

JAIRA B. DE FIGUEIREDO

**ESTUDO QUÍMICO E METABÓLICO DO
ÁCIDO FÓLICO E SUAS COENZIMAS**

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

CURITIBA
1967

ESTUDO QUÍMICO E METABÓLICO

D O

ÁCIDO FOLICO E SUAS COENZIMAS

C O N T E Ú D O

- I - Introdução
- II - Histórico e nomenclatura
- III - Estrutura
- IV - Propriedades físicas e químicas
- V - Biossíntese
- VI - Funções
- VII - Degradação
- VIII - Resumo e conclusão
- IX - Bibliografia

INTRODUÇÃO

No metabolismo celular os processos biológicos e bioquímicos estão associados a coenzimas específicas correspondentes a moléculas orgânicas complexas. Muitas vezes estas moléculas contêm radicais químicos que os animais são incapazes de sintetizar sendo necessário supri-los na dieta.

No caso de indivíduos carentes de vitaminas do complexo B, o acréscimo destas vitaminas à dieta determina correção do quadro característico da carência.

As vitaminas do complexo B, nas quais está incluído o ácido pteroilglutâmico (ácido fólico), são exemplos desses radicais químicos complexos, cuja coenzima será objeto de nosso estudo.

HISTÓRICO E NOMENCLATURA

Em 1931, Wills, (1) descreve e publica pela primeira vez um síndrome clínico observado em mulheres da Índia. A doença estava associada à gestação e apresentava quadro sangüíneo semelhante ao encontrado na anemia perniciosa. Alimentando as pacientes com grandes doses de Marmite (extrato concentrado de levedura autolizada), curava-se a anemia.

Wills e Stewart, (cf. ref. 1) induziram, experimentalmente, em macacos, este síndrome clínico, alimentando-os com dietas idênticas às das mulheres de Bombaim. Notaram que esta anemia em macacos (macrocítica tropical), também, podia ser curada com o extrato de levedura e certos tipos de extratos de fígado. Entretanto, observaram que extratos de fígado, eficazes na cura de anemia no homem, não tinham efeito para os macacos submetidos a esta dieta experimental. Estas observações serviram para distinguir o fator anemia anti-perniciosa do fígado, do fator efetivo para a anemia macrocítica tropical.

Day e colaboradores deram o nome de "Vitamina M" ao fator essencial que curava os macacos. Mais tarde, observaram ser este fator o "fator Lactobacillus casei" ou o ácido pteroilglutâmico. (2)

Stokstad e Manning (cf. ref. 1) observaram, em frangos sob dieta experimental, resposta efetiva a um fator desconhecido de crescimento em levedura. Designaram de "fator U" esta substância que, anos depois, verificaram ser idêntica ao ácido pteroilglutâmico.

Hogan e Parrott (cf. ref. 1) encontraram um fator, presente no fígado, que prevenia a anemia macrocítica em frangos, a que deram a denominação de "Vitamina B_c".

Mitchell et al., (cf. ref. 1) obtiveram do espinafre uma substância de reação ácida, com as mesmas propriedades microbiológicas, estimulante do crescimento de Streptococcus faecalis R e Lactobacillus casei. A esse fator deram o nome de "ácido fólico". O nome ácido fólico, foi defendido sem entretanto significar termo de uma substância química específica.

Os trabalhos apresentados desde então, trouxeram para a literatura nume-

resos nomes designando um mesmo princípio ativo da vitamina, muito antes de isolada e de sua estrutura ser determinada.

A Tabela I, dá um resumo histórico da nomenclatura de preparações com possível atividade biológica devida ao ácido pteroilglutâmico ou compostos relacionados.

TABELA I

Nome	Descrição	Data
Fator Wills	Extrato de levedura eficaz no tratamento de anemia macrocítica tropical	1931
Vitamina M	Extrato de fígado e levedura eficazes para citopenia nutricional em macacos	1938
Fator U	Fator de crescimento para frangos presente no extrato de levedura	1938
Vitamina B ₁₂	Fator do fígado que impede anemia macrocítica em frangos	1939
Fator de eluato de norite	Fator de crescimento para <u>L. casei</u> a partir de levedura e fígado	1940
Ácido fólico	Ativo para <u>S. lactis R.</u> , concentrado a partir de espinafre	1941
Fator <u>L. casei</u>	Isolado do fígado e levedura	1943
Fator S.L.R. (rizopterina)	Fator de crescimento para <u>S. lactis R.</u> , inativo para <u>L. casei</u> , obtido a partir do produto de fermentação de <u>Rhizopus nigricans</u>	1943

Trabalhos sucessivos com técnicas de isolamento de fígado, degradação e síntese conseguiu-se preparar o ácido pteroilglutâmico.

A vitamina foi encontrada conjugada com cadeias de ácido gama-glutâmico, variando de 3 a 7 resíduos ligados por cadeias peptídicas que podem ser rompidas por enzimas específicas, denominadas conjugases.

Um composto isolado do fermento, foi demonstrado conter 7 resíduos de ácido glutâmico, recebendo o nome de "Vitamina B₁₂ conjugada". Um outro composto isolado de cultura de Rhizopus nigricans, recebeu o nome de Rizopterina, sendo ativa para Streptococcus faecalis mas inativa para Lactobacillus casei.

Em 1948, foi isolado um composto semelhante ao ácido fólico, fator de crescimento para Leuconostoc citreorum 8081, verificando-se que o CF (fator citreorum) podia substituir Pte Glu (ácido pteroil-glutâmico), para crescimento de S. faecalis.

A TABELA II, apresenta fatores isolados de materiais naturais e sua constituição. (3)

TABELA: II

Ácido fólico e fatores relacionados, isolados de materias naturais			
Fator	Constituição	Ensaio	Fonte
Fator do eluato de norite	Ácido pteroilglutâmico	<u>L.casei</u>	Extrato levedura
Ácido fólico	" "	<u>S.lactis R</u> <u>S.faecalis R</u> <u>L.casei</u>	Espinafre autolizado
Vitamina B ₉	" "	Frangos	Fígado de porco autolizado
Fator <u>L.casei</u> fermentação	Ácido pteroiltriglutâmico	<u>L.casei</u>	Cultura de <u>Corynebacterium</u>
Fator <u>L.casei</u> fígado	" pteroilglutâmico	<u>L.casei</u>	Extrato aquoso de fígado
Vitamina B ₉	" pteroilheptaglutâmico	Frango	Levedura
Fator SLR	" 10-formil-pteróico	<u>S.lactis</u>	Licor de fermentação, extrato de tecido e fígado
Ácido 10-formil fólico	" 10-formilfólico	<u>S.faecalis R</u>	Fígado autolizado
Fator <u>L.citrovorum</u>	" 5-formiltetrahidrofólico	<u>L.citrovorum</u> (ou <u>P.cerevisiae</u>)	Fígado autolizado fração L do fígado
Ácido folínico	" 5-formiltetrahidrofólico	<u>L.casei</u> em presença de 7-metilfólico	Enzima digestiva de fígado de porco

Há grandes variações de nomenclatura e abreviações para o ácido fólico e seus derivados. Em 1964, a IUPAC e a IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry) tentando padronizar a nomenclatura e símbolos usados para estes compostos, traz a constante da Tabela III (4).

TABELA III

NOMENCLATURA E SÍMBOLOS

Ácido pterpico	Pte
" pteroil-glutâmico	Pte Glu
" pteroil-diglutâmico	Pte Glu ₂
" pteroil-triglutâmico	Pte Glu ₃
" pteroil-heptaglutâmico	Pte Glu ₇
" 7,8-diidro-pteroil-glutâmico	H ₂ Pte Glu
" 5,6,7,8-tetraidropteroil-glutâmico	H ₄ Pte Glu
Radical metila	H ₃ C-
" metilena	- H ₂ C -
" hidroximetila	HCH ₂
" formila	HCO -
" formimina	HCNH
Folato e Pterato	- Termos gerais para vários membros da família

ESTRUTURA QUÍMICA

O estabelecimento da composição química da vitamina e a conclusão de seu papel como um "princípio ativo" no metabolismo, deve-se aos estudos sobre a cura de anemias e fatores de crescimento para microrganismos. Concluiu-se que a substância envolvida nos diferentes casos não devia ser idêntica mas apresentar-se com um tipo comum de estrutura. (5,6)

O ácido Pte Glu isolado e caracterizado, foi a chave para a revelação de uma complicada origem de compostos interrelacionados e conjugados.

Através de técnicas de extração, precipitação, adsorção, cromatografia e trocas iônicas, o ácido Pte Glu tem sido isolado de várias fontes pela degradação de formas conjugadas (enzimólise). O primeiro fator cristalino ativo, obtido a partir do fígado, deve-se a Pfiffner et al. (7).

Binbley et al., isolaram um poliglutamato de levedura em forma cristalina que era inativa para *Lactobacillus casei* e *Streptococcus faecalis*, mas com atividade antianêmica para frangos. (8,9) Ficou demonstrado que concentrado de levedura incubado com uma enzima de rim de porco, tinha sua atividade aumentada para microrganismos, portanto, a enzima ativava uma forma conjugada inativa. (10)

Em 1946 Pfiffner, esclareceu que esse conjugado possuía sete resíduos de ácido L-glutâmico e era o ácido pteroil-hexa-gama-glutamil-glutâmico, cuja cadeia podia ser rompida por uma conjugase denominada "Vitamina B₆ conjugase". (11,12) Foram descritas duas conjugases, uma presente no rim de porco e outra em pâncreas de frango; ambas necessárias para hidrólise completa do conjugado de 7 resíduos. A conjugase de rim de porco hidrolisa 70% e a de pâncreas de frango, 30% usadas em etapas sucessivas. (13)

Stokstad, (2,14) elucidou a estrutura do ácido Pte Glu. Começou com a degradação do fator L. casei da levedura e, finalmente, estabeleceu a fórmula do Pte Glu como sendo o ácido N [4 { [(2-amino-4-hidroxi-6-pteridil)metil] amino}benzoil-glutâmico.

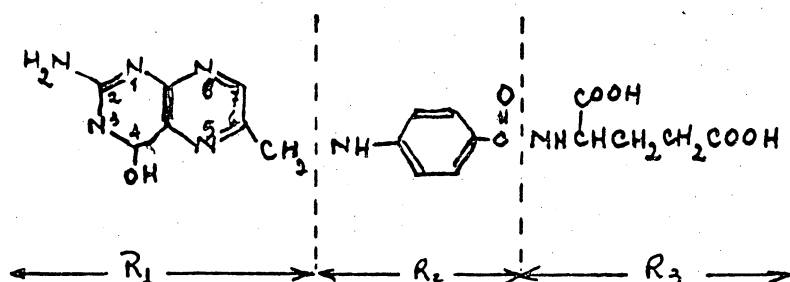


Fig.1 - Ácido pteroilglutâmico: R₁ metade pteridina, R₂ metade paraminobenzóico, R₃ metade ácido glutâmico.

A) - ESTRUTURA DA METADE PTERIDINA

A hidrólise aeróbica do fator L. casei de levedura origina um produto ácido dibásico: C₇H₅N₅O₃. A titulação eletrométrica indicou a presença de dois grupos ácidos: um carboxílico e um enólico. O aparecimento deste composto, apresentando uma absorção na faixa de ultra violeta, sugeriu tratar-se de uma metade pteridina, com uma estrutura de 2-amino pteridina (Fig. 2)

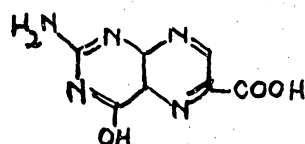


Fig.2 - Ácido 2-amino-4-hidroxi-6-carboxil pteridina

O grupo carboxílico na posição 6, foi determinado após tratamento do fator L. casei com ácido sulfuroso, dando um produto aldeídico que, em ausência de ar, foi tratado com álcali diluído, sofrendo uma oxi-redução semelhante a Cannizzaro dando quantidades eqüimolares de ácido e um composto metilado que foi degradado a 2-metil-5-amina pirazina. (Fig.3)

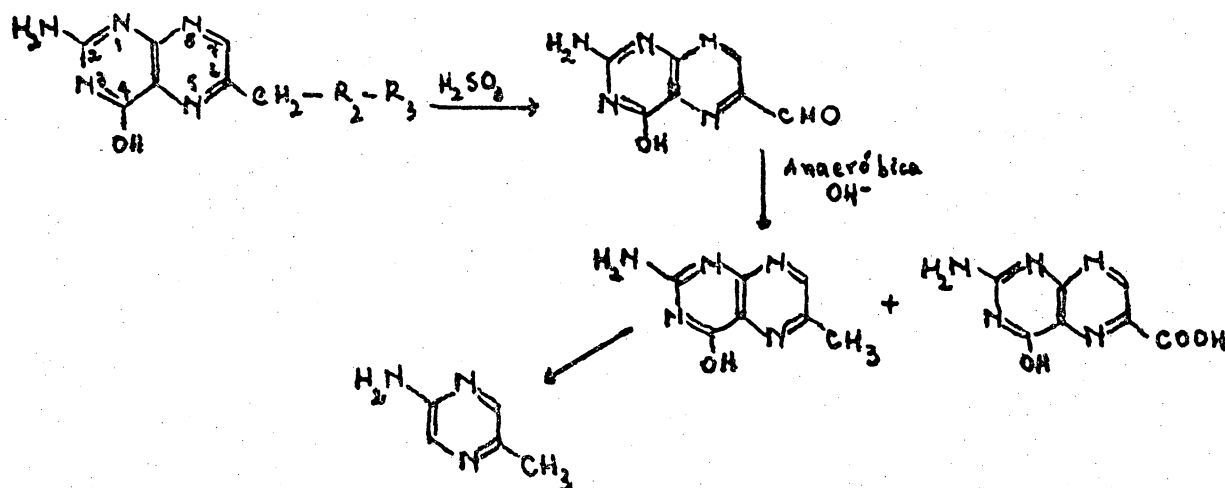


Fig. 3 - Hidrólise anaeróbica do fator L. casei

A confirmação da localização do grupo hidroxil na posição 4 e as posições dos outros grupos funcionais foram estabelecidos pela síntese do ácido 2-amino-4-hidroxi-6-carboxil pteridina.

