

Vanderlei Gageiro Machado e Faruk Nome

Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-970 - Florianópolis - SC

Recebido em 26/9/97; aceito em 20/10/98

ENERGY-RICH PHOSPHATE COMPOUNDS. The chemical and biological properties of energy-rich phosphate compounds, e.g. ATP and acetyl phosphate, were revised. The role of water in the formation of this class of energy-rich compounds in biological systems is also discussed.

Keywords: energy-rich compounds; ATP; acetyl phosphate.

INTRODUÇÃO

Os organismos vivos precisam de energia para que possam desempenhar uma série de funções ligadas à vida, tais como o crescimento, movimento e reprodução. Organismos classificados como autótrofos obtêm a energia de que necessitam do sol, através do processo de fotossíntese¹⁻³, sintetizando desta forma os seus nutrientes. Os nutrientes, verdadeiros estoques de energia sob a forma de ligações químicas, são empregados por organismos heterótrofos, que não podem realizar o processo de fotossíntese, a fim de poderem manter seus processos biológicos. Os alimentos são oxidados por um conjunto de catalisadores específicos e de alta eficiência, as enzimas, que utilizam a energia liberada durante o processo oxidativo para sintetizar compostos organofosfatados, que são empregados pelas células em seus diferentes processos⁴. É esta a classe de compostos, dos quais o trifosfato de adenosina (ATP) é de longe o mais importante, que as células aproveitam quando precisam de energia para executar, por exemplo, a síntese de proteínas, o transporte ativo, os movimentos e a transmissão de impulsos nervosos⁵.

Os ésteres derivados do ácido fosfórico são extremamente importantes por exercer um papel fundamental nos processos ligados à vida. É impossível imaginar-se uma rota metabólica sem a participação desta categoria de compostos. Os materiais genéticos DNA e RNA, por exemplo, são fosfodiésteres. Similarmente, a maior parte das coenzimas apresentam em sua estrutura grupos fosfato e pirofosfato. De extrema importância bioquímica, o ATP, o fosfo-enolpiruvato, a fosfocreatina e os resíduos acil-fosfatados são fosfatos que constituem as moedas de troca de energia nos processos vitais (Figura 1).

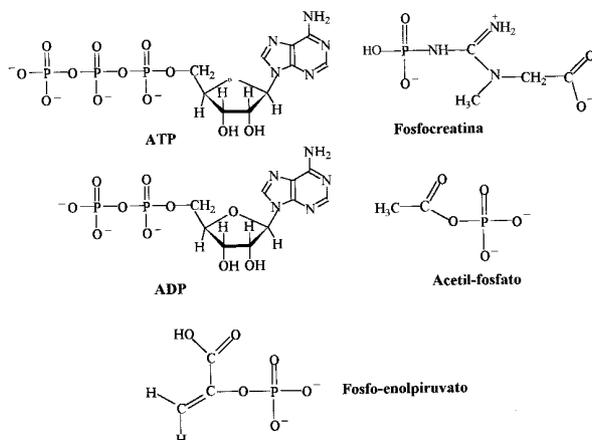


Figura 1. Estruturas de alguns compostos ricos em energia.

As energias liberadas nas reações de hidrólise das ligações P-O são normalmente de pequena magnitude. Por exemplo, nas reações de hidrólise de glicose-6-fosfato, monofosfato de adenosina (AMP) e glicerol- α -fosfato, ocorre uma diminuição nos valores das energias livres padrões de aproximadamente -9 a -14 kJ mol⁻¹ (Tabela 1). Entretanto, as reações de hidrólise nas ligações P-O ou P-N do ATP, difosfato de adenosina (ADP), acetil-fosfato, fosfocreatina e fosfo-enolpiruvato apresentam altas energias livres padrões de hidrólise, variando entre -30 e -62 kJ mol⁻¹^{5,6}. Por sua alta instabilidade termodinâmica, esta pequena classe de compostos recebe a denominação de "compostos ricos em energia" e diz-se que as suas ligações P-O ou P-N são "ligações fosfatadas de alta energia"⁷.

Tabela 1. Energias livres padrões para as hidrólises de alguns compostos fosfatados (pH 7,0)^a.

composto fosfatado	ΔG (kJ mol ⁻¹)
Fosfo-enolpiruvato	-61,9
Fosfocreatina	-43,1
Acetil-fosfato	-42,3
ATP (para ADP)	-30,5
AMP (para adenosina)	-9,2
Glicose-6-fosfato	-13,8
Glicerol- α -fosfato	-9,2

a) Todos os valores foram extraídos da ref. 5

Cabe-nos neste momento repetir a pergunta formulada anteriormente por Westheimer⁸: "por que a Natureza escolheu os fosfatos?" De acordo com o mesmo autor, os fosfatos representam a mais perfeita adaptação para desempenhar este papel por alguns motivos⁸. Eles podem, por exemplo, ligar dois nucleotídeos e ainda sofrer ionização em pH próximo à neutralidade (pH fisiológico). A ionização é extremamente importante em meio biológico do ponto de vista da estabilidade cinética: a carga negativa sobre o grupo fosfato repele eventuais nucleófilos e dificulta a hidrólise^{9,10}.

Além disso, há um motivo ligado à evolução dos organismos primitivos. Segundo Davis¹¹, a evolução favoreceu metabólitos que podiam conservar-se dentro da membrana celular. Como a maioria das moléculas neutras têm alguma solubilidade em lipídios, podendo por este motivo atravessar a membrana, e a maior parte das moléculas ionizadas são lipofóbicas, as últimas foram as favorecidas. Os fosfatos estão na forma ionizada em valores de pH fisiológico e desta forma podem ser convenientemente guardados no interior das células. O princípio de Davis pode ser aplicado para inúmeros processos bioquímicos. Exemplos interessantes podem ser encontrados na

biossíntese dos aminoácidos essenciais^{12,13}. Nestes processos, todas as etapas envolvem a participação de espécies intermediárias carregadas negativa ou positivamente.

