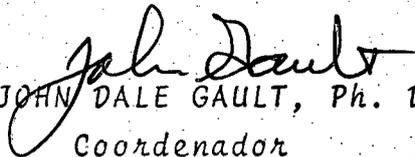


ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
"MESTRE EM CIÊNCIAS"

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

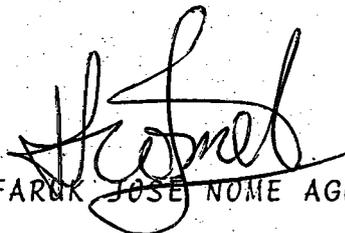


Prof. FARUK JOSÉ NOME AGUILERA, Ph. D.  
Orientador

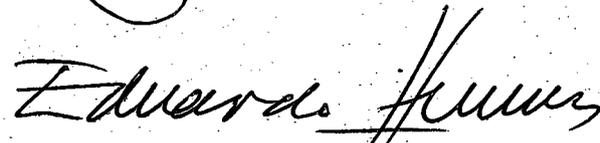


Prof. JOHN DALE GAULT, Ph. D.  
Coordenador

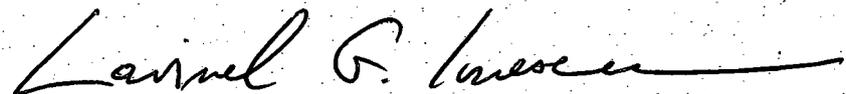
Banca examinadora



Prof. FARUK JOSÉ NOME AGUILERA, Ph. D.



Prof. JUAN JACOB EDUARDO HUMERES ALLENDE, Ph. D.



Prof. LAVINEL G. IONESCU, Ph. D.

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

ESTUDO DAS REAÇÕES DAS VITAMINAS B<sub>12a</sub> E B<sub>12b</sub>  
COM PESTICIDAS CLORADOS

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

MAURO CÉSAR MARGHETTI LARANJEIRA

JANEIRO - 1979

Aos meus pais, Miguel e Gicelza, e à  
minha esposa Luiza.

O meu especial agradecimento ao Professor Faruk José Nome Aguilera pela gentileza e dedicação com que orientou este trabalho.

Extendo os meus agradecimentos aos Professores Juan Jacob Eduardo Humeres Allende e Lavinel G. Ionescu pelos subsídios importantes que forneceram.

Gostaria de agradecer aos meus colegas do curso de pós-graduação em Físico-Química, pela colaboração e estímulo que sempre me deram.

Agradeço, também à Universidade Federal de Santa Catarina e à CAPES/CNPq pelo suporte dado neste trabalho.

Não posso deixar de agradecer à datilógrafa Nilza Silvestri de Souza pela confecção desta tese.

## Í N D I C E G E R A L

	pág.
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b>	
1. Importância e objetivos do estudo .....	1
2. Química dos pesticidas clorados .....	2
2.1. Família do norborneno .....	2
2.2. Família do DDT .....	6
3. Química da vitamina B <sub>12</sub> .....	11
3.1. Estrutura molecular e nomenclatura .....	11
3.2. Estados de oxidação da B <sub>12</sub> .....	19
3.3. Química da ligação cobalto-carbono .....	21
3.3.1. Reações nucleofílicas com (I) e por radicais livres (CoII) .....	21
3.3.2. Reações com transferência de alquilas .....	23
3.4. Equilíbrio químico .....	23
3.5. Espectros de absorção de cobalaminas .....	25
3.6. Funções bioquímicas da B <sub>12</sub> .....	25
3.6.1. Biossíntese da metionina .....	28
3.6.2. Formação de metano .....	28
3.6.3. Síntese de acetato .....	28
<b>CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
1. Equipamentos .....	29
2. Materiais .....	29
3. Métodos .....	34
3.1. Cromatografia em camada delgada .....	34

	pág.
3.2. Cromatografia em fase gasosa .....	34
3.3. Dosagem de cloretos .....	35
4. Esquema de reação .....	36
4.1. Sistema de purificação de nitrogênio e de reação ...	36
4.2. Reações de pesticidas clorados da família dos norbor- nenos com vitamina B <sub>12s</sub> .....	37
4.3. Reação do DDT com vitamina B <sub>12s</sub> .....	38
4.4. Reações de pesticidas clorados da classe do DDT com vitamina B <sub>12r</sub> .....	39

### CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Reações de pesticidas clorados da família do norborne- no com vitamina B <sub>12s</sub> .....	41
2. Reação do DDT com vitamina B <sub>12s</sub> .....	48
3. Reações de pesticidas clorados da classe do DDT com vitamina B <sub>12r</sub> .....	54
3.1. Reação do DDT .....	54
3.2. Reação do DDD .....	61
3.3. Reações do DDM .....	61
3.4. Reações do DDE e DDMU .....	65
3.5. Análise geral .....	67
4. Conclusões .....	69
BIBLIOGRAFIA .....	70

### APÊNDICE I - Estruturas e nomenclatura de pesticidas

I.1. Família do norborneno .....	74
I.2. Família do DDT .....	76

APÊNDICE II - Dados espectrofotométricos UV de alguns pes- ticidas clorados da classe do DDT e do trans-estilbeno ..	79
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1 - Cromatograma dos produtos entre DDT e cromo(II)	12
FIGURA 2 - Estrutura da vitamina B <sub>12</sub> .....	14
FIGURA 3 - Estrutura abreviada da coenzima B <sub>12</sub> .....	16
FIGURA 4 - Sistema do anel corrínico, com as densidades de carga calculadas para um íon metálico dipositivo .....	16
FIGURA 5 - Fórmulas estruturais planas dos compostos: (a) porfina (b) ftalocianina (c) clorofila .....	18
FIGURA 6 - Diagrama de orbital molecular e os níveis eletrônicos da organocobalamina .....	20
FIGURA 7 - Espectro de absorção: hidroxocobalamina; B <sub>12r</sub> e B <sub>12s</sub> .....	26
FIGURA 8 - Espectro de absorção: metilcobalamina; metilcobalamina protonada .....	27
FIGURA 9 - Espectros do complexo vitamina B <sub>12</sub> -aldrin em meio ácido antes da fotólise e dos produtos depois da fotólise .....	44
FIGURA 10 - Cromatograma dos produtos da reação entre DDT e vitamina B <sub>12s</sub> .....	50

FIGURA 11 - Espectro UV dos produtos DDE e DDD da reação do DDT com a vitamina B <sub>12r</sub> .....	57
FIGURA 12 - Espectro UV - VIS dos padrões B <sub>12a</sub> e Me-B <sub>12</sub> e do produto vitaminado da reação entre DDT e B <sub>12r</sub> .....	60
FIGURA 13 - Espectros UV dos produtos DDM, DDNU e DDO da reação do DDM com a B <sub>12r</sub> .....	66

## ÍNDICE DE TABELAS

	pág.
TABELA I - Constantes de velocidade e parâmetros de ativação da reação de desidrocloração de hidróxido de sódio em 92,6% de etanol aquoso dos compostos do tipo I (R=Cl)..	10
TABELA II - pKa para uma série de alquilcobalaminas.	24
TABELA III - Determinação do cloreto produzido nas reações entre vitamina B <sub>12s</sub> e os pesticidas norbornenos .....	42
TABELA IV - Dados cromatográficos dos produtos da reação do DDT com vitamina B <sub>12s</sub> .....	49
TABELA V - Cromatografia gasosa e cromatografia em camada delgada dos produtos da reação do DDT com a B <sub>12r</sub> .....	56
TABELA VI - Análise cromatográfica dos produtos da reação do DDT após tratamento com KOH alcoólico .....	58
TABELA VII - Análise cromatográfica dos produtos da reação do DDD com a vitamina B <sub>12r</sub> .....	62
TABELA VIII - Análise cromatográfica dos produtos da reação do DDM com a vitamina B <sub>12r</sub> .....	64

## R E S U M O

Foram estudadas as reações das vitaminas  $B_{12s}$  e  $B_{12r}$  com pesticidas clorados do tipo norborneno e DDT.

A retirada de um átomo de cloro dos pesticidas aldrin e dieldrin e de três átomos de cloro do  $\gamma$ -clordane, é consistente com os resultados já obtidos na reação de pesticidas norbornenos com  $NaBH_4$  na presença de diferentes íons metálicos.

A remoção de três átomos de cloro no  $\gamma$ -clordane indica a possibilidade de ocorrer a ligação Co-C tanto no lugar de um dos cloros da ponte metilênica, quanto no lugar dos dois cloros ligados aos dois carbonos secundários saturados. O produto  $B_{12-R}$  das reações da vitamina  $B_{12s}$  com os pesticidas derivados do norborneno é bastante instável, mesmo na ausência de luz e em baixa temperatura, decompondo-se em um dia em presença de oxigênio.

O maior produto da reação entre 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDT) e vitamina  $B_{12s}$  é o trans-p-p'-dicloroestilbeno (DCS), seguido de 1,1-bis(p-clorofenil)-2,2-dicloroetileno (DDE) e 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDD), além de outros produtos menores. O aparecimento de 1,1-bis(p-clorofenil)-1-monocloroetileno (DDMU), 1,1-bis(p-clorofenil)-etileno (DDNU) e 2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDO) como os menores produtos desta reação, sugere a participação da espécie  $B_{12r}$  no mecanismo da reação. A vitamina  $B_{12r}$  gerada pela fotólise da metilcobalamina, reage imediatamente com o DDT, removendo um átomo de cloro via radical livre, formando a vitamina  $B_{12-Cl}$ , a qual é

uma espécie de Co(III). Este complexo rapidamente torna-se hidratado formando vitamina B<sub>12a</sub> e íon cloreto livre.

Os maiores produtos da reação entre vitamina B<sub>12r</sub> e DDT, são o DDE e o DDD. Embora o 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDM) não fora isolado nesta reação, ele foi comprovado como um possível intermediário, reagindo com a B<sub>12r</sub> e formando os produtos DDNU e DDO.

Estudo da ação da vitamina B<sub>12r</sub> sobre os pesticidas DDT, DDD, DDM, DDE e DDMU, confirmam os resultados com o DDT. A percentagem de substrato reagido sugere que a ordem de reatividade é DDT > DDD < DDM, enquanto que DDE e DDMU não são reativos.

## A B S T R A C T

The reaction of vitamin B<sub>12</sub> with chlorinated pesticides of the type of norbornene and DDT was studied.

The removal of one atom of chlorine from the pesticides aldrin and dieldrin and three atoms of chlorine from  $\gamma$ -chlordanes is consistent with NaBH<sub>4</sub> in the presence of various metal ions.

The removal of three atoms of chlorine in the case of  $\gamma$ -chlordanes is consistent with existence of a Co-C bond in place of one of the chlorine atoms of the methylene bridge as well as in the place of the two chlorines bond to the two secondary saturated carbon atoms.

The products of the reaction of vitamin B<sub>12</sub>-R with norbornene pesticides are rather unstable, even in the absence of light and at low temperatures and they decompose in one day in the presence of oxygen.

The major product of the reaction of vitamin B<sub>12</sub> and 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) is trans-p-p'-dichlorostilbene (DCS), followed by 1,1-bis(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethylene (DDE) and 1,1-dichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDD) along with other minor ones. The formation of 1,1-bis(p-chlorophenyl)-1-monochloroethylene (DDMU), 1,1-bis(p-chlorophenyl)-ethylene (DDNU) and 2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDO) as the minor products of this reaction, suggests the participation of the B<sub>12</sub> species in the mechanism. Vitamin B<sub>12</sub>, generated by the photolysis of methylcobalamin, reacts immediately

with DDT, removing a chlorine atom via a free radical mechanism and forming vitamin  $B_{12}$ -Cl, which is a Co(III) species. This complex is rapidly hydrated and results in the formation of vitamin  $B_{12a}$  and free chloride ion.

The major products of the reaction of vitamin  $B_{12r}$  and DDT are DDE and DDD. Even though DDM was not isolated during this reaction, it was shown to react with vitamin  $B_{12r}$  forming DNNU and DDO and it was confirmed as a possible intermediate of the former reaction.

The study of the action of vitamin  $B_{12r}$  on the pesticides DDT, DDD, DDM, DDE and DDMU confirms the results with DDT. The percentage of reacted substrate suggests that the order of reactivity is  $DDT > DDD < DDM$  and that DDE and DDMU do not react.

## A B R E V I A Ç Õ E S

- MeB<sub>12</sub> - metilcobalamina
- B<sub>12</sub>-R - produto vitaminado
- DDT - 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano
- DDD - 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano
- DDM - 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano
- DDO - 2,2-bis(p-clorofenil)etano
- DDE - 1,1-bis(p-clorofenil)-2,2-dicloroetileno
- DDMU - 1,1-bis(p-clorofenil)-2-monocloroetileno
- DDNU - 1,1-bis(p-clorofenil)etileno
- DCS - trans-4-4'-dicloroestilbeno
- Dicofol - 1,1-bis(p-clorofenil)-2,2,2-tricloroetanol
- DBP - p-p'-diclorobenzofenona
- DDOH - 1,1-bis(p-clorofenil)-2-etanol
- DDA - 1,1-bis(p-clorofenil)-ácido acético
- DDMF - 1-cloro-1,2-bis(p-clorofenil)etano

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

### 1. Importância e objetivos do estudo

O crescimento da população mundial requer um aumento considerável de suprimentos essenciais para a sua sobrevivência, em vista disto a agricultura deverá ter um grande desenvolvimento. Um problema sério deste desenvolvimento é a presença das pestes nas colheitas.

Atualmente, os pesticidas que se podem obter, apresentam a maioria dos requisitos para um bom controle das enfermidades e pestes existentes. É essencial, entretanto, que as companhias produtoras tenham dados mais apurados nas condições tropicais e que eles dêem mais atenção à educação dos agricultores no uso correto destes materiais.<sup>1</sup>

Os hidrocarbonetos clorados persistentes (estáveis) são no momento de grande interesse público. Estes pesticidas podem ocorrer em alimentos, água potável e no ar que se respira. Entretanto, uma exposição maciça dos seres humanos aos pesticidas durante as suas produções e aplicações ou mesmo através de seus resíduos encontrados nos alimentos, pode resultar em graves efeitos tóxicos sobre os seus organismos. Portanto, seria ideal ter pesticidas que fossem biodegradáveis e que sua biodegradação terminasse em produtos não tóxicos.

Muito interesse tem-se concentrado na degradação do DDT em vários animais, tecidos isolados e culturas bacterianas.<sup>2</sup>

O objetivo geral deste trabalho, foi contribuir ao es tudo dos possíveis mecanismos biológicos de desintoxicação de ir

pesticidas clorados da classe do DDT e do hexacloronorborneno a traves de reações de descloração com vitamina  $B_{12r}$  (Co II) e vitamina  $B_{12s}$  (Co I). A vitamina  $B_{12r}$  pode iniciar uma reação com haletos de alquila segundo radicais livres, enquanto que a vitamina  $B_{12s}$  (alta densidade de carga e alta polarizabilidade no átomo de cobalto) apresenta-se como um forte nucleófilo, sendo capaz de reagir com agentes alquilantes.<sup>3</sup>

A fim de melhor esclarecimento do tema, apresentar-se-á uma breve introdução dividida em duas partes: química de pesticidas clorados (estruturas e nomenclatura ver Apêndice I) e química da vitamina  $B_{12}$ .

## 2. *Química dos pesticidas clorados*

As reações de transformações metabólicas dos hidrocarb<sup>o</sup>netos clorados são essencialmente reações de descloração, hidroxilação, desidrocloração, epoxidação da ligação C=C e oxidação.<sup>4</sup>

A seguir, discutir-se-á a importância relativa destes caminhos para as famílias do aldrin e do DDT.

### 2.1. *Família do norborneno*

Inseticidas ciclodienos como aldrin, dieldrin,  $\gamma$ -clor<sup>o</sup>dane, endrin, isodrin e heptaclor são substâncias quimicamente muito similares (ver Apêndice I), embora seus metabolismos e suas toxidades são muito diferentes. Estas substâncias de um modo geral praticamente não são transformadas biologicamente. Em microorganismos, somente após tratamento intensivo com estes insetici

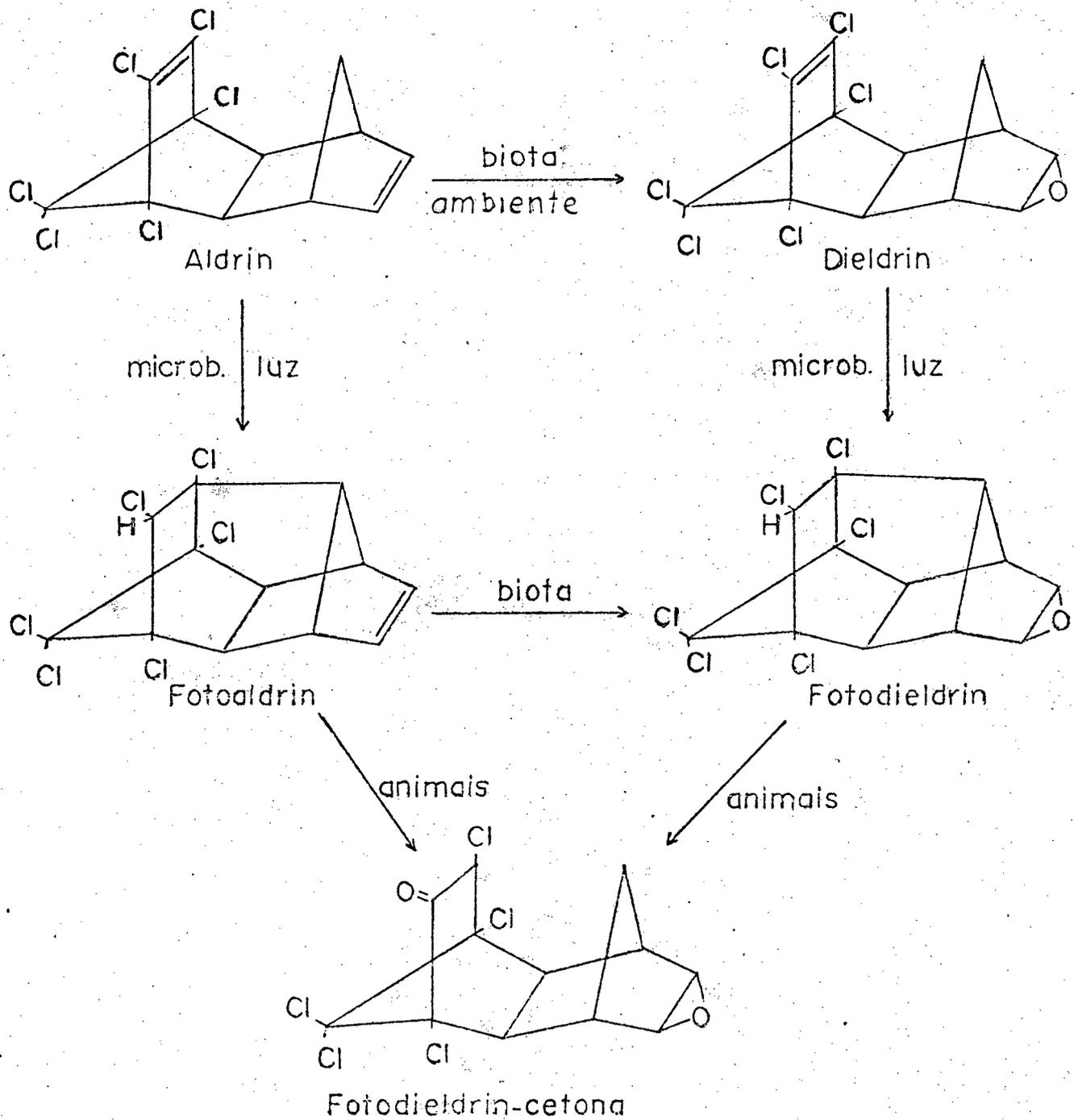
das detectaram-se metabólitos que realmente representavam produtos de decomposição.<sup>4</sup>

Desidrocloração oxidativa nos mamíferos e insetos do fotodieldrin (resíduo terminal de aldrin, dieldrin e fotoaldrin) dá como produto dieldrin-cetona, que é mais tóxico que o fotodieldrin.<sup>5</sup> (Esquema 1)

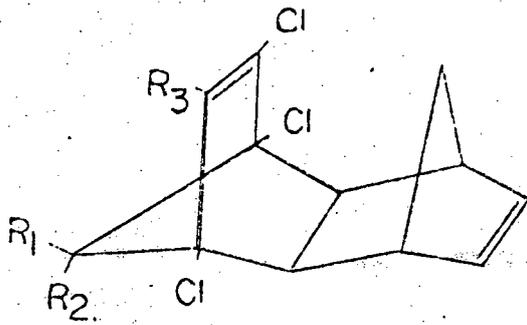
Reduções catalisadas com íons metálicos sobre pesticidas ciclodienos faz com que haja uma descloração seletiva, como é mostrado no Esquema 2.<sup>6</sup>

As reações de descloração dos pesticidas aldrin (I), isodrin (II), dieldrin (III) e endrin (IV), catalisadas com cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) na presença de um agente redutor, (NaBH<sub>4</sub>), causam monodescloração originando os produtos Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa e IVb respectivamente. Observa-se que em todos os casos um dos cloros da ponte metilênica é removido.<sup>6</sup> Este resultado é consistente com um mecanismo de substituição nucleofílica, pois sabe-se que os cloros vinílicos são pouco reativos, assim como os cloros da cabeça de ponte, justificando portanto a seletividade da descloração.