CONCLUSÃO: a) O ácido dibásico foi formado sob condições aeróbicas, provando que o grupo ligante foi oxidado antes da clivagem e, por esta razão, não seria o grupo carbonil de uma amida ou éster.

b) O grupo ligante poderia ter sido uma unidade de l-C, desde que o derivado pteridina e purinas transportassem substituintes de l-C.

Baseando-se na estrutura do ácido dibásico, a metade pteridina da vitamina foi deduzida como sendo um grupo 2-amino-4-hidroxi-6-pteridil metileno. (Fig. 4)

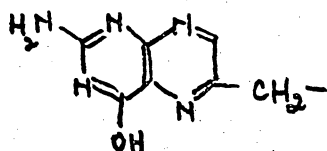


Fig. 4 - Metade pteridina

B) - ESTRUTURA DA METADE P-AMINO BENZOIL GLUTÂMICO

O estabelecimento da interrelação entre o fator L. casei do fígado, o fator L. casei da levedura e a natureza da metade p-amino benzoil, foi possível por hidrólise aeróbica e anaeróbica de cada composto.

Pela hidrólise alcalina anaeróbica (Fig. 6) resultaram um racêmico e dois equivalentes de ácido glutâmico. A hidrólise em pH 4 deu ácido l-pirrelidona carboxílico que, por hidrólise alcalina, produziu ácido L (+) -glutâmico.

Pela hidrólise alcalina aeróbica do fator L. casei, resultou uma amina aromática que, hidrolizada com ácido sulfúrico 2 N, deu um equivalente do ácido p-aminobenzóico e um ácido glutâmico.

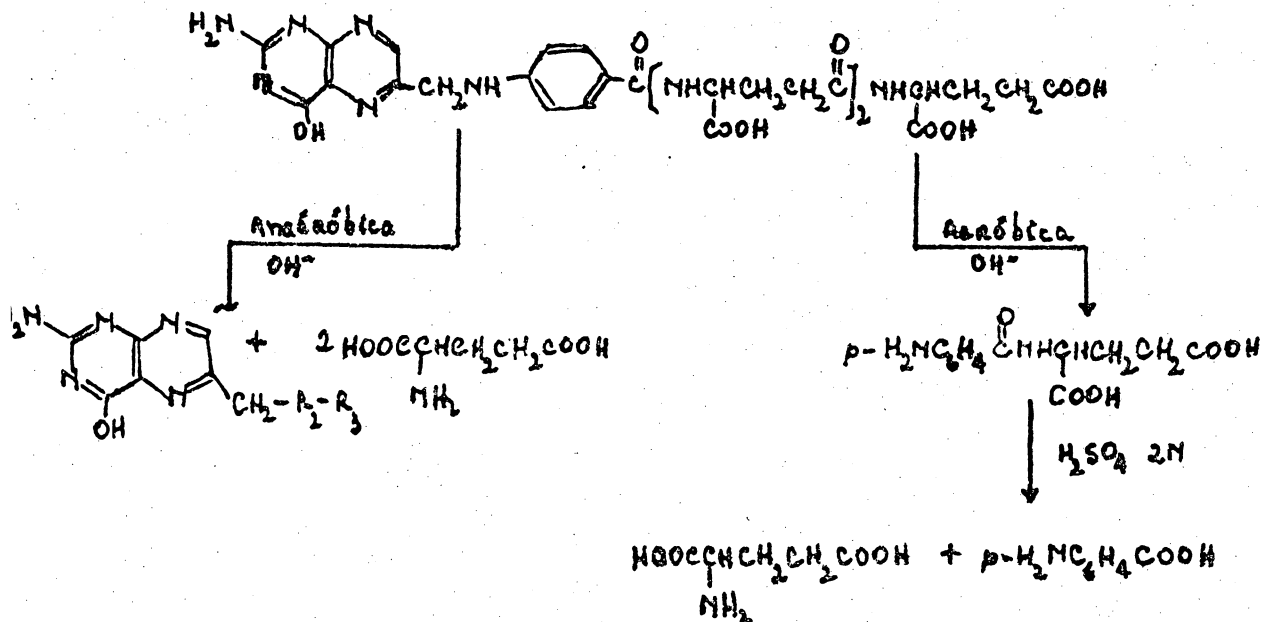


Fig. 5 - Esquema de hidrólise aeróbica e anaeróbica do ácido

CONCLUSÃO: No ácido pteroilglutâmico, a metade p-aminobenzoil consta, apenas, de um resíduo de ácido glutâmico, enquanto que o fator L. casei da levedura, contém três resíduos cujo modo exato de acoplamento é em tripeptídeos; os trabalhos de síntese mostraram que as ligações se fazem como no ácido gama-glutamil-gama-glutâmico. (15)

C) - ESTRUTURA DA RIZOPTERINA

A rizofterina foi isolada da cultura de Rhizopus nigricans à partir do produto de fermentação do ácido fumárico. Trata-se de um derivado do ácido pteróico (Fig. 6), também chamado ácido 10-formil pteróico, (Fig. 7)

Ao contrário do que se verifica com o ácido pteroiltriglutâmico, a rizofterina é ativa para S. faecalis (fator SLR) e inativa para L. casei. (2,16,17).

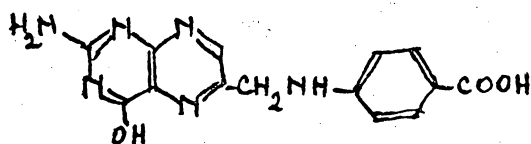


Fig. 6 - Ácido pteróico

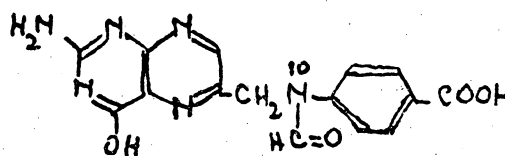


Fig. 7 - Rizofterina ou ácido 10-formil pteróico

D) - ESTRUTURA DO ÁCIDO FORMILTETRAHIDROFÓLICO

Souberlich e Baumann, (20) em estudos referentes à nutrição de Leuconostoc citrovorum 8081, observaram que não havia crescimento em meio basal constituído pelos amino ácidos conhecidos e vitaminas. Entretanto a adição de extrato de fígado concentrado (reticulogeno), promovia o crescimento. A este fator obtido de material natural, foi dado o nome de "fator citrovorum" (CF).

Três grupos independentes estabeleceram a estreita relação das estruturas do CF e do Pte Glu, pela comparação de atividade de substâncias antagônicas do Pte Glu.

O primeiro grupo encontrou em ensaios com L. casei, que, CF concentrado superava os efeitos tóxicos do ácido 4-aminopteroilglutâmico (Fig. 8) e do ácido metilfólico (Fig. 9).

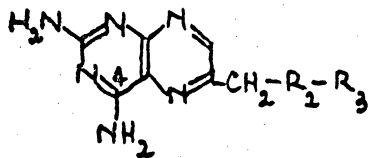


Fig. 8 - Ácido 4-aminopteroilglutâmico

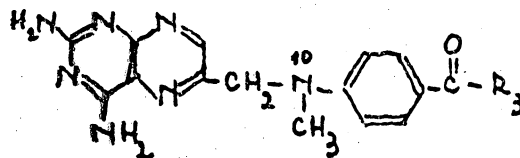


Fig. 9 - Ácido metilfólico

O segundo grupo demonstrou em *S. faecalis* e camundongos, a reversão competitiva e não competitiva do antagônico ácido 4-aminoptereilglutâmico. (21)

O terceiro grupo isolou sinteticamente em forma cristalina o ácido 5-formil-5,6,7,8-tetrahydropteroilglutâmico (Fig. 10), verificando sua atividade biológica ser tão efetiva como o CF natural. A este fator sintético, obtido do fígado denominaram de leucovorina. (22,23,24)

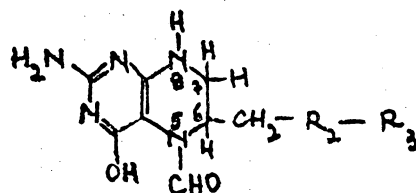


Fig. 10- Ácido folínico ou leucovorina.

O estudo para a dedução da estrutura do CF sintético foi feito por Pohland et al. (25) que, pela comparação do espectro de absorção em ultra violeta, concluiu que o anel pirazínico era reduzido e, por meio de titulações, mostrou que o grupo fenólico estava ligado ao anel piridínico em posição 5.

Allen et al. (26,27) concluíram, por estudos polarográficos que o ácido folínico SF era constituído de uma metade 5,6,7,8- tetrahydropteroil.

Todos estes dados forneceram a determinação da estrutura do fator citroverum sintético como sendo 5-formil-5,6,7,8-tetrahydropteroilglutâmico, cujos sinônimos são "fator citroverum (CF), ácido folínico SF e leucovorina".

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

A) - PROPRIEDADES GERAIS

As propriedades gerais do Pfe Glu estão apresentadas na Tabela IV (28)

TABELA IV

Fórmula empírica (a)	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆
Peso molecular	441.4
Côr	amarelo
Cristais	em forma de folíolos em lança (b)
Solubilidade em água (c)	
ácido livre	10mg/l a 0º; 500mg/l a 100º
sal dissódico	15mg/l a 0º
Rotação óptica	$[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$ em NaOH 0,1 N à concentração de 7,6g/l
Ponto de fusão	Escurece e carboniza a 250º
Absorção máxima (pH 13)	256 mμ E=30x10 ⁶ cm ² /mol 232 mμ E=20x10 ⁶ cm ² /mol 365 mμ E=9.8x10 ⁶ cm ² /mol
Valores de pK _a (d)	5,0 , 8.2

a) - amostra dessecada abaixo de 140º contendo 2 moles de H₂O

b) - cristalização à partir da água

c) - insolúvel, relativamente, em muitos solventes orgânicos
lentamente solúvel em ácido acético

d) - insolúvel abaixo de pH 5

O Pte Glu seca-se à temperatura moderada e à pressão atmosférica contendo uma quantidade de H_2O correspondente a dihidrato: a 145° em alto vácuo perde sua água de cristalização tornando-se higrométrico.

B) - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS

I - Espectro de absorção ultra violeta

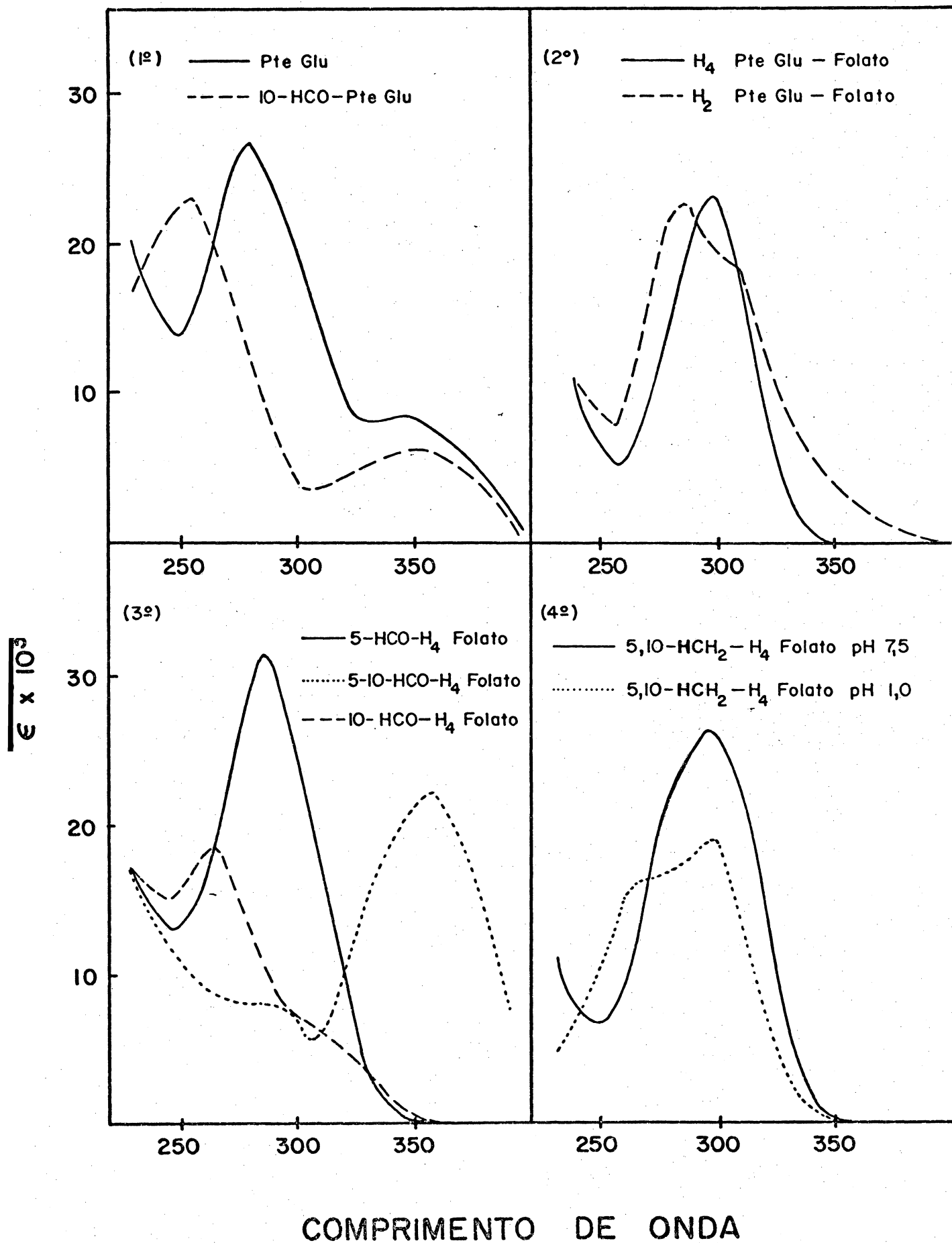
O Pte Glu tem espectro de absorção característico no ultra violeta altamente influenciado pelo pH. Apresenta um pico máximo a 256, 282 e 365 m μ em solução de hidróxido de sódio 0,1 N. Os picos a 256 e 265 m μ são devidos à porção pteridina da molécula, o pico a 282 m μ é devido ao ácido p-aminobenzóico.

O ácido glutâmico exerce pouco efeito sobre espectro de absorção registrado em ultra-violeta, assim a adição de mais um ácido glutâmico não troca a posição do pico de absorção.

Os espectros de absorção do ácido fólico, dihidrofólico, tetrahydrofólico e derivados como formil e hidroximetilfolatos, estão apresentados no Quadro I, onde a pH neutro o ácido tetrahydro e hidroximetiltetrahydrofólico tem picos idênticos. A pH ácido, o pico do hidroximetiltetrahydrofólico é a 290 m μ e a 270 m μ o pico do ácido tetrahydrofólico. (Quadro I pag. 10) (28)

QUADRO I

ESPECTRO DE ABSORÇÃO



II - Espectro fotofluorimétrico

As medidas do espectro de absorção e fluorescência das pteridinas são propriedades de grande valor para a caracterização das estruturas do Pte Glu e suas coenzimas.

As mudanças no espectro promovem meios convenientes para seguir reações enzimáticas envolvendo estas substâncias, isto é, no caso da transformação enzimática do ácido fólico para 10-CHO-fólico e ácido H₂Pte Glu, se estabelece através da leitura da fluorescência dos produtos formados. (29)

Em 1963, Uyeda et al. (30), relatam que dihidrofolatos e todos os tetrahydrofolatos derivados, possuem extinção máxima entre 300 a 320 mμ e fluorescência máxima entre 360 a 425 mμ, exceto o ácido 5,10-meteniltetrahydrofolato.

Examinando, ainda, os folatos e compostos relacionados, mostraram ativação máxima de 360 a 380 mμ e fluorescência máxima a 450- 460 mμ. Observaram que a intensidade da fluorescência do tetrahydrofolato aumenta em soluções ácidas, propriedade esta que proporciona método altamente sensível para uma determinação quantitativa de tetrahydrofolato. A Tabela V, apresenta os dihidro e tetrahydro derivados examinados apresentando as fluorescências e excitações máximas.

TABELA V

Propriedades de fluorescência do tetrahydrofolato e compostos relacionados

Composto	Excitação max. mμ	Fluor. max. mμ	% T (a)	pH ótimo	pH (b)	Conc. mM
tetrahydrofolato	305,310	360	1600	3	2-10	0.0038
5-formiltetrahydrofolato	314	365	32	7	7-9	0.05
10-formiltetrahydrofolato	313	360	47	7	7-9	0.007
5,10-meteniltetrahydrofolato	370	470	500	4	3-6	0.0088
5-formiminotetrahydrofolato	308	360	5	7	7-8	0.00385
4-amino-4-deoxitetrahydrofolato	308	360	4	2	2-7	0.004
2-amino-4-hidroxi-6-metil-tetrahydropteridina	-	-	0	-	2-9	0.05
2-amino-4-hidroxitetrahydropteridina dihydrofolato	-	-	0	-	2-9	0.05
dihydrofolato	317	425	32	9	5-9	0.011
folato	363	450-460	1	9	2-9	0.05
10-formilfolato	364	" "	140	9	2-9	0.05
pteroato	375	" "	4	9	6-9	0.05
4-amino-4-deoxifolato	385	" "	25	7	2-7	0.0025
2-amino-4-hidroxipteridina	353	450	120	8	6-8	0.025
2-amino-4-hidroxi-6-metilpteridina	355	450	1200	8	6-8	0.005
2-amino-4-hidroxi-6-carboxaldeidepteridina	360	450	22	9	2-9	0.05
2-amino-4-hidroxi-6-carboxipteridina	360	450	160	8	6-8	0.025
p-aminobenzoilglutamato	310	360	2	6	2-7	0.05

a) - Valores expressos em termos de transmissão % de uma solução padronizada a 1 mM para a escala fotomultiplicadora 0,01 do Espectrofotofluorômetro Aminco-Bowman, fixado para uma sensibilidade de 40.

b) - Os testes foram executados a intervalos de uma unidade de pH entre os limites mostrados.

C) CARACTERÍSTICAS CROMATOGRAFICAS

Os métodos de separação por cromatografia em papel são usados, também, para os produtos de hidrogenação de ácido fólico. A técnica é desenvolvida em fosfato dibásico de potássio 0,1 M (K_2HPO_4); em condições de baixa pressão de O_2 , aparece uma série de manchas azuis fluorescentes. Os valores do R_f destas manchas dependem dos solventes empregados para hidrogenação.

O ácido dihidrofólico formado em álcali diluído mostra, somente, uma mancha fluorescente sobre cromatografia (31)

D) - CARACTERÍSTICAS DAS REAÇÕES QUÍMICAS

I - REDUÇÃO A ÁCIDO DIHIDROFÓLICO

O ácido fólico e as pteridinas são, prontamente, hidrogenizáveis sendo, entretanto, reoxidados pelo oxigênio atmosférico.

O'Dell et al. (32) demonstraram redução do ácido Pte Glu em solução alcalina em presença de um catalizador, o óxido de platina. Observaram que um mol de hidrogênio era utilizado nesta redução, formando um produto colorido, o ácido dihidrofólico.

Furthermann, (33) preparou-o pela redução enzimática do Pte Glu com hidrosulfeto de sódio em solução a pH 6, em presença de ácido ascórbico.

O ácido H_2Pte Glu oxida-se em solução alcalina, ou abaixo de pH 5 exposto ao ar, formando o ácido fólico e produtos de degradação não identificados. (29) Em solução ácida a reoxidação se dá lentamente e os produtos de degradação são amarelos de comprimento de onda máxima à 420 mμ.

A atribuição da estrutura do produto reduzido nas posições 7,8 e não às posições 5,6, foi originalmente, feita com base em evidência química indireta. Se isoxantopterina (Fig. 11) não pode ser reduzida por hidrogenização catalítica, ambas duplas enólicas à posição 7,8 e 5,6 são refratárias, mas xantopterina (Fig. 12), entretanto, é reduzida para forma dihidro. Daí se deduzir que a dupla enólica à posição 5,6 seria não reativa e a redução provavelmente, ocorre, na posição 7,8 (32).

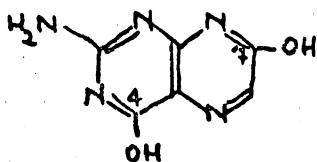


Fig. 11 - Isoxantopterina

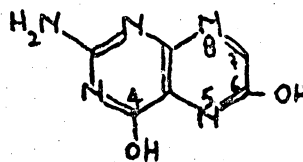


Fig. 12 - Xantopterina

Osborn et al. (34) relataram redução enzimática do ácido dihidrofólico, com informações referentes a sua estrutura. Pelo fato de que o $H_2Pte\ Glu$ reage 100% no sistema dihidro redutase, afirmaram fortemente que nenhum hidrogênio no dihidrofólico está na posição 6 e sim nas posições 7,8. Sendo estabelecida sua estrutura como mostra a (Fig. 13)

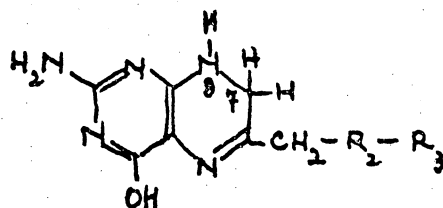


Fig. 13 - Ácido dihidrofólico

II - REDUÇÃO A ÁCIDO TETRAHIDROFÓLICO

A redução catalática do $Pte\ Glu$, adicionando dois moles de hidrogênio, com óxido de platina em uma variedade de solventes forma o ácido tetrahidrofólico ($H_4Pte\ Glu$). A redução pode ser ainda, executada em ácido acético glacial, em soluções aquosas neutras ou em ácido fórmico 98%. (Fig. 14)

Embora o ácido fólico seja solúvel neste último solvente, a média de redução é consideravelmente mais rápida do que em ácido acético glacial.

A obtenção do $H_4Pte\ Glu$ em laboratório, (35) a partir de redução da mistura por precipitação com éter em condições anaeróbicas ou pela remoção de ácido acético glacial por liofilização, dá inicialmente um produto branco e sólido, tornando-se acizentado ao se decompor pela exposição ao ar. Esta decomposição é evitada armazenando-o a vácuo a -10° .

O produto obtido pela liofilização, mostra uma absorção máxima a 298 $m\mu$ quando em solução neutra preparada recentemente. Em ausência de agentes redutores o composto torna-se instável apresentando o pico em 280-278 $m\mu$.

Em solução neutra o $H_4Pte\ Glu$ rapidamente, converte-se a $H_2Pte\ Glu$, e a subsequente oxidação é consideravelmente lenta, porém em presença de oxidantes como MnO_2 , MnO_4 e I_2 , oxida o anel pteridínico reduzido.

O ácido fólico contém um carbono assimétrico na metade ácido glutâmico, que não influencia na redução, e o produto formado contém igual quantidade dos dois isômeros. Comercialmente, o ácido fólico é preparado a partir de ácido L-glutâmico, sendo o produto, referido como ácido L-fólico. Ao se reduzir o ácido L-fólico produz o dl (L) - $H_4Pte\ Glu$ (tetrahydropteroylglutâmico): dl refere-se à configuração do anel tetrahydropteridina ao C-6 ; L refere-se à configuração da metade ácido glutâmico. (3)

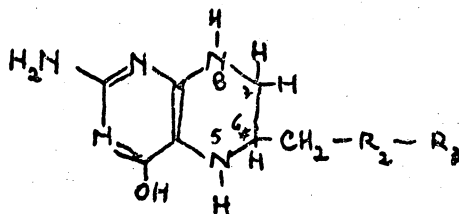


Fig. 14 - Ácido tetrahidrofólico

III) - FORMILAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO

Os ácido fólico e ácido pteréico, são formilados quando tratados com ácido fórmico a 98% dando, respectivamente, ácido 10-formilfólico e ácido 10-formilpteréico. O grupamento formil da molécula pode ser removido com NaOH 0,1 N, à temperatura ambiente ou quando aquecido em pH 10 - 12.

