

José Carlos Gesser, Santiago Yunes, Rosilene M. Clementin e Faruk Nome\*

Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - Trindade - Campus Universitário - 88040-970 - Florianópolis - SC

Recebido em 2/10/96; aceito em 18/6/97

**INTRAMOLECULAR REACTIONS AS NON MIMETIC MODELS OF ENZYME CATALYSIS. This review gives a critical idea on the importance of intramolecular reactions as models for enzymatic catalysis. Intramolecular lactonizations, ester and amide hydrolysis studies result in theories which try to explain the difference between intermolecular, intramolecular and enzyme reactions and rationalize the enhancement promoted by these biological catalyst.**

**Keywords: enzymatic catalysis; intramolecular reactions; nonmimetic enzyme models.**

A grande diferença de velocidade entre reações enzimáticas e não enzimáticas ( $10^{10}$ - $10^{14}$ ) tem despertado o interesse de pesquisadores de diferentes áreas e direcionado seus esforços no sentido da compreensão do mecanismo pelo qual atua uma enzima<sup>1-6</sup>; além disso, a recente descoberta do envolvimento de enzimas proteolíticas na replicação do HIV confere extrema importância ao assunto, pois sendo de interesse biológico, a indústria mundial investe bilhões de dólares anuais no domínio da tecnologia para o uso das próprias enzimas no tratamento de doenças como a AIDS<sup>7</sup>. Por outro lado, a definição da estrutura do complexo enzima-substrato, a especificidade das reações intermediadas por enzimas, a natureza da constante de velocidade para as diversas etapas da reação efetuada por essas biomoléculas e a explicação para a magnitude da constante de velocidade, são limitadas pelas técnicas disponíveis para estes estudos. Por isso, apesar dos inúmeros esforços até agora realizados, nenhuma enzima teve seu mecanismo de ação e as razões intrínsecas do seu poder catalítico, totalmente elucidados<sup>1-6, 8-10</sup>.

Modelos para as reações enzimáticas só puderam ser propostos e estudados a partir de informações sobre natureza da composição do sítio ativo da enzima, obtidas com o advento de técnicas de cristalografia de raio-X<sup>11-13</sup>. Assim, a partir de meados deste século, devido principalmente a limitações técnicas e ao grande número de variáveis impostas pela complexidade das enzimas, pesquisas mecanísticas de reações modelos que simulam a ligação no complexo enzima-substrato, além das transformações químicas ocorridas no sítio ativo das enzimas, tiveram um impulso muito grande. Este tipo de abordagem resultou num avanço significativo nesta área de conhecimento e mudou radicalmente as formas de estudar e entender a catálise enzimática<sup>1-13</sup>.

Não sendo muito sofisticadas, reações modelos tornam possível o entendimento do processo químico desencadeado durante a ação da enzima; por exemplo, pesquisas sobre a hidrólise intramolecular de acetais podem, atualmente, ser associadas ao mecanismo de ação da lisozima<sup>14,15</sup>. Usando palavras de Thomas H. Fife: "um modelo é talvez o método com maior chance de sucesso, na tentativa empreendida pelo cientista, para compreender as reações complexas que envolvem enzimas - tais como lisozima e carboxipetdase - para as quais o substrato natural não é disponível para um estudo cinético detalhado."

Além de fornecer uma explicação mecanística razoável, uma reação modelo cuidadosamente elaborada deve ser capaz de explicar quantitativamente a magnitude da velocidade de reação observada para uma reação enzimática. Então, um modelo oferece a oportunidade para a observação pormenorizada de uma série de fatores individuais e relevantes ao processo

catalítico desencadeado por essas macromoléculas biológicas. Observando-se esses mesmos modelos, informações sobre a catálise em solução aquosa também são obtidas, o que evidencia a importância primária do trabalho independente de qualquer relação entre o modelo e a reação enzimática, ou seja, a importância científica deste trabalho é oriunda da possível melhora de nossos conhecimentos sobre as leis que governam a catálise - esteja ele associado ou não diretamente a um sistema enzimático.

## REAÇÕES MODELOS

Reações químicas intermediadas por enzimas são extremamente rápidas, estereoespecíficas e ocorrem sob condições brandas de pH e temperatura. Por outro lado, reações intermoleculares, nas quais estão envolvidos os mesmos grupos funcionais, podem demorar horas mesmo sob condições extremas, tabela 1. A hidrólise do acetato de etila na presença do ácido acético, por exemplo, tem um tempo de meia vida de 90 anos, e mesmo depois deste período a hidrólise pode não ser detectada. Determinadas amidas para serem hidrolisadas precisam ser refluxadas por 10 horas em HCl 1M.

Esta disparidade tem estimulado um número incontável de químicos, das mais diversas áreas, a buscar uma explicação mecanística para a ação enzimática e, conseqüentemente, desvendar os fatores responsáveis pelo poder catalítico destas biomoléculas. A partir da década de 60, com o advento de técnicas de difração de raio-x que possibilitaram a determinação da estrutura tridimensional de algumas enzimas, um crescente volume de informações vem se acumulando e algumas relações de estrutura-atividade passaram a ser elaboradas. Esforços consideráveis tem sido realizados tanto no campo de enzimas artificiais, como de modelos miméticos baseados em sistemas mais simples que imitem a reação enzimática como um todo. Estes culminam com um modelo no qual acredita-se que as enzimas realizam suas funções catalíticas fixando o substrato de modo a aproximar os grupos reacionais e ligar-se selectivamente ao estado de transição, promovendo a estabilização do mesmo e portanto a catálise. Nestes termos, o entendimento do fenômeno catalítico pode ser definido em termos do reconhecimento molecular do estado de transição<sup>21</sup>.