Conforme mencionou-se há pouco, as cargas negativas protegem os anidridos fosfóricos ricos em energia do ataque nucleofílico pela água e outras espécies, conferindo-lhes uma grande estabilidade cinética em solução aquosa¹⁰, não obstante o fato de eles serem termodinamicamente instáveis. Esta contração é importantíssima na natureza, porque garante que após a síntese, o composto não sofrerá hidrólise, viabilizando sua utilização nos processos bioenergéticos. Mesmo assim, o uso destes compostos nos processos químicos que ocorrem nos sistemas biológicos seria inviável, não fosse o fato de as células terem à sua disposição as enzimas como catalisadores.

A ATP sintase ou F_0F_1 -ATPase é a principal enzima que opera realizando transdução de energia nas mitocôndrias, cloroplastos e bactérias. Ela foi isolada primeiramente por Penefsky e col.¹⁴ em 1960. Muitos artigos de revisão foram escritos recentemente¹⁵⁻¹⁹ sobre o funcionamento e os aspectos mecanísticos desta enzima. Da mesma forma, artigos que tratam de aspectos relevantes para um melhor entendimento do seu mecanismo de atuação vêm sendo publicados recentemente²⁰⁻²⁶. O leitor interessado na busca de material bibliográfico, que trate deste assunto, encontra-lo-á fartamente nestes artigos.

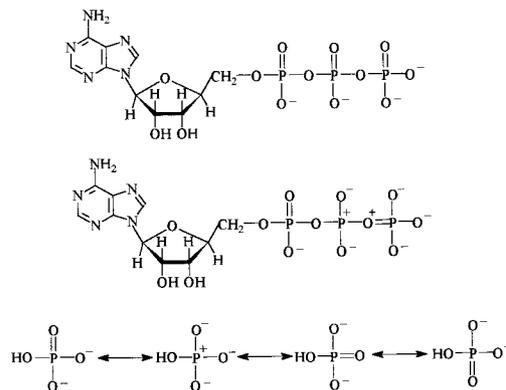
O principal propósito desta revisão é o de fornecer subsídios importantes para a compreensão da química dos compostos fosfatados ricos em energia. Inicialmente far-se-á uma rápida abordagem da visão clássica sobre sua hidrólise e síntese, mencionando-se ainda estudos teóricos envolvendo esta classe de compostos. A seguir, serão mostrados trabalhos que buscam elucidar o seu significado bioquímico. Finalmente, serão apresentados estudos recentes de modelos enzimáticos para a hidrólise e, principalmente, para a síntese de compostos fosfatados ricos em energia.

COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA

O conceito de compostos fosfatados ricos em energia foi idealizado inicialmente por Lipmann⁶ em meados deste século. As suas idéias sobre como as células utilizam compostos fosfatados como moedas de troca de energia foram aceitas até recentemente. De acordo com este autor, a energia de hidrólise de diferentes compostos fosfatados seria determinada somente pela natureza química da ligação entre o grupo fosfato e o restante da molécula, independentemente do fato de o composto encontrar-se em solução ou ligado ao sítio ativo da enzima. Uma vez que o composto fosfatado estivesse ligado à enzima, ele seria hidrolisado e a energia derivada da quebra da ligação de fosfato seria aproveitada pela enzima para realizar trabalho.

Nesta mesma época, Kalckar discutiu as ligações de alta energia como decorrentes da estabilização relativa, por ressonância, dos produtos da hidrólise dos compostos fosfatados em relação aos reagentes²⁷. Assim, ADP e 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 positivamente carregado (Esquema 1).

Hill e Morales²⁸ sugeriram que, além dos efeitos de ressonância, há um efeito eletrostático nos compostos ricos em energia como ATP e ADP contribuindo para a sua instabilidade termodinâmica. No ATP, por exemplo, ocorre uma repulsão eletrostática muito forte devido à proximidade das cargas negativas sobre os átomos de oxigênio vizinhos. Esta repulsão é reduzida quando o ATP é hidrolisado para ADP e P_i . Esta sugestão de que a energia livre "eletrostática" no ATP pode ser transformada em energia para ser utilizada em outros eventos foi exemplificada por Riseman e Kirkwood²⁹. Estes pesquisadores sugeriram que a relaxação da actomiosina envolve a



Esquema 1.

transferência de P_i do ATP para grupos alcoólicos da enzima. A cadeia da actomiosina é estendida pela repulsão entre cargas negativas dos grupos que estão interagindo, levando a enzima a guardar energia livre. A remoção do grupo fosfato carregado negativamente provoca a contração, com a enzima retornando ao seu estado original. A energia livre guardada é convertida em trabalho.

Estudos teóricos empregando a teoria π -elettrônica dos orbitais moleculares foram realizados, nos anos cinqüentas, por Pullman e Pullman³⁰ para compostos ricos em energia. Estes pesquisadores concluíram que a hipótese de Kalckar juntamente com a de Hill e Morales desempenham um papel muito importante nas reações de hidrólise do ATP, ADP, fosfoenolpiruvato e acetil-fosfato. Na década seguinte, Boyd e Lipscomb³¹, por meio de cálculos das estruturas de compostos ricos em energia empregando Hückel estendido, também chegaram à mesma conclusão.

