



**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Físicas e Matemáticas**  
**Departamento de Química**  
**Curso de Pós-Graduação em Química**

**Catálise Intramolecular Bifuncional em um Diéster  
de Fosfato: Modelando o Mecanismo da  
Ribonuclease**

**Elisa Souza Orth**

**Orientador: Prof Faruk José Nome Aguilera**

**Florianópolis, Fevereiro de 2008**

**Elisa Souza Orth**

**Catálise Intramolecular Bifuncional em um Diéster  
de Fosfato: Modelando o Mecanismo da  
Ribonuclease**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química (área de concentração: Química Orgânica) da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química.

**Orientador: Prof. Faruk José Nome Aguilera**

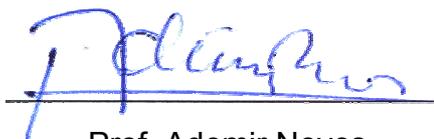
**Florianópolis, Fevereiro de 2008**

**Elisa Souza Orth**

**Catálise Intramolecular Bifuncional em um Diéster de Fosfato: Modelando o Mecanismo da Ribonuclease**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 22 de Fevereiro de 2008.



Prof. Ademir Neves

Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**



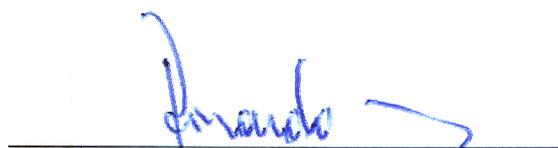
Prof. Faruk José Nome Aguilera

Orientador



Prof. Gustavo Amadeu Micke

(UFSC)



Prof. Ricardo José Nunes

(UFSC)



Prof. Héryan Franciso Terenzi

(UFSC)

## AGRADECIMENTOS

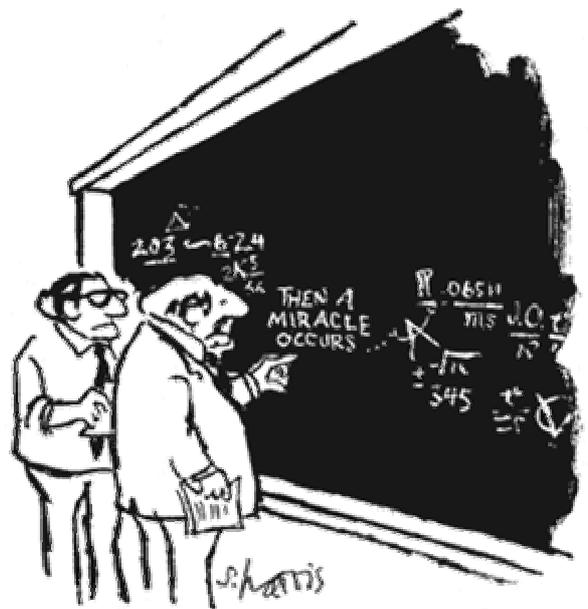
Gostaria de agradecer ao Professor Faruk Nome pela orientação, apoio, credibilidade e amizade. Meu amadurecimento acadêmico, em grande parte, deve-se a ele, cuja intelectualidade em muito me inspirou. Nesses últimos seis anos de convivência universitária pude aprender muito, não só em relação à ciência, mas à vida, e especialmente nos dois últimos anos de mestrado, nossas conversas ou até opiniões dispersas ampararam muitas das minhas decisões. Obrigada, pelas festas, pelos cafés, pelos churrascos, pelas aprendizagens e pelos conselhos.

Agradeço a toda família LACFI, que se tornou para mim muito mais que colegas de trabalho. A cada um, muito obrigada pela amizade, pelo café, pelas risadas e até mesmo pelas discussões, que com certeza em algo me acrescentaram. Especialmente agradeço a Renata, que além de uma grande amiga, de caráter inestimável, mostrou-se uma colega de trabalho excepcional, que muito ajudou no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço à Michelle também pela amizade e companheirismo, pelo apoio e pelas correções textuais indispensáveis nesse trabalho. Ao Bruno, pela colaboração nos cálculos computacionais, bem como nas muitas discussões proveitosas. Ao Tiago Brandão pela inspiração e amizade, cuja participação nesse trabalho foi indispensável.

Ao Professor Marcos Eberlin e Humberto Milagre pelo auxílio e disponibilização da estrutura do laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massa na UNICAMP para realização dos estudos de ESI-MS(MS).

Acima de todas estas pessoas, agradeço aos meus pais que são meus maiores ídolos. Aqueles que me garantiram uma educação exemplar, consolidando muitos valores imprescindíveis na minha vida, ensinando-me a almejar conquistas, mas também valorizar as derrotas. Com certeza eles tiveram papel fundamental na minha motivação acadêmica. Mãe, agradeço por toda paciência e carinho, bem como por toda dedicação e incentivo. Sem você, nada disso seria possível. Espero estar correspondendo a suas expectativas. Pai, obrigada pela rica influência acadêmica, e pelos sábios conselhos. Por fim, agradeço a todas aquelas pessoas que de alguma forma enriqueceram minha aprendizagem, me amparando nos momentos difíceis ou vitoriosos, pelos alicerces da amizade ou do amor.

Ao CNPq e a UFSC, pelo apoio financeiro e infra-estrutura.



"I THINK YOU SHOULD BE MORE EXPLICIT HERE IN STEP TWO."

## RESUMO

As ribonucleases constituem enzimas que quebram o RNA eficientemente, mas sua forma de atuação ainda não é de consenso entre os pesquisadores. Neste trabalho estudou-se a reação de hidrólise do diéster bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato, **BMIPP**. Foi obtido um perfil de pH em forma de sino, indicando uma catálise bifuncional pela espécie reativa zwitteriônica, com um máximo de velocidade em pH 6,5-6,8. Sugere-se que o efeito catalítico observado para **BMIPP** (hidrólise  $10^6$  vezes mais rápida que difenil fosfato) deve-se a uma catálise intramolecular básica do imidazol desprotonado sobre a água, simultânea a uma catálise intramolecular ácida do imidazol protonado, assistindo o grupo de saída. O efeito isotópico obtido (1,42) é típico de reações que envolvem uma transferência de próton no estado de transição. Os parâmetros de ativação também são consistentes com o mecanismo proposto, pois são característicos de reações bimoleculares com estado de transição altamente hidratado. Através desse mecanismo ácido-base, o diéster **BMIPP** forma como produtos o monóéster correspondente (**Me-IMPP**) e o 2-(1-metil-imidazol-2-il)fenol (**IMP**) e, posteriormente, o monoéster **Me-IMPP** sofre hidrólise levando à formação de um segundo equivalente do **IMP**. Através dos estudos de ESI-MS e ESI-MS/MS foi possível acompanhar a reação do **BMIPP** e identificar todos os produtos. Cálculos computacionais também foram realizados, e para a estrutura otimizada do estado de transição da reação do **BMIPP** com H<sub>2</sub>O, observou-se que a distância entre o oxigênio fenólico e o hidrogênio do imidazol protonado é característico de ligação de hidrogênio (1,7 Å), favorecendo uma catálise ácida intramolecular. O ataque da água sobre o fósforo também se mostrou favorável, com o nitrogênio imidazólico afastado 2,7 Å do hidrogênio da água. Apesar do impedimento conformacional dos grupos metilas, **BMIPP** se mostrou um eficiente modelo bifuncional da ribonuclease.

Palavras-chave: diéster de fosfato, ribonuclease, catálise intramolecular.

## ABSTRACT

Ribonucleases are enzymes that cleave RNA efficiently, through a mechanism which is not fully understood. In this study, the hydrolysis of the phosphate diester (bis(2-(1-methyl-1H-imidazolyl)phenyl)phosphate) **BMIPP** was evaluated. The bell-shaped pH-rate profile observed indicates bifunctional catalysis by the active zwitterionic species with a rate maximum at pH 6.5-6.8. The catalytic effect observed for **BMIPP** (hydrolysis  $10^6$  times faster than diphenyl phosphate) was attributed to an intramolecular basic catalysis of the deprotonated imidazole assisting the water attack, simultaneously to an intramolecular acid catalysis of the protonated imidazole, interacting with the leaving group. The observed kinetic isotope effect (1.42) is typical of reactions that involve proton transfer in the transition state. The activation parameters obtained indicate a bimolecular hydrolysis mechanism involving a highly hydrated transition state, consistent with the proposed mechanism. Hydrolysis of **BMIPP** through this acid-base pathway leads to the monoester **Me-IMP** and 2-(1-methyl-imidazol-2-yl)phenol (**IMP**) and, consecutively the hydrolysis of the monoester forms the second equivalent of **IMP**. The hydrolysis of **BMIPP** was also followed by ESI-MS and ESI-MS/MS, where all the expected products were identified, confirming the proposed mechanism. Computational studies were carried out and the optimized structure for the transition state for the reaction of **BMIPP** with  $H_2O$  showed that the distance between the phenolic oxygen and the protonated imidazole hydrogen is characteristic of hydrogen bonding (1.7 Å), favoring an intramolecular acid catalysis. The attack of water on the phosphorus was also favored, with the imidazolinic nitrogen and the water hydrogen 2.7 Å apart. Despite the conformational hindrance of the methyl groups, **BMIPP** was shown to be an efficient bifunctional ribonuclease model.

Keywords: phosphate diester, ribonuclease, intramolecular catalysis.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Tempo de meia-vida de algumas reações biológicas em solução neutra a 25°C. Das reações apresentadas, as que envolvem quebra da ligação P-O estão entre as mais demoradas. ....	13
<b>Figura 2</b> – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks de coordenada de reação para o ataque nucleofílico de N: sobre um monoéster de fosfato. O asterisco corresponde à posição de um estado de transição sincrônico e as coordenadas $A_N$ e $D_N$ correspondem a uma etapa associativa ou dissociativa. <sup>11</sup> .....	14
<b>Figura 3</b> – Modelo chave-fechadura para reações de A e B catalisadas pela enzima com sítios ativos X, Y e Z. ....	17
<b>Figura 4</b> – Comparação do diagrama de energia livre para uma reação enzimática ( $_{cat}$ ) e a reação correspondente em solução ( $_{cage}$ ). O substrato é designado como “L”, a parte reativa da enzima como L’ e E como enzima. ....	18
<b>Figura 5</b> – Estrutura cristalina do complexo da ribonuclease A com o nucleotídeo AMP (adenosina mono fosfato). <sup>30</sup> .....	21
<b>Figura 6</b> – Modelo de clivagem de RNA por RNase A, onde a cadeia polinucleotídica de fosfato se liga nos múltiplos sítios da enzima, P0, P1 e P2.....	22
<b>Figura 7</b> – Mecanismos propostos para a clivagem de RNA por RNase A. ....	22
<b>Figura 8</b> - Estrutura obtida por dinâmica molecular de RNase A/3’-UMP. <sup>38</sup> .....	24
<b>Figura 9</b> – Estrutura do tris (aminobenzilimidazol), <b>TABI</b> e dos substratos de RNA, “hairpin” e linear. ....	26
<b>Figura 10</b> – Estrutura do $\beta$ -ciclodextrina 6,6’-bis(imidazol), 4 e reação de hidrólise do 4-tert-butilcatecol fosfato cíclico 5. ....	27
<b>Figura 11</b> – Ribonuclease artificial contendo de imidazol onde ODN é oligo-deoxiribonucleotídeo. <sup>51</sup> .....	28
<b>Figura 12</b> – Eletroferogramas para a clivagem de tRNA na presença de tampão imidazol(a) e poliamina com grupo imidazol ancorado(b). As indicações dos sítios de clivagem estão apresentadas em (c).....	29
<b>Figura 13</b> – Estrutura do dendrímero peptídico <b>10</b> , construído a partir do dendron Dap-His-Ser (Dap=ácido 2,3-diamino-propriônico) e a reação de hidrólise do 8-butiloxipireno 1,3,6-trissulfonato.....	30
<b>Figura 14</b> – Espectro de RMN $^1H$ para <b>BMIPP</b> em D <sub>2</sub> O a 400MHz.....	34
<b>Figura 15</b> – Espectro de RMN $^1H$ ampliado para região 7.0-7.9 para <b>BMIPP</b> . ....	34
<b>Figura 16</b> – Espectros de UV-Vis para a reação de hidrólise do <b>BMIPP</b> em pH 6,5, 60° e $I=1,0$ (KCl).....	36

<b>Figura 17</b> – (a) Curva de titulação de uma solução 1,0 mM de <b>BMIPP</b> , KOH a 0,1008 M, força iônica a 0,1 (KCl), 25,0 °C. (b) distribuição de espécies de acordo com o <b>Esquema 9</b> e $pK_a$ s calculados 6,48±0,03 e 7,82±0,03. ....	38
<b>Figura 18</b> – Dependência da constante de velocidade ( $k_{obs}/a_W$ ) com pH ou $H_0^{58}$ (pH<0) para a reação de hidrólise do <b>BMIPP</b> a 60,0°C. A correção da atividade da água é necessária para pH<0, por a concentração de água diminuir com o aumento da concentração de ácido. A linha corresponde ao ajuste teórico segundo a <b>Eq. 1</b> e os parâmetros obtidos estão apresentados na <b>Tabela 3</b> . ....	39
<b>Figura 19</b> Estruturas dos (a) Isômeros <b>A,B</b> ; <b>A,C</b> e <b>A,D</b> de $\beta$ -ciclodextrina 6,6'-bis(imidazol) e (b) Isômero <b>A,B</b> , ilustrando a rotação dos grupos catalíticos.....	44
<b>Figura 20</b> – Tratamento de Bunnett para a reação de hidrólise do <b>BMIPP</b> para região de $H_0$ , $\log k_{obs} + H_0$ em função de $\log a_W$ (■) ou $H_0 + \log[HCl]$ (●), de acordo com as <b>Eq. 4</b> e <b>5</b> . ....	48
<b>Figura 21</b> – Mecanismos de catálise ácida específica para di- e triaril fosfatos. ....	49
<b>Figura 22</b> – Perfil de pH obtido para reação de hidrólise do <b>BMIPP</b> em H <sub>2</sub> O (■) e D <sub>2</sub> O (□), a 60°C e $I=1,0$ (KCl). As linhas correspondem ao ajuste pela <b>Eq.6</b> . ....	50
<b>Figura 23</b> – Dependência de $k_{obs}$ com o pH para a reação de hidrólise do <b>BMIPP</b> nas temperaturas de 50°C (□), 60°C(▲), 70°C(●) e 80°C(■), $I=1,0$ (KCl). ....	52
<b>Figura 24</b> - Reação do <b>BMIPP</b> em H <sub>2</sub> O (—), com imidazol (■), hidroxilamina (■), acetato (■) 1M, 60°C, $I= 1.0$ (KCl). ....	54
<b>Figura 25</b> - Dependência da constante de velocidade com o pH para reação de hidrólise do <b>Me-IMPP</b> (□) e <b>IMPP</b> (■) <sup>46</sup> , 60°C, $I=1,0$ (KCl). ....	55
<b>Figura 26</b> – ESI-MS depois de 25 minutos de reação do <b>BMIPP</b> em solução aquosa, pH 6,5 e 60°C. ....	58
<b>Figura 27</b> – ESI-MS/MS do ânion <b>Me-IMPP</b> de $m/z=253$ . ....	59
<b>Figura 28</b> – ESI-MS/MS do <b>IMP</b> desprotonado de $m/z=253$ . ....	59
<b>Figura 29</b> – Estrutura otimizada do estado reagente para reação do <b>BMIPP</b> <sup>±</sup> com H <sub>2</sub> O. A estrutura foi obtida ao nível B3LYP/PCM utilizando as funções de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa para os átomos de O, N e P. ....	61
<b>Figura 30</b> – Estrutura otimizada para o estado de transição de <b>BMIPP</b> <sup>±</sup> com H <sub>2</sub> O. A estrutura foi obtida em fase gasosa devido a alta demanda computacional. ....	62
<b>Figura 31</b> – Estrutura otimizada para a espécie zwitteriônica <b>Me-IMPP</b> A estrutura foi obtida ao nível B3LYP/PCM utilizando as funções de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa para os átomos de O, N e P. ....	64
<b>Figura 32</b> – Estrutura otimizada para o produto fenólico <b>IMP</b> . A estrutura foi obtida ao nível B3LYP/PCM utilizando as funções de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa para os átomos de O e N. ....	64

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Constantes de velocidades para as reações não catalisadas ( $k_{\text{non}}$ ) e catalisadas ( $k_{\text{cat}}$ ) por diversas enzimas. <sup>15</sup> .....	16
<b>Tabela 2</b> – Eficiência catalítica de diferentes substâncias na reação de hidrólise de ésteres de nitrofenila. ....	30
<b>Tabela 3</b> - Constantes de dissociação e parâmetros cinéticos para a hidrólise do <b>BMIPP</b> . ....	41
<b>Tabela 4</b> – Eficiência catalítica ( $k_{\text{cat}}/k_{\text{não-cat}}$ ) em reações de clivagem de ésteres de fosfato, com relevância para elucidação do mecanismo da RNase A. ....	45
<b>Tabela 5</b> – Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados da <b>Figura 22</b> pela <b>Eq. 6</b> . ....	51
<b>Tabela 6</b> – Constantes de velocidade ( $k_{3d}$ ) em função da temperatura para a reação de hidrólise de <b>BMIPP<sup>±</sup></b> , $I=1,0$ (KCl). ....	52
<b>Tabela 7</b> – Constantes de dissociação e parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do <b>Me-IMPP</b> e <b>IMPP</b> . ....	56
<b>Tabela 8</b> – Principais comprimentos de ligações (Å) e ângulos(°) para as estruturas otimizadas do estado reagente(E.R.) e do estado de transição (E.T.) para reação do <b>BMIPP<sup>±</sup></b> com H <sub>2</sub> O. ....	62
<b>Tabela 9</b> – Principais comprimentos de ligações (Å) e ângulos(°) para as estruturas otimizadas do <b>Me-IMPP</b> , <b>IMPP</b> e <b>IMP</b> , e parâmetros cristalográficos para <b>HPI</b> . ....	65

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RNA – Ácido Ribonucléico

BMIPP – bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-íneo-2-il)fenil)fosfato

Me-IMPP – 1-metil-2(2'-imidazolil)fenil fosfato

IMP – (1-metil-imidazol-2-il)fenol

ESI-MS – Espectrometria de massa por ionização de elétronspray

RNase A – Ribonuclease A

DNA - Ácido desoxirribonucléico

$t_{1/2}$  – Tempo de meia-vida

$\beta_{\text{nuc}}$  - Constante de Bronsted para nucleófilo

$\beta_{\text{lig}}$  - Constante de Bronsted para grupo de saída

MANEP – 8-dimetilamonio-naftil-1-fosfato

DANEP – Metil 8-dimetilamonio-naftil-1-fosfato

AMP – Adenosina monofosfato

His – Histidina

Glu – Ácido glutâmico

Lys – Lisina

Arg – Arginina

Asp – Ácido aspártico

Phe – Fenilalanina

Thre – Treonina

Ser – serina

BCPP – Bis-2-carboxifenil fosfato

IMPP – 2-(2'-imidazolil)fenil fosfato

TABI – tris(aminobenzilimidazol)

3'-UMP – 3'-uridina monofosfato

tRNA – RNA de transferência

PEI – polietilenoimina

$H_0$  – Função de acidez de Hammett

$I$  – Força iônica

DMSO – Dimetil sulfóxido

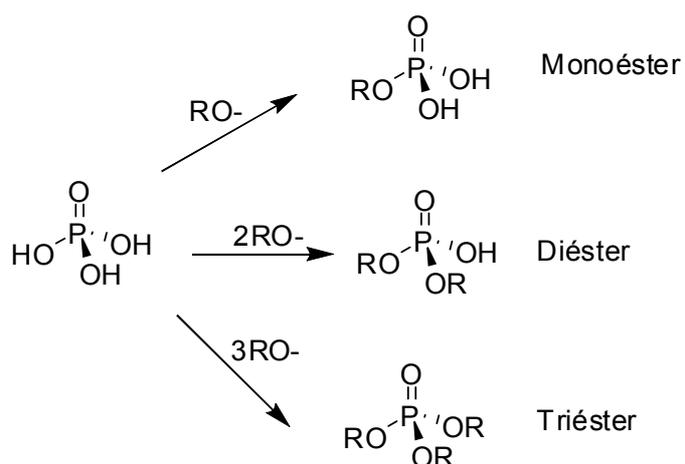
HPI – 2-(2'-hidroxifenil)imidazol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 MECANISMOS DE HIDRÓLISE DE ÉSTERES DE FOSFATO.....	13
1.2 CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	16
1.3 CATÁLISE INTRAMOLECULAR ÁCIDA-GERAL E BÁSICA-GERAL .....	19
1.4 RIBONUCLEASE A .....	21
1.5 MODELOS DE RIBONUCLEASES .....	25
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>33</b>
4.1 REAGENTES.....	33
4.2 SÍNTESE DO BMIPP.....	33
4.3 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA.....	35
4.4 ESTUDOS DE ESI-MS E ESI-MS/MS .....	35
4.5 MEDIDAS CINÉTICAS .....	36
4.6 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS .....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
5.1 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA.....	38
5.2 ESTUDO CINÉTICO.....	39
<b>5.2.1 Hidrólise de BMIPP<sup>±</sup></b> .....	<b>42</b>
<b>5.2.2 Hidrólise de BMIPP<sup>2+</sup></b> .....	<b>47</b>
<b>5.2.3 Efeitos Isotópicos para Reação de BMIPP</b> .....	<b>50</b>
<b>5.2.4 Efeitos Termodinâmicos da Temperatura para Reação de BMIPP</b> .....	<b>51</b>
<b>5.2.5 Reação de BMIPP com Nucleófilos</b> .....	<b>53</b>
<b>5.2.6 Estudo Cinético da Reação de Hidrólise do Monóester Me-IMPP</b> .....	<b>55</b>
5.3 REAÇÃO DO BMIPP ACOMPANHADA POR ESI-MS E ESI-MS/MS .....	58
5.4 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS .....	61
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

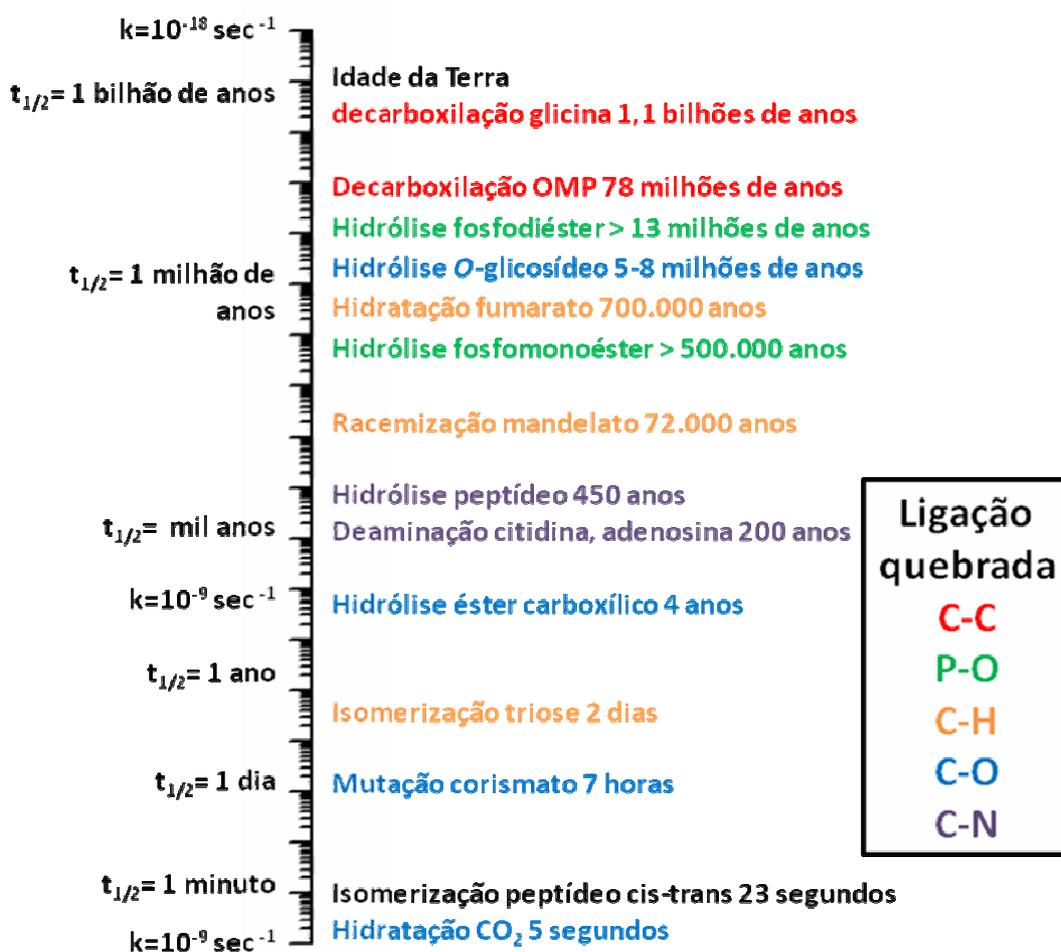
Os ésteres de fosfato são moléculas que apresentam grupos alcóxido ou arilóxido substituindo os grupos hidróxido do ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), podendo ser classificados em mono-, di- ou triésteres de acordo com o número de substituições, **Esquema 1**. Ainda, os mono- e diésteres de fosfato apresentam hidrogênios ionizáveis, conferindo às diferentes espécies iônicas, reatividades diferenciadas.



**Esquema 1**

Os ésteres fosfóricos apresentam uma função vital nos sistemas biológicos, são responsáveis pelo armazenamento e transmissão de informação genética (DNA e RNA),<sup>1</sup> participam na estrutura de coenzimas<sup>2</sup> e, anidridos fosfóricos, servem como reserva de energia<sup>3, 4</sup> e participam em diversos processos de sinalização e regulação da atividade biológica. A importância biológica dos ésteres de fosfato está intrinsecamente relacionada à alta estabilidade da ligação P-O, que pode levar milhões de anos para ser quebrada. Na **Figura 1** está apresentado o tempo de meia-vida de algumas reações biológicas.<sup>5</sup> Observa-se que  $t_{1/2}$  para a hidrólise espontânea de um diéster de fosfato ultrapassa 13 milhões de anos e esse valor pode chegar à ordem de bilhões de anos<sup>6</sup> para o DNA, superior a idade da terra. Já a hidrólise espontânea do difenilfosfato, tem um  $t_{1/2}$  de 180 anos a  $100^\circ\text{C}$ .<sup>7</sup>

Outros exemplos de fosfatos mostram elevada reatividade, fato que justifica a presença de ésteres de fosfato em inseticidas, pesticidas e armas de guerra.<sup>8,9</sup> Os ésteres de fosfato também têm aplicações como plastificantes, reagentes na preparação de polímeros organofosforados e complexantes para a extração de cátions de metais pesados.