Nesta revisão bibliográfica, estamos apresentando especificamente modelos nos quais uma característica específica da ação enzimática é imitada (modelos não miméticos)<sup>17</sup>. O objetivo fundamental desta metodologia de estudo da catálise enzimática é entender de forma quantitativa os diferentes aspectos físico-químicos de cada um dos fatores que contribuem para a eficiência catalítica observada.

**Tabela 1.** Comparação entre velocidades de reações enzimáticas e intermoleculares similares.

Enzima	Análogo não enzimático	Velocidade enzimática ( $V_e$ , $s^{-1}$ )	Velocidade não enzimática ( $V_o$ , $s^{-1}$ )	$V_e/V_o$
Lisozima	Hidrólise de acetais (catálise básica geral)	$5 \times 10^{-1}$	$3 \times 10^{-9}$	$2 \times 10^8$
Quimotripsina	Hidrólise de amidas (catálise básica geral)	$4 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^3$
Fumarase	Hidratação de alcenos (catálise ácida geral)	$5 \times 10^2$	$3 \times 10^{-9}$	$2 \times 10^{11}$

Os modelos não miméticos podem ser subdivididos em duas categorias:

i) aqueles que analisam a interação entre o substrato e a enzima no complexo enzima-substrato, dando origem aos estudos dos compostos de inclusão formados essencialmente por ciclodextrinas e éteres coroa. ii) os direcionados para os princípios físico-químicos que governam as modificações nos sítios ativos das enzimas, abordados mais freqüentemente por reações intramoleculares.

Reações intramoleculares têm sido apresentadas como modelos simples, a partir dos quais se tem buscado explicações para o grande poder catalítico das enzimas em sistemas biológicos. Os princípios sob o qual fundamentam-se tais modelos, estabelecem que os mesmos parâmetros físico-químicos que governam a reatividade entre dois grupamentos funcionais em uma reação intramolecular, também estão presentes para estes mesmos grupamentos quando constituem o sítio ativo da enzima.

Com o estudo principalmente de reações intramoleculares de lactonização, hidrólise de ésteres e hidrólise de amidas, como modelos para catálise enzimática, surgiram teorias como: Molaridade Efetiva, Direcionamento de Orbitais, Controle Estereopopulacional e a Teoria Espaço-Temporal. Estas teorias e as principais críticas às mesmas, abordadas nas próximas seções, reivindicam para si a primazia dos efeitos de aumento de velocidade observados em sistemas intramoleculares quando comparados às reações intermoleculares similares e estabelecem uma analogia com os fatores que determinam os enormes efeitos catalíticos exercidos pelas enzimas.

## MOLARIDADE EFETIVA

As reações intramoleculares freqüentemente ocorrem a uma velocidade muito maior que a velocidade das correspondentes reações bimoleculares. A crença de que as conseqüências da intramolecularidade podem ser utilizadas para melhor entender o mecanismo da ação enzimática, tem despertado um considerável interesse por estes processos.

Os dados escassos que existem sobre catálise intramolecular indicam que as mesmas leis que governam a eficácia relativa da catálise intermolecular ácido-base geral e da catálise intermolecular nucleofílica-eletrofilica mantêm-se para os sistemas intramoleculares. Contudo, esta generalização deve ser feita com cautela, pois as interações intramoleculares são em geral muito mais fortes, podendo resultar inclusive em mudanças mecanísticas, devido aos fortes efeitos presentes tais como dessolvatação, interações ligantes e não ligantes, tensão angular e estérica e tantos outros fatores que não são normalmente esperados em reações intermoleculares<sup>18-21</sup>.

Uma comparação cinética das catálises intra e intermoleculares correspondentes revelam algumas diferenças profundas. Essas catálises correspondem a processos de primeira e segunda ordem respectivamente; conseqüentemente, não estão sujeitas à comparação direta. Entretanto, uma relação entre as constantes de velocidade para a reação intramolecular ( $k_{intra}$ ) e intermolecular ( $k_{inter}$ ) pode ser estabelecida gerando um termo conhecido como Molaridade Efetiva (ME), equação 2, que

tem unidades de moles/litro e é interpretado como sendo a concentração do nucleófilo, ou eletrófilo, na reação intermolecular, necessária para que esta e a reação intramolecular tenham velocidades equivalentes. Em outras palavras, estes cálculos definem a molaridade efetiva como a concentração de catalisador externo necessária para igualar a concentração efetiva (local) do catalisador interno<sup>21</sup>.

$$ME = \frac{k_{intra}(s^{-1})}{k_{inter}(M^{-1}s^{-1})} \quad (2)$$

Por exemplo, a enolização do o-isobutirilbenzoato ao ser comparada com a enolização da acetofenona catalisada pelo íon benzoato revela uma molaridade efetiva equivalente a 50 M. Este fator torna a constante de velocidade de segunda ordem da reação intermolecular igual à constante de velocidade da reação intramolecular e pode ser interpretado como indicativo de que a concentração efetiva do íon o-carboxilato no o-isobutirilbenzoato é igual a 50 M. Em sistemas alifáticos menos rígidos envolvendo o ácido levulínico, a eficiência da catálise intramolecular é menor e o íon carboxilato interno é equivalente somente a 1 M do íon carboxilato externo.

