

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química

SÍNTESE E MARCAÇÃO COM  $^{32}\text{P}$  DE FOSFATOS DE MONOALQUILA  
E DO FOSFATO DE MONOFENILA SOB FORMA DE SAIS DE BIS-  
CICLOHEXILAMONIO. DETERMINAÇÃO DE ESPECTROS DE ABSORÇÃO  
EM INFRA-VERMELHO E DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA .

Maria Aparecida T. Marcilio de Almeida

Tese para a obtenção do título

" MESTRE EM CIÊNCIAS "

São Paulo

1973

## ERRATA

a) Página 1, § 1.1.0 - Propriedade do Elemento Fósforo.

Leia-se: Propriedades do elemento Fósforo.

b) Página 17, § 3º, linha 3a. - monofosfato de buteno 1-4-diol.

Leia-se : fosfato de monobuteno 1-4-diol.

c) Página 43, § 3.1.0, linha 6a. - 322g(7Mol) de Etanol

Leia-se : 322g(7 Moles) de Etanol

d) Página 47, § 2º, linha 4a. - 660  $\mu$

Leia-se : 660  $\mu\text{m}$

e) Página 53, Tabela II - Referência

Leia-se : Referências

f) Página 59, Tabela VII - 2525  $\text{cm}^{-1}$  - Harmônios de  $-\text{NH}_3^+$

Leia-se : Harmônicos de  $-\text{NH}_3^+$

g) Página 60, Tabela VIII - abaixo da frequência 980  $\text{cm}^{-1}$

Leia-se : 890  $\text{cm}^{-1}$  (Fr) - "Rock" de  $\text{CH}_2$  etc..

h) Página 61, Tabela IX - 870  $\text{cm}^{-1}$  - Vibração C-O do anel etc..

Leia-se : Vibração C-C do anel etc..

i) Página 64, Tabela XII - acrescentar: Frequência 1240  $\text{cm}^{-1}$  (M) -

Vibrações esqueléticas C-C em grupo ter-butila.

j) Página 69, § (f), linha 5a. - PEDERSEN(11)

Leia-se BERNSTEIN-PEDERSEN (11)

l) Página 72, § 1º, linha 3a. - expectros-

Leia-se : espectros

m) Página 75, linha 2a. - J = 1,5 cps

Leia-se:  $J_G = 1,5$  cps

n) Página 76, Tabela XVII, última linha - Triplete

Leia-se Tripleteo

o) Página 103 - Referência bibliográfica nº 82

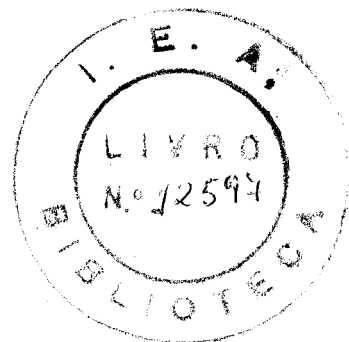
Leia-se : J. Am. chem. Soc.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA

SÍNTESE E MARCAÇÃO COM  $^{32}\text{P}$  DE FOSFATOS DE MONO-  
ALQUILA E DO FOSFATO DE MONOFENILA SOB FORMA  
DE SAIS DE BIS-CICLOHEXILAMÔNIO.  
DETERMINAÇÃO DE ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM INFRA-  
VERMELHO E DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA.

MARIA APPARECIDA T. MARCÍLIO DE ALMEIDA

Tese para obtenção do título de  
"Mestre em Ciências"



Orientador  
Dr. Vicente Guilherme Toscano

*À memória de meu pai.*

*À minha mãe*  
*À Maria Luiza*  
*Ao José Carlos*

Ao Instituto de Energia Atômica, na  
pessoa de seu Superintendente Prof.  
Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni, pela  
bolsa concedida e pelos meios pos-  
tos à minha disposição para que se  
tornasse possível a apresentação  
deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Vicente Guilherme Toscano, Orientador deste trabalho.

Ao Dr. José Carlos Barbério, Chefe da Divisão de Radiofarmácia.

Ao Dr. Hernán Chaimovitch, pelas valiosas sugestões no campo da Bioquímica e especialmente Enzimologia.

Ao Atilio Vanin, a quem devo os conhecimentos adquiridos e múltiplas discussões para a realização e interpretação dos espectros de Ressonância Nuclear Magnética.

Ao Dr. Eduardo Peixoto e Dr. Paulo Roberto Olivato, pelos proveitosos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. José Moura Gonçalves, pela atenção com que encaminhou análises ao Instituto Militar de Engenharia.

Aos colegas de trabalho, Seiko Sugawara e Carlos Henrique Mesquita, pela assistência e ajuda na contagem de materiais marcados com  $^{32}\text{P}$ .

A todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

## OBJETIVO DO TRABALHO

Propusemos a preparação de uma série de oito monoésteres - fosfóricos alifáticos e do monoéster fenílico, sob a forma de sais de bis-ciclohexilamônio e sua marcação subsequente com  $^{32}\text{P}$ .

A utilidade da marcação com  $^{32}\text{P}$  dos respectivos monoésteres, será a de possibilitar o estudo da possível variação da velocidade e especificidade de hidrólise, em reações catalizadas por Fosfatases ácidas, que serão realizadas no Departamento de Bioquímica da U.S.P.

A forma salina de bis-ciclohexilamônio foi preferida, porque é de fácil obtenção, separação e recristalização, sendo bem estável e pode ser utilizada em estudos de Enzimologia sem necessidade de transformações.

Dentre os vários métodos descritos na literatura e mencionados neste trabalho visando a síntese de monoésteres fosfóricos, o método de CRAMER provou ser muito eficiente tanto para álcoois primários, secundários e terciários como para o fenol. Esse método foi empregado para a preparação de toda a série proposta, tendo além do mais a característica de utilizar como agente fosforilante o próprio ácido fosfórico, permitindo-nos partir do  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  que é a forma sob a qual o material radioativo  $^{32}\text{P}$  é fornecido pelo Instituto de Energia Atômica.

Complementamos o trabalho com estudos de espectros de Absorção Infra-Vermelho e de Ressonância Nuclear Magnética de todos os monoésteres incluídos neste trabalho. Os espectros indicaram preliminarmente alguns dados interessantes referentes à estrutura dos referidos compostos.



## ÍNDICE

	Pág.
<b><u>CAPÍTULO I</u></b>	
PARTE A - INTRODUÇÃO .....	1
PARTE B - HISTÓRICO .....	4
1.3.0 - Síntese de Monoésteres Fosfóricos com $^{32}\text{P}$ .....	22
1.4.0 - Forma Salina, sob a qual podem ser apresentados - os monoésteres fosfóricos .....	25
1.5.0 - Aplicabilidade dos métodos de Fosforilação .....	25
1.5.1 - Considerações sobre os métodos de preparação de - Diclorofosfatos de alquila e de fenila .....	29
1.5.2 - Métodos de Síntese de monoésteres fosfóricos em - pregando $^{32}\text{P}$ .....	29
PARTE C - MÉTODO DE CRAMER .....	30
1.6.0 - Considerações sobre a utilização do método de CRAMER na preparação dos monoésteres fosfóricos - marcação com $^{32}\text{P}$ .....	30
1.6.1 - Reatividade do ácido fosfórico com a tricloroace- tonitrila .....	31
 <b><u>CAPÍTULO II</u></b>	
PROPRIEDADES GERAIS DOS MONOÉSTERES FOSFÓRICOS ESTUDADOS SOB - FORMA DE SAIS DE BIS-CICLOHEXILAMÔNIO .....	32
2.1.0 - Propriedades Gerais .....	33
2.1.1 - Solubilidade .....	33
2.1.2 - Forma de Cristalização .....	33
2.1.3 - Pontos de fusão .....	34
2.2.0 - Hidrólise de Monoésteres fosfóricos .....	34
2.2.1 - Influência de cátions na hidrólise de monoésteres fosfóricos .....	40
2.2.2 - Hidrólise de monoésteres fosfóricos realizada pe- las fosfatases .....	41

2.2.3 - Emprego do $^{32}\text{P}$ em estudos cinéticos de fosfatases	41
---	----

### CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL .....	42
3.0.0 - Síntese dos Monoésteres fosfóricos .....	42
3.0.1 - Preparação da Tricloroacetitrila .....	43
3.0.2 - Técnica de preparação dos fosfatos de monoalquila e fosfato de monofenila como sais de bis-ciclohexilamônio .....	44
3.1.0 - Purificação dos monoésteres fosfóricos-sais de bis-ciclohexilamônio .....	44
3.2.0 - Processos analíticos empregados .....	45
3.3.0 - Preparação dos monoésteres fosfóricos-sais de bis-ciclohexilamônio com $^{32}\text{P}$ .....	47
3.3.1 - Purificação dos monoésteres marcados .....	48
3.3.2 - Contagem do material contendo $^{32}\text{P}$ .....	48
3.3.3 - Contagem do $^{32}\text{P}$ para determinação de Rf em material cromatografado .....	49
3.4.0 - Espectros de Absorção Infra-Vermelho .....	49
3.4.1 - Espectros Suplementares .....	49
3.5.0 - Espectros de Ressonância Nuclear Magnética .....	50
3.5.1 - Espectros de RNM de $^{31}\text{P}$ .....	50

### CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
4.0.0 - Rendimentos de Síntese e de marcação com $^{32}\text{P}$ ....	52
4.1.0 - Purificação dos monoésteres fosfóricos sob forma de sais de bis-ciclohexilamônio .....	53
4.2.0 - Pontos de fusão .....	53
4.3.0 - Análises Cromatográficas .....	54
4.3.1 - Solventes utilizados .....	54
4.4.0 - Análises Quantitativas de <u>P</u> .....	55
4.5.0 - Análises Quantitativas de <u>N</u> .....	55
4.6.0 - Estudo dos Espectros de Absorção em Infra-Vermelho .....	56

4.6.2 - Atribuição das frequências observadas em espectros de Infra-Vermelho .....	58
4.7.0 - Estudo da Ressonância Nuclear Magnética (RNM) ...	67
4.7.1 - Espectros de RNM de $^1\text{H}$ .....	67
4.7.2 - Constantes de Acoplamento observadas em RNM de $^1\text{H}$	71
4.7.3 - O problema do pH das soluções de monoésteres fosfóricos quanto às constantes de acoplamento observadas .....	73
4.8.0 - Problemas rotacionais relacionados com RNM do $^1\text{H}$ .	73
4.8.1 - Aplicação da fórmula (a) para cálculo da população Trans ( $\alpha\text{T}$ ) em toda a série alquílica dos fosfatos estudados .....	75
4.9.0 - Ressonância Nuclear Magnética de $^{31}\text{P}$ .....	76
RESUMO .....	77
ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM INFRA-VERMELHO .....	80
ESPECTROS DE RNM .....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99

## CAPÍTULO I

### PARTE A - INTRODUÇÃO

#### 1.0.0.

O estudo dos compostos orgânicos de Fósforo tem sido desde há muito, objeto de interesse, devido a razões de importância química e biológica, tendo-se em conta a presença do elemento Fósforo em todos os seres vivos.

O Fósforo foi descoberto acidentalmente em 1669 pelo alquimista alemão *BRANDT* (110a) que procurava extrair a pedra filosofal da urina humana. *MARGRAFF* (87) reconheceu a existência de um ciclo de Fósforo, passando dos minerais aos vegetais e em seguida aos animais, retornando depois ao solo. *SAUSSURE* (87) demonstrou a necessidade do Fósforo no desenvolvimento dos seres vivos.

A importância capital do Fósforo no metabolismo, foi relatada por *LIEBIG* (65), *HARDEN-YOUNG* (52) e estabelecida por *MAYERHOF*, *LIPMANN* e outros autores (78).

A maioria dos metabolitos fosforilados é derivada do ácido fosfórico e em tecidos animais o Fósforo está presente nos ácidos nucleicos, fosfolípidos e em uma série de outros ésteres fosforados.

#### 1.1.0. - PROPRIEDADE DO ELEMENTO FÓSFORO

Pertencendo à segunda linha da classifica -

ção Periódica dos Elementos, o Fósforo possui propriedades características dos elementos da mesma. No que se segue utilizamos para as nossas discussões relacionadas com a estrutura eletrônica dos átomos, funções de onda *Hartree Fock*, descritas como um Único Determinante de *Slater* (97). Apesar de aproximado, a utilidade deste modelo prende-se ao fato de termos preservada a conveniente descrição de um elétron por orbital de spin do tipo *Slater*, ou seja, o caráter de partícula do mesmo. Desta maneira podemos descrever átomos polieletrônicos em termos de funções s, p, d, etc., à semelhança do átomo de Hidrogênio. O átomo de Fósforo no estado fundamental, corresponde a um  $4s$  cuja configuração é:  $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3s^2, 3p^3$ . Assim, por exemplo, o Fósforo dá origem a compostos do tipo  $PCl_5$  e  $PF_6$  nos quais orbitais d do mesmo participam nas ligações, acomodando dez ou doze elétrons, graças à propriedade que tem o átomo de Fósforo, de expandir as suas camadas externas e tomar em seus orbitais d um ou dois pares de elétrons a mais (54). Aliás, este é um tipo de opção à qual podem recorrer os elementos da segunda linha da Classificação Periódica, fora o Nitrogênio. A participação do Fósforo na formação de ligações duplas do tipo  $\pi$ , descritas pictorialmente como consequência do entrosamento lateral de orbitais p paralelos entre si, não só é bastante rara como também, em geral, resulta na formação de compostos instáveis (86). Na realidade não se conhece até o momento nenhum composto onde haja uma ligação  $\pi$  realmente autêntica entre C e P (54) (86). O próprio tamanho do átomo de Fósforo em relação ao Oxigênio e Carbono por exemplo, tende a impedir o mesmo de participar de ligações estáveis do tipo  $p-p_\pi$ . O orbital molecular  $\pi$ , que é comum em ligações duplas  $C=C$  ( $p-p_\pi$ ) não é da mesma natureza das ligações existentes entre Fósforo e Oxigênio, por exemplo, onde o orbital molecular pictorialmente descrito como  $P=O$ , é racionalizado como consequência de um entrosamento entre orbitais p do Oxigênio e d do Fósforo, formando uma ligação do tipo  $d-p_\pi$  conhecida como "ligação dativa de retorno" (back-donation). Quando o Fósforo

se acha ligado a um átomo de Oxigênio, este tipo de ligação representa papel tão importante que chega a ser a principal força diretriz em muitas reações de substituição nucleófilas do Fósforo, especialmente se tratando do grupo fosforila (P=O) (54).

As reações de fosforilação são extremamente importantes na química dos seres vivos, haja visto a reação de fosforilação oxidativa, dando origem à produção de ácido fosfórico em reações celulares promovidas pelas Enzimas.

### 1.1.1 - IMPORTÂNCIA DOS FOSFATOS ORGÂNICOS

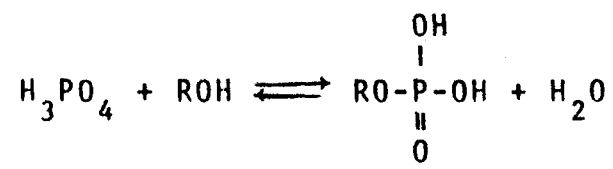
Os fosfatos orgânicos que passaremos a tratar daqui para diante, se envolvem em todas as oxidações biológicas (110b), sendo que o grupo  $PO_4$  pode servir como solubilizador (hexose) ou como ponto de ligação para Enzimas (nucleótidos flavínicos, etc.). Os fosfatos, tomam parte em fosforilações oxidativas de fundamental importância em mecanismos biológicos, embora não se envolvam diretamente na transferência de elétrons. Os derivados fosfatados das vitaminas do Complexo B (co-enzimas), participam também de oxidações biológicas (110b).

O nosso interesse no estudo dos monoésteres fosfóricos, se deve ao fato de que esta classe de substâncias se mostra de interesse no estudo de Enzimas do tipo Fosfomonoesterases, sendo que a marcação com  $^{32}P$  se constitui num instrumento útil para o acompanhamento das reações enzimáticas.

PARTE B - HISTÓRICO

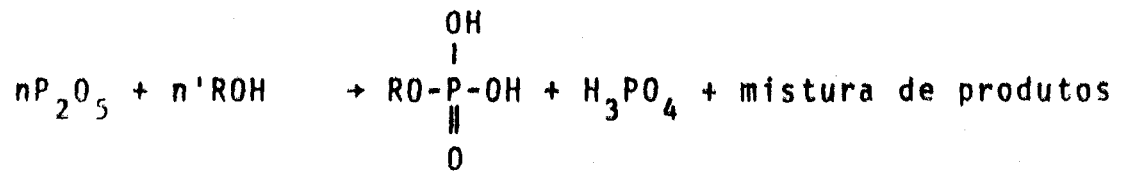
1.2.0.

As primeiras tentativas de síntese de monoésteres fosfóricos, remontam ao século passado, quando *LASSAIGNE* (64), *LIEBIG* (66) e *PÉLOUZE* (84) (85) reagiram diretamente o ácido fosfórico com álcoois. O produto resultante constituído por uma mistura complexa, tornou o método apenas pioneiro.



*SCHIFF* (96) utilizou o  $POCl_3$  como agente fosforilante para álcoois, obtendo também uma mistura de produtos.

*CAVALIER* (20)(21)(22) reagiu anidrido fosfórico com o álcoois alílico (20), metílico e etílico (21), -n-propílico, iso-propílico e iso-butílico (22).

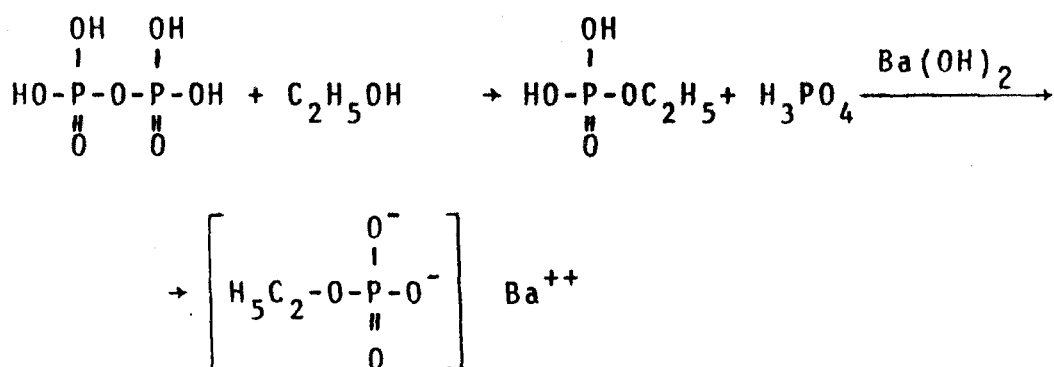


O produto de reação, tratado com  $Ba(OH)_2$ , foi separado como sal de Bário do monoéster fosfórico, graças à solubilidade diferente em relação aos sais de Bário de diésteres e fosfato de Bário inorgânico. Enquanto o  $BaHPO_4$  é insolúvel em água, o  $\left[ \left( RO \right) \overset{\overset{O}{||}}{P} \left( O \right)_2 \right] Ba^{++}$  é razoavel-

mente solúvel em água quente e o  $\left[ (\text{RO})_2 \underset{\text{O}}{\overset{\text{H}}{\text{P}}}-\text{O}^- \right]_2 \text{Ba}^{++}$  é bem solúvel em água quente.

O rendimento foi de 65% (19) na preparação do sal de Bário do fosfato de monometila.

LANGHELD(61) aqueceu o ácido metafosfórico com álcool etílico e neutralizou o produto de reação com  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , obtendo o sal de Bário do fosfato de monoetila, que foi precipitado com excesso de etanol.



O mesmo tipo de reação foi processado mais tarde por CRAMER-HETLER (29) que submeteram à alcoólise e hidrólise, trimetafosfatos de metila e de etila.

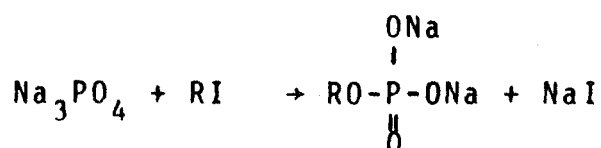


Na alcoólise do trimetafosfato de metila - com álcool metílico, o rendimento foi de 35%, enquanto a

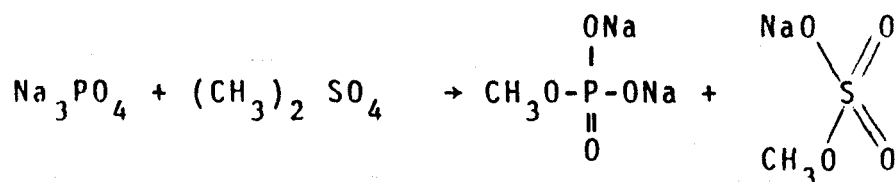


hidrólise deu rendimento de 96,7%.

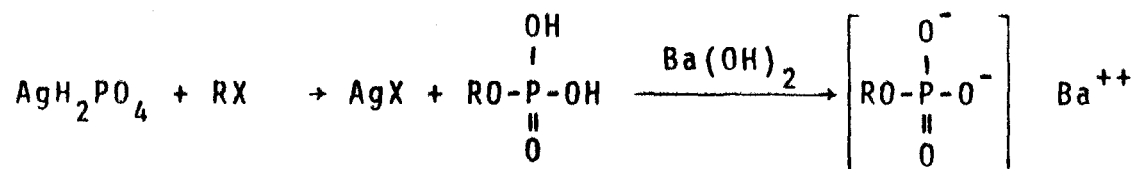
BAILLY (5) (6) reagiu iodeto em alquila em proporções equimoleculares, com fosfato trisódico em solução aquosa a temperatura de 60 a 100°C. Desta forma obteve os fosfatos de monometila, etila, n-propila, iso-propila, alila e iso-butila. Os rendimentos variaram de 73 a 10,6% do álcool metílico ao iso-butílico.



O mesmo autor (6) reagiu também fosfato trisódico com sulfato de dimetila e de dietila. Os rendimentos em monoésteres foram ao redor de 70%.



ZETZCHE (114) procurou evitar a formação de misturas na preparação de monoésteres, reagindo  $\text{AgH}_2\text{PO}_4$  com compostos orgânicos halogenados.



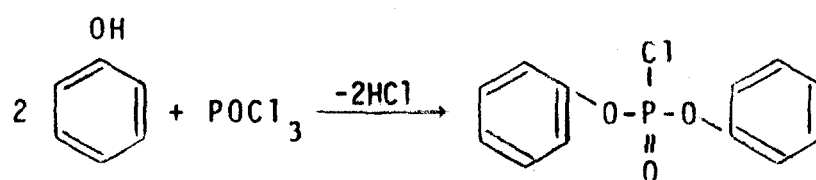
Para o fosfato de monobenzila o rendimento foi de 13,7%.

BAMANN e col. (7) empregaram o mesmo método

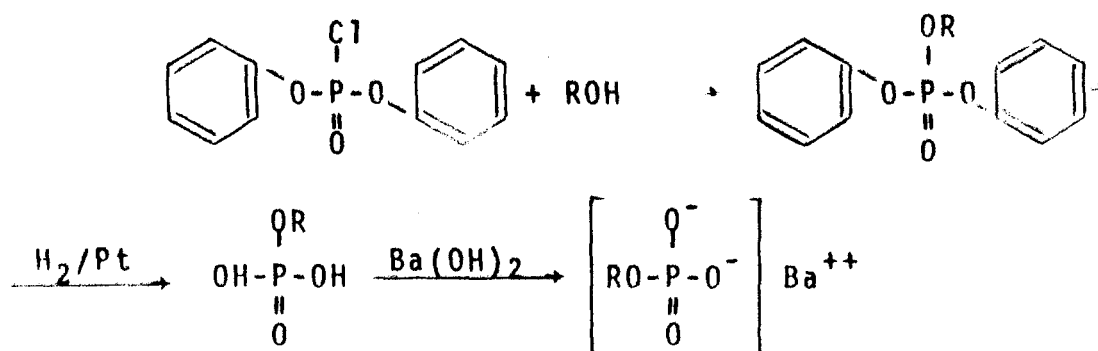
do alterando as condições da reação, visando obter melhores rendimentos; para isso prepararam  $\text{AgH}_2\text{PO}_4$  a partir de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  mais concentrado (90-95%) que anteriormente (50-80%); a quantidade de reagentes foi estequiométrica com um excesso de 10% de  $\text{AgH}_2\text{PO}_4$  e a reação mantida a  $0^\circ\text{C}$  em vez de temperatura ambiente. Os rendimentos para álcoois primários e secundários foram cerca de 40%.

*BRINGL-MÜLLER* (13) empregaram o clorofosfato de difenila como agente fosforilante. Essa substância ao reagir com um álcool dá um triéster, que após ser submetido à hidrogenação catalítica, perde os grupamentos fenila, formando assim o monoéster desejado.

A) Preparação do Clorofosfato de difenila:

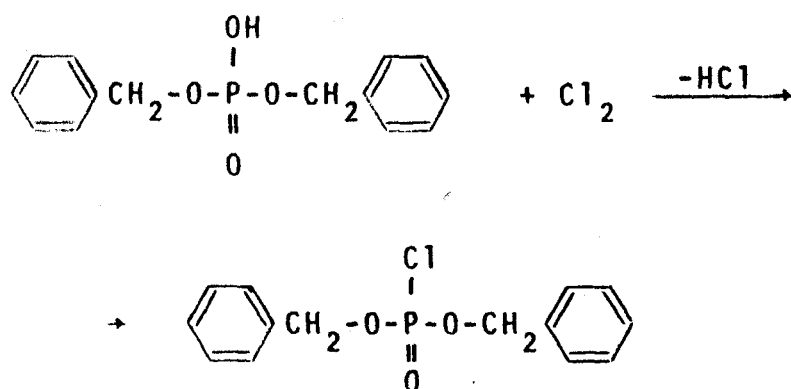


B) Preparação do monoéster fosfórico:

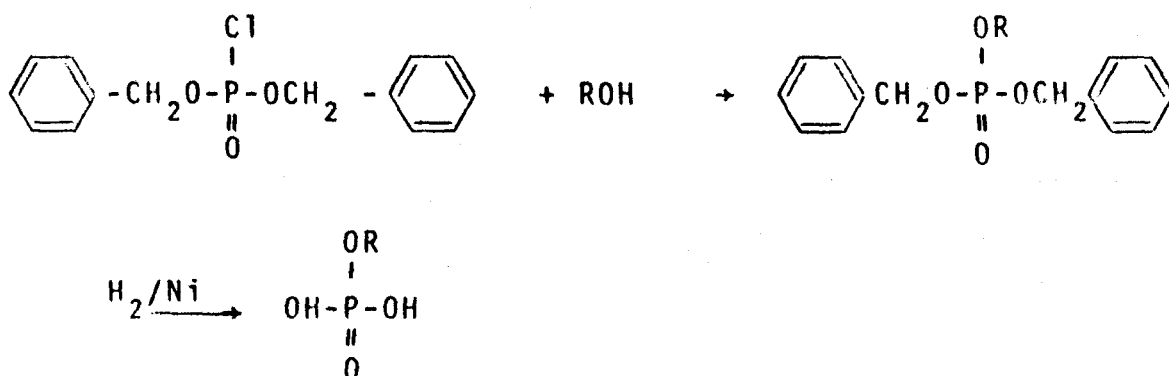


*ATHERTON* e col. (2)(3) utilizando-se do esquema acima descrito, partiram do clorofosfato de dibenzila (em vez do clorofosfato de difenila) dada a maior facilidade de remoção dos grupos benzila em relação aos grupos fenila. A hidrogenação foi feita com Níquel de Raney.

A) Preparação do clorofosfato de dibenzila:

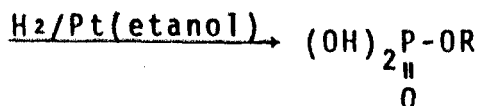


B) Preparação do monoéster fosfórico:



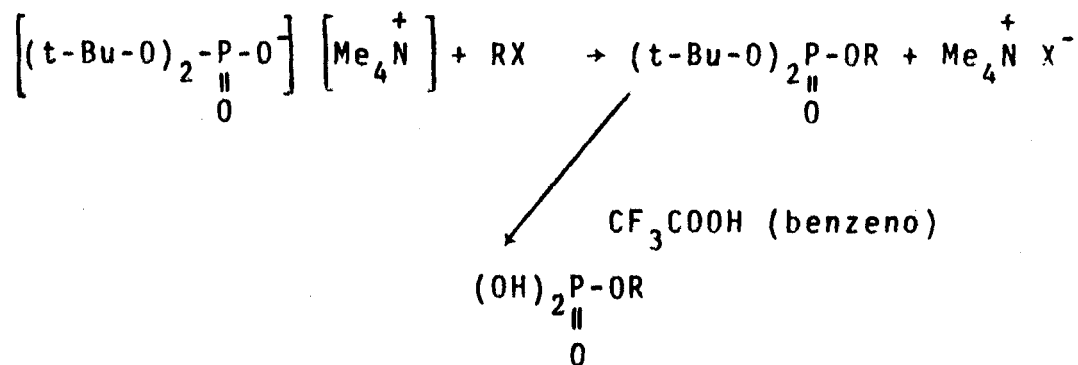
O rendimento obtido foi de 50% para o fosfato de monoetila-sal de Bário (2), de 56% para o fosfato de mono-n-butila sal de Bário e de 42% para o fosfato de mono-6-glicose (3).

