

MÁRIO STENCEL

# AS COBAMIDAS

Tese de mestrado em Bioquímica apresentada ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA  
1967

As Cobamidas

Mário Stencil

## As Cobamidas

- 1 - Introdução.
  - 2 - Estrutura e nomenclatura.
  - 3 - Isolamento e distribuição.
  - 4 - Propriedades físicas e químicas.
  - 5 - Biossíntese.
  - 6 - Degradação microbiológica.
  - 7 - Reações enzimáticas dependentes de cobamidas.
- Conclusão.

## As Cobamidas.

### 1 - Introdução.

Foram os estudos sobre anemia perniciosa que conduziram, primeiramente, ao reconhecimento da vitamina B<sub>12</sub> ou cianocobalamina que é, sem dúvida, a cobamida que deserta maior interesse. O indivíduo com anemia perniciosa não tem a capacidade de absorver vitamina B<sub>12</sub>, como resultado da deficiência do estômago para secretar uma muco-proteína chamada "fator intrínscico". Este fator é essencial para o transporte da vitamina B<sub>12</sub> das fontes da dieta para a corrente sanguínea através da mucosa intestinal. A anemia perniciosa era tratada, inicialmente, com extrato de fígado o qual deveria conter um fator anti-anemia perniciosa ou "fator extrínscico", como foi chamado(1,2).

Em 1948, E. L. Smith na Inglaterra, e Rickes et al. nos Estados Unidos, isolaram este fator em estado cristalino e puro, a partir de fígado(1). O "fator extrínscico" passou a chamar-se, então, vitamina B<sub>12</sub>, a única vitamina que contém cobalto na molécula.

Foi, também, logo revelado que a fonte original de vitamina B<sub>12</sub> na natureza é decorrente da atividade metabólica de microrganismos, mais especialmente bactérias e actinomicetos(1,3). Esta descoberta se deve, sobretudo, aos estudos sobre a carência de cobalto nos ruminantes. Podia-se prevenir ou curar-este mal pela adição de sais de cobalto aos alimentos, mas quando estes sais eram injetados não mostravam qualquer eficiência. Tornou-se, assim, evidente que os microrganismos do rúmen deveriam sintetizar algum composto orgânico contendo cobalto. Este composto foi identificado como sendo vitamina B<sub>12</sub>, uma vez que esta era capaz de aliviar a deficiência de cobalto dos ruminantes quando injetada ou administrada em doses mínimas(1,2).

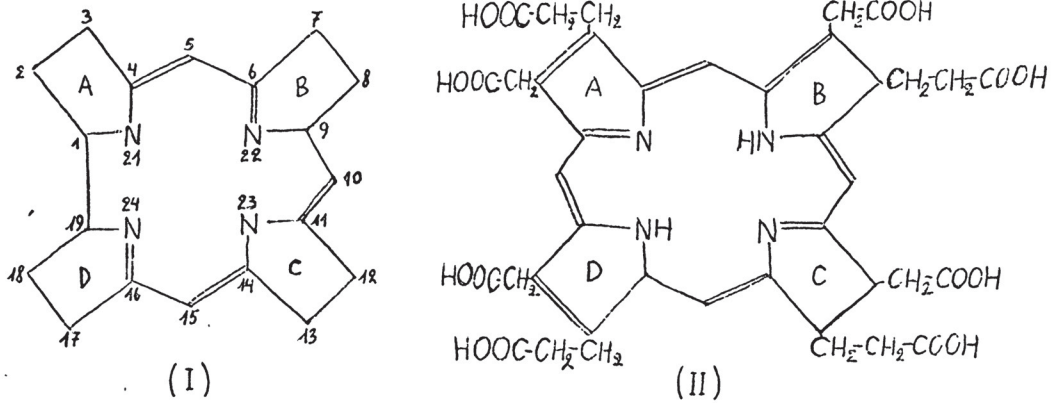
Desde então, desenvolveram-se diversos trabalhos de pesquisa no sentido de isolar cobamidas de diferentes microrganismos e de encontrar as melhores condições para sua produção microbiológica industrial. São, hoje, numerosos os microrganismos que sabemos serem produtores de cobamidas, como também são muitos os análogos da vitamina B<sub>12</sub> que foram encontrados(1,3,4,5).

Depois de obtida a vitamina em estado cristalino iniciaram-se trabalhos visando determinar sua estrutura química. Esta foi publicada em 1955 por Hodgkin et al. (1,6), após a realização de inúmeras análises químicas e estudos por difração de raios X.

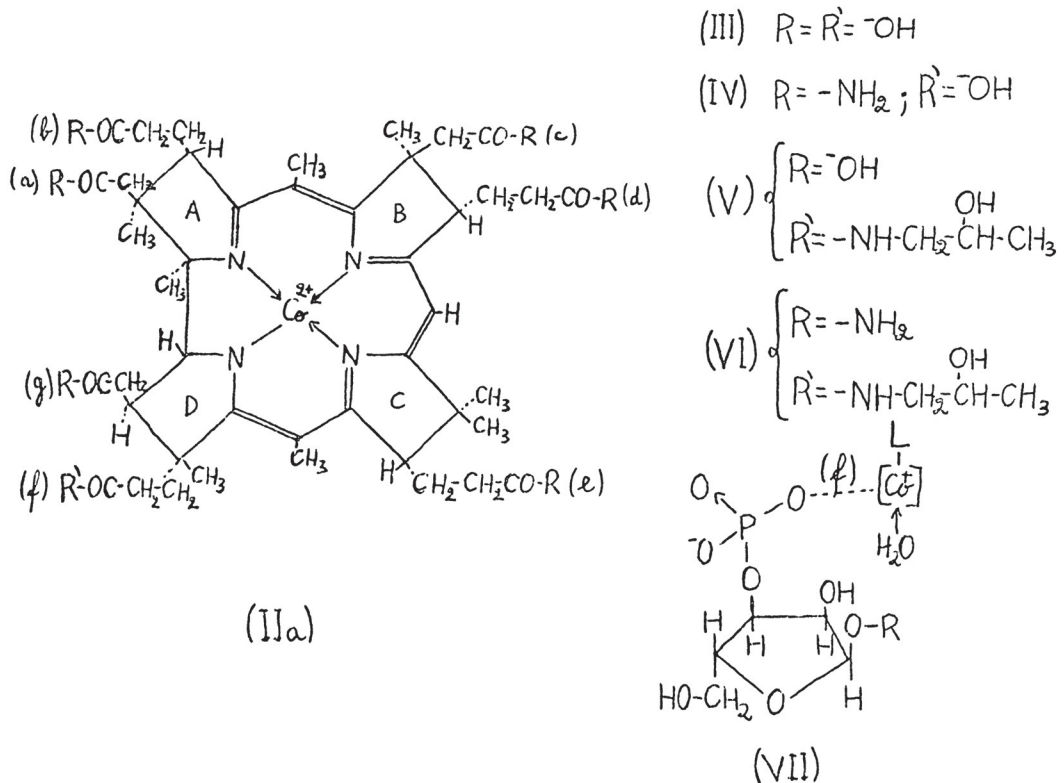
Também de grande significação, principal ente para elucidar a função bioquímica das cobamidas, foi o isolamento de formas coenzimáticas de cobamidas, a partir de diversas fontes bacterianas e de fígado(7). As cobamidas, portanto, existem nos organismos sob a forma de coenzima. A cianocobalamina, por exemplo, é um produto dos processos industriais de isolamento mas, quando introduzida no organismo, transforma-se novamente em coenzima. É, pois, às formas coenzimáticas que será dado um maior destaque nos capítulos que se seguem.

2 - Estrutura e nomenclatura.

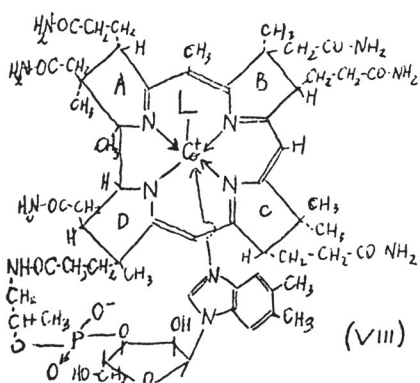
As cobamidas contêm um macro-anel tetrapirrólico característico. Este anel foi denominado "corrín" (I), e os compostos que contêm este tipo de anel podem ser chamados de "corrínóides". Além disso, todos os compostos naturais que possuem o anel "corrín" apresentam, também, um átomo central de cobalto. Contêm, ainda, resíduos de ácido acético e ácido propiônico nas mesmas posições que as porfirinas tipo III e são, a este respeito, particularmente semelhantes à uroporfirina III (II), com exceção de possuírem um grupo metila em lugar de um resíduo de ácido acético no carbono 12 (anel C).



O esqueleto básico dos corrínóides seria, portanto, o representado na figura (IIa) que corresponde ao chamado ácido cobirínico (III) o qual tem seis grupos metila adicionais como está representado e, tendo  $R=R' = OH^-$ . Todos os demais compostos desta série podem ser considerados como derivados do ácido cobirínico. Quando todos os grupos carboxila, menos o da posição (f), estão na forma de amida, o composto é chamado de ácido cobírico (IV). No ácido cobínico (V) o grupo carboxila em (f) forma uma amida com 1-amino-2-propanol, enquanto que os outros grupos carboxila estão livres. Na cobinamida (VI) ou fator B, está tudo na forma de amida. Na cobamida (VII) o grupo hidroxila do 1-amino-2-propanol da cobinamida está esterificado com 3'-fosfo-d-ribofuranose.



Os corrinóides contendo uma base N-glicosidil-imidazólica, cujo segundo nitrogênio está coordenado ao cobalto, também são chamados cobamidas, sendo este, assim, um nome genérico. As cobamidas podem conter benzimidazol, naftimidazol, imidazol ou uma base púrica, já tendo sido encontradas cobamidas com adenina, guanina, hipoxantina e derivados. Quando a base é o 5,6-dimetilbenzimidazol o composto é chamado de cobalamina (VIII). Os outros ligantes do cobalto podem ser água ou ânions e alguns exemplos são: L = CN<sup>-</sup> na ciano-5,6-dimetilbenzimidazolil-cobamida ou cianocobalamina, se L = OH<sup>-</sup> ou H<sub>2</sub>O temos a hidróxi(ou aquo)-cobalamina e se a base fôsse a adenina teríamos a hidróxi(ou aquo)adenil-cobamida. Nas cobamidas a adenina encontra-se ligada à ribose sempre através do nitrogênio 7, diferindo, assim, dos outros nucleotídeos que contêm adenina.

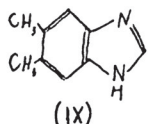


Dependendo da heterobase que está em coordenação com o cobalto, as propriedades físico-químicas do composto diferem consideravelmente, e este fato serve para a classificação e caracterização dos corrinóides (1,8).