Reação do aldrin com NaBH<sub>4</sub>, em hexametilfosforotriamida produz o composto Ic além dos isômeros Ia e Ib. O isômero Ic é produzido pela saída de um dos cloros vinílicos. É importante realçar que formação de Ic por mecanismos de eliminação redutiva, não tinha sido descrito, e considera-se altamente surpreendente. Sua formação somente tinha sido detectada anteriormente como um dos produtos de fotólise do aldrin.<sup>7</sup>



ESQUEMA 1

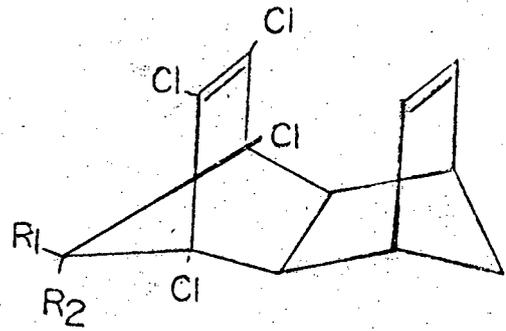


I:  $R_1 = R_2 = R_3 = Cl$

Ia:  $R_1 = H, R_2 = R_3 = Cl$

Ib:  $R_2 = H, R_1 = R_3 = Cl$

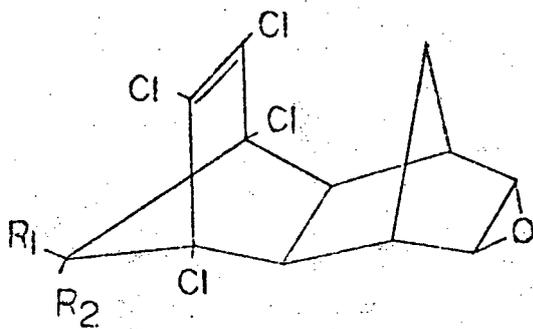
Ic:  $R_3 = H, R_1 = R_2 = Cl$



II:  $R_1 = R_2 = Cl$

IIa:  $R_1 = H, R_2 = Cl$

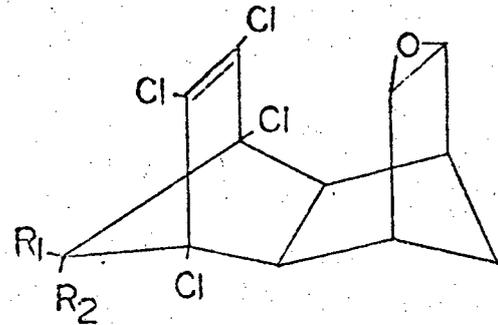
IIb:  $R_1 = Cl, R_2 = H$



III:  $R_1 = R_2 = Cl$

IIIa:  $R_1 = H, R_2 = Cl$

IIIb:  $R_1 = Cl, R_2 = H$



IV:  $R_1 = R_2 = Cl$

IVa:  $R_1 = H, R_2 = Cl$

IVb:  $R_1 = Cl, R_2 = H$

I: Aldrin

II: Isodrin

III: Dieldrin

IV: Endrin

ESQUEMA 2

Conhece-se mais sobre a ocorrência de hidrocarbonetos clorados e seus produtos de transformação da classe do DDT em relação aos da classe do aldrin, porque eles podem ser facilmente identificados por métodos sensíveis como por exemplo, a espectrofotometria U.V, ao passo que os pesticidas tipo aldrin não possuem grupos cromóforos em suas estruturas (não apresentam duplas ligações conjugadas), não sendo portanto sensíveis a este método. A identificação desta classe de pesticidas requer portanto uma instrumentação mais sofisticada como cromatógrafo gasoso (em geral com detector de captura eletrônica), aparelho de ressonância nuclear magnética, e espectrômetro de massa. Além disso, os processos de síntese dos pesticidas da família do DDT são mais simplificados do que os do tipo aldrin.

Com pesticidas da família do DDT e do aldrin, as reações de descloração constituem um mecanismo de desintoxicação - muito importante nos microorganismos, plantas e mamíferos. Os cicloedienos clorados como heptaclor e clordane também são desclorados.<sup>5</sup>

## 2.2. Família do DDT

Três caminhos são indicados para degradação do DDT *in vivo*: desidrocloração produzindo DDE, descloração redutiva que resulta na formação de DDD e hidroxilação no C(2) produzindo dicofol.<sup>2</sup>

A seguir, serão descritas algumas propriedades de degradação do DDT e seus derivados *in vivo* e *in vitro*.

DDT e seu metabólito DDE, foram concentrados em organismos humanos principalmente no tecido gorduroso.<sup>4</sup> A mosca doméstica *pos*

sui uma resistência ao DDT, devido a enzima desidroclorinase-glutathiona ativada que converte DDT para DDE.<sup>8</sup>

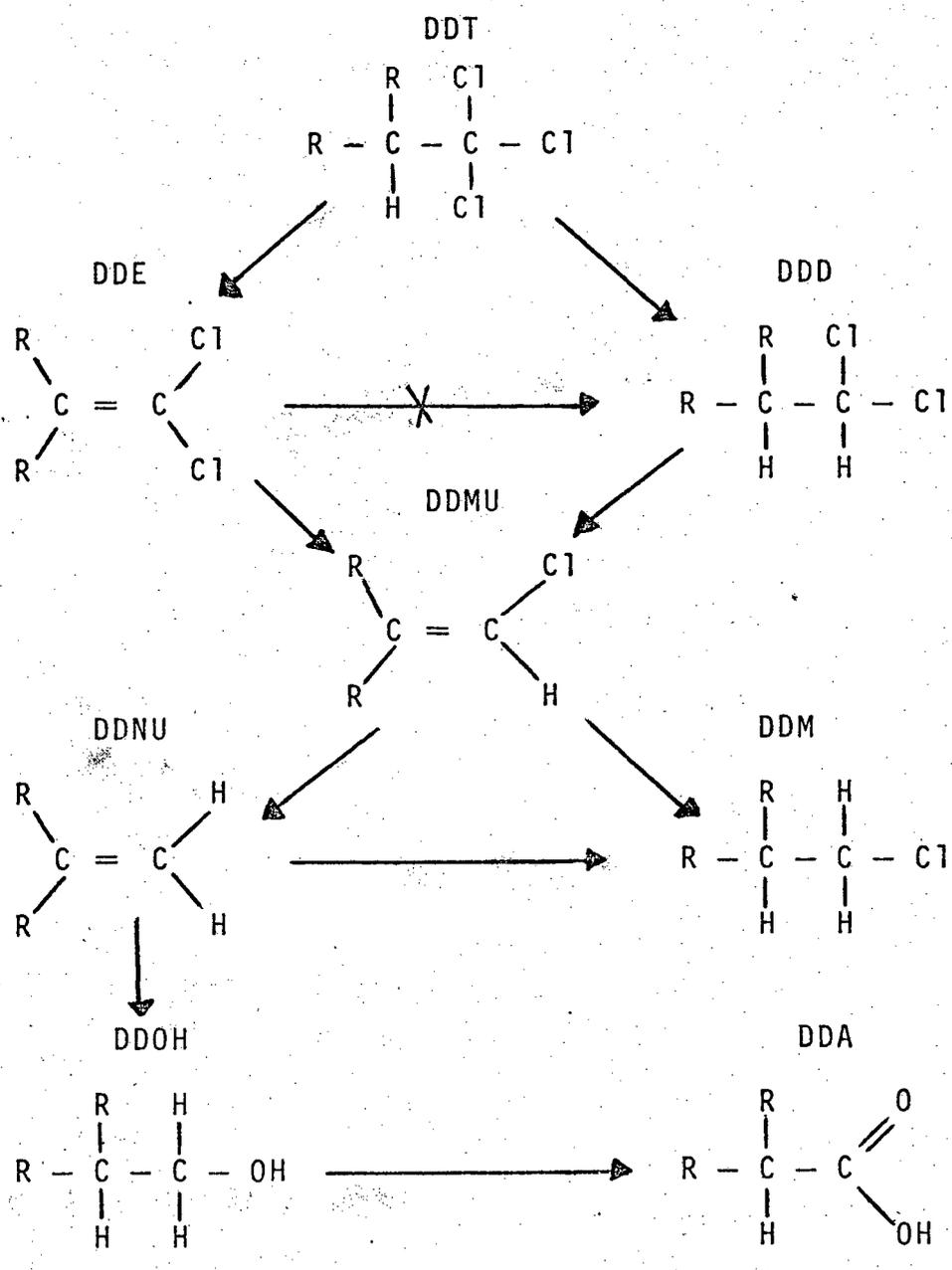
Visto que homem, ratos e macacos excretam DDA, supõe-se que exista uma via metabólica que metaboliza DDT para DDA, sem passar através do DDE como etapa intermediária. Esta suposição foi provada pela identificação dos produtos de degradação do DDT em ratos.<sup>4</sup> Porém, um caminho de degradação em ratos de DDE para DDA via DDNU tem sido também descrito.<sup>2</sup> (Esquema 3)

O maior produto de degradação de DDT em microorganismos, especialmente em condições anaeróbicas é o DDD.<sup>9</sup> O mecanismo metabólico de espécies de sangue quente que ocorre, exclusivamente, com sistemas enzimáticos de ratos, não é ainda garantido, visto que o DDD não foi identificado quando a análise foi realizada imediatamente após a morte dos animais; DDD aparece somente mais tarde.<sup>10</sup>

O DDT submetido à deuteração no carbono-2 foi injetado em ratos, dando como produtos de degradação DDE e DDD deutera do no mesmo átomo de carbono, ao invés de DDD não deutera do, demonstrando portanto que o DDE não é um intermediário na produção de DDD.<sup>2</sup>

Experimentos feitos sob condições não enzimáticas com DDT deram como produtos de transformação DDD e DDE. Possivelmente, simples reações químicas redox, por exemplo com coenzimas reduzidas, porfirinas e proteínas contendo centros metálicos, são responsáveis pelos resultados observados.<sup>11</sup>

A decomposição de DDT em águas, ocorre também por ação redutora de microorganismos. Experimentos *in vitro* com complexos porfirina-Fe (II), sugerem a possibilidade de serem catalisado-

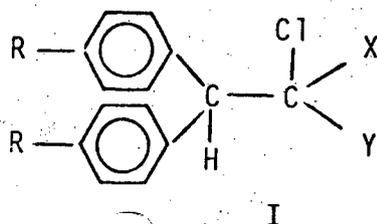


ESQUEMA 3

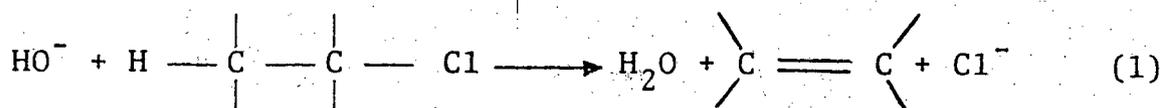
res da reação.<sup>12</sup>

Um estudo das cinéticas de desidrocloração de vários 2,2-diaril-cloroetanos com hidróxido de sódio etanólico foi feito a várias temperaturas.<sup>13</sup>

Os compostos estudados foram do tipo I



onde X e Y podem ser átomos de hidrogênio ou cloro. A reação estudada para este composto é mostrada em (1):



Valores satisfatórios foram obtidos com a expressão da constante de velocidade de segunda ordem, para todos os compostos estudados. Em cada caso quase exatamente um mol de íon cloreto foi produzido por um mol do composto halogenado após um longo intervalo de tempo. A Tabela I apresenta os dados e resultados destes experimentos. A partir desta tabela, foram calculadas as energias e entropias de ativação para a desidrocloração. Observa-se que o DDT tem constantes específicas de velocidade (a 30°C), 2,4 a 4,3 vezes maior que DDD, e que DDD possui constantes específicas de velocidade maior que DDM. Isto indica que a ordem de reatividade para a desidrocloração com NaOH alcoólico é DDT > DDD > DDM.

Esta ordem de reatividade é devida ao aumento na energia de ativação de aproximadamente 1,6 kcal/mol. para o DDD compara-

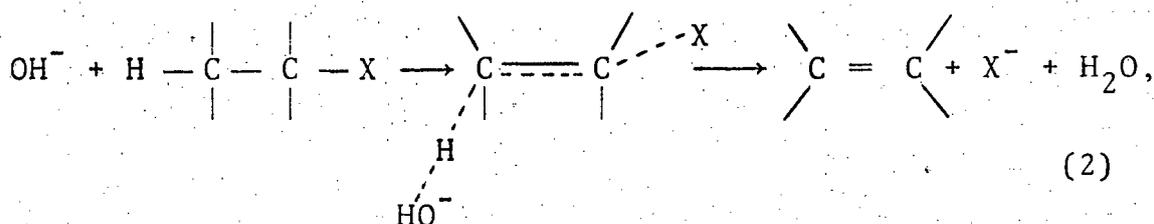
TABELA I: Constantes de velocidade e parâmetros de ativação da reação de desidrocloração de hidróxido de sódio em 92,6% de etanol aquoso dos compostos do tipo I (R=Cl)<sup>a</sup>

	DDT	DDD	DDM
$k \cdot 10^5$ l/s.mol	7110	1660	282
$E_a$ kcal/mol	18,3	20,1	20,2
$\Delta H^\ddagger$ kcal/mol	17,7	19,5	19,6
$\Delta S^\ddagger_{30^\circ}$ cal/mol.k <sup>0</sup>	-5,5	-2,3	-5,8
$\Delta G^\ddagger$ kcal/mol	19,4	20,2	21,4

<sup>a</sup> Estes dados foram obtidos na temperatura de 30°C.<sup>14</sup>

do ao DDT, sendo compensado parcialmente por um decréscimo na entropia de ativação molar, enquanto que as energias de ativação do DDM e DDD são praticamente idênticas; e o decréscimo na reatividade do DDM comparado com o DDD é devido totalmente ao decréscimo na entropia de ativação.<sup>14</sup> (Tabela I)

Os dados experimentais na reação de desidrocloração de DDT, DDD e DDM são consistentes com um mecanismo de eliminação bimolecular (E<sub>2</sub>), (2),



como um processo concertado de um único estágio, envolvendo simultaneamente a perda de próton, formação da dupla ligação carbono-carbono e a saída do íon haleto.<sup>13</sup>

Foi descoberto que cloreto de cromo (II) reage com DDT, resultando uma extensiva descloração e rearranjo para produzir trans-dicloroestilbeno (DCS) com cerca de 50%.<sup>2</sup> Vários outros produtos foram detectados além do DCS e a *Figura 1* descreve um traço do cromatograma dos produtos.

DCS tem sido produzido também na redução do DDT usando zinco em ácido clorídrico<sup>15</sup> ou ácido acético.<sup>16</sup>

### 3. Química da vitamina B<sub>12</sub>

#### 3.1. Estrutura molecular e nomenclatura

A vitamina B<sub>12</sub> e seus derivados são complexos orgânicos metálicos contendo um átomo de cobalto no centro da molécula.

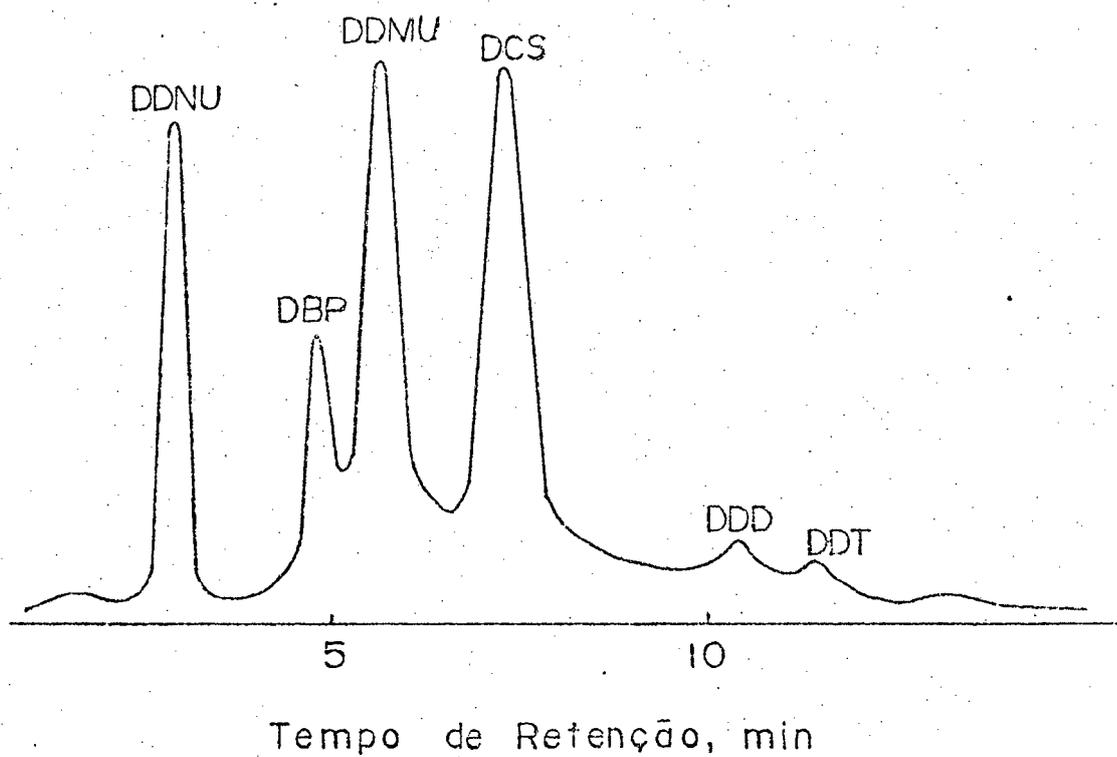


FIGURA 1: Cromatograma dos produtos entre DDT e cromo(II), obtido numa coluna (2mx3,2mm) empacotada com 3% de OV-17 em 80-100 mesh chrom-W-AW-DMCS.

A importância da vitamina B<sub>12</sub>, cianocobalamina, está refletida na atenção extensiva que ela tem recebido de uma grande variedade de disciplinas.<sup>17</sup> Sua pesquisa no campo da medicina tem sido relatada principalmente para a anemia perniciosa, uma doença seria resultante da deficiência da vitamina B<sub>12</sub>.<sup>18</sup>

Bioquímicos têm estudado o mecanismo da ação das enzimas dependentes da vitamina B<sub>12</sub>, a biossíntese da coenzima análogo e o papel da vitamina B<sub>12</sub> nas diferentes rotas biossintéticas.<sup>17</sup> Tem-se demonstrado que metilcobalamina reage com mercúrio *in vivo* e *in vitro* formando metil-mercúrio, uma espécie química com propriedades teratogênicas.<sup>12</sup>

É interessante observar que a produção de metano pela metanobactéria, a qual é dependente da vitamina B<sub>12</sub>, é fortemente inibida por DDT e DDD.<sup>12</sup>

A Figura 2 mostra a estrutura da vitamina B<sub>12</sub> cujas características principais são o íon central de cobalto(III) ligado por quatro átomos de nitrogênio dos grupos pirrólicos de um anel corrínico macrocíclico. O anel corrínico assemelha-se aparentemente ao anel porfirínico, mas não sendo totalmente conjugado, é portanto muito diferente quimicamente da porfirina. O anel corrínico não é planar; entretanto, as várias análises por raios-X mostraram que as conformações atuais do anel depende muito da natureza dos grupos funcionais ligados na sua periferia. Por causa da ausência de conjugação, o anel corrínico é muito flexível e as mudanças conformacionais podem, portanto ocorrer muito facilmente.<sup>19</sup> Além dos quatro ligandos pirrólicos, existem nos derivados da B<sub>12</sub> mais dois ligandos axiais. Os vários derivados

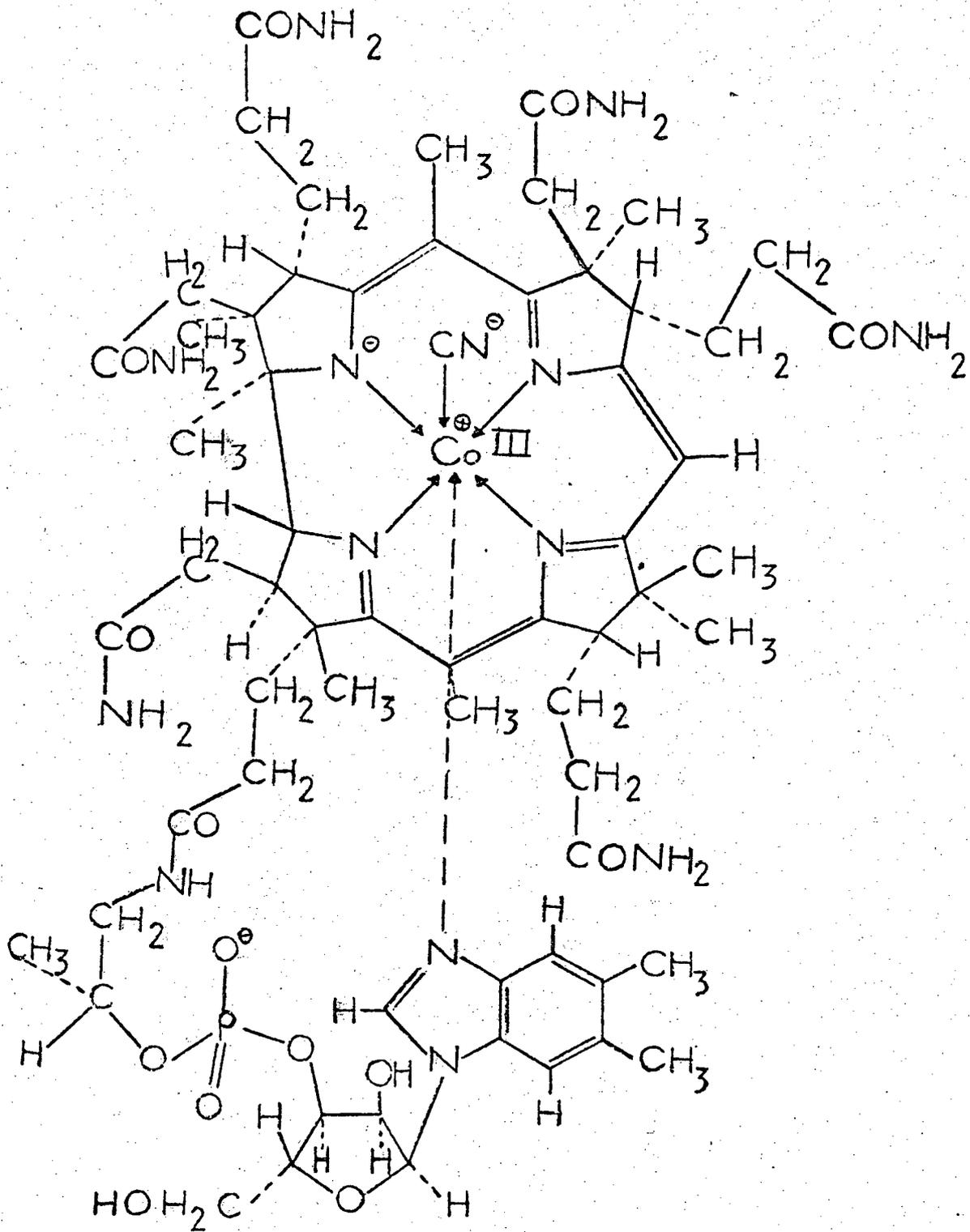


FIGURA 2: Estrutura da vitamina B<sub>12</sub>

da  $B_{12}$  resultam das trocas nos ligandos axiais unidos ao cobalto. Em geral, todas as moléculas exibindo o anel corrínico são referidas como corrinóides. O ligando axial ocupando a 5<sup>a</sup> posição de coordenação na *Figura 2* é um  $\alpha$ -5,6-dimetil-benzimidazol. Quando este grupo estiver presente na estrutura, as moléculas são usualmente referidas como cobalaminas. Assim, se  $R=CN^-$ , a molécula é cianocobalamina. É também propriamente chamada de vitamina  $B_{12}$ . Outras cobalaminas comuns são metilcobalamina ( $R=CH_3$ ), aquocobalamina ( $R=H_2O$ ), hidroxocobalamina ( $R=OH^-$ ) e 5'-deoksiadenosilcobalamina ( $R=5'$ -deoksiadenosina) (*Figura 3*). Por meio de hidrólise, o benzimidazol pode ser eliminado, para dar uma classe de derivados chamados de cobinamidas. Nestas, uma molécula de água ocupa o lugar do benzimidazol. Tal como as cobalaminas, o nome de um derivado da cobinamida depende da natureza do ligando axial superior, por exemplo, metilcobinamida, aquocobinamida. Em alguns casos outros ligandos (usualmente cianeto) ocupam a 5<sup>a</sup> posição de coordenação (axial inferior). Neste caso, a molécula será chamada de dicianocobinamida ou aquocianocobinamida quando  $R=CN^-$  ou  $H_2O$ , respectivamente.<sup>19</sup>

A seguir, será descrita uma breve comparação entre os anéis corrínicos e porfirínicos.

