



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Curso de Graduação em Química Bacharelado

**EFEITO SOBRE OS EQUILÍBRIOS DE PROTONAÇÃO E
REATIVIDADES DE ÉSTERES DE FOSFATO
DERIVADOS DE AMINOFENÓIS**

ELISA SOUZA ORTH

FLORIANÓPOLIS/SC
NOVEMBRO – 2005

ELISA SOUZA ORTH

**EFEITO SOBRE OS EQUILÍBRIOS DE PROTONAÇÃO E
REATIVIDADES DE ÉSTERES DE FOSFATO
DERIVADOS DE AMINOFENÓIS**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em
Química, da Universidade Federal de Santa Catarina –
UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Química

Coordenadora de Estágio: Profa. Dra. Iolanda da Cruz Vieira

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

FLORIANÓPOLIS / SC

NOVEMBRO – 2005

AGRADECIMENTOS

Acredito que estou concluindo um longo e árduo caminho. Concluindo, mas ao mesmo tempo iniciando outra nova e promissora jornada. Isto porque tenho certeza que toda minha aprendizagem na universidade criará raízes sólidas para a construção de um futuro próspero. Foram muitas pessoas que enriqueceram minha aprendizagem, não só no âmbito acadêmico, mas também para a vida. Conheci pessoas maravilhosas com personalidades distintas, concretizando muitas amizades verdadeiras que jamais esquecerei. Entre elas, a Ariane. Também tive a oportunidade e honra de conhecer muitos professores espetaculares, tanto didaticamente quanto como pessoa. Professores que tornaram a Química uma Ciência fascinante e ao mesmo tempo palpável. Um professor que teve uma grande influência nesta minha trajetória foi meu orientador, Prof Faruk Nome, de intelectualidade invejável e índole inquestionável. Com certeza, toda experiência que adquiri trabalhando em seu laboratório foi muito importante para o meu amadurecimento como aluna e jovem pesquisadora. Trabalhei praticamente quatro anos no Laboratório de Catalise e Fenômenos Interfaciais onde eu conheci pessoas que hoje cultivo como verdadeiros amigos. Pessoas que contribuíram muito no meu desenvolvimento acadêmico, me ajudando sempre nas horas necessárias. Entre elas destaco o doutorando Tiago Brandão do qual sou uma assídua pupila, que se tornou além de um grande amigo, um verdadeiro mestre, mostrando ser além de uma pessoa inestimável, um acadêmico muito competente. Agradeço também ao Bruno pela colaboração, apoio e amizade. Mas acima de todas estas pessoas, agradeço aos meus pais que são meus maiores ídolos. Aqueles que me garantiram uma educação exemplar, consolidando muitos valores imprescindíveis na minha vida, ensinando-me a almejar conquistas, mas também valorizar as derrotas. Com certeza eles tiveram papel fundamental na minha motivação acadêmica. Mãe, agradeço por toda paciência e carinho bem como por toda dedicação e espero estar correspondendo a suas expectativas. Pai, obrigada pela rica influência acadêmica, e pelos sábios conselhos. Por fim, agradeço a todas aquelas pessoas que passaram pela minha vida universitária, enriquecendo de alguma forma minha aprendizagem.

“A coisa mais incompreensível sobre o mundo é que ele é compreensível”

A. Einstein

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MECANISMOS DE HIDRÓLISE DE ÉSTERES DE FOSFATO	2
1.2 CATÁLISE INTRAMOLECULAR.....	5
1.2.1 Catálise Intramolecular Ácida-Geral.....	6
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	10
4.1 REAGENTES.....	10
4.2 SÍNTESE DO IMPP	10
4.2 TITULAÇÕES DE 8QP E IMPP	11
4.3 MEDIDAS CINÉTICAS	12
4.4 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X.....	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5.1 TITULAÇÕES	14
5.1.1 Titulações Potenciométricas	14
5.1.2 Titulações Espectrofotométricas	15
5.1.3 Titulações por ³¹ P RMN.....	16
5.2 ESTUDO CINÉTICO.....	17
5.3 CALCULOS COMPUTACIONAIS	21
5.4 RAIOS-X	23
6. CONCLUSÃO.....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila entre os grupos axiais X e Y.....	3
Figura 2 – Sistema de Titulação Potenciométrica,	11
Figura 3 - Curva de titulação : A – Solução de 1,0 mM de IMPP e B – Solução de 4 mM de 8QP; KOH a 0,1008 M, força iônica a 0,1 (KCl), 25,0 °C.	14
Figura 4 – Espectros UV-Vis do A - IMPP e B - 8QP em diferentes pHs a 25,0 °C	16
Figura 5 – Dados de ³¹ P RMN para IMPP e 8QP	17
Figura 6 – Perfil da reação do IMPP com água, força iônica=1,0, 60°C.....	17
Figura 7 - Perfis de pH para os ésteres 6 – 9 , Condições: 6 - 8 a 60 °C, 9 a 55 °C e $\mu = 0,2$	20
Figura 8 - Estruturas conformacionais para o IMPP obtidas por cálculos teóricos através do método PCM/B3LYP/6-31++G(d,p).....	22
Figura 9 – Raio X do IMPP.....	23
Figura 10 – Estrutura de raio-x do 2-(2-imidazolil) fenol.....	25

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento da estrutura do IMPP	13
Tabela 2 – Constantes obtidas através do ajuste teórico das curvas da Figura 3	15
Tabela 3 - Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) para o IMPP	24

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

IMPP - 2-(2'-imidazolil)fenilfosfato

8QP - 8-quinolil fosfato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

MANEP – 8-dimetilamino naftil-1-fosfato

RESUMO

Ésteres de fosfato têm grande importância biológica ocorrendo em muitos processos de sinalização e regulação celular, bem como em enzimas. Existe um grande interesse em compreender os mecanismos de hidrólise destes compostos, principalmente dos monoésteres de fosfato que podem apresentar uma grande sensibilidade em relação a processos catalíticos que incluem uma transferência de próton. Assim é importante distinguir os equilíbrios de desprotonação envolvidos para possibilitar um estudo mais concreto quanto às espécies iônicas presentes no meio e assim justificar suas diferentes reatividades.

Neste trabalho estudaram-se os equilíbrios de dissociação do 2-(2'-imidazolil)fenilfosfato (IMPP) e 8-quinolil fosfato (8QP), e encontraram-se valores de pK_a para o IMPP de 4,67 e 7,47, e para o 8QP de 4,30 e 6,63. Ainda foi observado para ambos compostos através de titulação espectrofotométrica e de ^{31}P RMN que o pK_{a1} corresponde à desprotonação do grupo fosfato e o pK_{a2} ao grupo imidazolínio ou quinolínico.

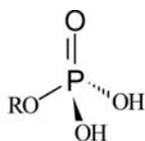
Foi estudada também a reação de hidrólise do IMPP, onde se observou que a espécie zwitteriônica do IMPP é mais reativa que as demais espécies, apresentando comportamento similar ao 8QP. Ao comparar com as reatividades de outros monoésteres de fosfato, corroborou-se uma íntima dependência entre reatividade e a possibilidade de formar ligação de hidrogênio, o que facilitaria o mecanismo por transferência de próton.

Cálculos computacionais mostraram que a estrutura mais estável do IMPP apresenta uma torção de $26,4^\circ$ entre o anel imidazolínio e fenílico, desfavorecendo uma ligação de hidrogênio. Esses resultados foram confirmados pelos dados de raio-x, onde se observou que os planos do anel imidazolínico e fenílico estão torcidos por 37° .

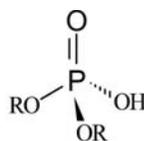
Comparação entre a estrutura do IMPP e do respectivo fenol, onde o grupo imidazolínio não apresenta torção em relação ao anel fenílico, permitiram propor que no estado de transição da reação de hidrólise do IMPP, o grupo imidazolínio deve girar em relação ao anel fenílico, favorecendo a estabilização do estado de transição e a expulsão do grupo de saída.

1. INTRODUÇÃO

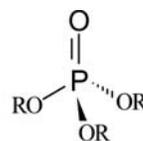
Os ésteres de fosfato são classificados em mono-, di- ou triésteres. A nomenclatura é baseada na substituição de um, dois ou três grupos alquila ou arila pelos hidrogênios do ácido fosfórico, respectivamente, como demonstrado abaixo.



monoéster fosfórico



diéster fosfórico



triéster fosfórico

Os ésteres fosfóricos apresentam uma função vital nos sistemas biológicos, são responsáveis pelo armazenamento e transmissão da informação genética (DNA e RNA),¹ participam na estrutura de coenzimas² e, anidridos fosfóricos, servem como reserva de energia^{3, 4} e participam em diversos processos de sinalização e regulação da atividade biológica. Também têm aplicações como plastificantes, reagentes na preparação de polímeros organofosforados, complexantes para a extração de metais pesados, inseticidas, pesticidas e armas de guerra⁵.

