

## HIDRÓLISE BÁSICA DE ACETILCOBALAMINA E DERIVADOS

Marcos Aires de Brito, Marcos Caroli Rezende, Dino Zanette, César Zucco e Faruk Nome.

Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Catarina  
88.001 – Florianópolis (SC).

Recebido em 5/8/86

Cópia revista recebida em 19/2/87

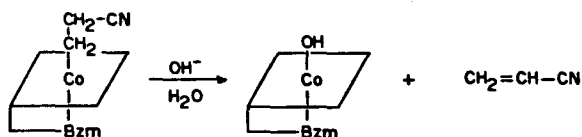
## ABSTRACT

## BASIC HYDROLYSIS OF ACETILCOBALAMIN AND DERIVATIVES:

The activation parameters for the basic hydrolysis of acetylco-balamín ( $\Delta H^\ddagger = 24 \cdot 7$  kcal/mol and  $\Delta S^\ddagger = 14 \cdot 7$  e.u) and acetylcobinamide ( $\Delta H^\ddagger = 16 \cdot 5$  kcal/mol and  $\Delta S^\ddagger = -10 \cdot 3$  e.u) were determined from the second order rate constants at different temperatures. The reaction mechanism involves a initial attack of hydroxide ion at the carbonyl group, followed by a reductive elimination of a Co (I) species.

## INTRODUÇÃO

A formação e a quebra da ligação Co–C desempenham um papel fundamental na bioquímica da Vitamina B<sub>12</sub><sup>1,2</sup>. A literatura registra vários exemplos de quebras homolíticas desta ligação<sup>3-5</sup>. Estudos cinéticos de reações de alquilcobalaminas envolvendo uma quebra heterolítica da ligação Co–C são mais raros<sup>6</sup>. A decomposição da 2-cianoetilcobalamina catalisada por hidróxido (Esquema 1) ocorre através de uma eliminação E<sub>2</sub><sup>7</sup>, semelhante à decomposição de 2,2-difeniletilcobalamina<sup>8</sup>.



ESQUEMA 1

A reação de acilcobalaminas com nucleófilos também se dá por quebra heterolítica<sup>9</sup>, mas o mecanismo da reação não foi estudado em detalhes. Além disso, não se conhece o papel do 5,6-dimetilbenzimidazol (Bzm) nem de outros ligantes axiais neste tipo de reação. Assim, como parte do nosso interesse pela química da vitamina B<sub>12</sub> e derivados<sup>10-13</sup>, o presente trabalho estuda a interação da acetilcobalamina e acetilcobinamida com o íon hidróxido.

## PARTE EXPERIMENTAL

A vitamina B<sub>12a</sub> (Merck) utilizada teve a sua pureza tes-

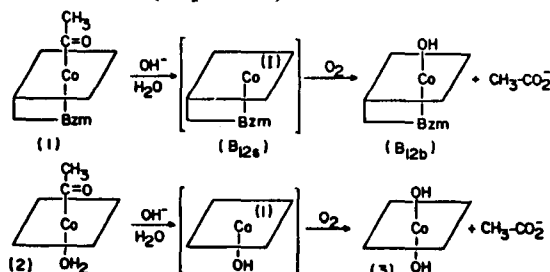
tada por espectroscopia de absorção. A acetilcobalamina foi preparada segundo procedimento descrito na literatura<sup>14</sup>. A acetilcobinamida foi preparada pela hidrólise ácida da acetilcobalamina. A água empregada foi deionizada e bidestilada.