Por redução catalítica do ácido 10-formilfólico em ácido fórmico, ácido acético ou em solução aquosa e aquecido em solução alcalina, obtém-se o ácido 5-formiltetrahidrofólico (Fig 10). Este produto, também, é obtido pela redução do ácido fólico em ácido fórmico aquecido em solução alcalina. Em ambas as reações presume-se ser o produto primário de redução o ácido 5-formiltetrahidrofólico (sintético), possuindo um centro assimétrico no C-6 da metade tetrahydropteridina, diferindo assim, daquele isolado de produtos naturais.

Uma mistura sintética de diastereoisômeros foi, parcialmente, separada, sendo um dos isômeros de forma 1L-isômero e o outro dL, obtido em forma pura apresentando atividade para micorganismos igual ao natural (fator citrovorum) (36) (Fig. 15)

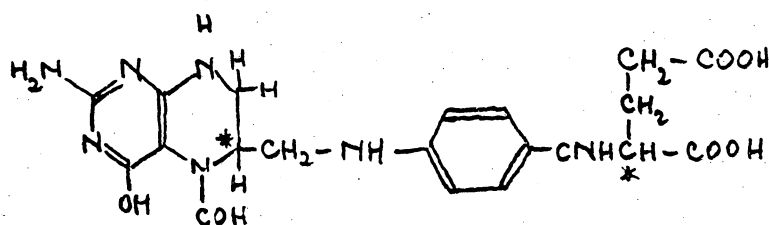
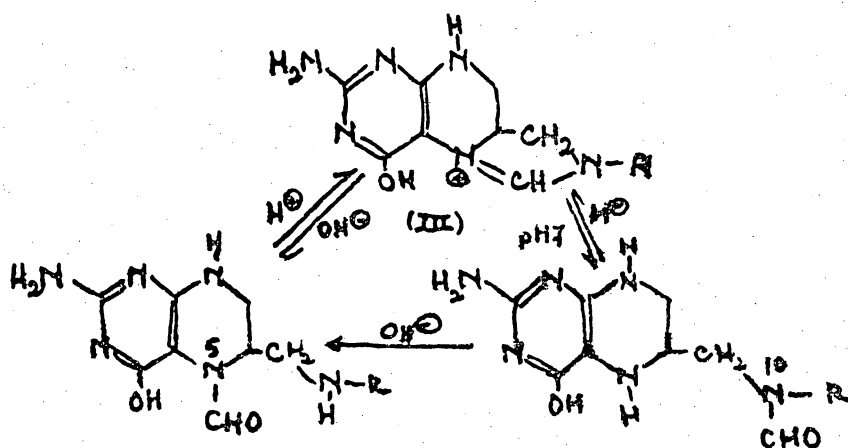


Fig. 15 - Ácido 5-formil-dl-5,6,7,8-tetrahydropteroil-L-glutâmico

O ácido 5-formiltetrahidrofólico e o ácido 10-formiltetrahidrofólico perdem uma molécula de água em presença de ácido, formando o ácido 5-10-metiltetrahidrofólico (Esquema 1) que é, também, chamado anidroleucovorina ou fator anidrocitrovorum. A interconversão destes compostos mostra o esquema.



Esquema I - Interconversão de compostos

O composto III, tem características de absorção máxima a 350 mμ em solução ácida. (3)

Kaufman et al. (37) separaram dois diastereoisômeros do 5,10-metilenotetrahidrofolato em coluna de trocas iônicas com di ou tri-etilaminoetil celulose. Observaram que o LL-isômero, é quase 100% ativo para microrganismos e serve como substrato para reações enzimáticas de dehidrogenase e redutase. O DL-isômero é inativo tanto para um como para outro processo.

BIOSSÍNTESE - MECANISMO DE FORMAÇÃO

I) - ÁCIDO GLUTÂMICO

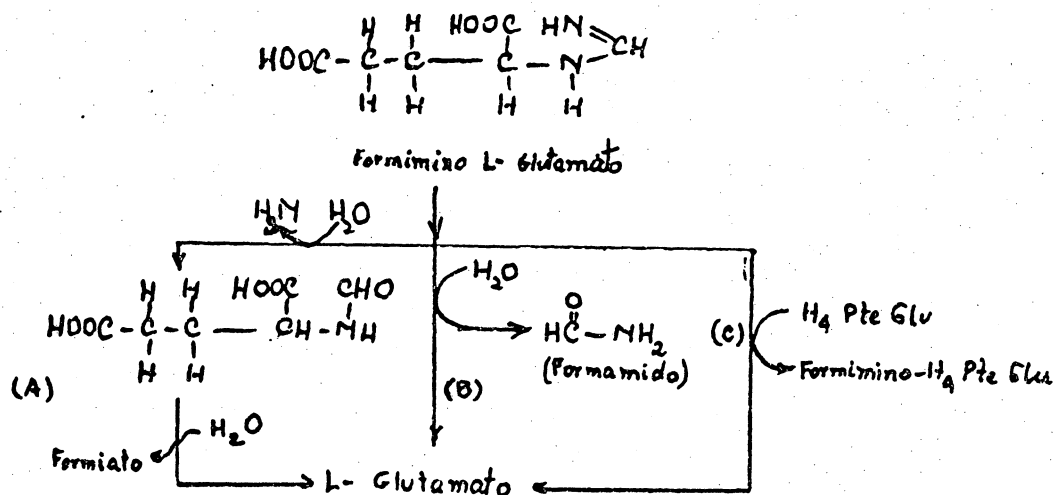
Há várias vias de formação do ácido glutâmico, composto chave no metabolismo em plantas e animais: por transaminação na via do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, catabolismo da histidina, carboxilação do gama-aminobutirato e por deaminação de glutamina.

A partir da histidina, a formação do ácido glutâmico tem uma via comum até a formação do formimino-L-glutamato (Esquema LL), variando, daí por diante, de acordo com o microrganismo usado.

Em Pseudomonas fluorescens, é removida a amônia, hidroliticamente dando o formil-L-glutamato que, hidrolizado, dá formiato e L-glutamato (parte A do esquema).

Em Aerobacter aerogenes e Clostridium tetanomorphum, o N-formimino-L-glutamato é, diretamente hidrolizado dando formimida e L-glutamato, (parte B do esquema).

Em fígado, o ácido glutâmico é formado a partir do N-formimino-L-glutamato, pela transferência do formimino para o ácido tetrahidrofólico produzindo o ácido 5-formimino tetrahidrofólico mais o L-glutamato, (parte C do esquema) (38).

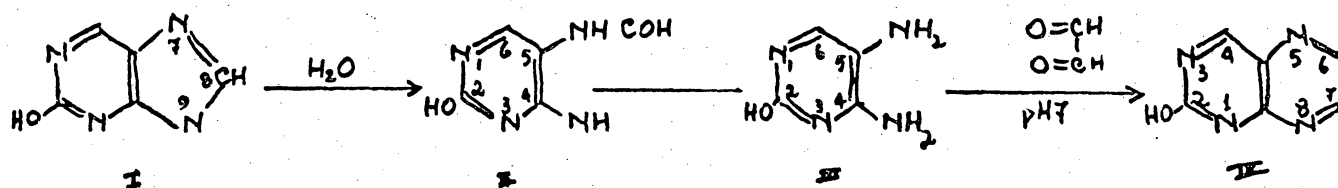


Esquema II - Mecanismo de formação do ácido glutâmico.

II) - PTERIDINA

A semelhança estrutural do núcleo de pteridina com a do núcleo de purina, pois em ambos os casos o anel de pirimidina vem ligado ao anel heterocíclico contendo dois átomos de N, levou Albert (39) a sugerir que, numa conversão química, as purinas poderiam ser precursoras de pteridinas.

Em 1957, Albert (40) apresentou um esquema em que uma 2-hidroxi-purina (I), por hidrólise de seu anel imidazólico, abre-se dando o 4-amino-5-formamida-2-hidroxipirimidina (II). Este formil derivado perde o grupo formil quando autocatalizado pelos ions H^+ liberados do ácido fórmico, possivelmente, dando 4-5-diamino-2-hidroxipirimidina (III) que, combinada com glicoxal, dá 2-hidroxipteridina (IV). Admitiu, ainda, que estas reações integrassem sistemas biológicos.



Esquema III - Síntese do anel pteridínico

Hartman e Buchanan (41), estudando a biogênese de purinas, observaram que os dois anéis da pteridina originam-se pela entrada de glicina e subsequentes adições de CO_2 e formiato, produzindo o componente pirimidina.

Weygand e Waldschmidt (42), injetando glicina marcada na carboxila com C^{14} e formiato com C^{14} em larvas de borboletas, observaram que estes compostos eram incorporados ao pigmento da pteridina e leucopterina, isolados das asas das borboletas adultas. Os resultados observados levaram à conclusão de que os átomos da posição 8a, 4a e 5a eram derivados da glicina. O átomo da posição 4 derivado do CO_2 , originado da carboxila da glicina, via ácido glioxílico; o átomo da posição 2 provinha do formiato e os átomos das posições 6 e 7 da glicose. Isto sugeria que purinas e pteridinas são formadas por semelhantes vias biossintéticas. (Fig. 16)

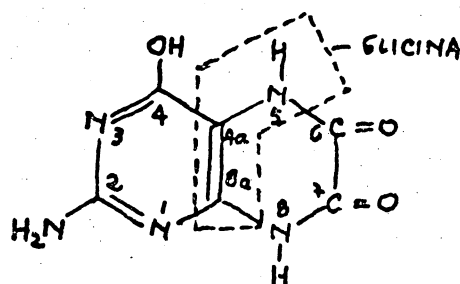
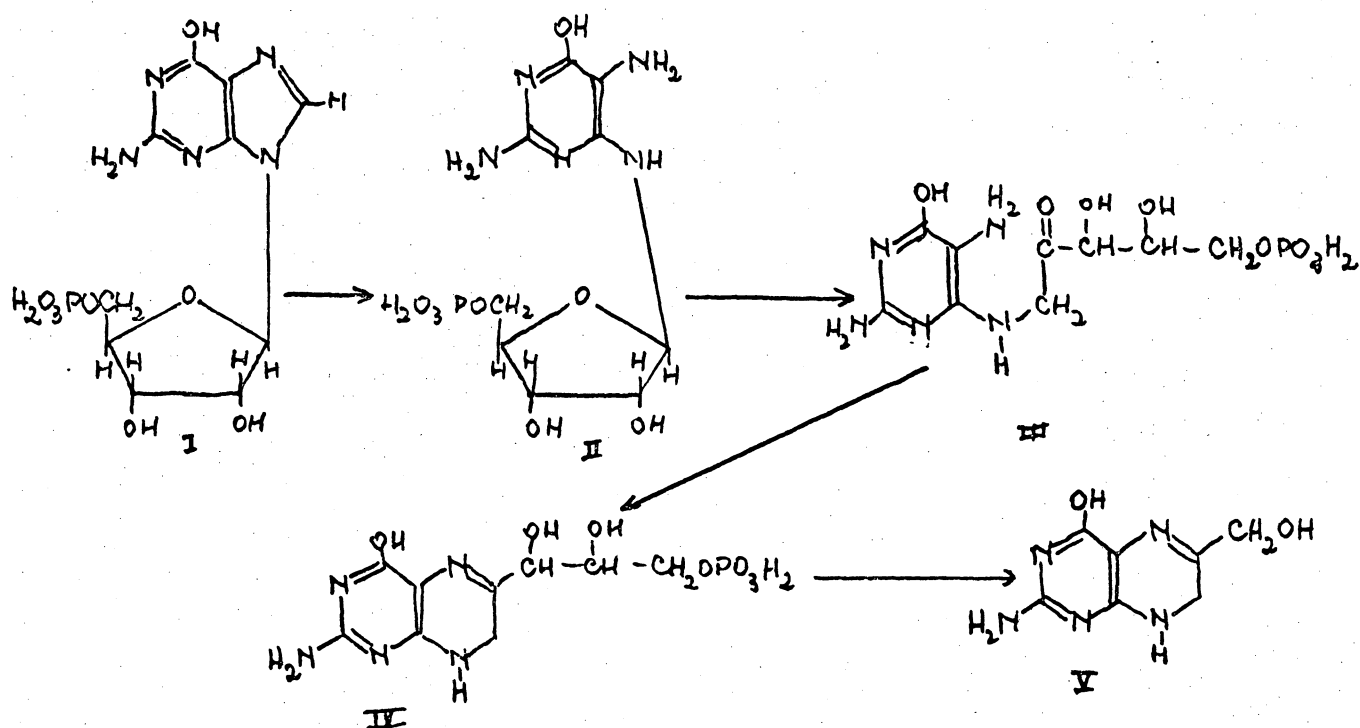


Fig. 16 - Leucopterina

Vieira e Shaw (43) estudaram a biogênese de folatos em células de Corynebacterium, a partir da adenina-2-C¹⁴, observando sua incorporação em ácido pteroiltriglutamato que, em coluna cromatográfica, apresentou alta radioatividade da purina em posição 2; concluíram que tais purinas são precursoras de anel pteridina do ácido fólico e a formação do referido anel envolve a remoção do C-8.