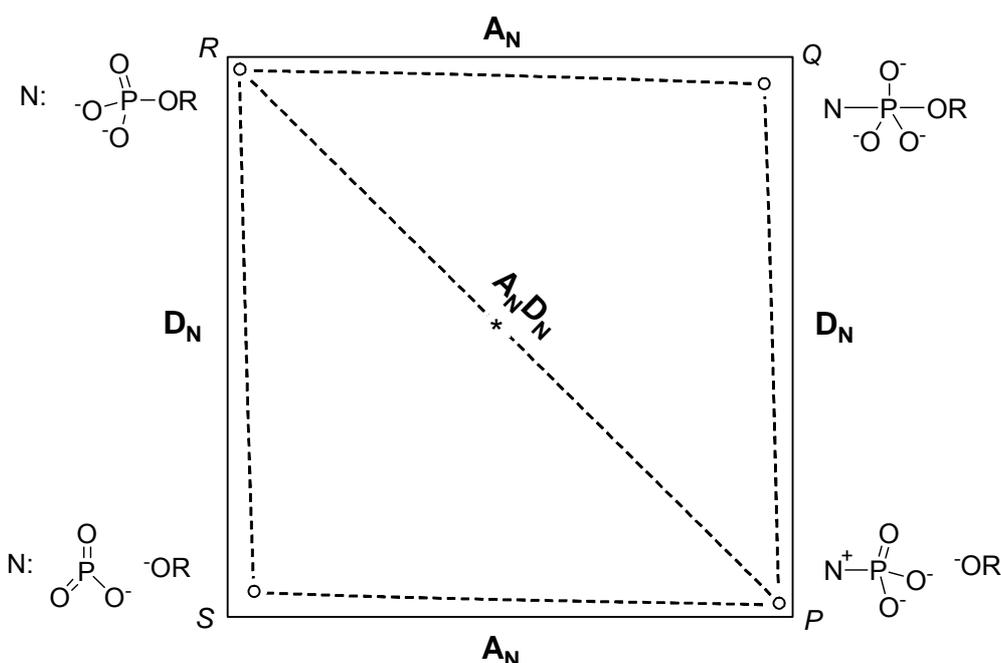
**Figura 1** – Tempo de meia-vida de algumas reações biológicas em solução neutra a 25°C. Das reações apresentadas, as que envolvem quebra da ligação P-O estão entre as mais demoradas.

## 1.1 Mecanismos de Hidrólise de Ésteres de Fosfato

Existem dois grupos de mecanismos diferentes para a reação de hidrólise de ésteres de fosfato, sendo que no primeiro, o átomo de carbono da ligação P-O-C do éster pode servir como eletrófilo, onde todo o grupo fosfato é substituído por um nucleófilo, ocorrendo assim quebra da ligação C-O. Outro mecanismo é quando o nucleófilo ataca o átomo de fósforo central e desloca o álcool ou alcóxido via quebra da ligação P-O.

Os mecanismos via quebra de ligação C-O ocorrem preferencialmente em pH baixo, onde o grupo de saída é o ácido fosfórico neutro. Já em pH maiores, onde o grupo de saída possui pelo menos uma carga negativa, a hidrólise ocorre com quebra da ligação P-O, podendo seguir caminhos dissociativo ou associativo<sup>9</sup>.

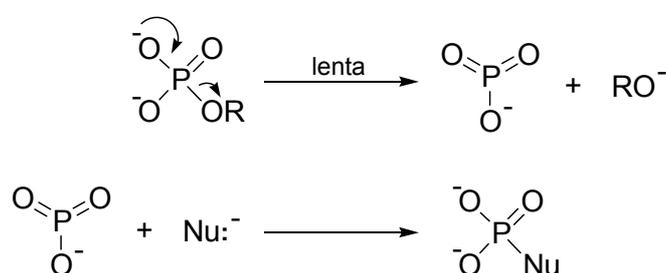
Na **Figura 2** está apresentado um diagrama de More O’Ferrall-Jencks, que ilustra os três mecanismos de substituição nucleofílica para hidrólise de ésteres fosfóricos: (i) mecanismo dissociativo para coordenada  $R \rightarrow S \rightarrow P$ , que ocorre em duas etapas ( $D_N + A_N$ )<sup>10</sup>, primeiro com a liberação do íon metafosfato hidratado ( $PO_3^-$ ), e após, reação com o nucleófilo. (ii) mecanismo associativo para coordenada  $R \rightarrow Q \rightarrow P$ , ocorrendo também em duas etapas, de adição e eliminação ( $A_N + D_N$ ), sendo que o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico resulta na formação de uma espécie intermediária pentacoordenada com geometria tipo bipirâmide trigonal. (iii) mecanismo concertado, coordenada  $R \rightarrow P$ , sem a formação de intermediário, com a simultânea adição do nucleófilo e eliminação do grupo de saída no estado de transição.



**Figura 2** – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks de coordenada de reação para o ataque nucleofílico de N: sobre um monoéster de fosfato. O asterisco corresponde à posição de um estado de transição sincrônico e as coordenadas  $A_N$  e  $D_N$  correspondem a uma etapa associativa ou dissociativa.<sup>11</sup>

Em geral, o mecanismo de hidrólise dos triésteres e diésteres de fosfatos possui maior caráter associativo com estados de transição situados entre o estado de transição concertado ( $A_N D_N$ ) e o canto Q. Nos monoésteres de fosfato, a reação pode ser dissociativa ou associativa, dependendo do pHs e do grupo de saída.

Para monómeros de fosfato, em pHs neutros e alcalinos, onde prevalece a espécie dianiônica, acreditava-se em um mecanismo puramente dissociativo, onde a etapa determinante da velocidade de reação é a formação do ânion metafosfato, que é instável e planar (**Esquema 2**). Esse mecanismo tem sido questionado, devido a dependência da constante de hidrólise com a basicidade.<sup>12</sup> Assim, o mecanismo de hidrólise de diânions de monoésteres se aproxima da aresta dissociativa no diagrama da **Figura 2**, porém não é estritamente dissociativo. A natureza dissociativa da reação é favorecida por melhores grupos de saída.



**Esquema 2**

Já a reação da espécie monoaniônica de monoésteres de fosfato envolve uma transferência intramolecular de um próton para o grupo de saída, em geral por um mecanismo concertado ou pré-associativo, com um estado de transição que vai depender da basicidade do grupo de saída, com pouca ou muita ligação do próton com o oxigênio do grupo de saída.

A hidrólise da espécie neutra dos monoésteres de fosfato, em pH ácido pode envolver quebra ligação P-O ou C-O, como anteriormente discutido, sendo que melhores grupos de saída favorecem a quebra da ligação P-O.

Para a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato, resultados experimentais, como valores  $\beta_{\text{Nuc}}$ ,  $\beta_{\text{lg}}$  e efeitos isotópicos evidenciam um estado de transição mais sincrônico que para os monoésteres de fosfato.<sup>13</sup> Sugere-se que reações de hidrólise de diésteres de fosfato derivados de fenóis com baixos  $pK_a$  devem seguir um mecanismo bimolecular associativo com caráter concertado, levando a formação de um estado de transição com natureza semelhante a um fosforano dianiônico, sem formar um intermediário. Analogamente, a hidrólise da espécie neutra do diéster tem sido explicada por um mecanismo envolvendo transferência de próton, com um estado de transição altamente hidratado.<sup>7</sup>

## 1.2 Catálise Enzimática

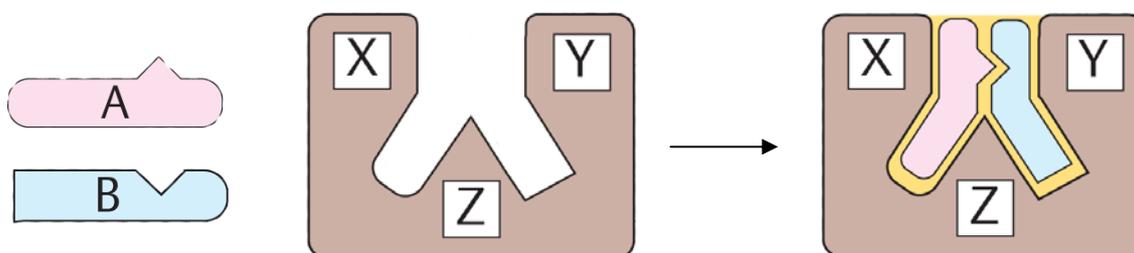
Conforme demonstrado na **Figura 1**, diversas reações biológicas essenciais podem levar até bilhões de anos para acontecer espontaneamente e as enzimas conseguem acelerar essas reações com efeitos catalíticos da ordem de  $10^6$  a  $10^{23}$  vezes.<sup>14</sup> A **Tabela 1** apresenta os valores do aumento da velocidade das reações na presença de diversas enzimas, comparando a reação não catalisada ( $k_{\text{non}}$ ) com a reação catalisada ( $k_{\text{cat}}$ ).<sup>15</sup> Os efeitos são em muitos casos extraordinários e mostram, por exemplo, que uma reação que demorava cerca de  $10^{13}$  anos para ocorrer, na presença da enzima frutose-1,6-bifosfatase leva apenas 0,33 segundos. Até mesmo para a anidrase carbônica, que mostrou efeito catalítico menor, a reação que ocorreria espontaneamente em um minuto ocorre em  $6,93 \times 10^{-6}$  segundos.

**Tabela 1** – Constantes de velocidades para as reações não catalisadas ( $k_{\text{non}}$ ) e catalisadas ( $k_{\text{cat}}$ ) por diversas enzimas.<sup>15</sup>

Enzima	$k_{\text{non}}, \text{S}^{-1}$	$k_{\text{cat}}, \text{S}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/ k_{\text{non}}$
frutose-1,6-difosfatase	$2,0 \times 10^{-20}$	21	$1,05 \times 10^{21}$
nuclease	$7,0 \times 10^{-16}$	95	$1,4 \times 10^{17}$
$\beta$ -amilase	$1,9 \times 10^{-15}$	$1,4 \times 10^3$	$7,2 \times 10^{17}$
fumarase	$3,5 \times 10^{-14}$	880	$3,5 \times 10^{15}$
urease	$1,2 \times 10^{-11}$	$3,6 \times 10^4$	$3 \times 10^{15}$
cloroacrilato dehalogenase	$2,2 \times 10^{-12}$	3,8	$1,8 \times 10^{12}$
Carboxipeptidase	$4,4 \times 10^{-11}$	240	$1,3 \times 10^{13}$
citidina deaminase	$2,7 \times 10^{-10}$	300	$1,1 \times 10^{12}$
fosfotriesterase	$2,0 \times 10^{-8}$	$2,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^{11}$
diidroorotato desidrogenase	$3,2 \times 10^{-11}$	1,2	$3,7 \times 10^{10}$
anidrase carbônica	0,13	$1,0 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$

Essa efetividade catalítica das enzimas vem sendo atribuída a fatores como especificidade na natureza dos substratos e no tipo de reações, bem como a estereoespecificidade. Além disso, a multifuncionalidade das enzimas pode conferir múltiplas catálises, como intramolecular ácida/básica e eletrostática. Essas interações eletrostáticas e de ligações de hidrogênio, juntamente com outros fatores, como liberação da água do sítio ativo enzimático, explicam as contribuições entálpicas e entrópicas nas reações enzimáticas.<sup>5</sup>

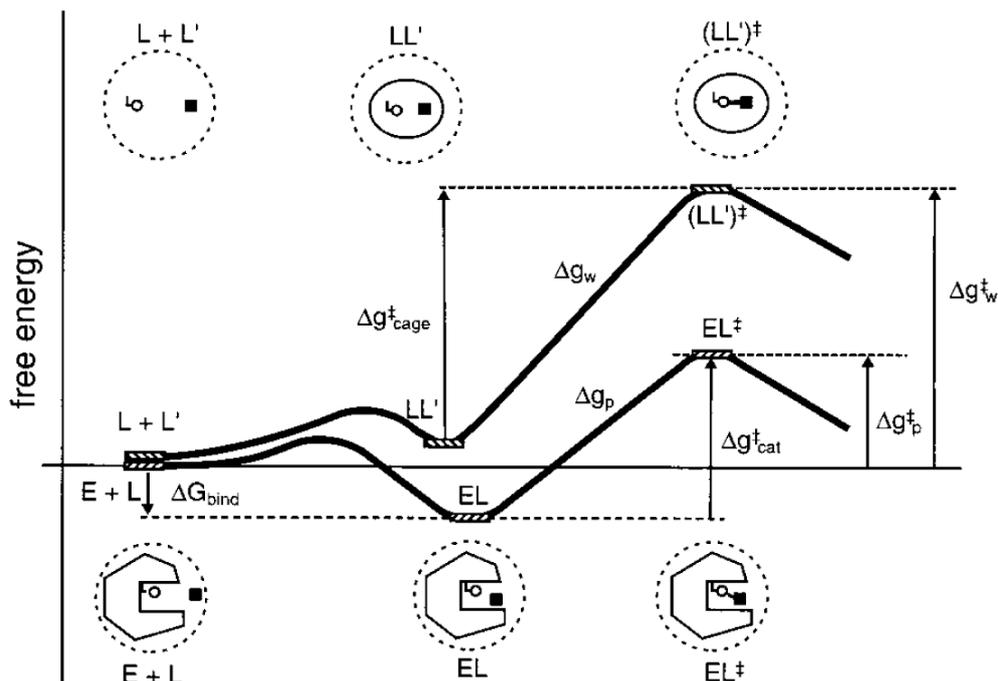
Aspectos como proximidade e orientação do substrato e dos grupos catalíticos também são fundamentais na catálise enzimática, e podem ser ilustrados pelo clássico modelo enzimático chave-fechadura, apresentado na **Figura 3**.<sup>16</sup>



**Figura 3** – Modelo chave-fechadura para reações de A e B catalisadas pela enzima com sítios ativos X, Y e Z.

O modelo chave-fechadura, uma das primeiras propostas para explicar a catálise enzimática, se baseava em um complexo ativado, formado pela enzima e pelo substrato. No entanto ela foi posteriormente modificada, onde se concluiu que a chave (substrato) não encaixa perfeitamente na fechadura (enzima), mas sim exerce certa “tensão” nele, ou seja, desestabiliza o estado reagente.<sup>17</sup> Essas considerações foram aprimoradas por Linus Pauling<sup>18</sup> que justifica a eficiência da catálise enzimática em termos da enzima ter maior afinidade em se ligar com o estado de transição do que com o substrato ou produto, o que diminui a energia de ativação da reação.

Schowen<sup>19</sup> concordou com Pauling, afirmando que o poder catalítico das enzimas reside na estabilização do estado de transição, por interações de ligação de hidrogênio, eletrostáticas e outras. Esses fatores explicam a diminuição da barreira energética de uma reação enzimática, tal ilustrado no clássico diagrama da **Figura 4**. Nesse diagrama,  $\Delta g^{\ddagger}_{cat}$  corresponde à barreira energética para reação catalisada por enzimas e  $\Delta g^{\ddagger}_{cage}$  se refere à reação correspondente “enjaulada” no solvente (“solvente cage”).<sup>20</sup>



**Figura 4** – Comparação do diagrama de energia livre para uma reação enzimática ( $_{cat}$ ) e a reação correspondente em solução ( $_{cage}$ ). O substrato é designado como “L”, a parte reativa da enzima como L’ e E como enzima.

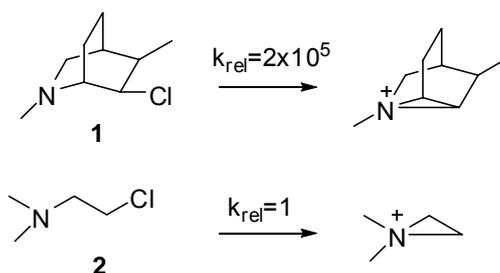
A compreensão dessa forma complexa de atuação das enzimas tem sido um grande desafio para os cientistas, e a mimetização desses sistemas catalíticos vem mostrando diversas aplicações na indústria química. A biocatálise, um alicerce da “química verde”, tem sido utilizada na produção de diversas substâncias, como fármacos, cosméticos e ainda substâncias de interesse agrícola.<sup>21</sup> No entanto, a utilização de enzimas naturais apresenta algumas dificuldades, como inibição pelo produto ou substrato, baixa solubilidade dos reagentes no meio reacional, e ainda a desnaturação que pode ocorrer em diversas condições.<sup>22</sup> Assim, modelos miméticos constituem uma importante ferramenta para contornar essas dificuldades, tanto na indústria, como em outros setores, por exemplo na medicina.

### 1.3 Catálise Intramolecular Ácida-Geral e Básica-Geral

Os estudos de reações intramoleculares são interessantes para modelar enzimas que possuem no seu sítio ativo vários grupos funcionais e assim compreender melhor a catálise enzimática. A catálise intramolecular é aquela onde grupos funcionais de uma molécula podem auxiliar a hidrólise de outro grupo funcional na mesma molécula. Em geral, é muito mais eficiente que a intermolecular, sendo que existe muita confusão na atribuição dos fatores responsáveis por essa eficiência.

Inicialmente, Koshland propôs fatores como dependência angular entre os reagentes sendo determinantes nas reações. Bruice explicou a eficiência em função do efeito de proximidade.<sup>23</sup> No entanto Menger<sup>23</sup> comprovou experimentalmente que o ângulo não parece ser um parâmetro fundamental nesse tipo de catálise. Em contrapartida, Page e Jencks<sup>23</sup> propuseram o efeito entrópico como único responsável pela alta eficiência catalítica de reações intramoleculares, porém esse fator também apresentou diversas divergências. Por último Menger<sup>23</sup>, com o postulado: “A velocidade de reação entre A e B é proporcional ao tempo que A e B residem dentro de uma distância crítica”, atribuiu a um fator espaço-temporal à eficiência da catálise intramolecular. Nessa teoria espaço-temporal, estão atrelados um conjunto de fatores como ângulo, entropia e proximidade.

Um exemplo está ilustrado no **Esquema 3**, onde a reação de solvólise de **1** ocorre  $10^5$  vezes mais rapidamente da que o análogo acíclico **2**.<sup>24</sup> Alguns aspectos parecem contradizer o efeito observado, como a menor reatividade esperada para o composto **1**, por ser um haleto secundário e ainda pelo estado de transição estar significativamente mais tensionado. No entanto, o postulado espaço-temporal explica o efeito catalítico observado em **1**: o nitrogênio está em posição antiperiplanar ao grupo de saída, por um tempo maior.

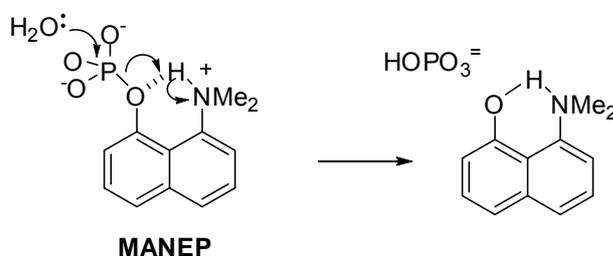


**Esquema 3**

O conceito de molaridade efetiva (ME) permite uma quantificação da eficiência da catálise intramolecular. A molaridade efetiva é definida como sendo a razão entre a constante de velocidade de primeira ordem da reação intramolecular e a constante de velocidade de segunda ordem da reação intermolecular. Assim quanto maior a ME, maior será a eficiência da reação intramolecular. Por exemplo, um grupo nucleofílico numa enzima chega a ter um ME de até  $10^9$  ou  $10^{10}$  vezes, o que torna ainda mais interessante mimetizar sistemas enzimáticos.

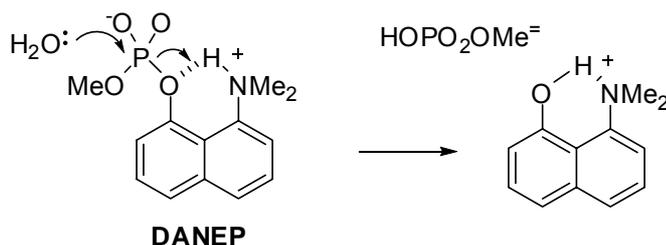
Catálise intramolecular pode ser classificada como nucleofílica, básica-geral ou ácida-geral, conforme o mecanismo de ação do catalisador. Na catálise básica-geral, uma base assiste o ataque de um nucleófilo, enquanto na catálise ácida-geral, uma transferência de próton acelera a reação, ativando o grupo de saída.

O estudo de modelos químicos que exibem esses tipos de catálise tem atraído crescente interesse. Nome e colaboradores<sup>25</sup> avaliaram o efeito da transferência de próton para derivados 8-dimetilamino-naftil-1-fosfato (**Esquema 4**) e observaram para o monoéster **MANEP** uma catálise ácida intramolecular do grupo vizinho  $\text{NH}^+$ , devido a forte ligação de hidrogênio, com incrementos catalíticos de até  $10^5$  vezes.



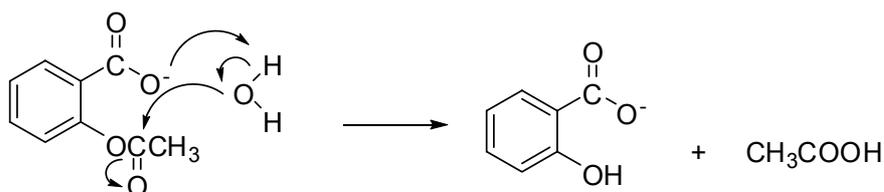
**Esquema 4**

O efeito da transferência de próton é maior ainda para um diéster<sup>26</sup> análogo **DANEP**, aonde incrementos na velocidade chegam até  $10^6$  vezes, provavelmente um dos maiores efeitos reportado na literatura para modelos de catálise ácida intramolecular.



**Esquema 5**

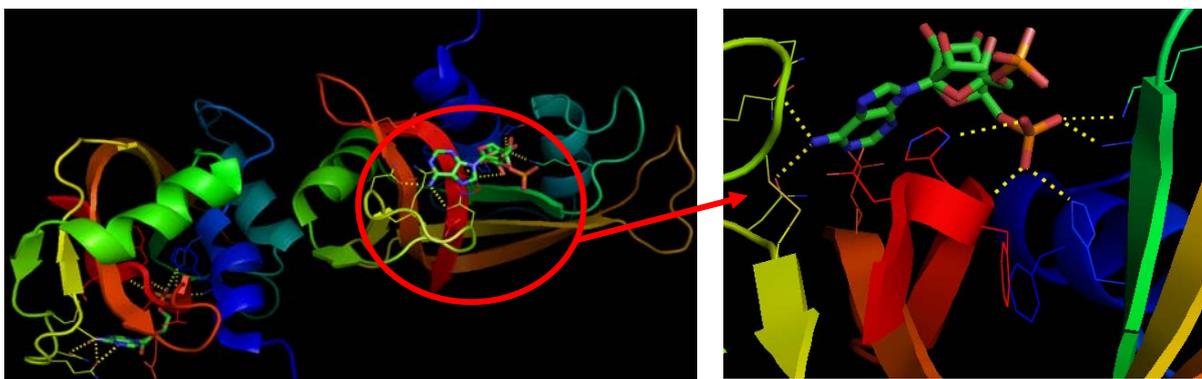
Modelos de catálise básica-geral vêm sendo estudados com derivados de aspirina<sup>27, 28</sup>, onde é proposto um mecanismo com o carboxilato catalisando intramolecularmente como uma base, o ataque da água no éster, **Esquema 6**. A hidrólise da aspirina apresenta uma molaridade efetiva de 13 M,<sup>27</sup> o que indica que o efeito do carboxilato na reação intramolecular é equivalente a presença de acetato em concentração 13 M na reação intermolecular correspondente.



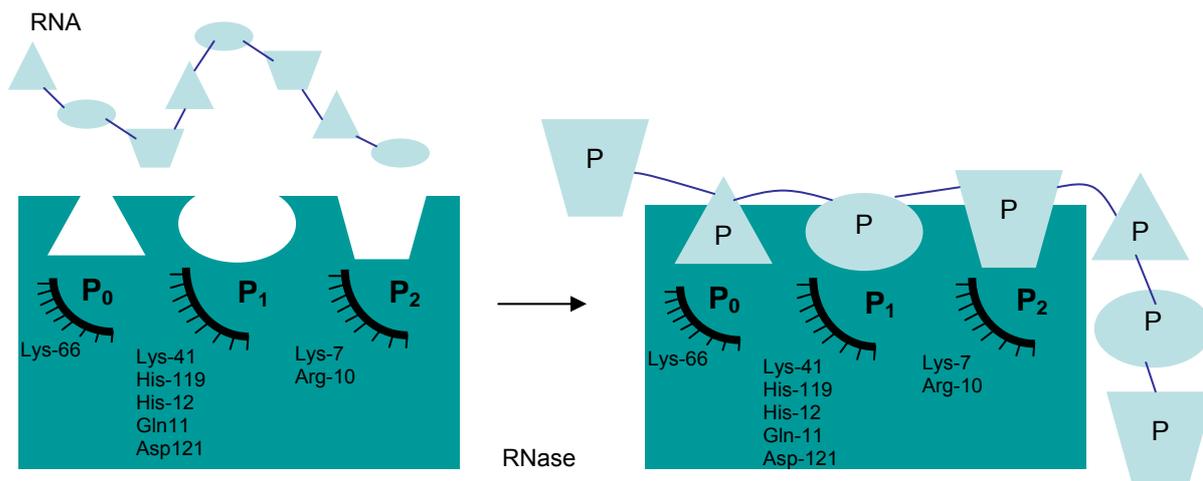
**Esquema 6**

## 1.4 Ribonuclease A

A quebra do RNA é mediada por ribonucleases (RNase A), **Figura 5**, enzimas pequenas com cerca de 100-150 aminoácidos, que apresentam três sub-sítios (B1, B2 e B3) que interagem com as bases nitrogenadas do substrato e três sub-sítios P0, P1 e P2, que interagem com o grupo fosforila, sendo P1, o sítio ativo principal. Na **Figura 6** está apresentado um modelo de clivagem do RNA pela enzima RNase A, cuja importância é elegantemente demonstrada pelo fato de ser a primeira enzima que teve seus aminoácidos seqüenciados,<sup>29</sup> bem como seus sítios catalíticos identificados. A forma de atuação da RNase A está principalmente relacionada aos resíduos His12 e His119 no sítio ativo principal.

