

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Renata da Silva Mello

**UTILIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS CONTENDO O
GRUPO FUNCIONAL ÁCIDO HIDROXÂMICO COMO
MODELOS MIMÉTICOS NA CLIVAGEM DE ÉSTERES DE
FOSFATO E ACETATO: AVALIANDO O EFEITO DA
COOPERATIVIDADE ENTRE GRUPOS FUNCIONAIS**

Florianópolis

2010

Renata da Silva Mello

**UTILIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS CONTENDO O
GRUPO FUNCIONAL ÁCIDO HIDROXÂMICO COMO
MODELOS MIMÉTICOS NA CLIVAGEM DE ÉSTERES DE
FOSFATO E ACETATO: AVALIANDO O EFEITO DA
COOPERATIVIDADE ENTRE GRUPOS FUNCIONAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Faruk Nome

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M527u Mello, Renata da Silva

Utilização de macromoléculas contendo o grupo funcional ácido hidroxâmico como modelos miméticos na clivagem de ésteres de fosfato e acetato [tese] : avaliando o efeito da cooperatividade entre grupos funcionais / Renata da Silva Mello ; orientador, Faruk José Nome Aguilera. - Florianópolis, SC 2010.

181 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Química. 2. Ésteres. 3. Fosfatos. 4. Acetatos. 5. Enzimas. 6. Hidrólise. 7. Polímeros. 8. Agentes ativos de superfícies. I. Nome Aguilera, Faruk José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

Renata da Silva Mello

UTILIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS CONTENDO O GRUPO FUNCIONAL ÁCIDO HIDROXÂMICO COMO MODELOS MIMÉTICOS NA CLIVAGEM DE ÉSTERES DE FOSFATO E ACETATO: AVALIANDO O EFEITO DA COOPERATIVIDADE ENTRE GRUPOS FUNCIONAIS

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

Florianópolis, 23 de Abril de 2010.

Prof. Ademir Neves, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Faruk Nome, Dr.
Orientador
DQ/UFSC

Prof. Vanderlei G. Machado, Dr.
Relator
FURB

Prof. Watson Loh, Dr.
IQ/Unicamp

Prof. Hugo A. G. Olmedo, Dr.
DQ/UFSC

Prof. Ademir Neves, Dr.
DQ/UFSC

Prof. Gustavo A. Micke, Dr.
DQ/UFSC

*Aos meus pais, Roberto e Maria
Cecília, com todo meu amor,
admiração e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente ao professor Faruk pela oportunidade de fazer parte do seu grupo, pelos ensinamentos e orientação, pelo modelo de pessoa e profissional que sempre foi e será para mim e por ser uma inspiração para todos nós.

À professora Haidi pelo seu entusiasmo, compreensão, amizade e disposição em ajudar sempre que precisei, desde a época da iniciação científica.

Agradeço ao professor Larry Romsted, pela sua amizade, incentivos e orientação durante o período de doutorado sanduíche. Agradeço por ter o conhecido, pois se tornou muito mais que um co-orientador, se tornou um grande amigo.

Agradeço ao professor Watson Loh, pelos experimentos de calorimetria, discussões e por estar sempre disposto a ajudar. Também agradeço aos alunos do seu laboratório no IQ da Unicamp que foram tão bacanas comigo no período em eu estive lá. Agradeço também ao prof. Marcos Eberlin e os alunos Humberto Milagre, Boniek Vaz e Vanessa Gonçalves pelas análises de ESI/MS.

Agradeço aos colegas dos laboratórios 210 e 203 pela amizade, companheirismo e pelos ótimos momentos vividos nesses vários anos de convivência. Agradeço em especial ao Bruno, a Michelle e ao Tiago pelos substratos e discussões e à Elisa pela grande participação no trabalho. Agradeço também a Lizandra pela ajuda com as titulações e ao Pedrinho que, apesar de muito reclamar, sempre me ajudou nas injeções nas cinéticas.

Agradeço aos funcionários da UFSC, em especial a Grace e ao Jadir, por estarem sempre dispostos a ajudar resolver os pepinos.

Agradeço aos meus pais, pessoas maravilhosas, que sempre nos incentivaram a estudar e não me deixaram sair da escola na segunda série do primário quando eu decidi que aquele ano não queria mais ir. Brincadeiras a parte, agradeço muito por entenderem a minha ausência por causa da química, mesmo quando estou com eles e agradeço por tudo o que fizeram por nós, a tudo que deixaram de ter para nos dar, e por serem exemplos de pessoas dignas e verdadeiras. Agradeço aos meus irmãos Dede, Guigo e Nazinha, por serem tão especiais. Saibam

que irmãos a gente não escolhe, mas se eu tivesse que escolher, escolheria vocês mesmo.

Agradeço ao Fabio, pela amizade, companheirismo e pelo apoio fundamental durante todo o período de doutorado.

Também agradeço às pessoas que fizeram Floripa ainda mais perfeita todos esses anos: Daniela, Deise, Gi, Evandro, Walker, Cris, Vanessas, e aos meus “roomies” Aline, Eduard e Chú...amo vocês. Vocês vão sempre morar no meu coração.

Agradeço ao programa de Pós-graduação da UFSC pela oportunidade e a todos que de uma forma ou de outra, colaboraram com esse trabalho.

Agradeço ao CNPQ, Capes, UFSC e INCT-Catálise pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço ao professor Vanderlei Gageiro Machado por aceitar ser o relator desta tese e aos professores membros da banca Watson, Ademir, Hugo e Micke, pelo tempo dispensado aqui e pela contribuição e atenção!

*“Triste época! É mais fácil desintegrar
um átomo que um preconceito”.*

Albert Einstein

RESUMO

Um polímero contendo os grupos funcionais ácido hidroxâmico e ácido carboxílico foi preparado (**PHA**) e apresentou capacidade de acelerar reações de clivagem de ésteres. A metodologia aplicada favoreceu o posicionamento dos grupos funcionais presentes no **PHA** vizinhos um ao outro, o que permitiu a cooperatividade entre eles, ideal quando se quer desenvolver uma enzima artificial. A caracterização do **PHA** foi realizada através de titulação potenciométrica, IV, RMN, ESI-MS e TGA. O **PHA** foi testado nas reações de clivagem dos ésteres: ácido 1-acetoxi-2-naftóico (**1-Ac**), ácido 2-acetoxi-1-naftóico (**2-Ac**), ácido 3-acetoxi-2-naftóico (**3-Ac**), bis(2,4-dinitrofenil) fostato (**BDNPP**) e dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), e *p*-nitrofenil acetato, butirato e octanoato (**PNPA**, **PNPB**, **PNPC**). De fato, o **PHA** foi muito eficiente e pode ser considerado promíscuo, uma vez que acelerou a reação de clivagem de todos os ésteres estudados, com incrementos catalíticos de até 10^{10} vezes. Quando se agregou o surfactante CTABr ao **PHA**, observou-se um incremento na velocidade de reação de clivagem do **BDNPP** (cerca de 15 vezes), quando comparado com a reação na presença de somente polímero. Porém, quando se adicionou SDS e SB3-14, as constantes de velocidade observadas praticamente não variaram no primeiro caso e inibição da reação ocorreu com SB3-14.

Na segunda parte deste trabalho, utilizaram-se co-micelas, que também contêm o grupo hidroxâmico (**LHA**), na clivagem do **BDNPP** e analisou-se o mecanismo de reação; As micelas mistas de **LHA**/CTABr aceleraram efetivamente essa reação de desfosforilação devido provavelmente à sua habilidade em concentrar ambos substrato e nucleófilo α na pseudo-fase micelar. A constante de velocidade observada para a desfosforilação do **BDNPP**, na fração molar do nucleófilo de 0,1, é aproximadamente 10^4 vezes mais rápida que a reação em água desse substrato. As reações de ambos **LHA** e ABH (ácido benzoidroxâmico) foram monitoradas por ESI-MS e EI-MS e os mecanismos de reações foram propostos. Por analogia, propôs-se também o mecanismo no caso do **PHA** com os mesmos substratos.

Palavras-chave: Ésteres de fosfato. Ésteres de acetato. Enzimas artificiais. Hidrólise. Polímeros. Surfactantes.

ABSTRACT

A polymer (**PHA**) containing the functional groups hydroxamic acid and carboxylic acid was developed, which showed the ability to accelerate several reactions of ester cleavage. The methodology used to prepare this polymer favored the position of the two functional groups next to each other, which allows the cooperativity between these groups. This cooperativity has an important role when one wants to mimic enzymes. The polymer was characterized through potentiometric titration, IR, NMR, ESI-MS e TGA.

The catalytic effect promoted by the polymer was evaluated on the cleavage of the following esters: 1-acetoxy-2-naphthoic acid (**1-Ac**), 2-acetoxy-1-naphthoic acid (**2-Ac**), 3-acetoxy-2-naphthoic acid (**3-Ac**), bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate (**BDNPP**), diethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (**DEDNPP**), e *p*-nitrophenyl acetate, butyrate e octanoate (**PNPA**, **PNPB**, **PNPC**). Indeed, **PHA** was very efficient and promiscuous since it increased the rate of all reactions by a factor of up to 10¹⁰-fold.

The effect of surfactants on the dephosphorylation of **BDNPP** by **PHA** was also investigated. It was observed that adding CTABr to **PHA**, the reaction is 15-fold faster compared to the reaction when only **PHA** is present. However, adding SDS almost has no effect on the observed rate constants, and adding SB3-14 inhibits the reaction.

In the second part of this Thesis, mixed micelles of lauryl hydroxamic and **LHA** and CTABr were used on the dephosphorylation of **BDNPP** and in fact, they accelerate effectively this reaction by concentrating both, the α -nucleophile and the substrate, in the micellar pseudophase. When the nucleophilic mole fraction is 0.1, the dephosphorylation of **BDNPP** is approximately 10⁴-fold faster than spontaneous hydrolysis.

The reactions of **LHA** and BHA (benzohydroxamic acid) were monitored by ESI-MS and EI-MS and the mechanism of the reactions were proposed. By analogy, it was also proposed the mechanism of the reaction of **PHA** and all the substrates used in this study.

Keywords: Phosphate esters. Acetate esters. Artificial enzymes. Hydrolysis. Polymers. Surfactants.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Escala logarítmica das constantes de velocidade e tempos médios para reações de hidrólise e hidratação, extrapoladas para 25 °C. 41
- Figura 2.** Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila entre os grupos axiais X e Y. 44
- Figura 3.** Alguns exemplos de espécies nucleofílicas que apresentam o efeito α em processos nucleofílicos 53
- Figura 4.** Gráfico logarítmico da constante de velocidade observada versus pH para o ataque nucleofílico pela NH_2OH no BDNPP (■), e da hidrólise espontânea do BDNPP a 25°C (♦)..... 54
- Figura 5.** Diagrama de coordenada de reação em que o estado de transição é mais estabilizado do que o estado fundamental 55
- Figura 6.** Ciclo termodinâmico que relaciona a catálise e a diferença na ligação entre o substrato e o estado de transição, onde S = substrato e E = enzima. 56
- Figura 7.** Mecanismo de ação da quimotripsina. 57
- Figura 8.** Dendrímero de poli(aminoácido) utilizado na hidrólise de um substrato fluorogênico. Relações espaciais entre His-Ser-Asp mostraram ser cruciais na função de mimetização. 64
- Figura 9.** Representação esquemática da formação da cavidade específica em um polímero reticulado através de um molde, contendo quatro grupos funcionais diferentes. 65
- Figura 10.** (1) Preparação do catalisador através de molde molecular utilizando duas moléculas de molde e Cu^{2+} ; (2) Sítio ativo da enzima artificial depois da remoção do molde; (3) O substrato ligado à cavidade da enzima artificial; (4) Formação do estado de transição tetraédrico durante a catálise. 66

Figura 11. Estruturas dos surfactantes (1) brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr), (2) aniônico doceilsulfato de sódio (SDS) e (3) dipolar iônico N,N-dimetilamônio propanosulfonato de N-tetradecil (SB3-14). 68

Figura 12. Polieletrólito constituído de um poliíon e seus contra-íons. 71

Figura 13. Efeito da adição de água a misturas de polieletrólitos e surfactantes carregados negativamente: A) a mistura concentrada é monofásica; B) com a adição de água, uma fase diluída contendo sal simples se separa; C) com a adição de mais água, a fase concentrada se torna mais concentrada. 73

Figura 14. Composições possíveis da mistura dos 4 componentes de misturas de polímeros e surfactantes de cargas opostas: o polieletrólito (poliíon + contra-íon simples), o surfactante (íon surfactante + contra-íon simples), o sal simples (dois contra-íons simples) e o sal complexo (poliíon + surfactante). 73

Figura 15. Variação de potência em função de injeções consecutivas de 5,0 μL de uma solução de CTABr $1,37 \times 10^{-2}$ mol/L em H_2O 81

Figura 16. Titulação potenciométrica de 0,013 mol/L de **PHA** (●) e 0,013 mol/L de **PAA** (■), usando KOH 0,108 mol/L a 25 °C. No detalhe está mostrado a curva diferencial do pH em função de a. 88

Figura 17. Variação espectral de UV/Vis da mistura reacional de **BDNPP** ($1,33 \times 10^{-5}$ mol/L) e **PHA** 0,013 mol/L em água, pH 10 e 25 °C. No detalhe está mostrado a variação da absorbância em função do tempo em 400 nm. 91

Figura 18. Perfil de pH para a reação de **BDNPP** ($1,33 \times 10^{-5}$ mol/L) com H_2O (□) e com **PHA** 0,013 mol/L (■), a 25 °C. A linha teórica foi traçada utilizando a Eq. 7. 92

Figura 19. Constantes de velocidade de segunda ordem observadas em função do pH para a reação de clivagem do **BDNPP** pelo **PHA** (●) e **ABH** (○). As constantes foram normalizadas de acordo com a concentração de grupos funcionais presentes na reação. 94

- Figura 20.** Mecanismo proposto para a catálise básica geral do grupo carboxilato na clivagem do **BDNPP** pelo **PHA**. 94
- Figura 21.** Gráfico logarítmico das constantes de velocidade em função dos valores de pK_a para reações com **BDNPP**. As constantes de velocidade e os valores de pK_a são corrigidos estatisticamente, (■) valores encontrados na literatura e (□) para **ABH** e **PHA⁻** e **PHA²⁻** (formas monoprotonada e desprotonada, respectivamente). 95
- Figura 22.** Perfil de concentração de **PHA** na clivagem do **BDNPP**, em pH 10, a 25 °C. 96
- Figura 23.** Variação espectral de UV/Vis da mistura reacional de **DEDNPP** ($6,67 \times 10^{-5}$ mol/L) e **PHA** 0,013 mol/L em água, pH 10 e 25 °C. No detalhe está mostrado a variação da absorbância em função do tempo em 400 nm. 99
- Figura 24.** Perfil de pH para a clivagem do **DEDNPP** por 0,013 mol/L de **PHA**, a 25 °C. A curva teórica foi gerada através do ajuste dos pontos experimentais, utilizando a Eq. 7. 100
- Figura 25.** Perfil de concentração de **PHA** na clivagem do **DEDNPP**, em pH 10, a 25 °C. 101
- Figura 26.** ESI-MS da reação do **ABH⁻** com **DEDNPP** em pH 10, a 25 °C. 102
- Figura 27.** Variação espectral de UV/Vis da mistura reacional de **1-Ac** ($6,67 \times 10^{-5}$ mol/L) e **PHA** 0,013 mol/L em água, pH 10 e a 25 °C. No detalhe está mostrada a variação da absorbância em função do tempo em 338 nm. 104
- Figura 28.** Perfil de pH para a degradação de **3-Ac** (■), **2-Ac** (▲) e **1-Ac** (●), na presença de **PHA** 0,013 mol/L e a reação de hidrólise na ausência de **PHA**, **3-Ac** (□), **2-Ac** (△) e **1-Ac** (○), a 25 °C. As curvas teóricas foram traçadas utilizando a Eq. 7. 104
- Figura 29.** Efeito da concentração de **PHA** nas reações com **1-Ac** (▲), **2-Ac** (■) e **3-Ac** (●), a 25°C e pH=10. 106

- Figura 30.** ESI-MS da solução reacional do **ABH⁻** com **1-Ac** em pH 10,0, a 25 °C. 109
- Figura 31.** Variação espectral de UV/Vis da mistura reacional de **PNPA** ($3,33 \times 10^{-5}$ mol/L) e **PHA** $3,3 \times 10^{-3}$ mol/L em água, pH 8,0 e 25 °C. No detalhe está mostrado, a variação da absorbância em função do tempo em 400 nm. 110
- Figura 32.** Efeito do pH na clivagem dos ésteres **PNPA** (■), **PNPB** (●) e **PNPC** (▲) na presença de $3,3 \times 10^{-3}$ mol/L de **PHA** e em água (□) **PNPA** e (○), a 25 °C. As curvas foram traçadas utilizando a Eq. 7. .. 111
- Figura 33.** Efeito da concentração de **PHA** nas reações com **PNPA** (■), **PNPB** (●) e **PNPC** (▲), a 25°C e pH=10. 114
- Figura 34.** ESI-MS da solução reacional do **ABH⁻** com **PNPB** em pH 10, a 25 °C. 116
- Figura 35.** Efeito da adição de acetonitrila em água nas reações do **PHA** com **1-Ac** (■), **3-Ac** (●) e **BDNPP** (▲), a 25°C e pH=10. 118
- Figura 36.** Efeito da adição de DMSO em água nas reações do **PHA** com **1-Ac** (■), **3-Ac** (●) e **BDNPP** (▲), a 25°C e pH=10. 119
- Figura 37.** Perfis de pH para a reação do **BDNPP** com **PHA** 0,013 mol/L, na presença (▲) e na ausência (■) de 0,01 mol/L de CTABr, e a reação espontânea do **BDNPP** (●) a 25 °C. 121
- Figura 38.** Efeito do CTABr 1×10^{-2} mol/L na reação do **PHA** com **BDNPP** (■), **1-Ac** (▲), e **3-Ac** (●), a 25°C e pH=10. 122
- Figura 39.** Efeito do CTABr 0,01 mol/L (■), SB3-14 0,01 mol/L (□) e SDS 0,01 mol/L (▼) na reação do **PHA** 0,013 mol/L com **BDNPP** (■), a 25 °C. A reação do **BDNPP** na presença do **PHA** (○) está apresentada para comparação. 123
- Figura 40.** Diluição de SDS 2,0% (m/m) em solução de poli (N-isopropilacrilamida), PNIPAM, 0,1% (m/m), curva preta, e em água (curva vermelha) a 17 °C. 124

- Figura 41.** Variação de entalpia observada em função da adição de CTABr $1,37 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em água, a 25°C . No detalhe está mostrado o gráfico da derivada de ΔH_{obs} em função da [CTABr]. 126
- Figura 42.** Variação de entalpia observada em função da adição de $6,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de SDS em água, a 25°C 126
- Figura 43.** Variação de entalpia observada em função da adição de SB3-14 $8,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em água, a 25°C 127
- Figura 44.** Variação de entalpia observada em função da adição de SB3-14 $8,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em água, a 35°C . No detalhe está mostrado o gráfico da derivada de ΔH_{obs} em função da [SB3-14]. 128
- Figura 45.** Variação de entalpia observada em função da adição de CTABr $1,37 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em **PHA** (●) $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, (■) $0,013 \text{ mol.L}^{-1}$ e em H_2O (○), a 25°C , pH 10. 129
- Figura 46.** Variação de entalpia observada em função da adição de CTABr em **PHA** $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, a 25°C 130
- Figura 47.** Ilustração da interação entre o polímero **PHA** e o surfactante CTABr em diferentes concentrações de CTABr. 131
- Figura 48.** Variação de entalpia observada em função da adição CTABr em **PHA** $0,013 \text{ mol L}^{-1}$, a 25°C 131
- Figura 49.** Variação de entalpia observada em função da adição de SB3-14 $8,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em **PHA** $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (○) e em H_2O (■) a 25°C , pH 10. 132
- Figura 50.** Variação de entalpia observada em função da adição de SB3-14 em **PHA** $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (■), e em H_2O (○), a 35°C , pH 10,0. . 132
- Figura 51.** Variação de entalpia observada em função da adição de $6,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de SDS em **PHA** $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (■) e em água (○), a 25°C 133

- Figura 52.** Ilustração da localização do substrato em uma solução contendo (I) somente **PHA** e (II) **PHA** e surfactante CTABr..... 135
- Figura 53.** Condutância específica em função de [CTABr], na ausência de **LHA** (○) e na presença de frações molares de **LHA** de: 0,048 (▲); 0,091 (■); 0,11 (□), 0,14 (◇) e 0,20 (●), a 25 °C e pH 10,0, na ausência de tampão. 137
- Figura 54.** Variação espectral de UV/Vis para a reação do LHA^- /CTABr com **BDNPP** em pH 9,0, a 25 °C. No detalhe tem-se a absorbância vs tempo, calculada em 400 nm..... 139
- Figura 55.** Constantes de velocidade observadas para a reação de desfosforilação do **BDNPP** ($1,33 \times 10^{-5}$ M) na presença de **LHA**, em função de [CTABr] (■), pH = 10,0, 25 °C, mantendo constante ($[\text{LHA}]/[\text{Surfactante}] = 0,1$)..... 139
- Figura 56.** Efeito da χ_{LHA} em k_{obs} (s^{-1}) para a reação do **BDNPP**, pH=10, sem tampão, com [CTABr] = 1×10^{-2} mol/L, em solução aquosa a 25°C. 140
- Figura 57.** Constantes de velocidades observadas para a reação do **BDNPP** em função do pH em água (▲) e na presença de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L (●) CTABr e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de **LHA**, na ausência de tampão, e a 25 °C. 141
- Figura 58.** ESI(-)MS para a solução reacional de **LHA**/CTABr e **BDNPP** a 25 °C, (A) pH 8 e (B) pH 9. 142
- Figura 59.** Ilustração da reação entre o LHA^- e o **BDNPP** na pseudofase micelar. 145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações dos substratos e os comprimentos de onda utilizados nos experimentos cinéticos.	79
Tabela 2. Parâmetros usados na síntese do PHA.....	87
Tabela 3. Constantes de velocidade observadas para a reação de clivagem dos ésteres 1-Ac , 2-Ac e 3-Ac , na presença de [PHA] = $1,33 \times 10^{-2}$ mol/L, pH 10, a 25 °C.	87
Tabela 4. Constantes de velocidade, de primeira e segunda ordem, para a reação de BDNPP na presença e ausência de PHA 0,013 mol/L e duração de 10 tempos de meia-vida.	93
Tabela 5. Constantes de velocidade obtidas para a reação de DEDNPP na presença e ausência de PHA 0,013mol/L.....	100
Tabela 6. Constantes de velocidade de primeira e segunda ordem para a reação de 3-Ac , 2-Ac e 1-Ac na presença e ausência de PHA 0,013mol/L.	106
Tabela 7. Constantes de velocidade para a reação do PNPA , PNPB e PNPC na presença e ausência de PHA $3,3 \times 10^{-3}$ mol/L.	112
Tabela 8. Constantes de velocidade para a reação do PNPA , PNPB e PNPC na presença e ausência de ABH 0,01 mol/L.	113
Tabela 9. Valores obtidos de CMC e ΔH_{mic} para a diluição dos surfactantes estudados.	128
Tabela 10. Parâmetros de interação PHA – surfactantes.	135
Tabela 11. Valores de CMC e α em diferentes χ_{LHA} em misturas de CTABr/LHA ^a	138
Tabela 12. Incremento catalítico promovido pelo PHA na clivagem de diversos ésteres.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LaCFI	Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais
PHA	Poliacrilamida funcionalizada com os grupos hidroxâmicos e carboxílicos
LHA	Ácido laurilhidroxâmico
BDNPP	Bis(2,4-dinitrofenil) fostato
DEDNPP	Dietil 2,4-dinitrofenil fosfato
1-Ac	Ácido 1-acetoxi 2-naftóico
2-Ac	Ácido 2-acetoxi 1-naftóico
3-Ac	Ácido 3-acetoxi 2-naftóico
PNPA	Acetato de <i>p</i> -nitrofenila
PNPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila
PNPC	Caprilato ou octanoato de <i>p</i> -nitrofenila
BHA	Ácido benzoidroxâmico
PAA	Poli (acrilamida)
Nu ⁻	Nucleófilo
S	Substrato
LG	Grupo de saída (<i>Leaving Group</i>)
DNP	2,4-dinitrofenolato
B _{AC} 2	Reação bimolecular catalisada por base com quebra da ligação acil-oxigênio.
A _{AC} 2	Reação bimolecular catalisada por ácido com quebra da ligação acil-oxigênio.
A _{AL} 1,	Reação bimolecular catalisada por ácido com quebra da ligação alquil-oxigênio.
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ³¹ P	Ressonância magnética nuclear de fósforo
<i>t</i> _{1/2}	Tempo de meia vida
λ	Comprimento de onda
μ	Força iônica = ½ Σ <i>M</i> . <i>z</i> ² , sendo <i>M</i> a concentração em quantidade de materia, e <i>z</i> a carga.
S _N 1	Substituição nucleofílica unimolecular
S _N 2	Substituição nucleofílica bimolecular
<i>k</i>	Constante de velocidade

K	Constante de equilíbrio
Abs	Absorbância
EM	Concentração Efetiva (<i>Effective Molarity</i>)
I.T.	Intermediário tetraédrico
E.T	Estado de transição
χ	Fração molar
HOMO	Orbital ocupado de maior nível
His	Histidina
Asp	Aspartato
Ser	Serina
PEI	Poli(etilenoimina)
PEO	Poli(óxido etileno)
PVA	Poli (álcool vinílico)
PPO	Poli (óxido de propileno)
PVP	Poli (vinilpirrolidona)
ITC	Titulação calorimétrica isotérmica
SAXS	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo
uncat	Reação não catalisada
PAMAN	Poli(amido amina)
AIBN	Azoisobutironitrila
Gbn	γ -globulina
CMC	Concentração micelar crítica
CAC	Concentração de associação crítica
CTABr	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SB3-14	N,N-dimetilamônio propanosulfonato de N-tetradecila
IV	Infravermelho
ESI-MS	Espectroscopia de massas por ionização por electrospray
TGA	Análise termogravimétrica
ΔH_{mic}	Variação de entalpia de micelização
ΔG_{mic}	Variação da energia de Gibbs para os processos de micelização do surfactante
ΔG_{agg}	Variação da energia de Gibbs para formação de agregados polímero–surfactante
ΔG_{ps}	Variação da energia de Gibbs referente à interação polímero–surfactante
α	Fração de ionização micelar

C_2
 ΔH_{obs}

Concentração de saturação
Variação de entalpia observada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	41
1.1	Ésteres de Fosfato.....	42
1.2	Ésteres de acila	47
1.3	Efeito de nucleófilos alfa na hidrólise de ésteres.....	52
1.4	Catálise Enzimática	55
1.5	Catálise intramolecular em modelos não miméticos	58
1.6	Planejamento de Macromoléculas e Química Biomimética .	61
1.7	Catálise em meio micelar	67
1.8	Agregados de polímeros-surfactante	71
2	OBJETIVOS	75
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
3.1	Materiais.....	77
3.2	Preparação do polímero funcionalizado PHA	77
3.3	Experimentos Cinéticos.....	78
3.4	Titulação Potenciométrica.	79
3.5	Titulação Calorimétrica Isotérmica	80
3.6	Medidas de Condutividade	81
3.7	Espectrometria de Massas	82
3.8	Outros Equipamentos Utilizados.....	83
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.1	Obtenção e caracterização do polímero funcionalizado PHA	84
4.2	Clivagem de ésteres pelo polímero funcionalizado PHA	90
4.2.1	Reação de desfosforilação de ésteres de fosfato	90
4.2.2	Reação de clivagem de ésteres carbóxi-naftóicos.....	103

4.2.3	Reação de Clivagem de Ésteres de Acetato	109
4.2.4	Efeito do solvente na clivagem dos ésteres BDNPP, 1-Ac e 3-Ac.....	117
4.2.5	Estudo da Hidrólise do BDNPP pelo PHA na presença de micelas – Interação Polímero-Surfactante.	120
4.2.6	Estudos do Agregado formado entre PHA e Surfactantes .	123
4.3	Clivagem de ésteres mediada por micelas funcionalizadas	137
4.3.1	Formação micelar e fração de ionização micelar.	137
4.3.2	Estudos Cinéticos em Micelas Mistas.....	138
4.3.3	Caracterização dos productos.....	141
5	CONCLUSÕES.....	146
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

1 INTRODUÇÃO

Para inserir o leitor na motivação para o desenvolvimento desse e de outros trabalhos no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (Lacfi), inicia-se ilustrando a árdua tarefa que os catalisadores biológicos possuem. A **Figura 1** mostra as constantes de velocidade de primeira ordem aparente e o tempo médio de reações biologicamente relevantes que ocorrem em soluções diluídas, em pH de cerca de 7, a 25 °C.

Constante de Velocidade Tempo médio para Hidrólise ou Hidratação, 25 °C

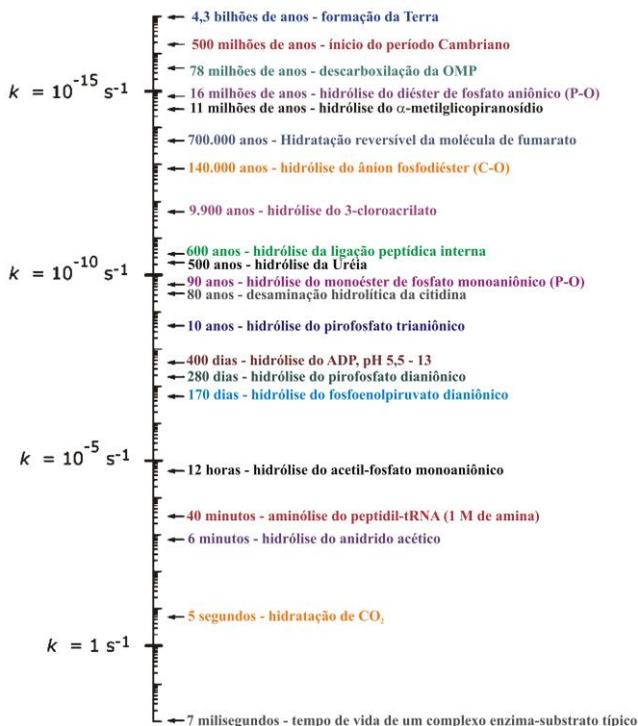
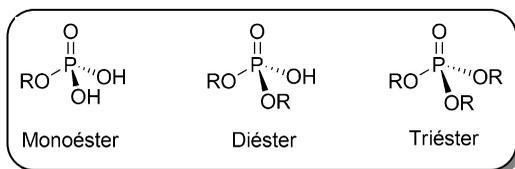


Figura 1. Escala logarítmica das constantes de velocidade e tempos médios para reações de hidrólise e hidratação, extrapoladas para 25 °C.¹

Nota-se que muitas dessas reações envolvem a hidrólise de di- e triésteres dos ácidos fosfóricos e ésteres de ácidos carboxílicos, o que justifica o interesse em compreender melhor o mecanismo dessas reações, bem como desenvolver modelos para acelerá-las, em soluções aquosas e em diferentes solventes orgânicos. Ênfase é dada principalmente i) ao estudo de reações intramoleculares que servem de modelo para as reações enzimáticas e ii) a aplicação de nucleófilos que são detentores do efeito alfa. Complementando os estudos mecanísticos em solução, estuda-se o efeito de micelas aniônicas, catiônicas e dipolares iônicas na velocidade dessas reações orgânicas. Tendo isso, essa Tese de doutoramento se baseia no desenvolvimento de um catalisador no sentido de acelerar as reações de clivagem desses ésteres. Para tal, nucleófilos (incluindo nucleófilo α) foram ancorados em um polímero e em uma micela com o intuito de mimetizar aspectos de uma enzima natural. A seguir, os principais aspectos relacionados com esses tópicos serão discutidos.

1.1 Ésteres de Fosfato

Os ésteres de fosfato podem ser classificados em mono-, di- ou triésteres e essa nomenclatura é baseada, respectivamente, na substituição de um, dois e três grupos alcóxido ou arilóxido pelo grupo hidróxido do ácido fosfórico (H_3PO_4), como pode ser observado abaixo.²



Esses ésteres constituem uma classe extremamente abrangente de compostos e são os principais responsáveis pelo armazenamento e transmissão de informação genética (DNA e RNA), participam na estrutura de coenzimas e anidridos fosfóricos, e compostos orgânicos (com ligações N-P) servem como reserva de energia.^{3, 4} São também utilizados como plastificantes, reagentes na preparação de polímeros organofosforados, complexantes para a extração de metais pesados, etc.² Enquanto os di- e monoésteres são extremamente importantes em

processos biológicos, os triésteres de fosfato não participam desses processos. De fato, a propriedade de ionização dos fosfatos é extremamente importante no meio biológico.²

Os ésteres de fosfato são compostos muito estáveis, e suas hidrólises são extremamente lentas na ausência de catalisadores. Por exemplo, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a clivagem do difenilfosfato, é de 180 anos a 100 °C.⁵ É justamente essa alta estabilidade das ligações P-O que fez com que a natureza encontrasse condições ideais para garantir a perpetuação dos seres vivos, utilizando a ligação P-O para compor os fosfodiésteres DNA e RNA.⁶ Contudo, essa mesma estabilidade também foi responsável pela escolha dos compostos organofosforados para o desenvolvimento de pesticidas, inseticidas e compostos tóxicos utilizados em armas de guerra,⁷ uma vez que a ligação P-O os tornam resistentes à ação da água, do solo e do ar.²

Basicamente, existem dois mecanismos fundamentais 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, em que todo o grupo fosfato é substituído pelo nucleófilo, ocorrendo assim quebra da ligação C-O. Outro mecanismo ocorre via ataque do nucleófilo no átomo de fósforo central, deslocando o álcool ou alcóxido via quebra da ligação P-O.²

Os mecanismos que acontecem via quebra de ligação C-O ocorrem preferencialmente em pH baixo, pois o grupo de saída é o ácido fosfórico neutro. Já em pHs maiores, onde o grupo de saída possui pelo menos uma carga negativa, a hidrólise ocorre com quebra da ligação P-O, podendo seguir um caminho dissociativo ou associativo.²

Na **Figura 2** está apresentado um diagrama de More O'Ferrall-Jencks, com uma simplificação dos mecanismos de hidrólise de ésteres fosfóricos, bem como suas variantes. Nesse diagrama, os mecanismos dissociativo e associativo estão representados ao longo das bordas, enquanto que os mecanismos concertados correspondem aos caminhos que passam pelo centro.²

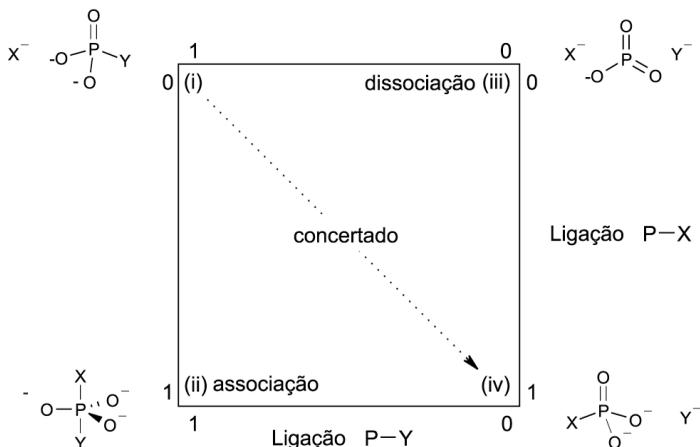
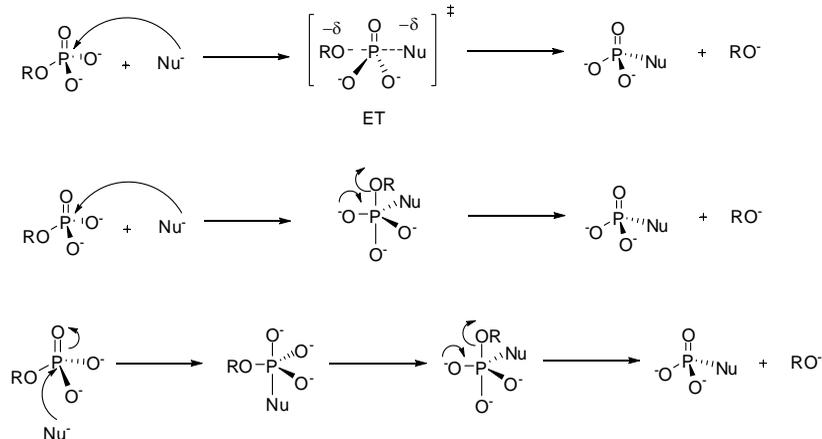


Figura 2. Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila entre os grupos axiais X e Y.²

O mecanismo dissociativo ocorre somente para monoésteres de fosfato, através de duas etapas: a liberação inicial do íon metafosfato hidratado (PO_3^-), o qual numa segunda etapa reage com o nucleófilo. Já no mecanismo associativo, a espécie formada com o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico é pentacoordenado com geometria tipo bipirâmide trigonal, sendo essa espécie um intermediário ou um estado de transição.

