classes de amidas são estudadas como modelos para simular algumas ações enzimáticas, com a finalidade de compreender o grande incremento nas velocidades causadas nas catalises enzimáticas.

### **1.1.2 Uso de amidas para reações modelos para catálise enzimática**

A ampla variedade de reações bioquímicas que envolvem a vida é, em sua maioria, mediada por uma série de fantásticos catalisadores biológicos conhecidos como enzimas. (VOET; VOET, 1995). Um dos grandes desafios da ciência natural sempre foi voltado ao entendimento exato de como as enzimas trabalham. Em certo ponto, pode-se compreender a catálise enzimática, como uma enzima que se liga ao substrato, estabilizando seletivamente o estado de transição para uma reação em particular. (FERSHT, 1985). Mas ao nível atual de entendimento não se encontra totalmente satisfatório no mais severo teste prático, na projeção e elaboração de sistemas enzimáticos artificiais com eficiência catalítica que simulem as enzimas naturais. Em sistemas biológicos, as reações químicas ocorrem em geral nos sítios ativos das enzimas, com especificidade e eficiência muito superior às encontradas para as mesmas reações em solução. Tal eficiência virou alvo de inúmeros estudos para desvendar os segredos mecanísticos envolvidos na catálise enzimática. No entanto, como enzimas são sistemas complexos, tem-se buscado sistemas alternativos tais como reações modelos, para que se possa obter uma maior compreensão do mecanismo de ação enzimática, como por exemplo o uso de algumas classes de amidas. (STRYER, 1979). (KIRBY, 1994).

Esses sistemas enzimáticos modelos surgiram da necessidade de estimar quantitativamente os fatores que são responsáveis pelo aumento na velocidade observado em reações enzimáticas comparados com análogos biomoleculares. Portanto, quanto maior a semelhança nas características físico-químicas dos modelos com as da enzima em questão, mais informações satisfatórias o modelo proporcionará.

São vários os modelos que simulam as mais diversas características das enzimas. Neste trabalho, foi abrangido modelos não miméticos que tentam imitar uma característica específica da ação enzimática. Tais modelos podem ser subdivididos em duas categorias: (i) aqueles que analisam a interação entre o substrato e a enzima no complexo enzima-substrato dando origem aos estudos dos compostos de inclusão formados essencialmente por ciclodextrinas e éteres coroa; (ii) os direcionados para os princípios físico-químicos que governam as reações no sítio ativo das enzimas, abordados mais frequentemente por reações intramoleculares. (GANDOUR, 1978).

Sendo essa segunda subdivisão o foco do trabalho, para maior envolvimento com reações intramolecular, a seguir será apresentado, de forma sucinta, as principais classes e subclasses de catálise que envolvem as amidas. De modo geral classificam-se de acordo com o número de fases: catálise heterogênea e homogênea. E ainda de acordo com a quantidade de moléculas que auxiliam na reação, sendo elas: catálise intermolecular e intramolecular.

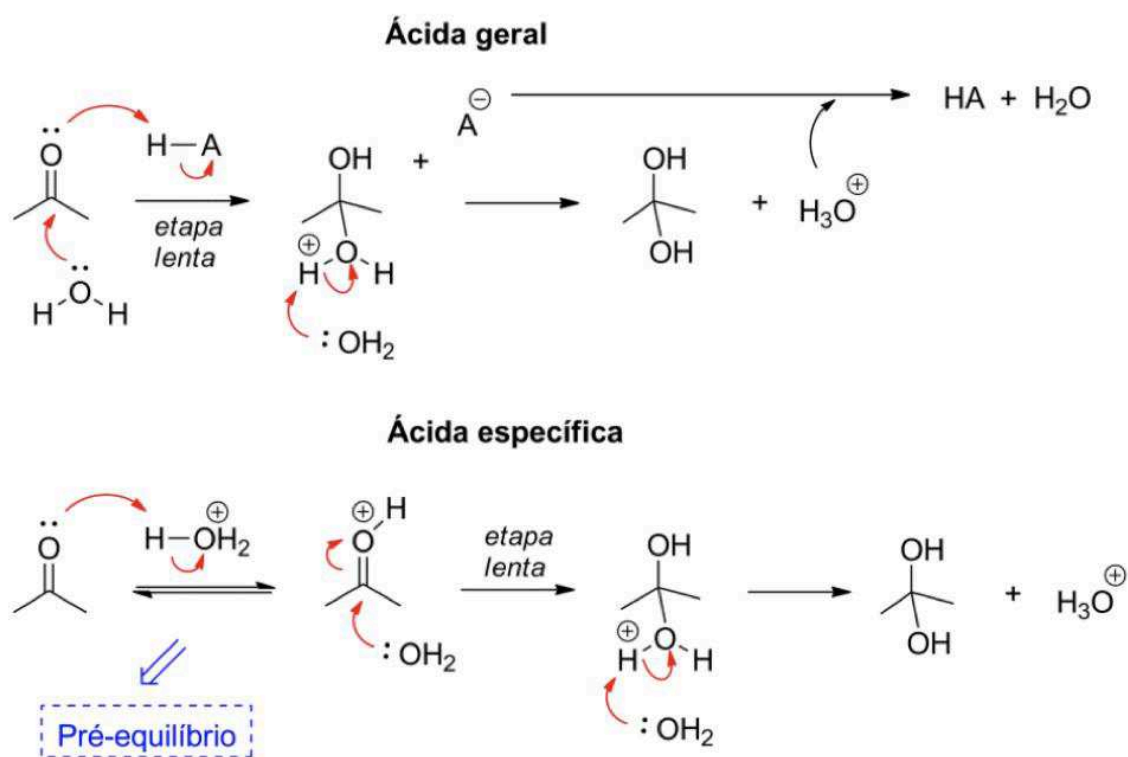
## 1.2 CATÁLISE

Um catalisador é uma substância que aumenta a velocidade de uma reação química, através da mudança do caminho reacional, do mecanismo, para um de menor energia de ativação, sem ser consumido ou modificado durante o processo. (BRUICE, 2006). É grande o número de aplicações dos processos catalíticos nas indústrias, na geração de energia e desenvolvimento de novos materiais. De modo geral as reações catalíticas podem ser classificadas em: (1) homogênea, quando os catalisadores e os reagentes estão em uma única fase; e (2) heterogênea, quando o catalisador constitui uma fase separada dos reagentes e produtos. (SCHMAL, 2011).

Além da classificação acima, a catálise também pode ser do tipo intramolecular, na qual um ou mais grupos funcionais de uma molécula podem auxiliar a hidrólise de outro grupo funcional da mesma molécula, diferindo da catálise intermolecular, na qual os grupos reativos se encontram em moléculas diferentes.

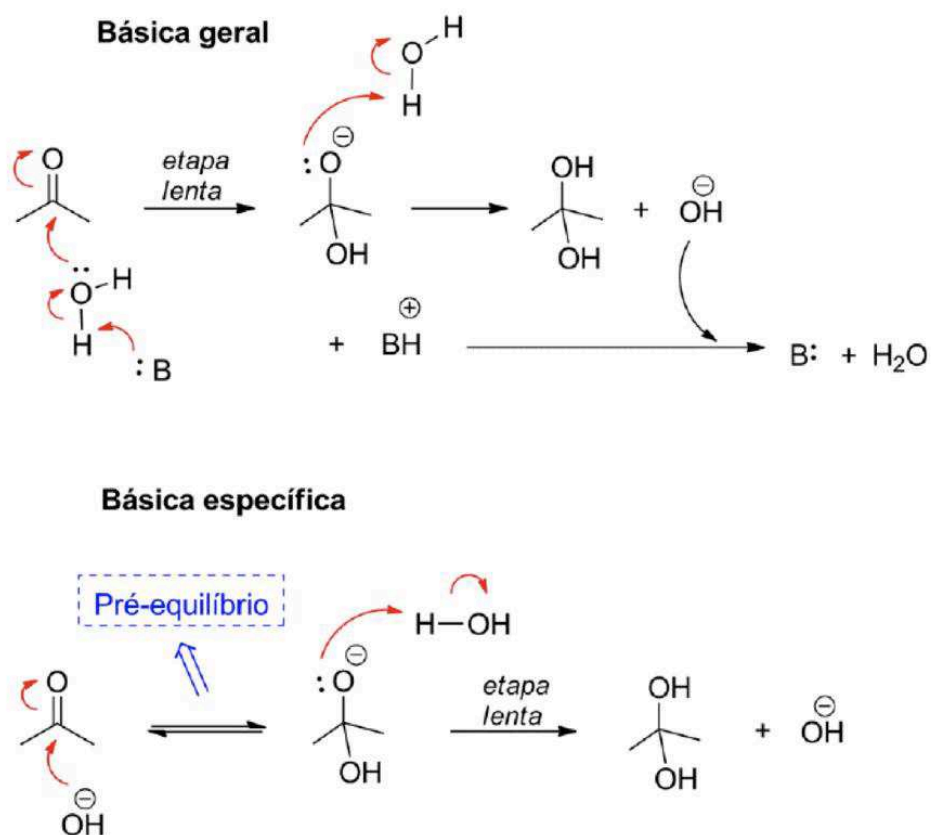
Uma catálise inter/intramolecular ainda pode ser subdividida em ácida (geral ou específica), básica (geral ou específica) e nucleofílica. Na catálise ácida, o catalisador ácido aumenta a velocidade da reação por meio da doação de próton ao reagente. Há dois tipos de catálise ácida: geral e específica. Na catálise ácida geral, o próton é transferido ao reagente durante a etapa lenta da reação, ou seja, é diretamente dependente da força do ácido. Já na catálise ácida específica, o próton é completamente transferido ao reagente numa etapa de pré-equilíbrio antes do início da etapa lenta da reação (**Figura 4**). (ANSLYN; DOUGHERTY, 2006).

**Figura 4** – Esquema representativo de catálise do tipo ácida geral e específica.



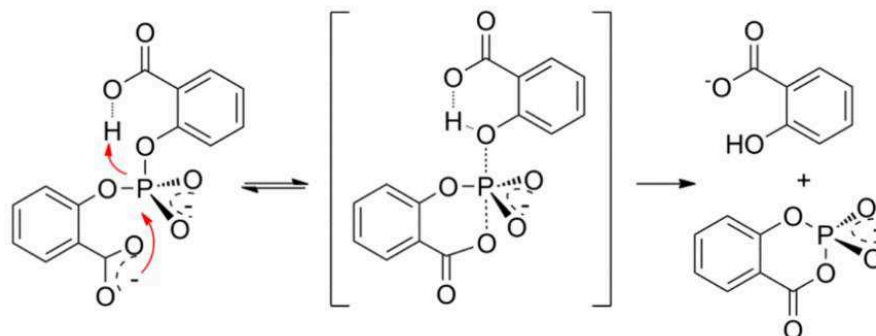
Já quando se fala da catálise básica, um catalisador básico aumenta a velocidade de uma reação pela remoção de um próton do reagente e assim como na catálise ácida, existem dois tipos de catálise básica: geral e específica. Na catálise básica geral, o próton é retirado do reagente durante a etapa lenta da reação. Já na catálise básica específica, o próton é completamente retirado do reagente antes do início da etapa lenta (**Figura 5**). (ANSLYN; DOUGHERTY, 2006). (BRUICE, 2006).

**Figura 5** – Esquema representativo de catálise do tipo básica geral e específica.



Por último, na catálise nucleofílica, um catalisador nucleofílico aumenta a velocidade de uma reação atuando como um nucleófilo, gerando um intermediário por meio de uma ligação covalente com um dos reagentes. (BRUICE, 2006). (ANSLYN; DOUGHERTY, 2006). Modelos clássicos de catálise nucleofílica envolvem reações intramoleculares com o grupo carboxilato. Por exemplo, na reação de hidrólise do 2-carboxifenil fosfato (**2CPP**), na **Figura 6**, o grupo carboxilato fornece um incremento na velocidade de até  $10^7$  vezes, comparado com a reação em ausência do grupo carboxilato ( $-\text{CO}_2$ ). Os resultados apresentados sugerem que a reação deve passar por um intermediário cíclico, sendo então a sua quebra a etapa determinante. (KHAN; KIRBY; WAKSELMAN, 1970).

**Figura 6** – Esquema representativo de catálise do tipo nucleofílica em ésteres de fosfato caracterizadas como reações do tipo intramolecular com o grupo carboxilato. (ABELL; KIRBY, 1983).



A catálise ácido-básica geral que explica a eficiência catalítica de muitas enzimas serve de parâmetro para a formulação de modelos catalíticos intramoleculares. A característica comum nesses sistemas é a presença de fortes ligações de hidrogênio, tanto no produto como no estado de transição. (KIRBY et al. 2006).

### 1.2.1 Catálise Intramolecular

As reações intramoleculares são reações modelos simples onde os grupos reacionais que podem auxiliar na hidrólise de outro grupo funcional estão situados na mesma estrutura molecular. Os estudos de reações intramoleculares são interessantes para facilitar a compreensão da catálise enzimática, modelando as enzimas que possuem no seu sítio ativo vários grupos funcionais. (ORTH, 2008).

As reações intramoleculares envolvendo catálise nucleofílica, tais como as ciclizações, são reações simples que podem competir com a catálise enzimática com velocidade equivalente. Partindo deste tipo de reações pode-se obter sistemas em que grupos estáveis de natureza biológica (amidas, glicosídeos e ésteres que tipicamente possuem tempo de meia vida longos sob condições fisiológicas) são extraordinariamente clivados em segundos ou menos. A eficiência da catálise intramolecular é convenientemente expressada em termos de Molaridade Efetiva (ME) do grupo catalítico. (KIRBY, 1980). A ME é definida como sendo a razão entre a constante de velocidade de primeira ordem para a reação intramolecular e a constante de segunda ordem para a reação intermolecular que seguem pelo mesmo

mecanismo sob as mesmas condições reacionais, e está representada na **Equação (1)**.

$$ME = \frac{k_{intramolecular}(s^{-1})}{k_{intermolecular}(M^{-1}s^{-1})} \quad (1)$$

A ME tem a dimensão de molaridade e é facilmente entendida como a concentração do grupo catalítico que será requerido em um processo intermolecular equivalente para se igualar a velocidade da reação intramolecular. A ME permite uma quantificação da eficiência catalítica e quanta está relacionada com uma determinada estrutura em sistemas projetados para manter juntos grupos funcionais intimamente próximos, de forma semelhante como os mesmos grupos funcionais são mantidos juntos num complexo enzima substrato. Assim quanto maior a ME, maior será a eficiência da reação intramolecular. Por exemplo, um grupo nucleofílico numa enzima chega a ter uma ME de até  $10^{10}$  vezes, o que torna ainda mais interessante mimetizar sistemas enzimáticos. (DOMINGOS, 1999). (ORTH, 2008).

Kirby resumizou os dados existentes sobre ME para uma série de reações intramoleculares. Dentro deste amplo levantamento de dados pode-se ver a importância deste cálculo simples. Distinguir uma reação que procede por catálise nucleofílica intramolecular ou por catálise básica geral em solução sempre foi uma tarefa trabalhosa de ser realizada, pois ambos casos apresentam a mesma lei cinética. Um método bastante conveniente para saber qual mecanismo está ocorrendo numa reação intramolecular deste tipo, é por comparação de suas molaridades efetivas, **Tabela 2**. (KIRBY, 1980).

**Tabela 2** – Valores de Molaridade Efetiva (ME) para reações que procedem por catálise intra e intermolecular realizadas por Kirby. (KIRBY, 1980).

<b>Molaridade Efetiva</b>	
Catálise nucleofílica Intramolecular	Catálise Básica-Geral
$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^{16}$ M	$< 80$ M

Há muita discussão sobre as origens do aumento de velocidade nestes sistemas. Com o estudo principalmente de reações intramoleculares de lactonização, hidrólise de ésteres e amidas, como modelos para catálise enzimática, surgiram teorias como: Controle Estereopopulacional, Direcionamento de Orbitais, e a Teoria Espaço temporal. Estas teorias, abordadas nas próximas seções, reivindicam para si a primazia dos efeitos de aumento de velocidade observados em sistemas intramoleculares quando comparados às reações intermoleculares similares. Em geral, é muito mais eficiente que a intermolecular, sendo que existe muita confusão na atribuição dos fatores responsáveis por essa eficiência. (ORTH, 2008). (DOMINGOS, 1999).

Inicialmente, Koshland propôs fatores como dependência angular entre os reagentes sendo determinantes nas reações. Bruice explicou a eficiência em função do efeito de proximidade. No entanto Menger comprovou experimentalmente que o ângulo não parece ser um parâmetro fundamental nesse tipo de catálise. Em contrapartida, Page e Jencks propuseram o efeito entrópico como único responsável pela alta eficiência catalítica de reações intramoleculares, porém esse fator também apresentou diversas divergências. Por último Menger com o postulado: “A velocidade de reação entre A e B é proporcional ao tempo que A e B residem dentro de uma distância crítica”, atribuiu a um fator espaço temporal à eficiência da catálise intramolecular. Nessa teoria espaço temporal, estão atrelados um conjunto de fatores como ângulo, entropia e proximidade. (MENGER, 1985).

### 1.2.2 Teoria Espaço Temporal

Em 1985, Menger concluiu que “efeitos de proximidade se manifestam em reações intramoleculares, mas não em reações intermoleculares” através de estudos de proximidade na reação bimolecular  $S_N2$  do iodeto de metila em piridina e reação de eliminação com pequena dependência de fatores orientacionais. Menger observou, para a primeira reação, um aumento pouco significativo de fator menor de três na  $k_{obs}$  quando a concentração de piridina é aumentada de 10% para 100%. Na segunda reação, de eliminação, o aumento de velocidade foi de apenas 12 vezes, sendo ordens de magnitude menor que a aceleração induzida pela proximidade nos sistemas intramoleculares. Portanto, a reação não apresentou um aumento

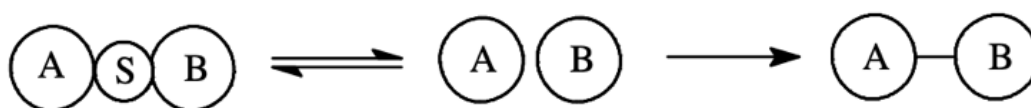


significante na velocidade quando é atingido um contato total entre nucleófilo e eletrófilo. Assim a proximidade é um componente necessário, mas não suficiente para explicar a alta reatividade de sistemas intramoleculares e conseqüentemente enzimáticos. (DOMINGOS, 1999). (MENGER; VENKATARAM, 1985).

Para justificar o motivo pelo qual efeitos da proximidade eram observados em reações intramoleculares, mas não em reações intermoleculares e também pelo qual algumas reações intramoleculares eram caracterizadas por valores grande de ME, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma nova teoria para abordar o problema da intramolecularidade. Menger afirma que conceitos como entropia, orientação e proximidade não reúnem em torno de si evidências suficientes para explicar os fatores responsáveis pelo grande aumento observado em reações intramoleculares e pela eficiência da catálise enzimática e enuncia a Teoria Espaço Temporal: “A velocidade de reação entre dois grupos funcionais A e B é proporcional ao tempo que A e B permanecem a uma distância crítica menor ou igual a soma dos raios de van der Waals dos grupos que participam da reação”. A ênfase a distância em detrimento aos fatores orientacionais é decorrência natural da teoria, pois a amplitude da energia de estiramento de uma ligação é maior que a amplitude da energia de vibração angular. (MENGER, 1983). (DOMINGOS, 1996).

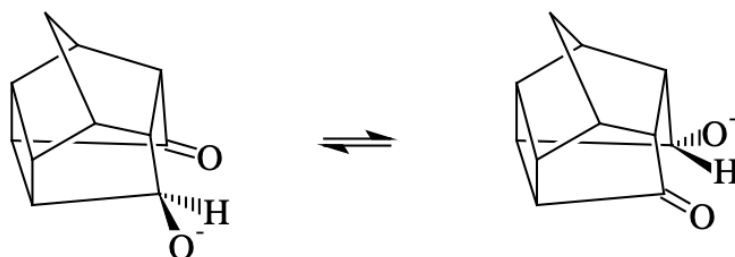
Em termos das leis formais de equilíbrio, a teoria é descrita considerando-se que duas moléculas separadas pelo solvente geram um complexo no qual os componentes do sítio reacional estão dentro de uma distância limite que impede sua solvatação. O produto numa segunda etapa é caracterizado por uma constante de velocidade intrínseca, no **Esquema 1**.

**Esquema 1** – Representação de duas moléculas separadas inicialmente pelo solvente, gerando um complexo como intermediário e formando numa segunda etapa o produto.



Menger, em seus experimentos posteriores, propõe a consolidação de sua hipótese Espaço temporal. Cálculos computacionais, pelo método AMPAC, para a transferência intramolecular de hidreto em alcoxicetonas, **Esquema 2**, fornecem uma energia para o processo global de 75 kJ.mol<sup>-1</sup>, dos quais 21 kJ.mol<sup>-1</sup>, são utilizados para a transferência do hidreto. As 54 kJ.mol<sup>-1</sup> restantes são utilizadas para posicionar os centros reacionais à distância crítica para a reação. (SHERROD; MENGER, 1990).

**Esquema 2** – Representação da transferência intramolecular de hidreto em alcoxicetonas.



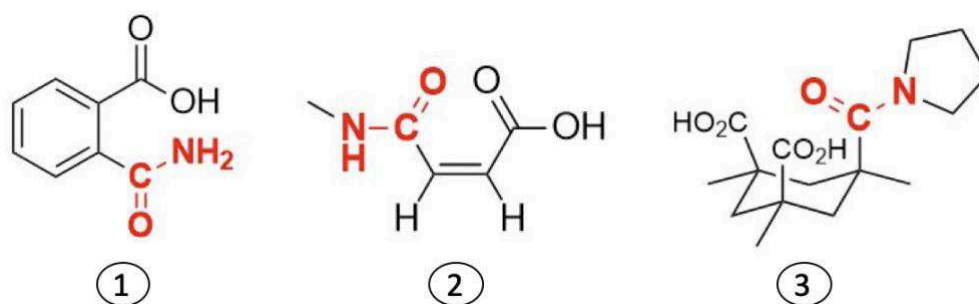
### 1.3 APERFEIÇOAMENTO NA VELOCIDADE DE REAÇÃO DE CLIVAGEM DE AMIDAS

A natureza selecionou a ligação amida para manter as proteínas juntas por um motivo: a ligação amida é enzimaticamente clivável, mas altamente estável. Por exemplo, um procedimento químico típico para a hidrólise de amidas requer um refluxo de 10 horas em 8 N HCl. (ECK; MARVEL, 1943).

Visto as condições drásticas exigidas ao meio reacional para a clivagem destas amidas, foram realizados diversos estudos com a finalidade de analisar fatores influentes que possam tornar esse meio mais conveniente para a reação. Um caminho favorável encontrado foi através do uso de grupos carboxílicos que são conhecidos por acelerar reações de clivagem de amidas em sistemas intramoleculares. Por exemplo, em pH 3 a hidrólise do ácido ftálico (**Figura 7-1**) é de aproximadamente 10<sup>5</sup> vezes mais rápida que a hidrólise da benzamida. (BENDER; CHOW; CHLOUPEK, 1958). Outro exemplo é a reação de clivagem do ácido *N*-metilmaleico (**Figura 7-2**), o qual apresenta um tempo de meia vida de 3 horas em

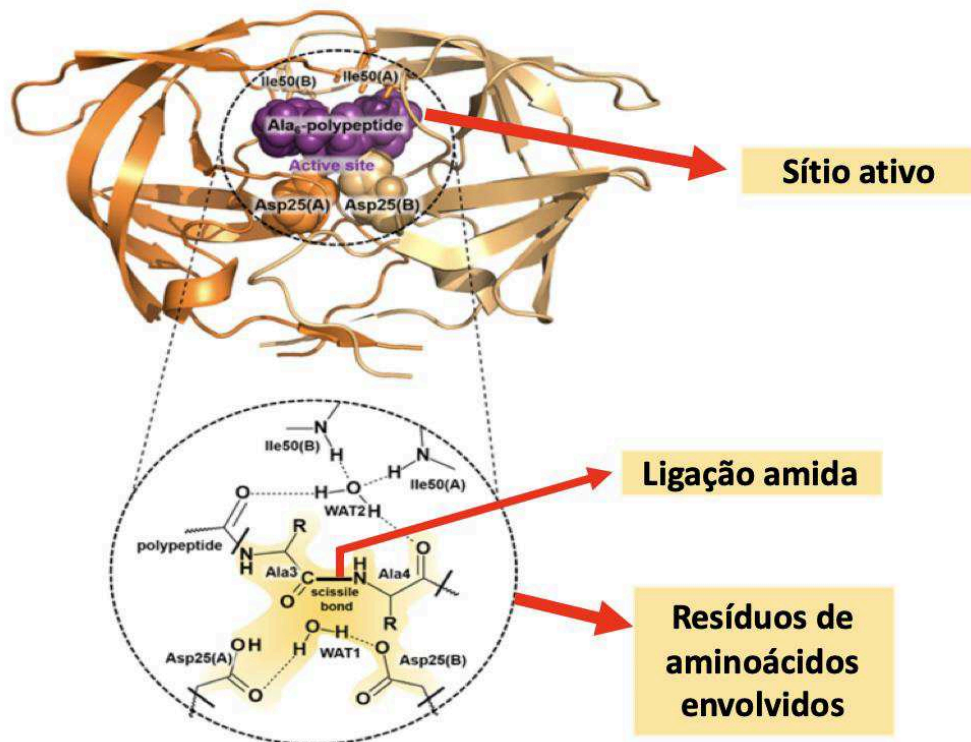
39 °C em pH 2, onde o grupo ácido carboxílico se encontra totalmente protonado. O grupo carboxilato, em si, não é catalítico, mas com a compressão estérica observada na estrutura aproximando os grupos reativos, muitas vezes é possível observar grandes efeitos catalíticos devido a este efeito estérico. (KIRBY; LANCASTER, 1972). Derivados do triácido de Kemp (**Figura 7-3**) apresenta um tempo de meia vida de apenas 8 minutos (valor de tempo de meia vida aproximado normalmente obtido para enzimas) a pD=7,05 e 21,5 °C, mostra que uma enzima poderia apresentar eficiência catalítica tendo apenas dois grupos ácidos carboxílicos adequadamente posicionados. (MENGER; LADIKA, 1988).

**Figura 7** – Amidas que apresentam grupos carboxílicos e foram utilizados para estudos de reações de clivagem de amidas em sistemas intramoleculares; (1) ácido ftálico; (2) ácido *N*-metilmaleico; (3) triácido de Kemp.



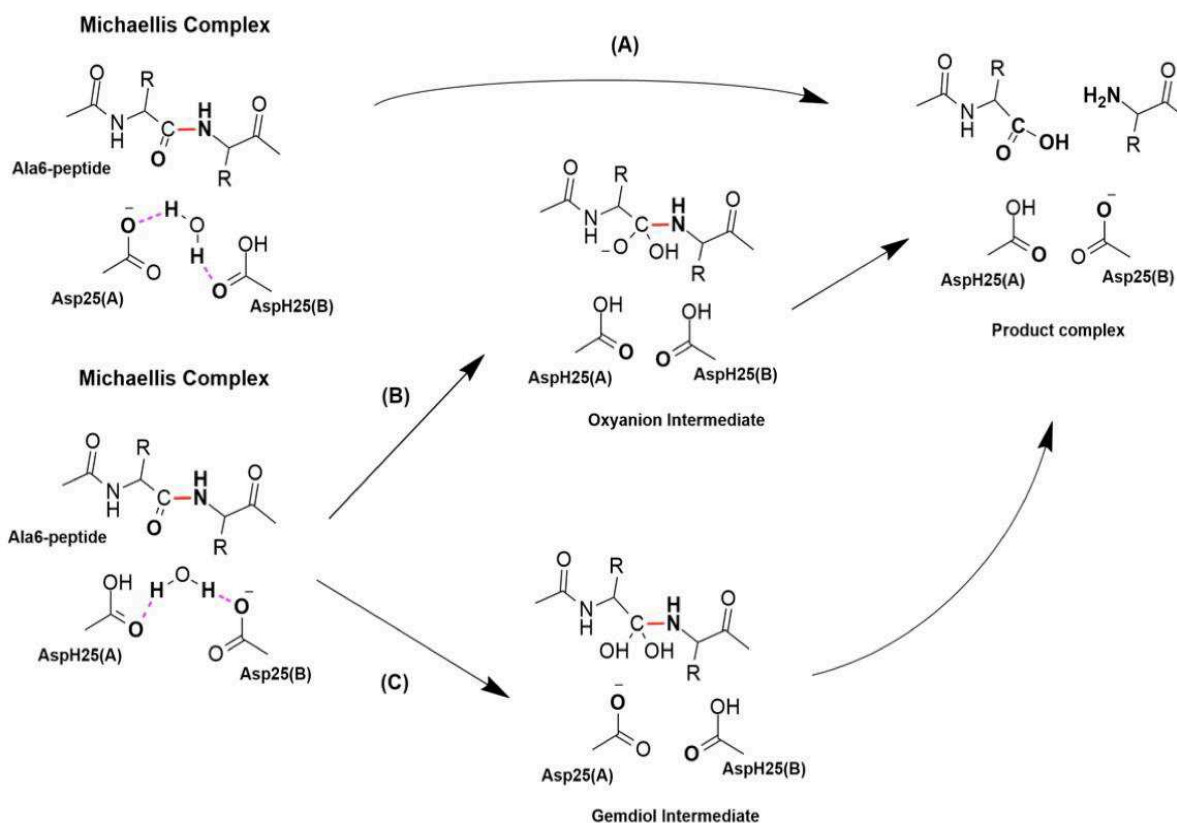
Outro exemplo de amidas que são favorecidas a hidrólise na presença de grupos ácidos carboxílicos está presente na protease HIV-1 (HIV-1 PR), a qual apresenta uma função importante no ciclo de vida vital do HIV-1 de reconhecer a forma assimétrica da estrutura do peptídeo e depois catalisar a reação de clivagem levando a hidrólise da ligação peptídica do substrato. A HIV-1 PR é uma enzima da família de proteinases aspárticas que é caracterizada pela presença de dois resíduos aspárticos no sítio ativo localizado no fundo de uma fenda de ligação ao substrato. A estrutura de um HIV-1 PR, juntamente com um detalhe do sítio ativo com o substrato e a molécula de água mencionada, está presente na **Figura 8**.

**Figura 8** – Representação de uma protease HIV-1 com detalhe do sítio ativo com o substrato. (Adaptado de KRZEMIŃSLA; MOLINER; ŚWIDEREK, 2016)



As proteases aspárticas, incluindo pepsina, renina e protease HIV-1, são sistemas enzimáticos que operam via dois grupos carboxilatos (na forma de aspartatos). Eles são ativos em valores de pH ácidos e estão associados a uma aceleração de  $10^{10}$  vezes. São três os mecanismos propostos para esse modelo de hidrólise de peptídeos catalisados por protease HIV-1 (**Esquema 3**). O primeiro mecanismo sugerido (**A**) envolve uma proteólise num processo de uma única etapa, onde o ataque nucleofílico da água ao carbono carbonílico ocorre simultaneamente com a transferência de próton para o nitrogênio e a clivagem da ligação peptídica. Cálculos teóricos não confirmaram a sincronia de ambos ataques e sim que ocorria de maneira gradual através de um intermediário. Então passou a ser considerado os dois outros mecanismos (**B**) e (**C**), com a ocorrência de um intermediário oxiânion e um intermediário diol geminal, respectivamente. (KRZEMIŃSLA; MOLINER; ŚWIDEREK, 2016).

**Esquema 3** – Mecanismos propostos para a clivagem de peptídeos catalisados por protease HIV-1. (A) mecanismo de proteólise em uma única etapa; (B) mecanismo através da formação de um intermediário oxianion; e (C) mecanismo através de um intermediário diol geminal. (KRZEMIŃSLA; MOLINER; ŚWIDEREK, 2016; adaptado).

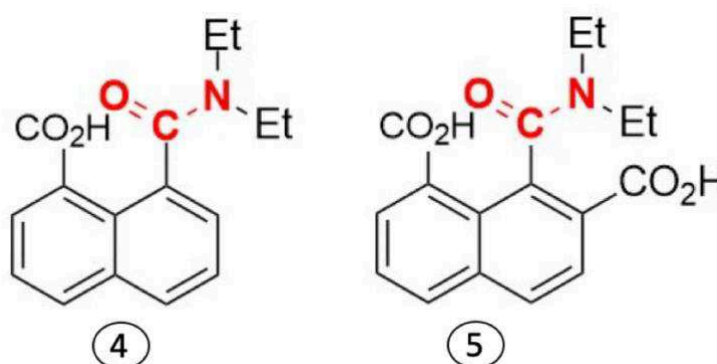


O mecanismo favorável e que é suportado tanto por investigações computacionais como experimentais é o mecanismo (C), o qual apresenta um ânion aspartato removendo um próton de uma molécula nucleofílica de água que se adiciona ao grupo carbonila da amida. Ao mesmo tempo, o segundo resíduo de aspartato, que se encontra na forma ácida, doa um próton ao grupo carbonil da amida, formando conseqüentemente um intermediário tetraédrico diol geminal que simultaneamente resulta na clivagem da amida. Excelentes velocidades associadas a este mecanismo podem ser atribuídas a geometrias de contato quase ideais. (KRZEMIŃSLA; MOLINER; ŚWIDEREK, 2016).

Souza e colaboradores (SOUZA et al. 2017) reportaram um exemplo específico de uma amida simples, a qual por se encontrar numa localização

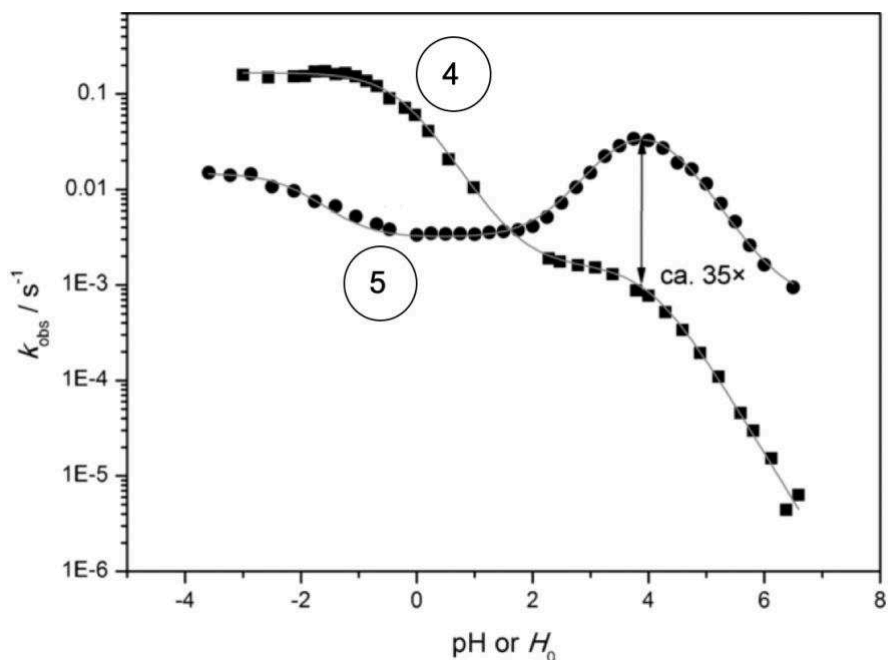
favorável entre dois grupos carboxílicos é muito reativa, via catálise bifuncional. As velocidades de clivagem de amidas foram determinadas para o ácido *N,N*-dietilnaftálmico (4), como referência, e o ácido 2-carboxil-*N,N*-dietilnaftálmico (5) (**Figura 9**).

**Figura 9** – Compostos usados por Souza e colaboradores para o estudo de clivagem de amidas.



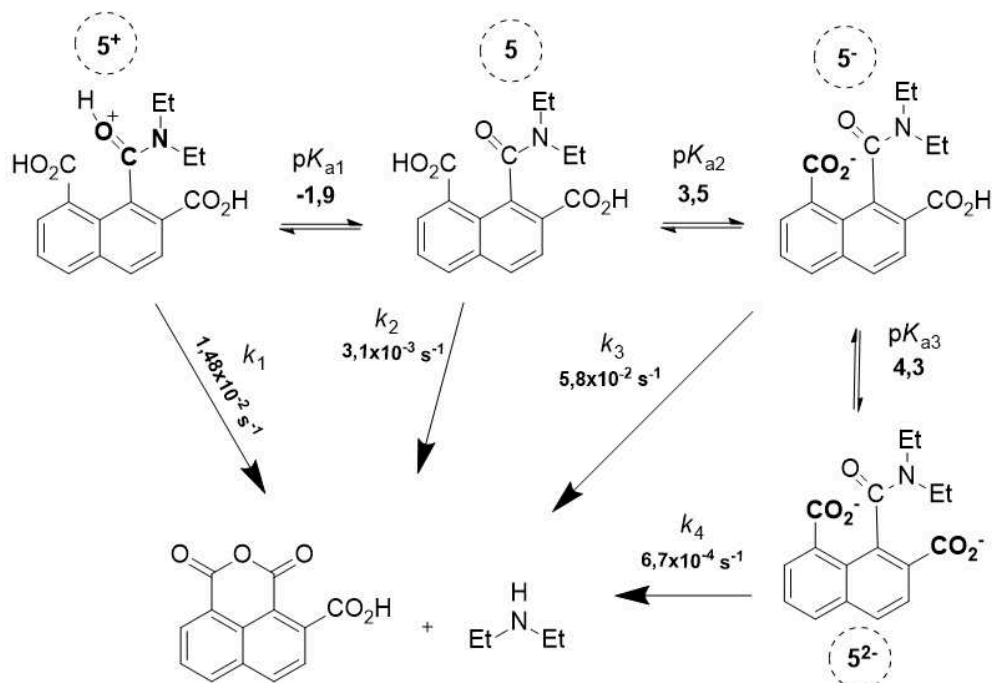
As constantes de velocidade observadas para as reações de clivagem das amidas **4** e **5** na temperatura de 35 °C em função do pH é apresentada na **Figura 10**. É possível observar que a clivagem da amida **4**, com apenas um grupo ácido carboxílico, apresenta duas regiões distintas acima de pH 0. Há um grande aumento na constante de velocidade observada quando diminui o valor de pH de 6,5 para pH 2, correspondendo a um grupo carboxilato sendo convertido em um ácido carboxílico ( $pK_a \sim 4,0$ ). Um segundo aumento da velocidade aparece abaixo de pH 2 (Catálise ácida). A amida **5**, apresenta uma curva em forma de sino, que é a evidência de catálise bifuncional. Em pH 6,0, o tempo de meia vida é de aproximadamente 10 minutos, cerca de 10<sup>2</sup> vezes menor que a amida **4**. Com o valor de pH diminuindo, a velocidade cresce ainda mais até um valor máximo em pH 4 e depois cai novamente. (SOUZA et al. 2017).

**Figura 10** – Constantes de velocidades observadas em primeira ordem ( $k_{\text{obs}}$ ) vs. pH para a decomposição dos compostos **4** e **5** em 35 °C (valores menores que pH 0 correspondem à função  $H_0$ ).



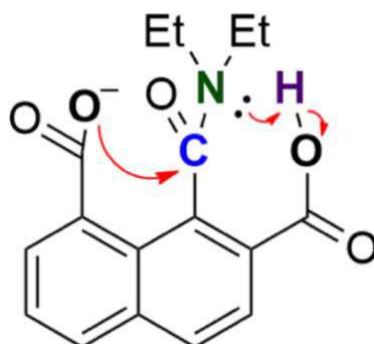
Neste estudo, a característica mais intrigante dos valores encontrados, foi a magnitude do valor da constante de velocidade da espécie monoaniônica de **5** ( $k_3$ ). A velocidade de reação de clivagem da amida, sendo avaliada pela espécie aniônica de **5** (**5**<sup>-</sup>) apresentada no **Esquema 4**, é caracterizada por ter simultaneamente os grupos carboxilato e ácido carboxílico. Essa espécie é mais reativa que as demais espécies do equilíbrio (dianion **5**<sup>2-</sup> ( $k_3 \gg k_4$ ), amida neutra **5** ( $k_3 \gg k_2$ ) e até mesmo a forma protonada **5**<sup>+</sup> ( $k_3 > k_1$ ). (SOUZA et al. 2017).

**Esquema 4** – Espécies relevantes envolvidas na reação de clivagem do ácido 2-carboxi-*N,N*-dietilnaftalâmico.



Tal acontecimento ocorre pelo fato do sistema estar engajado em uma catálise bifuncional no qual um grupo ácido carboxílico age como um catalisador ácido geral e um grupo carboxilato atua como um nucleófilo (**Figura 11**). O resultado final é uma amida que têm sua ligação rompida em um tempo de meia vida de 12 segundos. Em resumo, o perfil de pH em forma de sino é observado quando a velocidade em relação ao pH, ou seja, quando a espécie **5<sup>2-</sup>** é protonada para **5<sup>-</sup>** e posteriormente quando a espécie **5<sup>-</sup>** é neutralizada para **5**. (SOUZA et al. 2017).