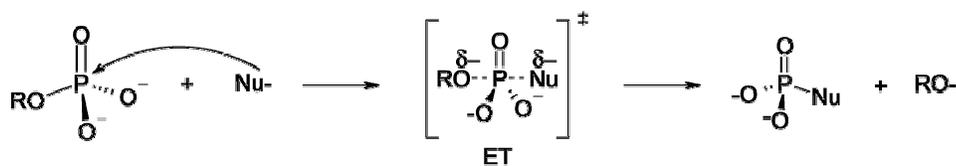
Os monoésteres de fosfato são compostos muito estáveis, por exemplo, a hidrólise de um alquilfosfato em 1M KOH tem um tempo de vida média ($t_{1/2}$) de 10^{12} anos a 25 °C⁶. Já o $t_{1/2}$ para a hidrólise espontânea do DNA, um diéster de fosfato, está estimado na ordem de bilhões de anos⁷. Tal estabilidade justifica o papel fundamental do DNA na preservação da informação genética e no caso de monoésteres na sinalização e controle de processos biológicos.

1.1 MECANISMOS DE HIDRÓLISE DE ÉSTERES DE FOSFATO

Existem dois mecanismos possíveis para a reação de hidrólise de ésteres de fosfato, no primeiro, o átomo de carbono da ligação P-O-C do éster serve como eletrófilo e como resultado o grupo fosfato é substituído pelo nucleófilo, ocorrendo assim quebra da ligação C-O. No segundo mecanismo de hidrólise de fosfato, o nucleófilo ataca o átomo de fósforo e desloca um alcóxido ou fenóxido via quebra da ligação P-O.

A reação via quebra da ligação C-O ocorre preferencialmente para ésteres alifáticos e nos pHs inferiores a 2, pois o grupo de saída é o ácido fosfórico neutro. Já em pHs mais elevados, 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 associativo⁸.

O mecanismo dissociativo ocorre através da liberação do íon metafosfato hidratado (PO_3^-), que possui uma geometria trigonal plana e pode reagir com o nucleófilo por ambas as faces. No mecanismo associativo, a espécie formada no ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo é pentacoordenada com geometria do tipo bipirâmide trigonal, sendo esta espécie um intermediário ou um estado de transição. No **Esquema 1** está representado um dos mecanismos associativos possíveis em reações de ésteres de fosfato. É interessante notar que no estado de transição pentacoordenado, o grupo de saída deve ocupar a posição apical nesta geometria, visto que as ligações apicais possuem comprimentos maiores e são conseqüentemente mais fracas. Um outro mecanismo associativo acontece com formação de um intermediário pentacoordenado, no qual o nucleófilo e o grupo de saída ocupam as posições apicais.



Esquema 1

Na **Figura 1** está apresentado um diagrama simplificado dos mecanismos de hidrólise de monoésteres de fosfato, bem como suas variantes.

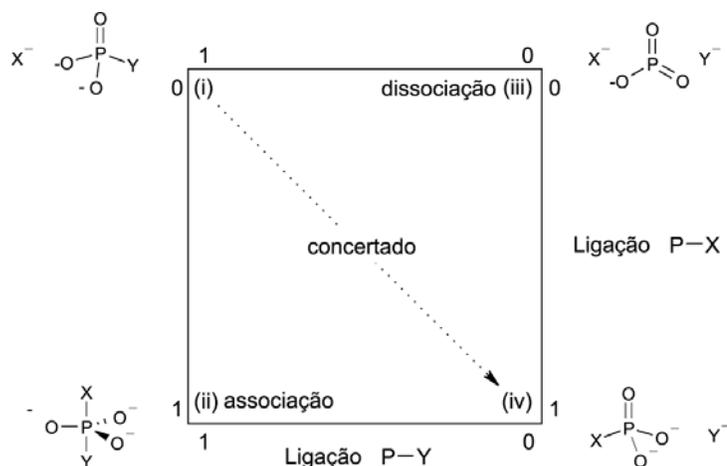
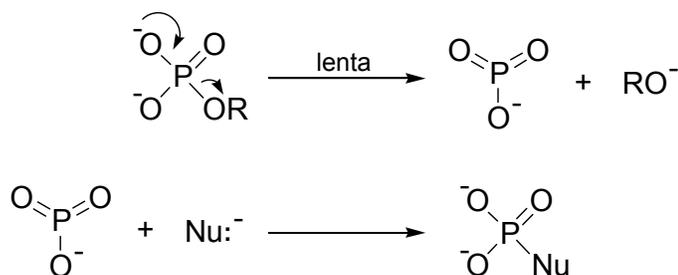


Figura 1 – Diagrama simplificado de coordenada de reação para a transferência do grupo fosforila entre os grupos axiais X e Y⁸.

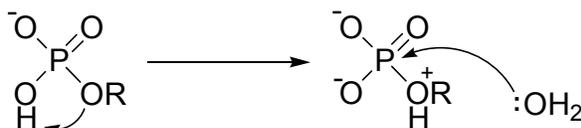
Neste diagrama observa-se que os mecanismos em etapas estão representados ao longo das bordas, enquanto que os mecanismos concertados correspondem aos caminhos que passam pelo centro.

O mecanismo de hidrólise de diânions de monoésteres de fosfato segue um caminho dissociativo, onde foi proposto que a etapa determinante da velocidade de reação é a formação do ânion e do metafosfato (**Esquema 2**). Este mecanismo tem sido questionado, devido a considerável dependência da constante de hidrólise em relação à basicidade.⁹ Assim, o mecanismo de hidrólise de diânions de monoésteres aproxima-se da aresta dissociativa no diagrama da **Figura 1**, porém não é estritamente dissociativo.



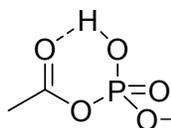
Esquema 2

Já o mecanismo de hidrólise de monoânions de ésteres de fosfato deve ocorrer através de uma catálise intramolecular por transferência de próton. Em geral, a hidrólise de monoânions de fosfomonoésteres é consideravelmente mais rápida do que a observada para a forma dianiônica, com exceção de monoésteres com grupos de saída bem ativados, por exemplo, o 2,4-dinitrofenil, onde a espécie dianiônica é a mais reativa.¹⁰ O mecanismo provável de hidrólise da espécie monoaniônica deve envolver a transferência intramolecular de um próton para o grupo de saída como demonstrado no **Esquema 3**.



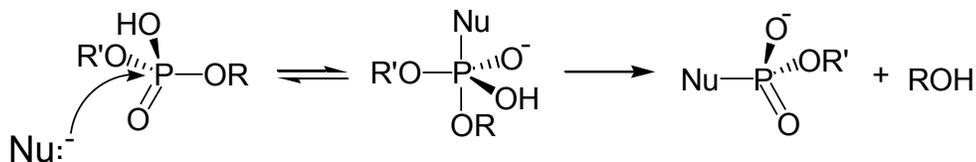
Esquema 3

Um exemplo interessante deste tipo de reação é a hidrólise do monoânion do anidrido **1**, que sofre hidrólise a 39,00°C, 20 vezes mais rápido que ésteres com grupos de saída comparáveis. Kirby¹⁰ atribuiu este efeito à rápida transferência de próton entre os centros básicos.



1

Na hidrólise da espécie neutra dos monoésteres de fosfato observa-se tanto a clivagem da ligação C-O quando P-O e ressalta-se que esta reação é mais rápida que a reação correspondente para monoânions e diânions de monoésteres. Geralmente ésteres com melhores grupos de saída sofrem preferencialmente clivagem P-O, através de uma reação concertada ou de um mecanismo adição-eliminação, com a formação de um intermediário pentacoordenado como demonstrado no **Esquema 4**.



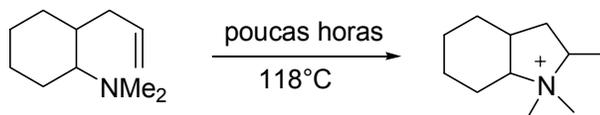
Esquema 4

1.2 CATÁLISE INTRAMOLECULAR

A catálise intramolecular é aquela onde 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, embora exista muita confusão na atribuição dos fatores responsáveis por esta eficiência.

Bruice explicou a eficiência da catálise intramolecular em função do efeito de proximidade.¹¹ Outros, como Koshland atribuíram a fatores como uma forte dependência angular das reações. No entanto Menger¹¹ demonstrou experimentalmente que o ângulo não parece ser um parâmetro fundamental neste tipo de catálise.

A proximidade parece uma idéia atrativa e tem sido considerada um fator importante na catálise intramolecular, sendo que diversos aspectos podem ser citados desse efeito. Page e Jencks¹¹ propuseram o efeito entrópico como responsável pela alta eficiência catalítica de reações intramoleculares. E Menger¹¹, foi mais adiante e postulou que: “A velocidade de reação entre dois sítios A e B também é proporcional ao tempo que esses sítios residem dentro de uma distância crítica”, conhecida como teoria espaço-temporal. Ela considera que a eficiência da catálise intramolecular está atrelada a fatores como entropia, proximidade e tempo de vida do complexo de sítios reativos. No **Esquema 5** está apresentado um exemplo de reação intramolecular, onde se observa a necessidade de um tempo suficiente a uma distância crítica para que ocorra a reação entre o grupo amino e a dupla ligação.

