

Artigo

Avanços Recentes na Decomposição de Triésteres de Fosfato Neurotóxicos**Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Souza, B. S.; Fiedler, H. D.; Nome, F.****Rev. Virtual Quim.*, 2014, 6 (3), 632-652. Data de publicação na Web: 13 de abril de 2014<http://www.uff.br/rvq>**Recent Advances on the Decomposition of Neurotoxic Phosphorous Triesters**

Abstract: The anti-cholinesterase activity exhibited by several organophosphorus compounds brings interest to the development of new antidotes for poisoning cases with such chemicals. The advance of more efficient methods for destruction of stockpiles of chemical warfare agents is also currently important. In this sense, the aim of this work is to present a review of the recent progress in the investigation of the reactivity of phosphate triesters in several different systems, which can give insights into the development of novel strategies for application in chemical defense.

Keywords: Organophosphorus; agrochemicals; chemical weapons; chemical defense; detoxification; dephosphorylation.

Resumo

A atividade anticolinesterase exibida por diversos organofosforados atrai interesse para o desenvolvimento de novos antídotos contra o envenenamento por tais compostos. O desenvolvimento de métodos mais eficientes para a destruição de estoques de armas químicas também é importante atualmente. Nesse sentido, o propósito deste trabalho é revisar o progresso recente no estudo da reatividade de triésteres de fosfato em diversos sistemas, o que pode fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novas estratégias para aplicação em defesa química.

Palavras-chave: Organofosforados; agroquímicos; armas químicas; defesa química; detoxificação; desfosforilação.

* Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, CEP 88040-900, Florianópolis-SC, Brasil.

✉ faruk.nome@ufsc.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20140040](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140040)

Avanços Recentes na Decomposição de Triésteres de Fosfato Neurotóxicos

Eduardo H. Wanderlind, Michelle Medeiros, Bruno S. Souza, Haidi D. Fiedler, Faruk Nome*

Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, CEP 88040-900, Florianópolis-SC, Brasil.

* faruk.nome@ufsc.br

Recebido em 4 de abril de 2014. Aceito para publicação em 10 de abril de 2014

1. Introdução
2. Mecanismos de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato
3. Hidrólise de triésteres fosfóricos
4. Reações de triésteres de fosfato com alfa-nucleófilos
5. Sistemas micro-heterogêneos e heterogêneos
6. Conclusões e perspectivas

1. Introdução

Os compostos organofosforados foram desenvolvidos ao longo do século passado para aplicação como armas químicas e pesticidas. Basicamente, estes compostos inibem o funcionamento de algumas enzimas, principalmente do sistema nervoso, podendo causar a morte dependendo do grau de intoxicação do indivíduo.^{1,2} Embora o desenvolvimento e a utilização de armas químicas sejam fortemente rechaçados

através de acordos internacionais, ainda existem grandes quantidades estocadas de organofosforados em diversos países. No entanto, a destruição dos estoques não é trivial, pois ainda não são conhecidos processos de baixo custo que transformem os organofosforados unicamente em produtos de menor toxicidade e que possam ser devolvidos diretamente ao meio ambiente.^{3,4} A Figura 1 apresenta alguns exemplos de agentes neurotóxicos fosforados utilizados com fins militares.

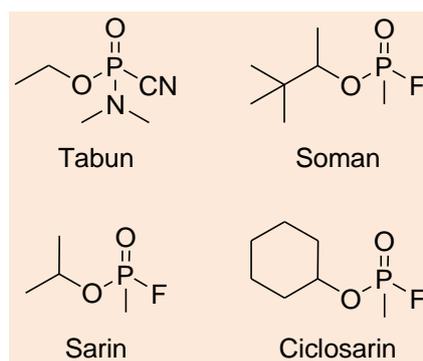


Figura 1. Exemplos de organofosforados utilizados para fins militares

A Figura 2 apresenta a estrutura de alguns compostos organofosforados que encontram aplicações como agroquímicos.^{3,5} Como se pode observar, a estrutura desses compostos é relacionada aos da Figura 1 e, portanto, a maioria exibe elevada toxicidade em humanos. Assim, agências reguladoras controlam a venda e utilização de agroquímicos, quer limitando a venda para uso agrícola somente, quer estabelecendo limites de concentração seguros para uso doméstico. No entanto, a aplicação de

agroquímicos é ainda realizada de modo indiscriminado em muitos países, a exemplo do Brasil, e inúmeros casos de intoxicação aguda são reportados como consequência da utilização em grandes quantidades e da falta de equipamentos de proteção adequados para aplicação dos produtos.⁵ Nesse sentido, reforça-se a importância do estudo em detalhes da reatividade de organofosforados, cujos resultados podem nortear o desenvolvimento de sistemas eficientes para defesa química.

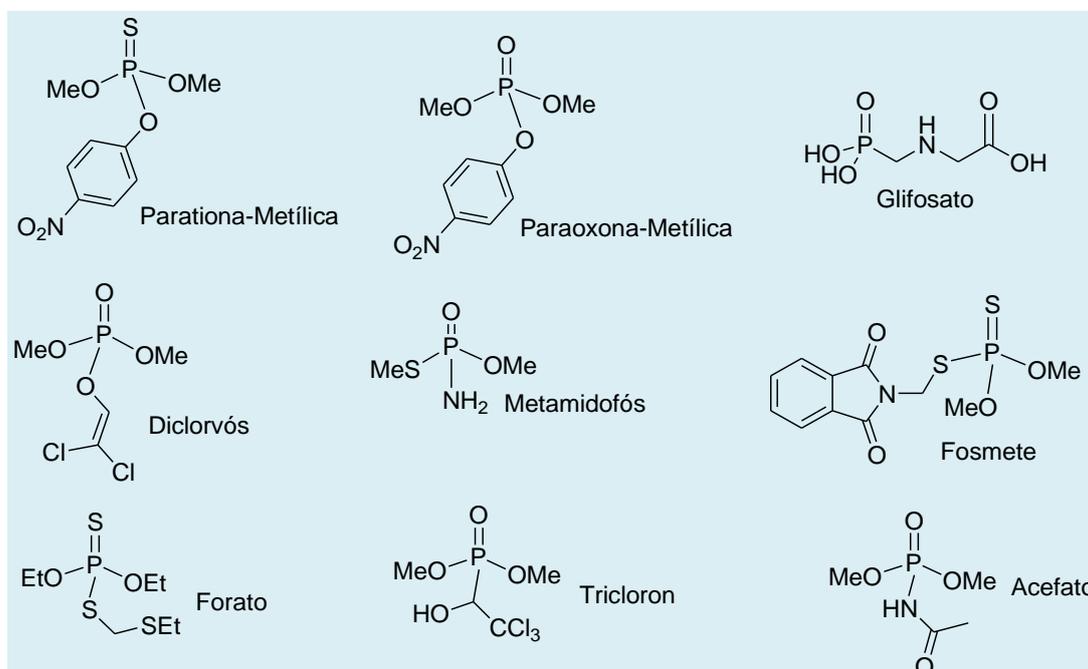


Figura 2. Exemplos de organofosforados utilizados para fins agrícolas. A paraoxona-metílica é proveniente da biotransformação da parationa-metílica⁶

Assim, existe motivação na comunidade científica na busca por: (i) novos antídotos

para o envenenamento por organofosforados e compostos correlatos, e (ii) novos

processos de destoxificação de tais compostos, visando a destruição dos estoques de armas químicas. Para alcançar tais objetivos é necessário que se conheça em detalhes a reatividade intrínseca dos organofosforados, e as ferramentas da físico-química orgânica têm sido de grande valia nesse sentido. Dentre as estratégias experimentais adotadas pelos pesquisadores, destacam-se o acompanhamento cinético de diversos tipos de reações de organofosforados, a caracterização detalhada dos produtos reacionais e a investigação de correlações estrutura-reatividade. Adicionalmente, realiza-se a modelagem teórica das reações por métodos computacionais.

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo cinético e mecanístico de reações de substituição nucleofílica em triésteres de fosfato em diversos sistemas. A paraoxonametilica é um exemplo dessa classe de substâncias que podem ser descritas como derivados orgânicos do ácido fosfórico, onde os três hidrogênios encontram-se substituídos por grupos alquílicos ou arílicos, mantendo-se o grupo fosfato e as ligações P–O.³ O propósito do presente texto é revisar nosso avanço recente nessa área. Os resultados contribuem para a evolução da tecnologia atual para clivagem de triésteres fosfóricos na medida em que abrangem uma série de aspectos relevantes, por exemplo, a recuperação de catalisadores ao término da reação. O leitor encontrará mais informações sobre diversos sistemas desenvolvidos em revisões detalhadas sobre defesa química.^{1,4,7}

2. Mecanismos de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato

Já que grande parte dos sistemas propostos para destoxificação e defesa

química são desenvolvidos em sistemas aquosos, é natural que a reatividade dos substratos frente à reação de hidrólise seja ponto de partida. Além disso, as reações em sistemas biológicos ocorrem em sistemas aquosos. Portanto, os mecanismos clássicos de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato serão inicialmente revisados e, em seguida, foco especial será dado na evolução do entendimento sobre a hidrólise de triésteres de fosfato.