Os anéis corrínicos são saturados exceto nos átomos de nitrogênio e átomos de carbono mais próximos, e além disso a conjugação não é totalmente cíclica devido a ausência de uma das pontes metilênicas. O sistema de densidades de carga no anel corrínico é mostrado na *Figura 4*.<sup>20</sup> Os ligandos porfirínicos são sistemas macrocíclicos tetrapirrólicos com ligações duplas (*Figura 5a*) e vários grupos ligados ao perímetro.

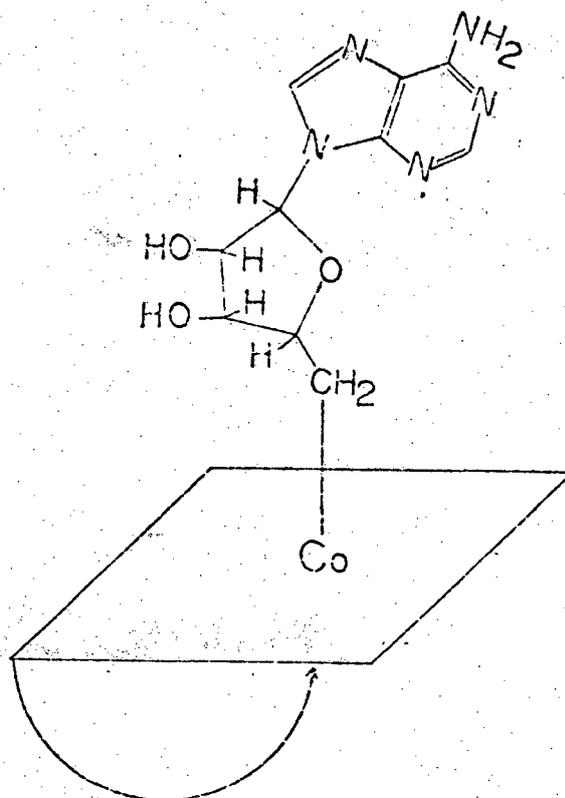


FIGURA 3: Estrutura abreviada da coenzima  $B_{12}$ . Na figura o retângulo representa o anel corrinico, e a flecha representa o grupo benzimidazol coordenado

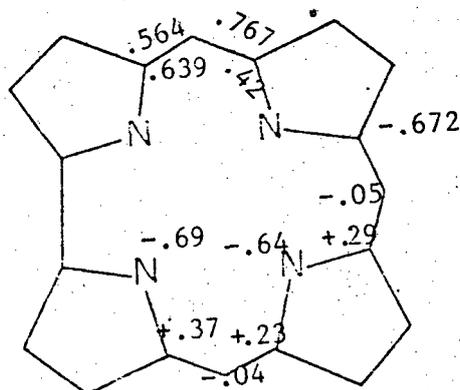


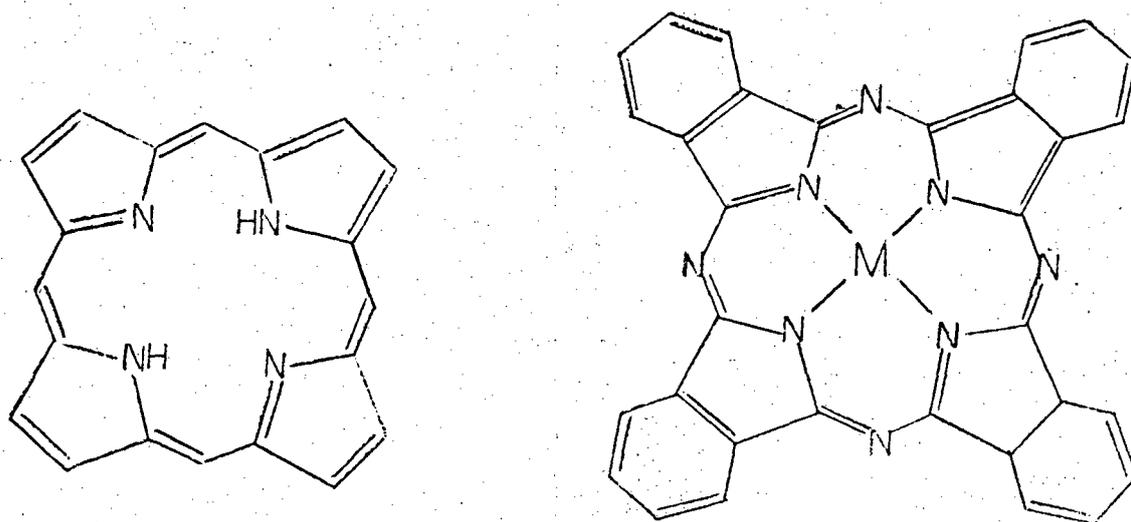
FIGURA 4: Sistema do anel corrinico, com as densidades de carga calculadas para um íon metálico dipositivo

As porfirinas podem aceitar dois íons hidrogênio para formar diácido+2 ou doar dois prótons e tornar-se ânion-2. Nesta última forma, é que as porfirinas complexam com íons metálicos, usualmente dipositivos, para formar complexos metaloporfirínico. O tamanho do *buraco* no centro do anel porfirínico é ideal para acomodar metais da primeira série de transição. O sistema porfirínico é razoavelmente rígido. Um grupo de compostos correlacionados, as ftalocianinas (*Figura 5b*), são isoeletrônicos com as porfirinas.<sup>20</sup>

O *buraco* no anel ftalocianínico é cerca de  $0,1 \text{ \AA}$  menor que os porfirínicos devido ao menor tamanho do átomo de nitrogênio formando ponte, comparado com o carbono. As metaloporfirinas são compostos biologicamente importantes, cujas funções podem variar pela troca do metal, seus estados de oxidação ou a natureza dos substituintes orgânicos na estrutura porfirínica.

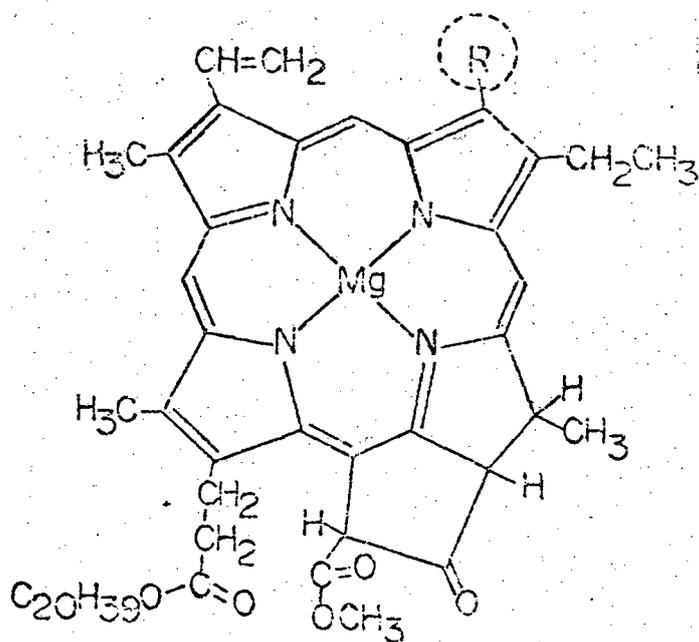
Uma interessante metaloporfirina é a clorofila, (*Figura 5c*) presente nas plantas verdes, um complexo de magnésio contendo um sistema de anel porfirínico, na qual a dupla ligação num dos anéis pirrólicos tem sido reduzida. Um anel fundido de ciclopentanona também está presente.<sup>20</sup>

Finalmente, a vitamina  $B_{12}$  é um complexo cobalto correlacionado de estrutura um pouco diferente. A molécula é construída ao redor de um anel corrínico (um anel porfirínico modificado) contendo um átomo de cobalto(III). É interessante notar que embora porfirinas de cobalto análogas à  $B_{12}$  tem sido sintetizadas, elas não podem ser reduzidas para cobalto(I) em meio aquoso.



(a)

(b)



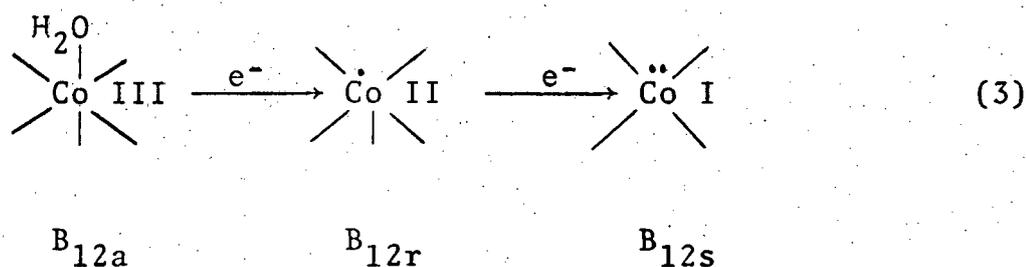
(c)

FIGURA 5: Fórmulas estruturais planas dos compostos:

- (a) Porphina
- (b) Ftalocianina
- (c) Clorofila

### 3.2. Estados de oxidação da B<sub>12</sub>

Cianocobalamina ou qualquer das alquilcobalaminas contém formalmente cobalto no estado de oxidação +3. Estas cobalaminas são diamagnéticas. As espécies cobalto(III), usualmente um ciano ou aquocobalamina, pode ser reduzida em etapas de um elétron para uma espécie cobalto(II) (B<sub>12r</sub>) e então para espécies cobalto(I) (B<sub>12s</sub>). (3)



Esta redução pode ser acompanhada por vários agentes redutores como boridreto de sódio, íon cromo (pH 5), zinco em ácido acético, ácido ascórbico, etc...

Um método muito conveniente para produzir B<sub>12r</sub> é a fotólise anaeróbica de alquilcobalaminas. B<sub>12r</sub>, uma espécie marrom de cobalto(II), é um complexo d<sup>7</sup> de baixo spin. Como tal, contém um elétron não emparelhado e é o único derivado da B<sub>12</sub> paramagnético. O elétron não emparelhado reside no orbital 3d<sub>z<sup>2</sup></sub>. Na maioria das condições a B<sub>12r</sub> é um complexo de coordenação 5. O composto pode ser muito facilmente oxidado retornando à aquocobalamina pelo oxigênio atmosférico e portanto deve ser armazenado anaerobicamente. Tem sido descrito que B<sub>12r</sub> em solução é capaz de sofrer dismutação para B<sub>12s</sub> e B<sub>12a</sub>.<sup>19</sup>

A seguir, é mostrado na Figura 6 um diagrama esquemático de orbital molecular descrevendo os efeitos dos ligandos axi

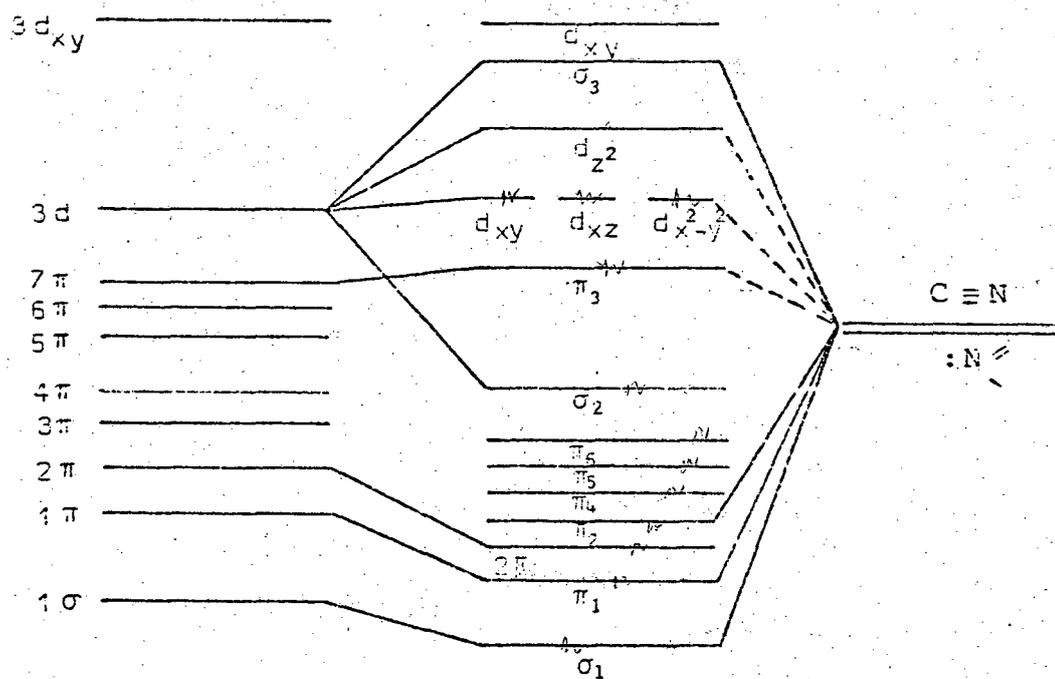
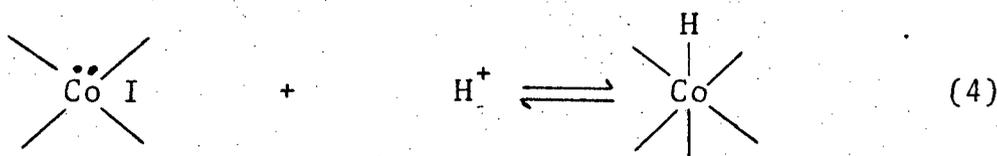


FIGURA 6: Diagrama de orbital molecular e os níveis eletrônicos da organocobalamina

ais nos níveis eletrônicos.<sup>21</sup>

$B_{12s}$ , é um complexo verde - acinzentado  $d^8$  de baixo spin: É diamagnético e é um nucleófilo extremamente forte (nucleófilo mais forte que existe em solução aquosa).<sup>3</sup> Vitamina  $B_{12s}$  é um intermediário muito importante na síntese de derivados alquilcobalaminas. Por exemplo, a síntese da metilcobalamina gera primeiro  $B_{12s}$  que reagirá rapidamente com iodeto de metila para obter o produto desejado. A maioria dos alquilas primários dão cobalaminas estáveis. A estabilidade da alquilcobalamina é geralmente inversamente relacionada ao volume do ligando alquila.

Grupos ligeiramente volumosos como sec-butil reagirão com o nucleófilo, mas não formam produtos estáveis.<sup>19</sup> As espécies reduzidas  $Co(I)$  têm índice de coordenação 4 em solução. Em soluções aquosas neutras o ligando benzimidazol não está coordenado, mas pode ser trocado por uma molécula de solvente fracamente ligada. Tem-se descrito recentemente que a redução de hidroxocobalamina em ácido acético glacial dá um produto que é largamente protonado ao qual se é referido como hidretocobalamina, que reage com olefinas não ativadas como etileno para dar etilcobalamina.<sup>19</sup> (4)

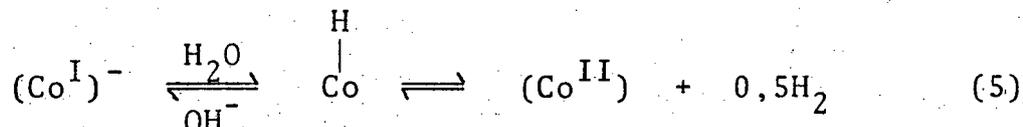


### 3.3. Química da ligação cobalto-carbono

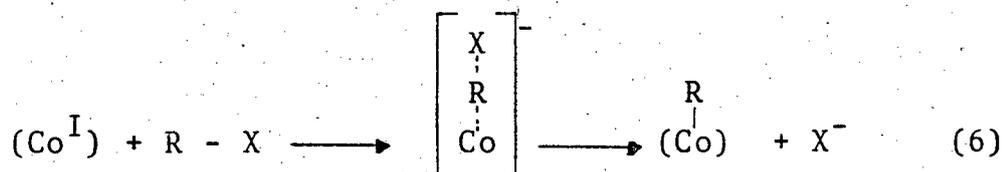
#### 3.3.1. Reações nucleofílicas com(I) e por radicais livres(CoII)

Vitamina  $B_{12s}$  está em equilíbrio com a vitamina  $B_{12r}$  e hidrogênio molecular. Nas soluções alcalinas, a forma predomi-

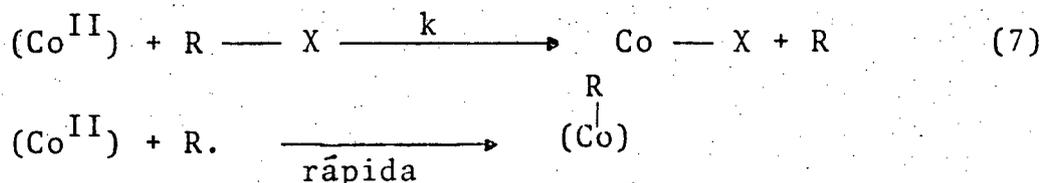
nante da vitamina B<sub>12s</sub> é a espécie Co(I) de spin emparelhado na qual o átomo de cobalto tem a propriedade de um forte nucleófilo. A concentração do ácido instável (H-Co) é muito pequena em soluções alcalinas ou em soluções ácidas.<sup>3</sup> (5)



Muitos agentes alquilantes convencionais reagem com vitamina B<sub>12s</sub> para produzir derivados organocobalto. Estas reações podem ser formuladas como processos de deslocamento nucleofílico e seu caráter S<sub>N</sub><sup>2</sup> tem sido rigorosamente estabelecido.<sup>3</sup> (6)

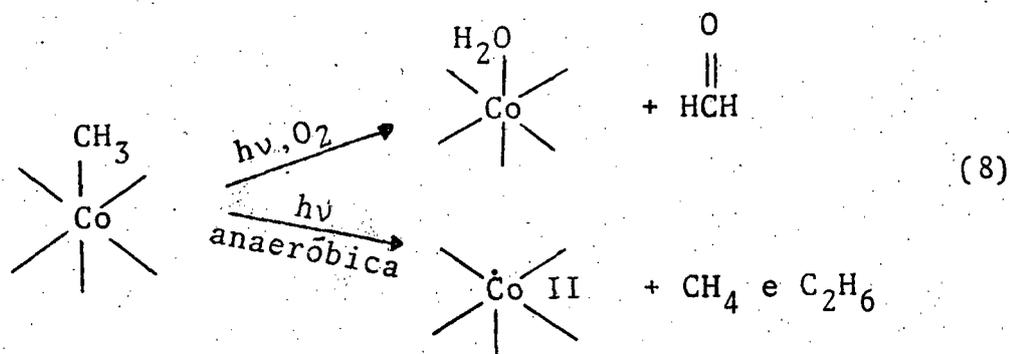


Em reações de espécies Co(II), uma alternativa mecânica fora alquilação, seria um processo de desalogenação envolvendo radicais livres seguido da reação do radical orgânico, com excesso de Co II.<sup>3</sup> (7)



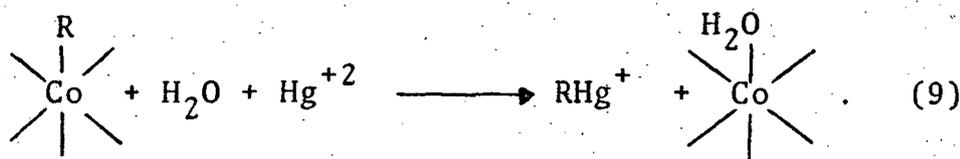
A seguir estudar-se-á a fotoquímica de alquilcobalaminas. Embora os alquil corrinóides são surpreendentemente estáveis numa variada vizinhança química tais como ácido ou base diluída, a ligação cobalto-carbono é rompida muito facilmente pela luz visível. A natureza dos produtos formados depende das condições sob as quais a fotólise é realizada. Quando uma solução aquosa

de metilcobalamina é fotolisada na presença de oxigênio, os produtos são aquocobalamina e formaldeído. Porém, fotólise anaeróbica dá B<sub>12r</sub>, metano e etano, (8), sendo este um método muito conveniente para gerar B<sub>12r</sub> pura.<sup>22</sup>