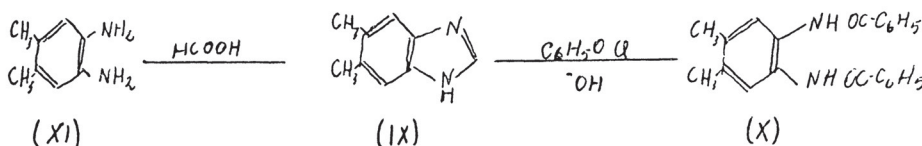
A estrutura das cobamidas foi determinada por meio de análise orgânica e difração de raios X. Abaixo estão resumidas as etapas da análise que conduziu à elucidação da estrutura da vitamina B<sub>12</sub>.

a) A fração ribofuranosil-5,6-dimetilbenzimidazol.

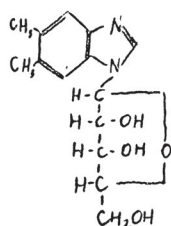
A hidrólise ácida da vitamina B<sub>12</sub>, com HCl 6N a 150°C por 24 horas, seguida de extração com clorofórmio e outras etapas de purificação, produz um composto básico que foi identificado como 5,6-dimetilbenzimidazol (IX):



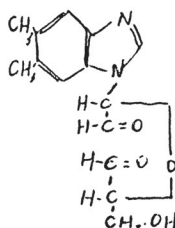
O tratamento deste produto com cloreto de benzóila em solução alcalina produz 4,5-dibenzemido-1,2-dimetilbenzeno (X) o qual foi identificado por comparação com uma amostra sintética. A síntese de 5,6-dimetilbenzimidazol foi realizada pela reação de 4,5-diamino-1,2-dimetilbenzeno (XI) com ácido fórmico:



Por outro lado, a hidrólise da vitamina B<sub>12</sub>, com HCl 6N a 120°C por 8 horas, produz um composto glicosil-benzimidazólico que foi identificado por estudos estruturais e sintéticos como 1-α-D-ribofuranosil-5,6-dimetilbenzimidazol (XII) ou, abreviadamente, "α-ribozól". O glicosídeo reagiu com 1 mol de periodato e o produto da oxidação foi identificado como o aldeído α-(5,6-dimetilbenzimidazol)-α'-nitroso-metil-diglicólico (XIII). Uma vez que só foi gasto 1 mol de periodato, formulou-se uma estrutura furanósica para a pentose que devia existir neste composto.

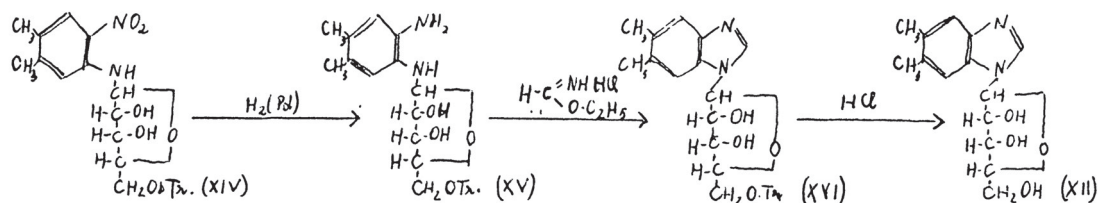


• (XII)



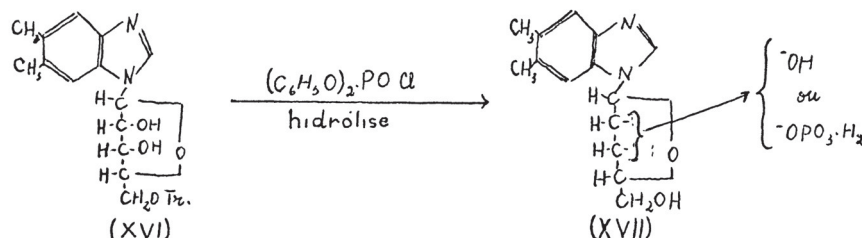
(XIII)

A síntese de 1- $\alpha$ -D-ribofuranosil-5,6-dimetilbenzimidazol (XII) possibilitou a identificação da pentose como ribose e confirmou a estrutura proposta. Procedeu-se a uma hidrogenação catalítica de 2-nitro-4,5-dimetil-N-(5'-tritol-D-ribofuranosil)-anilina (XIV), a qual produziu um amino-ribosídeo (XV) que se fez reagir com cloridrato de éter isopropilformimínico. O produto dessa reação (XVI) foi hidrolisado e obteve-se o 1- $\alpha$ -D-ribosídeo em forma cristalina:



### b) A fração fosfato de $\alpha$ -ribazol.

A partir de um hidrolisado de vitamina  $B_{12}$  foi precipitado um fosfato orgânico na forma de sal de bário. Este sal, que tinha a composição de um nucleotídeo de benzimidazol, não reagia com periodato mas, após hidrólise com  $HCl$  6N a  $100^\circ C$  por 48 horas, produzia um composto benzimidazólico N-substituído que era capaz de reagir com periodato. Baseando-se nos conhecimentos acerca do 1- $\alpha$ -D-ribofuranosil-5,6-dimetilbenzimidazol, tornou-se evidente que o composto possuía um radical fosfato ligado ao carbono 2 ou 3 da ribose. Um fosfato de  $\alpha$ -ribazol (XVII) foi obtido em estado cristalino por degradação da vitamina  $B_{12}$  e por síntese. Após a hidrólise ácida da vitamina o fosfato de  $\alpha$ -ribazol foi separado como sal de cálcio, liberado pelo tratamento com ácido sulfídrico e, então, purificado. A síntese do fosfato de  $\alpha$ -ribazol foi realizada pela reação de 5'-tritol- $\alpha$ -ribazol (XVI) com cloreto de difenil-fosfato seguida da remoção hidrolítica dos grupos tritila e fenilas:-



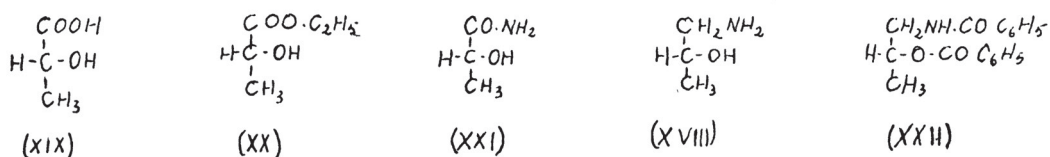
O fosfato está ligado ao carbono 3' como foi demonstrado, posteriormente, com os estudos por difração de raios X.

Nesta altura dos conhecimentos sobre a estrutura da vitamina  $B_{12}$ , já era sabido, através de estudos espectroscópicos, que havia uma ligação entre o nitrogênio na posição 3 do 5,6-dimetilbenzimidazol e o átomo de cobalto da vitamina.

### c) A fração 1-amino-2-propanol.

Entre os produtos da hidrólise da vitamina  $B_{12}$  com  $HCl$  a 20% e a  $100^\circ C$ , foi encontrada uma substância que reagia com a ninidrina. Esta substância foi isolada sob a forma de dibenzoato e identificada como 1-amino-2-propanol (XVIII). O hidrolisado da vitamina foi submetido a uma sequência de etapas de purificação e uma fração solúvel em água transformada em benzoatos. Fazendo-se a partição desta fração obteve-se um dibenzoato em forma cristalina cuja hidrólise produziu uma amina livre que deu, por oxidação com meta-periodato de sódio, acetaldeído e formaldeído. Considerando estes produtos da oxidação concluiu-se que a substância era o 1-amino-2-propanol cuja estrutura foi, então, confirmada por síntese. Em primeiro lugar, obteve-se ácido-D-lático da resolução, com morfina, de ácido-DL-lático. Então, a partir do ácido D-lático (XIX) foi prepara-

Então, a partir do ácido D-lático (XIX) foi preparado lactato de etila (XX). O lactato de etila foi convertido em lactamida (XXI), e esta, então, reduzida com borohidreto de alumínio e lítio a 1-amino-2-propanol (XVIII). A benzoilação deste produto deu um dibenzoato (XXII) idêntico ao preparado a partir do hidrolisado da vitamina B<sub>12</sub>.



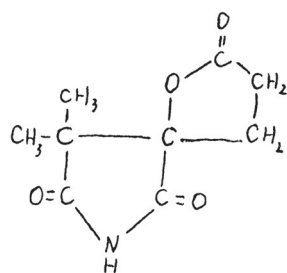
Também foi obtido um D-fosfato de 1-amino-2-propanol, pelo aquecimento de uma mistura de 1-amino-2-propanol e ácido pirofosfórico.

O conhecimento da natureza das diferentes frações descritas acima, conduziu à formulação de uma estrutura parcial para a vitamina B<sub>12</sub>. Faltava, no entanto, o núcleo pircíclico que encerra o cobalto e que corresponde a mais da metade da molécula.

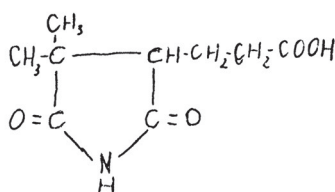
#### d) O anel tetrapirrólico.

A amônia foi logo reconhecida por todos os pesquisadores que estudaram a degradação hidrolítica da vitamina B<sub>12</sub>. Feita a determinação quantitativa da amônia liberada por hidrólise, foi encontrado um valor médio que correspondia a seis moles de amônia para cada mol de vitamina B<sub>12</sub>. A seguir, foi examinado o caráter poliamídico da vitamina B<sub>12</sub>. Uma hidrólise com ácido clorídrico concentrado 65°C por 5 minutos, produziu fosfato de α-ribazol e cobinamida (VI) como os principais produtos. Submetendo a cobinamida a uma hidrólise mais prolongada foram obtidos ácidos mono-, di- e tricarbóxicos com a liberação das correspondentes quantidades amônia. Também foram obtidos ácidos carboxílicos contendo a fração nucleotídica, sendo possível convertê-los em vitamina B<sub>12</sub>. Isto foi efetuado pela reação dos ácidos com etil-clorofornato e trietilmina, que produziu um anidrido, o qual se fez reagir com amônia. Ficou, assim, demonstrado o caráter poliamídico da vitamina B<sub>12</sub>.