MARUZEWSKA-WIEKZORKOWSKA e col. (68) utilizando o mesmo esquema, empregaram o clorofosfato de dialila, tendo em conta que o grupo alila é de fácil remoção - por hidrogenólise ou dealilação catalítica. O clorofosfato de dialila tem a desvantagem, porém, de tornar-se explosivo quando deixado algum tempo em repouso, devendo ser usado logo após seu preparo.

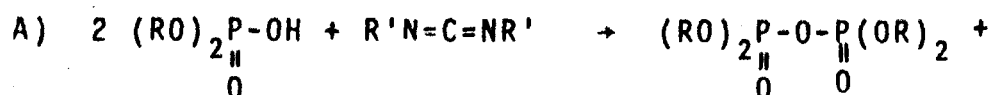


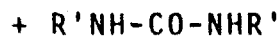
Para o fosfato de monoetila o rendimento obtido foi de 71%.

ZWIRZAK-KLUBA (116) publicaram um método de preparação de monoésteres fosfóricos, partindo do sal de tetrametilamônio do fosfato de di-ter-butila que reagindo com um haleto de alquila, produziu o fosfato de diter-butila alquila, o qual por sua vez foi convertido no monoéster alquílico com a retirada dos grupos protetores (ter-butila) por intermédio do ácido trifluoroacético.

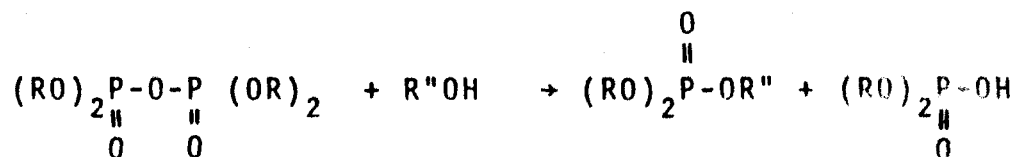


MOFFAT-KHORANA (75) partiram do pirofosfato de p-nitrofenila que reagiram com álcoois, formando-se então o triéster fosfórico, que por hidrólise alcalina branda se transformou no monoéster fosfórico correspondente.

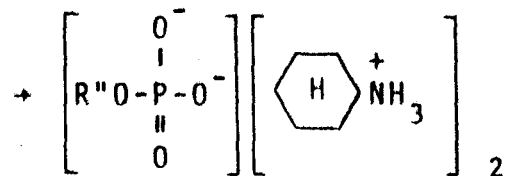
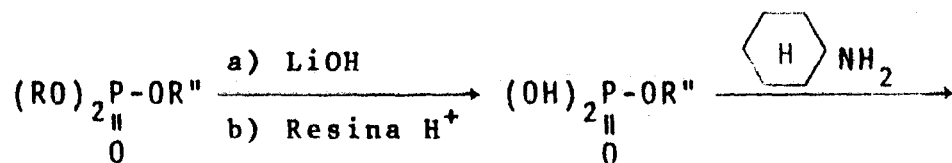




B) Fosforilação do álcool:

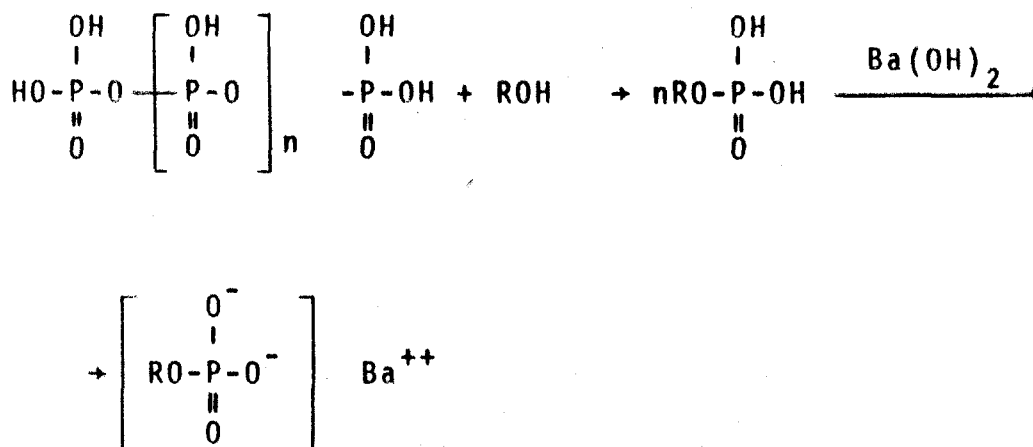


C) Hidrólise alcalina branda:

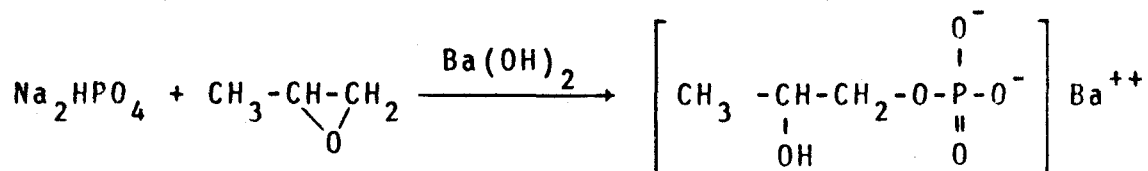


O rendimento para o fosfato de monobenzila foi de 94% e para o fosfato de monoetila 78%.

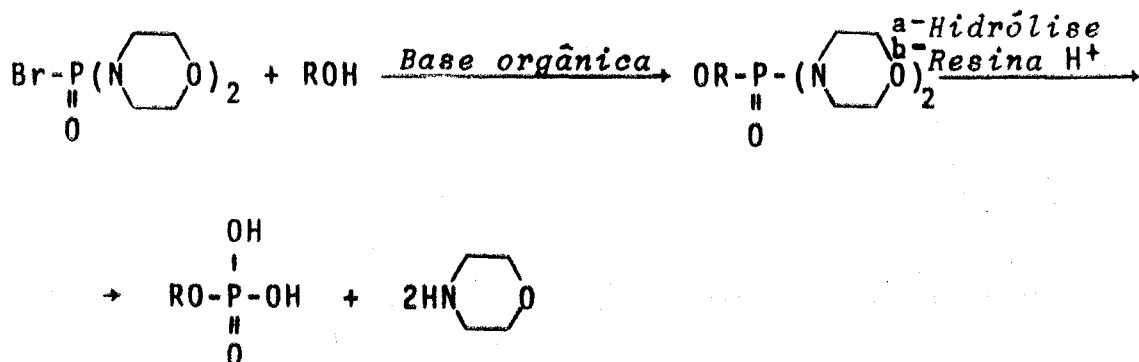
CHERBULIEZ (27) submeteu o ácido polifosfórico à alcoólise, obtendo então fosfato de monometila com 54% e fosfato de monobenzila com 31% de rendimentos. Essa alcoólise como ressaltou o autor, produz algumas impurezas constituídas principalmente por diésteres fosfóricos e a separação foi feita através dos sais de Bário.



DAVIS-ROSS (35) reagiram bifosfato de Sódio em solução aquosa, com óxido de propileno, obtendo o monofosfato de 2-hidroxi-propila com rendimento de 7%.



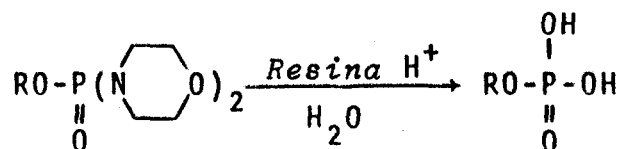
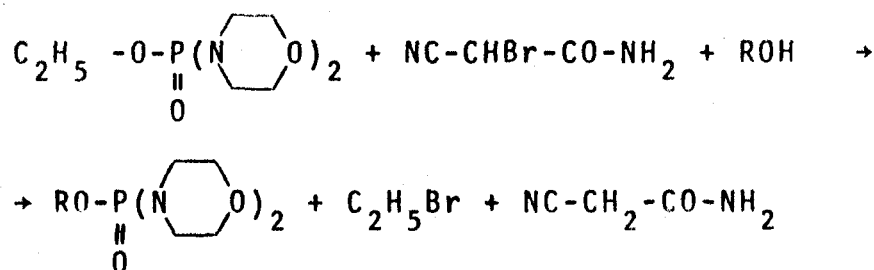
MONTGOMERY-TURNBULL (76) (77) utilizaram o bromofosfato de dimorfolina para a fosforilação de álcoois em presença de uma base orgânica. Após a reação de fosforilação, o produto formado foi hidrolizado, dando o monoesperado.



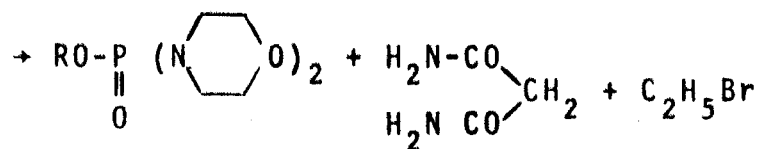
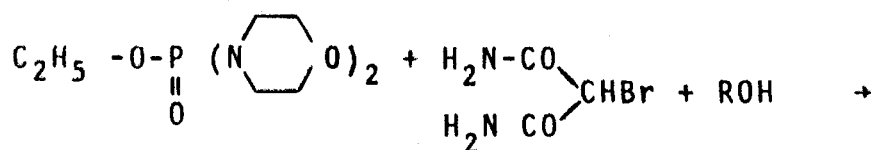
MITSUNOBU e col.(73) reagiram fosfato de di morfolina e etila, com  $\alpha$ -Bromo-cianoacetamida ou  $\alpha$ -Bromo-malonamida e álcool à temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

O produto de reação extraído com Clorofórmio, foi passado por resina catiônica na forma  $\text{H}^+$  dando o ácido monoalquilfosfórico.

A) Com  $\alpha$ -Bromo-acetamida:

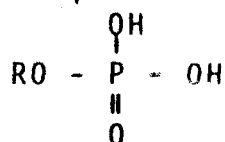


B) Com  $\alpha$ -Bromo-malonamida:



a)  $\text{H}_2\text{O}$

b) resina  $\text{H}^+$

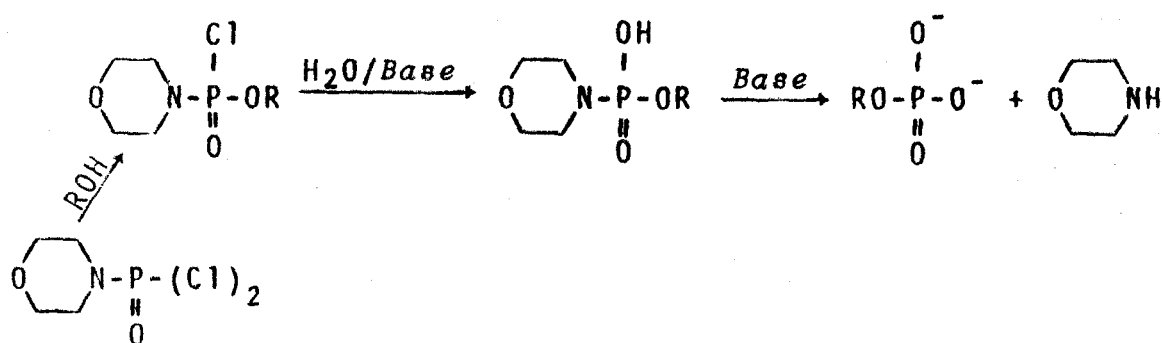


Para o fosfato de monoetila, preparado sob forma de sal de bis-ciclohexilamônio, o rendimento foi de 27%.

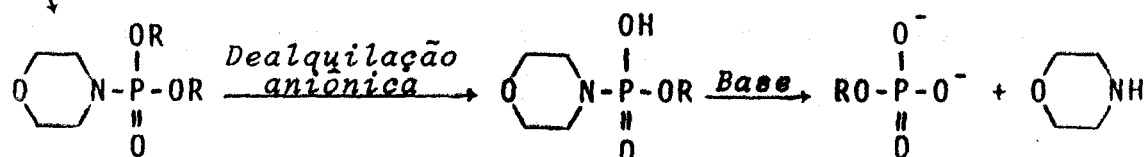
MEISE-MACHLEIDT (72) apresentaram várias possibilidades de preparação de monoésteres fosfóricos. As reações foram baseadas na ação do diclorofosfato de morfina com álcoois (esquema A e B) e alcoólise do fosfato de dimorfina (esquema C).

Esquemas apresentados:

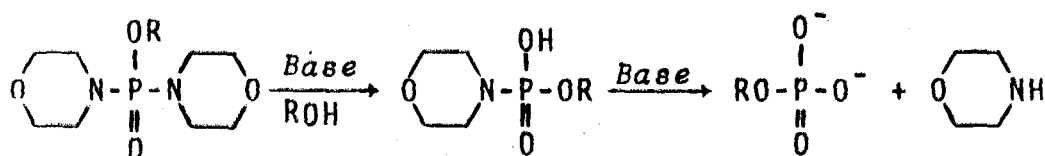
Esquema (A)



Esquema (B)



Esquema (C)

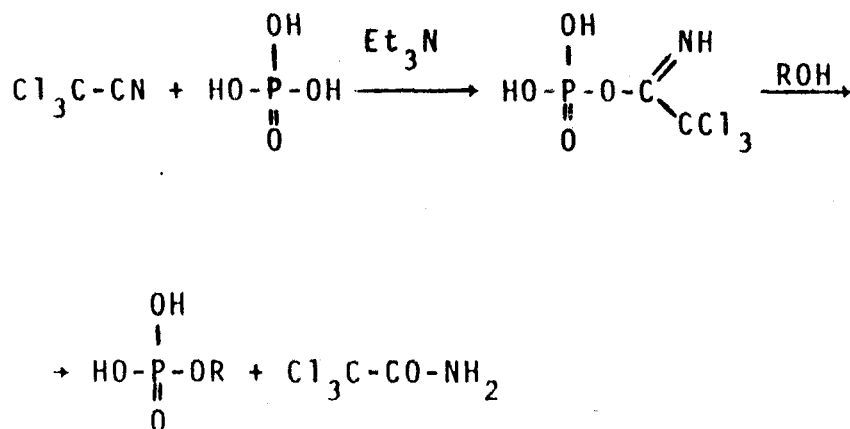


Pela hidrólise básica (esquemas A e C) obtêm-se o sal desejado do monoéster fosfórico; a dealquilação aniônica em (B) conduz à formação do fosfato de morfina e alquila que pode ser tratado com base, dando o monoéster desejado.



Seguindo o *esquema C* os autores prepararam fosfato de monoalila com rendimento de 45% e pelo *esquema B* com 76% de rendimento e fosfato de monoetila com 75% de rendimento.

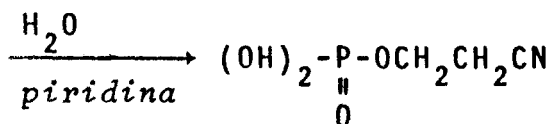
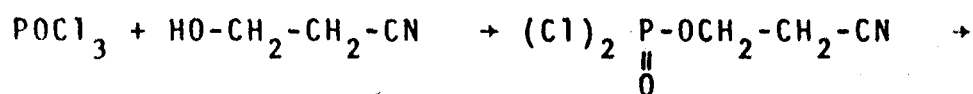
CRAMER e col. (30) (32) (33) idealizaram um método muito específico para a fosforilação de álcoois em geral. Partiram do  $H_3PO_4$  e usaram a tricloroacetonitrila como ativante de um grupo  $-OH$  do  $H_3PO_4$ , grupo esse que será substituído pelo grupo  $-OR$  do álcool. Forma-se assim especificamente o monoéster fosfórico determinado. O processo se dá em meio francamente básico com trietilamina e o solvente usado é a acetonitrila. Obtiveram rendimentos de 38,4% para o fosfato de mono-ter-Butila (33), 77% para o fosfato de monobenzila (32) e para ésteres de terpenos os rendimentos foram de 30% (fosfato de monofarnesila) e 36% (fosfato de monogeranila) (30).



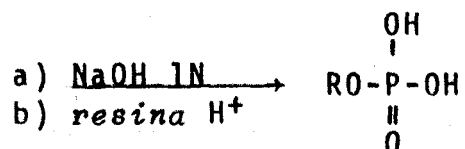
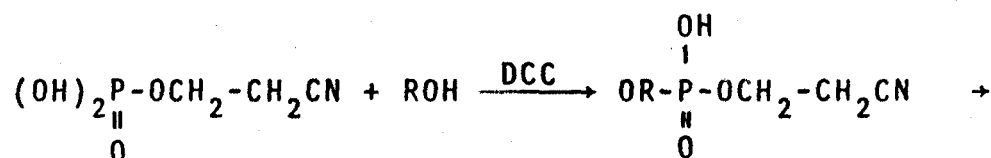
TENER (101) reagiu monofosfato de 2-cianoetila com álcoois em presença de Diciclohexilcarbodiimida (DCC) como ativador da reação. Desse modo se formou um diéster que por hidrólise alcalina branda perdeu um grupo cianoetila, dando o monoéster desejado. O monofosfato de 2-cianoetila foi preparado reagindo-se  $POCl_3$  com  $\beta$ -hidroxia

crilonitrila.

A)



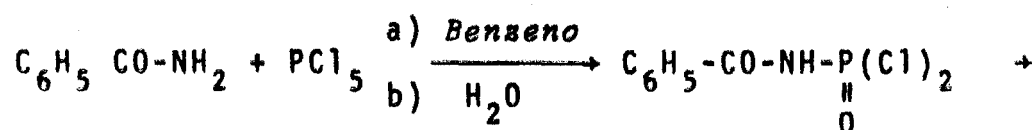
B) Fosforilação de álcoois:

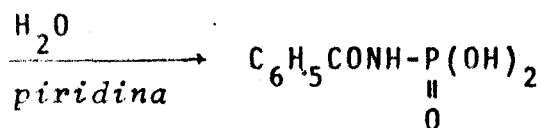


Por esse método, o autor preparou nucleótidos com 81 a 88% de rendimentos.

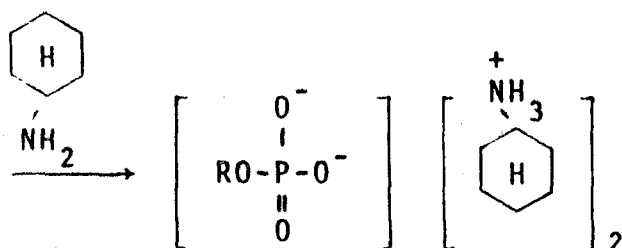
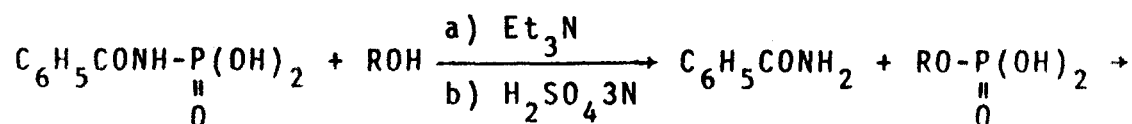
ZIOUDROU (115) utilizou a reação do ácido n-benzoilfosforamínico ou um de seus derivados (p-metil ou p-nitro) com álcoois, em presença de bases orgânicas, obtendo como resultado a fosforilação dos álcoois. A preparação do ácido n-benzoilfosforamínico obedeceu à técnica de TITHERLEY-WORRAL (103).

A)



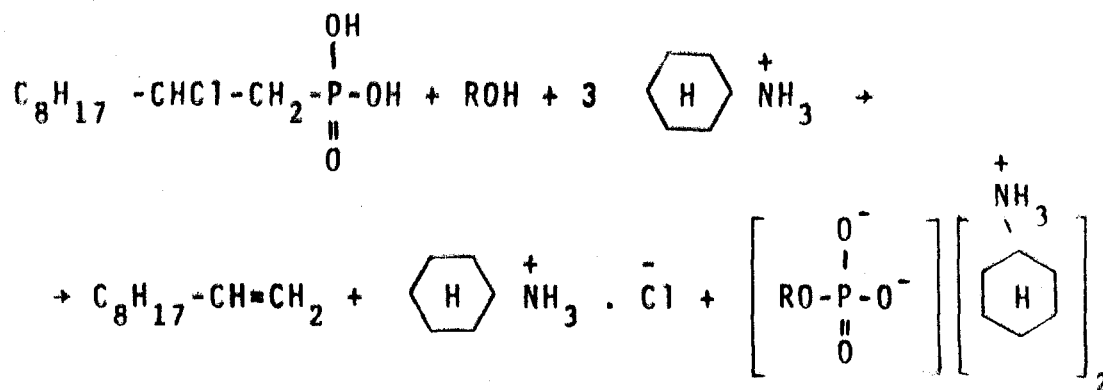


B) *Preparação do monoéster fosfórico.*



Os rendimentos obtidos foram de 74% para o fosfato de monoetila, de 63% para o fosfato de monobenzila e de 65% para o fosfato de monociclohexila.

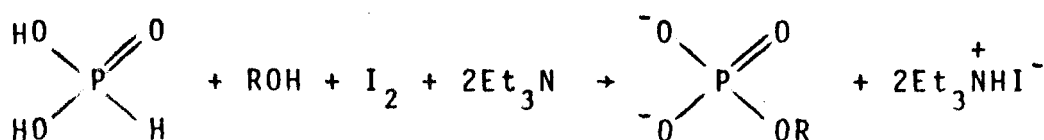
MAYNARD-SWAN (69) partiram do ácido 2-Cloro decilfosfônico, álcool e ciclohexilamina, obtendo o monoéster fosfórico.



Os autores foram os primeiros pesquisadores

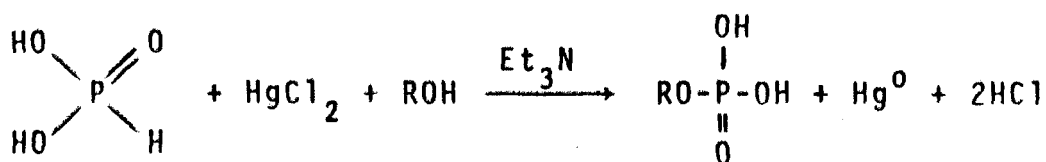
a sintetizar um monofosfato alquílico com álcool terciário, obtendo o fosfato monoter-Butila, cujo rendimento foi de 66%. Para o fosfato de monoetila o rendimento foi de 70% e para o fosfato de monofenila de 83%.

*KIRBY* (58) reagiu ácido fosforoso, trietilamina e iodo em solução alcoólica do álcool a ser fosforilado. A reação se realizou instantaneamente e se deu com a oxidação do ânion fosfito a fosfato pela ação do iodo.



O meio de reação necessita ser anidro para evitar a formação de impurezas fosforiladas e o rendimento conseguido para o monofosfato de buteno 1-4-diol foi da ordem de 90%.

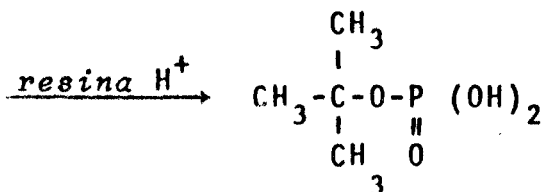
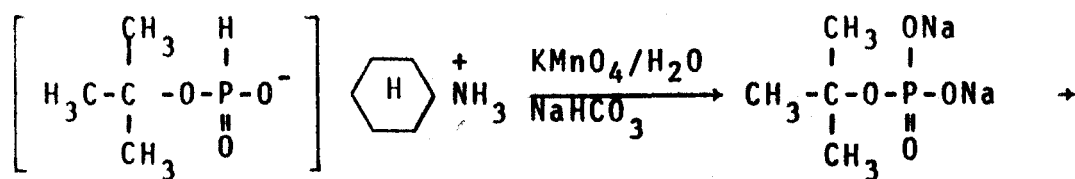
*OBATA* e col. (83) também reagiram ácido fosforoso com álcoois, empregando sais de mercúrio como oxidante, utilizando a trietilamina para acelerar a reação.



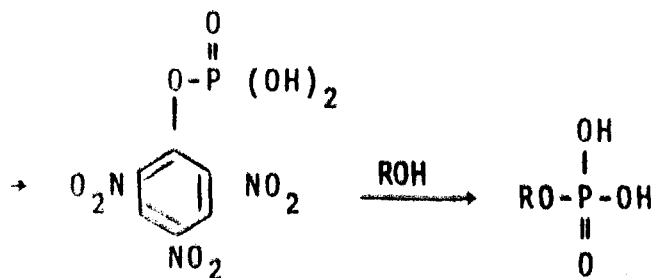
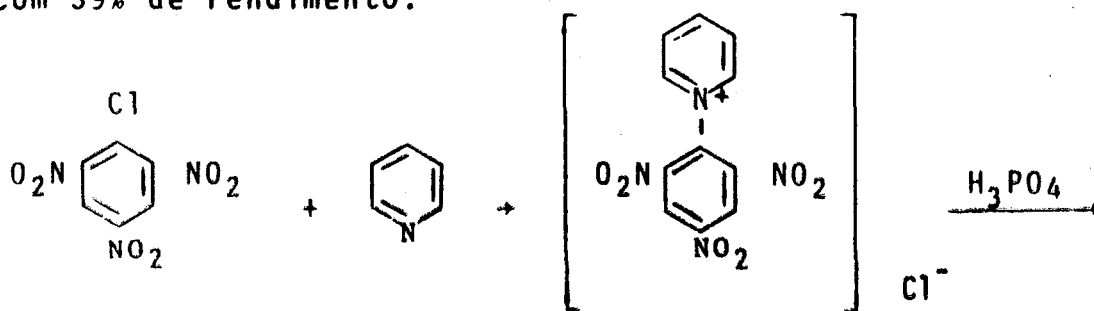
Os rendimentos obtidos foram de 80% para o fosfato de monobenzila. Os autores fosforilaram uma série de álcoois primários, secundários e borneol.

*LAPIDOT* (62) obteve o fosfato de monoter-Butila oxidando com  $\text{KMnO}_4$  o sal de monociclohexilamônio do

fosfito de ter-Butila.

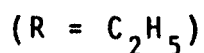
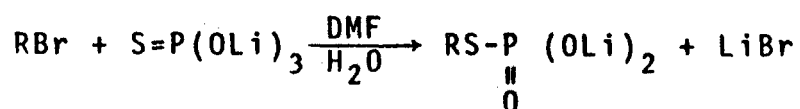


WITTMANN (112), partiu do ácido fosfórico - diretamente com álcoois, usando o cloreto de picrila ( em meio piridínico) como agente capaz de controlar a fosforilação, encaminhando-a para a formação de monoésteres fosfóricos. Por esse processo, preparou o fosfato de monoetila com 39% de rendimento.

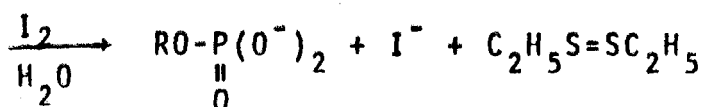
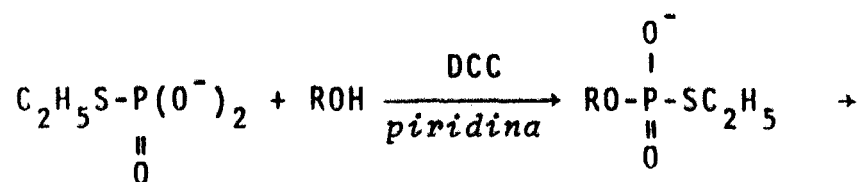


NUSSBAUM-TIBERI (82) utilizaram o ácido S-alquilfosforotióico (que age também como protetor de um grupo -OH do ácido fosfórico), para a produção de monoésteres fosfóricos. A substituição da tioalquila após a fosforilação de um álcool, foi feita em meio ácido ou básico, de forma branda e em presença de Iodo. O método utilizou-se da Diciclohexilcarbodiimida (DCC) para favorecer a reação; a preparação do ácido S-alquilfosforotióico foi feita segundo o método descrito por AKERFELDT (1) partindo-se do brometo de alquila e do sal de Lítio do ácido fosforotióico em presença de Dimetilformamida (DMF).

a) *Preparação do ácido S-alquilfosforotióico:*



b) *Fosforilação de álcoois:*



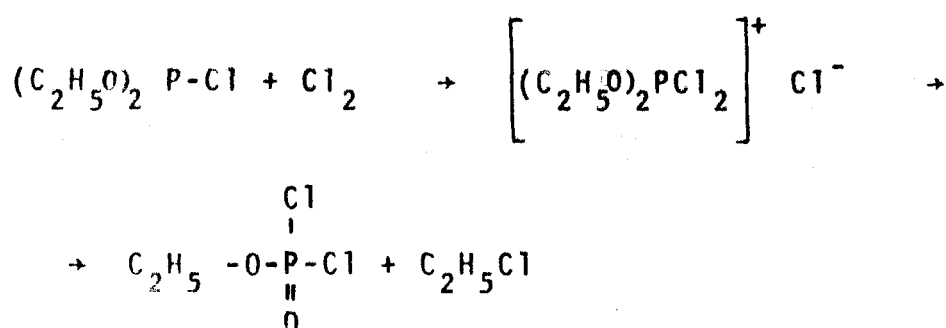
Os autores prepararam o monoéster fosfórico de um álcool esteroídico com 35% de rendimento e o fosfato de mono-5-iodo-deoxiuridina com 36% de rendimento.

