

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Mozart Silvio Pereira

**EFEITO ESPACIAL DO GRUPO IMIDAZOL NAS REAÇÕES DE
DIÉSTERES DE FOSFATO E FOSFOIMIDAZÓIS: MODELOS NÃO-
MIMÉTICOS DA FOSFOLIPASE D**

Belo Horizonte/MG

2015

UFMG/ICEx/DQ.1.095

D. 597

MOZART SILVIO PEREIRA

**EFEITO ESPACIAL DO GRUPO IMIDAZOL NAS REAÇÕES DE
DIÉSTERES DE FOSFATO E FOSFOIMIDAZÓIS: MODELOS NÃO-
MIMÉTICOS DA FOSFOLIPASE D**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

BELO HORIZONTE

2015

P436e Pereira, Mozart Silvio
2015 Efeito espacial do grupo imidazol nas reações de
D diésteres de fosfato e fosfoimidazóis [manuscrito] :
modelos não-miméticos da fosfolipase D / Mozart Silvio
Pereira. 2015.

[xii], 102 f. : il.

Orientador: Tiago Antônio da Silva Brandão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Catálise - Teses 3.
Imidazóis - Teses 4. Fosfolipases - Teses 5.
Mecanismos de reações orgânicas - Teses I. Brandão,
Tiago Antônio da Silva, Orientador II. Título.

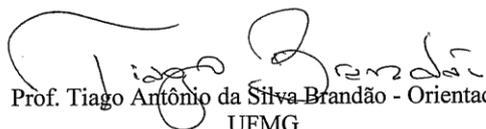
CDU 043

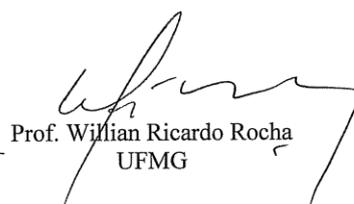


**"Efeito Espacial do Grupo Imidazol nas Reações de Diésteres de Fosfato E
Fosfoimidazóis: Modelos Não-Miméticos da Fosfolipase D"**

Mozart Silvio Pereira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão - Orientador
UFMG


Prof. Willian Ricardo Rocha
UFMG


Profa. Rita de Cássia de Oliveira Sebastião
UFMG

Belo Horizonte, 23 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Tiago Brandão a quem sou muito agradecido pelos ensinamentos não somente relacionados ao desenvolvimento deste trabalho, mas também sobre como é ser uma pessoa correta e justa. Obrigado pela sua preocupação com a nossa formação e desenvolvimento pessoal.

Aos Professores Willian Rocha (UFMG), pela disponibilização de recursos computacionais, Faruk Nome (UFSC), Ademir Neves (UFSC) e Bruno Souza (UFSC) pelo auxílio e disponibilização da estrutura de seus laboratórios na realização dos experimentos de ESI-MS/MS e *Stopped-flow*.

Aos alunos Alex Molina (UFSC) e Daniel Spudeit (UFSC) pelo auxílio na realização dos experimentos de ESI-MS/MS e *Stopped-flow*.

À minha família espiritual e física que sempre estão comigo me apoiando e dando força para perseverar e obter o sucesso nas empreitadas escolhidas por mim.

Aos amigos e colegas em especial Heveline Arruda, Stefanya Velasquez, Isabel Valerio, Gabriel Franco, Danniell Mendes, Thiago Louback, Wellerson de Jesus aqui vai meu muito obrigado.

Ao CNPq, Fapemig e ao INCT-Catálise pelo apoio financeiro.

“Não podemos voltar no tempo e mudar o passado, mas podemos mudar nós mesmos agora e construirmos um futuro melhor.”

Chico Xavier.

RESUMO

As reações que envolvem a transferência de grupos fosforila estão entre as mais estudadas em química e bioquímica devido à sua relevância em muitos processos químicos e biológicos. O controle e o aumento da velocidade reacional dessas reações são governados por uma vasta maquinaria enzimática que usa as cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo como nucleófilos. As enzimas são macromoléculas e sua complexidade estrutural, sensibilidade à temperatura e pH dificultam os estudos de seu mecanismo de catálise. Na busca pelo entendimento do poderio catalítico da fosfolipase D, este trabalho focou no estudo do mecanismo reacional de diésteres de fosfato, p-nitrofenil fosfatos de *orto*-(1H-imidazol-2-il)naftilas, denominados 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP, que são três novos modelos não-miméticos do mecanismo da fosfolipase D. Avaliou-se os efeitos de proximidade e direcionalidade do grupo imidazol na reação dos três diésteres de fosfato. Esses isômeros reagem aos respectivos monoésteres, *orto*-(1H-imidazol-2-il)naftil fosfatos, em duas etapas: *i.* a clivagem do fosfodiéster com o ataque nucleofílico intramolecular do grupo imidazol neutro ou aniônico sob o átomo de fósforo com a formação de p-nitrofenolato e de um intermediário fosfoimidazol; *ii.* a hidrólise do fosfoimidazol cíclico (grupo imidazol protonado) para render os respectivos monoésteres do 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP. Neste caso, observou-se que o fosfoimidazol cíclico (grupo imidazol desprotonado) reage lentamente com água ou com outros nucleófilos oxigenados. Dentre os três diésteres, o isômero 3Ni2P-pNP foi o mais reativo na primeira etapa, apresentando uma molaridade efetiva 6,5 vezes maior do que o 1Ni2P-pNP. A primeira etapa foi avaliada computacionalmente, com uma ótima concordância com os parâmetros termodinâmicos experimentais, mostrando que a reação dos três isômeros apresenta um estado de transição sincrônico. Na etapa de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos, os baixos valores obtidos de β_{NUC} , indicam um estado de transição adiantado. Por fim, baseado nos resultados deste e de outros estudos, propõe-se, conforme a teoria espaço-temporal, que o cone reacional para o ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo é menos dependente de direcionalidade em relação ao ataque sobre o átomo de carbono.

Palavras-chave: Catálise intramolecular, Fosfoimidazol, Fosforila, Fosfolipase D.

ABSTRACT

SPATIAL EFFECT OF IMIDAZOL GROUP IN PHOSPHATE DIESTERS REACTIONS AND FOSFOIMIDAZOLS: NON-MIMETICS MODELS OF PHOSPHOLIPASE D

The reactions involving phosphoryl transfer are among the most studied in chemistry and biochemistry because their relevance in many chemical and biological processes. The control and increase of the reaction rate of these reactions are governed by extensive enzymatic machinery using side chains of some amino acid residues present in the active site as nucleophiles. Enzymes are macromolecules and their structural complexity, sensitivity to temperature and pH interfere in studies of its mechanism of catalysis. In order of better understand the catalytic power of phospholipase D, this work focuses on the study of the reaction mechanism of the phosphate diesters, *p*-nitrophenyl phosphate *ortho*-(1H-imidazol-2-yl)naphthyles, named 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP and 3Ni2P-pNP, which are three new non-mimetic models of the mechanism of phospholipase D. We evaluated the effects of directionality and proximity of the imidazole group in the reaction of the three phosphate diesters. These isomers react to their monoesters, *ortho*-(1H-imidazol-2-yl)naphthyl phosphate in two steps: *i.* phosphodiester cleavage with intramolecular nucleophilic attack of the neutral or anionic imidazole group on the phosphorus atom with formation of *p*-nitrophenolate and an phosphoimidazol intermediate; *ii.* hydrolysis of cyclic phosphoimidazol (protonated imidazole group) to yield the respective monoesters of 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP and 3Ni2P-pNP. In this case, it was observed that the cyclic phosphoimidazol (deprotonated imidazole group) reacts slowly with water or other oxygen nucleophiles. Among the three diesters, the 3Ni2P-pNP isomer was the most reactive in the first step, presenting an effective molarity 6.5-fold greater than 1Ni2P-pNP. The first step was studied computationally, with a good agreement with the experimental thermodynamic parameters, showing that the reaction of the three isomers presents a synchronous transition state. In the hydrolysis step of the cyclic phosphoimidazol, low β_{NUC} values indicate an early transition state. Finally, based on the results of this and other studies, it is proposed that, according to the spatiotemporal theory, the reaction cone to the nucleophilic attack on the phosphorous atom is less dependent on directionality in relation to the attack on the carbon atom.

Keywords: Intramolecular catalysis, Phosphoimidazole, Phosphoryl transfer, Phospholipase D.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Modelo de catálise enzimática em que k_1 é denominada constante de velocidade de formação do complexo enzima-substrato, k_2 é a constante de velocidade de dissociação desse complexo e k_3 é a constante relacionada com a taxa de formação dos produtos da reação e a liberação de enzima livre sendo esta, usualmente a etapa determinante da reação.	2
Esquema 2. Mecanismo de reação via catálise ácida e básica geral.	4
Esquema 3. Mecanismo de reação de esterificação via catálise nucleofílica.	5
Esquema 4. Proposta para transferência de grupo fosforila via mecanismo dissociativo.....	12
Esquema 5. Mecanismo associativo de transferência de grupo fosforila.	12
Esquema 6. Possíveis tipos de ataque nucleofílicos em diésteres e triésteres de fosfato.	14
Esquema 7. Mecanismos propostos para a atuação do sítio ativo da enzima RNase A. ^[43]	16
Esquema 8. Mecanismo proposto para a enzima frutose-2,6-bisfosfatase.	19
Esquema 9. Mecanismo de catálise da tirosina fosfatase dependente de histidina.	19
Esquema 10. Proposta do mecanismo de catálise da fosfolipase D em (a) o nucleófilo da segunda etapa é uma molécula de água e (b) o nucleófilo da segunda etapa é uma molécula de álcool.....	20
Esquema 11. Mecanismo proposto para reação do fosfodiéster BMIPP[73].	21
Esquema 12. Possíveis caminhos reacionais para os diésteres de fosfato 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP.	29
Esquema 13. Esquema reacional proposto para a hidrólise dos diésteres de fosfato assistida pelo grupo imidazol.	44
Esquema 14. Esquema representativo do efeito isotópico do solvente.	48
Esquema 15. Diferenças dos mecanismos reacionais da hidrólise de acetatos e 4-nitrofenilfosfatos de <i>orto</i> - (1H-imidazólio-2-il)naftila.	48
Esquema 16. Esquema representativo do efeito isotópico do solvente para a hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de energia livre hipotético para uma reação não-catalisada e catalisada representando a diminuição do valor de energia livre devido a processos catalíticos.	3
Figura 2. Representação da diminuição entrópica em sistemas intramoleculares em comparação à sistemas intermoleculares.	6
Figura 3. Representação de um grupo de simetria esférica, a área sombreada indica a parte reativa do grupo de acordo com a orientação dos orbitais ^[18]	7
Figura 4. Representação do postulado da teoria espaço-temporal ^[21]	8
Figura 5. Estrutura dos ésteres de fosfato.	9
Figura 6. Caminhos reacionais envolvendo a transferência do grupo fosforila em um monoéster de fosfato.....	10
Figura 7. Monoéster de fosfato quiral.....	11
Figura 8. Diagrama de More O'Ferral-Jenks para ataque de um nucleófilo genérico Nu em um monoéster de fosfato.	13
Figura 9: Equilíbrios de desprotonação do imidazol.....	15
Figura 10. Possíveis formas de fosforilação dos aminoácidos (as formas mostradas acima são as espécies mais estáveis).	17
Figura 11: Representação da interação do grupo fosfato do 3-fosfohistidina com o grupo amino sendo que a mesma interação não ocorre no 1fosfohistidina.b	18
Figura 12. Estrutura dos p-nitrofenilfosfatos de orto-(1H-imidazol-2-il)naftilas obtidos para os estudos cinéticos.....	22
Figura 13: Estruturas dos fosfoimidazóis cíclicos obtidos para os estudos cinéticos.	23
Figura 14. Rota de síntese adotada para obtenção dos diésteres de fosfato.	25
Figura 15. (a) Espectros sucessivos de RMN de ³¹ P ao longo do tempo para o 1Ni2P-pNP e (b) gráficos das espécies em função do tempo tomados a partir da integração dos sinais de ³¹ P. As curvas sólidas até 200 minutos foram ajustadas a partir de um modelo cinético de primeira-ordem que segue a equação: $\Delta \text{Espécies} = ekt$ com uma constante k de $3,67 \times 10^{-4} \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$	30

Figura 16. (a) Espectros sucessivos de RMN de ^{31}P ao longo do tempo para o 2Ni1P-pNP e (b) gráficos das espécies em função do tempo tomados a partir da integração dos sinais de ^{31}P . As curvas sólidas até 240 minutos foram ajustadas a partir de um modelo cinético de primeira-ordem que segue a equação: $\Delta\text{Espécies} = ekt$ com uma constante k de $1,72 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \pm 0,02$	31
Figura 17. (a) Espectros sucessivos de RMN de ^{31}P ao longo do tempo para o 3Ni2P-pNP e (b) gráficos das espécies em função do tempo tomados a partir da integração dos sinais de ^{31}P . As curvas sólidas até 200 minutos foram ajustadas a partir de um modelo cinético de primeira-ordem que segue a equação: $\Delta\text{Espécies} = ekt$ com uma constante $1,52 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \pm 0,02$	32
Figura 18. Espectros sucessivos de RMN de ^1H para o composto 1Ni2P-pNP obtidos ao longo do tempo de reação com sinais em destaque para cada espécie.	33
Figura 19. Espectros sucessivos de RMN de ^1H para o composto 2Ni1P-pNP obtidos ao longo do tempo de reação para cada espécie.	33
Figura 20. Espectros sucessivos de RMN de ^1H para o composto 3Ni2P-pNP obtidos ao longo do tempo de reação.	34
Figura 21. Representação dos efeitos "peri" (linhas tracejadas) para os fosfoimidazóis cíclicos conforme observações do RMN ^1H	35
Figura 22. Espectro de ESI-MS referente à evolução da reação ao longo do tempo para a clivagem de 1Ni2P-pNP em 0,01M de NaOH após 2 e 40 min. De reação, espectros A e B (modo íon-negativo), respectivamente; e para a hidrólise do intermediário fosfoimidazol cíclico com 0,01M de HCOONa/HCOOH após 2 e 50 min. de reação, espectros C e D (modo íon-positivo), respectivamente.	37
Figura 23. Espectro de ESI-MS/MS das espécies da reação do 1Ni2P-pNP.....	37
Figura 24. Espectro de ESI-MS referente à evolução da reação ao longo do tempo para a clivagem de 2Ni1P-pNP em 5mM de NH_4OH após 2 e 40 min. De reação, espectros A e B (modo íon-negativo), respectivamente; e para a hidrólise do intermediário fosfoimidazol cíclico com 0,01M de $\text{HCOO}^-/\text{HCOOH}$ após 2 e 50 min. de reação, espectros C e D (modo íon-positivo), respectivamente.	38
Figura 25. Espectro de ESI-MS/MS das espécies da reação do 2Ni1P-pNP.....	38
Figura 26. Espectro de ESI-MS referente à evolução da reação ao longo do tempo para a clivagem de 3Ni2P-pNP em 5mM de NH_4OH após 2 e 40 min. De reação, espectros A e B (modo íon-negativo), respectivamente; e para a hidrólise do intermediário fosfoimidazol cíclico com 0,01M de $\text{HCOO}^-/\text{HCOOH}$ após 2 e 50 min. de reação, espectros C e D (modo íon-positivo), respectivamente.	39

Figura 27. Espectro de ESI-MS/MS das espécies da reação do 3Ni2P-pNP.....	39
Figura 28. Espectros sucessivos de Uv-Vis da reação de clivagem dos fosfodiésteres 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP em função do tempo em pH 10,00 e 25°C. As setas indicam os sentidos de aumento ou diminuição da absorvância com o tempo. No inserto estão os dados de absorvância em 405 nm em função do tempo mostrando um comportamento cinético típico de primeira-ordem.....	41
Figura 29. Espectros sucessivos de Uv-Vis da reação de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos 1Ni2P, 2Ni1P e 3Ni2P em função do tempo em pH 3,02 e 25°C. As setas indicam os sentidos de aumento ou diminuição da absorvância com o tempo. No inserto estão os dados de absorvância em 340 nm em função do tempo mostrando um comportamento cinético típico de primeira-ordem.....	42
Figura 30. Perfis de pH para as reações de formação dos três intermediários cíclicos estudados e as reações de hidrólise destes intermediários. As linhas sólidas correspondem ao ajuste não linear de acordo com as equações 9 e 15.	43
Figura 31: Interação do protón do grupo imidazol com o grupo fosfato nos três compostos estudados.	46
Figura 32. Efeitos dos nucleófilos sobre a reação de formação do 1Ni2P cíclico. Os valores no eixo das ordenadas referem à razão entre k_{obs} na presença e ausência dos nucleófilos e condições indicadas.	47
Figura 33. Perfil de pH em diferentes temperaturas a reação de clivagem do 1Ni2P-pNP as linhas sólidas correspondem aos ajustes-não-lineares obtidos a partir da Eq.9.....	49
Figura 34. Perfil de pH em diferentes temperaturas a reação de clivagem do 2Ni1P-pNP as linhas sólidas correspondem aos ajustes-não-lineares obtidos a partir da Eq.9.....	49
Figura 35: Perfil de pH em diferentes temperaturas a reação de clivagem do 3Ni2P-pNP as linhas sólidas correspondem aos ajustes-não-lineares obtidos a partir da Eq.9.....	50
Figura 36. Gráfico de $\ln(k_{c1}/T)$ vs T^{-1} e seu ajuste linear utilizando a equação de Eyring para a reação de de clivagem dos diésteres de fosfato cíclicos onde A para 1Ni2P-pNP, B para 2Ni1P-pNP e C para 3Ni2P-pNP.	51
Figura 37. Reação utilizada como guia para obtenção dos valores de β_{lg}	53
Figura 38. Relação de em função do pK _{nuc} para a reação de piridinas com aril metil fosfatos á 39°C.....	54

Figura 39. Representação do aumento da molaridade efetiva devido à efeitos estéricos estruturais.	55
Figura 40. Perfis de pH log k_{obs} em função do pH em diversas temperaturas para a reação de hidrólise do intermediário cíclico 1Ni2P com seus respectivos ajustes não-lineares considerando a Eq. 15.	58
Figura 41. Perfis de pH log k_{obs} em função do pH em diversas temperaturas para a reação de hidrólise do intermediário cíclico 1Ni2P com seus respectivos ajustes não-lineares considerando a Eq. 15.	59
Figura 42. Perfis de pH log k_{obs} em função do pH em diversas temperaturas para a reação de hidrólise do intermediário cíclico 1Ni2P com seus respectivos ajustes não-lineares considerando a Eq. 15.	59
Figura 43. Gráfico de $\ln k_{w2}/T$ vs T^{-1} e seu ajuste linear utilizando a equação de Eyring para a reação de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos onde A para 1Ni2P, B para 2Ni1P, e C para 3Ni2P.	60
Figura 44. Ajustes lineares para a obtenção de k_2 para cada nucleófilo na reação de hidrólise do fosfoimidazol 1Ni2P. As frações molares para a obtenção de k_2 dos nucleófilos foram igual a 1. Exceto para o bicarbonato que foi feito o ajuste de levando em conta as frações molares de 0,12, 0,21, 0,51, 0,57 e 1.	62
Figura 45. Gráfico dos valores de k_2 em função do pKa dos nucleófilos e seu ajuste linear para o 1Ni2P.	63
Figura 46. Ajustes lineares para a obtenção de k_2 para cada nucleófilo na reação de hidrólise do fosfoimidazol 2Ni1P. As frações molares para a obtenção de k_2 dos nucleófilos foram igual a 1. Exceto para o bicarbonato que foi feito o ajuste de levando em conta as frações molares de 0,12, 0,21, 0,51, 0,57 e 1.	64
Figura 47. Gráfico dos valores de k_2 em função do pKa dos nucleófilos e seu ajuste linear para o 2Ni1P.	65
Figura 48. Ajustes lineares para a obtenção de k_2 para cada nucleófilo na reação de hidrólise do fosfoimidazol 3Ni2P. As frações molares para a obtenção de k_2 dos nucleófilos foram igual a 1. Exceto para o bicarbonato que foi feito o ajuste de levando em conta as frações molares de 0,12, 0,21, 0,51, 0,57 e 1.	66
Figura 49. Gráfico dos valores de k_2 em função do pKa dos nucleófilos e seu ajuste linear para o 3Ni2P.	67
Figura 50. Representação do possível estado de transição nas reações de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos a partir dos dados obtidos para o beta nucleofílico.	68

Figura 51. Estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM para os estados reagente, transição e produtos para o ataque intramolecular do grupo imidazol no grupo <i>p</i> -nitrofenil fosfato de 1Ni2P-pNP. A estrutura do <i>p</i> -nitrofenolato encontra-se no Anexo D e as energias de cada espécie encontram-se nas Tabelas 12-14.....	70
Figura 52. Estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM para os reagente sendo a) 1Ni2P-pNP, b) 2Ni1P-pNP e c) 3Ni2P-pNP destacando os ângulos do grupo imidazol em relação ao anel naftalênico.....	72
Figura 53. Estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM para os reagente sendo a) 1Ni2P-pNP, b) 2Ni1P-pNP e c) 3Ni2P-pNP e os respectivos comprimentos de ligação N-p e P-p-nitrofenolato.	73
Figura 54. Em a) estruturas dos fosfodiésteres 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP e b) estruturas dos fosfoimidazóis cíclicos 1Ni2P, 2Ni1P e 3Ni2P.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
d	Dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Ionização por “elestrospray”
H _o	Função de acidez de Hammett
m	Multiplete
PCM	Modelo de contínuo polarizado (<i>Polarized Continuum Model</i>)
PLP	Fosfolipase D
PTF	Proteína Tirosina Fosfatase
PTF Hisdep	Proteína Tirosina Fosfatase dependente de Histidina
RLEL	Relação Linear de Energia Livre
RNA	Ácido ribonucléico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
δ	Deslocamento químico em ppm
s	Simpleto
t	Triplete
UV-Vis	Ultravioleta – visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Catálise Enzimática.....	1
1.2	Modelos de estudo da catálise enzimática.....	4
1.2.1	Catálise intramolecular e modelos miméticos.....	5
1.3	Reações envolvendo transferência de grupos fosforila.....	8
1.3.1	Mecanismos de reações de transferência do grupo fosforila.....	9
1.4	Papel do grupo imidazol em reações enzimáticas.....	14
1.4.1	Ribonucleases.....	15
1.4.2	Fosfohistidinas.....	17
1.4.3	Fosfoimidazol como intermediário em reações catalisadas por enzimas.....	18
1.4.3.1	Modelo mimético da fosfolipase D.....	21
2	Objetivos.....	22
3	Metodologia.....	24
3.1	Reagentes.....	24
3.2	Equipamentos.....	24
3.3	Síntese dos diésteres de fosfato.....	25
3.4	Medidas ESI/MS-MS.....	26
3.5	Medidas cinéticas de RMN.....	26
3.6	Medidas cinéticas UV-Vis.....	26
4	resultados e discussão.....	28
4.1	Caracterização de intermediários e produtos por RMN de ^{31}P e ^1H	29
4.2	Caracterização de intermediários e produtos por ESI-MS/MS.....	35
4.3	Estudos cinéticos por espectroscopia UV-Vis.....	40
4.3.1	Comportamento cinético em função do pH.....	43
4.3.2	Reações de clivagem dos fosfodiésteres.....	44
4.3.3	Reações de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos.....	55
4.4	Dados computacionais.....	68
5	Conclusões.....	74
	Referências Bibliográficas.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os esforços no entendimento da ação enzimática iniciado no século passado renderam teorias e modelos que serviram de alicerce para grandes avanços na química e biotecnologia. Este trabalho explora fatores conformacionais de grupos reativos em modelos não-miméticos da fosfolipase D, tendo como objetivo o entendimento dos fatores que governam a catálise enzimática nessas enzimas.

1.1 Catálise Enzimática

As enzimas são macromoléculas com massa variando de 5 a 200 kDa, que atuam como catalisadores biológicos e são constituídas basicamente por combinações de 20 tipos diferentes de aminoácidos, apresentando em certos casos cofatores, moléculas não-proteicas, que são essenciais para o funcionamento adequado da enzima. As enzimas são em sua maioria constituídas de 50 a 2000 resíduos de aminoácidos unidos covalentemente em longas sequências contendo múltiplas ligações amídicas, ditas peptídicas. A ampla possibilidade de combinações dos 20 tipos de aminoácidos possibilita a obtenção de uma vasta quantidade de enzimas que catalisam os mais variados tipos de reações em sistemas biológicos^[1, 2].

O sítio ativo ou catalítico, que é responsável pela interação e reação de conversão de substrato em produto, corresponde a uma pequena região da enzima que apresenta alguns poucos resíduos de aminoácidos. O sítio ativo, em forma de fenda, específica para interação com o substrato, tem a capacidade de se ligar ao estado de transição. Dessa forma, promove o aumento da concentração de tal estado no meio reacional e, conseqüentemente, aumenta a velocidade da reação^[3].

Dentro desse sítio, o substrato (S) complexa-se de modo não-covalente à enzima (E), formando um complexo enzima-substrato (ES), que reage para dar os produtos conforme mostrado no Esquema 1.



Esquema 1. Modelo de catálise enzimática em que k_1 é denominada constante de velocidade de formação do complexo enzima-substrato, k_2 é a constante de velocidade de dissociação desse complexo e k_3 é a constante relacionada com a taxa de formação dos produtos da reação e a liberação de enzima livre sendo esta, usualmente a etapa determinante da reação.

De modo geral, pode-se dizer que o poder catalítico das enzimas depende de três fatores principais^[4, 5]:

a) Proximidade e orientação, através de interações não-covalentes estabelecidas com o substrato, as enzimas conseguem orientar o substrato em uma posição em que os resíduos no centro catalítico encontram uma posição adequada para dar início à reação e promover a estabilização do estado de transição;

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

c) Efeito do meio, no sítio ativo da enzima o substrato sofre uma mudança em sua solvatação, que consiste geralmente em um meio de menor polaridade com interações dipolares mais eficientes. Por exemplo, o efeito do meio provoca um aumento na nucleofilicidade de certos grupos reativos, tais como hidroxilas, e torna as ligações de hidrogênio mais fortes^[6].

Esses fatores favorecem a reação química criando um caminho reacional de menor energia como exemplificado pela Figura 1. Independentemente de ser uma catálise enzimática ou química, esse é o ponto primordial para a capacidade e eficiência de um catalisador^[4].

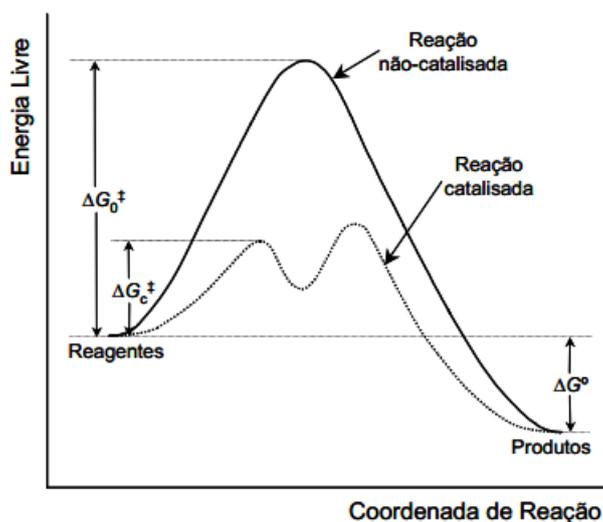


Figura 1. Diagrama de energia livre hipotético para uma reação não-catalisada e catalisada representando a diminuição do valor de energia livre devido a processos catalíticos.

Desde o século passado o interesse científico é crescente em descobrir o mecanismo de ação enzimática e as razões de seu alto poder catalítico. Porém o grande número de variáveis encontradas ao se trabalhar com sistemas tão complexos e as limitações técnicas no início do século passado dificultaram a formulação de reações modelo que pudessem descrever as transformações ocorridas no sítio ativo. A evolução de muitas técnicas de análise como, por exemplo, a cristalografia de raios-X, a ressonância magnética nuclear, e o dicroísmo circular, aplicadas na tentativa de elucidar a estrutura tridimensional da enzima e entender o seu funcionamento^[7], facilitaram a formulação de modelos que possam imitar as características do sítio ativo das enzimas.

O entendimento do funcionamento das enzimas, sua especificidade e eficiência catalítica em condições brandas de temperatura e pressão é uma questão fundamental em biologia e hoje é uma área de fronteira dentro da química, com implicações científicas e comerciais importantes^[8]. Esse entendimento do mecanismo catalítico de enzimas motivou a abertura de importantes áreas de pesquisa visando o desenvolvimento e síntese de compostos que mimetizem a estrutura e função das enzimas^[9].

Dentre a gama de estratégias existentes, podem-se citar os miméticos, que correspondem aos modelos que tentam imitar o sítio ativo das enzimas como um todo, e os não-miméticos, que visam o estudo de uma determinada ação enzimática^[10]. Os estudos dos modelos não-miméticos seguem duas linhas de

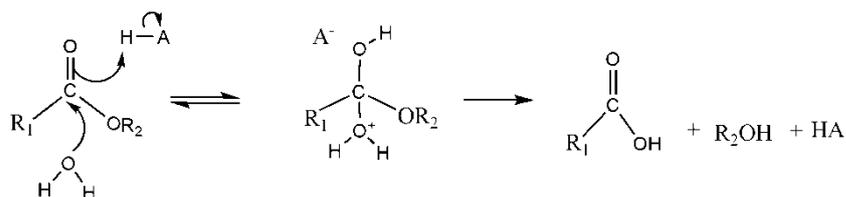
pesquisa: uma voltada para os estudos dos complexos de inclusão, que modelam as interações enzima-substrato, como por exemplo, as ciclodextrinas^[11] e calixarenos^[12] e outra voltada para os princípios físico-químicos que governam as reações no sítio ativo, tais como, as reações intramoleculares^[13].

1.2 Modelos de estudo da catálise enzimática

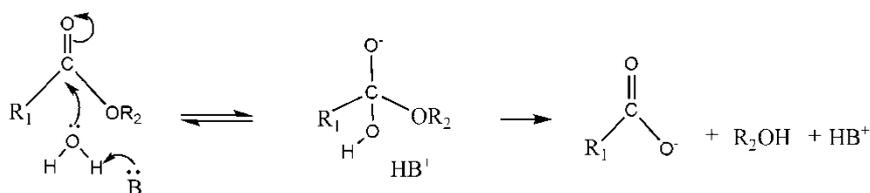
Os estudos do mecanismo de reação enzimática podem ser feitos com a enzima *in vitro* ou utilizando de reações modelo, específicas ao mecanismo enzimático proposto, que aplicam um ou mais modos de catálise descritos abaixo:

Catálise ácida ou básica geral: o mecanismo ocorre via transferência de um próton de alguma espécie do meio, durante ou até a etapa determinante da velocidade de reação. Várias reações de adição nucleofílica em aldeídos, cetonas, ésteres e amidas, entre outras, apresentam os mecanismos ácido e/ou base geral^[14].

(a) Catálise ácida geral

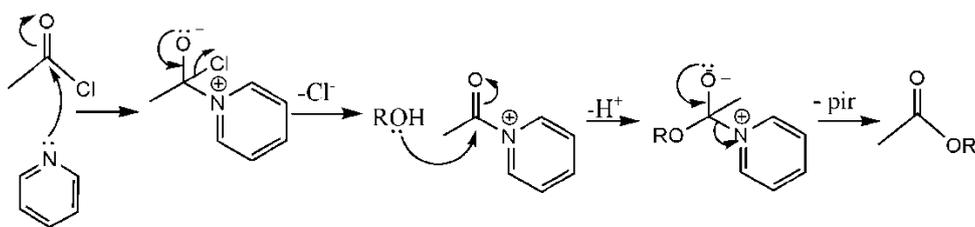


(b) Catálise básica geral



Esquema 2. Mecanismo de reação via catálise ácida e básica geral.

Catálise nucleofílica: esse mecanismo se dá pela utilização de compostos que atuam como bons nucleófilos no meio reacional para formar um intermediário reativo. No Esquema 3 está um exemplo no qual a piridina atua como catalisador nucleofílico em uma reação de esterificação^[15]:



Esquema 3. Mecanismo de reação de esterificação via catálise nucleofílica.

Os modos de catálise acima podem ter tanto o catalisador como o centro reativo em uma mesma molécula, possibilitando que esses grupos tenham uma proximidade favorável para que a reação química sofra um incremento considerável na velocidade de reação. Esse efeito é denominado catálise intramolecular e, as moléculas que promovem esse efeito, são utilizadas como modelos de estudo para a catálise enzimática que será detalhado a seguir.

1.2.1 Catálise intramolecular e modelos miméticos

As reações intramoleculares e modelos miméticos racionalizam de forma simples o grande poder catalítico das enzimas em sistemas biológicos. As bases que norteiam tais estudos estabelecem que os mesmos parâmetros físico-químicos que governam a reatividade entre dois grupamentos funcionais em uma reação intramolecular, também estão presentes para estes mesmos grupamentos quando constituem o sítio ativo de uma enzima.

A lactonização, hidrólise de ésteres carboxílicos e fosfóricos estão entre reações intramoleculares muito utilizadas como modelos para catálise enzimática. O estudo dessas reações levou ao surgimento de teorias para explicar o poderio catalítico das enzimas, a saber: Direcionamento de Orbitais, Controle Estereopopulacional e Teoria Espaço-Temporal, que serão detalhadas adiante. Essas teorias primam pela busca do entendimento dos efeitos de aumento de velocidade observados em sistemas intramoleculares quando comparados às respectivas reações intermoleculares e estabelecem um comparativo com os fatores que determinam os enormes efeitos catalíticos exercidos pelas enzimas. A importância desses fatores pode ser inferida pelo cálculo da Molaridade Efetiva.

A Molaridade Efetiva (ME) é um cálculo que define a razão entre a constante cinética de primeira-ordem da reação intramolecular em relação à constante cinética de segunda-ordem de uma reação intermolecular que ocorre via mecanismo e

condições idênticas (Equação 1) tendo como unidade de mol.L⁻¹. Dessa forma, a molaridade efetiva é interpretada como sendo a concentração necessária de nucleófilo, ou eletrófilo, na reação intermolecular para que esta tenha velocidade equivalente a intramolecular^[3].

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

Segundo esse cálculo, um dos fatores relacionados a altos valores de ME e que explicam a maior eficiência catalítica dos sistemas intramoleculares em comparação a sistemas intermoleculares é a dependência com fatores entrópicos. As características de sistemas intramoleculares fazem alusão a sistemas enzimáticos e sugere que na formação do complexo enzima-substrato há perda de graus de liberdade do substrato que seriam compensados da energia total utilizada para alcançar o estado de transição^[16]. Além disso, Page e Jencks^[16] mostraram que há diminuição da entropia na formação do estado de transição de uma reação intermolecular, pois graus de liberdade translacionais e rotacionais são perdidos, que, em contrapartida, não seria observado em uma reação intramolecular de entropia mais baixa (Figura 2).

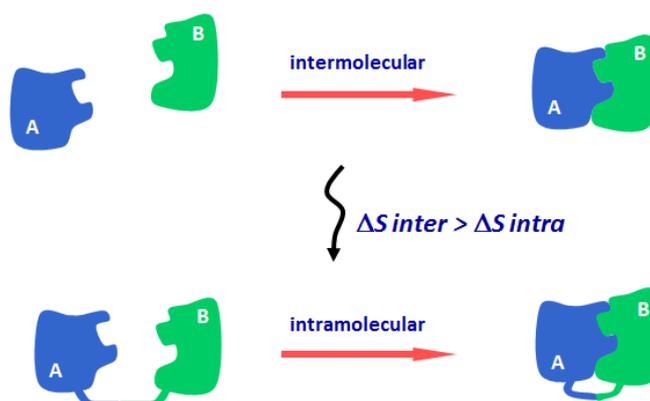


Figura 2. Representação da diminuição entrópica em sistemas intramoleculares em comparação à sistemas intermoleculares.

A proposta de direcionamento de orbitais de Koshland afirma que a alta capacidade catalítica das enzimas está intimamente ligada ao direcionamento dos ângulos de aproximação dos orbitais dos grupos reacionais, sendo que um pequeno desvio nestes ângulos provocaria uma diminuição na velocidade de reação^[17-19]. O

fator utilizado para estimar a catálise de uma reação intramolecular, em relação à catálise enzimática é a relação $1/\theta$. O ângulo θ é definido por uma pequena fração da superfície sólida que possui o direcionamento espacial correto dos orbitais de um átomo esférico que participaria da reação conforme mostrado na Figura 3.

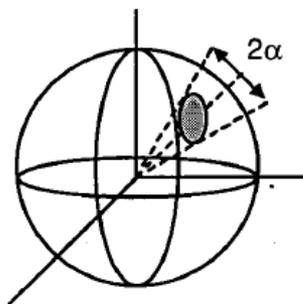


Figura 3. Representação de um grupo de simetria esférica, a área sombreada indica a parte reativa do grupo de acordo com a orientação dos orbitais^[18].

A teoria denominada de Controle Estereopopulacional, foi cunhada a partir de estudos conduzidos por Milstien e Cohen com reações modelo de lactonização de derivados do ácido o-hidroxihidrocinâmico, ciclização de mesilatos de 3-(o-hidroxifenil)-1-propila e formação de anidridos derivados do ácido homoftálico. Em todos os casos, ao se colocar um grupo metila em uma determinada posição houve um aumento considerável na velocidade de reação. Os pesquisadores atribuíram esse efeito ao aumento da concentração do confôrmero reativo graças à presença da metila que, por questões estéricas, “congela” no confôrmero mais reativo dentre as várias possibilidades que uma molécula pode assumir^[20]. Considerando esse efeito em reações enzimáticas, a rigidez conformacional pode ajudar a explicar o incremento da velocidade e a modelar o sítio ativo de uma enzima^[19].

A teoria Espaço-Temporal defendida por Menger^[21] racionaliza que o aumento da velocidade de reações enzimáticas e intramoleculares é proporcional ao tempo em que os grupos reativos A e B permanecem próximos o suficiente um do outro, impedindo que as moléculas de solvente fiquem entre estes, o que poderia comprometer o progresso da formação do complexo ativado. As conformações e distâncias que esses grupos podem adquirir sem perder sua reatividade foi denominada como “cone reacional”^[22].

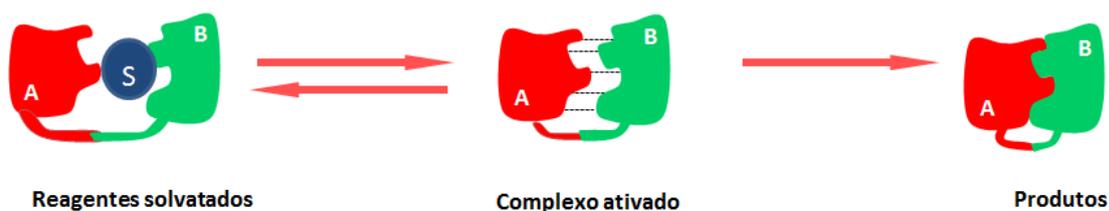


Figura 4. Representação do postulado da teoria espaço-temporal^[21].