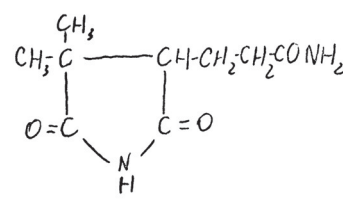
Procedeu-se, então, a uma oxidação do complexo de cobalto que resta da hidrólise da vitamina B<sub>12</sub>. Esta oxidação foi realizada com permanganato de potássio em meio alcalino a 50°C, e produziu uma mistura de oito ácidos que foram separados em forma cristalina. Somente quatro destes ácidos foram identificados: ácidos oxálico, succínico, metil-succínico e dimetil-succínico. Por outro lado, a fusão alcalina da vitamina B<sub>12</sub> deu um destilado que mostrou reações dos compostos pirrólicos. A oxidação de um hidrolisado da vitamina, com cromato de sódio em ácido acético, produziu duas succinimidas substituídas que foram identificadas por estudos estruturais e sintéticos, como a lactona do ácido 3,3-dimetil-2,5-dioxo-4-hidróxipirrolidina-4-propiónico (XXIII) e ácido DL:3,3-dimetil-2,5-dioxopirrolidina-4-propiónico (XXIV). Quando a vitamina foi oxidada diretamente, em solução de ácido acético com cromato de sódio, foi obtida uma terceira succinimida em estado cristalino, que foi identificada como a 3,3-dimetil-2,5-dioxopirrolidina-4-propionamida (XXV)---:



(XXIII)



(XXIV)



(XXV)

Estas três estruturas constituíram a principal evidência orgânica para a estrutura pirrólica do complexo cobáltico.

Finalmente, os estudos por difração de raios X contribuíram de modo decisivo para o conhecimento dos detalhes do macro-anel em torno do cobalto e da estereoquímica da molécula total (1,6).

As formas coenzimáticas dos corrinóides.

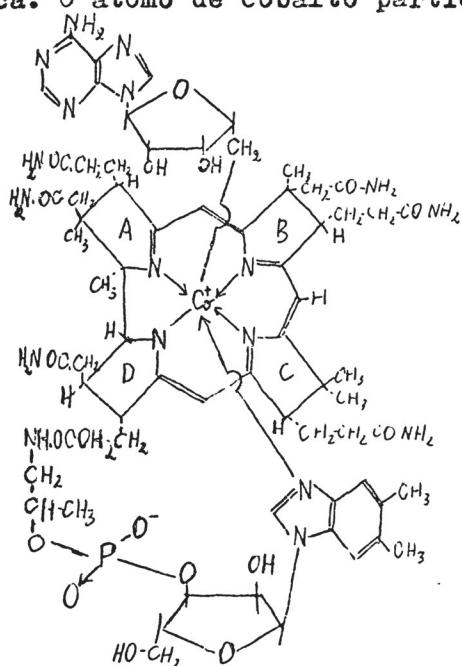
As formas coenzimáticas caracterizam-se por não conterem água ou ânions ligados ao cobalto, mas possuem, em seu lugar, o grupo 5'-deoxiadenosil. As evidências que levaram ao reconhecimento deste grupo são apresentadas no capítulo referente às propriedades das cobamidas.

A estrutura completa da coenzima da vitamina B<sub>12</sub> foi elucidada por análise por difração de raios X e, então, confirmada por síntese parcial (8). Como se vê na figura (XXVI), o nucleosídeo está ligado ao átomo central de cobalto através do carbono 5' por uma ligação covalente que pode ter um caráter parcialmente iônico. A adenina do nucleosídeo situa-se num plano, aproximadamente, paralelo ao anel planar "corrin", enquanto que a fração de ribose está num plano que forma um ângulo reto com o anel (9).

Tanto a coenzima como a vitamina B<sub>12</sub> contém cobalto trivalente, o que foi demonstrado por difração de raios X, comportamento eletroforético e suscetibilidade magnética sendo a coenzima diamagnética. O átomo de cobalto participa da ressonância do sistema de anéis e está ligado tão fortemente

que não pode ser removido sem a destruição da molécula (8,9). Um dos fatos mais notórios nas formas coenzimáticas é a ligação cobalto-carbono, característica dos compostos orgâno-metálicos.

Quanto à nomenclatura da coenzima derivada da vitamina B<sub>12</sub>, esta pode ser chamada de Co-5'-deoxiadenosil-cobalamina (XXVI) e, abreviadamente, 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub> ou coenzima-B<sub>12</sub> (8).



(XXVI)

### 3 - Isolamento e distribuição.

As cobamidas são produzidas em quantidades relativamente grandes por certos microrganismos, sendo que é neste poder de síntese que se baseia, atualmente, a produção industrial de cobamidas. Como alguns exemplos de microrganismos que são ótimos produtores de cobamidas podemos citar: Propionibacterium shermanii, Propionibacterium pentosaceum, Propionibacterium arabinosum, Clostridium tetanomorphum, Bacillus megaterium, e alguns microrganismos que produzem também antibióticos, como o Streptomyces griseus, Streptomyces aureofaciens e Streptomyces fradiae (3,4,5).

A cor vermelha das cobamidas é de grande valor para seguir a sua extração e a posterior purificação cromatográfica. Quanto aos processos de doseamento da vitamina B<sub>12</sub> e de seus análogos, têm sido descritos métodos colorimétricos, espectrofotométricos, químicos, por diluição de isótopos e microbiológicos. Os métodos colorimétricos e químicos só se prestam para amostras bastante puras de vitamina B<sub>12</sub> ou seus análogos. Os métodos microbiológicos não apresentam este inconveniente e são, atualmente, os mais utilizados. Baseiam-se no fato de que certos microrganismos crescem muito pouco ou não crescem na ausência de vitamina B<sub>12</sub>. Quando o microrganismo responde, também, a alguns análogos, pode ser empregada a cromatografia em papel para demonstrar a presença ou ausência de tais análogos. Entre os microrganismos mais utilizados para estes ensaios estão: o Lactobacillus lactis, Lactobacillus leichmanii ATTC 4797, e Escherichia coli 113-3 (1).

O primeiro isolamento de uma cobamida na forma de coenzima, foi realizado por Barker et al. que isolaram 5'-deoxiadenosil-adenilcobamida a partir de extratos de C. tetanomorphum (10). A seguir, foram isoladas a 5'-deoxiadenosil-benzimidazolil-cobamida e a 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub> a partir de extratos de P. shermanii (11). Esta última também foi isolada de fígado (12). Os processos de isolamento baseiam-se nas seguintes propriedades destes compostos: são prontamente extraídos de extratos bacterianos com etanol a 80%; em soluções neutras ou alcalinas eles não têm carga livre e não são retidos por resinas catiônicas ou aniônicas; podem ser extraídos por fenol a partir de soluções aquosas neutras e reextraídas do fenol em água pela adição de éter ou acetona; em solução com pH abaixo de 5, as coenzimas têm uma leve carga positiva e são retidas por resina catiônica, Dowex-50, podendo ser, subsequentemente, eluídas com tampões de pH elevado. O quadro I dá um resumo das etapas do isolamento da 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub>, em estado cristalino, a partir de extratos de P. shermanii (7,11).

Quadro I (Purificação da coenzima-B<sub>12</sub>)  
Material inicial= 4 kg de células de P. shermanii.

Etapas	Fração	Volume(ml)	micro-moles da coenzima	% rendimento
1	80% etanol	3000	aprox.530	100
2	Depois de Dowex 50 Na	3450	aprox.530	100
3	Depois de Dowex 2 OH	3940	520	98
4	Extrato fenólico	269	440	83
5	Dowex 50, pH 3	840	415	78
6	Extrato fenólico de 5	69	358	70
7	Coenzima cristalina		321	61

Quadro III - Alguns análogos da vitamina B<sub>12</sub>.

Nome comum	Nome sistemático	Base do nucleotídeo	Ocorrência
Pseudovitamina B <sub>12</sub>	adenil-cobamida	adenina	<u>P. shermanii</u> <u>P. arabinosum</u> <u>C. tetanomorphum</u> Amostras de rúmen.
Fator A	2-metil-adenil-cobamida.	2-metil-adenina	Conteúdo de intestino de bezerro. Anaeróbios. Fezes de porco e de bezerro. Material de esgoto.
Fator C	guanil-cobamida	guanina	<u>Nocardia rugosa</u>
Fator F	2-metil-tio-adenil-cobamida	2-metil-tio-adenina	Material de esgoto.
Fator G	hipoxantil-cobamida	hipoxantina	Fezes de porco.
Fator H	2-metil-hipoxantil-cobamida	2-metil-hipoxantina	"
Fator I	5-hidróxi-benzimidazolil-cobamida	5-hidróxi-benzimidazol	Material de esgoto.
—	benzimidazolil-cobamida	benzimidazol	<u>Propionibacteria.</u> Material de esgoto.
—	"cobinamida"	—	<u>Propionibacteria.</u> <u>Streptomyces.</u> Material de esgoto.

A determinação da atividade destas coenzimas pode ser efetuada valendo-se de uma enzima, a glutamato-mutase, que depende de 5'-deoxiadenosil-cobamidas. A glutamato-mutase, que foi evidenciada em extratos livres de células de C. tetanomorphum, transforma o ácido glutâmico em ácido  $\beta$ -metil-aspartico. A ação conjunta dessa mutase e de metil-aspartase leva à produção de ácido mesacônico, cuja formação pode ser medida pelo aumento de absorção em 240 m $\mu$ , possibilitando, assim, determinar a atividade da coenzima, quando há excesso de enzima (10,11).

O quadro II dá uma idéia da quantidade de coenzima B<sub>12</sub> que existe no fígado e em algumas bactérias que são excelentes produtoras da coenzima (7).

Quadro II

Tecido	$\mu$ moles/kg de peso úmido
Fígado humano	0,135
Fígado de carneiro	0,128
Fígado de coelno	0,06
<u>C. tetanomorphum</u>	21
<u>P. arabinosum</u>	10
<u>P. shermanii</u>	130

A coenzima B<sub>12</sub> também foi encontrada em organismos fixadores de nitrogênio, tais como, algumas espécies de Rhizobium, Azotobacter vinelandii, Clostridium pasteurianum, e em nódulos das raízes das leguminosas (13). As células de algumas espécies de Rhizobium e de nódulos de leguminosas contêm quantidades apreciáveis da enzima metil-malonil-coenzima A-mutase a qual depende da coenzima citada.

Têm sido encontrados, também, muitos análogos da vitamina B<sub>12</sub>, diferindo desta pela base do nucleotídeo que faz parte da molécula. O quadro III mostra alguns destes análogos, juntamente com as fontes donde foram isolados (3,5). Estes compostos encontram-se sob a forma de coenzima nestas fontes naturais.