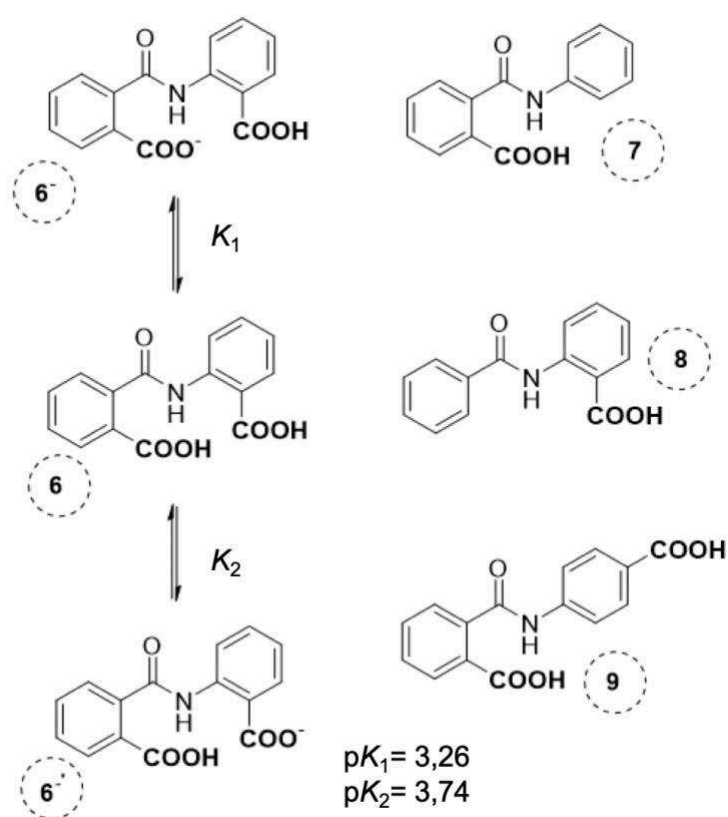
**Figura 11** – Catálise bifuncional onde um grupo carboxilo está atuando como uma base geral.





Outro exemplo semelhante, apresentado por Morawetz (MORAWETZ; ORESKES, 1958), é o ácido 2-carboxiftanílico (**2CPA**), onde apresenta uma amida altamente ativada localizado entre dois grupos ácidos carboxílicos, sendo um deles ionizados (**Figura 12**). No mesmo estudo, foram analisados outros compostos com estruturas similares ao **2CPA**.

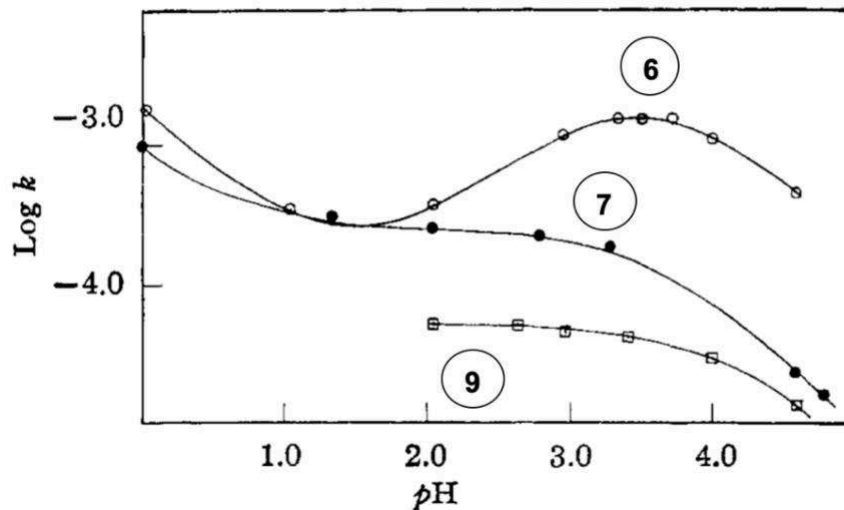
**Figura 12** – Amidas estudadas por Morawetz e estados de protonação do composto 6 de acordo com seus valores de  $pK_a$ .



Os estudos de Morawetz (1958 e 1962) demonstravam anteriormente, ao estudo de Souza e colaboradores, que a clivagem da ligação C-N em uma amida (**2CPA**) pode ocorrer por meio de uma catálise bifuncional. Ele observou em seus estudos duas características: (i) A reação de clivagem da amida com dois grupos carboxílicos, na posição adequada, apresenta o perfil de sino com a variação de pH; (ii) As demais amidas estudadas por ele, em que os grupos carboxílicos não favorecem a catálise bifuncional ou a presença de apenas um grupo carboxílico, não

apresentam mesmo perfil com variação de pH. Essas afirmações podem ser observadas na **Figura 13**.

**Figura 13** – Constantes de velocidade de primeira ordem ( $\log k$ ) vs. pH para a decomposição dos compostos **6**, **7** e **9** em 25 °C. (MORAWETZ; ORESKES, 1958).



Fonte: MORAWETZ; SHAFER, 1962

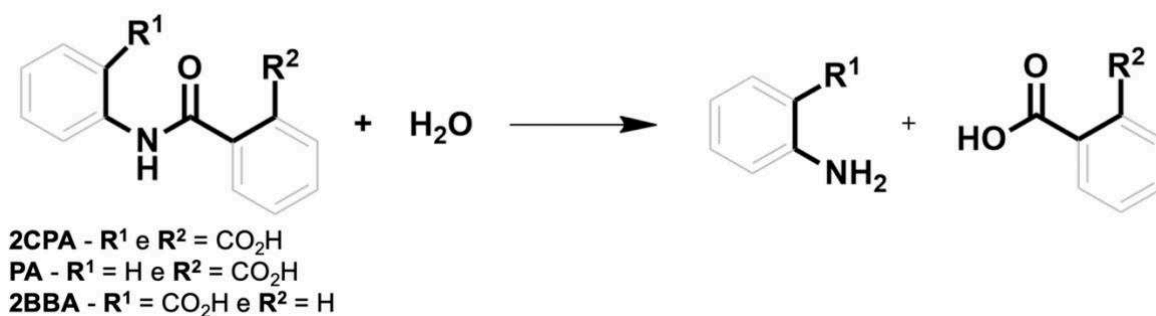
Visto a importância desses compostos e dos demais apresentados, nesta dissertação será abordada reações em um grupo de amidas, sendo a **2CPA** como principal. A finalidade dessa investigação será compreender mais sobre a catálise bifuncional e o mecanismo de clivagem da ligação C-N das amidas, através de estudos cinéticos experimentais e computacionais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo primordial deste trabalho é promover um melhor entendimento de alguns fatores que governam a catálise bifuncional intramolecular. Para isto estudou-se a reação de clivagem de um grupo de amidas em função da mudança de posição dos substituintes carboxílicos ( $\text{CO}_2\text{H}$ ) (**Esquema 5**).

**Esquema 5** – Esquema geral de clivagem da ligação C-N em um grupo de amidas estudadas.

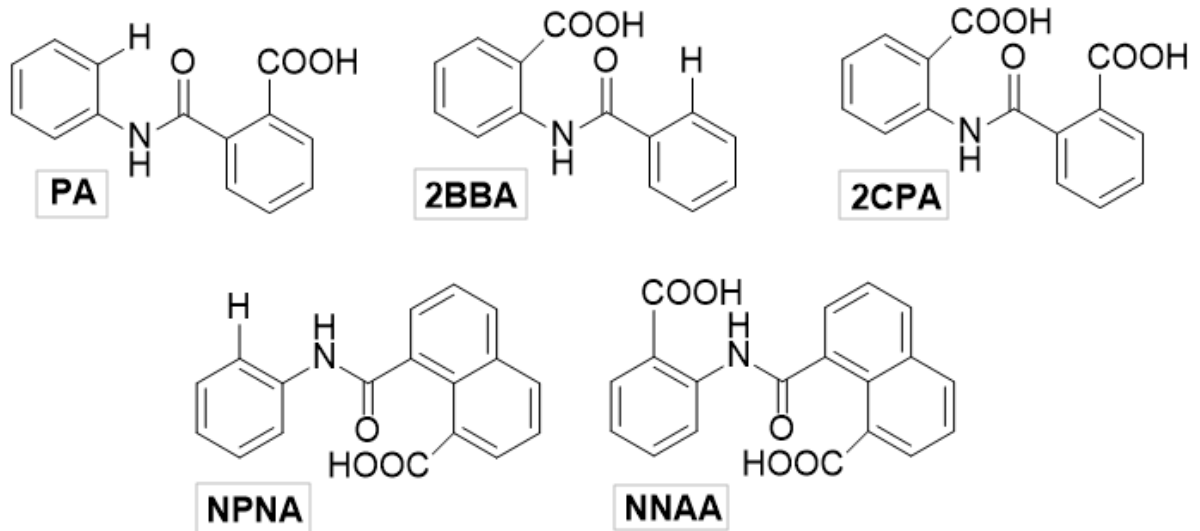


### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIAS

- Sintetizar as amidas: ácido 2-[(fenilamino)carbonil]benzoico (**PA**), ácido 2-(benzamido)benzoico (**2BBA**) e ácido 2-[(2-carboxibenzoil)amino]benzoico (**2CPA**) e as naftamidas ácido *N*-fenilnaftalanílico (**NPNA**) e ácido *N*-naftalantranílico (**NNAA**) (**Figura 14**); caracterizar os produtos por técnicas de ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- Acompanhar as reações de clivagem das amidas **PA** e **2CPA** obtidas utilizando espectrofotometria UV-vis, através da formação/consumo do produto referente a cada reação, com o intuito de avaliação cinética e mecanística, avaliando os seguintes efeitos: (I) pH do meio reacional, (II) Efeito isotópico do solvente e (III) Efeito da temperatura;

- Avaliação das possibilidades mecanísticas para clivagem da amida **2CPA** através dos cálculos computacionais pela comparação direta da barreira energética experimental e teórica para indicar sobre o provável mecanismo da reação;

**Figura 14** – Representação esquemática das amidas e naftamidas obtidas.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 EQUIPAMENTOS

- Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR): Um equipamento FTIR ABB do modelo FTLA 2000 foi usado para obtenção dos espectros de IV em pastilha de KBr.
- Ressonância Magnética Nuclear: As medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em um espectrômetro Bruker 200 e Varian 400, operando com detector de  $^1\text{H}$  (200,00 e 400,00 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50 e 100 MHz) e tratadas com o software MestRe-Nova 6.0.2 (Departamento de Química - UFSC, 2016). Foi utilizado tetrametilsilano (TMS, Cambridge Isotope Laboratories, 99,9 %) como referência interna para as análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em solventes orgânicos (Clorofórmio- $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO}-d_6$ ). Ambos os equipamentos estão localizados na central de análises de química.
- Espectroscopia na Região Ultravioleta e visível: As medidas cinéticas foram realizadas em um espectrofotômetro de UV-Vis Cary 50 acoplado a um computador contendo sistemas de aquisição e tratamentos de dados CaryWinUV 3.00, acoplado a um banho termostático Varian PCB 1500 com sistema de água com peltier. Para as medidas foram utilizadas cubetas de quartzo termostatizadas com capacidade de 3,5 mL e 1,0 cm de caminho óptico. O equipamento permite analisar os resultados em função do tempo e calcular as constantes de velocidade.
- Cálculos Computacionais: Os cálculos foram realizados utilizando o programa GAUSSIAN 09 instalado em sistema operacional Linux (Open Suse). Com o objetivo de obter os mínimos locais e global, intermediários e estados de transição no estado fundamental. As estruturas foram minimizadas em rotina de solvatação usando o modelo IEFPCM- SMD.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Cinética Química

A cinética química determina, em função do tempo de reação, as velocidades de consumo e formação de reagentes e produtos, respectivamente. A clivagem da ligação C-N das amidas **PA** e **2CPA** foram realizadas em solução aquosa, monitorando-se por espectroscopia UV/Vis. O consumo de **PA** foi acompanhado em comprimento de onda  $\lambda = 260$  nm. Já a formação de ácido antranílico foi acompanhada em comprimento de onda  $\lambda = 330$  nm, a partir da clivagem de **2CPA**.

As reações foram iniciadas pela adição de alíquotas de 15  $\mu\text{L}$  da solução estoque dos substratos (0,01 M em acetonitrila e estocadas em freezer) em 2,0 ml da solução tampão no pH desejado, de modo que a concentração inicial dos substratos em solução foi igual a  $1,0 \times 10^{-4}$  M. Na faixa de pH 2-7 foram utilizados tampões orgânicos e inorgânicos (ácido cloro-acético/cloro-acetato de potássio, ácido acético/acetato de potássio, BIS-TRIS metano), com adições de soluções diluídas de HCl e KOH para ajustar os valores de pH no final.

O aparecimento dos produtos foi acompanhado em comprimentos de ondas específicos por no mínimo 5 tempos de meia-vida (**Equação 2**). A partir dos gráficos de absorvância em função do tempo e utilizando a **Equação 3** foi possível determinar o valor das constantes de velocidade observada. Onde  $A_0$ ,  $A_\infty$  e  $A_t$  representam absorvância inicial, absorvância no infinito e absorvância final no tempo  $t$ , respectivamente.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2)$$

$$A_t = A_0 + (A_\infty - A_0)e^{-kt} \quad (3)$$

A medida do efeito isotópico do solvente foi realizada a 25 °C, sob valores de pD de 2,4-5,4. Esses valores foram medidos a partir do pH e corrigidos pela compensação com o uso de solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$  com ajustes de soluções diluídas de DCl e NaOD) através da **Equação 4**.

$$pD = pH + 0,40 \quad (4)$$

Para finalizar e comparar de forma direta com os cálculos computacionais serão realizadas as medidas cinéticas com a mudança de temperatura. As temperaturas serão variadas de 25-55 °C e o pH 2,0-5,0. As mudanças na velocidade de reação serão expressas com a temperatura segundo o ajuste linear da equação de Eyring, **Equação 5**. Será possível obter os parâmetros termodinâmicos (Energia livre, entalpia e entropia de ativação) para a reação de clivagem da ligação C-N.

$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = -\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{R}\right)\frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) \quad (5)$$

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

### 3.2.2 Cálculos Computacionais

Utilizando a teoria do funcional da densidade (DFT, do inglês Density Functional Theory) foram executados com o método  $\omega$ B97X-D e o conjunto de funções de base 6-311++G(d,p) usando o pacote GAUSSIAN 09 A.02 implementado em sistemas operacionais Linux. (CHAI; HEAD-GORDON, 2008). (MCLEAN; CHANDLER, 1980). (KRISHNAN; FRISCH, 1980).

Foram utilizados os parâmetros padrão para convergência: a convergência na matriz da densidade foi de  $10^{-9}$  unidades atômicas, o valor limite para o deslocamento máximo foi de 0,0018 Å e a força máxima 0,00045 Hartree/Bohr. Os pontos estacionários na superfície de energia potencial foram identificados por cálculos de frequência em 1 atm e 298,15 K. Como os efeitos de solvente são importantes, de fato cruciais quando o solvente é um reagente, todas as otimizações e cálculos de frequência foram executados utilizando o modelo contínuo polarizável (PCM, do inglês Polarizable Continuum Model) e a densidade do modelo de solvatação (SMD, do inglês Solvation Model Density) de Truhlar e colaboradores (MARENICH; CRAMER; TRUHLAR, 2009). Os estados de transição foram identificados por suas frequências imaginárias únicas, enquanto os reagentes, intermediários e produtos não mostram frequência imaginária. Os caminhos de

reação foram confirmados pela análise da coordenada intrínseca de reação (IRC) usando os parâmetros padrão implementados em Gaussian 09 a partir dos estados de transição. O mínimo global da espécie **2CPA** foi localizado na superfície de energia potencial (PES) construída pela variação dos ângulos diedros entre os dois anéis aromáticos e o plano da amida.

### 3.2.3 Síntese dos substratos modelo

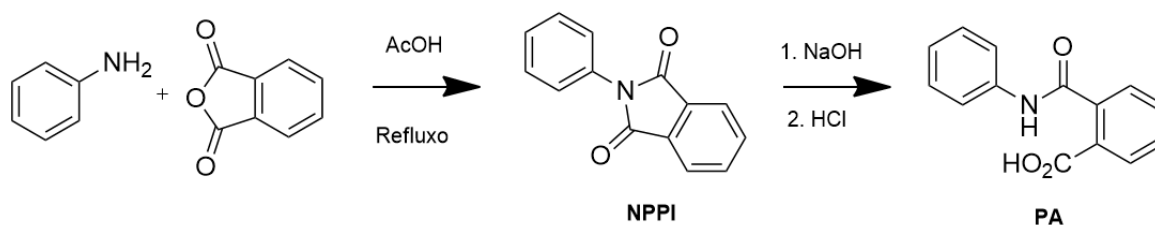
As amidas, **PA**, **2BBA** e **2CPA** e as Naftamidas, **NPNA** e **NNAA**, foram sintetizadas de acordo com as metodologias descritas a seguir e disponibilizadas no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI).

Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich, Carlo Erba, Merck, Acros e Vetec, e tratados com técnicas adequadas de purificação, quando necessário. (PERRIN; ARMAREGO, 1988)

#### 3.2.3.1 Síntese do Ácido 2-[(Fenilamino)carbonil]benzóico (**PA**)

A síntese do ácido 2-[(Fenilamino)carbonil]benzóico, usualmente conhecido como ácido ftalanílico (**PA**) foi realizada utilizando a *N*-fenilftalimida (**NPPI**) em meio alcalino. Como a **NPPI** não é disponível comercialmente, primeiramente preparou-se a partir da anilina e anidrido ftálico (**Esquema 6**), como descrito abaixo, seguindo uma adaptação do método na literatura (WIKLUND; ROMERO; BERGMAN, 2003).

**Esquema 6** – Reação de síntese do **PA** a partir da formação do precursor **NPPI**.



Em um balão de fundo redondo contendo uma barra de agitação magnética e adaptado a um condensador de refluxo refrigerado, 1,482 g de anidrido ftálico (10 mmols) foram dissolvidos em 6 mL de ácido acético, adicionando-se em seguida 20 mmols de anilina (1,867 g, 1,02 g/mL, 2 mL). A mistura reacional foi agitada e



mantida em refluxo por 48 horas. Após esse tempo e com a mistura ainda quente, foram adicionados 10 mL de H<sub>2</sub>O levando a formação de precipitado que foi filtrado e seco em bomba de alto vácuo resultando em um sólido branco que foi caracterizado sem purificação. Foi obtido, desta forma, 1,70 g de **NPPI** (R. 76%). PF: 210,0-212,0 °C (lit. 209-210 °C). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.95 (m, 2H), 7.78 (m, 2H), 7.53 (m, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.40 (m, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.37, 134.50, 131.86, 131.80, 129.21, 128.20, 126.68, 123.84. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3074, 1777, 1711, 1591, 1495, 1385, 1115, 718. (**Apêndice A**).

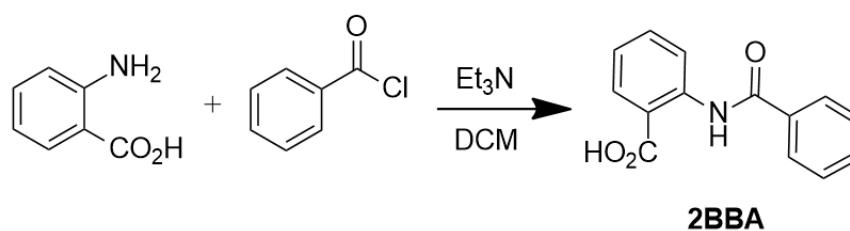
A síntese do ácido ftalanílico (**PA**) foi realizada por adaptação do método de Willund (WIKLUND; ROMERO; BERGMAN, 2003). Em um balão de fundo redondo contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 4 equivalentes de NaOH em uma solução de 300 mg de **NPPI** (1,12 mmols) em 6 mL de água destilada. A reação foi mantida em temperatura ambiente em agitação por 18 horas. Após esse tempo filtrou-se a reação a vácuo e o líquido filtrado foi acidificado com a adição de HCl (pH < 2) levando a precipitação de um sólido branco que foi então filtrado, lavado com solução de HCl 0,2 M gelada e seco sobre pressão reduzida. Desta forma foram obtidos 302,4 mg de **PA** (R. 93,3 %). P.f.: 165-167 °C (lit. 168-169 °C). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.33 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.61 (m, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.07 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.47, 167.38, 139.58, 138.92, 131.70, 129.97, 129.53, 129.36, 128.62, 127.78, 123.30, 119.52. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3324, 3060, 2616, 2471, 1720, 1659, 1598, 1548, 1445, 1341, 1338, 1246, 1146, 752, 694. (**Apêndice B**)

### 3.2.3.2 Síntese do Ácido 2-(Benzamido)benzóico (**2BBA**)

A síntese do ácido 2-(benzamido)benzóico (**2BBA**) (**Esquema 7**) foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Bozdag e colaboradores (BOZDAG et al. 2015). Em um balão de fundo redondo contendo uma barra de agitação magnética foi adicionado ácido antranílico (1,37 g, 10 mmols) e trietilamina (1,52 mL, 11 mmols) dissolvidos em 40 mL de diclorometano. Uma solução de

cloreto de benzoila (1,17 mL, 10 mmols) em 10 mL de diclorometano foi adicionado gota a gota no balão. A reação permaneceu em agitação por 5 horas em temperatura ambiente. Após esse tempo, foi lavado então a mistura reacional com água e formou-se um precipitado o qual foi filtrado e seco á vácuo, o mesmo foi caracterizado após ser purificado por recristalização com clorofórmio. Foi obtido 0,455 g de **2BBA** (R. 18,9%). P.f.: 179-181 °C (lit. 181-183 °C). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.83 (s, 1H), 12.24 (s, 1H), 8.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J* = 19.4, 6.4 Hz, 4H), 7.65 (s, 6H), 7.25 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.08, 164.70, 141.20, 134.57, 134.32, 132.17, 131.31, 128.98, 127.04, 122.91, 119.88, 116.49. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3049, 2608, 2467, 1687, 1644, 1609, 1540, 1452, 1318, 1230, 760, 706. (**Apêndice C**)

#### Esquema 7 – Reação de síntese do **2BBA**.



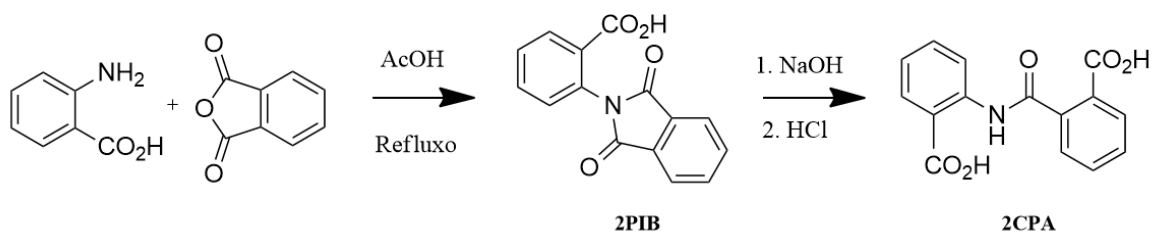
#### 3.2.3.3 Síntese do Ácido 2-[(2-carboxibenzoil)amino]benzóico (**2CPA**)

O ácido 2-[(2-carboxibenzoil)amino]benzóico, usualmente conhecido como ácido 2-carboxiftanílico (**2CPA**) foi sintetizada baseada na metodologia descrita por Per Wiklund e colaboradores (WIKLUND; ROMERO; BERGMAN, 2003) em duas etapas (**Esquema 8**). Na primeira etapa há a formação da imida, ácido 2-ftalimidobenzóico (**2PIB**). Em um balão de fundo redondo contendo uma barra de agitação magnética e adaptado a um condensador de refluxo refrigerado foi adicionado 6 mL de ácido acético e elevou-se a temperatura de refluxo (aprox. 120 °C), adicionou-se anidrido ftálico (1,481 g, 10 mmols) e ácido antranílico (1,246 g, 9,09 mmols). Deixou-se em agitação e refluxo por 15 horas. Após esse tempo, deixou-se esfriar e virou-se em 10 mL de H<sub>2</sub>O e o precipitado formado foi filtrado, lavado com água e seco em alto vácuo. Foi obtido 1,28 g (R. 53%) do sólido cinza esperado puro (**2PIB**). P.f.: 216-218 °C (lit. 216-217 °C). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-

$d_6$ ):  $\delta$  13.13 (br s, 1H), 8.07 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 8.02-7.90 (m, 4H), 7.78 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.65 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  167.1, 166.1, 134.8, 133.0, 131.8, 131.5, 131.0, 130.7, 129.3, 123.5. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3093, 2752, 2610, 1725, 1699, 1601, 1494, 1387, 1293, 1281, 1235, 1117, 1071, 895, 756, 718. (**Apêndice D**)

A segunda etapa, em um balão de fundo redondo foi adicionado 6 mL de água destilada, **2PIB** (300 mg, 1,12 mmol) e 4 equivalentes de NaOH (179,6 mg, 4,49 mmol) e foram agitadas em temperatura ambiente por 18 horas. Após esse tempo, a solução foi acidificada ( $\text{pH} < 2$ ) com HCl, obtendo assim um precipitado que foi filtrado, lavado com uma solução de HCl 0,2 M gelada e seco sobre pressão reduzida, resultando num sólido branco. Foi obtido então 270 mg de **2CPA** (R. 84%). P.f.: 165-167 °C (lit. 171-172 °C). RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  13.40 (br s, 2H), 11.56 (s, 1H), 8.64 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.04 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.89 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 7.71-7.59 (m, 4H), 7.22 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  169.7, 167.6, 167.0, 141.1, 138.1, 134.2, 131.9, 131.2, 130.6, 130.2, 129.8, 127.3, 123.0, 119.9, 116.5. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3039, 2646, 2598, 1716, 1687, 1637, 1607, 1590, 1533, 1454, 1366, 1326, 1227, 1154, 757, 726. (**Apêndice E**)

### Esquema 8 – Reação de síntese do **2CPA**.

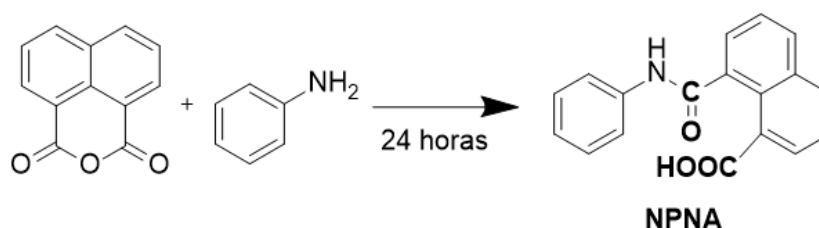


#### 3.2.3.4 Síntese do ácido N-fenilnaftalanílico (**NPNA**)

A síntese desta naftamida, ácido *N*-fenilnaftalanílico (**NPNA**), foi adaptada pela metodologia apresentada por Souza (SOUZA et al. 2017). Em um balão de fundo redondo contendo uma barra de agitação magnética foi adicionado anidrido 1,8-naftálico (3,0 g, 15 mmols) em anilina (27,4 mL, 0,3 mol) e deixado sobre

agitação por 24 horas (**Esquema 9**). Após esse período, com a finalidade de retirar os reagentes em excesso foi realizado uma coluna de sílica com uma mistura de solventes de acetato de etila e hexano 95:5, rotaevaporado e seco á vácuo, resultando em um sólido branco. Foi obtido 3,88g de **NPNA** (R. 88%). RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.62 (s, 1H), 8.54 (dd,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, 1H), 8.14 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.87 (ddd,  $J = 19.5, 7.2, 1.2$  Hz, 2H), 7.77 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.68 – 7.58 (m, 2H), 7.34 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.08 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.04 – 6.93 (m, 2H), 6.55 (dd,  $J = 8.4, 0.9$  Hz, 3H), 6.48 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  169.5, 168.1, 148.6, 139.8, 134.9, 134.1, 131.8, 131.5, 131.0, 128.8, 128.4, 128.1, 126.5, 125.3, 123.2, 120.1, 115.7, 113.9. (**Apêndice F**)

### Esquema 9 – Reação de síntese do NPNA.



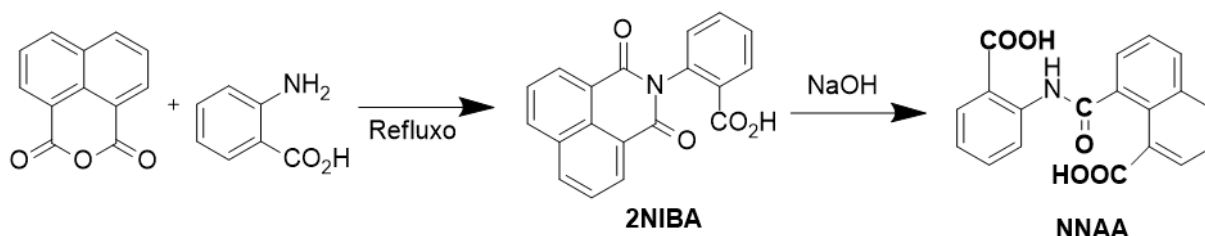
#### 3.2.3.5 Síntese do ácido *N*-Naftalantranílico (**NNAA**)

A síntese do ácido *N*-Naftalantranílico (**NNAA**) se deu a partir do precursor ácido 2-(1,8-naftalimido)benzoico (**2NIBA**), como pode-se ver no **Esquema 10**. A síntese do **2NIBA** foi de acordo com a metodologia de Duncanson (DUNCANSON et al. 2012). Em um balão de fundo redondo contendo uma barra de agitação magnética e adaptado a um condensador de refluxo refrigerado foi adicionado uma mistura de anidrido 1,8-naftálico (0,6 g, 3 mmol), ácido antranílico (0,43 g, 3 mmol), trietilamina (0,45 g, 4,35 mmol) e 10 mL de DMF. Elevou-se a temperatura de refluxo (aprox. 140° C) e deixou-se em agitação por 16 horas. Após esse tempo esperou-se esfriar, foi filtrado e o sólido foi rotaevaporado e seco á vácuo. O sólido cinza claro foi caracterizado após ser purificado por recristalização com metanol. Foi obtido 0,67 g de **2NIBA** (R. 75%). P.f.: 296 °C (lit. 292-293 °C). RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.51 (d,  $J = 7.7$  Hz, 4H), 8.13 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.90 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.78 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.55 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  165.9, 163.7, 136.3,

134.6, 133.1, 131.5, 131.2, 131.0, 130.8, 129.0, 128.8, 127.9, 127.3, 122.5.  
**(Apêndice G)**

A segunda etapa, em um balão de fundo redondo foi adicionado 6 mL de água destilada, **2NIBA** (355 mg, 1,12 mmols) e 4 equivalentes de NaOH (179,6 mg, 4,49 mmol) e foram agitadas em temperatura ambiente por 18 horas. Após esse tempo, a solução foi acidificada (pH < 2) com HCl, obtendo assim um precipitado que foi filtrado, lavado com uma solução de HCl 0,2 M gelada e seco sobre pressão reduzida, resultando num sólido branco. Foi obtido então 0,304 mg de **NNAA** (R. 81%). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.90 (s, 1H), 8.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.68 (dd, *J* = 14.9, 7.3 Hz, 3H), 7.21 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 169.77, 169.47, 167.81, 141.53, 135.42, 135.05, 134.26, 134.00, 132.52, 131.96, 131.59, 131.09, 129.26, 127.56, 127.41, 125.64, 122.68, 120.32, 116.71. **(Apêndice H)**

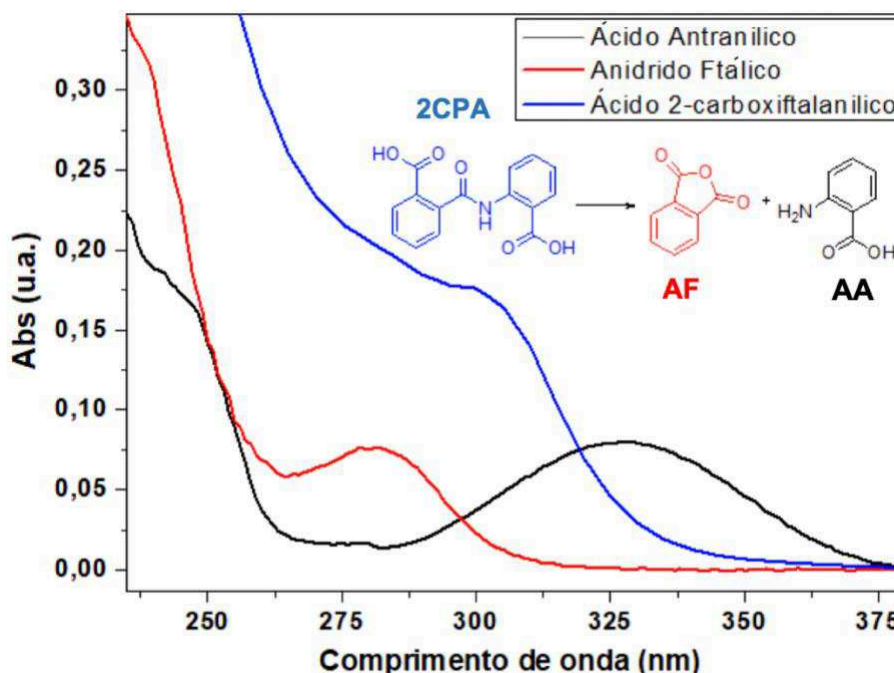
**Esquema 10 – Reação de síntese do NNAA.**



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente foram sintetizadas as amidas de interesse e identificadas por técnicas de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , infravermelho, ponto de fusão e UV-vis. A espectroscopia na região do ultravioleta e visível foi estabelecida como a melhor e mais versátil técnica para acompanhar as cinéticas de clivagem da ligação C-N nas amidas obtidas. Na **Figura 15** é possível verificar a relação entre os espectros de UV-Vis das espécies (reagente e produtos) envolvidas na reação de clivagem da amida **2CPA** na temperatura de 25 °C e pH 3,5. A amida (reagente) tem a sua principal banda de absorção em  $\lambda=310$  nm. Em contrapartida o anidrido ftálico e o ácido antranílico (produtos) apresentam suas bandas em  $\lambda=280$  nm e  $\lambda=330$  nm, respectivamente.

**Figura 15** – Gráfico de absorvância para as espécies envolvidas na reação de clivagem do composto **2CPA**, a 25 °C e pH 3,5.



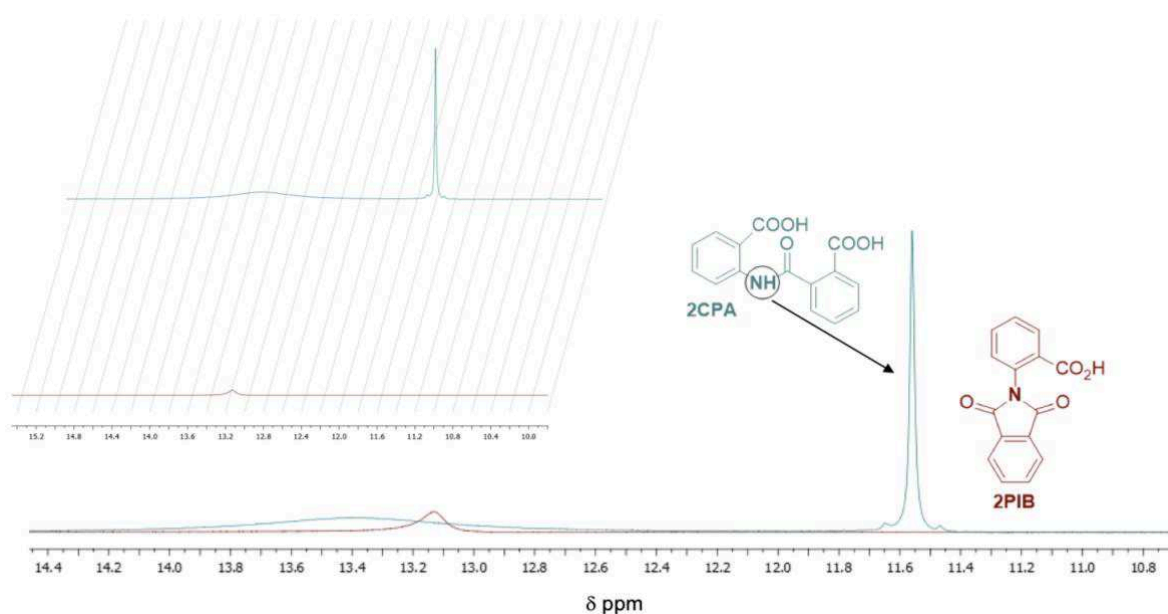
A seguir serão apresentadas as principais diferenças na caracterização dos compostos **PA**, **2BBA** e **2CPA** e **NNAA** e **NPNA** analisado por técnicas de RMN  $^{13}\text{C}$ , além dos estudos cinéticos de clivagem das amidas **PA** e **2CPA** e os cálculos teóricos com o intuito de investigação mecanística da reação de clivagem do **2CPA**.

#### 4.1 DADOS ESPECTROSCÓPICOS QUE EVIDENCIAM MUDANÇAS ESTRUTURAIS

Pelo simples fato de apresentarem uma estrutura bastante similar, muitas vezes surge a dificuldade de diferenciação entre as amidas submetidas ao estudo deste trabalho. Através das análises de caracterização apresentadas nos apêndices desta dissertação, é possível encontrar alguns pontos característicos e cruciais para a diferenciação das mesmas.

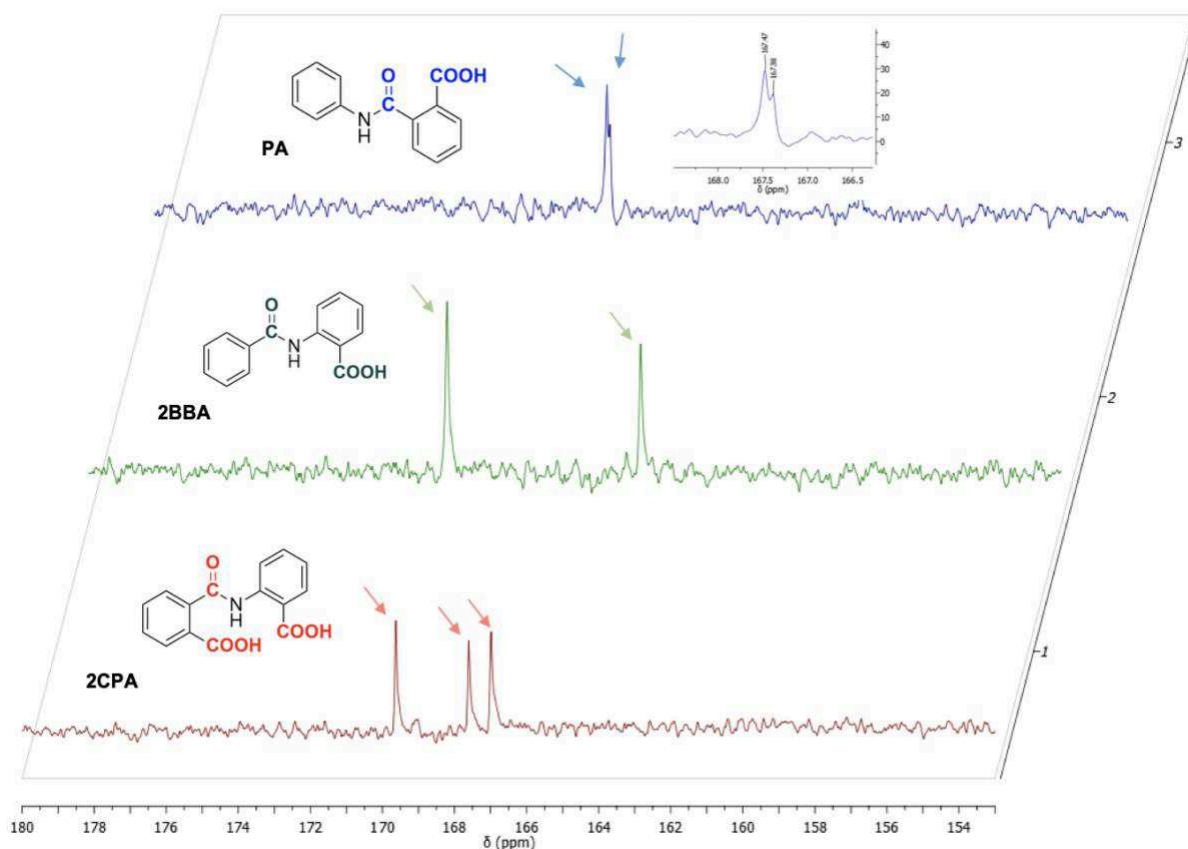
Para diferenciar, o primeiro passo é analisar as estruturas e identificar a maior diferença estrutural dos compostos que possam ser visíveis nos seus respectivos espectros. Com o auxílio dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , foi possível então confirmar a formação das amidas desejadas através do aparecimento do sinal referente ao próton ligado ao átomo de nitrogênio, até então ausente na imida (intermediário), confirmando assim que o processo de “abertura” da imida ocorreu com sucesso. Na **Figura 16**, utilizando o **2CPA** como exemplo, é nítido o aparecimento deste sinal em  $\delta$  11,55 ppm, o qual era ausente na forma de imida **2PIB**.

**Figura 16** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das regiões de  $\delta$  14,4-10,9 ppm, dando ênfase à presença e ausência do hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio dos compostos **2CPA** e **2PIB**, respectivamente.



Comparando os produtos finais, é notável que a maior discrepância nas estruturas se encontra na quantidade de grupos carbonílicos no substrato **2CPA** quando comparado ao **PA** e **2BBA**. Portanto, deve-se levar em consideração a quantidade de sinais referentes aos carbonos carbonílicos presentes nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de cada substrato (**Figura 17**). Nele, é possível distinguir o **2CPA** por possuir 3 sinais referentes aos carbonos carbonílicos (169.7, 167.6 e 167.0) dos outros dois substratos **PA** e **2BBA**, por possuírem apenas dois sinais referentes aos carbonos carbonílicos.

**Figura 17** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das regiões de  $\delta$  180-153 ppm, dando ênfase aos carbonos carbonílicos dos compostos **PA**, **2BBA** e **2CPA**, respectivamente.