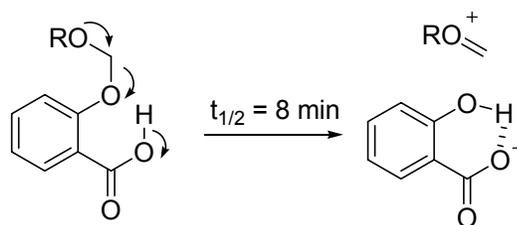


Esquema 5

O conceito de molaridade efetiva (EM) permite uma quantificação da eficiência da catálise intramolecular. A molaridade efetiva é definida como sendo a razão entre a constante de velocidade de primeira ordem da reação intramolecular e a constante de velocidade de segunda ordem da reação intermolecular. Assim quanto maior a 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} , o que torna ainda mais interessante mimetizar sistemas enzimáticos.

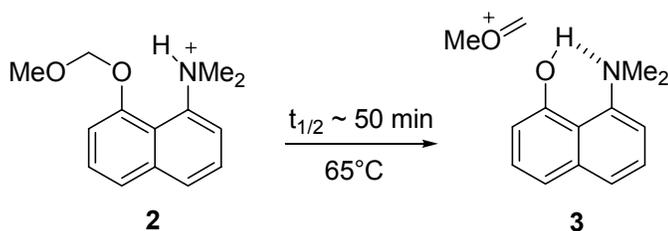
1.2.1 Catálise Intramolecular Ácida-Geral

Os estudos de reações intramoleculares são interessantes para modelar as características principais do sítio ativo de enzimas, e assim, explicar a nível molecular a eficiência da catálise enzimática. Entre os processos mais importantes que têm sido destacados na catálise enzimática é a catálise por transferência de próton. Assim, tem-se grande interesse em estudar modelos para estas reações, como por exemplo o cetal derivado de ácido salicílico, que tem $t_{1/2}$ de hidrólise de 8 minutos e EM acima de 10^4 M (**Esquema 6**).¹²



Esquema 6

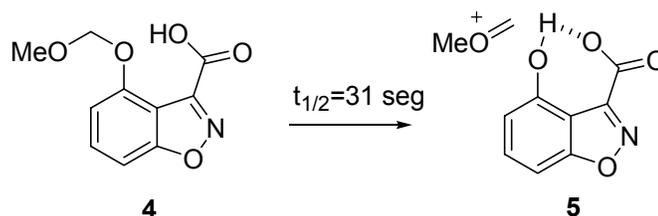
A alta eficiência da catálise intramolecular ácido-geral nesta reação tem sido atribuída a forte ligação de hidrogênio no ânion salicilato, com uma estabilização de 4-5 kcal/mol. Esta forte ligação de hidrogênio chega a aumentar consideravelmente o pK_a do fenol, de 10,00 para 12,95 (25°C).¹² Este sistema apresenta alguns fatores adicionais que podem justificar a catálise, como a conjugação do grupo ácido carboxílico e o grupo de saída (fenóxido). Outros sistemas também foram avaliados, como o metoxi-metil acetal derivado da hidroxinaftilamina (**Esquema 7**). Neste caso, tem-se uma eficiência catalítica na ordem de 10^6 , comparando com a hidrólise do grupo acetal.



Esquema 7

No composto **2**, observa-se uma ligação de hidrogênio entre o grupo Me_2NH^+ e o átomo de oxigênio ligado ao anel, razão pelo qual o $\text{p}K_a$ de Me_2NH^+ igual a 7,45 é superior aquele observado para uma simples naftilamina ($\text{p}K_a \sim 5$). Provavelmente a forte ligação de hidrogênio em **3**, bem como no estado de transição justifica a alta eficiência catalítica observada.¹³

Um exemplo interessante onde a transferência de próton também exerce papel fundamental é o composto **4** derivado da benzisoxazol (**Esquema 8**). O $t_{1/2}$ nesta reação é de somente 31 segundos a 39°C ¹⁴, sendo o fator determinante a formação de uma forte ligação de hidrogênio no produto **5**.



Esquema 8

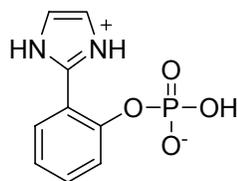
2. JUSTIFICATIVA

O estudo da clivagem de ésteres de fosfatos é uma área que tem atraído muito interesse. Ésteres de fosfato estão presentes em diversos processos biológicos, além de se encontrarem entre muitos agentes tóxicos, tais como gases de guerra e pesticidas, que reforçam o interesse no estudo destas reações. A compreensão dos mecanismos destas reações está atrelada à atribuição dos equilíbrios iônicos em solução aquosa, o que torna possível distinguir as espécies reativas presentes no meio. Existe ainda uma grande confusão quanto à atribuição dos pK_a s dos grupos amino e fosfato em ésteres derivados de aminofenóis, este tipo de problema resulta numa distribuição de espécies ineficaz para definir as espécies reativas, dificultando a discussão do mecanismo da reação. Outro fator importante neste tipo de discussão é o entendimento das reatividades de diferentes ésteres fosfóricos e de suas espécies. Há um interesse peculiar no estudo do mecanismo de hidrólise de monoésteres de fosfato quando envolve transferência de próton. A transferência de próton está presente em muitos mecanismos enzimáticos e pode ser responsável pela grande eficiência catalítica. Assim é importante a distinção dos equilíbrios de desprotonação dos ésteres de fosfato presentes neste trabalho, bem como a compreensão de suas reatividades.

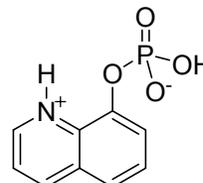
3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar os equilíbrios de protonação do 2-(2'-imidazolil)fenilfosfato de sódio (IMPP) e 8-quinolil fosfato (8QP) bem como as reatividades deles, comparando com outros ésteres de fosfato derivados de aminofenóis.



IMPP



8QP

Objetivos Específicos

De acordo com o objetivo geral, os objetivos específicos deste trabalho são:

- Sintetizar o 2-(2'-imidazolil)fenil fosfato (IMPP).
- Realizar a titulação potenciométrica, espectrofotométrica e espectrométrica do IMPP e 8QP, a fim de determinar seus pK_a s e avaliar os equilíbrios envolvidos.
- Estudar a reação de hidrólise do IMPP e comparar sua reatividade com outros ésteres de fosfatos derivados de amino-fenóis.
- Realizar cálculos computacionais para avaliar o efeito da transferência do próton nas estruturas do IMPP e 8QP.
- Obter a estrutura do IMPP por Raio-X, comparar aos cálculos computacionais e a outros resultados da literatura.

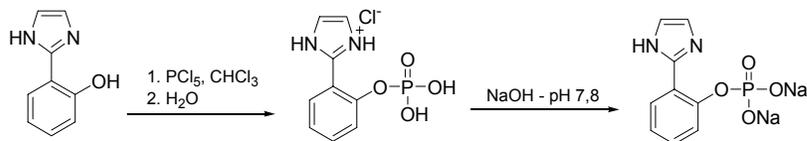
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 REAGENTES

O 8-quinolil fosfato foi sintetizado no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais por Tiago Brandão e Bruno Souza¹⁵, os demais reagentes foram adquiridos comercialmente e purificados previamente quando necessário. Os tampões e sais utilizados na preparação das soluções e misturas reacionais foram de padrões analíticos de acordo com a American Chemical Society e procedentes da Merck, Carlo Erba e Reagen.

4.2 SÍNTESE DO IMPP

A síntese do IMPP foi realizada como segue, uma solução de 2-(2'-hidroxifenil)imidazol¹⁶ (3,12 mmol) em CHCl_3 (15 mL) foi gotejada sobre uma solução de PCl_5 (3,12 mmol) em CHCl_3 (15 mL) sob banho de gelo. A mistura foi refluxada por 1,5 h e após adição de água (0,25 mL) reagiu por 12 horas à temperatura ambiente. A mistura foi rotaevaporada para obter um óleo, o qual com adição de acetona (20 mL) e água (5 mL) levou à formação de cristais brancos. O sólido resultante foi dissolvido em água (30 mL), o pH ajustado para 7,8 e então, extraído com CHCl_3 para remover o fenol que não reagiu. A solução aquosa resultante foi evaporada e após lenta adição de metanol houve a formação de cristais dissódicos puros de IMPP (200 mg) ou alternativamente com adição de HCl para formar cristais zwitteriônicos de IMPP (**Esquema 9**).



Esquema 9

4.2 TITULAÇÕES DE 8QP E IMPP

A técnica da titulação potenciométrica foi utilizada neste trabalho para determinar os pK_a s dos compostos estudados, bem como as espécies em equilíbrio. As titulações foram realizadas em uma célula de vidro, de parede dupla, com capacidade de 150 mililitros. Este sistema foi mantido fechado (**Figura 2**), com a temperatura controlada por um banho termostatizado a 25°C, com agitação magnética e fluxo contínuo de nitrogênio que foi previamente borbulhado em uma solução de KOH para retirar as impurezas, a força iônica foi mantida constante em 0,1 com KCl. A base utilizada (KOH livre de CO₂) foi bombeada para a célula de vidro através de um DOSIMAT 765 e o pH medido através do METROHM (713).



Figura 2 – Sistema de Titulação Potenciométrica

O tratamento dos resultados experimentais foi feito com os programas BEST7 e SPECIES¹⁷, que determinam as constantes de dissociação e distribuição de espécies, respectivamente.

