



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Lucas Fagundes Esteves

**INVESTIGAÇÃO COMPUTACIONAL DO MECANISMO DE
QUEBRA HIDROLÍTICA DE ÉSTERES DE FOSFATO
CATALISADO POR UM MODELO BIOMIMÉTICO DA
CATECOL OXIDASE**

Juiz de Fora

Fevereiro/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Lucas Fagundes Esteves

INVESTIGAÇÃO COMPUTACIONAL DO MECANISMO DE
QUEBRA HIDROLÍTICA DE ÉSTERES DE FOSFATO
CATALISADO POR UM MODELO BIOMIMÉTICO DA
CATECOL OXIDASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Sodré Costa

Juiz de Fora
Fevereiro/2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Esteves, Lucas Fagundes.

INVESTIGAÇÃO COMPUTACIONAL DO MECANISMO DE QUEBRA
HIDROLÍTICA DE ÉSTERES DE FOSFATO CATALISADO POR UM MODELO
BIOMIMÉTICO DA CATECOL OXIDASE / Lucas Fagundes Esteves. --
2016.

145

Orientador: Luiz Antônio Sodré Costa

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora,
Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em
Química, 2016.

1. Metaloenzimas e Modelos Miméticos . 2. Hidrólise de
Ésteres de Fosfato. 3. Complexos Dinucleares de Cobre. 4.
Promiscuidade Catalítica. 5. Teoria do Funcional da Densidade.
I. Costa, Luiz Antônio Sodré, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, o Autor da vida que torna tudo isto possível.
- A minha esposa Fernanda, que durante todo o Doutorado esteve ao meu lado sempre com muita paciência, amor e carinho. Seu apoio foi fundamental para a realização desta tese.
- A minha mãe Eliane, que sempre lutou pela minha educação o que me faz muito grato. Agradeço por toda a paciência, amor e carinho.
- Aos meus irmãos Tairine e Luciano.
- Aos amigos do Ministério Mãe Rainha que desde muito tempo me acompanham.
- Aos amigos do Colégio Apogeu, em especial aos professores Guilherme Calderano e Patrícia Barra pela amizade.
- A todos os amigos do NEQC e do Departamento de Química da UFJF. Em especial aos amigos Arthur, Willian, Diego e Antônio, cuja amizade se estende por quase 10 anos, pelas discussões científicas e momentos de procrastinação, Nathália pela amizade, discussões científicas e pela colaboração nesta tese durante o período de iniciação científica; Yulianna pela amizade recente e pelas aulas esporádicas de espanhol; aos alunos de IC (novos e antigos), Priscila, Marisa, Luã, Bruno, Daniela, Matheus, Jéssica pela participação e discussões nos seminários de grupo e por permitir que eu fizesse parte de alguma forma de suas formações (*Docendo Discimus* - Seneca). Aos ICs Júlio e Thiago pela amizade e companheirismo.
- Ao meu orientador e professor Luiz Antônio pelas discussões e contribuições científicas, pela grande paciência, por acreditar tanto em mim e pela amizade que se estende desde o mestrado.
- Ao professor Hélio pelas valiosas contribuições científicas neste projeto e pela amizade.
- Ao professor Nicolás A. Rey, pelas contribuições no exame de qualificação e no desenvolvimento deste projeto.
- A professora Juliana Fedoce por me receber em seu laboratório para o desenvolvimento de um modelo para a simulação de Monte Carlo para os complexos de cobre.
- E finalmente agradeço a CAPES pelo apoio financeiro concedido durante esses quatro anos de Doutorado.

“O Sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”

(Winston Churchill)

“Do. Or do not. There is no try”

(Yoda)

RESUMO

Esta tese propõe uma investigação teórica do mecanismo de quebra hidrolítica de um modelo para diésteres de fosfato, o íon **BDNPP** [*bis*(2,4-dinitrofenil)fosfato], catalisada por um complexo dinuclear de cobre(II) (**R1**). Esse complexo metálico foi originalmente planejado para mimetizar a estrutura e as propriedades catalíticas do sítio ativo das catecóis oxidases (COs), revelando um caso interessante de promiscuidade catalítica em sistemas biomiméticos. As possibilidades de mecanismo foram cuidadosamente avaliadas através de cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) em fase gás e em fase aquosa com cálculos no ponto dentro do modelo contínuo polarizável (PCM). Dois mecanismos principais foram encontrados. O **Mecanismo 1** (Concertado) corresponde a uma reação do tipo S_N2 que envolve o ataque da ponte μ -OH, situada entre os íons Cu(II), ao centro fosfórico da molécula de **BDNPP**, enquanto que o **Mecanismo 2** (Associativo) ocorre através de sucessivas transferências de próton entre o átomo de oxigênio desta mesma ponte com o átomo de oxigênio terminal do grupo fosfato, passando pela formação de um intermediário pentacoordenado estável. O **Mecanismo 1** envolve dois possíveis caminhos reacionais para a liberação do íon **DNPP** [(2,4-dinitrofenil)fosfato] gerado após a quebra hidrolítica. O primeiro caminho reacional (**p1**) envolve uma transferência de próton – que ocorre entre o átomo de oxigênio que compunha a ponte μ -OH e o átomo de oxigênio terminal do grupo fosfato – imediatamente após a quebra hidrolítica, seguido pela entrada de duas moléculas de água, sendo a etapa de transferência de próton determinante da velocidade. O segundo caminho reacional (**p2**) envolve a entrada de duas moléculas de água imediatamente após a quebra hidrolítica sem que haja a reação de transferência de próton, sendo a etapa de quebra hidrolítica a etapa determinante da velocidade. Dentre as propostas de mecanismo estudadas o caminho reacional **p2** dentro do **Mecanismo 1** corresponde ao mais provável, uma vez que possui a menor barreira de reação ($\Delta G^\ddagger = 23,7 \text{ kcal mol}^{-1}$, em solução aquosa). A constante de velocidade observada experimentalmente, k_{obs} , vale $1,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, indicando que o valor calculado teoricamente ($k_1 = 2,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) está em excelente acordo com o valor experimental. O efeito isotópico cinético (KIE) foi avaliado para o caminho reacional **p2** dentro do **Mecanismo 1** com o intuito de entender as alterações estruturais envolvidas na formação do **TS1-i** (Estado de

transição para o **Mecanismo 1**), caracterizando perfeitamente o mecanismo descrito. O efeito explícito da inclusão de moléculas do solvente foi avaliado de maneira preliminar para apenas uma estrutura do ciclo catalítico para a quebra hidrolítica de ésteres de fosfato, através da utilização do método de Monte Carlo. Os resultados permitem uma análise detalhada da organização das moléculas de solvente ao redor do complexo, podendo servir de ponto de partida para uma análise mais elaborada dos mecanismos reacionais utilizando modelos explícitos para o solvente. O mecanismo de oxidação de catecóis – representado pelo substrato modelo, o 3,5-di-*terc*butilcatecol (**DTBC**) – no sítio ativo do complexo **R1** foi avaliado através de cálculos quanto-mecânicos. Embora não tenham sido obtidos resultados conclusivos acerca da cinética da reação, os aspectos estruturais das principais espécies envolvidas no ciclo catalítico foram analisados.

Palavras-chave: Metaloenzimas; Modelos Miméticos; Hidrolise de Ésteres de Fosfato; Complexos dinucleares de cobre(II); DFT; Promiscuidade Catalítica.

ABSTRACT

In this thesis the theoretical investigation of the hydrolytic cleavage mechanism of a phosphate diester, **BDNPP** [*bis*(2,4-dinitrophenyl)phosphate] in the active site of the dinuclear copper complex, labelled as **R1**, has been proposed. The metal complex was originally designed to mimic the active site structure as well the catalytic properties of catechol oxidase, revealing an interesting case of catalytic promiscuity in biomimetic systems. The mechanistic possibilities have been carefully evaluated through Density Functional Theory (DFT) calculations in gas phase and in aqueous solution using continuum solvation models with single point calculations within the Polarizable continuum model (PCM). Two reaction mechanisms have been proposed. The **Mechanism 1** (Concerted) is a S_N2 type mechanism which involves the direct attack of the μ -OH bridge between the two copper(II) ions towards the phosphorus center whereas, the **Mechanism 2** (Associative) occurs through two successive proton transferences between the oxygen atom of the bridging hydroxo ligand and another oxygen atom of the phosphate model forming a stable pentacoordinate intermediate. There are two reactions paths for **Mechanism 1** to release the **DNPP** (2,4-dinitrophenylphosphate) ion generated after the hydrolytic cleavage. The first reaction path (**p1**) involves a proton transfer immediately after the hydrolytic cleavage, being the proton transfer the rate-determining step, followed by the entry of two water molecules. The second reaction path (**p2**) comprises the entry of two water molecules just after the hydrolytic cleavage without any proton transfer, being the hydrolytic cleavage the rate limiting step. The most probable catalytic path occurs via **Mechanism 1**, following the second reaction path (**p2**) once it involves the lowest free energies activation barrier ($\Delta G^\ddagger = 23.7 \text{ kcal mol}^{-1}$, in aqueous solution). The experimental rate constant, k_{obs} is $1.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, indicating that the calculated value, ($k_1 = 2.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) is in a very good accordance with the experimental value. Kinetic Isotope Effect (KIE) analysis for the second reaction path (**p2**) within the **Mechanism 1** has also been considered in order to understand the changes taking place in **TS1-i** (transition state of **Mechanism 1**) and perfectly characterize the mechanism here described. The solvent effect using explicit water molecules were evaluated in a preliminary fashion for one structure within the catalytic cycle of hydrolytic cleavage of phosphate ester, using the Monte Carlo method.

The obtained results allows a detailed analysis of the water molecules organization around the complex, serving as a starting point for an more elaborated study of the reaction mechanisms by using explicit solvent models. The oxidation of catechols – represented herein by the model substrate, 3,5-di-*terc*buthylcatechol (**DTBC**) – in the active site of the **R1** complex were evaluated by using quantum-mechanical calculations. The results are not conclusive for the kinetic, but the structural aspects for the main species in the catalytic cycle were studied.

Keywords: Metalloenzymes; Mimetic Models; Phosphate Ester Hydrolysis; Dinuclear Copper(II) Complexes; DFT; Catalytic Promiscuity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Efeito da enzima no mecanismo e na barreira de ativação para a reação.....	19
Figura 1.2: Estrutura do sítio ativo dos diferentes tipos de proteína de cobre. As siglas entre parênteses referem-se aos códigos PDBs correspondentes a cada estrutura.....	23
Figura 1.3: Estrutura do sítio ativo da catecol oxidase. (Código PDB: 1BT3).....	25
Figura 1.4: Caminhos reacionais em sítios de cobre do tipo-3 . Adaptado da referência (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).....	26
Figura 1.5: Mecanismo de oxidação de catecóis proposto originalmente por Güell e Siegbahn (GÜELL; SIEGBAHN, 2007).....	27
Figura 1.6: Fórmulas estruturais para os ésteres derivados do ácido fosfórico.....	30
Figura 1.7: Diagrama de More O’Ferral-Jencks para os possíveis mecanismos de quebra hidrolítica de ésteres de fosfato.....	31
Figura 1.8: Mecanismo atualmente aceito para a quebra hidrolítica de monoésteres de fosfato no sítio ativo de fosfatases ácidas púrpuras. Adaptado da referência (SCHENK et al., 2013).....	34
Figura 1.9: (a) Representação esquemática do ciclo catalítico de uma fosfatase alcalina (AP), extraído da referência (HOLTZ; KANTROWITZ, 1999). (b) Representação da estrutura do sítio ativo evidenciando a estrutura do estado de transição para a quebra hidrolítica do monoéster de fosfato, extraído da referência (ZALATAN; FENN; HERSCHLAG, 2008).....	36
Figura 2.1: Fluxograma para o procedimento de campo auto-consistente do método de Hartree-Fock (HF-SCF). (Figura adaptada da referência (CRAMER, 2004)).....	45
Figura 2.2: Procedimento autoconsistente (KS-SCF) para se encontrar a densidade eletrônica de um sistema molecular. Adaptado do Capítulo 3 da referência (MORGON; COUTINHO, 2007).....	52
Figura 2.3: Diagrama de energia para a reação apresentada na Equação 2.22. O complexo ativado existe na região definida por δ , centrada no topo da barreira.....	55
Figura 2.4: (a) Efeito isotópico cinético primário (b) Efeito isotópico cinético secundário. Adaptado da referência (CRAMER, 2004).....	57

Figura 2.5: Representação esquemática das superfícies de contorno associada as moléculas do soluto e do solvente. Adaptada da referência (MENNUCCI; CAMMI, 2007).....	60
Figura 2.6: Processo iterativo para encontrar a carga aparente de superfície.....	62
Figura 2.7: Replica das caixas de simulação e representação das condições de contorno periódica em duas dimensões.....	65
Figura 3.1: Representação esquemática da estrutura do modelo de éster de fosfato <i>bis</i> -(2,4-dinitrofenil)fosfato juntamente com o processo de quebra hidrolítica deste fosfodiéster.....	70
Figura 3.2: (a) Representação da fórmula estrutura para o ligante heptadentado 4-metil-2,6- <i>bis</i> -[(6-metil-1,4-diazepano)iminometil]fenol (b) Fórmula estrutural do complexo dinuclear de cobre, $Cu_2(\mu-OH)(C_{21}H_{33}ON_6)]^{2+}$, juntamente com a sua representação esquemática na qual somente os átomos do ligante que estão ligados diretamente ao cobre foram mantidos.....	70
Figura 3.3: Estrutura otimizada em fase gás no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ para a espécie R1 no estado singlete.....	71
Figura 3.4: Mecanismo concertado para a quebra hidrolítica do BDNPP promovido pelo complexo dinuclear de cobre(II).....	74
Figura 3.5: Mecanismo associativo para a quebra hidrolítica do BDNPP promovido pelo complexo dinuclear de cobre(II).....	76
Figura 3.6: Diferentes possibilidades para a estrutura do primeiro estado de transição envolvendo a quebra hidrolítica do BDNPP . (a) TS1-i - estado de transição para o mecanismo concertado, (b) TS1-i(inv-NO₂) - estado de transição para o mecanismo concertado diferindo na orientação do grupo DNP e (c) TS1-ii - estado de transição para o mecanismo associativo, envolvendo a transferência de próton entre a ponte $\mu-OH$ e o oxigênio terminal do grupo fosfato.....	78
Figura 3.7: (a) Variação da energia eletrônica ao longo da coordenada de reação (IRC) (b) Variação do comprimento das principais ligações ao longo da coordenada de reação. (c) destaque dos comprimentos de ligação avaliados no processo na estrutura do TS1-i	80
Figura 3.8: Diagrama de More O’Ferral-Jencks para o mecanismo concertado envolvendo a quebra hidrolítica do BDNPP passando pela estrutura do TS1-i . O ponto marcado com o símbolo ‡ corresponde a estrutura do estado de transição.....	81

Figura 3.9: Mecanismo de reação proposto para a primeira etapa do processo catalítico de quebra hidrolítica do BDNPP destacando as estruturas otimizadas para os intermediários de reação obtidas através do cálculo de IRC. (a) I1(TS1-i) e (c) I2(TS1-i) e a estrutura do estado de transição (b) TS1-i . Os comprimentos de ligação estão em Angstroms.....	83
Figura 3.10: (a) Variação da energia eletrônica ao longo da coordenada de reação (IRC) (b) Variação do comprimento das principais ligações ao longo da coordenada de reação. (c) destaque dos comprimentos de ligação avaliados no processo na estrutura do TS2-i	85
Figura 3.11: Estruturas otimizadas para as espécies envolvidas na etapa de transferência de prótons, I2(TS2-i) , TS2-i e I3(p1)	86
Figura 3.12: Estruturas otimizadas para os intermediários I4(p1) e I5(p1) na presença dos grupos DNP e DNPP	87
Figura 3.13: Perfil global da energia livre de Gibbs ao longo da coordenada de reação para a quebra hidrolítica do BDNPP seguindo o primeiro caminho reacional dentro do Mecanismo 1	89
Figura 3.14: Estruturas otimizadas para os intermediários I3(p2) e I4(p2) na presença dos grupos DNP e DNPP	91
Figura 3.15: Perfil global da energia livre de Gibbs ao longo da coordenada de reação para a quebra hidrolítica do BDNPP seguindo o segundo caminho reacional (p2) dentro do Mecanismo 1	93
Figura 3.16: (a) Variação da energia eletrônica ao longo da coordenada de reação (IRC) para a espécie TS1-ii . (b) Variação dos principais comprimentos de ligação ao longo da coordenada de reação. (c) Estrutura do estado de transição TS1-ii destacando os comprimentos de ligação analisados em (b)	96
Figura 3.17: Estruturas otimizadas para os intermediários envolvidos na primeira etapa de quebra catalítica obtidos a partir do TS2-ii	97
Figura 3.18: Átomos marcados para a análise do efeito isotópico cinético, $^{18}\text{O}_{\mu\text{-OH}}$ e $^{18}\text{O}_{\text{DNP}}$	100
Figura 3.19: (a) Variação da energia eletrônica ao longo da coordenada de reação (IRC) (b) Variação do comprimento das principais ligações ao longo da coordenada de reação. (c) destaque dos comprimentos de ligação avaliados no processo na estrutura do TS1-i(inv-NO₂)	101

Figura 3.20: Estrutura do intermediário I1(TS1-i(inv-NO₂)) em duas perspectivas.....	102
Figura 3.21: Estrutura otimizada para a espécie I5(p1)/I4(p2) na ausência dos íons DNP e DNPP em duas perspectivas.....	103
Figura 3.22: Variação da entalpia conformacional por molécula (H_c/N) ao longo da simulação. Termalização (2×10^5 passos MC) e Simulação (5×10^5 passos MC).....	104
Figura 3.23: Função de distribuição radial (a) centro de massa-centro de massa (b) cobre-oxigênio(H ₂ O) (c) Hidrogênio da água coordenada ao cobre –oxigênio(H ₂ O _{solvente}) (d) Oxigênio da água coordenada ao cobre-Oxigênio (H ₂ O _{solvente}).....	106
Figura 3.24: Função de autocorrelação para a simulação contendo 1000 moléculas de água e 700 mil passos de MC.....	108
Figura 3.25: Sobreposição das configurações obtidas com as primeiras 19 moléculas ao redor do soluto.....	109
Figura 3.26: Representação esquemática do processo de oxidação da molécula de DTBC	110
Figura 3.27: Ciclo catalítico para a oxidação de catecóis por um modelo mimético da Catecol Oxidase.....	111
Figura 3.28: Estruturas propostas para o primeiro intermediário de reação I1(E1) e I1(E2)	112
Figura 3.29: Estruturas otimizadas para os intermediários I1 e I2	113
Figura 3.30: Perfil do IRC obtido com a estrutura da espécie TS1	114
Figura 3.31: Mecanismo de reação proposto para a etapa de transferência de próton no processo de oxidação da molécula de DTBC pelo complexo R1 , destacando as estrutura otimizadas para os intermediários de reação obtidas através do cálculo de IRC: (a) I3 e (c) I4 e a estrutura do estado de transição (b) TS1 juntamente com a frequência imaginária associada ao modo vibracional correspondente à transferência de próton. Os comprimentos de ligação estão em Angstroms.....	115
Figura 3.32: Perfil energético para a primeira etapa do processo de oxidação do DTBC pela espécie R1	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Classificação Internacional de enzimas (NELSON; COX, 2005).....	20
Tabela 1.2: Enzimas envolvidas na quebra de ésteres de fosfato. (WILCOX, 1996).....	33
Tabela 3.1: Parâmetros estruturais para a espécie R1 otimizada em diferentes níveis de teoria e comparação com a estrutura experimental obtida por cristalografia de raios-X (REY et al., 2010). Os comprimentos de ligação apresentados estão em Angstrom (Å).....	72
Tabela 3.2: Dados estruturais relevantes para as espécies I1(TS1-i) , TS1-i e I2(TS1-i) obtidos em fase gás no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ.....	82
Tabela 3.3: Energia livre de Gibbs Relativa para as espécies envolvidas no primeiro caminho reacional do Mecanismo 1	88
Tabela 3.4: Energia livre de Gibbs Relativa para as espécies envolvidas no segundo caminho reacional do Mecanismo 1	92
Tabela 3.5: Variação da Energia livre de Gibbs, de Entalpia e de Entropia para as espécies envolvidas no ciclo catalítico de oxidação do DTBC . Os valores foram calculados em relação ao intermediário de reação I1	116

LISTA DE ABREVIACÕES

- AP – Fosfatase Alcalina (*Alkaline Phosphatase*)
- ATP – Trifosfato de Adenosina
- BDNPP – *bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (bis(2,4-dinitrophenil)phosphate)*
- CAS – Carga aparente de superficie
- CO – Catecol Oxidase
- DFT – Teoria do Funcional da Densidade (*Density Functional Theory*)
- DNA – cido desoxirribonucleico (*Desoxorribonucleic Acid*)
- DNP – 2,4-Dinitrofenolato (*2,4-dinitrophenolate*)
- DNPP – 2,4-dinitrofenil-fosfato (*2,4-dinitrophenil-phosphate*)
- DTBC – 3,5-di-*terc*-butilcatecol
- EP – Complexo Enzima Produto
- EPR – Ressonância paramagnética eletrônica (*Electron Paramagnetic Resonance*)
- ES – Complexo Enzima Substrato
- HF – Hartree-Fock
- HK – Hohenberg–Kohn
- HpPNP - 2-hidroxipropil-4nitrofenil-fosfato (*2-hidroxypropyl-p-nitrophenil-phosphate*)
- I – Intermediário de Reação
- IRC – Coordenada Intrínseca de Reação (*Intrinsic Reaction Coordinate*)
- IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)
- KbPAP – Fosfatase cida Purpura do Feijo Vermelho (*Kidney Bean Purple Acid Phosphatase*)
- KIE – Efeito Isotópico Cinético (*Kinetic Isotope Effect*)
- KS – Kohn-Sham
- LMCT – Transferência de Carga Ligante Metal (*Ligand to Metal Charge transfer*)
- MC – Monte Carlo
- NC – Número de Coordenação
- PAP – Fosfatase cida Purpura (*Purple Acid Phosphatase*)
- PCM – Modelo Contínuo Polarizável (*Polarizable Continuum Model*)
- PDB – Banco de dados de proteinas (*Protein Data Bank*)

QM/MM – Mecânico Quântico/Mecânico Molecular (*Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*)
QM/MM-FEP – *Quantum Mechanical/Molecular Mechanics-Free Energy Perturbation*
R - Reagente
RDF – Função de Distribuição Radial (*Radial Distribution Function*)
RNA – Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
SAS – Superfície Acessível pelo Solvente
SCF – Campo Auto-consistente (*Self consistent field*)
SCRf – Campo de Reação Auto-Consistente (*Self Consistent Reaction Field*)
SEP – Superfície de Energia Potencial
S_N2 – Substituição nucleofílica bimolecular
TS – Estado de Transição (*Transition State*)
TST – Teoria do Estado de Transição (*Transition State Theory*)
UAHF – United-atom Hartree Fock

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. ENZIMAS	18
1.2. METALOENZIMAS	20
1.3. METALOENZIMAS DE COBRE.....	23
1.3.1. A Oxidação de Catecóis	24
1.4. PROMISCUIDADE ENZIMÁTICA	28
1.5. MECANISMO DE QUEBRA HIDROLÍTICA DE ÉSTERES DE FOSFATO.....	30
1.5.1. Modelos miméticos envolvidos na quebra hidrolítica de ésteres de fosfato.	37
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	40
2.1. O MÉTODO DE HARTREE-FOCK	43
2.2. TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE.....	46
2.2.1. Teoremas de Hohenberg-Kohn	49
2.2.2. Metodologia de Campo Auto Consistente de Kohn-Sham	50
2.2.3. Utilização da DFT na Predição de Mecanismos de Reação de Metaloenzimas e no Mecanismo de Hidrólise de Ésteres De Fosfato.	52
2.3. TEORIA DO ESTADO DE TRANSIÇÃO	53
2.4. EFEITO ISOTÓPICO CINÉTICO	56
2.5. MODELOS PARA A INCLUSÃO DO SOLVENTE	58
2.5.1. Modelos Contínuos de Solvatação	59
2.5.2. Modelos Discretos de Solvatação.	63
2.5.2.1. <i>O Método de Monte Carlo</i>	65
2.5.2.2. <i>O Algoritmo de Metrópolis</i>	66
2.5.3. Modelos de Solvatação no Estudo das Reações de Hidrólise de Ésteres de Fosfato.	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1. ESTUDO DO MECANISMO DE HIDRÓLISE DO BIS-(2,4-DINITROFENIL)FOSFATO (BDNPP) POR UM MODELO MIMÉTICO DA CATECOL OXIDASE.	69
3.1.1. Primeira Etapa: Coordenação do BDNPP.....	76
3.1.2. Segunda Etapa: Formação do primeiro estado de transição (TS1)	77
3.1.3. Mecanismo 1 – Mecanismo Concertado	79

3.1.3.1. <i>Primeiro caminho reacional (p1)</i>	84
3.1.3.2. <i>Segundo caminho reacional (p1)</i>	90
3.1.4. Mecanismo 2 – Mecanismo associativo.....	95
3.1.5. Efeito Isotópico Cinético.....	99
3.1.6. Mecanismo Concertado com o ligante torcido.....	100
3.2. ANÁLISE DO EFEITO DO SOLVENTE NA ESTRUTURA E REATIVIDADE DE COMPLEXOS DE COBRE ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE MODELOS EXPLÍCITOS DO SOLVENTE.....	103
3.3. ESTUDOS PRELIMINARES DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO DE CATECÓIS POR UM MODELO BIOMIMÉTICO DA CATECOL OXIDASE.....	110
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
4.1. PERSPECTIVAS FUTURAS	120
4.2. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	121
4.2.1. Trabalhos apresentados em eventos	121
4.2.2. Artigos aceitos para publicação.....	122
4.2.2.1. <i>Artigo relacionado a esta tese</i>	122
4.2.2.2. <i>Artigos não relacionados a esta tese publicados no período</i>	122
4.2.2.3. <i>Capítulo de Livro não relacionado a tese escrito no período</i>	123
REFERÊNCIAS	125
APÊNDICE – ARTIGOS PUBLICADOS.....	132

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Ao analisarmos a composição de todos os seres vivos surge uma intrigante questão ainda não respondida pela ciência: Como aglomerados de átomos podem dar origem a seres animados capazes de se autorreplicar? Tal questionamento impede uma conexão suave entre a biologia e a química, assim como ocorre entre a física e a química. Uma resposta definitiva para este questionamento certamente está longe de ser encontrada. No entanto, sabemos que é através de reações químicas de alta complexidade que toda a diversidade da vida observada sobre o nosso planeta se origina (PROSS, 2009), envolvendo uma grande diversidade de biomoléculas em tais processos.

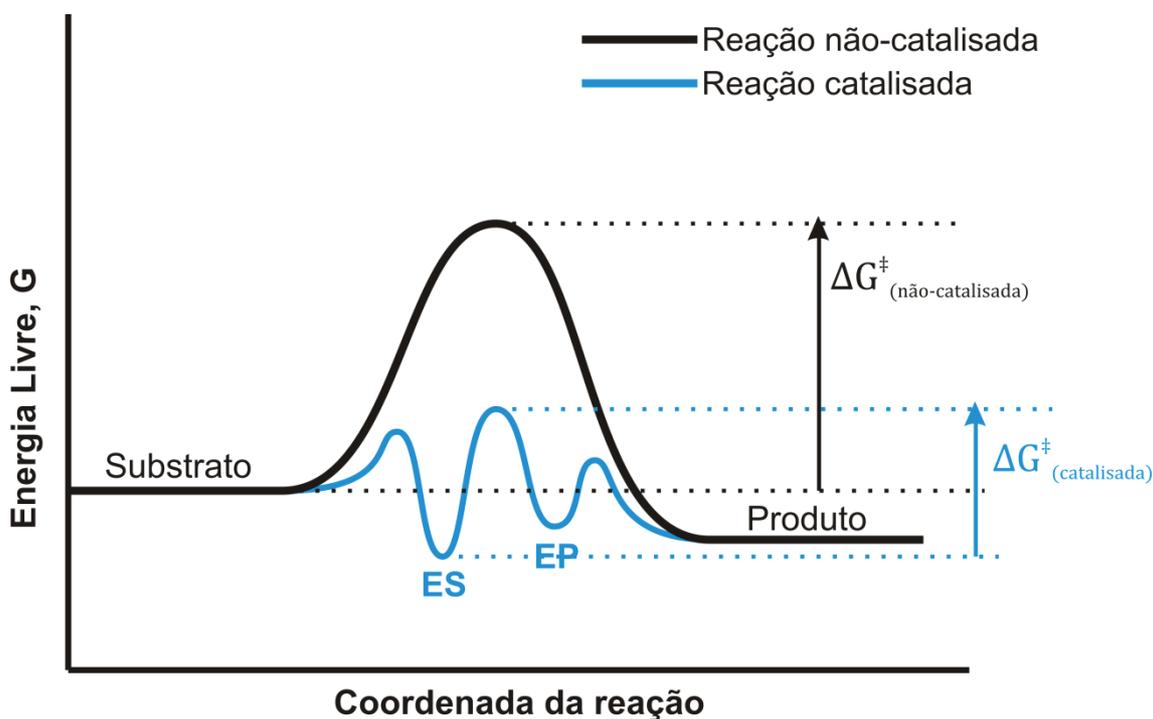
1.1. ENZIMAS

Grande parte destes processos químicos, os quais são de vital importância para a manutenção da vida, não ocorreriam em uma escala de tempo útil caso não houvesse uma importante classe de biomoléculas chamadas de enzimas (NELSON; COX, 2005).

As enzimas são notáveis pela sua atividade catalítica em sistemas biológicos, acelerando uma imensa variedade de reações de forma seletiva e específica. Em condições normais, as reações em meio biológico tenderiam a ser lentas uma vez que a grande maioria das biomoléculas são relativamente estáveis em meio neutro e em temperaturas próximas da temperatura ambiente. Algumas destas reações seriam altamente desfavoráveis ou improváveis nestas mesmas condições, como, por exemplo os processos que envolvem a formação de intermediários com grande separação de cargas ou colisões em orientações específicas.

As enzimas, como todos os outros catalisadores, atuam diminuindo a energia de ativação do processo, aumentando assim a proporção de espécies com energia suficiente para alcançar o estado de transição. Este efeito da presença da enzima na barreira de ativação do processo está descrito na Figura 1.1.

Figura 1.1: Efeito da enzima no mecanismo e na barreira de ativação para a reação.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Dentro da enzima há um ambiente altamente específico, onde a reação pode ocorrer mais rapidamente, chamado de **sítio ativo**. A molécula que sofre a reação no sítio ativo é chamada de **substrato**. Os princípios que explicam a alta especificidade e o elevado aumento na velocidade das reações estão associados às formas pelas quais o substrato interage com o sítio ativo. Ao se ligar ao sítio ativo da enzima o substrato forma um complexo molecular chamado de **ES** (complexo **Enzima-Substrato**), o qual, devido às interações (covalentes ou não-covalentes) formadas, deve ser acompanhado de uma estabilização do sistema, correspondendo assim a um ponto de mínimo na superfície de energia potencial. Após a formação do complexo **ES**, ocorre a formação de um estado de transição, no qual a complementariedade entre o substrato e o sítio ativo da enzima proporcionará uma diminuição da energia de ativação para o processo e acelerando, portanto, a reação. Após a formação deste estado de transição a reação seguirá para a formação de um novo estado estacionário, o complexo molecular **EP** (complexo **Enzima-Produto**), que em seguida liberará o produto deixando o sítio ativo disponível para a catálise. A enzima atua diminuindo a energia de ativação, alterando o mecanismo pelo qual a reação passa.

A grande variedade de enzimas aliada ao grande número de processos que podem ser catalisados, fez com que a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) criasse uma classificação para as enzimas de acordo com os processos que elas catalisam. Neste sistema de classificação, o qual se encontra resumido na Tabela 1.1, as enzimas são divididas em seis classes, as quais contêm subclasses tendo em conta a variedade de processos (CORNISH-BOWDEN, 2014).

Tabela 1.1: Classificação Internacional de enzimas

Classe	Tipo	Tipo de Reação Catalisada
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Adição de grupos em duplas ligações, ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos
5	Isomerasas	Reações de isomerização
6	Ligases	Formação de ligações químicas do tipo C–C, C–S, C–O e C–N, através de reações de condensação acopladas à quebra da ATP

Fonte: Adaptada da referência (NELSON; COX, 2005)

A nomenclatura da enzima é normalmente feita adicionando-se o sufixo “ase” à nomenclatura do substrato ou a uma palavra que descreva a atividade da enzima. Tomando como exemplo as enzimas chamadas de *catecolases* ou *catecol oxidases*, vemos que se referem às enzimas da classe das oxirredutases envolvidas na oxidação de catecóis.

1.2. METALOENZIMAS

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com atividade catalítica (RNAses), as enzimas são essencialmente proteínas. No entanto, algumas enzimas necessitam de **cofatores**¹ específicos para desempenhar sua atividade catalítica.

Estima-se, com base na análise do banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank* – PDB) (BERMAN et al., 2000), que cerca de mais de um terço das proteínas conhecidas contenham ao menos um íon metálico em sua constituição. Esses íons metálicos encontram-se normalmente na forma de **coenzimas** ou como **cofatores**

¹ Correspondem a grupos não-proteicos os quais podem ser íons metálicos ou até mesmo pequenas moléculas chamadas de coenzimas.

inseridos na estrutura da enzima, podendo apresentar função catalítica quando diretamente ligados ao sítio ativo da enzima, ou função estrutural quando atuam na manutenção da estrutura da mesma. Os sítios metálicos em proteínas podem ser divididos da seguinte forma (HOLM; KENNEPOHL; SOLOMON, 1996):

- i) Sítios Estruturais – Envolvidos na determinação da estrutura terciária ou quaternária da proteína.
- ii) Sítios de Armazenamento – Responsáveis pela captação, ligação e liberação de íons metálicos em uma forma solúvel.
- iii) Sítios de Transferência de elétrons – Captação, liberação e armazenamento de elétrons.
- iv) Sítios de Ligação ao di-oxigênio – Coordenação do di-oxigênio (O₂) aos íons metálicos.
- v) Sítios Catalíticos – Ligação ao substrato, Ativação e *turnover* (número máximo de reações catalisadas no ciclo catalítico).

No último grupo se encontram as **metaloenzimas**, nas quais o íon metálico encontra-se covalentemente ligado aos ligantes do sítio ativo, sendo assim essenciais para a atividade catalítica. Na Seção 1.1 vimos que a atividade catalítica de uma enzima é desempenhada através de interações específicas com o substrato. As metaloenzimas, cujos cofatores metálicos estão diretamente ligados ao sítio ativo, podem promover a aceleração da reação das seguintes formas:

- (a) Através do estabelecimento de ligações com o substrato, ativando-o ou orientando-o para a reação.
- (b) Através da transferência reversível de elétrons, no caso de metais que apresentam mais de um estado de oxidação.
- (c) Estabilizando eletrostaticamente, ou protegendo através de neutralização espécies carregadas negativamente liberadas em um dado processo.

Existe uma grande variedade de íons de metais de transição associados às estruturas de enzimas, tais como, Fe, Zn, Cu, Mo, Co, Cr, V, Mn, Ni (THEIL; RAYMOND, 1994), os quais podem estar diretamente associados ao seu sítio ativo ou afastados do mesmo. Nas próximas seções serão abordados alguns dos aspectos estruturais relativos às proteínas contendo íons cobre em seu sítio ativo e das enzimas

responsáveis pela quebra hidrolítica de ésteres de fosfato, as quais também contêm íons de metais de transição em seu sítio ativo.

A elucidação de mecanismos reacionais, bem como determinados aspectos estruturais associados às metaloenzimas nem sempre estão disponíveis dado a complexidade do sistema que conduz a uma série de inconvenientes experimentais. Uma estratégia para lidar com estas limitações está no desenvolvimento de modelos sintéticos para o sítio ativo destas metaloenzimas, pois estes, por serem quimicamente mais simples, propiciaram a obtenção de resultados mais precisos cuja exatidão dependerá de quão bem planejado o modelo foi. Em se tratando de metaloenzimas, a área de estudo onde se concentra o desenvolvimento desses modelos sintéticos é a Química Bioinorgânica, uma ramificação da química inorgânica que interliga diversas áreas do conhecimento como a Química, Física, Biologia, Bioquímica, Medicina, Toxicologia e Ciências ambientais. Os modelos miméticos consistem em complexos inorgânicos cujas esferas de coordenação têm sua síntese planejada de acordo com a esfera de coordenação do íon metálico quando no sítio catalítico de uma metaloenzima. (KARLIN, 1993)

O uso desses modelos permite uma análise muito mais apurada do mecanismo de ação catalítico, uma vez que a estrutura do catalisador é mais acessível aos métodos experimentais devido à simplicidade estrutural do modelo comparado à estrutura da metaloenzima. Dessa forma, o estudo do ciclo catalítico utilizando modelos miméticos é capaz de ampliar o entendimento do mecanismo de ação na enzima real. Além de permitir o entendimento do mecanismo reacional associado à enzima, os modelos miméticos podem ser sintetizados para servirem de novos catalisadores, uma vez que guardam consigo muitas das propriedades estruturais do sítio ativo da enzima, devendo, portanto possuir alguma atividade catalítica. Obviamente a atividade catalítica de um modelo mimético será muito inferior se comparada a de um sistema enzimático, uma vez que o último foi evolutivamente otimizado para desempenhar uma determinada função, possuindo para isso, além de um sítio ativo contendo metais em um arranjo específico, uma sequência de aminoácidos que contribui para a aceleração do processo. (ROSATI; ROELFES, 2010)

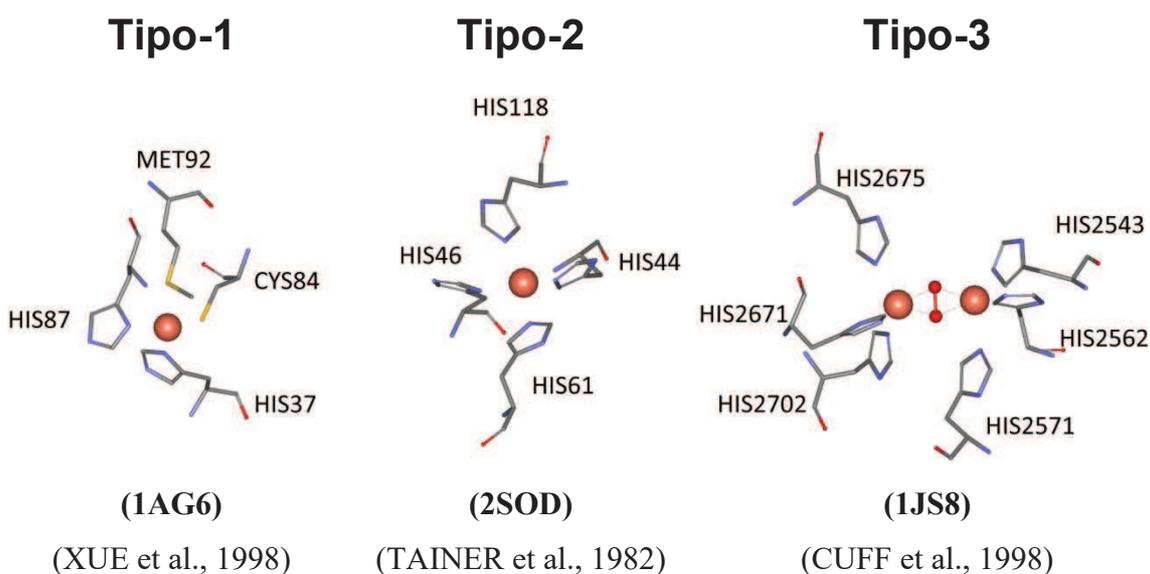
1.3. METALOENZIMAS DE COBRE

Íons cobre (Cu^+ e Cu^{2+}) desempenham um papel vital em diversos organismos, uma vez que esses íons metálicos encontram-se incorporados em um vasto número de proteínas cuja função é exclusivamente devida à presença dos mesmos. Os sítios contendo cobre podem variar tanto em estrutura quanto em função, sendo as principais:

- i) Armazenamento, transporte e absorção de íons metálicos
- ii) Transferência de elétrons
- iii) Armazenamento, transporte e absorção de dióxigênio
- iv) Catálise.

Dependendo dos ligantes que circundam os íons cobre(II) nos sítios ativos das proteínas de cobre, pode surgir um sinal espectroscópico característico cujo resultado permite subdividir as mesmas em três classes principais: proteínas do **tipo-1**, **tipo-2** e **tipo-3**. A Figura 1.2 mostra o arranjo estrutural dos ligantes da primeira esfera de coordenação nos sítios ativos destas proteínas.

Figura 1.2: Estrutura do sítio ativo dos diferentes tipos de proteína de cobre. As siglas entre parênteses referem-se aos códigos PDBs correspondentes a cada estrutura.



Fonte: Adaptada das referências (CUFF et al., 1998; TAINER et al., 1982; XUE et al., 1998)

As proteínas de cobre do **tipo-1** são caracterizadas como sítios mononucleares, contendo dois resíduos de histidina, um resíduo cisteína e um ligante axial, o qual pode variar. São também conhecidas como proteínas azuis de cobre (*blue copper proteins*), devido a sua intensa coloração azul, que surge em função de uma banda de absorção próximo de 600 nm, atribuída a uma transferência de carga ligante-metal (LMCT) entre o íon cobre(II) e um resíduo de cisteína diretamente coordenado ao íon metálico no sítio ativo. Os sítios do **tipo-1** são normalmente encontrados em proteínas responsáveis pelo transporte de elétrons tais como a plastocianina (Figura 1.2-(1AG6)), azurina, pseudoazurina e amicianina. Também podem ser encontrados em algumas enzimas da classe das oxirredutases, tais como, nitrito redutase e oxidases, contendo mais de um íon cobre em seu sítio ativo.

As proteínas de cobre do **tipo-2** possuem quatro ligantes doadores contendo átomos de nitrogênio ou oxigênio em uma geometria quadrática plana ou tetraédrica distorcida ligados diretamente ao íon cobre(II). São notáveis por estarem envolvidas em processos catalíticos, tendo como principais representantes da classe, a galactose oxidase, Cu-Zn Superóxido Dismutase (Figura 1.2 – [2SOD]) e oxigenases em geral.

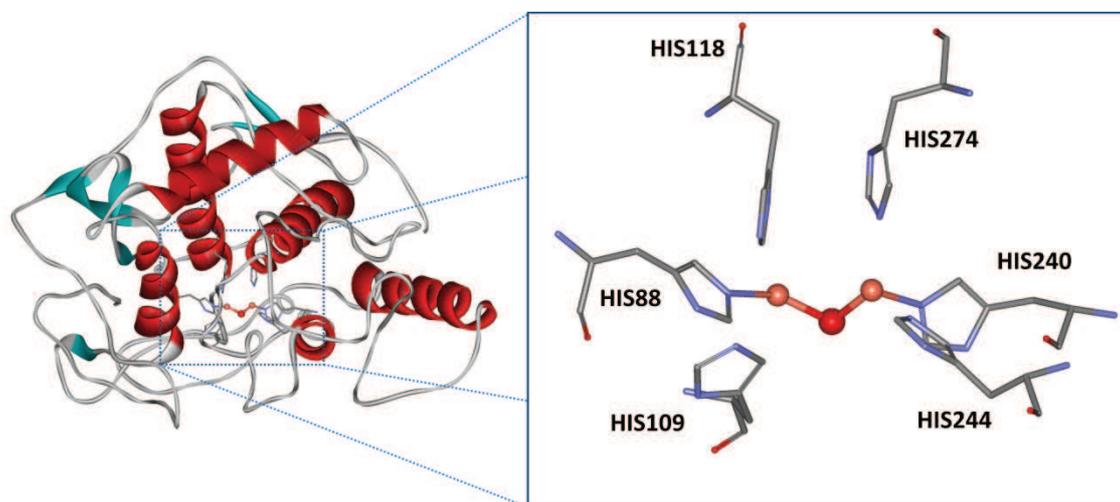
As proteínas de cobre do **tipo-3** são caracterizadas por centros dinucleares Cu(II)Cu(II), onde a cada íon cúprico estão coordenados três nitrogênios provenientes de resíduos de histidina. São notáveis pela sua habilidade de se ligar reversivelmente ao dióxigênio, estando envolvidas no transporte e ativação deste ligante. As proteínas de cobre do **tipo-3** não dão origem a nenhum sinal no espectro de EPR devido ao acoplamento antiferromagnético entre os dois íons Cu(II). Os principais representantes da classe são as hemocianinas (Figura 1.2 – [1JS8]), a catecol oxidase e a tirosinase.

1.3.1. A Oxidação de Catecóis

As proteínas de cobre do **tipo-3** atuam seguindo dois mecanismos básicos, ou como transportadoras de oxigênio (Hemocianinas derivadas de moluscos ou de artrópodes) ou como oxigenases/oxidases (catecol oxidase e tirosinase). As catecóis oxidases (*1,2-benzenodiol: Oxigênio oxirredutases*) estão envolvidas nas reações de oxidação de catecóis. A tirosinase, cujo sítio metálico é bastante similar ao das catecóis oxidases, apresenta atividade de mono-oxidase, o que faz com que estas enzimas sejam capazes de aceitar monofenóis como substratos.

As catecóis oxidases (**COs**) catalisam exclusivamente a reação de oxidação de *o*-difenois às suas respectivas *o*-quinonas, acoplada a um processo de redução do oxigênio molecular. Nesse processo oxidativo, formam-se quinonas altamente reativas, as quais podem sofrer auto-polimerização levando à formação de melaninas polifenólicas marrons. Acredita-se que, em algumas espécies de vegetais, tais melaninas possam proteger a planta de agentes patógenos e insetos (DEVERALL, 1961). As **COs** encontram-se presentes em tecidos vegetais e frutos, podendo também ser encontradas em alguns insetos e crustáceos. As tirosinases são encontradas em uma ampla variedade de plantas, fungos, bactérias, mamíferos, crustáceos e insetos (SOLOMON, 1996). A Figura 1.3 mostra esquematicamente a estrutura do sítio ativo para a catecol oxidase.

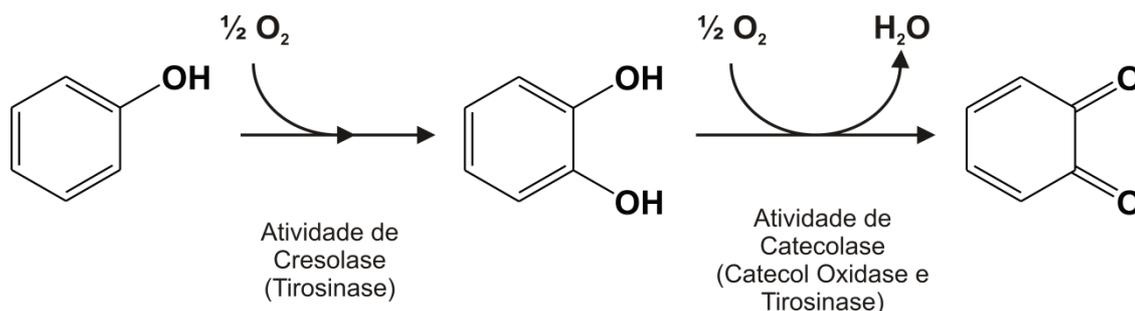
Figura 1.3: Estrutura do sítio ativo da catecol oxidase. (Código PDB: 1BT3)



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

As tirosinases, enzimas envolvidas na reação de oxidação de monofenóis a *o*-difenois, também apresentam atividade de catecolase. A Figura 1.4 mostra esquematicamente o processo de mono-oxigenação de fenóis (atividade de tirosinase) e de oxidação de catecóis (atividade de catecolase).

Figura 1.4: Caminhos reacionais em sítios de cobre do **tipo-3**.



Fonte: Adaptada da referência (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).