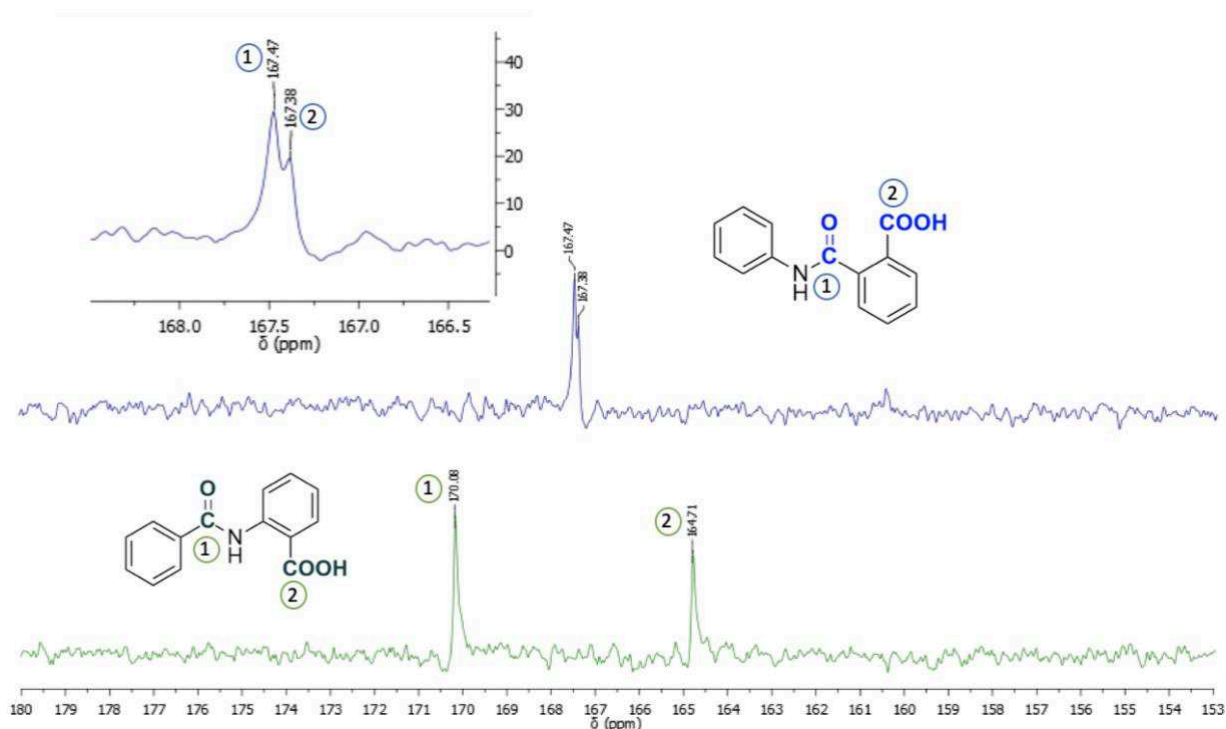


Os dois compostos restantes, **PA** e **2BBA**, por possuírem a mesma fórmula molecular, é de maior complexidade serem diferenciados pelos espectros, visto que ambos apresentam a mesma quantidade de carbonos e hidrogênios. Porém, analisando a mesma região estudada acima, na região dos carbonos carbonílicos é visto uma diferença significativa nos deslocamentos químicos dos sinais



carbonílicos, sendo do **PA** (167.47 e 167.38) e do **2BBA** (170.08 e 164.71) como é possível observar na **Figura 18**. Com isso, foi possível diferenciar os dois substratos, visto que no primeiro caso os sinais carbonílicos se encontram muito próximos um do outro, portanto eles devem sofrer ambos o mesmo efeito de desproteção, estando os dois presentes em um mesmo anel mais deficiente de elétrons, sendo então o **PA**. Conseqüentemente, no segundo caso, os dois sinais carbonílicos são magneticamente diferentes, sofrem um efeito distinto, portanto, se enquadra perfeitamente no caso do **2BBA**.

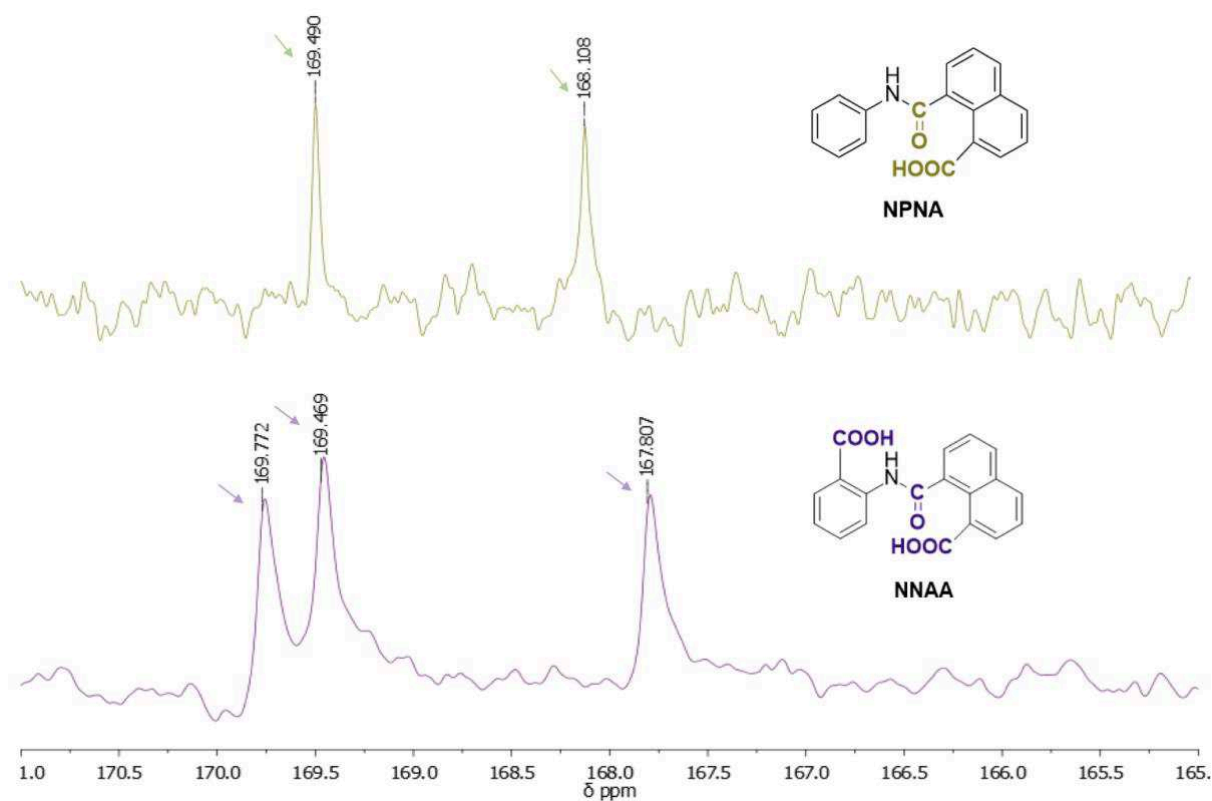
**Figura 18** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das regiões de  $\delta$  180-153 ppm, dando ênfase aos carbonos carbonílicos dos compostos **PA** e **2BBA**, respectivamente.



Utilizando os mesmos conhecimentos descritos acima, é possível distinguir os dois substratos naftálicos **NPNA** e **NNAA**. No primeiro caso, há a presença de apenas 2 (dois) grupos carbonílicos, o que irá acarretar no aparecimento de apenas dois sinais carbonílicos (169.49 e 168.11), enquanto no caso do **NNAA**, por apresentar em sua estrutura molecular 3 grupos carbonílicos irá, conseqüentemente,

obter três sinais referentes ao carbono carbonílico (169.77, 169.47 e 167.81) como é possível observar na **Figura 19**.

**Figura 19** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das regiões de  $\delta$  171-165 ppm, dando ênfase aos carbonos carbonílicos dos compostos **NPNA** e **NNAA**, respectivamente.



Com a obtenção e caracterização dos substratos realizados com sucesso, foi possível então realizar os estudos cinéticos com a finalidade de observar a influência dos grupos carbonílicos na clivagem da ligação C-N das amidas.

## 4.2 MEDIDAS CINÉTICAS

A seguir serão analisadas as medidas cinéticas para **PA** e **2CPA** com a finalidade de estudo da função e importância do grupo carboxilato na clivagem da ligação C-N, a fim de um melhor entendimento sobre a catálise bifuncional.

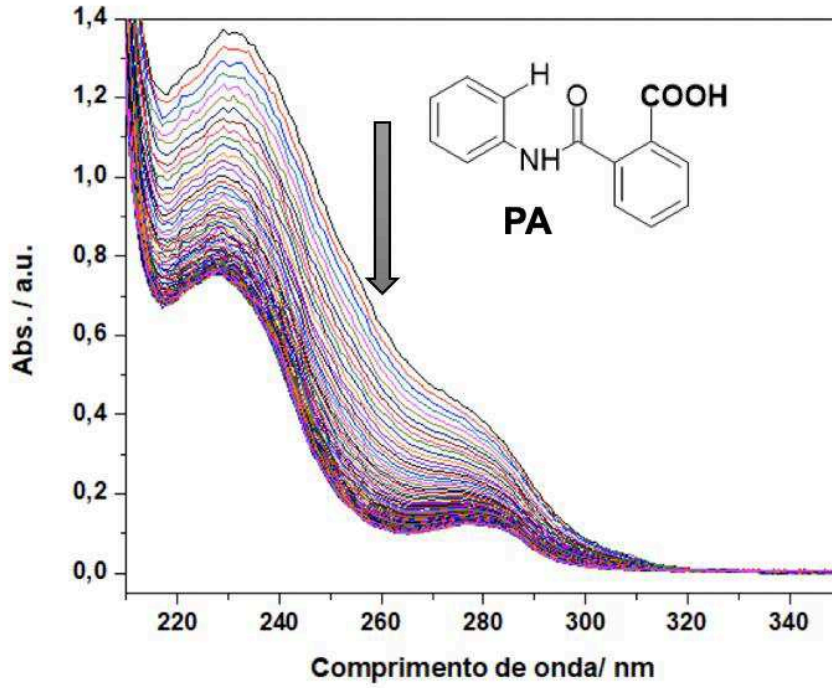
A **Figura 15**, apresentada em páginas anteriores, mostra o espectro de absorção de UV-Vis do anidrido ftálico/ ácido ftálico ( $\lambda = 280$  nm) e o ácido antranílico (**AA**,  $\lambda = 330$  nm) em  $1,0 \times 10^{-4}$  M, pH 3,50 e 25 °C. Em valores de pH inferiores o anidrido ftálico se hidrolisa à ácido ftálico. Portanto, a decomposição do **2CPA** leva ao ácido ftálico e ácido antranílico como produtos.

Não foi possível acompanhar as reações de clivagem da amida **2BBA** e das naftamidas por espectrofotometria de UV-Vis. A amida demonstrou-se como uma reação muito lenta para ser acompanhada de maneira convencional. Já para acompanhar as reações de clivagem das naftamidas, existe sobreposição de bandas entre os reagentes e produtos, dificultando assim a observação da variação espectral.

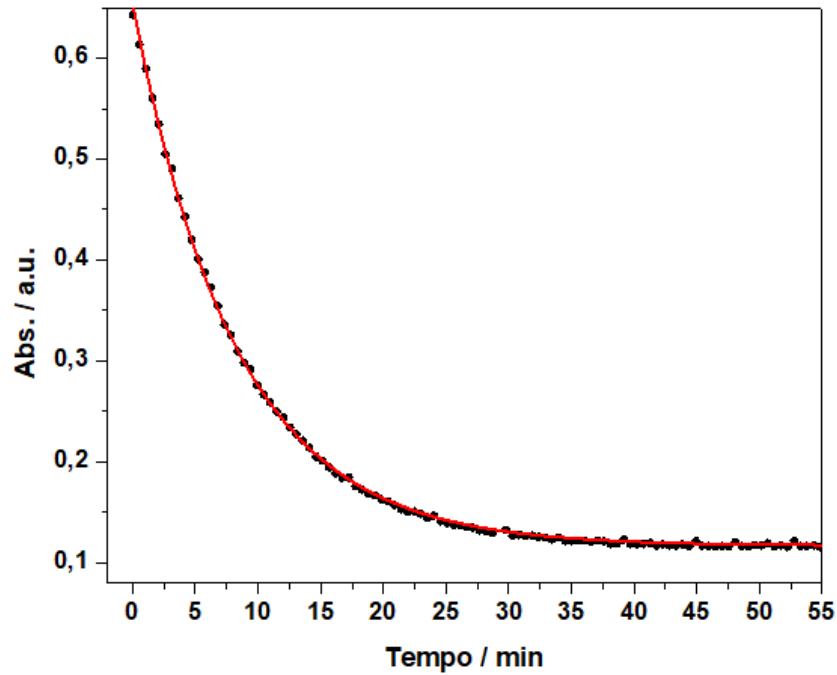
### 4.2.1 Reação de clivagem da amida PA

A reação foi acompanhada por espectrofotometria UV-Vis através da decomposição do substrato **PA** em  $\lambda = 260$  nm. O gráfico das absorvâncias medidas em pH 3,5 em função do comprimento de onda (**Figura 20**) e o gráfico relacionando as absorvâncias com o tempo (**Figura 21**), se encontram abaixo. Nota-se que para a reação atingir a saturação foram necessários aproximadamente 20 minutos. Com pode-se obter a constante de velocidade observada ( $k_{obs}$ , primeira ordem) para este valor de pH.

**Figura 20** – Gráfico de absorvância vs. comprimento de onda para a reação de clivagem do composto **PA**, a 45 °C e pH 2,0.

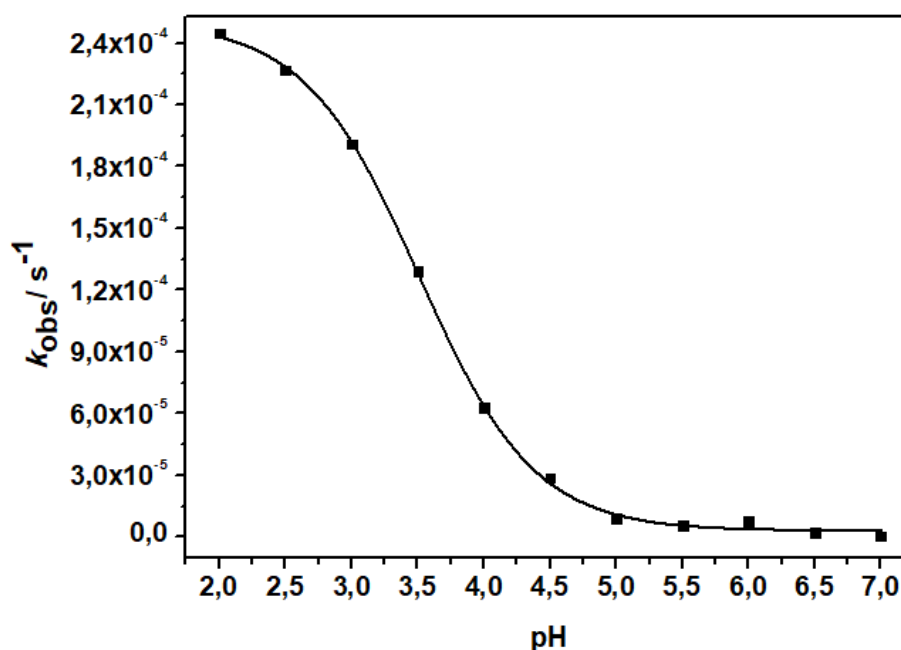


**Figura 21** – Gráfico das absorvâncias obtidas em 260 nm vs. tempo, na reação de clivagem do composto **PA**, a 45 °C e pH 2,0.



A diferença espectral permite analisar e monitorar o progresso da reação e também a obtenção das constantes de velocidade observada de primeira ordem, tornando possível o estudo em mudança do pH do meio na reação de clivagem do substrato **PA**. A reação foi acompanhada em uma faixa de pH de 2,0-7,0 a 25 °C (**Figura 22**), obtendo assim  $k_{obs}$  para seus respectivos valores de pH. O perfil completo de pH estudado apresenta duas regiões distintas. A clivagem começa a partir do pH 2,0, onde é o seu máximo (maior valor entre as constantes de velocidades observadas) e conforme vai aumentando o valor do pH as constantes diminuem sua grandeza, atingindo um patamar em que os valores de  $k_{obs}$  se mantem constantes até pH 7,0.

**Figura 22** – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH 2,0-7,0 nas reações de clivagem do composto **PA** em água à 25 °C.

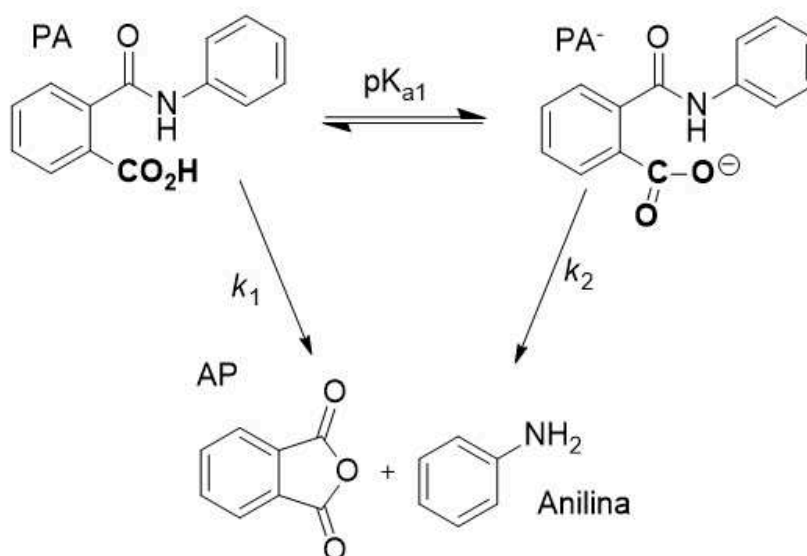


Correspondente a estas mudanças a partir dos valores de pH, um ajuste pode ser obtido, **Equação 6**, e atribuído para essa variação em função dos valores de constante de velocidade observada. Esse ajuste é atribuído ao equilíbrio químico entre as espécies protonada e desprotonada do **PA** (**Esquema 11**). Esse equilíbrio

tem como constante  $K_a$ , e possibilita obter as duas constantes absolutas,  $k_1$  e  $k_2$ , para cada espécie.

$$k_{obs} = \frac{k_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H_3O^+]}} + \frac{k_2}{1 + \frac{[H_3O^+]}{K_{a1}}} \quad (6)$$

**Esquema 11** – Representação dos estados de protonação da amida **PA** de acordo com o seu valor de  $pK_a$  e suas constantes de equilíbrio e velocidade.



**Tabela 3** – Valores obtidos através do ajuste da Equação 6 e o equilíbrio acima para a reação de clivagem do **PA**.

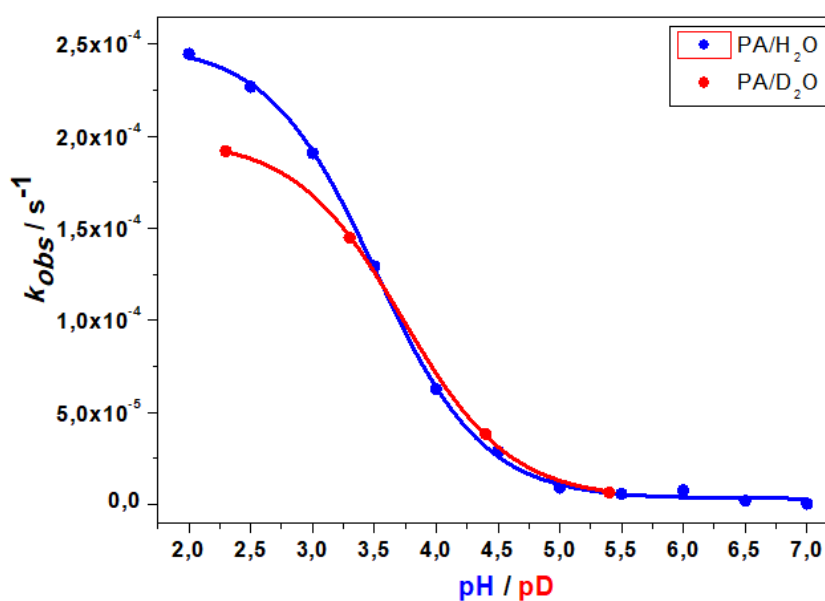
$pK_{a1}$	$k_1$	$k_2$
3,50	$2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$3,4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

O perfil observado pode ser entendido que há uma catálise com o pH diminuindo de 5,0 para 2,0, onde do valor do pH 3,50 para pH 2,0, criando uma espécie ácida não iônica, **PA**, que é associada a um  $k_1$  de aproximadamente 70 vezes maior que  $k_2$ . O grande aumento entre as constantes quando o pH decresce de 5,0 para 2,0, corresponde a um grupo carboxilato sendo convertido a um ácido carboxílico ( $pK_a \sim 4,0$ ).

Para analisar com maior profundidade sobre o efeito apresentado no perfil de pH, estudou-se os efeitos isotópicos cinético do solvente na clivagem do **PA**, e foi

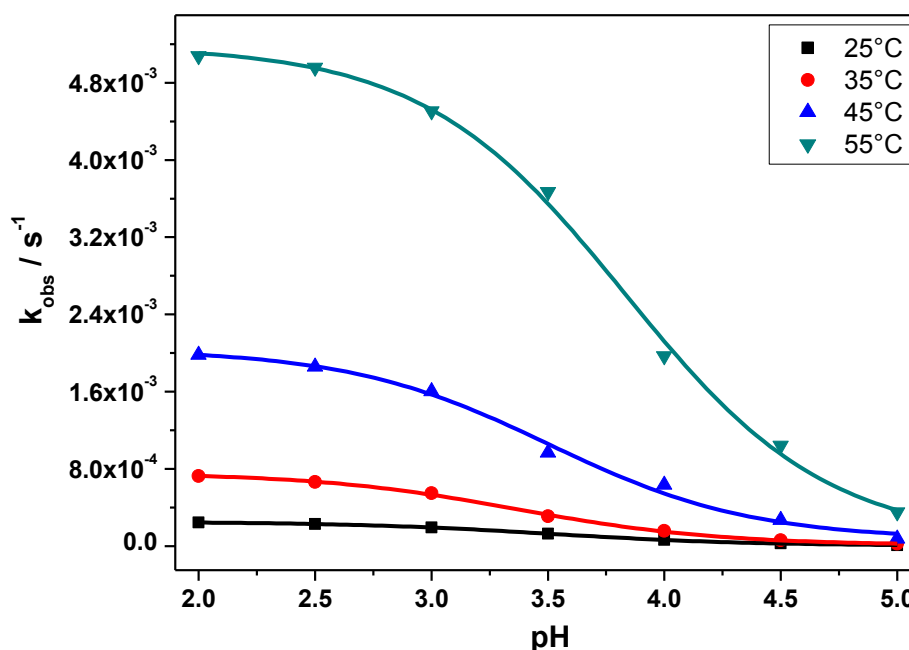
possível atribuir o mesmo ajuste em função de pD, obtendo constantes  $k_1$ ,  $k_2$  e  $K_a$  (**Apêndice I**) (**Figura 23**). Ao se comparar as constantes  $k_1$  (maior valor entre as constantes de velocidade) em  $H_2O$  e  $D_2O$ , o efeito isotópico do solvente  $k_H/k_D$  observado foi de 1,26, um pequeno efeito. Desta forma, este pequeno valor indica que a quebra de uma ligação O-H ou O-D apresenta uma baixa possibilidade de ocorrer na etapa determinante de velocidade, ou seja, indica ausência de transferência de prótons no estado de transição, estando de acordo com o mecanismo sugerido de um ataque nucleofílico intramolecular. O Deutério, apesar de ser quimicamente idêntico ao hidrogênio, tem uma massa atômica duas vezes maior e com isso a força de ligação O-D (do solvente) é maior que a força de O-H, que é justificada ao fato de possuir uma energia vibracional mais baixa que a ligação O-H.

**Figura 23** – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH/ pD 2,0-7,0 nas reações de clivagem de **PA** à 25 °C.



A reação de clivagem da amida **PA** foi estudada em diferentes temperaturas de 25-55 °C (**Figura 24**) com a finalidade de obter os parâmetros de ativação (energia livre, entalpia e entropia).

**Figura 24** – Gráfico das constantes de velocidade observadas em função do pH (2,0-5,0) nas reações de clivagem do composto **PA** de 25 à 55 °C.



Através do ajuste linear para  $k_1$  e  $k_2$ , através do plot de Eyring (**Apêndice H**) foi possível obter os valores dispostos na **Tabela 4**. Os valores obtidos indicam que  $k_1$  tem uma entalpia de ativação baixa quando comparado ao  $k_2$ , sendo assim, o fator entálpico mais importante para a faixa menor de pH e o fator entrópico para a faixa maior de pH. Além disso, os valores encontrados sugerem uma reação unimolecular, onde o grupo carboxílico age como um nucleófilo. É possível concluir que o valor de  $\Delta G^\ddagger$  em 25 °C para  $k_1$  é menor que o  $k_2$ , que é condizente com o valor encontrado para cada uma das constantes ( $k_1 > k_2$ ).

**Tabela 4** – Valores dos parâmetros de ativação obtidos pelo plot de Eyring para os valores de  $k_1$  e  $k_2$ .

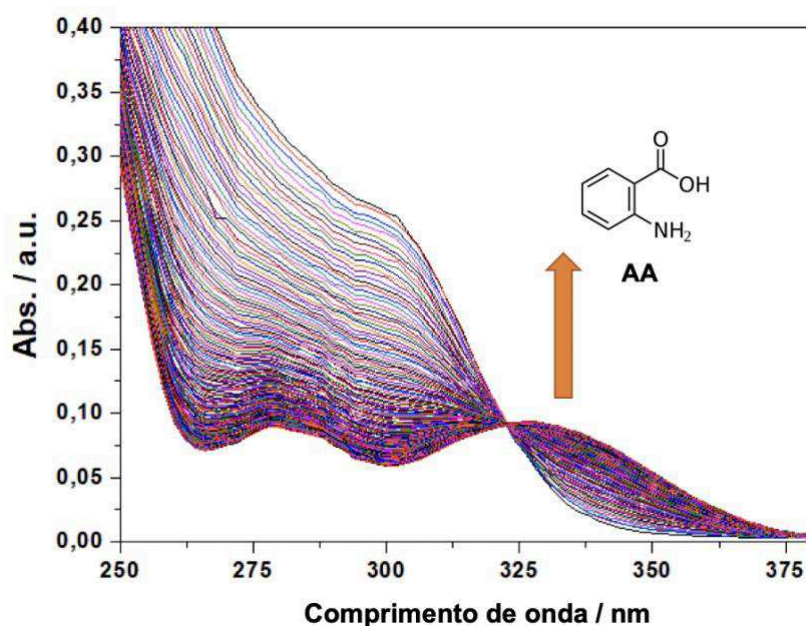
Parâmetros de ativação para valores de $k_1$			Parâmetros de ativação para valores de $k_2$		
$\Delta G^\ddagger$ em 25 °C / kcal.mol <sup>-1</sup>	$\Delta H^\ddagger$ / kcal.mol <sup>-1</sup>	$\Delta S^\ddagger$ / cal.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>	$\Delta G^\ddagger$ em 25 °C / kcal.mol <sup>-1</sup>	$\Delta H^\ddagger$ / kcal.mol <sup>-1</sup>	$\Delta S^\ddagger$ / cal.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
22,36	18,98	-11,34	25,85	23,04	-9,42



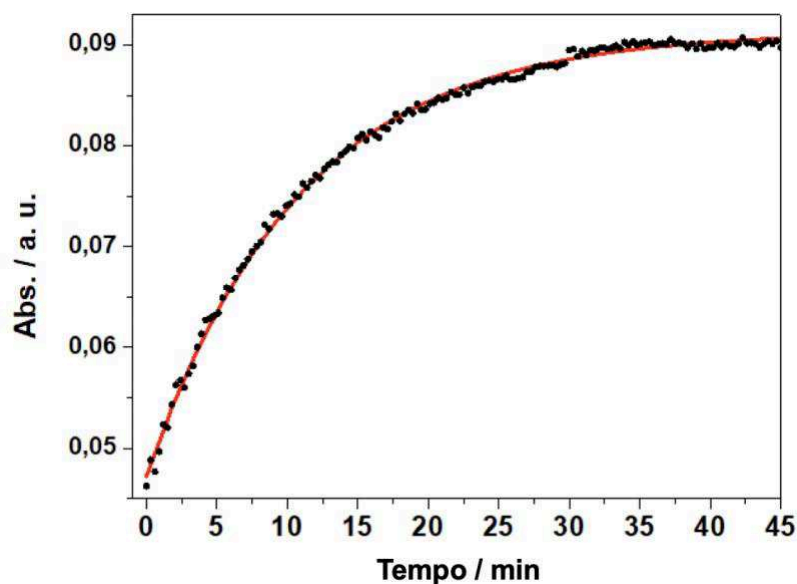
#### 4.2.2 Reação de clivagem do 2CPA

Como já mencionado, a reação pode ser acompanhada através da formação do produto ácido antranílico em  $\lambda = 330$  nm. O gráfico das absorvâncias medidas em pH 3,5 em função do comprimento de onda (**Figura 25**) e o gráfico relacionando as absorvâncias com o tempo (**Figura 26**), se encontram abaixo. Nota-se que para a reação atingir o valor de 0,07 (máxima conversão) de absorvância foram necessários aproximadamente 45 minutos. Com isso, ajustando o gráfico com a **Equação 3**, pode-se obter a constante de velocidade observada ( $k_{obs}$ ) para este valor de pH.

**Figura 25** – Gráfico de absorvância vs. comprimento de onda para a reação de clivagem do composto **2CPA**, a 25 °C e pH 3,5.

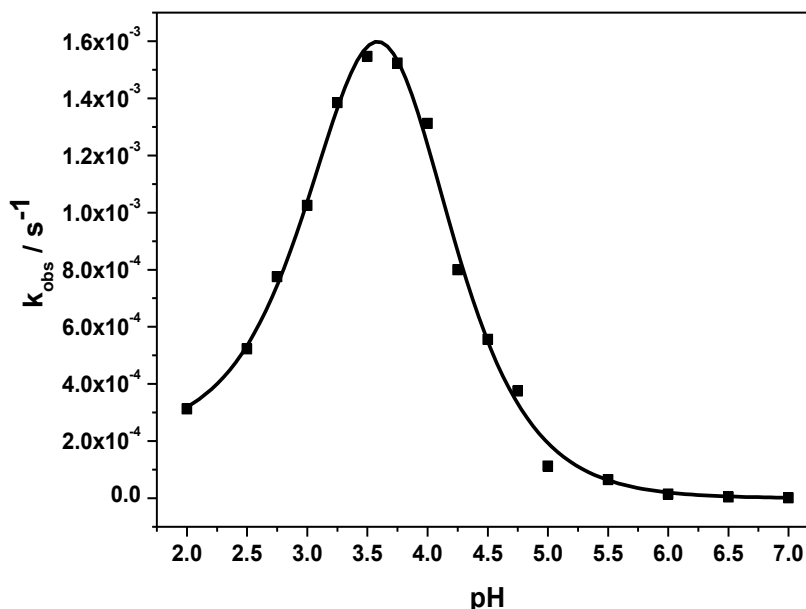


**Figura 26** – Gráfico das absorvâncias obtidas no comprimento de onda 330 nm em função do tempo na reação de clivagem do composto **2CPA**, a 25 °C e pH 3,5.



Desta maneira, pode-se obter os valores de constante observada  $k_{obs}$  para cada valor de pH, conforme observado na **Figura 27**. O perfil completo de pH estudado apresenta a clivagem da ligação C-N na amida **2CPA**, a partir de pH = 2,0. Um perfil de sino é observado entre os valores de pH 2,0-5,0. O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ , obtido pela **Equação 2**) da reação é de apenas 8 minutos no máximo do gráfico em perfil de sino (entre os valores de pH 3,4-3,6). Esse perfil já foi demonstrado anteriormente na literatura sobre essas condições, entretanto, essa condição, atípica quando comparada em reações de clivagem de amidas ainda gera discussão acerca da cinética e mecanismo. Posteriormente, é atingido um patamar em que os valores de  $k_{obs}$  se mantém ligeiramente semelhantes na faixa de pH 5,0-7,0.

**Figura 27** – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH 2,0-7,0 na reação de clivagem do composto **2CPA** à 25 °C.

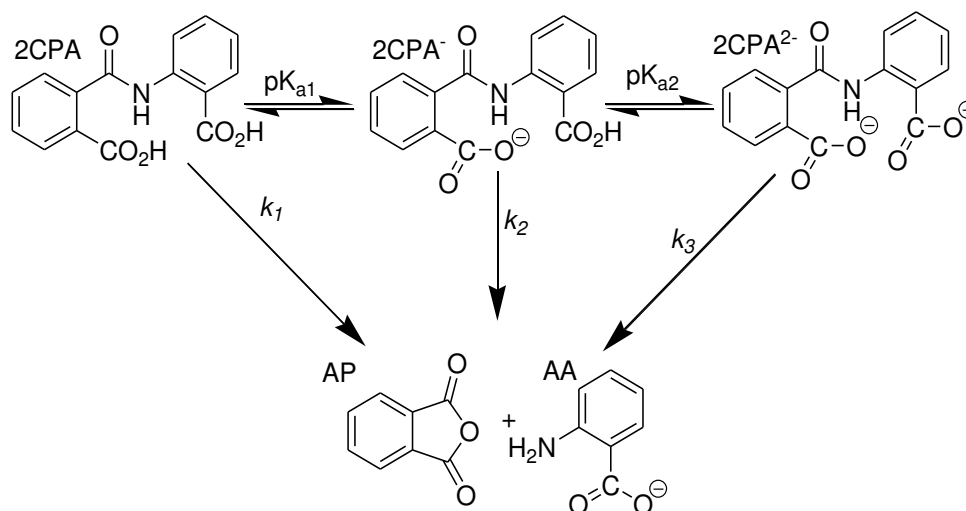


Para compreender tal comportamento, foi atribuído um ajuste aos valores de  $k_{obs}$  vs. pH, obtido pela **Equação 7**. Nesse ajuste é possível distribuir a participação de três espécies, uma neutra e duas aniônicas, em função do pH (**Esquema 12**), sendo assim possível obter dois equilíbrios químicos ( $K_{a1}$  e  $K_{a2}$ ) que separam essas espécies e conseqüentemente uma constante absoluta de primeira ordem para cada uma ( $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$ ).

$$k_{obs} = \frac{k_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2}} + \frac{k_2}{1 + \frac{[H_3O^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[H_3O^+]}} + \frac{k_3}{1 + \frac{[H_3O^+]}{K_{a2}} + \frac{[H_3O^+]^2}{K_{a1}K_{a2}}}$$

(7)

**Esquema 12** – Representação dos estados de protonação da amida **2CPA** de acordo com seu valor de  $pK_a$  e as constantes cinéticas obtidas na reação de clivagem da ligação C-N.



**Tabela 5** – Valores obtidos através do ajuste da Equação 7 e o equilíbrio acima para a reação de clivagem do **2CPA**.

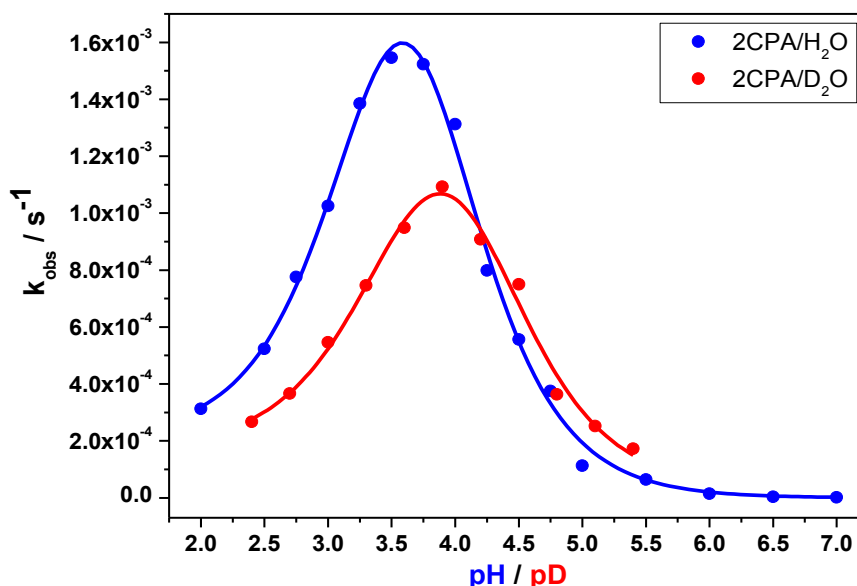
$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$k_1$	$k_2$	$k_3$
3,30	3,70	$2,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$4,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$1,4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

Os valores encontrados foram consistentes com os estudos de Morawetz (MORAWETZ 1962). O perfil de sino observado pode ser entendido que na faixa de valores de pH 5,0-7,0 há uma espécie dianiônica, **2CPA<sup>2-</sup>**, que é predominante e os ácidos carboxílicos se encontram desprotonados (carboxilatos) nessa faixa, impedindo a possibilidade de uma catálise ácida intramolecular, logo, a constante de velocidade corresponde a um valor de  $k_3$  menor quando comparado aos outros ( $k_3 < k_1$  e  $k_3 \ll k_2$ ). No máximo do perfil de sino, a espécie aniônica é formada, **2CPA<sup>-</sup>**, provendo ambos grupos ácido carboxílico e carboxilato. A constante de velocidade  $k_2$  é maior que todas as outras e consistente com uma catálise bifuncional onde o carboxilato pode agir como um nucleófilo e o ácido carboxílico como um ácido geral. Ainda é possível observar uma espécie neutra, **2CPA**, que é associada com um  $k_1$  de maior valor em relação a  $k_3$ , entretanto menor em relação a  $k_2$ .

Para maior entendimento sobre uma possível transferência do próton na etapa determinante de velocidade e explorar mais as evidências de uma catálise bifuncional realizou-se a análise de efeito isotópico de solvente (EIS) envolvendo a

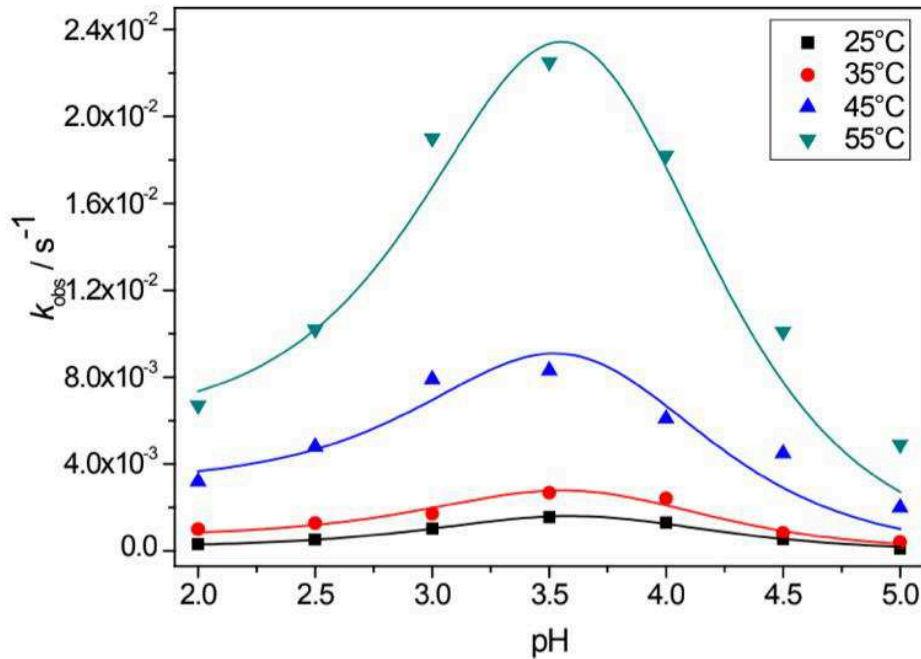
reação de clivagem de **2CPA** (apêndice K) apresentado no gráfico abaixo (**Figura 28**). Foi observado que houve diminuição no valor da constante de velocidade observada, quanto há substituição do isótopo de hidrogênio. O efeito isotópico de solvente apresentou um valor  $EIS > 1$ , isso se deve ao fato da água deuterada ser mais “pesada” que  $H_2O$ , portanto, existe uma maior possibilidade (quando comparado ao estudo do **PA** anteriormente) de a transferência de próton se encontra na etapa determinante da velocidade, sendo assim mais uma evidência da catálise bifuncional ( $k_H/k_D=1,90$ ).

**Figura 28** – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH/pD nas reações de clivagem de **2CPA** à 25 °C.



Ainda com os dados cinéticos obtidos, não seria possível esclarecer dúvida referente ao mecanismo da reação. Com o intuito de responder essa questão, foram realizados estudos termodinâmicos, para obtenção dos parâmetros com o intuito de complementar e comprovar tal mecanismo. Para tanto, a reação foi estudada em diferentes temperaturas de 25 a 55 °C (**Figura 29**). Na sequência, utilizando a **Equação 5**, foi possível obter um valor de  $k_2$  para cada temperatura. Sendo assim, o plot de Eyring obteve uma correlação linear (**Apêndice J**) e foi possível atribuir os valores de energia livre, entalpia e entropia de ativação para **2CPA** (**Apêndice K**) (**Tabela 6**).

**Figura 29** – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH 2,0-5,0 nas reações de clivagem do composto **2CPA** de 25 à 55 °C.



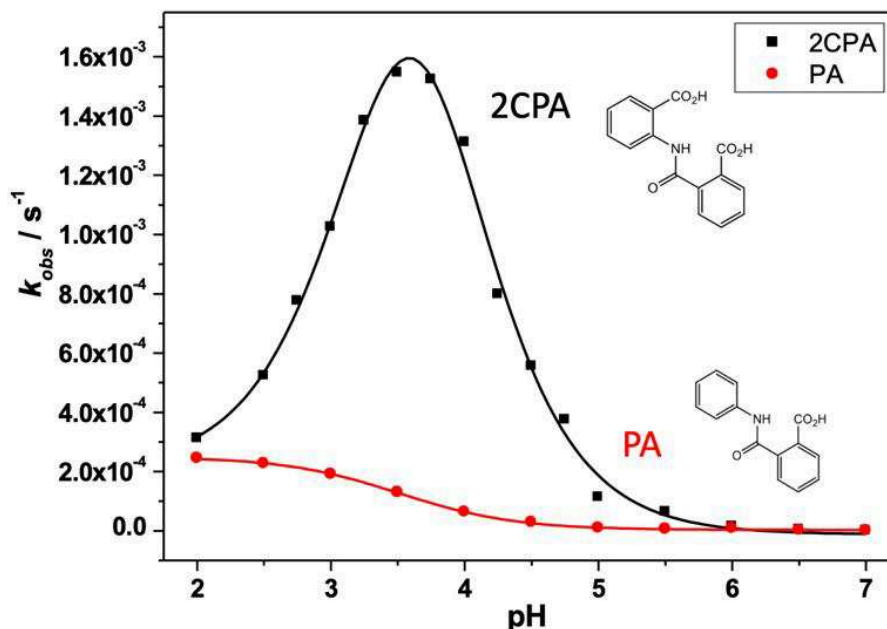
**Tabela 6** – Valores dos parâmetros de ativação obtidos pelo plot de Eyring.

