

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

ESTUDO DA REAÇÃO DA VITAMINA B_{12s} COM DDD

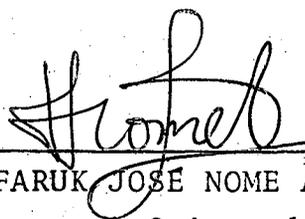
TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS

DINO ZANETTE

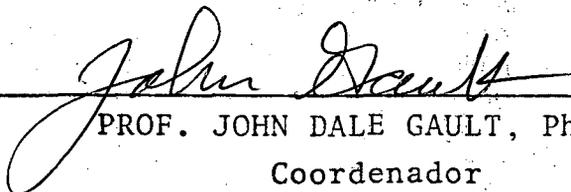
DEZEMBRO - 1978

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

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

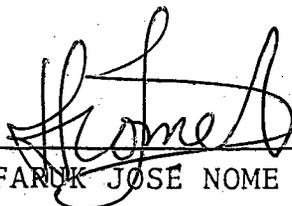


PROF. FARUK JOSÉ NOME AGUILERA, Ph. D.
Orientador



PROF. JOHN DALE GAULT, Ph. D.
Coordenador

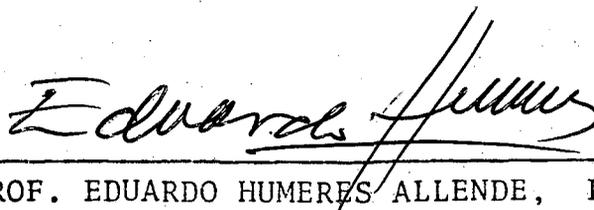
BANCA EXAMINADORA:



PROF. FARUK JOSÉ NOME AGUILERA, Ph. D.



PROF. LAVINEL G. IONESCU, Ph. D.



PROF. EDUARDO HUMERES ALLENDE, Ph. D.

DEDICAÇÃO

Este trabalho é dedicado à mi
nha esposa Ana Maria e à minha ga-
leguinha Melissa que sempre valori
zaram os meus esforços e compreen-
deram meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- especialmente, ao Professor Faruk José Nome Aguilera por sua perspicaz orientação, pela sincera amizade que sempre proporcionou incentivo e dedicação ao trabalho;
- aos Professores, Eduardo Humeres Allende e Lavinel G. Ionescu e a todos os demais colegas que, direta ou indiretamente, apoiaram-me e estimularam-me no desenrolar deste árduo trabalho e souberam compreender-me nas horas mais difíceis;
- à Universidade Federal de Santa Catarina e ao CNPq que me deram condições para que eu pudesse realizar este meu objetivo.

I N D I C E G E R A L

CAPÍTULO I	- INTRODUÇÃO	1
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	PORFIRINAS E VITAMINA B ₁₂ - ESTRUTURAS E NOMENCLATURAS	3
3.	QUÍMICA DA VITAMINA B ₁₂	9
4.	PESTICIDAS	22
4.1.	Estruturas e Nomenclaturas	23
4.2.	Reações de Desidrocloração	23
4.3.	Degradação de Pesticidas	27
5.	OBJETIVOS	32
CAPÍTULO II	- SECÇÃO EXPERIMENTAL	34
1.	CROMATOGRAFIA	34
2.	INSTRUMENTAÇÃO	35
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1.	Síntese	45
3.1.1.	Obtenção do Composto 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno - DDMU	45
3.1.2.	Obtenção do Composto 1,1-bis(p-clorofenil)etano - DDO	45
3.1.3.	Obtenção do composto 2-cloro-1,2-difeniletanol	48
3.1.4.	Obtenção do Composto 1-cloro-1,2-difeniletano	53
3.1.5.	Obtenção do composto 1-cloro-1,2-bis(p-clorofenil)etano - DDMF	58
3.1.6.	Obtenção do composto 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano - DDM	63
3.2.	Reações com a Vitamina B ₁₂	72
3.3.	Reação da Vitamina B _{12s} com DDD	74
3.4.	Teste Cinético Qualitativo em CCD	76
CAPÍTULO III	- RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
1.	IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS	77

2. MECANISMO DA REAÇÃO E OS POSSÍVEIS INTERMEDIÁ - RIOS	88
CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO	101
BIBLIOGRAFIA	102

ÍNDICE DAS FIGURAS

FIGURA 1	- Estrutura da vitamina B ₁₂	2
FIGURA 2	- Fórmulas estruturais planas dos compostos: porfina, protoporfirina, Fe-protoporfirina e clorofila	4
FIGURA 3	- Estrutura da vitamina B ₁₂ determinada pelo método clássico de raio-X.	8
FIGURA 4	- Diagrama energético do átomo central cobalto sob os três estados de oxidação	11
FIGURA 5	- Espectros de absorção UV-VIS das espécies porfirina, vitamina B ₁₂ e metilcobalamina	13
FIGURA 6	- Diagrama dos níveis de energia do anel porfirínico	16
FIGURA 7	- Espectro de absorção da vitamina B ₁₂	38
FIGURA 8	- Espectros de absorção no UV do DDT, DDD e DDE .	40
FIGURA 9	- Espectro de absorção IV do DDD	41
FIGURA 10	- Espectro de ressonância magnética nuclear do DDD	42
FIGURA 11	- Espectros de absorção no UV do DDA e etil-DDD .	44
FIGURA 12	- Espectros de absorção no UV do DDMU e do DDO ..	47
FIGURA 13	- Espectro de ressonância magnética nuclear do DDO	49
FIGURA 14	- Espectros de absorção no UV da benzoína e do cloreto de desila	52
FIGURA 15	- Espectro de absorção no UV do 1,2-difeniletanol	55
FIGURA 16	- Espectro de ressonância magnética nuclear do 1-cloro-1,2-difeniletano	57
FIGURA 17	- Espectro de absorção no UV do DDOH	60

FIGURA 18 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DDMF	62
FIGURA 19 - Espectro de absorção no UV do α ,4-dicloroacetofenona	66
FIGURA 20 - Espectros de absorção no UV do DDM e DDNU	70
FIGURA 21 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DDM	71
FIGURA 22 - Espectros de absorção no UV do DDD e DDMU	80
FIGURA 23 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DDMU	81
FIGURA 24 - Espectro de absorção no UV do DCS	84
FIGURA 25 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DCS	86
FIGURA 26 - Espectros de absorção no UV-VIS do B ₁₂ -DDM em meio ácido e em meio neutro	96
FIGURA 27 - Curva de determinação do pKa do B ₁₂ -DDM	97

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA 1 - Energias e entropias de ativação para as reações da desidrocloração dos derivados do DDT, DDD e DDM com NaOH em 92,6% etanol aquoso	26
TABELA 2 - Valores médios de R_f e RR_{DDD} dos principais compostos envolvidos no trabalho	39
TABELA 3 - Cálculo das quantidades de cloreto liberadas em reações da B_{12S} com DDD.	78

R E S U M O

A reação da vitamina B_{12s} com o composto 1,1-dicloro-bis(p-clorofenil)etano [DDD] resulta numa extensa descloração e formação de trans-4,4'-dicloroestilbeno [DCS]. Semelhantemente, a reação do 1,1-dicloro-bis(p-etilfenil)etano [etil-DDD] produz o trans-4,4'-dietilestilbeno [etil-DCS]. Assim, o método parece ser geral para sintetizar estilbenos substituídos.

Foram feitas reações da vitamina B_{12s} para estabelecer o mecanismo da reação com os seguintes compostos: 2-cloro-1,2-difeniletanol [DDMFOH], 1-cloro-1,2-bis(p-clorofenil)etano [DDMF] e 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano [DDM]. O DDMFOH não reage com a vitamina B_{12s} para produzir DCS; o DDM reage com a B_{12s} para produzir um complexo vitaminado estável, B_{12} -DDM, o qual foi isolado e possui um pKa igual a 2,5. O DDMF reage para originar dois produtos, o DCS e DDMFO. A evidência indica que a formação do DCS a partir do DDD ocorre através de um mecanismo de duas etapas ou por um mecanismo "concertado", sem formação de um intermediário estável.

A B S T R A C T

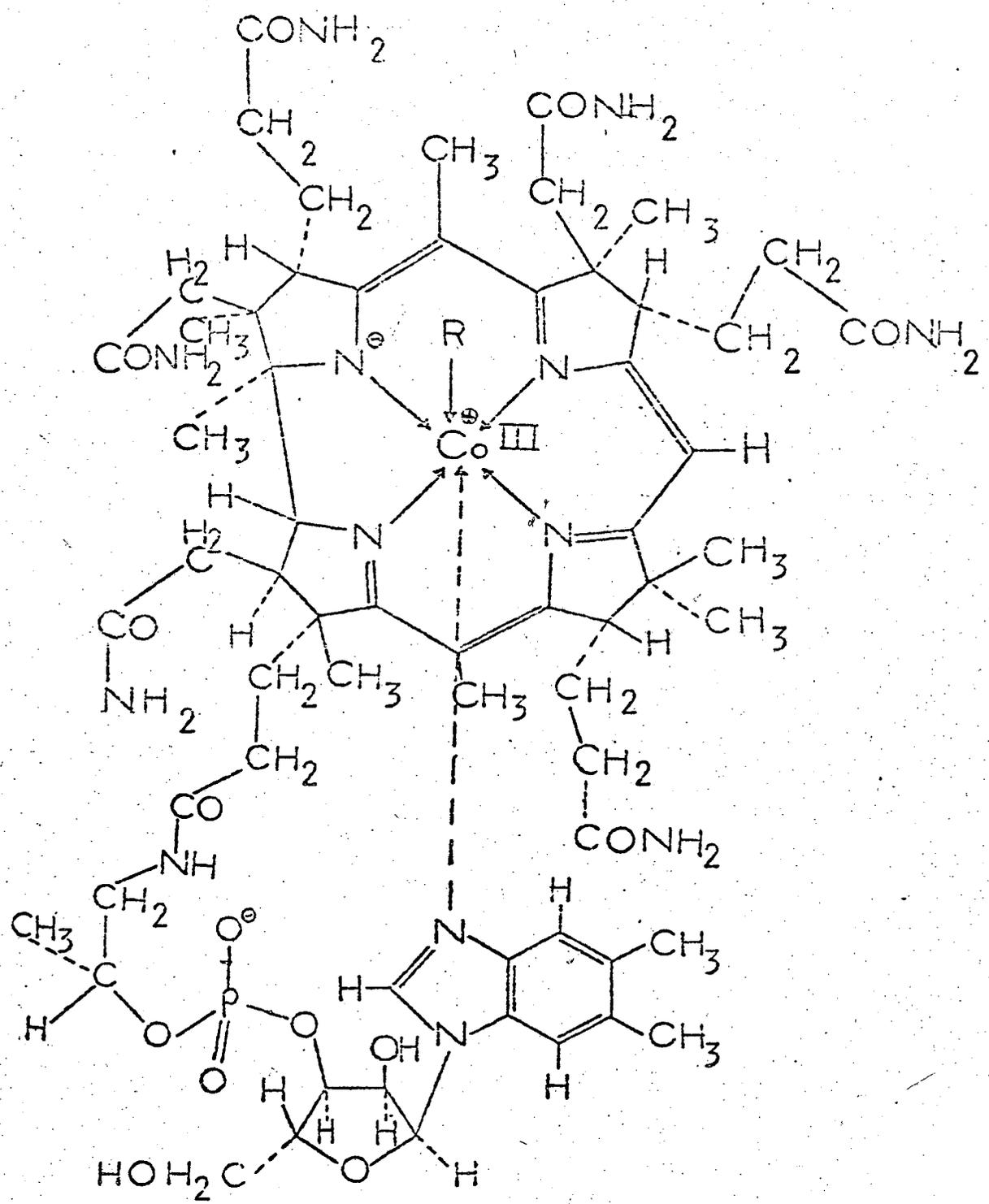
The reaction of vitamin B_{12s} with 1,1-dichloro-bis(p-chlorophenyl)ethane [DDD] results in an extensive dechlorination and the formation of trans-4,4'-dichlorostilbene [DCS]. Similarly, the reaction of 1,1-dichloro-bis(p-ethylphenyl)ethane [etil-DDD] yields trans-4,4'-diethylstilbene. The method appears to be a general one and it may be useful for the synthesis of substituted stilbenes at the laboratory level.

In order to establish the mechanism, vitamin B_{12s} was allowed to react with the following compounds: 2-chloro-1,2-diphenylethanol [DDMFOH], 1-chloro-1,2-bis(p-chlorophenyl)ethane [DDMF] and 1-chloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane [DDM]. DDMFOH does not react with vitamin B_{12s} to produce DCS; DDM reacts with B_{12s} producing a stable vitamin complex, B₁₂-DDM, which was isolated and has a pKa of 2,5. DDMF reacts giving two products, DCS and DDMFO. The experimental evidence indicates that the formation of DCS from DDD takes place through a mechanism involving two steps, which may be seccessive, or through a concerted mechanism, without formation of a stable intermediate.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A vitamina B₁₂ é uma substância que está chamando a atenção dos pesquisadores em todos os campos da química. Esta molécula é um complexo cujo átomo central é o cobalto. A vitamina B₁₂ tem a possibilidade de formar uma ligação estável do tipo carbono-cobalto, a qual é muito importante no metabolismo intermediário¹. Na medicina é aplicada no combate da anemia perniciosa e a sua deficiência resulta em sérias enfermidades². A estrutura da molécula é bastante complexa e foi determinada mediante reações químicas de degradação com subseqüentes análises de identificação. A conclusão dos trabalhos foi feita por Hodgkin e seus colaboradores, utilizando o método analítico, cristalografia de raio-X³. A vitamina B₁₂ tem sido encontrada somente em animais e microorganismos e não em plantas. Um composto muito semelhante à vitamina B₁₂ encontrado nas plantas é a clorofila, responsável pela fotossíntese. No fígado ocorre relativa quantidade de vitamina B₁₂, isolada na forma de cianocobalamina. Tem sido também isolada a hidroxicobalamina, a qual tem a hidroxila como um ligante axial do cobalto no lugar do cianeto. Industrialmente, obtém-se a vitamina B₁₂ a partir do cultivo de certas bactérias, as quais têm a vitamina como um fator de crescimento⁴. De outro lado, os químicos orgânicos já têm executada a síntese do complexo, concluída por R.B. Woodward e seus colaboradores¹. Esta síntese não é apropriada para preparar quantidades grandes de vitamina B₁₂.

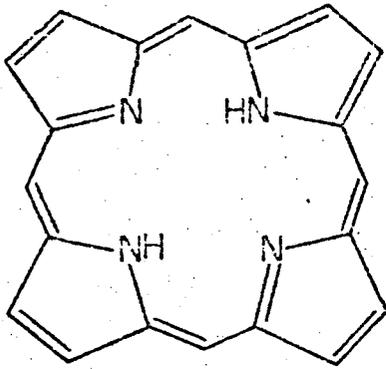


- FIGURA 1 - Estrutura da vitamina B₁₂.

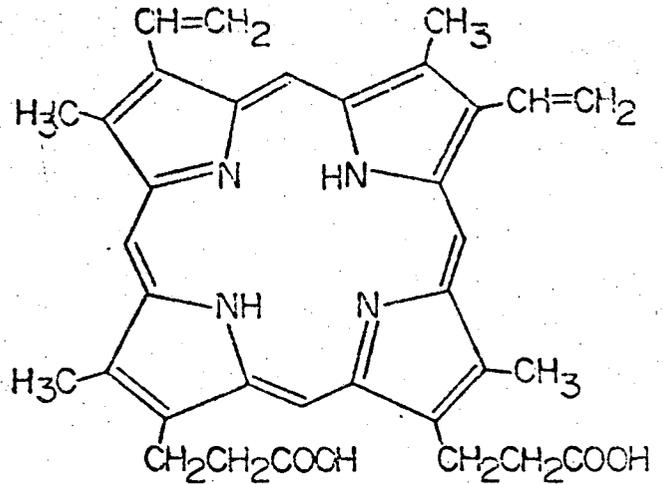
2. PORFIRINAS E VITAMINA B₁₂ - ESTRUTURAS E NOMENCLATURAS

Talvez a mais importante classe de compostos que contém um metal ligante em sistemas biológicos é do sistema porfirínico. O papel das porfirinas é importante na economia da célula. As porfirinas estão relacionadas com o transporte do oxigênio (pela hemoglobina e mioglobina), o transporte de elétrons até o oxigênio (pelos sistemas citocrômicos), a atividade catalítica da catalase e peroxidase e a fotossíntese.

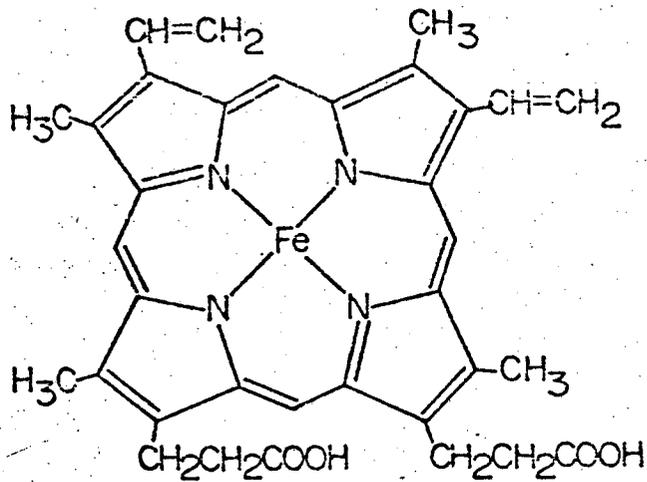
As porfirinas têm um sistema cíclico tetrapirrólico, com duplas ligações em conjugação (pontes metínicas) denominado de porfina (Fig. 2a) e vários grupos ligados na periferia. As diferentes porfirinas derivam dos vários grupos e cadeias laterais ligadas, bem como do tipo do metal central, e neste caso, são denominadas de porfirinas metálicas. Os metais encontrados nos tetrapirróis, bioquimicamente funcionais, são magnésio (na clorofila), ferro (no heme) e incluir-se-ia o cobalto (nas cobalaminas, tetrapirróis modificados) (Fig. 1). Na natureza a protoporfirina IX (Fig. 2b) é a mais comum e é um dos quinze isômeros possíveis. É encontrada em pigmentos respiratórios. Tem substituintes metílicas nas posições 1, 3, 5 e 8, grupos vinilas em 2 e 4 e $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ em 6 e 7. Caso os nitrogênios pirrólicos estejam coordenados com o ferro, então, a porfirina é denominada de Fe-protoporfirina IX (Fig. 2c), a qual é encontrada na hemoglobina e mioglobina. O átomo central é tetracoordenado e encontra-se sob o estado de oxidação 2+. As porfirinas podem aceitar dois íons hidrogênios para formar um diácido 2+ ou doar dois prótons para formar um anion 2-. É com a última forma que as porfirinas complexam-se



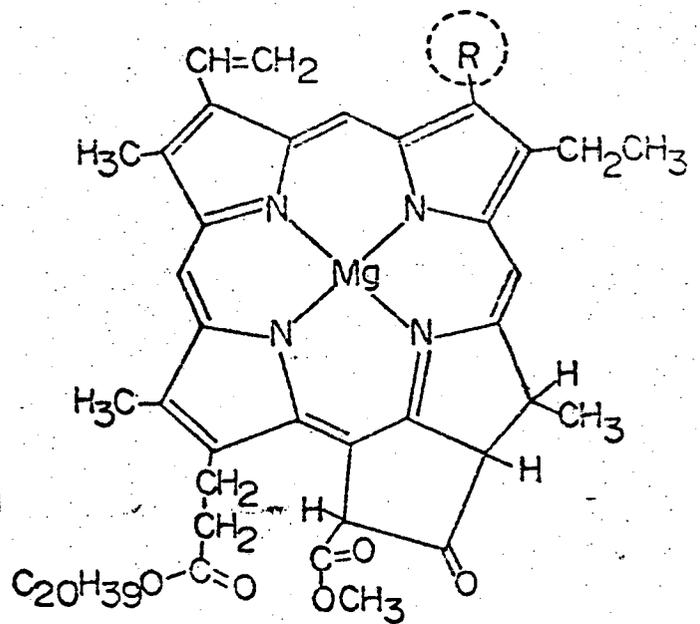
(a)



(b)



(c)

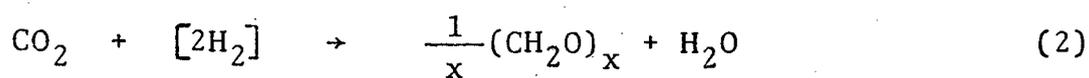


(d)

FIGURA 2 - Fórmulas estruturais planas da porfirina (a), protoporfirina (b), Fe-protoporfirina (c) e clorofila (d).

com íons metálicos, geralmente dipositivos, para formar os complexos porfirínicos metálicos. Pode-se estimar a distância de uma ligação entre o nitrogênio e um átomo da primeira série dos metais de transição de 2,0 Å. Portanto, o tamanho do "buraco" do centro do anel porfirínico é ideal para acomodar metais da primeira série de transição. O sistema porfirínico é bastante rígido e a distância metal-nitrogênio varia de 1,95 Å no Ni-porfirina para 2,10 Å no Fe(III)-porfirina. O anel porfirínico é espacialmente uma estrutura plana, e portanto, possui alta ressonância, com deslocamento perfeito dos orbitais moleculares, causa de várias propriedades desses complexos. O anel tem 22 elétrons π , mas somente 18 desses são incluídos na ressonância. Isto está de acordo com a regra de Hückel $4n+2$ para que haja aromaticidade ^{2,4}.

Os processos fotossintéticos nas plantas verdes consistem em quebrar as ligações da molécula de água seguida de redução do dióxido de carbono:



onde $[2\text{H}_2]$ não implica que seja hidrogênio livre, podendo ser em qualquer forma. A clorofila é Mg-porfirina cujo átomo central é o magnésio (Fig. 2d). A sua estrutura difere, essencialmente, do Fe-porfirina em vários pontos: a) contém um álcool alifático, o fitol, esterificado com um resíduo de ácido propiônico no anel IV de um tetrapirrol; b) contém uma dupla ligação reduzida num dos anéis pirrólicos; c) contém o grupo R que pode ser CH_3 (clorofila a) ou CHO (clorofila b); d) contém um anel ciclopentanona junto

ao anel pirrólico III.

O processo da fotossíntese é ainda não muito bem interpretado. Todavia, nas plantas verdes e em qualquer outro organismo que usa a H_2O como agente redutor, a unidade fotossintetizante contém dois fotossistemas, PS I e PS II, que são ativados por luz vermelha-escura (680-700 nm) e luz vermelha (650 nm), respectivamente. A energia luminosa, absorvida por essas clorofilas, ou por pigmentos acessórios e transferida a essas clorofilas, impulsiona uma reação fotoquímica, na qual, tanto o oxidante como o redutor, são formados. No caso do PS I, estudos de absorbância e fluorescência indicam que uma forma especial de clorofila a, conhecida como P-700, é um pigmento, no qual um redutor forte Z, capaz de reduzir o $NADP^+$ e ferredoxinas, é formado juntamente com o oxidante fraco. A clorofila a-682 nm envolvida no processo de captação de luz no PS II tem uma absorção máxima em 682 nm; a excitação desse pigmento dá origem a um redutor Q, e um oxidante forte Y, que é capaz de oxidar H_2O a O_2 . Tanto a unidade PS I como a PS II contém diferentes componentes do sistema conversor de energia, clorofilas e enzimas necessárias. Uma única unidade contém 400 moléculas de clorofila a, além de uma molécula de citocromo f e uma de plastocianina, duas moléculas de citocromo b_6 e duas de citocromo b_3 . Estas unidades têm como objetivo absorver energia solar para convertê-la em energia química. O responsável mais direto é o sistema conjugado da clorofila.

Presentes na captação de energia radiante, estão os carotenóides, os quais absorvem alta energia, os quais tem duas funções importantes: a) transferir para o sistema clorofílico para o uso fotossintético; b) proteger o sistema biológico de danos fotoquímicos.

A clorofila apresenta o fenômeno da fosforescência e esta é uma condição para haver fotossíntese. As porfirinas livres exibem emissão fluorescente e, portanto, se a clorofila tivesse este fenômeno, não haveria a possibilidade e tempo de transformar a energia radiante em química. No entanto, o acoplamento spin-orbital pelo íon metálico permite a mistura do singlete excitado e o estado tripleto e promove a formação de um relativo estável estado tripleto o qual é a fonte de fosforescência (e energia para a fotossíntese) ^{2,4}.

~~→~~ A vitamina B₁₂ é uma porfirina modificada. A sua estrutura tridimensional é conhecida com detalhes (Fig. 1). Corresponde a um complexo cujo átomo central é o cobalto(III) ligado a quatro grupos pirrólicos, através dos nitrogênios desses anéis. Os quatro anéis pirrólicos formam um ligante tetradentado macrocíclico denominado de anel corrínico. A difração de raio-X revelou que o anel corrínico não é bem planar (Fig. 3). Sua planaridade depende dos grupos ligados na periferia do anel. E ainda, por causa da falta de conjugação, o anel corrínico é quase flexível e trocas de configuração podem ser, portanto, ocorridas facilmente¹. A análise entre o anel porfirínico e o corrínico, indica que o último é deficitário de elétrons π , visto que o anel porfirínico tem 22 elétrons π , enquanto que o anel corrínico tem apenas 14 elétrons π . E, além disso, há interrupção parcial da conjugação entre os anéis pirrólicos I e IV, devido à modificação do anel intermediário (de 4 para 5 membros) e da redução da metina. O sistema apresenta conjugação, no entanto, tem menos ressonância do que as porfirinas e não parece ter aromaticidade, mesmo que tenha $4n+2$ elétrons π , pois a conjugação não se estende ao anel inteiro e sim ocorre interrupção de deslocamento de orbitais π , além da

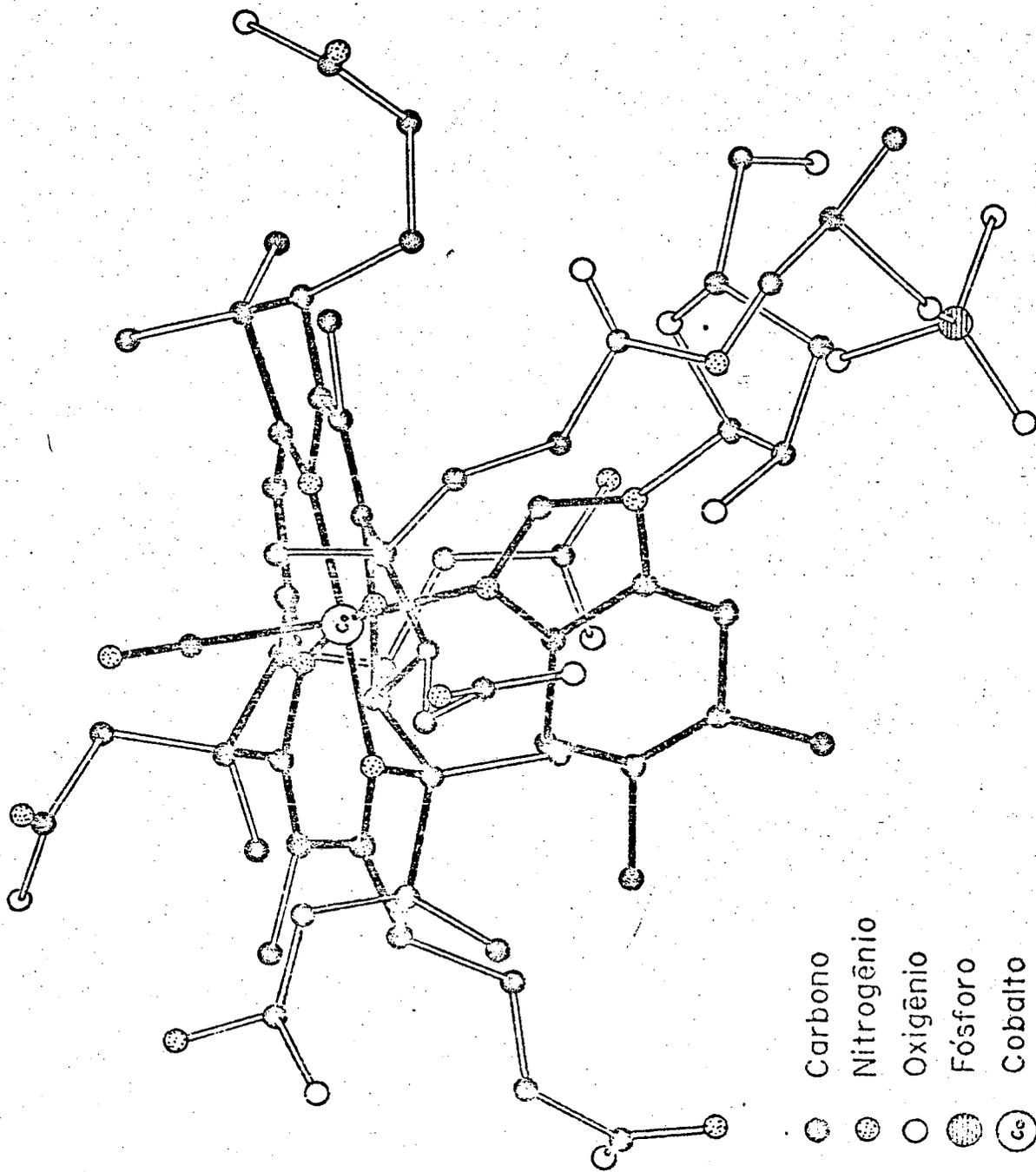
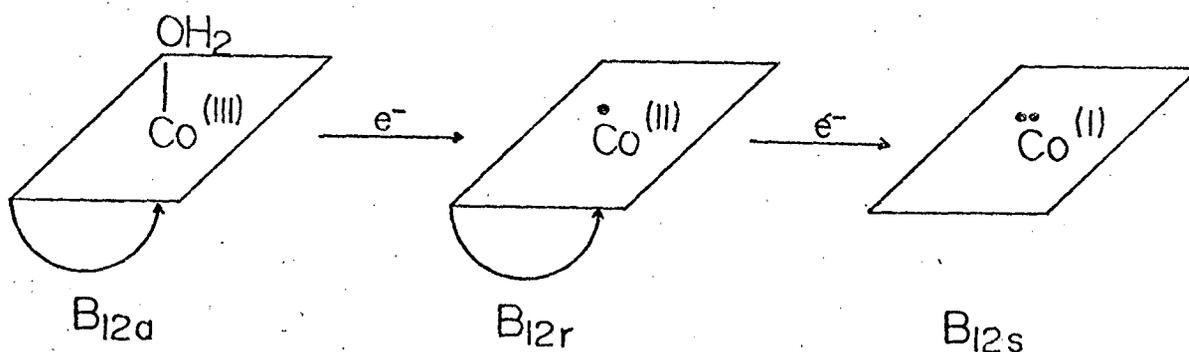


FIGURA 3 - Estrutura da vitamina B₁₂ determinada pelo método clássico de raio-X.

falta de planaridade do anel ⁵. Além dos quatros ligantes equatoriais, a vitamina B₁₂ tem dois outros ligantes axiais: a quinta posição de coordenação que na Figura 1 está representada por R, representa grupos como CN⁻, OH⁻, H₂O, etc, e a sexta posição é ocupada pelo ligante α-5,6-dimetil-benzimidazol. Quando este último ligante da sexta posição está presente, as moléculas são denominadas de cobalamina. Assim, para R = CN⁻, a molécula é a cianocobalamina. A cianocobalamina é a forma química conhecida por vitamina B₁₂. Outras cobalaminas importantes são hidroxicobalamina (R = OH⁻), aquocobalamina (R = H₂O), metilcobalamina (R = CH₃), etilcobalamina (R = C₂H₅) e 5'-deoxiadenosilcobalamina (R = 5'-deoxiadenosina). Esta última é também denominada de coenzima B₁₂ ¹.

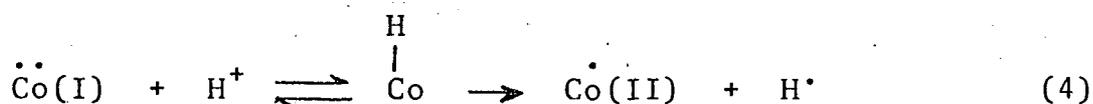
3. QUÍMICA DA VITAMINA B₁₂

As cobalaminas contêm, normalmente, o cobalto sob o estado de oxidação 3+. Porém, existe a possibilidade de reduzir o cobalto para os estados de oxidação 2+ e 1+ (Eq. 3), pela adição de agentes redutores apropriados ¹.



O diagrama de orbitais moleculares para as espécies Co(I), Co(II) e Co(III), tem sido calculado mediante uma modificação do método de Hückel, conhecida como técnica $(\omega - \beta)$ ⁶. Os resultados obtidos estão esquematizados na Figura 4.