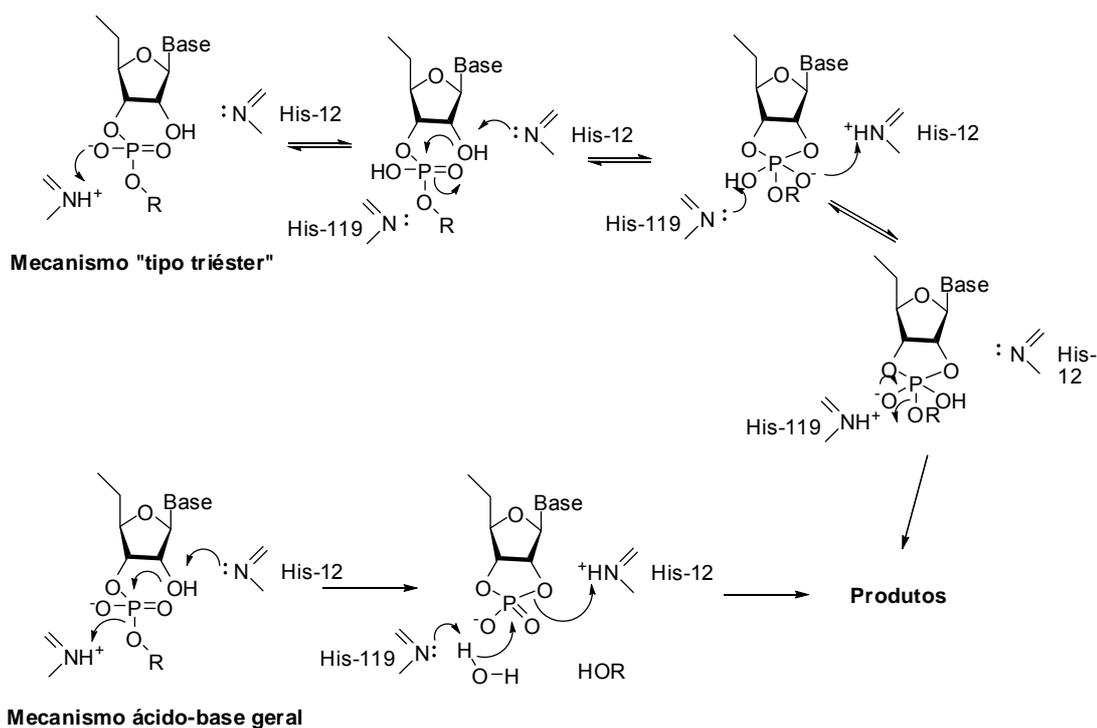


**Figura 5** – Estrutura cristalina do complexo da ribonuclease A com o nucleotídeo AMP (adenosina mono fosfato).<sup>30</sup>



**Figura 6** – Modelo de clivagem de RNA por RNase A, onde a cadeia polinucleotídica de fosfato se liga nos múltiplos sítios da enzima, P0, P1 e P2.

O mecanismo catalítico das ribonucleases vem sendo evidenciado por diversos estudos envolvendo mutagênese de aminoácidos, uso de diferentes substratos, mecanismo de deslocamento do fósforo, efeito de solventes, de pH e da temperatura<sup>31</sup>. Os resultados são consistentes com duas formas de catálise para a RNase A envolvendo os grupos imidazol, um mecanismo ácido-base geral concertado ou por um mecanismo “tipo triéster”, formando um intermediário tipo fosforano, **Figura 7**.

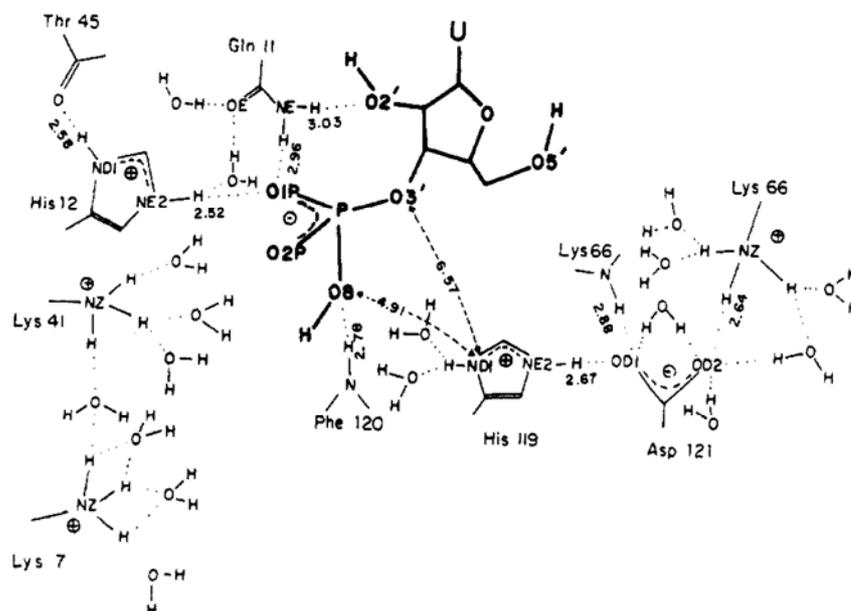


**Figura 7** – Mecanismos propostos para a clivagem de RNA por RNase A.

No mecanismo clássico ácido-base geral<sup>32</sup>, a reação ocorre em duas etapas, de transfosforilação, seguida da hidrólise do intermediário cíclico, a His-12 atua como catalisador básico geral, enquanto His-119 como ácido-geral na primeira etapa. Na etapa da hidrólise, o papel das histidinas é reverso, His-119 ativa o ataque da água por catálise básica geral e a His-12, como ácido geral, protona o grupo de saída. Diversas evidências fundamentam esse mecanismo, como perfil de pH em forma de sino, valores de  $pK_a$  característico do grupo imizadol obtidos por RMN e dados cristalográficos, no entanto outros aspectos sugerem um mecanismo “tipo triéster”. Nesse mecanismo, a protonação do oxigênio da fosforila leva a um estado de transição similar (ou intermediário) semelhante ao de reações de triésteres, conforme argumentado com modelos miméticos de ciclodextrinas,<sup>33, 34</sup> onde a substituição de grupos imidazol favorecia mais uma geometria que possibilitasse esse novo mecanismo, do que o mecanismo clássico.

Existe uma grande discussão<sup>32, 35, 36</sup> em torno da forma de atuação das ribonucleases, no entanto o mecanismo clássico ácido-base geral é o mais aceito e bem fundamentado. Por exemplo, análises de tio-efeitos,<sup>36</sup> com a substituição do oxigênio da fosforila por enxofre não apresenta o efeito esperado, de reduzir a velocidade de reação, como nas reações de triésteres de fosfato. Ainda, efeitos cinéticos isotópicos da clivagem com  $^{18}\text{O}$  são inconsistentes com o mecanismo “tipo triéster”.<sup>37</sup>

Na **Figura 8** está apresentada a estrutura do complexo do nucleotídeo UMP com RNase A, ilustrando a orientação dos seus principais resíduos, obtida por dinâmica molecular por Haydock e colaboradores. O papel dos resíduos Lys, Arg, Asp, Phe e Thre têm sido atribuídos a uma estabilização eletrostática.<sup>38</sup> Essa estrutura está de acordo com as estruturas cristalinas resolvidas para complexos de diversos polinucleotídeos com RNase A.<sup>39, 40</sup>



**Figura 8-** Estrutura obtida por dinâmica molecular de RNase A/3'-UMP.<sup>38</sup>

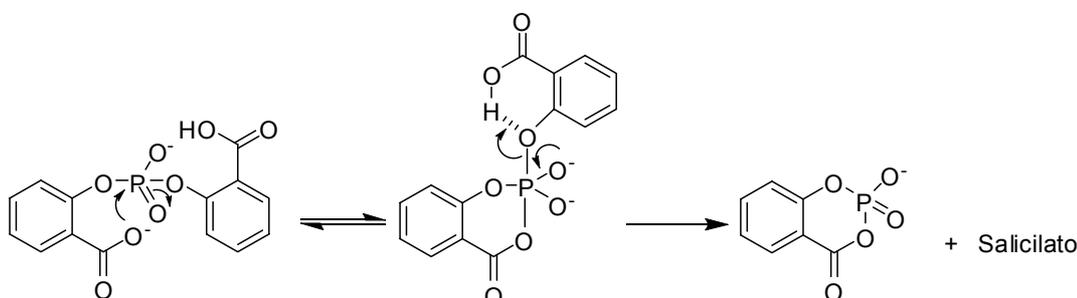
Existem ainda outras ribonucleases, como RNase T1<sup>41</sup> e barnase,<sup>42</sup> que atuam de forma semelhante a RNase A, por um mecanismo ácido-base geral, no entanto o carboxilato do resíduo de Glu-58 atua como base geral no lugar da His-12.

Descobertas recentes mostram que as ribonucleases também podem ser utilizadas no diagnóstico e tratamento de muitas doenças, como câncer. Resultados mostram que na presença de uma doença, quantidades de RNases aumentam significativamente nos fluidos humanos, ou extratos de células, e a presença das mesmas pode ser regulada por ativadores ou inibidores. Assim, muitas dessas moléculas regulatórias podem amparar o desenvolvimento de novas drogas para tratar doenças.<sup>43</sup> Por exemplo, a citotoxicidade das ribonucleases às células cancerígenas tem grande potencial como agente terapêutico, pois além de causar menores efeitos colaterais que os agentes quimioterapêuticos comumente utilizados, como onconase, também tem melhor aceitação biológica, pelo fato de serem naturais.<sup>44</sup>

## 1.5 Modelos de Ribonucleases

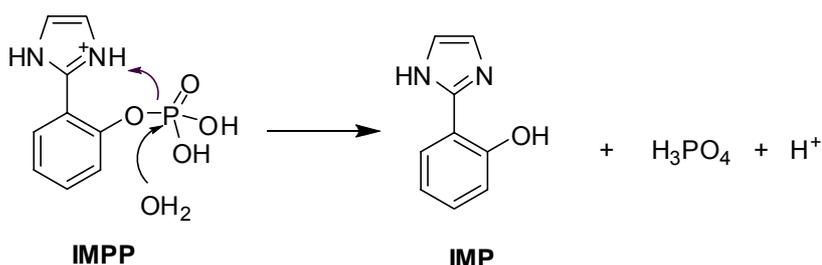
A compreensão da grande diferença de velocidade entre reações enzimáticas e não-enzimáticas tem se fundamentado em modelar as particularidades catalíticas das enzimas, como por exemplo, através de reações intramoleculares. Nesse sentido, as ribonucleases têm atraído crescente interesse, com a síntese de diversas moléculas orgânicas sintéticas que clivam eficientemente o RNA, ou ésteres de fosfato análogos com grupos imidazólínicos ancorados.

Modelos simples de catálise intramolecular que mimetizam particularidades da Rnase foram estudados por Kirby e Abell<sup>45</sup> com a hidrólise do diânion bis-2-carboxifenil fosfato, **BCPP**, **Esquema 7**. O efeito catalítico da ordem de  $10^{10}$  vezes observado para essa reação, comparado com difenil fosfato, foi atribuído a catálise nucleofílica e intramolecular ácido-geral pelos grupos salicilatos. No entanto, a catálise ácido geral intramolecular foi inesperadamente ineficiente, de apenas 4 vezes. Isso foi atribuído ao fato de que a quebra do intermediário cíclico deve ter um [rec-118](#) formada no oxigênio de saída desfavorece a etapa de transferência de próton.



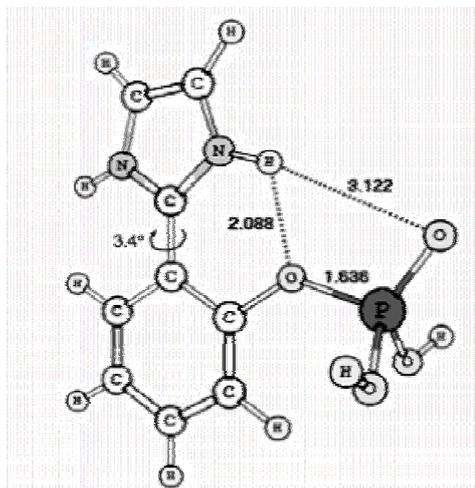
**Esquema 7**

Modelos que apresentam grupos imidazol têm demonstrado uma catálise intramolecular mais eficiente, destacando-se a hidrólise do monoéster de fosfato 2-(2'-imidazolil)fenil fosfato (IMPP),<sup>46</sup> com uma catálise intramolecular ácido-geral pelo grupo imidazólíneo, semelhante daquela observada em ribonucleases, **Esquema 8**.

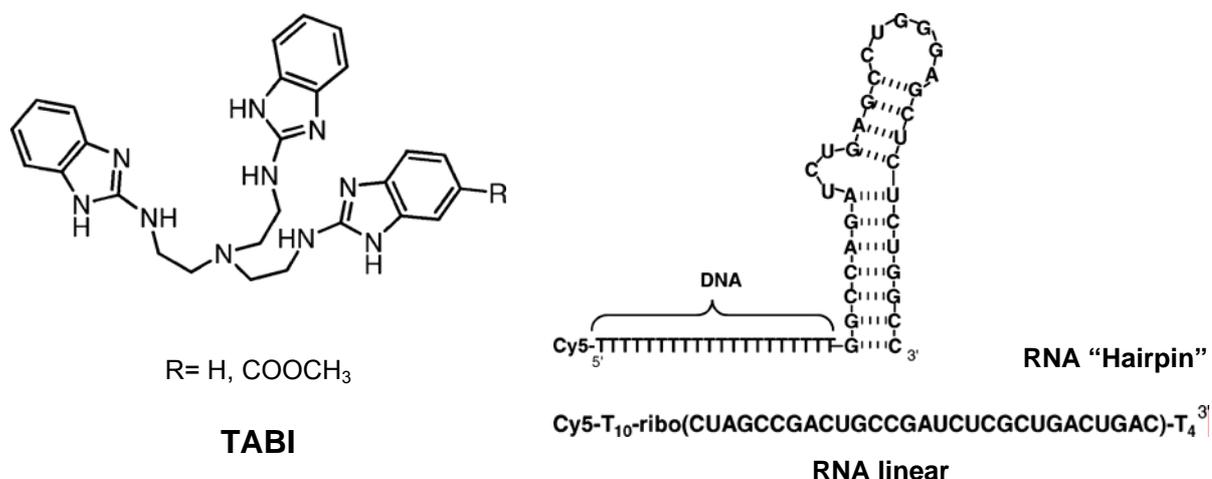


**Esquema 8**

Comparando essa reação com um triéster derivado de um fenol com  $pK_a$  10, os efeitos catalíticos chegam a  $10^6$  vezes. Cálculos computacionais confirmam uma geometria favorável para essa catálise intramolecular ácida, com o grupo imidazólio torcido apenas  $3.4^\circ$  em relação ao anel fenílico, **3**.

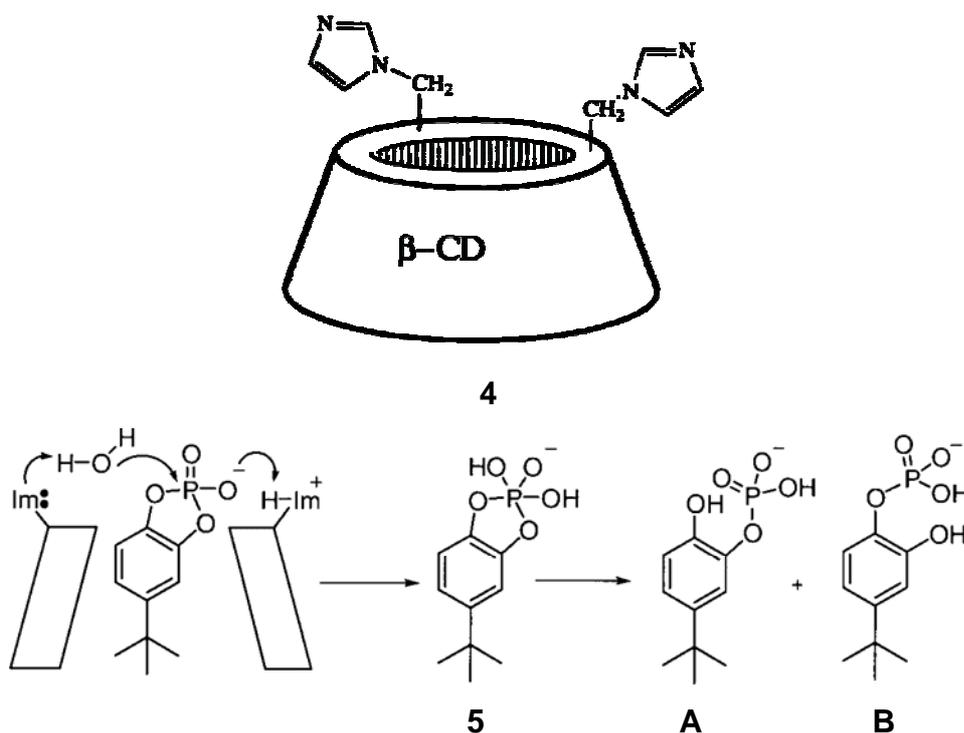
**3**

Gobel e colaboradores<sup>47</sup> avaliaram a eficiência do tris (aminobenzilimidazol), **TABI** na degradação do RNA, “hairpin” e linear, conforme ilustrado na **Figura 9**. Observaram que o composto **TABI** degradava efetivamente os substratos de RNA, com hidrólise de 92% para hairpin e 87% para linear, e tempos de meia-vida de 200 min e 120 min, respectivamente. Comparado com a hidrólise espontânea ( $t_{1/2}$ =13,4 anos, **Figura 1**), os efeitos catalíticos chegam a  $10^4$ , no entanto essas reações apresentam problemas de precipitação.



**Figura 9** – Estrutura do tris (aminobenzilimidazol), **TABI** e dos substratos de RNA, “hairpin” e linear.

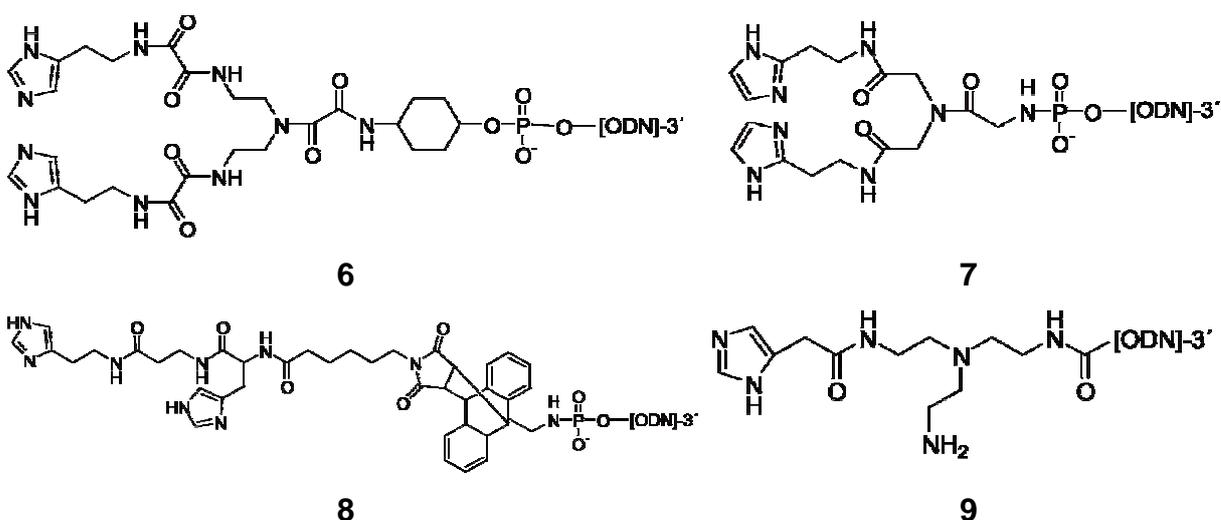
Modelos enzimáticos baseados em macromoléculas, conhecidas como enzimas sintéticas (synzymes), têm despertado grande interesse por mimetizar aspectos multifuncionais e geométricos das enzimas.<sup>48</sup> Exemplo são as ciclodextrinas com grupos imidazol ancorados em sua cavidade descritas por Breslow e colaboradores,<sup>33, 34, 49, 50</sup> os quais realizaram um estudo extensivo da reação de hidrólise do éster de fosfato cíclico **5** com ciclodextrina-bis(imidazol), **Figura 10**.



**Figura 10** – Estrutura do  $\beta$ -ciclodextrina 6,6'-bis(imidazol), **4** e reação de hidrólise do 4-tert-butilcatecol fosfato cíclico **5**.

Foi observada uma catálise de 120 vezes para essa reação com a ciclodextrina funcionalizada, além de uma alta seletividade, maior que 99:1 para o isômero A, em comparação com a hidrólise básica que leva a uma mistura dos dois produtos. Estudos de efeitos isotópicos<sup>50</sup> são consistentes com uma reação que acontece via catálise bifuncional simultânea, tal como ocorre na ribonuclease. O resultado também foi confirmado pela variação das posições dos grupos imidazol na ciclodextrina,<sup>33</sup> mostrando que a reação depende da posição do imidazol na ciclodextrina.

Derivados de oligonucleotídeos com resíduos imidazólínicos incorporados, também têm sido estudados como ribonucleases artificiais,<sup>51</sup> no entanto os resultados muitas vezes são contraditórios, devido à inesperada instabilidade dos nucleotídeos. Isso porque o  $t_{1/2}$  da quebra do oligonucleotídeo **6** com tampão imidazol foi apenas 1,5h. Assim, a rápida clivagem observada para os compostos **6**, **7**, **8** e **9** (Figura 11), indica uma instabilidade inerente da ligação fosfodiéster, que não está diretamente ligada a eficiência dos imidazólínicos conjugados.

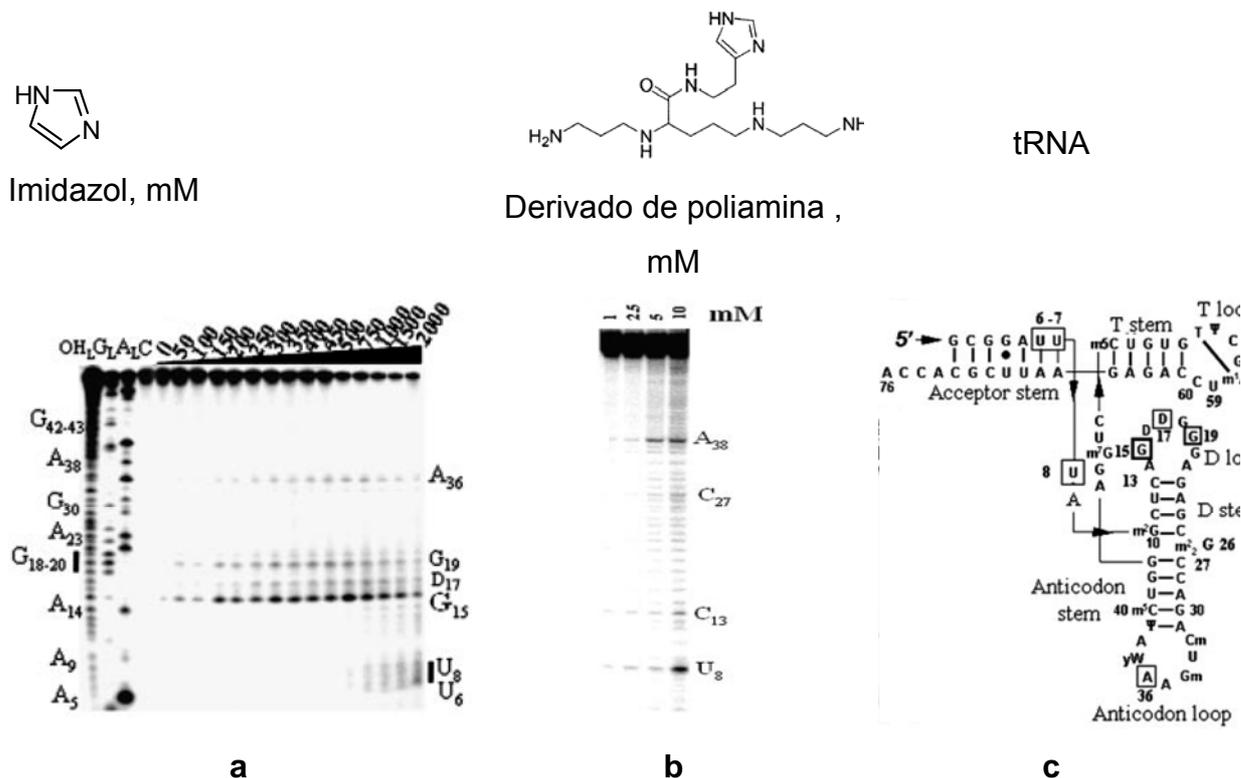


**Figura 11** – Ribonuclease artificial contendo de imidazol onde ODN é oligodeoxiribonucleotídeo.<sup>51</sup>

Modelos baseados em polímeros também têm atraído interesse e, por exemplo, destaca-se o estudo da clivagem do RNA por poliaminas com grupos imidazol ancorados. Os resultados mostram uma clivagem altamente seletiva do RNA na presença dos derivados de poliaminas, quando comparados com a clivagem randômica na presença de tampão imidazol, conforme pode ser observado pelos eletroferogramas da **Figura 12**.<sup>52</sup> Na presença de imidazol, o RNA é clivado em sete posições, acima de concentração 100 mM. Já na presença da poliamina, ocorre

ec-number>121</rec-number><ref-type name="Thesis">32





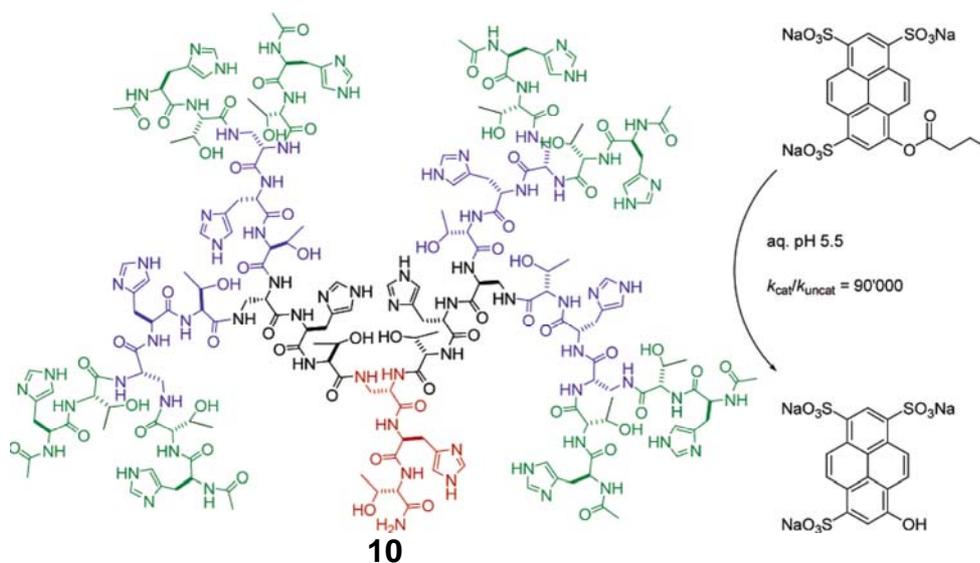
**Figura 12** – Eletroferogramas para a clivagem de tRNA na presença de tampão imidazol(a) e poliamina com grupo imidazol ancorado(b). Quanto mais escuro os símbolos, maior a intensidade da clivagem. As indicações dos sítios de clivagem estão apresentadas em (c).