### 3.3.2. Reações com transferência de alquilas

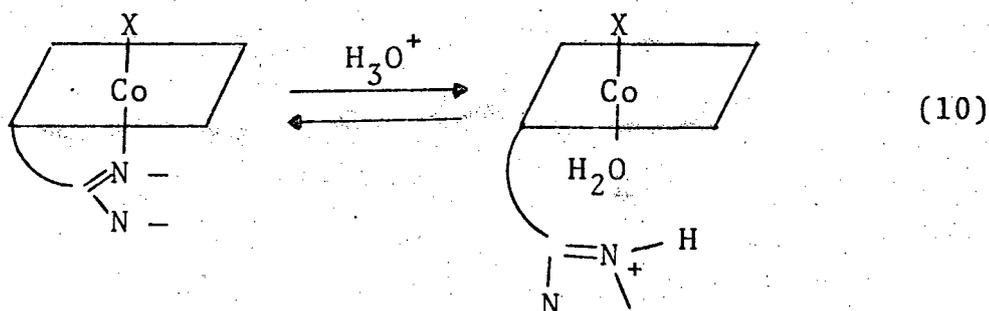
A ligação alquil-cobalto pode ser também quebrada e transferida para outras espécies químicas. A transferência de metila da metilcobaloxima para a vitamina B<sub>12r</sub>, tem sido descrita. Tem-se mostrado que na presença de Hg(II), K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> e Pt(IV), alquil de cobalto corrinóides sofrem reações de dealquilação, nas quais o ataque eletrofílico do metal resulta na remoção do grupo alquila como um carbânio.<sup>19</sup> (9)



### 3.4. Equilíbrio químico

Em soluções neutras, a maioria das cobalaminas tem o ligando 5,6-dimetilbenzimidazol coordenado na 5<sup>a</sup> posição ao cobalto. O N-3 do benzimidazol pode ser protonado causando o rompimento da cadeia nucleotídica com o metal. Quanto isto acontece,

uma molécula de água troca o grupo benzimidazol. (10)



O pKa para este equilíbrio de protonação depende principalmente da natureza do ligando que ocupa a 6<sup>a</sup> posição de coordenação (axial superior) num típico resultado do efeito trans.<sup>19</sup> (Tabela II)

TABELA II: pKa para uma série de alquilcobalaminas

Grupo alquila	pKa
CH <sub>3</sub>	2,7
n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	3,93
n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	4,01
5'-deoxiadenosil	3,52
HOOCCH <sub>2</sub>	1,50

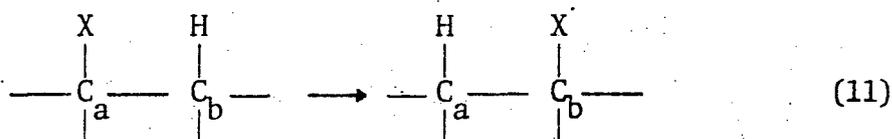
### 3.5. Espectros de absorção de cobalaminas

A seguir, serão apresentados os espectros de absorção das espécies  $B_{12a}$ ,  $B_{12r}$  e  $B_{12s}$  na *Figura 7*, e os espectros da  $Me-B_{12}$  e  $Me-B_{12}$  protonada na *Figura 8*.

### 3.6. Funções bioquímicas da $B_{12}$

Finalmente dar-se-á uma breve introdução da participação da vitamina  $B_{12}$  em sistemas biológicos.

Geralmente, as enzimas dependentes da  $B_{12}$  são classificadas em duas diferentes categorias: (1) aquelas usando coenzima  $B_{12}$  (5'-deoksiadenosilcobalamina) como o cofator e (2) aquelas usando metilcobalamina como cofator. As enzimas usando coenzima como cofator, conduz<sup>em</sup> a uma reação catalítica que envolve a transferência de um átomo de hidrogênio. Portanto, estas enzimas são às vezes, chamadas de enzimas de transferências de hidrogênio.<sup>19</sup> (11)



Aqui um átomo de hidrogênio é removido do carbono-b de uma molécula substrato, e o grupo X é transferido do carbono-a para o carbono-b. O átomo de hidrogênio retornando para a molécula substrato não é necessariamente o mesmo átomo que foi originalmente removido. Algumas destas enzimas são a glutamate mutase, metilmalonil-CoA isomerase, e dioldesidrase.<sup>19</sup>

A segunda categoria das enzimas dependentes da  $B_{12}$  que usa metilcobalamina como cofator, está envolvida no metabolismo

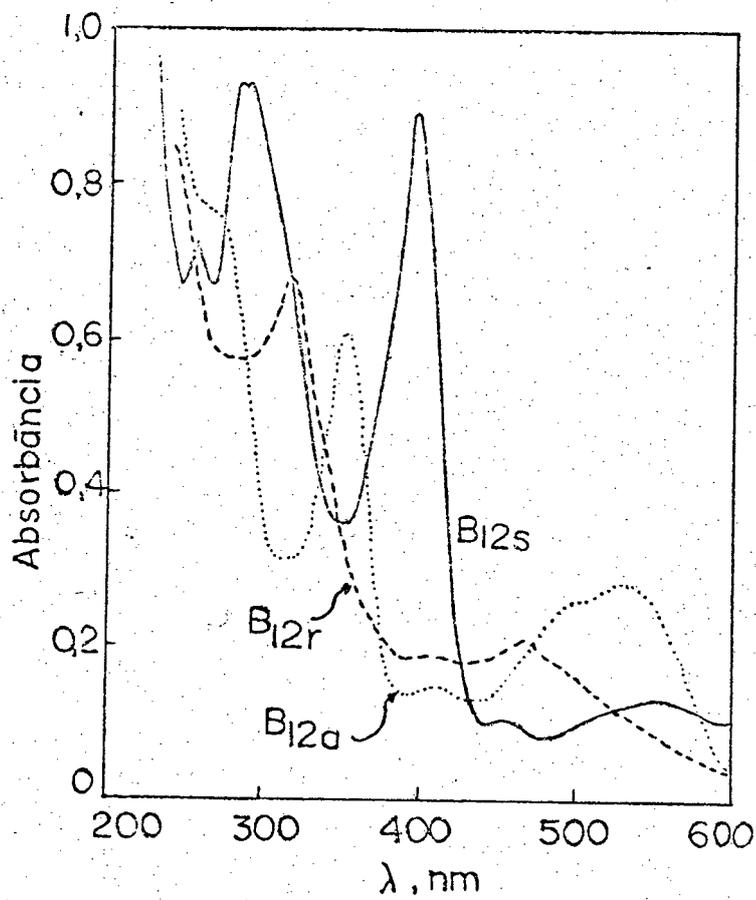


FIGURA 7: Espectro de absorção: (.....) hidroxocobalamina;  
(-----) B<sub>12r</sub>; (—) B<sub>12s</sub>

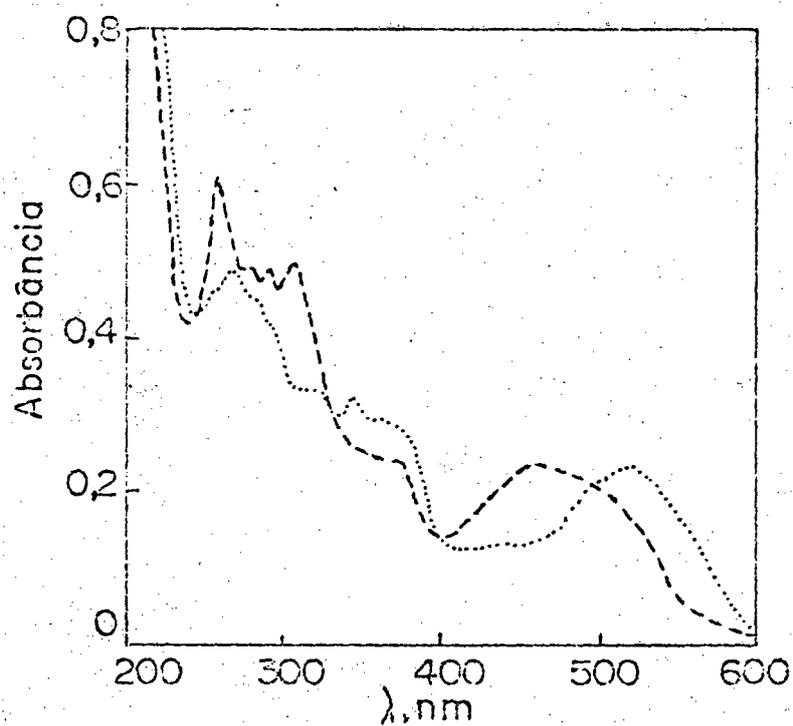
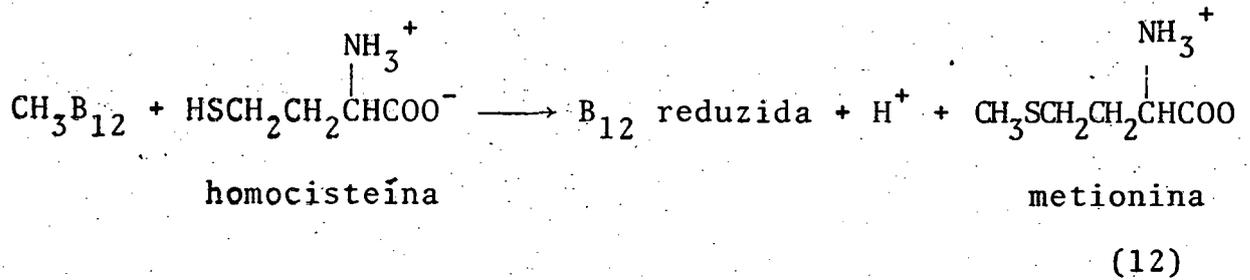


FIGURA 8: Espectro de absorção: (.....) metilcobalamina;  
(-----) metilcobalamina protonada

de carbono-1, isto é, elas conduzem reações nas quais um carbono (grupo metila) é transferido de um sítio para outro. Algumas destas reações são descritas a seguir.

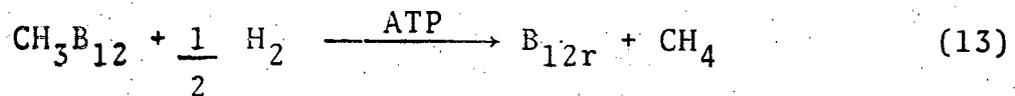
### 3.6.1. Biossíntese da metionina

Metionina é um dos aminoácidos importantes. A etapa terminal na biossíntese da metionina envolve a metilação do átomo de enxofre da homocisteína.<sup>19</sup> (12)



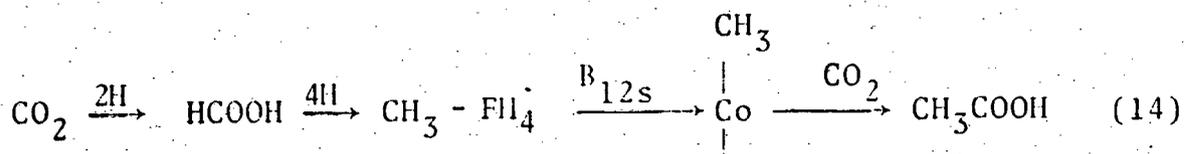
### 3.6.2. Formação de metano

Existem muitas bactérias anaeróbicas que geram metano como um produto final de seu metabolismo (Metanobacillus ome-lianskii, metanosorcina barkeri). Uma das etapas terminais na produção do metano é mostrada a seguir. (13)



### 3.6.3. Síntese do acetato

Um número de microorganismos produz uma grande quantidade de acetato. Alguns destes acetatos são sintetizados a partir do dióxido de carbono. Enzimas dependentes da B<sub>12</sub> (Clostridium thermoaceticum) estão envolvidas nas etapas terminais da síntese do acetato a partir do CO<sub>2</sub>.<sup>19</sup> (14)



## CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Equipamentos

Os espectros UV - VIS das substâncias padrão e dos produtos de reações foram obtidos usando um espectrofotômetro Varian 634-UV - VIS, equipado com um registrador potenciométrico ECB (Equipamentos Científicos do Brasil) - modelo RB 101 ou um espectrofotômetro Hitachi - Perkin - Elmer 139 - UV - VIS, na temperatura ambiente.

Determinação dos pontos de fusão, foi feita num aparelho da Metler, modelo FP-52 equipado com um microscópio Zeiss-Jena, modelo NU. Os pontos de fusão não foram corrigidos.

Cromatografia gasosa foi realizada num aparelho Varian modelo 2440-D, equipado com um registrador potenciométrico modelo 261 MM - Linear Instrument Corp. Irving, California - USA, equipado com um detetor de ionização de chamas (DIC) e uma coluna (2 m x 3,2 mm) empacotada com 3% de OV-17 em 80-100 mesh Chrom W - AW - DMCS.

Cromatografia em camada delgada foi realizada usando o equipamento da Desaga - Heidelberg, com placas de 20 x 20 cm e 20 x 5 cm. Foi utilizada uma lâmpada de luz mineral UV - SL - 25, com onda curta e onda longa para visualizar os componentes não coloridos sobre as placas.

### 2. Materiais

Vitamina B<sub>12b</sub>, hidroxocobalamina (Merck & Co.) foi

utilizada conforme recebida. Vitamina B<sub>12s</sub> foi preparada a partir da hidroxocobalamina por meio de uma redução com boridreto de sódio, em ambiente nitrogenado. Vitamina B<sub>12r</sub> foi preparada a partir da metilcobalamina por meio de fotólise utilizando-se de uma lâmpada de 300 watts.

Metilcobalamina foi preparada por redução da hidroxocobalamina através de boridreto de sódio, seguida por adição oxidativa de iodeto de metila.<sup>23</sup> Soluções de hidroxocobalamina (500 mg em 20 ml de H<sub>2</sub>O) e NaBH<sub>4</sub> (400 mg em 5 ml de H<sub>2</sub>O) foram purgadas por 30 minutos separadamente por nitrogênio purificado em recipientes fechados.

A seguir as duas soluções foram misturadas, reagindo até que a redução deu como produto a B<sub>12s</sub> de cor verde escuro (15 minutos). O recipiente da reação foi então coberto com a folha de alumínio para excluir a luz. Iodeto de metila (3 ml) foi adicionado à solução e a reação seguiu por 30 minutos. O nitrogênio continuou purgando durante o tempo de reação. Todas as operações de purificação foram conduzidas no escuro. A mistura de reação foi extraída num funil de separação com 60 ml de solução aquosa de fenol a 90% p/p. A metilcobalamina foi separada na fase fenólica. A fase aquosa foi desprezada e a camada fenólica foi lavada duas vezes com 25 ml de H<sub>2</sub>O. A seguir, adicionou-se à camada fenólica 200 ml de mistura éter/acetona (4:1).

A solução orgânica foi extraída três vezes com 35 ml de H<sub>2</sub>O. Toda a metilcobalamina foi removida para a fase aquosa, sendo esta lavada duas vezes cada com 50 ml de éter etílico. As camadas etéreas foram desprezadas. O volume da solução aquosa de

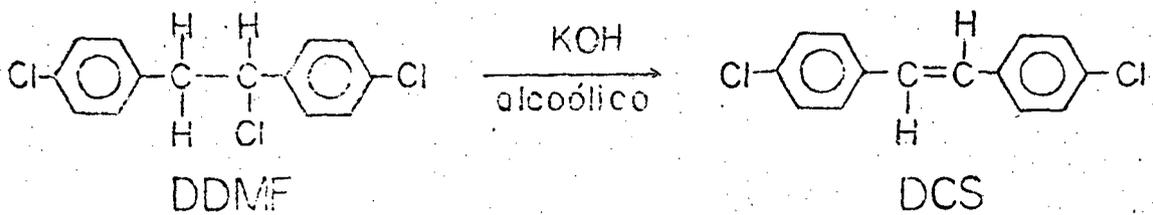
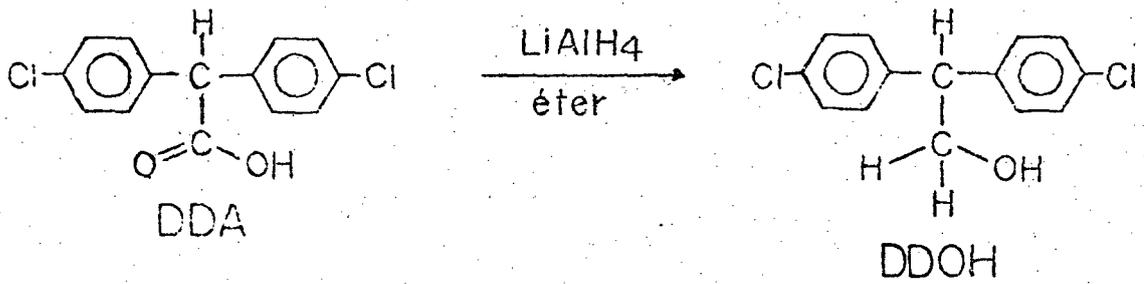
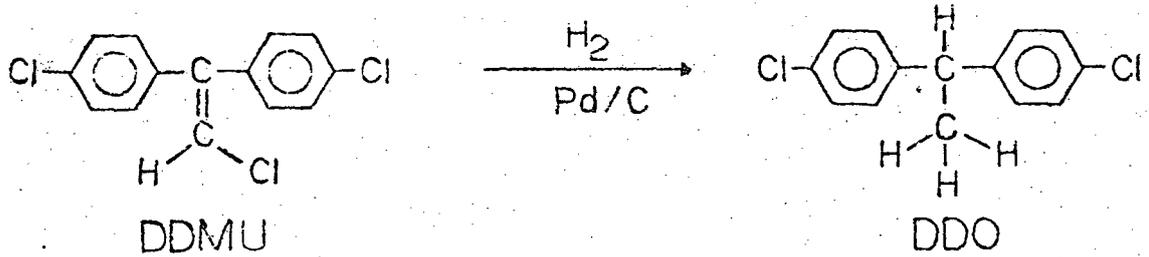
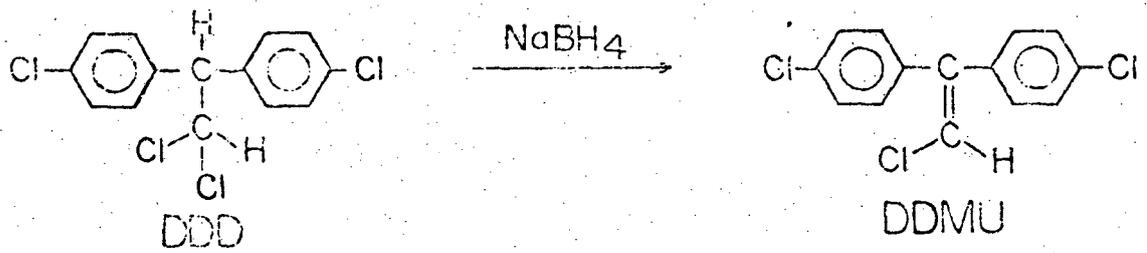
metilcobalamina foi reduzido a poucos mililitros num evaporador rotatório à temperatura menor que 35°C. A solução da metilcobalamina foi purificada, passando-a através da coluna OH<sup>-</sup> - DEAE - Celulose. O eluente foi concentrado no evaporador rotatório (t<sup>o</sup> < 35°C) e adicionou-se acetona gota a gota até aparecer turbidez, sendo que os cristais foram formados na solução refrigerada durante uma noite. O sobrenadante foi decantado, e os cristais vermelhos foram recolhidos. A metilcobalamina preparada foi secada numa pistola Abder Halden com sílica-gel, dando um rendimento superior a 90%. A pureza da metilcobalamina foi observada por espectrofotometria, observando-se a ausência do pico da B<sub>12a</sub> com  $\lambda_{\text{máx.}}$  igual a 350 nm.\*

Os compostos aldrin, dieldrin e  $\gamma$ -clordane eram padrões cromatográficos e foram utilizados conforme recebidos da Chem Service (West Chester, Pa, USA).

Os compostos DDT, DDD, DDE e DDA, foram utilizados conforme recebidos da Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee Wis. 53233, USA) e suas purezas foram consideradas satisfatórias por cromatografia em fase gasosa e cromatografia em camada delgada.

Os compostos DDMU, DDNU, DDD, DDM, DDOH e DCS foram sintetizados conforme descrito previamente<sup>24</sup> e não serão discutidos por extenso.

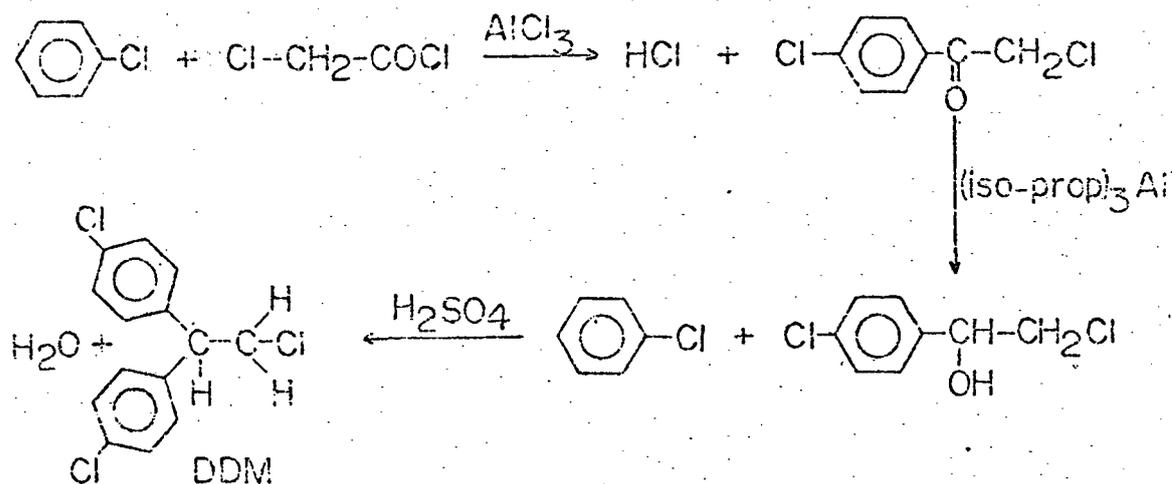
O Esquema 4 descreve as sínteses de DDMU, DDNU, DDO, DDOH e DCS. DDMU, DDNU e DCS foram preparados por desidrocloração de DDD, DDM e DDMF respectivamente. DDO foi preparado por hidrogenação catalítica de DDMU. Redução de DDA com hidreto de alumínio e lítio em dietil éter resultou na formação do DDOH.