### Parâmetros de ativação

$\Delta G^\ddagger$ em 25 °C / kcal.mol <sup>-1</sup>	$\Delta H^\ddagger$ / kcal.mol <sup>-1</sup>	$\Delta S^\ddagger$ / cal.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
20,73	16,89	-12,88

Em comparação, podemos citar a análise cinética obtida na amida **PA**. Inicialmente, apresentou cinética com valores de constantes de velocidades bastante inferiores quando comparados ao composto **2CPA** entre os valores de pH 3,0-4,5, como é possível observar na **Figura 30**.

**Figura 30** – Gráfico das constantes de velocidades observadas em função do pH 2,0-7,0 nas reações de clivagem dos compostos **PA** e **2CPA** à 25 °C.



Comparando os valores de energia livre de ativação em 25 °C, para o **PA** tivemos valores acima de 22 kilocalorias, enquanto que para **2CPA** 20,73 kcal.mol<sup>-1</sup>. A diferença ocorre pela faixa de pH em que essa barreira energética é menor para ambos os casos (aproximadamente pH 2 para **PA** e pH 3,5 para **2CPA**, no máximo do perfil de sino).

### 4.3 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

As análises cinéticas se apresentam como bases fortes para consolidar o entendimento mecanísticos dessas reações. Entretanto, algumas questões envolvendo as etapas de reação demonstram que as análises cinéticas se tornam inconclusivas. Por esse motivo foi escolhido elucidar a reação com o **2CPA** via cálculos computacionais para comparar diretamente com os dados experimentais.

Inicialmente foram realizados dois tipos de cálculos distintos: no primeiro foi realizado o mapeamento energético de todas as conformações possíveis para o

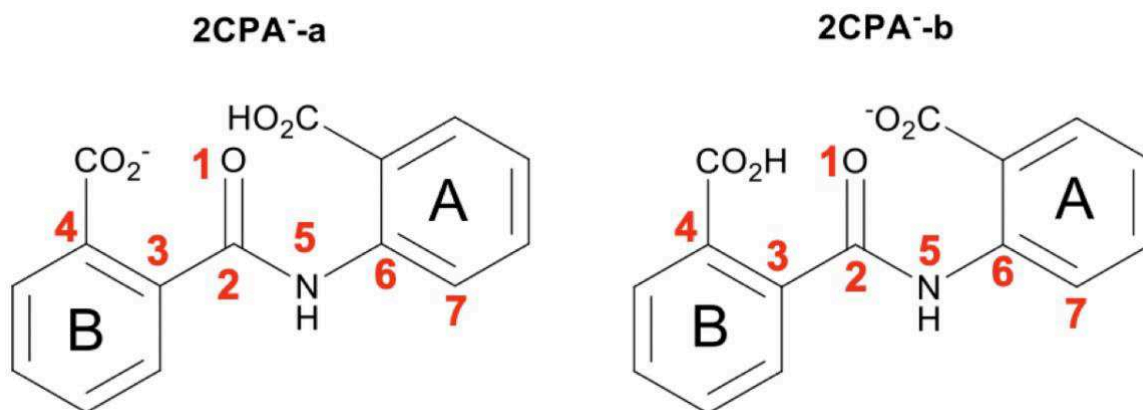
**2CPA** em função de dois ângulos diedros distintos; no segundo foi obtido as estruturas dos conformêros mais estáveis (mínimos locais e global).

#### 4.3.1 Superfície de Energia Potencial

O procedimento para a construção da superfície de energia potencial foi realizado com a amida **2CPA**. Nos gráficos de superfície de energia, os valores de ângulos diedros positivos e negativos referem-se apenas ao sentido da rotação em relação ao plano do anel, portanto são equivalentes.

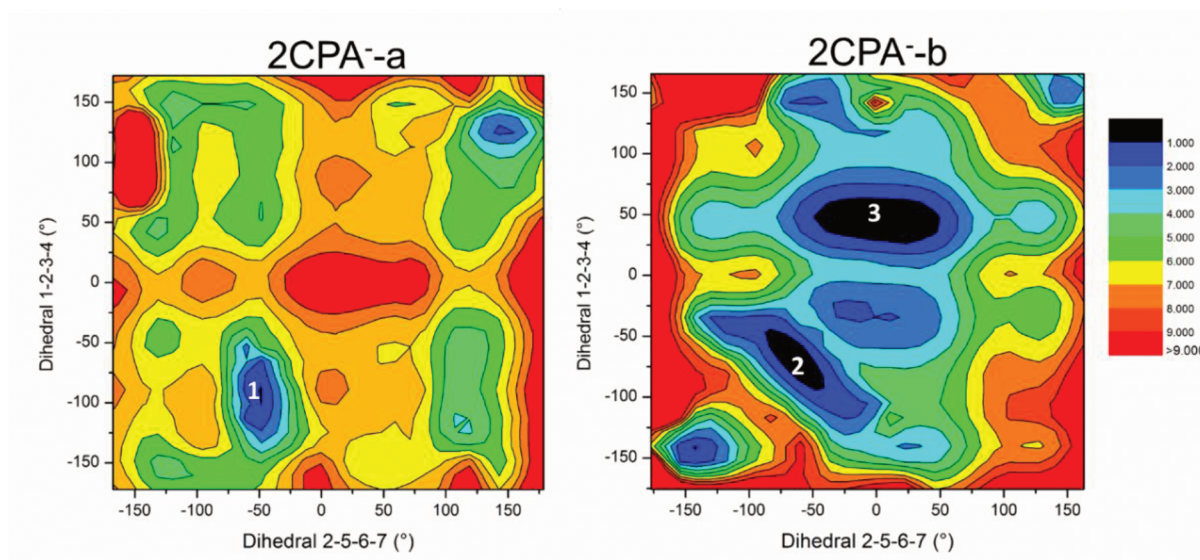
Como mostrado no **Esquema 13**, o substrato **2CPA<sup>-</sup>** pode existir em duas formas aniônicas, **2CPA<sup>-</sup>-a** e **2CPA<sup>-</sup>-b**. Portanto, cada uma admite uma superfície de energia potencial. Na **Figura 31** as energias na região preta do mapa são relativas à energia dos mínimos locais e global e correspondem a um  $\Delta E$  eletrônico. No total, foram localizados 3 mínimos.

**Esquema 13** – Espécies aniônicas do **2CPA<sup>-</sup>**.





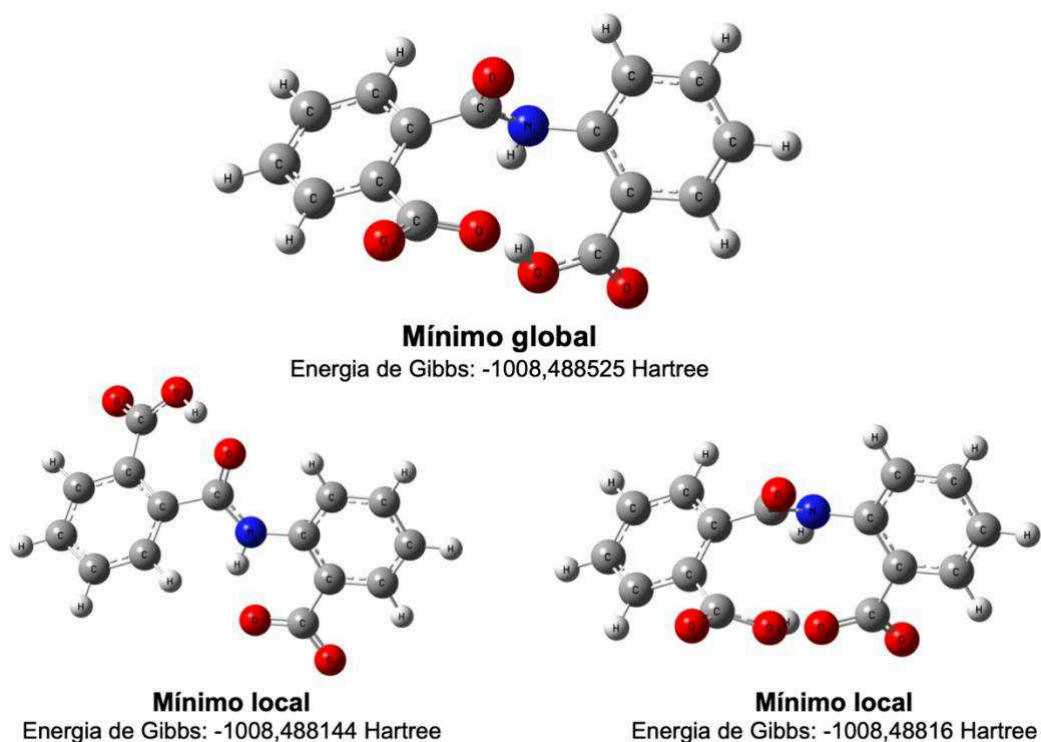
**Figura 31** – Superfície de energia potencial para **2CPA-a** (esquerda) e **2CPA-b** (direita). A energia é dada em kcal.mol<sup>-1</sup> e é relativa à estrutura mais estável.



#### 4.3.2 Análise dos Mínimos de Energia

As conformações de menor energia são atribuídas aos mínimos locais e global (1, 2 e 3, obtidas na **Figura 31**). O mínimo 1 tem a menor energia em relação aos outros (mínimos 2 e 3). Logo, a este denominamos o mínimo global do equilíbrio conformacional. Os mínimos 2 e 3, que têm uma energia relativa maior que o mínimo global, são denominados como mínimos locais. Na **Figura 32** estão dispostas as estrutura otimizadas dos mínimos de energia obtidas com o nível de teoria  $\omega$ B97X-D/6-311++G(d,p) para o composto **2CPA**.

**Figura 32** – Estruturas otimizadas com PCM/ $\omega$ B97X-D/6-311++G(d,p) do composto **2CPA** em suas estruturas de mínimos locais e global.

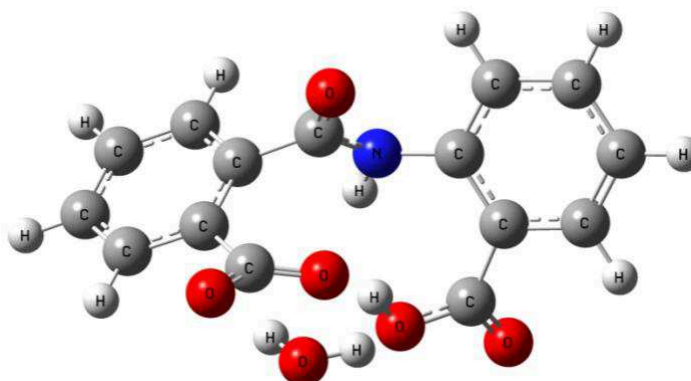


#### 4.3.3 Análise dos Intermediários e Estados de Transição

A partir do momento em que se determinou a energia do mínimo global, se faz necessário compreender como o progresso da reação acontece. Desta forma o caminho que ela toma pode ser diferente, mas o final deve ser o mesmo. Sendo assim duas características principais devem ser levadas em consideração nas possibilidades de clivagem da ligação C-N em **2CPA**: (i) qual grupo atua como nucleófilo? (ii) a catálise bifuncional orienta a transferência de próton para o oxigênio da carbonila ou para o nitrogênio da amida? Acerca destas questões foram escolhidas algumas possibilidades mecanísticas através dos cálculos de estados de transição (TS) e otimizações dos intermediários. A cada estado de transição obtido foram desenvolvidos os cálculos de coordenadas intrínsecas de reação (IRC) no sentido direto e inverso do caminho proposto.

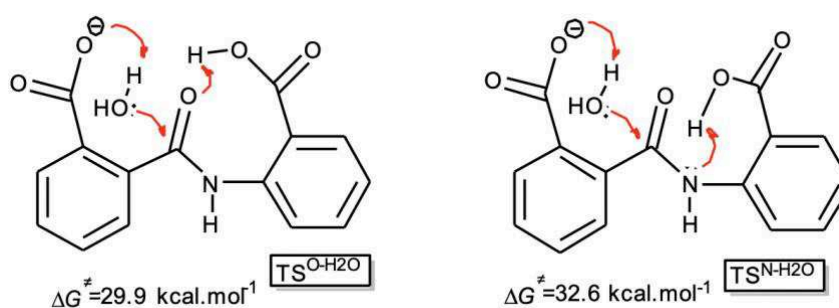
O primeiro mecanismo sugerido foi do ataque nucleofílico da água. Para isso, primeiramente, foi necessário otimizar o mínimo global (apresentado na **Figura 32**) adicionando uma molécula de água (**2CPA**·**H<sub>2</sub>O**), com intenção dos cálculos se manterem no mesmo nível energético (**Figura 33**).

**Figura 33** – Estrutura de mínimo global para o composto **2CPA-H<sub>2</sub>O**.



Nesta possibilidade mecanísticas, o carboxilato atua como uma base geral e orienta o ataque nucleofílico da água na carbonila do grupo amida. Simultaneamente uma transferência do próton pelo grupo ácido carboxílico, que age como um ácido geral ocorre em duas possibilidades: (i) o oxigênio do grupo amida (TS<sub>O-H<sub>2</sub>O</sub>) ou (ii) o nitrogênio do grupo amida (TS<sub>N-H<sub>2</sub>O</sub>) (**Esquema 14**).

**Esquema 14** – Esquemas dos estados de transição e energias para a decomposição do **2CPA**- envolvendo uma molécula nucleofílica de água com a assistência simultânea de uma base geral e um ácido geral aos átomos de oxigênio (TS<sub>O-H<sub>2</sub>O</sub>) ou nitrogênio (TS<sub>N-H<sub>2</sub>O</sub>).

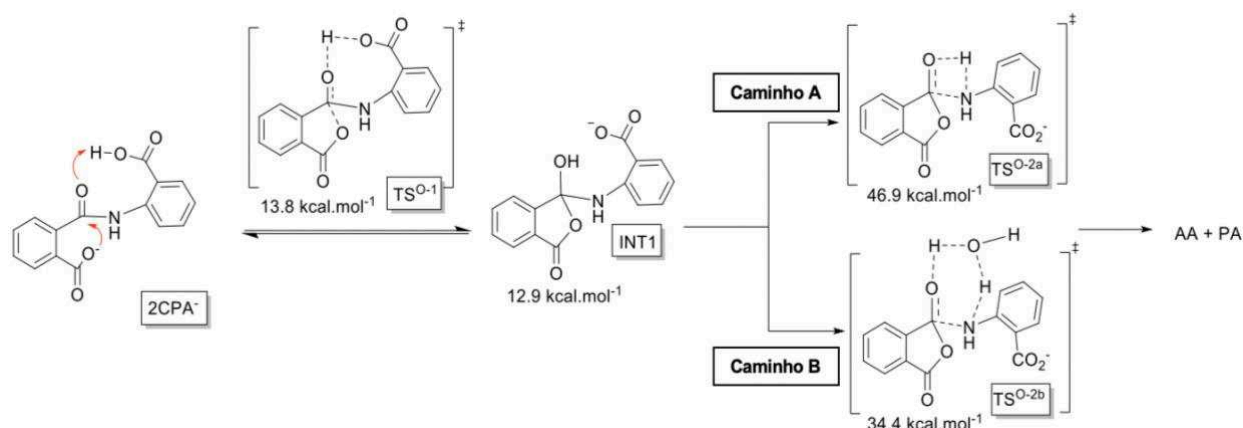


As energias livres de ativação, calculadas tomando a diferença da energia livre de Gibbs dos estados de transição e do mínimo **2CPA-H<sub>2</sub>O** foram de 29.9 kcal.mol<sup>-1</sup> e 32.6 kcal.mol<sup>-1</sup> para oxigênio e nitrogênio, respectivamente. Apresentando diferenças de aproximadamente 10 kcal que o valor de energia livre de ativação obtido experimentalmente (20.6 kcal.mol<sup>-1</sup> à 25 °C), concluiu-se que esse

mecanismo da reação pode não ser o observado, descartando assim qualquer possibilidade de ataque nucleofílico promovido por uma catálise básica geral.

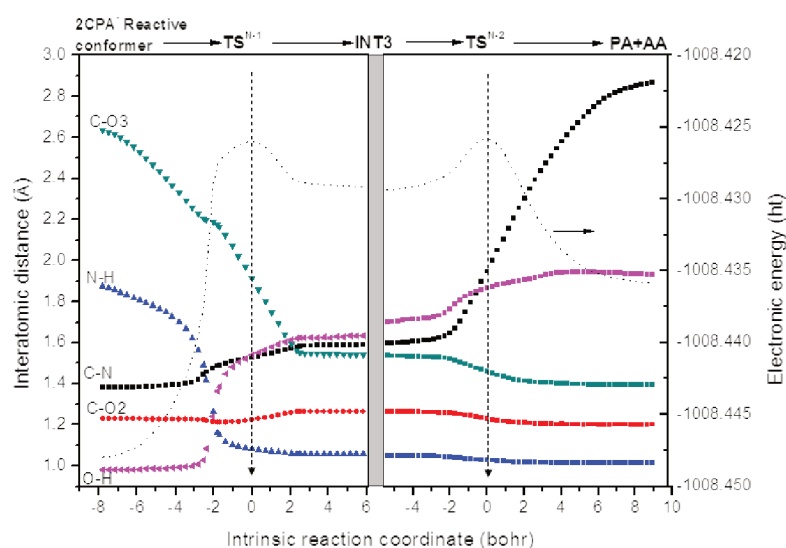
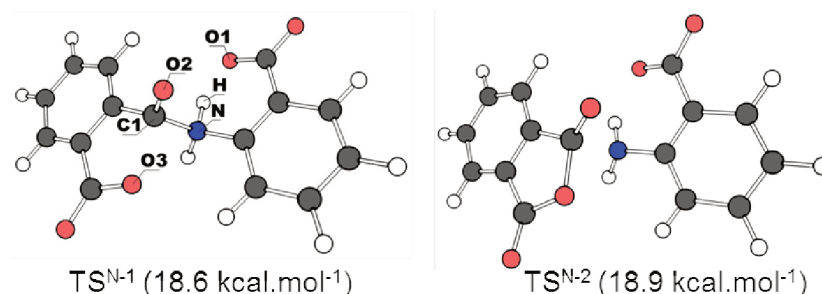
Neste momento é possível direcionar o estudo computacional exclusivamente para o ataque nucleofílico do carboxilato. Sendo assim uma segunda proposta mecanística é atribuída ao ataque da carbonila da amida a partir de uma transferência de próton ao oxigênio, ativando a mesma via catálise ácida geral (**Esquema 15**). É importante lembrar que nessa proposta, o mecanismo ocorre em duas etapas passando por um intermediário. A energia livre de ativação do estado de transição  $TS_{O-1}$  é de apenas  $13,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$  em relação ao **2CPA** e produz uma estrutura do tipo lactona de 5 membros (INT1) com um  $\Delta G^\ddagger$  de  $12,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . O anel de 5 membros incorpora a configuração clássica de “intermediário tetraédrico” postulada em reações de derivados de ácido carboxílico. A decomposição do INT1 pode ocorrer através da ativação do grupo de saída por protonação. Neste caso, são dois caminhos possíveis para a decomposição ocorrer. O caminho A passa por um estado de transição tensionado em um anel de quatro membros ( $TS_{O-2a}$ ). O caminho B ocorre pela assistência de uma molécula de água que fornece um próton ao nitrogênio enquanto remove um próton para restaurar o grupo carbonila ( $TS_{O-2b}$ ). Elevados valores energéticos são atribuídos para tais estados de transição ( $46,9$  e  $34,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$  para o  $TS_{O-2a}$  e  $TS_{O-2b}$ , respectivamente). Os valores de  $\Delta G^\ddagger$  calculados foram discrepantes para tornar esse mecanismo plausível.

**Esquema 15** – Decomposição do **2CPA** envolvendo um mecanismo em duas etapas. Para  $TS_{O-2a}$  a referência é o mínimo global **2CPA**, enquanto para  $TS_{O-2b}$  a referência é **2CPA.H<sub>2</sub>O**.



Por último, um mecanismo que envolve N-protonação foi considerado para a decomposição do composto **2CPA-**. A **Figura 34** mostra os estados de transição envolvidos  $TS_{N-1}$  e  $TS_{N-2}$  e a coordenada intrínseca de reação para melhor visualização do processo de quebra e de formações de ligações. No estado de transição  $TS_{N-1}$  a transferência de próton do ácido carboxílico para o nitrogênio da amida está bem avançado (as distâncias interatômicas N-H e O1-H são de 1.08 Å e 1.52 Å, respectivamente), a ligação C-N aumentou consideravelmente (1.53 Å versus 1.36 Å no mínimo **2CPA-**) e observa-se uma ligação incipiente entre o carboxilato e o carbono carbonílico da amida (C-O3 = 1.91 Å). A alta energia do intermediário INT3, no qual tanto O2 como N são quase equidistantes do grupo carbonila, está localizado em 5.8 Bohr do  $TS_{N-1}$  e -5.4 Bohr do  $TS_{N-2}$ . O intermediário se decompõe pelo  $TS_{N-2}$  e as principais mudanças geométricas envolvidas são o aumento da distancia interatômica C-N e a diminuição dos comprimentos das ligações de N-H e C-O3. Durante o curso da reação, o comprimento do carbonila da amida (C-O2) muda apenas ligeiramente, variando de 1,22 Å a 1,26 Å. Os estados de transição apresentam energias semelhantes (18,6 e 18,9 kcal.mol<sup>-1</sup> para  $TS_{N-1}$  e  $TS_{N-2}$ , respectivamente), sendo assim o intermediário se torna irrelevante para ser acumulado e é rapidamente convertido de ou no sentido reverso para **2CPA-** ou no sentido direto para formação de produtos.

**Figura 34** – Coordenada intrínseca de reação (IRC) e as estruturas correspondentes dos estados de transição envolvidos na decomposição do **2CPA-** via N-protonação intramolecular. Os estados de transição estão localizados em 0 bohr. Os valores em parênteses são as energias livres de Gibbs.



A transferência de próton no mecanismo representado na **Figura 35** é consistente com o efeito isotópico do solvente de 1.90 observado na **Figura 29**. Uma energia atingível de 18.6 kcal.mol<sup>-1</sup> está envolvida na primeira etapa (TS<sub>N-1</sub>), enquanto a decomposição subsequente do INT3 ocorre com o TS<sub>N-2</sub>, que fica acima de 18.9 kcal.mol<sup>-1</sup> em energia da **2CPA-**. Esse valor está em boa concordância com o valor experimental (20,6 kcal), as pequenas diferenças são atribuídas a efeitos provenientes do modelo de solvatação. Ainda que o modelo contínuo polarizável (PCM) seja uma boa aproximação teórica, correlações em modelos de solvatação explícita de solvente poderiam melhorar esta comparação. Entretanto, a relação de custo computacional elevada, de modelos mais elaborados, pode ser levada em consideração.

## 5 CONCLUSÃO

Nesta dissertação foi possível concluir de maneira experimental e computacional que a catálise bifuncional intramolecular se apresenta aceitável para compreender a clivagem de uma ligação C-N presente nos grupos amida.

O presente trabalho apresenta a síntese das amidas **PA**, **2BBA** e **2CPA**; e amidas naftóicas **NPNA** e **NNAA**. Posteriormente, apresenta a cinética química envolvida na clivagem das amidas **PA** e **2CPA**. Ao final, corrobora os resultados experimentais com cálculos computacionais para a amida **2CPA**.

Não foi possível acompanhar as reações de clivagem das amidas **2BBA**, **NPNA** e **NNAA** por espectrofotometria de UV-Vis. A amida demonstrou-se como uma reação muito lenta para ser acompanhada de maneira convencional. Já as naftamidas apresentam sobreposição de bandas entre os reagentes e produtos, dificultando assim a visualização da variação espectral.

Os substratos **PA**, **2BBA**, **2CPA**, **NPNA** e **NNAA** foram sintetizados e caracterizados por ponto de fusão, infravermelho, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As técnicas de ressonância permitem concluir que:

- i. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  permitem acompanhar o processo de formação da amida (a partir da imida) pela observação do sinal de hidrogênio em N-H.
- ii. Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  permitem diferenciar os produtos através dos sinais de carbonos carbonílicos (C=O) em várias posições e grupos (carbonilas de imidas, amidas e ácidos carboxílicos).

Os estudos cinéticos das reações de clivagem da amida **PA**, permitem concluir que:

- i. Comparando os valores das constantes de velocidade obtidas, é possível observar que de pH 3,50 para 2,0, a espécie se encontra numa forma ácida não iônica, **PA**, que é associada a uma constante de velocidade  $k_1$  de aproximadamente 70 vezes maior em

comparação com  $k_2$ , clivagem em  $\text{pH} > 3,50$  onde a espécie se encontra na forma aniônica **PA<sup>-</sup>**. Esta diferença pode ser justificada pela conversão de um grupo carboxilato a um ácido carboxílico e, portanto, em uma reação unimolecular o ácido carboxílico apresenta um ataque nucleofílico maior que o grupo carboxilato.

- ii. O pequeno efeito isotópico cinético do solvente encontrado de 1,26 indicou uma baixa possibilidade de a transferência do próton estar presente na etapa determinante da reação.
- iii. Os parâmetros termodinâmicos encontrados para esta clivagem foram condizentes com o valor encontrado para cada uma das constantes ( $k_1 > k_2$ ). O valor de  $\Delta G^\ddagger$  em 25 °C para  $k_1$  é menor que o  $k_2$ . Ainda  $k_1$  tem uma entalpia baixa quando comparado com  $k_2$ , sugerindo assim uma reação unimolecular onde o grupo carboxílico age como um nucleófilo.

Os estudos cinéticos das reações de clivagem da amida **2CPA**, permitem concluir que:

- i. O perfil de sino observado é uma grande característica de uma catálise bifuncional.
- ii. Na faixa de valores de  $\text{pH}$  5,0-7,0, há o predomínio da espécie dianiônica **2CPA<sup>2-</sup>**, onde os ácidos carboxílicos se encontram desprotonados, impedindo a possibilidade de uma catálise ácida intramolecular, correspondendo em um valor  $k_3$  menor comparado aos demais ( $k_3 < k_1$  e  $k_3 \ll k_2$ ).
- iii. No máximo do perfil de sino, a espécie aniônica **2CPA<sup>-</sup>** é a predominante, contendo ambos grupos ácido carboxílico e carboxilato, provendo uma catálise bifuncional, onde o carboxilato pode agir como um nucleófilo e o ácido carboxílico como um ácido geral. Conseqüentemente, a constante de velocidade  $k_2$  é maior e consistente com uma catálise bifuncional.
- iv. A espécie neutra **2CPA** é associada com um  $k_1$  maior em relação a  $k_3$ , entretanto menor em relação a  $k_2$ .



- v. O efeito isotópico do solvente encontrado  $k_H/k_D=1,90$  indica uma possibilidade da transferência de próton se encontrar na etapa determinante da velocidade, sendo assim concretizada mais uma evidência da existência da catálise bifuncional.
- vi. Os parâmetros termodinâmicos encontrados são satisfatórios com a catálise bifuncional e foram essenciais para o estudo computacional na investigação do mecanismo desta reação.

Os cálculos computacionais dos possíveis mecanismos das reações de clivagem da amida **2CPA**, permitem concluir que:

- i. O mecanismo baseado pelo ataque nucleofílico da água, onde o carboxilato atua como uma base geral, orientando o ataque nucleofílico da água na carbonila da amida e simultaneamente uma transferência do próton pelo grupo ácido carboxílico para o (i) oxigênio do grupo amida ou (ii) para o nitrogênio do grupo amida, foi descartado, pois houve uma energia livre de ativação de até 10 kcal a mais do valor de energia livre de ativação obtido experimentalmente (20.6 kcal.mol<sup>-1</sup> a 25 °C). Descartando assim qualquer possibilidade de ataque nucleofílico promovido por uma catálise básica geral.
- ii. O mecanismo referente ao ataque da carbonila da amida a partir de uma transferência do próton ao oxigênio, ativando a mesma via catálise ácida geral, que leva a formação de uma estrutura do tipo lactona de 5 membros (intermediário tetraédrico), apresentou valores de  $\Delta G^\ddagger$  discrepantes para tornar o mecanismo plausível.
- iii. O mecanismo que envolve N-protonação foi o que mais se aproximou dos valores de  $\Delta G^\ddagger$  obtidos experimentalmente e juntamente com a coordenada intrínseca de reação ficou mais nítida a confirmação da possibilidade deste mecanismo.

## 6 REFERÊNCIAS

ABELL, K. W. Y.; KIRBY, A. J. Intramolecular General Acid Catalysis of Intramolecular Nucleophilic Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Diester. **Journal of the Chemical Society Perkin Transaction 2**, n. 8, p. 1171, 1983.

ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern physical organic chemistry**. Sausalito, CA: University Science, 2006.

BENDER, M. L.; CHOW, Y. L.; CHLOUPEK F. Intramolecular Catalysis of Hydrolytic Reactions. II. The Hydrolysis of Phthalamic Acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 20, p. 5380-5384, 1958.

BODE, J. W.; PATTABIRAMAN, V. Rethinking Amide Bond Synthesis, **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 471–479, 2011.

BOZDAG, M.; ALAFEEFY, A. M.; VULLO, D.; CARTA, F.; DEDEOGLU, N.; ALTAMIMI, A. M. S.; AL-JABER, N. A.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN C. T. Benzenesulfonamides incorporating bulky aromatic/heterocyclic tails with potent carbonic anhydrase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 24, p. 7751-7764, 2015.

BROWN, D. G.; BOSTROM, J. Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 4443-4458, American Chemical Society (ACS), 2015.

BRUCE, P. Y. **QUÍMICA ORGÂNICA**. 4a Ed., São Paulo: Pearson Prentice Hall, v. 2, p. 413-429, 2006.

CHAI, J.-D.; HEAD-GORDON, M. Systematic Optimization of Long-range Corrected Hybrid Density Functionals. **The Journal of Chemical Physics**, v. 128, n. 9, p. 84106, 2008.

CHAI, J.-D.; HEAD-GORDON, M. Long-range Corrected Hybrid Density Functionals with Damped Atom–Atom Dispersion Corrections. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 44, p. 6615-6620, 2008.

DOMINGOS, J. B. **Reações Intramoleculares de Amidas e Ésteres derivados da Oxima do Ácido 9-Fluorenona-1-carboxílico. Síntese dos compostos modelo e estudos mecanísticos**. Universidade Federal de Santa Catarina, 1999.

DUNCANSON, P.; CHEONG, Y-K.; MOTEVALLI, M.; GRIFFITHS, V. A novel approach to isoindolo[2,1-a]indol-6-ones. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 21, p.4266, 2012.

ECK, J. C.; MARVEL, C. S. in **Organic Synthesis**, Wiley, NY, v. 2, p. 374, 1943.

FERSHT, A. R. **Enzyme Structure and Mechanism**, 2a ed. Freeman, New York, 1985.

GANDOUR, R. D. **Transition States of Biochemical Process**, Plenum Press, New York, p. 529, 1978.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55-68, 1999.

GLOMB, M. A.; PFAHLER, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars, **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 41638-41647, 2001.

KHAN, S. A.; KIRBY, A. J.; WAKSELMAN, M. Intramolecular catalysis of phosphate diester hydrolysis. Nucleophilic catalysis by the neighbouring carboxy-group of the hydrolysis of aryl 2-carboxyphenyl phosphate. **Journal of the Chemical Society (B)**, p. 1182, 1970.

KIM, M.; LEE, J.; LEE, H.; CHANG, S. Significant Self-Acceleration Effects of Nitrile Additives in the Rhodium-Catalyzed Conversion of Aldoximes to Amides: A New Mechanistic Aspect. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 351, n. 11-12, p. 1807-1812, 2009.

KIRBY, A. J. Enzyme Mimics. **Angewandte Chemie International Edition In English**, v. 33, n. 5, p. 551-553, 1994.

KIRBY, A. J.; **Advances in Physical Organic Chemistry**, v. 17, p. 183, 1980.

KIRBY, A. J.; LANCASTER, P. W. Structure and efficiency in intramolecular and enzymic catalysis. Catalysis of amide hydrolysis by the carboxy-group of substituted maleamic acids. **Journal of the Chemical Society Perkin Transaction 2**, n. 9, p. 1206-1214, 1972.

KIRBY, A. J.; LIMA, M. F.; DA SILVA, D.; ROUSSEV, C. D.; NOME, F. Efficient intramolecular general acid catalysis of nucleophilic attack on a phosphodiester. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 16944, 2006.

KRISHNAN, R.; FRISCH, M. J.; POPLE, J. A. Contribution of Triple Substitutions to the Electron Correlation-energy in 4th Order Perturbation-theory. **The Journal of Chemical Physics**, v. 72, n. 7, p. 4244-4245, 1980.

KRZEMIŃSLA, A.; MOLINER, V.; ŚWIDEREK, K. Dynamic and Electrostatic Effects on the Reaction Catalyzed by HIV-1 Protease. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 138, n. 50, p.16283-16298, 2016.

KUNG, P. P.; HUANG, B. W.; ZHANG, G.; ZHOU, J. Z.; WANG, J.; DIGITS, J. A.; SKAPTASON, J.; YAMAZAKI, S.; NEUL, D.; ZIENTEK, M.; ELLERAAS, J.; MEHTA, P.; YIN, M. J.; HICKEY, M. J.; GAJIWALA, K. S.; RODGERS, C.; DAVIES, J. F.; GEHRING, M. R. Dihydroxyphenylisoindoline Amides as Orally Bioavailable Inhibitors of the Heat Shock Protein 90 (Hsp 90), Molecular Chaperone, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 499-503, 2010.

MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Universal Solvation Model Based on the Generalized Born Approximation with Asymmetric Descreening. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, n. 9, p. 2447-2464, 2009.

MCLEAN, A. D.; CHANDLER, G. S. Contracted Gaussian-Basis sets for Molecular Calculations.1. 2nd Row Atoms, Z=11-18. **The Journal of Chemical Physics**, v. 72, n. 10, p. 5639-5648, 1980.

MCMURRY, J.; FAY, R.C. **Organic Chemistry**, 3<sup>a</sup> ed, Editora Prentice Hall, New Jersey, 2001.

MCMURRY, J.; **Química Orgânica**, 7<sup>a</sup> ed, Cengage Learning, v. 1. São Paulo, 2011.

MENGER, F. M. On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity. **Accounts of Chemical Research**, v.18, n. 5, p.128-134, 1985.

MENGER, F. M; LADIKA, M. Fast Hydrolysis of an Aliphatic Amide at Neutral pH and Ambient Temperature. A Peptidase Model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 20, p. 6794-6796, 1988.

MENGER, F. M.; VENKATARAM, U. V. Proximity as a component of organic reactivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 16, p. 4706-4709, 1985.

MENGER, F. M. Directionality of organic reactions in solution, **Tetrahedron**, v. 39, n. 7, p. 1013-1040, 1983.

MORAWETZ, H.; SHAFER, J. Intramolecular Bifunctional Catalysis of Amide Hydrolysis. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 84, n. 19, p. 3783-3784, 1962.

MORAWETZ, H.; ORESKES, I. Intramolecular Bifunctional Catalysis Of Ester Hydrolysis. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2591-2592, 1958.

ORTH, E. S. **Catalise intramolecular bifuncional em um diester de fosfato: modelando o mecanismo da ribonuclease**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**. Butterworth Heinemann: Oxford, UK, 1998.

SCHMAL, M. **Catálise Heterogênea**. ed. Synergia, 2011.

SHERROD, M. J.; MENGER, F. M., "Delivery-control" in Organic Reactivity. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 4, p. 459-462, 1990.

SOUZA, B. S.; MORA, J. R.; WANDERLIND, E. H.; CLEMENTIN, R. M.; GESSER, J. C.; FIEDLER, H. D.; NOME, F.; MENGER, F. M.; Transforming a Stable Amide into a Highly Reactive One: Capturing the Essence of Enzymatic Catalysis. **Angewandte Chemie**, v. 129, n. 19, p. 5429-5432, 2017.

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Editorial Revertè S.A, p. 875, 1979.

VALEUR, E.; BRADLAY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagentes. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 606-631, 2009.

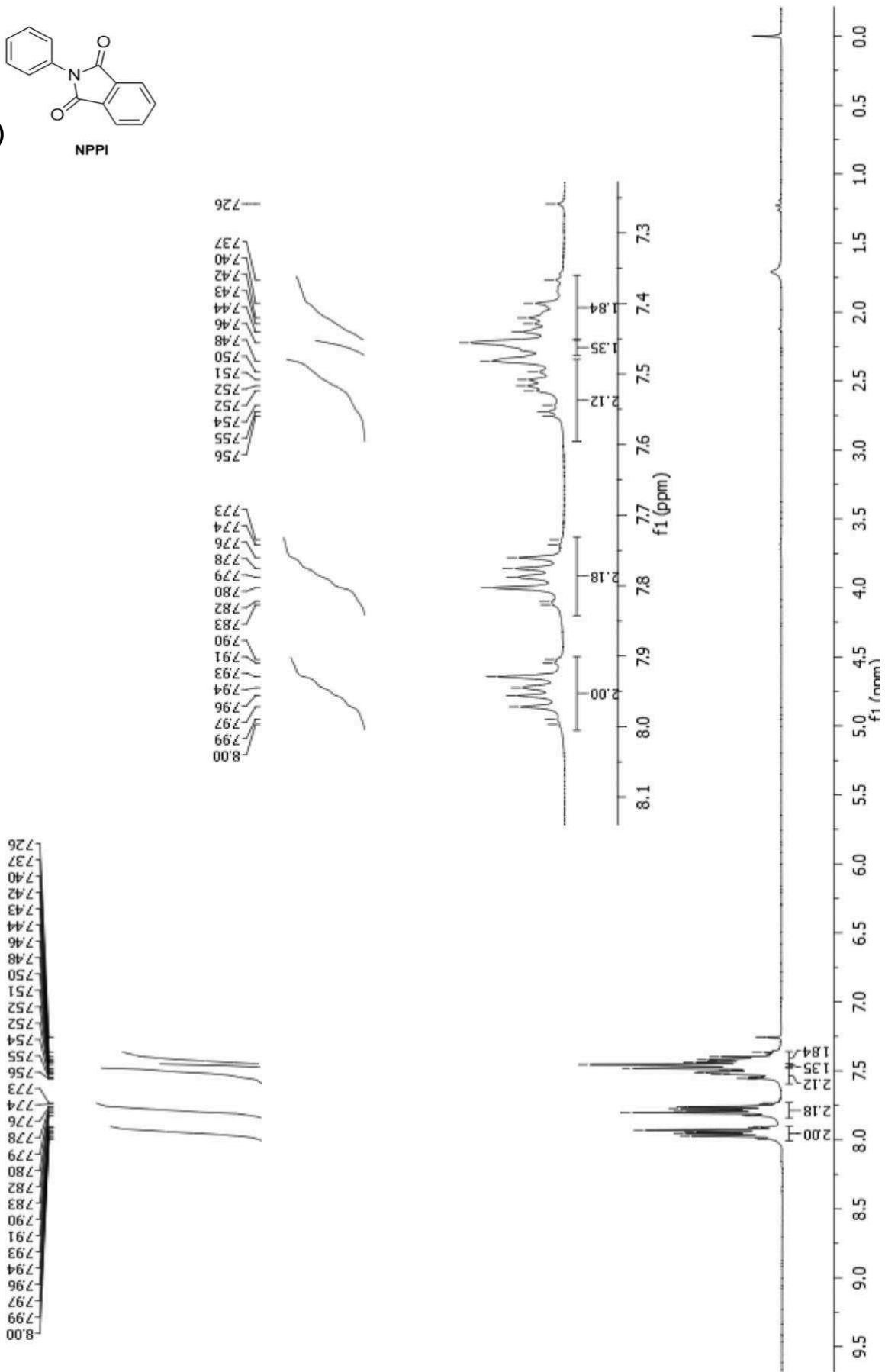
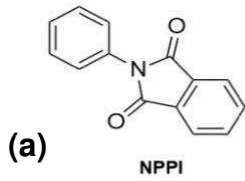
VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**, 2a edition, John Wiley & Sons, hic. New York, 1995.