1.2.1.

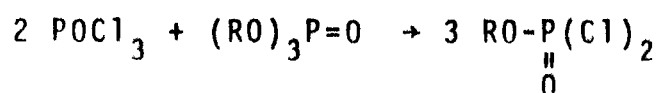
Preparação de monoésteres fosfóricos via Di-  
clorofosfatos de alquila e de Fenila.

O diclorofosfato de alquila ou de fenila que por hidrólise produz monoésteres fosfóricos, foi preparado por alguns autores e temos a ressaltar os seguintes trabalhos:

*WICHELHAUS* (111) partiu do cloreto de dietil fosfito, reagindo-o com cloro, obtendo primeiramente o sal de fosfônio que perdendo uma molécula de cloreto de etila deu o diclorofosfato de etila.



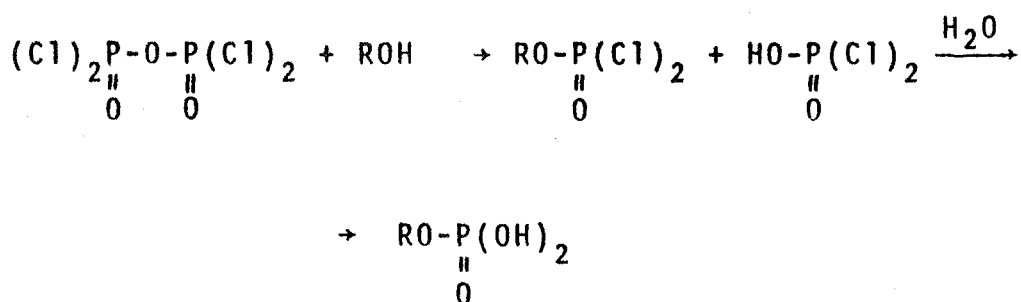
*GERRARD* (42) tentou obter o diclorofosfato de alquila, reagindo fosfatos trialquílicos com  $POCl_3$ . O rendimento porém foi muito baixo, porque a reação principal consiste na formação de pirofosfatos de alquila.



O mesmo autor melhorou o rendimento de diclorofosfato de alquila, em trabalho posterior (43) reagindo um complexo (fosfato trialquílico/cloreto de Boro) obtendo porém ao lado do produto principal, uma complexa mis

tura de compostos.

*GRUNZE* (46 a 49) obteve diclorofosfato de metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila e de alguns nucleósidos, partindo do anidrido diclorofosfórico, promovendo uma alcoólise com a quebra da ligação P-O-P. A reação foi realizada em temperaturas entre -20 a 0°C para diminuir a formação de produtos secundários e após a reação se separou o diclorofosfato de alquila por destilação.



Os rendimentos foram de 99% para álcoois primários e 40% para álcoois secundários; com nucleósidos obteve rendimentos até 85%.

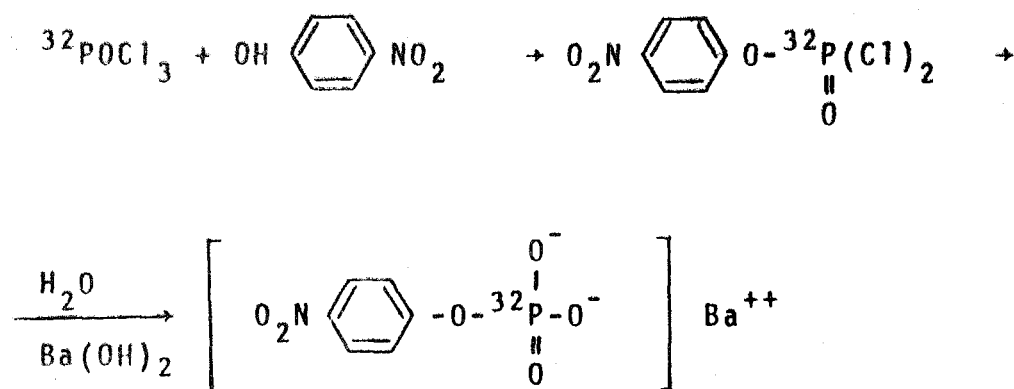
*MIZUMA* e col. (74) prepararam uma série de Diclorofosfatos de alquila partindo de  $\text{POCl}_3$  (dissolvido em éter) ao qual foi adicionado lentamente o álcool a ser fosforilado. Os rendimentos foram de 73% para o diclorofosfato de metila, descendo gradativamente até 42% para o diclorofosfato de n-decila.

*KING-NICHOLSON* (57) reagiram  $\text{POCl}_3$  com fenol em solução piridínica preparando assim o diclorofosfato de fenila, que dissolvido em água e neutralizado com  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  deu o sal de Bário de fosfato de monofenila com rendimento de 87%.

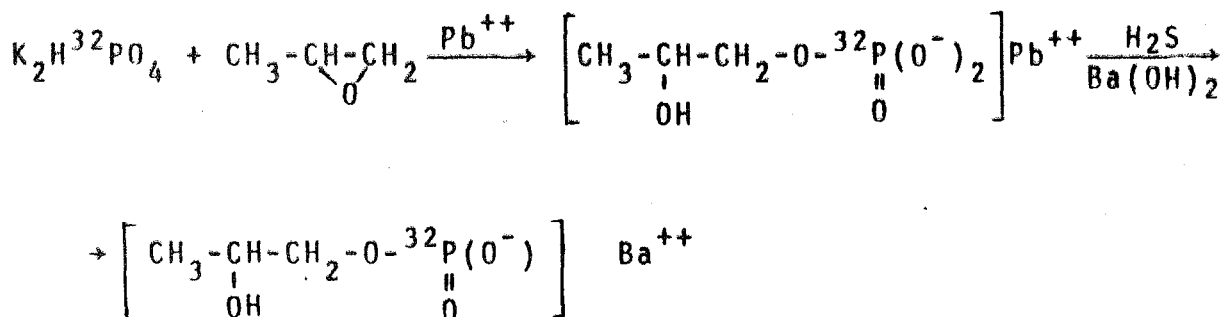




AXELROD (4) utilizou o  $^{32}\text{POCl}_3$  como agente fosforilante em presença de piridina, preparando assim o fosfato de mono-p-nitrofenila e em seguida o sal de Bário correspondente:

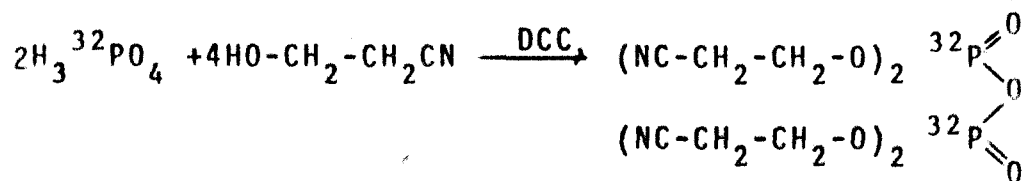


RUDNEY (94) introduziu  $^{32}\text{P}$  na molécula de fosfato de mono-2-hidrôxi-propila, reagindo  $\text{K}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  com óxido de propileno à temperatura ambiente durante 14 dias.

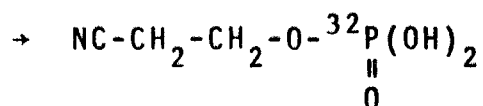
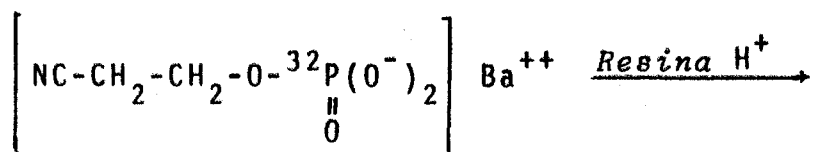
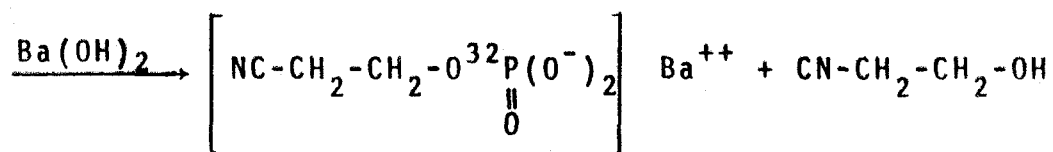
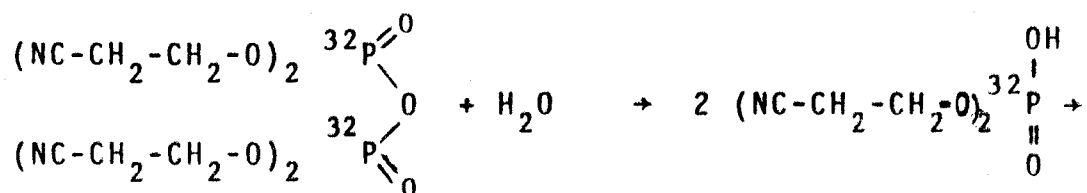


TENER (101) adaptou seu método de preparação de monoésteres alquílicos para a síntese dos mesmos com  $^{32}\text{P}$ . Usou a Diciclohexilcarbodiimida (DCC) para produzir pirofosfatos, os quais hidrolizados produziram diésteres de 2-cianoetila e com  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  obteve o monoéster fosfórico como sal de Bário. Após a fosforilação do álcool e remoção do grupo 2-cianoetila, obteve o monoéster fosfórico -  $^{32}\text{P}$ .

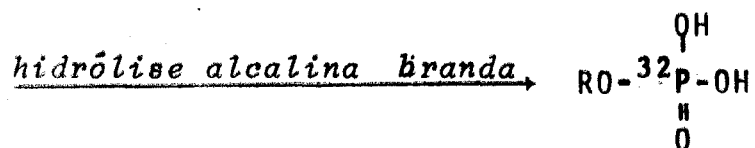
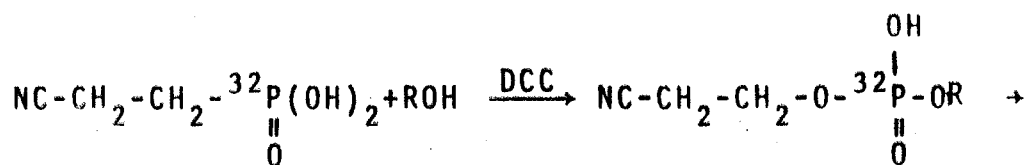
A)



B)



C) Fosforilação de um álcool:



Para o fosfato de mono-5'-ribonucleose  $^{32}\text{P}$ , o rendimento deste método foi de 60%.

1.4.0. - FORMA SALINA SOB A QUAL PODEM SER APRESENTADOS OS MONOÊSTERES FOSFÓRICOS.

CAVALIER (20)(21)(22) foi o primeiro a introduzir a forma salina de Bário como meio de purificação e separação dos monoésteres fosfóricos, tendo também preparado sais de Cálcio, Estrôncio, Potássio e Amônio (21). Desde então muitos autores têm preferido a forma de sais de Bário como meio de purificar e separar os monoésteres fosfóricos em geral (2)(3)(13)(27)(29)(35)(47)(57)(61)(114).

Trabalhos mais recentes empregam a forma de sais de bis-ciclohexilamônio que reúne várias vantagens de preparação, purificação e pode ser usada em estudos bioquímicos variados (32)(33)(62)(68)(69)(70)(72)(73)(75)(82).

OBATA-MUKAIYAMA (83) preferiram os sais de anilônio afirmando que os sais de bis-ciclohexilamônio dão análises elementares de C e H com teor mais baixo que o real, devido à exigência de temperaturas altas para a completa combustão.

ZWIRZAK-KLUBA (116) também usaram sais de anilônio.

Há ainda referências a trabalhos com sais de piridina (101), de mono-ciclohexilamônio (115) e fenilacetamida (77).

1.5.0. - APLICABILIDADE DOS MÉTODOS DE FOSFORILAÇÃO.

Os primeiros métodos estudados, principalmente aqueles do século passado e princípios deste século, já mencionados nesta introdução, produziram misturas de produtos fosforilados que após a separação e purificação como sais de Bário, apresentavam rendimentos baixos quanto

ao monoéster considerado.

Em face a problemas desta natureza, os pesquisadores foram levados à procura de métodos mais seletivos na preparação de monoésteres fosfóricos, tendo por objetivo a possibilidade de serem encontrados agentes fosforilantes e condições de trabalho específicas, abrangendo preparações de fosfatos monoalquílicos de álcoois primários, secundários, terciários, glicídios, nucleósidos, fosfatos monoarílicos, etc..

Procurando agrupar os diversos métodos descritos segundo as características de similaridade apresentadas, podemos classificar os seguintes agentes fosforilantes:

- a) *Ácidos: Metafosfórico, pirofosfórico ou polifosfórico.*

Alguns autores promoveram a alcoólise e hidrólise do trimetafosfato de alquila (29) com bons resultados somente para álcoois primários; para os álcoois em geral observa-se a formação de impurezas constituídas por ácido fosfórico (27)(61), fosfatos de dialquila (27) e metafosfato de dialquila (29). O emprego do pirofosfato de tetra-p-nitrofenila (75) na fosforilação de alguns álcoois primários como o metílico e o benzílico, deu bons resultados, com rendimentos de até 94% para o fosfato de monometila e de 78% para o fosfato de monobenzila.

- b) *Fosfato trissódico com Iodeto e Sulfato de alquila.*

O método foi estudado por BAILLY (5)(6) tendo sido indicado para fosforilações de álcoois primários - (70% de rendimento) e não satisfatório para álcoois secundários (11% de rendimento).

c) *Fosfato diácido de prata - (AgH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).*

Foi utilizado em dois trabalhos de síntese (7) (114) e foram fosforilados álcoois primários e secundários, mas os rendimentos não ultrapassaram 40%.

d) *Monoclorofosfatos de fenila e de alquila.*

A princípio foi desenvolvido um método visando a síntese de monoésteres fosfóricos de produtos naturais, que não se mostravam passíveis de serem preparados - pelos métodos existentes. Assim, pelo emprego do clorofosfato de difenila houve a possibilidade de fosforilação de vários glicídios (13)(63). Posteriormente empregou-se o monoclorofosfato de dibenzila (2)(3) e de dialila (68) obtendo-se monoésteres de álcoois primários e secundários com bons rendimentos.

e) *Agentes fosforilantes diversos; através de grupos protetores.*

O fosfato de mono-2-cianoetila em presença de Diciclohexilcarbodiimida (DCC) como ativador da reação foi empregado na preparação de nucleótidos com rendimentos de até 88% (101).

O ácido n-benzoilfosforamínico, fosforilou álcoois primários e secundários com rendimentos ao redor de 65% (115), enquanto que o ácido 2-Cloro-decilfosfônico em presença de ciclohexilamina permitiu a fosforilação de álcoois terciários pela primeira vez (69), além de fosforilar álcoois primários e fenol.

O emprego do ácido S-alquilfosforotióico - (82), cujo grupo tioalquílico funciona como grupo protetor de uma -OH do ácido fosfórico, favorece a formação de um monoéster e se presta a diversos tipos de fosforilação por

que o grupo protetor é passível de remoção em condições suaves: ácidas ou alcalinas.

O fosfato de di-ter-butila e alquila em presença de ácido trifluoroacético (116), perde os grupos ter-butila, dando um monoéster alquílico. O método só se presta à preparação de monoésteres de grupos alquílicos primários ou secundários. Os rendimentos bastante variados, foram de 95% para o fosfato de monometila, descendo para 36% com o fosfato de mono-sec-butila.

O emprego do ácido fosfórico e álcool diretamente, sem a formação de mistura complexa dos primeiros pesquisadores (64)(66)(84), só foi possível graças à introdução de agentes protetores como a tricloroacetona, utilizada com êxito nos trabalhos de CRAMER e col.(30)(32)(33), que permitiu a fosforilação de álcoois primários, secundários e terciários; também com o emprego do cloreto de picrila sugerido por WITTMANN (112) se conseguiu com êxito a síntese de alguns monoésteres fosfóricos de alquila e principalmente de nucleótidos.

f) *Fosfitos de alquila e ácido fosforoso.*

A oxidação do fosfito de ter-butila com  $\text{KMnO}_4$  (62), tornou possível a preparação de um fosfato de mono-ter-butila, sendo que poucos são os métodos que permitem a síntese de um monoéster fosfórico contendo grupos alquílicos com Carbono terciário, dado ao fato de sofrerem clivagem durante os processos de fosforilação.

A reação do ácido fosforoso com álcoois e agentes oxidantes como o Iodo, (58) ou sais de Mercúrio(83), deu rendimentos altos de 90 a 100%, não se aplicando para álcoois sólidos (58) ou álcoois passíveis de oxidação pelo Iodo.

1.5.1. - CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE DICLOROFOSFATOS DE ALQUILA E DE FENILA.

Os diclorofosfatos de alquila e de fenila, podem ser facilmente hidrolizados e convertidos em monoésteres fosfóricos.



*GERRARD* (42)(43) reagiu  $\text{POCl}_3$  com fosfatos trialquílicos, mas não obteve resultados satisfatórios; *MIZUMA* e col. (74) reagiram  $\text{POCl}_3$  com uma série de álcoois primários, obtendo rendimentos de 73% para o diclorofosfato de metila e de 42% para o diclorofosfato de n-decila; *KING-NICHOLSON* (57) reagiram também  $\text{POCl}_3$  com fenol, hidrolizando em seguida o diclorofosfato de fenila, obtendo um rendimento de 87% para o fosfato de mono-fenila sob forma de sal de Bário.

*GRUNZE* (46 a 49) empregou o ácido diclorometafosfórico como agente fosforilante, conseguindo diclorofosfatos de álcoois primários com 99% de rendimento e de álcoois secundários com 40% de rendimento.

1.5.2. - MÉTODOS DE SÍNTESE DE MONOÉSTERES FOSFÓRICOS EMPREGANDO  $^{32}\text{P}$ .

Vários autores, dentre os que prepararam monoésteres fosfóricos com  $^{32}\text{P}$ , partiram do  $^{32}\text{POCl}_3$  (4) (25) (35)(91), que pode ser preparado por troca isotrópica (108), ou então partiram do  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  (94) transformando-o no agente fosforilante após um trabalho demorado (101).

O método *CRAMER* (33) constando deste trabalho, nos permitiu partir do  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  sem necessidade de transformá-lo num agente fosforilante.



PARTE C - MÉTODO DE CRAMER

1.6.0. - CONSIDERAÇÕES SOBRE A UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE CRAMER NA PREPARAÇÃO DOS MONOÉSTERES FOSFÓRICOS. MARCAÇÃO COM  $^{32}\text{P}$ .

Dentre os métodos já descritos na literatura para a preparação de monoésteres fosfóricos alquílicos, e arílicos, poucos apresentaram rendimentos satisfatórios e a maioria produz misturas de produtos fosforados sob a forma de ortofosfatos, polifosfatos, diésteres e triésteres fosfóricos, cuja separação é muito difícil. A razão de tantos produtos secundários é decorrente da diferente reatividade dos álcoois primários, secundários, terciários, álcoois insaturados, função álcool de nucleósidos e fenóis.

Um dos métodos mais versáteis e que apresenta melhor rendimento para qualquer tipo de álcool, a partir de ácido fosfórico e tricloroacetona, foi desenvolvido por CRAMER e col. (33).

Este método é útil também para a marcação de fosfatos com  $^{32}\text{P}$ , tendo a vantagem de usar diretamente o  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  que nos é fornecido pelo Instituto de Energia Atômica de São Paulo.

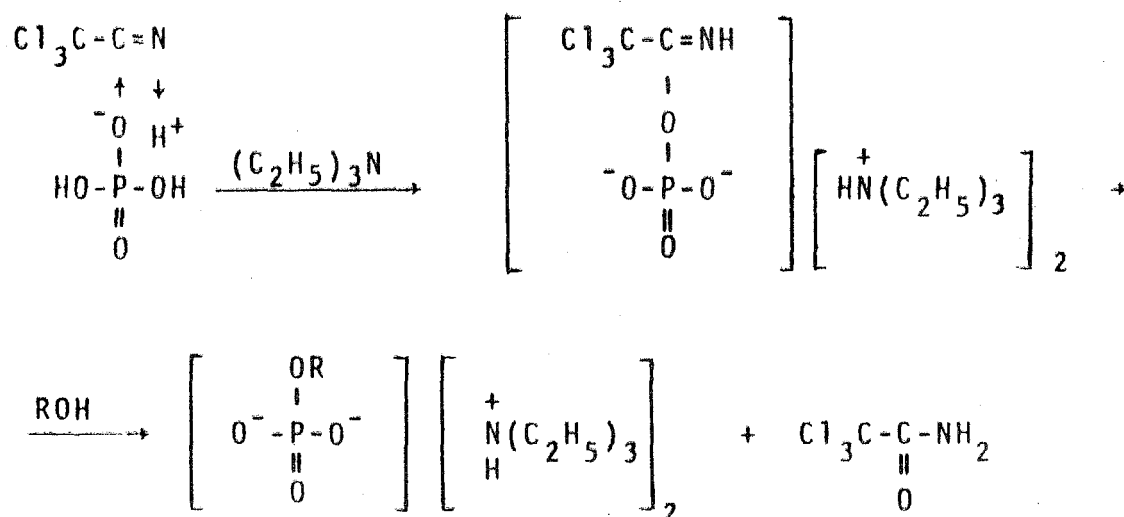
A primeira tentativa na preparação de monoésteres fosfóricos a partir de diclorofosfatos de alquila (74) e de fenila (57) só foi satisfatória para álcoois primários e fenol, levando-nos a optar pelo método de CRAMER.

Outros métodos análogos, partindo também do

ácido fosfórico como o de *WITTMANN* (112) e o de *TENER* (101) não foram considerados preferíveis ao de *CRAMER*, dadas as condições de trabalho mais longas e delicadas e principalmente devido às condições absolutamente anidras exigidas pelos mesmos, que nos forçaria a um tratamento prévio do ácido fosfórico  $^{32}\text{P}$  (56) que é fornecido em solução aquosa.

### 1.6.1 - REATIVIDADE DO ÁCIDO FOSFÓRICO COM A TRICLOROACETONITRILA.

O ácido fosfórico é passível de reação direta com a tricloroacetoneitrila, através de seu diânion  $\text{-HPO}_4^{--}$  que tem a exata nucleofilicidade (pK 6 a 7) para se adicionar ao grupo  $\text{-CN}$ , formando-se um imidoéster fosfórico. Esse imidoéster, reage com álcoois, numa reação em presença de uma base orgânica como a trietilamina, dando um monoéster fosfórico quando utilizados 2 moles de base para cada Mol de ácido fosfórico; caso seja empregado um só Mol de base, haverá a formação de um diéster (32)(39).



A reatividade da tricloroacetoneitrila com o ácido fosfórico, possibilitando a fosforilação de um álcool

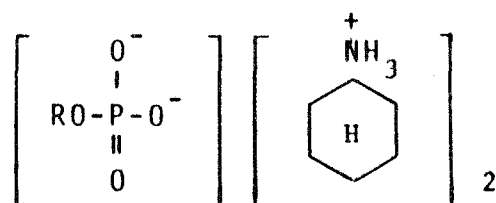
decorre dos seguintes fatores: (31)

- a) O grupo  $\text{Cl}_3\text{C}-$  da tricloroacetoneitrila tem efeito indutivo para a formação do imidoester.
- b) O grupo imidínico que se forma vai ter efeito in dutivo na fosforilação de um álcool.
- c) A tricloroacetamida formada após a reação do imi doester com um álcool, é irreversível.

## CAPÍTULO II

### PROPRIEDADES GERAIS DOS MONOÊSTERES FOSFÓRICOS ESTU- DADOS, SOB A FORMA DE SAIS DE BIS-CICLOHEXILAMÔNIO.

#### 2.0.0. - FÓRMULA GERAL:



R corresponde aos grupos: *Metila, Etila, n-Propila, iso-Propila, n-Butila, sec-Butila, ter-Butila, Benzila e Fenila.*

#### 2.1.0. - PROPRIEDADES GERAIS.

##### 2.1.1. - SOLUBILIDADE.

Os sais de bis-ciclohexilamônio dos monoêsteres fosfóricos em geral, são substâncias cristalinas incolores, sendo que os monoêsteres alquílicos se apresentam muito solúveis em água e metanol, pouco solúveis em álcool etílico a frio e insolúveis em acetona, éter e clorofórmio; o monoéster fenílico é bem solúvel em água, pouco solúvel em metanol e insolúvel em etanol, mesmo a quente.

##### 2.1.2. - FORMA DE CRISTALIZAÇÃO.

Todos os monoêsteres da série estudada fo-

ram obtidos sob forma anidra.

### 2.1.3. - PONTOS DE FUSÃO

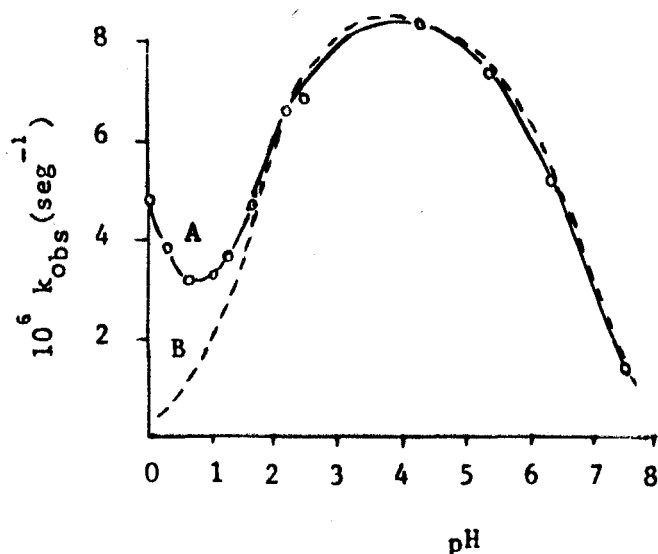
Os sais referidos apresentaram ponto de fusão determinado, com uma forma de "sintering" antes da fusão propriamente dita, que se dá com decomposição. Alguns pontos de fusão já constam da literatura, porém observa-se uma discordância entre os autores na determinação da temperatura de fusão dos fosfatos de monoetila e de monofenila, na forma de sais de bis-ciclohexilamônio. Isso pode ser decorrente especialmente de água de cristalização e outros fatores, tendo-se em vista os métodos diversos de síntese que foram empregados.

### 2.2.0. - HIDRÓLISE DE MONOÉSTERES FOSFÓRICOS

Os fosfatos orgânicos monosubstituídos, podem ser considerados ácidos dibásicos mais fortes que o ácido fosfórico. Em geral têm constantes de dissociação ácida de 1a. ordem de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  e de 2a. ordem de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  dependendo do grupamento orgânico esterificado na molécula (18)(60).

Tôdas as considerações referentes à hidrólise dos monoésteres fosfóricos, podem partir da curva típica representada na hidrólise do fosfato de monometila a 100,19C., variando-se o pH do meio de reação (17).

FIGURA I



Hidrólise de fosfato de monometila a 100,19C.

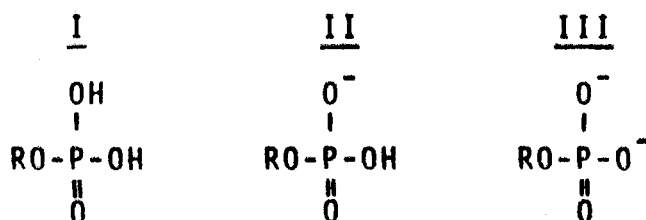
A) Curva experimental

B) Curva calculada.

