

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICO-QUÍMICA

ESTUDO CINÉTICO E TERMODINÂMICO NA HIDRÓLISE BÁSICA
DA ACETILCOBALAMINA E ACETILCOBINAMIDA

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS .

MARCOS AIRES DE BRITO

FLORIANÓPOLIS

SANTA CATARINA - BRASIL

ABRIL - 1981

ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE

"MESTRE EM CIÊNCIAS"

ESPECIALIDADE EM FÍSICO-QUÍMICA E APROVADA EM SUA FORMA FINAL
PELO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO.

Fauk Nome

PROF. FARUK JOSE NOME AGUILERA, Ph.D.
ORIENTADOR

Fauk Nome

PROF. FARUK JOSE NOME AGUILERA, Ph.D.
COORDENADOR

BANCA EXAMINADORA:

Fauk Nome

PROF. FARUK JOSE NOME AGUILERA, Ph.D.

Prof. Rosendo Augusto Yunes

PROF. ROSENDO AUGUSTO YUNES, Ph.D.

Prof. Marcos Caroli Resende

PROF. MARCOS CAROLI RESENDE, Ph.D.

A minha esposa Clarissa
e meu filho Davi.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Faruk Jose Nome Aguilera por sua orientação segura e constante apoio durante a elaboração deste trabalho.

- Aos colegas do Departamento de Química, pela amizade e grande espírito de compreensão.

- A Universidade Federal de Santa Catarina, CNPq e CAPES, que deram condições para a realização deste trabalho .

RESUMO

Foram calculados os parâmetros termodinâmicos de ativação para a hidrólise básica da acetilcobalamina ($\Delta H^\ddagger = 24,7 \pm 1,8$ Kcal/mol; $\Delta S^\ddagger = 14,7 \pm 5,9$ u.e.; $\Delta G^\ddagger = 20,4$ Kcal/mol) e acetilcobinamida ($\Delta H^\ddagger = 16,5 \pm 0,8$ Kcal/mol; $\Delta S^\ddagger = -10,3 \pm 3,8$ u.e.; $\Delta G^\ddagger = 19,6$ Kcal/mol), a partir dos valores encontrados para as constantes de velocidade específica de segunda ordem (k_2), nas diferentes temperaturas.

O composto aquoacetilcobinamida mostrou-se mais reativo que o composto acetilcobalamina, sendo que a forma hidroxiaacetilcobinamida apresentou reatividade desprezível nas condições experimentais do presente trabalho. A variação nas energias livres de ativação foi interpretada em termos de efeitos compensatórios envolvendo entalpias e entropias de ativação. A contribuição da entalpia de ativação refletiria uma maior dispersão de carga, envolvendo a rede do solvente para o caso da acetilcobinamida, sendo que parte relativa à entropia de ativação desfavorece a reação para o caso da acetilcobinamida. As entropias de ativação são comentadas levando-se em consideração as diferenças conformacionais do anel corrínico à medida que se avança na coordenada da reação. O sistema acetilcobalamina estaria distorcido enquanto que o sistema acetilcobinamida seria muito mais simétrico.

Os dados foram analisados levando-se em consideração as diferentes densidades eletrônicas sobre o átomo de cobalto à medida que se troca o quinto ligante, sendo que a dificuldade na eliminação do grupo de saída para gerar a espécie formal do Co(I),

tem relação direta com a capacidade de doação sigma desses ligantes. Desse modo, a ordem de efeito trans $H_2O > 5,6\text{-dimetilbenzimidazol} > OH^-$, se apresentou de maneira inversa à ordem de basicidade desses grupamentos. Os resultados obtidos sugerem um mecanismo do tipo BAC2, entretanto não se devendo descartar a possibilidade de um mecanismo ElcB.

ABSTRACT

The thermodynamic activation parameters for the basic hydrolysis of acetylcoalamine ($\Delta H^\ddagger = 24,7 \pm 1,8$ Kcal/mol; $\Delta S^\ddagger = 14,7 \pm 5,9$ u.e.; $\Delta G^\ddagger = 20,4$ Kcal/mol), and acetylcobinamide ($\Delta H^\ddagger = 16,5 \pm 0,8$ Kcal/mol; $\Delta S^\ddagger = -10,3 \pm 3,8$ u.e.; $\Delta G^\ddagger = 19,6$ Kcal/mol), were determined from the specific second order rate constants (k_2), at different temperatures.

The compounds aquoacetylcobinamide is more reactive than acetylcoalamine, and the hydroxoacetylcobinamide form was unreactive in the experimental conditions employed in this work. The difference in free activation energies was interpreted in terms of compensation between activation enthalpies and activation entropies. The enthalpic part probably reflects charge dispersion in the solvent sphere for the acetylcobinamide, with the entropic term disfavoring the reaction in this case. The activation entropies were explained in terms of conformational changes of the corrin system along the reaction coordinate. The acetylcoalamine is distorted and the acetylcobinamide system is more symmetrical.

In the interpretation of the experimental datas, it was taken into consideration that different electronic densities at the cobalt atom occur as the fifth ligand is changed. Thus, the elimination of the leaving group in order to create the formal Co(I) specie, should have a direct relation with the sigma donor character of these ligands. It follows that the trans effect, $H_2O > 5,6\text{-dimethylbenzimidazole} > OH^-$, is in the inverse order of the basicities of the ligands. The results suggest a BAC2 mechanism, but the possibilitis of an ElcB tipo mechanism cannot be discarded.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I	1. INTRODUÇÃO	1
	2. QUÍMICA DA VITAMINA B₁₂	2
	2.1. Estrutura Molecular e Nomenclatura	2
	2.2. Estados de Oxidação do Cobalto	5
	2.3. Espectros Eletrônicos	10
	2.4. O Efeito Trans	13
	3. DERIVADOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	16
	3.1. Hidrólise de Ésteres	17
	4. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ACETILCOBALAMINA	20
CAPÍTULO II	- PARTE EXPERIMENTAL	25
	1. INSTRUMENTAÇÃO	25
	2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
	3. SÍNTESES	27
	3.1. Obtenção do Composto Acetilcobalamina	27
	3.2. Obtenção do Composto Acetilcobinamida	28
	4. CINÉTICAS	29
CAPÍTULO III	- RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
CAPÍTULO IV	- CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura para sistemas corrínicos	3
Figura 2. Estrutura para o sistema metal-corrínico e metal-porfirínico	4
Figura 3. Diagrama da distribuição eletrônica para o átomo central de cobalto na Vitamina B ₁₂ , nos três estados de oxidação	7
Figura 4. Espectros correspondentes aos três estados de oxidação do cobalto na Vitamina B ₁₂	11
Figura 5. Tipos padrões de espectro de absorção dos derivados da Vitamina B ₁₂	12
Figura 6. Espectro de absorção UV-Visível da Vitamina B ₁₂ a	26
Figura 7. Espectro de absorção UV-Visível da acetilcobalamina em água e fotólise da mesma amostra	30
Figura 8. Espectro de absorção UV-Visível da acetilcobinamida em água e fotólise da mesma amostra	31
Figura 9. Determinação da constante de velocidade de pseudo primeira ordem para a degradação por base ($ \text{OH}^- _t = 0,05 \text{ M}$), do composto acetilcobalamina a 25, 30, 35 e 40°C	33
Figura 10. Determinação da constante de velocidade de pseudo primeira ordem para a degradação por base ($ \text{OH}^- _t = 0,05 \text{ M}$), do composto acetilcobinamida a 25, 30, 35 e 40°C	34

Figura 11. Espectro de absorção UV-Visível da acetilcobalamina em água e meio básico a 25°C	36
Figura 12. Espectros de absorção UV-Visível da acetilcobinamida em água e meio básico a 25°C	37
Figura 13. Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem versus concentração de hidróxido à 25°C, para a degradação da acetilcobalamina . . .	40
Figura 14. Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem versus concentração de hidróxido à 30, 35 e 40°C, para a degradação da acetilcobalamina	41
Figura 15. Variação da constante de velocidade específica de segunda ordem em função da temperatura, para a degradação por hidróxido da acetilcobalamina . . .	42
Figura 16. Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem versus concentração de hidróxido à 25°C, para a degradação da acetilcobinamida. . .	46
Figura 17. Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem versus concentração de hidróxido à 30, 35 e 40°C, para a degradação da acetilcobinamida.	47
Figura 18. Variação da constante de velocidade específica de segunda ordem em função da temperatura, para a degradação por hidróxido da acetilcobinamida. . .	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I	- Constantes de equilíbrio para a substituição de ligantes axiais em sistemas corrínicos	15
Tabela II	- Classificação de mecanismos para hidrólise de ésteres	18
Tabela III	- Constantes de velocidade observadas de pseudo - primeira ordem para a degradação por hidróxido da acetilcobalamina, a 25, 30, 35 e 40°C	39
Tabela IV	- Parâmetros termodinâmicos de ativação para a degradação por hidróxido da acetilcobalamina	43
Tabela V	- Constantes de velocidade observadas de pseudo - primeira ordem para a degradação por hidróxido da acetilcobinamida, a 25, 30, 35 e 40°C	45
Tabela VI	- Parâmetros termodinâmicos de ativação para a degradação por hidróxido da acetilcobinamida	55

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Muito interesse tem se concentrado na química e bioquímica da Vitamina B₁₂(1), e modelos relacionados com sistemas corrínicos (2). Pratt e colaboradores (3), realizaram estudos do efeito termodinâmico trans em alguns desses sistemas, mas até agora nada consta na literatura sobre efeito cinético e termodinâmico trans no estudo da hidrólise na acetilcobalamina.

Os sistemas corrínicos são apropriados para esse tipo de estudo pelas seguintes razões (1,3):

- a) A coordenação octaedral elimina a incerteza relacionada com a ligação de outros ligantes, como é o caso para complexos quadro-planos.
- b) O anel corrínico evita isomerizações do tipo cis-trans, ou seja, tem-se no caso um sistema "planar rígido" e dois ligantes (um acima e outro abaixo do plano do anel), que podem ser intercambiados num ataque por outro ligante.

O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento cinético e termodinâmico na hidrólise alcalina da acetilcobalamina e acetilcobinamida, a vários pH e temperaturas. Fazendo-se um estudo paralelo desses dois compostos, tentar-se-ã propor mecanismos consistentes que levarão a um raciocínio mais global em termos de efeito trans.

Em continuação apresentar-se-ã uma revisão da química da Vitamina B₁₂ e algumas considerações acerca de hidrólise de

ésteres, as quais ajudarão na interpretação dos resultados deste trabalho.

2. QUÍMICA DA VITAMINA B₁₂

2.1. Estrutura Molecular e Nomenclatura

A nomenclatura das cobalaminas e seus derivados é regida pela IUPAC (4). A diferença básica entre cobalaminas e cobinamidas prende-se ao fato de nas cobalaminas ter-se presente o ligante 5,6-dimetilbenzimidazol (BZ), na quinta posição de coordenação ao cobalto, enquanto que nas cobinamidas este ligante está ausente, sendo substituído por uma molécula de água ou outro ligante. A figura 1 ilustra essa diferença e apresenta a estrutura para sistemas corrínicos. Fazendo-se uma hidrólise ácida tem-se a quebra da ligação na posição indicada pela seta, sendo o método mais usual para obtenção de cobinamidas a partir de cobalaminas (5).

O sistema corrínico lembra o anel porfirínico, com a grande diferença entre os dois residindo na conjugação do anel. Enquanto o anel porfirínico apresenta 22 elétrons π , o sistema corrínico apresenta somente 14 elétrons π . Vê-se na figura 2 o esqueleto para complexos metal-corrínico e metal-porfirínico com grupamentos acetato e propionato nas cadeias laterais dos anéis (6).

O sistema corrínico é menos ressonante que o porfirínico e parece não ter aromaticidade (mesmo que apresente $4n + 2$

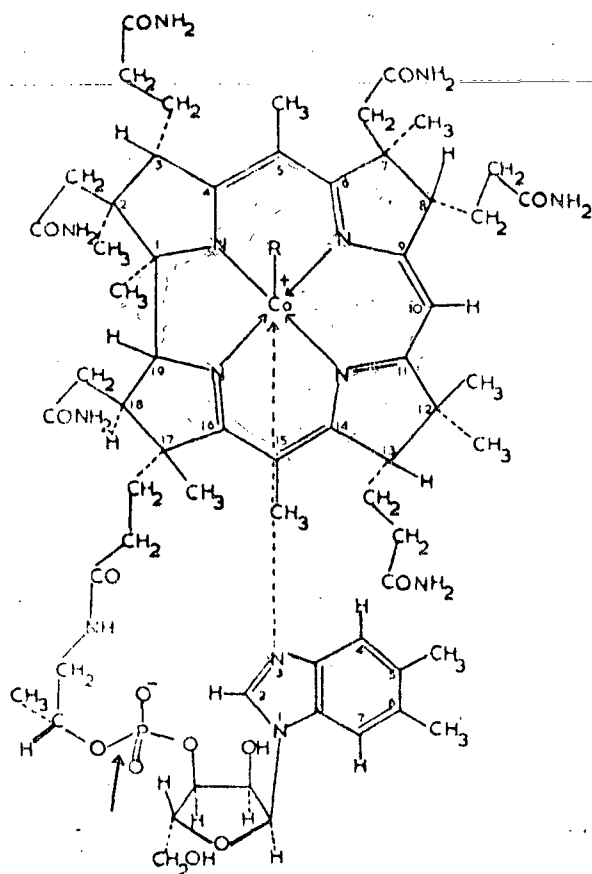


Figura 1. Estrutura para sistemas corrínicos.

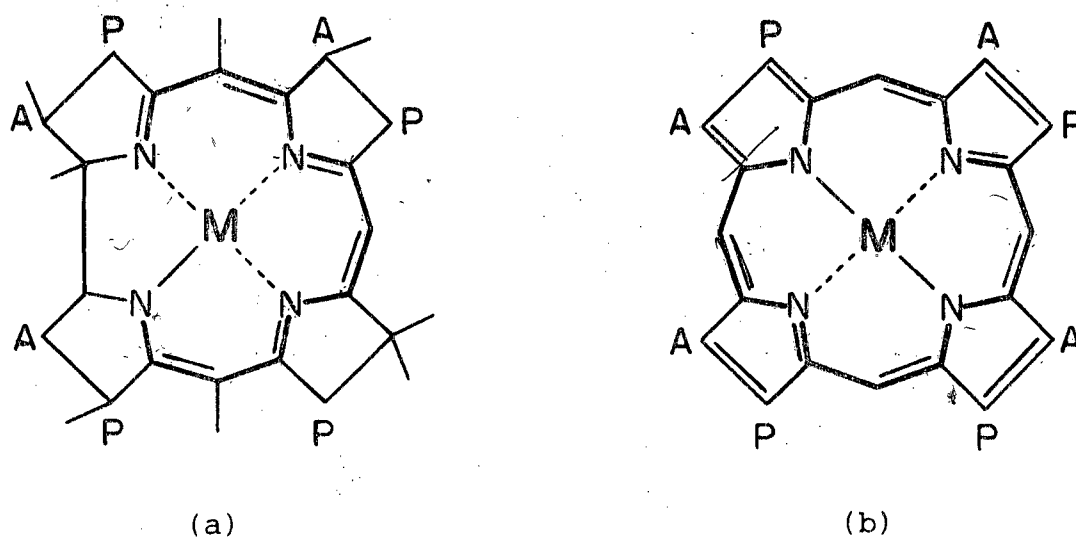


Figura 2. Estrutura para o sistema metal-corrínico (a) e metal-porfirínico (b), onde se destacam os grupamentos acetato (A) e propionato (P) nas cadeias laterais. A diferença em conjugação é indicada pelo traço mais forte contornando o anel.

elétrons π), pois a conjugação não se estende ao longo de todo o anel devido a uma interrupção de deslocamento de orbitais π entre os anéis pirrólicos. Este comportamento se explica pela falta de uma ponte de metileno e a pouca planaridade em comparação com o anel porfínico (5).

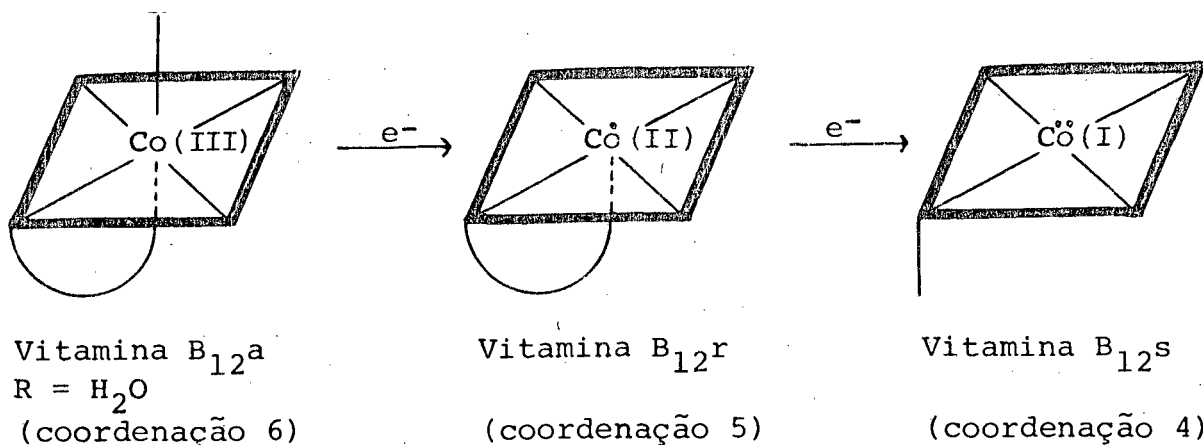
O grande número de derivados da Vitamina B₁₂ (cianocobalamina) resulta da troca de ligantes axiais ao cobalto. Assim se na figura 1, R = CN⁻ (cianocobalamina); R = H₂O (aquocobalamina = B₁₂a); R = OH⁻ (hidroxicobalamina = B₁₂b); R = alquil (alquilcobalamina); R = acetil (acetilcobalamina), etc. .

Para cobinamidas a nomenclatura é semelhante, acompanhando-se sempre a terminação correspondente. Ex.: diaquocobinamida, quando os dois ligantes axiais ao cobalto são moléculas de água; acetilcobinamida, quando na quinta posição de coordenação tem-se uma molécula de água e a sexta posição de coordenação é ocupada pelo grupo acetil.

2.2. Estados de Oxidação do Cobalto

O cobalto nas cobalaminas e derivados corrínicos pode se encontrar em três estados de oxidação, de acordo com o esquema 1.

A redução $\text{Co(III)} \longrightarrow \text{Co(II)} \longrightarrow \text{Co(I)}$, se realiza na ausência de oxigênio por alguns redutores como: Zinco em pó e solução a 10% de cloreto de amônio; borohidreto de sódio, íon cromoso a pH entre 9 — 10; ácido ascórbico; ou processos eletrolíticos (5,7,8).



Esquema 1. Estados de oxidação do cobalto nas cobalaminas e derivados corrínicos.

