

UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU – FURB
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LUCIANO ALBINO GIUSTI

**UMA ESTRATÉGIA SUPRAMOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE UM
MODELO ENZIMÁTICO PARA O ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS
FOSFATADOS RICOS EM ENERGIA**

BLUMENAU

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANO ALBINO GIUSTI

**UMA ESTRATÉGIA SUPRAMOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE UM
MODELO ENZIMÁTICO PARA O ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS
FOSFATADOS RICOS EM ENERGIA**

Relatório de dissertação
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Química do Centro
de Ciências Exatas e Naturais da
Universidade Regional de
Blumenau, como um dos requisitos
para a obtenção do grau de Mestre
em Química.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado – Orientador

BLUMENAU

2008

**UMA ESTRATÉGIA SUPRAMOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO
DE UM MODELO ENZIMÁTICO PARA A FORMAÇÃO DE
COMPOSTOS FOSFATADOS RICOS EM ENERGIA**

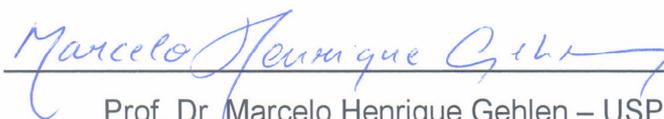
Por

LUCIANO ALBINO GIUSTI

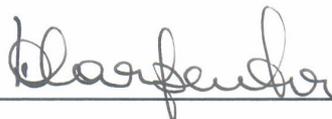
Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e demais membros da banca examinadora.



Presidente: Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado – Orientador – FURB



Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen – USP



Profa. Dra. Deyse Elisabeth Ortiz Suman Carpenter – FURB

Blumenau, 09 de maio de 2008

Dedico este trabalho aos meus pais, namorada,
amigos e a Deus.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado, de maneira especial, pela dedicação e competência na orientação do estudo.

A Prof.^a Dra. Deyse Elisabeth Ortiz Suman Carpenter, pela revisão e por sua contribuição com sugestões importantes a este relatório.

Ao Prof. Dr. Paulo César de Jesus, pelos espectros de infravermelho.

Ao Prof. Dr. Renato Wendhausen Júnior, pela atenção e apoio no laboratório de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Faruk Jose Nome Aguilera, pelo apoio e disponibilidade de alguns materiais empregados na realização deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Henrique Gehlen pela sua contribuição e disponibilidade de tempo dedicado a avaliação e concretização deste estudo.

RESUMO

Este trabalho apresenta uma estratégia supramolecular que permitiu a montagem de um modelo que mimetiza a formação, no sítio ativo da enzima, de compostos fosfatados ricos em energia, tais como o acetil-fosfato (AcP). Estudou-se a formação do AcP através da reação entre o acetato de 2,4-dinitrofenila (DNPA) e o di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) solubilizado por um agente criptante em solventes orgânicos, tais como acetonitrila, *N,N*-dimetilformamida, acetona e dimetilsulfóxido. Também foi estudado um sistema bifásico do tipo água- CH_2Cl_2 que mimetiza a ação enzimática responsável pela síntese na fase orgânica do AcP e pela sua ativação na fase aquosa como um composto rico em energia. A pesquisa foi desenvolvida em três etapas, sendo que na primeira etapa foi realizado um estudo da solubilidade do KH_2PO_4 em diversos solventes orgânicos, com o uso de um agente criptante (Kryptofix® 222). Verificou-se que a solubilidade do sal da ordem de $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ foi alcançada em acetonitrila, diclorometano, *N,N*-dimetilacetamida, *N,N*-dimetilformamida, acetona e dimetilsulfóxido, quando uma concentração igual a $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água foi empregada no sistema. Na segunda etapa montou-se um modelo não-enzimático para a formação do AcP pela reação de DNPA com KH_2PO_4 solubilizado em solvente orgânico com o uso de Kryptofix® 222. Os estudos demonstraram que a adição de água ao sistema levou a uma grande diminuição na velocidade da reação. Isto ocorreu porque a presença de água solvata preferencialmente o ânion fosfato, que deixa de atuar como nucleófilo, levando à diminuição na velocidade da reação e na concentração de AcP formado. O estudo do processo em vários solventes demonstrou que o meio que estabiliza a água em excesso torna o processo mais rápido, pois dessolvata o fosfato, o qual pode agir como nucleófilo, formando o AcP. Finalmente, estudou-se um ciclo de formação/transformação de AcP em um sistema bifásico (água/diclorometano) com o uso de Kryptofix® 222 e $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NBF}_4$ como agentes carreadores e de solubilização do KH_2PO_4 . O estudo deste sistema ilustrou a possibilidade de se modelar, de forma bastante simples e eficiente, o mecanismo de ação da ATP-sintase, proporcionando dois ambientes, um anidro onde facilmente e em alto rendimento a síntese pode ser executada e outro aquoso, para onde o composto rico em energia é transferido para executar uma determinada função, como, por exemplo, a sua hidrólise.

Palavras-chave: modelos enzimáticos, compostos ricos em energia, acetil-fosfato, dessolvatação, ATP-sintase, catálise por transferência de fase.

ABSTRACT

A supramolecular strategy that allowed the assembly of a model that mimics the formation, in the active site of the enzyme, of phosphate energy-rich compounds, such as acetyl phosphate (AcP) is described in this work. The formation of AcP was studied by the reaction of 2,4-dinitrophenyl acetate with potassium di-hydrogenphosphate (KH_2PO_4) solubilized in organic media (e.g., acetonitrile, *N,N*-dimethylformamide, acetone, and dimethylsulfoxide) using a cryptand agent (Kryptofix® 222). A water- CH_2Cl_2 biphasic system, which intended to mimic the enzyme sites responsible for the synthesis (organic phase) of AcP and by its “activation” in the aqueous phase as an “energy-rich” compound is also investigated. The study was performed in three steps, being the first the study of the conditions for the solubility of KH_2PO_4 in several organic solvents, with the use of a cryptand agent. The solubility of $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ in acetonitrile, dichloromethane, *N,N*-dimethylacetamide, *N,N*-dimethylformamide, acetone, and dimethylsulfoxide was obtained when a water concentration of $0.045 \text{ mol dm}^{-3}$ was used. A non-enzymatic model for the formation of AcP was studied in the second step by reacting DNPA with KH_2PO_4 solubilized in the organic medium with the use of Kryptofix® 222. Studies demonstrated that the addition of water into the system led to a great diminishment in the rate of the reaction. It occurred because the presence of water makes it to preferentially solvate the di-hydrogenphosphate anion, conducting to the reduction in the rate of the reaction and also in the formed AcP concentration. The study of the process in different organic solvents demonstrated that the solvent that better stabilize water makes faster the process, by desolvation of the phosphate, which can act as nucleophile, forming AcP. Finally, a formation/transformation cycle of AcP was studied in a biphasic system (water/ CH_2Cl_2) using Kryptofix® 222 and $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NBF}_4$ as both carrying and solubilizing agent for KH_2PO_4 . This system illustrated the possibility to model, in a very simple and efficient way, the mechanism of ATP synthases, offering two environments, an anhydrous where the easy, and in high yield synthesis, of the energy-rich compound can occur, and other with the presence of water, towards the energy-rich compound is transferred to perform a particular function, such as its hydrolysis.

Key-words: non-enzymatic models, phosphate energy-rich compounds, acetyl phosphate, desolvation, ATP-synthase, phase-transfer catalysis.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Estruturas de compostos ricos em energia.-----	18
Figura 1.2. Representação esquemática do ataque nucleofílico a ésteres de fosfatos em solução alcalina e em solução ácida.-----	20
Figura 1.3. Arranjo esquemático F ₀ F ₁ -ATPase da <i>Escherichia coli</i> .-----	24
Figura 1.4. Mecanismo de mudança de ligação para ATP hidrolase.-----	24
Figura 1.5. Representação das três diferentes conformações para a ativação catalítica por bi-sítio da ATP sintase.-----	27
Figura 1.6. Estrutura de ressonância para o ATP.-----	29
Figura 1.7. Representação do processo de síntese e hidrólise de compostos fosfatados no sítio catalítico de uma enzima.-----	33
Figura 1.8. Influência causada pela água no sítio catalítico de uma enzima.-----	35
Figura 1.9. O princípio da chave e da fechadura.-----	37
Figura 1.10. Estruturas de algumas poliaminas macrocíclicas.-----	38
Figura 1.11. Representação esquemática da reação de desfosforilação catalisada pelo macrociclo [24]-N ₆ O ₂ .-----	38
Figura 1.12. Complexação do íon fosfato e formação do PP _i por meio de um intermediário fosforamido.-----	39
Figura 1.13. Complexo ternário formado entre [24]-N ₆ O ₂ PO ₃ ²⁻ , Mg ²⁺ e ADP.-----	40
Figura 1.14. Estruturas de poliazafenantrolinas com diferentes grupos.-----	41
Figura 1.15. Representação esquemática da CTF-LL.-----	42

Figura 1.16. Estruturas de um éter-coroa e de um criptante.-----	43
Figura 1.17. Representação esquemática da preparação do DNPA.-----	47
Figura 1.18. Reação de caracterização do AcP.-----	51
Figura 1.19. Representação esquemática da reação de formação do AcP.-----	54
Figura 1.20. Mudanças espectrais decorrentes da reação entre o DNPA e o di-hidrogenofosfato em acetonitrila com traços de água à temperatura de 40°C.-----	55
Figura 1.21. Gráfico de $\log (A_{\infty} - A_t)$ em função do tempo para a reação entre o DNPA e o íon di-hidrogenofosfato na presença de Kryptofix® 222 à temperatura de 40°C.-----	56
Figura 1.22. Curva analítica para o 2,4-dinitrofenol em MeCN.-----	56
Figura 1.23. Espectros de infravermelho do reagente e produtos da reação.-----	57
Figura 1.24. Curva analítica para a determinação de AcP.-----	58
Figura 1.25. Influência provocada pela adição de água na reação do DNPA com o KH_2PO_4 na presença de Kryptofix® 222.-----	60
Figura 1.26. Gráfico da absorvância em função do tempo para a reação entre o DNPA e o íon di-hidrogenofosfato em MeCN com traços de água na presença de Kryptofix® 222 em diversas temperaturas.-----	61
Figura 1.27. Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}$ em função de $1/T$ para a reação do DNPA com o íon di-hidrogenofosfato em MeCN com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ e com $0,11 \text{ mol dm}^{-3}$ de água na presença de Kryptofix® 222.-----	62
Figura 1.28. Gráfico de $\ln [k_{\text{obs}} h (k_B T)^{-1}]$ em função de $1/T (K^{-1})$ para a reação do DNPA com o íon di-hidrogenofosfato em MeCN com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ e com $0,11 \text{ mol dm}^{-3}$ de água na presença de Kryptofix® 222.-----	63

Figura 1.29. Gráficos de $\ln k_{\text{obs}}$ em função de $1/T$ para a reação do DNPA com o íon di-hidrogenofosfato em DMA com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água na presença de Kryptofix® 222.-----	63
Figura 1.30. Gráficos de $\ln [k_{\text{obs}} h (k_{\text{B}} T)^{-1}]$ em função de $1/T (K^{-1})$ para a reação do DNPA com o íon di-hidrogenofosfato em DMA com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água na presença de Kryptofix® 222.-----	64
Figura 1.31. Gráficos de $\ln k_{\text{obs}}$ em função de $1/T$ para a reação do DNPA com o íon di-hidrogenofosfato em DMF com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água na presença de Kryptofix® 222.-----	64
Figura 1.32. Gráficos de $\ln [k_{\text{obs}} h (k_{\text{B}} T)^{-1}]$ em função de $1/T (K^{-1})$ para a reação do DNPA com o íon di-hidrogenofosfato em DMF com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água na presença de Kryptofix® 222.-----	65
Figura 1.33. Estado de transição associativo entre o DNPA e o íon H_2PO_4^- .-----	66
Figura 1.34. Sistema bifásico empregado na formação do AcP.-----	72
Figura 1.35. Gráfico de $\ln (A_{\infty} - A_t)$ em função do tempo para a reação em sistema bifásico água- Cl_2CH_2 entre DNPA e Kryptofix® 222, fase orgânica e íon di-hidrogenofosfato fase aquosa, à temperatura de 40°C .-----	73
Figura 1.36. Espectros de IV para a fase orgânica do sistema bifásico.-----	74
Figura 1.37. Sistema bifásico diclorometano-água representando esquematicamente a reação de formação do AcP.-----	75

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.1. Energias livres padrões para as hidrólises de alguns compostos fosfatados.-----	19
Tabela 1.2. Variações nos valores da entalpia padrão para as reações de hidrólise do PP_i .----	31
Tabela 1.3. Energias de hidrólise para o ATP e para o PP_i em diversos meios reacionais, à temperatura de 25°C.-----	34
Tabela 1.4. Influência da água na velocidade da reação de DNPA em MeCN com KH_2PO_4 na presença de Kryptofix® 222.-----	60
Tabela 1.5. Influência da temperatura na constante de velocidade da reação, em acetonitrila com água adicionada, do DNPA com KH_2PO_4 na presença de Kryptofix® 222.-----	62
Tabela 1.6. Parâmetros de ativação para a reação do DNPA com KH_2PO_4 na presença de Kryptofix® 222.-----	66
Tabela 1.7. Influência do meio orgânico contendo traços de água na velocidade da reação do DNPA com KH_2PO_4 na presença de Kryptofix® 222.-----	68
Tabela 1.8. Influência do meio na velocidade da reação do DNPA com di-hidrogenofosfato de tetrabutilamônio em solventes orgânicos a 25°C.-----	69

LISTAS DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A_0 – Absorbância para tempo igual a zero
 A_∞ – Absorbância para um tempo infinito
 A_t – Absorbância em um tempo t qualquer
 a, b e c – Subunidades do complexo F_0
 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ e ε – Subunidades do complexo F_1
AcP – Acetil-fosfato
ADP – Difosfato de adenosina
AMP – Monofosfato de adenosina
ATP – Trifosfato de adenosina
ATPase – Trifosfato de adenosina sintase
 $CHCl_3$ – Clorofórmio
 CH_2Cl_2 – Diclorometano
CTF – Catálise por transferência de fase
CTF-LL – Catálise por transferência de fase líquido-líquido
 ΔG° – Variação de energia livre padrão de Gibbs
 ΔH° – Variação de entalpia padrão de hidrólise
 ΔG^\ddagger – Variação de energia livre de ativação
 ΔH^\ddagger – Variação de entalpia de ativação
 ΔS^\ddagger – Variação de entropia de ativação
DMA – Dimetilacetamida
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNPA – Acetato de 2,4-dinitrofenila
 E_a – Energia de ativação
 $\varepsilon_{\text{máx.}}$ – Absortividade molar máxima
F – Identificação para fatores de acoplamento de energia
 F_0 – Complexo enzimático da F_0F_1 -ATPase
 F_1 – Complexo enzimático da F_0F_1 -ATPase
 F_0F_1 -ATPase – Trifosfato de adenosina sintase ou ATP sintase
 h – Constante de Planck – $6,626 \times 10^{-34}$ J s

H₄P₂O₇ – ácido pirofosfórico

IV – Infravermelho

k_B – Constante de Boltzmann – $1,381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$

KH₂PO₄ – Di-hidrogenofosfato de potássio

K_m – Constante de Michaelis-Menten

k_{obs} – Constante de velocidade observada de primeira ordem

Kryptofix® 222 – Agente criptante (4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]-hexacosano)

$\lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de onda máximo

MeCN – Acetonitrila

[24]-N₆O₂ – Poliamina macrocíclica (1,13-dioxa-4,7,16,19,22-hexaazaciclotetracosano)

~P – Ligação fosfatada de alta energia

P_i – Fosfato inorgânico

PC – Fosfocreatina

PEP – Fosfoenolpiruvato

pH – Potencial hidrogeniônico

P-N – Ligação fósforo-nitrogênio

P₂O₇⁴⁻ – Pirofosfato completamente desprotonado

P-O – Ligação fósforo-oxigênio

PP_i – Pirofosfato

R – Constante dos gases perfeitos – $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

r^2 – Coeficiente de correlação

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido ribonucléico

s – Segundo

sd – Desvio padrão

$t_{1/2}$ – Tempo de meia vida

UV-vis – Região do ultra-violeta e visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Revisão Bibliográfica	17
1.1.1. Propriedades e mecanismo de ação das F_0F_1 -ATPases	21
1.1.2. Compostos fosfatados ricos em energia	28
1.1.3. Influência da água nas energias de hidrólise dos compostos fosfatados ricos em energia	32
1.1.4. Modelagem enzimática na hidrólise e síntese de compostos ricos em energia	36
1.1.5. Catálise por transferência de fase	42
1.2. Objetivos e justificativa	43
1.2.1. Objetivo geral	45
1.2.2. Objetivo específico	45
2. PARTE EXPERIMENTAL	46
2.2. Materiais	46
2.2.1. Síntese do acetato de 2,4-dinitrofenila (DNPA)	46
2.3. Métodos	47
2.4. Estudos dos produtos	49
2.4.1. Estudos por espectrofotometria de IV	49
2.4.2. Identificação quantitativa do AcP	50
2.4.3. Estudos em sistema bifásico água-diclorometano	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1. A solubilização de íons fosfato em solventes orgânicos	53
3.2. Reação do DNPA com o di-hidrogenofosfato dessolvatado	54
3.3. Influência da concentração de água nas constantes de velocidade observadas	59
3.4. Parâmetros de ativação	61
3.5. A influência do meio na formação de compostos fosfatados ricos em energia	66
3.6. Reação do DNPA com di-hidrogenofosfato em sistema bifásico	70
4. CONCLUSÕES	77
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
6. ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

Paracelsus, no século XVI, disse que “a água é a matriz do mundo e de todas as suas criaturas” (BALL, 2008). Assim, os cientistas ligados às questões envolvendo a matéria viva têm considerado a água essencialmente como o pano de fundo sobre as quais 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 desta forma de uma interação delicada entre o que até pouco tempo atrás foi considerado como entidades distintas: a molécula e seu ambiente (BALL, 2008).

De acordo com Lipmann (LIPMANN, 1941), a energia obtida no processo de hidrólise de compostos fosfatados ricos em energia não dependeria do fato de o composto estar em solução ou ligado ao sítio ativo da enzima. As interações sofridas pelo reagente e pelo produto com o meio reacional eram sempre descartadas porque acreditava-se erroneamente que o solvente não interferia nos valores das constantes de equilíbrio para as reações de hidrólise dos compostos fosfatados. Esta questão é, contudo, de grande importância porque a água interage fortemente com o composto fosfatado por meio de ligações de hidrogênio, acarretando alterações nas suas propriedades físico-químicas. Machado e Nome (MACHADO, 2000), desenvolveram um modelo não-enzimático que representou o primeiro sistema bioorgânico que mimetizou com sucesso a síntese de um acilfosfato e demonstraram 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 principal no mecanismo de ação de enzimas responsáveis pela transferência de energia em sistemas biológicos. De acordo com de Meis (DE MEIS, 1989), são muitas as evidências experimentais que demonstram a importância da água nos processos de transdução de energia. Em misturas aquosas de diferentes solventes orgânicos, a energia de hidrólise do pirofosfato (PP_i) ou ATP é similar àquelas medidas na presença da enzima, ou seja, são muito menores que aquelas medidas em soluções totalmente aquosas.

Os modelos miméticos e não miméticos vêm suprindo informações essenciais para a interpretação dos mecanismos de ação das enzimas (GESSER, 1997). A mimetização das

reações biológicas de transferência do grupo fosforila tem representado um dos maiores desafios para os químicos nas últimas décadas. O desenvolvimento da química supramolecular (**HALL, 2004**) tornou possível o planejamento de receptores para ânions capazes de realizar a catálise molecular em reações envolvendo substratos de interesse químico e biológico, tais como o acetil-fosfato (AcP) e o trifosfato de adenosina (ATP). Este trabalho apresenta uma estratégia supramolecular no desenvolvimento de um modelo enzimático na formação de compostos fosfatados ricos em energia como o (ATP), o difosfato de adenosina (ADP), o fosfoenolpiruvato (PEP), a fosfocreatina (PC) e os resíduos acil-fosfatados, em especial aqui o acetil-fosfato (AcP).

Os compostos fosfatados ricos em energia, como o ATP e o AcP, tem importância vital em processos de transdução de energia em sistemas biológicos (**MACHADO, 1999; DE MEIS, 1989**). O ATP, por exemplo, é sintetizado a partir do ADP e fosfato inorgânico (P_i) no sítio catalítico das ATP-sintases, sendo hidrolisado no sítio ativo das ATPases (**PENEFSKY, 1991; CHOATE, 1979**). Há diversas evidências experimentais para o fato de que o ATP é sintetizado no sítio enzimático na ausência de água, sem a necessidade de energia. Assim, a energia seria necessária somente para remover o ATP formado do sítio enzimático. Isto ocorreria com a entrada de água no sítio da enzima após o ATP ter sido formado, o que o “transformaria” em um composto fosfatado rico em energia. Assim, um modelo enzimático foi estudado a fim de demonstrar a importância da ausência da água para a formação rápida de AcP em alto rendimento (**MACHADO, 1999; DE MEIS, 1989**). Nesta dissertação, busca-se mostrar que o P_i pode ser solubilizado em solventes orgânicos como a acetonitrila, na presença de um agente criptante e que a velocidade da reação é largamente dependente da concentração de água, e que o mesmo criptante atua como um carreador quando empregado em um sistema bifásico contendo água e CH_2Cl_2 , podendo desta forma mimetizar o microambiente do sítio ativo das enzimas responsáveis pela formação de compostos ricos em energia.

A seguir, é feita uma revisão bibliográfica sobre os compostos fosfatados ricos em energia, dando-se ênfase a questão da catálise no sítio catalítico das ATPases, a influência do meio na síntese e hidrólise destes compostos e o emprego da química supramolecular em catálise enzimática.

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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. Esta energia pode ser proveniente da luz (fotossíntese) ou de nutrientes químicos, sendo estes 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. Estes compostos são utilizados pelas células como fonte de energia, sendo o ATP o mais importante (**LEHNINGER, 2002; KIRSCHBAUM, 1984**).

Muitas reações biológicas 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 esteja acoplada a um intermediário comum (**LIPMANN, 1941**). Este acoplamento de energia pode ocorrer por mudança da configuração transmitida 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), que 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 nucleicos como nas mais diversas funções celulares.

O ATP é o principal responsável pela transdução de energia entre o catabolismo e o anabolismo, ou seja, a principal moeda de troca entre os metabólitos. A energia de ativação (E_a) é de importância fundamental para a estabilidade das biomoléculas, pois sem ela as biomoléculas no interior das células seriam quebradas de forma simples e com pequeno conteúdo energético, colocando em questão a continuidade e a organização da vida. No interior das células, esta barreira energética é vencida pelas enzimas que diminuem a E_a e aumentam a velocidade de reação ao redor de 10^{10} até 10^{14} vezes mais que uma reação não catalisada e estes catalisadores específicos são responsáveis pela regulação dos processos celulares (**LEHNINGER, 2002; MACHADO, 1999**).

Dos compostos fosfatados de maior importância bioquímica, o ATP, o difosfato de adenosina (ADP), o fosfoenolpiruvato (PEP), a fosfocreatina (PC) e os resíduos acil-

fosfatados, como o acetil-fosfato (AcP) (figura 1.1), se destacam por atuarem como moedas de troca de energia nos processos vitais (MACHADO, 1999).