Todos os trabalhos que discutem o conceito dos compostos ricos em energia, desde o trabalho de Lipmann até o final da década de 60, abordam a questão do ponto de vista estrutural teórico. A interação do reagente e do produto com o meio reacional era descartada, erroneamente, acreditando que o solvente não interferia nos valores das constantes de equilíbrio para as reações hidrolíticas dos compostos fosfatados. Esta questão é no entanto de grande importância, porque a água interage fortemente com o composto fosfatado por meio de ligações de hidrogênio, alterando suas propriedades físico-químicas.

No início dos anos setenta, George e col.³² publicaram um trabalho que se tornou um marco no estudo destes compostos. Analisando os aspectos termodinâmicos das reações de hidrólise, em diversos valores de pH para vários compostos ricos em energia, concluíram que os efeitos intramoleculares têm importância secundária, quando comparados com a interação de reagentes e produtos com o solvente. Analisando uma série de reações de hidrólise envolvendo pirofosfatos (Tabela 2), foi mostrado que em fase aquosa, o pirofosfato completamente protonado ($H_4P_2O_7$) tem uma entalpia de hidrólise $16,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ mais negativa que a espécie $P_2O_7^{4-}$. Estes resultados demonstram que a interação do pirofosfato com o solvente compensa muito bem a repulsão intramolecular muito forte da espécie completamente desprotonada. De acordo com esta nova proposta, a energia de hidrólise de um composto fosfatado é determinada pelas diferenças nas energias de solvatação de reagentes e produtos. Quanto mais solvatado se encontra o composto, mais estável ele é. Um valor alto para a constante de equilíbrio de hidrólise do composto decorre de uma maior solvatação dos produtos da reação em relação aos reagentes.

Hayes, Kenyon e Kollman³³ estudaram as reações hidrolíticas desta classe de compostos em fase gasosa por métodos *ab initio* e estabeleceram que, embora os efeitos intramoleculares mencionados acima sejam importantes para as energias

Tabela 2. Reações de hidrólise do pirofosfato^a.

Reação	ΔH° (kJ mol ⁻¹)
$H_4P_2O_7 + H_2O \rightarrow H_3PO_4 + H_3PO_4$	- 31,8
$H_3P_2O_7 + H_2O \rightarrow H_2PO_4^- + H_3PO_4$	- 30,5
$H_2P_2O_7^{2-} + H_2O \rightarrow H_2PO_4^- + H_2PO_4^-$	- 28,5
$HP_2O_7^{3-} + H_2O \rightarrow HPO_4^{2-} + H_2PO_4^-$	- 24,3
$P_2O_7^{4-} + H_2O \rightarrow HPO_4^{2-} + HPO_4^{2-}$	- 15,5

a) Valores extraídos da referência 32

de hidrólise de algumas destas reações, as energias relativas de solvatação de reagentes e produtos representam o fator de contribuição mais importante para as energias de hidrólise destes processos. As conclusões do trabalho, portanto, concordam com os resultados propostos anteriormente por George e col.³². Um outro trabalho realizado recentemente³⁴, no qual são empregados cálculos *ab initio* para se determinar as energias de compostos fosfatados, que têm em sua estrutura a ligação P-O-P, chegou a conclusões semelhantes.

A hidrólise do pirofosfato é um problema difícil para ser resolvido por métodos *ab initio* porque as espécies envolvidas na reação se encontram desprotonadas em pH fisiológico. A maior parte dos trabalhos que buscam fazer previsões sobre entalpia reacional tem sido realizadas para as espécies protonadas em fase gasosa com o objetivo de estabelecer se a reação dessolvatada é endotérmica ou exotérmica. Mesmo assim, os dados obtidos são bastante controversos, com entalpias de hidrólise em fase gasosa variando entre - 1,7 e -56 kJ mol⁻¹³³⁻³⁶. A busca de informações mais detalhadas e precisas acerca da hidrólise do pirofosfato levou Colvin e col.³⁷ a efetuar cálculos *ab initio* da entalpia da reação em fase gasosa. Os cálculos demonstraram que, em fase gasosa, a hidrólise do pirofosfato completamente protonado é desfavorecida em 21 kJ mol⁻¹. Isto resulta da formação de um par de ligações de hidrogênio intramoleculares que unem os dois grupos fosfato da molécula. A presença de ligações de hidrogênio intramoleculares, no pirofosfato, em estudos *ab initio*, em fase gasosa, também foi observada recentemente em outro trabalho³⁸. Observou-se ainda no trabalho de Colvin e col.³⁷ que, para as formas aniônicas do pirofosfato, correspondentes ao pH neutro, as energias de hidrólise em fase gasosa apresentam valores altamente negativos, que foram atribuídos à repulsão eletrostática. Foram ainda feitas previsões das energias de hidrólise para os estados desprotonados de pirofosfatos, por meio de vários métodos, fundamentados no modelo do contínuo dielétrico do solvente aquoso, com o intuito de se efetuar estimativas das energias de solvatação dos reagentes e produtos. Observou-se que a solvatação aquosa age no sentido de cancelar a repulsão intramolecular por meio de interações eletrostáticas, sugerindo que a hidrólise destes compostos pode ser melhor descrita como um compromisso entre a repulsão intramolecular e as interações intermoleculares com o solvente.

