

Dos compostos ricos em energia aos gases de guerra: uma revisão sobre a química dos compostos orgânicos fosfatados

Luciano Albino Giusti e Vanderlei Gageiro Machado*

Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, Blumenau, SC, Brasil, 89010-971.

Recebido em 14/09/08; aceito em 19/11/08; publicado na internet em 20/01/2009.

RESUMO: A química da ligação fósforo-oxigênio é utilizada largamente em sistemas biológicos em diversos processos, tais como a transdução de energia e o armazenamento, transmissão e expressão da informação genética, que são cruciais para que os seres vivos sejam capazes de realizar as mais variadas funções. Ao mesmo tempo, compostos que apresentam essa ligação foram planejados para diversas finalidades, que envolvem desde os defensivos agrícolas, para o aumento da produção de alimentos, até os gases neurotóxicos, que foram lamentavelmente utilizados para fins bélicos. Nesta revisão, apresentam-se aspectos relativos à química dos compostos orgânicos fosfatados, com ênfase especial para o papel dos compostos fosfatados em eventos bioquímicos e para a temática dos gases neurotóxicos de guerra. Assim, serão apresentados os compostos fosfatados ricos em energia e de que forma eles são utilizados como moeda de troca de energia nas células. Serão mostrados trabalhos que buscam elucidar o mecanismo de ação das enzimas responsáveis pela transdução de energia por meio do emprego de estudos bioquímicos, modelos enzimáticos e enzimas artificiais. Finalmente, serão apresentados estudos recentes sobre a detoxificação de gases de guerra baseados em ésteres fosfóricos e sobre o uso de quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos para a detecção dessas espécies fosfatadas.

PALAVRAS-CHAVE: compostos fosfatados ricos em energia; gases neurotóxicos de guerra; trifosfato de adenosina

* Autor de correspondência. E-mail: gageiro@furb.br

Introdução

Os organismos vivos, para manterem sua intrincada estrutura, reproduzirem-se, adaptarem-se, e realizarem trabalho mecânico, químico e osmótico, entre outras funções, necessitam de energia. Essa energia pode ser proveniente da luz (fotossíntese) ou de nutrientes químicos, sendo esses organismos divididos em autotróficos e heterotróficos. Os organismos autotróficos realizam fotossíntese, ou seja, convertem energia luminosa em energia química, sob a forma de ligações químicas. Já os seres heterotróficos não realizam fotossíntese e a energia é proveniente da oxidação de nutrientes orgânicos. As oxidações destes nutrientes são mediadas por enzimas altamente específicas e liberam energia, a qual é utilizada para a síntese de compostos organofosfatados que são utilizados pelas células como fonte de energia, sendo o trifosfato de adenosina (ATP) o mais importante [1, 2].

Muitas reações bioquímicas não são espontâneas, ou seja, são endergônicas, possuem a variação da energia livre padrão de Gibbs (ΔG°) positiva. Contudo, uma reação termodinamicamente endergônica pode ser impelida por uma reação exergônica desde que esta seja acoplada a um intermediário comum [3]. Esse acoplamento de energia pode ocorrer por mudanças conformacionais transmitidas em macromoléculas protéicas e pelo fluxo de íons através de membranas. No metabolismo celular, muitas reações catalisadas por enzimas são organizadas como vias (catabolismo e anabolismo), as quais são seqüências diferentes de reações que produzem e consomem energia através de ligações químicas que são formadas e sofrem cisão, tanto para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos como nas mais diversas funções celulares.

Os estudos que buscam a compreensão do processo de produção de compostos fosfatados ricos em energia em sistemas biológicos, tais como o ATP, são de enorme importância. Merece ser citado que a quantidade estimada de ATP sintetizado por um ser humano no seu dia-a-dia a fim de que o mesmo possa desempenhar suas funções pode chegar à magnitude de 40 kg diários de ATP. Toda essa produção decorre unicamente do processo enzimático de fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) e desfosforilação do ATP [4].

A ligação entre fósforo e oxigênio foi selecionada pela evolução dentre as várias combinações químicas possíveis por explorar a baixa capacidade cinética dos compostos que apresentam essa ligação para sofrerem reação com a água juntamente com uma alta capacidade termodinâmica para reagirem. Assim, a natureza utiliza compostos organofosforados não somente em processos bioenergéticos como ainda no armazenamento de informação [5-11]. Nessas questões, a água desempenha um papel fundamental e o estudo da solvatação dos compostos fosfatados é de grande importância

na elucidação dos processos bioquímicos.

É interessante observar que compostos organofosforados foram selecionados pelo ser humano para desenvolver pesticidas, inseticidas e muitos gases de guerra. As ligações P-O são ideais para o desempenho dessas classes de compostos, já que os tornam resistentes à ação da água, do solo e do ar, a fim de que possam atingir o seu objetivo biológico sem serem alterados quimicamente [10]. No que se refere aos gases de guerra, estes são relativamente fáceis de serem sintetizados e vêm representando uma preocupação bastante grande nos dias atuais devido às constantes ameaças por parte de grupos terroristas de utilizá-los em alvos civis.

Esta revisão tem como objetivo principal apresentar o papel dos compostos fosfatados em eventos bioquímicos e na temática dos gases neurotóxicos de guerra. Inicialmente far-se-á uma abordagem sobre os compostos fosfatados ricos em energia e de que forma eles são utilizados como moeda de troca de energia nas células. A seguir, serão mostrados trabalhos que buscam elucidar o mecanismo de ação das enzimas responsáveis pela transdução de energia por meio do emprego de modelos enzimáticos. Finalmente, serão apresentados estudos recentes sobre os ésteres fosfóricos como gases de guerra, dando-se atenção especial aos trabalhos que visam a sua desativação, e o emprego de quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos para a detecção de espécies apresentando o grupo fosfato em sua estrutura.

Compostos fosfatados ricos em energia

A energia contida nas ligações químicas das reações de hidrólise das ligações P-O ou P-N para a maior parte dos compostos fosfatados de interesse bioquímico são normalmente de pequena magnitude. Entretanto, as reações de hidrólise do ATP, do ADP, do fosfoenolpiruvato (PEP), da fosfocreatina (PC) e dos resíduos acil-fosfatados, como o acetil-fosfato (AcP) (Figura 1), apresentam valores de ΔG° altos, variando entre -30 e -62 kJ mol⁻¹. Esses compostos atuam nas células como moedas de troca de energia [12], possuindo alta instabilidade termodinâmica e, logo, uma capacidade termodinâmica alta para reagir, sendo assim denominados como compostos fosfatados ricos em energia [12]. A energia de ativação (E_a) é de importância fundamental para a estabilidade desses compostos. Baixos valores de E_a tornariam fácil a sua quebra no interior das células e com pequeno conteúdo energético, o que inviabilizaria a continuidade e a organização da vida. Assim, no interior das células, essa barreira energética é vencida pelas enzimas que diminuem a E_a e aumentam as velocidades das reações com magnitude entre 10¹⁰ até 10¹⁴ vezes maior que os mesmos processos não catalisados e são esses catalisadores específicos os responsáveis pela regulação dos processos celulares [1, 12].

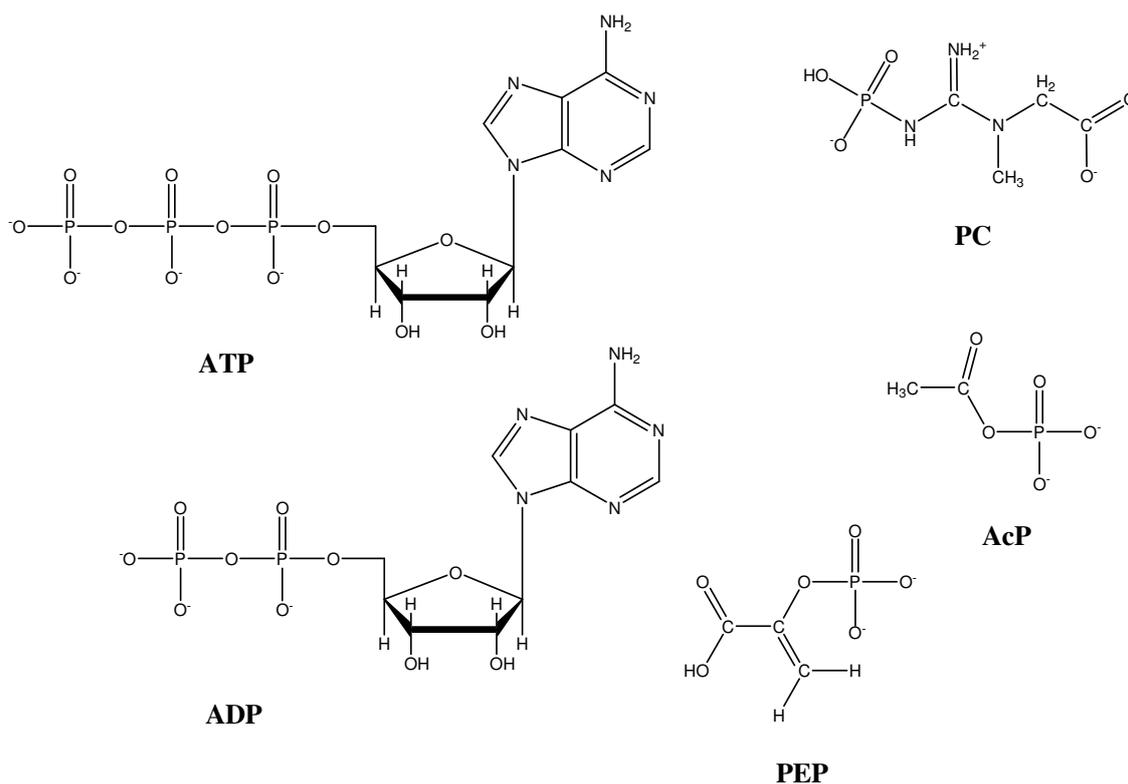


Figura 1. Estruturas de compostos fosfatados ricos em energia.

É importante buscar entender por que o grupo fosfato e não outro grupo funcional possui tão importante responsabilidade na evolução da transformação bioquímica. Segundo Westheimer, para que possa existir a vida, os sistemas vivos devem ser razoavelmente estáveis [13]. As biomoléculas não somente devem ficar confinadas dentro de um pacote definido por uma membrana lipídica, como também devem sobreviver em água por um tempo apreciável, preferencialmente por um longo tempo. Os metabólitos, ou ao menos alguns deles, podem ter vida curta, porém não o material genético, pelo fato de armazenar, transmitir e exprimir a informação genética. A ligação que une dois nucleotídeos no ácido desoxirribonucléico (DNA; Figura 2) é uma ligação fosfodiéster, que é facilmente ionizada em pH próximo à neutralidade (pH fisiológico) [13]. A hidrólise de ésteres de ácido fosfórico carregados negativamente é mais difícil de ocorrer em comparação com ésteres de ácidos carboxílicos, como por exemplo, o acetato de etila [6]. Os metabólitos fosfatados, retidos no interior da célula, encontram-se carregados negativamente, o que faz diminuir a possibilidade de ataque nucleofílico ao grupo fosfato. Em soluções alcalinas, o ataque nucleofílico ocorre pelo íon hidróxido à molécula já ionizada, similarmente à hidrólise de ésteres. No entanto, em soluções ácidas, novamente devido à influência dos grupos hidroxílicos, o átomo de fósforo carregado positivamente atrairá espécies nucleofílicas, podendo assim reagir com a água [7].

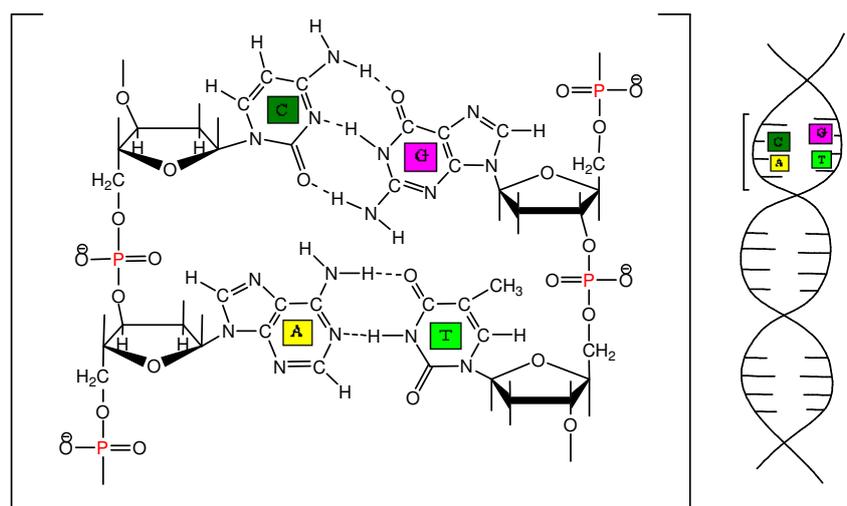


Figura 2. Estrutura do DNA.

Os nucleófilos, assim como o íon hidróxido, são repelidos por cargas negativas e, portanto, reagem menos rapidamente com ânions do que com substâncias neutras. As cargas negativas sobre os fosfatos são importantes na ligação de coenzimas às enzimas, no empacotamento do ácido nucléico e nas interações intermoleculares. Por esta razão, os grupos fosfodiésteres no DNA e no ácido ribonucleíco (RNA) são carregados negativamente: eles tornam-se relativamente mais resistentes à hidrólise e foram, portanto, preferidos a ésteres de ácidos carboxílicos como material genético [8]. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a hidrólise de certos ésteres fosfóricos de longe excede o tempo de vida alcançado pelos humanos. Assim, por exemplo, o $t_{1/2}$ para a reação de hidrólise espontânea do difenilfosfato é de 180 anos a 100 °C [9]. A hidrólise espontânea do DNA em solução neutra é tão lenta que a constante de velocidade para esse processo é desconhecida, mas o $t_{1/2}$ já foi estimado em 200 milhões de anos [14]. Tal estabilidade é coerente com o papel fundamental do DNA na preservação da informação genética [10].

Outro aspecto que merece ser observado refere-se ao fato de que, nos primórdios da evolução, os compostos seriam difundidos através das membranas de organismos primitivos evolucionários, podendo eles ser dissolvidos na parte externa da célula [11]. Muitas moléculas eletricamente neutras possuem alguma solubilidade em lipídios e atravessam a membrana; a maioria das moléculas ionizadas, na forma de sais, é insolúvel em lipídios. Essa regra geral não é absoluta, porém seguramente as moléculas podem ser mantidas dentro da membrana caso elas permaneçam ionizadas [11, 13].