Jaenick (cf.ref.38,44), usando ribose marcada em Corynebacterium, verificou sua incorporação nos C-6 e C-7 na porção pteridina do ácido fólico e do ácido pteroiltriglutamato, sendo que provinham dos C-1 e C-2 da ribose.

Reynolds e Brown (45), usando extrato livre de células de E.coli, demonstraram a síntese enzimática de pteridinas que podem catalizar a conversão de guanosina nucleotídeos (GMP, GDP, GTP) a folatos derivados. Apresentaram um esquema de reação, possivelmente ocorrida, formando o precursor da pteridina do ácido fólico. Nenhuma evidência obtiveram da natureza da unidade de 1-C removido na etapa enzimática que ocorre na metade guanina.



Esquema IV - Síntese enzimática de pteridina

O composto de 1-C poderia ser removido ao se dar a oxidação do ácido fórmico, reque-
rendo talvez o ácido tetrahidrofólico como coenzima, entretanto, adições da coenzi-
ma na mistura de reação não afetam as quantidades de guanosina e GMP convertidos em
folato.

A formação do composto III, envolve um rearranjo de Amadori na
porção ribose do composto II. O precursor do ácido fólico no sistema enzimático do
E. coli, é o composto IV defosforilado.

CONCLUSÃO: Uma guanosina nucleotídeo é o mais direto precursor de pteridi-
nas. O uso de substratos radioativos trouxe as seguintes informações:

a) Guanosina marcada, uniformemente, com C¹⁴, incorpora, efe-
tivamente, no composto pteridina (ácido dihidrofólico) obtido como produto enzimá-

enzimático;

b) Guanosina-8-C¹⁴, incorpora no ácido dihidrofólico mas o produto não é radioativo.

c) Quando várias espécies de ribose-C¹⁴, são adicionados em misturas reativas com guanina fria, verifica-se que C-1 da ribose é incorporado no produto pteridina.

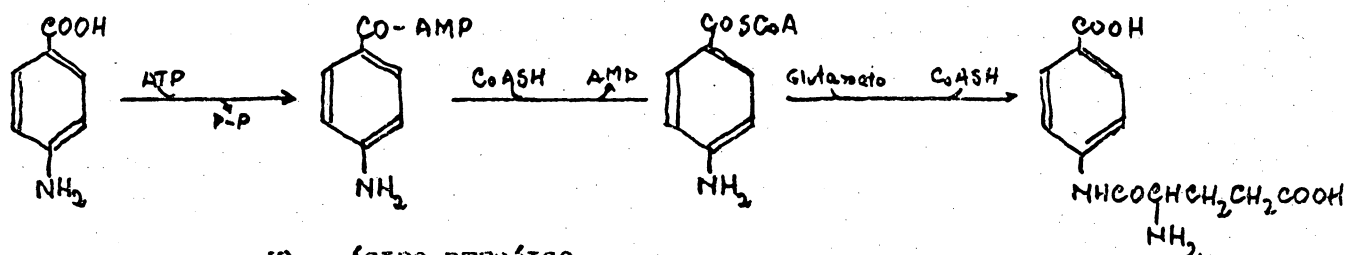
III) - ÁCIDO p-AMINO BENZÓICO

O ácido shiquímico tem sido identificado como chave intermediária da biossíntese dos aminos ácidos aromáticos e ácido-p-aminobenzóico.

Os estudos enzimáticos da conversão do ácido-5-fosfoshiquímico em ácido p-aminobenzóico com glutamina como amino doador específico foram feitos em extrato livre de células de levedura de padreiro. O mecanismo está, totalmente, elucidado sabendo-se que a amida-N da glutamina é transferida para o ácido 5-fosfoshiquímico. (Srinivasan e Weiss cf. ref. 38)

IV) - p-AMINO BENZOIL GLUTAMATO

A formação do p-aminobenzoilglutamato, a partir do ácido p-aminobenzóico, glutamato, ATP, Mg⁺⁺ e CoA, tem sido relatado por Katunuma et al. (cf. ref. 38) com extrato livre de células de *Mycobacterium avium*. Incubando-se a mistura sem glutamato, ocorre uma reação positiva hidroxâmica (rearranjo de Lossen), indicando a formação de uma CoA derivada do ácido p-aminobenzóico. Considera-se que a reação envolve, também, um aciladenilato, como na reação indicada no esquema abaixo:



Na biossíntese do ácido fólico em sistemas de *L. arabinosus* e *E. coli*, substituindo-se p-aminobenzoilglutamato por p-aminobenzoato ou p-aminobenzoato + L-glutamato, forma-se igualmente o ácido pteróico.

A partir de 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-dihidropteridina e p-aminobenzóico em presença de ATP e Mg⁺⁺ (sistema de Brown), forma-se também o ácido dihidropteróico, sendo que a reação é inibida por sulfamidas. (46)

VI) - REAÇÕES DE CONDENSACÃO

As reações de condensação são hipotéticas, não se tendo evidenciado se a pteridina se condensa com p-aminobenzoilglutamato ou se o ácido pteróico condensa-se com o glutamato. Foram postuladas duas reações referentes a biossíntese do ácido fólico, ambas reações, possivelmente, existentes in vivo.

Katunuma et al., Shiota, Brown et al. (cf.ref. 38), demonstraram respectivamente em sistemas livre de células em Micobacterium avium, Lactobacillus arabinosus, e E. coli, a ocorrência da seguinte reação:



No sistema enzimático de Brown em E. coli, observa-se a ocorrência da seguinte reação:

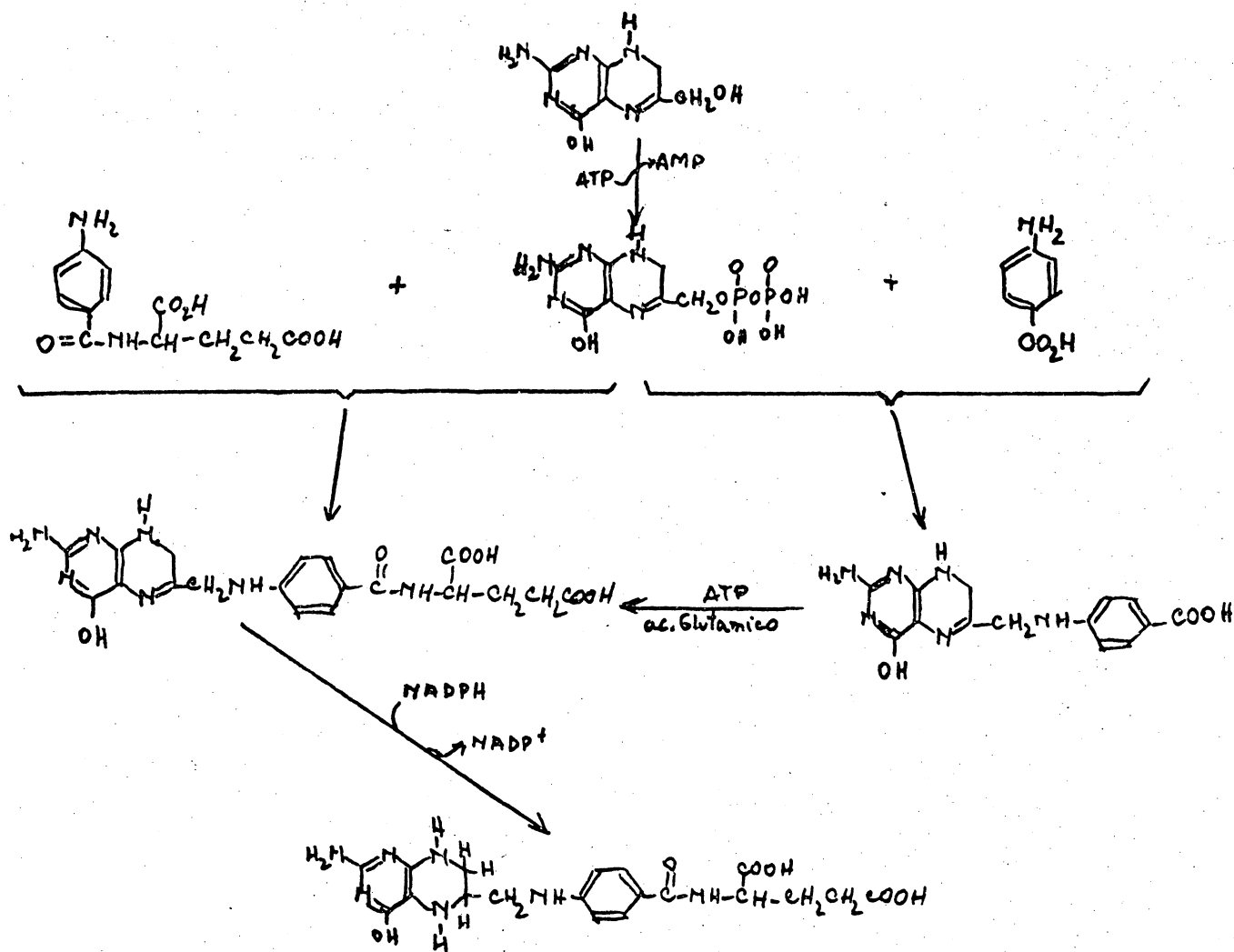


Esta reação coincide com a observação, anteriormente citada, de que o p-aminobenzoato é substrato mais efetivo para o ácido pteróico do que o p-aminobenzoilglutamato e é para a síntese de ácido fólico.

VII) - BIOSÍNTESE DOS ÁCIDOS DIHIDROFÓLICO E TETRAHIDROFÓLICO

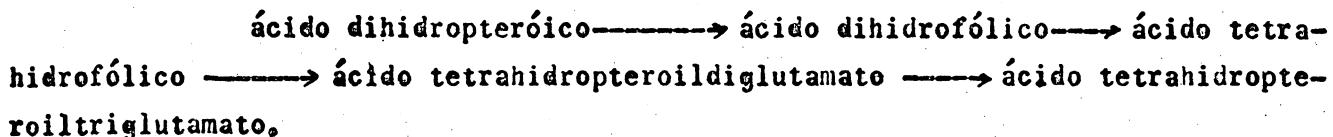
Weisman e Brown, (47) isolaram duas proteínas de E. coli, que sintetizam o ácido dihidrofólico a partir do 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-dihidropteridina e p-aminobenzoico ou p-aminobenzoilglutâmico, respectivamente. Uma fração cataliza a conversão do composto (I) em presença de ATP dando um produto éster difosfato (intermediário). A outra fração, com p-aminobenzoico, converte o produto intermediário em dihidropteroato (VI) ou dihidrofolato sem requerer ATP. A atividade das duas frações protéicas, catalizando o acoplamento da dihidropteridina derivada com p-aminobenzoilglutamato, é mais instável do que aquela reação promovida com p-aminobenzoato (III).

A formação de dihidrofolato pode ocorrer por etapas sucessivas de adição de p-aminobenzoato e glutamato, ou pela condensação de pteridina com p-aminobenzoilglutamato conforme mecanismo proposto por Katunuma et al. (cf. ref.38) em Mycobacterium avium.



ESQUEMA V - Biossíntese de ácido dihidro e tetrahidrofólico

Não se conseguiu, em *E. coli*, nenhum sistema enzimático que condensasse ácido dihidropteróico com ácido glutâmico dando ácido dihidrofólico. A formação de ácido tetrahidropteróiltri-glutamato, a partir de ácido dihidropteróico, ocorre por adições sucessivas do ácido L-glutâmico em presença de ATP seguindo o estabelecido por Griffin e Brown (48) cujos trabalhos levaram a concluir a seguinte via de biossíntese do ácido tetrahidropteróiltri-glutamato:



FUNÇÕES DAS COENZIMAS DO ÁCIDO FÓLICO

Utilizada por uma classe de enzimas conhecidas com o nome geral de "pteroproteínas", o ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico é uma coenzima essencial para o metabolismo de unidades de 1-C. Sua função tem distintas contribuições:

1) age como transportador de unidade de 1-C, ocorrendo em estágios: primeiro, consiste na aceitação de uma unidade de 1-C e a formação de compostos primários, formiltetrahidrofólico, formiminotetrahidrofólico e hidroximetiltetrahidrofólico; o segundo estágio consiste na ativação destes compostos, numa série de isomerizações ou reações de hidrólise e o terceiro, consiste na doação de unidades de 1-C para um aceitador apropriado.