Apesar da facilidade de comparação entre as velocidades das reações intramoleculares e intermoleculares que nos fornece valores para a Molaridade Efetiva, algumas considerações devem ser levadas em conta na hora de fazermos tais cálculos. Entre elas, deve-se enfatizar que as reações comparadas devem ocorrer pelo mesmo mecanismo. Além disso, como nem sempre as reações intermoleculares são observadas nas condições utilizadas para as reações intramoleculares, muitas vezes são necessárias correções devido à diferença dos pKa dos grupos de ataque e de saída, diferença nos meios reacionais, etc. Estas correções nem sempre diminuem o valor da ME e muitas vezes chegam mesmo a aumentá-lo.

Kirby tem se preocupado em recopilar os dados existentes sobre a molaridade efetiva para uma série de reações intramoleculares<sup>22</sup>. Dentro deste amplo levantamento de dados pode-se perceber que uma reação que procede por catálise nucleofílica intramolecular é muito mais eficiente que outra que ocorre por catálise básica geral em solução. Então, um método bastante direto para identificar o mecanismo pelo qual determinada reação ocorre, surge quando determinamos suas molaridades efetivas, tabela 2.

Uma explicação para esta observação considera que, em linhas gerais, o fator mais importante na definição do tipo de

**Tabela 2.** Valores de molaridade efetiva para reações que procedem por catálise intra e intermolecular.

Molaridade Efetiva	
Catálise nucleofílica intramolecular	Catálise básica-geral
de 102 a 1016	menor de 80

mecanismo é a distância em que se encontram os grupos catalíticos na molécula. Quando a distância entre os grupos

**Tabela 3.** Efeito orientacional sobre a velocidade de lactonização de ácidos  $\gamma$ -hidroxicarboxílicos.

Composto	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH + CH <sub>3</sub> COOH				
V <sub>rel.</sub>	1	79	305	6630	1.027.000
V <sub>rel. corrig.</sub>	1	413	17	1660	18.700

catalíticos é da ordem da soma de seus raios de van der Waals, eles se encontram dessolvatados e observa-se um valor de molaridade efetiva alto. A uma distância maior que esta, encontram-se moléculas de água entre os grupos catalíticos e uma catálise básica-geral é observada<sup>22</sup>.

A ênfase na discussão prévia destaca que a proximidade é de importância primordial. Isto certamente é verdade, mas junto com ela, a importância da orientação correta para uma catálise efetiva em sistemas intramoleculares também deve ser considerada. O catalisador deve não somente ter uma grande concentração efetiva local, mas também deve ter a orientação estereoquímica correta.

### DIRECIONAMENTO DE ORBITAIS:

Testando a sensibilidade de reações químicas à orientação dos átomos que participam do sítio reacional, Koshland estudou a velocidade de esterificação e lactonização de  $\gamma$ -hidróxiácidos<sup>23</sup>.

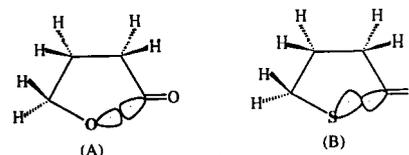
Quando comparadas à velocidade de esterificação entre o ácido acético e etanol, as reações de ciclização intramolecular ocorrem 10<sup>6</sup> vezes mais rapidamente que a reação intermolecular. Mesmo depois que correções para efeitos de proximidade, tensão e efeitos conformacionais são feitas, um fator de aumento de velocidade de até 10<sup>4</sup> permanece sem explicação, tabela 3.

Conforme a abordagem de Koshland, durante a formação dessas estruturas cíclicas, o ataque do oxigênio hidroxílico sobre o carbono carbonílico tem uma orientação limitada se comparada às orientações das colisões que ocorrem ao acaso em processos bimoleculares. Este fator orientacional, representado por 1/ $\theta$ , fornece uma estimativa do aumento de velocidade observada em reações enzimáticas devido à otimização da orientação dos orbitais dos átomos reacionais em questão.  $\theta$  é o ângulo definido pela fração da superfície sólida, de um átomo de simetria esférica, sujeita à reação ao longo de um caminho selecionado na coordenada de reação.

Um fator de aceleração de reação da ordem de 10<sup>4</sup> está longe de conferir às reações intramoleculares análogas a mesma velocidade das reações enzimáticas. Porém, a combinação de vários grupos catalíticos ancorados numa única estrutura carbônica, a exemplo do que ocorre num complexo enzima-substrato, pode revelar fatores tão grandes quanto 10<sup>12</sup>, justificando a origem do alto poder catalítico das enzimas.

Em um experimento adicional de comprovação de sua teoria, Koshland testa o efeito da substituição de um átomo de oxigênio por um átomo de enxofre sobre a componente angular das reações de lactonização anteriormente apresentadas. Como resultado, a razão entre as constantes de velocidade de lactonização em meio ácido e tiolactonização em meio básico são 70, 115, 2,5x10<sup>4</sup> e 426 para os compostos I, II, III e IV, respectivamente. A marcante desaceleração de velocidade para os compostos tioanálogos, especialmente para a razão k<sub>III</sub>/k<sub>VI</sub>, é interpretada como um desvio desfavorável nos ângulos de aproximação entre os orbitais atômicos dos grupos reacionais, tornando a estrutura do tiol, (B), menos produtiva orientacionalmente<sup>24,25</sup>, figura 1.