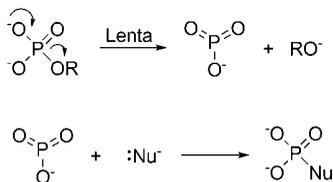
Os mecanismos associativos possíveis estão representados no **Esquema 1**. Vale ressaltar que tanto o ataque do nucleófilo quanto a partida do grupo de saída encontram-se na posição apical de um fósforo na geometria trigonal bipiramidal, visto que as ligações apicais possuem comprimentos maiores e são mais fracas. Por último, tem o mecanismo concertado, sem a formação de intermediário, com a simultânea adição do nucleófilo e eliminação do grupo de saída.



Esquema 1

Em geral, o mecanismo de hidrólise dos triésteres e diésteres de fosfato possui maior caráter associativo, enquanto os monoésteres de fosfato, associativo ou dissociativo, dependendo do pH e da natureza do grupo de saída.

Para os monoésteres de fosfato, em pHs neutros e alcalinos, onde prevalece sua espécie dianiônica, acreditava-se em um mecanismo puramente dissociativo, onde a etapa determinante da velocidade de reação é a formação do ânion instável e plano metafosfato (**Esquema 2**). Esse mecanismo tem sido bem questionado, devido à considerável dependência da constante de hidrólise em relação à basicidade do solvente.⁸ Assim, o mecanismo de hidrólise de diânions de monoésteres se aproxima da aresta dissociativa no diagrama da **Figura 2**, não sendo, porém, estritamente dissociativo.



Esquema 2

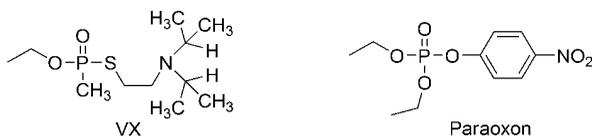
Já a espécie monoaniônica de monoésteres de fosfato envolve uma transferência intramolecular de um próton para o grupo de saída, em geral por um mecanismo que pode ser concertado ou pré-associativo. O estado de transição vai depender da basicidade do grupo de saída, com pouca ou muita ligação do próton com o oxigênio do grupo de saída.²

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 promovem uma quebra P-O.

Para a hidrólise de ânions de diésteres de fosfato, resultados experimentais de efeitos isotópicos evidenciam um estado de transição mais sincrônico que aquele observado em monoésteres de fosfato. Sugere-se que reações de hidrólise de diésteres de fosfato derivados de fenóis com baixos valores de pK_a devem seguir o mecanismo apresentado no **Esquema 1**, com a formação do fosforano dianiônico como estado de transição e não como intermediário.

Apesar de amplamente estudado, o mecanismo dessas reações ainda não é totalmente esclarecido, embora existam evidências para os propostos acima. Uma melhor compreensão dos fatores envolvidos no mecanismo dessas reações pode contribuir significativamente para esclarecer o mecanismo de diversos processos biológicos, e como consequência, permitir o desenvolvimento de novas drogas. A compreensão desses sistemas também permite o planejamento de estruturas mais simples que podem “imitar” a atividade enzimática ou até mesmo agir como catalisadores em processos industriais.

Como já mencionado no início dessa seção, muitos compostos extremamente tóxicos utilizados como armas químicas, inseticidas e pesticidas são ésteres fosfóricos.⁹ Como exemplo, tem-se o agente neurotóxico VX e o inseticida paraoxon (**Esquema 3**).



Esquema 3

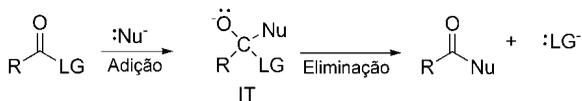
Apenas uma gota do agente neurotóxico VX na pele pode causar a morte de uma pessoa em minutos. O mecanismo de ação desses compostos organofosforados ocorre através da inibição de diversas enzimas, em especial a acetilcolinesterase que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina.¹⁰ A acumulação da acetilcolina causa um colapso do sistema nervoso central, perda da coordenação muscular, colúscos e consequentemente, a morte. Por isso existe uma grande preocupação no processo de destruição do estoque desses compostos (ou seja, a retirada do seu caráter tóxico), que desde o ano 1997, estão proibidos de serem desenvolvidos, armazenados e empregados como armas químicas. Essa proibição aconteceu durante uma Convenção Internacional Mundial sobre a Proibição do Desenvolvimento, Produção, Armazenamento e Uso de Armas Químicas (CPAQ), que estabeleceu ainda que os países detentores dessas armas deveriam destruí-las em um prazo de 10 anos. Uma das estratégias mais atraentes para tal consiste na utilização de nucleófilos estáveis que sejam capazes de clivar quantitativamente a ligação P-O. Essa é mais uma justificativa para o grande interesse na química desses compostos e o crescente número de estudos que têm por objetivo aumentar a velocidade de quebra desses compostos.²

1.2 Ésteres de acila

Uma das substituições mais comuns em centros carbonílicos são as reações envolvendo a transferência do grupamento acila.¹¹ Essas reações não são somente importantes em procedimentos de síntese orgânica convencional, mas também são extremamente importantes do ponto de vista biológico e estão presentes no mecanismo de atuação de diversas drogas. Por exemplo, essas reações estão envolvidas na hidrólise de proteínas e peptídeos, no mecanismo de atuação de diversas drogas^{12, 13} e, além disso, os ésteres são grupos muito importantes na química de lipídeos.¹⁴ Sabe-se também que plantas reagem a infecções patogênicas induzindo uma resistência sistêmica adquirida (SAR) a infecções subseqüentes.¹⁵ Por exemplo, foi observado que o nível de ácido salicílico aumenta em algumas plantas em resposta a infecções e exposição à luz UV e ozônio e provavelmente essa resposta faz parte do processo de sinalização que inicia essa resistência adquirida.¹⁶ Ainda não se sabe qual é o mecanismo envolvido nesse processo. Toda essa

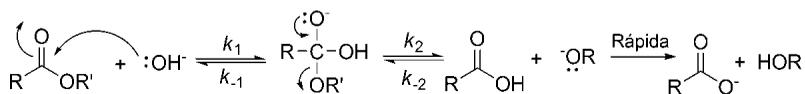
relevância biológica fez das reações de transferência do grupo acila uma das mais estudadas em química orgânica.¹¹

Nessas reações, o grupo acila ligado a um grupo de saída é transferido para um nucleófilo, normalmente via mecanismo de adição-eliminação, em que LG se refere ao grupo de saída (do inglês: *leaving group*) e $:\text{Nu}^-$ ao nucleófilo (**Esquema 4**).¹⁷



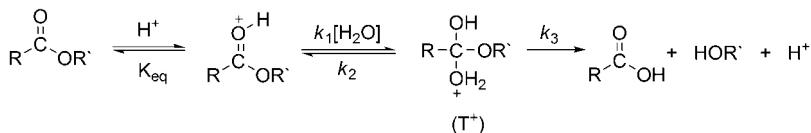
Esquema 4

As reações de transferência do grupo acila de ésteres podem ocorrer tanto em condições básicas quanto ácidas. Em soluções alcalinas, as reações são tipo $\text{B}_{\text{AC}2}$, onde o termo “B” indica que a reação é catalisada por base, AC correspondente à transferência de grupo acila e 2 que a reação bimolecular. A reação é essencialmente irreversível uma vez que hidróxido não é regenerado ao fim da reação. Os efeitos isotópicos observados são consistentes com o ataque da água na etapa determinante de velocidade na reação de hidrólise, como mostrado no **Esquema 5**.¹⁴



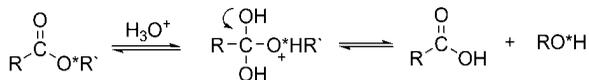
Esquema 5

Em meio ácido, a reação é reversível, com a posição de equilíbrio dependente das concentrações relativas da água e do álcool, tendo um mecanismo do tipo $\text{A}_{\text{AC}2}$, que indica uma reação bimolecular catalisada por ácido. O mecanismo mais aceito envolve a protonação do oxigênio da carbonila na primeira etapa, seguida pela adição de água e quebra do intermediário tetraédrico (I.T.) a produtos, como mostra o **Esquema 6**.¹¹



Esquema 6

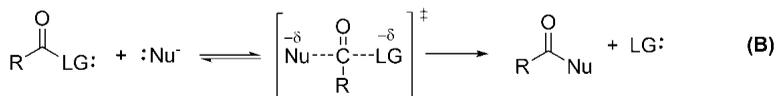
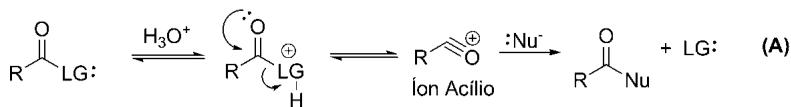
Além dos estudos cinéticos que mostram a dependência esperada em relação à concentração do íon hidrônio ou hidróxido, outra evidência que suporta a existência dos mecanismos discutidos acima são os estudos de marcação isotópica em ésteres, que provam que é a ligação acil-oxigênio, não a alquil oxigênio, que é normalmente quebrada durante a hidrólise (**Esquema 7**).^{11, 18}



Esquema 7

Existem outras possibilidades da reação ocorrer sem haver formação de um intermediário tetraédrico. De acordo com Williams e colaboradores, o I.T. se torna instável para moléculas contendo bons grupos de saída. Por exemplo, o mecanismo para haletos ácidos, ésteres e algumas amidas em condições extremamente ácidas é dissociativo e ocorre com formação de íons acílio. Isso é atribuído ao fato de ocorrer protonação do grupo de saída ao invés do oxigênio carbonílico (**Esquema 8 -A**).¹⁹

Outro mecanismo possível é o concertado, tipo S_N2 (**Esquema 8-B**). Experimentos de efeito isotópico realizados por Cleland e Hengge com o acetato de *p*-nitrofenila (PNPA) indicam que a reação ocorre via mecanismo concertado. No estudo, a maioria dos nucleófilos utilizados tinha pK_a na faixa de 9,3 - 9,9 e, segundo os autores, com um grupo de saída como o *p*-nitrofenol, o intermediário tetraédrico se torna instável, favorecendo o mecanismo concertado.^{14, 20}

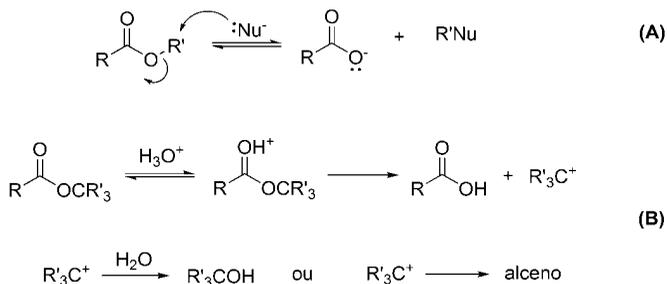


Esquema 8

Hess e colaboradores examinaram o mecanismo de transferência do grupo acila da reação do PNPA com algumas enzimas tais como quimotripsina e papaína, entre outras.²¹ Embora, como mencionado anteriormente, as reações com esse éster ativado ocorrem através de um mecanismo concertado, os autores testaram a hipótese de que os sítios oxaniônicos das enzimas pudessem mudar o mecanismo de reação através da ligação e estabilização do I.T., resultando em um mecanismo em etapas ao invés de concertado. Entretanto, as reações enzimáticas apresentaram efeitos isotópicos consistentes com um mecanismo concertado, isto é, com valores medidos no oxigênio do grupo de saída fenol ($^{18}k_{\text{O}}$) de cerca de 1,02, indicando um alto grau de quebra de ligação do grupo de saída no E.T, tal como observado em reações não catalisadas em meio aquoso. Entretanto, nessas reações enzimáticas, o estado de transição apresentou algum caráter tetraédrico, embora mantendo a ligação π carbonílica parcial.²¹ Isso provavelmente ocorre por haver um maior número de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas com o grupo carbonílico do éster no E.T. das reações enzimáticas do que nas reações não catalisadas.²¹

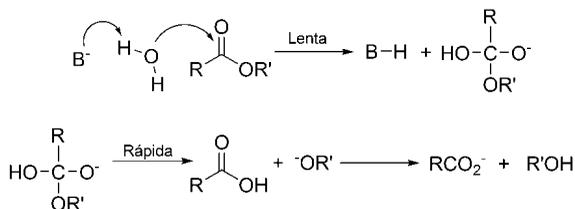
Embora o mecanismo envolvendo a quebra da ligação acil-oxigênio seja a mais comum em processos biológicos, o mecanismo via quebra da ligação alquil-oxigênio é importante em síntese orgânica, mas só ocorre para grupos que sofrem ataque nucleofílico facilmente, tais como metil e benzil, e na presença de um nucleófilo muito forte, como RS^- ou RSe^- . A reação via $\text{S}_{\text{N}}2$ também é favorecida se o grupo acil for estericamente impedido (**Esquema 9 - A**). Outra possibilidade é o mecanismo do tipo $\text{A}_{\text{AL}}1$, assim designado pois ocorre quebra da ligação alquil-oxigênio. Esse mecanismo de hidrólise catalisada por ácido

ocorre com ésteres derivados de alcoóis terciários com formação de um carbocátion terciário estável em meio ácido (**Esquema 9 - B**).²²



Esquema 9

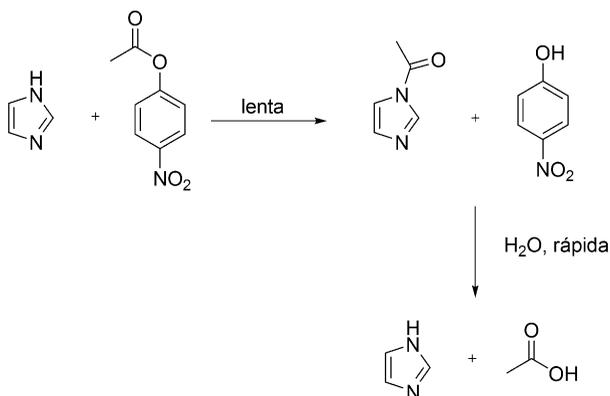
Vale ressaltar que o mecanismo para a hidrólise de ésteres na presença de alguns ácidos ou bases que não sejam fortes pode envolver catálise básica ou catálise ácida geral. Catálise básica geral geralmente ocorre no caso de ésteres com o grupo acila contendo substituintes retiradores de elétrons e o estado de transição (E.T.) envolve a transferência de prótons da molécula de água para a base geral durante a formação do intermediário tetraédrico (**Esquema 10**). Na catálise ácida geral a etapa determinante de velocidade é a formação de um intermediário que resulta da adição de água no reagente.¹¹



Esquema 10

Os ésteres também podem ser hidrolisados por catálise nucleofílica, onde um componente com maior poder nucleofílico que a água ou hidróxido ataca a carbonila formando um intermediário.²³ Subseqüentemente, esse intermediário é hidrolisado com uma

velocidade maior que o éster inicial, como pode ser observado no **Esquema 11**.²³



Esquema 11

1.3 Efeito de nucleófilos alfa na hidrólise de ésteres

A primeira definição do efeito α no contexto da físico-química orgânica foi como “o aumento de nucleofilicidade observado quando um átomo adjacente ao centro nucleofílico têm pares de elétrons não compartilhados”.²⁴ Entretanto, essa definição se mostrou um tanto ambígua uma vez que não especifica o nucleófilo de referência. Como alternativa, uma segunda definição de efeito α foi proposta, como sendo: “o desvio positivo de um gráfico de nucleofilicidade, como o de Bronsted, exibido por um nucleófilo α ”.²⁴ Isso é, o nucleófilo dito normal na primeira definição possui a mesma basicidade que o nucleófilo α , mas não sofre desvio no gráfico de Bronsted. Dentre as espécies que exibem essa reatividade, estão incluídas a hidroxilamina, o ânion hipoclorito, os ácidos hidroxâmicos, as oximas, os hidroperóxidos, o nitrito e o sulfito (**Figura 3**).²

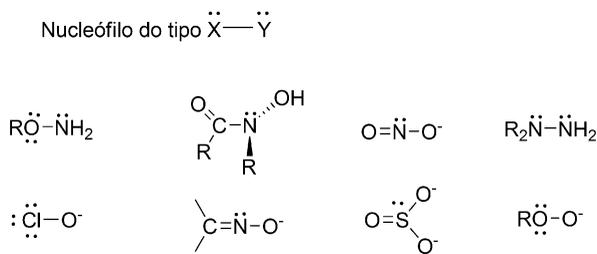


Figura 3. Alguns exemplos de espécies nucleofílicas que apresentam o efeito α em processos nucleofílicos.²

Embora numerosos estudos tenham sido realizados envolvendo nucleófilos detentores do efeito α desde que foi descrito por Edwards e Pearson, a explicação desse fenômeno ainda permanece obscuro. Contudo, estudos mostram que vários fatores podem influenciar a reatividade nucleofílica e ser importantes para o efeito α . Acredita-se que o átomo eletronegativo que está na posição α com o seu par de elétrons livres tenha um papel fundamental no aumento da nucleofilicidade desses nucleófilos. Uma possível explicação é o aumento da nucleofilicidade decorrente do aumento da densidade eletrônica efetiva no centro da reação gerado pelos pares de elétrons sobre os átomos na posição α . Outra explicação plausível seria com relação à deficiência eletrônica sobre Y causada pela remoção parcial dos elétrons no nucleófilo X-Y (**Esquema 12**) por doação ao substrato S no caminho que leva ao estado de transição. A doação eletrônica de X estabilizaria o que resultaria em um aumento na densidade eletrônica efetiva no substrato e, conseqüentemente na nucleofilicidade de X-Y.



Esquema 12

Em termos da teoria dos orbitais moleculares, a idéia mais aceita seria que o estado fundamental do nucleófilo é desestabilizado pela repulsão dos orbitais ocupados $p\pi$ dos átomos adjacentes, o que acarretaria em um aumento na energia do orbital ocupado de maior nível

(HOMO) que participa da reação. Como consequência, o orbital (HOMO) do nucleófilo interagiria fortemente com o centro eletrofílico, levando a uma diminuição da repulsão entre orbitais $p\pi$ e um consequente aumento da reatividade.²⁵

Além disso, tem se demonstrado que o efeito α pode aumentar, diminuir ou até mesmo ter o formato de sino dependendo da natureza e composição do solvente na reação, mostrando que o efeito do solvente no efeito α é significativo.^{24, 26} Mudanças na composição de solvente de uma reação podem ter uma grande influencia na reatividade dependendo de quão esse afeta a energia do estado de transição ou o estado fundamental. Sugere-se ainda que o efeito α em substituições nucleofílicas surge da diferença de solvatação do nucleófilo α no estado fundamental, e do seu correspondente estado de transição com um substrato, que é extremamente diferente da diferença envolvida em reações com nucleófilos ditos normais.²⁷

Devido à sua maior reatividade, nucleófilos α possuem um efeito catalítico notável na clivagem de diésteres de fosfato, conforme demonstrado por Domingos e colaboradores que investigaram a hidrólise do bis(2,4-dinitrofenil) fosfato, **BDNPP**, na presença de hidroxilamina.²⁵ Os dados experimentais para essa reação em água, na faixa de pH de 4 a 12, mostram que a constante de velocidade de primeira ordem k_{obs} inicialmente aumenta em função do pH, mas torna-se independente do mesmo entre valores de pH de 7,2 até 10, como é mostrado na **Figura 4**.²⁵

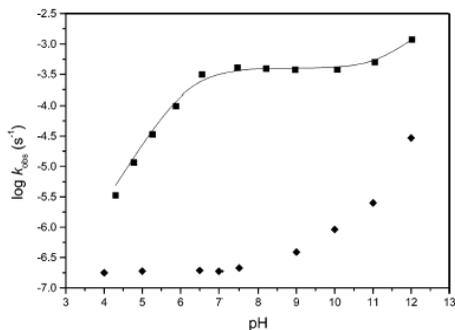


Figura 4. Gráfico logarítmico da constante de velocidade observada versus pH para o ataque nucleofílico pela NH_2OH no BDNPP (■), e da hidrólise espontânea do BDNPP a 25°C (◆).²⁵

1.4 Catálise Enzimática

As enzimas são extremamente eficientes em catalisar reações (10^8 - 10^{10} vezes) com uma regio- e estereoseletividade impressionante e, principalmente, em condições brandas de pH e temperatura.

São várias as teorias que visam explicar a catálise enzimática. O modelo mais antigo e talvez o mais familiar é o da “chave-fechadura” que propõe que a ligação entre o substrato e o sítio ativo da enzima resulta em uma conformação reativa do substrato. Outra proposta seria a da desestabilização do estado fundamental. Recentemente, a teoria do estado de transição ganhou destaque e postula que um aumento na velocidade da reação ocorre quando o estado de transição é ligado mais fortemente ao catalisador do que o substrato, possuindo uma energia de ativação menor comparada à reação não catalisada. Em outras palavras, o catalisador deve estabilizar mais o estado de transição do que o estado fundamental, como pode ser visualizado na **Figura 5**.^{19, 28-30} A reação não catalisada de S é dada em (A), com uma barreira de ativação de ΔG_a^\ddagger e uma constante de velocidade de k_a . Em (B), a enzima 1 (E_1) estabiliza igualmente o estado fundamental (GS) e o estado de transição (TS), sendo então a barreira de reação ΔG_b^\ddagger igual a barreira de reação ΔG_a^\ddagger para a reação não catalisada; neste caso $k_b = k_a$, e a enzima não é um catalisador. Em (C), a enzima 2 (E_2) estabiliza mais o estado de transição do que o estado fundamental de forma que $\Delta G_c^\ddagger < \Delta G_a^\ddagger$, e $k_c > k_a$, e a enzima é um catalisador.²⁹

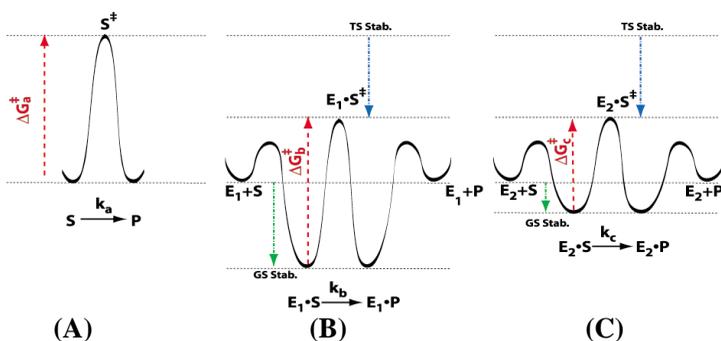


Figura 5. Diagrama de coordenada de reação em que o estado de transição é mais estabilizado do que o estado fundamental.²⁹

A estabilização pode ocorrer através de forças específicas entre o substrato e a enzima, como por exemplo interação eletrostática ou estérica, ligação de hidrogênio ou efeitos de solventes.³¹ O fato é que obviamente o estado de transição fica estabilizado, provavelmente porque o catalisador é mais complementar a estrutura do E.T. do que ao estado fundamental.¹⁷

Através da termodinâmica, pode-se ter uma fundamentação para o fato de que a catálise ocorrerá se o catalisador estabilizar mais o estado de transição do que o estado fundamental, como ilustra a **Figura 6**.²⁸ Observam-se dois caminhos para interconversão de um substrato em um estado de transição, onde $K_{a(S)}$ é o equilíbrio de ligação entre o substrato e o catalisador, $K_{a(S^\ddagger)}$ é o equilíbrio de ligação hipotético entre o E.T. e o catalisador, K_1^\ddagger é o equilíbrio entre o substrato e o E.T. ligado ao catalisador e K_2^\ddagger é o equilíbrio entre o substrato e o E.T. livre em solução. Como consequência, tem-se que K_1^\ddagger e K_2^\ddagger são diretamente proporcionais às constantes de velocidades catalisadas e não-catalisadas, respectivamente, e $K_1^\ddagger/K_2^\ddagger = k_{\text{cat}}/k_{\text{não-cat}}$ (aumento na velocidade).²⁸

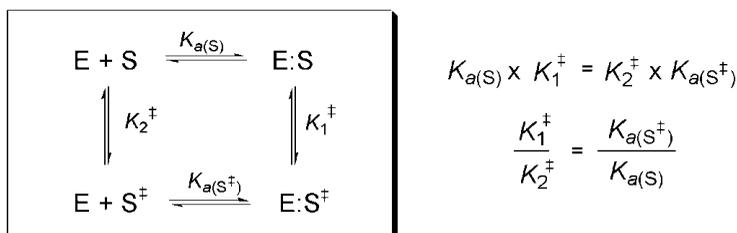


Figura 6. Ciclo termodinâmico que relaciona a catálise e a diferença na ligação entre o substrato e o estado de transição, onde S = substrato e E = enzima.

Mas a questão é, por que uma enzima é capaz de acelerar uma reação e como podemos imitá-la? Obviamente não se trata somente dos seus sítios catalíticos, mas também do posicionamento correto desses em relação ao outro. De fato, existem três fatores que são importantes na catálise de uma reação de hidrólise: i) facilitar o ataque nucleofílico, ii) estabilizar o intermediário tetraédrico estabilizando assim o estado de transição e iii) facilitar a partida do grupo de saída. Por isso, é necessário que o substrato esteja posicionado apropriadamente em

relação aos sítios catalíticos, e que grupos que sejam capazes de fazer interações específicas com o substrato e entre eles, estejam presentes. A interação desses grupos com o substrato é importante não só para localizá-lo, como também para estabilizá-lo. Como já foi mencionado, para a catálise acontecer é requerido que ocorra uma estabilização preferencial do estado de transição relativa ao estado fundamental.²⁹ A **Figura 7** mostra o mecanismo de ação da quimotripsina, que é apenas um exemplo desse posicionamento específico e perfeito dos grupos necessários para a catálise ocorrer. No sítio ativo dessa enzima estão presentes, entre outros, três resíduos que formam a tríade catalítica, His-57, Asp-102 e Ser-195. O ataque nucleofílico do grupo álcool da serina é assistido pela i) catálise básica geral do grupo imidazol da histidina, e ii) pelo resíduo de aspartato através da formação do par iônico com o imidazólio formado na primeira etapa de reação. O intermediário tetraédrico é estabilizado por ligações de hidrogênio em um bolso chamado de “sítio oxianiônico”. Neste sítio, os grupos NHs das amidas do esqueleto peptídico contribuem com a formação das ligações de hidrogênio. O grupo de saída é assistido por uma catálise ácida geral pelo imidazólio.¹⁷

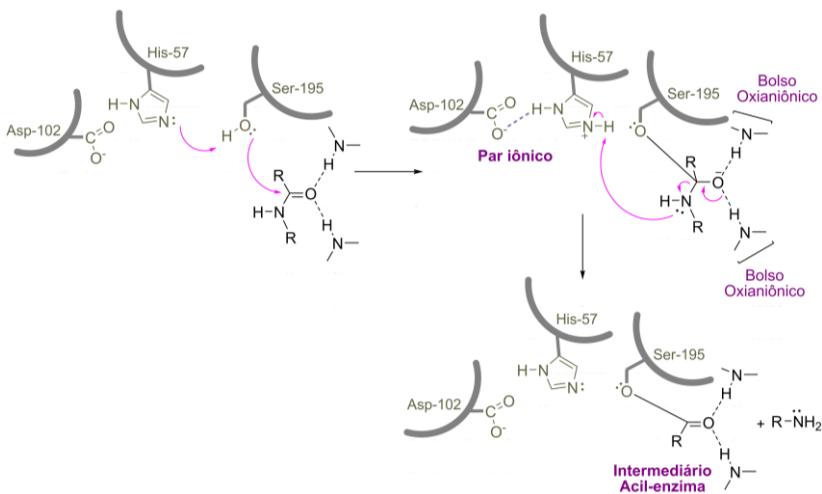


Figura 7. Mecanismo de ação da quimotripsina.¹⁷

Como notado através da **Figura 7**, as interações entre os grupos presentes no sítio catalítico são fundamentais uma vez que podem assistir ao ataque desses grupos no substrato através de catálise ácida ou básica geral. Por essa razão inúmeros modelos não miméticos de catálise intramolecular têm sido criados e estudados com o objetivo de compreender melhor e de forma quantitativa os diferentes aspectos e fatores que contribuem para a eficiência catalítica observada, mesmo que esses modelos não apresentem necessariamente relação direta com algum processo enzimático. Alguns desses modelos serão discutidos no próximo item.

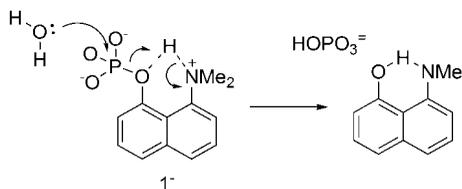
1.5 Catálise intramolecular em modelos não miméticos

Os estudos de reações intramoleculares são interessantes para modelar as características principais do sítio ativo de enzimas, e assim, explicar em nível molecular a eficiência da catálise enzimática. Na catálise intramolecular, um ou mais grupos funcionais de uma molécula podem auxiliar a hidrólise de outro grupo funcional da mesma molécula, sendo muito mais eficiente que a intermolecular.

De acordo com Menger,^{32, 33} a relação entre catálise enzimática e reações intramoleculares é atrativa por duas razões principais: i) grandes acelerações geralmente são observadas quando uma reação intermolecular é convertida em sua respectiva reação intramolecular e ii) uma enzima reagindo com seu substrato é semelhante a uma reação orgânica intramolecular. Consequentemente ambos, complexo enzima-substrato e sistemas intramoleculares, mantêm seus respectivos grupos reativos em proximidade.³²

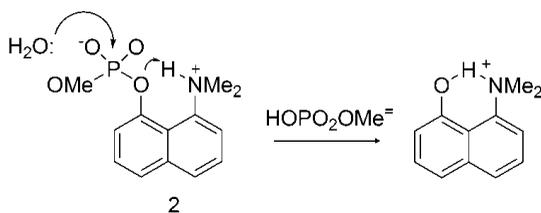
Vários fatores são atribuídos à eficiência da catálise intramolecular. Por exemplo, Page e Jencks³⁴ têm sugerido que a alta velocidade observada nessas reações intramoleculares é consequência do efeito entrópico decorrente da conversão de uma reação bimolecular em unimolecular. Entretanto, de acordo com Bruice,³⁵ essa eficiência deve-se mais a fatores entálpicos do que a entrópicos demonstrando que, em uma série de reações intramoleculares, a velocidade da reação está diretamente relacionada à entalpia e não à entropia de ativação. Já Menger postulou a teoria conhecida como espaço-temporal: “A velocidade de reação entre dois sítios A e B também é proporcional ao tempo que esses sítios residem dentro de uma distância crítica”.³³

O estudo de modelos químicos que exibem esses tipos de catálise tem atraído crescente interesse. Nome e colaboradores avaliaram o efeito da transferência de próton para derivados 8-dimetilamino-naftil-1-fosfato (**Esquema 13**) e observaram uma catálise ácida intramolecular do grupo vizinho NH^+ , devido à forte ligação de hidrogênio, com incrementos catalíticos de até 10^5 vezes.³⁶



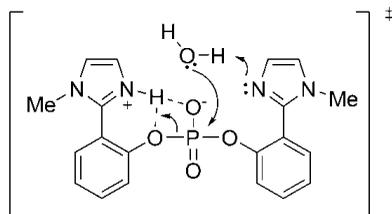
Esquema 13

O efeito da transferência de próton é maior ainda para um diéster análogo **2**, onde incrementos na velocidade chegam até 10^6 vezes, o que corresponde ao maior efeito reportado na literatura para catálise ácida intramolecular (**Esquema 14**).³⁷



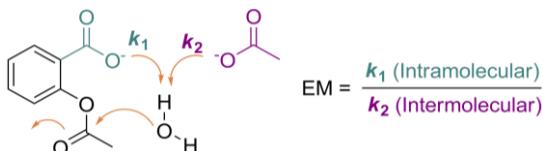
Esquema 14

Recentemente, Nome e colaboradores desenvolveram um modelo de ribonuclease, em que se observou a catálise ácida e básica ocorre simultaneamente no estado de transição (**Esquema 15**).³⁸ Nesse composto, o grupo imidazol atua como catalisador básico geral ativando uma molécula de água enquanto que o próton do grupo imidazolíneo estabiliza o grupo de saída aril-óxido. O nucleófilo e o grupo de saída devem ocupar posições apicais e opostas.³⁸



Esquema 15

O conceito de molaridade efetiva (EM) permite quantificar a 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 (**Esquema 16**), sendo que as reações devem ocorrer via o mesmo mecanismo e nas mesmas condições.³⁹ Assim quanto maior a EM, maior será a eficiência da reação intramolecular. Por exemplo, um grupo nucleofílico numa enzima chega a ter um EM de até $10^9 - 10^{10}$, o que torna interessante mimetizar sistemas enzimáticos.^{33, 39}



Esquema 16

Nesses derivados de aspirina, na qual o carboxilato participa catalisando intramolecularmente como uma base o ataque da água no éster, a hidrólise da aspirina apresenta uma molaridade efetiva de 13 M, 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.⁴⁰

Essa seção discutiu modelos não miméticos de catálise intramolecular e nesses sistemas, os grupos reativos são mantidos próximos através de ligações covalentes. Contudo, há um grande número de estudos que mimetizam as interações não-covalentes enzimá-

substrato e para tal, macromoléculas como polímeros,^{41, 42} ciclodextrinas,^{43, 44} calixarenos,⁴⁵ dendrímeros^{46, 47} e éteres-coroa⁴⁸ têm sido amplamente utilizado. A utilização dessas macromoléculas no design de enzimas artificiais é discutida com mais detalhes na próxima seção.

1.6 Planejamento de Macromoléculas e Química Biomimética

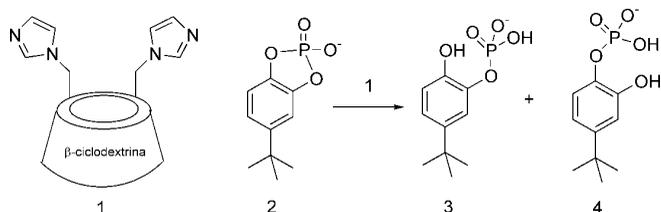
Sabe-se que enzimas são macromoléculas que possuem estruturas com massas molares de cerca de 10 kDa. Por essa razão, a utilização de macromoléculas como esqueleto onde grupos funcionais podem ser ancorados se torna extremamente interessante. Esses grupos podem ser ou não os mesmos encontrados em sítios ativos de enzimas. Dentre as macromoléculas com potencial na mimetização de sistemas biológicos destacam-se as ciclodextrinas, éteres-coroa, micelas, polímeros e dendrímeros. A química biomimética envolve a síntese e estudo de enzimas artificiais e tem se expandido de uma maneira notável, embora, como mencionado anteriormente, às tentativas bem sucedidas de mimetizar enzimas naturais reportadas até agora não tenham atingido o grau de sofisticação, especificidade, e número de ciclos (“turnovers”) de enzimas naturais.^{31, 47, 49} Por isso, são uma fonte de inspiração para nós químicos, uma vez que demonstram o que pode ser alcançado compreendendo melhor seu mecanismo de ação. É importante ter em mente, porém, que mesmo os “modelos enzimáticos” encontrados na literatura que alegam ter eficiência comparada à de enzimas, utilizam substratos muito mais ativos (*i.e.* éster de *p*-nitrofenila) que os inertes clivados por enzimas (como por exemplo uma amida).³² Contudo, apesar dessa distância na eficiência observada para enzimas naturais e compostos preparados por químicos, esses modelos são fundamentais no sentido não só de compreender melhor o mecanismo de ação enzimática, mas também na tentativa de acelerar diversar reações.