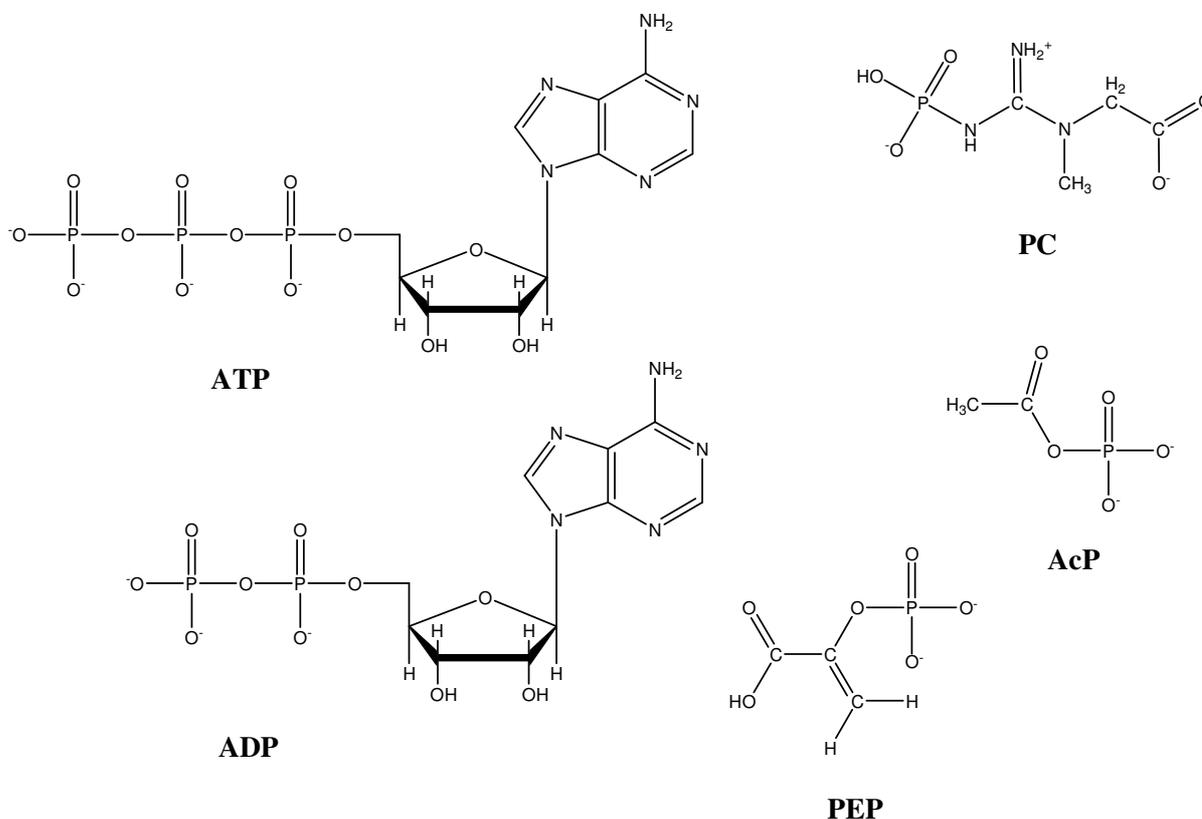


Figura 1.1. Estruturas de compostos fosfatados ricos em energia.

A energia contida nas ligações químicas das reações de hidrólise das ligações P-O ou P-N são normalmente de pequena magnitude. Exemplificando, nas reações de hidrólise de glicerol- α -fosfato, glicose-6-fosfato, monofosfato de adenosina (AMP), PP_i e glicose-1-fosfato ocorre uma diminuição nos valores de ΔG° em cerca de 9-21 kJ mol⁻¹ (Tabela 1.1), correspondendo a valores modestos. Entretanto, as reações de hidrólise do ATP, acetil-coenzima A (acetil-CoA), ADP, AcP, PC, 1,3-difosfoglicerato e PEP apresentam valores de ΔG° altos, variando entre -30 e -62 kJ mol⁻¹. Esta pequena classe de compostos possui alta instabilidade termodinâmica e, logo, uma capacidade termodinâmica alta para reagir, sendo assim dito que suas ligações P~O ou P~N são “ligações fosfatadas de alta energia” (~P). Assim, estes compostos receberam a denominação de compostos fosfatados ricos em energia (MACHADO, 1999).

Tabela 1.1. Valores de ΔG° para as hidrólises de alguns compostos fosfatados.^a

Composto fosfatado	ΔG°	
	kJ mol ⁻¹	kcal mol ⁻¹
PEP	-61,9	-14,8
1,3-difosfoglicerato (para 3-fosfoglicerato + P _i)	-49,3	-11,8
PC	-43,0	-10,3
AcP	-42,3	-10,1
ATP (para AMP + PP _i)	-45,6	-10,9
ADP (para AMP + P _i)	-32,8	-7,84
Acetil-CoA	-31,4	-7,50
ATP (para ADP + P _i)	-30,5	-7,30
Glicose-1-fosfato	-20,9	-5,00
PP _i (para 2P _i)	-19,0	-4,00
Frutose-6-fosfato	-15,9	-3,80
AMP (para adenosina + P _i)	-14,2	-3,40
Glicose-6-fosfato	-13,8	-3,30
Glicerol- α -fosfato	-9,21	-2,20

^a Os valores foram extraídos das referências (LEHNINGER, 2002; MACHADO, 1999).

É importante buscar entender por que o grupo fosfato e não outro grupo funcional possui tão importante responsabilidade na evolução da transformação bioquímica. Para isso, faz-se uso da questão levantada por Westheimer (1987): “*Por que a natureza escolheu os fosfatos?*” Segundo ele, para que possa existir a vida, os sistemas vivos devem ser razoavelmente estáveis. 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 metabólitos, podem ter vida curta, porém não o material genético, pelo fato de armazenar e transmitir a informação genética. A ligação que une dois nucleotídeos no material genético é uma ligação fosfodiéster, que é facilmente ionizada em pH próximo à neutralidade (pH fisiológico) (WESTHEIMER, 1987).

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 (COX, 1964). Os metabólitos fosfatados, retidos no interior da célula, encontram-se

carregados negativamente, o que faz diminuir a possibilidade de ataque nucleofílico ao grupo fosfato. Conforme o Figura 1.2, em soluções alcalinas (a), 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 elétrons, e poderá ser atacado pela água (b) (BENTLEY, 1949).

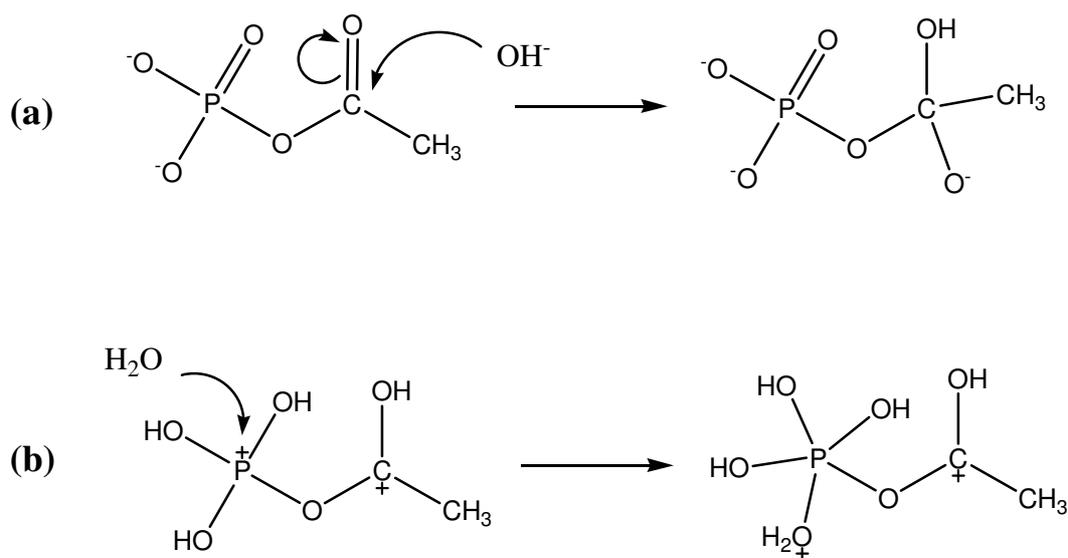


Figura 1.2. Representação esquemática do ataque nucleofílico a ésteres de fosfatos em solução alcalina (a) e em solução ácida (b). A figura é proveniente da referência (BENTLEY, 1949).

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 de ésteres de fosfatos no DNA e RNA são carregados negativamente: eles tornam-se relativamente mais resistentes à hidrólise e são, portanto, preferidos a ésteres de ácidos carboxílicos como material genético (MILLER, 1966). O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a hidrólise de certos ésteres fosfóricos de longe excede o tempo de vida alcançado por um ser humano. Assim, por exemplo, o $t_{1/2}$ para a reação de hidrólise espontânea do difenilfosfato é de 180 anos a 100°C (KIRBY, 1970). A hidrólise espontânea do DNA em solução neutra é tão lenta que a constante de velocidade para este processo é desconhecida. Tal estabilidade é

coerente com o papel fundamental do DNA na preservação da informação genética (DOMINGOS, 2003).

Além disso, de acordo com Davis (1958), nos primórdios da evolução, compostos poderiam ser difundidos através das membranas de organismos primitivos evolucionários, podendo eles serem dissolvidos na parte externa da célula. Muitas moléculas eletricamente neutras possuem alguma solubilidade em lipídios e atravessam a membrana; a maioria das moléculas ionizadas, isto é, sais, são insolúveis em lipídios. Mais precisamente, o pH de um ácido será menor do que 4 e de uma base maior do que 10 para garantir que só uma pequena parte dos compostos permaneçam na forma não ionizada. Esta regra geral não é absoluta, porém seguramente as moléculas podem ser mantidas dentro da membrana se elas permanecerem ionizadas (WESTHEIMER, 1987; DAVIS, 1958).

De acordo com o que foi mencionado há pouco, o grupo fosfato encontra-se ionizado em pH fisiológico, essa carga negativa protege os anidridos fosfóricos ricos em energia do ataque nucleofílico pela água e outras espécies, conferindo-lhes uma grande estabilidade cinética em solução aquosa (DAVIS, 1958). O fato dos compostos fosfatados ricos em energia possuírem alta capacidade termodinâmica para reagir torna-se uma contradição. Esta contradição é importantíssima na natureza, porque garante que após a sua síntese, o composto não sofra hidrólise, esperando o momento certo para ser utilizado nos processos bioenergéticos. O seu emprego, sem a catálise enzimática, não seria viável para utilizar a energia contida nas ligações ~P para realizar as funções biológicas mais variadas.

É interessante observar que compostos organofosforados foram selecionados pelo ser humano para desenvolver pesticidas, inseticidas e gases de guerra. As ligações P-O são ideais para o desempenho destas 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 (DOMINGOS, 2003).

1.1.1. Propriedades e mecanismo de ação das F_0F_1 -ATPases

Vários artigos de revisão abastecem profundamente a visão com respeito às propriedades das ATPases e suas funções, na transdução de energia e no transporte de íons (CROSS, 1981; AMZEL, 1983; BOYER, 1993; AMZEL, 1994; PENEFSKY, 1960). Aqui serão enfatizadas como visão geral as suas propriedades e mecanismos de operação, de modo a facilitar a compreensão deste trabalho.

As enzimas ATPases do tipo F desempenham um papel central nas reações de transdução de energia e se encontram acopladas à membrana nas bactérias, nas mitocôndrias e nos cloroplastos. Ela foi isolada primeiramente por Penefsky e col (1960). em 1960. 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 sintases ou ainda F_0F_1 -ATPase (LEHNINGER, 2002).

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 acoplado a 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. 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 (CHOATE, 1979), 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 (PENEFSKY, 1991).

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 deste complexo. Ele apresenta um agregado assimétrico de subunidades, constituído por $\gamma\delta\epsilon ab_2$, que se encontra no interior de um complexo cilíndrico externamente formado por $\alpha_3\beta_3c_{9-12}$ (CROSS, 1994). Estudos realizados no 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. Neste arranjo, as subunidades ocupam posições equivalentes e alternadas (GOGOL, 1989). Bianchet e col. (1991) 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 col.

(1983) na década de oitenta, com cristais da F_1 -ATPase mitocondrial obtida de fígado de rato. Obtiveram mais informações para a estrutura quaternária da enzima, a qual apresenta as dimensões $120 \text{ \AA} \times 120 \text{ \AA} \times 74 \text{ \AA}$, encontrando-se suas subunidades α e β presentes como um arranjo trimérico. Todos os dados estruturais concordaram com os resultados obtidos por microscopia eletrônica (BIANCHET, 1991). 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 transtornos 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 (2,8Å). A F_1 -ATPase apresenta estrutura assimétrica pelo menos em parte, suas subunidades α e β são arranjadas alternadamente, assemelhando a uma laranja (ver Figura 1.3). A subunidade γ passa por uma larga cavidade no interior entre suas subunidades vizinhas α e β . A simetria requerida para o mecanismo de mudança de ligação (“binding change mechanism”) da F_1 -ATPase, particularmente na região do sítio ativo, ficou evidente na estrutura cristalina. As três diferentes conformações da subunidade β são atribuídas ao posicionamento assimétrico da subunidade γ (ABRAHAMS, 1994). Este trabalho apresenta 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 (BOYER, 2000).

A hipótese do mecanismo de mudança de ligação foi desenvolvida inicialmente por Boyer e col. (1973) 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 (ROSING, 1977). Isto reflete a necessidade de romper as mais favoráveis interações proteína-ligante 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 nos três sítios catalíticos que, porém, separados interagem entre si permanecendo sempre 120° fora de fase no ciclo catalítico (Figura 1.4) (BOYER, 1993; PENEFSKY, 1991).

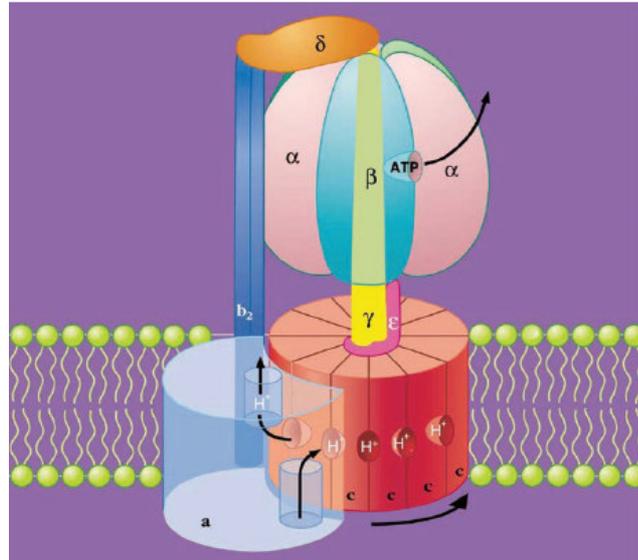


Figura 1.3. Arranjo esquemático da F_0F_1 -ATPase da *Escherichia coli* e o caminho de prótons proposto. A porção F_1 é constituída pelas subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ enquanto a porção F_0 tem em sua estrutura as subunidades $ab_2c_9-12?$. A passagem do próton na interface da subunidade a e o disco da subunidade c causa a rotação de c e prende as subunidades γ e ε ao resto da enzima. A subunidade γ assimétrica estende-se atravessando o centro da “laranja” $\alpha_3\beta_3$. As subunidades a e b_2 funcionam como um extrator. A rotação da subunidade γ resulta em uma mudança sequencial de conformação do sítio catalítico que promove a ligação de ADP e P_i , formando ATP e liberando ATP. A figura é proveniente da **referência (HUTCHEON, 2001)** (direitos autorais em 2001 por: National Academy of Sciences, U.S.A.).

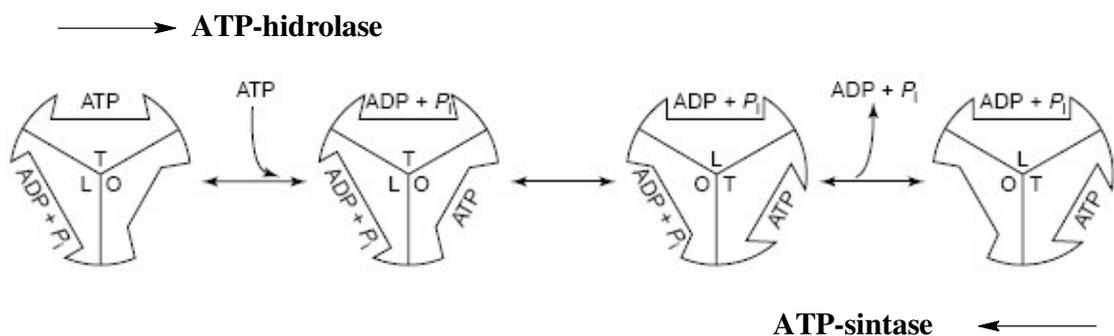


Figura 1.4. Mecanismo de mudança de ligação para a ATP hidrolase. Cada ciclo possui três sítios catalíticos com diferentes conformações: T, L e O. O ATP liga-se ao sítio O (aberto e vazio) para converter-se em um sítio T (fechado e ocupado por ATP). Após a quebra da ligação, o sítio T é convertido a L (liberto e ocupado por ADP + P_i), através do qual o produto pode escapar para recuperar o estado O. A hidrólise ou síntese de uma molécula de ATP

ocorre, dependendo da enzima apropriada, com movimentos de 120° como uma chave na fechadura. Figura adaptada da referência (CAPALDI, 2002).

O fator chave da hipótese sugerida por Boyer é que os três sítios catalíticos e, portanto os três pares de subunidades $\alpha\beta$ que contêm estes 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 (figura 1.4). Estas mudanças seriam responsáveis pelo ciclo catalítico que conduz à síntese do ATP (GRESSER, 1982). 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 $\alpha\beta$ 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 (CAPALDI, 2002).

Sem dúvida nenhuma, um grande avanço científico foi alcançado pela demonstração da rotação da subunidade γ para conduzir a síntese do ATP (NOJI, 1997; YASUDA, 1998). Recentemente, estudos vêm demonstrando a mudança conformacional das subunidades durante o curso da catálise em uma variedade de métodos, incluindo cinéticas usando reagentes modificados, mudança espectral de sonda óptica, imagem de microscopia eletrônica, microscopia por vídeo-fluorescência (<http://www.res.titech.ac.jp/seibutu/main.html>, 2008), e microscopia óptica por feixe (NAKAMOTO, 1999). Esta última permitiu uma imagem de alta velocidade que demonstrou a rotação desta 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. Este esquema provavelmente aplica-se para 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 ATP-sintase por rotação reversa da F_1 -ATPase (YASUDA, 2001). Demonstrou-se assim que a enzima funciona como um “motor molecular”, como Boyer e Cox haviam pressuposto. No ano de 1997, Boyer e Walker foram premiados com o Prêmio Nobel em Química por sua contribuição ao campo (BOYER, 1998; WALKER, 1998; BOYER, 1997). Os mecanismos

de ação da ATP-hidrolase e da bomba de prótons (SKOU, 1998), vão ficando assim mais bem esclarecidos (WEBER, 2000).

Os estudos realizados por Junge e col. em 2001 vêm firmando a idéia de que a unidade F_0 funciona como um gerador, F_1 como um motor e ambos atuam acoplados mecanicamente por movimentos rotatórios de 360° , sendo uma subunidade oposta à outra (JUNGE, 2001). Observações intrigantes relacionadas às subunidades γ e c_{10-14} da *Escherichia coli* mostram-na como sendo um rotor que se move em oposição às subunidades $\alpha_3\beta_3\delta ab_2$ que são denominadas como extrator no complexo F_0F_1 (WEBER, 2000). Foi demonstrado ainda que a enzima compete com simetria desigual entre seus motores e assim uma transmissão flexível de capacidade elástica entre F_1 e F_0 foi observada (JUNGE, 2001).

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 este 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 (BOYER, 2002). 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 rápida hidrólise do ATP requereria que todos os três sítios tivessem ADP ou ATP presentes (WEBER, 2001). As importantes considerações a serem feitas referem-se contudo não ao número de sítios catalíticos que podem 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 (JUNGE, 2001). Estas mudanças conformacionais rápidas foram consideradas requererem somente a ocupação específica de um segundo sítio, e deste 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 1.5. As diferentes formas dos sítios na Figura 1.5 indicam uma dualidade. Como isto pode ser alcançado não é conhecido, mas isso pode ser devido à capacidade para 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 (BOYER, 2002).

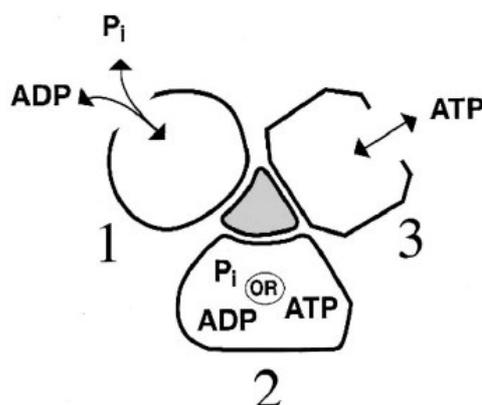


Figura 1.5. Representação das três diferentes conformações para a ativação catalítica por bi-sítio na síntese (seqüência 1, 2, 3) ou hidrólise (seqüência 3, 2, 1) do ATP por ATP sintase. No sítio **1** o ADP se liga melhor do que o ATP e é o sítio no qual ADP e P_i devem estar presentes para ocorrer a síntese rápida. O sítio **2** tem a capacidade para catalisar 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 neste sítio para a hidrólise rápida. A figura é proveniente da referência (BOYER, 2002).

Novas estratégias foram aplicadas para examinar esta questão (BOYER, 2002). Os resultados são conflitantes, contestando que a atividade de hidrolase por bi-sítio deva ser negligível (SENIOR, 1984; WEBER, 1992) ou que não possa igualmente existir (WEBER, 2001), embora as análises de Weber e Sênior (WEBER, 2001), não dêem informações se a ativação do bi-sítio é operativa em concentrações elevadas de ATP. Liu e col. (2005), realizaram simulações que indicam a dependência do mecanismo de mudança de ligação com a concentração do ATP, onde a baixa concentração do ATP favorece a ativação por mono-sítio, para bi-sítio com ATP pré-saturado e para tri-sítio em concentrações de ATP altas. Cross e Milgrom (2005), usando medidas diretas de ligações nucleotídicas por total atividade endergônica do complexo F_1 mitocondrial proveniente do coração de 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 destes resultados serem conflitantes e alvo de discussões calorosas tornam necessários trabalhos adicionais para a perfeita elucidação destas questões.

1.1.2. Compostos fosfatados ricos em energia

Em vários processos metabólicos o fosfato encontra-se introduzido não somente devido à facilidade de seu colapso em condições adequadas, mas também como um carreador de energia. Estudos da PC presente em tecidos musculares sugeriram sua conexão com o armazenamento de energia. Os compostos fosfatados, como a PC, foram então em meados do século passado conceituados por Lipmann como compostos fosfatados ricos em energia (**LIPMANN, 1941**). Os diferentes compostos fosfatados seriam diferenciados pela natureza química da ligação entre o grupo fosfato e o restante da molécula, quanto à energia obtida no processo de hidrólise, independentemente do fato de o composto encontrar-se em solução ou ligado ao sítio ativo da enzima. Uma vez que o composto fosfatado esteja ligado à enzima, ele será hidrolisado e a energia proveniente da quebra da ligação de fosfato será aproveitada pela enzima para realizar trabalho. As idéias de Lipmann sobre como as células utilizam compostos fosfatados como moeda de troca de energia foram aceitas até o final da década de oitenta (**LIPMANN, 1941**).

A alta instabilidade termodinâmica dos compostos fosfatados foi atribuída a ligações P-O ou P-N, definidas como sendo ligações fosfatadas de alta energia. E esta energia contida nas ligações seria decorrente da estabilização relativa, por ressonância, dos produtos de hidrólise dos compostos fosfatados em relação aos reagentes (**KALCKAR, 1941**). Assim, o ADP e o P_i possuem mais estruturas de ressonância que o ATP, além do fato de o ATP apresentar estruturas de ressonância de contribuição muito pequena, com átomos de oxigênio apresentando três ligações e carga positiva adjacente ao átomo de fósforo, também carregado positivamente (ver abaixo) (**KALCKAR, 1941**).