INFLUÊNCIA DA ÁGUA NAS ENERGIAS DE HIDRÓLISE DOS COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA

A partir da década de 70, resultados obtidos por muitos grupos de pesquisa, levaram a outras conclusões sobre o assunto, após descobrir-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. O assunto foi revisado amplamente por de Meis^{39,40}. Diversos estudos dos ciclos catalíticos, de várias enzimas, indicam que a energia torna-se disponível para a enzima realizar trabalho antes da quebra do composto fosfatado. De acordo com esses resultados, a enzima, após ligar-se ao composto fosfatado, realiza trabalho sem o composto sofrer hidrólise. Neste processo, dá-se 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 dissociam-se da enzima após o composto fosfatado ser hidrolisado, em um processo que envolve uma mudança de energia relativamente pequena. Na reação reversa, como seria de se esperar, compostos fosfatados como o ATP ou o acetil-fosfato podem ser sintetizados na superfície enzimática, sem a necessidade de energia, em um sítio hidrofóbico da enzima. Uma mudança conformacional leva à entrada de água no sítio catalítico. No retorno ao meio aquoso, as constantes de equilíbrio para a hidrólise destes compostos voltam a ganhar valores muitos altos.

De acordo com de Meis³⁹, são muitas as evidências experimentais que demonstram a importância da água nos processos de transdução de energia. Em primeiro lugar, as energias de hidrólise de pirofosfato (PPi) ou ATP, em misturas aquosas de diversos solventes orgânicos, são similares àquelas medidas na presença das enzimas, ou seja, muito menores que aquelas medidas em soluções totalmente aquosas. Pode-se apreciar alguns destes resultados^{32, 41-57} em exposição na Tabela 3.

Outra evidência importante é conseguida pela observação de que a síntese de compostos ricos em energia, no sítio ativo das enzimas, é facilitada na presença de solventes orgânicos. Este efeito é obtido porque um decréscimo da concentração de água no sítio catalítico conduz a um decréscimo no valor do K_m aparente para P_i , ou seja, ocorre um grande aumento da afinidade da enzima por P_i . Isto é semelhante ao que ocorre, por exemplo, na 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 ativo da F_1 -ATPase mitocondrial, em meio 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 semelhante³⁹ é obtido se DMSO é adicionado ao meio: 40% deste solvente reduz o valor de K_m para a mesma faixa de 10⁻³ mol dm⁻³. Sakamoto⁵⁸ observou que a concentração de P_i necessária para a formação da metade da quantidade máxima de ATP aumenta

Tabela 3. Energias de hidrólise de ATP e PPi em diversos meios reacionais, à temperatura de 25°C.

Composto fosfatado	Condições reacionais	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
ATP	solução aquosa diluída	-20,5 a -44,8 ^a
ATP	F_1 -ATPase, miosina	+1,7 ^b
ATP	clorofórmio com vestígios de água	+1,3 ^c
PPi	solução aquosa diluída, pH ~7	-11,3 a -27,2 ^d
PPi	pirofosfatase inorgânica	-3,8 ^e
PPi	clorofórmio com vestígios de água	-7,5 ^c
PPi	50% de etileno glicol, pH 7,2	-7,5 ^f
PPi	50% de poli(etilenoglicol) 8000, pH 7,2	+0,8 ^f

a) Refs. 32, 41-45; b) Refs. 46-49; c) Ref. 44; d) Refs. 44, 50-54; e) Refs. 55-57; f) Ref. 52.

de 0,7 para 11 mmol dm⁻³ diminuído a concentração de DMSO no meio reacional de 40% para 10%. A habilidade de F₁ em hidrolisar ATP é inibida quando solventes orgânicos, que facilitam a formação do ATP, são adicionados ao meio. O efeito é facilmente revertido diluindo o solvente orgânico^{59,60}.

Concluindo, as energias para as reações de hidrólise e síntese do ATP e compostos relacionados, variam bastante, dependendo da composição do meio em que eles se encontram. A conceituação clássica de Lipmann para os compostos organofosfatados foi revisada recentemente por de Meis^{39,40}. De acordo com ele, a variação nos valores das constantes de equilíbrio de hidrólise de ATP e outros compostos possuindo uma ligação do tipo fosfoanidrido está relacionada às mudanças de entropia em solução⁴⁰. Ele propôs 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"⁴⁰. Em oposição a esta classe de compostos estão os outros compostos organofosfatados, como glicose-6-fosfato e glicerol- α -fosfato, que apresentam uma contribuição muito pequena em entropia para suas reações de hidrólise. Nesta situação, as energias de hidrólise quase não variam com as mudanças de pH, concentrações de sais e composição do meio. Fosfoésteres de baixa energia podem portanto ser redefinidos como compostos que não permitem o uso de energia entrópica⁴⁰.

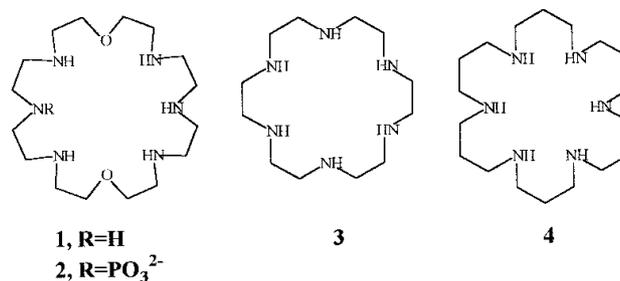
MODELAGEM ENZIMÁTICA NA HIDRÓLISE E SÍNTESE DE COMPOSTOS RICOS EM ENERGIA

A mimetização das reações biológicas de transferência do grupo fosforila, tem representado um dos maiores desafios para os químicos nas últimas três 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 acetilfosfato, assim como de compostos relacionados, já foram bastante estudados⁶¹⁻⁶⁹. Da mesma forma, vários trabalhos, envolvendo estudos mecanísticos da hidrólise de fosfoésteres, forneceram contribuições importantes para a compreensão do papel biológico destes compostos⁶⁹⁻⁷⁴. Também já foram realizados numerosos estudos do mecanismo de hidrólise do ATP^{10,75-77}. Considerando-se que íons metálicos participam nos processos biológicos onde ocorre a transferência de fosforila⁷⁸⁻⁸⁰, a hidrólise não-enzimática do ATP, promovida por íons metálicos, em especial por cátions divalentes, tem sido bastante investigada⁸¹⁻⁸⁷. Acelerações grandes de velocidade foram obtidas, particularmente com íons Co³⁺ coordenados⁸⁸⁻⁹⁰. Diversos exemplos recentes podem ainda ser encontrados na literatura para a hidrólise de fosfodiésteres mediada por íons metálicos⁹¹⁻⁹⁸.