Nesta etapa, a teoria de Direcionamento de Orbitais está delineada, porém não totalmente aceita; então Koshland, fa-



**Figura 1**

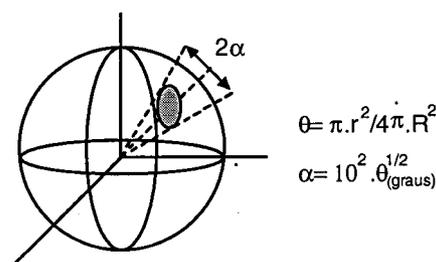
zendo uso da teoria do estado de transição, procura consolidar suas hipóteses através de cálculos das funções de partições vibracionais, rotacionais e rotacionais internas que são necessárias à avaliação do fator estérico  $p$ , presente na lei de velocidade derivada da teoria das velocidades absolutas:  $k = p \cdot z \cdot e^{-E_0/RT}$ <sup>26,27</sup>. O fator  $p$  é associado ao fator  $\theta$  e é avaliado de acordo com a metodologia de análise de Benson<sup>28</sup>.

$$p = \frac{q_{AB(Rot)}^\ddagger \cdot q_{AB(Vib)}^\ddagger \cdot q_{AB(Rot.Int)}^\ddagger}{q_{AB(Rot)}^\ddagger \cdot q_{A(Rot)}^\ddagger \cdot q_{B(Rot)}^\ddagger \cdot q_{A(Vib)}^\ddagger \cdot q_{B(Vib)}^\ddagger \cdot q_{A(Rot.Int)}^\ddagger \cdot q_{B(Rot.Int)}^\ddagger} \quad (1)$$

A partir da equação (1) obtém-se valores de 10<sup>-3</sup>-10<sup>-5</sup> para a reação de formação do formiato de metila, considerando naturezas diferentes para o estado de transição, tabela 4.

Como, pelas argumentações de Koshland,  $\theta$  (o fator de orientação) é o recíproco de  $p$ ; a magnitude da aceleração derivada pela teoria do estado de transição é a mesma daquela obtida a partir das hipóteses iniciais do Direcionamento de Orbitais baseadas na teoria das colisões. Assim, efeitos orientacionais dos átomos reagentes podem contribuir significativamente para reações enzimáticas.

As primeiras refutações às idéias de Koshland surgiram ainda na década de 70 com Capon<sup>29</sup>, Detar<sup>30</sup> e Thomas C. Bruce<sup>31</sup> que num trabalho de cunho teórico demonstra que, para átomos ou grupo de átomos de simetria esférica, uma razão de velocidade k<sub>intra</sub>/k<sub>inter</sub> = 10<sup>6</sup> requer uma orientação crítica de 0,1° entre os grupos participantes da reação, figura 2. Conclui-se que, qualquer desvio na orientação dos orbitais, desta ordem de magnitude, deverá reduzir drasticamente a velocidade da reação. Porém, a amplitude das vibrações angulares numa molécula a temperatura ambiente oscila entre 5° e 10° e, obviamente, tende a aumentar com o aumento da temperatura. Este fato, aplicado a teoria de Koshland, requer que a velocidade de uma reação química diminua com o aumento da temperatura. Por outro lado,



**Figura 2.** Representação de um grupo de simetria esférica, somente uma pequena porção de sua superfície é reativa (área sombreada). A magnitude de 2 $\alpha$  é um indicador de quão crítica é a orientação do grupo.

**Tabela 4.** Cálculo das funções de partição e do fator estérico para reação de formação do formato de etila.

$q$	MeOH	HCOOH	ET <sub>frouxo</sub>	ET <sub>médio</sub>	ET <sub>rígido</sub>
$q_{(rot.)}$	$3,175 \times 10^3$	$8,908 \times 10^3$	$98 \times 10^3$	$98 \times 10^3$	$82 \times 10^3$
$q_{(rot.int.)}$	1,431	1	~60	~60	~10
$q_{(vib.)}$	1,091	1,117	57	4,1	2,4
$q_{AB(rot.)}$	—	—	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
$p$	—	—	$4,4 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-5}$

cálculos computacionais do tipo CNDO/2 determinando o mecanismo de ação da  $\alpha$ -quimotripsina<sup>32</sup> confirmam a importância do direcionamento de orbitais.

Críticas de cunho experimental à natureza orientacional das reações enzimáticas e intramoleculares, são feitas examinando-se a reatividade entre grupos funcionais ancorados numa estrutura carbônica rígida com ângulos e distâncias bem definidos<sup>33</sup>, tabela 5.

Cálculos computacionais, realizados sobre a série de com-

**Tabela 5.** Efeito da estrutura sobre a velocidade de lactonização de hidroxiácidos catalisada por ácido a 25°C.

Composto				
$v_{rel}$	1	1,2	36	22
ângulo $O_1C_2C_3$	70	80	76	85
$v_{H^+}$	0,0083	0,01	0,30	0,18

postos VIII, IX, X e XI, revelam que os pares VIII - IX e X - XI têm energias de formação similares e distância entre o oxigênio hidroxílico e o carbono carbonílico também similares (2,83 Å para VIII e IX e 2,81 Å para X e XI); a diferença entre os ângulos  $O_1C_2C_3$  é de  $10^\circ$  para cada par.

Conforme os dados, as velocidades de lactonização de VIII e IX são semelhantes, o mesmo acontecendo para X e XI. Se a adição a compostos carbonílicos fosse extremamente dependente de fatores angulares uma variação de  $10^\circ$  no ângulo entre os orbitais dos átomos reacionais deveria produzir um variação de  $10^4$  na velocidade da reação o que não é observado neste estudo colocando em dúvida o rigor do direcionamento de orbitais como fator determinante da alta reatividade de processos biológicos controlados por enzimas.