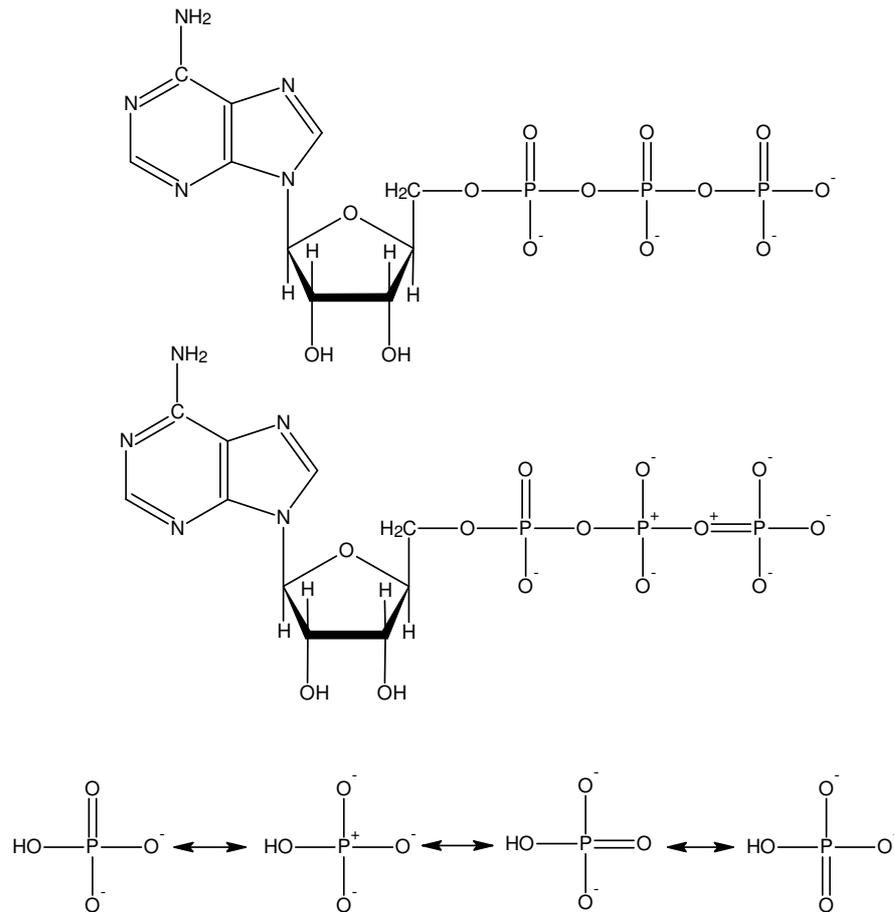


Figura 1.6. Estruturas de ressonância para o ATP. A figura é proveniente da **referência (MACHADO, 1999).**

Em 1951, Hill e Morales (1951) sugeriram que compostos fosfatados ricos em energia, como o ATP, o ADP e o PEP, apresentam juntamente com o efeito de ressonância, um efeito eletrostático que contribui para a instabilidade termodinâmica. Este efeito eletrostático é maior no ATP, sendo esta repulsão eletrostática muito forte devido à proximidade das cargas negativas sobre os átomos de oxigênio vizinhos do ATP. Quando o ATP é hidrolisado para ADP e P_i esta repulsão pode ser reduzida, sugerindo que a energia livre “eletrostática” no ATP, juntamente com sua forma atribuída, podem conferir à esta substância seu papel especial como doador de energia. Riseman e Kirkwood (1948), 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 esta originada da degradação da ligação de fosfato,

esta 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 (1963) para os compostos 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. Na década de sessenta, Boyd e Lipscomb (1969), também chegaram à mesma conclusão por meio de cálculos das estruturas para os compostos ricos em energia empregando Hückel estendido.

Os trabalhos que discutiram o conceito dos compostos fosfatados ricos em energia até o final da década de sessenta abordaram a questão do ponto de vista exclusivamente teórico. As interações sofridas pelo reagente e pelo produto com o meio reacional eram sempre descartadas porque acreditava-se erroneamente que o solvente não interferia nos valores das constantes de equilíbrio para as reações de hidrólise dos compostos fosfatados. Esta questão é, contudo, de grande importância porque a água interage fortemente com o composto fosfatado por meio de ligações de hidrogênio, acarretando alterações nas suas propriedades físico-químicas (MACHADO, 1999).

Já na década de setenta, George e col. (1970), analisando os aspectos termodinâmicos das reações de hidrólises, em diversos valores de pH, para vários compostos fosfatados ricos em energia, concluíram que os efeitos intramoleculares analisados acima têm importância secundária quando comparados com a interação de reagentes e produtos com o solvente. Na Tabela 1.2 pode ser observada uma série de reações de hidrólise envolvendo o PP_i , analisada pelos autores. Foi observado por eles, que em fase aquosa, o PP_i completamente protonado ($H_4P_2O_7$) tem uma entalpia de hidrólise (ΔH°) de $-31,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ comparada com a espécie não protonada ($P_2O_7^{4-}$), que apresenta um valor de ΔH° de $-15,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, o que acarreta uma entalpia de hidrólise $16,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ mais negativa que a espécie não protonada. Estes resultados demonstram que a interação do PP_i com o solvente compensa muito bem a repulsão intramolecular muito forte da espécie completamente desprotonada. De acordo com esta nova proposta, a energia livre na hidrólise de um composto fosfatado é determinada também pelas diferenças nas energias de solvatação de reagentes e produtos. Quanto mais solvatado se encontra o composto, mais estável ele é e, portanto, menos reativo. Assim, um valor alto para a constante de equilíbrio de hidrólise do composto tais como, ΔH° e ΔS° , significaria uma maior solvatação dos produtos da reação em relação aos reagentes (GEORGE, 1970).

Tabela 1.2. Variação de entalpia padrão para as reações de hidrólise do PP_i.^a

Reação	ΔH° (kJ mol ⁻¹)
$\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$	-31,8
$\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{PO}_4^- + \text{H}_3\text{PO}_4$	-30,5
$\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	-28,5
$\text{HP}_2\text{O}_7^{3-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	-24,3
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{HPO}_4^{2-}$	-15,5

^a Valores extraídos da ref. (GEORGE, 1970).

Buscando entender a química de compostos fosfatados ricos em energia, vários estudos envolvendo mecânica-quântica já foram realizados. Kollman e col. (HAYES, 1978), apresentaram cálculos *ab initio* para reações hidrolíticas em fase gasosa junto à classe da maioria dos compostos fosfatados ricos em energia de importância em processos biológicos. Eles estabeleceram que os efeitos intramoleculares de ressonância e repulsão eletrostática mencionados acima são de importância secundária para determinar a energia de hidrólise em algumas destas reações, porém, as energias relativas de solvatação de reagentes e produtos são em grande parte o fator mais importante para determinar as energias de hidrólise destes processos. Os resultados obtidos concordaram com os resultados propostos anteriormente por George e col. (1970), Em 1988, Ewig e van Wazer, (1988), também empregando cálculos *ab initio* para determinar as energias de hidrólise para compostos fosfatados, que têm em sua estrutura a ligação P-O-P, chegaram a conclusões bastante semelhantes.

A hidrólise do PP_i é um problema difícil para resolver por métodos *ab initio* porque todas as espécies envolvidas na reação se encontram bastante desprotonadas em pH fisiológico. A maior parte dos trabalhos que buscam fazer previsões sobre a entalpia reacional tem sido realizada para as espécies completamente protonadas em fase gasosa com o objetivo de estabelecer se a reação dessolvatada é endotérmica ou exotérmica. Mesmo assim, os dados apresentados são bastante controversos, com entalpias de hidrólise em fase gasosa variando entre -1,7 e -56 kJ mol⁻¹(HAYES, 1978; EWIG, 1988; O'KEEFFE, 1985; SAINT-MARTIN, 1991).

Apesar dos numerosos experimentos a este respeito, um conhecimento detalhado dos fatores energéticos que contribuem para as energias destas reações ainda está faltando. A busca de informações mais detalhadas e precisas acerca da hidrólise do PP_i levou Colvin e col. (1995) a efetuar cálculos *ab initio* da entalpia da reação em fase gasosa. Os cálculos demonstraram que, em fase gasosa, a hidrólise do PP_i totalmente protonado é desfavorável em 21 kJ mol^{-1} . A origem desta energia livre desfavorável é um par de ligações de hidrogênio intramoleculares que une os dois grupos fosfato na molécula. Os estudos da energia de hidrólise em fase gasosa para as formas aniônicas do PP_i , correspondentes ao pH neutro, apresentaram valores altamente negativos, que foram atribuídos à repulsão eletrostática (MA, 1994). Foram ainda feitas previsões das energias de hidrólise para os estados desprotonados do PP_i em fase aquosa usando vários métodos, fundamentados no modelo do contínuo dielétrico do solvente aquoso (COLVIN, 1995). Foi assim observado que a solvatação aquosa age no sentido de minimizar esta repulsão intramolecular por meio de interações eletrostáticas. Os resultados sugerem que a hidrólise destes compostos pode ser mais bem descrita como um compromisso entre a repulsão intramolecular e as interações intermoleculares com o solvente. A presença de ligações de hidrogênio intramoleculares, no PP_i , em estudos *ab initio*, em fase gasosa, também foi observada recentemente em outros trabalhos (HWANG, 1999; LU, 2005; VISHVESHWARA, 2006).

1.1.3. Influência da água nas energias de hidrólise dos compostos fosfatados ricos em energia

De acordo com Lipmann (1941), a energia obtida no processo de hidrólise não dependeria do fato de o composto estar em solução ou ligado ao sítio ativo da enzima. Esta idéia determinou como os pesquisadores veriam a síntese e a hidrólise dos compostos fosfatados ricos em energia por aproximadamente trinta anos, até o início da década de setenta. A partir desta época, vários resultados obtidos por muitos grupos de pesquisa levaram a outras conclusões a respeito deste assunto. Descobriu-se 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 (MACHADO, 1999). No final da década de oitenta e início da de noventa este assunto foi revisado amplamente por de Meis (1989; 1993). 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 este 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 o mesmo sofra hidrólise. Neste processo, ocorre um decréscimo no nível energético do composto fosfatado; a sua presença permite à enzima seguir para uma outra conformação e nesta 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, 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 leva à entrada de água no sítio catalítico (Figura 1.7). Neste retorno ao meio aquoso, as constantes de equilíbrio para a hidrólise destes compostos voltam a ganhar valores muito altos.

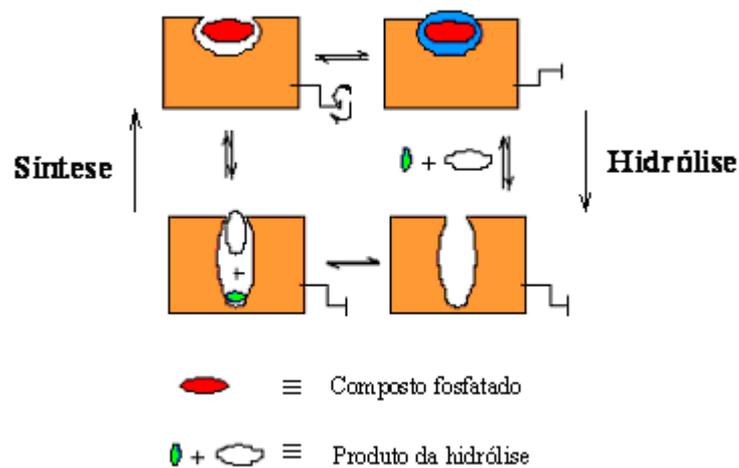


Figura 1.7. Representação do processo de síntese e hidrólise de compostos fosfatados ricos em energia no sítio catalítico de uma enzima (representada em alaranjado); mudança conformacional e realização de trabalho (representado pela posição da manivela).

De acordo com de Meis (1989), são muitas as evidências experimentais que demonstram a importância da água nos processos de transdução de energia. Em misturas aquosas de diferentes solventes orgânicos, a energia de hidrólise do PP_i ou ATP é similar àquelas medidas na presença da enzima, ou seja, são muito menores que aquelas medidas em soluções totalmente aquosas (Figura 1.8). A Tabela 1.3 expõe alguns destes resultados.

Tabela 1.3. Variação de energia livre padrão para a hidrólise de ATP e PP_i em diversos meios reacionais, à temperatura de 25°C.^a

Composto fosfatado	Condição reacional	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
ATP	Solução aquosa diluída	-20,5 a -44,8
ATP	F ₁ -ATPase, miosina	+1,7
ATP	Clorofórmio com traços de água	+1,3
PP _i	Solução aquosa diluída, pH~ 7	-11,3 a -27,2
PP _i	Pirofosfatase inorgânica	-3,8
PP _i	Clorofórmio com traços de água	-7,5
PP _i	50% de etilenoglicol, pH 7,2	-7,5
PP _i	50% de poli(etilenoglicol) 8000, pH 7,2	+0,8

^aReferência (MACHADO, 1999).

Outra grande evidência experimental é conseguida pela observação de que a síntese de compostos fosfatados ricos em energia, no sítio ativo das enzimas, é bastante facilitada na presença de solventes orgânicos. Quando isto ocorre, é observado um decréscimo no valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) aparente para P_i, porque há um decréscimo na concentração de água no sítio catalítico da enzima, e por conseqüência, ocorre um grande aumento da afinidade da enzima por P_i (Figura 1.7). Como exemplo, podem-se citar os resultados obtidos com a ATP sintase mitocondrial quando um gradiente eletroquímico é gerado. Assim, por exemplo, o valor de K_m para P_i na reação de formação de ATP, ligado firmemente ao sítio catalítico da F₁-ATPase mitocondrial, em meio totalmente aquoso, na ausência de um gradiente de prótons, encontra-se acima de 0,4 mol dm⁻³. Quando o gradiente de prótons é gerado, o valor de K_m é abaixado para 10⁻³ mol dm⁻³. Um efeito semelhante é observado se dimetilsulfóxido (DMSO) for adicionado ao meio: 40% deste solvente reduz o valor de K_m para a mesma faixa de 10⁻³ mol dm⁻³ (DE MEIS, 1989). Foi observado por Sakamoto (1984), que quando a concentração de DMSO no meio reacional é diminuída de 40% para 10% a concentração de P_i necessária para a formação da metade da quantidade máxima de ATP aumenta de 0,7 para 11 mmol dm⁻³. A habilidade de F₁ em hidrolisar o ATP é inibida quando solventes orgânicos, que facilitam a entrada de P_i no sítio catalítico da enzima favorecendo a formação de ATP, são adicionados ao meio. O efeito reverso pode ser

facilmente alcançado pela diluição do solvente orgânico (SAKAMOTO, 1983; DE MEIS, 1987).

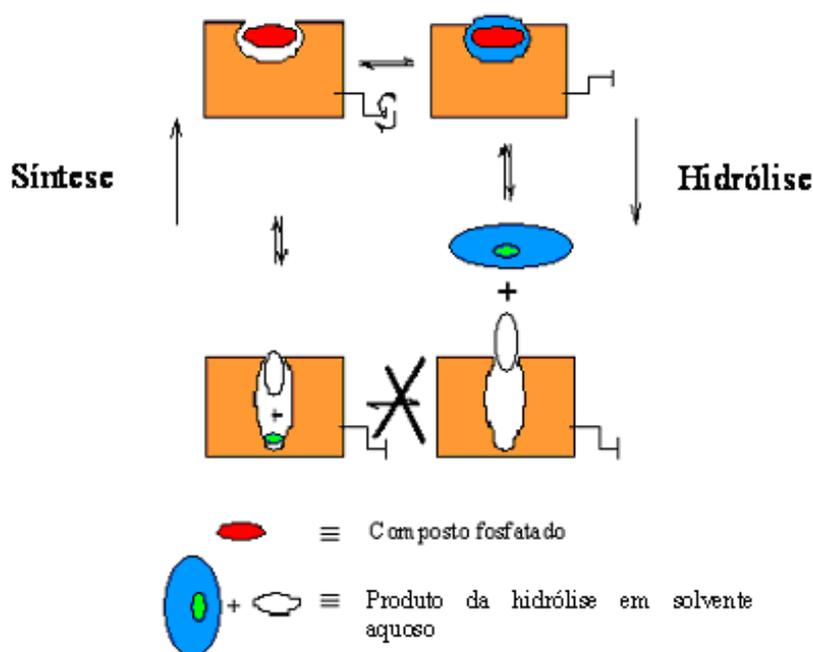


Figura 1.8. Inibição causada pela água (produto da hidrólise em meio aquoso) no sítio catalítico de uma enzima (representada em alaranjado) na síntese de compostos fosfatados ricos em energia.

A conceituação clássica de Lipmann para os compostos organofosfatados precisou ser revista, pois as energias para as reações de hidrólise e síntese do ATP e de outros compostos organofosfatados variam muito dependendo da atividade da água. De acordo com a revisão realizada por de Meis (1989; 1993), 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 (DE MEIS, 1993). Foi proposto por ele então uma redefinição para o conceito dos compostos fosfatados ricos em energia. De acordo com a nova conceituação, “ATP e outros compostos possuindo ligações do tipo fosfoanidrido são moléculas que permitem o uso de energia entrópica” (DE MEIS, 1993). Em oposição à esta classe de compostos estão os outros compostos organofosfatados, como a glicose-6-fosfato e o glicerol- α -fosfato, que apresentam uma contribuição muito pequena em entropia nas suas reações de hidrólise. Nesta situação, as energias de hidrólise quase não variam com as mudanças de pH, de concentração de sais e da composição do meio. Estes fosfoésteres de baixa energia podem, portanto, ser redefinidos

simplesmente como compostos que não permitem o uso de energia entrópica (DE MEIS, 1993).

1.1.4. Modelagem enzimática na hidrólise e síntese de compostos 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 miméticos vêm suprindo informações essenciais para a interpretação do mecanismo enzimático. A mimetização das reações biológicas de transferência do grupo fosforila tem representado um dos maiores desafios para os químicos nas últimas décadas. A transferência do grupo fosforila para a água vem a ser a mais simples das correspondentes reações *in vitro*. O mecanismo e a catálise da hidrólise do AcP, assim como de compostos relacionados, já foram bastante estudados (KOSHLAND, 1952; DI SABATO, 1961-I; DI SABATO, 1961-II; HERTSCHLAG, 1986; PHILLIPS, 1969; LAU, 1978). Da mesma forma, vários trabalhos envolvendo estudos mecanísticos da hidrólise de ésteres fosfatados forneceram contribuições muito importantes para a compreensão do papel biológico destes compostos. Estudos do mecanismo de hidrólise do ATP também já foram realizados. 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 (MACHADO, 1999). Foi observado um grande aumento na velocidade quando íons cobalto (III) coordenados participam da reação (TAFESSE, 1985).

O desenvolvimento da química supramolecular (HALL, 2004) – a química “além da molécula” (“beyond the molecule”), o estudo de conjuntos de moléculas operando coletivamente por meio de interações intermoleculares – tornou possível o planejamento de receptores de ânions capazes de realizar a catálise molecular em reações envolvendo substratos de interesse químico e biológico, tais como o AcP e o ATP. Estas 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 1.9) (BEER, 1999). Nos últimos anos, vários trabalhos nos quais é realizada a hidrólise do ATP, utilizando-se moléculas orgânicas como catalisadores, têm representado um grande avanço no conhecimento dos fatores que controlam a hidrólise enzimática do ATP (MACHADO, 1999).

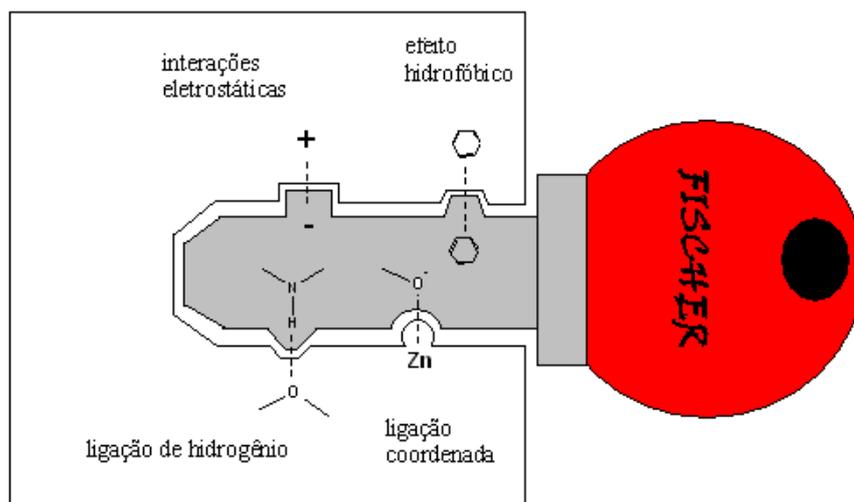


Figura 1.9. O princípio da chave e da fechadura. O sítio receptor (fechadura) é complementar ao substrato (chave). Figura adaptada da referência (BEER, 1999).

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 (NAKAI, 1977). Suzuki e col. (1973; 1975), no entanto, verificaram que o composto pentaetileno-hexamina catalisa a hidrólise do ATP com um pequeno aumento de velocidade. O desenvolvimento de moléculas com fatores catalíticos de transformação biológica e planejamento apropriado é de interesse contemporâneo não somente para a elucidação da origem da eficiência e seletividade em processos catalíticos enzimáticos, mas também no desenvolvimento de catalisadores que atuem como enzimas artificiais. A esse respeito, Lehn e col. (HOSSEINI, 1983), tiveram a idéia de utilizar várias poliaminas macrocíclicas (Figura 1.10), na catálise supramolecular da hidrólise do ATP. Estudos acompanhados por meio de espectrometria de RMN de ^{31}P demonstraram um grande aumento na sua velocidade de hidrólise. A maior aceleração de velocidade foi obtida para o macrociclo [24]- N_6O_2 , que complexa fortemente o ATP e catalisa a sua hidrólise para ADP e P_i .

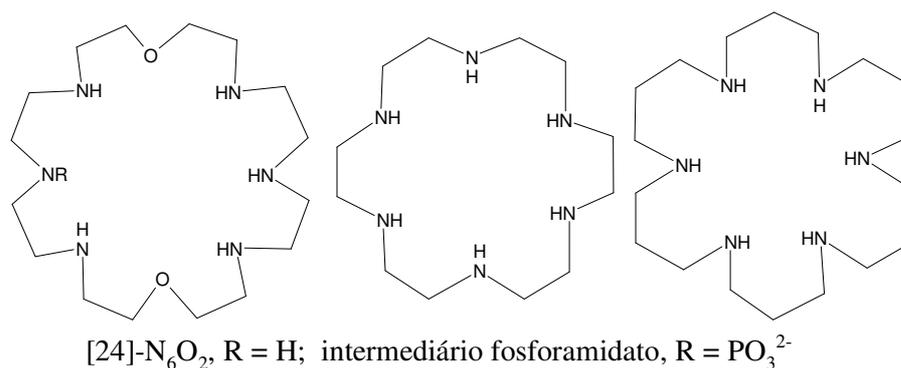


Figura 1.10. Estruturas de algumas poliaminas macrocíclicas.

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. Lehn e col. (HOSSEINI, 1983), propuseram o mecanismo desta reação da seguinte forma: inicialmente, ocorre a formação de um complexo entre o ATP e o macrociclo protonado, o qual atua como um receptor aniônico, conforme a Figura 1.11. Em seguida, ocorre uma reação no próprio complexo, que deve envolver uma combinação de catálise ácida, básica e nucleofílica.

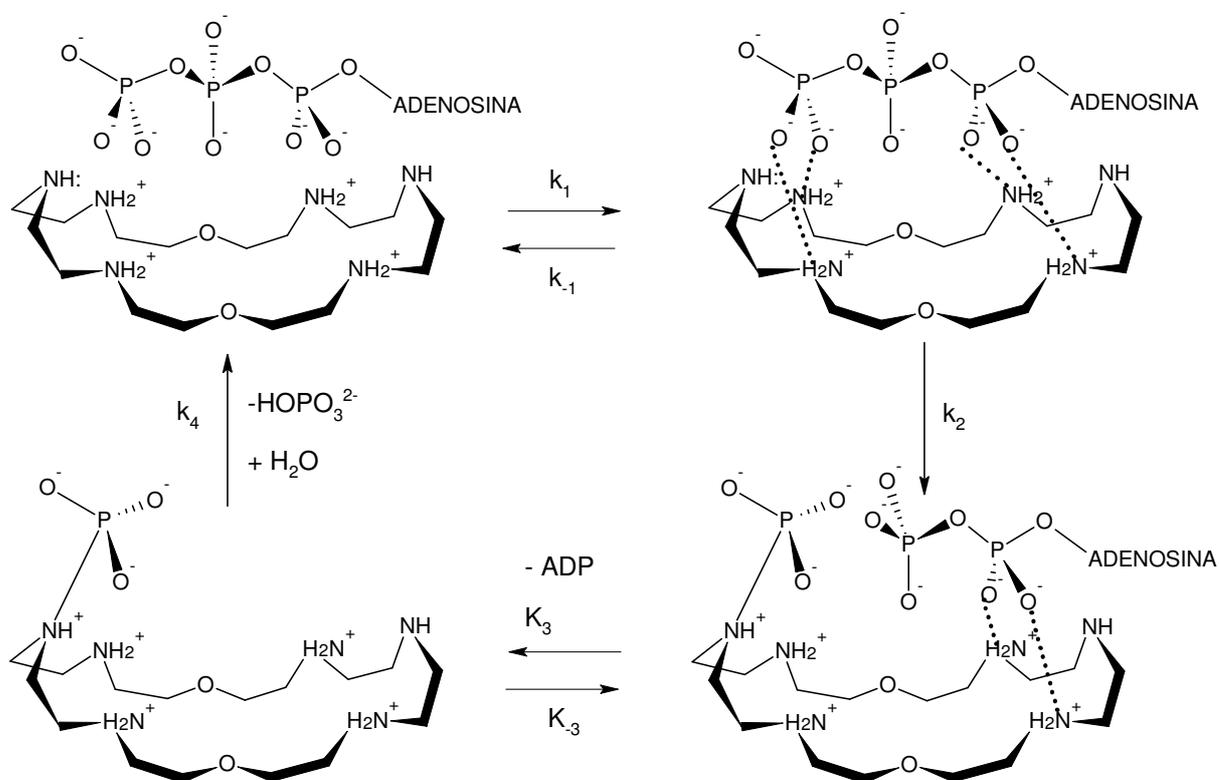


Figura 1.11. Representação esquemática da reação para desfosforilação catalisada pelo macrociclo [24]-N₆O₂. As geometrias dos complexos são hipotéticas, porém compatíveis com a estrutura potencial das espécies envolvidas. Figura adaptada da referência (LEHN, 1989).