As determinações espectrométricas foram realizadas com um espectrofotômetro Shimadzu UV – 210 A, com células termostatizadas ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ). As constantes de velocidade de hidrólise da acetilcobalamina e acetilcobinamida foram determinadas acompanhando-se o aparecimento da Vitamina B<sub>12b</sub> a 357 nm e da dihidroxocobinamida a 343 nm. As constantes de pseudo-primeira ordem  $k_{\text{obs}}$  foram obtidas a partir de gráficos lineares de  $\ln(A_\infty - A_t)$  vs. tempo. Todos estes gráficos eram lineares até pelo menos 90% da reação, com coeficientes de correlação maiores que 0,99. As constantes de segunda ordem  $k_2$  foram determinadas a partir de gráficos lineares de  $k_{\text{obs}}$  vs. concentração de hidróxido. As energias de ativação foram calculadas a partir de gráficos de Arrhenius de  $\ln k_2$  vs.  $1/T$ , com valores de constantes de segunda ordem obtidos na faixa de 25–40°C.

As entalpias de ativação foram calculadas a partir da relação  $\Delta H^\ddagger = E_a - RT$ , as entropias de ativação a partir de  $\Delta S^\ddagger = R (\ln k_2 - \ln kT/h + E_a/RT - n)$ , onde  $n$  é a ordem da reação, e a energia livre de ativação da equação  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A acetilcobalamina (1) por tratamento com base forma a vitamina B<sub>12b</sub> (Esquema 2). Por sua parte a acetilcobinamida (2) em presença de hidróxido dá origem à dihidroxocobinamida (3), conforme se depreende da variação espectral observada (Figura 1). Ambas reações de hidrólise básica são irreversíveis. (Esquema 2)



ESQUEMA 2

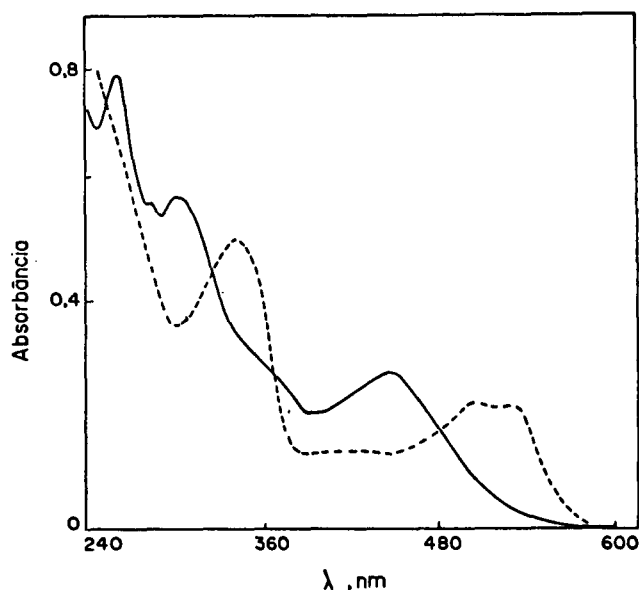


Figura 1. Espectros da acetilcobinamida (1) ( ) e do seu produto de hidrólise di-hidroxocobinamida (3) (-----)

A formação da vitamina B<sub>12b</sub> e da dihidroxocobinamida (3) é devida à oxidação das correspondentes espécies de Co(I) em presença de oxigênio. Se a hidrólise da acetilcobalamina (1) é realizada em atmosfera anaeróbica e em presença de iodometano, que consome o intermediário supernucleofílico de Co(I), constata-se a formação de metilcobala-