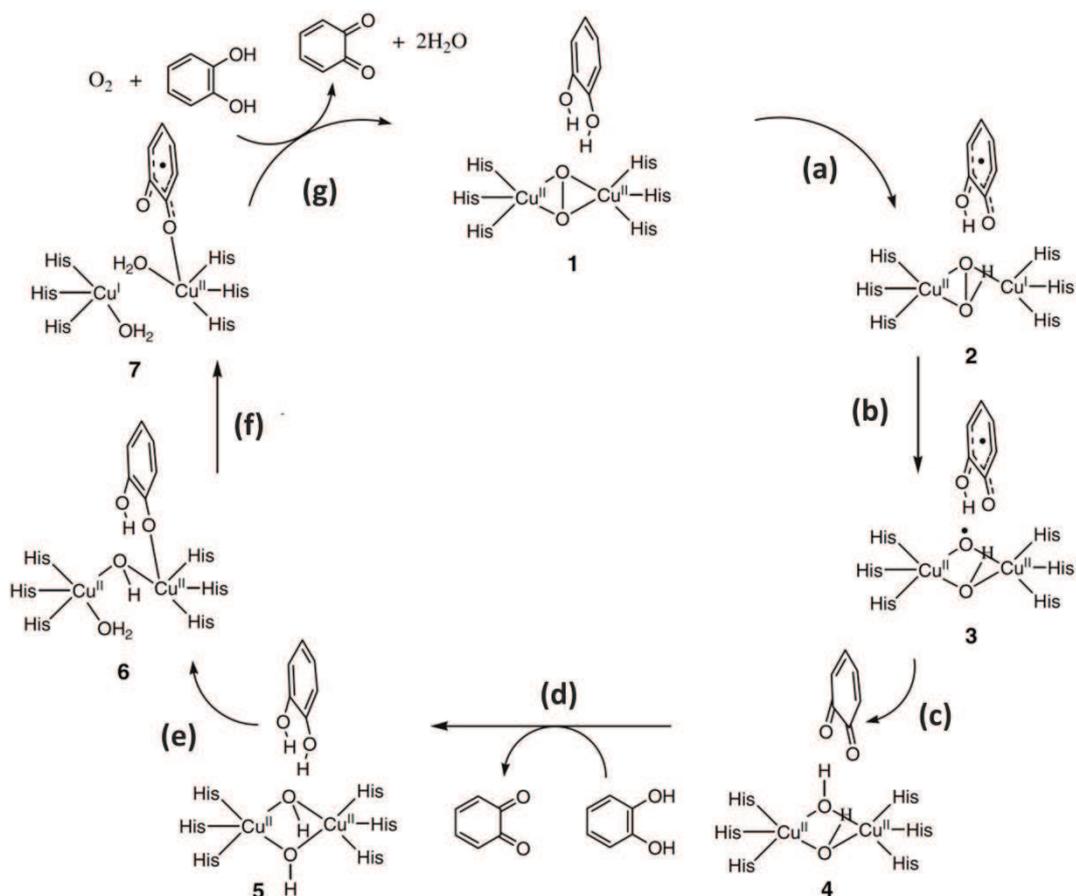
Duas principais propostas de mecanismo, para a descrição da reação de oxidação de catecóis no sítio ativo de enzimas de cobre **tipo-3**, são encontradas na literatura, as quais são baseadas em dados bioquímicos e espectroscópicos. A principal diferença entre estas propostas, está basicamente na forma de ligação do substrato ao íon cobre(II). No mecanismo proposto por Solomon (SOLOMON, 1996), a oxidação ocorre em três etapas. A primeira etapa envolve a coordenação do substrato aos dois íons cobre(II) no sítio metálico, seguida da oxidação do substrato e redução do sítio metálico, a segunda etapa consiste na ligação do oxigênio ao sítio metálico em sua forma reduzida causando a oxidação do íon metálico e a terceira etapa a oxidação da segunda molécula de substrato. Já no mecanismo proposto por Klabunde (KLABUNDE et al., 1998) a coordenação do substrato ao íon cobre(II) é monodentada, ocorrendo apenas por uma hidroxila do catecol, baseando-se na estrutura da catecol oxidase juntamente com o inibidor feniltioureia.

Um mecanismo mais recente, proposto teoricamente através de cálculos de teoria do funcional da densidade (DFT)², envolve sucessivas reações de transferência de próton, as quais estão associadas aos passos onde ocorrem as oxidações do substrato, tratando-se, portanto, de uma transferência de prótons acoplada com uma transferência de elétrons (*Proton Coupled Electron Transfer*). A oxidação foi monitorada teoricamente através dos cálculos de populações de spin para cada estrutura do ciclo catalítico (GÜELL; SIEGBAHN, 2007). O modelo utilizado para o estudo teórico do mecanismo de oxidação de catecóis envolveu apenas os átomos na primeira esfera de coordenação da estrutura do sítio ativo caracterizado experimentalmente. Alguns átomos tiveram as suas posições originais fixadas de modo que a otimização foi

² A teoria do funcional da densidade será devidamente abordada na Seção 2.2 desta tese.

conduzida com restrições. O mecanismo proposto teoricamente é apresentado na Figura 1.5.

Figura 1.5: Mecanismo de oxidação de catecóis proposto originalmente por Güell e Siegbahn.



Fonte: Adaptada da referência (GÜELL; SIEGBAHN, 2007)

O ciclo catalítico descrito na Figura 1.5 inicia-se com duas transferências de próton sucessivas entre os grupos -OH da catecol e os átomos de oxigênio em ponte entre os íons Cu(II) (estruturas **1**, **2** e **3**), levando à oxidação de uma molécula de catecol com liberação de uma molécula de *o*-quinona. Para que o ciclo catalítico se complete, outra molécula de catecol se aproxima do sítio ativo, coordenando-se diretamente a um dos íons Cu(II) e efetuando duas transferências de próton sucessivas entre os grupos -OH da molécula de catecol e os grupos -OH em ponte entre os íons metálicos (estrutura **5**, **6** e **7**), liberando uma segunda molécula de *o*-quinona. A última etapa do processo envolve a entrada de uma molécula de O₂ que deslocará as duas moléculas de água formadas pelas transferências de próton entre a segunda molécula de catecol e os íons -

OH coordenados ao metal, regenerando a ponte peróxido $\mu(\text{O}_2^{2-})$ entre os íons metálicos.

Em outro trabalho utilizando modelos sintéticos para o sítio ativo das COs (BORN et al., 2007), o mecanismo de oxidação de um substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol (dtbc), por modelos miméticos do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ -bispidina³, foi estudado através de metodologias teóricas e experimentais, levando a formulações de novas propostas de mecanismo, que diferem das propostas descritas anteriormente para o sítio ativo das COs. As duas grandes diferenças encontram-se na estequiometria da reação, na qual apenas uma molécula de catecol é oxidada por ciclo e na redução do oxigênio molecular ao longo do ciclo, o qual é convertido em peróxido, diferentemente da reação enzimática, onde o oxigênio molecular é reduzido à água.

Todo o trabalho apresentado ao longo desta tese envolve a estrutura de um modelo biomimético, cujos ligantes foram planejados para mimetizar as propriedades estruturais e cinéticas da catecol oxidase, apresentada nesta seção. Porém, as reações estudadas ao longo desta tese envolvem a quebra hidrolítica de ésteres de fosfato, as quais serão promovidas por um modelo da catecol oxidase, caracterizando assim um caso de **promiscuidade catalítica** em sistemas biomiméticos. Na próxima seção será apresentado o conceito de promiscuidade enzimática.

1.4. PROMISCUIDADE ENZIMÁTICA

Na Seção 1.1, as interações altamente específicas entre enzima e substrato foram apontadas como um dos principais fatores que justificam a alta eficiência dos sistemas enzimáticos se comparado com catalisadores sintéticos. Embora os sítios ativos tenham sido evolutivamente otimizados para um determinado processo é evidente que muitas enzimas possuem sítios ativos com elevada similaridade sugerindo que elas evoluíram de uma enzima mais primitiva, uma espécie de “ancestral comum”. Por esse motivo, enzimas pertencentes à mesma classe (ou seja, enzimas que catalisam a mesma classe de reações) podem possuir sítios ativos praticamente idênticos, enquanto que as sequências peptídicas certamente serão diferentes. Consideremos, por exemplo, as proteínas de cobre do **tipo-3**, as quais estão envolvidas em processos que vão desde o

³ 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonano

transporte de oxigênio em moluscos e artrópodes até o escurecimento em plantas e frutos. Comparando as estruturas de hemocianinas em moluscos e artrópodes, vemos que embora ambas apresentem a mesma função, tratam-se de enzimas que compartilham uma alta similaridade estrutural, mas que não são efetivamente a mesma enzima.

As enzimas, em determinadas situações, são capazes de aceitar em seu sítio ativo substratos que são muito similares aos seus substratos naturais. Quando uma enzima é capaz de aceitar em seu sítio ativo um substrato não cognato e efetuar um processo reativo que não se relaciona com aquele observado para o substrato original, por exemplo, a quebra de diferentes ligações, dizemos que a enzima atua de maneira promíscua (O'BRIEN; HERSCHLAG, 1999).

A promiscuidade enzimática pode ocorrer em relação às condições de reação, à natureza do substrato e em relação ao tipo de reação catalisada, isto é, a promiscuidade catalítica. A promiscuidade catalítica se relaciona com a habilidade de um único sítio ativo catalisar mais de um tipo diferente de reação, seja através da quebra de diferentes ligações ou através da formação de estados de transição que são diferentes dependendo da reação (HULT; BERGLUND, 2007). Um exemplo de promiscuidade catalítica ocorre na família das fosfatases alcalinas (*Alkaline Phosphatase* – **AP**). As **APs** possuem como substrato natural monoésteres de fosfato, no entanto essas enzimas atuam de maneira promíscua hidrolisando diésteres de fosfato, um substrato não cognato, cuja clivagem segue um mecanismo diferente daquele observado para monoésteres de fosfato (HOU; CUI, 2013). Outro exemplo de promiscuidade catalítica pode ser encontrado nas fosfatases ácidas púrpuras (*Purple Acid Phosphatase* – **PAP**) extraídas de mamíferos. As **PAPs** extraídas de mamíferos possuem fosfomonoésteres como substratos naturais, porém podem estar envolvidas em reações de peroxidação, as quais são facilitadas pela presença de íons Fe(III) e Fe(II) nos sítios ativos destas enzimas, que atuam mediando reações redox (SCHENK et al., 2013).

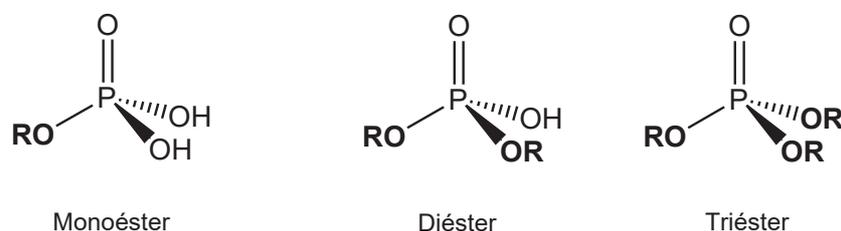
Nesta tese será apresentado um exemplo de promiscuidade catalítica em sistemas biomiméticos, analisando a habilidade de um complexo dinuclear de cobre, originalmente planejado para mimetizar os aspectos estruturais e reativos do sítio ativo de catecóis oxidases (REY et al., 2007), em promover a hidrólise de diésteres de fosfato.

1.5. MECANISMO DE QUEBRA HIDROLÍTICA DE ÉSTERES DE FOSFATO

Os ésteres de fosfato são indubitavelmente um dos principais grupos presentes em ambientes biológicos. A presença desse grupo é de fundamental importância na manutenção da estrutura de moléculas de extrema importância, como as moléculas de DNA e RNA, responsáveis pelo armazenamento e transmissão da informação genética em seres vivos. Além de estarem presentes em outras biomoléculas como o ATP, fosfocreatina, fosfato de adenosina, entre outras (WESTHEIMER, 1987). A elevada estabilidade dos ésteres de fosfato é possivelmente uma das razões que justifica a escolha da natureza por esses grupos (KAMERLIN et al., 2013).

Os ésteres de fosfato podem ser classificados como mono-, di- e triésteres de fosfato, conforme apresentado na Figura 1.6. Os triésteres não ocorrem naturalmente em sistemas biológicos, embora componham a estrutura de alguns pesticidas exercendo assim alguma influência em processos biológicos.

Figura 1.6: Fórmulas estruturais para os ésteres derivados do ácido fosfórico.



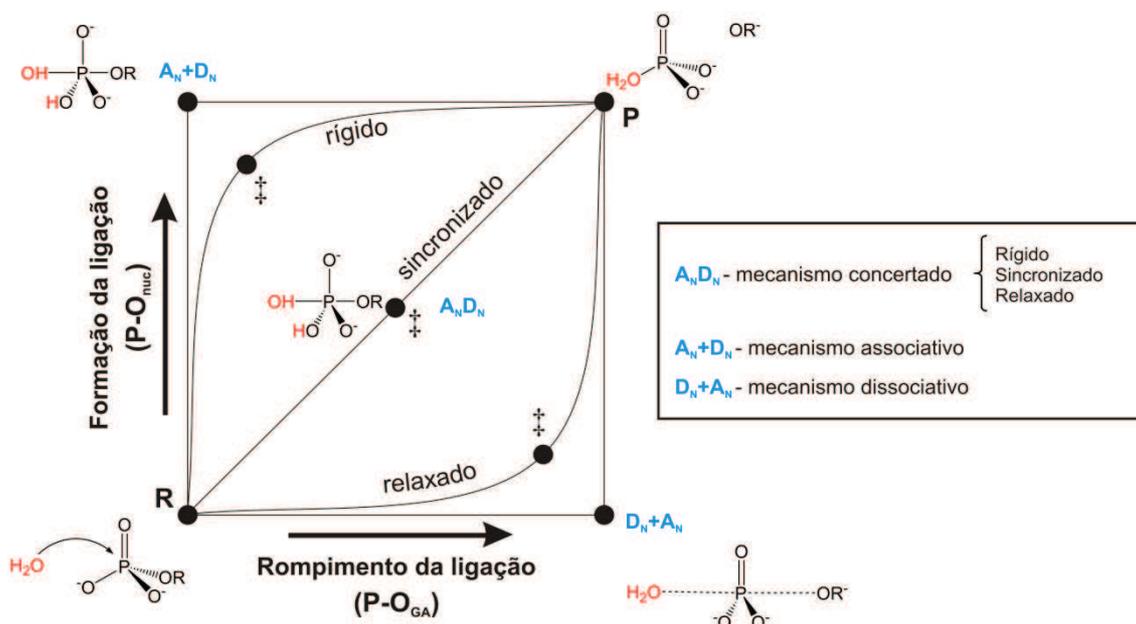
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O mecanismo de hidrólise de ésteres de fosfato é um tópico que atrai a atenção da comunidade científica há muitos anos (COX; RAMSAY, 1964; FLORIÁN; WARSHEL, 1998; THATCHER; KLUGER, 1989; WESTHEIMER, 1987). Existem basicamente três possibilidades para a quebra hidrolítica de ésteres de fosfato em solução aquosa. A primeira possibilidade envolve um mecanismo dissociativo ($D_N + A_N$)⁴, no qual ocorre a formação de um íon metafosfato como intermediário de reação. A formação do íon metafosfato somente é observada em fase gasosa. A segunda

⁴ A_N+D_N , D_N+A_N e A_ND_N referem-se à notação da IUPAC para designar mecanismos associativos, dissociativos e concertados respectivamente. A_N relaciona-se com a formação da ligação e D_N relaciona-se com o rompimento da ligação.

possibilidade envolve um mecanismo associativo ($A_N + D_N$), o qual passa por um intermediário pentacoordenado estável, chamado de fosforano. A terceira possibilidade envolve um caminho concertado ($A_N D_N$), onde ocorre a formação de um estado de transição pentacoordenado. O diagrama de More O’Ferral-Jencks (JENCKS, 1972; O’FERRALL, 1970), mostrado na Figura 1.7, ilustra claramente os possíveis caminhos para a hidrólise de ésteres de fosfato.

Figura 1.7: Diagrama de More O’Ferral-Jencks para os possíveis mecanismos de quebra hidrolítica de ésteres de fosfato.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O caminho associativo envolve a formação da ligação entre o nucleófilo (H_2O para este exemplo) e o átomo de fósforo, levando à formação de um intermediário pentacoordenado, esquematizado no vértice superior à esquerda do diagrama. Note que, para este exemplo específico, ocorreu uma reação de transferência de próton entre o oxigênio terminal do grupo fosfato e a água. Após a formação do intermediário fosforano, a reação procede com o rompimento da ligação com o grupo abandonador ($-OR$), conduzindo à estrutura do produto. Seguindo o caminho dissociativo podemos observar que a ligação entre o grupo abandonador e o fósforo é rompida anteriormente à entrada do nucleófilo, levando assim a uma estrutura de um íon metafosfato, esquematizado no vértice aresta inferior à direita do diagrama. O caminho concertado,

evita as arestas do diagrama, fazendo com que a formação da ligação com o nucleófilo ocorra ao mesmo tempo em que a ligação com o grupo abandonador é rompida se assemelhando a um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) em haletos de alquila, não sendo, portanto, observados intermediários estáveis entre a espécie reagente e o produto. Os estados de transição para o mecanismo concertado podem ser de três tipos: **(i) rígidos** (*tight transition state*), no qual a formação da ligação predomina sobre o rompimento da ligação ao longo do caminho reacional, **(ii) sincronizados** (*synchronous transition state*), no qual o rompimento da ligação ocorre ao mesmo tempo em que a ligação é formada ao longo do caminho reacional e, **(iii) relaxados** (*loose transition state*), no qual o rompimento da ligação predomina sobre a formação da ligação ao longo do caminho reacional (LASSILA; ZALATAN; HERSCHLAG, 2011).

Os possíveis mecanismos para as reações de monoésteres e diésteres de fosfato em solução aquosa foram investigados detalhadamente em diversos trabalhos de Arieh Warshel (FLORIÁN; WARSHEL, 1998; KAMERLIN; FLORIÁN; WARSHEL, 2008; KLÄHN; ROSTA; WARSHEL, 2006; PRASAD; PLOTNIKOV; WARSHEL, 2013) e revisados recentemente nos trabalhos de Duarte e Nome (DUARTE et al., 2015; KIRBY; NOME, 2015).

Embora a hidrólise de algumas moléculas contendo ésteres de fosfato, como o DNA, seja termodinamicamente espontânea, do ponto de vista cinético elas são altamente desfavoráveis na ausência de um catalisador (FEKRY; GATES, 2009). A quebra hidrolítica espontânea, em solução aquosa, frequentemente não ocorre em uma escala de tempo observável; como exemplo temos a reação de hidrólise espontânea do difenilfosfato, a qual possui um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 180 anos, na temperatura de 100 °C (DOMINGOS et al., 2003). Se considerarmos a molécula de DNA, veremos que a estimativa para o tempo de meia-vida é de cerca de 31 milhões de anos (SCHROEDER et al., 2006). A baixa reatividade de ésteres de fosfato é consistente com o papel desempenhado por esse grupo.

Um grande número de enzimas evoluiu na direção de catalisar as reações de hidrólise de ésteres de fosfato, seguindo uma variedade de mecanismos, em diferentes condições de temperatura e pH. As principais enzimas responsáveis pela quebra hidrolítica de ésteres de fosfato estão listadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Enzimas envolvidas na quebra de ésteres de fosfato. (WILCOX, 1996)

Enzima	Substrato(s)	Metais presentes no sítio ativo
Fosfatases Ácidas Púrpuras (<i>Purple Acid Phosphatase</i>)	Monoésteres de fosfato em condições ácidas.	Fe(III) e M(II) (onde, M= Zn, Mn ou Fe)
Fosfatases Alcalinas (<i>Alkaline Phosphatase</i>)	Monoésteres de fosfato (meio básico)	Dois íons Zn(II) e um íon Mg(II)
Inositol Monofosfatase (<i>Inositol Monophosphatase</i>)	Inositol Monofosfato	Um íon Mg(II) podendo ser ativada pela entrada de um segundo íon Mg(II)
Frutose-1,6-bifosfatase (<i>Fructose-1,6-bisphosphatase</i>)	D-frutose-1,6-bisfosfato Produto gerado na hidrólise (D-frutose-6-bisfosfato)	Mg(II), Mn(II), Zn(II) e Co(II)
Ser/Thr Fosfatases (<i>Ser/Thr Phosphatases</i>)	Fosforilação e desfosforilação de resíduos de proteínas. (ligação dos aminoácidos Ser-, Thr-, Tyr- com grupos fosfato)	Zn(II) e Fe(III)
Pirofosfatases (<i>Inorganic Pyrophosphatase</i>)	Pirofosfatos Inorgânicos	Mg(II)
Fosfolipase C (<i>Phospholipase C</i>)	Fosfolipídeos	Três íons Zn(II)
Nucleases (DNA Polimerase, Transcriptase reversa, P1 Nuclease, EcoRV Endonuclease)	DNA, RNA	Os principais íons são: Mg(II), Mn(II), Zn(II)

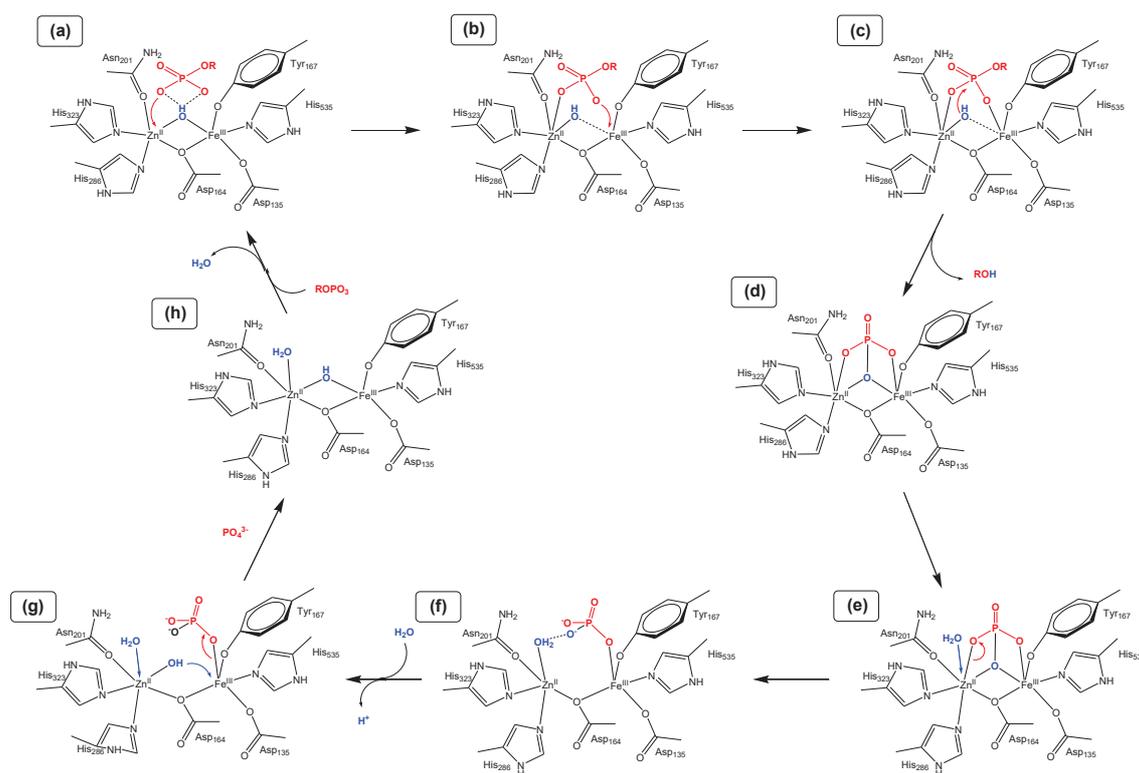
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Dentre as enzimas destacadas na Tabela 1.2, as fosfatases ácidas púrpuras (**PAPs**) juntamente com as fosfatases alcalinas (**APs**) representam os exemplos mais estudados.

As **PAPs**, dentre as diversas classes de metaloidrolases dinucleares experimentalmente caracterizadas, são as únicas que possuem um sítio bimetálico heterovalente, contendo um íon Fe(III) e um outro íon divalente M(II), onde M = Fe, Zn or Mn. Embora nem todas as **PAPs** compartilhem uma grande homologia no que diz

respeito às suas sequências peptídicas, a estrutura do sítio ativo e a coloração púrpura se mantém em todas as fosfatases caracterizadas experimentalmente. A coloração púrpura desta classe de enzimas se deve a uma transferência de carga ligante-metal ($\lambda_{\text{máx}} = 510 - 560 \text{ nm}$; $\epsilon = \sim 3000 - 40000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (KLABUNDE et al., 1996), envolvendo um resíduo de tirosina ligado diretamente ao íon Fe(III) encontrado em todas as **PAPs**. O principal substrato das **PAPs** são os monoésteres de fosfato, embora as **PAPs** possam estar envolvidas na hidrólise de fosfodiésteres (COX et al., 2007). Existem diversas proposições de mecanismo disponíveis na literatura, para a quebra hidrolítica de monoésteres de fosfato nos sítios ativos das **PAPs** (ALBERTO et al., 2010; FERREIRA et al., 2012; KLABUNDE et al., 1996). O mecanismo mais atual para a quebra hidrolítica de monoésteres de fosfato nos sítios ativos das **PAPs** é apresentado na Figura 1.8.

Figura 1.8: Mecanismo atualmente aceito para a quebra hidrolítica de monoésteres de fosfato no sítio ativo de fosfatases ácidas púrpuras.



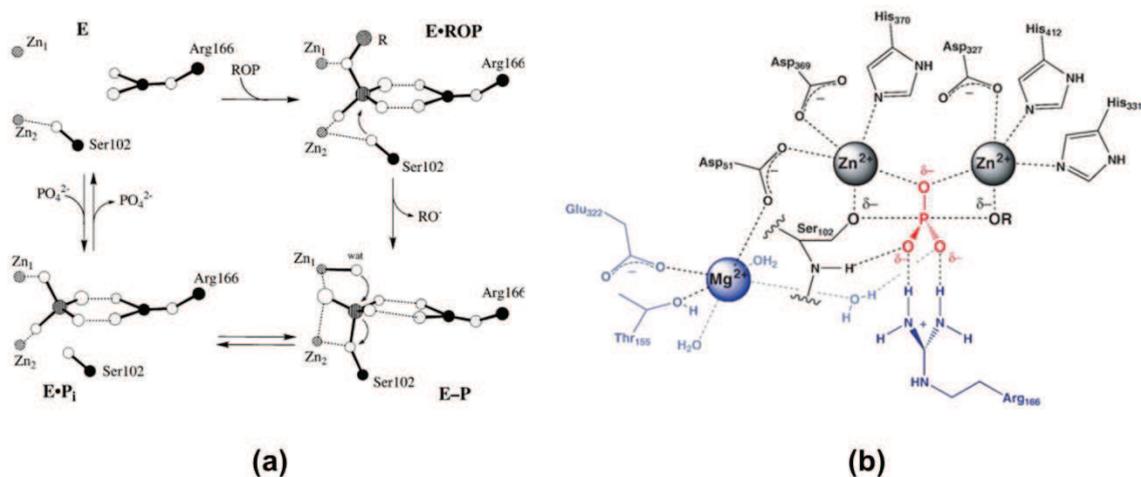
Fonte: Adaptado da referência (SCHENK et al., 2013).

A primeira etapa do ciclo catalítico, assinalada como **(a)** na Figura 1.8, envolve uma interação do substrato (fosfomonoéster) na segunda esfera de coordenação do sítio

ativo. Na segunda etapa, **(b)** o substrato sofre um rearranjo para se coordenar ao íon metálico divalente facilitando o ataque do nucleófilo em **(c)**, que pode ser a ponte μ -OH destacada em azul, ou outro grupo hidróxido derivado de moléculas de solvente. Após o ataque nucleofílico pelo grupo hidróxido e liberação do grupo -OR em **(c)**, forma-se uma estrutura em **(d)**, na qual o grupo fosfato gera uma ponte entre os íons metálicos. As próximas etapas do ciclo catalítico envolvem a regeneração do estado de repouso da enzima, passando pela coordenação de moléculas de água em **(e)**, que causará uma abertura da ponte formada pelo grupo fosfato em **(f)**, seguida pela entrada de uma segunda molécula de água que promoverá a liberação completa do grupo fosfato em **(g)**, regenerando a forma de repouso da enzima em **(h)** (SCHENK et al., 2013).

As fosfatases alcalinas (**AP**) estão envolvidas na quebra hidrolítica de monoésteres de fosfato em condições básicas. Correspondem a um dos sistemas bimetalícos mais estudados, devido à riqueza de informações estruturais obtidas para a enzima isolada e na presença do substrato. Assim como as **PAPs** trata-se de uma metaloenzima com sítio ativo bimetalíco, contendo dois íons Zn(II) além de conter um íon Mg(II) cuja função não foi estabelecida de maneira inequívoca, embora se acredite que o íon Mg(II) contenha um grupo hidróxido que está envolvido na desprotonação do resíduo de Ser102 responsável pelo ataque nucleofílico. O mecanismo reacional que envolve a quebra hidrolítica é bem esclarecido e passa por um mecanismo concertado com a formação de um estado de transição, no átomo de fósforo, que se aproxima de um mecanismo dissociativo, ou seja, um estado de transição relaxado. A Figura 1.9a mostra as etapas envolvidas no processo catalítico juntamente com a representação da estrutura do estado de transição na Figura 1.9b.

Figura 1.9: (a) Representação esquemática do ciclo catalítico de uma fosfatase alcalina (AP), extraído da referência (HOLTZ; KANTROWITZ, 1999). (b) Representação da estrutura do sítio ativo evidenciando a estrutura do estado de transição para a quebra hidrolítica do monoéster de fosfato, extraído da referência (ZALATAN; FENN; HERSCHLAG, 2008).



Fonte: Adaptado das referências (HOLTZ; KANTROWITZ, 1999; ZALATAN; FENN; HERSCHLAG, 2008)

Através da análise da Figura 1.9a vemos que o processo catalítico se inicia com a aproximação do monoéster de fosfato (**ROP**) da estrutura da enzima (**E**), o qual estabelecerá uma interação com os dois íons $Zn(II)$ e com o resíduo Arg166, formando o complexo enzima-substrato (**E•ROP**). A próxima etapa envolve o ataque nucleofílico do resíduo Ser102 que levará a formação do estado de transição representado na Figura 1.9b, no qual ocorrerá a entrada do resíduo Ser102 e saída do grupo $-OR$, em um estado de transição relaxado, isto é, que se aproxima do vértice inferior à direita no diagrama de More O’Ferral-Jencks apresentado na Figura 1.7. Após a formação do estado de transição, o complexo enzima-produto (**E•P**) é formado (Figura 1.9a), o qual em seguida retorna à forma de repouso da enzima através da entrada de uma molécula de água que promove a quebra hidrolítica da ligação do grupo fosfato com o resíduo Ser102 formando a espécie **E•Pi** onde **Pi** representa o fosfato inorgânico. Em seguida o fosfato inorgânico é deslocado do sítio ativo para que o ciclo catalítico se reinicie com outro monoéster de fosfato.

As fosfatases alcalinas também podem clivar hidroliticamente diésteres de fosfato (JONAS; HOLLFELDER, 2009). A reação de diésteres de fosfato no sítio ativo

das **APs** é dita promíscua, uma vez que a clivagem de diésteres de fosfato segue um mecanismo que envolve a formação de um estado de transição em um mecanismo sincronizado, isto é, que não passa próximo a nenhum dos vértices do diagrama de More O'Ferral-Jencks (HOU; CUI, 2013).

1.5.1. Modelos miméticos envolvidos na quebra hidrolítica de ésteres de fosfato.

Existe atualmente uma série de modelos sintéticos capazes de promover a quebra hidrolítica de ésteres de fosfato (BOUDALIS et al., 2007; WILLIAMS et al., 1999). Desbouis et al. apresenta, em um artigo de revisão, uma análise estrutural e de mecanismos para alguns complexos metálicos de Cu(II), Zn(II) e Ni(II) selecionados, que possuem atividade na quebra hidrolítica de ésteres de fosfato (DESBOUIS et al., 2012). O mecanismo teórico de quebra de ésteres de fosfato por modelos sintéticos também já foi previamente descrito na literatura. Ferreira et al. propôs um estudo teórico para o mecanismo de quebra hidrolítica de um diester de fosfato, catalisado por um modelo biomimético de uma fosfatase ácida púrpura extraída do feijão (**kbPAP**) com um centro hetero-bimetálico contendo Fe(III), Zn(II) e um ligante assimétrico. A quebra hidrolítica ocorre através de um mecanismo associativo, que envolve uma transferência intramolecular de próton entre o nucleófilo e o átomo de oxigênio terminal do grupo fosfato, com a formação de um intermediário pentacoordenado, seguida por uma segunda reação de transferência de próton que promove a liberação do grupo abandonador, uma molécula de metanol que inicialmente compunha a estrutura do grupo fosfato (FERREIRA et al., 2008). No trabalho de Gao et al. foi apresentado o mecanismo teórico para a quebra hidrolítica do substrato **HpPNP** (2-hidroxi-propil-4-nitrofenil-fosfato), um modelo para a cadeia lateral de moléculas de **RNA**, por um complexo dinuclear de Zn(II) com um ligante simétrico. Os resultados mostram que a quebra hidrolítica segue um mecanismo concertado com uma barreira de ativação de 16,5 kcal mol⁻¹. Os estados de transição para a clivagem do fosfodiéster envolvem uma transferência de próton acoplada com o ataque nucleofílico do oxigênio terminal do grupo 2-hidroxi-propil na molécula do substrato (**HpPNP**) (GAO et al., 2011).

No trabalho apresentado nesta tese, serão analisados os possíveis mecanismos para a quebra hidrolítica do substrato **BDNPP** (bis(2,4-dinitrofenil)fosfato) por um complexo dinuclear de Cu(II) contendo um ligante simétrico heptadentado. O complexo

foi originalmente planejado para mimetizar os aspectos reativos e estruturais das catecóis oxidases. Tal fato justifica a relevância do estudo aqui apresentado, por se tratar de um caso de promiscuidade catalítica em sistemas biomiméticos, embora se saiba que complexos mononucleares de cobre apresentam atividade hidrolítica na quebra de diésteres de fosfato (MORROW; TROGLER, 1988). Os estudos teóricos envolvendo os mecanismos de quebra hidrolítica de diésteres de fosfato normalmente concentram-se na etapa de quebra hidrolítica, ou apenas nas etapas iniciais, não se preocupando em revelar as estruturas dos intermediários que surgem ao longo do processo catalítico, os quais podem ser determinantes para a ocorrência ou não do processo. Neste trabalho serão avaliadas todas as etapas envolvendo o ciclo catalítico da quebra hidrolítica do **BDNPP** por um complexo metálico, sendo esse o maior diferencial em termos de análise teórica de mecanismos.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A descrição dos sistemas moleculares fornece a ponte que conecta o mundo microscópico dos átomos e moléculas às propriedades macroscópicas observáveis. Essa conexão se tornou menos obscura com o advento da mecânica quântica, no início do século XX. A equação de Schrödinger, publicada em 1926 (SCHRODINGER, 1926), representou um grande avanço nesta descrição através da resolução analítica do problema do átomo de hidrogênio. Átomos contendo mais de um elétron, no entanto, não podem ser descritos de maneira analítica, sendo necessário lançar mão de métodos aproximados.

Os sistemas moleculares possuem uma descrição ainda mais complexa, pois o número de variáveis associadas ao sistema é muito grande se comparado ao átomo de hidrogênio. Foi a partir da formulação da aproximação de Born-Oppenheimer que a descrição de sistemas simples se tornou possível, pois esta assumia que o movimento eletrônico poderia ser separado do movimento nuclear. A equação de Schrödinger para um sistema molecular pode ser escrita em função das coordenadas de cada elétron e cada núcleo conforme mostrado na Equação 2.1.

$$\hat{H}\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_n, \vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_N) = E\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_n, \vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_N) \quad (2.1)$$

Onde \hat{H} corresponde ao Hamiltoniano, \vec{x}_n corresponde à coordenada do elétron n e \vec{R}_N corresponde à coordenada do núcleo N .

O Hamiltoniano (\hat{H}) de um sistema molecular pode então ser escrito, em unidades atômicas, levando em consideração a presença de todos os N núcleos e todos os n elétrons como mostrado na Equação 2.2:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \frac{\hbar^2}{2} \sum_{A=1}^N \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \sum_{A=1}^N \sum_{i=1}^n \frac{Z_A e'^2}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{e'^2}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^{N-1} \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B e'^2}{R_{AB}} \quad (2.2)$$

em que:

$$e'^2 = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0}$$

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$$

\hbar é a constante de Planck dividida por 2π , m_e é a massa do elétron, M a massa do núcleo, r_{iA} a distância elétron-núcleo, r_{ij} a distância elétron-elétron e R_{AB} a distância núcleo-núcleo. ∇_i^2 e ∇_A^2 representam os laplacianos para os elétrons e núcleos respectivamente.

Conforme mencionado no início deste capítulo, a solução de um problema de mais de um elétron somente é encontrada através de métodos aproximados. A aproximação de Born-Oppenheimer permite a separação das variáveis nucleares das variáveis eletrônicas, através do argumento de que os núcleos possuem uma massa muito mais elevada que a dos elétrons e, portanto, devem estar em velocidades bem menores podendo ser considerados praticamente em posições fixas. Tal aproximação propõe que o termo de energia cinética associado aos núcleos na expressão do Hamiltoniano apresentado na Equação 2.2 seja nulo. Sendo assim, o último termo desta equação pode ser considerado constante. A energia total do sistema passa a ter uma dependência paramétrica em relação às coordenadas nucleares, isto é, devemos encontrar numericamente um arranjo nuclear que conduzirá a uma minimização da energia do sistema. Nessa aproximação o Hamiltoniano pode ser dividido em uma parte eletrônica e outra parte nuclear. O Hamiltoniano eletrônico é mostrado na Equação 2.3:

$$\hat{H}_{ele} = \underbrace{-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2}_{\hat{T}} + \underbrace{\sum_{i=1}^n \sum_{A=1}^M -\frac{Z_A}{r_{iA}}}_{\hat{U}} + \underbrace{\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{1}{r_{ij}}}_{\hat{V}_e} \quad (2.3)$$

em que \hat{T} é o operador energia cinética, \hat{V}_e é o operador de repulsão elétron-elétron contendo os termos clássicos de Coulomb e não clássicos de troca e correlação e \hat{U} é o potencial externo associado as interações entre os núcleos e elétrons.

Aplicando o Hamiltoniano da Equação 2.3 na função de onda eletrônica, $\psi_{ele}(\vec{r}; \vec{R})$, podemos encontrar a energia eletrônica do sistema, conforme mostrado na Equação 2.4.

$$\hat{H}_{ele} \psi_{ele}(\vec{r}; \vec{R}) = E_{ele} \psi_{ele}(\vec{r}; \vec{R}) \quad (2.4)$$

A função de onda eletrônica, $\psi_{ele}(\vec{r}; \vec{R})$, bem como a energia eletrônica E_{ele} , dependem explicitamente das coordenadas eletrônicas e parametricamente das coordenadas nucleares (SZABO; OSTLUND, 1996). Como a dependência é paramétrica, cada arranjo nuclear gerará uma função de onda eletrônica diferente.

A repulsão internuclear, dentro da aproximação de Born-Oppenheimer, altera somente o autovalor de energia, não influenciando nas autofunções do operador, o mesmo vale para qualquer constante adicionada ao operador. A energia total com os núcleos fixos é então dada pela energia eletrônica mais a repulsão entre os núcleos, conforme mostra a Equação 2.5:

$$E_{tot} = E_{ele} + \sum_{A=1}^{M-1} \sum_{B=A+1}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2.5)$$

em que: R_{AB} – é a distância entre dois núcleos A e B

Se todas as posições nucleares possíveis forem testadas na Equação 2.5, o resultado obtido corresponderá a uma **superfície de energia potencial** (SEP), na qual o ponto de menor energia dessa superfície corresponderá à estrutura molecular do sistema. Para um sistema de dois átomos apenas, esta superfície será demasiadamente simples, pois a energia do sistema apresentará apenas a dependência paramétrica com a distância entre estes dois átomos, de modo que o ponto de menor energia será aquele correspondente à distância de ligação na molécula. Em sistemas contendo mais de dois átomos, já se torna impossível visualizar uma superfície de energia potencial, pois esta teria que apresentar mais de três dimensões, sendo necessário fixar uma ou mais variáveis para se observar graficamente a dependência da energia com as coordenadas internas do sistema.

2.1. O MÉTODO DE HARTREE-FOCK

Um dos desafios de se resolver a Equação 2.3 está no termo \hat{V}_e que corresponde à repulsão intereletrônica. A existência deste termo, no Hamiltoniano da Equação 2.3, impede uma resolução analítica da equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos, uma vez que não é possível separar as variáveis para a resolução do problema. Os dois primeiros termos da Equação 2.3 dependem somente da coordenada de cada elétron e por esse motivo podem ser escritos como um operador de um elétron, cuja notação será dada por $\hat{h}(r_i)$. O termo que envolve a repulsão inter-eletrônica, possui dependência com a coordenada de mais de um elétron e pode ser escrito como uma operador $\hat{g}(r_i, r_j)$, de modo que o Hamiltoniano em 2.3 é reescrito como:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^n \hat{h}(r_i) + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \hat{g}(r_i, r_j) \quad (2.6)$$

O problema consiste em encontrar os autovalores e as autofunções do operador Hamiltoniano escrito na Equação 2.6. Para resolvermos este problema, podemos partir de várias aproximações. Uma aproximação inicial seria considerar que os elétrons não interagem entre si, de modo que o Hamiltoniano em 2.6 iria conter somente os operadores de um elétron, o que faria com que as autofunções pudessem ser escritas como um produto de funções de um elétron. Embora apresente uma simplicidade matemática bastante atraente, esta aproximação é obviamente grosseira e não possui aplicação prática no tratamento de sistemas moleculares. Uma segunda aproximação seria considerar que cada elétron interage com a densidade de carga gerada pelos outros elétrons da molécula. Nesta aproximação, conhecida como aproximação de Hartree, o potencial de interação pode ser encontrado de maneira auto-consistente. Embora possua mais sentido físico que a primeira aproximação, o método de Hartree desconsidera o fato de o movimento dos elétrons estarem correlacionados.

A aproximação de **Hartree-Fock** (HF) busca a resolução do problema de muitos elétrons, através da inclusão de maneira explícita da antissimetria da função de onda, escrevendo a mesma como um determinante de Slater, conforme mostrado na Equação 2.7, para um sistema contendo N elétrons.

$$\Psi(1,2, \dots, N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \psi_1(1) & \psi_2(1) & \dots & \psi_N(1) \\ \psi_1(2) & \psi_2(2) & \dots & \psi_N(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \psi_1(N) & \psi_2(N) & \dots & \psi_N(N) \end{vmatrix} \quad (2.7)$$

Além disto, o método de Hartree-Fock encontra os autovalores de energia através da aplicação do método variacional. Os autovalores de energia obtidos pelo método de Hartree-Fock, quando aplicados a sistemas moleculares, são dados pela Equação 2.8. A derivação completa da equação encontra-se nos livros LEVINE e SZABO (LEVINE, 2000; SZABO; OSTLUND, 1996).

$$E_{HF} = 2 \sum_{i=1}^{n/2} \varepsilon_i + \sum_{i=1}^{n/2} \sum_{j=1}^{n/2} (2J_{ij} - K_{ij}) + V_{NN} \quad (2.8)$$

Em que:

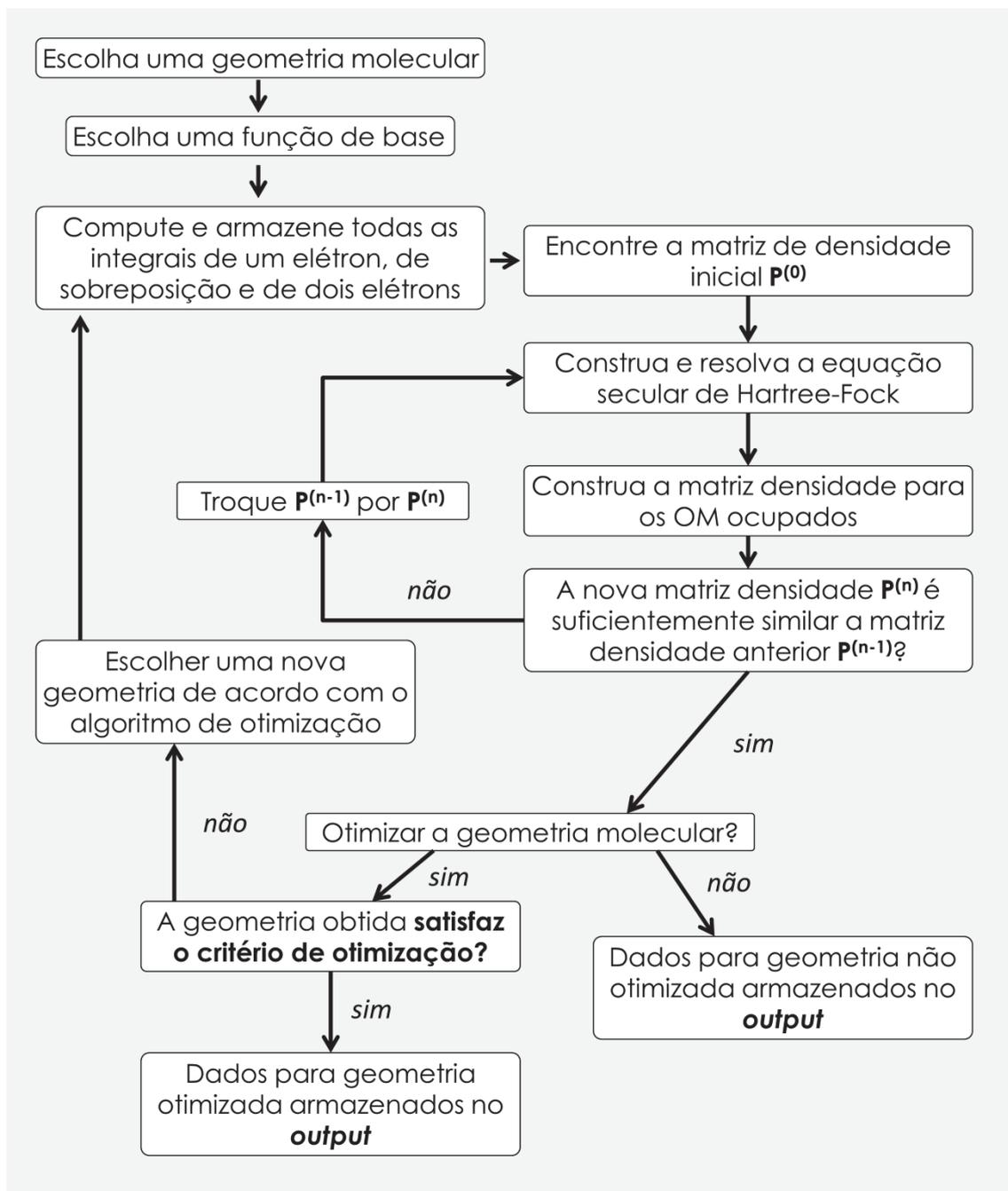
- ε_i corresponde à energia de cada orbital, de modo que a soma $2 \sum_i \varepsilon_i$ em 2.8 é feita considerando que existem dois elétrons por orbital molecular.
- J_{ij} corresponde à integral de Coulomb que representa a repulsão eletrônica entre dois elétrons e cuja expressão é dada por $J_{ij} = \langle \phi_i(1)\phi_j(2) | 1/r_{12} | \phi_i(1)\phi_j(2) \rangle$.
- K_{ij} corresponde à integral de troca, que surge em virtude de estarmos tratando um sistema de férmions que portanto devem ser indistinguíveis e descritos por funções de onda antissimétricas conforme previsto pelo princípio da exclusão de Pauli. A expressão para a integral de troca é dada por $K_{ij} = \langle \phi_i(1)\phi_j(2) | 1/r_{12} | \phi_j(1)\phi_i(2) \rangle$. Note que a integral de troca não possui análogo clássico.
- V_{NN} corresponde à repulsão internuclear a qual é constante em cada etapa do processo de otimização.

Adicionalmente ao trabalho envolvido na formulação do método de Hartree-Fock está a proposição de Roothaan de se expandir os orbitais ϕ_i em uma combinação linear de um conjunto de funções de base de um elétron χ_s , conduzindo às equações

conhecidas como Equações de Hartree-Fock Roothaan. Está além do escopo desta tese discutir todo o formalismo associado à dedução do método de Hartree-Fock-Roothaan.

A Figura 2.1 apresenta de maneira esquemática o método SCF (*Self consistent field*) para obtenção das energias e das geometrias moleculares através da utilização do método de Hartree-Fock.

Figura 2.1: Fluxograma para o procedimento de campo auto-consistente do método de Hartree-Fock (HF-SCF).



Fonte: Adaptada da referência (CRAMER, 2004)

A teoria por trás da formulação do método de Hartree-Fock não inclui a correlação eletrônica, mesmo se assumirmos um sistema em que os átomos envolvidos sejam descritos por uma função de base infinita. De fato este ponto é chamado de limite Hartree-Fock, no qual qualquer erro associado à atribuição da energia real de sistema é conhecido como energia de correlação, dada por $E_{cor} = E - E_{HF}$. Diversos métodos buscam recuperar a correlação eletrônica. Na próxima seção deste capítulo será apresentada a teoria do funcional da densidade, DFT (do inglês: *Density Functional Theory*) que representa uma forma alternativa de se recuperar parte da energia associada à correlação eletrônica, além de proporcionar algumas vantagens ao simplificar as funções avaliadas no momento da busca pela energia do sistema.

2.2. TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE

Uma das principais limitações do método de Hartree-Fock, conforme já mencionado anteriormente, consiste na recuperação da correlação eletrônica, que reside no último termo do Hamiltoniano eletrônico apresentado na Equação 2.3. Vários métodos estão disponíveis para se recuperar a correlação eletrônica e nesta seção serão apresentados os conceitos por trás da teoria do funcional da densidade (DFT), que será utilizada ao longo do trabalho apresentado nesta tese.

A DFT, como utilizada atualmente tem sua origem fundamentada nos teoremas de Hohenberg e Kohn (HOHENBERG; KOHN, 1964), os quais mostram que a energia eletrônica do estado fundamental pode ser determinada completamente e inequivocamente por sua densidade eletrônica (ρ). Uma análise intuitiva é capaz de revelar que a suposição inicial (que posteriormente é rigorosamente provada) do teorema de Hohenberg e Kohn está correta, pois:

- A integral da densidade eletrônica define o número de elétrons do sistema
- As cúspides na função associada à densidade eletrônica definem a posição dos núcleos.
- Os pesos associados às cúspides definem as correspondentes cargas nucleares.