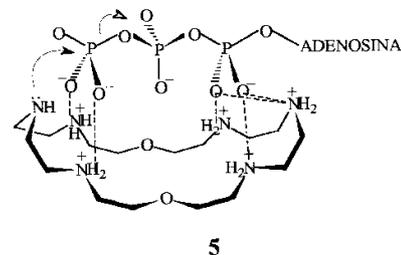
O desenvolvimento da química supramolecular tornou possível o planejamento de receptores de ânions capazes de catalisar reações envolvendo substratos de interesse biológico, tais como o acetil-fosfato e o ATP. Nos últimos anos, vários trabalhos nos quais é realizada a hidrólise do ATP, utilizando moléculas orgânicas como catalisadores, têm permitido o avanço no conhecimento dos fatores que controlam a hidrólise enzimática do ATP.

Várias poliaminas biológicas, como a putrescina, a espermidina, a espermina e a cadaverina, apresentam a interessante propriedade de complexar AMP, ADP e ATP⁹⁹, mas praticamente não influenciam nos valores das constantes de velocidade do ATP. Suzuki e col.^{100,101}, no entanto, verificaram que a pentaetileno-hexamina catalisa a hidrólise do ATP com um pequeno aumento de velocidade. Lehn e col.¹⁰² tiveram então a idéia de utilizar várias poliaminas macrocíclicas, tais como os compostos **1**, **3** e **4**, na catálise da hidrólise do ATP. Foram obtidos grandes aumentos na velocidade de hidrólise, que foram acompanhados por meio de espectroscopia de RMN de ³¹P. A maior aceleração de velocidade foi obtida para o

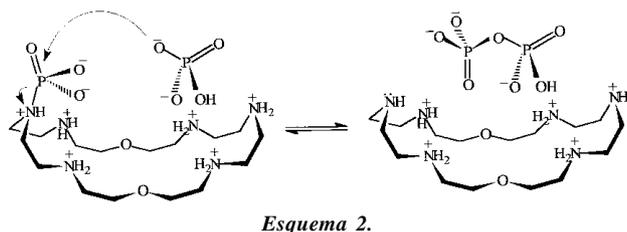
macrociclo **1**, [24]-N₆O₂, que complexa fortemente o ATP e catalisa a sua hidrólise para ADP e P_i, formando o fosforamidato **2** como intermediário.



A catálise funciona sobre uma faixa bastante larga de pH (de 2,5 a 8,5), apresenta cinética de 1^a ordem e é catalítica com renovação ("turnover") da poliamina. De acordo a Lehn e col.¹⁰² inicialmente ocorre a formação do complexo **5** entre o ATP e o macrociclo protonado. Em seguida, ocorre uma reação no próprio complexo, que deve envolver uma combinação de catálises ácida, básica e nucleofílica. O intermediário fosforamidato **2** é formado por fosforilação do macrociclo e é, a seguir, hidrolisado, com a recuperação do catalisador. A poliamina [24]-N₆O₂ funciona portanto como uma ATPase, e recebeu de Lehn a denominação de protoenzima^{103,104}.



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 denominado por Lehn como cocatálise¹⁰⁵. Mertes e col.¹⁰⁶ verificaram a ocorrência de cocatálise na reação de hidrólise do ATP, catalisada pelo macrociclo [24]-N₆O₂ e por íons metálicos (Ca²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺), na presença de íons fosfato. Após a formação do intermediário fosforamidato, ocorre a complexação do íon fosfato da solução ao macrociclo protonado, Esquema 2.



Em seguida, ocorre a transferência de fosforila, do fosforamidato **2** para o fosfato, com a formação de pirofosfato. A descomplexação do produto recupera o catalisador para um novo ciclo. Um trabalho semelhante foi realizado simultaneamente por

Hosseini e Lehn¹⁰⁷, no qual foi explorado o princípio da cocatálise para a síntese do pirofosfato, a partir do acetil-fosfato, empregando-se como catalisador o composto [24]-N₆O₂.

O mesmo macrociclo foi utilizado em seguida no estudo da catálise da fosforilação de ADP pelo acetil-fosfato, sintetizando-se o ATP via intermediário 2¹⁰⁸, sendo observado que os íons Ca²⁺ ou Mg²⁺ exercem um grande efeito sobre a formação de ATP¹⁰⁹. Enquanto em uma mistura de 5 equivalentes de [24]-N₆O₂, ADP e acetil-fosfato, em solução aquosa e pH neutro, somente 7,5% de ATP foi obtido, a adição de 1 equivalente de Mg²⁺ ao meio reacional elevou o rendimento para 24,7% em ATP¹⁰⁸. Os autores sugeriram que as espécies reativas podem estar formando um complexo ternário, envolvendo o intermediário fosforamidoato, o ADP e o íon metálico. Neste complexo, o cátion divalente funciona como ponte, ligando o grupo fosforila do intermediário ao grupo fosforila terminal do ADP, ligado ao macrociclo¹⁰⁹. O cátion tem assim a função de conservar as espécies reagentes próximas, facilitando a fosforilação.