Um diagrama da distribuição eletrônica para o átomo central de cobalto na Vitamina B₁₂, nos três estados de oxidação, pode ser visto na figura 3. A espécie Co(III) é diamagnética com os orbitais 1σ e 2σ responsáveis pelos orbitais moleculares com os ligantes axiais (9). Percebe-se pelo diagrama que a ligação axial com o orbital 2σ produz um grande efeito nos níveis energéticos de orbitais π. A Vitamins B₁₂a é um complexo Co(III) que apresenta grande labilidade em reações de intercâmbio de ligantes, sendo tal fato contrastante com a estabilidade de complexos simples do tipo d⁶ (1). Na Vitamina B₁₂r, com o cobalto no estado de oxidação II, o orbital 1σ acomoda o ligante BZ e o orbital 3dz² possuindo um elétron desemparelhado, torna-a paramagnética e confere-lhe a importante propriedade de reagir através de radicais livres. Na Vitamina B₁₂s, o orbital dxy está vazio e o orbital dz² acomoda 2 elétrons, sendo que o complexo é diamagnético.

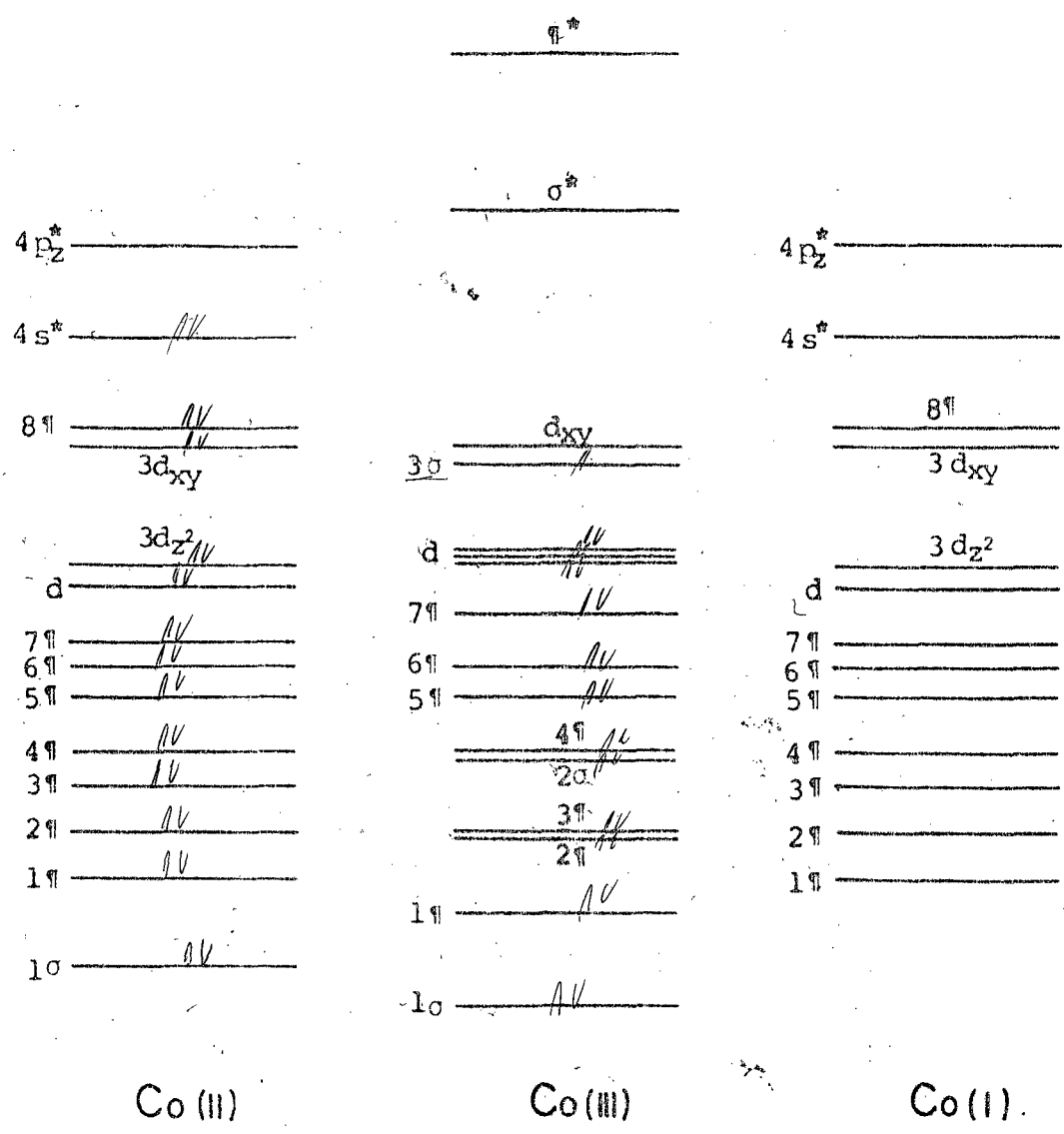
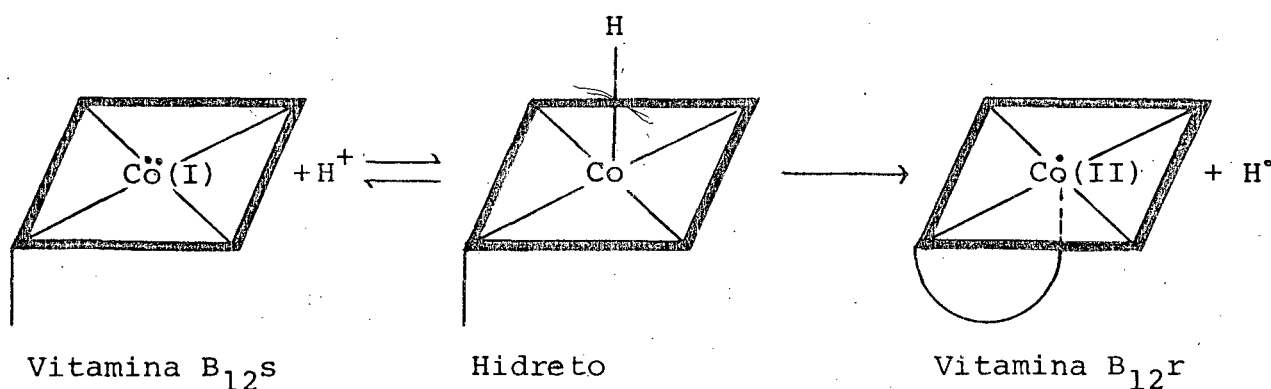


Figura 3. Diagrama da distribuição eletrônica para a Vitamina B₁₂, nos três estados de oxidação.

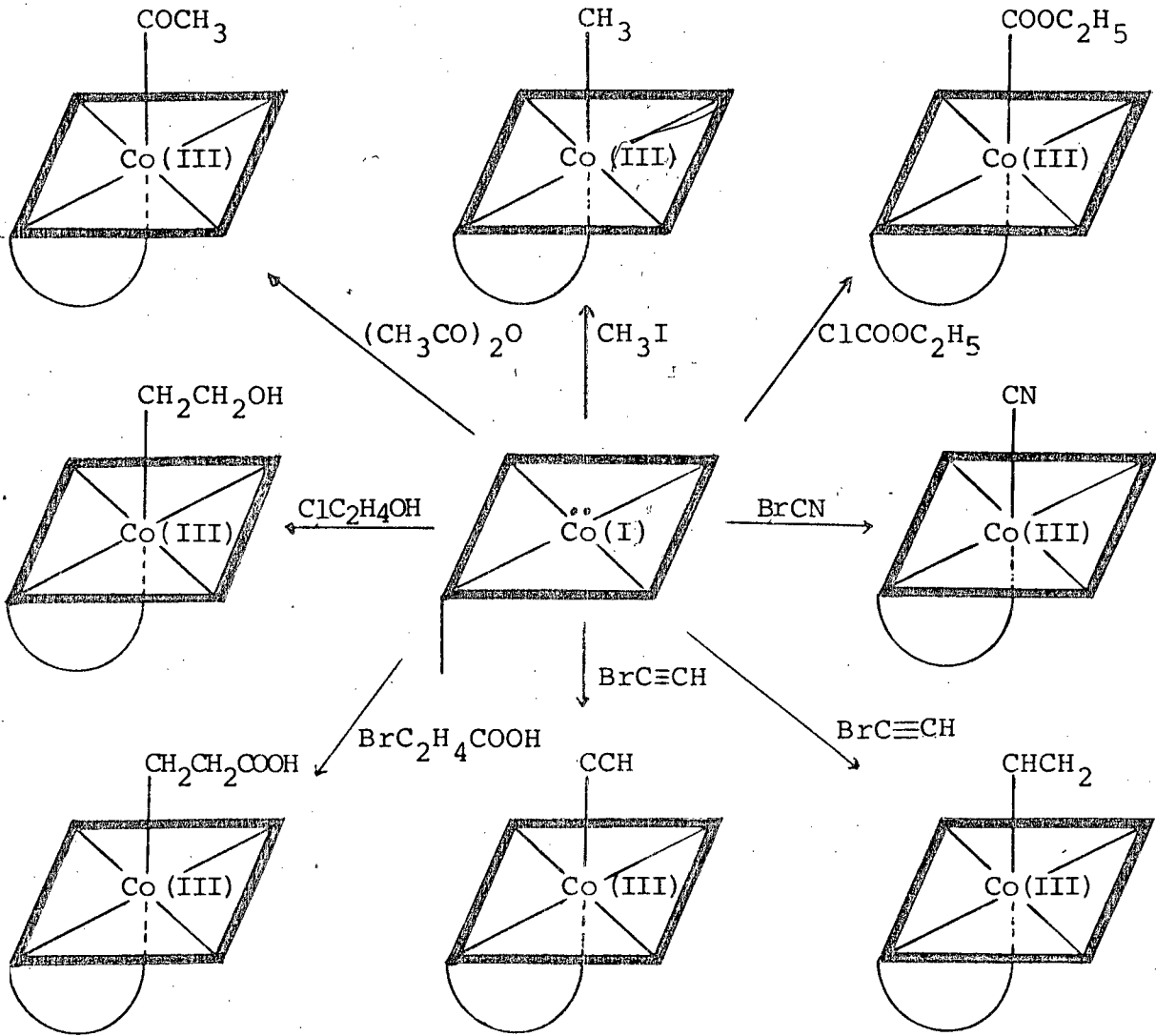
A presença de 2 elétrons neste orbital faz com que o complexo Co(I) se comporte como uma base de Lewis. Na realidade a Vitamina B₁₂s é extremamente nucleofílica e por isso Schauzer (10), denominou-a de supernucleófilo. Sendo uma base de Lewis é possível de coexistir em equilíbrio de protonação que em meio ácido, resulta na formação de um hidreto, conforme o esquema 2 (11).



Esquema 2. Produção do hidreto da Vitamina B₁₂s.

A espécie Co(I) não é estável em meio ácido pois o hidreto produzido se decompõe em Vitamina B₁₂r e hidrogênio nascente. O hidreto é um intermediário muito importante para a síntese de derivados da Vitamina B₁₂ (5).

Algumas reações de adição oxidativa ao Co(I) na Vitamina B₁₂s, podem ser vistas no esquema 3. Estas reações resultam na formação de alquil ou acetilcobalaminas, onde o cobalto tem o número de oxidação três.



Esquema 3. Reações de adição oxidativa ao Co(I) na Vitamina B_{12}s .

2.3. Espectros Eletrônicos

Um dos métodos mais convenientes para se identificar um derivado da Vitamina B₁₂ é a espectroscopia de absorção eletrônica. A figura 4 apresenta os espectros correspondentes aos três estados de oxidação do cobalto da Vitamina B₁₂.

Em geral, três bandas relativamente fortes aparecem para todos os sistemas corrínicos. Elas são usualmente denominadas de α , β , γ , em analogia à terminologia usada no espectro das porfirinas (12). Pratt e colaboradores num trabalho extensivo (13), apresentaram um critério que sumariza os espectros de absorção dos derivados da Vitamina B₁₂ em quatro tipos padrões. A figura 5 apresenta o espectro A como sendo do tipo normal (dicianocobalamina), passando por espectros do tipo B e C, considerados intermediários, e finalmente um espectro do tipo D, considerado anômalo (metilcobalamina em meio ácido).

As transições eletrônicas responsáveis pelo espectro de absorção na Vitamina B₁₂, na parte visível do espectro, ocorrem devido ao sistema ressonante do anel corrínico. As absorções seriam demasiado fortes para serem consideradas como transições do tipo d-d, e muito fracas para serem transições de transferência de carga tipo metal-ligante ou ligante-metal, pois em sistemas corrínicos livres de metal espectros similares (descobaltocobalamina) são observados. Assim o metal e suas ligações axiais atuam no sistema cromóforo modificando a densidade eletrônica do anel e deslocando ou suprimindo absorções. Desse modo tem sido aceito que as transições são todas do tipo $\pi-\pi^*$ (5,12).

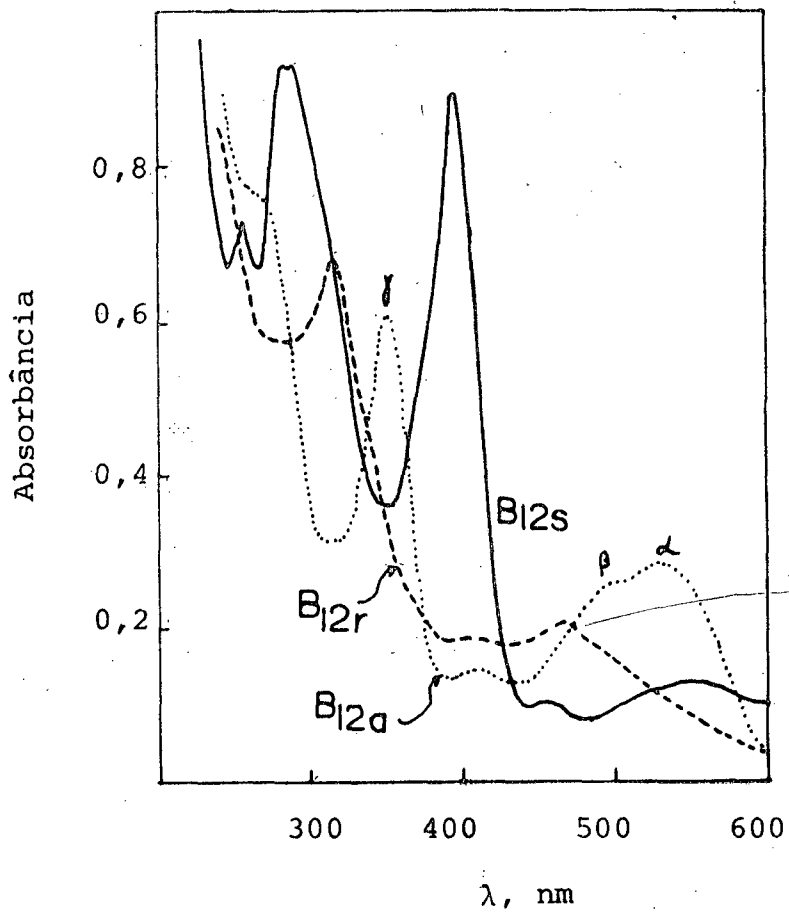


Figura 4. Espectros correspondentes aos três estados de oxidação do cobalto na Vitamina B₁₂.

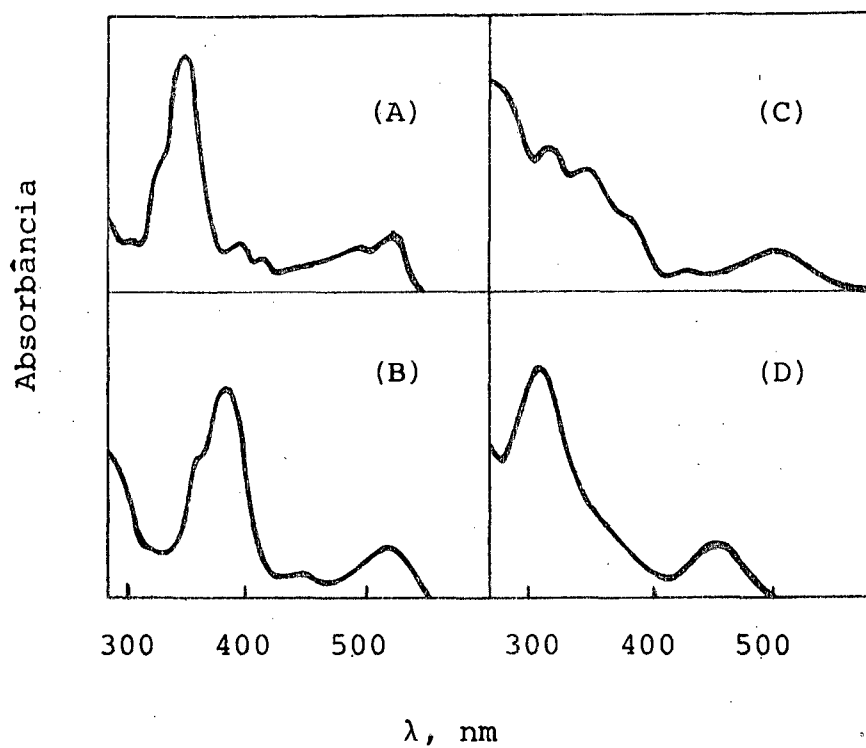
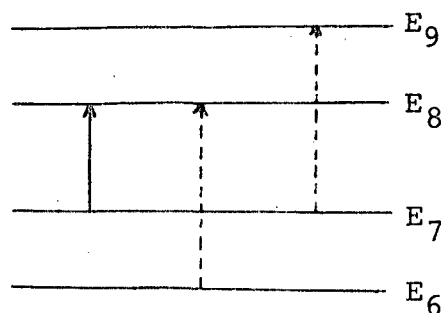


Figura 5. Tipos padrões de espectro de absorção dos derivados da Vitamina B₁₂. Tipo (A), como sendo normal (dicianocobalamina); Tipos (B) e (C), considerados intermediários e tipo (D), considerado anômalo (metilcobalamina em meio ácido).

O esquema 4 apresenta as transições que dão origem às bandas α e β (transições $E_7 \longrightarrow E_8$), sendo que a banda γ tem sido considerada (5,12), como sendo do tipo $E_6 \longrightarrow E_8$ ou $E_7 \longrightarrow E_9$, pois são praticamente da mesma energia.



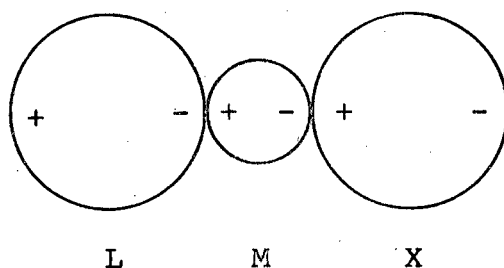
Esquema 4. Transições que dão origem às bandas α , β , e γ .