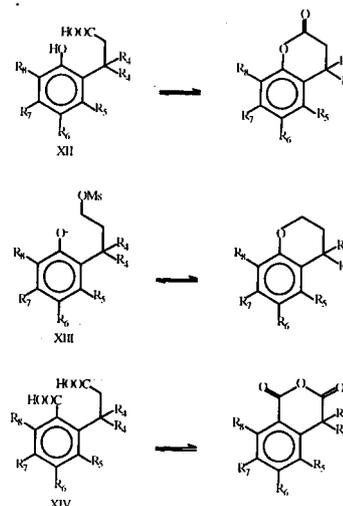
## CONTROLE ESTEREOPOPULACIONAL

É razoável supor que, durante a formação do complexo enzima-substrato, a enzima limita o substrato a uma única conformação, possivelmente aquela mais favorável ao desempenho de sua função catalítica. Esta restrição conformacional pode ser imposta por meio de ligações de hidrogênio, atração ou repulsão eletrostática, repulsão de van der Waals, repulsão do tipo par não compartilhado e outras. Tal diversidade de fatores, capazes de produzir um único efeito, foi englobada numa teoria denominada Controle Estereopopulacional.

A quantificação do fator de aumento de velocidade devido à restrição conformacional foi feita por Milstien e Cohen, estudando como reação modelo a lactonização de derivados do ácido o-hidroxihidrocinâmico, XII<sup>34</sup>, a ciclização de mesilatos de 3-(o-hidroxifenil)-1-propila, XIII<sup>35</sup>, e a formação de anidridos derivados do ácido homoftálico, XIV<sup>36</sup>, esquema 1.

Em tais casos, quando  $R_4$  é um grupamento  $CH_3$ , observa-se uma velocidade relativa de reação  $10^4$  vezes maior que a velocidade da reação para o composto não substituído. Milstien

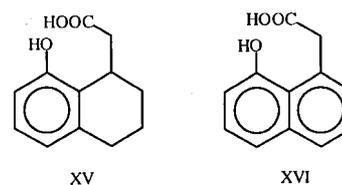
e Cohen atribuíram este fator de aumento de velocidade a um "bloqueio" pelos grupamentos metílicos que resulta num congelamento conformacional da cadeia lateral no rotâmero mais produtivo para a reação, tabela 6, aumentando a população deste conformero<sup>37</sup>.

**Esquema 1**

A velocidade relativa de  $10^{11}$  tem merecido maior atenção por parte dos autores; pois, se para XIII e XIV as velocidades encontradas são fatores típicos para o efeito de controle estereopopulacional, então a reação de XII estaria recebendo contribuições de variáveis não identificadas até aquele momento. Bruce<sup>38</sup> demonstrara, estudando a hidrólise de monofenilésteres derivados de ácidos dibásicos, que o efeito do aumento de velocidade devido a restrição conformacional dos grupos reacionais é, na verdade, bem menor.

Karle e Karle mostraram, a partir de dados de cristalografia de raio-X, que para o composto XII, quando  $R_4=R_5=R_7=R_8=CH_3$ , os ângulos de ligação entre os átomos do anel benzênico sofrem desvios do valor padrão de  $120^\circ$ . Assim, o alívio da tensão angular do estado fundamental, à medida que este conduz ao estado de transição, é a principal força diretora da reação<sup>39</sup>.

Danforth e Nicholson<sup>40</sup> estudaram as velocidades de lactonização dos compostos XV e XVI, para os quais a tensão angular (à primeira vista) não é o fator determinante da velocidade. As velocidades relativas de ciclização são 150 e 21.000 respectivamente e atribuem o valor de  $10^4$  para a magnitude do aumento de velocidade oriundo de limitações conformacionais no curso de reações químicas.



**Tabela 6.** Efeito da substituição de hidrogênio por metila sobre a velocidade relativa de ciclização de XII, XIII e XIV.

R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	XII	XII <sup>a</sup>	XIII	XIII <sup>a</sup>	XIV	XIV <sup>a</sup>
H	H	H	H	H	1	1	1	1	1	1
H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	—	—	—	—	10	—
H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	—	—	3,5	—	—	—
H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	6,8	—	7	—	—	—
H	CH <sub>3</sub>	H	H	H	—	1	—	1,6	52	1
H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	—	—	—	—	50	—
CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	4.440	4.440	3.100	3.100	82.000	82.000
CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	16.700	—	—	—	—	—
CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	—	—	10.464	—	—	—
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	8x10 <sup>10</sup>	—	—	—	—	—
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	3x10 <sup>11</sup>	—	—	—	—	—
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3x10 <sup>11</sup>	—	9x10 <sup>4</sup>	—	—	—
CH <sub>3</sub>	—	—	—	2x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>5</sup>	—				
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	—	5x10 <sup>10</sup>	—	—	—	16.000

<sup>a</sup> velocidades relativas corrigidas

Por outro lado, a análise dos dados da tabela 6, no que concerne a formação do anidrido XIV, revela um aumento de velocidade de apenas 10 vezes quando o derivado do ácido homoftálico com R<sub>4</sub>-R<sub>8</sub>=CH<sub>3</sub> é comparado com XIV com o derivado no qual R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>-R<sub>8</sub>=H. O mesmo tipo de substituição nos compostos XII e XIII produz um aumento de velocidade de 10<sup>7</sup> e 10<sup>2</sup>, respectivamente. Hillery e Cohen<sup>36</sup> concluem, portanto, que a tensão angular não é o fator determinante da velocidade e o controle estereopopulacional é responsável por um aumento de velocidade maior que 10<sup>4</sup>.