Esse modelo também pode ser aplicado sob o escopo de mecanismos enzimáticos, uma vez que nas enzimas, os resíduos de aminoácidos e o substrato, sofrem dessolvatação em um ambiente confinado^[21].

1.3 Reações envolvendo transferência de grupos fosforila

As reações envolvendo a transferência de grupos fosforila abrangem uma série de compostos extremamente importantes em processos biológicos, esse campo de estudo existe a mais de 50 anos e utiliza os conhecimentos e ferramentas da química para o entendimento desses processos biológicos.

Os ésteres de fosfato compõem uma classe abrangente de compostos subdividida em monoésteres, diésteres e triésteres de acordo com o número de grupos substituintes alquilas e/ou arilas substituindo as hidroxilas do ácido fosfórico (Figura 5). Triésteres são em geral neutros, mas os mono e diésteres de fosfatos apresentam hidrogênios ionizáveis que lhes conferem reatividades diferenciadas em função do pH^[23, 24].

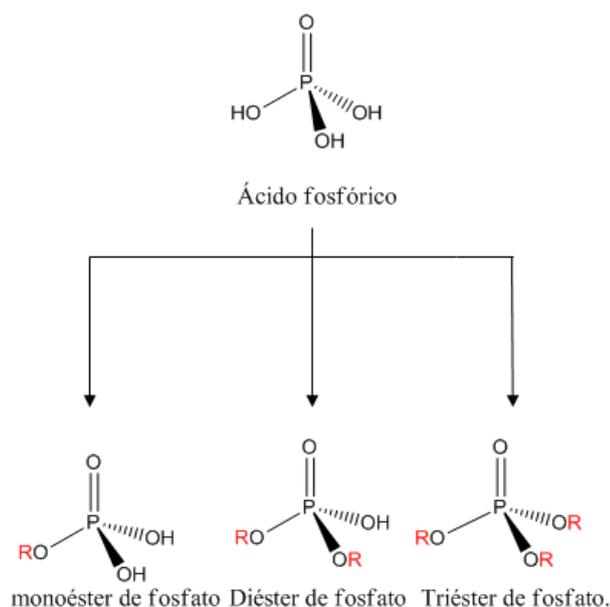


Figura 5. Estrutura dos ésteres de fosfato.

A ligação P-O nestes ésteres, em especial mono e diésteres de fosfato, possui uma estabilidade elevada, da ordem de milhões de anos em condições não-catalisadas^[25]. Devido a essa alta estabilidade, a perpetuação dos seres vivos é garantida por ligações fosfodiésteres nas estruturas do DNA e RNA. Estudos relacionados a essa estabilidade mostram que o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a hidrólise de diésteres de fosfato é da ordem de $3,1 \times 10^7$ anos^[26], o que é coerente com o papel fundamental do DNA na conservação da informação genética.

Há várias enzimas altamente especializadas que catalisam a clivagem da ligação P-O, com isso, os estudos mecanísticos envolvendo as reações de transferência de grupos fosforila tornaram-se um amplo campo de estudo de enzimas^[27] e reações-modelo que permitem a racionalização de seus mecanismos reacionais^[28]. A seguir serão apresentadas as propostas mecanísticas utilizadas para o entendimento dessas reações.

1.3.1 Mecanismos de reações de transferência do grupo fosforila

A fosforilação pode resultar na alteração da conformação espacial ou dinâmica da enzima, conseqüentemente, promove a modificação da reatividade da proteína, podendo ativá-la ou desativá-la para uma determinada reação. Tais reações podem ser reguladas por sistemas de segundos mensageiros ou por

ligantes extracelulares (no caso de fatores tróficos e hormônios)^[29], entre outros processos de estimulação^[30].

A transferência do grupo fosforila ocorre via substituição nucleofílica e pode ocorrer de dois modos: (a) com o ataque do nucleófilo (Nu) ao átomo de carbono presente na ligação P-O-C, levando ao rompimento da ligação C-O tendo o grupo fosfato como grupo abandonador, formando uma nova ligação C-Nu; (b) via ataque do nucleófilo no átomo de fósforo central onde o alcóxido ou álcool é grupo abandonador, levando à formação de uma nova ligação P-Nu (Figura 6).

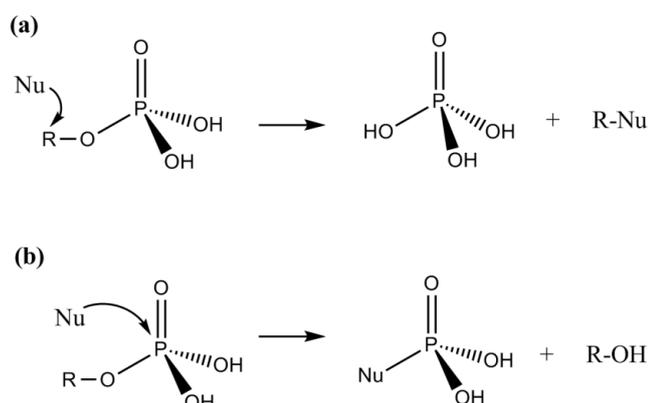


Figura 6. Caminhos reacionais envolvendo a transferência do grupo fosforila em um monoéster de fosfato.

A reação que ocorre com o ataque do nucleófilo no átomo de carbono é favorecida em condições ácidas com valores de $\text{pH} < 0$, visto que o dihidrogenofosfato é um bom grupo abandonador. Em condições em que o meio se encontra ácido com valores de $\text{pH} > 0$ até a faixa básica, o grupo fosfato do substrato possui no mínimo uma carga negativa, com isso, o nucleófilo ataca o átomo central de fósforo e o caminho reacional pode seguir por meio de um mecanismo associativo, dissociativo ou concertado^[31].

O mecanismo dissociativo também conhecido como $\text{S}_{\text{N}}1\text{P}$ ocorre em duas etapas, na primeira forma-se no meio reacional o íon metafosfato e em uma segunda etapa ocorre o ataque do nucleófilo nesse íon^[23].

Há uma discussão sobre o mecanismo ser puramente dissociativo em condições neutras e básicas para a hidrólise de monoésteres de fosfato, na qual a formação do íon metafosfato é dita como a etapa determinante da velocidade da reação. Porém, o íon metafosfato foi observado somente em fase gasosa em que é muito pouco reativo e favoravelmente formado^[32] sendo elusivo, até o momento em

sistemas aquosos. De fato, em sistemas aquosos, observa-se uma pequena dependência da constante de velocidade de reação frente à basicidade de nucleófilos indicando um estado de transição sutilmente associado, o que indica que o mecanismo não seja puramente dissociativo^[33]. Além disso, a inversão da configuração observada para ésteres quirais marcados isotopicamente (Figura 7) reforça essa ideia, pois se o mecanismo fosse puramente S_N1P, haveria a racemização dos produtos^[34].

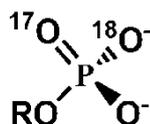


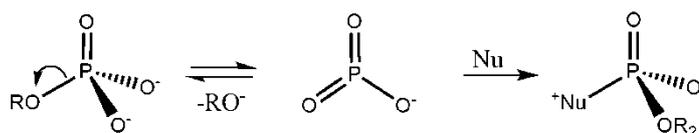
Figura 7. Monoéster de fosfato quiral.

Em contrapartida, estudos foram desenvolvidos em solventes aquosos e não-aquosos na busca de racionalizar a existência de um processo puramente dissociativo, sendo que em meio não aquoso o íon metafosfato seria pouco reativo devido à sua baixa interação com o solvente^[34]. A conclusão foi que o estado de transição da reação para os meios aquosos e não-aquosos seriam similares o que indicaria a presença do íon metafosfato em ambas as condições.

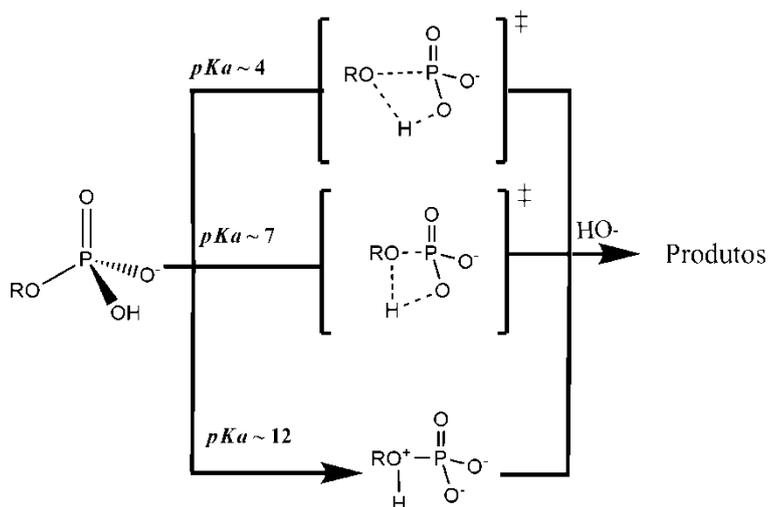
Outra proposta para o mecanismo de hidrólise de ésteres de fosfato desenvolvida foi que haveria a existência de um pré-equilíbrio entre o grupo fosforila e a água com a transferência de um próton da água para a forma dianiônica, o íon hidróxido formado atacaria o átomo central de fósforo posteriormente^[35, 36].

Há uma proposta mecanística para reações que envolvem a espécie monoaniônica dos monoésteres de fosfato, em que o estado de transição envolve a transferência intramolecular de um próton. Esse mecanismo não é tão imprescindível para grupos abandonadores de ácidos conjugados com valores baixos de pK_a s, visto que à ligação P-O estar relativamente alongada. Entretanto, com o aumento da basicidade do grupo abandonador ocorre um encurtamento de ligação P-O e a transferência do próton é adiantada até a formação de um intermediário dipolar. Na sequência da reação, esse intermediário é clivado na etapa determinante da reação para formar os produtos^[37, 38]. O Esquema 4 ilustra os caminhos reacionais descritos acima.

(i) Formação do íon metáfosfato seguida do ataque nucleofílico

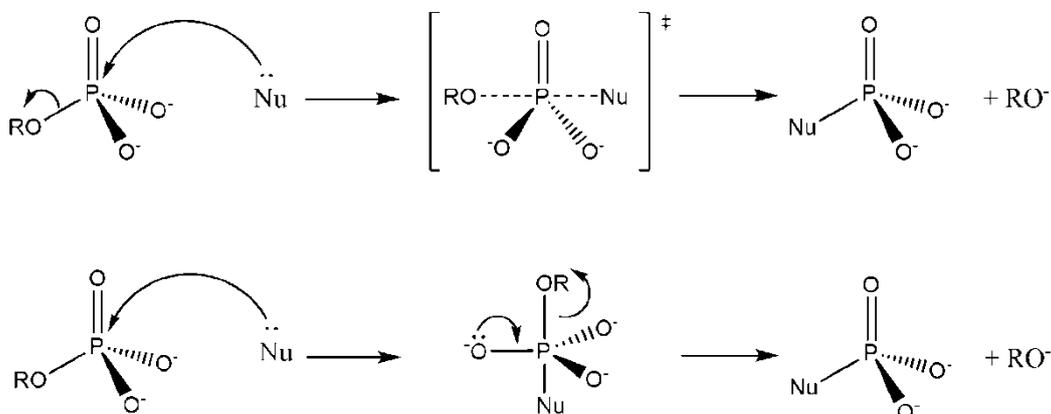


(ii) Transferência de próton intramolecular da espécie monoaniônica



Esquema 4. Proposta para transferência de grupo fosforila via mecanismo dissociativo.

O mecanismo associativo denominado S_N2P ocorre em duas etapas, uma adição e posteriormente uma eliminação, sendo a primeira caracterizada pelo ataque do nucleófilo no átomo central de fósforo tetraédrico, formando um intermediário ou estado de transição pentacoordenado, na segunda etapa, ocorre a eliminação do grupo abandonador RO. Estas etapas são mostradas no Esquema 5.



Esquema 5. Mecanismo associativo de transferência de grupo fosforila.

Uma maneira útil de racionalização desses mecanismos é o diagrama de More O'Ferral-Jencks (Figura 8). Esse diagrama esquematiza uma coordenada referente ao ataque nucleofílico denominada $A_N^{[39]}$, que corresponde à distância de ligação "P-Nu", e uma segunda coordenada, referente à eliminação do grupo abandonador, denominada $D_N^{[39]}$ que corresponde à distância de ligação "P-OR". Do ponto de vista energético, no diagrama os reagentes estão em um poço de energia sendo que o caminho reacional até o poço de energia dos produtos se dá por uma superfície com a menor energia potencial possível^[23].

No diagrama de More O'Ferral-Jencks, os mecanismos reacionais que seguem por mais de uma etapa, a reação acompanha as bordas do diagrama e os mecanismos reacionais concertados, seguem o interior do diagrama. O caminho puramente dissociativo segue o caminho mostrado $i \rightarrow ii \rightarrow iv$; e o caminho associativo segue o caminho indicado por $i \rightarrow iii \rightarrow iv$.

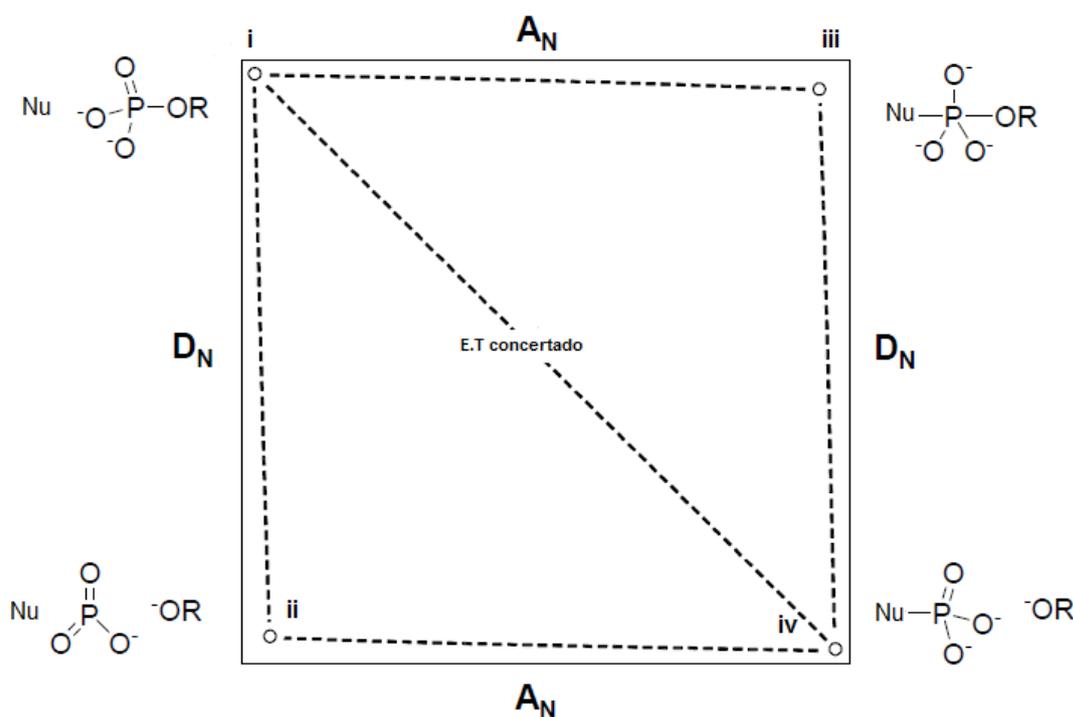
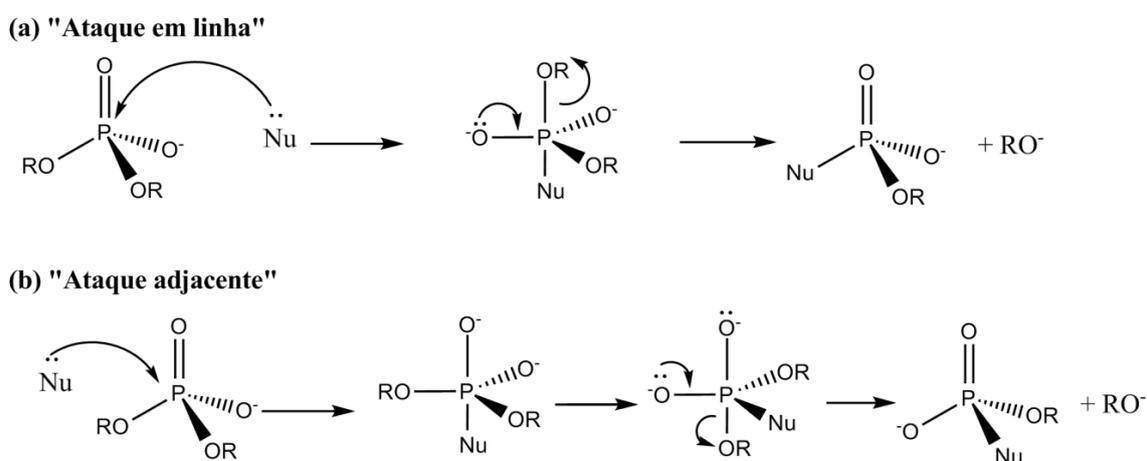


Figura 8. Diagrama de More O'Ferral-Jencks para ataque de um nucleófilo genérico Nu em um monoéster de fosfato.

Nos mecanismos de transferência de grupos fosforila em diésteres e triésteres de fosfato, o estado de transição envolvidos nestas reações, estão entre os caminhos associativo e concertado, e os mecanismos de transferência de grupo fosforila em monoésteres estão entre os caminhos dissociativo e concertado.

Existem duas possibilidades de ataque do nucleófilo no mecanismo do tipo associativo: (a) o ataque “em linha” no qual tanto o nucleófilo quanto o grupo abandonador estão na posição apical da espécie pentacoordenada^[40]; (b) o ataque “adjacente” no qual o nucleófilo ataca o átomo de fósforo pela face do grupo abandonador e a espécie pentacoordenada, com o nucleófilo na posição apical e o grupo abandonador na equatorial, deve sofrer pseudorotação de Berry para que o nucleófilo ocupe a posição equatorial e o grupo abandonador a posição apical, mais favorável a sua saída^[41] (Esquema 6).



Esquema 6. Possíveis tipos de ataque nucleofílicos em diésteres e triésteres de fosfato.

Vários estudos mostram que o mecanismo de transferência de grupo fosforila raramente segue um caminho reacional puramente dissociativo ou associativo, porém, um deles será mais pronunciado, dependendo de fatores como nucleofilicidade do nucleófilo, impedimentos eletrostáticos e ou estéreos, nucleofugacidade, pH do meio reacional, etc. Mas, de forma geral, para diésteres e triésteres de fosfato o caráter associativo é mais pronunciado e para monoésteres de fosfato o caráter dissociativo tem um peso maior.

1.4 Papel do grupo imidazol em reações enzimáticas

O imidazol é uma amina aromática que possui dois átomos de nitrogênio que podem atuar como base ou ácido, sendo o primeiro pK_a em torno de 7 e o segundo pK_a próximo de 11. Com isso, em meio neutro o ácido conjugado do imidazol se encontra 50% na forma desprotonada, que apresenta um par de elétrons

deslocalizado entre os dois átomos de nitrogênios. Assim, o imidazol é versátil para atuar como ácido, base ou nucleófilo^[15].

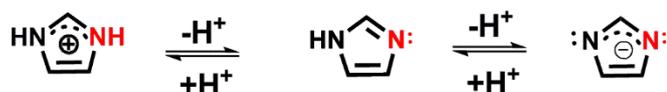


Figura 9: Equilíbrios de desprotonação do imidazol.

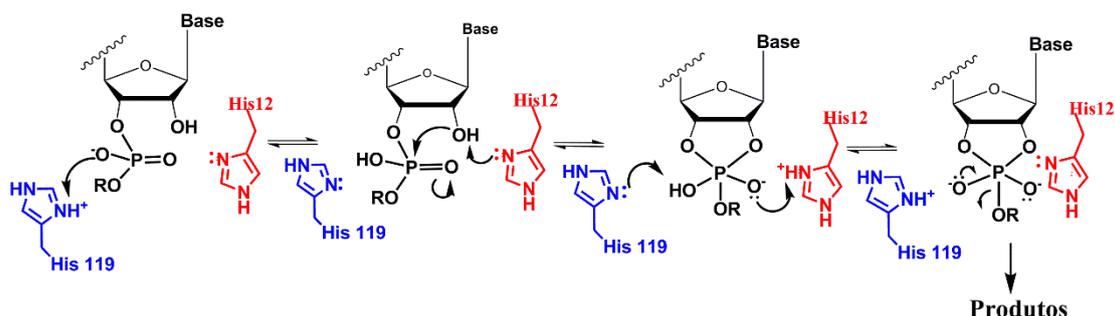
A atuação do grupo imidazol em reações enzimáticas como parte de um resíduo de aminoácido histidina, possui relevância em processos de sinalização e regulação celular^[42], reações envolvendo a clivagem de RNA^[43] e metabolismos relacionados à produção de ATP^[44]. A seguir serão detalhadas algumas enzimas que utilizam de modo específico, a versatilidade do imidazol.

1.4.1 Ribonucleases

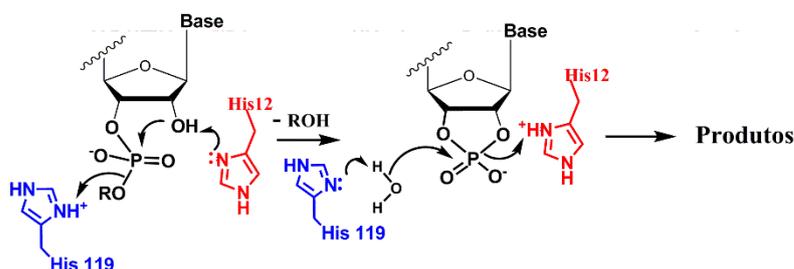
As ribonucleases são enzimas responsáveis pela clivagem de RNA. A RNase A é uma das enzimas mais importantes na clivagem de RNA^[43] e seu primeiro cristal foi obtido há mais de 50 anos^[45], sendo a primeira enzima a ter sua sequência de aminoácidos elucidada^[46], a terceira enzima e a quarta proteína a ter sua estrutura resolvida por difração de raios X^[47].

Vários estudos foram feitos para a elucidação de seu mecanismo de catálise, que se sabe depende de dois grupos imidazol, nos resíduos de aminoácidos His12 e His119 localizados no seu sítio ativo. Duas propostas mecanísticas para a catálise da RNase A foram cunhadas (Esquema 7): (a) mecanismo tipo “triéster”, envolvendo a formação de um intermediário pentacoordenado denominado fosforano^[48]. Nesse mecanismo, a His 119 atua como catalisador ácido geral e a His 12 como base geral. Na segunda etapa os papéis das histidinas são invertidos na saída do grupo abandonador do intermediário fosforano; (b) o mecanismo tipo catálise ácido-base geral, as histidinas atuam da mesma forma, porém a histidina ativa uma molécula de água do meio para promover a hidrólise sem passar pela formação do intermediário pentacoordenado^[49].

(a) Mecanismo "tipo triéster"



(b) Mecanismo ácido-base geral



Esquema 7. Mecanismos propostos para a atuação do sítio ativo da enzima RNase A.^[43]

O mecanismo tipo triéster fundamenta-se em dados cristalográficos mostrando que a geometria dos resíduos de histidina no sítio ativo favorecem a protonação do oxigênio do grupo fosforila, levando à formação de um grupamento neutro^[48]. Estudos computacionais também apontam à formação de uma geometria favorável para este tipo de reação^[50]. O mecanismo ácido-base geral é fundamentado por estudos que avaliam o efeito isotópico cinético ¹⁸O na clivagem do grupo fosforila a partir da incorporação de ¹⁸O no substrato. Segundo este estudo, a presença deste isótopo alterou a ordem de ligação do estado de transição, sendo que os valores obtidos de efeito isotópico cinético indicaram inconsistências no mecanismo envolvendo a formação do fosforano, visto que a ordem de ligação do estado de transição deveria ser de 5, diferente do observado^[51]. As conclusões apontaram para um mecanismo em que o imidazol atua como catalisador básico-geral sem a formação do intermediário fosforano. Estudos computacionais também mostraram menores valores de energia de formação do estado de transição do mecanismo ácido-base geral^[52].

Um modelo proposto para o mecanismo da RNase A, envolve o estudo de grupos imidazol ancorados na β -ciclodextrina, originando a ciclodextrina-bis(imidazol). Dados cinéticos da hidrólise do composto 4-terc-butilcatecol fosfato na

presença desta ciclodextrina, sugerem que o mecanismo dessa reação segue um mecanismo que envolve uma catálise bifuncional ácida-básica geral dos grupos imidazóis^[53-55].

1.4.2 Fosfohistidinas

As reações que envolvem a fosforilação e desfosforilação em sistemas vivos, importantes em processos de sinalização celular podem envolver duas classes de enzimas: a) as cinases, que promovem a fosforilação de centros nucleofílicos em certos compostos, por exemplo, a *piruvato cinase*; b) as fosfatases, enzimas que catalisam a hidrólise de monoésteres de fosfato como a proteína tirosina fosfatase^[56]. As enzimas dessas duas famílias se ligam ao grupo fosfato por diferentes resíduos de aminoácidos que podem formar intermediários via O ou N fosforilação em que o grupo fosfato se liga ao átomo de oxigênio do resíduo de aminoácido ou ao átomo de nitrogênio do resíduo de aminoácido. Aqui se dará um foco maior para o fosfoimidato devido ao interesse deste trabalho.

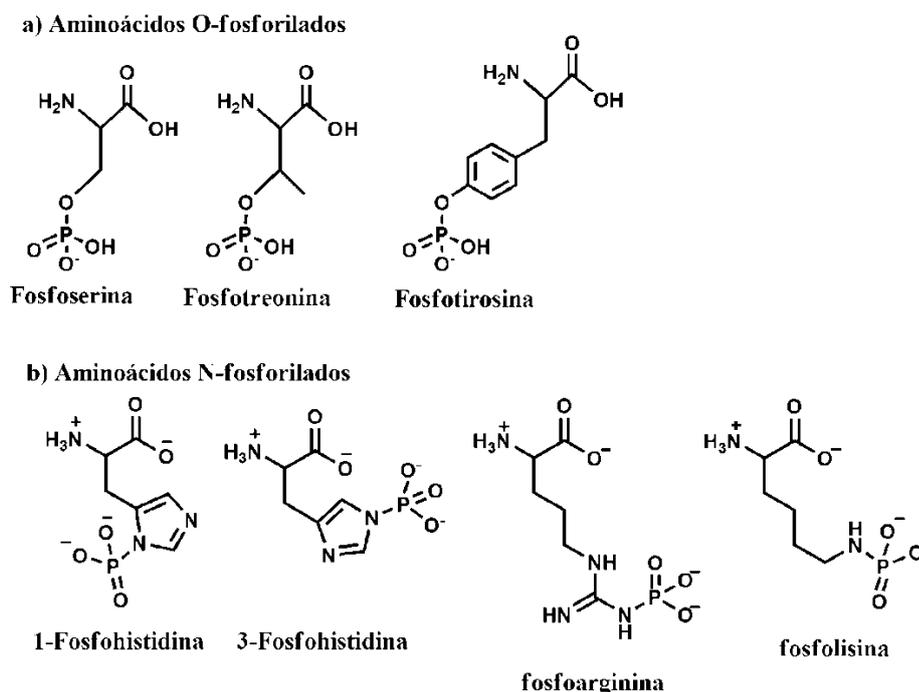


Figura 10. Possíveis formas de fosforilação dos aminoácidos (as formas mostradas acima são as espécies mais estáveis).

As duas espécies N-fosforiladas da histidina se formam devido às duas formas tautoméricas que o grupo imidazol pode assumir graças à deslocalização dos elétrons entres os dois átomos de nitrogênio. A literatura reporta que em

sistemas biológicos há uma preferência pelo isômero 3-fosfoimidazol devido a sua forma protonada estabilizar eletrostaticamente o grupo amino vizinho ao fosfoimidazol^[57] ^[58].

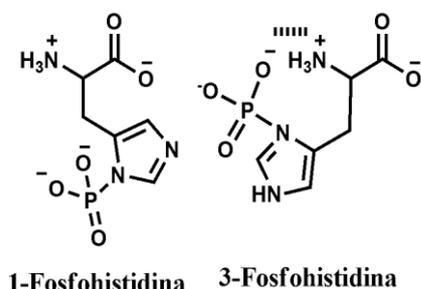


Figura 11: Representação da interação do grupo fosfato do 3-fosfohistidina com o grupo amino sendo que a mesma interação não ocorre no 1-fosfohistidina.

Estudos iniciais da hidrólise de fosfoimidazol mostraram que essas moléculas se mostram pouco reativas via catálise ácida ou básica geral. De modo que, a hidrólise é mais rápida em condições ácidas, em que o nitrogênio distal do grupo imidazol seria protonado em uma etapa de pré-equilíbrio antes de ocorrer a clivagem da ligação P-N^[59].

Dentro do escopo termodinâmico, as fosfohistidinas possuem um ΔG° de hidrólise entre -12 e -14 kcal.mol⁻¹ na direção do estado desfosforilado. Comparado a ésteres de fosfato, o fosfoimidato tem uma maior capacidade de transferir o grupo fosforila para outras moléculas sendo um dos motivos da natureza aplicar as características do fosfoimidato no processo de sinalização celular^[57].

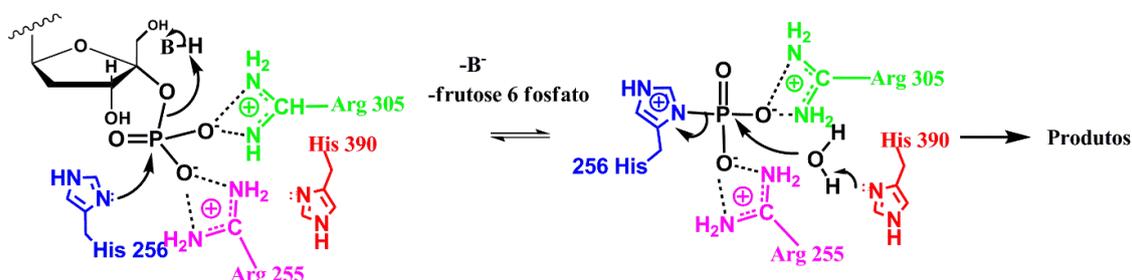
A seguir, são destacadas algumas enzimas que em suas reações catalisadas formam o fosfoimidazol como intermediário reacional em seu sítio ativo.

1.4.3 Fosfoimidazol como intermediário em reações catalisadas por enzimas

A frutose 2,6-bisfosfatase catalisa a reação de conversão da frutose 2,6 bisfosfato em frutose-6-fosfato e fosfato inorgânico. A frutose 2,6-bisfosfato é um potente inibidor da enzima glicolítica frutose-1,6-bisfosfatase. Este substrato possui papel importante como metabólito de sinalização e regulação entre essas duas vias opostas do metabolismo dos carboidratos hepáticos^[60].

A frutose-2,6-bisfosfatase possui em seu sítio ativo dois resíduos de histidina altamente conservados, His256 e His390, sendo que o papel da primeira histidina é atuar como nucleófilo, na formação de um intermediário fosfoimidazol, e o segundo

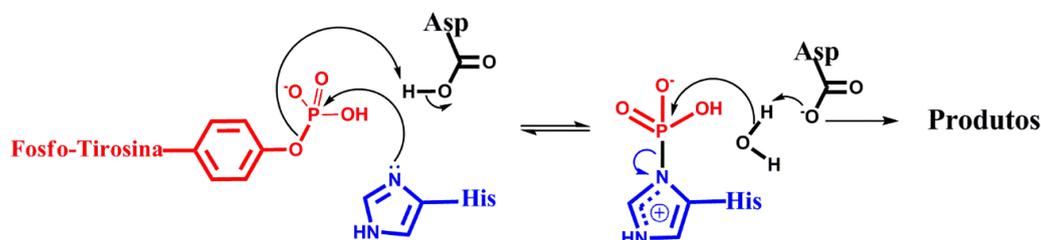
resíduo atua como catalisador básico-geral, na hidrólise do intermediário formado (Esquema 8). Existem, ainda, resíduos de Arg305 e Arg255 que fazem ligações de hidrogênio e formam pares iônicos com o grupo fosfato, aumentando a eletrofilicidade deste grupo que é atacado pela histidina^[61].



Esquema 8. Mecanismo proposto para a enzima frutose-2,6-bisfosfatase.

Dentre as enzimas dependentes de um resíduo de histidina nucleofílico na reação catalítica estão aquelas da família das Proteína Tirosina Fosfatase Histidina dependentes (PTF Hist-dep). As PTFs normalmente possuem a sequência de aminoácidos **C(X)₅RST** na clivagem de monoésteres de fosfato (C= Cisteína; X = qualquer aminoácido; R= Arginina; S= Serina e T= Treonina), sendo a cisteína o resíduo nucleofílico na reação catalisada^[62]. Porém, as PTF Hist-dep é uma classe distinta, pois a sua sequência de aminoácidos de seu sítio ativo são: **RHGXRXP** (R= Arginina; H= Histidina; G= glicina; P= prolina e X = qualquer aminoácido)^[63].

Dados estruturais e medidas cinéticas da ação enzimática mostram que, no sítio ativo da PTF Hist-dep, um resíduo de histidina e um resíduo de ácido aspártico são responsáveis pelo mecanismo catalítico da enzima. O resíduo de histidina atua como nucleófilo formando o intermediário fosfoimidazol e o resíduo de ácido aspártico atua como catalisador ácido-geral na primeira etapa e básico-geral na segunda etapa (Esquema 9)^[64, 65].



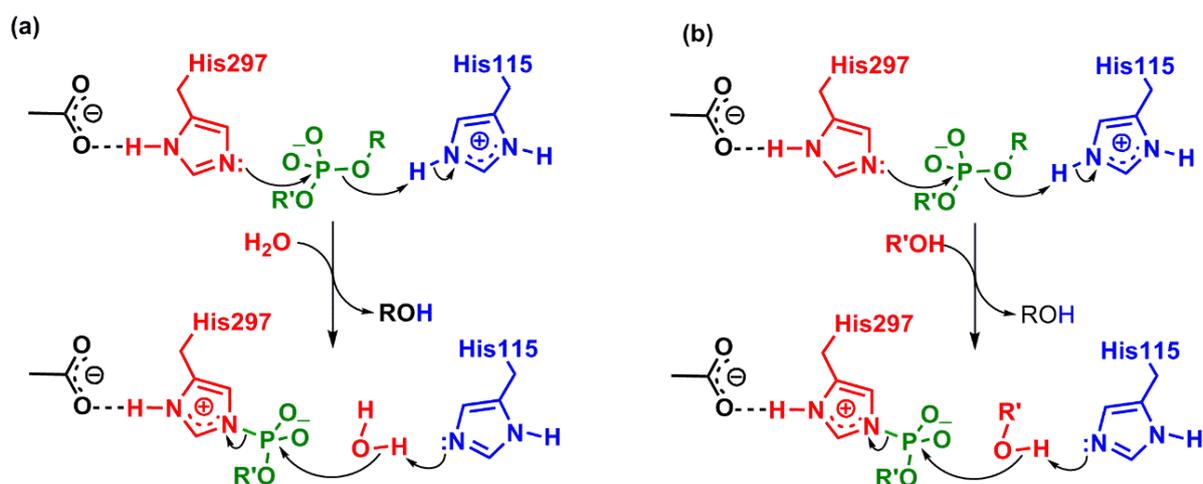
Esquema 9. Mecanismo de catálise da tirosina fosfatase dependente de histidina.

Outra enzima que possui resíduos de histidina nucleofílicos em seu sítio ativo é a Fosfolipase D (PLD), uma enzima da superfamília das fosfodiesterases. A PLD

catalisa a reação de hidrólise da fosfatidilcolina em ácido fosfatídico e colina^[66]. O ácido fosfatídico facilita mudanças morfológicas na curvatura das membranas celulares tendo papel importante em processos de formação de vesículas, endocitose e fusão de camadas lipídicas das membranas celulares^[67]. O ácido fosfatídico também é precursor de outros lipídeos sinalizadores celulares, incluindo o diacilglicerol e o ácido lisofosfatídico^[68]. Além disso, o ácido fosfatídico pode atuar como mensageiro secundário, ativando proteínas sinalizadoras e servindo de localizador do ponto em que as proteínas devem se situar na membrana plasmática^[69].

A fosfolipase D também está envolvida em um processo denominado transfosfatidilação da fosfatidilcolina, na qual a enzima ativa uma molécula de álcool, geralmente etanol presente no meio, ao invés de utilizar uma molécula de água. Esse processo é utilizado também para determinação da atividade enzimática *in vitro*^[70].

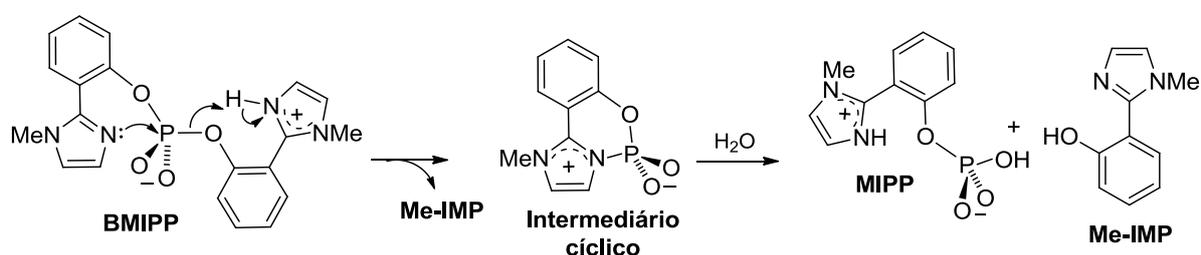
O mecanismo reacional proposto para a fosfolipase D tem como nucleófilo um grupo imidazol de um resíduo de histidina altamente conservado, que é assistido por catálise ácida-geral de um segundo grupo imidazol protonado (Esquema 10)^[71]. O produto desta reação é um complexo enzima-substrato, contendo uma ligação fosfodiéster que é clivada por (a) água em uma segunda etapa ou (b) por um álcool no processo de transfosfatidilação^[72].



Esquema 10. Proposta do mecanismo de catálise da fosfolipase D em (a) o nucleófilo da segunda etapa é uma molécula de água e (b) o nucleófilo da segunda etapa é uma molécula de álcool.