O efeito hidrofóbico também foi avaliado com modelos poliméricos de polietilenoimina com grupos imidazol e dodecil ancorados. Na **Tabela 2** estão as constantes catalíticas da enzima natural  $\alpha$ -quimotripsina, do imidazol e do polímero com imidazol e grupos hidrofóbicos para a reação de hidrólise de ésteres de nitrofenila.<sup>53</sup> Apesar do significativo efeito hidrofóbico, a comparação não está completamente correta, visto que os ésteres estudados nas reações da enzima natural e do imidazol foi o acetato de *p*-nitrofenila e no caso do polímero modificado, foi o caproato de *p*-nitrofenila, que é significativamente mais apolar. De fato, ao estudar reações de ésteres de nitrofenila com polietilenoimina, o efeito dos grupos hidrofóbicos mostrou-se mais significativo para ésteres com maior cadeia carbônica ( $10^3$  vezes) do que para ésteres menos hidrofóbicos, por exemplo, de acetato (15 vezes).<sup>54</sup>

**Tabela 2** – Eficiência catalítica de diferentes substâncias na reação de hidrólise de ésteres de nitrofenila.

	Constante Catalítica $k$ ( $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
Imidazol	10
$\alpha$ -quimotripsina	10 000
PEI, 10% dodecil, 15% imidazol	2700

No entanto, algumas propriedades das macromoléculas biológicas são negligenciadas nos modelos artificiais poliméricos, como a monodispersidade, característica de macromoléculas que possuem unidades moleculares uniformes em termos de massas moleculares. Esse desafio na síntese de polímeros tem sido contornado estudando modelos artificiais monodispersos. Exemplos são os dendrímeros, os quais são construídos utilizando ramificações simétricas de unidades menores, e que mostram na sua estrutura final um interior hidrofóbico e uma superfície hidrofílica. Nesse tipo de modelos foi estudada a hidrólise de 8-butiloxipireno-1,3,6-trissulfonatos, na presença do dendrímero **10**, e foram observados efeitos catalíticos de  $9 \times 10^4$  vezes, **Figura 13**. A forma de atuação do dendrímero está fortemente atrelada a fatores hidrofóbicos, e ao resíduo histidina que pode atuar como nucleófilo ou catalisador básico-geral, no entanto os resultados não esclarecem totalmente o mecanismo catalítico.<sup>55</sup>



**Figura 13** – Estrutura do dendrímero peptídico **10**, construído a partir do dendron Dap-His-Ser (Dap=ácido 2,3-diamino-propriônico) e a reação de hidrólise do 8-butiloxipireno 1,3,6-trissulfonato.

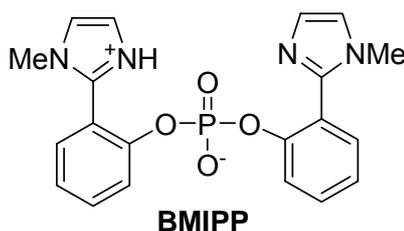
## 2 JUSTIFICATIVA

O estudo da clivagem de ésteres de fosfato é uma área que tem atraído grande interesse, por mimetizar processos biológicos fundamentais para o armazenamento e transmissão de informação genética. Essas reações de transferência do grupo fosforila são extremamente desfavoráveis em solução aquosa, com tempo de meia-vida que pode chegar até  $10^7$  anos, a  $25^{\circ}\text{C}$ , no caso do dimetil fosfato. Nos sistemas biológicos, essas reações são mediadas por enzimas, com fatores catalíticos de até  $10^{17}$  vezes, promovidos por uma estrutura multifuncional complexa. As ribonucleases constituem enzimas que quebram o RNA eficientemente, e ainda que sua forma de atuação não seja de consenso entre os pesquisadores, o mecanismo bifuncional ácido-base tem sido bem argumentado, baseado em modelos artificiais. Esses modelos podem ser miméticos ou não-miméticos, baseando-se em reações intermoleculares, intramoleculares ou em sistemas formados por macromoléculas. No entanto, muitas das ribonucleases artificiais não são consistentes com o mecanismo clássico ácido-base proposto para a enzima. Em muitos casos, a catálise promovida por grupos imidazol é ofuscada por aspectos como geometria dos grupos, instabilidade dos fosfodiésteres estudados ou ainda efeito hidrofóbicos. Portanto, o interesse em esclarecer a forma de atuação das ribonucleases complementa o estudo da compreensão das reações enzimáticas, envolvendo a transferência do grupo fosforila, com perspectivas para terapia genética.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a reação de hidrólise do diéster de fosfato, bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato (**BMIPP**), avaliando a catálise intramolecular ácida-básica geral como modelo de ribonuclease.



#### Estratégias específicas

Para poder conseguir atender plenamente o objetivo geral, as estratégias utilizadas neste trabalho são:

- Sintetizar o bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato (**BMIPP**) e caracterizá-lo espectroscopicamente. Titular potenciométricamente o **BMIPP** a fim de determinar os valores de  $pK_a$  dos diferentes grupos funcionais.
- Estudar a reação de hidrólise do **BMIPP**, avaliando efeito isotópico, de pH e de temperatura, e com diversos nucleófilos, como imidazol, acetato, até  $\alpha$ -nucleófilos, como hidroxilamina.
- Estudar a hidrólise do monoéster de fosfato 1-metil-2-(2'-imidazolil) fenil fosfato (**Me-IMPP**), produto da reação de hidrólise do **BMIPP**, e compará-lo com o análogo não metilado.
- Caracterizar os produtos da hidrólise do **BMIPP** e do **Me-IMPP** por ESI-MS e ESI-MS/MS.
- Realizar cálculos computacionais para auxiliar no estudo da reação de hidrólise do **BMIPP**.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes

O 1-metil-2-(2'-hidroxifenil)imidazol utilizado na obtenção do **BMIPP** foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Rogers e Bruice.<sup>56</sup> A água deuterada (D<sub>2</sub>O) foi adquirida da Cambridge Isotope e NaOD (40%) e DCl (37%) foram adquiridos da Aldrich. Os demais reagentes eram de qualidade P.A., procedentes da Aldrich, Carlo Erba, Acros e Vetec, e previamente purificados quando necessário.

### 4.2 Síntese do BMIPP

A síntese do **BMIPP** foi realizada utilizando uma solução de 1-metil-2-(2'-hidroxifenil)imidazol<sup>56</sup> (2,87 mmol) em CHCl<sub>3</sub> (15 mL), a qual foi gotejada sobre uma solução de PCl<sub>5</sub> (2,87mmol) em CHCl<sub>3</sub> (15 mL) sob banho de gelo e atmosfera de argônio, com a formação imediata de um sólido branco. A mistura foi agitada por 2 h a temperatura ambiente e após adição de água (0,25 mL), deixou-se reagir durante uma noite. A mistura foi evaporada rotatoriamente até obter um óleo, o qual com adição de metanol (5 mL) e água (3 mL) levou à formação de cristais brancos, com rendimento de 51%, com ponto de fusão de 110-114°C. A análise do produto obtido foi consistente com o produto puro: <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, referência interna TMS)  $\delta$ 3,48 (s, 6H, Me),  $\delta$ 7,32 (d, 2H,  $J_{12}=8,4$  Hz, H-1 e H-1'),  $\delta$ 7,43 (t, 2H,  $J_{32}=7,6$  Hz e  $J_{34}=7,6$ , H-3 e H-3'),  $\delta$ 7,50 (d, 4H,  $J_{56}=5,2$  Hz e  $J_{65}=5,2$ , H-5, H-5', H-6, H-6'),  $\delta$ 7,56 (d, 2H,  $J_{43}=7,6$  Hz, H-4 e H-4'),  $\delta$ 7,67 (t, 2H,  $J_{23}=7,6$  Hz e  $J_{21}=8,4$ , H-2 e H-2'), **Figura 14 e 15.**

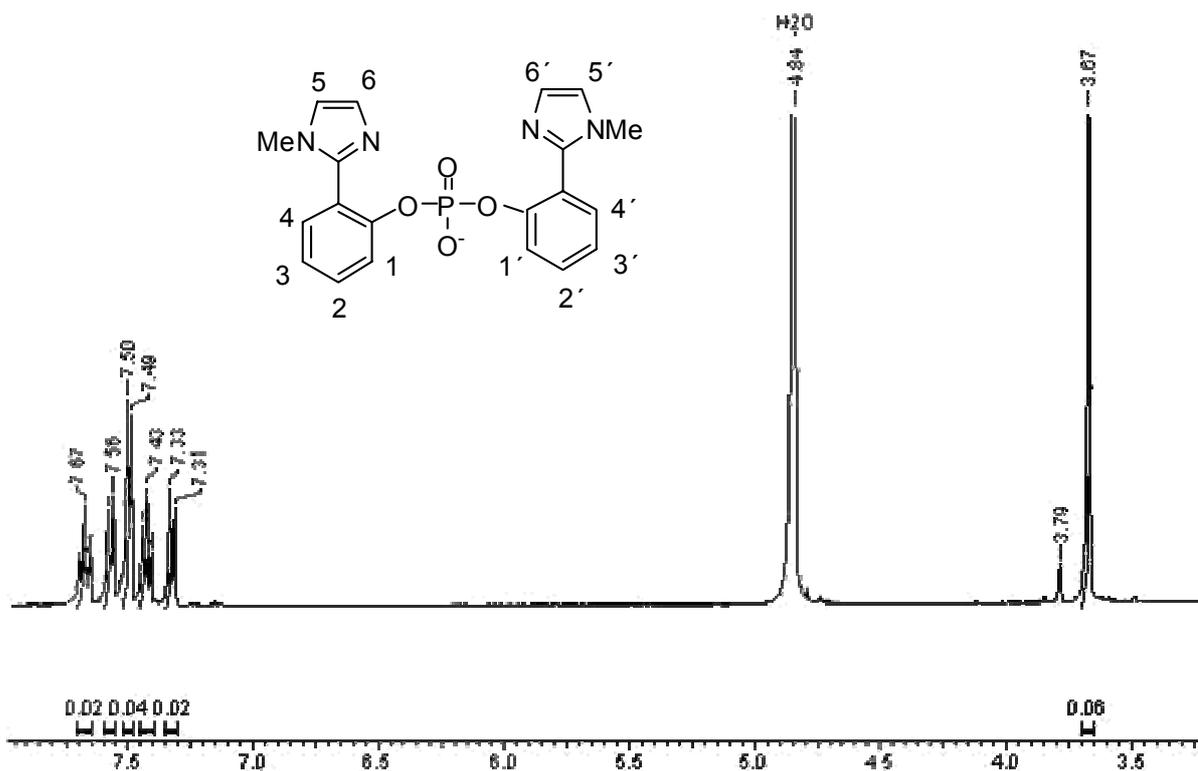


Figura 14 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para **BMIPP** em  $\text{D}_2\text{O}$  a 400MHz.

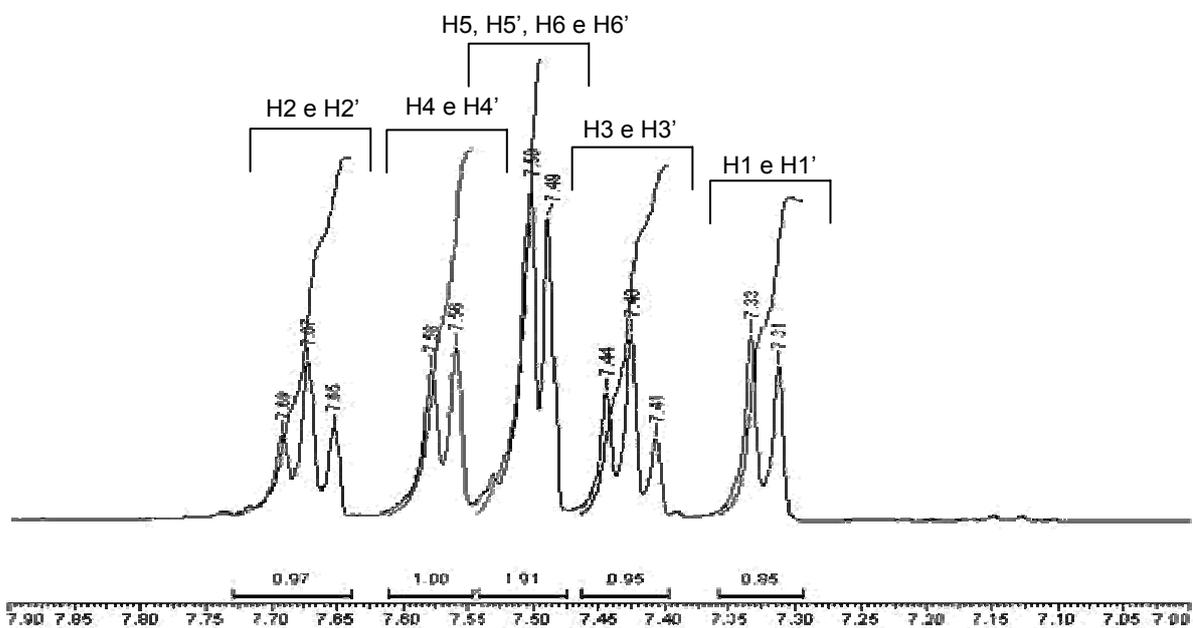


Figura 15 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ampliado para região 7.0-7.9 para **BMIPP**.

### 4.3 Titulação Potenciométrica

A técnica da titulação potenciométrica foi utilizada para determinar os  $pK_a$ s do **BMIPP**, bem como as espécies em equilíbrio em função do pH. As titulações foram realizadas em uma célula de vidro, de parede dupla, com capacidade de 150 mililitros. Esse sistema foi mantido fechado, com a temperatura controlada por um banho termostatizado a 25°C, agitação magnética e fluxo contínuo de nitrogênio que foi previamente borbulhado em uma solução de KOH para retirar as impurezas, a força iônica foi mantida constante em 0,1 com KCl. A base utilizada foi bombeada para a célula de vidro através de um DOSIMAT 765 e o pH medido através de um equipamento METROHM (modelo 713).

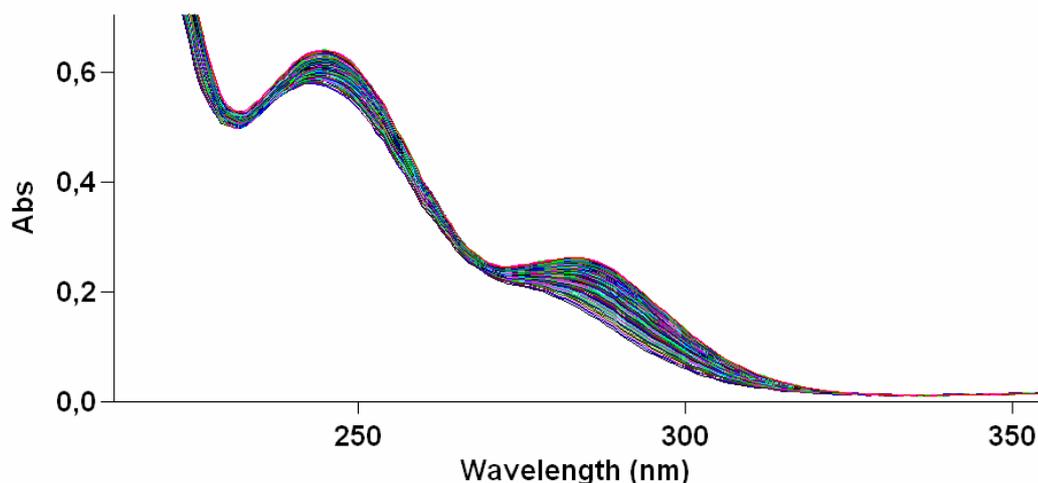
O tratamento dos resultados experimentais foi feito com os programas BEST7 e SPECIES,<sup>57</sup> que permitem determinar as constantes de dissociação e distribuição de espécies, respectivamente.

### 4.4 Estudos de ESI-MS e ESI-MS/MS

Os experimentos de ESI/MS e ESI-MS/MS foram realizados no Laboratório ThoMson de Espectrometria de Massa na UNICAMP. Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massa ESI-QqTof com resolução de massa de 5000 e 50 ppm de exatidão no analisador TOF. As condições foram: 10 mL de solução aquosa  $10^{-5}$  M de **BMIPP** foi preparada em pH 6,5 e 60°C. Alíquotas dessa solução foram injetadas no aparelho periodicamente. O aparelho foi operado no modo de íon negativo, sob fluxo contínuo de nitrogênio  $20 \text{ mL min}^{-1}$ , voltagem do capilar de 4kV, voltagem do cone de 20V e temperatura de desolvatação de 100°C. spray de íon -4500 eV, potencial de entrada 10 eV e potencial de saída da cela de colisão -12 eV. As espécies aniônicas foram submetidos à dissociação por colisão induzida (CID) com nitrogênio com a energia de colisão de 5 a 45 eV.

## 4.5 Medidas Cinéticas

O estudo cinético foi realizado em um espectrofotômetro de UV/VIS Cary 50, **Figura 16**. As reações de hidrólise do **BMIPP** foram iniciadas pela adição de uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da solução estoque do substrato (0,01 M em água, pH~10 e estocadas em freezer) em 3 mL de mistura reacional de modo que a concentração inicial do substrato fosse igual a 66,7  $\mu\text{M}$ .



**Figura 16** – Espectros de UV-Vis para a reação de hidrólise do **BMIPP** em pH 6,5, 60° e  $I=1,0$  (KCl).

A reação de hidrólise do **Me-IMPP** foi realizada utilizando uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da mistura reacional de **BMIPP** 0,001M, pH 7,5, a qual após 10  $t_{1/2}$ , foi adicionada num volume final de 3 mL em diferentes pHs. As constantes de velocidade observadas ( $k_{\text{obs}}$ ) foram calculadas em 310 nm para **BMIPP** e 290 nm para **Me-IMPP**. As reações foram acompanhadas em meio aquoso em diferentes pHs, a temperatura foi mantida em 60,0 °C e a força iônica em 1,0 (KCl), exceto nas medidas em  $[\text{HCl}] > 0,01$ . O pH das medidas cinéticas foi mantido com tampões preparados utilizando: ácido cloroacético (pH 2-3); ácido fórmico (pH 3-4,5); ácido acético (pH 4-5,5); dihidrogenofosfato de sódio (pH 5,5-7,8); bicarbonato de sódio (pH 8-9,5). As reações na presença de nucleófilos foram realizadas com concentração 1M.

As reações foram seguidas por no mínimo três tempos de meia-vida. As  $k_{obs}$  foram calculadas pelo ajuste iterativo dos gráficos lineares de  $\ln(A_{\infty}-A_t)$  contra o tempo, sendo que para todas as medidas os coeficientes de correlações ( $r$ ) foram superiores a 0,999. As reações extremamente lentas foram acompanhadas por velocidades iniciais, calculando o coeficiente angular da absorbância *versus* tempo para 2 a 5% do tempo total de reação, o qual foi corrigido utilizando as absorbâncias finais estimadas.

As regressões não-lineares foram realizadas com o programa de computação ORIGIN versão 7.5 (OriginLab, 2003) utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt para encontrar o mínimo da soma dos quadrados.

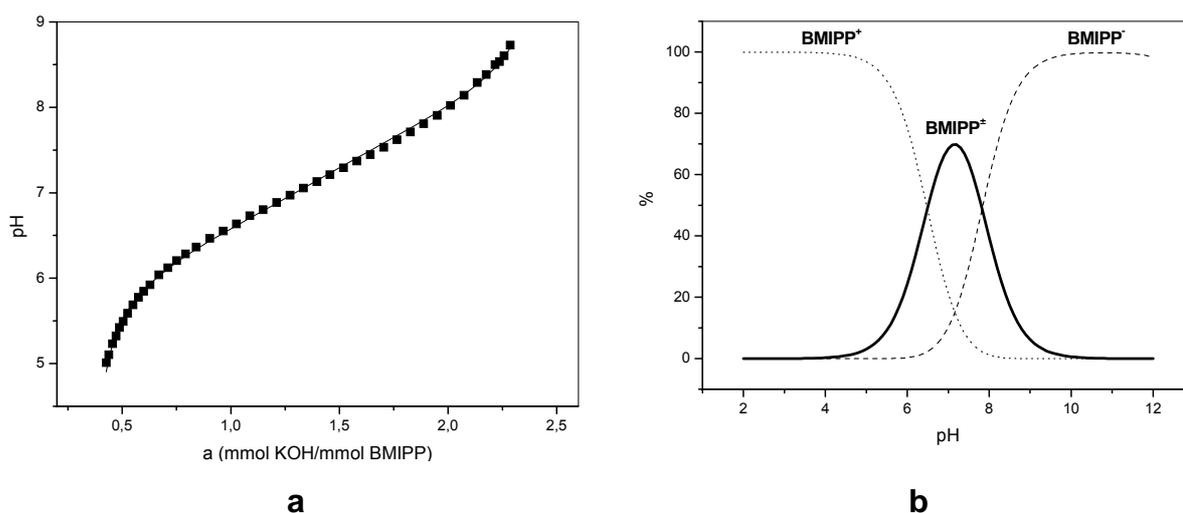
## 4.6 Cálculos Computacionais

Os cálculos computacionais para **BMIPP**, **Me-IMPP** e **IMP** foram realizados através da metodologia B3LYP no programa Gaussian para Linux. Os mínimos globais foram obtidos através da variação contínua da estrutura molecular e otimizados utilizando o modelo PCM com o contínuo dielétrico da água. O estado de transição da reação de hidrólise do **BMIPP** foi otimizado em fase gasosa devido à alta demanda computacional. Todos os átomos foram descritos por uma função de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa para os átomos de O, N e P.

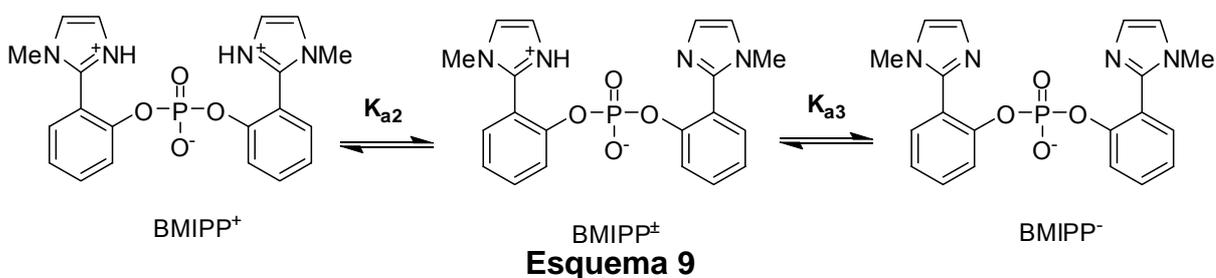
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Titulação Potenciométrica

A titulação potenciométrica do **BMIPP** foi realizada sob as condições experimentais previamente descritas, utilizando KOH como base (0,1008 M). A curva de titulação com o ajuste teórico obtido pelo Programa BEST7 está apresentada na **Figura 17a**. Na faixa de pH estudada foram observados dois  $pK_a$ s,  $6,48 \pm 0,03$  e  $7,82 \pm 0,03$ , que permitiram calcular a distribuição das espécies (**Figura 17b**) apresentadas no **Esquema 9**. Considerando o  $pK_a = 7,0$  do imidazol não substituído, os valores obtidos estão próximos mas diferem devido ao efeito de proximidade entre os dois centros dissociativos.

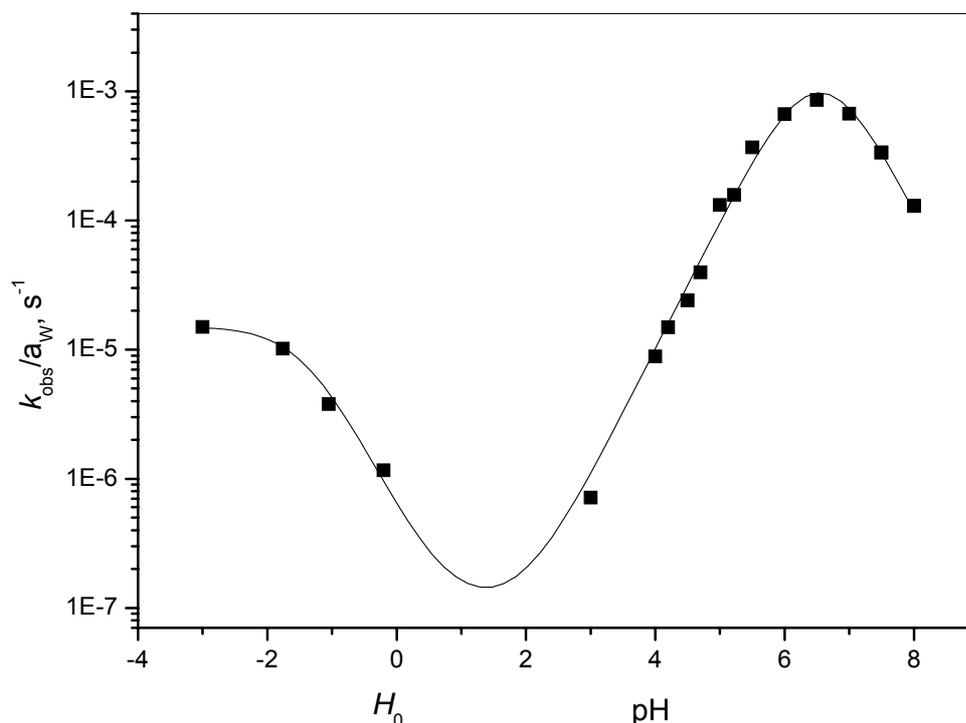


**Figura 17** – (a) Curva de titulação de uma solução 1,0 mM de **BMIPP**, KOH a 0,1008 M,  $I = 0,1$  (KCl), 25,0 °C. (b) distribuição de espécies de acordo com o **Esquema 9** e  $pK_a$ s calculados  $6,48 \pm 0,03$  e  $7,82 \pm 0,03$ .