Um intermediário fosforamidato é formado por fosforilação do macrociclo, com possível associação envolvendo interação com P_α e P_γ . A catálise se dá preferencialmente no grupo fosfato terminal e este intermediário é hidrolisado em seguida, com recuperação do catalisador. A poliamina [24]- N_6O_2 funciona, portanto como uma ATPase, e recebeu de Lehn a denominação de protoenzima (**BLACKBURN, 1987; HOSSEINI, 1987**).

Embora uma grande variedade de modelos enzimáticos tenha sido criada com o objetivo de se estudar reações nas quais ocorre a quebra de ligações químicas, modelos enzimáticos nos quais se dá a catálise da formação de ligações químicas, entre dois substratos, têm sido muito pouco estudados. A dificuldade resulta de vários fatores, tais como a presença de grupos reativos e de grupos responsáveis pela complexação das espécies químicas, situados em posições estratégicas na estrutura do receptor empregado como modelo. O processo pelo qual moléculas correceptoras aproximam os substratos e cofatores, via complexação, mediando as reações entre eles, dentro da estrutura supramolecular, foi denominada por Lehn como a cocatálise (**LEHN, 1988**). Estudos realizados na reação de hidrólise do ATP catalisada pelo [24]- N_6O_2 e por íons metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}), na presença de íons fosfato, apresentaram a ocorrência de cocatálise (**BLACKBURN, 1987; HOSSEINI, 1987; LEHN, 1988; YOHANNES, 1985**). Após a formação do intermediário fosforamidato, ocorre a complexação do íon fosfato da solução ao macrociclo protonado. Em seguida, ocorre a transferência de fosforila, do fosforamidato para o fosfato, com a formação de pirofosfato. A descomplexação do produto recupera o catalisador para um novo ciclo catalítico (Figura 1.12). Um trabalho semelhante foi realizado simultaneamente por Hosseini e Lehn (**HOSSEINI, 1985**), no qual foi explorado o princípio da cocatálise para a síntese do PP_i , a partir do AcP, empregando-se como catalisador o composto [24]- N_6O_2 .

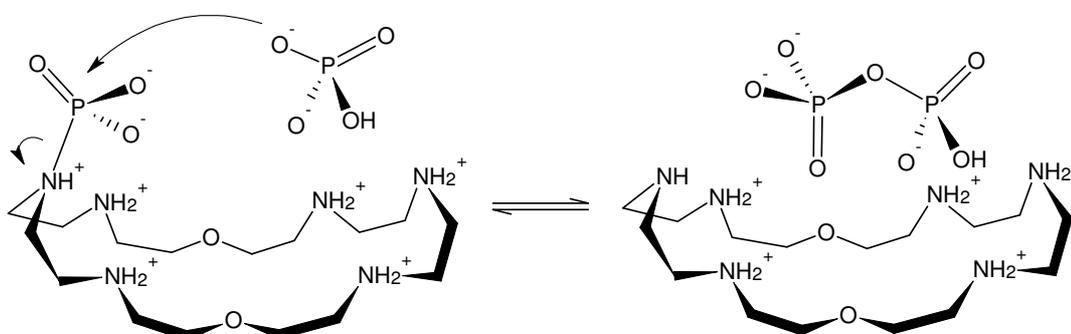


Figura 1.12. Complexação do íon fosfato e formação do PP_i por meio de um intermediário fosforamidato. Figura adaptada da referência (**HOSSEINI, 1985**).

O mesmo macrociclo foi utilizado em seguida no estudo da catálise da fosforilação de ADP pelo AcP, sintetizando-se o ATP via intermediário fosforamidato (HOSSEINI, 1988). Também foi observado que os íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} exercem um grande efeito sobre a formação de ATP. Enquanto em uma mistura de cinco equivalentes de [24]- N_6O_2 , ADP e AcP, em solução aquosa em pH neutro, somente 7,5% de ATP foi obtido, a adição de um equivalente de Mg^{2+} ao meio reacional, elevou o rendimento para 24,7% em ATP (HOSSEINI, 1991). Os autores sugeriram que as espécies reativas possam ser agrupadas na forma de um complexo ternário, envolvendo o intermediário fosforamidato, o ADP e o íon metálico (Figura 1.13).

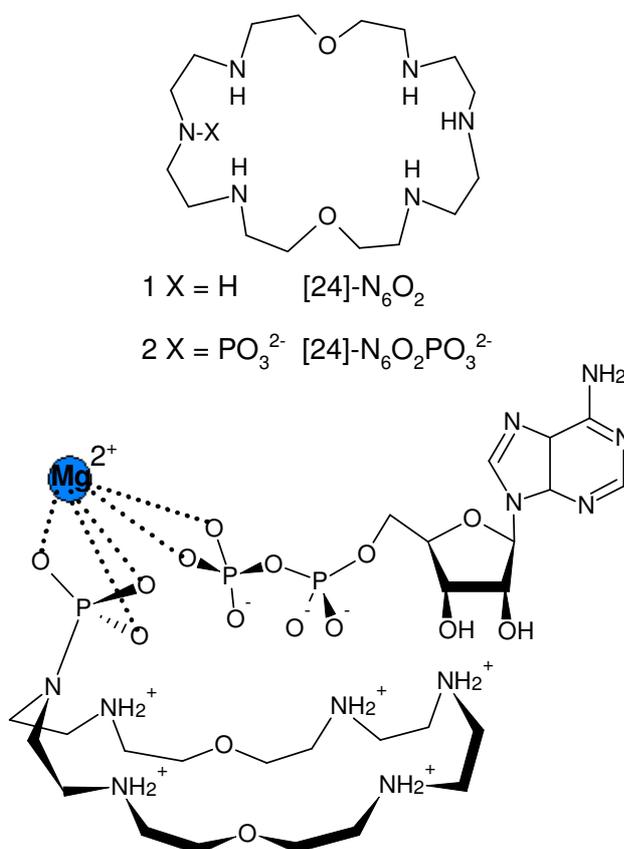


Figura 1.13. Complexo ternário formado entre [24]- $\text{N}_6\text{O}_2\text{PO}_3^{2-}$, Mg^{2+} e ADP, sugerido para explicar o aumento do rendimento na síntese do ATP. Figura adaptada de Hosseini (1991).

Neste complexo, o cátion divalente funciona como uma ponte, ligando o grupo fosforila do intermediário fosforamidato ao grupo fosforila terminal do ADP, ligado ao macrociclo. O cátion tem assim a importante função de conservar as espécies reagentes próximas, facilitando desta maneira a fosforilação (HOSSEINI, 1991).

Lehn e Fenniri (1993) 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 um sistema abiótico que produz ATP [1, AcP, Mg^{2+} , ADP] (Figura 1.13), o qual foi acoplado a receptores enzimáticos naturais que consomem ATP, resultando como produto o NADH. Outros trabalhos foram realizados empregando-se o composto [24]- N_6O_2 como mimetizador enzimático (MERTER, 1990; FENNIRI, 1996).

Recentemente, estudos de diferentes poliazafenantrolinas têm sido utilizados em estudos biomiméticos e de catálise supramolecular devido à sua capacidade de coordenação química. Lin e col. (2003), demonstraram que os compostos L1, L2 e L3 (ver figura 1.14) são seletivos para nucleotídeos em pH fisiológico e que atuam como catalisadores para a reação de hidrólise de 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.

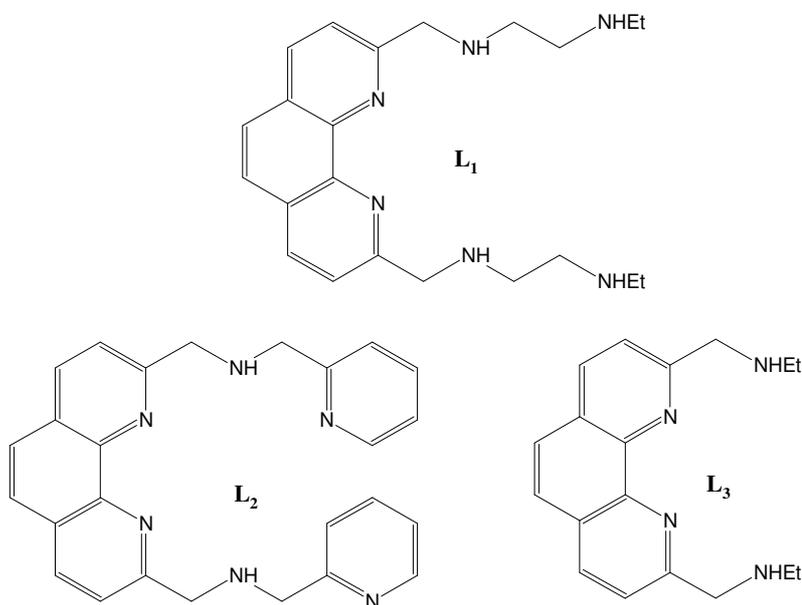


Figura 1.14. Estruturas de poliazafenantrolinas com diferentes grupos. Figura adaptada da referência (LIN, 2003).

1.1.5. Catálise por transferência de fase

A catálise por transferência de fase (CTF) é uma poderosa ferramenta em muitas áreas da química. Trata-se de uma técnica para conduzir reações entre dois ou mais reagentes em duas ou mais fases pela atuação de um agente carreador. A CTF-Líquido-Líquido (CTF-LL), descoberta por Jarrouse na década de cinquenta (**JARROUSE, 1951**), é um processo que favorece as reações entre um substrato lipofílico dissolvido em uma fase orgânica como CH_2Cl_2 , com um reagente hidrofílico solubilizado em água. Trata-se de um método muito vantajoso em reações orgânicas, sendo que a Figura 1.15 esquematiza uma CTF-LL na qual Q^+ representa um agente carreador responsável pela transferência do reagente aniônico X^- da fase aquosa para a fase orgânica, via um par iônico lipofílico Q^+X^- . A reação com o substrato lipofílico R-Y conduz à formação do produto RX (**MARCH, 2007**).

Atualmente, a CTF é amplamente aplicada nas indústrias farmacêutica, de agrotóxicos, de aromatizantes, de corantes, especialmente de polímeros e também se estende a processos de controle ambiental (**WANG, 2006**).

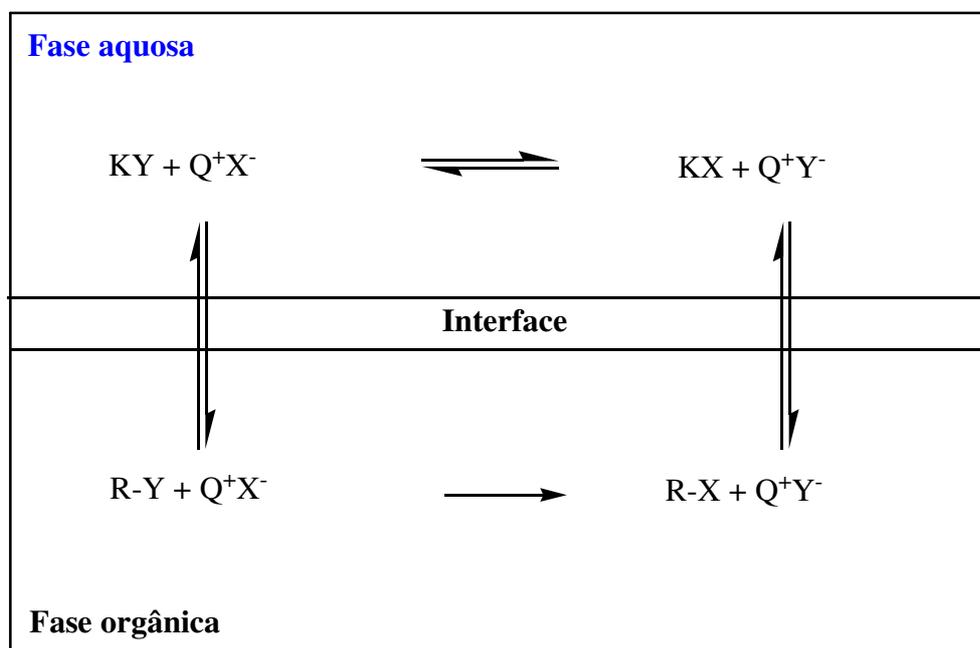


Figura 1.15. Representação esquemática da CTF-LL. Figura adaptada da referência (**MARCH, 2007**).

Os catalisadores mais empregados em CTF são sais de amônio quaternários, tais como: tetrafluoroborato de tetrabutilamônio ($(C_4H_9)_4NBF_4$), cloreto de metiltrioctilamônio (Adogen® 336), cloreto de metil-trialquil (C_8-C_{10}) amônio (Adogen® 464), cloreto ou brometo de benziltriethylamônio (TEBA ou TBA-Br), hidrogenossulfato, hidróxido e haletos de tetra-n-butilamônio e hidróxido de benziltrimetilamônio. Os poliéteres macrocíclicos, como os éteres-coroa e os criptantes (Figura 1.16), também vêm sendo utilizados como catalisadores de CTF, o que se justifica pela sua capacidade de complexação específica com cátions, permitindo a solubilização de sais orgânicos e inorgânicos de metais alcalinos em solventes orgânicos apolares (MARZORATI, 2000).

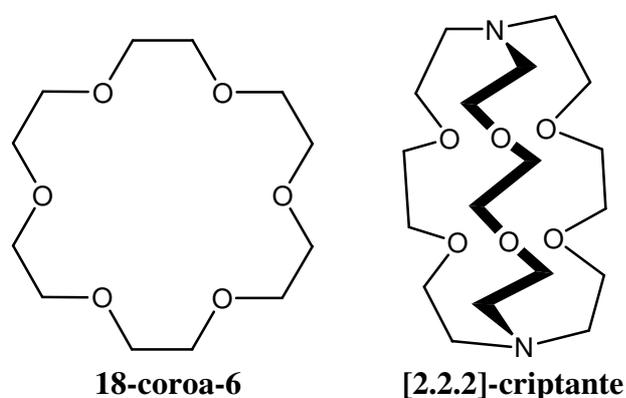


Figura 1.16. Estruturas de um éter-coroa e de um criptante.

1.2. Objetivos e justificativa

A compreensão do mecanismo de operação das enzimas representa um dos grandes desafios para os químicos nos tempos atuais (DOMINGOS, 2003; MENGER, 2005). Devido à complexidade do funcionamento das enzimas, várias teorias surgiram em busca de uma maior compreensão para a questão (DOMINGOS, 2003; MENGER, 2005). Estudos que envolvem a síntese de compostos fosfatados ricos em energia (MACHADO, 1997; MACHADO, 2000), demonstram a importância do meio na eficiência da enzima como catalisador por influenciar não somente na velocidade como também no curso da reação. Muito poucos estudos foram realizados com modelos enzimáticos apresentando elevada eficiência na formação de compostos fosfatados ricos em energia. Levando-se em consideração a importância que esta classe de compostos representa em processos biológicos de transdução de energia (MACHADO, 1999) e ainda a complexidade do mecanismo de ação

das enzimas responsáveis pela formação destes compostos (ver seção 1.1.1), pode-se ter aí uma idéia das dificuldades inerentes ao planejamento deste tipo de modelos enzimáticos.

O fósforo é um elemento vital na composição da matéria viva e não se conhece um organismo vivo que não utilize a química deste elemento. O corpo humano contém aproximadamente 1% em massa de fósforo e, embora esta quantidade de fósforo orgânico seja aparentemente pequena, seu papel é essencial nos processos celulares. A química dos fosfatos encontra-se sempre cercada de interesse atual também pelo fato de que os fosfodiésteres são os principais responsáveis pelo armazenamento e transmissão de informação genética (DNA e RNA), duas biomoléculas cruciais para a vida. Além da sua importância em processos biológicos, os ésteres de fosfato encontram aplicações em processos industriais como plastificantes, reagentes na preparação de polímeros organofosforados, complexantes para a extração de cátions de metais pesados, inseticidas, pesticidas e compostos tóxicos utilizados em armas de guerra (YANG, 1992).

A idéia recente de que compostos organofosforados, tais como ATP e o AcP – por desempenhar um papel biológico em processos de transferência de energia – formam-se espontaneamente no sítio catalítico das enzimas responsáveis por sua síntese em uma região hidrofóbica, tem modificado a maneira clássica de descrever sua formação (MACHADO, 1999; DE MEIS, 1989; DE MEIS, 1993). De acordo com esta nova descrição, amparada no conceito de que a constante de equilíbrio depende do meio no qual o processo ocorre, a energia livre é necessária somente para provocar uma mudança conformacional que leva à entrada (ou saída) de água no sítio da enzima. Assim, Machado e Nome (MACHADO, 1997; MACHADO, 2000), desenvolveram um modelo não-enzimático que representou o primeiro sistema bioorgânico que mimetizou com sucesso a síntese de um acilfosfato e demonstraram 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 principal no mecanismo de ação de enzimas responsáveis pela transferência de energia em sistemas biológicos, em conformidade com as discussões recentes sobre o assunto (DE MEIS, 1989; DE MEIS, 1993; MACHADO, 1997; MACHADO, 2000). O trabalho 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 (MACHADO, 1997; MACHADO, 2000), o que inspirou o trabalho executado aqui, o qual envolve o uso de uma estratégia supramolecular e ferramentas físico-químicas para avaliar possíveis influências do meio sobre a síntese do AcP.

1.2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar uma estratégia supramolecular que permitisse a montagem de um modelo não enzimático para a formação de AcP, um composto fosfatado rico em energia, e que considerasse a importância do papel do meio na sua formação.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Estudar as condições para a solubilização de di-hidrogenofosfato de potássio em diversos solventes orgânicos, com o uso de um agente criptante (Kryptofix® 222);
2. Estudar a formação do AcP pela reação de acetato de 2,4-dinitrofenila com di-hidrogenofosfato de potássio solubilizado em um solvente não aquoso com o uso de Kryptofix® 222 como um agente de solubilização;
3. Estudar um ciclo de formação/transformação de AcP em um sistema bifásico (água/clorofórmio ou água/diclorometano) com o uso de Kryptofix® 222 ou $(C_4H_9)_4NBF_4$ como agente carreador e de solubilização de di-hidrogenofosfato.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.2.MATERIAIS

Os solventes, acetonitrila (MeCN), clorofórmio (CHCl₃), diclorometano (CH₂Cl₂), *N,N*-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) e *N,N*-dimetilacetamida (DMA) foram purificados e guardados sobre peneira molecular (Aldrich), de acordo com a metodologia descrita no Vogel (1989). A água empregada nos experimentos foi destilada, fervida e borbulhada com nitrogênio para a remoção do dióxido de carbono. O composto 2,4-dinitrofenol (Vetec), di-hidrogenofosfato de potássio (Reagen), di-hidrogenofosfato de tetrabutilamônio (>97%; Fluka), tris(hidroximetil)aminometano, tris (Aldrich), o 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]-hexacosano (Kryptofix® 222) (Aldrich) e o tetrafluoroborato de tetrabutilamônio (C₄H₉)₄NBF₄ (Aldrich) foram usados sem purificação prévia.

Os reagentes empregados nos ensaios de caracterização e de quantificação do AcP foram usados sem purificação prévia. São eles: cloridrato de hidroxilamina (Vetec), hidróxido de sódio (Vetec), ácido acético (Vetec), acetato de sódio (Vetec), ácido clorídrico (Vetec) e cloreto férrico hexa-hidratado (Biotec).

2.2.1. Síntese do acetato de 2,4-dinitrofenila (DNPA)

O DNPA foi preparado conforme a Figura 1.17, de acordo com a metodologia descrita por Blanksma (CHATTAWAY, 1931). Foram misturados 2,4-dinitrofenol (5,43 mmol) com anidrido acético (31,8 mmol) em um béquer de 250 cm³ mantido em banho de gelo. À mistura reacional foram adicionados 0,05 cm³ de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e em seguida foi feita a homogeneização. A mistura foi deixada repousar em banho de gelo até a formação do sólido de cor esbranquiçada. O sólido obtido foi então lavado, filtrado a vácuo com água destilada gelada e em seguida seco a vácuo em dessecador. O ponto de fusão obtido foi de 71 °C (lit. 72-73°C). IV v_{\max}/cm^{-1} : 1772 (deformação axial de carbonila), 3091 e 3078 (deformação de C-H aromático), (deformação de C=C do anel aromático), 1537 (deformação

angular de CH₃), 1409 (deformação de C-C(=O)-O de acetato) e 1350 cm⁻¹ (deformação assimétrica de O-C=C).

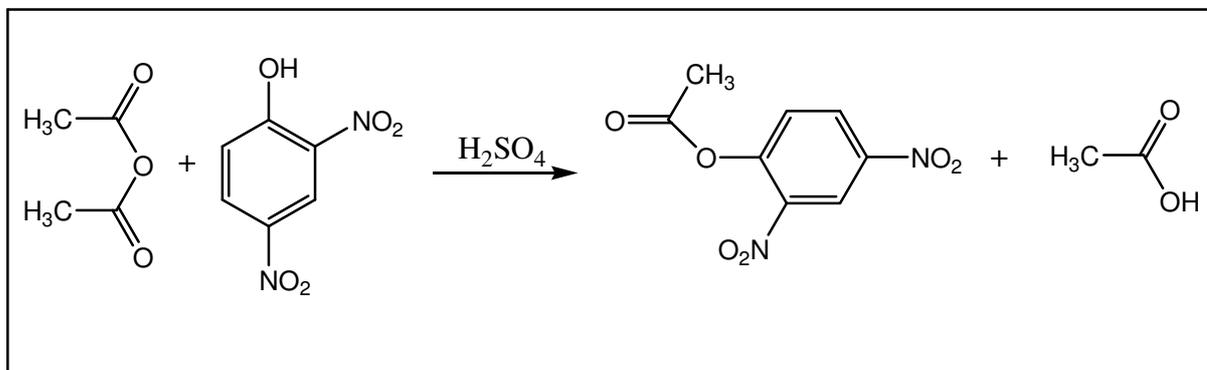


Figura 1.17. Representação esquemática da preparação do DNPA.

2.3.Métodos

Todos os espectros de UV-vis e as corridas cinéticas foram obtidos com um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50, equipado com um banho termostatizado. Os mesmos instrumentos foram empregados na obtenção dos dados cinéticos.

Os espectros de IV foram realizados em um espectrofotômetro modelo Prestige-21 da Shimadzu.

As medidas de pH foram determinadas com um peagômetro Gehaka modelo PG 2000.

As corridas cinéticas foram efetuadas sob condições de primeira ordem com um excesso de KH₂PO₄ de no mínimo 33 vezes. A solução estoque do éster foi 0,03 mol dm⁻³ nos respectivos solventes anidros citados anteriormente. Todas as reações em sistema monofásico foram iniciadas misturando-se 5,2×10⁻⁷ dm³ de uma solução estoque do Kryptofix® 222 à solução do KH₂PO₄ com o éster, equilibrada termicamente em uma cubeta de quartzo de 3,0×10⁻³ dm³ hermeticamente fechada e com 10 mm de caminho óptico. As cinéticas foram realizadas em temperaturas de 25, 30, 40, 50 e 60 °C. A concentração de DNPA na cubeta foi de 2,9×10⁻⁵ mol dm⁻³. As velocidades de transferência de acetila foram medidas seguindo-se o aumento nas absorvâncias em 424 nm (produção de 2,4-dinitrofenolato). Todas as misturas reacionais foram realizadas em condições experimentais que levaram a cinéticas estritamente de primeira ordem (*k*_{obs.}). Os valores da constante de velocidade observada de primeira ordem

(k_{obs}) foram obtidos graficamente empregando a equação 1.1, na qual A_t representa a absorbância no tempo t qualquer, A_{inf} o valor da absorbância em tempo infinito e $[A]_0$ representa a absorbância para o tempo t igual a zero. Um gráfico de $\ln(A_{\text{inf}} - A_t)$ como função do recíproco da temperatura termodinâmica forneceu uma correlação linear na qual $\ln(A)_0$ é igual ao intercepto e k_{obs} representa o coeficiente angular.

Os estudos em que foi empregado o fosfato de tetrabutílamônio foram feitos de forma análoga ao parágrafo anterior, porém não se fez necessário o uso do Kryptofix® 222 e as cinéticas foram realizadas à temperatura de 25°C com ausência de água.

Para todas as cinéticas em acetonitrila com traços de água, os valores de k_{obs} mostraram comportamento linear na concentração de $1,24 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de KH_2PO_4 . Em todas as misturas contendo água foi empregada a solução tampão tris ($1,21 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; pH 8,0).