Sob o estado Co(I), como pode-se observar, tem-se um complexo de baixo spin, porém diamagnético, sendo que o orbital d_{xy} está vazio e o orbital d_{z^2} está com dois elétrons. A presença de dois elétrons nesse orbital faz com que o Co(I) comporte-se como uma base de Lewis e, sendo assim, é possível existir um equilíbrio de protonação, resultando na formação de um hidreto de cobalto o qual pode decompor-se em Co(II) acompanhado de liberação de hidrogênio (Eq. 4). Assim, como é de se esperar, o Co(I) não é



estável em soluções ácidas. A geração desta espécie é feita em meio alcalino ⁷. Em presença de oxigênio o Co(I) é facilmente convertido em Co(III) como indica a Equação 3. Os sete orbitais π acomodam os 14 elétrons do anel corrínico; a carência de orbitais σ , em comparação com a espécie Co(II) e Co(III) é devido ao fato de que o Co(I) não tem ligantes nas posições axiais. A alta densidade eletrônica no orbital $3d_{z^2}$ é responsável pelo fato da vitamina B₁₂ ser o nucleófilo mais forte que se conhece, tendo um valor de $n_{\text{CH}_3\text{I}} = 14,4$ na escala de Pearson, definida pela Equação 5, que se refere à velocidade de deslocamento nucleofílico do iodeto de metila ⁸. As equações 6 e 7 referem-se às reações empre

$$n_{\text{CH}_3\text{I}} = \log \left(\frac{k_{\text{Co(I)}}}{k_{\text{CH}_3\text{OH}}} \right) \quad (5)$$

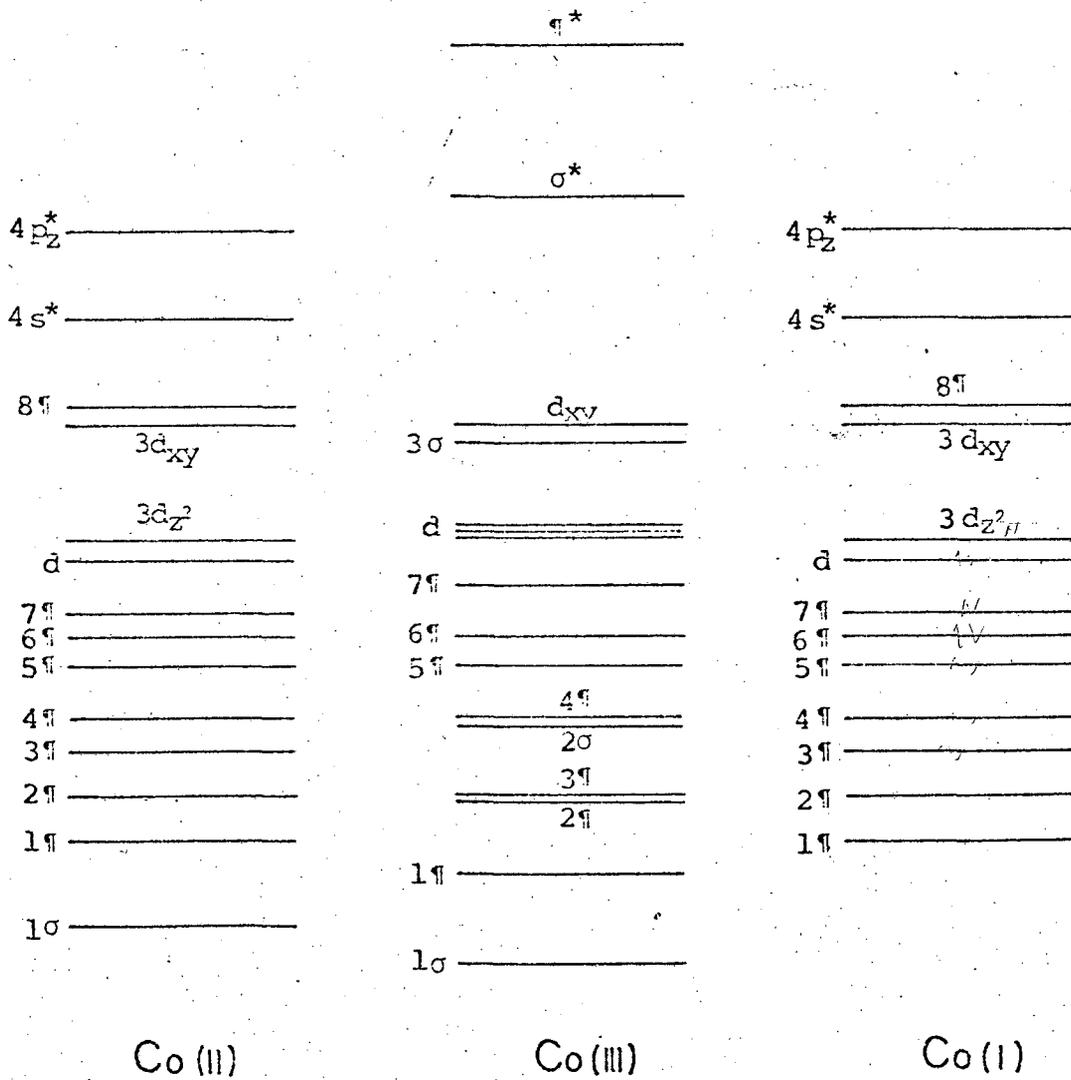
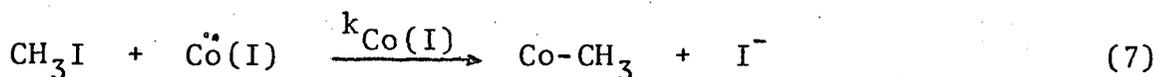
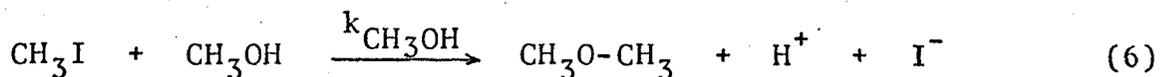


FIGURA 4 - Diagrama energético do átomo central cobalto na vitamina B_{12} sob os três estados de oxidação, Co(I), Co(II) e Co(III).

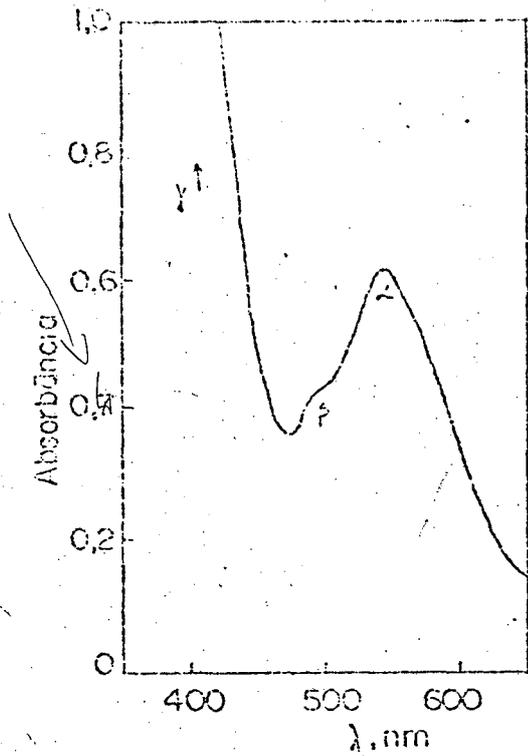
gadas para medir o valor de $n_{\text{CH}_3\text{I}} = 14,4$.



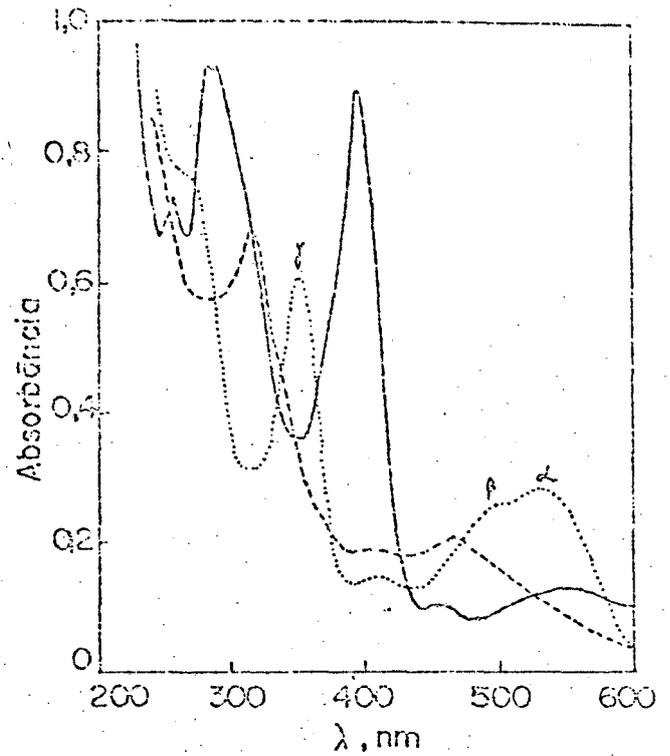
A vitamina $\text{B}_{12\text{r}}$, sob o estado de oxidação $\text{Co}(\text{II})$, como pode-se observar no diagrama da Figura 4, basicamente é diferente da $\text{B}_{12\text{s}}$, devido ao orbital 1σ , o qual acomoda o benzimidazol coordenado na quinta posição. Assim, o $\text{Co}(\text{II})$ apresenta uma estrutura piramidal quadrática com relação aos nitrogênios dos grupos ligantes. O elétron no orbital $3d_z^2$ é desemparelhado, sendo assim, a vitamina $\text{B}_{12\text{r}}$ é uma espécie paramagnética⁶. Em consequência, esta espécie em solução é detectada e exibe um espectro característico de ressonância eletrônica do spin⁸. Reage rapidamente com o oxigênio oxidando-se para $\text{B}_{12\text{a}}$. Uma propriedade importante da vitamina $\text{B}_{12\text{r}}$ é de reagir por via de radicais livres.

A vitamina $\text{B}_{12\text{a}}$ possui o átomo central na sua forma mais estável. O $\text{Co}(\text{III})$ neste caso é diamagnético. Apresenta dois orbitais σ , 1σ e 2σ , que são responsáveis pelas formações dos dois orbitais moleculares com os dois ligantes axiais. Segundo o diagrama da Figura 4, percebe-se que a introdução de uma nova ligação σ , proveniente do orbital 2σ , produz um efeito muito grande nos níveis dos orbitais π , e como poderia ser esperado, há reprodução de grandes mudanças espectrais nos espectros de absorção UV-VIS (Fig. 5c). Os complexos de $\text{Co}(\text{III})$ são bastante lábeis e muitas reações de intercâmbio de ligante têm sido estudadas³.

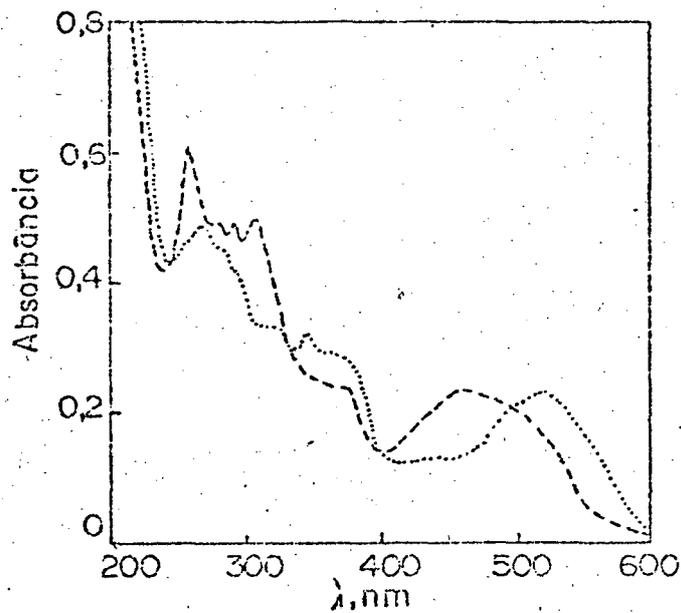
Experimentalmente, há a possibilidade de distinguir a



(a)



(b)



(c)

FIGURA 5 - Espectros de absorção UV-VIS da porfirina (a), vitamina B_{12} sob as formas (...) B_{12a} , (---) B_{12r} (b) e metilcobalamina em meio ácido (---) e em meio neutro (...) (c).

vitamina B_{12} nos seus três estados de oxidação por meio das cores exibidas em solução: a B_{12a} é vermelha, enquanto que a B_{12r} e B_{12s} são marron e verde-cinza, respectivamente. Estas diferenças de cores são reflexos das diferentes regiões de absorção em comprimentos de onda do visível. A Figura 5b representa os espectros de absorção UV-VIS das três formas oxidadas ¹. O espectro da aquo cobalamina é caracterizado pelas bandas abaixo de 300 nm correspondentes às transições $\pi-\pi^*$ do grupo benzimidazol ⁹.

→ O espectro das cobalaminas, em linhas gerais, é bastante semelhante ao espectro das porfirinas. Assim, nos dois grupos aparecem as bandas de absorção denominadas de α, β e γ (Fig. 5a e Fig. 5b) ^{1,10}. Em 1883, uma banda de intensa absorção em torno de 400 nm foi observada pela primeira vez na hemoglobina por Soret ¹¹; esta mesma banda foi detectada em porfirinas por Gamgee ¹². Verificou-se, depois, que a banda de Soret, assim denominada, aparecia em todos os derivados da porfirina, sendo que os valores da absortividade molar variava numa faixa de 2 a $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Os espectros observados das porfirinas são classificados de acordo com três categorias: a) transições eletrônicas d-d; b) transferência de carga; c) transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ ^{13,14}. As transições d-d ocorrem entre orbitais moleculares, os quais são orbitais localizados 3d na região do átomo central. As bandas por transferência de carga são dadas pelas transições dos orbitais moleculares, localizados no metal, para um localizado no ligante, e vice-versa. As transições $\pi - \pi^*$ ocorrem entre os orbitais moleculares associados com os ligantes. O anel porfirínico é enquadrado no grupo de simetria D_{4h} ^{13,15}, e as transições na região de 350-620 nm são, essencialmente, transições eletrônicas $\pi - \pi^*$. Segundo a teoria do orbital molecular, estas

transições são originadas dos orbitais moleculares simétricos A_{2u} e A_{1u} do grupo de simetria D_{4h} e implicam num orbital E_g ¹⁶. A Figura 6 mostra um diagrama energético para as transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ de um anel porfirínico. O diagrama apresenta as funções de onda para os orbitais moleculares responsáveis pelas transições $\pi - \pi^*$. Apresenta duas transições eletrônicas, ambas com simetria A_u .

As transições energéticas altas correspondem à banda de Soret presente em todas as porfirinas metálicas. Esta banda é denominada também de banda γ , é muito intensa e aparece ao redor de 400 nm com uma absorvidade molar de aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Fig. 5a). As transições energéticas baixas correspondem às bandas α e β , as quais encontram-se ao redor de 550 nm e são cerca de 10 vezes menos intensas do que a banda de Soret. Ambas são decorrentes da mesma transição eletrônica, porém, acompanhadas das transições vibracionais $0 \rightarrow 0$ e $0 \rightarrow 1$ ^{13,17}.

Offernhartz e seus colaboradores¹⁷ compararam um espectro de um composto corrínico (dicianocobinamida) com um porfirínico. A dicianocobinamida apresenta uma região de absorção ao redor de 550 nm, e em 370 nm uma banda bastante forte. Comparando com a porfirina, esta apresenta as regiões de absorção muito semelhantes, sendo que a banda em 370 nm, também é denominado de banda de Soret. Em suma, os anéis corrínicos também apresentam as bandas denominadas de α , β e γ . Enquanto que a banda de Soret tem uma absorvidade molar ao redor de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, na dicianocobinamida a banda é enfraquecida segundo um fator de 10. As bandas, na região do visível, das porfirinas e dos corrínicos, têm intensidades semelhantes. No entanto, a relação das intensidades entre as bandas visível/ultravioleta nas porfirinas é na ordem de 20, en-

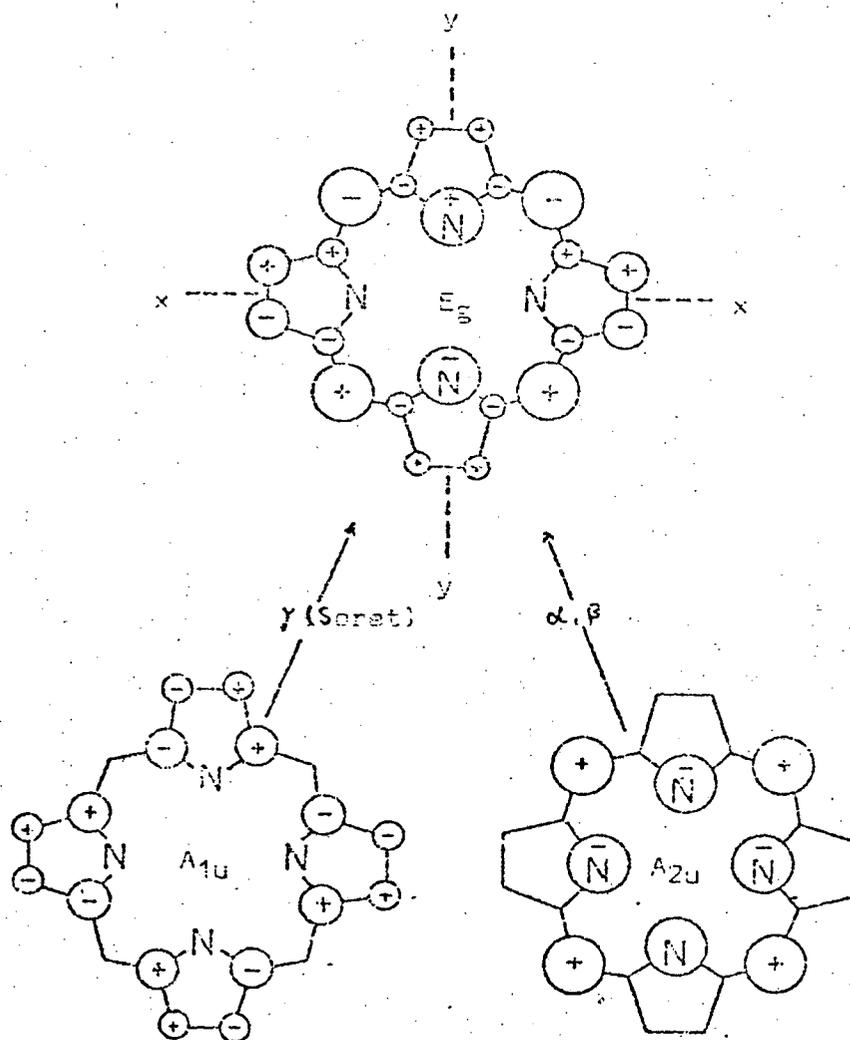
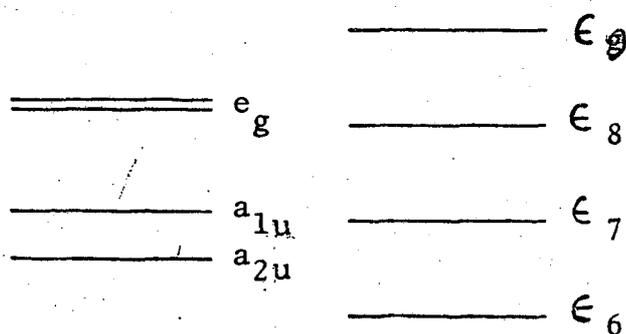


FIGURA 6 - Diagrama dos níveis de energia do anel porfirínico.

quanto que nos anéis corrínicos, raramente excede de 2. Um esquema das energias dos orbitais moleculares das porfirinas (à esquerda) e dos corrínicos (à direita) é o seguinte:



onde os orbitais a_{1u} e a_{2u} correspondem a ϵ_7 e ϵ_6 , e e_g corresponde a ϵ_8 e ϵ_9 . Nas porfirinas os últimos dois orbitais são duplamente degenerados, assim as excitações correspondem a duas distintas bandas. Como os altos orbitais ocupados são quase degenerados, as duas bandas interagem fortemente para produzir uma banda de alta energia de alta intensidade (banda de Soret) e uma banda de baixa energia de baixa intensidade. Nos anéis corrínicos a excitação de baixa energia ($7 \rightarrow 8$) não é degenerada, enquanto que as outras duas excitações ($7 \rightarrow 9$ e $6 \rightarrow 8$) são aproximadamente degeneradas (banda γ) pois envolvem energias muito parecidas.

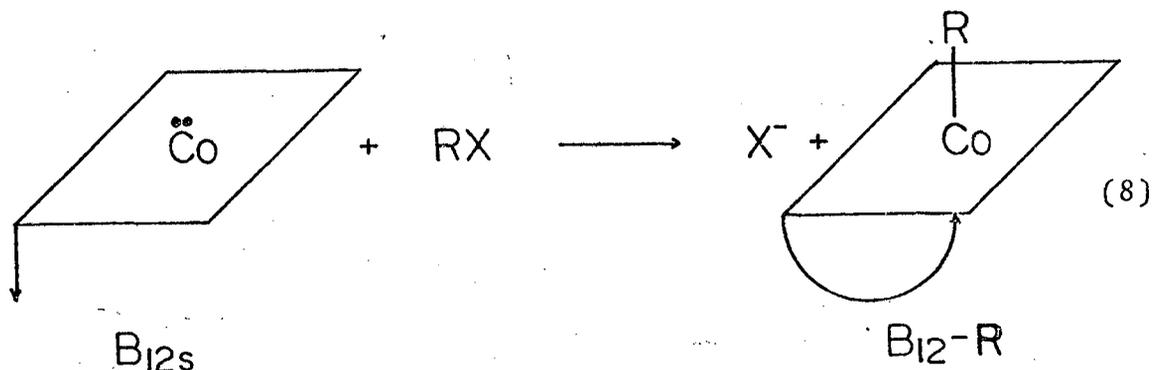
Poder-se-ia dizer que o ideal grupo de simetria dos anéis corrínicos seria C_{2v} , assim o estado excitado da transição $\psi_7 \rightarrow \psi_8$ pertence à simetria A_1 e os dois componentes de baixa energia no espectro, α e β , são ambos dados pela transição $\psi_7 \rightarrow \psi_8$ e são dos componentes vibracionais $0 \rightarrow 0$ e $0 \rightarrow 1$ ¹.

Neste modelo deu-se muita atenção à influência da carga no íon metálico. Baseado na aproximação de Hückel demonstrou-se que a transição $7 \rightarrow 8$ cresce em energia com o aumento da carga no

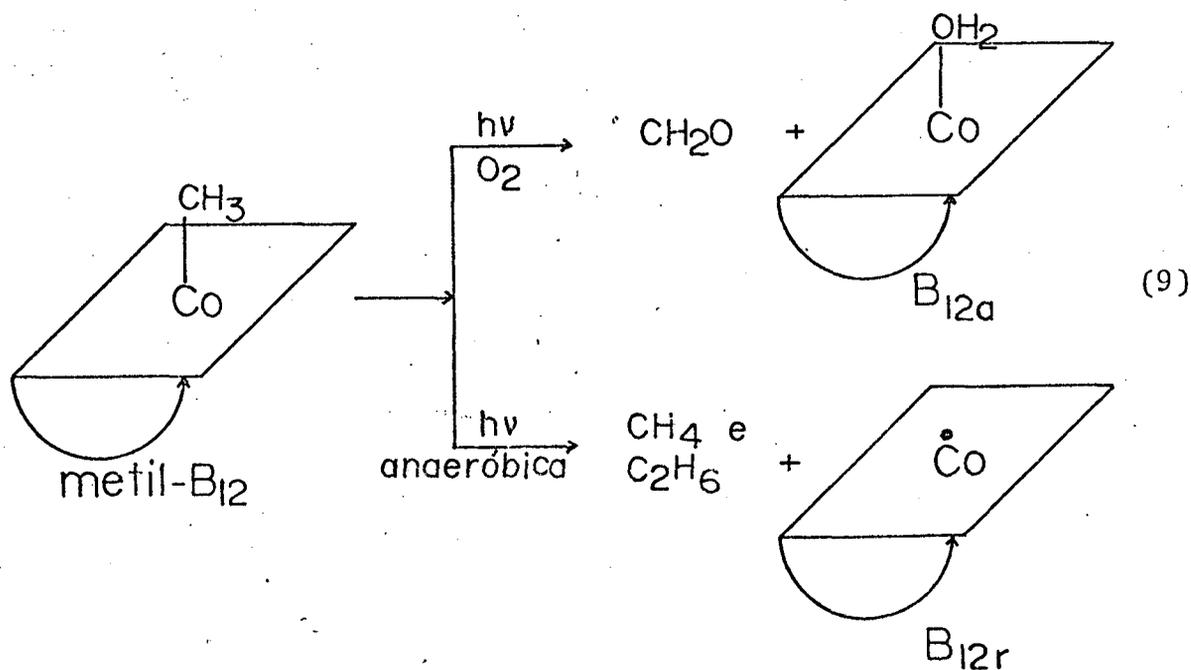
cobalto. Portanto, a posição da banda β depende da carga sobre o metal, aumentando, para complexos do Co(III), em direção a 600 nm, quando os ligantes são CN^- e CH_3^- e diminuindo para 450 nm no caso da metilcobalamina "base off" (Fig. 5c). De outro lado, a redução do metal central, também influencia a posição da banda β . Os complexos de Co(I) têm a banda β na região do vermelho ($\beta \sim 600$ nm); o espectro dos complexos de Co(II) dependerá do poder doador dos ligantes, e irá em direção ao azul desde que o Co(II) forme somente fracas ligações com estes ligantes ^{1,17}.

Nos métodos mais comuns de redução da vitamina $\text{B}_{12\text{a}}$ estão incluídos os redutores borohidreto de sódio, o zinco em pó em solução de cloreto de amônio, o íon cromoso em pH 9 a 10 e o método eletroquímico ¹⁸.

A $\text{B}_{12\text{s}}$ é um intermediário muito importante na síntese dos derivados alquilcobalaminas. A Equação 8 descreve a reação de deslocamento nucleofílico do tipo SN_2 , responsável pela formação das alquilcobalaminas. Por exemplo, na síntese da metilcobalamina reage-se iodeto de metila com $\text{B}_{12\text{s}}$. E assim, muitas outras alquilcobalaminas são obtidas pelo mesmo processo. As cobalaminas de grupos alquilas primários são relativamente estáveis. Quando o ligante é o sec-butila, ocorre reação, porém, o produto é instável. Se for o neopentila, não ocorre reação ¹. Isto sugere que o impedimento estérico é um fator importante na formação de alquilcobalaminas. Jensen estudou a alquilação da espécie Co(I) usando, como modelo, a cobaloxima (I). Os resultados levaram a crer que as reações de alquilação são processadas bimolecularmente e concluiu que ocorrem via reações do tipo SN_2 ¹⁹.

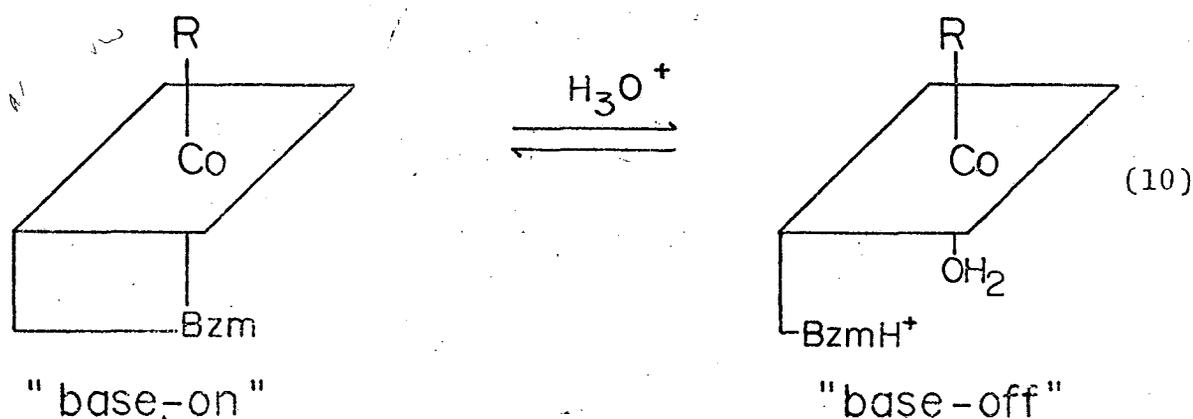


As alquilcobalaminas são muito instáveis em presença de luz e em solução. Ocorre a quebra da ligação carbono-cobalto. Os produtos dependem da fotólise (Eq. 9). Tomando como exemplo a metilcobalamina, quando em presença de oxigênio, há formação de aquocobalamina e formaldeído. Numa fotólise anaeróbica, há formação de B_{12r} , metano e eteno¹. A fotólise, em condições anaeróbicas, sugere um bom método para produzir B_{12r} pura. Em presença de oxigênio, a velocidade da reação de fotólise é bem mais rápida do que em ausência.



De outro lado depende também do grupo alquila ligante.

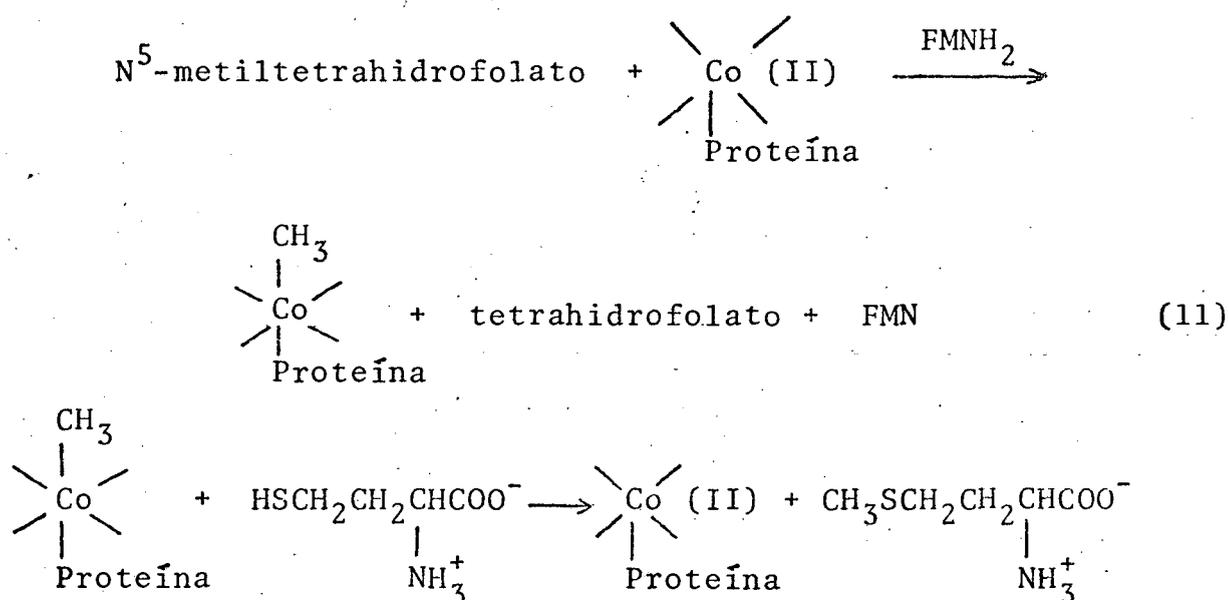
Uma alquicobalamina em solução neutra possui o ligante axial α -5,6-dimetilbenzimidazol coordenado com o cobalto. No entanto, em meio ácido pode haver a protonação do nitrogênio 3 do benzimidazol, trocando o ligante por uma molécula de água (Eq. 10).



Esta propriedade é comum das cobalaminas substituídas. A forma "base-on" tem cor vermelha, enquanto que a "base-off" caracteriza-se pela coloração amarela. Os valores de pKa dependem da natureza do grupo R ligado ao átomo central. Assim, as cobalaminas metil, etil, propil e butil possuem valores de 2,72; 2,87; 3,81 e 3,93, respectivamente ^{1,20,21}.

Neste momento, seria interessante dar ênfase especial à função bioquímica da vitamina B₁₂. Já foi visto que uma aplicação de B₁₂ era no combate da anemia perniciosa, no entanto ela participa de outros metabolismos importantes; cerca de 11 já foram estudados ⁴. A maioria dessas participações foram estudadas e detectadas em bactérias, sendo que a forma ativa é na forma de coenzima ¹. Interessa aqui saber sobre sua participação no metabolismo dos mamíferos e sobre as espécies oxidadas presentes. Uma importante participação é na biossíntese da metionina, já muito

bem estudada em organismos como E. coli, A. aerogenes, Salmonella typimurium e Streptococcus faecalis. Foram feitos estudos em fígado de mamíferos^{22,24} e verificaram que a vitamina B₁₂ era ativa na síntese desse aminoácido. A etapa final envolve a metilação do átomo de enxofre da homocisteína. A reação procede semelhantemente, segundo a Equação 11:



A metil-B₁₂ é um composto que está presente durante o metabolismo. Para ocorrer a metilação da B₁₂, é necessário que haja uma redução do Co(III) ou Co(II) para Co(I) e que tenha um sistema redutor presente. Acredita-se que o sistema envolvido é o protêico NADH-flavoproteína-(S-S). O redutor, NADH, transfere seus elétrons, via flavoproteína, a uma proteína (S-S) específica, para formar uma proteína ditiólica (SH-SH) que converte a vitamina B_{12r} a vitamina B_{12s}⁴. Portanto, as espécies Co(I) e Co(II) estão presentes em organismos de mamíferos.

4. PESTICIDAS

O uso de pesticidas clorados, sulfurados e fosforados, vem aumentando assustadoramente no Brasil e também em outros países. Este uso é feito no campo da agricultura e também em ambientes domésticos. O aumento da aplicação dos pesticidas deriva de uma tecnologia usada sem escrúpulos em todos os setores, sem orientação prévia, além da necessidade habitual, com um intuito desajustado de consumo de material produzido e estocado. Este mal, que muitos dizem ser necessário para o aumento da produção, para exterminação das pragas e animais portadores de doenças, como também para diminuição da fome da humanidade, coloca dúvidas profundas quanto à nocividade ao homem, aos animais domésticos, aos peixes e quanto à permanência no solo. No Brasil os pesticidas clorados são usados indiscriminadamente e com pouca orientação ²⁵. Inseticidas como DDT e DDD nos Estados Unidos da América e em alguns países da Europa são proibidos devido, principalmente, ao grande poder residual no solo. O DDT, por exemplo, tem um poder residual no solo de 4 a 30 anos, dependendo da acidez e do regime pluviométrico. Já, na planta, é de 25 dias ²⁵. No entanto, mesmo que o uso indiscriminado possa trazer problemas, não se pode deixar de mencionar a atividade benévola do DDT. Por exemplo: ele é responsável pela erradicação quase total da malária no mundo inteiro. A tecnologia tentou mudar o uso de pesticidas de poder residual grande, como os clorados, para pesticidas de poder residual menor, como os fosforados, os quais em média têm um prazo que vai desde alguns dias até alguns meses ²⁵. Portanto, pesticidas clorados são quimicamente estáveis e suas degradações, em condições normais e ambientais, são bastante demoradas e difíceis.

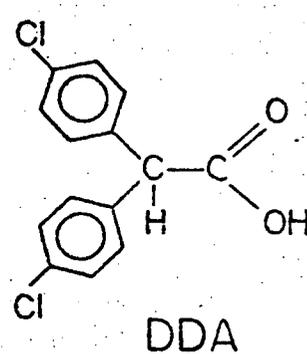
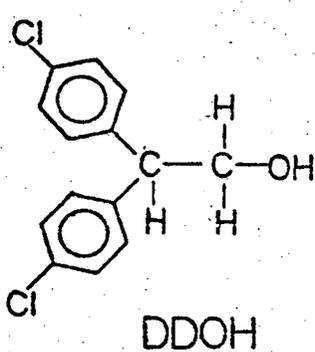
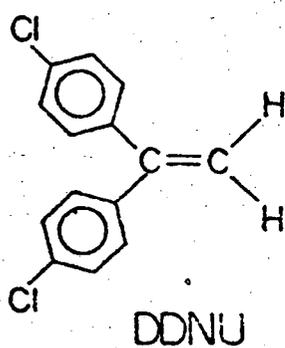
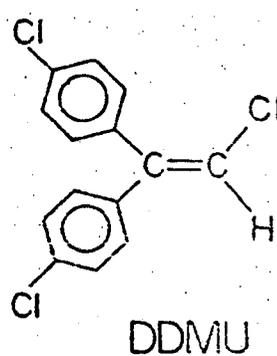
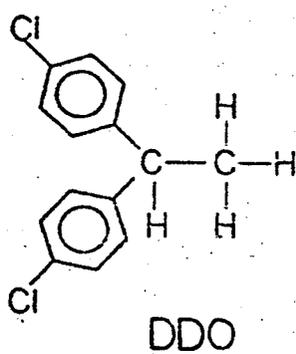
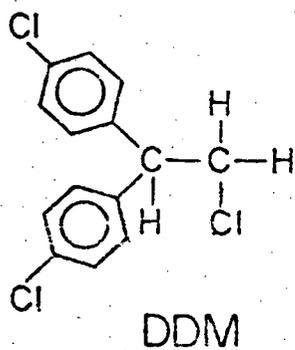
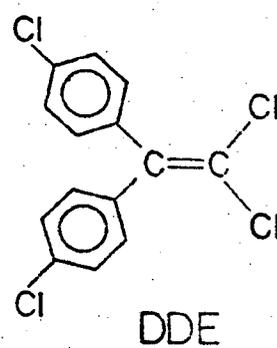
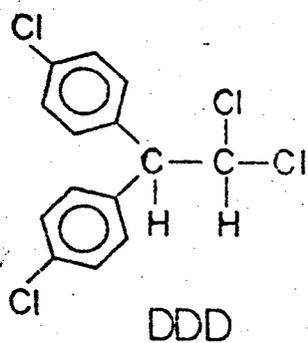
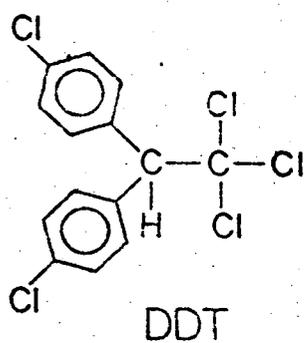
A produção de DDT, mundialmente, restringe-se, anualmente, a um milhão de toneladas ²⁶.