Lipmann, em meados do século passado, observou que os compostos fosfatados seriam diferenciados pela natureza química da ligação entre o grupo fosfato e o restante da molécula, não importando se o composto estivesse em solução ou ligado ao sítio ativo da enzima [3]. Uma vez que o composto fosfatado estivesse ligado à enzima, ele seria

hidrolisado e a energia proveniente da quebra da ligação de fosfato seria aproveitada pela enzima para realizar trabalho. Lipmann, dessa forma, conceituou pela primeira vez os compostos fosfatados ricos em energia e as suas idéias sobre como as células utilizam esses compostos como moeda de troca de energia foram aceitas até o final da década de oitenta [3].

Kalckar sugeriu que a energia contida nas ligações químicas fosfatadas de alta energia seria decorrente da estabilização relativa, por ressonância, dos produtos de hidrólise dos compostos fosfatados em relação aos reagentes [15]. Assim, o ADP e o fosfato inorgânico (P_i) apresentam mais estruturas de ressonância que o ATP, além do fato de que as estruturas de ressonância que podem ser representadas para o ATP contribuem muito pouco para a sua estabilização, com átomos de oxigênio apresentando três ligações e carga positiva adjacente ao átomo de fósforo, também carregado positivamente (Figura 3) [15].

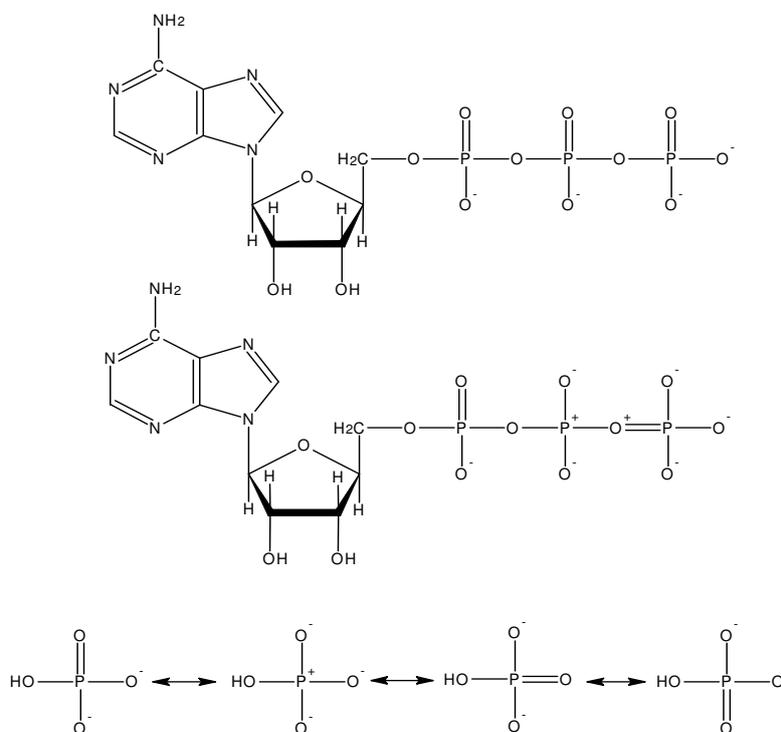


Figura 3. Estruturas de ressonância representadas para o ATP e para o íon fosfato.

Em 1951, Hill e Morales [16] sugeriram que os compostos fosfatados ricos em energia, tais como o ATP, o ADP e o PEP, apresentam, juntamente com o efeito de ressonância, um efeito eletrostático que contribui para a instabilidade termodinâmica. Esse efeito eletrostático é maior no ATP, sendo essa repulsão eletrostática muito forte devido à proximidade das cargas negativas sobre os seus átomos de oxigênio vizinhos. Quando o ATP é hidrolisado para ADP e P_i essa repulsão é reduzida, sugerindo que a energia livre "eletrostática" no ATP pode conferir a essa substância seu papel especial

como doador de energia. Riseman e Kirkwood [17] já haviam sugerido uma explicação para a questão baseada em estudos envolvendo a actomiosina, que faz parte do grupo de enzimas responsáveis pela desfosforilação do ATP a ADP e P_i . O primeiro passo envolve a fosforilação de grupos alcoólicos residuais contidos na própria enzima. A cadeia da actomiosina é estendida pela repulsão entre cargas negativas dos grupos que estão interagindo, fazendo com que a enzima armazene energia livre na forma de entropia configuracional negativa, energia essa originada da degradação da ligação de fosfato de alta energia contida no ATP. A remoção do grupo fosfato carregado negativamente faz com que a energia armazenada seja convertida em trabalho mecânico causando uma contração da cadeia, ou seja, a retomada da configuração.

Estudos teóricos realizados posteriormente por Pullman e Pullman [18] para os compostos fosfatados ricos em energia levaram à conclusão que a hipótese de Kalckar juntamente com a de Hill e Morales são realmente importantes para o entendimento dos aspectos termodinâmicos envolvidos nas reações de hidrólise do ATP, ADP, PEP e AcP. Boyd e Lipscomb [19], na década de sessenta, concluíram o mesmo, ao utilizar Hückel estendido para fazer cálculos teóricos das estruturas de compostos fosfatados ricos em energia.

Já na década de setenta, George e colaboradores [20], analisando os aspectos termodinâmicos das reações de hidrólise para vários compostos fosfatados ricos em energia em diversos valores de pH, puderam concluir que os efeitos intramoleculares analisados acima apresentam importância secundária quando comparados à solvatação de reagentes e produtos. Foi observado por eles que, em fase aquosa, o PP_i completamente protonado ($H_4P_2O_7$) tem uma entalpia de hidrólise (ΔH^0) de $-31,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, enquanto a espécie não protonada ($P_2O_7^{4-}$) apresenta um valor de ΔH^0 de $-15,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, apontando para uma entalpia de hidrólise $16,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ mais negativa para a espécie tetraprotonada [20]. Esse estudo clássico veio, portanto, a demonstrar, por meio de dados experimentais, que a estabilidade do composto fosfatado é determinada pela capacidade do meio para solvatá-lo e quanto maior ela for, menor será a sua reatividade. Usando-se outras palavras, um valor alto para a constante de equilíbrio de hidrólise do composto reflete uma maior solvatação dos produtos da reação em relação aos reagentes [20].

Buscando entender a química dos compostos fosfatados ricos em energia, vários estudos mecânico-quânticos já foram efetuados. Kollman e colaboradores [21] apresentaram cálculos *ab initio* para reações de hidrólise de compostos fosfatados ricos em energia em fase gasosa. Foi verificado que os efeitos intramoleculares de ressonância e repulsão eletrostática mencionados acima são de importância secundária para determinar a energia de hidrólise em algumas dessas reações, e que as energias

relativas de solvatação de reagentes e produtos são em grande parte o fator mais importante para determinar as energias de hidrólise nesses processos. Ewig e van Wazer [22] também chegaram a conclusões bastante similares, ao empregarem cálculos *ab initio* para o estudo das energias das reações hidrolíticas de compostos fosfatados que apresentam a ligação P-O-P em sua estrutura.

Um problema bastante difícil para ser solucionado por métodos *ab initio* é o da hidrólise do PP_i pois todas as espécies envolvidas nesse processo estão desprotonadas em pH neutro. Muitos trabalhos buscam fazer previsões sobre a entalpia para essa reação considerando as espécies em fase gasosa completamente protonadas, com o intuito de verificar se o processo sem a participação do solvente é endotérmico ou exotérmico. Os resultados apresentados, no entanto, são controversos, apontando para entalpias de hidrólise em fase gasosa díspares, que variam de $-1,7$ a -56 kJ mol^{-1} [20, 22-24]. Colvin e colaboradores [25] demonstraram, por cálculos *ab initio* da entalpia da hidrólise do PP_i totalmente protonado em fase gasosa, que a reação é desfavorável em 21 kJ mol^{-1} , o que se deve à formação de um par de ligações de hidrogênio intramoleculares entre os dois fosfatos na molécula. Com respeito a esse aspecto, a presença de ligações de hidrogênio intramoleculares, no PP_i , em estudos *ab initio*, em fase gasosa, também foi observada recentemente em outros trabalhos [26-29]. Os estudos das energias de hidrólise em fase gasosa para as formas aniônicas do PP_i , relacionadas ao pH fisiológico, mostraram valores bastante negativos, que foram explicados como sendo devidos à repulsão eletrostática [29]. Algumas previsões das energias de hidrólise para os estados desprotonados do PP_i em fase aquosa foram realizadas por meio de vários métodos baseados no modelo do contínuo dielétrico do meio aquoso [25]. Foi verificado que a solvatação por parte da água resulta na minimização dessa repulsão intramolecular por meio de interações eletrostáticas. Os resultados apontam dessa forma para o fato de que a hidrólise desses compostos pode ser mais bem descrita como um compromisso entre a solvatação das espécies envolvidas e as repulsões intramoleculares.

As idéias clássicas de Lipmann sobre a síntese e a hidrólise dos compostos fosfatados ricos em energia passaram por uma revisão ampla ao final da década de oitenta e início da de noventa por de Meis [30, 31]. Essa reformulação se deveu à descoberta, por vários resultados obtidos no decorrer da década de setenta por muitos grupos de pesquisa, que as energias de hidrólise de compostos fosfatados diferentes variam grandemente dependendo do fato de eles estarem em solução ou no sítio ativo da enzima [12]. Estudos do ciclo catalítico de diferentes tipos de enzimas envolvidas com transdução de energia indicam que a energia torna-se disponível para a enzima realizar trabalho antes da quebra do composto fosfatado. Com esse novo ponto de vista, surge uma nova seqüência de eventos destinados à hidrólise de um composto fosfatado, de modo que ele, após ligar-se à enzima, faz com que ela realize trabalho sem que ocorra a

hidrólise do mesmo. Nesse processo, ocorre um decréscimo no nível energético do composto fosfatado, sendo que a sua presença permite à enzima seguir para outra conformação e nessa transição o trabalho pode ser realizado. Os produtos da hidrólise do composto fosfatado dissociam-se da enzima em um processo que envolve uma mudança de energia livre relativamente pequena. No processo reverso, portanto, os compostos fosfatados assim como o ATP e o AcP podem ser sintetizados na superfície da enzima, sem a necessidade de energia livre, em um sítio hidrofóbico da enzima. Uma mudança conformacional da enzima leva à entrada de água no sítio catalítico. Nesse retorno ao meio aquoso, as constantes de equilíbrio para a hidrólise desses compostos voltam a ganhar valores muito altos. Como um exemplo, as variações de energia livre para a hidrólise de ATP a 25 °C situam-se entre -20,5 e -44,8 kJ mol⁻¹ em solução aquosa diluída [20, 32-36], enquanto na superfície da F₁-ATPase ocorre uma mudança importante na magnitude da constante para +1,7 kJ mol⁻¹ [30, 37-39], valor esse bastante próximo do medido experimentalmente para a mesma reação em clorofórmio com traços de água (+1,3 kJ mol⁻¹) [35]. Outra evidência experimental importante foi conseguida pela observação de que a síntese de compostos fosfatados ricos em energia, no sítio ativo das enzimas, é bastante facilitada pela adição de solventes orgânicos ao meio, enquanto a hidrólise desses compostos é inibida se solventes orgânicos são adicionados, pois facilitam a entrada de P_i no sítio catalítico da enzima favorecendo a formação de ATP [40-42].

De acordo com de Meis [30, 31], a variação nos valores das constantes de equilíbrio de hidrólise de compostos como o ATP e compostos da mesma classe, possuindo uma ligação do tipo fosfoanidrido está relacionada às mudanças de entropia em solução [31]. Foi proposto por ele então uma nova definição para o conceito dos compostos fosfatados ricos em energia, segundo a qual o *"ATP e outros compostos possuindo ligações do tipo fosfoanidrido são moléculas que permitem o uso de energia entrópica"* [31].

Modelos enzimáticos para o estudo de compostos fosfatados ricos em energia

Para que se possa ter uma visão detalhada de uma reação enzimática, é necessário conhecer a identidade química do sítio ativo junto à superfície da enzima, seu arranjo espacial e seu efeito junto ao substrato. Os modelos enzimáticos vêm suprindo informações essenciais para a interpretação do modo de operação das enzimas [43]. A mimetização das reações biológicas de transferência do grupo fosforila tem representado um dos maiores desafios para os químicos nas últimas décadas [44-49]. Tendo em vista a importância de íons metálicos nos processos biológicos, especialmente na transferência de fosforila, a hidrólise não-enzimática do ATP, promovida por íons metálicos, em

especial por cátions divalentes, tem sido bastante investigada [12]. Foi observado um grande aumento na velocidade quando íons cobalto (III) coordenados participam da reação [50].

O desenvolvimento da química supramolecular [51] – a química “além da molécula” (“beyond the molecule”), que estuda o comportamento de conjuntos de moléculas operando coletivamente por meio de interações intermoleculares – tornou possível o planejamento de receptores de ânions capazes de realizar a catálise supramolecular em reações envolvendo substratos de interesse químico e biológico, tais como o AcP e o ATP. Essas moléculas receptoras operam de forma análoga à descrição contida no *princípio da chave e da fechadura*, descrito por Emil Fischer em 1894 para representar o complexo enzima-substrato em biocatálise (Figura 4) [52].

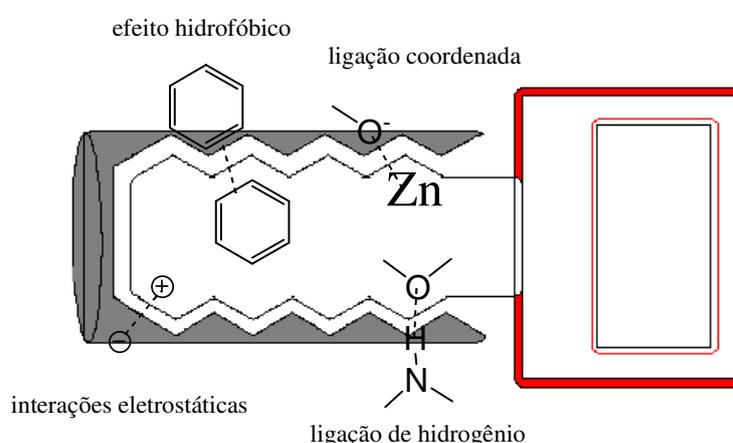


Figura 4. O princípio da chave e da fechadura. O sítio receptor (fechadura) é complementar ao substrato (chave).