A velocidade da reação nos diferentes pH estudados, permitiu que se chegasse à conclusão de que o melhor pH coincide com o valor 4.

A curva representativa da hidrólise do fosfato de monobenzila se apresenta de modo um pouco diferente da curva correspondente à hidrólise do fosfato de monometila, pois o pH correspondente ao ponto máximo é deslocado para regiões mais ácidas (12).

Em solução aquosa, os monoésteres fosfóricos sofrem dois tipos de dissociação, dando origem a três formas em solução:

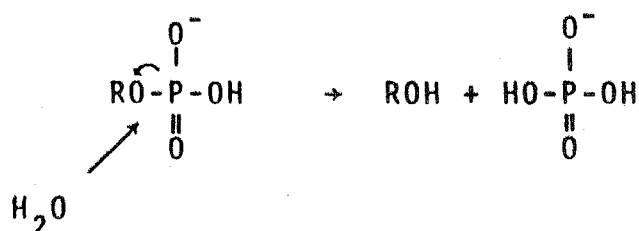


Cada forma de dissociação iônica, pode ser envolvida em reações químicas diretamente com a água ou a través de um intermediário reativo. Essas reações são feitas pela quebra da ligação C-O ou P-O (44). Na curva de hidrólise vê-se que a melhor condição coincide com pH 4 havendo em pH 1 ou 8 uma queda na velocidade de hidrólise. O conhecimento das constantes  $pK_1$  e  $pK_2$  dos monoésteres fosfóricos, nos permite calcular as quantidades relativas presentes das formas iônicas II, III e da forma I, em cada pH considerado, e deve-se levar em conta também os efeitos produzidos pela variação estrutural dos grupos R com relação à velocidade de hidrólise. Para cada pH considerado, na hidrólise do fosfato de monometila a 100,1°C., foi calculada teoricamente a velocidade de reação pela equação:

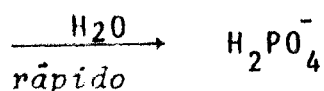
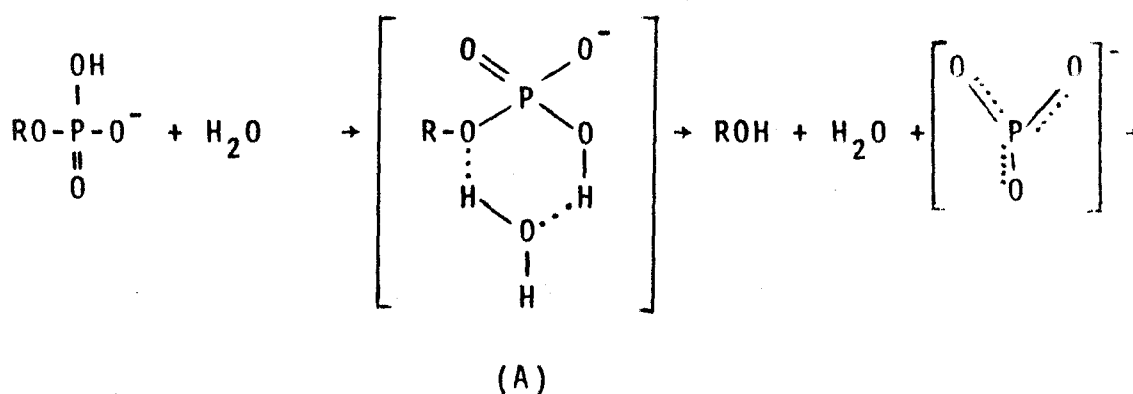
$$10^6 v = 8,23 [M] + 0,5 [N] e^{0,423\mu} + 3,08 [N] [H^+] \quad (16)$$

$[M]$  e  $[N]$  são concentrações dos ésteres nas formas iônicas e neutra, calculadas pelas constantes de dissociação do fosfato de monometila em que o  $pK_1=1,61$  e o  $pK_2=6,85$  a 100°C.;  $[H^+]$  é a concentração hidrogeniônica e a exponencial descreve o efeito do sal na hidrólise da espécie neutra. A curva traçada com esta equação teve boa coincidência com a curva experimental de hidrólise (17) como no gráfico atrás, representado na figura 1.

CHANLEY e col. (24) sugeriram que a hidrólise de monoésteres fosfóricos se realize com o ataque nucleofílico da água ao fósforo, havendo a quebra rápida do estado de transição:



Para uma melhor compreensão do problema da hidrólise de monoésteres fosfóricos, é necessário considerar, que entre as formas de dissociação, a forma II ou monoiônica, é a que sofre hidrólise com mais facilidade e mais rapidamente portanto; seu pH ótimo é 4 e a clivagem da molécula se dá na ligação P-O (18). A grande reatividade do monoânion é explicada de várias formas por diferentes autores (107) e verifica-se a existência de um intermediário (A) da seguinte forma:



A alta reatividade do monoânion deve depender de dois fatos: da carga negativa  $-\text{O}^-$  e do grupo  $-\text{OH}$  ligados ao átomo de Fósforo. O grupo  $-\text{OH}$  pode transferir um próton ao "leaving group" alcóxido que seria eliminado sob a forma de álcool (ROH) e esse processo é mais favorável e energeticamente do que a eliminação de um íon alcóxido (18). A transferência do próton ao O alcólico é parte obrigatória do processo e a função do próton é de converter o grupo alcóxido no "leaving group" energeticamente mais favorável (16).

Na equação acima vista, o íon metafosfórico monomérico hipotético  $-\text{PO}_3^-$  reagiria rapidamente com a água, dando o íon fosfato di-hidrogenado. Nos solventes com



pouca água, os metafosfatos condensados chegaram a ser isolados, mas os metafosfatos monoméricos não, pois apenas formados, seriam captados pelo solvente ou se condensariam com eles próprios. As constantes observadas são de 1ª ordem (18).

A estabilidade do di-ânion III perante o ataque dos íons  $\text{-OH}^-$  da água dipolar, reside na repulsão eletrostática sofrida por esses íons em face ao excesso de carga negativa do di-ânion. Todavia, esse raciocínio nos levaria a crer que a forma neutra I seria a mais reativa, visto não ter carga livre para repelir o ataque da oxidri-la da água. Outra explicação dada (24) seria que na formação do estado de transição, após o ataque da molécula da água, existe um certo estiramento da ligação P-O e presume-se que a maior capacidade de estiramento se deva à menor força de ligação entre os átomos P-O nas diversas formas iônicas dos monoésteres fosfóricos. Na forma neutra, portanto a ligação P-O é forte e o estiramento é dificultado. Na forma mono iônica, as forças que poderiam impedir o ataque da água são minimizadas e a espécie iônica se torna bastante reativa.

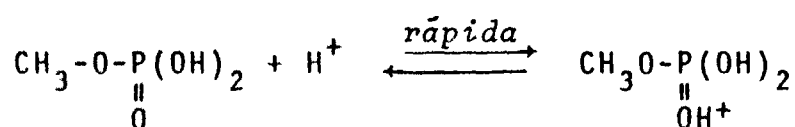
Em soluções muito ácidas, a concentração da forma não dissociada é alta e a hidrólise teria um intermediário semelhante à forma (A) onde existe a adição de um íon  $\text{H}^+$ ; seria formado um álcool ROH e o ácido metafosfórico monomérico  $\text{-HPO}_3^-$ . Nesse caso, o intermediário não perderia ROH tão rapidamente como faz o intermediário (A) que tem uma carga negativa. Em presença de ácidos fortes, esses monoésteres apresentam um ou mais mecanismos adicionais, com clivagem C-O predominante (19).

O emprego  $^{18}\text{O}$  esclareceu bastante o estudo da hidrólise. Tratava-se de estabelecer com precisão se a quebra seria preferencialmente na ligação C-O ou P-O, (16). Os monoésteres alquílicos em pH 4 apresentaram a quebra na região P-O.

Alguns autores puseram em dúvida o valor de  $^{18}\text{O}$  na determinação do ponto de clivagem da ligação P-O-C, aventando a possibilidade de troca simultânea do  $^{18}\text{O}$  nos reagentes e produtos formados, falseando então os resultados (16).

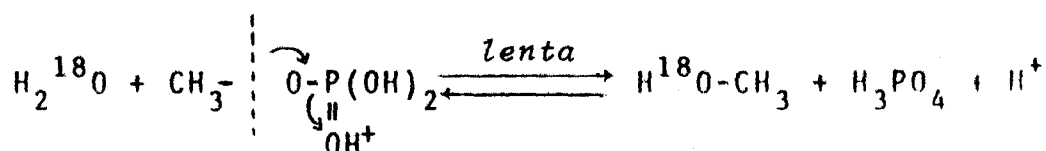
BUNTON (18) estudou a hidrólise do fosfato de monometila e apresentou o seguinte esquema:

*Catálise ácida-fase inicial.*

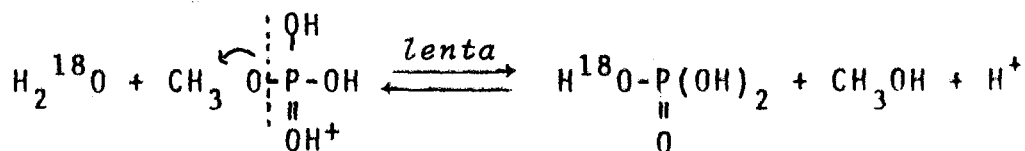


Em seguida pode ocorrer uma das fases descritas:

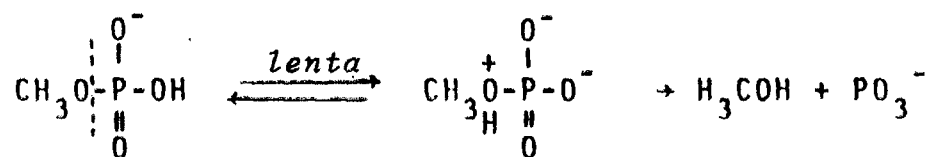
a) hidrólise com quebra C-O:



b) quebra P-O:



c) reação do monoânion:



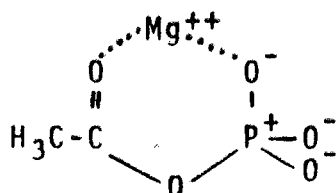
*Hidrólise do monoéster não dissociado:*



A hidrólise de monoânion é pouco influenciada pela presença de substituintes que atraem elétrons pertencentes ao grupo R (18).

### 2.2.1. - INFLUÊNCIA DE CÂTIONS NA HIDRÓLISE DE MONOÉSTERES FOSFÓRICOS.

Quase todos os monoésteres fosfóricos alquílicos ou arílicos são estáveis em pH alcalino acima de 7 e formam complexos cuja estabilidade está ligada à espécie iônica. Com fosfatos de acetila em hidrólise não enzimática, adicionando-se íons  $\text{Mg}^{++}$  em pH 7,6 se observou um certo aumento na taxa de reação com predominância de quebra P-O (59). Esse fato foi atribuído à formação de um complexo do tipo quelato com o  $\text{Mg}^{++}$ , que é passível de ser atacado pela água, com quebra P-O. Foi também sugerida a formação de complexos do tipo quelato nos quais o P seria um ligante bidentado (16).



A catálise verificada na hidrólise de monoésteres fosfóricos, por meio de certos metais como o La e Ce na forma de hidróxidos (8)(78) foi proposta como um modelo que pode ser aplicado para a hidrólise enzimática.

Os complexos metálicos de diânions podem ser

espécies reativas tanto em catálise enzimática, como não enzimática (45).

### 2.2.2. - HIDRÓLISE DE MONOÉSTERES FOSFÓRICOS REALIZADA PELAS FOSFATASES.

O termo Fosfatase é bastante genérico, abrangendo enzimas que catalizam a hidrólise de um éster ou anidrido fosfórico, transformando-os em metabolitos fosforilados (40)(92). A hidrólise de um monoéster fosfórico alquílico pode ser promovida por uma Fosfatase, a qual irá produzir a clivagem da ligação C-O ou P-O do monoéster fosfórico utilizado. Usando-se substratos marcados com  $^{18}\text{O}$  em reações catalizadas por Fosfatases, se observou clivagem P-O (78), e a faixa de pH considerada ótima abrange certos valores, havendo a predominância de clivagem P-O, se o pH for ácido, ocorrendo clivagem C-O, se for mudado o pH da reação. Para um mesmo valor de pH, mudando-se somente o grupo R esterificado, pode haver mudança no mecanismo de reação.

### 2.2.3. - EMPREGO DE $^{32}\text{P}$ EM ESTUDOS CINÉTICOS DE FOSFATASES

O uso de  $^{32}\text{P}$  em estudos relacionados com a cinética das reações com Fosfatases, tem sido feito com a finalidade de elucidar pontos nos quais o traçador isotópico se torna indispensável. O  $^{32}\text{P}$  pode ser adicionado ao substrato de reação sob forma de fosfato inorgânico, sendo detectado nos produtos de reação formados na catálise enzimática, ou então o substrato é previamente marcado com  $^{32}\text{P}$  e empregado na determinação de certos mecanismos (78)(55).

### CAPÍTULO III

#### PARTE EXPERIMENTAL

1. Preparação dos fosfatos monoalquílicos e do fosfato de monofenila sob forma de sais de bis-ciclohexilamônio.
2. Purificação dos monoésteres.
3. Processos analíticos de reconhecimento qualitativo e avaliação quantitativa dos elementos: P, N.
4. Preparação dos monoésteres fosfóricos com  $^{32}\text{P}$ .
5. Processos de contagem do  $^{32}\text{P}$  em contadores de radiação  $\beta$ .
6. Espectros de Absorção Infra-Vermelho.
7. Espectros de Ressonância Nuclear Magnética.

#### 3.0.0. - SÍNTESE DOS MONOÉSTERES FOSFÓRICOS.

##### Reagentes utilizados:

- a) Ácido fosfórico p.a. (Reagen).
- b) Acetonitrila (Carlo Erba).
- c) Trietilamina (Carlo Erba).
- d) Acetona p.a. (Merck).
- e) Álcoois: Metílico, etílico, n-propílico, iso-propílico, n-butílico, sec-butílico, ter-butílico, benzílico (Baker).
- f) Fenol (Baker).
- g) Ciclohexilamina (Koch-Light-London).

- h) Ácido fosfórico  $^{32}\text{P}$  - Instituto de Energia Atômica.
- i) Tricloroacetoneitrila - preparada em nossos laboratórios.

### 3.0.1. - PREPARAÇÃO DA TRICLOROACETONITRILA ( $\text{CCl}_3\text{-CN}$ ).

A síntese da tricloroacetoneitrila se baseou fundamentalmente nos trabalhos de *DAVIES - JENKIN* (34) e *MCBEE* e col. (71).

#### A) *Preparação de tricloroacetato de etila:*

Deixou-se reagir sob refluxo 223,5g (1,38 - Mol) de ácido tricloroacético, 322g (7 Mol) de Etanol absoluto e 1 ml de ácido clorídrico concentrado. Após 6 horas de refluxo, o produto resultante foi destilado em coluna de fracionamento e pressão atmosférica ambiente. P.E.=162-165<sup>o</sup> (750mm Hg). O rendimento foi de 217g (83%).

#### B) *Preparação da tricloroacetamida (34):*

Colocou-se 100g de tricloroacetato de etila em um balão e após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se lentamente 200cm<sup>3</sup> de amônia concentrada. Conservou-se em geladeira por uma noite a 0<sup>o</sup>C. A tricloroacetamida se depositou no fundo do balão sob forma de cristais volumosos e transparentes. Filtrou-se, lavou-se com um pouco de tetracloreto de carbono e a umidade remanescente foi eliminada suspendendo-se o material em tetracloreto de carbono e destilando-se a mistura azeotrópica até a ausência de turvação no destilado. O rendimento foi de 55g (72%).

#### C) *Preparação da tricloroacetoneitrila:*

47g de tricloroacetoneitrila foram mistura-

dos com 50 g de  $P_2O_5$  num balão de destilação munido de coluna de fracionamento. A mistura foi aquecida lentamente, destilando-se a tricloroacetoneitrila a uma temperatura de 84°C e pressão atmosférica ambiente. Rendimento: 31g (67%).

3.0.2. - TÉCNICA DE PREPARAÇÃO DOS FOSFATOS DE MONOALQUILA E FOSFATO DE MONOFENILA COMO SAIS DE BIS-CICLOHEXILAMÔNIO.

Dissolveu-se 8,5g de tricloroacetoneitrila - em 40mMoles do álcool desejado ou fenol e colocou-se essa mistura em um funil de separação ligado a um balão contendo: 2,3g de ácido fosfórico (20mMoles), 4,1g de trietilamina (40mMoles), 15ml de acetoneitrila e 3 gotas de água. O balão estava munido de agitador magnético e foi deixado à temperatura ambiente todo o tempo de reação. Gotejou-se o conteúdo do funil de separação, lentamente, durante 15 minutos, deixando-se então a reação se processar por um período de mais duas horas sob agitação. Passado esse tempo, juntou-se ao balão 150ml de acetona, transferindo-se tudo para um frasco erlenmeyer de 250ml de capacidade, adicionando-se 15ml de ciclohexilamina, que formou um precipitado volumoso do monoéster fosfórico sob forma de sal de bis-ciclohexilamônio. Deixou-se por uma noite em geladeira - (0°C) após o que se procedeu à filtração a vácuo do precipitado, lavando-o em seguida com acetona.

3.1.0. - PURIFICAÇÃO DOS MONOÉSTERES FOSFÓRICOS - SAIS DE BIS-CICLOHEXILAMÔNIO.

Para os fosfatos monoalquílicos, a técnica de purificação foi a descrita por CRAMER (33): dissolveu-se a quente cerca de 2g de cada monoéster em uma mistura de 100ml de álcool etílico com 10% de ciclohexilamina e 1% de

água. A solução resfriada e levada à geladeira (0°C) depositou após algumas horas, cristais em forma de agulhas que foram filtrados, lavados com acetona e secos a vácuo sob  $P_2O_5$ . A recristalização foi repetida de três a cinco vezes, controlando-se o grau de pureza através de cromatografia em papel e ponto de fusão.

O fosfato de monofenila-sal de bis-ciclohexilamônio foi purificado dissolvendo-se 2g do sal a quente em álcool etílico/água 1:1 (v/v), contendo 10% de ciclohexilamina. A recristalização foi feita no mínimo por três vezes até o produto se apresentar cromatograficamente puro e com o ponto de fusão constante.

Outras técnicas de recristalização também foram experimentadas. Dentre os solventes utilizados temos:

- a) Etanol a quente/éter (70); só para os monoésteres alquílicos.
- b) Água/acetona (72)(77).
- c) Metanol/éter; só para os monoésteres alquílicos.
- d) Etanol a 80% a quente e deposição dos cristais - por resfriamento em geladeira; só para monoésteres alquílicos.

### 3.2.0. - PROCESSOS ANALÍTICOS EMPREGADOS.

- a) Ponto de fusão.

Todos os pontos de fusão foram determinados em microscópio *REICHERT-Áustria*, munidos de placa de aquecimento e termômetro acoplado.

- b) Cromatografia.

As análises cromatográficas foram realizadas em papel Whatman nº 1 como suporte e o tipo de corrida do solvente foi do ascendente; o tempo de corrida foi cer-



ca de 2 horas à temperatura de 220°C.

*Sistemas de solventes empregados:*

1. n-Propanol, amônia concentrada, água (6:3:1) (33).
2. n-Butanol, ácido fórmico, água (32:1:9) (41).

*Outros sistemas também experimentados:*

1. Clorofórmio, etanol (4:1).
2. n-Butanol, etanol, piridina (1:1:1).
3. n-Propanol, amônia concentrada (7:3) (79).
4. Benzeno, ácido fórmico, água (15:15:20). A camada orgânica foi diluída com cinco volumes de n-Butanol (23).
5. n-Butanol, n-Propanol, amônia 2N (5:2:3) (99).
6. iso-Propanol, amônia concentrada (75:25) (99).
7. n-Propanol, acetato de etila, água (7:1:2) (41).

Após o tempo de corrida e eliminação do solvente, se procedeu à detecção das manchas respectivas dos produtos fosforados, utilizando-se o reativo *HANNES-ISHERWOOD* (51). Após a pulverização do reagente citado, levou-se o papel cromatografado para uma estufa a 100°C por 3 minutos. As manchas contendo fosfatos apareceram em cor azul.

c) Determinação quantitativa de P.

O método empregado, foi o processo colorimétrico de *FISK-SUBBAROW* (38). Antes de cada análise, os monoésteres foram submetidos a uma hidrólise da seguinte forma: em tubos de ensaio de 20ml se colocou 1  $\mu$  Mol de cada produto, que foi misturado com 1ml de uma solução contendo ácido sulfúrico/ácido nítrico 7:3 (v/v) e aquecidos lentamente até 180°C através de um banho de óleo, permanecendo nessa temperatura durante um intervalo de 40 minutos.

Em seguida adicionou-se aos tubos de ensaio

com as amostras, 0,4ml de água, levando-os a um banho-maria por 10 minutos, para hidrolizarem-se os pirofosfatos formados. Decorrido esse tempo, após resfriamento das amostras se completou o volume até 10ml com água destilada em balão volumétrico. Cada ml dessa solução continha 0,1 $\mu$ Mol de P/ml.

As amostras foram então tratadas com os reagentes específicos e a técnica descrita por *FISK-SUBBAROW*, (38) ; a cor azul foi lida em *spectrocolorimeter* E-1009 - *Metrhon Herisau*, em comprimento de onda de 660m $\mu$ .

A cada lote de análises, acompanhou uma curva padrão feita com soluções de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  nas diluições de 0,1 a 0,3  $\mu$ Mol de P/ml.

Paralelamente, foram feitas também análises gravimétricas de Fósforo para confirmar os resultados obtidos com o processo colorimétrico. Essas análises foram efetuadas segundo a técnica de *VOGEL* (109). Também neste caso as amostras foram hidrolizadas previamente da seguinte forma: foram pesados cerca de 8mg de cada amostra em tubos de ensaio de 20ml, juntando-se 5ml de ácido nítrico concentrado; a mistura foi levada a aquecimento até a solução se tornar incolor, tendo sido então diluída a cerca de 50ml em um bequer de 250ml e procedida a precipitação dos fosfatos.

d) Determinação quantitativa de N.

As análises quantitativas de N obedecem ao processo Kjeldahl em escala semi-micro, cuja técnica está descrita no "The National Formulary" (81).

3.3.0. - PREPARAÇÃO DOS MONOÉSTERES FOSFÓRICOS-SAIS DE BIS-CICLOHEXILAMÔNIO COM  $^{32}\text{P}$ .

A introdução de um átomo de  $^{32}\text{P}$  na molécula

dos monoésteres fosfóricos citados, foi feita por síntese, tendo sido empregado o mesmo método descrito para os monoésteres não marcados, introduzindo-se porém junto com o ácido fosfórico, no balão de reação, uma quantidade de  $H_3^{32}PO_4$  correspondente à atividade de  $500\mu Ci$  para cada grama de monoéster preparado.

O  $^{32}P$  por nós utilizado, foi fornecido pelo Instituto de Energia Atômica de São Paulo e preparado a partir de S elementar levado a irradiação em reator(67) durante um período de 48 horas, a um fluxo de nêutrons de  $10^{12}n/s/cm^2$ .

### 3.3.1.- PURIFICAÇÃO DOS MONOÉSTERES MARCADOS.

A purificação dos monoésteres com  $^{32}P$  após a síntese descrita, foi efetuada nos mesmos solventes e em condições iguais às descritas para os mesmos produtos não marcados.

### 3.3.2.- CONTAGEM DO MATERIAL CONTENDO $^{32}P$ .

A contagem da radiação  $\beta$  emitida pelo  $^{32}P$  foi realizada em contador de cintilação líquida do tipo "Liquid-Scintillation Systems" 720-Nuclear Chicago. As leituras foram feitas tendo-se dissolvido cada amostra em um volume de 15ml de água destilada (106), em tubos especiais para a contagem e na concentração que foi ajustada segundo a atividade de cada amostra, visando um maior número de contagens com um mínimo de erro nas leituras; o método para a contagem foi o de CERENKOV (50)(93), por ser o  $^{32}P$  um elemento  $\beta$  emissor puro, cuja energia é de 1,71 Mev, suficientemente alta e que dispensa o emprego de líquido-cintiladores especiais.

As atividades das amostras foram comparadas com a atividade de um padrão de  $^{32}P$  contado em idênticas

condições.

3.3.3. - CONTAGEM DO  $^{32}\text{P}$  PARA DETERMINAÇÃO DE Rf EM MATE -  
RIAL CROMATOGRAFADO.

Após a corrida em papel nos solventes determinados, os cromatogramas foram levados a um detetor de radiação  $\beta$ , do tipo ACTIGRAF II Modelo 1002 VAC-Nuclear Chicago, especial para cromatografia. As manchas contendo  $^{32}\text{P}$  foram identificadas quanto ao Rf apresentado.

3.4.0. - ESPECTROS DE ABSORÇÃO INFRA-VERMELHO.

As análises dos sais de bis-ciclohexilamônio dos monoésteres fosfóricos estudados, foram realizadas em espectrofotômetro de absorção Infra-Vermelho PERKIN-ELMER Modelo 337, com grade de difração, cuja fenda foi graduada com abertura Normal. As regiões registradas abrangeram as frequências de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  ou 2,5 a 25  $\mu$ . A calibração da escala foi efetuada com filme de Poliestireno e cada amostra foi preparada sob forma de pastilha de KBr na concentração de aproximadamente 1%.

3.4.1. - ESPECTROS SUPLEMENTARES.

Além dos espectros da série de monoésteres estudados, foram feitos mais dois espectros:

- a) Fosfato de monoetila-sal de bis-ciclohexilamônio preparado pela hidrólise de diclorofosfato de etila, o qual foi sintetizado pelo método MIZUMA e col. (74). e a separação do sal de bis-ciclohexilamônio e sua purificação foi feita conforme técnica descrita no item 3.1.0. do capítulo III.

- b) Fosfato de mono-iso-propila sal de Bário, preparado a partir do correspondente sal de bis-ciclohexilamônio percolado em resina Dowex 50, na forma  $Ba^{++}$ .

### 3.5.0. - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA.

O aparelho utilizado para análises de Ressonância Nuclear Magnética, foi um espectrômetro PERKIN-ELMER, Modelo R-10, operando com uma fonte de Radiofrequência de 60 MHz. A temperatura das amostras durante o registro dos espectros foi de 33°C.

Antes de submeter cada amostra à análise RNM, foi eliminado o cátion ciclohexilamônio, substituindo o por  $K^+$ . A remoção desses grupos foi feita por percolação das amostras em resina Dowex 50 forma  $K^+$ , tendo sido depois retirada a água da solução, por liofilização em aparelho do tipo VIRTIS-Modelo 10-146 MRBA. Uma das amostras foi percolada em resina  $Ba^{++}$ , obtendo-se o sal de Bário correspondente (fosfato de mono-ter-Butila) o qual foi também liofilizado da mesma forma descrita. A finalidade de remoção dos grupos ciclohexilamônio, foi a de evitar a interferência que esses grupos apresentam, com uma banda muito alargada a cerca de  $7\tau$  (41).

Todas as amostras foram dissolvidas em  $D_2O$ , e colocadas em tubos especiais, numa concentração de cerca de 25% (exceto para o sal de Bário do fosfato de mono-ter-Butila, que é bem menos solúvel) e usou-se como referência de escala o álcool ter-butílico que apresenta sinal único a 8,73 $\tau$ .

### 3.5.1. - ESPECTROS DE RNM DE $^{31}P$ .

Os espectros de RNM do  $^{31}P$ , foram possíveis

graças à gentileza da VARIAN que registrou esses espectros na Califórnia (U.S.A.) em aparelho do tipo XL-100. As amostras foram analisadas sob forma de sais de bis-ciclohexilamônio e o solvente utilizado foi igualmente a  $D_2O$ . Como referência interna de escala se utilizou o  $H_3PO_4$  e os desvios medidos, foram calculados a partir do pico apresentado pelo padrão.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.0.0. - RENDIMENTOS DE SÍNTESE E DE MARCAÇÃO COM  $^{32}\text{P}$ .

Os rendimentos obtidos na preparação dos monoésteres fosfóricos alquílicos sob forma de sais de bis-ciclohexilamônio, foram ao redor de 40% para toda a série preparada, enquanto que o rendimento do fosfato de monofenila-sal de bis-ciclohexilamônio foi de 20%. Todos os rendimentos foram calculados após total da purificação das amostras.