ESQUEMA 4

No Esquema 5 está descrito o método da síntese do DDM. Reação com clorobenzeno com cloreto de cloroacetila na presença de  $\text{AlCl}_3$  resultou na formação de  $\alpha$ -4-dicloroacetofenona. Tratamento desta com isopropóxido de alumínio, seguido de reação do produto seco com clorobenzeno na presença de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  deu como resultado a formação de DDM.

Sílica-gel GF<sub>254</sub>, usado na cromatografia em camada delgada foi comprada da Merck & Co. Os solventes utilizados foram de grau pró-análise (P.A.) e foram obtidos da Merck e da Reagen. Todos os demais reagentes utilizados foram do melhor grau de pureza disponível.



ESQUEMA 5

### 3. Métodos

#### 3.1. *Cromatografia em camada delgada*

As placas para a CCD foram preparadas segundo o método recomendado por Stahl<sup>25</sup> em placas de 20 x 20 cm e 20 x 5 cm. Foi usado como suporte sólido sílica-gel GF<sub>254</sub> (Merck). Para a espessura de 0,30 mm usou-se a proporção de 1:2 de sílica-água (40 g de sílica-gel em 80 ml de H<sub>2</sub>O). Após vigorosa agitação e espalhamento sobre as placas, estas foram ativadas à 110°C numa estufa por 30 minutos. As amostras dissolvidas em solventes voláteis foram introduzidas no suporte sólido usando tubos capilares. O eluente utilizado foi éter de petróleo, fração 30 - 60°C, da Reagen. As placas com as amostras e padrões adsorvidos eram introduzidas numa câmara cromatográfica, onde tinha início a eluição. Quando o solvente atingia certa altura, a corrida era interrompida, com a marcação da frente do solvente. Com o auxílio da lâmpada UV eram marcadas as áreas das manchas dos componentes e padrões. Então, eram calculados os R<sub>f</sub>, ou seja, a razão entre a altura do componente e a altura da frente do solvente.

#### 3.2. *Cromatografia em fase gasosa*

A coluna (2 m x 3,2 mm) empacotada com 3% de OV-17 em 80-100 mesh Chrom - W - AW - DMCS, foi condicionada por 3 dias a 225°C com um fluxo moderado de nitrogênio. As condições de operação cromatográfica foram as seguintes: temperatura da coluna 190°C, bloco de injeção 215°C e detetor 200°C; fluxo de nitrogênio 40 ml/min, atenuação em 1, e sensibilidade 10<sup>-10</sup>.<sup>26</sup>

As soluções de pesticidas padrão da família do DDT fo

ram preparadas em ciclohexano (Merck, p.a.). Foram medidos os respectivos tempos de retenção. Sob as condições descritas, a eficiência da coluna foi calculada pela fórmula<sup>27</sup>  $n = \left(\frac{D}{L}\right)^2 \cdot 16$ , onde n é o número de pratos teóricos, D a distância de retenção (distância em centímetros do pico máximo até o início da injeção), e L o comprimento do pico, dando como resultado 2150 pratos teóricos em relação ao DDT.

Retenções relativas, definido como a razão entre as distâncias ou tempos de retenção de vários componentes e a distância ou tempo de retenção de um determinado componente, foram tomadas segundo o padrão DDD. Portanto, o  $RR_{DDD}$  é igual a unidade, ou seja,  $RR_{DDD} = \frac{D_{DDD}}{D_{DDD}} = \frac{t_{DDD}}{t_{DDD}} = 1$ .

### 3.3. Dosagem de cloretos

Foram usados dois métodos, um gravimétrico e um volumétrico. No método gravimétrico um determinado volume de solução aquosa (amostra) contendo cloretos foi tratado com algumas gotas de  $\text{HNO}_3$  concentrado e um volume adequado de  $\text{AgNO}_3$  0,1 N (precipitante). A mistura foi aquecida durante 10 minutos, para ajudar a coagulação do precipitado de cloreto de prata. Decantou-se, logo após filtrou-se e o precipitado foi lavado com  $\text{HNO}_3$  diluído. A seguir foi levado à estufa a  $110^\circ\text{C}$ , por 2 horas. Toda a operação anterior foi realizada na penumbra, devido à decomposição do  $\text{AgCl}$  pela luz. Após esse tempo necessário para o precipitado ser levado a peso constante, foi calculado o peso de cloreto existente na amostra, segundo a relação:

$$\text{peso cloreto} = \text{peso amostra} \times \frac{\text{átomo-grama Cl}^-}{\text{molécula-grama AgCl}}$$

O método gravimétrico é pouco preciso no caso onde as quantidades são de ordem de miligramas, tendo um erro de aproximadamente 10% neste caso.

Um volume total da amostra contendo cloretos foi medido. O pH da solução foi corrigido para 7. Alíquotas desta solução (geralmente 3 alíquotas de 20 ml) foram tituladas com solução de  $\text{AgNO}_3$  0,1 N, usando como indicador 1 ml de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  a 5%. O ponto final da titulação foi acompanhado ao de um branco ( $\text{CaCO}_3$  em água destilada e  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  a 5%), dado a cor característica vermelho tijolo. Os volumes gastos de  $\text{AgNO}_3$  0,1 N foram medidos, e o valor médio destes volumes foi usado no cálculo na quantidade de cloretos (mg) existente na amostra total, segundo a seguinte relação:

$$\text{peso Cl}^- = V_{\text{AgNO}_3} \cdot N_{\text{AgNO}_3} \times 35,5 \quad (15)$$

No método volumétrico o erro foi de aproximadamente 3%.

#### 4. Esquema de reação

##### 4.1. Sistema de purificação de nitrogênio e de reação

Como todas as reações dos pesticidas clorados da família do norborneno ou da família do DDT com a vitamina  $\text{B}_{12\text{S}}$ , necessitavam ser realizadas em ambientes nitrogenados, procurou-se utilizar de um sistema de purificação de gás nitrogênio, como foi descrito anteriormente.<sup>234</sup>

#### 4.2. Reações de pesticidas clorados da família dos norbornenos com vitamina B<sub>12s</sub>

Foram feitas várias reações de pesticidas como aldrin, dieldrin, e  $\gamma$ -clordane com a vitamina B<sub>12s</sub>, nas mesmas condições de quantidades de reagentes e de procedimentos. Em vista disto, será descrito a seguir em detalhes todo o esquema da reação da vitamina B<sub>12s</sub> com pesticidas da família dos norbornenos.

Soluções de hidroxocobalamina (40 mg de B<sub>12a</sub> em 10 ml de H<sub>2</sub>O) e pesticida (100 mg de pesticida em 50 ml de metanol, aproximadamente 9 vezes de excesso de pesticida) foram separadamente purgadas com nitrogênio purificado em recipientes fechados por 30 minutos. A seguir adicionou-se NaBH<sub>4</sub> em excesso à solução da vitamina B<sub>12a</sub>, deixando-se reagir até que a coloração ficou verde escuro, ou seja, formação da B<sub>12s</sub> por redução. O recipiente foi então coberto com folha de alumínio para excluir toda a luz. Solução de pesticida foi adicionada à solução da B<sub>12s</sub>, deixando-se reagir por 30 minutos. O nitrogênio continuou purgando durante todo o processo.

A mistura da reação foi extraída num funil de separação com éter etílico (Reagen). A solução da vitamina ficou separada na fase aquosa juntamente com os cloretos liberados na reação, enquanto que a fração orgânica ficou na fase etérea. A solução contendo vitamina e cloretos, foi então extraída com fenol a 90%, tal como foi descrito previamente na síntese da metilcobalamina.<sup>23</sup>

Finalmente, a solução aquosa de vitamina foi submetida à análise por espectrofotometria UV - VIS, enquanto que a solução

aquosa contendo cloretos, foi submetida à dosagem de cloretos por gravimetria e titulação (método de Mohr).

#### 4.3. Reação do DDT com vitamina B<sub>12s</sub>

Soluções de DDT (100 mg de DDT em 60 ml de metanol) e hidroxocobalamina (Merck) (50 mg de B<sub>12a</sub> em 6 ml de H<sub>2</sub>O) foram purgadas com N<sub>2</sub> separadamente por 30 minutos. Logo após foi adicionado na solução da B<sub>12a</sub> 100 mg de boridreto de sódio, seguindo-se a redução em ambiente nitrogenado até formar a B<sub>12s</sub> (5 minutos).

Misturou-se então, as soluções de DDT e B<sub>12s</sub>, deixando-se reagir por 1 hora. A seguir, a mistura da reação foi extraída com clorofórmio, sendo empregado volumes pequenos de clorofórmio e água. Sucessivas extrações (volume pequeno) foram feitas, sendo que a vitamina e componentes inorgânicos ficaram na fase aquosa, enquanto que todos os derivados do DDT ficaram na fase orgânica. A solução clorofórmica foi então evaporada até a secura. A fração orgânica foi então analisada por cromatografia gasosa (ver seção 3.1) e por cromatografia em camada delgada (ver seção 3.2).

A seguir foram realizadas reações *em branco* entre DDT e NaBH<sub>4</sub>, sem a presença da vitamina B<sub>12s</sub>. Soluções de DDT (100 mg em 40 ml de MeOH) e boridreto de sódio (250 mg em 5 ml de H<sub>2</sub>O) foram purgadas com nitrogênio por 15 minutos. A seguir misturou-se as soluções. Após 30 minutos de reação, a mistura foi extraída com clorofórmio. A solução aquosa foi submetida à dosagem de cloretos (Mohr), enquanto que a solução clorofórmica foi submetida à cromatografia em camada delgada.

#### 4.4. Reações de pesticidas clorados da classe do DDT com vitamina B<sub>12r</sub>

Várias reações de cada pesticida como DDT, DDD, DDM, DDE e DDMU foram feitas mol a mol com a vitamina B<sub>12r</sub>, nas mesmas condições de procedimentos. Portanto, será descrito a seguir, um esquema geral das reações destes pesticidas com a vitamina B<sub>12r</sub>, tomando como exemplo a reação do DDT.

O gás nitrogênio purificado conforme descrito previamente é introduzido num sistema da reação constituído de um balão de uma boca onde foram colocadas soluções de metilcobalamina (200 mg de Me-B<sub>12</sub> em 25 ml de H<sub>2</sub>O) e de DDT (52,7 mg de DDT em 90 ml de MeOH).

O ambiente da reação foi purgado com nitrogênio por 30 minutos na ausência de luz; após este tempo fechou-se o sistema para impedir a entrada de oxigênio. Logo após, ainda na ausência de oxigênio, foi feita a fotólise da metilcobalamina com uma lâmpada de 300 watts, a fim de gerar a vitamina B<sub>12r</sub>, para iniciar a reação com o DDT no mesmo sistema de reação. Após 2 dias em presença de luz, a mistura da reação foi extraída com clorofórmio. A solução aquosa da vitamina foi extraída com fenol como foi previamente descrito, sendo doseada para análise de cloretos, enquanto que a camada clorofórmica com os produtos derivados do DDT foi submetida à evaporação até a secura num evaporador rotatório.

Uma parte da fração orgânica foi separada por cromatografia preparativa em camada delgada e analisada em UV, cromatografia em camada delgada e cromatografia em fase gasosa.

A outra parte da fração orgânica foi submetida à reação com KOH alcoólico 3 N. A seguir foi feita extração com clorofórmio, sendo que a fração orgânica foi analisada por cromatografia em camada delgada e por cromatografia em fase gasosa. Em condições similares, fotólise do DDT não deu nenhuma formação de produtos.

A fim de seguir espectrofotometricamente o percurso da reação, preparou-se 10 ml de solução contendo metilcobalamina de concentração  $10^{-4}$  M e DDT de concentração  $10^{-3}$  M (0,0013 g de Me-B<sub>12</sub> em 2 ml de H<sub>2</sub>O e 0,0035 g de DDT em 8 ml de MeOH). Colocou-se 3 ml desta solução numa cubeta de quartzo, onde na ausência de luz foi purgada com nitrogênio por 30 minutos. Logo em seguida, foi obtido um espectro UV-VIS. Após isto, foram feitas 3 fotólises com uma lâmpada de 300 watts com intervalos de 3 minutos, sendo que no final de cada intervalo foi registrado o espectro UV-VIS. Este acompanhamento espectrofotométrico foi feito apenas para a reação do DDT com a vitamina B<sub>12r</sub>.

Na reação do DDM com a vitamina B<sub>12r</sub>, a fração orgânica após análise por CCD, foi passada através de uma coluna de sílica-gel usando como eluente ciclohexano (Merck). A separação dos componentes foi acompanhada numa bateria de tubos através do espectrofotômetro UV. Os produtos da reação do DDM também foram analisados por cromatografia em fase gasosa.

### CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1. Reações de pesticidas clorados da família do norborneno com vitamina B<sub>12s</sub>

A reação da vitamina B<sub>12s</sub>, gerada por redução da vitamina B<sub>12a</sub> em ambiente nitrogenado, com pesticidas norbornenos foi estudada com respeito aos produtos. Foram feitas determinações com a solução aquosa contendo a vitamina e doseou-se o cloreto retirado durante o percurso da reação (Tabela III).

A solução aquosa da vitamina B<sub>12</sub> resultante da reação com os pesticidas norbornenos apresentou uma coloração vermelha, semelhante à aquela da vitamina B<sub>12a</sub>. Porém, uma alíquota desta solução, colocada em meio ácido, resultou em troca de coloração para amarelo nítido, demonstrando que o derivado da vitamina B<sub>12</sub> formado durante o percurso da reação apresentou um equilíbrio do tipo *base on - base off*. Esta troca de cor representa um aumento de aproximadamente 5 unidades no valor do pKa do benzimidazol ligado na 5ª posição de coordenação comparado com a vitamina B<sub>12a</sub> e representa um fenômeno típico de derivados da vitamina B<sub>12</sub> contendo um radical alquila ligado ao carbono na 6ª posição de coordenação.

A solução amarela, submetida à fotólise decompunha-se rapidamente, trocando de coloração novamente para vermelho. Esta é também uma evidência da formação de alquilcobalamina (B<sub>12</sub>-R). As reações *em branco* entre os mesmos pesticidas norbornenos e excesso de NaBH<sub>4</sub> nas mesmas condições, apresentaram traços de cloretos comparados aos valores teóricos da tabela III.

TABELA III: Determinação do cloreto produzido nas reações entre vitamina B<sub>12</sub> e os pesticidas norbornenos

Pesticida	Cloreto teórico <sup>a</sup> (mg)	Cloreto experimental <sup>b</sup> (mg)	Nº de Cloros retirados
aldrin	9,7	9,6	≈ 1
dieldrin	9,3	7,8	≈ 1
γ-clordane	8,7	24,0	≈ 3

a - calculado a partir da saída de 1 cloro em 100 mg de pesticida por meio de relações estequiométricas

b - calculado a partir dos dados da titulação com AgNO<sub>3</sub> 0,1 N

A *Figura 9* representa o espectro do complexo vitamina  $B_{12}$ -aldrin em meio ácido, antes da fotólise e o espectro dos produtos depois da fotólise. O espectro após fotólise foi encontrado idêntico com aquele da vitamina  $B_{12a}$ . Num trabalho posterior se rão determinados os produtos orgânicos da fotólise.

Assim, pode-se dizer que a vitamina  $B_{12s}$  reagiu com o aldrin, dieldrin e  $\gamma$ -clordane, pelo fato do produto vitaminado ( $B_{12-R}$ ), em meio ácido ter trocado de coloração (a vitamina  $B_{12a}$  não troca), e pela retirada de átomos de cloro dos pesticidas, conforme *Tabela III*.

O produto  $B_{12-R}$  era muito instável, mesmo na ausência de luz e na geladeira ( $t^{\circ} \approx 4^{\circ}C$ ), decompunha-se em um dia. Devido a este problema, não isolou-se composto puro.

A instabilidade do produto  $B_{12-R}$ , possivelmente é devida à fraca ligação entre o átomo de cobalto da  $B_{12s}$  e o átomo de carbono secundário dos norbornenos. Tentativas de isolar o composto  $B_{12-R}$  no caso de reação entre  $B_{12s}$  e cloreto de isopropila foram feitas por Schrauzer e colaboradores<sup>28</sup>, porém a ligação Co-C era imediatamente rompida e detectava-se somente propileno e propano como produtos de reação. Portanto, o composto  $B_{12-CH-(CH_3)_2}$  não pode ser isolado devido à grande instabilidade desta ligação. Isto justifica a grande instabilidade do composto  $B_{12-R}$  (reações com norbornenos), não podendo também ser isolado.

É sabido que os átomos de cloro vinílico de uma dupla ligação,  $C=C$ , dificilmente são reativos, devido ao fato de serem pobres grupos de saída, sendo portanto praticamente impossível as suas remoções. Por outro lado, os átomos de cloro nas

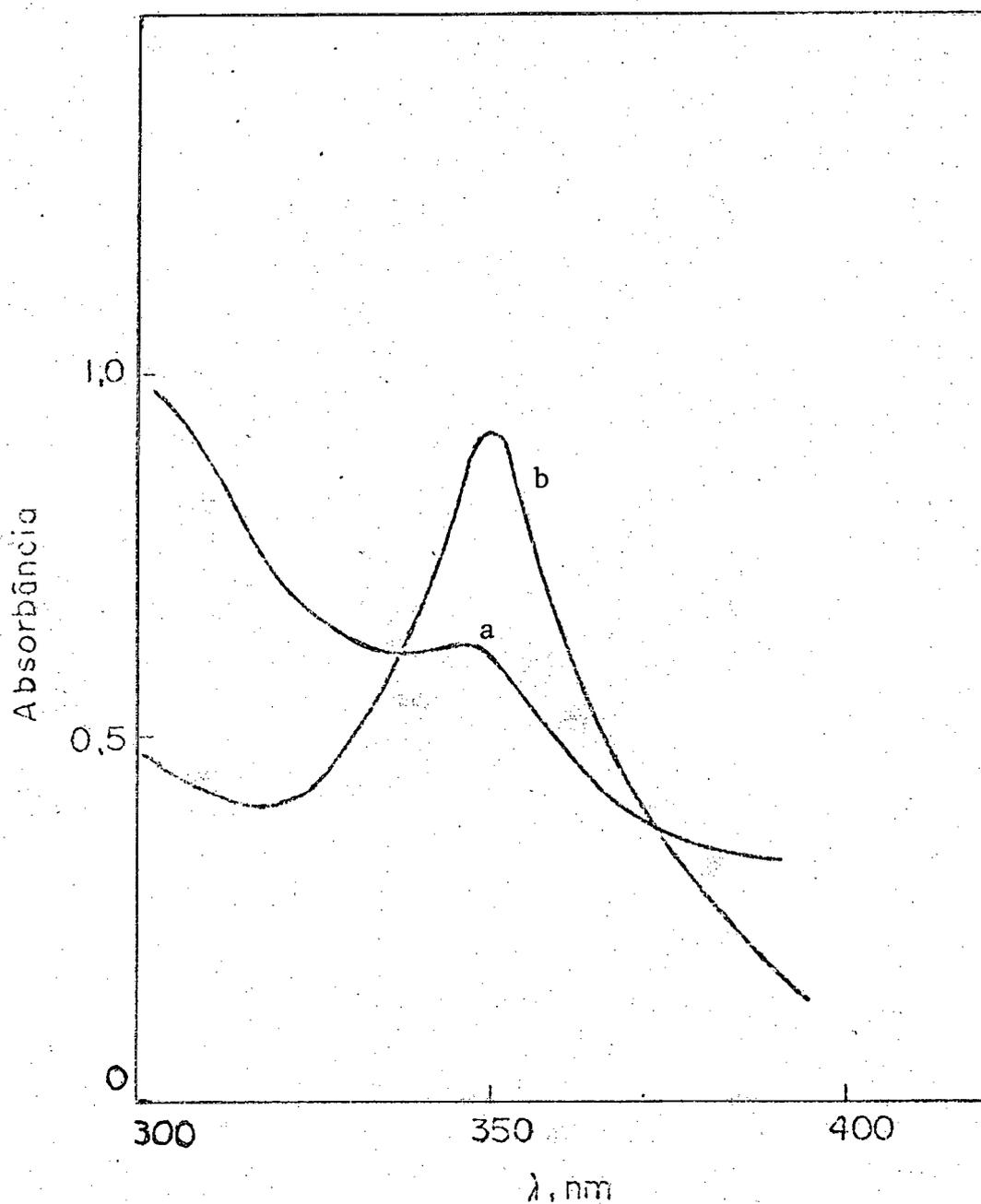


FIGURA 9: Espectros do complexo vitamina B<sub>12</sub>-aldrin em meio ácido antes da fotólise e dos produtos depois da fotólise  
a - antes da fotólise (pH ácido - amarela)  
b - depois da fotólise (vermelha)  
Solvente: MeOH

cabeças de ponte de um composto bicíclico só reagem segundo mecanismo  $S_N1$ , enquanto que as reações por ataque nucleofílico com cobalto (I) se realizam segundo substituição nucleofílica bimolecular  $S_N2$ .<sup>3</sup> Estudos iniciais da reação de substratos assimétricos com cobaloximas (I), dando um produto com completa inversão de configuração, indicam que o mecanismo da reação é  $S_N2$ .<sup>3</sup>

Além disso, outras evidências foram constatadas:<sup>3</sup>

a) Foi estabelecido que para deslocamentos tanto por  $S_N2$  como por radicais livres, a ordem da eficiência do *grupo de saída* é  $I > Br > Cl$ . Observou-se no entanto, que em geral as reações de Co(I) (tributilfosfina-cobaloxima(I) ou vitamina  $B_{12S}$ ) com haletos de alquila são cerca de um fator de 10 mais sensíveis aos efeitos do *grupo de saída* do que uma reação tipo  $S_N2$ , enquanto que as reações de pentacianocobaltato(II) com haletos de alquila são 100 vezes mais sensíveis à natureza do *grupo de saída* do que às reações de Co(I). Isto sugere que as reações de Co(I) assemelham-se à uma reação típica  $S_N2$ .

b) Reações de haletos de cicloalquilas com cobaloxima (I), sob uma ampla variedade de condições demonstraram que as velocidades relativas são típicas de uma reação  $S_N2$ , pelo fato de apresentarem variação de reatividade, enquanto que os haletos reagindo por um mecanismo de radicais livres, mantinham as suas reatividades constantes.

