

# Estudo Cinético e Mecanístico de Reações de Fosforilação da Histidina

Eduardo H. Wanderlind<sup>1\*</sup> (PQ), José R. Mora<sup>2</sup> (PQ), Bruno S. Souza<sup>3</sup> (PQ)

[ewanderlind@ufrj.br](mailto:ewanderlind@ufrj.br)

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica/RJ, Brasil.

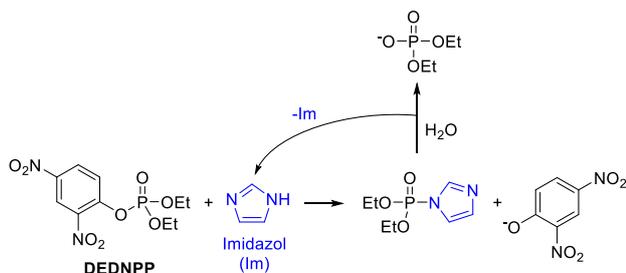
<sup>2</sup> Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Equador.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil.

Palavras Chave: Fosforilação, Ésteres de fosfato, Histidina, Imidazol, Catálise nucleofílica, Hidrólise.

## Introdução

A fosforilação reversível do imidazol histidínico está envolvida em diversos processos biológicos. Nesse sentido, estudos anteriores buscaram avaliar os mecanismos de reações-modelos entre ésteres de fosfato e imidazol e derivados.<sup>1,2</sup> Como exemplo, cita-se a reação do **Esquema 1**, entre o imidazol e o triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (**DEDNPP**), em que se observa a formação e a decomposição de um intermediário de imidazol fosforilado.



**Esquema 1<sup>1</sup>**

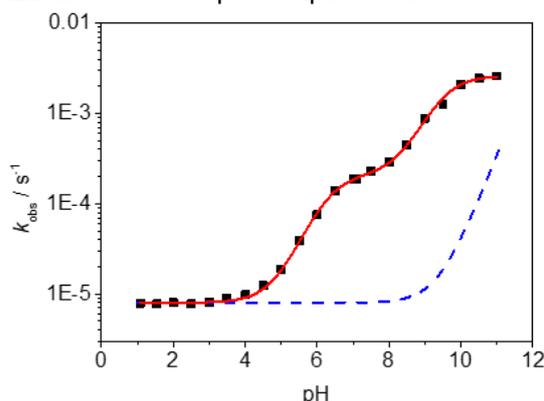
No entanto, devido à instabilidade das fosfohistidinas em sistemas biológicos, diversos aspectos dessas reações ainda não foram elucidados, e diferentes abordagens tem sido empregadas para contornar esse aspecto.<sup>3</sup> Curiosamente, até o momento, nenhum estudo investigou os mecanismos de fosforilação do imidazol da histidina em solução. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo o estudo cinético e mecanístico das reações da L-histidina (His) com o triéster **DEDNPP** em meio aquoso.

## Resultados e Discussão

As cinéticas foram acompanhadas por espectrofotometria de UV/Vis, através da formação do produto 2,4-dinitrofenol, em condições de pseudo-primeira ordem em relação ao substrato, e as constantes de velocidade observadas ( $k_{obs}$ ) foram calculadas pelo ajuste iterativo dos dados de absorbância em função do tempo.

A **Figura 1** apresenta o perfil de pH das reações, em que se observa o aumento da reatividade com a desprotonação do anel imidazólico ( $pK_a = 6,26$ ) e do grupo amínio ( $pK_a = 9,45$ ). O ajuste dos dados da **Figura 1** permitiu calcular a constante de segunda

ordem de  $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para a reação de **DEDNPP** com a espécie dipolar iônica de His.



**Figura 1.** Perfil de pH da reação de **DEDNPP** com L-histidina (0,1M), em meio aquoso, a 25°C e  $I=1\text{M}$ . O perfil de pH da hidrólise espontânea do substrato (em tracejado) é mostrado para fins comparativos.

Dados de efeito isotópico cinético de solvente (SKIE,  $k_{H_2O}/k_{D_2O}$ ) indicam que a reação envolvendo o anel imidazol é de natureza nucleofílica, e experimentos de controle indicam que o ataque nucleofílico ocorre exclusivamente no fósforo.

Experimentos preliminares de RMN <sup>31</sup>P permitiram o monitoramento da formação e decomposição de um dos intermediários de histidina fosforilada. Além disso, os mecanismos estão sendo investigados por cálculos teóricos utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT).

## Conclusões

O imidazol da L-histidina reage com o triéster **DEDNPP** em meio aquoso via mecanismo nucleofílico. Atualmente, experimentos espectroscópicos adicionais e cálculos teóricos estão em progresso.

## Agradecimentos

FAPERJ, FAPESC, CNPq e CAPES.

<sup>1</sup> Orth, E. S.; Wanderlind, E. H.; Medeiros, M. et. al. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8003.

<sup>2</sup> Wanderlind, E. H.; Liz, D. G.; Gerola, A. P. et. al. *ACS. Catalysis* **2018**, *8*, 3343.

<sup>3</sup> Fuhs, S. R.; Hunter, T. *Curr Opin Cell Biol.* **2017**, *45*, 8.