Considerando o átomo de fósforo como o centro eletrofílico da reação, os mecanismos das reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato costumam ser classificados em associativo, dissociativo ou concertado,⁸ e podem ser representados através do diagrama de More O'Ferrall-Jencks,⁹ ilustrado na Figura 3. No diagrama, o mecanismo (i) corresponde ao mecanismo associativo ($A_N + D_N$), em que o ataque nucleofílico ocorre em uma primeira etapa, levando à formação de um intermediário fosforano, e a eliminação do grupo de saída ocorre em uma segunda etapa. O mecanismo (ii) é denominado dissociativo ($D_N + A_N$) e também ocorre em duas etapas, sendo que a primeira corresponde à eliminação do grupo de saída, havendo a formação de um intermediário metafosfato, ao qual o nucleófilo é adicionado na segunda etapa. Por fim, o mecanismo (iii) é denominado concertado ($A_N D_N$), e o ataque nucleofílico e a eliminação do grupo de saída ocorrem de forma simultânea, havendo a formação de um único estado de transição. O diagrama ainda exemplifica outros dois mecanismos possíveis, (iv) e (v), que também não passam por intermediários, mas que variam no grau de sincronicidade para formação do estado de transição. Em (iv), a formação da ligação com o nucleófilo ocorre antecipadamente à quebra da ligação com o grupo de saída, ao passo que (v) representa um caminho concertado em que a quebra da ligação com o grupo de saída é favorecida.

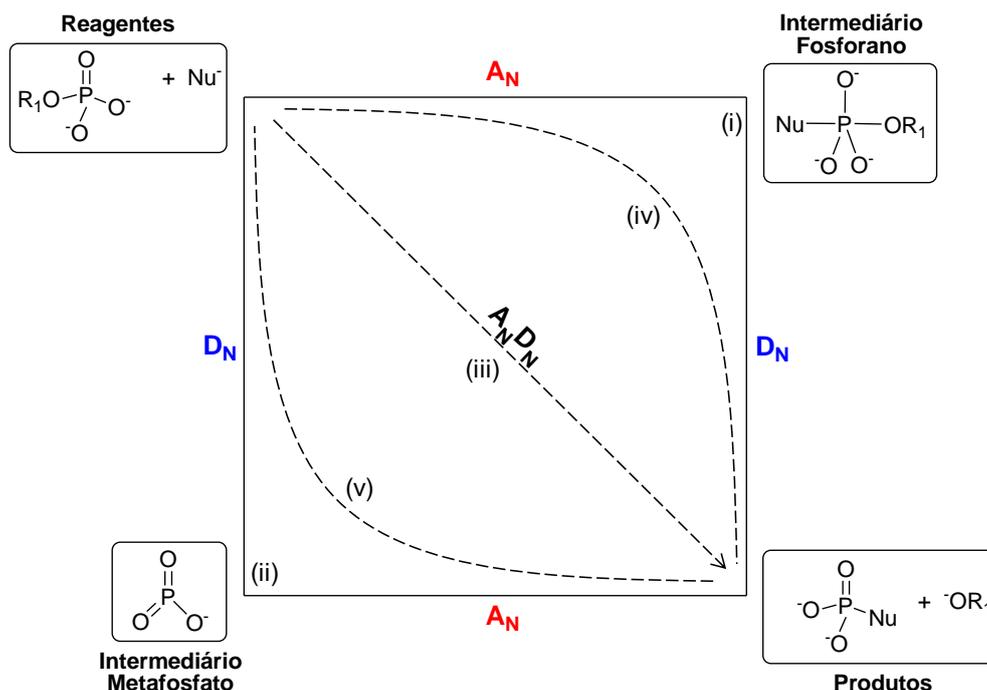


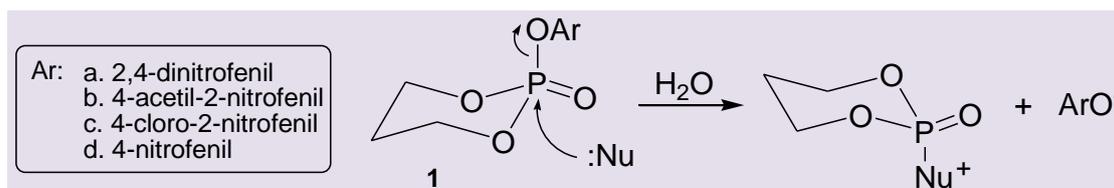
Figura 3. Diagrama de More O'Ferrall-Jencks para reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato, exemplificado com um monoéster. De acordo com a nomenclatura IUPAC, A_N , D_N e $A_N D_N$ referem-se às etapas associativa, dissociativa e concertada¹⁰

Não é possível estabelecer um padrão rigoroso de reatividade de ésteres de fosfato frente a reações de substituição nucleofílica, já que a reatividade depende de diversas variáveis, por exemplo, as habilidades do nucleófilo e do grupo de saída. Ainda assim, observa-se uma tendência geral de que monoésteres de fosfato reagem via mecanismos concertados de caráter dissociativo,^{11,12} ao passo que diésteres de fosfato mostram uma preferência por caminhos concertados de caráter associativo.^{13,14} A reatividade de triésteres fosfóricos será revisada na seção seguinte.

O ataque de um dado nucleófilo pode ocorrer também em um dos substituintes do éster de fosfato, no átomo de carbono vizinho ao oxigênio do grupo fosfato. Nesse caso, o grupo fosfato é substituído pelo nucleófilo, e as possibilidades mecânicas em geral pertencem à uma das categorias: substituição nucleofílica em carbono tetraédrico, ou substituição nucleofílica aromática.⁹

3. Hidrólise de triésteres fosfóricos

As reações de substituição nucleofílica em triésteres de fosfato foram inicialmente estudadas de forma sistemática por Khan e Kirby.¹⁵ Esses autores reportaram em 1970 as reações de uma série de triésteres derivados do 1,3-propanodiol com diversos nucleófilos, incluindo a água (Esquema 1). Os substratos dialquil arílicos foram convenientemente escolhidos porque a liberação do grupo de saída arílico é favorecida na faixa de pH, em detrimento dos substituintes alquílicos, e facilmente acompanhada por espectrofotometria de UV-Vis. As reações de hidrólise foram estudadas com $Ar = a-d$ (Esquema 1), e experimentos de marcação isotópica confirmam que as substituições em (1) procedem via quebra de ligação P-O.¹⁵



Esquema 1. Substituição nucleofílica em triésteres de fosfato derivados do 1,3-propanodiol

Nas reações de hidrólise de (1), as constantes de velocidade (k_0) aumentam à medida que os substratos tornam-se mais reativos, isto é, com melhores grupos de saída, e a sensibilidade de k_0 em relação ao pK_a do grupo de saída foi avaliada em termos de uma correlação de Brønsted para grupo de saída, a 39 °C: $\log k_0 = -0,82 - 0,99 pK_a$ (min^{-1}) (Figura 4).¹⁵ Embora essa correlação

tenha sido obtida para uma série de triésteres dialquil arílicos, ela foi utilizada por décadas para estimar a constante de hidrólise de novos triésteres, independente da natureza dos grupos espectadores, já que a reatividade nas reações de transferência do grupo fosforila era essencialmente avaliada em função das habilidades do nucleófilo e do grupo de saída.

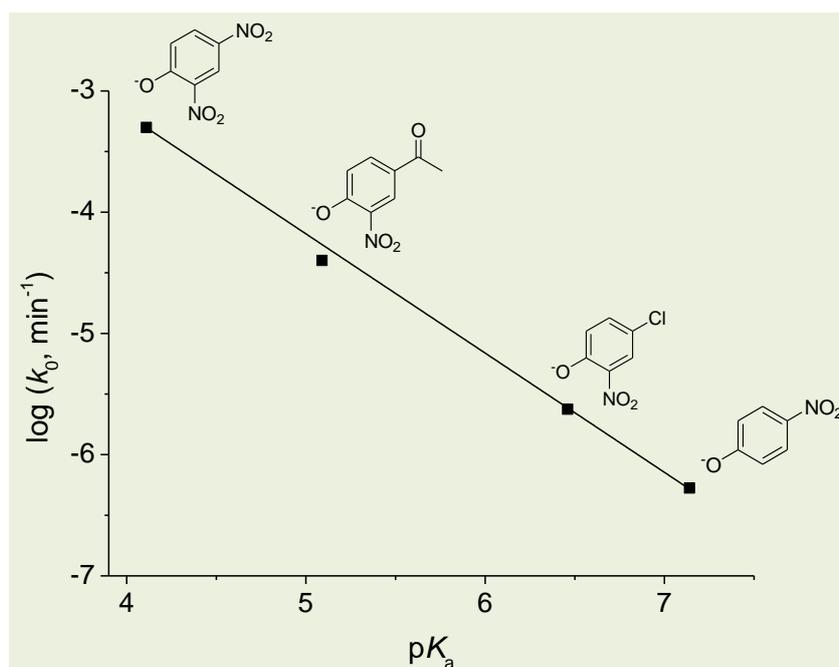


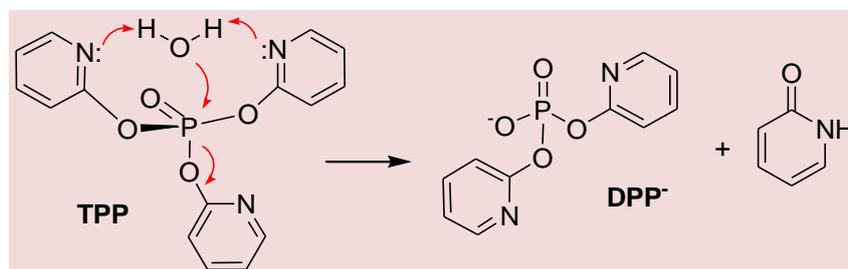
Figura 4. Gráfico de Brønsted para a hidrólise dos triésteres 1a-d (Esquema 1), a 39 °C.¹⁵ Para fins didáticos, somente as estruturas dos grupos de saída são mostradas