O fato de haver uma concentração intracelular de poliaminas considerável sugere sua possível interação com metabólitos, o que poderia acarretar efeitos diversos em suas propriedades. Os estudos realizados com a putrescina, a espermidina, a espermina e a cadaverina confirmaram sua propriedade interessante de complexar AMP, ADP e ATP, embora elas praticamente não tenham influenciado nos valores das constantes de velocidade de hidrólise do ATP [53]. Foi no entanto verificado que a pentaetilenoxamina catalisa a hidrólise do ATP com um pequeno aumento de velocidade [54, 55]. Lehn e colaboradores [56] tiveram assim a idéia de utilizar as poliaminas macrocíclicas 1-3 (Figura 5) na catálise supramolecular da hidrólise do ATP. Estudos acompanhados por meio de espectrometria de RMN de ^{31}P demonstraram um grande aumento na velocidade de hidrólise ao se adicionar ao meio cada macrociclo, mas a maior aceleração de velocidade foi obtida para o macrociclo [24]- N_6O_2 , o qual complexa fortemente o ATP e catalisa a sua hidrólise para ADP e P_i . A catálise ocorreu sobre uma faixa bastante larga

de pH (de 2,5 a 8,5) e apresentou cinética de primeira ordem, sendo catalisada com renovação ("turnover") da poliamina. Os dados obtidos apontaram para a seguinte proposta de mecanismo de reação (Figura 6) [56]: primeiramente, forma-se um complexo por meio de interações eletrostáticas do ATP desprotonado negativamente com o macrociclo protonado positivamente, o qual atua assim como um receptor aniônico. A seguir, acontece uma reação no próprio complexo formado, fruto de uma combinação de catálise ácida, básica e nucleofílica envolvendo o fosfato terminal do ATP, que leva à transferência de fosforila do ATP para o macrociclo. Forma-se um macrociclo fosforilado intermediário rico em energia do tipo fosforamidato, o qual é hidrolisado em seguida, com recuperação do catalisador. A poliamina [24]-N₆O₂ funciona, portanto como uma ATPase, e a enzima artificial recebeu de Lehn a denominação de protoenzima [57, 58]. Foi ainda demonstrado que, na reação de hidrólise do ATP na presença de íons fosfato, catalisada pelo [24]-N₆O₂ e por íons metálicos (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺), após a formação do intermediário fosforamidato, o íon fosfato da solução complexa-se ao macrociclo fosforilado [57-61]. A seguir, ocorre uma nova transferência de fosforila, do fosforamidato para o fosfato, com a formação de PP_i, o qual é descomplexado para recuperar o catalisador para um novo ciclo catalítico. Em outro trabalho, realizado por Hosseini e Lehn [62], esse processo de co-catálise [60] foi explorado para a síntese do PP_i a partir do AcP, empregando-se como catalisador o macrociclo [24]-N₆O₂. O mesmo macrociclo catalisou a fosforilação de ADP pelo AcP, resultando na síntese do ATP via intermediário fosforamidato [63]. Também foi observado que a adição de íons Ca²⁺ ou Mg²⁺ aumentou o rendimento da formação de ATP [64], o que levou à sugestão de que as espécies reativas agrupam-se na forma de um complexo ternário, que tem a participação do intermediário fosforamidato, do ADP e do íon metálico [64]. Nesse complexo formado, o cátion divalente funciona como uma ponte, ligando o grupo fosforila do intermediário fosforamidato ao grupo fosforila terminal do ADP complexado ao macrociclo e, ao manter os reagentes próximos, facilita dessa maneira a fosforilação [64]. Lehn e Fenniri [65] fizeram uso da catálise supramolecular reunindo um processo enzimático combinado natural-artificial para a produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH). Assim, utilizaram o mesmo sistema abiótico de produção de ATP acoplado a receptores enzimáticos naturais que consomem ATP, resultando como produto o NADH. Outros trabalhos foram realizados empregando-se o composto [24]-N₆O₂ como mimetizador enzimático [66, 67], sendo que esse aspecto foi amplamente revisado anteriormente [12].

Recentemente, estudos de diferentes poliazafenantrolinas têm sido utilizados em estudos biomiméticos e de catálise supramolecular devido à sua capacidade de coordenação química. Lin e colaboradores [68] demonstraram que os compostos **4**, **5** e **6** são seletivos para nucleotídeos em pH fisiológico e que catalisam a reação de hidrólise do

ATP. Os íons metálicos Mg^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} atuam como cofatores na hidrólise do ATP por sua ligação com o biossubstrato, e ao serem reconhecidos pelas poliazafenantrolinas, com diferentes afinidades e diferentes mecanismos, auxiliam no reconhecimento e hidrólise do ATP.

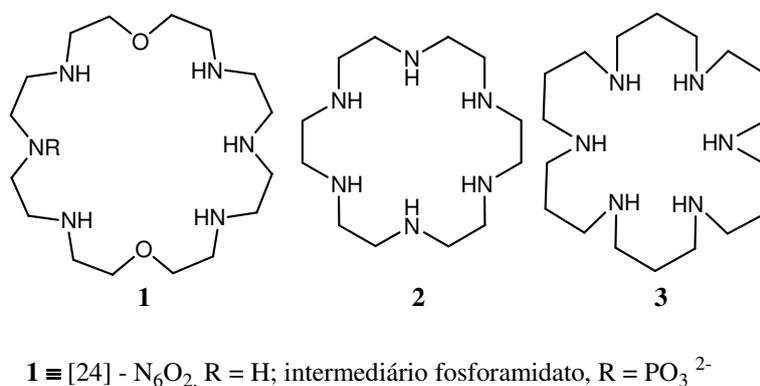


Figura 5. Estruturas de algumas poliaminas macrocíclicas.

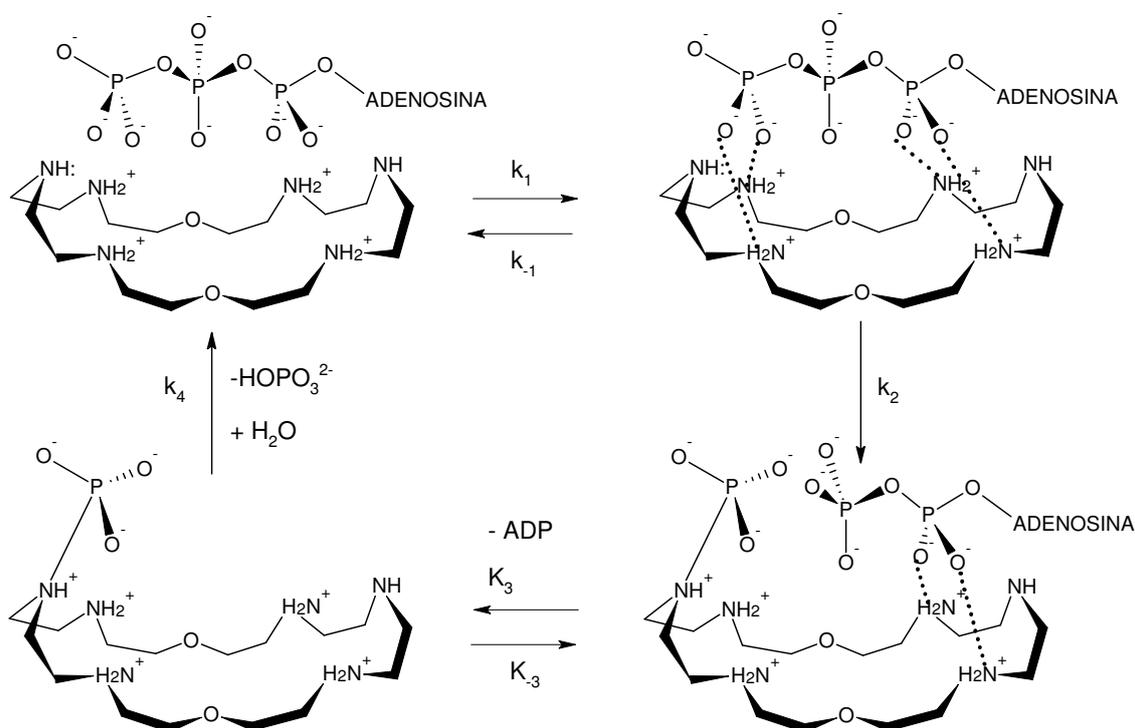
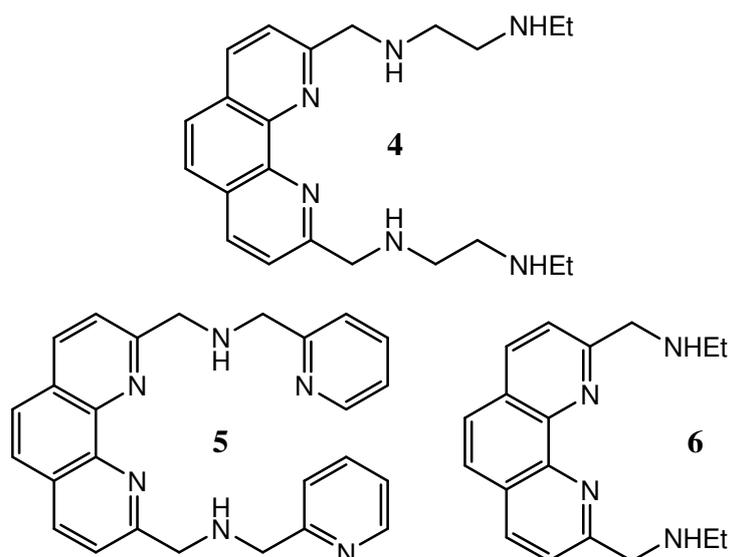


Figura 6. Representação esquemática para a desfosforilação do ATP catalisada pelo macrociclo $[24] - N_6O_2$. As geometrias dos complexos são hipotéticas, mas compatíveis com a estrutura potencial das espécies envolvidas [56].



As ciclodextrinas (CDs) apresentam estruturas bastante interessantes no planejamento de enzimas artificiais por apresentarem cavidades que em sua parte externa são hidrofílicas e com o interior tendo natureza lipofílica [69-73]. Assim, muitos sistemas abióticos que apresentam CDs em sua estrutura têm sido sintetizados para a realização da hidrólise de substratos fosfatados. Nessas enzimas artificiais, a CD tem o papel principal de atuar como unidade receptora de reconhecimento molecular, mas pode servir também para ancorar grupos catalíticos e aproximar espécies químicas responsáveis pela reação dos substratos.

Outra abordagem para o desenvolvimento de modelos para o estudo do mecanismo de ação das ATPases refere-se à modelagem do microambiente do sítio ativo dessas enzimas, considerando a visão descrita na seção anterior, amparada no conceito de que a constante de equilíbrio para a formação de compostos fosfatados ricos em energia depende do meio no qual o processo ocorre, sendo a energia livre necessária somente para provocar uma mudança conformacional que leva à entrada (ou saída) de água no sítio da enzima [30, 31]. Assim, foi desenvolvido um modelo não-enzimático que mostrou que o íon *n*-decilfosfato em acetonitrila anidra reage facilmente com acetato de 2,4-dinitrofenila (DNPA) para formar o AcP correspondente, com cem por cento de rendimento (Figura 7) [74, 75]. A adição de muito pequenas quantidades de água ao meio foi responsável não somente por tornar a reação bastante lenta como ainda por diminuir drasticamente o rendimento do AcP formado. Isto se deveu ao fato de que a água solvata preferencialmente o íon fosfato dificultando a sua ação nucleofílica e facilitando a hidrólise do DNPA por meio de catálise básica geral [74, 75]. Esse modelo representou o primeiro sistema bioorgânico que mimetizou com sucesso a síntese de um acilfosfato e demonstrou a importância do meio não somente para aumentar a

nucleofilicidade do fosfato, como também para mudar o curso da reação. Foi posta assim em evidência a solvatação preferencial como representando papel importante no mecanismo de ação de enzimas responsáveis pela transferência de energia em sistemas biológicos, em conformidade com as discussões recentes sobre o assunto [12, 76, 30, 31].

O modelo apresentado inspirou a montagem de outro modelo [77, 78], o qual demonstrou a possibilidade da solubilização do sal KH_2PO_4 em acetonitrila com traços de água, utilizando um agente criptante bastante eficiente para solubilizar íons K^+ em solventes orgânicos, o Kryptofix® 222 [79]: o fosfato solubilizado pode ser facilmente acetilado juntando-se ao sistema o DNPA. Os estudos realizados demonstraram que a adição de água ao sistema causa forte redução na velocidade e na percentagem de AcP formado, da mesma forma que o modelo estudado anteriormente. Esse modelo preliminar foi utilizado como base para o desenvolvimento de outro modelo que mimetiza o ciclo catalítico da ATP-sintase para a formação e utilização de compostos fosfatados ricos em energia, o qual se baseou em um sistema bifásico do tipo água- CH_2Cl_2 [77, 80]. Na fase aquosa foi colocado KH_2PO_4 enquanto na fase orgânica encontrava-se o DNPA. Naquelas condições, nenhum dos reagentes poderia migrar de uma fase para a outra. A situação mudou completamente com a adição de Kryptofix® 222, que teve um papel supramolecular fundamental no processo, transportando o íon H_2PO_4^- para a fase orgânica. O ânion dessolvatado reage ali com o DNPA, formando o AcP correspondente, o qual a seguir migrou à fase aquosa, onde foi hidrolisado. Assim, esse modelo mimetizou com sucesso o ambiente hidrofóbico do sítio ativo da enzima responsável pela formação do composto fosfatado rico em energia (o AcP) e a matriz mitocondrial (a fase aquosa), para onde o AcP transferido pode realizar uma função, no caso do experimento, ser hidrolisado.

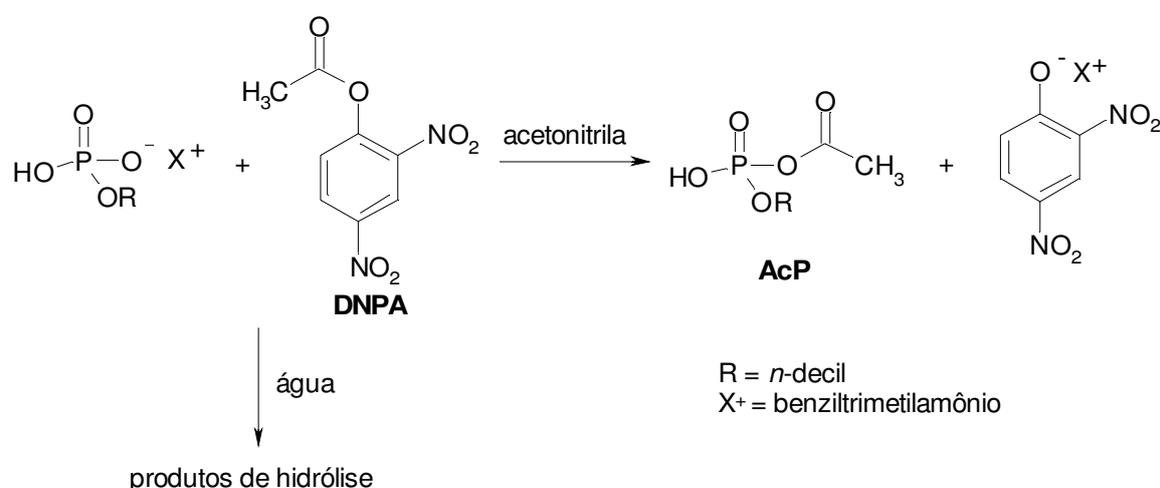


Figura 7. Influência do meio sobre os produtos da reação do acetato de 2,4-dinitrofenila (DNPA) com o íon *n*-decilfosfato.