1.4.3.1 Modelo mimético da fosfolipase D

Como dito anteriormente, uma maneira de estudar os processos de catálise do sítio ativo de uma enzima é por meio de modelos miméticos. Um dos primeiros estudos de mimetização da enzima PLD foi o fosfodiéster BMIPP, cujos estudos mostraram que a clivagem da sua ligação P-O depende da ação bifuncional de dois grupos imidazóis. O grupo imidazol desprotonado ataca nucleofilicamente o átomo de fósforo, enquanto que o outro grupo imidazol protonado transfere seu próton para o átomo de oxigênio da ligação P-O que está sendo rompida^[13, 73]. O intermediário cíclico é hidrolisado em uma segunda etapa (Esquema 11).



Esquema 11. Mecanismo proposto para reação do fosfodiéster BMIPP[73].

A dificuldade encontrada em se obter dados específicos desse modelo mimético se deve aos dois grupos imidazóis poderem exercer influências distintas e concomitantes na catálise do composto, dificultando a avaliação do auxílio de cada grupo imidazol separadamente no mecanismo proposto. Também, o intermediário cíclico foi suficientemente estável para ser observado somente através de técnicas avançadas de espectrometria de massas. Porém, o estudo deste modelo permitiu a construção dos novos modelos estudados neste trabalho, que possibilitam avaliar a capacidade nucleofílica do grupo imidazol e as características físico-químicas do intermediário cíclico fosfoimidazol.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral determinar o efeito da proximidade e orientação de grupos reativos na catálise nucleofílica intramolecular do grupo imidazol na hidrólise de *ortho*-(1H-imidazol-2-il)naftilas e na reação dos seus respectivos fosfoimidazóis com diferentes nucleófilos. Neste sentido, os estudos focam em modelos bioinspirados no mecanismo catalítico da fosfolipase D. De acordo com o exposto acima, têm-se os seguintes objetivos específicos:

i) Obtenção dos modelos enzimáticos apresentados na Figura 12. Os compostos de interesse são *p*-nitrofenilfosfatos de *ortho*-(2'-imidazolil)naftóis com grupos imidazolínio em diferentes posições: (4-nitrofenil) fosfatos de 1-(1H-imidazol-2-il)naftalen-2-ila (**1Ni2P-pNP**), 2-(1H-imidazol-2-il)naftalen-2-ila (**2Ni1P-pNP**) e 3-(1H-imidazol-2-il)naftalen-2-ila (**3Ni2P-pNP**).

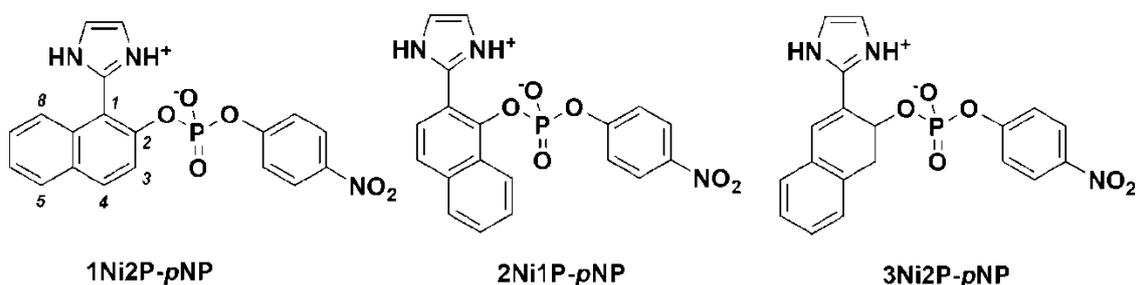


Figura 12. Estrutura dos *p*-nitrofenilfosfatos de *ortho*-(1H-imidazol-2-il)naftilas obtidos para os estudos cinéticos.

ii) Avaliação da orientação do grupo imidazol na catálise intramolecular na reação de clivagem dos compostos acima em relação à reatividade e o mecanismo reacional:

- a. Identificação dos intermediários e produtos das reações através das técnicas ESI-MS/MS e RMN de ^1H e ^{31}P ;
- b. Determinação dos perfis de pH ($\log k_{\text{obs}}$ vs pH) para avaliar o comportamento reacional de diferentes espécies iônicas em solução;
- c. Realização de estudos isotópicos de solvente ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) para avaliar a ocorrência de transferência de prótons até a etapa determinante da velocidade de reação;

- d. Avaliação da influência de bases e ácidos-gerais para determinação do mecanismo reacional;
- e. Determinação de parâmetros termodinâmicos para avaliação do estado de transição formado na reação;

iii) Obtenção dos fosfoimidazóis cíclicos a partir dos fosfodiésteres mostrados na Figura 12.

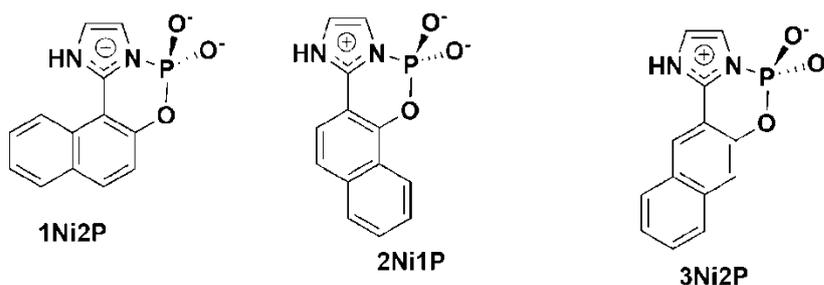


Figura 13: Estruturas dos fosfoimidazóis cíclicos obtidos para os estudos cinéticos.

iv) Estudo do efeito de nucleófilos sobre a clivagem dos fosfoimidazóis em que se pretende avaliar a influência de requerimentos geométricos e a reatividade dos fosfoimidazóis frente a diferentes condições reacionais. Especificamente:

- a. Determinação dos perfis de pH (k_{obs} vs pH) para as reações de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos para determinar as espécies reativas em função do pH;
- b. Realização de estudos isotópicos de solvente (H_2O/D_2O) para determinação da existência de transferência de prótons na etapa de clivagem da ligação P-N;
- c. Determinação de parâmetros termodinâmicos para avaliar o estado de transição envolvido na reação;
- d. Determinação do efeito de diferentes nucleófilos oxigenados e nitrogenados;

v) Otimização das estruturas de todas as espécies reacionais e estados de transição da reação dos diésteres de fosfato (Figura 12) por meio de cálculos computacionais e obtenção dos valores dos parâmetros termodinâmicos teóricos que serão comparados aos valores obtidos experimentalmente.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Os isômeros constitucionais orto-(2'-imidazolil)naftóis foram sintetizados de acordo com a literatura^[74]. Na síntese dos diésteres de fosfato, utilizou-se reagentes de qualidade P.A. adquiridos comercialmente (Aldrich, *Synth*, Vetec) e purificados previamente quando necessário. Os solventes e reagentes utilizados nos experimentos isotópicos e RMN foram adquiridos da Cambridge Isotope, o NaOD (40%) e o DCI (37%) foram adquiridos da Aldrich.

3.2 Equipamentos

Os experimentos de RMN foram conduzidos à temperatura de 21 °C em um espectrômetro de 200 MHz Bruker DPX 200 interfaciado com um programa operacional topspin 1.3. Para os experimentos de UV-Vis utilizou-se o equipamento da marca Varian modelo Cary 50 interfaciado com o programa CarywinUV acoplado a um banho termostático da marca Polyscience modelo 9106 com precisão de $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Para os experimentos cinéticos com $t_{1/2}$ inferior a 2 segundos utilizou-se um *stopped-flow* modelo SX20 marca AppliedPhotophysics com programa operacional proKII tendo sido acoplado a um banho termostático Microquímica, modelo MQBTC99-20 com precisão de $\pm 0,1^\circ\text{C}$. As medidas de pH foram feitas com pHmetro Hanna modelo *pH200* calibrado de acordo com a faixa de leitura desejada com soluções padrões de pH 4,00, 7,00, 10,00 (*Synth*); uma sonda de temperatura e cela acoplada à um banho termostático da marca Tecnal modelo TE2005 foram utilizadas para medidas acima de 30°C. As análises de ESI/MS foram feitas em um espectrômetro de massa LC/MS/MS triplo-quadrupolo, QTrap 3200 com resolução unitária. O aparelho foi operado no modo do íon negativo ou positivo e espécies as individuais foram submetidas à dissociação por colisão induzida (CID).

3.3 Síntese dos diésteres de fosfato

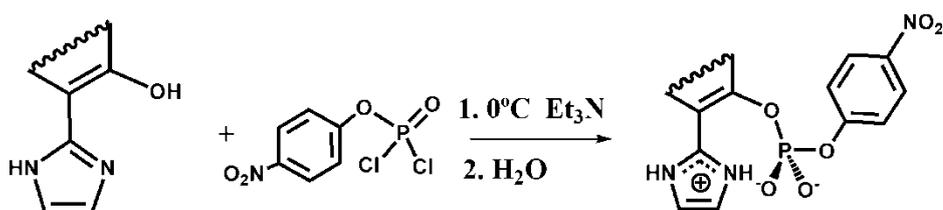


Figura 14. Rota de síntese adotada para obtenção dos diésteres de fosfato.

A rota de síntese mostrada na Figura 14 seguiu o procedimento a seguir: dissolveu-se 320 mg (1,52 mmol, 1,0 eq.) do *orto*-(1H-imidazol-2-il)naftol em 30 mL de clorofórmio e adicionou-se 320 μ L (2,28 mmol, 1,5 eq.) de trietilamina. Em um balão de 50 mL pesou-se 584 mg (1,52 mmols, 1,0 eq.) de fosforodichloridato de 4-nitrofenila (pureza de 98%) e sob agitação magnética, atmosfera inerte e banho de gelo foi adicionado vagarosamente o imidazol à mistura reacional que tomou uma coloração acinzentada. Após 14 horas, a coloração da mistura reacional tinha um tom marrom e foi rotaevaporada para a remoção de todo o clorofórmio. Em seguida, adicionou-se 15 mL de acetona e 10 gotas de água destilada, formou-se um precipitado pardo que foi extraído por filtração a vácuo deixado secar em dessecador. Um rendimento total de 50% foi obtido. Para a caracterização dos compostos foram feitas soluções com 15mg dos compostos em 600 μ L de dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d6).

1Ni2P-pNP: RMN ^1H (200MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm 7,30 (2H, d, $J = 7,0\text{Hz}$, H-12,H-13), 7,4-7,7 (4H, m, H-3,H-6,H-7,H-16), 7,85 (2H, s, H-18, H-19), 8,0-8,3 (3H, m,H-5,H-8, H-13), 14,9 (2H, s,N-H) ; RMN ^{13}C (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm 110,6 (C-19),110,7 (C-18) 120,3 (C-1), 120,5 (C-3),120,7 (C-12) 122,1 (C-16), 123,9 (C-6),125,7 (C-8) 126,2 (C-13) ,128,7 (C-15), 128,9 (C-13), 129,8 (C-15), 132,2 (C-5), 133,7 (C-10), 139,5 (C-4), 142,6 (C-9), 151,1 (C-14), 151,2 (C-2) 159,1(C-11); RMN ^{31}P (81 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm -11,1 (**Anexo A**).

2Ni1P-pNP: RMN ^1H (200MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm 6,9 (2H, d, H-12,H-16), 7,4 (2H, d, H-6,H-7), 7,6-7,9 (2H, m,H-3, H-4), 8,1- 8,4 (3H, m, H-5,H-13, H-13), 15,1 (2H, s,N-H) ; RMN ^{13}C (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm 112,7 (C-19),112,9 (C-18) 116,1 (C-17), 120,1 (C-2),120,7 (C-6) 121,1 (C-12), 121,8 (C-4), 125,4 (C-10) 125,8 (C-12), 126,5 (C-8), 127,1 (C-3), 128,2 (C-7), 128,9 (C-13), 135,9 (C-15), 141,1 (C-5), 143,1

(C-10), 151,1 (C-14), 151,2 (C-1) 159,1(C-11); RMN ^{31}P (81 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm -9,2 (**Anexo B**).

3Ni2P-pNP: RMN ^1H (200MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm 7,4 (2H, d, $J= 8,0$ Hz, H-12,H-16), 7,6- 7,8 (3H, m, H-1, H-6,H-7), 7,9 -8,1 (4H, m, H-5, H-8, H-18, H19), 8,2 (2H, d, H-15,H-13), 8,4 (1H, s, H-4), 15,2 (2H, s, N-H); RMN ^{13}C (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm 117,2 (C-19),117,3 (C-18) 120,8 (C-17), 125,8 (C-13),126,8 (C-15) 127,7 (C-1), 128,7 (C-16), 129,1 (C-12) 129,5 (C-6), 131,7 (C-3), 135,1 (C-8), 141,4 (C-7), 142,5 (C-5), 142,9 (C-4), 143,2 (C-10), 143,6 (C-9), 146,1 (C-14), 146,2 (C-2) 158,7(C-11); RMN ^{31}P (81 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ ppm -9,3 (**Anexo C**).

3.4 Medidas ESI/MS-MS

Para a caracterização das espécies reacionais por meio de ionização por electrospray, foi injetado 1 mL de solução aquosa com 100 μM de substrato a pH 8,0 (5,0 mM de $\text{NH}_3 / \text{NH}_4\text{OH}$) sob um fluxo de 10 mL / min. O acompanhamento da hidrólise do intermediário fosfoimidazol foi feita pela a injeção da solução de mesma concentração, mas em pH 3,0 (5,0 mM $\text{HCOOH} / \text{HCOO}^-$). Algumas das principais espécies aniônicas detectados por ESI-MS no modo negativo foram submetidos ao ESI-MS/MS utilizando dissociação induzida por colisão (CID) com nitrogênio. As energias de colisão variaram de 5 a 45 eV de modo a obter os melhores rendimentos de dissociação.

3.5 Medidas cinéticas de RMN

As reações foram seguidas por RMN de ^{31}P e ^1H em D_2O a 21 °C. Primeiramente, pesou-se 15mg do composto e uma ponta de espátula de TMSP. As reações foram iniciadas pela a adição de NaOD suficiente para uma concentração final de 0,01M e um volume total de 600 μL de mistura reacional. Espectros de ^{31}P e ^1H foram obtidos ao longo do tempo até a verificação do fim da reação de formação do intermediário fosfoimidazol. Em seguida, adicionou-se 15 μL de DCI 1M e a decomposição do intermediário foi seguida de modo similar à sua formação.

3.6 Medidas cinéticas UV-Vis

As reações foram iniciadas pela adição de alíquotas de 20 μL de solução estoque dos substratos (5,0 mM em dimetil sulfóxido e estocadas em freezer) em 3ml da solução tamponada no pH desejado, de modo que a concentração inicial dos

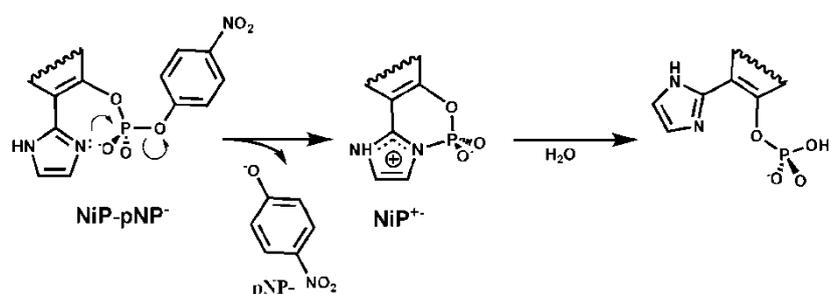
substratos em solução foi igual a 33,33 μ M. As constantes cinéticas da reação de formação dos intermediários fosfoimidazóis foram obtidas em dois comprimentos de onda: 405 nm para reações em valores de pH acima de 6,7 e 340 nm para reações abaixo deste pH. Para a reação de hidrólise do intermediário as constantes cinéticas foram obtidas somente em 340 nm. Na faixa de pH 2 a 12 foram utilizados tampões adequados para cada faixa de pH na concentração de 0,01M e a força iônica foi mantida em 1M em todas as medidas cinéticas com a adição de KCl. Para os experimentos de efeito isotópico, o ajuste do valor de pD das soluções, foram corrigidos considerando $pD = pH_{lido} + 0,4$ a 25°C^[75]. Os tampões e faixas de pH utilizadas foram: H₃O⁺Cl⁻/H₂O (pH<2), CH₂ClCOOH/CH₂ClCOO⁻ (pH2-3), HCOOH/HCOO⁻ (pH 3-4,5), CH₃COOH/CH₃COO⁻ (pH 4-5,5), H₂PO₄⁻/HPO₄⁻² (pH 6,0-8,5), HCO₃⁻/CO₃²⁻ (pH 9-11), HPO₄⁻²/PO₄⁻³ (pH 11-12) e H₂O/KOH pH>12.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

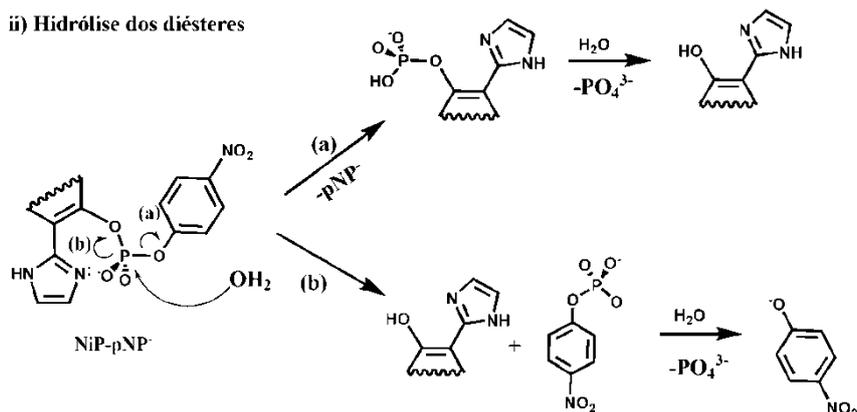
No presente trabalho estudou-se o mecanismo reacional influências de características estruturais nas reações de três diésteres de fosfato, isômeros constitucionais 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-Pnp (Figura 12, pg. 22). Conforme exposto na introdução, as reações de transferência de grupo fosforila podem seguir diferentes caminhos reacionais. Com isso, pode-se delinear propostas reacionais em duas etapas para esses três compostos conforme mostrado no Esquema 12:

- i) A catálise nucleofílica intramolecular do grupo imidazol envolvendo a formação de um intermediário fosfoimidazol cíclico e p-nitrofenolato como grupo abandonador na primeira etapa. Na segunda etapa, a hidrólise deste intermediário leva à formação do respectivo monoéster.
- ii) A reação nucleofílica bimolecular do diéster de fosfato com água ou íon hidróxido em uma primeira etapa, tendo: (a) p-nitrofenolato como grupo abandonador e um orto-(1H-imidazol-2-il)naftil fosfato, que sofre hidrólise em uma segunda etapa; (b) orto-(1H-imidazol-2-il)naftol como grupo abandonador e p-nitrofenilfosfato, que sofre hidrólise em uma segunda etapa.

i) Catálise nucleofílica intramolecular



ii) Hidrólise dos diésteres



Esquema 12. Possíveis caminhos reacionais para os diésteres de fosfato 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP.

4.1 Caracterização de intermediários e produtos por RMN de ³¹P e ¹H

Experimentos de RMN ³¹P (Figuras 15a-17a), em função do tempo, foram feitos para a caracterização intermediários e produtos na reação dos diésteres de fosfato 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP. Sob condições básicas (0,01M NaOD), a solução reacional adquire uma tonalidade amarela ao longo do tempo indicando a formação de p-nitrofenolato. O sinal de ³¹P próximo de -10,9 ppm, que corresponde ao reagente, desaparece ao longo do tempo, formando um intermediário estável que, nestas condições, é observado um sinal próximo de -12,9 ppm. Este valor, o mais negativo dentre todas as espécies reacionais, indica um átomo de fósforo mais blindado que atribuímos como pertencente ao intermediário fosfoimidazol. Neste, diferente dos demais contendo somente ligações P-O, o átomo de fósforo está ligado a um átomo de nitrogênio menos eletronegativo^[76]. Ao adicionar ácido (DCI 0,02M) à mistura reacional, após o fim da primeira etapa, verificou-se o desaparecimento do sinal do intermediário, levando à formação do respectivo produto da reação com um sinal que aparece em -4,9 ppm que são valores típicos para monoésteres de fosfato^[76]. As figuras 13b-15b apresentam os

gráficos da porcentagem das espécies em função do tempo de reação tomando a integração dos sinais de fósforo de cada espectro obtido.

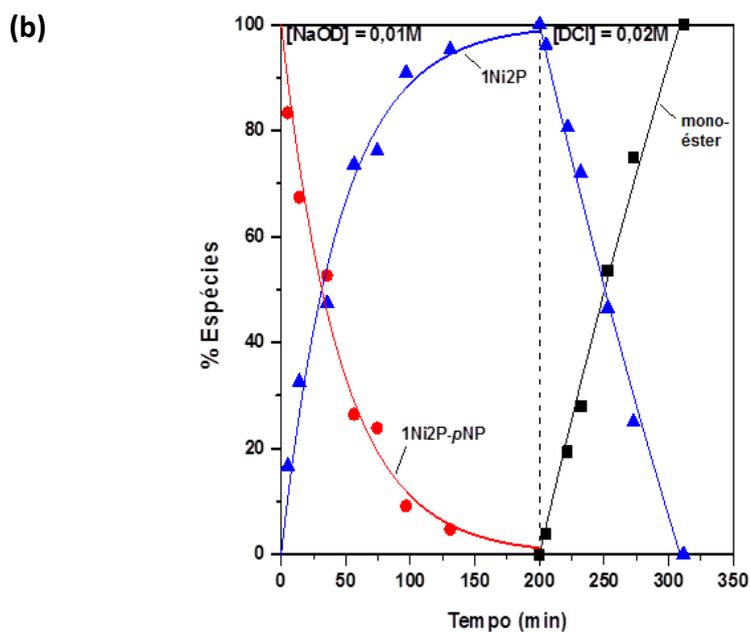
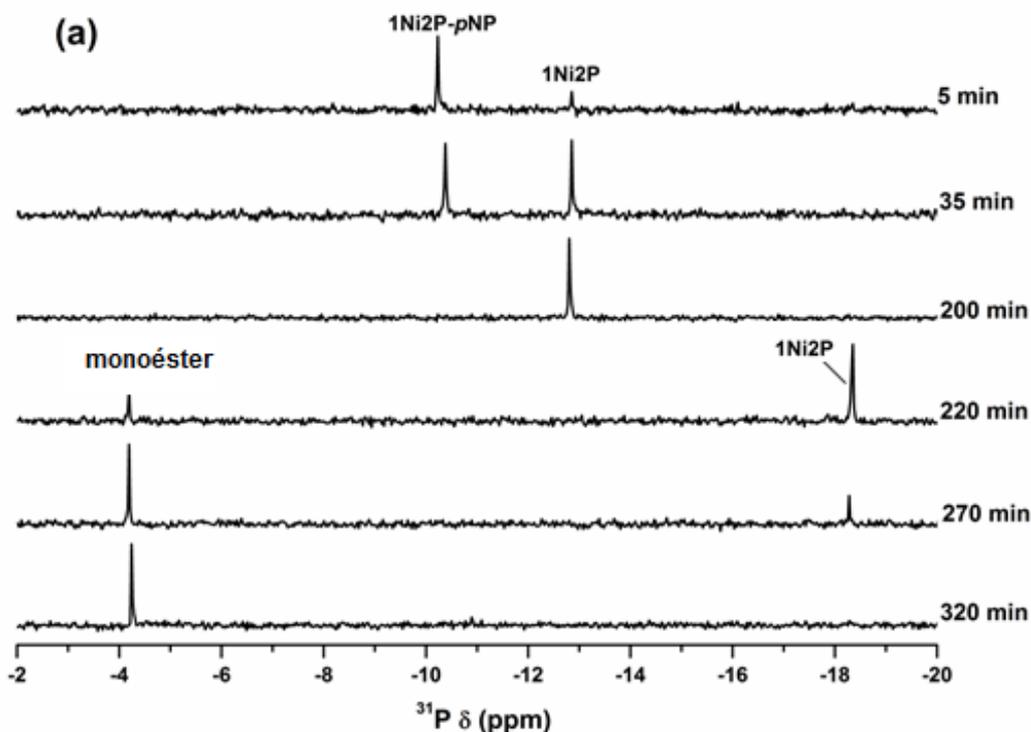


Figura 15. (a) Espectros sucessivos de RMN de ^{31}P ao longo do tempo para o 1Ni2P-pNP e (b) gráficos das espécies em função do tempo tomados a partir da integração dos sinais de ^{31}P . As curvas sólidas até 200 minutos foram ajustadas a partir de um modelo cinético de primeira-ordem que segue a equação: $\Delta[\text{Espécies}] = e^{kt}$ com uma constante k de $(3,67 \pm 0,03) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

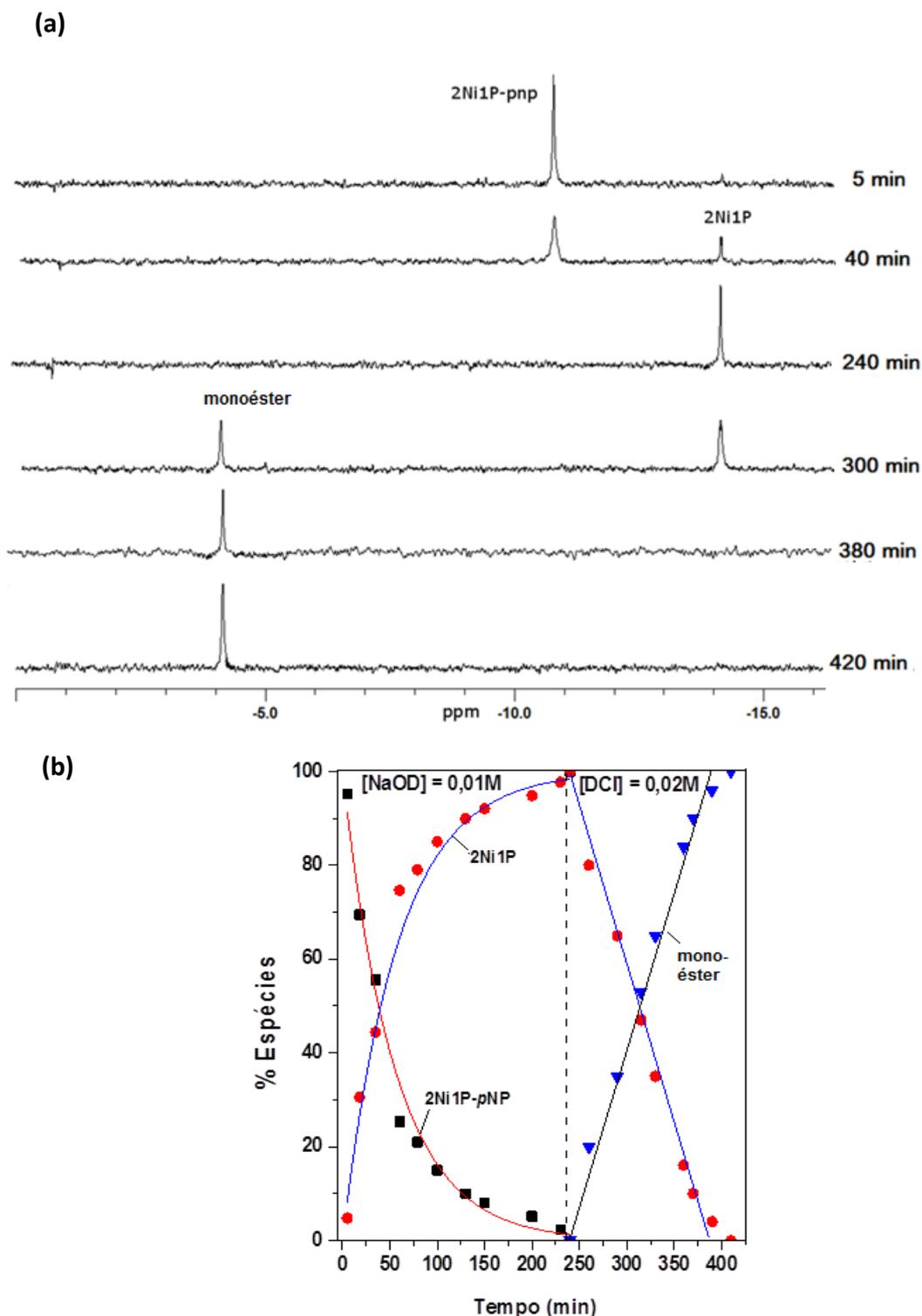


Figura 16. (a) Espectros sucessivos de RMN de ^{31}P ao longo do tempo para o 2Ni1P-pNP e (b) gráficos das espécies em função do tempo tomados a partir da integração dos sinais de ^{31}P . As curvas sólidas até 240 minutos foram ajustadas a partir de um modelo cinético de primeira-ordem que segue a equação: $\Delta[\text{Espécies}] = e^{kt}$ com uma constante k de $(1,72 \pm 0,02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

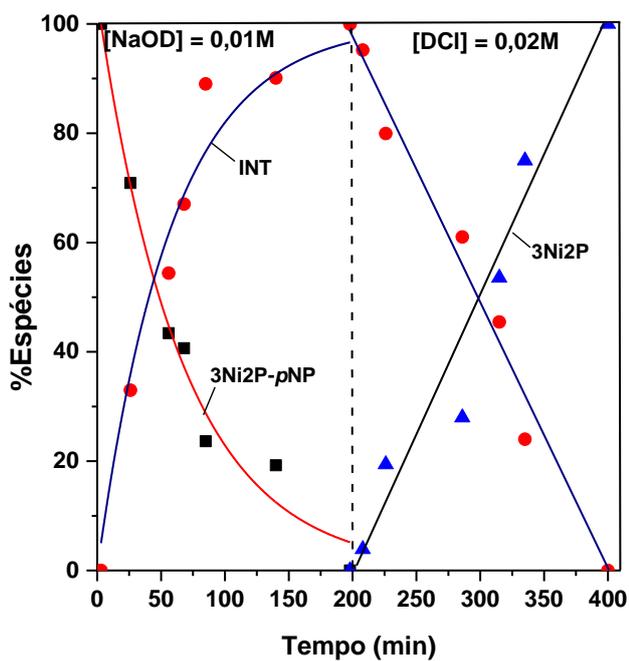
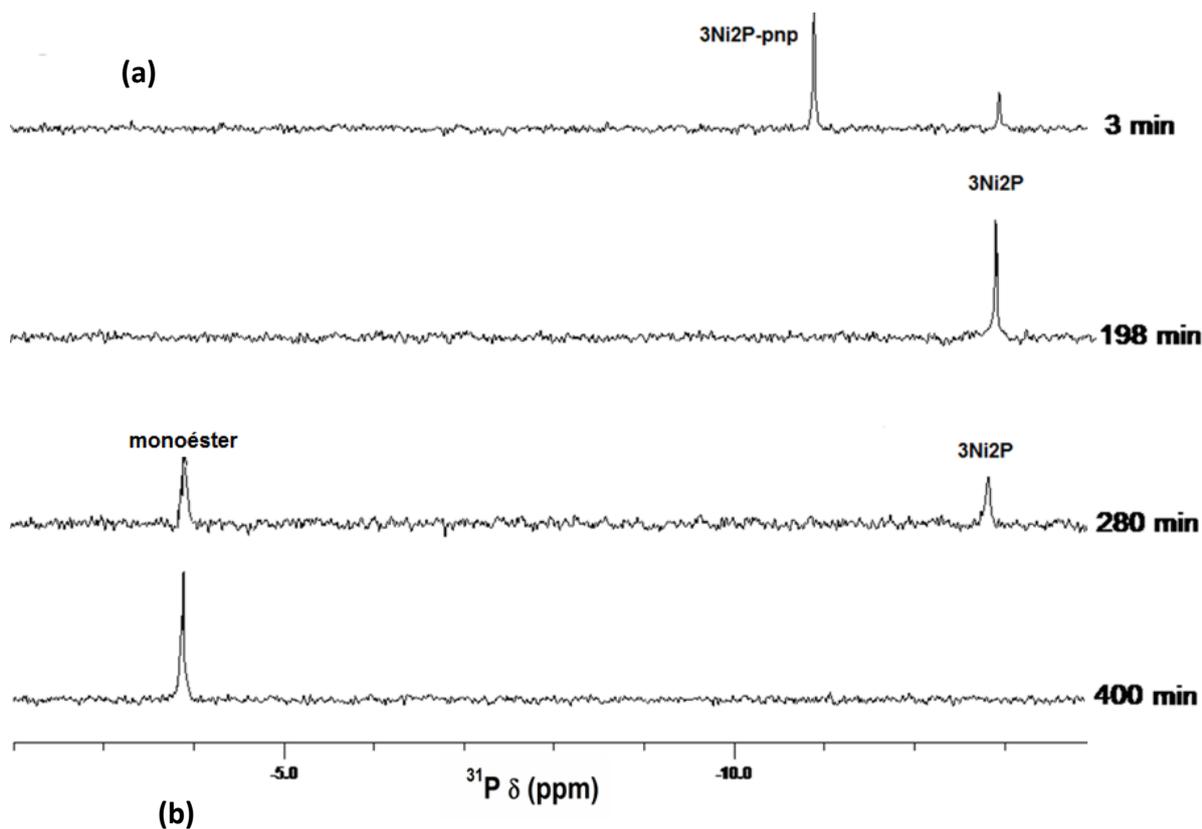


Figura 17. (a) Espectros sucessivos de RMN de ^{31}P ao longo do tempo para o 3Ni2P-pNP e (b) gráficos das espécies em função do tempo tomados a partir da integração dos sinais de ^{31}P . As curvas sólidas até 200 minutos foram ajustadas a partir de um modelo cinético de primeira-ordem que segue a equação: $\Delta[\text{Espécies}] = e^{kt}$ com uma constante $(1,52 \pm 0,02) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

As figuras 18-20 mostram espectros sucessivos de RMN de ^1H para as reações dos diésteres de fosfato em função do tempo.

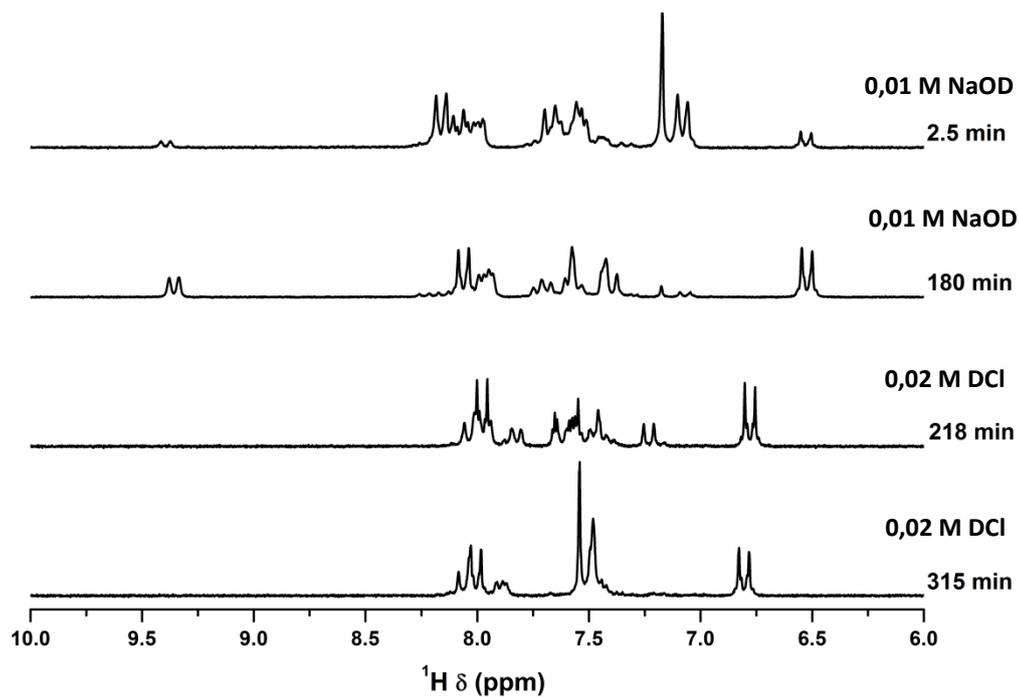


Figura 18. Espectros sucessivos de RMN de ^1H para o composto 1Ni2P-pNP obtidos ao longo do tempo de reação com sinais em destaque para cada espécie.

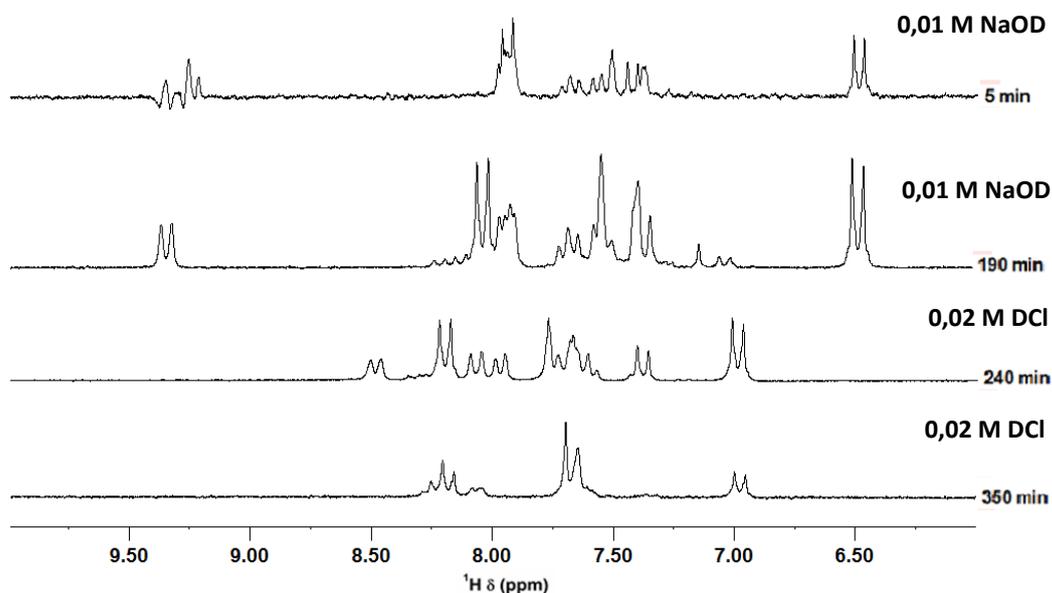


Figura 19. Espectros sucessivos de RMN de ^1H para o composto 2Ni1P-pNP obtidos ao longo do tempo de reação para cada espécie.