Como discutido na seção 1.4, geralmente as enzimas se ligam ao seu substrato e com a ação de dois ou mais grupos funcionais com localização ótima em relação ao substrato, realizam a catálise (**Figura 7**). Essa característica leva à seletividade e estereo-especificidade da enzima em relação ao substrato. A ligação entre enzima e substrato pode incluir coordenação por metal, formação de par iônico, coordenação ácido-base de Lewis ou ligação de hidrogênio em meio não aquoso e

interação hidrofóbica em soluções aquosas.⁵⁰ Por essa razão é de extrema importância que, em uma enzima artificial, existam grupos catalíticos e outros que permitam interagir tanto com o substrato, como também com os grupos catalíticos.

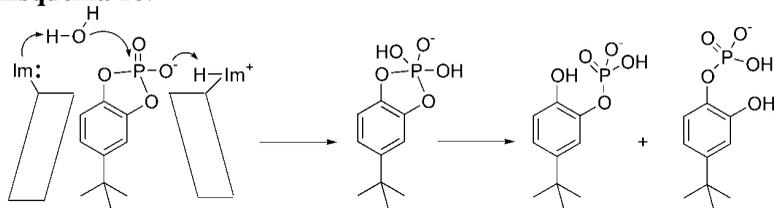
O uso de derivados do polímero polietilenoimina (PEI) como mimese de enzimas foi primeiramente reportado por Irving Klotz, que introduziu o termo *sinzimas* (do inglês, *synthetic enzymes - synzymes*) para esses catalisadores.⁵¹ Ele mostrou que ancorando grupos dodecil e metilenoimidazol à PEI se obtém um catalisador eficiente para a hidrólise de ésteres ativados como 4-nitrofenil acetato e na descarboxilação de derivados de isoxazol. Kirby e colaboradores reportaram *sinzimas* obtidas da PEI que catalisam a abertura do anel benzoxazol.^{52, 53}

Como já mencionado, um dos aspectos mais importantes do mecanismo enzimático é a cooperação dos grupos funcionais frequentemente observados no seu sítio ativo. O ambiente eletrostático no sítio da ligação mantém o balanço de pK_a s necessário para os vários grupos participarem cataliticamente. Nesse sentido, e tendo em vista que a histidina em particular, é frequentemente capaz de participar como ácido ou base em catálise bi ou multifuncional simultaneamente, Anslyn e Breslow mimetizaram a ribonuclease A que utiliza His-12 e His-119 como principais grupos catalíticos na hidrólise do RNA, ancorando dois anéis imidazóis em β -ciclodextrina, como mostrado no **Esquema 17**.⁵⁴ Segundo os autores, essa *sinzima* 1 catalisa a clivagem de fosfatos cíclicos (k_{cat} $120 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ comparado com k_{uncat} $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) e mostra uma grande seletividade para um dos dois produtos formados na reação. Outro dado interessante é que o posicionamento relativo dos grupos imidazois no anel da β -ciclodextrina é de grande importância em relação ao produto que será formado e a constante de velocidade da reação de hidrólise.⁵⁴ Somente quando os grupos imidazois estão ancorados a açúcares adjacentes um único produto 3 foi detectado. Esse isômero da β -ciclodextrina além de ser mais seletivo, mostrou ser responsável pela maior velocidade de hidrólise e se ligar mais fortemente com 2.⁵⁴



Esquema 17

A partir dos dados de análise de produtos e da dependência da constante de velocidade em função do pH, pode-se concluir que o mecanismo inclui um grupo imidazólio funciona como ácido geral e um imidazol como base geral ativando uma molécula de água, como mostra o **Esquema 18**.⁵⁴



Esquema 18

Na tentativa de mimetizar a transaminase, piridoxamina foi ancorada em PEI, e estudos cinéticos revelaram que a sinzima aumentou a velocidade da transaminação da piridoxamina com ácido pirúvico por um fator de 6700-8300 em pH 5,0. Uma das razões para esse grande aumento na velocidade foi atribuída à catálise ácido-base geral exercida pelas poliaminas.⁴¹ Entretanto, o modelo enzimático da PEI não tem uma estrutura bem definida, e cada molécula de polímero contém mais do que uma unidade de coenzima.

Visando criar um modelo macromolecular de transaminase bem definido, dendrímeros têm sido constantemente utilizados como modelo mimético enzimático. Por exemplo, foram sintetizados dendrímeros de poliamidoamina (PAMAN) no núcleo com uma piridoxamina ancorada covalentemente. Resultados mostraram que a estrutura e o tamanho dos dendrímeros exercem uma grande influência nas constantes de velocidade de transaminação, sendo estabelecido que uma única

piridoxamina no núcleo de um dendrímero (PAMAN) é comparável com uma unidade de piridoxamina ligada à PEI de massa molar = 60000 g/mol na transaminação do ácido pirúvico e fenilpirúvico e da alanina e fenilalanina, sendo menos efetivo porém do que a PEI-piridoxamina laurilada.⁴⁹

Dendrímeros catalíticos de peptídeos foram desenvolvidos utilizando como unidades de ramificação ácido 2,3-diaminopropanóico para organização de 7 aminoácidos, que a seguir foram dimerizados por ligação dissulfídica resultando em um dendrímero com 14 aminoácidos. A atividade esterolítica desse foi avaliada na hidrólise do substrato mostrado na **Figura 8**, um éster fluorogênico em solução aquosa. Foi observado que a sinzima mostrou atividade hidrolítica com uma reatividade de até 40 vezes por resíduo de histidina comparado ao 4-metilimidazol.^{55, 56}

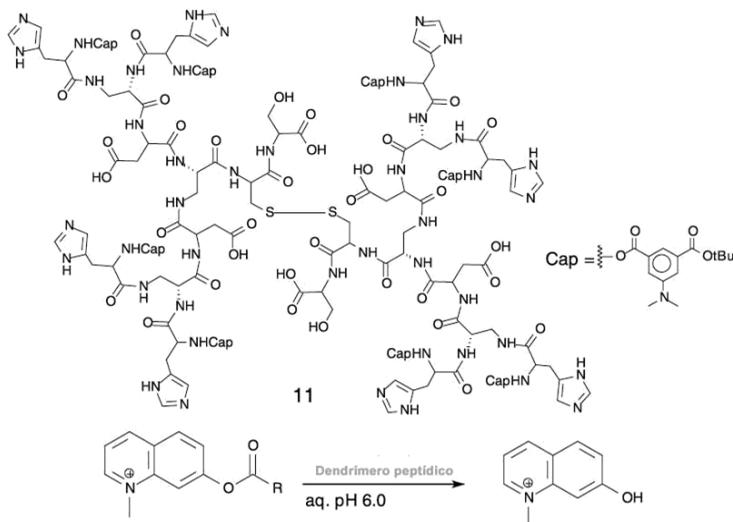


Figura 8. Dendrímero de poli(aminoácido) utilizado na hidrólise de um substrato fluorogênico. Relações espaciais entre His-Ser-Asp mostraram ser cruciais na função de mimetização.

É interessante que os grupos funcionais estejam próximos na cadeia da macromolécula para mimetizar sítios ativos. Para esse fim, um método que vem atraindo atenção é o planejamento de moldes

moleculares, que são elementos de controle que favorecem a formação de um produto único. Exemplos de moldes moleculares na natureza são DNA, que é um molde para o RNA, que por sua vez é um molde para síntese de proteínas. Moldes são capazes de organizar um conjunto de átomos de uma maneira específica no espaço e favorecem a formação de um único produto quando a formação de mais de um é possível e, além disso, promovem a interação entre unidades que são ordenadas ao seu redor. Para isso, tem-se utilizado o método denominado “*molecular imprinting*”, que consiste em grupos funcionais, pré-organizados com um molde, que mimetizam o estado de transição, ancorados a monômeros vinílicos que serão polimerizados. Subsequentemente, se faz uma copolimerização na presença de solventes e concentrações relativamente grandes de agentes reticulantes para produzir polímeros macroporosos rígidos. Após a remoção do molde, as cavidades ficam disponíveis no polímero, e a forma e arranjo dos grupos funcionais são determinados pela estrutura do molde original (**Figura 9**).⁵⁷

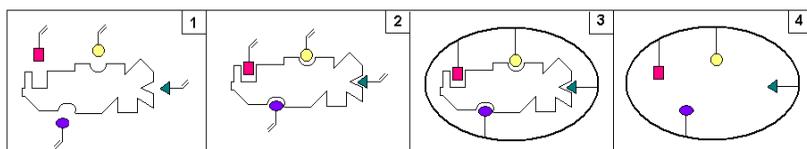


Figura 9. Representação esquemática da formação da cavidade específica em um polímero reticulado através de um molde, contendo quatro grupos funcionais diferentes.⁵⁷

Através dessa técnica, um modelo mimético da enzima carboxipeptidase A foi obtido. Os autores utilizaram um análogo do E.T. como molde para a introdução de dois grupos amidínicos e um centro de Cu^{2+} , em uma orientação definida no sítio ativo (**Figura 10**). Após remoção do molde, a hidrólise do carbonato apresenta um $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ de cerca de 410.000, maior valor já observado para catalisadores preparados através de moldes moleculares.⁵⁸

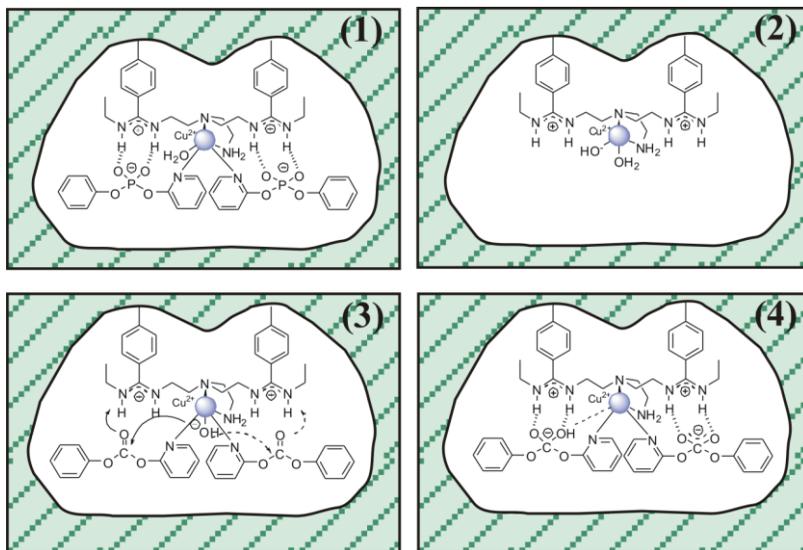
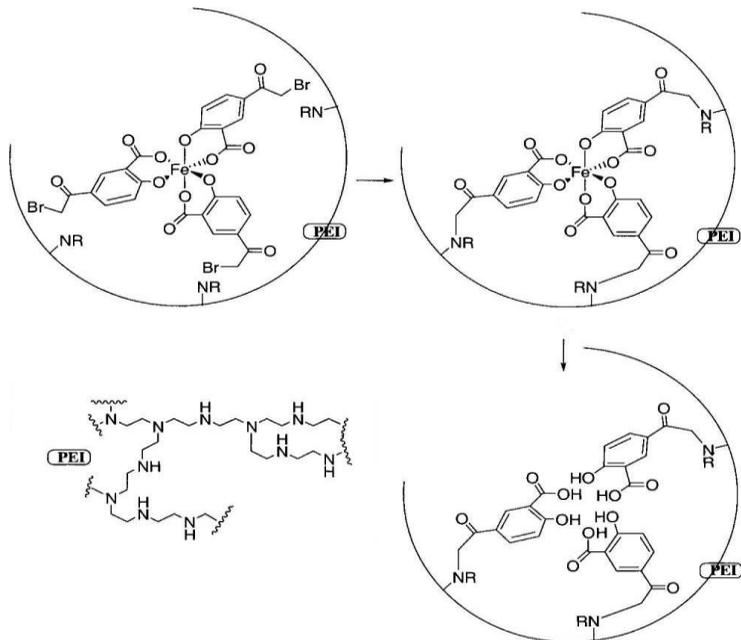


Figura 10. (1) Preparação do catalisador através de molde molecular utilizando duas moléculas de molde e Cu^{2+} ; (2) Sítio ativo da enzima artificial depois da remoção do molde; (3) O substrato ligado à cavidade da enzima artificial; (4) Formação do estado de transição tetraédrico durante a catálise.⁵⁸

Suh e colaboradores prepararam uma proteinase artificial ancorando sítios ativos no esqueleto do polímero polietilenoimina (PEI). Esse sítio ativo consiste de três resíduos de salicilatos, que foi preparado utilizando três moléculas de 4-bromoacetilsalicilato pré-organizadas com o íon Fe(III) . Então, os resíduos de salicilatos foram reticulados com a PEI, e após a remoção do molde íon Fe(III) , os três resíduos de salicilato permaneceram próximos. Esses resíduos constituem o sítio ativo de uma sinzima que possui três grupos carboxílicos (grupo funcional dos resíduos aspartato e glutamato) e três grupos fenóis (grupo funcional da tirosina), como pode ser visto no **Esquema 19**.⁵⁹ A enzima artificial demonstrou atividade como proteinase na clivagem hidrolítica da γ -globulina (Gbn), sendo sua atividade ótima na faixa de pH 5-7. O tempo de meia-vida para clivagem de duas cadeias de Gbn pela proteinase artificial foi de 1 hora em pH 7 a 50 °C. Considerando que o tempo de meia-vida da hidrólise espontânea de ligações amidas a pH 7 e

25 °C foi estimado como sendo de ~1000 anos, conclui-se que a proteinase artificial tem um efeito na aceleração de hidrólise de ligações amidas de 10^6 vezes.⁵⁹



Esquema 19

1.7 Catálise em meio micelar

Os surfactantes são moléculas anfifílicas que possuem em sua estrutura uma parte polar hidrofílica e uma cadeia de hidrocarbonetos (cauda) de natureza hidrofóbica. Moléculas com esse tipo de propriedades podem associar-se espontaneamente acima de uma concentração específica denominada concentração crítica micelar (CMC) em solução aquosa diluída gerando agregados de vários tipos, formas e tamanhos, denominadas micelas. O formato desses agregados (globulares, cilíndricos ou vesículas esféricas) é determinado pela estrutura molecular do surfactante. A tendência de essas moléculas formarem micelas em solução aquosa é consequência do efeito hidrofóbico.⁶⁰ Os surfactantes podem ser classificados como catiônicos,

aniônicos, dipolares iônicos e neutros, dependendo se há ou não carga presente na estrutura do monômero e se esta é positiva ou negativa. A **Figura 11** mostra os surfactantes catiônico brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTABr), aniônico docecil sulfato de sódio (SDS) e dipolar iônico N,N-dimetilamônio propanosulfonato de N-tetradecil (SB3-14).

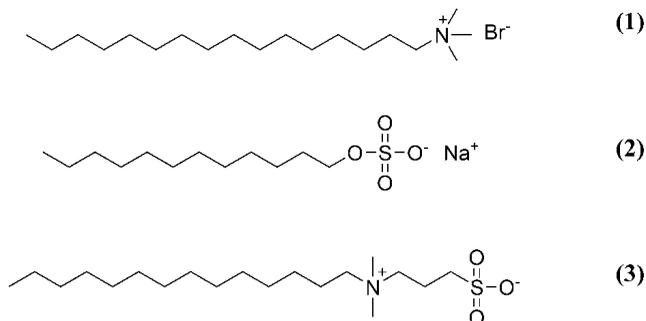


Figura 11. Estruturas dos surfactantes (1) brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr), (2) aniônico docecil sulfato de sódio (SDS) e (3) dipolar iônico N,N-dimetilamônio propanosulfonato de N-tetradecil (SB3-14).

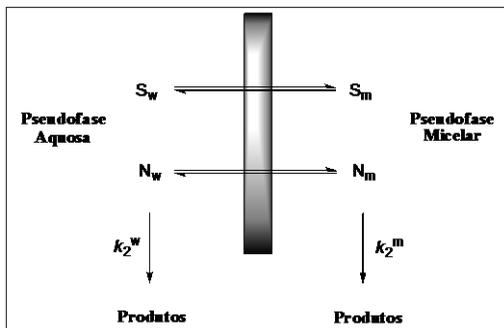
O efeito micelar sobre reações bimoleculares em soluções aquosas tem sido extensivamente estudado e muitas reações químicas entre compostos hidrofóbicos ou entre um íon reativo e uma molécula orgânica são efetivamente aceleradas por surfactantes na forma de micelas.⁶¹⁻⁶⁵ Isso se deve ao fato de micelas atuarem como “micro-reatores”, concentrando ou diluindo reagentes e assim alterando velocidades aparentes e constantes de equilíbrio de reações químicas.⁶⁴

A reação de hidrólise do bis(2,4-dinitrofenil) fostato (BDNPP) é catalisada aproximadamente 30 vezes por brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr).⁶⁶ Em solução alcalina, a catálise pode ser explicada através da capacidade das micelas catiônicas em concentrar reagentes aniônicos e simultaneamente concentrar compostos orgânicos.⁶⁶

Perfis de constante de velocidade em função da concentração de surfactante, para uma variedade de reações bimoleculares, exibem características que dependem da carga e da hidrofobicidade do substrato,

da carga do grupo polar e do tamanho da cadeia do surfactante e da concentração e tipo do contra-íon.⁶⁴ A superfície micelar é um conjunto dinâmico que interage com íons coulombicamente e especificamente, como pode ser observado através de efeitos específicos de contra-íons nas propriedades micelares. Interações coulômbicas dependem da densidade de carga superficial da micela e valência iônica, enquanto que interações específicas são maiores para íons polarizáveis com densidade de cargas menores.⁶⁴

O modelo de pseudofase e troca iônica (PIE) tem sido muito utilizado para simular reações bimoleculares e íon-molécula.⁶⁴ De acordo com Bunton, Quina, Romsted e Nome, monômeros de surfactantes, moléculas orgânicas, e íons entram e saem de micelas com uma velocidade aproximadamente igual àquela controlada por difusão. Então o surfactante micelizado está em equilíbrio térmico com solutos na reação, e as velocidades observadas podem ser tratadas como a soma das velocidades de reações concorrentes em cada pseudofase (**Esquema 20**), com m e w indicando as pseudofases micelar e aquosa respectivamente, e k_2^w e k_2^m sendo as constantes de velocidade de segunda ordem.



Esquema 20⁶⁴

A ligação de um substrato orgânico na micela, S , é governada por interações coulômbicas e hidrofóbicas e é geralmente descrita por uma constante de associação K_S :

$$K_S = \frac{[S_m]}{[S_w][D_n]} \quad \text{Eq. 1}$$

em que $[D_n]$ é a concentração de surfactante micelizado.

Combinando a expressão de velocidade para k_{obs} baseada no **Esquema 16** com a **Eq. 1**, se tem:

$$k_{obs} = \frac{k_2^y [N_w] + k_2^y K_S N_m [D_n]}{1 + K_S [D_n]} \quad \text{Eq. 2}$$

em que N_m é a concentração local do reagente iônico na pseudofase micelar:

$$N_m = \frac{[N_m]}{[D_n]V_m} \quad \text{Eq. 3}$$

Sendo V_m na equação acima o volume em litros/mol da região reativa e $[D_n]V_m$ é a fração de volume micelar na qual a reação ocorre.

Nessa equação, tem-se que a proporção relativa da reação total ocorrendo nas pseudofases aquosa e micelar depende de $[D_n]$ e K_S . A **Eq. 3** mostra uma propriedade fundamental de todos os modelos de pseudofases: a velocidade de reação na pseudofase micelar depende da concentração local de N em cada pseudofase e não da sua concentração estequiométrica.

No modelo de pseudofase e troca iônica (PIE), é assumido que:

i) a superfície micelar atua como um trocador seletivo de íons, e a competição entre contra-íons inertes, X, e contra-íons reativos, N é dada por um parâmetro chave do modelo que é a constante de troca iônica:⁶⁴

$$K_N^X = \frac{[N_w][X_m]}{[N_m][X_w]} \quad \text{Eq. 4}$$

ii) a fração de sítios da superfície ocupada pelos dois contra-íons é considerada como sendo constante e dado pelo grau de ligação do contra-íon, β :

$$\beta = \frac{[N_m] + [X_m]}{[D_n]} \quad \text{Eq. 5}$$

1.8 Agregados de polímeros-surfactante

Poliíons são polímeros compostos de unidades repetitivas carregadas ou parcialmente carregadas e ligadas covalentemente. Cada carga do poliíon é neutralizada por um contra-íon de carga oposta e o poliíon e seu contra-íon, juntos constituem o polieletrólito, como mostrado na **Figura 12**.

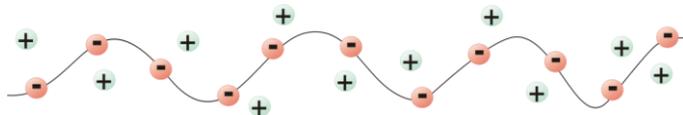


Figura 12. Polieletrólito constituído de um poliíon e seus contra-íons.

Polieletrólitos são solúveis em água devido à dissociação de seus contra-íons e, geralmente, possuem uma configuração mais estendida do que polímeros não carregados uma vez que ocorre repulsão entre as cargas da cadeia.⁶⁷

A partir de 1957, muitas propriedades físico-químicas de misturas contendo macromoléculas e surfactantes (ou lipídeos) têm sido estudadas, destacando-se as misturas de surfactantes com proteínas e outros polieletrólitos biologicamente relevantes, visando investigar mecanismos em processos biológicos. Logo, trabalhos envolvendo polieletrólitos apareceram, que não só serviam como modelos para proteínas, como também para entender o papel de surfactantes e lipídeos na transfecção do DNA.⁶⁸ Ainda, esses tipos de agregados se tornam interessantes para serem usados em diversas aplicações tecnológicas, como em cosméticos, medicamentos e materiais.⁶⁹

Fases organizadas são geradas com a mistura de polieletrólitos e surfactantes em baixas concentrações, devido à forte interação eletrostática, nas quais as propriedades são controladas pela concentração de polímero e/ou surfactante, temperatura, pH e força iônica.⁶⁹ Esses complexos micelares são formados em soluções livres de sal em uma concentração de agregação crítica (CAC), ao longo do esqueleto do poliíon, sendo a CAC cerca de 3-10 vezes mais baixa que a CMC.⁷⁰ A CAC está relacionada com a capacidade do polímero em nuclear a formação desses complexos micelares ou agregados de surfactante.⁷¹ Portanto, a CAC pode ser considerada como uma

indicação da intensidade da interação surfactante-polímero: quanto mais intensa a interação, menor é o valor da CAC (isso quando se comparam surfactantes com valores próximos de CMC). Para surfactantes diferentes com valores de CMC diferentes, compara-se a diferença entre a CAC e a CMC.⁷¹

O modelo mais aceito para o complexo formado entre um polímero solúvel em água e um surfactante foi proposto por Cabane para explicar a interação entre poli(óxido etileno) (PEO) e dodecil sulfato de sódio (SDS) e de acordo com esse modelo, uma fração dos segmentos da cadeia do polímero se liga à superfície micelar.⁷² Segundo o autor, o processo de complexação polímero-micela se dá principalmente devido à estabilização da interface entre o núcleo hidrofóbico da micela e água.⁷² Entretanto, as interações específicas entre os grupos polares do polímero com as cabeças dos surfactantes também possuem um papel importante, pois as micelas são estabilizadas pelo poliíon, que atua como um grande contra-íon polivalente, diminuindo a repulsão entre as cabeças do surfactante e, como consequência os contra-íons simples são liberados na solução.⁷²

Isso foi elegantemente comprovado por Iekti e colaboradores,^{73,74} ao estudarem o sistema poli(acrilato de sódio) (NaPA) e CTABr. Em um dos estudos, soluções aquosas de NaPA foram misturadas com diferentes fases do sistema água-CTABr e em todas as misturas, os íons do surfactante (CTA⁺) se associam formando micelas. Os poliíons (PA⁻) se ligam a essas micelas removendo seus contra-íons e ligando-as entre si, formando pontes e mudando as formas micelares. Essas pontes podem mudar as distâncias entre as micelas resultando na sua separação como uma fase concentrada, o que, nesse caso, libera excesso de água e sal para a fase aquosa diluída, como pode ser visto na **Figura 13**. Através de medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), foi possível determinar as estruturas das fases concentradas: em quantidades baixas de água, as fases micelares hexagonal e nemática do sistema contendo polímero surgem com as fases correspondentes de CTABr/água, e em grande quantidade de água, as fases concentradas que se separam são próximas às fases cúbicas e hexagonais do acetato de cetiltrimetilamônio/água.⁷⁴

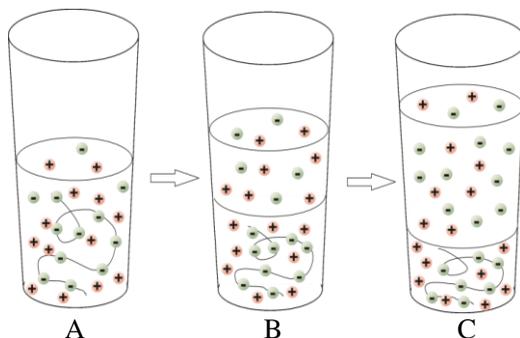


Figura 13. Efeito da adição de água a misturas de polieletrólitos e surfactantes carregados negativamente: A) a mistura concentrada é monofásica; B) com a adição de água, uma fase diluída contendo sal simples se separa; C) com a adição de mais água, a fase concentrada se torna mais concentrada.

Thalberg e colaboradores⁷⁵ propuseram um diagrama de fase tridimensional, uma pirâmide tetragonal, que permite descrever o comportamento de todas as composições possíveis da mistura dos 4 componentes contendo polímeros e surfactantes de cargas opostas. A pirâmide continha no topo a água e em cada um dos quatro ápices: o polieletrólito (poliíon + contra-íon simples), o surfactante (íon surfactante + contra-íon simples), o sal simples (dois contra-íons simples) e o sal complexo (poliíon + surfactante), **Figura 14**.

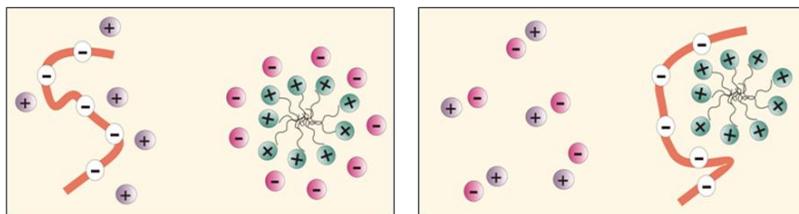


Figura 14. Composições possíveis da mistura dos 4 componentes de misturas de polímeros e surfactantes de cargas opostas: o polieletrólito (poliíon + contra-íon simples), o surfactante (íon surfactante + contra-íon simples), o sal simples (dois contra-íons simples) e o sal complexo (poliíon + surfactante).

O espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS), que fornece informações estruturais na faixa de 10-1000 Å, é adequada e muito utilizada para estudar fases líquidas cristalinas. Além do SAXS,⁷⁶ técnicas como, espalhamento de luz,⁷⁷ eletroforese,⁷⁸ fluorimetria,⁶⁸ condutimetria⁷⁹ e turbidez⁸⁰ são normalmente utilizados na determinação de propriedades de agregados polímero/surfactante.

Vale ressaltar que muitos desses sais complexos possuem uma considerável solubilidade em água, principalmente quando a cauda do surfactante é pequena ou se os poliíons contem uma fração considerável de unidades não carregadas. Nesses sistemas, a técnica de titulação calorimétrica isotérmica (ITC) se torna muito interessante na investigação de processos de associação envolvendo surfactantes, possibilitando a determinação simultânea dos principais parâmetros termodinâmicos associados a esses processos.⁸¹

O sistema surfactante-polímero mais estudado através de ITC é aquele formado por SDS e poli (óxido de etileno), PEO, e resultados mostram que esse surfactante aniônico interage fortemente com esse polímero neutro e outros, tais como, poli (álcool vinílico), PVA, poli (óxido de propileno), PPO e poli (vinilpirrolidona), PVP.⁷¹ Por outro lado, por razões que ainda não foram totalmente esclarecidas, é sugerido que interações entre surfactantes catiônicos e polímeros neutros são fracas ou até mesmo inexistentes.⁷¹ Contudo, resultados um tanto surpreendentes de Wang e Tam⁸² mostraram uma forte interação entre brometo de dodecil trimetil amônio (DTABr) e poli (ácido acrílico) o qual, com um baixo grau de ionização, é praticamente neutro. Já, como mencionado no início desta seção, polieletrólitos e surfactantes interagem fortemente e essa associação tem sido atribuída como uma consequência de interações hidrofóbicas e eletrostáticas.⁷⁶

2 OBJETIVOS

O Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (Lacfi) vem se dedicando ao estudo de reações de ésteres de fosfato e carboxilatos, sendo que os focos principais são o estudo mecanístico dessas reações e a obtenção de estratégias para a degradação desses ésteres baseando-se em ésteres modelos e nucleófilos α . A motivação dessa linha reside na importância dessas reações uma vez que são vitais à composição biológica, como no caso dos diésteres de fosfato e ésteres de acetato ou podem ser extremamente tóxicos, como os casos dos triésteres.

Até o presente momento, nucleófilos (especialmente nucleófilos α) de tamanhos pequenos foram utilizados nos estudos de clivagem de ésteres de fosfato.⁸³⁻⁸⁵ Todavia, sabe-se que reações biologicamente relevantes incluem grupos nucleofílicos em enzimas e essas são relativamente grandes. Por isso, para melhor mimetizar uma enzima reagindo com um éster, decidiu-se desenvolver modelos miméticos maiores (polímero e micelas) para o estudo de clivagem de ésteres de fosfato e acetatos.

Assim sendo, o objetivo principal desta tese de doutoramento é a *obtenção de um polímero capaz de acelerar reações de clivagem de ésteres*. Para atingir tal objetivo, as seguintes estratégias foram utilizadas:

- ✓ preparação de um polímero contendo o grupo funcional ácido hidroxâmico e ácido carboxílico ancorado em sua estrutura, a fim de se obter uma enzima artificial;
- ✓ caracterização do polímero através de técnicas como titulação potenciométrica, IV, RMN, ESI-MS e TGA.
- ✓ utilização de moléculas de baixas massas molares que contenham o mesmo grupo funcional (ácido hidroxâmico) para se ter um experimento de controle;
- ✓ Avaliação do polímero e dos compostos de controle preparados em relação ao seu efeito catalítico na hidrólise dos ésteres: ácido 1-acetoxi-2-naftóico (**1-Ac**),

ácido-2-acetoxi 1-naftóico (**2-Ac**), ácido 3-acetoxi-2-naftóico (**3-Ac**), bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) e dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), e *p*-nitrofenil acetato, butirato e octanoato (**PNPA**, **PNPB**, **PNPC**);

- ✓ adição de surfactantes ao polímero para avaliar o efeito do agregado na desfosforilação do diéster de fosfato **BDNPP**;
- ✓ utilização de co-micelas que também contenham o grupo ácido hidroxâmico na desfosforilação do **BDNPP** e análise do mecanismo de reação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

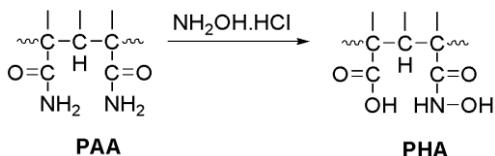
3.1 Materiais

Os substratos acetato de *p*-nitrofenila 97%, butirato de *p*-nitrofenila 98% e octanoato de *p*-nitrofenila foram procedentes da Aldrich, sendo que o butirato de *p*-nitrofenila foi gentilmente cedido pela prof. Maria da Graça Nascimento. A água deuterada (D₂O) foi adquirida da Cambridge Isotope Laboratories, com grau de pureza rotulado em 99,9%. O polímero poli(acrilamida) de massa molar 1500 g mol⁻¹ foi obtido da Scientific Polymer e o cloridrato de hidroxilamina da Aldrich. Os surfactantes CTABr, SDS e SB3-14 foram obtidos da Aldrich. Os demais reagentes foram de qualidade p.a. (procedentes da Aldrich, Carlo Erba, Acros e Vetec) e utilizados sem tratamento prévio.

As metodologias para as sínteses dos substratos ácido 1-acetoxi-2-naftóico (**1-Ac**), ácido-2-acetoxi 1-naftóico (**2-Ac**), ácido-3-acetoxi 2-naftóico (**3-Ac**),⁸⁶ bis(2,4-dinitrofenil) fostato (**BDNPP**)⁸⁷ e dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**)⁸⁸ para a preparação do ácido lauril hidroxâmico (**LHA**)⁸⁹ e ácido benzoidroxâmico (**ABH**)⁸⁵ já foram previamente descritas.

3.2 Preparação do polímero funcionalizado PHA

O polímero funcionalizado (**PHA**) foi preparado ancorando os grupos funcionais hidroxâmico e carboxílico no esqueleto da poli(acrilamida) (PAA), baseado no método de Domb e colaboradores (**Esquema 21**).⁹⁰



Esquema 21. Obtenção do **PHA** a partir da PAA.

Em geral, 5,0 g (3,3 mmol) de PAA de massa molar 1500 g mol^{-1} foram dissolvidos em 10 mL de água destilada e 5,2 g (75 mmol) de cloridrato de hidroxilamina dissolvida em 25 mL de água destilada foram adicionados à solução do polímero. Depois de 2 horas de reação, uma solução de NaOH (75 mmol) foi adicionada e agitou-se por 48 horas, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução foi transferida para um béquer e HCl concentrado foi adicionado até o pH atingir cerca de 1,0 e então metanol foi adicionado, ocorrendo a formação de um precipitado branco. A mistura permaneceu no freezer e depois de 24 horas, o precipitado foi filtrado, lavado várias vezes com metanol e seco na estufa (cerca de 3 horas). Depois de seco, o sólido foi macerado até virar um pó rosado, com um rendimento de 69%. O tempo da reação foi variado a fim de ver o efeito desse parâmetro na conversão dos grupos funcionais.

3.3 Experimentos Cinéticos

As concentrações dos substratos e os comprimentos de onda utilizados nos experimentos cinéticos estão apresentados na **Tabela 1**, e o aparecimento dos produtos foi acompanhado por no mínimo 5 tempos de meia-vida ($t_{1/2}$). A reação foi iniciada pela adição de uma alíquota de 10, 20 ou 30 μL de uma solução estoque dos substratos em acetonitrila (estocada no freezer), em uma cubeta de quartzo com 3 mL de solução aquosa com a mistura reacional, que continha um grande excesso do nucleófilo, assegurando condições de pseudoprimeira-ordem. No caso dos experimentos com o **PNPC**, uma menor quantidade desse substrato foi injetada para evitar a sua agregação uma vez que se trata de um éster de cadeia longa.⁹¹ Nos experimentos com **PHA** e **LHA**, nenhum tampão foi utilizado, uma vez que a solução era auto-tamponada pelo nucleófilo e a força iônica não foi mantida constante.⁸⁹ Nos experimentos na ausência das macromoléculas, os tampões CH_3COOH (pH 4,00-5,00); **BIS-TRIS** (pH 6,00-7,00); e **TRIS** (pH 8,00-9,00) foram utilizados e a força iônica foi mantida em 1,0 nas medidas cinéticas com adição de KCl. No ajuste do pH, KOH e HCl foram utilizados. Contudo, nos experimentos com o surfactante SDS, NaOH foi utilizado, uma vez que ocorre precipitação do sistema quando se utiliza KOH. O pH de cada mistura foi verificado no final de cada corrida cinética. As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro digital Hanna, calibrado à

78

temperatura ambiente com soluções padrões pH 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlos Erba). Vale lembrar que um cuidado especial deve ser tomado na manipulação do triéster devido à sua alta toxicidade.

Tabela 1. Concentrações dos substratos e os comprimentos de onda utilizados nos experimentos cinéticos.

Substratos	10 ⁵ Conc. Inicial, mol/L	λ , nm
BDNPP	1,33	400
DEDNPP	6,67	400
1-Ac	6,67	338
2-Ac	6,67	338
3-Ac	6,67	338
PNPA	3,33	400/317,5 ¹
PNPB	11,3	400/317,5 ¹
PNPC	1,00	400/317,5 ¹

¹ aumento da absorvância devido à formação do *p*-nitrofenolato ou *p*-nitrofenol.⁹²

Todas as medidas cinéticas para acompanhar as reações de clivagem dos compostos foram realizadas em um espectrofotômetro Cary 50 (Varian) acoplado a um banho termostático da Microquímica, modelo MQBTC99-20, e a um microcomputador contendo o sistema de aquisição e tratamento de dados Cary WinUV 3.00. As cubetas utilizadas eram de quartzo, com capacidade de 3,5 mL e caminho ótico de 1,0 cm. As regressões lineares e não-lineares para ajustes de dados cinéticos foram realizadas com o programa de computação ORIGIN versão 8.0 (OriginPro, 2008).