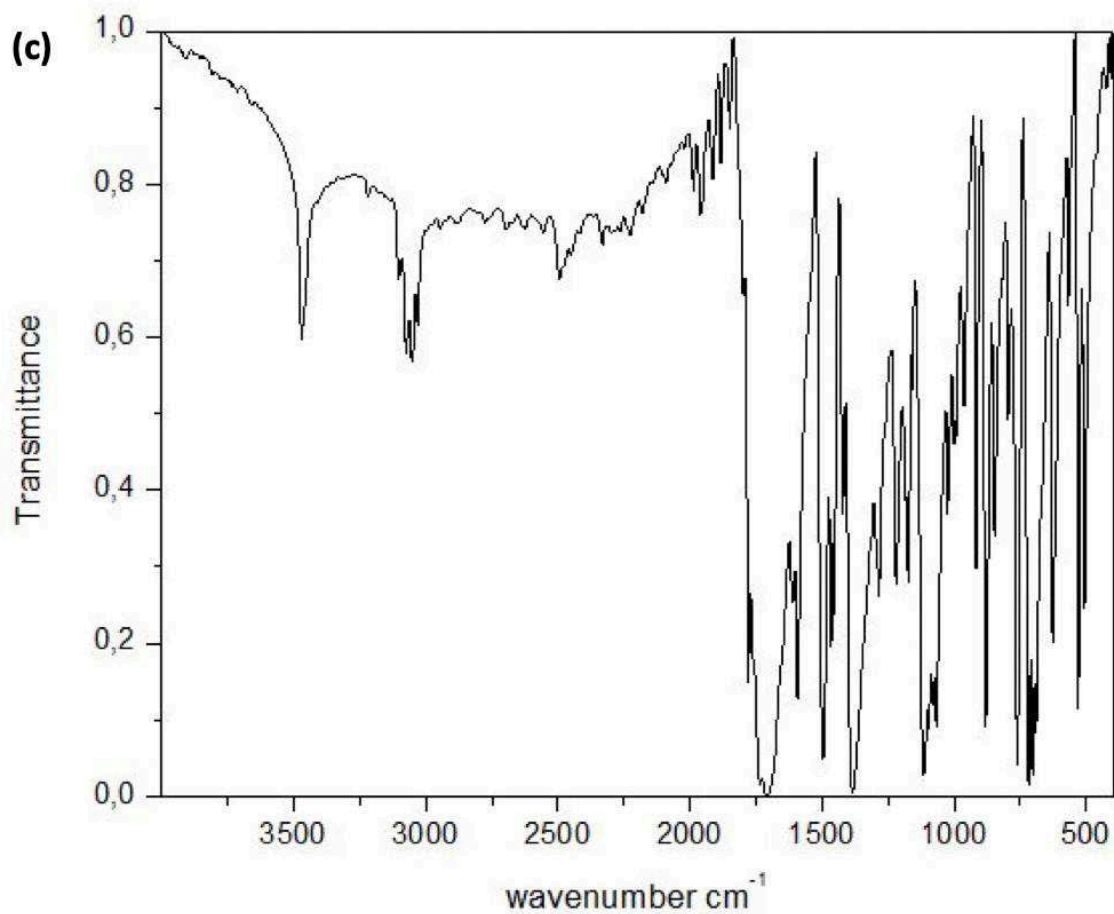
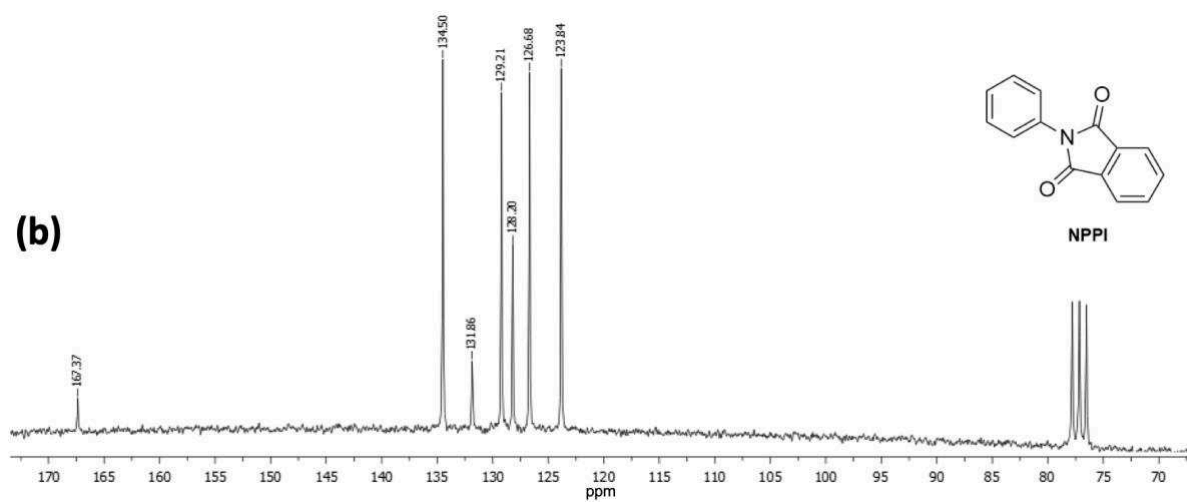
WIKLUND P.; ROMERO, I.; BERGMAN, J. Products from dehydration of dicarboxylic acids derived from anthranilic acid. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 19, p. 3396-3403, 2003.

WRIGHT, A. J. The penicillins. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 3, p. 290-307, 1999.

WU, J.; WU, Y.; DAI, J.; XU, H. Benzoic Acid-Catalyzed Transamidation Reactions of Carboxamides, Phthalimide, Ureas and Thioamide with Amines. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 356, n. 11-12, p. 2429-2436, 2014.

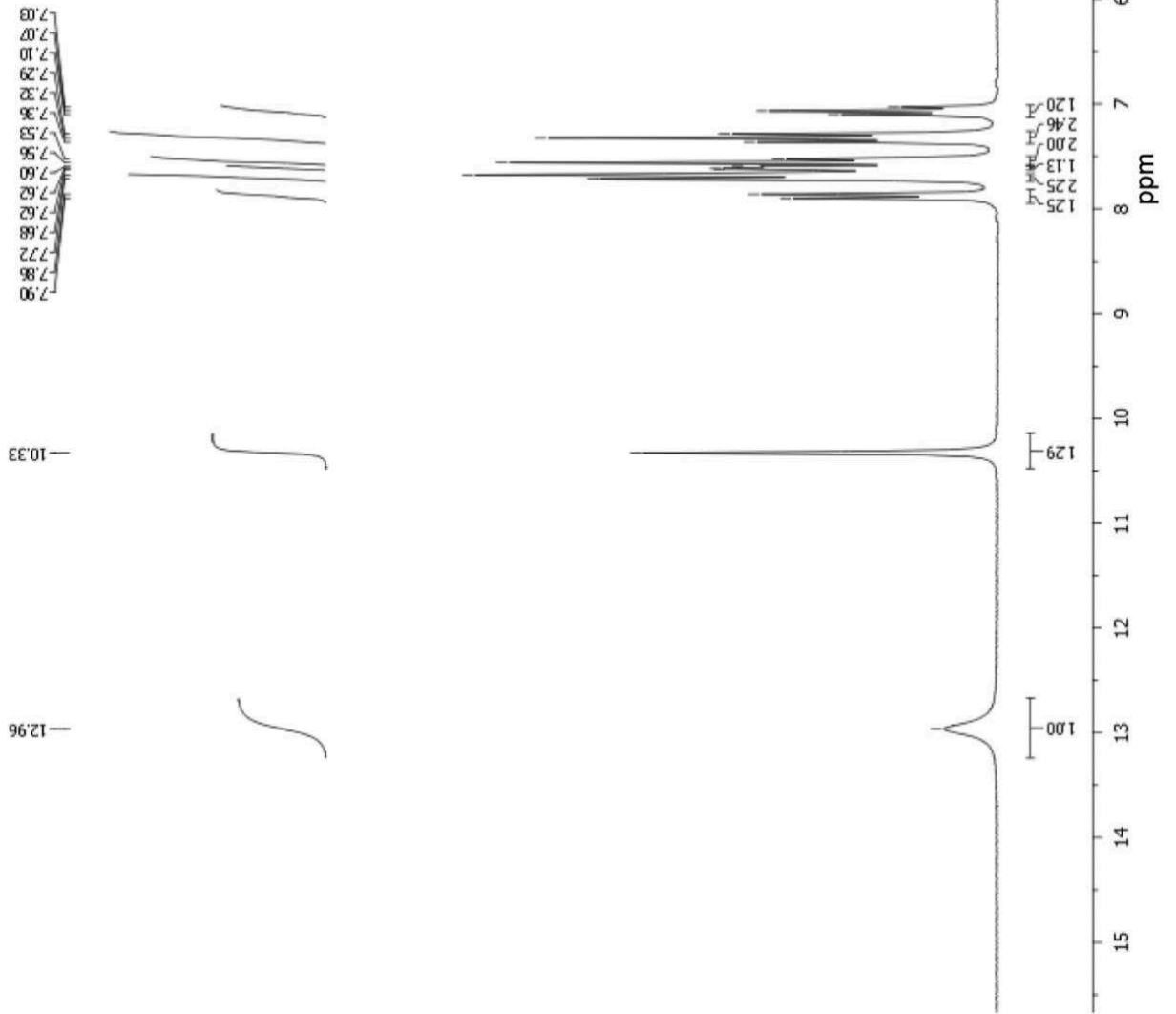
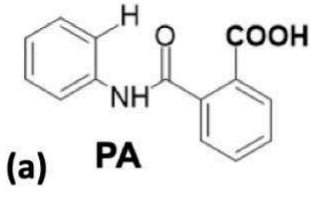
**APÊNDICE**

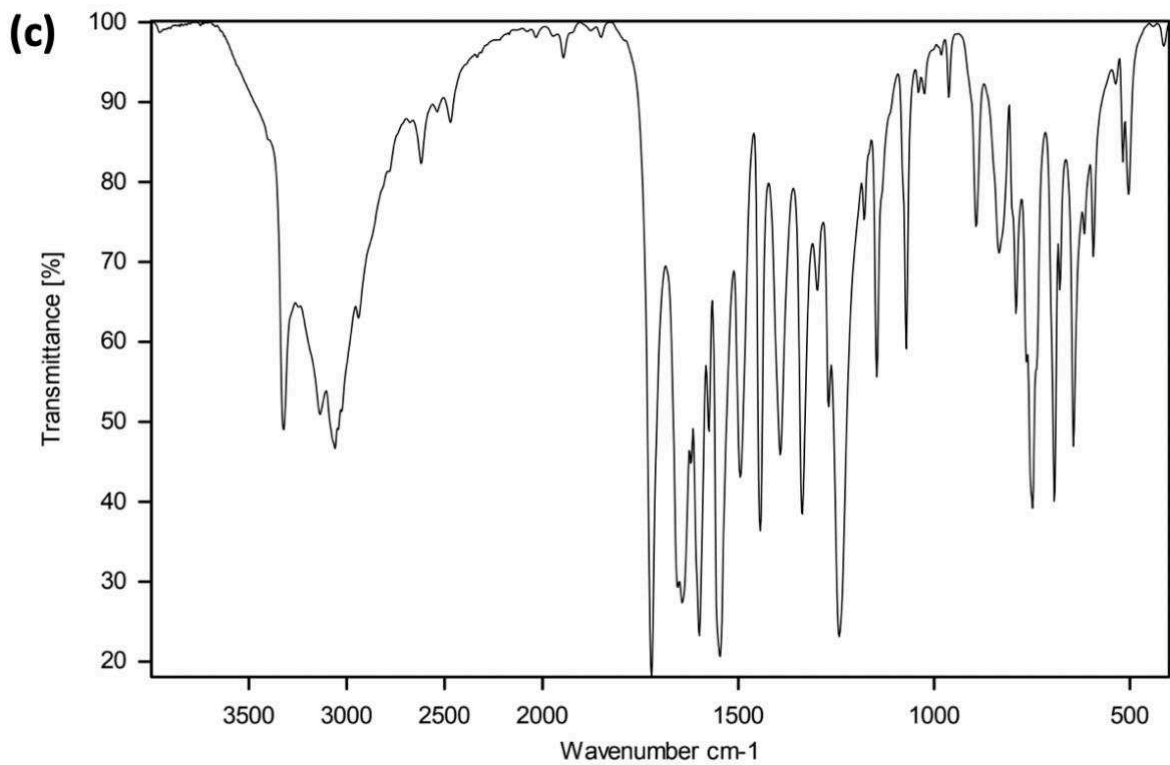
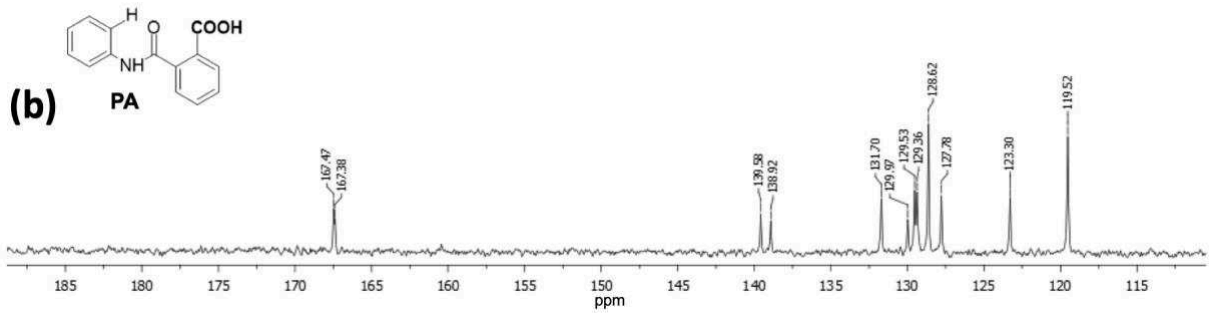




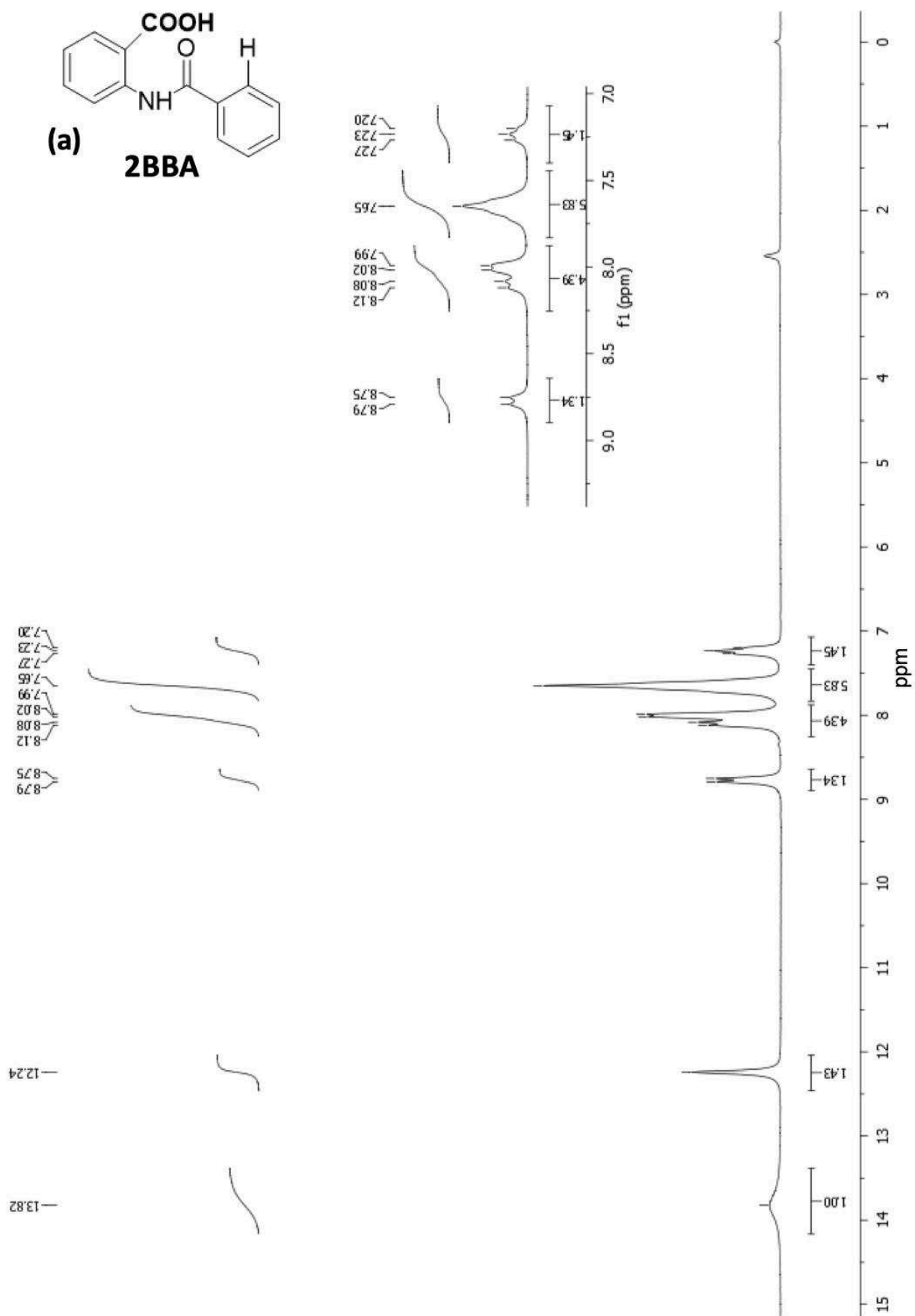
**Apêndice A** – Espectros de RMN de **(a)**  $^1\text{H}$  (200 MHz) e **(b)**  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) do **NPPI** em  $\text{CDCl}_3$ . **(c)** Espectro de IV do **NPPI**.

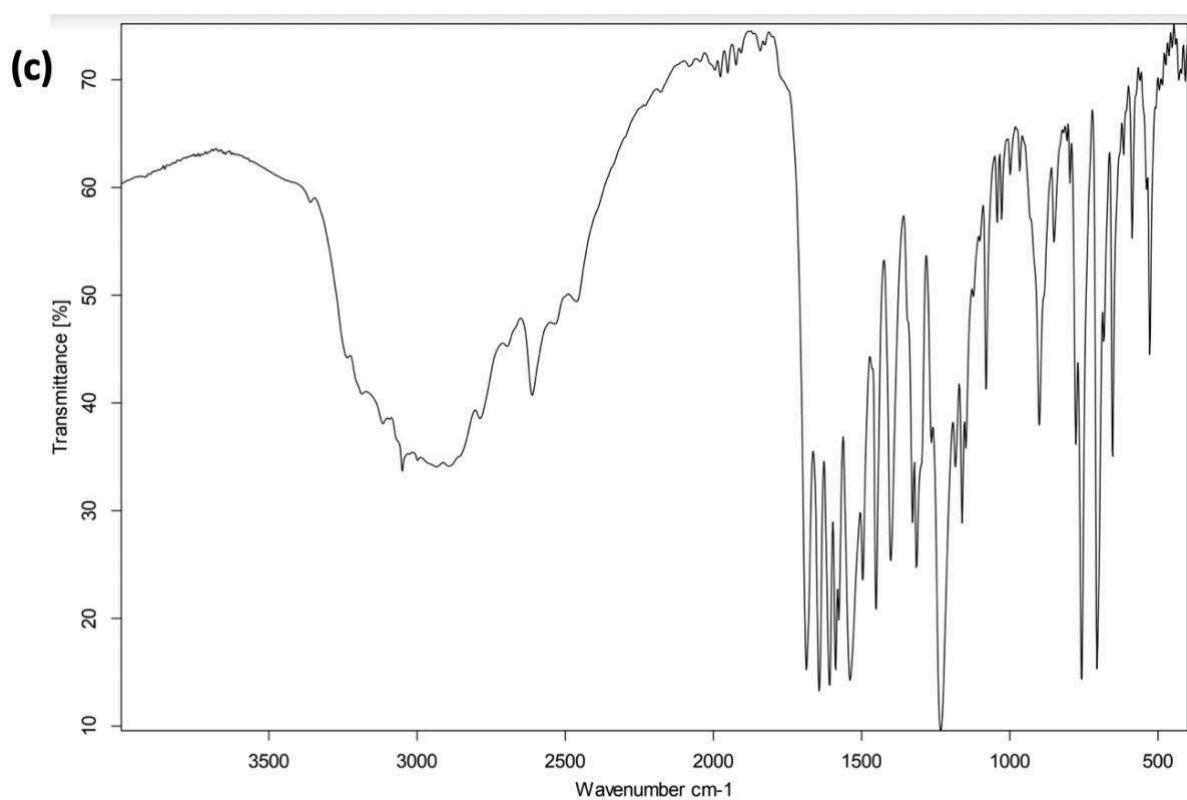
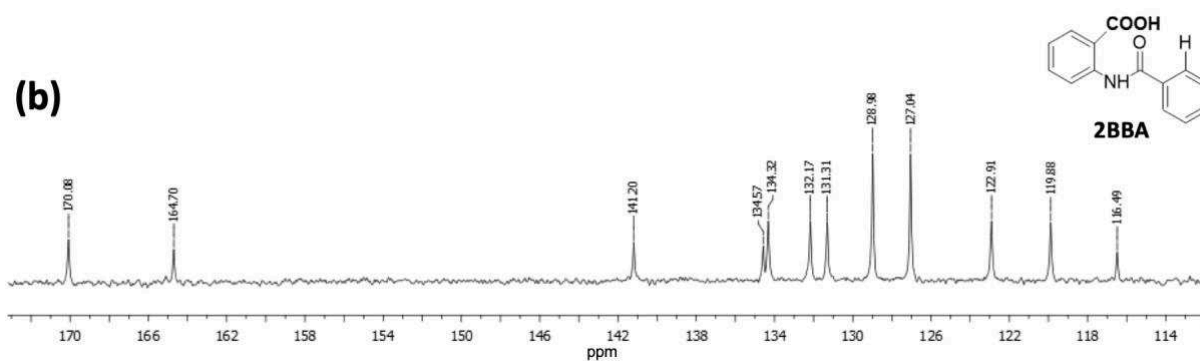




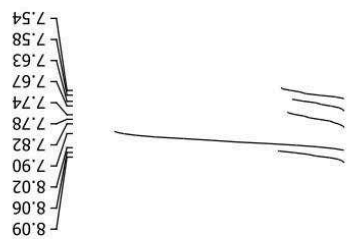
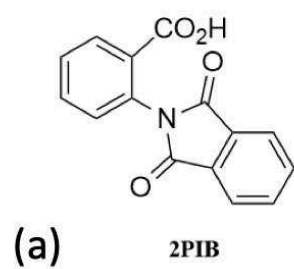


**Apêndice B** – Espectros de RMN de **(a)**  $^1\text{H}$  (200 MHz) e **(b)**  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) do **PA** em  $\text{DMSO-}d_6$ . **(c)** Espectro de IV do **PA**.

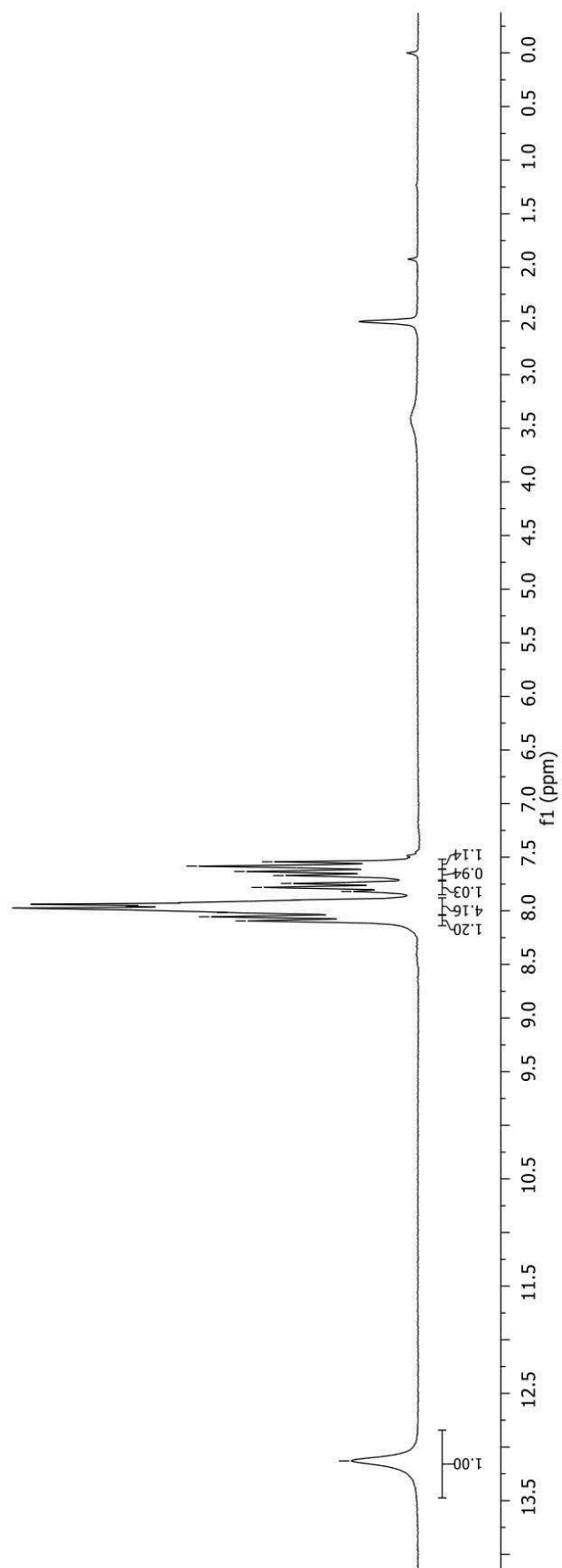


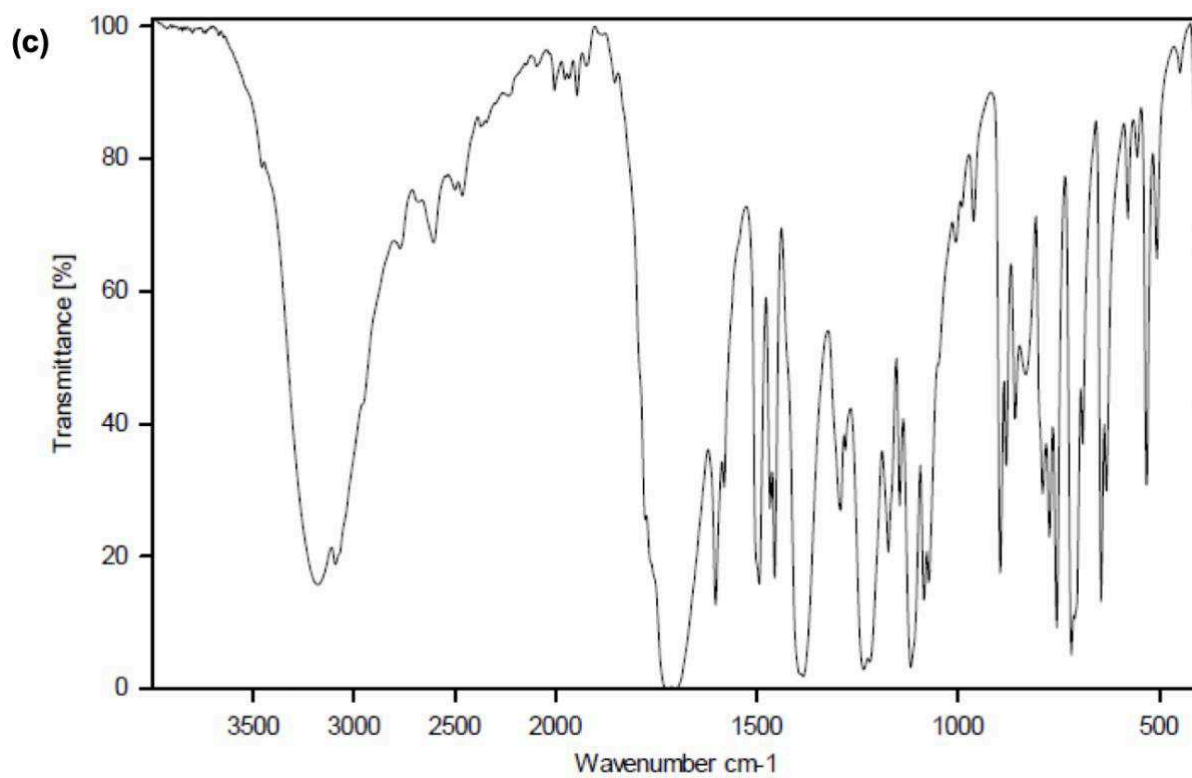
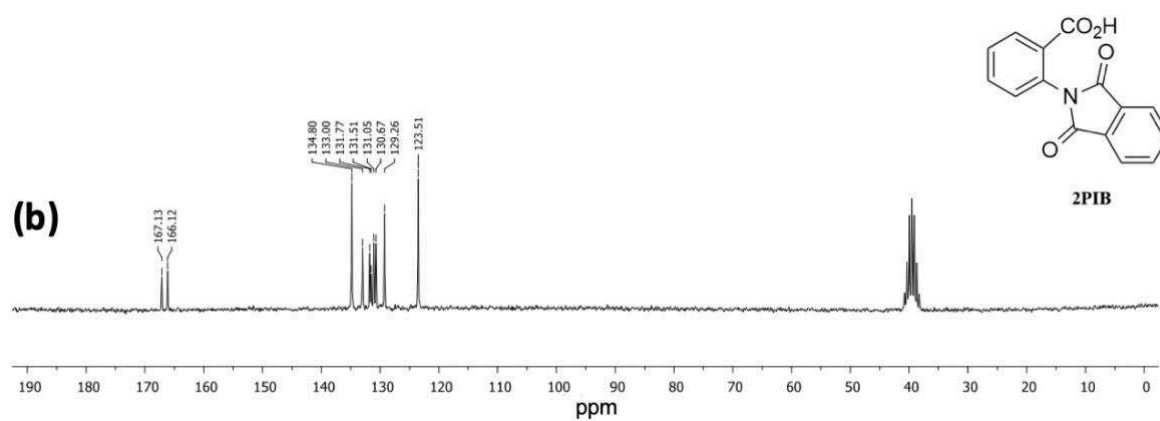


**Apêndice C** – Espectros de RMN de (a)  $^1\text{H}$  (200 MHz) e (b)  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) do **2BBA** em  $\text{DMSO-}d_6$ . (c) Espectro de IV do **2BBA**.

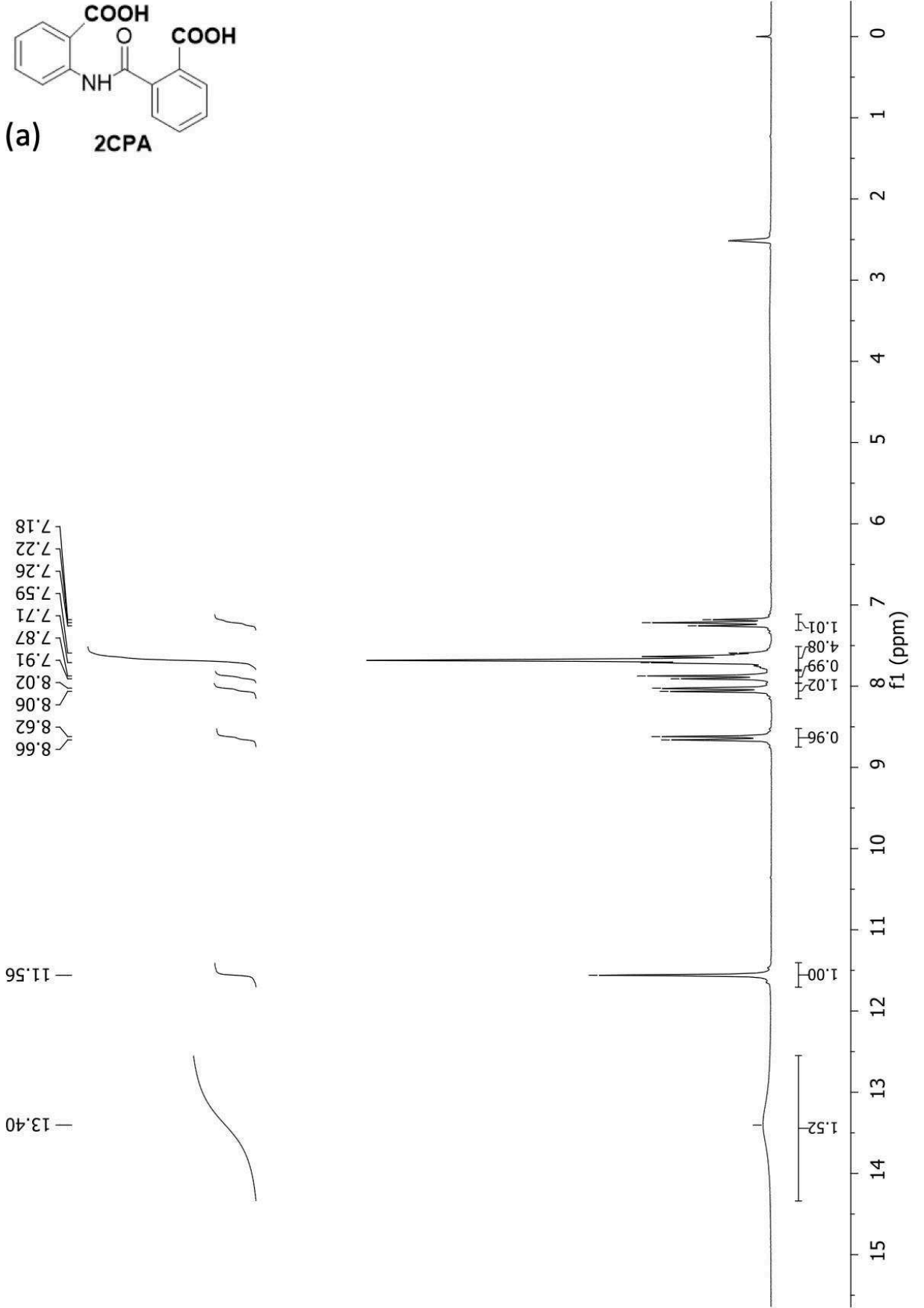
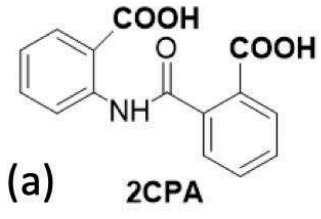


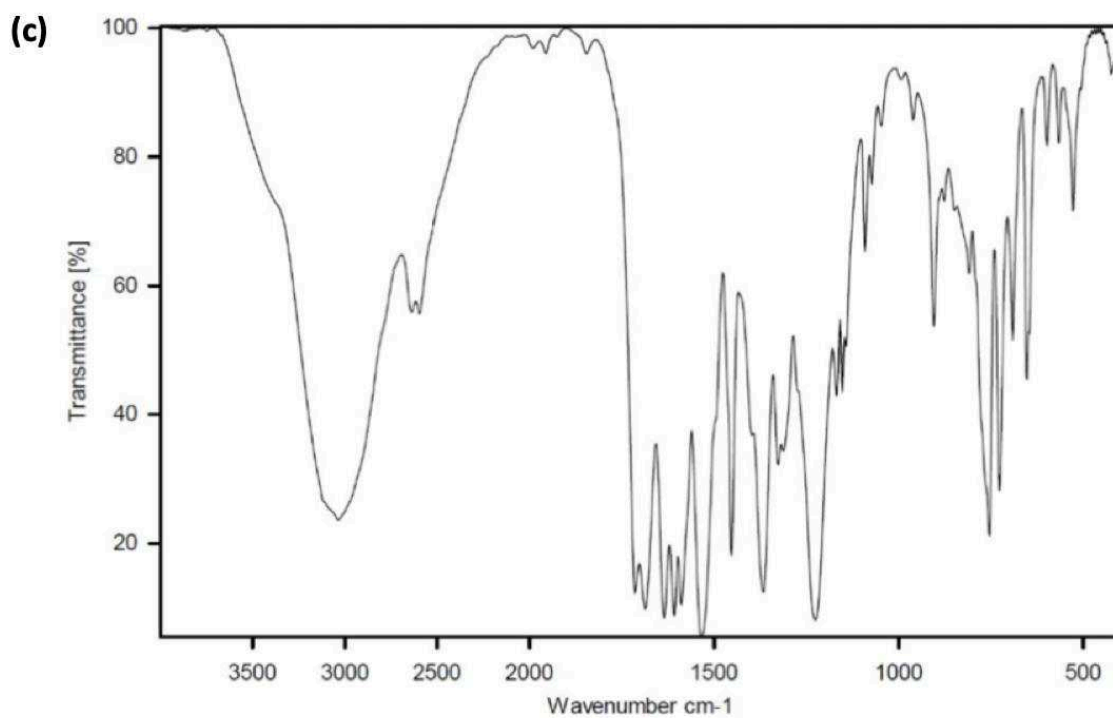
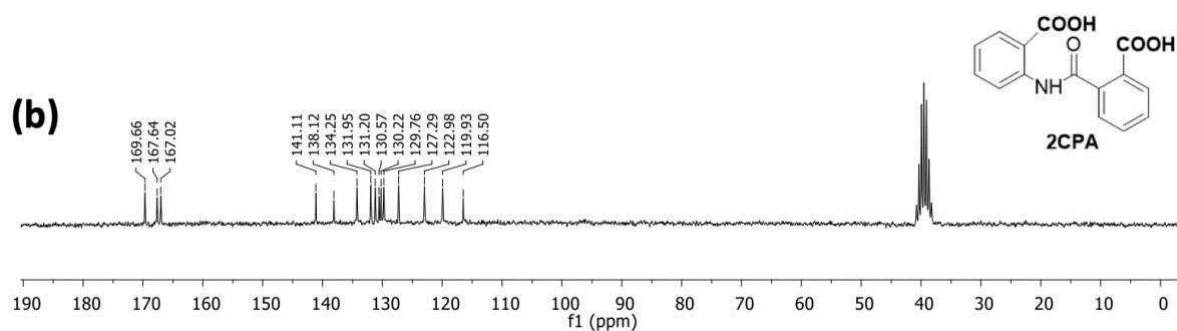
— 13.13





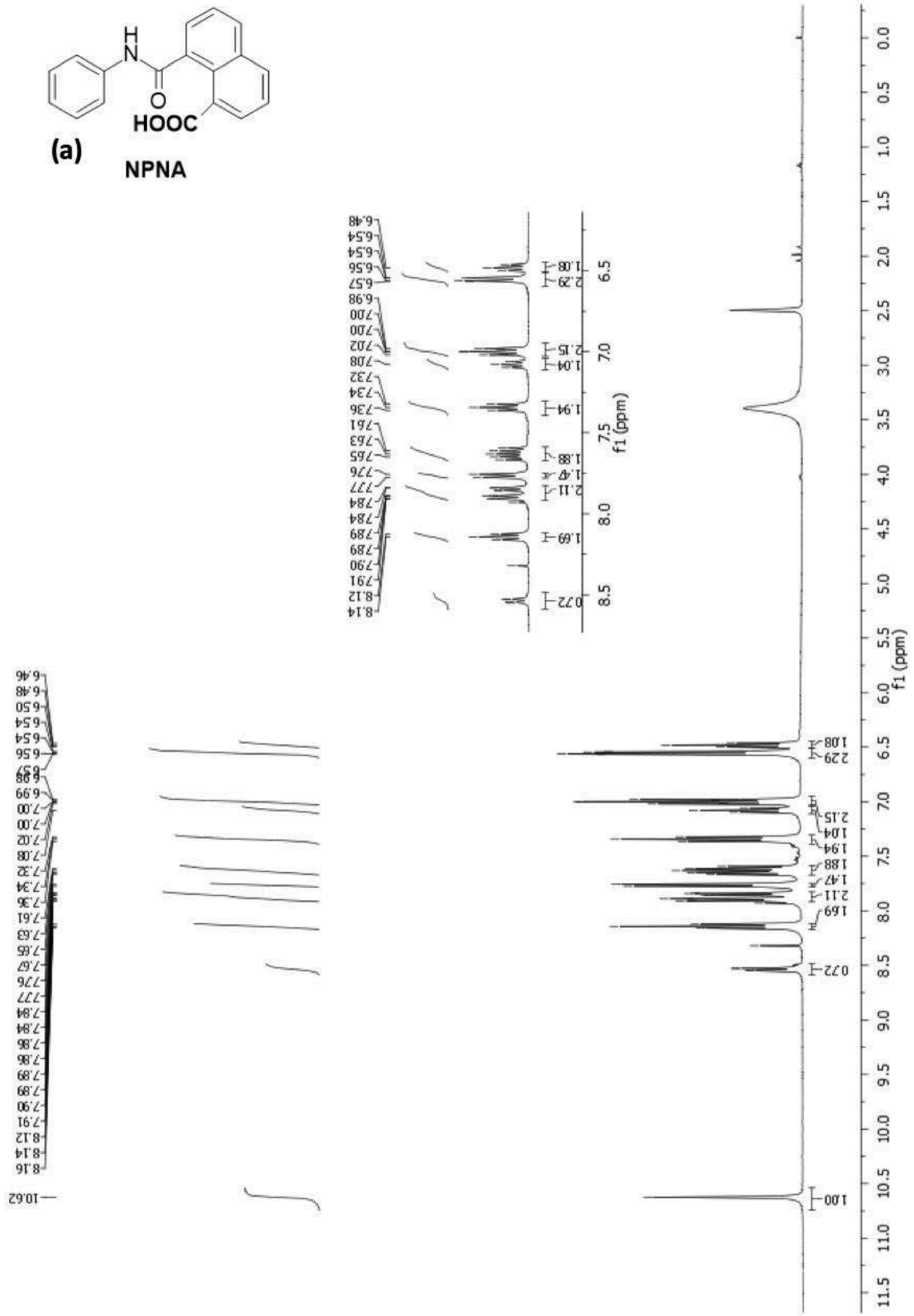
**Apêndice D** – Espectros de RMN de (a)  $^1\text{H}$  (200 MHz) e (b)  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) do **2PIB** em  $\text{DMSO-}d_6$ . (c) Espectro de IV do **2PIB**.