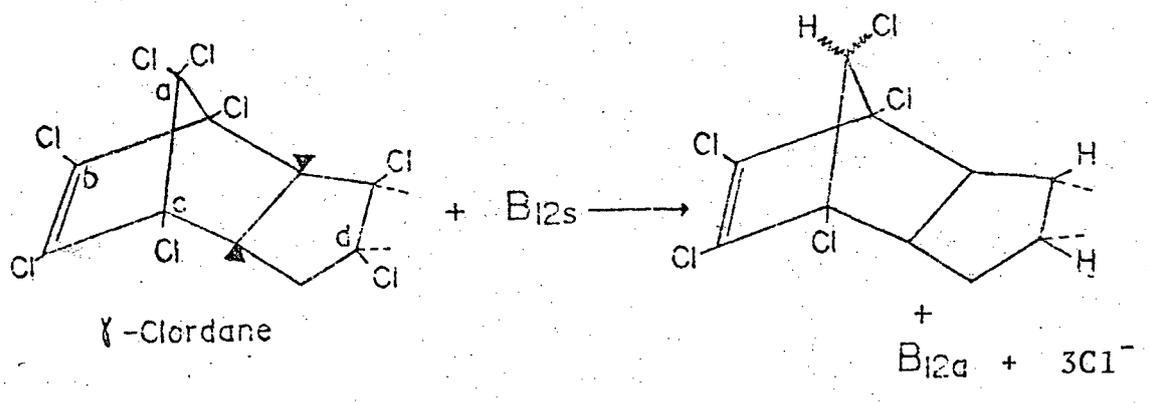
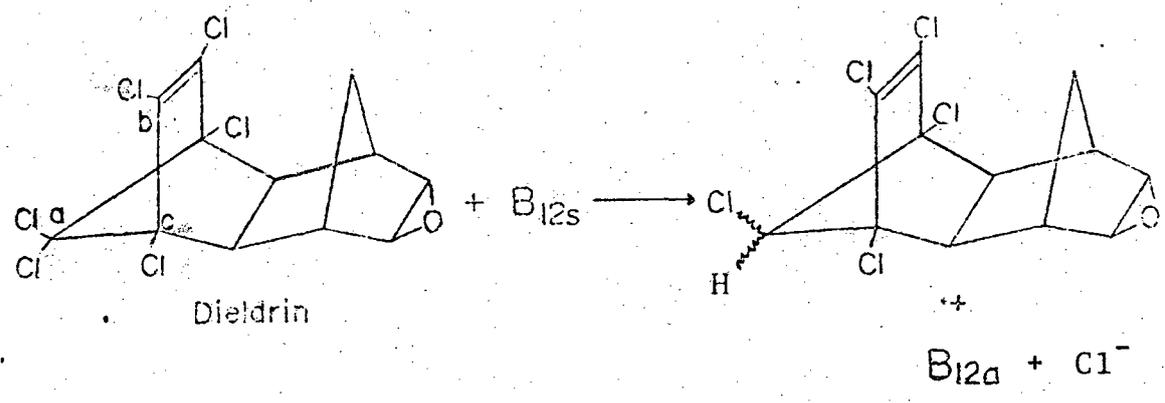
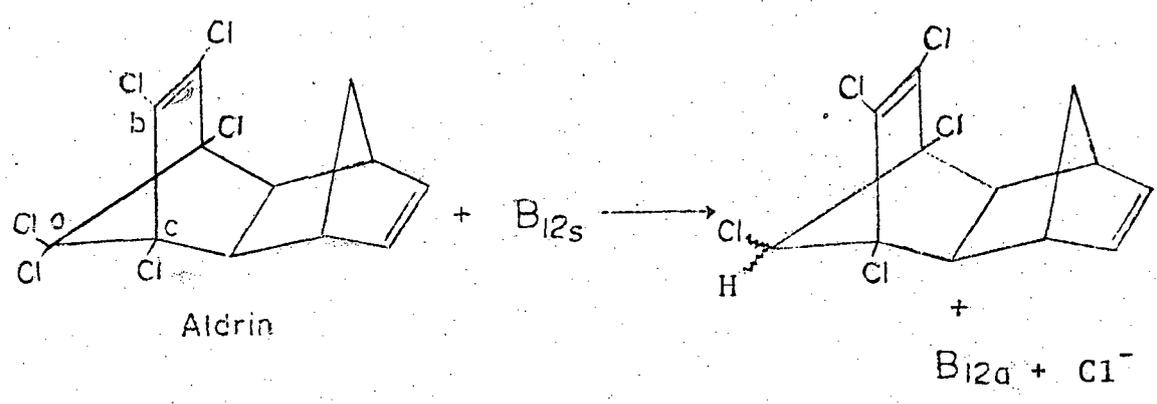
c) Determinações iniciais dos parâmetros de ativação para as reações das espécies cobalto (I) com haletos de alquila indicam que as diferenças de velocidade observadas são grandemente devidas às variações no  $\Delta H^\ddagger$ , e que em geral  $\Delta S^\ddagger$  é grande e negativa (-20 à -30ue). Isto significa num aumento da ordem no estado de

transição e implicando no aumento do número de coordenação do íon metálico no complexo ativado (pentacoordenado nos reagentes e hexacoordenado nos produtos). Isto está de acordo com um mecanismo de uma etapa ( $S_N2$ ) e não com um mecanismo de radicais livres, onde a coordenação do metal não é aumentada na etapa determinante da reação.

d) Não há uma grande dependência do solvente para a alquilação de espécies  $Co(I)$  por haletos de alquila. Isto é definitivamente consistente com uma reação  $S_N2$  entre um íon e uma molécula neutra. Não está claro que seria esperado ou não um efeito diferente num mecanismo via radicais livres.

Ainda que a reação de espécies  $Co(I)$  com haletos de alquila simples e monocíclicos ocorre via um mecanismo  $S_N2$ , é possível que em compostos como aldrin, a saída dos cloretos da ponte metilênica possa ocorrer via um mecanismo  $S_N1$  através de um íon carbônio não clássico com assistência anquimérica da dupla ligação ( $C_2$  e  $C_3$ ) na expulsão de um grupo de saída na posição 10 ( $C_{10}$ ).<sup>29</sup>

A análise da Tabela III dá como resultado a retirada de um cloro nos pesticidas aldrin e dieldrin e 3 cloros no  $\gamma$ -clordane. O Esquema 6 mostra uma possível explicação dos resultados obtidos com aldrin e dieldrin, sendo consistentes com a previsão das diferentes reatividades dos diferentes átomos de cloro na molécula. Além disso, estão de acordo com os resultados publicados por Korte<sup>6</sup> na reação de pesticidas do tipo norborneno com  $NaBH_4$  na presença de diferentes íons metálicos ( $CoCl_2$ , um deles) como catalisadores. A reação do  $\gamma$ -clordane ainda um pouco dife-



- a - cloros da ponte metilênica
- b - cloros vinílicos
- c - cloros da cabeça de ponte
- d - cloros de carbono secundário num ciclo saturado

ESQUEMA 6

rente pode ser facilmente entendida observando a estrutura deste composto.

Os cloros *d* no Esquema 6, não são cabeças de ponte e também não são cloros *vinílicos*, sendo também cloros ligados a carbonos secundários que podem ser atacados, pois nestas posições os átomos de cloro estão mais desprotegidos, portanto justificando a saída de dois átomos de cloro, além de um da ponte metilênica. Os produtos no Esquema 6 não foram comprovados e são simplesmente aqueles que melhor representam os resultados obtidos.

Apesar do interesse que representa uma identificação segura dos produtos orgânicos da reação, a falta de padrões e instrumentação adequada foi a responsável pela não continuação deste trabalho. Assim, precisaria-se de um aparelho de RMN e outros tipos de instrumentos de espectroscopia para poder identificar os produtos de reação inequivocadamente.

## 2. Reação do DDT com vitamina B<sub>12s</sub>

A reação da vitamina B<sub>12s</sub>, gerada por redução da vitamina B<sub>12a</sub> em ambiente nitrogenado com DDT foi estudada com respeito aos produtos. Os resultados das análises por cromatografia gasosa e por cromatografia em camada delgada da fração orgânica estão retratados na Tabela IV. A Figura 10 representa um cromatograma típico dos produtos da reação.

Nota-se pela Tabela IV, que o DDT foi totalmente consumido na reação, resultando em DCS como o maior produto, seguido de DDE e DDD. Uma reação *em branco* entre DDT e NaBH<sub>4</sub> nas mesmas

TABELA IV: Dados cromatográficos dos produtos da reação do DDT com vitamina B<sub>12s</sub>

Produtos	Rf	Tempo de retenção (min)	RR <sup>a</sup>	Percentagem relativa dos produtos (área dos picos)
DDT	-	-	-	0
DDD	0,37	48	1,00	18,2
DDE	0,74	30	0,63	19,8
DCS	0,56	28	0,58	43,5
DDMU	-	24	0,49	< 0,2
DDNU	-	13	0,26	9,8
DDO	-	11	0,23	6,5

a - RR em relação ao DDD

Rf - foram obtidos a partir da eluição com éter de petróleo dos produtos sobre um suporte sólido de sílica-gel GF<sub>254</sub> (Merck)

RR - foram obtidos a partir de injeções dos produtos dissolvidos em ciclohexano (Merck) numa coluna (2m x 3,2mm) empacotada com 3% de UV-17 em 80-100 mesh Chrom-W-AW-DMCS nas seguintes condições de operação: temperatura da coluna 190°C, bloco de injeção 215°C e detector 200°C

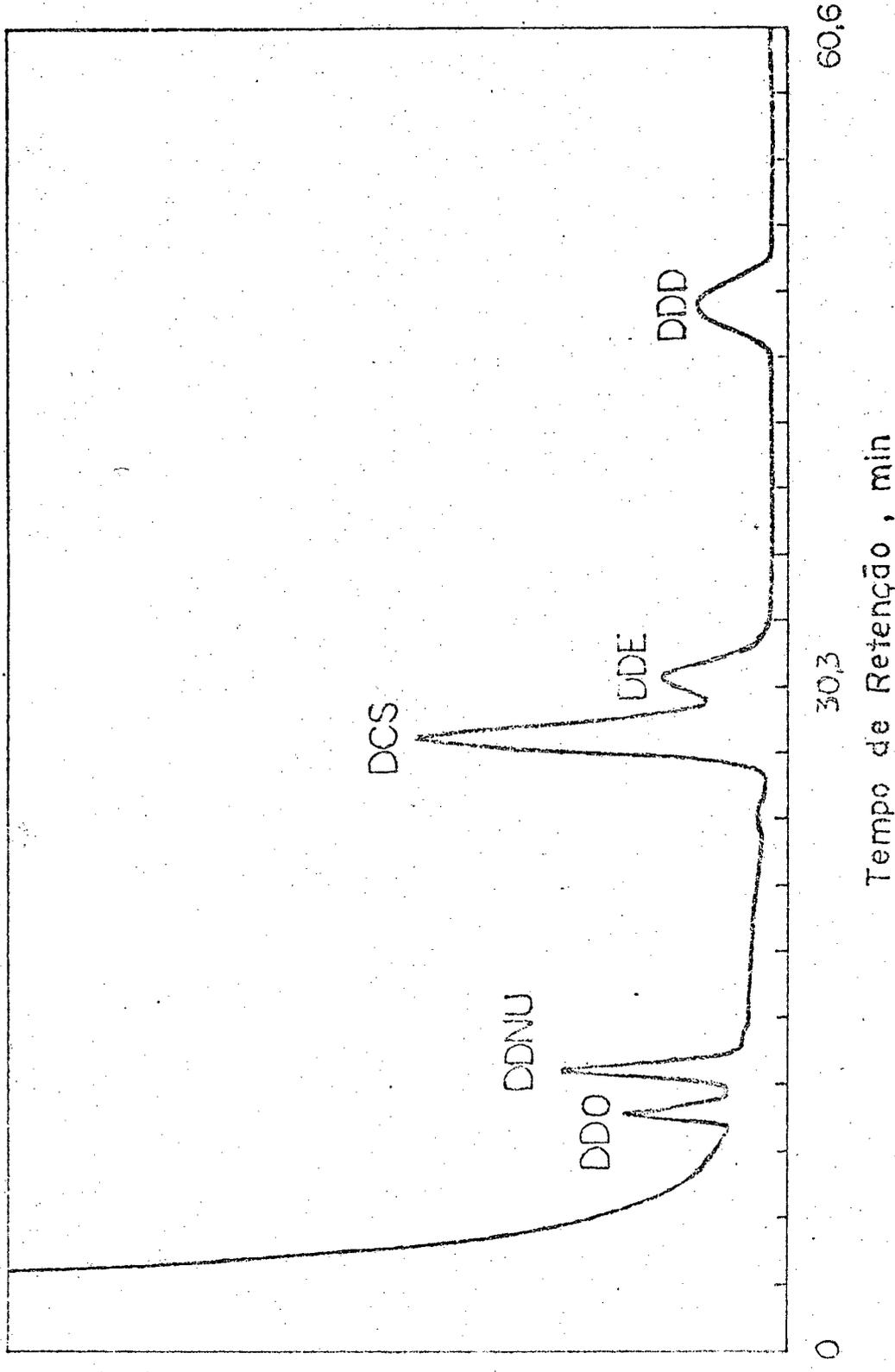


FIGURA 10: Cromatograma dos produtos da reação entre DDT e vitamina B<sub>12</sub>s

condições, deu como resultado a formação de traços de DDE co-  
mo único produto no tempo de reação normalmente utilizado. Quan-  
tidades significativas de produtos na ausência da vitamina  $B_{12}$   
são podem ser formadas após 24 horas ( $\approx 30\%$  de DDE em presença de  
100 vezes de excesso de  $NaBH_4$ ).

O Esquema 7 representa um possível mecanismo que expli-  
caria a formação dos produtos de reação.

O radical livre alquila  $R - \begin{array}{c} R \\ | \\ C \\ | \\ R \end{array} - \begin{array}{c} Cl \\ | \\ C \\ | \\ Cl \end{array}$  formado por ci-  
são homolítica do complexo  $B_{12}$ -DDT, perdendo e ganhando hidrogê-  
nio atômico ( $H\cdot$ ) dá origem respectivamente ao DDE e DDD. O rompi-  
mento da ligação Co-C é devido ao fato de que esta ligação é  
muito fraca por apresentar o átomo de cobalto ligado a um átomo  
de carbono substituído por dois átomos de cloro.<sup>24</sup>

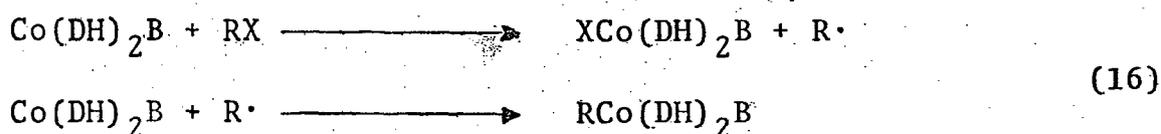
O produto DCS que aparece como o maior produto da  
reação, é resultante da reação do produto DDD com vitamina  $B_{12s}$   
(regenerada por reduções da vitamina  $B_{12r}$  com excesso de  $NaBH_4$ ),  
através de um rearranjo do grupo fenílico.<sup>24</sup>

Os traços de DDMU detectado podem também ser explica-  
dos com base numa reação de desidrocloração. O meio é bastante  
básico nas reações de redução com  $NaBH_4$ , pois a vitamina  $B_{12s}$  é  
instável em meio ácido, justificando portanto o aparecimento do  
DDMU. Porém, o aparecimento de DDO e DDNU é surpreendente pois  
requer a participação de uma espécie diferente da  $B_{12s}$  na reação.  
Assim, é conhecido o fato de que a vitamina  $B_{12s}$  não reage com  
DDE e DDMU, e reage com DDD para formar DCS.<sup>24</sup> É óbvio que a úni-  
ca outra espécie reativa na solução pode ser a vitamina  $B_{12r}$ . O  
Esquema 7, baseado na hipótese da vitamina  $B_{12r}$  ter participado



na reação, explica facilmente a formação dos produtos DDO e DDNU através de reações sucessivas de descloração via um mecanismo de radicais livres.

Mecanismo similar à da reação da vitamina B<sub>12r</sub> com haletos de alquila, tem sido descrito na equação 16 para as reações de complexos bis(glioximato)cobalto (II) tipo Co(DH)<sub>2</sub>B<sup>30</sup>, bem como para a reação de pentacianocobaltato(II)<sup>31</sup>,



Medidas de RSE (ressonância de spin eletrônico) confirmaram que soluções de benzeno dos complexos do tipo Co(DH)<sub>2</sub>B são paramagnéticas.<sup>30</sup>

As principais conclusões reveladas pelos dados cinéticos foram que a constante de velocidade de segunda ordem, *k*, aumenta com a basicidade do ligando axial B; *k* aumenta aproximadamente de um fator de 5 do PhCH<sub>2</sub>Br para o correspondente haleto secundário Ph-CH(CH<sub>3</sub>)Br. A ausência de um apreciável efeito do solvente na velocidade, é consistente com o mecanismo via radical livre proposto.<sup>30</sup>

A fim de comprovar a hipótese da participação da vitamina B<sub>12r</sub> no mecanismo da reação, tentou-se estudar a reação desta última com os diferentes pesticidas clorados. É interessante salientar neste estágio que os produtos encontrados são os mesmos que aparecem na degradação biológica de pesticidas clorados.<sup>2</sup>

### 3. Reações de pesticidas clorados da classe do DDT com vitamina $B_{12r}$

Sabe-se que a vitamina  $B_{12a}$  em solução ao ser reduzida por um agente redutor adequado gera as espécies  $B_{12r}$  e  $B_{12s}$  em equilíbrio. Como pretende-se comprovar a participação da vitamina  $B_{12r}$  na reação do DDT com a vitamina  $B_{12s}$ , procurou-se um método que produzisse vitamina  $B_{12r}$  pura. O método escolhido foi o da geração da espécie  $B_{12r}$  a partir da fotólise da metilcobalamina sob ambiente de nitrogênio. A metilcobalamina a ser fotolisada foi colocada no mesmo ambiente dos pesticidas da classe do DDT em quantidades estequiométricas.

#### 3.1. Reação do DDT

Esta reação foi realizada várias vezes, mantendo as mesmas quantidades de reagentes e condições gerais. No entanto, como o sistema de purificação do gás nitrogênio empregado não foi totalmente seguro, podendo em certas ocasiões apresentar no sistema quantidades (traços) de oxigênio diferentes, os resultados em termos de percentagens de produtos foram variados, embora estes produtos apareceram sempre nas diversas reações em proporções similares. Em consequência disto, a percentagem de desaparecimento de DDT na reação com a vitamina  $B_{12r}$  registrada nos cromatogramas varia de 50 a 80%. Logo, a dosagem de cloretos na solução aquosa vitaminada, apresentou como resultados valores entre 57 a 94% na retirada de 1 cloro. Isto significa que na reação entre DDT e vitamina  $B_{12r}$ , pode ser retirado até 94% de 1 átomo de cloro do DDT aproximadamente, justificando uma relação

estequiométrica (1:1).

A seguir apresentar-se-ã os resultados das análises por cromatografia gasosa e por cromatografia em camada delgada de uma das reações efetuadas na *Tabela V*. Analisando a *Tabela V*, nota-se que esta reação entre DDT e vitamina B<sub>12r</sub> ocorre em torno de 50%, dando como principais produtos o DDE (28%) e o DDD (17%). Em seguida, foram isolados os compostos DDT, DDD e DDE por cromatografia preparativa em camada delgada.

A *Figura 11* mostra os espectros do DDD e DDE isolados conforme previamente descrito, os quais são idênticos com aqueles reportados.<sup>24</sup> Além disto, a confirmação das estruturas do DDE e DDD e do DDT como excesso de reagente, foi feita pela reação de desidrocloração com KOH alcoólico da mistura dos produtos. (*Tabela VI*)

Comparando as *Tabelas V e VI* observa-se que todo o DDT e DDD desapareceram e estas quantidades foram acrescidas do DDE e DDMU respectivamente, permanecendo praticamente constante DDNU, DDO e o composto que não pode ser identificado (RR igual a 0,36).

Em seguida serão abordados aspectos da discussão dos mecanismos desta reação.

A vitamina B<sub>12r</sub> foi gerada através da fotólise da metilcobalamina sob ambientes de nitrogênio, segundo a Equação 17.