Nos experimentos de efeito de solvente, 1,0 mL de uma solução estoque de PHA 0,1 mol/L com pH=10 foi adicionado a um balão volumétrico e esse foi completado com diferentes volumes de DMSO ou CH₃CN e H₂O, dependendo da fração de solvente orgânico desejada.

3.4 Titulação Potenciométrica.

As medidas de titulação potenciométrica foram realizadas em um sistema automatizado Metrohm (pHmetro 713 e Dosimat 765) em

uma cela termostatizada de 150,0 mL de capacidade, sob atmosfera de N_2 a 25°C. Nos experimentos, uma solução contendo 30 mL de **PHA** ou PAA 0,013 mol/L foi acidificada com 0,5 mL de HCl 0,1 mol/L e titulada com pequenos incrementos de KOH 0,1008 mol/L, livre de CO_2 . Nos experimentos contendo surfactantes junto com **PHA**, a concentração utilizada de surfactante foi de 0,01 mol/L. Quando o SDS esteve presente no experimento, NaOH 0,10017 mol/L foi utilizado, por motivos já comentados anteriormente.

3.5 Titulação Calorimétrica Isotérmica

Um calorímetro modelo VP-ITC, Micro Cal Inc. (Northampton, Massachusetts) foi utilizado para as medidas, as quais foram realizadas no laboratório do prof. Watson Loh, do IQ/Unicamp. Esse calorímetro contém uma cela com volume de 1,4 mL que é preenchida até o volume máximo, sendo esse valor de volume constante durante todo o experimento, pois o volume injetado do titulante é derramado da cela. O equipamento possui um circuito de autocompensação que mantém nula a diferença de temperatura entre a cela de referência e a cela da amostra (calorímetro de compensação). Então, durante o experimento, quando não ocorre nenhuma reação ou processo físico, tem-se uma linha base que corresponde a uma energia de compensação constante. Quando ocorre liberação de calor decorrente de uma injeção no interior da cela da amostra, a energia de compensação aplicada na cela de referência irá aumentar temporariamente, ou diminuir no caso de um processo endotérmico. Os valores da entalpia de reação são obtidos integrando os picos a partir da linha base, como mostra a **Figura 15**.⁷¹

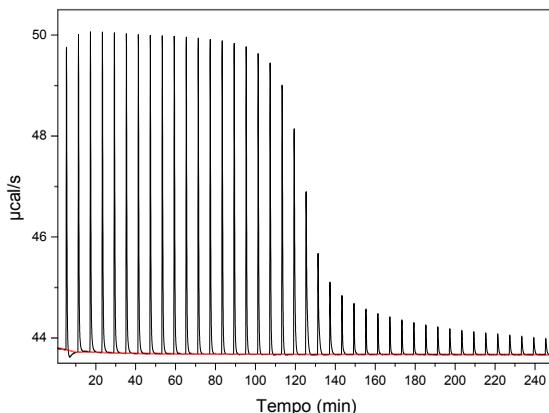


Figura 15. Variação de potência em função de injeções consecutivas de 5,0 μL de uma solução de CTABr $1,37 \times 10^{-2}$ mol/L em H_2O .

Alíquotas de 5 a 10 μL de uma solução concentrada dos surfactantes CTABr (0,5% (m/m) = $1,37 \times 10^{-2}$ mol/L ou 0,14% (m/m) = $4,11 \times 10^{-3}$ mol/L), SDS (2,0% (m/m) = $6,9 \times 10^{-2}$ mol/L) e SB3-14 (0,3% (m/m) = $8,25 \times 10^{-3}$ mol/L), foram adicionadas à cela contendo soluções de **PHA** em diferentes concentrações, ou água. O tempo entre duas injeções foi ajustado em cada corrida, sendo cerca de 10 min, sendo o tempo se refere ao tempo necessário para se atingir o equilíbrio, verificado através da linha base. A temperatura utilizada no experimento foi de 25 °C para CTABr e SDS e 35 °C para o SB3-14. Em todos os experimentos utilizou-se água desionizada Milli-Q.

3.6 Medidas de Condutividade

As titulações condutimétricas foram realizadas a 25 °C, com um condutivímetro modelo 712 da Metrohm. O procedimento de medição consiste da adição de uma solução estoque de surfactante numa célula que contém um volume apropriado de água desionizada, **PHA** ou **LHA**, mantida sob agitação. A CMC foi obtida do encontro de duas retas do gráfico de condutividade em função da concentração de surfactante.

3.7 Espectrometria de Massas

ESI/MS. Para identificar intermediários e produtos das reações, análises de ESI/MS com injeção direta foram realizadas utilizando o espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass) instalado no Laboratório ThoMson de Espectrometria de Massas do IQ/Unicamp. No equipamento, a solução reacional passa pela fonte de ionização, onde os íons são gerados e conduzidos para os analisadores de massa no interior do aparelho. As condições típicas de operação foram as seguintes: voltagem de capilar de 3kV, voltagem do cone de 8 V e temperatura de dessolvatação do gás de 100 °C. Nos experimentos com **LHA**, 1,0 mL de **BDNPP** 1×10^{-6} mol/L, em meio aquoso em pHs 8 e 9, foi misturado com **LHA/CTABr** 0,1 mol/L. Uma bomba de microsseringa foi utilizada para injetar a solução na fonte de ESI, com uma taxa de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. Nos experimentos com **ABH**, 30 μL de substrato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (em acetonitrila) foram adicionados a 470 μL de uma solução aquosa de **ABH** 0,03 mol/L em pH 10, resultando em uma concentração final de $[\text{ABH}] = 2,8 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ e $[\text{substrato}] = 3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. Nos experimentos com polímeros, 160 μL de substrato $0,05 \text{ mol/L}$ (em acetonitrila) foram adicionados a 340 μL de uma solução aquosa de **PHA** 0,015 mol/L em pH 10, resultando em uma concentração final de $[\text{PHA}] = 1,02 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ e $[\text{Substrato}] = 1,6 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$.

GC/MS. Análises de GC-MS (instrumento Shimadzu CGMS-QP5050A) foram realizadas para detectar produtos menos polares ou não iônicos no meio reacional. A reação entre **LHA** e **BDNPP** (1:1) foi acompanhada em solução aquosa a pH 9 e 25 °C por 10 min, e os produtos extraídos com éter etílico. Após a evaporação do éter, os dados de EI-MS da mistura foram obtidos usando o modo de injeção direta. As amostras foram colocadas no porta-amostra e transferidas para o instrumento. A temperatura foi aumentada a uma taxa de 10 °C/min até atingir 85 °C, até 3 min, passando a uma taxa de 20 °C/min entre 85 a 300 °C, com energia de ionização de 70 eV.

3.8 Outros Equipamentos Utilizados.

As medidas de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizadas a $25,0\text{ }^\circ\text{C}$, em D_2O , em um espectrômetro Varian Mercury Plus 400-MHz. Utilizou-se 3-(trimetilsil) propionato de sódio (TSP) como referência interna para RMN de ^1H e de ^{13}C . Os espectros de IV foram realizados em um espectrômetro Varian modelo Excalibur 3100 com transformada de Fourier equipado com um detector do tipo MCT acoplado a um microcomputador contendo um sistema de aquisição e tratamento de dados. As amostras foram analisadas à temperatura ambiente ($25\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$) utilizando KBr para infravermelho (marca Sigma). Para a análise termogravimétrica foi utilizado o Analisador Térmico marca Shimadzu modelo TGA-50 e BET da Quantachrome Instruments, modelo Autosorb-1C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

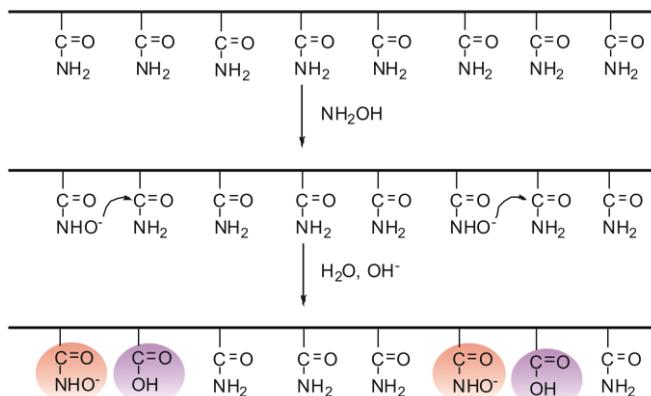
Os resultados obtidos serão mostrados e discutidos nesta seção, que está dividida em dois itens principais:

- i) A utilização de polímeros contendo os grupos funcionais ácido hidroxâmico e carboxílico, na clivagem de ésteres de fosfato e acetato. Serão discutidas a preparação e caracterização do polímero (**PHA**), seu efeito na quebra de ésteres e prováveis mecanismos envolvidos. Por fim, será analisado o modo de agregação do **PHA** com surfactantes catiônicos, aniônicos e dipolares iônicos;
- ii) O mecanismo da reação de clivagem do éster **BDNPP** na presença de co-micelas de ácido laurilhidroxâmico (**LHA**) e CTABr, estudado através de ESI-MS e ESI-MS/MS.

4.1 Obtenção e caracterização do polímero funcionalizado PHA

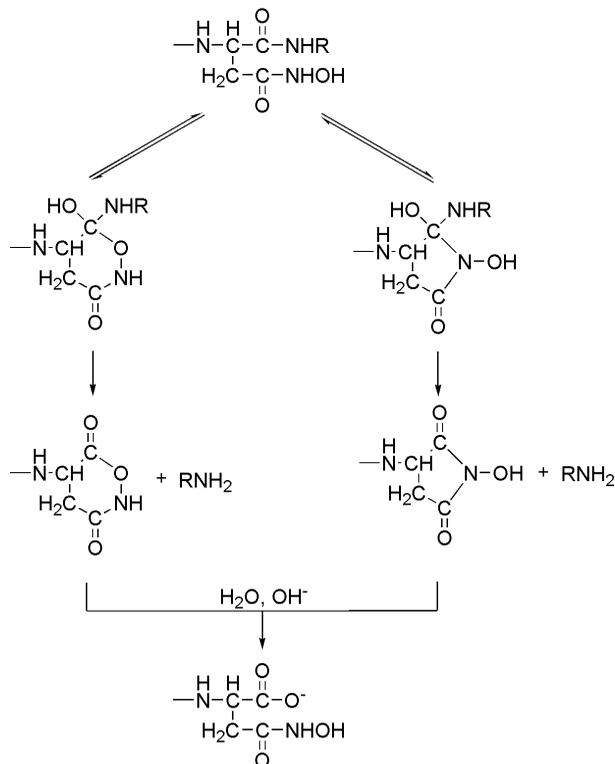
Como discutido anteriormente, enzimas são macromoléculas que contêm grupos funcionais em seu sítio ativo, com uma orientação específica responsável por tornar a catálise extremamente eficiente. Inspirado por essa eficiência, um polímero foi preparado introduzindo dois grupos funcionais distintos (ácido carboxílico, CO_2H e ácido hidroxâmico, CONH_2OH), em um esqueleto polimérico, em uma posição que se acredita ser ótima, sendo que esses grupos têm por finalidade mimetizar o sítio ativo de uma enzima. O grupo ácido hidroxâmico foi escolhido por ser um nucleófilo α , apresentando então uma maior nucleofilicidade, podendo acelerar diversos processos incluindo transferência de grupos acila e fosforila.^{85, 89} O grupo ácido carboxílico foi escolhido já que é conhecido por atuar como uma base geral em vários processos como, por exemplo, na quebra do diéster **BDNPP** pela hidroxilamina.²⁵ Além disso, estão presentes em vários sítios ativos de enzimas, incluindo a quimotripsina⁹³ e tripsina.¹⁷

Na síntese do polímero **PHA**, os grupos amida da poliacrilamida (PAA) foram convertidos em ácidos carboxílico e hidroxâmico (**Esquema 22**).



Esquema 22

A metodologia utilizada permitiu o posicionamento de um grupo próximo ao outro e isso porque, em excesso de hidroxilamina, o ácido hidroxâmico formado ataca o grupo amida próximo a ele, formando o grupo ácido carboxílico. Isso é extremamente interessante quando se tem por objetivo avaliar o efeito cooperativo entre grupos funcionais presentes na mesma molécula.⁹⁴ O processo envolvido na formação do ácido carboxílico foi reportado por Blodgett e colaboradores, que observaram que em alguns peptídeos contendo o resíduo ácido hidroxâmico, na presença de excesso de hidroxilamina, o grupo ácido hidroxâmico formado ataca a amida, gerando intermediários tetraédricos que se quebram formando o ácido carboxílico (**Esquema 23**).⁹⁴



Esquema 23. Formação do grupo carboxílico na reação de um peptídeo contendo grupo ácido hidroxâmico em excesso de hidroxilamina.⁹⁴

A influência do tempo na preparação do **PHA** foi avaliada através de titulação potenciométrica e está mostrada na **Tabela 2**. A modificação do PAA e a formação dos grupos carboxílicos e hidroxâmicos foram quantificados e observou-se que a conversão aumenta com o aumento do tempo de reação. O grau de conversão mais alto foi observado para a reação (3), que apresentou 28% de grupos carboxílicos e 72% de hidroxâmicos.

Tabela 2. Parâmetros usados na síntese do PHA.

Reação*	1	2	3
Tempo (dias)	1	3	10
% de conversão	10	16	23
% ácido carboxílico	66	58	28
% ácido hidroxâmico	34	42	72

Testes a fim de avaliar o efeito catalítico de cada um desses polímeros na clivagem do éster ácido 2-acetoxi-1-naftóico (**2-Ac**) mostraram que o polímero da reação (2) foi o mais eficiente relativo a quantidade de matéria em mols do grupo ácido hidroxâmico presente (**Tabela 3**) e por esse motivo todos os testes de efeito catalítico foram realizados com esse polímero. Além disso, o polímero obtido da reação (2) foi o que apresentou quantidade dos dois grupos funcionais com aproximadamente a mesma proporção (1:1), o que é interessante para avaliar o efeito de cooperatividade entre os grupos funcionais.

Tabela 3. Constantes de velocidade observadas para a reação de clivagem dos ésteres **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac**, na presença de **[PHA]** = $1,33 \times 10^{-2}$ mol/L, pH 10, a 25 °C.

Reação	k_{obs}/s^{-1}	$k_{obs}/n_{hidroxâmico}$
	2-Ac	2-Ac
1 (1 dia)	$1,50 \times 10^{-4}$	33,2
2 (3 dias)	$2,10 \times 10^{-3}$	234,0
3 (10 dias)	$3,64 \times 10^{-3}$	165,4

quantidade de base necessária para neutralizar o ácido (dpH/da). No gráfico mostrado no detalhe da **Figura 16** observam-se três picos, sendo que o primeiro corresponde à neutralização do ácido adicionado no início da titulação (P_i), o segundo à desprotonação dos grupos ácido carboxílico (P_a) e o terceiro à desprotonação dos grupos ácido hidroxâmico (P_h). Através das **Eq. 6(a)** e **6(b)** obtém-se a porcentagem de cada grupo no polímero.

$$\% \text{ Ácido Carboxílico} = \frac{P_a - P_i}{P_h - P_i} * 100 \quad \text{Eq. 6(a)}$$

$$\% \text{ Ácido Hidroxâmico} = \frac{P_h - P_a}{P_h - P_i} * 100 \quad \text{Eq. 6(b)}$$

O pK_a do ácido acrílico é 4,76, entretanto o valor de pK_a obtido para os grupos ácidos carboxílicos no polímero foi 6,1.⁹⁵ Languécir e colaboradores realizaram experimentos de titulação potenciométrica do poli(ácido acrílico) de diversas massas molares que mostraram que o aumento da repulsão eletrostática entre os monômeros carregados ao longo da cadeia tem um papel fundamental nas propriedades ácido-base do polieletrólito. Nesse estudo, foi observado um decréscimo de K_a com o aumento do grau de ionização, o que foi atribuído à presença de cargas vicinais que são responsáveis por tornar a ionização mais difícil.⁹⁵ Efeito semelhante pode ser observado nos sítios ativos de enzimas, onde grupos ácidos frequentemente possuem valores de pK_a s diferentes de seus valores em água dependendo do ambiente em que se encontram, isto é, de quais grupos estão em sua proximidade.¹⁷

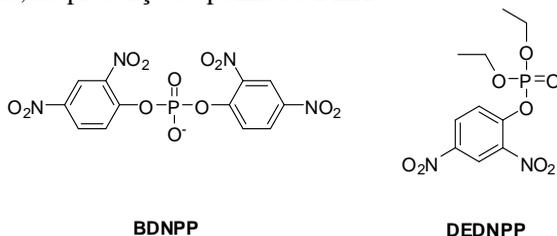
Os polímeros também foram caracterizados através de espectroscopia no IV, ESI-MS, TGA, RMN de ^1H e de ^{13}C e alguns desses resultados encontram-se no apêndice. Entretanto, devido à baixa conversão dos grupos amida em grupos ácidos carboxílico e hidroxâmico, os espectros de IV, RMN e ESI-MS do reagente de partida e produtos apresentaram pouca ou nenhuma diferença.

4.2 Clivagem de ésteres pelo polímero funcionalizado PHA

O polímero **PHA** foi avaliado quanto à sua eficiência em acelerar reações de clivagem de ésteres de vários tipos. Nesta primeira seção são mostrados e discutidos os resultados obtidos nas reações de clivagem de ésteres de fosfato mediados pelo **PHA**. Nos tópicos seguintes o tratamento dos resultados obtidos nas reações de hidrólise dos ésteres de ácidos carboxílicos e de ácidos hidroxi-naftóicos são apresentados.

4.2.1 Reação de desfosforilação de ésteres de fosfato

Muito já se sabe sobre a importância de se estudar o mecanismo de reações de desfosforilação de ésteres de fosfato. Neste trabalho, estudaram-se as reações envolvendo o diéster bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) e o triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), **Esquema 25**, na presença do polímero **PHA**.



Esquema 25

4.2.1.1 Cinética de Reação do BDNPP

A constante de velocidade para a reação de quebra em água do diéster **BDNPP** é consideravelmente lenta (na ordem de 10^{-7} s^{-1} , o que é equivalente a cerca de 1 ano para 10 tempos de meia-vida).⁸⁷ Inúmeros estudos têm se concentrado na tentativa de aumentar a velocidade dessa reação, principalmente porque o **BDNPP** é amplamente utilizado para mimetizar diésteres de fosfato biologicamente importantes, como DNA e RNA.^{84, 96}

As reações do **BDNPP** na presença do **PHA** foram seguidas pelo aumento da absorbância em 400 nm e a **Figura 17** ilustra a variação espectral para a reação. Em todos os casos houve a liberação de

mais de 1,5 mols de 2,4-dinitrofenol (DNP) como principal produto. Entretanto, outro produto que absorve em cerca de 360 nm foi observado, sendo formado mais rapidamente numa reação complexa de duas etapas, como mostra a **Figura 17**.

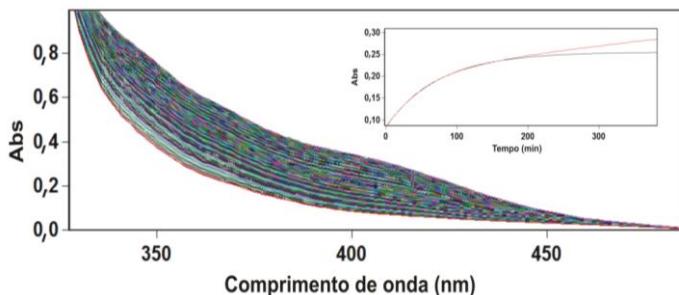


Figura 17. Variação espectral de UV/Vis da mistura reacional de **BDNPP** ($1,33 \times 10^{-5}$ mol/L) e **PHA** 0,013 mol/L em água, pH 10 e 25 °C. No detalhe está mostrado a variação da absorbância em função do tempo em 400 nm.

Os perfis de pH para a reação do **BDNPP** com **PHA** e em H_2O ,⁸⁷ para fins comparativos, estão mostrados na **Figura 18**. Na região de maior pH, observa-se que a constante de velocidade da reação é aproximadamente 10^3 vezes maior do que para a reação em água do **BDNPP**, o que significa que o tempo da reação decresce para 5 horas quando o **PHA** está presente. Na faixa ácida de pH, os efeitos são ainda maiores e o tempo de reação reduz de cerca de 1 ano para 1 dia. A curva da **Figura 18** foi ajustada utilizando a **Eq. 2**, que considera a reação em água do **BDNPP** (k_0). A contribuição do nucleófilo no aumento de velocidade da reação é quantificada através dos termos relacionados às formas neutra (k_N), monoprotonada (k_M) e desprotonada (k_D) do **PHA**, além das constantes de ionização para os grupos do polímero K_{a1} e K_{a2} para a formação dessas espécies, de acordo com o **Esquema 26**.

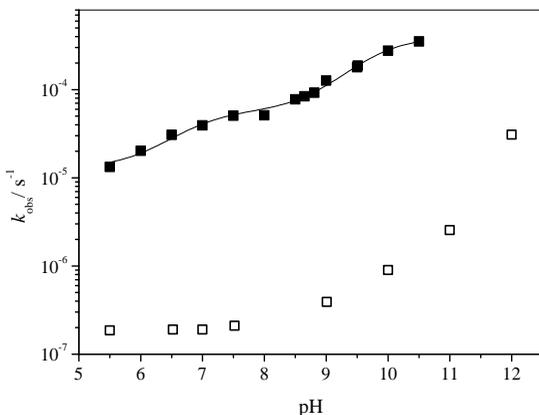
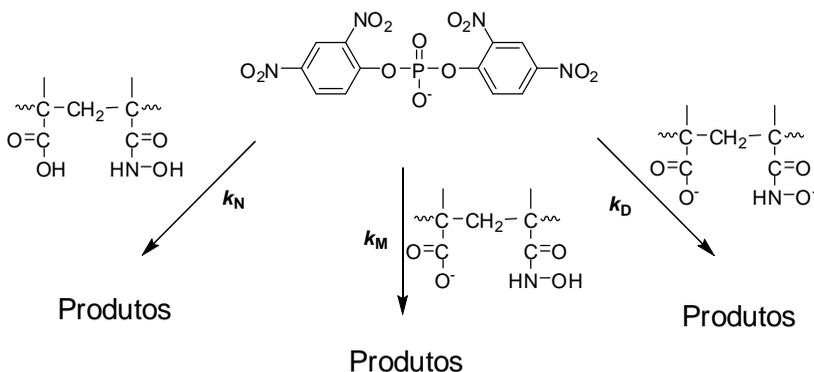


Figura 18. Perfil de pH para a reação de **BDNPP** ($1,33 \times 10^{-5}$ mol/L) com H_2O (\square) e com **PHA** 0,013mol/L (\blacksquare), a 25 °C. A linha teórica foi traçada utilizando a Eq. 7.



Esquema 26

$$k = k_o + k_{OH}[OH^-] + k_N \chi_{COOH} \chi_{NHOH} + k_M \chi_{COO^-} \chi_{NHOH} + k_D \chi_{COO^-} \chi_{NHO^-}$$

Eq. 7

Os valores das constantes de velocidade obtidas através do ajuste dos dados experimentais do perfil de pH (**Figura 18**), com a **Eq. 7** e **Esquema 26**, estão apresentados na **Tabela 4**. Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} , 6,1 e 9,2, respectivamente, para as dissociações do **PHA** foram

obtidas através de titulação potenciométrica (item 4.1) e mantidos invariáveis no ajuste das curvas.

Tabela 4. Constantes de velocidade, de primeira e segunda ordem, para a reação de **BDNPP** na presença e ausência de **PHA** 0,013 mol/L e duração de 10 tempos de meia-vida.

	PHA		ABH ⁸⁵	
	s ⁻¹	Lmol ⁻¹ s ⁻¹	10 t _{1/2}	Lmol ⁻¹ s ⁻¹
k_0, s^{-1}	2,9x10 ⁻⁷	9,5x10 ⁻⁹	9 meses	-
k_N, s^{-1}	8,0x10 ⁻⁶	-	8 dias	-
k_M, s^{-1}	4,0x10 ⁻⁵	0,033	1 dia	-
k_D, s^{-1}	3,0x10 ⁻⁴	0,33	4 horas	0,261

Analisando os valores da **Tabela 4**, pode se observar que k_0 , a constante de velocidade para a reação em água do **BDNPP**, é muito pequena e, por isso, pode ser desconsiderada. Através da **Figura 18**, fica evidente que o efeito catalítico promovido pela espécie OH⁻ também pode ser negligenciado na faixa de pH estudada. As constantes de velocidade de segunda ordem foram obtidas dividindo as constantes de velocidade observada, k_M e k_D , pela quantidade de matéria em mols dos grupos ácido carboxílico (9,3%) e ácido hidroxâmico (6,7%), respectivamente. Nota-se, comparando os valores de k_D e k_0 , que quando o **PHA** está presente na forma desprotonada observa-se um aumento expressivo na velocidade da reação de cerca de 3x10⁷ vezes.

A **Tabela 4** também mostra as constantes de segunda ordem para a reação de clivagem do **BDNPP** na presença do também nucleófilo α ácido benzoidroxâmico (ABH).⁸⁵ De fato, na **Figura 19**, observa-se que a eficiência do **PHA** é comparável com a do ABH em pHs maiores do que os pK_as dos nucleófilos (pK_as do ABH e **PHA** = 9,16 e 9,2, respectivamente). Entretanto, o **PHA** se mostrou mais reativo que o ABH em pHs menores que 9, onde os grupos hidroxâmicos dos

dois nucleófilos estão protonados, porém o grupo carboxílico do **PHA** está desprotonado.

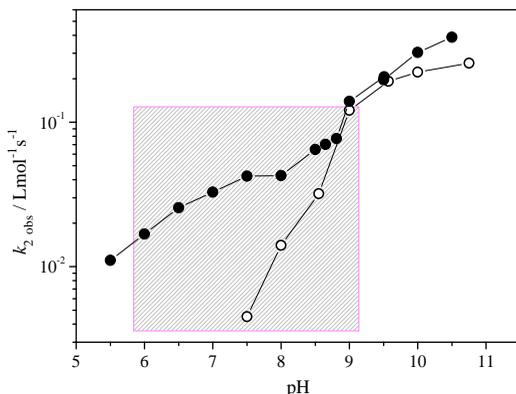


Figura 19. Constantes de velocidade de segunda ordem observadas em função do pH para a reação de clivagem do **BDNPP** pelo **PHA** (●) e **ABH** (○).⁸⁵ As constantes foram normalizadas de acordo com a concentração de grupos funcionais presentes na reação.

Esses resultados sugerem que, na faixa de pH entre 6 e 9, em que a espécie monoprotonada é predominante, o mecanismo pode ocorrer através do ataque direto do grupo carboxilato no **BDNPP** (caminho **(A)** - **Figura 20**), e/ou através de uma catálise básica, assistida pelo oxigênio do grupo carboxilato, que auxilia o ataque do grupo ácido hidroxâmico, aumentando sua nucleofilicidade (caminho **(B)** - **Figura 20**).

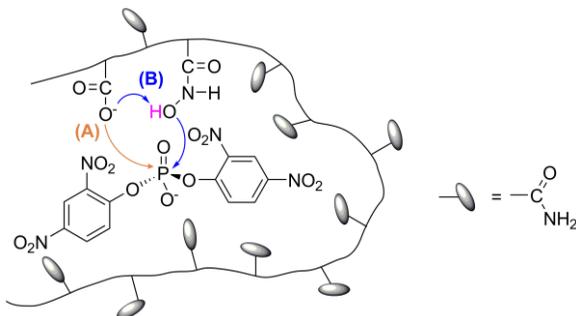


Figura 20. Mecanismo proposto para a catálise básica geral do grupo carboxilato na clivagem do **BDNPP** pelo **PHA**.

A constante de segunda ordem para o ataque do **PHA** (na sua forma mono protonada, PHA^- , e desprotonada, PHA^{2-}) no **BDNPP** foi comparada com os valores obtidos da literatura para as reações de outros nucleófilos com ataque no fósforo do **BDNPP**, através de um gráfico de Brönsted. A **Figura 21** mostra que a reatividade do **PHA** é maior que a de nucleófilos tais como hidroxilamina e seus derivados metilados. Entretanto, o valor de k_2 utilizado para o **PHA** abrange o ataque no carbono e no fósforo, conforme será discutido no próximo item, e, por essa razão, está mais acima que os outros nucleófilos α . Nota-se que, embora o coeficiente angular da linha de Brönsted não seja muito diferente da das reações com H_2O e HO^- , a reatividade dessas reações são cerca de 2000 vezes menor que a dos nucleófilos α .

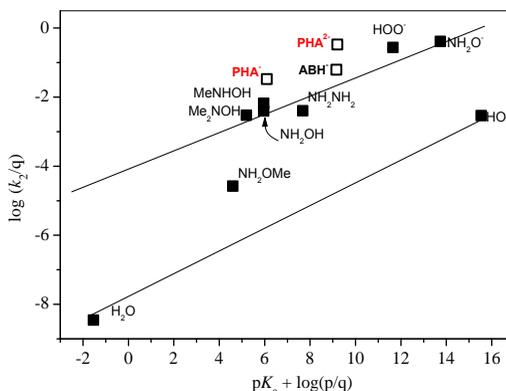


Figura 21. Gráfico logarítmico das constantes de velocidade em função dos valores de pK_a para reações com **BDNPP**. As constantes de velocidade e os valores de pK_a são corrigidos estatisticamente,⁹⁷ (■) valores encontrados na literatura⁹⁶ e (□) para ABH ⁸⁵ e PHA^- e PHA^{2-} (formas mono protonada e desprotonada, respectivamente).

O polímero poli(ácido acrílico) de massa molar 5.000 g/mol, em pH 10, também foi testado na clivagem do **BDNPP**, porém a reação foi lenta e 3 dias não foram suficientes para se obter a constante de velocidade. Entretanto, esse resultado não indica que o grupo carboxilato não está atuando como nucleófilo na reação entre **PHA** e **BDNPP**, entre pH 6-9. Considerando que o poli(ácido acrílico) tem grupos carboxílicos ao longo de toda sua cadeia e todos esses grupos

estão desprotonados, o substrato **BDNPP**, que também é carregado negativamente, pode estar sendo repellido, dificultando a aproximação do nucleófilo ao substrato. Como mencionado anteriormente, essa é a vantagem de se ter poucos grupos funcionais nucleofílicos distribuídos no esqueleto polimérico, o que cria um ambiente adequado para posicionar o substrato.

O efeito da concentração do **PHA** na clivagem do **BDNPP** está apresentado na **Figura 22**, e os dados foram ajustados com uma equação linear (**Eq. 8**) na qual o intercepto é k_o e o coeficiente angular obtido ($2,1 \times 10^{-2} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$) é a constante de segunda ordem k_2 . Porém, como discutido acima, esse é um valor menor do que o real uma vez que o número de grupos funcionais é relativamente pequeno. Corrigindo a concentração do nucleófilo em termos do número de sítios ativos, se obtém um valor para k_2 de $0,31 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esse valor é um pouco superior ao observado para a reação do **ABH** com **BDNPP** ($0,26 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$).⁸⁵

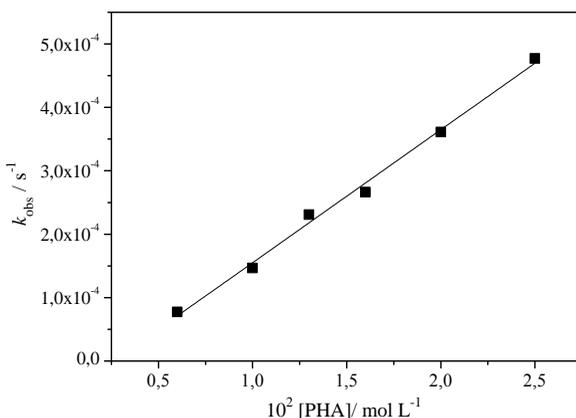
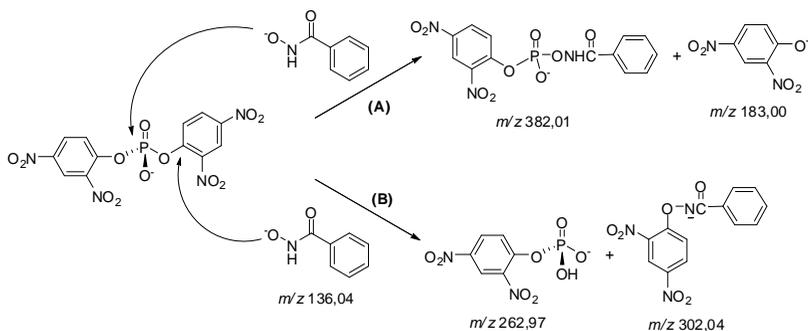


Figura 22. Perfil de concentração de **PHA** na clivagem do **BDNPP**, em pH 10, a 25 °C.

$$k_{\text{obs}} = k_o + k_2 * [\text{PHA}] \quad \text{Eq. 8}$$

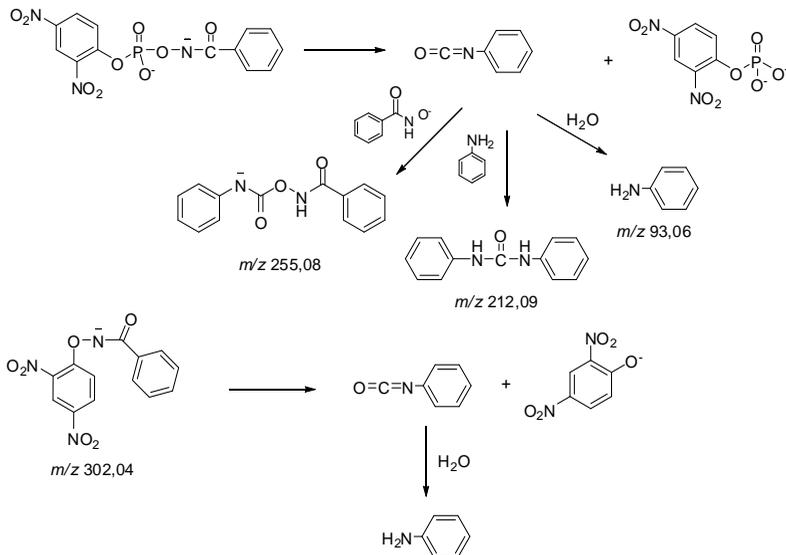
Proposta Mecanística para a Reação entre BDNPP e PHA

Como sugere a **Figura 17**, além do DNP, outro produto que absorve em cerca de 360 nm foi observado se formando mais rapidamente numa reação complexa de duas etapas.⁸⁵ Estudos anteriores ajudaram a elucidar o mecanismo de reação entre o ânion benzoidroxamato (ABH⁻) e **BDNPP** e os produtos foram identificados através de espectrometria de massas e RMN de ¹H. De acordo com os resultados, o ataque nucleofílico do ABH⁻ pode seguir dois caminhos reacionais: **(A)** ataque no fósforo, gerando um intermediário instável de *m/z* 382, que não foi detectado e **(B)** ataque no carbono aromático, gerando um intermediário de *m/z* 302 que foi detectado. Esses dois caminhos estão ilustrados no **Esquema 27**.⁸⁵



Esquema 27

O intermediário fosforilado formado a partir do ataque do ABH⁻ no átomo de fósforo sofre rearranjo de Lossen e permite formar fenil isocianato, anilina, difeniluréia, e *o*-fenilcarbamilbenzohidroxamato. O intermediário detectado formado no ataque do ABH⁻ no carbono aromático se decompõe formando 2,4-dinitrofenolato e outros produtos semelhantes aos do rearranjo de Lossen (**Esquema 28**).



Esquema 28

A espectrometria de massas também foi utilizada para tentar identificar os produtos da reação entre o **BDNPP** e o **PHA**, porém os resultados não foram tão óbvios como no caso da reação com **ABH**. Como se trata de um polímero, as possibilidades de quebra são muitas, o que dificulta a atribuição dos picos. Além disso, existe a dificuldade adicional de que apenas 16% dos grupos do **PHA** podem reagir com **BDNPP**, o que torna a quantidade de intermediários e produtos pequena em comparação com os reagentes. Entretanto a variação na absorbância em função do tempo e o perfil das constantes de velocidade em função do pH indicam que a reação do **PHA** com **BDNPP** possui o mesmo mecanismo do observado para o **ABH** com **BDNPP**.