4.1. Estruturas e Nomenclaturas

As estruturas dos inseticidas e de seus principais metabólitos mais importantes, derivados do DDT, são vistos no Esquema 1. O inseticida DDT é denominado de 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano; DDD de 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano; o DDE de 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno; o DDM de 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano; o DDO de 1,1-bis(p-clorofenil)etano; o DDMU de 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno; o DDNU de 1,1-bis(p-clorofenil)etileno; o DDA de ácido-bis(p-clorofenil)acético; o DDOH de 2,2-bis(p-clorofenil)etanol. Além dos inseticidas DDT, DDD e DDE, encontram-se seus isômeros o,p-cloro e p,p-cloro, na forma de o,p-substituídos como por exemplo, os substituintes $\text{CH}_3\text{O}-$, CH_3- , C_2H_5- e outros.

4.2. Reações de Desidrocloração

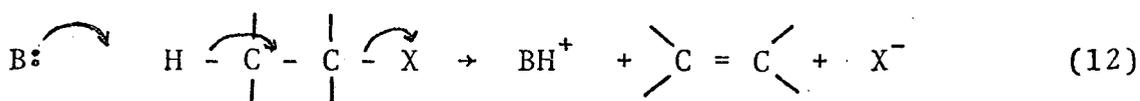
Um tipo de reação bastante conhecida do DDT e DDD é denominada de desidrocloração. Este tipo de reação ocorre biologicamente, quando o DDT reage para produzir DDE, e o DDD para produzir DDMU. De outro lado, o DDM também reage para formar DDNU. Para esta série, verificou-se que a velocidade de desidrocloração aumen-



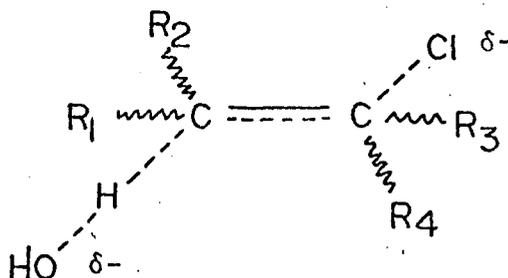
ESQUEMA 1

ta do DDM \rightarrow DDD \rightarrow DDT ²⁷. Comparando o DDT (triclora) com o DDD (diclora), a constante de velocidade, a 40,19 °C, é cerca de 3,5 vezes maior, enquanto que o DDD tem uma constante cerca de 6 vezes maior do que o DDM ²⁷. Assim, o aumento da reatividade do composto DDT sobre o correspondente DDD é indício apresentado pela diminuição da energia de ativação de aproximadamente 1,6 kcal/mol para o composto diclora (equivalente a um fator de 14 na velocidade) comparado com o composto triclorado. De outro lado, as energias de ativação do DDM e DDD são, substancialmente, idênticas e o decréscimo de reatividade do DDM comparado com o DDD é atribuído inteiramente pelo decréscimo da entropia de ativação (Tab. 1) ²⁷.

As reações de desidrocloreção desses compostos sugerem um mecanismo de eliminação E₂, representado pela Equação 12, como um mecanismo envolvendo ao mesmo tempo a saída do próton, formação da dupla carbono-carbono e a saída do íon halogeneto. O esta-



do de transição para a eliminação E₂ "concertada" é representado como:



Estas mesmas reações têm possibilidades de ocorrerem em organismos vivos durante os processos de degradação desses inseticidas. Espera-se que a reatividade determinada "in vitro" também ocorra "in vivo".

TABELA 1 - Energias e entropias de ativação para as reações de desidrocloração dos derivados do DDT,DDD e DDM com NaOH em 92,6% etanol aquoso ²⁷.

Para Substituinte	Composto	Ea kcal.mol ⁻¹	ΔE_a ^a	ΔS_{30° cal. grau ⁻¹ .mol ⁻¹	$\Delta \Delta S_{30^\circ}$ ^b
CH ₃ O	DDT	21,4	1,6	-6,1	3,6
CH ₃ O	DDD	23,0		-2,5	
CH ₃	DDT	21,0	1,3	-7,1	2,7
CH ₃	DDD	22,3		-4,4	
H	DDT	20,5	1,4	-6,5	2,9
H	DDD	21,9		-3,4	
F	DDT	19,8	1,8	-4,6	3,3
F	DDD	21,6		-1,3	
Cl	DDT	18,3		-5,5	
Cl	DDD	20,1	1,8	-2,3	3,2
Cl	DDM	20,2	0,1 ^c	-5,8	-3,5 ^d
Br	DDT	18,8		-3,0	
Br	DDD	20,6	1,8	0,0	3,0
Br	DDM	20,2	-0,4 ^c	-5,0	-5,0 ^d

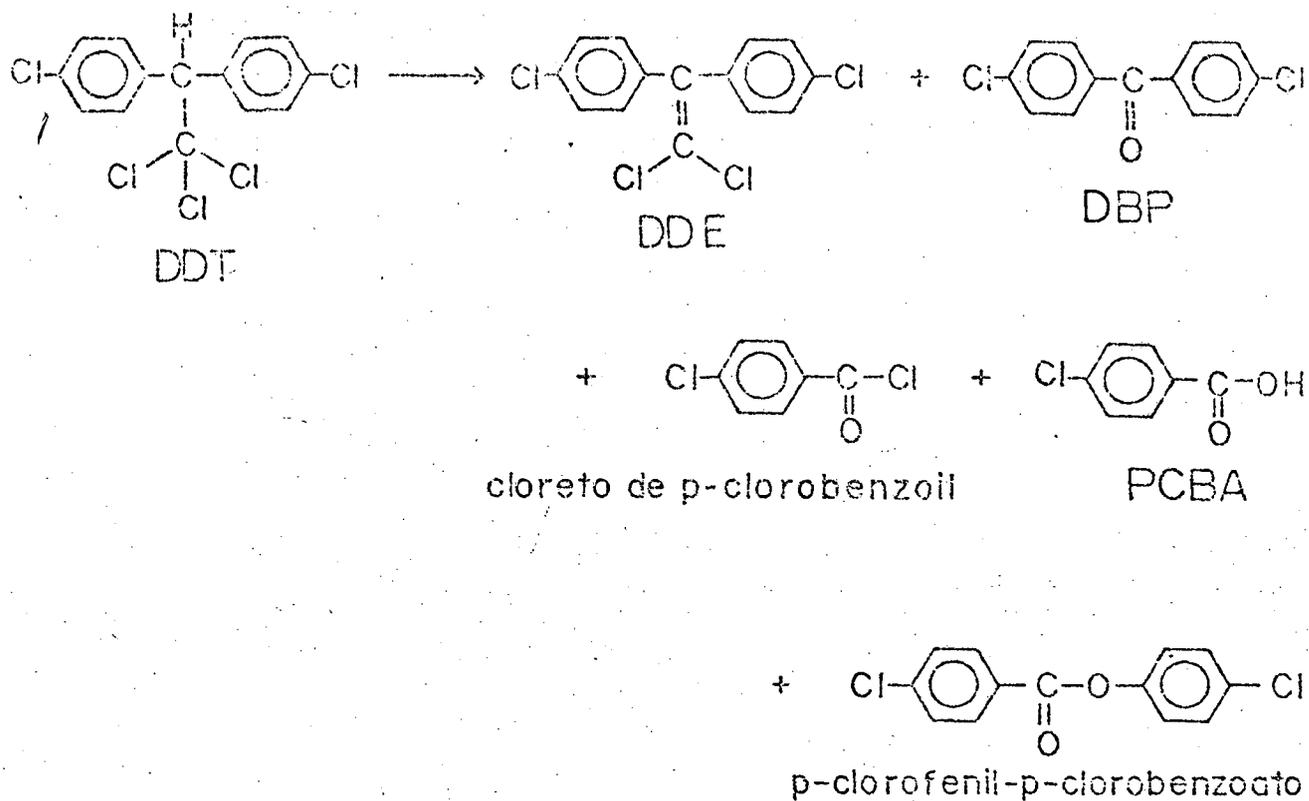
^aDiferenças na energia de ativação entre os compostos do DDD e DDT. ^bDiferenças na entropia de ativação entre os compostos DDD e DDT. ^cDiferenças na energia de ativação entre os compostos DDM e DDD. ^dDiferenças na entropia de ativação dos compostos DDM e DDD.

4.3. Degradação dos Pesticidas

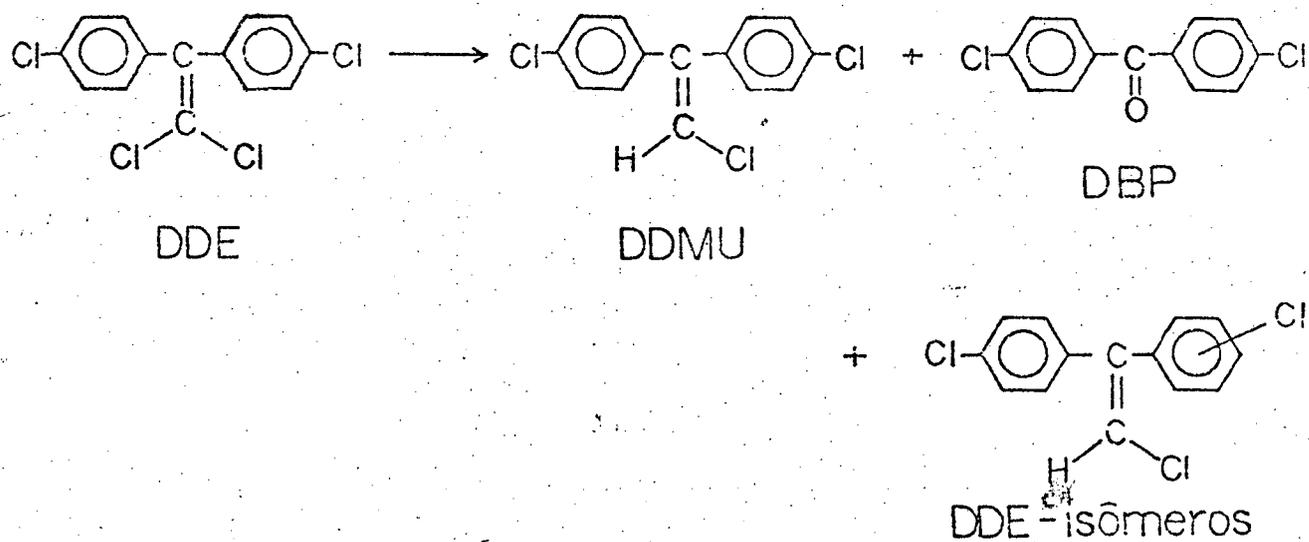
Além do interesse geral de evitar que a poluição proveniente dos pesticidas propague-se, há outro muito importante, sob o aspecto científico, que é o conhecimento dos produtos intermediários e finais da degradação, bem como os agentes responsáveis. O estudo dos produtos de degradação não está bem elucidado, porém, já se conhecem alguns casos em que a análise dos produtos finais "in vivo" trouxeram alguns esclarecimentos químicos.²⁶

Quando um pesticida é colocado numa planta, parte pode ser evaporado na atmosfera e é exposto às radiações ou aos agentes químicos (agentes oxidantes). Seria bom conhecer o comportamento dessas substâncias nas condições ambientais. Na maioria dos casos, sob condições não biológicas, as transformações fotoquímicas não são as mais indicadas. Há possibilidade de reproduzir em laboratório as condições atmosféricas (se bem que a simulação é muito difícil) e submeter o DDT às radiações de uma lâmpada ultravioleta. Resultaram produtos vistos no Esquema 2²⁶. Visto que o DDE é conhecido como "quasi ubíquo" produto de transformação do DDT, a decomposição no meio inanimado é de especial interesse. A fotólise do DDE resultou nos produtos do Esquema 3²⁶.

No ser humano o DDT, DDD, DDE e os demais metabolitos, encontram-se armazenados em maior quantidade no tecido adiposo, devido ao seu caráter lipofílico, já que são insolúveis em água. O DDT acumula-se espontaneamente no tecido nervoso central. Experiências feitas em gato, mostraram que injetando DDT-¹⁴C, 99,7% do DDT radioativo foi encontrado no cérebro, além de 0,6% de DDE e 0,3% de outros metabolitos²⁶. Nos mamíferos está comprovado que o DDE é um produto de degradação final do DDT²⁸.



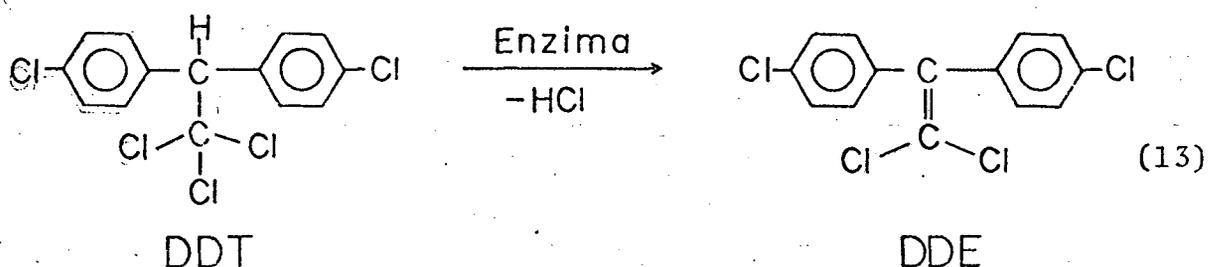
ESQUEMA 2



ESQUEMA 3

O metabolismo em ratos é bastante elucidado. Em experiências feitas, injetando DDT no estômago do rato, a análise final indicou a presença de DDE e DDA como produtos finais^{26,29}. O DDD é o maior produto formado a partir do DDT (Esq. 4). O mecanismo de degradação envolve o DDD e está relacionado com o DDE³⁰.

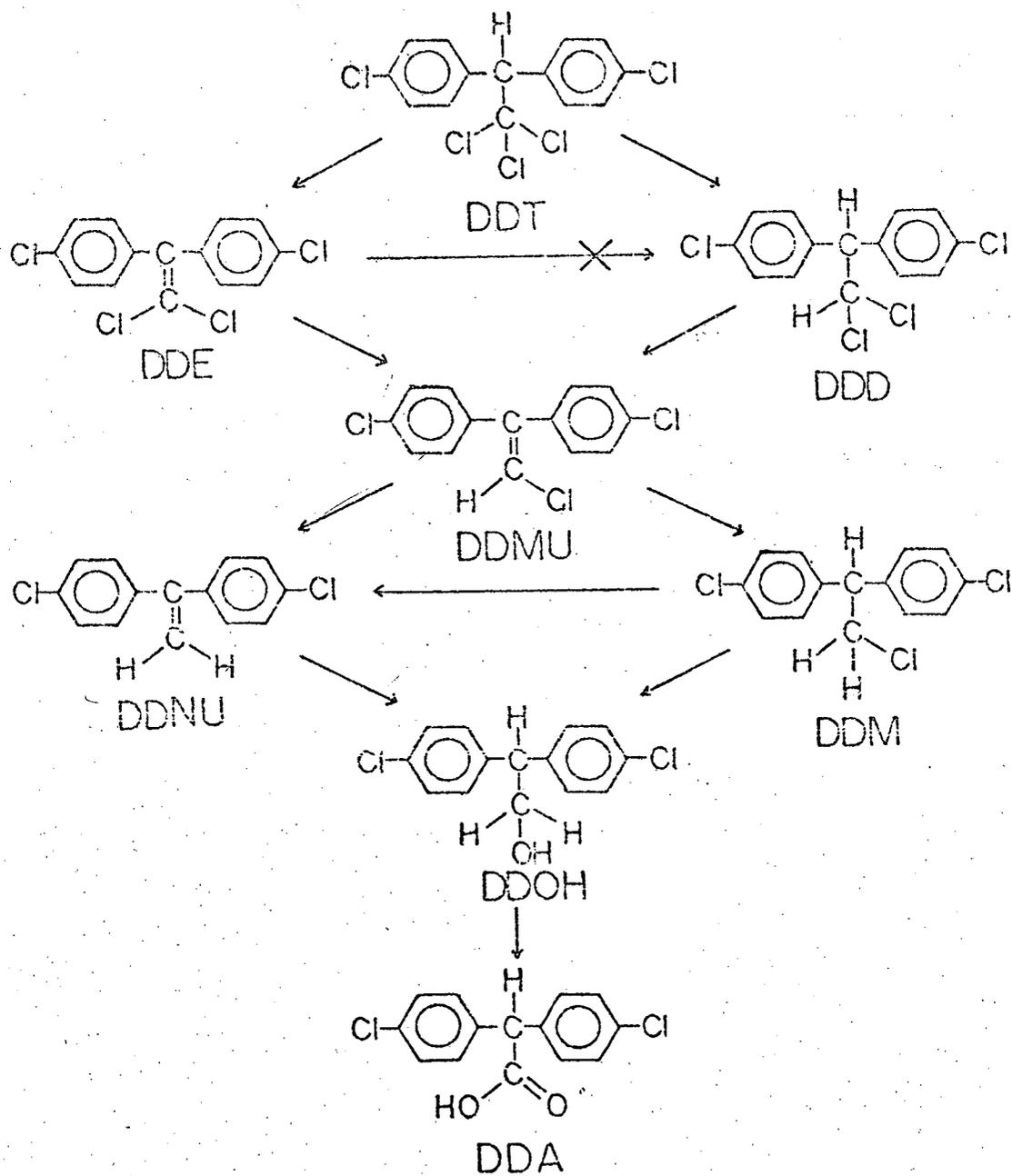
Em insetos foram feitas várias experiências. A mosca doméstica, por exemplo, resiste à ação do DDT porque possui uma enzima, DDT-desidroclorese, a qual reage produzindo DDE (Eq. 13). Desta forma, como a atividade pesticídica do DDE é menor do que a do DDT, a mosca resiste à ação do mesmo³¹. De outro lado, a de



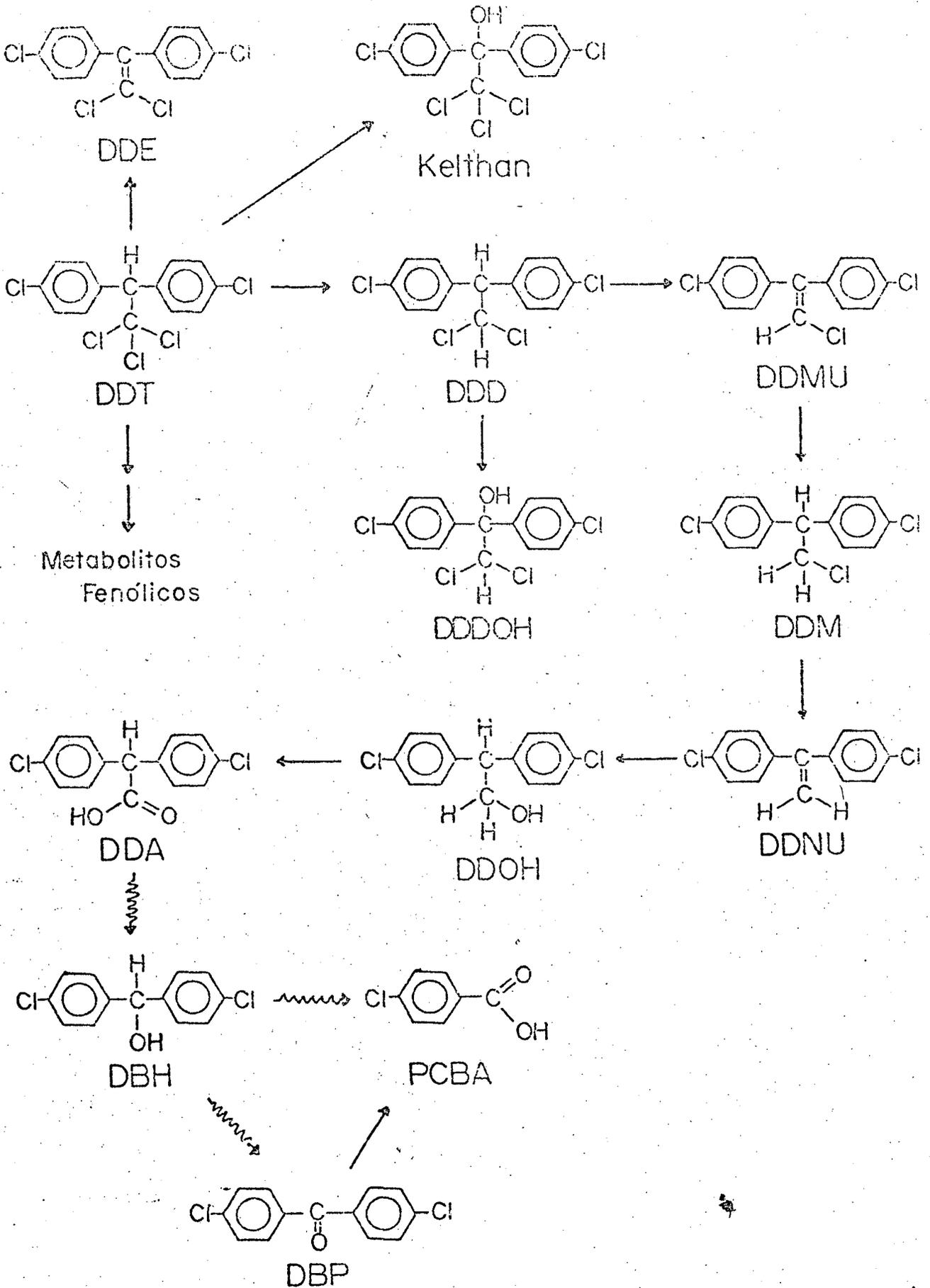
gradação a partir do DDD já tem sido elucidada em bactéria do tipo A. Aerogenes. Neste caso o DDA sofre descarboxilação e oxidação para SBP e o DDE não é um intermediário na produção de DDD³².

As conclusões dos diversos estudos feitos sobre a degradação dos pesticidas são as seguintes:

a. o mecanismo não está nada esclarecido. O que se conhece são casos esporádicos e diversificados. No homem, por exemplo, nada se sabe definitivamente, pois as experiências em ratos são as que esclareceram uma seqüência da degradação, bem como os produtos finais. Mesmo em ratos, não se sabe quem catalisa e provoca a degradação. No homem as experiências "in vivo" são mais difíceis.



ESQUEMA 4



ESQUEMA 5

b. pelos dados apresentados, o mecanismo de degradação, varia entre espécies de seres. Poder-se-ia concluir o assunto sobre degradação, representando o Esquema 5 apresentado por F. Korte e W. Klein ²⁶, que resume grande parte de trabalhos publicados.

5. OBJETIVOS

Este trabalho tinha como propósito principal encontrar um agente que pudesse atuar como catalisador na degradação dos pesticidas clorados. Usou-se o DDD como um modelo para estudar a degradação. Como já foi visto, o DDD faz parte também do processo biológico de degradação do DDT, e portanto, é um dos metabolitos importantes da série. O catalisador escolhido foi a vitamina B₁₂, por dois motivos: a) a vitamina B₁₂ existe no organismo sob formas de oxidação variadas do metal central, as quais participam em diferentes processos do metabolismo biológico intermediário; b) o pesticida DDD é um halogeneto di-substituído em carbono primário, e, portanto, há uma grande probabilidade de que a vitamina B₁₂, em seus estados mais reduzidos, reaja e participe do mecanismo de degradação. Ainda que a redução da vitamina B₁₂ sob o estado de oxidação de Co(I) seja conhecida e for efetuada sob condições experimentais não biológicas, é importante dizer que a vitamina B₁₂ participa em vários processos metabólicos sob este estado de oxidação. É possível que a redução da vitamina B₁₂ em presença de enzimas possa ser realizada sem condições tão enérgicas. Num trabalho ulterior, tentar-se-á estudar uma reação na qual utilizem

-se enzimas como redutores desta reação que, provavelmente, será uma melhor aproximação a um modelo para o mecanismo de degradação de pesticidas clorados.

C A P Í T U L O I I

SECÇÃO EXPERIMENTAL

1. CROMATOGRAFIA

Para purificar os produtos obtidos de reações, foi usado, frequentemente, o método de cromatografia em coluna (CC). Os solventes normalmente usados para a eluição foram: éter do petróleo, hexano, tetracloreto de carbono, metanol e éter etílico, todos produtos nacionais adquiridos da Ecibra (São Paulo, SP) e da Reagen (Rio de Janeiro, RJ). Para substâncias incolores, a seqüência da eluição era acompanhada por cromatografia de camada delgada.

O método de análise de cromatografia de camada delgada (CCD) foi utilizado com os seguintes fins: a) identificação qualitativa dos produtos obtidos em reações; b) controle do aparecimento do produto da reação e desaparecimento do reagente; c) controle da eluição dos produtos de uma mistura em cromatografia de coluna.

Foram usadas placas de vidro de 200x200 mm e 50x200 mm. Para cobrir 5 placas de 200x200 mm, 0,25 mm de espessura da camada, pesavam-se 40 g de sílica gel HF₂₅₄ da Merck, colocava-se num Erlenmeyer e adicionavam-se cerca de 80 ml de água destilada. Fazia-se uma agitação vigorosa da mistura e, em seguida, a aplicação sobre as placas por meio de um aplicador da Desaga³³. As placas eram, então, deixadas ao ar livre durante duas horas. Na seqüência eram levadas à estufa e ativadas durante 1 hora a 120°C.

Nos trabalhos em CCD, dissolvia-se a amostra num solvente pouco polar, geralmente clorofórmio, éter do petróleo e éter etílico, e aplicava-se com tubos capilares. A aplicação era auxiliada pelo gabarito da Desaga³³. A eluição processava-se numa cuba de tampa esmerilhada 220x120x220 mm. A revelação era feita mediante o uso de uma lâmpada ultravioleta UVSL.25 da Ultra Violet Products Inc..

2. INSTRUMENTAÇÃO

Os espectros de absorção no ultravioleta e visível (UV-VIS) foram usados para identificação das bandas de absorção e foram obtidos usando os aparelhos Varian, série 634 e Carl Zeiss, modelo PMQ-II, utilizando células de quartzo com caminho ótico de 1 cm. Os solventes aplicados para dissolver as amostras foram o metanol, o etanol e o ciclohexano (Merck p.a., Florianópolis, SC), sem prévia purificação, pois, suas transmitâncias, na região do espectro estudado, eram satisfatórias.

Na identificação dos compostos por meio de espectroscopia no infravermelho (IV), foi usado um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 720. Todos os espectros foram obtidos em fase sólida, 2 a 3% de amostra em KBr. O brometo de potássio (Merck p.a.) era secado a 110 °C, durante 8 horas na estufa. Preparavam-se as pastilhas por meio de uma prensa da Perkin-Elmer, segundo técnicas descritas³⁴. Normalmente a escala do aparelho era padronizada usando um filme de poliestireno.

A ressonância magnética nuclear (RMN) foi usada no auxílio da identificação de compostos por meio dos aparelhos Varian T-60 e Varian XL-100. Tipicamente, no XL-100, os espectros foram

obtidos com uma amplitude de 1000 cps e com um tempo de varredura de 250 segundos. As regiões aromáticas foram ampliadas para 500 cps a fim de observar os sistemas de acoplamentos. As amostras orgânicas eram secas previamente num aparelho de Abderhalden e dissolvidas em tetracloreto de carbono Uvasol (Merck). Às amostras era adicionado tetrametil silano (TMS) como padrão interno de referência.

O método de cromatografia gasosa foi utilizado para identificar qualitativamente produtos de reações, bem como determinar a percentagem de formação dos produtos. Foi usado um cromatógrafo Varian modelo 2440, acoplado com um registrador potenciométrico de um canal modelo 261/MN. Foi utilizada a coluna 3% OV-17 sob chromosob W-AW-DMCS (80-100 mesh). As condições das operações foram: temperatura da coluna 190 °C; temperatura do detector de ionização de chama 200 °C; temperatura do injetor 215 °C. As amostras eram dissolvidas em ciclohexano (Merck p.a.) e injetada em volumes de 1:1.

Os pontos de fusão foram conseguidos por meio de um microscópio da Mettler, modelo FP-52. As temperaturas não foram corrigidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Parte dos reagentes empregados nos trabalhos foram conseguidos comercialmente e os demais foram sintetizados em laboratório.

A vitamina B₁₂ proveio da Merck e foi usada sem purificação prévia. A análise pelo método espectrofotométrico indicava

uma pureza aceitável. Na Figura 7 está representado o espectro obtido o qual é idêntico à literatura ¹. A vitamina B₁₂ usada foi do tipo hidroxicobalamina 82,4%. O borohidreto de sódio foi comprado da Fisher Scientific Company (Fair Lawn, New Jersey, 07410, USA). Os reagentes DDD, DDT, DDE e DDA foram conseguidos da Aldrich Chemical Company (940 West St. Paul Avenue, Milwaukee, Wisconsin, 53233, USA), enquanto que o etil-DDD da Chem Service (West Chester, PA, 19380, USA). Todos tinham pureza ótima, testados através de CCD (os R_f estão na Tabela 2), utilizando como absorvente a sílica gel da Merck HF₂₅₄, tipo 60, e como aluente o éter do petróleo da Merck DAB7, faixa de ponto de ebulição 40-60 °C. Os espectros obtidos no UV do DDT, DDD e DDE são consistentes com a literatura ^{35,37} e estão representados na Figura 8. O DDT apresenta um λ_{max} em 265,5 nm de uma região de absorção devido à banda B do anel benzeno. De outro lado, a banda K do anel benzeno aparece neste composto deslocada para 236 nm. O DDD apresenta um λ_{max} em 268,5 nm que é a mesma banda B do anel benzeno. Outros picos de absorção de menores intensidades desta mesma região acham-se localizados em 277,0; 261,5 e 255,5 nm. Para o DDD a banda K encontra-se em 232 nm. Quanto ao DDE, o espectro UV revela para a banda K o λ_{max} em 244,5 nm, enquanto que a banda B submerge.

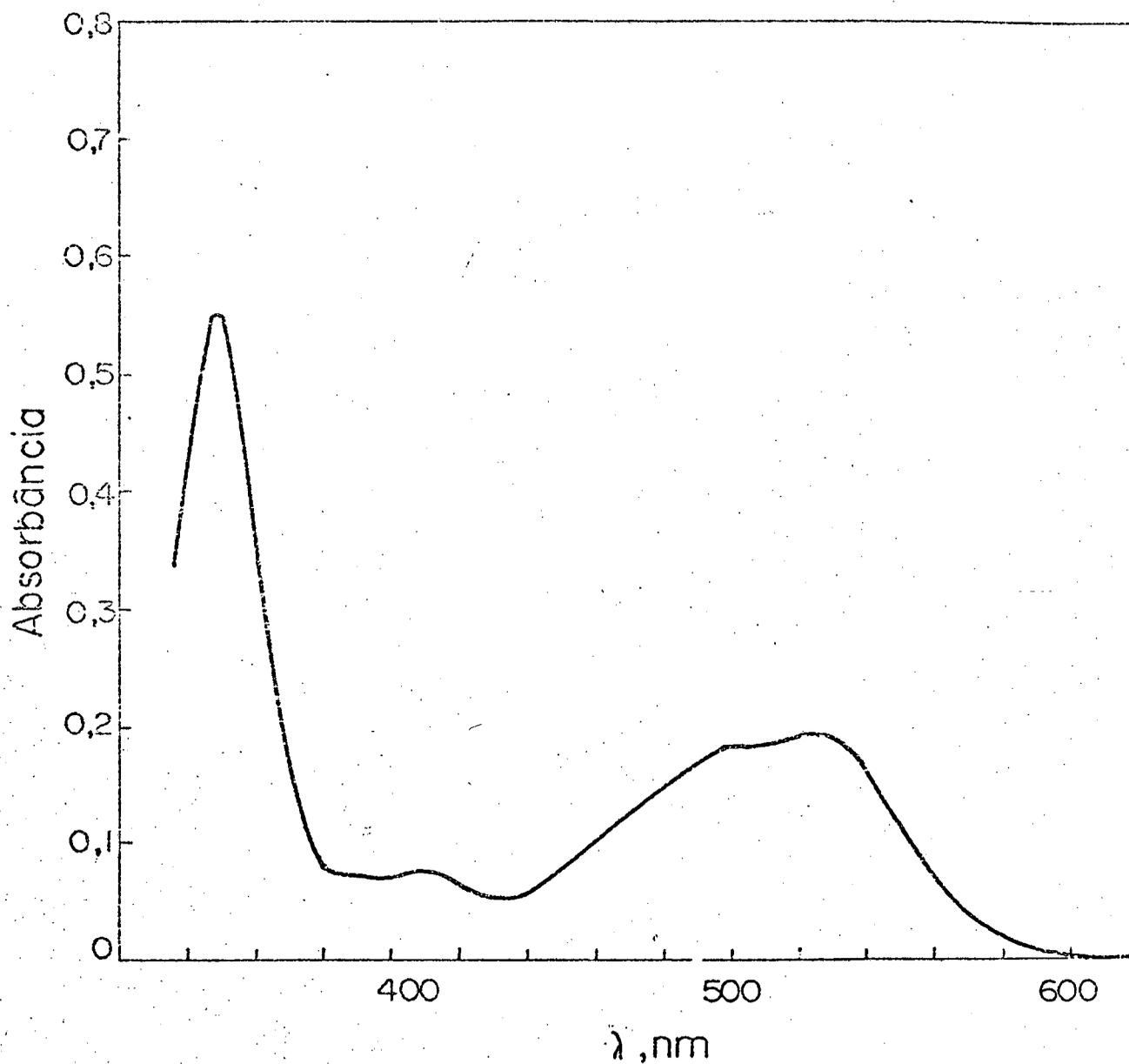


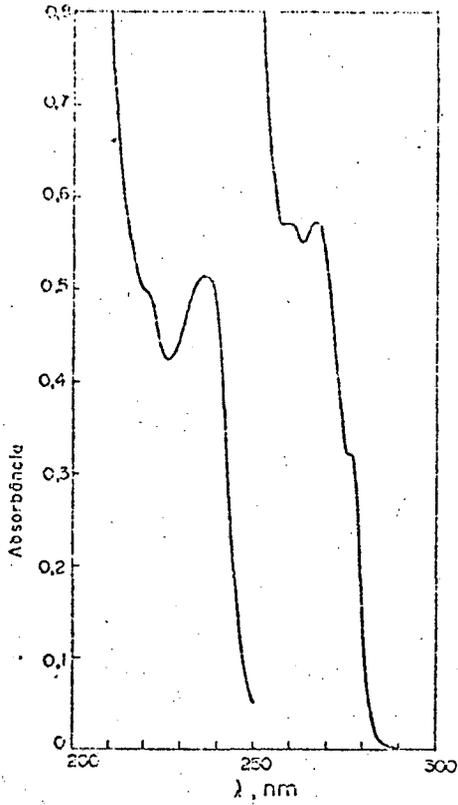
FIGURA 7 - Espectro de absorção da vitamina B₁₂ de concentração $2,2 \times 10^{-5}$ mol/litro a 25 °C em água.

TABELA 2 - Valores médios de R_f e RR_{DDD} dos principais compostos envolvidos no trabalho.