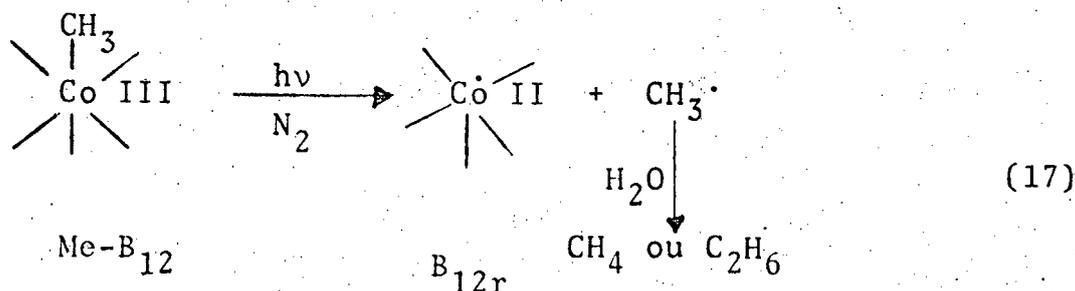


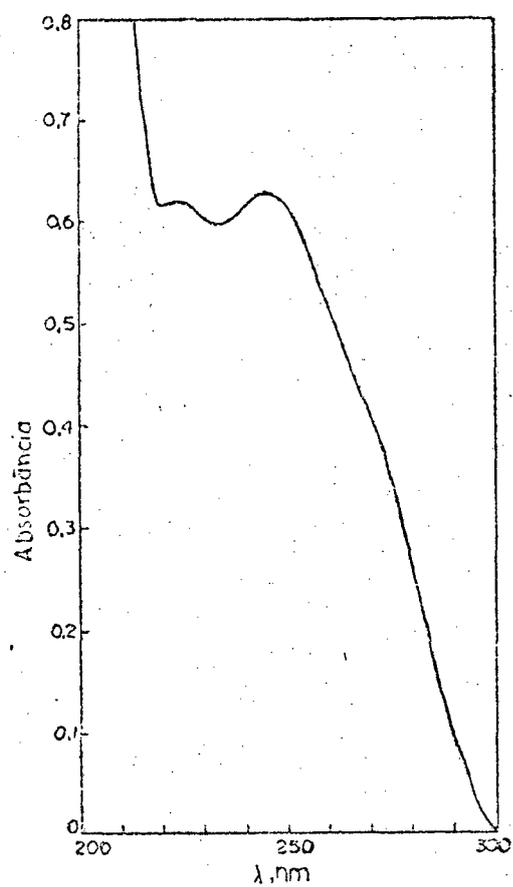
TABELA V: Cromatografia gasosa e cromatografia em camada delgada dos produtos da reação do DDT com a  $B_{12r}$

Produtos	Rf	Tempo de retenção (min)	RR <sup>a</sup>	Percentagem relativa dos produtos (área dos picos)
DDT	0,62	60	1,24	52,0
DDD	0,39	48	1,00	17,0
DDE	0,80	31	0,63	27,9
DDMU	0,73	24	0,50	1,35
DDNU	0,94	14	0,28	0,20
DDO	-	12	0,24	0,15

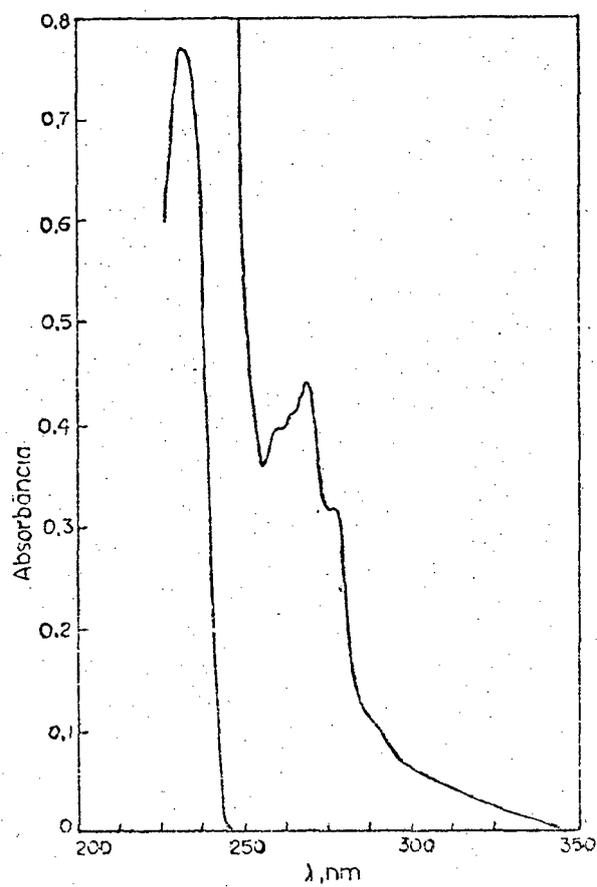
a - RR em relação ao DDD

b - a soma das percentagens foi de 99%, pois tinha-se 1% de compostos não identificados (RR = 0,36 e RR = 0,41)

Condições de RR e Rf conforme Tabela IV



(a)



(b)

FIGURA 11: Espectros UV dos produtos DDE e DDD da reação do DDT com a vitamina B<sub>12</sub>

a - DDE

b - DDD

Solvente: MeOH

TABELA VI: Análise cromatográfica dos produtos da reação do DDT após tratamento com KOH alcoólico

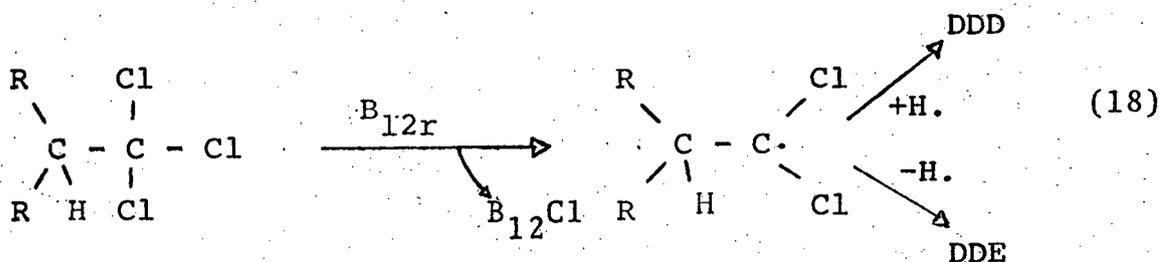
Produtos	Tempo de retenção (min)	RR <sup>a</sup>	Percentagem relativa dos produtos (área dos picos)
DDE	31	0,63	82,25
DDMU	24	0,49	16,4
DDNU	12	0,26	0,20
DDO	11	0,22	0,15

a - RR em relação ao DDD

b - a soma das percentagens é de 99%, pois 1% se refere ao composto não identificado (RR = 0,36)

condições de RR e Rf conforme Tabela IV

A vitamina  $B_{12r}$  reage com DDT removendo um átomo de cloro e gera um radical livre na fração orgânica. Este radical livre é capaz de perder ou ganhar hidrogênio resultando DDE e DDD respectivamente. (18)



É importante salientar que o complexo  $B_{12}-Cl$  formado por causa da remoção via radical livre de um átomo de cloro é formalmente uma espécie de  $Co(III)$ . Este processo de transferência de elétrons explica o aparecimento de íon cloreto numa quantidade estequiométrica (1:1), visto que o complexo  $B_{12}$ -cloreto rapidamente torna-se hidratado formando vitamina  $B_{12a}$  e íon cloreto livre.<sup>18</sup>

Esta reação foi seguida espectrofotometricamente, e os resultados são apresentados na *Figura 12*; observa-se que logo após 3 minutos da primeira fotólise, o espectro assemelha-se ao da vitamina  $B_{12a}$ . Isto significa que no momento que a vitamina  $B_{12r}$  é gerada pela fotólise, ela reage imediatamente com o DDT removendo um átomo de cloro via radical livre e forma a vitamina  $B_{12a}$ . O espectro UV-VIS da vitamina  $B_{12r}$  não foi registrado. A diferença de eficiência na fotólise, deve-se ao fato deste experimento ter-se realizado com uma solução mais diluída de  $Me-B_{12}$  e a espessura a ser transposta pela luz era muito menor.

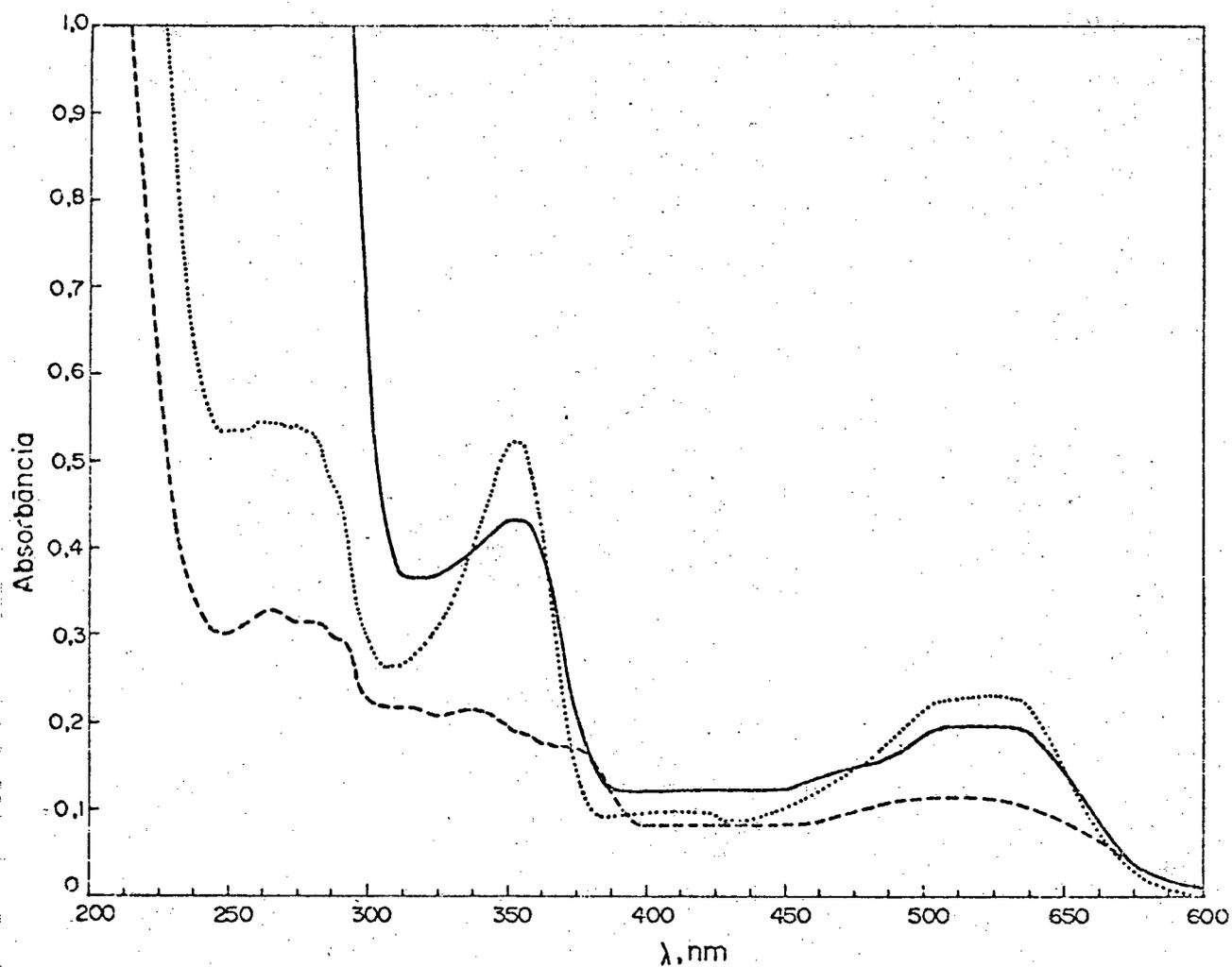


FIGURA 12: Espectros UV - VIS dos padrões  $B_{12a}$  e  $Me-B_{12}$  e do produto vitaminado da reação entre DDT e  $B_{12a}$

———— produto vitaminado da reação

- - - - -  $Me-B_{12}$  ( $10^{-3}$  M)

.....  $B_{12a}$

Solvente:  $MeOH/H_2O$  (4:1)

A fim de uma melhor confirmação dos produtos menores da reação entre DDT e  $B_{12r}$ , tais como DDMU, DDNU e DDO, e a ausência do DDM como produto de reação, foram feitas reações de DDD, DDM, DDE e DDMU com vitamina  $B_{12r}$  em condições estequiométricas (1:1). Além disto, é necessário um melhor entendimento das reações envolvidas a fim de poder-se postular um esquema consistente.

### 3.2. Reação do DDD

Os resultados das análises por cromatografia em camada delgada e por cromatografia gasosa são retratados na *Tabela VII*.

Analisando a *Tabela VII*, observou-se que a reação entre DDD e a vitamina  $B_{12r}$  após dois dias ocorreu em torno de apenas 5% de rendimento, dando como produtos DDM (1,6%) e DDMU (3,8%). Portanto, a reatividade do DDD com a vitamina  $B_{12r}$  é bem menor do que a do DDT, nas mesmas condições. Como foi também determinado a presença de cloreto livre na solução, após a reação, conclui-se que o mecanismo da remoção do átomo de cloro, é realizado por via radical livre, conforme o *Esquema 8*.

### 3.3. Reações do DDM

Os resultados cromatográficos do DDM com a vitamina  $B_{12r}$  são retratados na *Tabela VIII*. Observou-se que o rendimento da reação foi de aproximadamente 27%. Isto sugere que o DDM é mais reativo do que ao DDD e menos reativo em relação do DDT, na reação com vitamina  $B_{12r}$ . O maior produto da reação foi o DDNU, seguido de DDO e um composto não identificado (RR = 0,40).

TABELA VII: Análise cromatográfica dos produtos da reação do DDD com a vitamina B<sub>12</sub>r

Produtos	Rf	Tempo de retenção (min)	RR <sup>a</sup>	Percentagem <sup>b</sup> (área dos picos)
DDD	0,42	41,4	1,00	94,5
DDM	-	30,0	0,72	1,6
DDMU	0,76	23,0	0,55	3,8

a - RR em reação ao DDD

b - percentagem relativa aos produtos

Condições de Rf e RR conforme Tabela IV



TABELA VIII: Análise cromatográfica dos produtos da reação do DDM com a vitamina B<sub>12</sub><sub>r</sub>

Produtos	Rf	Tempo de retenção (min)	RR <sup>a</sup>	Percentagem <sup>b</sup> (área dos picos)
DDM	0,39	28	0,64	73,0
DDO	0,59	10	0,23	11,0
DDNU	0,76	11	0,25	13,0
composto não identificado	-	18	0,40	3,0

a - RR em relação ao DDD

b - percentagem relativa aos produtos

Condições de RR e Rf conforme Tabela IV



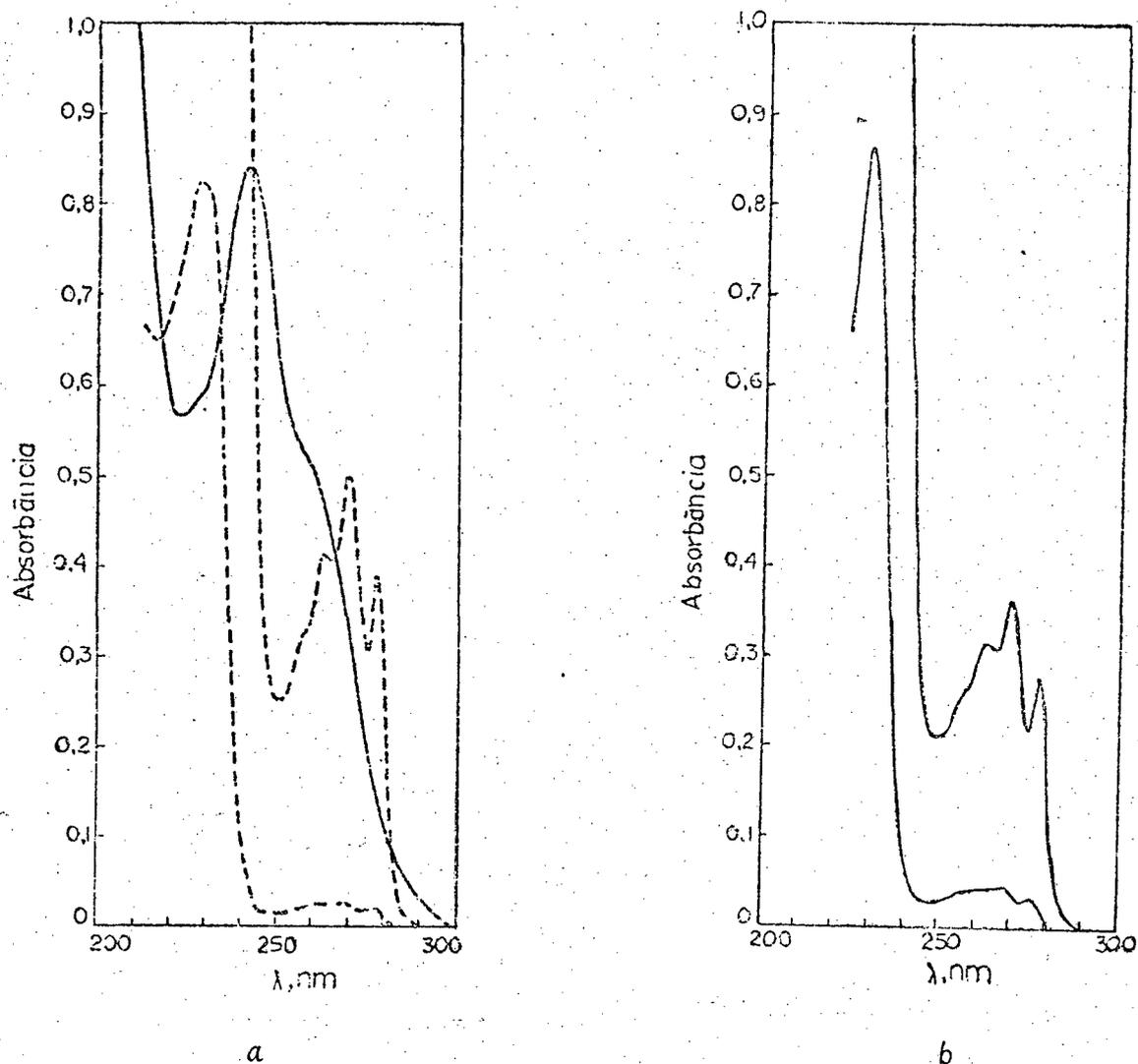


FIGURA 13: Espectros UV dos produtos DDM, DDNU e DDO da reação do DDM com a  $B_{12\pi}$

a) ——— DDNU

----- DDM

b) DDO

Solvente: ciclohexano

### 3.5. Análise Geral

Após a análise dos produtos das reações do DDT, DDD e DDM com a vitamina B<sub>12r</sub>, pode-se apresentar o esquema completo da reação do DDT (Esquema 10).

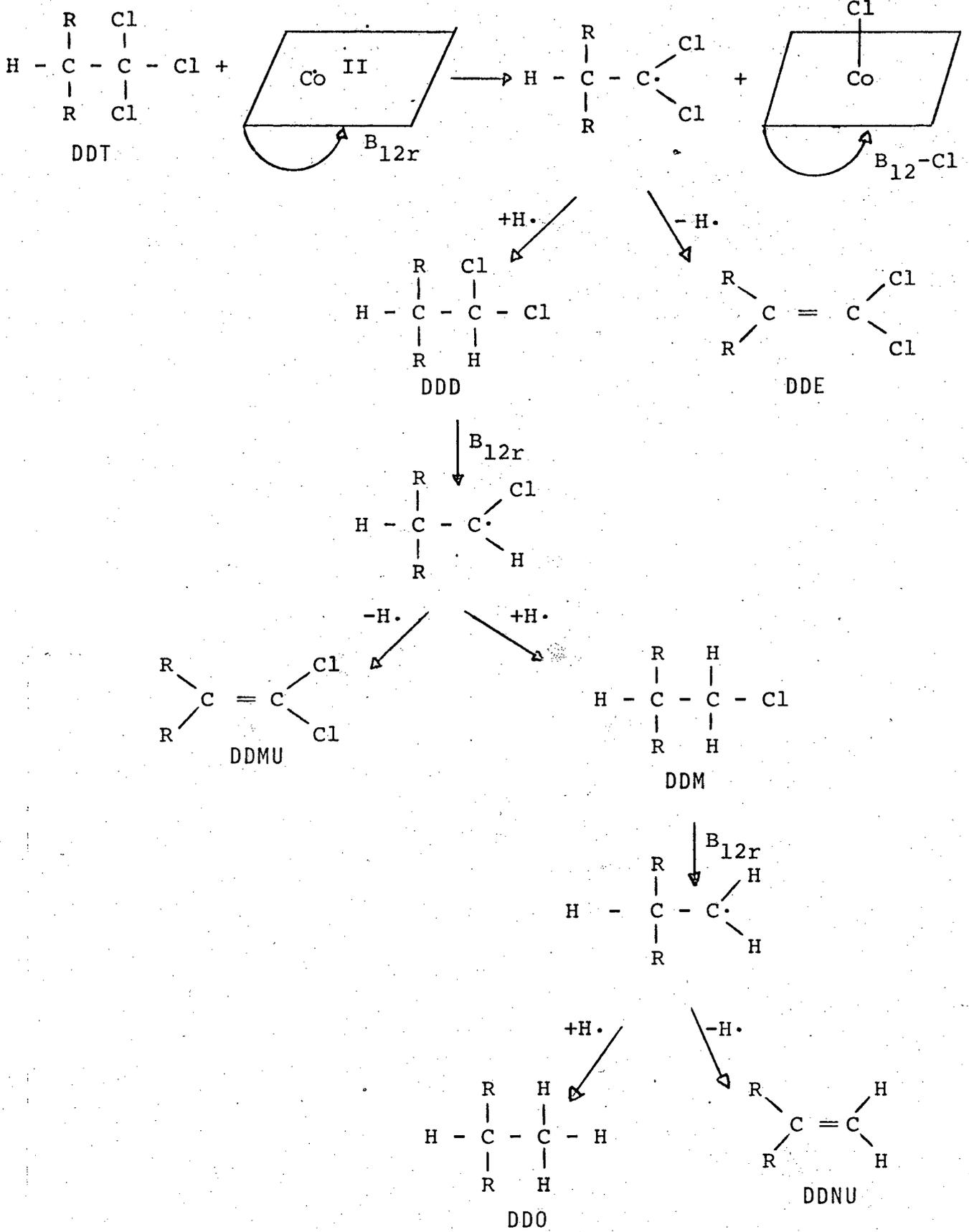
Trans-4-4'-dicloroestilbeno (DCS), um composto altamente cancerígeno, o maior produto das reações de DDT com a vitamina B<sub>12s</sub>, não foi detectado na reação da vitamina B<sub>12r</sub> com DDT, DDD, DDM, DDE ou DDMU.