Outros trabalhos interessantes foram realizados, empregando-se o composto [24]-N₆O₂ como mimetizador da N¹⁰-formil-tetrahidrofolato sintetase¹¹⁰, no acoplamento da síntese supra-molecular do ATP com sistemas enzimáticos consumidores de ATP¹¹¹ e também como modelo de enolase¹¹².

Não obstante todo o sucesso alcançado por Lehn e col. em seus estudos envolvendo reações de fosforilação *in vitro*, é importante lembrar que os modelos apresentados exigem, para seu funcionamento, um composto rico em energia que fosforile o macrociclo. Isto leva à geração de um intermediário fosforamidoato rico em energia, bastante hábil para formar ATP ou PPi. Assim, esta é uma limitação destes modelos, já que eles não mimetizam a formação de compostos ricos em energia a partir de reagentes simples, a exemplo do que acontece no sítio ativo das ATPases. Recentemente, apresentou-se um modelo para a síntese do acetil-fosfato considerando-se o aspecto da dessolvatação do nucleófilo¹¹³. Este modelo consistiu na reação, em acetonitrila anidra, do acetato de 2,4-dinitrofenila com n-decilfosfato de benziltrimetilamônio. A adição de íons n-decilfosfato ao solvente anidro permitiu ao nucleófilo dessolvatado reagir facilmente com o éster, levando à produção de acetil-n-decilfosfato. A adição de água ao meio exerceu uma enorme influência sobre os valores da constante de velocidade e sobre o curso da reação. Em solução aquosa, o ânion fortemente solvatado não pôde agir como nucleófilo. Nestas condições, foram obtidos somente os produtos de hidrólise do éster. Os parâmetros de ativação, obtidos para a reação-modelo na ausência e na presença de pequenas quantidades de água, revelaram que as energias livres de ativação (E_a) crescem com o aumento da concentração de água no meio reacional¹¹⁴. As mudanças em ΔS[#] também são bastante significativas (-116 e -150 J K⁻¹ mol⁻¹ para 99% e 100% de acetonitrila, respectivamente). Os valores de ΔH[#] aumentam com a adição de água, refletindo a maior dificuldade do íon n-decilfosfato para atuar como nucleófilo quando a água está presente. Os valores de ΔS[#] negativos sugerem que no estado de transição encontram-se interagindo o éster e o íon n-decilfosfato. A adição de água aumenta os valores de ΔS[#], indicando uma maior dificuldade da água em solvatar o estado de transição em relação aos reagentes, em virtude da dispersão da carga negativa do nucleófilo no estado de transição.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme relatado, o estudo dos compostos fosfatados ricos em energia, representa uma das questões mais fascinantes das que vêm sendo estudadas nas últimas décadas. Muitos esforços foram empregados no intuito de se buscar entender a química destes compostos. Se inúmeras questões levantadas já foram respondidas, muitas outras ainda necessitam ser exploradas.

A questão do papel da água nos sistemas biológicos, particularmente a sua ausência, foi até o momento muito pouco explorada, não obstante o fato de saber-se que ela, por exemplo,

ocupa 85% do volume total da massa cinzenta do cérebro. Trabalhos recentes têm sugerido que a água exerce um importante papel estruturador das células, através da formação de "clusters" ou agregados ordenados em tamanhos e formatos que propiciam a construção da célula¹¹⁵. Assim, são necessários estudos mais aprofundados com o objetivo de se descobrir que outros papéis a água pode desempenhar nos eventos bioquímicos. Este parece ser um bom caminho para que se possa vislumbrar com maior nitidez como ocorrem os processos de transdução de energia.

Embora muitos estudos envolvendo cálculos teóricos venham sendo utilizados no estudo dos compostos ricos em energia e dos mecanismos enzimáticos de diferenciação entre sulfato e fosfato nos sítios ativos¹¹⁶⁻¹¹⁸, ainda há muito para ser feito no campo da modelagem teórica do solvente.

Finalmente, há que se considerar o muito a ser feito na mimetização da síntese enzimática do ATP e dos outros compostos ricos em energia. Diversos modelos enzimáticos^{105,119-129} podem ser sintetizados e explorados. Eles poderão contribuir grandemente na elucidação dos diversos aspectos que compõem a química das enzimas responsáveis pela transdução de energia. Afinal, conforme escreveu Knowles¹³⁰, a catálise enzimática não é diferente daquela efetuada pelos modelos miméticos: é somente melhor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FINEP e PADCT-II pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Govindjee, D.; *Bioenergetics of Photosynthesis*; Academic Press: New York 1975.
2. Govindjee, D.; Whitmarsh, J.; in *Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria*; Govindjee, D., Ed.; Academic Press: New York 1982.
3. Andreo, C. S.; Vallejos, R. H.; *Fotosíntesis*; General Secretariat of the Organization of American States: Washington, D.C. 1984.
4. Kirschbaum, J.; *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 28.
5. Corbridge, D. E. C.; *Phosphorus*; Elsevier: Amsterdam 1978; pp 261-325.
6. Lipmann, F.; *Adv. Enzymol.* **1941**, *1*, 99.
7. O símbolo P~O é comumente usado para se descrever uma ligação fosfatada de alta energia.
8. Westheimer, F. H.; *Science* **1987**, *235*, 1173.
9. Bentley, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2765.
10. Miller, D. L.; Westheimer, F. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1507.
11. Davis, B. D.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *78*, 497.
12. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*; John Wiley: New York 1990.
13. Campbell, M.; *Biochemistry*; Saunders: Orlando 1995.
14. Penefsky, H. S.; Pullman, M. E.; Datta, A.; Racker, E.; *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3330.
15. Walker, J. E.; Fearnley, I. M.; Lutter, R.; Todd, R. J.; Runswick, M. J.; *Phil. Trans. R. Soc.* **1990**, *326*, 367.
16. Penefsky, H. S.; Cross, R. L.; *Adv. Enzym. Rel. Areas Molec. Biol.* **1991**, *64*, 173.
17. Boyer, P. D.; *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1140*, 215.
18. Cross, R. L.; *Nature* **1994**, *370*, 594.
19. Amzel, L. M.; Bianchet, M. A.; Pedersen, P. L.; *Membrane Protein Structure Experimental Approaches*; White, S. H.; Ed.; Oxford: New York, 1994.
20. Gogol, E. P.; Lucken, U.; Bork, T.; Capaldi, R. A.; *Biochemistry* **1989**, *28*, 4709.
21. Bianchet, M.; Ysern, X.; Hüllihen, J.; Pedersen, P. L.; Amzel, L. M.; *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 21197.