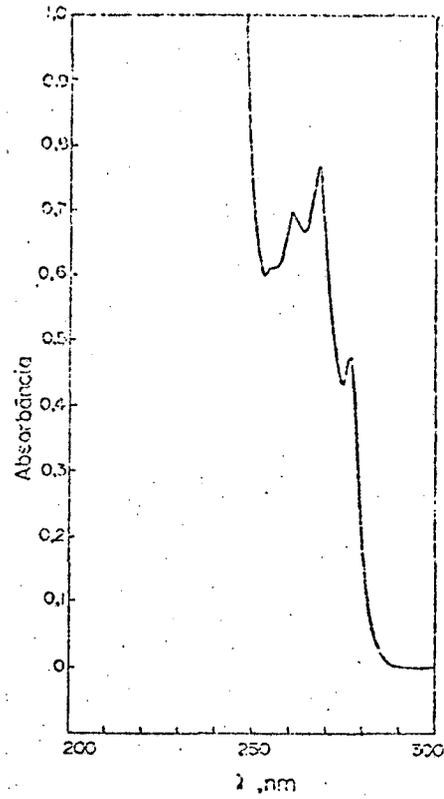
COMPOSTO	R_f^a	RR_{DDD}^b
DDOH	0,00	-
DDA	0,00	-
DDM	0,31	0,65
DDD	0,29	1,00
DDE	0,70	0,63
DDT	0,49	1,23
DCS	0,47	0,60
DDO	0,61	0,29
DDMU	0,65	0,50
DDNU	0,74	0,30
DDMF	0,38	-

^a Valores de R_f obtidos em CCD com o adsorvente sílica-gel HF₂₅₄, tipo 60, Merck, e com o eluente éter do petróleo da Merck DAB7.

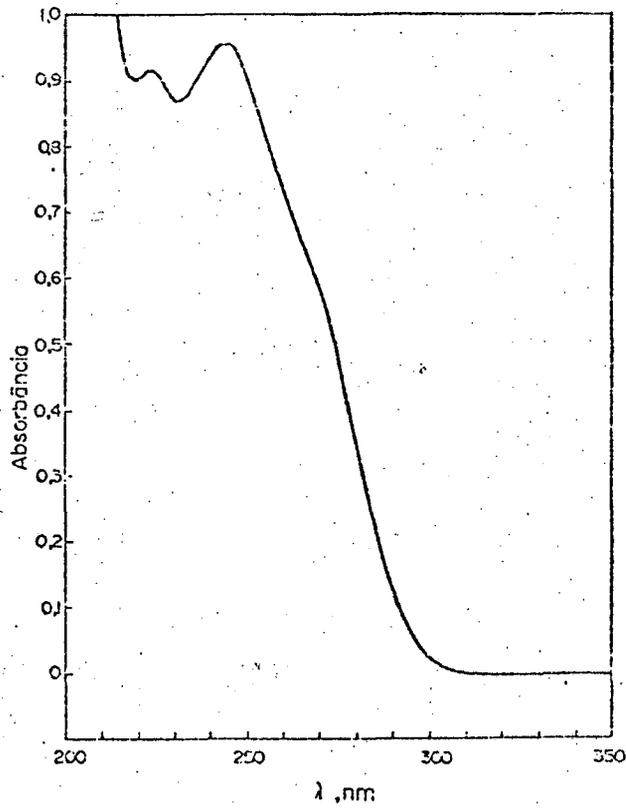
^b Valores de RR_{DDD} (tempo de retenção relativa ao DDD) obtidos num cromatógrafo da Varian modelo 2440, coluna 3% OV-17 sob chromosob W-AW-DMCS (80-100 mesh), temperatura de 190, 200 e 215 °C, referentes à coluna, ao detector de ionização de chama e ao injetor, respectivamente.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 8 - Espectros de absorção no UV dos compostos:

(a) DDT, $7,8 \times 10^{-4} M$; (b) DDD, $1,2 \times 10^{-3} M$;(c) DDE, $5,3 \times 10^{-5} M$.

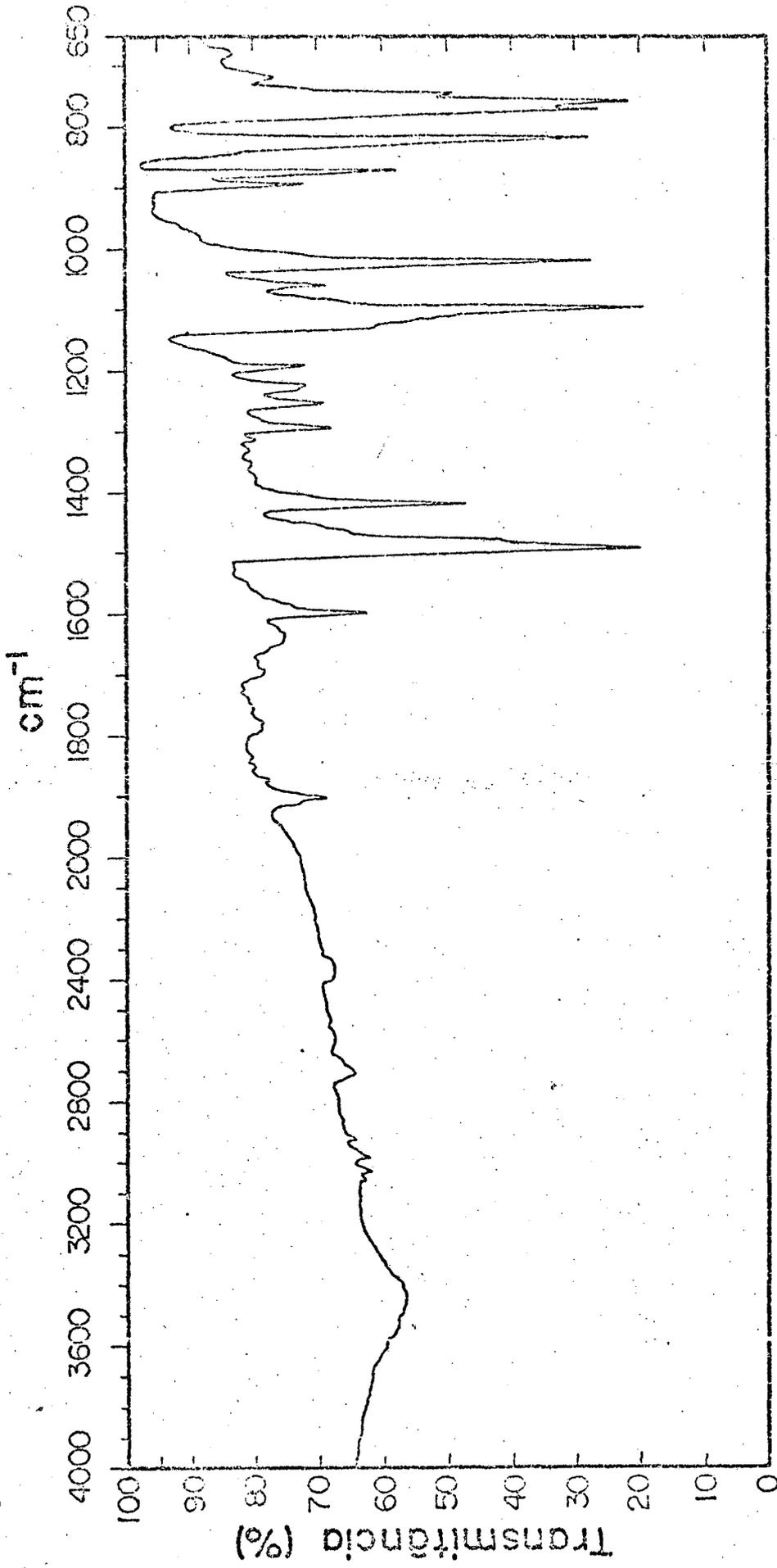
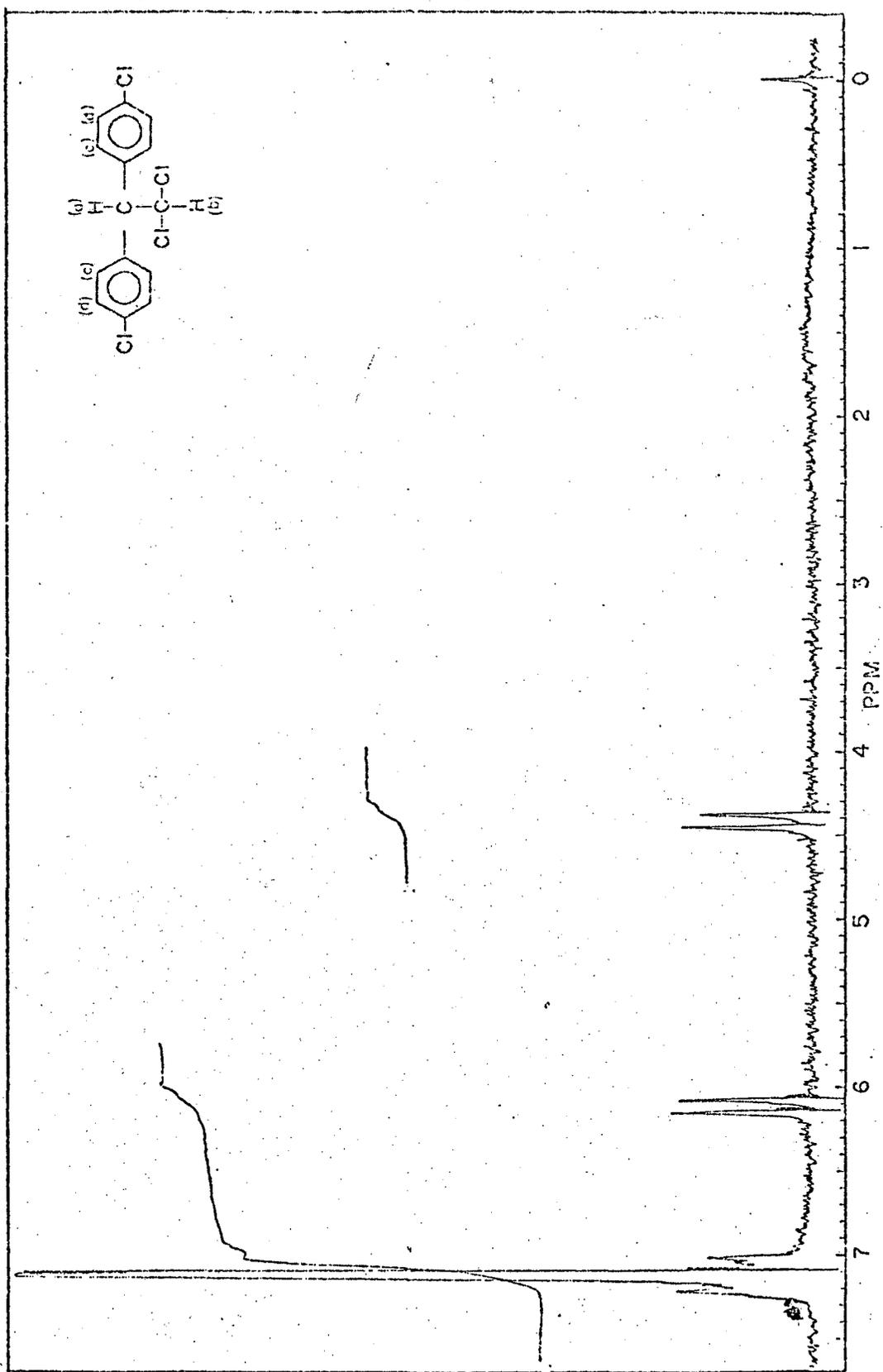


FIGURA 9 - Espectro de absorção infravermelho do DDD.



ESCALA ?
UNIDADES ?

FIGURA 10 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DDD.

O infravermelho do DDD apresenta as seguintes bandas de absorção (médias para fortes): 1592; 1483; 1403; 1082; 1007; 874,5; 853; 795; 758; 747; 730 e 702 cm^{-1} (Fig. 9), as quais estão de acordo com a literatura ³⁸.

O RMN do DDD apresenta duas regiões de absorção como dupletos: uma centrada em 4,46 ppm, cuja constante de acoplamento é igual a 8 e uma outra em 6,18 ppm com J também igual a 8. Correspondem aos prótons (a) e (b) acoplados. Em 7,23 ppm e 7,27 ppm aparecem multipletos referentes aos prótons (c) e (d), respectivamente, dos anéis benzenos, os quais correspondem a um sistema de acoplamento A_2B_2 (Fig. 10). Os dados estão consistentes com as referências 39 e 40.

O espectro do DDA apresenta um λ_{max} em 268,5 nm referente à absorção máxima da banda B do benzeno. Outros picos de absorção estão centrados em 251,5 e 277 nm. A banda K está deslocada para 225 nm (Fig. 11). O espectro UV do composto etil-DDD apresenta um λ_{max} em 265 nm para a banda B, enquanto que a banda K observa-se a máxima absorção em 228,5 nm (Fig. 11).

O espectro infravermelho do DDA, caracteriza nitidamente a banda de absorção do estiramento da ligação O-H de ácido associado, forte e larga, entre 3300 e 2400 cm^{-1} . Além desta, apresenta a forte banda em 1700 cm^{-1} , devido ao estiramento da dupla ligação da carbonila.

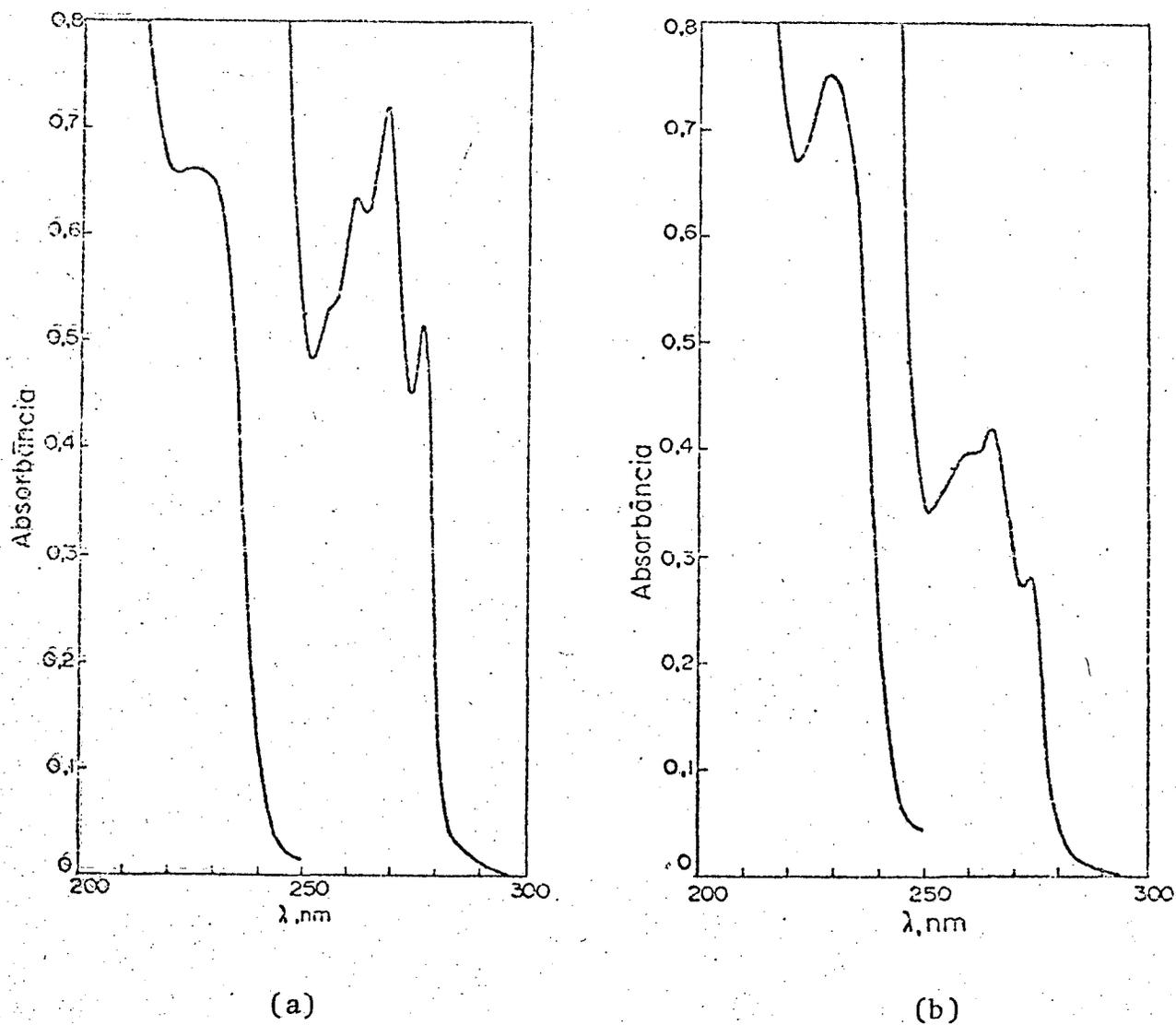
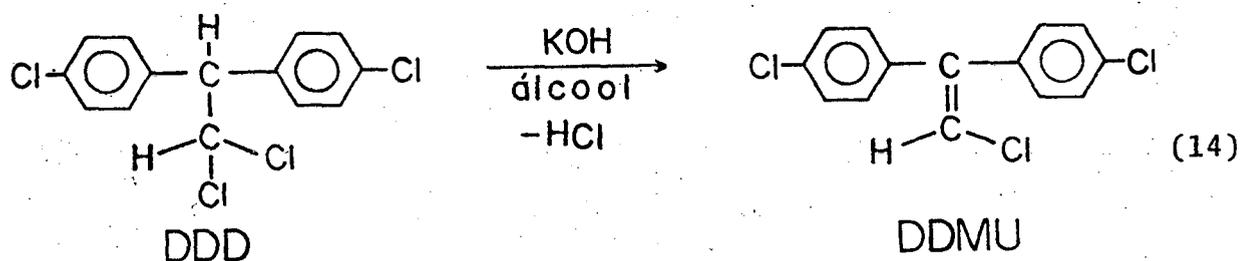


FIGURA 11 - Espectros de absorção no UV em EtOH 95% a 25 °C a 25 °C dos compostos (a) DDA, $1,2 \times 10^{-3}$ M e (b) etil-DDD, $6,5 \times 10^{-4}$ M.

3.1. Síntese

3.1.1. Obtenção do composto 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil) etileno-DDMU

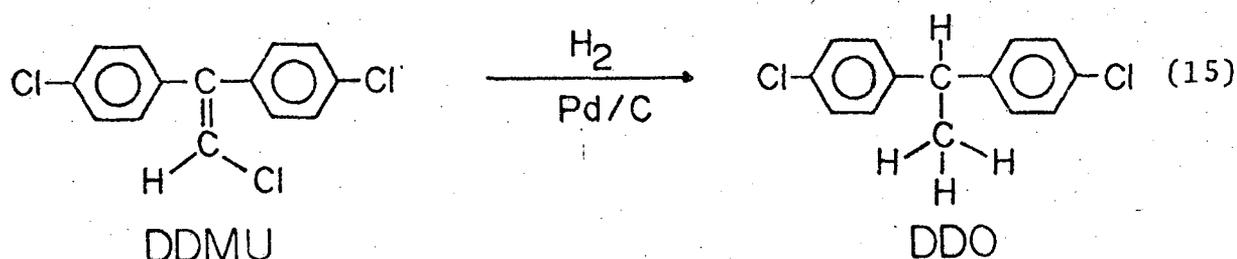
O DDMU foi preparado por desidrocloração do DDD, segundo a Equação 14. Tipicamente, 10,0 g de DDD e 400 ml de solução metanólica de KOH 1 M foram colocados num balão de 1 litro. A mistura foi agitada até que todo soluto dissolveu-se. O avanço da reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada, usando síli-



ca gel da Merck, tipo 60, HF₂₅₄. Após uma hora de reação, o conteúdo foi precipitado com a adição de água, aos poucos e com agitação constante, até que cessou toda precipitação. Filtrou-se a vácuo e o precipitado foi seco na estufa a 60 °C, durante 12 horas. O produto obtido rendeu 8,7 g. O produto da precipitação foi testado em CCD e resultou o aparecimento de uma única mancha (R_f = 0,65); em cromatografia gasosa apareceu um único pico (RR_{DDD} = 0,50).

3.1.2. Obtenção do composto 1,1-bis(p-clorofenil)etano-DDO

O DDO foi sintetizado por via hidrogenação catalítica do DDMU, usando 10% de Pd/C como catalisador (Eq. 15). Tipicamente,



3,0 g de DDMU foram colocados num balão de três bocas de 500 ml. O soluto foi dissolvido com 150 ml de álcool etílico absoluto. Na boca central do balão, foi adaptada uma rolha de borracha perfurada para a entrada de gás hidrogênio.

A segunda saída do balão foi ligada a um bulhometro para controlar a vazão do gás. Foram adicionados 400 mg de catalisador, constituído de uma mistura de paládio-carbono ativado (10% Pd, Merck). O balão foi colocado sobre um agitador magnético. A reação processou-se à temperatura ambiente e sob pressão atmosférica, durante 3 horas. Durante este tempo, a reação foi controlada mediante recolhimento de 50 μ l de solução, aproximadamente, em tempos diferentes, dissolvidos em metanol e analisados por espectrofotometria UV-VIS, até o desaparecimento do espectro do DDMU, caracterizado pelos λ_{max} 242 e 257 nm e o aparecimento do espectro do DDO (Fig. 12), representado por finas bandas em 269,5; 262,5 e 277,7 nm referente à banda B do anel benzeno e em 227 nm referente à banda K. O DDO foi precipitado com água, adicionada paulatinamente e com agitação contínua da mistura. Durante a precipitação, o balão ficou mergulhado num recipiente contendo água gelada. O precipitado branco foi filtrado a vácuo, lavado com água e seco na estufa a 35 °C durante 12 horas. O peso do DDO obtido foi de 1,85 g, 69% de rendimento.

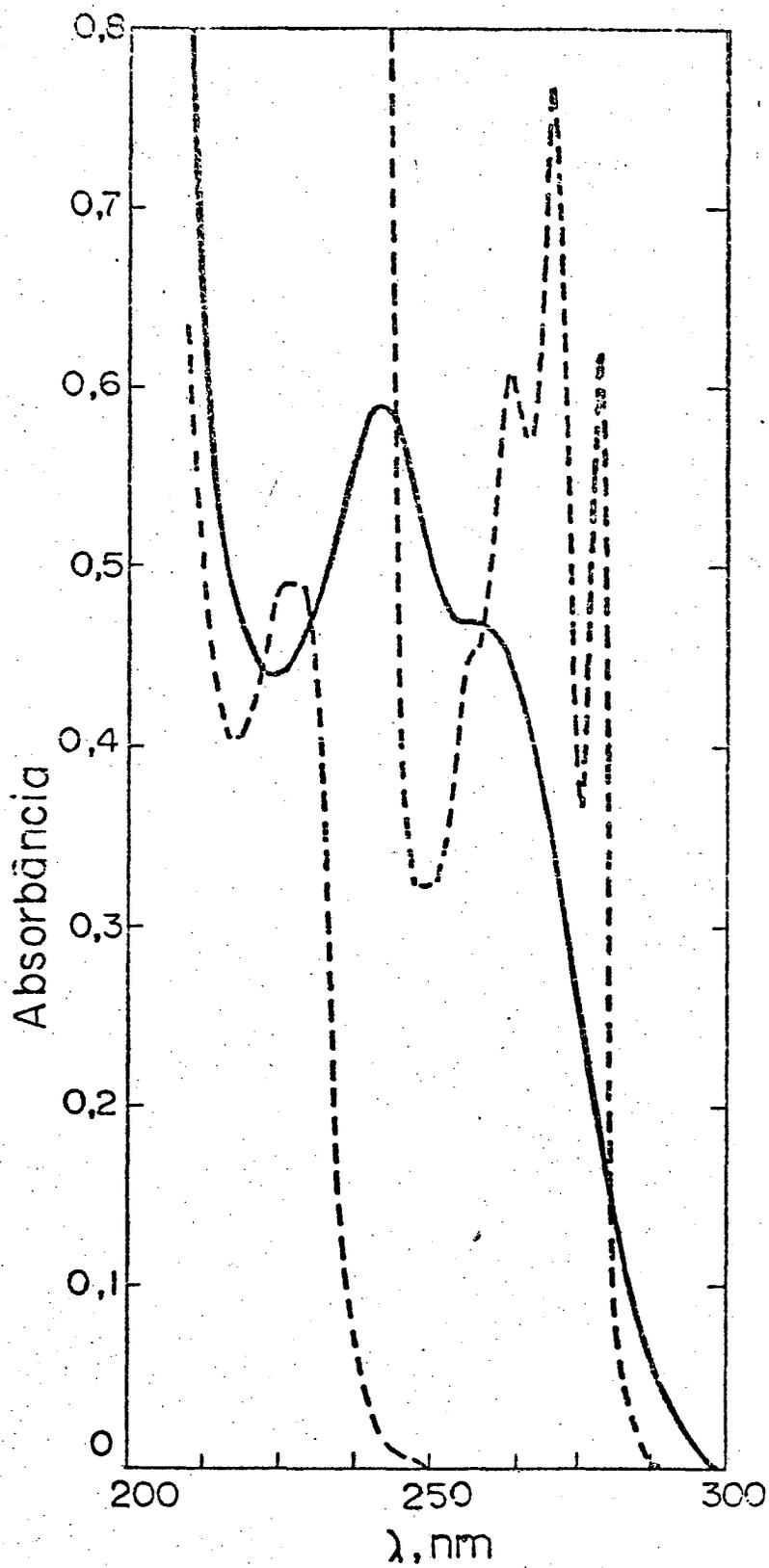
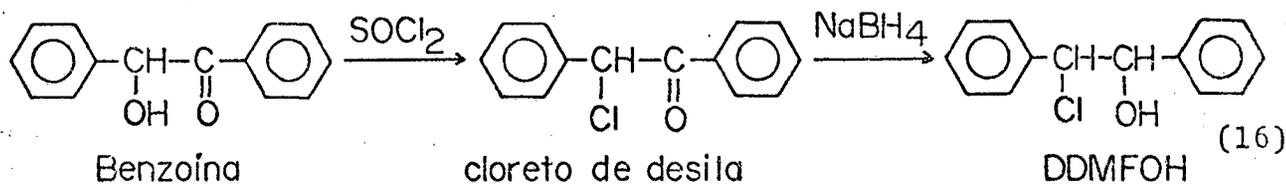


FIGURA 12 - Espectros de absorção no UV do DDMU (—), $3,8 \times 10^{-5}$ M em MeOH a 25°C e do DDO (---), $1,3 \times 10^{-3}$ M em EtOH 95% a 25°C .

O espectro RMN do DDO revela três regiões de absorção (Fig. 13): em 1,55 ppm existe um dublete referente aos prótons (b) e em 4,05 ppm um quarteto do próton (a). Os prótons (a) e (b) estão acoplados, sendo que a constante de acoplamento é igual a 9 cps. Em 7,13 e 7,18 ppm estão centrados os dois multipletes dos prótons (c) e (d) dos anéis aromáticos. A integração revela a proporção 1:3:8 referente aos prótons (a), (b) e (c,d).

3.1.3. Obtenção do composto 2-cloro-1,2-difeniletanol

O composto 2-cloro-1,2-difeniletanol foi sintetizado a partir da benzoína (α -hidroxibenzil fenil cetona) por tratamento com cloreto de tionila para obter o composto cloreto de desila (α -cloro-benzil fenil cetona), seguido por redução deste último com borohidreto de sódio (Eq. 16).



3.1.3.1. Reação da benzoína com SOCl_2

O cloreto de tionila é um reagente muito utilizado em reações de cloração, já que minimiza a tendência de migração de

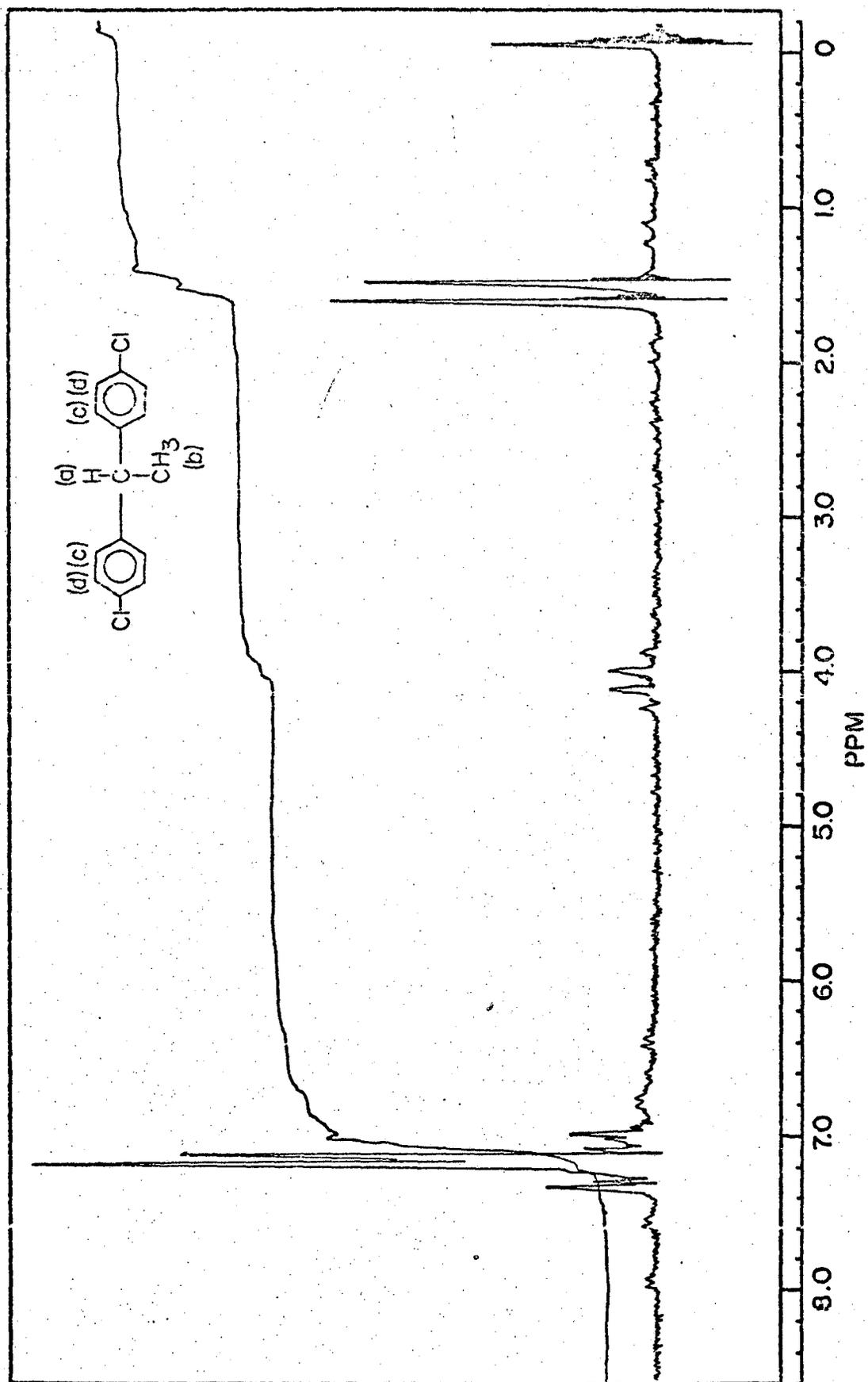


FIGURA 13 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DDO.

grupos. Os álcoois reagem substituindo a hidroxila por cloreto. De outro lado, os produtos secundários são gasosos, libertam-se da reação, enquanto que o excesso de SOCl_2 pode ser retirado por destilação, já que ferve a 79°C ⁴¹.

Tipicamente, 12 gramas de benzoína (Carlo Erba) foram secos num aparelho de Abderhalden durante 5 horas. Num balão de três bocas de capacidade de 250 ml foram adaptados uma rolha com um termômetro e um condensador de refluxo. Na parte superior do condensador, foi colocado um tubo em U com sulfato de cálcio, com a finalidade de impedir a entrada de água, pois, o SOCl_2 reage com a mesma. Toda a aparelhagem foi seca na estufa e montada usando as devidas precauções para que não entrasse umidade no interior. O balão foi mergulhado num recipiente contendo óleo, e foi aquecido com uma chapa elétrica. No balão foram colocados os 12 g de benzoína e depois adicionaram-se aos poucos 4,3 ml de SOCl_2 (Merck p.a.), os quais correspondem à quantidade equivalente, mais 50% de excesso. A reação processou-se a 87°C ⁴² até que cessou todo desprendimento de HCl . Após, adaptou-se o cabeçote de destilação ao condensador e destilou-se o excesso de SOCl_2 , tomando o cuidado de não elevar muito a temperatura além do ponto de ebulição para evitar a decomposição do produto. O material restante foi dissolvido em metanol e precipitado com água.

Tanto o cloreto de desila como a benzoína foram analisados por espectroscopia UV (Fig. 14) e observou-se um λ_{max} em 247,5 nm para a benzoína e em 251 nm para o cloreto de desila ^{43,46}. Na espectroscopia IV, observou-se para o cloreto de desila o desaparecimento do pico da benzoína, correspondente ao estiramento da ligação O-H, banda forte e larga, centrada em 3360 cm^{-1} . Além disso, o pico da carbonila é mantido, com pequena variação, de 1670 a

1685 cm^{-1} . No espectro do cloreto de desila aparece ainda uma banda forte da vibração da ligação C-Cl, localizada em 730 cm^{-1} .

3.1.3.2. Reação do cloreto de desila com NaBH_4

O cloreto de desila produzido foi reduzido com borohidreto de sódio, com o objetivo de obter o composto 2-cloro-1,2-difenil etanol. 1,0 g de cloreto de desila foi dissolvido em metanol num copo de bēquer. Em seguida, acrescentou-se 0,3 g de borohidreto de sódio e a reação prosseguiu até que cessou toda a efervescência. A amostra foi tomada e testada por espectroscopia no UV. O resultado obtido foi o desaparecimento do pico em 251 nm, causado pelo cromóforo benzeno em conjugação com os elétrons da carbonila, banda K do anel benzeno deslocada, para aparecer os picos em 265; 260 e 254 nm, característicos da absorção do anel benzeno correspondente à banda B. Este resultado era esperado, pois, a redução da carbonila resulta numa diminuição do sistema conjugado e diminuição da absortividade molar (benzoína $\epsilon_{250}^{\text{MetOH}} = 13300$ (Ref. 49) e 2-cloro-1,2-difeniletanol $\epsilon_{260} = 500$).