É interessante notar que DDD reage muito mais lentamente com a vitamina B<sub>12r</sub> que DDT ou DDM. Este resultado é consistente com o aparecimento de DDD como um dos maiores produtos na reação com o DDT e também pelo fato de que *in vivo* DDD é detectado como um dos maiores metabólitos do DDT.

Em termos de reatividade com a vitamina B<sub>12r</sub>, é sugerido que o DDT é maior que o DDD, este é menor que o DDM, o que não está de acordo com os resultados da reação de desidrocloração de DDT, DDD e DDM com KOH alcoólico.<sup>13</sup>

Portanto, seria interessante estudar a cinética das reações de DDT, DDD e DDM com a vitamina B<sub>12r</sub>, para esclarecer melhor as reatividades dos vários compostos.

Os resultados obtidos, sugerem a vitamina B<sub>12r</sub> como um excelente catalisador para a degradação de pesticidas hidrocarbonetos polihalogenados, por um mecanismo de descloração via radical livre.



R = p - clorofenil

ESQUEMA 10

#### 4. Conclusões

- 1) As reações de aldrin, dieldrin e  $\gamma$ -clordane com vitamina B<sub>12s</sub>, sugerem que os cloros reativos foram um dos cloros da *ponte metilênica* e os dois cloros ligados a carbonos secundários saturados, enquanto que os cloros *vinílicos* e *cabeça de ponte* não foram reativos.
- 2) O fato do DDD reagir muito pouco com a vitamina B<sub>12r</sub> é consistente com o aparecimento de DDD como um dos maiores produtos na reação com o DDT e também com o fato de que *in vivo* DDD é detetado como um dos maiores metabólitos do DDT.
- 3) DCS, um composto altamente cancerígeno, o maior produto das reações de DDT com a vitamina B<sub>12s</sub>, não foi detectado na reação da vitamina B<sub>12r</sub> com DDT, DDD ou DDM.
- 4) Os produtos encontrados nas reações dos pesticidas clorados da família do DDT com a vitamina B<sub>12r</sub>, são os mesmos que aparecem na degradação biológica destes pesticidas.
- 5) Os resultados obtidos sugerem a vitamina B<sub>12r</sub> como um excelente catalisador para a degradação de pesticidas hidrocarbonetos polihalogenados (DDT), por um mecanismo de descloração via radical livre.

## BIBLIOGRAFIA

1. NIEDERHAUSER, S. J. & BARNES, D. Use of pesticides on basic food crops in the tropics. Advances in chemistry series. Washington, D.C., American Chemical Society, Vol. 13:3-4, 1955.
2. STOTTER, D.A. Metal centres and DDT. J. Inorg. Nucl. Chem., 19: 721 - 7, 1971.
3. SCHRAUZER, G. N.; DEUTSCH, E.; WINDGASSEN, R. J. The nucleophilicity of vitamin B<sub>12</sub>s. J. Amer. Chem. Soc., 90: 2441 - 2, 1968.
4. KORTE, F. & KLEIN, W. Some problems on environmental chemistry. Pharma International, 1: 1 - 35, 1971.
5. KHAN, M. Biodegradation of pesticides. Chemtech January: 62 - 8, 1976.
6. KORTE, F.; BIENIEK, D.; MOZA, P. N.; KLEIN, W. Beiträge zur ökologischen chemie XXIX. Tetrahedron Lett, 47: 4005 - 8, 1970.
7. ROSEN, J. D. Photolysis of aldrin. Chem. Commun., 4: 189 - 90, 1967.
8. LIPKE, H. & KEARNS, C. W. DDT dehydrochlorinase. I. Isolation, chemical properties, and spectrophotometric assay. J. Biol. Chem., 243: 2123 - 8, 1959.
9. FRIES, G. F. Degradation of chlorinated hydrocarbons under anaerobic conditions. Advan. Chem. Ser., 111: 256 - 70, 1972.

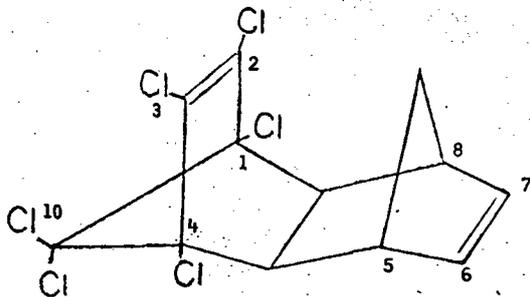
10. PETERSON, J. E. & ROBINSON, W. J. Metabolic products of p-p'-DDT. Toxicol Appl. Pharmacol, 6: 321, 1964.
11. ECOBICHON, D. J. & SASHCHENBRECKER, P. W. Dechlorination of DDT in frozen blood. Science, 156: 663 - 5, 1967.
12. STOTTER, D. A. & PRINCE, R. H. Recent developments in the bio-inorganic chemistry of B<sub>12</sub>-I. J. Inorg. Nucl. Chem., 35: 321 - 39, 1972.
13. CRISTOL, S. J.; HAUSE, N. L.; QUANT, A. J.; MILLER, H. W.; EILAR, K. R.; MEEK, J. S. Mechanism of elimination reactions. VI. The Kinetics of dehydrochlorination of various 2,2-diaryl-chloroethanes. J. Amer. Chem. Soc., 74: 3333-7, 1952.
14. CRISTOL, S. J. & HAUSE, N. L. Mechanism of elimination reactions. V. Preparation and elimination reactions of cis - and trans-11,12-dichloro-9-10-dihydro-9-10-ethanoanthracene. J. Amer. Chem. Soc., 74: 2193 - 7, 1952.
15. FORREST, J.; STEPHENSON, O.; WATERS, W. A. I chemical investigations of the insecticide DDT and its analogs. I. Reactions of DDT and associated compounds. J. Chem. Soc.: 333-9, 1946.
16. GAROFANO, T.; ARCOLEO, A.; NATOLI, M. C. Reduction of halo diphenylethane derivatives in acid media. Atti. Accad. Sci., Lettere Arti Palermo, 24: 236-64, 1965.
17. NOME, F. J. Kinetic and thermodynamic study of the interaction of vitamin B<sub>12a</sub> with ligands in aqueous and micellar environments. Doutorado em filosofia. 155 fl. datilografada

- das. Bibliografia, p. 149-54. Texas A & M University, Te  
xas, dezembro, 1976.
18. PRATT, J. M. Inorganic chemistry of vitamin B<sub>12</sub>. New York,  
N. Y., Academic Press, 1972.
19. BROWN, D. The chemistry of vitamin B<sub>12</sub> and related inorga  
nic model systems. Prog. Inorg. Chem., 18: 177-229, 1973.
20. HUHEEY, J. E. Inorganic Chemistry: principles of structure  
and reactivity. New York, N. Y., Harper & Row, cap. 16:  
627-9, 1972.
21. SCHRAUZER, G. M.; LEE, L. P.; SIBERT, J. W. Alkilcobalamins  
and alkilcobaloximes. Eletronic structure, spectra and  
mechanism of photodealkylation. J. Amer. Chem. Soc., 92  
(10): 2997-3004, 1970.
22. DOLPHIN, D. H.; JOHNSON, A. W.; RODRIGO, R. Some reactions  
of the vitamin B<sub>12</sub> coenzyme and its alkyl analogs. Ann.  
N. Y. Acad. Sci., 112 (2): 590-600, 1964.
23. ROBINSON, G. G.; NOME, F.; FENDLER, J. H. Interaction of  
mercuric ion with methylcobalamin. J. Amer. Chem. Soc.,  
99 (15): 4969, 1977.
24. ZANETTE, D. Estudo da reação da vitamina B<sub>12s</sub> com DDD. Te  
se de mestrado em ciências. Universidade Federal de Santa  
Catarina, dezembro, 1978.
25. STAHL, E. Thin-layer chromatography. A laboratory handbook.  
Springer - Verlag, 301-3, 642, 1969.

26. LEONI, V & PUC CETI, G. Gas - liquid chromatography on pesticides on OV-17 stationary phase. J. Chromatog., 43: 388-91, 1969.
27. MARTIN, A. J. T.; & SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. I. A theory of chromatography. II. Application to the microdetermination of the higher monoamino acids in proteins. Biochem. J., 35:1358 - 68, 1941.
28. SCHRAUZER, G. N. & DEUTSCH, E. Alkylation of vitamin B<sub>12</sub>s and cobaloximes. J. Amer. Chem. Soc., 91 (12): 3441-9, 1968.
29. GOULD, E. S. Mecanismos e estruturas de química orgânica. Buenos Aires, Editorial Kapeluz: 657-663, 1967.
30. SCHNEIDER, P. W.; PHELAN, P. F.; HALPERN, J. Kinetics of the reactions of bis (glyoximate) cobalt (II). Complexes with organic halides. J. Amer. Chem. Soc., 91 (1): 77-81, 1968.
31. KWIATEK, J. & SEYLER, J. K. Preparation of organocyanocobaltate(III) complexes. J. Organometallic Chem., 3, (6): 421-1965.

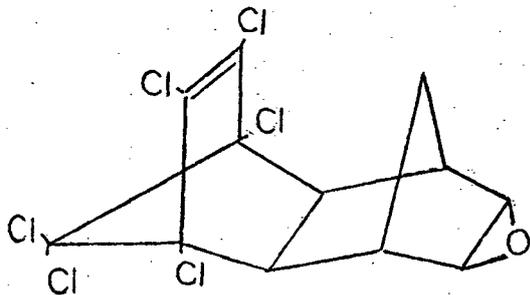
APÊNDICE I - Estruturas e nomenclatura de pesticidas

1.1. Família do norborneno



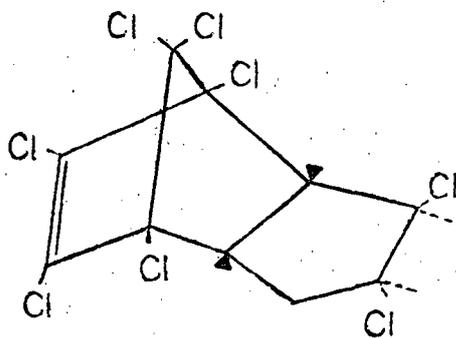
[1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,  
5,8,8a-hexahidro-1,4-endo-exo-  
5-8-dimetanonafthaleno]

Aldrin



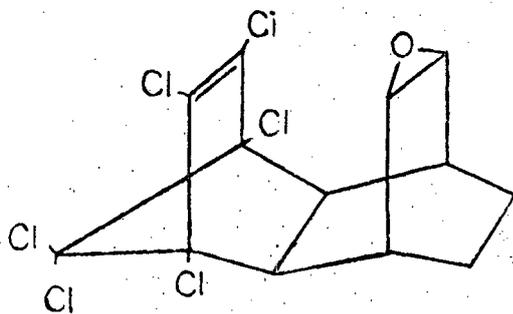
[1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epô  
xido-1,4-4a,5,6,7,8,8a-octahi -  
dro-1,4-endo-exo-5,8-dimetanonaf  
taleno]

Dieldrin



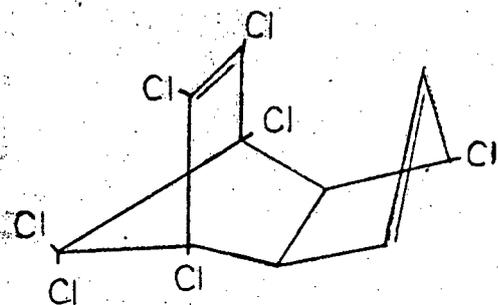
[1-exo-2-endo,4,5,6,7,8,8-octaclo  
ro-2,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-  
metanoindeno]

γ-Clordane

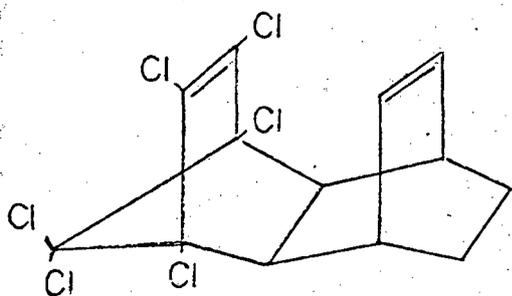


[1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epo  
xi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-  
1,4-endo,endo-5,8-dimetanonaf  
taleno]

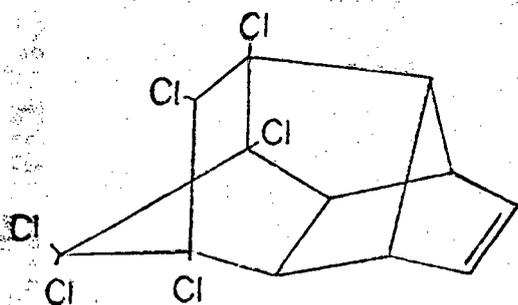
Endrin



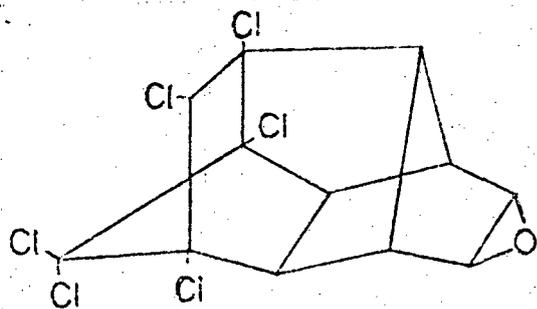
[1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,  
7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno]  
*Heptaclor*



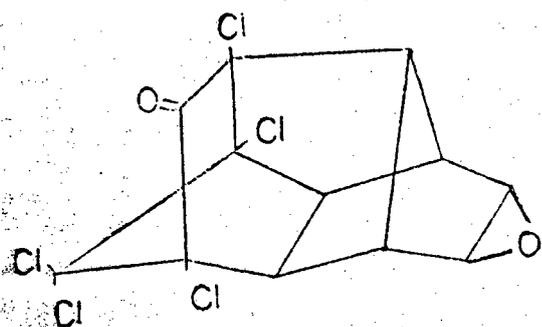
[1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,  
5,8,8a-hexahidro-1,4-endo-endo-  
5,8-dimetanonaftaleno]  
*Isodrin*



[1,8,9,10,11,11-hexacloropentaci-  
clo-dodec-4-ene]  
*Fotoaldrin*

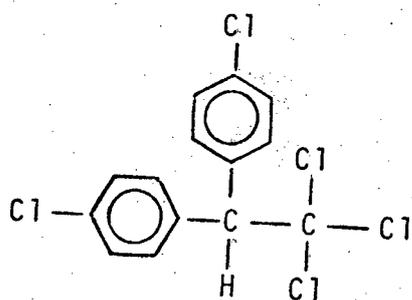


[1,8,9,10,11-hexacloropentaciclo-  
4-epóxi-4-dodecano]  
*Fotodieldrin*



[1,8,10,11,11-pentacloropenciclo-  
-4-epóxi-dodecanona]  
*Fotodieldrin-cetona*

## 1.2. Família do DDT



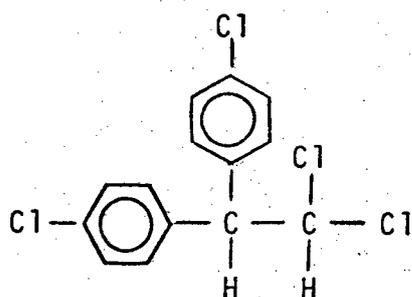
p-p'-diclorodifeniltricloroeta

no

ou

1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-cloro  
fenil)etano

DDT



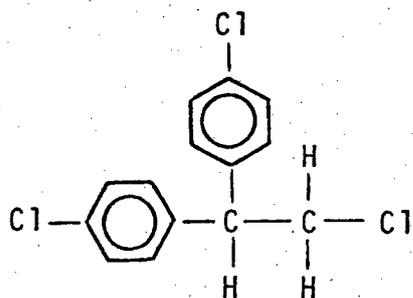
p-p'-diclorodifenildicloroeta-

no

ou

1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofe-  
nil)etano

DDD



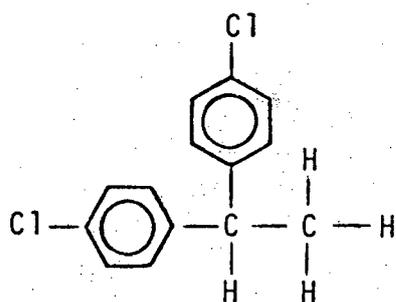
p-p'-diclorodifenilmonocloroe-

tano

ou

1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)e  
tano

DDM

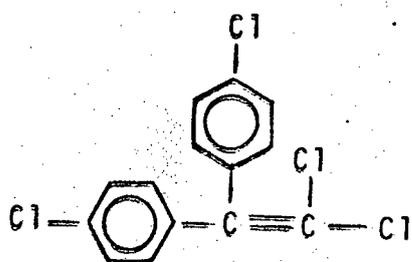


p-p'-diclorodifeniletano

ou

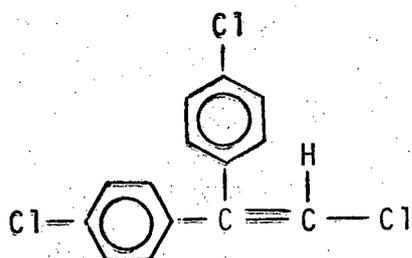
2,2-bis(p-clorofenil)etano

DDO



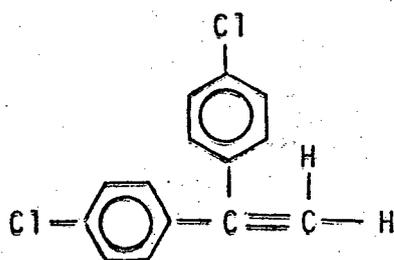
1,1-bis(p-clorofenil)-2,2-dicloro-  
roetileno

DDE



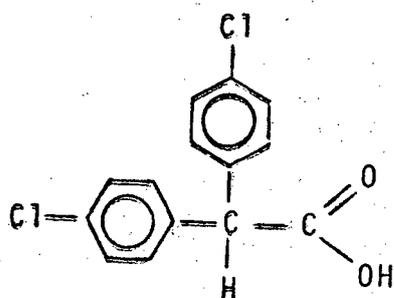
1,1-bis(p-clorofenil)-2-monocloro-  
roetileno

DDMU



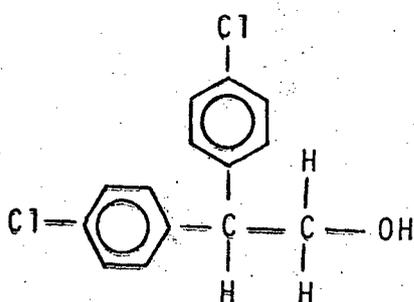
1,1-bis(p-clorofenil)-etileno

DDNU



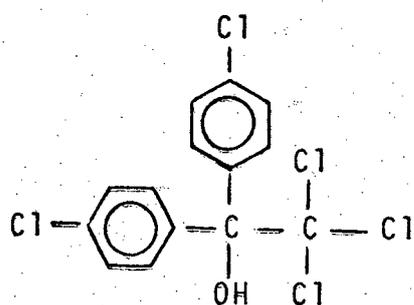
1,1-bis-(p-clorofenil)-ácido acé-  
tico

DDA



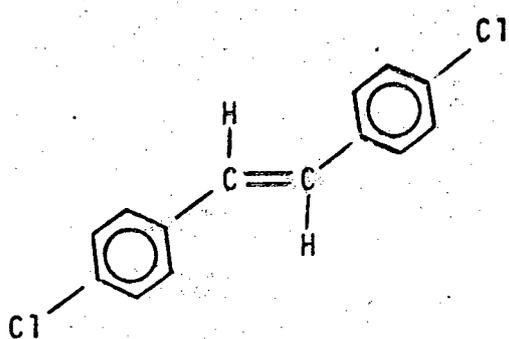
1,1-bis-(p-clorofenil)-2-etanol

DDOH



1,1-bis-(p-clorofenil)-2,2,2-tri-  
cloroetanol

Dicofol (Kelthane)

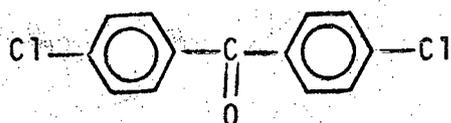


trans-p-p'-dicloroestilbeno

ou

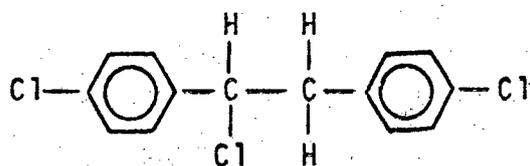
trans-1,2-bis-(p-clorofenil)eti-  
leno

DCS



p-p'-diclorobenzofenona

DBP



1-cloro-1,2-bis-(p-clorofenil)

etano

DDMF

APÊNDICE II - Dados espectrofotométricos UV de alguns pesticidas clorados da classe do DDT<sup>a</sup> e do trans-estilbeno<sup>b</sup>

Pesticida	$\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (m $\mu$ )	$\epsilon_{\lambda_{\text{m\acute{a}x}}}$
DDD	268	633
	231	19518
DDT	266	702
	235,5	19569
DDE	244,5	17900
	224,5	17500
Trans-estilbeno	227	21000
	294	33200
	307	32100

(a) espectros tomados em metanol, Sadtler Research Laboratories Inc. 5898 UV-1961

(b) espectros tomados em metanol, Sadtler Research Laboratories Inc. 18440 UV-1972