22. Boekema, E. J.; Böttcher, B.; *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1098*, 131.
23. Moser, C. C.; Keske, J. M.; Warncke, K.; Farid, R. S.; Dutton, P. L.; *Nature* **1992**, *355*, 796.
24. Abrahams, J. P.; Leslie, A. G. W.; Lutter, R.; Walker, J. E.; *Nature* **1994**, *370*, 621.
25. Wilkens, S.; Capaldi, R. A.; *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1994**, *375*, 43.
26. Capaldi, R.; Aggeler, R.; Turina, P.; Wilkens, S.; *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 284.
27. Kalckar, H. M.; *Chem. Rev.* **1941**, *28*, 71.
28. Hill, T. L.; Morales, M. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1656.
29. Riseman, J.; Kirkwood, J. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 2820.
30. Pullman, B.; Pullman, A.; *Quantum Biochemistry*; Interscience: New York 1963.
31. Boyd, D. B.; Lipscomb, W. N.; *J. Theor. Biol.* **1969**, *25*, 403.
32. George, P.; Witonsky, R. J.; Trachtman, M.; Wu, C.; Dorwatr, W.; Richman, L.; Richman, W.; Shurayh, F.; Lentz, B.; *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *223*, 1.
33. Hayes, D. M.; Kenyon, G. L.; Kollman, P. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4331.
34. Ewig, C. S.; Van Wazer, J. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 79.
35. O'Keefe, M.; Domenges, B.; Gibbs, G. V.; *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 2304.
36. Saint-Martin, H.; Otega-Blake, I.; Lez, A.; Adamowitz, L.; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1080*, 205.
37. Colvin, M. E.; Evleth, E.; Akacem, Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4357.
38. Ma, B.; Meredith, C.; Schaefer, H. F.; *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 8216.
39. de Meis, L.; *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *973*, 333.
40. de Meis, L.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *306*, 287.
41. Alberty, R. A.; *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 1337.
42. Alberty, R. A.; *J. Chem. Educ.* **1969**, *46*, 713.
43. Phillips, C. R.; George, P.; Rutman, J. R.; *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 3330.
44. Wolfenden, R.; Williams, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4345.
45. Gajewski, E.; Steckler, D. K.; Goldberg, R. N.; *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12733.
46. Boyer, P. D.; Cross, R. L.; Momsen, W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 2837.
47. Boyer, P. D.; Chance, B.; Ernster, L.; Mitchell, P.; Racker, E.; Slater, E. C.; *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 955.
48. Gomez-Puyou, A.; Gomez-Puyou, M. T.; De Meis, L.; *Eur. J. Biochem.* **1986**, *159*, 133.
49. Eisenberg, E.; Hill, T. L.; *Science* **1985**, *227*, 999.
50. Flodgaard, H.; Fleron, P.; *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3465.
51. de Meis, L.; *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6090.
52. de Meis, L.; Behrens, M. I.; Petretski, J. H.; Politi, M. J.; *Biochemistry* **1985**, *24*, 7783.
53. Daley, L. A.; Renosto, F.; Segel, I. H.; *Anal. Biochem.* **1986**, *157*, 385.
54. Romero, P. J.; de Meis, L.; *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7869.
55. Janson, C. A.; Degani, C.; Boyer, P. D.; *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 3743.
56. Springs, B.; Welsh, K. M.; Cooperman, B. S.; *Biochemistry* **1981**, *20*, 6384.
57. Cooperman, B. S.; *Methods Enzymol.* **1982**, *87*, 526.
58. Sakamoto, J.; *J. Biochem.* **1984**, *96*, 483.
59. Sakamoto, J.; Tomomura, Y.; *J. Biochem.* **1983**, *93*, 1601.
60. de Meis, L.; *FEBS Lett.* **1987**, *213*, 333.
61. Koshland, D. E., Jr.; *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2286.
62. Park, J. H.; Koshland, D. E., Jr.; *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 986.
63. di Sabato, G.; Jencks, W. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4393.
64. di Sabato, G.; Jencks, W. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4400.
65. Phillips, D. R.; Fife, T. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6803.
66. Phillips, D. R.; Fife, T. H.; *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2710.
67. Lau, H. P.; Gutsche, C. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1857.
68. Hertschlag, D.; Jencks, W. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7938.
69. de Meis, L.; Suzano, V. A.; *FEBS Lett.* **1988**, *232*, 73.
70. Kirby, A. J.; Varvoglis, A. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *89*, 415.
71. Bunton, C. A.; Fendler, E. J.; Sepulveda, L.; Yang, K. U.; *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5512.
72. Westheimer, F. H.; *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 313.
73. Hengge, A. C.; Cleland, W. W.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1972.
74. Tsao, B. L.; Pieters, R. J.; Rebek, J., Jr.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2210.
75. Benkovic, S. J.; Schray, K. J.; In *The Enzymes*; Boyer, P. D.; Lardy, H.; Myrback, Eds.; Academic Press; New York 1973, vol. 8.
76. Ramirez, F.; Marecek, J. F.; *Pure Appl. Chem.* **1980**, *52*, 2213.
77. Meyerson, S.; Kuhn, E. S.; Ramirez, F.; Marecek, J. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7231.
78. Eichhorn, G. L.; *Met. Ions Biol. Syst.* **1980**, *10*, 1.
79. Wu, F. Y.-H.; Wu, C.-W.; *Met. Ions Biol. Syst.* **1983**, *15*, 157.
80. Kalbitzer, H. R.; *Met. Ions Biol. Syst.* **1986**, *22*, 81.
81. Scheller-Krattiger, V.; Sigel, H.; *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2628.
82. Sigel, H.; *Coord. Chem. Rev.* **1987**, *79*, 293.
83. Haight, G. P., Jr.; *Coord. Chem. Rev.* **1987**, *79*, 293.
84. Tafesse, F.; Milburn, R. M.; *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *135*, 119.
85. Tafesse, F.; Massoud, S. S.; Milburn, R. M.; *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2591.
86. Meyer, G. R.; Cornelius, R.; *J. Inorg. Biochem.* **1984**, *22*, 249.
87. Sigel, H.; Tribolet, R.; *J. Inorg. Biochem.* **1990**, *40*, 163.
88. Suzuki, S.; Higashiyama, T.; Nakahara, A.; *Bioorg. Chem.* **1978**, *8*, 277.
89. Hediger, M.; Milburn, R. M.; *J. Inorg. Biochem.* **1982**, *16*, 165.
90. Milburn, R. M.; Gautum-Basak, M.; Tribolet, R. J.; Sigel, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3315.
91. Linkletter, B.; Chin, J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 472.
92. Takasaki, B. K.; Chin, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8582.
93. Young, M. J.; Chin, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10577.
94. Komiyama, M.; *J. Biochem. (Tokyo)* **1995**, *118*, 665.
95. Rammo, J.; Hettich, R.; Roigk, A.; Schneider, H.-J.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1996**, 105.
96. Breslow, R.; Zhang, B. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7893.
97. Tsubouchi, A.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11614.
98. Tsubouchi, A.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7399.
99. Nakai, C.; Glinsmann, W.; *Biochemistry* **1977**, *16*, 5636.
100. Suzuki, S.; Higashiyama, T.; Nakahara, A.; *Bioorg. Chem.* **1973**, *2*, 145.
101. Suzuki, S.; Nakahara, A.; *Bioorg. Chem.* **1975**, *4*, 250.
102. Hosseini, M. W.; Lehn, J. -M.; Mertes, M. P.; *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 2454.
103. Blackburn, G. M.; Thatcher, G. R. J.; Hosseini, M. W.; Lehn, J. -M.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2779.
104. Hosseini, M. W.; Lehn, J. -M.; Maggiora, L.; Mertes, K. B.; Mertes, M. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 537.
105. Lehn, J. -M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89.
106. Yohannes, P. G.; Mertes, M. P.; Mertes, K. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8288.