Vários artigos de revisão abastecem profundamente a visão com respeito aos aspectos estruturais, propriedades e funções das ATPases na transdução de energia e no transporte de íons [76, 81-83]. Aqui serão enfatizadas como visão geral as suas propriedades e mecanismos de operação, de modo a facilitar a compreensão de como elas intermedeiam os processos de transdução de energia no plano celular a partir de sua capacidade para catalisar a síntese e a hidrólise do ATP, com o objetivo de se alcançar uma melhor compreensão da importância do microambiente dos compostos fosfatados ricos em energia para o exercício de suas funções.

As enzimas ATPases do tipo F são responsáveis por desempenhar um papel central nas reações de transdução de energia e se encontram acopladas às membranas celulares nas bactérias, nas mitocôndrias e nos cloroplastos. O isolamento de uma dessas enzimas foi feito por Penefsky e colaboradores em 1960 [84]. O F de seu nome origina-se de sua identificação como fatores de acoplamento de energia. Elas catalisam a passagem ascendente de prótons na transmembrana, dirigida pela hidrólise do ATP, bem como a reação reversa, na qual o fluxo descendente de prótons guia a síntese do ATP. No segundo caso, as ATPases do tipo F são mais apropriadamente chamadas de trifosfato de adenosina sintase ou ATP sintase ou ainda como F_0F_1 -ATPase [1].

A enzima F_0F_1 -ATPase usa a energia derivada de um gradiente eletroquímico de prótons, gerado através da membrana por um fluxo de elétrons, para realizar a síntese endergônica do ATP a partir do ADP e P_i . Este fato foi confirmado quando preparações de F_0F_1 -ATPase muito purificada, incorporada no interior de micelas fosfolipídicas e acoplada à uma conveniente fonte de energia, catalisou a síntese do ATP. A componente F_1 hidrofílica e extrínseca à membrana protéica consiste de cinco subunidades (α , β , γ , δ e ϵ). Na subunidade β estão os sítios catalíticos que são responsáveis pela síntese do ATP. A componente F_1 pode ser separada do complexo F_0F_1 , purificada e homogeneizada utilizando uma solução hidrofílica solúvel. Quando F_1 é desconectada do canal de prótons (F_0) que lhe fornece energia, transforma-se em uma ATPase ativa que também catalisa uma troca entre os átomos de oxigênio da água e os oxigênios dos grupos γ -fosforila do ATP, durante a reação de hidrólise [85], assim como a troca entre os oxigênios da água e os do P_i . A F_0 hidrofóbica encontra-se encaixada na membrana protéica e atua como um canal de prótons. A F_0 é constituída de três subunidades, a , b e c , das quais a subunidade b atravessa F_1 , permanecendo com F_0 após a separação do complexo F_0F_1 -ATPase [86].

Os estudos realizados com o complexo F_0F_1 -ATPase da *Escherichia coli* demonstraram como sendo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_9-12$ a estequiometria das subunidades desse

complexo. Ele apresenta um agregado assimétrico de subunidades, constituído por $\gamma\delta\epsilon\alpha\beta_2$, que se encontra no interior de um complexo cilíndrico externamente formado por $\alpha_3\beta_3C_9-12$ [87]. Estudos realizados ao final da década de oitenta com o objetivo de coletar dados relacionados à estrutura F_1 da *Escherichia coli*, utilizando a microscopia eletrônica, demonstraram que as subunidades α e β são alongadas e formam um arranjo hexagonal. Nesse arranjo, as subunidades ocupam posições equivalentes e alternadas [88]. Bianchet e colaboradores [89] utilizaram o método de difração de raios-X com resolução de 3,6 Å, a qual é 2,5 vezes maior em comparação com aquela dos estudos realizados por Amzel e colaboradores [82] na década de oitenta, com cristais da F_1 -ATPase mitocondrial proveniente de fígado de rato. Obtiveram mais informações para a estrutura quaternária da enzima, a qual apresenta as dimensões 120 Å × 120 Å × 74 Å, encontrando-se suas subunidades α e β presentes como um arranjo trimérico. Todos os dados estruturais concordaram com os resultados obtidos por microscopia eletrônica [89]. Este trabalho representou um marco importante para o entendimento do mecanismo de operação da enzima, pois a falta de informação estrutural e atômica relativa à ATPase vinha a ser um dos maiores obstáculos para o seu conhecimento.

Em 1994, Abrahams e colaboradores apresentaram uma estrutura para a F_1 -ATPase mitocondrial bovina com a utilização da técnica de cristalografia de raios-X de alta-resolução (2,8 Å) [90]. Os dados mostraram que a F_1 -ATPase apresenta uma estrutura assimétrica pelo menos em parte, sendo suas subunidades α e β arranjadas alternadamente, assemelhando-se a uma laranja. A subunidade γ passa por uma cavidade interna larga entre as subunidades vizinhas α e β .

Um dos grandes méritos desse trabalho foi o de apresentar boa concordância com uma hipótese que vem sendo usada largamente nas últimas três décadas para explicar a síntese do ATP pela F_0F_1 -ATPase, o mecanismo de mudança de ligação ("binding change mechanism") [91]. A hipótese do mecanismo de mudança de ligação foi desenvolvida inicialmente por Boyer e colaboradores [92] em 1973 e estabelece que a síntese do ATP ocorre espontaneamente no sítio catalítico da enzima e que energia é necessária somente para liberar o ATP formado. A ligação dos substratos ao sítio catalítico também foi considerada ser uma etapa que requer energia [93]. Isto reflete a necessidade de romper as interações proteína-ligante mais favoráveis que devem contribuir para a ligação firme do ATP. A energia adicionada na ligação do substrato, a formação do ATP firmemente ligado à proteína e o produto liberado ocorrem simultaneamente em três sítios catalíticos que, embora separados, interagem entre si permanecendo sempre 120° fora de fase no ciclo catalítico [86, 94]. A simetria requerida para o mecanismo de mudança de ligação da F_1 -ATPase, particularmente na região do sítio ativo, ficou evidente na estrutura cristalina [90]. As três diferentes conformações da subunidade β são assim atribuídas ao posicionamento assimétrico da subunidade γ [90].

O fator chave da hipótese sugerida por Boyer é que os três sítios catalíticos e, portanto, os três pares de subunidades $a\beta$ que contêm esses sítios estão cada um em conformações diferentes ao mesmo tempo. Um está aberto e pronto para a ligação com ATP (ou ADP + P_i), enquanto o segundo e o terceiro estão em formação circular, nas formas parcialmente aberta e fechada, respectivamente, presos a nucleotídeos. A ligação do ATP e o conseqüente fechamento do sítio aberto produzem uma mudança conformacional cooperativa nas quais os outros dois sítios são alternados. Essas mudanças seriam responsáveis pelo ciclo catalítico que conduz à síntese do ATP [4, 95]. Portanto, cada sítio ocorre alternando-se entre os três estados como ATP-hidrolase ou, na direção reversa, como ATP-sintase. Os detalhes específicos sobre o número de intermediários conformacionais que os três pares $a\beta$ juntos podem adotar e sobre a reação de equilíbrio da clivagem ou síntese do ATP em cada sítio, em cada estado, estão ainda em debate [4].

Sem dúvida nenhuma, um grande avanço científico foi alcançado pela demonstração da rotação da subunidade γ para conduzir a síntese do ATP [96, 97]. Recentemente, estudos vêm demonstrando a mudança conformacional das subunidades durante o curso da catálise por meio de uma variedade de métodos, incluindo cinéticas usando reagentes modificados, mudança espectral de sonda óptica, imagem de microscopia eletrônica, microscopia por vídeo-fluorescência [98] e microscopia óptica por feixe [99]. Essa última permitiu uma imagem de alta velocidade que demonstrou a rotação dessa subunidade na qual o passo de 120° consiste severamente de subpassos de 90° e 30° , cada um necessitando somente de uma fração de um milissegundo. A ligação do ATP conduz ao subpasso de 90° , e o subpasso de 30° é provavelmente conduzido para liberação de um produto de hidrólise. Os dois subpassos são separados por duas reações de aproximadamente 1 ms cada, as quais juntas ocupam a maior parte do ciclo da ATP-hidrolase. Esse esquema provavelmente aplica-se para a rotação em velocidade total (em torno de 130 revoluções por segundo em condições de saturação com ATP) e sustenta o modelo de mudança de ligação para a ATP-sintase por rotação reversa da F_1 -ATPase [100]. Demonstrou-se assim que a enzima funciona como um "motor molecular", como Boyer e Cox haviam pressuposto. No ano de 1997, Boyer, Walker e Skou foram agraciados com o Prêmio Nobel em Química por sua contribuição ao campo [76, 101-103]. Os mecanismos de ação da ATP-hidrolase e da bomba de prótons [103] vão ficando assim mais bem esclarecidos [104].

Os estudos realizados por Junge e colaboradores em 2001 vêm firmando a idéia de que a unidade F_0 funciona como um gerador, F_1 como um motor e que ambos atuam acoplados mecanisticamente por movimentos rotatórios de 360° , sendo uma subunidade oposta à outra [105]. Observações intrigantes relacionadas às subunidades $\gamma\epsilon C_{10-14}$ da *Escherichia coli* mostram-na como sendo um rotor que se move em oposição às

subunidades $a_3\beta_3\delta ab_2$ que são denominadas como extrator no complexo F_0F_1 [104]. Foi demonstrado ainda que a enzima compete com simetria desigual entre seus motores e assim uma transmissão flexível de capacidade elástica entre F_0 e F_1 foi observada [105].

Uma proposta feita para a síntese rotacional rápida do ATP pela ATP-sintase sugere que um segundo sítio específico deva ligar o ADP e P_i , e que na hidrólise do ATP esse segundo sítio deva ligar o ATP. Assim, a ativação por bi-sítio foi considerada ocorrer na presença ou na ausência do ADP ou do ATP em um terceiro sítio da enzima [106]. Em contraste, uma das mais recentes propostas que têm sido desenvolvidas sugere que a hidrólise rápida do ATP pela F_1 -ATPase ocorra somente após ambos um segundo e um terceiro sítio terem iniciado a ligação com o ATP. Assim, a hidrólise rápida do ATP requereria que todos os três sítios tivessem ADP ou ATP presentes [107]. As importantes considerações a serem feitas referem-se, contudo, não ao número de sítios catalíticos que possam ser ocupados, mas quais sítios podem ser ocupados para ocorrer a mudança conformacional rápida da enzima. Os dados que foram obtidos, embora ainda incipientes, sugerem uma catálise rápida por ativação de bi-sítio, com um dos três sítios sempre se apresentando desocupado [105]. Essas mudanças conformacionais rápidas foram consideradas requererem somente a ocupação específica de um segundo sítio e, desse modo, a ocupação pelo nucleotídeo em um terceiro sítio promove pouca ou nenhuma ativação. Assim, foi postulado que o sítio ao qual o ADP deva ligar para a rede de síntese tem uma afinidade maior por ADP do que por ATP. Os três sítios catalíticos da ATP-sintase são considerados ficarem em conformações diferentes, como mostra a Figura 8. As diferentes formas dos sítios indicam uma dualidade. Como isso pode ser alcançado não é conhecido, mas isso pode ser devido à capacidade para a transformação química ser mantida enquanto as propriedades do sítio mudam para favorecer a presença do ADP e P_i ou ATP, com a posição relativa das subunidades γ e β durante um passo de rotação determinando se a hidrólise ou a eliminação da água é favorecida [106].

Novas estratégias foram aplicadas para examinar essa questão [106]. Os resultados são conflitantes, contestando que a atividade de hidrolase por bi-sítio deva ser negligível [108, 109] ou que não possa igualmente existir [107], embora as análises de Weber e Senior [107] não dêem informações se a ativação do bi-sítio é operativa em concentrações elevadas de ATP. Liu e colaboradores [110] realizaram simulações que indicam a dependência do mecanismo de mudança de ligação com a concentração do ATP, onde a concentração baixa do ATP favorece a ativação por mono-sítio, para bi-sítio com ATP pré-saturado e para tri-sítio em concentrações altas de ATP. Cross e Milgrom [111], por meio do uso de medidas diretas de ligações nucleotídicas por total atividade endergônica do complexo F_1 mitocondrial proveniente de coração bovino, confirmaram as evidências de que a atividade por bi-sítio é primariamente responsável pela forte cooperatividade catalítica positiva exibida pelas enzimas. Assim, o fato desses resultados

serem conflitantes e alvo de discussões calorosas tornam necessários trabalhos adicionais para a perfeita elucidação dessas questões.

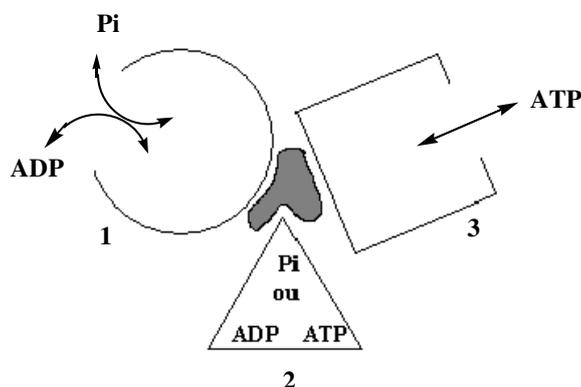


Figura 8. Representação das três diferentes conformações para a ativação catalítica por bi-sítio na síntese (seqüência 1, 2, 3) ou hidrólise (seqüência 3, 2, 1) do ATP por ATP-sintase. No sítio **1** o ADP se liga melhor do que o ATP e é o sítio no qual ADP e P_i devem estar presentes para ocorrer a síntese rápida. O sítio **2** catalisa a transformação química e pode estar presente como uma forma com ADP e P_i presente ou ATP presente. O ATP pode ser liberado no sítio **3** durante a síntese e deve estar presente nesse sítio para a hidrólise rápida [106].