A função de onda de um sistema multieletrônico depende de três coordenadas espaciais e uma de spin para cada elétron do sistema, o que torna a sua interpretação muito complicada. O grande número de variáveis associadas à função de onda de um

sistema incitou no último século o questionamento acerca da existência de um observável físico a partir do qual seria possível extrair os valores de energia de um sistema molecular. Como o Hamiltoniano de um determinado sistema depende essencialmente das posições e dos números atômicos do núcleo e do número total de elétrons (ver Equação 2.2), a densidade eletrônica surgiu, então, como a principal candidata a ser esse observável físico, uma vez que a integral da densidade eletrônica nos fornece o número total de elétrons (N) do sistema:

$$N = \int \rho(r) dr \quad (2.9)$$

Além disso, se considerarmos que os núcleos são essencialmente cargas pontuais, poderemos perceber que as suas posições corresponderiam aos pontos de máximos na densidade eletrônica (cúspides) e os números atômicos de cada um desses núcleos se relacionariam com a taxa de variação da densidade no ponto correspondente à posição do núcleo em questão, conforme mostrado na Equação 2.10 a seguir:

$$\left. \frac{\partial \bar{\rho}(r_A)}{\partial r_A} \right|_{r_A=0} = -2Z_A \rho(r_A) \quad (2.10)$$

em que Z_A corresponde ao número atômico do núcleo A , r_A corresponde à distância radial em relação ao núcleo A e $\bar{\rho}$ corresponde à densidade eletrônica tomada como uma média esférica ao redor do núcleo A .

Apesar de os argumentos possuírem sentido físico, eles não apresentam uma forma racional de se encontrar a energia a partir da densidade eletrônica. Para que a DFT tenha aplicação prática, temos de ser capazes de formar o Hamiltoniano e este por sua vez deve se associar às autofunções e autovalores de energia, a partir de uma determinada densidade eletrônica. Para iniciar a resolução deste problema podemos escrever as expressões clássicas para a energia de um sistema multieletrônico em termos da densidade eletrônica. Os potenciais clássicos correspondentes à atração elétron-núcleo ($V_{ne}[\rho(r)]$) e à repulsão elétron-elétron ($V_{ee}[\rho(r)]$) são dados por:

$$V_{ne}[\rho(r)] = \sum_A^{\text{núcleo}} \int \frac{Z_A}{|r - r_A|} \rho(r) dr \quad (2.11)$$

$$V_{ee}[\rho(r)] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad (2.12)$$

A parte correspondente à energia cinética é facilmente escrita considerando um sistema de partículas dentro da aproximação de Born-Oppenheimer, conforme apresentado na Equação 2.3. No entanto, escrever a energia cinética em função da densidade eletrônica é uma tarefa menos óbvia, mas que pode ser executada baseando-se em argumentos de mecânica estatística. Um dos primeiros funcionais para a DFT baseava-se no modelo do gás uniforme de elétrons e foi desenvolvido por **Llewellyn Thomas** e **Enrico Fermi**, o qual em seguida foi modificado por **Paul Dirac** para se incluir a energia de troca para este gás de elétrons, onde $V_{ee}[\rho(r)]$ e $V_{ne}[\rho(r)]$ correspondem aos potenciais clássicos escritos nas Equações 2.13 e 2.14:

$$E_{TFD}[\rho(r)] = \underbrace{C_F \int \rho(r)^{5/3} dr}_{\text{Energia cinética}} + V_{ee}[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] - \underbrace{C_x \int \rho(r)^{4/3} dr}_{\text{Energia de troca}} \quad (2.13)$$

em que:

$$C_F = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{2/3} \quad \text{e} \quad C_x = \frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{1/3} \quad (2.14)$$

Cada um dos termos da Equação 2.13 depende da densidade eletrônica, que por sua vez possui dependência com as coordenadas espaciais. A função cujo argumento é também uma função é chamada de funcional. Neste sentido a equação de **Thomas-Fermi-Dirac** corresponde a um funcional de energia para um gás uniforme de elétrons, ou seja, através de uma determinada densidade eletrônica é possível extrair um valor de energia para o sistema.

2.2.1. Teoremas de Hohenberg-Kohn

O primeiro teorema de Hohenberg-Kohn prova que a densidade eletrônica define univocamente o número de elétrons do sistema, conforme já mostrado na Equação 2.9 e o potencial externo associado aos elétrons $v(r_i)$ (exceto por uma constante aditiva arbitrária). O potencial externo (correspondente ao segundo termo (\hat{U}) da Equação 2.3) corresponde à energia potencial de interação entre o i -ésimo elétron da molécula e os núcleos, dependendo somente das coordenadas x_i , y_i e z_i associada aos elétrons, uma vez que consideramos dentro da aproximação de Born-Oppenheimer que os núcleos estão em posições fixas. A prova deste teorema não será apresentada aqui, mas a dedução detalhada pode ser encontrada na referência (CRAMER, 2004). O primeiro teorema de HK prova que a energia eletrônica do estado fundamental E_0 é um funcional de $\rho_0(r)$, podendo ser escrita como $E_0 = E_v[\rho_0]$, onde o subscrito v enfatiza a dependência de E_0 com o potencial externo $v(r)$ o qual deve possuir um valor para cada sistema molecular. O potencial externo pode então ser separado na equação da energia total como um funcional da densidade conforme mostrado na Equação 2.15:

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \int \rho_0 v(r) dr + \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle \quad (2.15)$$

a partir da qual podemos extrair um funcional universal dado pela Equação 2.16:

$$F[\rho] = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle \quad (2.16)$$

A densidade eletrônica, assim como observado para o método de Hartree-Fock, obedece a um princípio variacional de modo que para uma densidade eletrônica aproximada para um dado sistema $\tilde{\rho}(r)$, de modo que $\tilde{\rho}(r) \geq 0$ e $\int \tilde{\rho}(r) dr = N$, a energia total será sempre maior ou igual à energia exata do sistema, isto é, $E[\tilde{\rho}(r)] \geq E[\rho] = E_0$.

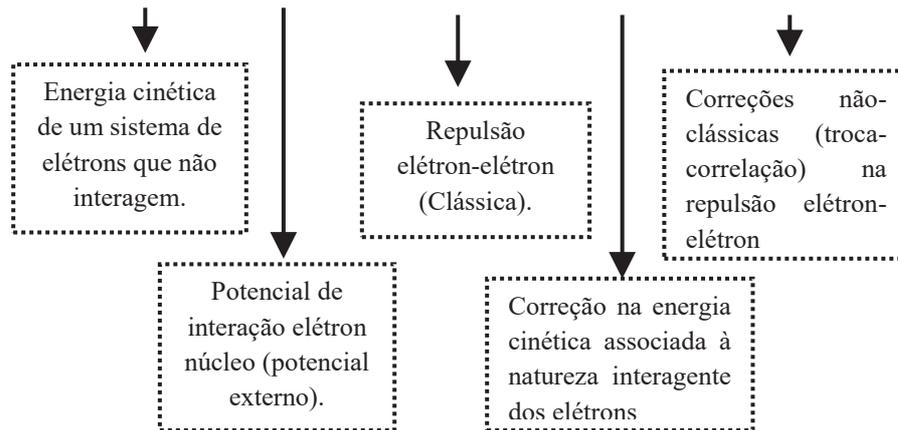
2.2.2. Metodologia de Campo Auto Consistente de Kohn-Sham

Os teoremas de Hohenberg-Kohn somente não são suficientes para implementar cálculos de DFT de maneira prática, uma vez que apenas provam a relação de todas as propriedades fundamentais de um determinado sistema com a sua densidade eletrônica não fornecendo uma maneira de se calcular a densidade eletrônica. A saída para este problema foi proposta em 1965 por Kohn e Sham 1965 (KOHN; SHAM, 1965) assumindo inicialmente um sistema de elétrons não-interagentes, ao qual associaremos o índice s . Este Hamiltoniano \hat{H}_s pode ser escrito como uma soma de operadores de um elétron (\hat{h}_i^{KS}), conforme mostrado na Equação 2.17:

$$\hat{H}_s = \sum_{i=1}^n \left[-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(r) \right] \equiv \sum_{i=1}^N \hat{h}_i^{KS} \quad (2.17)$$

As autofunções do operador em 2.17 devem respeitar o princípio da exclusão de Pauli e, portanto, são escritas como determinantes de Slater das funções individuais de um elétron. O funcional de energia escrito na equação 2.15 é reescrito na Equação 2.18 como:

$$E_0[\rho(r)] = T_s[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] + \Delta T[\rho(r)] + \Delta V[\rho(r)] \quad (2.18)$$



Os termos $\Delta T[\rho(r)]$ e $\Delta V[\rho(r)]$ na Equação 2.18 contém respectivamente, o erro na energia cinética associado ao fato de que em um sistema multieletrônico os elétrons interagem e o erro na energia potencial de repulsão elétron-elétron os quais estão associados às contribuições não-clássicas de troca e correlação eletrônica. A

Equação 2.18 pode ser reescrita agrupando os termos $\Delta T[\rho(r)]$ e $\Delta V[\rho(r)]$ em um novo termo $E_{xc}[\rho(r)]$ o qual é conhecido como energia de troca e correlação, embora contenha os erros associados à energia cinética. O Hamiltoniano de um elétron (h_i^{KS}) pode ser utilizado para se encontrar as funções de onda ψ_i^{KS} de um elétron de um sistema de elétrons não-interagentes.

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla_i^2 + v_s(r)\right)\psi_i^{KS} = \varepsilon_i\psi_i^{KS} \quad (2.19)$$

Este sistema hipotético pode ser conectado ao sistema real através da escolha de um potencial efetivo na equação 2.19 capaz de gerar uma densidade eletrônica, $\rho_s(r)$ que seja igual a densidade eletrônica do estado fundamental, $\rho_0(r)$, isto é, $\rho_s(r) = \sum_{i=1}^N 2|\psi_i^{KS}(r)|^2 = \rho_0(r)$. A energia cinética para o sistema de elétrons não-interagentes $T_s[\rho(r)]$, pode então ser calculada com o valor de $\psi_i^{KS}(r)$ de maneira autoconsistente. O potencial efetivo pode então ser obtido através de um procedimento variacional, ou seja, o potencial efetivo será aquele que minimizará a energia na Equação 2.18, o qual é dado pela Equação 2.20:

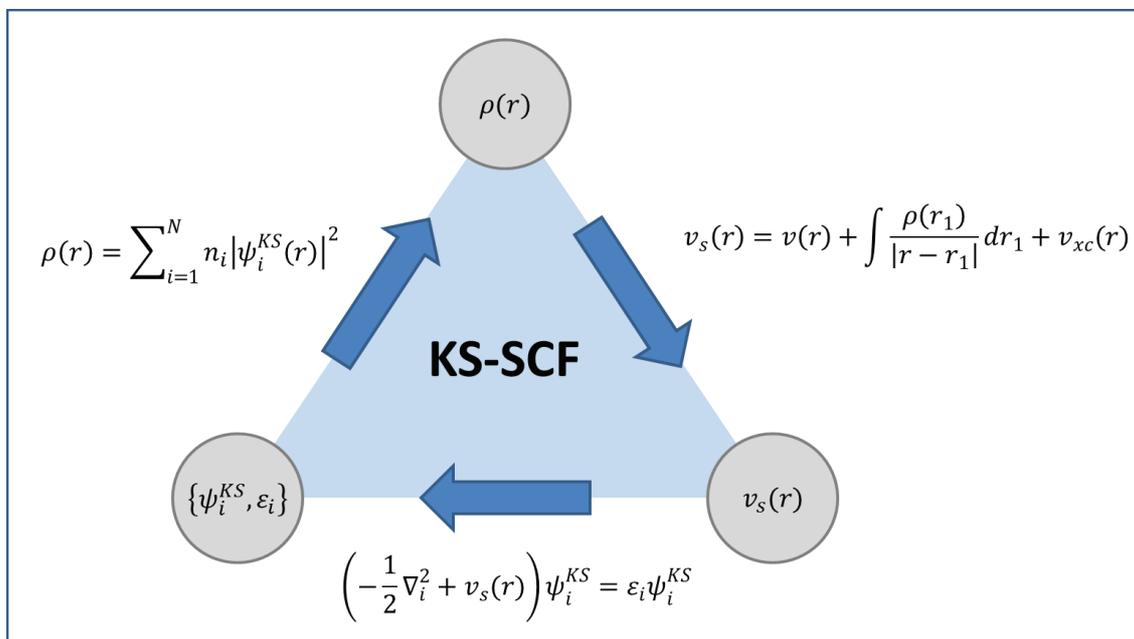
$$v_s(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r_1)}{|r - r_1|} dr_1 + v_{xc}(r) \quad (2.20)$$

em que

$$v_{xc}(r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (2.21)$$

As Equações 2.19, 2.20 e 2.21 correspondem ao esquema Kohn-Sham autoconsistente (KS-SCF). O esquema é dito autoconsistente, pois o potencial efetivo depende da densidade eletrônica. A Figura 2.2 mostra de maneira esquemática o procedimento autoconsistente seguindo as equações de Kohn Sham.

Figura 2.2: Procedimento autoconsistente (KS-SCF) para se encontrar a densidade eletrônica de um sistema molecular.



Fonte: Adaptado do Capítulo 3 da referência (MORGON; COUTINHO, 2007).

O esquema Kohn-Sham permite encontrar uma densidade eletrônica exata do estado fundamental, de um sistema de elétrons que interagem, a partir da solução, em um procedimento autoconsistente, de um sistema de elétrons que não interagem, mas que foi definido para fornecer a mesma densidade do estado fundamental.

2.2.3. Utilização da DFT na Predição de Mecanismos de Reação de Metaloenzimas e no Mecanismo de Hidrólise de Ésteres De Fosfato.

A DFT se estabeleceu nas últimas décadas como a principal metodologia para o estudo de mecanismos de reações envolvendo sítios ativos de metaloenzimas, tendo como principais referências os trabalhos de Per E. M. Siegbahn e Margareta Blomberg da Stockholm University (BLOMBERG; BOROWSKI; HIMO, 2014; SIEGBAHN; BOROWSKI, 2006; SIEGBAHN, 2003, 2006). O estudo quanto-mecânico de mecanismos reacionais em sítios ativos de metaloenzimas normalmente é conduzido em

fragmentos da enzima original contendo apenas a região de interesse (SIEGBAHN; HIMO, 2009). Existem algumas alternativas disponíveis para se elucidar o mecanismo reacional, como por exemplo, os métodos híbridos QM/MM em que a estrutura do modelo é mais realística ou a utilização de modelos miméticos para a estrutura do sítio ativo. Em se tratando de cálculos que utilizam a DFT, particular destaque é dado para o funcional híbrido B3LYP, que certamente é um dos funcionais mais populares da DFT. O motivo que justifica a escolha frequente deste funcional está na velocidade e eficácia com que ele é capaz de tratar modelos com um número significativo de átomos. Obviamente, modelos tratados através de cálculos *ab initio* como Coupled Cluster fornecem resultados que são muito mais precisos que os obtidos com o funcional B3LYP, no entanto tais modelos exigem longos tempos de cálculo, o que faz com que muitas vezes o sistema tenha de conter um número menor de átomos (SIEGBAHN, 2006). A elaboração de um modelo adequado se apresenta como a principal estratégia para se extrair bons resultados de um sistema.

Em se tratando de hidrólise de ésteres de fosfato, que constitui o tema central desta tese, o funcional B3LYP tem sido utilizado com frequência juntamente com o conjunto de funções de base 6-31G(d). Os resultados obtidos por RIBEIRO et al. (RIBEIRO; RAMOS; FERNANDES, 2010) através de uma avaliação comparativa de funcionais (*benchmarking*) mostram que embora o funcional B3LYP seja a primeira escolha, outros funcionais como, MPWB1K, MPW1B95 e PBE1PBE, também devem ser considerados, pois fornecem bons resultados no estudo da hidrólise de fosfato. Ao longo deste trabalho três funcionais foram testados, B3LYP, MPW1PW91 e MPW1K. No entanto, serão apresentados somente os resultados obtidos com o funcional B3LYP, pois nos estudos cinéticos, para a primeira etapa do processo não houve diferenças significativas entre os funcionais escolhidos.

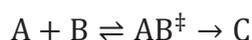
2.3. TEORIA DO ESTADO DE TRANSIÇÃO

A primeira tentativa bem sucedida de se estabelecer uma relação quantitativa entre a velocidade de uma determinada reação e a temperatura foi fornecida no final do século XVIII pelo químico sueco Svante Arrhenius, em uma relação hoje conhecida como *Equação de Arrhenius*. Um dos pontos chaves desta equação está no fato de a constante de velocidade ser muito sensível à temperatura, de modo que somente as

alterações nas energias cinéticas das partículas colidentes não seriam suficientes para explicar o elevado aumento da constante de velocidade. Supôs-se então a existência de uma energia mínima para que os reagentes pudessem se converter em produtos, sendo esta chamada de energia de ativação (E_a).

A teoria do estado de transição (TST) – publicada em 1935 por Henry Eyring (EYRING, 1935) – fornece as bases teóricas para se interpretar o **complexo ativado** (também chamado de **Estado de Transição**) na superfície de energia potencial e calcular, a partir deste, a constante de velocidade utilizando relações advindas da mecânica estatística.

Consideremos a reação, onde uma determinada espécie A se combina com uma espécie B para gerar a espécie C. De acordo com a TST o estado de transição AB^\ddagger está em equilíbrio com as espécies reagentes, de modo que a reação deve acontecer em duas etapas (Equação 2.22).



Cuja lei de velocidade é dada por: (2.22)

$$v = \frac{d[C]}{dt} = k[A][B]$$

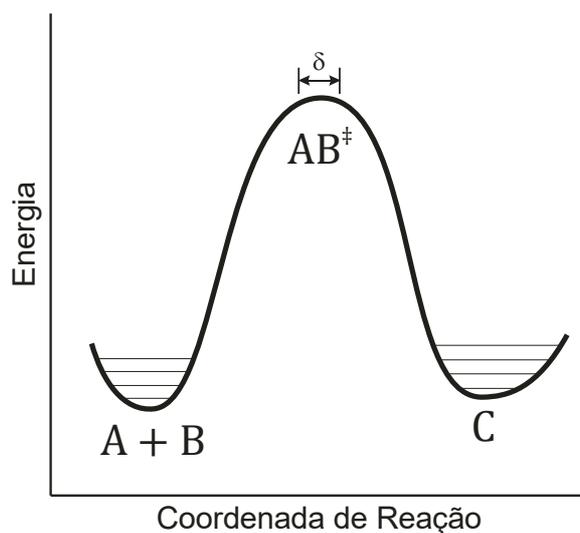
A constante de equilíbrio do processo no qual os reagentes se convertem nesse estado de transição pode ser escrita em função das funções de partição (q) das espécies envolvidas:

$$K_c^\ddagger = \frac{[AB^\ddagger]/c^0}{[A]/c^0[B]/c^0} = \frac{[AB^\ddagger]c^0}{[A][B]} = \frac{(q^\ddagger/V)c^0}{(q_A/V)(q_B/V)} \quad (2.23)$$

Onde c^0 corresponde a uma concentração padrão (frequentemente igual a 1 mol L^{-1}), q_A , q_B e q^\ddagger são respectivamente as funções de partição para as espécies A, B e AB^\ddagger .

A reação descrita na Equação 2.22 pode ser representada em um diagrama de energia conforme o mostrado na Figura 2.3, considerando apenas uma coordenada de reação.

Figura 2.3: Diagrama de energia para a reação apresentada na Equação 2.22. O complexo ativado existe na região definida por δ , centrada no topo da barreira.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Supondo a existência de um complexo ativado AB^\ddagger , a lei de velocidade para a reação descrita na Equação 2.22 pode então ser reescrita como o produto da concentração do complexo ativado $[AB^\ddagger]$ por uma frequência ν_c que corresponde à frequência em que o complexo ativado passa pelo topo da barreira.

$$\frac{d[C]}{dt} = \nu_c [AB^\ddagger] \quad (2.24)$$

Combinando as Equações 2.22, 2.23 e 2.24 é possível chegar ao seguinte resultado:

$$k = \frac{\nu_c K_c^\ddagger}{c^0} \quad (2.25)$$

A partir de argumentos da termodinâmica estatística, que relacionam a função de partição translacional para o complexo ativado e a Equação 2.25 é possível obter a Equação 2.26 que relaciona a barreira de energia (diferença de energia entre os reagentes envolvidos e o complexo ativado) com a constante de velocidade.

$$k(T) = \frac{k_B T}{h c^0} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (2.26)$$

A Equação 2.26 contém parâmetros como a constante de Boltzmann (k_B), a constante de Planck (h), a temperatura (T), a constante dos gases ideais (R) e uma concentração padrão (c_0) dada em unidades de mol L⁻¹ e assumida nesse caso, como unitária e é chamada de equação de Eyring (EYRING, 1935). Ela será utilizada ao longo deste trabalho na estimativa das constantes de velocidade para cada uma das reações estudadas ao longo desta tese nas quais os dados associados ao estado de transição foram obtidos.

2.4. EFEITO ISOTÓPICO CINÉTICO

Na elucidação de um mecanismo de reação é necessário um extremo cuidado para se investigar qual é o destino de cada átomo ao longo do processo reacional. Devido a sua natureza transeunte as estruturas de estados de transição dificilmente são acessadas através de métodos experimentais o que dificulta a elucidação de um mecanismo provável para uma determinada reação. O efeito isotópico cinético (KIE – *Kinetic Isotope Effect*) representa uma boa alternativa para se estudar experimentalmente o mecanismo de uma determinada reação. O método consiste em substituir um átomo da molécula reagente por um isótopo mais pesado, facilitando assim a identificação das quebras da ligação na etapa determinante da velocidade (ATKINS; PAULA, 2009). O KIE pode ser classificado como primário, quando a etapa determinante da velocidade envolve a quebra de uma ligação na qual o isótopo está envolvido ou secundário, quando a ligação com o isótopo não é rompida na etapa determinante.

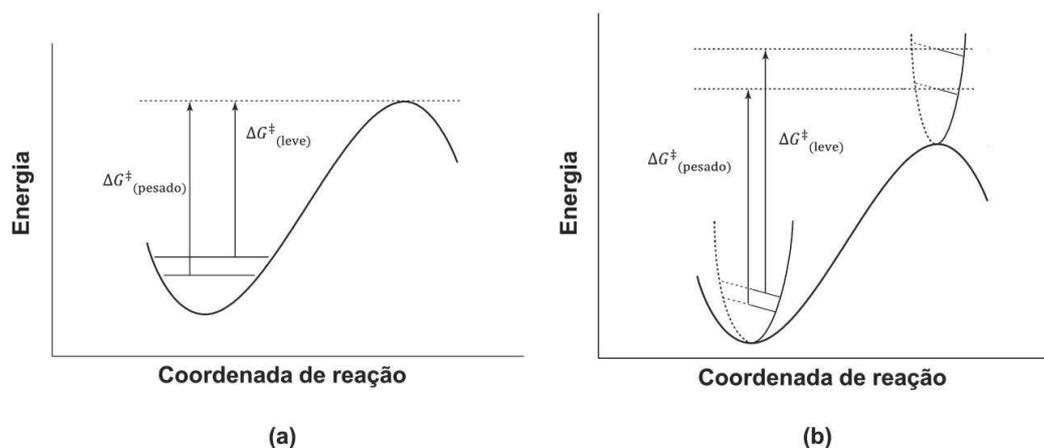
Por definição o efeito isotópico cinético corresponde à razão entre as constantes de velocidade do isótopo leve e do isótopo pesado, conforme mostrado na Equação 2.27.

$$\text{KIE} = \frac{k_{\text{leve}}}{k_{\text{pesado}}} \quad (2.27)$$

A notação comumente utilizada para se descrever o efeito isotópico coloca sobrescrito ao lado esquerdo da constante de velocidade a massa atômica do isótopo leve. Por exemplo, ^{18}k indica que o efeito isotópico avaliado corresponde ao isótopo oxigênio-18, i.e., $^{16}k/^{18}k$. O efeito isotópico cinético é dito normal quando ele é maior do que 1, isto é, quando a constante de velocidade para o isótopo leve é maior que àquela observada para o isótopo pesado. Quando o efeito isotópico cinético é menor do que 1 ele é dito inverso, nesse caso a substituição isotópica faz com que a reação se torne mais rápida.

Além de ser uma ferramenta experimental poderosa na proposição de um mecanismo, o efeito isotópico pode ser calculado teoricamente com razoável simplicidade. Os pontos estacionários na superfície de energia potencial e as suas energias eletrônicas são independentes das massas dos núcleos bem como as constantes de força moleculares. As frequências vibracionais possuem, no entanto uma dependência em relação à massa, quanto maior a massa do sistema menor devem ser as frequências vibracionais. A Figura 2.4a ilustra o efeito isotópico cinético primário no qual somente a ocupação de estados no reagente é alterada, uma vez que a ligação se romperá no produto. A Figura 2.4b ilustra o efeito isotópico cinético secundário no qual a ocupação de estados no reagente e no produto sofre alterações, o que pode fazer com que o efeito cinético seja normal ou inverso dependendo se a ligação está sendo formada ou rompida ao passar do reagente para o estado de transição.

Figura 2.4: (a) Efeito isotópico cinético primário (b) Efeito isotópico cinético secundário.



Fonte: Adaptado da referência (CRAMER, 2004).

O KIE primário apresentado na Figura 2.3a surge devido ao fato de a substituição por um isótopo mais pesado causar uma diminuição na frequência vibracional do reagente, fazendo com que a barreira de ativação seja maior do que a observada para o isótopo leve. O KIE primário é normalmente maior do que 1. O KIE secundário apresentado na Figura 2.3b, envolve as frequências vibracionais dos reagentes e do estado de transição e para que o KIE observado seja maior do que 1 é necessário que o átomo marcado isotopicamente esteja mais fortemente ligado nos reagentes se comparado ao estado de transição. Caso a ligação no estado de transição seja mais forte será observado um KIE inverso.

2.5. MODELOS PARA A INCLUSÃO DO SOLVENTE

Reações em fase condensadas, sempre apresentaram uma dificuldade intrínseca em sua descrição global por meio de métodos *ab initio* que se fundamenta na interação do sistema estudado com as suas vizinhanças. Consideremos, por exemplo, as reações em sistemas biológicos, as quais frequentemente são estudadas considerando apenas pequenas frações do espaço. Negligenciar os efeitos das interações com as vizinhanças pode trazer sérias implicações do ponto de vista químico, pelo fato de a descrição estar, de alguma forma, incompleta. Obviamente não podemos incluir toda a vizinhança para se calcular uma determinada propriedade ou reatividade de uma molécula. Por esse motivo é extremamente importante desenhar um bom modelo para o sistema em estudo e poder assim, extrair informações que sejam capazes de simular a realidade da maneira mais adequada possível.

Para as reações em fase aquosa, o efeito da interação com as vizinhanças pode ser incluído de forma **explícita**, na qual as moléculas de solvente são adicionadas explicitamente ao cálculo, ou de forma **implícita**, onde as moléculas de solvente são simuladas através de um campo médio correspondente ao solvente. Essas duas abordagens envolvendo os modelos contínuos e discretos serão analisadas nas seções a seguir, dando enfoque às metodologias utilizadas ao longo deste trabalho.

2.5.1. Modelos Contínuos de Solvatação

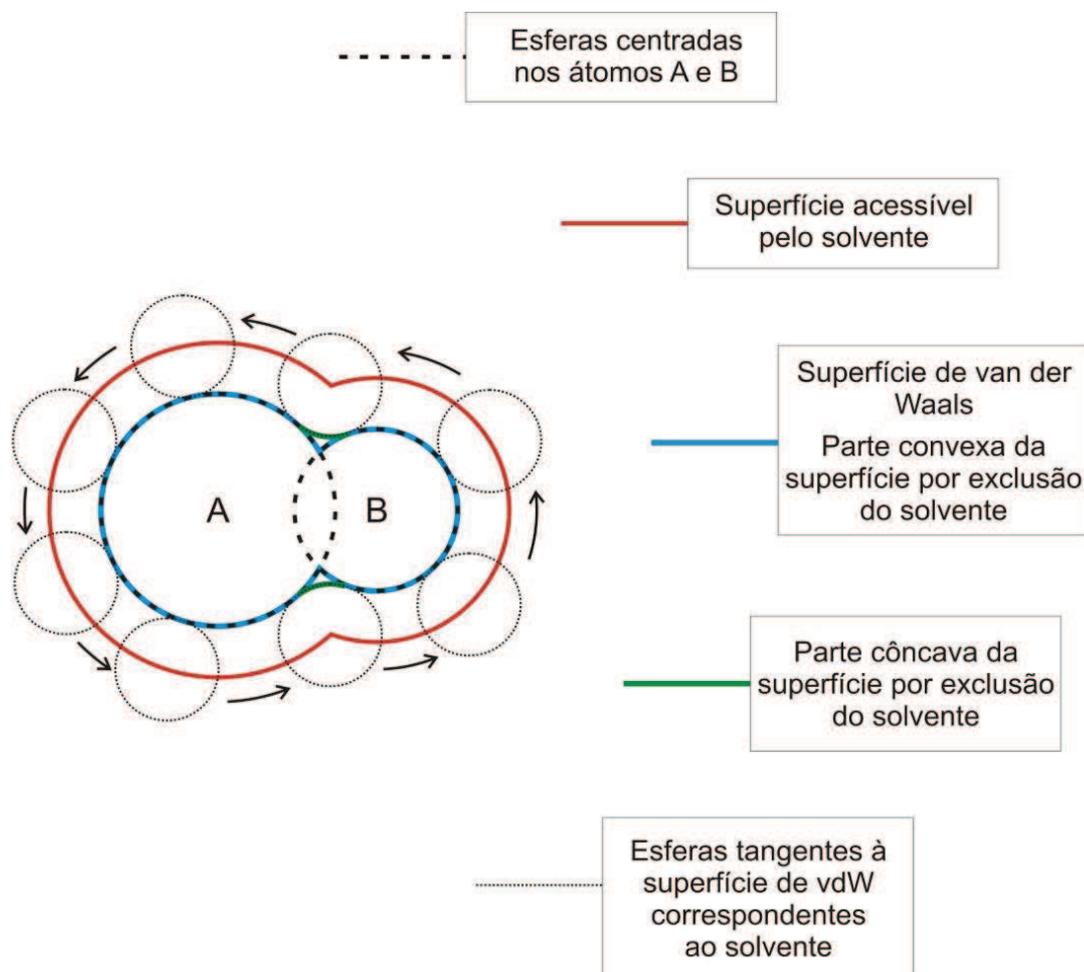
Em determinados processos químicos, as moléculas de solvente constituem apenas as vizinhanças do sistema, não estando envolvidas diretamente no processo reacional. Embora nem sempre elas participem da reação, as moléculas do solvente podem afetar o comportamento do soluto, alterando a sua distribuição de cargas, influenciando em sua geometria e alterando aspectos termodinâmicos ao estabelecer interações intermoleculares, influenciando por esse motivo os aspectos cinéticos relativos à reação. Nos casos em que as moléculas de solvente estão diretamente envolvidas no processo reativo é recomendável que elas sejam adicionadas explicitamente.

Nos modelos contínuos, o solvente não é representado de maneira explícita, mas sim por um meio contínuo dielétrico, com uma constante dielétrica (ϵ) definida. O cálculo da energia de solvatação de um determinado soluto em um contínuo dielétrico pode ser imaginado como um processo em etapas. Inicialmente é necessário abrir um espaço no solvente para inserir a molécula de soluto, um processo que envolve um gasto de energia. Esse espaço é conhecido como formação da cavidade do soluto e constitui-se como uma das principais diferenças entre os modelos contínuos disponíveis. A seguir é necessário inserir a molécula de soluto na cavidade que foi gerada, um processo que causará um decréscimo na energia em consequência da formação de interações entre o soluto e o solvente. Consideremos que o soluto não possua uma distribuição de cargas uniforme, i.e., uma molécula com momento dipolar (μ). A presença do soluto altera a distribuição das cargas no contínuo dielétrico promovendo a criação de um campo elétrico (que definiremos aqui como *campo de reação*) ao redor da molécula de soluto. Esta nova distribuição de cargas no solvente, alterará, portanto, a polarização do soluto gerando um novo valor para o seu momento de dipolo, o qual por sua vez novamente alterará a distribuição de cargas no contínuo dielétrico. Isto pode ser feito de maneira auto-consistente em um método conhecido Campo de reação auto-consistente (SCRF – *Self Consistent Reaction Field*).

O modelo contínuo polarizável (PCM) para a descrição do solvente, proposto por Miertus, Scrocco e Tomasi (MIERTUŠ; SCROCCO; TOMASI, 1981) possui uma cavidade mais realística que as do modelo de Onsager. No modelo PCM sob cada núcleo atômico da molécula de um determinado soluto AB (Ver Figura 2.5) é adicionada uma esfera cujo raio é igual a 1,2 vezes o raio de van der Waals para o

átomo em questão, conforme representado pelo círculo com linhas pontilhadas em preto na Figura 2.4.

Figura 2.5: Representação esquemática das superfícies de contorno associadas às moléculas do soluto e do solvente.



Fonte: Adaptada da referência (MENNUCCI; CAMMI, 2007).

O procedimento de adicionar esferas sobre cada um dos núcleos atômicos faz com que elas se interceptem, gerando assim uma espécie de fenda na superfície correspondente à molécula do soluto **AB**, conforme representado pela linha azul na Figura 2.5. A linha azul representa a superfície de van der Waals para a molécula **AB**. Um processo de suavização da superfície, próxima à região destas fendas, faz-se necessário, o qual é representado pelas linhas verdes próximas às fendas na superfície de van der Waals. A superfície acessível pelo solvente (SAS) pode ser encontrada

supondo uma molécula esférica de solvente (pequenos círculos com linhas pontilhadas em preto) que tangencia toda a superfície da molécula AB, conforme representado pela linha vermelha.

O termo, que corresponde à interação solvente-soluto (\hat{V}_{int}) no PCM, é encontrado de maneira iterativa. O processo passa pelo cálculo do potencial eletrostático clássico ϕ_σ produzido pelo contínuo dielétrico, o qual se relaciona com uma carga aparente de superfície (CAS) distribuída na superfície da cavidade molecular. A CAS que é caracterizada por uma densidade de carga de superfície, pode ser encontrada substituindo-a por muitos pontos de carga na superfície da cavidade. A superfície da cavidade é então dividida em pequenas regiões, e uma carga aparente Q_k é alocada na k -ésima região. Se r_k corresponde ao ponto no qual Q_k está localizado, então o potencial elétrico $\phi_\sigma(r)$ devido a polarização do dielétrico é (em unidades atômicas) dado pela Equação 2.28.

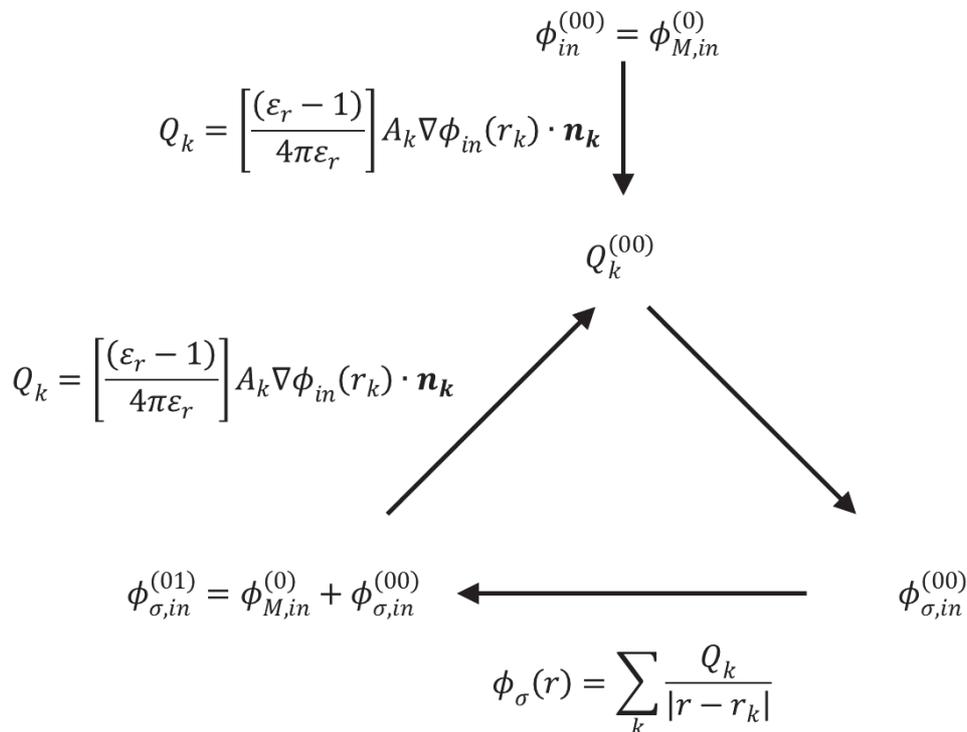
$$\phi_\sigma(r) = \sum_k \frac{Q_k}{|r - r_k|} \quad (2.28)$$

As cargas aparentes Q_k são dadas pela Equação 2.22,

$$Q_k = \left[\frac{(\epsilon_r - 1)}{4\pi\epsilon_r} \right] A_k \nabla\phi_{in}(r_k) \cdot \mathbf{n}_k \quad (2.29)$$

na qual, A_k é a área da k -ésima região, r_k é o ponto no qual Q_k está localizado, $\nabla\phi_{in}(r_k)$ é o gradiente do potencial elétrico no interior da cavidade avaliado no limite da aproximação do ponto r_k , e \mathbf{n}_k é um vetor unitário perpendicular à superfície da cavidade no ponto r_k que aponta para o exterior da cavidade. O processo de iteração envolve a busca por potenciais elétricos ϕ_{in} no interior da cavidade e as cargas de superfície Q_k .

Figura 2.6: Processo iterativo para encontrar a carga aparente de superfície



Fonte: Adaptada da referência (LEVINE, 2000)

Em cada etapa uma nova carga aparente de superfície é encontrada. O processo iterativo se repete até que as cargas aparentes de superfície converjam para um determinado valor $Q_k^{(0f)}$. As cargas $Q_k^{(0f)}$ serão utilizadas para se encontrar uma estimativa inicial de \hat{V}_{int} , o qual é dado pela Equação 2.30.

$$\hat{V}_{int}^{(0)} = - \sum_i \phi_{\sigma}^{(0f)}(r_i) + \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \phi_{\alpha}^{(0f)}(r_{\alpha}) \quad (2.30)$$

em que a soma é feita sobre todos os elétrons e os núcleos e $\phi_{\sigma}^{(0f)}$ é encontrado a partir da Equação 2.28 utilizando as cargas $Q_k^{(0f)}$. $\hat{V}_{int}^{(0)}$ é adicionado ao Hamiltoniano eletrônico molecular, o qual é utilizado para gerar uma densidade eletrônica melhorada $\rho^{(1)}$ para a molécula AB, a qual fornecerá $\phi_{M,in}^{(1)}$, que gerará um potencial melhorado $\phi_{\sigma,in}^{(10)} = \phi_{M,in}^{(1)} + \phi_{\sigma,in}^{(0f)}$ que será utilizado novamente na equação para Q_k iniciando assim um novo ciclo de iteração para as cargas e para o potencial ϕ_{σ} . O processo continua até que a convergência tenha sido alcançada.

Um dos métodos para definir a cavidade dentro do formalismo do PCM é o método **UAHF** (United-Atom Hartree Fock) (BARONE; COSSI; TOMASI, 1997), o qual utiliza esferas atômicas para definir a cavidade molecular, no entanto as esferas não incluem os átomos de hidrogênio, de modo que estes são incluídos em esferas correspondentes aos átomos que o hidrogênio está ligado. O método **UAHF** foi utilizado em todos os cálculos apresentados no Capítulo em que os efeitos do solvente foram avaliados. A cavidade Bondi, na qual os hidrogênios são incluídos explicitamente, também foi utilizada em alguns testes, embora não estejam relatados nesta tese, mas em função da semelhança de resultados não foi utilizada em todos os cálculos.

2.5.2. Modelos Discretos de Solvatação.

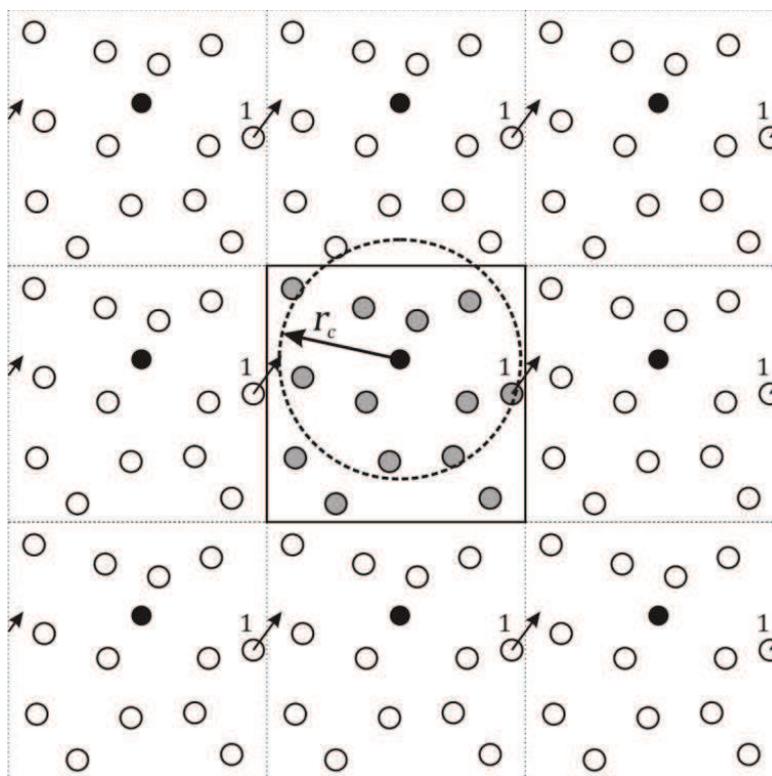
A solvatação descrita de maneira implícita negligencia uma série de aspectos associados à interação intermolecular das moléculas de solvente com o soluto. No entanto, a realização de cálculos puramente quânticos dotados de significado físico torna, em muitas situações, a utilização de modelos explícitos impraticável. Consideremos, por exemplo, uma molécula de metanol rodeada por moléculas de água. Quantas moléculas de água serão necessárias para se descrever a energia de interação entre o soluto e o solvente? Se considerarmos apenas a primeira camada de solvatação, ou seja, àquela em que as moléculas do solvente interagem diretamente com a molécula do soluto, veríamos que isto não seria suficiente, pois as moléculas do solvente em um sistema real estariam interagindo com outras moléculas de uma segunda camada de solvatação. Estas por sua vez estariam interagindo com uma terceira camada de solvatação e assim por diante. Outra limitação desta abordagem está em encontrar uma configuração para as moléculas de solvente. Em sistemas contendo um grande número de interações não-ligadas (interações intermoleculares) existe um elevado grau de liberdade o que possibilita a existência de muitos pontos de mínimo, os quais podem ser energeticamente próximos. Seguindo a distribuição de estados de Boltzmann, podemos concluir que tais estados em um sistema real estão intercambiando-se de modo que uma descrição realística deveria incluir um número grande de configurações.

Uma alternativa disponível para se incluir os efeitos do solvente de maneira explícita pode ser encontrada na simulação computacional, pois através desta as

múltiplas configurações assumidas pelas moléculas do solvente podem ser levadas em conta. Em um sistema real o número de moléculas é demasiadamente grande conforme dito anteriormente, por esse motivo as simulações são normalmente feitas em *caixas de simulação* onde estão presentes as moléculas do soluto e do solvente. O uso da caixa de simulação introduz outro problema, pois como o sistema encontra-se no vácuo, as moléculas de solvente na borda da caixa interagiriam de forma diferente se comparadas às moléculas no interior da caixa em um fenômeno conhecido como *efeito de borda*. Tal efeito pode se propagar para o interior do sistema e gerar resultados pouco confiáveis.

A solução para tal problema consiste na utilização de réplicas da caixa de simulação em todas as direções, introduzindo o conceito de **condições de contorno periódicas**. Nesta estratégia, são criadas imagens (réplicas) da caixa de simulação, de modo que as moléculas na borda de cada caixa individual passam a enxergar o outro lado da caixa, eliminando assim os efeitos de borda. As moléculas em cada réplica se movem exatamente da mesma forma que as moléculas na caixa original e sempre que uma molécula extrapola os limites da caixa, ela surge novamente no lado oposto, conforme esquematizado na Figura 2.6 na molécula assinalada como ‘1’ situada em uma caixa hipotética bidimensional.

Figura 2.7: Replica das caixas de simulação e representação das condições de contorno periódica em duas dimensões.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Algumas considerações, no entanto devem ser feitas, pois uma molécula no interior da caixa não pode interagir duas vezes com a mesma molécula, isto é, com a molécula original e com a sua réplica. Para evitar este problema, podemos utilizar um raio de corte (r_c) para a interação entre as partículas além do qual a interação simplesmente desaparece, ou seja, como se uma molécula somente fosse afetada por moléculas situadas a uma distância inferior à do raio de corte, conforme representado na Figura 2.6.

2.5.2.1. O Método de Monte Carlo

As raízes do Método de Monte Carlo (MC) estão associadas ao desenvolvimento de tecnologias durante a 2ª Guerra Mundial, mais especificamente durante o desenvolvimento do projeto Manhattan. A significância do método somente pôde ser alcançada com o advento de computadores modernos, pois para que se

produzam resultados significativos é necessário gerar e processar uma imensa quantidade de procedimentos aleatórios. A seguir será dada uma breve descrição do funcionamento do método, incluindo o algoritmo de Metropolis (COUTINHO, 2000).

A simulação de Monte Carlo se inicia com um sistema contendo um número N de partículas, confinadas em uma caixa de volume V a uma certa temperatura T . As configurações sucessivas são espaçadas pelo que iremos definir adiante como passo de Monte Carlo, ou passo MC. Cada partícula do sistema tem um conjunto de variáveis associadas a ela, as suas coordenadas cartesianas x , y e z , e durante um único passo MC, todas as partículas do sistema são visitadas e em cada uma de suas variáveis são adicionadas quantidades aleatórias. Em cada uma destas visitas cinco números aleatórios são gerados, δx , δy , δz que representam alterações aleatórias nas coordenadas de cada partícula do sistema, $\delta\theta$, que representa uma rotação aleatória em um intervalo de $\pm 15^\circ$ e $\pm \delta r_{max}$, em que $\delta r_{max} = \{\delta x, \delta y, \delta z\}$. Apesar de todos os movimentos serem aleatórios, nem todos serão aceitos. A amostragem de Metropolis é um dos algoritmos disponíveis para se decidir quais movimentos serão e quais não serão aceitos. Ela se baseia em argumentos da termodinâmica estatística para gerar os critérios de aceitação de cada configuração.

2.5.2.2. O Algoritmo de Metrópolis

O Algoritmo de Metrópolis desenvolvido em 1953 por Metropolis (METROPOLIS et al., 1953) e generalizado por Hastings em 1970 (HASTINGS, 1970) consiste em avaliar os critérios de aceitação para uma geração de uma nova configuração aleatória com base nos pesos estatísticos associados à probabilidade de transição entre dois estados. De forma simplificada podemos racionalizar a transição entre dois estados de duas formas:

- 1- A energia do novo estado é menor do que a do anterior, fazendo com que o novo estado seja prontamente aceito como uma nova configuração uma vez que diminui a energia do sistema.
- 2- A energia do novo estado é maior do que a do estado anterior, exigindo assim um critério de aceitação da nova configuração, baseado no peso estatístico da mesma.

Durante o trabalho desenvolvido nesta tese, o método de Monte Carlo foi utilizado em uma única estrutura do ciclo de quebra hidrolítica de ésteres de fosfato com o intuito de reconhecer as regiões acessíveis pelas moléculas de solvente. Embora os resultados sejam preliminares e não tenham resultado em uma contribuição significativa para a comunidade científica, eles representam o ponto de partida para estudos mais completos do mecanismo de hidrólise de ésteres de fosfato catalisado por modelos miméticos de metaloenzimas com a inclusão de solvatação explícita.