2.4. O Efeito Trans

O efeito trans é definido por Huheey (14) como sendo a capacidade que um ligante tem de labilizar a ligação do grupamento na posição trans. Segundo Cotton (15), tal efeito é um fenômeno cinético e, desse modo, seria o efeito de um grupo coordenado sobre a velocidade de substituição na posição trans a esse grupo, em complexos octaédricos ou quadrado-planos.

Pode-se tentar explicar o efeito trans através da teoria de polarização de Grinberg que enfoca primariamente efeitos no estado fundamental da ponte ligante-metal-ligante em trans. O

esquema 5 representa esse tipo de fenômeno. O íon metálico induz um dipolo no ligante L que por sua vez provoca um dipolo induzido no metal. A orientação desse dipolo no metal é no sentido de repelir carga negativa no ligante X em trans.



Esquema 5. Polarização ligante-metal-ligante para o efeito trans.

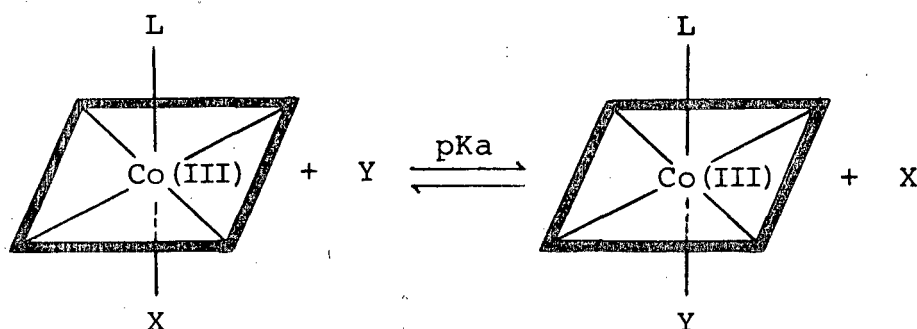
Um trabalho inicial foi apresentado por Pratt e colaboradores (3), nessa área de corrinóides, para determinar constantes de equilíbrio em intercâmbio de ligantes. Especial atenção foi dispensada à maneira com que um ligante axial fixo influencia o equilíbrio. A tabela I apresenta esse tipo de comportamento. Os valores de pKa se referem ao intercâmbio de um ligante axial X, na quinta posição de coordenação ao cobalto, por outro Y, fixando-se L, conforme o esquema 6.

Nesta série de dados a influência mais significativa do efeito trans, se observa para os casos de deslocamento de água por cianeto. A diferença em constante de equilíbrio, quando água

TABELA I

Constantes de equilíbrio para a substituição de ligantes axiais, segundo o esquema 6.

	X	Y	Sistema	pKa
(i)	H ₂ O	OH ⁻	Aquocobalamina	7.8
			Diaquocobinamida	6.0
			Cianocobinamida	11.0
			Methylcobinamida	14.0
(ii)	H ₂ O	CN ⁻	Diaquocobinamida	-14.0
			Aquocobalamina	-12.0
			Cianocobinamida	-8.0
			Methylcobinamida	-3.0
(iii)	H ₂ O	BZ	Aquocobalamina	+2.4
			Cianocobalamina	-0.1
			Ethinilcobalamina	-0.7
			Vinilcobalamina	-2.4
			Methylcobalamina	-2.5
			Coenzima B ₁₂	-3.4
(iv)	BZ	CN ⁻	Cianocobalamina	-4.0
			Ethinilcobalamina	-2.7
			Vinilcobalamina	-0.7
			Methylcobalamina	-0.1



Esquema 6. Intercâmbio de ligantes em sistemas corrínicos.

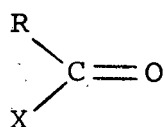
X = H₂O e Y = OH⁻ ou CN⁻ para cobinamidas.

X = H₂O ou BZ e Y = BZ ou CN⁻ para cobalaminas.

é o ligante em trans e o ligante em trans é metil, é de 10¹¹. Portanto, o ligante axial em trans (L), exerce uma influência marcante na química do ligante axial oposto a ele (X).

3. DERIVADOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

A estrutura (I) é normalmente considerada (16) como representativa de derivados de ácidos carboxílicos, como: ésteres, anidridos, amidas.



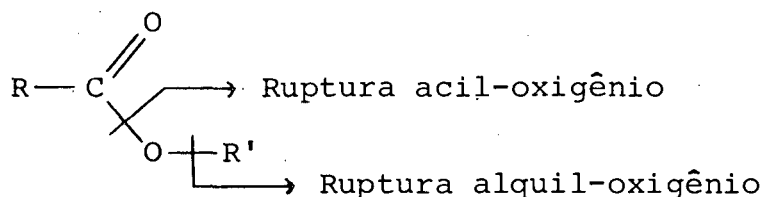
Estrutura I.

Os derivados dos ácidos carboxílicos, têm sido objeto de intensa investigação, tendo em vista sua importância central em química orgânica e sistemas bioquímicos (17,18). A seguir apresentar-se-á uma rápida revisão sobre hidrólise de ésteres, de grande utilidade na interpretação dos resultados da hidrólise alcalina da acetilcobalamina e acetilcobinamida.

3.1. Hidrólise de Ésteres

Inicialmente, Ingold (19) classificou oito tipos de mecanismos para hidrólise de ésteres de acordo com o esquema mostrado na tabela II. Uma nova categoria foi adicionada mais recentemente (20), com o mecanismo tipo ElcB (eliminação unimolecular da base conjugada) para a hidrólise alcalina com ruptura da ligação acil-oxigênio.

A sub-divisão primária é feita com base no rompimento da ligação acil-oxigênio ou alquil-oxigênio. Este tipo de ruptura é mostrado na estrutura (II).



Estrutura II.

TABELA II

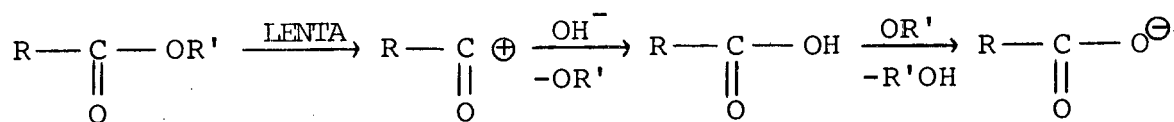
CLASSIFICAÇÃO DE MECANISMOS PARA HIDRÓLISE DE ÉSTERES (19)

Mecanismo	Descrição da Reação
AAC1	Catálise ácida unimolecular, com ruptura da ligação acil-oxigênio.
AAC2	Catálise ácida bimolecular, com ruptura da ligação acil-oxigênio.
AAL1	Catálise ácida unimolecular, com ruptura da ligação alquil-oxigênio.
AAL2	Catálise ácida bimolecular, com ruptura da ligação alquil-oxigênio.
BAC1	Catálise básica unimolecular, com ruptura da ligação acil-oxigênio.
BAC2	Catálise básica bimolecular, com ruptura da ligação acil-oxigênio.
BAL1	Catálise básica unimolecular, com ruptura da ligação alquil-oxigênio.
BAL2	Catálise básica bimolecular, com ruptura da ligação alquil-oxigênio.

As reações que se processam pela ruptura da ligação alquil-oxigênio, são de substituição nucleofílica no carbono saturado, tendo como grupo de saída um carboxilato ou um ácido carboxílico. Este tipo de grupo de saída é uma base fraca.

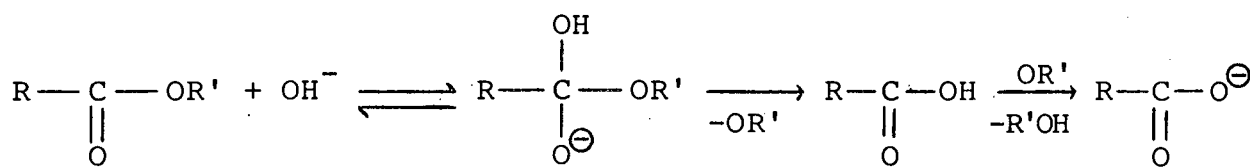
Dos mecanismos apresentados, interessam de maneira especial para o presente trabalho, aqueles que envolvem ruptura acil-oxigênio em catálise básica, por se assemelharem às rupturas acil-cobalto esperadas nas reações de hidróxido com acetilcobalamina e acetilcobinamidas. Desse modo as possibilidades mecanísticas estariam restritas aos mecanismos BAC1, BAC2 e ElcB. A catálise básica com ruptura acil-oxigênio do tipo BAC1 ainda não foi observada, sendo que a hidrólise tipo BAC2 é quase universal (20).

O mecanismo geralmente aceito para reações do tipo BAC1, apresenta a etapa lenta da reação como sendo a decomposição unimolecular do éster na primeira etapa da reação (esquema 7).



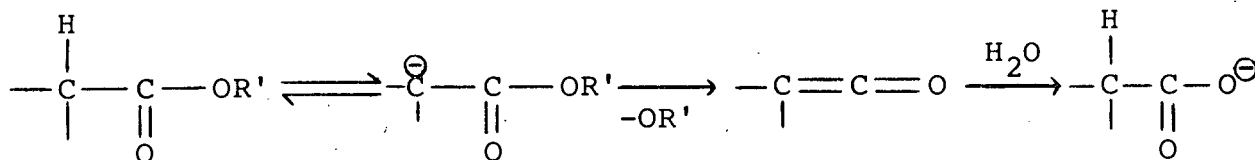
Esquema 7.

Para as reações que procedem via um mecanismo BAC2 a etapa determinante da velocidade é o ataque do íon hidróxido sobre a carbonila sendo que a reação se procede através de um intermediário tetraédrico (esquema 8).



Esquema 8.

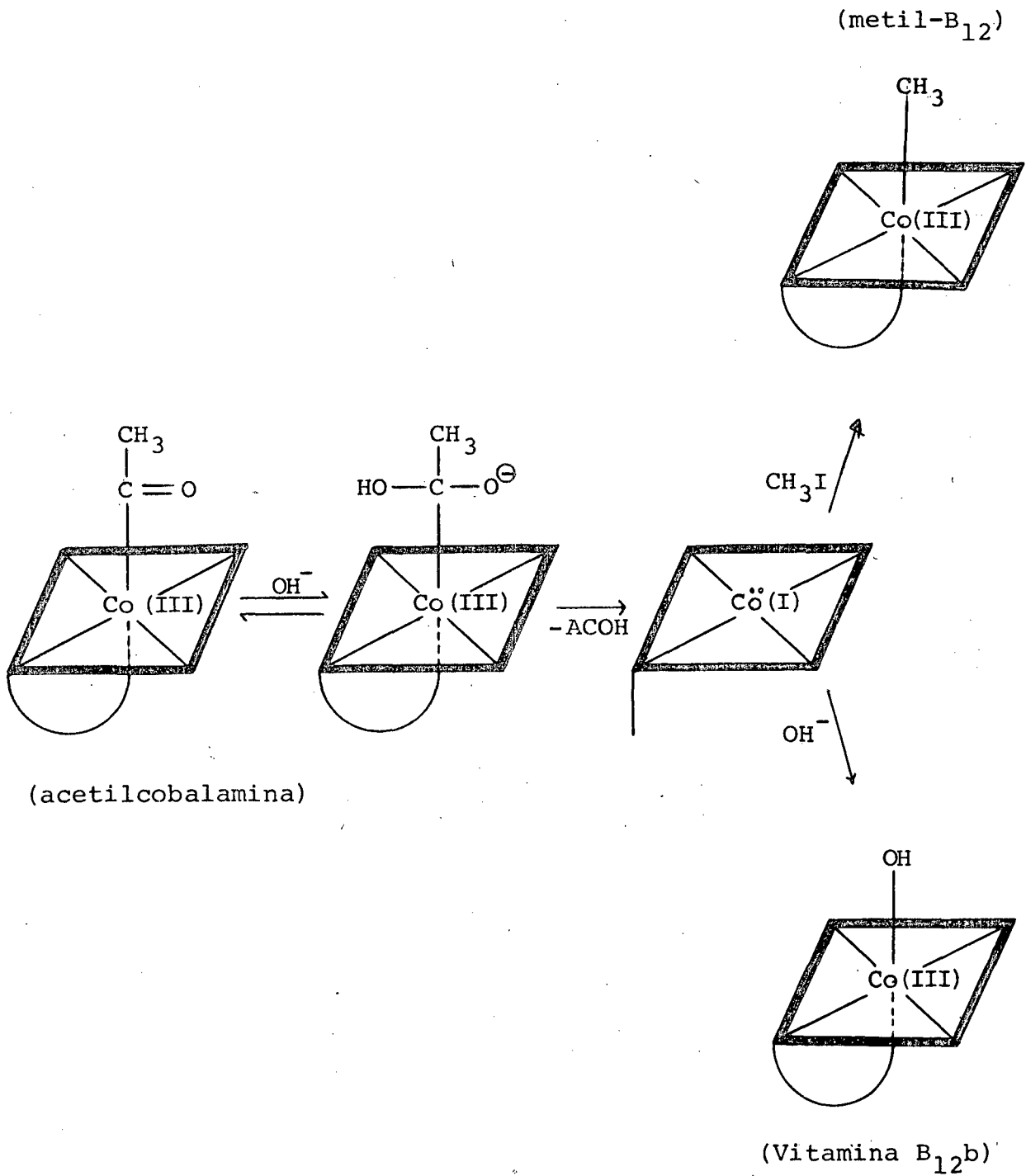
O mecanismo ElcB procede via abstração de um próton ligado ao carbono α da carbonila, formando um intermediário carba-niônico o qual se decompõe unimolecularmente dando origem a uma cetena que sofrendo hidrólise rápida gera o carboxilato correspondente (esquema 9).



Esquema 9.

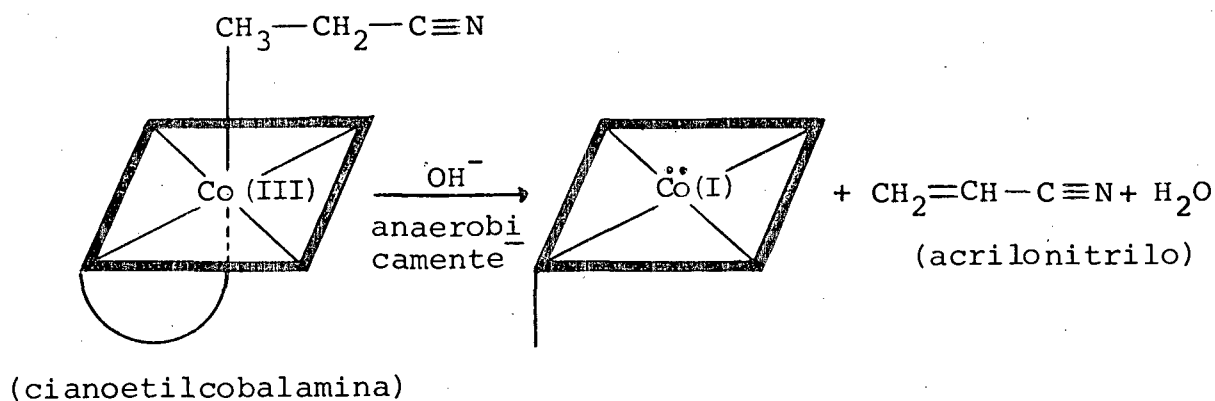
4. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ACETILCOBALAMINA

As pesquisas realizadas por Bernhauer e Irion (21), mostraram que o grupo acila ligado ao cobalto nas cobalaminas é reativo, e que por ataque de um nucleófilo sofre degradação. No caso particular da acetilcobalamina, o ataque por íon hidróxido pode ser visualizado no esquema 10. O mecanismo proposto pelo grupo de



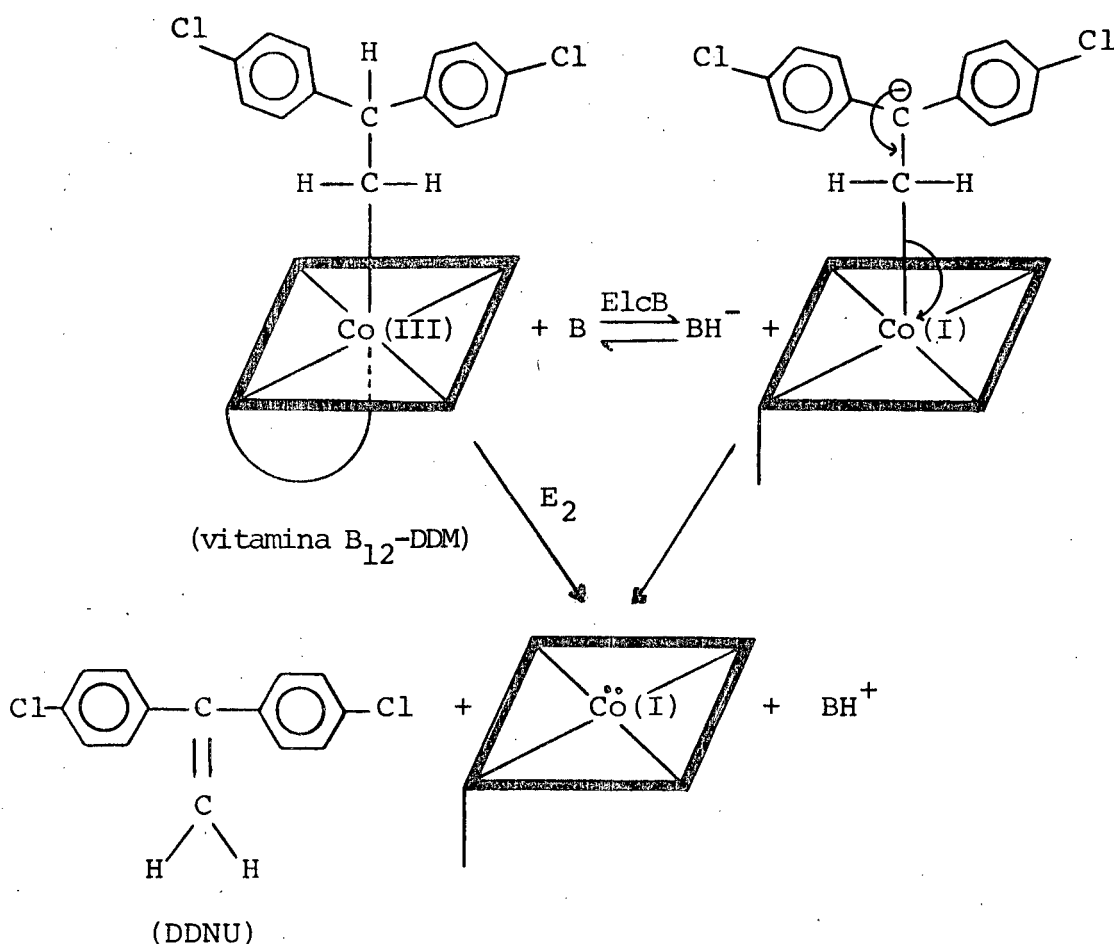
Esquema 10. Reação da acetilcobalamina com o íon hidróxido, na presença de iodeto de metila (anaerobicamente), e na ausência de iodeto de metila (aerobicamente).

pesquisadores envolve uma ruptura heterolítica da ligação cobalto-carbono. Como intermediário forma-se a Vitamina B₁₂s, que em condições aeróbicas, produz a Vitamina B₁₂b, e em condições anaeróbicas, na presença de iodeto de metila, gera metilcobalamina. Rupturas heterolíticas em ligações cobalto-carbono, tais como as postuladas por Bernhauer e Irion, têm sido apresentadas em reações de alquilcobalaminas. Assim, Hogenkamp e colaboradores (22), estudaram a decomposição por hidróxido da cianoetilcobalamina em condições anaeróbicas e pH acima de 7,9 resultando na formação de Acrilonitrilo e Co(I) (Esquema 11).