2) age como substrato para oxi-redução da unidade de 1-C. Esta função consiste na interconversão de hidroximetiltetrahidrofolatos a formiltetrahidrofolatos. A reação é reversível e as enzimas que a catalizam utilizam piridina nucleotídeos como coenzima.

3) age como coenzima para redução da unidade de 1-C, de um substrato hidroximetilado para seu homólogo metilado. Esta reação pode ser acoplada com a oxidação de $H_4Pte\ Glu$ para $H_2Pte\ Glu$.

A transferência dessas diferentes unidades de 1-C se dá em três categorias: a) radical formila $-CH=O$, e o radical formimina $-CH=NH$, são unidades transportadas ao nível de oxidação do formiato;

b) radical hidroximetila $-CH_2OH$, transportada ao nível de oxidação do formaldeído;

c) radical metila $-CH_3$, obtido pela redução do grupo $-CH_2OH$.

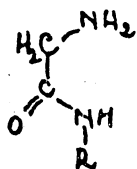
Constituem importantes transformações metabólicas a transferência destas unidades de 1-C de um substrato a outro ou sua mútua interconversão.

As principais reações catalizadas pela coenzima do ácido fólico classificam-se em duas diferentes séries, de acordo com a natureza do substrato sobre o qual atuam.

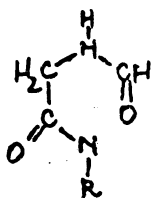
A) No metabolismo de ácidos nucleicos:

a) As transformações envolvidas na síntese "de novo" de purinas, em que o tetrahidrofólico é o cofator que introduz os átomos de C-2 e C-8 das purinas. (1)

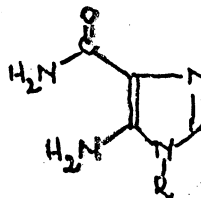
b) cataliza a formilação de glicinamida ribotídeo (GAR) e 5-amino-4-imidazol-carboxamida ribotídeo (AICAR) para respectivamente, formil glicinamida ribotídeo (FGAR) e 5-formamido-4-imidazol-carboxamida ribotídeo (FAICAR) (49).



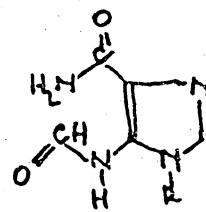
GAR



FGAR

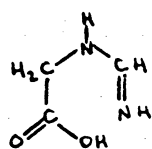


AICAR

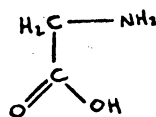


FAICAR

c) As transformações envolvidas no catabolismo de purinas: na degradação de xantina, formiminoglicina (FIG) transforma-se em glicina (G) pela enzima formimino transferase de FIG, chamada Enzima I, que utiliza $H_4Pte\ Glu$ como coenzima (50).

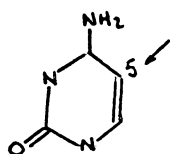


FIG



G

d) Na síntese de timina e 5-metilcitosina, a coenzima cataliza a metilação de deoxiribotídeo de uracil para ácido timidílico e introduz o grupo hidroximetila na posição 5 do ácido citidílico, na síntese do 5-metilcitosina (51,52)



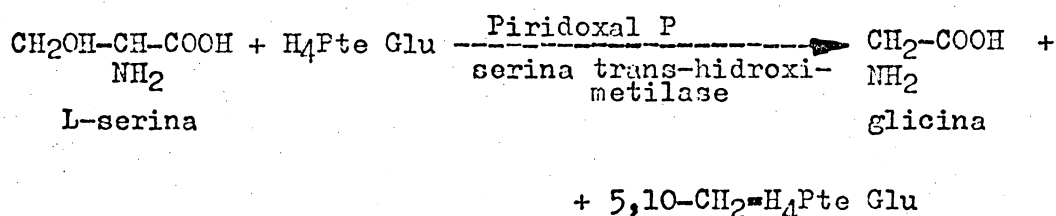
Ácido citidílico

B) No metabolismo de proteínas:

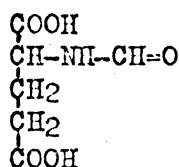
a) A interconversão dos amino ácidos serina-glicina, em que a coenzima transfere o grupo hidroximetil da serina para glicina. Embora seja reversível a transformação de serina em glicina, a reação torna-se mais complexa, seguindo uma diferente via na transformação glicina em serina. (53)

A transformação serina em glicina é catalizada pelo piridoxal fosfato, envolvendo a formação da base de Schiff entre esta coenzima e o amino ácido. O $H_4Pte\ Glu$ transfere uma unidade de 1-C à glicina. Este aceitador do grupo hidroximetil forma uma base de Schiff (glicina e piridoxal), representando a forma ativa da glicina (54). O piridoxal fosfato é requerido pela enzima de fígado (67)

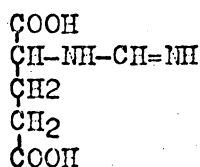
A reação serina-glicina é catalizada pela serina transhidroximetilase (68):



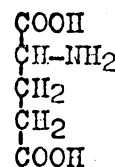
b) Transformação de histidina em ácido glutâmico. Numa das etapas dessa transformação, a coenzima cataliza a saída do grupo de 1-C transformando ácido N-formilglutâmico e N-formiminoglutâmico em ácido glutâmico (55).



FGLU



FIGLU



GLU

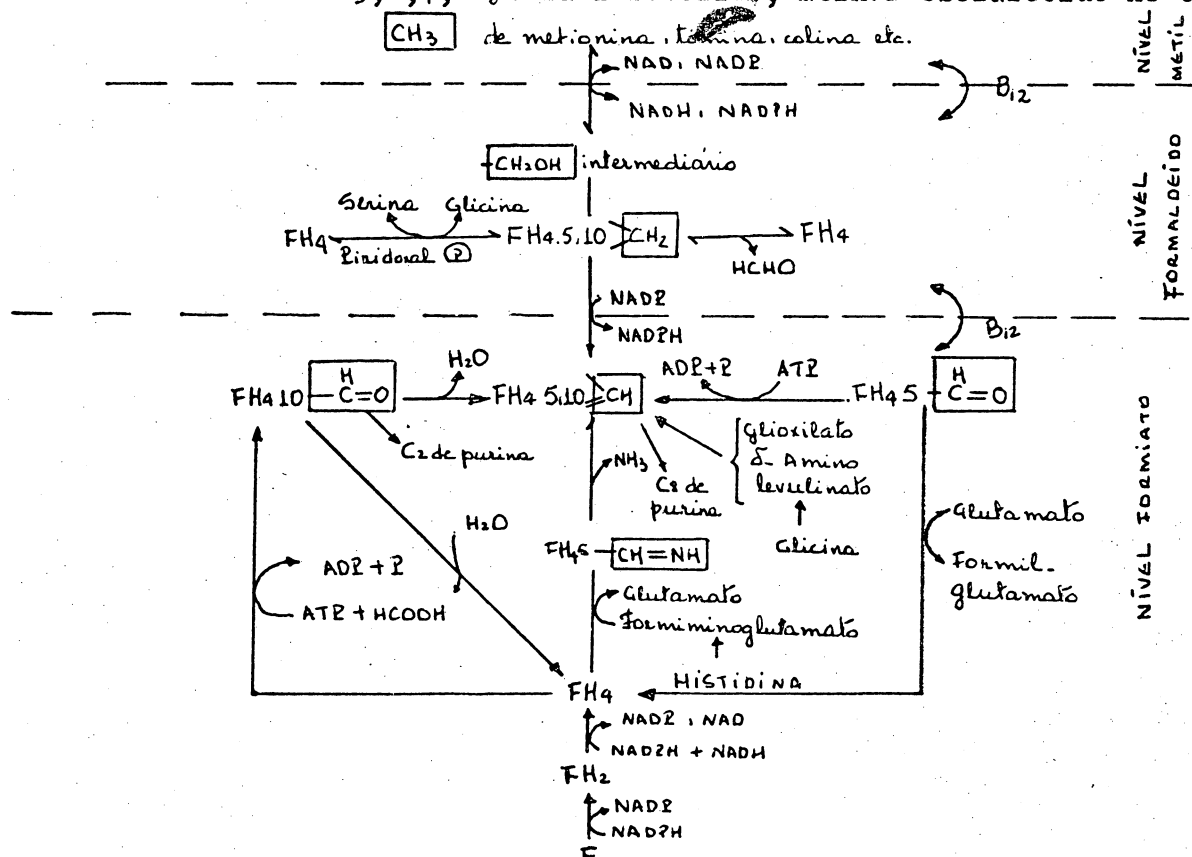
c) Na síntese de colina e metionina, o $H_4Pte\ Glu$, é coenzima necessária para doar metil grupos a metionina e colina, mas sua função não está definitiva-

mente estabelecida. A síntese de metionina pode ser obtida pela transferência do grupo metil. O mecanismo desta reação envolve transmetilação via complexo S-adenosilmetionina para homocisteína. (56)

A síntese de colina se dá pela transmetilação para etanolamina e para seu mono e di metil derivados (57).



Nestas funções metabólicas de unidade de 1-C chamadas "formiato ou formil" e "formaldeído ou hidroximetil", a coenzima que transporta fragmentos formila e hidroximetila é o ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, melhor esclarecido no esquema: (58)



Esquema VI: Metabolismo de fragmentos de 1-C
F, FH2, FH4 = ácidos fólico, di e tetrahidrofólico

O formaldeído livre (derivado da oxidação de grupos metílicos da sarcosina e dimetilglicina) e o beta C da serina são fontes diretas do fragmento hidroximetil. O formiminoglutâmato, metabólito da histidina é a fonte do fragmento formimino. No esquema o esboço dos doadores e aceitadores de unidade de 1-C e o modo de seu transporte são mostrados nos três níveis de oxidação:

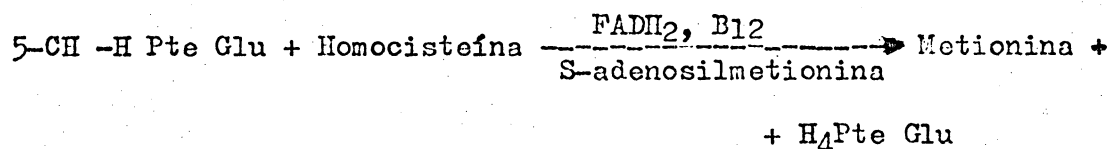
- Ao nível do formiato:
- 1) um grupo formimino, transportador na posição 5 do H4Fte Glu (-CH=NH)
 - 2) um grupo formil (-CH=O), transportador nas posições 5 ou 10
 - 3) um grupo metenil (=CH), transportador de anidroformil às posições 5 e 10

Ao nível do formaldeído ou hidroximetil: o fragmento de l-C reagindo na forma

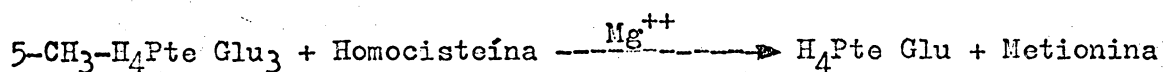
5,10-metileno sôbre o $H_4Pte\ Glu$

Ao nível do grupo metil: dois tipos de reações ocorrem na transferência de metil grupos: o primeiro envolvendo cobalamina, em mutantes de E.coli, (59) e o segundo independente da cobalamina.

Na primeira reação, o tetrahydro é a coenzima responsável e requer para o seu funcionamento cofatores tais como $FADH_2$, S-adenosilmetionina e Vitamina B_{12} , segundo a reação: (69)



Na reação independente de cobalamina, só funciona com a coenzima derivada do ácido fólico conjugado ($H_4Pte\ Glu_2$), requerendo -se nesta reação ions de Mg^{++} como ativador.