2.5.3. Modelos de Solvatação no Estudo das Reações de Hidrólise de Ésteres de Fosfato.

A escolha do modelo de solvatação é fundamental para uma boa descrição do processo estudado. Para que a reação de hidrólise de fosfodiésteres, tema central desta tese, ocorra em solução aquosa (na ausência da enzima ou de um modelo mimético), é necessário incluir ao menos uma molécula de água que estará atuando como nucleófilo da reação. Em um estudo comparativo, proposto por Kamerlin e colaboradores analisaram a diferença entre a solvatação utilizando modelos contínuos utilizando o modelo COSMO, modelos híbridos utilizando a metodologia QM/MM-FEP (Quantum Mechanical/Molecular Mechanical free energy perturbation) no qual as moléculas de água são incluídas explicitamente e um modelo de solvatação híbrido no qual algumas moléculas de água são incluídas explicitamente em um meio contínuo (KAMERLIN; HARANCZYK; WARSHEL, 2009). Os resultados mostram modelos contínuos e híbridos fornecem resultados adequados, com erros inferiores a 1 kcal mol^{-1} em comparação com o ΔG_{obs} enquanto que os modelos mistos de solvatação (contínuo dielétrico contendo moléculas explícitas de solvente) devem ser planejados com muito mais cuidado, através de uma simulação prévia onde é possível estimar a posição mais provável para as moléculas de água do sistema, além dos erros associados às contribuições entrópicas decorrentes da adição de moléculas de água para a formação da supermolécula.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

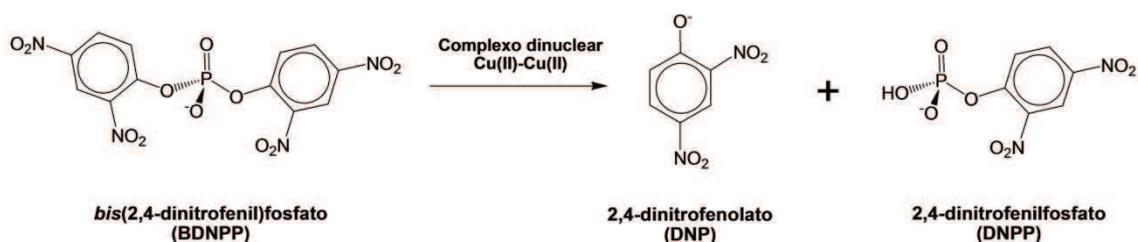
Os resultados obtidos ao longo desta tese serão divididos em três partes com o intuito de facilitar o entendimento. Na primeira parte será abordado o estudo do mecanismo de quebra hidrolítica de ésteres de fosfato por um complexo dinuclear de cobre. Na segunda parte serão apresentados resultados relacionados ao efeito da inclusão explícita de moléculas do solvente ao redor de algumas das moléculas estudadas na etapa anterior através da utilização da simulação de Monte Carlo. Na terceira e última parte serão avaliadas algumas das estruturas associadas ao mecanismo de oxidação de catecóis pelo mesmo complexo dinuclear de cobre.

3.1. ESTUDO DO MECANISMO DE HIDRÓLISE DO BIS-(2,4-DINITROFENIL)FOSFATO (BDNPP) POR UM MODELO MIMÉTICO DA CATECOL OXIDASE.

A importância dos ésteres de fosfato, bem como os principais mecanismos concernentes a quebra hidrolítica associadas às suas ligações foram expostas ao longo do capítulo 1 desta tese. Vários sistemas enzimáticos e sintéticos estão diretamente envolvidos com a quebra hidrolítica de ésteres de fosfato. Os sistemas enzimáticos contendo íons cobre (Cu^+ e Cu^{2+}) em seus sítios ativos, conforme fora apresentado no capítulo 1, geralmente estão envolvidos em reações de oxirredução, devido à capacidade dos íons cobre em alterar os seus números de oxidação durante a atividade catalítica destas enzimas. Complexos metálicos contendo cobre em sua estrutura podem estar envolvidos em uma maior variedade de processos, em parte devido ao fato de não serem tão específicos como um sistema enzimático podendo assim estabelecer interações químicas com uma variedade maior de substratos.

O foco desta seção está na análise teórica do mecanismo de quebra hidrolítica de um fosfodiéster, *bis*(2,4-dinitrofenil)fosfato (**BDNPP**), cuja fórmula estrutural, juntamente com o esquema representativo de quebra hidrolítica são apresentadas na Figura 3.1.

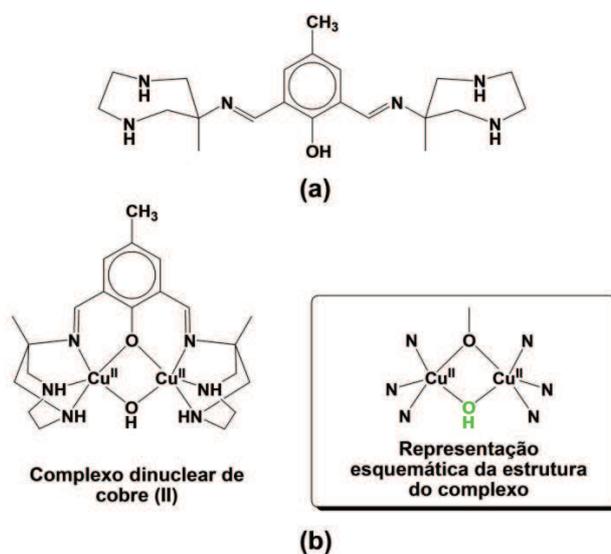
Figura 3.1: Representação esquemática da estrutura do modelo de éster de fosfato *bis*-(2,4-dinitrofenil)fosfato juntamente com o processo de quebra hidrolítica deste fosfodiéster.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A fórmula estrutural do complexo metálico dinuclear de cobre(II) utilizado no estudo da clivagem hidrolítica do **BDNPP**, o qual foi inicialmente proposto por Rey e colaboradores (REY et al., 2007) é esquematizada na Figura 3.2, destacando a estrutura do ligante polidentado, a fórmula estrutural do complexo metálico e a representação esquemática que será utilizada em todos os ciclos catalíticos daqui por diante, na qual somente os átomos diretamente ligados aos íons Cu(II) no sítio de reação foram mantidos.

Figura 3.2: (a) Representação da fórmula estrutural para o ligante heptadentado 4-metil-2,6-*bis*-[(6-metil-1,4-diazepano)iminometil]fenol (b) Fórmula estrutural do complexo dinuclear de cobre, $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$, juntamente com a sua representação esquemática na qual somente os átomos do ligante que estão ligados diretamente ao cobre foram mantidos.

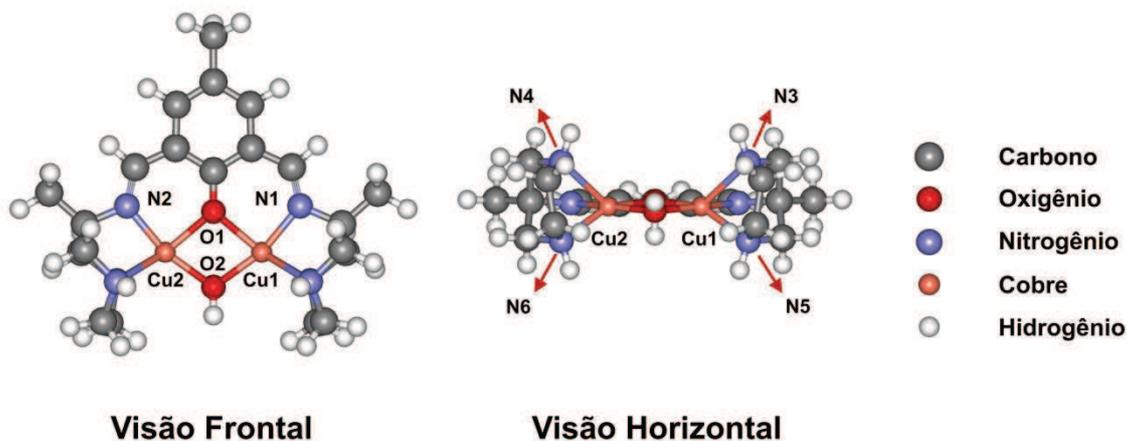


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR

O complexo dinuclear de cobre (II) representado na Figura 3.2b já foi objeto de estudos teóricos preliminares no qual foram avaliadas as suas propriedades estruturais e espectroscópicas em diferentes níveis de teoria, bem como o modo de coordenação com o **BDNPP** (REY et al., 2010). O complexo dinuclear de cobre (II), que passaremos a chamar de **R1** (Reagente 1) foi re-otimizado em fase gás com a utilização da DFT com o funcional B3LYP e o conjunto de funções de base 6-31G(d) para todos os átomos não metálicos e o pseudopotencial não-relativístico LANL2DZ para os íons Cu(II).

A estrutura da espécie **R1**, representada em duas perspectivas na Figura 3.3, corresponde a um cátion molecular, uma vez que a sua carga total é igual a +2. Grande parte dos cálculos de otimização de geometria apresentados nesta tese foram realizados em fase gás considerando as estruturas em seu estado singlete (multiplicidade de spin igual a 1, $((2S + 1) = 1)$), sendo que somente a estrutura da espécie **R1** foi avaliada em mais de um estado de multiplicidade de spin ($((2S + 1) = 3$ e $(2S + 1) = 5$).

Figura 3.3: Estrutura otimizada em fase gás no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ para a espécie **R1** no estado singlete.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR

A espécie **R1** foi também otimizada em meio contínuo utilizando o modelo PCM com a cavidade definida pelo modelo **UAHF** (do inglês: *United-Atom Hartree-Fock*) e em fase gás considerando o estado tripleto. Em ambas otimizações os aspectos visuais da estrutura da espécie **R1** se mostraram bastante similares. As diferenças estruturais somente se tornam visíveis através da análise dos dados estruturais, os quais se encontram na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Parâmetros estruturais para a espécie **R1** otimizada em diferentes níveis de teoria e comparação com a estrutura experimental obtida por cristalografia de raios-X (REY et al., 2010). As distâncias de ligação apresentadas estão em Angstrom (Å).

	B3LYP/6-31G(d)/ LANL2DZ		B3LYP/6-31G(d)/ LANL2DZ/UAHF	Estrutura de raios-X
	(singlete)	(tripleto)	(singlete)	(singlete)
rCu1-Cu2	3,12	2,99	3,10	2,896(1)
rCu1-O1	2,05	2,00	2,06	1,954(4)
rCu2-O1	2,05	2,00	2,06	1,963(4)
rCu1-O2	1,93	1,96	1,92	1,920(5)
rCu2-O2	1,93	1,96	1,92	1,914(5)
rCu1-N1	1,95	1,96	1,96	1,928(6)
rCu2-N2	1,95	1,96	1,96	1,912(6)
rCu1-N3	2,37	2,40	2,44	2,524(7)
rCu2-N4	2,37	2,40	2,44	2,372(6)
rCu1-N5	2,17	2,14	2,08	2,041(7)
rCu2-N6	2,17	2,14	2,08	2,092(6)

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

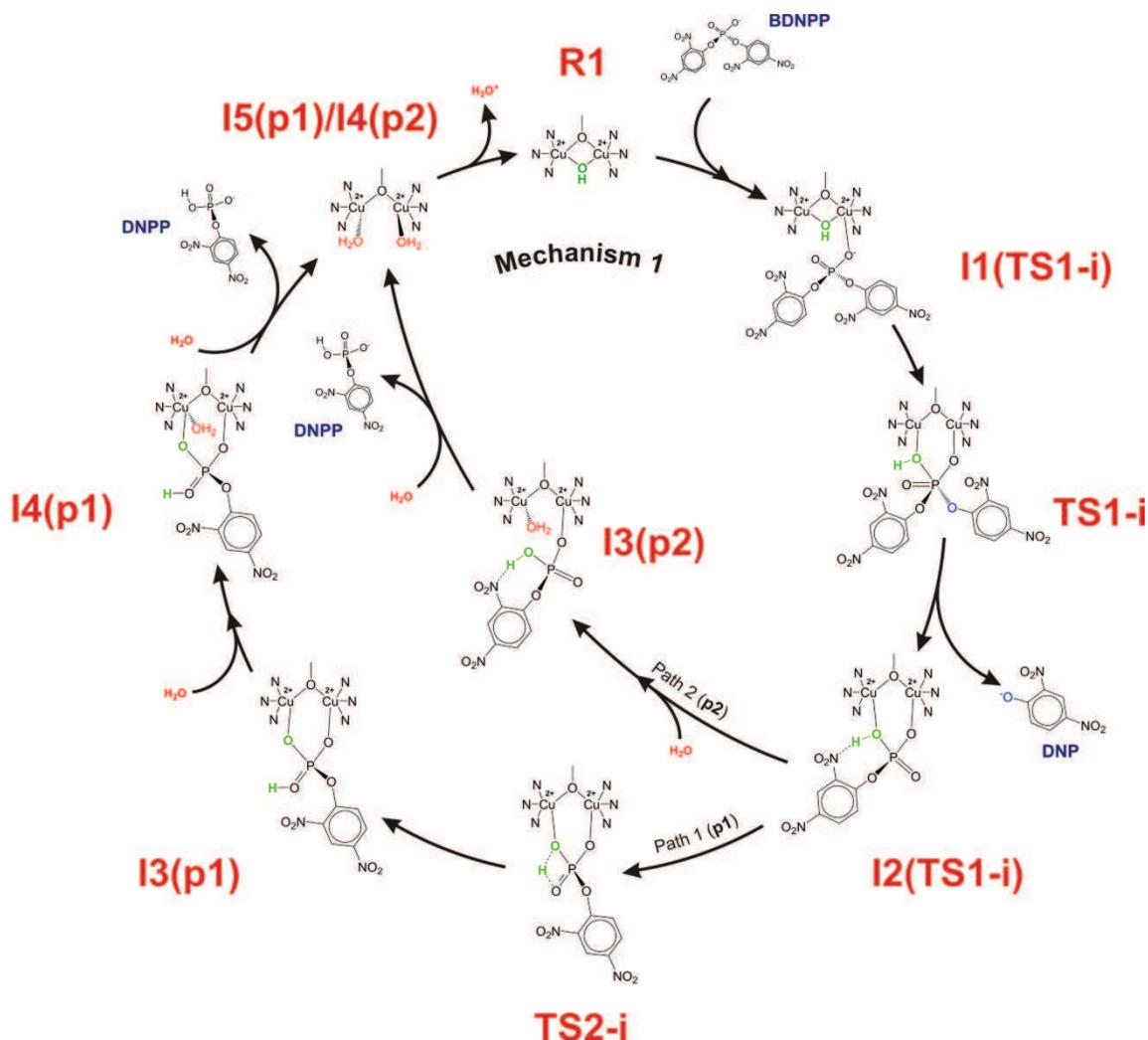
Analisando a Tabela 3.1 é possível perceber que a espécie **R1** não pertence ao grupo de ponto C_{2v} , o que é evidenciado através da comparação dos comprimentos dos pares de ligações rCu1-N3/rCu1-N5 e rCu2-N4/rCu2-N6, os quais apresentam valores diferentes. A principal implicação desta ausência de simetria está no fato de existirem duas formas de aproximação do substrato em relação ao centro metálico, uma vez que um lado do complexo é diferente do outro. Nas situações onde foi necessário incluir o substrato, as duas possibilidades foram consideradas e após as otimizações de geometria ambas convergiram para o mesmo ponto, independente do lado escolhido, havendo apenas diferenças nos tempos de convergências destas otimizações.

A comparação energética entre os dois estados de multiplicidade de spin eletrônico para a espécie **R1** revela que o estado tripleto é o mais estável em fase gás (cerca de 22 kcal mol⁻¹ mais estável que o estado singleto), no entanto as evidências experimentais apontam que nestes complexos binucleares os íons Cu(II) encontram-se acoplados ferromagneticamente, uma vez que tais complexos são silenciosos no espectro de EPR (REY et al., 2012), indicando assim um estado eletrônico singleto. Por esta razão, embora o estado tripleto tenha se mostrado mais estável nos cálculos em fase gás, optaremos por otimizar todas as geometrias considerando apenas o estado singleto.

O mecanismo associado à quebra hidrolítica do **BDNPP** ocorre em mais de uma etapa e nesta tese foram investigadas os possíveis mecanismos pelo qual a molécula de substrato pode ser quebrada. Todos os caminhos reacionais devem começar com uma interação entre a espécie **R1**, o catalisador e o íon **BDNPP** levando à formação do intermediário de reação **I1**. Esta coordenação a um dos íons Cu(II) promove uma ativação do átomo de fósforo e o nucleófilo, a ponte μ -OH, se torna mais lábil facilitando assim o ataque nucleofílico. A quebra de ésteres de fosfato pode ocorrer através de três mecanismos principais (dissociativo, associativo e concertado) (Ver Figura 1.7), no entanto para este complexo não foi considerado a possibilidade de um mecanismo dissociativo, o qual geralmente é observado para fosfomonoésteres em fase gás (LASSILA; ZALATAN; HERSCHLAG, 2011). Dois mecanismos são então esperados para esta quebra hidrolítica.

O **Mecanismo 1** (Figura 3.4) corresponde a um mecanismo *concertado* no qual a formação da ligação entre o nucleófilo e o átomo de fósforo ocorrerá ao mesmo instante do rompimento da ligação entre o grupo abandonador e este mesmo átomo, similar a um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular, S_N2 .

Figura 3.4: Mecanismo concertado para a quebra hidrolítica do **BDNPP** promovido pelo complexo dinuclear de cobre(II).



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Após a formação do intermediário **I1(TS1-i)**⁵, um ataque nucleofílico da ponte μ -OH conduz à estrutura do estado de transição **TS1-i** para o mecanismo concertado. A estrutura do intermediário **I2(TS1-i)** é gerada em sequência, ocorrendo a liberação do íon 2,4-dinitrofenolato (**DNP**). A conversão do intermediário **I1(TS1-i)** em **I2(TS1-i)** corresponde à etapa química⁶ do processo, pois é nesta etapa que a ligação química do fosfodiéster é rompida. Existem duas formas de se regenerar o catalisador partindo do intermediário **I2(TS1-i)**. O primeiro caminho (**p1**) envolve uma transferência de próton entre o átomo de oxigênio originário da ponte μ -OH e o oxigênio terminal do grupo

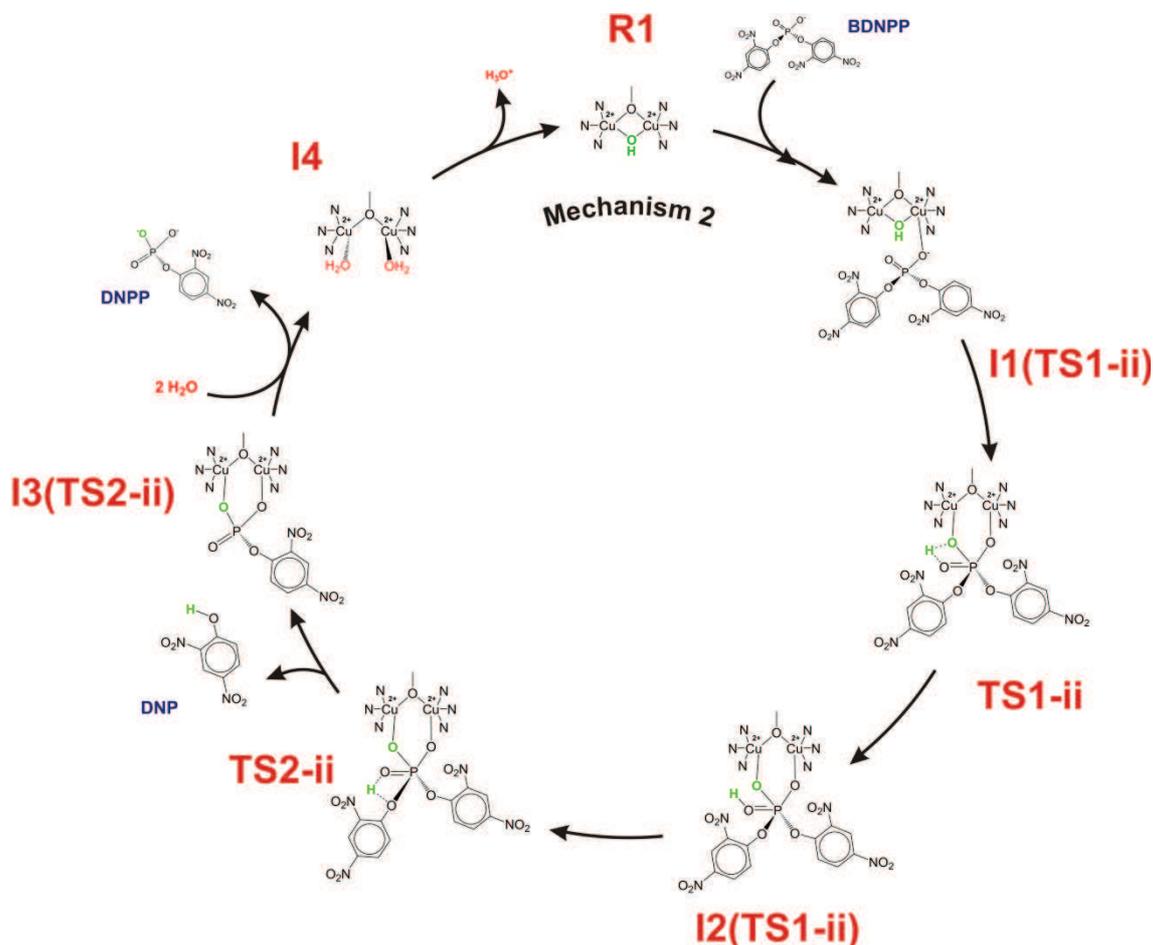
⁵ O intermediário **I1** foi obtido a partir de um cálculo de coordenada intrínseca de reação (IRC), feito a partir da estrutura do **TS1-i**. A indicação entre parênteses servirá para apontar a origem do intermediário em questão, p.ex: **I2(TS2-i)** indica o intermediário I2 obtido a partir da estrutura do **TS2-i**.

⁶ A etapa química corresponde àquela em que a ligação do fosfodiéster é rompida.

fosfato, formando a estrutura do **TS2-i** (destacado em verde na Figura 3.4). Após esta etapa, moléculas de água promovem a retirada do íon (2,4-dinitrofenil)fosfato, (**DNPP**), formando um complexo di-aquo contendo uma molécula de água coordenada em cada íon cobre(II) do complexo dinuclear, chamado de intermediário **I5(p1)**. Após a formação deste complexo di-aquo, a ponte μ -OH deverá ser regenerada através de uma etapa de desprotonação, a qual pode ocorrer ou através de uma transferência de prótons intramolecular envolvendo as duas moléculas de água do intermediário **I5(p1)** com liberação de íons H_3O^+ ou através da protonação de moléculas de água presentes ao redor do complexo que levaria à formação de um íon hidróxido diretamente coordenado ao cobre(II) que por sua vez levaria ao deslocamento da molécula de água remanescente regenerando assim o catalisador **R1**. A segunda forma de se regenerar o catalisador, (**p2**), a partir da estrutura da espécie **I2(TS1-i)**, envolve a entrada de duas moléculas de água na estrutura do complexo que promovem o deslocamento do **DNPP** ligado aos íons cobre(II). Este segundo caminho de reação (**p2**) não possui estado de transição adicional se comparado com o primeiro caminho reacional (**p1**). A última etapa deste segundo caminho conduz ao intermediário **I4(p2)**, o qual corresponde a uma estrutura bastante similar a do intermediário **I5(p1)**, diferindo apenas no modo de interação entre o **DNPP** e o complexo di-aquo.

O **Mecanismo 2** (Figura 3.5) corresponde a um mecanismo *associativo*, isto é que passa pela formação de um intermediário pentacoordenado de fósforo estável (fosforano), indicando que a saída do grupo abandonador ocorre após a entrada do nucleófilo. Embora seja reconhecido na literatura que a quebra hidrolítica de fosfodiésteres siga um caminho concertado no sítio ativo de metaloenzimas, alguns estudos envolvendo modelos miméticos mostram outras alternativas de mecanismo para esta quebra hidrolítica (FERREIRA et al., 2008).

Figura 3.5: Mecanismo associativo para a quebra hidrolítica do **BDNPP** promovido pelo complexo dinuclear de cobre(II).



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A primeira etapa do **Mecanismo 2** é essencialmente igual àquela obtida para o **Mecanismo 1**. Após a coordenação do **BDNPP** uma transferência de próton entre o oxigênio da ponte μ -OH e o oxigênio terminal do grupo fosfato levará à formação do estado de transição **TS1-ii**. O qual em seguida será convertido no intermediário pentacoordenado **I2(TS2-ii)**. Uma segunda transferência de próton entre o oxigênio terminal do grupo fosfato e o oxigênio do grupo **DNP** ligado diretamente ao fósforo, conduz à formação do **TS2-ii**, após o qual ocorrerá a liberação do grupo **DNP** completando a etapa química do processo, sendo necessário regenerar a estrutura do catalisador, o que ocorrerá através de um mecanismo similar ao observado para o **Mecanismo 1**.

3.1.1. Primeira Etapa: Coordenação do BDNPP

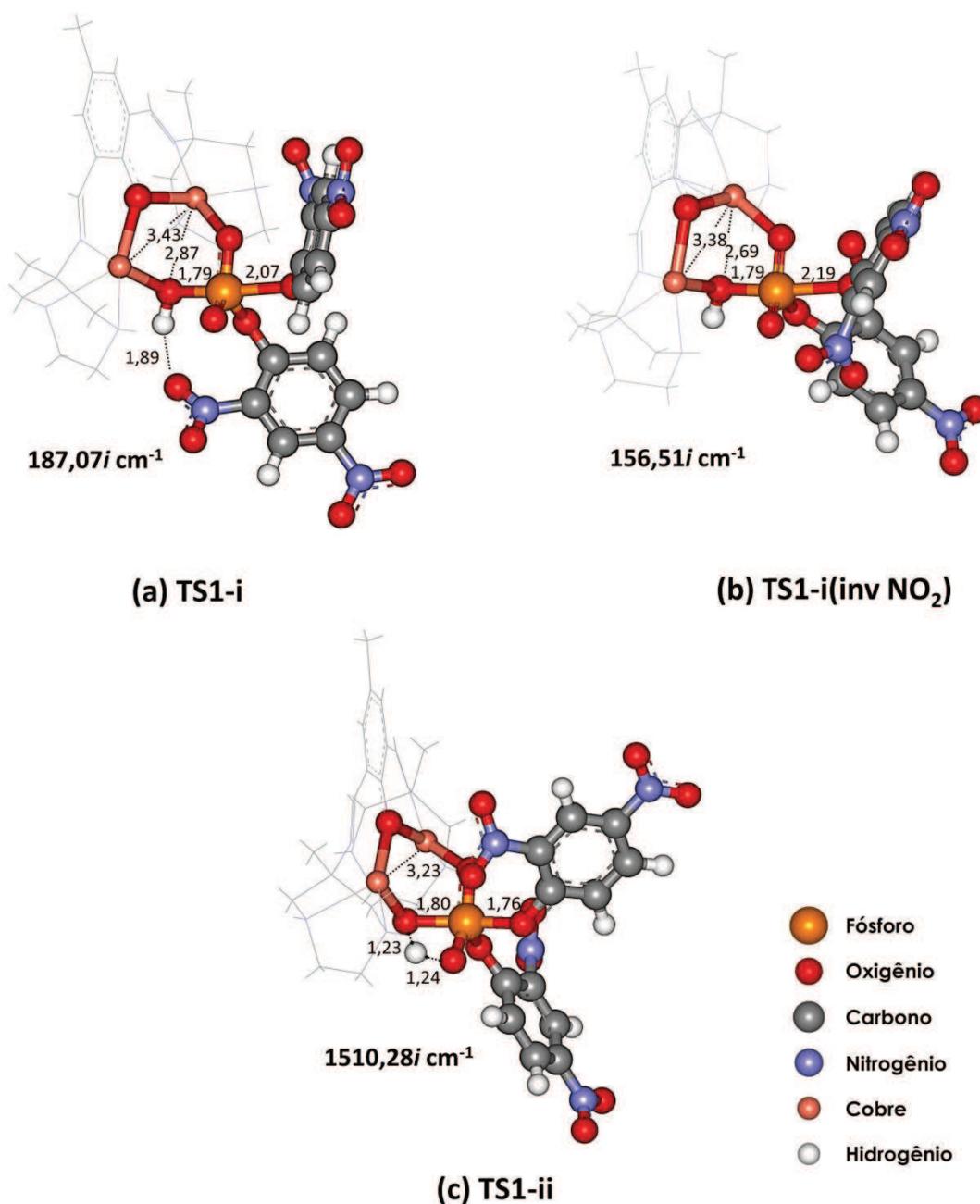
Nesta primeira etapa do processo foi avaliada a coordenação do **BDNPP** ao complexo de cobre, que corresponde a primeira etapa do processo catalítico. A estrutura do intermediário de reação, no qual o **BDNPP** está diretamente coordenado ao complexo dinuclear de cobre(II) foi originalmente obtida do cálculo de coordenada intrínseca de reação (*Intrinsic Reaction Coordinate* - IRC) realizado a partir da estrutura do **TS1-i**, um processo que será descrito a seguir.

A formação do intermediário **I1** a partir das moléculas **R1** e **BDNPP** é altamente exergônica, com uma energia livre de formação calculada em fase gasosa ($\Delta_r G_{(g)}$) de $-362,4 \text{ kcal mol}^{-1}$. O ligante **BDNPP** e o complexo **R1** possuem cargas opostas o que justifica, em parte, o valor encontrado para a energia de formação do intermediário **I1**, apesar de existir a possibilidade desse resultado obtido em fase gás ser superestimado.

3.1.2. Segunda Etapa: Formação do primeiro estado de transição (TS1)

A formação do primeiro estado de transição em ambos os mecanismos envolve uma aproximação da ponte μ -OH do átomo de fósforo do **BDNPP**. De modo que para construir as estruturas destes possíveis **TSs** a ponte μ -OH foi orientada para o átomo de fósforo do **BDNPP** se alinhando com o oxigênio do grupo **DNP** situado no lado oposto ao oxigênio da ponte μ -OH. Após a otimização destas estruturas, três estados de transição foram obtidos, um para o mecanismo associativo e dois para o mecanismo concertado (Figura 3.6).

Figura 3.6: Diferentes possibilidades para a estrutura do primeiro estado de transição envolvendo a quebra hidrolítica do **BDNPP**. (a) **TS1-i** - estado de transição para o mecanismo concertado, (b) **TS1-i(inv-NO₂)** - estado de transição para o mecanismo concertado diferindo na orientação do grupo **DNP** e (c) **TS1-ii** - estado de transição para o mecanismo associativo, envolvendo a transferência de próton entre a ponte μ -OH e o oxigênio terminal do grupo fosfato.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O modo vibracional associado à frequência imaginária na estrutura do **TS1-i** (Figura 3.6a) envolve as ligações que serão formadas e rompidas entre os átomos de oxigênio e o fósforo, sendo muito similar a uma reação S_N2 . O mesmo modo vibracional é observado para a estrutura do **TS1-i(inv NO₂)**. A estrutura do **TS1-i** possui uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo -NO₂ do **BDNPP** e o hidrogênio da ponte μ -OH e esta interação não está presente na estrutura do **TS1-i(inv NO₂)** uma vez que o grupo **DNP** está invertido em relação à estrutura do **TS1-i**. Como será visto a seguir, este fator pode contribuir para uma maior estabilidade da espécie **TS1-i** se comparada a espécie **TS1-i(inv NO₂)**.

O estado de transição para o mecanismo associativo, **TS1-ii**, possui um modo vibracional característico de um processo de transferência de prótons. Note que esta transferência envolve a formação de um anel de quatro membros que pode desfavorecer energeticamente este estado de transição. Analisando os valores das distâncias de ligação entre os átomos de oxigênio do nucleófilo (ponte μ -OH) e do grupo **DNP** com o átomo de fosforo do grupo fosfato vê-se que ela é ligeiramente menor para a estrutura do **TS2-ii**, confirmando assim a natureza associativa do mecanismo.

Os estados de transição obtidos para cada uma das propostas de mecanismo serão utilizados nos cálculos de IRC, através dos quais será possível conectar cada um dos estados de transição aos seus respectivos intermediários de reação.

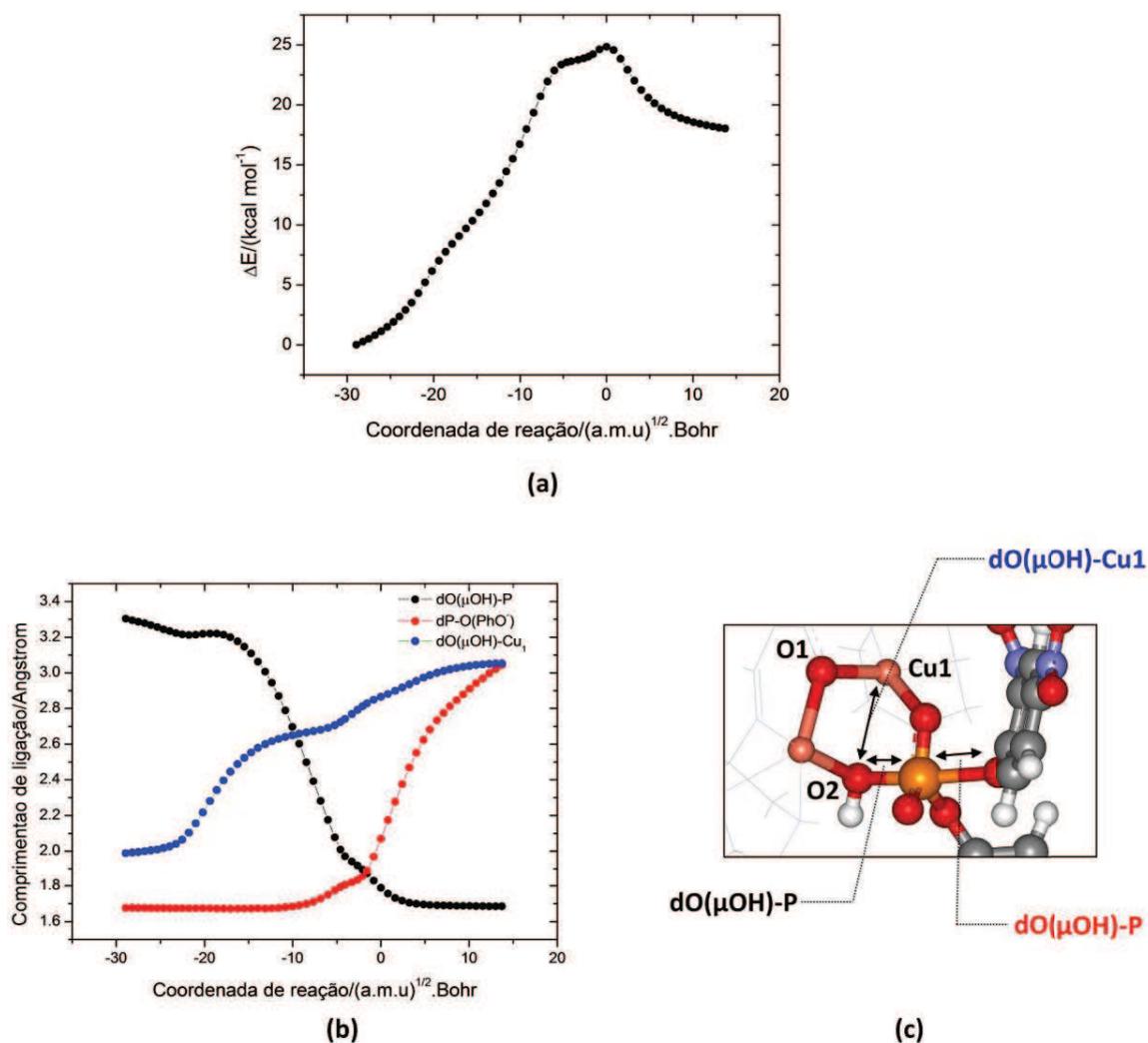
3.1.3. Mecanismo 1 – Mecanismo Concertado

O estado de transição **TS1-i**, obtido para o mecanismo concertado foi otimizado em fase gás e caracterizado como um ponto de sela de primeira ordem possuindo apenas uma frequência imaginária de $187,07i \text{ cm}^{-1}$. O modo vibracional associado a esta frequência envolve o estiramento das ligações P-O(μ -OH) e P-O(DNP) as quais correspondem respectivamente às ligações entre o nucleófilo e o grupo abandonador. Para se ter uma ideia mais precisa do mecanismo reacional, os principais comprimentos de ligação foram avaliados ao longo do caminho de reação. Os cálculos de IRC foram conduzidos no mesmo nível de teoria utilizado nas otimizações de geometria, utilizando o seguinte conjunto de parâmetros, *stepsize* = 20, *maxpoint* = 60⁷ utilizando os algoritmos de Hratchian e Schlegel (HRATCHIAN; SCHLEGEL, 2004)

⁷ *Stepsize* – refere-se ao tamanho do passo entre duas configurações no cálculo de IRC; *Maxpoint* – refere-se ao número máximo de pontos que deve ser obtido seguindo cada lado da curva de IRC.

conforme implementado no programa Gaussian 09 (FRISCH, 2009). Os pontos do IRC e os dados correspondentes à esta análise das ligações ao longo da coordenada de reação são mostrados na Figura 3.7, onde os pontos em preto correspondem à distância da ligação entre o oxigênio da ponte μ -OH e o átomo de fósforo do **BDNPP** (Formação da ligação), os pontos em vermelho correspondem à distância da ligação entre o oxigênio do grupo **DNP** com o átomo de fósforo e os pontos em azul correspondem à distância da ligação entre o oxigênio da ponte μ -OH e o íon cobre(II) (**Cu1**) no qual o grupo **BDNPP** se encontra diretamente coordenado na estrutura do intermediário **I1**.

Figura 3.7: (a) Variação da energia eletrônica ao longo da coordenada de reação (IRC) (b) Variação do comprimento das principais ligações ao longo da coordenada de reação. (c) destaque dos comprimentos de ligação avaliados no processo na estrutura do **TS1-i**.

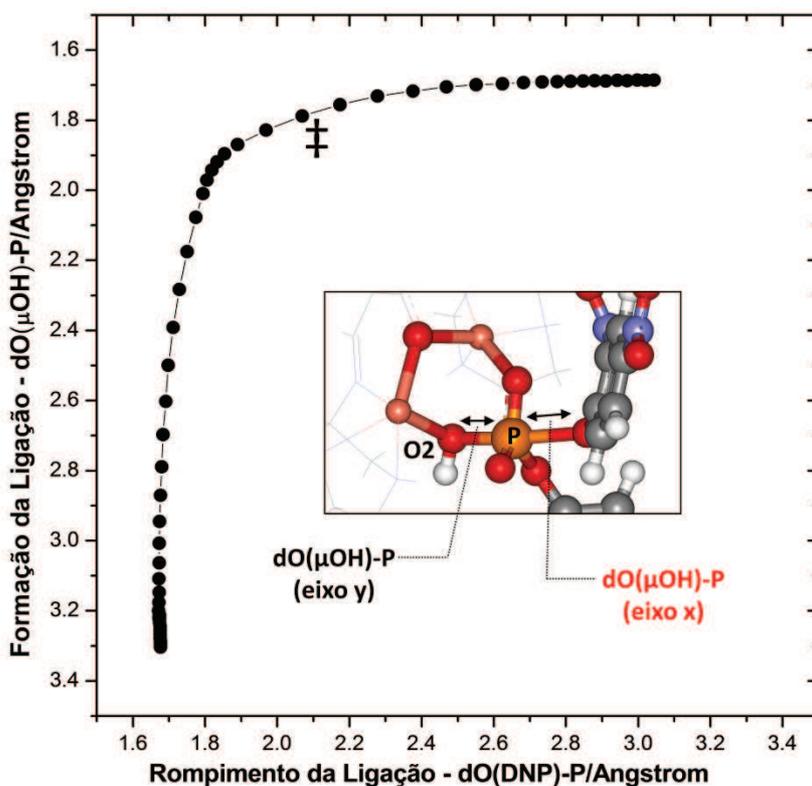


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A análise dos pontos em azul na Figura 3.7b nos mostra que o processo se inicia com um ligeiro aumento da distância da ligação entre o oxigênio da ponte μ -OH e o átomo de cobre assinalado como Cu1 na Figura 3.7c e com uma aproximação deste mesmo átomo de oxigênio em relação ao átomo de fósforo do **BDNPP**. Após este rearranjo o estado de transição **TS1-i** é formado com os seguintes comprimentos de ligação, 1,788 Å para a ligação dO(μ -OH)-P, 2,069 Å para a ligação dP-O(DNP) e 2,865 Å para a ligação dO(μ -OH)-Cu1. Note que na estrutura do **TS1-i** a ponte μ -OH não mais existe. Após a formação do **TS1-i** o grupo **DNP** será liberado o que pode ser evidenciado pela análise dos pontos em vermelho na Figura 3.7b indicando um aumento significativo na distância da ligação dP-O(DNP) após a formação do **TS1-i**.

Os pontos correspondentes à formação da ligação, dO(μ -OH)-P e ao rompimento da ligação dP-O(DNP) ao longo da coordenada de reação foram plotados em um diagrama de More O’Ferral-Jencks, para se ter uma ideia a respeito do tipo de mecanismo obtido. O resultado desta correlação é apresentado na Figura 3.8.

Figura 3.8: Diagrama de More O’Ferral-Jencks para o mecanismo concertado envolvendo a quebra hidrolítica do BDNPP passando pela estrutura do **TS1-i**. O ponto marcado com o símbolo ‡ corresponde a estrutura do estado de transição.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O mecanismo concertado envolve a passagem por um estado de transição relaxado (*loose*) se compararmos o diagrama da Figura 3.8 com o da Figura 1.7, o que indica que ao longo da coordenada de reação a ligação do nucleófilo com o fósforo irá se formar antes que a ligação com o grupo abandonador comece a ser rompida. Deve estar claro que o mecanismo, embora se aproxime de uma das arestas, é um mecanismo concertado, pois não há a formação de um intermediário pentacoordenado ao longo do processo.

Os pontos estacionários associados aos intermediários de reação **I1(TS1-i)** e **I2(TS1-i)** para o **Mecanismo 1** foram obtidos através da otimização das estruturas correspondentes aos últimos pontos de cada lado do IRC na Figura 3.7a. A Tabela 3.2 apresenta alguns dos principais comprimentos de ligação para as espécies envolvidas nesta etapa do processo.

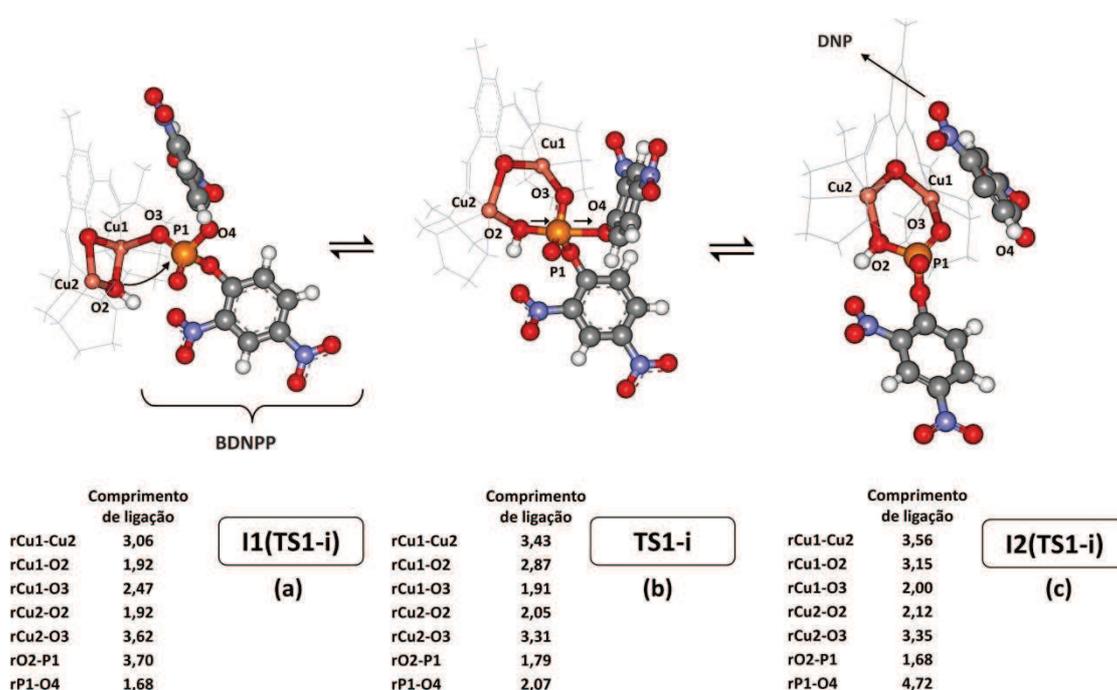
Tabela 3.2: Dados estruturais relevantes para as espécies **I1(TS1-i)**, **TS1-i** e **I2(TS1-i)** obtidos em fase gás no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ.

Comprimentos de ligação/Å	Espécies envolvidas no processo reacional		
	I1(TS1-i)	TS1-i	I2(TS1-i)
rCu1–Cu2	3,06	3,43	3,56
rCu1–O1	2,03	2,03	2,08
rCu1–O2	1,92	2,87	3,15
rCu2–O1	2,11	2,15	2,12
rCu2–O2	1,92	2,04	2,12
rCu1–N1	1,95	1,95	1,97
rCu1–N3	2,75	2,51	2,69
rCu1–N5	2,06	2,15	2,15
rCu2–N2	1,97	1,99	1,97
rCu2–N4	2,32	2,46	2,42
rCu2–N6	2,17	2,23	2,25
rCu1–O3	2,47	1,91	2,00
rO2–P1	3,70	1,79	1,68
rO3–P1	1,49	1,55	1,51
rO4–P1	1,68	2,07	4,73

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

As estruturas otimizadas envolvidas nesta etapa do processo são apresentadas na Figura 3.9, juntamente com alguns dos principais comprimentos de ligação. Com a finalidade de facilitar a visualização, somente os átomos envolvidos diretamente no processo estão representados pelo modelo de bastão e bola, os outros átomos da molécula serão representados por linhas.

Figura 3.9: Mecanismo de reação proposto para a primeira etapa do processo catalítico de quebra hidrolítica do **BDNPP** destacando as estrutura otimizadas para os intermediários de reação obtidas através do cálculo de IRC. **(a) I1(TS1-i)** e **(c) I2(TS1-i)** e a estrutura do estado de transição **(b) TS1-i**. Os comprimentos de ligação estão em Angstroms.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Esta primeira etapa do Mecanismo 1 corresponde a etapa química do processo, isto é, a etapa na qual ocorre a hidrólise do éster de fosfato, sendo portanto a etapa mais importante do ciclo catalítico. A formação do **TS1-i** a partir da estrutura do intermediário **I1(TS1-i)** possui uma energia livre de ativação (ΔG_1^\ddagger) de +23,7 kcal mol⁻¹ calculado no modelo PCM utilizando água como solvente. A constante de velocidade calculada com o auxílio da equação de Eyring (Equação 2.19) é igual a 2.6×10^{-5} s⁻¹.

A segunda etapa do ciclo catalítico se inicia com o intermediário **I2(TS1-i)**. A partir desta estrutura dois caminhos são esperados, conforme fora apresentado na Figura 3.4. O primeiro caminho reacional (**p1**) envolve uma reação de transferência de próton entre o oxigênio da ponte μ -OH e o oxigênio terminal do grupo fosfato, seguido pela coordenação de duas moléculas de água que serão responsáveis por deslocar o **DNPP** da estrutura do complexo metálico. O segundo caminho reacional (**p2**) não envolve transferência de prótons de modo que após a formação do intermediário **I2(TS1-i)** duas moléculas de água promovem o deslocamento do **DNPP**. Em ambos os caminhos (**p1** ou **p2**) ocorre a formação de um complexo diaquo que será convertido no reagente original por uma desprotonação.

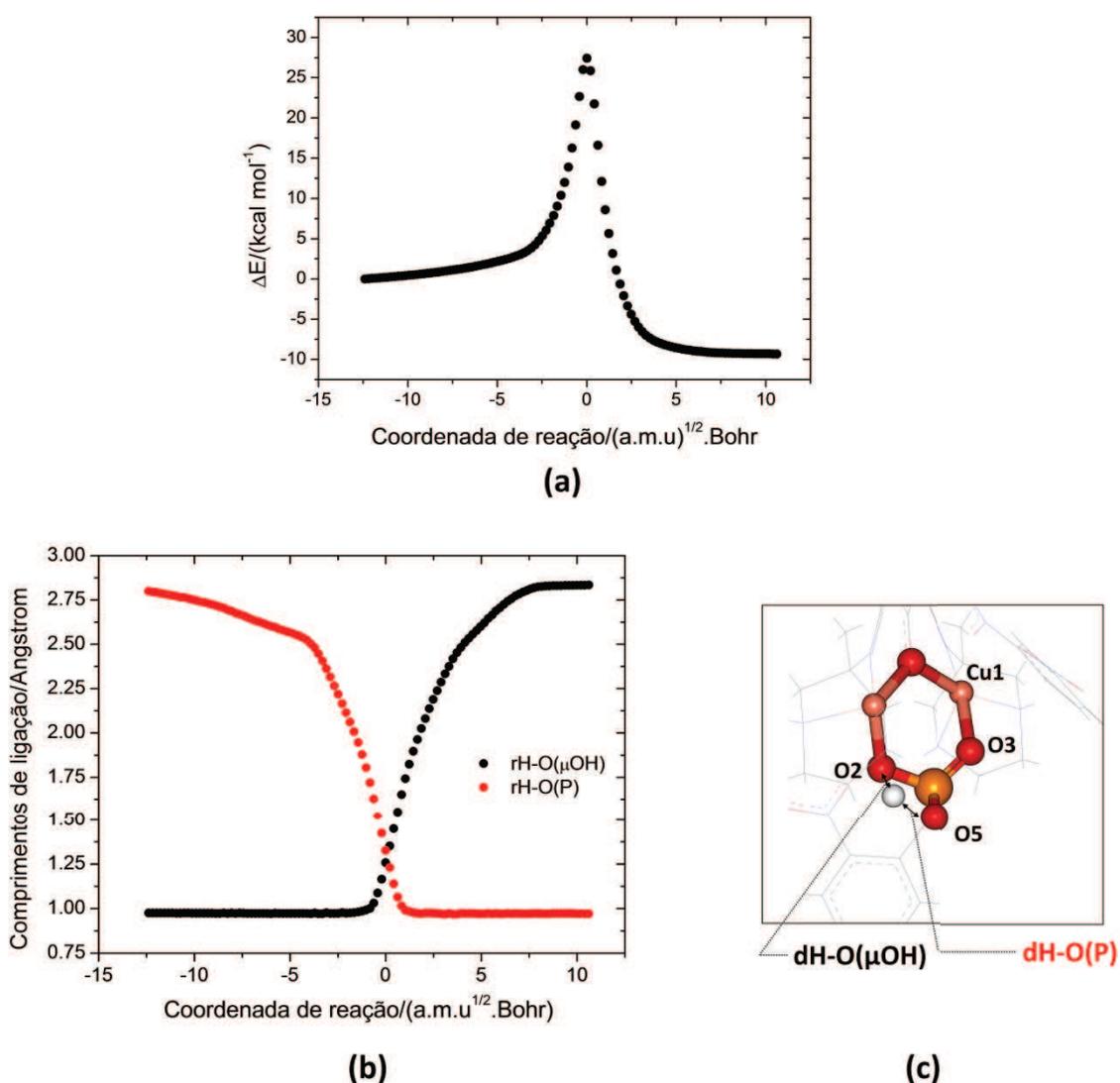
3.1.3.1. Primeiro caminho reacional (p1)

No primeiro caminho reacional (**p1**) a conversão do intermediário **I2(TS1-i)** ao intermediário **I3(p1)** passa pelo estado de transição **TS2-i**. A estrutura da espécie **TS2-i** foi construída assumindo que o estado de transição envolvia uma transferência de próton com o hidrogênio sendo transferido do átomo de oxigênio do grupo μ -OH para o átomo de oxigênio terminal do grupo **DNPP** de modo que durante a proposição da estrutura de partida (*input*) para o **TS2-i**, o hidrogênio foi posicionado a uma distância intermediária destes átomos de oxigênio. Duas estratégias foram inicialmente utilizadas no estudo deste processo. Na primeira otimização de geometria o grupo **DNP**, liberado na quebra hidrolítica, foi retirado da estrutura e a otimização da geometria do **TS2-i** foi conduzida na ausência deste grupo. Na segunda otimização de geometria, o grupo **DNP** foi mantido, conforme se encontra na Figura 3.9c e a estrutura do **TS2-i** foi otimizada. Estas duas estratégias, embora conduzissem a estruturas com diferentes energias, geraram estados de transição bastante similares, no entanto somente a estrutura contendo o grupo **DNP** será apresentada.

