

Estudo Cinético e Mecanístico de Reações de Fosforilação da Histidina

Eduardo H. Wanderlind^{1*} (PQ), José R. Mora² (PQ), Bruno S. Souza³ (PQ)

ewanderlind@ufrj.br

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

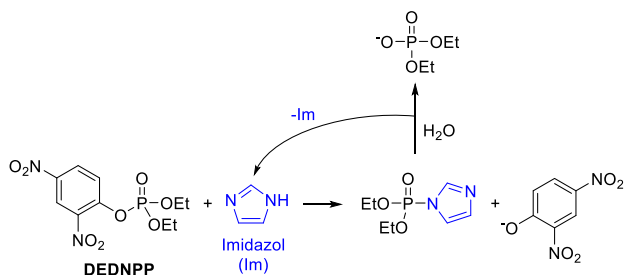
² Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Equador.

³ 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.^{1,2} 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 1¹

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.³ 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.

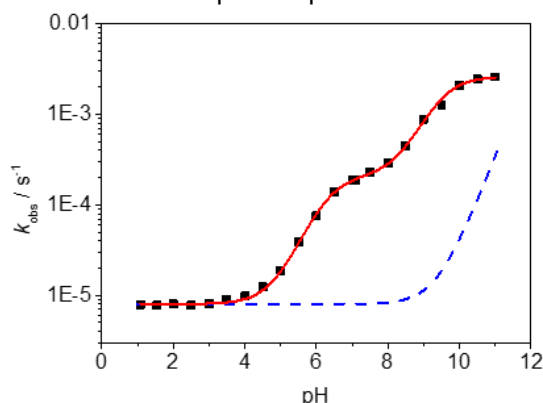


Figura 1. Perfil de pH da reação de **DEDNPP** com L-histidina (0,1M), em meio aquoso, a 25°C e $I=1\text{M}$. O perfil de pH da hidrólise espontânea do substrato (em tracejado) é mostrado para fins comparativos.

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 ³¹P 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.

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

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

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