Outra técnica utilizada na determinação das constantes de dissociação foi a titulação espectrofotométrica, que consiste na leitura da absorbância em diferentes pHs, e está baseada no fato que a desprotonação de um grupo pode levar a uma variação espectral. As medidas espectroscópicas foram realizadas em um espectrofotômetro HP 8453, cubetas de quartzo com caminho de ótico de 1 cm foram utilizadas, o volume total de solução contendo $6,67 \times 10^{-5}$ M de IMPP e $4,18 \times 10^{-5}$ M de 8QP foi de 3 mL e a temperatura foi mantida a 25,0 °C.

As titulações por ^{31}P (81 MHz) RMN foram realizadas para avaliar o efeito do pH no deslocamento químico dos átomos de fósforo. Os experimentos foram realizados em D_2O e titulados com pequenas alíquotas de NaOD e o pH corrigido através da **Equação 1**.

$$pD = pH + 0,4 \quad (1)$$

4.3 MEDIDAS CINÉTICAS

O estudo cinético do IMPP ($6,67 \times 10^{-5}\text{M}$) foi realizado em um espectrofotômetro de UV/VIS Cary 50. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas em 310 nm. As reações foram acompanhadas em meio aquoso em diferentes pHs, a temperatura foi mantida em $60,0\text{ }^\circ\text{C}$ e a força iônica em 1,0 com KCl. O pH durante as medidas cinéticas foram mantidos com tampões preparados utilizando: ácido cloroacético (pH 2-3); ácido fórmico (pH 3-4,5); ácido acético (pH 4-5,5); dihidrogenofosfato de sódio (pH 5,5-7,8); bórax (pH 8-9,5).

4.4 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Monocristais incolores do IMPP foram obtidos da precipitação lenta da espécie zwitteriônica em uma mistura de metanol e água. A coleta de dados para a obtenção da estrutura cristalina foi realizada em um difratômetro automático de raios X para monocristais ENRAF-NONIUS modelo CAD-4. Para a resolução e refinamento da estrutura cristalina foram empregados os programas SHELXS-97¹⁸ e SHELXL-97¹⁹ respectivamente. A estrutura molecular foi construída usando os programas ORTEP3²⁰. Tanto a coleta de dados como a resolução da estrutura foram realizadas por Adailton J. Bortoluzzi do Departamento de Química da UFSC. Os dados cristalográficos bem como os parâmetros de refinamento da estrutura estão contidos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento da estrutura do IMPP

Fórmula empírica	$C_9 H_9 N_2 O_4 P$
Peso molecular	240,15
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0,71069 Å
Sistema cristalino	Hexagonal
Grupo espacial	P 65
Dimensões da cela unitária	$a = 9,0850(9) \text{ \AA}; b = 9,0854(9) \text{ \AA}; c = 20,973(3) \text{ \AA}$
Volume	$1499,2(3) \text{ \AA}^3$
Z, Densidade calculada	6, 1,596 g/cm ³
Coefficiente de absorção	0,275 mm ⁻¹
F(000)	744
Tamanho do cristal	0,23 x 0,16 x 0,16 mm ³
Intervalo de θ	2,59 a 27,97°
Intervalo dos índices h, k, l	$-11 \leq h \leq 0; 0 \leq k \leq 11; 0 \leq l \leq 27$
Reflexões coletadas/únicas	2667/1228 ($R_{int} = 0,0291$)
Correção de absorção	Nenhum
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz completa em F^2
Dados/restrições/parâmetros	1228 / 1 / 148
GOOF em F^2	1,041
Índice final de $R[I > 2\sigma(I)]$	$R_1 = 0,0298, wR_2 = 0,0671$
Índice R (todos os dados)	$R_1 = 0,0454, wR_2 = 0,0726$
Parâmetro absoluto da estrutura	0,19(12)
Densidade eletrônica residual	0,201 e $-0,187 \text{ e, \AA}^{-3}$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TITULAÇÕES

5.1.1 Titulações Potenciométricas

As titulações do IMPP e 8QP foram realizadas sob as condições experimentais previamente descritas, utilizando KOH como base (0,1008 M). As curvas de titulações e os ajustes teóricos estão apresentados na **Figura 3**.

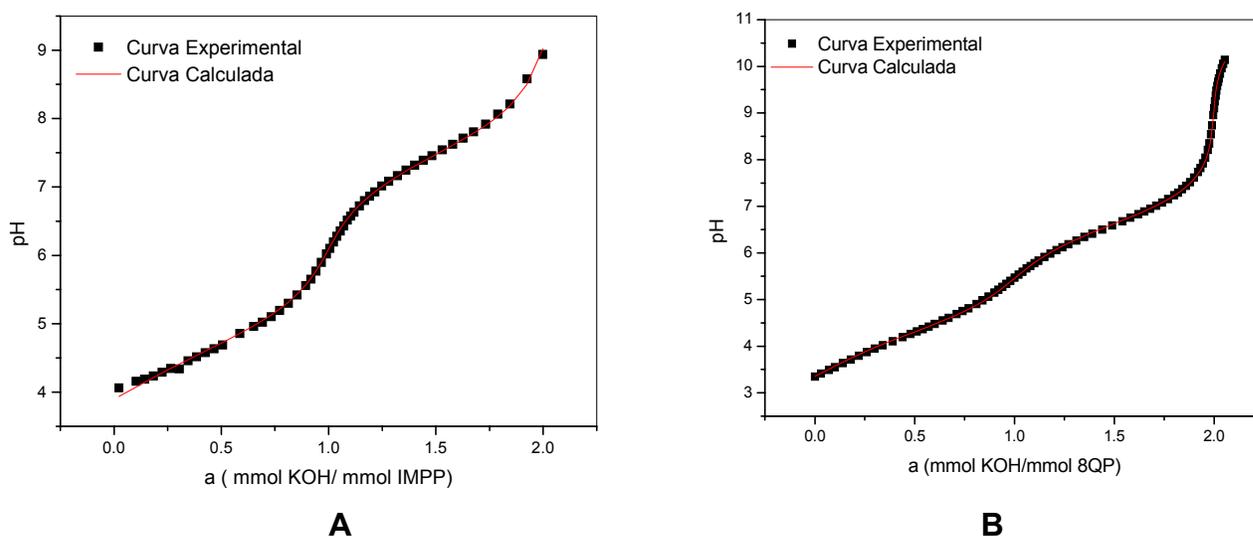
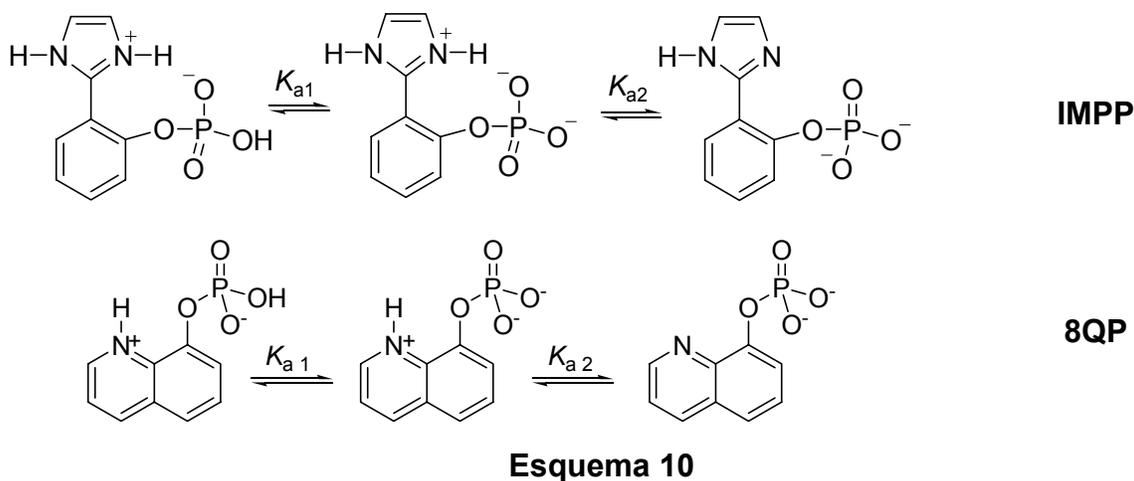


Figura 3 - Curva de titulação : **A** – Solução de 1,0 mM de IMPP e **B** – Solução de 4 mM de 8QP; KOH a 0,1008 M, força iônica a 0,1 (KCl), 25,0 °C.

O tratamento dos dados através do programa BEST7 mostrou um bom ajuste teórico para ambas as curvas obtendo as constantes relacionadas na **Tabela 2**. O parâmetro sigma pH fit corresponde ao desvio padrão entre os valores calculados e experimentais, devendo ser inferior a 0,03 para o ajuste ser considerado aceitável. Os equilíbrios envolvidos para ambos compostos estão representados no **Esquema 10**.

Tabela 2 – Constantes obtidas através do ajuste teórico das curvas da **Figura 3**.

	IMPP	8QP
pK_{a1}	4,67	4,30
pK_{a2}	7,47	6,63
Sigma pH fit	0,014	0,018



5.1.2 Titulações Espectrofotométricas

Para confirmar os sítios microscópicos de desprotonação para o IMPP e 8QP tal qual proposto no **Esquema 10** realizou-se titulação espectrofotométrica. Avaliando a variação da absorbância em função do pH, foi possível não só estudar os equilíbrios envolvidos com maior distinção, mas também foi possível determinar o pK_a de cada grupo. Os dados da titulação espectrofotométrica do IMPP foram obtidos de pH 2,0 a 9,0 sendo que os espectros correspondentes a cada faixa de pK_a foram selecionados em comprimentos de onda de 305 nm e 290 nm para os pHs 3,0-6,0 e 6,5-9,0, respectivamente (**Figura 4**). Já para o 8QP foram selecionados nos comprimentos de 242 nm e 247 nm, que correspondem aos pontos isobésticos.