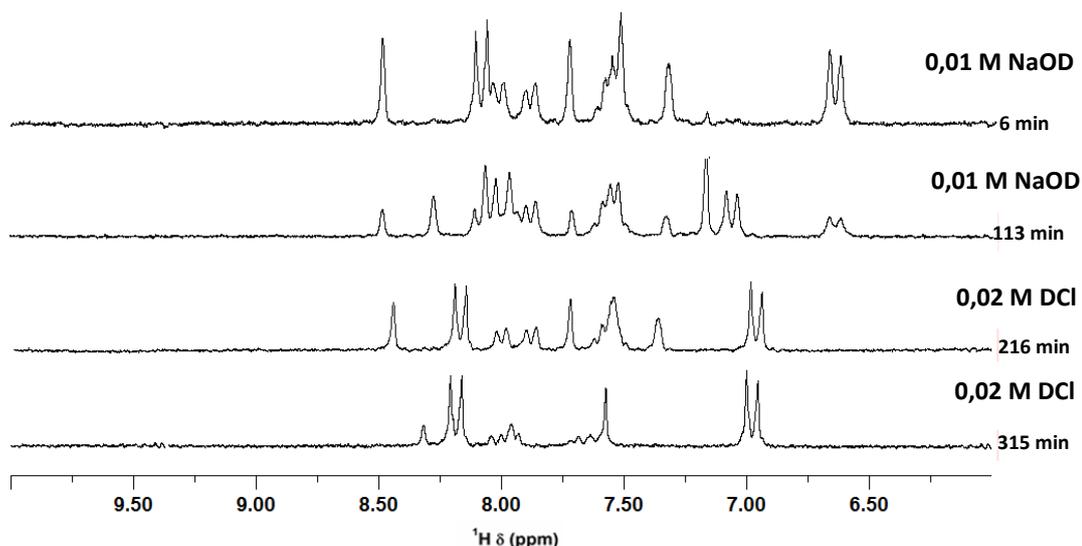


Figura 20. Espectros sucessivos de RMN de ^1H para o composto 3Ni2P-pNP obtidos ao longo do tempo de reação.

De modo geral, os espectros de RMN de ^1H em meio básico mostram um sinal em 7,2 ppm referente aos hidrogênios do grupo imidazol dos reagentes, um sinal em 6,5 ppm referente ao grupo abandonador, p-nitrofenolato, que sob condições ácidas aparece deslocado para 6,8 ppm, um sinal em torno de 9,3 ppm para os intermediários fosfoimidazóis cíclicos 1Ni2P e 2Ni1P e 8,5 ppm para o 3Ni2P cíclico. Os sinais em 9,3 ppm para o 1Ni2P e 2Ni1P refere ao hidrogênio aromático ligado ao carbono na posição 8 do anel naftalênico, que aparece desblindado em relação ao respectivo sinal do 3Ni2P por causa do efeito “*peri*”^[77]. Este efeito deve-se a interação intramolecular do H-8 com um par de elétrons de um grupo na posição 1. No caso do 1Ni2P, a interação envolve o átomo de nitrogênio do grupo fosfoimidazol e no 2Ni1P o átomo de oxigênio do grupo fosfato do grupo fosfoimidazol. O efeito *peri* não é pronunciado para o 3Ni2P por não haver interação nem do grupo imidazol nem do grupo fosfato com os hidrogênios alfa do anel naftalênico (Figura 19). Por fim, observa-se o aparecimento de um singlete em 7,6 ppm referente aos hidrogênios do grupo imidazol do monoéster. Não há nenhum indício espectral que indica a formação de *orto*-(1H-imidazol-2-il)naftol conforme comparação direta com uma amostra pura destes compostos.

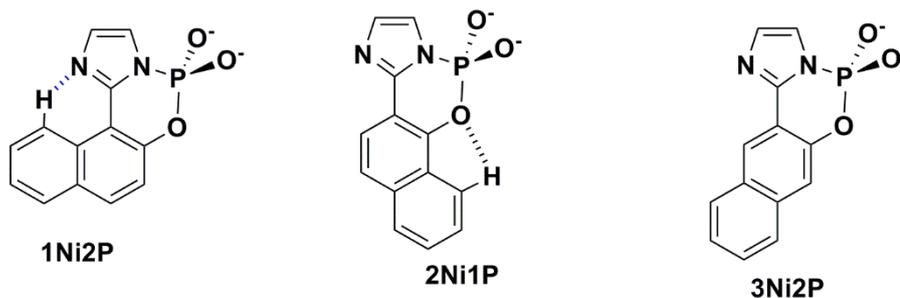


Figura 21. Representação dos efeitos "peri" (linhas tracejadas) para os fosfoimidazóis cíclicos conforme observações do RMN ^1H .

4.2 Caracterização de intermediários e produtos por ESI-MS/MS

As reações dos diésteres de fosfato 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP também foram avaliadas por espectrometria de massas com ionização por "electrospray" (ESI-MS/MS) nos modos negativo e positivo. As figuras 22, 24 e 26 mostram na ordem os espectros ESI-MS ao longo do tempo das reações dos diésteres de fosfato 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP. Os espectros A, realizados em modo negativo, foram obtidos após 2 minutos de reação em solução aquosa em pH 8,5 (NH_4OH 5,0 mM) para 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP e pH 12 (NaOH 0,01M) para 1Ni2P-pNP. Os valores de m/z 410 e m/z 271 correspondem na ordem ao fosfodiéster e ao intermediário fosfoimidazol formado a partir da reação do primeiro. Os espectros B foram obtidos após 40 minutos de reação sob as mesmas condições em A. Os sinais m/z 271 e 138 correspondem ao intermediário cíclico fosfoimidazol e p-nitrofenolato formados como produto da reação intramolecular do fosfodiéster. Os espectros C em modo positivo foram obtidos após acidificação do meio (HCOOH 5mM, pH 3,5) e término da primeira reação, observando-se a espécie fosfoimidazol protonada em m/z 273. Os espectros D mostram a evolução da segunda etapa de reação após 50 minutos exibindo a relação m/z 291 relativo ao monoéster completamente protonado.

As Figuras 23, 25 e 27 mostram os espectros CID das espécies presentes nas reações dos fosfodiésteres. O espectro A mostra a perda do grupo p-nitrofenolato do diéster de fosfato resultando em um sinal m/z 271. O espectro B mostra o perfil de fragmentação do fosfoimidazol cíclico de sinal m/z 271, sendo a espécie de m/z 243 e 192 correspondentes à perda de CH_2N e PO_3 , respectivamente. O espectro C mostra o padrão de fragmentação do p-nitrofenolato com sinal m/z 139, correspondente ao íon molecular, e o sinal de m/z 108 que refere

à perda de um fragmento NO. O espectro D mostra o perfil de fragmentação do fosfoimidazol cíclico protonado, sendo que os sinais de fragmentação m/z 255, 243 e 193 referem-se à perda de uma molécula de água, CH_2N e HPO_3 , respectivamente. O espectro E mostra o perfil de fragmentação do monoéster de fosfato com íon molecular de m/z 291 e suas fragmentações em m/z 273 e 211 relativas à perda de uma molécula de água e HPO_3 , respectivamente.

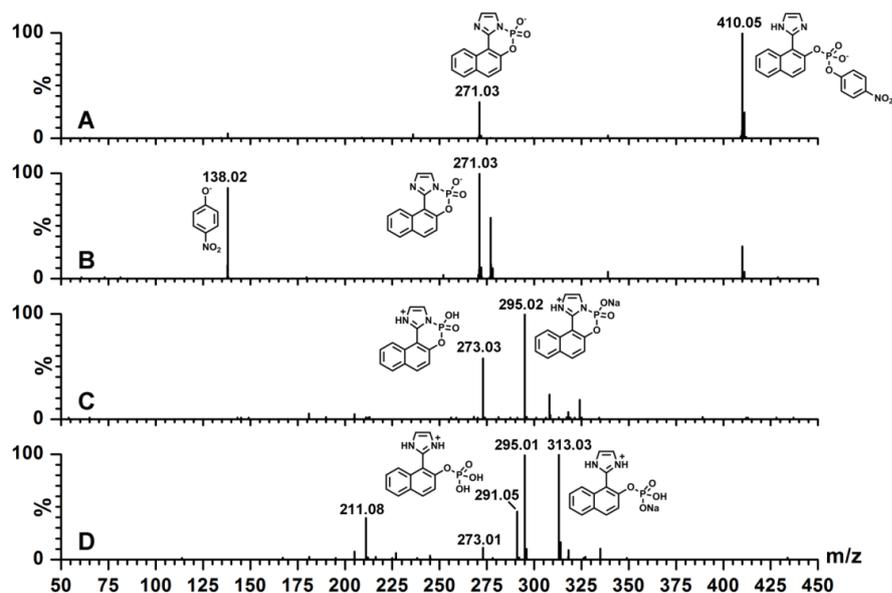


Figura 22. Espectro de ESI-MS referente à evolução da reação ao longo do tempo para a clivagem de 1Ni2P-pNP em 0,01M de NaOH após 2 e 40 min. De reação, espectros A e B (modo íon-negativo), respectivamente; e para a hidrólise do intermediário fosfoimidazol cíclico com 0,01M de HCOONa/HCOOH após 2 e 50 min. de reação, espectros C e D (modo íon-positivo), respectivamente.

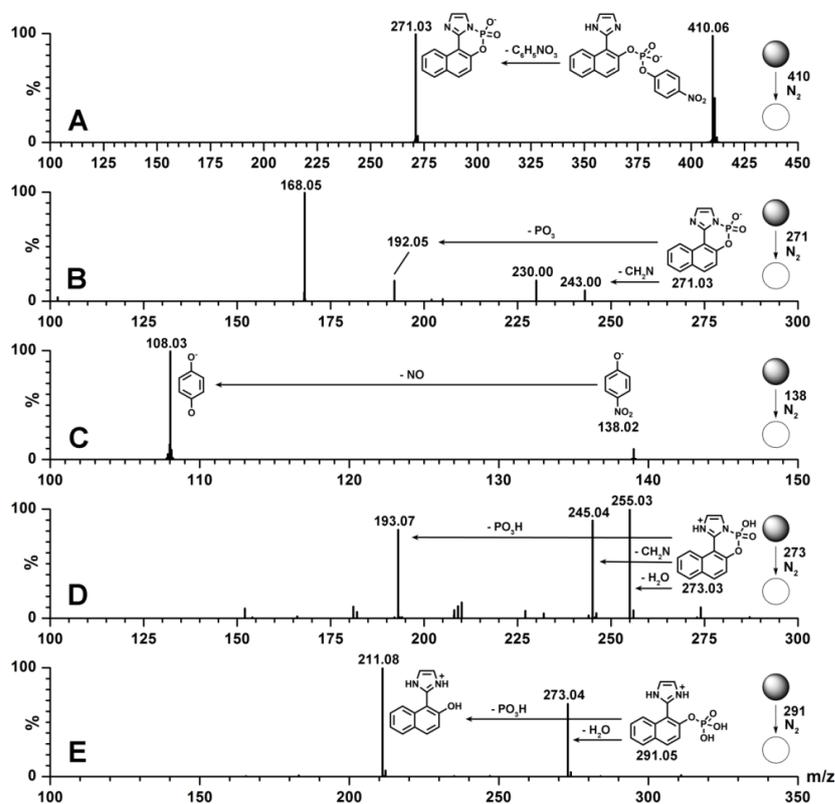


Figura 23. Espectro de ESI-MS/MS das espécies da reação do 1Ni2P-pNP.

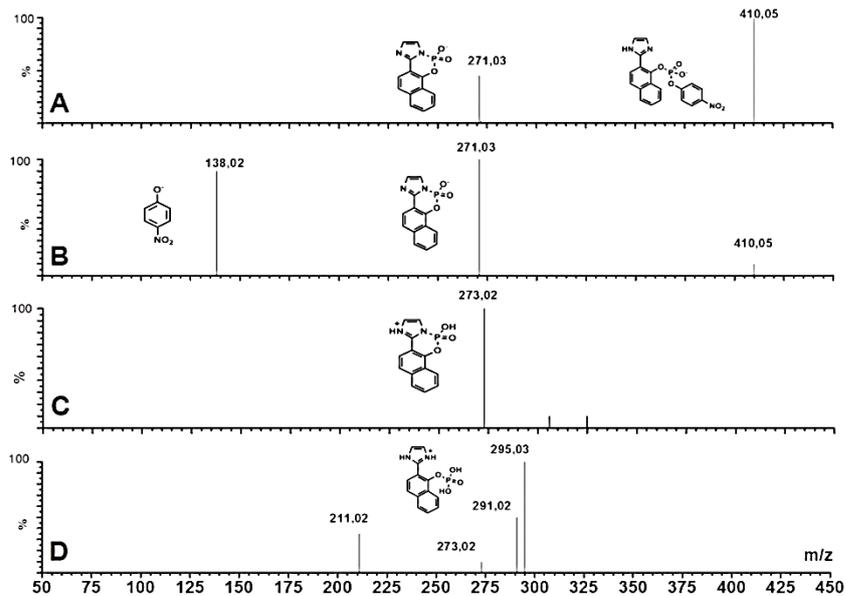


Figura 24. Espectro de ESI-MS referente à evolução da reação ao longo do tempo para a clivagem de 2Ni1P-pNP em 5mM de NH_4OH após 2 e 40 min. De reação, espectros A e B (modo íon-negativo), respectivamente; e para a hidrólise do intermediário fosfoimidazol cíclico com 0,01M de $\text{HCOO}^-/\text{HCOOH}$ após 2 e 50 min. de reação, espectros C e D (modo íon-positivo), respectivamente.

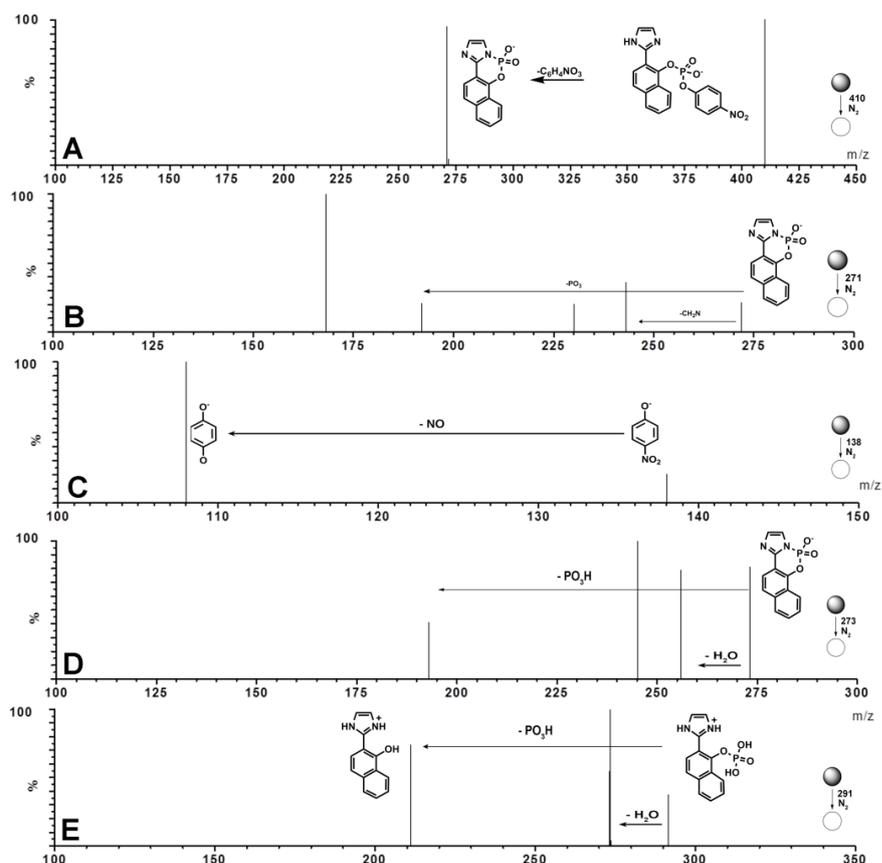


Figura 25. Espectro de ESI-MS/MS das espécies da reação do 2Ni1P-pNP.

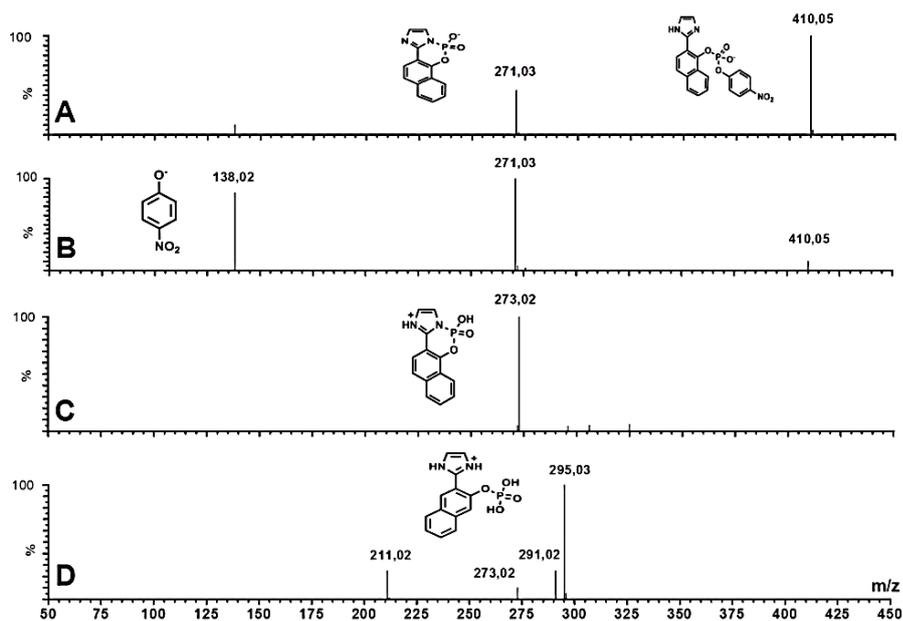


Figura 26. Espectro de ESI-MS referente à evolução da reação ao longo do tempo para a clivagem de 3Ni2P-pNP em 5mM de NH_4OH após 2 e 40 min. De reação, espectros A e B (modo íon-negativo), respectivamente; e para a hidrólise do intermediário fosfoimidazol cíclico com 0,01M de $\text{HCOO}^-/\text{HCOOH}$ após 2 e 50 min. de reação, espectros C e D (modo íon-positivo), respectivamente.

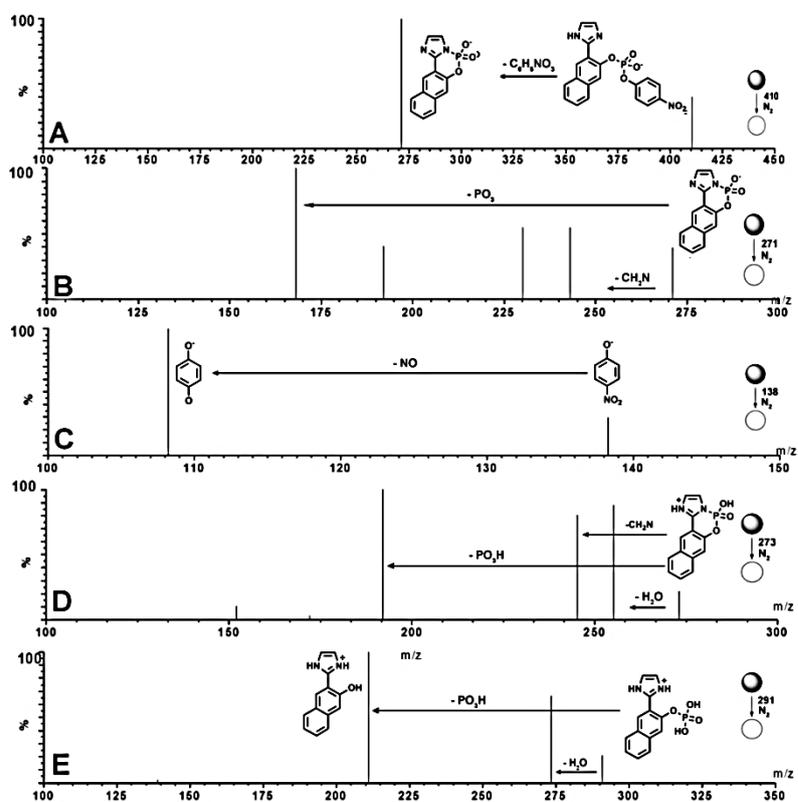


Figura 27. Espectro de ESI-MS/MS das espécies da reação do 3Ni2P-pNP.

A partir dos dados de RMN e as relações m/z das espécies obtidas nos espectros de ESI/MS-MS pode-se inferir que o grupo imidazol ataca nucleofilicamente o átomo de fósforo formando um intermediário fosfoimidazol tendo p-nitrofenol como grupo abandonador na reação de clivagem dos diésteres de fosfato. Na etapa subsequente, a hidrólise do intermediário fosfoimidazol ao respectivo monoéster.

4.3 Estudos cinéticos por espectroscopia UV-Vis

Estudos cinéticos por UV-vis foram realizados para as reações dos três diésteres de fosfato, a figura 28 apresenta espectros de UV-Vis para a clivagem de cada diéster indicando uma única reação conforme sugerido por ponto isobésticos bem definidos. A figura 29 sugere o mesmo comportamento para a reação de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos, que também mostra pontos isobésticos bem definidos.

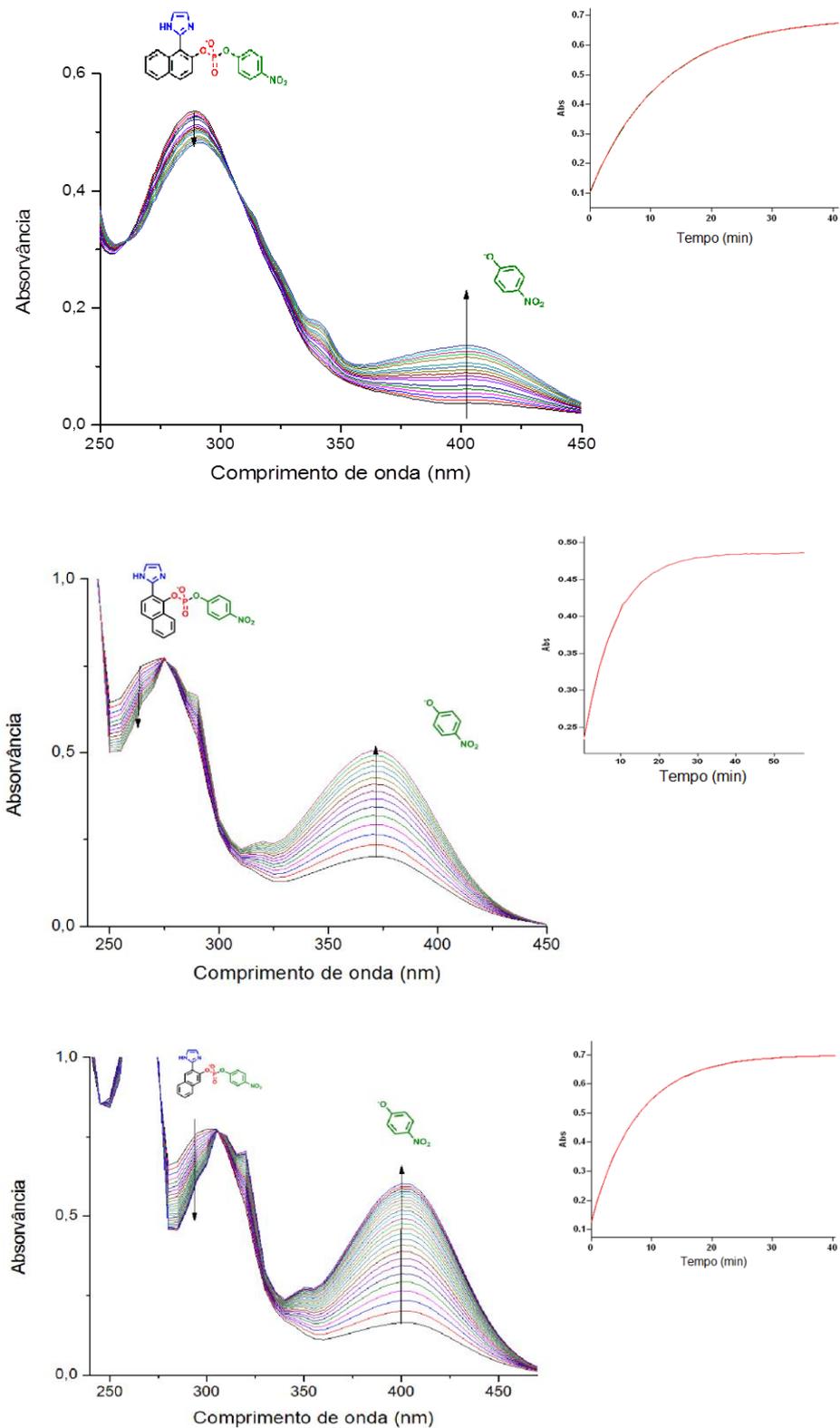


Figura 28. Espectros sucessivos de Uv-Vis da reação de clivagem dos fosfodiésteres 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP em função do tempo em pH 10,00 e 25°C. As setas indicam os sentidos de aumento ou diminuição da absorvância com o tempo. No inserto estão os dados de absorvância em 405 nm em função do tempo mostrando um comportamento cinético típico de primeira-ordem.

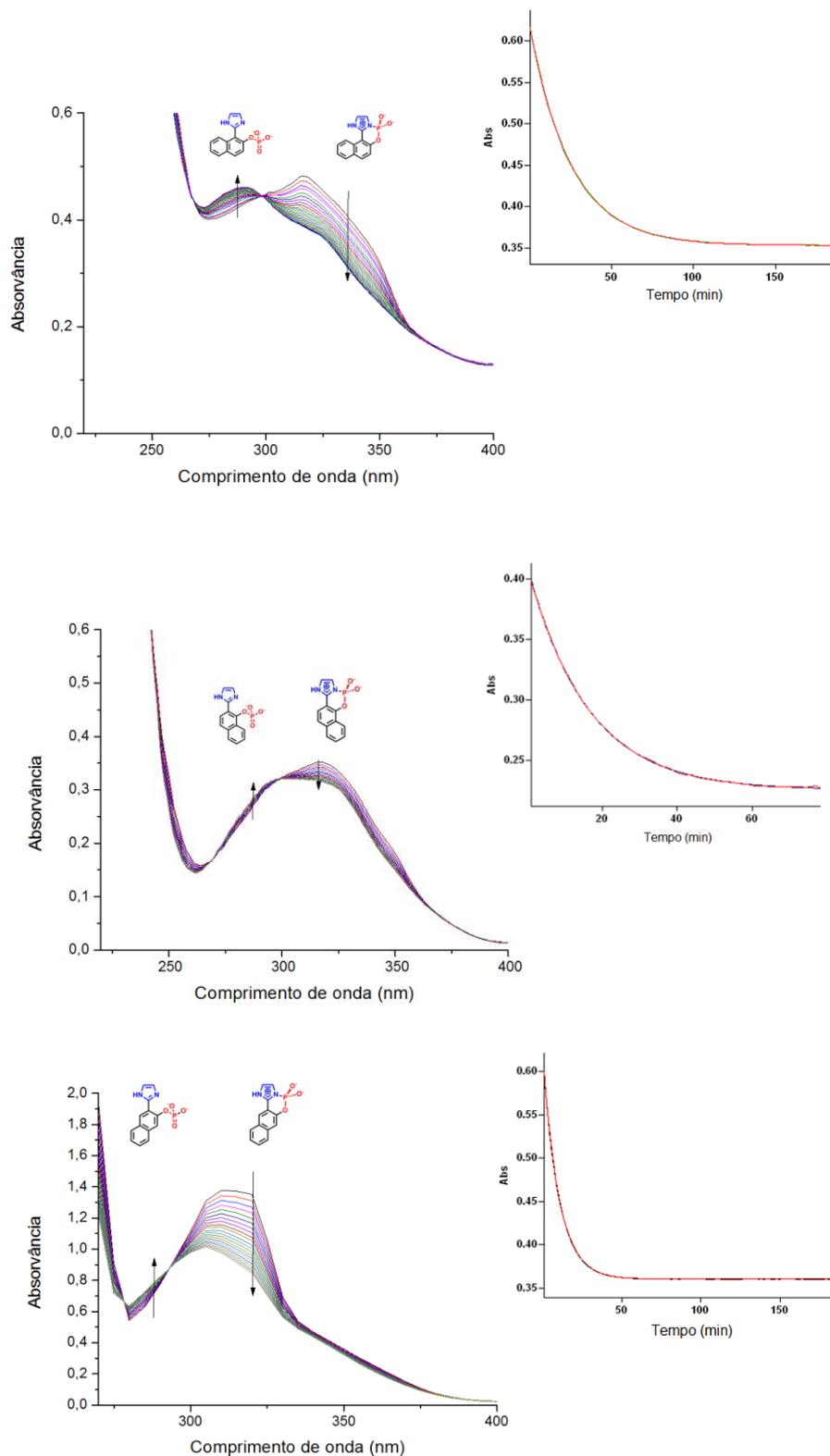


Figura 29. Espectros sucessivos de Uv-Vis da reação de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos 1Ni2P, 2Ni1P e 3Ni2P em função do tempo em pH 3,02 e 25°C. As setas indicam os sentidos de aumento ou diminuição da absorvância com o tempo. No inserto estão os dados de absorvância em 340 nm em função do tempo mostrando um comportamento cinético típico de primeira-ordem.

4.3.1 Comportamento cinético em função do pH

A figura 30 mostra os perfis das constantes reacionais observadas em função do pH para a reação de clivagem dos compostos 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP, 3Ni2P-pNP e de hidrólise dos seus respectivos fosfoimidazóis cíclicos a 45°C e força iônica igual a 1,0.

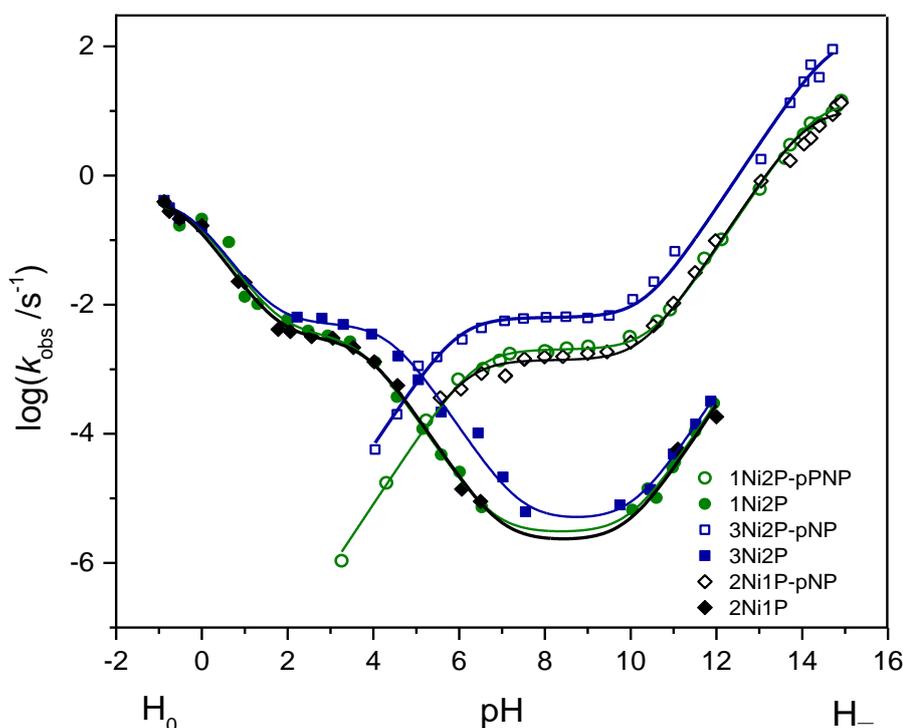
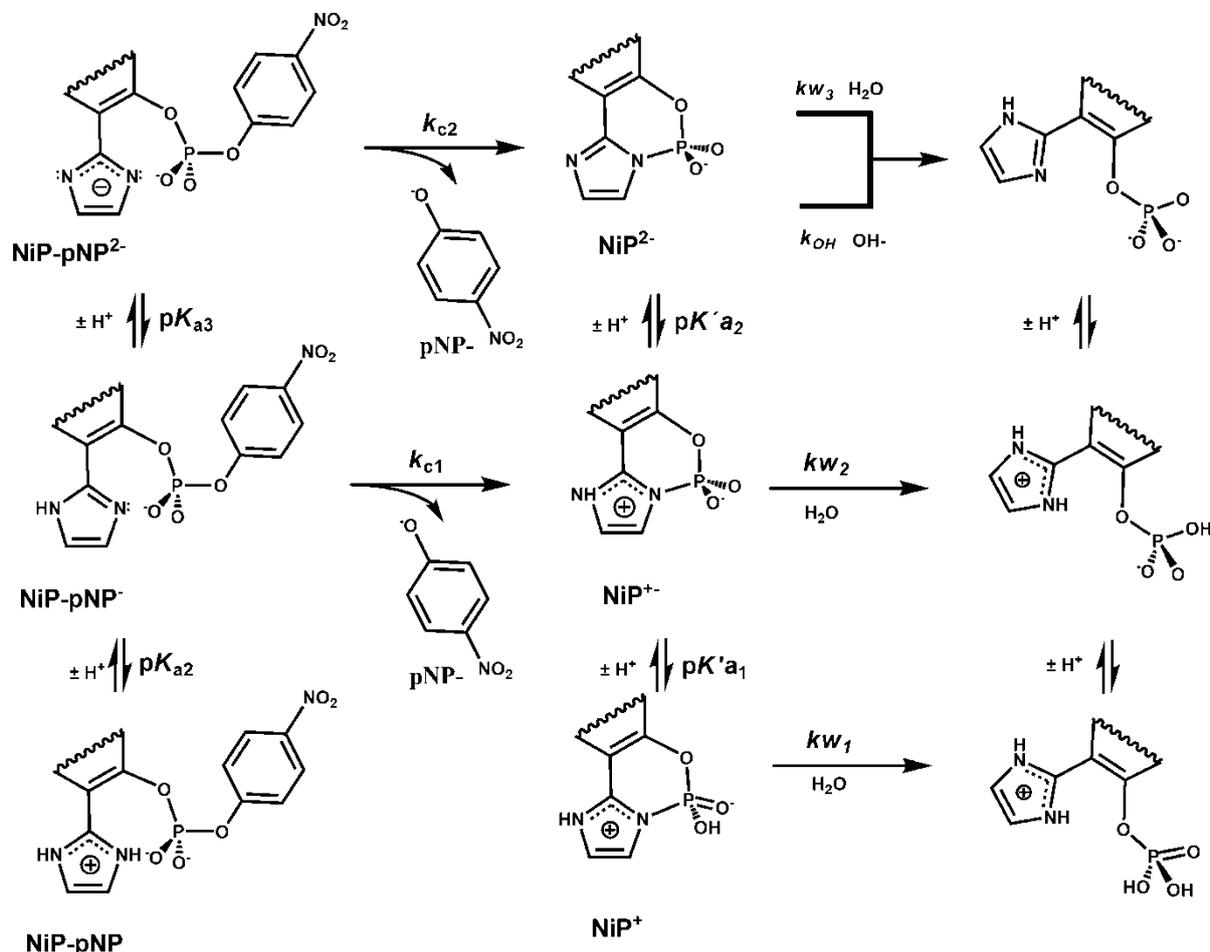


Figura 30. Perfis de pH para as reações de formação dos três intermediários cíclicos estudados e as reações de hidrólise destes intermediários. As linhas sólidas correspondem ao ajuste não linear de acordo com as equações 9 e 15.

Conforme indicado pelos dados de RMN e ESI-MS/MS a conversão dos fosfodiésteres nos respectivos monoésteres de fosfato segue um esquema reacional em duas etapas, sendo a primeira etapa de reação o ataque nucleofílico do grupo imidazol sobre o átomo de fósforo que rende o fosfoimidazol cíclico. Essa reação possui um perfil em formato sigmoidal que depende do estado de protonação dos reagentes. A segunda etapa envolve a hidrólise do intermediário fosfoimidazol cíclico que tem um perfil de pH que também depende do grau de protonação de diferentes espécies. Para a região em que as concentrações de HCl foram superiores a 1M (pH=0) foi utilizado a função H_0 de Hammett como expressa em expressa em misturas de H_2O/HCl de acordo com os equilíbrios de protonação de

protonação de bases fracas, anilinas substituídas, e nas condições em que as concentrações de KOH foram superiores a 1M (pH=14) foi utilizada a função H. como expressa em misturas de H₂O/KOH de acordo com os equilíbrios ácido-base de aminas aromáticas^[78].



Esquema 13. Esquema reacional proposto para a hidrólise dos diésteres de fosfato assistida pelo grupo imidazol.

4.3.2 Reações de clivagem dos fosfodiésteres

A partir do perfil dos dados cinéticos em função do pH e do esquema proposto para a reação de clivagem dos fosfodiésteres, a equação 2 foi proposta considerando a fração molar de cada espécie ativa e suas constantes de velocidade individuais:

$$k_{obs} = k_{c1} \cdot \chi_{\text{NiP}^-} + k_{c2} \cdot \chi_{\text{NiP}^{2-}} \quad \text{Eq.2}$$

onde,

k_{c1} , corresponde a constante de velocidade de reação de clivagem da espécie zwitteriônica;

k_{c2} , corresponde a constante de velocidade de reação de clivagem da espécie dianiônica ativa;

$\chi NiP - pNP^-$ e $\chi NiP - pNP^{2-}$ correspondem à fração molar de cada espécie ativa.

Os termos $\chi NiP - pNP^-$ e $\chi NiP - pNP^{2-}$ podem ser demonstrados em função das constantes termodinâmicas de desprotonação dos equilíbrios mostrados no esquema 13.

Inicialmente, para obter a equação desejada considera-se que:

$$\chi NiP - pNP^- = \frac{[NiP-pNP^-]}{[NiP-pNP]+[NiP-pNP^-]+[NiP-pNP^{2-}]} \quad \text{Eq.3}$$

$$\chi NiP - pNP^{2-} = \frac{[NiP-pNP^{2-}]}{[NiP-pNP]+[NiP-pNP^-]+[NiP-pNP^{2-}]} \quad \text{Eq.4}$$

Cada espécie está relacionada a $[H^+]$, K_{a2} e K_{a3} conforme as Equações 5 e 6:

$$[NiP - pNP] = \frac{[NiP-pNP^-].[H^+]}{K_{a2}} \quad \text{Eq.5}$$

$$[NiP - pNP^{2-}] = \frac{[NiP-pNP^-].K_{a3}}{[H^+]} \quad \text{Eq.6}$$

Substituindo as Eqs. 5 e 6 na Eq. 3 temos:

$$\chi NiP - pNP^- = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{K_{a3}}{[H^+]}}; \quad \text{Eq.7}$$

de maneira análoga substituímos os valores para $\chi NiP - pNP^{2-}$ e obtemos:

$$\chi NiP - pNP^{2-} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]^2}{K_{a2}.K_{a3}} + \frac{[H^+]}{K_{a3}}}; \quad \text{Eq.8}$$

Substituindo as Eqs. 7 e 8 na Eq.2 obtemos a Eq.9 em termos de valores mensuráveis e conhecidos:

$$k_{obs} = k_{c1} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{K_{a3}}{[H^+]}} \right) + k_{c2} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{[H^+]^2}{K_{a2}.K_{a3}} + \frac{[H^+]}{K_{a3}}} \right); \quad \text{Eq.9}$$

A Eq.9 foi utilizada no ajuste não-linear dos dados cinéticos em função do pH para clivagem dos fosfodiésteres, obtendo os parâmetros cinéticos e de equilíbrio apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Constantes cinéticas e constantes de dissociação das espécies ativas para a formação dos fosfoimidazóis cíclicos a 45°C e $\mu=1$ (KCl) calculadas a partir da equação 2.

