

Bruno Szpoganicz

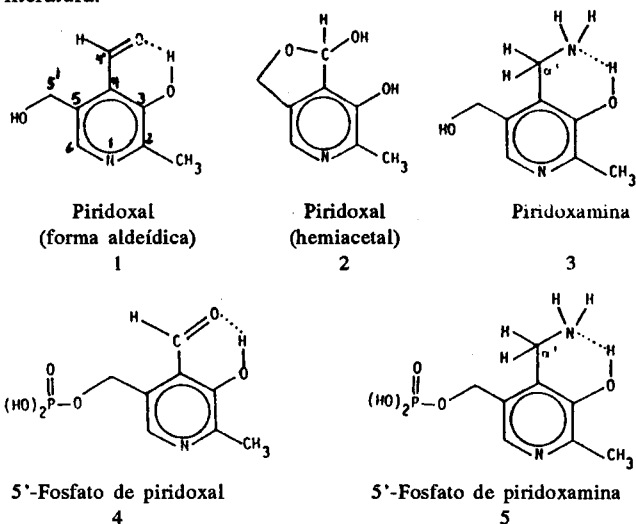
Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - 88049 - Florianópolis - SC

Recebido em 2/8/91; cópia revisada em 18/5/92

Reaction pathways and mechanisms of transamination, racemization, α and α' -proton exchange, β -decarboxylation and β -dephosphonylation reactions in model systems are presented. Metal chelates used by the author in the studies of vitamin B₆-catalyzed reactions are described.

Keywords: vitamin B₆; transamination; decarboxylation; dephosphonylation.

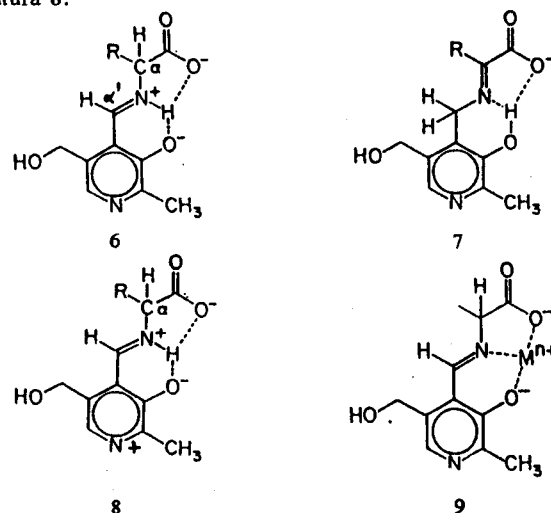
São muitas as enzimas que requerem a vitamina B₆ como um cofator. Algumas, mencionadas neste artigo, como as transaminases, racemases, e descarboxilases, são enzimas que transaminam, racemizam e descarboxilam aminoácidos ou cetoácidos. As formas da coenzima B₆ empregadas nos estudos das reações catalisadas por esta vitamina estão indicadas pelas estruturas 1-5, e uma revisão dessas reações está presente na literatura.¹



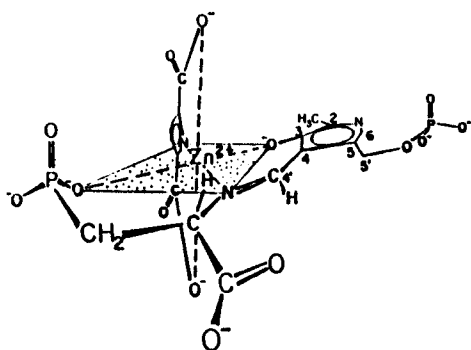
As reações enzimáticas e não enzimáticas catalisadas pela vitamina B₆ foram descobertas mais ou menos simultaneamente e em muitos casos reações com modelos foram observadas antes. Transaminação, por exemplo, foi descoberta primeiro com modelos, ocasionando a procura das enzimas que catalisam essa reação com aminoácidos e cetoácidos.^{2,3} A vantagem da pesquisa com compostos que sirvam de modelos, comparados com sistemas enzimáticos é a habilidade de se poder acompanhar as reações variando largamente o pH e a composição das soluções, tornando possível determinar a dependência da velocidade com cada reagente, com as concentrações de H⁺ e OH⁻, e com a forma da coenzima empregada.