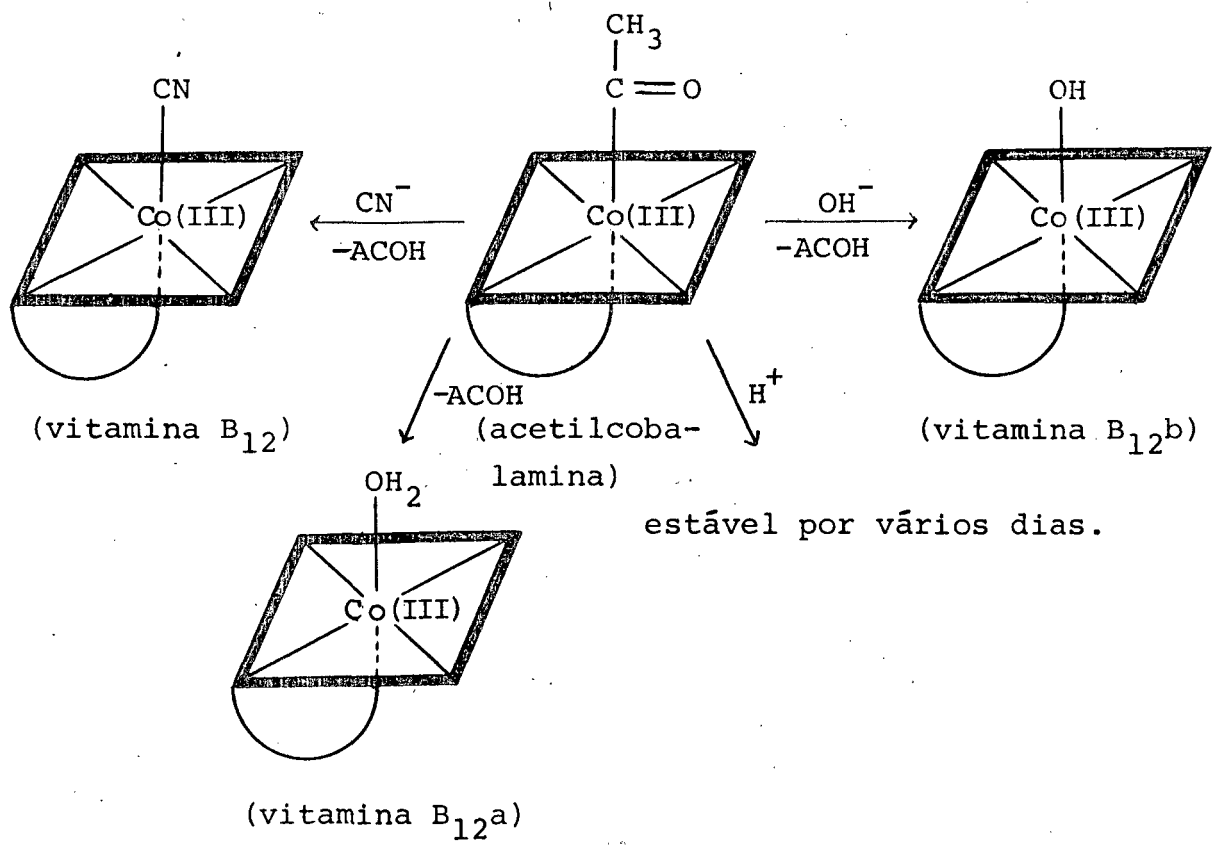
Esquema 11. Decomposição anaeróbica por íons hidróxidos da cianoetilcobalamina.

Mais recentemente Ademir Neves e Faruk Nome (23) estudaram a decomposição do composto B₁₂-DDM por hidróxido, catalizada por micela, e postularam um mecanismo como sendo do tipo E₂ ou E1cb, como mostra o esquema 12.



Esquema 12. Decomposição catalisada por micelas do composto B₁₂-DDM.

O esquema 13 apresenta alguns aspectos da química da acetilcobalamina. Em geral, em presença de ácidos a acetilcobalamina é estável, sendo que em presença de hidróxido ou outro nucleófilo é degradada. Outra característica importante da ligação acil-cobalto é a sua susceptibilidade à fotólise. Na presença de luz, a acetilcobalamina é rapidamente degradada e como produto tem-se a Vitamina B₁₂a, numa reação que é típica de alquilcobalaminas.



Esquema 13. Algumas reações aeróbicas da acetilcobalamina.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

1. INSTRUMENTAÇÃO

Os espectros de absorção nas regiões ultra-violeta e visível, para caracterização dos substratos, foram conseguidos utilizando-se espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-210 A, equipado com registrador Shimadzu U-135, dispendo de células de quartzo com caminho ótico de 1 cm. As medidas de acompanhamento cinético foram realizadas no mesmo aparelho, tendo-se acoplado ao equipamento um banho termoregulador Haake FJ, que fornecia um fluxo contínuo de água a temperatura constante a célula de reação, com oscilações de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Para medidas de pH utilizou-se um pH-metro digital micromal B-222. Para aplicações das amostras nas corridas cinéticas utilizou-se uma microseringa Hamilton de 10 μ l.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes, pro-análise, empregados neste trabalho foram conseguidos de firmas comerciais especializadas. A Vitamina B₁₂a (acetato de aquocobalamina), Merck, foi analisada por espectroscopia UV-Visível (figura 6) e utilizada sem prévia purificação. Na obtenção de atmosfera extritamente isenta de oxigênio, para as sínteses, utilizou-se Argônio ultra puro White Martins. Os reagentes borohidreto de sódio, zinco em pó, anidrido acético, ácido clorídrico e cloreto de amônio, foram adquiridos

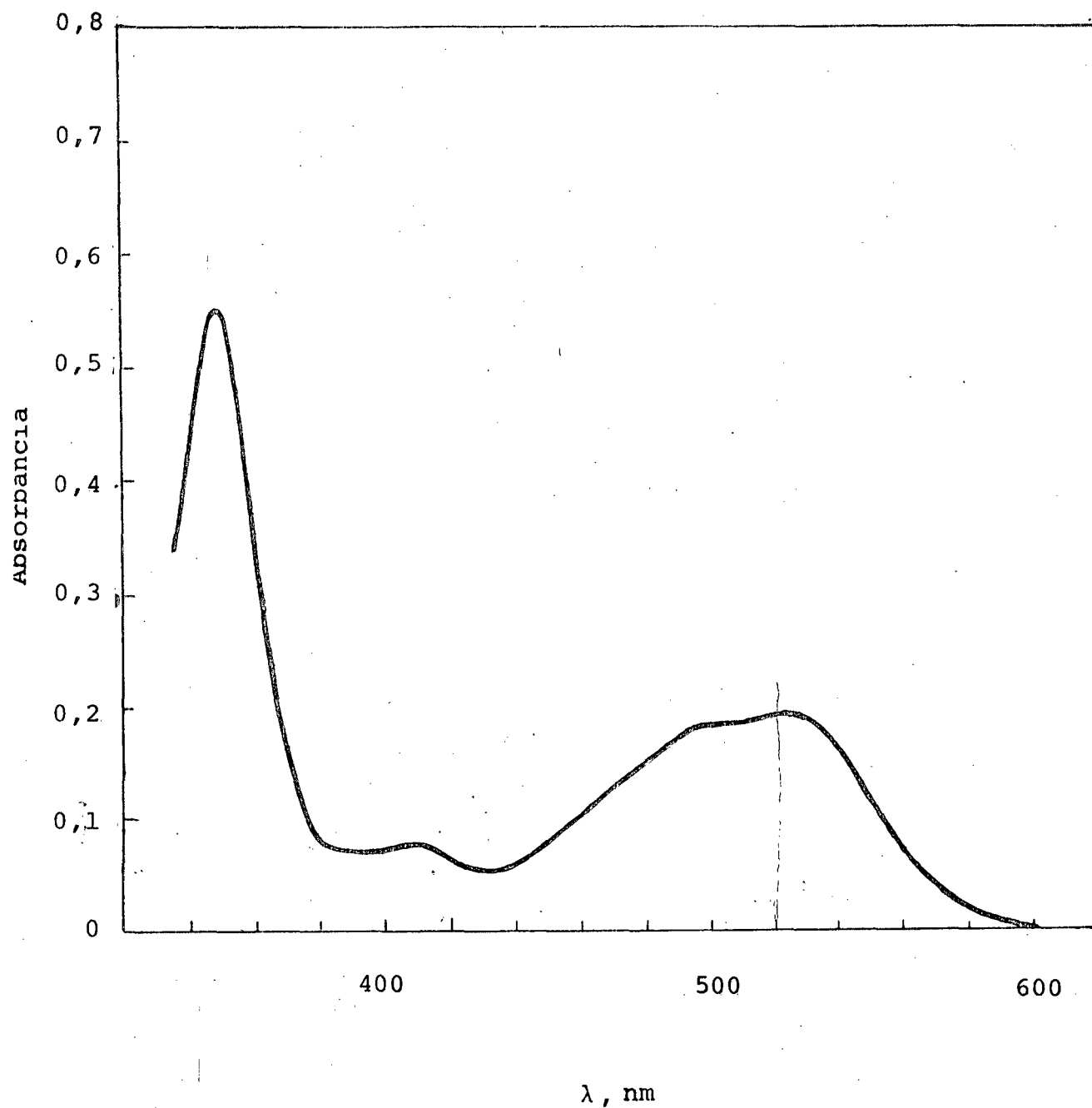


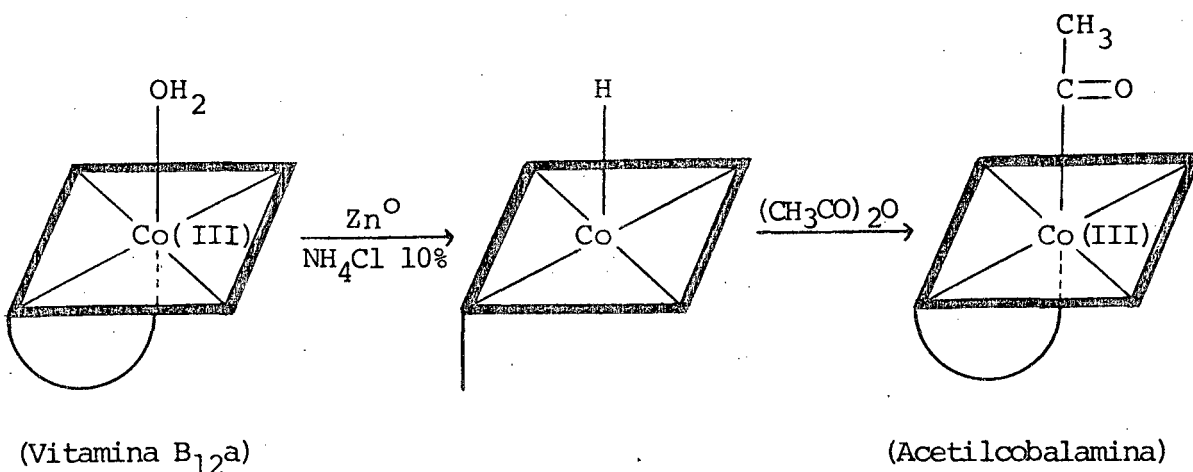
Figura 6. Espectro de absorção UV-Visível da Vitamina B₁₂a em água a 25°C, de procedência Marck, utilizada na síntese dos substratos.

da Merck. Os solventes utilizados em processos de extração, bem como a sílica gel para coluna cromatográfica e a resina catiônica utilizada na eliminação de zinco, tinham procedência Merck, Eci-bra ou Reagem.

3. SÍNTESES

3.1. Obtenção do Composto Acetilcobalamina

Este composto foi sintetizado na ausência de luz para evitar a fotólise. A câmara de reação consistia de um balão de três bocas envolvido em papel escuro revestido com papel alumínio. O sistema permaneceu na capela, com o laboratório em condições de pouca claridade, durante todo o processo de síntese e purificação do composto. O esquema 14 representa os processos envolvidos nesta síntese. Utilizou-se normalmente 150 mg de Vitamina B₁₂^a em 50 ml de solução a 10% de cloreto de amônio e 2 g de zinco em pó,

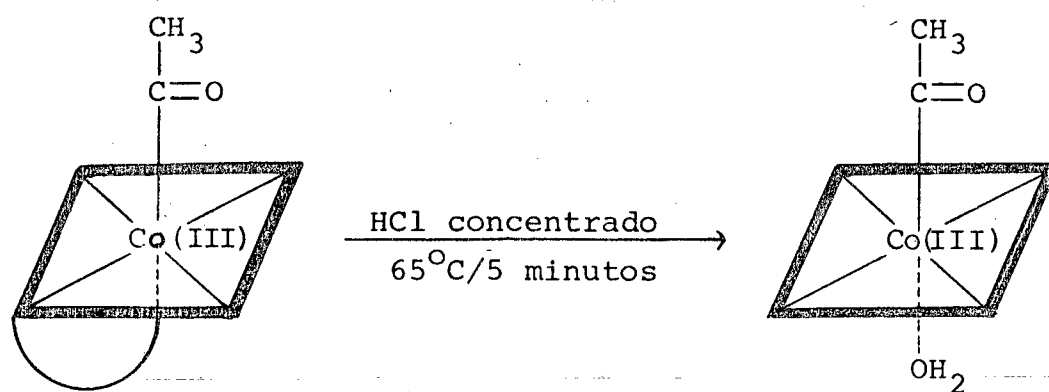


Esquema 14. Síntese da acetilcobalamina.

sob atmosfera de argônio. Após 15 minutos de reação, adicionou-se à essa mistura 2 ml de anidrido acético. Deixava-se a reação por mais 5 minutos e imediatamente se fez extração com fenol (11,12). Toda a acetilcobalamina foi extraída para a camada fenólica e a parte aquosa foi desprezada. Em seguida, adicionou-se 100 ml de uma mistura 4:1 de éter-acetona e 1,5 ml de água destilada. A acetilcobalamina passava à fase aquosa, e seguiu-se extraíndo o fenol restante com porções sucessivas de éter etílico. O composto foi passado por uma coluna de sílica gel tipo 60, usando-se metanol como eluente. As frações foram recolhidas e caracterizadas por espectroscopia UV-Visível. Concentrou-se a solução com evaporação rotatória e a pureza do composto foi comparada com a literatura disponível (11). Na etapa seguinte foi feita a eliminação de zinco. Passou-se o composto através de uma resina catiônica ativada, usando-se água destilada como eluente. Extraíu-se novamente o composto com fenol, seguido da passagem para a fase aquosa.

3.2. Obtenção do Composto Acetilcobinamida

A síntese deste composto pode ser representada através do esquema 15. Primeiramente gerou-se o composto acetilcobalamina, que foi submetido a extração com fenol, conforme descrito anteriormente. Antes de se passar pela coluna de sílica gel, fez-se uma hidrólise ácida do fosfato no ligante 5,6-dimetilbenzimidazol (24), adicionou-se 10 ml de ácido clorídrico concentrado e aquecendo-se por 5 minutos à temperatura de 65°C. Em seguida a amostra era purificada por extração com fenol e cromatografia em coluna de sílica gel tipo 60, como já descrito para a acetilcobalamina. A



Esquema 15. Síntese da acetilcobinamida.

identificação foi feita por espectroscopia UV-Visível, em comparação com a literatura (11). Os espectros de absorção UV-Visível, para os compostos acetilcobalamina e acetilcobinamida, além dos produtos obtidos por fotólise aeróbica, podem ser vistos nas figuras 7 e 8 respectivamente.

4. CINÉTICAS

A velocidade de degradação da acetilcobalamina era seguida em 357 nm, acompanhando-se o aparecimento da Vitamina B₁₂. A degradação da acetilcobinamida era acompanhada em 343 nm, seguindo-se o aparecimento do composto dihidroxibinamida. Todas as corridas cinéticas foram realizadas em condições de pseudo-primeira ordem, adicionando-se 15 µl de uma solução de acetilcobalamina ou acetilcobinamida ($3,2$ a $3,5 \times 10^{-2}$ M) a 3,0 ml de uma solução termostaticada de base. As soluções de hidróxido de potássio

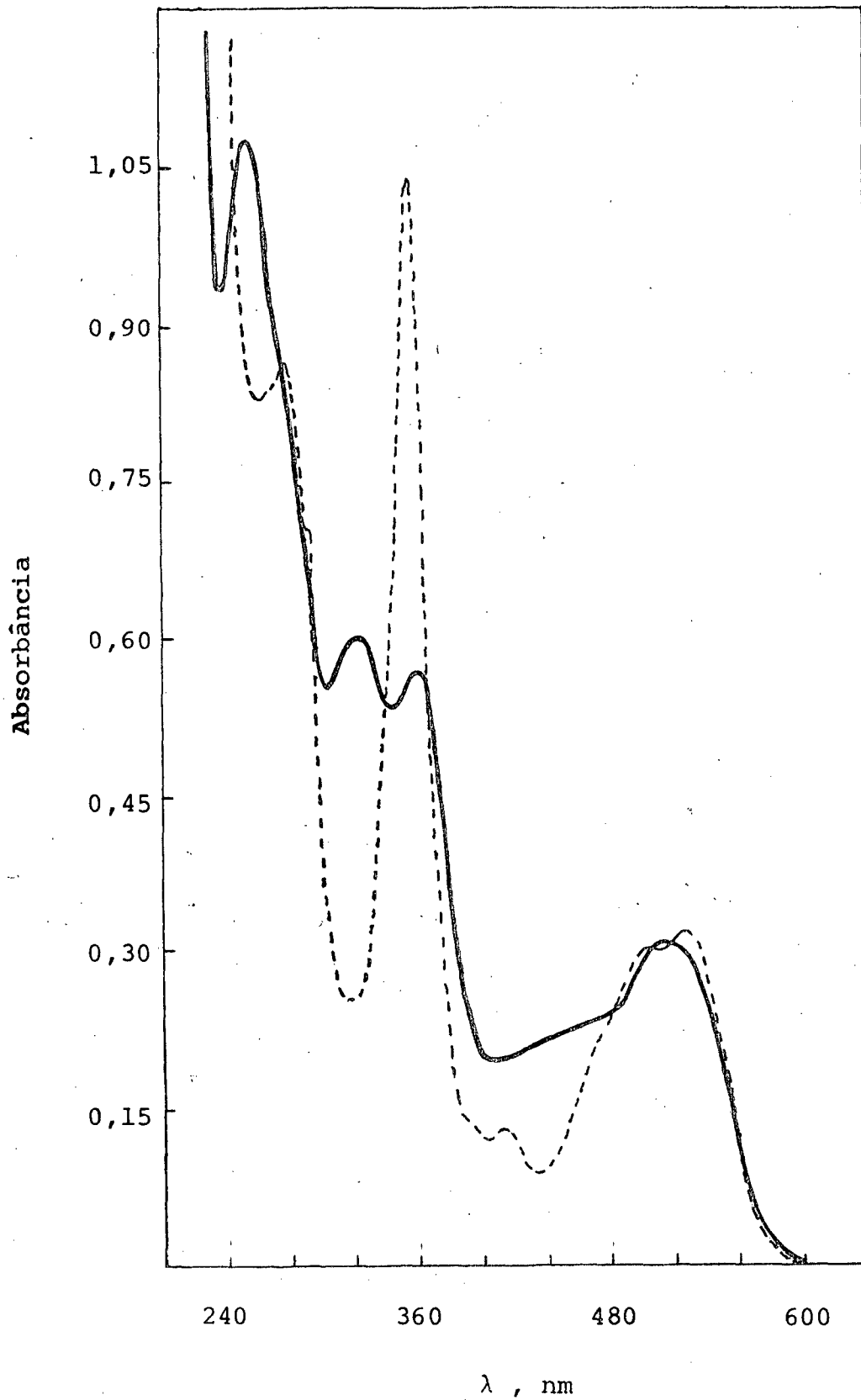


Figura 7. Espectro de absorção UV-Visível da acetilcolina em água a 25°C (—); Fotólise da mesma amostra (----).