Observou-se uma menor variação espectral para o primeiro pK_a em relação ao segundo pK_a para ambos compostos, sugerindo que o segundo pK_a corresponde à desprotonação do nitrogênio, que está mais conjugado ao sistema e causa uma maior variação espectral.

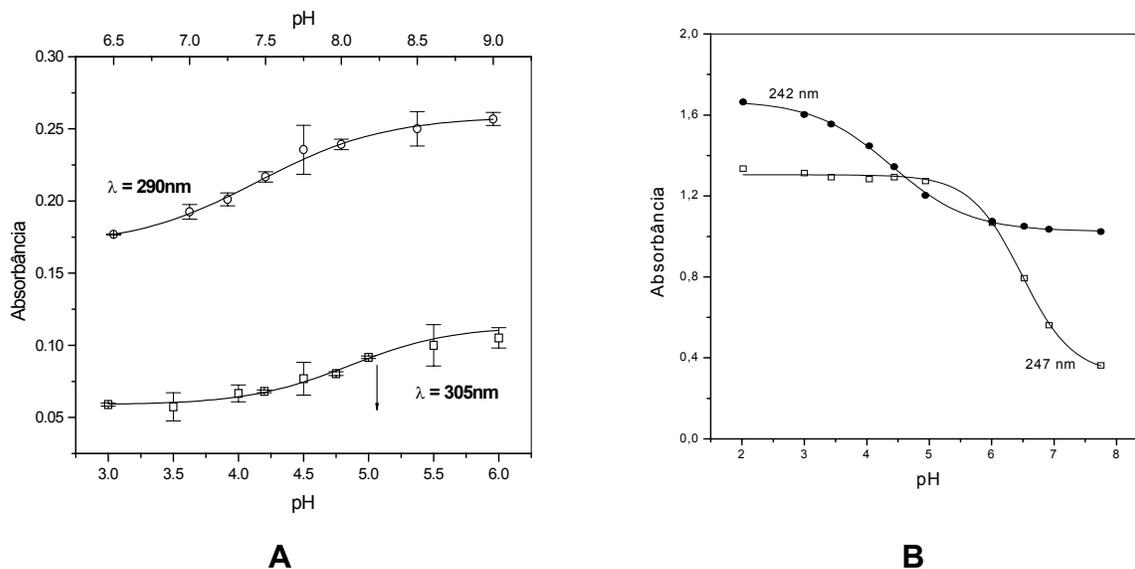


Figura 4 – Espectros UV-Vis do **A** - IMPP e **B** - 8QP em diferentes pHs a 25,0 °C

5.1.3 Titulações por ^{31}P RMN

Além das titulações espectrofotométricas foram realizadas titulações por ^{31}P RMN para avaliar o efeito do pH nos deslocamentos químicos dos átomos de fósforo e assim corroborar os equilíbrios propostos no **Esquema 10**. A desprotonação do grupo fosfato deve provocar uma maior mudança no deslocamento químico do fósforo do que o efeito esperado para a desprotonação do nitrogênio. Na **Figura 5** estão apresentados os resultados obtidos de ^{31}P RMN para o IMPP e 8QP onde observou-se para ambos compostos um maior efeito no deslocamento químico do fósforo na região do $\text{p}K_{\text{a}1}$, fato esperado devido a dissociação do grupo fosfato. Já na região do segundo $\text{p}K_{\text{a}}$ não se observa um efeito significativo no deslocamento químico, indicando a desprotonação do grupo imidazólio.

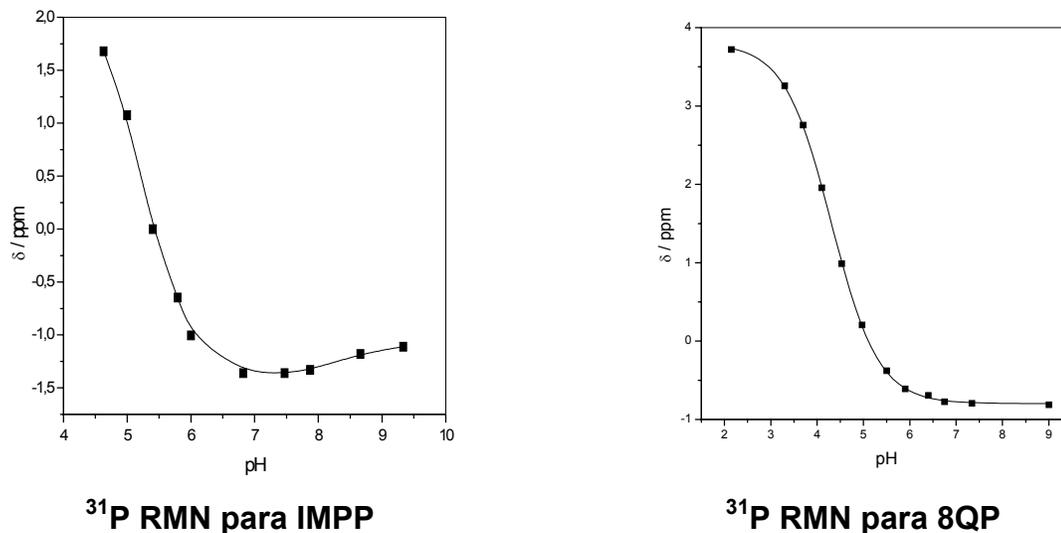


Figura 5 – Dados de ^{31}P RMN para IMPP e 8QP

5.2 ESTUDO CINÉTICO

Na **Figura 6** estão representados os dados de k_{obs} em função do pH para a hidrólise do IMPP em água. Os valores de pKa calculados para o IMPP (**Tabela 2** e **Esquema 10**) indicam que a espécie reativa principal é a forma zwitteriônica do IMPP, já que para valores de pH < 4 observa-se um patamar do valor de k_{obs} . Estes resultados são condizentes com o **Esquema 11**, a qual foi utilizada através da **Equação 2** para deduzir a **Equação 3**.

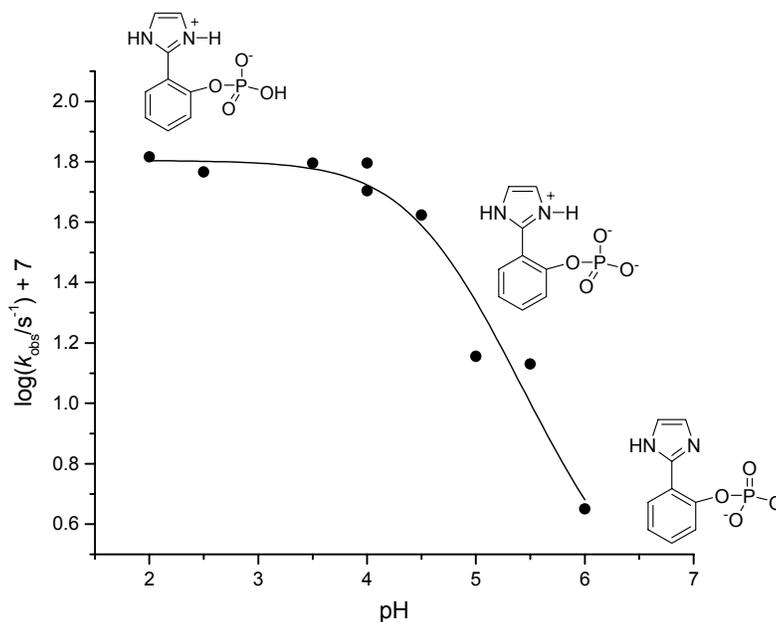
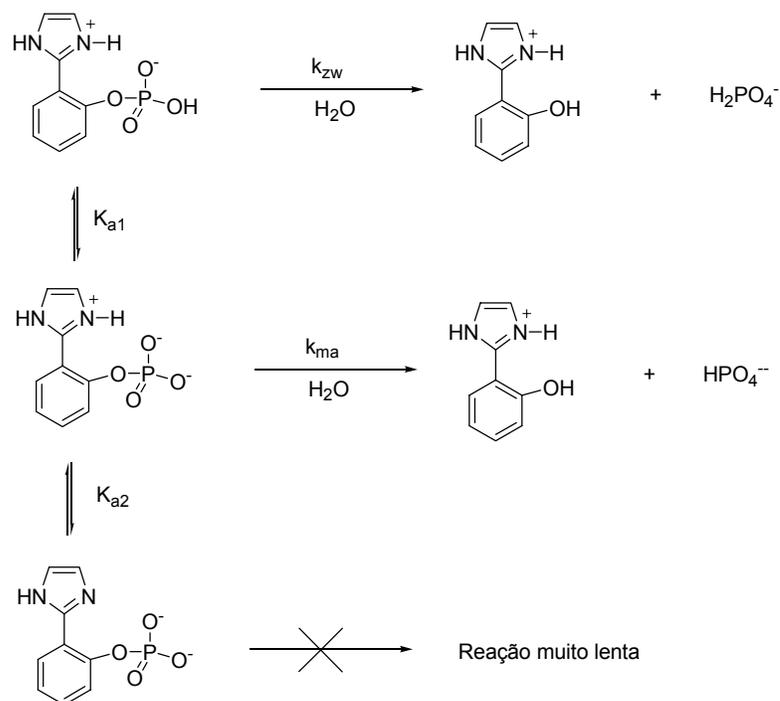


Figura 6 – Perfil da reação do IMPP com água, força iônica=1,0, 60°C.