O cálculo dos parâmetros de ativação foi feito através dos valores de k_{obs} para as reações de transferência de acetila em quatro temperaturas diferentes, variando entre 25 e 60°C. Para o cálculo, foi empregada a equação de Eyring (MASKILL, 1985), representada abaixo (eq. 1.2), na qual k_{obs} refere-se à constante de velocidade observada de primeira ordem, h a constante de Planck, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura em Kelvin e R a constante universal dos gases. ΔS^\ddagger é a variação de entropia de ativação e ΔH^\ddagger é a variação de entalpia de ativação. Um gráfico de Eyring de $\ln [k_{\text{obs}} h (k_B T)^{-1}]$ como função do recíproco da temperatura termodinâmica forneceu uma correlação linear na qual $\Delta S^\ddagger R^{-1}$ é igual ao intercepto e $\Delta H^\ddagger R^{-1}$ representa o coeficiente angular. As energias de ativação (E_a) foram fornecidas através da equação 1.3 enquanto as variações de energia livre de ativação (ΔG^\ddagger) foram calculadas a partir da equação 1.4.

$$\ln (A_\infty - A_t) = -k_{\text{obs}} t + \ln A_0 \quad (\text{eq. 1.1})$$

$$\ln [k_{\text{obs}} h (k_B T)^{-1}] = \Delta S^\ddagger R^{-1} - \Delta H^\ddagger (RT)^{-1} \quad (\text{eq. 1.2})$$

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (\text{eq. 1.3})$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad (\text{eq. 1.4})$$

O tratamento de dados fundamentado nas equações 1.1-1.4 foi feito usando-se o programa ORIGIN 5.0® para a obtenção dos parâmetros de ativação. Todos os coeficientes de correlação (r^2) situaram-se acima de 0,99, com os desvios-padrões abaixo de 9×10^{-2} .

2.4. Estudos dos produtos

O estudo dos produtos da reação do DNPA com di-hidrogenofosfato nos diversos experimentos foi feito usando-se as técnicas de IV e de UV-vis, conforme se mostra a seguir.

2.4.1. Estudos por espectrofotometria de IV

O espectro do DNPA, que apresenta uma banda de deformação axial de carbonila em 1772 cm^{-1} , foi obtido usando-se pastilha de KBr. O mesmo procedimento foi utilizado na análise dos produtos da reação do DNPA com di-hidrogenofosfato.

O procedimento descrito a seguir, para um determinado experimento, pode ser generalizado para todos os testes realizados quando o produto estiver em solução. Em um balão volumétrico de $5,0 \text{ cm}^3$ foram adicionados $5,0 \text{ }\mu\text{L}$ de KH_2PO_4 em solução aquosa ($1,24 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). Em seguida, adicionaram-se $2,0 \text{ cm}^3$ de MeCN e $270 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de Kryptofix® 222 ($3,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) em MeCN e a solução foi sonicada por 1 minuto. Foram adicionados então, $78,6 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução estoque ($9,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) do éster em MeCN, em seguida o balão foi avolumado com MeCN para o volume de $5,0 \text{ cm}^3$. O balão foi fechado e agitado à temperatura de 25°C . Após a reação haver terminado, o solvente foi removido em um evaporador rotatório e ao resíduo foi adicionado KBr seco. Essa mistura do sal com o produto da reação, foi prensada produzindo uma pastilha, a qual permitiu a observação direta do produto. O espectro de IV obtido mostrou uma banda de carbonila em 1735 cm^{-1} , ausente no espectro dos reagentes e consistente com a presença de AcP (MACHADO, 2000; HAJDU, 1980; HAJDU, 1981; WALLERBERG, 1981).

2.4.2. Identificação quantitativa do AcP

O AcP pôde ser identificado quantitativamente por uma modificação do método para a determinação de acil-fosfato de Lipmann e Tuttle (1945). Neste caso, o procedimento foi o mesmo detalhado acima (ver seção 2.3.1). Após o fim da reação de formação do AcP, o solvente foi removido e $1,0 \text{ cm}^3$ da solução de hidroxilamina foi adicionada, seguido de $2,0 \text{ cm}^3$ do tampão acetato. A mistura reacional foi deixada repousar por 10 minutos em temperatura ambiente. Logo após, $1,0 \text{ cm}^3$ de solução de ácido clorídrico e $1,0 \text{ cm}^3$ de solução de cloreto férrico foram adicionados. Foi então observado o desenvolvimento de cor púrpura, em 500 nm , devido à complexação do ácido hidroxâmico formado quantitativamente com o Fe^{3+} (Figura 1.18). A solução de cloreto férrico não absorve na região de $580\text{-}540 \text{ nm}$. A reação de formação do AcP foi seguida até o final por estudos de IV (ver seção 2.3.1), visto que a hidroxilamina também reage com o DNPA.

Os reagentes empregados neste ensaio foram preparados conforme abaixo:

- ✓ **Solução de hidroxilamina - (cloridrato de hidroxilamina - 4 mol dm^{-3})** – uma solução 28% de cloridrato de hidroxilamina (4 mol dm^{-3}), foi neutralizada por adição de um volume igual de 14% de hidróxido de sódio ($3,5 \text{ mol dm}^{-3}$). A mistura apresentou um pH de 6,4. Esta solução de hidroxilamina neutralizada é de estabilidade limitada e é melhor prepará-la diariamente através de solução estoque. A solução de cloridrato de hidroxilamina pode ser guardada por períodos longos, desde que seja mantida refrigerada;
- ✓ **Tampão acetato** – uma mistura de ácido acético e acetato de sódio foi preparada, ambos $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ em proporção 1:4, pH 5,4;
- ✓ **Ácido clorídrico** – 1 volume do ácido concentrado foi diluído com 3 volumes de água;
- ✓ **Cloreto férrico** – foi preparada uma solução 5% de cloreto férrico hexa-hidratado, em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

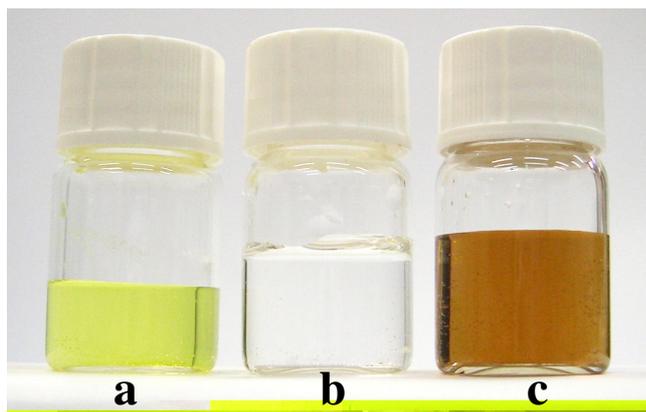


Figura 1.18. Reação de caracterização do AcP. Conversão do cloridrato de hidroxilamina ao ácido hidroxâmico (a), acidificação do meio contendo o ácido hidroxâmico formado (b) e complexação do ácido hidroxâmico em meio ácido, com ferro trivalente, formando o complexo (c).

2.4.3. Estudos em sistema bifásico água- CH_2Cl_2

Nos estudos em sistema bifásico, foi utilizada uma incubadora de bancada com agitação modelo T-420 da Tecnal com precisão no aquecimento de $\pm 0,1$ °C e ajuste rotatório de 30 a 250 rpm.

O sistema bifásico diclorometano-água utilizando como carreador Kryptofix® 222 foi estudado misturando-se o carreador (4×10^{-3} mol dm^{-3}) com o DNPA ($7,5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}) em CH_2Cl_2 para um volume total de 5 mL. A fase aquosa consistiu em uma solução do KH_2PO_4 ($2,5 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}) para um volume total de 5 mL de água tamponada (tris, $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3} ; pH 8,0). As soluções foram então misturadas em um frasco, sendo que primeiramente foi colocada a fase orgânica e depois a fase aquosa. O frasco foi a seguir vedado e mantido em repouso à temperatura de 25°C por um período de 5 dias. A seguir, a fase orgânica foi separada, seca usando sulfato de sódio anidro e filtrada. Após, o solvente foi removido e o sólido foi estudado usando-se espectrofotometria de IV e o teste de Lipmann, conforme descrito acima (ver itens 2.3.1 e 2.3.2).

Outro sistema bifásico CH_2Cl_2 -água foi estudado, utilizando como carreador o tetrafluoroborato de tetrabutylamônio ($1,5 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}). Neste caso, ele foi colocado com o DNPA ($1,5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}) em CH_2Cl_2 para um volume total de 0,1 dm^3 . Na fase aquosa, foi preparada uma solução do KH_2PO_4 ($5,0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}) para um volume total de 0,1 dm^3 em

água tamponada (tampão tris, $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3} ; pH 8,0). As soluções foram então misturadas em um frasco, sendo que primeiramente foi colocada a fase orgânica e depois a fase aquosa. O frasco foi a seguir vedado e colocado em uma incubadora de bancada com agitação rotatória de 150 rpm à temperatura de 35°C por um período de 5 dias. A seguir, a fase orgânica foi submetida ao mesmo tratamento descrito para o sistema bifásico do parágrafo anterior.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.A SOLUBILIZAÇÃO DE ÍONS FOSFATO EM SOLVENTES ORGÂNICOS

A questão da solubilização de eletrólitos em solventes orgânicos representa um problema comum que é encontrado quando se necessita solubilizar um sal inorgânico em concentrações apreciáveis em solventes orgânicos, no caso específico deste trabalho o KH_2PO_4 . Kovach (1980), e em outro trabalho independente Hajdu e Smith (1980; 1981), em seus estudos demonstraram que o acetato de potássio apresentava solubilidade em MeCN quando em presença de um éter-coroa específico. Hajdu e Smith (1980; 1981) demonstraram que a adição de acetato de potássio, em uma solução de éter-coroa em MeCN anidra, permite aos íons acetato dessolvatados reagirem facilmente com *o*-toluatos de *p*-nitrofenila por meio de adição nucleofílica direta, levando à produção de acetato de *o*-toluila. A reação representou um exemplo de conversão intermolecular de um éster em um anidrido altamente reativo, por meio de um nucleófilo carboxilato. Os resultados obtidos pelos autores providenciaram um modelo físico-químico orgânico para o possível mecanismo de reações de transferência de acila catalisada por enzimas que fazem uso da participação catalítica de um resíduo carboxilato dessolvatado.

Estudos relacionados com a ligação de ânions junto ao calix[4]pirrol realizados por Schmidtchen (2002), no qual afirmou ter solubilizado o KH_2PO_4 em MeCN utilizando um agente criptante – tendo em vista a capacidade dele para associar-se ao íon potássio – inspirou este trabalho, a utilização do agente criptante Kryptofix® 222 para solubilizar o KH_2PO_4 com teor mínimo de água e em uma concentração suficiente para realizar-se os estudos cinéticos. A concentração mínima de água empregada no sistema para a solubilização do sal foi igual a $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$, e revelou ser fundamental para que as forças iônicas do retículo cristalino do sal possam ser vencidas, facilitando o papel do agente criptante em solubilizar o sal. O emprego do Kryptofix® 222 mostrou ser viável para solubilizar o sal na ordem de $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ em MeCN, CH_2Cl_2 , DMF, DMSO e DMA com traços de água, suficiente para a realização dos estudos. Ao final deste trabalho, foi verificado também que o ânion di-hidrogenofosfato pode ser solubilizado em solventes orgânicos na forma de di-

hidrogenofosfato de tetrabutilamônio em uma concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Desta forma, corridas cinéticas puderam ser efetuadas e foram feitas comparações com o sistema estudado na presença do agente criptante (ver seção 3.5).

3.2.Reação do DNPA com o di-hidrogenofosfato dessolvado

A adição de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) em MeCN na presença de um agente criptante (Kryptofix® 222) permite aos íons di-hidrogenofosfato dessolvados reagirem facilmente com o éster (DNPA), por meio de substituição acílica nucleofílica (Figura 1.19). O AcP é produzido e o 2,4-dinitrofenolato é liberado.

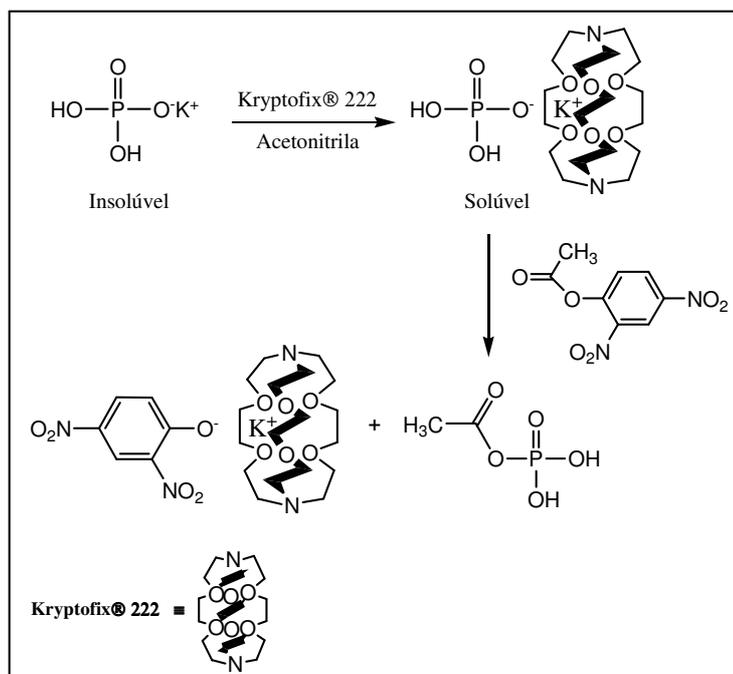


Figura 1.19. Representação esquemática da reação de formação do AcP.

A reação entre o di-hidrogenofosfato dessolvado e o DNPA na presença de Kryptofix® 222 foi realizada em MeCN, CH_2Cl_2 , acetona, DMF, DMSO e DMA e em diversas misturas MeCN-água à temperatura de 25°C . A Figura 1.20 mostra uma seqüência de espectros de UV-vis que corresponde à reação do DNPA com o di-hidrogenofosfato na presença de Kryptofix® 222 em MeCN com traços de água. Pode ser visto que à medida que o tempo passa, a intensidade das bandas aumenta em 372 e em 424 nm, ocorrendo um ponto isobéstico em 310 nm. Estas bandas correspondem à formação de 2,4-dinitrofenolato. As

constantes de velocidade para a reação foram determinadas pelo acompanhamento da formação de 2,4-dinitrofenolato em 424 nm (Figuras 1.20 e 1.21).

Uma curva analítica foi construída para o 2,4-dinitrofenol em cada solvente, relacionando-se a sua concentração com os valores de absorbância em 424 nm, conforme representados na Figura 1.22 para o 2,4-dinitrofenol em acetonitrila. Foi obtido um valor de $\epsilon_{\text{máx.}}$ igual a $1,94 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a banda tendo o seu máximo de absorbância em 424 nm. Os espectros de UV-vis foram feitos para os produtos da reação após cada cinética ter terminado e os valores de absorbância foram obtidos em 424 nm. Com isso, pôde ser verificado que a reação aconteceu até todo o éster ser consumido: ou seja, para cada equivalente do DNPA consumido, um equivalente de 2,4-dinitrofenolato foi produzido. A estequiometria da reação foi ainda determinada comparando-se o espectro de absorção da mistura reacional após a reação ter chegado ao fim com o espectro de 2,4-dinitrofenolato preparado com igual concentração. A análise de espectros de IV ao final da reação (ver a seção 2.3.1 de parte experimental) revelou a inexistência da carbonila do éster, que deveria ter aparecido em 1772 cm^{-1} .

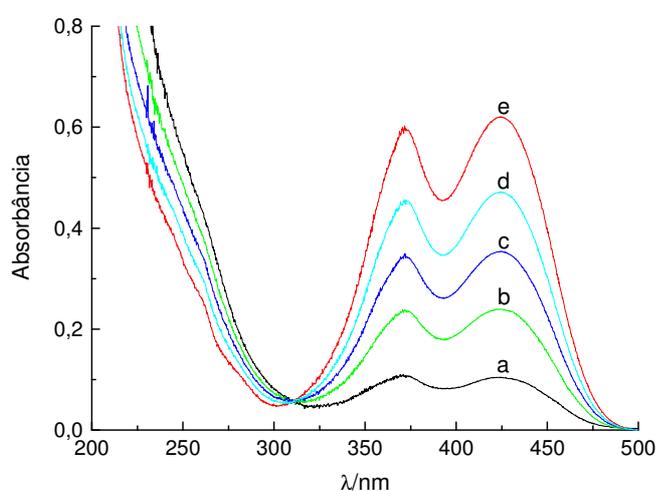


Figura 1.20. Mudanças espectrais decorrentes da reação entre DNPA ($2,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), di-hidrogenofosfato ($1,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) e Kryptofix® 222 ($2,8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) em MeCN com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água à temperatura de 40°C . Os espectros são mostrados em 60 (a), 180 (b), 300 (c), 540 (d) e 7800 s (e). A curva final mostra o espectro dos produtos da reação.

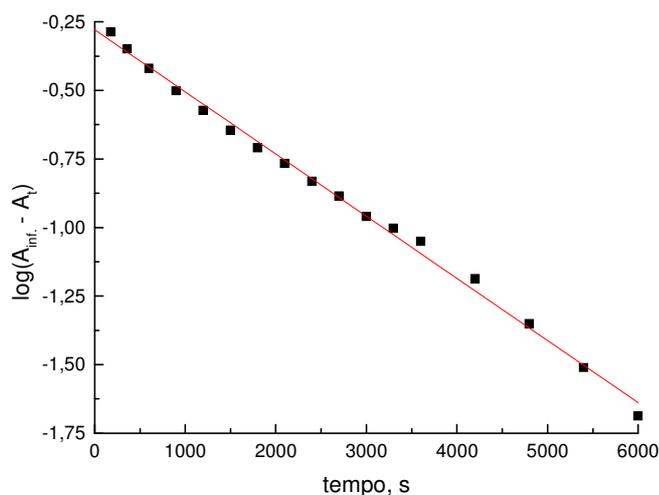


Figura 1.21. Gráfico de $\log(A_{\infty} - A_t)$ em função do tempo para a reação entre DNPA ($2,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) e íon di-hidrogenofosfato ($1,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) na presença de Kryptofix® 222 ($2,8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) à temperatura de 40°C . As absorbâncias foram extraídas para o $\lambda_{\text{máx}} = 424 \text{ nm}$ (aparecimento do 2,4-dinitrofenolato).

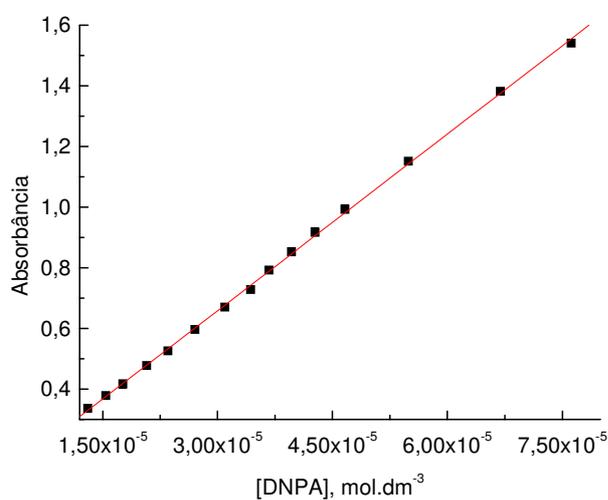


Figura 1.22. Curva analítica para o 2,4-dinitrofenol em MeCN. As absorbâncias foram coletadas em $\lambda_{\text{máx}} = 424 \text{ nm}$. Obteve-se a seguinte equação: $Y = 0,0762(\pm 0,0052) + 19415,20589(\pm 128,63868) X$, que foi empregada nos cálculos dos rendimentos das reações.

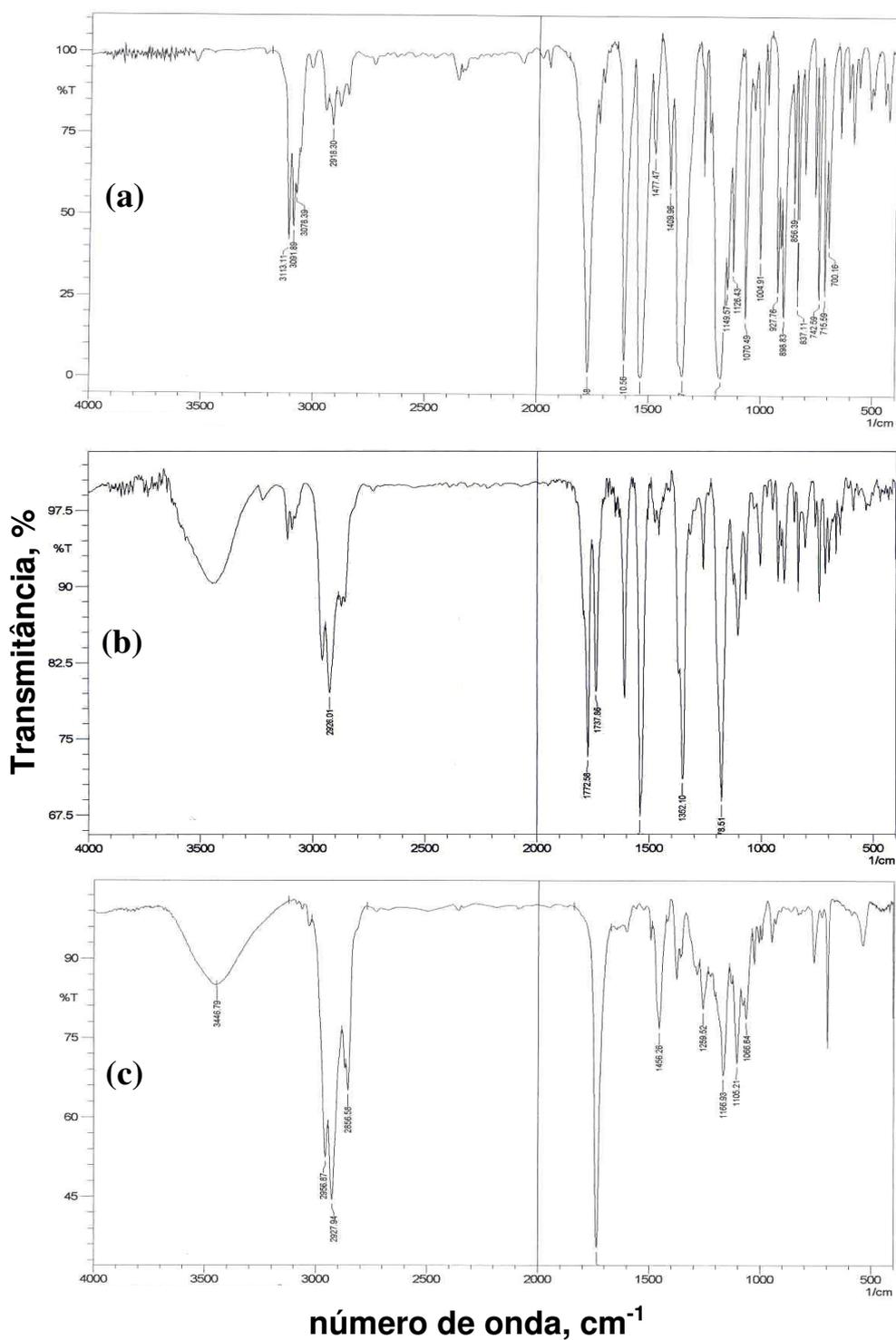


Figura 1.23. Espectros de IV. (a) Espectro do reagente DNPA, apresentando banda em 1772 cm^{-1} ; (b) espectro da reação entre DNPA, di-hidrogenofosfato de potássio e Kryptofix® 222 em MeCN, após 2 horas de reação, com diminuição na intensidade da banda em 1772 cm^{-1} com surgimento da banda em 1735 cm^{-1} ; (c) após o final da reação, com total desaparecimento da banda em 1772 cm^{-1} .

A formação do AcP foi confirmada pelo espectro de IV dos produtos da reação em MeCN. A presença da banda de carbonila em 1735 cm^{-1} , inexistente nos espectros dos reagentes, forneceu forte evidência para a presença de AcP (ver seção 2.3.1 da parte experimental). A análise de diferentes momentos da reação revelou que enquanto a banda de carbonila do éster de partida (DNPA) vai decrescendo com o tempo, a banda correspondente ao produto, em 1735 cm^{-1} vai aumentando em intensidade, até o final da reação (Figura 1.23).