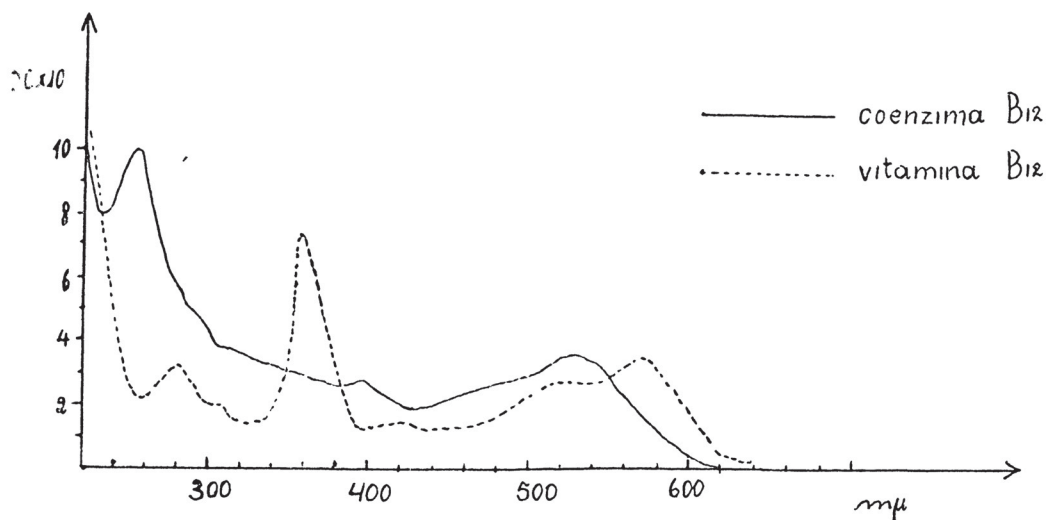
Muitos análogos da vitamina B<sub>12</sub> podem ser obtidos adicionandó-se as bases apropriadas aos meios de cultura de microrganismos capazes de sintetizar cobamidas. Isto pode ser realizado das seguintes maneiras: a) adicionar cobinamida e uma base apropriada a culturas de bactérias exigentes de vitamina B<sub>12</sub>, como é o caso da E. coli 113-3; b) ajuntar estes compostos a culturas de microrganismos que sintetizam quantidades metabólicas de vitamina B<sub>12</sub>, como certas cepas nativas de E. coli; c) ajuntar, somente, a base apropriada em excesso a culturas de microrganismos que sintetizam quantidades elevadas de cobamidas, tais como Streptomyces sp., P. arabinosum, P. pentosaceum e outros. Esta última possibilidade é a melhor, uma vez que dá os maiores rendimentos (5).

#### 4 - Propriedades físicas e químicas.

O estudo químico das cobamidas vem desenvolvendo-se, grandemente, nos últimos anos (8,14). As propriedades, que estão descritas abaixo, são, em geral, as que interessam mais de perto à compreensão do que se conhece a respeito da biossíntese e degradação das cobamidas, bem como da sua ação como coenzimas.

##### a) Características espectrais.

O espectro da 5'-deoksiadenosil-B<sub>12</sub> mostra um pico em 260 m $\mu$ , devido à presença de 5'-deoksiadenosina, e um pico alargado na região visível com um máximo de absorção a cerca de 520 m $\mu$ . A vitamina B<sub>12</sub> apresenta o máximo de absorção em 361 m $\mu$ , onde o espectro da coenzima B<sub>12</sub> apresenta um "plateau".



A pH neutro existem significantes diferenças entre o espectro das cobamidas contendo benzimidazol e o das que possuem uma purina na porção nucleotídica. As cobamidas com purina apresentam na região visível um máximo de absorção em 460 m $\mu$  enquanto que as com benzimidazol mostram, na região visível, um máximo de absorção em 520 m $\mu$ . Em soluções ácidas (pH 2), o espectro da coenzima B<sub>12</sub> é semelhante ao da coenzima de adenil-cobamida, apresentando ambos um pico em 460 m $\mu$  (7,9).

##### b) Redução.

A redução, em etapas, da cianocobalamina por hidrogenação catalítica ou com acetato cromoso a pH 5, produz B<sub>12r</sub> que é uma forma reduzida da hidroxí(ou aquo)cobalamina e que contém cobalto divalente. Este produto possui uma cor marron-alaranjada. A redução com acetato cromoso a pH 9,5, com pó de zinco ou com borohidreto de sódio troca a cor vermelha da cianocobalamina para marron-alaranjado e, finalmente, a verde-cinza. Este produto verde-cinza foi chamado de B<sub>12s</sub> e contém cobalto monovalente. A B<sub>12s</sub> decompõe a água, lentamente, dando hidrogênio e B<sub>12r</sub>. Ambos os produtos de redução B<sub>12r</sub> e B<sub>12s</sub> são, rapidamente, oxidados pelo ar produzindo hidroxí-cobalamina. A B<sub>12s</sub> é capaz de reagir com iodeto de metila dando metil-cobalamina (metil-B<sub>12</sub>) (14).

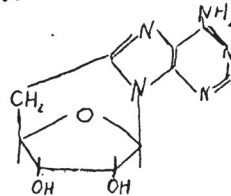
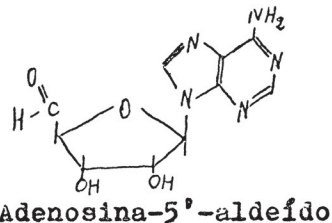
##### c) Síntese da ligação cobalto-carbono.

A B<sub>12s</sub> reage, rapidamente, em temperatura ambiente, com haletos de alquila, fosfatos de alquila, sulfatos de alquila ou com ésteres do ácido p-toluen-sulfônico, havendo a ligação direta dos grupos alquila com o cobalto. A alquilação da B<sub>12s</sub> com 2',3'-isopropilideno-5'-tosil-adenosina, seguida da remoção hidrolítica do grupo isopropilideno, conduz à produção de 5'-deoksiadenosil-B<sub>12</sub>.

Esta última propriedade tem possibilitado a obtenção de diversos análogos da 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub>, quando se faz a substituição do grupo 5'-deoxiadenosil por outros 5'-deoxinucleosídeos (14).

**d) Efeito da luz sobre as cobamidas.**

A 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub> e seus análogos, sob a ação da luz, sofrem fotólise e foto-redução dando complexos cobaltosos (9). A fotólise da 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub>, na presença de oxigênio, resulta na formação de hidróxi-cobalamina, adenosina-5'-aldeído e 8,5'-ciclo-adenosina.

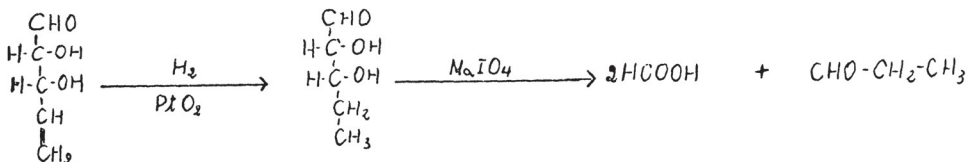


Há, portanto, uma fissão da ligação cobalto-carbono e uma oxidação da B<sub>12</sub> formada, a hidróxi-cobalamina. Na ausência de oxigênio a ação da luz produz B<sub>12</sub> e, principalmente, 8,5'-ciclo-adenosina. A ciano-cobalamina, sob a ação da luz, sofre uma foto-aquação dando um complexo aquo-cobaltico (9,14,15,16).

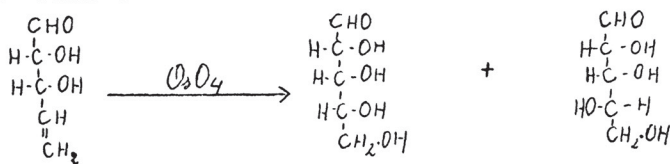
**e) Hidrólise ácida da 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub>.**

A hidrólise ácida (HCl 1N por 20 min a 100°C) da 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub> resulta na clivagem do nucleosídeo da coenzima e, também, hidrólise a ligação adenina-açúcar. O açúcar obtido foi identificado como sendo o D-eritro-2,3-dihidróxi-Δ<sup>4</sup>-pentenal, pelos achados descritos abaixo.

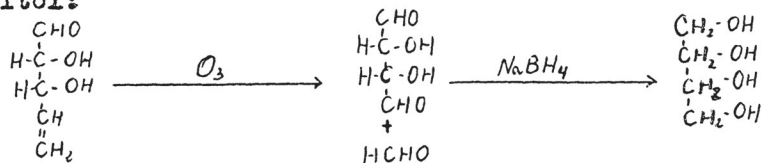
1) A redução do açúcar seguida de tratamento por periodato conduz a 2 moles de formiato e 1 mol de propionaldeído:



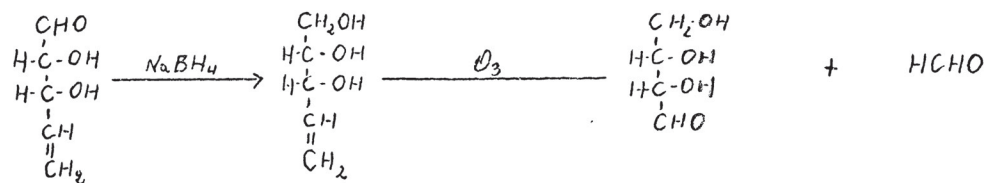
2) A hidroxilação do açúcar com tetróxido de ósmio produz D-ribose e L-xilose:



3) A ozonólise seguida por redução com borohidreto de sódio produz eritritol:



4) A redução da função carbonila seguida por ozonólise produz L-eritrose e formaldeído:



A hidrólise da coenzima da adenil-cobamida, feita nas mesmas condições, libera não só adenina e o açúcar insaturado como também o nucleotídeo de adenina. Este fato permite distinguir, facilmente, as coenzimas contendo purina das que possuem benzimidazol (7,9,17).

f) Ação do cianeto.

