

Elucidação do Mecanismo de Catálise Ácido-Base em um Modelo de Ribonuclease por ESI-MS(MS).

Elisa S. Orth¹ (PG)*, Humberto M. S. Milagre² (PG), Marcos N. Eberlin² (PQ) e Faruk Nome¹ (PQ).
 elisaorth@gmail.com

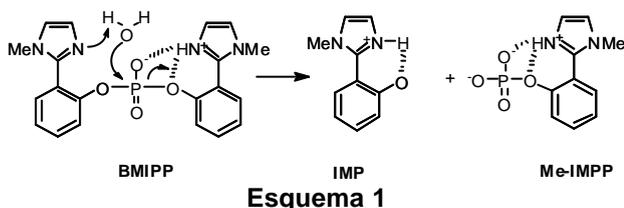
¹Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis/SC

²Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP.

Palavras Chave: *catálise intramolecular, ribonuclease, espectrometria de massas.*

Introdução

As ribonucleases constituem enzimas que quebram o RNA eficientemente, mas sua forma de atuação ainda não é de consenso entre os pesquisadores.¹ Um modelo de ribonuclease que vem sendo estudado em nosso grupo é o diéster bis(2-(1-metil-1H-imidazol-3-íno-2-il)fenil) fosfato, **BMIPP**, que mostrou efeitos catalíticos surpreendentes (hidrólise 10⁶ vezes mais rápida que difenil fosfato).² Estudos cinéticos indicam que sua reação de hidrólise deve proceder por um mecanismo bifuncional intra-molecular ácido-base geral, **Esquema 1**.



Neste trabalho, a reação de hidrólise do **BMIPP** foi acompanhada por espectroscopia de massa (ESI-MS e ESI-MS/MS), que constitui uma importante ferramenta no monitoramento de reações, para confirmar os produtos nos mecanismos propostos.

Resultados e Discussão

Na **Figura 1** está apresentado o espectro de ESI-MS após 25 minutos de hidrólise do **BMIPP** em pH 6,5, a 60°C, com as estruturas moleculares dos picos mais relevantes. Os picos foram caracterizados como: (i) **BMIPP** de m/z 409; (ii) monoéster **Me-IMP** de m/z 253 (iii) produto final fenólico **IMP** de m/z 173; (iv) fosfato inorgânico na forma de metafosfato (PO_3^-) de m/z 79 e H_2PO_4^- de m/z 97

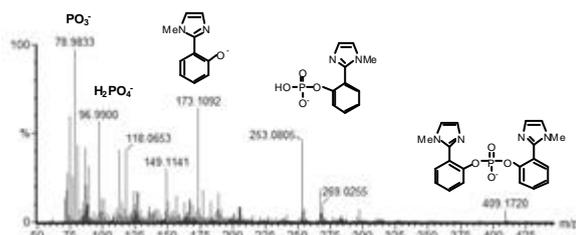


Figura 1. ESI-MS depois de 25 minutos de reação do **BMIPP** em solução aquosa, pH 6,5 e 60°C.

ESI-MS/MS foi então usado para caracterizar essas importantes espécies por dissociação por colisão induzida (CID). Nas **Figuras 2 e 3** estão apresentados os espectros ESI-MS/MS para **Me-IMP** e **IMP**. Observa-se que o ânion **Me-IMP** de m/z 253 dissocia quase exclusivamente para PO_3^- de m/z 79. Já o ânion **IMP** mostrou um fragmento de m/z 158 pela perda de um radical metil, outro fragmento de m/z 118 indicando quebra do anel imidazolínio, perdendo 1-metil-1H-azirine ($\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$) e formando 2-cianofenóxido. O pico de m/z 93 indica perda do grupo imidazol.



Figura 2. ESI-MS/MS do Me-IMP de $m/z=253$.

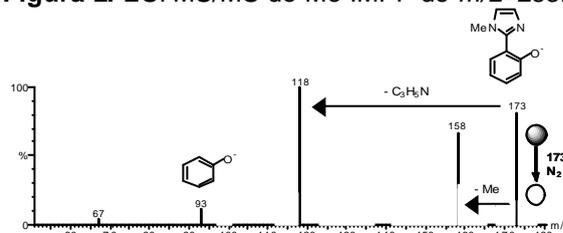


Figura 3. ESI-MS/MS do IMP de $m/z=173$.

Conclusões

Os resultados permitem confirmar que o efeito catalítico observado para **BMIPP** deve-se a uma catálise intramolecular básica do imidazol desprotonado sobre a água, simultânea a uma catálise intramolecular ácida do imidazol protonado, assistindo o grupo de saída. Outro mecanismo possível seria um ataque intramolecular nucleofílico do imidazol, que pode ser descartado, pois o intermediário cíclico esperado não foi detectado (m/z 236).

Agradecimentos

CNPq, PRONEX, FINEP, UFSC, FAPESC, FAPESP e UNICAMP.

Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

¹ Herschlag, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11631.

² Orth, E.S.; Brandão, T.A.S.; Milagre, H.M.S.; Eberlin, M.N.;
Nome, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *in press*.