De fato, a correlação de 1970 foi recentemente utilizada para estimar a constante de velocidade de hidrólise do triéster *tris*-2-piridil fosfato (TPP), Esquema 2, considerando o pK_a de 9,09 para o grupo de saída 2-hidroxipiridina.¹⁶ No entanto, o valor experimental obtido ($k_0 = 2,35 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, a 25 °C) é aproximadamente 10^8 vezes maior que

o valor previsto. Inicialmente, a reatividade atípica do substrato foi explicada através de um mecanismo eficiente de catálise básica geral intramolecular promovida pelos grupos piridínicos espectadores, que assistem o ataque nucleofílico da água no átomo de fósforo (Esquema 2). O valor bastante negativo de entropia de ativação e resultados

de efeito isotópico cinético de solvente, incluindo um estudo de inventário de prótons, eram a priori consistentes com um

mecanismo com a transferência de dois prótons para a formação de um estado de transição cíclico.¹⁶



Esquema 2. Hidrólise do triéster de fosfato TPP

No entanto, resultados complementares mostraram que a hidrólise do TPP é sensível à presença de tampões, isto é, a hidrólise do substrato sofre catálise básica geral promovida por bases externas em reações intermoleculares.¹⁷ Tais resultados contestam o mecanismo inicialmente proposto, já que reações intermoleculares geralmente não competem com reações intramoleculares altamente eficientes, que exibem vantagens, como proximidade e geometria apropriada entre grupos funcionais reativos. De fato, considerando a baixa basicidade do nitrogênio do grupo piridínio espectador ($pK_b = 13,78$), uma contribuição mínima do mecanismo do Esquema 2 deve ser esperada.

Além da catálise por tampão, outros resultados indiretos colocaram em cheque o mecanismo de catálise intramolecular na hidrólise do TPP. Em particular, obteve-se uma constante de hidrólise de mesma magnitude que a do TPP para o triéster *tris*-3-clorofenil fosfato, cujo grupo de saída possui $pK_a = 9,02$, próximo ao da 2-hidroxipiridina ($pK_a = 9,09$).¹⁷ Considerando que o *tris*-3-

clorofenil fosfato não dispõe de grupos funcionais catalíticos, os resultados sugerem que as constantes de hidrólise substancialmente maiores de tais triésteres, comparadas aos valores estimados pela correlação de Khan e Kirby para triésteres com grupos de saída de $pK_a \sim 9$, são consequência direta de efeitos eletrônicos dos substituintes espectadores arílicos.¹⁷ Nesse sentido, investigou-se a hidrólise de novas séries de triésteres fosfóricos, cujas estruturas mais representativas são mostradas na Figura 5, e comprovou-se recentemente que as constantes de hidrólise são significativamente influenciadas pela natureza dos grupos espectadores (alquílicos ou arílicos).¹⁷ Consequentemente, concluiu-se que o TPP não possui constante de hidrólise maior do que a esperada para um triéster com grupo de saída de $pK_a = 9,09$, isso porque o valor de k_0 foi estimado por uma correlação para triésteres diaquílicos arílicos, já que o efeito dos grupos espectadores não havia sido quantificado até então.

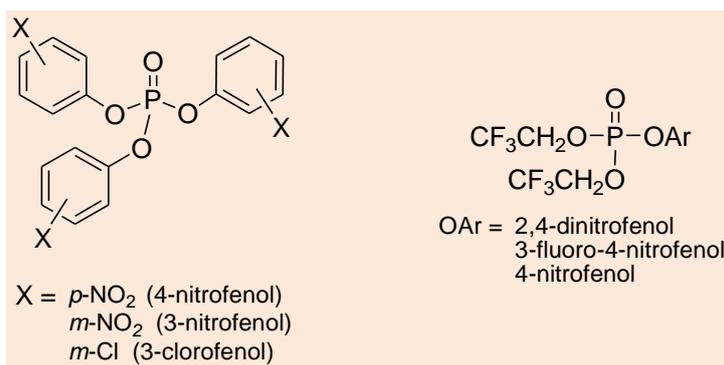


Figura 5. Famílias de triésteres de fosfato estudadas

A fim de quantificar o efeito dos grupos espectadores, novas correlações foram obtidas para a hidrólise de triésteres de fosfato, considerando ambos valores de pK_a : do grupo de saída e dos grupos espectadores.¹⁷ A Figura 6 apresenta duas novas relações lineares de energia livre para grupo de saída (arílico), juntamente com a correlação de 1970. Observa-se que as retas apresentam inclinações semelhantes, mas, para um dado grupo de saída, os valores de k_0 das novas correlações são maiores em várias ordens de magnitude em comparação com a correlação dos triésteres (1). Essa observação é bastante evidente para o 4-nitrofenol como grupo de saída ($pK_a = 7,14$). Os resultados indicam que a reatividade dos triésteres frente à reação de hidrólise cresce com o caráter elétron-retirador dos substituintes, que devem elevar o nível de energia dos reagentes e estabilizar a densidade de carga negativa em desenvolvimento no átomo de fósforo no estado de transição. Em particular, para a série de triésteres triarílicos, a inclinação da reta deve ser função de dois termos, a sensibilidade ao grupo de saída (β_{LG}) e a sensibilidade ao grupo espectador (β_{NLG}), e, portanto, deve corresponder à soma $\beta_{LG} + 2\beta_{NLG}$, embora o coeficiente angular obtido

seja coincidentemente igual ao reportado para a série de triésteres (1).¹⁷

A sensibilidade aos grupos espectadores (β_{NLG}) foi avaliada através dos dados de hidrólise de uma série de triésteres de fosfato com grupo de saída arílico constante (4-nitrofenol) e diferentes grupos espectadores.¹⁷ A Figura 7 mostra que são obtidas duas correlações entre os valores de k_0 e o somatório dos pK_a 's dos grupos espectadores, indicando maior sensibilidade das constantes de hidrólise a substituintes alquílicos (sistemas dialquil arílicos) em comparação aos substituintes arílicos (sistemas triarílicos). Em outras palavras, confirma-se que grupos espectadores exercem efeito substancial na hidrólise de triésteres, comparável ao efeito do grupo de saída, e os resultados mostram reatividade diferenciada dos substratos para a série com grupo de saída arílico constante, e com grupos espectadores dialquílicos ou diarílicos. Assim, no panorama mais recente da hidrólise de triésteres fosfóricos, os parâmetros de sensibilidade para os sistemas triarílicos são $\beta_{LG} = -0,42$ e $\beta_{NLG} = -0,28$, e para os sistemas dialquil arílicos, $\beta_{LG} = -0,99$ e $\beta_{NLG} = -0,61$.¹⁸

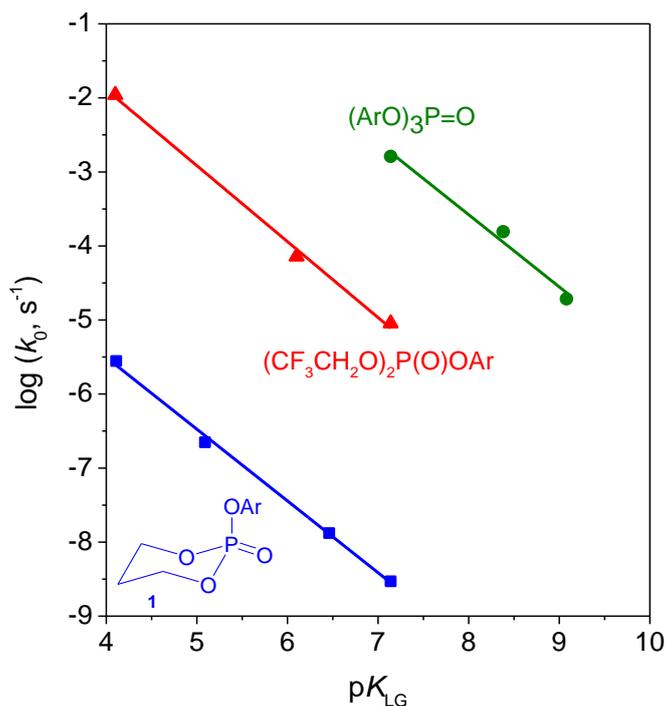


Figura 6. Gráficos de Brønsted referentes aos grupos de saída arílicos (OAr) para a hidrólise de três séries de triésteres de fosfato, obtidas a 25°C ou, para a série de triésteres (1), normalizada a 25°C.¹⁸ As estruturas para as novas correlações são mostradas na Figura 5