A estrutura do composto obtido foi confirmada através de uma reação característica⁴⁷: 200 mg do produto foram dissolvidos em 100 ml de ácido acético glacial e foram adicionados à mistura 200 mg de zinco em pó. A mistura ficou refluxando durante 1 hora. Após este tempo, retirou-se uma amostra e a análise por meio de espectroscopia UV revelou a presença do trans-1,2-difeniletano (trans-estilbeno) de λ_{max} 307,5; 294,5 e 227,8 nm (307; 294 e 227 nm)⁴⁸. Portanto, segundo a literatura, dever-se-ia obter trans-estilbeno,

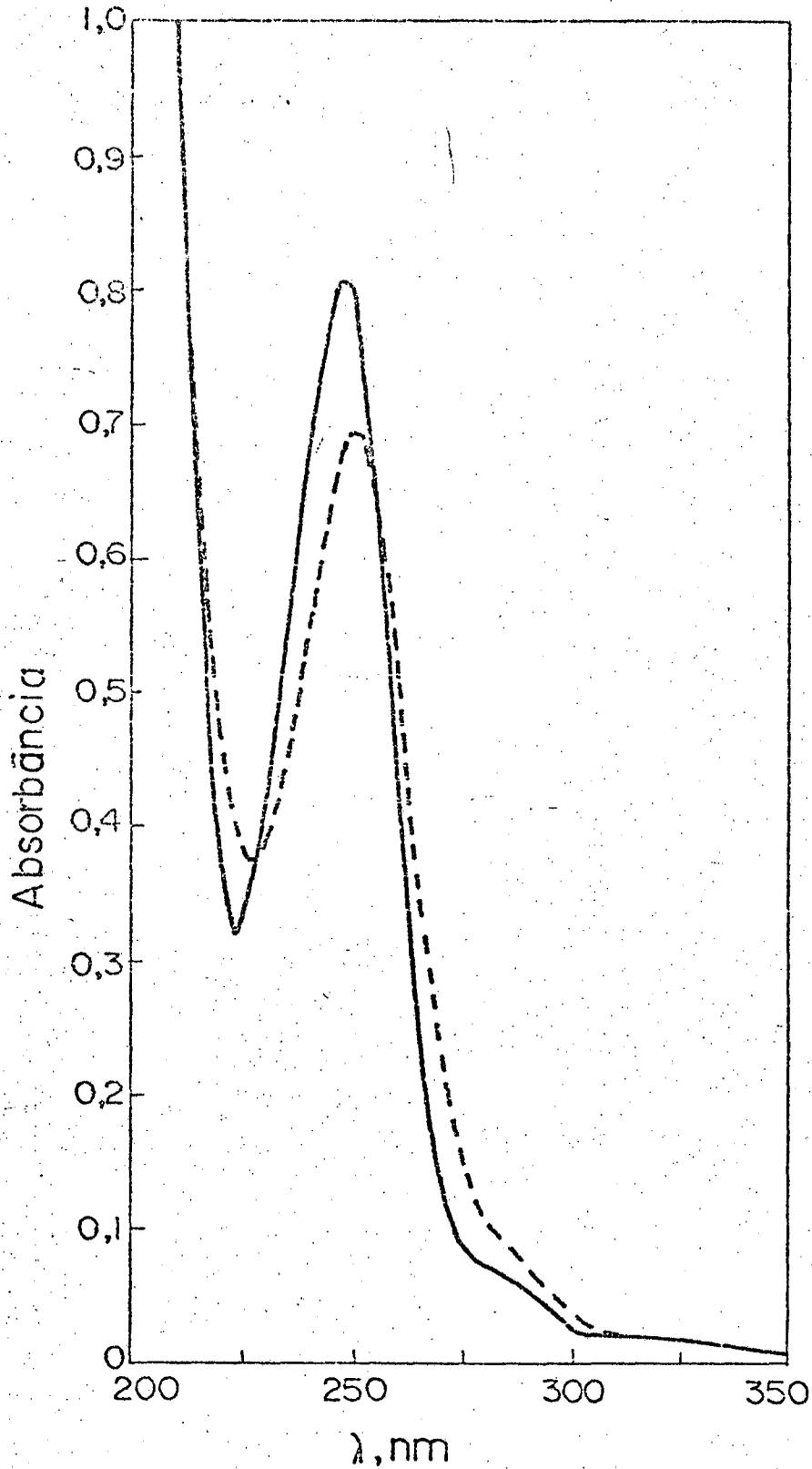
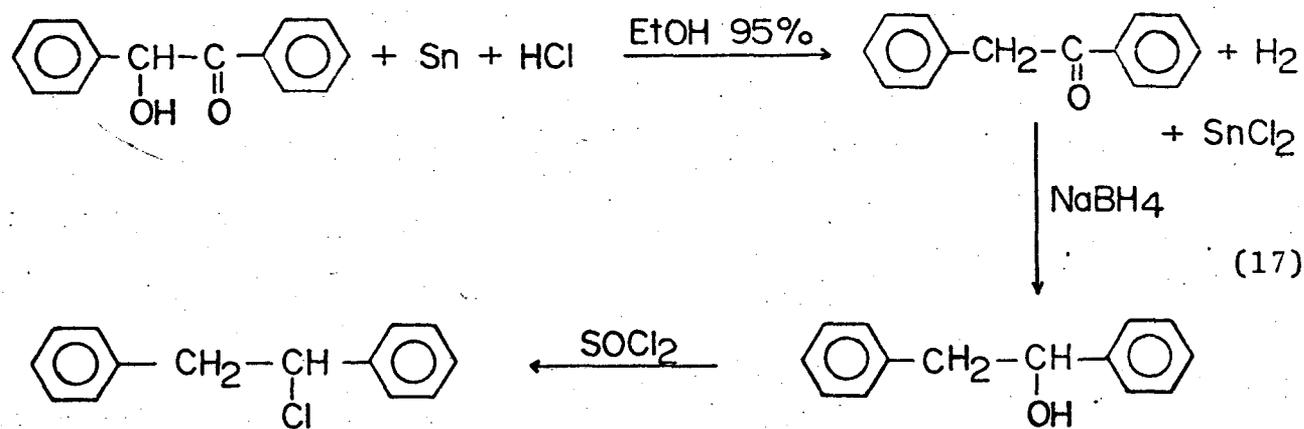


FIGURA 14 - Espectros de absorção no UV em MeOH a 25 °C dos compostos benzoína (—); $6,2 \times 10^{-5}$ M e cloreto de desila (---), $5,2 \times 10^{-5}$ M.

o que de fato ocorreu.

3.1.4. Obtenção do composto 1-cloro-1,2-difeniletano

O composto 1-cloro-1,2-difeniletano foi sintetizado a partir da benzoína tratando-a com excesso de estanho em meio ácido (HCl), reduzindo-a para desoxibenzoína (α -fenil acetofenona) ⁴². A desoxibenzoína, por sua vez, foi reduzida com NaBH₄ produzindo 1,2-difeniletanol e este último foi tratado com SOCl₂ para dar o composto 1-cloro-1,2-difeniletano (Eq. 17).



3.1.4.1. Reação de obtenção da desoxibenzoína

Tipicamente, 10,0 g de benzoína e 10,0 g de estanho em pó (Merck p.a., 0,1-0,8 mm) foram adicionados num balão de três bocas de 125 ml de capacidade, adaptado com um condensador de refluxo numa das três bocas. Sobre a mistura foram colocados 20 ml de álcool etílico 95% e 13 ml de ácido clorídrico concentrado. A reação foi efetuada sob refluxo constante. O avanço da reação foi acompanhado por CCD e por espectroscopia UV. Este último método ca

racterizava, de uma forma bastante clara, um espectro de λ_{max} em 243 nm ($\lambda_{\text{max}}^{\text{alc.}} = 240 \text{ nm}$)⁴⁹. Após o término da reação, a metade da mistura foi colocada numa coluna de sílica gel e purificada. A cromatografia de camada delgada registrava uma única mancha do produto purificado de $R_f = 0,60$, quando o adsorvente era a sílica gel GF₂₅₄, tipo 60, e o solvente éter do petróleo/acetona 1:5. A espectroscopia IV apresentou duas características importantes, comprovando o composto: uma, o desaparecimento da larga banda do estiramento do O-H associado, localizada em 3360 cm^{-1} e uma segunda, a manutenção da banda da carbonila em 1680 cm^{-1} (1680 cm^{-1})⁵⁰. O rendimento da reação foi de 54%.

3.1.4.2. Reação de obtenção do 1,2-difeniletanol

2,0 g de desoxibenzoína foram colocados num corpo de bēquer. O composto foi dissolvido em 50 ml de álcool metílico. Iniciou-se a adição de NaBH_4 à solução, a qual foi controlada por CCD e encerrou-se quando a mancha de $R_f = 0,60$ desapareceu totalmente para o surgimento de uma outra de $R_f = 0,72$. A mistura resultante foi adicionado éter etílico com a finalidade de precipitar os boratos em solução. A mistura ficou em repouso de um dia para o outro, a fim de que a precipitação fosse total. A espectroscopia UV de uma amostra do filtrado acusou uma banda de absorção característica do cromóforo do benzeno, sem extensão de conjugação, tendo um λ_{max} em 259 nm (Fig. 15).

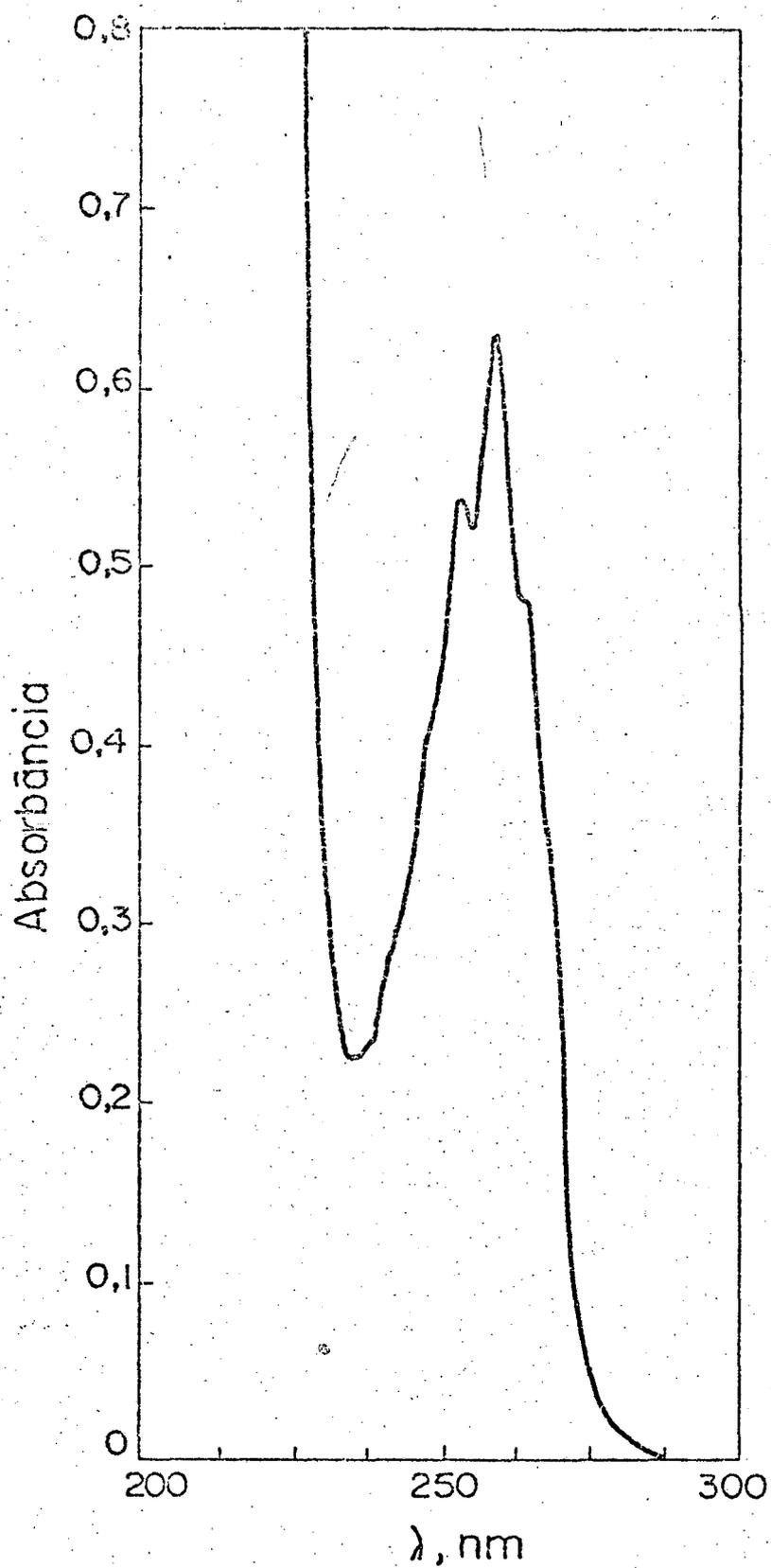


FIGURA 15 - Espectro de absorção no UV do composto 1,2-difeniletanol $1,6 \times 10^{-3}$ M em MeOH a 25 °C.

3.1.4.3. Reação de obtenção do 1-cloro-1,2-difeniletano

Tipicamente, 1,5 g de 1,2-difeniletanol foram tratados com 1,0 ml de cloreto de tionila. A reação transcorreu mediante controle por CCD, até o desaparecimento do álcool. Análise de uma alíquota por via espectroscopia UV revelou a formação de quantidades de trans-estilbeno, espectro de absorção no UV muito característico, devido λ_{max} 307,5 e 294,5 nm (307 e 294 nm)⁴⁸. O teste em CCD, usando sílica gel GF₂₅₄, tipo 60, Merck e o solvente éter do petróleo, acusou duas manchas, sendo que uma escura de R_f menor e uma outra de maior fluorescência em presença das radiações da lâmpada UV. A purificação da mistura, inicialmente, foi feita utilizando uma coluna de sílica gel. A partir deste processo o trans-estilbeno continuou como impureza na ordem de 1,5%. Nova purificação foi feita através de cromatografia em camada delgada, utilizando sílica gel 60, PF₂₅₄₊₃₆₆ de 0,5 mm de espessura. A sílica gel contendo a mancha do produto foi raspada e extraiu-se o produto com ciclohexano. Obteve-se 100 mg de composto tendo 0,1% de trans-estilbeno como impureza.

O halogeneto obtido foi analisado pelo método de ressonância magnética nuclear (Fig. 16). O espectro revela um dublete localizado em 3,24 ppm e um triplete em 4,84 ppm referentes aos prótons (a) e (b), os quais estão acoplados e o valor da constante de acoplamento igual a 8. Os prótons dos anéis aromáticos exibem multipletes em 7,00 e 7,10 ppm, referentes aos prótons (d) e (c), respectivamente. A integração forneceu a relação 1:2:10.

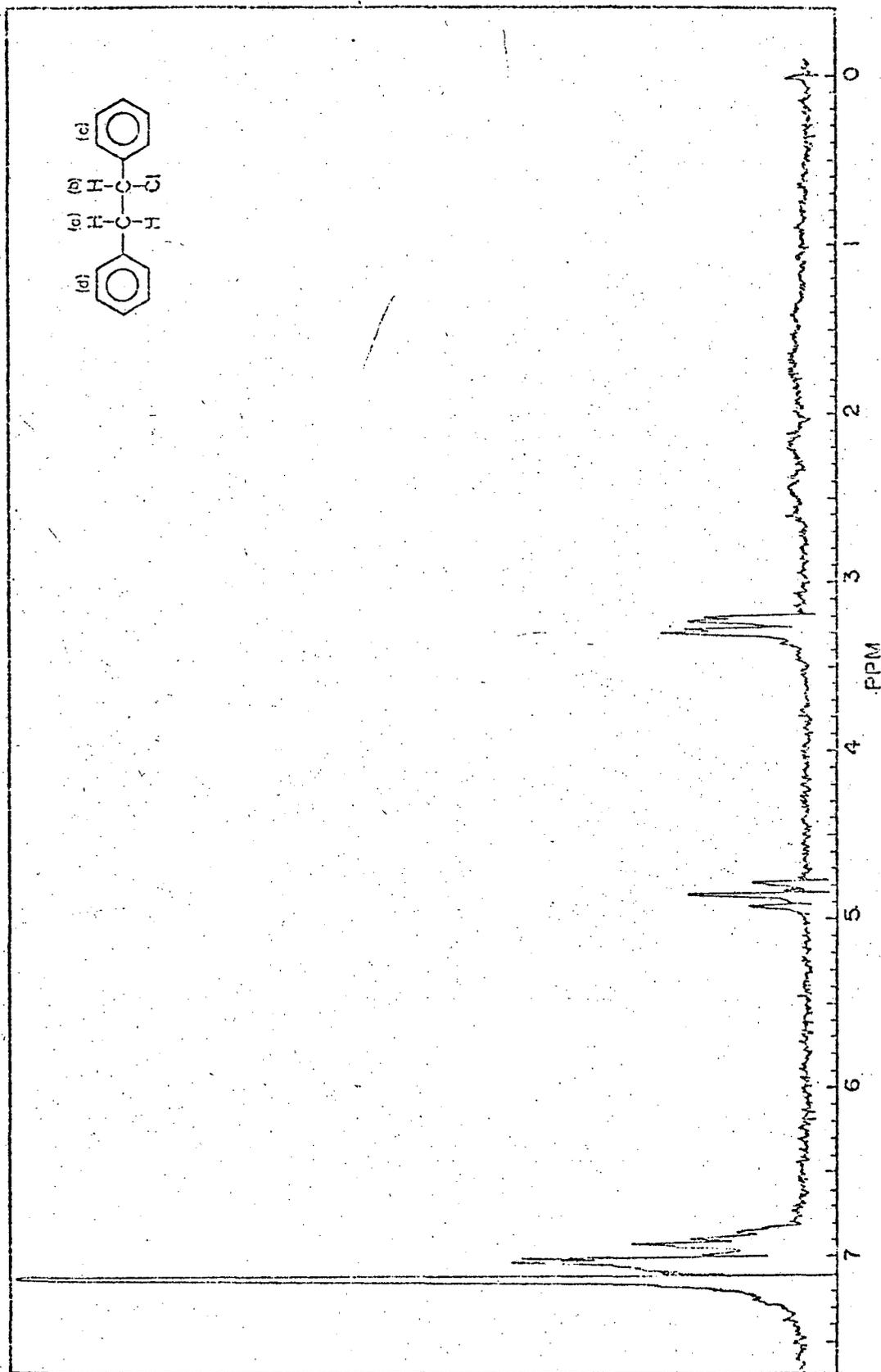
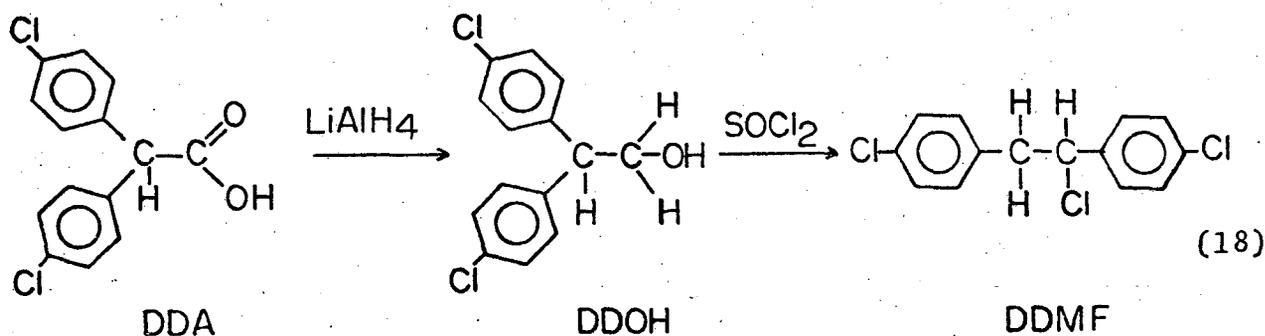


FIGURA 16 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto
1-cloro-1,2-difeniletano.

3.1.5. Obtenção do composto 1-cloro-1,2-bis(p-clorofenil)etano-DDMF

O composto DDMF foi obtido mediante redução do ácido-bis-(p-clorofenil)acético (DDA) com LiAlH_4 ^{42,51} para produzir o composto 1,1-bis(p-clorofenil)etanol (DDOH). A sua vez, o DDOH foi tratado com SOCl_2 para produzir o DDMF (Eq. 18).



3.1.5.1. Reação do DDA com LiAlH_4

O reagente DDA foi seco antes de usá-lo, num aparelho de Abderhalden, durante 5 horas. Para esta reação, utilizou-se como solvente o éter etílico seco, antes com sulfato de cálcio anidro e depois com finas raspas de sódio metálico, durante 24 horas. Após, foi destilado em aparelhagem seca. O éter foi recolhido em frasco de tampa esmerilhada e foi lacrada com parafina.

Exatamente 10,0 g de DDA foram colocados num balão de três bocas de 250 ml e dissolveram-se em 100 ml de éter etílico seco. Numa das bocas laterais foi adaptado um tubo em U contendo sulfato de cálcio anidro e as outras duas bocas foram fechadas com

tampas esmerilhadas. O LiAlH_4 foi adicionado em pequenas porções e a adição só foi interrompida quando a efervescência não se fez mais presente. De outro lado, a reação foi controlada por cromatografia de camada delgada por meio do desaparecimento do DDA de $R_f = 0,26$ para o aparecimento de uma outra de $R_f = 0,46$, referente ao DDOH, quando o solvente é uma mistura de éter do petróleo/aceto na 5:1. O excesso de LiAlH_4 foi decomposto mediante adição de acetato de etila. O material inorgânico formado, insolúvel no meio, foi filtrado a vácuo. Em seguida, o solvente foi evaporado até a secura. O peso do material bruto rendeu 9,0 gramas.

Três gramas deste material foi purificado por meio de cromatografia em coluna, obtendo-se 1,5 g de DDOH. A Espectroscopia no UV delineou uma região de absorção referente à banda B do benze no com os λ_{max} em 269; 277,5 e 262 nm e da banda K deslocada para 229 nm (Fig. 17).

3.1.5.2. Reação do DDOH com SOCl_2

Tipicamente, 6,0 g de DDOH e 20 ml de éter etílico seco foram colocados num balão de três bocas de 125 ml e dissolvidos. Na boca central foi adaptado um condensador de refluxo, enquanto que as outras duas foram mantidas fechadas com tampas de vidro esmerilhado. Sobre a mistura foram adicionados 1,7 ml de cloreto de tionila. O balão foi instalado sobre uma manta elétrica e a mistura refluxada durante três horas. Neste ínterim, a amostra foi testada em cromatografia de camada delgada e observou-se a presença de uma mancha escura que seria o composto interessado, porém, havia uma outra que caracterizava o DCS. O SOCl_2 estava provocando

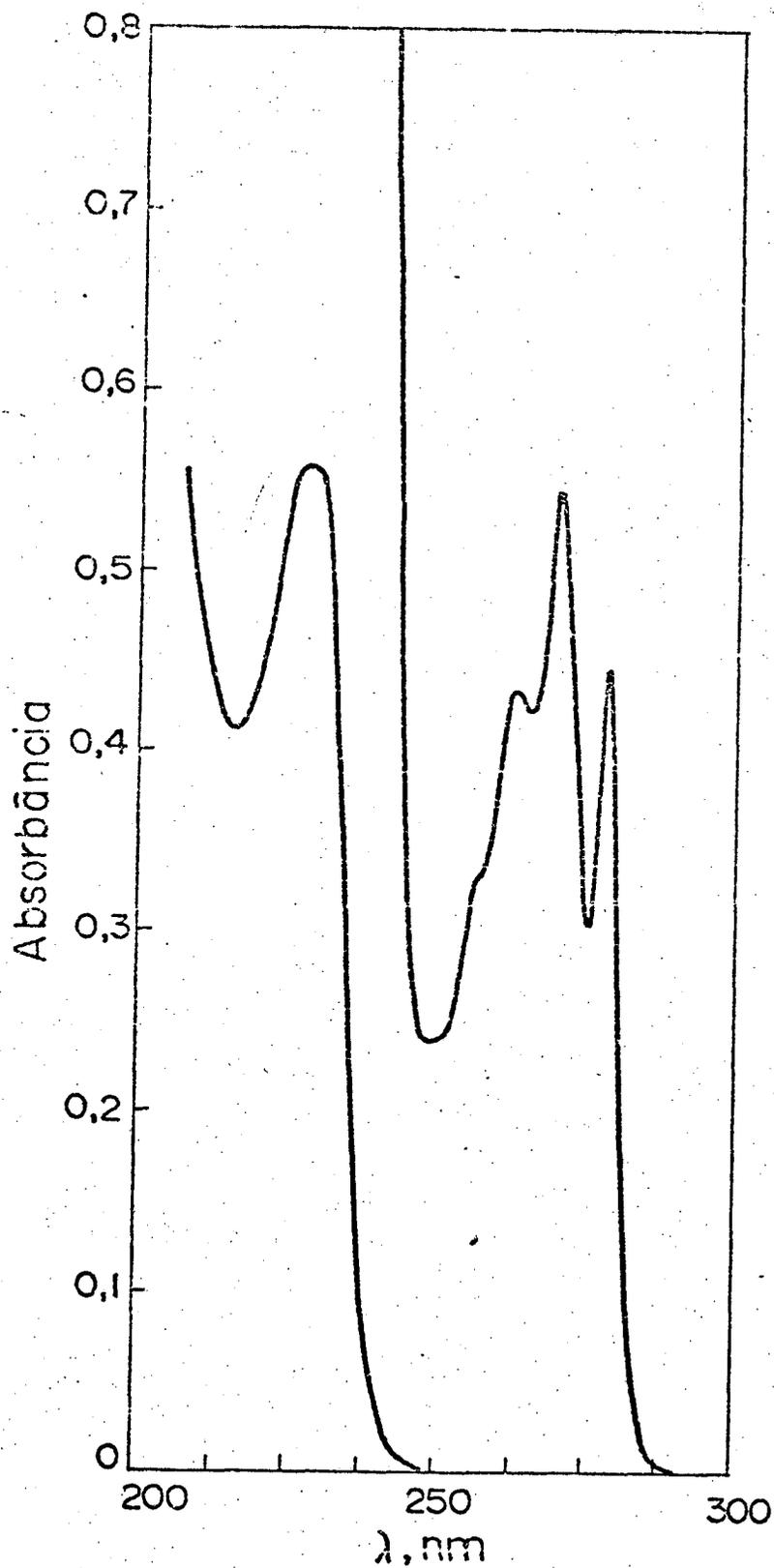
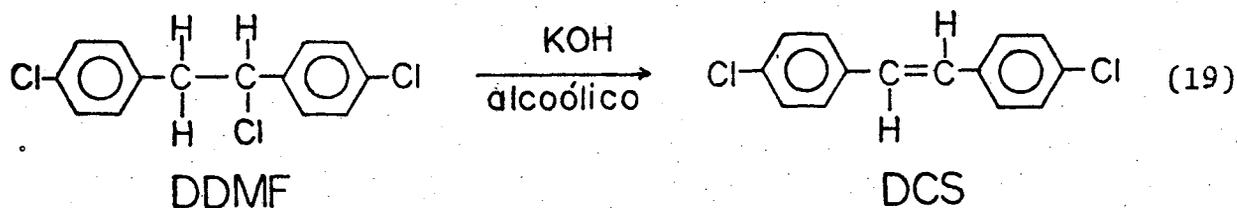


FIGURA 17 - Espectro de absorção no UV do DDOH em EtOH 95%.

eliminação de ácido com formação de dupla do DDMF. Interrompeu-se o refluxo e a mistura foi esfriada, acompanhada por solidificação. Adicionou-se, então, álcool etílico 95%, aqueceu-se novamente o suficiente para dissolver a massa sólida. Com o esfriamento da mistura apareceu grande quantidade de um precipitado cristalino, obscurecido por um material negro. O teste em CCD do precipitado identificou uma única mancha fluorescente correspondente ao DCS, enquanto que a impureza ficava na origem. Filtrou-se o precipitado a vácuo. O DCS foi purificado numa coluna de sílica gel utilizando o hexano como eluente. A impureza ficou retida na origem, enquanto que o DCS era recolhido. Evaporado o solvente, obteve-se 1,2 g de DCS.

Do filtrado da precipitação anterior contendo o produto interessado, evaporou-se o solvente num evaporizador rotatório, enquanto que o resíduo foi dissolvido em hexano e aplicado numa coluna de sílica gel para purificá-lo. Recolheu-se a fração interessada, evaporou-se o solvente e secou-se a amostra, que rendeu 1,3 g.

A espectroscopia UV acusou um espectro de um composto que indicava a presença do cromóforo do benzeno, com λ_{\max} em 276,5; 268 e 261 nm, além da banda de forte intensidade de absorção em 226 nm. Indicava também uma pequena impureza de DCS, na ordem de 0,1%. A reação com KOH alcoólico produziu DCS (Eq. 19). Este teste indicava eliminação de HCl e portanto confirmava o cloro ligado em carbono saturado. O RMN concretizou a idéia de que de fato o produ



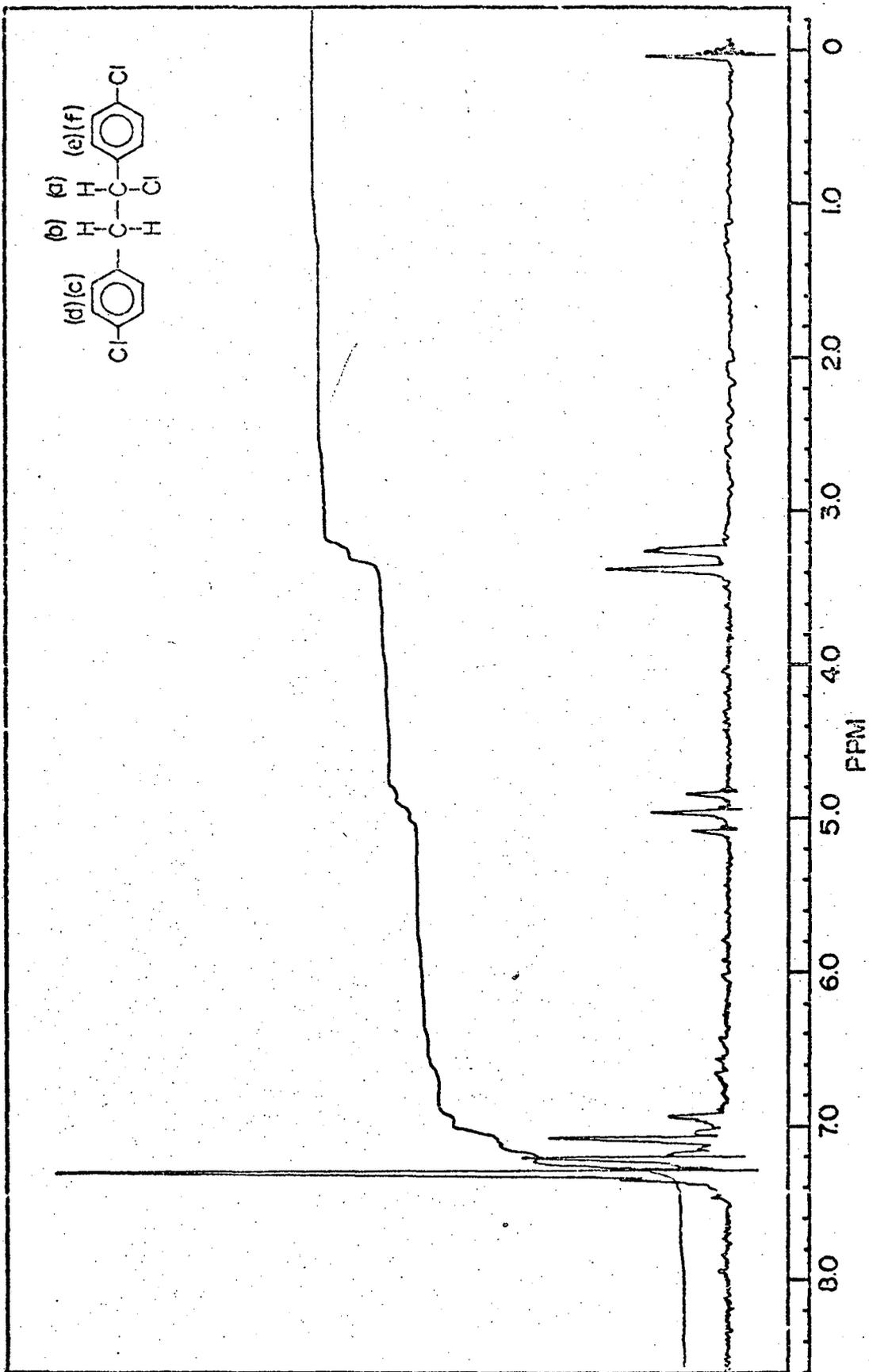
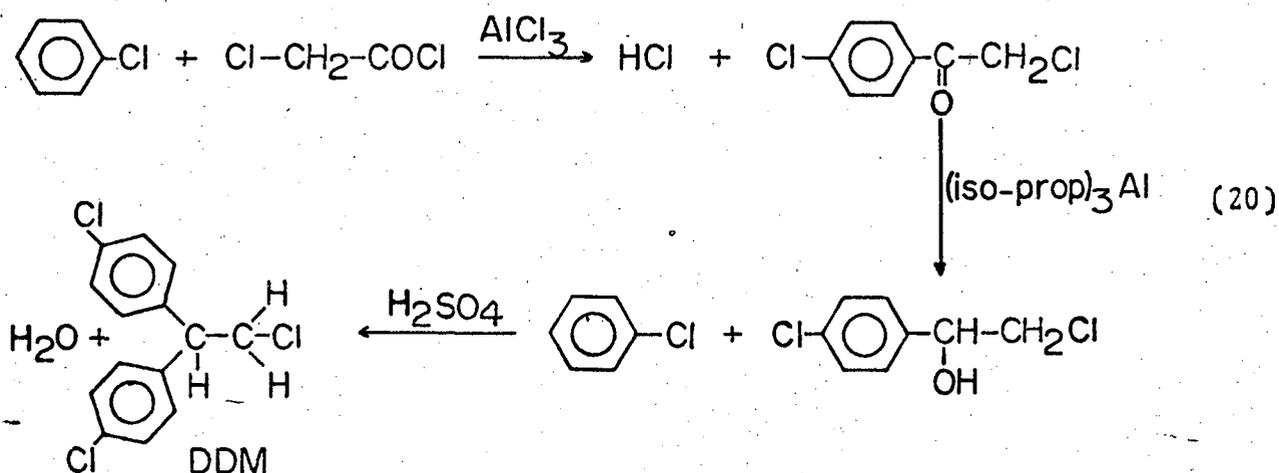


FIGURA 18 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DDMF.

to isolado era o DDMF (Fig. 18). O espectro mostra um dublete centrado em 3,27 ppm referente aos prótons (b) acoplados com o próton (a) com deslocamento químico 4,90 ppm. Além disso, em 7,00 e 7,26 ppm localiza-se um sistema de acoplamento A_2B_2 dos prótons (c) e (d). Os prótons (e) e (f) estão representados pelo multiplete em 7,3 ppm. A integração desse espectro RMN resultou em 1:2:8.

3.1.6. Obtenção do composto 1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)-etano- nil)-etano-DDM

O DDM foi obtido por meio de uma acilação de Friedel-Crafts, reagindo o clorobenzeno com cloreto de cloro acetila (CCA), produzindo o composto α ,4-dicloroacetofenona^{27,51}. Este produto foi reduzido com isopropóxido de alumínio, obtido da reação entre alumínio metálico com álcool isopropílico, resultando o correspondente álcool (redução de Meerwein-Ponndorf-Verley)⁴⁸. O álcool, 2-cloro-1-(p-clorofenil)etanol, reagiu com o clorobenzeno em presença do ácido sulfúrico concentrado para formar o DDM (Eq. 20).



3.1.6.1. Preparação do cloreto de cloroacetila - CCA

O cloreto de cloroacetila foi obtido a partir da reação do ácido cloroacético (Riedel p.a.) com cloreto de tionila⁵¹. Tipicamente, 60 g de ácido cloroacético foram adicionados num balão de três bocas de 250 ml. Numa das bocas laterais foi adaptado um condensador com um tubo em U com dessecante encaixado na saída superior e na outra um funil de separação com 134 g de SOCl_2 . A boca central foi fechada com uma tampa de vidro esmerilhado. O conjunto foi montado dentro de um recipiente contendo água, suportado por uma chapa elétrica. O aquecimento levado até 63°C fez com que o ácido cloroacético fundisse. Neste momento, iniciou-se a adição de SOCl_2 , pouco a pouco, durante uma hora. Durante este tempo, a temperatura da água era mantida entre 50 a 60°C . A reação processou-se até que cessou todo desprendimento de HCl , que durou, aproximadamente, 21 horas.