Constantes	Valores		
	1Ni2P-pNP	2Ni1P-pNP	3Ni2P-pNP
$k_{c1}, 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$2,10 \pm 0,08$	$1,35 \pm 0,08$	$6,28 \pm 0,05$
$k_{c2}, \text{ s}^{-1}$	$5,2 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,3$	154 ± 15
pKa_2	$6,40 \pm 0,03$	$6,15 \pm 0,08$	$5,98 \pm 0,06$
pKa_3	$13,81 \pm 0,03$	$13,63 \pm 0,04$	$14,69 \pm 0,05$

Os dados obtidos mostram que os valores de pKa_2 para os três fosfodiésteres são próximos à valores encontrados para fosfohistidinas protonadas e atribuídos ao grupo imidazólio^[58], as diferenças nos valores dentre os três compostos se deve a existência de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o imidazólio e o grupo fosfato, que diminui a tendência de perda do próton (Figura 31). Os parâmetros cinéticos k_{c1} do 1Ni2P-pNP e 2Ni1P-pNP são semelhantes e cerca de 3 vezes menor do que observado para 3Ni2P-pNP, enquanto que k_{c2} do 1Ni2P-pNP e 2Ni1P-pNP são semelhantes e cerca de 30 vezes menor do que do 3Ni2P-pNP, tais diferenças ocorrem, provavelmente, ocasionadas por efeitos conformacionais que favorecem o ataque nucleofílico do grupo imidazol exercendo influência nas velocidades de reação dos três compostos. O 3Ni2P-pNP reage mais rapidamente devido a sua maior liberdade conformacional, que favorece uma taxa de encontro mais elevada dos grupos reativos aumentando a população de moléculas com conformações favoráveis para a reação^[21, 22].

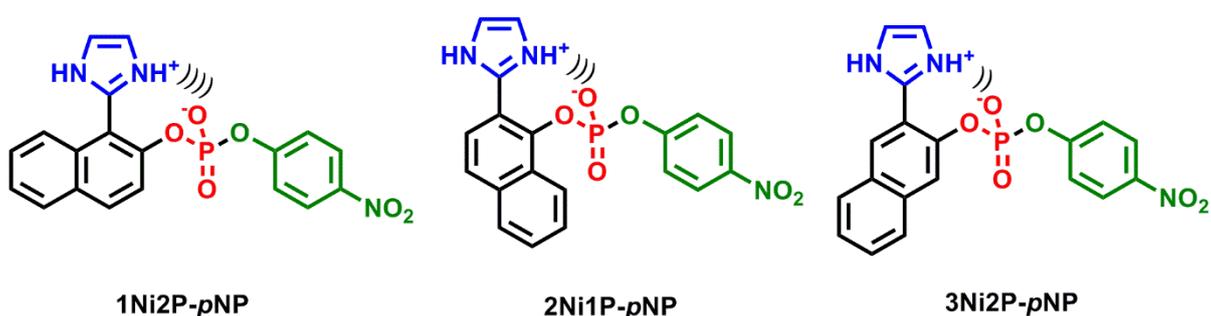


Figura 31: Interação do próton do grupo imidazol com o grupo fosfato nos três compostos estudados.

A nucleofilicidade do grupo imidazol também foi avaliada frente à nucleófilos externos que poderiam competir com o grupo imidazol para o ataque ao átomo de fósforo do fosfodiéster. O gráfico na Figura 32 relaciona a razão da constante cinética observada em água (k_o) com a constante cinética observada na presença

de determinado nucleófilo (k_{nuc}), mostrando que o grupo imidazol é um nucleófilo potente, mesmo na presença de 1M de hidroxilamina, um potente nucleófilo na clivagem de ésteres de fosfato^[79, 80].

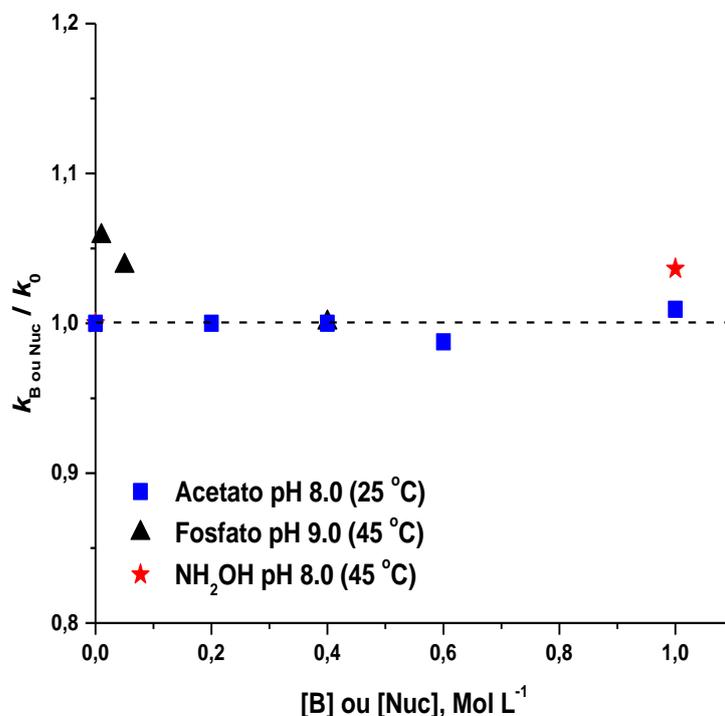


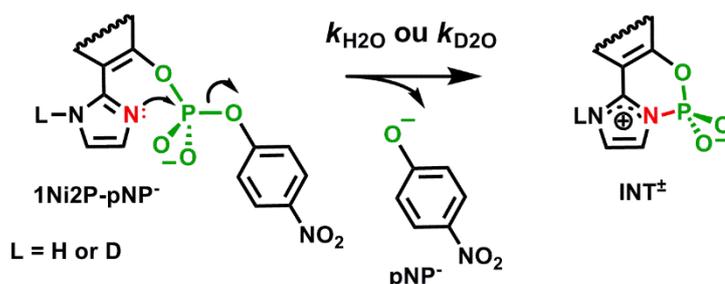
Figura 32. Efeitos dos nucleófilos sobre a reação de formação do 1Ni2P cíclico. Os valores no eixo das ordenadas referem à razão entre k_{obs} na presença e ausência dos nucleófilos e condições indicadas.

Os estudos na presença dos íons acetato e fosfato também descartam o mecanismo de catálise básica-geral, pois a presença das bases acetato e fosfato no meio reacional não alteraram os valores das constantes observadas evidenciando que não existe transferência de prótons na etapa determinante de reação.

Os dados de estudos de efeito isotópico cinético do solvente corroboram a observação acima (Tabela 2). Os valores da razão das constantes observadas obtidas em H₂O e D₂O ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$) sob as mesmas condições de temperatura e acidez são ligeiramente superiores a 1 e atribuídos somente a um pequeno efeito secundário referente à porção N-L no anel imidazólico (vide Esquema 14).

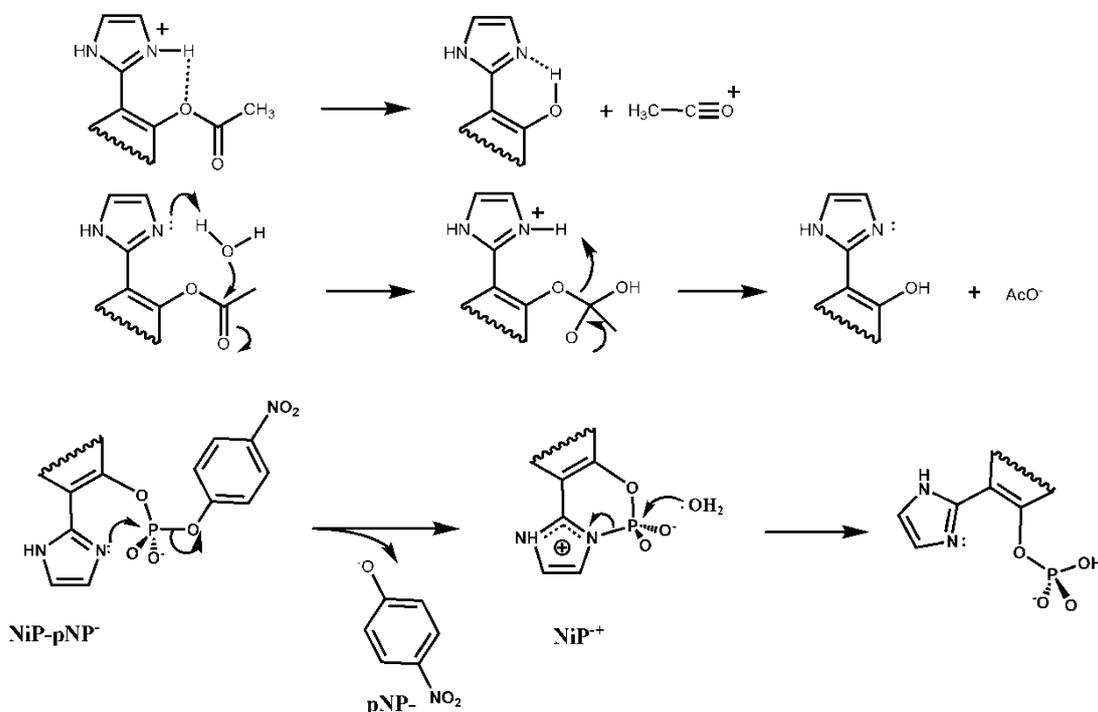
Tabela 2. Valores das constantes de velocidade observada para a formação dos fosfoimidazóis cíclicos em H₂O e D₂O e o efeito isotópico do solvente ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$) a 45°C e $\mu=1$ (KCl).

Diéster de fosfato	pL= (pH ou pD)	$k_{\text{H}_2\text{O}}, 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{D}_2\text{O}}, 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{D}_2\text{O}}$
1Ni2P-pNP	8,51	2,1	1,7	1,2
2Ni1P-pNP	8,42	1,6	1,5	1,1
3Ni2P-pNP	8,50	6,5	5,1	1,3



Esquema 14. Esquema representativo do efeito isotópico do solvente.

O mecanismo de reação proposto acima difere substancialmente do proposto para a hidrólise de *orto*-(1H-imidazol-2-il)naftil-acetatos (dados não-publicados), em que se observa catálise ácida-geral intramolecular do grupo imidazol protonado e básica-geral de sua base conjugada.



Esquema 15. Diferenças dos mecanismos reacionais da hidrólise de acetatos e 4-nitrofenilfosfatos de *orto*-(1H-imidazólio-2-il)naftila.

Na busca pelo detalhamento sobre o mecanismo reacional do ataque intramolecular do grupo imidazol nos fosfodiésteres obtiveram-se os parâmetros termodinâmicos que são a essência do caminho reacional tomado por uma reação química.

As figuras 33, 34 e 35 mostram os perfis de $\log K_{obs}$ em função do pH em diferentes temperaturas para a reação de formação dos três fosfoimidazóis cíclicos, os dados foram tratados com a Eq.9 para o cálculo da constante cinética k_{c1}

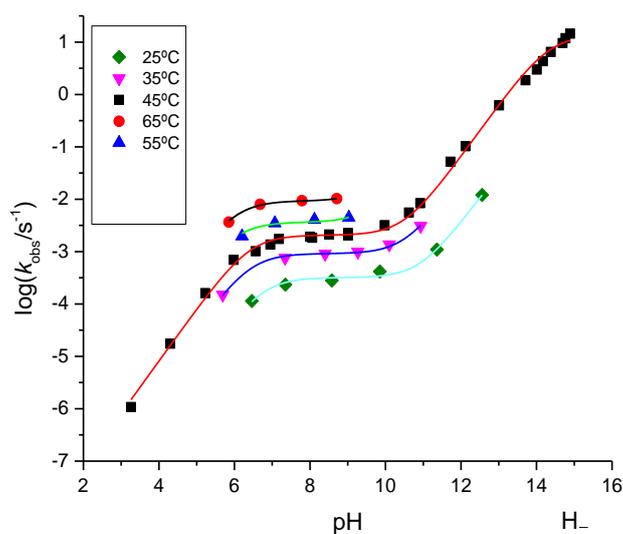


Figura 33. Perfil de pH em diferentes temperaturas a reação de clivagem do 1Ni2P-pNP as linhas sólidas correspondem aos ajustes-não-lineares obtidos a partir da Eq.9.

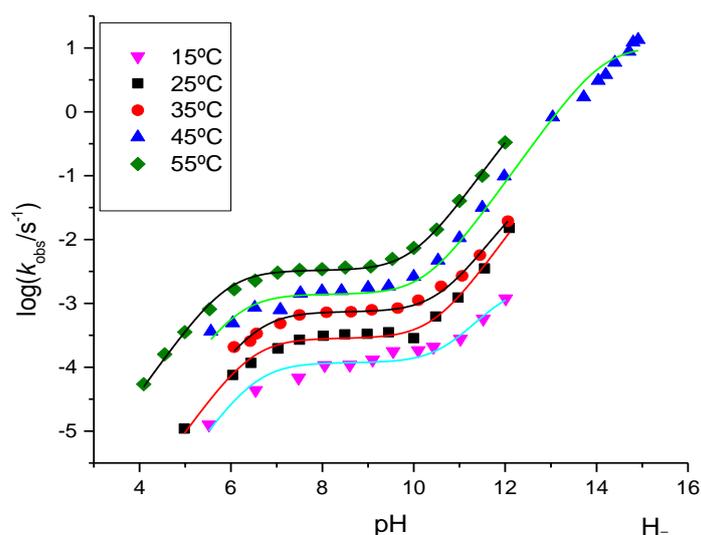


Figura 34. Perfil de pH em diferentes temperaturas a reação de clivagem do 2Ni1P-pNP as linhas sólidas correspondem aos ajustes-não-lineares obtidos a partir da Eq.9.

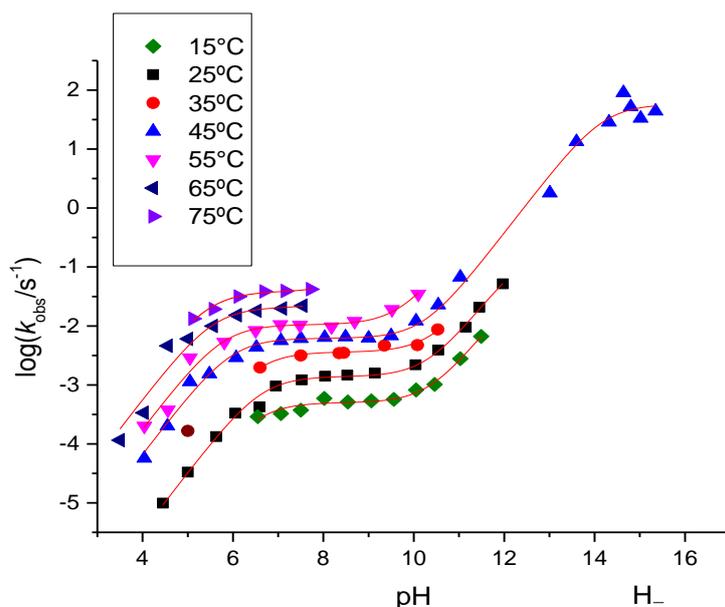


Figura 35: Perfil de pH em diferentes temperaturas a reação de clivagem do 3Ni2P-pNP as linhas sólidas correspondem aos ajustes-não-lineares obtidos a partir da Eq.9.

Os parâmetros de ativação foram calculados utilizando-se a equação de Eyring^[81] (Equação 10) e os dados de k_{c1} plotados em função da temperatura na Figura 36. Os parâmetros de ativação estão mostrados na Tabela 3.

$$\ln\left(\frac{k_c}{T}\right) = -\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{R}\right) \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) \quad \text{Eq.10}$$

onde,

k_c corresponde ao valor da constante de velocidade

T, é a temperatura absoluta;

ΔH^\ddagger , é a entalpia padrão de ativação;

ΔS^\ddagger , é a entalpia padrão de ativação;

k_B , a constante de Boltzmann;

R, a constante dos gases ideais;

h, a constante de Planck.

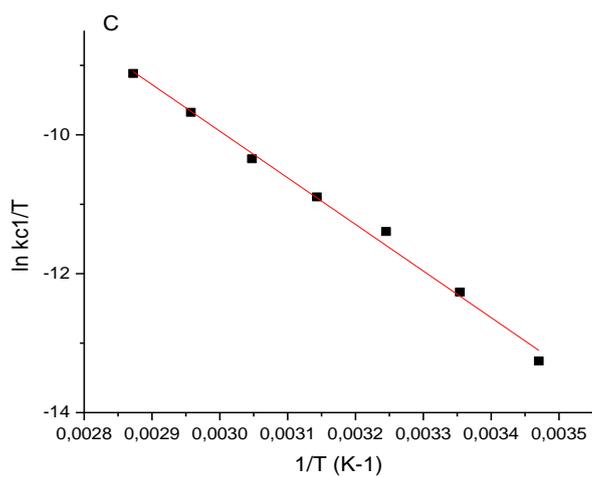
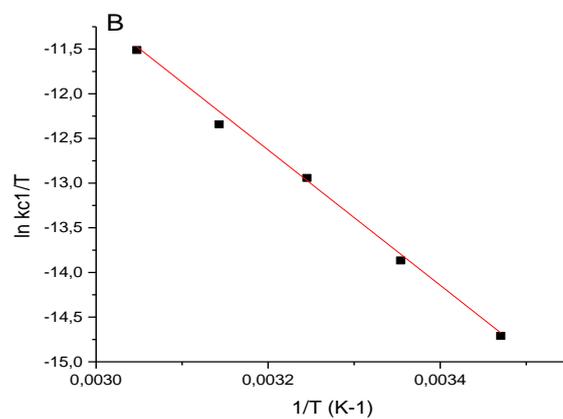
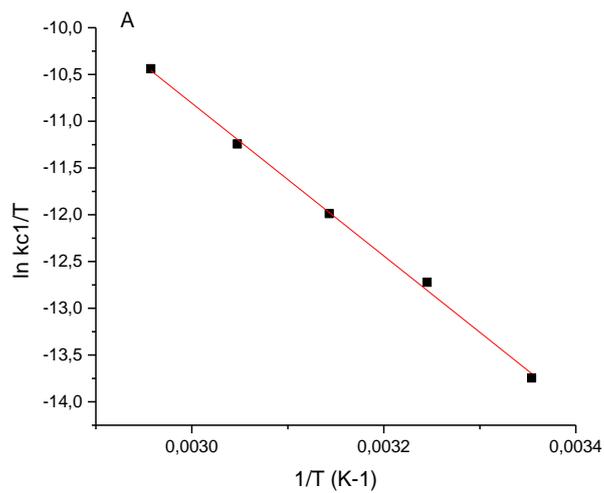


Figura 36. Gráfico de $\ln(k_{c1}/T)$ vs T^{-1} e seu ajuste linear utilizando a equação de Eyring para a reação de clivagem dos diésteres de fosfato cíclicos: A para 1Ni2P-pNP, B para 2Ni1P-pNP e C para 3Ni2P-pNP.

Tabela 3. Parâmetros de ativação para as reações de clivagem dos diésteres de fosfato considerando a etapa de ataque intramolecular representada pela constante de velocidade k_{c1} .

Diéster de fosfato	ΔH^\ddagger (kcal mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (e.u.)
1Ni2P-pNP	16,22 ± 0,02	-20,49 ± 0,05
2Ni1P-pNP	14,89 ± 0,02	-25,22 ± 0,05
3Ni2P-pNP	13,33 ± 0,03	-27,45 ± 0,08

Os valores de entropia encontrados são bem negativos comparados ao observado para outras de reações de ciclização, por exemplo, a reação S_N2 intramolecular em bromoalquilaminas apresenta valores ligeiramente positivos^[82]. De fato, na reação da espécie NiP-pNP⁻, que contém um grupo imidazol neutro há uma deslocalização de carga no estado de transição, com isso, a entropia do sistema diminui, pois o estado de transição se encontra com alto grau de solvatação.

As diferenças observadas nos valores de ΔS^\ddagger para os três diésteres pode ser explicada em termos de dois fatores: (i) a reação do 3Ni2P-pNP experimenta uma maior solvatação na direção do estado de transição, quando comparada as reações dos demais compostos; (ii) o 3Ni2P-pNP, que apresenta maior número de graus conformacionais experimenta maior penalidade na direção do estado reativo, enquanto as demais com maior restrição conformacional apresentam um menor número de possibilidades de confôrmeros reativos. É interessante notar que tais dados diferem dos dados para os acetato de *orto*-(1H-imidazol-2-il) naftila (dados não publicados), estes possuem valores muito próximos de entropia de ativação entre si com valores de -28,1 e.u que são muito próximos entre si.

Embora, ambas as séries de compostos apresentem valores substancialmente negativos indicando estados de transição bem solvatados, as diferenças entre os isômeros sugerem que fatores conformacionais podem afetar a catálise intramolecular nos diésteres de fosfato mais eficientemente do que na catálise base-geral nos ésteres carboxílicos. Outro fator pode ser o maior número de moléculas de água envolvidas na solvatação dos estados reacionais dos diésteres de fosfato, que apresentam maior dispersão de carga no estado de transição e, assim, maior dependência com relação à solvatação.

A molaridade efetiva no ataque nucleofílico do grupo imidazol sobre o átomo de fósforo do grupo fosfodiéster foi calculada considerando a razão dos valores da constante de primeira-ordem k_{c1} e da constante de segunda-ordem (k_2) para o

ataque bimolecular de um nucleófilo de pK_a 7 (ácido conjugado do imidazol) sobre um diéster de fosfato com p-nitrofenolato como grupo abandonador (Figura 37). A reação bimolecular é consideravelmente lenta para ser medida e a constante de segunda-ordem foi prevista a partir de dados para compostos mais ativados e relações de energia livre (RLEL) como segue:

- i) Dados de β_{lg} (*beta leaving group*) a 39°C são conhecidas para o ataque nucleofílico de três piridinas substituídas sobre aril metil fosfatos substituídos (tabela 4)^[83]. Um gráfico de β_{lg} em função do pK_{nuc} (pK_a^{HA} de cada piridina) fornece uma relação linear da qual se obtém o valor de β_{lg} de -1,02 para um nucleófilo nitrogenado de pK_{nuc} igual a 7. (Figura 38), o valor de β_{lg} indica a carga efetiva e o quanto a ligação do grupo abandonador foi desfeita no estado transição.

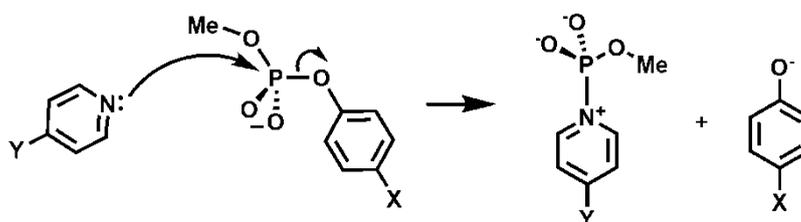


Figura 37. Reação utilizada como guia para obtenção dos valores de β_{lg} .

Tabela 4. Tabela de valores para a construção da relação linear para obtenção de valor de β_{lg} para a reação com um nucleófilo nitrogenado com pK_{nuc} de 7.

Nucleófilo	β_{lg} (39°C) ^[83]	pK_{nuc}
4-aminopiridina	0,98	9,52
4-metilpiridina	1,03	6,7
Piridina	1,06	5,16

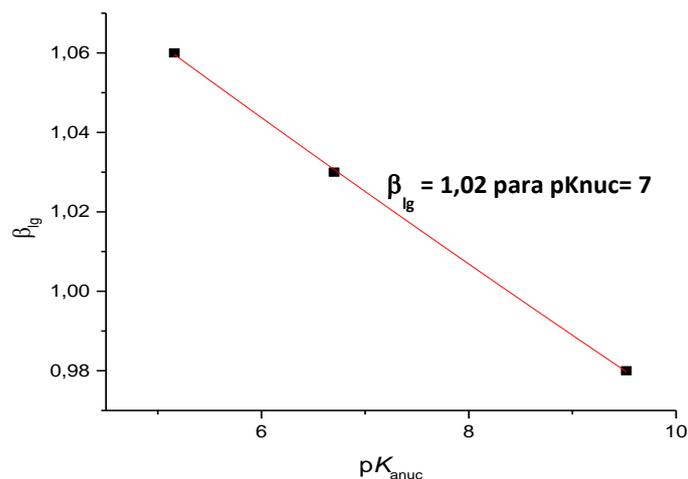


Figura 38. Relação de β_{lg} em função do pK_{nuc} para a reação de piridinas com aril metil fosfatos à 39°C.

- ii) O valor de β_{lg} de -1,02 a 39°C foi corrigido para 25°C considerando a Eq.11^[84].

$$\beta_{lg} \cdot T_1 = \beta_{lg} \cdot T_2 \quad \text{Eq.11}$$

- iii) A constante de segunda-ordem para o ataque nucleofílico de imidazol em bis-(2,4-dinitrofenil) fosfatos ($pK_{lg}=4,07$) é conhecida e igual a $1,42 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a 25°C^[85]. Dessa forma, pode-se calcular o logaritmo da constante de velocidade de segunda-ordem para a reação de um diéster de fosfato com pK_{lg} igual a zero a partir da Eq. 12.

$$\log k_2 = \beta_{lg} \cdot p k_{lg} + \log k_2^{pK_{lg}=0} \quad \text{Eq.12}$$

- iv) A partir da Eq.13 calculou-se um valor de $k_2=7,0 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C para o ataque intermolecular do imidazol sobre um diéster de fosfato de pK_{lg} igual a 7,15. Este valor foi utilizado para o cálculo da molaridade efetiva como indicado acima.

$$\log k_2 = -1,07 + p k_{lg} + 0,65 \quad \text{Eq.13}$$

Verificou-se que fatores de estericidade entre o imidazol e o anel naftalênico forçam um determinado ângulo de ataque do grupo imidazol gerando uma que prejudica o ataque do imidazol e, conseqüentemente, diminui a efetividade molar.

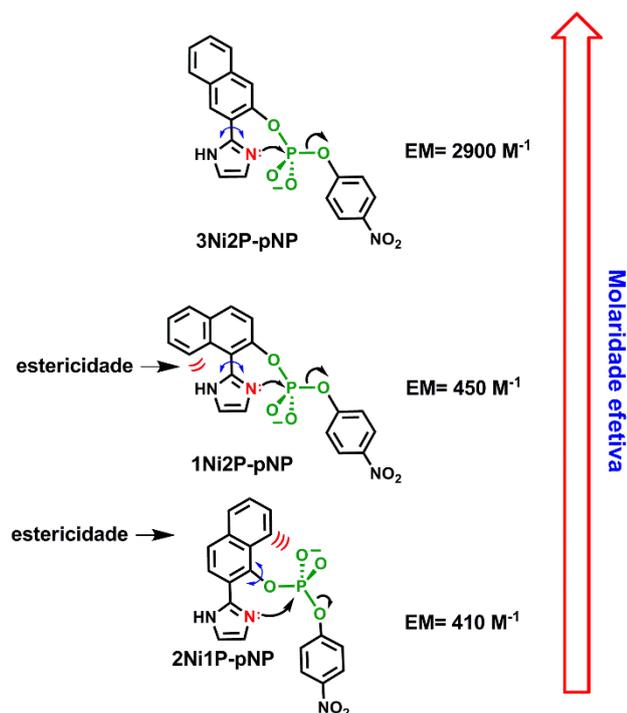


Figura 39. Representação do aumento da molaridade efetiva devido à efeitos estéricos estruturais.

Sob outro escopo, pode relacionar os efeitos de estericidade com a variação da amplitude da janela reacional proposta por Menger. O impedimento estérico impede com que molécula assuma uma conformação mais adequada para a reação, porém se ela estiver dentro de uma gama de conformações, chamada janela reacional, a reação prosseguirá^[22].

4.3.3 Reações de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos

De acordo com o perfil de $\log k_{obs}$ em função do pH para a hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos (Figura 30), considerando a fração molar de cada espécie ativa no Esquema 13 e suas constantes de velocidade individuais, foi proposta a Eq.14:

$$k_{obs} = k_{w1} \cdot \chi NiP^{+} + k_{w2} \cdot \chi NiP^{+-} + [k_{w3} + (k_{OH} \cdot [OH^{-}])]. \chi NiP^{-} \quad \text{Eq.14}$$

onde,

k_{w1} corresponde a constante de velocidade de primeira-ordem de hidrólise espontânea da espécie catiônica;

k_{w2} corresponde a constante de velocidade de primeira-ordem de hidrólise espontânea da espécie zwitteriônica;

k_{w3} corresponde a constante de velocidade de primeira-ordem de hidrólise espontânea da espécie aniônica;

k_{OH} corresponde a constante de velocidade de segunda-ordem da reação de hidrólise básica da espécie aniônica;

χNiP^+ , χNiP^{+-} e χNiP^- correspondem à fração molar de cada espécie ativa.

A partir da Equação 14 desenvolveu-se a Eq.15 como uma função dos parâmetros termodinâmicos dos equilíbrios envolvidos e da acidez do meio:

$$k_{obs} = k_{w1} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{Ka'_1}{[H^+]} + \frac{Ka'_1 \cdot K'a_2}{[H^+]^2}} \right) + k_{w2} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{Ka'_1} + \frac{K'a_2}{[H^+]}} \right) + (k_{w3} + k_{OH} \cdot [OH^-]) \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K'a_2} + \frac{[H^+]^2}{Ka'_1 \cdot K'a_2}} \right) \quad \text{Eq. 15}$$

Com base na Equação15 e o ajuste não-linear dos dados cinéticos na Figura 28 obtiveram-se os parâmetros cinéticos e termodinâmicos para as reações de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos (Tabela 5). A confirmação da existência de k_{w3} se deu pelo perfil de pH obtido somente em 55° C, pois em temperaturas mais baixas a reação é demasiadamente lenta ($t_{1/2} = 61$ horas a 55 °C).

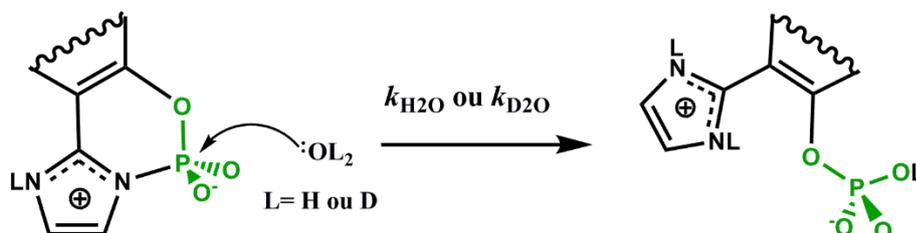
Tabela 5. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos em 45,0 °C e $\mu = 1,0$ (KCl).

Constantes	Valores		
	1Ni2P	2Ni1P	3Ni2P
k_{w1}, s^{-1}	0,41 ± 0,04	0,47 ± 0,05	0,43 ± 0,05
$k_{w2}, 10^3 s^{-1}$	3,5 ± 0,3	2,96 ± 0,03	5,0 ± 0,4
$k_{OH}, M^{-1} \cdot s^{-1}$	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,005	0,045 ± 0,007
$k_{w3}, 10^6 s^{-1}$	3 ± 1	2 ± 1	5 ± 2
$pKa1$	-0,29 ± 0,07	-0,45 ± 0,06	-0,28 ± 0,06
$pKa2$	3,72 ± 0,06	3,83 ± 0,06	4,40 ± 0,06

Os valores das constantes cinéticas para os três compostos são muito próximos entre si indicando que estruturalmente os intermediários possuem geometrias e reatividades muito similares sem dependência com relação a requerimentos geométricos impostos pelo anel naftalênico. O primeiro valor de pKa

refere-se à protonação do grupo fosfato dos intermediários e são valores esperados de acordo com a literatura^[86]. O segundo pKa refere-se à constante de desprotonação do grupo imidazol protonado.

O mecanismo proposto de hidrólise envolve a catálise ácida específica na formação das espécies NiP^+ e NiP^\pm que reage nucleofilicamente com água. A espécie NiP^- sofre hidrólise, provavelmente, por catálise ácida-geral ou básica específica dependendo da concentração de íons hidróxido no meio. Efeitos isotópicos do solvente a 45 °C foram determinados na região de k_{w2} do perfil de $\log k_{\text{obs}}$ versus pH. A tabela 6 fornece os valores obtidos para cada composto e verifica-se a partir dos dados, um efeito isotópico primário que indica que a participação de pelo menos uma molécula do solvente na etapa determinante da velocidade de reação.



Esquema 16. Esquema representativo do efeito isotópico do solvente para a hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos.

Tabela 6. Valores das constantes de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos em H_2O e D_2O e o efeito isotópico do solvente ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$) a 45°C e $\mu=1\text{M}$ (KCl).

Composto	pL=(pH ou pD)	$k_{\text{H}_2\text{O}}, 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{D}_2\text{O}}, 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{D}_2\text{O}}$
1Ni2P	2,50	3,94	1,69	2,33
	3,00	3,31	1,49	2,22
	3,50	2,69	0,98	2,74
2Ni1P	2,50	3,22	1,27	2,54
	3,00	3,04	1,20	2,53
	3,50	2,16	1,04	2,10
3Ni2P	2,04	8,58	4,25	2,10
	2,46	6,09	3,22	2,02
	3,06	5,13	2,45	1,90

De maneira análoga à reação de formação dos fosfoimidazóis cíclicos, a partir da equação de Eyring (Equação 8) foram obtidos os parâmetros termodinâmicos para k_{w2} para a hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos. As figuras 40, 41, 42 mostram os perfis de pH em diferentes temperaturas para a reação de

hidrólise dos três fosfoimidazóis cíclicos e a tabela 7 fornece os parâmetros obtidos para cada intermediário.

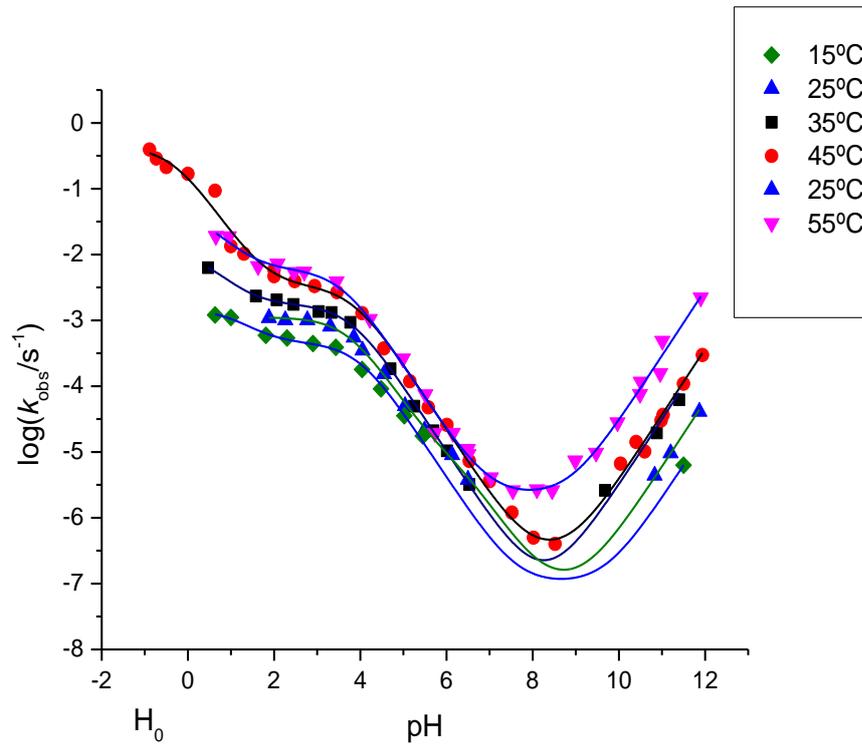


Figura 40. Perfis de pH $\log k_{\text{obs}}$ em função do pH em diversas temperaturas para a reação de hidrólise do intermediário cíclico 1Ni2P com seus respectivos ajustes não-lineares considerando a Eq. 15.

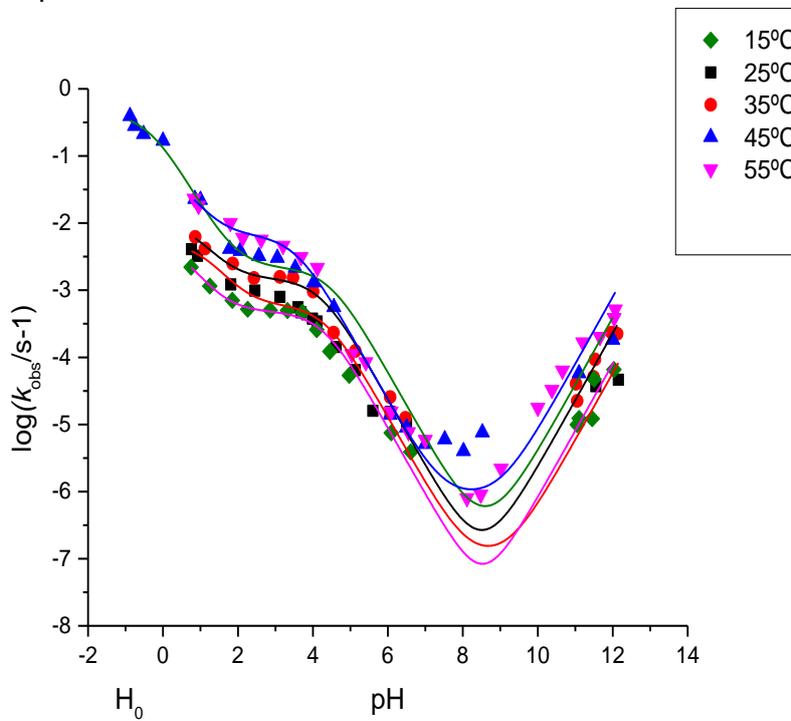


Figura 41. Perfis de pH $\log k_{\text{obs}}$ em função do pH em diversas temperaturas para a reação de hidrólise do intermediário cíclico1Ni2P com seus respectivos ajustes não-lineares considerando a Eq. 15.