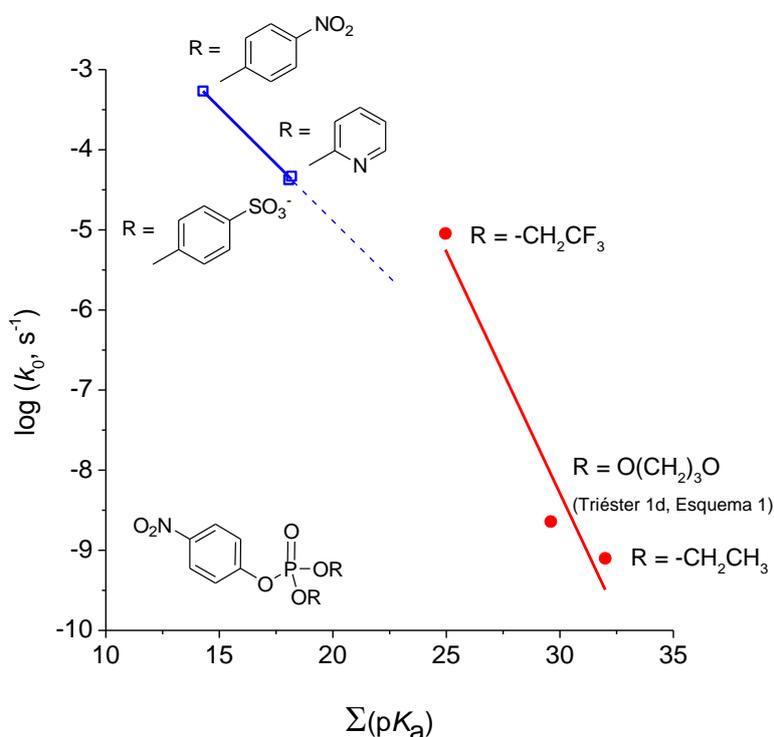
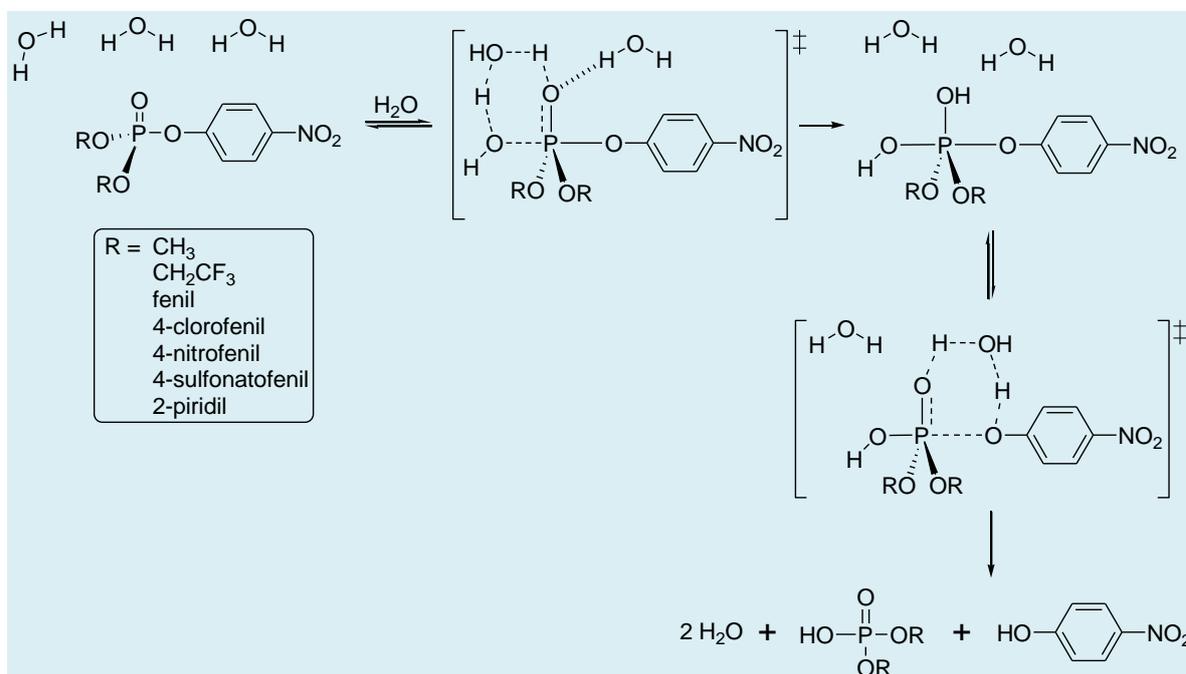


Figura 7. Gráficos de Brønsted referentes ao somatório dos pK_a 's dos grupos espectadores para a hidrólise de triésteres de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenol e grupos espectadores arílicos (símbolos não-preenchidos) e grupos espectadores alquílicos (símbolos preenchidos), com dados obtidos (ou estimados) a 25°C.¹⁷ Para fins didáticos são mostradas as estruturas dos grupos espectadores

Sequencialmente, as reações de hidrólise do TPP e de uma série de triésteres cujo grupo de saída é o 4-nitrofenol (Esquema 3) foram estudadas através de cálculos computacionais, com a finalidade de investigar o mecanismo de hidrólise e detalhar o efeito dos grupos espectadores.¹⁹ Utilizou-se a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), nível B3LYP/6-31+G(d), e avaliou-se a superfície de energia potencial a fim de localizar reagentes, estados de transição, intermediários e produtos, e obter valores teóricos de parâmetros de ativação, os quais foram comparados com dados experimentais previamente obtidos. Para todos os triésteres investigados, os autores propõem um mecanismo associativo de duas etapas, passando por um intermediário fosforano, Esquema 3, e observa-se excelente concordância entre os valores teóricos e experimentais de energia livre de Gibbs de ativação quando são consideradas três moléculas de água discretas com papéis bem

definidos. Na primeira etapa, determinante da velocidade de reação, ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água sobre o átomo de fósforo, assistido por uma segunda molécula de água, que permite a transferência simultânea de dois prótons para a formação de um intermediário fosforano neutro através de um estado de transição cíclico de seis membros. Através de uma ligação de hidrogênio intermolecular, uma terceira molécula de água estabiliza a densidade de carga negativa desenvolvida no oxigênio fosforílico para formação do estado de transição. Na segunda etapa, ocorre a quebra do intermediário fosforano, novamente assistida por uma molécula de água via um estado de transição cíclico (Esquema 3). O mecanismo do Esquema 3 é coerente com os dados experimentais previamente reportados (entropias de ativação bastante negativas e expressivos valores de efeito isotópico cinético de solvente).¹⁹



Esquema 3. Estruturas e mecanismo de hidrólise para triésteres de fosfato com grupo de saída 4-nitrofenol. O mesmo mecanismo é proposto para o triéster TPP

A investigação teórica da hidrólise dos triésteres forneceu também informações detalhadas dos efeitos dos substituintes espectadores sobre o mecanismo do Esquema 3. Dentro de um grupo de quatro triésteres representativos derivados do 4-nitrofenol, são observados no estado de transição da etapa determinante, para cada substrato, valores quase idênticos de comprimentos de ligação entre o fósforo e os átomos de oxigênio do nucleófilo e do grupo de saída (ligações em posição axial, P_1-O_2 e P_1-O_7 , Figura 8).¹⁹ Verifica-se que tais comprimentos de ligação diminuem gradualmente com a diminuição do pK_a do grupo espectador, isto é, o aumento do caráter elétron-retirador dos grupos

espectadores promove um encurtamento gradual das ligações P–O, o que contribui para a estabilização do estado de transição. Naturalmente, a diminuição dos comprimentos de ligação das posições axiais é acompanhada de um alongamento das ligações em posição equatorial (P_1-O_8 , Figura 8), com exceção da ligação com o oxigênio fosforílico, que possui certo caráter de ligação dupla. A análise de distribuição de cargas, além de comprovar que a eletrofilicidade do fósforo aumenta com a diminuição do pK_a dos substituintes, mostra que o catalisador básico geral e o solvente são os principais responsáveis pela dispersão da carga desenvolvida para formação do estado de transição.¹⁹

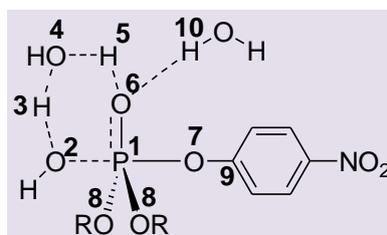


Figura 8. Estrutura geral do estado de transição da etapa determinante na hidrólise dos triésteres do Esquema 3

Assim, se observa que a descrição dos mecanismos de substituição nucleofílica em triésteres de fosfato sofreu significativa evolução recentemente, complementando os estudos clássicos realizados nas décadas de 1960 e 1970. Conclui-se que as características estruturais dos triésteres de fosfato são decisivamente importantes para explicar a reatividade das reações de hidrólise de tais substratos.^{17,18} Em conjunto com o entendimento mecanístico das reações, esses resultados contribuem para o planejamento de sistemas artificiais mais eficientes e com mecanismos melhor delineados, para aplicação em defesa química. Destaca-se a importância e o aprimoramento gradual das metodologias computacionais, que complementam sobremaneira os dados experimentais, e que certamente permitirão alcançar no futuro um nível de sofisticação elevado na descrição de reações orgânicas envolvendo ésteres de fosfato.

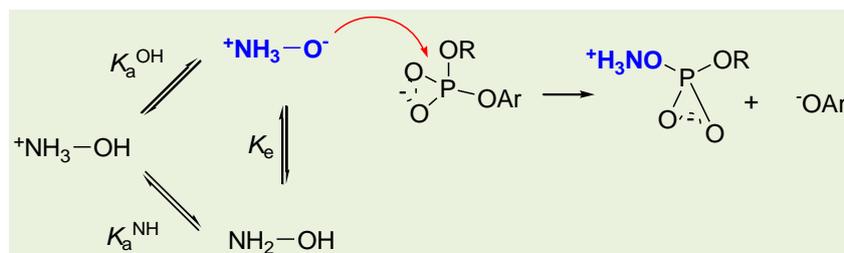
4. Reações de triésteres de fosfato com alfa-nucleófilos

Uma das alternativas consideradas para a defesa química consiste na utilização de alfa-nucleófilos, que exibem uma reatividade excepcional frente a ésteres de fosfato.²⁰⁻²² A hidroxilamina é um dos alfa-nucleófilos cuja reatividade desperta interesse devido à presença de dois centros nucleofílicos (átomos de oxigênio e nitrogênio), que apresentam seletividades distintas: as reações de alquilação ocorrem via átomo de nitrogênio, enquanto que, em reações envolvendo ésteres de acila e fosforila, o ataque nucleofílico acontece preferencialmente pelo átomo de oxigênio, mesmo o átomo de nitrogênio sendo consideravelmente mais básico.²³

Estimativas indiretas com base em

correlações de estrutura-reatividade, aliadas a estudos computacionais e cristalográficos, indicam que cerca de 20% de hidroxilamina existem em solução aquosa na forma dipolar iônica, $^+\text{NH}_3\text{-O}^-$.^{24,25} Provavelmente tal forma é preferida em algumas reações devido à

possibilidade de transferência de próton do grupo H_3N^+ para o substrato. O Esquema 4 ilustra diferentes equilíbrios da hidroxilamina em solução aquosa, e exemplifica a reatividade da forma dipolar iônica frente a um diéster de fosfato.