Muitas reações enzimáticas em que participam os derivados do ácido fólico têm sido estudadas; um sumário dessas reações está apresentado em Tabela VI, (3), página seguinte:

TABELA VI

Reações enzimáticas envolvendo derivados do ácido fólico

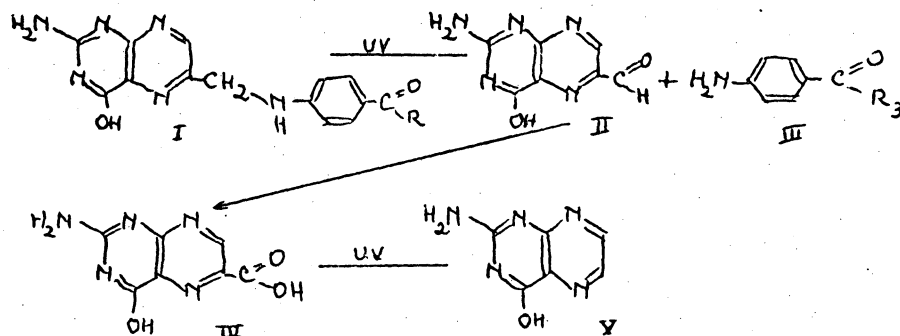
	Enzima	Reações
* THF*	THF-formilase	$\text{HCOOH} + \text{ATP} + \text{THF} \rightleftharpoons 10\text{-formil-THF} + \text{ATP} + \text{Pi}$
	Formaldeído ativo	$\text{HCHO} + \text{THF} \longrightarrow 5,10\text{-metileno-THF}$
	Formimino transferase	$\text{Formiminoglicina} + \text{THF} \rightleftharpoons 5\text{-formimino-THF} + \text{glicina}$
		$\text{Formiminoglutâmico} + \text{THF} \rightleftharpoons 5\text{-formimino-THF} + \text{ácido glutâmico}$
	Transformilase	$\text{N-formil-AICAR} + \text{THF} \rightleftharpoons 10\text{-formil-THF} + \text{AICAR}$
	Serina hidroximetilase	$\text{Serina} + \text{THF} \rightleftharpoons 5,10\text{-metileno-THF} + \text{glicina}$
	DHF redutase	$\text{THF} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{DHF} + \text{NADPH} + \text{H}^+$
10-formil-THF	10-formil-THF deacilase	$10\text{-formil-THF} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{HCOOH} + \text{THF}$
	Transformilase	$\text{GAR} + (10\text{-formil-THF}) \longrightarrow \text{N-formil-GAR} + \text{THF}$
		$\text{AICAR} + (10\text{-formil-THF}) \rightleftharpoons (\text{N-formil-AICAR}) + \text{THF} \rightleftharpoons \text{IMP}$
	THF-formilase	$10\text{-formil-THF} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{HCOOH} + \text{ATP} + \text{THF}$
5,10-metenil-THF	5,10-metenil-THF ciclohidrolase	$5,10\text{-metenil-THF} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 10\text{-formil-THF}$
	5,10-metileno-THF dehidrogenase	$5,10\text{-metenil-THF} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons 5,10\text{-metileno-THF} + \text{NADP}^+$
5-formimino-THF	5-formimino-THF ciclodeaminase	$5\text{-formimino-THF} \longrightarrow 5,10\text{-metenil-THF} + \text{NH}_3$
	Formimino transferase	$5\text{-formimino-THF} + \text{glicina} \rightleftharpoons \text{THF} + \text{formiminoglicina}$
		$5\text{-formimino-THF} + \text{ác. glutâmico} \rightleftharpoons \text{THF} + \text{formiminoglutâmico}$
5,10-metileno-THF	Serina hidroximetilase	$\text{Glicina} + 5,10\text{-metileno-THF} \rightleftharpoons \text{Serina} + \text{THF}$
	5,10-metileno-THF dehidrogenase	$5,10\text{-metileno-THF} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons 5,10\text{-metenil-THF} + \text{NADPH} + \text{H}^+$
5-formil-THF	5-formil-THF ativado (5-formil-THF isomerase)	$5\text{-formil-THF} + \text{ATP} \longrightarrow (10\text{-formil-THF ou } 5,10\text{-metenil-THF}) + \text{ADP} + \text{Pi}$
	(5-formil-THF ciclodehidrase)	$5\text{-formil-THF} + \text{ATP} \longrightarrow 5,10\text{-metenil-THF} + \text{AMP} + \text{PP}$
DHF**	DHF redutase	$\text{DHF} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{THF} + \text{NADP}^+$
Ácido fólico	Ácido fólico redutase	$\text{Ácido fólico} \xrightarrow{\text{NADPH}} \text{DHF} \xrightarrow{\text{NADPH}} \text{THF}$
	Pteridina redutase	$\text{Ácido pirúvico} + \text{CoA} + \text{ác. fólico} \longrightarrow \text{Acetil CoA} + \text{DHF} + \text{CO}_2$

* THF e ** DHF, são símbolos usados para ácidos tetrahidrofólico e dihidrofólico respectivamente.

DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO E SEUS DERIVADOS

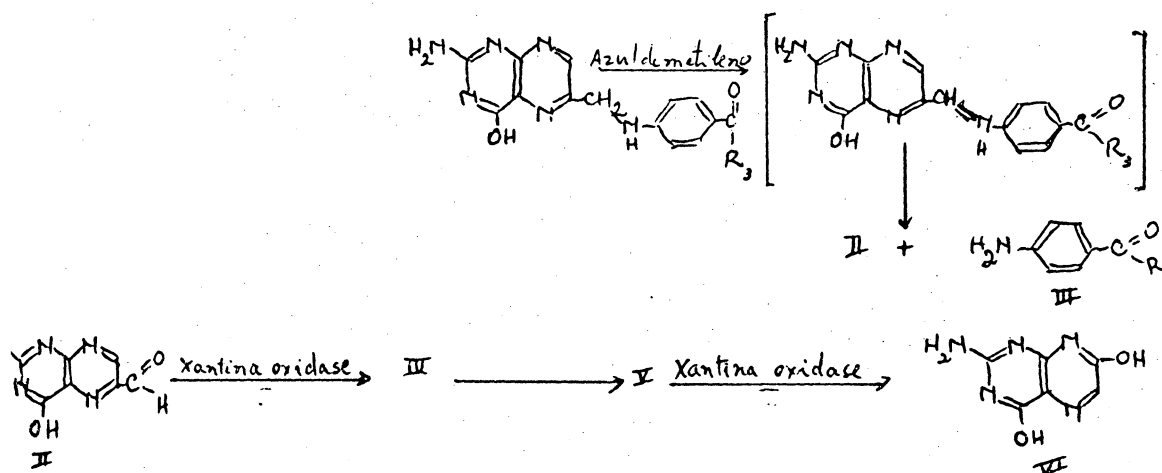
O ácido fólico, em solução levemente ácida, e irradiado pela luz ultra violeta, sofre clivagem oxidativa dando substâncias identificadas como produtos de decomposição: p-aminobenzoilglutâmico (III), e algumas pteridinas derivadas, substâncias altamente fluorescentes. O primeiro produto da fotólise é o 2-amino-4-hidroxi-pteridina-6-aldeído (II) que, por ação da luz converte-se em ácido 6-carboxil (VI) e, finalmente, 2-amino-4-hidroxipteridina (V). (60)

ESQUEMA-



A degradação do ácido fólico, em presença de azul de metileno (61) e xantina oxidase purificada em condições aeróbicas, assemelha-se à fotólise não enzimática; converte-se no primeiro produto (II), que é subsequentemente oxidado pela xantina oxidase dando ácido carboxílico correspondente (VI), oxidando, também, o 2-amino-4-hidroxipteridina (V) a 2-amino-4,7-dihidroxipteridina (VI) (isoxantopterina).

ESQUEMA-



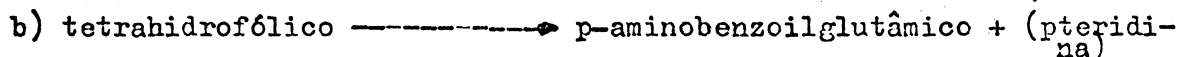
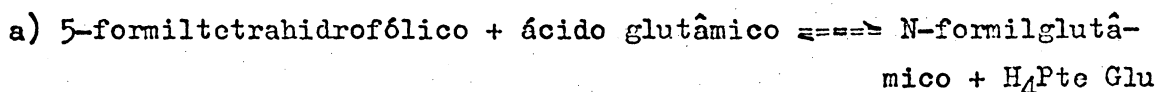
Registrou-se também, a degradação enzimática do ácido fólico por células bacterianas e homogenado de tecidos, notando-se que um dos produtos da reação é o ácido p-aminobenzoilglutâmico (62,63).

A inativação do ácido fólico e a formação de amina diazotável, requer NADP^+ , ATP e um substrato oxidável. Observou-se que, em presença de oxigênio há degradação não enzimática (64).

Preparações de fígado fazem clivagem enzimática do 5-formil-tetrahydro-

H₄Pte Glu que, degradado oxidativamente, forma p-aminobenzoilglutâmico e 6-aldeído pteridina derivada.

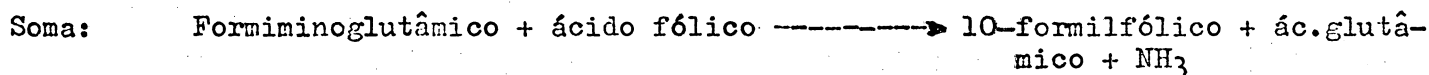
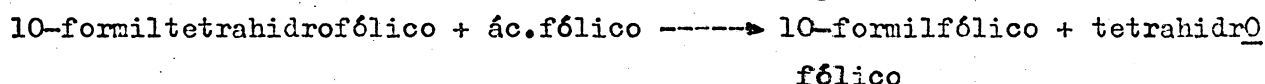
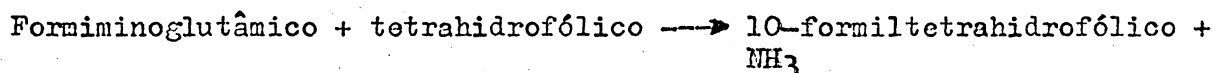
Silverman et al., (65) purificaram uma enzima do fígado de porco responsável pela degradação do 5-formiltetrahidrofólico, na qual o ácido glutâmico é requerido atuando o formil como aceitador. O N-formilglutâmico é formado, em quantidades equi valente ao 5-formiltetrahidrofólico degradado, em condições anaeróbicas.



Em a), o ácido formiminoglutâmico reage como o N-formilglutâmico dando o 10-formiltetrahidrofólico ou 5,10-meteniltetrahidrofólico, e não o 5-formiltetrahidrofólico, isto sugere que uma enzima I (formimino transferase deo FIG) é que cataliza a reação.

A conversão do ácido fólico em 10-formilfólico, foi observada quando incubado com homogenado de fígado em presença de vários doadores de um carbono como histidina e serina. Extrato de fígado de bezerro tratado em Dowex, converte ácido fólico em 10-formilfólico em presença de formiminoglutâmico e certa quantidade catalítica de tetrahidrofólico. O ácido fólico pode atuar como um aceitador de grupo formil (66).

As equações abaixo explicam a atividade catalítica do tetrahidrofólico no total da reação:



RESUMO E CONCLUSÃO

O presente estudo foi uma revisão dos exaustivos trabalhos realizados sobre o ácido fólico e suas coenzimas, atestando sua importância coenzimática no metabolismo.

Os fatos relatados para a função do ácido tetrahidrofólico como aceitador de unidade de 1-C em reações enzimáticas na ausência de ativadores, as unidades formil, formimino e hidroximetil, todos são transferidos de um substrato para o N-5 da coenzima. Entretanto, nas reações requerendo um ativador complementar, K⁺ ou ATP, a unidade de 1-C é aceita pelo N-10.

Os fatos relatados para a função como um doador de unidade de 1-C nas reações de transferência, são consideradas as verdadeiras formas ativas o ácido 10-formil e o ácido 5,10-formiltetrahidrofólico.

Os requerimentos das coenzimas fólicas são gerais para todas as células do organismo, não se achando restrito a um único sistema, já pela sua participação indispensável na biossíntese de bases puricas e pirimidicas e metabolismo de amino-ácidos.

As pesquisas feitas até o momento, muito contribuíram para esclarecer totalmente sobre as estruturas químicas, função, biossíntese, degradação.