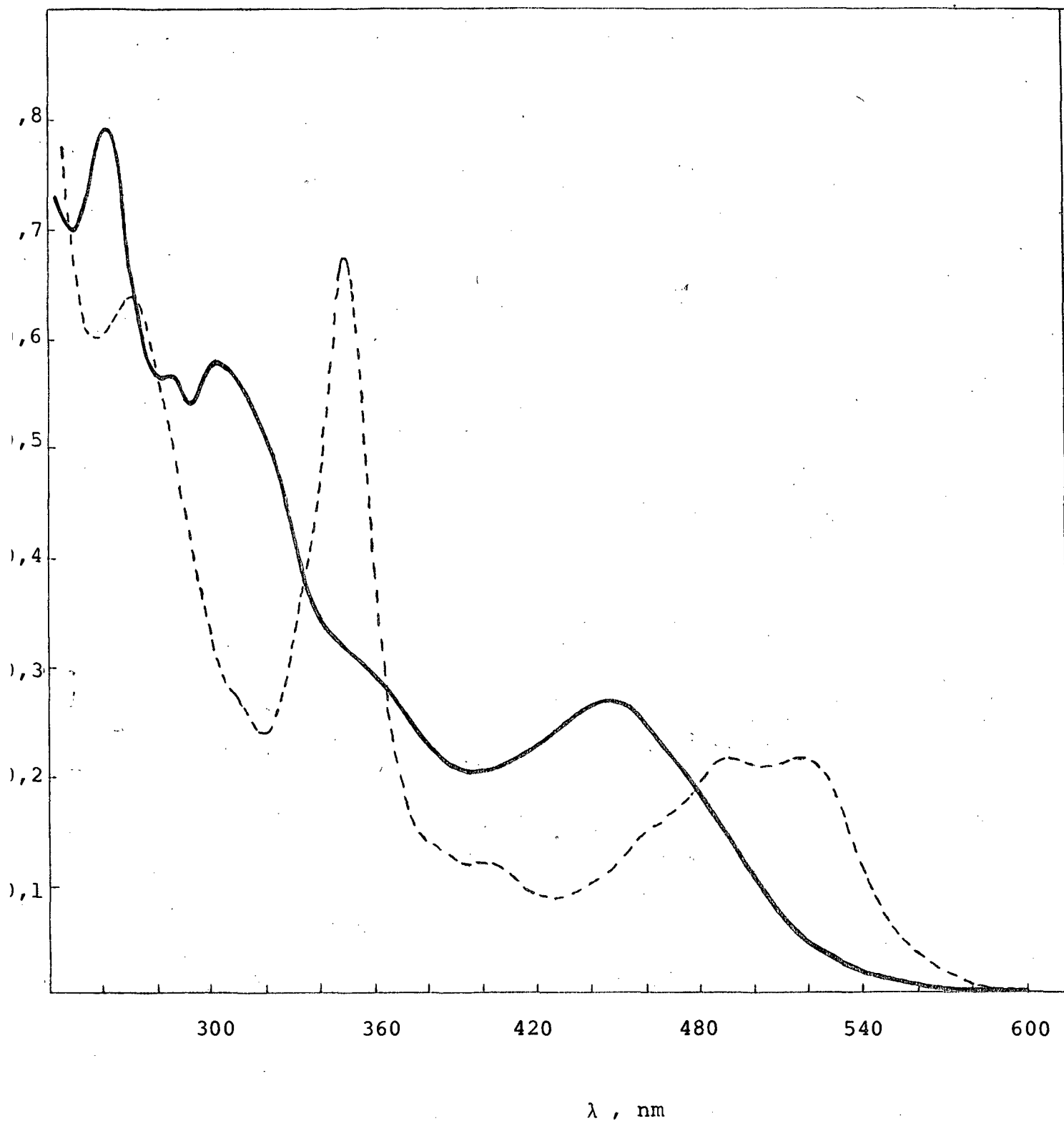


Figura 8. Espectro de absorção UV-Visível da acetilcobinamida em água a 25°C (—); Fotólise da mesma amostra (----) .

foram tituladas volumetricamente, três vezes, usando-se alaranjado de metila como indicador, com erro inferior a 1%. Foram determinadas as constantes de velocidade a várias concentrações de íons hidróxidos nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C. Gráficos lineares de $\text{Ln}(A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, mostraram comportamento linear (figuras 9 e 10). Os valores numéricos das constantes de velocidade foram calculados por regressão linear.

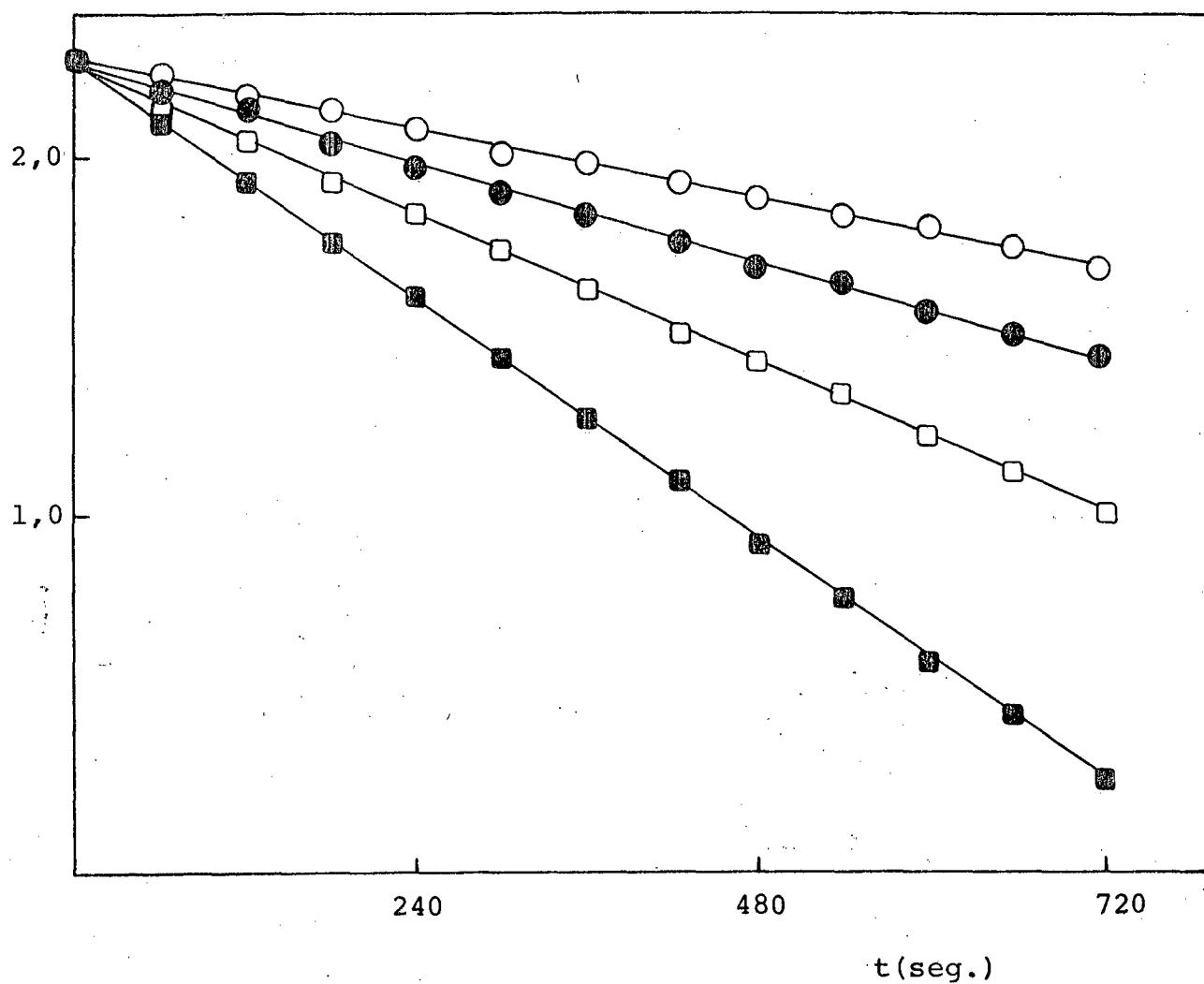


Figura 9. Determinação da constante de velocidade de pseudo -
-primeira ordem para a degradação por base ($[\text{OH}^-]_t = 0,05 \text{ M}$), do composto acetilcobalamina a 25°C (○) ,
 30°C (●), 35°C (□), e 40°C (■).

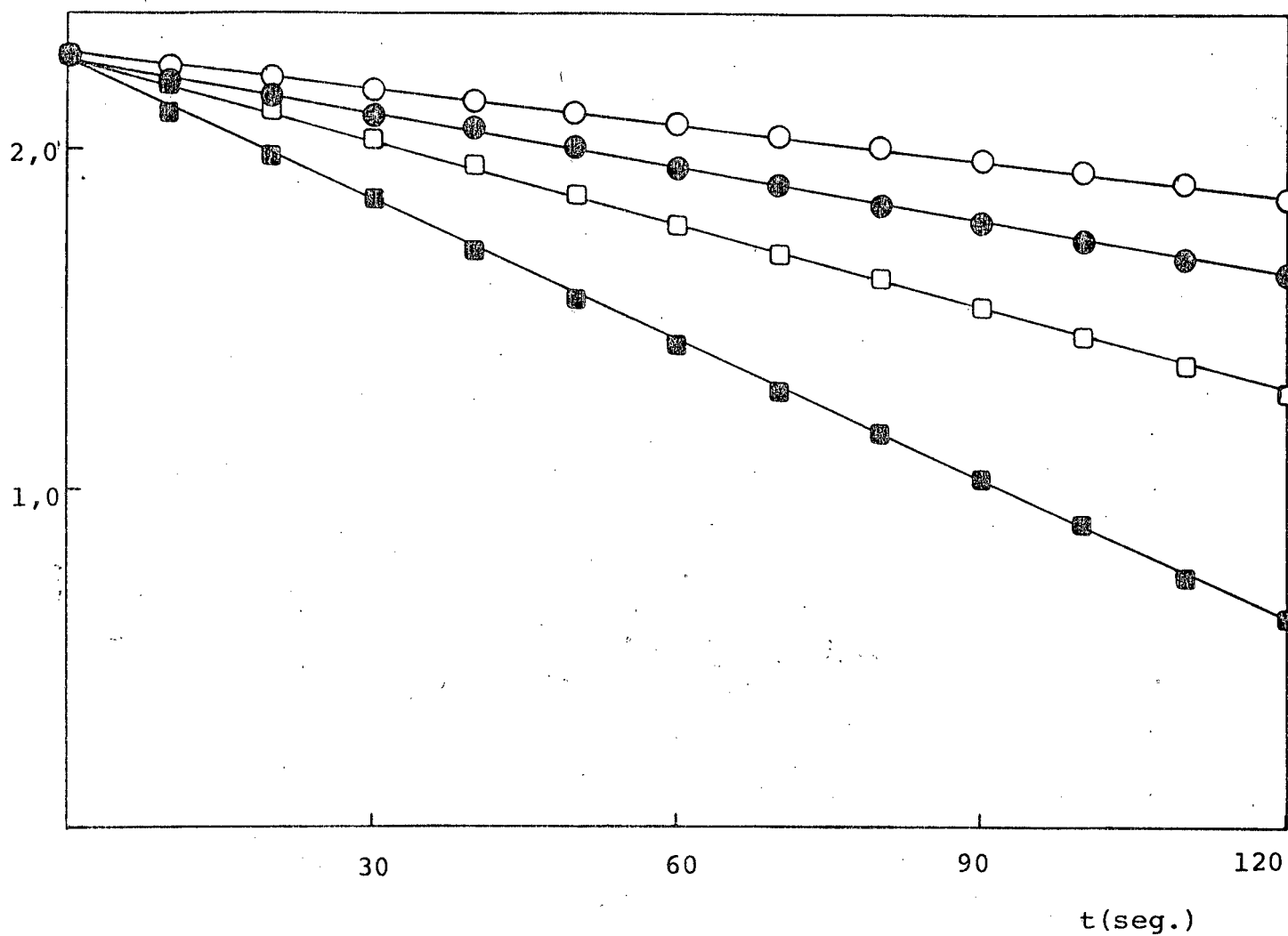
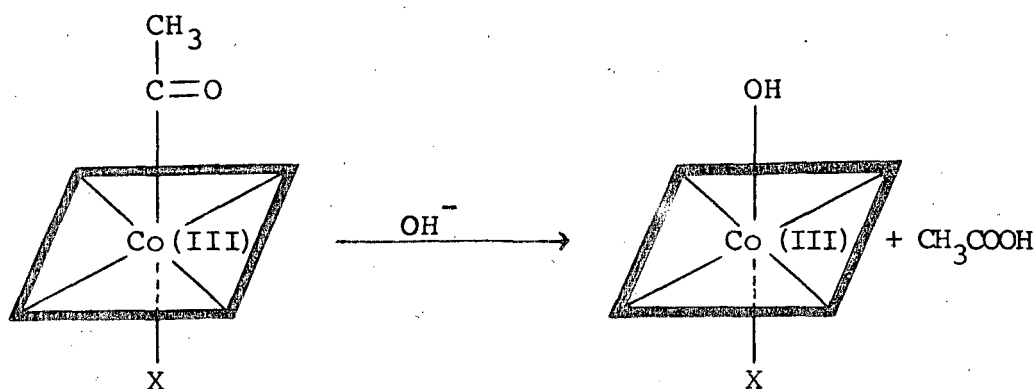


Figura 10. Determinação da constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para a degradação por base ($[\text{OH}^-]_t = 0,05 \text{ M}$), do composto acetilcobinamida a 25°C (○), 30°C (●), 35°C (□), e 40°C (■).

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presença de íons hidróxidos ($|\text{OH}^-| > 10^{-2} \text{ M}$), o espectro da acetilcobalamina muda irreversivelmente, sendo o espectro final idêntico ao espectro da Vitamina B₁₂b (figura 11). Essa mudança espectral é consistente com os dados existentes na literatura (21), e permite se acompanhar a cinética de formação do produto a 357 nm, comprimento de onda onde existe a maior diferença de absorvidade molar entre reagentes e produtos. Fenômeno similar ocorre com a acetilcobinamida, a qual gera dihidroxicobinamida (figura 12). O comprimento de onda mais adequado para se acompanhar a formação do produto localiza-se em 343 nm. O esquema 16 é consistente com as mudanças espectrais que ocorrem em soluções concentradas de base.



X = H₂O (acetilcobinamida)

X = BZ (acetilcobalamina)

X = OH⁻ (dihidroxicobinamida)

X = BZ (hidroxicobalamina)

Esquema 16. Degradação por base da acetilcobalamina e acetilcobinamida.

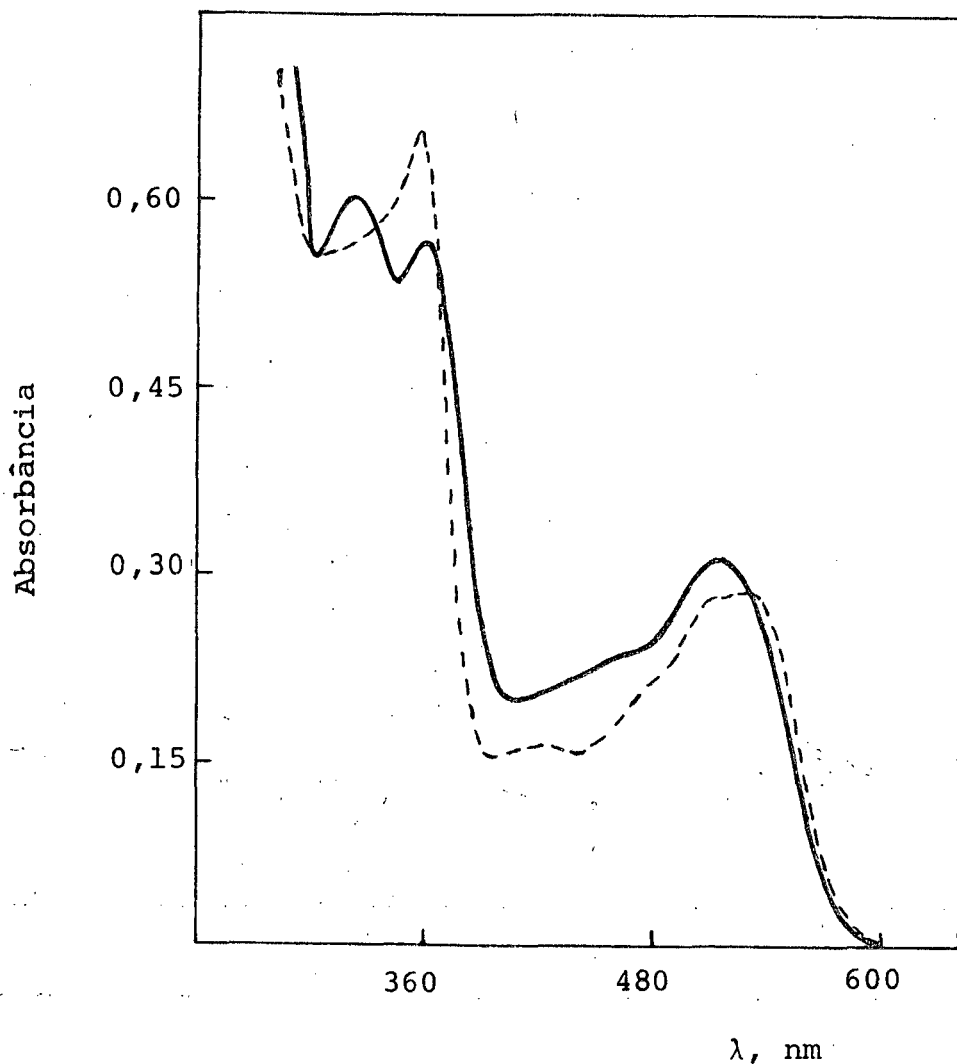


Figura 11. Espectro de absorção UV-Visível da acetilcobalamina em água a 25°C (—); Espectro de absorção UV-Visível da acetilcobalamina em KOH 1,0 M a 25°C (----).