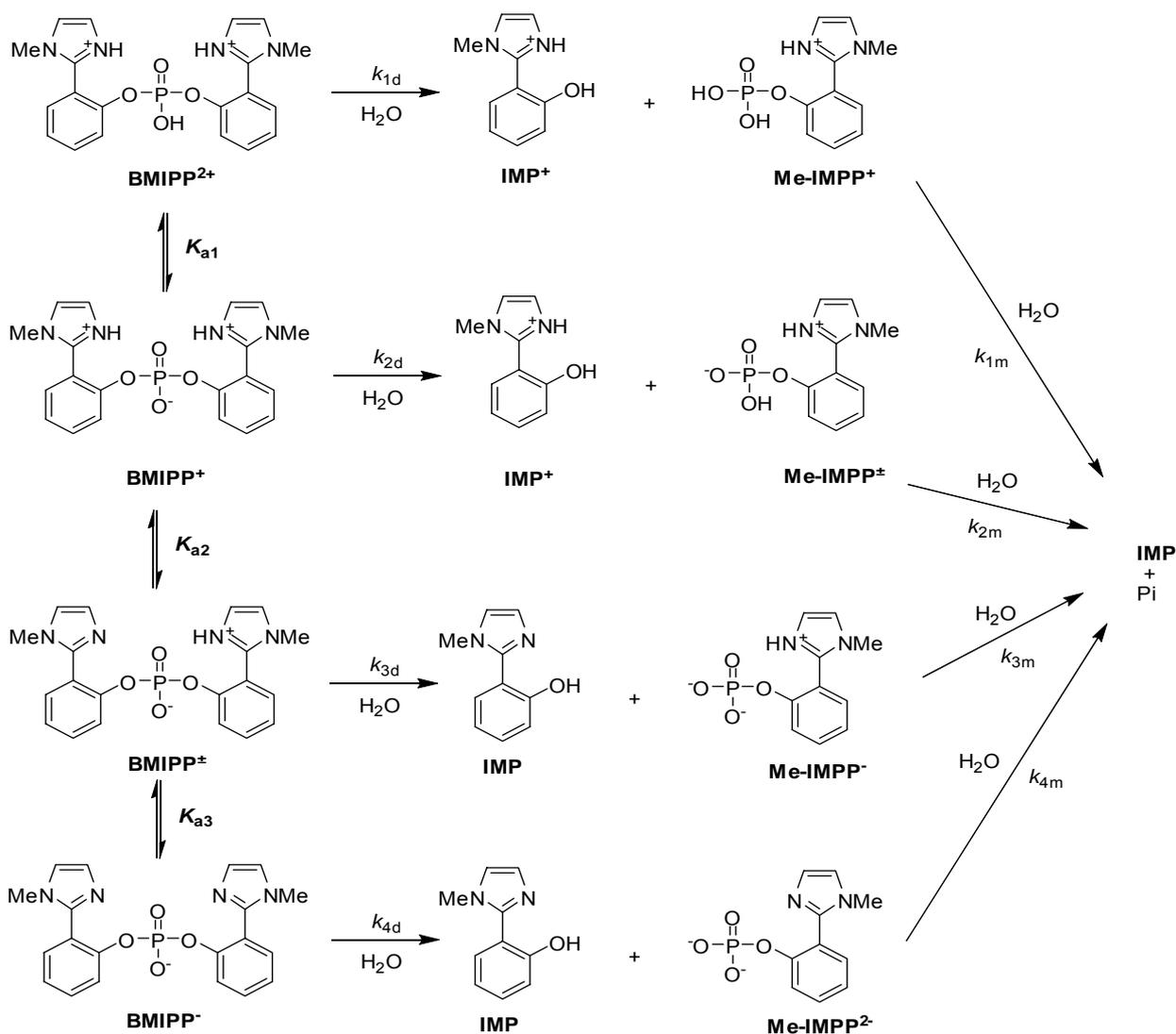
## 5.2 Estudo Cinético

A reação de hidrólise do **BMIPP** foi estudada em função do pH ou  $H_0$  ( $\text{pH} < 0$ ) e os resultados experimentais estão apresentados na **Figura 18**. A escala de  $H_0$  para misturas  $\text{H}_2\text{O}$ -HCl está de acordo com a função de acidez de Hammett, baseada nos equilíbrios de protonação de bases fracas derivadas de anilina.<sup>58</sup> Observa-se que na faixa de  $\text{pH} = 4$  até 8, um perfil em forma de sino, com um máximo de reatividade em  $\text{pH} 6,5$ , típico de reações bifuncionais que dependem de uma espécie protonada e outra desprotonada. Isso é confirmado pelo valor do coeficiente angular da curva ascendente e descendente ( $\text{pH} 4$ -8), em torno de um, sugerindo a participação de dois prótons. Esses dados mostram que a espécie zwitteriônica **BMIPP<sup>±</sup>** é a mais reativa, com um grupo imidazolinio protonado e outro desprotonado. Para valores de  $\text{pH} < 2$  até  $H_0 = -3$  pode ser observado um comportamento típico de catálise ácida, que indica saturação consistente com a desprotonação do fosfato ( $\sim \text{p}K_{a1} = -1,42$ ).



**Figura 18** – Dependência da constante de velocidade ( $k_{\text{obs}}/a_w$ ) com  $\text{pH}$  ou  $H_0$ <sup>58</sup> ( $\text{pH} < 0$ ) para a reação de hidrólise do **BMIPP** a  $60,0^\circ\text{C}$ . A correção da atividade da água ( $a_w$ ) é necessária para  $\text{pH} < 0$ , por a concentração de água diminuir com o aumento da concentração de ácido. A linha corresponde ao ajuste teórico segundo a **Eq. 1** e os parâmetros obtidos estão apresentados na **Tabela 3**.

O **Esquema 10** é consistente com os resultados experimentais e mostra que a reação é governada pelo equilíbrio entre quatro espécies de **BMIPP**, formando como produtos de hidrólise 1-metil-2-(2'-hidroxifenil)imidazol **IMP** e o monoéster de fosfato 2-(1-metil-1*H*-2-imidazolil)fenil hidrogeno-fosfato **Me-IMPP**. A hidrólise posterior de **Me-IMPP** forma outro equivalente de **IMP**, que será descrita em maior detalhe no item **5.2.3** A representação matemática que descreve os dados experimentais em termos de constantes de velocidade e as frações de espécies ( $\chi$ ) presentes está resumida na **Eq. 1**.



$$k_{obs} = k_{1d}\chi_{BMIPP^{2+}} + k_{2d}\chi_{BMIPP^{+}} + k_{3d}\chi_{BMIPP^{\pm}} + k_{4d}\chi_{BMIPP^{-}}$$

O formato da curva cinética experimental indica que apenas as espécies **BMIPP**<sup>2+</sup> e **BMIPP**<sup>±</sup> são cineticamente importantes, assim os termos referentes às outras espécies podem ser eliminados. A **Eq. 2** permite expressar as constantes de velocidade observadas de acordo com todos os equilíbrios envolvidos,

$$k_{obs} = k_{1d} \left( \frac{[H^+]^2 h_0}{[H^+]^2 h_0 + K_{a1} [H^+]^2 + K_{a1} K_{a2} [H^+] + K_{a1} K_{a2} K_{a3}} \right) + k_{3d} \left( \frac{K_{a1} K_{a2} [H^+]}{[H^+]^2 h_0 + K_{a1} [H^+]^2 + K_{a1} K_{a2} [H^+] + K_{a1} K_{a2} K_{a3}} \right) \quad 2$$

onde  $k_{1d}$ ,  $k_{2d}$ ,  $k_{3d}$  e  $k_{4d}$  correspondem às constantes de velocidade referentes às espécies totalmente protonada, catiônica, zwitteriônica e aniônica do **BMIPP**, respectivamente,  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$ ,  $K_{a3}$  se referem às constantes de dissociação das espécies totalmente protonada, catiônica e zwitteriônica (**Esquema 10**) e  $H_0 = -\log h_0$ .

Na **Tabela 3** estão apresentadas as constantes de equilíbrio e parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste não-linear dos dados da **Figura 18** com a **Eq. 2**.

**Tabela 3-** Constantes de dissociação e parâmetros cinéticos para a hidrólise do **BMIPP**.

Constante	Valor
$k_{1d}, s^{-1}$	$(1,52 \pm 0,11) \times 10^{-5}$
$k_{3d}, s^{-1}$	$(1,98 \pm 0,13) \times 10^{-3}$
$pK_{a1}$	$-1,42 \pm 0,05^a$
$pK_{a2}$	$6,10 \pm 0,04^a$
$pK_{a3}$	$7,20 \pm 0,05^a$

<sup>a</sup>  $pK_a$ s calculados no ajuste dos dados cinéticos a 60°C.

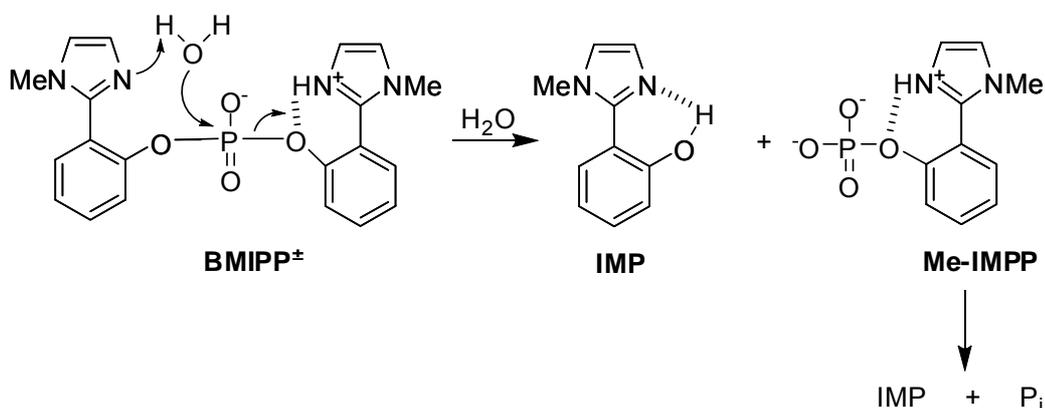
O valor de  $pK_{a1}$  obtido baseado no ajuste dos dados cinético utilizando os valores de  $H_0$  está coerente com valores obtidos para outros ésteres de fosfato com estruturas similares, com  $pK_a$  em torno de -1,50.<sup>26</sup> Os valores de  $pK_{a2}$  (6,10) e  $pK_{a3}$  (7,10) obtidos pela **Eq. 1** a 60°C são levemente inferiores que as constantes obtidas por titulação a 25°C (6,48 e 7,82), um resultado que é coerente com o efeito esperado devido ao aumento de temperatura.

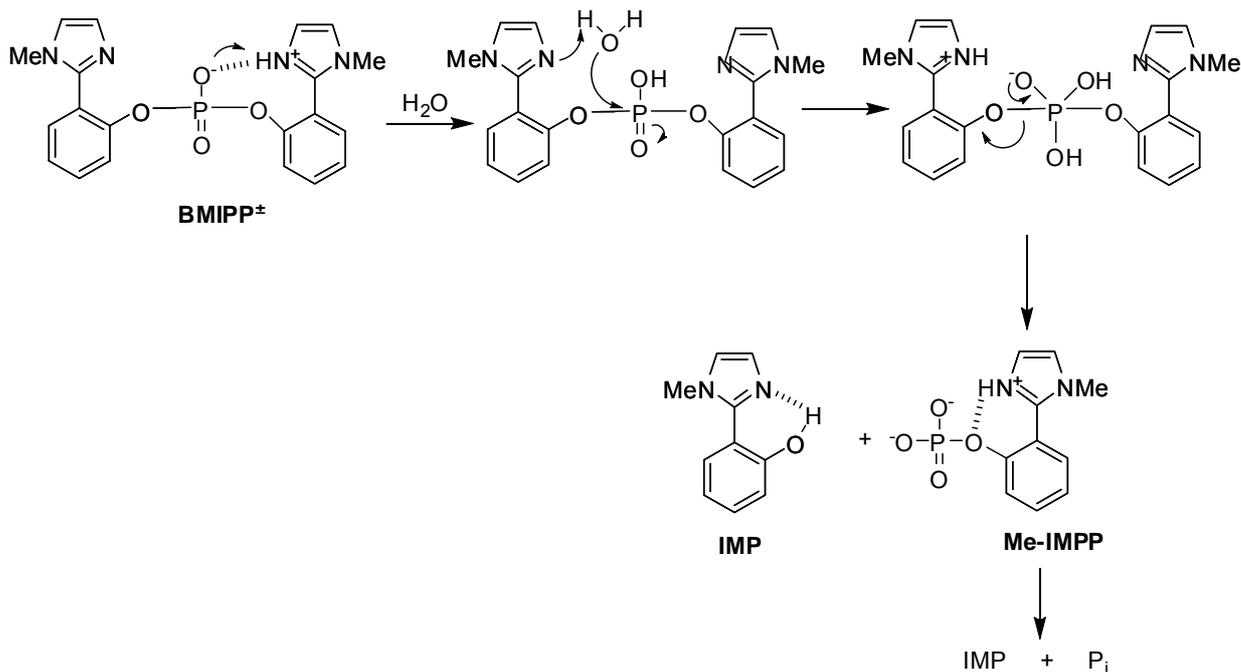
### 5.2.1 Hidrólise de **BMIPP<sup>±</sup>**

Os valores das constantes de velocidade mostram que **BMIPP<sup>±</sup>** tem uma reatividade  $10^3$  vezes maior que **BMIPP<sup>2+</sup>**. Ainda, comparando a hidrólise de **BMIPP<sup>±</sup>** com a hidrólise do difenil fosfato<sup>59</sup> tem-se um aumento de velocidade superior a  $10^7$  vezes. No entanto, essa comparação não considera o efeito eletrônico dos grupos imidazol do **BMIPP**. De fato, o  $pK_a$  do fenol derivado do difenil fosfato é superior ao  $pK_a$  (9,99) do fenol derivado do **BMIPP**, 1-metil-2-(2'-hidroxifenil)imidazol, o qual é aproximadamente 7,85.<sup>56</sup> O efeito eletrônico do imidazol diminui o  $pK_a$  do grupo de saída, tornando necessário uma comparação com diésteres de fosfato de menor valor de  $pK_a$  que fenol. Kirby e Younas<sup>59</sup> relacionaram a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato com diferentes  $pK_a$  do grupo de saída ( $pK_a^{OH}$ ) através da **Eq. 3**.

$$\log k_o = 1,57 - 0,97pK_a^{OH} \quad \mathbf{3}$$

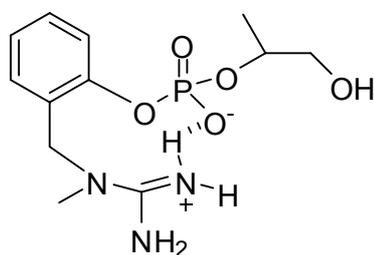
Através dessa equação é possível estimar um efeito catalítico na reação de hidrólise de **BMIPP<sup>±</sup>** superior a  $10^6$  vezes, a 60°C. Esse efeito pode ser explicado por dois mecanismos, o clássico ácido-base (**Esquema 11**) e o “tipo triéster” (**Esquema 12**). A possibilidade de a reação ocorrer por um mecanismo intramolecular nucleofílico será discutido no item 5.3. No mecanismo de catálise intramolecular ácido-básica geral, um imidazol desprotonado atua como base retirando um próton da água, que por sua vez ataca o átomo de fósforo e o imidazol protonado atua como ácido-geral, auxiliando o grupo de saída pela transferência de um próton (**Esquema 11**). Esse mecanismo deve ocorrer através de um processo concertado.





Esquema 12

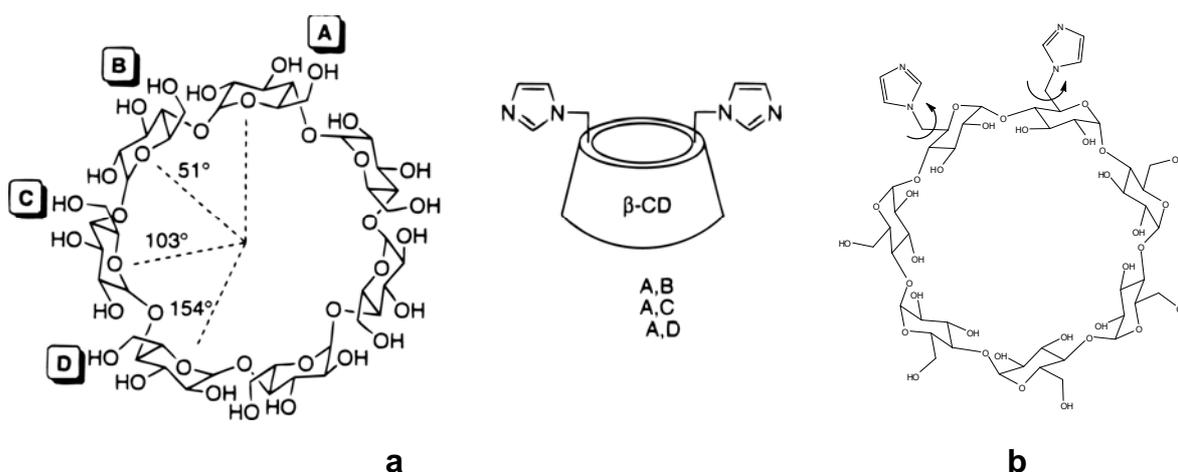
No mecanismo “tipo triéster”, o grupo imidazolínio transfere um próton ao oxigênio aniônico do fosfato e o grupo imidazol atua como base geral, assistindo o ataque da água sobre o fósforo. No entanto, essa forma de ativação do oxigênio aniônico provoca efeitos catalíticos relativamente baixos. Por exemplo, Anslyn e colaboradores<sup>60</sup> observaram um aumento de velocidade de apenas 40 vezes em diésteres de fosfato onde o grupo vizinho guanidíneo ativa o oxigênio aniônico do fosfato, **11**. A alta eficiência catalítica observada para **BMIPP** sugere que sua reação de hidrólise deve ocorrer pelo mecanismo “clássico” ácido-base.



11

Ainda que o mecanismo clássico ácido-base tem sido o melhor fundamentado para a forma de atuação da enzima RNase A,<sup>32</sup> o mecanismo tipo “triéster” tem sido sugerido em estudos com ciclodextrinas como modelos de ribonucleases, **Figura 10**.<sup>33</sup> Os resultados mostram uma dependência significativa da velocidade de reação em função da estrutura de três isômeros de ciclodextrina, com grupos imidazol ancorados em unidades de glicose vizinhas ou separadas. Nesse estudo, o mecanismo clássico ácido-base é excluído, pois se esperaria uma melhor eficiência catalítica em uma geometria onde os grupos catalíticos estivessem mais separados, e de fato, o isômero com os grupos imidazol mais próximos mostrou-se mais eficiente (**Figura 19a**).<sup>61, 62</sup> Assim, os autores sugerem que na geometria onde os grupos imidazol estão mais próximos não poderia haver uma catálise intramolecular básica assistindo o ataque da água, de forma simultânea a uma catálise ácida no grupo de saída. No entanto, essa argumentação não está totalmente correta, pois não considera a possibilidade de rotação do grupo imidazol para alcançar uma geometria favorável (**Figura 19b**) nem a regioseletividade do substrato pela cavidade da ciclodextrina.<sup>62</sup>

Estudos posteriores confirmaram a dependência da regioseletividade do substrato com a estrutura da ciclodextrina, mostrando que a mudança geométrica dos grupos catalíticos não influencia apenas a eficiência da catálise, mas também a seletividade pelo substrato.<sup>63</sup>



**Figura 19** Estruturas dos (a) Isômeros A,B; A,C e A,D de β-ciclodextrina 6,6'-bis(imidazol) e (b) Isômero A,B, ilustrando a rotação dos grupos catalíticos.

Estudos na clivagem do RNA, na presença de tampão imidazol, também sugerem um mecanismo tipo “triéster”, onde as espécies protonada e desprotonada de imidazol atuam em etapas diferentes.<sup>61, 64</sup> Esses resultados por si só não excluem a possibilidade do mecanismo ácido-base, pois o alinhamento que os grupos imidazol podem encontrar na RNase A ou em modelos miméticos é improvável de ocorrer nas reações de clivagem de RNA com tampão imidazol.<sup>32</sup> Além disso, a clivagem do RNA na presença de tampão não apresentou um perfil de pH em forma de sino. Assim, o mecanismo ácido-base ainda parece ser o mecanismo mais aceito e melhor fundamentado para reações com catálise bifuncional dos grupos imidazol, originalmente proposto na RNase A.

**Tabela 4** – Eficiência catalítica ( $k_{cat}/k_{n\tilde{a}o-cat}$ ) em reações de clivagem de ésteres de fosfato, com relevância para elucidação do mecanismo da RNase A.

Reação		$k_{cat}/k_{n\tilde{a}o-cat}$
Catálise ácida geral intramolecular na hidrólise do bis-2-carboxifenil fosfato, <b>BCPP</b> <sup>45</sup>		4 <sup>a</sup>
Catálise ácida geral intramolecular na hidrólise do 4,4'-metileno bis(3-hidroxi-2-ácido naftóico) fosfato, <b>BHNP</b> <sup>65</sup>		10 <sup>4a</sup>
Catálise ácida geral intramolecular na hidrólise do 2-(2'-imidazolil)fenil fosfato, <b>IMPP</b> <sup>46</sup>		10 <sup>6b</sup>
Catálise ácida geral intramolecular em derivados de 8-( <i>N,N</i> -dimetilamino)naftol	Monoéster de fosfato, <b>MANEP</b> <sup>25</sup>	10 <sup>5c</sup>
	Diéster de fosfato, <b>DANEP</b> <sup>26</sup>	10 <sup>6c</sup>
Catálise na hidrólise do 4-terc-butilcatecol fosfato cíclico na presença de:	Ciclodextrina bis(imidazol) <sup>48, 63</sup>	120
	Ciclodextrina mono imidazol <sup>34</sup>	11
Clivagem de substratos de RNA na presença de:	Imidazol <sup>64</sup>	8
	Imidazol + Zn <sup>2+</sup> <sup>66</sup>	850
	<b>TABI</b> <sup>47</sup>	10 <sup>4</sup>
	RNase A <sup>67</sup>	10 <sup>11</sup>
Clivagem de ésteres de fosfato de nitrofenila <sup>53</sup>	Imidazol	10
	PEI, 10% dodecil, 15% imidazol	2700
	$\alpha$ -quimotripsina	10000
Catálise bifuncional ácido-base na reação de hidrólise do <b>BMIPP</b> <sup>±</sup>		10 <sup>6</sup>
Catálise intramolecular ácida na reação de hidrólise do <b>BMIPP</b> <sup>2+</sup>		10 <sup>4</sup>

<sup>a</sup> Efeitos comparados com análogo com um carboxilato, 2-carboxifenil fosfato e 3-carboxi-2,2'-dihidroxi-difenilmetano. <sup>b</sup> Comparado com triéster derivado de fenol,  $pK_a=10$ . <sup>c</sup> Comparados com fosfatos de arila derivados de fenol com  $pK_a$  9,4.

Na **Tabela 4** está apresentada a eficiência catalítica de diversas reações que envolvem clivagem de ésteres de fosfato, que procuram mimetizar particularidades da RNase A. Analisando os dados, observa-se que o efeito catalítico observado para **BMIPP<sup>±</sup>** ( $10^6$  vezes) está entre os maiores efeitos reportados de catálise intramolecular, superando a eficiência catalítica dos clássicos modelos macromoleculares de RNase A, como as ciclodextrinas substituídas.

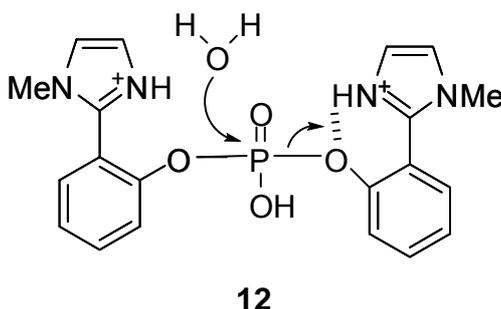
Ressalta-se que nas reações apresentadas na **Tabela 4** alguns aspectos devem ser considerados, como: (i) o uso de diferentes substratos; (ii) reações intramoleculares; e (iii) efeito hidrofóbico em modelos macromoleculares, como ciclodextrinas e polímeros.

O extraordinário efeito catalítico observado para **BMIPP<sup>±</sup>** é similar a catálise ácida intramolecular observada em ésteres de fosfato derivados de 8-(*N,N*-dimetilamino)naftol,<sup>26</sup> onde os dados cinéticos permitem estimar um valor de  $pK_a$  efetivo do grupo de saída desses de 3,76. Isso, provavelmente devido ao fato que nesses compostos a transferência de próton é garantida por uma estrutura mais rígida, com menor liberdade conformacional.

A maior peculiaridade na catálise observada no **BMIPP<sup>±</sup>** está na sua simplicidade, pois consegue atuar como um eficiente catalisador bifuncional intramolecular, e mesmo sem atrelar efeitos macromoleculares a sua catálise, como hidrofobicidade, consegue mimetizar com clareza o mecanismo da RNase A.