A formação do AcP pôde ser observada através do teste de Lipmann e Tuttle (HOSSEINI, 1983; LEHN, 1989; HOSSEINI, 1988). Assim, a obtenção ao final do teste de uma solução apresentando cor púrpura, com $\lambda_{\text{máx}}$ em 500 nm, forneceu outra importante evidência de que o produto AcP foi formado (ver Figuras 1.18 e 1.23). Foi determinada a absorvidade molar para o complexo Fe^{3+} -ácido hidroxâmico formado ($\epsilon_{\text{máx}} = 968,6\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) aplicando-se o teste de Lipmann para o DNPA (figura 1.24). Este resultado é utilizado classicamente para a detecção visual e quantitativa de resíduos acil-fosfatados (HOSSEINI, 1983; LEHN, 1989; HOSSEINI, 1988), e baseia-se na reação do acil-fosfato com hidroxilamina para a formação de ácido hidroxâmico, o qual pode ser fortemente complexado com Fe(III) para a formação de um complexo do tipo tris(hidroxamato)Fe(III), o qual absorve fortemente na região de 500 nm.

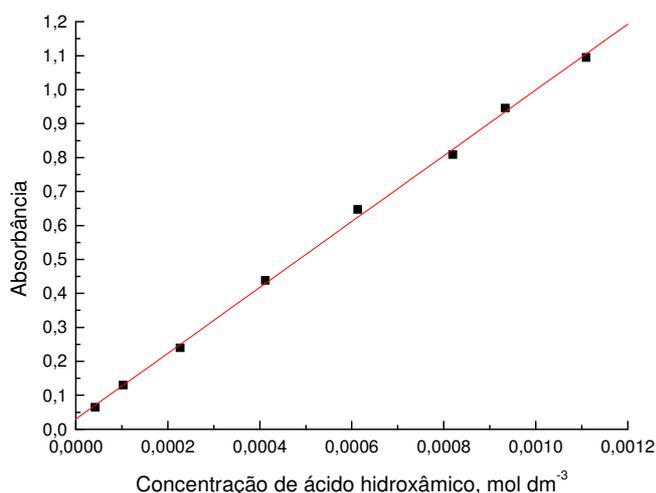


Figura 1.24. Curva analítica para a determinação de AcP. As absorvâncias foram coletadas em $\lambda_{\text{máx}} = 500\text{ nm}$. Obteve-se a seguinte equação: $Y = 0,03015(\pm 0,0089) + 968,60912(\pm 13,68559) X$, que foi empregada nos cálculos dos rendimentos das reações.

A equação obtida foi empregada para se determinar o rendimento dos produtos. Verificou-se que a formação do AcP nestes experimentos efetuados nos solventes orgânicos com traços de água é quantitativa, ou seja, cem por cento do AcP foi formado mesmo com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água.

3.3. Influência da concentração de água nas constantes de velocidade observadas

A adição de pequenas quantidades de água acarreta sensíveis mudanças nos parâmetros cinéticos da reação do DNPA com di-hidrogenofosfato a 40°C (ver Tabela 1.4). O sistema aqui estudado requereu $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água em MeCN, com um valor de k_{obs} igual a $5,22 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Quando $0,95 \text{ mol dm}^{-3}$ de água está presente no meio, o valor de k_{obs} mudou para $1,36 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, correspondendo a uma diminuição de 50,7 vezes na constante de velocidade observada. Os dados da Tabela 1.4, com exceção do solvente anidro, estão dispostos na forma de um gráfico das constantes de velocidade observadas como função da quantidade de água adicionada (Figura 1.25) e corroboram os resultados apresentados, indicando que a velocidade da reação sob estudo é fortemente diminuída pela adição de água. Estes dados experimentais foram ajustados à uma curva polinomial de quarta ordem a fim de se estimar o valor de k_{obs} , resultando um valor igual a $6,89 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

O decréscimo de 50,7 vezes no valor da constante de velocidade para a reação quando se adiciona 1,71% (em massa) de água (para fornecer uma concentração igual a $0,95 \text{ mol dm}^{-3}$) corresponde a uma mudança no tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a reação de 1004,6 s para 50944 s. Nestas condições, não foi detectada, por meio do teste de Lipmann e por espectrofotometria de IV, a formação de AcP, sugerindo que em uma concentração de água igual ou maior a esta o fosfato atua como um catalisador básico geral, hidrolisando o éster. Assim, a inibição na velocidade da reação de transferência de acila está relacionada com solvatação preferencial do di-hidrogenofosfato pela água, o que diminui a sua habilidade nucleofílica e aumenta simultaneamente a sua atuação como um catalisador básico geral (JENCKS, 1972) em reações hidrolíticas.

Tabela 1.4. Influência da água sobre a velocidade da reação do DNPA com o KH_2PO_4 e Kryptofix® 222 em MeCN a 40°C .^a

$[\text{H}_2\text{O}]$, mol dm^{-3}	% em massa água	$10^4 k_{\text{obs}}$, s^{-1}	$t_{1/2}$, s
0,00 ^b	0,00	6,89 ^b	1004,6
0,045	0,08	5,22	1327,7
0,11	0,2	3,67	1887,8
0,13	0,23	3,43	2022,5
0,15	0,27	2,57	2700,6
0,16	0,3	2,39	2901,8
0,33	0,60	1,19	5812,0
0,54	0,97	0,605	11449,2
0,95	1,71	0,136	50944,2

^aTodas as medidas cinéticas foram efetuadas com $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de KH_2PO_4 , usando solução tampão (tris $1,21 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; pH 8,0) ^b Calculado por meio do ajuste dos dados cinéticos a uma equação polinomial de quarta ordem.

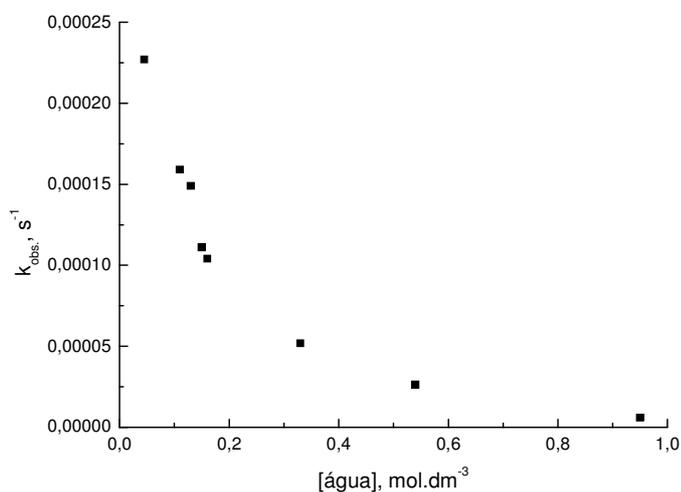


Figura 1.25. Influência da adição de água sobre a velocidade da reação do DNPA com o KH_2PO_4 na presença de Kryptofix® 222 em MeCN a 40°C . Foi empregada em todos os casos uma concentração igual a $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de nucleófilo.

3.4. Parâmetros de ativação

Os gráficos da absorbância em 424 nm em função do tempo para a reação do DNPA com di-hidrogenofosfato foram utilizados para se observar a influência da temperatura com o tempo de formação dos produtos. Na Figura 1.26 pode-se observar que o decréscimo da temperatura do sistema, conduz a um aumento no tempo de formação dos produtos. A influência da temperatura na velocidade da reação podendo ser confirmado na Tabela 1.5 quando comparado os valores dos k_{obs} em diferentes temperaturas. Os parâmetros de ativação foram calculados a 25, 30, 40, 50 e 60°C para a reação do DNPA com di-hidrogenofosfato de potássio na presença do criptante em MeCN com 0,045 e 0,11 mol dm⁻³ de água (Figuras 1.27 e 1.28), em DMA com 0,045 mol dm⁻³ de água (Figuras 1.29 e 1.30) e com o DMF na presença de 0,045 mol dm⁻³ de água (Figuras 1.31-1.32).

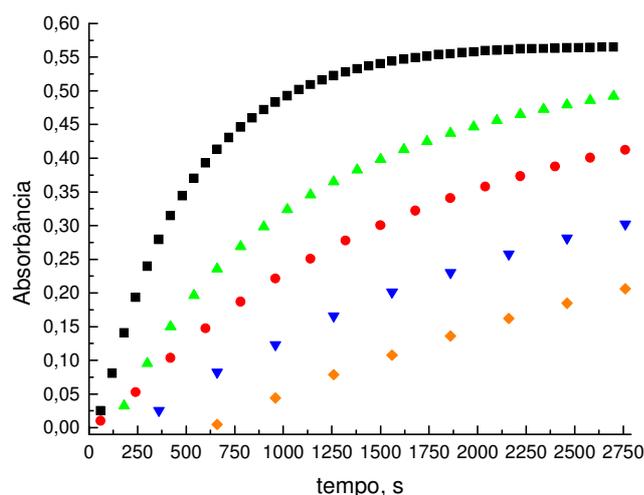


Figura 1.26. Gráfico da absorbância vs. tempo para a reação entre o DNPA (2×10^{-5} mol dm⁻³) íon di-hidrogenofosfato ($1,2 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) e Kryptofix® 222 ($2,8 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) em MeCN com 0,045 mol dm⁻³ de água às temperaturas de 25°C (◆), 30°C (▼), 40°C (●), 50°C (▲) e 60°C (■). As absorbâncias foram obtidas em $\lambda_{m\acute{a}x} = 424$ nm (aparecimento do 2,4-dinitrofenolato). Todas as curvas cinéticas tiveram uma absorbância infinita coincidindo em 0,56, mas para uma melhor comparação dos dados experimentais, com exceção da curva cinética a 60°C, em todas as outras foram omitidos dados experimentais.

Tabela 1.5. Influência da temperatura na constante de velocidade da reação de DNPA em KH_2PO_4 em acetonitrila com água adicionada.^a

$[\text{H}_2\text{O}]$, mol dm^{-3}	T , $^{\circ}\text{C}$	$10^4 k_{\text{obs}}$, s^{-1}
0,045	25	1,86
	30	2,52
	40	5,22
	50	9,82
	60	21,2
0,11	25	1,03
	30	1,41
	40	3,67
	50	6,90
	60	14,1

^a Todas as corridas cinéticas de pseudo primeira ordem foram efetuadas com concentração de di-hidrogenofosfato de potássio igual a $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

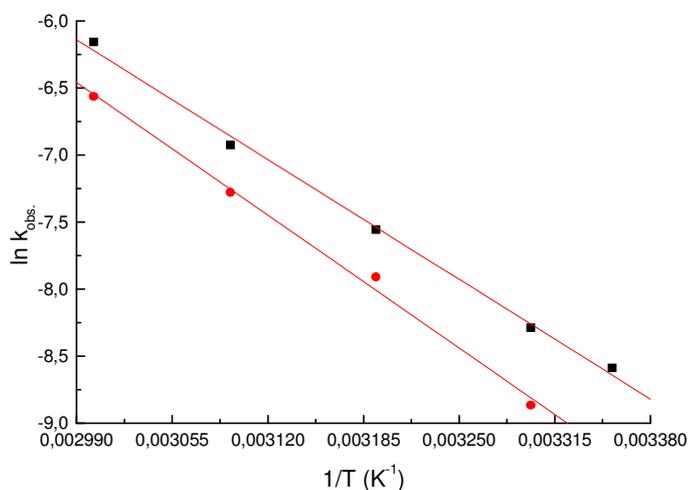


Figura 1.27. Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}$ vs. $1/T$ (K^{-1}) para a reação do DNPA com o íon H_2PO_4^- e Kryptofix® 222 em MeCN com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ (■) ($r^2 = 0,998$; $\text{sd} = 0,0645$; $a = 14,4$; $b = -6,87 \times 10^3$) e $0,11 \text{ mol dm}^{-3}$ (●) ($r^2 = 0,998$; $\text{sd} = 0,0822$; $a = 16,3$; $b = -7,62 \times 10^3$) de água.

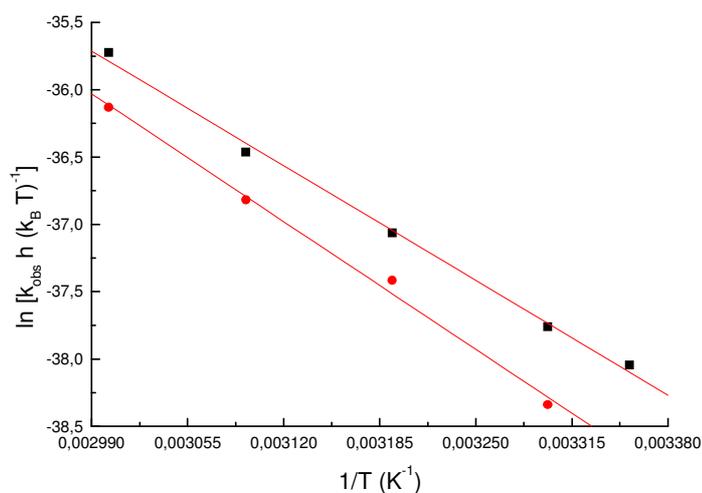


Figura 1.28. Gráficos de $\ln [k_{\text{obs}} h (k_B T)^{-1}]$ vs. $1/T (K^{-1})$ para a reação do DNPA com o íon H_2PO_4^- e Kryptofix® 222 em MeCN na presença de $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ (■) ($r^2 = 0,998$; $\text{sd} = 0,0639$; $a = -16,1$; $b = -6,56 \times 10^3$) e com $0,11 \text{ mol dm}^{-3}$ (●) ($r^2 = 0,998$; $\text{sd} = 0,0826$; $a = -14,2$; $b = -7,30 \times 10^3$) de água.

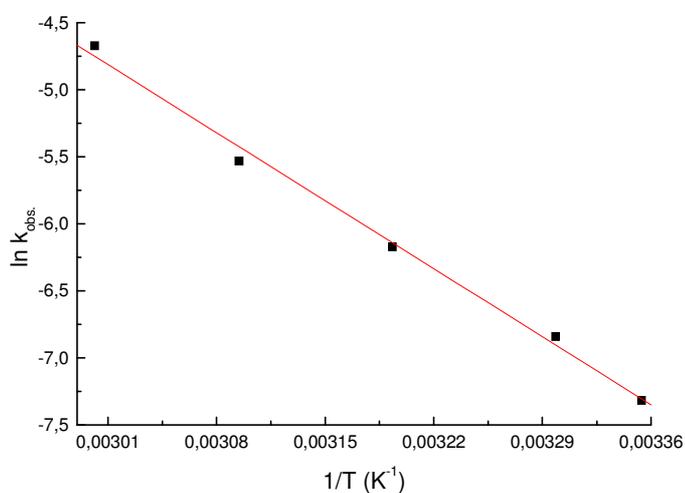


Figura 1.29. Gráficos de $\ln k_{\text{obs}}$ vs. $1/T$ para a reação do DNPA com o íon H_2PO_4^- e Kryptofix® 222 em DMA na presença de $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água ($r^2 = 0,998$; $\text{sd} = 0,08755$; $a = 17,0$; $b = -7,24 \times 10^3$).

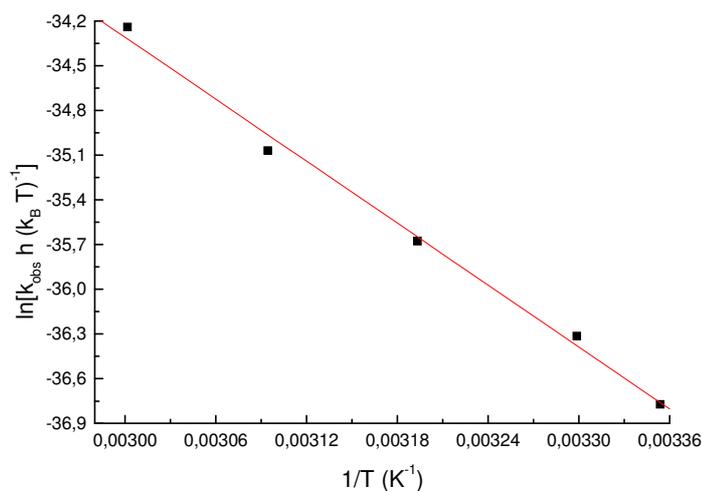


Figura 1.30. Gráficos de $\ln [k_{\text{obs}} h (k_B T)^{-1}]$ vs. $1/T (K^{-1})$ para a reação do DNPA com o íon H_2PO_4^- e Kryptofix® 222 em DMA na presença de $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água ($r^2 = 0,998$; $\text{sd} = 0,0870$; $a = -13,5$; $b = -6,93 \times 10^3$).

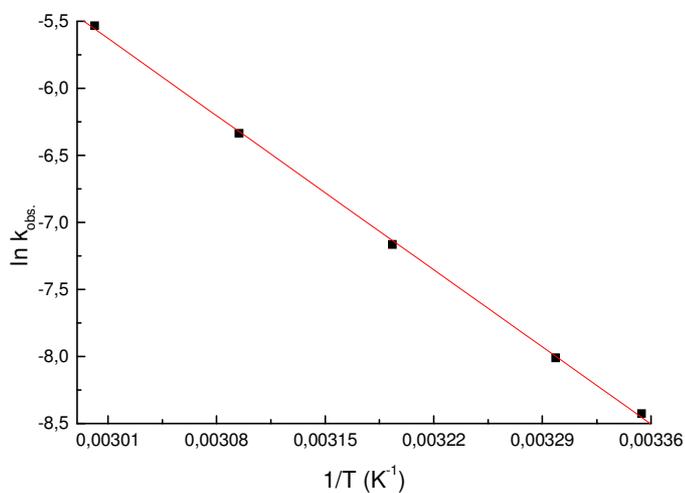


Figura 1.31. Gráficos de $\ln k_{\text{obs}}$ vs. $1/T$ para a reação do DNPA com o íon H_2PO_4^- e Kryptofix® 222 em DMF com $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água ($r^2 = 0,999$; $\text{sd} = 0,0303$; $a = 19,1$; $b = -8,22 \times 10^3$).

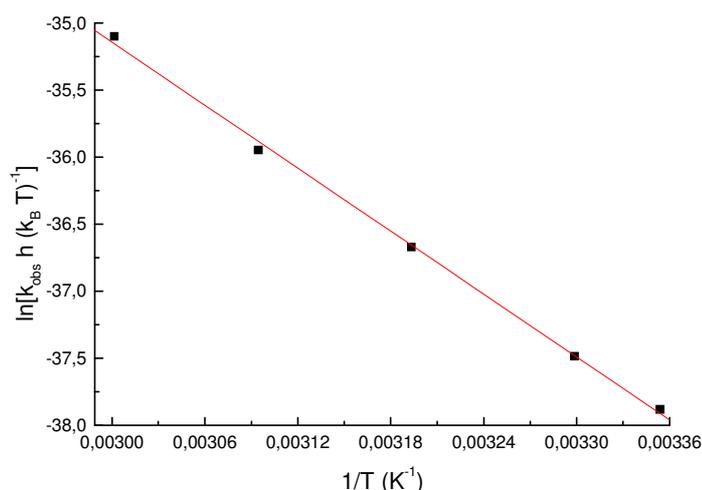


Figura 1.32. Gráficos de $\ln [k_{\text{obs}} h (k_{\text{B}} T)^{-1}]$ vs. $1/T (K^{-1})$ para a reação do DNPA e Kryptofix® 222 em DMF com o íon H_2PO_4^- na presença de $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água ($r^2 = 0,999$; $\text{sd} = 0,0531$; $a = -11,7$; $b = -7,83 \times 10^3$).

Por meio de gráficos de Arrhenius (Figuras 1.27, 1.29 e 1.31) foram determinados os valores de E_a . Os gráficos de Eyring (Figuras 1.28, 1.30 e 1.32) foram usados para a obtenção dos valores de ΔH^\ddagger e de ΔS^\ddagger . Os valores de ΔG^\ddagger foram obtidos através da equação 1.3 (ver parte experimental).

De acordo com a Tabela 1.6, os valores de ΔH^\ddagger crescem com o aumento da concentração de água no meio reacional, refletindo o decréscimo agudo na nucleofilicidade do íon fosfato. As mudanças na ΔS^\ddagger são significativas com valores elevados e negativos ($-97,0$ a $-133,9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Com a adição de $0,12 \%$ de água o ΔS^\ddagger torna-se menos negativos em $16 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, provavelmente, porque a água impede a formação de um possível estado de transição associativo envolvendo a participação do DNPA e do íon H_2PO_4^- (Figura 1.33) (MACHADO, 2000).

proporciona a diminuição da atividade de água no sítio da enzima. Quando assim ocorre, é observado um grande aumento da afinidade da enzima por P_i . Estas mudanças seriam responsáveis pelo ciclo catalítico que conduz à síntese do ATP (**GRESSER, 1982**). Portanto, cada sítio ocorre alternando-se entre os três estados conformacionais como ATP-hidrolase ou, na direção reversa, como ATP-sintase (**CAPALDI, 2002**). O mecanismo de mudança de ligação (**BOYER, 2000**) tem sido bastante utilizado para explicar a síntese do ATP pelas ATP sintases (**CROSS, 1981; AMZEL, 1983; BOYER, 1993; AMZEL, 1994; PENEFSKY, 1960; LEHNIGER, 2002; CHOATE, 1979; PENEFSKY, 1991; CROSS, 1994**). Este modelo estabelece que a síntese do ATP ocorre espontaneamente no sítio catalítico da enzima e que energia é necessária somente para soltar o ATP formado. Como isto pode ser alcançado não é conhecido, mas pode ser que a capacidade para a transformação química seja 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 (**BOYER, 2002**). Em comparação, de Meis (**1989**) demonstrou ser possível evidenciar experimentalmente que a presença de solventes orgânicos vem a facilitar a síntese de compostos ricos em energia no sítio ativo da enzima. Isto ocorre porque há um decréscimo na concentração de água no sítio catalítico, e, por conseqüência, ocorre um aumento na afinidade da enzima por P_i (**DE MEIS, 1989**).

O fato experimental da reação em acetonitrila anidra, diferir de maneira significativa dos valores ocorridos na presença de quantidades pequenas de água, e completamente da observada em sistemas aquosos (**MACHADO, 2000**), demonstra que o estudo de reações de importância bioquímica em sistemas puramente aquosos pode, em muitas situações, não contribuir de forma adequada para a compreensão da catálise enzimática. A existência de regiões hidrofóbicas no sítio catalítico de uma enzima particular faz com que a água não se torne um estado padrão adequado para a comparação de constantes de velocidade (**HAJDU, 1980; HAJDU, 1981; WALLERBERG, 1981**).

Em reações que envolvem ataque nucleofílico, a nucleofilicidade do ânion é determinada, entre outras coisas, pela sua basicidade e sua polarizabilidade, sendo que uma ou outra prevalece. Tanto a polarizabilidade quanto a basicidade são fortemente influenciadas pelo solvente. Os solventes aceitadores de ligações de hidrogênio, tais como MeCN, acetona, DMF, DMSO e DMA, por não solvatarem fortemente o ânion permitem a ele exibir sua verdadeira nucleofilicidade, podendo desta forma contribuir para o ânion dessolvatado realizar o ataque nucleofílico (**HAJDU, 1981**). Os dados mostrados na Tabela 1.7 demonstram que a utilização de um agente solubilizante (Kryptofix®222) para estabilizar o

sal KH_2PO_4 (ver seção. 2.2) em meio orgânico proporcionou ao íon di-hidrogenofosfato dessolvado uma grande habilidade para atuar como nucleófilo.

Tabela 1.7. Influência do meio na velocidade da reação do DNPA com KH_2PO_4 na presença de Kryptofix® 222 em solventes orgânicos contendo $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água a 25°C .

Solvente	Número doador		
	(ND) kJ mol^{-1}	$10^4 k_{\text{obs}}$, s^{-1}	$t_{1/2}$, s
Diclorometano	6,69	0,959	7224,6
Clorofórmio	16,7	-	-
MeCN	59,0	1,86	3724,4
Acetona	71,1	2,02	3422,6
DMF	111	2,19	3161,8
DMA	116	6,66	1040,6
DMSO	125	8,14	851,7

Todas as corridas cinéticas foram realizadas sob condições de primeira ordem, utilizando-se $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ de DNPA. O nucleófilo di-hidrogenofosfato foi empregado em excesso (no mínimo 30 vezes mais em relação ao éster).

Quando fez-se reagir DNPA com di-hidrogenofosfato de tetrabutílamônio para a preparação do AcP (Tabela 1.8) com os mesmos solventes orgânicos descritos na Tabela 1.7, pôde-se observar um aumento muito expressivo nos valores de k_{obs} quando os valores das tabelas são comparados. Como já discutido, a água influencia fortemente a velocidade da reação de modo que pequenas quantidades de água são suficientes para diminuir o valor de k_{obs} . Na Tabela 1.7 as cinéticas foram realizadas na presença de $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ de água, para efeito de solubilidade do KH_2PO_4 , o que faz com que os valores observados para o k_{obs} sejam menores quando comparados aos valores de k_{obs} da Tabela 1.8 onde o di-hidrogenofosfato de tetrabutílamônio não apresenta problemas de solubilidade. As cinéticas foram realizadas à temperatura de 25°C com exceção da reação ocorrida em DMF, a qual precisou ser efetuada em uma temperatura menor (15°C), pois em temperaturas maiores a velocidade da reação é muito rápida para ser medida usando-se o equipamento disponível no laboratório. As constantes de velocidade não puderam ser medidas para DMA e DMSO devido à rapidez do processo, mesmo a 15°C (Tabela 1.8). Em todas estas reações em que foi utilizado o fosfato

de tetrabutilamônio apresentaram-se positivas para o teste de Lipmann (ver item 2.4.2), demonstrando que o AcP foi formado quantitativamente. Os espectros de IV demonstraram que ao final do processo apenas a banda de estiramento de carbonila do AcP pôde ser visualizada.