O estado de transição **TS2-i** foi caracterizado como um ponto de sela contendo uma única frequência imaginária, cujo valor é de $1725.92i \text{ cm}^{-1}$. Assim como foi proposto para a estrutura do **TS1-i**, o estado de transição **TS2-i** foi utilizado como estrutura de partida para a condução dos cálculos de IRC com o intuito de se obter os intermediários de reação **I2(TS2-i)** e **I3(p1)**. Os pontos correspondentes ao IRC da estrutura **TS2-i** são mostrados na Figura 3.10a. Os comprimentos das principais ligações

envolvidas na caracterização da espécie **TS2-i**, também foram avaliados (Figura 3.10b), sendo os pontos em preto correspondentes à distância da ligação entre o hidrogênio e o oxigênio pertencentes à ponte μ -OH ($r\text{H-O}(\mu\text{-OH})$) (ligação que será rompida) e os pontos em vermelho correspondentes à distância da ligação entre o hidrogênio da ponte μ -OH e o oxigênio terminal do grupo fosfato ($r\text{H-O(P)}$) (ligação que será formada).

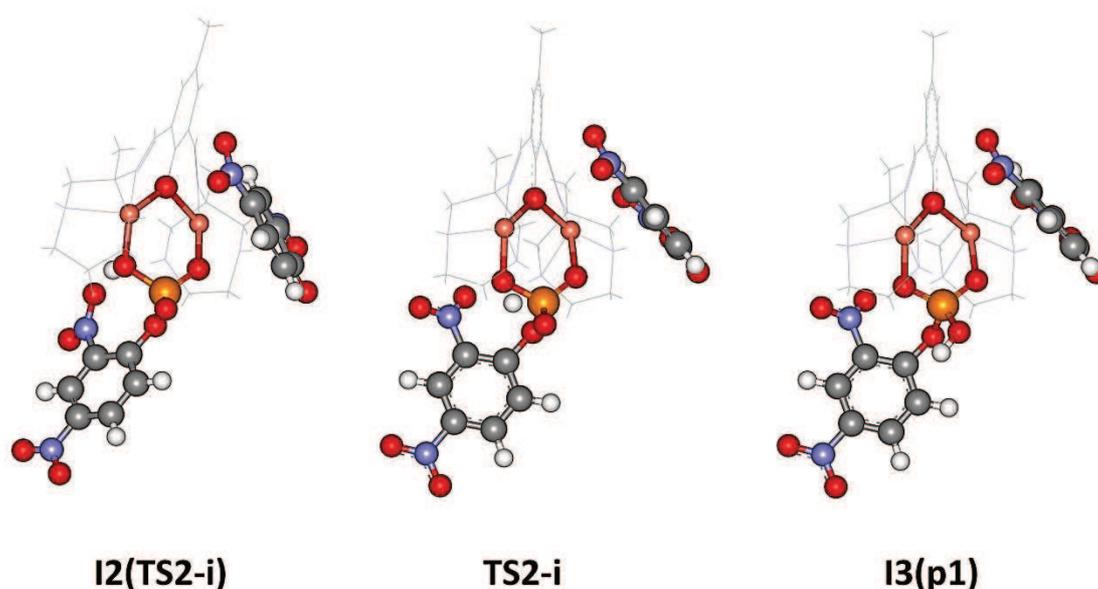
Figura 3.10: (a) Variação da energia eletrônica ao longo da coordenada de reação (IRC) (b) Variação do comprimento das principais ligações ao longo da coordenada de reação. (c) destaque dos comprimentos de ligação avaliados no processo na estrutura do **TS2-i**.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A distância entre o átomo de hidrogênio e o oxigênio do grupo fosfato, $r_{\text{H-O(P)}}$, é de 2,79Å no início do IRC. No entanto esse valor diminui lentamente ao longo da coordenada de reação, conforme pode ser observado na Figura 3.10b, pois o hidrogênio precisa se orientar na direção do oxigênio terminal do grupo fosfato. Uma vez feito isto, o comprimento da ligação $r_{\text{H-O(P)}}$ começa a diminuir até a formação do **TS2-i**, no qual são observadas as seguintes distâncias de ligação 1,25Å para a ligação $r_{\text{H-O}(\mu\text{-OH})}$ e 1,33Å para a ligação $r_{\text{H-O(P)}}$. O modo vibracional associado à única frequência imaginária encontrada para o **TS2-i** envolve o estiramento destas duas ligações ao longo da coordenada de reação, conforme destacado na Figura 3.10. As estruturas otimizadas para cada uma das espécies obtidas nesta etapa estão apresentadas na Figura 3.11.

Figura 3.11: Estruturas otimizadas para as espécies envolvidas na etapa de transferência de prótons, **I2(TS2-i)**, **TS2-i** e **I3(p1)**.

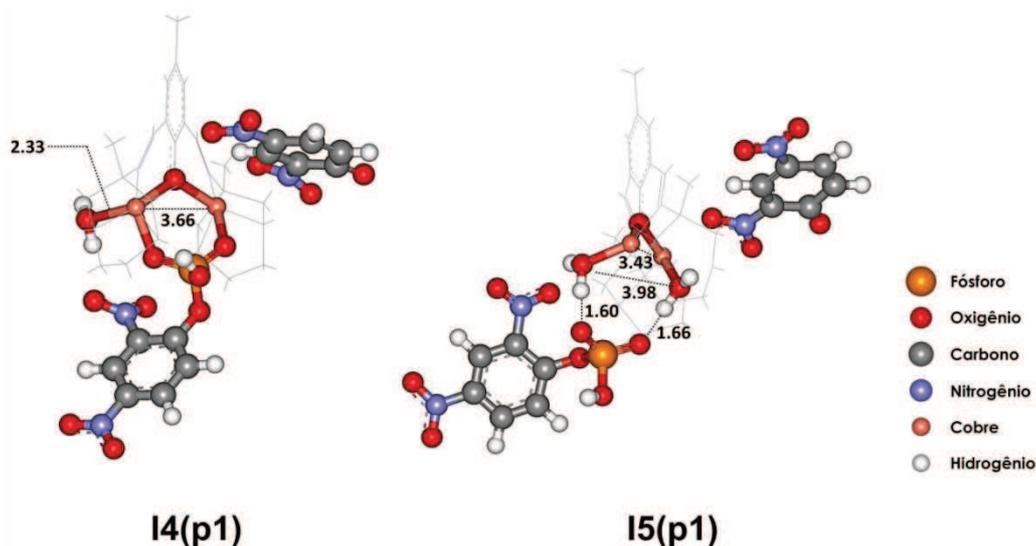


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A análise da Figura 3.11 evidencia que o esqueleto associado ao complexo metálico praticamente não altera a sua estrutura no processo de transferência de próton. O próton a ser transferido na estrutura do intermediário **I2(TS2-i)** encontra-se afastado do oxigênio terminal do grupo fosfato de modo que para que a estrutura **TS2-i** se forme ele deverá inicialmente se aproximar deste átomo de oxigênio terminal do grupo fosfato sem que a ligação com o oxigênio da ponte $\mu\text{-OH}$ seja rompida.

As próximas etapas seguindo o primeiro caminho reacional (**p1**), consistem na entrada de duas moléculas de água, as quais promoverão o deslocamento do que restou do substrato, íon **DNPP**, da estrutura do complexo metálico. Não foram obtidos estados de transição associados à entrada de moléculas de água. A entrada da primeira molécula de água será responsável por formar a estrutura do intermediário **I4(p1)** e a da segunda molécula de água será responsável pela formação do intermediário **I5(p1)**. Para se construir a estrutura do intermediário **I4(p1)** uma molécula de água foi adicionada à estrutura do intermediário **I3(p1)**. Quatro possibilidades foram, então, consideradas, duas em cada íon cobre(II). Destas possibilidades, em apenas uma a molécula de água se ligou covalentemente à estrutura do complexo, com um comprimento de ligação de 2.33Å. Nas outras estruturas propostas a molécula de água apenas interagiu com o centro metálico, não estabelecendo nenhuma ligação com os íons cobre(II). Estas últimas estruturas não serão apresentadas aqui, pois além de não conter a água diretamente ligada ao complexo, correspondem a estruturas menos estáveis que a estrutura **I4(p1)** mostrada na Figura 3.12. A estrutura do intermediário **I5(p1)** foi construída a partir da estrutura do intermediário **I4(p1)**, embora neste caso apenas uma possibilidade de entrada da molécula de água tenha sido considerada. A entrada da segunda molécula de água deverá formar uma ligação com o íon cobre que não se encontra ligado à primeira molécula de água. A estrutura do intermediário **I5(p1)** também é apresentada na Figura 3.12.

Figura 3.12: Estruturas otimizadas para os intermediários **I4(p1)** e **I5(p1)** na presença dos grupos **DNP** e **DNPP**.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A entrada da primeira molécula de água, que conduz à formação do intermediário **I4(p1)**, não causa a abertura do anel de seis membros formado entre o oxigênio do grupo fosfato, os dois íons cobre(II) e o oxigênio da ponte μ -OH. A entrada da segunda molécula de água causará a formação do intermediário **I5(p1)** forçando o afastamento do grupo **DNPP** do centro metálico. Os oxigênios terminais pertencentes ao grupo **DNPP** na estrutura do intermediário **I5(p1)** estabelecem ligações de hidrogênio com as moléculas de água diretamente coordenadas aos íons cobre(II). Em um sistema real os íons **DNPP** e **DNP** seriam retirados da estrutura por moléculas de solvente presentes no meio, restando apenas o complexo com duas moléculas de água coordenadas diretamente a ele. Esta estrutura será apresentada na Seção 3.2.

Tendo otimizado todas as estruturas do ciclo catalítico seguindo o primeiro caminho reacional (**p1**) dentro do **Mecanismo 1**, pode-se avaliar o perfil energético para essas espécies através do qual será possível estimar as barreiras de reação e, conseqüentemente, as constantes de velocidade. Todas as estruturas foram otimizadas em fase gás no nível B3LYP/6-31G(d)/LANLDZ e os efeitos do solvente foram incluídos através de cálculos no ponto (*single point calculations*). A Tabela 3.3 mostra os valores obtidos para as energias de cada uma das espécies envolvidas no **Mecanismo 1/(p1)**. Cálculos no ponto foram realizados com alteração do conjunto de função de base para os átomos não metálicos para 6-31+G(2df). Os resultados obtidos em fase gás, em fase aquosa com o modelo PCM e em fase aquosa com o conjunto de função de base 6-31+G(2df) para os átomos não metálicos são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Energia livre de Gibbs Relativa para as espécies envolvidas no primeiro caminho reacional do **Mecanismo 1**.

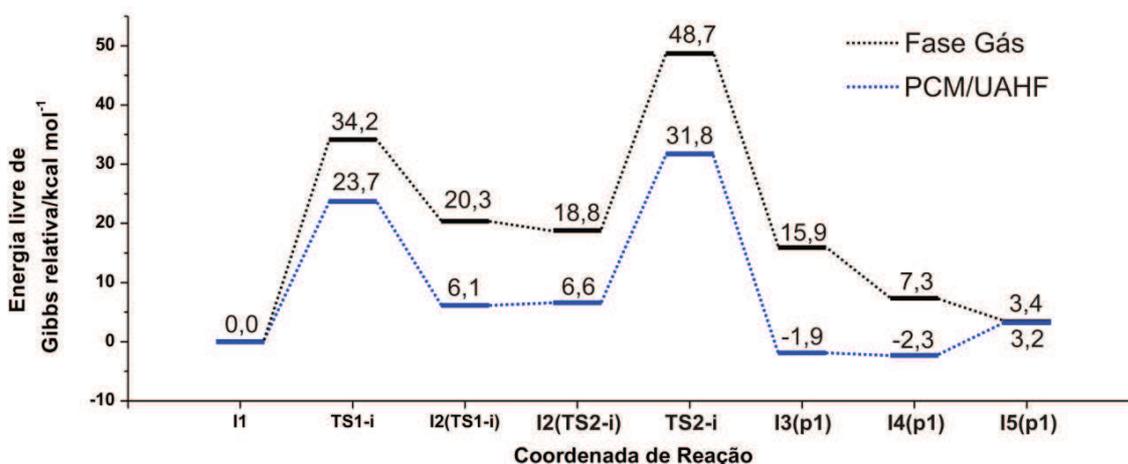
	Energia livre de Gibbs relativa* ($\Delta G_{[I1(TS1-i)]}^{rel}$)/ kcal mol ⁻¹		
	B3LYP/6-31G(d)/ LANL2DZ	B3LYP/6-31G(d)/ LANL2DZ:UAHF	B3LYP/6-31+G(2df)/ LANL2DZ:UAHF
I1(TS1-i)	0,00	0,00	0,00
TS1-i	34,17	23,71	24,80
I2(TS1-i)	20,33	6,15	3,86
I2(TS2-i)	18,81	6,42	4,02
TS2-i	48,69	31,75	28,40
I3(p1)	15,90	-2,28	-5,97
I4(p1)	7,34	2,30	1,72
I5(p1)	3,40	3,24	16,02

* Os valores para a energia livre de Gibbs relativa foram calculados em relação ao intermediário **I1(TS1-i)**.

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O perfil energético para o **Mecanismo 1**, seguindo o primeiro caminho reacional, é apresentado na Figura 3.13, comparando os resultados obtidos em fase gás com os resultados obtidos em fase aquosa com o modelo PCM. Todos os valores de energia, tanto na Tabela 3.3 quanto na Figura 3.13, foram obtidos em relação ao primeiro intermediário de reação, a espécie **I1(TS1-i)**.

Figura 3.13: Perfil global da energia livre de Gibbs ao longo da coordenada de reação para a quebra hidrolítica do **BDNPP** seguindo o primeiro caminho reacional (**p1**) dentro do **Mecanismo 1**.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O perfil global da energia livre de Gibbs ao longo da coordenada de reação, representado na Figura 3.13, mostra que o caminho reacional em fase gás é ligeiramente diferente do caminho reacional em fase aquosa. Por exemplo, as estabilidades relativas das espécies **I2(TS1-i)** e **I2(TS2-i)** são dependentes do meio, enquanto que em fase gás o intermediário **I2(TS2-i)** é o mais estável, em fase aquosa o intermediário **I2(TS1-i)** se mostra a mais estável. Tais fatores são extremamente relevantes no momento de se definir a barreira de reação para o processo. A etapa determinante da velocidade em fase gás corresponde à etapa química do processo, ou seja, a etapa onde ocorre a quebra da ligação, uma vez que esta etapa possui a maior barreira ($\Delta G_{1(g)}^{\ddagger} = 34,2 \text{ kcal mol}^{-1}$). No entanto, nos resultados em fase aquosa, a etapa determinante da velocidade corresponde à etapa de transferência de próton, pois esta possui a barreira de ativação mais alta ($\Delta G_{2(aq)}^{\ddagger} = 25,7 \text{ kcal mol}^{-1}$). A constante de velocidade calculada para o

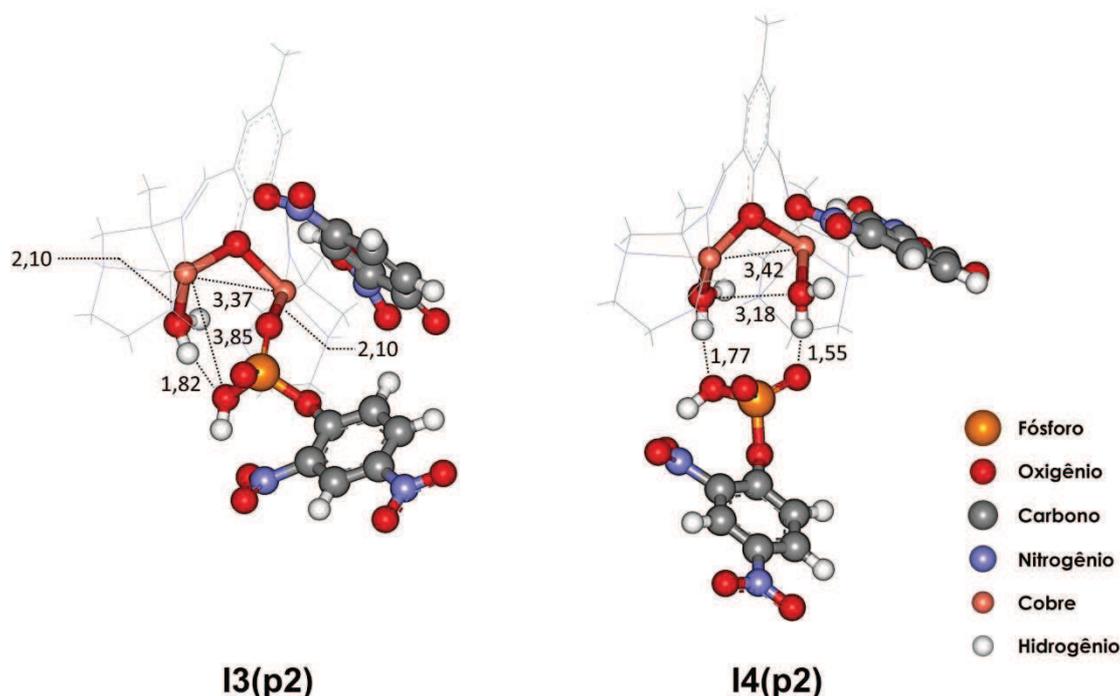
caminho reacional **p1** seguindo o **Mecanismo 1**, possui o valor de $7,6 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ obtido através da equação de Eyring (Equação 2.19).

A diferença de energia entre os intermediários **I4(p1)** e **I3(p1)** de $-0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ indica que a entrada de moléculas de água na estrutura do intermediário **I3(p1)** promove uma estabilização do sistema ao formar a espécie **I4(p1)**, enquanto que a entrada da segunda molécula de água na estrutura da espécie **I4(p1)**, conforme evidenciado pela diferença de energia de $5,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ desestabiliza o sistema ao formar a espécie **I5(p1)**, embora duas ligações de hidrogênio tenham sido formadas entre o **DNPP** e as moléculas de água diretamente coordenadas ao cobre, conforme apresentado na Figura 3.12. Este pequeno aumento na energia livre de Gibbs pode ser justificado pelo fato de duas ligações entre o **DNPP** e o complexo metálico terem sido rompidas, enquanto que apenas uma ligação com a molécula de água tenha sido formada na conversão da espécie **I4(p1)** na espécie **I5(p1)**.

3.1.3.2. Segundo caminho reacional (p1)

Conforme discutido anteriormente, o segundo caminho reacional seguindo o **Mecanismo 1** não possui nenhum estado de transição além daquele obtido para a etapa química do processo. As moléculas de água que promoverão o deslocamento do grupo **DNPP** da estrutura do complexo metálico se coordenarão sem a transferência de prótons. Para construir os intermediários de reação para esta etapa, uma molécula de água foi adicionada à estrutura do intermediário **I2(TS1-i)** próxima a um dos íons cobre(II), ocasionando a formação do intermediário **I3(p2)**. Assim como foi feito para **p1**, quatro posições para a entrada da molécula de água foram consideradas e somente a estrutura de menor energia será apresentada aqui. A segunda molécula de água foi adicionada à estrutura do intermediário **I3(p2)** com a intenção de se construir a estrutura para o intermediário **I4(p2)**. Para a entrada desta segunda molécula de água somente uma possibilidade foi considerada, pois a mesma deve entrar no íon cobre(II) que não está coordenado à primeira molécula de água. A primeira etapa, seguindo o caminho reacional **p2**, é idêntica àquela obtida para o caminho reacional **p1**, de modo que a análise para as estruturas envolvidas na primeira etapa do processo não será repetida. A Figura 3.14 contém as estruturas otimizadas para as espécies **I3(p2)** e **I4(p2)** destacando alguns dos principais comprimentos de ligação.

Figura 3.14: Estruturas otimizadas para os intermediários **I3(p2)** e **I4(p2)** na presença dos grupos **DNP** e **DNPP**.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A entrada da primeira molécula de água na estrutura do intermediário **I2(TS1-i)** conduz à formação do intermediário **I3(p2)**. Diferentemente da estrutura do intermediário **I4(p1)** – que corresponde à entrada da primeira molécula de água seguindo o caminho reacional **p1** (Figura 3.12) – a entrada desta primeira molécula de água causa uma abertura do anel de seis membros, os quais contém dois átomos de oxigênio e um átomo de fósforo do **DNPP** e os dois íons cobre(II) juntamente com o átomo de oxigênio do ligante do complexo metálico. A entrada da segunda molécula de água promove o deslocamento do **DNPP**, que agora passa a interagir com o complexo metálico por meio de ligações de hidrogênio, assim como ocorreu para o intermediário **I5(p2)**.

É válido notar que, embora as conectividades dos átomos nas estruturas **I5(p2)** (Figura 3.14) e **I4(p1)** (Figura 3.12) sejam muito similares, elas correspondem a estruturas diferentes. Na estrutura da espécie **I4(p1)** o **DNPP** estabelece duas ligações de hidrogênio com as águas coordenadas aos íons cobre(II) através de dois de seus átomos de oxigênio terminais, enquanto que na estrutura do intermediário **I5(p2)**, esta interação envolve um átomo de oxigênio terminal e um átomo de oxigênio do grupo

hidroxila do **DNPP**, caracterizando assim, interações diferentes se compararmos os dois intermediários, o que também pode ser confirmado através da análise energética.

Com as estruturas otimizadas para o caminho reacional (**p2**) é possível avaliar as estabilidades relativas das espécies e estimar os valores para as barreiras de ativação para a reação e calcular as constantes de velocidade. As estruturas obtidas para o caminho reacional (**p2**) também foram otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ e os efeitos do solvente incluídos através de cálculos no ponto utilizando o modelo PCM. Refinamentos na energia foram realizados utilizando o conjunto de funções de base 6-31+G(2df) para os átomos não metálicos dentro do modelo PCM. Os valores correspondentes às energias livres relativas ao intermediário **I1(TS1-i)** são apresentados na Tabela 3.4.

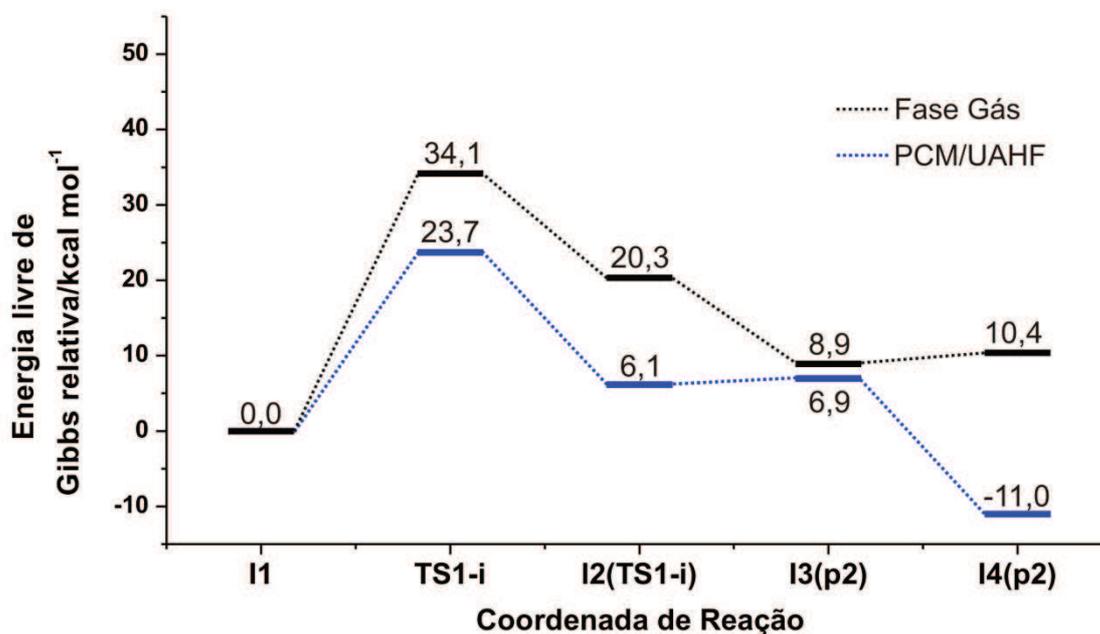
Tabela 3.4: Energia livre de Gibbs Relativa para as espécies envolvidas no segundo caminho reacional do **Mecanismo 1**.

	Energia livre de Gibbs relativa* ($\Delta G_{[I1(TS1-i)]}^{rel}$)/ kcal mol ⁻¹		
	B3LYP/6-31G(d)/ LANL2DZ	B3LYP/6-31G(d)/ LANL2DZ:UAHF	B3LYP/6-31+G(2df)/ LANL2DZ:UAHF
I1(TS1-i)	0,00	0,00	0,00
TS1-i	34,17	23,71	24,80
I2(TS1-i)	20,33	6,15	3,86
I3(p2)	8,91	6,95	12,99
I4(p2)	10,39	-11,00	-26,43

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O perfil energético para o **Mecanismo 1** seguindo o caminho reacional **p2** é apresentado na Figura 3.15, comparando os resultados obtidos em fase gás com os resultados obtidos em fase aquosa com o modelo PCM. Todos os valores de energia livre, os da Tabela 3.4 e os da Figura 3.15 foram obtidos em relação ao primeiro intermediário de reação, a espécie **I1(TS1-i)**.

Figura 3.15: Perfil global da energia livre de Gibbs ao longo da coordenada de reação para a quebra hidrolítica do BDNPP seguindo o segundo caminho reacional (**p2**) dentro do **Mecanismo 1**.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Este segundo caminho reacional (**p2**) seguindo o **Mecanismo 1** tem a quebra hidrolítica do BDNPP como etapa determinante da velocidade. O perfil global para a energia livre de Gibbs apresentado na Figura 3.15, mostra que a estabilidade relativa das espécies em fase aquosa é ligeiramente diferente daquela observada em fase gás. A entrada da primeira molécula de água na estrutura do intermediário **I2(TS1-i)** formando a estrutura do intermediário **I3(p1)** estabiliza o sistema em fase gás em $-11,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ enquanto que o mesmo processo em fase aquosa ocorre com uma ligeira desestabilização do sistema em $+0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, o que em parte pode ser explicado pela ruptura do anel de seis membros na estrutura da espécie **I2(TS1-i)**. A entrada da segunda molécula de água, que conduz a formação do intermediário **I4(p2)** desestabiliza o sistema em $1,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ em fase gás, enquanto que o mesmo processo em fase aquosa ocorre com uma estabilização do sistema em $-17,9 \text{ kcal mol}^{-1}$. Este ganho de estabilidade é bastante significativo e possivelmente está associado às ligações de hidrogênio formadas entre o **DNPP** e as moléculas de água diretamente coordenadas aos íons cobre(II), uma vez que estas interações são ligeiramente diferentes se comparadas às observadas no intermediário **I5(p1)**.

Como o segundo caminho reacional apresenta um único estado de transição, a etapa determinante da velocidade corresponderá à etapa química do processo, cuja barreira em fase aquosa é igual a $\Delta G_{1(aq)}^\ddagger = 23,7 \text{ kcal mol}^{-1}$.

A constante de velocidade (k_{cat}) encontrada para esta etapa do processo é igual a $2,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, cujo valor é 60 vezes maior que a constante de velocidade para a hidrólise do **BDNPP** na ausência do catalisador ($3,88 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, medido em $\text{pH} = 9.0$ na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$) (BUNTON; FARBER, 1969).

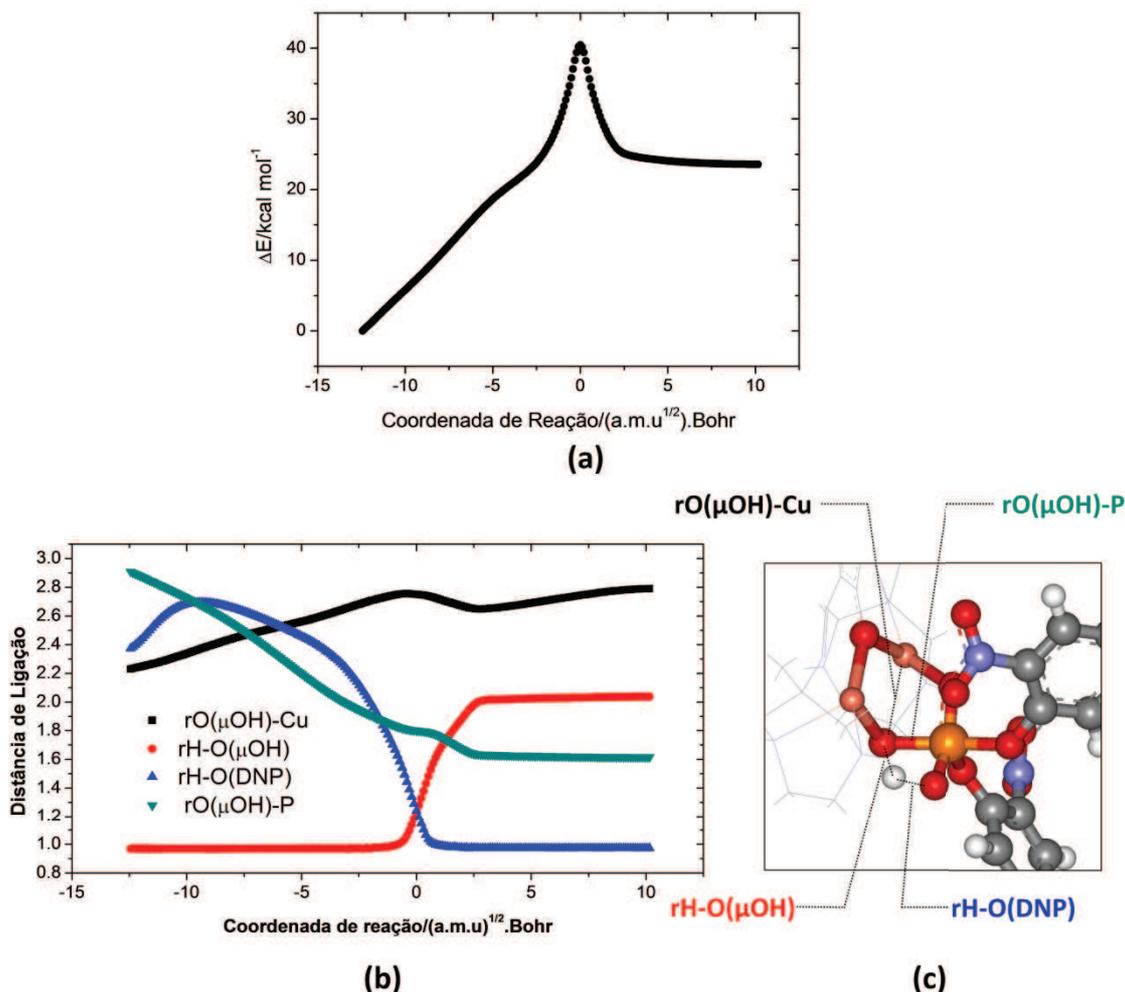
O processo de quebra hidrolítica do **BDNPP** pelo complexo **R1** foi avaliado experimentalmente (REY et al., 2007), onde uma constante de velocidade de segunda ordem $2,1 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ foi obtida através de uma condição de pseudo primeira ordem, mantendo a concentração do substrato constante, $[\text{BDNPP}] = 4,1 \times 10^{-5} \text{ M}$ e variando a concentração do complexo **R1** de 3 a 20 vezes a $[\text{BDNPP}]$, isto é, $[\text{R1}] = 1,23 \times 10^{-4} \text{ M}$ a $8,2 \times 10^{-4} \text{ M}$. A constante de velocidade, obtida sob esta condição de pseudo primeira ordem, k_{obs} , foi determinada para cada concentração de complexo, utilizando o método das velocidades iniciais. O sinal espectroscópico do grupo **DNP**, liberado ao longo do processo catalítico, foi utilizado para medir de maneira indireta a velocidade inicial, v_0 e, conseqüentemente, a constante de velocidade observada, a qual é dada por: $k_{obs} = v_0/[\text{BDNPP}]$ e $k_{obs} = k_2[\text{R1}]$.

O valor obtido para k_{obs} , foi plotado em função da concentração do complexo **R1** e uma correlação linear foi observada. O coeficiente linear da reta que correlaciona k_{obs} com a concentração da espécie **R1** corresponde à constante de velocidade k_2 obtida para o processo experimental. Assumindo que o processo segue uma cinética de pseudo primeira ordem, é possível obter o valor esperado para k_{obs} (que será igual a constante de velocidade para um processo de primeira ordem, k_1) considerando que o processo ocorre na situação em que a concentração do complexo está em excesso. Esta condição é obtida experimentalmente quando a concentração do complexo atinge o seu valor máximo, i.e., $[\text{R1}] = 8,2 \times 10^{-4} \text{ M}$. Nesta situação, a constante de velocidade observada (k_1) é igual a $1,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, a qual possui uma alta concordância com o valor calculado para o **Mecanismo 1** seguindo o caminho reacional (**p2**), $k_1 = 2,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

3.1.4. Mecanismo 2 – Mecanismo associativo

Uma segunda proposta de mecanismo envolve a formação de um intermediário pentacoordenado, conforme o mecanismo apresentado na Figura 3.5. O **Mecanismo 2** se inicia com a formação de um intermediário I1, assim como o **Mecanismo 1**, seguido de uma transferência de próton entre o oxigênio da ponte μ -OH e o oxigênio terminal situado no grupo fosfato. Esta transferência de próton causa a formação do estado de transição **TS1-ii**, apresentado na Figura 3.6c. O estado de transição **TS1-ii** foi caracterizado como um ponto de sela, possuindo apenas uma única frequência imaginária de $1510,28i \text{ cm}^{-1}$ a qual está associada ao estiramento da ligação entre o hidrogênio e a ponte μ -OH e o hidrogênio com o oxigênio terminal do grupo fosfato. Após a transferência de próton ocorre a formação do intermediário de reação **I2(TS1-ii)**, o qual por sua vez, corresponde ao intermediário pentacoordenado que caracteriza o mecanismo associativo. A estrutura otimizada da espécie **TS1-ii** foi utilizada nos cálculos de IRC, cujo perfil é apresentado na Figura 3.16a. As principais distâncias envolvidas na formação do **TS1-ii** foram avaliadas ao longo do IRC e se encontram na Figura 3.16b. Os pontos em preto, correspondem à ligação entre o átomo de oxigênio da ponte μ -OH e o íon cobre(II) onde ocorre a coordenação do grupo fosfato, $rO(\mu\text{-OH})\text{-Cu}$. Os pontos em verde claro, correspondem à ligação entre o átomo de oxigênio da ponte μ -OH e o átomo de fósforo do grupo **BDNPP**, $rO(\mu\text{-OH})\text{-Cu}$. Os pontos em vermelho, por sua vez, correspondem à ligação entre os átomos de hidrogênio e oxigênio da ponte μ -OH, $rH\text{-O}(\mu\text{-OH})$. Finalmente, os pontos em azul correspondem à ligação entre o átomo de hidrogênio da ponte μ -OH e o átomo de oxigênio do grupo **DNP**, $rH\text{-O}(\text{DNP})$. Estas distâncias de ligação estão indicadas na Figura 3.16c.

Figura 3.16: (a) Variação da energia eletrônica ao longo da coordenada de reação (IRC) para a espécie **TS1-ii**. (b) Variação dos principais comprimentos de ligação ao longo da coordenada de reação. (c) Estrutura do estado de transição **TS1-ii** destacando os comprimentos de ligação analisados em (b).

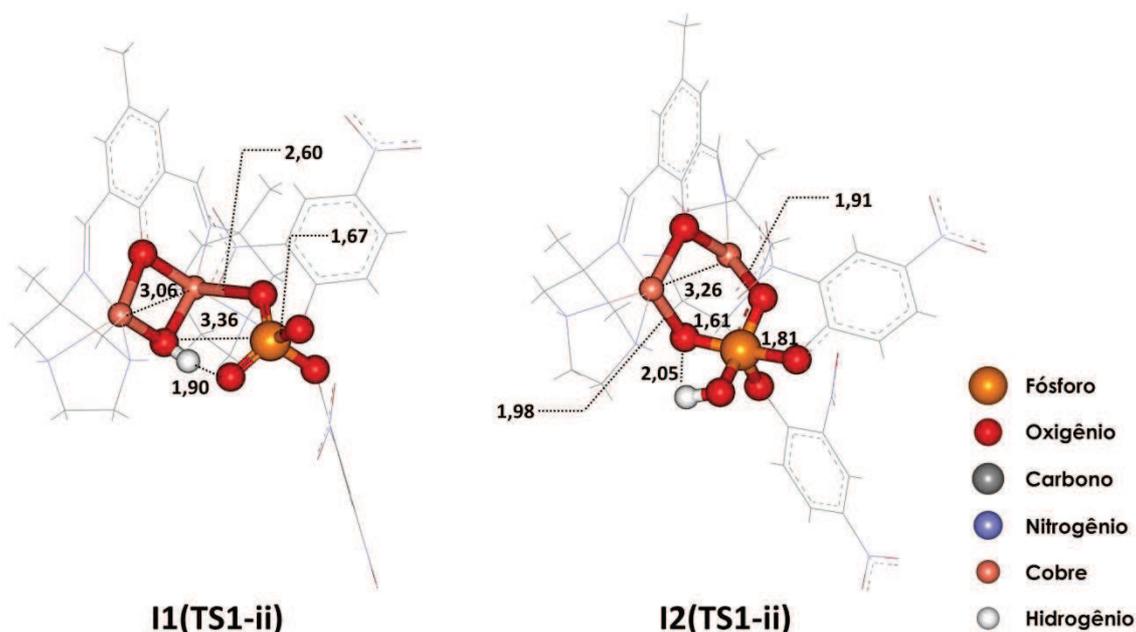


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A análise das distâncias de ligação $rH-O(\mu-OH)$ e $rH-O(DNP)$ ao longo da coordenada de reação, mostram a movimentação do átomo de hidrogênio envolvido na transferência de próton, evidenciando que inicialmente ele se encontra ligado ao átomo de oxigênio da ponte $\mu-OH$ e interagindo com o oxigênio do grupo **DNP**. Avançando pela coordenada de reação nota-se que a distância deste átomo de hidrogênio em relação ao grupo **DNP** sofre um ligeiro aumento, o qual é ocasionado por um rearranjo na estrutura da molécula para se formar o **TS1-ii**, e em seguida começa a diminuir o seu valor indicando a transferência de próton. A distância do átomo de hidrogênio ao átomo de oxigênio da ponte $\mu-OH$ permanece constante até as proximidades do estado de

transição, onde ela começa a aumentar o seu valor. Toda esta análise é esperada para uma transferência de próton, no entanto a Figura 3.16b traz informações adicionais sobre o que acontece em outras partes da molécula à medida que o próton é transferido. Conforme pode ser identificado nos pontos em preto, a ponte μ -OH é rompida ao longo da coordenada de reação, uma vez que a distância do oxigênio da ponte μ -OH ao cobre sofre um aumento ao longo do IRC. Os pontos em verde na Figura 3.16b indicam que o átomo de fósforo estabelece uma ligação com o oxigênio da ponte μ -OH ao longo da coordenada de reação indicando a formação de um intermediário pentacoordenado, uma vez que nenhum dos oxigênios do grupo **DNP** estão se afastando do átomo de fósforo ao longo do IRC. Os pontos em cada uma das extremidades do IRC foram otimizados, para se assegurar de que se tratavam de pontos estacionários e suas estruturas otimizadas em fase gás são mostradas na Figura 3.17.

Figura 3.17: Estruturas otimizadas para os intermediários envolvidos na primeira etapa de quebra catalítica obtidos a partir do **TS2-ii**.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Se as distâncias de ligação na espécie **I2(TS1-ii)** forem comparadas com as da estrutura do estado de transição **TS1-ii** na Figura 3.6c será possível notar que o grupo **DNP** não é hidrolisado nesta primeira etapa, uma vez que a distância $r_{\text{O(DNP)-P}}$ varia de 1,67Å na espécie **I1(TS1-ii)** para 1,76Å na espécie **TS1-ii** chegando ao valor de 1,81Å na estrutura do intermediário **I2(TS1-ii)**. A distância $r_{\text{O(DNP)-P}}$ não foi

apresentada na Figura 3.16c pois ela se manteve ligeiramente constante ao longo da coordenada de reação. A estrutura do intermediário **I1(TS1-ii)**, que posteriormente será utilizada como referência para o cálculo da barreira de reação, é bastante similar à estrutura do intermediário **I1(TS1-i)** apresentado na Figura 3.9, porém na estrutura do intermediário **I1(TS1-i)** existe uma interação de hidrogênio intramolecular entre o grupo -NO₂ do **BDNPP** e o grupo -OH em ponte entre os íons cobre(II), enquanto que na estrutura do intermediário **I1(TS1-ii)** também é observado uma ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo -OH, no entanto esta ligação envolve o átomo de oxigênio terminal do grupo fosfato.

A proposição desta etapa reacional seguiu o mecanismo teórico proposto por Ferreira e colaboradores para a hidrólise do dimetil fosfato catalisada por um modelo mimético de uma fosfatase ácida púrpura (FERREIRA et al., 2008). Seguindo o mecanismo proposto na literatura para a quebra associativa de fosfodiésteres a próxima etapa deveria envolver uma segunda transferência de próton entre o oxigênio terminal do grupo fosfato e o oxigênio do grupo **DNP** ligado na posição axial em relação ao átomo de oxigênio da ponte μ -OH⁸. Foram feitas várias tentativas de obtenção de um segundo estado de transição, porém em nenhuma delas obtivemos sucesso devido a problemas de convergência dos cálculos, isto é, as otimizações de geometria não permitiram a obtenção de uma estrutura de mínimo na superfície de energia potencial. Por esse motivo faremos uma análise somente com a primeira etapa do **Mecanismo 2**.

Tendo otimizado as estruturas envolvidas nesta primeira etapa do **Mecanismo 2**, é possível avaliar o perfil energético para essas espécies através do qual as barreiras de reação e conseqüentemente as constantes de velocidade poderão ser estimadas. Todas as estruturas foram otimizadas em fase gás no nível B3LYP/6-31G(d)/LANLDZ e os efeitos do solvente foram incluídos através de cálculos no ponto (*single point calculations*). A estrutura do intermediário **I1(TS1-ii)** é cerca de 6,5 kcal mol⁻¹ mais estável que a estrutura do intermediário **I1(TS1-i)** nos cálculos com a inclusão do solvente. No entanto, o valor calculado para a barreira de ativação da primeira etapa do **Mecanismo 2** foi de 60,2 kcal mol⁻¹ em fase aquosa o que fez com que apenas o **Mecanismo 1** fosse considerado nas análises.

Com base nestes resultados podemos concluir que dentre os dois mecanismos propostos, o **Mecanismo 1** seguindo o caminho reacional **p2** é o mais provável, pois

⁸ Note que a ponte μ -OH não existe mais, embora continuemos nos referindo ao átomo de oxigênio que antes formava a ponte μ -OH como O(μ -OH).

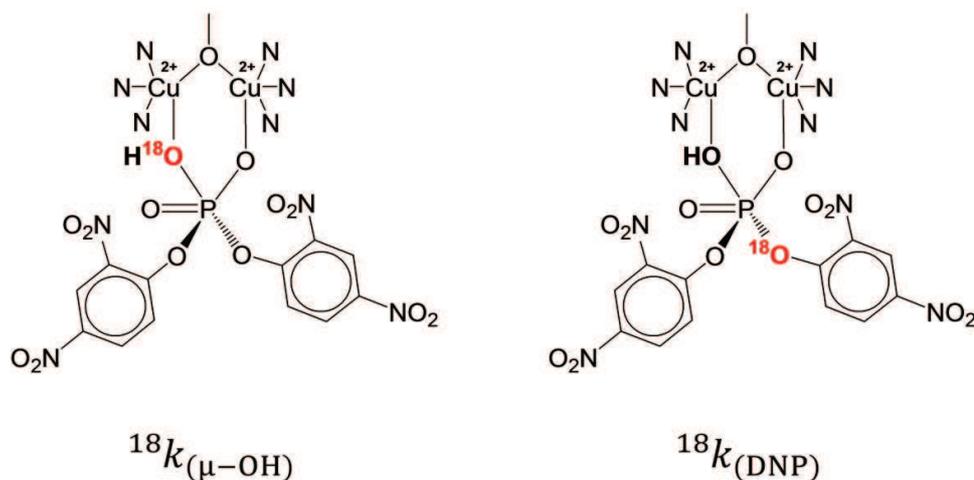
além de possuir a menor barreira de ativação para a descrição do processo, possui a constante de velocidade que melhor concorda com o valor obtido experimentalmente.

Uma alternativa para se estudar o **Mecanismo 2** envolveria a adição de moléculas explícitas de água que auxiliariam o processo de transferência de próton, seguindo o mecanismo proposto por WARSHEL (PRASAD; PLOTNIKOV; WARSHEL, 2013). A transferência de próton seria mediada por moléculas de água do solvente ocorrendo de maneira indireta. Algumas tentativas de se otimizar um estado de transição envolvendo a transferência de próton assistida pelo solvente foram realizadas, contudo, até o presente momento nenhuma estrutura correspondente a um estado de transição foi obtida. A transferência de próton assistida pelo solvente poderia diminuir consideravelmente a barreira de ativação do processo, uma vez que o estado de transição não precisaria envolver um anel de quatro membros que de certa forma contribui para desestabilizar a estrutura do estado de transição. Por esse motivo, não podemos desconsiderar a possibilidade de um mecanismo associativo para a quebra hidrolítica do **BDNPP**.

3.1.5. Efeito Isotópico Cinético

O efeito isotópico cinético (KIE) é uma técnica amplamente utilizada na investigação de mecanismos de reação, especialmente aqueles envolvendo a hidrólise de ésteres de fosfato (HENGGE, 2002; ZALATAN et al., 2007). Embora não existam dados experimentais para o KIE envolvendo o mecanismo estudado, foram realizados cálculos para se investigar o KIE com a intenção de fornecer um resultado que possa ser confirmado experimentalmente. O KIE foi calculado através da comparação do cálculo de frequências harmônicas para a espécie substituída isotopicamente e para espécie com o isótopo leve. O KIE foi avaliado apenas para a etapa lenta do **Mecanismo 1** seguindo o segundo caminho reacional (**p2**) através da marcação do oxigênio do nucleófilo (ponte μ -OH), $^{18}\text{O}_{\mu\text{-OH}}$ e o átomo de oxigênio do grupo abandonador $^{18}\text{O}_{\text{DNP}}$, conforme indicado na Figura 3.18.