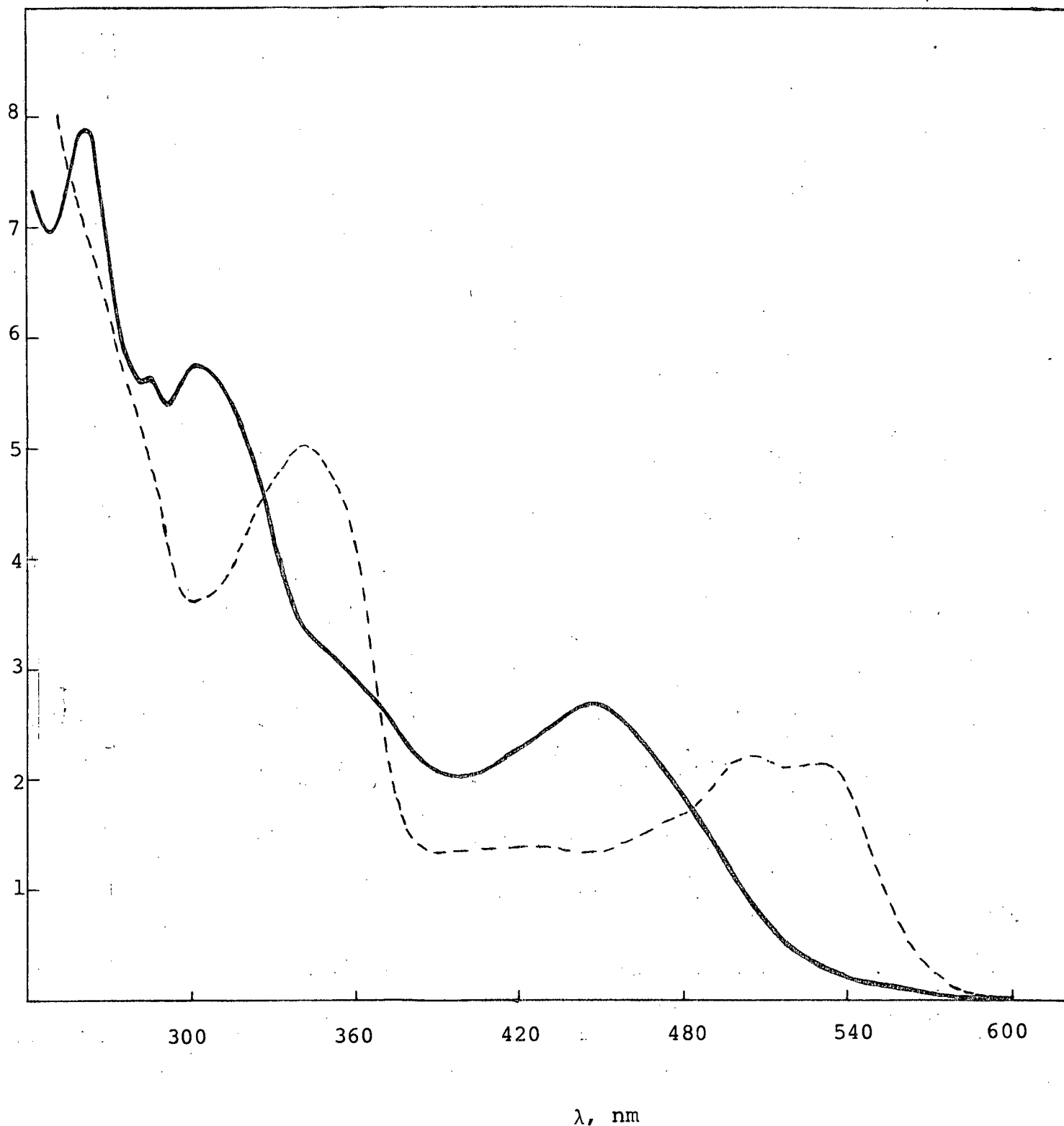


Figura 12. Espectro de absorção UV-Visível da acetilcobinamida em água a 25°C (—); Espectro da absorção UV-Visível da acetilcobinamida em KOH 0,8 M a 25°C (----).

A velocidade de hidrólise da acetilcobalamina foi medida a diferentes temperaturas e concentrações de hidróxido (tabela III). Como pode ser visto nas figuras 13 e 14, em toda a faixa de temperatura entre 25 a 40°C existe uma dependência linear entre a constante observada de pseudo-primeira ordem, k_{obs} , e a concentração do íon hidróxido. Portanto a reação é de segunda ordem total, sendo de primeira ordem em relação à acetilcobalamina e de primeira ordem em relação ao íon hidróxido. A dependência linear com relação ao íon hidróxido elimina a possibilidade de um mecanismo BAC1, sendo que somente mecanismos BAC2 e BlcB poderiam ocorrer. Usando os valores de k_2 , determinados a partir dos coeficientes angulares dos gráficos de k_{obs} versus concentração de hidróxido (equação 1), foram calculados os parâmetros termodinâmicos

$$k_{obs} = k_2 [OH^-] \quad (1)$$

de ativação para a reação. A energia de ativação (E_a), foi calculada a partir dos valores de $\ln k_2$ versus $1/T$ (figura 15), segundo a equação de Arrhenius (equação 2). As entalpias de ativação (ΔH^\ddagger), entropias de ativação (ΔS^\ddagger) e energias livres de ativação (ΔG^\ddagger) foram calculadas a partir das equações (3), (4) e (5) respectivamente (25). Os valores de k_2 para as diferentes temperaturas e os parâmetros termodinâmicos de ativação se encontram na tabela IV.

$$\ln k_2 = \ln A - E_a/RT \quad (2)$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (3)$$

$$\Delta S^\ddagger/R = \ln k_2 - \ln \frac{k_b t}{h} + E_a/RT - n \quad (4)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (5)$$

TABELA III

Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem para a degradação por hidróxido da acetilcobalamina.

	25°C	30°C	35°C	40°C
$ \text{OH}^- _t$ M	kobs x 10 ⁺³ s-1	kobs x 10 ⁺³ s-1	kobs x 10 ⁺³ s-1	kobs x 10 ⁺³ s-1
0,05	0,91	1,71	3,80	7,61
0,10	1,89	3,84	8,05	13,40
0,20	3,80	7,03	14,16	23,30
0,40	7,32	13,50	30,91	51,00
0,60	11,24			
0,80	14,63			
1,00	18,00			

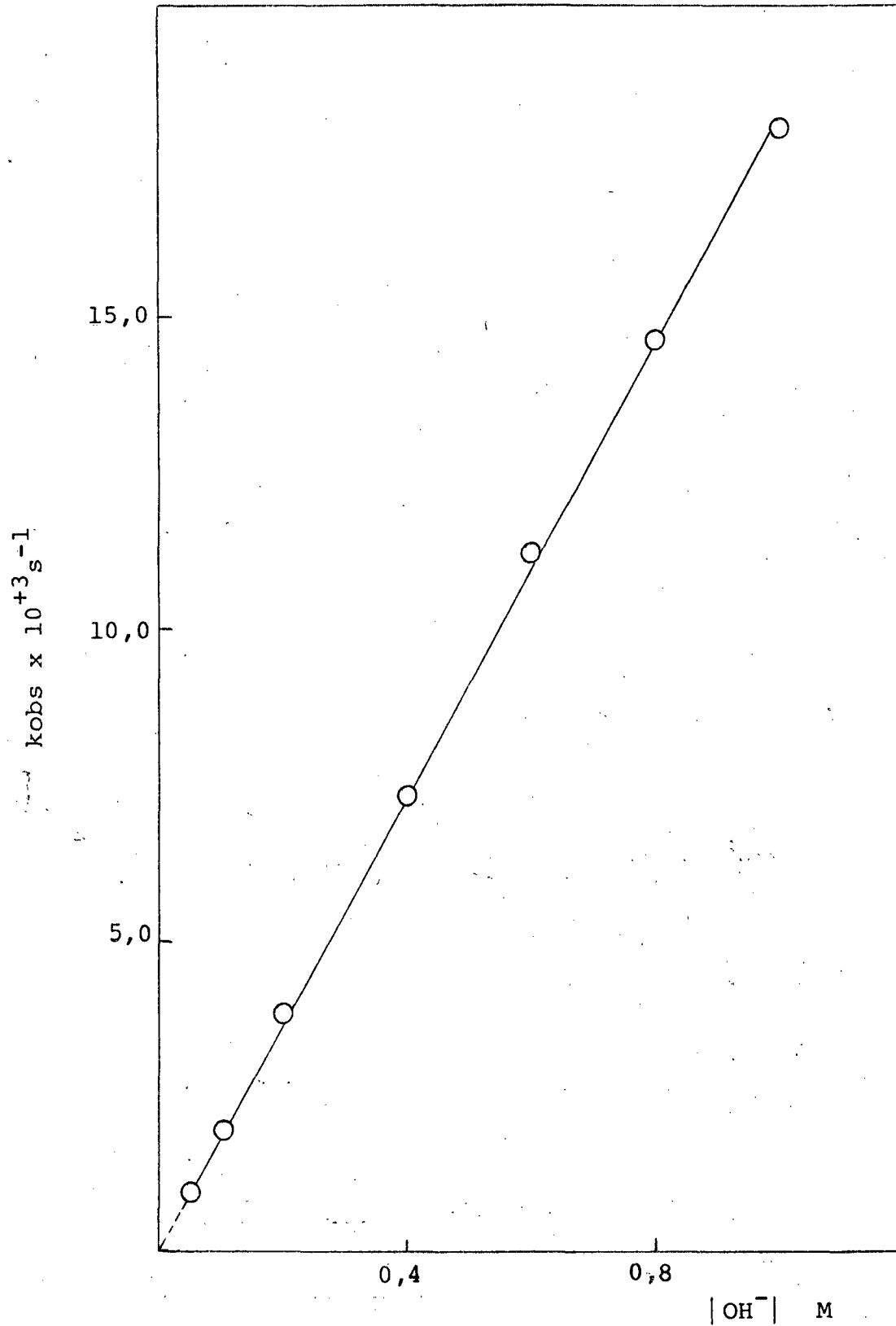


Figura 13. Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem versus concentração de hidróxido à 25°C, para a degradação da acetilcobalamina.

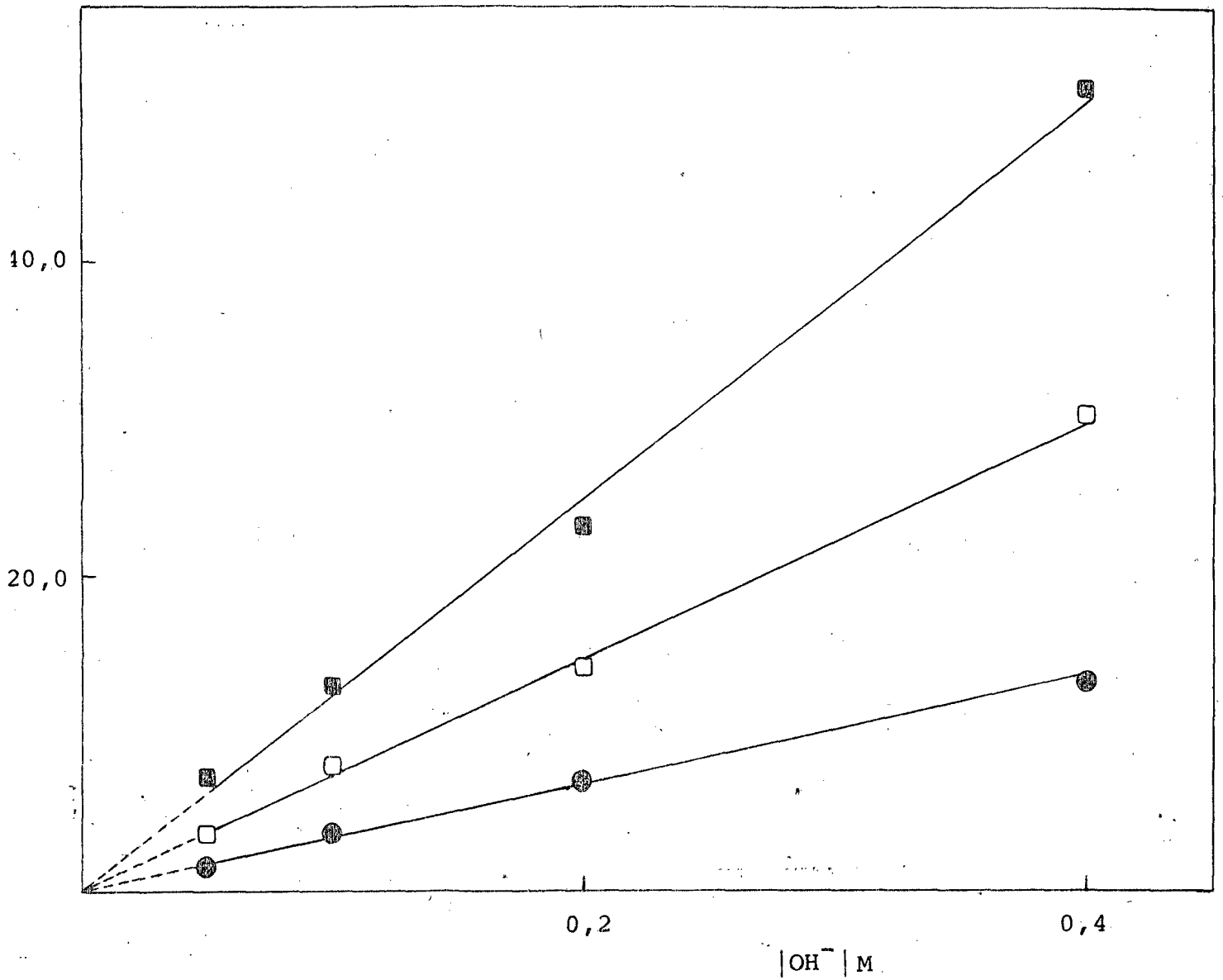


Figura 14. Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem versus concentração de hidróxido a 30°C (●) , 35°C (□), e 40°C (■), para a degradação da acetilcolinesterase.

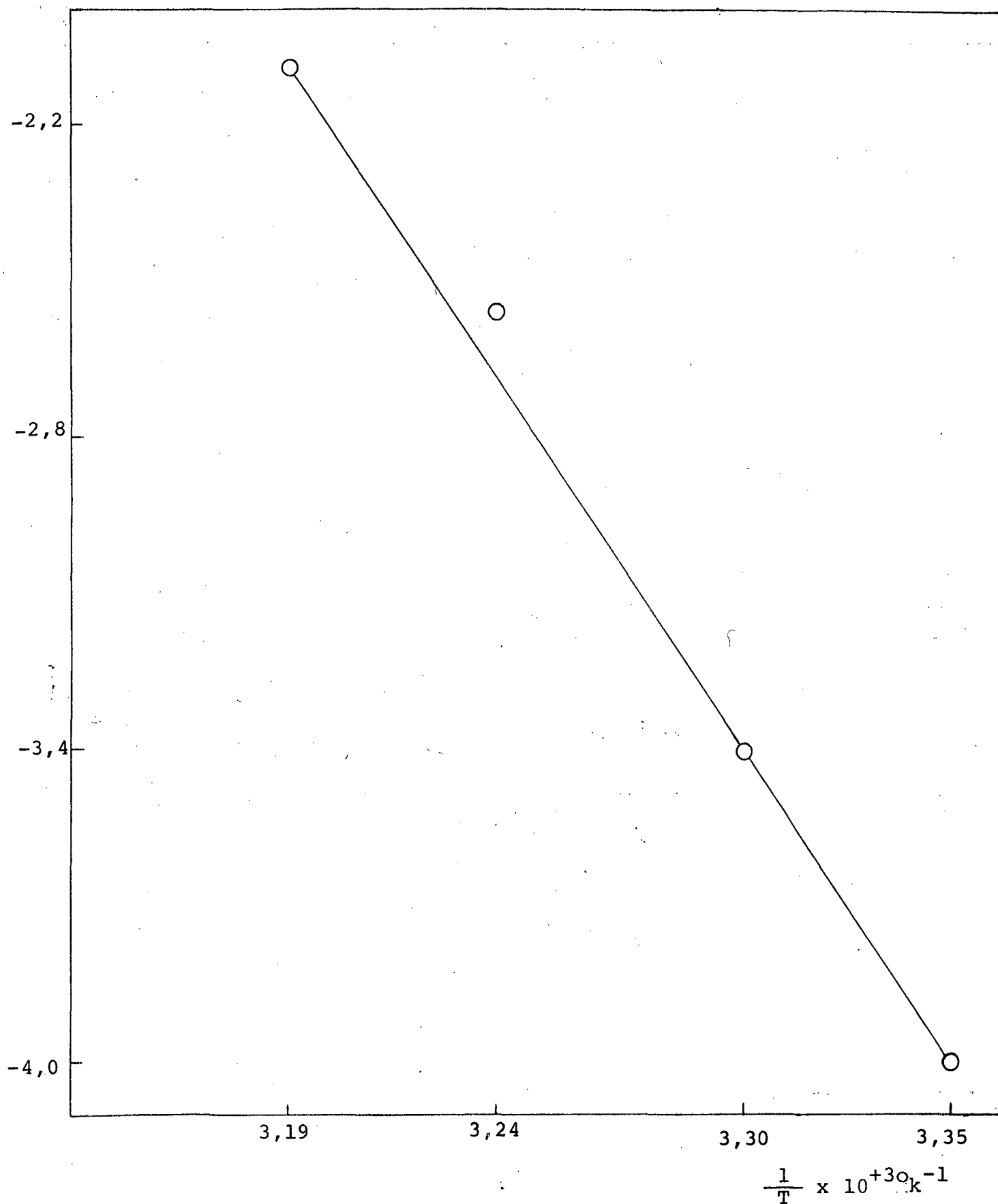


Figura 15. Variação da constante de velocidade específica de segunda ordem em função da temperatura, para a degradação por hidróxido da acetilcobalamina.

TABELA IV.

Parâmetros termodinâmicos de ativação para a degradação por hidróxido da acetilcobalamina.