Tabela 1.8. Influência do meio na velocidade da reação do DNPA com di-hidrogenofosfato de tetrabutilamônio em solventes orgânicos a 25°C.

Solvente	Número doador		
	(ND) kJ mol ⁻¹	10 ⁴ <i>k</i> _{obs} , s ⁻¹	<i>t</i> _{1/2} , s
Diclorometano	6,69	10,9	635,9
Clorofórmio	16,7	38,4	180,5
MeCN	59,0	52,8	131,3
Acetona	71,1	494,9	14,0
DMF	111	3168,4 ^a	2,2 ^a
DMA	116	b	-
DMSO	125	b	-

Todas as corridas cinéticas foram realizadas sob condições de primeira ordem, utilizando-se 3,0×10⁻⁵ mol dm⁻³ de DNPA. O nucleófilo di-hidrogenofosfato foi empregado em excesso (no mínimo 30 vezes mais em relação ao éster). ^a À temperatura de 15°C. ^b As constantes de velocidade não puderam ser medidas devido à rapidez do processo, mesmo a 15°C.

A habilidade dos solventes para interagirem em processos físico-químicos por meio da ‘doação’ de pares de elétrons resultou no conceito da capacidade doadora, que foi quantificada por Gutmann na forma de números doadores (ND) para os solventes (REICHARDT, 2004). A capacidade doadora foi definida por Gutmann como o valor negativo da variação de entalpia para o complexo formado com estequiometria 1:1 entre pentacloreto de antimônio e o solvente doador de par de elétrons, em uma solução num solvente não doador como 1,2-dicloroetano. Alguns destes valores encontram-se relacionados nas Tabelas 1.7 e 1.8 para os solventes usados neste trabalho. Assim, enquanto solventes clorados como o diclorometano (ND= 6,69 kJ mol⁻¹) e o clorofórmio (ND= 16,7 kJ mol⁻¹) podem ser reconhecidos pela sua baixa capacidade doadora, solventes aceitadores de ligações de hidrogênio, como o DMA (ND= 116 kJ mol⁻¹) e o DMSO (ND= 125 kJ mol⁻¹) apresentam

valores de ND altos, o que reflete sua grande habilidade para doação dos seus pares de elétrons nos átomos de oxigênio, sendo assim capazes de, por exemplo, fazerem ligações de hidrogênio bastante fortes com outras espécies químicas que sejam doadoras de ligações de hidrogênio. Enquanto os solventes pouco doadores de elétrons podem facilitar fortemente a formação associativa entre os íons por ligação de hidrogênio, o inverso ocorre em solventes que apresentam um elevado ND (MASKILL, 1985). Comparando o ND para os solventes das Tabelas 1.7 e 1.8, pode-se observar que com o aumento da capacidade doadora do meio aumenta a velocidade da reação estudada. Como em todos os meios estudados encontrava-se presente uma pequena quantidade de água, o solvente que apresenta uma maior capacidade doadora tem uma maior habilidade para formar ligações de hidrogênio com a água, deixando o íon di-hidrogenofosfato mais livre para agir como nucleófilo. No outro extremo, o diclorometano, com um valor de ND bastante baixo, apresenta uma habilidade muito menor para interagir com a água por ligações de hidrogênio e assim a água interage mais fortemente com o íon di-hidrogenofosfato, tornando mais difícil a sua ação nucleofílica, o que se reflete no baixo valor de k_{obs} . O efeito observado é muito mais visível para o sistema estudado com di-hidrogenofosfato de tetrabutilamônio em comparação com aquele estudado na presença de Kryptofix® 222, pois neste último sistema as quantidades de água que foram empregadas foram bem maiores.

3.6. Reação do DNPA com di-hidrogenofosfato em sistema bifásico

A CTF é uma poderosa ferramenta aplicada em muitas áreas da química. A CTF-LL (MARCH, 2007) é um processo que deve favorecer as reações entre um substrato lipofílico como o DNPA, dissolvido em uma fase orgânica como o CH_2Cl_2 , com um reagente hidrofílico como o KH_2PO_4 solubilizado em água. A reação poderia ser catalisada com o emprego de um agente carreador, podendo este ser um sal orgânico, como o tetrafluoroborato de tetrabutilamônio ou um agente criptante como o Kryptofix® 222. Assim, os dois compostos foram empregados neste trabalho como agentes carreadores.

O sistema bifásico água- CH_2Cl_2 empregado neste trabalho teve por objetivo verificar a possibilidade de mimetizar o ciclo catalítico de uma ATP-sintase, o qual envolve segundo de Meis (1989) a formação do composto rico em energia em um ambiente com a mínima quantidade de água e a remoção subsequente do composto formado para a fase aquosa, onde ele será utilizado. A energia é necessária apenas para soltar o composto do sítio catalítico.

Assim, a fase orgânica do sistema bifásico mimetizaria o ambiente hidrofóbico do sítio ativo da enzima responsável pela formação do AcP, enquanto a fase aquosa mimetizaria a matriz mitocondrial, onde o KH_2PO_4 seria carregado, pela ação do agente criptante, à fase orgânica (sítio ativo da enzima), e nela, dessolvatado, reagiria com o DNPA, para formar o AcP. Após a sua formação, ele seria carregado para a fase aquosa, onde desempenharia sua função, como composto rico em energia. Dentre estas funções, poderia ocorrer hidrólise (o que parece acontecer no sistema aqui proposto) ou reação com fosfato em excesso na presença de íons cálcio ou magnésio para formar outro composto rico em energia apresentando energia mais baixa (e.g., PP_i e ATP). Assim, a mistura de AcP, ADP e $[\text{24}]\text{-N}_6\text{O}_2$ em solução aquosa e em pH neutro, na presença de um equivalente de Mg^{2+} levou à formação de ATP (**HOSSEINI, 1991**). Em outro exemplo interessante, Hertschlag e Jencks (**1986**) demonstraram que o uso de altas concentrações de íons sódio em meio aquoso contendo AcP e íons fosfato levou à formação de PP_i , tendo sido sugerido por eles que os íons sódio adicionados ao meio facilitam a formação do pirofosfato devido à sua capacidade de reduzir a repulsão eletrostática entre AcP e P_i em solução.

A preparação de um sistema bifásico do tipo água- CH_2Cl_2 pretende assim mimetizar os sítios na enzima responsáveis pela síntese (fase orgânica) e pela “ativação” do AcP formado como um composto “rico em energia” (fase aquosa) pela mudança do sítio de hidrofóbico para hidrofílico (fase aquosa) para a realização de uma função. Nas condições estudadas, esta função corresponderia à sua hidrólise. Este sistema depende do gradiente iônico lipofílico Kryptofix® 222 $\text{K}^+\text{H}_2\text{PO}_4^-$ gerado na fase aquosa e transportado à fase orgânica, onde o di-hidrogenofosfato transportado reagiria com o DNPA, formando o AcP.

Após as condições experimentais empregadas no sistema bifásico água- CH_2Cl_2 terem sido ajustadas (ver na parte experimental o item 2.4), foi realizado um experimento no qual o DNPA foi colocado na fase orgânica com o objetivo de verificar se a hidrólise ocorreria naquelas condições (Figura 1.34 b). Não foi verificada qualquer reação na ausência do fosfato e do criptante, mesmo após um mês. A seguir, foi realizado outro experimento, desta vez colocando-se o KH_2PO_4 na fase aquosa. Nas mesmas condições, não foi verificado qualquer alteração no meio (Figura 1.34 d). Quando pequenas quantidades do criptante foram adicionadas, foi verificado o aparecimento de cor amarela na fase orgânica, significando que o fosfato foi carregado da fase aquosa para a fase orgânica e reagiu com o DNPA (Figura 1.34 c). Para efeitos de comparação, a reação foi feita apenas em diclorometano, misturando-se DNPA, KH_2PO_4 e Kryptofix® 222. Foi verificada a reação, conforme demonstrado visualmente pelo aparecimento da coloração amarela típica de liberação de 2,4-dinitrofenolato

(Figura 1.34 e).

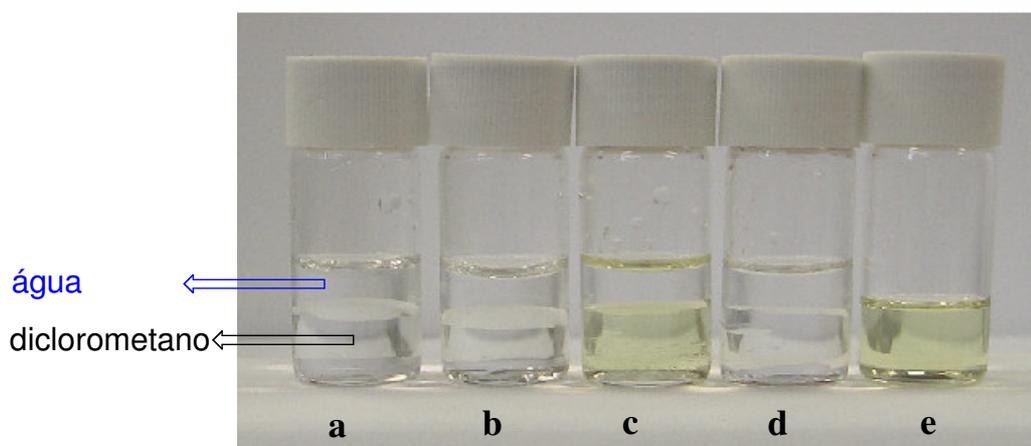


Figura 1.34. Sistema bifásico empregado na formação do AcP. Água-CH₂Cl₂ (a); água-CH₂Cl₂ e DNPA (b); água-CH₂Cl₂, DNPA, KH₂PO₄ e Kryptofix® 222 (c); água-CH₂Cl₂, DNPA e KH₂PO₄ (d); DNPA, KH₂PO₄ e Kryptofix® 222 em CH₂Cl₂ (e). O tempo reacional foi de 17 horas a 25°C e sem agitação. O log do coeficiente de partição (log P) octanol-água a 25°C é de 1,25 e a solubilidade do CH₂Cl₂ em água a 25°C é de 1,73 g 100 mL⁻¹ de água (LIDE, D. R. 2003).

A reação foi acompanhada usando-se um espectrofotômetro de UV/Vis e observou-se que à medida que o tempo passou ocorreu um aumento da absorvância em 424 nm, referente à formação quantitativa de 2,4-dinitrofenolato. A constante de velocidade para a reação foi igual a $9,65 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, determinada pelo acompanhamento da formação de 2,4-dinitrofenolato em 424 nm (Figura 1.35).

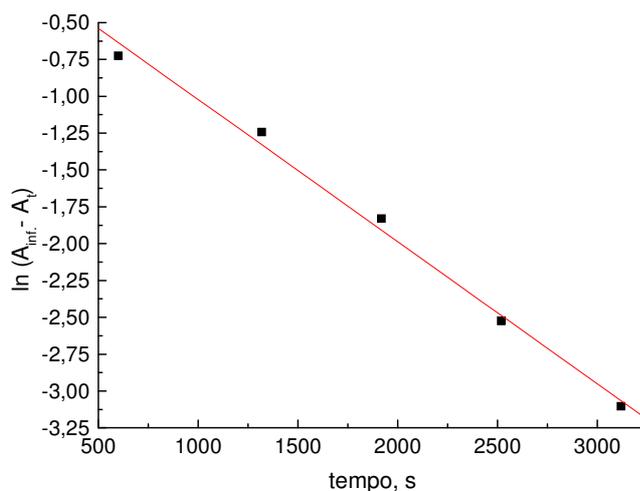


Figura 1.35. Gráfico de $\ln(A_{\infty} - A_t)$ em função do tempo para a reação em sistema bifásico água- CH_2Cl_2 entre DNPA ($2,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) e K_{222} ($3,1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$), fase orgânica e íon di-hidrogenofosfato ($3,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) fase aquosa, à temperatura de 40°C . As absorvâncias foram extraídas para o $\lambda_{\text{máx}} = 424 \text{ nm}$ (aparecimento do 2,4-dinitrofenolato).

Os espectros de infravermelho (Figura 1.36), feitos a partir do produto obtido após separar-se a fase orgânica da aquosa e após remoção do solvente da fase orgânica, revelaram uma banda de carbonila de pequena intensidade em 1735 cm^{-1} (Figura 1.35 a). Este experimento foi efetuado após uma hora de reação, pois após o final da reação, em dezessete horas, não foram observadas as bandas referentes ao estiramento de carbonila do AcP, tampouco do DNPA (Figura 1.35 b). A posição é exatamente a mesma obtida para a reação feita em MeCN e é consistente com a formação do AcP (ver item 3.2). A baixa intensidade da banda se deveu à migração do AcP formado à fase aquosa. O teste de Lipmann feito para os produtos, analisando-se a fase orgânica, deu resultado negativo. O mesmo teste foi então efetuado para a fase aquosa e também deu resultado negativo. Os espectros de IV demonstraram que a reação ocorreu quantitativamente.

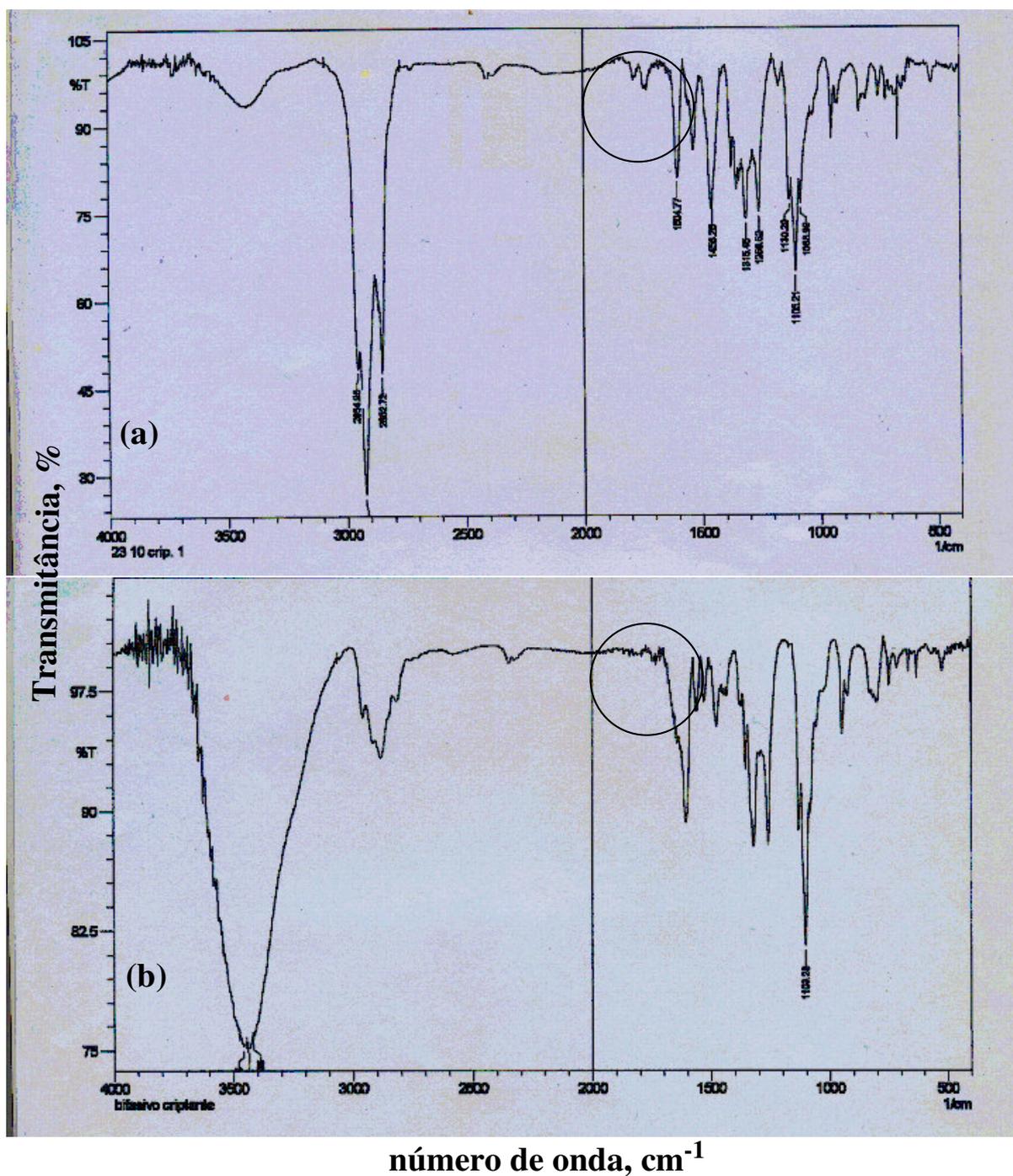


Figura 1.36. Espectros de IV para a fase orgânica do sistema bifásico. (a) espectro da reação entre DNPA, di-hidrogenofosfato de potássio e Kryptofix® 222 em água- Cl_2CH_2 , após 1 hora de reação, com diminuição na intensidade da banda em 1772 cm^{-1} com surgimento da banda em 1735 cm^{-1} , conforme assinalado pelo círculo sobre o espectro; (b) após 17 horas de reação, não foram observadas as bandas referentes ao estiramento de carbonila do AcP em 1735 cm^{-1} , tampouco do DNPA 1772 cm^{-1} .

Os dados obtidos podem ser explicados por meio da Figura 1.36, a qual mostra que o agente criptante tem um papel fundamental no processo, transportando o íon H_2PO_4^- para a fase orgânica. O ânion dessolvatado reage com o DNPA, formando o AcP, o qual, segundo os dados sugerem, é transportado à fase aquosa, onde é hidrolisado muito rapidamente.

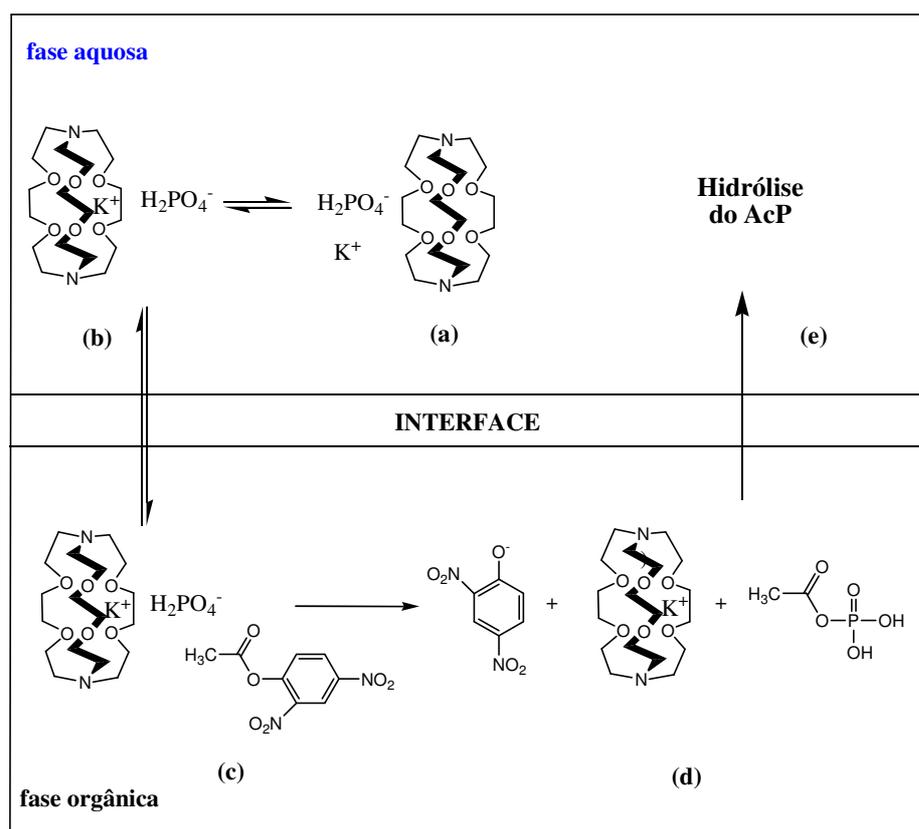


Figura 1.37. Sistema bifásico diclorometano-água representando esquematicamente a reação de formação do AcP. O agente carreador (Kryptofix® 222) juntamente com o sal (KH_2PO_4) solubilizados na fase aquosa (a); o agente carreador transfere o reagente aniônico (H_2PO_4^-) da fase aquosa para a fase orgânica via um par iônico lipofílico ($\text{Kryptofix}^\circledast 222 \text{ K}^+ \text{ H}_2\text{PO}_4^-$) (b); o H_2PO_4^- agora na fase orgânica pode reagir com DNPA para formar AcP (c); produtos da transferência de acila, AcP formado e fenolato liberado (d); migração do AcP à fase aquosa (e).

Um segundo sistema bifásico diclorometano-água foi estudado com o emprego de agitação, utilizando como carreador tetrafluoroborato de tetrabutilamônio (ver parte experimental item 2.4). A reação ocorre somente com agitação sendo assim fundamental para que o agente carreador possa conduzir o íon di-hidrogenofosfato para a fase orgânica. As

cinéticas não puderam ser medidas, pois a fase orgânica apresentava turvamento. A quantidade do tetrafluoroborato de tetrabutilamônio foi muito grande cerca de cem vezes maior, quando comparada à concentração do Kryptofix® 222, para que acontecesse a reação. Assim, os resultados obtidos assemelham-se com os resultados discutidos no parágrafo anterior para o sistema bifásico água-CH₂Cl₂ onde foi empregado o Kryptofix® 222 sem o emprego de agitação. No entanto, o sistema que faz uso do agente criptante mostrou ser muito mais eficiente para a realização do transporte de íons da fase orgânica para a fase aquosa e vice-versa.

4. CONCLUSÕES

A questão da solubilização de eletrólitos em solventes orgânicos representa um problema comum que é encontrado quando se necessita solubilizar um sal inorgânico em concentrações apreciáveis em solventes orgânicos. A estratégia supramolecular desenvolvida neste trabalho permitiu solubilizar o KH_2PO_4 em diversos solventes orgânicos, como o MeCN, utilizando um agente criptante (Kryptofix® 222).

O íon H_2PO_4^- , solubilizado em MeCN por ação de um agente criptante, pôde ser usado com sucesso para a síntese do AcP, um composto fosfatado de relevância bioquímica, segundo um modelo que mimetiza o efeito da polaridade na ação das enzimas responsáveis pela síntese destes compostos. Os estudos demonstraram a dependência da concentração de água sobre a formação do AcP, mostrando claramente a importância da participação deste componente na reatividade nucleofílica. Valores elevados e negativos de ΔS^\ddagger sugerem um possível estado de transição associativo para o sistema estudado.

Os estudos realizados com solventes doadores de pares de elétrons enfatizaram a importância do meio na síntese de compostos ricos em energia. Quando comparados os valores de ND para estes solventes, pôde-se observar que com o aumento da capacidade doadora do meio aumenta a velocidade da reação estudada. O solvente que apresenta uma maior capacidade doadora tem uma maior habilidade para formar ligações de hidrogênio com a água, deixando o íon di-hidrogenofosfato mais livre para agir como nucleófilo.

O sistema bifásico água- CH_2Cl_2 estudado neste trabalho vem propor uma estratégia supramolecular no desenvolvimento de um modelo enzimático para mimetizar o ciclo catalítico da ATP-sintase para a formação e utilização de compostos fosfatados ricos em energia. Este modelo mimetizou com sucesso o ambiente hidrofóbico do sítio ativo da enzima responsável pela formação do AcP e a fase aquosa, a matriz mitocondrial, para onde o AcP transferido é hidrolisado. O agente criptante (Kryptofix® 222) tem um papel supramolecular fundamental no processo, transportando o íon H_2PO_4^- para a fase orgânica (sítio ativo da enzima). O ânion dessolvatado reage ali com o DNPA, formando o AcP, o qual, segundo os dados sugeridos, é transportado à fase aquosa, novamente por ação do agente criptante, onde é hidrolisado. O sal $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NBF}_4$ também pôde ser empregado de forma satisfatória como

carreador do íon di-hidrogenofosfato na CTF-LL, porém mostrou ser muito menos eficiente que o agente criptante.