Figura 3.18: Átomos marcados para a análise do efeito isotópico cinético, $^{18}\text{O}_{\mu\text{-OH}}$ e $^{18}\text{O}_{\text{DNP}}$.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

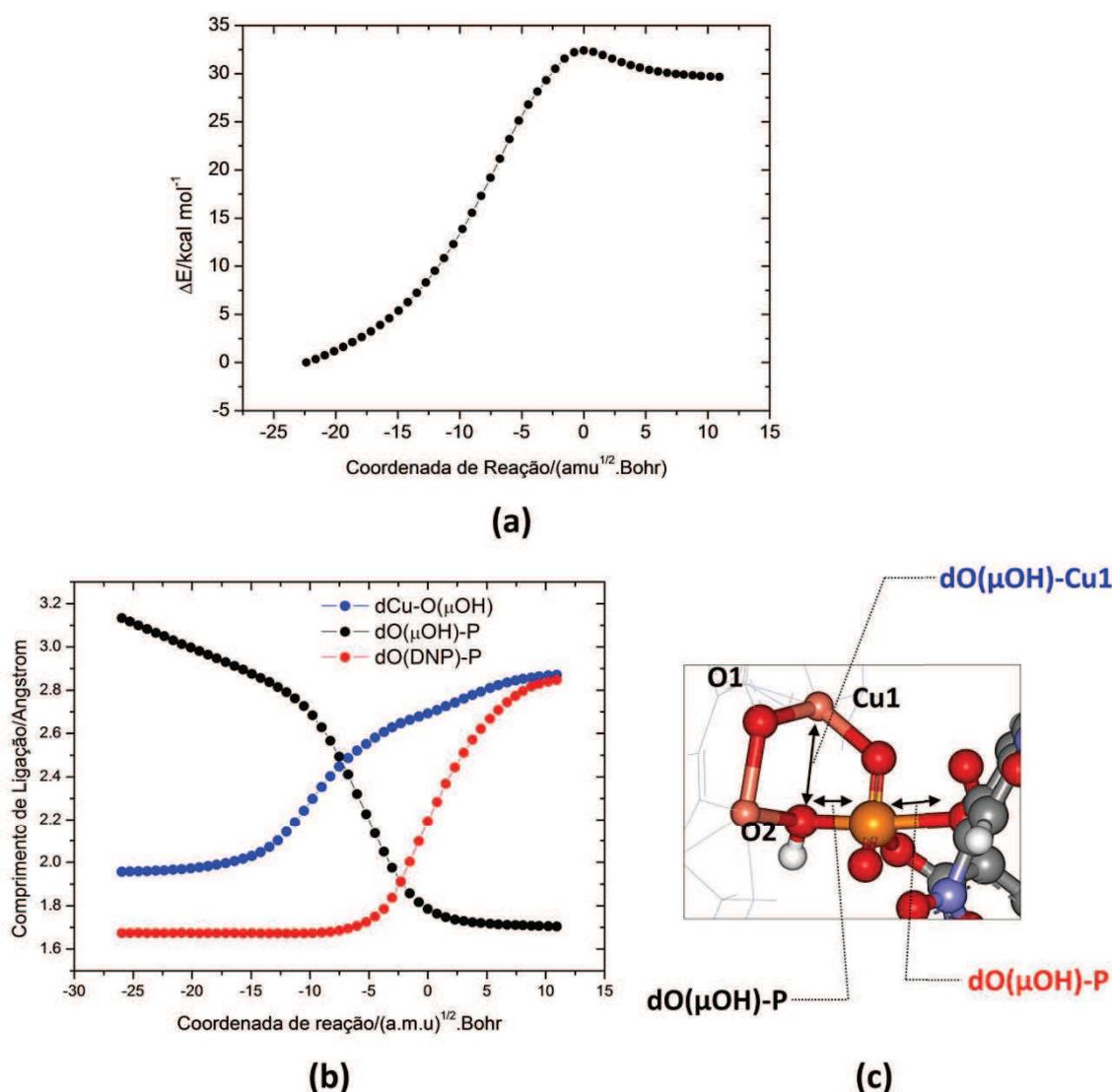
Um KIE normal (maior do que 1) é observado para a substituição isotópica do grupo abandonador, $^{18}k_{\text{DNP}} = 1,0322$, indicando que a ligação entre o átomo de oxigênio do grupo **DNP** e o átomo de fósforo do grupo **BDNPP** se torna mais fraca na formação do estado de transição. A observação deste resultado é condizente com o mecanismo proposto, uma vez que se espera que o átomo de oxigênio do grupo **DNP** rompa sua ligação com o átomo de fósforo. Um KIE inverso é observado para o nucleófilo, cujo valor é $^{18}k_{\mu\text{-OH}} = 0,9894$, indicando que o átomo de oxigênio do nucleófilo estabelece uma ligação mais forte com o átomo de fósforo na espécie **TS1-i** se comparada com a ligação existente na espécie **I1(TS1-i)**. Este resultado também é condizente com o mecanismo proposto, pois como o átomo de oxigênio não está ligado ao fósforo em **I1(TS1-i)**, mas está ligado diretamente ao fósforo em **TS1-i**, é observado um abaixamento significativo na frequência vibracional para a ligação O-P na espécie **TS1-i**, o que não é tão significativo na espécie **I1(TS1-i)**.

3.1.6. Mecanismo Concertado com o ligante torçionado.

Na intenção de cobrir todas as possibilidades para este mecanismo de quebra hidrolítica, foi proposta a estrutura de um estado de transição considerando um mecanismo concertado, porém com o substrato em uma conformação diferente, com o grupo -NO_2 ligado diretamente ao anel benzênico do **BDNPP**. O estado de transição

correspondente a este mecanismo foi apresentado na Figura 3.6b e assinalado como **TS1-i(inv-NO₂)**. Os mesmos procedimentos foram seguidos para a espécie **TS1-i(inv-NO₂)**, isto é, os cálculos de IRC foram efetuados com a estrutura otimizada do **TS1-i(inv-NO₂)** com a intenção de se obter os intermediários de reação **I1(TS1-i(inv-NO₂))** e **I2(TS1-i(inv-NO₂))**.

Figura 3.19: (a) Variação da energia eletrônica ao longo da coordenada de reação (IRC) (b) Variação do comprimento das principais ligações ao longo da coordenada de reação. (c) destaque dos comprimentos de ligação avaliados no processo na estrutura do **TS1-i(inv-NO₂)**.



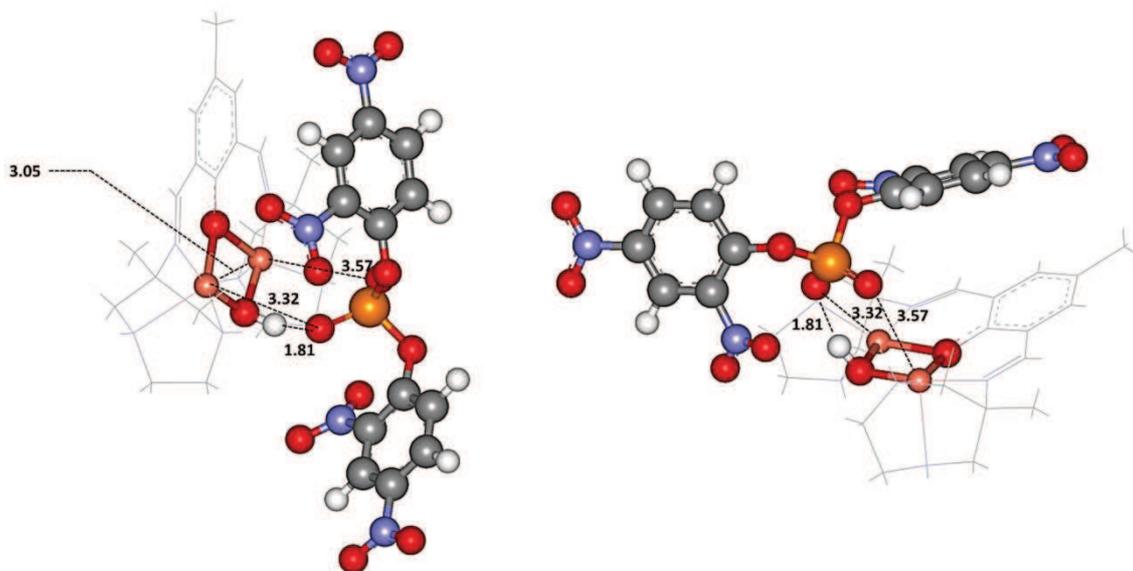
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A Figura 3.19b mostra a análise da variação dos principais comprimentos de ligação ao longo da coordenada de reação. Os resultados revelam um mecanismo muito

similar àquele observado para o **TS1-i**, ou seja, o oxigênio da ponte μ -OH se aproxima do átomo de fósforo ao mesmo tempo em que se afasta do átomo de cobre assinalado como Cu1 na Figura 3.19c, enquanto que a ligação entre o oxigênio do grupo **DNP** e o átomo de fósforo praticamente não se altera até as proximidades do ponto onde se forma o estado de transição. Na estrutura do estado de transição, os comprimentos de ligação são 1,785Å para a ligação dO(μ -OH)-P, 2,193Å para a ligação dP-O(DNP) e 2,693Å para a ligação dO(μ -OH)-Cu1. A ligação entre o fósforo e o oxigênio do grupo **DNP** é ligeiramente maior na estrutura do **TS1-i(inv-NO₂)** se comparada com a estrutura do **TS1-i** indicando a ocorrência de um estado de transição ligeiramente mais relaxado.

Cada extremidade do IRC foi otimizada para a obtenção dos intermediários de reação. O intermediário **I1(TS1-i(inv-NO₂))**, embora apresente um modo de interação diferente do intermediário **I1(TS1-i)**, apresenta uma estabilidade ligeiramente maior.

Figura 3.20: Estrutura do intermediário **I1(TS1-i(inv-NO₂))** em duas perspectivas.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

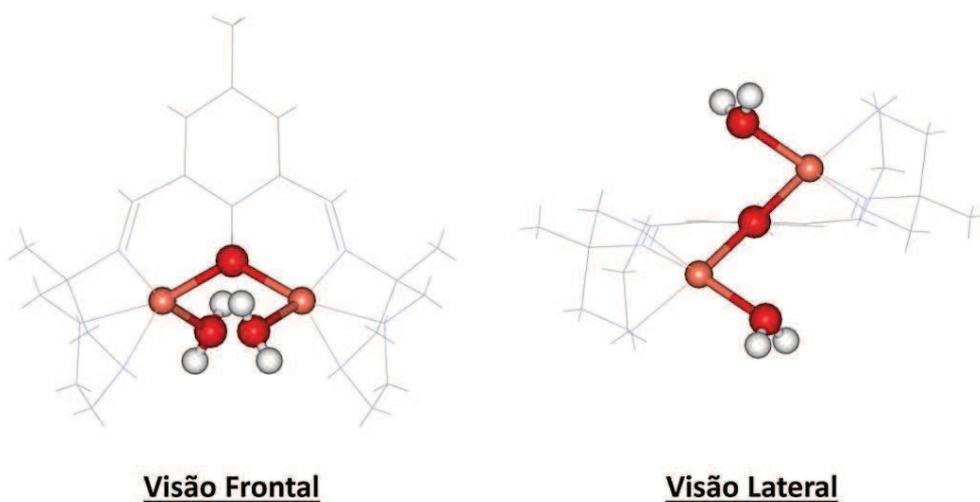
As análises energéticas em fase gás para esta etapa do processo revelam que o mecanismo concertado passando pelo estado de transição **TS1-i(inv-NO₂)** possui uma barreira de ativação igual a 47,8 kcal mol⁻¹ em fase gás. Devido ao elevado valor da barreira, o mecanismo não foi estudado em maiores detalhes e somente o mecanismo concertado, passando pela estrutura da espécie **TS1-i** foi assumido como sendo provável.

3.2. ANÁLISE DO EFEITO DO SOLVENTE NA ESTRUTURA E REATIVIDADE DE COMPLEXOS DE COBRE ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE MODELOS EXPLÍCITOS DO SOLVENTE.

A inclusão de moléculas de solvente de maneira explícita, embora aumente o realismo do sistema deve ser feita de maneira cuidadosa, pois um líquido pode existir em um número muito grande de configurações estáveis o que tornaria o cálculo com moléculas explícitas impossível, caso tentássemos encontrar todas as configurações possíveis apenas mudando o input de otimização. O método de Monte Carlo, discutido na Seção 2.5.2 no Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos, apresenta uma maneira elegante de se lidar com o problema de múltiplas configurações através de um procedimento que combina argumentos da mecânica estatística com as técnicas do método de Monte Carlo para resolução de integrais.

Ao longo deste trabalho, o método de Monte Carlo foi aplicado no estudo da solvatação da espécie **I5(p1)/I4(p2)** na ausência dos íons **DNP** e **DNPP** obtidas no **Mecanismo 1**. A estrutura otimizada no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ para a espécie **I5(p1)/I4(p2)** é mostrada na Figura 3.21.

Figura 3.21: Estrutura otimizada para a espécie **I5(p1)/I4(p2)** na ausência dos íons **DNP** e **DNPP** em duas perspectivas.



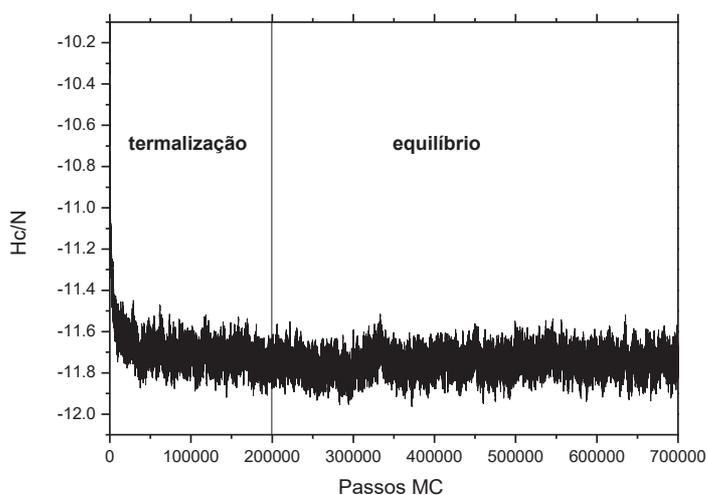
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

As simulações para a estrutura do solvente foram efetuadas com o auxílio do programa DICE (COUTINHO; CANUTO, 2003), o qual utiliza o método de Monte Carlo para a geração das configurações do solvente ao redor da molécula do soluto.

Inicialmente, uma caixa cúbica contendo 1000 moléculas do solvente (H_2O) e 1 molécula de soluto foi gerada a uma temperatura fixa de 298,15 K e pressão de 1 atm. A simulação foi conduzida no ensemble isobárico-isotérmico (NPT) no qual a temperatura e a pressão se mantêm constantes, uma vez que a densidade experimental da solução é desconhecida. Neste ensemble o volume da caixa pode-se alterar mantendo a pressão constante de modo que uma variável aleatória associada à variação do volume δV também é gerada a cada passo MC. O número de moléculas de solvente foi previamente afixado como sendo 1000, devido a uma melhor convergência das propriedades estruturais do líquido, no entanto algumas considerações e ajustes em relação a este número ainda podem ser feitas.

A etapa de termalização foi realizada com 200.000 passos MC, enquanto a etapa de simulação teve 500.000 passos MC. A Figura 3.22 apresenta as etapas de termalização e a etapa de médias para a simulação com a espécie **I5(p1)/I4(p2)** correlacionando a entalpia conformacional por molécula com o número de passos de Monte Carlo.

Figura 3.22: Variação da entalpia conformacional por molécula (H_c/N) ao longo da simulação. Termalização (2×10^5 passos MC) e Simulação (5×10^5 passos MC)



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Conforme mostra a Figura 3.22, os 200.000 passos MC para a termalização foram suficientes para colocar o sistema em equilíbrio, pois nota-se uma clara convergência da propriedade (entalpia conformacional por molécula) em função do número de passos MC.

A análise estrutural do solvente pode ser feita através da função de distribuição radial (RDF – do inglês *Radial Distribution Function*), pois a RDF fornece uma ideia de como as moléculas do solvente estão distribuídas ao redor do soluto, uma vez que relaciona a probabilidade de se encontrar um par de átomos a uma distância r , relativa à probabilidade esperada para um sistema no qual somente o solvente encontra-se presente. Na prática, isto é feito através do histograma das distâncias entre dois átomos i e j no intervalo de r a $r + dr$, comparando-o com o histograma das distâncias entre dois átomos do solvente situados em um mesmo intervalo de distância.

$$G_{ij}\left(r + \frac{1}{2} dr\right) = \frac{n_{ij}(r, r + dr)}{n_{id}(r, r + dr)} \quad (3.1)$$

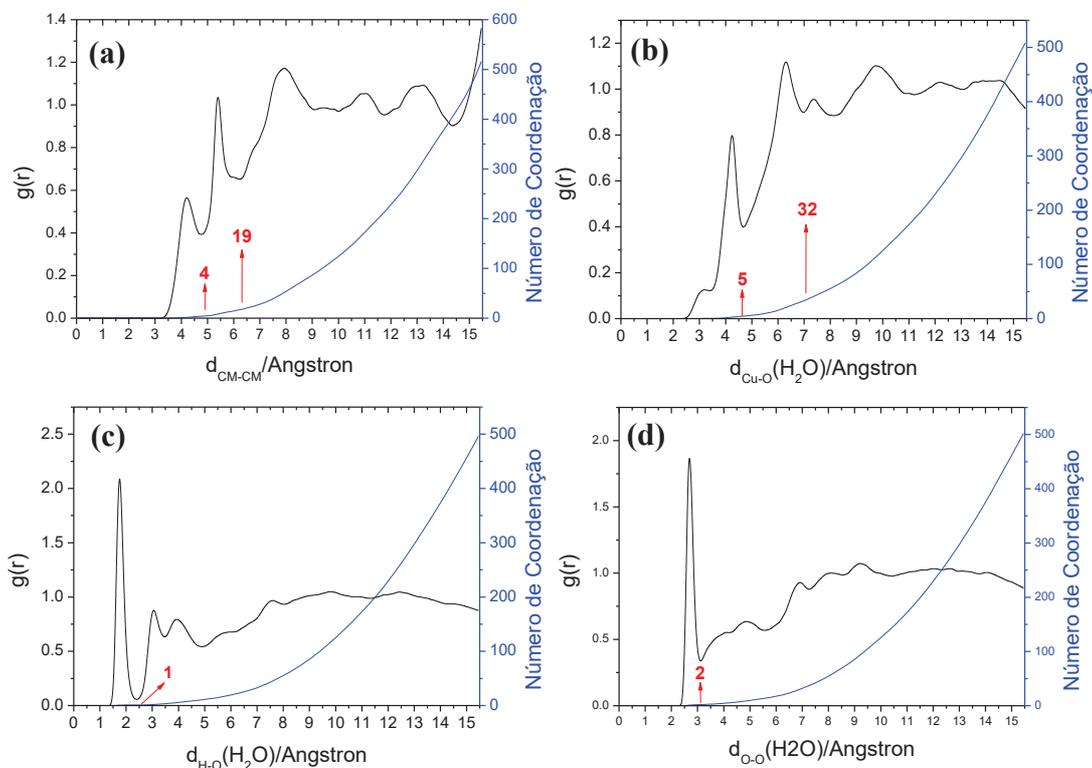
Através da RDF pode-se ter uma ideia das camadas de solvatação do sistema e também do número de moléculas em cada camada, o qual é obtido através da integração da função descrita na equação em uma casca esférica, conforme mostrado na Equação 3.2.

$$N_s(r) = 4\pi \frac{N}{V} \int_0^r G_{ij}(r) r^2 dr \quad (3.2)$$

A integração do primeiro pico da RDF fornece o número de moléculas situado na primeira camada de solvatação e o seu valor é definido como sendo o **Número de Coordenação (NC)**⁹. Na Figura 3.23 são mostradas algumas das RDFs que relacionam alguns átomos da molécula do soluto com átomos da molécula do solvente.

⁹ Aqui o Número de Coordenação é definido como o número de moléculas de água solvatando o sistema. Não deve ser confundido com uma coordenação das moléculas de água a algum dos íons metálicos.

Figura 3.23: Função de distribuição radial **(a)** centro de massa-centro de massa **(b)** cobre-oxigênio(H_2O) **(c)** Hidrogênio da água coordenada ao cobre –oxigênio(H_2O_{solvente}) **(d)** Oxigênio da água coordenada ao cobre-Oxigênio (H_2O_{solvente})



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Analisando as RDFs da Figura 3.23 pode-se perceber que o soluto causa uma influência muito grande na distribuição das camadas de solvatação, tendo em vista que não há convergência estrutural destas camadas em longas distâncias. Em uma simulação eficiente, a $g(r)$ deve convergir para a unidade, isto é, em longas distâncias não deve haver influência do soluto. A não convergência estrutural possivelmente está associada à carga do soluto. Além disto, a forma do soluto pode afetar significativamente o comportamento da RDF, uma vez que existem regiões do soluto que são hidrofóbicas, situadas principalmente na região onde se encontra o ligante, e regiões hidrofílicas onde se encontra o centro metálico.

A RDF entre os centros de massa, Figura 3.23a, revela um pico pouco expressivo na distância de aproximadamente 5,0 Å, o qual está associado a algumas moléculas de água que estão interagindo com as moléculas de água no sítio ativo. A integração do segundo pico fornece de fato a primeira camada de solvatação, a qual os

cálculos indicam conter 19 moléculas de água, conforme destacado em vermelho na Figura 3.23a.

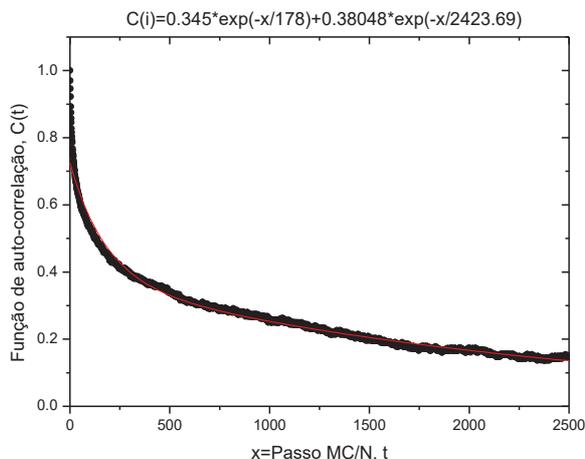
As RDFs ao redor das moléculas de água coordenadas ao cobre na Figura 3.23c e Figura 3.23d revelam, conforme esperado, duas moléculas de água do solvente envolvidas em ligações de hidrogênio com as moléculas de água coordenadas ao metal.

Conforme já discutido na Seção 2.5.2 do Capítulo 2, as propriedades macroscópicas para um determinado sistema são estimadas a partir da análise das médias populacionais para este sistema. No entanto, algumas configurações contribuem pouco para a propriedade média. A análise da função de autocorrelação permite determinar em qual intervalo de configurações teremos configurações estatisticamente descorrelacionadas. O tempo de correlação (τ), aqui entendido como intervalo entre configurações, é definido como sendo a integral da função de autocorrelação sobre todo o intervalo de configurações geradas, conforme mostrado na Equação 3.3, haja vista que na simulação de Monte Carlo não há sucessão temporal das configurações.

$$\tau = \int_0^{\infty} C(t) dt \quad (3.3)$$

Os pontos obtidos para a função de autocorrelação foram ajustados para se obter a expressão matemática que descreve o seu comportamento. O comportamento para a função de autocorrelação, juntamente com a equação exponencial que se ajusta aos pontos são mostrados na Figura 3.24. Detalhes da definição de $C(t)$ podem ser encontrados em (COUTINHO, 2000).

Figura 3.24: Função de autocorrelação para a simulação contendo 1000 moléculas de água e 700 mil passos de MC.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

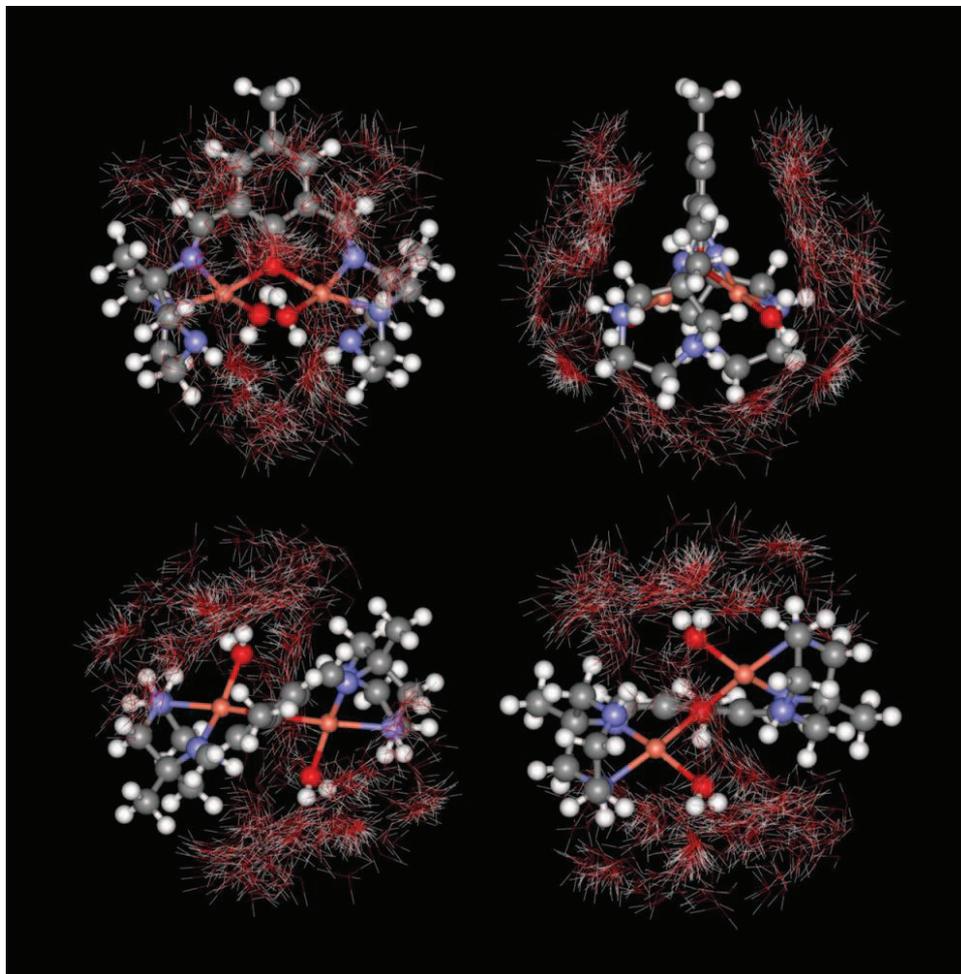
Com base no valor de τ obtido através do ajuste gráfico para a função $C(t)$, foi possível obter as configurações que se encontram estatisticamente descorrelacionadas. Tendo o espaçamento entre estas configurações e observando a RDF na Figura 3.23a, na qual é possível notar 19 moléculas na primeira camada de solvatação, as diferentes configurações para as moléculas do solvente ao redor da molécula do complexo podem ser obtidas. A resolução analítica da Equação 3.3 fornece um valor de τ dado por:

$$\tau = C_1\tau_1 + C_2\tau_2 \quad (3.4)$$

O valor de τ obtido com o auxílio da Equação 3.4 é igual a 983,5. A ineficiência estatística (s) definida como $s \approx 2\tau$ apresenta um valor igual a 1967, indicando que a cada 1967 configurações algumas serão estatisticamente descorrelacionadas.

A Figura 3.25 mostra a sobreposição dessas 50 configurações contendo somente as 19 moléculas de água mais próximas à molécula do soluto selecionadas de acordo com o resultado obtido na RDF da Figura 3.22a. É válido notar que com as moléculas explícitas do solvente alguns fenômenos interessantes podem ser observados, principalmente no que diz respeito à orientação preferencial das moléculas do solvente em sítios onde ocorrem ligações de hidrogênio.

Figura 3.25: Sobreposição das configurações obtidas com as primeiras 19 moléculas ao redor do soluto.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

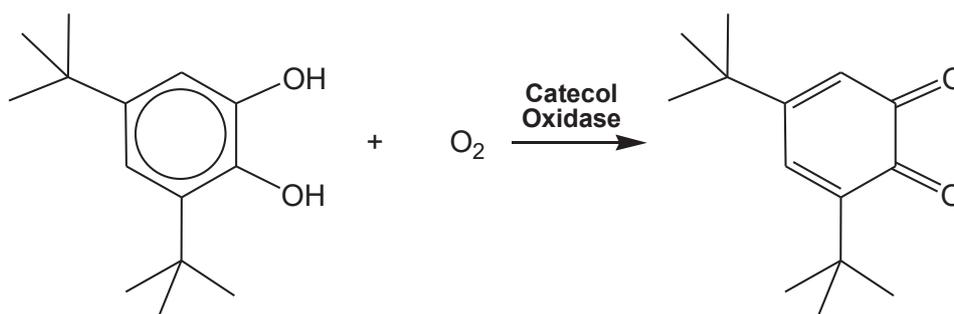
A motivação para se utilizar o método de Monte Carlo nesta tese, estava no estudo da desprotonação do complexo diaquo, conforme descrito na última etapa do mecanismo da Figura 3.4. Duas hipóteses foram pensadas para o processo de desprotonação, a primeira envolveria uma desprotonação intramolecular, na qual uma das moléculas de água coordenada ao complexo, em uma reação de transferência de prótons com a segunda molécula de água promoveria a formação do íon H_3O^+ que seria prontamente repellido das proximidades da estrutura do complexo metálico devido à sua carga positiva. A outra possibilidade consiste em uma protonação de moléculas de água situadas nas vizinhanças, também através de reações de transferência de prótons, que causariam a formação de um grupo -OH. Este mesmo grupo -OH estaria envolvido no

deslocamento da molécula de água remanescente na estrutura do complexo diaquo regenerando assim o catalisador **R1**. Para a desprotonação intramolecular, várias possibilidades de estado de transição foram testadas, no entanto nenhuma delas correspondeu a um estado de transição. Para testar o processo de transferência de prótons envolvendo moléculas de solvente das vizinhanças, era necessário se ter uma boa noção das prováveis posições das moléculas de água ao redor do centro de reação. Embora toda a simulação tenha sido efetuada, não foram obtidos resultados referentes à desprotonação do complexo por moléculas de solvente, sendo ainda necessário definir um modelo adequado para conduzir tais estudos.

3.3. ESTUDOS PRELIMINARES DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO DE CATECÓIS POR UM MODELO BIOMIMÉTICO DA CATECOL OXIDASE.

As catecóis oxidases, discutidas no Capítulo 1, são enzimas envolvidas na oxidação de catecóis às suas respectivas quinonas. Nesta seção apresentaremos algumas das etapas envolvidas no mecanismo de oxidação do 3,5-di-*tert*-butilcatecol (**DTBC**), conforme apresentado na Figura 3.26.

Figura 3.26: Representação esquemática do processo de oxidação da molécula de **DTBC**.



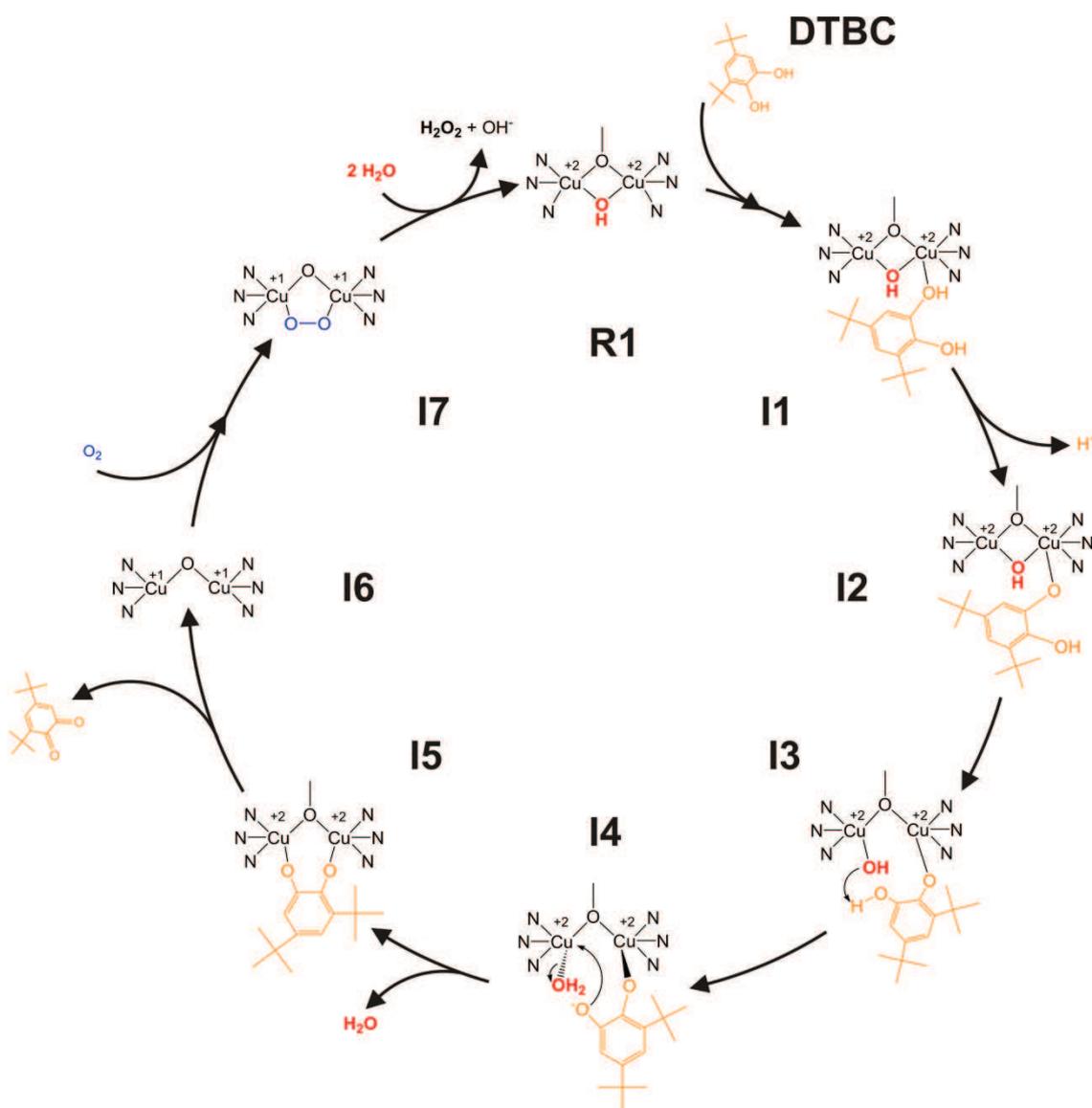
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O complexo **R1** (Figura 3.3), analisado na Seção 3.1, foi originalmente planejado a partir da estrutura das catecóis oxidases, na tentativa de mimetizar a sua atividade catalítica, que envolve a oxidação de catecóis às suas respectivas *o*-quinonas. Na estrutura do complexo **R1**, pode-se notar que os seis átomos de nitrogênio do ligante

mimetizam a coordenação dos seis resíduos de histidina presentes no sítio catalítico das enzimas de cobre do **tipo-3**.

O ciclo catalítico para a oxidação de catecóis é apresentado na Figura 3.27. Este ciclo corresponde a uma adaptação do ciclo originalmente proposto por REY (REY, 2008) e servirá como um guia na elucidação do mecanismo reacional teórico.

Figura 3.27: Ciclo catalítico para a oxidação de catecóis por um modelo mimético da Catecol Oxidase (CO).



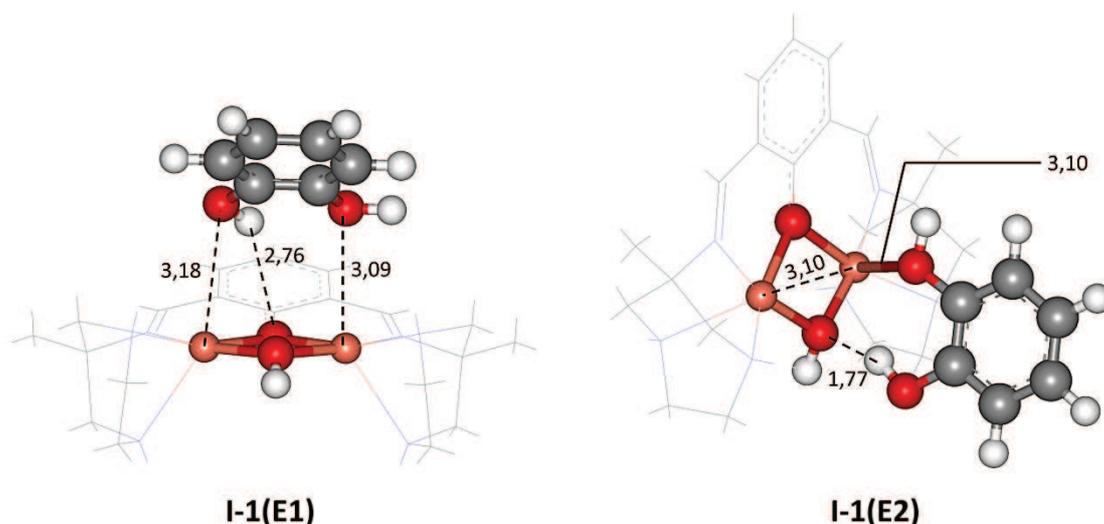
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A única similaridade com o ciclo catalítico da Figura 3.4 (quebra hidrolítica do BDNPP) está no reagente R1. Os processos descritos na Figura 3.27 acima foram

estudados em fase gás e em meio contínuo seguindo as mesmas metodologias utilizadas no mecanismo de quebra hidrolítica do **BDNPP**. Todas as estruturas do ciclo encontram-se otimizadas, no entanto os estados de transição referentes às passagens do intermediário **I3**→**I4**(**TS1**), do intermediário **I4**→**I5**(**TS2**) e do intermediário **I5**→**I6** (**TS3**), ainda não foram obtidos. O terceiro estado de transição representa um desafio adicional haja vista que o processo de passagem de **I5** para **I6** envolve alterações no estado de oxidação do íon metálico e das espécies a ele coordenadas, enquanto que as mudanças estruturais são muito mais sutis.

A primeira etapa do processo envolve a coordenação da molécula de catecol ao complexo dinuclear de cobre(II), para avaliar as possibilidades de coordenação desta molécula os grupos *terc*-butil foram extraídos com a finalidade de simplificar o modelo. Experimentalmente, a escolha pelo substrato **DTBC** se justifica pelo baixo potencial de redução desta molécula, o que facilita a formação da 3,5-*terc*-butilquinona, além do fato de que presença dos grupos *terc*-butil na estrutura do **DTBC** podem impedir reações de oxidação e polimerização indesejáveis. A Figura 3.28 mostra as duas possibilidades para a coordenação da molécula de catecol (sem os grupos *terc*-butil) na molécula do complexo dinuclear de cobre (**R1**).

Figura 3.28: Estruturas propostas para o primeiro intermediário de reação **I1**(**E1**) e **I1**(**E2**).

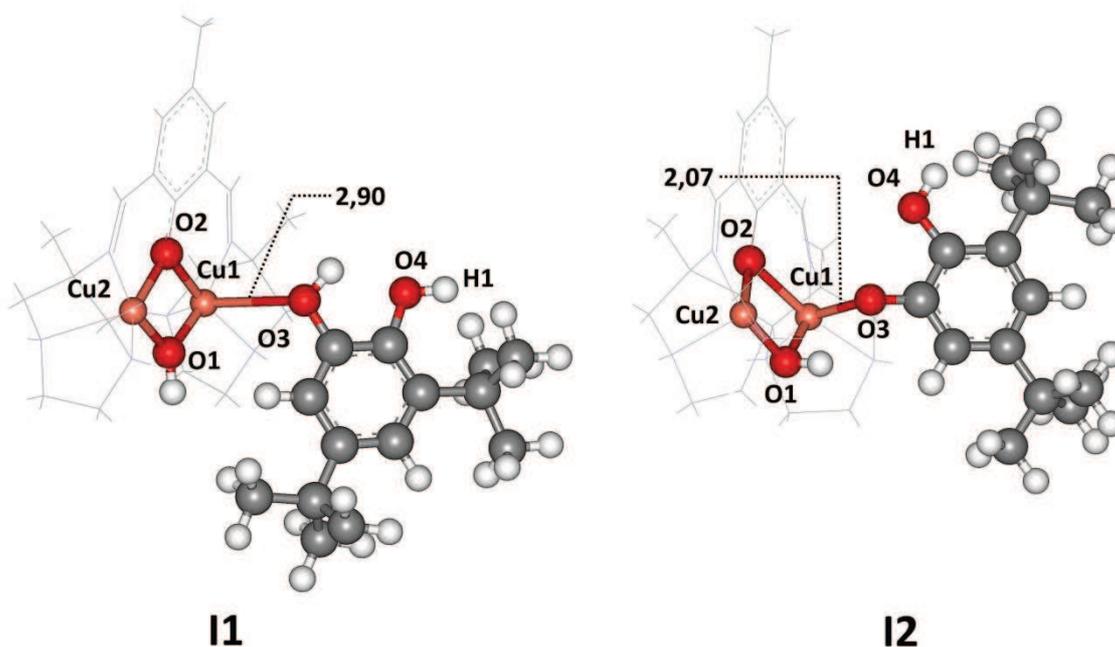


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A estrutura **I1(E1)** envolve uma interação bidentada entre a molécula de catecol e o complexo **R1** enquanto que a estrutura **I1(E2)** envolve uma interação monodentada da catecol com apenas um dos átomos de cobre e a formação de uma interação de hidrogênio entre o grupo hidroxila da molécula de catecol e a ponte μ -OH situada entre os dois íons cobre. A inclusão dos grupos *terc*-butil torna o modo de interação observado na estrutura **I1(E2)** o mais provável, devido ao elevado volume dos grupos *terc*-butil o que tornou impossível a obtenção de uma estrutura similar a estrutura **I1(E1)**.

A estrutura para a espécie **I1**, que envolve o complexo **R1** e a molécula de **DTBC**, é mostrada na Figura 3.29, juntamente com a estrutura do intermediário **I2**, o qual é obtido após a perda do próton pela espécie **I1**.

Figura 3.29: Estruturas otimizadas para os intermediários **I1** e **I2**.



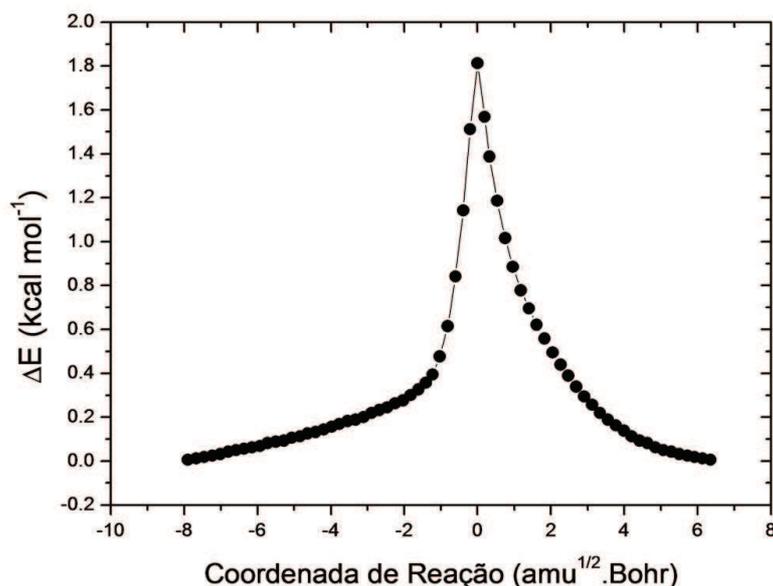
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A perda do próton, na passagem da espécie **I1** para a espécie **I2**, é mediada por moléculas de água situadas na vizinhança, no entanto, tal processo não foi modelado devido a dificuldades em se otimizar um estado de transição envolvendo a transferência de próton entre o hidrogênio do oxigênio **O3** e uma molécula de água da vizinhança.

Ambas as estruturas apresentadas na Figura 3.29 foram otimizadas em fase gás considerando o estado de multiplicidade de spin singlete. Conforme esperado, a molécula de **DTBC** se aproxima do centro metálico após a liberação do primeiro próton.

O processo continua com uma transferência de próton entre o oxigênio **O4** da molécula de substrato e o átomo de oxigênio **O1** situado na ponte μ -OH entre os íons cobre(II). Para que este processo se inicie, a molécula de **DTBC**, diretamente coordenada ao cobre (**Cu1**), conforme apresentado na Figura 3.29, deverá sofrer uma torção para que os átomos de oxigênio **O4** e **O1** estejam alinhados levando à formação do intermediário **I3** (Figura 3.31a). Na Figura 3.31, são mostradas cada uma das estruturas envolvidas nesta etapa. O estado de transição **TS1** (ver Figura 3.31b) foi construído e otimizado assumindo que o processo de transferência de próton envolve os átomos **O1** e **O3**. Após a otimização o estado de transição, **TS1**, foi caracterizado, possuindo uma única frequência imaginária cujo valor é $861,94i \text{ cm}^{-1}$. A geometria otimizada da estrutura **TS1**, foi utilizada nos cálculos de IRC para obter os intermediários de reação **I3** e **I4**. O perfil do IRC conduzido com a estrutura da espécie **TS1** é mostrado na Figura 3.30.

Figura 3.30: Perfil do IRC obtido com a estrutura da espécie **TS1**

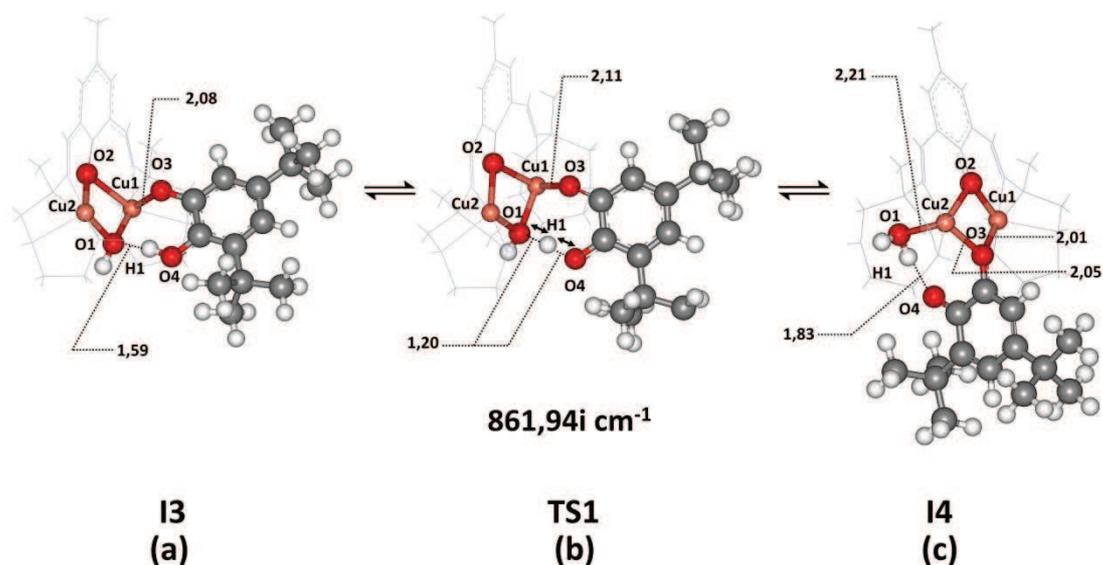


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O IRC apresentado na Figura 3.30 apresenta um perfil pouco usual, uma vez que a curva não apresenta um aspecto suave, com um ponto similar a uma cúspide

exatamente na coordenada de reação correspondente ao **TS1**. As energias eletrônicas obtidas apenas com o IRC mostram que os intermediários estão muito próximos em energia (cerca de 1,9 kcal mol⁻¹). As estruturas obtidas em cada extremidade do IRC foram otimizadas e levaram as estruturas dos intermediários **I3** e **I4** apresentados na Figura 3.31a e 3.31c respectivamente, juntamente com a estrutura otimizada para o **TS1** mostrado na Figura 3.31b.

Figura 3.31: Mecanismo de reação proposto para a etapa de transferência de próton no processo de oxidação da molécula de **DTBC** pelo complexo **R1**, destacando as estruturas otimizadas para os intermediários de reação obtidas através do cálculo de IRC: **(a) I3** e **(c) I4** e a estrutura do estado de transição **(b) TS1** juntamente com a frequência imaginária associada ao modo vibracional correspondente à transferência de próton. Os comprimentos de ligação estão em Angstroms.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

De posse das energias livres de Gibbs obtidas em fase gás para as espécies **I3**, **TS1** e **I4**, foi feito o cálculo da barreira de ativação para o processo. No entanto, estranhamente, a estrutura correspondente ao **TS1** se mostrou 1,97 kcal mol⁻¹ mais estável que a espécie **I3**, conduzindo a uma barreira de ativação negativa. O processo de transferência de próton dentro do modelo utilizado deve ocorrer, essencialmente, sem barreira de ativação. A Tabela 3.5 mostra os valores para as energias livre de Gibbs, a

variação de entalpia e a variação de entropia para as espécies envolvidas nesta primeira etapa do processo.

Tabela 3.5: Variação da Energia livre de Gibbs, de Entalpia e de Entropia para as espécies envolvidas no ciclo catalítico de oxidação do DTBC. Os valores foram calculados em relação ao intermediário de reação **I1**.