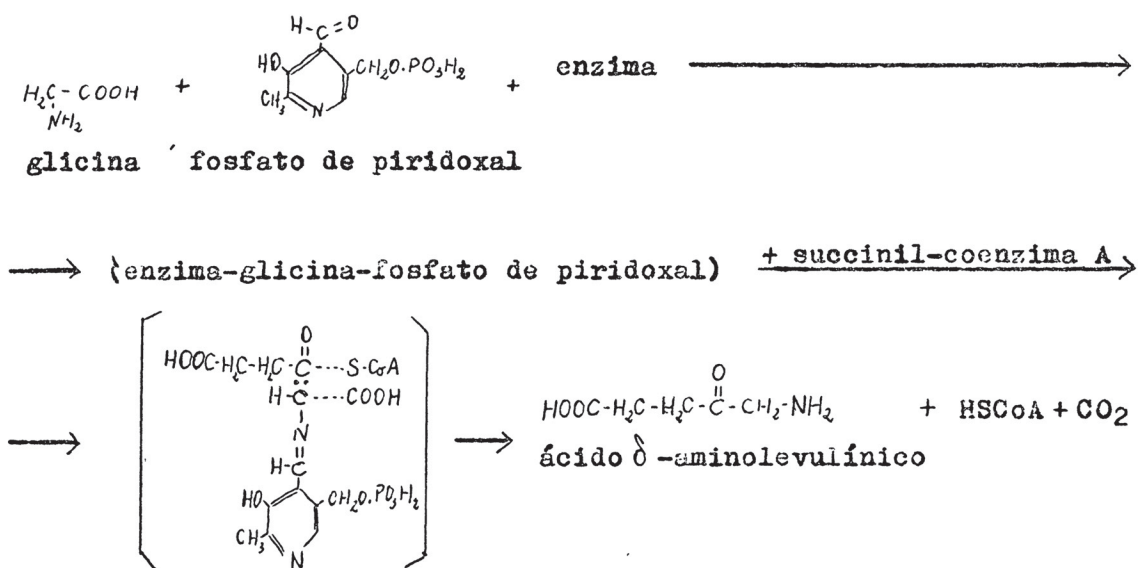
O tratamento da 5'-deoksiadenosil-B<sub>12</sub> com cianetos alcalinos resulta numa rápida inativação da coenzima com produção de cianocobalamina e adenina. O cianeto ataca a ligação cobalto-carbono da coenzima liberando o nucleosídeo que é, então, rapidamente, clivado para produzir adenina livre e a cianidrina da D-citro-2,3-dihidróxi- $\Delta^4$ -pentalenal (7,9,14).

## 5 - A biossíntese das cobamidas.

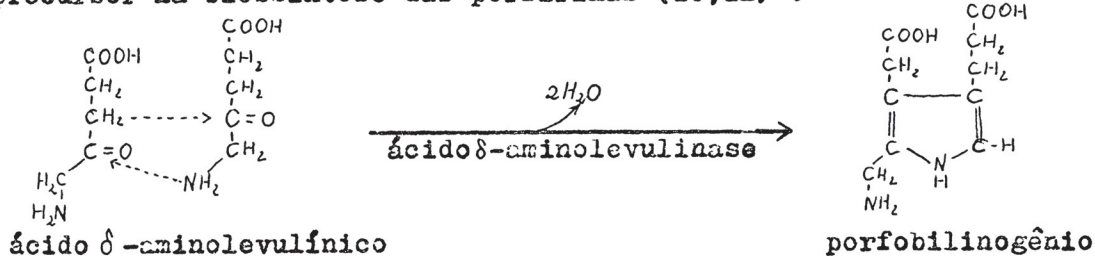
### a) Formação do anel "corrin".

As investigações sobre a biossíntese da vitamina B<sub>12</sub> têm demonstrado que os precursores do anel "corrin" são os mesmos das porfirinas (18).

A primeira etapa na biossíntese das porfirinas é a condensação de glicina com succinil-coenzima A, resultando na formação de ácido δ-aminolevulínico (19). A enzima que catalisa esta reação depende de fosfato de piridoxal e foi chamada de ácido δ-aminolevulínico-sintetase (20,21). A glicina seria, inicialmente, ativada pelo fosfato de piridoxal, seguindo-se, então, a condensação com a succinil-coenzima A e a liberação de coenzima A e CO<sub>2</sub> (21) :



Após a formação do ácido δ-aminolevulínico, duas moléculas deste se condensam para formar porfobilinogênio que é o primeiro pirrol precursor na biossíntese das porfirinas (20,21) :



Shemin et al. (22,23) demonstraram, através de estudos com glicina, ácido δ-aminolevulínico e porfobilinogênio marcados com carbono 14, que estes compostos são incorporados na molécula de vitamina B<sub>12</sub> por culturas de microrganismos sintetizantes desta vitamina. Os resíduos pirrólicos do anel "corrin" são sintetizados, portanto, da mesma maneira que os resíduos pirrólicos das porfirinas.

Os compostos com o anel "corrin", bem como a uroporfirina III, resultam da condensação de quatro moléculas de porfobilinogênio. Estas unidades de porfobilinogênio ligam-se através do carbono proveniente da glicina e que estava, inicialmente, aminado. Há, assim, neste processo, a intervenção de uma desaminase e, ainda, de uma isomerase específica que daria a disposição correta à estrutura para que se formem os compostos citados (21,24,25).

A incorporação do átomo de cobalto nas cobamidas é possível que ocorra numa forma de cadeia aberta e favoreça o fechamento do macrociclo ligando os anéis A e D; uma vez que o anel "corrin" ainda não foi encontrado livre de cobalto. Foi sugerida, também, a intervenção de uma enzima específica, a cobalto-porfirina-sintetase, que catalisaria a incorporação de cobalto em pigmentos tetrapirrólicos (26).

Quanto aos grupos metila situados ao redor do anel tetrapirrólico das cobamidas, demonstrou-se, usando metionina marcada com  $C^{14}$  no grupo metila, que seis dos oito grupos derivam da metila da metionina. Um dos dois grupos metila ligados ao carbono 12 (anel C) provêm da descarboxilação de um resíduo de ácido acético e parece provável que a metila ligada ao carbono 1 (anel A) provenha do carbono  $\delta$  do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (18,27). Os estágios em que ocorrem as metilações e a descarboxilação do resíduo de ácido acético no anel C não são conhecidos.

#### b) Formação de cobinamida.

As etapas biossintéticas consideradas anteriormente, conduzem ao ácido cobirínico (fórmula III). Este composto, sofrendo completa amidação e ligando-se ao 1-amino-2-propanol, produz cobinamida (fórmula VI) que pode ser considerada o intermediário central na biossíntese das cobamidas.

Têm sido isolados de diferentes microrganismos, tais como mutantes de N. rugosa e culturas muito jovens de P. shermanii, diversos intermediários da passagem de ácido cobirínico a cobinamida. Wagner (14), levando em consideração estes diversos achados, propôs duas vias prováveis para a formação de cobinamida. Uma das vias seria a seguinte: um grupo carboxílico do ácido cobirínico transforma-se em amida dando ácido cobirínico monoamida, há então a incorporação de 1-amino-2-propanol produzindo-se ácido cobirínico-monoamida (fórmula V), o qual sofre cinco amidações sucessivas dando cobinamida. A outra via seria a hexa-amidação do ácido cobirínico dando ácido cobirínico (fórmula IV), e este, ligando-se ao 1-amino-2-propanol daria cobinamida. Entretanto, o ácido cobirínico em qualquer grau de amidação, poderia sofrer a incorporação do resíduo de 1-amino-2-propanol dando ácido cobirínico com um ou mais grupos carboxílicos na forma de amida, o qual, então, seguiria a primeira via.

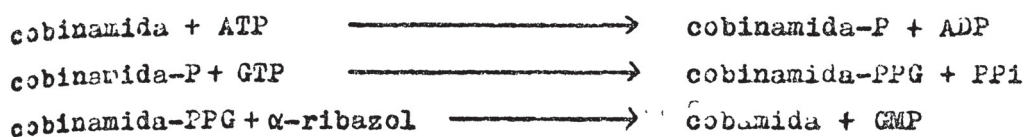
O grupo 1-amino-2-propanol, que faz a ligação entre a cobinamida e a porção nucleotídica das cobamidas, provavelmente, se origina da L-treonina por descarboxilação. Na presença de L-treonina marcada com  $N^{15}$  o Streptomyces griseus concentra  $N^{15}$  no resíduo de 1-amino-2-propanol (28).

#### c) Incorporação da fração nucleotídica.

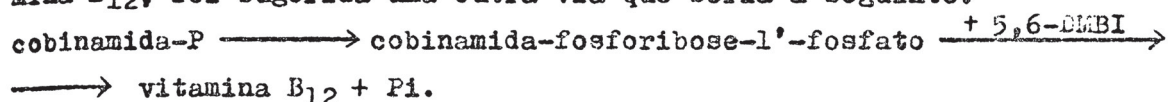
Uma mutante de E. coli (113-3), exigente de vitamina  $B_{12}$ , biossintetiza esta vitamina a partir de cobinamida e 5,6-dimetil-benzimidazol, sendo que resultados semelhantes foram obtidos com cepas selvagens de E. coli, P. shermanii e S. griseus (5).

Posteriormente, foram isolados, de culturas de Nocardia rugosa, os compostos cobinamida-fosfato (cobinamida-P) e cobinamida-guanosina-difosfato (cobinamida-PPG) que poderiam ser prováveis intermediários na biossíntese de cobamidas (29,30). As evidências que levaram a considerar estes compostos como intermediários foram as seguintes: a cobinamida-P e a cobinamida-GDP aparecem durante os estágios iniciais da produção de vitamina  $B_{12}$  por N. rugosa; estes dois compostos acumulam-se numa mutante de N. rugosa na qual a biossíntese da vitamina  $B_{12}$  está bloqueada; e uma mutante de N. rugosa, na qual está bloqueada a biossíntese de cobinamida-P, converte este composto e cobinamida-GDP em vitamina  $B_{12}$ .

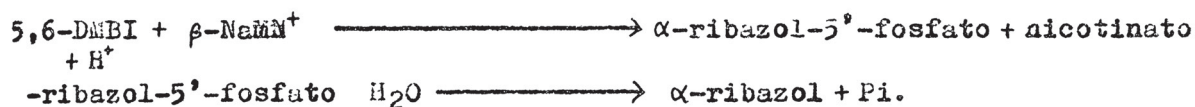
Ademais, experimentos na presença de 5,6-dimetil-benzimidazol, 1- $\alpha$ -D-ribofuranosil-5,6-dimetil-benzimidazol( $\alpha$ -ribazol) e ribose marcados, levaram à conclusão de que, na via provável neste microrganismo, o  $\alpha$ -ribazol seria incorporado como tal, e da seguinte maneira(29,30,31):



Por outro lado, extratos livres de células de *P. shermanii*, quando em presença dos precursores 5,6-dimetil-benzimidazol,  $\alpha$ -ribazol e  $\alpha$ -ribazol-3'-fosfato, convertem em vitamina B<sub>12</sub>, aproximadamente, na mesma proporção, os seguintes compostos: cobinamida, cobinamida-P, cobinamida-PPG, cobinamida-PPA (cobinamida-adenosina-difosfato) e cobinamida-fosforibose (14); Levando-se em conta o fato de que a cobinamida-fosforibose, juntamente com 5,6-dimetil-benzimidazol(5,6-DMBI), pode ser utilizada por *E. coli* 113-3 e *P. shermanii* para a biossíntese da vitamina B<sub>12</sub>, foi sugerida uma outra via que seria a seguinte:



Quanto à formação de  $\alpha$ -ribazol, Friedman e Harris(32,33) conseguiram evidenciar uma enzima, em *P. shermanii*, que catalisa uma reação entre 5,6-dimetil-benzimidazol(5,6-DMBI) e ácido nicotínico-mononucleotídeo ( $\beta$ -NAmN<sup>+</sup>) para formar  $\alpha$ -ribazol-5'-fosfato, o qual é logo desfosforilado pela ação de uma fosfatase endógena:



Finalmente, o quadro IV mostra o crescimento de *E. coli* 113-3 em presença dos supostos intermediários(14).