Agentes neurotóxicos organofosforados

Em abril de 1915, na cidade francesa de Ypres, as tropas alemãs utilizaram pela primeira vez o gás cloro como uma arma química [112]. A partir daí, desencadeou-se uma corrida voltada à produção de armas químicas, que culminou com o advento dos agentes neurotóxicos organofosforados (Figura 9). Eles surgiram como subprodutos do desenvolvimento de pesquisas envolvendo inseticidas organofosforados. Esses compostos agem fosfonilando ou fosforilando um resíduo hidroxílico de serina no sítio ativo da acetilcolinesterase (ACE)– enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor –, o que resulta no acúmulo de acetilcolina nas sinapses das células nervosas, levando a um colapso no sistema nervoso central [113].

Os agentes neurotóxicos organofosforados podem ser classificados em dois tipos: os agentes G e os agentes V. Dentre os agentes neurotóxicos do tipo G, o tabun foi sintetizado pela primeira vez na Alemanha em 1936, enquanto o sarin e o soman foram descobertos no mesmo país em 1938 e em 1944, respectivamente [113]. A síntese de agentes neurotóxicos do tipo V, que são cerca de dez vezes mais tóxicos do que o sarin, teve o seu início em 1952, com a descoberta do VX. Mais tarde, foi sintetizada a versão russa do VX, o rVX. A persistência desses agentes é uma propriedade crucial que define o seu espectro de ação. Um agente persistente não sofre hidrólise rapidamente e não

apresenta volatilidade, de tal forma que pode persistir em uma área por um longo período de tempo. Os agentes G não são persistentes, enquanto os agentes V são bastante persistentes. Embora não tenham sido utilizados nas duas guerras mundiais do século passado, os agentes neurotóxicos foram usados pelo Iraque em seu conflito com o Irã e contra a população curda logo após a Primeira Guerra do Golfo Pérsico.

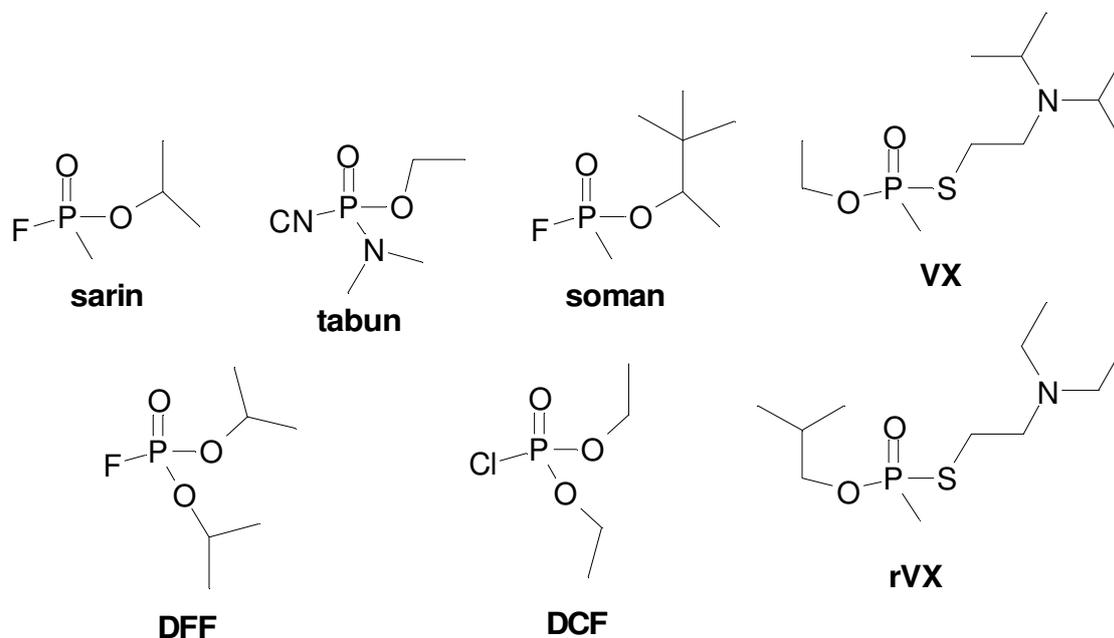


Figura 9. Estruturas de alguns agentes neurotóxicos baseados em ésteres fosfóricos e de dois simuladores, o DFF e o DCF.

Os relatos dos conflitos armados nos quais os gases de guerra foram empregados apontaram para uma realidade ainda mais estarrecedora que a atrocidade verificada quando as chamadas armas convencionais são empregadas contra alvos civis e militares. As mortes ocorridas após um longo sofrimento, por parte das pessoas expostas, juntamente com as seqüelas deixadas nos sobreviventes dos ataques por armas químicas, revelaram o seu efeito devastador. No caso do agente químico ser persistente, as áreas contaminadas devem ser isoladas. Outro aspecto não menos importante envolve a possibilidade de uso dessas armas químicas contra alvos civis, por parte de grupos terroristas, o que é uma preocupação real no mundo atual. A década de noventa registrou diversos ataques terroristas no Japão que tiveram o uso de agentes neurotóxicos. Em um deles, em março de 1995, a seita Aum Shinrikyo causou a morte de 12 pessoas e feriu cerca de outras 6000 ao lançar sarin em uma estação de metrô em Tóquio. Esses ataques serviram como alerta importante, especialmente após os atentados de 11 de setembro de 2001. É necessário ser ressaltado que países como os Estados Unidos da América e a Rússia possuem estoques em larga escala de agentes neurotóxicos. Esforços foram então envidados no sentido de se banir o uso desses

compostos químicos em conflitos armados. Eles culminaram no tratado da Convenção Internacional Mundial sobre a Proibição do Desenvolvimento, Produção, Armazenamento e Uso de Armas Químicas (CPAQ), que entrou em vigor em 29 de abril de 1997 e que estabeleceu, entre outros objetivos, a total destruição e detoxificação dessas armas pelos países detentores [114]. Ao mesmo tempo, o estudo de procedimentos de remoção desses compostos em áreas contaminadas por eles é de grande importância [115-118], da mesma forma que o desenvolvimento de métodos simples e precisos para a sua detecção visual e quantitativa, considerando-se que os agentes neurotóxicos organofosforados são incolores e inodoros.

Detoxificação de agentes neurotóxicos organofosforados

A detoxificação dos gases de guerra consiste na remoção do seu caráter tóxico por meio de processos simples, rápidos e com o uso de reagentes estáveis, de baixo custo e de baixa massa molecular [117]. Além disso, é necessário considerar que os intermediários e produtos gerados não apresentem toxidez e que não seja de forma alguma possível, a partir dos produtos gerados nesses processos, formarem novamente gases de guerra. Isto significa que os diferentes mecanismos de detoxificação dos agentes devem ser estudados com grande detalhe, a fim de se verificar as proporções dos produtos obtidos e a toxidez de cada um deles. Um exemplo desse quebra-cabeça molecular é proporcionado pelo VX, que, não obstante o fato de ser uma molécula simples apresenta diferentes possibilidades de ataque nucleofílico à sua estrutura, com a geração de vários produtos (Figura 10). Um dos produtos de degradação do VX é o composto EA 2192, que é muito menos reativo que o VX [117, 119]. Em pH 8,0, EA 2192 é o produto principal da hidrólise do VX [119], e além de ser muito persistente no meio-ambiente, apresenta atividade anticolinesterase bastante significativa [120], tornando-o o produto de degradação mais tóxico do VX. A toxidez intravenosa do EA 2192 em ratos é muito semelhante à do VX [120] e para que a degradação desse intermediário ocorra completamente, o VX precisa ser deixado em pH 12,0 por cerca de três meses [121].

Os estudos da detoxificação dos agentes neurotóxicos, assim como de metodologias para a sua detecção e para a descontaminação de áreas expostas, requerem ainda uma precaução importante considerando-se que a alta ação tóxica desses compostos torna inviável o seu uso direto em experimentos laboratoriais. Assim, faz-se necessário o uso de compostos modelos, de baixa toxidez, que são planejados para serem estudados experimentalmente e que recebem o nome de simuladores [122]. Dois simuladores bastante utilizados são o diisopropilfluorofosfato (DFF) e o

dietilclorofosfato (DCF). Considerando-se que um simulador raramente oferece todas as características relacionadas com o agente, vários simuladores precisam ser empregados antes de se ensaiar o processo de detoxificação com o agente neurotóxico.

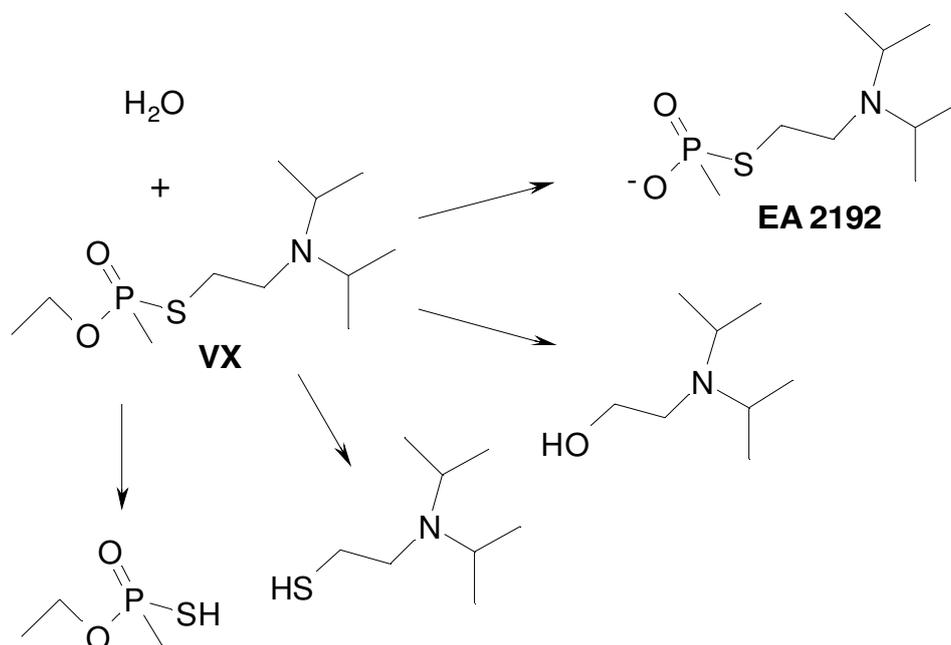


Figura 10. Representação esquemática dos diferentes produtos iniciais possíveis da hidrólise do VX [117].

Embora vários processos de detoxificação de agentes neurotóxicos organofosforados encontrem-se disponíveis na literatura, na prática somente algumas reações podem ser utilizadas. A oxidação, com o uso de agentes oxidantes eficientes como o peróxido de hidrogênio, e a substituição nucleofílica, com o uso de nucleófilos fracos, como o metanol e a água, e de supernucleófilos detentores do efeito α , encontram-se entre os processos químicos preferidos para a detoxificação, sob condições brandas, dos agentes tóxicos [117]. No que se refere à oxidação de agentes neurotóxicos, particularmente o VX, foi observado que o peróxido de hidrogênio é um descontaminante muito útil [116] e, nesse caso, o desenvolvimento de ativadores de peróxido eficientes [123] pode ser um caminho importante para aumentar a eficiência dessa metodologia. O desenvolvimento de catalisadores especialmente talhados para atuarem em metanol tem possibilitado a detoxificação do VX por meio da metanólise [124-126]. Em um trabalho recente, Neverov e colaboradores utilizaram um complexo dinuclear de Zn(II) capaz de acelerar, em metanol, a clivagem de uma série de diésteres de metil aril fosfato por fatores de 10^{11} a 10^{13} vezes [126]. Esses resultados são bastante importantes por sugerirem a descontaminação do VX em um curto espaço de tempo, mas a aplicação tecnológica apresenta limitações, tais como a necessidade de se usar metanol

como meio e reagente e ainda o problema da estabilidade dos catalisadores empregados [117].

Os processos de detoxificação em água, sempre que possíveis, devem ser preferíveis a outros métodos devido à sua grande disponibilidade. As reações de hidrólise de agentes do tipo G, que são hidrolisados em água com meias-vidas da ordem de um dia, podem ser mediadas por enzimas ou por métodos não-enzimáticos. Várias enzimas aceleram eficientemente a hidrólise dos agentes G, de compostos relacionados, tais como pesticidas organofosforados, e em alguns casos, do agente VX. Alguns artigos recentes têm revisado esse aspecto [117, 127, 128]. Da mesma forma, os mecanismos das enzimas que operam realizando transferência de fosfato foram revisados recentemente [129]. É de importância estudar não simplesmente enzimas capazes de hidrolisar os agentes neurotóxicos, como também os produtos de sua degradação (ver acima). Assim, Raushel e colaboradores apresentaram recentemente uma fosfodiesterase capaz de hidrolisar o composto EA 2192 [119]. Outra estratégia bastante promissora para o aumento da eficiência e da estabilidade de hidrolases de compostos organofosforados envolve o uso de técnicas da mutagênese sítio-dirigida [130].

A hidrólise não enzimática dos agentes neurotóxicos tem sido conduzida com o uso de íons metálicos, de complexos inorgânicos e de nucleófilos que apresentam efeito α . Nesses trabalhos, usam-se comumente ésteres de fosfato ativados como compostos modelos, tais como o bis(*p*-nitrofenil)fosfato (BNPP) e o bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP). A catálise por íons de metais alcalinos [131] e por íons metálicos de transição, como Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Co^{3+} e La^{3+} também vem sendo empregada nas reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato [132, 133]. Moss e colaboradores estudaram a hidrólise de ésteres de fosfato mediada por actinídeos [134] e cátions Th(IV) [135] e Ce(IV) [136]. Como um exemplo, íons Th(IV) colocados em solução aquosa na presença de micelas formadas pelo surfatante Brij resultaram na hidrólise do BNPP com uma aceleração na constante de velocidade observada da ordem de 2,8 bilhões de vezes [135]. Mais recentemente, foi estudada a hidrólise de BDNPP por diversos lantanídeos em meio básico, na presença de tampão bis-tris-propano, o qual foi usado para estabilizar os complexos do lantanídeo com íons hidróxido [137]. Os íons metálicos apresentam múltiplas funções nesses processos hidrolíticos, aproximando as espécies reagentes, ativando os nucleófilos presentes no meio, estabilizando os grupos de saída e tornando o centro de fósforo mais eletrofílico por meio da interação do metal com o oxigênio da ligação P-O. Também complexos inorgânicos de metais de transição têm sido empregados como catalisadores para realizar a hidrólise de ésteres de fosfato, tendo sido esse assunto revisado recentemente para complexos metálicos binucleares [138] e mais especificamente para complexos de Zn(II) [139] hábeis para atuar como hidrolases artificiais. Foi demonstrado que um complexo binuclear de Fe(III) atua como

um catalisador na hidrólise de BDNPP [140]. Recentemente, Kuo e colaboradores demonstraram a primeira degradação seletiva de um análogo do VX por um complexo de molibdênio organometálico em condições de pH próximo à neutralidade [141].