TABELA I

Rendimentos após a síntese e purificação

$(\text{RO})\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2 \left[ \text{NH}_3\text{C}_6\text{H}_{11} \right]_2$ R=	% de rendimento	% de rendimento em atividade de $^{32}\text{P}$
Metila	42	40
Etila	43	44
n-propila	40	36
iso-propila	40	38
n-butila	36	38
sec-butila	34	35
ter-butila	38	36
benzila	40	39
fenila	20	20

4.1.0. - PURIFICAÇÃO DOS MONOÊSTERES FOSFÓRICOS SOB FORMA DE SAIS DE BIS-CICLOHEXILAMÔNIO.

A eliminação de sub-produtos de síntese foi conseguida após no mínimo três purificações realizadas em álcool etílico a quente, contendo 1% de água e 10% de ciclohexilamina (33). As tentativas de purificação usando os solventes descritos no Capítulo III, § 3.1.0, não foram satisfatórios para os monoésteres fosfóricos preparados.

4.2.0. - PONTOS DE FUSÃO.

TABELA II

$(RO)P(O)(O^-)_2 \left[ \begin{array}{c} + \\ NH_3C_6H_{11} \\ \end{array} \right]_2$	Pontos de Fusão	Pontos de fusão descritos na literatura	Referência
Metila	167-169°C	195-198°C	(75)
Etila	179-182°C	178-182°C	(72)
		188°C	(77)
		188-190°C	(68)
		201-202°C	(73)
Etila + H <sub>2</sub> O		225-230°C	(69)(70)
n-Propila	203-205°C		
iso-Propila	207-208°C		
n-Butila	193-195°C		
sec-Butila	200-202°C		
ter-Butila	191-192°C	191-193°C	(33)(62)
Benzila	212-215°C		
Benzila + H <sub>2</sub> O		232-234°C	(75)
		233°C	(31)
		233-235°C	(26)
Fenila	205-206°C	211°C	(77)
		212-215°C	(69)(70)



#### 4.3.0. - ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.

Dentre os sistemas de solventes utilizados, s̄o dois foram eficientes, deslocando bem as manchas e eliminando a presen̄a de caudas. É dese ressaltar que os mono-ésteres fosf̄ricos em geral, necessitam de solventes muito polares para se ter boas an̄lises cromatogr̄ficas (99). Quanto aos R<sub>f</sub> apresentados, somente o referente ao fosfato de mono-ter-butila, sal de bis-ciclohexilam̄nio foi relatado na literatura (33).

#### 4.3.1. - SOLVENTES UTILIZADOS: TABELA III.

- A) n-Propanol, am̄nea concentrada, āgua (6:3:1:)(33)  
 B) n-Butanol, ācido f̄rmico, āgua (32:1:9) (41):

TABELA III

R<sub>f</sub> dos mono-ésteres fosf̄ricos  
 -sais de bis-ciclohexilam̄nio

$(RO)P(O)(O^-)_2 [NH_3C_6H_{11}]_2$	Solvente A	Solvente B
Metila	0,36	0,50
Etila	0,40	0,63
n-Propila	0,51	0,65
iso-Propila	0,48	0,63
n-Butila	0,58	0,72
sec-Butila	0,50	0,74
ter-Butila	0,46	0,75
Benzila	0,51	0,62
Fenila	0,43	0,66

4.4.0. - ANÁLISES QUANTITATIVAS DE P-TABELA IV.

$(RO)P(O^-)_2 \left[ NH_3^+ C_6H_{11} \right]_2$	% teórica	% encontrada (método Fisk - Subbarow)	% encontrada (Método Vogel)
Metila	9,98	10,20	9,79
Etila	9,55	9,80	9,43
n-Propila	9,15	9,41	9,24
iso-Propila	9,15	9,45	9,33
n-Butila	8,79	9,00	9,00
sec-Butila	8,79	9,05	9,01
ter-Butila	8,79	9,08	9,03
Benzila	8,01	8,02	8,01
Fenila	8,31	8,22	8,25

4.5.0. - ANÁLISES QUANTITATIVAS DE N.

TABELA V

$(RO)P(O)(O^-)_2 \left[ NH_3^+ C_6H_{11} \right]_2$	% teórica	% encontrada
Metila	9,02	8,78
Etila	8,03	8,01
n-Propila	8,28	8,02
iso-Propila	8,28	8,03
n-Butila	7,95	7,78
sec-Butila	7,95	7,89
ter-Butila	9,95	7,79
Benzila	7,25	7,22
Fenila	7,52	7,58

#### 4.6.0. - ESTUDO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM INFRA-VERMELHO

Os monoésteres fosfóricos sais de bis-ciclohexilamônio, foram relativamente pouco estudados quanto a espectroscopia Infra-Vermelho. *BRINTZINGER* (14) estudou a absorção do grupo  $-PO_3^{--}$  empregando o fosfato de monometila e os Catálogos *SADTLER* publicaram o espectro do sal de Bário do fosfato de mono-iso-propila (95). Recentemente o trabalho de *ZWIRZAK-KLUBA* (116) se referiu a algumas bandas de absorção em espectros de sais de anilônio dos fosfatos de monometila, monoetila, mono-propila, mono-iso-propila, mono-n-butila, mono-sec-butila e mono-benzila, sem no entanto, apresentar estudo interpretativo dos mesmos.

Determinamos os espectros de absorção em Infra-Vermelho de todos os monoésteres preparados, procurando atribuir às bandas de absorção obtidas, a relação com o grupamento respectivo e procurando interpretar as características das moléculas de cada monoéster, relacionando ou

troussim as possíveis influências estéricas ou indutivas dos grupos substituintes.

#### 4.6.1. -

Um estudo comparativo de espectros de Infra Vermelho de monoésteres obtidos por outros métodos, comprovaram a estrutura daqueles obtidos pelo método de *CRAMER* : o espectro do sal de bis-ciclohexilamônio do fosfato de monoetila, obtido via hidrólise do diclorofosfato de etila, que se mostrou idêntico ao monoéster correspondente via método de *CRAMER* e o sal de Bário do fosfato de monoisopropila, obtido por esse mesmo método, tendo sido percolado o éster correspondente em resina  $Ba^{++}$  e que se mostrou idêntico ao espectro do mesmo produto publicado nos catálogos *SADTLER* (95).

4.6.2. - ATRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS OBSERVADAS EM ESPECTROS DE INFRA-VERMELHO.

TABELA VI

Fosfato de monometila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
2940(F)	Estiramento C-H	(28)
2850(M)	Estiramento simétrico de $-\text{CH}_3$	(100a)
	Estiramento simétrico de $-\text{O}-\text{CH}_3$	(113)
2830(Fr)	Vibração de $-\text{O}-\text{CH}_3$	(100a)
2560(Fr)	Grupo $-\text{NH}_3^+$ (harmônico)	(28)
2005(Fr)	Grupo $-\text{NH}_3^+$ (harmônico) +	(28)
1550(F)	"Bending" simétrico de $-\text{NH}_3$	(28)
1460(F)	"Scissoring" do $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(28)
	Deformação assimétrica de C-H do $-\text{CH}_3$	(28)
1390(F)	Deformação simétrica de $-\text{O}-\text{CH}_3$	(113)
1190(M)	Estiramento de $\text{P}=\text{O}$	(28)
1140(M)	"Rock" no plano de $-\text{CH}_3$	(100a)
1060(F)	Vibração da valência antissimétrica de $-\text{PO}_3^{--}$	(14)
	P-O-C (alifático)	(15)
980(F)	P-O-C (alifático)	(102)
925(Fr)	"Rock" do $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(100c)
890(Fr)	"Rock" do $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano quando visinho a um <u>N</u>	(100c)
845(Fr)	Deformação C-C do anel ciclohexano	(100c)

Observação: F = Forte, M = Média, Fr = Fraca  
Os termos assinalados referem-se à intensidade de absorção.

TABELA VII

Fosfato de monoetila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
2925(F)	Estiramento C-H	(28)
	Estiramento assimétrico de C-H em $-\text{CH}_2\text{O}-$	(51)(88)
2850(M)	Vibração simétrica de H em $\text{CH}_2$	(28)
2525(Fr)	Harmônios de $-\text{NH}_3$	(28)
1550(M)	"Bending" simétrico de $-\text{NH}_3$	(28)
1450(M)	Deformação assimétrica de $-\text{CH}_2-$ Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ci- clohexano	(28) (100b)
1380(M)	Deformação simétrica de $-\text{CH}_3$ "Wagging" de $-\text{CH}_2-\text{O}-$	(28) (113)
1100(Fr)	Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ci- clohexano	(100c)
1060(F)	Vibração da valência antissimé- trica $-\text{PO}_3^-$	(14)
1030(Fr)	Estiramento C-N	(28)
975(M)	P-O-C (alifático)	(102)
890(Fr)	"Rock" do anel ciclohexano visi- vel a <u>N</u>	(100c)
870(Fr)	Vibração -C-C- do anel ciclohe- xano.	(100c)
770(M)	Estiramento no plano do anel ci- clohexano	(100c)

TABELA VIII

Fosfato de mono-n-propila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
2940(F)	Estiramento C-H Estiramento assimétrico de $-\text{CH}_2-\text{O}$	(28) (53)(88)
2860(M)	Estiramento simétrico de $-\text{CH}_3$	(28)
2040(Fr)	Harmônicos de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1460(F)	Estiramento simétrico de C-H em $-\text{CH}_3$	(28)
1500(F)	"Bending" simétrico de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1250(M)	Estiramento P=O	(15)
1190(Fr)	Deformação do $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(100c)
1160(Fr)	"Twist" de C-H do grupo $-\text{CH}_2-$	(28)
1070(F)	Vibração da valência antissimétrica $-\text{PO}_3$	(14)
1040(Fr)	Estiramento C-N	(28)
980(F)	P-O-C (alifático) "Rock" de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(102) (100c)
800(M)	Estiramento no plano do anel ciclohexano	(100c)

TABELA IX

Fosfato de mono-iso-propila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
2940(F)	Estiramento C-H	(28)
2860(F)	Estiramento simétrico de $\text{CH}_3$ em cadeia ramificada	(100a)
2560(Fr)	Harmônicos de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1630(M)	Vibração assimétrica de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1550(M)	"Bending" simétrico de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1450(M)	"Scissors" assimétrico de $-\text{CH}_3$	(100a)
	Deformação assimétrica de C-H	(28)
	Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(100b)
1350 1380 (M)	Dublete característico de um grupo isopropila	(28)(100a)
1190(Fr)	Estiramento de C-N	(28)
1170(M)	Vibrações esqueléticas C-CH	(28)
	Deformações do grupo iso-pro- pila	(100a)
1050(F)	Vibração da valência antissi- métrica $-\text{PO}_3^{--}$	(14)
890(Fr)	"Rock" do anel ciclohexano vi- sinho a <u>N</u>	(100b)
870(M)	Vibração C-O do anel ciclohe- xano	(100b)
750(M)	Estiramento no plano do anel ciclohexano	(100b)



TABELA X

Fosfato de mono-n-butila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
2940	Estiramento C-H Estiramento C-H do grupo $\text{CH}_2\text{-O-}$	(28) (88)(53)
2860(M)	Vibração simétrica de $-\text{CH}_2-$	(28)
2560(Fr)	Harmônicos de $-\text{NH}_3$	(28)
2020(Fr)	Harmônicos de $-\text{NH}_3$	(28)
1560(M)	"Bending" de N-H	(28)
1450(F)	Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(28)(100c)
1390(F)	"Wagging" de $-\text{CH}_2\text{-O-}$ Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(113) (100c)
1230(F)	Estiramento C-N	(28)
1100(Fr)	Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(100c)
1060(F)	Vibração da valência antissimétrica $-\text{PO}_3$	(14)
980(F)	P-O-C (alifático)	(102)
920(M)	Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(100c)
900(Fr)	"Rock" de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano vizinho a <u>N</u>	(100c)
785(F)	Vibração de $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$	(28)
750(F)	Deformação no plano do anel ciclohexano	(100c)
710(Fr)	"Rock" de C-H em $-\text{CH}_2-$	(28)

TABELA XI

Fosfato de mono-sec-bútila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
2948(F)	Estiramento C-H	(28a)
2850(M)	Estiramento simétrico de -CH <sub>2</sub> - em cadeia ramificada	(100a)
	Vibração simétrica do H em -CH <sub>2</sub> -	(28)
1550(M)	"Bending" simétrico de -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	(28)
1450(M)	"Bending" de C-H em -CH <sub>2</sub> -	(28)
	Deformação assimétrica de C-H em -CH <sub>3</sub>	(28)
	Deformação assimétrica do -CH <sub>2</sub> - do anel ciclohexano	(28)(100c)
1350(M)	"Twist" de C-H de -CH <sub>2</sub>	(28)
	"Wagging" de : $\begin{array}{c}   \\ -\text{C}-\text{O} \\   \\ \text{H} \end{array}$	(113)
1180(Fr)	Deformação do -CH <sub>2</sub> - do anel ciclohexano	(100c)
1050(F)	Vibração da valência anti- simétrica -PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	(14)
1000(M)	P-O-C (alifático)	(15)(102)
975(M)	"Rock" de C-H	(28)

TABELA XII

Fosfato de mono-ter-butila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
2940(F)	Estiramento C-H	(28)
	Vibração assimétrica do grupo ter-butila +	(100a)
2550(M)	Harmônicos de $-\text{NH}_3$ +	(28)
1550(M)	"Bending" simétrico de $-\text{NH}_3$	(28)
1450(M)	Deformação de $-\text{CH}_2-$ em anel ciclohexano	(28)(100c)
	Deformação assimétrica do grupo ter-butila	(100a)
1380{ 1360{	Dublete característico do grupo ter-butila (deformação C-H)	(28)
1200(F)	Deformação esquelética do grupo ter-butila	(100a)
1195(M)	Vibração esquelética de C-C - em grupo ter-butila	(28)
1140(M)	Estiramento C-O em C terciário	(28)
1050(F)	Vibração da valência antissimétrica $-\text{PO}_3^{--}$	(14)
1000(M)	P-O-C (alifático)	(15)(102)
920(M)	"Rock" de $-\text{CH}_2-$ em anel ciclohexano	(100c)
885(Fr)	Anel ciclohexano monosubstituído	(100c)

TABELA XIII

Fosfato de monobenzila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
3050(Fr)	Estiramento de C-H do anel aromático monosubstituído	(28)
3000(Fr)	Harmônico de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
2940(F)	Estiramento C-H de $-\text{CH}_2-\text{O}$ (assimétrico).	(88)(53)
2000(Fr)	Harmônico de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1570(Fr)	"Bending" assimétrico de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1495(M)	Vibração C=C de anel aromático	(10)(28)e (89)
	"Bending" simétrico de $-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1460(M)	Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexano	(28)(100c)
	"Bending" de C-H de $-\text{CH}_2$	(28)
1390(M)	"Wagging" de $-\text{CH}_2-\text{O}-$	(113)
1220(Fr)	Estiramento C-N	(28)
1150(M)	Estiramento P=O	(102)
	"Twist" de C-H de $-\text{CH}-$	(28)
1090(F)	Vibração da valência antissimétrica de $-\text{PO}_3^{--}$	(14)
1050(Fr)	Deformação no plano de C-H do anel aromático	(10)(89)
880(Fr)	"Rock" do anel ciclohexano - visinho a N	(100b)
790(Fr)	Estiramento no plano do anel ciclohexano	(100c)
730(M)	Deformação fora do plano de C-H do anel aromático monosubstituído	(10)
695(M)	Anel aromático mono-substituído: bandas de vibração fora do plano	(28)(100d)

TABELA XIV

Fosfato de monofenila-sal de bis-ciclohexilamônio

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	A t r i b u i ç ã o	Referência
2940(F)	Estiramento C-H-	(28)
2550(Fr)	Harmônico de $-\overset{\dagger}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1600(M)	"Bending" assimétrico de $-\overset{\dagger}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
	Vibrações esqueléticas de anel aromáti- co monosubstituído	(10)(89)
	Estiramento do anel aromático	(100d)
1550(M)	"Bending" simétrico de $-\overset{\dagger}{\text{N}}\text{H}_3$	(28)
1480(M)	Estiramento C=C do anel aromático	(100d)
1450(M)	Deformação de $-\text{CH}_2-$ do anel ciclohexa- no	(28)(100c)
1280(M)	Estiramento P=O	(9)(15)
1250(F)	Deformações de $-\text{CH}_2-$ de anel ciclohexa- no	(100c)
1190(M)	P-O-C aromático	(15)
1170(M)	Deformação no plano do anel aromático	(10)(89)
1090(F)	Vibração da valência antissimétrica - $-\text{PO}_3^-$	(14)
1050(Fr)	Deformação de C-H no plano correspon- dente ao anel aromático	(10)(89)
1000(Fr)	idem, idem	(10)(89)
975(F)	Vibração P-O-C (aromático)	(102)
875(F)	idem, idem	(15)(28)
755(F)	Deformação no plano do anel aromático monosubstituído	(10)(89)
690(F)	Vibração de C-H do anel aromático mo- nosubstituído (fora do plano)	(10)(28)(89)

Uma observação necessária é quanto à banda alargada que aparece em todos os espectros, na região de  $3490 \text{ cm}^{-1}$  e que corresponde à presença de água. O fato de termos utilizado o processo de pastilha de KBr na confecção das amostras analisadas, deu como resultado o aparecimento dessa banda espúria, fato esse confirmado pela análise de uma pastilha de KBr puro.

#### 4.7.0. - ESTUDO DA RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA (RNM).

STATTFORD-BALDSCHWILER (98) estudaram a Ressonância Nuclear Magnética do  $^1\text{H}$  em alguns compostos fosforados e obtiveram informações quanto à influência do  $^{31}\text{P}$  (riqueza isotópica 100%) nos espectros registrados, tendo-se em conta que o  $^{31}\text{P}$  tem spin  $1/2$ . O comportamento anormal dos acoplamentos verificados em espectros de compostos fosforados em geral, foi atribuído à influência que exercem os elétrons da orbital d do Fósforo em tais acoplamentos. Estudos de RNM efetuados em um composto com o grupo etila diretamente ligado ao fósforo, revelaram algumas anomalias nos espectros registrados, devido ao envolvimento de elétrons não compartilhados na ligação entre o P e  $-\text{C}_2\text{H}_5$  (36)(80)(98) e posteriormente adicionando-se compostos metálicos de cobalto com propriedades para magnéticas, houve o desaparecimento desses acoplamentos entre o P e grupos alquílicos (37).

Dentre os monoésteres fosfóricos em geral pouca coisa foi feita quanto a estudos de RNM. *TSUBOI* e col. (104) estudaram RNM em vários compostos fosforados e entre eles o fosfato de monometila e fosfato de monoetila; *UHLENHOP* (105) procurou determinar a influência do pH em soluções de fosfato de monometila quanto ao valor da constante de acoplamento em espectros de RNM. *MAYNARD - SWAN* (69) determinaram o espectro do fosfato de mono-ter-butila-sal de bis-ciclohexilamônio e recentemente *ZWIRZAK-KLUBA* (116) registraram espectros de RNM de  $^1\text{H}$  em alguns fosfatos mono alquílicos-sais de anilônio, tendo somente apresentado constantes de acoplamentos e desvios químicos, sem entrar em pormenores sobre os dados obtidos em relação à estrutura das moléculas.

#### 4.7.1. - ESPECTROS DE RNM de $^1\text{H}$ .

a) Fosfato de monometila-sal de  $K^+$ .

Apresenta somente um dublete a cerca de  $6,5\tau$ , resultante do acoplamento do  $H$  com o  $P$ .

b) Fosfato de monoetila- sal de  $K^+$ .

O espectro é constituído por um quinteto na região de  $6\tau$ , originado do acoplamento spin-spin do  $-CH_2-$  com  $-CH_3-$  e com  $P$ . A  $8,5 - 9\tau$  se observa um tripleto característico do grupo  $-CH_3$ ; esse grupo não se acopla com o  $P$ , porque entre os  $H$  da metila e o  $P$  existem mais de três ligações e de separação (37). *TSUBOI* e col.(104) mediram um pequeno desdobramento do pico central deste tripleto e deram o valor de  $0,8$  cps.

c) Fosfato de mono-n-propila, sal de  $K^+$ .

O espectro RNM desse monoéster, apresenta três grupamentos de picos: (C) (B) (A)

$CH_3 - CH_2 - CH_2 - O -$ , nos quais o grupo  $-CH_2-$  (A) é representado por um quarteto a cerca de  $6\tau$ , resultante do acoplamento do  $H$  com o  $P$ . A  $8,5\tau$  se observa um sexteto correspondente ao grupo  $-CH_2-$  (B) com acoplamento dos  $H$ , desse grupo com os grupos vizinhos (A e C); o grupo  $-CH_3$  (C) é representado por um tripleto em que os  $H$  se acoplam com os  $H$  do grupo vizinho.

d) Fosfato de mono-iso-propila- sal de  $K^+$ .

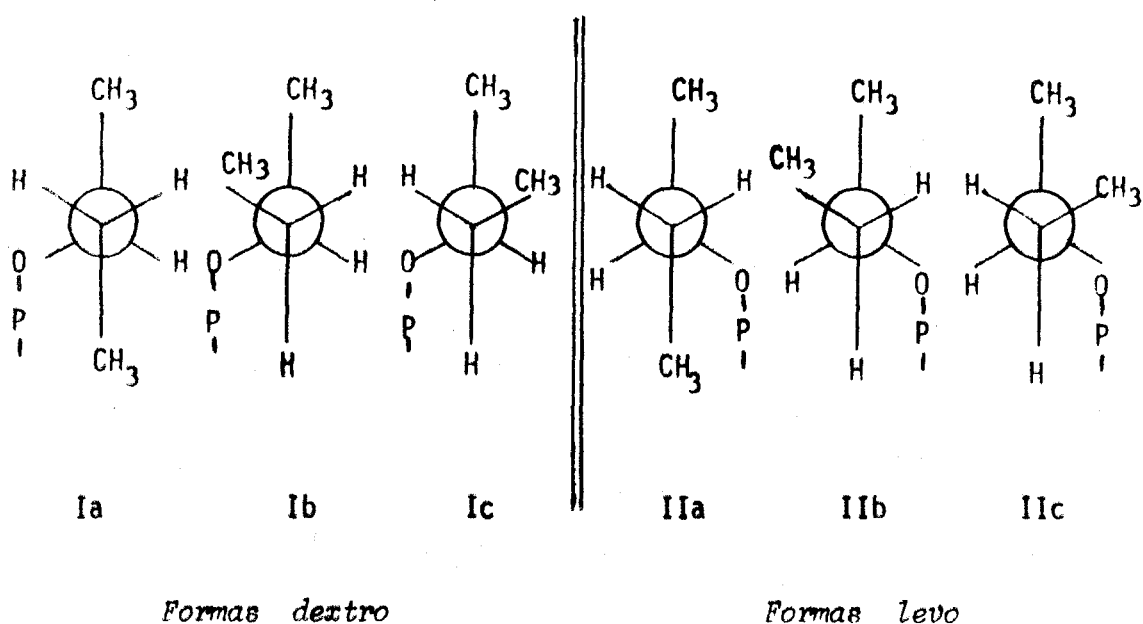
Apresenta um multiplete na região de  $5,5\tau$ , que se acha em parte encoberto pelo pico da água residual, que acompanha a  $D_2O$ ; esse multiplete corresponde ao acoplamento de  $H$  de  $-CH$  com o  $P$  e com os grupos  $-CH_3$  vizinhos. A  $8,8\tau$  se observa um dublete bem caracterizado, correspondente aos grupos  $-CH_3$  acoplando-se com  $-CH$ ; não se verificou





As formas A e B foram determinadas como as mais estáveis e a forma C, a mais instável. As rotações possíveis em compostos com  $C$  assimétrico (90) explicam que as formas *levo* e *dextro* quando giram em torno de um eixo - da molécula não apresentam um mesmo tipo de simetria após a rotação e isso leva a molécula com  $C$  assimétrico a se comportar como se possuísse uma certa assimetria intrínseca ao sofrer rotações e esse fato é importante nos deslocamentos químicos registrados nos espectros de RNM.

- Exemplificando com modelos rotacionais temos:



No espectro obtido, se registrou um multiplete (provavelmente um hepteto) equivalente ao grupo  $-O-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}\text{H}$  acoplado-se com o  $P$  e com os grupos vizinhos. A cerca de  $8,5\tau$  aparece um grupo de picos que correspondem provavelmente a  $-\text{CH}_2-$ , e um dublete a  $8,8\tau$  correspondendo ao sinal do  $-\text{CH}_3$  ligado ao  $C$  assimétrico; neste caso, os dois picos do dublete deveriam estar desdobrados pelo efeito da isomeria, verificando-se porém a ausência desse desdobramento, provavelmente por se tratar de um deslocamento químico mui

to pequeno, não resolvido no tipo de aparelho utilizado. O triplete apresentado a certa de  $9,1\tau$  corresponde ao sinal característico de  $-\text{CH}_3$  (ligado a  $-\text{CH}_2-$ ).

g) *Fosfato de mono-ter-butila- sal de  $\text{Ba}^{++}$ .*

É um espectro simples, com um sinal a  $8,73\tau$  correspondendo às três metilas não acopladas com o P.

h) *Fosfato de monobenzila- sal de  $\text{K}^+$ .*

Também apresenta um espectro simples, com um sinal a  $2,3\tau$  correspondendo aos H do anel benzênico não acoplados, com o P e a  $5\tau$  aparece um dublete que representa o acoplamento do P com  $-\text{CH}_2-$  da benzila.

i) *Fosfato de monofenila- sal de  $\text{K}^+$ .*

Esse espectro se constitui num multiplete a cerca de  $3\tau$  e apresenta as características de espectro de 2a. ordem típico. A identificação e elucidação dos problemas a ele ligados, reclamariam o auxílio de um programa de computadores.

#### 4.7.2. - CONSTANTES DE ACOPLAMENTO OBSERVADAS EM RNM DE $^1\text{H}$

TABELA XV

R=	J(cps)	Valor
Metila	$J_{HP}$	10,8
Etila	$J_{HP}$	7,3 (quinteto)
	$J_{HH}$	7,5 (triplete)
n-Propila	$J_{HP}$	6,9 (quarteto)
	$J_{HH}$	7,4 (sexteto)
	$J_{HH}$	7,5 (triplete)
iso-propila	$J_{HP}$	7,1 (multiplete)
	$J_{HH}$	6,4 (dubleto)
n-butila	$J_{HP}$	6,7 (quarteto)
	$J_{HH}$	6,2 (triplete)
sec-butila	$J_{HP}$	6,4 (multiplete)
	$J_{HH}$	7,00 (dubleto)
benzila	$J_{HP}$	7,4 (dubleto)

Com excessão dos espectros dos fosfatos de monometila e de monoetila que são tipicamente de 1ª ordem os demais (com excessão do fosfato de monofenila), são espectros que podem receber um tratamento de 1ª ordem, estando todavia em transição para uma 2ª ordem como se pode observar no espectro do fosfato de mono n-propila, cuja constante de acoplamento (J) referente ao triplete apresenta valor um pouco maior do que (J) referente ao quarteto. A resolução mais conveniente de problemas dessa natureza, se faria necessária com um aparelho de 100MHz e com o emprego de modelos matemáticos avançados com programas de computadores.

O alargamento de certos picos pode ser conseqüência também do uso de resinas de troca iônica (preparação dos sais de  $K^+$  e de  $Ba^{++}$ ) que podem conter impurezas

de caráter para-magnético mesmo da ordem de traços.

O uso de  $D_2O$ , necessária para dissolver estes monoésteres (insolúveis em solventes orgânicos adequados) oculta informações como no caso do fosfato de mono-iso-propila.

4.7.3. - O PROBLEMA DO pH DAS SOLUÇÕES DE MONOÉSTERES FOSFÓRICOS QUANTO ÀS CONSTANTES DE ACOPLAMENTO OBSERVADAS.