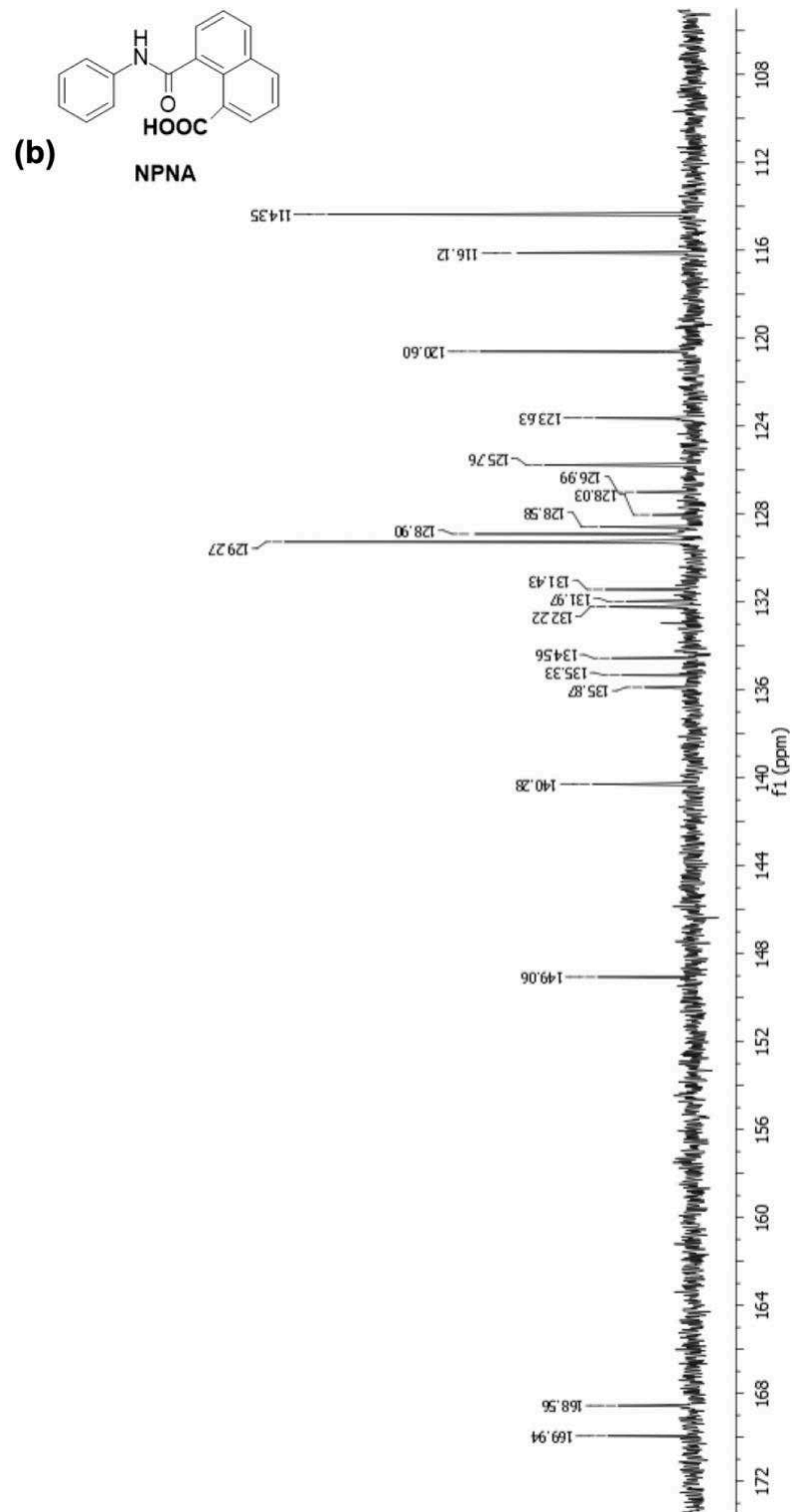




**Apêndice E** – Espectros de RMN de (a)  $^1\text{H}$  (200 MHz) e (b)  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) do **2CPA** em  $\text{DMSO-}d_6$ . (c) Espectro de IV do **2CPA**







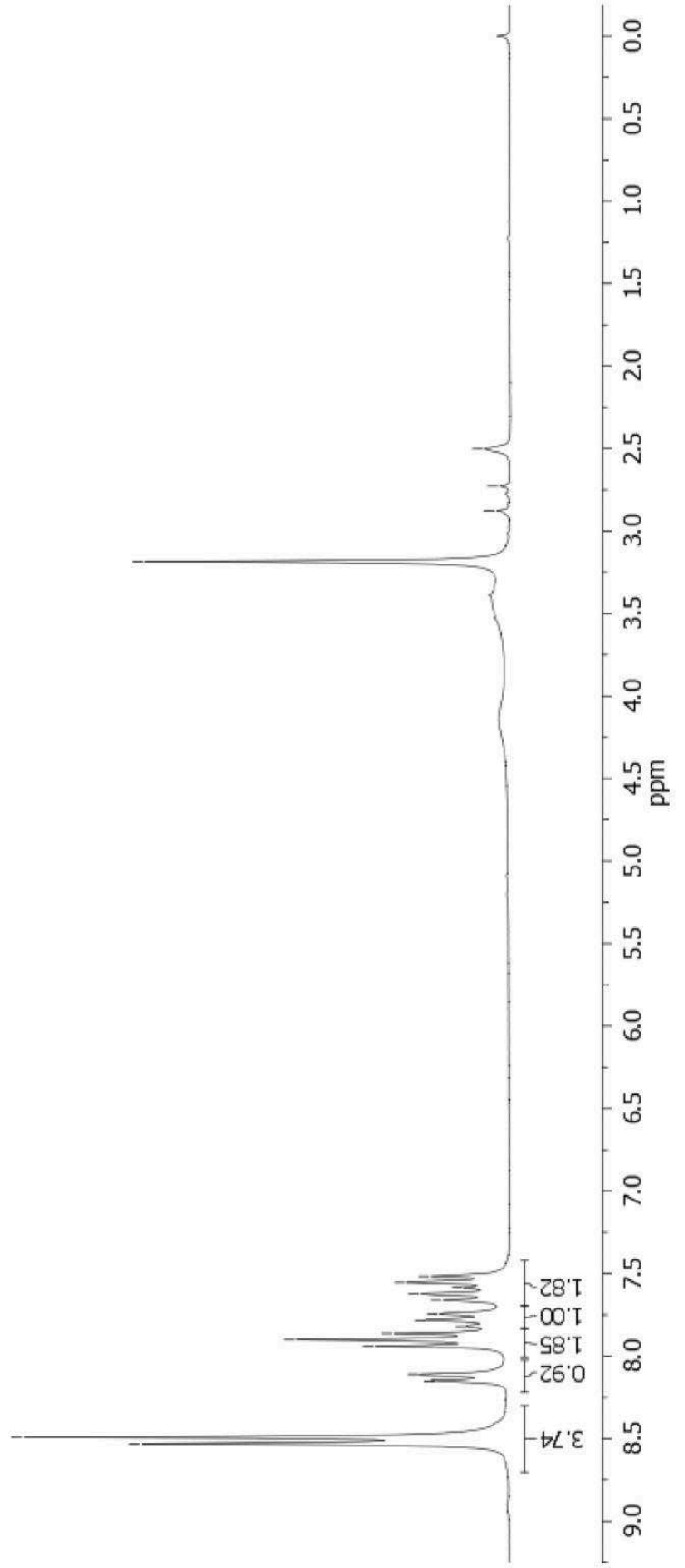
**Apêndice F** – Espectros de RMN de (a)  $^1\text{H}$  (200 MHz) e (b)  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) do **NPNA** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

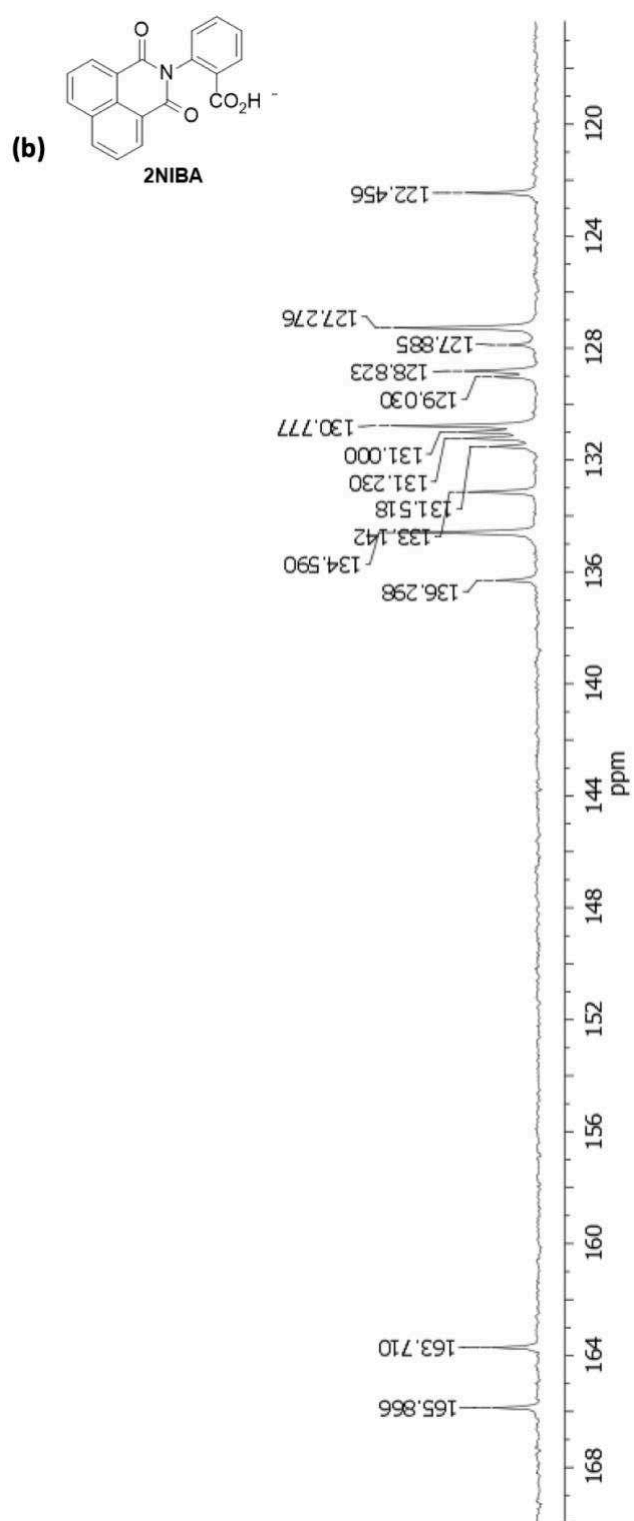


3.184  
2.876  
2.727  
2.502

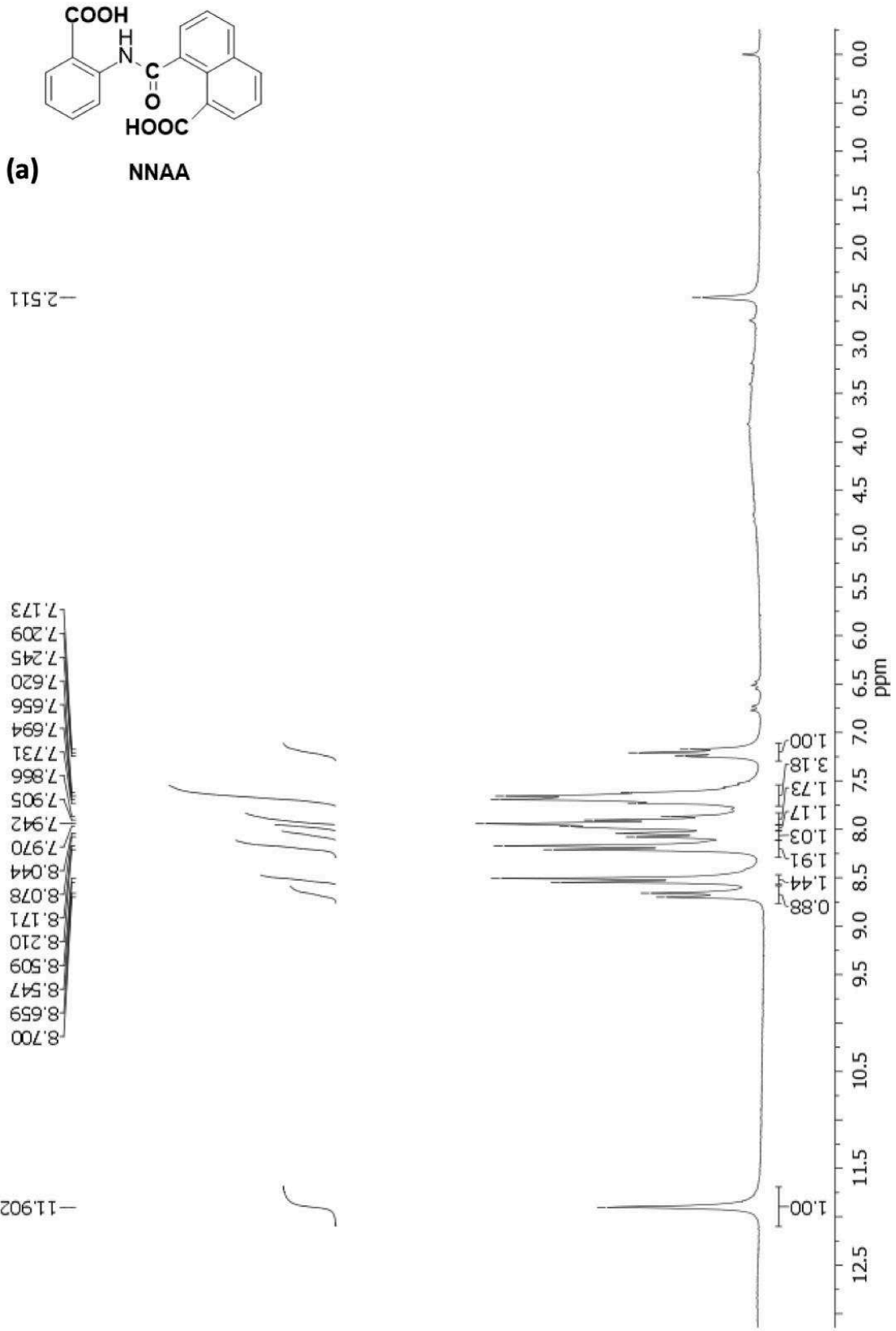
8.531  
8.492  
8.153  
8.109  
7.940  
7.901  
7.863  
7.822  
7.785  
7.747  
7.659  
7.621  
7.583  
7.555  
7.516

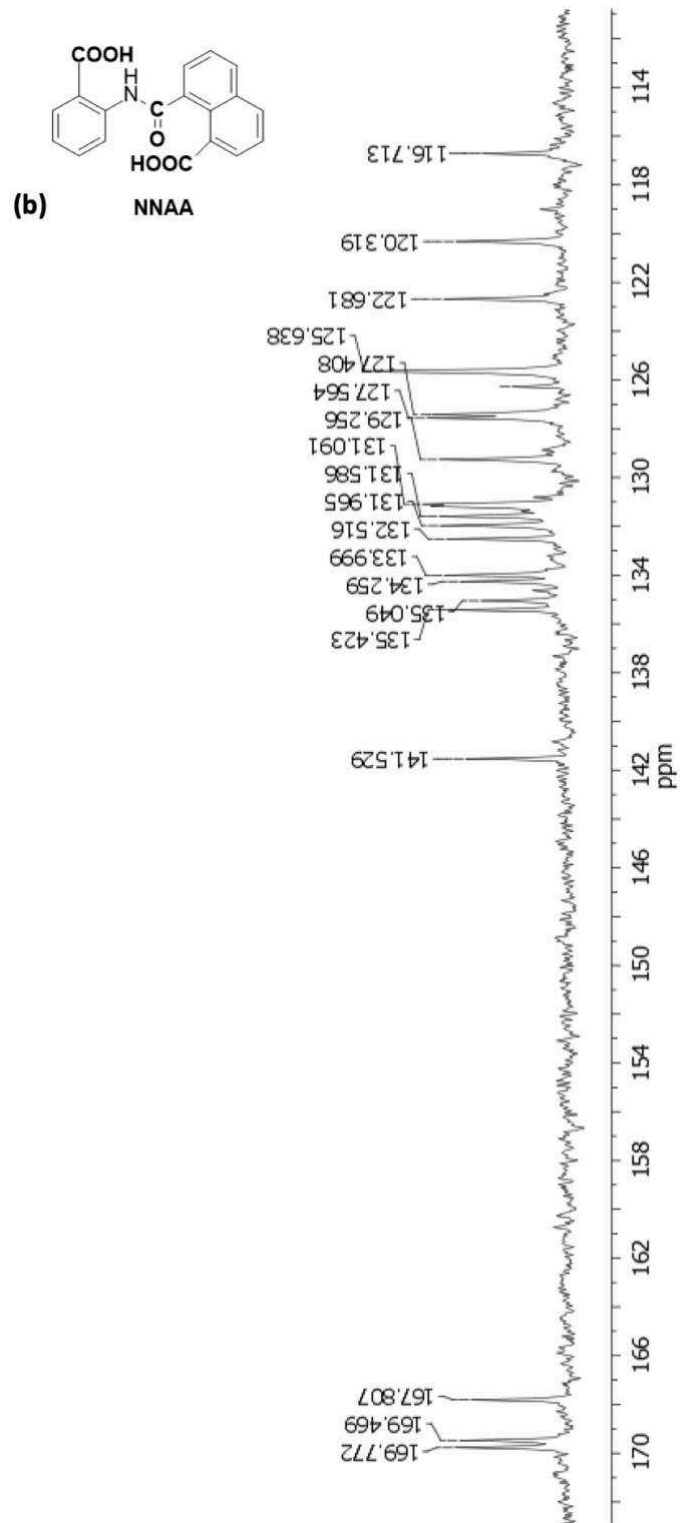
*Handwritten integration values:*  
1.11  
1.11



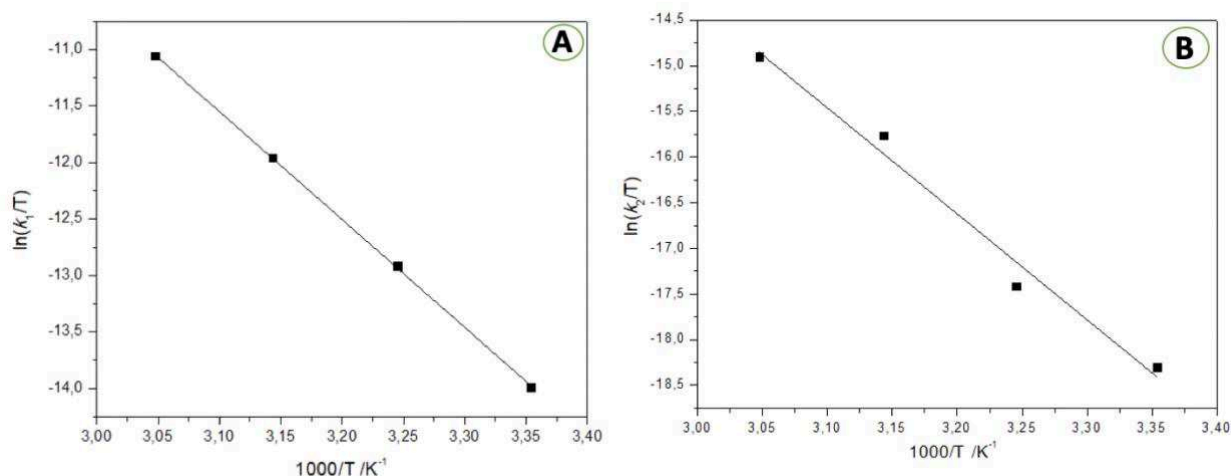


**Apêndice G** – Espectros de RMN de (a)  $^1\text{H}$  (200 MHz) e (b)  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) do **2NIBA** em  $\text{DMSO-}d_6$ .





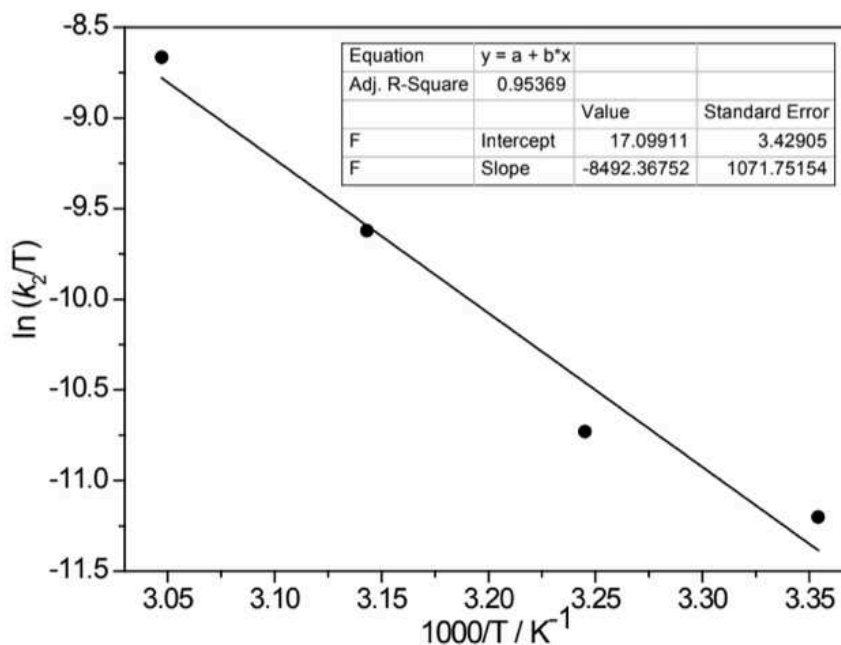
**Apêndice G** – Espectros de RMN de (a)  $^1\text{H}$  (200 MHz) e (b)  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) do **NNAA** em  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Apêndice H** – (a) Gráficos do  $\ln(k_1/T)$  em função da temperatura nas reações de clivagem do composto PA. (b) Gráficos do  $\ln(k_2/T)$  em função da temperatura nas reações de clivagem do composto **PA**.

<i>Temperatura</i>	<i>k<sub>1</sub> (s<sup>-1</sup>)</i>	<i>k<sub>2</sub> (s<sup>-1</sup>)</i>	<i>pK<sub>a1</sub></i>
<b>25° C (D<sub>2</sub>O)</b>	1.98x10 <sup>-4</sup>	2.99x10 <sup>-6</sup>	3.73
<b>25° C</b>	2.50x10 <sup>-4</sup>	3.37x10 <sup>-6</sup>	3.51
<b>35° C</b>	7.57x10 <sup>-4</sup>	8.44x10 <sup>-6</sup>	3.36
<b>45° C</b>	2.04x10 <sup>-3</sup>	6.57x10 <sup>-5</sup>	3.50
<b>55° C</b>	5.18x10 <sup>-3</sup>	1.11x10 <sup>-4</sup>	3.83

**Apêndice I** – Tabela com os parâmetros cinéticos para a clivagem do substrato **PA** em função da temperatura e efeito isotópico cinético do solvente em D<sub>2</sub>O.



**Apêndice J** – Gráfico do  $\ln(k_2/T)$  em função da temperatura na reação de clivagem do composto **2CPA**.

<b>Temperatura</b>	<b><math>k_1</math> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>k_2</math> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>k_3</math> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>pK_{a1}</math></b>	<b><math>pK_{a2}</math></b>
<b>25° C (D<sub>2</sub>O)</b>	1.73x10 <sup>-4</sup>	2.11x10 <sup>-3</sup>	-	3.64	4.18
<b>25° C</b>	2.09x10 <sup>-4</sup>	4.04x10 <sup>-3</sup>	1.41x10 <sup>-5</sup>	3.53	3.70
<b>35° C</b>	6.92x10 <sup>-4</sup>	6.74x10 <sup>-3</sup>	-	3.61	3.77
<b>45° C</b>	3.16x10 <sup>-3</sup>	2.11x10 <sup>-2</sup>	-	3.52	3.72
<b>55° C</b>	5.73x10 <sup>-3</sup>	5.66x10 <sup>-2</sup>	-	3.53	3.72

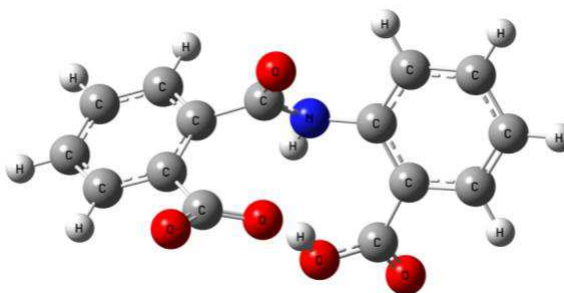
**Apêndice K** – Tabela com os parâmetros cinéticos para a clivagem do substrato **2CPA** em função da temperatura e efeito isotópico cinético do solvente em D<sub>2</sub>O.



Coordenadas cartesianas de todas as estruturas DFT em nível PCM// $\omega$ B97X-D/6-311++G(d,p):

2CPA- (mínimo global, estrutura 1 na Figura 32)

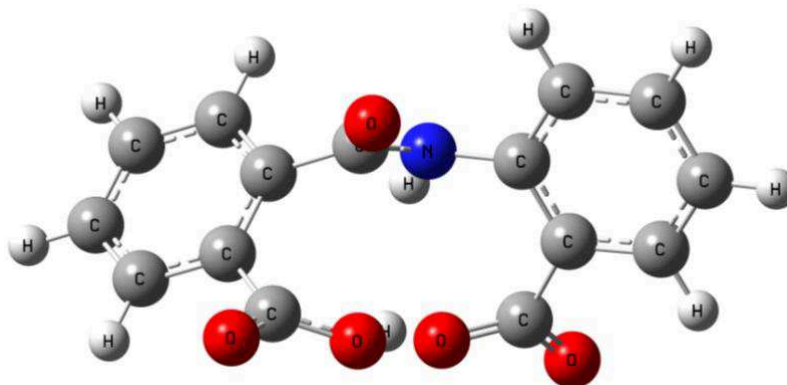
C	3.81497400	0.59384800	0.02950600
C	2.52365300	0.24688800	0.42024600
C	1.87875800	-0.80333400	-0.24306100
C	2.51206100	-1.48247100	-1.27910200
C	3.79643200	-1.11635500	-1.66547600
C	4.44617100	-0.07580100	-1.01211500
H	4.32153000	1.40538700	0.53907800
H	2.00443800	-2.30166600	-1.77642300
H	4.28704800	-1.64553100	-2.47425500
H	5.44686600	0.21418200	-1.31158500
C	0.50863300	-1.22035500	0.19976300
O	0.32299600	-1.83435700	1.24257700
N	-0.48438300	-0.85133600	-0.65547800
C	1.84372400	1.01323800	1.53844000
O	2.54994000	1.39769300	2.49186100
O	0.59625900	1.21714200	1.43784000
H	-0.18925400	-0.27016600	-1.42860500
C	-1.84010100	-0.75255700	-0.25867800
C	-2.52129300	0.46466300	-0.39299500
C	-2.50403900	-1.86531200	0.24911200
C	-3.86471200	0.53937000	-0.02191600
C	-3.82947900	-1.76455600	0.64809000
H	-1.97992700	-2.80933400	0.31796200
C	-4.51369700	-0.56115100	0.51535200
H	-4.38956000	1.47971600	-0.14195800
H	-4.33157300	-2.63644300	1.05104900
H	-5.55057500	-0.48243300	0.81935200
C	-1.91041900	1.70505900	-0.97238000
O	-2.52946900	2.39053700	-1.76678200
O	-0.69085800	2.06664900	-0.61646600
H	-0.26325100	1.57729000	0.15276000



Zero-point correction=	0.227089 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.243785
Thermal correction to Enthalpy=	0.244729
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.181574
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1008.443010
Sum of electronic and thermal Energies=	-1008.426314
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1008.425370
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1008.488525

2CPA- (mínimo local, estrutura 2 na Figura 32)

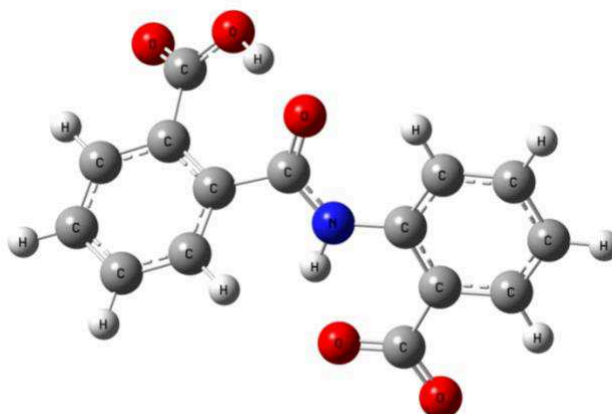
C	3.78078100	0.58828200	0.02560900
C	2.49860400	0.21204500	0.41836800
C	1.83270000	-0.80247000	-0.27839900
C	2.44463700	-1.41611800	-1.36629500
C	3.72002800	-1.02626100	-1.75807600
C	4.38617800	-0.02288700	-1.06473800
H	4.29562900	1.37233000	0.56855000
H	1.92888200	-2.20801500	-1.89726100
H	4.19281300	-1.51001800	-2.60475700
H	5.37973100	0.28386100	-1.36978300
C	0.46784400	-1.22793800	0.17533900
O	0.28886800	-1.76730600	1.26159600
N	-0.51853500	-0.90893000	-0.69889400
C	1.89913800	0.89799700	1.61003400
O	0.67720500	1.39103000	1.52679400
O	2.52658600	1.00864500	2.64772200
H	-0.22206900	-0.29447300	-1.44572600
H	0.25227100	1.45522000	0.61255100
C	-1.87217900	-0.76122500	-0.29578800
C	-2.57170900	-1.85842600	0.19577800
C	-2.49301300	0.48935500	-0.41415200
C	-3.89015300	-1.71387700	0.60570700
H	-2.08015600	-2.82182600	0.24759700
C	-3.82810800	0.60456100	-0.02528000
C	-4.52043500	-0.47902600	0.49758900
H	-4.42612900	-2.57067200	0.99748600
H	-4.31949100	1.56545800	-0.12347200
H	-5.55121500	-0.36130800	0.81125400
C	-1.78643300	1.72002700	-0.95587700
O	-2.45753700	2.49874300	-1.66213400
O	-0.56359700	1.89735500	-0.66436200



Zero-point correction=	0.226859 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.243649
Thermal correction to Enthalpy=	0.244593
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.181061
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1008.442363
Sum of electronic and thermal Energies=	-1008.425573
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1008.424629
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1008.488160

2CPA- (mínimo local, estrutura 3 na Figura 32)

C	-4.01494400	0.78761500	0.09303500
C	-2.95285100	-0.11830800	0.11442300
C	-1.72649700	0.26219800	-0.47014900
C	-1.62092400	1.52060000	-1.06480800
C	-2.69695900	2.39617000	-1.09871900
C	-3.89938200	2.02876000	-0.51432400
H	-4.94916400	0.50250800	0.55967400
H	-0.68654600	1.81600000	-1.52641500
H	-2.58815100	3.36087200	-1.57976500
H	-4.74678600	2.70383800	-0.52687500
C	-0.50664500	-0.61560900	-0.52486500
O	-0.59013000	-1.80928600	-0.85992600
N	0.63613000	0.00741200	-0.21853400
C	-3.26179500	-1.41247800	0.82340600
O	-2.63711000	-2.52248200	0.47146600
O	-4.11445100	-1.45902600	1.69046900
H	0.59957700	0.98737400	0.10329600
H	-1.91480200	-2.35048600	-0.19239300
C	1.95866500	-0.47522700	-0.20634400
C	2.29039500	-1.77115000	-0.60952200
C	2.97144500	0.40879700	0.23273800
C	3.61076200	-2.19819600	-0.57401400
H	1.51773800	-2.44219600	-0.94927900
C	4.28598100	-0.05650200	0.25357400
C	4.61599900	-1.34484100	-0.14047600
H	3.84616100	-3.20857400	-0.88931500
H	5.06165000	0.61915300	0.59031400
H	5.64713200	-1.67684500	-0.10972700
C	2.71771300	1.84496000	0.68201100
O	1.52590200	2.27639500	0.67933700
O	3.70760200	2.52636600	1.02795600

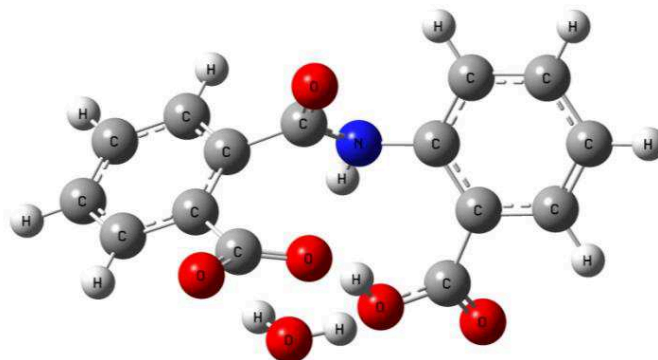



---

Zero-point correction=	0.226964 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.243675
Thermal correction to Enthalpy=	0.244619
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.180073
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1008.441253
Sum of electronic and thermal Energies=	-1008.424542
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1008.423598
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1008.488144

2CPA-H<sub>2</sub>O (mínimo global com H<sub>2</sub>O na Figura 33)

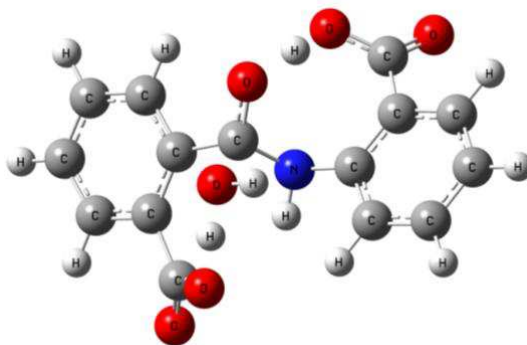
C	-3.74050200	-0.19785800	0.53463600
C	-2.46390600	-0.04506100	-0.00137900
C	-1.72576700	-1.18896500	-0.32669900
C	-2.25800100	-2.45702500	-0.11630400
C	-3.52940200	-2.59391200	0.42970800
C	-4.26848800	-1.46367600	0.75875500
H	-4.31578700	0.68461500	0.78952200
H	-1.68185200	-3.33558100	-0.38515100
H	-3.94168700	-3.58275200	0.59416300
H	-5.25749300	-1.56730400	1.19011100
C	-0.37010800	-1.03761700	-0.95086100
O	-0.22931200	-0.69613100	-2.11804800
N	0.66075200	-1.31285800	-0.10618500
C	-1.89787800	1.34301600	-0.20917000
O	-2.69781100	2.24648200	-0.54434400
O	-0.65803500	1.51453500	-0.03871600
H	0.39376200	-1.49611200	0.85150000
C	1.98352600	-0.85938700	-0.32769400
C	2.62472500	-0.07008100	0.63748500
C	2.65816900	-1.21369800	-1.49227400
C	3.93925600	0.34377500	0.41525900
C	3.95169500	-0.76282600	-1.71389200
H	2.16928200	-1.85479700	-2.21370600
C	4.59553300	0.01962900	-0.76158900
H	4.43645800	0.94142400	1.17000100
H	4.46249500	-1.03926200	-2.62903800
H	5.60796400	0.36665100	-0.92977400
C	2.00661300	0.32415300	1.94499700
O	2.65079600	0.28197800	2.97744300
O	0.74875100	0.73043500	1.98387300
H	0.29416900	0.90834800	1.10787300
O	-1.48641400	4.67580200	-1.00065900
H	-1.90512600	3.80583900	-0.82818000
H	-0.54405400	4.49132500	-0.97629600



Zero-point correction=	0.250925 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.271010
Thermal correction to Enthalpy=	0.271954
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.200240
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1084.873315
Sum of electronic and thermal Energies=	-1084.853230
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1084.852286
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1084.924000

TS<sub>o</sub>-H<sub>2</sub>O (Estrutura 1 no Esquema 14)

C	-4.01626800	0.00301000	-0.54604300
C	-2.71589600	-0.40108300	-0.23303000
C	-1.83144200	0.53843400	0.33610100
C	-2.27921300	1.83939300	0.54860200
C	-3.57731600	2.22258900	0.23914500
C	-4.45494800	1.29666700	-0.30499400
H	-4.69582600	-0.72189400	-0.97701300
H	-1.58763600	2.56040900	0.96527900
H	-3.89652500	3.24196500	0.42373400
H	-5.47458700	1.57506200	-0.54492400
C	-0.36260200	0.29137500	0.70696300
O	0.22869100	1.18340300	1.42929900
N	0.38900800	-0.15330800	-0.42183100
C	-2.40926900	-1.85650800	-0.54695600
O	-2.94814900	-2.37396800	-1.53025600
O	-1.62476400	-2.51161700	0.23482800
H	-0.08715700	-0.87094300	-0.95281900
C	1.75412800	-0.51869700	-0.20626200
C	2.79354100	0.42068600	-0.26587000
C	2.06412500	-1.86321400	0.00166400
C	4.11069000	-0.00619400	-0.07886900
C	3.37631500	-2.27440700	0.18683500
H	1.25592600	-2.58691400	0.01470400
C	4.40438800	-1.33892900	0.16322500
H	4.90932000	0.72449400	-0.12910600
H	3.59173300	-3.32356800	0.35342600
H	5.43195600	-1.64702100	0.31589100
C	2.60659900	1.87005700	-0.61664500
O	3.38106800	2.41824200	-1.38980700
O	1.62573300	2.54053000	-0.06914400
H	1.05497800	1.96773900	0.59633300
H	-1.05940500	-1.80676900	1.10239600
O	-0.56914500	-1.01576700	1.75610000
H	0.30970200	-1.30508000	2.03355200

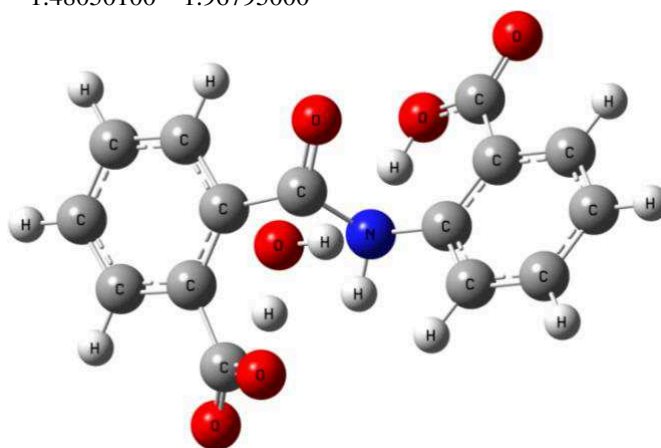


$\nu_{im.} = -738.44 \text{ cm}^{-1}$

Zero-point correction=	0.248451 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.265896
Thermal correction to Enthalpy=	0.266840
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.202596
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1084.830569
Sum of electronic and thermal Energies=	-1084.813124
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1084.812180
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1084.876424

TS<sub>N-H<sub>2</sub>O</sub> (Estrutura 2 no Esquema 14)

C	-3.99906300	0.05679800	-0.45791500
C	-2.69798500	-0.37793600	-0.18897200
C	-1.79461100	0.51271000	0.42957500
C	-2.23078200	1.80049900	0.72993900
C	-3.52845600	2.21575000	0.46292800
C	-4.42257100	1.33531500	-0.12808100
H	-4.69000100	-0.63311300	-0.92641200
H	-1.52663600	2.48562700	1.18461500
H	-3.83437400	3.22446700	0.71641600
H	-5.44202600	1.63811400	-0.33703200
C	-0.31768000	0.24042000	0.78033700
O	0.29634600	1.06923500	1.50241200
N	0.40862800	-0.19780900	-0.42296800
C	-2.41935300	-1.80823300	-0.61053700
O	-2.99349700	-2.26549900	-1.59842400
O	-1.60455400	-2.52765800	0.09348500
H	-0.06178100	-0.95416700	-0.90626300
C	1.78530500	-0.53398800	-0.22803900
C	2.77199000	0.46120400	-0.29184200
C	2.15292000	-1.85466900	0.01132200
C	4.10541100	0.11456800	-0.06691600
C	3.48577400	-2.18871200	0.21167600
H	1.38207000	-2.61717800	0.04254300
C	4.46406400	-1.20072900	0.18558700
H	4.86331600	0.88683200	-0.11230300
H	3.75669400	-3.22216000	0.39468700
H	5.50442000	-1.45464300	0.34996500
C	2.48368000	1.88138400	-0.66456400
O	3.29966500	2.77290600	-0.52482300
O	1.30969400	2.14590500	-1.22737600
H	0.73899100	1.33393000	-1.16096600
H	-1.07475300	-1.93807800	0.95332000
O	-0.53890400	-1.17123300	1.72313400
H	0.34181400	-1.48050100	1.96795000

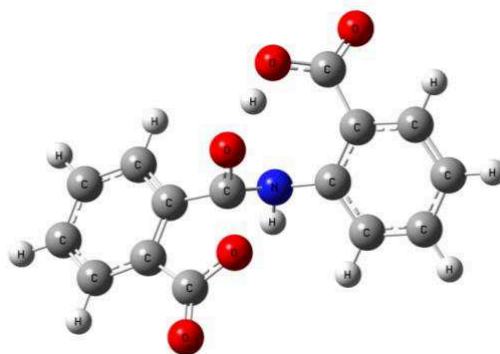


$\nu_{im} = -842.76 \text{ cm}^{-1}$

Zero-point correction=	0.248984 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.266717
Thermal correction to Enthalpy=	0.267661
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.202233
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1084.825376
Sum of electronic and thermal Energies=	-1084.807643
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1084.806699
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1084.872127

## TS0-1 (Estado de transição no Esquema 15)

C	4.19735500	0.37926200	-0.24073400
C	2.85196200	0.54764500	0.05842600
C	1.94988200	-0.49447700	-0.02613600
C	2.35758100	-1.75976200	-0.41567000
C	3.70422200	-1.94284000	-0.71823800
C	4.61584200	-0.88658400	-0.63300800
H	4.89503600	1.20556100	-0.16742000
H	1.65286700	-2.58117400	-0.47907300
H	4.05464800	-2.92211000	-1.02473400
H	5.65869900	-1.06017400	-0.87144900
C	0.55625100	-0.06411000	0.38755300
O	0.06925600	-0.59490300	1.48180700
N	-0.33740500	-0.06753600	-0.73563400
C	2.13954800	1.76068000	0.51621300
O	0.86963200	1.47887700	0.72349100
O	2.61621300	2.87099400	0.69308000
H	0.09691900	0.41030400	-1.51806400
C	-1.65383000	0.44190400	-0.51844800
C	-2.69815700	-0.37352400	-0.05842900
C	-1.92761700	1.77037400	-0.84739400
C	-3.97533500	0.17336000	0.09702200
C	-3.19878000	2.30101600	-0.68944100
H	-1.12150200	2.38711500	-1.22948400
C	-4.22711700	1.50353400	-0.19766500
H	-4.77679400	-0.46514900	0.44989200
H	-3.38369500	3.33867700	-0.94297700
H	-5.22159700	1.91137700	-0.05981600
C	-2.56825600	-1.85017000	0.19430700
O	-3.44838700	-2.61305000	-0.19198500
O	-1.53109800	-2.29918700	0.84296800
H	-0.83898300	-1.53138500	1.14752800