4.2.1.2 Cinéticas de reação do **DEDNPP**

Conforme discutido na introdução (item 1.1), os triésteres são, em muitos casos, os mais reativos dos ésteres de fosfato e as constantes de velocidade observadas para essas reações são muito superiores às observadas para os diésteres equivalentes. Uma consequência desse fato é a sua alta toxicidade, o que justifica o enorme número de estudos que

visam i) encontrar compostos que degradem completamente esses ésteres e ii) melhor compreender seu mecanismo de hidrólise.

As reações do dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**) com **PHA** foram seguidas pelo aumento da absorbância em 400 nm e a **Figura 23** ilustra a variação espectral para a reação.

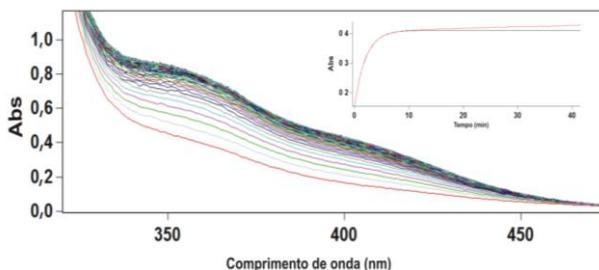


Figura 23. Variação espectral de UV/Vis da mistura reacional de **DEDNPP** ($6,67 \times 10^{-5}$ mol/L) e **PHA** 0,013 mol/L em água, pH 10 e 25 °C. No detalhe está mostrado a variação da absorbância em função do tempo em 400 nm.

Os perfis de pH para as reações de degradação do triéster **DEDNPP** na presença de **PHA** e H_2O ⁸⁸ estão mostrados no **Figura 24**, em que a curva teórica foi ajustada utilizando a **Eq. 7**, que considera a contribuição da reação de hidrólise espontânea (k_o). Como no caso do **BDNPP**, a contribuição do nucleófilo na catálise da reação é quantificada através dos termos relacionados às formas neutra (k_N), monoprotonada (k_M) e desprotonada (k_D) do **PHA**, além das constantes de dissociação do polímero K_{a1} e K_{a2} para a formação dessas espécies. Os valores obtidos com o ajuste da **Eq. 7** e os parâmetros utilizados estão apresentados na **Tabela 5**. Dividindo-se os valores de k_D e k_M pela concentração dos grupos ácidos hidroxâmico e carboxílico do **PHA**, respectivamente, se obtém as constantes de segunda ordem. Comparando o valor de k_D com a constante de segunda ordem para a reação espontânea, nota-se um aumento de aproximadamente 10^8 vezes. Ainda, quando se compara k_D para a reação de **DEDNPP** com hidroxilamina ($2,65 \times 10^{-1}$ Lmol⁻¹s⁻¹), se conclui que a constante de velocidade de segunda ordem para a reação do **PHA** é aproximadamente 60 vezes maior do que a obtida para a hidroxilamina, o que representa um efeito bastante expressivo.⁸⁸

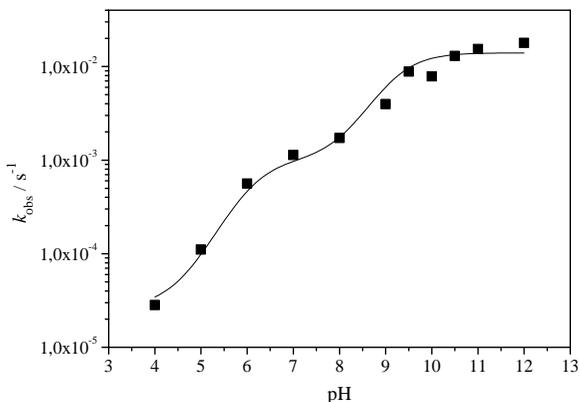


Figura 24. Perfil de pH para a clivagem do **DEDNPP** por 0,013 mol/L de **PHA**, a 25 °C. A curva teórica foi gerada através do ajuste dos pontos experimentais, utilizando a Eq. 7.

Tabela 5. Constantes de velocidade obtidas para a reação de **DEDNPP** na presença e ausência de **PHA** 0,013mol/L.

	s^{-1}	$Lmol^{-1}s^{-1}$
k_o	$6,9 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-7}$
k_N	$2,0 \times 10^{-5}$	-
k_M	$1,0 \times 10^{-3}$	0,83
k_D	$1,4 \times 10^{-2}$	15,6

A **Figura 25** mostra o efeito da concentração do **PHA** na clivagem do **DEDNPP** e os dados foram ajustados com uma equação linear e o coeficiente angular obtido, $0,60 Lmol^{-1}s^{-1}$ é a constante de segunda ordem. Porém, normalizando as constantes observadas em função da concentração de cada nucleófilo presente obtém-se um coeficiente angular de $9,01 Lmol^{-1}s^{-1}$.

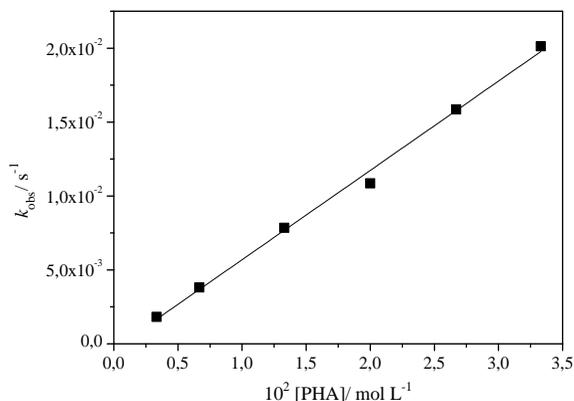


Figura 25. Perfil de concentração de **PHA** na clivagem do **DEDNPP**, em pH 10, a 25 °C.

Proposta mecanística para a reação entre **DEDNPP** e **PHA**

Conforme comentado anteriormente para a reação entre **BDNPP** e **PHA**, existe dificuldade para identificar os produtos da reação, já que o nucleófilo está ancorado num polímero. Por isso, o **ABH** foi utilizado para esse fim, e a reação desse α -nucleófilo com **DEDNPP** foi estudada através de ESI-MS para identificação dos produtos, assumindo que o mecanismo deva ser o mesmo para as reações do éster de fosfato com **PHA** e **ABH**. Na **Figura 23**, observa-se que outro produto que absorve em cerca de 360 nm foi formado mais rapidamente numa reação complexa de duas etapas, como observado para o **BDNPP**.

Estudos realizados no grupo LACFI levaram à conclusão que na reação do **DEDNPP** com hidroxilamina o ataque do nucleófilo ocorre predominantemente no fósforo e não apresenta contribuição significativa de ataque no anel aromático.^{88, 98} A **Figura 26** mostra um espectro, no modo negativo, característico da reação do **DEDNPP** e **ABH**, em que reagentes, intermediários e produtos são transferidos da solução para a fase gasosa e detectados por ESI-MS. Nesse espectro notam-se os ânions chave como ABH^- de m/z 136, dinitrofenol de m/z 183 e dietilfosfato de m/z 153. Além desses, o ataque do ABH^- ao anel pode ser observado pela detecção do ânion de m/z 302. O ânion de m/z 255 corresponde à forma aniônica do derivado carbamílico (**Esquema**

28) do rearranjo de Lossen do intermediário formado através do ataque do hidroxamato ao fósforo.

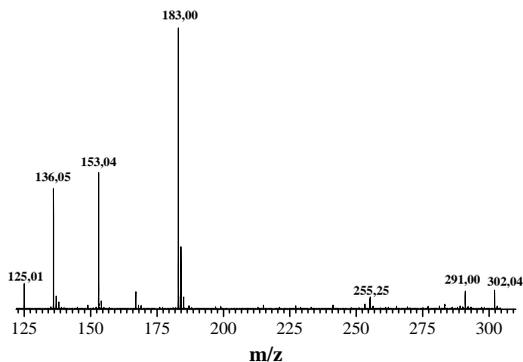
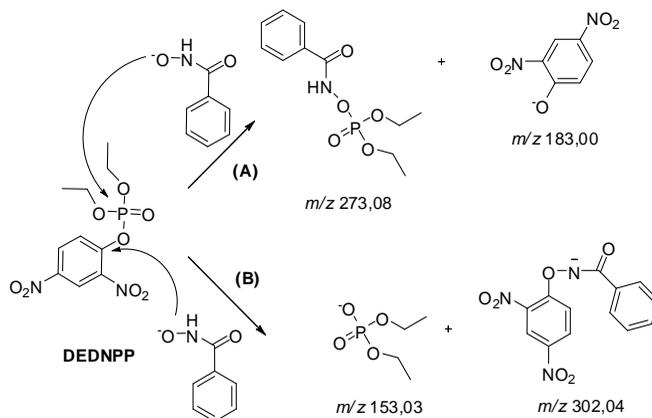


Figura 26. ESI-MS da reação do **ABH** com **DEDNPP** em pH 10, a 25 °C.

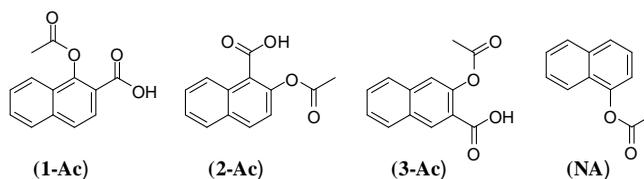
Com isso, conclui-se que a reação entre o triéster e o ABH também segue os caminhos observados com o **BDNPP**: **(A)** ataque no fósforo e **(B)** ataque no carbono do anel aromático, como mostra o **Esquema 29**. Contudo, o intermediário fosforilado aniônico de m/z 272 não foi identificado, provavelmente devido à sua baixa estabilidade. No caso da reação entre hidroxilamina e **DEDNPP**, por RMN de ^{31}P , houve somente a identificação do dietilfosfato, como produto da reação e o intermediário fosforilado também não foi detectado, nem mesmo em experimentos conduzidos a baixas temperaturas.⁸⁸



Esquema 29. Ataque nucleofílico do ABH⁻ no (A) fósforo e no (B) carbono do anel aromático do DEDNPP.

4.2.2 Reação de clivagem de ésteres carbóxi-naftóicos

As estruturas dos ésteres ácido 1-acetoxi-2-naftóico (**1-Ac**), ácido 2-acetoxi-1-naftóico (**2-Ac**), ácido 3-acetoxi-2-naftóico (**3-Ac**) e acetato de naftila (**NA**) estão mostradas no **Esquema 30**.



Esquema 30

As reações desses ésteres na presença do PHA foram seguidas pelo aumento da absorbância em 338 nm e a **Figura 27** ilustra a variação espectral para a reação do **1-Ac** com PHA.

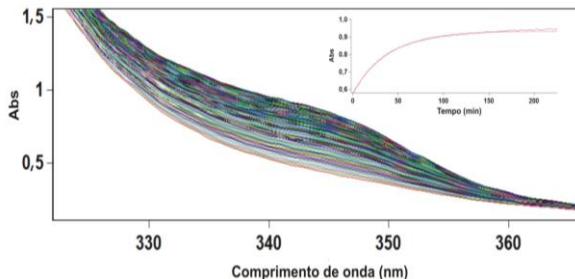


Figura 27. Variação espectral de UV/Vis da mistura reacional de **1-Ac** ($6,67 \times 10^{-5}$ mol/L) e **PHA** 0,013 mol/L em água, pH 10 e a 25 °C. No detalhe está mostrada a variação da absorvância em função do tempo em 338 nm.

Na **Figura 28** estão apresentados os dados cinéticos da reação de clivagem do **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac** a 25 °C. Para fim de comparação, o gráfico também mostra o perfil de pH dos substratos na ausência de **PHA**, na mesma temperatura e força iônica (μ) = 1,0. Notam-se, em todos os casos, efeitos catalíticos significativos quando se comparam as constantes de velocidade na ausência e presença do **PHA**.

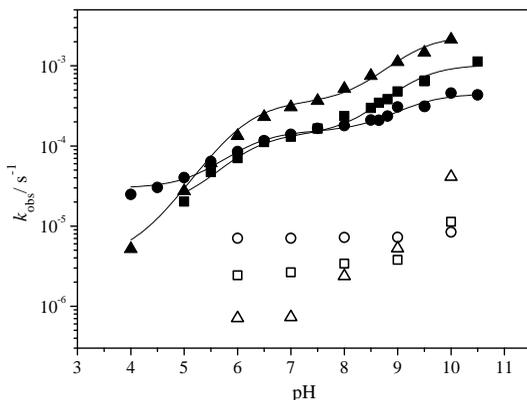
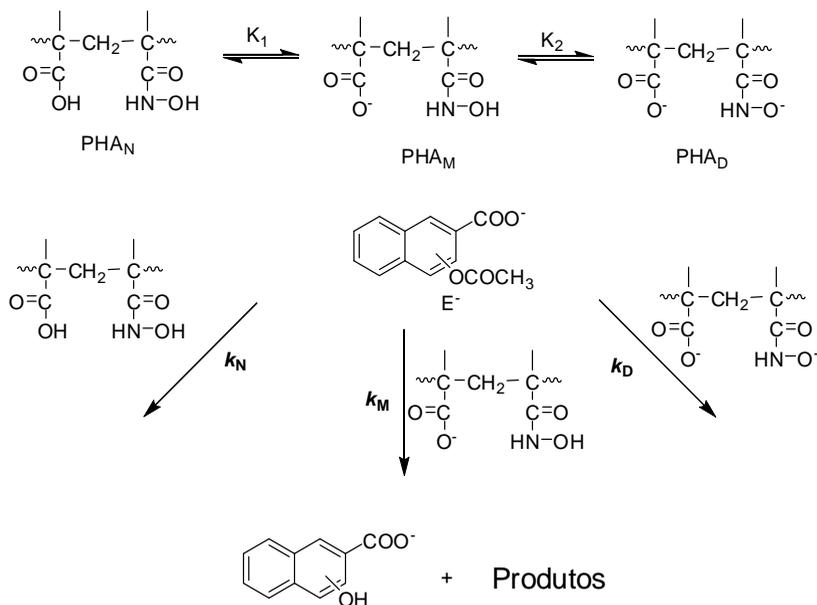


Figura 28. Perfil de pH para a degradação de **3-Ac** (■), **2-Ac** (▲) e **1-Ac** (●), na presença de **PHA** 0,013mol/L e a reação de hidrólise na ausência de **PHA**, **3-Ac** (□), **2-Ac** (△) e **1-Ac** (○), a 25 °C. As curvas teóricas foram traçadas utilizando a Eq. 7.

Para os cálculos das constantes k_N , k_M , k_D e k_o foi utilizada a **Eq. 7**, mostrada na seção anterior, obtida com base no **Esquema 31**. Através da **Figura 28**, fica evidente que o efeito catalítico promovido pelo íon hidróxido pode ser negligenciado na faixa de pH estudada.



Esquema 31

A **Tabela 6** apresenta as constantes de velocidade de primeira e de segunda ordem para as reações. Comparando a constante de velocidade de segunda ordem para a reação espontânea com a da reação quando **PHA** está presente na sua forma monoprotonada (k_M), observa-se um aumento de aproximadamente 2×10^6 , $1,6 \times 10^7$ e 1×10^6 vezes na velocidade da reação para as reações com **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac**, respectivamente. Quando se compara a constante de velocidade para a reação com **PHA** na sua forma desprotonada (k_D), observa-se um aumento de 7×10^6 , $1,5 \times 10^8$ e $1,3 \times 10^7$ vezes para **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac**, respectivamente, comparado com a constante de velocidade da reação espontânea.

Tabela 6. Constantes de velocidade de primeira e segunda ordem para a reação de **3-Ac**, **2-Ac** e **1-Ac** na presença e ausência de **PHA** 0,013mol/L.

	s^{-1}			$Lmol^{-1}s^{-1}$		
	1-Ac	2-Ac	3-Ac	1-Ac	2-Ac	3-Ac
k_o	$3,57 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$4,69 \times 10^{-6}$	$6,4 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^{-8}$	$8,5 \times 10^{-8}$
k_N	$2,6 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	-	-	-
k_M	$1,5 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-4}$	0,125	0,292	0,117
k_D	$4,5 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	0,494	2,67	1,14

O efeito da concentração de **PHA** nas reações de clivagem do **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac** está mostrado na **Figura 29**, podendo-se observar um perfil linear na faixa de concentração estudada. Os dados foram ajustados com uma equação linear, na qual se fixou os interceptos (k_o) como $3,57 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-6}$ e $4,69 \times 10^{-6} s^{-1}$ para **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac**, respectivamente, e os coeficientes angular obtidos foram 0,026, 0,068 e 0,037 $Lmol^{-1}s^{-1}$, que são as constantes de velocidade de segunda ordem. Porém, considerando que somente 6,7% dos grupos correspondem ao α -nucleófilo hidroxâmico, e normalizando as constantes observadas em função da concentração de cada nucleófilo presente, e fixando os mesmos interceptos (k_o), se obtém os valores dos coeficientes angulares 0,40, 1,01 e 0,57 $Lmol^{-1}s^{-1}$, para **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac**, respectivamente.

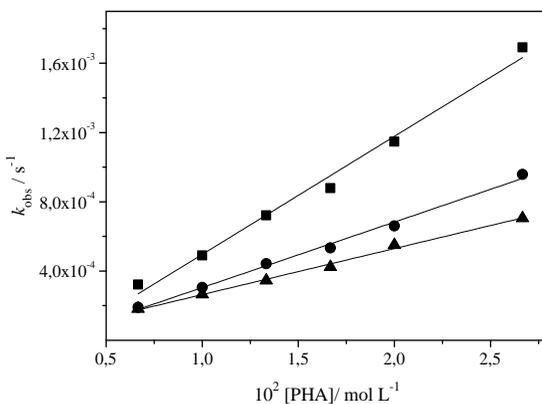
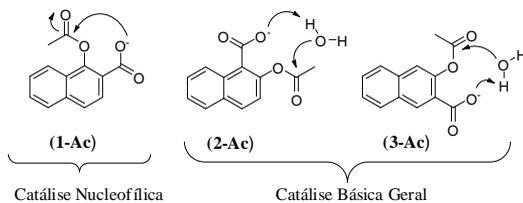


Figura 29. Efeito da concentração de **PHA** nas reações com **1-Ac** (\blacktriangle), **2-Ac** (\blacksquare) e **3-Ac** (\bullet), a 25°C e pH=10.

Estudos recentes efetuados por Souza avaliaram a catálise intramolecular na reação de clivagem desses ésteres naftóicos.⁸⁶ Os resultados cinéticos mostraram que no caso dos três ésteres, efeitos catalíticos puderam ser atribuídos tanto à catálise básica específica quanto à ácida específica. O éster **2-Ac** foi o único que se mostrou mais reativo na forma protonada, enquanto que para o **1-Ac** e **3-Ac**, observou-se um aumento de velocidade a partir de pH 2, sendo um indício de que o grupo carboxilato está atuando como um catalisador da reação. De fato, em pH 7, as constantes de velocidade podem ser até 430 vezes maiores que as constantes observadas para a hidrólise de acetato de fenila, o que torna claro a importância do grupo COO^- na catálise das reações de hidrólise desse tipo de ésteres. Além disso, constatou-se através de experimentos de efeito isotópico do solvente, incorporação de oxigênio 18 e dos parâmetros de ativação, que o grupo COO^- atua como base geral catalisando o ataque de uma molécula de água nos ésteres **2-Ac** e **3-Ac**. No caso do **1-Ac**, o grupo COO^- atua como um nucleófilo que ataca a carbonila do éster (**Esquema 32**), sendo que a contribuição do ataque nucleofílico na constante de velocidade é superior à da catálise básica.⁸⁶



Esquema 32⁸⁶

Corroboraram esses resultados as superfícies de energia potencial em função dos ângulos diedros formados entre os grupos carboxilato e éster e o plano médio do anel para os ésteres **1-Ac** e **3-Ac**. Enquanto que para o **3-Ac**, o grupo éster é praticamente livre para rotacionar, para o **1-Ac**, observou-se que o “grupo éster tem a rotação impedida por interação repulsiva com o H_α do anel lateral, favorecendo a permanência em uma posição que favorecerá o ataque nucleofílico intramolecular”. O nível de cálculo utilizado foi o B3LYP/6-31+G(d)/SCRF-PCM.⁸⁶

Pode-se assim propor no caso da reação na presença do **PHA**, que o grupo COO^- pode de fato contribuir com a catálise na reação de hidrólise. A questão é: em qual extensão? Se nas reações na ausência de **PHA**, o **1-Ac** é clivado mais rapidamente pelo fato da reação proceder por ataque nucleofílico, esperar-se-ia que se o grupo COO^- oferecesse a mesma contribuição nos casos de todos os ésteres, na presença do **PHA**, a hidrólise do **1-Ac** também seria a mais rápida. O perfil de pH apresentado na **Figura 28** mostra que as reações de hidrólise do **2-Ac** e **3-Ac** na presença de **PHA** são mais rápidas que as reações do **1-Ac** o que podem indicar que o grupo COO^- contribui mais nas reações de hidrólise dos substratos **2-Ac** e **3-Ac**.

É importante lembrar que, diferentemente do substrato **BDNPP**, discutido na seção 4.1.2, os ésteres aqui tratados possuem um grupo funcional, nesse caso o carboxilato, que assiste através de uma catálise intramolecular. O efeito desse grupo carboxilato foi avaliado comparando o efeito catalítico do **PHA** com esses substratos (contendo o grupo carboxilato) com o efeito catalítico do **PHA** na hidrólise do acetato de naftila ($k = 4,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), substrato que não contém o grupo carboxilato. Foi observado que a reação com **1-Ac**, um substrato que contém o carboxilato é 12 vezes mais rápida que a reação com o acetato de naftila (**NA**). As reações com **3-Ac** e **2-Ac** são 30 e 60 vezes, respectivamente, mais rápidas que a reação com acetato de naftila, corroborando a idéia de que o grupo ácido carboxílico tem um papel fundamental nas reações estudadas assim como sua posição na molécula.

Proposta Mecanística para a Reação entre Ésteres Carboxi-Naftóicos e **PHA**

Como nas reações discutidas anteriormente, o **ABH** também foi utilizado para tentar identificar os produtos da reação entre os ésteres naftóicos **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac**, através de **ESI-MS** e assumimos que o mecanismo é o mesmo para as reações desses ésteres com **PHA** e **ABH**. A **Figura 30** mostra um espectro no modo negativo característico da reação do **1-Ac** e **ABH**, em que reagentes, intermediários e produtos são transferidos da solução para a fase gasosa e detectados por **ESI/MS**. Observam-se nesse espectro ânions mostrados no **Esquema 33**, que embora sejam referentes ao **1-Ac**, foram também observados para as reações com **2-Ac** e **3-Ac**. O ataque do **ABH** ao carbono carbonílico do **1-Ac** pode ser confirmado pela detecção do ânion de m/z 178. O ânion

de m/z 255 corresponde à forma aniônica do derivado carbamílico (Esquema 28) do rearranjo de Lossen do intermediário formado através do ataque do hidroxamato na carbonila. Nestas reações, o produto proveniente do ataque do ABH^- no anel não foi identificado. No espectro no modo positivo (não mostrado), os produtos do rearranjo de Lossen de m/z 213, 94 e 121 puderam ser detectados, referentes à feniluréia, anilina e isocianato (Esquema 28).

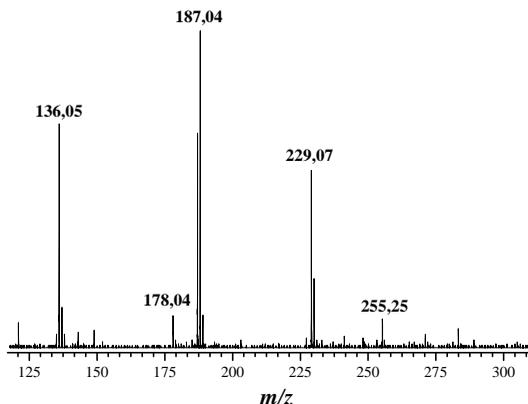
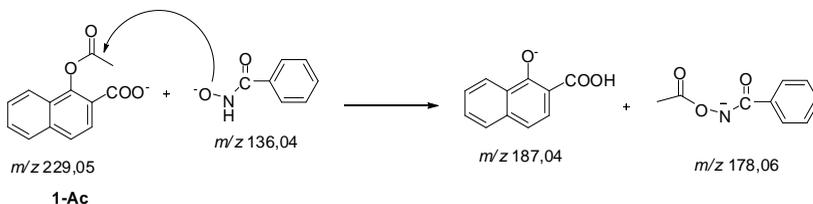


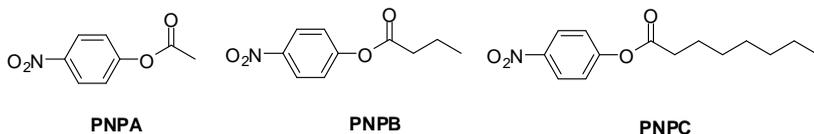
Figura 30. ESI-MS da solução reacional do ABH^- com **1-Ac** em pH 10,0, a 25 °C.



Esquema 33. Ataque nucleofílico do ABH^- no carbono carbonílico do **1-Ac**.

4.2.3 Reação de Clivagem de Ésteres de Acetato

As estruturas dos ésteres acetato de *p*-nitrofenila (**PNPA**), *n*-butirato de *p*-nitrofenila (**PNPB**) e *n*-octanoato de *p*-nitrofenila (**PNPC**) estão no Esquema 34.



Esquema 34

As reações desses ésteres na presença do **PHA** foram seguidas pelo aumento da absorbância em 400 nm na faixa básica de pH e 317,5 nm na faixa ácida. A **Figura 31** ilustra a variação espectral para a reação do **PNPA** com **PHA**.⁹²

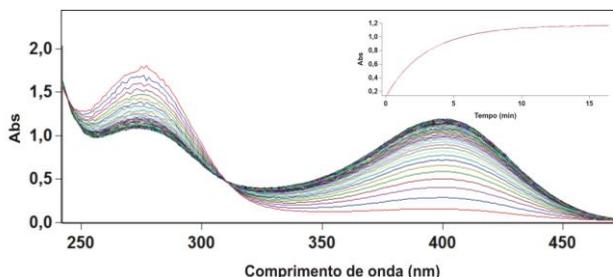


Figura 31. Variação espectral de UV/Vis da mistura reacional de **PNPA** ($3,33 \times 10^{-5}$ mol/L) e **PHA** $3,3 \times 10^{-3}$ mol/L em água, pH 8,0 e 25 °C. No detalhe está mostrado, a variação da absorbância em função do tempo em 400 nm.

Na **Figura 32** estão apresentados os dados cinéticos da reação de clivagem do **PNPA**, **PNPB** e **PNPC** a 25 °C na presença do **PHA**. Para fins de comparação, o gráfico também mostra as constantes de velocidade observada em alguns pHs dos substratos na ausência de **PHA**, na mesma temperatura e $\mu=1,0$. Nos dados em H₂O e pH 7,0, valores de k_{obs} foi obtido através do método de velocidades iniciais. As constantes de velocidade para a reação de clivagem do **PNPC** em água não puderam ser obtidas uma vez que ocorre formação de agregados dos alcenoatos de cadeia longa, mesmo nas concentrações espectrofotométricas, e as curvas não puderam ser ajustadas. Tee e Enos⁹¹ estudaram a hidrólise em meio básico de ésteres de cadeia longa em misturas variadas de H₂O com solventes orgânicos e observaram que a adição desses cossolventes reduz ou até remove a agregação

hidrofóbica desses ésteres de cadeia longa.⁹¹ A concentração do substrato **PNPC** adicionada nos experimentos cinéticos foi menor do que a utilizada para **PNPA** e **PNPB** justamente para evitar a formação de agregados do substrato (vide Materiais e Métodos).

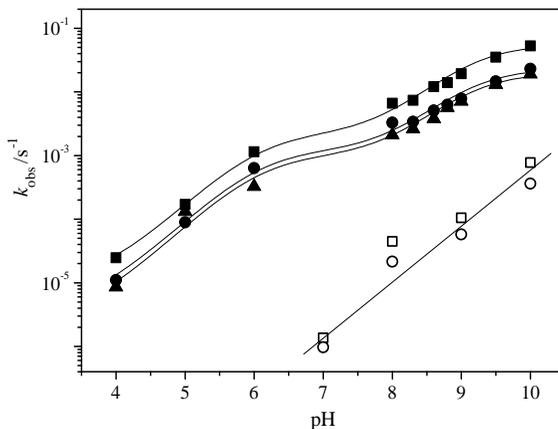
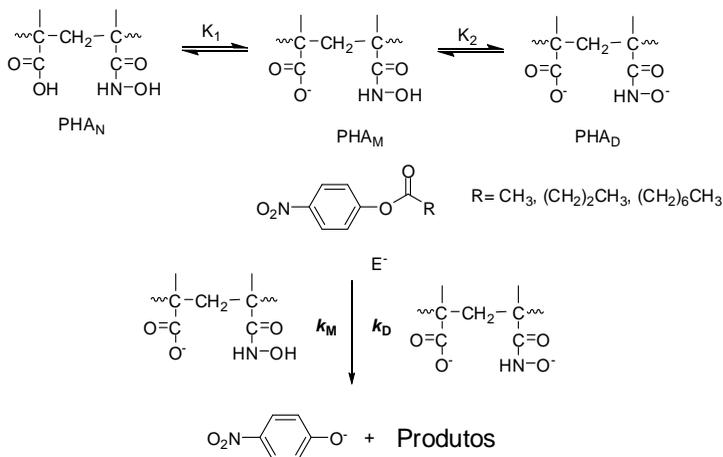


Figura 32. Efeito do pH na clivagem dos ésteres **PNPA** (■), **PNPB** (●) e **PNPC** (▲) na presença de $3,3 \times 10^{-3}$ mol/L de **PHA** e em água (□) **PNPA** e (○), a 25 °C. As curvas foram traçadas utilizando a Eq. 7.

Examinando a **Figura 32**, notam-se, em todos os casos, efeitos catalíticos significativos quando se comparam as constantes de velocidade na ausência e presença do **PHA**, como mostra a **Tabela 7**. Para os cálculos das constantes, k_M , k_D e k_o foi utilizada a Eq. 7, mostrada na seção anterior, obtida com base no **Esquema 35**.



Esquema 35

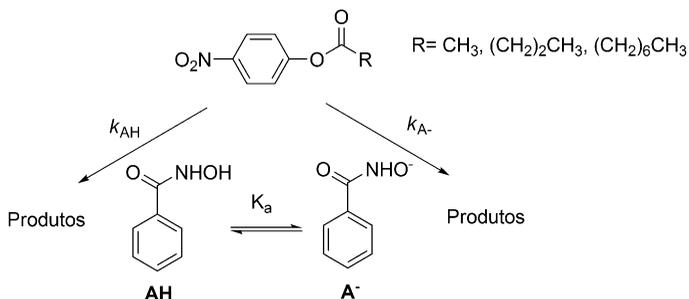
A **Tabela 7** apresenta as constantes de velocidade de primeira e de segunda ordem para as reações. Comparando as constantes de velocidade de segunda ordem da reação quando **PHA** está presente na sua forma monoprotonada e quando está na forma desprotonada, observa-se um aumento de 34,9, 26,7 e 27,8 na velocidade da reação para o **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**, respectivamente. A reação na presença de **PHA** na sua forma desprotonada (k_D) é $1,4 \times 10^{10}$, $5,8 \times 10^9$ e $5,0 \times 10^9$ vezes maior do que a reação não catalisada para **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**, respectivamente.

Tabela 7. Constantes de velocidade para a reação do **PNPA**, **PNPB** e **PNPC** na presença e ausência de **PHA** $3,3 \times 10^{-3}$ mol/L.

	PHA /s ⁻¹			PHA /Lmol ⁻¹ s ⁻¹		
	PNPA	PNPB	PNPC	PNPA	PNPB	PNPC
k_o	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^{-8}$
k_N	$1,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	-	-	-
k_M	$2,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	7,17	3,91	3,26
k_D	$5,5 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	250,0	104,5	90,9

Na **Tabela 8** estão apresentadas as constantes de segunda ordem (k_A e k_{AH}) para as reações do nucleófilo α ácido

benzoidroxâmico (ABH) com os ésteres **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**, de acordo com o **Esquema 36** e Eq. 9. Comparando a eficiência dos grupos hidroxâmicos ancorados no polímero com o do ABH (isto é, comparando k_D com k_A), observa-se que na região acima de pH, acima dos pK_a s dos nucleófilos (pK_a s do ABH e **PHA** = 9,16 e 9,2, respectivamente), a eficiência do **PHA** é cerca de 5,2, 7,5 e 9,2 vezes superior para o **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**, respectivamente, comparado à do ABH. Entretanto, como observado para o caso do **BDNPP**, o **PHA** se mostrou mais reativo que o ABH em pHs menores que 9, onde os grupos hidroxâmicos dos dois nucleófilos estão protonados, porém o carboxílico do **PHA** está desprotonado. Nessa região de pH, o **PHA** é cerca de 20, 32,6 e 81,5 vezes superior para o **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**, respectivamente, comparado ao ABH.


Esquema 36

$$k_{obs} = k_o + k_{AH}\chi_{AH} + k_{A-}\chi_{A-} \quad \text{Eq. 9}$$

Tabela 8. Constantes de velocidade para a reação do **PNPA**, **PNPB** e **PNPC** na presença e ausência de **ABH** 0,01 mol/L.

	ABH/s^{-1}			$\text{ABH /Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$		
	PNPA	PNPB	PNPC	PNPA	PNPB	PNPC
k_o	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^{-8}$
k_{AH}	$3,6 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-4}$	0,36	0,12	0,04
k_{A-}	0,48	0,14	0,099	48	14	9,9

Como comentado anteriormente, esses resultados podem sugerir que, na faixa de pH entre 6 e 9, em que predomina a espécie monoprotonada, o mecanismo pode ocorrer através do ataque direto do grupo carboxilato no **BDNPP** como mostra o caminho (A) - **Figura 20**), e/ou através de uma catálise básica, assistida pelo oxigênio do grupo carboxilato, que assiste o ataque do grupo hidroxâmico, aumentando sua nucleofilicidade (caminho (B) - **Figura 20**), similar à reação do **PHA** com **BDNPP**. É importante notar também que, com esses ésteres de acetato, mesmo em pHs abaixo de 6, o polímero é capaz de aumentar a velocidade da reação.

O efeito da concentração de **PHA** nas reações de clivagem do **PNPA**, **PNPB** e **PNPC** está mostrado na **Figura 33**, podendo-se observar um perfil de linear na faixa de concentração estudada. Os dados foram ajustados com uma equação linear e os coeficientes angulares obtidos foram 19,5, 7,9 e 6,27 $\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$, que são as constantes de velocidade de segunda ordem. Porém, normalizando as constantes observadas em função da concentração de cada nucleófilo presente, se obtém as constantes de velocidade de segunda ordem 290,4, 117,7 e 93,6 $\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$, para **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**, respectivamente.

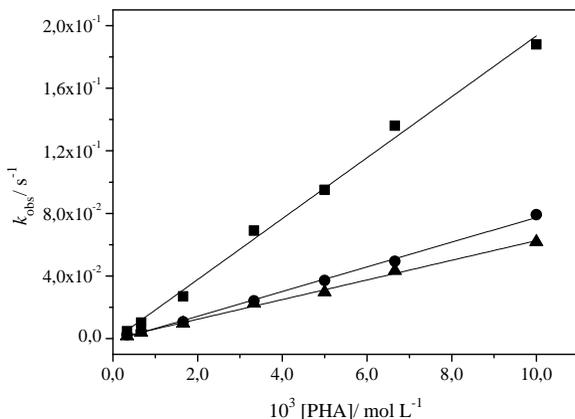
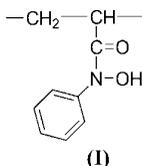


Figura 33. Efeito da concentração de **PHA** nas reações com **PNPA** (■), **PNPB** (●) e **PNPC** (▲), a 25°C e pH=10.

Dentre os resultados apresentados, observou-se que quanto maior a cadeia do éster, menor sua reatividade, o que é consistente com dados reportados por outros autores.⁹⁹ Isso provavelmente se deve ao

impedimento estérico para o ataque nucleofílico no éster. Contudo, de acordo com Tee e colaboradores, alcenoatos de *p*-nitrofenila com cadeia maior que 3 carbonos apresentam constantes de velocidade para hidrólise praticamente constantes se não houver efeitos de agregação hidrofóbica.⁹⁹ Porém, comparando as constantes de velocidade da reação com polímero e com ABH, observa-se que o incremento na reação do PHA com PNPC é maior do que o observado para os ésteres PNPA e PNPB.