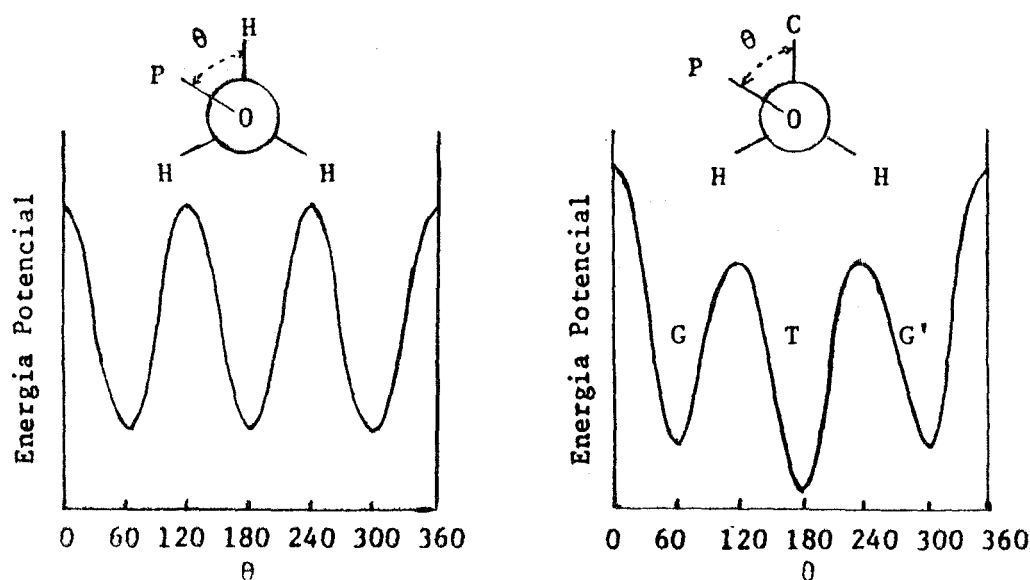
UHLENHOP e col. (105) registraram espectros de RNM do fosfato de monometila sal de sódio, variando o pH das soluções analisadas entre os valores de 2 a 4. Os autores observaram pequenas variações nas constantes de acoplamento, sendo que em pH acima de 5 houve um decréscimo da constante  $J_{pH}$ ; esse fato, estendido a toda a série alquílica analisada, pode ser consequência da presença do monôion em pH mais ácidos, enquanto aparece o diânion em pH maiores.  $J_{pH}$  aumentou quando houve diminuição das cargas negativas no ânion fosfato. Esse fato poderia explicar a pequena diferença obtida nos valores de  $J_{pH}$  nas análises RNM feitas por ZWIRZAK-KLUBA (116) que trabalhou com sais de anilônio e os valores por nós obtidos (sais de  $K^+$ ). Também obtivemos um valor um pouco diferente de  $J_{pH}$  nos espectros RNM de  $^{31}P$ , quando se analisaram sais de bis-ciclohexilamônio.

4.8.0. - PROBLEMAS ROTACIONAIS RELACIONADOS COM RNM DO  $^1H$ .

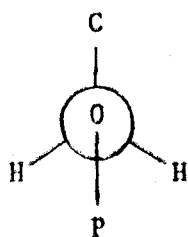
TSUBOI e col (104) realizaram extensos estudos, relacionando o valor das constantes de acoplamento de fosfatos de monometila e de monoetila com problemas rotacionais. Relacionaram ainda, a rotação interna dos gru-

pos alquílicos substituídos nos ésteres fosfóricos, em torno do eixo formado pela ligação C-O.

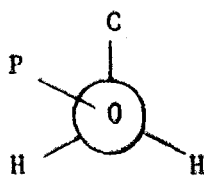
Os modelos rotacionais dos fosfatos de monometila e de monoetila são diferentes porque tendo o grupo metila três H ligados a um C apresentam um diagrama de rotação com um só mínimo de energia potencial. O fosfato de monoetila tem o C do eixo C-O ligado a dois H e a um grupo -CH<sub>3</sub> apresentando por isso, mínimos de energia potencial diferentes nas posições de rotação exibidas.



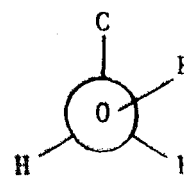
Para o fosfato de monoetila, podem ser consideradas três formas rotacionais:



Forma Trans (T)



Forma Gauche (G)



Forma Gauche (G')

A forma Trans(T) sendo a mais estável energeticamente, pode ser calculada quanto à sua população em

relação às formas (G) e (G'). Para isso, os autores (104) calcularam valores de  $J_T$  e  $J_G$  :  $J_T = 28$  cps e  $J_G = 1,5$  cps.

O valor de  $J_T$  foi calculado a partir do fosfato de monometila e se refere à forma Trans do H em relação ao P.  $J_{PH}$  é a constante de acoplamento registrada.  $J_G$  foi calculada em um fosfato cíclico.

A população  $\alpha_T$  da forma Trans considerando o P em relação ao grupo alquílico, foi dada pela expressão:

$$J_{PH} = \frac{1-\alpha_T}{2} J_T + \frac{1+\alpha_T}{2} J_G \quad (a) \quad (104)$$

4.8.1 - APLICAÇÃO DA FÓRMULA (a) PARA CÁLCULO DA POPULAÇÃO Trans ( $\alpha_T$ ) EM TODA A SÉRIE ALQUÍLICA DOS FOSFATOS ESTUDADOS.

A fórmula (a) calculada, foi aplicada a toda a série alquílica estudada e se obteve valores muito próximos, significando que para os monofosfatos alquílicos a forma Trans é energeticamente mais favorável de 55 a 60% em relação às formas Gauche possíveis (calculando em porcentagem).

TABELA XVI

Valores de  $\alpha_T$  calculados

Grupo Esterificado. R=	Valor de $\alpha_T$	$\alpha_T$ descrito na literatura (104)
Etila	0,56	0,59
n-Propila	0,59	-
iso-Propila	0,57	-
n-Butila	0,60	-
sec-Butila	0,63	-
Benzila	0,55	-

#### 4.9.0 - RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE $^{31}\text{P}$ .

A molécula dos monoésteres fosfóricos contendo somente um átomo de  $\text{P}$ , apresentou, como se deveria esperar, um espectro bastante simples. Cada monoéster registrou somente um grupo de picos, correspondendo ao sinal do  $^{31}\text{P}$  acoplado com os  $^1\text{H}$  vizinhos.

TABELA XVII

Valores de  $J_{\text{PH}}$  (cps) e deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em relação ao  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (padrão).

Grupo esterificado. R=	$J_{\text{HP}}$ (cps)	$\delta$ (ppm)	sinais registrados
Metila	10,1	4,762	quarteto
Etila	6,2	3,360	tripleto
n-Propila	6,1	2,765	tripleto
iso-Propila	7,7	0,614	dublete
n-Butila	5,7	3,673	tripleto
sec-Butila	7,9	0,605	dublete
ter-Butila	0	-3,456	singleto
Benzila	5,5	3,567	tripleto

Na tabela acima se pode observar que os monoésteres de cadeia normal têm desvios em campo bem mais alto do que os monoésteres de cadeia ramificada. O efeito indutivo do grupo alquílico cedendo elétrons, aumenta a densidade eletrônica do P sendo então responsável pela localização dos sinais no espectro.

## RESUMO

Os monoésteres fosfóricos alquílicos e o fenílico, sob forma de sais de bis-ciclohexilamônio, foram objeto de estudo minucioso que abrangeu um retrospecto histórico dos métodos de síntese a partir do século passado até o presente momento.

Foi feito um estudo crítico dos métodos até agora publicados.

Em uma primeira fase, selecionamos - um método de síntese a partir do  $\text{POCl}_3$  como agente fosforilante e o álcool desejado (33). Seria produzido assim o diclorofosfato de alquila, que tratado com água, daria o ácido monoalquil fosfórico, cuja separação seria feita por precipitação na forma de sal de Bário ou de bis-ciclohexilamônio. Esse método, que também permitiria a síntese de monoésteres fosfóricos com  $^{32}\text{P}$  pela facilidade de obtenção do  $^{32}\text{POCl}_3$  teve que ser posto de lado por não ter sido satisfatório para toda a série alquílica desejada.

O método dado por CRAMER foi escolhido para a preparação de toda a série proposta, dadas as condições especiais apresentadas por esse método: é específico para monoésteres fosfóricos, é aplicável à fosforilação de álcoois primários, secundários, terciários e foi satisfatório para o fenol.

O fato do método escolhido partir diretamente do ácido fosfórico, possibilitou a



preparação de monoésteres fosfóricos com  $^{32}\text{P}$  - sendo que o material radioativo nos é fornecido pelo Instituto de Energia Atômica, sob a forma de  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ .

Os seguintes monoésteres fosfóricos foram sintetizados sob forma de sais de bis-ciclohexilamônio: Fosfato de monometila, monoetila, mono-n-propila, mono-iso-propila, mono-n-butila, mono-sec-butila, mono-ter-butila, monobenzila e monofenila.

Após a síntese e purificação dos produtos, se procedeu às análises elementares de N e P.

Procedeu-se à determinação dos pontos de fusão de todos os monoésteres preparados, tendo-se em conta que alguns pontos de fusão não foram encontrados descritos na literatura.

As análises cromatográficas permitiram determinar o  $R_f$  de todos os produtos estudados, tendo em vista o controle de pureza a pós cada recristalização. Dentre os  $R_f$  determinados só havia uma citação na literatura, utilizando o sistema de solventes mencionado.

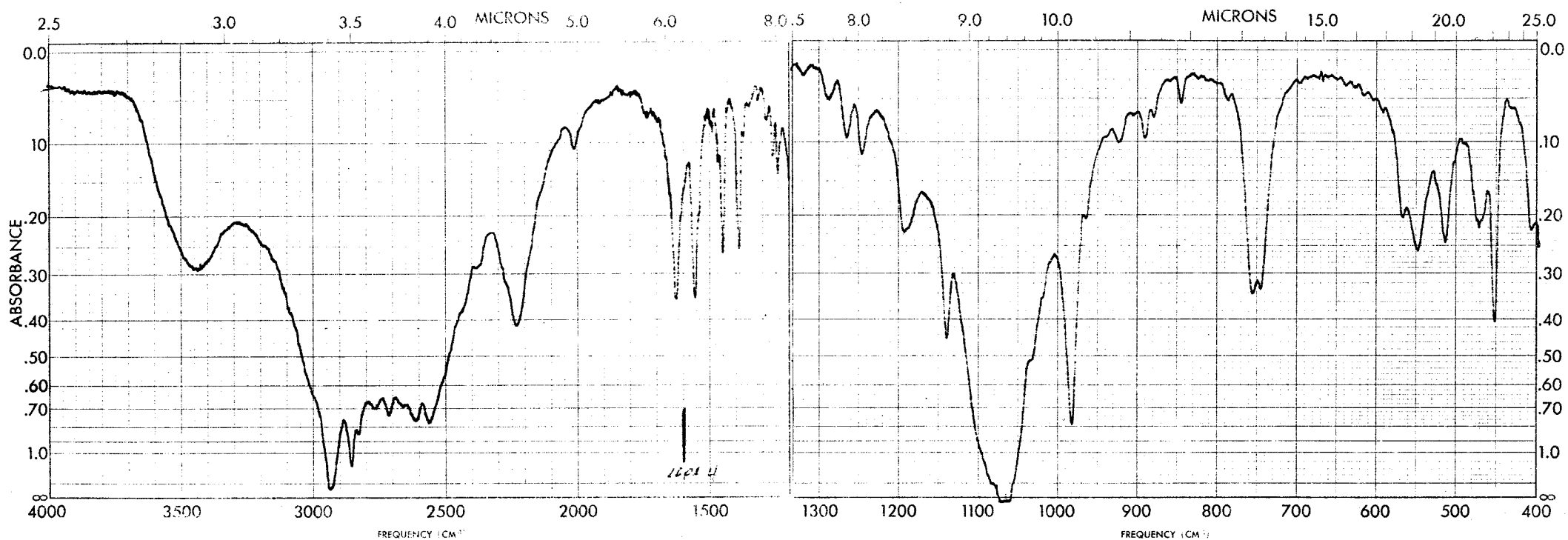
Os produtos marcados com  $^{32}\text{P}$  foram contados em cintiladores líquidos empregando-se o método de CERENKOV.

Foi dada particular importância às análises de absorção em Infra-Vermelho e Ressonância Nuclear Magnética, esta última realizada para o  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$ .

Os espectros em Infra-Vermelho serviram para a identificação de todos os monoésteres preparados e confirmação da presença de grupos esterificados.

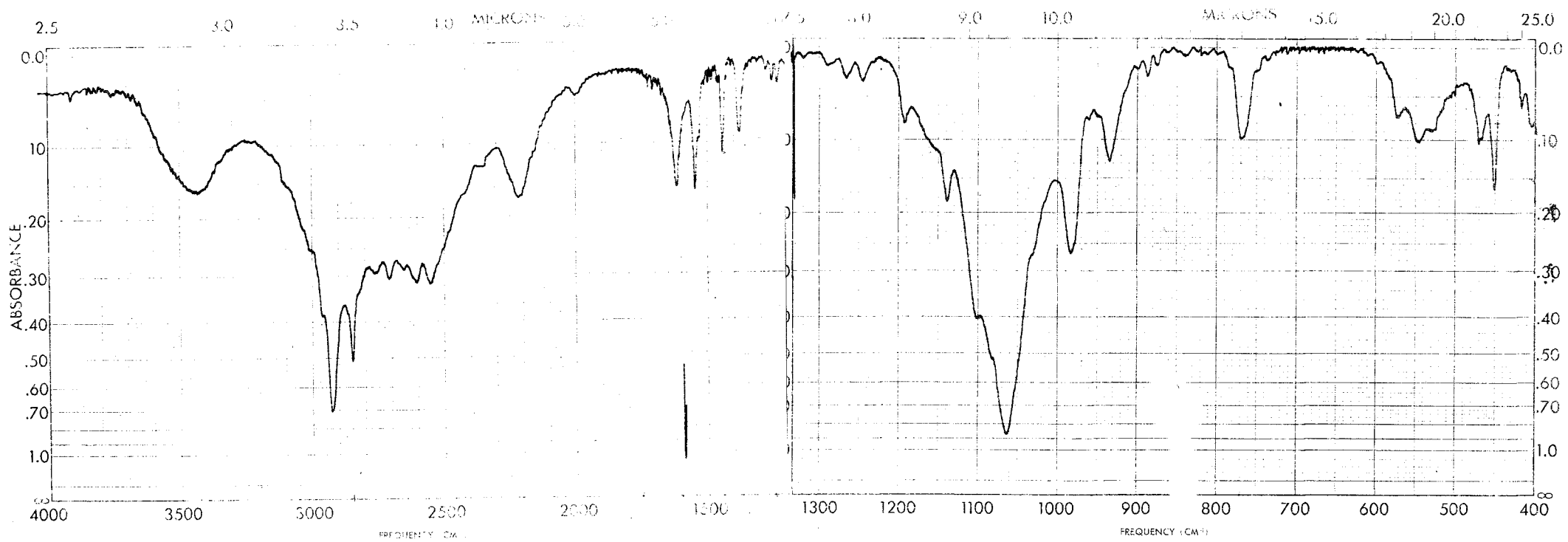
A Ressonância Nuclear Magnética do  $^1\text{H}$  confirmou também a presença de todos os grupos alquílicos e do grupo fenílico esterificados, tendo sido calculados os desvios químicos e constantes de acoplamento dos espectros registrados. Foi calculada a população de algumas formas rotacionais mais estáveis quanto à energia.

As análises de Ressonância Nuclear Magnética do  $^{31}\text{P}$  foram mais simples quanto aos espectros apresentados e foram calculados os desvios químicos e constantes de acoplamento, relacionando-as com as constantes de acoplamento para a Ressonância de  $^1\text{H}$ .



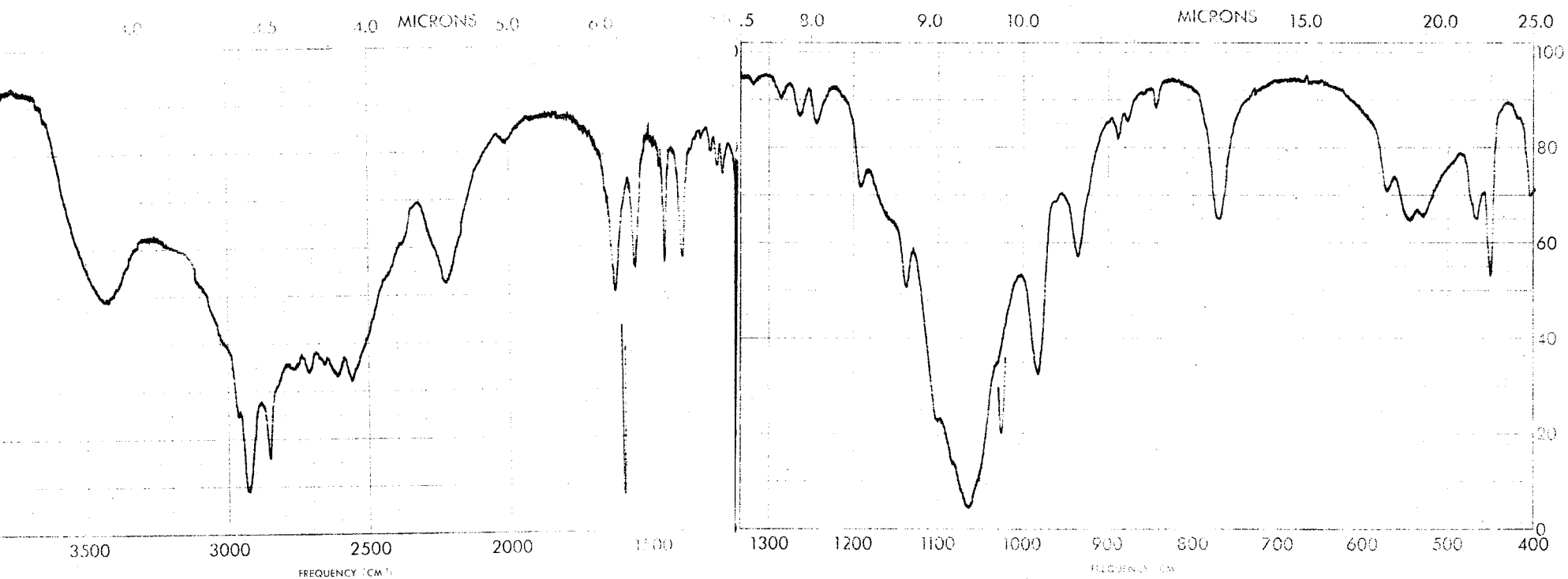
ESPECTRO Nº 1

Infra-Vermelho - Fosfato de Monometila-sal de bis-ciclohexilamônio



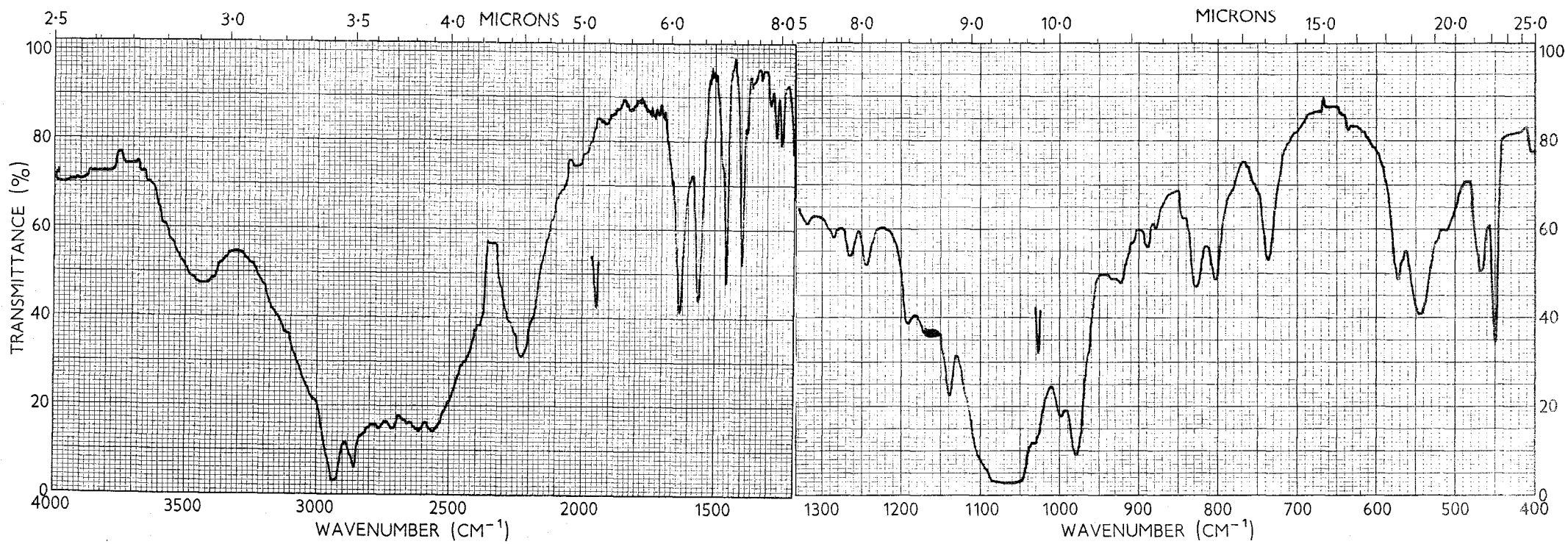
ESPECTRO Nº 2

Infra-Vermelho - Fosfato de Monoetila-sal de bis-ciclohexilamônio  
(via método de CRAMER)



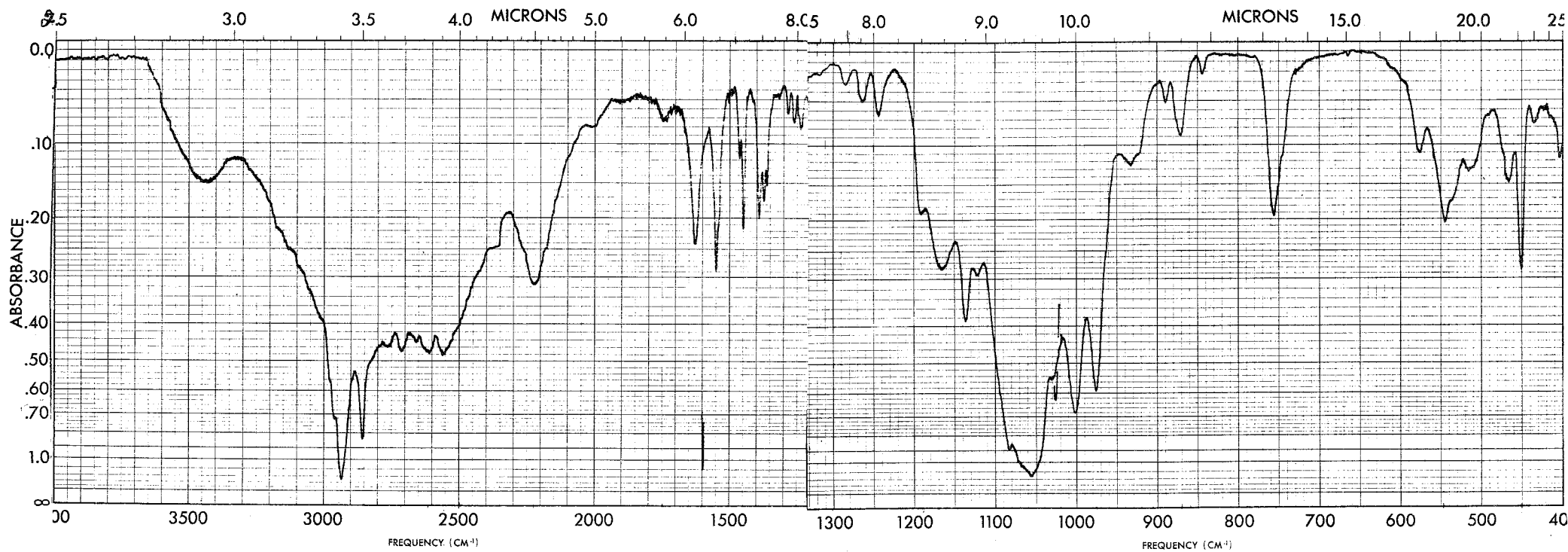
ESPECTRO Nº 3

Infra-Vermelho - Fosfato de monoetila-sal de bis-ciclohexilamônio  
Via  $\text{POCl}_3$



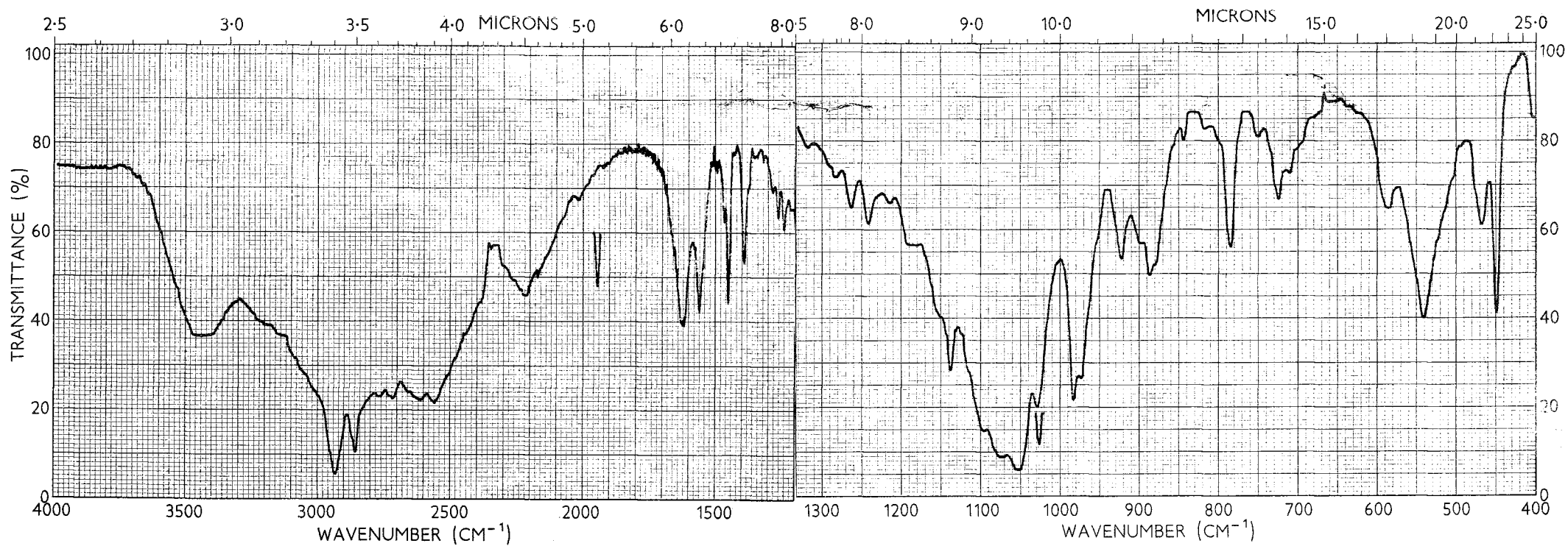
ESPECTRO Nº 4

Infra-Vermelho - Fosfato de mono-n-propila-sal de bis-ciclohexilamônio



ESPECTRO Nº 5

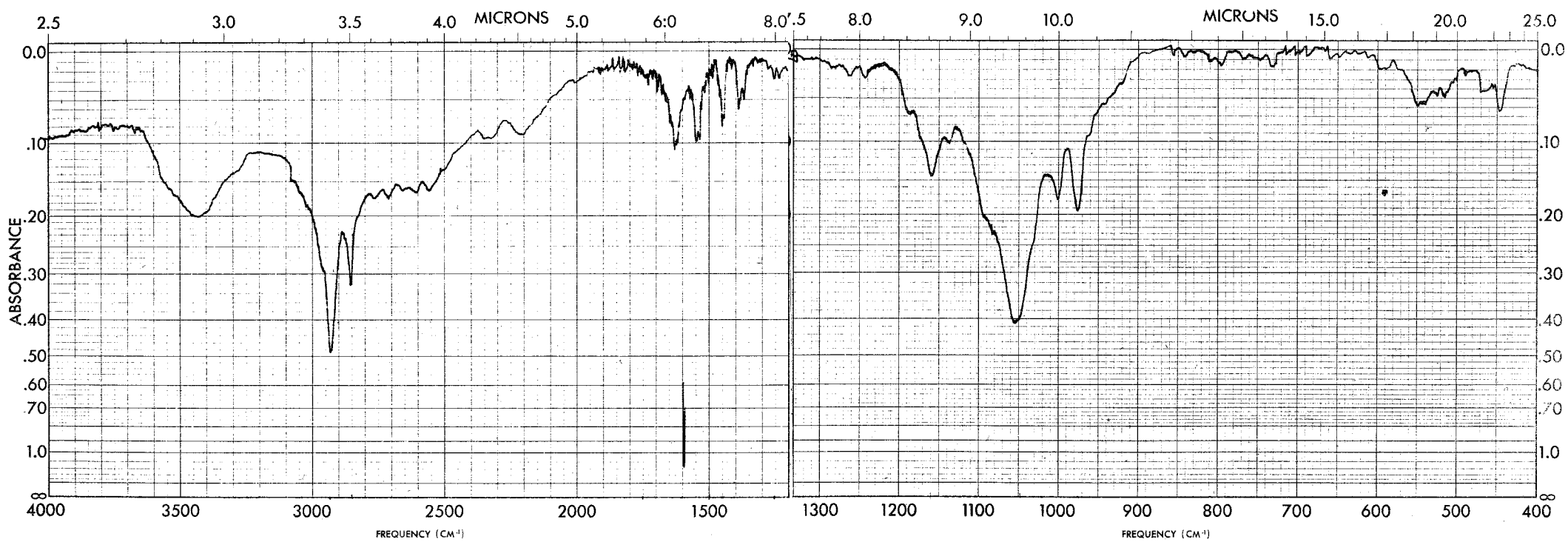
Infra-Vermelho - Fosfato de mono-iso-Propila-sal de bis-ciclohexilamônio