°C	k_2 ($M^{-1} \text{seg}^{-1}$)
25	1,80 x 10^{-2}
30	3,37 x 10^{-2}
35	7,75 x 10^{-2}
40	1,24 x 10^{-1}

Ea (Kcal/mol)	ΔH^\ddagger (Kcal/mol)	ΔS^\ddagger (u.e.)	ΔG^\ddagger (Kcal/mol)
25,3 \pm 1,8	24,7 \pm 1,8	14,7 \pm 5,9	20,4

onde: n = ordem da reação
 h = constante de Planck
 k_2 = constante de velocidade específica de segunda ordem
 k_b = constante de Boltzman
 T = temperatura absoluta.

A hidrólise básica da acetilcobinamida apresenta comportamento marcadamente diferente do observado para o caso da acetilcobalamina. Na tabela V, encontram-se os valores das constantes observadas de pseudo-primeira ordem, para a formação de dihidroxicobinamida a diferentes temperaturas e concentrações de íon hidróxido. Como pode ser visto, figura 16, k_{obs} não aumenta linearmente com a concentração do íon hidróxido. A existência de um patamar, para concentrações do íon hidróxido superiores a 0,4, sugere que a reação tenha uma ordem aparentemente zero com respeito ao íon hidróxido. Comportamento idêntico ao descrito para 25°C foi observado também para as demais temperaturas (figura 17), o que permite afirmar ser este um fenômeno geral de hidrólise básica da acetilcobinamida.

A presença do patamar poderia sugerir que o mecanismo da reação fosse do tipo ElcB, mas, não parece lógico que a mudança do ligante 5,6-dimetilbenzimidazol por uma molécula de água, na quinta posição de coordenação ao cobalto, tenha um efeito tão significativo no sentido de mudar o mecanismo da reação. Na realidade, a reação da acetilcobalamina apresenta valores de k_{obs} com comportamento linear em relação à concentração de íons hidróxido, na faixa de 0,05 M até 1,0 M, muito superiores ao necessário para se alcançar o patamar (0,4 M).

TABELA V

Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem para a degradação por hidróxido da acetilcobinamida.

$[\text{OH}^-]_t$ M	25°C	30°C	35°C	40°C
	kobs x 10 ⁺³ s ⁻¹	kobs x 10 ⁺³ s ⁻¹	kobs x 10 ⁺³ s ⁻¹	kobs x 10 ⁺³ s ⁻¹
0,05	3,43	5,57	8,54	13,55
0,10	5,89	9,42	14,42	24,45
0,15	9,31	14,31	22,62	40,81
0,20	10,91	16,03	26,49	47,60
0,25	12,44	17,73	28,50	50,84
0,30	12,82	19,21	30,00	52,57
0,40	15,03			
0,60	16,42			
0,80	15,81			

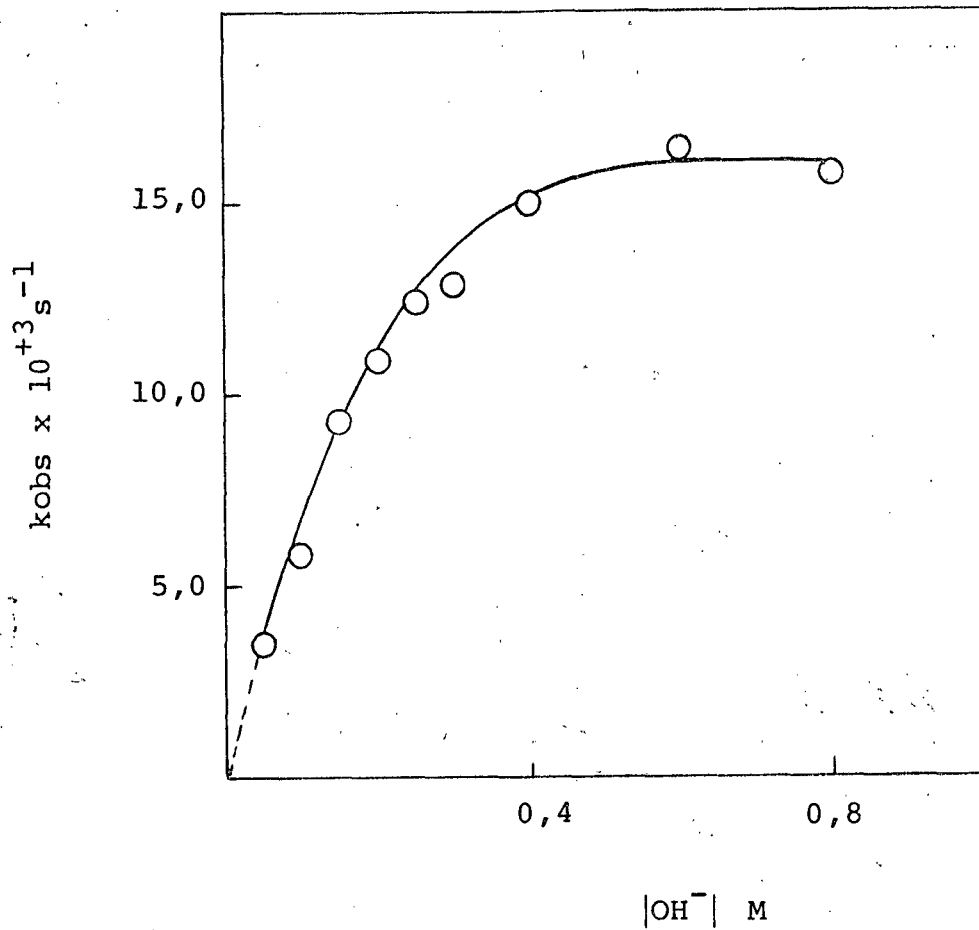


Figura 16. Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem versus concentração de hidróxido à 25°C, para a degradação da acetilcobinamida.

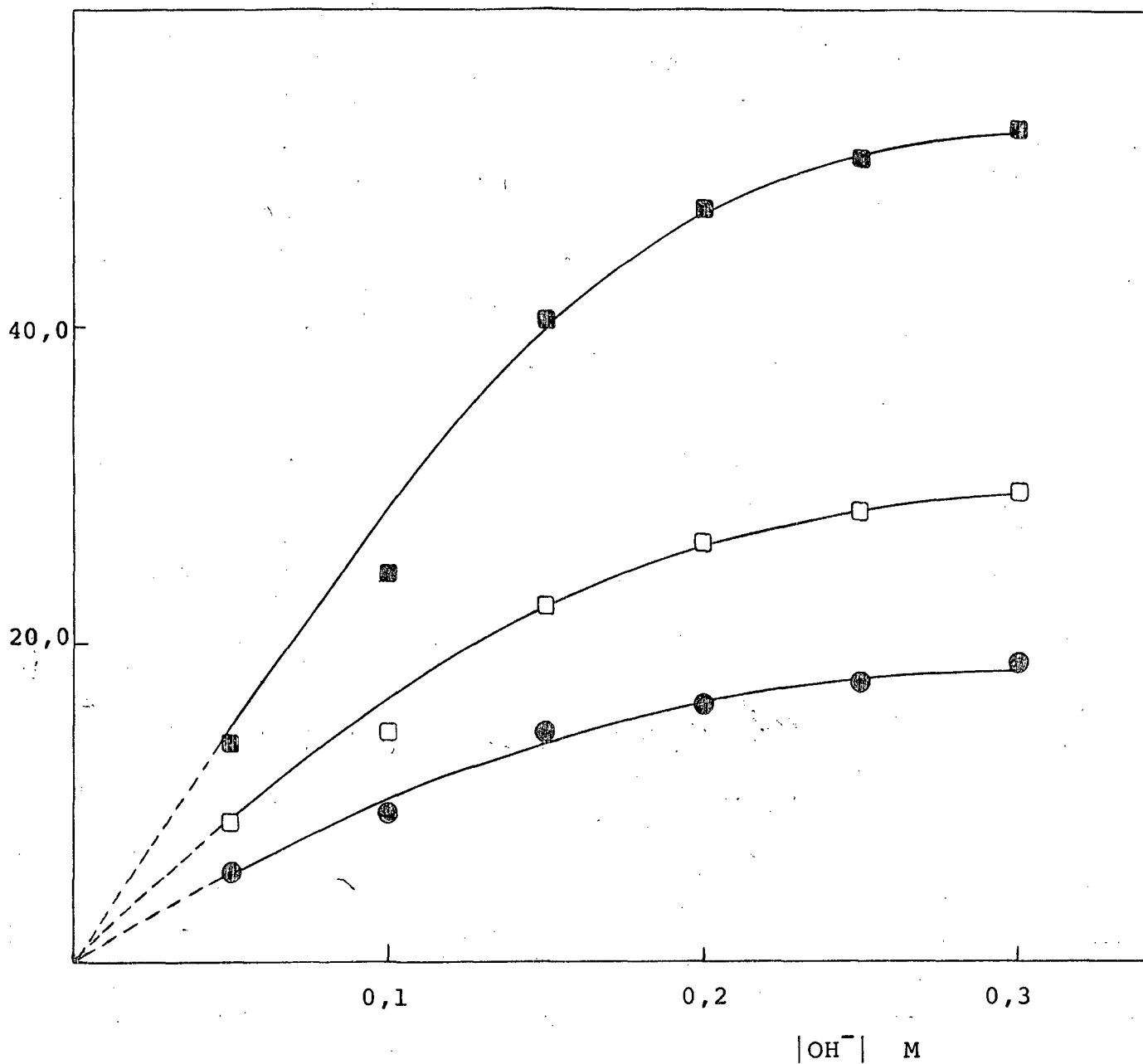
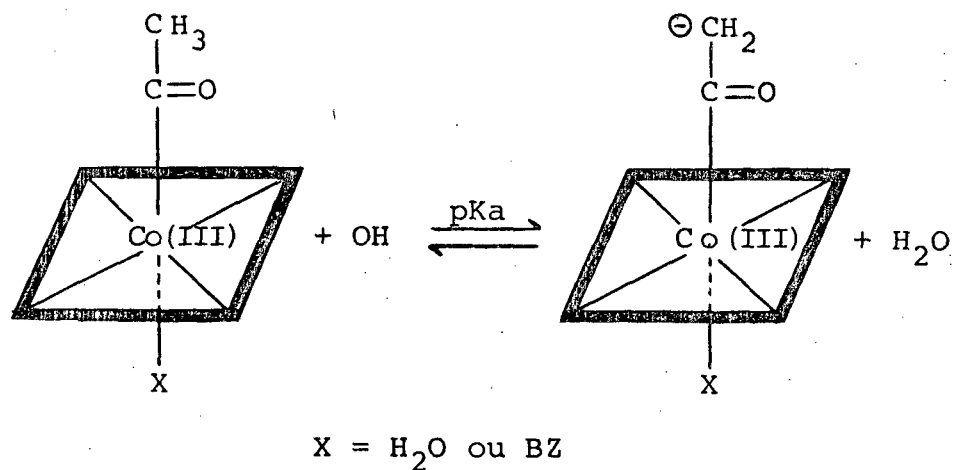


Figura 17. Constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem versus concentração de hidróxido à 30°C (●) , 35°C (□), e 40°C (■), para a degradação da acetilco-binamida.

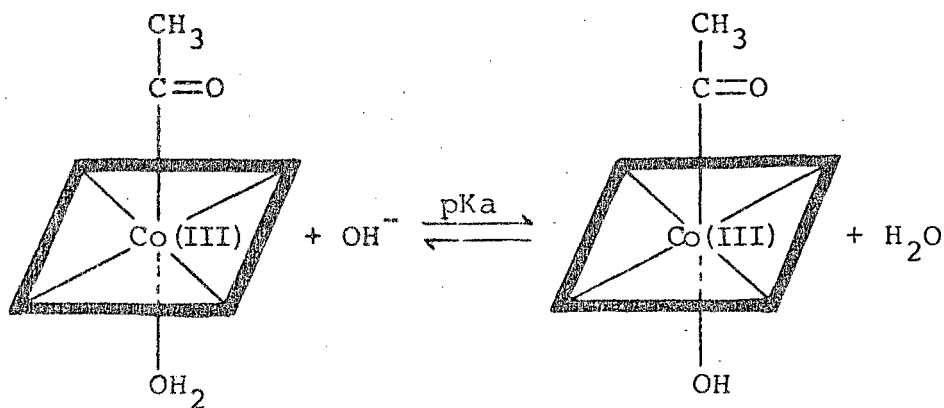
Para um mecanismo ElcB ser operativo, o intermediário carbaniónico deveria se formar conforme o esquema 17. Devido ao



Esquema 17.

grupo X estar distante do centro carbaniónico e também não ligado com possibilidade de ressonância direta, parece difícil admitir uma mudança de pKa superior a uma unidade, a qual seria necessária para mudar o mecanismo.

Uma explicação alternativa pode ser apresentada baseando-se especificamente na ionização da acetilcobinamida. A medida que se aumenta a concentração do íon hidróxido, o equilíbrio mostrado no esquema 18 se estabelece. A troca do ligante água por hidróxido, na quinta posição de coordenação ao cobalto, é marcante para o prosseguimento da reação. O ligante hidróxido sendo melhor doador sigma (14) que a água, aumentaria a densidade eletrônica sobre o cobalto e lembrando que a ruptura da ligação



Esquema 18.

é do tipo heterolítica (21), e que o cobalto é efetivamente reduzido durante o desenrolar da reação, é óbvio que a ionização de água desfavorece a reação. Este não é o único caso em que a troca de água por hidróxido diminui notavelmente a reatividade. Em reações de intercâmbio de ligantes na Vitamina B₁₂^a e Vitamina B₁₂^b, a reatividade da forma aquocobalamina é muito maior que a reatividade da forma hidroxycobalamina (1).

De acordo com o esquema 19, a velocidade de desaparecimento da acetilcobinamida poderia ser representada pela equação 6.

$$d|AC|_T/dt = k_2^a |AAC| |OH^-| + K_2^h |HAC| |OH^-| \quad (6)$$

onde: $|AAC|$ = concentração da forma aquoacetilcobinamida

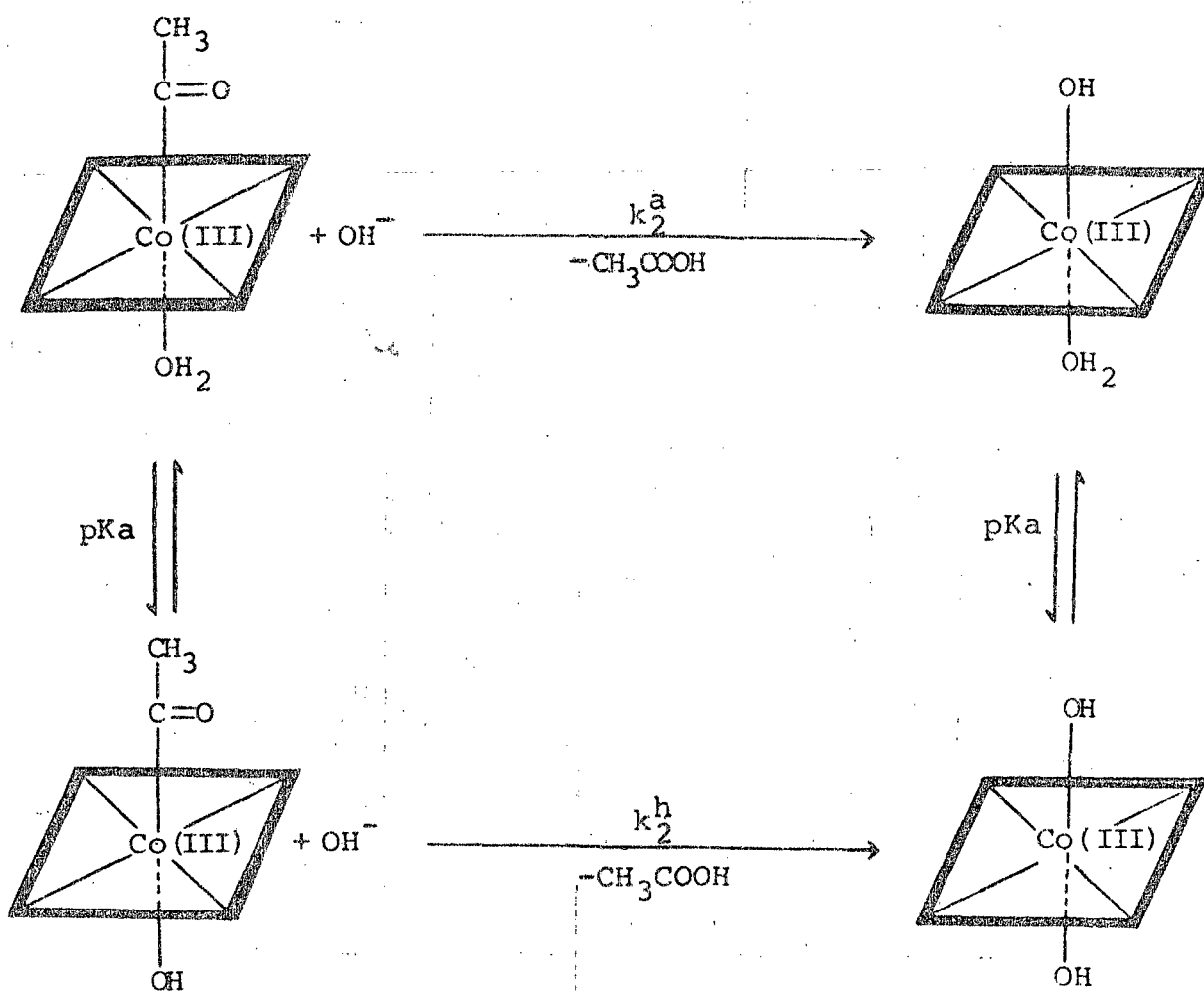
$|HAC|$ = concentração da forma hidroxiacetilcobinamida

k_2^a = constante de velocidade específica de segunda ordem para aquoacetilcobinamida

k_2^h = constante de velocidade específica de segunda ordem para hidroxiacetilcobinamida.

(acetilcobinamida)

(aquohidroxicobinamida)



(hidroxiacetilcobinamida)

(dihidroxicobinamida)

Esquema 19. Degradação por hidróxido da acetilcobinamida como substrato inicial.