Quadro IV ( A atividade máxima é indicada por 100)

Composto testado	Tempo de incubação		
	10h	16h	24h
cianocobalamina	100	100	100
cobinamida	72	82	98
cobinamida-P	87	95	101
cobinamida-PPG	38	42	76
cobinamida-PPA	38	43	74
cobinamida-fosforibose	43	61	86

Os dados obtidos com os microrganismos citados acima, permitem dizer que a cobinamida-P e o  $\alpha$ -ribazol são intermediários na biossíntese da vitamina B<sub>12</sub>. A cobinamida-PPG também poderia ser um intermediário, como indicam as experiências com *N. rugosa*.

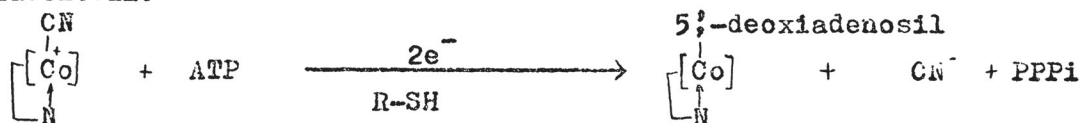
Ainda não existem dados concretos a respeito da origem da fração benzimidazólica.

d) Biossíntese da 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub>(coenzima-B<sub>12</sub>).

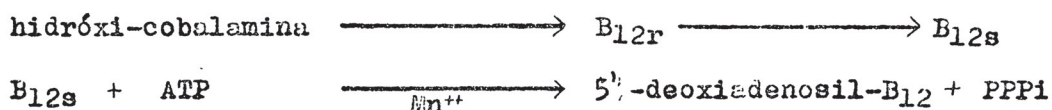
Foi demonstrada em sistemas livres de células de P. shermanii e C. tetanomorphum, a conversão enzimática de cianocobalamina ou hidróxi-cobalamina para 5'-deoxiadenosil-cobalamina (34,35). O sistema enzimático requer ATP, NADH, uma flavina reduzida, glutátion reduzido ou mercaptoetanol, sendo os íons Mn<sup>++</sup> e K<sup>+</sup> ativadores do sistema. O glutátion pode ser substituído pelo mercaptoetanol e várias flavinas agem tão bem quanto a FMN, por exemplos. Contudo, outros nucleotídeos-trifosfato não substituem a adenosina-trifosfato. Sabe-se que o ATP funciona na biossíntese da coenzima não como o faz habitualmente, isto é como um composto com alto potencial de energia, mas sim como um doador do grupo 5'-deoxiadenosil (36,37).

Estudos feitos com ATF marcado com C<sup>14</sup> indicam que, para cada equivalente de coenzima formado, são incorporados um equivalente de adenina e um equivalente de ribose. A adenina e a ribose livres não são incorporadas na coenzima e um fato notável é a clivagem única do ATP resultando na liberação de tripolifosfato inorgânico(37,38). Estudos sobre a liberação de cianeto da cianocobalamina e das mudanças espectrais durante a síntese da coenzima indicaram não haver necessidade de uma forma reduzida da vitamina B<sub>12</sub> como intermediário obrigatório na síntese em si. A B<sub>12r</sub> pode servir como substrato mas permanece a exigência pelos agentes redutores citados acima (39). Os agentes redutores forneceriam, assim, um par de elétrons adicional ao cobalto possibilitando a formação da ponte cobalto-carbono da coenzima.

Considerando estes diversos dados pode-se formular uma reação simples na qual o cianeto da cianocobalamina é substituído pelo radical 5'-deoxiadenosil:

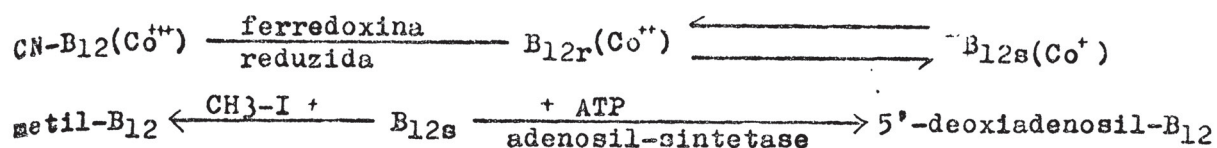


Entretanto, têm sido indicados outros mecanismos para a biossíntese de 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub>. Num sistema enzimático de C. tetanomorphum foi evidenciado um mecanismo em etapas no qual a B<sub>12s</sub> é o reagente com o ATP, tendo sido purificada 300 vezes a enzima capaz de adenosilar a B<sub>12s</sub> (40,41) :



O NADH e o FADH<sub>2</sub> serviriam como agentes redutores, mas o ácido lipóico reduzido foi indicado como um redutor mais eficiente.

A ferredoxina reduzida pode, também, converter a cianocobalamina em B<sub>12r</sub> e, a seguir, em B<sub>12s</sub>. O último composto oxida-se, rapidamente, à forma mais estável B<sub>12r</sub>, a não ser em condições estritamente anaeróbicas. Contudo, a extrema rapidez com que os agentes alquilantes reagem com a B<sub>12s</sub> torna possível detectar a formação transitória de uma cobamida reduzida por dois elétrons. A redução da cianocobalamina por ferredoxina reduzida representa outra via para a redução de cobamidas por compostos naturais. E a cobalamina reduzida poderia produzir 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub> em presença de ATP e da adenosil-sintetase de C. tetanomorphum (42):



As flavinas reduzidas têm sido consideradas os redutores biológicos naturais na biossíntese da 5'-deoksiadenosil-B<sub>12</sub>. Parece, agora, que tanto as flavinas reduzidas como a ferredoxina reduzida são capazes de reduzir, não enzimaticamente, derivados de cobamidas. E, é provável que muitos compostos naturais possam levar a efeito a redução de cobamidas "in vitro". Não foi demonstrado, ainda, um sistema enzimático que catalise, especificamente, a redução de cobamidas(42).

Os corrinóides reduzidos com dois elétrons são, portanto, os substratos ativos para a biossíntese das formas coenzimáticas, uma vez que possibilitam uma substituição eletrofílica e a conseqüente formação da ligação cobalto-carbono das coenzimas.

Presume-se que a introdução do grupo 5'-deoksiadenosil ocorra, provavelmente, nos estágios de ácido cobínico-monoamida ou de ácido cobínico-diamida (14).

## 6 - Degradação microbiológica das cobamidas.

A grande importância dos estudos sobre a degradação microbiológica reside, principalmente, na possibilidade da obtenção de produtos de degradação em quantidades suficientes para sua caracterização e estudos estruturais. Estes produtos serviriam, então, como compostos de referência para os estudos metabólicos nos animais e no homem, onde as cobamidas estão distribuídas, somente, em quantidades mínimas.

As culturas de Aerobacter aerogenes, quando crescidas em presença de cianocobalamina, convertem a vitamina em dois pigmentos amarelos que foram chamados de I e II (43). Posteriormente, foram experimentados diversos microrganismos capazes de transformar a cianocobalamina em outros produtos. O microrganismo mais ativo foi a Pseudomonas rubescens que converte a vitamina em produtos amarelados ou marron-amarelados, em condições anaeróbicas e no escuro, sendo que a cor vermelha da vitamina pode ser restaurada por aeração. Como se sabe, a vitamina B<sub>12</sub> pode ser, quimicamente, reduzida a um produto marron a B<sub>12r</sub>. Entretanto, os estudos espectrais mostraram ser o produto diferente da B<sub>12r</sub> preparada por hidrogenação catalítica ou fotólise da coenzima-B<sub>12</sub> (44). Foi utilizada, também, vitamina B<sub>12</sub> marcada com Co<sup>57</sup> e feita a extração e o estudo eletroforético dos pigmentos obtidos. Foram separadas duas frações, A e B, com propriedades semelhantes aos produtos I e II de Aerobacter aerogenes. As frações A e B são incapazes de promoverem o crescimento de Lactobacillus leichmanii. Estes componentes foram, ainda, fracionados por cromatografia e as características espectrais de cada fração diferem das da vitamina B<sub>12</sub>, de seus análogos e derivados, sendo os pigmentos prováveis produtos da degradação da vitamina B<sub>12</sub> (45,46). Os pigmentos amarelos não são convertidos em vitamina B<sub>12</sub> pelo cianeto, têm um espectro semelhante ao da coenzima-B<sub>12</sub> mas diferem desta quanto ao seu comportamento frente à luz. Contém um nucleotídeo com dimetil-benzimidazol, tendo sido sugerida uma alteração no núcleo "corrin" dos pigmentos (47).

## 7 - Reações enzimáticas dependentes de cobamidas.

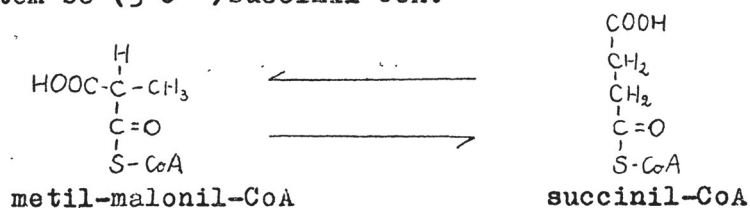
Os estudos sobre o metabolismo do ácido glutâmico por extratos livres de células de *C. tetanomorphum* é que conduziram ao primeiro isolamento de uma coenzima de cobamida. Esta coenzima, que foi identificada como a 5'-deoksiadenosil-adenil-cobamida, participa na transformação de glutamato a  $\beta$ -metil-aspartato pela glutamato-mutase (10). Desde então, rapidamente, têm aumentado os conhecimentos acerca das funções das cobamidas como coenzimas. Entretanto, o mecanismo de ação destas coenzimas é, ainda, imperfeitamente conhecido.