ESPECTRO Nº 6

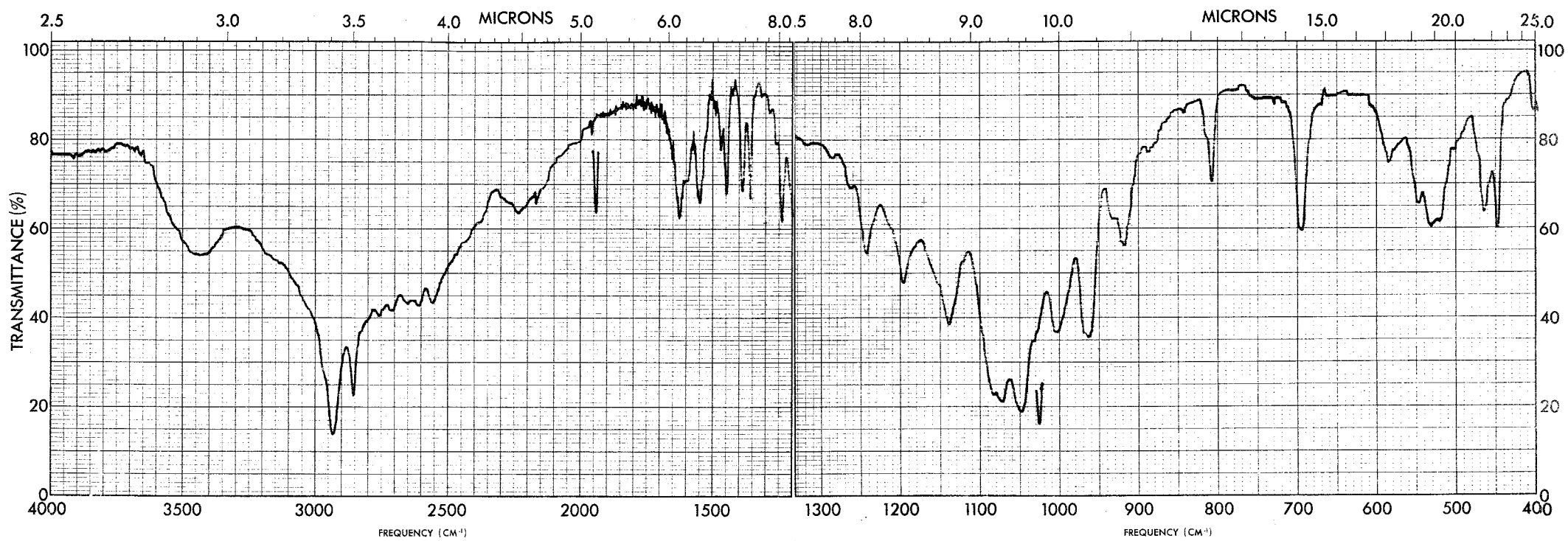
Infra-Vermelho - Fosfato de mono-n-Butila-sal de bis-ciclohexilamônio





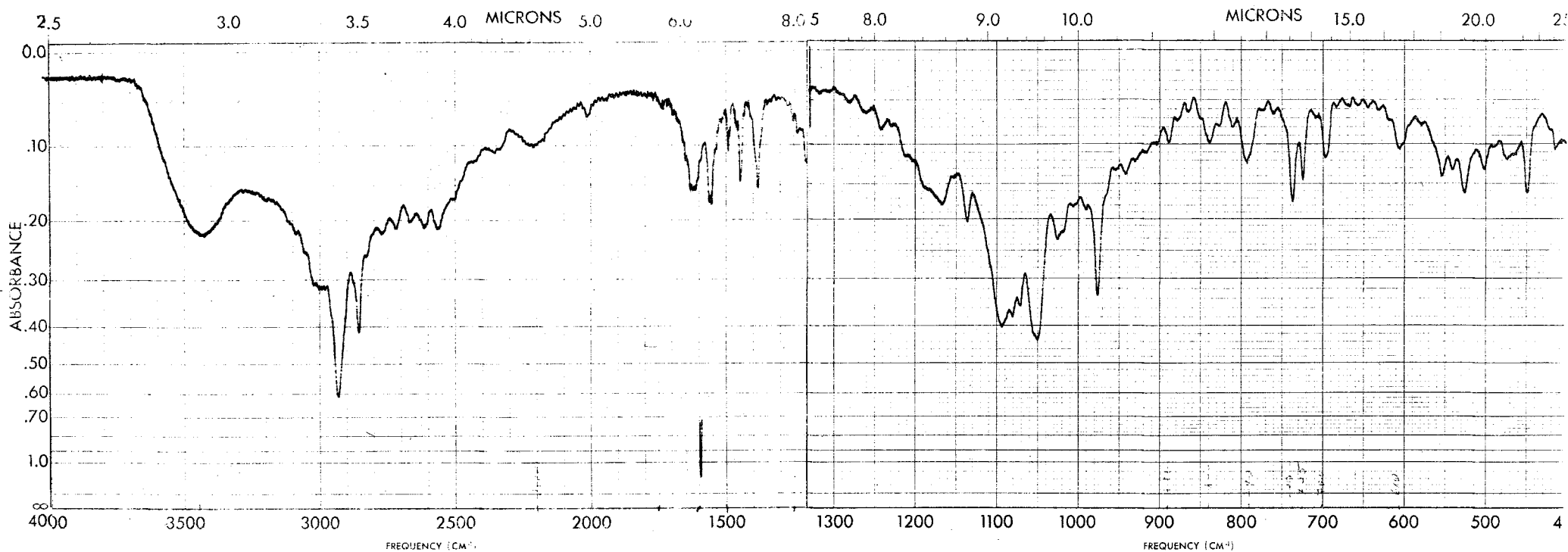
ESPECTRO Nº 7

Infra.Vermelho - Fosfato de mono-sec-Butila-sal de bis-ciclohexilamônio



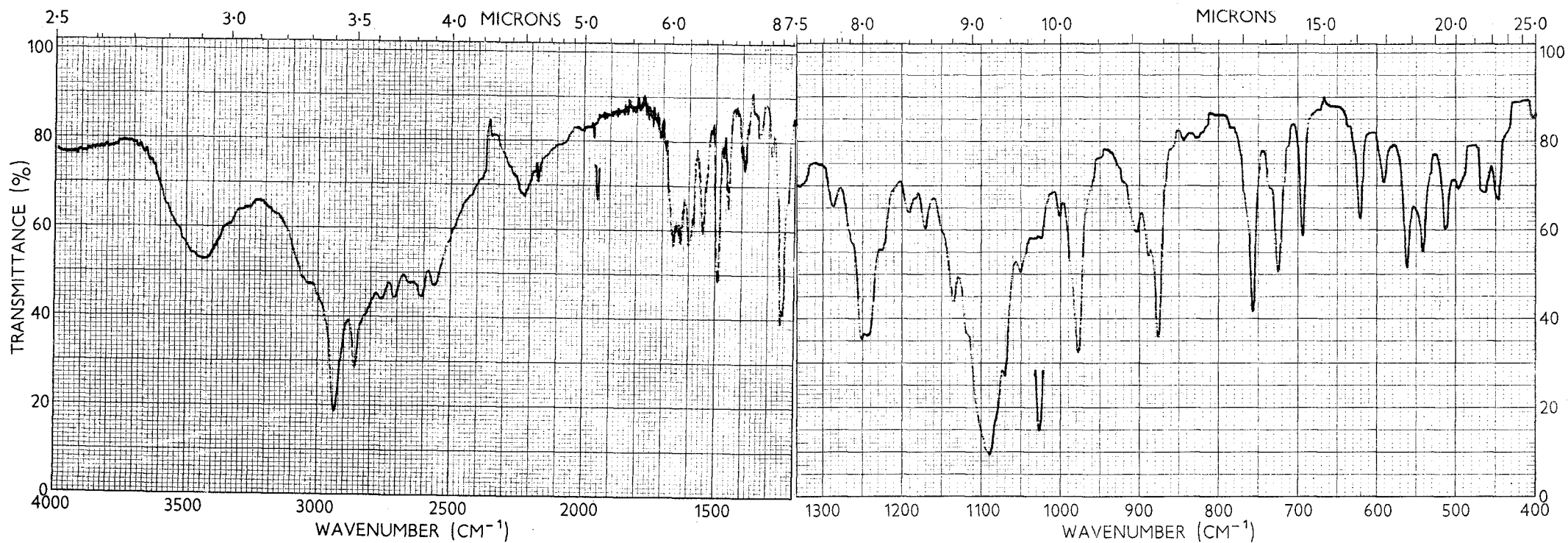
ESPECTRO Nº 8

Infra-Vermelho - Fosfato de mono-ter-Butila-sal de bis-ciclohexilamônio



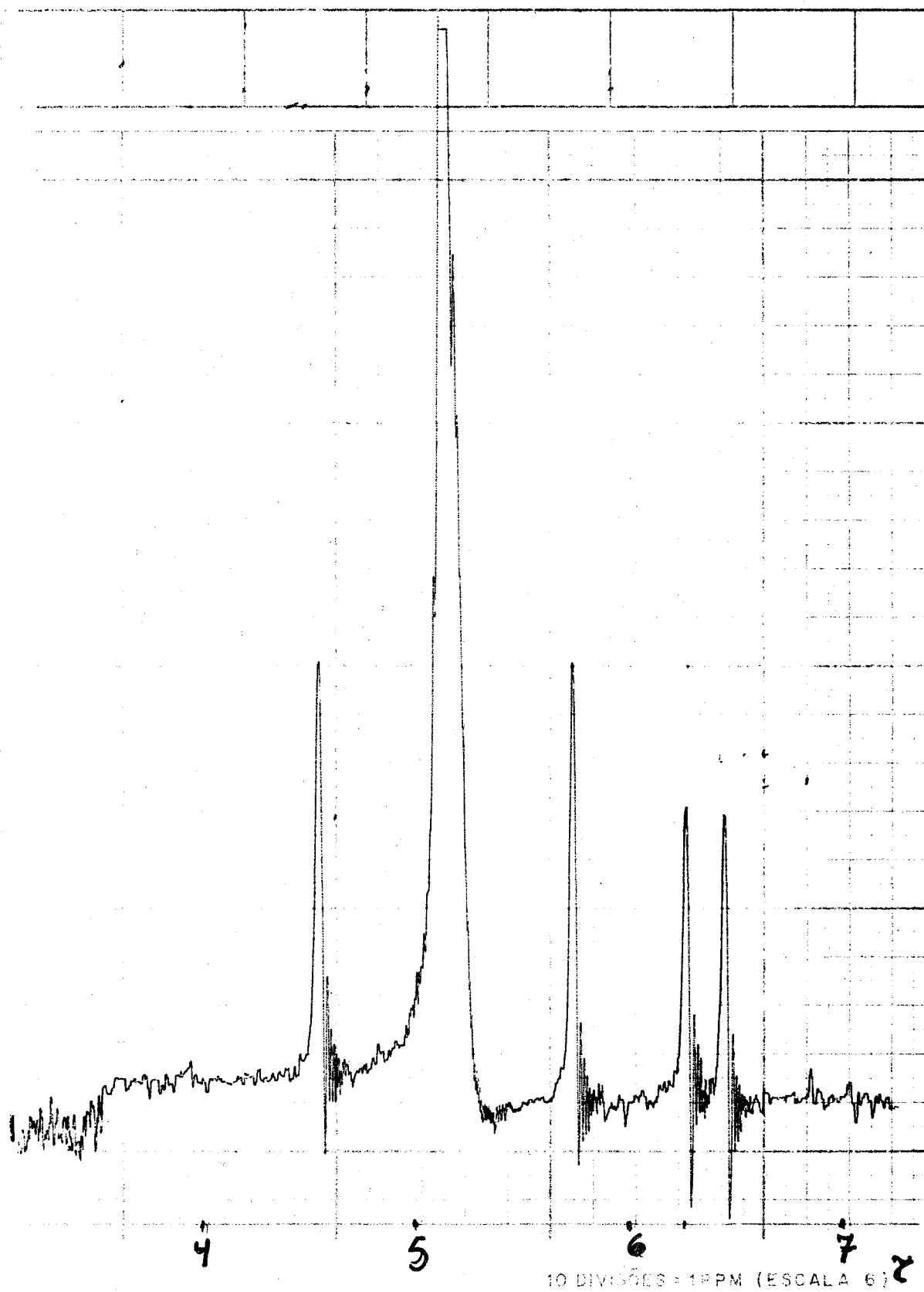
ESPECTRO Nº 9

Infra-Vermelho - Fosfato de monobenzila-sal de bis-ciclohexilamônio



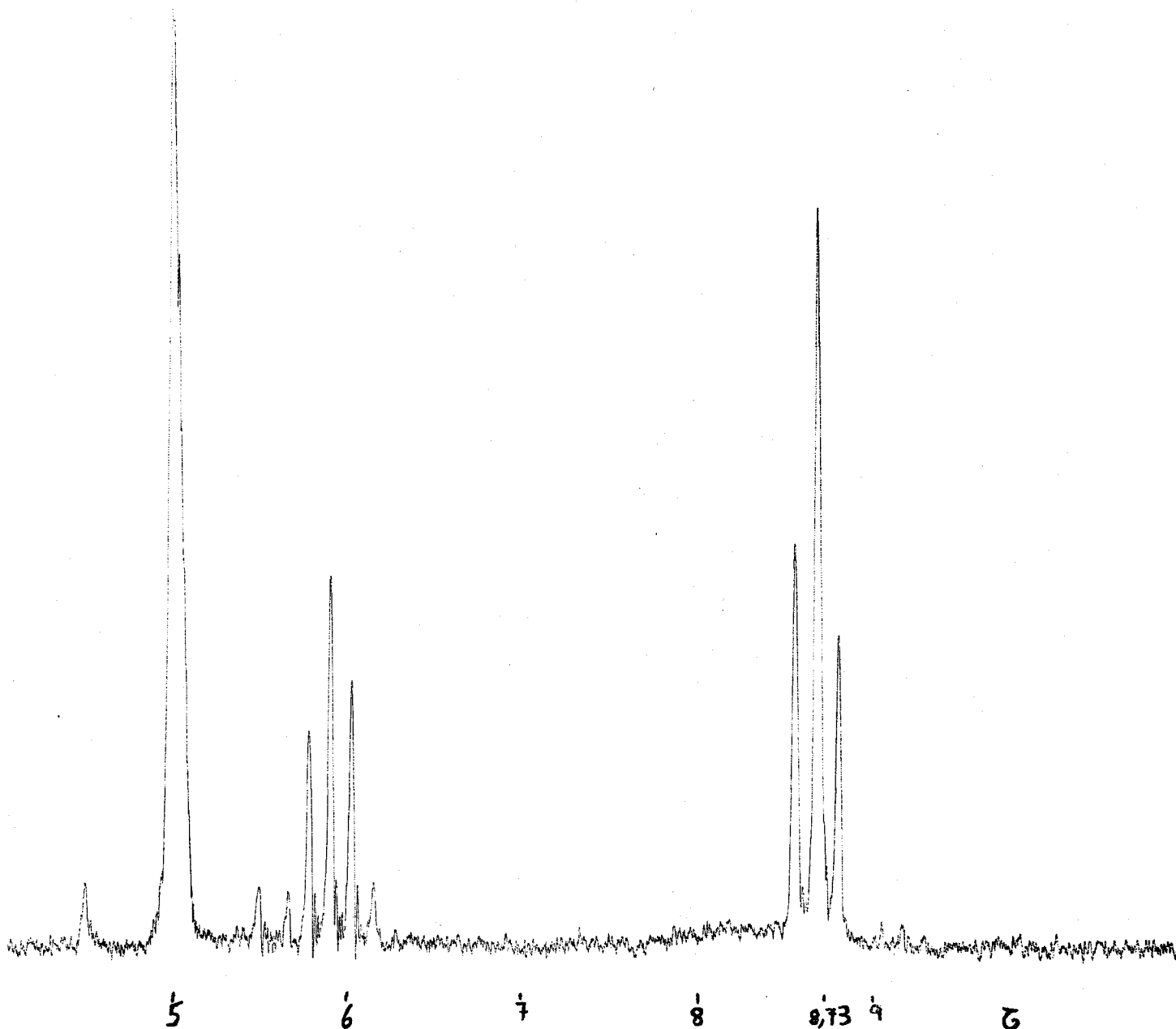
ESPECTRO Nº 10

Infra-Vermelho - Fosfato de Monofenila-sal de bis-ciclohexilamônio



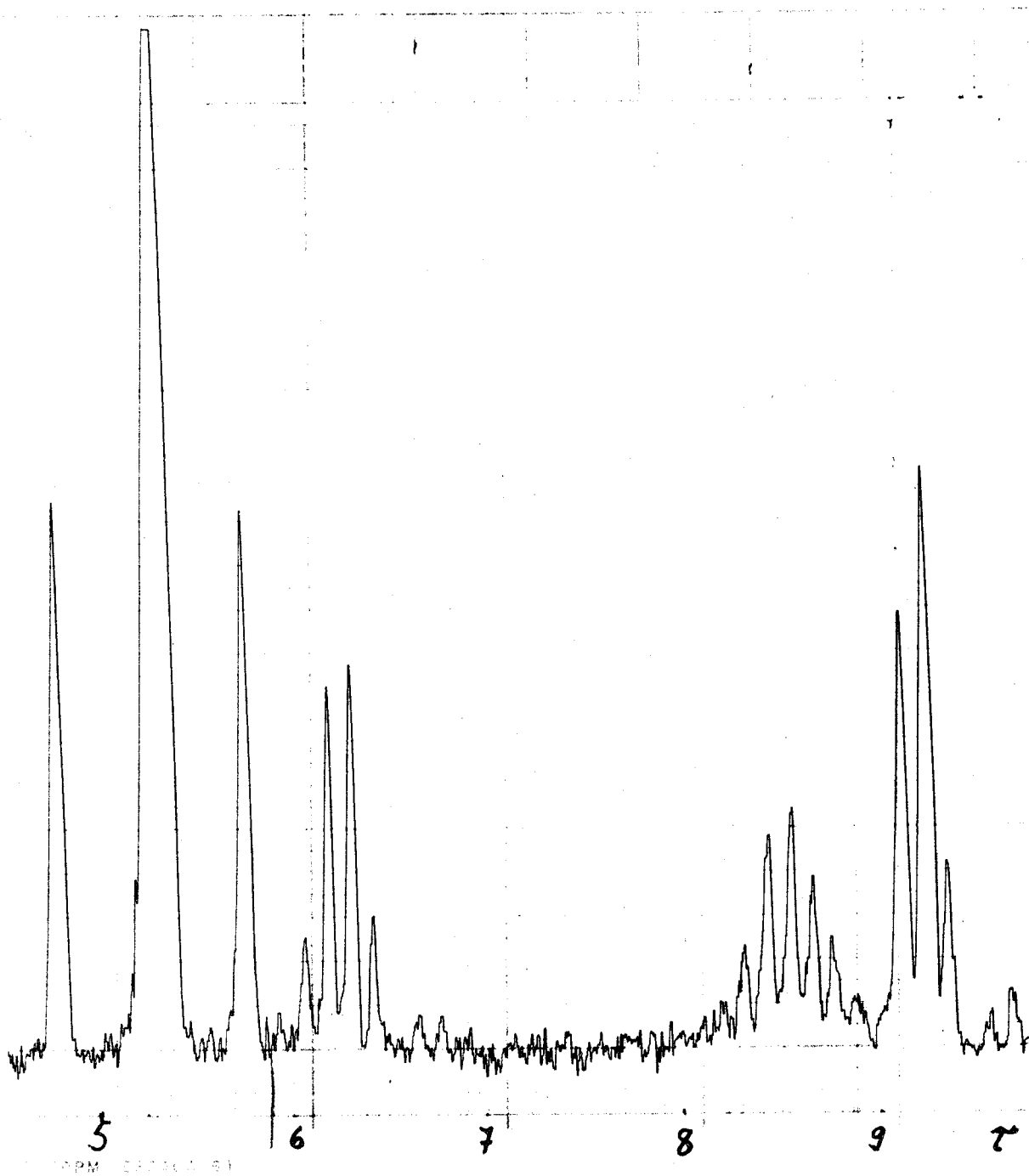
ESPECTRO Nº 11

RNM- Fosfato de monometila-sal de  $K^+$



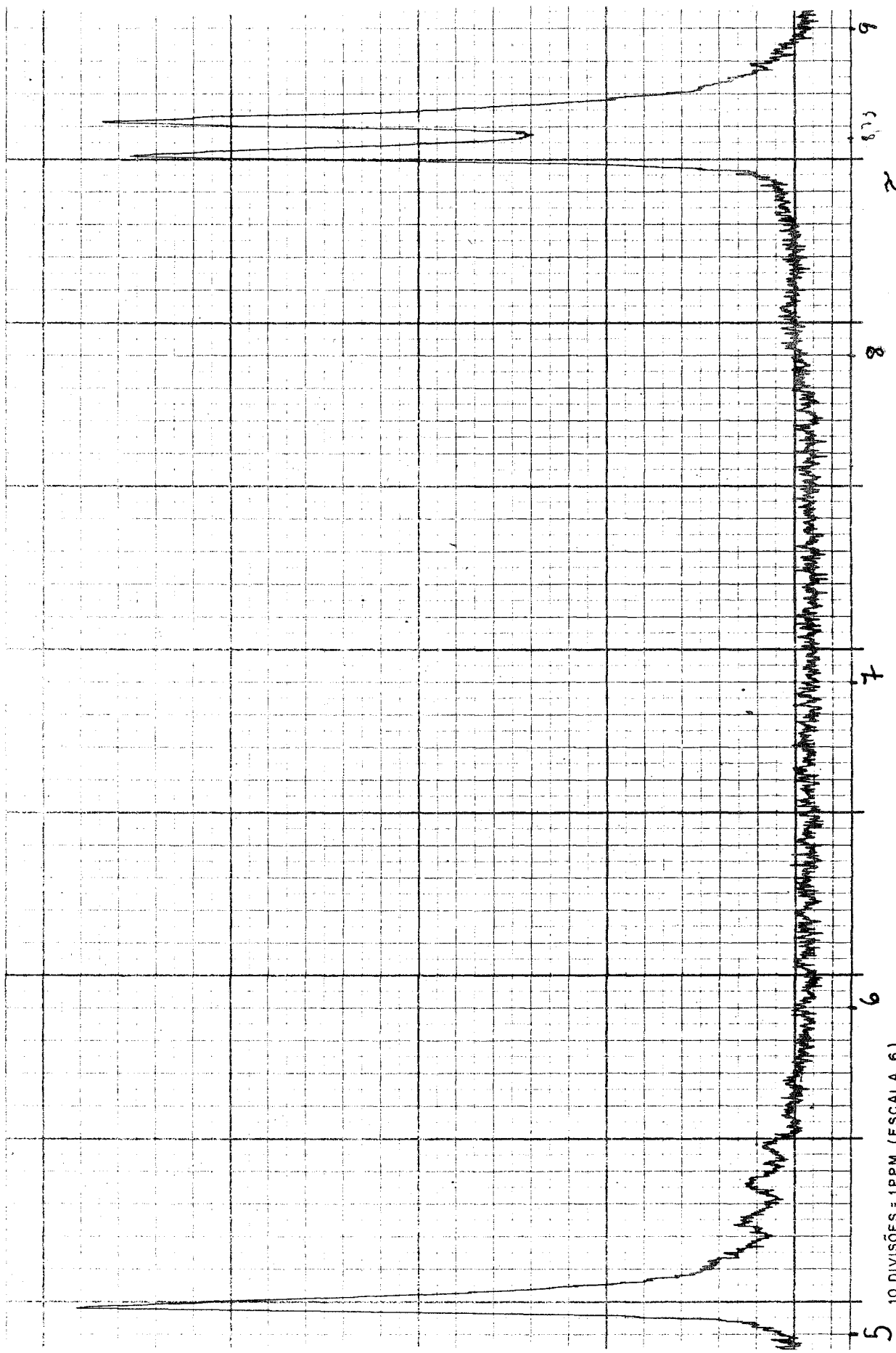
ESPECTRO Nº 12

RNM - Fosfato de monoetila- sal de K<sup>+</sup>



ESPECTRO Nº 13

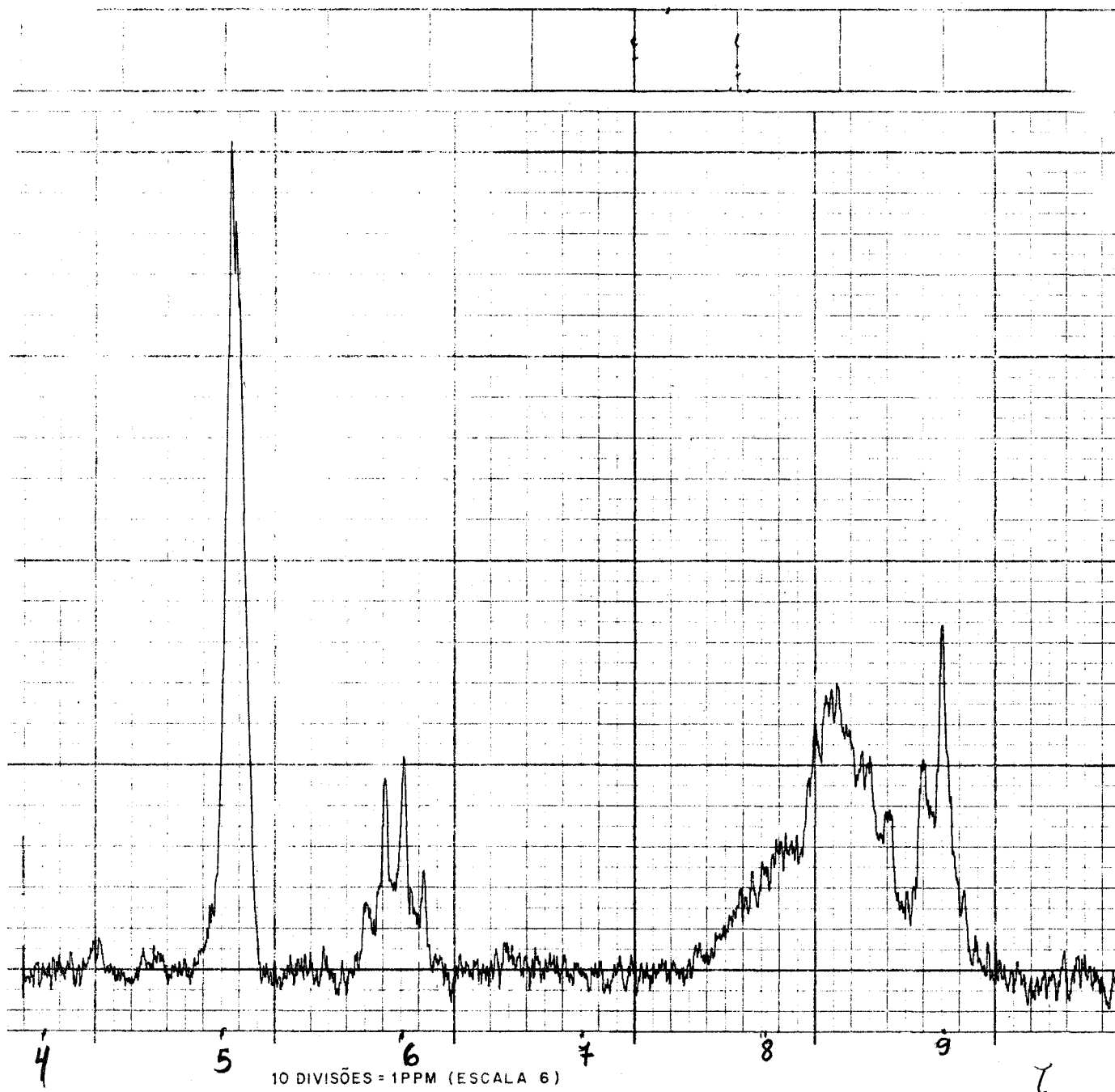
RNM - Fosfato de mono-n-Propila-sal de  $K^+$