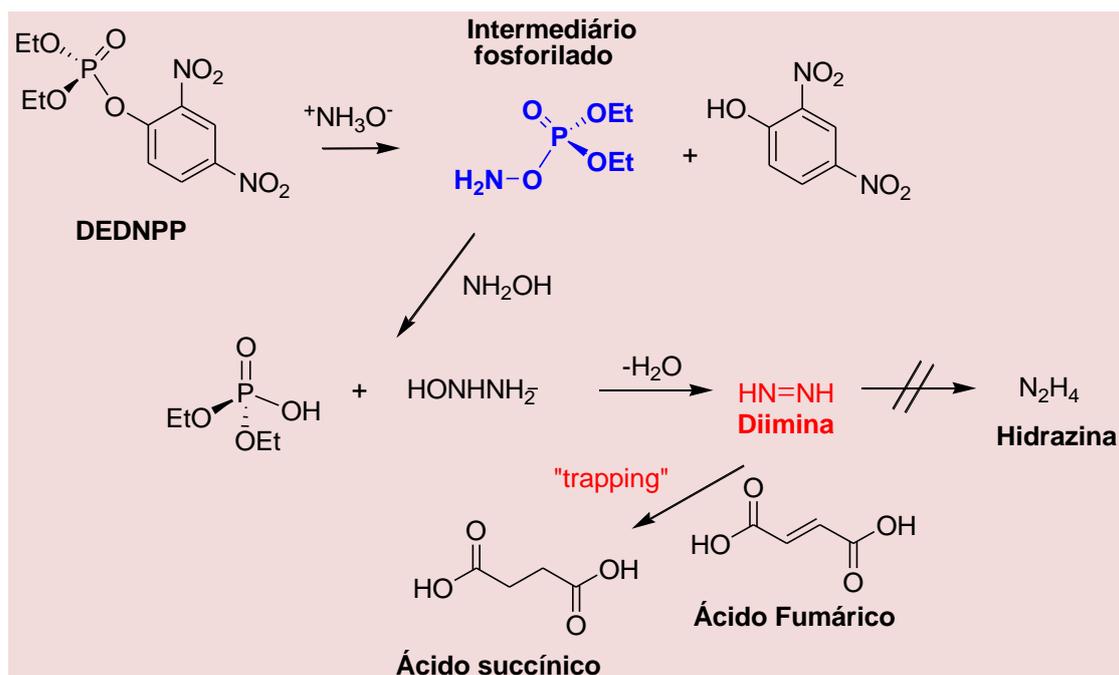
Esquema 4. Equilíbrios ácido-base da hidroxilamina e a decomposição de um diéster de fosfato pela espécie dipolar iônica

Além disso, resultados da reação da hidroxilamina com o triéster de fosfato dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (DENDPP) mostram que o ataque nucleofílico ocorre via átomo de oxigênio, fornecendo o produto *O*-fosforilado, o qual, devido à sua elevada instabilidade, é rapidamente convertido em diimina (Esquema 5).²⁶ Esta, por sua vez, reage com outra diimina, gerando $\text{N}_{2(\text{g})}$ e hidrazina. O mecanismo foi proposto com base na identificação da hidrazina por métodos colorimétricos e na captura do intermediário diimina, através da redução do ácido fumárico para succínico. Esses resultados constituem uma evidência química do ataque nucleofílico da hidroxilamina via átomo de oxigênio em ésteres de fosfato, fortalecendo a hipótese de que a forma dipolar iônica seja responsável pelo ataque nucleofílico nesses compostos.²⁶ Ressalta-se que resultados semelhantes foram obtidos mais recentemente na reação da hidroxilamina com o triéster de fosfato TPP.²⁷

As oximas (Figura 9) constituem uma classe de alfa-nucleófilos de grande relevância do ponto de vista da defesa química. Nesse caso, tais nucleófilos são importantes porque possuem aplicação direta no tratamento médico em casos de intoxicação por agentes neurotóxicos que inibem a ação de enzimas do sistema

nervoso,² especialmente a acetilcolinesterase (AChE), que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Com a inibição da AChE, a acetilcolina acumula-se nas sinapses das células nervosas, levando a um colapso do sistema nervoso central.

A inibição da AChE por um agente organofosforado ocorre no interior do sítio ativo, no aminoácido serina da tríade catalítica serina, histidina e ácido glutâmico (Ser-His-Glu), conforme ilustrado no Esquema 6. A ligação ocorre entre o átomo de fósforo do agente neurotóxico e o oxigênio da serina, havendo a eliminação do grupo de saída (X). Após a formação da enzima inibida, ocorre a etapa denominada envelhecimento, que corresponde à quebra da ligação O-R_1 , sendo essa etapa irreversível. O tratamento médico para reversão da atividade da AChE deve ocorrer antes do processo de envelhecimento, e consiste na aplicação de oximas que reagem com o grupo fosfato e regeneram o resíduo serina. A 2-pralidoxima (2-PAM), Figura 9, é uma oxima amplamente utilizada (comercializada no Brasil com o nome de Contrathion[®]) sendo administrada em conjunto com outras drogas, que agem no sentido de diminuir os sintomas decorrentes do acúmulo da acetilcolina no sistema nervoso.^{1,2}



Esquema 5. Desfosforilação do triéster de fosfato DEDNPP por hidroxilamina

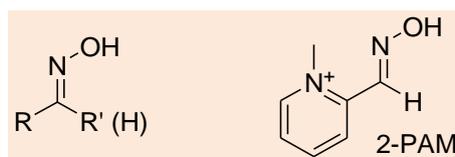
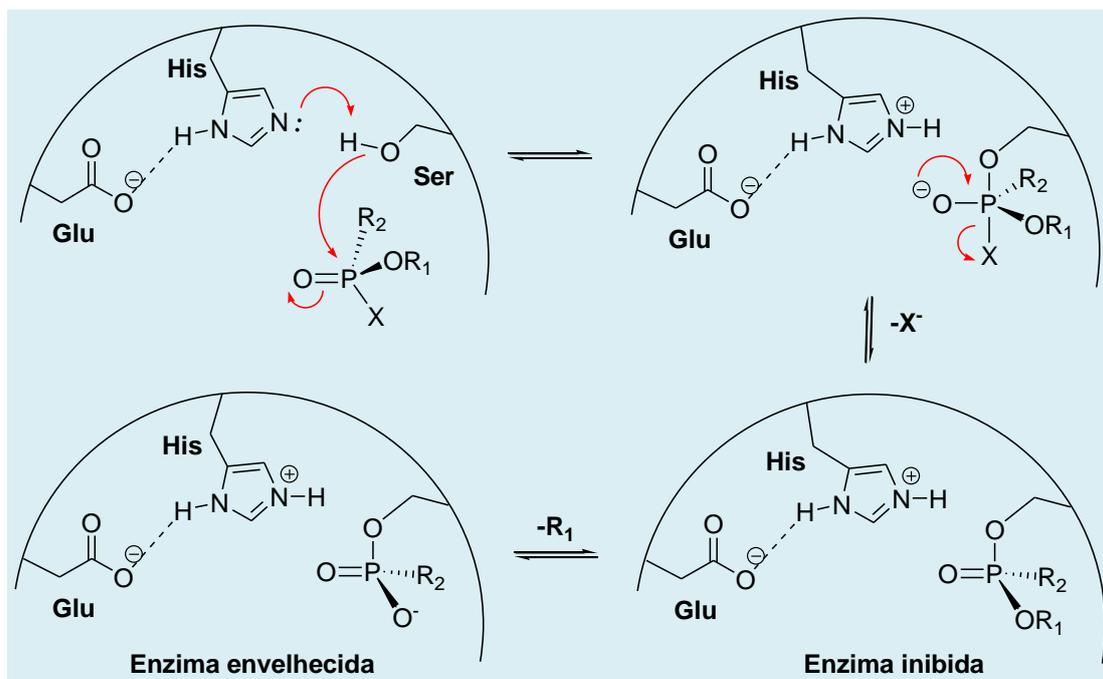


Figura 9. Estrutura geral de uma oxima (à esquerda) e da 2-pralidoxima (2-PAM)



Esquema 6. Inibição da AChE por organofosforado (adaptada da referência 1)

Novas propostas de fármacos para a reativação da AChE têm sido reportadas por diversos grupos de pesquisa.^{28,29} Alternativamente, nosso laboratório investigou recentemente a reatividade do fármaco deferoxamina (DFO)(Figura 10) já disponível comercialmente, e utilizado para tratamento de disfunções de excesso de ferro e alumínio. Considerando a presença de três grupos ácido hidroxâmico na estrutura da DFO e, portanto, de três potenciais sítios

reativos detentores do efeito alfa, estudou-se a reação da DFO com o triéster DEDNPP. Os resultados mostram maior reatividade das espécies em que os grupos ácido hidroxâmico encontram-se aniônicos, de acordo com os valores de pK_a dos equilíbrios de dissociação ácida, mostrados na Figura 10. O incremento global promovido por DFO na clivagem de DEDNPP chega a 10^7 vezes, comparado com a reação de hidrólise espontânea do substrato.³⁰