Este trabalho apresentou contribuições para o campo dos modelos enzimáticos para as enzimas responsáveis pela síntese e utilização dos compostos fosfatados ricos em energia. Primeiramente, o uso do fosfato inorgânico como nucleófilo em um ambiente que mimetiza o sítio anidro da enzima responsável pela síntese do composto fosfatado rico em energia pôde ser demonstrado. Em segundo lugar, demonstrou-se que o meio que melhor interage com a água torna o processo mais rápido, pois dessolvata o fosfato, o qual pode agir como nucleófilo, formando o AcP. Finalmente, o estudo no sistema bifásico ilustra a possibilidade de se modelar, de forma bastante simples e eficiente a cinética de ação da ATP-sintase, proporcionando dois ambientes, um anidro onde facilmente e em alto rendimento a síntese pode ser executada e outro aquoso, para onde o composto rico em energia é transferido para executar uma determinada função.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSON, J. P., LESLIE, A. G. W., LUTTER, R., WALKER, J. E. **“Structure at 2.8 Å Resolution of F₁-ATPase from Bovine Heart Mitochondria”**. Nature 370, p. 621-628, 1994.

AMZEL, L. M., BIANCHET, M. A., PEDERSEN, P. L. **In Membrane Protein Structure Experimental Approaches**, White, S. H., Ed.; New York: Oxford, 1994.

AMZEL, L. M., PEDERSEN, P. L. **“Proton ATPases: Structure and Mechanism”**. Annu. Rev. Biochem. 52, p. 801-824, 1983.

BALL, P. **“Water as an Active Constituent in Cell Biology”**. Chem. Rev. 108, p. 74-108, 2008.

BEER, P. D., GALE, P. A., SMITH, D. K. **Supramolecular Chemistry**, New York: Oxford University Press, 1999.

BENTLEY, R. **“The Mechanism of Hydrolysis of Acetyl Dihydrogen Phosphate”**. J. Am. Chem. Soc. 71, p. 2765-2767, 1949.

BIANCHET, M., YSERN, X., HULLIHEN, J., PEDERSEN, P. L., AMZEL, M. **“Mitochondrial ATP Synthase”**. J. Biol. Chem. 266, p. 21197-21201, 1991.

BLACKBURN, G. M., THATCHER, G. R. J., HOSSEINI, M. W., LEHN, J-M. **“Evidence for a Protophosphatase Catalysed Cleavage of Adenosine Triphosphate by a Dissociative-Type Mechanism within a Receptor-Substrate Complex”**. Tetrahedron Lett. 28, p. 2779-2782, 1987.

BOYD, D. B., LIPSCOMB, W. N. **“Electronic Structure for Energy-Rich Phosphates”**. J. Theor. Biol. 25, p. 403-420, 1969.

BOYER, P. D. **“Catalytic Site Forms and Controls in ATP Synthase Catalysis”**. Biochim. Biophys. Acta 1458, p. 252-262, 2000.

BOYER, P. D. **“Catalytic Site Occupancy During ATP Synthase Catalysis”**. FEBS Lett. 512, p. 29-32, 2002.

BOYER, P. D. **“Energy, Life, and ATP”**. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 37, p. 2297-2307, 1998.

BOYER, P. D. **“The ATP Synthase – A Splendid Molecular Machine”**. Annu. Rev. Biochem. 66, p.717-749, 1997.

BOYER, P. D. **“The Binding Change Mechanism for ATP Synthase – Some Probabilities and Possibilities”**. Biochim. Biophys. Acta 1140, p. 215-250, 1993.

BOYER, P. D., CROSS, R. L., MOMSEN, W. **“New Concept for Energy Coupling in Oxidative Phosphorylation Based on a Molecular Explanation of the Oxygen Exchange Reactions”**. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, p. 2837-2839, 1973.

CAPALDI, R., AGGELER, R. **“Mechanism of the F₁F₀-type ATP Synthase, a Biological Rotary Motor”**. Trends Biochem. Sci. 27, p. 154-160, 2002.

CHATTAWAY, F. **“Acetylation in Aqueous Alkaline Solutions”**. J. Chem. Soc. p. 2495-2496, 1931.

CHOATE, G. L., HUTTON, R. L., BOYER, P. D. **“Occurrence and Significance of Oxygen Exchange Reactions Catalyzed by Mitochondrial Adenosine Triphosphatase Preparations”**. J. Biol. Chem. 254, p. 286-290, 1979.

COLVIN, M. E., EVLETH, E., AKACEM, Y. **“Quantum Chemical Studies of Pyrophosphate Hydrolysis”**. J. Am. Chem. Soc. 117, p. 4357-4362, 1995.

COX, J. R., RAMSAY, O. B. **“Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters”**. Chem. Rev. 64, p. 317-352, 1964.

CROSS, R. L. **“Our Primary Source of ATP”**. Nature 370, p. 594-595, 1994.

CROSS, R. M. **“The Mechanism and Regulation of the Synthesis by F₁-ATPases”**. Annu. Rev. Biochem. 50, p. 681-714, 1981.

CROSS, R., MILGROM, Y. M. **“Rapid Hydrolysis of ATP by Mitochondrial F₁-ATPase Correlates with the Filling of the Second of Three Catalytic Sites”**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, p. 13831-13836, 2005.

DAVIS, B. D. **“On The Importance of Being Ionized”**. Arch. Biochem. Biophys. 78, p. 497-509, 1958.

DE MEIS, L. **“Effects of Organic Solvents and Orthophosphate on the ATPase Activity of F₁ ATPase”**. FEBS Lett. 213, p. 3333-336, 1987.

DE MEIS, L. **“Role of Water in the Energy of Phosphate Compounds-Energy Transduction in Biological Membranes”**. Biochim. Biophys. Acta 973, p. 333-349, 1989.

DE MEIS, L. **“The Concept of Energy-Rich Phosphate Compounds: Water, Transport ATPases, and Entropic Energy”**. Arch. Biochem. Biophys. 306, p. 287-296, 1993.

DI SABATO, G., JENCKS, W. P. **“Mechanism and Catalysis of Reactions of Acyl Phosphates. I. Nucleophilic Reactions”**. J. Am. Chem. Soc. 83, p. 4393-4400, 1961.

DI SABATO, G., JENCKS, W. P. **“Mechanism and Catalysis of Reactions of Acyl Phosphates. II. Hydrolysis”**. J. Am. Chem. Soc. 83, p. 4400-4405, 1961.

DOMINGOS, J. B., LONGHINOTTI, E., MACHADO, V. G., NOME, F. **“A Química dos Ésteres de Fosfato”**. Química Nova, 26, p. 745-753, 2003.

EWIG, C. S., VAN WAZER, J. R. “**Ab Initio Structures of Phosphorus Acids and Esters. 3. The P-O-P Bridged Compounds $H_4P_2O_{2n-1}$ for $n = 1$ to 4**”. J. Am. Chem. Soc. 110, p. 79-86, 1988.

FENNIRI, H., LEHN, J-M, MARQUIS-RIGAULT, A. “**Supramolecular Catalysis of H/D Exchange in Malonate Ions by Macrocyclic Polyamines: a Model Enzyme with Enolase Activity**”. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35, p. 337-339, 1996.

GEORGE, P., WITONSKY, R. J., TRACHTMAN, M., WU, C., DORWART, W., RICHMAN, L., RICHMAN, W., SHURAYH, F., LENTZ, B. “**Squiggle-Water. An Enquiry into the Importance of Solvation Effects in Phosphate Ester and Anhydride Reactions**”. Biochim. Biophys. Acta 223, p. 1-15, 1970.

GOGOL, E. P., LUCKËN, T. B., CAPALDI, R. A. “**Molecular Architecture of *Escherichia coli* F_1 Adenosine-triphosphatase**”. Biochemistry 28, p. 4709-4716, 1989.

GRESSER, M. J., MYERS, J. A., BOYER, P. D. “**Catalytic Site Cooperativity of Beef Heart Mitochondrial F_1 Adenosine Triphosphatase**”. J. Biol. Chem. 257, p. 12030-12037, 1982.

HAJDU, J. SMITH, G. M. “**Catalytic Mechanisms of Acyl Transfer Reaction in Dipolar Aprotic Media. 1. Desolvated Carboxylate Ion as Acyl Acceptor**”. J. Am. Chem. Soc. 102, p. 3960-3962, 1980.

HAJDU, J. SMITH, G. M. “**Catalytic Mechanisms of Acyl Transfer Reactions in Dipolar Aprotic Media. 2. Electrophilic Activation of the Carbonyl Group by Quaternary Alkylammonium and Imidazolium Functions**”. J. Am. Chem. Soc. 103, p. 6192-6197, 1981.

HALL, N., **Neoquímica. A Química Moderna e suas Aplicações**. Traduzido por Paulo S. Santos, Oswaldo L. Alves, Célio Pasquini e Gianluca C. Azzellini. Porto Alegre: Bookman, 2004.

HAYES, D. M., KENYON, G. L., KOLLMAN, P. A. **“Theoretical Calculations of the Hydrolysis Energies of Some ‘High-Energy’ Molecules. 2. A Survey of Some Biologically Important Hydrolytic Reactions”**. J. Am. Chem. Soc. 100, p. 4331-4340, 1978.

HERTSCHLAG, D., JENCKS, W. P. **“Pyrophosphate Formation from Acetyl Phosphate and Orthophosphate Anions in Concentrated Aqueous Salt Solutions does not Provide Evidence for a Metaphosphate Intermediate”**. J. Am. Chem. Soc. 108, p. 7938-7946, 1986.

HILL, T. L., MORALES, M. F. **“On ‘High Energy Phosphate Bonds’ of Biochemical Interest”**. J. Am. Chem. Soc. 73, p. 1656-1660, 1951.

HOSSEINI, M. W., LEHN, J-M, MERTES, M. P. **“Efficient Molecular Catalysis of ATP-Hydrolysis by Protonated Macrocyclic Polyamines”**. Helv. Chim. Acta 66, p. 2454-2466, 1983.

HOSSEINI, M. W., LEHN, J-M. **“Cocatalysis: Pyrophosphate Synthesis from Acetylphosphate Catalysed by a Macrocyclic Polyamine”**. J. Chem. Soc., Chem. Commun. p. 1155-1157, 1985.

HOSSEINI, M. W., LEHN, J-M. **“Supramolecular Catalysis in the Hydrolysis of ATP Facilitated by Macrocyclic Polyamines: Mechanistic Studies”**. J. Am. Chem. Soc. 109, p. 537-544, 1987.

HOSSEINI, M. W., LEHN, J-M. **“Supramolecular Catalysis of Adenosine Triphosphate Synthesis in Aqueous Solution Mediated by a Macrocyclic Polyamine and Divalent Metal Cations”**. J. Chem. Soc., Chem. Commun. p. 451-453, 1991.

HOSSEINI, M. W., LEHN, J-M. **“Supramolecular Catalysis: Substrate Phosphorylations and Adenosine Triphosphate Synthesis with Acetylphosphate Catalysed by a Macrocyclic Polyamine”**. J. Chem. Soc., Chem. Commun. p. 397-399, 1988.

<http://www.res.titech.ac.jp/seibutu/main.html> acesso em: 05 de set. 2008.

HUTCHEON, M. L., DUNCAN, T. M., NGAI, H., CROSS, R. L. **“Energy-Driven Subunit Rotation at the Interface Between Subunit a and the c Oligomer in the F₀ Sector of *Escherichia coli* ATP Synthase”**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, p. 8519-5824, 2001.

HWANG, M-J., CHU, P-Y., CHEN, J-C., CHAO, I. **“Conformational Analysis of Three Phyrophosphate Model Species: Diphosphate, Methyl Diphosphate, and Triphosphate”**. J. Comput. Chem. 20, p. 1702-1715, 1999.

JARROUSE, M. J., **“The Influence of Quaternary Ammonium Chloride on the Reaction of Labile Hydrogen Compounds and Chlorine-Substituted Chlorine Derivatives”**. C. R. Acad. Sci. Ser., 232, p. 1424 1951.

JENCKS, W. P. **“General Acid-base Catalysis of Complex Reactions in Water”**. Chem. Rev. 72, p. 705-718, 1972.

JUNGE, W., PÄNKE, O., CHEREPONOV, D. A., GUMBIOWSKI, K., MÜLLER, M., ENGELBRESCHT, S. **“Inter-Subunit Rotation and Elastic Power Transmission in F₀F₁-ATPase”**. FEBS Lett. 504, p. 152-160, 2001.

KALCKAR, H. M. **“The Nature of Energetic Coupling in Biological Syntheses”**. Chem. Rev. 28, p. 71-178, 1941.

KIRBY, A. J., YOUNAS, M. **“The Reactivity of Phosphate Esters. Diester Hydrolysis”**. J. Chem. Soc. B, p. 510-513, 1970.

KIRSCHBAUM, J. **“Biological Oxidations and Energy Conservation”**. J. Chem. Educ. 45, p. 28-37, 1984.

KOSHLAND, D. E., JR. **“Effect of Catalysts on the Hydrolysis of Acetyl Phosphate Nucleophilic Displacement Mechanisms in Enzymatic Reactions”**. J. Am. Chem. Soc. 74, p. 2286-2292, 1952.

KOVACH, I. M. **“Transition States of Some Acyl Transfer Reaction in Acetonitrile”**. Tetrahedron Lett. 21, p. 4309-4312, 1980.

LAU, H. P., GUTSCHE, C. D. **“Association Phenomena. 3. Polyfunctional Catalysis of Acetyl Phosphate Decomposition”**. J. Am. Chem. Soc. 100, p. 1857-1865, 1978.

LEHN, J-M. **“Supramolecular Chemistry – Scope and Perspectives. Molecules, Supramolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture)”**. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 27, p. 89-112, 1988.

LEHN, J-M., FENNIRI, H. **“Coupling of Supramolecular Syntesis of ATP with ATP-Consuming Enzyme Systems”**. J. Chem. Soc., Chem. Commun., p. 1819-1821, 1993.

LEHN, J-M., HOSSEINI, M. W., JONES, K. C., PLUTE, K. E., MERTES, K. B., MERTES, M. P. **“Supramolecular Catalysis: Polyammonium Macrocycles as Enzyme Mimics for Phosphoryl Transfer in ATP Hydrolysis”**. J. Am. Chem. Soc. 111, p. 6330-6335, 1989.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**, 3^a ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2003-2004**. 84^a ed. Boca Raton, 2003.

LIN, H. K., ZHOU, C., ZHU, S., GUO, Y., GE, Q., LIN, H. **“The Different Roles of Metal Ions and Water Molecules in the Recognition and Catalyzed Hydrolysis of ATP by Phenanthroline-Containing Polyamines”**. Biophys. Chem., 105, p. 119-131, 2003.

LIPMANN, F. **“Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy”**. Adv. Enzymol. 1, p. 99-162, 1941.

LIPMANN, F., TUTTLE, L. C. **“A Specific Micromethod for the Determination of Acyl Phosphates”**. J. Biol. Chem. 159, p. 21-29, 1945.

LIU, M. S., TODD, B. D., SADUS, R. **“Cooperativity in the Motor Activities of the ATP-fueled Molecular Motors”**. *Biochem. Biophys. Acta.* 1752, p. 111-123, 2005.

LU, B., WONG, C. F., MCCAMMON, J. A. **“Release of ATP from the Catalytic Subunit of Protein Kinase A: A Molecular Dynamics Simulation Study”**. *Protein Scienc.* 14, p. 159-168, 2005.

MA, B., MEREDITH, C., SCHAEFER, H. F. **“Pyrophosphate Structures and Reactions: Evaluation of Electrostatic Effects on the Pyrophosphates with and without Alkali Cations”**. *J. Phys. Chem.* 98, p. 8216-8223, 1994.

MACHADO, V. G., BUNTON, C. A., ZUCCO, C., NOME, F. **“Desolvated Phosphate Ions as Acyl Acceptors in Dipolar Aprotic Media. A Non-Enzymatic Model for Formation of ‘Energy-Rich’ Acyl Phosphates”**. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, p. 169-173, 2000.

MACHADO, V. G., NOME, F. **“Acyl Transfer Reaction in Dipolar Aprotic Medium: Desolvated Phosphate Ion as Acyl Acceptor in the Formation of Energy-rich Phosphate Compounds”**. *Chem. Commun.* p. 1917-1918, 1997.

MACHADO, V. G., NOME, F. **“Compostos Fosfatados Ricos em Energia”**. *Química Nova.* 22, p. 351-357, 1999.

MARCH, J., SMITH, M. B. **March’s Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure.** 6^a ed. Published by John Wiley e Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2007.

MARZORATI, L., LUCCHESI, A. M. **“Catálise de Transferência de Fase”**. *Quím. Nova.* 23, p. 641-652, 2000.

MASKILL, H. **The Physical Basis of Organic Chemistry**, New York: Oxford University Press, p. 216-267, 1985.

MENGER, F. M. **“An Alternative View of Enzyme Catalysis”**. Pure Appl. Chem. 77, p. 1873-1886, 2005.

MERTES, M. P., MERTES, K. B. **“Polyammonium Macrocycles as Catalysts for Phosphoryl Transfer: the Evolution of an Enzyme Mimic”**. Acc. Chem. Res. 23, p. 413-418, 1990.

MILLER, D. L., WESTHEIMER, F. H. **“The Hydrolysis of γ -Phenylpropyl Di- and Triphosphates”**. J. Am. Chem. Soc. 88, p. 1507-1511, 1966.

NAKAI, C., GLINSMANN, W. **“Interactions between Polyamines and Nucleotides”**. Biochemistry 16, p. 5636-5641, 1977.

NAKAMOTO, R. K., KETCHUM, C. J., AL-SHAWI, M. K. **“Rotational Coupling in the F_0F_1 -ATP Synthase”**. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28, p. 205-2034, 1999.

NOJI, H., YASUDA, R., YOSCHIDA, M., KINOSITA, K. Jr. **“Direct Observation of the Rotation of F_1 -ATPase”**. Nature 386, p. 299-302, 1997.

O'KEEFFE, M. DOMENGES, B. **“Ab Initio Molecular Orbital Calculations on Phosphates: Comparison with Silicates”**. J. Phys. Chem. 89, p. 2304-2309, 1985.

PENEFSKY, H. S., CROSS, R. L. **“Structure and Mechanism of F_0F_1 -Type ATP Synthases and ATPases”**. Adv. Enzym. Rel. Areas Molec. Biol. 64, p. 173-214, 1991.

PENEFSKY, H. S., PULLMAN, M. E., DATTA, A., RACHER, E. **“Partial Resolution of the Enzyme Catalyzing Oxidative Phosphorylation”**. J. Biol. Chem. 235, p. 3330-3336, 1960.

PHILLIPS, D. R., FIFE, T. H. **“Polar and Steric Effects in Acyl Phosphate Monoanion and Dianion Reactions”**. J. Org. Chem. 34, p. 2710-2714, 1969.

PULLMAN, B., PULLMAN, A. **Quantum Biochemistry**; New York: Interscience, 1963.

REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**, 3^a ed. Verlag Chemie: Weinheim, p. 19, 2004.

RISEMAN, J., KIRKWOOD, J. G. “**Remarks on the Physico-chemical Mechanism of Muscular Contraction and Relaxation**”. J. Am. Chem. Soc. 70, p. 2820-2822, 1948.

ROSING, J., KAYALAR, C., BOYER, P. D. “**Evidence for Energy-Dependence Change in Phosphate Binding for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Based on Measurements of Medium and Intermediate Phosphate-Water Exchanges**”. J. Biol. Chem. 252, p. 2478-2485, 1977.

SAINT-MARTIN, H., ORTEGA-BLAKE, I., LES, A., ADAMOWICZ, L. “**Ab Initio Calculation of the Pyrophosphate Hydrolysis Reaction**”. Biochim. Biophys. Acta. 1080, p. 205-214, 1991.

SAKAMOTO, J. “**Effect of Dimethylsulfoxide on ATP Synthesis by Mitochondrial Soluble F₁-ATPase**”. J. Biochem. 96, p. 483-487, 1984.

SAKAMOTO, J. TONOMURA, Y. “**Synthesis of Enzyme-Bound ATP by Mitochondrial Soluble F₁-ATPase in the Presence of Dimethylsulfoxide**”. J. Biochem. 93, p. 1601-1614, 1983.

SCHMIDTCHEN, F. P. “**Surprises in the Energetics of Host-Guest Anion Binding to Calix[4]pyrrole**”. Org. Lett. 3, p. 431-434, 2002.

SENIOR, A. E., PERLIN, D., LATCHNEY, L. R., WISE, J. G. “**Specificity of the Proton Adenosinetriphosphatase of *Escherichia-coli* for Adenine, Guanine, and Isonine Nucleotides in Catalysis and Binding**”. J. Biochem. 23, p. 4998-5003, 1984.

SKOU, J. C. “**The Identification of the Sodium-Potassium Pump**”. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 37, 2321-2328, 1998.

SUZUKI, S., HIGASHIYAMA, T., NAKAHARA, A. “**Nonenzymic Hydrolysis Reactions of Adenosine 5'-Triphosphate and its Related Compounds. 1. Hydrolysis**

Reactions of ATP with some Continuous-Chain Polyamines". Bioorg. Chem. 2, p. 145-154, 1973.

SUZUKI, S., NAKAHARA, A. **"Nonenzymic Hydrolysis Reactions of Adenosine 5'-Triphosphate and Related Compounds. II. Kinetic Studies of the Hydrolysis of ATP and Related Compounds with Various Polyamines"**. Bioorg. Chem. 4, p. 250-258, 1975.

TAFESSE, F., MASSOUD, S. S., MILBURN, R. M. **"Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) Hydrolysis Promoted by the Highly Reactive Hydroxoquo(3,3',3'-Triaminotripropylamine)Cobalt (III) Ion. Patterns of Reactivity and Mechanistic Considerations"**. Inorg. Chem. 24, p. 2591-2593, 1985.

VISHVESHWARA, S., HANSIA, P., GURUPRASAD, N. **"Ab Initio Studies on the Tri- and Diphosphate Fragments of Adenosine Triphosphate"**. Biophys. Chem. 119, p. 127-136, 2006.

VOGEL, A. I. **Textbook of Practical Organic Chemistry**, London: Longman, p. 410, 1989.

WALKER, J. E. **"ATP Synthesis by Rotary Catalysis"**. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 37, 2309-2319, 1998.

WALLERBERG, G., HAAKE, P. **"Solvation and Catalysis in Displacement at Phosphorus. Reaction of Imidazole and Benzoate Ion with p-Nitrophenyl and 2,4-Dinitrophenyl Diphenylphosphinates"**. J. Org. Chem. 46, p. 43-46, 1981.

WANG, M.-L., LEE, Z.-F. **"Reaction of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1-biphenyl and Phenol in Two-phase Medium via Phase-Transfer Catalysis"**. J. Mol. Catal. 264, p. 119-127, 2006.

WEBER, J., LEE, R. S. F., GRELL, E., WISE, J. G., SENIOR, A. E. **"On the Location and Function of Tyrosine-Beta-331 in the Catalytic Site of *Escherichia-colin* F₁-ATPase"**. J. Biol. Chem. 267, p. 1712- 1718, 1992.

WEBER, J., SENIOR, A. E. **“ATP Synthase: What we Know About ATP-Hydrolysis and What we do not Know About ATP-Synthesis”**. *Biochim. Biophys. Acta* 1458, p. 300-309, 2000.

WEBER, J., SENIOR, A. E. **“Bi-site Catalysis in F₁-ATPase: Does it Exist?”**. *J. Biol. Chem.* 276, p. 35422-35428, 2001.

WESTHEIMER, F. H. **“Why Nature Chose Phosphates?”**. *Science* 235, p. 1173-1178, 1987.

YANG, Y-C., BAKER, J. A., WARD, J. R. **“Decontamination of Chemical Warfare Agents”**. *Chem. Rev.* 92, p. 1729-1743, 1992.

YASUDA, R., NOJI, H., KINOSITA, K. Jr., YOSHIDA, M. **“F₁-ATPase is a Highly Efficient Molecular Motor that Rotates with Discret 120° Steps”**. *Cell* 93, p. 1117-1124, 1998.

YASUDA, R., NOJI, H., YOSHIDA, M., KINOSITA, K. Jr., ITOH, H. **“Resolution of Distinct Rotational Substeps by Submillisecond Kinetic Analysis of F₁-ATPase”**. *Nature* 410, p. 898-904, 2001.

YOHANNES, P. G., MERTES, M. P., MERTES, K. B. **“Pyrophosphate Formation via a Phosphoramidate Intermediate in Polyammonium Macrocycle/Metal Ion-Catalyzed Hydrolysis of ATP”**. *J. Am. Chem. Soc.* 107, p. 8288-8289, 1985.

6. ANEXO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)