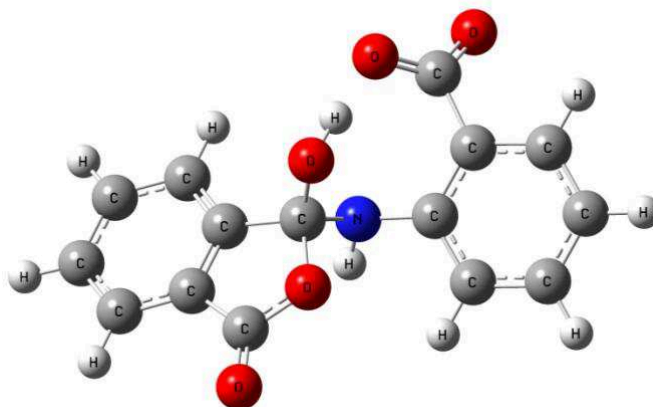
$\nu_{im} = -138.84 \text{ cm}^{-1}$

Zero-point correction=	0.224135 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.239632
Thermal correction to Enthalpy=	0.240576
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.180295
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1008.422706
Sum of electronic and thermal Energies=	-1008.407209
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1008.406264
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1008.466546



## INT1 (Intermediário 1 no Esquema 15)

C	4.21622300	0.33768900	-0.26257700
C	2.87457700	0.54494100	0.02717700
C	1.94757400	-0.47642100	-0.02580800
C	2.31744000	-1.76434700	-0.37020400
C	3.66074900	-1.98770100	-0.66116700
C	4.59907700	-0.95209400	-0.61007500
H	4.93365100	1.14846900	-0.21678400
H	1.59280500	-2.56926600	-0.40708800
H	3.98798500	-2.98526700	-0.93155200
H	5.63693700	-1.16086600	-0.84129300
C	0.58332900	0.04941200	0.36506300
O	0.10176300	-0.44245600	1.55301300
N	-0.35232800	-0.08692700	-0.70592700
C	2.17272500	1.77290700	0.44025700
O	0.87754700	1.48352800	0.64456400
O	2.61152100	2.89035200	0.59515700
H	0.05344800	0.30481300	-1.54945100
C	-1.67468300	0.43138200	-0.49495500
C	-2.71335900	-0.40459200	-0.06542400
C	-1.94436100	1.76545400	-0.79984800
C	-3.99412700	0.13329300	0.08242400
C	-3.22086900	2.28714500	-0.64613700
H	-1.13681300	2.39215100	-1.16206100
C	-4.24888500	1.47004100	-0.18786900
H	-4.79953900	-0.51491800	0.40892600
H	-3.40998700	3.32864700	-0.88008200
H	-5.24831500	1.86872800	-0.05609500
C	-2.53496600	-1.88788100	0.19746400
O	-3.37428300	-2.66091300	-0.30970300
O	-1.57050200	-2.26278900	0.92940400
H	-0.55491700	-1.18115300	1.34755900

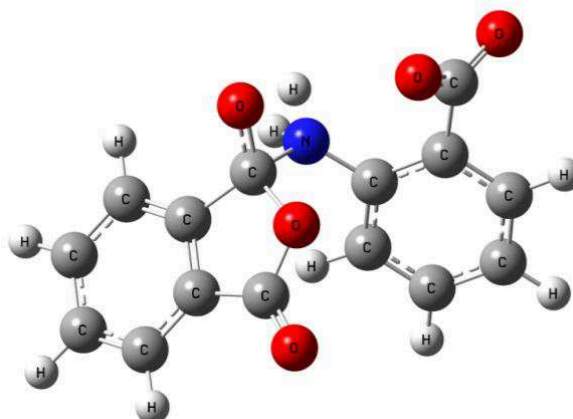


Zero-point correction=	0.227771 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.243538
Thermal correction to Enthalpy=	0.244483
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.183909
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1008.424132
Sum of electronic and thermal Energies=	-1008.408364
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1008.407420
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1008.467993



TS<sub>O-2a</sub> (Estado de transição no Esquema 15)

C	3.64986100	0.95753600	0.50020900
C	2.42988200	0.30773700	0.61966300
C	2.02433400	-0.66187600	-0.27756500
C	2.82316700	-1.03249000	-1.34469400
C	4.04990000	-0.38687200	-1.47731400
C	4.45899000	0.59514100	-0.56958100
H	3.95661500	1.71185400	1.21471500
H	2.50867000	-1.79208500	-2.05059300
H	4.70477300	-0.65140100	-2.29954800
H	5.42110600	1.07548300	-0.70232100
C	0.66201100	-1.15965000	0.12329400
O	0.42930100	-2.47715600	0.23777000
N	-0.47122100	-0.86606100	-0.84953900
C	1.37775300	0.44827400	1.63831900
O	1.32202300	1.16955200	2.60304400
O	0.38400800	-0.42661800	1.34758900
H	-0.08267600	-0.87963100	-1.79260100
C	-1.30320300	0.30315800	-0.67529800
C	-2.61206700	0.17467400	-0.21617800
C	-0.77382900	1.54753900	-1.00330100
C	-3.37920700	1.33373100	-0.08165200
C	-1.54094500	2.69149000	-0.83866200
H	0.24054500	1.61087700	-1.38327500
C	-2.84668700	2.58260400	-0.36977300
H	-4.40394100	1.24705300	0.26219500
H	-1.12241400	3.66117200	-1.08122500
H	-3.45402900	3.47109500	-0.24018800
C	-3.23582400	-1.16784300	0.12259400
O	-4.33004600	-1.43287100	-0.43461800
O	-2.62684300	-1.89921700	0.93984100
H	-0.60247500	-2.06042400	-0.42974600

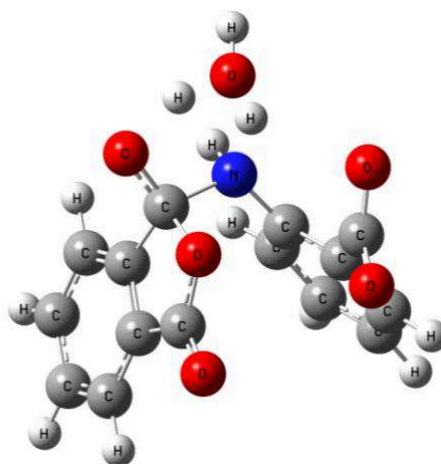


$\nu_{im} = - 1790.83 \text{ cm}^{-1}$

Zero-point correction=	0.222574 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.237804
Thermal correction to Enthalpy=	0.238748
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.178979
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1008.370195
Sum of electronic and thermal Energies=	-1008.354965
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1008.354021
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1008.413790

TS<sub>0-2b</sub> (Estado de transição no Esquema 15)

C	2.90866600	0.67226300	1.38888500
C	1.82216700	-0.11577300	1.03477600
C	1.72675300	-0.71946700	-0.20346800
C	2.72269100	-0.56618200	-1.15177300
C	3.81799900	0.22311600	-0.81187900
C	3.91103900	0.83713700	0.44110800
H	2.97068800	1.13781400	2.36545400
H	2.64809900	-1.03384400	-2.12677300
H	4.61501000	0.36698600	-1.53263600
H	4.77732400	1.44525300	0.67386400
C	0.42883300	-1.49213500	-0.30064900
O	0.51519700	-2.76970600	-0.57790700
N	-0.58028000	-0.81978200	-1.22979900
C	0.62842400	-0.48503700	1.81721000
O	0.34190600	-0.18859900	2.95623100
O	-0.15830600	-1.26562800	1.06294800
H	-0.15559100	-0.92253000	-2.15174600
C	-0.82897500	0.58733100	-1.01735000
C	-1.78434500	1.04150600	-0.10273000
C	-0.05462900	1.50179500	-1.72998200
C	-1.90988600	2.41784600	0.09801600
C	-0.21456400	2.86684000	-1.54167300
H	0.68474800	1.13362800	-2.43370000
C	-1.14222200	3.32799300	-0.61520800
H	-2.64026300	2.77375300	0.81595600
H	0.39091500	3.56255400	-2.11097900
H	-1.27204900	4.39157700	-0.45086900
C	-2.74962300	0.13421300	0.64027800
O	-3.38497300	-0.70389000	-0.04512000
O	-2.88742900	0.32946200	1.87314100
O	-1.83460900	-2.93473100	-1.23630000
H	-1.55328100	-1.82910400	-1.27194500
H	-1.99019400	-3.24525600	-2.13694400
H	-0.84169100	-3.16628500	-0.96840100

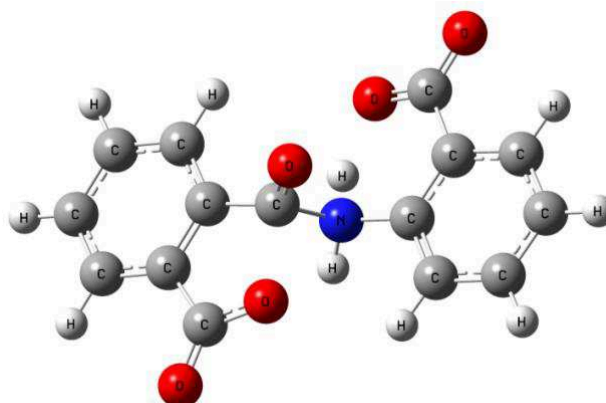


$\nu_{im.} = -1084.63 \text{ cm}^{-1}$

Zero-point correction=	0.247309 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.265202
Thermal correction to Enthalpy=	0.266146
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.200510
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1084.822437
Sum of electronic and thermal Energies=	-1084.804544
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1084.803600
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1084.869236

TS<sub>N-1</sub> (Estrutura 1 na Figura 34)

C	-4.15857700	-0.09832100	-0.32998800
C	-2.85892400	-0.48345000	-0.03245600
C	-1.89325300	0.45906900	0.28011700
C	-2.19234100	1.81361300	0.30483100
C	-3.49384800	2.20368200	0.00155600
C	-4.46894400	1.25715800	-0.31255700
H	-4.91082200	-0.84171500	-0.56709600
H	-1.43181800	2.54618800	0.54973500
H	-3.75124900	3.25653300	0.01191300
H	-5.47741000	1.58190400	-0.54106100
C	-0.53766300	-0.10012500	0.61095700
O	0.00231800	0.00785200	1.69642700
N	0.38584500	-0.04335500	-0.61684600
C	-2.32261000	-1.87597500	0.01449100
O	-3.00244700	-2.87737200	-0.22266600
O	-1.07298100	-1.88789400	0.32842300
H	-0.04589100	-0.53735400	-1.39887000
C	1.74912300	-0.49705000	-0.38164600
C	2.74013800	0.46222500	-0.15981800
C	2.02321300	-1.85476600	-0.37641400
C	4.03622000	0.00681900	0.08033300
C	3.32327200	-2.28192100	-0.14186300
H	1.22557800	-2.56570500	-0.55230400
C	4.32883800	-1.34989000	0.08978900
H	4.81913500	0.73477500	0.25305900
H	3.54644200	-3.34228000	-0.13964000
H	5.34436600	-1.68065800	0.27359100
C	2.46716000	1.96001600	-0.20611400
O	3.35758900	2.72908200	0.19690700
O	1.34453300	2.33195400	-0.67193500
H	0.49783100	0.99631600	-0.83595300

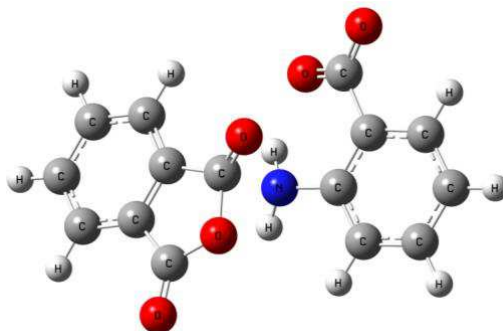


$$v_{im} = -212.17 \text{ cm}^{-1}$$

Zero-point correction=	0.226086 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.242108
Thermal correction to Enthalpy=	0.243052
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.180904
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1008.413712
Sum of electronic and thermal Energies=	-1008.397690
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1008.396746
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1008.458895

TS<sub>N-2</sub> (Estrutura 2 na Figura 34)

C	-4.08846500	-0.30685100	-0.41975700
C	-2.80596600	-0.57341600	0.03667700
C	-1.90760000	0.43868400	0.32214200
C	-2.24382500	1.77095200	0.16547900
C	-3.52858500	2.05094800	-0.29357600
C	-4.43783700	1.02884800	-0.58320500
H	-4.78679800	-1.10616900	-0.63696200
H	-1.53552200	2.56099400	0.38483700
H	-3.83131100	3.08261600	-0.43108700
H	-5.42916100	1.28399100	-0.93874500
C	-0.62710000	-0.17654400	0.79257300
O	0.10594900	0.23270800	1.68167600
N	0.35176600	-0.11799200	-0.85404500
C	-2.14704700	-1.86207200	0.31516200
O	-2.57243300	-2.98561500	0.19193700
O	-0.89756700	-1.61896600	0.77366200
H	-0.10325300	-0.73345900	-1.52263500
C	1.70492500	-0.46742100	-0.61772200
C	2.61652300	0.50434600	-0.18222000
C	2.08611600	-1.80244000	-0.73425100
C	3.91885300	0.09608700	0.11337600
C	3.38786500	-2.18074700	-0.44478300
H	1.35552300	-2.53496100	-1.05981100
C	4.31000300	-1.22815100	-0.02047100
H	4.63267600	0.83922400	0.44794600
H	3.68132000	-3.21886600	-0.55080500
H	5.33026500	-1.51646100	0.20463100
C	2.25298900	1.97643800	-0.05725500
O	2.95008500	2.67930200	0.71004300
O	1.28669200	2.40363800	-0.75023600
H	0.29699600	0.86853900	-1.12873700



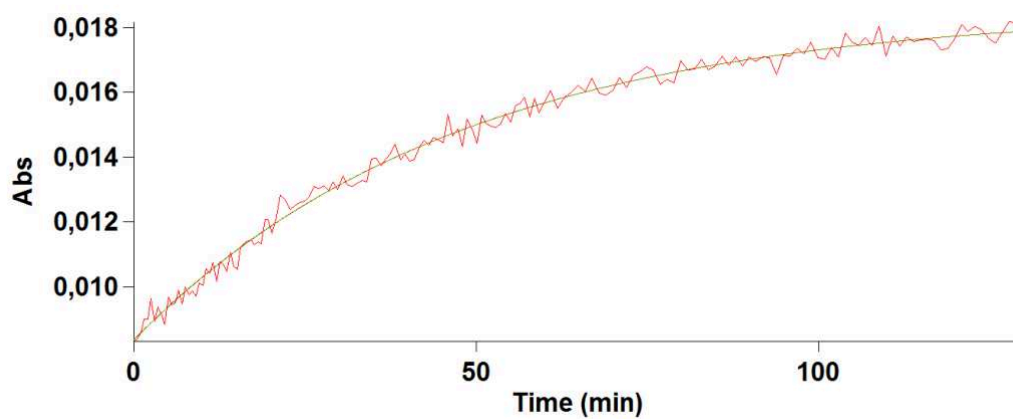
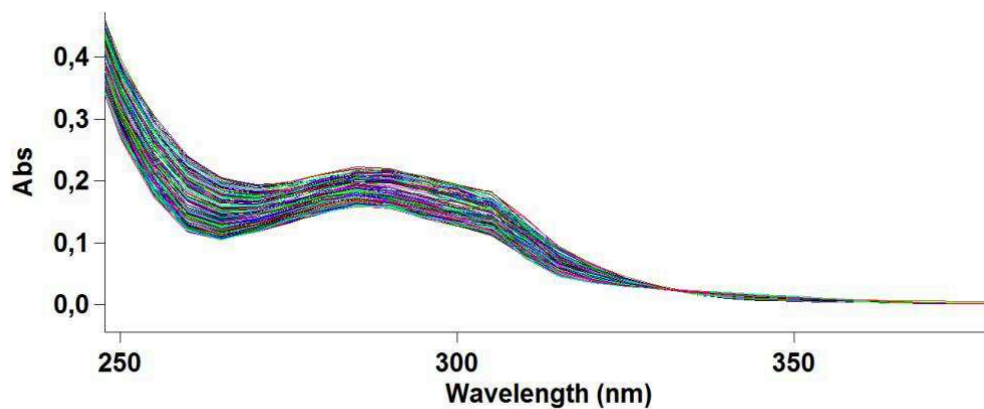
$$v_{im} = -253.94 \text{ cm}^{-1}$$

Zero-point correction=	0.226370 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy=	0.242429
Thermal correction to Enthalpy=	0.243373
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.181296
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1008.413336
Sum of electronic and thermal Energies=	-1008.397276
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1008.396332
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1008.458409

**Apêndice L** – Coordenadas cartesianas de todas as estruturas DFT em nível PCM// $\omega$ B97X-D/6-311++G(d,p).

## Análise UV-Vis da clivagem do 2CPA

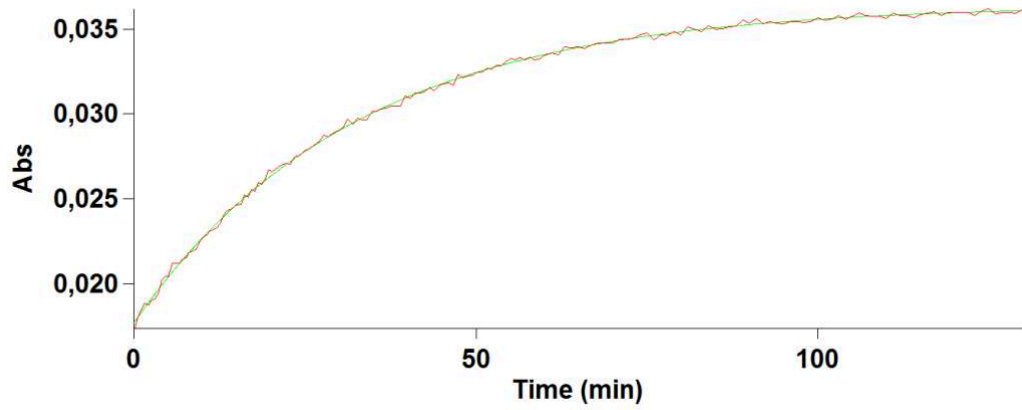
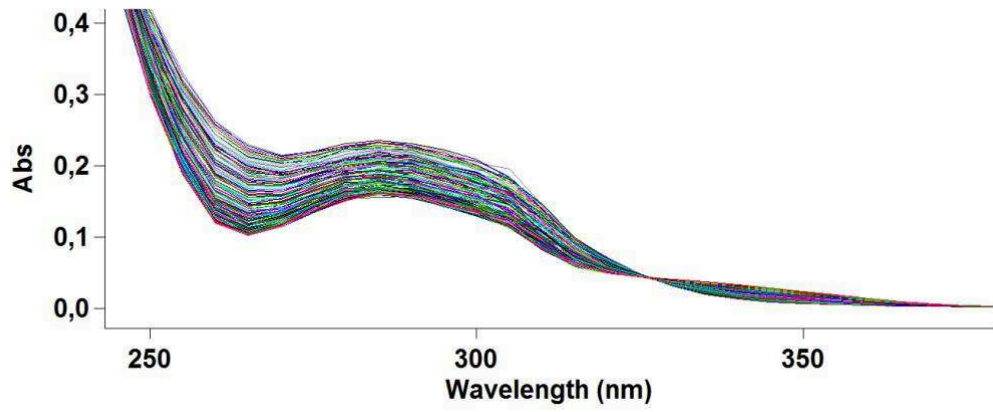
pH 2,0



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 2.00_1_330.00	0.000	186.0	0.0190	0.0190	0.0087	0.0182	0.0003

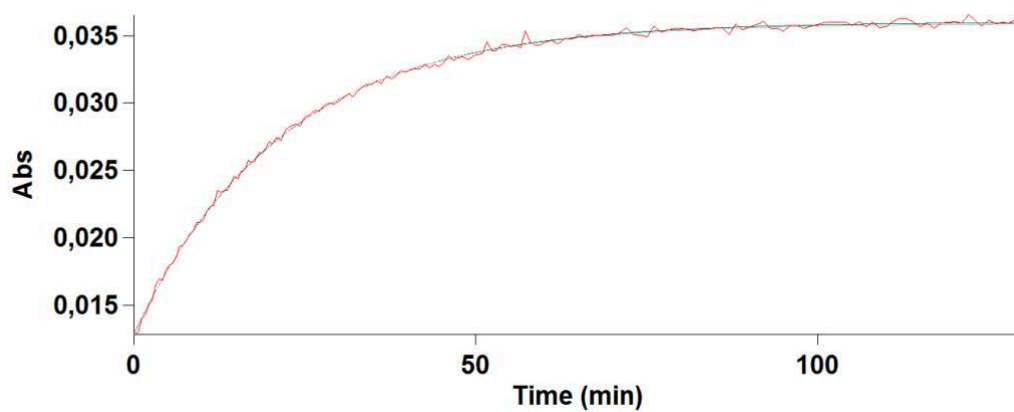
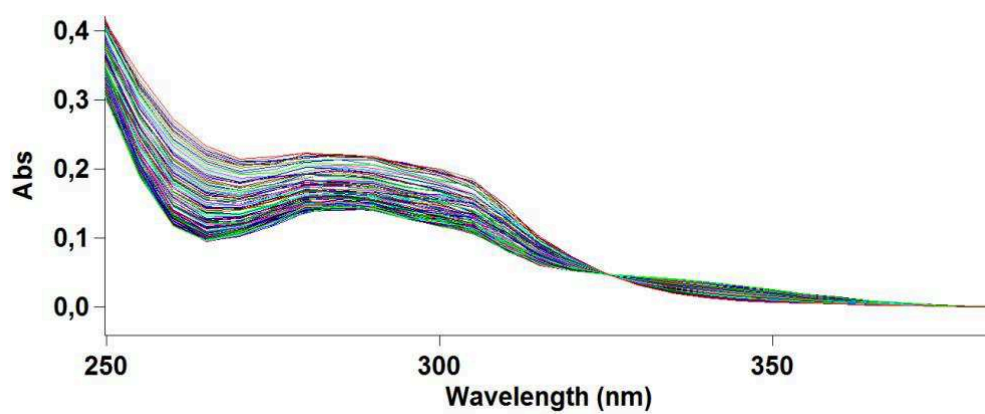
## pH 2,50



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 2.50_1_330.00	0.000	110.0	0.0313	0.0313	0.0153	0.0349	0.0002

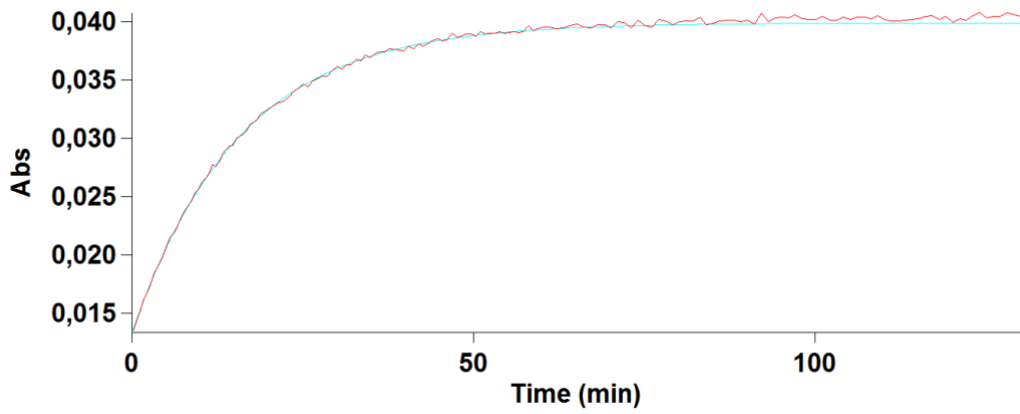
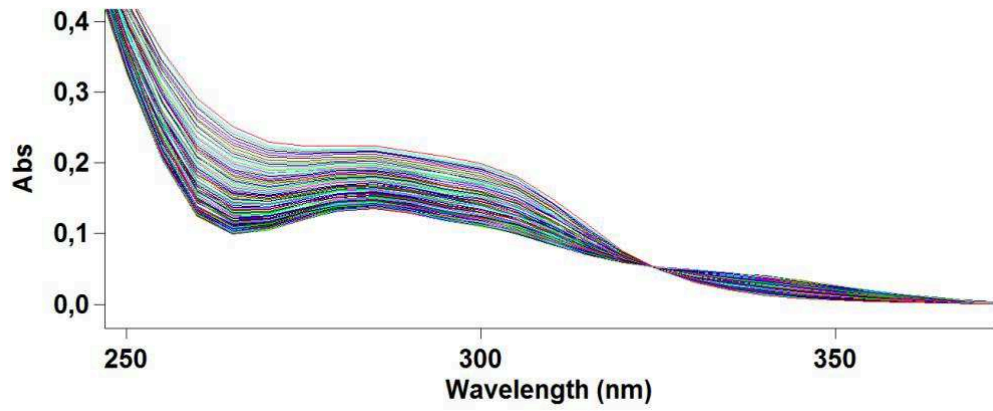
pH 2,75



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 2.75_1_330.00	0.000	75.00	0.0471	0.0471	0.0128	0.0359	0.0002

pH 3,0

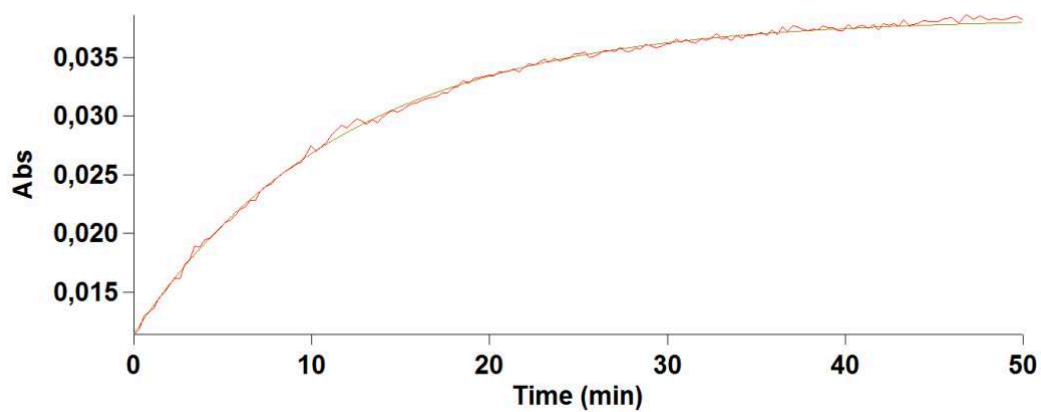
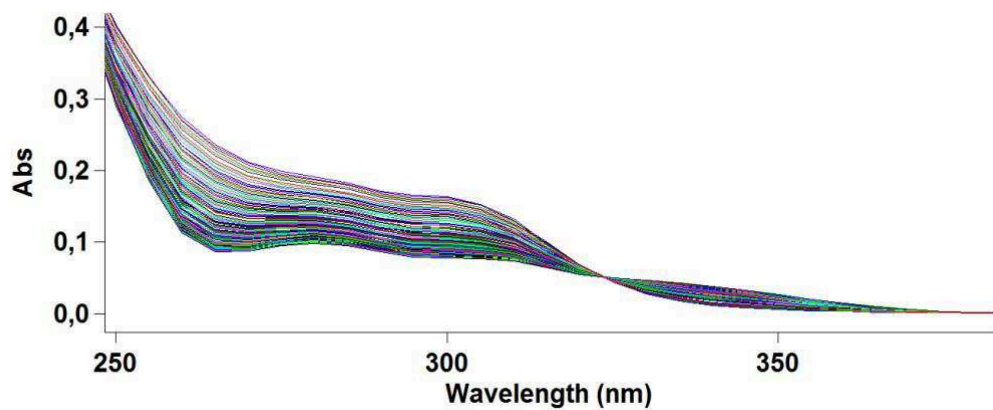


First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 3.00_1_330.00	0.000	57.00	0.0638	0.0638	0.0134	0.0399	0.0002



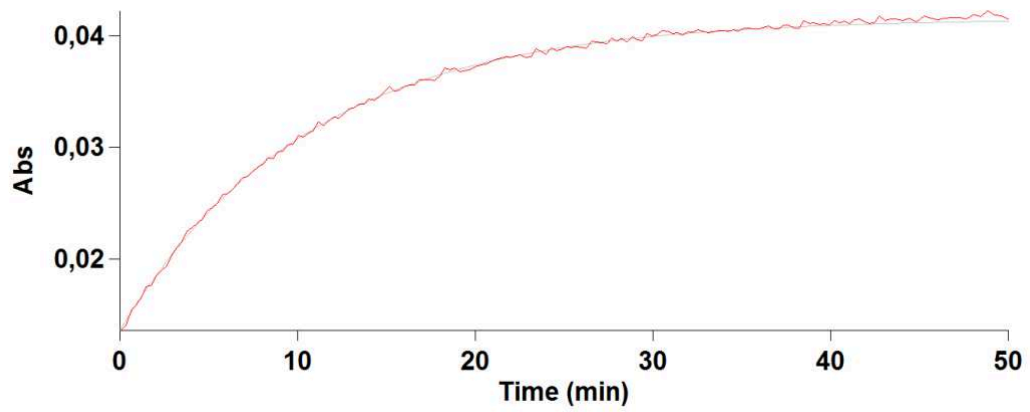
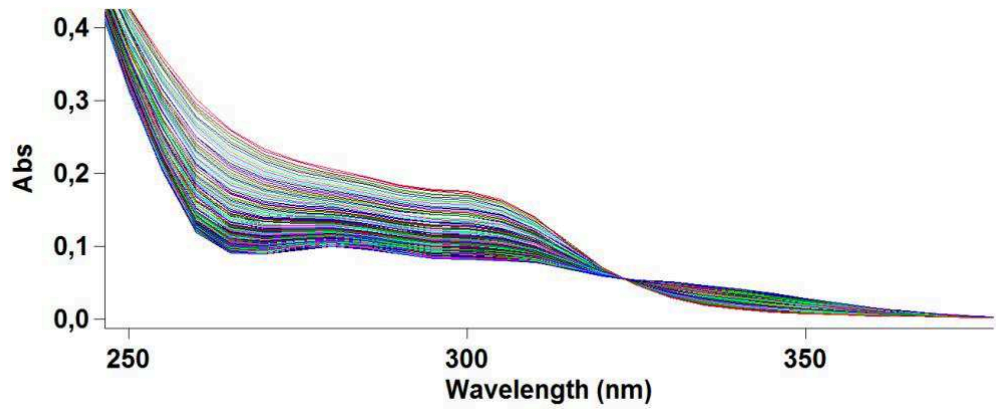
## pH 3,25



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 3.25_1_330.00	0.000	42.00	0.0848	0.0848	0.0114	0.0383	0.0002

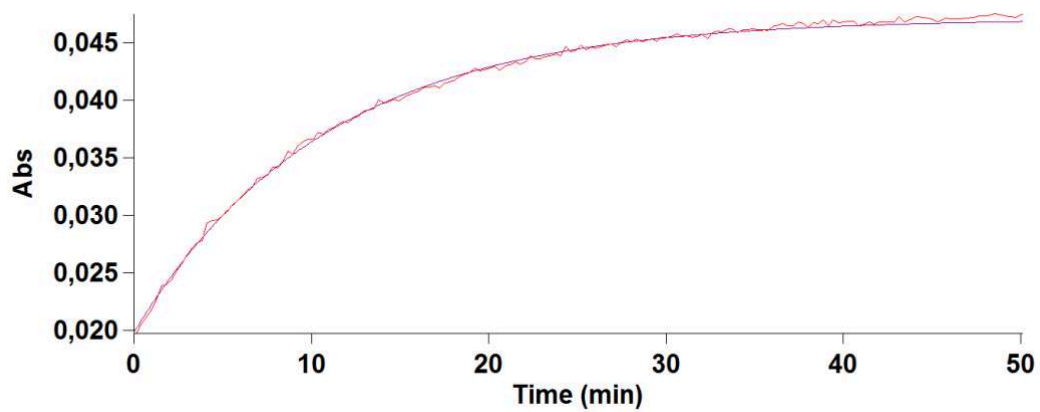
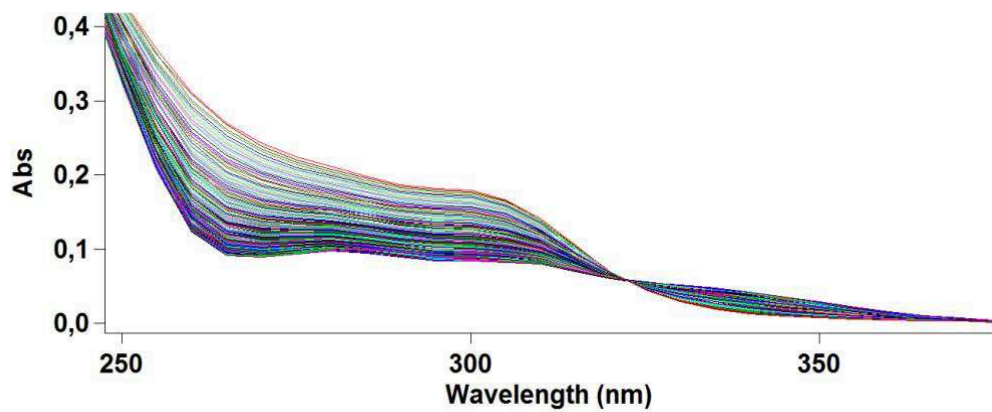
## pH 3,50



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 3.50_1_330.00	0.000	38.00	0.0951	0.0951	0.0136	0.0416	0.0002

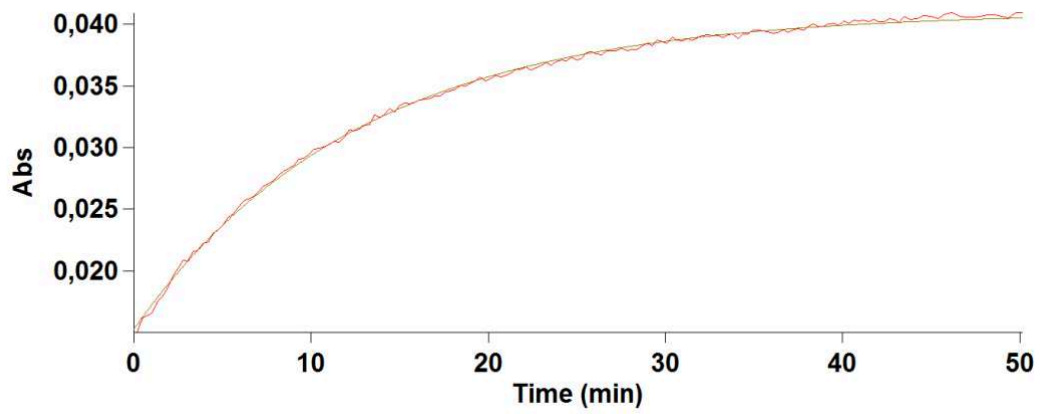
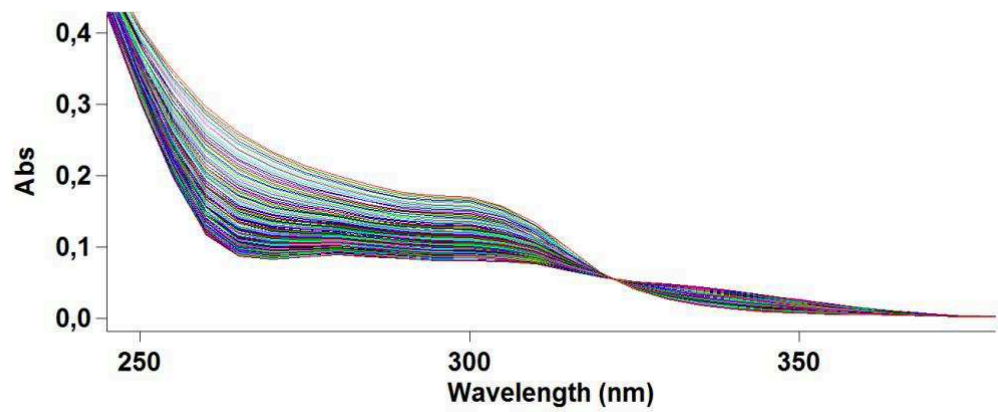
pH 3,75



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 3.75_1_330.00	0.000	38.00	0.0934	0.0934	0.0198	0.0471	0.0003

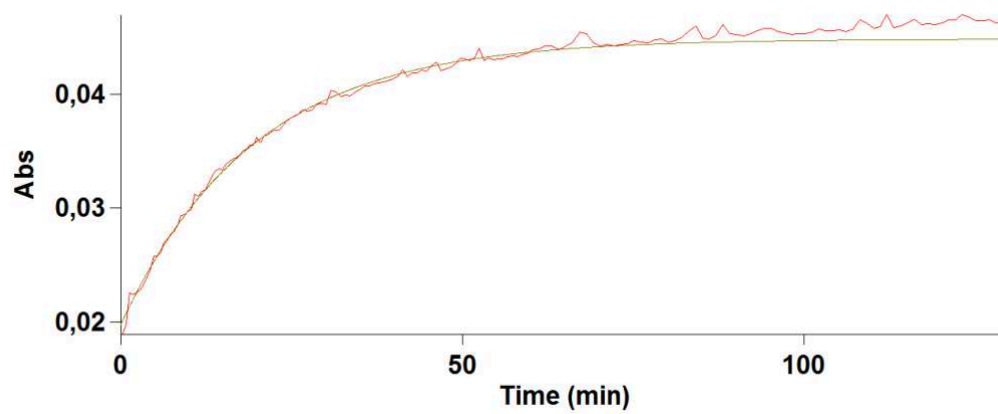
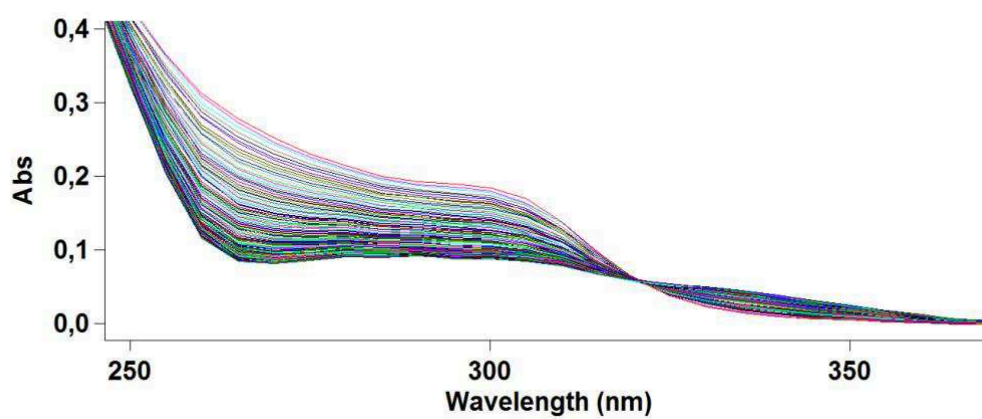
pH 4,0



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 4.00_1_330.00	0.000	45.00	0.0794	0.0794	0.0153	0.0410	0.0002

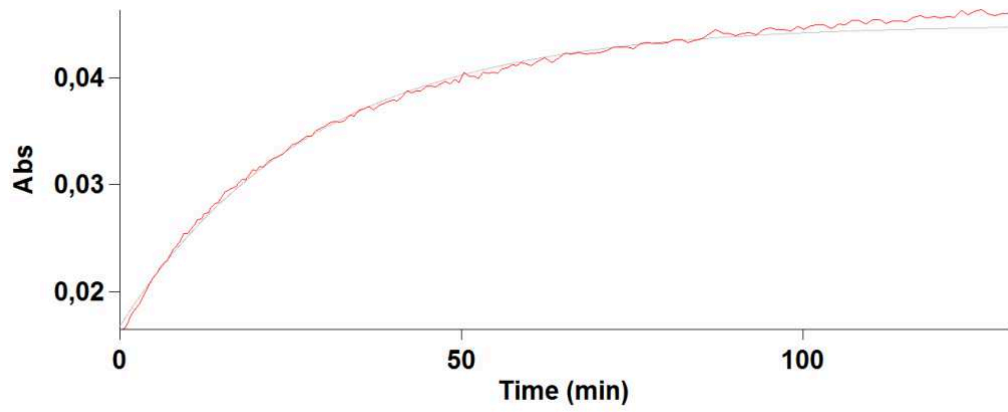
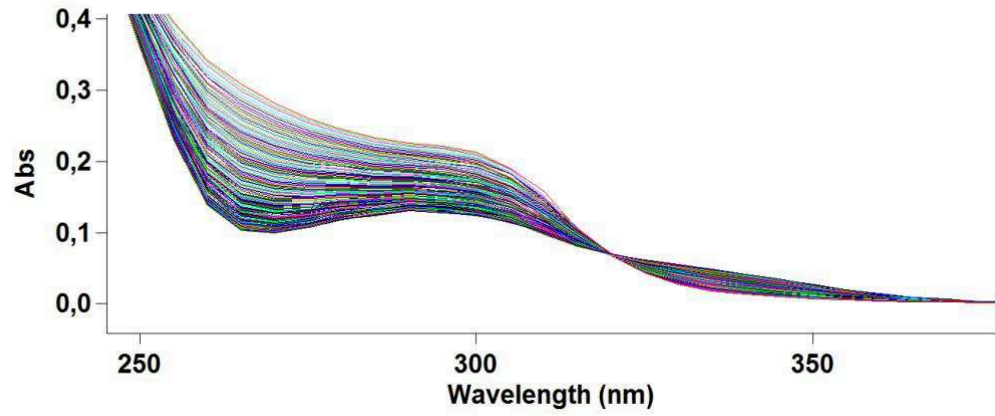
pH 4,25



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 4.25_1_330.00	0.000	72.00	0.0515	0.0515	0.0199	0.0448	0.0004