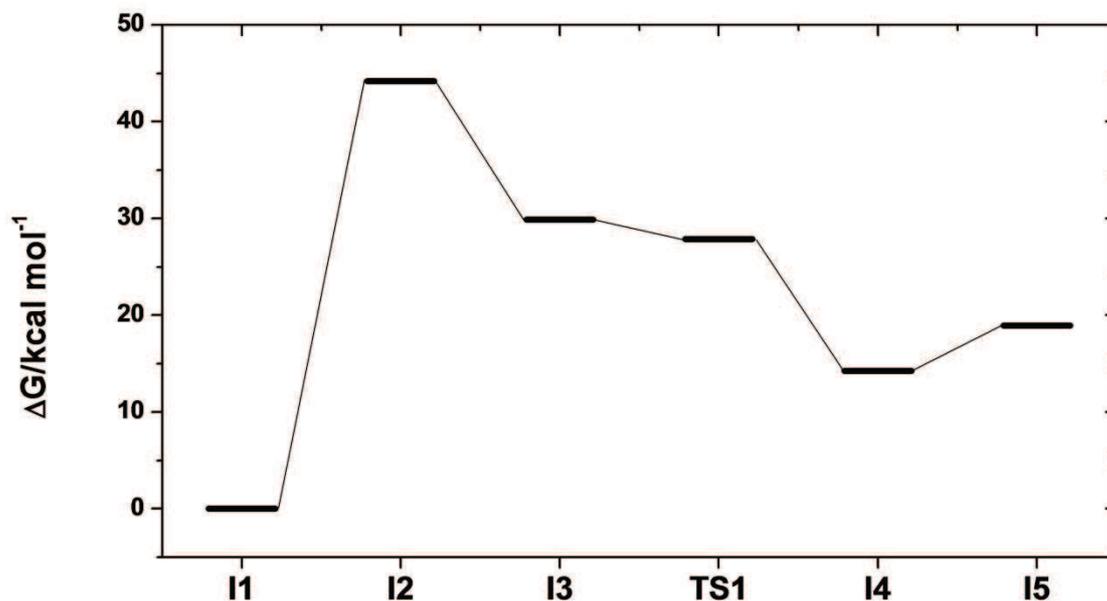
	I1	I2	I3	TS1	I4	I5
$\Delta G_{(gas)}/kcal\ mol^{-1}$	0,00	44,21	29,88	27,90	14,23	18,93
$\Delta H_{(gas)}/kcal\ mol^{-1}$	0,00	43,54	27,41	26,19	11,93	26,64
$\Delta S_{(gas)}/cal\ mol^{-1}\ K^{-1}$	0,00	-2,25	-8,29	-5,75	-7,74	25,87

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A obtenção de barreiras de ativação negativas em cálculos teóricos pode estar associada à obtenção de uma estrutura errada para o estado de transição, ou a erros no modelo escolhido e também aos erros numéricos que todo cálculos teórico está sujeito. Assim como foi sugerido no processo de quebra hidrolítica de ésteres de fosfato, este processo poderia ser estudado através de uma transferência de próton assistida pelo solvente, contudo nenhuma das tentativas de otimização de um estado de transição para esse processo foi bem sucedida. Os principais fatores entrópicos podem estar contribuindo para a obtenção de uma barreira de ativação negativa. Se observarmos as estruturas, as energias livres relativas e as entropias relativas para as espécies **I3** e **TS1** veremos que o processo de transferência de próton ocorre com um aumento de entropia, conforme revelado na análise da Tabela 3.5. A transferência de próton é intramolecular de modo que o estado de transição **TS1** apresenta um grau de liberdade vibracional maior para os átomos que o compõe uma vez que o próton, envolvido na transferência, não se encontra ligado covalentemente a nenhum dos oxigênios, encontrando-se em distâncias intermediárias.

Devido ao fato de nenhuma barreira de ativação ter sido obtida para o processo, nenhuma análise cinética foi realizada para este processo. O perfil energético em fase gás para as espécies envolvidas nesta primeira etapa do mecanismo é mostrado na Figura 3.32.

Figura 3.32: Perfil energético para a primeira etapa do processo de oxidação do DTBC pela espécie R1.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O processo foi estudado considerando que a transferência de elétrons ocorre de maneira acoplada com as reações de desprotonação (**I1** → **I2**) e de transferência de próton (**I3** → **I4**). O estudo do processo de oxidação de catecóis, conforme apresentado aqui, se encontra incompleto, devido ao fato de não termos encontrado um modelo adequado para descrever tais reações, embora alguns aspectos estruturais associados ao processo tenham sido revelados pelos cálculos.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho métodos de mecânica quântica foram utilizados com o objetivo de determinar, em detalhes atômicos, os possíveis mecanismos para a quebra hidrolítica de um fosfodiéster (BDNPP) por um complexo dinuclear de cobre que atua de maneira promíscua.

Dois mecanismos reacionais foram propostos para esta quebra hidrolítica: o Mecanismo 1 que corresponde a um mecanismo concertado, em que ocorre a formação de um estado de transição pentacoordenado e o Mecanismo 2 que corresponde a um mecanismo associativo, passando pela formação de um intermediário pentacoordenado. O Mecanismo 1 apresenta dois possíveis caminhos para a liberação do substrato hidrolisado (DNPP), nomeados como p1 e p2, somando assim, juntamente com o Mecanismo 2, três possíveis caminhos reacionais completos para a quebra hidrolítica do BDNPP.

O caminho reacional p2 do Mecanismo 1 (Mecanismo concertado) mostrou-se como o mais provável dentre as três propostas, uma vez que apresentou a menor barreira de ativação e a melhor concordância com os resultados experimentais. A hidrólise de diésteres de fosfato – em solução e nos sítios ativos das enzimas cujos substratos naturais são fosfodiésteres – ocorre preferencialmente por um mecanismo concertado. Porém, a avaliação das diferentes possibilidades de mecanismo se mostra necessária, pois a estrutura de um complexo metálico não é capaz de mimetizar todas as características de um sistema enzimático, fazendo com que exista a possibilidade de mecanismos diferentes.

O caminho reacional p1, embora tenha apresentado uma barreira de ativação maior que a observada para o caminho p2, pode ser um caminho igualmente provável, pois a etapa limitante, correspondente à transferência de próton, poderia ocorrer por um mecanismo ligeiramente diferente, envolvendo moléculas de solvente em uma transferência de próton assistida, na qual a molécula de solvente é a mediadora da transferência de próton.

O estudo do mecanismo concertado alterando a conformação do ligante (TS1-i(inv-NO₂)) revelou que mais de uma estrutura de partida pode estar envolvida dentro de uma proposta de mecanismo. Contudo os resultados encontrados para a barreira de reação dentro desta proposta, mostram que a inversão do anel aromático do grupo DNP aumenta o valor da barreira. O mecanismo concertado passando pelo TS1-i apresentou

uma barreira de ativação igual a 34,2 kcal mol⁻¹ calculada em fase gás, enquanto que o mesmo mecanismo passando pela estrutura do TS1-i(inv-NO₂) apresentou uma barreira de ativação igual a 47,8 kcal mol⁻¹. O principal fator que justifica as diferenças nas barreiras está na estabilidade dos estados de transição. Além das diferenças conformacionais a estrutura do TS1-i apresenta uma interação de hidrogênio entre o grupo -NO₂ ligado ao DNP e a ponte μ -OH que não está presente na estrutura do TS1-i(inv-NO₂).

Os estudos envolvendo moléculas explícitas de solvente, embora ainda não sejam conclusivos, fornecem algumas ideias acerca dos possíveis sítios de interação entre o complexo metálico e as moléculas de água, podendo contribuir futuramente para uma descrição mais completa do mecanismo de desprotonação destes complexos metálicos.

O estudo do mecanismo de oxidação do DTBC produziu alguns resultados que exigem uma melhor análise, seja do nível de teoria ou do modelo proposto, embora as estruturas sejam coerentes dentro da proposição experimental. A obtenção de barreiras de ativação negativas pode estar associada a ruídos numéricos, inerentes ao próprio método, ou pode ser uma consequência da escolha do modelo para a reação.

Os estudos apresentados aqui objetivaram a descrição completa dos processos catalíticos de quebra hidrolítica de ésteres de fosfato e oxidação de catecóis pelo mesmo complexo metálico, cujo principal diferencial está na descrição do processo como um todo e não apenas a etapa química.

4.1. PERSPECTIVAS FUTURAS

Alguns dos resultados apresentados ao longo desta tese ainda não estão concluídos e, portanto serão analisados em detalhes nos próximos meses.

Elaboração de uma metodologia para análise do processo de desprotonação do complexo diaquo apresentado na Seção 3.2 utilizando o método de Monte Carlo.

Investigar o processo de oxidação do **DTBC** no sítio ativo da catecol oxidase através de correções no modelo adotado ou da proposição de um novo modelo. Propor modelos utilizando moléculas explícitas de solvente adicionadas através do método de Monte Carlo.

Investigar a interação do complexo **R1** com sequências nucleotídicas, através de métodos QM/MM ONIOM, com a intenção de estabelecer as principais interações que justificam a atividade experimental deste complexo na clivagem hidrolítica de moléculas de DNA plasmidial.

4.2. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

4.2.1. Trabalhos apresentados em eventos

Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: A theoretical Study of a Metalloenzyme Model Mechanism

Lucas Fagundes Esteves, Hélio Ferreira dos Santos e Luiz Antônio Sodré Costa XXXVIII Congresso Internacional de Químicos Teóricos de Expressão Latina (QUITEL), 2012, Natal, RN. *Apresentação Oral.*

Estudo Teórico do Mecanismo de Quebra da Ligação de Ésteres de Fosfato Catalisado por um Modelo Biomimético da Catecol Oxidase

Lucas Fagundes Esteves, Hélio Ferreira dos Santos e Luiz Antônio Sodré Costa XXVII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2013, São João Del Rey, MG. *Apresentação Oral.*

Estudo Computacional do Mecanismo de Oxidação de Catecóis Catalisada por um Modelo Mimético da Catecol Oxidase

Thiago Gomes Menzonatto, Lucas Fagundes Esteves e Luiz Antônio Sodré Costa XXVII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2013, São João Del Rey, MG. *Apresentação de Pôster.*

Ab Initio Study of the Oxidation Mechanism of Catechol by a Biomimetic Copper Model for Catechol Oxidase: A Preliminary View.

Nathália Magalhães Paixão, Lucas Fagundes Esteves e Luiz Antônio Sodré Costa XVII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry BMIC, 2014, Araxá, MG. *Apresentação de Pôster.*

Computational Study of Phosphate esters hydrolysis catalyzed by a biomimetic model of a catechol oxidase: Catalytic promiscuity in biomimetic systems

Lucas Fagundes Esteves, Hélio Ferreira dos Santos e Luiz Antônio Sodré Costa

10th Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists WATOC 14, 2014, Santiago, Chile. *Apresentação de Pôster.*

Multiple Pathways in the Hydrolysis of Phosphate Esters Catalysed by a Synthetic Model of Catechol Oxidase - Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems.

Lucas Fagundes Esteves, Hélio Ferreira dos Santos e Luiz Antônio Sodré Costa

XVIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica - SBQT 2015, 2015, Pirenópolis, GO. *Apresenta o de Pôster.*

4.2.2. Artigos aceitos para publica o

4.2.2.1. *Artigo relacionado a esta tese*

A Theoretical Proposal for the Whole Phosphate Diester Hydrolysis Mechanism Promoted by a Catalytic Promiscuous Dinuclear Copper(II) Complex.

Lucas Fagundes Esteves, Hélio Ferreira dos Santos e Luiz Antônio Sodré Costa

Inorganic Chemistry, 2016, 55, 2806-2818.

4.2.2.2. *Artigos não relacionados a esta tese publicados no período.*

Theoretical Study of Inclusion of a Dinuclear Platinum(II) Complex in α , β , and γ -Cyclodextrin

Nathália M. Paixão, Lucas Fagundes Esteves, Cleber P. A. Anconi, Clebio Soareas do Nascimento Jr., Wagner B. De Almeida, Hélio F. Dos Santos e Luiz Antônio Sodré Costa

International Journal of Quantum Chemistry, 2012, 112, 3403-3408.

Investiga o Computacional Sobre a Espectroscopia de Dicro simo Circular Vibracional (VCD) dos Aminoácidos R-alanina e S-alanina

Lucas Fagundes Esteves e Luiz Antônio Sodré Costa

Revista Virtual de Química, 2014, 6(4), 926-936.

The conformation effect of the diamine bridge on the stability of dinuclear platinum(II) complexes and their hydrolysis.

Lucas Fagundes Esteves, Hélio Ferreira dos Santos e Luiz Antônio Sodré Costa.

Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2015, 61, 290-296

4.2.2.3. *Capítulo de Livro não relacionado a tese escrito no período.*

Cisplatina e seus Análogos – uma (re)visão computacional sobre esse poderoso agente antitumoral.

Lucas Fagundes Esteves e Luiz Antônio Sodré Costa.

Capítulo de Livro - em processo de edi o pela Editora da UFJF.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALBERTO, M. E. et al. Atomistic details of the catalytic mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 8, p. 2424–2433, 2010.
- ATKINS, P.; PAULA, J. DE. **Físico-Química - Volume 2**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
- BARONE, V.; COSSI, M.; TOMASI, J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model RID C-7344-2008. **J. Chem. Phys.**, v. 107, n. 8, p. 3210–3221, 1997.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BLOMBERG, M.; BOROWSKI, T.; HIMO, F. Quantum chemical studies of mechanisms for metalloenzymes. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p. 3601–3658, 2014.
- BORN, K. et al. Catecholase activity of dicopper(II)-bispidine complexes: Stabilities and structures of intermediates, kinetics and reaction mechanism. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 36–48, 2007.
- BOUDALIS, A. K. et al. Synthesis and characterization of the tetranuclear iron(III) complex of a new asymmetric multidentate ligand. A structural model for purple acid phosphatases. **Dalton Transactions**, n. 44, p. 5132–5139, 2007.
- BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. The Hydrolysis of Bis (2,4-dinitrophenyl) Phosphate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 767–772, 1969.
- CORNISH-BOWDEN, A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**, v. 1, p. 74–87, 2014.
- COUTINHO, K. Metodo Monte Carlo Aplicado à Simulação de Líquidos 1-Introdução aos Métodos de Simulação. **Livro de Resumos da VII Escola Brasileira de Estrutura Eletrônica**, p. 48–73, 2000.
- COUTINHO, K.; CANUTO, S. **DICE: A Monte Carlo program for molecular liquid simulation, University of São Paulo, Brazil, version 2.9 (2003)**., 2003.
- COX, J. R.; RAMSAY, O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. **Chemical Reviews**, v. 64, n. 4, p. 317–352, 1964.
- COX, R. S. et al. Diesterase Activity and Substrate Binding in Purple Acid Phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 31, p. 9550–9551, 2007.
- CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. 2 Ed. Chichester: Wiley, 2004.

CUFF, M. E. et al. Crystal Structure of a Functional Unit From Octopus Hemocyanin. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, p. 855–870, 1998.

DESBOUIS, D. et al. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, p. 897–937, 2012.

DEVERALL, B. J. Phenolase and Pectic Enzyme Activity in the Chocolate Spot Disease of Beans. **Nature**, v. 189, n. 4761, p. 311, 1961.

DOMINGOS, J. B. et al. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 745–753, 2003.

DUARTE, F. et al. Resolving Apparent Conflicts Between Theoretical and Experimental Models of Phosphate Monoester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 3, p. 1081–1093, 2015.

EYRING, H. The Activated Complex in Chemical Reactions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 3, n. 2, p. 107–115, 1935.

FEKRY, M. I.; GATES, K. S. DNA-catalyzed hydrolysis of DNA phosphodiester. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 10, p. 710–1, 2009.

FERREIRA, D. E. C. et al. Theoretical investigation of the reaction mechanism for the phosphate diester hydrolysis using an asymmetric dinuclear metal complex as a biomimetic model of the purple acid phosphatase enzyme. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, p. 7039–7046, 2008.

FERREIRA, D. E. C. et al. Broken Symmetry Density Functional Study of Biomimetic Models for Purple Acid Phosphatases of the Type Fe (III)–M(II) (M = Fe, Cu, Ni, Co and Mn). **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 979, p. 89–95, 2012.

FLORIÁN, J.; WARSHEL, A. Phosphate Ester Hydrolysis in Aqueous Solution: Associative Versus Dissociative Mechanisms. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 5647, n. 97, p. 719–34, 1998.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09, Revision E.01**. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GAO, H. et al. Dinuclear Zn(II) Complex Catalyzed Phosphodiester Cleavage Proceeds via a Concerted Mechanism: A Density Functional Theory Study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 9, p. 2904–2915, 2011.

GERDEMANN, C.; EICKEN, C.; KREBS, B. The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight Into the Function of Type-3 Copper Proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, p. 183–191, 2002.

GUELL, M.; SIEGBAHN, P. E. M. Theoretical Study of the Catalytic Mechanism of Catechol Oxidase. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 1251–1264, 2007.

HASTINGS, W. K. Monte Carlo Sampling Methods Using Markov Chains and Their Applications. **Biometrika**, v. 57, p. 97–109, 1970.

HENGGE, A. C. Isotope Effects in the Study of Phosphoryl and Sulfuryl Transfer Reactions. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 2, p. 105–112, 2002.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864, 1964.

HOLM, R. H.; KENNEPOHL, P.; SOLOMON, E. I. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2239–2314, 1996.

HOLTZ, K. M.; KANTROWITZ, E. R. The Mechanism of the Alkaline Phosphatase Reaction: Insights from NMR, Crystallography and Site-specific Mutagenesis. **FEBS Letters**, v. 462, p. 7–11, 1999.

HOU, G.; CUI, Q. Stabilization of Different Types of Transition States in a Single Enzyme Active Site: QM/MM Analysis of Enzymes in the Alkaline Phosphatase Superfamily. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 28, p. 10457–10469, 2013.

HRATCHIAN, H. P.; SCHLEGEL, H. B. Accurate Reaction Paths Using a Hessian Based Predictor-Corrector Integrator. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 21, p. 9918–9924, 2004.

HULT, K.; BERGLUND, P. Enzyme Promiscuity: Mechanism and Applications. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 231–8, 2007.

JENCKS, W. P. General Acid-Base Catalysis of Complex Reactions in Water. **Chemical Reviews**, v. 72, n. 6, p. 705–718, 1972.

JONAS, S.; HOLLFELDER, F. Mapping Catalytic Promiscuity in the alkaline Phosphatase Superfamily. **Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 731–742, 2009.

KAMERLIN, S. C. L. et al. Why nature really chose phosphate. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 46, n. 1, p. 1–132, 2013.

KAMERLIN, S. C. L.; FLORIÁN, J.; WARSHEL, A. Associative Versus Dissociative Mechanisms of Phosphate Monoester Hydrolysis: On the Interpretation of Activation Entropies. **ChemPhysChem**, v. 9, n. 12, p. 1767–1773, 2008.

KAMERLIN, S. C. L.; HARANCZYK, M.; WARSHEL, A. Are Mixed Explicit/Implicit Solvation Models Reliable for Studying Phosphate Hydrolysis? A Comparative Study of Continuum, Explicit and Mixed Solvation Models. **ChemPhysChem**, v. 10, n. 7, p. 1125–1134, 2009.

KARLIN, K. D. Metalloenzymes, Structural Motifs, and Inorganic Models. **Science**, v. 261, p. 701–708, 1993.

- KIRBY, A. J.; NOME, F. Fundamentals of Phosphate Transfer. **Accounts of Chemical Research**, n. 48, p. 1806–1814, 2015.
- KLABUNDE, T. et al. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, p. 737–748, 1996.
- KLABUNDE, T. et al. Crystal Structure of a Plant Catechol Oxidase Containing a Dicopper Center. **Nature Structural Biology**, v. 5, p. 1084–1090, 1998.
- KLÄHN, M.; ROSTA, E.; WARSHEL, A. On the Mechanism of Hydrolysis of Phosphate Monoesters Dianions in Solutions and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 47, p. 15310–15323, 2006.
- KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133–A1138, 1965.
- LASSILA, J. K.; ZALATAN, J. G.; HERSCHLAG, D. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 669–702, 2011.
- LEVINE, I. N. **Quantum Chemistry**. 6. ed. New York: Pearson, 2009.
- MENNUCCI, B.; CAMMI, R. **Continuum Solvation Models in Chemical Physics: From Theory to Applications**. Chichester: Wiley, 2007.
- METROPOLIS, N. et al. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. **The Journal of Chemical Physics**, v. 21, p. 1087–1092, 1953.
- MIERTUŠ, S.; SCROCCO, E.; TOMASI, J. Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum. A Direct Utilizaion of Ab Initio Molecular Potentials for the Prevision of Solvent Effects. **Chemical Physics**, v. 55, p. 117–129, 1981.
- MORGON, N.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007.
- MORROW, J. R.; TROGLER, W. C. Hydrolysis of Phosphate Diesters with Copper (II) Catalysts. **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 20, p. 3387–3394, 1988.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. [s.l.: s.n.]. v. 4th editio
- O'BRIEN, P. J.; HERSCHLAG, D. Catalytic Promiscuity and the Evolution of New Enzymatic Activities. **Chemistry and Biology**, v. 6, n. 4, 1999.
- O'FERRALL, R. A. M. Relationships Between E2 and E1cB Mechanisms of β -elimination. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, n. 274, p. 274, 1970.

PRASAD, B. R.; PLOTNIKOV, N. V.; WARSHEL, A. Addressing Open Questions About Phosphate Hydrolysis Pathways by Careful Free Energy Mapping. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 1, p. 153–163, 2013.

PROSS, A. Seeking the Chemical Roots of Darwinism: Bridging Between Chemistry and Biology. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, p. 8374–8381, 2009.

REY, N. A. et al. Catalytic Promiscuity in Biomimetic systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-bridged Complex. **Inorganic chemistry**, v. 46, n. 2, p. 348–50, 22 jan. 2007.

REY, N. A. **Novos Ligantes Binucleantes e seus Complexos Metálicos do tipo CuII–(μ-OH)–Cu II: 1) Modelos Estruturais para o Sítio Ativo das Catecol Oxidases e 2) Análogos Sintéticos com Atividade Redox e/ou Hidrolítica**. 2008. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

REY, N. A. et al. A Promiscuous Dicopper(II) System Promoting the Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate: Gaining Mechanistic Insight by Means of Structural and Spectroscopic DFT Studies. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 110, p. 1432–1442, 2010.

REY, N. A. et al. Doubly Phenoxo–hydroxo-Bridged Dicopper(ii) Complexes: Individual Contributions of the Bridges to Antiferromagnetic Coupling Based on two Related Biomimetic Models for Catechol Oxidases. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 24, p. 7196, 2012.

RIBEIRO, A. J. M.; RAMOS, M. J.; FERNANDES, P. A. Benchmarking of DFT Functionals For the Hydrolysis of Phosphodiester Bonds. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, p. 2281–2292, 2010.

ROSATI, F.; ROELFES, G. Artificial Metalloenzymes. **ChemCatChem**, v. 2, n. 8, p. 916–927, 2010.

SCHENK, G. et al. Purple Acid Phosphatase: A Journey Into The Function and Mechanism of a Colorful Enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 2, p. 473–482, 2013.

SCHRODINGER, E. an Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules. **Die Naturwissenschaften**, v. 28, n. 6, p. 1049–1070, 1926.

SCHROEDER, G. K. et al. The time Required for Water Attack at the Phosphorus Atom of Simple Phosphodiester and of DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 11, p. 4052–4055, 2006.

SIEGBAHN, P. E. M. Mechanisms of Metalloenzymes Studied by Quantum Chemical Methods. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 36, p. 91–145, 2003.

SIEGBAHN, P. E. M. The Performance of Hybrid DFT for Mechanisms Involving Transition Metal Complexes in Enzymes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, p. 695–701, 2006.

SIEGBAHN, P. E. M.; BOROWSKI, T. Modeling Enzymatic Reactions Involving Transition Metals. **Accounts of chemical research**, v. 39, n. 10, p. 729–738, 2006.

SIEGBAHN, P. E. M.; HIMO, F. Recent Developments of the Quantum Chemical Cluster Approach for Modeling Enzyme Reactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 14, p. 643–651, 2009.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2563–2606, 1996.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S. **Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory**. New York: Dover, 1996.

TAINER, J. A. et al. Determination and Analysis of the 2 Å Structure of Copper, Zinc Superoxide Dismutase. **Journal of Molecular Biology**, v. 160, p. 181–217, 1982.

THATCHER, R. J. G.; KLUGER, R. Mechanism and Catalysis of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. **Advances in Physical Organic Chemistry**, v. 25, p. 99–265, 1989.

THEIL, E. C.; RAYMOND, K. N. Transition-metal Storage, Transport, and Biomineralization. **Bionorganic Chemistry**, p. 1–35, 1994.

WESTHEIMER, F. H. Why Nature Chose Phosphates. **Science**, v. 235, p. 1173–1178, 1987.

WILCOX, D. E. Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2435–2458, 1996.

WILLIAMS, N. H. et al. Structure and Nuclease Activity of Simple Dinuclear Metal Complexes: Quantitative Dissection of the Role of Metal Ions. **Accounts of Chemical Research**, v. 32, n. 6, p. 485–493, 1999.

XUE, Y. et al. Crystal Structure of Spinach Plastocyanin at 1.7 Å resolution. **Protein Science**, v. 7, p. 2099–2105, 1998.

ZALATAN, J. G. et al. Kinetic Isotope Effects for Alkaline Phosphatase Reactions: Implications for the Role of Active-site Metal ions in Catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 31, p. 9789–9798, 2007.

ZALATAN, J. G.; FENN, T. D.; HERSCHLAG, D. Comparative Enzymology in the Alkaline Phosphatase Superfamily to Determine the Catalytic Role of an Active-site Metal Ion. **Journal of Molecular Biology**, v. 384, n. 5, p. 1174–89, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE – ARTIGOS PUBLICADOS

Theoretical Proposal for the Whole Phosphate Diester Hydrolysis Mechanism Promoted by a Catalytic Promiscuous Dinuclear Copper(II) Complex

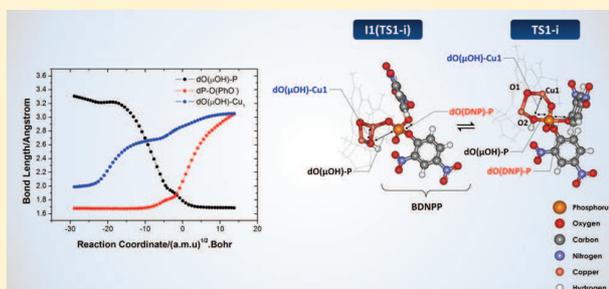
Lucas F. Esteves,[†] Nicolás A. Rey,[‡] Hélio F. Dos Santos,[†] and Luiz Antônio S. Costa^{*,†}

[†]NEQC (Núcleo de Estudos em Química Computacional), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas (ICE), Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário Martelos, 36036-900 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

[‡]Laboratório de Síntese Orgânica e Química de Coordenação Aplicada a Sistemas Biológicos (LABSO-BIO), Departamento de Química, Centro Técnico Científico (CTC), PUC-Rio, 22453-900 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: The catalytic mechanism that involves the cleavage of the phosphate diester model BDNPP (bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate) catalyzed through a dinuclear copper complex is investigated in the current study. The metal complex was originally designed to catalyze catechol oxidation, and it showed an interesting catalytic promiscuity case in biomimetic systems. The current study investigates two different reaction mechanisms through quantum mechanics calculations in the gas phase, and it also includes the solvent effect through PCM (polarizable continuum model) single-point calculations using water as solvent. Two mechanisms are presented in order to fully describe the phosphate diester hydrolysis. Mechanism 1 is of the S_N2 type, which involves the direct attack of the μ -OH bridge between the two copper(II) ions toward the phosphorus center, whereas mechanism 2 is the process in which hydrolysis takes place through proton transfer between the oxygen atom in the bridging hydroxo ligand and the other oxygen atom in the phosphate model. Actually, the present theoretical study shows two possible reaction paths in mechanism 1. Its first reaction path (p1) involves a proton transfer that occurs immediately after the hydrolytic cleavage, so that the proton transfer is the rate-determining step, which is followed by the entry of two water molecules. Its second reaction path (p2) consists of the entry of two water molecules right after the hydrolytic cleavage, but with no proton transfer; thus, hydrolytic cleavage is the rate-limiting step. The most likely catalytic path occurs in mechanism 1, following the second reaction path (p2), since it involves the lowest free energy activation barrier ($\Delta G^\ddagger = 23.7 \text{ kcal mol}^{-1}$, in aqueous solution). A kinetic analysis showed that the experimental k_{obs} value of $1.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ agrees with the calculated value $k_1 = 2.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; the concerted mechanism is kinetically favorable. The KIE (kinetic isotope effect) analysis applied to the second reaction path (p2) in mechanism 1 was also taken into account to assess the changes that take place in TS1-i (transition state of mechanism 1) and to perfectly characterize the mechanism described herein.



1. INTRODUCTION

Phosphate esters are undoubtedly one of the most important groups in biological environments, since they play a central role in several important processes such as intracellular energy transfer and metabolism.¹ Its high stability may be the main reason why nature prefers this group in the structure of key biomolecules,^{2,3} because the hydrolysis rates of phosphate esters in the absence of a catalyst are exceedingly slow. Nonetheless, phosphate ester bonds (P–O) can be hydrolyzed in the presence of some specific catalysts such as purple acid phosphatases (PAPs),^{4,5} which are dinuclear metalloenzymes featuring the presence of a heterovalent active site with a trivalent iron ion and a bivalent metal ion, i.e., Fe^{III}M^{II}, wherein M = Fe, Zn, Mn.^{6,7} The alkaline phosphatases (AP),⁸ which are homodimeric metalloenzymes, contain two tightly bonded Zn^{II} ions and a Mg^{II} ion.⁹ The hydrolysis mechanism of phosphate

esters in the active site of PAPs involves binding of the substrate to the active site and subsequent nucleophilic attack, which is responsible for the phosphate ester bond cleavage.^{7,4} The hydrolysis mechanism of phosphate esters remains a subject of intense research in chemistry and biology due to the multiple possibilities offered by this reaction either in solution or in the active site of some enzymes.^{10,11} The hydrolytic cleavage of phosphate esters in solution may follow three main mechanisms, namely (i) the dissociative mechanism, which involves metaphosphate ion formation, (ii) the associative mechanism, in which the pentavalent stable intermediate is observed, and (iii) the concerted mechanism, in which the

Received: November 12, 2015

Published: March 2, 2016

reaction occurs in a single step and passes through a transition state where the phosphorus is pentacoordinated.^{8,12–14}

The hydrolysis description in the active site of metalloenzymes has been the subject of experimental⁴ and theoretical studies.¹⁵ Theoretical studies on metalloenzyme reaction mechanisms follow two main approaches; the first focuses on active site studies using chemical models of different sizes often extracted from the X-ray structures^{16–18} of specific enzymes, and the second involves modeling the structure and the reactive aspects using the entire enzyme structure by mixing classical and quantum chemical methods (QM/MM approaches).¹⁹

An alternative to study the reaction mechanisms consists of assembling biomimetic models that mimic the active sites of these enzymes. These models are constructed to resemble the structural and/or catalytic action mode of the original enzyme. Nevertheless, at least three characteristics should be considered to build a suitable mimetic model: (i) the metal valence and the intermetallic distance, (ii) the ligand structure and its geometry, and (iii) the presence of labile sites to initiate a catalytic process such as that in the original enzyme. It is possible to picture the most likely mechanism in the active site of the original metalloenzyme through reactivity studies involving complex models.^{20,21}

There are several synthetic models able to hydrolytically cleave the phosphate ester bond.^{22,23} Desbouis et al.¹ presented an excellent review focused on analyzing the structural and mechanistic aspects for Cu(II), Zn(II), and Ni(II) synthetic complexes that hydrolytically cleave the phosphate esters. Ferreira et al.²⁴ recently published a theoretical study about the hydrolysis mechanism of a phosphate diester using a mimetic kidney bean purple acid phosphatase (**kbPAP**) model which had a heterobimetallic center containing Fe(III) and Zn(II) ions with an unsymmetrical ligand. The hydrolytic cleavage occurs through a stepwise mechanism involving an intramolecular proton transfer between the nucleophile and the oxygen in the phosphate group and the pentacoordinate intermediate formation, which is followed by a second intramolecular proton transfer. Such a transfer releases the methanol group initially bonded to the phosphate, and it concludes the phosphate ester hydrolysis. Gao et al.²⁵ reported the hydrolysis mechanism of **HpPNP** (2-hydroxypropyl-4-nitrophenyl phosphate)—which is a substrate model for the RNA backbone—through a dinuclear Zn(II) complex with a symmetric ligand, wherein the hydrolytic cleavage takes place through a concerted mechanism with a free energy barrier of 16.5 kcal mol⁻¹. The transition state to the phosphodiester bond cleavage involves a proton transfer that happens along with the nucleophilic attack of the activated terminal oxygen atom of the 2-hydroxypropyl group in the substrate molecule (**HpPNP**).

The enzymatic systems have evolved to a high substrate specificity; however, some of them can catalyze different chemical reaction classes, as defined in the catalytic promiscuity concept, which challenges the concept that each enzyme is specific for a given substrate.²⁶ A good example of promiscuous catalysis is found in the alkaline phosphatase superfamily.²⁷ The experimental work by Hershlag, which is based on kinetic isotope effects (KIE) and on linear free energy relationships (LFER),^{28–30} alongside the theoretical work by Hou and Cui,³¹ shows that alkaline phosphatase (AP), which has phosphate monoesters as a natural substrate, and the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP), which has phos-

phate diesters as a natural substrate, can catalyze phosphodiester and phosphomonoester hydrolyses without changing the nature of the transition state (loose or tight) related to the solution reactions. Mammalian PAPs, which feature a redox diiron in its active center (Fe^{III}Fe^{II}), are also involved in peroxidation reactions that follow a mechanism based on Haber–Weis–Fenton-type reactions.⁵

One of the first descriptions in the literature of catalytic promiscuity in biomimetic systems was given by Rey et al.³² They described the hydrolytic activity of a dicopper(II) system originally designed to mimic the catalytic activity of catechol oxidases, alongside the model substrate known as bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate (**BDNPP**) and plasmidial DNA. According to their findings, this dinuclear complex catalyzes the catechol oxidation and also the **BDNPP** hydrolytic cleavage, thus characterizing the promiscuous activity, although the copper complexes appear to be involved in the hydrolytic cleavage of the phosphate ester.³³ Figure 1 depicts the L1 ligand structures and the dinuclear copper(II) complex.

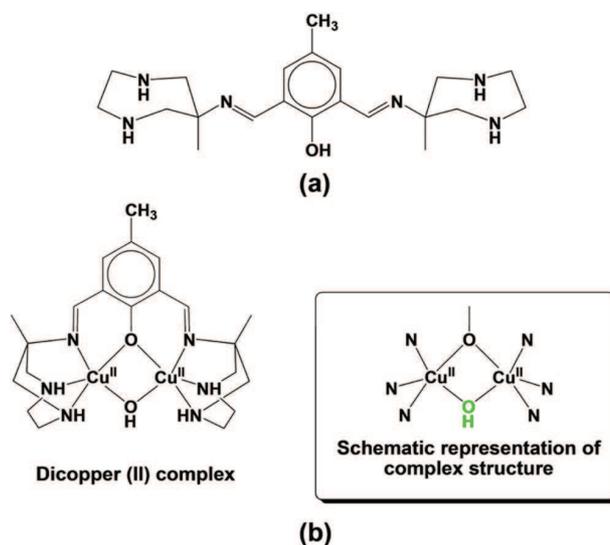
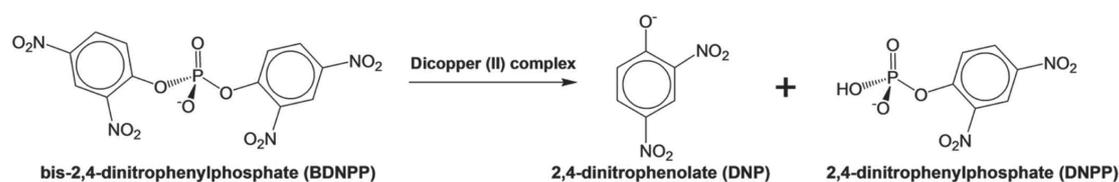


Figure 1. Schematic structures of (a) the free ligand 4-methyl-2,6-bis[(6-methyl-1,4-diazepane)iminomethyl]phenol (**L1**) and (b) the dinuclear copper(II) complex $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$.

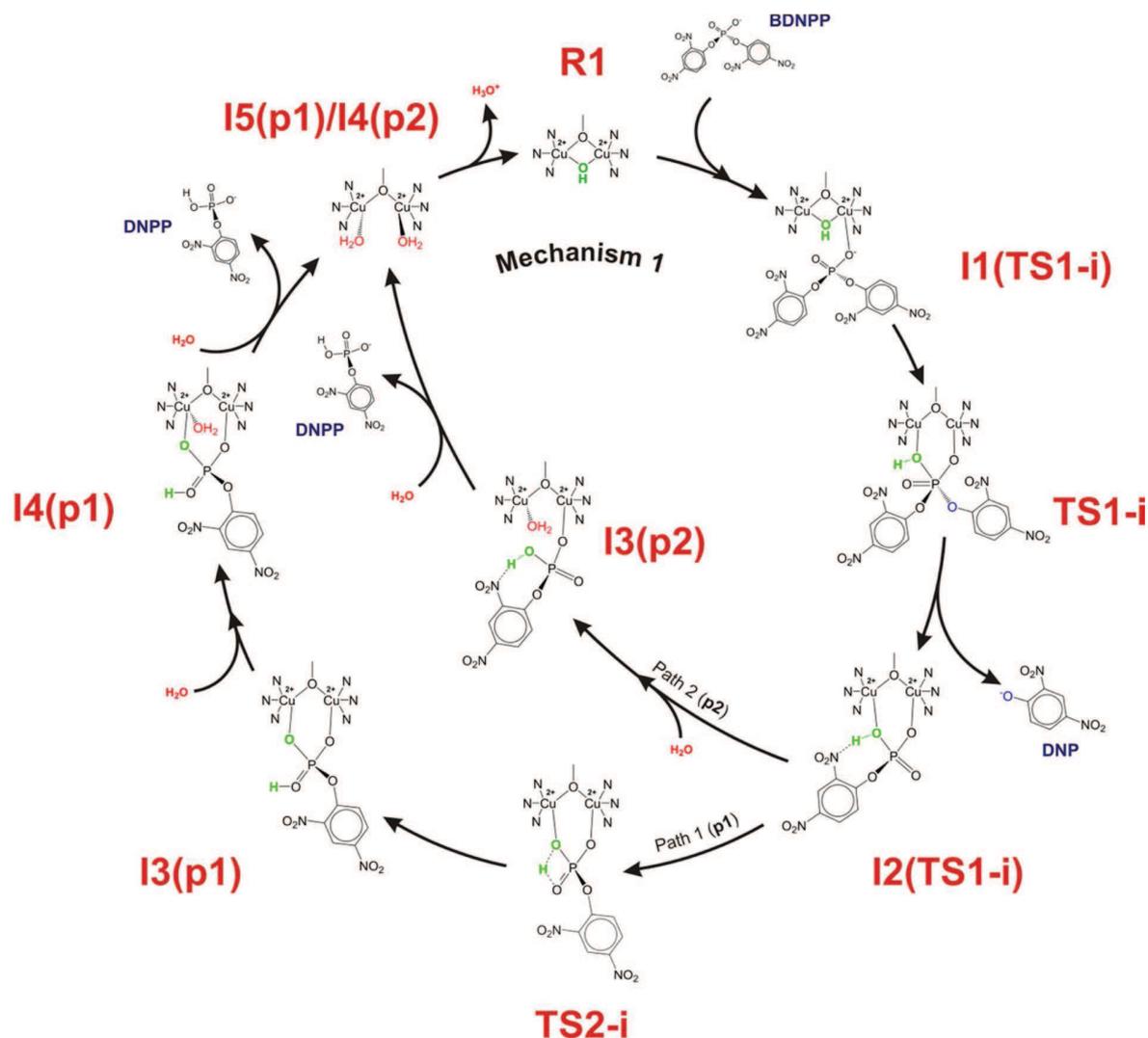
The aim of the current study is to investigate the hydrolysis mechanism of a phosphate ester substrate model, **BDNPP** (see Scheme 1), through the synthetic dinuclear copper(II) complex described by Rey et al.^{32,34} It is not the authors' intention to turn their study into a theoretical benchmark. Thus, there is a full article by Ribeiro and co-workers³⁵ wherein the hydrolysis of phosphodiester bonds has been fully investigated through several DFT functional and basis sets.

The study presented herein is the first attempt to theoretically describe the full mechanism that involves catalytic promiscuity in biomimetic systems at the molecular level through the analysis of all the involved intermediates and transition states throughout the catalytic process. We have described the **BDNPP** coordination mode in the dinuclear copper(II) complex in a previous publication, and it evidenced that the phosphate group works as a monodentate ligand that causes site activation and a possible subsequent nucleophilic attack by the $\mu\text{-OH}$ group between the copper centers.³⁴

Scheme 1. Catalytic Process Representation of the Substrate Molecule Hydrolysis of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate (BDNPP)



Scheme 2. Concerted Mechanism for the Hydrolytic Cleavage of BDNPP Promoted by the Dinuclear Copper(II) Complex, Following Mechanism 1



2. METHODOLOGY

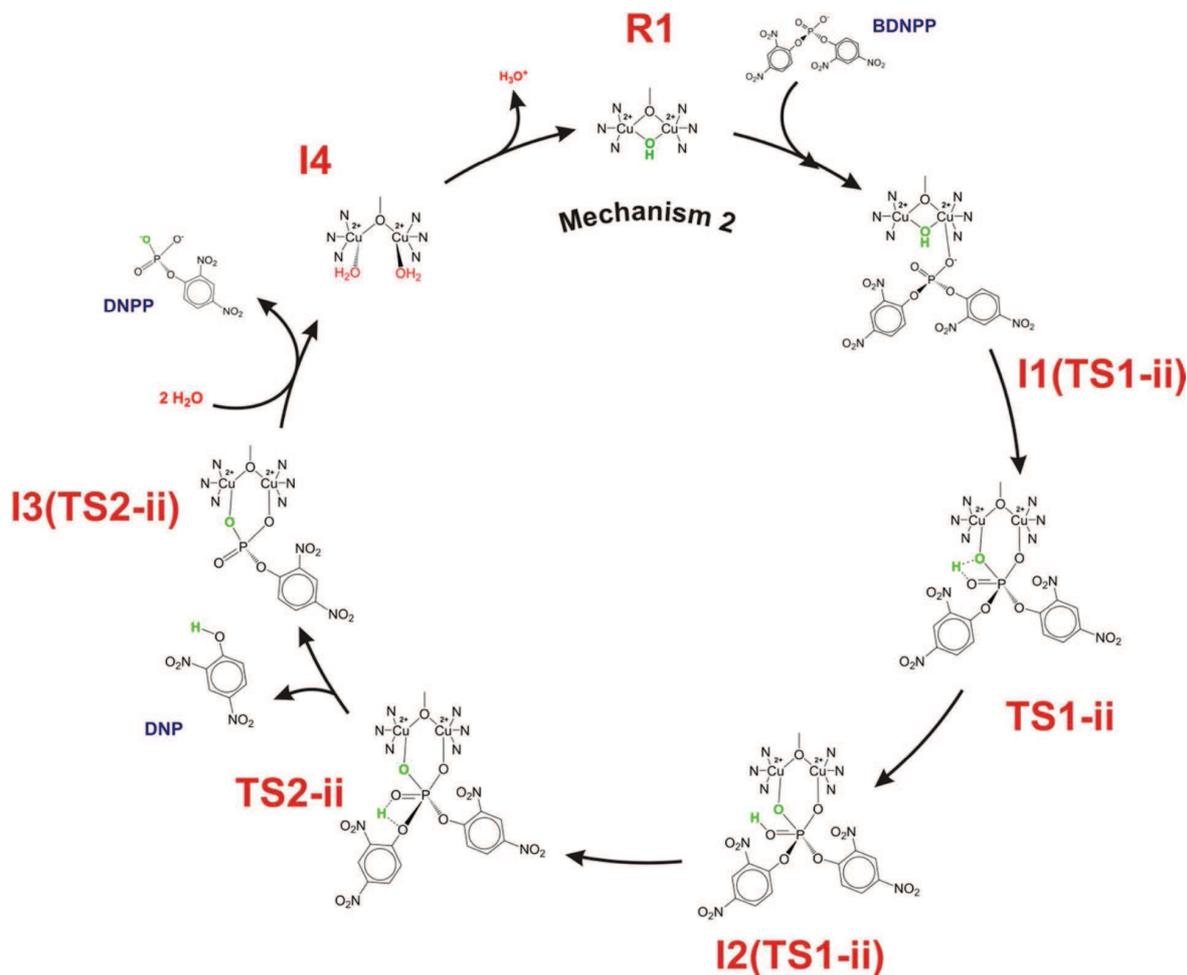
2.1. Theoretical Details. All the calculations presented herein were carried out using the Becke exchange correlation for the three-parameter hybrid functional B3LYP^{36,37} implemented in Gaussian 09.³⁸ Geometry optimization was performed in the gas phase using the split valence basis set 6-31G(d) for all nonmetallic atoms and the nonrelativistic effective core potential (ECP) of Hay and Wadt LANL2DZ for the copper atoms.³⁹

Hessian matrices were calculated for all structures at the same level of theory to find the transition states and to characterize them as saddle points in the potential energy surface (PES), as well as to assess the thermal and entropic contributions from each stationary point in

the reaction path. An intrinsic reaction coordinate (IRC) analysis was performed using the Hratchian and Schlegel algorithm⁴⁰ implemented in Gaussian 09 on the basis of the structures of the transition states in order to generate the minimum points (reactant and product). The stable species obtained from the IRC calculations were then fully optimized and characterized through frequency calculations using the minimum points in the PES (no imaginary vibrational frequencies).

The kinetic properties of the rate-limiting step were determined through the Eyring formalism (eq 1),⁴¹ wherein k is the rate constant, k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature (set to 298.15 K), h is the Planck constant, c_0 is the standard concentration (1 mol L⁻¹), and ΔG^\ddagger is the activation free energy.

Scheme 3. Stepwise Mechanism for the Hydrolytic Cleavage of BDNPP Promoted by the Dinuclear Copper(II) Complex, Following Mechanism 2



$$k = \frac{k_B T}{h c_0} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (1)$$

The solvent effects were just included in the energy calculation, which used the gas-phase optimized geometries and employed the polarizable continuum model (PCM). Thus, the solvent can be represented by a continuum homogeneous medium characterized by its dielectric constant.³⁵ The solute cavity in the solvent was generated by the united atoms for Hartree–Fock (UAHF) cavity, where a sphere is just placed in the heavy atoms, excluding the hydrogen atom. The dielectric constant of the continuum medium was set to 78.39, which is the dielectric constant of water.⁴³ Single-point calculations were conducted through the replacement of the basis set by the better well-balanced basis set 6-31+G(2d,f) for the nonmetal atoms only. The results obtained at the B3LYP/6-31+G(2d,f)/LANL2DZ:UAHF level of theory are displayed in a comparative table (Table S1 in the Supporting Information). All thermodynamic data were obtained at 298.15 K and 1 atm. The ΔG^\ddagger value of the phosphate ester cleavage in the first mechanism has also been assessed at 323.15 K.

Kinetic isotope effects (KIEs) were evaluated for the species involved in the kinetically most probable mechanism, although the KIE experimental data from this process are not available. The isotope effects allow tracking the changes in the bonds of the leaving group and nucleophile in the phosphoryl group;⁴⁴ they also reflect the difference in the bond nature of the labeled atom in the stable and transition states of the rate-determining step. The KIE was calculated through harmonic frequency calculations as implemented in Gaussian

09. Two atoms were labeled in the KIE analysis: the oxygen in the nucleophile ($^{18}k_{\mu\text{-OH}}$; $\mu\text{-OH}$ bridge) and the oxygen in the leaving group ($^{18}k_{\text{DNP}}$).

2.2. Reaction Mechanism. The BDNPP hydrolytic cleavage mechanism through a dinuclear copper(II) complex occurs by more than one pathway. All paths begin from the substrate monodentate coordination to the dicopper(II) center in the R1 species (Schemes 2 and 3). Such coordination promotes the phosphorus atom activation in BDNPP, and the nucleophile ($\mu\text{-OH}$ bridge) becomes more labile to establish the nucleophilic attack. Two different mechanisms are expected from the first intermediate structure (II). The first mechanism (mechanism 1) involves the nucleophilic attack of the $\mu\text{-OH}$ moiety toward the phosphorus atom, and it generates a pentacoordinated transition state (TS1-i) (Scheme 2). On the basis of the proposed mechanism it can be seen that the nucleophilic attack of the $\mu\text{-OH}$ group bridging the two copper(II) ions enables the release of 1 mol of 2,4-DNP/mol of the complex. The DNP production rates (i.e., of BDNPP hydrolysis), do not support additional reactions involving the monoester DNPP due to the weakly nucleophilic power of a $\mu\text{-OH}$ bridge in comparison to a terminal OH.^{5,6}

The second mechanism (mechanism 2) involves the formation of an intermediate species labeled as II(TS1-ii), in which the phosphorus atom is pentacoordinated. The phosphate ester cleavage occurs through two consecutive proton transfer reactions in mechanism 2 (see Scheme 3).



Figure 2. Gas-phase optimized structure at the B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ level for the cationic dinuclear copper(II) complex **R1**. The calculated bond lengths and the experimental X-ray values were extracted from ref 32. The bond lengths are given in angstroms.