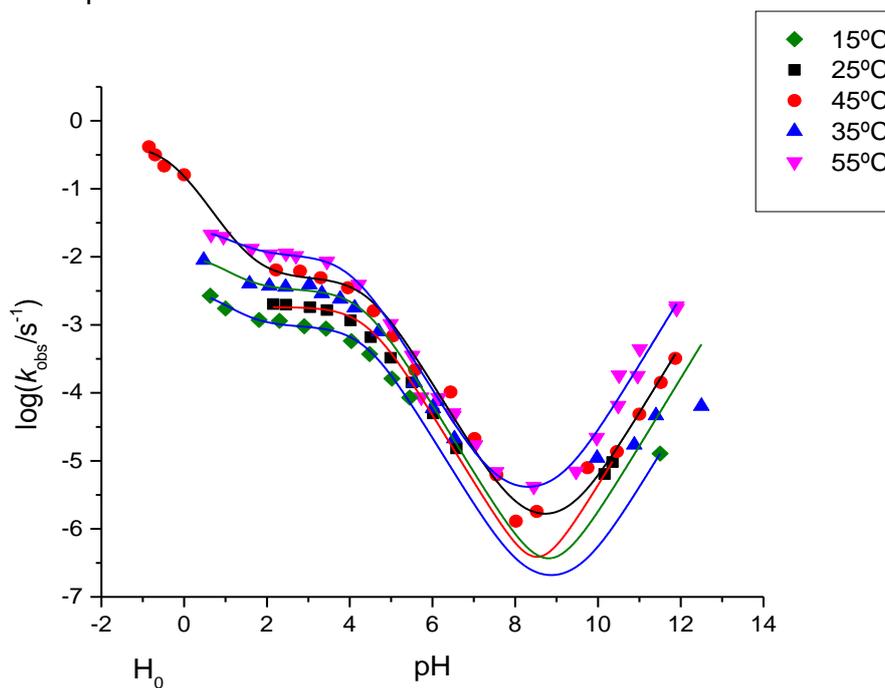


Figura 42. Perfis de pH $\log k_{\text{obs}}$ em função do pH em diversas temperaturas para a reação de hidrólise do intermediário cíclico1Ni2P com seus respectivos ajustes não-lineares considerando a Eq. 15.

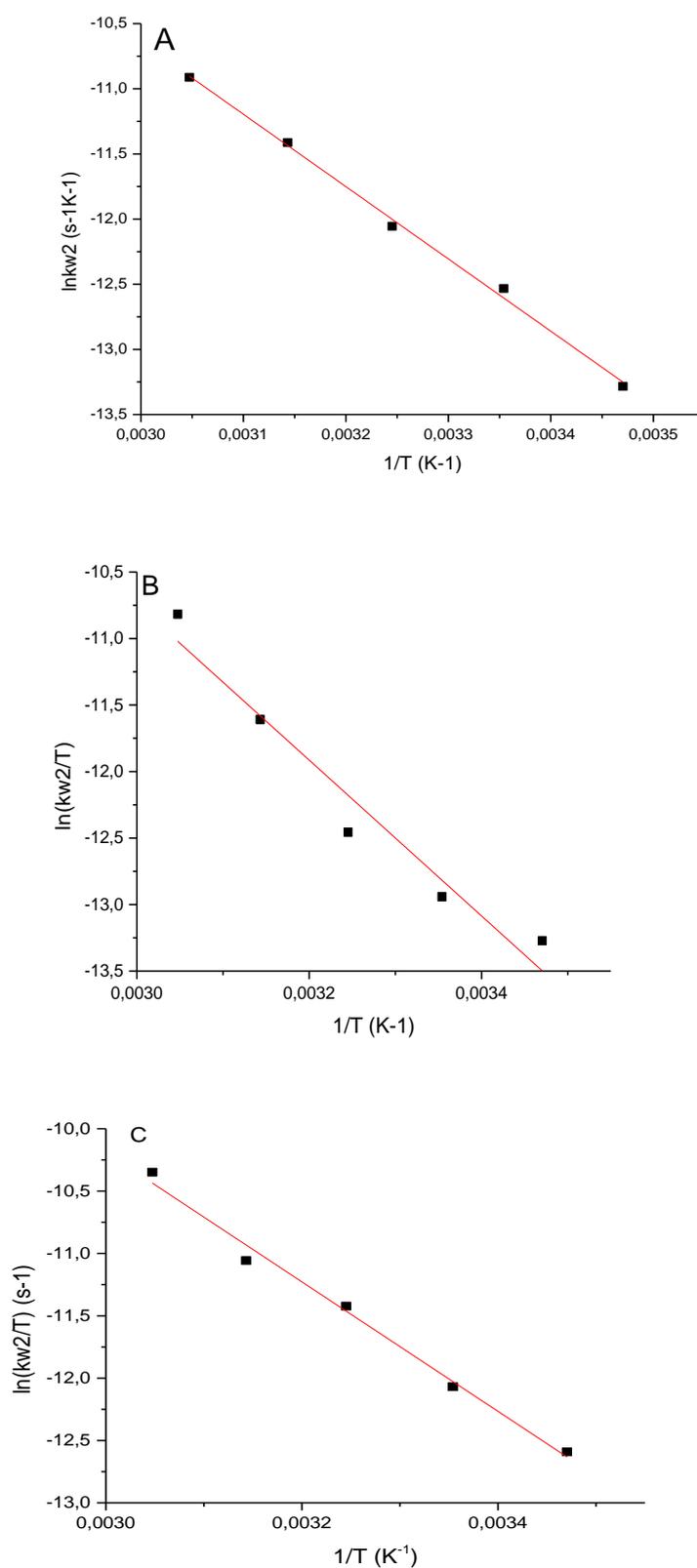


Figura 43. Gráfico de $\ln k_{w2}/T$ vs T^{-1} e seu ajuste linear utilizando a equação de Eyring para a reação de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos onde A para 1Ni2P, B para 2Ni1P, e C para 3Ni2P.

Tabela 7. Parâmetros de ativação de reações de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos considerando a constante de velocidade k_{w2} .

Parâmetros	ΔH^\ddagger (kcal mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (e.u)
1Ni2P	11,34 ± 0,01	-34,77 ± 0,04
2Ni1P	11,3 ± 0,6	-34,2 ± 0,2
3Ni2P	10,32 ± 0,02	-36,98 ± 0,07

Os valores de entropia encontrados para k_{w2} mostram uma pequena variação entre os três compostos indicando que possuem grau de solvatação similares e estados de transição com conformações muito parecidas entre si.

Na região do perfil de log k_{obs} vs pH em que envolvem as duas constantes k_{w3} e k_{OH} pode-se obter os valores de beta nucleofílico de Brønsted β_{NUC} que indicam a dependência da velocidade de reação com os fosfoimidazóis cíclicos com diferentes nucleófilos. Os valores de β_{NUC} para cada composto foram obtidos através da relação linear dos valores de log k_2 em função do pKa dos nucleófilos pK_{nuc} . Os valores de k_2 correspondem ao coeficiente das constantes de velocidade observadas em função da concentração de cada nucleófilo (Figuras 44, 46 e 48).

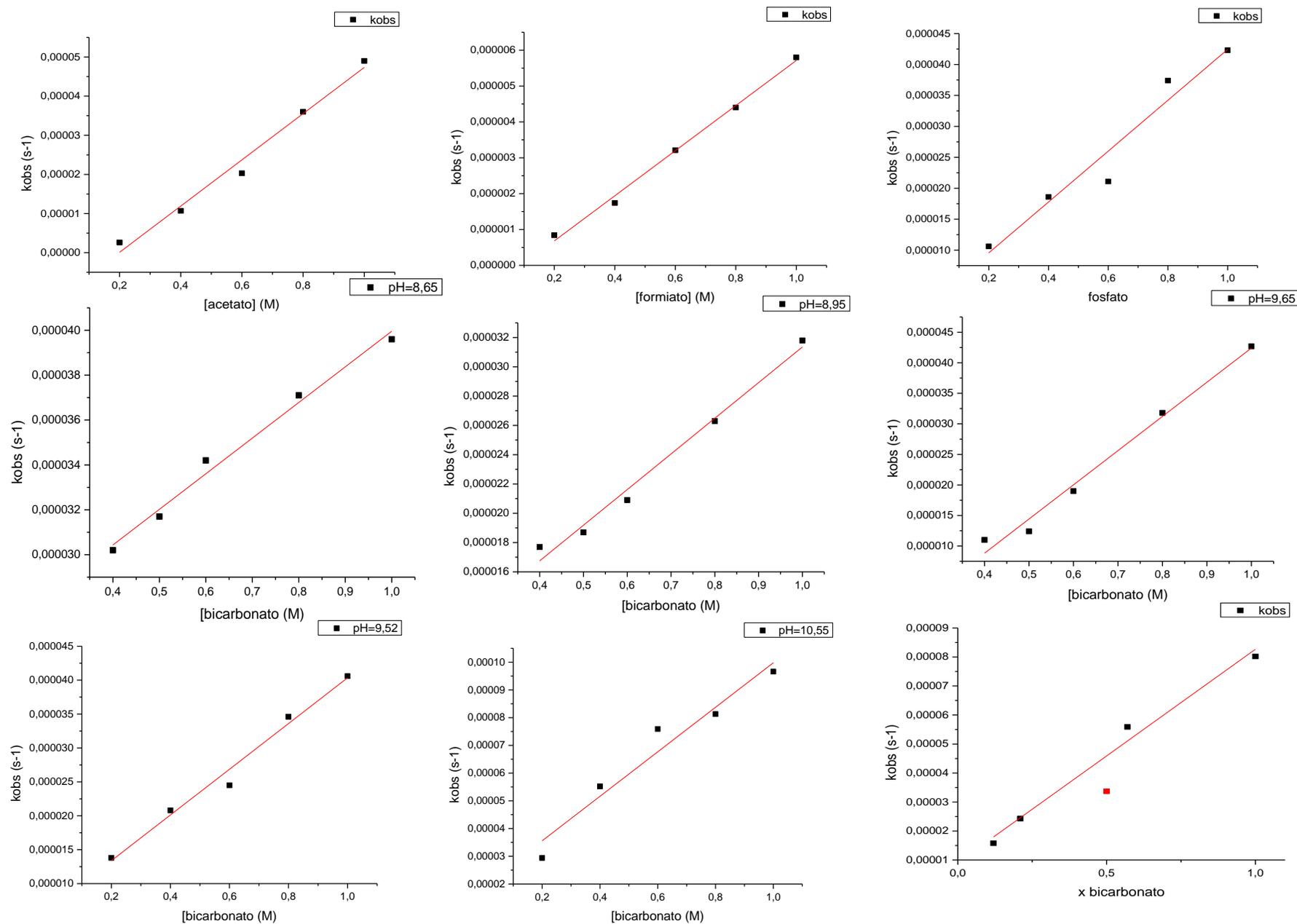


Figura 44. Ajustes lineares para a obtenção de k_2 para cada nucleófilo na reação de hidrólise do fosfoimidazol 1Ni2P. As frações molares para a obtenção de k_2 dos nucleófilos foram igual a 1. Exceto para o bicarbonato que foi feito o ajuste de levando em conta as frações molares de 0,12, 0,21, 0,51, 0,57 e 1.

Tabela 8. Constantes k_2 de cada nucleófilo para o 1Ni2P.

Nucleófilo	pKa	k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$)	$\log(k_2)$ ($M^{-1}.s^{-1}$)
Água	-1,74	4,65E-8	-7,33255
Hidróxido	13,71	0,29	-0,5376
Acetato	4,52	6,29E-6	-5,20135
Formiato	3,48	5,9E-5	-4,22915
Dihidrogenofosfato	6,34	4,11E-5	-4,38616
Carbonato	9,52	8,04E-5	-4,09474
Bicarbonato	5,95	1,52E-5	-4,81816

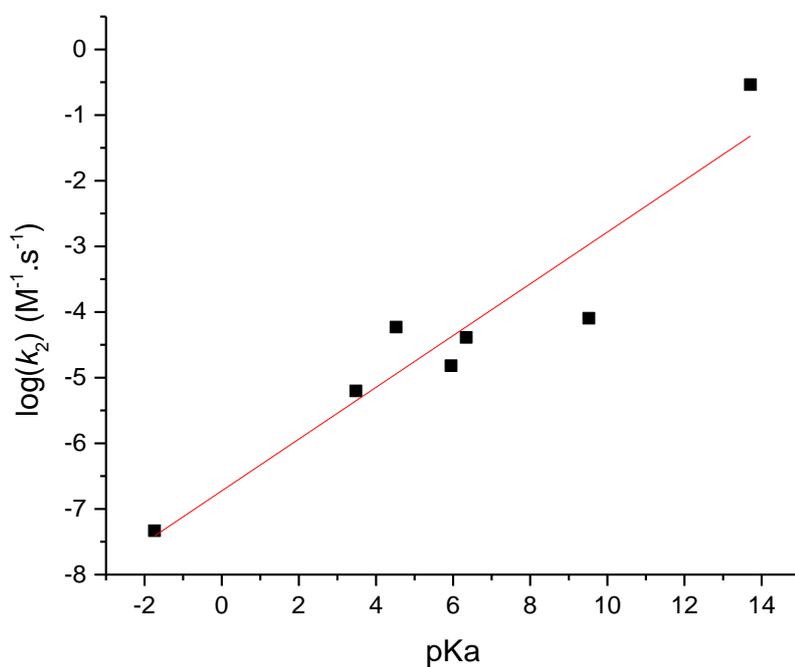


Figura 45. Gráfico dos valores de k_2 em função do pKa dos nucleófilos e seu ajuste linear para o 1Ni2P.

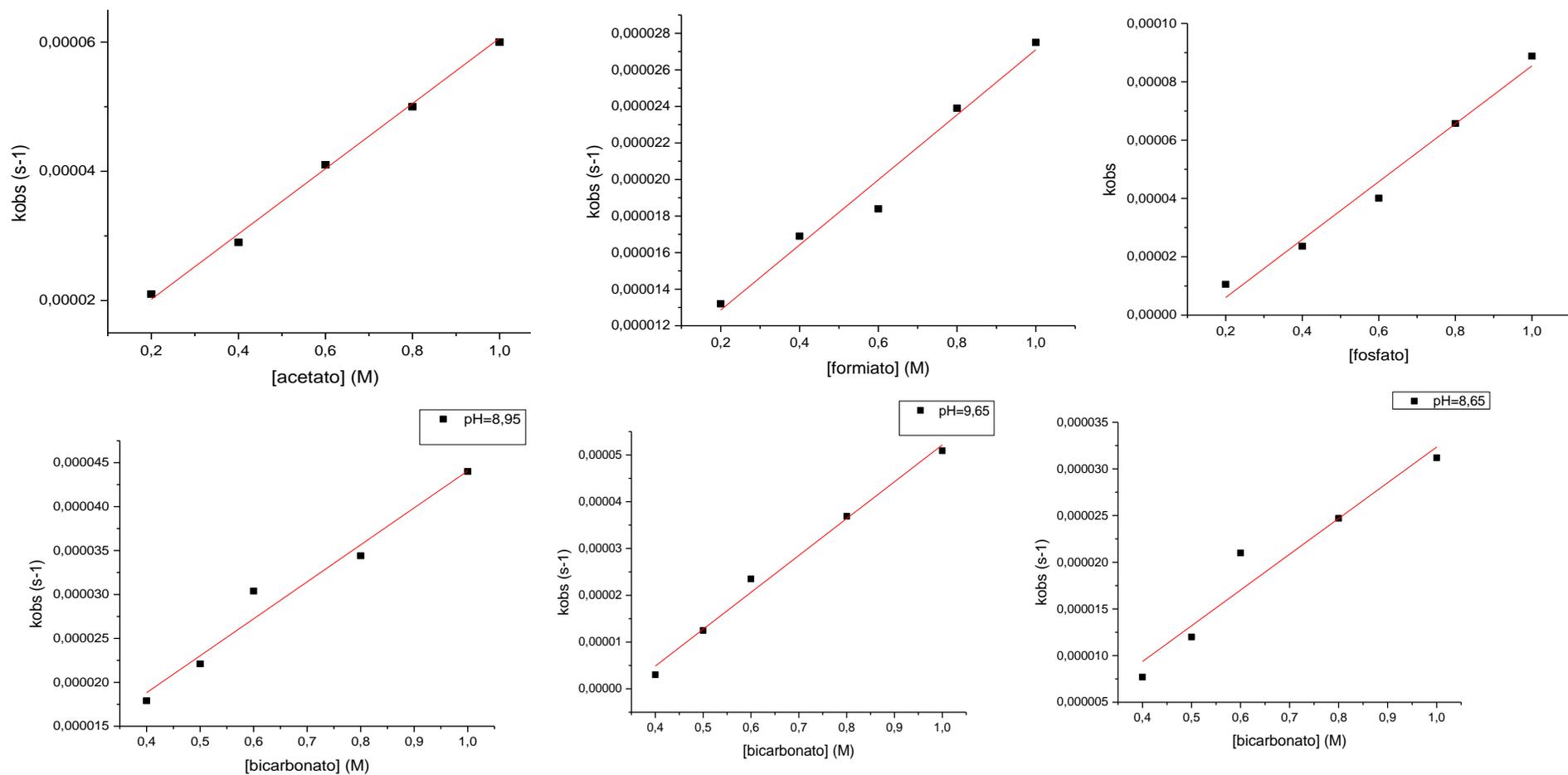


Figura 46. Ajustes lineares para a obtenção de k_2 para cada nucleófilo na reação de hidrólise do fosfoimidazol 2Ni1P. As frações molares para a obtenção de k_2 dos nucleófilos foram igual a 1. Exceto para o bicarbonato que foi feito o ajuste de levando em conta as frações molares de 0,12, 0,21, 0,51, 0,57 e 1.

Tabela 9. Constantes nucleofílicas para o 2Ni1P.

Nucleófilo	pKa	$k_2(M^{-1}.s^{-1})$	$\log(k_2)(M^{-1}.s^{-1})$
Água	-1,74	8,09E-7	-6,09178
Hidróxido	13,71	0,0789	-1,10292
Acetato	4,52	2,01E-5	-4,6968
Formiato	3,48	1,605E-5	-4,79452
Dihidrogenofosfato	6,34	9,175E-5	-4,03739
Bicarbonato	9,52	6,72E-5	-4,17263
Carbonato	5,95	6,2E-6	-5,20761

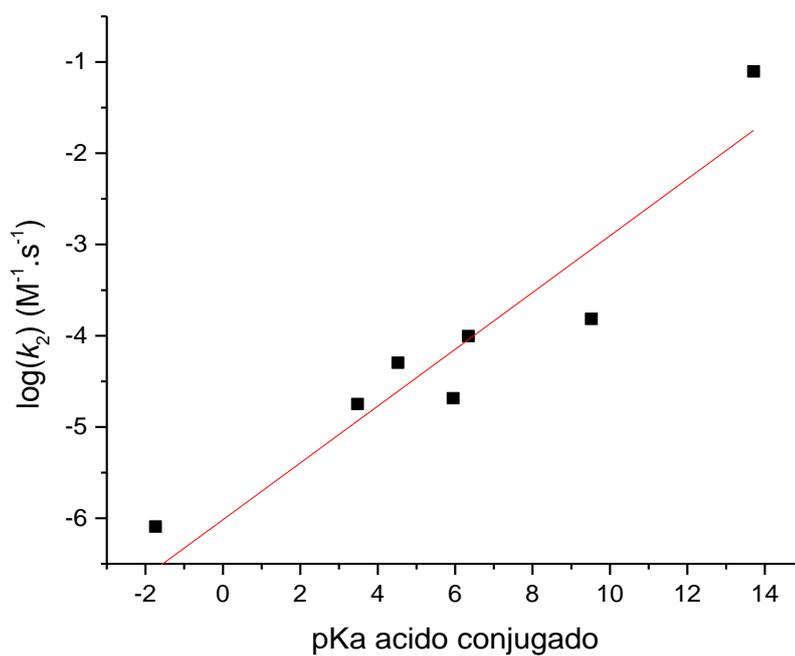


Figura 47. Gráfico dos valores de k_2 em função do pKa dos nucleófilos e seu ajuste linear para o 2Ni1P.

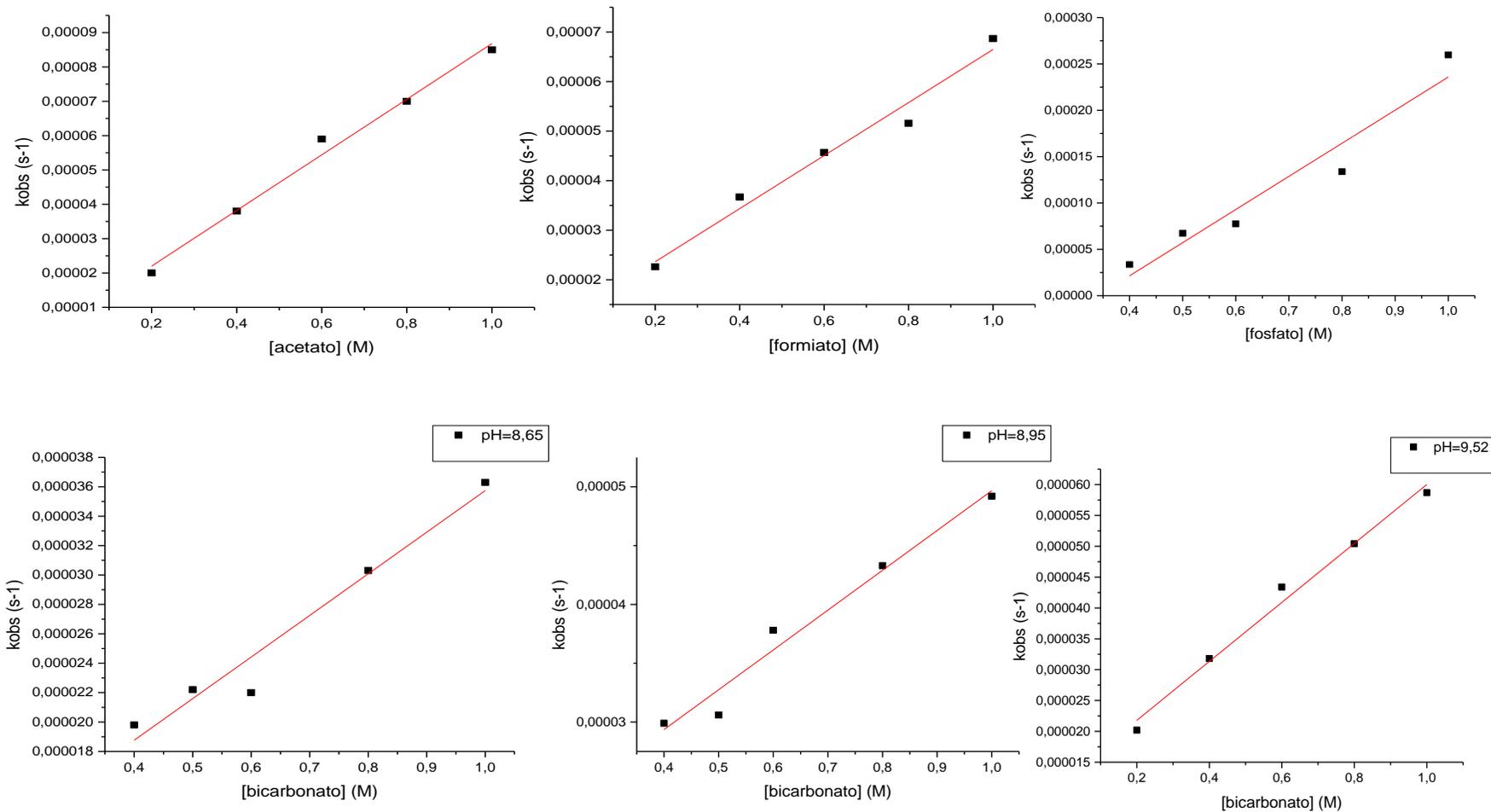


Figura 48. Ajustes lineares para a obtenção de k_2 para cada nucleófilo na reação de hidrólise do fosfoimidazol 3Ni2P. As frações molares para a obtenção de k_2 dos nucleófilos foram igual a 1. Exceto para o bicarbonato que foi feito o ajuste de levando em conta as frações molares de 0,12, 0,21, 0,51, 0,57 e 1.

Tabela 10. Constantes nucleofílicas para o 3Ni2P.

Nucleófilo	pKa	$k_2 (M^{-1}.s^{-1})$	$\log(k_2) (M^{-1}.s^{-1})$
Água	-1,74	5,59E-8	-7,25259
Hidróxido	13,71	0,26	-0,58503
Acetato	4,52	8,1E-5	-4,09151
Formiato	3,48	5,035E-5	-4,298
Dihidrogenofosfato	6,34	3,57382E-4	-3,44687
Carbonato	9,52	8,16E-5	-4,08831
Bicarbonato	5,95	2,05E-5	-4,68825

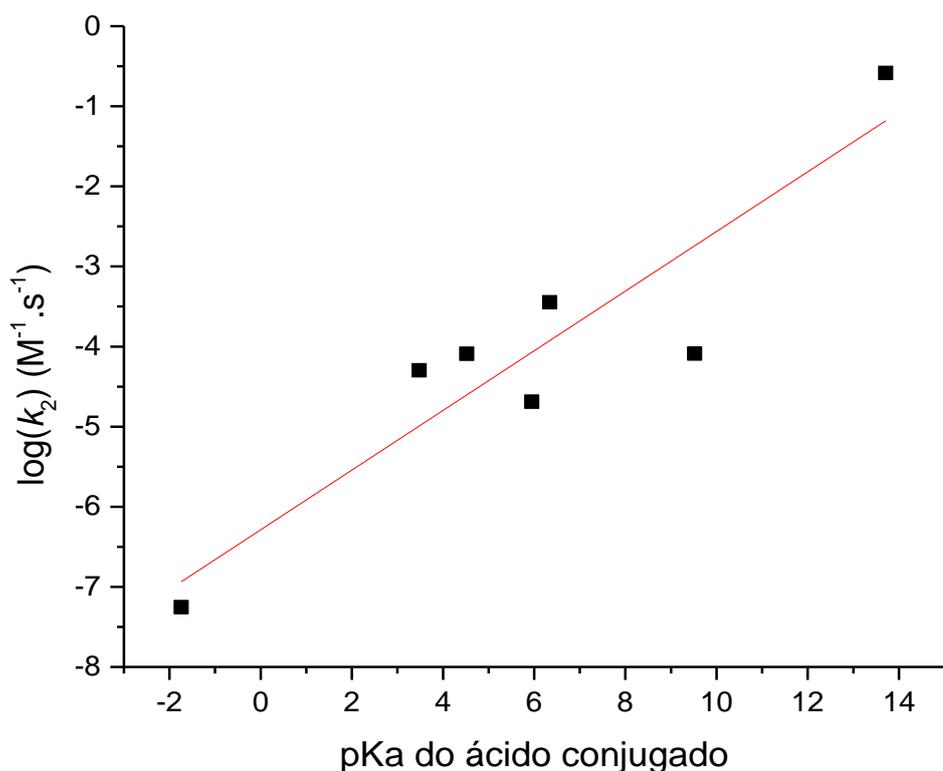


Figura 49. Gráfico dos valores de k_2 em função do pKa dos nucleófilos e seu ajuste linear para o 3Ni2P.

Tabela 11. Constantes de β_{NUC} para os três intermediários

Composto	β_{NUC}
1Ni2P	0,39
2Ni1P	0,31
3Ni2P	0,37

O valor de β_{NUC} obtido para uma reação química indica a carga efetiva e o comprimento de ligação no estado de transição da reação estudada. Com isso, os baixos valores obtidos de indicam que o nucleófilo ataca o reagente a uma distância considerável formando um estado de transição adiantado, ou seja, o nucleófilo não necessita estar muito próxima do reagente para promover o ataque nucleofílico conforme proposto na Figura 50.

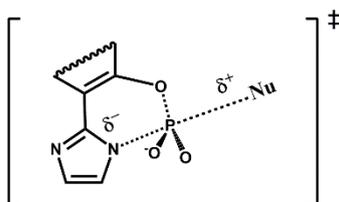


Figura 50. Representação do possível estado de transição nas reações de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos a partir dos dados obtidos para o beta nucleofílico.

4.4 Dados computacionais

Cálculos de estrutura eletrônica foram realizados para uma melhor interpretação dos fatores conformacionais envolvidos na reação dos diésteres de fosfato e traçar um comparativo com os dados experimentais. Inicialmente, os cálculos para o 1Ni2P-pNP no estado gasoso mostraram um colapso de cargas entre os grupos imidazol e fosfato que diferiu das possíveis espécies em meio aquoso, tendo sido necessário a otimização com PCM.

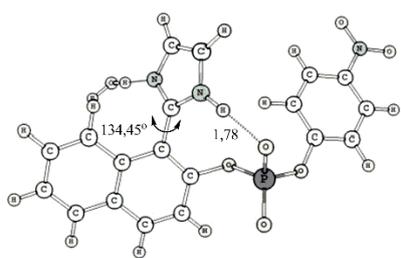
O modelo PCM foi desenvolvido por Tomasi e colaboradores para obtenção do potencial eletrostático gerado por um dielétrico e utiliza o método das cargas aparentes de superfície. A densidade eletrônica é determinada por cálculos de estrutura eletrônica *ab initio*, de forma que a polarização do soluto é incluída^[87].

Nesse modelo, as moléculas de solvente são substituídas por um contínuo que representa as propriedades das moléculas do solvente, levando em conta sua polaridade e constante dielétrica. A energia do soluto no método PCM, é calculada considerando termos eletrostáticos, de repulsão, dispersão e de movimento molecular, ao quais é adicionada a energia de cavitação que é denominada como a energia necessária para que a molécula de soluto crie espaço no contínuo do solvente.

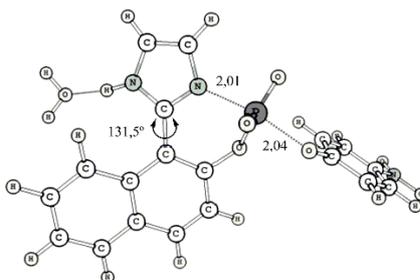
Apesar do PCM não descrever interações específicas entre o soluto e as moléculas de água da primeira camada de solvatação, o modelo mostra-se de implementação fácil e prática, fazendo com que os resultados teóricos aproximem-

se um pouco mais do resultado “real” em solução^[88]. Uma maneira de contornar o problema de solvatação é a utilização de algumas moléculas de água explícitas na solvatação dos grupos polares, principalmente os iônicos. Devendo-se ter cautela quanto à definição do número de moléculas de água, uma vez que um número elevado pode tornar o cálculo muito demorado além de obter como resultado um produto com inúmeros mínimos na superfície de energia potencial.

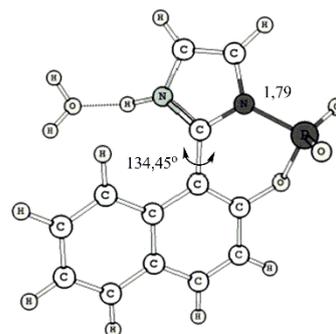
A Figura 51 mostra as estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM (solvente = água) para os estados reagente, transição e produtos para o ataque intramolecular do grupo imidazol no grupo *p*-nitrofenil fosfato dos diésteres de fosfato. O cálculo de frequência foi realizado em cada caso para obter a contribuição da ZPE e avaliar a ocorrência de frequências negativas, apenas uma no estado de transição e nenhuma no estado fundamental. As energias de cada espécie para a reação estão apresentadas nas Tabelas 7-9. Para cada estrutura otimizada, utilizou-se a notação EF para as moléculas no estado fundamental e ET para as moléculas no estado de transição.



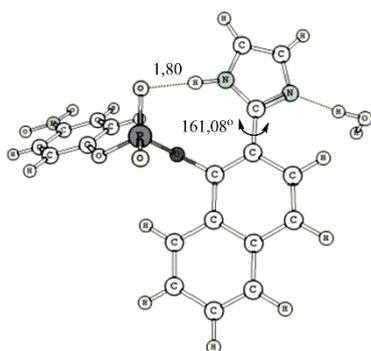
1Ni2P-pNP⁻·(H₂O)_{solv} / EF



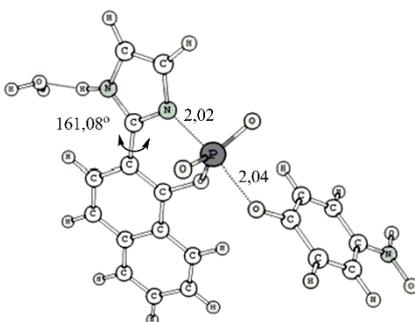
1Ni2P-pNP⁻·(H₂O)_{solv} / ET



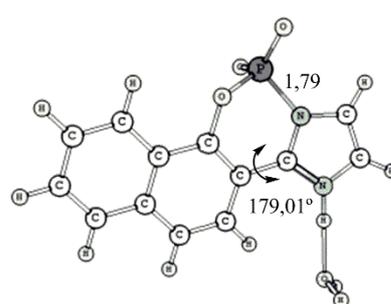
1Ni2P[±]·(H₂O)_{solv} / EF



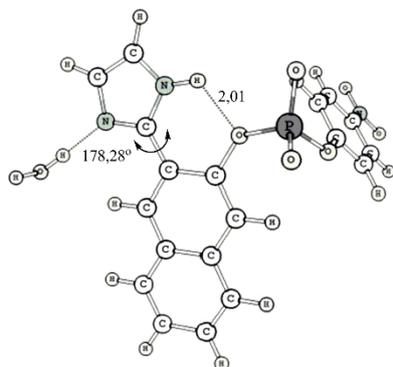
2Ni1P-pNP⁻·(H₂O)_{solv} / EF



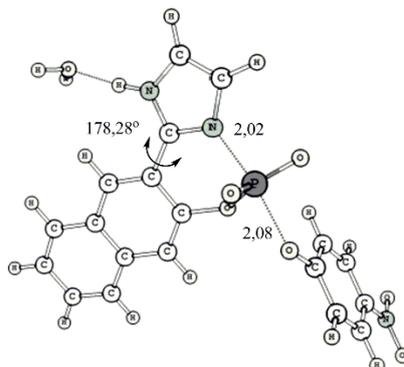
2Ni1P-pNP⁻·(H₂O)_{solv} / ET



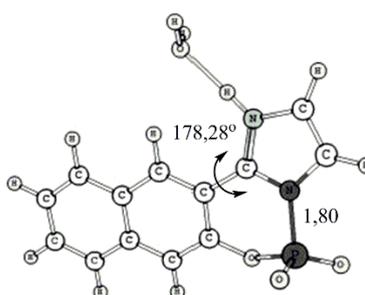
2Ni1P[±]·(H₂O)_{solv} / EF



3Ni2P-pNP⁻·(H₂O)_{solv} / EF



3Ni2P-pNP⁻·(H₂O)_{solv} / ET



3Ni2P[±]·(H₂O)_{solv} / EF

Figura 51. Estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM para os estados reagente, transição e produtos para o ataque intramolecular do grupo imidazol no grupo *p*-nitrofenil fosfato de 1Ni2P-pNP. A estrutura do *p*-nitrofenolato encontra-se no Anexo D e as energias de cada espécie encontram-se nas Tabelas 12-14.

Tabela 12. Energias no nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM (solvente = água) calculadas para as espécies individuais e energias de reação calculadas para o ataque intramolecular do grupo imidazol no grupo *p*-nitrofenil fosfato de 1Ni2P-*p*NP.

Estrutura / estado ^a	Energia ^b (Hartree)
1Ni2P- <i>p</i> NP ⁻ .(H ₂ O) _{solv} / EF	-1765,264210
1Ni2P- <i>p</i> NP ⁻ .(H ₂ O) _{solv} / ET	-1765,226401
1Ni2P [±] .(H ₂ O) _{solv} / EF	-1253,768126
<i>p</i> NP ⁻ / EF	-511,499318
1Ni2P-<i>p</i>NP⁻.(H₂O)_{solv} → 1Ni2P.(H₂O)_{solv} + <i>p</i>NP⁻	
ΔG[‡] (kcal/mol)^c	23,7
ΔG^o (kcal/mol)^d	-2,0

^a EF = estado fundamental, ET = estado de transição; ^b Considerando a ZPE e correção térmica para energia livre a 298K; ^c ΔG[‡] = G(estado de transição) - G(reagentes); ^d ΔG^o = G(produtos) - G(reagentes).

Tabela 13. Energias no nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM (solvente = água) calculadas para as espécies individuais e energias de reação calculadas para o ataque intramolecular do grupo imidazol no grupo *p*-nitrofenil fosfato de 2Ni1P-*p*NP.

Estrutura / estado ^a	Energia ^b (Hartree)
2Ni1P- <i>p</i> NP ⁻ .(H ₂ O) _{solv} / EF	-1765,268123
2Ni1P- <i>p</i> NP ⁻ .(H ₂ O) _{solv} / ET	-1765,233817
2Ni1P [±] .(H ₂ O) _{solv} / EF	-1253,777282
<i>p</i> NP ⁻ / EF	-511,499318
2Ni1P-<i>p</i>NP⁻.(H₂O)_{solv} → 2Ni1P.(H₂O)_{solv} + <i>p</i>NP⁻	
ΔG[‡] (kcal/mol)^c	21,5
ΔG^o (kcal/mol)^d	-5,3

^a EF = estado fundamental, ET = estado de transição; ^b Considerando a ZPE e correção térmica para energia livre a 298K; ^c ΔG[‡] = G(estado de transição) - G(reagentes); ^d ΔG^o = G(produtos) - G(reagentes).

Tabela 14. Energias no nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM (solvente = água) calculadas para as espécies individuais e energias de reação calculadas para o ataque intramolecular do grupo imidazol no grupo *p*-nitrofenil fosfato de 3Ni2P-*p*NP.

Estrutura / estado ^a	Energia ^b (Hartree)
3Ni2P- <i>p</i> NP ⁻ .(H ₂ O) _{solv} / EF	-1765,269840
3Ni2P- <i>p</i> NP ⁻ .(H ₂ O) _{solv} / ET	-1765,233624
3Ni2P [±] .(H ₂ O) _{solv} / EF	-1253,774823
<i>p</i> NP ⁻ / EF	-511,499318
3Ni2P-<i>p</i>NP⁻.(H₂O)_{solv} → 3Ni2P.(H₂O)_{solv} + <i>p</i>NP⁻	
ΔG[‡] (kcal/mol)^c	22,7
ΔG^o (kcal/mol)^d	-2,7

^a EF = estado fundamental, ET = estado de transição; ^b Considerando a ZPE e correção térmica para energia livre a 298K; ^c ΔG[‡] = G(estado de transição) - G(reagentes); ^d ΔG^o = G(produtos) - G(reagentes).

Os valores de ΔG[‡] experimental da etapa de clivagem dos fosfodiésteres foi calculado para uma temperatura de 25°C e obteve-se os valores de 22,3 kcal.mol⁻¹,

22,4 kcal.mol⁻¹ e 21,5 kcal.mol⁻¹ para o 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP, respectivamente. Esses valores são muito próximos dos valores encontrados a partir dos cálculos teóricos mostrando que as estruturas otimizadas representam adequadamente as estruturas reativas envolvidas na reação de clivagem dos diésteres de fosfato estudados.