Kunitake e colaboradores¹⁰⁰ prepararam dois co-polímeros contendo grupos hidroxamatos protegidos (11 e 3,9% de grupos hidroxamatos, **Estrutura I**) e acrilamida e observaram que na reação com PNPA (1,4 v/v % CH₃CN-H₂O, 30 °C), a unidade de hidroxamato foi menos reativa que o monômero correspondente. As constantes de velocidade de segunda ordem foram 5,31 e 9,12 Lmol⁻¹s⁻¹ para os polímeros contendo 11 e 3,9%, respectivamente. Essas constantes são cerca de 30 vezes menores que a observada para a reação com o mesmo substrato, na presença do PHA ($k_2 = 250 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$). Provavelmente, a menor reatividade se deve ao impedimento estérico promovido pelo grupo fenila no polímero.¹⁰⁰



Proposta Mecanística para a Reação entre Ésteres de Acetato e PHA

Como nas reações discutidas anteriormente, o ABH também foi utilizado para tentar identificar os produtos da reação entre os ésteres de acetato PNPA, PNPB e PNPC, através de ESI-MS e assumimos que o mecanismo é o mesmo para as reações desses ésteres com PHA e ABH. A **Figura 34** mostra um espectro no modo negativo característico da reação do PNPB e ABH, em que reagentes, intermediários e produtos são transferidos da solução para a fase gasosa e detectados por ESI/MS. Observa-se nesse espectro ânions mostrados no **Esquema 37**. O ataque do ABH⁻ no carbono carbonílico do PNPB pode ser confirmado pela detecção do ânion de *m/z* 206. O ânion de *m/z* 255 corresponde à forma

aniônica do derivado carbamílico (**Esquema 28**) proveniente do rearranjo de Lossen do intermediário formado através do ataque do hidroxamato na carbonila. O produto proveniente do ataque do ABH⁻ no anel não foi identificado, um resultado que indica que a reação acontece preferencialmente no carbono carbonílico. No espectro no modo positivo (não mostrado), os produtos do rearranjo de Lossen de m/z 213, 94 e 121 referentes à feniluréia, anilina e fenilisocianato (**Esquema 28**) puderam ser detectados.

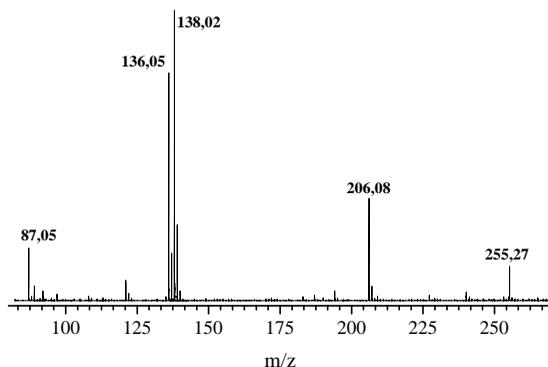
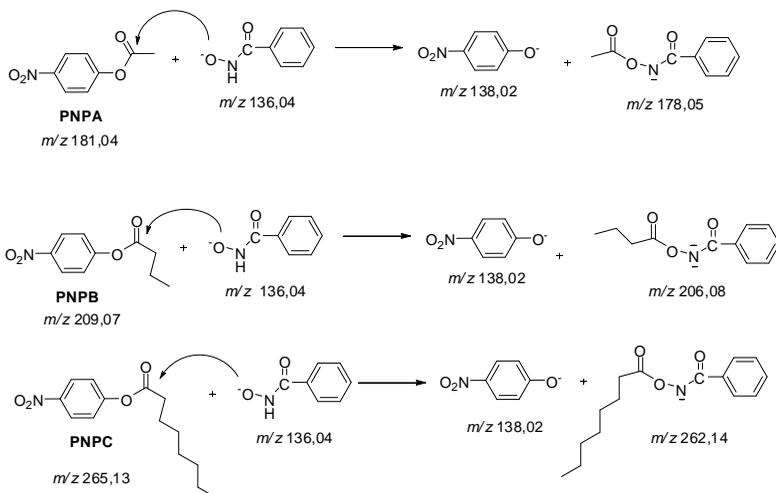


Figura 34. ESI-MS da solução reacional do ABH⁻ com PNPB em pH 10, a 25 °C.

Nos espectros no modo negativo obtidos para o PNPA e PNPC (não mostrados), foram observados os picos de m/z 138, 178 e 262, referentes aos ânions mostrados no **Esquema 37**.



Esquema 37. Ataque nucleofílico do ABH^- no carbono carbonílico dos ésteres **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**.

4.2.4 Efeito do solvente na clivagem dos ésteres **BDNPP**, **1-Ac** e **3-Ac**.

Existem inúmeros estudos em que o principal objetivo é entender a origem do efeito α e, como foi mencionado anteriormente, acredita-se que o efeito do solvente desempenha um papel fundamental.¹⁰¹ De fato, sugere-se que o efeito α em substituições nucleofílicas surge da diferença na solvatação do estado fundamental do nucleófilo α e do seu estado de transição na reação com um dado substrato, em comparação com o efeito observado com nucleófilos que não apresentam o efeito α .^{27, 102} Solventes possuem um papel fundamental na dinâmica de uma reação química; efeitos de solvente podem ser atribuídos à solvatação preferencial, efeito hidrofóbico e estrutura do solvente.¹⁰²

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos do estudo das reações de clivagem dos ésteres **BDNPP**, **1-Ac** e **3-Ac** em misturas de água com acetonitrila (CH_3CN), **Figura 35**, e de água com dimetil sulfóxido (DMSO), **Figura 36**, em diferentes composições.

Sabe-se que a parte negativa do dipolo na acetonitrila (CH_3CN) está exposta enquanto que a positiva se encontra “escondida” no meio

da molécula.¹⁰³ Com isso em mente, pensar-se-ia que um nucleófilo aniônico seria fortemente desestabilizado com a adição de acetonitrila em água o que acarretaria em um aumento significativo da velocidade da reação. Entretanto, como pode ser observado na **Figura 35**, não é o que se observa. Nota-se ainda que a constante de velocidade observada para as reações de clivagem do **BDNPP**, **1-Ac** e **3-Ac** na presença de **PHA** inicialmente decresce com adição de cerca de 30-40 % de acetonitrila e depois se mantém aproximadamente constante. O estudo não pôde ser realizado com adições maiores de acetonitrila em água, uma vez que ocorre precipitação. Outros autores já haviam observado esse mínimo de velocidade em 30-40% de CH_3CN em água e o efeito observado tem sido atribuído à forte tendência da acetonitrila formar complexos com duas moléculas de água, uma vez que a razão estequiométrica de 1:2 para $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ é atingido em 33,3 % de acetonitrila.¹⁰¹ Estudos anteriores mostram que na reação de **PNPA** com OH^- e com um nucleófilo que não apresenta efeito alfa (ClPhO^-) em misturas $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$, a constante de velocidade da reação decresce com adição de CH_3CN no meio reacional até cerca de 30-40% de CH_3CN e, em seguida, a reatividade de ambos aumenta frente ao **PNPA** conforme mais acetonitrila é adicionada ao sistema.¹⁰¹ O resultado obtido para a reação do ácido benzoidroxâmico com **PNPA** é similar aos encontrados para as reações de **PHA** com **BDNPP**, **1-Ac** e **3-Ac**, na mistura de $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$: depois do mínimo, a reatividade se mantém aproximadamente constante.¹⁰¹

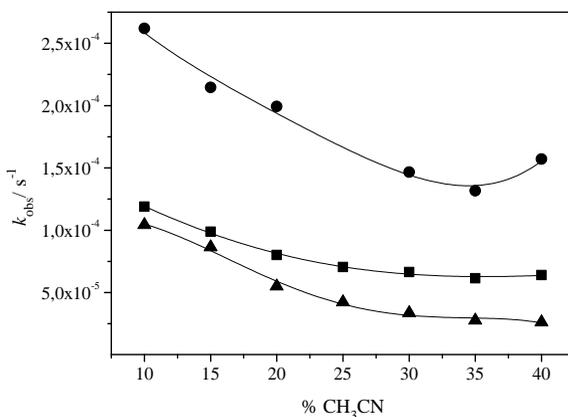


Figura 35. Efeito da adição de acetonitrila em água nas reações do **PHA** com **1-Ac** (■), **3-Ac** (●) e **BDNPP** (▲), a 25°C e pH=10.

A **Figura 36** mostra que, com a adição do DMSO nas mesmas reações, as constantes de velocidade observadas aumentam continuamente, um comportamento diferente do observado para a CH_3CN .

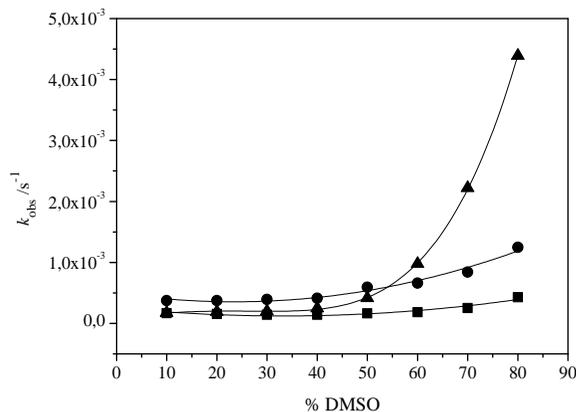
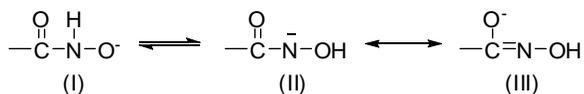


Figura 36. Efeito da adição de DMSO em água nas reações do **PHA** com **1-Ac** (■), **3-Ac** (●) e **BDNPP** (▲), a 25°C e $\text{pH}=10$.

Para se ter certeza de que o aumento na velocidade observado quando DMSO era adicionado não era decorrente apenas do DMSO na hidrólise dos ésteres, mas sim decorrente do efeito do DMSO na reação entre o **PHA** e o **BDNPP**, **1-Ac** e **3-Ac**, experimentos foram realizados na ausência do **PHA**. Nas composições de solvente 10%:90% e 0%:100% H_2O :DMSO, as reações de clivagem dos ésteres foram muito lentas, sendo que 3 dias de cinética não foram suficientes para se obter as constantes.

Assim como a CH_3CN , o DMSO é um solvente não doador de ligação de hidrogênio e também possui a parte negativa do dipolo exposto, enquanto que a positiva se encontra “escondida” no meio da molécula.²⁴ Entretanto, enquanto o DMSO é um solvente altamente polarizável, a CH_3CN não é. Por essa razão, o DMSO é capaz de estabilizar fortemente anions polarizáveis ou estados de transição aniônicos através de interações de dispersão de carga; a CH_3CN não é capaz de interagir dessa maneira. Então, as constantes de velocidade de reações nucleofílicas frequentemente aumentam significativamente com o aumento de DMSO na mistura.^{102, 104} Outras diferenças entre os dois solventes mostram que DMSO forma fortes ligações de hidrogênio com

a água e por isso, a adição de DMSO em água diminuiria a concentração de moléculas livres de H₂O. Isso reduziria a quantidade de ligações de hidrogênio entre moléculas livres de H₂O e ânions hidroxamatos.¹⁰² Vale ressaltar que efeitos de solvente em reações envolvendo ácidos hidroxâmicos apresentam “complicações” a mais. A estrutura dos hidroxamatos tem sido alvo de diversos estudos em que se sugere que esses formam um equilíbrio entre as formas isoméricas (I), (II) e (III), e a posição do equilíbrio depende fortemente de solvente (**Esquema 38**). Sugere-se que os ácidos hidroxâmicos podem se comportar como ácidos NH ou OH dependendo do solvente sendo que em H₂O, hidroxamatos existem principalmente como (I), mas em solventes como DMSO, dioxano, acetonitrila e metanol, as formas (II) ou (III) podem ser preferenciais.¹⁰²



Esquema 38

4.2.5 Estudo da Hidrólise do BDNPP pelo PHA na presença de micelas – Interação Polímero-Surfactante.

O efeito do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr) na clivagem dos ésteres pelo **PHA** também foi avaliado, devido à conhecida habilidade de micelas em interagir com polímeros e aproximar reagentes, podendo aumentar assim velocidades de reações.

O perfil de pH para a reação do **BDNPP** com **PHA**, na presença e ausência de CTABr (**Figura 37**) mostra que a reação é 15 vezes mais rápida quando CTABr está presente comparado com a reação na presença de somente **PHA**. Uma vez que a reação do **BDNPP** com **PHA** é 250 vezes mais rápida do que a reação em água, a reação na presença de ambos, **PHA** e **CTABr** ocorre 3750 vezes mais rapidamente do que a reação em água. Para se ter uma noção melhor do efeito, transformamos esses valores foram transformados em tempo e tem-se que o tempo de reação que em água é de 9 meses, é diminuído para 10 minutos quando **PHA** e **BDNPP** estão presentes.

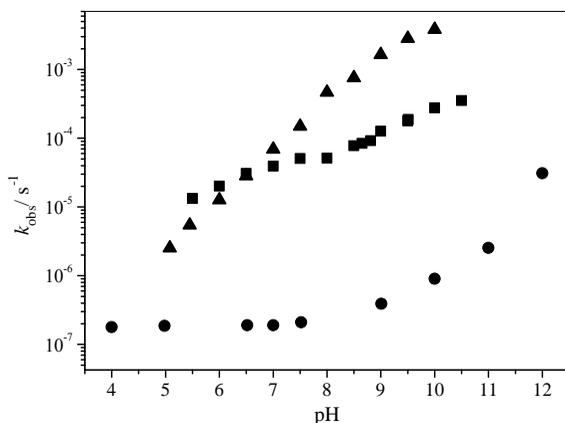


Figura 37. Perfis de pH para a reação do **BDNPP** com **PHA** 0,013 mol/L, na presença (▲) e na ausência (■) de 0,01 mol/L de CTABr, e a reação em água do **BDNPP** (●) a 25 °C.

Esse incremento observado na velocidade da reação quando ambos, **PHA** e CTABr, estão presentes provavelmente ocorre porque as micelas de CTABr são catiônicas e o polímero **PHA** e os substratos são aniônicos. Portanto, se espera que as micelas positivas sejam capazes de concentrar ambos os reagentes e que com o aumento de concentração a velocidade da reação aumente.

A **Figura 38** apresenta o efeito do CTABr na reação do **PHA** com **BDNPP**, **1-Ac** e **3-Ac** e pode ser observado que quando os valores de concentração de surfactante são maiores ocorre saturação.

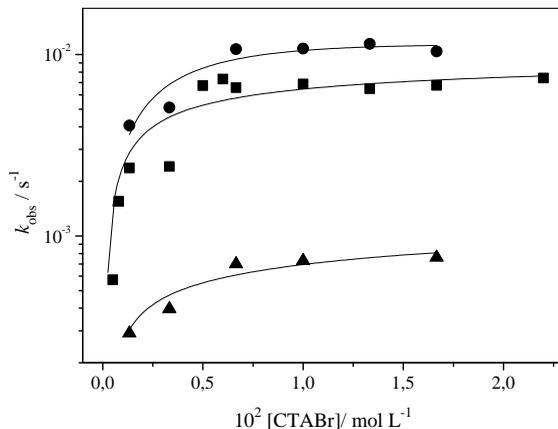


Figura 38. Efeito do CTABr 1×10^{-2} mol/L na reação do PHA com BDNPP (■), 1-Ac (▲), e 3-Ac (●), a 25°C e pH=10.

Também foi avaliado o efeito dos surfactantes dipolar iônico, SB3-14, e aniônico, SDS, na clivagem do BDNPP na presença do PHA (Figura 39). Os resultados mostraram que o surfactante SDS praticamente não tem efeito algum na reatividade do PHA frente ao BDNPP. Provavelmente o SDS pode ser responsável por criar um ambiente mais hidrofóbico, o que pode facilitar a inclusão do substrato nas proximidades do PHA. Entretanto, o SDS pode dificultar ou até impedir a aproximação do PHA e do substrato aniônico, o que provocaria uma diminuição das constantes de velocidades observadas. Entretanto, surfactantes aniônicos são conhecidos por aumentarem o pK_a das espécies presentes e, talvez o PHA esteja menos ionizado do que se estivesse somente em água, o que o tornaria menos reativo. Há uma variada gama de possibilidades para explicar a falta de efeito cinético na presença de SDS e os resultados observados podem resultar de uma combinação dos efeitos descritos acima.

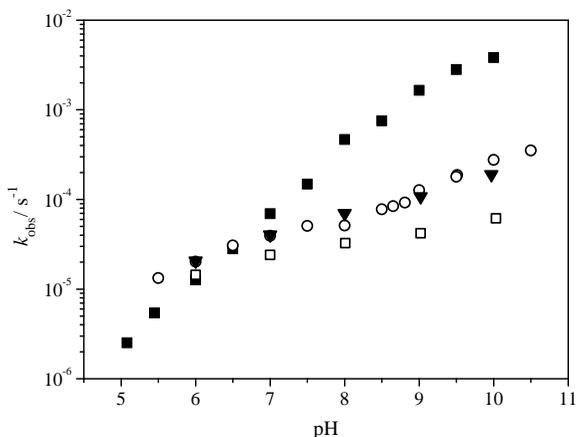


Figura 39. Efeito do CTABr 0,01 mol/L (■), SB3-14 0,01 mol/L (□) e SDS 0,01 mol/L (▼) na reação do PHA 0,013mol/L com BDNPP (■), a 25 °C. A reação do BDNPP na presença do PHA (○) está apresentada para comparação.

Conforme mostra a **Figura 39**, a adição de SB3-14, que é formalmente neutra, no PHA inibe a reação de clivagem do BDNPP o que é um tanto surpreendente, uma vez que o SDS, que é aniônico, não a inibiu. Como imaginado no caso do SDS, o SB3-14 poderia facilitar a inclusão do substrato nas proximidades do PHA. Contudo, com os resultados obtidos, sugere-se que o SB3-14 impede a aproximação do BDNPP e PHA, enquanto que o SDS não.

Na tentativa de entender o comportamento dos três surfactantes estudados na presença do polímero, experimentos de titulação calorimétrica isotérmica foram realizados e os resultados serão discutidos no próximo item.

4.2.6 Estudos do Agregado formado entre PHA e Surfactantes

Resultados discutidos anteriormente mostram que quando se agrega o surfactante CTABr ao PHA, ocorre um incremento na velocidade de reação de clivagem dos ésteres estudados em relação à reação na presença de somente polímero. Porém, quando se adiciona SDS e SB3-14, as constantes de velocidade observadas praticamente não variam no primeiro caso e a inibição da reação ocorre com SB3-14.

A fim de melhor compreender a origem desses efeitos, as interações entre **PHA** e esses surfactantes foram estudadas utilizando a técnica calorimétrica de titulação isotérmica (ITC).

Nos experimentos, uma solução de surfactante (volume de 5-10 μL) é adicionada em seqüência a uma solução contendo água ou polímero, em um determinado intervalo de tempo. O calorímetro fornece um gráfico de potência em função do tempo (**Figura 15**, vide Materiais e Métodos). A variação de entalpia pode ser obtida integrando cada um dos picos referentes a cada injeção. Um gráfico típico, obtido através de ITC, consiste na divisão dessa variação de entalpia pela quantidade de matéria em mols de surfactante que foram injetados em função da concentração total de surfactante na cela após cada injeção no eixo x . Com essa técnica, se obtém a concentração micelar crítica (CMC), a concentração de associação crítica (CAC), C_2 (concentração de saturação - concentração em que micelas se formam em solução na presença de solução polimérica e não estão associadas com o polímero) e ΔH_{mic} (variação da entalpia de micelização). Através da CMC e de ΔH_{mic} , as grandezas ΔG_{mic} (variação da Energia de Gibbs de micelização) e ΔS_{mic} (variação da entropia de micelização), podem ser calculadas. Na **Figura 40**, tem-se um gráfico geral que ilustra de que maneira essas informações podem ser obtidas.

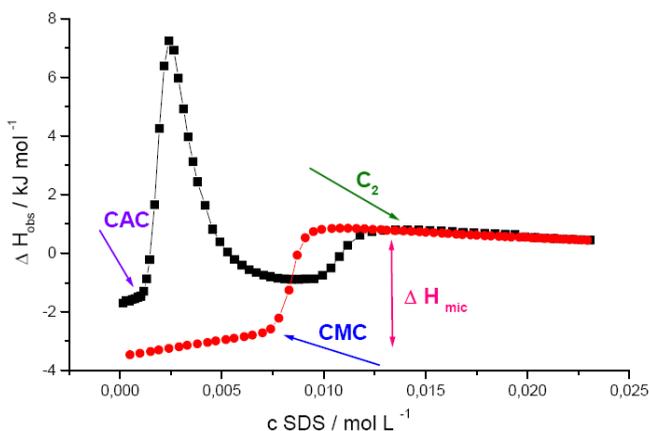


Figura 40. Diluição de SDS 2,0% (m/m) em solução de poli (N-isopropilacrilamida), PNIPAM, 0,1% (m/m), curva preta, e em água (curva vermelha) a 17 °C.^{105, 106}

A entalpia de micelização observada, que é a que se obtém do gráfico, $\Delta H_{mic(obs)}$, é definida como a diferença entre a entalpia do surfactante em sua forma micelar e a entalpia do surfactante na forma monomérica. Para se obter a ΔH_{mic} , é necessário fazer uma correção matemática. Apesar da concentração do surfactante na seringa, CI , ser bem maior do que sua concentração micelar crítica, uma fração do surfactante está na forma monomérica e esta fração contribui apenas para a entalpia de diluição do surfactante. O valor real da variação de entalpia de micelização, ΔH_{mic} , é resultado da divisão de $\Delta H_{mic(obs)}$ pela fração do surfactante presente na seringa que está na forma micelar, $(CI - cmc)/CI$, (Eq. 10).

$$\Delta H_{mic} = \frac{\Delta H_{mic(obs)}}{[(CI - cmc)/CI]} \quad \text{Eq. 10}$$

Primeiramente são apresentados os resultados dos processos de micelização dos surfactantes em água, a 25 °C, onde as primeiras injeções de surfactante nas curvas apresentadas referem-se apenas à diluição e quebra das micelas de surfactante presentes inicialmente na seringa (**Figuras 41-44**). À medida que se aumenta a concentração de surfactante, os valores de entalpia se tornam menores para o caso do CTABr e maiores para o SDS, até que se atingem concentrações em que ocorrem mudanças bruscas nos valores de entalpia. A extrapolação dos pontos nessa região fornece a CMC, que é a concentração em que micelas de surfactantes se formam em solução. Entretanto, é importante lembrar que a CMC não é um ponto definido, mas sim uma região de concentração e por esse motivo pode ser definida como o ponto de inflexão da curva da energia em função da concentração (método da derivada), método que foi utilizado no presente trabalho.⁷¹

Para as medidas realizadas com CTABr, o valor de CMC encontrado foi $1,02 \times 10^{-3}$ mol/L, **Figura 41**. Após a região da CMC, em que se observa essa mudança brusca, os valores de entalpia permanecem praticamente constantes, uma vez que está ocorrendo apenas uma diluição de micelas em água.

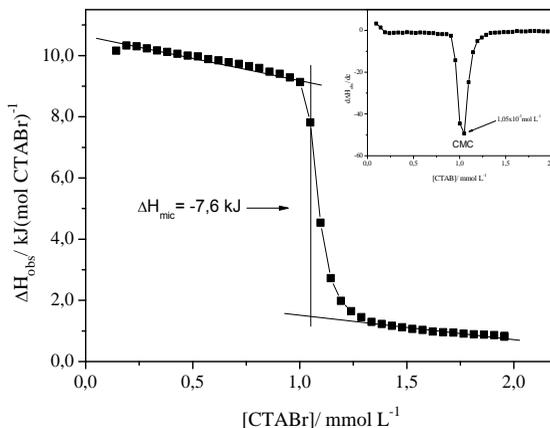


Figura 41. Variação de entalpia observada em função da adição de CTABr $1,37 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em água, a 25°C . No detalhe está mostrado o gráfico da derivada de ΔH_{obs} em função da $[\text{CTABr}]$.

No caso do SDS, os valores de entalpia se tornam maiores aumentando a concentração de surfactante, e o valor encontrado da CMC foi $8,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (**Figura 42**).

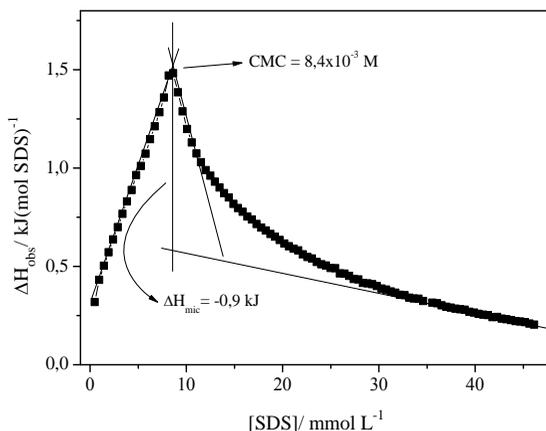


Figura 42. Variação de entalpia observada em função da adição de $6,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de SDS em água, a 25°C .

Com relação ao surfactante SB3-14, nota-se que a variação de entalpia é praticamente nula a 25 °C, **Figura 43**, isso porque todo surfactante tem um $\Delta H_{\text{mic}} = 0 \text{ kJ mol}^{-1}$ em alguma temperatura e a do SB3-14 provavelmente é 25 °C.¹⁰⁶

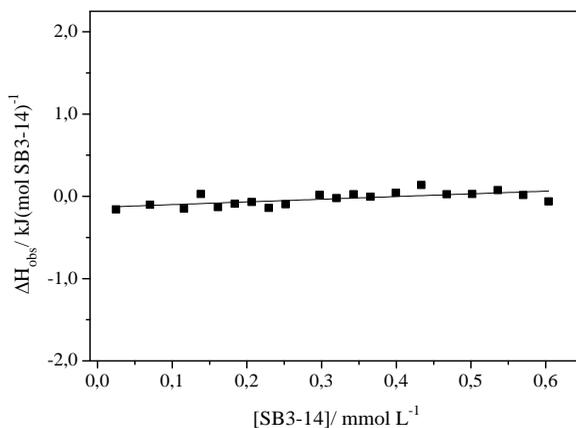


Figura 43. Variação de entalpia observada em função da adição de SB3-14 $8,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em água, a 25 °C.

Por essa razão, os experimentos com esse surfactante foram realizados a 35 °C, e o resultado está mostrado na **Figura 44**.

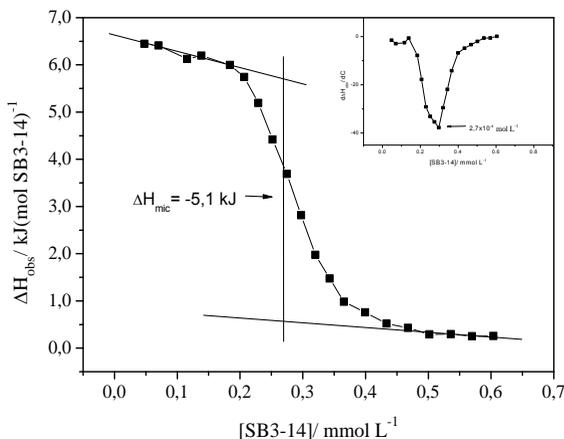


Figura 44. Variação de entalpia observada em função da adição de SB3-14 $8,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em água, a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. No detalhe está mostrado o gráfico da derivada de ΔH_{obs} em função da [SB3-14].

A entalpia de micelização observada (ΔH_{mic}) é a diferença entre a entalpia do surfactante em sua forma micelar e a entalpia do surfactante na forma monomérica. Os valores obtidos para a diluição dos surfactantes estudados estão na **Tabela 9**.

Tabela 9. Valores obtidos de CMC e ΔH_{mic} para a diluição dos surfactantes estudados.

Surfactante	CMC/ mol/L	$\Delta H_{\text{mic}}/ \text{kJ mol}^{-1}$	T/ $^\circ\text{C}$
CTABr ^a	$1,02 \times 10^{-3}$	-7,6	25
SDS ^a	$8,4 \times 10^{-3}$	-0,9	25
SB3-14 ^b	$2,7 \times 10^{-4}$	-5,1	35

Quando se titula CTABr na presença de **PHA** se observa um perfil de entalpia diferente do observado para a curva de diluição do CTABr, o que por si só já indica a ocorrência de interação do **PHA** com o surfactante (**Figura 45**). Embora a variação de entalpia seja endotérmica para o processo de diluição do CTABr, a adição do surfactante no polímero foi menos endotérmica, o que indica uma interação exotérmica entre o **PHA** e CTABr. Nota-se ainda que o

aumento da concentração de **PHA** torna a curva menos exotérmica em relação à diluição do surfactante. À medida que mais CTABr é adicionado, a curva se aproxima daquela da diluição do surfactante pois não está havendo mais nenhuma interação, apenas está ocorrendo diluição das micelas.

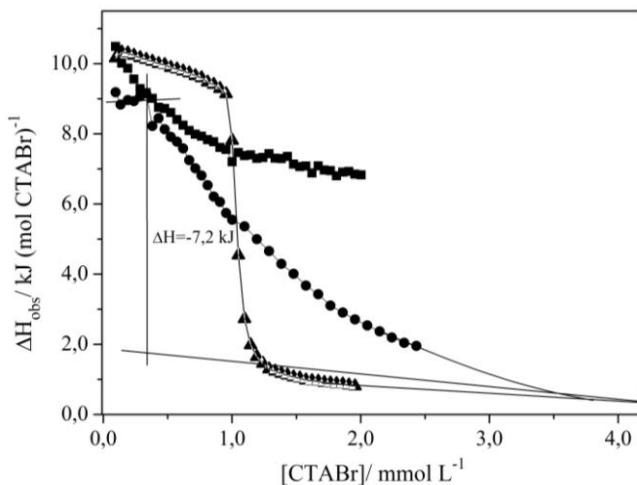


Figura 45. Variação de entalpia observada em função da adição de CTABr $1,37 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹ em **PHA** (●) $1,27 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, (■) $0,013$ mol.L⁻¹ e em H₂O (▲), a 25 °C, pH 10.

Para a determinação da CAC do sistema **PHA** e CTABr, titulou-se uma solução de CTABr mais diluída ($4,11 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) na solução de **PHA** $1,27 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, (**Figura 46**). Encontrou-se um valor de $1,1 \times 10^{-4}$ mol/L, cerca de 10 vezes menor que a CMC. Essa associação pode ser atribuída à neutralização de carga decorrente da atração eletrostática entre os monômeros de surfactante carregados positivamente e a cadeia do polímero carregada negativamente (Região **I**) das **Figuras 46 e 47**).

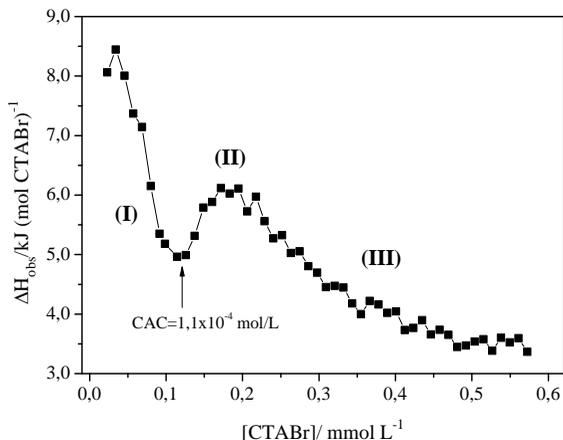


Figura 46. Variação de entalpia observada em função da adição de CTABr em PHA $1,27 \times 10^{-3} mol/L$, a $25^\circ C$.

Depois dessa concentração, observa-se um aumento na variação de entalpia que provavelmente indica que está se aproximando da concentração de CTABr necessária para que toda a carga do polímero seja neutralizada ($2 \times 10^{-4} mol/L$), considerando que 16% do polímero está desprotonado em pH 10). Esse pequeno aumento pode estar ocorrendo devido aos monômeros adicionados estarem interagindo com a parte não carregada do polímero e, conseqüentemente, moléculas de água que estavam solvatando as moléculas do polímero são expelidas (Região (II) das Figuras 46 e 47). Em uma dada concentração de surfactante adicionado, o mesmo não interage mais com o polímero, então é como se tivesse apenas ocorrido a formação de micelas livres em solução, e assim, as curvas de diluição do surfactante na solução polimérica e em água deveriam se sobrepor (Região (III) das Figuras 46 e 47).

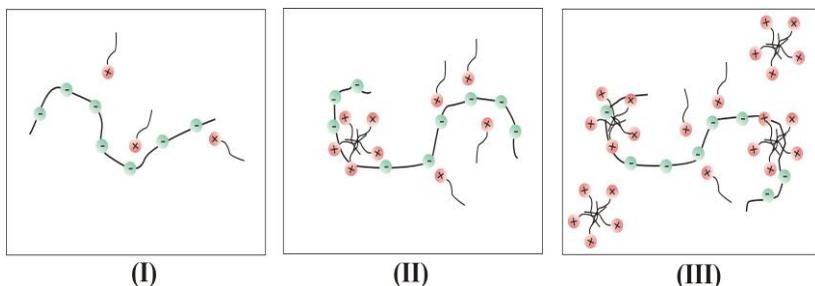


Figura 47. Ilustração da interação entre o polímero **PHA** e o surfactante CTABr em diferentes concentrações de CTABr.

A **Figura 48** mostra que quando se titula CTABr $4,11 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução de **PHA** $0,013 \text{ mol L}^{-1}$, obtém um valor para a CAC concordante com o valor encontrado para o **PHA** $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, como era esperado.

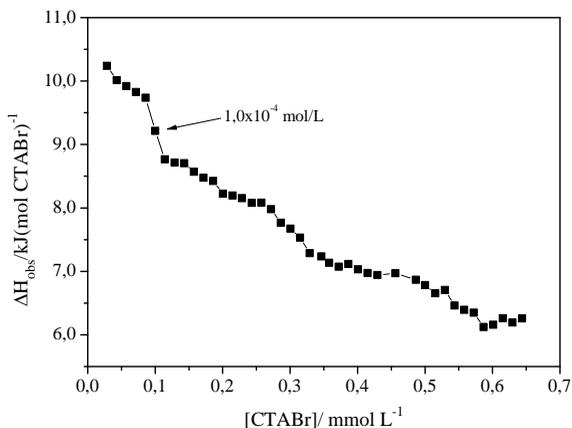


Figura 48. Variação de entalpia observada em função da adição CTABr em **PHA** $0,013 \text{ mol L}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como mencionado anteriormente, a variação de entalpia para a diluição do SB3-14 é praticamente nula a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A **Figura 49** mostra que titulando o surfactante em uma solução de **PHA** $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, nessa temperatura, não ocorre variação de entalpia.

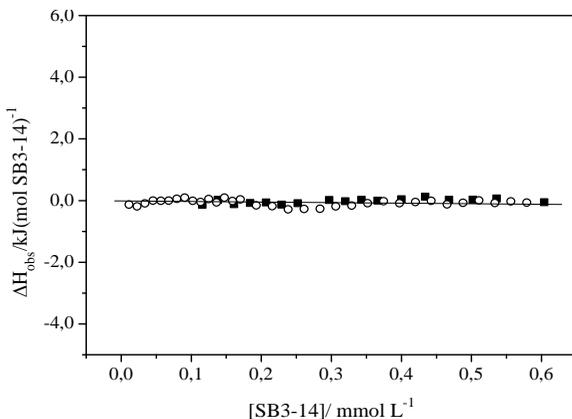


Figura 49. Variação de entalpia observada em função da adição de SB3-14 $8,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PHA $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (\circ) e em H_2O (\blacksquare) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 10.

Por essa razão, titulou-se SB3-14 em PHA $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e o resultado está mostrado na **Figura 50**. Nota-se que o perfil da curva é semelhante ao da curva de diluição de SB3-14 nessa temperatura, o que sugere que praticamente não ocorre interação entre o PHA e o SB3-14.

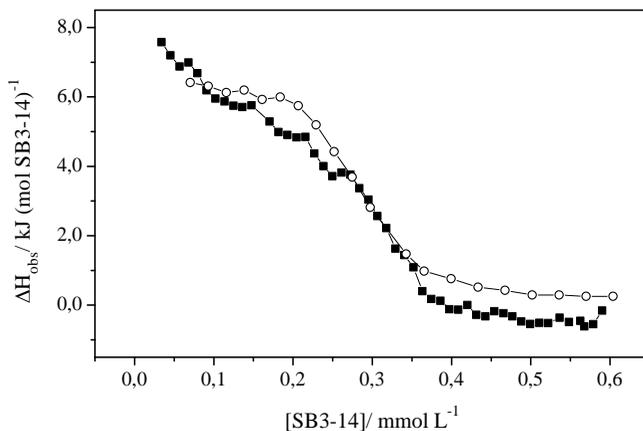


Figura 50. Variação de entalpia observada em função da adição de SB3-14 em PHA $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (\blacksquare), e em H_2O (\circ), a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 10,0.