### 5.2.2 Hidrólise de $\text{BMIPP}^{2+}$

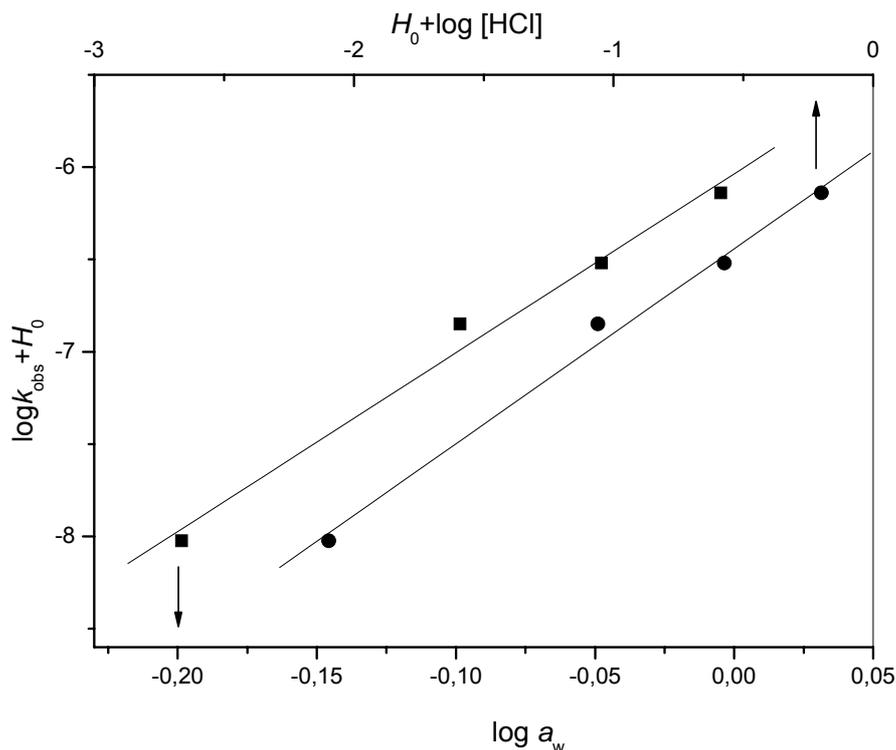
A reação de hidrólise da espécie catiônica de  $\text{BMIPP}^{2+}$  também está apresentada na **Tabela 4**, e se observa uma diminuição da eficiência catalítica em relação à espécie  $\text{BMIPP}^{\pm}$ , decorrente da protonação da base geral. Ainda assim, o valor da constante catalítica para  $\text{BMIPP}^{2+}$  apresentado na **Tabela 4** é similar aos valores obtidos para hidrólise de outros diésteres de fosfato difenílicos<sup>68</sup> ou triésteres de fosfatos diarílicos,<sup>69</sup> onde em pH ácido ocorre uma catálise ácida.<sup>7, 69</sup> Sugere-se que a reação de hidrólise da espécie catiônica deve proceder através de uma catálise intramolecular ácida de grupo imidazólio assistindo o grupo de saída, **12**. A eficiência dessa forma de ativação foi estimada em torno de  $10^4$  vezes, usando a **Eq. 3**. Este efeito é muito significativo, pois se deve considerar que o efeito catalítico calculado para **IMPP** está baseado em um  $\text{p}K_a = 10$  para o grupo de saída, que calculado pela **Eq. 3** com  $\text{p}K_a$  7,4, também leva a um efeito de  $\sim 10^4$  vezes.



O tratamento de Bunnett<sup>70-72</sup> constitui uma ferramenta interessante para esclarecer como ocorre a catálise ácida. Esse tratamento utiliza gráficos dos valores de  $\log k_{obs} + H_0$  em função de  $\log a_w$  ou de  $H_0 + \log[\text{HCl}]$ , e os coeficientes angulares dessas retas fornecem os valores de  $w$  e  $\varphi$  (**Eq. 4 e 5**), que estão vinculados a aspectos mecanísticos da catálise ácida (**Figura 20**).

$$\log k_{obs} + H_0 = w \log a_w + Const \quad (4)$$

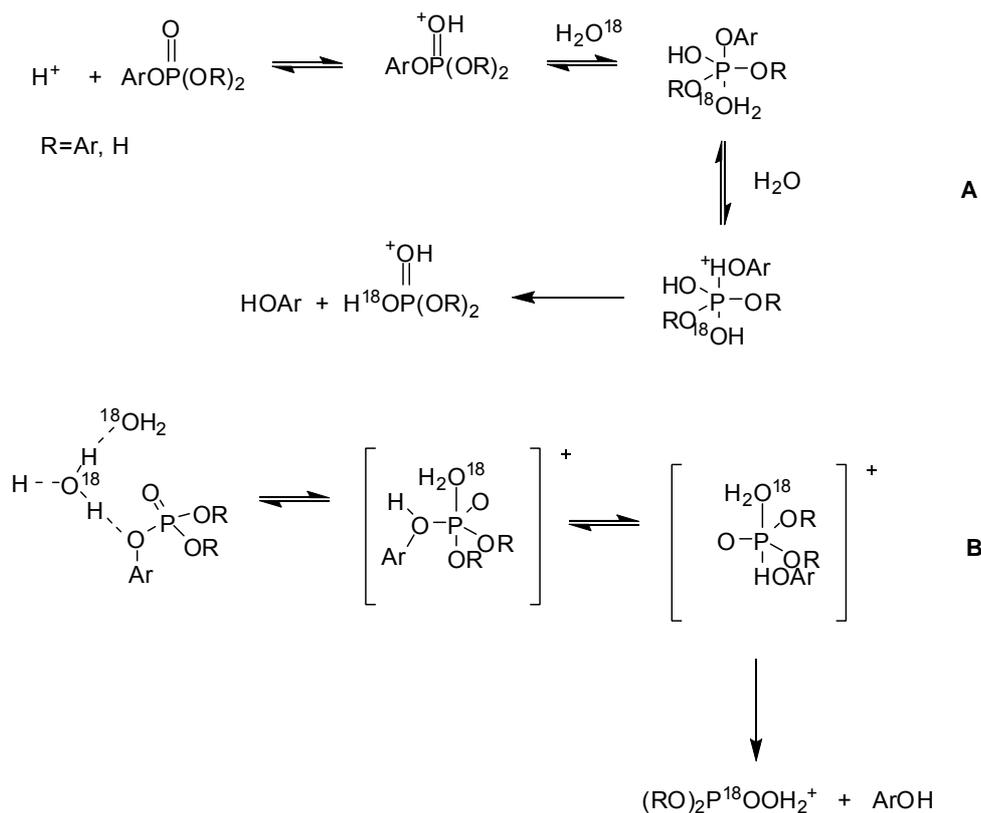
$$\log k_{obs} + H_0 = \varphi(H_0 + \log[\text{HCl}]) + Const \quad (5)$$



**Figura 20** – Tratamento de Bunnett para a reação de hidrólise do **BMIPP** para região de  $H_0$ ,  $\log k_{obs} + H_0$  em função de  $\log a_w$  (■) ou  $H_0 + \log [HCl]$  (●), de acordo com as Eq. 4 e 5.

A partir dos gráficos apresentados na **Figura 20** foram calculados os valores de  $w=9,6$  ( $n=4$ ,  $R=0,979$ ) e  $\varphi=0,98$  ( $n=4$ ,  $R=0,979$ ). Esses valores são similares aos valores obtidos para a hidrólise ácida do **IMPP** ( $w=11,6$ ,  $\varphi=1,31$ ,  $n=7$ ,  $R=0,998$ ),<sup>46</sup> do **MANEP** ( $w=10,9$ ,  $\varphi=1,18$ ,  $n=12$ ,  $R=0,997$ )<sup>25</sup> e de outros ésteres de fosfato arílicos ( $w \sim 7$  e  $\varphi \sim 1,2$ ),<sup>11</sup> sugerindo que a hidrólise envolve uma transferência lenta de próton, com um ataque concertado de uma molécula de água, e o grupo hidroxila do grupo fosfato estaria hidratado.

Bunton<sup>7</sup> sugeriu que a catálise ácida específica de ésteres de di- e triaril fosfatos pode ocorrer por dois mecanismos **A** e **B**, um com formação de intermediário e outro com ativação do grupo de saída por ligação de hidrogênio (**Figura 21**).



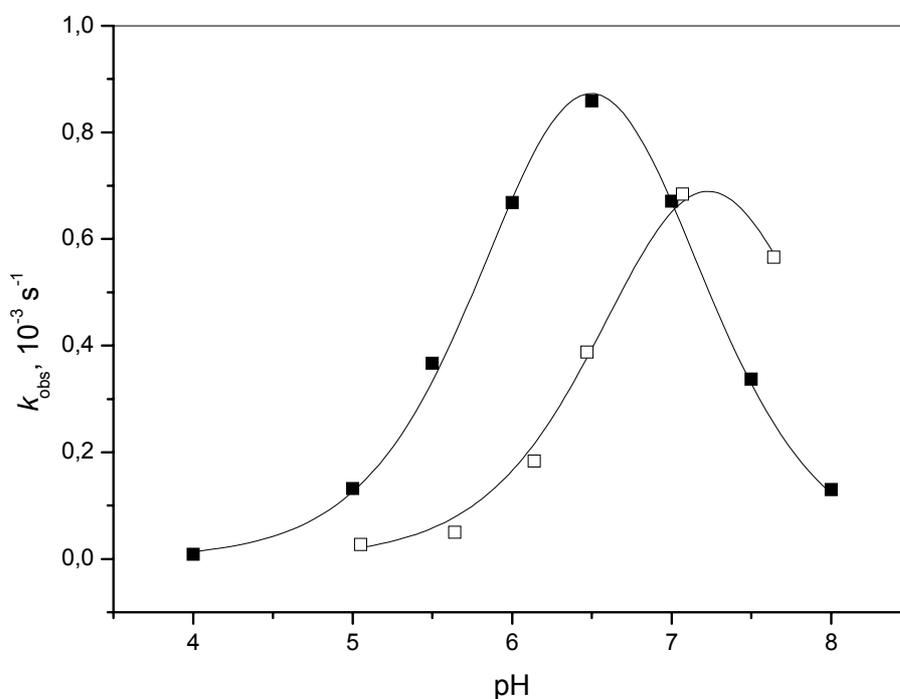
**Figura 21** – Mecanismos de catálise ácida específica para di- e triaril fosfatos.

Os mecanismos propostos são pouco prováveis para **BMIPP**<sup>2+</sup>: no caso **A**, devido à restrição conformacional para formar o intermediário; no mecanismo **B**, há uma transferência de hidrogênio ativando o grupo de saída, análogo ao sugerido para **12**, entretanto é uma catálise ácida específica e não geral, como no caso do **BMIPP**<sup>2+</sup>.

Os resultados apresentados indicam uma forte dependência da eficiência da catálise intramolecular com a liberdade conformacional e força da ligação de hidrogênio. Dados de efeitos isotópicos e termodinâmicos, bem como cálculos computacionais poderiam elucidar o mecanismo para catálise observada.

### 5.2.3 Efeitos Isotópicos para Reação de BMIPP

Comumente, estudos de efeito isotópico avaliam a importância de transferência de prótons em reações e são realizados numa região onde a velocidade de reação independe do pH, pois o pH pode variar em meio deuterado. No entanto, o perfil de pH para **BMIPP** apresentado na **Figura 18** não apresenta um patamar definido na faixa onde está presente a espécie dipolar iônica. Assim para avaliar o efeito isotópico obteve-se um perfil na região entre pH 5 e pH 8 para a reação de hidrólise do **BMIPP** em D<sub>2</sub>O, **Figura 22**. O perfil de pH obtido em D<sub>2</sub>O foi ajustado pela **Eq. 6**, uma forma simplificada da **Eq. 2**, onde considera-se apenas a catálise pela espécie **BMIPP<sup>±</sup>** do **Esquema 10**.



**Figura 22** – Perfil de pH obtido para reação de hidrólise do **BMIPP** em H<sub>2</sub>O (■) e D<sub>2</sub>O (□), a 60°C e *I*=1,0 (KCl). As linhas correspondem ao ajuste pela **Eq.6**.

$$k_{obs} = k_{3d} \left( \frac{[H^+]}{K_{a2} + [H^+]} \right) \left( \frac{K_{a3}}{[H^+] + K_{a3}} \right) \quad 6$$

Os parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados da **Figura 22** estão apresentados na **Tabela 5**, e mostram um aumento de até 0,8 unidade nos valores de  $pK_a$  em  $D_2O$ , efeito similar ao observado para outros diésteres de fosfato.<sup>65, 73</sup>

O efeito isotópico para a reação de **BMIPP** foi calculado comparando a constante  $k_3$ , referente à espécie **BMIPP<sup>±</sup>**, obtido em  $H_2O$  e  $D_2O$ , que foi  $k_{3d}^H/k_{3d}^D = 1,39$ . Esse valor, relativamente baixo, é típico de reações bimoleculares de hidrólise de fosfatos onde ocorre transferência de próton no estado de transição, sendo semelhante daquele encontrado para outras reações de hidrólise de diésteres de fosfato com catálise ácida geral.<sup>59, 69, 74</sup> Esse valor está entre o efeito obtido para IMPP ( $k^H/k^D \sim 1,0$ ) e os derivados de 8-(*N,N*-dimetilamino)naftol ( $k^H/k^D = 1,46 - 1,72$ ), que apresentam catálise intramolecular ácida-geral pelo grupo <sup>+</sup>NH. Ainda, o efeito isotópico é coerente com um mecanismo clássico ácido-base geral tal proposto, pois se a reação ocorresse por um mecanismo tipo “triéster”, o pré-equilíbrio levaria a um efeito isotópico inverso.

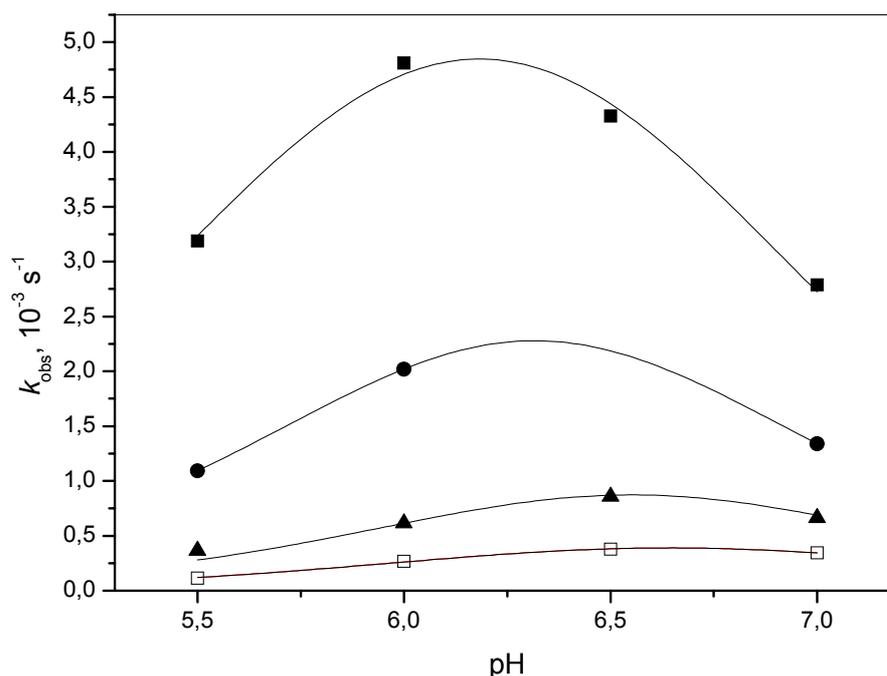
**Tabela 5** – Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados da **Figura 22** pela **Eq. 6**.

Constantes	$H_2O^a$	$D_2O$
$pK_{a2}$	6,10	6,91
$pK_{a3}$	7,20	7,51
$k_{3d}, s^{-1}$	$(1,98 \pm 0,13) \times 10^{-3}$	$1,42 \pm 0,20) \times 10^{-3}$

<sup>a</sup> Constantes da **Tabela 3**.

#### 5.2.4 Efeitos Termodinâmicos da Temperatura para Reação de **BMIPP**

Os parâmetros termodinâmicos de ativação também foram determinados para espécie **BMIPP<sup>±</sup>** na faixa de pH 5,5 a 7,0, obtendo assim um valor de  $k_{3d}$  em cada temperatura. Na **Figura 23** estão apresentados os dados de  $k_{obs}$  vs pH para cada temperatura, que foi ajustado pela **Eq. 6**, e as constantes obtidas estão apresentadas na **Tabela 6**.



**Figura 23** – Dependência de  $k_{\text{obs}}$  com o pH para a reação de hidrólise do **BMIPP** nas temperaturas de 50°C (□), 60°C (▲), 70°C (●) e 80°C (■),  $I=1,0$  (KCl).

**Tabela 6** – Constantes de velocidade ( $k_{3d}$ ) em função da temperatura para a reação de hidrólise de **BMIPP<sup>±</sup>**,  $I=1,0$  (KCl).

Temp, °C	$k_3, 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$\text{pKa}_2$	$\text{pKa}_3$
50	0,77	6,24	6,99
60	1,52	6,12	6,98
70	3,52	5,80	6,83
80	7,15	5,58	6,79

Através da **Tabela 6** é possível constatar uma diminuição acentuada dos valores de  $\text{pKa}$  com o aumento da temperatura, acompanhada de um aumento na constante  $k_3$ . Os valores de entropia e entalpia foram calculados pela **Eq. 7** que relaciona a temperatura com as constantes de velocidades  $k_{3d}$ .

$$\ln\left(\frac{k_3}{T}\right) = \left[ \ln\left(\frac{k_b}{\hbar}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right] - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad 7$$

onde  $k_b$  é a constante de Boltzmann igual a  $1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$  e  $\hbar$  é a constante de Planck igual a  $6,6 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ .

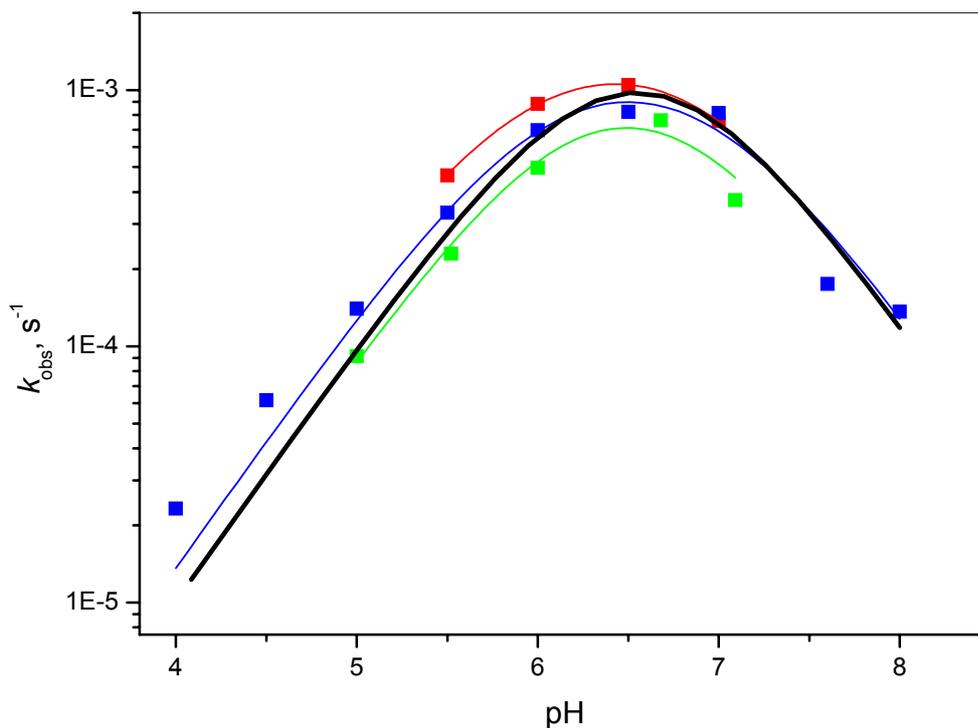
Os parâmetros termodinâmicos de ativação ( $\Delta H^\ddagger = 19,0 \pm 1,2$  kcal/mol e  $\Delta S^\ddagger = -9,05 \pm 0,5$  eu) estão de acordo com os valores esperados para diésteres de fosfato arílicos,<sup>59, 68</sup>  $\Delta H^\ddagger \sim 20-30$  kcal/mol e  $\Delta S^\ddagger < 0$ , indicando reações bimoleculares com um estado de transição altamente hidratado.

Os parâmetros termodinâmicos e o efeito isotópico concordam com o mecanismo de catálise intramolecular ácido-base proposto para hidrólise do **BMIPP**<sup>±</sup> e além de indicar a transferência de próton no estado de transição altamente hidratado, também são característicos de reações bimoleculares envolvendo água, eliminando assim uma possível catálise intramolecular nucleofílica do grupo imidazol. Valores de entropia para reações de diésteres de fosfato que exibem catálise nucleofílica intramolecular são próximos de zero ou levemente negativos.<sup>65</sup> A importância das transferências de prótons em **BMIPP**<sup>±</sup> pode também ser evidenciada pelo efeito de solventes que suprimem essas ligações de hidrogênio essenciais à catálise. A reação de **BMIPP** foi extremamente lenta quando realizada em etanol 40%, DMSO 50% e acetonitrila 50%, onde não foi possível calcular  $k_{obs}$ , fortemente reafirmando o mecanismo ácido-base proposto.

### 5.2.5 Reação de **BMIPP** com Nucleófilos

Muitas reações de hidrólise de diésteres de fosfato são aceleradas na presença de nucleófilos, principalmente  $\alpha$ -nucleófilos, que são nucleófilos com uma nucleofilicidade excepcional em relação a nucleófilos normais, pois apresentam um átomo com par de elétron livre adjacente ao átomo que ataca. Por exemplo, a clivagem de bis(2,4-dinitrofenil) fosfato em pH neutro é  $10^4$  vezes mais rápida na presença de hidroxilamina em comparação com a reação em água.<sup>75</sup> Já a velocidade da reação de hidrólise do **MANEP** aumenta até 100 vezes na presença de hidroxilamina e até 30 vezes para nucleófilos normais.<sup>25</sup>

Foi estudado o efeito de diferentes nucleófilos, imidazol ( $pK_a=7,0$ ), acetato ( $pK_a=4,75$ ) e hidroxilamina ( $pK_a=6,0$ ), e o perfil de pH obtido está apresentado na **Figura 24**, junto com os dados para reação em água. Observa-se que os nucleófilos não provocam efeito catalítico na reação de hidrólise do **BMIPP**, e o ajuste dos dados apresentados pela **Eq. 6** mostra uma pequena variação da constante  $k_{3d}$  para espécie reativa **BMIPP**<sup>±</sup> que pode ser considerada dentro do erro experimental ( $< 10^{-4}$  unidades).



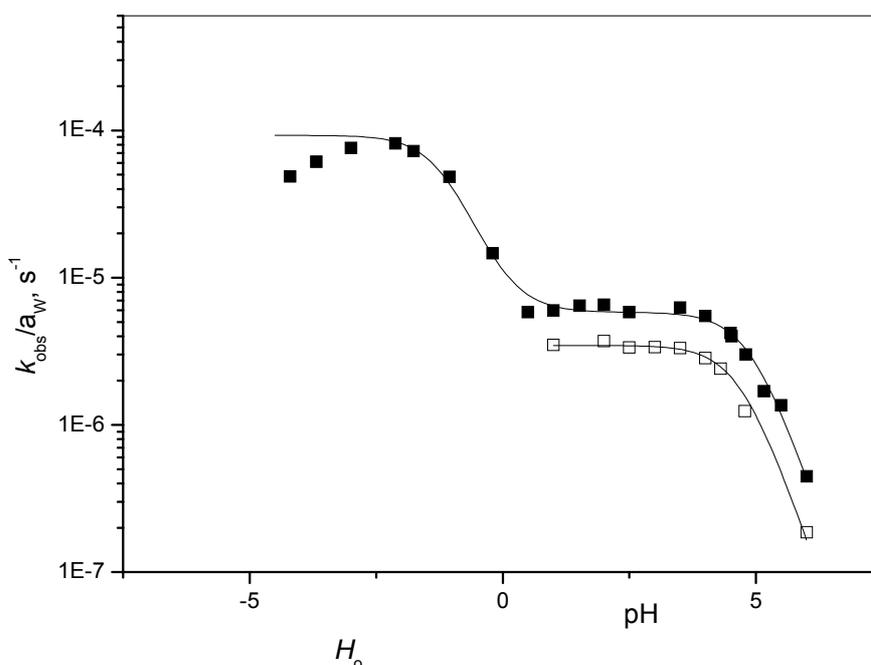
**Figura 24-** Reação do **BMIPP** em H<sub>2</sub>O (—), com imidazol (■), hidroxilamina (■), acetato (■) 1M, 60°C,  $I = 1.0$ (KCl).

Os dados mostram que o alto efeito catalítico que geralmente é observado para nucleófilos, até mesmo para os mais potentes, com efeito  $\alpha$ , não ocorre para a clivagem do substrato **BMIPP**. Isso pode ser explicado pela estrutura do **BMIPP**, pois a conformação dos grupos imidazol pode dificultar o ataque de nucleófilos sobre o fósforo. Ainda que os grupos imidazol pudessem assumir uma conformação que permitisse o ataque do nucleófilo, a catálise intramolecular básica geral do imidazol sobre a água parece ser mais eficiente, dispensando uma catálise nucleofílica.

### 5.2.6 Estudo Cinético da Reação de Hidrólise do Monóéster Me-IMPP

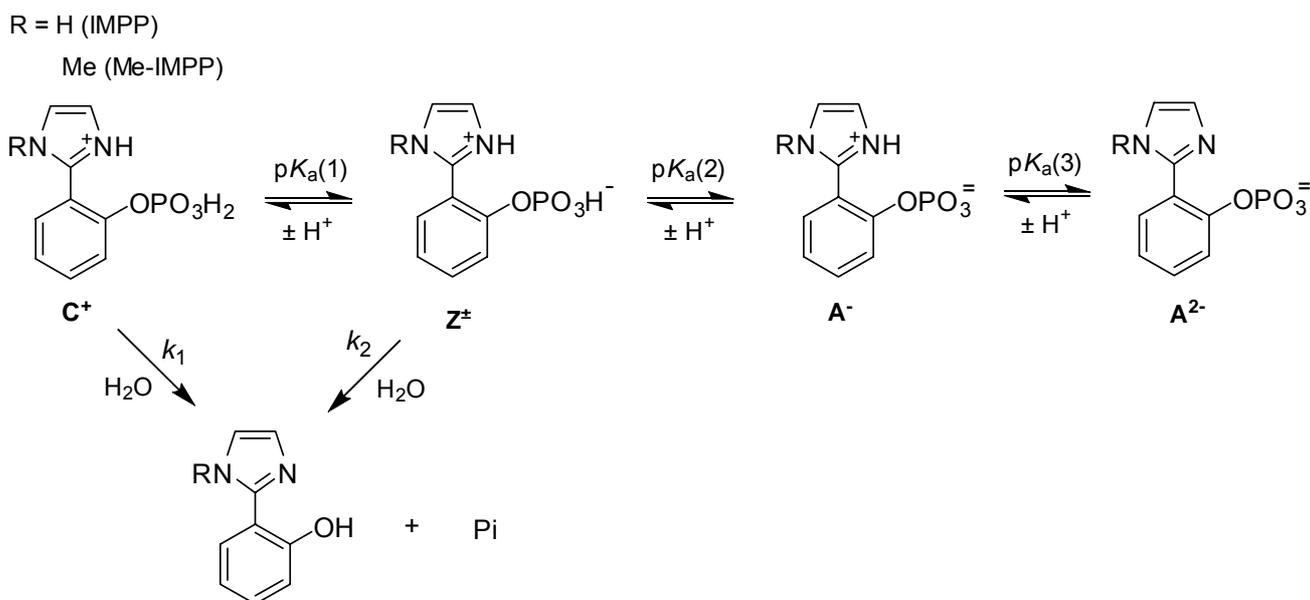
A hidrólise do monoéster **Me-IMPP**, produto da reação de hidrólise do diéster **BMIPP** foi estudada para (i) confirmar o mecanismo proposto para espécie **BMIPP**<sup>±</sup> e (ii) avaliar o efeito da metilação do grupo imidazol na catálise ácida observada para o monoéster não-metilado correspondente (**IMPP**). A reação do **Me-IMPP** foi acompanhada em diferentes pHs após 10 tempos de meia-vida da reação de hidrólise do **BMIPP** em pH 7. De fato, foi possível acompanhar a reação do **Me-IMPP**, indicando que o mecanismo proposto para **BMIPP** está correto,<sup>76</sup> e os dados são consistentes com a hidrólise do monoéster de fosfato não metilado (**IMPP**).