O produto foi purificado por destilação com o cuidado de ter todos os materiais de vidro internamente secos, pois o CCA reage rapidamente com a água. A destilação ocorreu sob pressão atmosférica e foi recolhida a fração compreendida entre 102 a 107°C . A reação rendeu 35 ml do produto (Lit. 105°C , Handbook of Chemistry and Physics).

3.1.6.2. Reação do CCA com o clorobenzeno

O clorobenzeno (Carlo Erba p.a.) sofreu um processo de secagem com sulfato de cálcio, durante 12 horas. Depois foi destilado e conservado no dessecador em frasco de tampa de vidro esmerilhado.

Tipicamente, 60 ml de clorobenzeno seco e 21,0g de AlCl_3 anidro (Carlo Erba p.a.) foram adicionados num balão de três bocas de 250 ml. As duas bocas laterais foram ocupadas por um condensador de refluxo com dessecante na saída superior e por um funil de separação com 20 ml de CCA, enquanto que a terceira boca era fechada com uma tampa de vidro esmerilhado. Inicialmente, o balão foi deixado dentro de um recipiente contendo água e gelo, que a sua vez estava sobre um agitador magnético. A adição de CCA foi feita aos poucos, durante uma hora, a frio, a fim de evitar reação violenta. Verificava-se desprendimento de HCl , mesmo a frio, mas, lentamente. A mistura foi deixada sob agitação contínua, durante 15 horas. Durante este tempo, a temperatura da água não foi controlada. Aqueceu-se, então, até 50°C , durante duas horas, para certificar-se do término da reação.

Esfriada a mistura, foi jogada sobre gelo picado com a finalidade de decompor o excesso de CCA. Uma fração orgânica avermelhada separou-se da água que foi extraída com duas porções de 100 ml de benzeno. Evaporado o solvente, dissolveu-se o conteúdo em éter etílico e reprecipitou-se duas vezes. O material bruto rendeu 12 g.

Uma amostra foi testada na espectroscopia UV e verificou-se um espectro (Fig. 19) que evidenciava as seguintes características: a) a transição $n \rightarrow \pi^*$ em 330 nm indicando a presença do grupo carbonila; b) uma intensa banda absorção com λ_{max} em 255,5 nm representando a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do cromóforo benzeno em conjugação com a carbonila da banda K deslocada; c) a transição mais fraca, da banda B, encontra-se submersa.

Segundo as referências 53, 54 e 55, têm-se os compostos acetofenona de λ_{max} 243 nm ($\log \epsilon = 4,12$), α -cloroacetofenona de

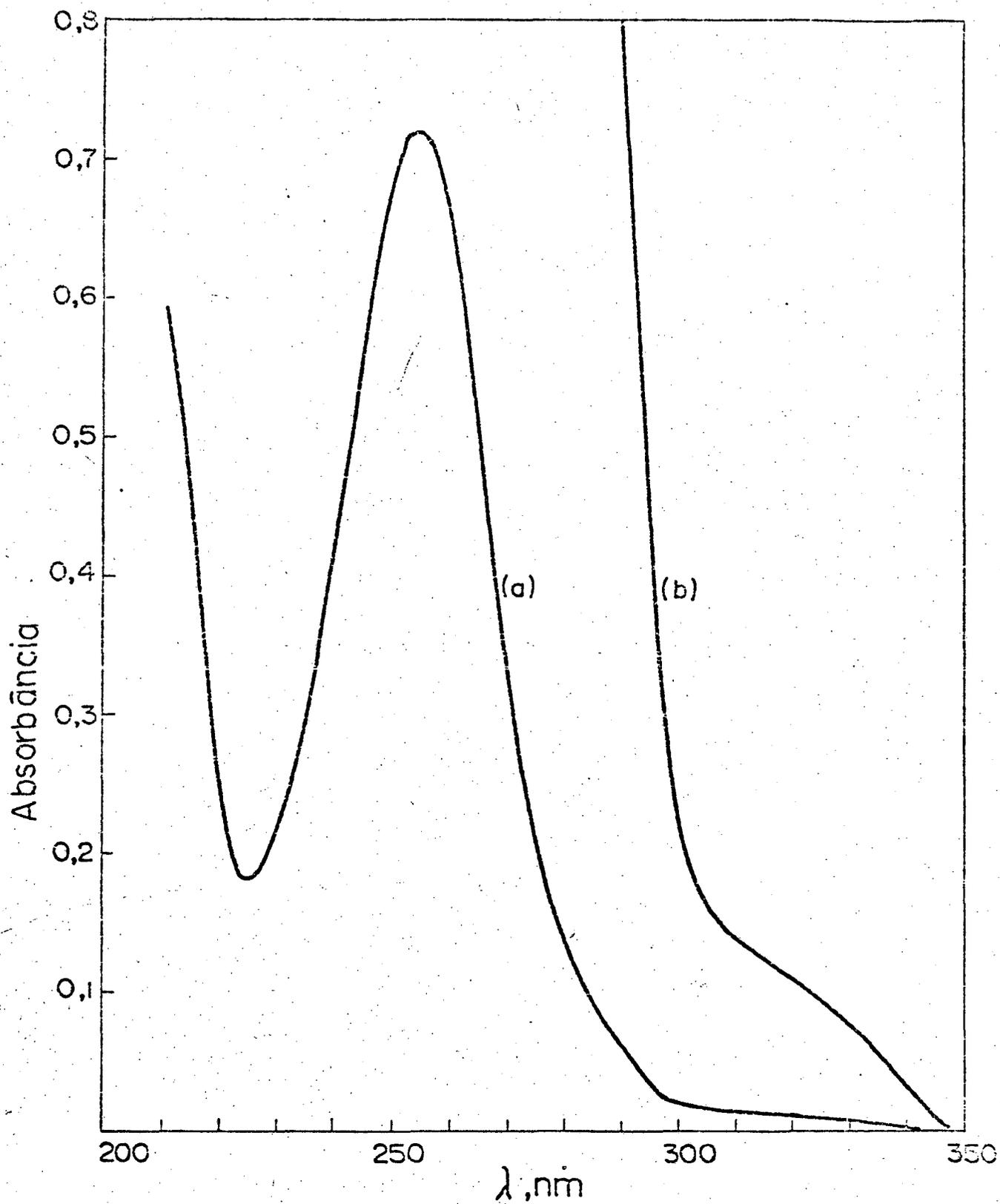


FIGURA 19 - Espectro de absorção no UV do composto (a) $\alpha,4$ -di-cloroacetofenona em EtOH 95% aquoso a 25°C aproximadamente $3,6 \times 10^{-5} M$ e (b) $3,2 \times 10^{-4} M$.

λ_{\max} 246 nm ($\log \epsilon = 3,92$) e 4-cloroacetofenona de λ_{\max} 249 nm ($\log \epsilon = 4,23$). Segundo estes dados, observa-se que há um deslocamento batocrômico em função dos átomos de cloro ligados ao cromóforo, ou próximos do cromóforo. Um átomo de cloro em posição α desloca o λ_{\max} , em relação à acetofenona, 6 nm, enquanto que, o cloro em posição "para" desloca 9 nm. No caso aqui analisado, esperava-se um efeito batocrômico superior aos demais compostos apresentados, pois, têm-se dois cloros, um em posição α e o outro em "para". E, de fato, o resultado obtido foi um $\lambda_{\max} = 255,5$ nm.

3.1.6.3. Reação do $\alpha,4$ -dicloroacetofenona com o isopropóxido de alumínio

O isopropóxido de alumínio é um composto redutor usado, principalmente, em reduções de cetonas. Para a mesma finalidade, pode-se empregar o NaBH_4 , com maiores conveniências. Todavia, a redução que vai ser aqui apresentada foi feita com ambos os redutores. Com o NaBH_4 utilizou-se apenas 1 g da cetona aromática e serviu como um teste, já que a literatura que se tinha em mãos ²⁷, servia-se do isopropóxido de alumínio.

O isopropóxido de alumínio ⁴² foi obtido, particularmente, colocando num balão de três bocas de 250 ml, 2 g de lâminas de alumínio cortadas e 60 ml de álcool isopropílico (seco com sulfato de cálcio durante 12 horas e destilado, p.e. 83 °C), juntamente com 100 mg de cloreto de mercúrio. Numa das bocas foi colocado um condensador de refluxo com a saída superior protegida por um dessecante, enquanto que as outras duas bocas eram mantidas fechadas com tampas de vidro esmerilhado. Um aquecimento moderado foi feito

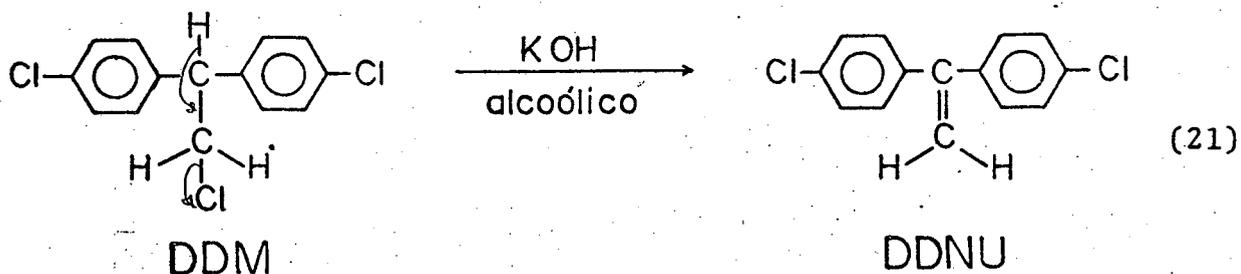
com uma manta elétrica controlado por um termostato. Iniciado o refluxo, 0,5 ml de CCl_4 foram adicionados à mistura, como agente catalisante. O refluxo permaneceu até que todo o alumínio decomps-se (aproximadamente 10 horas). Neste ínterim, 11 g de $\alpha,4$ -dicloroacetofenona, previamente secos, foram adicionados ao balão, enquanto que o condensador era adaptado para destilar a acetona formada. A reação foi acompanhada por via CCD, durante 3 horas, tempo necessário para o término da reação. O excesso de álcool isopropílico foi destilado com um vácuo feito por uma bomba. Em seguida, foram adicionados 120 ml de solução de HCl (20 ml de HCl concentrado em 120 ml de água) sobre a mistura, com agitação. O produto foi extraído com três porções de 100 ml de benzeno. A solução apresentava-se com uma cor avermelhada intensa. Evaporou-se o solvente e o material sólido foi dissolvido no eluente e colocado numa coluna de sílica gel com a finalidade de reter o produto colorido. O eluente era composto de uma mistura de ciclohexano/éter etílico 10:1. Apenas uma impureza escura permaneceu na origem da coluna, enquanto que os demais produtos passaram com o 2-cloro-1-(p-clorofenil) etanol.

3.1.6.4. Reação do 2-cloro-1-(p-clorofenil)etanol com clorobenzeno

Tipicamente, 7,0 g de 2-cloro-1-(p-clorofenil)etanol não purificados, foram colocados num balão de três bocas de 250 ml e dissolvidos com 3,5 ml de clorobenzeno. Ao balão eram adaptados um agitador mecânico e um funil de decantação com 16 ml de H_2SO_4 concentrado (Merck p.a., 95-97%). O balão ficou contido dentro de um

recipiente com água e gelo. O ácido foi adicionado, gotejante, durante 45 minutos, enquanto que o agitador permanecia em movimento, pois após um quarto de ácido adicionado a mistura reacionária tornou-se bastante viscosa. Depois de três horas de agitação, a reação foi interrompida vertendo a mistura sobre gelo. Extraíu-se a fração orgânica com duas porções de éter etílico. O produto bruto foi passado numa coluna de sílica gel para purificar. A fração interessada foi recolhida e o solvente evaporado. Seca a amostra com uma bomba de fazer vácuo, deixou-se no congelador de uma geladeira durante uma semana para cristalizar-se. Recolheram-se 2,5 g do produto.

A identificação do produto foi feita por espectroscopia UV que apresentou um espectro muito parecido com o DDD e o DDO, com λ_{max} em 269, 277 e 262 nm referentes à banda B do anel benzênico e em 226,5 nm referente à banda K (Fig. 20). Reagindo o produto com KOH alcoólico 3N, houve desaparecimento da banda B, cujos valores de absorvidade são pequenos, para aparecer uma outra banda, bastante intensa, em 242 nm, do composto DDNU (Eq. 21, Fig. 20).



Esta reação comprova, de fato, a presença do DDM, porque este composto sofre desidrocloração²⁷, liberando HCl e formando dupla ligação. A cromatografia de camada delgada acusou, nitidamente, o desaparecimento da mancha de $R_f = 0,31$ do DDM, para aparecer uma única outra mancha de $R_f = 0,74$ (Tab. 2).

O DDNU produzido através da desidrocloração foi introduzido numa coluna de sílica gel e purificado. A espectroscopia IV

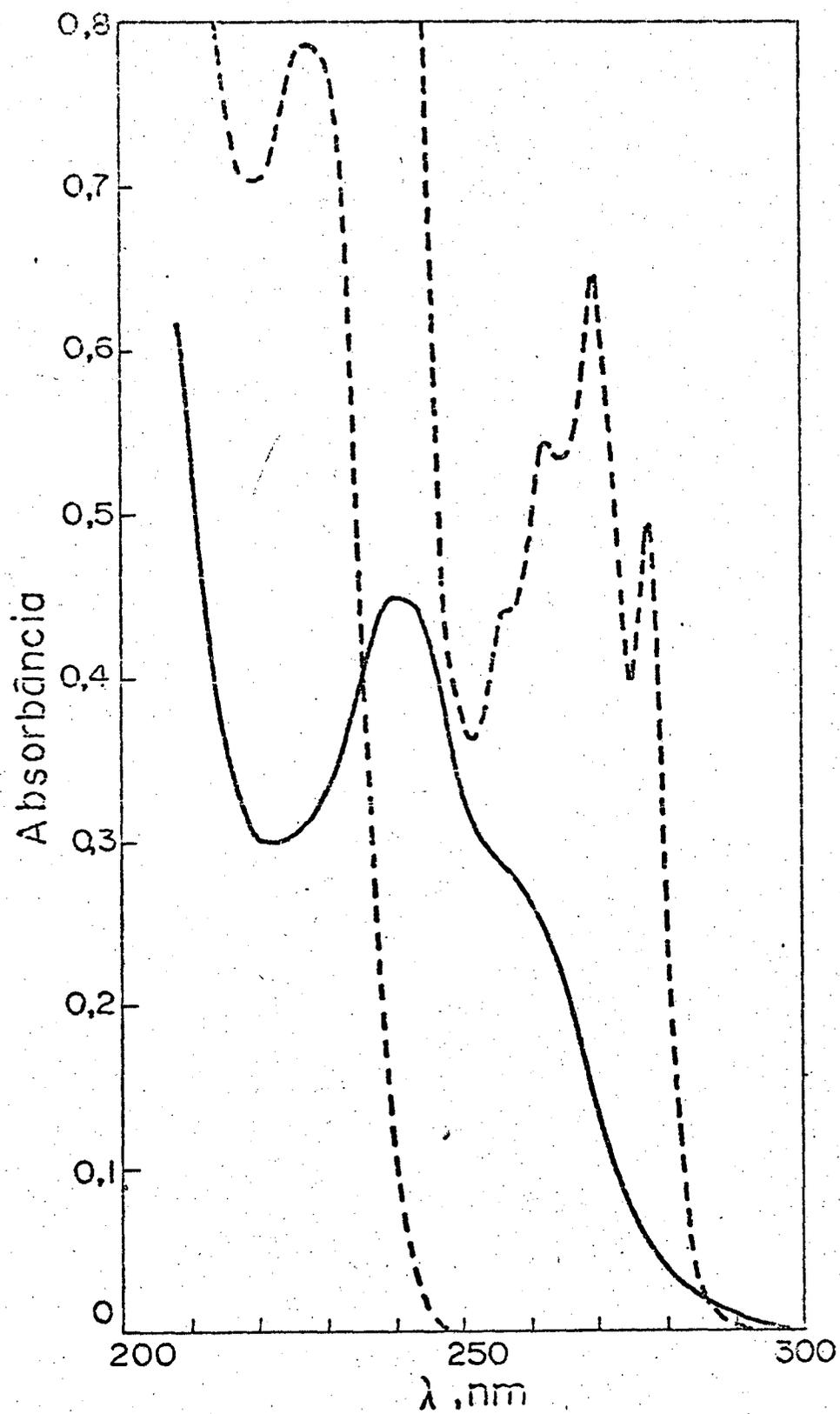


FIGURA 20 - Espectros de absorção no UV em EtOH a 25 °C dos compostos DDM (---), $1,0 \times 10^{-3} M$ e DDNU (—), $3,2 \times 10^{-5} M$.

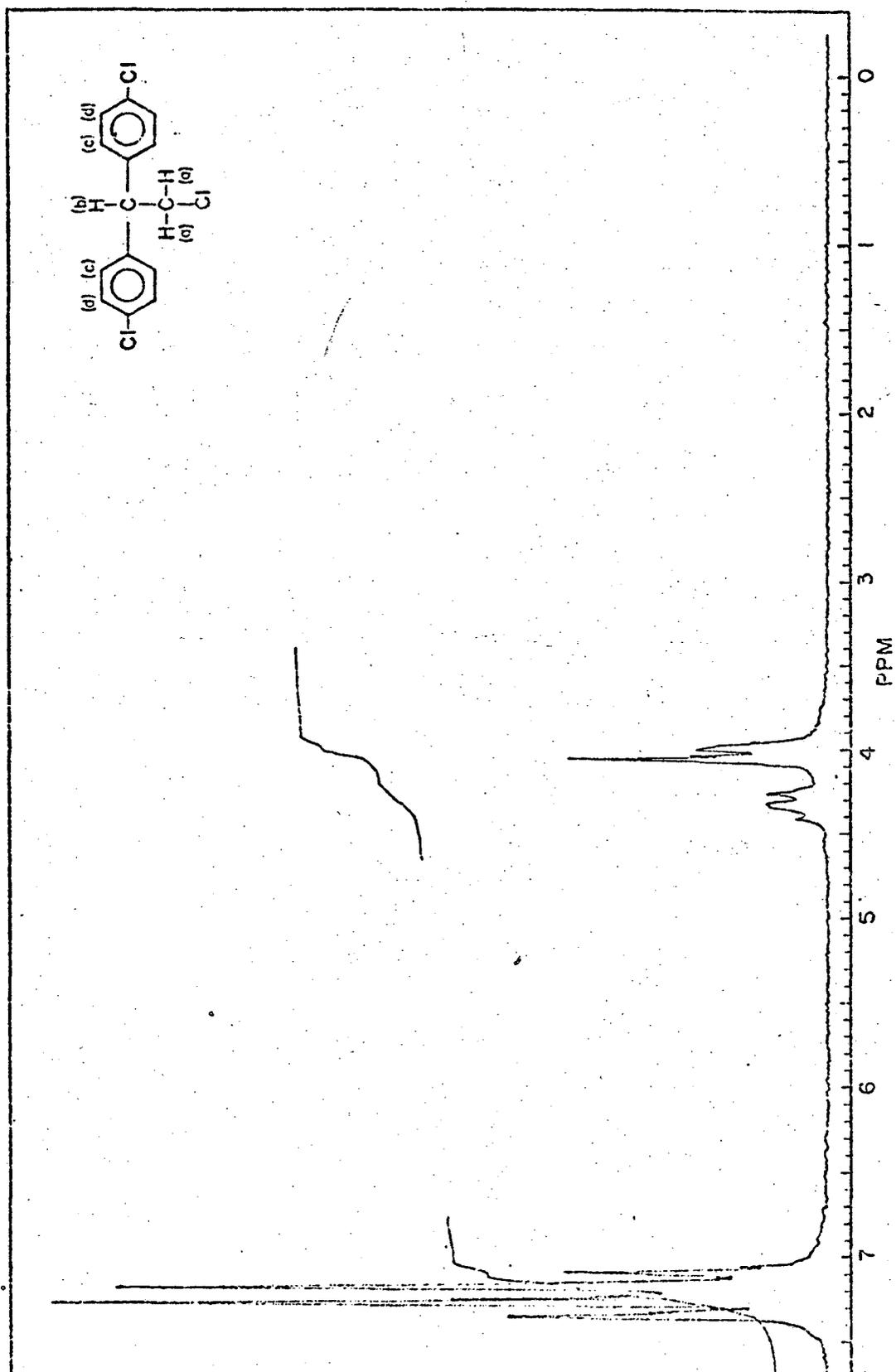
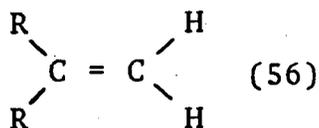


FIGURA 21 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DDM.

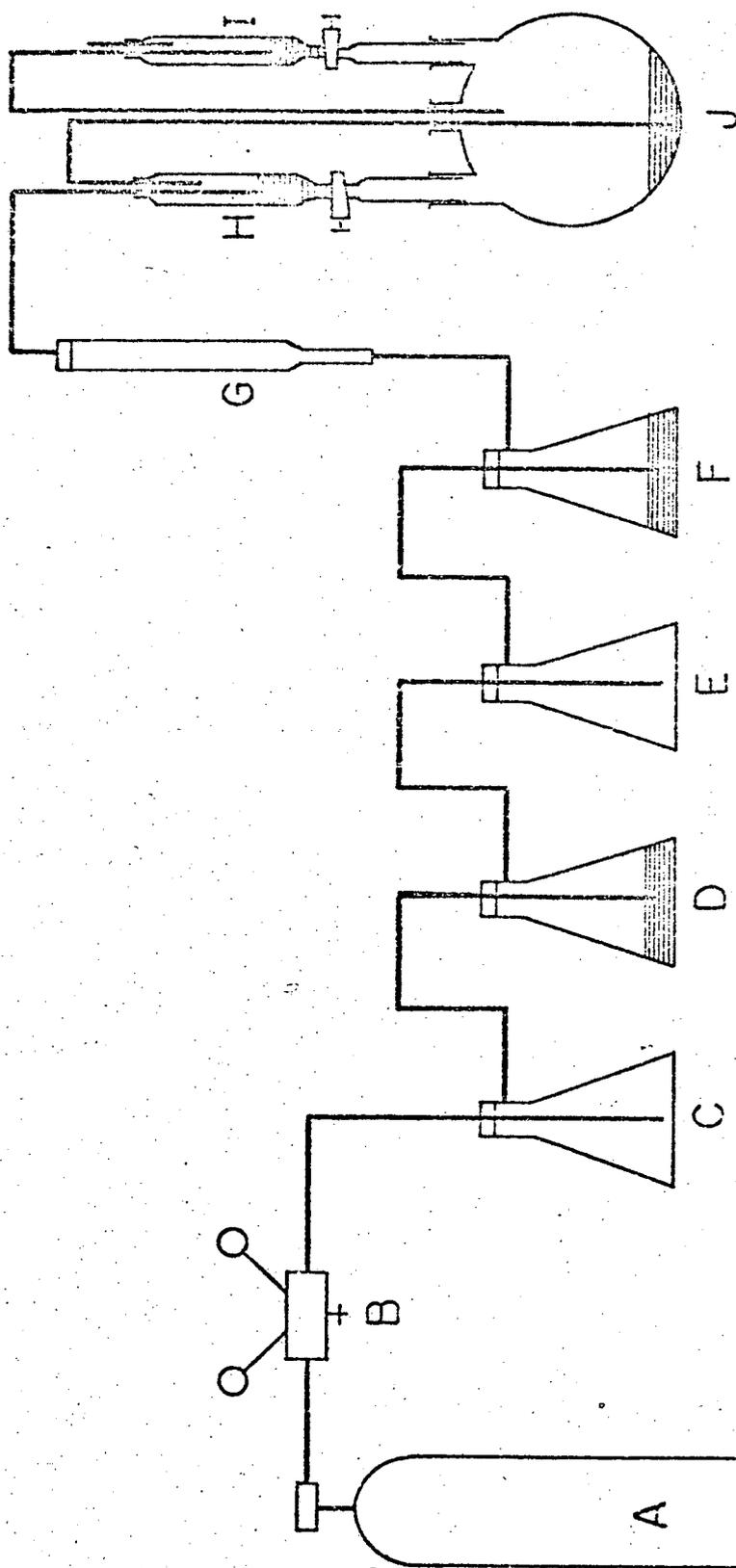
identificou-o devido, principalmente, à intensa banda localizada em 900 cm^{-1} que é característica da deformação angular fora do plano dos hidrogênios das olefinas do tipo



O RMN assegurou a autenticidade do produto DDM (Fig. 21). Em 3,95 e 4,25 ppm estão descritos um dublete e um triplete, respectivamente, acoplados, enquanto que em 7,12 e 7,26 dois multipletes do sistema de acoplamento A_2B_2 dos anéis benzênicos são observados. A integração forneceu a relação 1:2:8³⁹.

3.2. Reações com a Vitamina B₁₂

Todas as reações que utilizaram a vitamina B₁₂ foram feitas de acordo com o Esquema 6. Em A está representado um cilindro de nitrogênio do tipo super seco (SS) que tinha, como finalidade, purgar a câmara de reação, bem como todas as soluções que seriam usadas na reação. Controlava-se a vazão do gás por meio do manômetro B. O nitrogênio era purificado passando-o pelos frascos C, D, E e F. Em C tinha algodão para reter possíveis partículas sólidas transportadas pelo gás. Em seguida, o nitrogênio borbulhava numa solução de pirogalol com a finalidade de eliminar o oxigênio, o qual, mesmo em pequenas quantidades, oxida as espécies Co(I) e Co(II) para Co(III). A solução era preparada dissolvendo-se 50 g de KOH em 100 ml de água e depois acrescentava-se 5 g de pirogalol⁵⁷. A solução era renovada, repetidamente. O frasco F continha ácido sul



- A - NITRÔGÊNIO
 B - MANÔMETRO
 C - FRASCO COM ALGODÃO
 D - FRASCO COM PIROGALOL
 E - FRASCO DE SEGURANÇA
 F - FRASCO COM H_2SO_4
 G - COLUNA DE SÍLICA GEL
 H - FUNIL COM DDD
 I - FUNIL COM NaBH_4
 J - CÂMARA DE REAÇÃO

ESQUEMA 6

fúrico concentrado e, na coluna G, sílica gel dessecante, indicadora de umidade, ambos para reter a água. O frasco E estava vazio e tinha a finalidade de prevenir o retrocesso do ácido concentrado sobre a solução de pirogalo1. Na câmara de reação J, constituída de um balão de três bocas, era colocada, inicialmente, a vitamina B₁₂, a qual era dissolvida em água. Em H e I, que correspondiam a funis de decantação, eram colocadas, respectivamente, as soluções do inseticida em meio metanólico e do borohidreto de sódio em meio aquoso. Todas as conexões entre os frascos eram de mangueira de látex flexível. As tampas dos frascos eram de rolha perfurada com entrada de tubo de vidro. A purgação de todas as soluções era feita numa seqüência do funil H para o balão J e finalmente para o funil I.

Não houve um rígido controle de temperatura. As reações foram sempre feitas na temperatura ambiente, de 20 a 25 °C. A particularidade importante foi que a câmara de reação foi sempre protegida da luz, pois os produtos vitaminados fotolizam-se facilmente, de sorte que, iniciada a reação, cobria-se com papel alumínio ao mesmo tempo que o ambiente (laboratório) era escurecido. Estes cuidados foram sempre tidos durante todas as operações com os produtos vitaminados.

3.3. Reação da Vitamina B_{12s} com DDD

Uma experiência típica foi efetuada da seguinte forma: exatamente, 400 mg de hidroxicoalamina foram dissolvidos em 20 ml de água destilada num balão de três bocas de 500 ml. A solução preparada foi purgada com nitrogênio purificado, durante 2 horas, com

a finalidade de eliminar o oxigênio presente em solução. Simultaneamente, as soluções de DDD (1,67 g dissolvidos em 250 ml de metanol) e de NaBH_4 (3,33 g dissolvidos em 3 ml de água) foram nitrogenadas com a mesma finalidade durante 2 horas. Após este tempo, a solução aquosa de NaBH_4 foi adicionada à solução de vitamina e a mistura seguiu reagindo por 2 minutos. Processada a redução da vitamina, a qual se caracteriza pelo aparecimento de uma cor verde, adicionou-se a solução de DDD. Imediatamente notou-se a troca de cor da solução para vermelha com o aparecimento de um precipitado branco. Deixou-se a mistura em ambiente desoxigenado durante 1 hora.

O precipitado branco foi filtrado a vácuo. Em seguida, o metanol foi evaporizado num evaporizador rotatório, tomando o cuidado para que a temperatura do banho não ultrapassasse os 35 °C. Restando somente a água, interrompeu-se o processo e o precipitado branco (insolúvel em água) foi filtrado e lavado com água, até que todo o produto vitaminado dissolveu-se completamente. Os precipitados brancos das duas etapas foram reunidos e secos na estufa a 50 °C durante 12 horas. O peso do precipitado branco rendeu 1360 mg.

A fração aquosa contendo os produtos solúveis foi transportada para um funil de decantação de 500 ml e lavada com 70 ml de solução fenólica 90%. Os produtos vitaminados ficaram retidos na fase fenólica, enquanto que, em solução aquosa, restaram as espécies iônicas, como o cloreto e o borato. A solução fenólica foi lavada mais duas vezes com 30 ml de água de cada vez para extrair todo o cloreto. O fenol foi extraído da solução por meio de uma mistura acetona/éter (40 ml de acetona/160 ml de éter etílico) sendo gastas quatro porções de 40 ml da mistura, de sorte que o produto vitaminado ficou na fase aquosa. A água foi evaporada por

meio do evaporizador rotatório, numa temperatura não maior do que 35 °C. Em seguida, adicionaram-se 5 ml de metanol para dissolver o conteúdo e foi levado para uma coluna de dimensões de 35x400 mm de sílica gel 60 da Merck, cujo eluente foi o metanol. A coluna separou duas manchas: a primeira é o produto vitaminado interessado, enquanto que a segunda é a vitamina B_{12a} que não reagiu. A solução alcoólica contendo o produto vitaminado foi levada ao evaporizador rotatório e o álcool foi destilado até quase à escura. Retirou-se o conteúdo alcoólico concentrado com uma pipeta e transportou-se para um copo de bēquer e precipitou-se com a adição de éter etílico. A precipitação completou-se deixando na geladeira durante 24 horas. Seco o material rendeu 340 mg. A discussão da identificação dos produtos será feita no próximo capítulo.

3.4. Teste Cinético Qualitativo em CCD

A cinética da reação da vitamina B_{12s} com DDD não pode ser seguida espectrofotometricamente devido à formação de borbulhas de gás hidrogênio. Portanto, foi feita uma cinética qualitativa por cromatografia de camada delgada e o procedimento foi o seguinte: as amostras (2 ml de solução) foram recolhidas em tempos diferentes e adicionadas sobre 5 ml de HNO₃ 0,2 N. O ácido teria a finalidade de decompor o excesso de NaBH₄. Os produtos orgânicos foram extraídos por meio de adição de 2 ml de clorofórmio. As frações clorofórmicas (1,5 ml) foram retiradas e evaporadas até a secura e, após, foram adicionados 0,5 ml de clorofórmio sobre o material seco. As amostras foram aplicadas, em quantidades iguais, sobre uma placa cromatográfica.

C A P Í T U L O I I I

RESULTADOS E DISCUSSÃO1. IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS

Os testes e estudos da caracterização dos produtos da reação da B_{12S} com o DDD sucederam-se. Em primeiro lugar, com a adição de ácido, a solução contendo o produto vitaminado mudava de cor, de vermelha para amarela. A troca de cor é característica da formação de um composto do tipo B_{12-R} contendo uma ligação cobalto-carbono e reflete o equilíbrio "base on" para "base off" devido à protonação do ligante 2,6-dimetil-benzimidazol ocupando a quinta posição de coordenação.

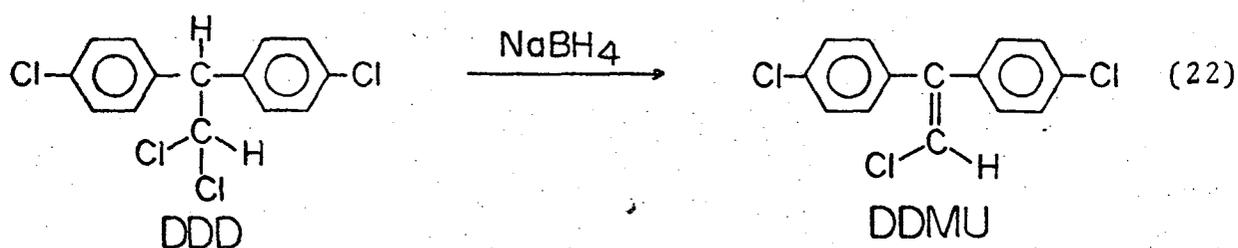
A solução contendo cloretos foi testada com nitrato de prata e houve formação de precipitado branco de cloreto de prata. Usou-se o método de Mohr⁵⁹ e o método gravimétrico com a finalidade de determinar os cloretos totais. Para tanto, a solução foi diluída para um volume conhecido e foram retiradas alíquotas para titular. Nas várias reações feitas, observou-se que a quantidade teórica para a saída de um cloro, correspondia mais ou menos à quantidade obtida. Isto sugeriu, preliminarmente, que fosse eliminado totalmente um cloro. Para que isto ocorresse, seria necessário que todas as reações descritas na Tabela 3 fossem totais, isto é, todo o DDD tivesse reagido.

No entanto, tomando o produto branco bruto da reação, fez-se teste com CCD e o resultado obtido foram três manchas bastante distintas. A mancha inferior de $R_f = 0,29$ correspondia ao

TABELA 3 - Cálculos da quantidade de cloreto liberado em reações da B_{12s} com DDD.

REAÇÃO	PESO DDD (mg)	PESO Cl ⁻ TEÓRICO(mg)	PESO Cl ⁻ ENCONTRADO(mg)
1	100	11,1	12,6
2	100	11,1	12,4
3	1333	148,0	151,0

DDD, comprovado pela adição simultânea de um padrão, que correspondia a uma quantidade que não havia reagido. Neste ínterim, a idéia sugerida através da determinação de 100% de um cloro do DDD já não era mais aceita, porque, desta forma, não seria possível restar DDD sem reagir. A mancha mais acima apresentava uma fluorescência azul intensa, tanto na lâmpada de comprimento de onda curto como no longo. O composto fluorescente ($R_f = 0,47$) no momento representava o principal produto derivado do DDD. A mancha mais alta de $R_f = 0,65$ foi identificada quando se fez uma reação bastante simples, colocando NaBH_4 numa solução metanólica de DDD. O resultado imediato foi o aparecimento de um produto observado quando a mistura era aplicada numa placa cromatográfica. Esta mancha tinha semelhante R_f ao composto que aparecia na reação. Pensou-se que o meio levemente básico ocasionado pelo borohidreto de sódio pudesse processar uma reação de desidrocloração (Eq. 22). Foi feita, então,



uma reação onde dissolveram-se 200 mg de DDD em 50 ml de metanol e acrescentaram-se 400 mg de borohidreto de sódio. Como a reação não foi total, o suposto DDMU foi purificado por via CCD, testado pelo método espectroscopia UV e o resultado foi a obtenção de um espectro completamente diferente do DDD (Fig. 22). Houve o desaparecimento da estrutura fina característica do cromóforo benzênico para aparecer um espectro do benzeno em conjugação, representado pelo λ_{max} 242 nm e do 257 nm, de absorvidade molar bastante grande.