A **Figura 51** mostra que quando se adiciona SDS no **PHA**, o surfactante “sente” a presença do polímero, pois reduz a CMC do SDS.

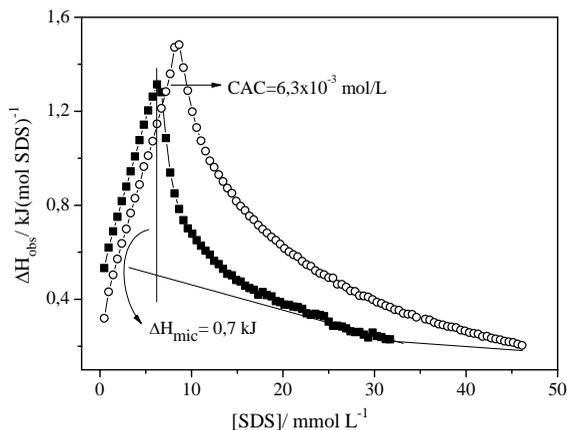


Figura 51. Variação de entalpia observada em função da adição de $6,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de SDS em **PHA** $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (■) e em água (○), a 25°C .

Quando se estudou a interação de PEO de massa molar 1500 g mol^{-1} e SDS, se observou um processo endotérmico, atribuído à desidratação do polímero.¹⁰⁷ No caso do **PHA**/SDS, a interação foi mais exotérmica do que a diluição do surfactante, o que pode ser atribuído ao caráter mais hidrofílico do **PHA**, ou ainda ao processo exotérmico ser predominante em relação ao endotérmico, por isso o último não pôde ser observado.

Na **Tabela 10** estão apresentados os valores de CAC e ΔH_{mic} para o sistema **PHA**/SDS, que são $6,3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ e $-0,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente. Para o sistema PEO 1500/SDS esses valores são $4,1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ e $4,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. A diferença apresentada para os valores pode ser consequência do **PHA** ser mais hidrofílico que o PEO além de ser carregado. Os resultados mostram que com as primeiras adições de SDS, uma interação já pode ser observada referente aos monômeros de surfactante e polímero, o que pode ser concluído através da diferença de ΔH_{obs} da solução de **PHA** com SDS comparado à solução de SDS em água. Em uma concentração específica de SDS, a formação de agregados de surfactante se inicia, sendo essa concentração menor que a

CMC do surfactante puro. Isso indica que mesmo ambos possuindo carga negativa, o polímero nucleia a formação de agregados micelares de SDS. Finalmente, em uma dada concentração de surfactante na solução, a adição de SDS não participa mais da interação entre polímero-surfactante, uma vez que, nessa concentração, a quantidade de monômeros de SDS nos agregados do polímero é quase a mesma que a de monômeros nas micelas presentes na solução. A concentração de surfactante em que isso acontece é chamada de C_2 e depois dessa concentração, os monômeros de surfactante adicionados formam micelas que praticamente não fazem mais nenhuma interação com o polímero.

Uma maneira de se comparar quão espontânea é a associação entre os diferentes surfactantes com o **PHA** é a determinação da variação de energia livre de Gibbs para cada interação. Considerando que: i) quanto mais negativas forem as variações de energia livre de Gibbs, mais espontâneos serão os processos e ii) processos não-espontâneos tem valores mais positivos; através de valores de variação de energia livre de Gibbs pode-se saber a intensidade da interação polímero-surfactante.

As variações das energias livre de Gibbs para os processos de micelização do surfactante na ausência do polímero (ΔG_{mic}) e de formação de agregados polímero-surfactante (ΔG_{agg}) podem ser expressas através das **Eq. 11** e **12**:⁷¹

$$\Delta G_{mic} = RT \ln (CMC) \quad \text{Eq. 11}$$

$$\Delta G_{agg} = RT \ln (CAC) \quad \text{Eq.12}$$

Em que *mic* refere-se ao processo de micelização e *agg* refere-se à formação de agregados polímero-surfactante. Assim, a energia de Gibbs referente à interação polímero-surfactante pode ser calculada através da **Eq. 13** com base nas **Eq. 11** e **12**:⁷¹

$$\Delta G_{ps} = \Delta G_{agg} - \Delta G_{mic} = RT \ln (CAC/CMC) \quad \text{Eq. 13}$$

Em que *ps* refere-se à interação polímero-surfactante.

Fazendo-se o cálculo da ΔG_{ps} ao se utilizar soluções de **PHA** $1,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, temperatura de 25 ou 35°C, e os surfactantes CTAB,

SDS e SB3-14 obtêm-se os seguintes valores: -5,6, -0,71 e 0,00 kJ mol^{-1} kJ mol^{-1} , respectivamente. Esses valores (**Tabela 10**) sugerem a seguinte seqüência para a intensidade de interação PHA 0,19% (m/m)–surfactante, a 25°C: CTAB > SDS > SB3-14.

Tabela 10. Parâmetros de interação PHA – surfactantes.

Surfactante	CAC/ mmol L^{-1}	$\Delta H_{\text{mic}}/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta G_{\text{ps}}/\text{kJ mol}^{-1}$
CTABr	0,11	-7,2	-5,6
SDS	6,3	-0,7	-0,71
SB3-14	0,0	-6,2	0,0

Esses dados ajudam a esclarecer os resultados obtidos através de estudos cinéticos, sobre o efeito da adição de surfactante em PHA na reação de hidrólise do BDNPP. Então, quando se adiciona CTABr à PHA, ocorre uma interação favorável entre eles, e nas concentrações utilizadas nos experimentos cinéticos, o CTABr existe somente como um agregado com polímero, que começa a se formar a partir de uma concentração de CTABr = $1,1 \times 10^{-4}$ mol/L. Com isso, pode-se sugerir que o incremento catalítico observado seja decorrente da concentração de substrato entre esses agregados, o que o torna mais próximo dos grupos catalíticos do polímero. A **Figura 52 (II)** ilustra essa habilidade do CTABr em concentrar o substrato.

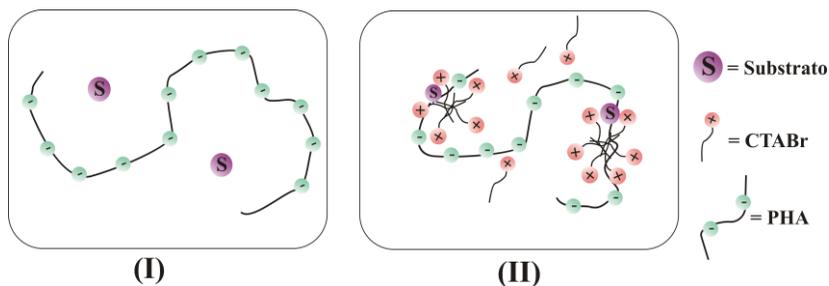


Figura 52. Ilustração da localização do substrato em uma solução contendo (I) somente PHA e (II) PHA e surfactante CTABr.

As constantes de velocidade observada para a clivagem do **BDNPP** na presença de **PHA** e SDS permaneceram praticamente as mesmas que foram obtidas para a reação na presença de somente **PHA**. Conforme comentado anteriormente, poder-se-ia esperar que ocorresse uma inibição uma vez que o SDS e o **PHA** são carregados negativamente, então não iriam interagir de uma maneira a aproximar o **BDNPP** (que também é negativamente carregado). Porém essa inibição não foi observada e os dados obtidos através do ITC mostram que, de fato, a agregação do SDS é afetada pela presença do **PHA**. É importante lembrar que apenas 16% dos grupos amida do polímero foram convertidos em hidroxamatos e carboxilatos, então o SDS poderia estar “interagindo” com os grupos não carregados do **PHA**, o que não impediria a aproximação do substrato.

Os resultados obtidos através do ITC mostram que o **PHA** e o SB3-14 praticamente não interagem, o que talvez explique o fato de na reação de clivagem do **BDNPP**, ocorrer inibição quando SB3-14 e **PHA** estão presentes. O surfactante pode estar dificultando a aproximação do substrato no **PHA**. Outra possível explicação para essa inibição observada é que o substrato pode estar se incorporando dentro das micelas de SB3-14, fazendo com que o polímero e o substrato fiquem mais afastados.⁸⁹

4.3 Clivagem de ésteres mediada por micelas funcionalizadas

4.3.1 Formação micelar e fração de ionização micelar.

A CMC e a fração de ionização micelar (α), para micelas mistas de **LHA** e CTABr foram estimadas através de gráficos de condutância em função da concentração de surfactante (**Figura 53**). As descontinuidades nesses gráficos fornecem os valores de CMC.^{108, 109}

Observa-se que esses valores variam pouco com o aumento de χ_{LHA} , porém os valores de α , obtidos através da razão do coeficiente angular, aumentam com o aumento de χ_{LHA} , indicando que a adição do íon laurilhidroxamato efetivamente neutraliza as micelas catiônicas, diminuindo assim o potencial superficial micelar e a afinidade por contra-íons. Como mostra a **Tabela 11**, esse efeito se mostrou ser bastante dependente da χ_{LHA} .

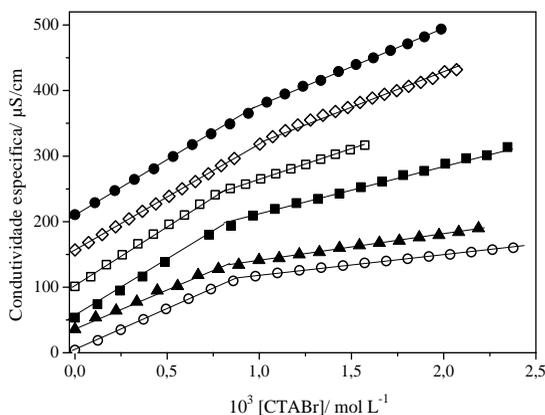


Figura 53. Condutância específica em função de [CTABr], na ausência de **LHA** (○) e na presença de frações molares de **LHA** de: 0,048 (▲); 0,091 (■); 0,11 (□), 0,14 (◇) e 0,20 (●), a 25 °C e pH 10,0, na ausência de tampão.

Tabela 11. Valores de CMC e α em diferentes χ_{LHA} em misturas de CTABr/LHA^a.

χ_{LHA}	α	10^4 CMC, mol/L
0,0	0,23	8,8
0,048	0,41	7,9
0,091	0,43	7,7
0,11	0,50	6,8
0,14	0,60	9,9
0,20	0,71	8,3

^a Em pH = 10,0, 25 °C, 0,01 mol/L.

4.3.2 Estudos Cinéticos em Micelas Mistas

Como anteriormente mencionado, a reação em água do **BDNPP** é relativamente lenta e, em pH 8,0, ($k = 2,5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) é acelerada cerca de 30 vezes pela micela catiônica de CTABr,⁶⁶ o que é esperado para reações do íon hidróxido e um substrato orgânico que pode ser incorporado na micela.⁶⁴ Como nos resultados reportados por Buist e colaboradores, para a hidrólise do **BDNPP** em pH 10,0, k_{obs} aumenta até um máximo e então decresce à medida que os reagentes são diluídos devido ao aumento do volume micelar.⁶⁴ Isso é típico de reações bimoleculares.

A desfosforilação do **BDNPP** em pH 10,0 (auto-tamponado, conforme descrito na **Parte Experimental**) em micelas mistas de CTABr e ácido laurilhidroxâmico (**LHA**) é muito mais rápida do que a mesma na reação na presença de somente CTABr. O aumento da absorbância em 400 nm é consistente com uma liberação de 200 mol% de **DNP**.⁸³ Entretanto, outro produto que absorve em cerca de 360 nm foi observado se formando mais rapidamente numa reação complexa de duas etapas, como mostrado na **Figura 54**.⁸⁵

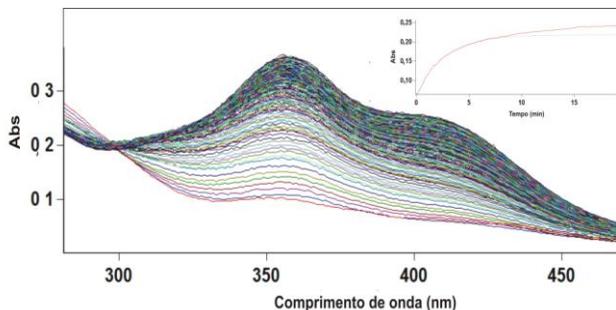


Figura 54. Variação espectral de UV/Vis para a reação do LHA^- /CTABr com **BDNPP** em pH 9,0, a 25 °C. No detalhe tem-se a absorbância *vs* tempo, calculada em 400 nm.

Em uma χ_{LHA} constante e pH 10, as constantes de velocidade observadas apresentam um valor médio de $0,021 \text{ s}^{-1}$, que é muito superior, cerca de 1200, à observada na ausência de LHA, no mesmo pH, **Figura 55**. Observa-se que com $\chi_{\text{LHA}}=0,1$, k_{obs} é independente da [CTABr], indicando que o **LHA** e o substrato se encontram na fase micelar.

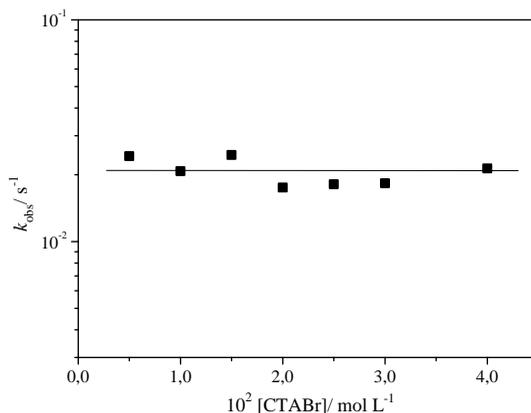


Figura 55. Constantes de velocidade observadas para a reação de desfosforilação do **BDNPP** ($1,33 \times 10^{-5} \text{ M}$) na presença de **LHA**, em função de [CTABr] (■), pH = 10,0, 25 °C, mantendo constante ($[\text{LHA}]/[\text{Surfactante}] = 0,1$).

Conforme esperado, k_{obs} é proporcional à χ_{LHA} e a **Figura 56** mostra que o aumento da [LHA], quando se mantém constante a [surfactante], causa um aumento significativo de k_{obs} para a desfosforilação do **BDNPP**.

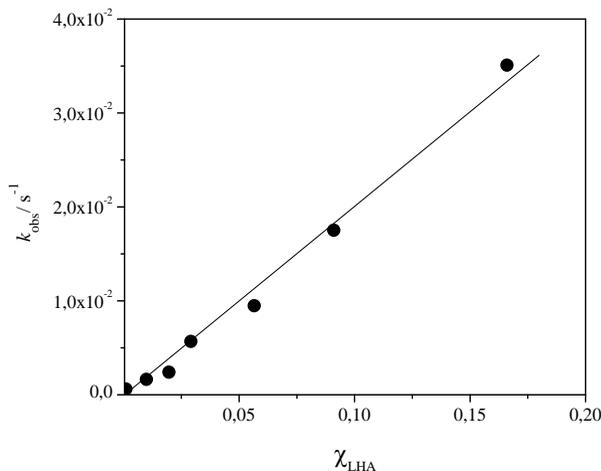


Figura 56. Efeito da χ_{LHA} em k_{obs} (s^{-1}) para a reação do **BDNPP**, pH=10, sem tampão, com $[\text{CTABr}] = 1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, em solução aquosa a 25°C .

A **Figura 57** ilustra o perfil de pH para a desfosforilação do **BDNPP** pelo **LHA**, na presença de CTABr, em que k_{obs} aumenta com o pH e atinge um patamar na região de pH em que o **LHA** está totalmente desprotonado. No gráfico, a hidrólise espontânea do **BDNPP** está incluída para comparação e, em pH 10, k_{obs} é cerca de $9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. Pode-se observar a notável aceleração da reação, em cerca de 2×10^4 vezes, com a incorporação do **LHA** na micela. Essa aceleração pode ser atribuída a (i) efeito hidrofóbico e de carga, que concentram reagentes na micela mista e (ii) nucleofilicidade do lauril hidroxamato monoaniônico, que é um nucleófilo α efetivo que contém pares de elétrons não compartilhados nos átomos de oxigênio e nitrogênio.

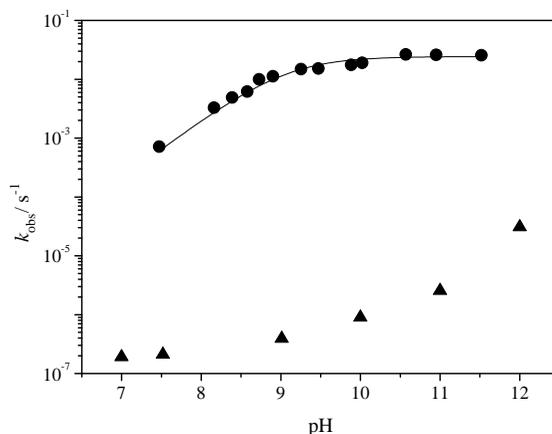


Figura 57. Constantes de velocidades observadas para a reação do **BDNPP** em função do pH em água (▲) e na presença de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L (●) CTABr e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de **LHA**, na ausência de tampão, e a 25 °C.

Esses efeitos micelares são tratados em termos do equilíbrio de distribuição do **BDNPP** e do hidroxamato entre as pseudofases aquosa e micelar, como representado no **Esquema 20** (vide **Introdução**).⁶⁴

As constantes de velocidade na presença do **LHA** são significativamente maiores que na sua ausência, e nas condições experimentais utilizadas aqui, ambos **BDNPP** e **LHA** estão totalmente incorporados na fase micelar. Com isso, pode-se negligenciar reações em água e na ausência de **LHA**, e tratar k_{obs} em função do pH utilizando a **Eq. 14**, que relaciona as constantes de velocidade e a formação do hidroxamato, em termos do pH e do pK_a aparente do **LHA**. O formalismo da **Eq. 14** fornece uma constante de dissociação aparente de 9,2 para o **LHA** em CTABr, em uma $\chi_{LHA} = 0,1$, e uma constante de velocidade na região do patamar de $0,025 \text{ s}^{-1}$.

$$k_{obs} = k_m \chi_{LHA} \frac{K_a}{(K_a + [H^+])}$$

Eq. 14

4.3.3 Caracterização dos productos

Como mostrado anteriormente, a desfosforilação do ânion **BDNPP** pelo ânion benzohidroxamato (**ABH**⁻) segue dois caminhos reacionais: (i) reação no fósforo, gerando um intermediário instável que sofre um rearranjo de Lossen para fenilisocianato, anilina, difeniluréia e *o*-fenilcarbamil benzohydroxamato; e (ii) ataque no carbono aromático gerando um intermediário que de fato foi detectado, mas vagarosamente se decompõe à anilina e 2,4-dinitrofenol.⁸⁵ Com a finalidade de investigar se a reação do **LHA** com **BDNPP** em meio micelar segue o mesmo caminho, ESI-MS no modo negativo foi usado para monitorar o curso reacional da composição aniônica da reação. Reagentes, intermediários e produtos aniônicos foram transferidos diretamente da solução reacional para a fase gasosa e então detectados por ESI(-)-MS. A **Figura 58** mostra dois espectros característicos de ESI-MS coletados no mesmo tempo de reação, mas em diferentes pHs.

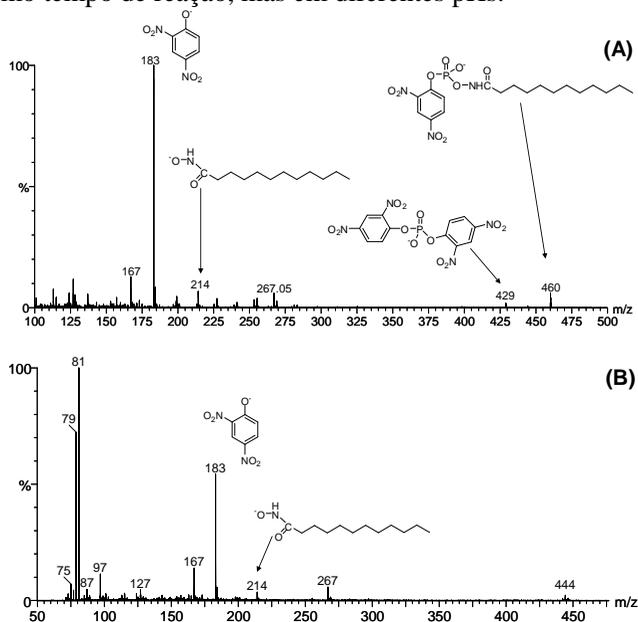
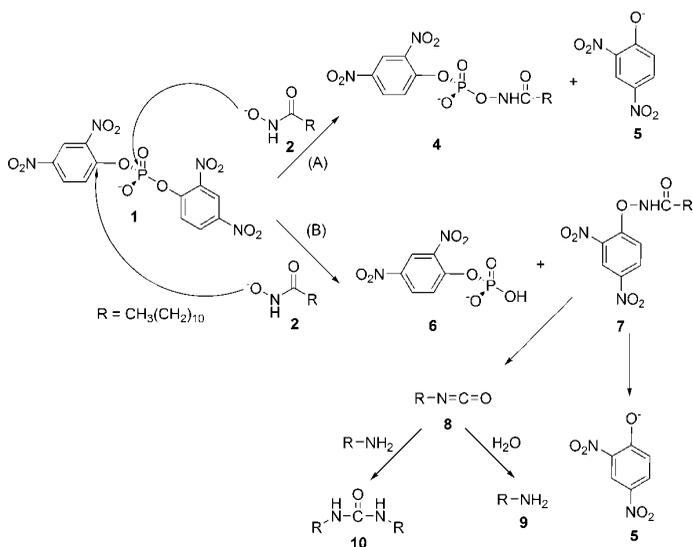


Figura 58. ESI(-)-MS para a solução reacional de **LHA/CTABr** e **BDNPP** a 25 °C, (A) pH 8 e (B) pH 9.

No espectro de ESI(-)-MS da **Figura 58**, foram detectados vários ânions importantes: **BDNPP** de m/z 429, **LHA**⁻ de m/z 214 e ânions provenientes da clivagem do **BDNPP** tais como o fenóxido **DNP**,

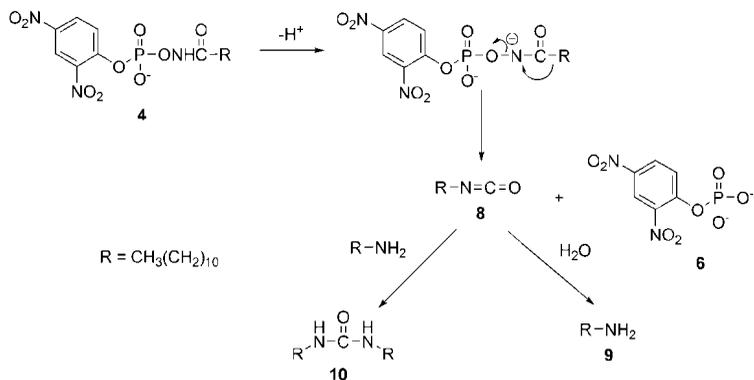
5, de m/z 183, H_2PO_4^- de m/z 97, PO_3^- de m/z 79 e H_2PO_3^- de m/z 81. Entretanto, o ânion mais relevante mecanisticamente é o de m/z 460, que confirma o ataque do hidroxamato no fósforo (caminho **(A)** no **Esquema 39**). Esse intermediário foi confirmado por ESI(-)-MS/MS, que demonstrou sua dissociação à **DNP**, **5**, de m/z 183 (Ver anexo). O ataque via caminho **(A)** no **Esquema 39** forma os produtos de clivagem do **BDNPP**,⁸³ **5**, conforme esperado, e o intermediário **4** de m/z 460, o qual subsequentemente gera **5** e outros produtos conforme será discutido adiante. O fragmento de m/z 167 possivelmente se origina da perda do oxigênio da estrutura **5**. As cinéticas da reação de **LHA**⁻ e **BDNPP** são típicas de uma reação com duas etapas, no qual um composto que absorve no UV é formado, sendo isso consistente com a ocorrência do caminho **B**: o ataque no carbono aromático que fornece o intermediário **7** que subsequentemente se decompõe via rearranjo de Lossen à **DNP**, undecilamina, **9**, entre outros produtos discutidos a seguir.



Esquema 39. Ataque nucleofílico do **LHA**⁻ através de dois caminhos: **(A)** no fósforo, e **(B)** no carbono aromático.

Na tentativa de identificar os produtos da reação do **LHA** e **BDNPP**, RMN de ¹H foi utilizado, comparando-se os espectros com àqueles do material de partida, com o **LHA** em excesso em relação ao

sal de sódio do **BDNPP**, que foi utilizado para evitar sinal de ^1H do íon piridínio, o que complicaria o espectro de ^1H RMN.⁸³ Contudo, os sinais de RMN não foram úteis, uma vez que foram obstruídos pelos sinais do **LHA** em excesso e a troca H-D dificulta a análise dos sinais de NH. Depois de completada a reação, somente o íon 2,4-dinitrofenolato foi observado por espectroscopia de RMN de ^1H (δ 6,74 (d, 1H, $J=9,6\text{Hz}$, Ar), 8,11 (dd, 1H, $J_{ab}=9,6\text{Hz}$ and $J_{bx}=3,0\text{Hz}$, Ar), 8,90 (d, 1H, $J=3,0\text{Hz}$, Ar)), e os sinais foram idênticos àqueles do 2,4-dinitrofenol no pH apropriado. Os sinais do fosfato inorgânico ($\delta=1,86$ ppm) não apareceram simultaneamente com o **DNP**, indicando a formação de derivados do ácido laurilhidroxâmico fosforilado, que lentamente se decompõe, similar aos produtos da reação do **BDNPP** e hidroxilamina. Espectrometria de massas por ionização de elétrons (EI-MS) com o modo de injeção direta também foi aplicada para monitorar a formação de produtos menos polares e não iônicos, e de fato, também foi capaz de identificar outros produtos tais como produtos do rearranjo de Lossen (ver Apêndice). Esses produtos foram extraídos com éter da mistura reacional do **BDNPP** com **LHA**⁻ aquoso (1:1) em pH 9, 25 °C, depois de 10 min. de reação. Os dados de EI-MS foram consistentes com a formação de 1-isocianatoundecano (**8**, m/z 197), undecilamina (**9**, m/z 171) e 1,3-diundeciluréia (**10**, m/z 368). Os resultados estão de acordo com o **Esquema 40**, e indicam que o intermediário O-fosforilado **4** se decompõe à DNPP em meio básico, e sofre rearranjo de Lossen gerando 1-isocianatoundecano, **8**, num rearranjo similar ao sofrido pelo intermediário **7**. Subsequentemente, o isocianato **8** se decompõe à undecilamina **9**, que por sua vez reage com o isocianato **8**, gerando a uréia (**10**). Além disso, dados de EI-MS mostram íons de m/z 325, 311, 297, 283, 269 e 255 que podem ser relacionados com a perda consecutiva de 28 Da da 1,3-diundeciluréia (**10**), que são quebras típicas para dialquil uréias de cadeia longa.¹¹⁰ O **Esquema 40** mostra esse rearranjo, e assim como no caso do ácido benzoidroxâmico, o ânion **LHA**⁻ também se comporta como um nucleófilo suicida, uma vez que perde sua nucleofilicidade depois de reagir com o **BDNPP**.⁸⁵



Esquema 40. Auto-destruição do intermediário da reação do **LHA⁻** e **BDNPP** via rearranjo de Lossen.

A **Figura 59** ilustra como e onde a reação ocorre, com base nos **Esquemas 39** e **40**, e no fato do **LHA** e do substrato estarem totalmente incorporado na micela de CTABr.⁸⁹

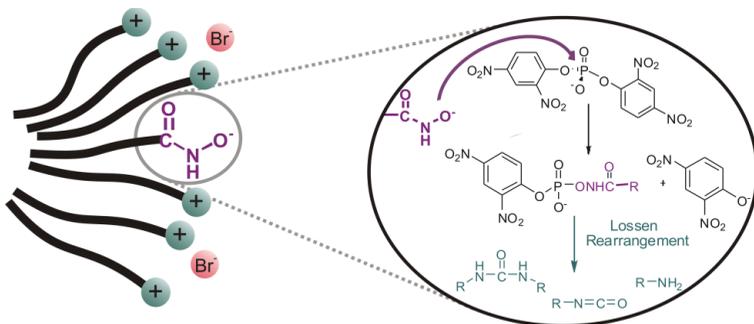


Figura 59. Ilustração da reação entre o **LHA⁻** e o **BDNPP** na pseudofase micelar.

5 CONCLUSÕES

Como mencionado na seção dos Objetivos desta Tese, a principal meta era a obtenção de um polímero capaz de acelerar reações de clivagem de ésteres. De fato, esse polímero (**PHA**) foi obtido, através de uma modificação relativamente simples da poli(acrilamida), PAA. A metodologia aplicada permitiu o posicionamento dos dois grupos funcionais presentes no **PHA** (ácido hidroxâmico e ácido carboxílico) vizinhos um ao outro, o que permitiu a cooperação entre eles, ideal quando se quer desenvolver uma mimese enzimática.

A caracterização do **PHA** foi realizada através de titulação potenciométrica, IV, RMN, ESI/MS, TGA e UV-visível. Porém, houve certa dificuldade, uma vez que a diferença entre o polímero de partida e o **PHA** era muito pequena, já que a conversão do grupo funcional amida para os grupos hidroxâmico e carboxílico foi de apenas 16%. A titulação potenciométrica foi o método mais eficaz para comprovar a presença dos novos grupos funcionais. Claramente, a maior prova da presença desses novos grupos no **PHA** foi o fato desse polímero acelerar diversas reações de clivagem de ésteres, enquanto que a PAA não tem efeito nenhum nessas reações.

O polímero foi testado nas reações de hidrólise dos ésteres: ácido 1-acetoxi-2-naftóico (**1-Ac**), ácido 2-acetoxi-1-naftóico (**2-Ac**), ácido 3-acetoxi-2-naftóico (**3-Ac**), bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) e dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), e *p*-nitrofenil acetato, *n*-butirato e *n*-octanoato (**PNPA**, **PNPB**, **PNPC**). De fato, o **PHA** foi muito eficiente e pode ser considerado promíscuo, uma vez que acelerou a reação de hidrólise de todos os ésteres estudados. O efeito catalítico do **PHA** está apresentado na **Tabela 12**.

Quando se agregou o surfactante CTABr ao **PHA**, observou-se um incremento na velocidade de reação de hidrólise do **BDNPP** (cerca de 15 vezes), quando comparado com a reação na presença de somente polímero. Porém, quando se adicionam SDS e SB3-14, as constantes de velocidade observadas praticamente não variam no primeiro caso e a inibição da reação ocorre com SB3-14. Através de experimentos utilizando ITC, obteve-se a seguinte seqüência para a intensidade de interação **PHA**-surfactante: CTAB > SDS > SB3-14, o que pôde explicar os resultados cinéticos.

Tabela 12. Incremento catalítico promovido pelo **PHA** na clivagem de diversos ésteres.

Substratos	$10^6 k_D/k_o$
BDNPP	30
DEDNPP	130
1-Ac	7,0
2-Ac	150
3-Ac	13
PNPA	14000
PNPB	5800
PNPC	5000

Na segunda parte deste trabalho, utilizaram-se co-micelas que também contêm o grupo hidroxâmico na clivagem do **BDNPP** e analisou-se o mecanismo de reação. As micelas mistas de **LHA/CTABr** aceleraram efetivamente essa reação de desfosforilação devido provavelmente à sua habilidade em concentrar ambos substrato e nucleófilo α na pseudo-fase micelar. As constantes de velocidade observadas aumentam em função do pH, consequência da formação do laurilhidroxamato reativo, que é linearmente dependente da fração molar do nucleófilo na pseudo-fase micelar. Quando essa fração é 0,1, a desfosforilação do **BDNPP** é aproximadamente 10^4 vezes mais rápida que a hidrólise espontânea desse substrato.

As reações de ambos **LHA** e **ABH** (ácido benzoidroxâmico) com **BDNPP** foram monitoradas por ESI-MS e EI-MS e os resultados obtidos são consistentes com um mecanismo envolvendo ataque nucleofílico simultâneo do hidroxamato (i) no fósforo, gerando um intermediário instável que sofre rearranjo de Lossen formando uréia, amina, isocianato e carbamil hidroxamato, que foram detectados; e (ii) no carbono aromático, gerando um intermediário que foi detectado mas decompõe à undecilamina e 2,4-dinitrofenol. A reação do **ABH** com os ésteres **1-Ac**, **2-Ac**, **3-Ac**, **PNPA**, **PNPB** e **PNPC** também foi monitorada por ESI-MS e os resultados obtidos são consistentes com um mecanismo envolvendo ataque nucleofílico do hidroxamato no carbono carbonílico, gerando um intermediário instável que sofre rearranjo de Lossen, formando uréia, amina, isocianato e carbamil

hidroxamato. Acredita-se que esses mecanismos são os que ocorrem para o caso do **PHA** com esses substratos.

A nucleofilicidade do **LHA**, **ABH** e por comparação, do **PHA** (quando se usa o **BDNPP** como um substrato modelo) é similar ao de uma série de oximas e hidroxilaminas que apresentam atividade na clivagem de DNA e esses compostos podem ser ancorados em peptídeos ou outras moléculas para promover a quebra específica de sequência do DNA. Devido ao mecanismo observado na reação de desfosforilação do **BDNPP** pelo **LHA**, **PHA** e **ABH**, conclui-se que esses se comportam como tesouras intramoleculares suicidas, uma vez que perdem sua nucleofilicidade após reagir com o éster. Essa característica dos nucleófilos pode ser relevante na criação de “tesouras moleculares” para terapia genética.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wolfenden, R., Degrees of Difficulty of Water-Consuming Reactions in the Absence of Enzymes *Chemical Reviews* **2006**, 106, 3379-3396.
2. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Machado, V. G.; Nome, F., A Química dos Ésteres de Fosfato. *Química Nova* **2003**, 26, (5), 745-753.
3. Machado, V. G.; Nome, F., Energy-rich Phosphate Compounds. *Química Nova* **1999**, 22, (3), 351-357.
4. Westheimer, F. H., Why Nature Chose Phosphates. *Science* **1987**, 235, (4793), 1173-1178.
5. Kirby, A. J.; Younas, M., Reactivity of Phosphate Esters - Diester Hydrolysis. *Journal of the Chemical Society B-Physical Organic* **1970**, (3), 510-513.
6. Thatcher, G. R. J.; Kluger, R., Mechanism and Catalysis of Nucleophilic-Substitution in Phosphate-Esters. *Advances in Physical Organic Chemistry* **1989**, 25, 99-265.
7. Yang, Y. C.; Baker, J. A.; Ward, J. R., Decontamination of Chemical Warfare Agents. *Chemical Reviews* **1992**, 92, (8), 1729-1743.
8. Jencks, W. P., When Is an Intermediate Not an Intermediate - Enforced Mechanisms of General Acid-Base Catalyzed, Carbocation, Carbanion, and Ligand-Exchange Reactions. *Accounts of Chemical Research* **1980**, 13, (6), 161-169.
9. Yang, Y. C.; Berg, F. J.; Szafraniec, L. L.; Beaudry, W. T.; Bunton, C. A.; Kumar, A., Peroxyhydrolysis of Nerve Agent VX and Model Compounds and Related Nucleophilic Reactions. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1997**, (3), 607-613.
10. Cremllyn, R. J., *Em Agrochemicals: Preparation and Mode of Action* John Wiley & Sons: West Sussex, 1991.
11. Carey, F. A.; Sundberg, R. J., *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanism*. 4 ed.; Springer Science: New York, 2006.
12. Dooley, C. M.; Devocelle, M.; McLoughlin, B.; Nolan, K. B.; Fitzgerald, D. J.; Sharkey, C. T., A Novel Family of Hydroxamate-based Acylating Inhibitors of Cyclooxygenase. *Molecular Pharmacology* **2003**, 63, (2), 450-455.
13. Vane, J. R.; Botting, R. M., The Mechanism of Action of Aspirin. *Thrombosis Research* **2003**, 110, (5-6), 255-258.