### a) L-Metil-malonil-coenzimaA-mutase.

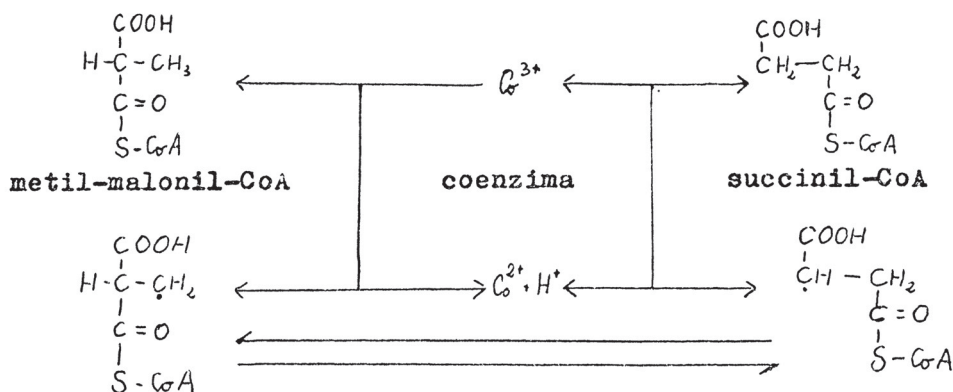
Esta enzima, que catalisa a transformação de metil-malonil-Co A em succinil-CoA, tem sido estudada em bactérias, rim e fígado, e tem grande importância no metabolismo do propionato (48).

A L-metil-malonil-CoA-mutase foi obtida, em estado purificado, de *P. shermanii* (49) e de fígado de carneiro (50). A enzima bacteriana e a de fígado apresentam diferenças. A holoenzima purificada de fígado de carneiro tem um peso molecular de, aproximadamente, 165000 e contém 2 moles de 5'-deoksiadenosil-B<sub>12</sub> por mol de enzima. Enquanto a holoenzima é relativamente estável, a apoenzima é muito instável e sensível à ligação com reagentes sulfidrílicos, sendo que sua atividade pode ser restaurada pela adição 5'-deoksiadenosil-B<sub>12</sub> (50). A enzima bacteriana tem um peso molecular de 56000, não depende de grupos sulfidrílicos e a coenzima pode ser separada facilmente (49).

Na isomerização de metil-malonil-CoA a succinil-CoA ocorre uma transferência do grupo carbonil-tio-éster, simultaneamente com uma transferência de hidrogênio. Quando se utiliza (2-C<sup>14</sup>)metil-malonil-CoA obtém-se (3-C<sup>14</sup>)succinil-CoA.



Esta transferência é intramolecular, uma vez que experimentos usando metil-malonil-CoA, duplamente marcada, mostram que o grau de isótopos em cada molécula permanece constante durante a isomerização (48). Para explicar esta transferência foi proposto um mecanismo de radicais livres e, de acordo com este mecanismo, a coenzima sofreria uma reação reversível de óxido-redução (48) :

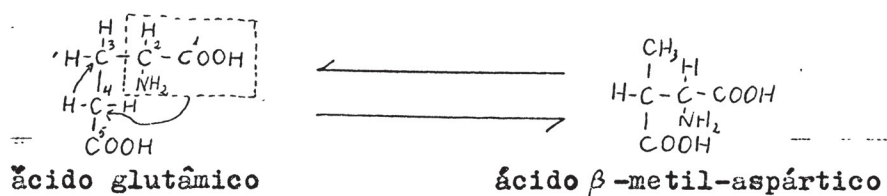


As modificações na parte 5'-deoxiadenosil têm um pronunciado efeito sobre a atividade coenzimática, enquanto que as mudanças na parte nucleotídica não têm tanta influência, mas a 5'-deoxiadenosil-cobinamida não tem atividade (48).

b) Glutamato-mutase.

A glutamato-mutase, que foi evidenciada em extratos livres de células de *C. tetanomorphum*, efetua a transformação de glutamato em β-metil-aspartato e depende de 5'-deoxiadenosil-cobamidas(51). Foram evidenciadas, também, neste sistema duas proteínas separáveis, chamadas componentes E e S, sendo os dois essenciais para a atividade da enzima. A coenzima encontra-se, fracamente, ligada ao componente E (51,52).

Estudos sobre distribuição de isótopos nesta reação estabeleceram que há um rearranjo duplo envolvendo a transferência de um resíduo de glicina e de um hidrogênio (51) :

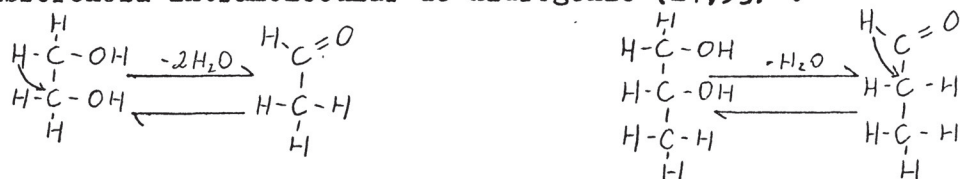


Foi eliminada, por experimentos com elementos radioativos, a possibilidade da existência de amônia livre, α-cetoglutarato, glicina, ácido acrílico ou de um próton, como intermediários (51).

O grupo 5'-deoxiadenosil é necessário para a atividade da coenzima na reação da glutamato-mutase. Sua substituição por outros ligantes do cobalto, tais como 5'-deoxiuridina, 2',5'-dideoxiadenosil, 5'-deoxitimidil ou grupos alquila, conduzem à perda de atividade ou a antagonismo competitivo (14,51).

c) Dioldehidrase.

Esta enzima, que foi purificada a partir de extratos livres de células de *Aerobacter aerogenes*, catalisa a conversão de 1,2-etanodiol a acetaldeído e de 1,2-propanodiol a aldeído propiônico, havendo uma transferência intramolecular de hidrogênio (14,53) :



A enzima depende de 5'-deoxiadenosil-cobamidas, sendo a 5'-deoxiadenosil-B<sub>12</sub> a mais ativa. A hidroxí-cobalamina, a cianocobalamina e a metil-cobalamina são inativas ou inibidores competitivos (14).

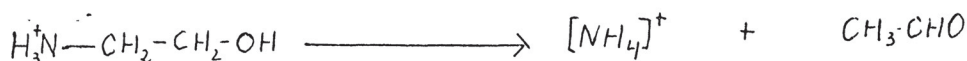
Foram realizados estudos das reações do complexo dioldehidrase-coenzima-B<sub>12</sub> com oxigênio, glicolaldeído e glioxal. O complexo enzima-coenzima não apresenta função catalítica nestas reações, mas funciona como um reagente. Contudo, as propriedades das reações não catalíticas sugerem que mecanismos semelhantes podem estar envolvidos nas reações catalíticas e não catalíticas. Quando o glicol-aldeído é adicionado ao complexo enzima-coenzima este é inativado e o glicol-aldeído transformado em glioxal. O glicol-aldeído, quando em solução, está hidratado e assemelha-se, assim, a um diol. As reações não catalíticas mostram que o complexo enzima-coenzima pode funcionar como um doador ou aceptor de elétrons, mas a coenzima livre não funciona como tal. Sugeriu-se, então, que a interação de apoenzima e coenzima resulta em modificações químicas reversíveis na coenzima.

Esta ativação da coenzima pela apoenzima intensificaria a labilidade da ligação cobalto-carbono da coenzima aumentando a habilidade desta para funcionar como agente oxidante ou redutor (54).

As experiências com 1,2-propanodiol marcado com  $H^3$  no carbono 1 levaram à conclusão de que a conversão de propanodiol a propionaldeído ocorre em duas etapas: transferência de hidrogênio do carbono 1 para o carbono 5' da porção 5'-deoksiadenosil da coenzima- $B_{12}$  e desta posição para o carbono 2 do produto (55).

d) Etanol-amina desaminase.

Uma etanol-amina-desaminase de um Clostridium sp. fermentante de etanol-amina requer 5'-deoksiadenosil- $B_{12}$  ou 5'-deoksiadenosil- $\alpha$ -benzimidazolil-cobamida como coenzima. Esta enzima converte a etanol-amina em amônia e acetaldeído:



A reação assemelha-se às catalisadas pela dioldehidrase, sendo a desaminase, também inibida pela hidroxicobalamina, cianocobalamina e metil-cobalamina (14).

e) Ribonucleotídeo-redutase.

Extratos de Lactobacillus leichmanii, que convertem ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos, exigem 5'-deoksiadenosil- $B_{12}$  como coenzima, juntamente com ácido dinidrolipóico (14).

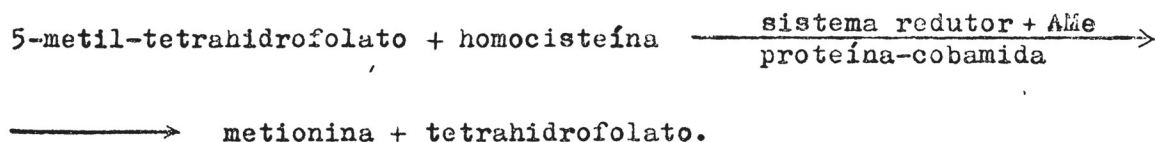
O mecanismo desta reação poderia, também, ser semelhante ao da dioldehidrase.

f) Degradação da lisina.

Os extratos livres de células de Clostridium sticklandii degradam a lisina a butirato, acetato e amônia. Exigem uma 5'-deoksiadenosil-cobamida como coenzima, não se sabendo, entretanto, em que etapa específica ela atua (14).

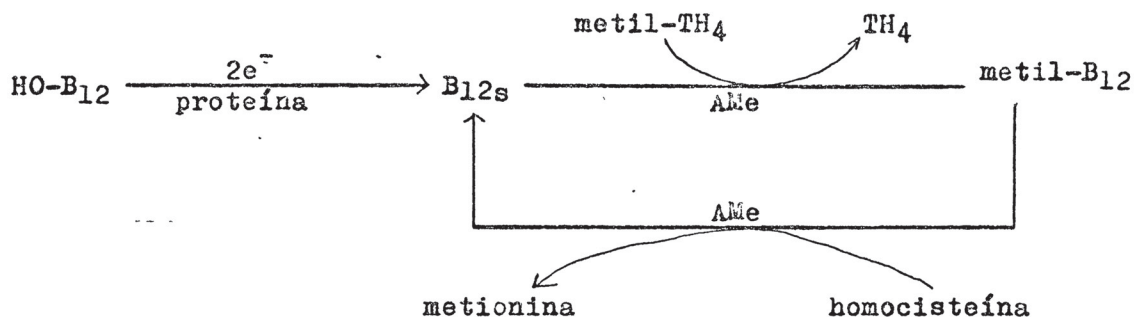
g) Biossíntese da metionina.

São conhecidas duas vias para a biossíntese da metionina a partir de homocisteína. Uma delas não depende de vitamina  $B_{12}$  e a outra sim. A via que requer vitamina  $B_{12}$  requer, ainda, como cofatores: FAD reduzido, S-adenosil-metionina (Ame) e 5-metil-tetrahydropteroil-mono ou tri-glutamato (metil- $TH_4$ ) como doador de metila. Este sistema foi encontrado em E. coli PA-15, E. coli W, Aerobacter aerogenes e em fígado de mamífero (56).