107. Hosseini, M. W.; Lehn, J. -M.; *J. Chem. Soc.; Chem. Commun.* **1985**, 1155.
108. Hosseini, M. W.; Lehn, J. -M.; *J. Chem. Soc.; Chem. Commun.* **1988**, 397.
109. Hosseini, M. W.; Lehn, J. -M.; *J. Chem. Soc.; Chem. Commun.* **1991**, 451.
110. Mertes, M. P.; Mertes, K. B.; *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 413.
111. Fenniri, H.; Lehn, J. -M.; *J. Chem. Soc.; Chem. Commun.* **1993**, 1819.
112. Fenniri, H.; Lehn, J. -M.; Marquis-Rigault, A.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 337.
113. Machado, V. G.; Nome, F.; *Chem. Commun.* **1997**, 1917.
114. Machado, V. G.; Nome, F.; Resumos da Sociedade Brasileira de Química, FQ-72, 1997.
115. Watterson, J. G.; *Biochem. J.* **1987**, 248, 615.
116. Thatcher, G. R. J.; Cameron, D. R.; Nagelkerke, R.; Schmitke, J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 386.
117. Luecke, H.; Quioco, F. A.; *Nature* **1990**, 347, 402.
118. Anderson, C. J.; Lucas, L. J. H.; Widlanski, T. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3889.
119. Cram, D. J.; *Science* **1988**, 240, 760.
120. Lehn, J. -M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304.
121. Wolfe, J.; Muehldorf, A.; Rebek, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1453.
122. Breslow, R.; *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 146.
123. Jubian, V.; Veronese, A.; Dixon, R. P.; Hamilton, A. D.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1237.
124. Kirby, A. J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35, 707.
125. Kirby, A. J.; *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 290.
126. Murakami, Y.; Kikuchi, J.; Hisaeda, Y.; Hayashida, O.; *Chem. Rev.* **1996**, 96, 721.
127. Muche, M. -S.; Göbel, M. W.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2126.
128. Kaim, W.; Rall, J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 43.
129. Willner, I.; Rubin, S.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 367.
130. Knowles, J. R.; *Nature* **1991**, 350, 121.