14. Marlier, J. F., Multiple Isotope Effects on the Acyl Group Transfer Reactions of Amides and Esters. *Accounts of Chemical Research* **2001**, 34, (4), 283-290.
15. Ryals, J.; Uknes, S.; Ward, E., Systemic Acquired-Resistance. *Plant Physiology* **1994**, 104, (4), 1109-1112.
16. Dixon, R. A.; Paiva, N. L., Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **1995**, 7, (7), 1085-1097.
17. Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A., *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books: Sausalito, California, 2004.
18. Bender, M. L., Mechanisms of Catalysis of Nucleophilic Reactions of Carboxylic Acid Derivatives. *Chemical Reviews* **1960**, 60, (1), 53-113.
19. Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A., *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books: Sausalito, California, 2004.
20. Cleland, W. W.; Hengge, A. C., Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. *Chemical Reviews* **2006**, 106, (8), 3252-3278.
21. Hess, R. A.; Hengge, A. C.; Cleland, W. W., Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Acyl Transfer from p-Nitrophenyl Acetate: Concerted Mechanisms and Increased Hyperconjugation in the Transition State. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2703-2709.
22. Davies, A. G.; Kenyon, J., Alkyl-Oxygen Heterolysis in Carboxylic Esters and Related Compounds. *Quarterly Reviews* **1955**, 9, (3), 203-228.
23. Bender, M. L.; Turnquest, B. W., The Imidazole-Catalyzed Hydrolysis of para-Nitrophenyl Acetate. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79, (7), 1652-1655.
24. Buncel, E.; Um, I. H., The Alpha-Effect and its Modulation by Solvent. *Tetrahedron* **2004**, 60, (36), 7801-7825.
25. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Bunton, C. A.; Nome, F., Reactions of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate with Hydroxylamine. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68, (18), 7051-7058.
26. Buncel, E.; Um, I. H., The Solvent Effect on the Alpha-Effect. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1986**, (8), 595-595.
27. Um, I. H.; Buncel, E., The Origin of the Alpha-Effect: Dissection of Ground-State and Transition-State Contributions. *Journal of Organic Chemistry* **2000**, 65, (2), 577-582.

28. Fersht, A. R., *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company: New York, 1998.
29. Kraut, D. A.; Carroll, K. S.; Herschlag, D., Challenges in Enzyme Mechanism and Energetics. *Annual Review of Biochemistry* **2003**, *72*, 517-571.
30. Benkovic, S. J.; Hammes-Schiffer, S., A Perspective on Enzyme Catalysis. *Science* **2003**, *301*, (5637), 1196-1202.
31. Motherwell, W. B.; Bingham, M. J.; Six, Y., Recent Progress in the Design and Synthesis of Artificial Enzymes. *Tetrahedron* **2001**, *57*, (22), 4663-4686.
32. Menger, F. M., Enzyme Reactivity from an Organic Perspective. *Accounts of Chemical Research* **1993**, *26*, (4), 206-212.
33. Menger, F. M., On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity. *Accounts of Chemical Research* **1985**, *18*, (5), 128-134.
34. Page, M. I.; Jencks, W. P., Entropic Contributions to Rate Accelerations in Enzymic and Intramolecular Reactions and the Chelate Effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, *68*, (8), 1678-1683.
35. Bruice, T. C.; Brown, A.; Harris, D. O., Concept of Orbital Steering in Catalytic Reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, *68*, (3), 658-661.
36. Kirby, A. J.; Dutta-Roy, N.; da 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 PO₃²⁻ Group. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, (19), 7033-7040.
37. Kirby, A. J.; Lima, M. F.; da Silva, D.; Roussev, C. D.; Nome, F., Efficient Intramolecular General Acid Catalysis of Nucleophilic Attack on a Phosphodiester. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, (51), 16944-16952.
38. Orth, E. S.; Brandão, T. A. S.; Milagre, H. M. S.; Eberlin, M. N.; Nome, F., Intramolecular Acid-Base Catalysis of a Phosphate Diester: Modeling the Ribonuclease Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, (8), 2436-2437.
39. Kirby, A. J., Effective Molarities for Intramolecular Reactions. *Advances in Physical Organic Chemistry* **1980**, *17*, 183-278.

40. Fersht, A. R.; Kirby, A. J., Hydrolysis of Aspirin. Intramolecular General Base Catalysis of Ester Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89, (23), 4857-4863.
41. Liu, L.; Breslow, R., A Potent Polymer/Pyridoxamine Enzyme Mimic. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (18), 4978-4979.
42. Liu, L.; Rozenman, M.; Breslow, R., Hydrophobic Effects on Rates and Substrate Selectivities in Polymeric Transaminase Mimics. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (43), 12660-12661.
43. Luzhkov, V.; Åqvist, J., Computer Simulation of Phenyl Ester Cleavage by β -Cyclodextrin in Solution. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (24), 6131-6137.
44. Breslow, R.; Dong, S. D., Biomimetic Reactions Catalyzed by Cyclodextrins and their Derivatives. *Chemical Reviews* **1998**, 98, (5), 1997-2011.
45. Baldini, L.; Bracchini, C.; Cacciapaglia, R.; Casnati, A.; Mandolini, L.; Ungaro, R., Catalysis of Acyl Group Transfer by a Double-Displacement Mechanism: The Cleavage of Aryl Esters Catalyzed by Calixcrown-Ba²⁺ Complexes. *Chemistry-a European Journal* **2000**, 6, (8), 1322-1330.
46. Liu, L.; Breslow, R., Dendrimeric Pyridoxamine Enzyme Mimics. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (40), 12110-12111.
47. Liu, L.; Breslow, R., Polymeric and Dendrimeric Pyridoxal Enzyme Mimics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12, (12), 3277-3287.
48. Chao, Y.; Weisman, G. R.; Sogah, G. D. Y.; Cram, D. J., Host-Guest Complexation .21. Catalysis and Chiral Recognition Through Designed Complexation of Transition-States in Transacylations of Amino Ester Salts. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, 101, (17), 4948-4958.
49. Breslow, E., *Artificial Enzymes*. Wiley-VXHGmbH & CO. KGaA: Weinheim, 2005.
50. Breslow, R., Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design. *Accounts of Chemical Research* **1995**, 28, 146-153.

51. Klotz, I. M.; Royer, G. P.; Scarpa, I. S., Synthetic Derivatives of Polyethyleneimine with Enzyme-like Catalytic Activity (synzymes) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, 68, (2), 263-264.
52. Hollfelder, F.; Kirby, A. J.; Tawfik, D. S., Efficient Catalysis of Proton Transfer by Synzymes. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, (40), 9578-9579.
53. Hollfelder, F.; Kirby, A. J.; Tawfik, D. S., On the Magnitude and Specificity of Medium Effects in Enzyme-like Catalysts for Proton Transfer. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, (17), 5866-5874.
54. Anslyn, E.; Breslow, R., Proton Inventory of a Bifunctional Ribonuclease Model. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, (24), 8931-8932.
55. Esposito, A.; Delort, E.; Lagnoux, D.; Djojo, F.; Reymond, J. L., Catalytic Peptide dendrimers. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, 42, (12), 1381-1383.
56. Liang, C.; Frechet, J. M. J., Applying Key Concepts from Nature: Transition State Stabilization, Pre-Concentration and Cooperativity Effects in Dendritic Biomimetics. *Progress in Polymer Science* **2005**, 30, (3-4), 385-402.
57. Diederich, F.; Stang, P. J., *Template Organic Synthesis*. Wiley-VCH: Weinheim, 2000.
58. Liu, J. Q.; Wulff, G., Functional Mimicry of Carboxypeptidase A by a Combination of Transition State Stabilization and a Defined Orientation of Catalytic Moieties in Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, (25), 8044-8054.
59. Suh, J.; Hah, S. S., Organic Artificial Proteinase with Active Site Comprising Three Salicylate Residues. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (39), 10088-10093.
60. Maibaum, L.; Dinner, A. R.; Chandler, D., Micelle Formation and the Hydrophobic Effect. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, (21), 6778-6781.
61. Allohedan, H. A.; Bunton, C. A.; Romsted, L. S., Micellar Effects Upon the Reaction of Hydroxide Ion with n-Alkyl-2-Bromopyridinium Ion. *Journal of Organic Chemistry* **1982**, 47, (18), 3528-3532.

62. Allohedan, H.; Bunton, C. A.; Mhala, M. M., Micellar Effects Upon Spontaneous Hydrolyses and Their Relation to Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104, (24), 6654-6660.
63. Bunton, C. A.; Diaz, S.; Romsted, L. S.; Valenzuela, O., Effect of Substrate Micellization on Hydrolysis of n-Decyl Phosphate. *Journal of Organic Chemistry* **1976**, 41, (18), 3037-3040.
64. Bunton, C. A.; Nome, F.; Quina, F. H.; Romsted, L. S., Ion Binding and Reactivity at Charged Aqueous Interfaces. *Accounts of Chemical Research* **1991**, 24, (12), 357-364.
65. Marin, M. A. B.; Nome, F.; Zanette, D.; Zucco, C.; Romsted, L. S., Effect of Cetyltrimethylammonium Micelles with Bromide, Chloride, and Hydroxide Counterions on the Rates of Decomposition of Parasubstituted Aryl-2,2,2-Trichloroethanols in Aqueous NaOH. *Journal of Physical Chemistry* **1995**, 99, (39), 14572-14572.
66. Buist, G. J.; Bunton, C. A.; Robinson, L.; Sepulveda, L.; Stam, M., Micellar Effects Upon Hydrolysis of Bis-2,4-Dinitrophenyl Phosphate. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92, (13), 4072-4078.
67. Piculell, L.; Svensson, A.; Norrman, J.; Bernardes, J. S.; Karlsson, L.; Loh, W., Controlling Structure in Associating Polymer-Surfactant Mixtures. *Pure and Applied Chemistry* **2007**, 79, (8), 1419-1434.
68. Romani, A. P.; Gehlen, M. H.; Itri, R., Surfactant-Polymer Aggregates formed by Sodium Dodecyl Sulfate, Poly(vinyl-2-pyrrolidone), and Poly(ethylene glycol) *Langmuir* **2005**, 21, (1), 127-133.
69. Mesa, C. L., Polymer-Surfactant and Protein-Surfactant Interactions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 286, 148-157.
70. Samokhina, L.; Schrunner, M.; Ballauff, M., Binding of Oppositely Charged Surfactants to Spherical Polyelectrolyte Brushes: A Study by Cryogenic Transmission Electron Microscopy. *Langmuir* **2007**, 23, 3615-3919.
71. Olofsson, G.; Loh, W., On the use of Titration Calorimetry to Study the Association of Surfactants in Aqueous Solutions. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, 20, (4), 577-593.
72. Cabane, B., Structure of Some Polymer-Detergent Aggregates in Water *Journal of Physical Chemistry* **1977**, 81, (17), 1639-1645.

73. Ilekti, P.; Piculell, L.; Tournilhac, F.; Cabane, B., How to Concentrate an Aqueous Polyelectrolyte/Surfactant Mixture by Adding Water. *J Phys Chem B* **1998**, 102, 344-351.
74. Ilekti, P.; Martin, T.; Cabane, B.; Piculell, L., Effects of Polyelectrolytes on the Structures and Interaction of Surfactant Aggregates. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 9831-9840.
75. Thalberg, K.; Lindman, B., Polyelectrolyte-ionic Surfactant Systems: Phase Behavior and Interactions. *Surfactants in Solution* **1991**, 11, 243-260.
76. Piculell, L.; Norrman, J.; Svensson, A. V.; Lynch, I.; Bernardes, J. S.; Loh, W., Ionic Surfactants with Polymeric Counterions. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, 147-48, 228-236.
77. Lof, D.; Niemiec, A.; Schillen, K.; Loh, W.; Olofsson, G., A Calorimetry and Light Scattering Study of the Formation and Shape Transition of Mixed Micelles of EO20PO68EO20 Triblock Copolymer (P123) and Nonionic Surfactant (C12EO6). *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, 111, (21), 5911-5920.
78. Asker, D.; Weiss, J.; McClements, D. J., Analysis of the Interactions of a Cationic Surfactant (Lauric Arginate) with an Anionic Biopolymer (Pectin): Isothermal Titration Calorimetry, Light Scattering, and Microelectrophoresis. *Langmuir* **2009**, 25, 116-122.
79. Bai, G.; Santos, L. M. N. B. F.; Nichifor, M.; Lopes, A.; Bastos, M., Thermodynamics of the Interaction between a Hydrophobically Modified Polyelectrolyte and Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 405-413.
80. Bakshi, M. S.; Sachar, S., Surfactant Polymer Interactions Between Strongly Interacting Cationic Surfactants and Anionic Polyelectrolytes from Conductivity and Turbidity Measurements. *Colloid and Polymer Science* **2004**, 282, (9), 993-999.
81. Niemiec, A.; Loh, W., Interaction of Ethylene Oxide-Propylene Oxide Copolymers with Ionic Surfactants Studied by Calorimetry: Random versus Block Copolymers. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, 112, (3), 727-733.
82. Wang, C.; Tam, K. C., Interaction between Polyelectrolyte and Oppositely Charged Surfactant: Effect of Charge Density. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, (26), 8976-8982.

83. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandao, 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* **2004**, 69, (18), 6024-6033.
84. 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* **2004**, 69, (23), 7898-7905.
85. Orth, E. S.; da Silva, P. L. F.; Mello, R. S.; Bunton, C. A.; Milagre, H. M. S.; Eberlin, M. N.; Fiedler, H. D.; Nome, F., Suicide Nucleophilic Attack: Reactions of Benzohydroxamate Anion with Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74, (14), 5011-5016.
86. Souza, B. S. Catálise Intramolecular na Reação de Hidrólise de Ésteres Naftóicos: Relação entre a Conformação e o Efeito do Grupo Carboxílate - Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
87. Bunton, C. A.; Farber, S. J., Hydrolysis of Bis(2,4-Dinitrophenyl) Phosphate. *Journal of Organic Chemistry* **1969**, 34, (4), 767-772.
88. Medeiros, M. Estudo Mecanístico da Reação entre Hidroxilamina e um Triéster de Fosfato: Caracterização de Produtos e Intermediários - Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
89. Silva, M.; Mello, R. S.; Farrukh, M. A.; Venturini, J.; Bunton, C. A.; Milagre, H. M. S.; Eberlin, M. N.; Fiedler, H. D.; Nome, F., The Mechanism of Dephosphorylation of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate in Mixed Micelles of Cationic Surfactants and Lauryl Hydroxamic Acid. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74, (21), 8254-8260.
90. Domb, A. J.; Cravalho, E. G.; Langer, R., The Synthesis of Poly(hydroxamic acid) from Poly(acrylamide). *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **1988**, 26, 2623-2630.
91. Tee, O. S.; Enos, J. A., Hydrolysis of Para-Nitrophenyl Alkanoates in Aqueous Organic-Solvent Mixtures - the Dispersal of Aggregates and the Uncoiling of Normal-Alkyl Chains. *Canadian*

- Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1988**, 66, (12), 3027-3030.
92. Kezdy, F.; Bender, M. L., The Kinetics of the α -Chymotrypsin-Catalyzed Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate. *Biochemistry* **1962**, 1, (6), 1097-1106.
93. Bender, M. L.; Kezdy, F. J., The Mechanism of Action of Proteolytic Enzymes. XXXII. The Current Status of the α -chymotrypsin Mechanism. *Journal of American Chemical Society* **1964**, 86, (18), 3704-3714.
94. Blodgett, J. K.; Loudon, G. M.; Collins, K. D., Specific Cleavage of Peptides Containing an Aspartic Acid (β -hydroxamic acid) Residue. *Journal of American Chemical Society* **1985**, 107, (14), 4305-4313.
95. Laguecir, A.; Ulrich, S.; Labille, J.; Fatin-Rouge, N.; Stoll, S.; Buffle, J., Size and pH Effect on Electrical and Conformational Behavior of Poly(Acrylic Acid): Simulation and Experiment. *European Polymer Journal* **2006**, 42, (5), 1135-1144.
96. Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandao, 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. Comparison of O- and N-Phosphorylation. *Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69, (23), 7898-7905.
97. Bell, R. P.; Evans, P. G., Kinetics of Dehydration of Methylene Glycol in Aqueous Solution. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences* **1966**, 291, (1426), 297-323.
98. Kirby, A. J.; Souza, B. S.; Medeiros, M.; Priebe, J. P.; Manfredi, A. M.; Nome, F., Hydroxylamine as an Oxygen Nucleophile. Chemical Evidence from its Reaction with a Phosphate Triester. *Chemical Communications* **2008**, (37), 4428-4429.
99. Tee, O. S.; Mazza, C.; Du, X. X., Chain-Length Effects in the Cleavage of Aryl Esters by Cyclodextrins - Different Transition-States for Meta-Nitrophenyl and Para-Nitrophenyl Alkanoates. *Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, (11), 3603-3609.
100. Kunitake, T.; Okahata, Y.; Ando, R., Reaction of Hydroxamic Acid Group in Polymer with Para-Nitrophenyl Acetate. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1974**, 47, (6), 1509-1515.

101. Um, I. H.; Yoon, H. W.; Lee, J. S.; Moon, H. J.; Kwon, D. S., Effect of Solvent on the Alpha-Effect: Nucleophilic Substitution Reactions of p-Nitrophenyl Acetate with m-Chlorophenoxide and Benzohydroxamates in MeCN-H₂O Mixtures of Varying Compositions. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, (17), 5939-5944.
102. Ghosh, K. K.; Satnami, M. L.; Sinha, D.; Vaidya, J., Solvent Effects on the Nucleophilic Substitution Reactions of p-Nitrophenyl Acetate with Hydroxamate Ions. *Journal of Molecular Liquids* **2005**, 116, (1), 55-60.
103. Um, I. H.; Park, Y. M.; Buncl, E., The Effect of Solvent on the Alpha-Effect: the MeCN-H₂O Solvent System. *Chemical Communications* **2000**, (19), 1917-1918.
104. Um, I. H.; Lee, E. J.; Buncl, E., Solvent Effect on the Alpha-Effect for the Reactions of Aryl Acetates with Butane-2,3-Dione Monoximate and p-Chlorophenoxide in MeCN-H₂O Mixtures. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, (14), 4859-4864.
105. Teixeira, L. A. C. Investigação Calorimétrica da Interação entre Poli(N-isopropilacrilamida) e Surfactantes Iônicos - Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
106. Loh, W.; Teixeira, L. A. C.; Lee, L. T., Isothermal Calorimetric Investigation of the Interaction of Poly(N-isopropylacrylamide) and Ionic Surfactants. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 3196-3201.
107. Silva, R. C. Aplicação de Calorimetria ao Estudo da Intereção entre Polímeros não Iônicos e Surfactantes Iônicos - Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
108. Farrukh, M. A.; Beber, R. C.; Priebe, J. P.; Satnami, M. L.; Micke, G. A.; Costa, A. C. O.; Fiedler, H. D.; Bunton, C. A.; Nome, F., Reactivity and Models for Anion Distribution: Specific Iodide Binding to Sulfobetaine Micelles. *Langmuir* **2008**, 24, (22), 12995-13000.
109. Neves, M. F. S.; Zanette, D.; Quina, F.; Moretti, M. T.; Nome, F., Origin of the Apparent Breakdown of the Pseudophase Ion-Exchange Model for Micellar Catalysis with Reactive Counterion Surfactants. *Journal of Physical Chemistry* **1989**, 93, (4), 1502-1505.
110. SDBS Web: <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Acessado : 19 de Maio de 2009).

Apêndice

Apêndice A – Caracterização do PHA

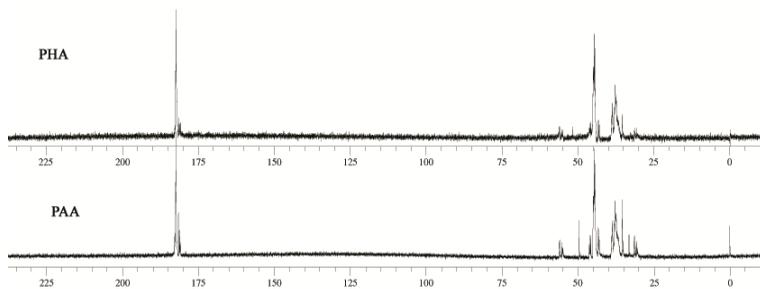


Figura A1. Espectros de RMN de ^{13}C (100,6 MHz) do PHA e PAA em D_2O .

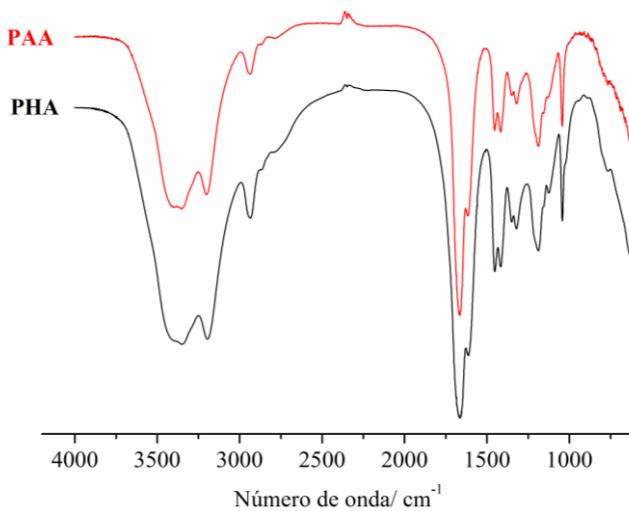


Figura A2. Espectros de IV do PHA e PAA.

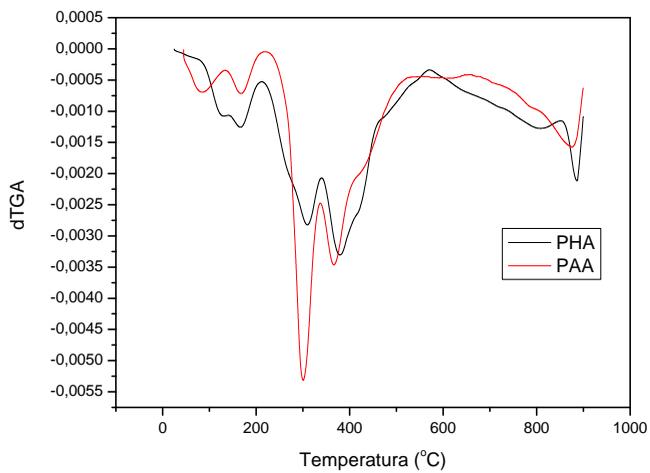


Figura A3. Termogramas do PHA e PAA.

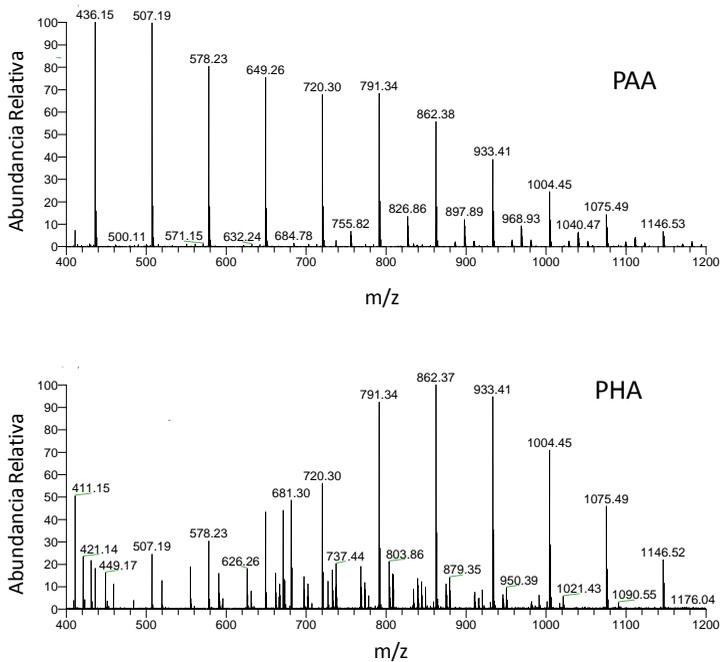


Figura A4. Espectros de ESI-MS no modo negativo do (A) PHA e (B) PAA.

Apêndice B – Dados Cinéticos

Tabela B1. Perfil de pH para a reação de **BDNPP** ($1,33 \times 10^{-5}$ mol/) com **H₂O** e com **PHA** 0,013 mol/L, a 25 °C.

PHA		H₂O	
pH	$10^5 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$	pH	$10^7 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$
5,5	1,32	5,5	1,86
6	2,02	6,52	1,90
6,5	3,07	7	1,91
7	3,94	7,52	2,10
7,5	5,07	9,01	3,92
8	5,13	10	8,99
8,5	7,76	11	25,5
8,6	8,41	12	309,0
8,8	9,24		
9	12,7		
9,5	18,7		
10	27,6		
10,5	35,3		

Tabela B2. Perfil de concentração de **PHA** na clivagem do **BDNPP**, em pH 10, 25 ° C.

$10^2 [\text{PHA}]/ \text{mol L}^{-1}$	$10^4 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$
0,6	0,77
1,0	1,47
1,3	2,31
1,6	2,66
2,0	3,61
2,5	4,77

Tabela B3. Perfil de pH para a clivagem do **DEDNPP** na presença de 0,013 mol/L de **PHA**, 25 °C.

pH	$10^3 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$
4	0,028
5	0,11
6	0,56
7	1,14
8	1,73
9	3,96
10	7,84
9,5	8,81
10,5	13,0
11	15,4
12	17,9

Tabela B4. Perfil de concentração de **PHA** na clivagem do **DEDNPP**, em pH 10, 25°C.

10^2 [PHA]/ mol L ⁻¹	10^3 k_{obs} / s ⁻¹
0,333	1,82
0,667	3,81
1,33	7,84
2,00	10,9
2,67	15,8
3,33	20,1

Tabela B5. Perfil de pH para a reação do **3-Ac**, **2-Ac** e **1-Ac**, na presença de **PHA** 0,013 mol/L a 25 °C.

2-Ac		1-Ac		3-Ac	
pH	$10^4 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$	pH	$10^4 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$	pH	$10^4 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$
4,0	0,05	4,0	0,25	5,0	0,2
5,0	0,27	4,5	0,30	5,5	0,47
5,5	0,61	5,0	0,40	6,0	0,71
6,0	1,33	5,5	0,64	6,5	1,12
6,5	2,30	6,0	0,85	7,0	1,30
7,0	3,04	6,5	1,16	7,5	1,64
7,5	3,65	7,0	1,40	8,0	2,36
8,0	5,18	7,5	1,65	8,5	2,97
8,5	7,50	8,0	1,79	8,6	3,45
9,0	11,2	8,5	2,11	8,8	3,84
9,5	14,6	8,6	2,09	9,0	4,78
10,0	21,3	8,8	2,36	9,5	6,43
		9,0	3,06	9,5	6,53
		9,5	3,11	10,5	1,13
		9,5	3,11		
		10,0	4,57		
		10,5	4,33		

Tabela B6. Perfil de pH para a reação do **3-Ac**, **2-Ac** e **1-Ac**, em água, a 25 °C.

2-Ac		1-Ac		3-Ac	
pH	$10^6 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$	pH	$10^6 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$	pH	$10^6 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$
6	7,07	6	2,43	6	0,71
7	7,04	7	2,65	7	0,73
8	7,22	8	3,39	8	2,37
9	7,25	9	3,79	9	5,26
10	8,42	10	1,13	10	41,3

Tabela B7. Efeito da concentração de **PHA** nas reações com **1-Ac**, **2-Ac** e **3-Ac**, a 25°C e pH=10.

$10^2 [\text{PHA}]/ \text{mol L}^{-1}$	$10^4 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$		
	1-Ac	2-Ac	3-Ac
0,67	1,82	3,22	1,90
1,0	2,65	4,90	3,05
1,33	3,45	7,22	4,42
1,67	4,23	8,78	5,33
2,0	5,50	11,5	6,60
2,67	7,05	16,9	9,58

Tabela B8. Efeito do pH nas reações de clivagem dos ésteres **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**, na presença de 0,013 mol/L de **PHA**, a 25°C.

pH	$10^3 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$		
	PNPA	PNPB	PNPC
4,0	0,0247	0,011	0,0085
5,0	0,17	0,089	0,13
6,0	1,15	0,64	0,33
7,0	2,42	1,20	0,99
8,0	6,61	3,29	2,1
8,3	7,35	3,38	2,61
8,6	12,1	5,1	3,78
8,8	14,0	6,3	5,62
9,0	19,3	7,84	7,1
9,5	35,1	14,6	13,0
10,0	53,0	23,0	19,0

Tabela B9. Efeito do pH nas reações de quebra dos ésteres **PNPA**, **PNPB** e **PNPC** em H₂O, a 25°C.

pH	$10^4 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$	
	PNPA	PNPB
10	7,75	3,63
9	1,05	0,57
8	0,45	0,021
7	0,014	0,0097

Tabela B10. Efeito da concentração de **PHA** nas reações com **PNPA**, **PNPB** e **PNPC**, a 25°C e pH=10.

$10^4 [\text{PHA}]/ \text{mol L}^{-1}$	$10^2 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$		
	PNPA	PNPB	PNPC
3,33	0,473	0,256	0,156
6,66	1,02	0,477	0,394
16,6	2,7	1,07	0,976
33,3	6,9	2,41	2,25
50,0	9,5	3,72	2,97
66,6	13,6	4,94	4,33
100	18,8	7,92	6,18

Tabela B11. Efeito da adição de acetonitrila em água nas reações do PHA 0,013 mol/L com **1-Ac**, **3-Ac** e **BDNPP**, a 25°C e pH=10.

% CH ₃ CN em H ₂ O	$10^5 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$		
	1-Ac	3-Ac	BDNPP
40	6,40	15,7	2,61
35	6,15	13,2	2,77
30	6,65	14,7	3,36
25	7,05	-	4,23
20	8,01	19,9	5,49
15	9,89	21,4	8,65
10	11,9	26,2	10,4

Tabela B12. Efeito da adição de DMSO em água nas reações do PHA 0,013 mol/L com **1-Ac**, **3-Ac** e **BDNPP**, a 25°C e pH=10.

% DMSO em H ₂ O	$10^4 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$		
	1-Ac	3-Ac	BDNPP
80	4,27	12,5	43,9
70	2,51	8,40	22,2
60	1,84	6,59	9,75
50	1,65	5,94	4,15
40	1,40	4,11	2,48
30	1,42	3,95	2,01
20	1,54	3,74	1,90
10	1,68	3,75	1,75

Tabela B13. Perfil de pH para a reação do **BDNPP** com **PHA** 0,013 mol/L, na presença de CTABr, a 25 °C.

pH	$10^5 k_{\text{obs}}/\text{s}^{-1}$
10	383
9,5	282
9	164
8,5	75,4
8	46,5
7,5	14,9
7	6,93
6,5	2,82
6	1,26
5,45	0,54
5,08	0,25

Tabela B14. Efeito da concentração de **CTABr** nas reações com **BDNPP**, **1-Ac**, e **3-Ac**, a 25°C e pH=10.

$10^4 [\text{CTABr}] / \text{mol L}^{-1}$	$10^4 k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$		
	1-Ac	3-Ac	BDNPP
5,0	-	-	5,73
8,0	-	-	15,5
13,3	2,91	40,6	23,7
33,3	3,96	51,1	24,1
50,0	-	-	67,4
60,0	-	-	73,3
66,6	7,0	107	65,7
100,0	7,3	108	68,8
133,3	7,6	114,5	64,8
166,6	2,91	104	67,6
220	-	-	74,2

Tabela B15. Efeito do CTABr 0,01 M, SB3-14 0,01 mol/L e SDS 0,01 mol/L, na reação do PHA 0,013 mol/L com BDNPP , a 25°C e pH=10.

CTABr		SDS		SB3-14	
pH	$10^5 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$	pH	$10^5 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$	pH	$10^5 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$
10	383,0	9,97	19,0	10,03	6,15
9,5	282,0	9,02	10,8	9,02	4,19
9	164,0	8	7,0	8,01	3,26
8,5	75,4	7	4,03	7	2,41
8	46,5	6	2,07	6	1,44
7,5	14,9				
7	6,9				
6,5	2,82				
6	1,26				
5,45	0,54				
5,08	0,25				

Apêndice C - Clivagem de ésteres mediados por micelas funcionalizadas

C1. ESI-MS/MS do intermediário chave de m/z 460

O ânion de m/z 460 que confirma o ataque do hidroxamato no fósforo foi detectado via ESI(-)-MS/MS, que se dissocia para formar **DNP** de m/z 183 (**Figura D1**).

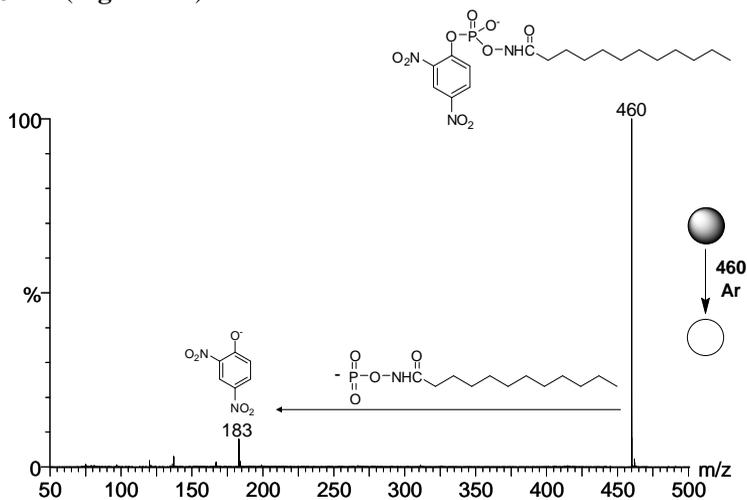


Figura C1. ESI-MS/MS do intermediário chave de m/z 460.

C2 - Dados de EI-MS para identificação do produto

A **Tabela D1** apresenta a designação dos picos para os produtos da reação do **BDNPP** com **LHA**. As fragmentações de massas tipicamente observadas para alguns produtos também estão mostradas, sendo que os resultados são concordantes com o da literatura.

Tabela C1. Dados de EI-MS para os produtos extraídos com éter da reação do **BDNPP** com **LHA** (1:1) em pH 9, a 25 °C, depois de 10 min.

Composto	<i>m/z</i>
LHA	<i>m/z</i> 184, 183, 113, 111, 99, 97, 85
2,4-dinitrofenol (5)	<i>m/z</i> 184, 154, 107, 91, 63, 53
Undecilamina (9)	<i>m/z</i> 171, 100, 86, 55, 45, 44, 43, 41, 30, 29
1-isocianato undecano (8)	<i>m/z</i> 197, 169, 168, 155, 126, 125, 113, 112, 111, 99
Difeniluréia (10)	<i>m/z</i> 368, 325, 311, 297, 283, 269, 255

Apêndice D – Dados Cinéticos para a reação BDNPP com LHA⁻

Tabela D1. Constantes de velocidade observadas para a reação do **BDNPP** com **LHA**, em função de [CTABr], pH = 10,0, a 25 °C, com ([LHA]/[CTABr]) = 0,1.

10^3 [LHA], mol/L	10^2 [CTABr], mol/L	$10^2 k_{\text{obs}}$, s ⁻¹
0,5	0,5	2,43
1,0	1,0	2,08
1,5	1,5	2,42
2,0	2,0	1,75
2,5	2,5	1,81
3,0	3,0	1,43
3,5	3,5	-
4,0	4,0	2,05

Tabela D2. Constantes de velocidade observada para a reação do **BDNPP** ($1,33 \times 10^{-5}$ M) em função do pH, na presença de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de CTABr e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de **LHA**, pH = 10,0, a 25 °C.

pH	$10^2 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	pH	$10^2 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
6,5	0,024	9,9	1,75
7,5	0,071	10,0	1,90
8,2	0,33	10,6	2,64
8,4	0,49	11,0	2,60
8,6	0,62	11,5	2,55
8,7	0,99		
8,9	1,12		
9,3	1,49		
9,5	1,12		

Tabela D3. Efeito de χ_{LHA} em k_{obs} (s^{-1}) para a reação do **BDNPP**, $\text{pH}=10$ e $[\text{CTABr}] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$, em solução aquosa, a 25°C .

$10^3 [\text{LHA}], \text{ mol/L}$	χ_{LHA}	$10^2 k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$
0,01	$9,9 \times 10^{-4}$	0,062
0,1	$9,9 \times 10^{-3}$	0,16
0,2	$1,96 \times 10^{-2}$	0,24
0,3	$2,91 \times 10^{-2}$	0,57
0,6	$5,66 \times 10^{-2}$	0,95
1,0	$9,1 \times 10^{-2}$	1,75
2,0	0,166	3,51