## TEORIA ESPAÇO-TEMPORAL

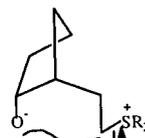
Em 1985, avaliando o efeito da proximidade em reações bimoleculares do tipo S<sub>N</sub>2 entre iodeto de metila e piridina<sup>41</sup>, Menger observou um aumento de aproximadamente doze vezes na velocidade quando a concentração do nucleófilo é aumentada de 1% para 100% (12,4M de piridina). Comparando seus resultados com a observação de outros autores sobre a velocidade de reações intramoleculares, conclui: “o efeito de proximidade é manifestado em reações intramoleculares porém não em reações intermoleculares”. Logo, proximidade é um componente necessário, todavia não suficiente para explicar a alta reatividade de sistemas intramoleculares e conseqüentemente enzimáticos.

A questão fundamental levantada na época é traduzida da seguinte forma: Por que efeitos de proximidade são observados em reações que ocorrem intra e não intermolecularmente?; ou ainda: Por que certas reações intramoleculares são caracterizadas por valores tão grandes de molaridade efetiva?

Koshland tem argumentado que orientação e proximidade são os principais fatores responsáveis por essa discrepância; porém, a severa dependência angular imposta por sua teoria encontra barreiras à sua aceitação. Além disso, tem sido demonstrado que são poucos os sistemas que possuem uma “janela de reação” estreita<sup>42</sup>.

Page e Jencks sustentam que uma reação intramolecular é mais rápida que uma reação intermolecular, porque a primeira é favorecida entropicamente. Cálculos teóricos sobre a dimerização Diels-Alder do ciclopentadieno em fase gasosa<sup>43</sup> demonstram que uma reação intramolecular pode ser 10<sup>8</sup> vezes mais rápida que uma reação intermolecular e que o congelamento de um grau de liberdade rotacional de uma ligação química gera um aumento de 5 vezes na velocidade da reação. Não havendo nada de extraordinário na extrema reatividade destes processos de ciclização, valores elevados de ME seriam esperados e sua relevância para a catálise enzimática deveria ser mínima. Contudo, valores de ME menores que a unidade são descritos na literatura<sup>22</sup> e os teoremas entrópicos falham ao explicá-los.

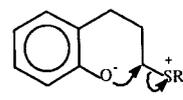
Por exemplo, os compostos XVII e XVIII, modelos de metilases (O-metil transferases)<sup>44</sup>, não mostram relação entrópica com a velocidade de ciclização.



XVII

$$\Delta S^*_{H_2O} = -37e.u$$

$$\Delta S^*_{H_2O} = -37e.u$$



XVIII

$$\Delta S^*_{H_2O} = +14e.u$$

$$\Delta S^*_{H_2O} = +14e.u$$

Adicionalmente a avaliação dos parâmetros de ativação em reações de ciclização do tipo S<sub>N</sub>2<sup>45,46</sup> não estabelecem qualquer relação entre a entropia de ativação e a reatividade do sistema.

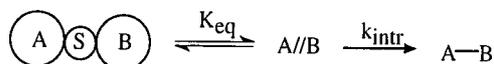
A maior crítica aos fatores entrópicos definidos por Page e Jencks é apresentada por Daform e Koshland<sup>47</sup> durante cálculos realizados para a combinação de Br• (bromo radicalar) para formar Br<sub>2</sub>. O mesmo método computacional usado por Page e Jencks na dimerização do ciclopentadieno, neste caso fornece uma constante de velocidade 10<sup>6</sup> vezes menor que a obtida inicialmente. Desta forma, a dependência entre a sistemática de cálculo e a reação modelo usada mostra a vulnerabilidade da teoria entrópica.

Conforme Menger<sup>48</sup>, conceitos como entropia, orientação e proximidade não reúnem em torno de si evidências suficientes para explicar os fatores responsáveis pelo grande aumento de velocidade observado em reações intramoleculares e pela eficiência da catálise enzimática. Ao contrário, o termo entropia é confuso reunindo, em torno de si, uma gama de conceitos como variações na solvatação, conformação e molecularidade, entre muitos outros. A entropia de ativação para uma reação em meio aquoso, por exemplo, é de tal modo complexa que dificilmente tem sido produtiva na explicação do fenômeno a que se propõe justificar. Segundo Menger, “a entropia é útil para vencer debates” e pouca contribuição presta ao entendimento da intramolecularidade.

Torna-se necessário, então, o desenvolvimento de um novo conceito que possa abordar o problema da intramolecularidade. Esse novo conceito foi denominado Teoria Espaço-Temporal e é enunciado da seguinte forma: “A velocidade de reação entre dois grupos funcionais A e B é proporcional ao tempo que A e B permanecem a uma distância crítica menor ou igual a soma dos raios de van der Waals dos grupos que participam da reação”. A ênfase à distância em detrimento aos fatores

orientacionais é uma decorrência natural da teoria, pois a amplitude da energia de estiramento de uma ligação é maior que a amplitude da energia de vibração angular.

Em termos das leis formais de equilíbrio, a teoria é descrita considerando-se que duas moléculas separadas pelo solvente geram um complexo no qual os componentes do sítio reacional estão dentro de uma distância limite que impede sua solvatação. O produto fornecido numa segunda etapa é caracterizado por uma constante de velocidade intrínseca, esquema 2.



Esquema 2

A hipótese da pré-associação é suportada por vários exemplos na literatura<sup>49</sup> e relações entre distância e velocidade foram anteriormente descritas por Benesi<sup>50,51</sup>.

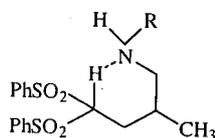
Menger, em seus experimentos posteriores, propõe a consolidação de sua hipótese Espaço-Temporal. Assim, cálculos computacionais usando o método AMPAC para a transferência intramolecular de hidreto em cetoalcoicetonas, esquema 3, fornecem uma energia para o processo global igual a 18 Kcal.mol<sup>-1</sup>, dos quais 5 Kcal.mol<sup>-1</sup> são usados para a transferência do hidreto. As 13 Kcal/mol restantes são usados para posicionar os centros reacionais a uma distância crítica para a reação<sup>52</sup> e de acordo com os resultados “a física precede a química”.