A 5-metil-tetrahydrofolato-homocisteína-transmetilase, que catalisa esta reação, contém um derivado de vitamina  $B_{12}$  como grupo prostético. A formação da holoenzima é catalisada por uma enzima de extratos de E. coli, a partir da apoenzima e de 5'-deoksiadenosil- $B_{12}$  na presença de um piridino-nucleotídeo reduzido (57). Quando se utiliza a cianocobalamina, a hidroxicobalamina ou a  $B_{12r}$ , também é necessário um sistema redutor, mas com a metil-cobalamina não (58).

Baseando-se nestes dados foi imaginada uma via cíclica para explicar a biossíntese da metionina (14):



#### h) Formação de metano.

A redução de metil-cobalamina, com o grupo metil marcado com C<sup>14</sup>, a metano C<sup>14</sup> é catalisada por extratos livres de células de Metanosarcina barkeri. Estes extratos catalisam, também, a formação de metano a partir de metanol, formaldeído e dióxido de carbono. A metil-cobalamina deve ser, pois, um intermediário na biossíntese de metano, sendo o microrganismo citado bastante rico em cobamidas (59).

A formação de metano a partir de metil-B<sub>12</sub> também foi demonstrada em Metanobacterium omelianski, parecendo ser esta uma propriedade comum às metanobactérias (14).

#### i) Formação de acetato.

Os extratos livres de células de Clostridium thermoaceticum catalisam a formação de acetato a partir de dióxido de carbono, piruvato e metil-B<sub>12</sub> (60). A metil-B<sub>12</sub> serviria, assim, como uma fonte de grupos metila para a síntese de acetato (61).

Os extratos deste microrganismo também produzem acetato a partir de carboxi-metil-cobalamina, na presença de NADP reduzido (14).

### Conclusão.

As cobamidas são substâncias de estrutura complexa e participam de reações enzimáticas de grande importância.

Existem, entretanto, muitos pontos obscuros com relação à biossíntese destas substâncias e sua degradação bioquímica é desconhecida. O mecanismo de ação das cobamidas, nas reações enzimáticas, também é imperfeitamente conhecido.

O desenvolvimento do estudo químico das cobamidas, possibilitando um melhor conhecimento sobre sua reatividade química e sobre a síntese química de análogos da coenzima-B<sub>12</sub> e de intermediários de seu metabolismo, talvez venha a elucidar muitos destes pontos. Os estudos sobre a degradação microbiológica das cobamidas podem, também, propiciar a obtenção de produtos de degradação que serviriam como compostos de referência para estudos metabólicos.

Outra possibilidade é de que a cristalização e o estudo das enzimas que participam de etapas da biossíntese das cobamidas, bem como, das proteínas que se ligam às cobamidas, e seria o caso das enzimas que contêm a coenzima: B<sub>12</sub>, contribuam para o esclarecimento da biossíntese e do mecanismo de ação das cobamidas.

### Bibliografia.

- (1) - Smith, E.L. - Vitamin B<sub>12</sub> (Methuen's Monographs on Biochemical Subjects), London, (1960).
- (2) - Jukes, T.H. e Broquist, H.P. - Metabolic Pathways II, 731, Greenberg, D., Ed., Acad. Press, Inc., New York, London, (1961).
- (3) - Perlman, D. - Advances in Applied Microbiology, vol. 1, 87, Umbreit, W.W., Ed., Acad. Press, Inc., New York, London, (1959).
- (4) - Perlman, D. - Advances in Applied Microbiology, vol. 7, 104, Umbreit, W.W.; Ed., Acad. Press, Inc., New York, London, (1965).
- (5) - Goodwin, T.W. - Biochemistry of Industrial Microorganisms, 169, Rainbow, C. e Rose, A.H., Eds., Acad. Press, Inc., New York, London, (1963).
- (6) - Wagner, A.F. e Folkers, K. - Medicinal Chemistry, 257, Burger, A., Ed., Interscience Publishers, Inc., N.Y., London, (1960).
- (7) - Weissbach, H., Peterkofsky, A.; e Barker, H.A. - Comprehensive Biochemistry, vol. 16, 189, Florkin, M. e Stotz, E.H., Eds., Elsevier, Amsterdam, (1965).
- (8) - Bernhauer, K., Muller, O. e Wagner, F - Angew. Chem. Intern. Ed. Engl., 4, 200, (1964).
- (9) - Hogenkamp, H.P.C. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 552, (1964).
- (10) - Barker, H.A., Smith, R.D., Weissbach, H., Munch-Petersen, A., Tooney, J.I., Ladd, J.N., Volcani, B.E.; e Wilson, R.M. - J. Biol. Chem., 235, 181, (1960).
- (11) - Barker, H.A., Smith, R.D., Weissbach, H., Tooney, J.I., Ladd, J.N. e Volcani, B.E. - J. Biol. Chem., 235, 480, (1960).
- (12) - Tooney, J.I. e Barker, H.A. - J. Biol. Chem., 236, 560, (1961).
- (13) - Evans, H.J. e Kliever, M. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 745, (1964).
- (14) - Wagner, F. - Ann. Rev. Biochem., 35, 405, (1966).
- (15) - Hogenkamp, H.P.C.; Ladd, J.N. e Barker, H.A. - J. Biol. Chem., 273, 1950, (1962).
- (16) - Brady, R.O. e Barker, H.A. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 4, 373, (1961).
- (17) - Hogenkamp, H.P.C. e Barker, H.A. - J. Biol. Chem., 236, 3097, (1961).
- (18) - Shemin, D. e Bray, R.C. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 615, (1964).
- (19) - Shemin, D. - The Harvey Lectures, 258, Acad. Press, Inc., N.Y., (1956).
- (20) - Granick, S. - J. Biol. Chem., 232, 1101, (1958).
- (21) - Granick, S. e Mauzerall, D. - Metabolic Pathways II, 525, Greenberg, D., Ed., Acad. Press, Inc., N.Y., London, (1961).
- (22) - Corcoran, J.W. e Shemin, D. - Biochim. Biophys. Acta, 25, 661, (1957).
- (23) - Bray, R.C. e Shemin, D. - Biochim. Biophys. Acta, 30, 647, (1958).
- (24) - Granick, S. e Mauzerall, D. - J. Biol. Chem., 232, 1119, (1958).
- (25) - Cornford, P. - Biochem. J., 64, 91, (1964).
- (26) - Porra, R.J. e Ross, R.D. - Biochem. J., 94, 557, (1965).
- (27) - Bray, R.C. e Shemin, D. - J. Biol. Chem., 238, 1501, (1963).

- (28)- Krasna, J., Roseblum, C. e Sprinson, D.B. - J. Biol. Chem., 225, 745, (1957).
- (29)- Barchielli, R., Boretti, G., Di Marco, A., Julita, P., Migliacci, A., Minghetti, A., Spalla, C. - Biochim. J., 74, 382, (1960).
- (30)- Boretti, G., Di Marco, A., Fuoco, L., Marnatti, M.P., Migliacci, A., Spalla, C. - Biochim. Biophys. Acta, 37, 379, (1960).
- (31)- Brown, G.M. e Reynolds, J.J. - Ann. Rev. Biochem., 32, 450, (1963).
- (32)- Friedman, H.G. e Harris, L.D. - J. Biol. Chem., 240, 406, (1965).
- (33)- Friedman, H.G. - J. Biol. Chem., 240, 413, (1965).
- (34)- Brady, R.J. e Barker, H.A. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 4, 464, (1961).
- (35)- Weissbach, H., Redfield, B. e Peterkofsky, A. - J. Biol. Chem., 236, P. C. 40, (1961).
- (36)- Peterkofsky, A., Redfield, B. e Weissbach, H. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 5, 213, (1961).
- (37)- Peterkofsky, A. e Weissbach, H. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 622, (1964).
- (38)- Peterkofsky, A. e Weissbach, H. - J. Biol. Chem., 238, 1491, (1963).
- (39)- Weissbach, H., Redfield, B. e Peterkofsky, A. - J. Biol. Chem., 237, 3217, (1962).
- (40)- Vitols, E., Walker, G. e Hunnekens, F.M. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 372, (1964).
- (41)- Vitols, E., Walker, G. e Hunnekens, F.M. - J. Biol. Chem., 241, 1455, (1966).
- (42)- Weissbach, H., Brot, N. e Lovenberg, W. - J. Biol. Chem., 241, 317, (1966).
- (43)- Helgeland, K., Jonson, J. e Laland, S. - Biochem. J. - 81, 260, (1961).
- (44)- Hufham, J.B., Burgus, R.C., Scott, W.M. e Pfiffner, J.J. - J. Bacteriol. 88, 538, (1964).
- (45)- Scott, W.M., Burgus, R.C., Hufham, J.B. e Pfiffner, J.J. - J. Bacteriol. 88, 581, (1964).
- (46)- Burgus, R.C., Hufham, J.B., Scott, W.M., e Pfiffner, J.J. - J. Bacteriol., 88, 1139, (1964).
- (47)- Burgus, R.C., Hufham, J.B., Scott, W.M. e Pfiffner, J.J. - Arch. Biochem Biophys., 110, 490, (1965).
- (48)- Wood, H.G., Kellermeyer, R.W., Stjernholm, R. e Allen, S.H.G. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 661, (1964).
- (49)- Kellermeyer, R.W., Allen, S.H.G., Stjernholm, R. e Wood, H.G. - J. Biol. Chem., 239, 2562, (1964).
- (50)- Cannata, J.J.B., Focesi, A., Mazunder, R., Warner, R.C. e Ochoa, S. - J. Biol. Chem., 240, 3249, (1965).
- (51)- Barker, H.A., Suzuki, F., Iodice, A. e Rooze, V. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 644, (1964).
- (52)- Suzuki, F. e Barker, H.A. - J. Biol. Chem., 241, 818, (1966).

- (53)- Abeles, R.H. e Lee, H.A. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 695, (1964).
- (54)- Wagner, O.W., Lee, H.A., Frey, P.A. e Abeles, R.H. - J. Biol. Chem., 241, 1751, (1966).
- (55)- Frey, P.A. e Abeles, R.H. - J. Biol. Chem., 241, 2732, (1966).
- (56)- Buchanan, J.M., Elford, H.L., Loughlin, R.E., McDougall, B.M. e Rosenthal, S. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 756, (1964).
- (57)- Brot, N. e Weissbach, H. - J. Biol. Chem., 241, 2024, (1966).
- (58)- Guest, J.R., Friedman, S., Dillworth, M.J., Woods, D.D. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 774, (1964).
- (59)- Blaylock, B.A. e Stadman, T.C. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 799, (1964).
- (60)- Poston, J.M., Kuratomi, K. e Stadman, T.C. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 804, (1964).
- (61)- Poston, J.M., Kuratomi, K. e Stadman, T.C. - J. Biol. Chem., 241, 4209, (1966).