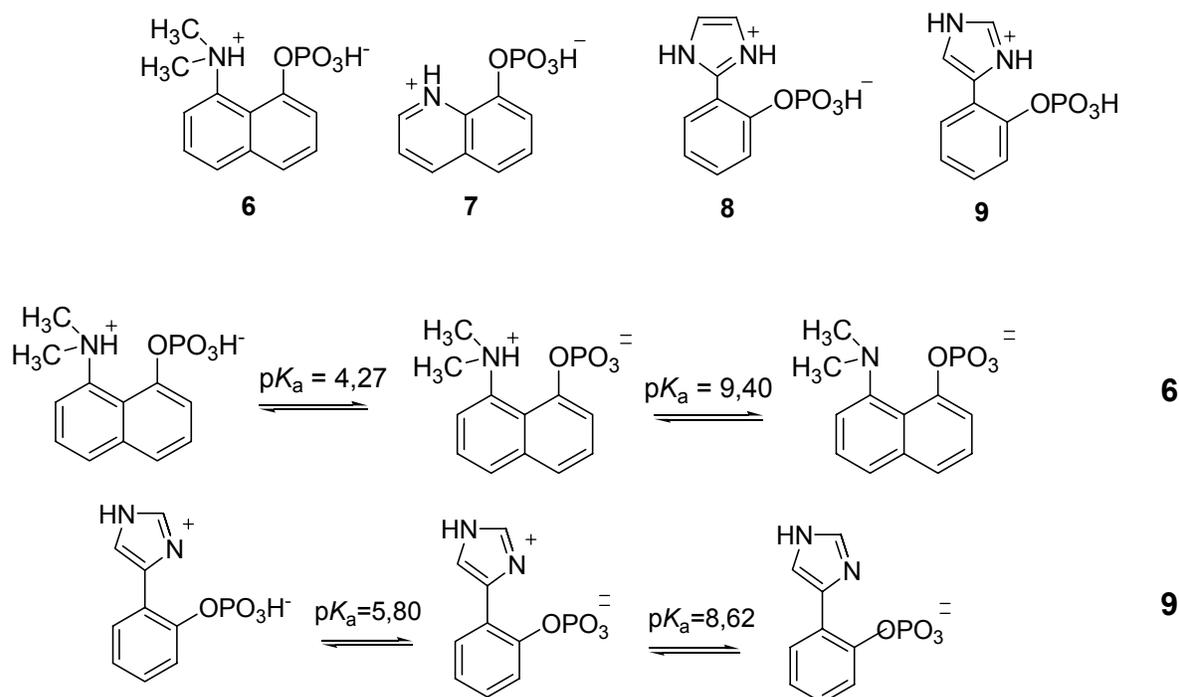
Esquema 11

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{zw}} \chi_{\text{zw}} + k_{\text{ma}} \chi_{\text{ma}} \quad \mathbf{2}$$

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{zw}} \left(\frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{a1}} + [\text{H}^+]} \right) + k_{\text{ma}} \left(\frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{a2}} + [\text{H}^+]} \right) \quad \mathbf{3}$$

Nas equações 2 e 3, o termo k_{zw} refere-se à espécie zwitteriônica e k_{ma} à espécie monoaniônica e os termos K_{a1} e K_{a2} correspondem às constantes de dissociação do IMPP. A espécie dianiônica não foi considerada na dedução desta equação visto sua hidrólise ser extremamente lenta. Pelo ajuste iterativo dos resultados da **Figura 6** utilizando a **Equação 2** foi obtido um valor de k_{zw} de $(6,16 \pm 0,58) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, o que é equivalente a um tempo de meia-vida igual a 31 horas a 60°C . O valor de k_{ma} através deste ajuste apresentou um erro muito elevado devido ao número insuficiente de dados nos pHs > 5 e seu valor foi $(2,06 \pm 1,08) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

Com base nestes resultados, observa-se que a espécie zwitteriônica é mais reativa que a espécie monoaniônica. Para uma melhor elucidação do mecanismo de hidrólise de monoésteres de fosfato é importante relacionar as reatividades do IMPP com outros ésteres similares, tais como os compostos **6-9**. No **Esquema 12** estão apresentados os equilíbrios de desprotonação para os compostos **6** e **9**, enquanto que os equilíbrios do IMPP e 8QP estão apresentados no **Esquema 10**.



Esquema 12

Comparando os dados da **Figura 6** com os resultados cinéticos apresentados na **Figura 7**, para os ésteres **6-9**, observa-se que o monoéster **8** apresenta um comportamento bastante similar com o 8QP (**7**) e 2-(4(5)-imidazolil)fenil fosfato (**9**).²¹ Já o monoéster 8-dimetilamino naftil-1-fosfato (MANEP, **6**)²² tem comportamento diferente, sendo a espécie monoaniônica mais reativa.

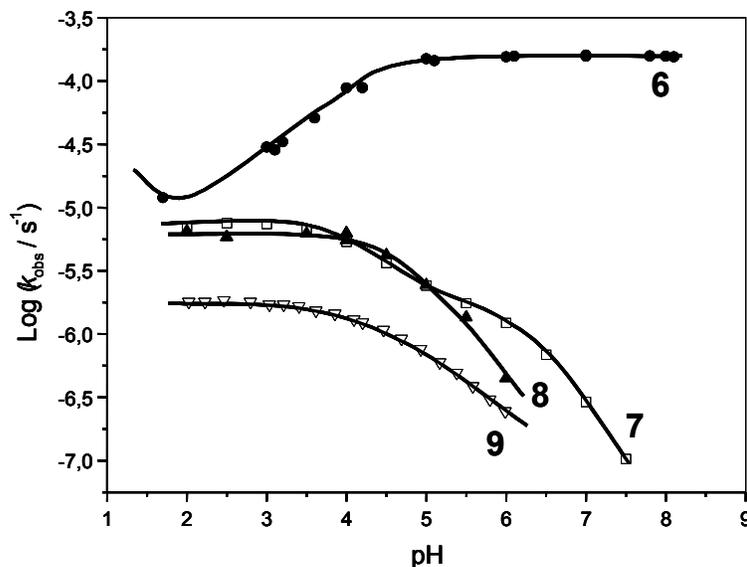


Figura 7 - Perfis de pH para os ésteres **6 – 9**, Condições: **6 - 8** a 60 °C^{21, 23, 24}; **9** a 55 °C e $\mu = 0,2$.

A ativação do grupo de saída do éster **6** tem sido destacado como um dos aspectos mais importantes na catálise, sendo que a protonação provoca um aumento do comprimento da ligação P-O_R¹⁰. Apesar de uma reatividade elevada para a forma monoaniônica do composto **6**, é importante salientar que a forma zwitteriônica do MANEP é apenas aproximadamente 4 vezes mais reativa que a dos compostos **7,8** e **9**. Entre os aspectos que podem ser observados para este aumento é a transferência de próton, que é facilitada para formação de ligação de hidrogênio, a qual é mais forte neste composto do que nos demais. Isto ocorre porque os grupos metil ligados ao nitrogênio orientam melhor o hidrogênio para formar ligação de hidrogênio, no sentido de menor impedimento estérico. Assim no MANEP, a energia do reagente aumenta mais do que para os outros monoésteres de fosfato, sendo menos estável e conseqüentemente de maior reatividade. Nos demais ésteres de fosfato, tal como **7 - 9** a sensibilidade à ligação de hidrogênio intramolecular decai bastante, provavelmente devido a orientação pobre desta ligação no oxigênio do grupo de saída. Por exemplo, no 8QP devido a estericidade de um anel de quatro membros há considerável dificuldade em orientar o hidrogênio para formar uma ligação com o oxigênio do grupo de saída, embora neste composto a protonação do nitrogênio conjugado ao anel diminua mais fortemente a densidade eletrônica no anel e conseqüentemente no

oxigênio do grupo de saída. Nos compostos **8** e **9**, a orientação do hidrogênio ácido do anel imidazolínico com o grupo de saída é mais favorável do que em 8QP, devido à formação de um anel de seis membros, entretanto, em relação ao MANEP a ligação de hidrogênio no estado reagente é mais fraca, visto que a rotação do anel imizadolínico desfavorece a formação da ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo de saída.

O composto **9** é menos reativo que o **8** devido às posições dos nitrogênios, pois em **8** podem ser formadas ligações de hidrogênio com ambos nitrogênios e em **9** com apenas um dos nitrogênios protonados, outro fato que pode ser citado é que no composto **8** o nitrogênio está mais conjugado ao anel do que em **9**.