Na **Figura 25** está apresentado o perfil de pH obtido para **Me-IMPP**, juntamente com os dados para **IMPP**, previamente estudado<sup>46</sup>. Na região de pH 0-6, o perfil cinético é semelhante daquele observado para **IMPP**, indicando que a reação é semelhante daquela observada para monoésteres de fosfato com grupos de saída de  $pK_a$  maiores que 5,5, sugerindo que a espécie catiônica deve ser mais reativa que as espécies mono- e dianiônicas. Essa maior reatividade da espécie catiônica está associada a uma catálise ácida intramolecular pelo grupo imidazol, tal como ocorre no **IMPP** (**Esquema 8**).



**Figura 25** - Dependência da constante de velocidade com o pH para reação de hidrólise do **Me-IMPP** (□) e **IMPP**(■)<sup>46</sup>, 60°C,  $I=1,0$  (KCl).

No **Esquema 13** estão apresentadas as reações envolvidas na hidrólise do **Me-IMPP** e **IMPP**, que permitiu deduzir a **Eq. 9**, onde não foram consideradas as reações das espécies  $A^-$  e  $A^{2-}$  por serem muito lentas. Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos obtidos estão apresentados na **Tabela 7**.

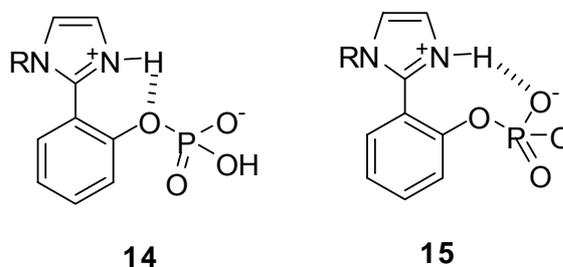


$$k_{obs} = k_1\chi_{C^+} + k_2\chi_{Z^\pm} + k_3\chi_{A^-} + k_4\chi_{A^{2-}} \quad \mathbf{9}$$

**Tabela 7** – Constantes de dissociação e parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do **Me-IMPP** e **IMPP**.

	<b>IMPP</b> <sup>46</sup>	<b>Me-IMPP</b>
$k_1, s^{-1}$	$(8,67 \pm 0,57) \times 10^{-5}$	--
$k_2, s^{-1}$	$(5,83 \pm 0,18) \times 10^{-6}$	$(3,65 \pm 0,06) \times 10^{-6}$
$pK_{a1}$	$-1,17 \pm 0,16$	--
$pK_{a2}$	$4,67 \pm 0,02$	$4,52 \pm 0,03$
$pK_{a3}$	$7,43 \pm 0,04$	--

Análise da **Tabela 7** confirma a menor reatividade de **Me-IMPP** em relação ao **IMPP**, observado na **Figura 25**. A espécie zwitteriônica da monoéster metilado é cerca de 2 vezes menos reativa que a espécie análoga não-metilada. Resultados anteriores sugerem que na hidrólise da espécie zwitteriônica do **IMPP** pode ocorrer duas formas de ativação, com formação de ligação de hidrogênio entre o grupo  $^+NH$  e o oxigênio fenólico (**14**) ou fosfatídico (**15**). Nas duas formas de ativação, a conformação do grupo imidazol é fundamental, pois determina a força e liberdade da ligação de hidrogênio. A menor reatividade da espécie zwitteriônica do **Me-IMPP** pode ser atribuída ao efeito do grupo metil em provocar uma maior rotação do grupo imidazol em relação ao anel fenílico, o que desfavorece a ativação por ligação de hidrogênio com o oxigênio fenólico.

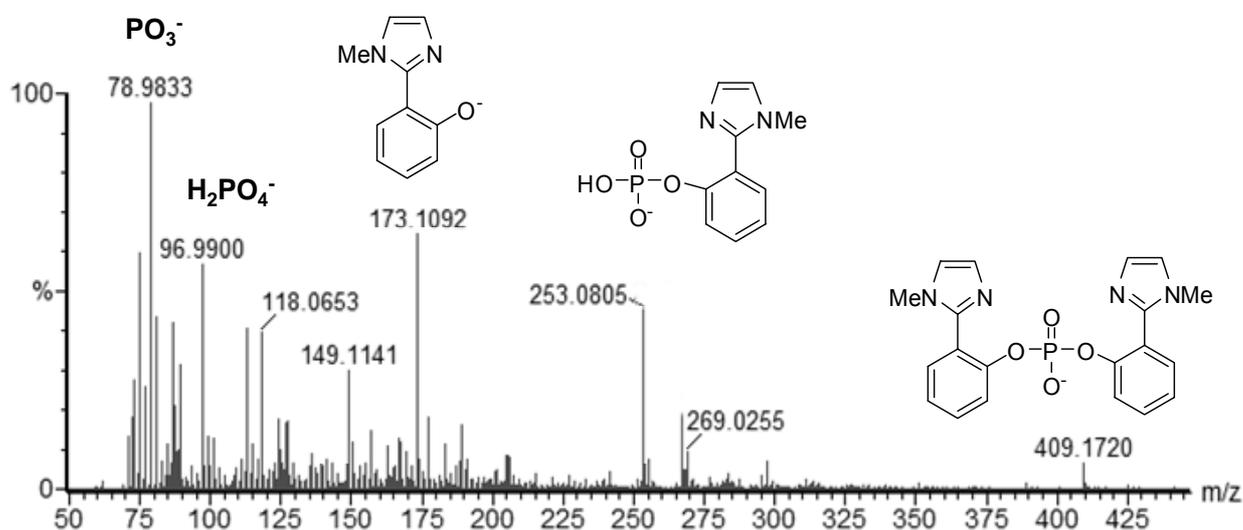


Comparando a reação de hidrólise da espécie dipolar iônica do diéster **BMIPP<sup>±</sup>** com o monoéster análogo, **Me-IMPP**, tem-se um aumento na reatividade de 540 vezes, sendo que normalmente se espera uma maior reatividade de monoéster de fosfato. Por exemplo, a reação de hidrólise do diânion 2,4-dinitrofenil fosfato é 1000 vezes mais rápida que a reação do diéster metil 2,4-dinitrofenil fosfato.<sup>7, 68</sup> No entanto, uma catálise intramolecular ácida-geral eficiente diminui essa grande diferença de reatividade, observando, por exemplo, para a hidrólise do **MANEP** que a reação é cerca de 18 vezes mais eficiente que o diéster **DANEP**, um efeito atribuído ao efeito estérico que dificulta a catálise ácida observada.<sup>26</sup>

Já no caso do **BMIPP**, o comportamento é inverso e extremamente acentuado. A maior reatividade em relação ao monoéster corrobora a importante catálise básica geral promovida pelo imidazol desprotonado, ausente no **Me-IMPP** ( $Z^{\pm}$ ). Um comportamento similar foi observado para o monoéster e diéster de 2-carboxifenilfosfato, no entanto a reatividade do diéster aumentou apenas cerca de 4 vezes em relação ao monoéster, fato atribuído a uma catálise ácida geral na decomposição do fosforano formado como intermediário.<sup>45</sup>

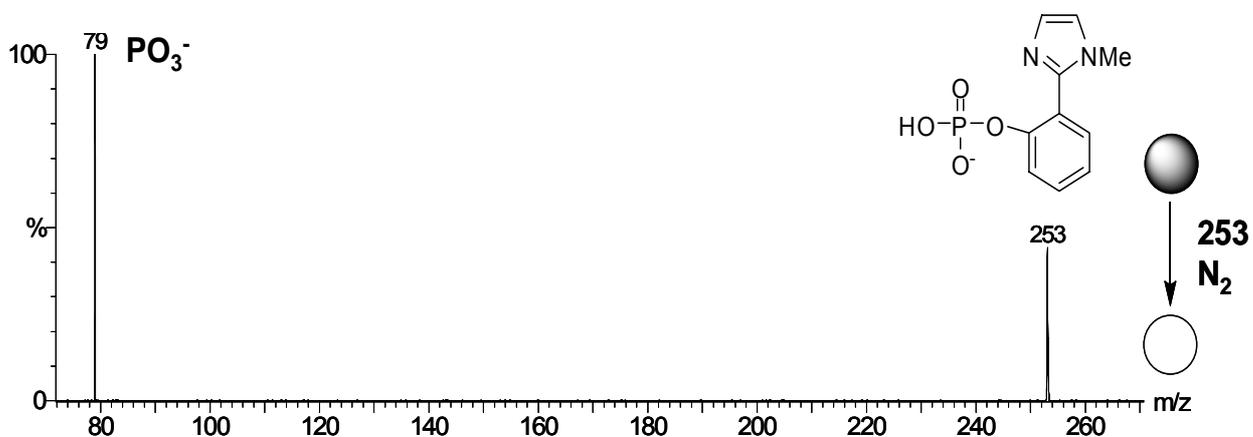
### 5.3 Reação do BMIPP Acompanhada por ESI-MS e ESI-MS/MS

A reação de hidrólise do **BMIPP** foi acompanhada por espectroscopia de massa (ESI-MS e ESI-MS/MS), que constitui uma importante ferramenta no monitoramento de reações, para confirmar os produtos nos mecanismos propostos.<sup>76, 77</sup> Na **Figura 26** está apresentado o espectro de ESI-MS após 25 minutos de hidrólise do **BMIPP** em pH 6,5, a 60°C, com as estruturas moleculares dos picos mais relevantes. Pelo espectro apresentado foram detectados e identificados alguns ânions majoritários que confirmam o mecanismo proposto para **BMIPP**<sup>±</sup> no **Esquema 10**. Os picos foram caracterizados como: (i) forma desprotonada do **BMIPP** de  $m/z$  409; (ii) monoéster **Me-IMPP** de  $m/z$  253 (iii) produto final fenólico **IMP** de  $m/z$  173; (iv) fosfato inorgânico na forma de metafosfato ( $\text{PO}_3^-$ ) de  $m/z$  79 e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  de  $m/z$  97. Ainda, observa-se a alta precisão na medida de massa molecular por ESI-MS, que calculados correspondem: **BMIPP** 409,1071; **Me-IMPP** 253,0368; **IMP** 173,0715;  $\text{PO}_3^-$  78,9585 e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  96,9691, o que permite confirmar as estruturas propostas.

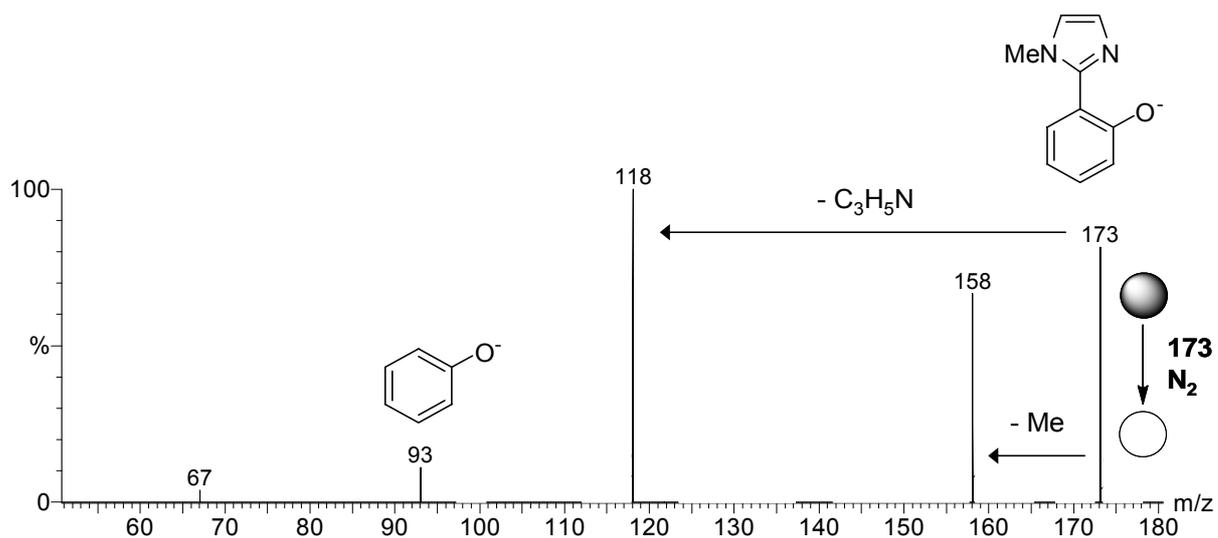


**Figura 26** – ESI-MS depois de 25 minutos de reação do **BMIPP** em solução aquosa, pH 6,5 e 60°C.

ESI-MS/MS foi então usado para caracterizar essas importantes espécies por dissociação por colisão induzida (CID). Nas **Figuras 27 e 28** estão apresentados os espectros ESI-MS/MS para **Me-IMPP** e **IMP**. Observa-se que o ânion **Me-IMPP** de  $m/z$  253 dissocia quase exclusivamente para  $\text{PO}_3^-$  de  $m/z$  79. Já o ânion **IMP** mostrou três dissociações, com um fragmento de  $m/z$  158 para perda de um radical metil, outro fragmento de  $m/z$  118 indicando quebra do anel imidazólio perdendo 1-metil-1H-azirine ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ ) e formando 2-cianofenóxi. O pico de  $m/z$  93 indica perda do grupo imidazol.

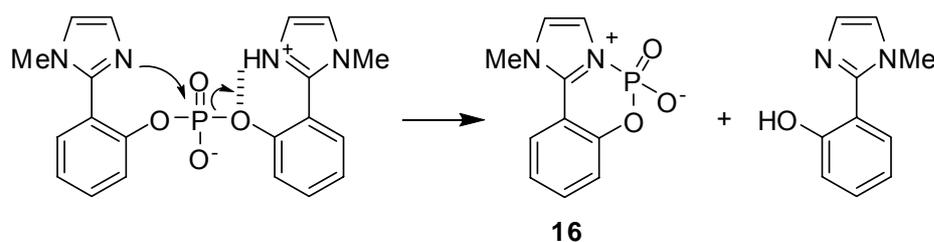


**Figura 27** – ESI-MS/MS do ânion **Me-IMPP** de  $m/z=253$ .



**Figura 28** – ESI-MS/MS do **IMP** desprotonado de  $m/z=253$ .

Os resultados obtidos por ESI-MS e ESI-MS/MS permitem concluir que a catálise observada para **BMIPP**<sup>±</sup> deve-se por uma catálise ácido-básica geral, pois os produtos esperados por esse caminho concordam com os dados cinéticos e os dados de ESI-MS. Uma catálise intramolecular nucleófila do imidazol também poderia ser sugerida para a reação do **BMIPP**, tal como foi observado para o estudo de hidrólise de diésteres de fosfato com grupo carboxilato atuando como nucleófilo intramolecular.<sup>45</sup> Por esse mecanismo se espera a formação de um intermediário cíclico, que para o caso do **BMIPP** está apresentado no **Esquema 14**. No entanto, esse mecanismo seria pouco provável de prever para o **BMIPP** pela restrição conformacional, pois a conformação que o grupo fosfato teria que assumir para o ataque direto do imidazol e formação do intermediário é pouco provável devido à liberdade espacial dos grupos imidazol. Além disso, os parâmetros termodinâmicos obtidos são típicos de reações bimoleculares e não unimoleculares. O intermediário **16** ( $m/z=236,04$ ) não é possível de ser detectado no modo negativo, já que é dipolar iônico. Assim, foram realizados estudos de ESI-MS no modo positivo em diversas condições experimentais, onde não foi detectado o intermediário e sim apenas as mesmas espécies detectadas na **Figura 26**. Para esclarecer melhor as diferentes possibilidades mecanísticas apresentadas também foram realizados estudos computacionais.

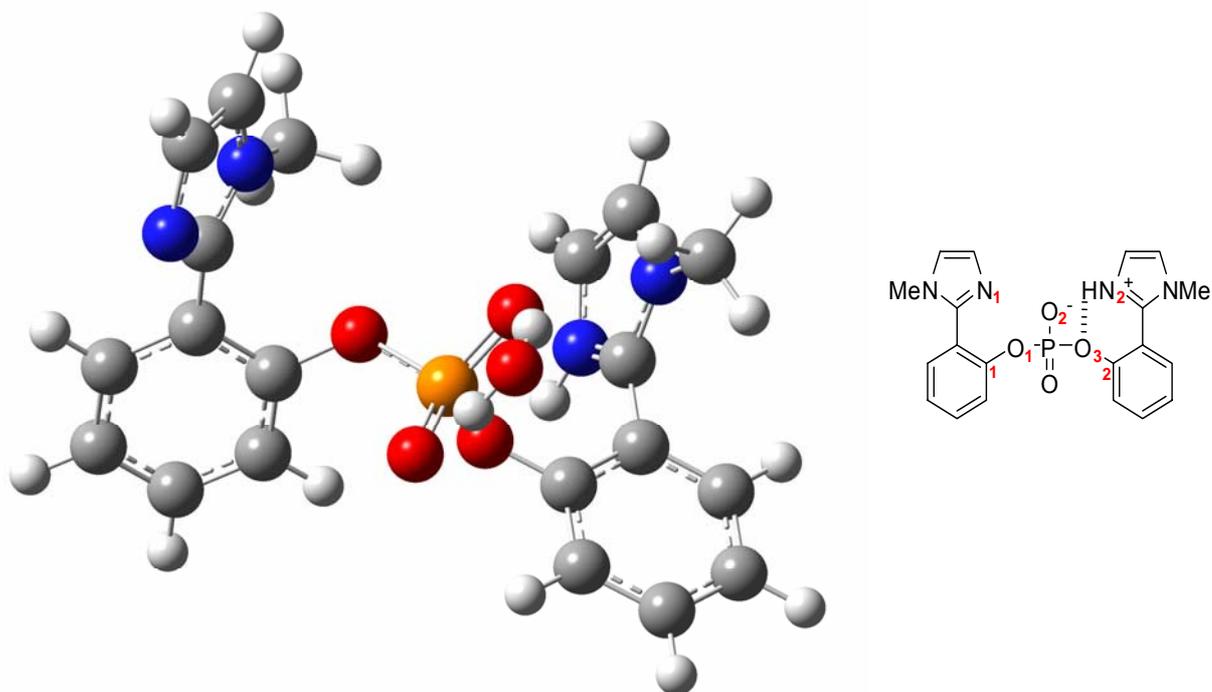


**Esquema 14**

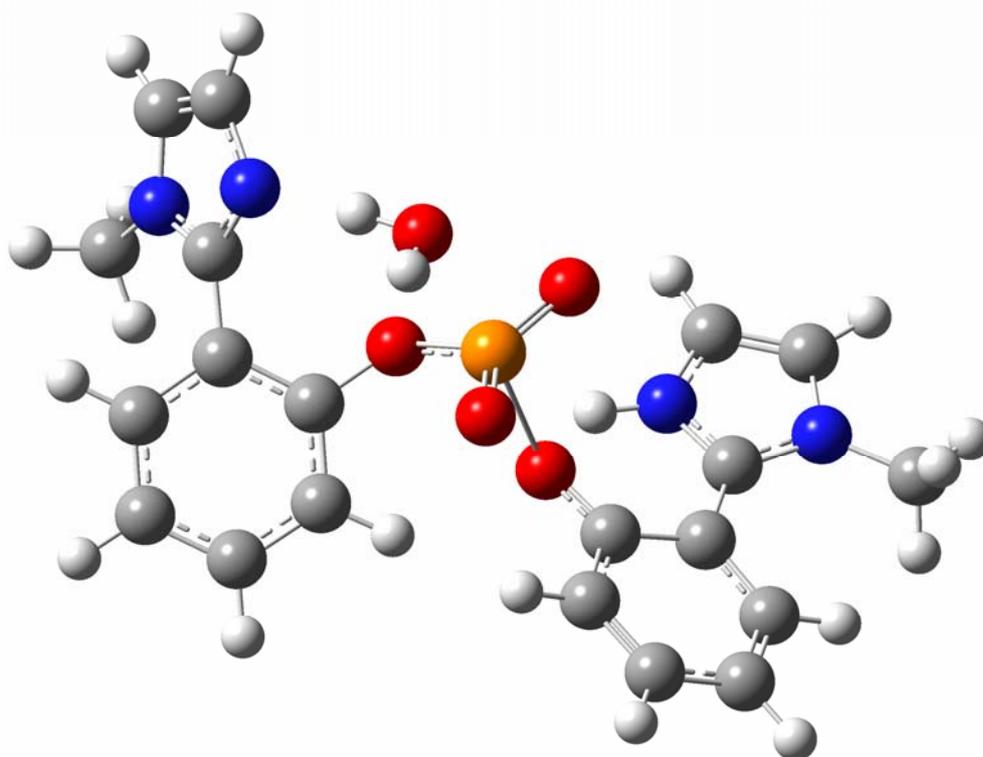
## 5.4 Cálculos Computacionais

A catálise intramolecular depende crucialmente da conformação dos compostos avaliados. Foram realizados cálculos computacionais para otimizar as estruturas de **BMIPP<sup>±</sup>**, **Me-IMPP** e **IMP**, tentando obter também estruturas para o estado de transição. A otimização foi feita no contínuo dielétrico da água utilizando a metodologia PCM. Os átomos de H, C, N, O e P foram descritos por uma função de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa e de polarização *p* para os átomos de O, N e H. A aplicação do modelo de solvatação foi necessária devido à separação de carga.

Foram obtidas as estruturas otimizadas para o estado reagente e estado de transição para a reação do **BMIPP<sup>±</sup>** com H<sub>2</sub>O, que estão apresentadas nas **Figuras 29** e **30**, respectivamente. A comparação entre as duas estruturas está ilustrada na **Tabela 8**, que relaciona os comprimentos de ligações e ângulos obtidos por cálculo computacional.



**Figura 29**– Estrutura otimizada do estado reagente para reação do **BMIPP<sup>±</sup>** com H<sub>2</sub>O. A estrutura foi obtida ao nível B3LYP/PCM utilizando as funções de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa para os átomos de O, N e P.



**Figura 30** – Estrutura otimizada para o estado de transição de  $\text{BMIPP}^{\pm}$  com  $\text{H}_2\text{O}$ . A estrutura foi obtida em fase gasosa devido a alta demanda computacional.

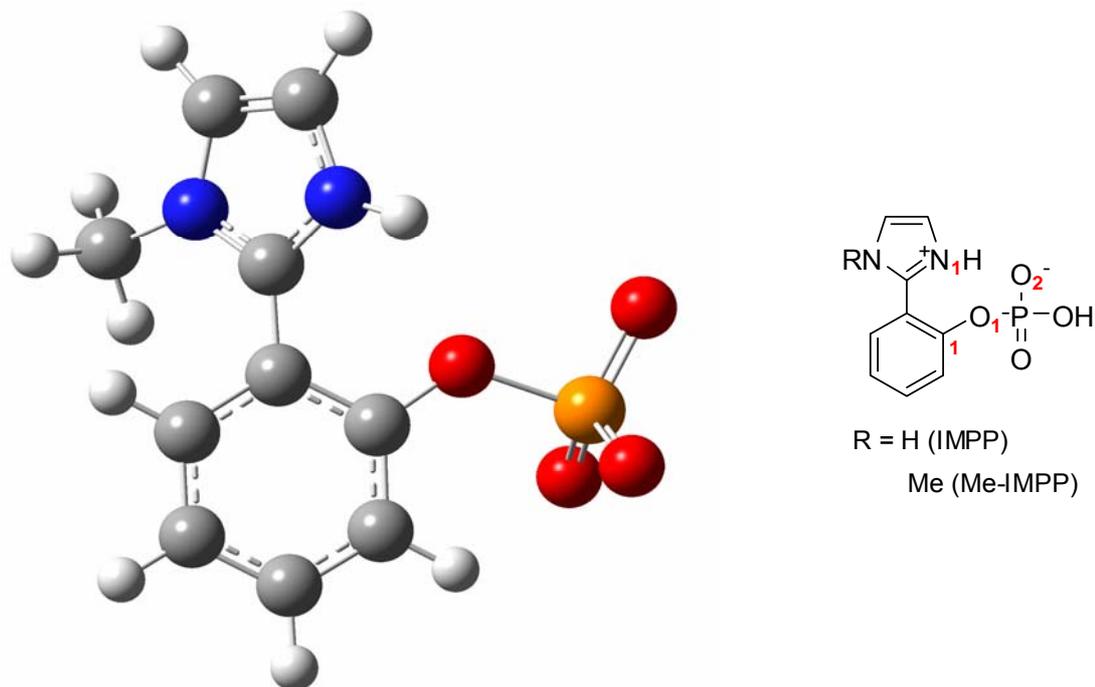
**Tabela 8** – Principais comprimentos de ligações (Å) e ângulos( $^{\circ}$ ) para as estruturas otimizadas do estado reagente(E.R.) e do estado de transição (E.T.) para reação do  $\text{BMIPP}^{\pm}$  com  $\text{H}_2\text{O}$ .