Os agentes do tipo V, muito resistentes à hidrólise e pouco voláteis, necessitam de uma estratégia alternativa que faz uso de reagentes com alto poder nucleofílico: os nucleófilos detentores do efeito α [10]. Esses nucleófilos têm um átomo eletronegativo com um ou mais pares de elétrons isolados adjacente ao centro nucleofílico e isto os torna muito mais reativos do que seria de se esperar a partir de uma correlação de Brønsted entre reatividade e basicidade [142,143]. Dentre os nucleófilos apresentando essa característica, merecem destaque os iodobenzoatos, que são capazes de promover eficientemente a hidrólise catalítica de agentes do tipo G e de outros organofosfatos [144]. Hatton e colaboradores sintetizaram recentemente polímeros tendo em sua superfície grupos iodoxibenzoil [145]. Esses polímeros catalisaram a hidrólise de um simulador do sarin. Ramakrishna e colaboradores fabricaram membranas constituídas por nanofibras poliméricas funcionalizadas a partir do PVC com β -CD e com ácido iodobenzoico [146]. Foi estudada a capacidade desse novo material para a descontaminação de agentes neurotóxicos e ainda foi verificado que a capacidade de adsorção das membranas é maior que a do carvão ativado. Foi assim proposto que o material possa vir a ser empregado no desenho de roupas de proteção de agentes neurotóxicos [146]. Além do ácido iodobenzoico, outros nucleófilos apresentando efeito α têm sido estudados para a hidrólise eficiente de organofosfatos em solução aquosa, os quais incluem peróxido, hidroxilaminas e a hidrazina [147-150]. Recentemente, estudos realizados por McAnoy e colaboradores relacionados com o ânion hidroperóxido (HOO^-) na degradação do simulador dimetil-metilfosfato (DMMP) evidenciou o efeito α em fase gasosa na degradação de gases neurotóxicos de guerra [151]. Finalmente, o campo de ação desses supernucleófilos tem englobado também o desenvolvimento em larga escala de antídotos, para o tratamento de pacientes intoxicados com agentes neurotóxicos, baseados em oximas como reativadores da acetilcolinesterase [152, 153].

Quimiossensores para a detecção de agentes neurotóxicos

Muitos trabalhos têm sido realizados com o intuito de se desenvolver sistemas seletivos e sensíveis para a detecção de agentes neurotóxicos organofosforados [154-157]. Embora muitos métodos tenham sido desenvolvidos, eles apresentam limitações no que se refere, por exemplo, às baixas respostas, à falta de especificidade, à seletividade limitada, à complexidade operacional e às dificuldades de monitoramento em tempo real. Os primeiros trabalhos de detecção de agentes neurotóxicos empregando métodos

colorimétricos foram realizados nas décadas de 40 e 50 [158, 159]. Nos últimos anos, o desenvolvimento de ensaios baseados em quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos inspirados em estratégias supramoleculares tem representado uma maneira para detectar de forma simples, rápida e confiável aqueles analitos [160-163]. A detecção da espécie a ser analisada é alcançada por meio de mudanças nas propriedades ópticas do quimiossensor, como por exemplo, na capacidade dele para absorver ou emitir luz se o analito encontra-se presente no meio. Esse método de detecção óptica, em especial a colorimétrica, apresenta baixo custo pela instrumentação requerida, e possibilita ainda a detecção visual do analito, ou seja, sua determinação de forma rápida e semi-quantitativa.

Um princípio que pode ser explorado na detecção de gases neurotóxicos de guerra envolve o desenvolvimento de métodos que apresentam resposta para a reatividade geral que proporciona a base para sua toxidez. Assim, Zhang e Swager [164] desenvolveram quimiossensores fluorogênicos (Figura 11) inspirados no fato de que os agentes neurotóxicos atuam reagindo com uma hidroxila para formar um éster de fosfato no sítio ativo da ACE. O composto **7**, por exemplo, apresenta em diclorometano um comprimento de onda máximo em 291 nm e um máximo de emissão em 385 nm. A adição do simulador DFF causou um deslocamento batocrômico nas bandas de absorção e de fluorescência, para 340 nm e 465 nm, respectivamente. A larga alteração espectral decorre da ciclização do grupo cromóforo flexível causada pelo analito presente no meio na faixa de concentração de $\mu\text{mol/L}$. O único inconveniente desse sistema estudado é o de que como usa um álcool como nucleófilo a reação ocorre lentamente, com um tempo de meia-vida estimado em uma hora com o DFF.

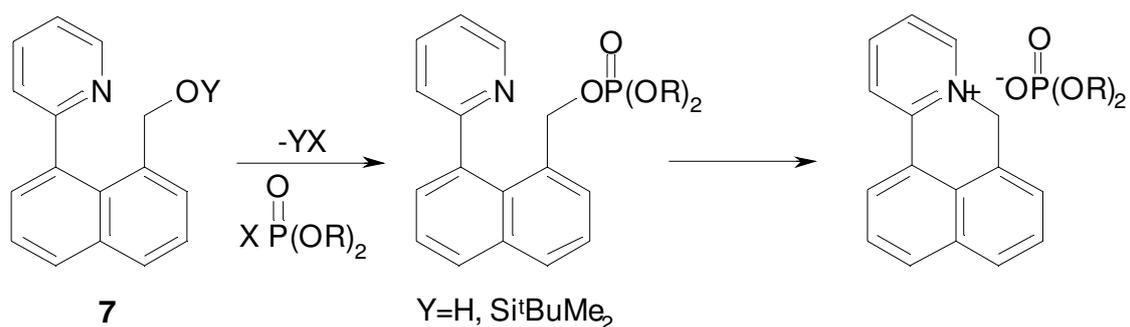
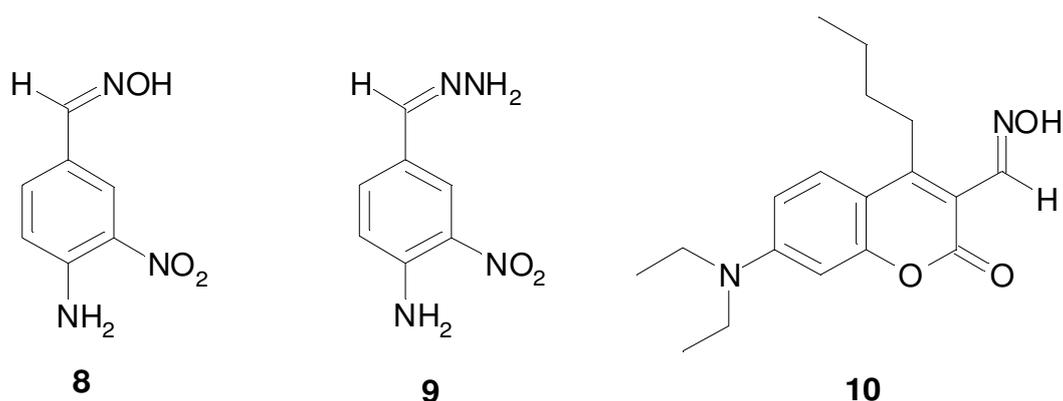


Figura **11**. Um quimiossensor fluorogênico para agentes neurotóxicos organofosforados baseado no ataque nucleofílico do grupo -OH no quimiossensor seguido de um segundo ataque nucleofílico intramolecular.

O efeito α pode ser explorado no planejamento de indicadores cromogênicos contendo em sua estrutura grupos supernucleofílicos. Anslyn e colaboradores demonstraram que a oxima **8** e a hidrazona **9** atuam eficazmente como quimiossensores

cromogênicos de agentes neurotóxicos em uma mistura de dimetilsulfóxido com solução aquosa de NaOH [165]. No caso do composto **8**, a base presente no meio abstrai um próton gerando o ânion oximato, o qual ataca nucleofilicamente o simulador DCF para formar um intermediário que afinal decompõe-se em meio básico com a formação de uma nitrila. O composto **8** é colorido em solução, com máximo no comprimento de onda em 461nm e a adição de DCF faz decrescer a banda simultaneamente ao aparecimento de uma outra banda em 410 nm, com um ponto isobéstico em 431 nm.

Em outro trabalho, Anslyn e colaboradores sintetizaram a cumarina **10**, que apresenta em sua estrutura um grupo oxima [166]. A desprotonação da oxima em DMSO com o uso de uma base forte e não nucleofílica gerou um oximato capaz de reagir nucleofilicamente, com alta eficiência, com DFF. Enquanto a oxima apresenta em DMSO uma banda larga com máximo de absorvância em 409 nm, o oximato apresenta $\lambda_{\max} = 443$ nm. A adição de DFF à solução do oximato desloca hipsocromicamente a banda para $\lambda_{\max} = 409$ nm, com um ponto isobéstico ocorrendo em 425 nm, o que representou uma evidência importante para a fosforilação do oximato por parte do DFF. Também foram realizados experimentos usando a técnica de fluorescência para o composto **10**, o oximato correspondente e o produto obtido da titulação do oximato com DFF [166]. Foi verificado que o sinal de fluorescência do oximato é fraco devido à supressão de fluorescência causada pelo par eletrônico isolado do ânion via um mecanismo de transferência eletrônica fotoinduzida (TEF). No entanto, a fosforilação do oximato por DFF abaixa a energia daqueles orbitais, reduzindo o efeito supressor por TEF e a fluorescência é dessa forma ativada. O tempo de meia-vida estimado em 40 ms para esse processo demonstra que ele ocorre bastante rapidamente. A rapidez é um requisito fundamental na detecção de agentes neurotóxicos.



Dale e Rebek desenvolveram quimiossensores fluorogênicos para agentes neurotóxicos organofosforados baseados em derivados do triácido de Kemp funcionalizados com um grupo pireno como fluoróforo e com um grupo hidroxílico nucleofílico [167]. O fluoróforo nesses sensores encontra-se estrategicamente próximo a

um grupo amino, o que leva à supressão de sua fluorescência via TEF. A Figura 12 ilustra a ação dos quimiossensores (**11**, $n=1-4$). A adição de DCF ao meio em que se encontra o quimiossensor leva inicialmente à fácil fosforilação de sua hidroxila e a seguir, o grupo amino ataca nucleofilicamente o carbono vizinho, resultando na saída de dietilfosfato e na formação de um íon amônio quaternário do tipo aza-adamantano (**12**). A reação leva ao bloqueio da TEF, o que torna o sistema altamente fluorescente em solução [167]. Os pesquisadores demonstraram ainda que a mesma estratégia pode ser utilizada no planejamento de novos quimiossensores, substituindo-se o fluoróforo por outros desde que a energética para transferência eletrônica seja favorável, por meio da ligação de uma 6,7-dimetilcumarina ao módulo amino-álcool [167].

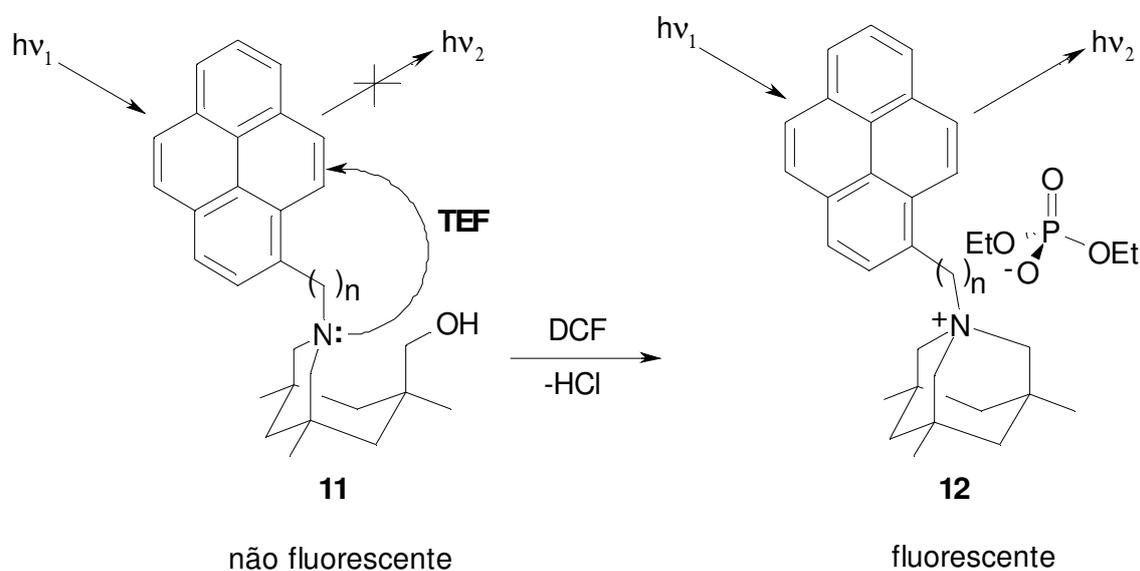


Figura 12. Uso do mecanismo de TEF para a montagem de um quimiossensor fluorogênico para agentes neurotóxicos organofosforados.

A quimiluminescência [168, 169] representa uma ferramenta de análise para a detecção seletiva e sensível de espécies químicas [170]. Recentemente, Anslyn e colaboradores desenvolveram uma metodologia de detecção quimiluminescente de DFF em acetonitrila [171], fundamentada no mecanismo de Luminescência Quimicamente Iniciada por Troca de Elétrons (LQITE) [172]. A principal característica desse mecanismo envolve a transferência de elétron do fluoróforo para a dioxetanodiona (um dímero do dióxido de carbono, formado no meio pela reação de peróxido de hidrogênio com um oxalato), levando à formação de um par radicalar cátion-ânion. O radical-ânion dioxetanodionila formado é transformado então em dióxido de carbono e no radical-ânion dióxido de carbono. Esse último transfere então um elétron para o fluoróforo presente no meio, gerando o estado excitado singlete do fluoróforo, o que leva finalmente, pela sua relaxação, à emissão de fluorescência. Assim, foi demonstrado que, na ausência de DFF, a oxima **13** em meio básico gera um oximato, que atua como um supernucleófilo

reagindo com oxalato de triclorofenila (OTCF) e formando um aduto que não pode participar da LQITE [171]. Ao se misturar a oxima em meio básico com DFF, ocorre a rápida reação de fosforilação do oximato. A adição de OTCF ao meio, seguida da adição do fluoróforo difenilantraceno (DFA) e peróxido de hidrogênio, leva à observação de um sinal quimiluminescente azul brilhante, de fácil detecção visual (Figura 13). Como esse processo não requer uma fonte de luz adicional, ele apresenta uma vantagem sobre os métodos baseados em fontes de luz visível e ultravioleta.