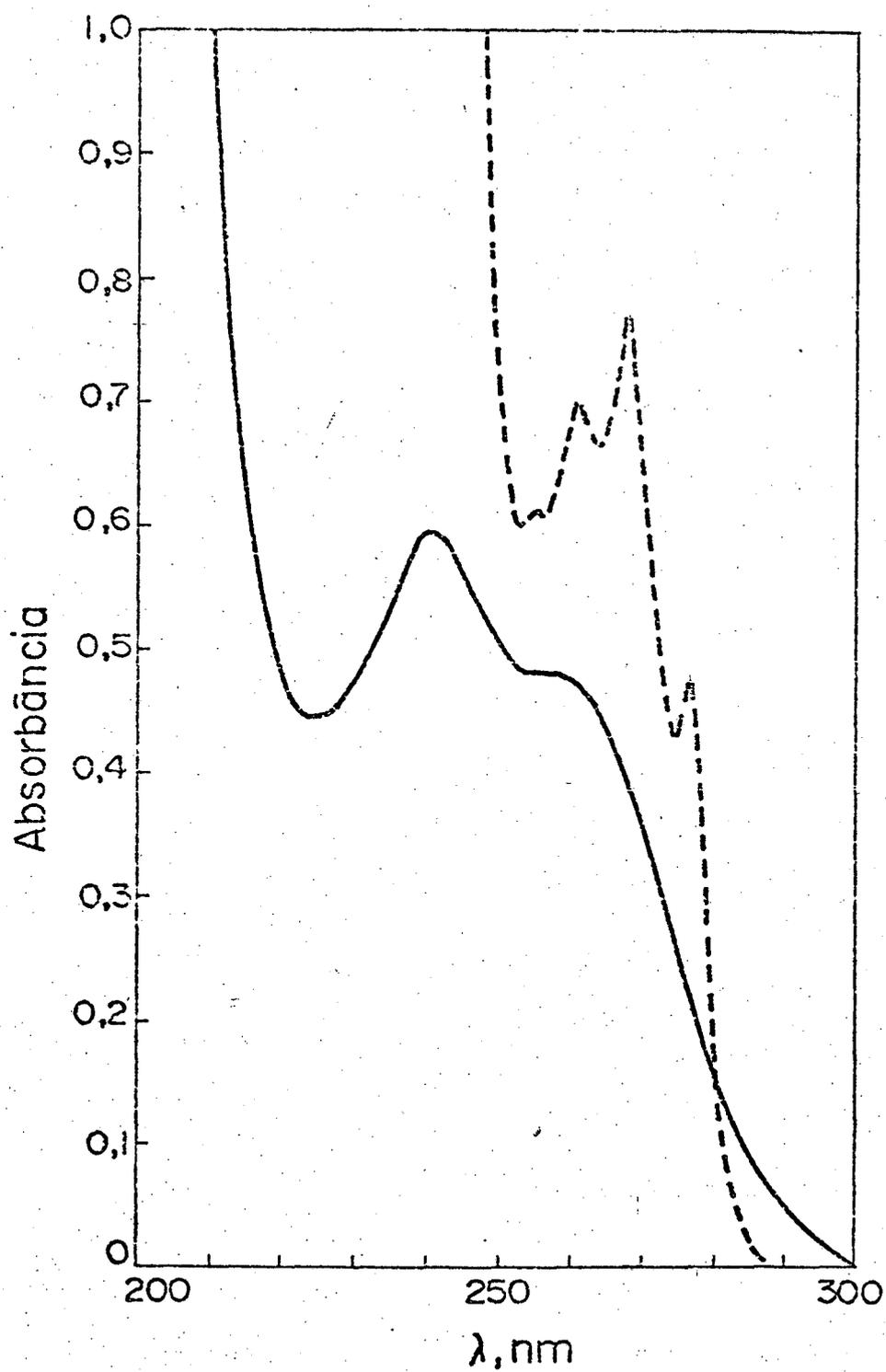


FIGURA 22 - Espectros de absorção no UV em MetOH a 25 °C dos compostos DDD (---) $1,2 \times 10^{-3} M$ e DDMU (—) $3,8 \times 10^{-5} M$.

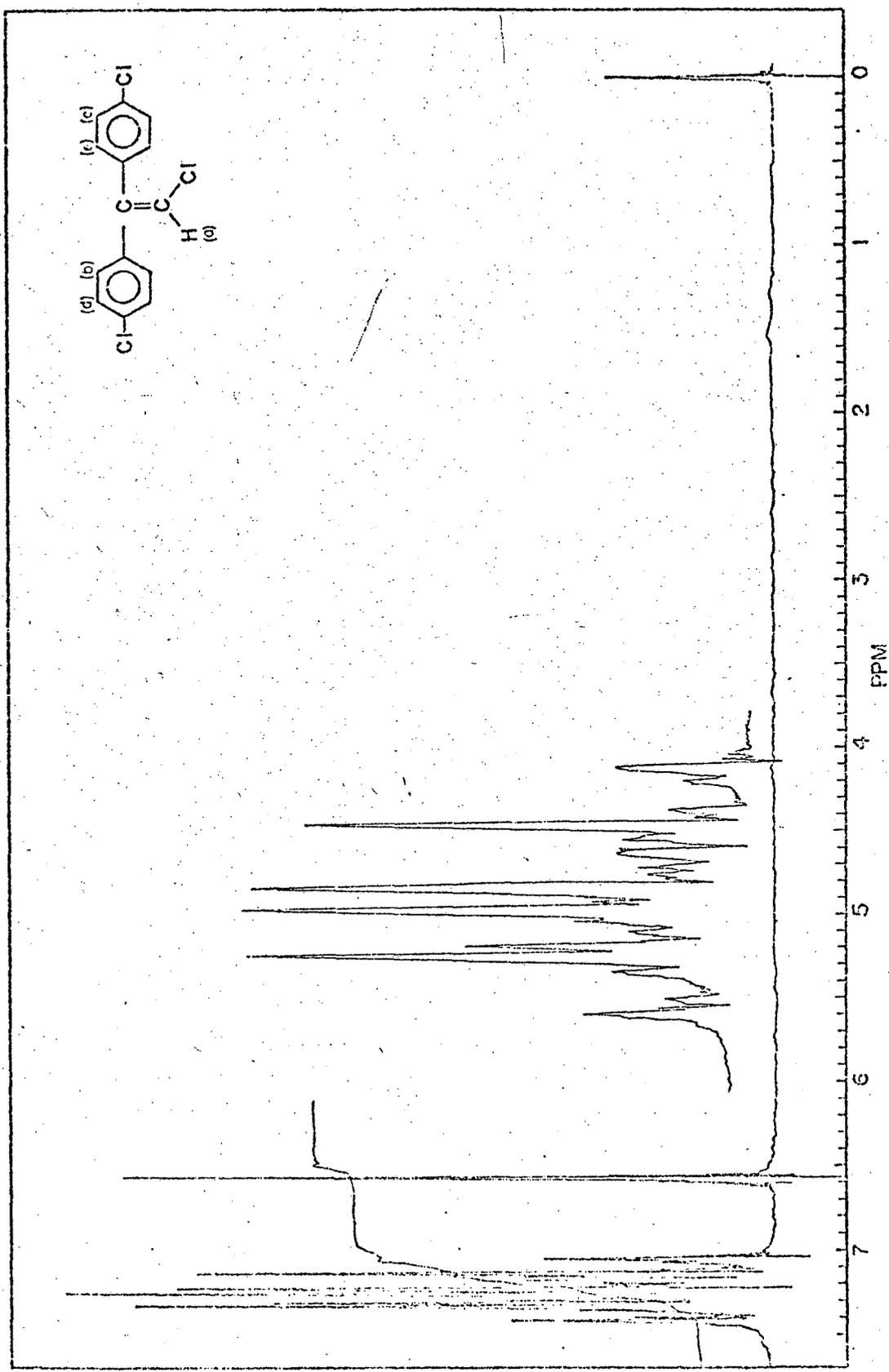


FIGURA 23 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DDMU.

De outro lado, uma amostra de DDMU obtida por desidrocloração do DDD por via KOH alcoólico, também foi testada em espectroscopia UV e o resultado foi a produção de um espectro idêntico.

A espectroscopia no infravermelho acusou um espectro com as bandas 3030; 1655; 1600; 1580; 1480; 1390; 1080; 1010; 855 e 800, referente ao DDMU.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é definitiva em relação à caracterização do DDMU, já que aparece um espectro bastante claro (Fig. 23): um singlete em 6,60 ppm representa a ressonância do próton (a), enquanto que os prótons benzênicos exibem os multipletes em 7,09; 7,22; 7,27 e 7,37 para os prótons (b), (c), (d) e (e) respectivamente. O espectro do DDMU tem dois sistemas de acoplamento AA'BB' de multipletes devido à estereoquímica não simétrica em relação à dupla ligação substituída por um átomo de cloro. O multiplete de menor blindagem (AA') é dado pelos prótons em posição orto do anel próximo do cloro³⁹. A integração forneceu uma relação de 1:8.

A fim de eliminar a possibilidade de que o DDMU fosse um intermediário da reação, fez-se então, uma reação da vitamina B_{12s} com o DDMU nas mesmas condições, em ambiente desoxigenado. Os testes em cromatografia mostraram que, após 20 minutos de reação, a mancha do DDMU permaneceu inalterada, enquanto que, nenhuma outra apareceu na placa; e ainda, não houve formação de produto fluorescente. Todavia, isto era esperado, porque o cloro vinílico é muito pouco reativo, bem menos do que o alifático.

A evidência experimental indica que o DDMU é produzido durante a reação do DDD com B_{12s} através de uma reação secundária em decorrência do meio alcalino.

Um espectro de RMN obtido usando a mistura do produto

orgânico branco, sem purificação prévia, mostrou um resultado caracterizando a presença do DDD, devido ao aparecimento de dois doubletes acoplados em 4,46 ppm e 6,18 ppm, além das bandas de absorção do composto fluorescente.

O produto fluorescente da reação, aparentemente sendo o trans-4,4'-dicloroestilbeno, foi purificado por meio de recristalização em etanol 95%. Concentrou-se a mistura a quente, refluxando, e após esfriou-se. O resultado foi o aparecimento de cristais brancos, laminares, ponto de fusão 174-175 °C (lit. 176 °C) enquanto que os demais produtos permaneceram em solução. O teste na espectroscopia UV acusou duas regiões de altas intensidades de absorção com λ_{\max} 315,5 e 302 nm (lit. λ_{\max} 315 e 305) e 229 nm (Fig. 24). As referências 56 e 61, trazem o espectro do composto trans-estilbeno. Fazem referência a um deslocamento batocrômico da banda K do cromóforo fundamental do benzeno (204 nm em hexano) da transição $\pi - \pi^*$ para um $\lambda_{\max}^{\text{MetOH}}$ 295 nm, além dos picos em 308 e 320 nm. Além desta variável, a banda torna-se muito intensa e as absortividades molares aumentam consideravelmente (benzeno $\epsilon = 7900$, hexano) para os valores de 25000, 25000 e 15800, respectivamente. Os dados estão muito coerentes levando em conta que o trans-estilbeno possui uma boa coplanaridade, fazendo que a conjugação estenda-se por meio da dupla etilênica de anel para anel benzeno. O composto encontrado assemelha-se muito com o trans-estilbeno⁶¹ com duas exceções: uma que o λ_{\max} da banda K está deslocada para 302 nm e os demais picos para 315,5 e 328 nm e a outra que a absortividade molar em 302 nm está na ordem de 33000 (lit. 33700)⁶⁰. O deslocamento batocrômico da banda K e o aumento da probabilidade de transição do composto encontrado são dados pelos dois cloros, ambos em posição "para", os quais são considerados auxôcromos por possuírem

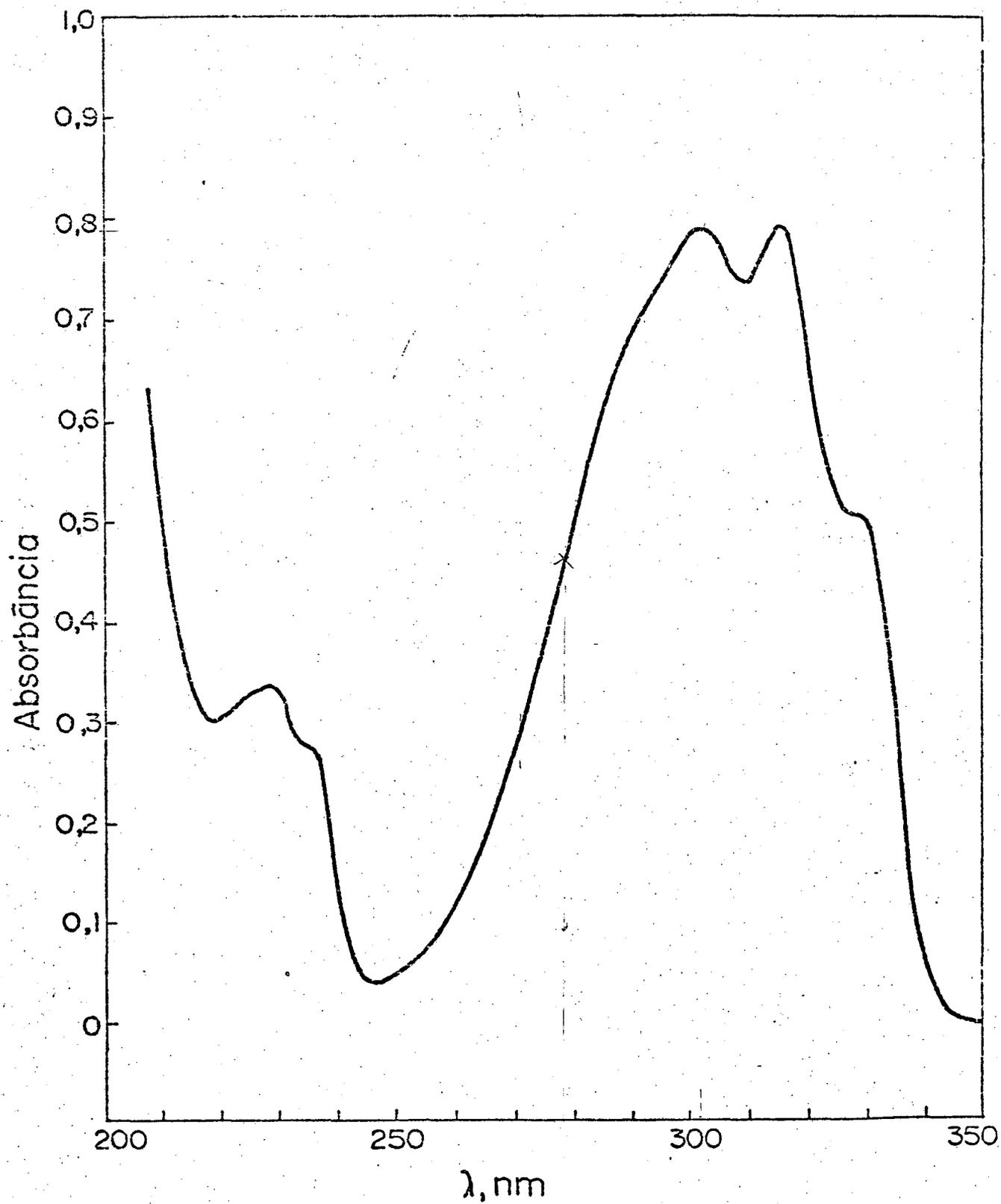
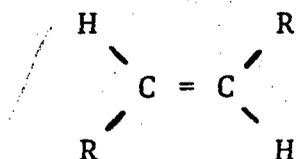


FIGURA 24 - Espectro de absorção no UV do DCS em MetOH a 25 °C $2,4 \times 10^{-5} M$

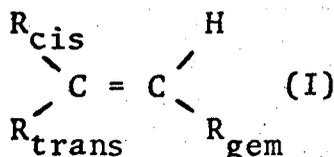
elétrons não-ligantes capazes de participarem da conjugação.

O espectro tirado no infravermelho caracterizou precisamente uma banda localizada em 970 cm^{-1} (lit. 980 e 960 cm^{-1}) ⁵⁶ resultante de uma deformação angular fora do plano de uma olefina do tipo:



Além desta, está expressamente caracterizada uma forte banda em 825 cm^{-1} de deformações angulares fora do plano do anel benzeno de dois hidrogênios adjacentes. A forte banda em 1085 cm^{-1} representa o estiramento da ligação $\phi\text{-Cl}$. Além destas, bandas do anel benzeno são observadas em 1585 ; 1480 ; 1405 e 1095 cm^{-1} .

O espectro de ressonância magnética nuclear (Fig. 25) complementa a definição da estrutura do produto. O método RMN mostra duas regiões de absorção de prótons: em $6,87\text{ ppm}$ está centrado um singlete referente aos prótons (a) e (b), quimicamente equivalentes, e um sistema aromático do tipo A_2B_2 dos prótons dos anéis benzenos em $7,27\text{ ppm}$ dos prótons (d) e $7,20\text{ ppm}$ dos prótons (c). Uma forma de comprovar a autenticidade do singlete em $6,87\text{ ppm}$ é de calcular o deslocamento químico do próton vinílico, conforme as regras descritas por Pascual, Meier e Simon ⁶⁸. Nesta aproximação os diferentes grupos substituintes são definidos com relação à este- reoquímica em função do hidrogênio vinílico, utilizando a Equação 23 para determinar empiricamente o deslocamento químico, onde Z_i



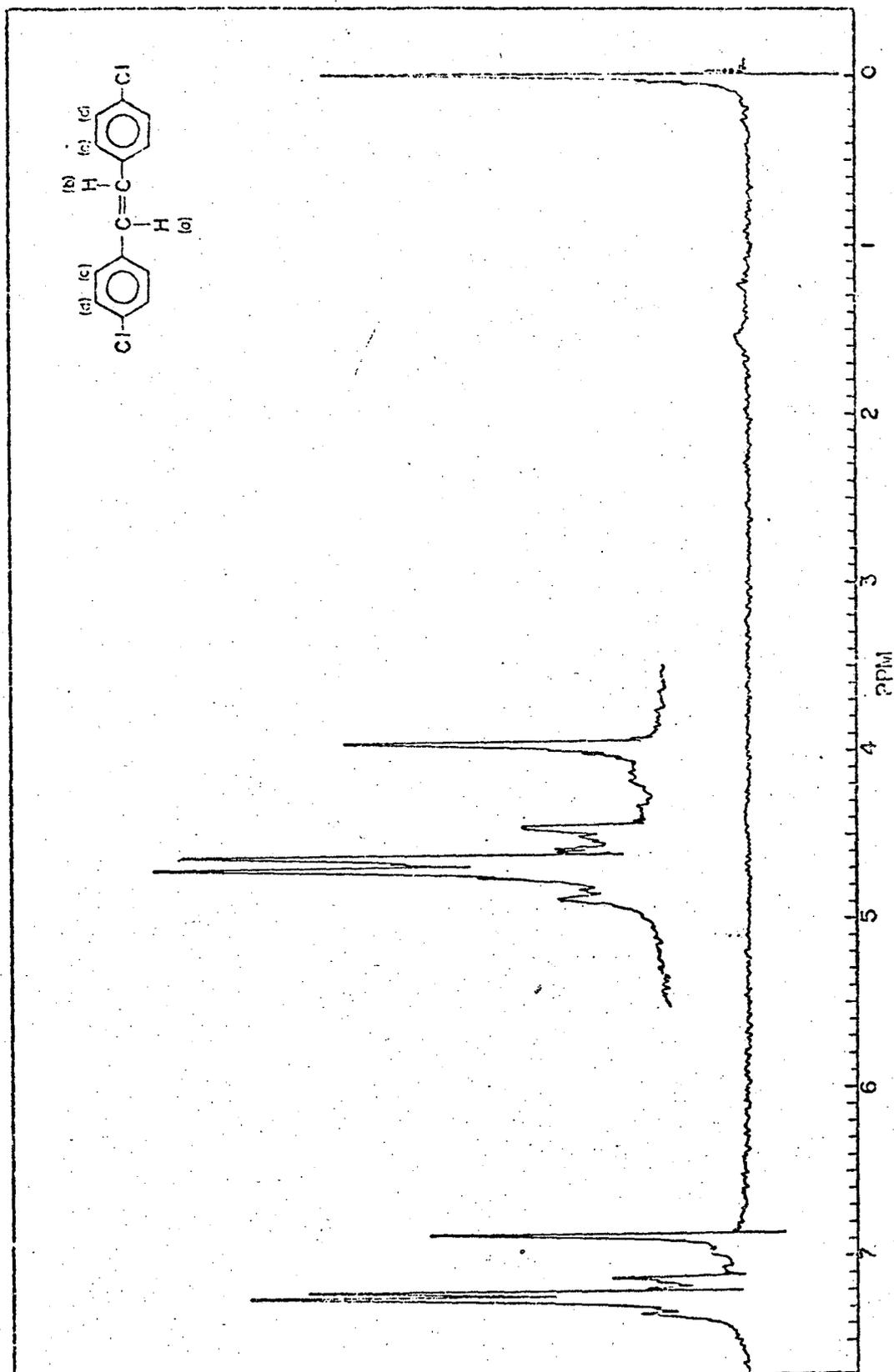


FIGURA 25 - Espectro de ressonância magnética nuclear do DCS.

representa o deslocamento químico provocado pelo grupo ligante. Com base nos dados experimentais obtidos foi calculado o valor de

$$\delta = 5,28 + \sum_i Z_i \quad (23)$$

Z_i para as posições cis, trans e gem do grupo benzeno substituído em posição "para" por um átomo de cloro, usando um sistema de três equações e três incógnitas. Foram achados os seguintes valores:

$Z_{\text{cis}} = 0,20$; $Z_{\text{trans}} = 0,02$; $Z_{\text{gem}} = 1,30$. Desta forma, substituindo os valores obtidos na Equação 23 o deslocamento químico do hidrogênio olefínico é igual a:

$$\delta_{\text{Ha}} = 5,28 + 1,30 + 0,02 + 0,20 = 6,80 \text{ ppm}$$

O resultado conseguido é bastante satisfatório, considerando os erros experimentais e as aproximações envolvidas no tratamento teórico.

A reação do DDD com B_{12s} é uma reação mais rápida do que a do DDD com $NaBH_4$. Isto foi comprovado por meio de um teste cinético qualitativo em CCD numa reação entre 30 mg de B_{12a} com um excesso de 100 mg de DDD (descrito na Secção Experimental). O resultado obtido foi que, nestas condições, não apareceu nenhuma mancha referente ao DDMU, enquanto que a reação parava mais ou menos aos 10 minutos. O aparecimento do produto e o desaparecimento do reagente foram estimados pelas áreas das manchas.

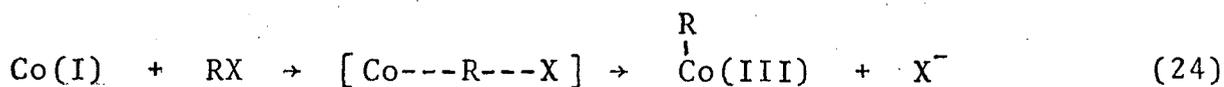
De outro lado, foi feita uma reação semelhante, com 200 mg de $NaBH_4$ com 100 mg de DDD, uma espécie de prova em branco. A reação foi feita nas mesmas condições anteriores. A cromatografia revelou que, somente começou a aparecer DDMU, após 15 a 20 minutos de reação. Estes resultados, ainda que não sejam muito precisos, devido ao erro inerente ao método, foram bastante significativos, por

que mais uma vez ficou comprovado que a reação entre DDD e NaBH_4 é secundária e nada tem a ver com a formação do DCS. Mostram ainda que há a possibilidade de produzir DCS, mesmo que seja com rendimento menor, porém, sem qualquer outra impureza apreciável.

Semelhante reação utilizando a vitamina $\text{B}_{12\text{s}}$ foi feita com o composto etil-DDD. O resultado foi análogo ao da reação com o DDD, produzindo o composto trans-4,4'-dietilestilbeno(etil-DCS), comprovado pela fluorescência característica em cromatografia de camada delgada e principalmente pelo espectro de absorção UV muito parecido com o DCS, com os λ_{max} em 301,5 e 315 nm. Este fato sugere um ótimo método de obtenção de derivados do DCS.

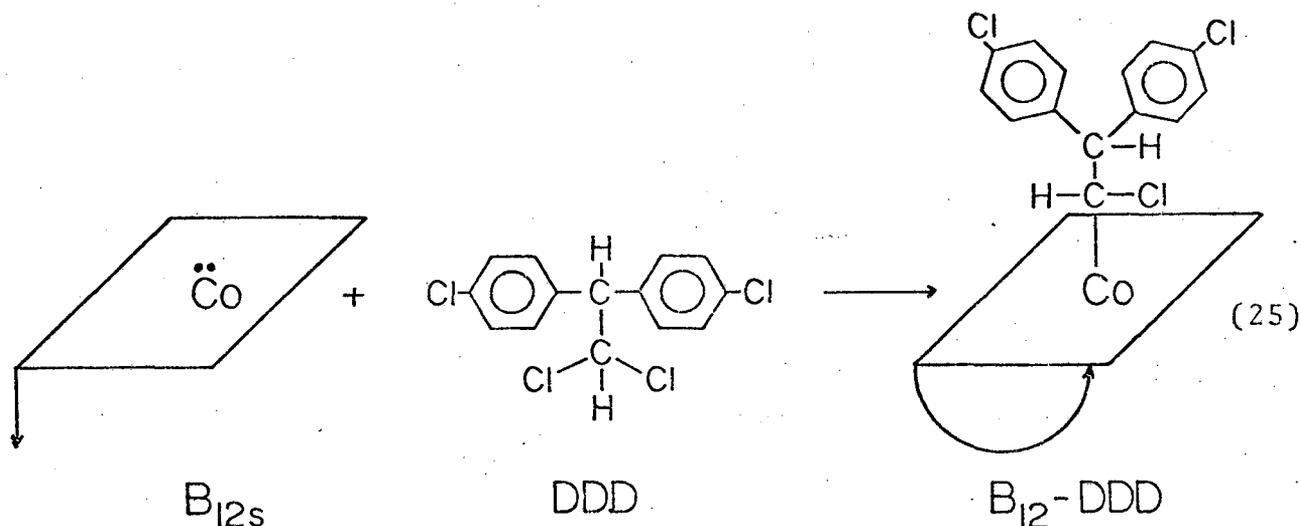
2. MECANISMO DA REAÇÃO E OS POSSÍVEIS INTERMEDIÁRIOS

As reações da vitamina $\text{B}_{12\text{s}}$ com halogenetos de alquila têm sido estudadas exaustivamente⁶³. Independentemente na natureza do halogeneto, as reações ocorrem com uma cinética de segunda ordem: primeira ordem em relação à vitamina $\text{B}_{12\text{s}}$ e primeira ordem em relação ao halogeneto⁶³. O mecanismo da reação é do tipo SN_2 e resulta na produção de uma alquilcobalamina (Eq. 24). Esta reação tem como característica importante a mudança do número de oxidação do Co de 1+ para 3+; desta forma é considerada como uma adição oxidativa. O grupo alquilo que é deslocado como um íon carbônio, tem natureza de carbânio na alquilcobalamina. Este processo de transferência de dois elétrons resulta na oxidação do Co. Com

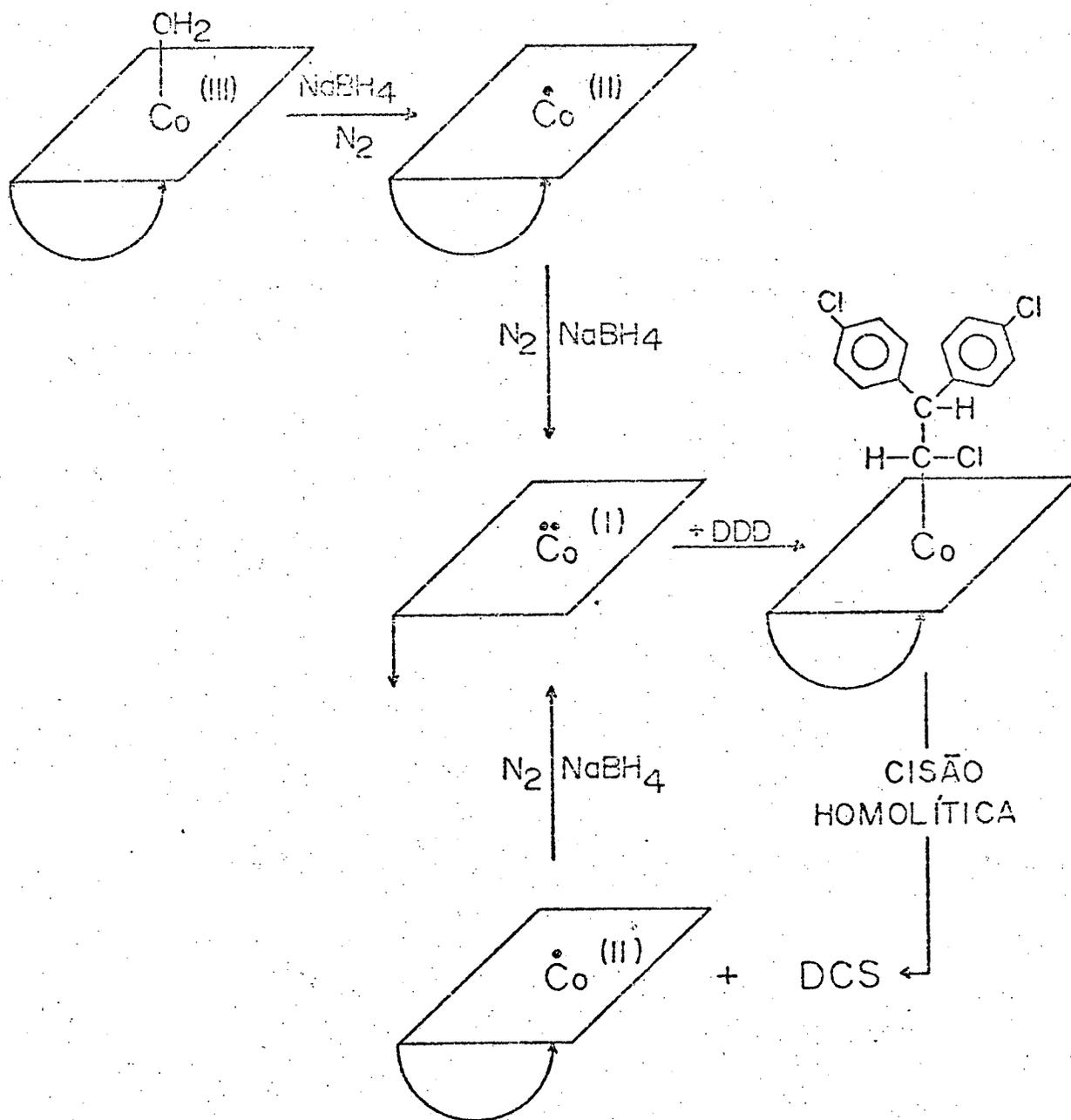


dação do Co de 1+ para 3+; desta forma é considerada como uma adição oxidativa. O grupo alquilo que é deslocado como um íon carbônio, tem natureza de carbânio na alquilcobalamina. Este processo de transferência de dois elétrons resulta na oxidação do Co. Com

base nas informações existentes, a Equação 25 descreve a etapa inicial da reação do DDD com vitamina B_{12s}.



A alquilcobalamina formada não é estável. Na verdade, ainda que usando um excesso de DDD de 14:1, é possível mediante adições sucessivas de NaBH₄ decompor todo o halogeneto orgânico para formar DCS. Assim, a vitamina B_{12s} aparentemente tem na reação um papel do tipo catalítico. A falta de estabilidade do complexo formado entre o DDD e a vitamina B₁₂ é facilmente entendida do ponto de vista das interações estéricas entre a fração orgânica e o anel corrínic. Segundo G.N. Schrauzer e E. Deutsch⁶³, na reação do iodeto de isopropila, um halogeneto de alquila secundário, não foi possível isolar o produto vitaminado, pois decompunha originando olefina e B_{12r}. Semelhantes resultados têm sido obtidos em nosso laboratório com pesticidas da família do Aldrin⁶⁴. De outro lado, as cobalaminas originadas de halogenetos de alquila primários eram suficientemente estáveis para serem isoladas. Na reação da vitamina B_{12s} com DDD, o intermediário formado (Eq. 25) tem grupos suficientemente volumosos para que as interações da fração orgânica com o anel corrínic desestabilizem a ligação σ , possibilitando a quebra homolítica da ligação Co-C. O Esquema 7 descreve os pro-



ESQUEMA 7

cessos que ocorrem em solução. A aquocobalamina é reduzida para o estado de Co(II) e subsequentemente ao estado de Co(I); em seguida, a reação com DDD resulta na formação do complexo B_{12} -DDD, o qual, por cisão homolítica da ligação Co-C, geraria a vitamina B_{12r} e um radical orgânico precursor do trans-estilbeno. O Co(II) produzido pode ser reduzido novamente em presença de $NaBH_4$ para formar Co(I) que pode reiniciar o ciclo. É óbvio que no sistema descrito a vitamina está participando de um ciclo catalítico.

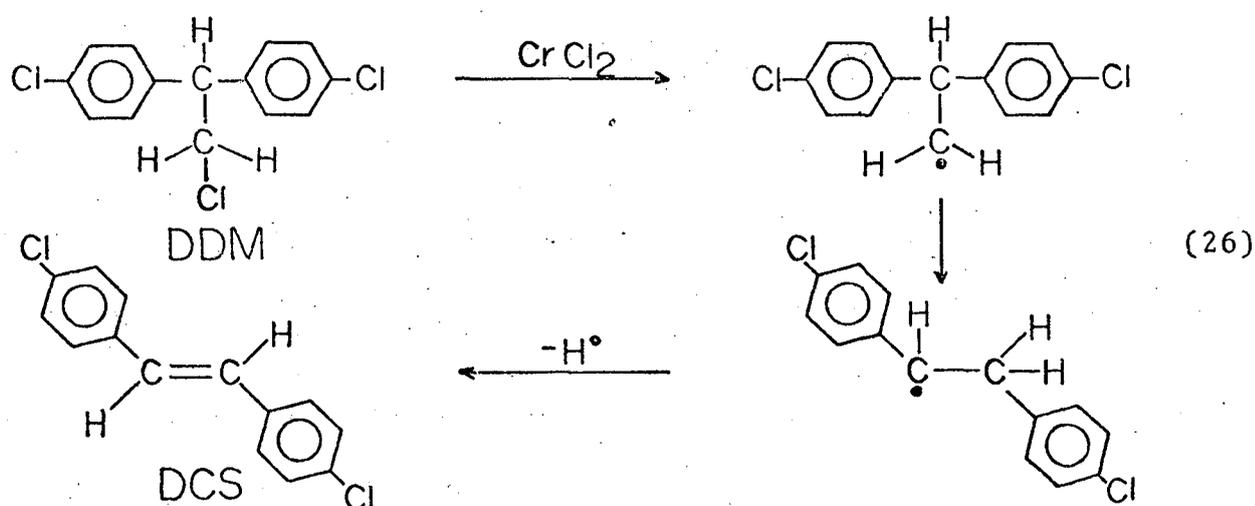
A vitamina B_{12r} , formada por decomposição do complexo B_{12} -DDD, reage com DDD muito lentamente, dando, aproximadamente, 4% de produtos em 24 horas; desta forma, sua participação na formação de trans-estilbeno numa reação direta pode ser excluída⁶⁴.