ESPECTRO Nº 14

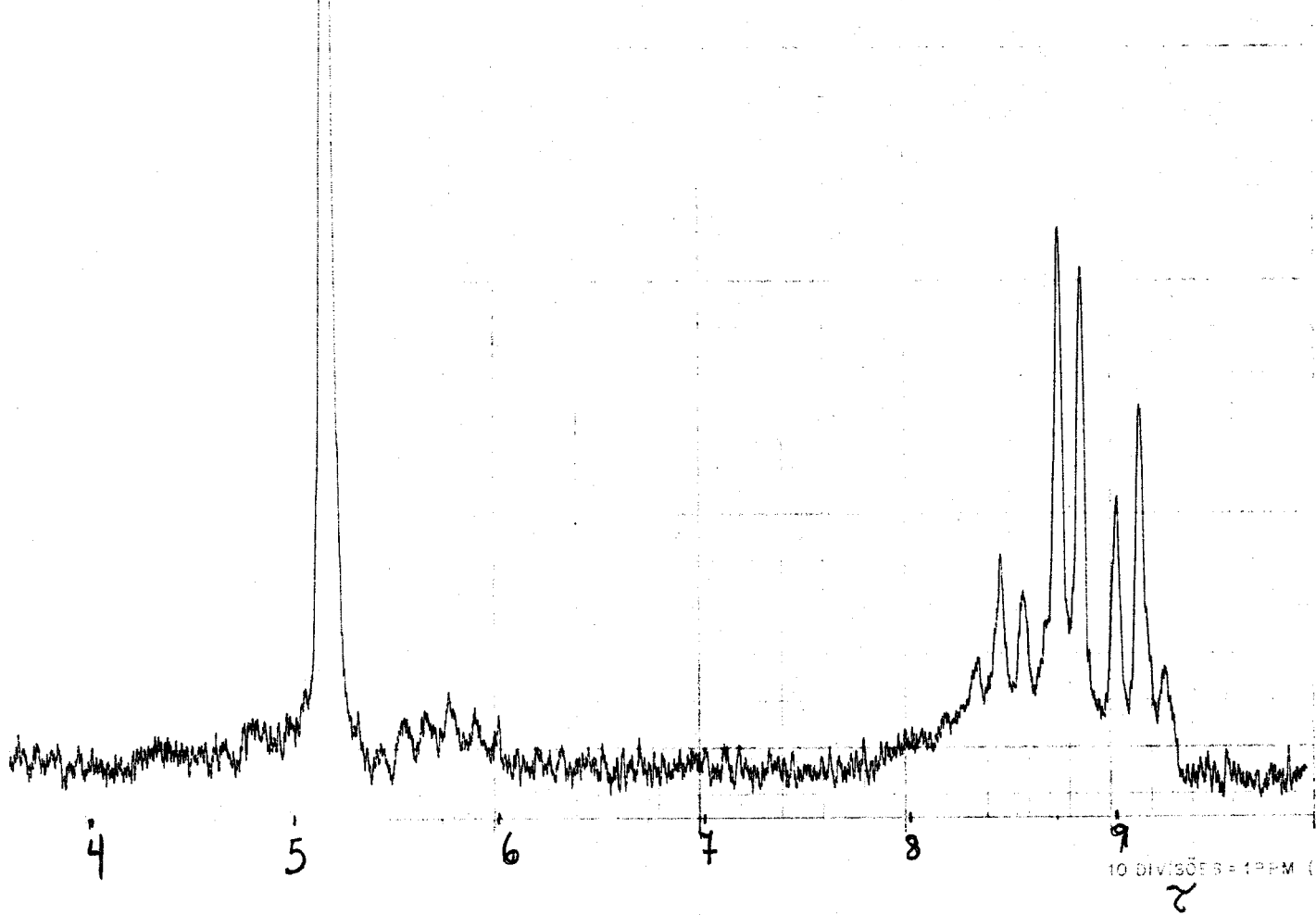
RNM - Fosfato de mono-iso-Propila-sal de K<sup>+</sup>





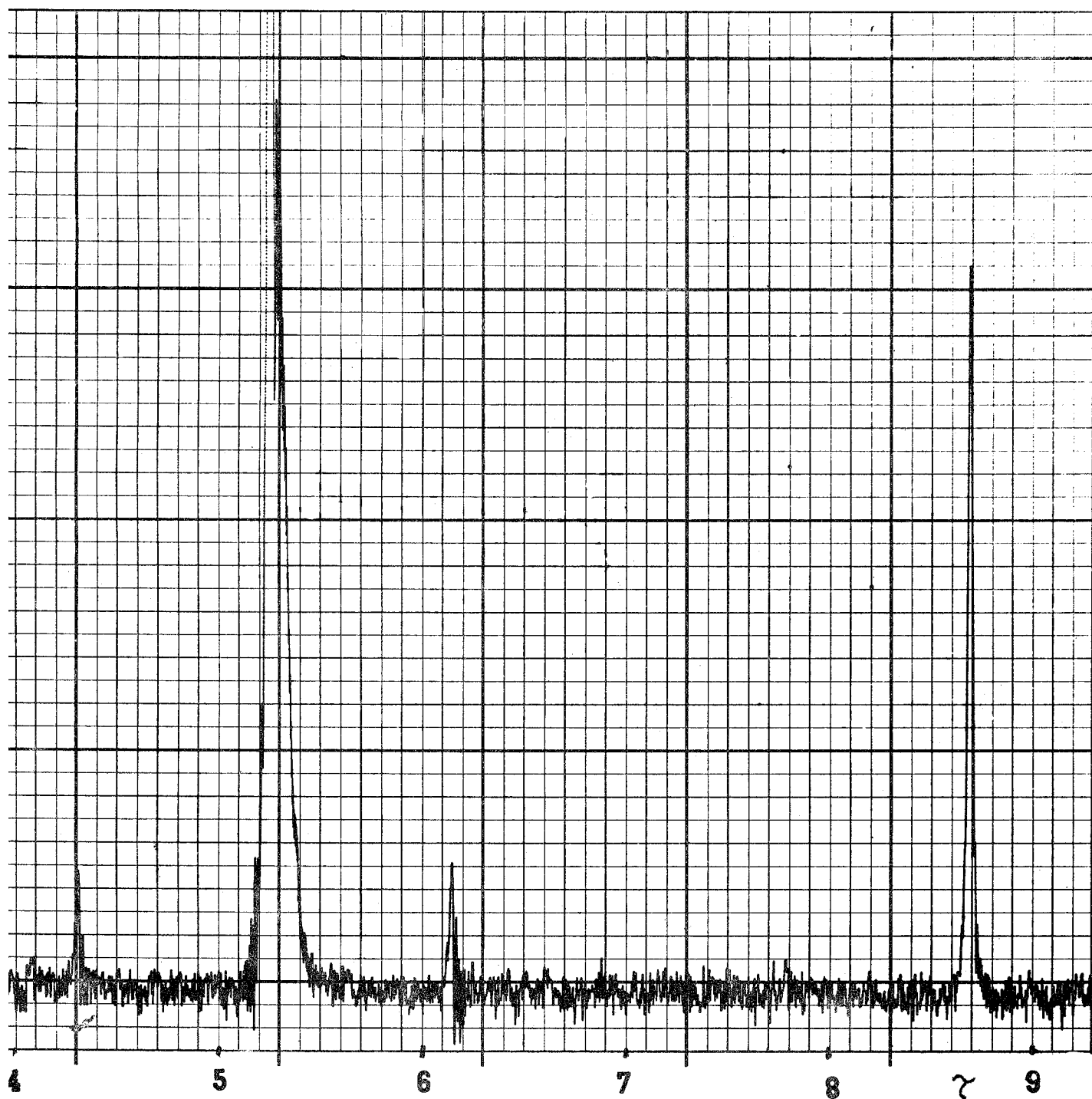
ESPECTRO Nº 15

RNM - Fosfato de mono-n-Butila-sal de  $K^+$



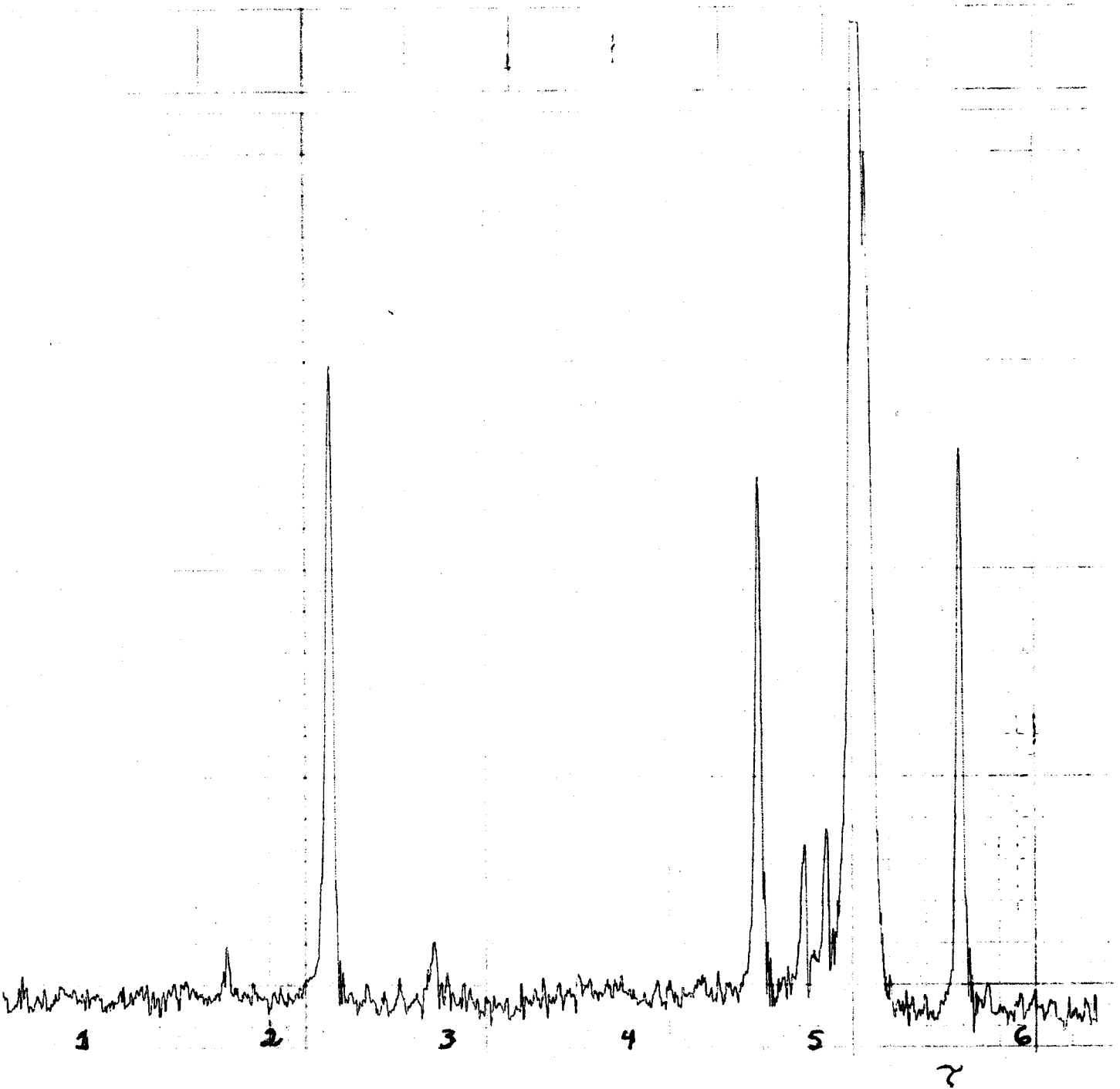
ESPECTRO Nº 16

RNM - Fosfato de mono-sec-Butila-sal de  $K^+$



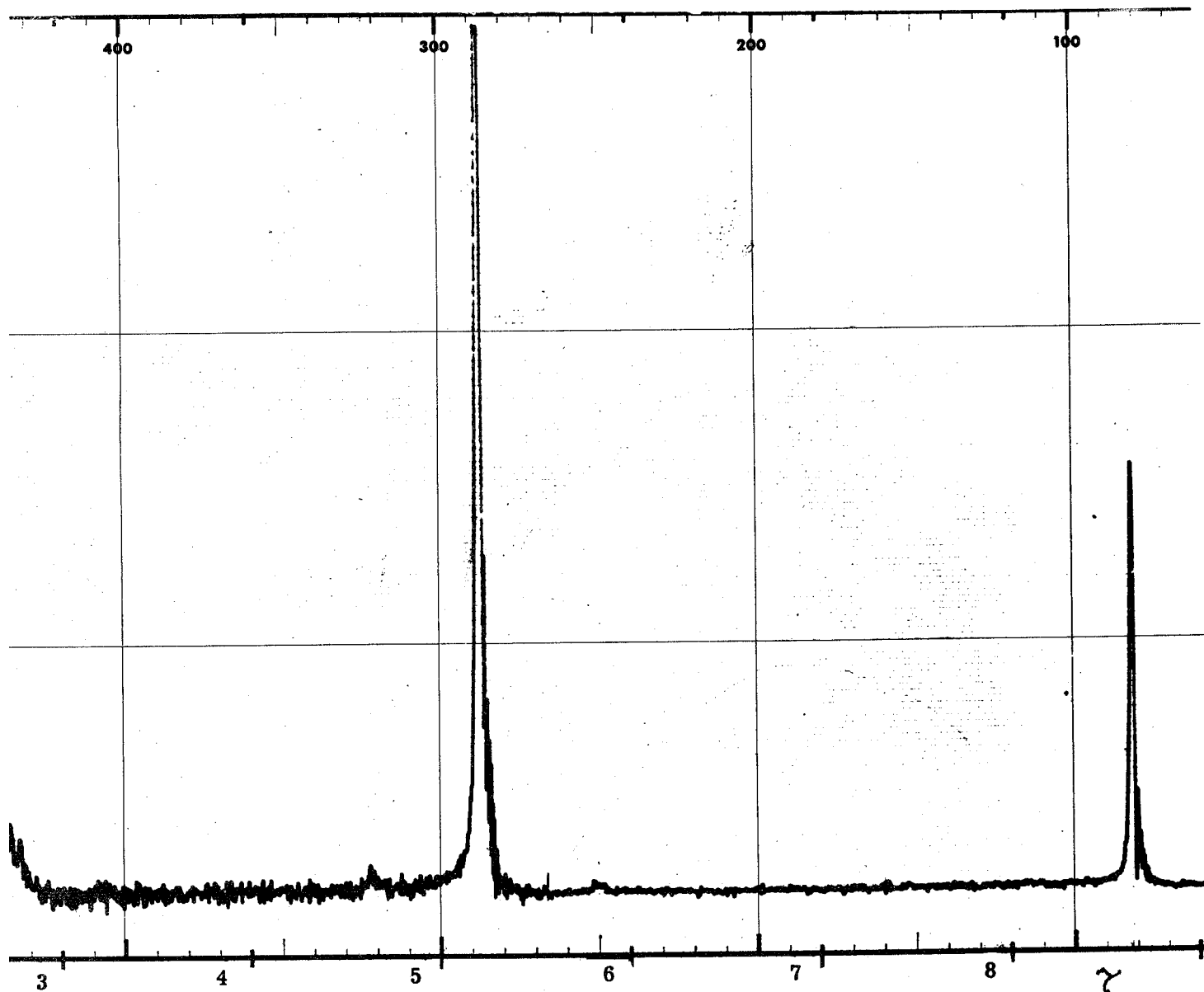
ESPECTRO Nº 17

RNM - Fosfato de Mono-ter-Butila-sal Ba<sup>++</sup>



ESPECTRO Nº 18

RNM - Fosfato de mono-benzila-sal de  $K^+$



ESPECTRO N° 19

RNM - Fosfato de monofenila-sal de  $K^+$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÅKERFELDT, S. - Acta chem. Scand. 16, 1897 (1962).
2. ATHERTON, E.; OPENSHAW, H.; TODD, A. - J.Chem. Soc. 382 (1945).
3. ATHERTON, F.; HOWARD, H.; TODD, A. - J.Chem. Soc. 1106 (1948)
4. AXELROD, B. - J. Biol. chem. - 176, 295 (1948).
5. BAILLY, O. - C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris - 168, 561 - (1919).
6. BAILLY, O. - C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris - 170, 1061 (1920).
7. BAMANN, E.; STADELMANN, W.; RIEHL, J. - Arch. Pharm. 292. 36 (1959).
8. BAMANN, E.; TRAPMANN, H. - Advanc. Enzymol. 21, 169 (1959).
9. BELLAMY, L.; BEECHER, L. - J. chem. Soc. 475 (1952).
10. BELLAMY, L. - "The Infrared Spectra of Complex Molecules"-John Willey, New York (1958), p. 65.
11. BERNSTEIN, H.; PEDERSEN, E. - J. Chem. Phys. 17, 885 (1949).
12. BOYER, P.; LARDY, H.; MYRBÄCK, K. - "The Enzymes" 2<sup>th</sup> Ed. Academic Press, New York (1961), p.7.
13. BRIGL, P.; MÜLLER, H. - Ber. dt. chem. Ges. 72, 2121 (1939).
14. BRINTZINGER, H. - Helv. chem. Acta 48 (1), 47 (1965).
15. BRÜGEL, W. - "Infrared Spectroscopy", John Willey, New York - (1962).
16. BRUCE, T.; BENKOVIC, S. - "Biorganic Mechanismus", Benjamin W., New York (1966), vol. II, p.3.
17. BUNTON, C. et. alii - J. chem. Soc. 3574 (1958).
18. BUNTON, C. - J. Chem. Educ. 45, 21 (1968).

19. BUTCHER, W.; WESTHEIMER, F. - J.Am.Chem.Soc. 77, 2420 (1955).
20. CAVALIER, J. - Bull. chim. Paris 13, 885 (1895).
21. CAVALIER, J. - Bull. chim. Paris - 19(3), 883 (1898).
22. CAVALIER, J.; PROST, E. - Bull.chim.Paris 24 (3), 678 (1900).
23. CERRAI, E.; CESARANO, C.; GADDA, F. - Energia Nucl. 4 (5), -  
405 (1957).
24. CHANLEY, J.; FEAGESON, E. - J.Am.Chem.Soc. - 77, 4002 (1955).
25. CHARGAFF, E. - J. Am. chem. Soc. - 60, 1700 (1938).
26. CHASE, B.; KENNER, G. - J.Chem. Soc. 1371 (1956).
27. CHERBULIEZ, F.; WENIGER, H. - Helv. chim.Acta 29, 2006 (1946).
28. CONLEY, R. - "Infrared Spectroscopy"- Allyn, Bacon, Boston -  
(1966), p. 92 a 183.
29. CRAMER, F.; HETTLER, H. - Chem.Ber. 91 , 1181 (1958).
30. CRAMER, F.; BÖHM, W. - Angew. Chem. 71, 775 (1959).
31. CRAMER, F.; BALDAUF, H. - Chem. Ber. 92, 370 (1959).
32. CRAMER, F.; WEIMANN, G. - Chem.Ind. 9, 46 (1960).
33. CRAMER, F.; BOHM, W.; RITTERSDORF, W. - Justus Liebigs Annln.Chem  
654, 180 (1962).
34. DAVIES, M.; JENKIN, D. - J.Chem.Soc. 2374 (1954).
35. DAVIS, W.; ROSS, W. - J.chem.Soc. 4296 (1952).
36. EMSLEY, J. et alii - "High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy" Pergamon, London (1966) vol. II, p. 1052.
37. EUGEN, R.; JUNG, A - J.chem.Soc. 10, 1761 (1971).
38. FISK, C.; SUBBAROW, Y. - J.biol.Chem. 66, 375 (1925).
39. FOERST, W. - "Newer Methods of Preparative Organic Chemistry", Academic Press, New York (1964), vol. III - p. 336.

40. FOLLEY, S.; KAY, H. - *Ergeb. Enzymforsch.* 5, 159 (1936).
41. FONDY, T.; GHANGAS, G. REZA, M. - *Biochemistry* 9 (16), 3272 (1970)
42. GERRARD, W. - *J. chem. Soc.* 1464 (1940).
43. GERRARD, W.; GRIFFEY, P. - *J. chem. soc.* 4095 (1961).
44. GRABE, B. - *Bioch. Biophys. Acta* - 30, 560 (1958).
45. GREEN, J. - *Ind. Eng. Chem.* 42, 1542 (1950).
46. GRUNZE, H.; KOFANSKY, K. - *Z. anorg. Allg. Chem.* 296, 63 (1958).
47. GRUNZE, H.; KORANSKI, K. - *Angew. Chem.* 71, 407 (1959).
48. GRUNZE, H. - *Angew. Chem.* 71, 70 (1959).
49. GRUNZE, H.; THILO, E. - *Chem. Zentral Blatt* - 16.937 (1960).
50. HABERER, K. - *Atom. Wirtsch.* 10, 36 (1965).
51. HANNES, C.; ISHERWOOD, F. - *Nature, Lond.* 164, 1107 (1949).
52. HARDEN, A.; YOUNG, W. - *Proc. R. Soc.* 78, 369 (1906) ser. B
53. HENBEST, H. et alii - *J. chem. Soc.* 1462 (1957).
54. HENDRIKSON, J.; CRAM, D.; HAMMOND, G. - "Organic Chemistry" -  
3<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill, New York (1970) p. 789.
55. IGARASHI, M.; TAKAIASHI, H.; TSUYAMA, M. - *Bioch. Biophys. Acta* -  
220, 85 (1970).
56. KALINSKI, J.; WEINSTEIN, A. - *J. Am. chem. Soc.* 76, 5882 (1954).
57. KING, E.; NICHOLSON, T. - *Bioch. J.* 33, 1182 (1939).
58. KIRBY, A.; - *Chem. Ind.* 1877 (1963).
59. KOSHLAND, D.; Mc ELROY, W.; GLAS, B. - "Phosphorus Metabolism"-  
John Hopkins, Baltimore (1951), vol. I, p. 473.
60. KUMLER, W.; EILER, J. - *J. Am. chem. Soc.* 65, 2355 (1943)
61. LANGFELD, K. - *Ber. dt. Chem. Ges.* 44, 2077 (1911).
62. LAPIDOT, A.; SAMUEL, D.; WEISS-BRODAY, M. - *J. chem. Soc.* 43, 637  
(1964).



63. LARDY, H.; FISCHER, H. - J.biol.Chem. 164, 513 (1946).
64. LASSAIGNE, J. - Annls. Chim.Phys. 13(2), 294 (1820). In Weyl , T.; Houben, V. "Methoden der Organischen Chemie" - Thieme, G.; Stuttgart, 4e. Auflage (1964), vol. XII - (2), p. 143.
65. LIEBIG, J. - "The Natural Laws of Husbandry". In Florkin, M. ; Stotz, E. (Eds) "Comprehensive Biochemistry" - Elsevier, New York (1965), vol. 16, cap. II, p. 62.
66. LIEBIG, J. - Justus Liebigs annln.Chem. 6, 149 (1833).
67. LIMA, F.; da SILVA, C.; - "Status Report on Isotope Production at the Institute de Energia Atômica" - São Paulo, - Brazil - IAEA-125, p. 63.
68. MARUZEWSKA-WIECKZORKOWSKA, E. et alii - Chemy. Ind. 1668 (1961)
69. MAYNARD, J.; SWAN, J. - Aust.J.Chem. 16, (4), 596 (1963).
70. MAYNARD, J.; SWAN, J. - Proc. chem. Soc. 61, (1963).
71. McBEE, E.; PIERCE, O.; BOLT, R. - Engng.Chem.Ind.Edn. 39 (3) , 391 (1947).
72. MEISE, W.; MACHLEIDET, H. - Justus Liebigs Annln.Chem. 693, 76 (1966).
73. MITSUNOBU, O. et alii-Bull.chem.Soc.(Japan), 38(12),2100 (1965)
74. MIZUMA, T.; MINAKI, Y.; TOYOSHIMA, J. - J.Pharm.Soc.(Japan)81, 51 (1961).Chem.Abstr. 55:12379g.
75. MOFFAT, J.; KHORANA, H. - J.Am.chem.Soc. 79, 3741 (1957).
76. MONTGOMERY, H.; TURNBULL, J. - Proc.chem.Soc. 178 (1957).
77. MONTGOMERY, H.; TURNBULL, J. - J.chem.Soc. 1963 (1958).
78. MORTON, R. - "Phosphatases". In Florkin,M.; Stotz, E. - "Comprehensive Biochemistry" - Elsevier, New York (1965), vol. 16, cap. II, p. 62.

79. MOULE, H.; GREENFIELD, S. - J.Chromat. 11, 77 (1963).
80. NARASHIMHAN, P.; ROGERS, M. - J.Chem.Phys. 34, 1049 (1961).
81. THE NATIONAL FORMULARY - American Pharmaceutical Association - (1950), 9<sup>th</sup>. Ed. p.750.
82. NUSSBAUM, A.; TIBERI, R. - J.Am.Soc. 87, 2513 (1965).
83. OBATA, T.; MUKAIYAMA, T. - J.Org.Chem. 32, 1063 (1967).
84. PÉLOUZE, J. - Annln.Chim. Phys. 52 (2), 37 (1833).
85. PÉLOUZE, J. - Justus Liebigs Annln. Chem. 6, 129 (1833).
86. PETTIT, L. - Quarterly Reviews 25 (1), 1 (1971).
87. POLONOVSKI, J. - "Composés Organiques du Phosphore" - Colloques Nationaux du Centre National de la Recherche Scientifique" - Toulouse(1965).
88. POZEFSKY, A.; COGGESHALL, N. - Analyt.Chem. 23, 1611 (1911).
89. RAO, C. - "Chemical Application of Infrared Spectroscopy" Academic Press, New York (1963), p.157.
90. REEVES, L. - "NMR Measurement of reaction velocities and Equilibrium constants as a function of temperature". In Gold V. - Advances in Physical Organic Chemistry, Academic Press, London (1965) - vol. 3, p.187.
91. RILEY, R. - J.Am.chem.Soc. 66, 512 (1944).
92. ROCHE, J.; SUMNER, J.; MIRBÄCK, K. (Eds) - "The Enzymes" - Academic Press, New York (1950) vol. I, p. 473.
93. ROSS, H. - Analyt.Chem. 41 (10), 1260 (1969).
94. RUDNEY, H. - J.biol.Chem. 210, 353 (1954).
95. THE SADTLER STANDARD SPECTRA - Sadtler Research Laboratories- Philadelphia (1967), vol. 9, espectro n° 9. 219.
96. SCHIFF, H. - Annln, Chim. Phys. 102, 334 (1857).
97. SLATER, J. - "Quantum Theory of Atomic Structure", McGraw-Hill New York (1960). vol. I.

98. STAFFORD, S.; BALDSCHWIELER, J. - J.Am.Chem.Soc. 83,4473 (1961)
99. STANLEY, C. - J. Chromat. 16, 467 (1964).
100. SEYMANSKI, H. - "Interpreted Infrared Spectra", Plenum Press ,  
New York (1964) vol.Ia)p.9; b)p.99; c)p.230; d) vol.  
III, p.7.
101. TENER, G. - J.Am.Chem.Soc. 83, 159 (1961).
102. THOMAS, L.; CHITTENDEN, R. - Chemy. Ind. 1913 (1961).
103. TITHERLEY, A.; WORRAL, E. - J.chem.Soc. 95, 1143 (1909).
104. TSUBOI, M. et alii - Bull.chem.Soc. (Japan) 40, 1813 (1967).
105. UHLENHOPP, E.; GLASEL, J.; KRASNA, A. -J.org.Chem.34(7), 2237  
(1969)
106. VEMMER, H.; GÜTTE, J. - Atompraxis 10, 475 (1964).
107. VERNON, C. - J.chem.Soc. 17 (1957) Special Publ. (8).
108. VIGNE, J.; TABAU, R. - Bull.Soc.chi. France 1194 (1958).
109. VOGEL, A. - "A textbook of quantitative Inorganic Analyses" -  
Longmans, London 3<sup>th</sup>. Ed. (1961) p.402.
110. WASER, J. van - "Phosphorus and its Compounds", Chemistry Inter  
science, New York (1958).a)vol. I p.93; b)vol.II p .  
1329.
111. WICHELHAUS, H.- Justus Liebigs Annln.Chem. 6, 257 (1868).
112. WITTMANN, R. - Chem.Ber. 96, (8), 2116 (1965).
113. WLADISLAU, B.; GIORA, A.;VICENTINI,G.-J.Chem.Soc.(B),586(1966)
114. ZETZCHE,F.;NACHMANN, M. - Helv.chim. Acta 8, 943 (1925).
115. ZTOUDROU, C. - Tetrahedron 18, 197 (1962).
116. ZWIRZAK, A.; KLUBA, M. - Tetrahedron 27, 3163 (1971).

---

Nota: Abreviaturas de nomes de revistas conforme indicação de: BROWN,  
P.; STRATTON, G. - "World List of Scientific Periodicals", -  
Butterworths, London (1963), vol. 1,2,3.