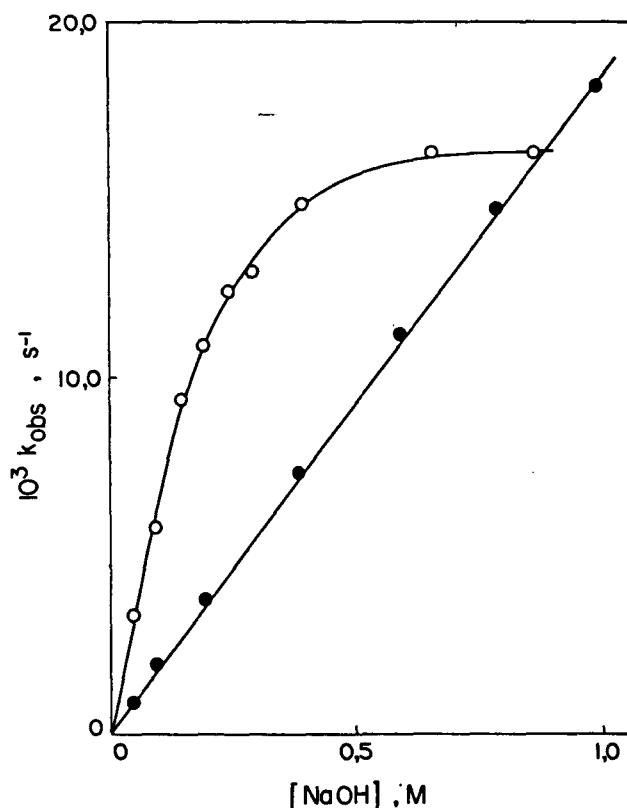


Figura 2. Gráficos de  $k_{obs}$  vs. concentração de hidróxido para as hidrólises da acetilcobalamina ( ) e acetilcobinamida (O) a 25°C.

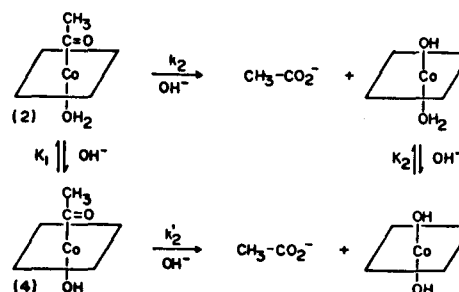
mina. Assim, em ambos os casos, a etapa determinante da reação é a eliminação de um grupo de saída de organocobalto, com a concomitante redução deste metal.

A Figura 2 mostra a dependência linear entre a constante de velocidade observada  $k_{obs}$  para a hidrólise básica da acetilcobalamina e a concentração de base. Diversamente, quando o substrato é a acetilcobinamida, a variação de  $k_{obs}$  com a concentração de  $[OH^-]$  não é linear, (Figura 2). À baixas concentrações de hidróxido a reação é claramente de primeira ordem em relação a  $[OH^-]$ , mas com aumento da concentração de base,  $k_{obs}$  tende a um valor constante, independente de  $[OH^-]$ . Resultados semelhantes foram obtidos a 30,0, 35,0 e 40,0°. (Tabela 1).

Tabela 1. Constantes de pseudo-primeira ordem  $k_{obs}$  para a hidrólise básica da acetilcobalamina (1) e acetilcobinamida (2) a diferentes temperaturas.

| $[OH^-], M$ | $10^3 k_{obs}, s^{-1}$ |       |       |                      |       |       |
|-------------|------------------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|
|             | Acetilcobalamina (1)   |       |       | Acetilcobalamina (2) |       |       |
|             | 30°C                   | 35°C  | 40°C  | 30°C                 | 35°C  | 40°C  |
| 0,05        | 1,71                   | 3,80  | 7,61  | 5,57                 | 8,54  | 13,6  |
| 0,10        | 3,84                   | 8,05  | 13,40 | 9,42                 | 14,40 | 24,50 |
| 0,15        | —                      | —     | —     | 14,30                | 22,60 | 40,80 |
| 0,20        | 7,03                   | 14,20 | 23,30 | 16,00                | 26,50 | 47,60 |
| 0,25        | —                      | —     | —     | 17,70                | 28,50 | 50,80 |
| 0,30        | —                      | —     | —     | 19,20                | 30,00 | 52,60 |
| 0,40        | 13,50                  | 30,90 | 51,00 | —                    | —     | —     |

Enquanto o tratamento dos dados para a acetilcobalamina é simples ( $k_{obs} = k_2 \cdot [OH^-]$ ), a hidrólise da acetilcobinamida requer um tratamento cinético mais complexo. Poder-se-ia conjecturar que a existência de um patamar na curva  $k_{obs}$  vs  $[OH^-]$  nesta última reação indicaria uma mudança de mecanismo, a degradação da acetilcobalamina se processando por eliminação em um intermediário tetraédrico e a degradação da acetilcobinamida através de uma eliminação E<sub>1</sub>cB envolvendo um carbânion do tipo  $^-CH_2 - C(O) - Co$ . É pouco razoável entretanto, postular uma variação de mecanismo, fruto de uma grande variação da acidez dos prótons do grupo acetila, quando se substitui o ligante Bzm na cobalamina (1) pela água na cobinamida (2). Uma explicação mais razoável é descrita no Esquema 3.