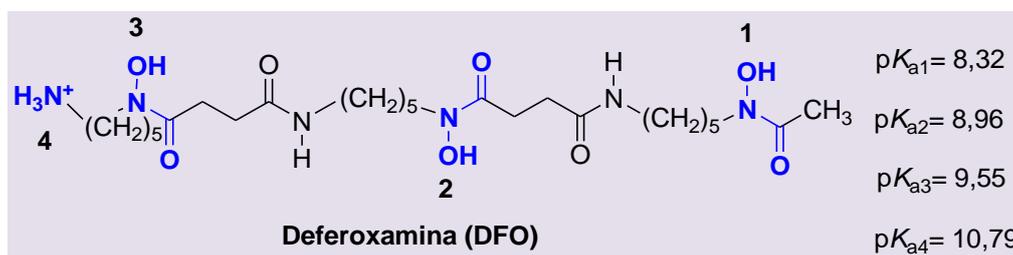


Figura 10. Fármaco DFO e valores de pK_a dos equilíbrios de dissociação ácida de seus grupos funcionais nucleofílicos³¹

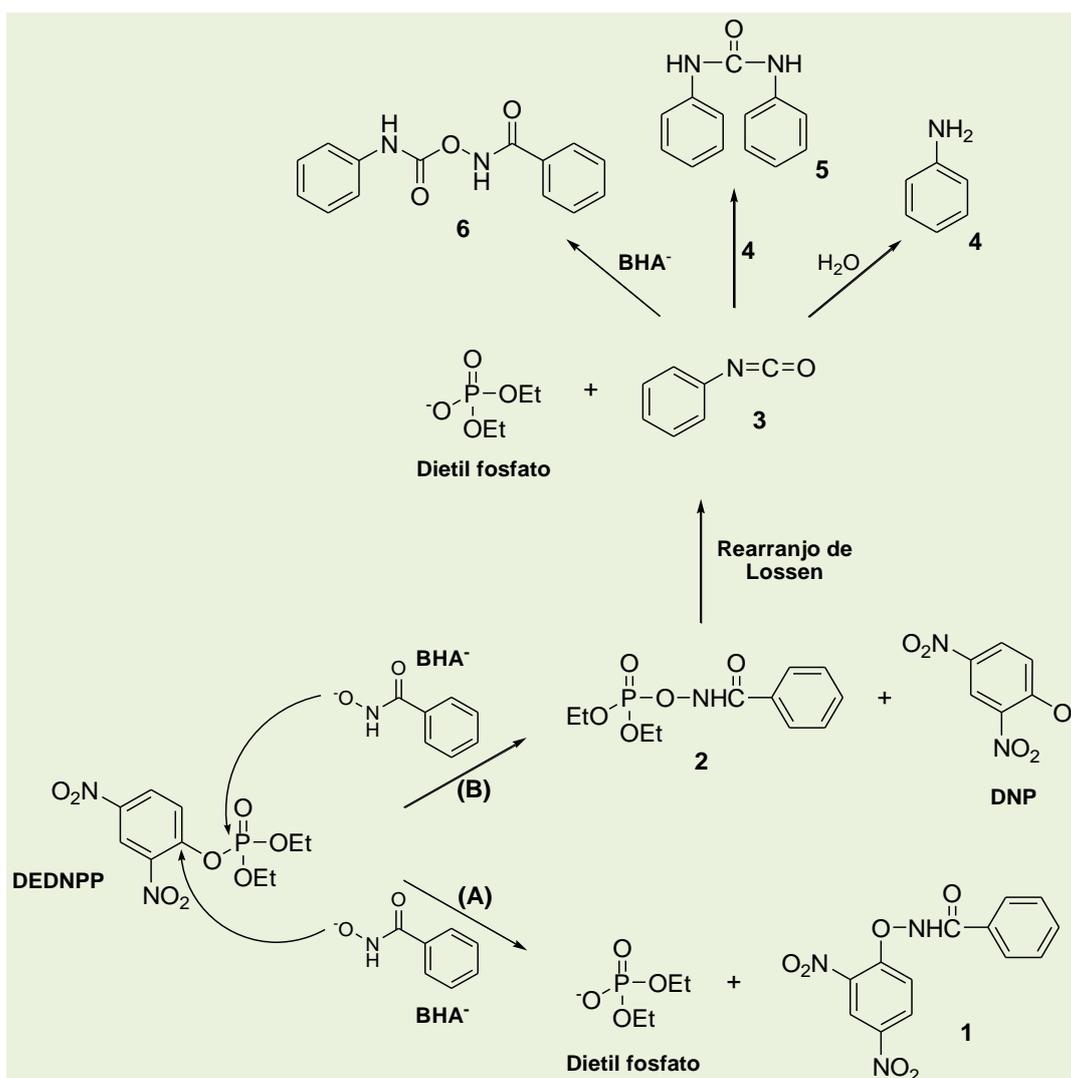
Uma vez que a DFO já é utilizado como um fármaco, os resultados de alta reatividade na clivagem de DEDNPP sugerem possível utilização adicional para a DFO: na reativação da AChE em casos de intoxicação aguda por compostos organofosforados. Com o objetivo de reforçar essa hipótese, foi realizada a reação de desfosforilação da paraoxona-metílica na ausência e presença de DFO. Os dados mostram que, nas condições estudadas, a reação de clivagem da paraoxona-metílica tem um incremento na constante de velocidade de segunda ordem em torno de 8×10^4 vezes em presença de DFO. Assim, os resultados da reação de DFO com da paraoxona-metílica sustentam a sugestão de utilização adicional de DFO para tratamento médico da intoxicação por organofosforados, e fornecem perspectivas para a investigação de outros fármacos como possíveis antídotos e, eventualmente, como reagentes para destoxificação de estoques de armas químicas.³⁰

Considerando a maior complexidade estrutural de DFO, informações mais detalhadas sobre o seu padrão de reatividade

frente a triésteres de fosfato foram obtidas a partir do acompanhamento da reação de DEDNPP com o alfa-nucleófilo estruturalmente análogo, ácido benzohidroxâmico (BHA) (Esquema 7). Observa-se que os nucleófilos apresentam reatividades similares, já que a constante de velocidade de segunda ordem da reação da espécie totalmente desprotonada de DFO é menos de 2 vezes menor que aquela obtida para a reação do ânion do ácido benzohidroxâmico (BHA⁻) com o mesmo substrato. Ressalta-se que o BHA é conhecido como um dos mais poderosos α -nucleófilos frente a ésteres de fosfato, e a pequena diferença de reatividade observada pode ser explicada em termos da extensa estrutura da DFO, que deve apresentar um efeito estérico significativo sobre os grupos hidroxamato. Com base em uma análise detalhada de produtos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, são observados dois caminhos principais na reação entre BHA⁻ e DEDNPP (Esquema 7) havendo ataque sobre ambos os átomos de fósforo e carbono

aromático. No caminho (A), o ataque sobre o carbono aromático leva à formação do diéster dietil fosfato e do intermediário aromático (1). Já no caminho (B), o ataque sobre o átomo de fósforo desloca o 2,4-dinitrofenolato (DNP) e gera o intermediário de benzohidroximato fosforilado (2), que sofre um rápido rearranjo de Lossen e produz

isocianato de fenila (3), sequencialmente hidrolisado à anilina (4). Ainda, observa-se a formação de difenilureia (5) e do derivado carbamílico (6), a partir das respectivas reações do isocianato de fenila com a anilina gerada e BHA⁻ (este, em excesso no meio reacional).³⁰



Esquema 7. Caminhos reacionais na desfosforilação de DEDNPP pelo ânion do ácido benzohidroxâmico

5. Sistemas micro-heterogêneos e heterogêneos

Além da utilização de alfa-nucleófilos em sistemas homogêneos, ambientes micro-heterogêneos também têm sido propostos

para a degradação de ésteres fosfóricos. Polímeros, por exemplo, podem atuar como nanoreatores e promover incrementos nas constantes de velocidade observadas.