5.3 CALCULOS COMPUTACIONAIS

As reatividades dos ésteres de fosfato derivados de aminofenóis dependem fortemente da orientação das ligações de hidrogênio. Foram realizados alguns cálculos teóricos com IMPP, onde as estruturas **1a** e **1b** foram otimizadas por DFT utilizando o funcional híbrido B3LYP com uma função base 6-31++G(d,p), utilizando água como um contínuo de solvente (PCM). Observou-se que a estrutura **1b** (**Figura 8**), é 9,7 kcal/mol mais estável que a estrutura **1a**. Em termos mais práticos, pode-se calcular através da **Equação 4**, considerando ΔE equivalente a ΔG , que o equilíbrio na direção da formação de **1b** é mais favorecido por $1,37 \times 10^7$ vezes.

$$\frac{C_B}{C_A} = \frac{e^{-\Delta E/RT}}{1 - e^{-\Delta E/RT}} = 1,378 \times 10^7 \quad (4)$$

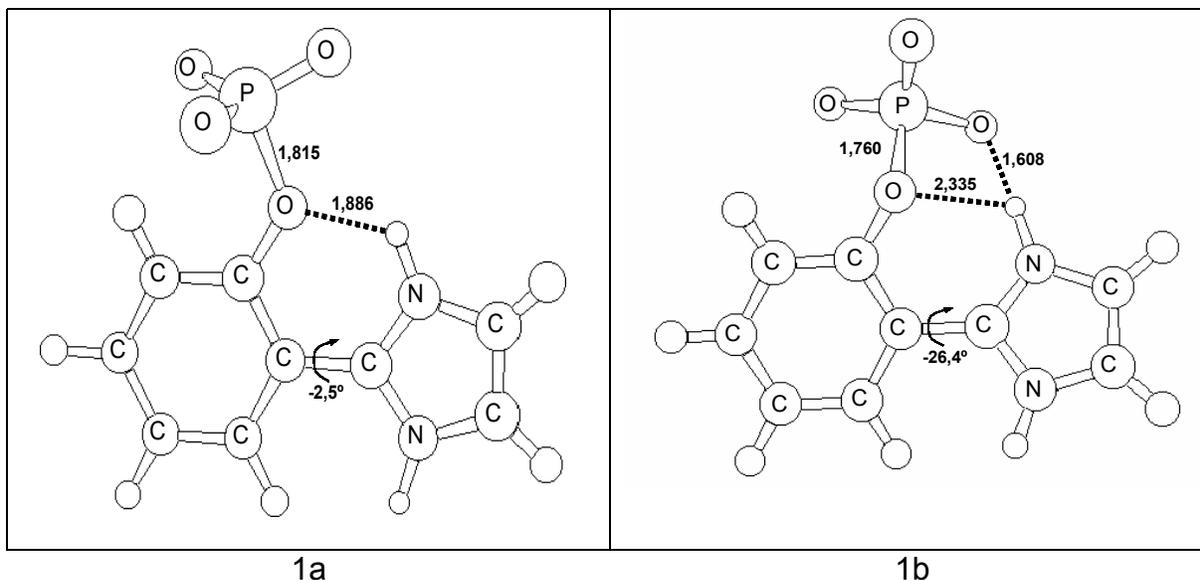


Figura 8 - Estruturas conformacionais para o IMPP obtidas por cálculos teóricos através do método PCM/B3LYP/6-31++G(d,p).

O favorecimento da estrutura **1b** de IMPP que possui uma ligação de hidrogênio mais fraca do que **1a** justifica sua maior estabilidade frente à hidrólise quando comparado com o MANEP. Por outro lado, se a estrutura mais estável fosse **1a**, a clivagem da ligação P-O seria favorecida, pois haveria uma transferência de próton facilitada para o grupo de saída. E como discutido anteriormente, MANEP deve ser mais instável no estado reagente do que IMPP, indicando que no caso do MANEP uma estrutura tal como **1a** deve ser favorecida.²⁴

5.4 RAIÓ-X

Na **Tabela 3** estão apresentados todos os comprimentos de ligação e ângulos para IMPP. A estrutura cristalina está representada na **Figura 9** com o esquema de numeração atômica.

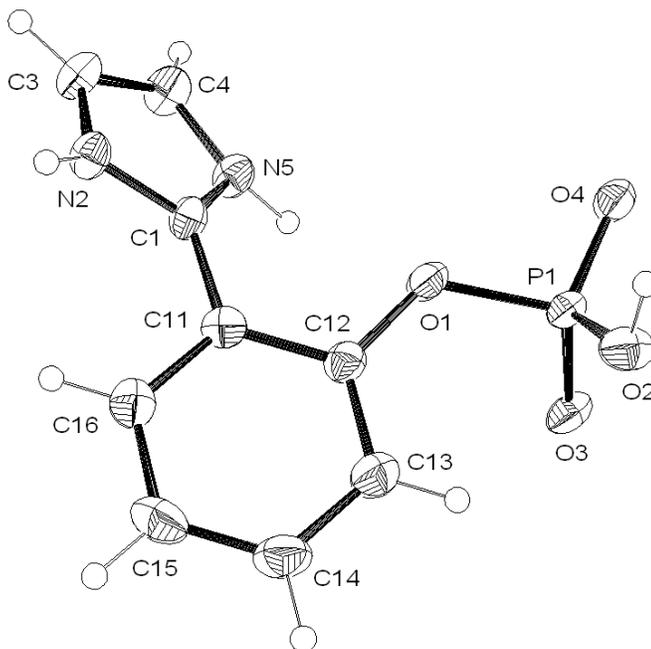


Figura 9– Raio-X do IMPP

Os aspectos mais interessantes com relação a esta estrutura que devem ser discutidos são: (i) a torção entre o anel e o grupo imidazol é de 37° , como previsto através dos cálculos computacionais, e justificam a pequena ligação de hidrogênio entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio (N5) e o oxigênio (O1) ligado ao anel; (ii) o comprimento de ligação N(5)-H(5) de 1,026 Å é superior ao comprimento de ligação N(2)-H(2) de 0,830 Å, demonstrando que o átomo de H(5) é parcialmente influenciado pelo átomo de O(1) para formar uma fraca ligação de hidrogênio, o que leva em contrapartida ao encurtamento da ligação N(2)-H(2).

Tabela 3 - Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) para o IMPP

C(1)-N(5)	1,326(4)	C(4)-C(3)-N(2)	106,9(3)
C(1)-N(2)	1,336(3)	C(3)-C(4)-N(5)	107,0(3)
C(1)-C(11)	1,470(4)	C(1)-N(5)-C(4)	109,3(2)
N(2)-C(3)	1,359(4)	C(16)-C(11)-C(12)	119,3(3)
C(3)-C(4)	1,346(4)	C(16)-C(11)-C(1)	117,8(3)
C(4)-N(5)	1,370(4)	C(12)-C(11)-C(1)	122,8(3)
C(11)-C(16)	1,382(4)	O(1)-C(12)-C(13)	123,3(3)
C(11)-C(12)	1,398(4)	O(1)-C(12)-C(11)	117,2(2)
C(12)-O(1)	1,379(3)	C(13)-C(12)-C(11)	119,5(3)
C(12)-C(13)	1,388(4)	C(14)-C(13)-C(12)	120,0(3)
C(13)-C(14)	1,380(5)	C(15)-C(14)-C(13)	120,8(3)
C(14)-C(15)	1,372(5)	C(14)-C(15)-C(16)	119,4(3)
C(15)-C(16)	1,383(4)	C(11)-C(16)-C(15)	120,9(3)
P(1)-O(4)	1,478(2)	O(4)-P(1)-O(3)	118,21(13)
P(1)-O(3)	1,499(2)	O(4)-P(1)-O(2)	112,52(12)
P(1)-O(2)	1,560(2)	O(3)-P(1)-O(2)	106,83(11)
P(1)-O(1)	1,626(2)	O(4)-P(1)-O(1)	105,02(11)
N(5)-C(1)-N(2)	107,2(2)	O(3)-P(1)-O(1)	107,64(12)
N(5)-C(1)-C(11)	128,5(2)	O(2)-P(1)-O(1)	105,87(12)
N(2)-C(1)-C(11)	124,0(2)	C(12)-O(1)-P(1)	124,87(17)
C(1)-N(2)-C(3)	109,6(2)		

Na **Figura 10** está representada a estrutura cristalina do 2-(2'-hidroxifenil)imidazol, o qual é o produto da reação de hidrólise do IMPP.²⁵ Os aspectos que podem ser observados comparando com a estrutura do IMPP são: (i) a torção entre os planos do anel e do grupo imidazol é de apenas 1,54°; (ii) nesta estrutura tem-se a transferência do próton do nitrogênio imidazólico para o fenol, apresentando um comprimento de ligação entre os átomos de nitrogênio e hidrogênio do O-H de 1,475 Å, inferior a distância entre o hidrogênio do nitrogênio (N5) e o oxigênio (O1) do IMPP que é igual a 2,683 Å; (iii) como esperado, o comprimento de ligação C-O é inferior no fenol do que em IMPP, respectivamente, 1,363 e 1,379 Å.