ESQUEMA 3

A Equação (1) relaciona a constante observada  $k_{\text{obs}}$  com a concentração de hidróxido  $[\text{OH}^-]$  para o esquema cinético descrito no Esquema 3.

$$k_{\text{obs}} = \frac{K_w k_2 [\text{OH}^-] + K_1 k'_2 [\text{OH}^-]^2}{K_w + K_1 [\text{OH}^-]} \quad (1)$$

As constantes  $k_2$  e  $k'_2$  são constantes de segunda ordem para as decomposições básicas da aquoacetilcobinamida (2) e da hidroxacetilcobinamida (4), respectivamente,  $K_1$  é a constante de equilíbrio entre (2) e (4) e  $K_w$  é o produto iônico da água, igual a  $10^{-14}$ . Derivando  $k_{\text{obs}}$  em função de  $[\text{OH}^-]$ , obtém-se a Equação (2).

$$\frac{d k_{\text{obs}}}{d [\text{OH}^-]} = \frac{K_w^2 k_2 + 2K_1 K_w k'_2 [\text{OH}^-] + K_1^2 k'_2 [\text{OH}^-]^2}{[K_w + K_1 [\text{OH}^-]]^2} \quad (2)$$

Para altas concentrações de hidróxido a Figura 2 mostra que a curva  $k_{\text{obs}}$  vs.  $[\text{OH}^-]$  tende para um patamar. Matematicamente isto corresponde a escrever

$$\lim_{[\text{OH}^-] \rightarrow \infty} \frac{d k_{\text{obs}}}{d [\text{OH}^-]} = k'_2 = 0 \quad (3)$$

Os dados experimentais mostram, portanto, que a espécie (4) não é reativa ( $k'_2 = 0$ ), o que nos permite simplificar a Equação (1) para a forma (4).

$$k_{\text{obs}} = \frac{K_w k_2 [\text{OH}^-]}{K_w + K_1 [\text{OH}^-]} \quad (4)$$

A drástica redução da reatividade da cobinamida (2), quando o ligante axial  $\text{H}_2\text{O}$  é substituído por  $\text{OH}^-$  é razoável de um ponto de vista puramente químico. Com efeito, o ligante hidróxido é muito mais elétron-doador do que a água e deve dificultar a quebra heterolítica da ligação  $\text{Co}-\text{C}$  com a concomitante redução do cobalto (III) a cobalto (I).

À baixas concentrações de hidróxido,  $K_1 [\text{OH}^-] \ll K_w$  e a Equação (4) se reduz a uma reta de coeficiente angular  $k_2$ .

$$k_{\text{obs}} = k_2 \cdot [\text{OH}^-] \quad (5)$$

Para altas concentrações de  $\text{OH}^-$ ,  $K_1 \cdot [\text{OH}^-] \gg K_w$  e a constante observada independe da concentração da base.