A fim de esclarecer o mecanismo através do qual a reação ocorre, tentou-se captar a formação de algum intermediário. Obviamente, o intermediário deveria ser instável nas condições da reação. O Esquema 8 descreve as possíveis reações que podem ocorrer com o radical orgânico formado da decomposição do complexo B_{12} -DDD. O radical orgânico pode reagir com hidrogênio e formar DDM ou com OH^{\cdot} para formar DDOHCl. Uma outra possibilidade seria a migração do grupo fenila e reações com H^{\cdot} ou OH^{\cdot} para formar DDMF ou DDMFOH, respectivamente. Dos quatro possíveis intermediários, o DDOHCl foi excluído, pois nas condições da reação (meio básico e em presença de $NaBH_4$) daria lugar à formação do aldeído e posteriormente de álcool, o qual é um produto estável e não foi detectado na reação. Os compostos restantes (DDMFOH, DDMF e DDM) foram sintetizados como previamente descrito (ver secções 3.1.3, 3.1.5 e 3.1.6) e testados com vitamina B_{12s} para verificar se eram precursores do trans-estilbeno. Seria possível elucidar o mecanismo da reação com a técnica de ressonância eletrônica spin (ESR), mas, a não disponibili-

dade desse aparelho obrigou-nos a recorrer ao método mais laborioso da síntese de possíveis intermediários. Idealmente, uma combinação de ambos os métodos deveria ser usada.

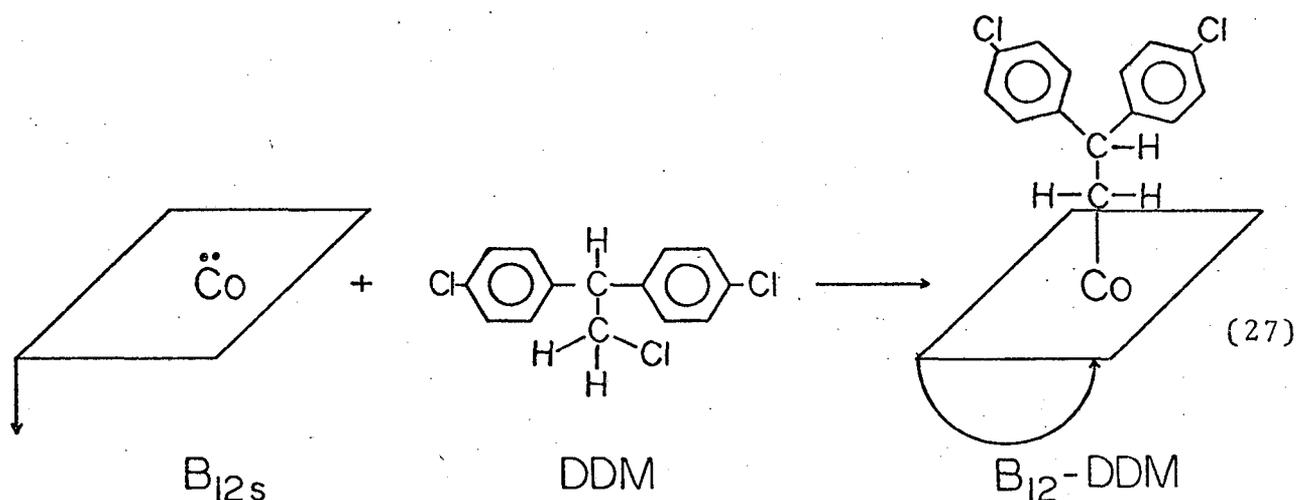
O DDMFOH reage lentamente com a vitamina B_{12s} , porém, não foi detectado trans-estilbeno como produto da reação, tanto por cromatografia em camada delgada como por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta do espectro. A alta fluorescência do trans-estilbeno e o coeficiente de extinção, aproximadamente 100 vezes maior do que o DDMFOH, além de absorver num comprimento de onda diferente, garantem que teríamos detectado a formação de trans-estilbeno, ainda que fosse ao nível de 1%. Assim, a informação obtida foi suficientemente aceitável para abandonar o DDMFOH como possível intermediário.

A reação do DDM com a vitamina B_{12s} foi estudada com mais detalhes. A razão é que o DDM foi postulado como intermediário na reação do $CrCl_2$ com DDT para produzir DCS (Eq. 26) ²⁹.



Uma reação, utilizando um excesso de 15 vezes de DDM em relação à quantidade de vitamina B_{12s} , foi feita em condições idênticas àquela anteriormente descrita com DDD. Alíquotas de amostras

foram tomadas a 0; 0,5; 1; 2; 4; 7; 15 e 30 minutos e analisadas via CCD. O resultado foi que aparentemente o DDM não reagia, pois não apareceu nenhum composto orgânico. Na prática, os possíveis produtos da reação, DDO, DDNU e DCS, têm R_f diferentes do DDM (veja Tabela 2). Porém, a solução contendo vitamina B_{12} parecia mostrar características típicas de um composto com ligação Co-C, já que trocava de cor de vermelha para amarela com a dição de ácido. Uma possível explicação era de que o produto vitaminado, B_{12} -DDM era estável (Eq. 27). Esta concepção parecia razoável já que



o DDM é um composto com menor impedimento estérico do que o DDD.

Para comprovar esta idéia, fez-se uma outra reação, equimolecular, usando 100 mg de B_{12a} e 25 mg de DDM. A vitamina foi reduzida com 200 mg de NaBH_4 . Testou-se a solução resultante com ácido e a cor vermelha mudou para amarela. Extração com éter etílico, seguida de evaporação do solvente e aplicação do conteúdo numa placa cromatográfica, resultou traços de DDM e nenhum outro produto orgânico foi localizado.

O produto vitaminado foi purificado numa coluna de sílica gel, tipo 60, Merck, utilizando como eluente o metanol. A primeira fração vermelha foi recolhida, concentrada e conservada na geladeira na ausência de luz a fim de evitar fotólise.

O espectro de absorção no UV-VIS mostrou, perfeitamente, que havia um composto vitaminado do tipo alquilcobalamina (Fig. 25) o qual apresentava em 0,1 N de HCl, forma "base-off", um λ_{max} no visível em 458 nm, enquanto que em pH = 6,8, forma "base-on", um λ_{max} deslocado para 521 nm. Em 350 nm o espectro mostra o visível desaparecimento do pico da aquocobalamina (veja Figura 7). De outro lado, comparando os espectros obtidos em meio neutro e em meio ácido, a semelhança com a metilcobalamina é muito grande (veja Figura 5c). Com este composto fez-se um trabalho de determinação do pKa, através da obtenção dos espectros em vários valores de pH. Obteve-se um valor de 2,5 (Fig. 26). Os espectros acusaram um ponto isobéstico centrado em 496 nm e em outro em 388 nm.

Independentemente, a geração do radical descrito na Equação 26 por reação da vitamina B_{12r} com o DDM não dá como produto o trans-estilbeno, e sim, o DDO e o DDNU⁶⁴. Portanto, a participação do DDM como intermediário pode ser abandonada devido à estabilidade mostrada pelo produto B₁₂-DDM nas condições da reação.

O terceiro possível intermediário, DDMF, foi testado usando-se 100 mg de DDMF e 30 mg de B_{12a} (um excesso de 15,5 vezes de DDMF). A redução da vitamina foi executada com 200 mg de NaBH₄. A reação terminou no intervalo de tempo de 5 a 10 minutos com o total desaparecimento do DDMF. A análise da reação por via CCD resultou na observação de dois produtos, o trans-4,4'-dicloroestilbeno e um outro de R_f = 0,28. Nesta reação, a vitamina B_{12s} atua como catalisador. A falta de estabilidade do complexo σ formado (Eq. 28) pode ser facilmente entendida, já que o composto B₁₂-DDMF tem um carbono secundário ligado ao cobalto. Como tem sido discutido anteriormente, as ligações cobalto-carbono secundário são altamente instáveis e rompem-se homoliticamente¹. A ruptura do complexo

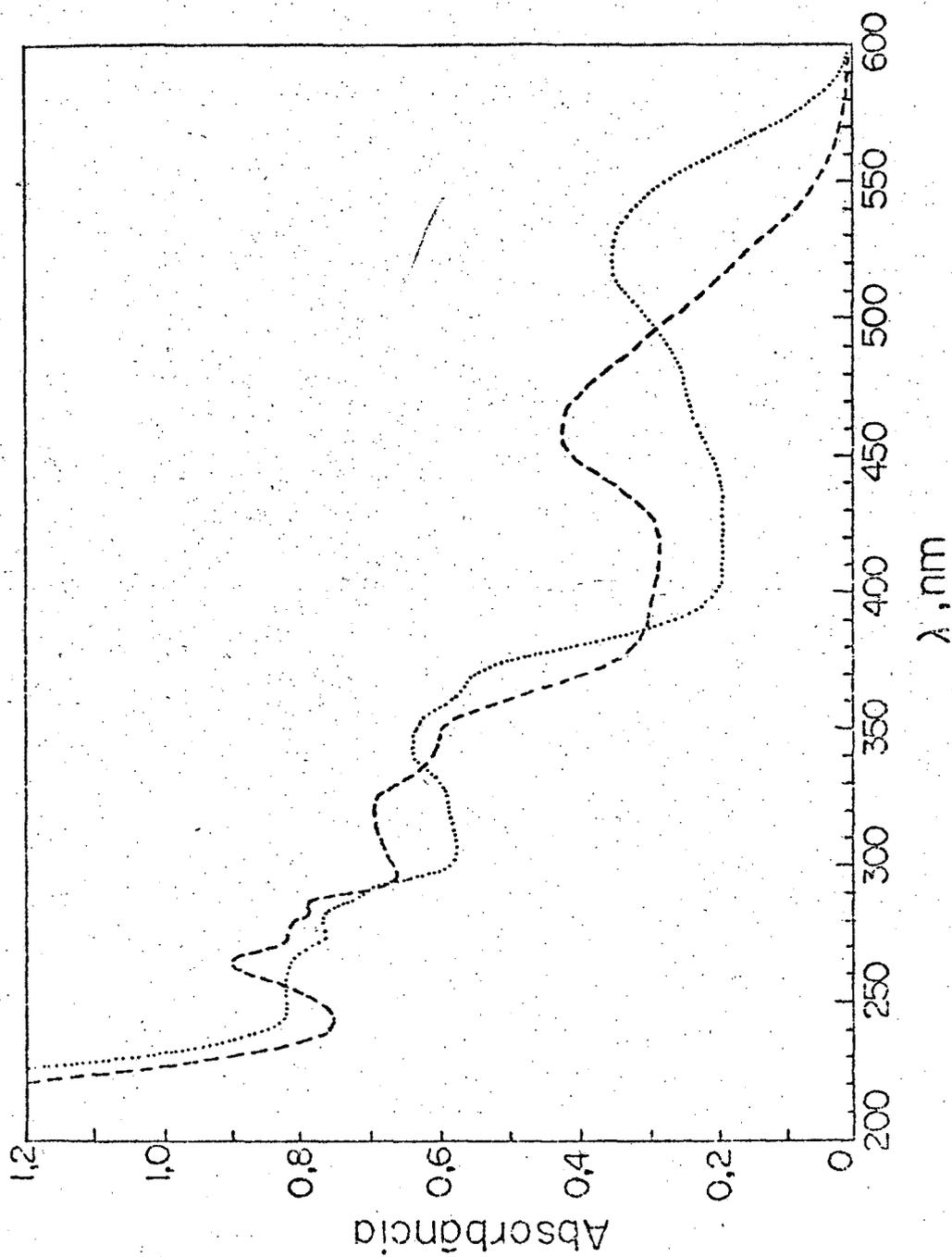


FIGURA 26 - Espectros de absorção no UV-VIS do complexo B₁₂-DDM em meio ácido (---) e em meio neutro (...).

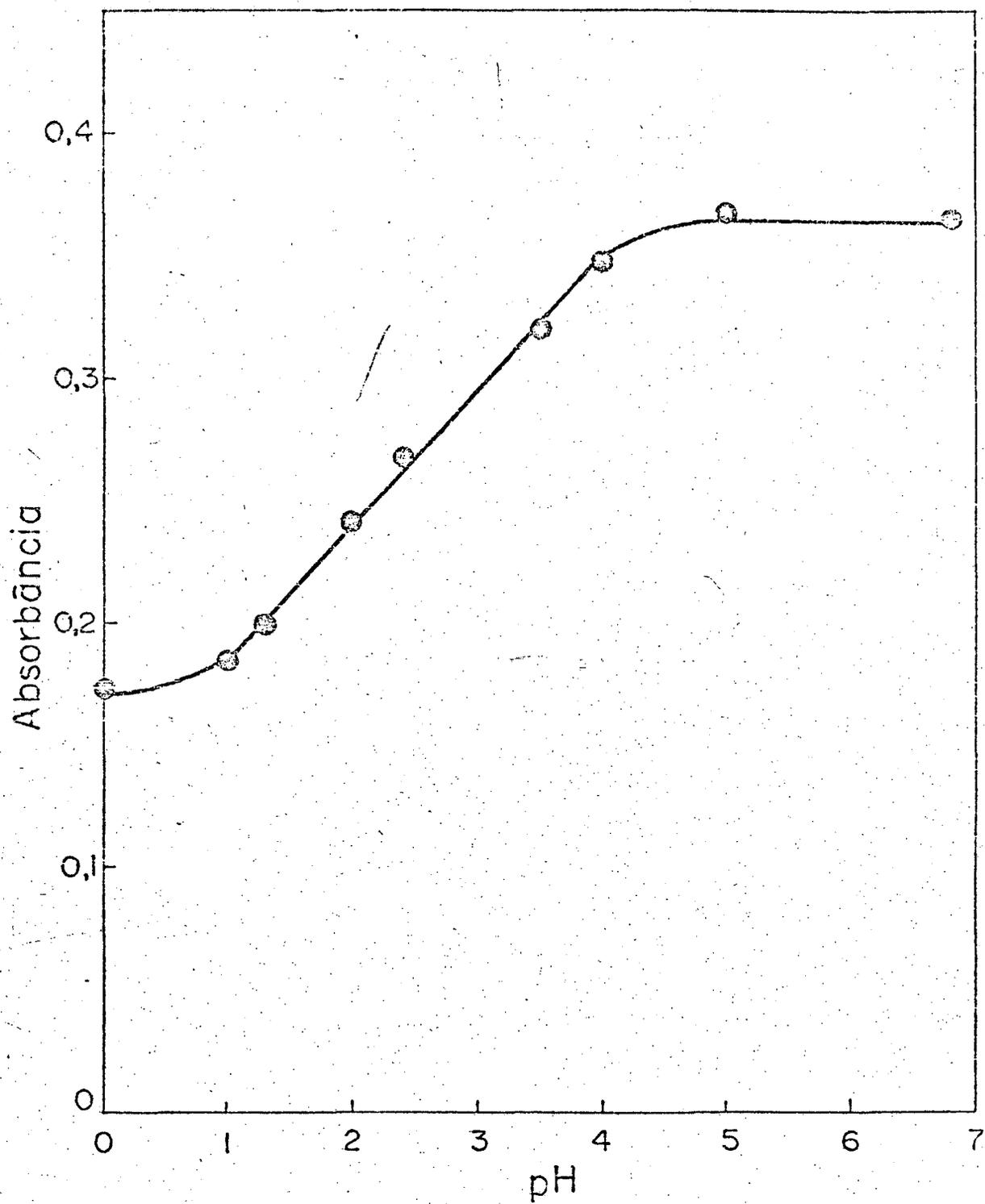
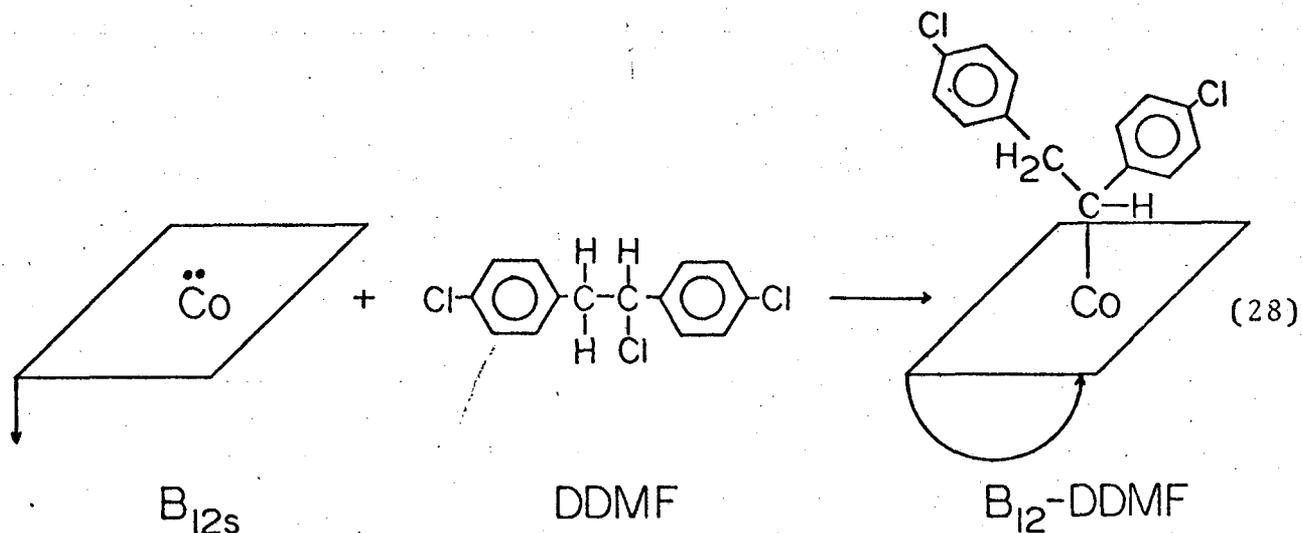
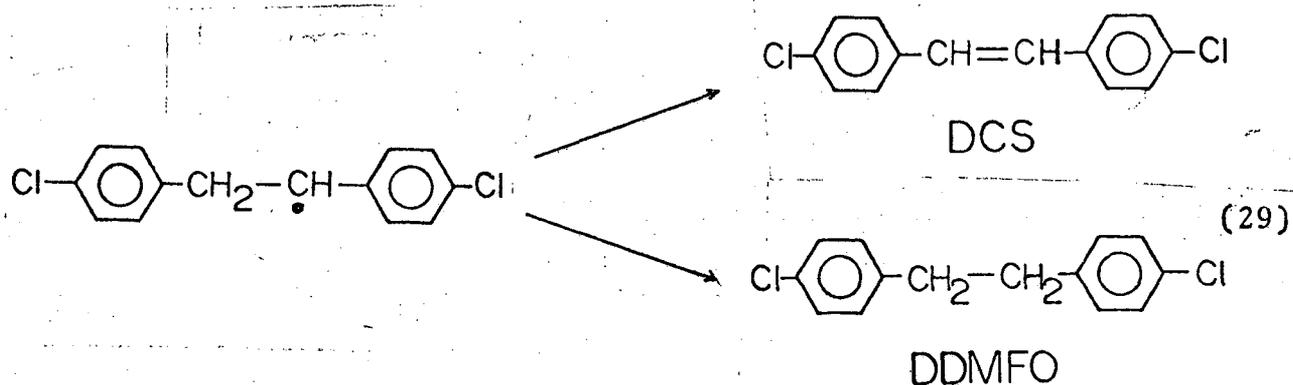


FIGURA 27 - Curva de determinação do pKa do complexo B_{12}^{-} -DDM.

B_{12} -DDMF geraria um radical secundário e B_{12r} . A B_{12r} pode ser reduzida pelo excesso de $NaBH_4$ conforme já se tem discutido e o radical formado (Eq. 29) pode dar lugar à formação de trans-etilbeno ou do



1,2-bis(p-clorofenil)etano. Este último composto foi isolado pela cromatografia preparativa e mostrou uma banda em 224 nm e outras de estruturas finas na região de 250 a 285 nm (λ_{max} em 277,5; 269 e 262,5 nm) características do anel benzeno não conjugado. O resultado é plenamente satisfatório e está de acordo com o que se esperava. Na realidade, a fotólise de uma alquilcobalamina dá lugar à formação de um hidrocarboneto saturado e de uma olefina mais estável.

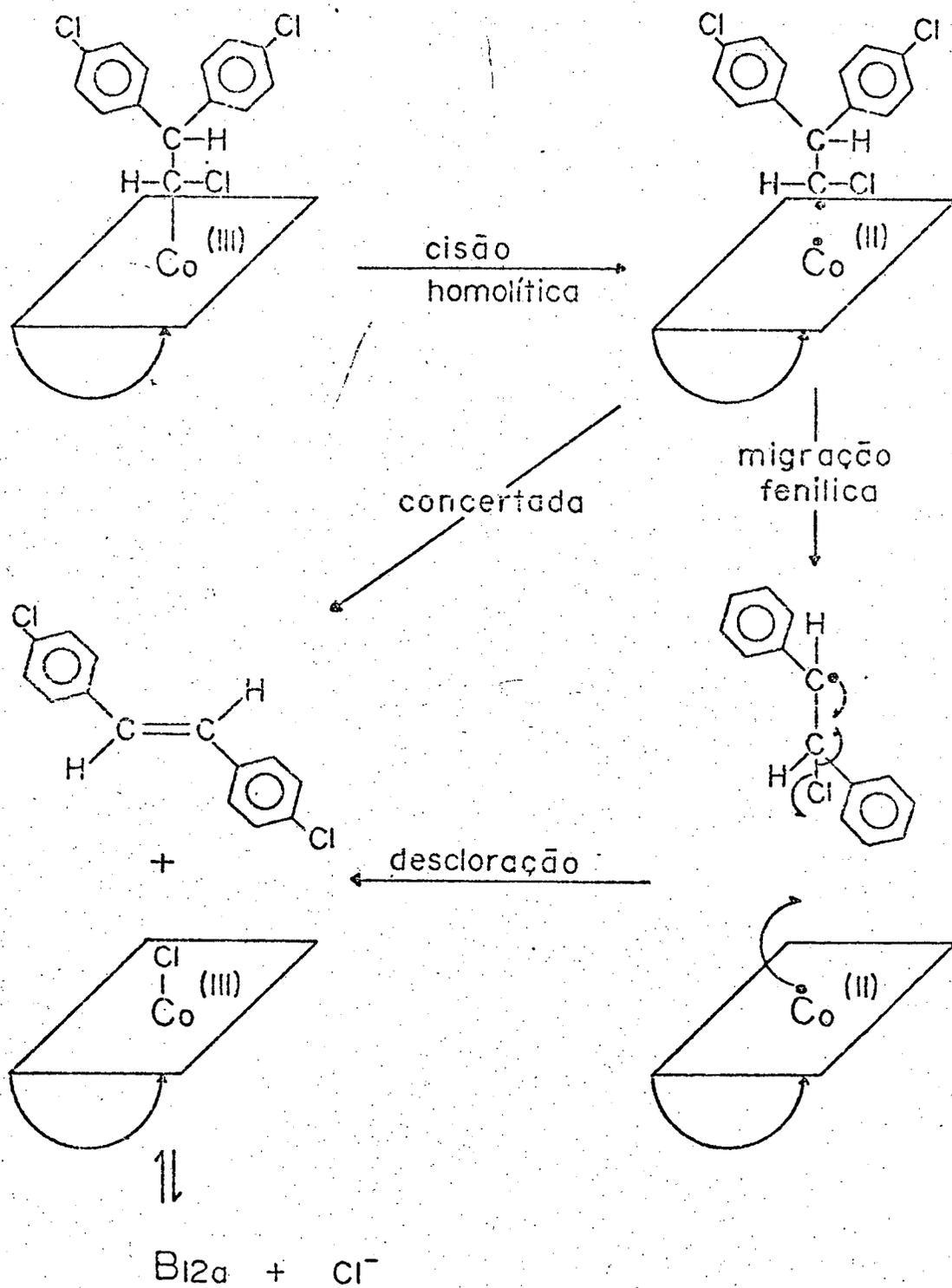


Os resultados obtidos no estudo das reações da vitamina B_{12s} com os três intermediários da reação são bastante claros. É óbvio que o DDMFOH e o DDM não podem ser intermediários da reação,

pois o primeiro deles não reage para formar trans-estilbeno e o segundo forma um produto vitaminado estável. Assim, o DDMF apresenta as características mais adequadas, pois é o único deles que dá lugar à formação de trans-estilbeno, produz somente o isômero trans, (o cis não foi detectado) e reage mais rapidamente que o DDD. No entanto, tem como inconveniente um outro produto além do DCS.

Uma alternativa para a formação do DDMF como intermediário é apresentada no Esquema 9. Nele a migração do grupo fenila ocorre antes da saída do segundo cloro dando lugar à formação de um intermediário com o radical livre num carbono secundário. A estrutura do intermediário é semelhante ao DDMF e pode ser desclorado pela vitamina B_{12r} formada na cisão homolítica do complexo vitamínico B_{12} -DDD. A descloração resultaria na formação de um complexo B_{12} -Cl e de trans-estilbeno. Alternativamente, o processo pode ocorrer de uma forma simultânea, isto é, migração do grupo fenila e eliminação de cloreto ao mesmo tempo. A presença de cloreto em quantidades estequiométricas pode ser facilmente explicada já que o complexo B_{12} -Cl tem o Co sob o estado de oxidação 3+, o que resulta num processo de transferência de um elétron do metal ao ligante. O complexo B_{12} -Cl pode ser facilmente hidrolisado para formar B_{12a} e Cl^- ⁹.

Na verdade, apesar de haver evidência direta deste último mecanismo, eliminado o fato de que o DDMF e o DDM não participam do mesmo, além dos resultados positivos obtidos com o DDMF, leva a pensar que a estrutura do intermediário, se se formou algum, deve ter uma estrutura semelhante ao DDMF. Assim, parece que o mecanismo proposto no Esquema 9 é o mais viável para a formação de trans-estilbeno a partir do DDD e da vitamina B_{12s} .



ESQUEMA 9

C A P Í T U L O I V

CONCLUSÃO

Deste trabalho pode-se concluir que:

- o átomo de cobalto sob a forma de Co(I) na vitamina B₁₂ reage com o DDD produzindo apenas DCS;
- a reação do DDD e derivados com a vitamina B_{12s} constitui um ótimo método para produzir, a nível de laboratório, trans-estilbenos substituídos;
- o DDM e seus derivados formam produtos vitaminados estáveis;
- o mecanismo da reação do DDD com B_{12s} aparenta ser de duas etapas, migração do grupo p-clorofenil e depois eliminação de ácido clorídrico, ou, um mecanismo "concertado", onde os dois processos ocorrem ao mesmo tempo.

BIBLIOGRAFIA

1. BROWN, D.G. The chemistry of vitamin B₁₂ and related inorganic model systems. Prog. Inorg. Chem., 18:177, 1973.
2. HUHEEY, J.E. Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity. New York, Harper & Row, 1972. Cap. 16.
3. NOME, F.J. Kinetic and thermodynamic study of the interaction of vitamin B_{12a} with ligands in aqueous and micellar environments. Texas, 1976. 155 f. Datilografadas. Bibliografia, p. 149-54. (doutorado em filosofia) Texas A & M University.
4. CONN, E.E. & STUMPF, P.K. Introdução à bioquímica. São Paulo, E. Blücher, 1975. Part. II., p. 160 e 282.
5. COTTON, F.A. Chemical applications of group theory. New York, Wiley, 1971. Part. II, p. 139.
6. SCHRAUZER, G.N.; LEE, L.P. & SIBERT, J.W. Alkylcobalamins and alkylcobaloximes. Electronic structure, spectra, and mechanism of photodealkylation. J. Amer. Chem. Soc., 20:2997, 1970.
7. SCHRAUZER, G.N. & HOLLAND, R.J. J. Amer. Chem. Soc., 93:4060, 1971.
8. BAYSTON, J.H. et al. Superoxocobalamin, the first intermediate in the autoxidation of vitamin B_{12r}. J. Amer. Chem. Soc., 91:2775, 1969.
9. PRATT, J.M. Inorganic chemistry of vitamin B₁₂. New York, Academic Press, 1972.
10. DOROUGH, G.D.; MILLER, J.R. & HUENNEKENS, F.M. Spectra of the metallo derivatives of α , β , γ e δ - tetraphenylporphine. J. Amer. Chem. Soc., 73:4315, 1951.
11. AVARIA, Guillermina E. Interaction of ferrimyoglobin and ferriprotoporphyrin IX with cetyltrimethylammonium bromide. Detroit, 1978. (mestrado em ciências) - University of Detroit.
12. GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins. J. Mol. Spectrosc., 6: 138, 1961.

13. GOUTERMAN, M. Study of the effects of substitution on the absorption spectra of porphin. J. Chem. Phys., 30:1139, 1959.
14. WEISSBLUTH, M. The physics of hemoglobin in Structure and Bonding. Berlin, Springer-Verlag, 1967. Vol. 2.
15. NAFIE, L.A.; PÉZOLET, M. & PETICOLAS, W.L. On the origin of the intensity of the resonant Raman bands of differing polarization in heme proteins. Chem. Phys. Lett., 20:563, 1973.
16. SPIRO, T.G. & STREKAS, T.C. Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state. J. Amer. Chem. Soc., 96:338, 1974.
17. OFFENHARTZ, P.O.; OFFENHARTZ, B.H. & FUNG, M.M. A theoretical analysis of corrin optical spectra. J. Amer. Chem. Soc., 92: 2966, 1970.
18. DOLPHIN, D. Methods in enzymology. New York, Wiley, 1971, Vol. XVIIIc, p. 34.
19. JENSEN, F.R.; MANDAN, V. & BUCHANAN, D.H. Stereochemistry of the alkylation of cobalt (I). J. Amer. Chem. Soc., 92: 1414, 1970.
20. DOLPHIN, D.; JOHNSON, A.W. & RODRIGO, R. Reactions of the vitamin B₁₂ coenzyme and its alkyl analogs. Ann. N.Y. Acad. Sci., 112:590, 1964.
21. HOGENKAMP, H.P.C.; RUSH, J.E. & SWENSON, C.A. Organometallic bond of the corrinoid coenzymes. Biol. Chem., 240:3643, 1965.
22. BURKE, G.T.; MANGUM, J.H. & BRODIE, J.D. Biochem., 9:4297, 1970.
23. KERWAR, S.S. et al. Interrelation of adenosyl methionine and methyl-B₁₂ in the biosynthesis of methionine. Arch. Biochem. Biophys., 116:305, 1966.
24. MANGUM, J.H.; MURRAY, B.K. & NORTH, J.A. Biochem., 8:3496, 1969.
25. COVERO, E.S.; GUERRA, M.S. & SILVEIRA, C.P.D. Manual de inseticidas e acaricidas, aspectos toxicológicos. Pelotas, Airmara, 1976.

26. KORTE, F. & KLEIN, W. Some problems of environmental chemistry. São Paulo, 1977. (Apresentado no seminário sobre química ambiental e acotoxicologia - Instituto Biológico de São Paulo).
27. CRISTOL, S.J. et al. Mechanisms of elimination reactions. The kinetics of dehydrochlorination of various 2,2-diarylchloroethanes. J. Amer. Chem. Soc., 74:3333, 1952.
28. PEARCE, G.W.; MATTSON, A.M. & HAYES, W.J. Science. 116:254, 1972.
29. STOTTER, D.A. Metal centres and DDT. J. Inorg. Nucl. Chem., 39:721, 1977.
30. LIPKE, H. & KEARNS, C.W. DDT dehydrochlorinase. I. Isolation, chemical properties and spectrophotometric assay. J. Biol. Chem., 234:2123, 1959.
31. PETERSON, J. E. & ROBINSON, W.J. Metabolic products of p,p'-DDT. Toxicol. Appl. Pharmacol., 6:321, 1964.
32. PLIMMER, J.R.; KEARNEY, P.C. & VON EMDT, D.W. Mechanism of conversion of DDT to DDD by aerobacter [enterobacter] aerogens. J. Agr. Food. Chem., 16: 594, 1968.
33. STAHL, E. Thin-layer chromatography. Berlin, Spring-Verlag, 1969. Section C, p. 52.
34. HANNAH, R.W. & SWINEHART, T.S. Experiments in techniques of infrared spectroscopy. 2. ed. Connecticut, Perkin - Elmer Corp., 1972.
35. SADTLER RESEARCH LABORATORIES INC., n° 4655 UV.
36. ———. n° 5898 UV.
37. ———. n° 10847 UV.
38. ———. n° 18450 IR.
39. KEITH, L.H.; ALFORD, A.L. & GARRISON, A.W. The high resolution NMR spectra of pesticides. II. The DDT-Type compounds. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52(5), 1969.
40. SADTLER RESEARCH LABORATORIES INC., n° 2040 NMR.
41. MORRISON, R.T. & BOYD, R.N. Organic chemistry. 2 ed. Boston, Allyn & Bacon, 1966. Cap. 18, p. 601.

42. FIESER, L.F. & FIERSER, Mary. Reagents for organic synthesis. New York, J. Wiley, 1967.
43. HANDBOOK of Chemistry and Physics. 53. ed. Ohio, Chemical Rubber, 1972. C-194, b 1945.
44. ———. C-353, k 8.
45. SADTLER RESEARCH LABORATORIES INC., nº 736 UV.
46. ———. nº 6666 UV.
47. PATAI, S. Ed. The chemistry of the carbon-halogen bond - Part. I. London, J. Wiley, 1973. Cap. 3, p. 151.
48. SADTLER RESEARCH LABORATORIES INC., nº 18440 UV.
49. HANDBOOK of Chemistry and Physics. 53. ed. Ohio, Chemical Rubber, 1972. C-353, K 7.
50. SADTLER RESEARCH LABORATORIES INC., nº 7197 IR.
51. VOGEL, A.I. Análise orgânica qualitativa. 3. ed. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico, 1971.
52. CREMLYN, R.J.W. & STILL, R.H. Named and miscellaneous Reactions in practical organic chemistry. New York, J. Wiley, 1967.
53. HANDBOOK of Chemistry and Physics. 53. ed. Ohio, Chemical Rubber, 1972. C - 92, a 645.
54. ———. C - 93, a 661.
55. ———. C - 93, a 664.
56. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C. & MORRIL, T.C. Spectrometric identification of organic compounds. 3. ed. New York, J. Wiley, 1974.
57. ASSUMPCÃO, R.M.V. & MORITA, T. Manual de soluções, reagentes & solventes. São Paulo, E. Blücher, 1968.
58. ROBINSON, G.V.; NOME, F. & FENDLER, J.H. Effects of surfactants on cobalamin dependent methyl transfer. Influence of aqueous and reversed micelles on the interaction of mercuric ion with methylcobalamin. J. Amer. Chem. Soc., 99:4969, 1977.
59. AYRES, G.H. Análisis químico cuantitativo. Madrid, Ediciones del Castillo, 1970. Part. III, p. 350.

60. WHEELER, O.H. & PABON, Hilda, N.B. Synthesis of stilbenes. A comparative study. J. Org. Chem., 30:1476, 1965.
61. SADTLER RESEARCH LABORATORIES INC., nº 18440 UV.
62. PASTO, D.J. & JONHSON, C.R. Organic structure determination. Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall, 19. Part. II, p.167.
63. SCHRAUZER, G.N. & DEUTSCH, E. Reactions of cobalt (I) super-nucleophiles. The alkylation of vitamin B₁₂, cobaloximes(I), and related compounds. J. Amer. Chem. Soc., 91:(12): 3341, 1968.
64. LARANJEIRA, M.C.M. Estudo das reações das vitaminas B_{12s} e B_{12r} com pesticidas clorados. Florianópolis, 1979. (mestrado em ciências) - Universidade Federal de Santa Catarina.