As estruturas otimizadas mostram que os fatores geométricos estruturais das moléculas influenciam na sua reatividade (Figura 52). A disposição tanto do grupo de ataque (imidazol) quanto o grupo abandonador (p-nitrofenolato) são importantes para a reação. A estrutura do 3Ni2P-pNP possui estes dois grupos com menor impedimento rotacional o que explica, a partir dos dados experimentais, sua maior velocidade reacional. Para o 1Ni2P-pNP o grupo imidazol possui uma restrição conformacional, porém, seu grupo p-nitrofenil fosfato não possui impedimento rotacional, com isso, sua velocidade reacional diminui em relação ao 3Ni2P-pNP. No 2Ni1P-pNP verificou-se uma restrição para o grupo p-nitrofenil fosfato, o que também lhe conferiu uma menor reatividade frente ao 3Ni2P-pNP. Além disso, comprimento da ligação do átomo de fósforo com o grupo imidazol nucleofílico indicam um estado de transição sincrônico nos três casos (Figura 53).

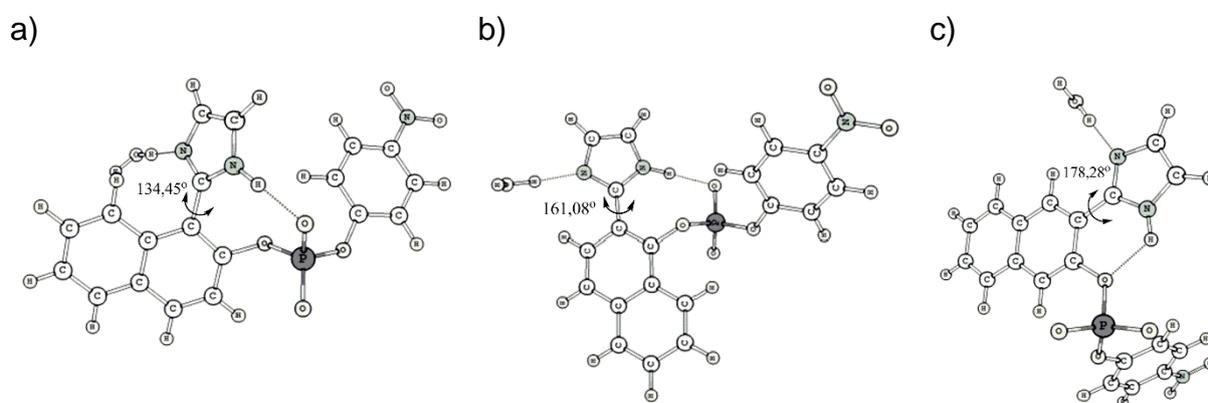


Figura 52. Estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM para os reagentes, sendo a) 1Ni2P-pNP, b) 2Ni1P-pNP e c) 3Ni2P-pNP, destacando os ângulos do grupo imidazol em relação ao anel naftalênico.

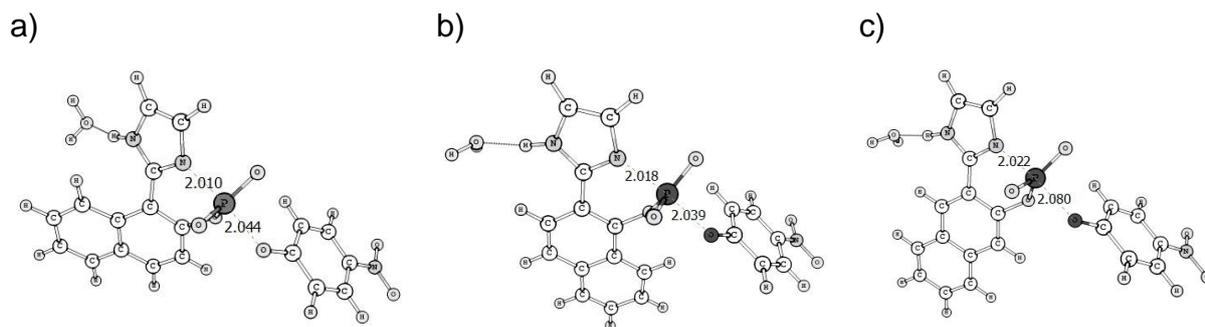
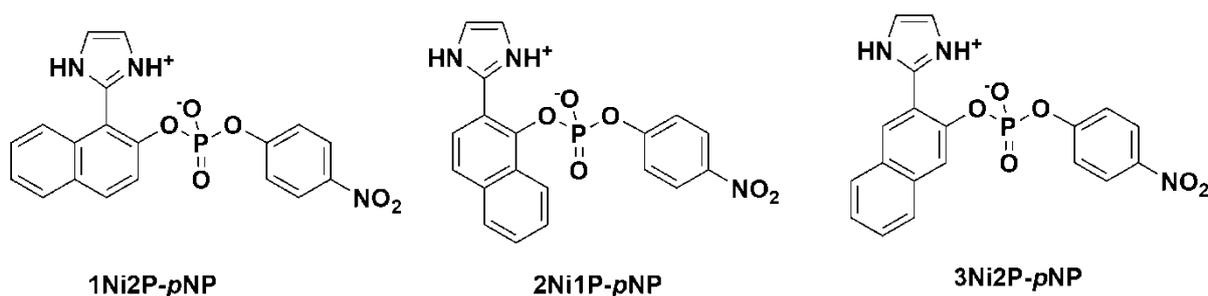


Figura 53. Estruturas otimizadas em nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM para os reagentes, sendo a) 1Ni2P-pNP, b) 2Ni1P-pNP e c) 3Ni2P-pNP, e os respectivos comprimentos de ligação N-P e P-O_(p-nitrofenolato).

5 CONCLUSÕES

Na busca pela determinação do efeito da proximidade e orientação de grupos reativos na catálise intramolecular do grupo imidazol em *p*-nitrofenil fosfatos de *orto*-(1H-imidazol-2-il)naftilas 1Ni2P-*p*NP, 2Ni1P-*p*NP, 3Ni2P-*p*NP (Figura 54a) e de seus respectivos fosfoimidazóis 1Ni2P, 2Ni1P, 3Ni2P (Figura 54b) com diferentes nucleófilos chegou-se as conclusões:

a)



b)

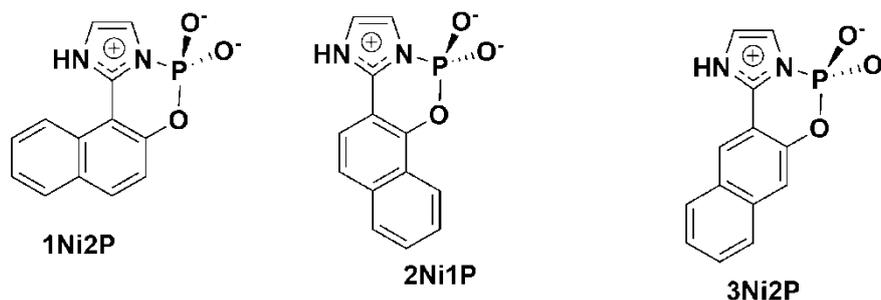


Figura 54. Em a) estruturas dos fosfodiésteres 1Ni2P-*p*NP, 2Ni1P-*p*NP e 3Ni2P-*p*NP e b) estruturas dos fosfoimidazóis cíclicos 1Ni2P, 2Ni1P e 3Ni2P.

- i) Os estudos de RMN de ¹H, ³¹P e ESI-MS/MS mostraram que a clivagem dos fosfodiésteres segue um mecanismo de ataque nucleofílico intramolecular do grupo imidazol sob o átomo de fósforo com a formação de um fosfoimidazol cíclico e com saída de um íon *p*-nitrofenolato como grupo abandonador. A reação de hidrólise dos fosfoimidazóis cíclicos leva a formação de monoéster de fosfato *orto*-(1H-imidazol-2il)naftil fosfatos.
- ii) Estudos cinéticos em função do pH indicam a presença de diferentes espécies reacionais em solução. A protonação do grupo imidazol nucleofílico nos *p*-nitrofenil fosfatos de *orto*-(1H-imidazol-2il)naftilas

diminui drasticamente sua reatividade. Em contrapartida, a protonação do grupo imidazol nos fosfoimidazóis cíclicos favorece a reatividade desses compostos. Embora, em meios fortemente básicos a hidrólise alcalina dos fosfoimidazóis cíclicos seja um caminho reacional favorável.

- iii) Na comparação da velocidade de reação de ataque intramolecular do grupo imidazol em 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP observou-se que 3Ni2P-pNP é mais reativo apresentando uma molaridade efetiva de 6,5 vezes maior que o 1Ni2P-pNP. A razão dessa diferença deve-se ao maior número de graus conformacionais na direção do estado de transição. Embora, o custo entrópico seja o maior dentre os três fosfodiésteres estudados, indicativo de múltiplas possibilidades conformacionais.
- iv) Conforme estudos cinéticos e isotópicos, a reação intramolecular do grupo imidazol em 1Ni2P-pNP, 2Ni1P-pNP e 3Ni2P-pNP não depende de uma base-geral, visto que não há transferência de próton na etapa determinante de velocidade de reação. O estado de transição é sincrônico conforme demonstrado por estudos computacionais.
- v) De acordo com estudos cinéticos, a hidrólise dos fosfoimidazóis 1Ni2P, 2Ni1P e 3Ni2P segue via catálise ácida-específica em meios ácidos, possivelmente ácida-geral em meio neutro e básica-específica em meio básico. Não há diferenças nítidas na reatividade dos três fosfoimidazóis que reagem com diferentes nucleófilos por estados de transição com pouca participação nucleofílica e elevada solvatação pela água.

Embora, existam pequenas diferenças reacionais entre os fosfodiésteres, claramente influenciadas por fatores geométricos, a reatividade do átomo de fósforo depende pouco de tais fatores comparado ao ataque em um átomo de carbono carbonílico. Isto ocorre porque o cone reacional para o ataque no átomo de fósforo é mais amplo e, portanto, menos dependente de direcionalidade em relação ao ataque em átomos de carbono. Embora, tal conclusão deve ser confirmada por estudos futuros, o maior cone reacional no átomo de fósforo pode indicar a preferência da natureza por reações de transferência de grupo fosforila em enzimas, como observado para a Fosfolipase D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stryer, L., *Bioquímica*. 1996; , Guanabara Koogan S. A.
2. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2013: W.H. Freeman.
3. Kirby, A.J. and F. Hollfelder, *From enzyme models to model enzymes*. 2009: Royal Society of Chemistry.
4. Price, N.C. and L. Stevens, *Fundamentals of enzymology*. 1989: Oxford University Press, Incorporated.
5. Kraut, J., *How do enzymes work?* Science, 1988. **242**(4878): p. 533-40.
6. Gao, J., et al., *Mechanisms and Free Energies of Enzymatic Reactions*. Chemical Reviews, 2006. **106**(8): p. 3188-3209.
7. Isom, D.G., et al., *Charges in the hydrophobic interior of proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(37): p. 16096-16100.
8. Padlan, E.A., C. Abergel, and J. Tipper, *Identification of specificity-determining residues in antibodies*. The FASEB journal, 1995. **9**(1): p. 133-139.
9. Berdis, A.J., *Mechanisms of DNA Polymerases*. Chemical Reviews, 2009. **109**(7): p. 2862-2879.
10. Gandour, R.D. and R.L. Schowen, *Transition states of biochemical processes*. 1978: Plenum Press.
11. Brandão, T.A., et al., *Catalytic and inhibitory effects of β -cyclodextrin on the hydrolysis of benzoic anhydride*. Journal of physical organic chemistry, 2004. **17**(5): p. 370-375.
12. Jędrzejewska, H., et al., *Dynamic Formation of Hybrid Peptidic Capsules by Chiral Self-Sorting and Self-Assembly*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(50): p. 13760-13764.
13. Orth, E.S., et al., *Intramolecular acid-base catalysis of a phosphate diester: Modeling the ribonuclease mechanism*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(8): p. 2436-2437.
14. Jencks, W.P., *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. 1987: Dover.
15. Clayden, J., N. Greeves, and S.G. Warren, *Organic chemistry*. 2012, Oxford; New York: Oxford University Press.
16. Jencks, W.P., *Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the circe effect*. 1975: Wiley Online Library.
17. Gesser, J.C., et al., *Reações intramoleculares como modelos não miméticos de catálise enzimática*. Química Nova, 1997. **20**: p. 631-637.
18. Dafforn, A. and D. Koshland, *Proximity, entropy and orbital steering*. Biochemical and biophysical research communications, 1973. **52**(3): p. 779-785.
19. Dafforn, A. and D.E. Koshland, *Theoretical Aspects of Orbital Steering*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1971. **68**(10): p. 2463-2467.
20. Milstien, S. and L.A. Cohen, *Rate Acceleration by Stereopopulation Control: Models for Enzyme Action*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1970. **67**(3): p. 1143-1147.
21. Menger, F., *On the source of intramolecular and enzymatic reactivity*. Accounts of chemical Research, 1985. **18**(5): p. 128-134.

22. Menger, F.M., *Directionality of organic reactions in solution*. Tetrahedron, 1983. **39**(7): p. 1013-1040.
23. Lassila, J.K., J.G. Zalatan, and D. Herschlag, *Biological phosphoryl-transfer reactions: understanding mechanism and catalysis*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 669-702.
24. Kirby, A.J. and F. Nome, *Fundamentals of Phosphate Transfer*. Accounts of Chemical Research, 2015.
25. Wolfenden, R., *Benchmark Reaction Rates, the Stability of Biological Molecules in Water, and the Evolution of Catalytic Power in Enzymes*. Annual Review of Biochemistry, 2011. **80**(1): p. 645-667.
26. Lad, C., N.H. Williams, and R. Wolfenden, *The rate of hydrolysis of phosphomonoester dianions and the exceptional catalytic proficiencies of protein and inositol phosphatases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(10): p. 5607-5610.
27. Gajewski, S., et al., *Analysis of the active site mechanism of Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I: a member of the phospholipase D superfamily*. Journal of Molecular Biology, 2012. **415**(4): p. 741-758.
28. Kirby, A.J. and M. Younas, *The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis*. Journal of the Chemical Society B: Physical Organic, 1970(0): p. 510-513.
29. Rajadhyaksha, A., et al., *L-type Ca²⁺ channels are essential for glutamate-mediated CREB phosphorylation and c-fos gene expression in striatal neurons*. The Journal of neuroscience, 1999. **19**(15): p. 6348-6359.
30. Walaas, S.I. and P. Greengard, *Protein phosphorylation and neuronal function*. Pharmacological Reviews, 1991. **43**(3): p. 299-349.
31. Florián, J. and A. Warshel, *Phosphate Ester Hydrolysis in Aqueous Solution: Associative versus Dissociative Mechanisms*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(4): p. 719-734.
32. Henchman, M., et al., *Thermodynamic and kinetic properties of the metaphosphate anion, PO₃⁻, in the gas phase*. Journal of the American Chemical Society, 1985. **107**(5): p. 1453-1455.
33. Jencks, W.P., *When is an intermediate not an intermediate? Enforced mechanisms of general acid-base, catalyzed, carbocation, carbanion, and ligand exchange reaction*. Accounts of Chemical Research, 1980. **13**(6): p. 161-169.
34. Hengge, A.C., W.A. Edens, and H. Elsing, *Transition-State Structures for Phosphoryl-Transfer Reactions of p-Nitrophenyl Phosphate*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(12): p. 5045-5049.
35. Åqvist, J., et al., *Mechanistic alternatives in phosphate monoester hydrolysis: what conclusions can be drawn from available experimental data?* Chemistry & biology, 1999. **6**(3): p. R71-R80.
36. Williams, N.H., *Models for biological phosphoryl transfer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2004. **1697**(1): p. 279-287.
37. Bianciotto, M., J.-C. Barthelat, and A. Vigroux, *Reactivity of Phosphate Monoester Monoanions in Aqueous Solution. 2. A Theoretical Study of the Elusive Zwitterion Intermediates RO⁺(H)PO₃²⁻*. The Journal of Physical Chemistry A, 2002. **106**(27): p. 6521-6526.
38. Grzyska, P.K., et al., *Transition State Differences in Hydrolysis Reactions of Alkyl versus Aryl Phosphate Monoester Monoanions*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(43): p. 13106-13111.

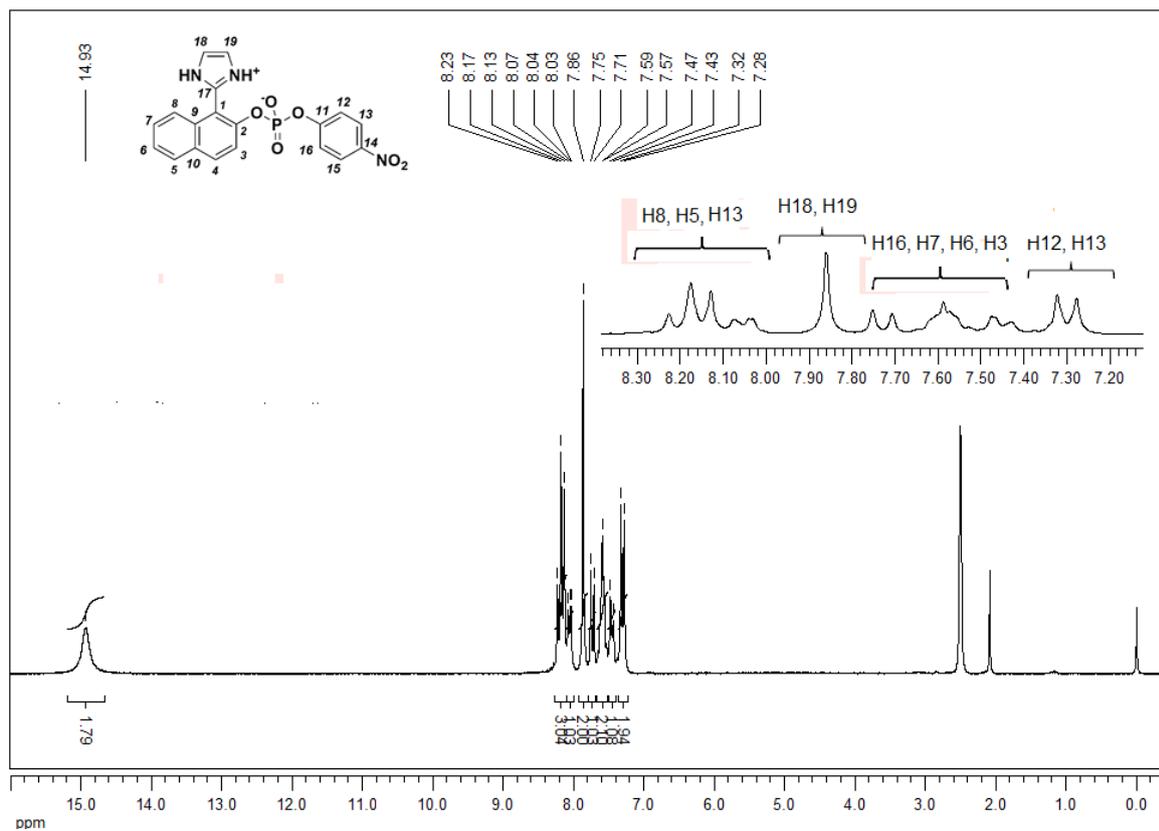
39. Guthrie, R.D. and W.P. Jencks, *IUPAC recommendations for the representation of reaction mechanisms*. Accounts of Chemical Research, 1989. **22**(10): p. 343-349.
40. Holmes, R.R., *Phosphoryl Transfer Enzymes and Hypervalent Phosphorus Chemistry*. Accounts of Chemical Research, 2004. **37**(10): p. 746-753.
41. Ugi, I., et al., *Berry pseudorotation and turnstile rotation*. Accounts of Chemical Research, 1971. **4**(8): p. 288-296.
42. Attwood, P., et al., *Focus on phosphohistidine*. Amino acids, 2007. **32**(1): p. 145-156.
43. Raines, R.T., *Ribonuclease a*. Chemical reviews, 1998. **98**(3): p. 1045-1066.
44. Admiraal, S.J. and D. Herschlag, *Catalysis of phosphoryl transfer from ATP by amine nucleophiles*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(25): p. 5837-5845.
45. Kunitz, M., *Isolation from beef pancreas of a crystalline protein possessing ribonuclease activity*. Science, 1939. **90**(2327): p. 112-113.
46. Hayashi, R., S. Moore, and W.H. Stein, *Carboxypeptidase from yeast Large scale preparation and the application to COOH-terminal analysis of peptides and proteins*. Journal of Biological Chemistry, 1973. **248**(7): p. 2296-2302.
47. Kartha, G., J. Bello, and D. Harker, *Tertiary structure of ribonuclease*. 1967.
48. Anslyn, E. and R. Breslow, *Geometric evidence on the ribonuclease model mechanism*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(15): p. 5972-5973.
49. Beckmann, C., et al., *Mechanisms of catalysis by imidazole buffers of the hydrolysis and isomerisation of RNA models*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 1998(3): p. 573-582.
50. Elsässer, B., M. Valiev, and J.H. Weare, *A Dianionic Phosphorane Intermediate and Transition States in an Associative AN+ DN Mechanism for the RibonucleaseA Hydrolysis Reaction*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(11): p. 3869-3871.
51. Sowa, G.A., A.C. Hengge, and W. Cleland, *¹⁸O isotope effects support a concerted mechanism for ribonuclease A*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(9): p. 2319-2320.
52. Swift, R.V., et al., *Toward Understanding the Conformational Dynamics of RNA Ligation*. Biochemistry, 2009. **48**(4): p. 709-719.
53. Breslow, R., *Biomimetic chemistry and artificial enzymes: catalysis by design*. Accounts of chemical research, 1995. **28**(3): p. 146-153.
54. Breslow, R., et al., *beta.-Cyclodextrinylbisimidazole, a model for ribonuclease*. Journal of the American Chemical Society, 1978. **100**(10): p. 3227-3229.
55. Breslow, R. and C. Schmuck, *Goodness of fit in complexes between substrates and ribonuclease mimics: effects on binding, catalytic rate constants, and regiochemistry*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(28): p. 6601-6605.
56. Brandão, T.A.S., et al., *Impaired Acid Catalysis by Mutation of a Protein Loop Hinge Residue in a YopH Mutant Revealed by Crystal Structures*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **131**(2): p. 778-786.
57. Puttick, J., E.N. Baker, and L.T. Delbaere, *Histidine phosphorylation in biological systems*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2008. **1784**(1): p. 100-105.

58. Hultquist, D., R.W. Moyer, and P. Boyer, *The preparation and characterization of 1-phosphohistidine and 3-phosphohistidine**. *Biochemistry*, 1966. **5**(1): p. 322-331.
59. Hultquist, D.E., R.W. Moyer, and P.D. Boyer, *The Preparation and Characterization of 1-Phosphohistidine and 3-Phosphohistidine**. *Biochemistry*, 1966. **5**(1): p. 322-331.
60. Pilkis, S.J., et al., *6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme*. *Annual review of biochemistry*, 1995. **64**(1): p. 799-835.
61. Mizuguchi, H., et al., *Reaction Mechanism of Fructose-2, 6-bisphosphatase A MUTATION OF NUCLEOPHILIC CATALYST, HISTIDINE 256, INDUCES AN ALTERATION IN THE REACTION PATHWAY*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(4): p. 2166-2175.
62. Tonks, N.K., *Protein tyrosine phosphatases – from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction*. *FEBS Journal*, 2013. **280**(2): p. 346-378.
63. Van Etten, R., et al., *Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(4): p. 2313-2319.
64. Ostanin, K., A. Saeed, and R. Van Etten, *Heterologous expression of human prostatic acid phosphatase and site-directed mutagenesis of the enzyme active site*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(12): p. 8971-8978.
65. Sharma, S., A. Rauk, and A.H. Juffer, *A DFT study on the formation of a phosphohistidine intermediate in prostatic acid phosphatase*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(30): p. 9708-9716.
66. Rudolph, A.E., et al., *Expression, Characterization, and Mutagenesis of the Yersinia pestis Murine Toxin, a Phospholipase D Superfamily Member*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(17): p. 11824-11831.
67. Stace, C.L. and N.T. Ktistakis, *Phosphatidic acid-and phosphatidylserine-binding proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2006. **1761**(8): p. 913-926.
68. Ghosh, S., et al., *Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(14): p. 8472-8480.
69. Rizzo, M.A., et al., *The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(31): p. 23911-23918.
70. Henage, L.G., J.H. Exton, and H.A. Brown, *Kinetic Analysis of a Mammalian Phospholipase D ALLOSTERIC MODULATION BY MONOMERIC GTPases, PROTEIN KINASE C, AND POLYPHOSPHOINOSITIDES*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(6): p. 3408-3417.
71. Cheng, Y., et al., *Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II*. *Biochem. J*, 2006. **398**: p. 177-185.
72. Selvy, P.E., et al., *Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation*. *Chemical reviews*, 2011. **111**(10): p. 6064-6119.

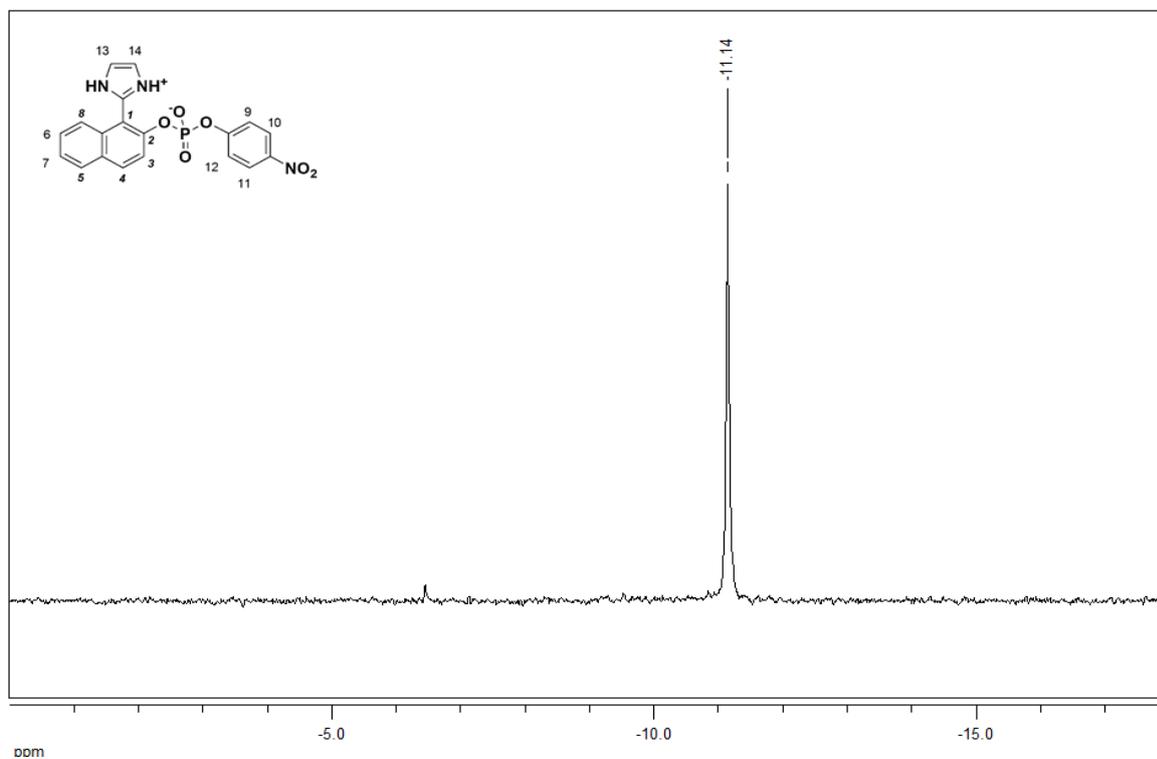
73. Orth, E.S., et al., *Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(24): p. 8513-8523.
74. Oliveira, T.C., et al., *Effective targeting of proton transfer at ground and excited states of ortho-(2'-imidazolyl) naphthol constitutional isomers*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015. **17**(4): p. 2404-2415.
75. Schowen, K.B., *Solvent hydrogen isotope effects*, in *Transition states of biochemical processes*. 1978, Springer. p. 225-283.
76. Quin, L.D. and A.J. Williams, *Practical Interpretation of P-31 NMR Spectra and Computer-assisted Structure Verification*. 2004: Advanced Chemistry Development.
77. Balasubramaniyan, V., *peri Interaction in Naphthalene Derivatives*. Chemical Reviews, 1966. **66**(6): p. 567-641.
78. Bowden, K., *Acidity Functions for Strongly Basic Solutions*. Chemical Reviews, 1966. **66**(2): p. 119-131.
79. Domingos, J.B., et al., *Mechanisms of nucleophilic substitution reactions of methylated hydroxylamines with bis (2, 4-dinitrophenyl) phosphate. Mass spectrometric identification of key intermediates*. The Journal of organic chemistry, 2004. **69**(18): p. 6024-6033.
80. Domingos, J.B., et al., *Reaction of bis (2, 4-dinitrophenyl) phosphate with hydrazine and hydrogen peroxide. Comparison of O-and N-phosphorylation*. The Journal of organic chemistry, 2004. **69**(23): p. 7898-7905.
81. Lente, G., I. Fabian, and A.J. Poe, *A common misconception about the Eyring equation*. New Journal of Chemistry, 2005. **29**(6): p. 759-760.
82. DeTar, D.F. and N.P. Luthra, *Quantitative evaluation of steric effects in SN2 ring closure reactions*. Journal of the American Chemical Society, 1980. **102**(13): p. 4505-4512.
83. Kirby, A. and M. Younas, *The reactivity of phosphate esters. Reactions of diesters with nucleophiles*. Journal of the Chemical Society B: Physical Organic, 1970: p. 1165-1172.
84. Kirby, A. and M. Younas, *The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis*. Journal of the Chemical Society B: Physical Organic, 1970: p. 510-513.
85. Orth, E.S., et al., *Phosphorylimidazole derivatives: potentially biosignaling molecules*. The Journal of organic chemistry, 2011. **76**(19): p. 8003-8008.
86. Han, R. and J.E. Coleman, *Dependence of the phosphorylation of alkaline phosphatase by phosphate monoesters on the pKa of the leaving group*. Biochemistry, 1995. **34**(13): p. 4238-4245.
87. Miertuš, S., E. Scrocco, and J. Tomasi, *Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilizaion of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects*. Chemical Physics, 1981. **55**(1): p. 117-129.
88. Pliego, J.R. and J.M. Riveros, *The cluster-continuum model for the calculation of the solvation free energy of ionic species*. The Journal of Physical Chemistry A, 2001. **105**(30): p. 7241-7247.

ANEXOS

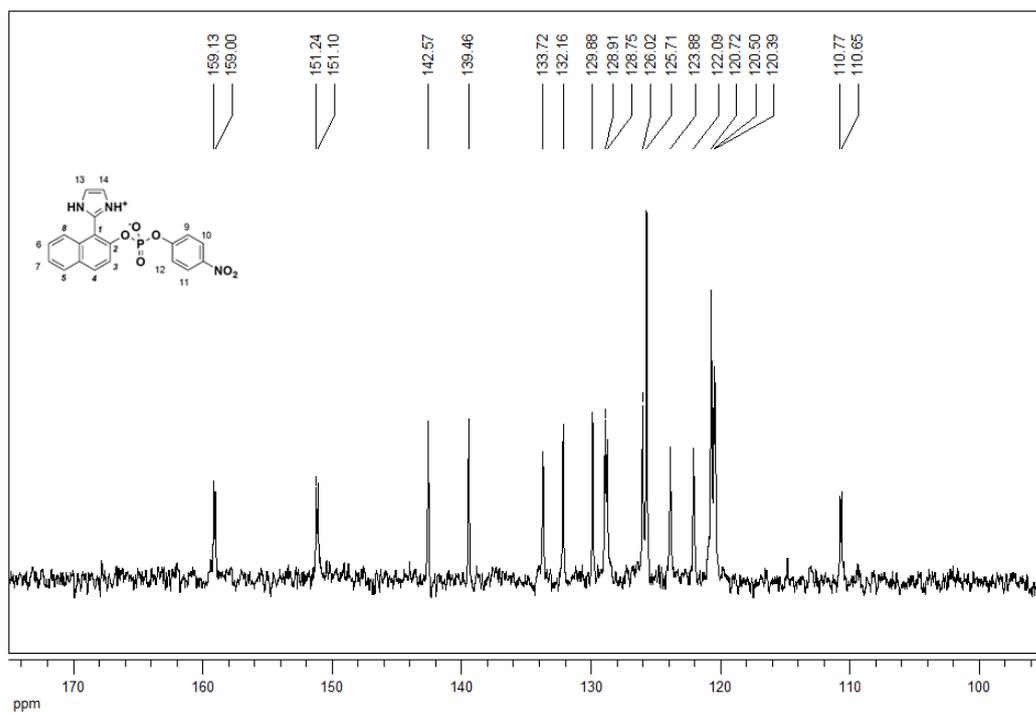
Anexo A – Espectros de RMN de ^1H , ^{31}P e ^{13}C para o 1Ni2P-pNP.



Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 200 MHz) do composto 1Ni2P-pNP.

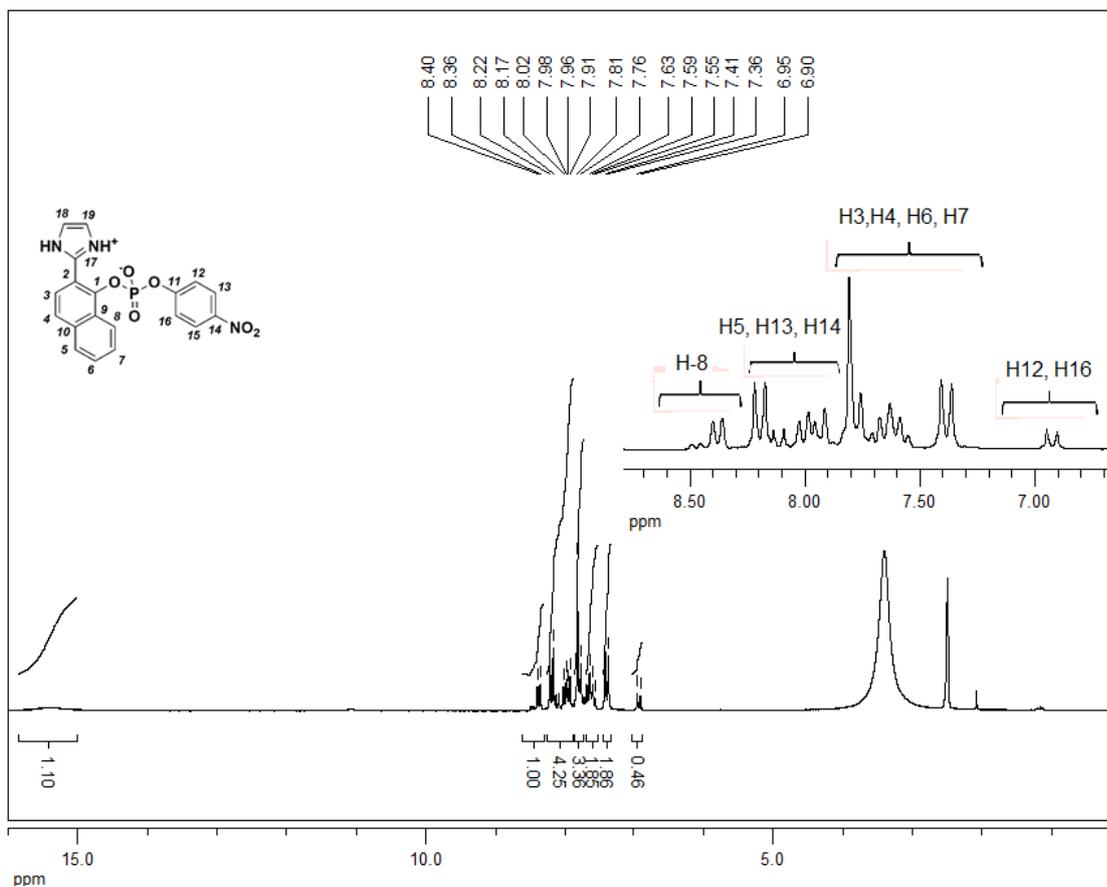


Espectro de RMN de ^{31}P ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 81 MHz) do composto 1Ni2P-pNP.

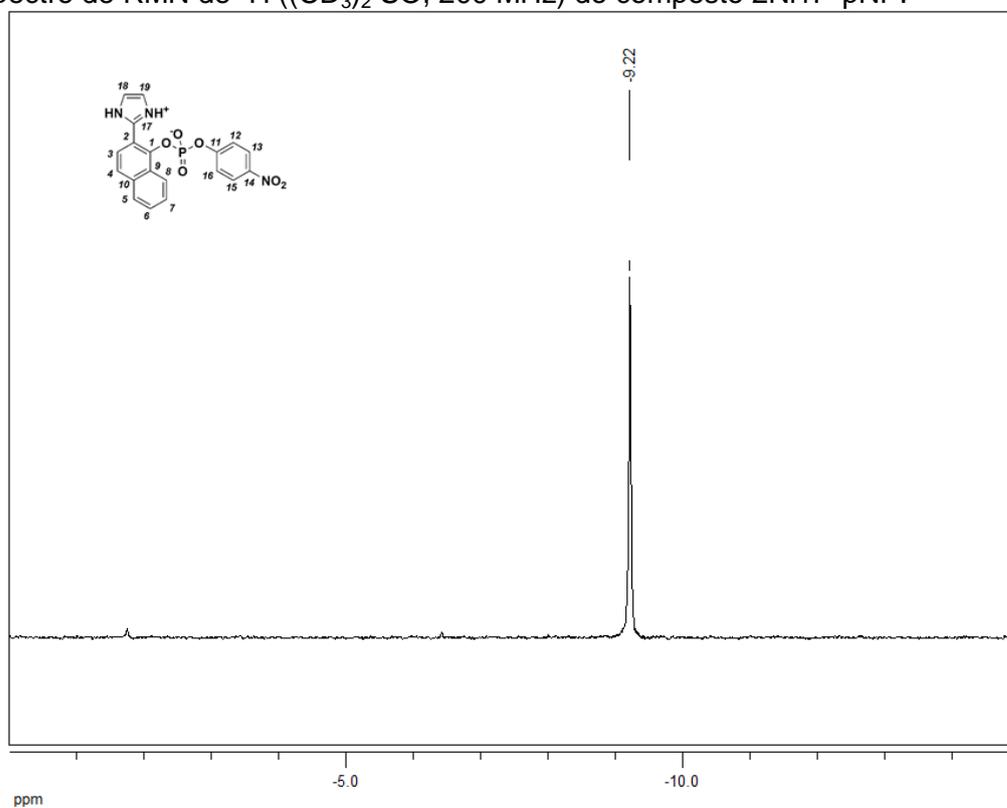


Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 50 MHz) do composto 1Ni2P-pNP.