BIBLIOGRAFIA

- (1) - Stokstad, E.L.R., (1954) The Vitamins, III, 89-109; Academic Press - N.York
- (2) - Day, P.L., Mins, V., Tobter, J.R., Stokstad, E.L.R., Hutschings, B.L., Sloane, N.H., (1945) The successful treatment of Vit.M deficiency in the monkey with highly purified L.casei factor. - J.Biol.Chem., 157, 423
- (3) - Rabinowitz, J.C., (1960) Folic Acid - The Enzymes 2, 186, Academic Press, N.York
- (4) - Jaenicke, L., English, J.P., Guest, J., and Huennkens, F.M., (1965) Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. Biochem.Biophys.Acta, 107, 11-13
- (5) - Johnson, B.C., (1946) The activity of "Lactobacillus casei factor" "Folic acid" and "Vitamin B₉" for Streptococcus faecalis and L.casei - J.Biol.Chem., 163, 255
- (6) - Hutchings, B.L., Clesen, J.J., and Stokstad, E.L.R., (1946) The L.casei factors in the nutrition of chick - J.Biol.Chem., 163, 447
- (7) - Pfiffner, J.J., Binkley, S.B., Bloom, E.S., Brown, R.A., Bird, O.D., Emmett, A.D., (1943) Isolation of the antianemia factor (Vit.B₉) in crystalline form from liver. Science, 97, 404
- (8) - Binkley, S.B., Bird, O.D., Bloom, E.S., Brown, R.A., Calkins, D.G., Campbell, C.J., Emmett, A.D., Pfiffner, J.J., (1944) On the Vitamin B₉ conjugate in yeast. Science, 100, 36
- (9) - Pfiffner, J.J., Calkins, D.G., O'Dell, B.L., Bloom, E.S., Brown, R.A., Campbell, C.J., Bird, O.D., (1945) Isolation of an antianemia factor (Vit.B₉ conjugate) in crystalline form from yeast. Science, 102, 223
- (10) - Minns, V., Torrer, J.R., Day, P.L., (1944) A method for the determination of substances enzymatically convertible to the factor stimulation S.Lactis R. J.Biol.Chem., 155, 401
- (11) - Pfiffner, J.J., Calkins, D.G., Bloom, E.S., O'Dell, B.L. (1946) On the peptide nature of vit.B₉ conjugate from yeast. J.Am.Chem.Soc., 68, 1392
- (12) - Bird, O.D., Binkley, S.C., Bloom, E.S., Emmett, A.D., Pfiffner, J.J., (1945) On the enzymic formation of vitamin B from its conjugate., J.Biol.Chem., 157, 413
- (13) - Sreenivasan, A., Harper, A.E., and Elvehjem, C.A., (1949) The use of conjugase preparations in the microbiological assay of Folic Acid. J.Biol.Chem., 177, 117
- (14) - Stokstad, E.L.R., (1943) Some properties of a growth factor for L.casei J.Biol.Chem., 149, 573
- (15) - Wagner, A.F., and Bolkers, D., (1960) The vitamins - Medicinal Chemistry, 173 Interscience Publishers, N.York
- (16) - Rickes, E.L., Chalet, L., and Keresztesy, J.C., (1947) Isolation of the Rhisopterin a new growth factor for S.Lactis R. J.Am.Chem.Soc., 69, 2749
- (17) - Keresztesy, J.C., Rickes, E.L., Stokes, J.L., (1943) A new growth factor for S.lactis - Science, 97, 465
- (18) - Rickes, E.L., Trenner, H.R., Conn, J.B., and Keresztesy, J.C., (1947) A degradation products of Rhisopterin. J.Am.Chem.Soc., 69, 2751
- (19) - Wolf, D.E., Anderson, R.C., Kaczka, E.A., Harris, S.A., Arth, G.E., Soutwich, P.L., Moring, R., and Karl, R., (1947) The structure of Rhisopterin, J.Am.Chem.Soc., 69, 2753
- (20) - Sauberlich, H.E., Baumann, C.A., (1948) A factor required for the growth of Leuconostoc citrovorum - J.Biol.Chem., 176, 165
- (21) - Broquist, H.P., Stokstad, E.L.R., and Jukes, R.H., (1950) Some biological and chemical properties of the Citrovorum factor - J.Biol.Chem., 185, 399
- (22) - Keresztesy, J.C., Silverman, M., (1951) Crystalline Citrovorum factor from liver. J.Am.Chem.Soc., 73, 5510
- (23) - Sauberlich, H.E., (1952) Comparative studies with the natural and synthetic Citrovorum factor - J.Biol.Chem., 195, 337
- (24) - Roth, B., Hultquist, H.E., Fahrenbach, H.J., Cousulich, D.B., Broquist, H.P., Brockman, J.A., Jr., Smith, J.M., Jr., Parker, R.P., Stokstad, E.L.R., and Jukes, T.H., (1952) Synthesis of Leucovorin - J.Am.Chem.Soc., 74, 3247
- (25) - Pohland, A., Flynn, E.H., Jones, R.G., and Shive, W., (1951) A proposed structure for folinic acid-SF, a growth factor derived from pteroylglutamic acid J.Am.Chem.Soc., 73, 3247
- (26) - Allen, W., Pasternak, R.L., and Seaman, W., (1952) Polarographic determination and evidence for the structure of leucovorin - J.Am.Chem.Soc., 74, 3264
- (27) - Cousulich, D.B., Roth, B., Smith, J.M., Hultquist, H.E.Jr., and Parker, R.P., (1952) Chemistry of Leucovorin J.Am.Chem.Soc., 74, 3252
- (28) - Huennekens, F.M., and Osborns, M.J., (1959) Folic acid coenzymes and one-carbon metabolism - Advances in Enzymology, 21, 369

INSTITUTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE FISIOLÓGIA DE MICROORGANISMOS

- 29 -

- (29)- Wirth, B.E., Anderson, H.D., and Herman, E.C., (1958) The role of polyglutamylpteridine coenzymes in Serine Metabolism. *J. Biol. Chem.*, 230, 271
- (30)- Uyeda, K., and Rabinowitz, J.C., (1963) Fluorescence properties of tetrahydrofolate and related compounds - *Analy. Biochem.*, 6, 100
- (31)- Blakley, R.L., (1957) The interconversion of Serine and Glycine: Preparation and properties of catalytic derivatives of Pteroylglutamic Acid - *Biochem. J.*, 65, 331
- (32)- O'Dell, B.L., Vandenbelt, J.M., Bloom, E.S., and Pfaffner, J.J., (1947) Hydrogenation of Vitamin B₉ and related pterines. *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 250
- (33)- Furttermann, S., (1957) Enzymatic reduction of folic acid and dihydrofolic acid to tetrahydrofolic acid. *J. Biol. Chem.*, 228, 1031
- (34)- Osborn, M.S., Huennkens, F.H., (1958) Enzymatic reduction of dihydrofolic acid *J. Biol. Chem.*, 233, 969
- (35)- Rabinowitz, J.C., and Pricer, W.E. Jr., (1957) An Enzymatic method for the determination of formic acid. *J. Biol. Chem.*, 229, 321
- (36)- Causulic, D.B., James, M.S. Jr., and Broquist, H.P., (1952) Diastereoisomers of leucovorin - *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 4215
- (37)- Kaufman, B.T., Donaldson, K.O., and Keresztesy, J.C., (1963) Chromatographic separation of the diastereoisomers of dl, L-5,10-methylenetetrahydrofolate. *J. Biol. Chem.*, 238, 1498
- (38)- Goodwin, T.W., (1963) The biosynthesis of Vitamins and related Compounds, 104 Academic Press, N. York
- (39)- Albert, A., (1954) The transformation of purines into pteridine. *Biochem. J.*, 51, X
- (40)- Albert, A., (1957) The transformation of purines into pteridines. *Biochem. J.*, 65, 124
- (41)- Hartman, S.C., and Buchanan, J.M., (1959) Nucleic acids, Purines, pyrimidines. *Ann. Rev. Biochem.*, 28, 365
- (42)- Weygand and Waldschmidt in *Metabolic Pathways*, (1961) Biogenesis and Metabolism of Folic Acid and Vitamin B₁₂, II, 720 (David M. Greenberg, Academic Press, N. York)
- (43)- Vieira, E., Shaw, E., (1961) The utilization of purines in the biosynthesis of folic acid. *J. Biol. Chem.*, 236, 2507
- (44)- Jaenicke, L., in *Plant Biochemistry*, Bonner and Verner, 419 (1965) Academic Press N. York
- (45)- Reynolds, J.J., and Brown, C.M., (1964) The biosynthesis of folic acid *J. Biol. Chem.*, 239, 317
- (46)- Brown, G.M., (1963) The biosynthesis of folic acid - *J. Biol. Chem.*, 237, 536
- (47)- Weisman, R.A., and Brown, G.M., (1964) The biosynthesis of folic acid. *J. Biol. Chem.*, 239, 326
- (48)- Griffin, J.M., Brown, G.M., (1964) The biosynthesis of folic acid - *J. Biol. Chem.*, 239, 310
- (49)- Flaks, J.G., Erwin, M.J., and Buchanann, J.M., Biosynthesis of the purines (1957) *J. Biol. Chem.*, 229, 603; Warren, L., and Buchanann, J.M., (1957) Biosynthesis of Purines. *J. Biol. Chem.*, 229, 613; Warren, L., Flaks, J.G., and Buchanann J.M., (1957) Biosynthesis of purines, 229, 629
- (50)- Rabinowitz, J.C., and Pricer, W.E. Jr., (1956) ATP formation accompanying formimino glycine utilization *Am. Chem. Soc.*, 78, 1513; Rabinowitz, J.C., and Pricer, W.E. Jr., (1956) Formimino-THF acid and methenyltetrahydrofolic acid as intermediates in the formation of N-10-formyltetrahydrofolic acid. *Am. Chem. Soc.*, 78, 5702
- (51)- Humphreys, G.K., and Greenberg, D.M., (1958) Studies on the conversion of deoxyuridylic acid to thymidylic acid by a soluble extract from rat thymus *Arc. Biochem. Biophys.*, 78, 275
- (52)- Flaks, J.G., and Cohen, S.S., (1959) Virus-induced acquisition of metabolic function. *J. Biol. Chem.*, 234, 1501
- (53)- Blakley, R.L., (1957) The interconversion of Serine and Glycine: some further properties of the enzyme system. *Biochem. J.*, 65, 342
- (54)- Pullman, B. and Pullman, A., (1963) *Quantum Biochemistry*, 572 - Interscience Publishers N. York
- (55)- Miller, A., and Waelisch, H., (1957) The conversion of urocanic acid to formamido-glutamic acid *J. Biol. Chem.*, 228, 365
- (56)- Brown, D.D., Silva, O.L., Garehner, R.G., and Silverman, M., (1960) Metabolism of formiminoglutamic acid by vit. B₁₂ and folic acid deficient rats fed excess methionine - *J. Biol. Chem.*, 235, 2058
- (57)- a) Nakao, A., Greenberg, D.M., (1958) Studies on the incorporation of isotopes from formaldehyde-C¹⁴ and serine-3-C¹⁴ into the methyl group of methionine. *J. Biol. Chem.*, 230, 603
b) Bremer, J., and Greenberg, D.M., (1960) Biosynthesis of choline in vitro *Biochim*

- (57)- c) Loughlin, R.E., Elford, H.L. and Buchanan, J.M., (1964) Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine. *M.Biol.Chem.*, 232, 2888
- (58)- Cantarow - Shepartz (1962) *Biochemistry*, 579, E.B. Saunders Company, London
- (59)- Foster, M.A., Tejerina, G., Guest, J.R., Woods, D.D., (1964) Two enzyme mechanisms for the methylation of homocysteine by extracts of *E.coli*. *Biochem.J.*, 92, 476
- Guest, J.R., Friedman, S., Foster, M.A., Tejerina, G., and Woods, D.D., (1964) Transfer, of the methyl group from N-methyltetrahydrofolates of homocysteine in *E.coli*. *Biochem.J.*, 92, 497
- (60)- Lowry, O.H., Bessay, O.A., and Grawford, E.J., (1949) Photolytic and enzymatic transformations of pteroylglutamic acid - *J.Biol.Chem.*, 180, 389
- (61)- Blair, J.A., (1957) Some observations on the oxidative degradation of pteroyl-L-glutamic acid. *Biochem.J.*, 65, 209
- (62)- Stokes, J.L., and Larsen, A., (1945) Transformation of the *Streptococcus Lactis* R factor to "Folic Acid" by resting cell suspensions of *Enterococci*. *J.Bact.*, 50, 219
- (63)- Keresztezy, J.C., and Silverman, M., (1953) Enzymatic cleavage in the citrovorum factor - *J.Am.Chem.Soc.*, 75, 1512
- (64)- Furtterman, S., and Silverman, M., (1957) The inactivation of folic acid by liver *J.Biol.Chem.*, 224, 31
- (65)- Silverman, M., Keresztezy, J.C., Koval, G.J., (1957) Citrovorum factor and the synthesis of formylglutamic acid - *J.Biol.Chem.*, 226, 83
- (66)- Miller, A., and Waelasch, H., (1957) The formation of N¹⁰-formylfolic acid from formamidinoglutamic acid and folic acid *J.Biol.Chem.*, 228, 383
- (67)- Blakley, R.L., (1955) The interconversion of serine and glycine: participation of pyridoxal phosphate. *Biochem.J.*, 61, 315
- (68)- Jaenicke, L., (1956) Conversion of beta-carbon of serine to N¹⁰-formyl tetrahydrofolic acid *Federation Proc.*, 15, 281
- (69)- Stoskstad, E.L.R., and Koch, J., (1967) Folic Acid Metabolism *Phys.Rev.*, 47, 83