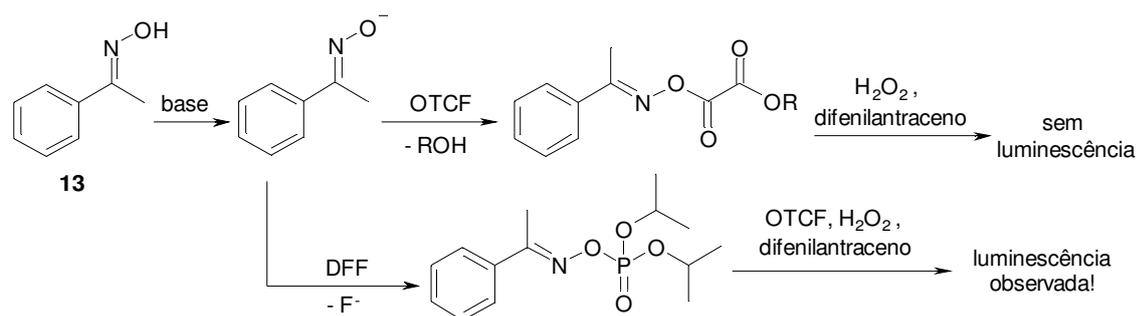


Figura 13. Representação esquemática de uma metodologia de detecção DFF em acetonitrila fundamentada em um processo quimiluminescente.

Conclusões e Perspectivas

Paracelsus, no século XVI, dizia que “a água é a matriz do mundo e de todas as suas criaturas” [173]. Nas últimas décadas, os cientistas ligados às questões envolvendo a matéria viva têm considerado a água essencialmente como o pano de fundo sobre o qual os componentes moleculares da vida são arranjados. É fundamental o papel que a água representa frente à bioquímica das células, sendo uma substância que interage ativamente com as biomoléculas, tais como as proteínas, provocando mudanças nelas. As funções biológicas dependem dessa forma de uma interação delicada da molécula com seu microambiente, que até pouco tempo atrás foram entidades consideradas distintas [173].

O papel da água frente ao mecanismo da hidrólise de ésteres de fosfato em sistemas enzimáticos e não enzimáticos vem sendo muito estudado [129], devido à presença de fosfatos em moléculas de suma importância que estão envolvidas desde o armazenamento e utilização de energia, passando pelo armazenamento, transmissão e expressão da informação genética, até a interação *in vivo* de agentes neurotóxicos com biomoléculas. Os estudos de enzimas que possam hidrolisar organofosfatos, tais como fosfotriesterases provenientes de bactérias em solo agricultável e fosfodiesterase de

veneno de cobra e de estafilococos sugerem futuras aplicações para os problemas recentes que concernem à contaminação e intoxicação por agentes neurotóxicos de guerra e pesticidas organofosforados [129]. Muitos grupos de pesquisa têm ainda realizado modificações nos sítios ativos de hidrolases e de butirilcolinesterases [117], por meio de técnicas de mutagênese sítio-dirigida, com o intuito de gerar catalisadores de alta eficiência para a hidrólise de agentes neurotóxicos organofosforados, o que tem constituído uma área de pesquisas bastante promissoras. Os estudos referentes ao desenvolvimento de supernucleófilos detentores de efeito α também precisam ter continuidade, pois eles são bastante promissores para o desenvolvimento de processos de descontaminação e de detoxificação de agentes neurotóxicos de guerra.

No plano da detecção de espécies fosfatadas, as perspectivas são inúmeras, indo desde o controle de qualidade de alimentos, passando pelo desenvolvimento de testes clínicos eficientes, com possibilidade de monitoramento de espécies fosfatadas em tempo real, até a detecção de agentes neurotóxicos organofosforados. Assim, quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos simples têm sido planejados e estudados para a detecção seletiva visual e quantitativa de diidrogenofosfato, PP_i , ATP e de ácidos nucleicos [174-184]. Conforme foi mostrado neste trabalho, eles apresentam um grande potencial para o desenvolvimento de sistemas ópticos simples para a detecção de agentes neurotóxicos organofosforados. Da mesma forma, os biossensores ópticos oferecem uma enorme gama de aplicações para a detecção dessas espécies [185].

Dentre os nanoobjetos montados por meio de técnicas de nanofabricação, os nanossensores ópticos representam um dos principais interesses da nanotecnologia [186]. Assim, diversos trabalhos recentes têm explorado os recursos da nanotecnologia para o desenvolvimento de métodos de detecção de agentes neurotóxicos organofosforados [187-191]. Narizes eletrônicos têm sido desenvolvidos como sensores de compostos organofosforados para serem empregados em controle de qualidade de alimentos, tendo em vista a aplicação desses compostos como agroquímicos, e na classificação e detecção de agentes de guerra [192, 193]. Para o desenvolvimento desses sistemas, inúmeras estratégias podem ser planejadas para a busca da detecção dos analitos com simplicidade aliada à alta eficiência, confiabilidade, reprodutibilidade, seletividade satisfatória, reversibilidade, menor tempo de resposta e menor custo [155, 163, 194].

Em outra vertente que vem sendo explorada, compostos organofosforados, tais como a tioetilenotiofosforamida, a 2-[bis(2-cloroetil)amino]-2-oxo-1,3,2-oxazafosforinana e também fosforodiamidatos vêm sendo sintetizados e estudados por fazerem parte de uma classe de agentes largamente empregados no tratamento oncológico antineoplásico [195].

Assim, os compostos organofosfatados, ao mesmo tempo simples e sofisticados, seguem oferecendo aos humanos uma visão paradoxal. Pelos caminhos trilhados em consonância com as leis da Evolução Natural eles apresentaram, por meio dos compostos fosfatados ricos em energia e dos ácidos nucleicos, a possibilidade da vida se instalar, manter-se e evoluir em nosso planeta. A aventura humana na Terra pôde então prosperar, entre erros e acertos. As ligações fosfatadas tornaram-se então, nas mãos humanas, instrumentos para a criação de moléculas com os mais diversos fins, que envolveram por um lado a busca para a cura do câncer com o objetivo de salvar vidas e a necessidade de se controlar pragas para aumentar a produtividade agrícola e provocar a derrubada das teses malthusianas. Por outro lado, foram concebidas e produzidas armas químicas mortíferas capazes de subjugar povos com a máxima crueldade, ao mesmo tempo em que, atualmente, grupos terroristas ameaçam utilizar essas mesmas armas contra alvos civis. Os pesticidas organofosforados, usados sem critérios, provocaram e causam ainda hoje verdadeiras catástrofes ambientais. Cabe assim aos químicos neste início de um novo século, e os trabalhos apresentados aqui apontam para essa direção, equacionar os problemas causados pela má gestão dos compostos organofosforados e aproveitar a grande versatilidade que essas moléculas oferecem para, com criatividade, utilizá-las na obtenção de produtos e processos que melhorem a qualidade de vida em nosso planeta.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar o seu agradecimento à Capes e ao CNPq pelas bolsas concedidas e também à FURB e ao PRONEX FAPESC/CNPq pelo apoio financeiro.

ABSTRACT

From energy-rich phosphate compounds to warfare agents: A review on the chemistry of organic phosphate compounds

The chemistry of the phosphorus-oxygen bond is widely used in biological systems in many processes, such as energy transduction and the storage, transmission and expression of genetic information, which are essential to living beings in relation to a wide variety of functions. Compounds containing this bond have been designed for many purposes, ranging from agricultural defense systems, in order to increase food

production, to nerve agents, for complaining use in warfare. In this review, features related to the chemistry of organic phosphate compounds are discussed, with particular emphasis on the role of phosphate compounds in biochemical events and in nerve agents. To this aim, the energy-rich phosphate compounds are focused, particularly the mode of their use as energy currency in cells. Historical and recent studies carried out by research groups have tried to elucidate the mechanism of action of enzymes responsible for energy transduction through the use of biochemical studies, enzyme models, and artificial enzymes. Finally, recent studies on the detoxification of nerve agents based on phosphorous esters are presented, and on the utilization of chromogenic and fluorogenic chemosensors for the detection of these phosphate species.

Keywords: energy-rich phosphate compounds; nerve agents; adenosine triphosphate

Referências Bibliográficas

- [1] Lehninger, A.L.; *Principles of Biochemistry*, 4^a ed. New York: W. H. Freeman & Co, **2004**.
- [2] Kirschbaum, J. *J. Chem. Educ.* **1984**, 45, 28.
- [3] Lipmann, F. *Adv. Enzymol.* **1941**, 1, 99.
- [4] Capaldi, R. A.; Aggeler, R. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 154.
- [5] Westheimer, F.H. *Science* **1987**, 235, 1173.
- [6] Cox, J.R.; Ramsay, O.B. *Chem. Rev.* **1964**, 64, 317.
- [7] Bentley, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2765.
- [8] Miller, D.L.; Westheimer, F.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1507.
- [9] Kirby, A.J.; Younas, M. *J. Chem. Soc. B* **1970**, 510.
- [10] Domingos, J.B.; Longhinotti, E.; Machado, V.G.; Nome, F. *Quim. Nova* **2003**, 26, 745.
- [11] Davis, B.D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, 78, 497.
- [12] Machado, V.G.; Nome, F. *Quim. Nova* **1999**, 22, 351.
- [13] Westheimer, F.H. *Science* **1987**, 235, 1173.
- [14] Komiyama, M.; Sumaoka, J. *Corr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 751.
- [15] Kalckar, H.M. *Chem. Rev.* **1941**, 28, 71.
- [16] Hill, T.L.; Morales, M.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 1656.
- [17] Riseman, J.; Kirkwood, J.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70, 2820.
- [18] Pullman, B.; Pullman, A. *Quantum Biochemistry*, New York: Interscience, 1963.
- [19] Boyd, D.B.; Lipscomb, W.N. *J. Theor. Biol.* **1969**, 25, 403.
- [20] George, P.; Witonsky, R.J.; Trachtman, M.; Wu, C.; Dorwart, W.; Richman, L.; Richman, W.; Shurayh, F.; Lentz, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, 223, 1.
- [21] Hayes, D.M.; Kenyon, G.L.; Kollman, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4331.
- [22] Ewig, C.S.; Van Wazer, J.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 79.
- [23] O'Keeffe, M.; Domenges, B. *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 2304.
- [24] Saint-Martin, H.; Ortega-Blake, I.; Les, A.; Adamowicz, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1080, 205.
- [25] Colvin, M.E.; Evleth, E.; Akacem, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4357.

- [26] Hwang, M.-J.; Chu, P.-Y.; Chen, J.-C.; Chao, I. *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 1702.
- [27] Lu, B.; Wong, C.F.; McCammon, J.A. *Protein Scienc.* **2005**, 14, 159.
- [28] Vishveshwara, S.; Hansia, P.; Guruprasad, N. *Biophys. Chem.* **2006**, 119, 127.
- [29] Ma, B.; Meredith, C.; Schaefer, H.F. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 8216.
- [30] de Meis, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 973, 333.
- [31] de Meis, L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 306, 287.
- [32] Alberty, R.A. *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 1337.
- [33] Alberty, R.A. *J. Chem. Educ.* **1969**, 46, 713.
- [34] Phillips, C.R.; George, P.; Rutman, J.R. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 3330.
- [35] Wolfenden, R.; Williams, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4345.
- [36] Gajewski, E.; Steckler, D.K.; Goldberg, R.N. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 2733.
- [37] Boyer, P.D.; Chance, B.; Ernster, L.; Mitchell, P.; Racker, E.; Slater, E.C. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, 46, 955.
- [38] Gomez-Puyou, A.; Gomez-Puyou, M.T.; de Meis, L. *Eur. J. Biochem.* **1986**, 159, 133.
- [39] Eisenberg, E.; Hill, T.L. *Science* **1985**, 227, 999.
- [40] Sakamoto, J. *J. Biochem.* **1984**, 96, 483.
- [41] Sakamoto, J.; Tonomura, Y. *J. Biochem.* **1983**, 93, 1601.
- [42] de Meis, L. *FEBS Lett.* **1987**, 213, 3333.
- [43] Gesser, J.C.; Yunes, S.; Clementin, R.M.; Nome, F. *Química Nova.* **1997**, 20, 631.
- [44] Koshland, D.E., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2286.
- [45] Di Sabato, G.; Jencks, W.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 4393.
- [46] Di Sabato, G.; Jencks, W.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 4400.
- [47] Herschlag, D.; Jencks, W.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7938.
- [48] Phillips, D.R.; Fife, T.H. *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 2710.
- [49] Lau, H.P.; Gutsche, C.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 1857.
- [50] Tafesse, F.; Massoud, S.S.; Milburn, R.M. *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 2591.
- [51] Hall, N.; *Neoquímica. A Química Moderna e suas Aplicações*, traduzido por Santos, P.S.; Alves, O.L.; Pasquini, C.; Azzellini, G.C. Porto Alegre: Bookman, 2004.
- [52] Beer, P.D.; Gale, P.A.; Smith, D.K. *Supramolecular Chemistry*, New York: Oxford University Press, 1999.
- [53] Nakai, C.; Glinsmann, W. *Biochemistry* **1977**, 16, 5636.
- [54] Suzuki, S.; Higashiyama, T.; Nakahara, A. *Bioorg. Chem.* **1973**, 2, 145.
- [55] Suzuki, S.; Nakahara, A. *Bioorg. Chem.* **1975**, 4, 250.
- [56] Hosseini, M.W.; Lehn, J.-M.; Mertes, M.P. *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 2454.
- [57] Lehn, J.-M.; Hosseini, M.W.; Jones, K.C.; Plute, K.E.; Mertes, K.B.; Mertes, M.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6330.
- [58] Blackburn, G.M.; Thatcher, G.R.J.; Hosseini, M.W.; Lehn, J.-M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2779.
- [59] Hosseini, M.W.; Lehn, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 537.
- [60] Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89.
- [61] Yohannes, P.G.; Mertes, M.P.; Mertes, K.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 8288.
- [62] Hosseini, M.W.; Lehn, J.-M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1155.