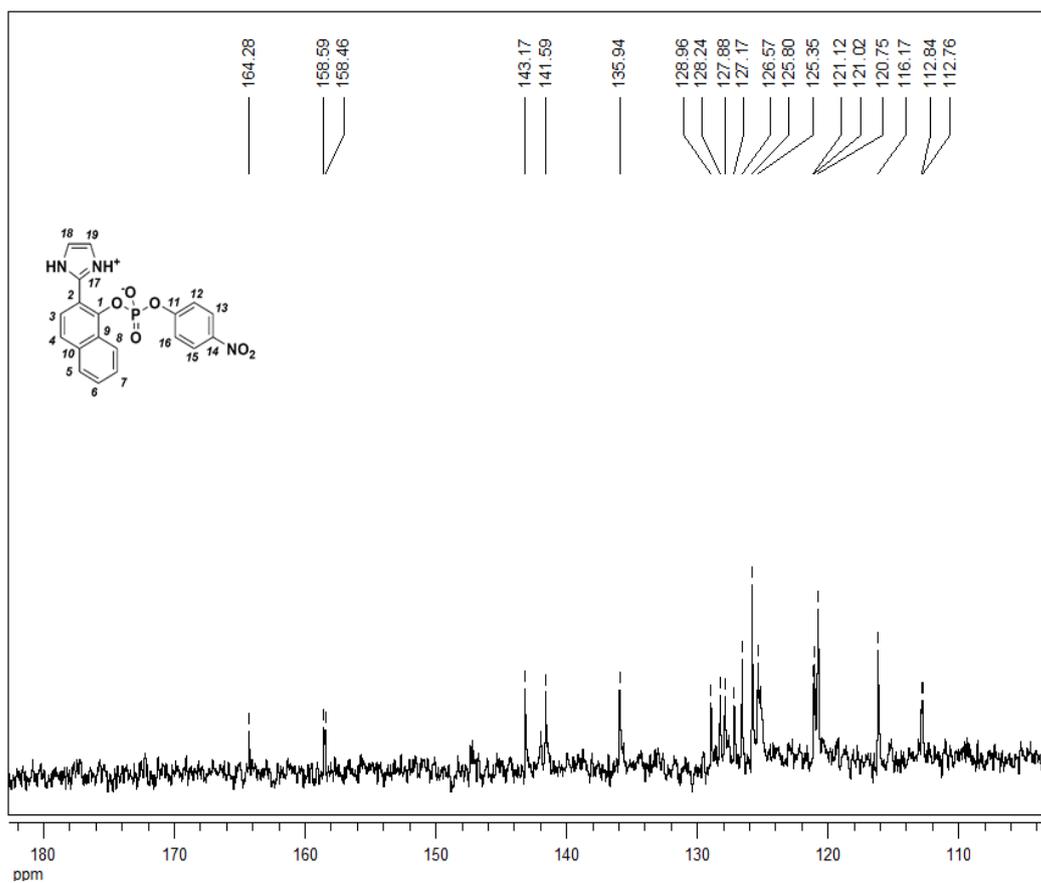
Anexo B – Espectros de RMN de ^1H ^{31}P e ^{13}C para o 2Ni1P-pNP.



Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 200 MHz) do composto 2Ni1P-pNP.

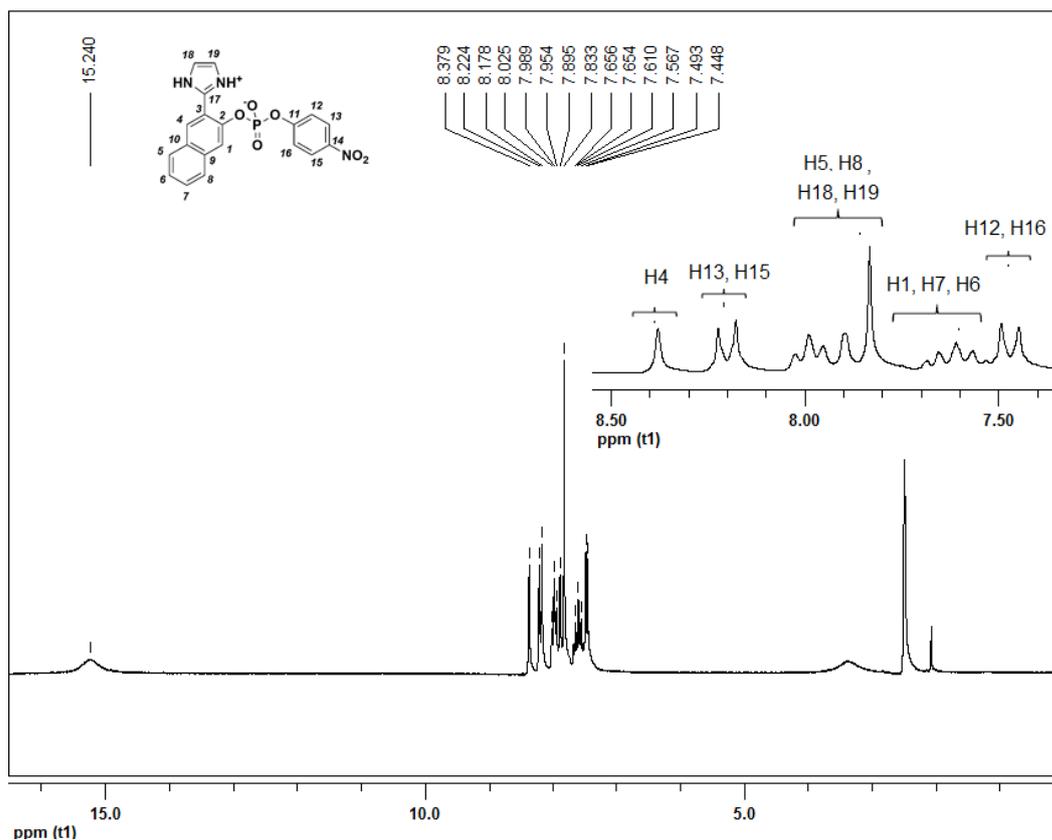


Espectro de RMN de ^{31}P ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 81 MHz) do composto 2Ni1P-pNP.

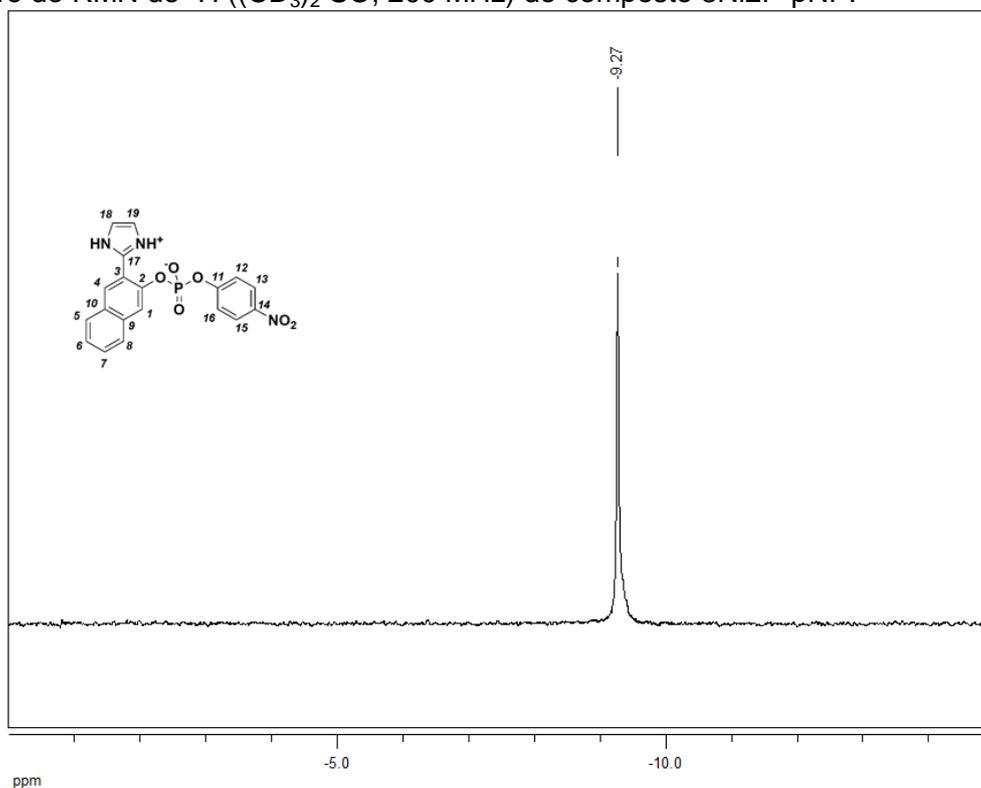


Espectro de RMN de ¹³C ((CD₃)₂ SO, 50 MHz) do composto 2Ni1P-pNP.

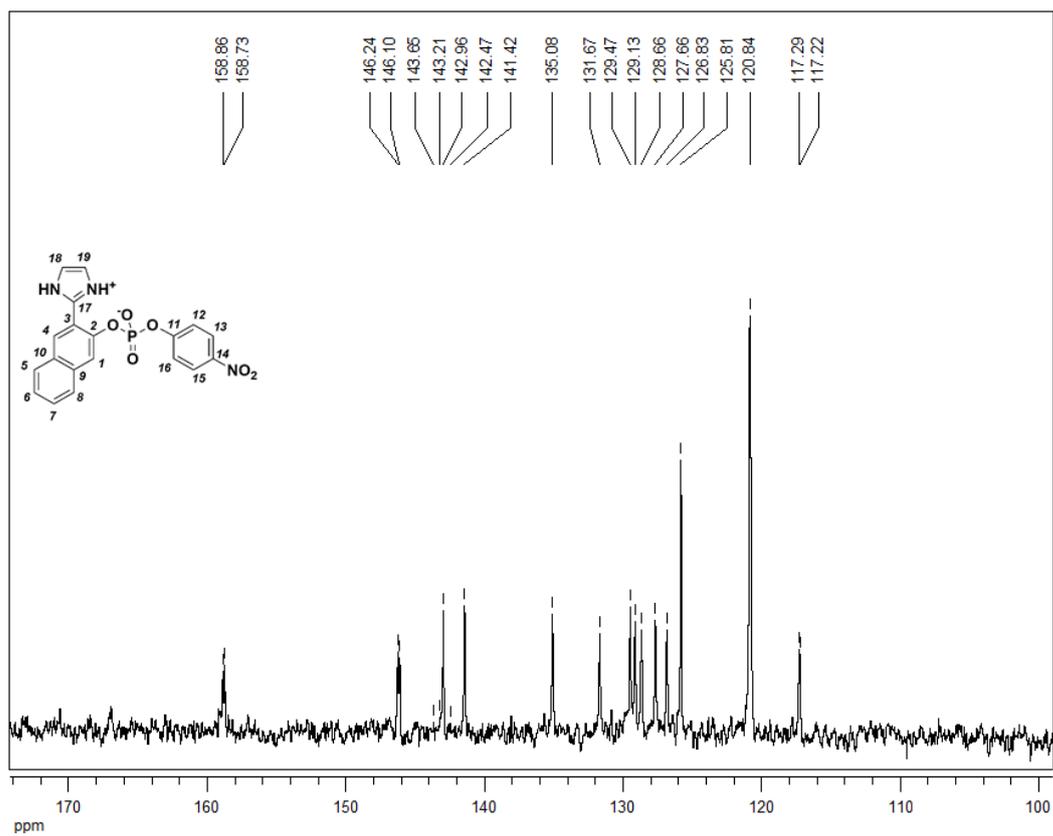
Anexo C – Espectros de RMN de ^1H , ^{31}P e ^{13}C para o 3Ni2P-pNP.



Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 200 MHz) do composto 3Ni2P-pNP.

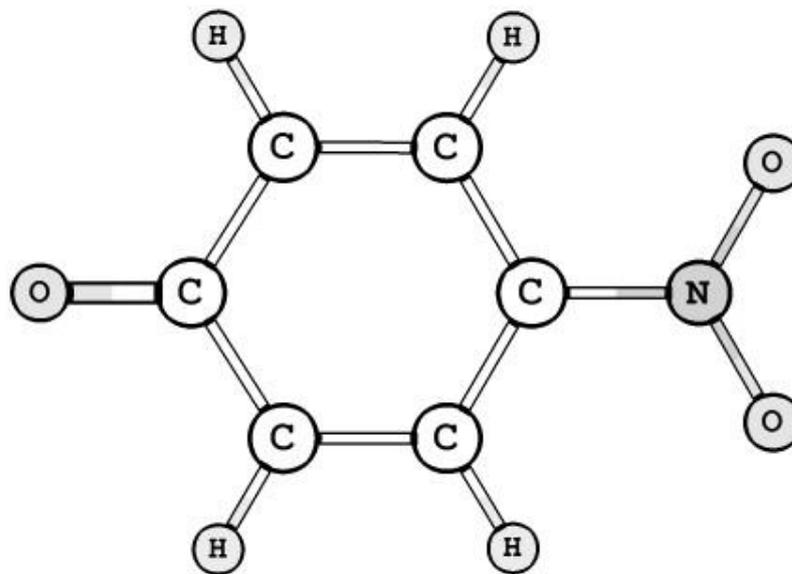


Espectro de RMN de ^{31}P ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 81 MHz) do composto 3Ni2P-pNP.



Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 50 MHz) do composto 3Ni2P-pNP.

Anexo D – Estrutura do p-nitrofenolato otimizada a nível B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-
(Solvente Água) PCM.



Anexo E– Valores de k_{obs} para cada nucleófilo em função de sua concentração para os três fosfoimidazóis cíclicos

Valores de k_{obs} para cada nucleófilo em função de sua concentração para o composto 1Ni2P.

Acetato		Formiato		Fosfato		Carbonato									
pH=8,00		pH=8,00		pH=8,00		pH=8,65		pH=8,95		pH=9,65		pH=9,52		pH=10,55	
Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$
0,2	2,6E-6	0,2	8,4E-6	0,2	1,06E-5	0,4	3,02E-5	0,4	1,77E-5	0,4	1,1E-5	0,4	1,38E-5	0,4	2,94E-5
0,4	1,07E-5	0,4	1,74E-6	0,4	1,86E-5	0,5	3,17E-5	0,5	1,87E-5	0,5	1,24E-5	0,5	2,08E-5	0,5	5,52E-5
0,6	2,03E-5	0,6	3,21E-6	0,6	2,11E-5	0,6	3,42E-5	0,6	2,09E-5	0,6	1,9E-5	0,6	2,45E-5	0,6	7,59E-5
0,8	3,6E-5	0,8	4,4E-6	0,8	3,74E-5	0,8	3,71E-5	0,8	2,63E-5	0,8	3,18E-5	0,8	3,46E-5	0,8	8,13E-5
1	4,9E-5	1	5,8E-6	1	4,23E-5	1	3,96E-5	1	3,18E-5	1	4,27E-5	1	4,06E-5	1	9,66E-5

Valores de k_{obs} para cada nucleófilo em função de sua concentração para o composto 2Ni1P.

Acetato		Formiato		Fosfato		Carbonato									
pH=8,00		pH=8,00		pH=8,00		pH=8,65		pH=8,95		pH=9,65		pH=9,52		pH=10,55	
Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$	Conc M	$k_{obs} (s^{-1})$
0,2	2,1E-5	0,2	1,32E-5	0,2	1,06E-5	0,4	7,7E-6	0,4	1,79E-5	0,4	3E-6	0,2	1,4E-5	0,2	9,08E-5
0,4	2,9E-5	0,4	1,69E-5	0,4	2,36E-5	0,5	1,2E-5	0,5	2,21E-5	0,5	1,25E-5	0,4	3,08E-5	0,4	1,196E-4
0,6	4,1E-5	0,6	1,84E-5	0,6	4,01E-5	0,6	2,1E-5	0,6	3,04E-5	0,6	2,35E-5	0,6	3,88E-5	0,6	1,44E-4
0,8	5E-5	0,8	2,39E-5	0,8	6,57E-5	0,8	2,47E-5	0,8	3,44E-5	0,8	3,69E-5	0,8	5,45E-5	0,8	1,64E-4
1	6E-5	1	2,75E-5	1	8,88E-5	1	3,12E-5	1	4,4E-5	1	5,09E-5	1	7,01E-5	1	2,024E-4

Valores de k_{obs} para cada nucleófilo em função de sua concentração para o composto 3Ni2P.

Acetato		Formiato		Fosfato		Carbonato		Carbonato		Carbonato		Carbonato	Carbonato
pH=8,00		pH=8,00		pH=8,00		pH=8,65		pH=8,95		pH=9,65		pH=9,52	pH=10,55
Conc M	$k_{\text{obs}} (s^{-1})$	Conc M	$k_{\text{obs}} (s^{-1})$	Conc M	$k_{\text{obs}} (s^{-1})$	Conc M	$k_{\text{obs}} (s^{-1})$	Conc M	$k_{\text{obs}} (s^{-1})$	Conc M	$k_{\text{obs}} (s^{-1})$	Conc M	$k_{\text{obs}} (s^{-1})$
0,2	2,02E-5	0,2	2,26E-5	0,4	3,359E-5	0,4	1,98E-5	0,4	2,99E-5	0,4	8,4E-6	0,4	2,02E-5
0,4	3,8E-5	0,4	3,67E-5	0,5	6,73E-5	0,5	2,02E-5	0,5	3,06E-5	0,5	1,04E-5	0,5	3,18E-5
0,6	5,90E-5	0,6	4,57E-5	0,6	7,75E-5	0,6	2,2E-5	0,6	3,58E-5	0,6	1,87E-5	0,6	4,34E-5
0,8	7,02E-5	0,8	5,16E-5	0,8	1,338E-4	0,8	3,03E-5	0,8	4,13E-5	0,8	3,09E-5	0,8	5,04E-5
1	8,50E-5	1	6,87E-5	1	2,598E-4	1	3,63E-5	1	4,82E-5	1	4E-5	1	5,87E-5

Anexo F– Valores de k_{obs} em diferentes valores de pH e temperatura para a reação de formação dos três fosfoimidazóis cíclicos

Valores de k_{obs} e $\log(k_{obs})$ para diferentes valores de pH para o composto 1Ni2P-pNP na reação de formação do fosfoimidazol 1Ni2P nas temperaturas indicadas.

Temperatura 15°C			Temperatura 25°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
12,06	0,00144	-2,84	9,85	0,000418	-3,37882
12,57	0,00288	-3,05	7,35	0,000234	-3,63078
13	0,00021	-3,68	8,58	0,000281	-3,55129
13,5	0,000669	-3,17	11,36	0,0011	-2,96019
14	0,00416	-2,38	12,56	0,01203	-1,91966
13,5	0,12378	-0,91	6,46	0,000114	-3,9431
13	0,02673	-1,57			
14	1,3144	0,12			
Temperatura 35°C			Temperatura 45°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
5,69	0,000149	-3,82681	6,56	0,00102	-2,99268
7,34	0,000756	-3,12148	6,95	0,00136	-2,86487
8,4	0,000904	-3,04383	8,06	0,00184	-2,73518
9,27	0,000993	-3,00305	9,01	0,00204	-2,69037
10,1	0,00136	-2,86519	9,98	0,00319	-2,49621
10,93	0,00307	-2,51272	10,92	0,00841	-2,0752
12,03	1,151	-1,02	3,26	1,08E-06	-5,96658
			4,3	1,74E-05	-4,75945
			8	0,00192	-2,7167
			8,51	0,00212	-2,67366
			9,01	0,00226	-2,64589
			5,23	0,000161	-3,79317
			5,98	0,000697	-3,15677
			7,18	0,00174	-2,75945
			10,62	0,00554	-2,2562
			11,72	0,05201	-1,28389
			12,12	0,10269	-0,98847
			13,01	0,619	-0,20831
			13,71	1,868	0,27138
			14,17	4,323	0,63579
			14,01	2,995	0,4764

Temperatura 55°C			Temperatura 65°C		
pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$	pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$
6,2	0,00197	-2,70531	6,68	0,00798	-2,098
7,07	0,00349	-2,45705	7,79	0,00935	-2,02919
8,12	0,00409	-2,38881	8,71	0,01026	-1,98885
9,03	0,00447	-2,34969			
9,43	0,00521	-2,28316			
10,92	0,01785	-1,74836			

Valores de k_{obs} e $\log(k_{\text{obs}})$ para diferentes valores de pH para o composto 2Ni1P-PNP na reação de formação do fosfoimidazol 2Ni1P nas temperaturas indicadas.

Temperatura 15°C			Temperatura 25°C		
pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$	pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$
7,48	6,79E-05	-4,16813	8,02	3,10E-04	-3,50836
8,05	1,07E-04	-3,97021	8,49	3,27E-04	-3,48585
8,6	1,08E-04	-3,96497	8,98	3,34E-04	-3,4769
9,1	1,31E-04	-3,88306	9,45	3,52E-04	-3,45321
9,55	1,77E-04	-3,75105	10	2,85E-04	-3,54577
10,1	1,84E-04	-3,73565	10,48	6,22E-04	-3,20656
10,43	2,08E-04	-3,68215	10,97	0,00123	-2,90939
11,02	2,77E-04	-3,55689	11,55	0,00353	-2,45211
11,52	5,70E-04	-3,24405	12,09	0,01514	-1,81996
12,01	0,00119	-2,92478	4,98	1,09E-05	-4,96257
			6,04	7,55E-05	-4,12205
			6,44	1,17E-04	-3,93256
			7,03	1,96E-04	-3,70863
Temperatura 35°C			Temperatura 45°C		
pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$	pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$
6,07	2,06E-04	-3,6855	7,08	7,90E-04	-3,10221
6,56	3,37E-04	-3,47289	7,52	0,00142	-2,84701
7,08	4,83E-04	-3,31569	7,99	0,00156	-2,80813
7,5	6,57E-04	-3,18243	8,42	0,00157	-2,80385
8,09	7,23E-04	-3,14068	9,45	0,00186	-2,73126
8,63	7,38E-04	-3,13188	9	0,00176	-2,75444
9,08	7,92E-04	-3,10149	10	0,00262	-2,58138
9,65	8,41E-04	-3,07546	10,53	0,00471	-2,32734
10,1	0,00112	-2,95148	11	0,01055	-1,97675
10,6	0,00185	-2,73313	11,5	0,03159	-1,50045
11,06	0,0027	-2,56905	11,98	0,09809	-1,00838
11,45	0,00568	-2,24554	5,56	3,63E-04	-3,44033
12,06	0,01935	-1,71339	6,04	4,92E-04	-3,3083
6,42	2,56E-04	-3,5921	6,52	8,59E-04	-3,06586
6,07	2,06E-04	-3,6855	7,08	7,90E-04	-3,10221
6,56	3,37E-04	-3,47289	7,52	0,00145	-2,83794

Temperatura 55°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
4,09	5,42E-05	-4,266
4,55	1,59E-04	-3,79751
4,99	3,54E-04	-3,451
5,53	8,10E-04	-3,09146
6,07	0,00166	-2,77906
6,53	0,00228	-2,64214
7,02	0,00304	-2,51754
7,5	0,00332	-2,47837
7,99	0,00343	-2,46472
8,5	0,00364	-2,43905
9,06	0,00379	-2,42154
9,53	0,00495	-2,30551
10	0,00738	-2,13207
10,5	0,01428	-1,84539
11	0,04032	-1,39451
11,5	0,0998	-1,00087
12	0,33215	-0,47867

Valores de k_{obs} e $\log(k_{obs})$ para diferentes valores de pH para o composto 3Ni2P-pNP na reação de formação do fosfoimidazol 3Ni2P nas temperaturas indicadas

Temperatura 15°C			Temperatura 25°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
11,49	0,00666	-2,17682	8,53	0,00146	-2,83499
11,03	0,00279	-2,55408	9,14	0,00159	-2,79975
10,46	0,00102	-2,99029	10,04	0,0022	-2,65746
10,05	8,22E-04	-3,08539	11,15	0,0095	-2,02223
9,56	5,70E-04	-3,24428	11,97	0,05174	-1,28616
9,06	5,38E-04	-3,26946	11,45	0,02068	-1,68437
8,54	5,14E-04	-3,28887	10,54	0,00389	-2,40958
8,02	5,90E-04	-3,22915	7,52	0,00122	-2,91393
7,5	3,73E-04	-3,42783	6,95	9,56E-04	-3,01977
7,06	3,26E-04	-3,48678	6,59	4,26E-04	-3,37049
6,55	2,89E-04	-3,53895	6,05	3,31E-04	-3,48017
			5,63	1,33E-04	-3,87648
			5	3,32E-05	-4,47886
Temperatura 35°C			Temperatura 45°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
7,5	0,00316	-2,50086	5,48	0,00154	-2,81248
6,6	0,00197	-2,7058	5,05	0,00113	-2,94692
8,35	0,00346	-2,46143	4,55	2,01E-04	-3,69789
10,08	0,00473	-2,32514	4,04	5,71E-05	-4,24336
9,35	0,00465	-2,33255	6,07	0,00289	-2,5391
8,45	0,00349	-2,4568	8,49	0,0065	-2,18699
10,53	0,00874	-2,05864	8,03	0,00637	-2,19591
Temperatura 55°C			7,5	0,00611	-2,21424
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	7,06	0,00562	-2,25036
4,04	2,01E-04	-3,69724	6,52	0,00435	-2,36136
4,56	3,78E-04	-3,42205	9	0,0062	-2,20761
5,05	0,0029	-2,5376	9,5	0,0068	-2,16749
5,81	0,0053	-2,27572	10,05	0,0121	-1,91721
6,5	0,0084	-2,07572	10,54	0,0227	-1,64397
7,05	0,0106	-1,97469	11,03	0,0672	-1,17263
7,48	0,0103	-1,98716	13,01	1,795	0,25406
8,18	0,0097	-2,01323	13,6	13,329	1,1248
8,69	0,012	-1,92082	14,32	28,534	1,45536
9,52	0,0191	-1,71897	14,8	52,16	1,71734
10,1	0,0347	-1,45967	14,64	90,377	1,95606
			15,02	33,238	1,52163
			15,35	44,087	1,64431

Temperatura 65°C			Temperatura 75°C		
pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$	pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$
3,5	1,16E-04	-3,93629	5,12	0,01328	-1,8768
4,03	3,37E-04	-3,47198	5,57	0,0193	-1,71444
4,56	0,0046	-2,33766	6,12	0,03151	-1,50161
5,01	0,00603	-2,21945	6,69	0,03846	-1,41496
5,56	0,00996	-2,00193	7,16	0,03914	-1,4074
6,09	0,01517	-1,8189	7,72	0,04195	-1,37726
6,53	0,01809	-1,74254			
7,09	0,01986	-1,70209			
7,54	0,02205	-1,65659			

Anexo G– Valores de k_{obs} em diferentes valores de pH e temperatura para a reação de hidrólise dos três fosfoimidazóis cíclicos.

Valores de k_{obs} e $\log(k_{obs})$ para diferentes valores de pH para a reação de hidrólise do fosfoimidazol 1Ni2P nas temperaturas indicadas.

Temperatura 15°C			Temperatura 25°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
0,63	0,00121	-2,91894	1,88	0,00109	-2,96225
1	0,00111	-2,95581	3,85	5,49E-04	-3,26074
1,81	5,91E-04	-3,22827	4,05	3,50E-04	-3,45618
2,3	5,40E-04	-3,26769	2,26	0,00101	-2,99632
2,9	4,43E-04	-3,3533	3,3	8,07E-04	-3,09307
3,43	3,88E-04	-3,41083	2,77	0,00101	-2,99632
4,04	1,80E-04	-3,74594	5,04	5,01E-05	-4,30016
4,48	9,09E-05	-4,04144	4,55	1,53E-04	-3,81645
5,02	3,55E-05	-4,44977	5,49	2,13E-05	-4,67162
5,45	1,75E-05	-4,75696	6,13	9,00E-06	-5,04576
11,5	6,30E-06	-5,20066	6,5	3,80E-06	-5,42022
			10,83	4,40E-06	-5,35655
			11,2	9,60E-06	-5,01773
			11,87	4,11E-05	-4,38616
Temperatura 35°C					
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$			
2,45	0,00175	-2,75818			
3,33	0,00131	-2,88187			
5,25	4,97E-05	-4,30364			
5,7	2,09E-05	-4,67985			
1,58	0,00233	-2,63242			
0,47	0,00632	-2,19955			
2,06	0,00204	-2,68954			
3,03	0,00136	-2,86624			
4,7	1,83E-04	-3,73684			
3,77	9,31E-04	-3,03105			
6,01	1,04E-05	-4,98297			
6,53	3,20E-06	-5,49485			
9,68	2,61E-06	-5,58336			
11,4	6,21E-05	-4,20691			
10,88	1,95E-05	-4,70997			

Temperatura 45°C			Temperatura 55°C		
pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$	pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$
6,5	1,11E-05	-4,95468	2,08	0,00723	-2,14063
10,51	1,17E-04	-3,93367	2,7	0,00545	-2,26356
11,01	4,86E-04	-3,31345	3,45	0,0039	-2,4088
0,65	0,0191	-1,71903	4,22	0,00104	-2,98184
0,95	0,01887	-1,72425	4,99	2,62E-04	-3,58153
1,63	0,00664	-2,178	6,15	1,94E-05	-4,7122
2,46	0,00541	-2,26695	6,5	1,11E-05	-4,95468
11,9	0,00222	-2,65337	10,51	1,17E-04	-3,93367
5,51	7,51E-05	-4,12436	11,01	4,86E-04	-3,31345
6,51	9,20E-06	-5,03621	0,65	0,0191	-1,71903
7,03	4,10E-06	-5,38722	0,95	0,01887	-1,72425
7,54	2,60E-06	-5,58503	1,63	0,00664	-2,178
8,1	2,70E-06	-5,56864	2,46	0,00541	-2,26695
8,45	2,60E-06	-5,58503	11,9	0,00222	-2,65337
8,99	7,40E-06	-5,13077	5,51	7,51E-05	-4,12436
10,96	1,57E-04	-3,80327	6,51	9,20E-06	-5,03621
10,49	7,60E-05	-4,11919	7,03	4,10E-06	-5,38722
9,97	2,81E-05	-4,55129	7,54	2,60E-06	-5,58503
9,47	9,70E-06	-5,01323	8,1	2,70E-06	-5,56864
5,73	1,94E-05	-4,7122	8,45	2,60E-06	-5,58503
10,4	1,42E-05	-4,84802	8,99	7,40E-06	-5,13077
0	0,1678	-0,77521	10,96	1,57E-04	-3,80327
-0,5	0,2126	-0,67244	10,49	7,60E-05	-4,11919
-0,73	0,2868	-0,54242	9,97	2,81E-05	-4,55129
-0,89	0,3932	-0,40539	9,47	9,70E-06	-5,01323
7	3,60E-06	-5,4437	5,73	1,94E-05	-4,7122
7,52	1,20E-06	-5,92082			
8,02	5,00E-07	-6,30103			
8,52	4,00E-07	-6,39794			

Valores de k_{obs} e $\log(k_{obs})$ para diferentes valores de pH para a reação de hidrólise do fosfoimidazol 2Ni1P nas temperaturas indicadas.

Temperatura 15°C			Temperatura 25°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
0,75	0,0022	-2,65758	0,76	0,00409	-2,38823
1,25	0,00115	-2,93923	0,92	0,00325	-2,48785
1,85	7,04E-04	-3,15218	1,81	0,00122	-2,91535
2,26	5,22E-04	-3,28241	2,45	9,87E-04	-3,00568
2,86	5,04E-04	-3,29731	3,12	7,93E-04	-3,10095
3,32	4,99E-04	-3,30181	3,68	4,68E-04	-3,33013
3,72	4,68E-04	-3,32957	3,99	3,78E-04	-3,42297
4,1	2,58E-04	-3,58804	4,62	1,42E-04	-3,8468
4,45	1,22E-04	-3,91257	3,6	5,56E-04	-3,25524
4,97	5,40E-05	-4,26761	4,11	3,42E-04	-3,46636
12,03	6,58E-05	-4,18177	5,13	6,45E-05	-4,19044
11,5	4,74E-05	-4,32422	5,6	1,60E-05	-4,79588
11,1	1,23E-05	-4,91009	6,06	1,53E-05	-4,81531
6,09	7,50E-06	-5,12494	6,5	1,01E-05	-4,99568
6,61	3,90E-06	-5,40894	11,55	3,71E-05	-4,43063
11,05	9,90E-06	-5,00436	12,15	4,64E-05	-4,33348
11,45	1,22E-05	-4,91364			
Temperatura 35°C					
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$			
0,86	0,00624	-2,20493			
1,12	0,00417	-2,37971			
1,86	0,00249	-2,6034			
3,47	0,00153	-2,81474			
4,01	9,55E-04	-3,01991			
11,05	2,24E-05	-4,64975			
11,49	5,09E-05	-4,29328			
4,55	2,33E-04	-3,63209			
3,12	0,00158	-2,80187			
11,97	2,33E-04	-3,63302			
2,43	0,00152	-2,81927			
5,13	1,24E-04	-3,90588			
6,06	2,56E-05	-4,59176			
6,47	1,25E-05	-4,90309			
11,02	4,05E-05	-4,39254			
11,53	9,28E-05	-4,03245			
12,12	2,25E-04	-3,64878			

Temperatura 45°C			Temperatura 55°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
2,06	0,00384	-2,41574	11,66	2,02E-04	-3,69486
2,56	0,00322	-2,49266	0,83	0,02314	-1,63564
3,05	0,00304	-2,51763	0,95	0,01812	-1,74179
3,53	0,00216	-2,66516	5,04	1,12E-04	-3,95273
4,02	0,00131	-2,88333	12,04	3,87E-04	-3,41263
4,56	5,59E-04	-3,25236	1,8	0,01008	-1,99671
1	0,02219	-1,6538	2,62	0,00568	-2,24602
0,85	0,02287	-1,64068	2,13	0,00606	-2,21785
6,06	1,39E-05	-4,85699	3,2	0,00461	-2,33653
6,5	9,00E-06	-5,04576	3,68	0,00311	-2,50696
1,78	0,00414	-2,38338	4,12	0,00216	-2,66539
12	1,83E-04	-3,73731	5,41	8,47E-05	-4,07212
11,1	5,77E-05	-4,23882	6,09	1,56E-05	-4,80688
0	0,1678	-0,77521	6,55	7,70E-06	-5,11351
-0,52	0,2126	-0,67244	7	5,90E-06	-5,22915
-0,76	0,2788	-0,55471	8,11	8,00E-07	-6,09691
-0,88	0,3932	-0,40539	8,48	9,00E-07	-6,04576
7	5,10E-06	-5,29243	9,02	2,20E-06	-5,65758
7,52	6,00E-06	-5,22185	10	1,78E-05	-4,74958
8,02	4,00E-06	-5,39794	10,38	3,28E-05	-4,48413
8,52	7,60E-06	-5,11919	10,66	6,38E-05	-4,19518
			11,2	1,67E-04	-3,77676
			12,07	5,20E-04	-3,28433

Valores de k_{obs} e $\log(k_{obs})$ para diferentes valores de pH para a reação de hidrólise do fosfoimidazol 3Ni2P nas temperaturas indicadas.

Temperatura 15°C			Temperatura 25°C		
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$	pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$
0,63	0,00268	-2,57185	4,99	3,28E-04	-3,48386
1	0,00174	-2,75843	4,51	6,60E-04	-3,18019
1,81	0,00118	-2,92691	4,02	0,00117	-2,93323
2,3	0,00115	-2,94078	3,45	0,00165	-2,78207
2,9	9,56E-04	-3,01968	3,04	0,00181	-2,74177
3,43	8,81E-04	-3,05493	2,46	0,00198	-2,70285
4,04	5,79E-04	-3,23725	2,15	0,00202	-2,69527
4,48	3,72E-04	-3,42969	5,5	1,42E-04	-3,84649
5,02	1,62E-04	-3,78941	6,02	4,97E-05	-4,30364
5,45	8,50E-05	-4,07058	6,58	1,52E-05	-4,81816
11,5	1,28E-05	-4,89279	10,16	6,40E-06	-5,19382
			10,35	9,60E-06	-5,01773
Temperatura 35°C					
pH	$k_{obs} s^{-1}$	$\log(k_{obs})$			
12,5	6,37E-05	-4,19586			
2,45	0,0036	-2,44381			
3,33	0,0029	-2,53735			
4,12	0,00178	-2,74978			
5,57	1,42E-04	-3,8471			
6,1	7,53E-05	-4,12321			
0,47	0,00894	-2,04852			
1,58	0,00402	-2,39626			
2,06	0,00374	-2,42747			
3,03	0,00391	-2,40832			
3,77	0,00241	-2,61883			
4,7	7,97E-04	-3,09838			
6,01	5,89E-05	-4,22988			
6,53	2,13E-05	-4,67162			
11,4	4,63E-05	-4,33442			
10,88	1,72E-05	-4,76447			
9,98	1,10E-05	-4,95861			

Temperatura 45°C			Temperatura 55°C		
pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$	pH	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\log(k_{\text{obs}})$
2,22	0,00641	-2,19308	2,08	0,01097	-1,95995
2,8	0,00615	-2,21084	2,7	0,01037	-1,98426
3,3	0,00494	-2,30619	3,45	0,00857	-2,0668
3,96	0,0035	-2,45577	4,22	0,00393	-2,40539
4,58	0,00161	-2,79382	4,99	0,00104	-2,98176
5,05	6,89E-04	-3,16159	6,15	8,46E-05	-4,07242
5,58	2,17E-04	-3,66294	6,5	5,06E-05	-4,29585
6,44	1,03E-04	-3,98801	10,51	1,82E-04	-3,73993
7,02	2,13E-05	-4,67162	11,01	4,44E-04	-3,35242
7,55	6,20E-06	-5,20761	0,65	0,02129	-1,67182
11,87	3,21E-04	-3,49363	0,95	0,0199	-1,70123
10,46	1,37E-05	-4,86328	1,63	0,01321	-1,879
9,75	7,90E-06	-5,10237	2,46	0,01128	-1,94765
11,52	1,42E-04	-3,84832	11,9	0,00173	-2,76073
11	4,86E-05	-4,31336	5,51	3,56E-04	-3,44904
0	0,1611	-0,7929	5,73	8,64E-05	-4,06349
-0,48	0,217	-0,66354	6,51	4,66E-05	-4,33161
-0,7	0,3147	-0,5021	7,03	1,71E-05	-4,767
-0,85	0,414	-0,383	7,54	6,90E-06	-5,16115
8,02	1,30E-06	-5,88606	8,45	4,20E-06	-5,37675
8,52	1,80E-06	-5,74473	9,47	7,00E-06	-5,1549
			9,97	2,20E-05	-4,65758
			10,49	6,51E-05	-4,18642
			10,96	1,79E-04	-3,74618
			11,9	0,00189	-2,72402