$$k_{\text{obs}} = K_w \cdot k_2 / K_1 \quad (6)$$

Podemos assim, por ajuste aos dados experimentais da Figura 2, obter os valores de  $k_2$  e  $K_1$  no Esquema 3. A Tabela 2 fornece os valores das constantes de segunda ordem  $k_2$  assim determinadas para várias temperaturas. Incluem-se nesta Tabela os valores correspondentes de  $k_2$

para a degradação da acetilcobalamina, bem como as entalpias e entropias de ativação para a decomposição básica dos dois sistemas. Uma comparação entre os dois substratos evidencia o que já havíamos observado acima a respeito da reatividade relativa das cobinamidas (2) e (4) (ver o Esquema 3). A reatividade destes sistemas decresce na ordem acetilaquocobinamida (2) > acetilcobalamina (1) > acetilhidroxocobinamida (4). Esta ordem corresponde à crescente capacidade, elétron-doadora do ligante axial nestes sistemas,  $\text{H}_2\text{O} < \text{Bzm} < \text{OH}^-$ , a qual inibe cada vez mais a eliminação redutiva do grupo de saída de organocobalto.

Tabela 2: Valores das constantes de segunda ordem  $k_2$  à diferentes temperaturas, e correspondentes parâmetros de ativação para a hidrólise básica de acetilcobalamina (1) e acetilcobinamida (2)

| t, °C | $10^2 \cdot k_2, \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ |                      |
|-------|-----------------------------------------------------|----------------------|
|       | Acetilcobalamina (1)                                | Acetilcobinamida (2) |
| 25,0  | 1,80                                                | 7,20                 |
| 30,0  | 3,37                                                | 12,0                 |
| 35,0  | 7,75                                                | 18,5                 |
| 40,0  | 12,4                                                | 28,7                 |

|                  | $\Delta H^\ddagger$<br>kcal/mol | $\Delta S^\ddagger$ u.e | $\Delta G^\ddagger$<br>kcal/mol |
|------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Acetilcobalamina | $24,7 \pm 1,8$                  | $14,7 \pm 5,9$          | 20,4                            |
| Acetilcobinamida | $16,5 \pm 0,8$                  | $-10,3 \pm 3,8$         | 19,6                            |

O valor do  $\text{p}K_1$  à a dissociação de (2) foi obtido a partir da constante  $K_1$ , sendo estimado como  $13,20 \pm 0,20$ . Este valor é razoável se considerarmos valores de  $\text{p}K_a$  para sistemas análogos<sup>15,16</sup>. Assim, a aquocianocobinamida apresenta um  $\text{p}K_a$  de 11,0, enquanto a aquometilcobinamida tem um  $\text{p}K_a = 14,0$ . O valor intermediário de 13,2 para o acetilderivado (2) corresponde à posição intermediária do grupo acetila como substituinte elétron-aceptor entre os grupos ciano e metila.

Em conclusão, o presente trabalho mostra que a hidrólise básica de acetilcobalamina e cobinamidas se dá através de uma adição inicial do ion hidróxido à carbonila, seguida da eliminação redutiva do grupo de saída de organocobalto (I). O efeito cinético devido aos substituintes axiais trans sugere que o estado de transição se encontra bem avançado sobre a coordenada de reação, com um grau elevado de transferência do par de elétrons para o metal na quebra heterolítica da ligação  $\text{Co}-\text{C}$ .

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro a este trabalho.