- [63] Hosseini, M.W.; Lehn, J.-M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 397.
- [64] Hosseini, M.W.; Lehn, J.-M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 451.
- [65] Lehn, J.-M.; Fenniri, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1819.
- [66] Mertes, M.P.; Mertes, K.B. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 413.
- [67] Fenniri, H.; Lehn, J.-M.; Marquis-Rigault, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 337.
- [68] Lin, H.K.; Zhou, C.; Zhu, S.; Guo, Y.; Ge, Q.; Lin, H. *Biophys. Chem.* **2003**, 105, 119.
- [69] Dugas, H.; *Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action*, 3^a ed., Springer-Verlag: New York, 1996, pp 345-361.
- [70] Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1997.
- [71] Breslow, R. In: *Artificial Enzymes*. Breslow, R., ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, cap. 1.
- [72] Iglesias, E. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2005**, 2, 237.
- [73] Venturini, C.G.; Nicolini, J.; Machado, C.; Machado, V.G. *Quim. Nova* **2008**, 2, 360.
- [74] Machado, V.G.; Nome, F. *Chem. Commun.* **1997**, 1917.
- [75] Machado, V.G.; Bunton, C.A.; Zucco, C.; Nome, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 169.
- [76] Boyer, P.D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 2297.
- [77] Giusti, L.A. *Uma estratégia supramolecular no desenvolvimento de um modelo enzimático para o estudo da formação de compostos fosfatados ricos em energia*. [Dissertação.] Blumenau: Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Química da Universidade Regional de Blumenau, 2008.
- [78] Giusti, L.A.; Nome, F.; Machado, V.G. 30a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, FQ-013, Águas de Lindóia, Brasil, 2007.
- [79] Lehn, J.-M. *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 49.
- [80] Giusti, L.A.; Nome, F.; Machado, V.G. 31a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, FQ-037, Águas de Lindóia, Brasil, 2008.
- [81] Cross, R.M. *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, 50, 681.
- [82] Amzel, L.M.; Pedersen, P.L. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, 52, 801.
- [83] Amzel, L.M.; Bianchet, M.A.; Pedersen, P.L. In: *Membrane Protein Structure Experimental Approaches*, White, S. H., ed. New York: Oxford, 1994.
- [84] Penefsky, H.S.; Pullman, M.E.; Datta, A.; Racher, E. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 3330.
- [85] Choate, G.L.; Hutton, R.L.; Boyer, P.D. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 286.
- [86] Penefsky, H.S.; Cross, R.L. *Adv. Enzym. Rel. Areas Molec. Biol.* **1991**, 64, 173.
- [87] Cross, R.L. *Nature* **1994**, 370, 594.
- [88] Gogol, E.P.; Luckén, T.B.; Capaldi, R.A. *Biochemistry* **1989**, 28, 4709.
- [89] Bianchet, M.; Ysern, X.; Hullihen, J.; Pedersen, P.L.; Amzel, M. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 21197.
- [90] Abrahams, J.P.; Leslie, A.G.W.; Lutter, R.; Walker, J.E. *Nature* **1994**, 370, 621.
- [91] Boyer, P.D. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1458, 252.
- [92] Boyer, P.D.; Cross, R.L.; Momsen, W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 2837.

- [93] Rosing, J.; Kayalar, C.; Boyer, P.D. *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 2478.
- [94] Boyer, P.D. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1140, 215.
- [95] Gresser, M.J.; Myers, J.A.; Boyer, P.D. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 12030.
- [96] Noji, H.; Yasuda, R.; Yoshida, M.; Kinoshita, K., Jr. *Nature* **1997**, 386, 299.
- [97] Yasuda, R.; Noji, H.; Kinoshita, K., Jr.; Yoshida, M. *Cell* **1998**, 93, 1117.
- [98] Disponível em: <http://www.res.titech.ac.jp/~seibutu/main.html>. Acesso em setembro de 2008.
- [99] Nakamoto, R.K.; Ketchum, C.J.; Al-Shawi, M.K. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 205.
- [100] Yasuda, R.; Noji, H.; Yoshida, M.; Kinoshita, K., Jr.; Itoh, H. *Nature* **2001**, 410, 898.
- [101] Walker, J.E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 2309.
- [102] Boyer, P.D. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 717.
- [103] Skou, J.C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 2321.
- [104] Weber, J.; Senior, A.E. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1458, 300.
- [105] Junge, W.; Pänke, O.; Chereponov, D.A.; Gumbiowski, K.; Müller, M.; Engelbrescht, S. *FEBS Lett.* **2001**, 504, 152.
- [106] Boyer, P.D. *FEBS Lett.* **2002**, 512, 29.
- [107] Weber, J.; Senior, A.E. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 35422.
- [108] Senior, A.E.; Perlin, D.; Latchney, L.R.; Wise, J.G. *J. Biochem.* **1984**, 23, 4998.
- [109] Weber, J.; Lee, R.S.F.; Grell, E.; Wise, J.G.; Senior, A.E. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 1712.
- [110] Liu, M.S.; Todd, B.D.; Sadus, R. *Biochem. Biophys. Acta.* **2005**, 1752, 111.
- [111] Cross, R.; Milgrom, Y.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 13831.
- [112] McCamley, N.J.; *The Secret History of Chemical Warfare*, Pen & Sword Military: South Yorkshire, 2006.
- [113] Vale, J.A. *Toxicology* **2007**, 240, 129.
- [114] Disponível em: www.opcw.nl. Acesso em agosto de 2008.
- [115] Yang, Y.-C.; Baker, J.A.; Ward, R.J. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1729.
- [116] Yang, Y.-C. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 109.
- [117] Smith, B.M. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 470.
- [118] Wellert, S.; Imhof, H.; Dolle, M.; Altmann, H.-J.; Richardt, A.; Hellweg, T. *Coll. Polym. Sci.* **2008**, 286, 417.
- [119] Ghanem, E.; Li, Y.; Xu, C.; Raushel, F.M. *Biochemistry* **2007**, 46, 9032.
- [120] Munro, N.B.; Talmage, S.S.; Griffin, G.D.; Waters, L.C.; Watson, A.P.; King, J.F.; Hauschild, V. *Environ. Health Perspect.* **1999**, 107, 933.
- [121] Disponível em: <http://cryptome.org/vx-msds.htm>. Acesso em setembro de 2008.
- [122] Bartelt-Hunt, S.L.; Knappe, D.R.U.; Barlaz, M.A. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2008**, 38, 112.
- [123] Chanda, A.; Khetan, S.K.; Banerjee, D.; Ghosh, A.; Collins, T.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12058.
- [124] Lewis, R.E.; Neverov, A.A.; Brown, R.S. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4082.
- [125] Melnychuk, S.A.; Neverov, A.A.; Brown, R.S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 1767.

- [126]Neverov, A.A.C.; Liu, T.; Bunn, S.E.; Edwards, D.; White, C.J.; Melnychuk, S.A.; Brown, R.S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6639.
- [127]Raushel, F.M. *Curr. Opin. Microbiol.* **2002**, 5, 288.
- [128]Singh, B.K.; Walker, A. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, 30, 428.
- [129]Cleland, W.W.; Hengge, A.C. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3252.
- [130]Reeves, T.E.; Wales, M.E.; Grimsley, J.K.; Li, P.; Cerasoli, D.M.; Wild, J.R. *Protein Engineering Design Selection* **2008**, 21, 405.
- [131]Gomez-Tagle, P.; Vargas-Zuniga, I.; Taran, O.; Yatsimirsky, A.K. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 9713.
- [132]Chin, J.; Takasaki, B.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9337.
- [133]Bruice, T.C.; Blaskó, A. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 475.
- [134]Moss, R.A.; Bracken, K.; Zhang, J. *Chem. Commun.* **1997**, 563.
- [135]Moss, R.A.; Zhang, J.; Bracken, K. *Chem. Commun.* **1997**, 1639.
- [136]Moss, R.A.; Ragunathan, K.G. *Chem. Commun.* **1998**, 1871.
- [137]Longhinotti, E.; Domingos, J.B.; da Silva, P.L.F.; Szpoganicz, B.; Nome, F. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18, 167.
- [138]Mitic, N.; Smith, S.J.; Neves, A.; Guddat, L.W.; Gahan, L.R.; Schenk, G. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3338.
- [139]Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bonaccini, C.; Giorgi, C.; Gratteri, P.; Moro, S.; Palumbo, M.; Simionato, A.; Sgrignani, J.; Sissi, C.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 5473.
- [140]Longhinotti, E.; Domingos, J.B.; Szpoganicz, B.; Neves, A.; Nome, F. *Inorg. Chim. Acta* **2005**, 358, 2089.
- [141]Kuo, L.Y.; Adint, T.T.; Akagi, A.E.; Zakharov, L. *Organometallics* **2008**, 27, 2560.
- [142]Buncel, E.; Um, I.H. *Tetrahedron* **2004**, 60, 7801.
- [143]Ren, Y.; Yamataka, H. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 5660.
- [144]Morales-Rojas, H.; Moss, R.A. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 2497.
- [145]Bromberg, L.; Zhang, H.; Hatton, T.A. *Chem. Mater.* **2008**, 20, 2001.
- [146]Ramaseshan, R.; Sundarrajan, S.; Liu, Y.J.; Barhate, R.S.; Lala, N.L.; Ramakrishna, S. *Nanotechnology* **2006**, 17, 2947.
- [147]Nome, F.; Domingos, J.B.; Longhinotti, E.; Bunton, C.A. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7051.
- [148]Domingos, J.B.; Longhinotti, E.; Brandão, T.A.S.; Santos, L.S.; Eberlin, M.N.; Bunton, C.A.; Nome, F. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7898.
- [149]Kirby, A.J.; Lima, M.F.; da Silva, D.; Nome, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1350.
- [150]Kirby, A.J.; Lima, M.F.; da Silva, D.; Roussev, C.D.; Nome, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16944.
- [151]McAnoy, A.M.; Paine, M.R.L.; Blanksby, S.J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2316.
- [152]Kassa, J.; Karasova, J.; Musilek, K.; Kuca, K.; Jung, Y.S. *Drug Chem. Toxicol.* **2008**, 31, 371.
- [153]Kuca, K.; Stodulka, P.; Hrabínova, M.; Hanusova, P.; Jun, D.; Dolezal, B. *Defence Sci. J.* **2008**, 58, 399.
- [154]Hill, H.H.; Martin, S.J. *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 2281.

- [155]Royo, S.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Costero, A.M.; Parra, M.; Gil, S. *Chem. Commun.* **2007**, 4839.
- [156]Burnworth, M.; Rowan, S.J.; Weder, C. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 7828.
- [157]Eubanks, L.M.; Dickerson, T.J.; Janda, K.D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 458.
- [158]Gehauf, B.; Goldenson, J. *Anal. Chem.* **1957**, 29, 276.
- [159]Gehauf, B.; Epstein, J.; Wilson, G.B.; Witten, B.; Sass, S.; Bauer, V.E.; Rueggeberg, W.H.C. *Anal. Chem.* **1957**, 29, 278.
- [160]Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4419.
- [161]Kubik, S.; Reyheller, C.; Stüwe, S. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, 52, 137.
- [162]Mohr, G.J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 1201.
- [163]Zimmermann-Dimer, L.M.; Machado, V.G. *Quim. Nova* **2008**, 31, 2134.
- [164]Zhang, S.-W.; Swager, T.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3420.
- [165]Wallace, K.J.; Morey, J.; Lynch, V.M.; Anslyn, E.V. *New J. Chem.* **2005**, 29, 1469.
- [166]Wallace, K.J.; Fagbemi, R.I.; Folmer-Andersen, F.J.; Morey, J.; Lynth, V.M.; Anslyn, E.V. *Chem. Commun.* **2006**, 3886.
- [167]Dale, T.J.; Rebek, J., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4500.
- [168]Stevani, C.V.; Baader, W.J. *Quim. Nova* **1999**, 22, 715.
- [169]Nery, A.L.P.; Baader, W.J. *Quím. Nova* **2001**, 24, 626.
- [170]Arnous, A.; Petrakis, C.; Makris, D.P.; Kefalas, P. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2002**, 48, 171.
- [171]Hewage, H.S.; Wallace, K.J.; Anslyn, E.V. *Chem. Commun.* **2007**, 3909.
- [172]Na língua inglesa, Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence (CIEEL).
- [173]Ball, P. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 74.
- [174]Fenniri, H.; Hosseini, M.W.; Lehn, J.-M. *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 786.
- [175]Ojida, A.; Park, S.-K.; Mito-oka, Y.; Hamachi, I. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 6193.
- [176]Sancenón, F.; Benito, A.; Lloris, J.M.; Martínez-Mañez, R.; Pardo, T.; Soto, J. *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 1505.
- [177]Marcotte, N.; Taglietti, A. *Supramol. Chem.* **2003**, 15, 617.
- [178]Mameri, S.; Charbonnière, L.J.; Ziessel, R.F. *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 1819.
- [179]Li, C.; Numata, M.; Takeuchi, M.; Shinkai, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 6371.
- [180]Descalzo, A.B.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Soto, J.; Beltran, D.; Amoros, P. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 2721.
- [181]Wu, F.-Y.; Tan, X.-F.; Wu, Y.-M.; Zhao, Y.-Q. *Spectrochim. Acta, Part A* **2006**, 65, 925.
- [182]Ojida, A.; Miyahara, Y.; Wongkongkatep, A.; Tamaru, S.; Sada, K.; Hamachi, I. *Chem. Asian J.* **2006**, 1, 555.
- [183]Kim, S.K.; Seo, D.; Han, S.J.; Son, G.; Lee, I.-J.; Lee, C.; Lee, K.D.; Yoon, J. *Tetrahedron* **2008**, 64, 6402.
- [184]Spangler, C.; Schaeferling, M.; Wolfbeis, O. *Microchim. Acta* **2008**, 161, 1.
- [185]Borisov, S.M.; Wolfbeis, O.S. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 423.

- [186]Gates, B.D.; Xu, Q.B.; Stewart, M.; Ryan, D.; Willson, C.G.; Whitesides, G.M. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1171.
- [187]Newman, J.D.S.; Roberts, J.M.; Blanchard, G.J. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 602, 101.
- [188]He, W.; Liu, Z.; Du, X.; Jiang, Y.; Xiao, D. *Talanta* **2008**, 76, 698.
- [189]Wang, J.; Timchalk, C.; Lin, Y. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 2688.
- [190]Dasary, S.S.R.; Rai, U.S.; Yu, H.; Anjaneyulu, Y.; Dubey, M.; Ray, P.C. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, 460, 187.
- [191]Tan, H.Y.; Loke, W.K.; Tan, Y.T.; Nguyen, N.T. *Lab Chip* **2008**, 8, 885.
- [192]Alizadeh, T.; Zeynali, S. *Sensors and Actuators* **2008**, 129, 412.
- [193]He, W.; Liu, Z.X.; Du, X.S.; Jiang, Y.D.; Xiao, D. *Talanta*, **2008**, 76, 698.
- [194]Anslyn, E. V. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 687.
- [195]dos Santos, V.M.R.; Donnici, C.L.; da Costa, J.B.N.; Caixeiro, J.M.R. *Quim. Nova*, **2007**, 30, 159.