Esquema 3

Enfatizando o poder preditivo da teoria, cálculos computacionais demonstram que amidas derivadas do triácido de Kemp possuem a hidroxila do grupamento amida a uma distância igual à soma do raio de van der Waals dos grupos em questão (2,80 Å). Dados experimentais confirmam a altíssima velocidade de hidrólise esperada para a reação com base na relação tempo-distância ( $t_{1/2}$ =8 min; EM≈1012 M)<sup>53</sup>.

A auto-troca de próton NH/CH na amino disulfona XIX foi estudada em tolueno-d<sub>8</sub>. A reação ocorre via transferência de próton para formar um par iônico R<sub>3</sub>C<sup>-</sup>/H<sub>3</sub>NR<sup>+</sup>, depois do qual um próton diferente, oriundo do grupamento amínico, retorna ao carbono<sup>54</sup>. O composto XIX possui uma distância de contato de 2,34 Å (menor que a soma do raio de van der Waals, ≈ 2,75 Å), dentro de uma geometria tal que a transferência de próton é rápida na escala de tempo de RMN, mesmo em solventes não polares, à baixa temperatura e com uma barreira de pKa bastante grande.



XIX

A disparidade entre a velocidade da catálise básica geral intramolecular e a velocidade da catálise básica geral enzimática, neste caso, é atribuída à distância de contato a qual não

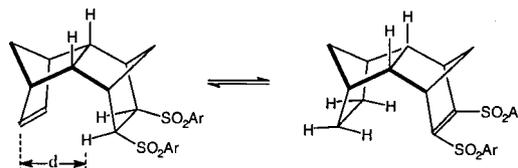
permite a intervenção de moléculas do solvente (“esta é a chave para a origem da alta reatividade deste sistema, e reflete o papel importante da pré-associação”).

Os argumentos da teoria induzem, conseqüentemente, à conclusão de que nenhum mecanismo esotérico é necessário para explicar os efeitos catalíticos das enzimas e que a relação espaço-temporal entre os grupos funcionais participantes da reação é mais do que suficiente para este propósito.

Recentemente, Houk<sup>55-57</sup> e colaboradores estudaram a reação de lactonização intramolecular de quatorze  $\gamma$ -hidroxiácidos. Através de modelagem molecular por cálculos mecânicos moleculares do tipo MM2, criou um modelo de campo de força do estado de transição para as reações sob estudo obtendo valores tanto para a distância e ângulo de ataque da hidroxila ao carbono carbonílico, como para o alívio da compressão estérica durante o processo de ciclização. Os resultados da pesquisa sugerem que não existe correlação entre a distância dos grupos reagentes e ou ângulo de ataque com a velocidade de lactonização nestes compostos.

Menger<sup>58</sup> refutou os argumentos de Houk, dizendo que o sucesso do cálculo para a modelagem do estado de transição fundamenta-se numa constante de força muito maior do que aquelas esperadas para as ligações, em questão, no complexo ativado. Quando estas constantes de força são substituídas por parâmetros derivados de *ab initio*, a correlação degenera-se. Correlações próximas da unidade são obtidas entre a velocidade e a energia de ativação calculada, utilizando um campo de força sem sentido, criado por um programa chamado de FUDGIT, o que mostra a irrelevância dos cálculos apresentados por Houk.

Em 1990, Leo Paquette<sup>59</sup> posiciona-se de acordo com as teorias de Menger. Ao estudar reações simples de transisomerização, esquema 4, ele observa uma grande dependência entre a velocidade e a distância, d, neste tipo de reação. A vantagem nesta reação residia no fato de se obter tanto os reagentes como os produtos no estado cristalino e as distâncias interatômicas eram exatas e fáceis de obter por cristalografia de raio-X.



Esquema 4

Em 1991, Leo Paquette<sup>60</sup>, estudando a mesma reação numa gama maior de compostos, observa um aumento na velocidade observada em função da diminuição da distância em alguns casos e o efeito inverso em outros. Aparentemente, então, além da distância, outros fatores tais como ângulos de ataque permitidos na coordenada de reação, efeitos eletrônicos, energia torsional, etc., também contribuem na reatividade da reação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo desta revisão foi o de motivar os químicos orgânicos e bioquímicos, com esta importante área de pesquisa dedicada a elucidar o mecanismo íntimo de ação das enzimas. De fato, o uso de reações intramoleculares como modelos não miméticos no estudo do mecanismo de ação das enzimas, vislumbra a possibilidade de se estudar fenômenos específicos e intrínsecos dentro do emaranhado somatório de efeitos que contribuem para a atividade das mesmas. Esta área de pesquisa, tem crescido vertiginosamente a ponto de merecer livros especializados, tanto na área de química como na área de bioquímica<sup>3, 21, 61, 62</sup>.

Não obstante o enorme contexto no qual estão inseridas, reações modelos também prestam sua contribuição à áreas de pesquisas básicas, em termos de avanço de conhecimento e interdisciplinaridade, em físico-química orgânica e catálise em geral. Em termos de perspectivas futuras, o campo de pesquisa está totalmente aberto, sendo necessários esforços nas áreas de modelagem molecular, síntese de novos substratos com estereoquímica adequada, modelagem de reações para a formação de compostos de alta energia em sistemas biológicos, no acoplamento de complexos de inclusão que possuam características catalíticas especiais. Tudo isto, sem considerar enzimas artificiais e modelos miméticos em geral, os quais constituem uma área complementar e tão rica quanto esta aqui descrita<sup>1-3, 21, 63</sup>. Certamente, a modelagem de reações enzimáticas é uma área na qual o único fator limitante é nossa imaginação.