## REFERÊNCIAS:

- <sup>1</sup> Dolphin, D.; (Ed.) "B<sub>12</sub>", John Wiley and Sons, New York, vol. 2, 1982.
- <sup>2</sup> Pratt, J. M.; "Inorganic Chemistry of Vitamin B<sub>12</sub>", Academic Press, London, 1972.
- <sup>3</sup> Schrauzer, G. N.; Grate, J. H.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1981), **103**, 541.
- <sup>4</sup> Baldwin, D. A.; Betterton, L. A.; Chemaly, S. M.; Pratt, J. M.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1985), 1613.
- <sup>5</sup> Halpern, J.; Ng, F. T. T.; Rempel, G. L.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1979), **101**, 7124.
- <sup>6</sup> Reenstra, W. W.; Abeles, R. H.; Jencks, W. P.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1982), **104**, 1016.
- <sup>7</sup> Barnet, R.; Hogenkamp, H. P. C.; Abeles, R. H.; *J. Biol. Chem.* (1966), **241**, 1483.
- <sup>8</sup> Nome, F.; Neves, A.; Ionescu, L. G.; "Solution Behavior of Surfactants, Theoretical and Applied Aspects", Fendler, E. J.; Mittal, K. (Eds.) Plenum Press, 1982.
- <sup>9</sup> Bernhauer, K.; Irion, E.; *Biochem. Z.* (1964), **339**, 430.
- <sup>10</sup> Nome, F.; Zanette, D.; *J. Org. Chem.* (1979), **44**, 2308.
- <sup>11</sup> Nome, F.; Zanette, D.; *Can. J. Chem.* (1980), **58**, 2402.
- <sup>12</sup> Armstrong, D. W.; Laranjeira, M. C. M.; Nome, F.; *Bioorg. Chem.* (1980), **9**, 313.
- <sup>13</sup> Nome, F.; Rezende, M. C.; de Souza, N. S.; *J. Org. Chem.* 1983, **48**, 5357.
- <sup>14</sup> Mueller, O.; Mueller, G.; *Biochem. Z.* (1962), **336**, 299.
- <sup>15</sup> Hayward, G. C.; Hill, H. A. O.; Pratt, J. M.; Williams, R. J. R.; *J. Chem. Soc.* (1965), 6485.
- <sup>16</sup> Brown, D. B.; *Prog. Inorg. Chem.* (1973), **18**, 177.

## ARTIGO

### SOBRE A CICLIZAÇÃO COM ÁCIDO SULFÚRICO E A BROMAÇÃO DO 1- $\beta$ -FENILETIL-2-ALILCICLOHEXANOL\*

Octavio A. C. Antunes, J. R. Pereira da Silva, W. F. Braga, S. F. G. da Silva,  
R. Braz Filho, Roderich A. Barnes

(IQ-UFRJ, Cidade Universitária, RJ, 21910; DQ-UFRJ; NPPN-UFRJ)

Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro; Cid. Universitária;  
21910 – Rio de Janeiro (RJ)

Departamento de Química – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Recebido em 19/9/85

Cópia revista recebida em 22/4/87

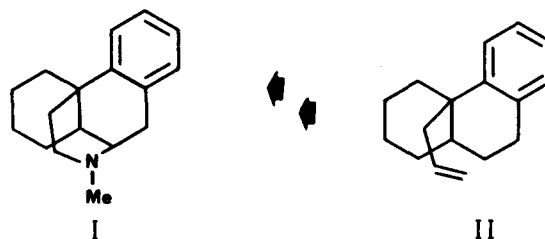
## ABSTRACT

Acid cyclization of 1- $\beta$ -phenylethyl-2-allylcyclohexanol (III) has been investigated and the presence of six 4a-allyl-1, 2,3,4,4a,9,10, 10a - octahydrophenanthrene (II) isomers has been verified. The octahydrophenanthrene II has been previously described as the only product in this reaction. Also the bromination of alcohol III leads to a mixture of isomers, the product of bromine addition to the double bond being one of the smallest in the reaction. In the present study we have used high resolution gas chromatography-mass spectrometry to analyse the reaction products.

Ciclizações, em meio ácido, de 1- $\beta$ -feniletilciclohexanóis têm sido objeto de estudo<sup>1-3</sup>, devido a possibilidade de entrada no sistema 1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a-octaidrofenantreno, que é o sistema básico de diversos diterpenos, de

alcalóides morfínicos e de morfina sintéticas<sup>4-8</sup>.

Como parte de nosso trabalho na investigação de rotas químicas de obtenção de octaidrofenantrenos, passíveis de serem convertidos em N-metilmorfina (I)<sup>9</sup>, foi considerada a possibilidade de utilizar-se o 4a-allyl-1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a-octaidrofenantreno (II) como ponto de partida para obtenção de I (ESQUEMA I).



\* Trabalho apresentado no XVI Congresso Latino Americano de Química, Rio de Janeiro, outubro de 1984.