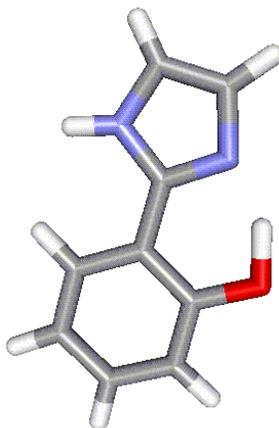


Figura 10 – Estrutura de raio-x do 2-(2-imidazolil) fenol²⁵

A conclusões que podem ser obtidas da comparação entre as estruturas cristalinas do IMPP e do respectivo fenol sugerem que o caminho para a reação de hidrólise do IMPP deve passar por um estado de transição onde o grupo imidazólio gira em relação ao anel fenílico, formando uma ligação de hidrogênio $>N-H\cdots O<$ mais forte do que no estado reagente. Estas observações estão mostradas na **Figura 11**.

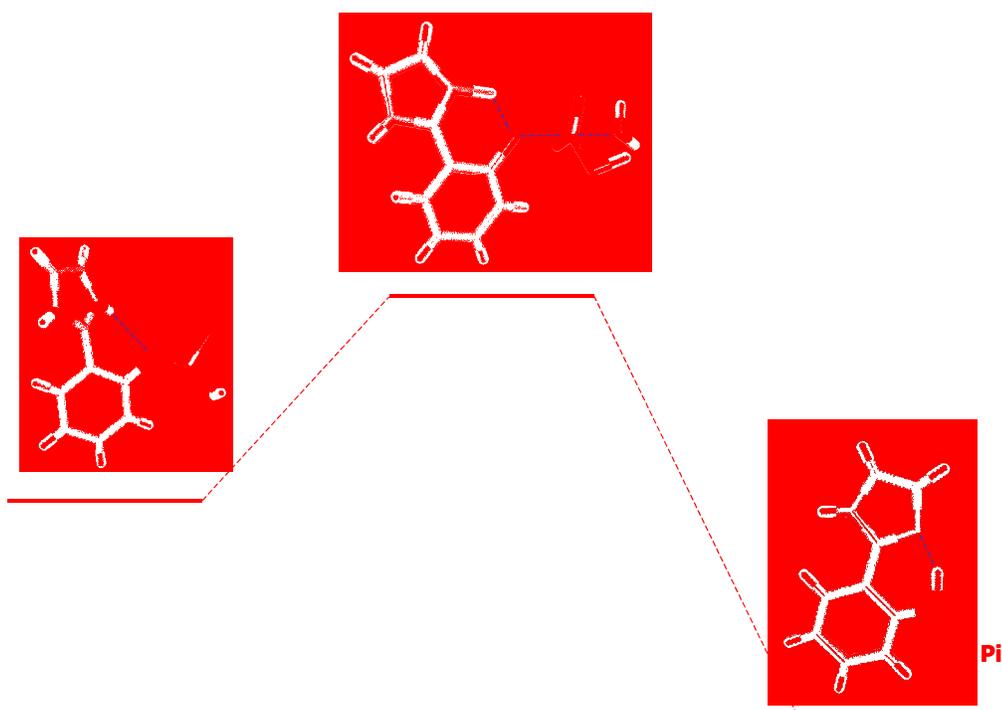


Figura 11 – Coordenada de reação para a reação de hidrólise do IMPP.

Esta observação é particularmente importante na comparação da reatividade do monoânion do MANEP e do IMPP. Embora, o estado reagente do MANEP tenha uma energia superior à do IMPP, a estabilização no estado de transição é pequena em relação a IMPP, desde que a posição da ligação de hidrogênio no MANEP não muda muito na direção do estado de transição.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho pode-se concluir que:

(i) Através das titulações observou-se que em 8QP e IMPP ocorre primeiro a desprotonação do grupo fosfato e após aquela do nitrogênio. Assim, com a atribuição das espécies foi possível atribuir qual influência poderiam ter na hidrólise total de monoésteres de fosfato derivados de aminofenóis.

(ii) Os estudos da reação de hidrólise do IMPP em água mostraram que a espécie zwitteriônica do IMPP é mais reativa que a mono- e dianiônica. Outros ésteres como, 8QP também apresentaram comportamento similar, mas diferente da observada para MANEP, onde a espécie monoaniônica foi mais reativa. A comparação entre as reatividades dos diferentes ésteres de fosfato demonstrou uma forte dependência da reatividade com a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com o oxigênio do grupo de saída.

(iii) Foram realizados alguns cálculos teóricos com IMPP utilizando PCM/B3LYP/6-31++G(d,p). Observou-se que na estrutura mais estável os planos do anel imidazólico e fenílico estão torcidos por $26,4^\circ$, desfavorecendo a ligação de hidrogênio com o grupo de saída. Esses resultados foram confirmados pelos dados de raio-x, onde se observou que os planos do anel imidazólico e fenílico estão torcidos por 37° .

(iv) A comparação entre as estruturas cristalinas do IMPP e do respectivo fenol sugere que na coordenada de reação para hidrólise do IMPP, o anel imidazólico deve girar na direção da coplanariedade ao anel fenílico para estabilizar o estado de transição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SAENGER, W. **Principles of Nucleic Acid Structure**. New York: Springer, 1984.
2. DUGAS, H. **Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action**. New York: VCH, 1996.
3. WESTHEIMER, F.H. Why nature chose phosphates. **Science**, v. 235, p. 1173-1178, 1987.
4. MACHADO, V.G. e NOME, F. Energy-rich phosphate compounds. **Química Nova**, v. 22, p. 351-357, 1999.
5. YANG, Y.-C., BAKER, J. e WARD, J.R. Decontamination of chemical warfare agents. **Chem. Rev.**, v. 92, p. 1729-1743, 1992.
6. WILLIAMS, N.H. Models for Biological Phosphoryl Transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1697, p. 279-287, 2004.
7. LIU, C., WANG, M., ZHANG, T. e SUN, H. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coord. Chem. Rev.**, v. 248, p. 147-168, 2004.
8. DOMINGOS, J.B., LONGHINOTTI, E., MACHADO, V.G. e NOME, F. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 745-753, 2003.
9. JENCKS, W.P. When is an Intermediate not an Intermediate? Enforced Mechanisms of General Acid-Base, Catalyzed, Carbocation, Carbanion, and Ligand Exchange Reaction. **Accounts of Chemical Research**, v. 13, n. 6, p. 161-169, 1980.
10. KIRBY, A.J. e VARVOGLIS, A.G. The Reactivity of Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 2, p. 415-423, 1967.
11. MENGER, F.M. On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity. **Acc. Chem. Res.**, v. 18, p. 128-134, 1985.
12. KIRBY, A.J. Efficiency of Proton Transfer Catalysis in Models and Enzymes. **Acc. Chem. Res.**, v. 30, p. 290-296, 1997.
13. KIRBY, A.J. e PERCY, J.M. Intramolecular Proton-Transfer Catalysis of Nucleophilic Catalysis of Acetal Hydrolysis – The Hydrolysis of 8-dimethylamino-1-methoxymethoxynaphthalene. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2**, v. 7, p. 907-912, 1989.
14. KIRBY, A.J. Most Efficient Intramolecular General Acid Catalysis of Acetal Hydrolysis by the Carboxy Group. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, v. 6, p. 707-708, 1994.

15. SOUZA, B.S. **Estudo da reação de hidrólise do 8-quinolil fosfato na presença de íons lantânio III**. 2005. 36 f. Monografia (Bacharelado em Química) – Graduação, Universidade Federal de Santa Catarina.
16. ROGERS, G.A. e BRUICE, T. Control of modes of intramolecular imidazole catalysis of ester hydrolysis by steric and electronic effects. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 96, p. 2463-2472, 1974.
17. MARTELL, A.E. e HANCOCK, R.D. **Metal Complexes in Aqueous Solutions**. New York: Plenum Press, 1996.
18. SHELDRIK, G.M. **SHELXS97: Program for the Solution of Crystal Structures**. Germany: University of Göttingen, 1990.
19. SHELDRIK, G.M. **SHELXL97: Program for the Solution of Crystal Structures**. Germany: University of Göttingen, 1997.
20. FARRUGIA, L.J. ORTEP-3 for Windows - a Version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). **J. Appl. Cryst.**, v. 30, p. 565, 1997.
21. BENKOVIC, S.J. e DUNIKOSKI, L.K.J. An Unusual Rate Enhancement in Metal Ion Catalysis of Phosphate Transfer. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 93, p. 1526-1527, 1971.
22. KIRBY, A.J., LIMA, M.F., SILVA, D. e NOME, F. Nucleophilic Attack by Oxyanions on a Phosphate Monoester Dianion: The Positive Effect of a Cationic General Acid. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, p. 1350-1351, 2004.
23. MURAKAMI, Y., SUNAMOTO, J. e SADAMORI, H. Solvolysis Reactions of 3-Pyridyl and 8-Quinolyl Phosphate. **Chem. Commun.**, v. n. p. 983-984, 1969.
24. KIRBY, A.J., DUTTA-ROY, N., SILVA, D., GOODMAN, J.M., LIMA, M.F., ROUSSEV, C.D. e NOME, F. Intramolecular general acid catalysis of phosphate transfer. Nucleophilic attack by oxyanions on the PO₃²⁻ group. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, p. 7033-7040, 2005.
25. Foces-Foces, C., Llamas-Saiz, A.L., Claramunt, R.M., Cabildo, P. e Elguero, J. Studies of intramolecular hydrogen bonds (IMHB): crystal and molecular structure of 2-(2'-hydroxy-phenyl)imidazoles. **Journal of Molecular Structure**, v. 440, p. 193-202, 1998.