Considerando que,

$$K_1 = \frac{|\text{HAC}| |\text{H}^+|}{|\text{AAC}|} \quad (7)$$

e

$$|\text{AC}|_T = |\text{HAC}| + |\text{AAC}| \quad (8)$$

combinando-se 7 com 8, tem-se:

$$|\text{AAC}| = \frac{|\text{AC}|_T}{\left|1 + \frac{K_a}{|\text{H}^+}|\right|} \quad (9)$$

$$|\text{HAC}| = \frac{|\text{AC}|_T}{\left|1 + \frac{|\text{H}^+|}{K_a}\right|} \quad (10)$$

Substituindo-se 9 e 10 em 6 tem-se:

$$\frac{d|\text{AC}|_T}{dt} = \frac{k_2^a |\text{AC}|_T |\text{OH}^-|}{\left|1 + \frac{K_a}{|\text{H}^+}|\right|} + \frac{k_2^h |\text{AC}|_T |\text{OH}^-|}{\left|1 + \frac{|\text{H}^+|}{K_a}\right|} \quad (11)$$

donde

$$\frac{d|\text{AC}|_T}{|\text{AC}|_T} = \frac{k_2^a}{\left|1 + \frac{K_a}{|\text{H}^+}|\right|} |\text{OH}^-| + \frac{k_2^h}{\left|1 + \frac{|\text{H}^+|}{K_a}\right|} |\text{OH}^-| dt \quad (12)$$

Integrando-se a equação 12, chega-se finalmente a equação que determina a constante observada de velocidade de pseudo-primeira ordem para a hidrólise básica da acetilcobinamida.

$$k_{\text{obs}} = \left| \frac{k_2^a}{\left|1 + \frac{K_a}{|\text{H}^+}|\right|} + \frac{k_2^h}{\left|1 + \frac{|\text{H}^+|}{K_a}\right|} \right| |\text{OH}^-| \quad (13)$$

Considerando que a reação atinge a um patamar a concentrações altas do íon hidróxido, região que corresponderia à forma hidroxiacetilcobinamida, pode-se simplificar a equação 13 para a equação 14.

$$k_{\text{obs}} = \left| \frac{k_2^a}{1 + \frac{K_a}{|H^+|}} \right| |OH^-| \quad (14)$$

A equação 14 apresenta duas condições limites:

i) Quando $|H^+|$ for muito maior que K_a ,

$$k_{\text{obs}} = k_2^a |OH^-| \quad (15)$$

Esta equação explica a região inicial da dependência de k_{obs} versus concentração de íons hidróxido na figura 16.

ii) Quando $|H^+|$ for muito menor que K_a ,

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2^a K_w}{K_a} \quad (16)$$

Esta equação se aplica à região do patamar na figura 16.

O valor de pK_a para a ionização da forma aquoacetilcobinamida em hidroxiacetilcobinamida foi estimado a partir dos dados cinéticos como sendo $13,20 \pm 0,20$. Este valor de pK_a para o equilíbrio de ionização, acima descrito é bastante razoável em comparação com os valores apresentados na literatura para sistemas semelhantes (3,5). O equilíbrio entre aquocianocobinamida e hidroxicianocobinamida apresenta um pK_a de 11,0, enquanto que o equilíbrio entre

aquometilcobinamida e hidroximetilcobinamida tem $pK_a = 14,0$. O efeito encontrado para o grupamento acetil se mostrou intermediário entre aqueles observados para os grupamentos metil e cianeto.

Utilizando a parte linear da dependência de k_{obs} na concentração de íons hidróxido, foram obtidos os valores para k_2^a a diferentes temperaturas. A partir desses valores foram calculados os parâmetros termodinâmicos de ativação de maneira similar à discutida anteriormente para o caso da acetilcobalamina. A figura 18 apresenta a dependência de $\ln k_2^a$ em função de $1/T$. Os parâmetros termodinâmicos de ativação e os valores de k_2^a a diferentes temperaturas se encontram na tabela VI.

Comparando-se os resultados de k_2^a e ΔG^\ddagger (tabelas IV e VI), pode-se concluir que aquoacetilcobinamida é mais reativa que a acetilcobalamina sendo que a reatividade da forma hidroxiacetilcobinamida é desprezível nas condições experimentais discutidas anteriormente. A partir dos parâmetros termodinâmicos de ativação para os compostos acetilcobalamina e acetilcobinamida, pode-se concluir que a diminuição na energia livre de ativação, e portanto uma maior reatividade da acetilcobinamida, é resultante de uma diminuição na entalpia de ativação, sendo que a contribuição da entropia de ativação desfavorece a reação para o caso da acetilcobinamida.

A diferença apresentada nos parâmetros termodinâmicos de ativação, nas reações da acetilcobalamina e acetilcobinamida com hidróxido, estar fora das margens de erro experimental.

O aumento significativo da entalpia de ativação que ocorre com a introdução do ligante 5,6-dimetilbenzimidazol, na quinta posição de coordenação ao cobalto, prende-se a dois fatos distintos:

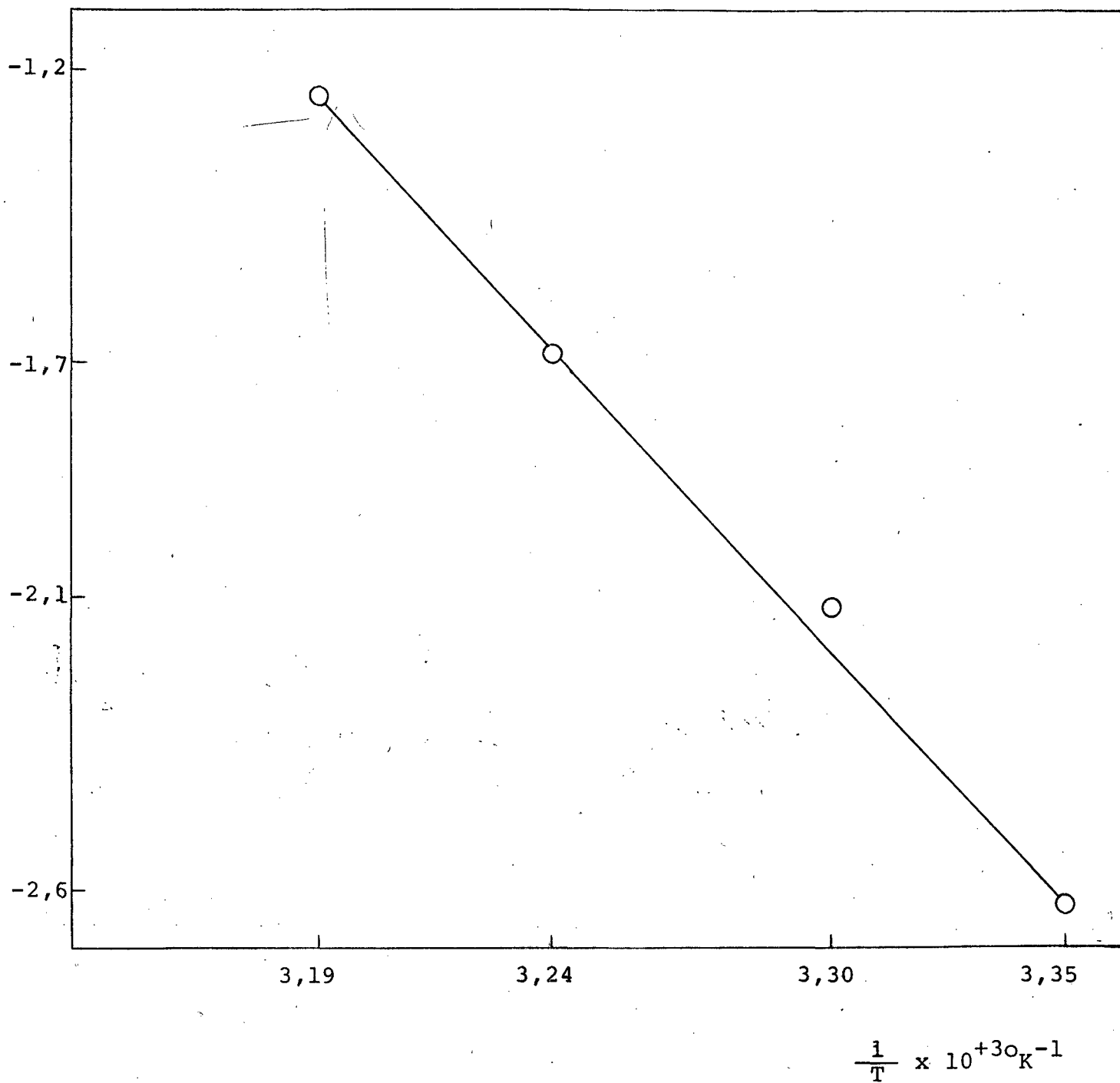


Figura 18. Variação da constante de velocidade específica de segunda ordem em função da temperatura, para a degradação por hidróxido da acetilcobinamida.

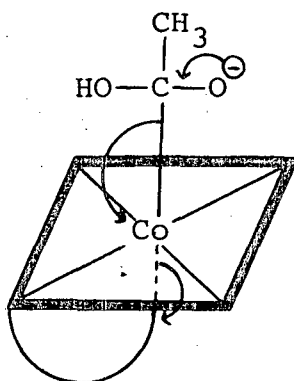
TABELA VI

Parâmetros termodinâmicos de ativação para a degradação por hidróxido da acetilcobinamida.

	$^{\circ}\text{C}$	k_2^a ($\text{M}^{-1}\text{seg}^{-1}$)		
	25	$7,2 \times 10^{-2}$		
	30	$1,2 \times 10^{-1}$		
	35	$1,85 \times 10^{-1}$		
	40	$2,87 \times 10^{-1}$		
E_a (Kcal/mol)	ΔH^{\ddagger} (Kcal/mol)	ΔS^{\ddagger} (u.e.)	ΔG^{\ddagger} (Kcal/mol)	
$17,7 \pm 0,8$	$16,5 \pm 0,8$	$-10,3 \pm 3,8$	19,6	

a) O ligante 5,6-dimetilbenzimidazol é um melhor doador σ que a água, e considerando que a reação se processa através de uma eliminação redutiva para a formação dos produtos, na qual deve ocorrer um deslocamento de dois elétrons na direção do cobalto, a mesma será dificultada pelo aumento da densidade eletrônica ao redor do átomo de cobalto. Além do ligante 5,6-dimetilbenzimidazol estar coordenado com uma ligação mais forte que a da água, existe a dificuldade adicional com relação à saída desse ligante da quinta posição de coordenação para a formação do complexo Co(I), pelo fato do mesmo ter características de quadrado-plano (5).

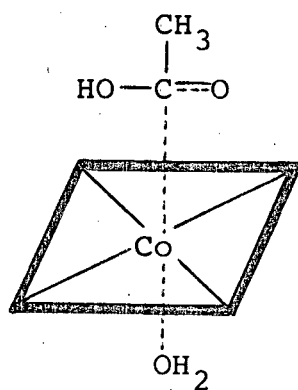
b) Além da variação em termos de densidade eletrônica ao redor do átomo central de cobalto, existe um segundo fator de importância que é a necessidade da ocorrência de uma mudança conformacional ao atingir-se o estado de transição. Os derivados de cobalaminas são essencialmente não planares (26). A falta de planaridade resulta da interação entre o átomo de hidrogênio do carbono 4 do ligante 5,6-dimetilbenzimidazol (figura 1) e os carbonos 5 e 6 do anel corrínico. À medida que se avança na coordenada da reação, desde os reagentes até o estado de transição, paralelamente ocorre uma diminuição no número de coordenação do cobalto de $6 \rightarrow 4$ (estrutura III), o que leva a uma



Estrutura III.

diminuição na interação do ligante 5,6-dimetilbenzimidazol com o anel corrínico. Este fenômeno permite uma mudança conformacional que leva a um estado de maior planaridade. Nas cobinamidas com o cobalto em número de oxidação três e coordenação seis, a estrutura é praticamente planar (26), de forma que não ocorre uma mudança significativa na planaridade do anel à medida que se atinge o estado de transição.

A mudança em entropia de ativação é provavelmente um reflexo do grau de reestruturação do solvente durante o percurso da reação. Na acetilcobalamina a saída do ligante 5,6-dimetilbenzimidazol, da quinta posição de coordenação ao cobalto, requer uma reestruturação significativa da rede do solvente. Isto está associado ao câmbio conformacional e a separação formal do ligante 5,6-dimetilbenzimidazol do seu sítio normal de coordenação ao cobalto. Na acetilcobinamida a mudança na entropia de ativação provavelmente reflete a dispersão de carga que ocorre na busca do estado de transição (estrutura IV), a qual não é balanceada por



Estrutura IV.

efeitos adicionais como no caso da acetilcobalamina.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

1. O processo de eliminação redutiva do intermediário de adição estaria relacionado com diferentes mudanças conformacionais ao se atingir o estado de transição. Desse modo, a reatividade da aquoacetilcobinamida é maior que a reatividade da acetilcobalamina frente à base.

2. A ordem do efeito trans $H_2O > BZ > OH^-$, reflete as diferentes densidades eletrônicas ao redor do átomo central de cobalto à medida que se troca o quinto ligante, sendo que a dificuldade na eliminação desse quinto ligante coordenado ao cobalto, para gerar a espécie Co(I), tem relação direta com a doação σ desses grupamentos.

3. Nas reações estudadas no presente trabalho o mecanismo mais provável seria do tipo BAC2, porém são necessários outros experimentos para se descartar a possibilidade de um mecanismo ElcB. Estes experimentos envolveriam dois tipos de procedimentos:

a) Realizar a hidrólise dos compostos acetilcobalamina e acetilcobinamida em tampão anilina a diferentes pH. A catálise na formação do carbânio inicial, e portanto a quebra da ligação com o grupo de saída, seria evidenciada através da saturação cinética num gráfico de k_{obs} versus concentração do tampão(27). Catalizando a formação inicial do carbânio, a anilina competi-

ria com a água no ataque sobre o intermediário acilado, resultando numa mistura de ácido carboxílico e acetoanilida. A formação da acetoanilida seria uma evidência da presença de um intermediário ceteno e portanto, uma prova conclusiva de um mecanismo ElcB.

- b) Realizar experimentos envolvendo efeito isotópico de deutério. Usando-se uma solução de hidróxido de potássio em água deuterada, o experimento sugere uma distinção entre os mecanismos ElcB e BAC2 na hidrólise de ésteres (28). Normalmente se aceita uma maior relação k_{H_2O} / k_{D_2O} para um mecanismo BAC2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NOME, F.J. Kinetics and thermodynamic study of the interaction of Vitamin B₁₂ with ligands in aqueous and micelar environments. (Tese de doutorado - TAMU - 1976 - USA).
2. SCHRAUZER, G.N. Recent advances in the chemistry of Vitamin B₁₂ and Vitamin B₁₂ model compounds: Reductive cobalt-carbon bond cleavage reactions. Pure and applied chemistry, 33, 545-565 (1973).
3. HAYWARD, G.C., HILL, H.A.O., PRATT, J.M., & WILLIAMS, R. J. R. The chemistry of Vitamin B₁₂. Part IV. The thermodynamic trans-effect. J. Chem. Soc., 6485-6493 (1965).
4. IUPAC. Definitive rules for the nomenclature of the vitamins. J. Am. Chem. Soc., 82, 5581-5583 (1960).
5. BROWN, D.G. The chemistry of Vitamin B₁₂ and related Inorganic model systems. Prog. Inorg. Chem., 18, 177-285 (1973).
6. GEORGOPAPADAKOU, N.H. & SCOTT, A.I. On B₁₂ biosynthesis and evolution. J. Theor. Biol., 69, 381-384 (1977).
7. BONNETT, R. The chemistry of the Vitamin B₁₂ group. Chem. Rev., 63, 573-605 (1963).
8. BEAVEN, G.H. & JOHNSON, E.A. The reduction of Vitamin B₁₂. Nature, 176, 1264-1265 (1955).
9. ZANETTE, D. Estudo da reação da Vitamina B₁₂s com DDD. (Tese de mestrado em Físico-Química - UFSC - 1978).

10. SCHRAUZER, G.N. & DEUTSCH, E. Reaction of cobalt(I) supernucleophiles. The alkylation of Vitamin B₁₂s, Cobaloximes(I), and related compounds. J. Am. Chem. Soc., 91, 3341 - 3349 (1969).
11. MULLER, O. & MULLER, G. Synthesen auf dem Vitamin B₁₂-gebiet, XIV. Uber die synthesen von corrinoiden mit kobalt-kohlenstoff-bindung. Bioch. Z., 336, 299-313 (1962).
12. OFFENHARTZ, P. O'D, OFFENHARTZ, B.H. & FUNG, M.M. A theoretical analysis of corrin optical spectra. J. Am. Chem. Soc., 92, 2966-2973 (1970).
13. FIRTH, R.A., HILL, H.A.O., PRATT, J.M., WILLIAMS, R.J.P. & JACKSON, W.R. The circular dichroism and absorption spectra of some Vitamin B₁₂ derivatives. Bioch., 6, 2178-2188(1967).
14. HUHEEY, J.E. Inorganic chemistry: Principles of structure and reativity. New York, Harper & Row, 1975.
15. COTTON, F.A. & WILKINSON, G. Advanced Inorganic Chemistry: A comprehensive text. New York, Interscience, 1972.
16. LOWRY, T.H. & RICHARDSON, K.S. Mechanism and theory in organic chemistry. New York, Harper & Row, 1976.
17. BENDER, M.L. Mechanisms of homogeneous catalysis from protons to proteins. New York, Wiley, 1971.
18. JENKS, W.P. Catalysis in chemistry and enzymology. New York, McGraw-Hill, 1969.
19. INGOLD, C.K. Structure and mechanism in organic chemistry. New York, Cornell University press, 1969.

20. MARCH, J. Advanced organic chemistry: Reactions, mechanisms, and structure. Tokyo, McGraw-Hill Kogakusha, 1977.
21. BERNHAUER, K. & IRION, E. Synthesen auf dem Vitamin B₁₂-gebiet, XVII. Co-acyl-cobalamine und deren transfer-reaktionen. Bioch., 7, 339, 530-538 (1964).
22. BARNET, R., HOGENKAMP, H.P.C. & ABELES, R.H. Reactions of the carbon-cobalt bond of alkylcobalamins. A reversible dissociation of the carbon-cobalt bond. J. Biol. Chem., 241, 1483-1486 (1966).
23. NEVES, A. Catálise micelar específica numa reação de eliminação. (Tese de mestrado em Físico-Química - UFSC - 1980).
24. ARMITAGE, J.B., CANNON, J.R., JOHSON, A.W. PARKER, L.F.J., SMITH, E.L., STAFFORD, W.H. & TODD, A.R. Chemistry of the Vitamin B₁₂ group. Part III. The course of hydrolytic degradations. J. Chem. Soc., 3849-3864 (1953).
25. GLASSTONE, S., LAIDLER, K.J. & EYRING, H. The theory of rate processes. New York, McGraw-Hill, 1969.
26. GRATE, J.H. & SCHRAUZER, G.N. Sterically induced spontaneous dealkylation of secondary alkylcobalamins due to axial base coordination and conformational changes of the corrin ligand. J. Am. Chem. Soc., 101, 4601-4611 (1979).
27. PRATT, R.F. & BRUICE, T.C. The carbanion mechanism (ElcB) of ester hydrolysis. III. Some structure-reactivity studies and the ketene intermediate. J. Am. Chem. Soc., 92, 5956-5964 (1970).

28. TOBIAS, P.S.; KÉZDY, F.J. The alkaline hydrolysis of 5-nitro-coumaranone. A method for determining the intermediacy of carbanions in the hydrolysis of esters with labile protons. J. Am. Chem. Soc., 91, 5171-5173 (1969).