	E.R. $\text{BMIPP}^{\pm} + \text{H}_2\text{O}$	E.T. $\text{BMIPP}^{\pm} + \text{H}_2\text{O}$
N1-N2	8,37	7,13
C1-O1	1,38	1,38
O1-P	1,65	1,64
P-O3	1,68	2,25
O3-C2	1,37	1,30
N2H-O2	3,32	2,83
N2H-O3	5,06	1,74
$\text{H}_2\text{O}$ -P	3,37	2,30
$\text{OH}_2$ -N1	5,24	2,77
<hr/>		
Torção Imidazol(N1)-Fenil	$57^{\circ}$	$59^{\circ}$
Torção Imidazol(N2)-Fenil	$-75^{\circ}$	$-15^{\circ}$

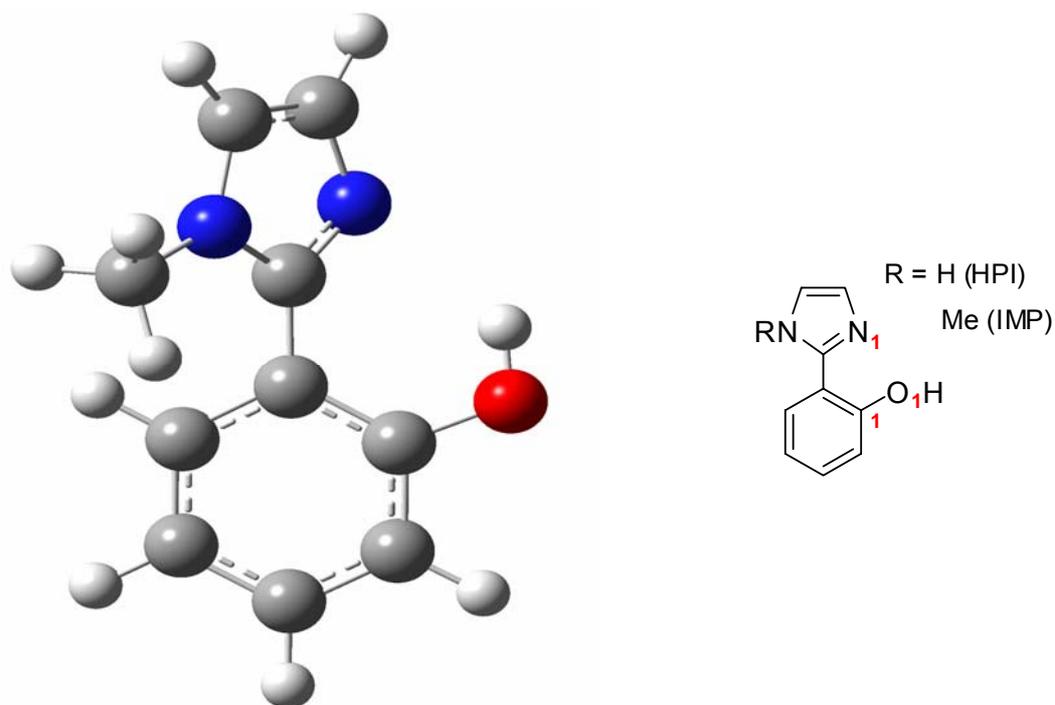
Análise da **Tabela 8** permite detectar as mudanças mais significativas que acontecem na mudança do estado reagente ao estado de transição. No estado reagente, os anéis imidazólicos estão um pouco mais distantes da posição favorável para catálise intramolecular, provavelmente devido à repulsão ocasionada pelos grupos metila. No entanto, a energia necessária para acomodar os grupos imidazol para uma catálise intramolecular deve ser pequena, visto que no estado de transição otimizado algumas peculiaridades sugerem o mecanismo clássico ácido-base: (i) alongamento da ligação P-O3 e encurtamento da ligação O3-C2; (ii) favorecimento da ligação de hidrogênio N2H-O3, que mostrou comprimentos menores que a ligação N2H-O2 característicos de um mecanismo tipo triéster; (iii) uma torção do grupo imidazol em relação ao grupo fenila de até 75°, indo do estado reagente para estado de transição para favorecer a catálise intramolecular, refletindo numa diminuição nas ligações intramoleculares pertinentes N2H-O3 e OH<sub>2</sub>-N1 e (iv) diminuição da distância entre os grupos imidazol de cerca de 1 Å que mostra para o estado de transição uma distância similar para a observada na estrutura da enzima natural RNase A (~6,5Å).

Essas considerações são consistentes com o mecanismo bifuncional ácido-base intramolecular, mesmo com a liberdade conformacional do grupo imidazol e repulsão entre os grupos metila e hidrogênios fenílicos. Assim, do estado inicial em direção ao de transição, o átomo de oxigênio fenólico pode aceitar um próton do grupo imidazólio, buscando uma maior coplanaridade com o anel fenílico, e similarmente deve ocorrer para o grupo imidazol desprotonado ao aceitar um próton da água. Simultaneamente, acontece a clivagem da ligação P-O que é concertada. A força diretiva para alcançar a maior coplanaridade está relacionada à estabilização por conjugação e o desenvolvimento de carga negativa sobre o átomo de oxigênio do grupo de saída traz o próton do grupo imidazólio para a posição correta de transferência.

Para complementar a descrição acima, foram obtidas as estruturas otimizadas para os produtos da reação de hidrólise do **BMIPP<sup>±</sup>**, do **Me-IMPP** e do **IMP**, **Figuras 31 e 32**, respectivamente.



**Figura 31** – Estrutura otimizada para a espécie zwitteriônica **Me-IMP**. A estrutura foi obtida ao nível B3LYP/PCM utilizando as funções de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa para os átomos de O, N e P.



**Figura 32** – Estrutura otimizada para o produto fenólico **IMP**. A estrutura foi obtida ao nível B3LYP/PCM utilizando as funções de base 6-31G(d), adicionando uma função difusa para os átomos de O e N.

Na **Tabela 9** estão apresentados os ângulos e comprimentos de ligações das estruturas otimizadas do monoéster não-metilado **IMPP**<sup>46</sup> e os parâmetros cristalográficos do seu produto de hidrólise, o fenol 2-(2'-hidroxifenil)imidazol (**HPI**),<sup>78</sup> para avaliar o efeito da metilação nos ângulos e comprimentos de ligações.

**Tabela 9** – Principais comprimentos de ligações (Å) e ângulos(°) para as estruturas otimizadas do **Me-IMPP**, **IMPP** e **IMP**, e parâmetros cristalográficos para **HPI**.

	<b>Me-IMPP</b>	<b>IMPP</b> <sup>46</sup>	<b>IMP</b>	<b>HPI</b> <sup>78</sup>
N1H-O2	4,00	3,15	-	-
N1H-O1	2,63	2,07	2,42	1,48
O1-H	-	-	0,97	1,13
C1-O1	1,34	1,47	1,36	1,45
O1-P	1,76	1,63	-	-
Torção Imidazol-Fenil	48,0°	17,5°	-51,8°	0°

Os resultados apresentados na **Tabela 9** mostram um efeito significativo do grupo metila na torção do grupo imidazol em relação ao grupo fenila, dificultando a formação das ligações de hidrogênio, como pode ser corroborado pelo aumento nos comprimentos das ligações N1H-O1 e NH1-O2 para as estruturas com grupo metila. Essa dificuldade em realizar uma catálise ácida intramolecular justifica a menor reatividade do monoéster metilado.

Comparando mais detalhadamente a estrutura otimizada do **IMP** com a estrutura cristalográfica do **HPI**, tem-se: (i) o grupo imidazol está torcionado 16,0° em relação ao anel fenílico, enquanto no **HPI**, está alinhado, efeito possivelmente devido ao efeito estérico do grupo metil e hidroxila; (ii) a distância entre o oxigênio fenólico e o hidrogênio ligado a ele é 1,13Å para **HPI** e 0,99 Å para **IMP**, isto é, uma ligação mais longa para OH no **HPI**, evidência de ligação de hidrogênio com o imidazol; (iii) a distância entre o hidrogênio ligado ao oxigênio fenólico e o nitrogênio imidazolinio para **IMP** é 1,705 Å, 0,3 Å superior que **HPI**, diferença justificada pela ligação de hidrogênio dificultada na estrutura de **IMP** onde há torção entre os anéis.

A maior reatividade do monoéster não metilado **IMPP** em relação ao metilado **Me-IMPP** está relacionada intrinsecamente as estruturas dos reagentes, pois o **IMPP** apresenta uma estrutura estabilizada por ligação de hidrogênio, o que indica uma catálise intramolecular ácida-geral mais eficiente. Para o **Me-IMPP**, a não-coplanariedade do seu produto fenólico **IMP** indica um menor favorecimento dessa catálise ácida.

## 6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi estudado a reação de hidrólise do diéster de fosfato bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-ínio-2-il)fenil) **BMIPP**, onde observou-se:

- (i) um perfil de pH em forma de sino, indicando uma catálise bifuncional pela espécie reativa dipolar iônica, com um máximo de velocidade em pH 6,5-6,8;
- (ii) um expressivo efeito catalítico de  $10^6$  vezes para o **BMIPP** comparado com difenil fosfato, sugerindo uma catálise intramolecular básica geral do imidazol desprotonado sobre a água, simultânea a uma catálise intramolecular ácida geral do imidazol protonado, assistindo o grupo de saída;
- (iii) um efeito isotópico (1,42) típico de reações que envolvem uma transferência de próton lenta no estado de transição;
- (iv) que os parâmetros de ativação obtidos também concordam com o mecanismo proposto, pois são característicos de reações bimoleculares com estado de transição altamente hidratado.

Através do mecanismo ácido-base proposto, o diéster **BMIPP** forma o monóéster correspondente (**Me-IMP**) e o fenol do grupo de saída (**IMP**) e, posteriormente, o monoéster sofre hidrólise formando um segundo equivalente do fenol **IMP**. Os estudos de ESI-MS e ESI-MS/MS permitiram acompanhar a reação do **BMIPP**, e confirmar todos os produtos esperados. Cálculos computacionais para reagentes, produtos e para a estrutura otimizada do estado de transição da reação do **BMIPP** com  $H_2O$ , são característicos de ligação de hidrogênio (1,7 Å), favorecendo uma catálise ácida geral intramolecular. O ataque da água sobre o fósforo também se mostrou favorável, com o nitrogênio imidazólico afastado 2,7Å permitindo acomodar uma molécula de água. O **BMIPP** se mostrou, em todos os aspectos analisados, um eficiente modelo bifuncional da ribonuclease.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SAENGER, W. **Principles of Nucleic Acid Structure**. 1ed.Springer: New York, 1984.356p.
2. DUGAS, H. **Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action**. 3ed.VCH: New York, 1996.724p.
3. WESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. **Science**,v.235, p.1173-1178.1987
4. MACHADO, V. G.; NOME, F. Energy-rich phosphate compounds. **Química Nova**,v.22, (2), p.351-357.1999
5. WOLFENDEN, R.; SNIDER, M. J. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. **Accounts of Chemical Research**,v.34, (12), p.938-945.2001
6. LIU, C.; WANG, M.; ZHANG, T.; SUN, H. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**,v.248, p.147-168.2004
7. BUNTON, C. A. Hydrolysis of Ortophosphate Esters. **Accounts of Chemical Research**,v.3, (8), p.257-265.1970
8. YANG, Y.-C.; BAKER, J.; WARD, J. R. Decontamination of chemical warfare agents. **Chemical Review**,v.92, (8), p.1729-1743.1992
9. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**,v.26, (5), p.745-753.2003
10. GUTRIE, R. D.; JENCKS, W. P. IUPAC recommendations for the representation of reaction mechanisms. **Accounts of Chemical Research**,v.22, p.343-349.1989
11. BRANDÃO, T. A. S. Desenvolvimento de Novos Catalisadores, Modelos Não-Miméticos de Fosfatases e Relações Lineares de Energia-Livre.160f.Tese(Doutor em Química)-Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
12. 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**,v.13, (6), p.161-169.1980
13. CLELAND, W. W.; HENGGE, A. C. Enzymatic Mechanisms of Phosphate and Sulfate Transfer. **Chemical Review**,v.106, (8), p.325-3278.2006
14. KRAUT, D. A.; CARROLL, K. S.; HERSCHLAG, D. Challenges in Enzyme Mechanism and Energetics. **Annual Review of Biochemistry**,v.72, p.517-571.2003

15. WOLFENDEN, R. Degrees of Difficulty of Water-Consuming Reactions in the Absence of Enzymes. **Chemical Review**,v.106, (8), p.3379-3396.2006
16. KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2 ed.; THIEME: New York, 2005.
17. BENKOVIC, S. J.; HAMMES-SCHIFFER, S. A Perspective on Enzyme Catalysis. **Science**,v.301, p.1196-1202.2003
18. GARCIA-VILOCA, M.; GAO, J.; KARPLUS, M.; TRUHLAR, D. G. How Enzymes Work: Analysis by Modern Rate Theory and Computer Simulations. **Science**,v.203, (5655), p.186-195.2003
19. SCHOWEN, R. L. How an enzyme surmounts the activation energy barrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**,v.100, (21), p.11931-11932.2003
20. VILLA, J.; WARSHEL, A. Energetic and Dynamics of Enzymatic Reactions. **Journal of Physical Chemistry B**,v.105, (33), p.7887-7907.2001
21. REYNALDO, V.; CAO, R.; FRAGOSO, A. Supramolecular Chemistry of Cyclodextrins in Enzyme Techonology. **Chemical Review**,v.107, (7), p.3088-3116.2007
22. SCHOEMAKER, H. E.; MINK, D.; WUBBOLTS, M. G. Dispelling the Myths-- Biocatalysis in Industrial Synthesis. **Science**,v.299, p.1694-1697.2003
23. MENGER, F. M. On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity. **Accounts of Chemical Research**,v.18, (5), p.128-134.1985
24. HUTCHINS, R. O.; RUA, L. Neighboring group assistance in azabicyclic derivatives. Tremendous rate accelerations in 2-aza-6-halobicyclo[2.2.2]- and 6-aza-4-halobicyclo[3.2.1]octanes. **Journal of Organic Chemistry**,v.40, (17), p.2567-2568.1975
25. KIRBY, A. J.; DUTTA-ROY, N.; SILVA, D.; GOODMAN, J. M.; LIMA, M. F.; ROUSSEV, C. D.; NOME, F. Intramolecular General Acid Catalysis of Phosphate Transfer. Nucleophilic Attack by Oxyanions on the  $\text{PO}_3^{2-}$  Group. **Journal of the American Chemical Society**,v.127, (19), p.7033-7040.2005
26. KIRBY, A. J.; LIMA, M. F.; SILVA, D.; ROUSSEX, C. D.; NOME, F. Efficient Intramolecular General Acid Catalysis fo Nucleophilic Attack on a Phosphodiester. **Journal of the American Chemical Society**,v.128, p.16944-16952.2006
27. FERSHT, A. **Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding**. 1ed.W.H. Freeman and Company: New York, 1999;650 p.
28. PIERRE, T. S.; JENCKS, W. P. Intramolecular Catalysis in the Reactions of Nucleophilic Reagents with Aspirin. **Journal of the American Chemical Society**,v.90, (14), p.3817-3827.1968

29. SMYTH, D. G.; STEIN, W. H.; MOORE, S. The Sequence of Amino Acid Residues in Bovine Pancreatic Ribonuclease: Revisions and Confirmations. **Journal of Biological Chemistry**,v.238, (1), p.227-234.1963
30. HATZOPOULOS, G. N.; LEONIDAS, D. D.; KARDAKARIS, R.; KOBE, J.; OIKONOMAKOS, N. G. The binding of IMP to Ribonuclease A. **Febs Journal**,v.272, p.3988-4001.2005
31. NOGUÉS, M. V.; VILANOVA, M.; CUCHILLO, C. M. Bovine Pancreatic Ribonuclease A as a Model of an Enzyme with Multiple Substrate Binding Sites. **Biochimica et Biophysica Acta**,v.1253, p.16-24.1995
32. RAINES, R. T. Ribonuclease A. **Chemical Review**,v.98, (3), p.1045-1065.1998
33. BRESLOW, R.; E., A. Geometric Evidence on the Ribonuclease Model Mechanism. **Journal of the American Chemical Society**,v.111, (15), p.5972-5973.1989
34. BRESLOW, R.; DOHERTY, J. B.; GUILLOT, G.; LIPSEY, C.  $\beta$ -Cyclodextrinylbisimidazole, a Model for Ribonuclease. **Journal of the American Chemical Society**,v.100, (10), p.3227-3229.1978
35. BRESLOW, R.; CHAPMAN, W. H. On the Mechanism of Action of Ribonuclease A: Relevance of Enzymatic Studies with a p-nitrophenylphosphate Ester and a Thiophosphate Ester. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**,v.93, p.10018-10021.2007
36. HERSCHLAG, D. Ribonuclease Revisited: Catalysis via the Classical General Acid-Base Mechanism or a Triester-like Mechanism? **Journal of the American Chemical Society**,v.116, (26), p.11631-11635.1994
37. SOWA, G. A.; HENGGE, A. C.; CLELAND, W. W.  $^{18}\text{O}$  Isotope Effects Support a Concerted Mechanism for Ribonuclease A. **Journal of the American Chemical Society**,v.119, (9), p.2319-2320.1997
38. HAYDOCK, K.; LIM, C.; BRUNGER, A. T.; KARPLUS, M. Simulation Analysis of Structures on the Reaction Pathway of RNase A. **Journal of the American Chemical Society**,v.112, (10), p.3826-3831.1990
39. FONTECILLA-CAMPS, J. C.; LLORENS, R.; LE DU, M. H.; CUCHILLO, C. M. Crystal Structure of Ribonuclease A d(ApTpApApG) Complexo. **Journal of Biological Chemistry**,v.269, (34), p.21526-21531.1994
40. BOQUE, L.; COLL, M. G.; VILANOVA, M.; CUCHILLO, C. M.; FITA, I. Structure of Ribonuclease A Derivative II at 2.1-Å Resolution. **Journal of Biological Chemistry**,v.269, (31), p.19707-19712.1994
41. STEYAERT, J. A decade of protein engineering on ribonuclease T1. Atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. **European Journal of Biochemistry**,v.247, p.1-11.1997

42. SCHREIBER, G.; FRISCH, C.; FERSHT, A. R. The Role of Glu73 of Barnase in Catalysis and the Binding of Barstar. **Journal of Molecular Biology**,v.270, p.111-122.1997
43. SCHEIN, C. H. From housekeeper to microsurgeon: The diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. **Nature Biotechnology**,v.15, p.529-536.1997
44. LELAND, P. A.; RAINES, R. T. Cancer chemotherapy - ribonucleases to the rescue. **Chemistry and Biology**,v.8, (5), p.405-413.2001
45. KIRBY, A. J.; ABELL, K. W. Y. Intramolecular General Acid Catalysis of Intramolecular Nucleophilic Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Diester. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions II**,v.8, p.1171-1174.1983
46. BRANDÃO, T. A. S.; ORTH, E. S.; ROCHA, W. R.; BORTOLUZZI, A. J.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Intramolecular General Acid Catalysis of the Hydrolysis of 2-(2'-Imidazolium)phenyl Phosphate, and Bond Length-Reactivity Correlations for Reactions of Phosphate Monoester Hydrolysis. **Journal of Organic Chemistry**,v.72, (10), p.3800-3807.2007
47. SCHEFFER, U.; STRICK, A.; LUDWIG, V.; PETER, S.; KALDEN, E.; GOBEL, M. W. Metal-Free Catalysts for the Hydrolysis of RNA Derived from Guanidines, 2-Aminopyridines, and 2-Aminobenzimidazoles. **Journal of the American Chemical Society**,v.127, (7), p.2211-2217.2005
48. MOTHERWELL, W. B.; BINGHAM, M. J.; SIX, Y. Recent progress in the design and synthesis of artificial enzymes. **Tetrahedron**,v.57, p.4463-4686.2001
49. BRESLOW, R. Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes:Catalysis by Design. **Accounts of Chemical Research**,v.28, (3), p.146-153.1995
50. BRESLOW, R.; ANSLYN, E. Proton Inventory of a Bifunctional Ribonuclease Model. **Journal of the American Chemical Society**,v.111, (24), p.8931-8932.1989
51. NIITTYMAKI, T.; LONNBERG, H. Artificial Ribonucleases. **Organic and Biomolecular Chemistry**,v.4, (1), p.15-25.2006
52. FOUACE, S.; GAUDIN, C.; PICARD, S.; CORVAISIER, S.; RENAULTS, J.; CARBONI, B.; FELDEN, B. Polyamine derivatives as selective RNase A mimics. **Nucleic Acid Research**,v.32, (1), p.151-157.2004
53. KLOTZ, I. M.; ROYER, G. P.; SCARPA, I. Synthetic Derivatives of Polyethyleneimine with Enzyme-Like Catalytic Activity (Synzymes). **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**,v.68, (2), p.263-264.1971
54. BRESLOW, R. **Artificial Enzymes**. Wiley-VCH: Weinheim, 2005.191p.
55. DELORT, E.; NGUYEN-TRUNG, N. Q.; DARBRE, T.; REYMOND, J. L. Synthesis and Activity of Histidine-Containing Catalytic Peptide Dendrimers. **Journal of Organic Chemistry**,v.12, (71), p.4468-4480.2006

56. ROGERS, G. A.; BRUICE, T. Control of modes of intramolecular imidazole catalysis of ester hydrolysis by steric and electronic effects. **Journal of the American Chemical Society**, v.96, (8), p.2463-2472.1974
57. MARTELL, A. E.; HANCOCK, R. D. **Metal Complexes in Aqueous Solutions**. Plenum Press: New York, 1996.264p.
58. PAUL, M. A.; LONG, F. A.  $H_0$  and Related Indicator Acidity Function. **Chemical Review**, v.57, p.1-45.1957
59. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. The Reactivity of Phosphate Esters. Diester Hydrolysis. **Journal of the Chemical Society (B)**, p.510-513.1970
60. ANSLYN, E. V.; PIATEK, A. M.; GRAY, M. Guanidinium Groups Act as General-Acid Catalysts in Phosphoryl Transfer Reactions: A Two-Proton Inventory on a Model System. **Journal of the American Chemical Society**, v.126, p.9878-9879.2004
61. BRESLOW, R.; DONG, S. D.; WEBB, Y.; XU, R. Further Studies in the Buffer-Catalyzed Cleavage and Isomerization of Uridyluridine. Medium and Ionic Strength Effects on Catalysis by Morpholine, Imidazole, and Acetate Buffers Help Clarify the Mechanisms Involved and Their Relationship to the Mechanism Used by the Enzyme Ribonuclease and by Ribonuclease Mimic. **Journal of the American Chemical Society**, v.118, (28), p.6588-6600.1996
62. BRESLOW, R.; DONG, S. D. Biomimetic Reactions Catalyzed by Cyclodextrins and Their Derivatives. **Chemical Review**, v.98, (5), p.1997-2001.1998
63. BRESLOW, R.; SCHMUCK, C. Goodness of Fit in Complexes between Substrates and Ribonuclease Mimics: Effects on Binding, Catalytic Rate Constants, and Regiochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v.118, (28), p.6601-6605.1996
64. BRESLOW, R. How do Imidazole Groups Catalyze the Cleavage of RNA in Enzyme Models and in Enzymes? Evidence from "Negative Catalysis. **Accounts of Chemical Research**, v.24, (11), p.317-324.1991
65. BRUICE, T. C.; BLASKÓ, A.; ARASASINGHAM, R. D.; KIM, J. S. Participation of Two Carboxyl Groups in Phosphodiester Hydrolysis. 2. A Kinetic, Isotopic, and  $^{31}\text{P}$  NMR Study of the Hydrolysis of a Phosphodiester with Carboxyl Groups Fixed in an Attack Conformation. **Journal of the American Chemical Society**, v.117, (49), p.12070-12077.1995
66. BRESLOW, R.; HUANG, D. L.; ANSLYN, E. On the mechanism of action of ribonuclease: Dinucleotide cleavage catalyzed by imidazole and  $\text{Zn}^{2+}$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v.86, p.1746-1750.1989
67. THOMPSON, J. E.; RAINES, R. T. Values of General Acid-Base Catalysis to Ribonuclease A. **Journal of the American Chemical Society**, v.116, (12), p.5467-5468.1994

68. BUNTON, C. A.; FARBER, S. J.; FENDLER, E. J. The Hydrolysis of *p*-Nitrophenyl Diphenyl Phosphate. **Journal of Organic Chemistry**, v.33, (1), p.29-33.1968
69. BARNARD, W. C.; BUNTON, C. A.; KELLERMAN, D.; MHALA, M. M.; SILVER, B.; VERNON, C. A.; WELCH, V. A. Reactions of Organic Phosphates. Part VI. The Hydrolysis of Aryl Phosphates. **Journal of the Chemical Society (B)**, p.227-235.1966
70. BUNNETT, J. F. Kinetics of Reactions in Moderately Concentrated Aqueous Acids. I. Classification of Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v.83, p.4956-4967.1961
71. BUNNETT, J. F. Kinetics of Reactions in Moderately Concentrated Aqueous Acids. II. An Empirical Criterion of Mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v.83, p.4968-4973.1961 **Journal of the American Chemical Society**
72. BUNNETT, J. F. Kinetics of Reactions in Moderately Concentrated Aqueous Acids. IV. Application of the Empirical Criterion to Diverse Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v.83, p.4978-4983.1961
73. DALBY, K. N.; KIRBY, A. J.; HOLLFELDER, F. Models for Nuclease Catalysis: Mechanisms for General Acid Catalysis of the Rapid Intramolecular Displacement of Methoxide from a Phosphate Diester. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions II**, p.1269-1281.1993
74. BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. The Hydrolysis of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate. **Journal of Organic Chemistry**, v.34, (4), p.767-772.1969
75. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reactions of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate with Hydroxylamine. **Journal of Organic Chemistry**, v.68, (18), p.7051-7058.2003
76. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDÃO, T. A. S.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reaction of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate with Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Comparing O- and N-Phosphorylation. **Journal of Organic Chemistry**, v.69, (23), p.7898-7905.2004
77. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDÃO, T. A. S.; BUNTON, C. A.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Mechanisms of Nucleophilic Substitution Reactions of Methylated Hydroxylamines with Bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. Mass Spectrometric Identification of Key Intermediates. **Journal of Organic Chemistry**, v.69, (18), p.6024-6033.2004
78. FOCES-FOCES, C.; LLAMAS-SAIZ, A. L.; CLARAMUNT, R. M.; CABILDO, P.; ELGUERO, J. Studies of intramolecular hydrogen bonds (IMHB): crystal and molecular structure of 2-(2'-hydroxy-phenyl)imidazoles. **Journal of Molecular Structure**, v.440, p.193-202.1998