Recentemente, avaliou-se a reatividade de um polímero contendo grupos funcionais ácido hidroxâmico e ácido carboxílico (PHA)

frente ao triéster de fosfato DEDNPP (Figura 11). Os equilíbrios de protonação dos grupos ácidos de PHA geram espécies distintas em função do pH, sendo os pK_a 's dos grupos ácido carboxílico e ácido hidroxâmico de 5,95 e 9,46, respectivamente, favorecendo a atuação cooperativa dos grupos funcionais. Assim, dois mecanismos principais podem ser delineados para as reações de PHA com o substrato, (Figura 11): (i) ataque nucleofílico

do grupo carboxilato diretamente no átomo de fósforo, e (ii) ataque nucleofílico do grupo hidroxamato sobre o fósforo, assistido por uma catálise básica geral exercida pelo grupo carboxilato. O incremento promovido por PHA na desfosforilação de DEDNPP, em relação à hidrólise espontânea do substrato, chega à ordem de 10^4 vezes.³²

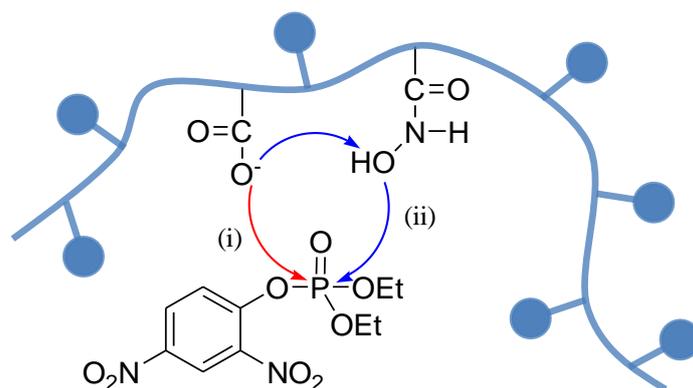
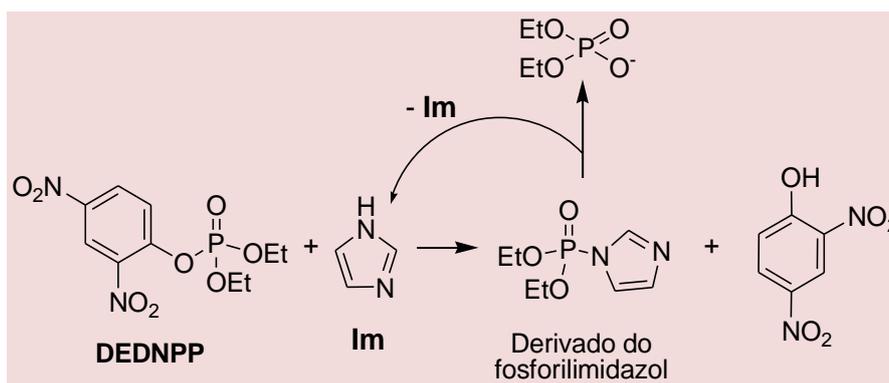


Figura 11. Representação esquemática do polímero PHA e das possibilidades mecânicas na reação com o triéster fosfórico DEDNPP

Ainda, o ancoramento de grupos funcionais imidazolíneos em cadeias poliméricas é de interesse, já que resultados anteriores de reações de desfosforilação promovidas pelo imidazol livre mostram que tal amina comporta-se como autêntico catalisador nucleofílico, isto é, observa-se a sua regeneração ao término da reação.³³ Por exemplo, na reação do imidazol (Im) com o triéster DEDNPP, detectou-se por métodos espectroscópicos um derivado estável do fosforilimidazol (Esquema 8) como consequência do ataque nucleofílico do imidazol exclusivamente no fósforo. No entanto, o intermediário é sequencialmente hidrolisado ao diéster dietil fosfato e imidazol, caracterizando as reações do Esquema 8 como um ciclo de catálise nucleofílica.³³ Nesse sentido, a química do imidazol foi estendida a um sistema mais

complexo, através da funcionalização do ácido poliacrílico com grupos 1-(3-aminopropil)imidazol. Obteve-se um polímero (PAIM)(Figura 12) e o tratamento teórico dos dados de titulação potenciométrica indicam que cerca de 47% do ácido poliacrílico foi funcionalizado, resultando em uma proporção de aproximadamente 1:1 entre os grupos funcionais ácido carboxílico e imidazol. Dados cinéticos mostram que PAIM promoveu incrementos da ordem de 10^7 na desfosforilação de DEDNPP, em comparação com a hidrólise espontânea do substrato. Em particular, dados de efeito isotópico cinético de solvente sugerem que a desfosforilação de DEDNPP pelos grupos imidazol de PAIM pode ocorrer por dois mecanismos simultaneamente: nucleofílico e básico geral.³⁴



Esquema 8. Catálise nucleofílica promovida pelo imidazol na degradação de DEDNPP

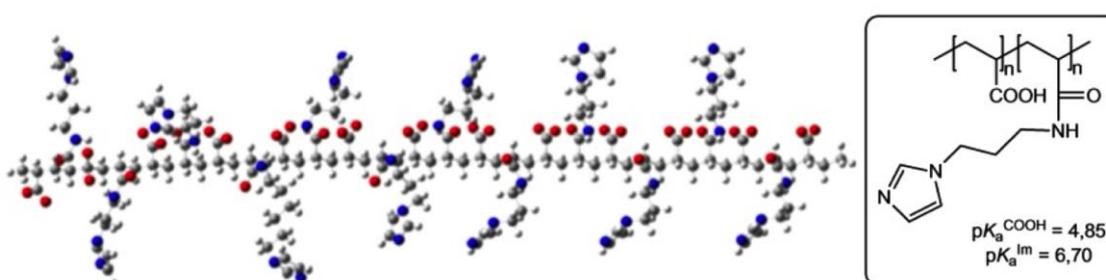
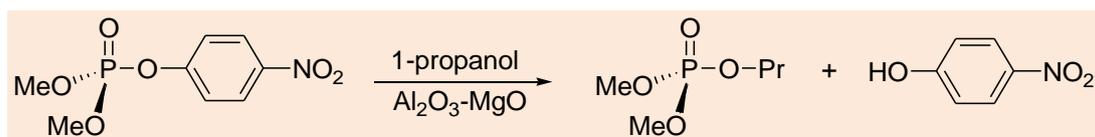


Figura 12. Vista lateral da estrutura otimizada de PAIM negativamente carregado. No detalhe, estrutura do monômero e valores de pK_a dos equilíbrios de dissociação ácida dos grupos funcionais

A utilização de sistemas heterogêneos também constitui uma alternativa para a degradação de compostos organofosforados e diversos tipos de sólidos podem ser utilizados como catalisadores para essa finalidade.^{35,36} Recentemente, foram preparados óxidos mistos $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-MgO}$ pelo método de co-precipitação, que foram empregados como catalisadores na reação de propanólise da paraoxona-metílica (Esquema 9).³⁷ Dentre os diversos óxidos obtidos, que foram caracterizados por diversas técnicas, observou-se melhor atividade catalítica da forma espinélio incipiente (MgAl_2O_4), que promove incrementos na ordem de 10^5 vezes na degradação do substrato em comparação com a propanólise espontânea do mesmo. O mecanismo de propanólise da paraoxona-metílica utilizando o espinélio MgAl_2O_4 como catalisador é proposto com base na função dos íons metálicos em mecanismos enzimáticos, a saber, aumento da

nucleofilicidade de um dado resíduo, estabilização de intermediários e estados de transição, e assistência à eliminação do grupo de saída. Assim, conforme demonstrado na Figura 13, a paraoxona-metílica pode se coordenar à superfície do sólido, principalmente em função da deficiência de elétrons do centro tetraédrico Mg^{2+} . Os íons do propanol podem se coordenar à superfície em posições vizinhas ao sítio de coordenação do substrato, de modo a favorecer o ataque nucleofílico no átomo de fósforo. Naturalmente, a organização dos substituintes do triéster, em particular do grupo de saída 4-nitrofenolato, deve ser igualmente apropriada e também deve envolver os íons metálicos do sólido. Ressalta-se que resultados de espectrometria de massas (ESI-MS/MS) confirmam a formação do produto dimetil propil fosfato, um triéster de fosfato estruturalmente análogo a uma família de retardadores de chamas.³⁷



Esquema 9. Propanólise da paraoxona-metílica catalisada por óxidos mistos $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-MgO}$

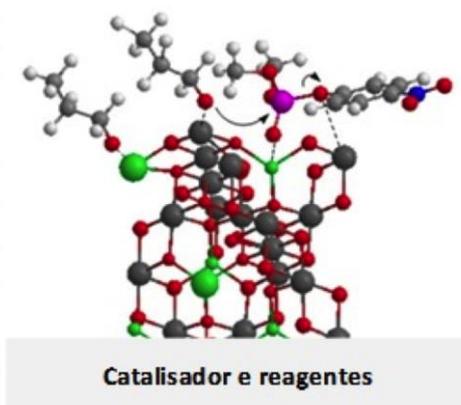


Figura 13. Representação esquemática da reação de propanólise da paraoxona-metílica na superfície do espinélio incipiente de $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-MgO}$. As estruturas dos reagentes foram otimizadas ao nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)

6. Conclusões e perspectivas

A toxicidade exibida por diversas classes de organofosforados ao organismo humano levou, ao longo do século passado, ao desenvolvimento de agentes neurotóxicos potentes para aplicação como armas químicas. Nesse sentido, parte dos esforços dos pesquisadores dedica-se à busca por metodologias eficientes e de baixo custo para a destruição de estoques de armas químicas. Ainda, a ação neurotóxica dessas armas, somada aos inúmeros casos de intoxicação por agroquímicos, motivam o desenvolvimento de antídotos mais eficientes para envenenamento por organofosforados. A pesquisa em defesa química abrange o estudo cinético e mecanístico de reações envolvendo organofosforados em solução aquosa e em ambientes micro-heterogêneos, bem como em sistemas heterogêneos.