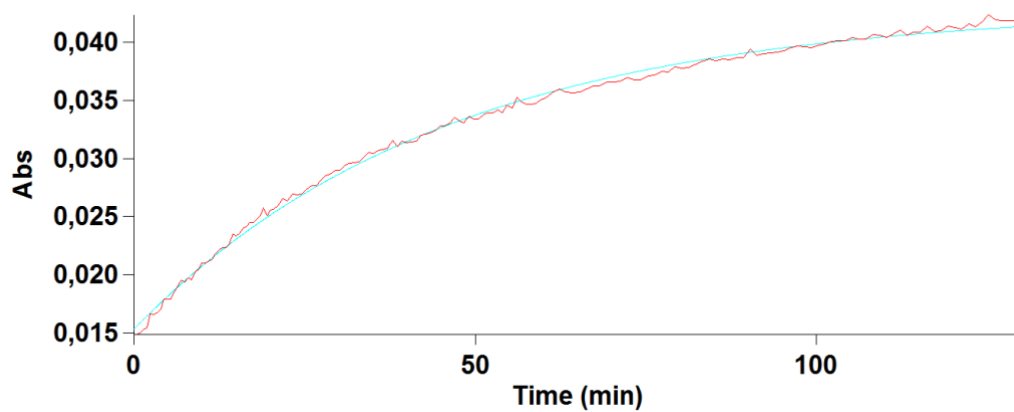
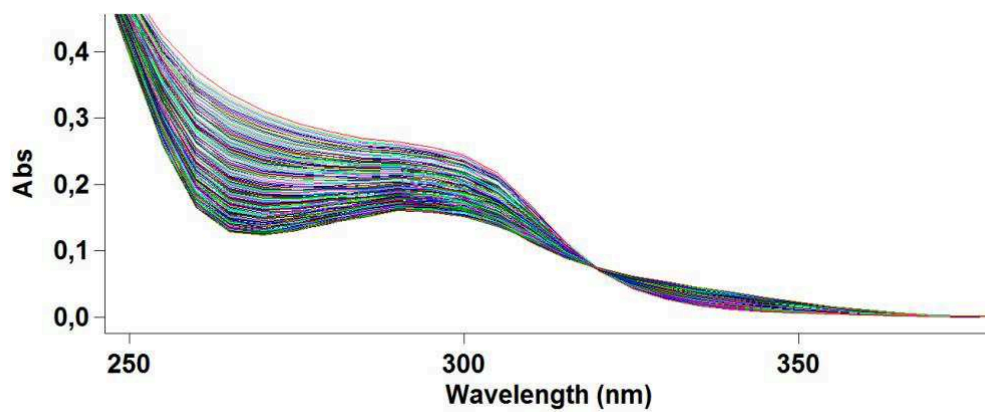
## pH 4,50



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 4.50_1_330.00	0.000	105.0	0.0356	0.0356	0.0168	0.0450	0.0004

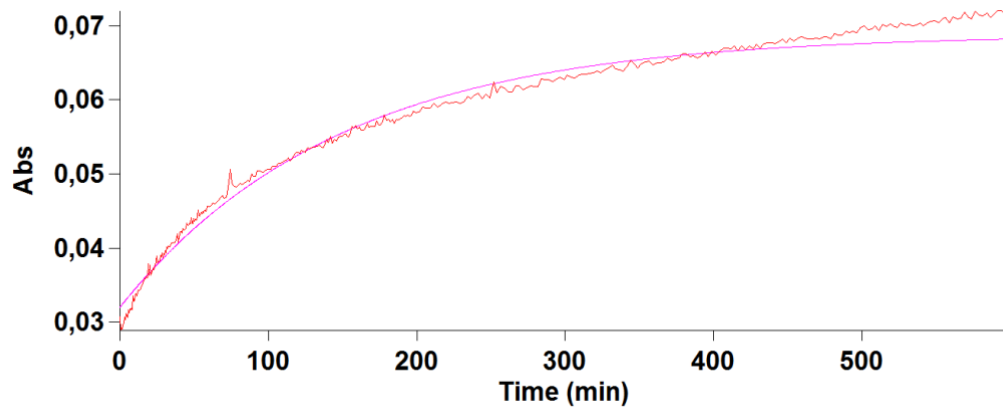
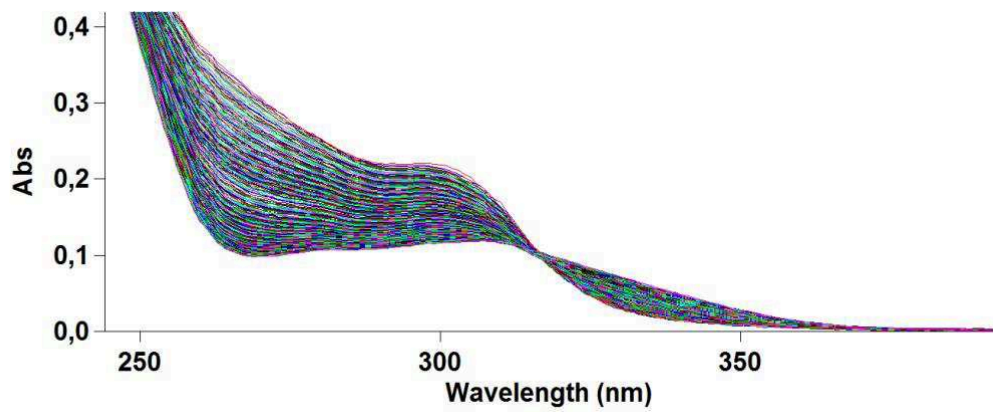
pH 4,75



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 4.75_1_330.00	0.000	160.0	0.0220	0.0220	0.0153	0.0429	0.0004

pH 5,0

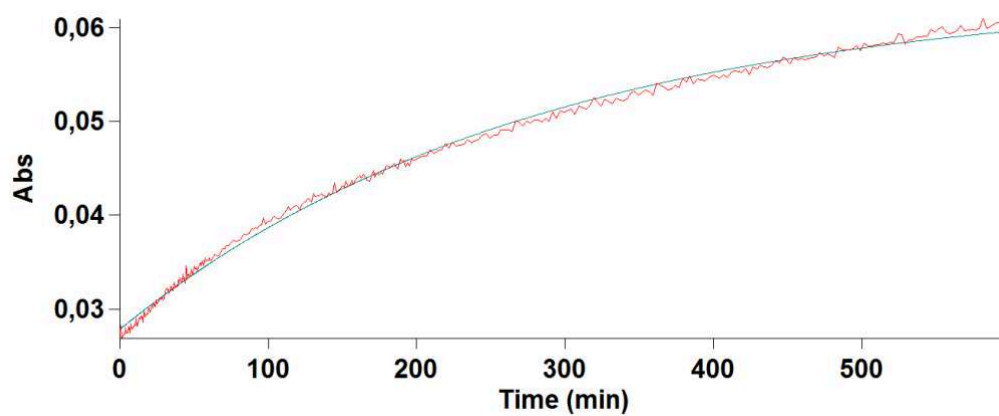
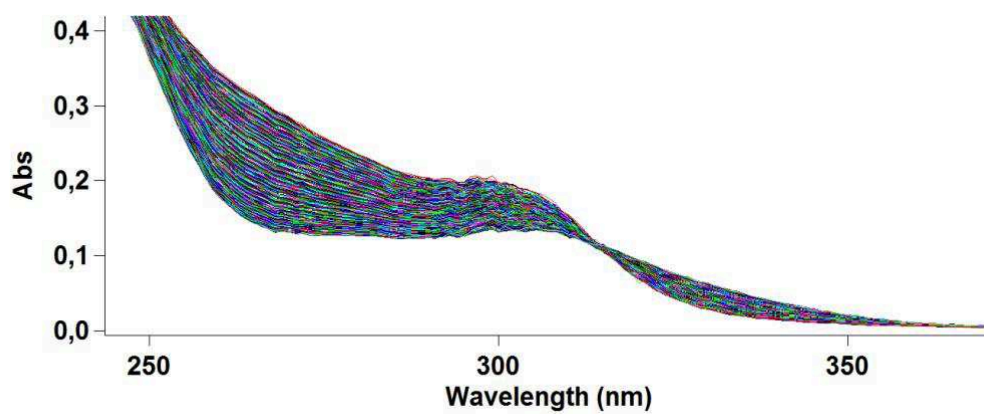


First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 5.00_1_330.00	0.000	520.0	0.0068	0.0068	0.0320	0.0688	0.0011



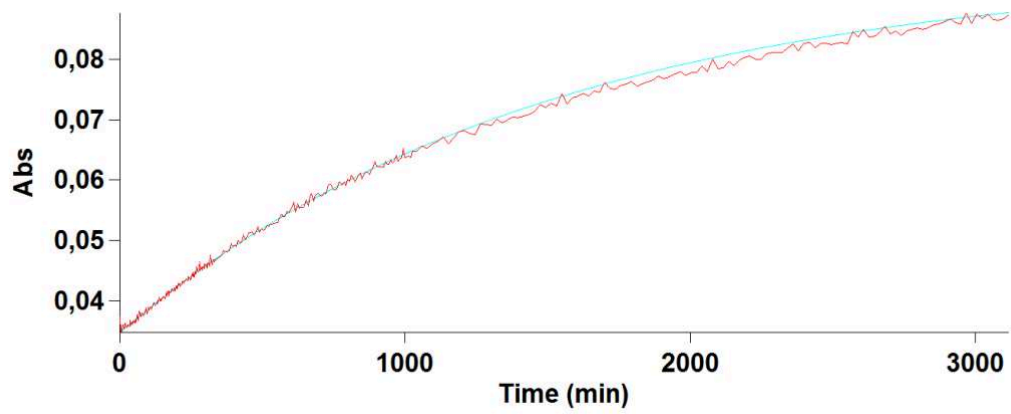
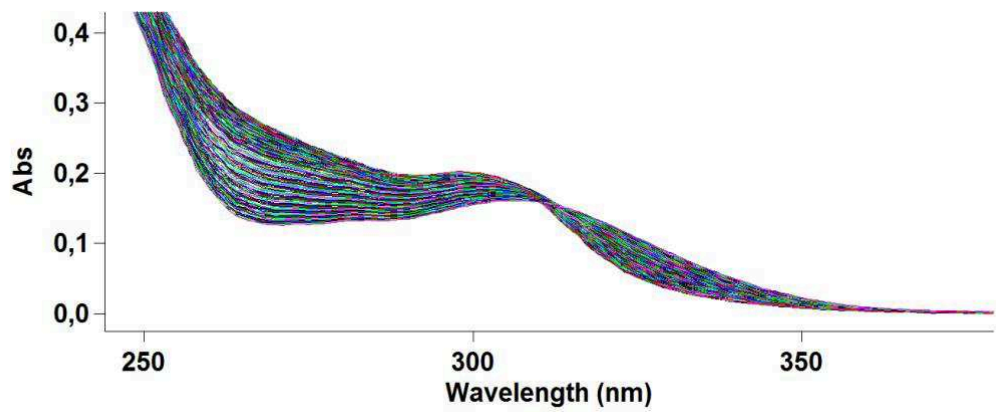
## pH 5,50



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 5.50_1_330.00	0.000	900.0	0.0036	0.0036	0.0278	0.0638	0.0006

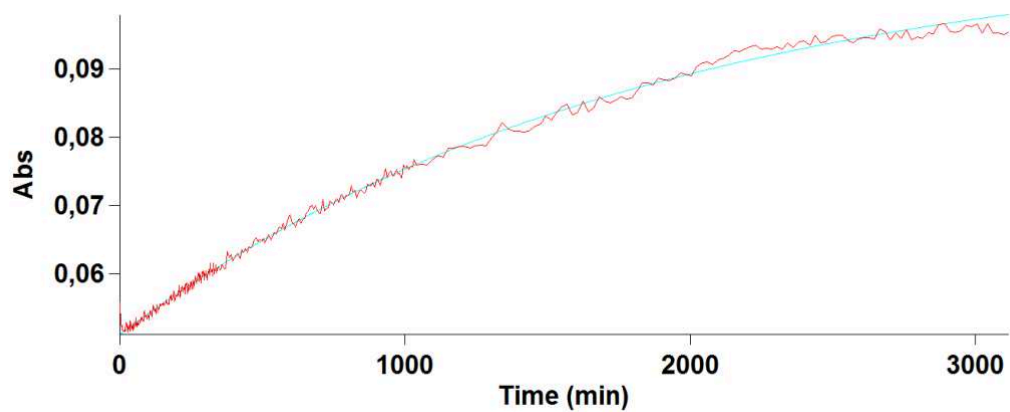
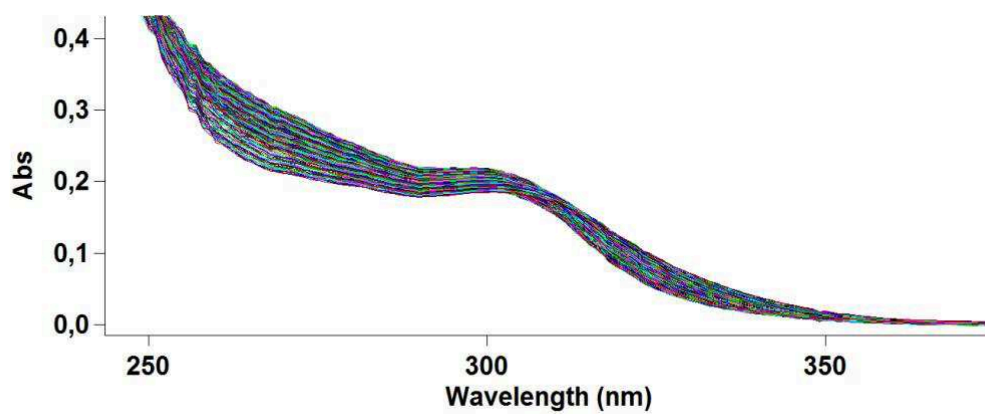
pH 6,0



First Order Result Table

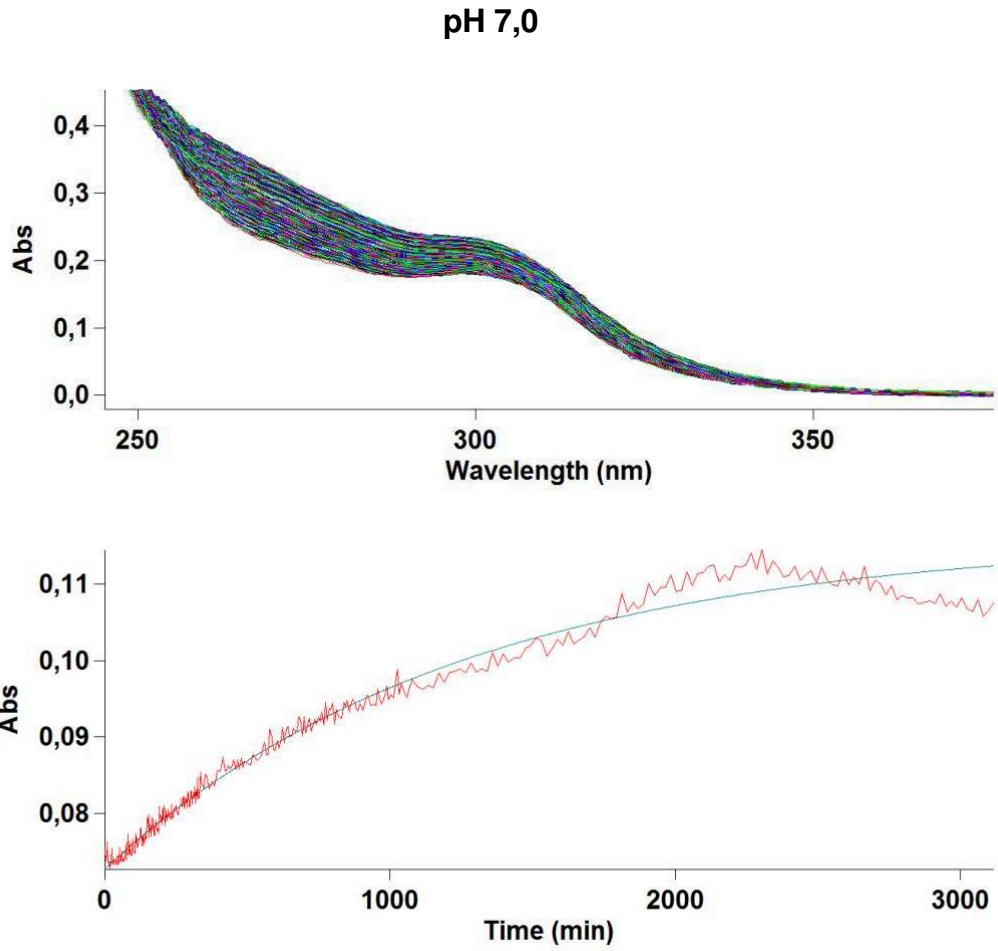
Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 6.00_1_330.00	0.000	3000	0.0007	0.0007	0.0357	0.0945	0.0005

pH 6,50



First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 6.50_1_330.00	0.000	3000	0.0006	0.0006	0.0511	0.1082	0.0007



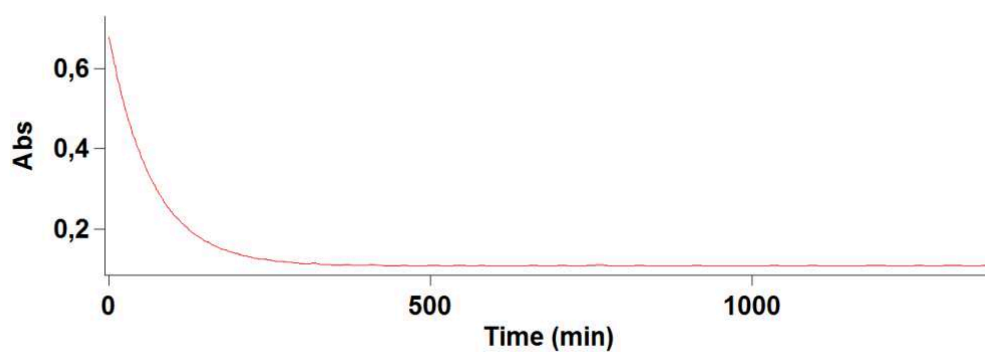
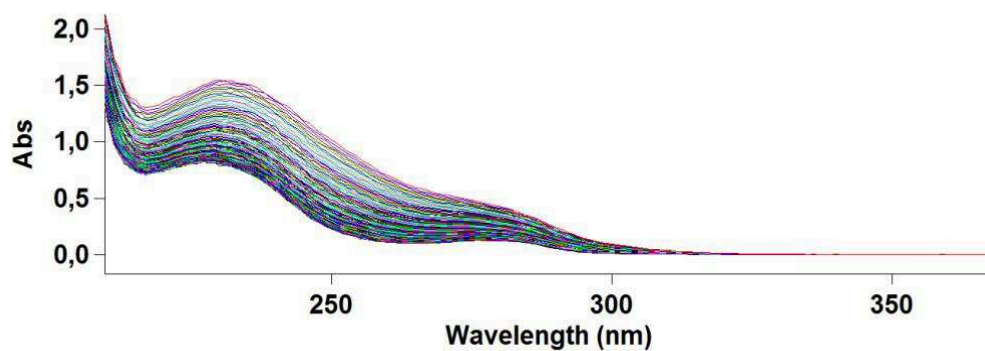
First Order Result Table

Factor	1.00						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
pH 7.00_1_330.00	0.000	3000	0.0008	0.0008	0.0728	0.1161	0.0015

**Apêndice M** – Espectro de UV-Vis da clivagem do **2CPA**. O perfil cinético foi obtido acompanhando a absorbância em 330 nm, correspondendo a formação do ácido antranílico em pH 2,0 a 7,0.

## Análise UV-Vis da clivagem do PA

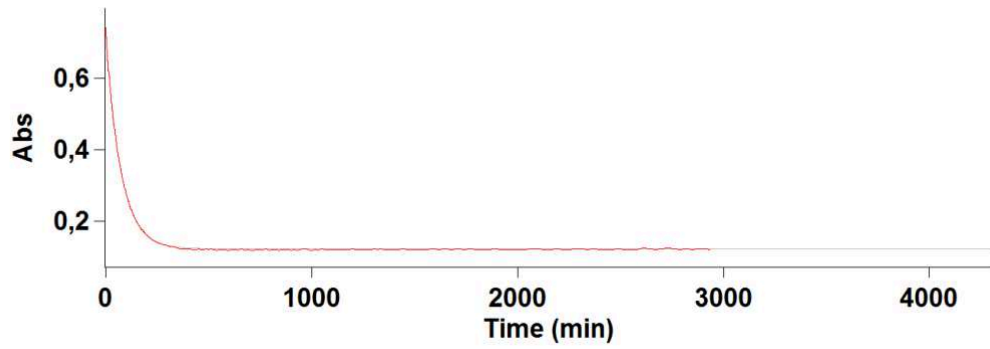
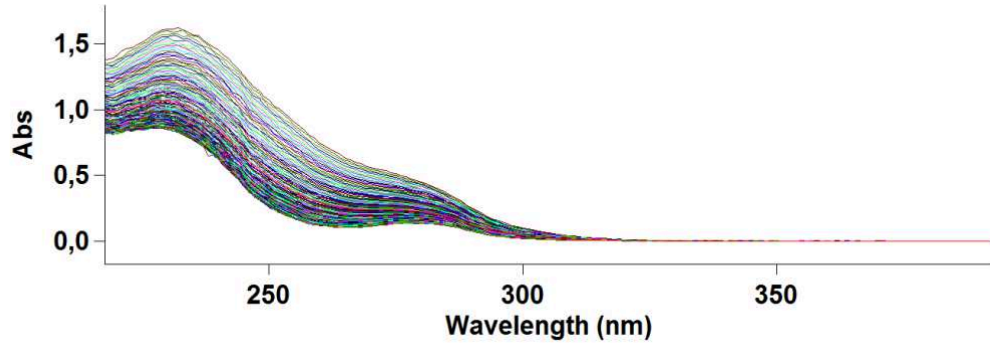
pH 2,0



First Order Result Table

Factor	166,67						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample1_1_261,08_1	0.000	200,0	0,0148	2,4668	0,6781	0,1079	0,0014

pH 2,50

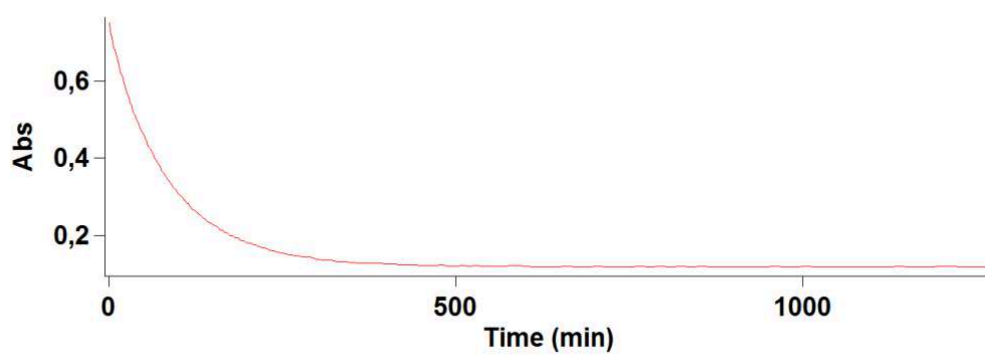
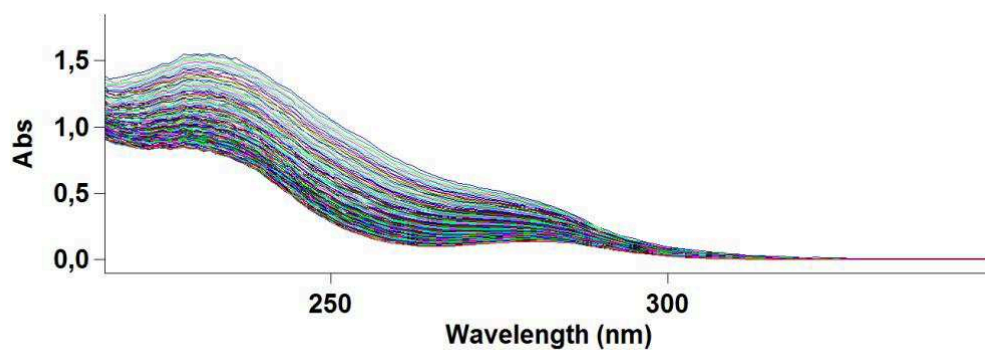


First Order Result Table

Factor 166,67

Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample2_1_260,12_1	0,000	250,0	0,0138	2,3059	0,7369	0,1221	0,0019

pH 3,00

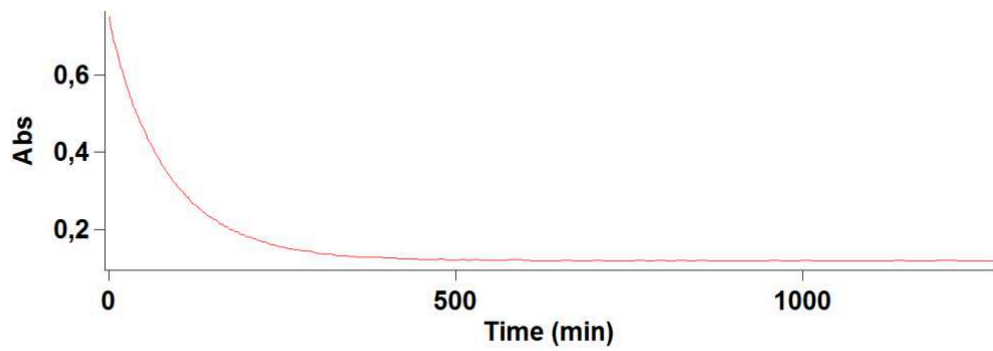
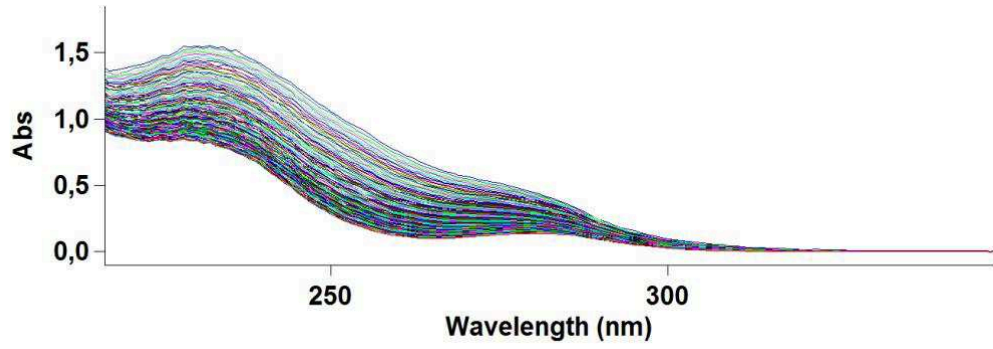


First Order Result Table

Factor 166,67

Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample3_1_260,19_1	0.000	400,0	0,0120	2,0039	0,7361	0,1247	0,0028

pH 3,50

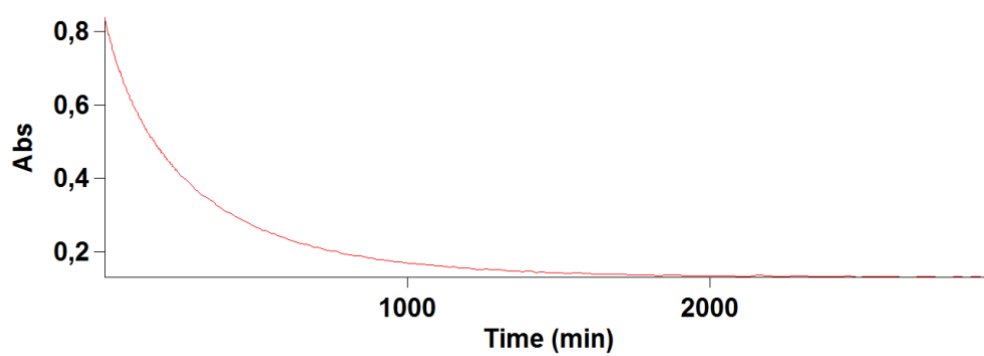
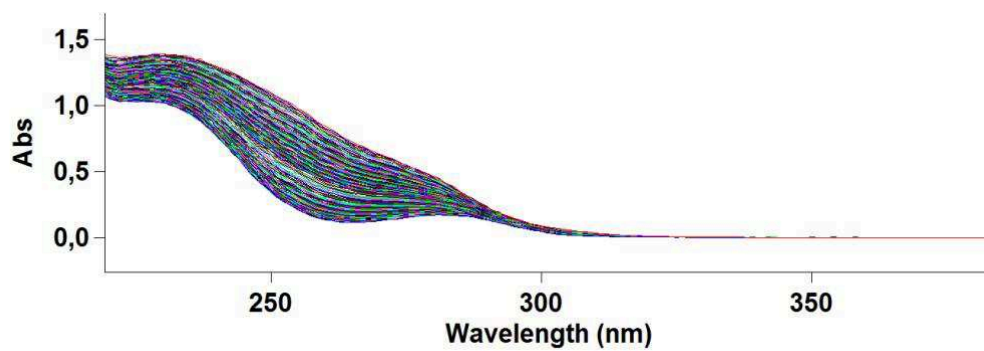


First Order Result Table

Factor	166,67						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample4_1_260,64_1	0,000	600,0	0,0085	1,4235	0,7435	0,1303	0,0042



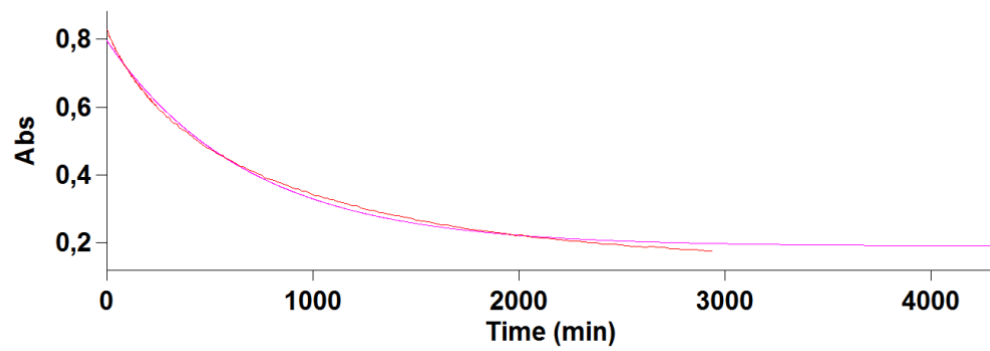
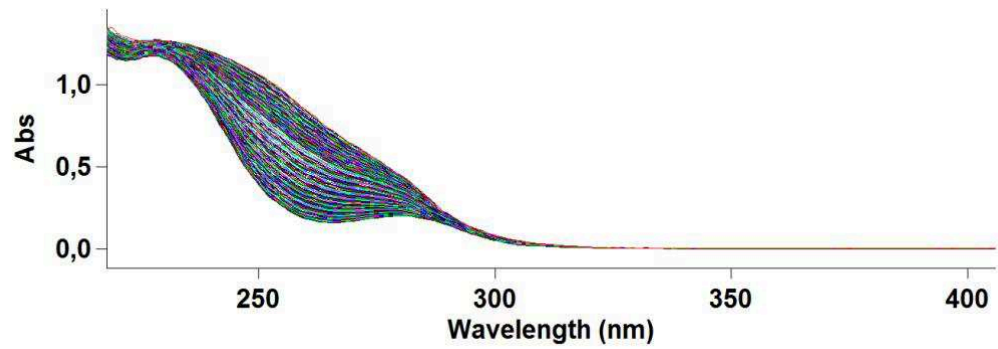
pH 4,00



First Order Result Table

Factor	166,67						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample5_1_260,34_1	0.000	2300	0,0036	0,6082	0,7996	0,1483	0,0104

pH 4,50

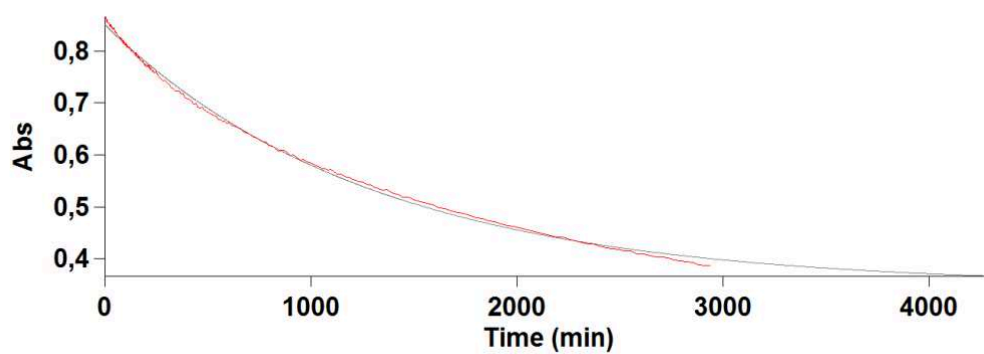
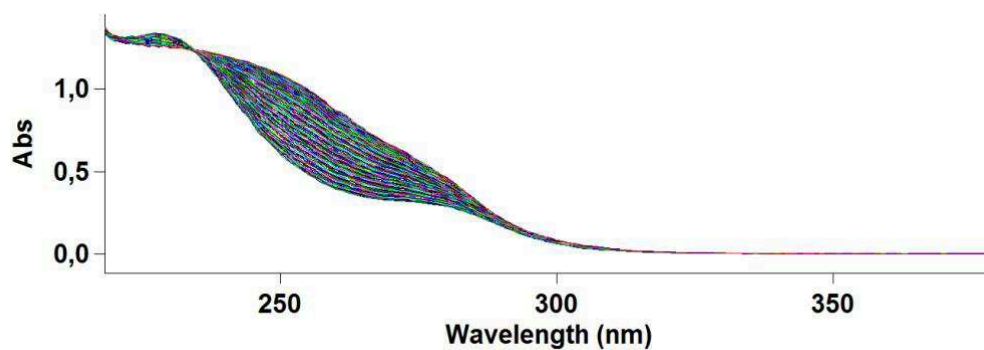


First Order Result Table

Factor 166,67

Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample6_1_260,85_1	0.000	3000	0,0015	0,2449	0,7950	0,1905	0,0116

pH 5,00

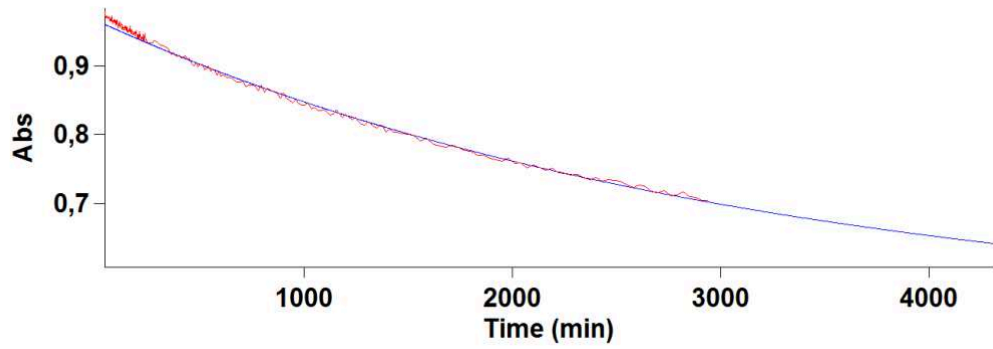
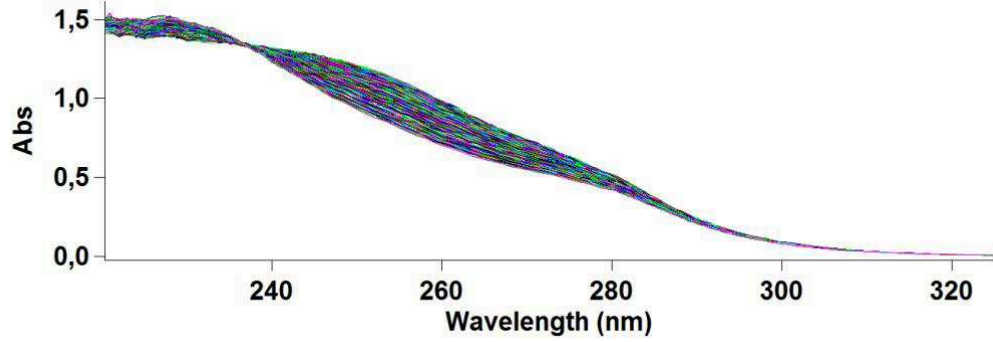


First Order Result Table

Factor 166,67

Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample7_1_260,53_1	0,000	4000	0,0008	0,1288	0,8500	0,3488	0,0063

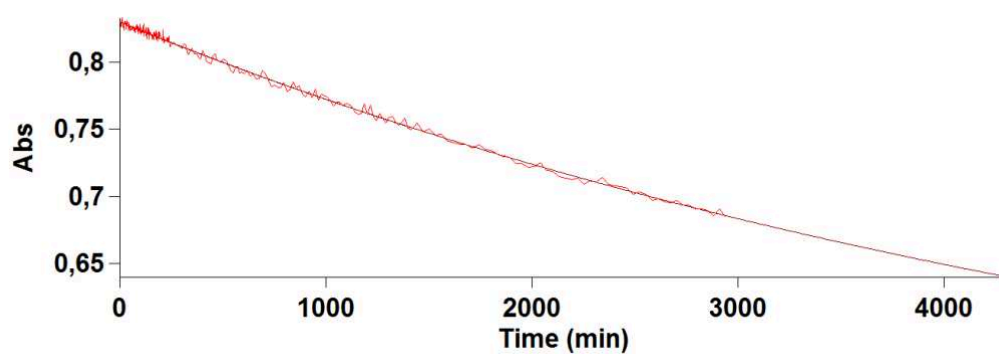
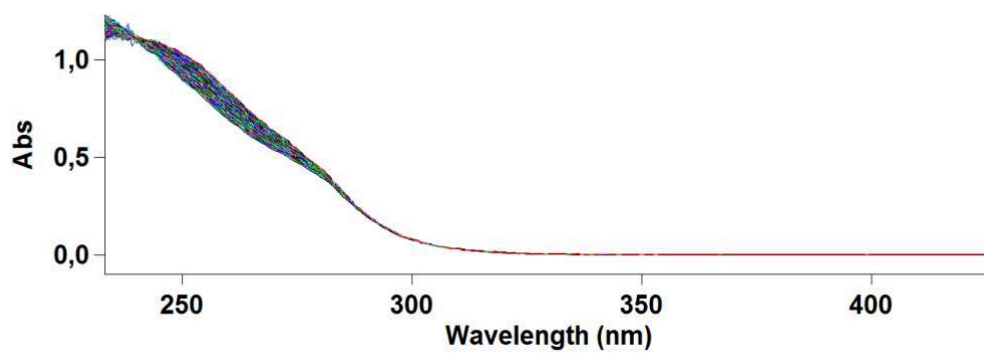
pH 5,50



First Order Result Table

Factor	166,67						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample8_1_259,83_1	0.000	4000	0,0003	0,0531	0,9667	0,5310	0,0650

pH 6,00

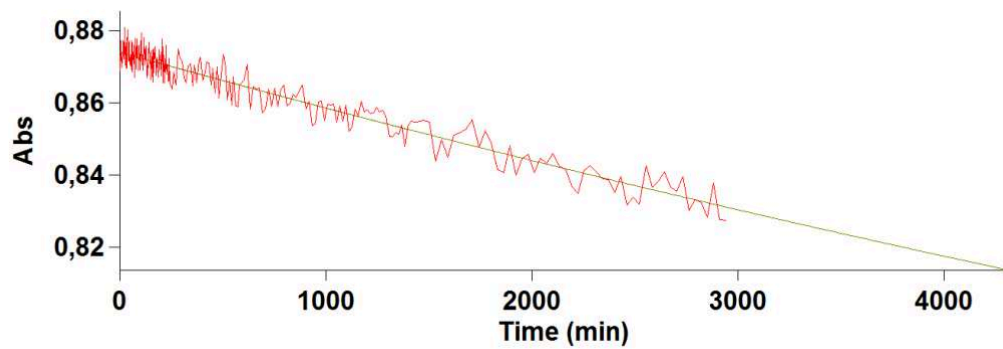
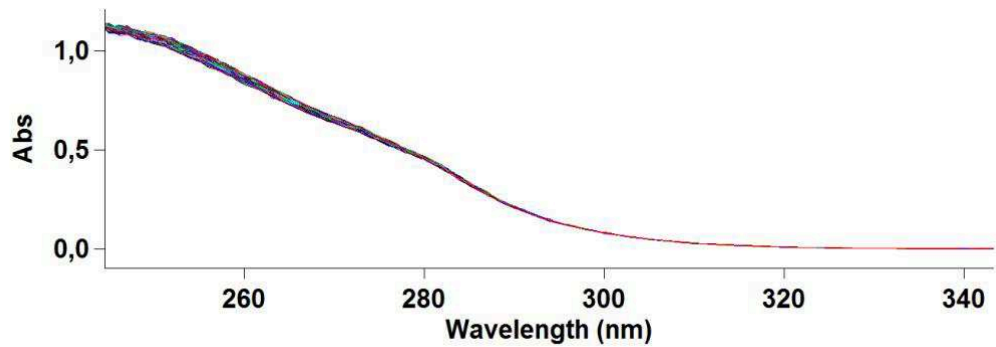


First Order Result Table

Factor 166,67

Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample9_1_260,26_1	0.000	4000	0,0002	0,0292	0,8297	0,4714	0,0025

pH 6,50



Factor	166,67						
Sample	Start (min)	Stop (min)	k (min <sup>-1</sup> )	Factor*k	A0	A inf	S.D.
Sample10_1_260,24_1	0,000	4000	0,0001	0,0104	0,8741	0,6178	0,0033

**Apêndice N** – Espectro de UV-Vis da clivagem do **PA**. O perfil cinético foi obtido acompanhando a absorbância em 260 nm, correspondendo ao consumo do **PA** em pH 2,0 a 6,50.