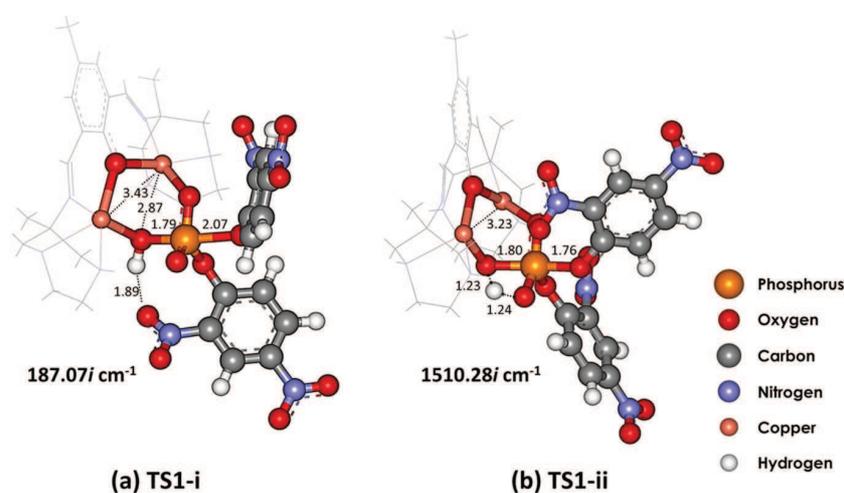


Figure 3. Different possibilities for the first transition state, which involves the hydrolytic cleavage of the phosphate ester. (a) **TS1-i** is the transition state in both the concerted mechanism and the stepwise mechanism. (b) **TS1-ii** is the transition state in an associative mechanism involving phosphorane intermediate formation. The atoms from **BDNPP** and the dicopper active site are depicted as a ball and stick model, whereas the rest of the structure appears as a wire model for clarity.

The catalyst has to be regenerated in all of the possible mechanisms. By following mechanism 1, it can be seen that the catalyst can be regenerated and, thus, it can create two different reaction paths after breaking the phosphate diester bond to form the species **I2**(**TS1-i**). The first path (p1) involves a proton transfer between the oxygen atom in the μ -OH bridge and the terminal oxygen atom in **DNPP**. It is followed by the entry of two water molecules, which are responsible for replacing the substrate in the catalyst active site. The water molecules replace the **DNPP** molecule that heads toward the copper(II) ions, without any proton transfer, in the second path (p2); thus, they promote **DNPP** release from the active site.

Mechanism 2 does not present an S_N2 -like transition state, and the cleavage occurs through proton transfer reactions. The proton is transferred from the μ -OH group to the terminal oxygen atom in the phosphate group through **TS1-ii**, in the first proton transfer process, and it leads to the formation of the reaction intermediate **I2**(**TS1-ii**). The hydrogen is transferred from the terminal oxygen atom in **BDNPP** to the oxygen atom in 2,4-dinitrophenolate (**DNP**), which is axially bonded to the phosphorus through **TS2-ii** in the second proton transfer process. Such a transfer leads to the intermediate **I3**(**TS2-ii**) through the release of one of the two **DNP** groups, concluding the hydrolytic cleavage. The last step in this cycle involves the entry of water molecules to remove the **DNPP** from the dicopper center, as is observed in mechanism 1.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The key feature of the catalytic mechanism is the cationic dinuclear $\text{Cu}^{\text{II}}\cdots\text{Cu}^{\text{II}}$ complex. **Figure 2** presents its optimized structure in the gas phase (**R1**) along with the main bond lengths. This complex is a molecular cation with 2+ net charge. The copper(II) ions are assumed to be antiferromagnetically coupled, so that the structure has singlet multiplicity according to the experimental results.⁴⁵

Structural aspects reveal that the metal complex **R1** is symmetrical but that the three copper–nitrogen bonds (Cu–N) in each copper(II) ion are different. For instance, the Cu1–N1, Cu1–N3, and Cu1–N5 bond lengths are 1.96, 2.44, and 2.08 Å, respectively, and this suggests that the substrate coordination at the up and down faces (see horizontal view in **Figure 2**) could lead to distinct intermediates. However, both structures converged to the same point after optimization. The **R1** complex structure was experimentally and theoretically described, and the optimized structure agreed with the experimental structure previously determined by X-ray diffraction.³⁴

The precoordination of the model substrate **BDNPP** to one of the copper ions in the dinuclear complex is the first step of

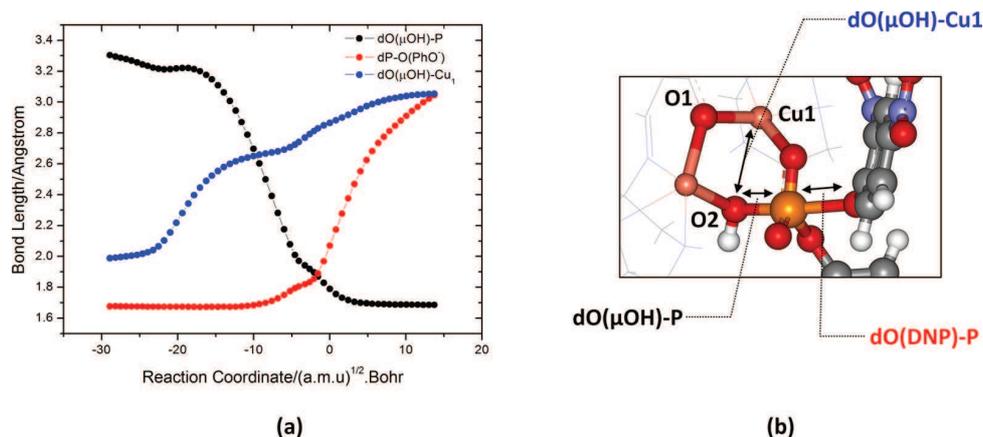


Figure 4. (a) Main bond length variation along the IRC coordinate. (b) TS1-i structure, emphasizing the evaluated bond lengths.

the reactive process. This precoordination process was previously described in the gas-phase studies by Rey et al.,³⁴ who mixed spectroscopy data and DFT calculations from the R1 and I1 species. Their findings showed that the BDNPP molecule establishes a monodentate coordination and forms a single bond between the oxygen in the phosphate diester model and one of the copper centers. The phosphorus atom becomes more susceptible to the nucleophilic attack by the μ -OH moiety after such coordination.

The formation of the intermediate I1(TS1-i) from R1 and BDNPP species is highly exergonic, and it presents a reaction Gibbs free energy ($\Delta_r G(g)$) of $-362.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ in the gas phase. This is a reasonable value, since both the ligand and the complexes are molecular ions that possess opposite charges. The hypothesis considered herein is that two different mechanisms are expected after the I1(TS1-i) formation, as was described in Schemes 2 and 3.

The attack of the μ -OH moiety in mechanism 1 (concerted mechanism) generates a pentacoordinated transition state in the phosphorus atom. Then, the BDNPP cleaves into two parts, namely 2,4-dinitrophenyl phosphate (DNPP) and 2,4-dinitrophenolate (DNP). In mechanism 2 (stepwise mechanism) the reaction occurs through proton transfer between the μ -OH moiety and the oxygen atom in the phosphate group, and it is followed by a second proton transfer between the oxygen in the phosphate group and the oxygen atom in DNP. This last transfer causes the release of the leaving group and promotes the phosphate ester hydrolysis, which is similar to the mechanistic proposal studied by Ferreira et al.²⁴

The μ -OH moiety was aligned to the phosphorus atom and to the oxygen atom in the DNP group in order to assemble the transition states. Figure 3 shows the optimized structures for the obtained transition states.

In the structure of TS1-i, the imaginary vibrational mode involves P–O bond stretching, similar to an S_N2 reaction. A hydrogen bond (1.89 \AA) forms between the oxygen atom in the DNP NO_2 group and the μ -OH moiety, and it could justify the higher TS1-i stability in comparison to that of TS1-ii.

The imaginary vibrational mode of the TS1-ii structure leads to proton transfer from μ -OH, which was formerly bridging the copper(II) ions, to the oxygen in DNP bonded to the phosphorus atom. The hydrolysis is complete after the second proton transfer between the oxygen in the phosphate group and that in DNP.

The optimized structures of these two TSs were used in the IRC calculations in order to connect the I1 and I2 reaction intermediates and to calculate the energy barrier in each process. The results showed that the mechanism presented the lowest energy barrier in the gas phase through TS1-i; thus, it was first evaluated through mechanism 1.

3.1. Mechanism 1: Concerted Mechanism. The TS1-i transition state was obtained and characterized as a first-order saddle point, since it had a single imaginary frequency of $187.07i \text{ cm}^{-1}$. The vibrational mode associated with this frequency is similar to the S_N2 nucleophilic substitution when the μ -OH attacks and DNP leaves the phosphorus atom. The main bond lengths along the IRC coordinate were assessed in order to give a clear picture of the reaction mechanism. The obtained data are shown in Figure 4a, wherein the black dots correspond to the bond between the oxygen in the μ -OH moiety and the phosphorus atom in BDNPP, the red dots correspond to the bond between the oxygen in the DNP group and the phosphorus atom, and finally the blue dots correspond to the bond distance between the μ -OH oxygen and the copper ion to which the BDNPP group is directly coordinated to in the I1 intermediate.

An analysis of Figure 4a shows that the process starts with an increased distance of the μ -OH moiety in the copper(II) ion, wherein the phosphate group is coordinated, and with an approach of the μ -OH group to the phosphate group. The transition state forms after the rearrangement in the structure, and it presents a bond length of 1.788 \AA in the $dO(\mu\text{-OH})\text{-P}$ bond, 2.069 \AA in the $dP\text{-O(DNP)}$ bond and 2.865 \AA in the $dO(\mu\text{-OH})\text{-Cu1}$ bond. After the TS1-i formation, the DNP group is released from the phosphate moiety and reaches the I2(TS1-i) reaction intermediate. The stationary points associated with the I1(TS1-i) and I2(TS1-i) species in mechanism 1 were obtained through optimization of the structures that correspond to the last points in each side of the IRC graph. Table 1 shows some relevant structural data of the obtained I1(TS1-i), TS1-i, and I2(TS1-i) species.

In addition to the main bond lengths, the optimized structures involved in the catalytic step, in which the phosphate ester cleavage occurs, are shown in Figure 5. Only the atoms placed at the reactive site are represented by a ball-and-stick model for purposes of clarity; the other atoms of the molecule are represented by lines.

The first step in mechanism 1 is represented in Figure 5, and it is certainly the most important of the whole catalytic cycle,

Table 1. Relevant Structural Data (Bond Lengths in Å) of the I1(TS1-i), TS1-i, and I2(TS1-i) Species Obtained in the Gas Phase at the B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ Level of Theory

	reactive species		
	I1(TS1-i)	TS1-i	I2(TS1-i)
$r(\text{Cu1}-\text{Cu2})$	3.06	3.43	3.56
$r(\text{Cu1}-\text{O10})$	2.03	2.03	2.08
$r(\text{Cu1}-\text{O2})$	1.92	2.87	3.15
$r(\text{Cu2}-\text{O1})$	2.11	2.15	2.12
$r(\text{Cu2}-\text{O2})$	1.92	2.04	2.12
$r(\text{Cu1}-\text{N1})$	1.95	1.95	1.97
$r(\text{Cu1}-\text{N3})$	2.75	2.51	2.69
$r(\text{Cu1}-\text{N5})$	2.06	2.15	2.15
$r(\text{Cu2}-\text{N2})$	1.97	1.99	1.97
$r(\text{Cu2}-\text{N4})$	2.32	2.46	2.42
$r(\text{Cu2}-\text{N6})$	2.17	2.23	2.25
$r(\text{Cu1}-\text{O3})$	2.47	1.91	2.00
$r(\text{O2}-\text{P1})$	3.70	1.79	1.68
$r(\text{O3}-\text{P1})$	1.49	1.55	1.51
$r(\text{O4}-\text{P1})$	1.68	2.07	4.73

since it involves phosphate ester cleavage. The formation of TS1-i from the I1(TS1-i) intermediate has a free energy barrier (ΔG^\ddagger_1) of +23.7 kcal mol⁻¹ in aqueous solution in the PCM model, and the rate constant (k) calculated according to the Eyring equation (eq 1) is $2.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. The dependence at 323.15 K in frequency calculations showed that the rate constant increased to $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. The observed

experimental rate constant in this step (k_{obs}) is $1.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, measured at pH 6.0 as a function of the concentration of the R1 dicopper(II) complex. The BDNPP concentration was kept constant, $[\text{BDNPP}] = 4.1 \times 10^{-5} \text{ M}$, and the maximum complex concentration (in which it is possible to write a pseudo-first-order rate law) was $[\text{R1}] = 8.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ during the kinetic analysis.³² This experimental value is comparable to the constants reported by Young et al.⁴⁶ for the hydrolytic cleavage of the same BDNPP through two mononuclear copper(II) complexes and agrees well with the values described herein.

The I2(TS1-i) intermediate is the starting point for the second step of the catalytic cycle. The labels in parentheses indicate that this reaction intermediate was obtained from TS1-i. Two possible paths are expected from the I2(TS1-i) structure, as depicted in Scheme 2. The first reaction path (p1) involves a proton transfer from the μ -OH moiety to the oxygen of the phosphate group; it is followed by the coordination of water molecules that promotes the release of the DNPP group. The second reaction path (p2) involves the direct coordination of a water molecule to the metal center, without any proton transfer reactions, as well as promotes the DNPP substrate release to regenerate the catalyst.

The I2(TS1-i) species conversion into the I3(p1) intermediate in the first reaction path (p1) passes by the saddle point (TS2-i) in the reaction coordinate (see Figure 6). TS2-i was assembled on the basis of the assumption that the transition state structure involves a proton transfer, in which the hydrogen atom is transferred from the oxygen atom in the μ -OH moiety to the oxygen atom of the phosphate group.

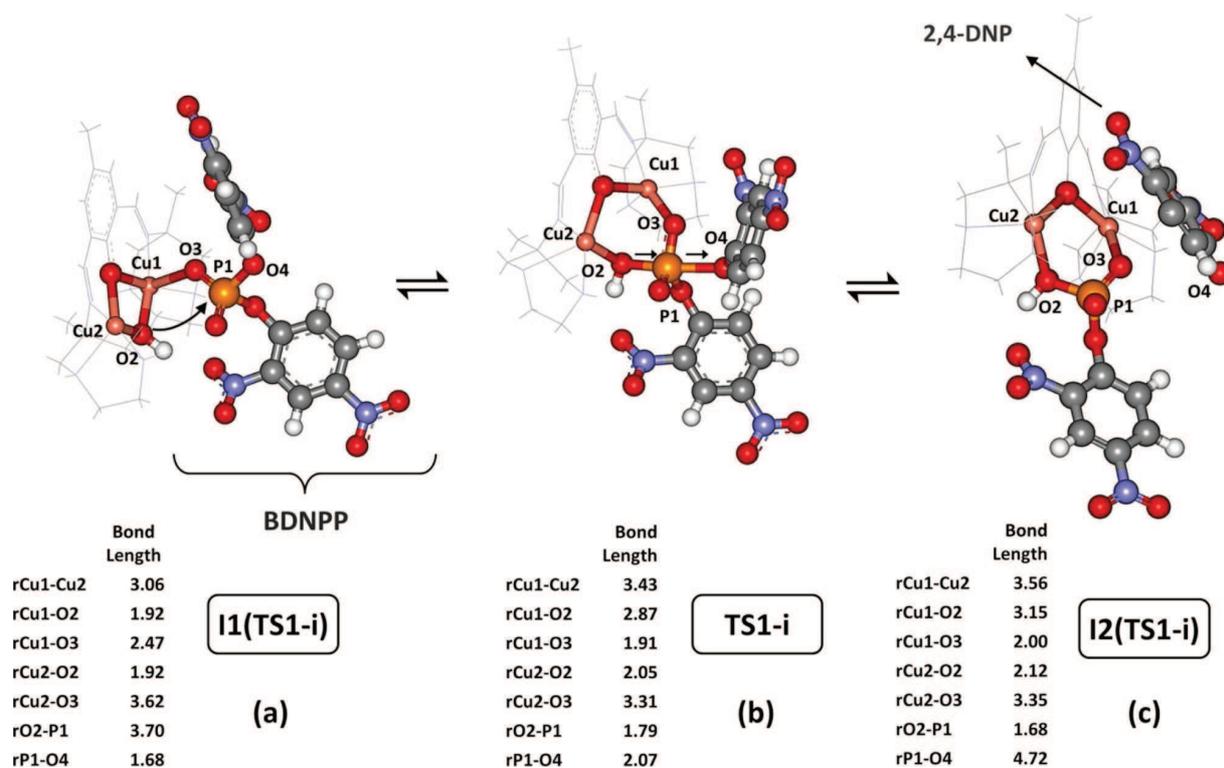


Figure 5. Reaction mechanism proposed for the first step of the phosphate ester hydrolytic cleavage along with the optimized structures obtained from the IRC for the reaction intermediates (a) I1(TS1-i) and (c) I2(TS1-i) and (b) the transition state structure TS1-i. Bond lengths are given in Å.

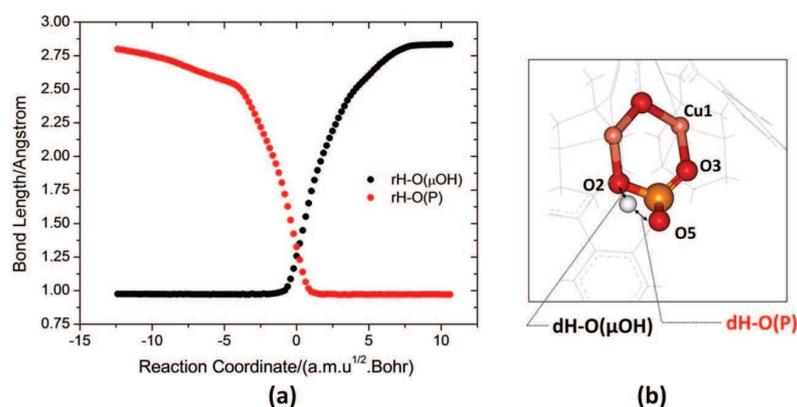


Figure 6. (a) Main bond length variations along the IRC coordinate. (b) TS2-i structure, emphasizing the evaluated bond lengths.

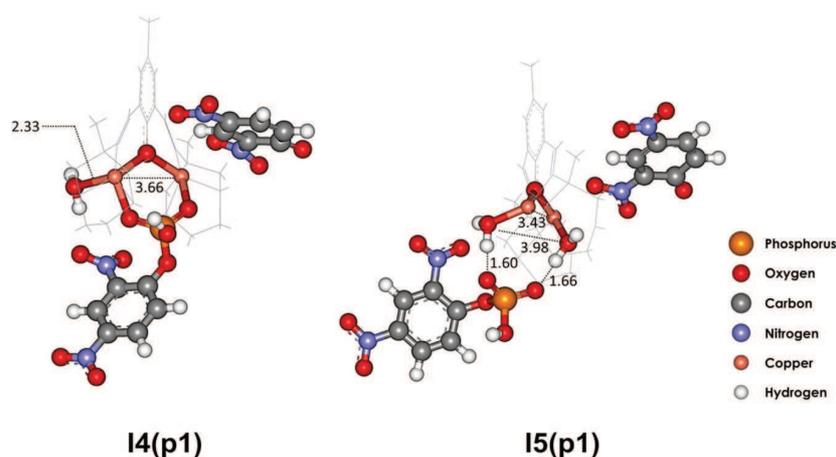


Figure 7. Optimized intermediate structures I4(p1) and I5(p1) in the presence of the DNPP and DNP groups.

Accordingly, the hydrogen atom involved in this process was placed at an intermediate distance from the oxygen atoms in the TS2-i assemble. The obtained TS2-i was characterized as a saddle point with a single imaginary frequency of $1725.92i \text{ cm}^{-1}$. The optimized structure was used to obtain the IRC profile in order to connect the two reaction intermediates, namely I2(TS2-i) and I3(p1), to the transition state TS2-i (see Figure S2 in the Supporting Information), as was done in TS1-i. The I2(TS2-i) intermediate obtained in the second IRC was slightly different from the I2(TS1-i) intermediate obtained from the first IRC; therefore, it was assigned as I2(TS2-i).

The distance between the hydrogen atom and the oxygen in the phosphate group, $r(\text{H}-\text{O}(\text{P}))$, is 2.79 \AA at the beginning of the IRC calculation. However, this value decreases along the reaction coordinate, as the hydrogen, initially placed at the $\mu\text{-OH}$ moiety, approaches the oxygen in the phosphate group (red dots in Figure 6). The process starts when the hydrogen atom in the $\mu\text{-OH}$ moiety heads toward the oxygen atom (O5) in the phosphate group, which causes the bond length $r(\text{H}-\text{O}(\text{P}))$ to decrease before the formation of the TS2-i transition state. The bond lengths are 1.25 \AA for $r(\text{H}-\text{O}(\mu\text{-OH}))$ and 1.33 \AA for $r(\text{H}-\text{O}(\text{P}))$ in TS2-i, and the vibrational mode just involves the stretching of these two bonds. The optimized structure for the last point on the product side of the IRC corresponds to the I3(p1) reaction intermediate, wherein the bond lengths were 0.97 \AA for $r(\text{H}-\text{O}(\text{P}))$ and 2.85 \AA for $r(\text{H}-\text{O}(\mu\text{-OH}))$.

The I2(TS1-i) intermediate was used as a reference to calculate the free energy barrier in the second step (ΔG_2^\ddagger). The calculated free energy barrier in aqueous solution within the PCM model ($\Delta G_2^\ddagger(\text{aq})$) was $25.7 \text{ kcal mol}^{-1}$. This value is higher than $\Delta G_1^\ddagger(\text{aq})$; therefore, it is the rate-limiting step of the catalytic cycle, which follows the first path (p1) and presents a rate constant of $8.98 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (calculated through the Eyring equation).

The next step of the catalytic cycle follows the first reaction path (p1) in mechanism 1 and involves the coordination of water molecules that promotes the release of the phosphate group from the dicopper center. It was not possible to obtain the transition states for the entry of water molecules in this step. The first water molecule coordination forms the I4(p1) intermediate structure, and the second water molecule coordination leads to the I5(p1) intermediate.

The I4(p1) intermediate structure was built on the basis of the I3(p1) structure, and it keeps the DNP group in the active site of the molecule during the optimization process. Four possibilities concerning the entry of the first water molecule were taken into account, two in each of the copper atoms. We present herein the lowest energy structure only (see Figure 7). The water molecule is directly coordinated to the copper(II) ion in this structure, and it presents a bond length of 2.33 \AA . The water molecule coordination stabilizes the system by only $0.41 \text{ kcal mol}^{-1}$ in the PCM model, and no energy barrier was observed in this step.

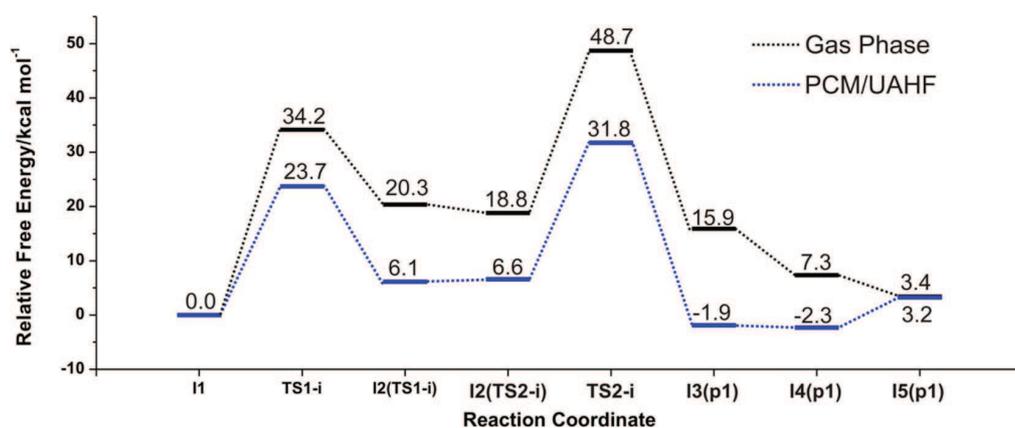


Figure 8. Overall free energy profile along the reaction coordinate for the hydrolytic cleavage of BDNPP. It follows the approaches for the first reaction path (p1) of mechanism 1.

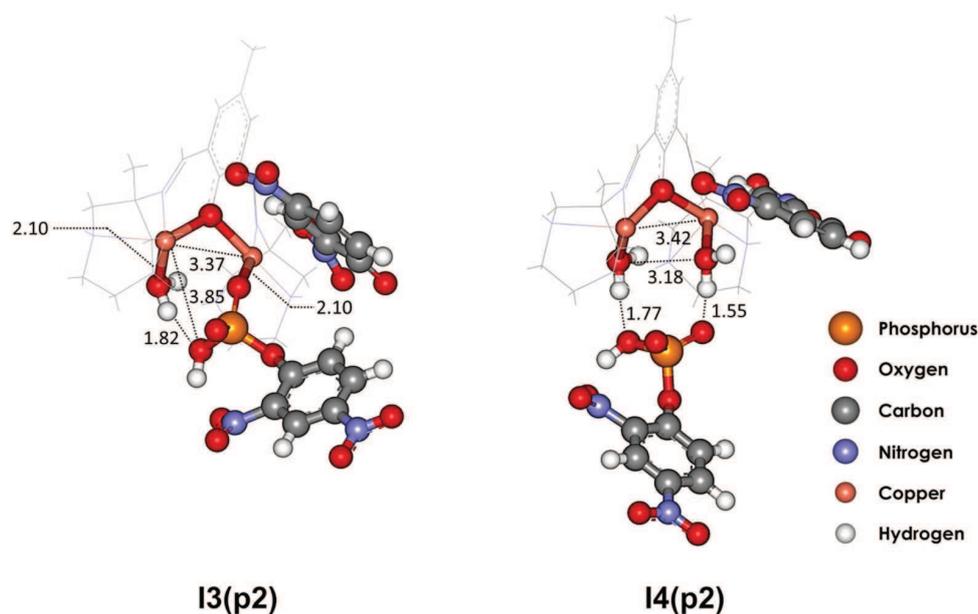


Figure 9. Optimized structures of the intermediates I3(p2) and I4(p2).

The intermediate structure I5(p1) was generated through the addition of the second water molecule to the intermediate structure I4(p1). Accordingly, only one entry position was considered, since the water molecule should enter the other copper atom at the opposite side of the first water molecule (Figure 7). The released phosphate group establishes hydrogen bonds with the water molecules directly coordinated to the copper ions in the intermediate structure I5(p1). The system is destabilized by 5.54 kcal mol⁻¹ in the PCM model, due to the intermediate I4(p1), despite the strong hydrogen bonds that were formed.

The intermediate structure I5(p1) in the absence of DNPP and DNP was optimized, and its structure corresponds to the last point of the catalytic cycle presented in Scheme 2 (Figure S4 in the Supporting Information). This intermediate was optimized according to two multiplicity states, since it could be treated due to the higher spin multiplicity revealed through EPR experiments in similar complexes. However, the optimization does not significantly change the geometry of

the molecular cation but only influences the free energy values in the complex, which is more stable in the triplet state.⁴⁷

One may build the energetic profile of the reaction path with the optimized structures through the application of mechanism 1. Figure 8 shows the free energy of all species in the catalytic cycle related to the I1(TS1-i) intermediate in path 1 of mechanism 1. The black line represents the energy profile obtained in the gas phase, and the blue line represents the energy profile obtained in aqueous solution with the single-point PCM/UAHF corrections for the energy values.

The overall profile represented in Figure 8 shows that the reaction pathway in the gas phase is slightly different from that in the aqueous solution. The relative stability of some species shows a different pattern in the aqueous phase, for example the relative stability of I2(TS1-i) in comparison to that of I2(TS2-i) and that of I3(p1) in comparison to I4(p1). The rate-limiting step is also different when the results in the gas phase and in aqueous solution are compared. The first step is the limiting one in the gas-phase reaction, and the aqueous solution reaction shows that the proton transfer has a higher free energy

barrier; thus, it is the limiting step. Such a result motivated the search for a different reaction path originating from the **I2(TS1-i)** structure.

The second path (p2) involves the coordination of water molecules before the proton transfer reaction; thus, it caused the release of the DNPP group from the metal center. The first water molecule was placed in the **I2(TS1-i)** intermediate structure, close to one of the Cu(II) ions, in order to assemble the reaction intermediates in this second path, and this caused formation of the intermediate **I3(p2)** (Figure 9). The coordination of the first water molecule at the Cu(II) ion opened the ring formed by the phosphate group and the dicopper center. Such a feature was not observed during formation of the intermediate **I4(p1)** in path 1 (see Figure 7). The second water molecule was placed at the second Cu(II) ion after the entry of the first water molecule, and this led to formation of the intermediate **I4(p2)** (Figure 9).

A hydrogen bond formed between the phosphate group and the water molecule directly coordinated to the copper(II) ion in the **I3(p2)** structure. This could be one of the reasons the ring opened when the **I3(p2)** structure was compared to the **I4(p1)** structure, wherein DNPP forms a six-membered ring that involves both copper ions. The hydrogen bond formed in **I3(p2)** is slightly less stable in the aqueous phase than the intermediate structure **I2(TS1-i)**. Nevertheless, the second water molecule involved in **I4(p2)** formation stabilizes the system by 17.9 kcal mol⁻¹ in aqueous solution. The gained stability is justified by the hydrogen bonds formed between the water molecules and the phosphate group from the DNP located close to the bimetallic center, as is shown in Figure 9. One should note that the **I4(p2)** structure (see Figure 9) shares some similarities with the **I5(p1)** structure (see Figure 7), although some differences can be observed in the way the DNPP group interacts with the water molecules directly coordinated to the copper(II) ions. The DNPP group released in **I5(p1)** establishes hydrogen bonds through the terminal oxygen atoms from the phosphate group, whereas the DNPP group establishes hydrogen bonds through a terminal oxygen and a terminal hydroxyl moiety from the phosphate group in **I4(p2)**.

The overall energy profile for the second reaction path (p2) (Figure 10) reveals that the nucleophilic attack of the μ -OH bridge toward the phosphorus atom (first step) is the limiting step in the reaction mechanism. There is no energy barrier in the last steps of the catalytic cycle, except for that in which the first water molecule coordinates to one of the copper(II) ions, a

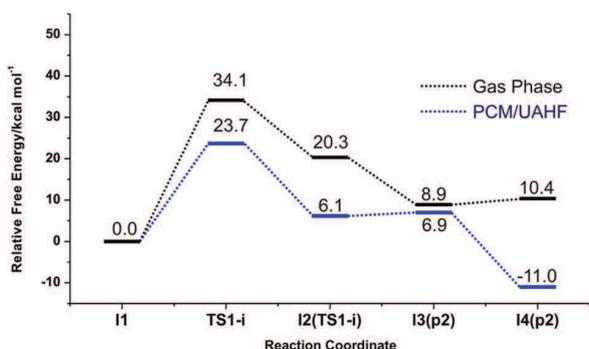


Figure 10. Overall energy profile for the BDNPP hydrolytic cleavage, which follows the second path (p2) of mechanism 1.

fact that increases the energy in the system by 0.8 kcal mol⁻¹. For this reason, the second reaction path (p2) is more feasible than the first path (p1), since it presents the lowest energy barrier values.

The isotope effect on the reaction kinetics was assessed by labeling the oxygen in the nucleophile ¹⁸O _{μ -OH} and the oxygen atom in the leaving group ¹⁸O_{DNP} in the second reaction path (p2) of mechanism 1. A normal KIE (higher than 1) was observed in the leaving group, ¹⁸k_{DNP} = 1.0322, and this indicates that the bond between the oxygen atom in 2,4-DNP and the phosphate group becomes loose as the transitions are formed. With regard to the nucleophile, an inverse KIE is observed; its value is ¹⁸k _{μ -OH} = 0.9894, thus indicating that the nucleophile establishes a stronger bond with the phosphate group in **TS1-i** in comparison to the bond established in the intermediate **I1(TS1-i)**.

3.2. Mechanism 2: Stepwise Mechanism. The other possibility for the phosphate ester hydrolysis involves a proton transfer between the oxygen in the μ -OH group and the phosphate ester, passing through **TS1-ii** (Figure 3b). It causes a pentacoordinate intermediate formation at the phosphorus atom. After the IRC was tracked from the structure of **TS1-ii**, two reaction intermediates were obtained and labeled as **I1(TS1-ii)** and **I2(TS1-ii)**, as is represented in Scheme 3. The optimized structures of the reaction intermediates in the first step of this process are represented in Figure 11.

The intermediate **I1(TS1-ii)** is similar to the reaction intermediate obtained for the concerted process **I1(TS1-i)** described in the previous section (see Figure 5a). However, a hydrogen bond is formed between the oxygen in the phosphate group and the hydroxyl moiety in the **I1(TS1-ii)** structure, whereas in the structure of **I1(TS1-i)** a hydrogen bond is formed between the -NO₂ group from DNP and the hydroxyl moiety. The intermediate **I1(TS1-ii)** was 6.5 kcal mol⁻¹ more stable than the intermediate **I1(TS1-i)** after the solvent effect was included. However, the stepwise mechanism has a free energy barrier of 60.2 kcal mol⁻¹, which was calculated in aqueous medium using **I1(TS1-ii)** and **TS1-ii** as the reactive species. After this process, the intermediate **I2(TS1-ii)** was obtained. Mechanism 2 was not studied in detail due to the high free energy barrier in its first step. The structures associated with the next steps are not presented in the current study.

At this point, it is important to compare our results with those for the synthetic complexes able to hydrolytically cleave phosphate ester bonds. Some of the most recently studied catalysts are shown in Table 2, in which the rate constants for the catalytic process (k_{cat}), the substrate molecule, and the kinetic solvent system can be found.

Two rate constants (k_{cat}) were found in the current study, one for each path in mechanism 1. The lowest value corresponds to the rate constant calculated in path 2 (p2), which was $2.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. This value is 60 times greater than the rate constant of the BDNPP hydrolysis in the absence of the catalyst ($3.88 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, measured at pH 9.0 and at 50 °C).⁵⁶ When the obtained result is compared to the experimental data of similar complexes presented in Table 2, which use the same substrate, it is possible to see that the theoretical mechanism is reasonable, if one takes the sensitivity of the Eyring equation into account. The complexes that use different substrates should have different rate constants due to the different reactivity and steric effects associated with the substrate. One may note that the hydrolytic cleavage

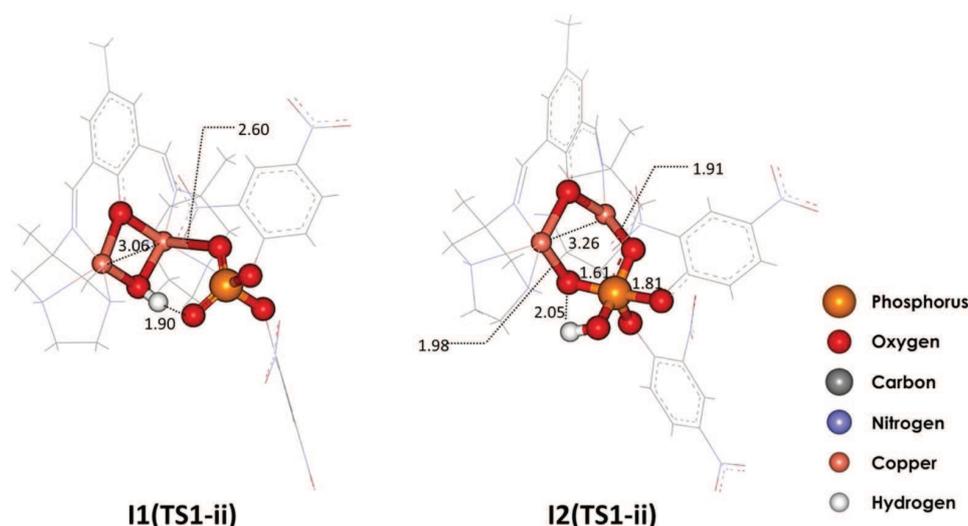


Figure 11. Optimized structures of the reaction intermediates obtained from TS1-ii involved in the first step of hydrolytic cleavage.

Table 2. Synthetic Models That Promote the Hydrolytic Cleavage of the Phosphate Esters

complex	k_{cat} (s^{-1})	ΔG^\ddagger (kcal mol^{-1}) ^a	substrate	kinetic solvent system	ref
$[\text{Cu}_2(\text{L})]^{2+}$ ^b	2.97×10^{-4}	22.3	2,4-BDNPP	aqueous	48
$[\text{Cu}_2(\text{L})]^{2+}$ ^c	5.16×10^{-4}	21.9	2,4-BDNPP	aqueous	48
$[\text{Cu}_2(\text{L})]^{2+}$ ^d	1.80×10^{-4}	22.5	2,4-BDNPP	aqueous	48
$[\text{Co}_2(\text{BrL})(\text{CH}_3\text{COO})_2]^+$ ^e	1.90×10^{-2}	19.8	2,4-BDNPP	aqueous	49
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L})(\text{CH}_3\text{COO})_2]^f$	3.2×10^{-3}	20.9	2,4-BDNPP	water/acetonitrile	50
$[\text{Co}_2(\text{L})]^g$	1.29×10^{-5}	24.1	4-BNPP	water	51
$[\text{Zn}_2(\text{L})_2\text{Cl}_2]^h$	13.06	15.9	4-NPP	DMF/methanol	52
$[\text{Zn}_2\text{L}_2]^i$	11.62	16.0	4-NPP	DMF/water	53
$[\text{Cu}_2(\text{L})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ^j	1.69	17.1	4-NPP	DMSO/water	54
$[\text{Cu}_3(\text{L})(\mu\text{-OAc})]^{2+}$ ^k	9.76×10^{-4}	21.6	2,4-BDNPP	Cu(II)–Cu(II)–Cu(II)	55

^aThe free activation energies were calculated with the Eyring equation (eq 1). ^bL = *N,N,N*-tris(2-pyridylmethyl)-*N*-(2-hydroxy-3,5-di-*tert*-butylbenzyl)-1,3-propanediamin-2-ol. ^cL = *N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)-*N*-(2-hydroxybenzyl)-*N*-(2-hydroxy-3,5-di-*tert*-butylbenzyl)-1,3-propanediamin-2-ol. ^dL = *N*-(2-hydroxybenzyl)-*N,N,N*-tris(2-pyridylmethyl)-1,3-propanediamin-2-ol. ^eL = 2,6-bis{[(2-methoxyethyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino]methyl}-4-methylphenol. ^fL = 2-[[bis(2-methoxyethyl)amino]methyl]-6-[[2-hydroxybenzyl(2-pyridylmethyl)amino]methyl]-4-methylphenol. ^gL = 2,6-bis{[6-(2-pyridylmethylamino)-*b*-cyclodextrin]methyl}-4-methylphenol. ^hL = bis(2-methoxyethyl)aminomethyl]-4-chlorophenol. ⁱL = 2-[[bis(2-methoxyethyl)-aminomethyl]-4-isopropylphenol. ^jL = 2,6-bis[(2-hydroxyethylimino)methyl]-4-methylphenol. ^kL = *N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)(2-hydroxy-3-carbonyl-5-methylbenzyl)-1,3-propanediamine-2-ol.

mechanism depends on the structure of the active site and on the substrate by comparing the obtained results to the available theoretical data about the hydrolytic cleavage of phosphate esters. Moreover, these phosphate esters may follow different paths in this cleavage: either concerted, as was presented by Gao et al.,²⁵ or associative, as studied by Ferreira et al.²⁴

4. CONCLUSION

Quantum mechanical methods have been applied in the present study in order to define the hydrolytic cleavage mechanism of a phosphate ester substrate (BDNPP) by a promiscuous dinuclear copper(II) complex model in atomistic detail. Two different hydrolytic mechanisms were proposed: namely, (i) an associative mechanism (mechanism 2) which passes through a phosphorane intermediate wherein the phosphorus atom in the BDNPP forms a stable pentacoordinated intermediate after a proton transfer between the $\mu\text{-OH}$ moiety and the terminal oxygen of phosphate and (ii) a concerted mechanism that presents a $\text{S}_{\text{N}}2$ -like transition state centered at the phosphorus atom. The associative mechanism presented the highest free energy barrier ($\Delta G^\ddagger_2(\text{aq}) = 60.2 \text{ kcal mol}^{-1}$), which was

possibly related to the four-membered-ring structure generated in the proton transfer process during the transition state formation. From a stereoelectronic point of view, this ring structure is unfavorable. On the other hand, the concerted mechanism (mechanism 1) was the most kinetically probable one, since it presented the lowest free energy barrier $\Delta G^\ddagger_1(\text{aq}) = 23.7 \text{ kcal mol}^{-1}$; therefore, the associative mechanism was not investigated further. The phosphodiester hydrolysis followed a concerted mechanism in the active site of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP), as we have observed in the present study. However, the reaction may follow different mechanisms in the structure of mimetic models due to the lack of specificities that arise from the enzyme structure.

The two different reaction pathways proposed for mechanism 1, p1 and p2, differed during the release of the DNPP group from the metal center. The first reaction pathway (p1) was the least probable, since it presented the highest free energy barrier ($\Delta G^\ddagger_2(\text{aq}) = 25.7 \text{ kcal mol}^{-1}$). The rate-determining step was not associated with the chemical step: i.e., the phosphate ester cleavage. The proton transfer in the

structure TS2-i that followed the first reaction path (p1) gave a four-membered ring (similar to the proton transfer in the structure TS1-ii), and this possibly justifies the higher barrier for the proton transfer step, as was discussed for TS1-ii. The inclusion of water molecules oriented to the reactive center to promote the solvent-assisted proton transfer would be an alternative mechanistic description for this step. It would likely decrease the free energy barrier associated with this step and turn the nucleophilic attack of the hydroxyl moiety in the first reaction pathway (p1) into the rate-determining step.

The second path (p2) involves the DNPP group displacement right before the proton transfer step, but it did not involve an additional free energy barrier; thus, it turned the catalytic step into the rate-determining step, which was the nucleophilic attack of the exogenous μ -OH bridge toward the phosphorus atom. This process presented the lowest free activation energy ($\Delta G^{\ddagger}_1(\text{aq}) = 23.7 \text{ kcal mol}^{-1}$) and represented the most kinetically favorable path with a catalytic rate constant of $2.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Such a value was comparable to the experimental values found in the literature and to the experimental data of the studied complex ($1.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

Finally, it is worth mentioning that elements able to assume multiple oxidation states, such as copper and iron, are highly desirable in the active oxidoreductase site. Although the dicopper(II) complex studied herein was originally designed to mimic catechol oxidase activity, it shared some structural similarities with the active site of some enzymes that cleave phosphate ester bonds such as a bimetallic center and the presence of a hydroxyl group, which somehow justifies the observed phosphodiesterase activity. In fact, this is the same pattern which justifies the bifunctional activity of mammalian PAPs.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.inorgchem.5b02604](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02604).

Intrinsic reaction coordinate (IRC) calculation plots for the studied mechanisms, optimized structure for the last point of the catalytic cycle, the intermediate I5(p1) or I4(p2) in the absence of DNP and DNPP ions, relative Gibbs free energy values for the species involved in mechanism 1, and Cartesian coordinates (xyz) for the optimized structures, along with the charges and the multiplicities (PDF)

A movie showing movement in a calculated structure (AVI)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail for L.A.S.C.: luiz.costa@ufff.edu.br.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work is dedicated to Prof. Ademir Neves, on the occasion of his 65th birthday, who has made substantial experimental contributions to the mechanistic study of biomimetic models of several metalloenzymes, such as PAPs and catechol oxidases. The authors acknowledge the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPEMIG

(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) for financial support and research grants. The current study is a collaboration research project between members of the Rede Mineira de Química (RQ-MG), which is supported by the FAPEMIG (Project: CEX-RED-00010-14).

■ REFERENCES

- (1) Desbouis, D.; Troitsky, I. P.; Belousoff, M. J.; Spiccia, L.; Graham, B. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 897–937.
- (2) Westheimer, F. H. *Science* **1987**, *235*, 1173–1178.
- (3) Kamerlin, S. C. L.; Sharma, P. K.; Prasad, R. B.; Warshel, A. *Q. Rev. Biophys.* **2013**, *46*, 1–132.
- (4) Klubunde, T.; Sträter, N.; Fröhlich, R.; Witzel, H.; Krebs, B. *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 737–748.
- (5) Schenk, G.; Mitić, N.; Hanson, G. R.; Comba, P. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 473–482.
- (6) Wilcox, D. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2435–2458.
- (7) Mitić, N.; Smith, S. J.; Neves, A.; Guddat, L. W.; Gahan, L. R.; Schenk, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3338–3363.
- (8) Kim, E. E.; Wyckoff, H. W. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 449–464.
- (9) Holtz, K. M.; Stec, B.; Kantrowitz, E. R. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8351–8354.
- (10) Kamerlin, S. C. L.; Florián, J.; Warshel, A. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 1767–1773.
- (11) Florián, J.; Warshel, A. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 719–734.
- (12) Kamerlin, S. C. L.; Wilkie, J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2098–2108.
- (13) Duarte, F.; Åqvist, J.; Williams, N. H.; Kamerlin, S. C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1081–1093.
- (14) Prasad, B. R.; Plotnikov, N. V.; Warshel, A. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 153–163.
- (15) Alberto, M. E.; Marino, T.; Ramos, M. J.; Russo, N. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 2424–2433.
- (16) Siegbahn, P. E. M.; Himo, F. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 643–651.
- (17) Siegbahn, P. E. M.; Borowski, T. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 729–738.
- (18) Siegbahn, P. E. M. *Q. Rev. Biophys.* **2003**, *36*, 91–145.
- (19) Senn, H. M.; Thiel, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1198–1229.
- (20) Tolman, W. B.; Spencer, D. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 188–195.
- (21) Holm, R. H.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 347–348.
- (22) Boudalis, A. K.; Aston, R. E.; Smith, S. J.; Mirams, R. E.; Riley, M. J.; Schenk, G.; Blackman, A. G.; Hanton, L. R.; Gahan, L. R. *Dalton Trans.* **2007**, *44*, 5132–5139.
- (23) Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485–493.
- (24) Ferreira, D. E. C.; De Almeida, W. B.; Neves, A.; Rocha, W. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 7039–7046.
- (25) Gao, H.; Ke, Z.; Deyonker, N. J.; Wang, J.; Xu, H.; Mao, Z. W.; Phillips, D. L.; Zhao, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2904–2915.
- (26) O'Brien, P. J.; Herschlag, D. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91–R105.
- (27) Jonas, S.; Hollfelder, F. *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 731–742.
- (28) Zalatan, J. G.; Catrina, I.; Mitchell, R.; Grzyska, P. K.; O'Brien, P. J.; Herschlag, D.; Hengge, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9789–9798.
- (29) Zalatan, J. G.; Herschlag, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1293–1303.
- (30) Lassila, J. K.; Zalatan, J. G.; Herschlag, D. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 669–702.
- (31) Hou, G.; Cui, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10457–10469.
- (32) Rey, N. A.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Pich, C. T.; Terenzi, H. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 348–350.
- (33) Morrow, J. R.; Trogler, W. C. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 3387–3394.
- (34) Rey, N. A.; Neves, A.; De Almeida, W. B.; Dos Santos, H. F.; Costa, L. A. S. *Int. J. Quantum Chem.* **2010**, *110*, 1432–1442.

- (35) Ribeiro, A. J. M.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 2281–2292.
- (36) Becke, A. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (37) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37*, 785–789.
- (38) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, J. D. *Gaussian 09, rev. A.01*; Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
- (39) Wadt, W. R.; Hay, P. J. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284–298.
- (40) Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9918–9924.
- (41) Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107–115.
- (42) Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129.
- (43) Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3210–3221.
- (44) Hengge, A. C. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 105–112.
- (45) Rey, N. A.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Haase, W.; Tomkowicz, Z. *Dalton Transactions* **2012**, *41*, 7196–7200.
- (46) Young, M. J.; Wahnou, D.; Hynes, R. C.; Chin, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9441–9447.
- (47) Torelli, S.; Belle, C.; Gautier-Luneau, I.; Pierre, J. L.; Saint-Aman, E.; Latour, J. M.; Le Pape, L.; Luneau, D. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3526–3536.
- (48) Osório, R. E. H. M. B.; Peralta, R. A.; Bortoluzzi, A. J.; De Almeida, V. R.; Szpoganicz, B.; Fischer, F. L.; Terenzi, H.; Mangrich, A. S.; Mantovani, K. M.; Ferreira, D. E. C.; Rocha, W. R.; Haase, W.; Tomkowicz, Z.; Dos Anjos, A.; Neves, A. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 1569–1589.
- (49) Daumann, L. J.; Comba, P.; Larrabee, J. A.; Schenk, G.; Stranger, R.; Cavigliasso, G.; Gahan, L. R. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 2029–2043.
- (50) Roberts, A. E.; Schenk, G.; Gahan, L. R. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 3076–3086.
- (51) Zhao, M.; Xue, S.; Jiang, X.; Zheng, L.; Ji, L. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2015**, *396*, 346–352.
- (52) Sanyal, R.; Chakraborty, P.; Zangrando, E.; Das, D. *Polyhedron* **2015**, *97*, 55–65.
- (53) Sanyal, R.; Zhang, X.; Kundu, P.; Chattopadhyay, T.; Zhao, C.; Mautner, F. a.; Das, D. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 2315–2324.
- (54) Majumder, I.; Chakraborty, P.; Das, S.; Kara, H.; Chattopadhyay, S. K.; Zangrando, E.; Das, D. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 51290–51301.
- (55) Osório, R. E. H. M. B.; Neves, A.; Camargo, T. P.; Mireski, S. L.; Bortoluzzi, A. J.; Castellano, E. E.; Haase, W.; Tomkowicz, Z. *Inorg. Chim. Acta* **2015**, *435*, 153–158.
- (56) Bunton, C. A.; Farber, S. J. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 767–772.