## REFERÊNCIAS

- Fersht, A. R.; *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed., Freeman, New York, 1985.
- Kraut, J.; *How do Enzymes Work?* Science **1988**, 242, 533.
- Page, M. I. and Williams, A.; *Enzyme Mechanism*, Royal Society of Chemistry, London, 1987.
- Kirby, A. J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 707.
- Chin, J.; *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 145.
- Bertini, I.; Gray, H. B.; Lippard, S. J.; Valentine, J. S.; *Bioinorganic Chemistry*, Interscience Books, Mill Valley, CA, 1994
- Althaus, I.; J. Chou, A. Gonzales; Deibel, M.; Chou, K.; Kezdy, F.; Romero, D.; Palmer, J.; Thomas, R.; Aristoff, P.; Tarpley, W.; and Reusser, F.; *Biochemistry* **1993**, 32, 6548.
- Bender, M. L.; *Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins*, Wiley-Interscience, New York, 1971, Cap. 9.
- Menger, F. M.; *Biochemistry* **1992**, 31, 53.
- Kirby, A. J.; *Philos. Trans. R. Soc. London A* **1993**, 345, 67.
- Phillips, D. C.; *Scientific American*, USA. **1966**, 215, 78.
- Sigman, D.; *The Enzymes*, Academic Press, San Diego, vol. 19, 1992.
- Sigman, D.; *The Enzymes*, Academic Press, San Diego, Vol. 20, 1992
- Fife, T. H.; *Acc Chem. Res.* **1972**, 5, 264
- Bruice, T. C.; in: *The Enzymes*, 3<sup>a</sup> ed. (Boyer, P. D., ed.), v. 2, p. 217-279, Academic Press, New York, 1970.
- Kirby, A. J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 707.
- Gandour, R. D.; *Transition States of Biochemical Process*, Plenum Press, New York, N. Y., 1978, p. 535.
- Ruben, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 563.
- Firestone, R. A. and Christensen, B. G. *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 389.
- Ferreira, R.; and Gomes, M. A. F.; *Braz. Symp. Theor. Phys.*, 6th., vol.2, 1980, p. 281.
- Mock, W. L.; *Bioorg. Chem.* **1976**, 5, 403
- Kirby, A. J.; *Adv. Phy. Org. Chem.* **1980**, 17, 183.
- Storm, D. R.; Koshland Jr., D. E.; *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **1970**, 66, 445.
- Storm, D. R.; Koshland Jr., D. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 5815.
- Storm, D. R.; Tjlan, N, R.; Koshland Jr., D. E.; *Chem. Commun.* **1971**, 854.
- Dafforn, A.; Koshland Jr., D. E.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 2463.
- Dafforn, A.; Koshland Jr., D. E.; *Bioorg. Chem.* **1971**, 1, 129.
- Benson, S. W.; *The foundations of kinetics.* **1960**, McGraw-Hill Book Co., Inc., N. Y., p.276.
- Capon, B.; *J. Chem. Soc. B.* **1971**, 1207.
- Detar, D. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 1254.
- Bruice, T. C.; Brown, A.; Harris, D. O.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 658.
- Umeyama, H.; Imamura, A.; Nagata, C.; Hanano, M.; *J. Theor. Biol.* **1973**, 41, 485.
- Menger, F. M.; Glass, L. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5404.
- Milstien, S. and Cohen, L. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 9158.
- Borchardt, R. T. and Cohen, L. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 9166.
- Hillery, P. S.; Cohen, L. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 2760.
- Milstien, S.; Cohen, L. A.; *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **1970**, 67, 1143.
- Bruice, T. C.; Pandit, U. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 5858.
- Karle, J. M.; Karle, L. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 9182.
- Danforth, A. W.; Nicholson, J. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 4275.
- Menger, F. M.; Venkataram, U. V., J.; *Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4706.
- Menger, F. M.; *Tetrahedron* **1983**, 39, 1013.
- Page, M. J.; Jencks, W. P.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1978**, 68, 1678.
- Knipe, J. O.; Coward, J. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4339.
- Detar, D. F.; Luthra, N. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4505.
- Bird, R.; Stirling, C. J. M.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2* **1973**, 1221.
- Daform, A.; Koshland, D. E.; *Biophys. Res. Commun.* **1972**, 49, 940.
- Menger, F. M.; *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 128.
- Jencks, W. P.; *Acc. Chem. Res.* **1976**, 9, 425.
- Benesi, A. J.; *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 4926.
- Benesi, A. J.; *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4729.
- Sherrod, M. J. and Menger, F. M.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 459.
- Menger, F. M.; Ladika, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6794.
- Menger, F. M. and Gabrielson, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3574.
- Dorigo, A. E. and Houk, K. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3698.
- Houk, K. N.; Tucker, J. A.; Dorigo, A. E.; *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 107.
- Evanseck, J. D. and Houk N. K.; *J. Am. Soc.* **1990**, 112, 9148.
- Menger, F. M.; Sherrod, M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8071.
- Paquette, L. A.; Kesselmayer, M. A.; Rogers, R. D.; *J. A. Chem. Soc.* **1990**, 112, 284.
- Paquette, L. A.; O'Doherty, G. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7761.
- Dugas, H. and Penny, C.; *Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action*. New York, W. H. Freeman, 1985.
- Jencks, W. P.; *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1978.
- Kirby, A. J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 35, 1996.