Diversos pesquisadores tem trabalhado continuamente no desenvolvimento de

novos candidatos a fármacos como antídotos para envenenamento por organofosforados. Nesse sentido, buscam-se alfa-nucleófilos mais eficientes em relação àqueles atualmente empregados.^{28,29,38,39} A reatividade dos compostos é em geral avaliada por meio do estudo cinético e mecanístico das reações entre os nucleófilos e organofosforados representativos, bem como através da quantificação direta da reativação de enzimas específicas inibidas em laboratório.⁴⁰ O estudo de modelos em meios micro-heterogêneos é particularmente interessante, pois contribui para a mimetização do caráter hidrofóbico característico de sítios enzimáticos. Além disso, tem-se investigado a clivagem enzimática de organofosforados por fosfotriesterases, enzimas capazes de clivar tais substratos, ainda que estes não sejam de ocorrência natural.⁴¹ Um aspecto relevante que contribui para o aprimoramento dos estudos realizados é a utilização de metodologias computacionais.⁴²⁻⁴⁴

Mais recentemente, destaca-se o

desenvolvimento de sistemas catalíticos heterogêneos.³⁵⁻³⁷ A catálise heterogênea é vantajosa em diversos aspectos, em comparação à catálise homogênea, por exemplo, na separação dos catalisadores do meio reacional visando o reuso dos mesmos. Ainda, esses aspectos tornam-se particularmente atraentes quando o substrato tóxico é convertido em produtos de baixa toxicidade e com possível aplicação industrial. Sem dúvidas a catálise heterogênea representa um dos campos mais promissores para a pesquisa em destoxificação química, já que muitos aspectos relevantes ainda são pouco conhecidos, por exemplo, as interações entre os substratos e a superfície de óxidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento INCT-Catálise, CNPq, CAPES e FAPESC.

Referências Bibliográficas

- ¹ Delfino, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, *20*, 407. [[CrossRef](#)]
- ² Cannard, K. The acute treatment of nerve agent exposure. *Journal of the Neurological Sciences* **2006**, *249*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Machado, V. G.; Nome, F. The chemistry of phosphate esters. *Química Nova* **2003**, *26*, 745. [[CrossRef](#)]
- ⁴ Kim, K.; Tsay, O. G.; Atwood, D. A.; Churchill, D. G. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 5345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵ Krieger, R. (Org.). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 3rd ed., Academic Press: San Diego, 2010.
- ⁶ Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. *Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo da parationa metílica*. Nota técnica de reavaliação de agrotóxicos em cumprimento à Resolução RDC nº 10/2008. [[Link](#)]
- ⁷ Smith, B. M. Catalytic methods for the destruction of chemical warfare agents under ambient conditions. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Cox Jr., J. R.; Ramsay, O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. *Chemical Reviews* **1964**, *64*, 317. [[CrossRef](#)]
- ⁹ Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*, University Science: Sausalito, 2006.
- ¹⁰ Guthrie, R. D.; Jencks, W. P. Iupac Recommendations for the Representation of Reaction Mechanisms. *Accounts of Chemical Research* **1989**, *22*, 343. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Kirby, A. J.; Varvoglis, A. G. The Reactivity of Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 415. [[CrossRef](#)]
- ¹² Kirby, A. J.; Varvoglis, A. G. The Reactivity of Phosphate Esters: Reactions of Monoesters with Nucleophiles. Nucleophilicity Independent of Basicity in a Bimolecular Substitution Reaction. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic* **1968**, 135. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Kirby, A. J.; Younas, M. The Reactivity of Phosphate Esters. Diester Hydrolysis. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic* **1970**, 510. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Kirby, A. J.; Younas, M. The Reactivity of Phosphate Esters. Reactions of Diesters with Nucleophiles. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic* **1970**, 1165. [[CrossRef](#)]
- ¹⁵ Khan, S. A.; Kirby, A. J. The Reactivity of Phosphate Esters. Multiple Structure Reactivity Correlations for Reactions of Triesters with Nucleophiles. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic* **1970**, 1172. [[CrossRef](#)]

- ¹⁶ Kirby, A. J.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Brandão, T. A. S.; Nome, F. Activating Water: Efficient Intramolecular General Base Catalysis of the Hydrolysis of a Phosphate Triester. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 8475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Kirby, A. J.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Orth, E. S.; Brandão, T. A. S.; Wanderlind, E. H.; Amer, A.; Williams, N. H.; Nome, F. Activating Water: Important Effects of Non-leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 14996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Kirby, A. J.; Mora, J. R.; Nome, F. New light on phosphate transfer from triesters. *Biochimica et Biophysica – Proteins and Proteomics* **2013**, *1834*, 454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Mora, J. R.; Kirby, A. J.; Nome, F. Theoretical Study of the Importance of the Spectator Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 7061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Herschlag, D.; Jencks, W. P. Nucleophiles of High Reactivity in Phosphoryl Transfer-Reactions - Alpha-Effect Compounds and Fluoride-Ion. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 1951. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Bunton, C. A.; Nome, F. Reactions of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydroxylamine. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 7051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandão, T. A. S.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Bunton, C. A.; Nome, F. Reaction of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydrazine and hydrogen peroxide. Comparison of *O*- and *N*-phosphorylation. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 7898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Jencks, W. P. *Catalysis in chemistry and enzymology*, McGraw-Hill: New York, 1969.
- ²⁴ Kirby, A. J.; Davies, J. E.; Brandão, T. A. S.; Da Silva, P. F.; Rocha, W. R.; Nome, F. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Structure and reactivity of ammonia oxide. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 12374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Kirby, A. J.; Davies, J. E.; Fox, D. J.; Hodgson, D. R. W.; Goeta, A. E.; Lima, M. F.; Priebe, J. P.; Santaballa, J. A.; Nome, F. Ammonia oxide makes up some 20% of an aqueous solution of hydroxylamine. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 1302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Kirby, A. J.; Souza, B. S.; Medeiros, M.; Priebe, J. P.; Manfredi, A. M.; Nome, F. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Chemical evidence from its reaction with a phosphate triester. *Chemical Communications* **2008**, 4428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Medeiros, M.; Wanderlind, E. H.; Mora, J. R.; Moreira, R.; Kirby, A. J.; Nome, F. Major mechanistic differences between the reactions of hydroxylamine with phosphate di- and tri-esters. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 6272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ Kassa, J.; Kuca, K.; Bartosova, L.; Kunesova, G. The development of new structural analogues of oximes for the antidotal treatment of poisoning by nerve agents and the comparison of their reactivating and therapeutic efficacy with currently available oximes. *Current Organic Chemistry* **2007**, *11*, 267. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Musilek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Design, Evaluation and Structure-Activity Relationship Studies of the AChE Reactivators Against Organophosphorus Pesticides. *Medicinal Research Reviews* **2011**, *31*, 548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Medeiros, M.; Orth, E. S.; Manfredi, A. M.; Pavez, P.; Micke, G. A.; Kirby, A. J.; Nome, F. Dephosphorylation Reactions of Mono-, Di-, and Triesters of 2,4-Dinitrophenyl Phosphate with Deferoxamine and Benzohydroxamic Acid. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 10907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ³¹ Farkas, E.; Enyedy, E. A.; Csóka, H. A comparison between the chelating properties of some dihydroxamic acids, desferrioxamine B and acetohydroxamic acid. *Polyhedron* **1999**, *18*, 2391. [CrossRef]
- ³² Mello, R. S.; Orth, E. S.; Loh, W.; Fiedler, H. D.; Nome, F. Polymers Containing Hydroxamate Groups: Nanoreactors for Hydrolysis of Phosphoryl Esters. *Langmuir* **2011**, *27*, 15112. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Orth, E. S.; Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Kirby, A. J.; Nome, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 8003. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Giusti, L. A.; Medeiros, M.; Ferreira, N. L.; Mora, J. R.; Fiedler, H. D. Polymers containing imidazole groups as nanoreactors for hydrolysis of esters. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2014**, *27*, 297. [CrossRef]
- ³⁵ Rajagopalan, S.; Koper, O.; Decker, S.; Klabunde, K. J. Nanocrystalline metal oxides as destructive adsorbents for organophosphorus compounds at ambient temperatures. *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8*, 2602. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Saxena, A.; Srivastava, A. K.; Singh, B.; Gupta, A. K.; Suryanarayana, M. V. S.; Pandey, P. Kinetics of adsorptive removal of DECIIP and GB on impregnated Al₂O₃ nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *175*, 795. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁷ Zimmermann, L. M.; Almerindo, G. I.; Mora, J. R.; Bechtold, I. H.; Fiedler, H. D.; Nome, F. Degradation of Methyl Paraoxon in the Presence of Mg²⁺-Al³⁺ Mixed Oxides. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 26097. [CrossRef]
- ³⁸ Morales-Rojas, H.; Moss, R. A. Phosphoryl reactivity of *o*-iodosylcarboxylates and related nucleophiles. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 2497. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁹ Saint-André, G.; Kliachyna, M.; Kodepelly, S.; Louise-Leriché, L.; Gillon, E.; Renard, P. Y.; Nachon, F.; Baati, R.; Wagner, A. Design, synthesis and evaluation of new alpha-nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6352. [CrossRef]
- ⁴⁰ Ribeiro, T. S.; Prates, A.; Alves, S. R.; Oliveira-Silva, J. J.; Riehl, C. A. S.; Figueroa-Villar, J. D. The Effect of Neutral Oximes on the Reactivation of Human Acetylcholinesterase Inhibited with Paraaxon. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, *23*, 1216. [CrossRef]
- ⁴¹ Bigley, A. N.; Raushel, F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. *Biochimica et Biophysica – Proteins and Proteomics* **2013**, *1834*, 443. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴² Wang, J.; Gu, J.; Leszczynski, J.; Feliks, M.; Sokalski, W. A. Oxime-induced reactivation of sarin-inhibited AChE: A theoretical mechanisms study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 2404. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ Delfino, R. T.; Figueroa-Villar, J. D. Nucleophilic Reactivation of Sarin-Inhibited Acetylcholinesterase: A Molecular Modeling Study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 8402. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁴ Silva, G. R.; Borges, I.; Figueroa-Villar, J. D.; de Castro, A. T. Chemical Defense: History, Warfare Agent Classification and Action of Neurotoxic Agents. *Química Nova* **2012**, *35*, 2083. [CrossRef]