As bases de Schiff formadas entre aminoácidos e piridoxal, 6, ou 5'-fosfato de piridoxal são denominadas *aldiminas*, e aquelas formadas a partir de cetoácidos e piridoxamina, 7, ou 5'-fosfato de piridoxamina, de *cetiminas*. As aldiminas e cetiminas são intermediários importantes nas reações catalisadas pela vitamina B₆. A estrutura 6 representa a forma monoprotonada da base de Schiff do piridoxal, onde o próton está covalentemente ligado ao nitrogênio azometínico e formando pontes de hidrogênio com os grupos carboxilato e fenolato. O

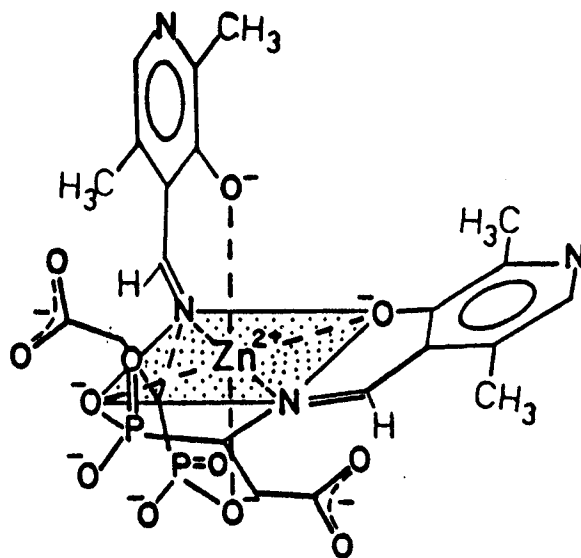
fato do próton estar covalentemente ligado ao nitrogênio azometínico foi comprovado por Heinert e Martell.⁴⁻⁶ A segunda protonação ocorre no nitrogênio piridínico como mostra a estrutura 8.



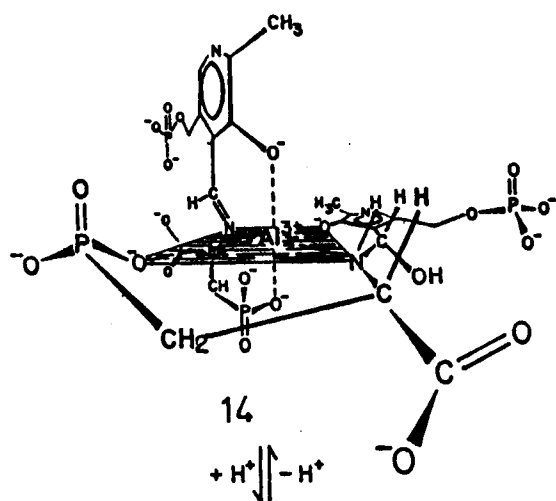
Tem sido ressaltado por Metzler,² Martell,^{1,7} e Leussing⁸ que o uso de íons metálicos em sistemas modelos aumenta a formação de base de Schiff (tanto a aldimina como a cetimina), sendo, portanto, útil no estudo dessas reações, pois todas apresentam bases de Schiff como intermediários. As bases de Schiff funcionam como ligantes tridentados como indicado em 9. O íon metálico ocupa o lugar do próton ligado ao nitrogênio azometínico. As outras três posições de coordenação do íon metálico octaédrico podem ainda estar ligadas a uma segunda base de Schiff formando a espécie ML₂. Alguns quelatos metálicos empregados pelo autor deste artigo são indicados pelas estruturas 10-15.⁹⁻¹² Em 10 é utilizado um ligante secundário, o ácido 2,6-piridinedicarboxílico, que ocupa duas posições axiais e uma equatorial do íon metálico octaédrico, Zn²⁺. A base de Schiff formada entre o ácido 2-amino-3-fosfonopropiônico e o 5'-fosfato de piridoxal coordena-se nas três posições equatoriais restantes. A base de Schiff coordena-se através do nitrogênio azometínico, o grupo fenolato e o grupo fosfonato pertencente ao ácido aminofosfônico. Os ligantes bases de Schiff do complexo 11 são formados por um composto análogo à vitamina B₆, o 5'-deoxipiridoxal. A vantagem de se utilizar esse composto está na maior formação de base de Schiff, já que ele não forma a estrutura hemiacetal como no caso do piridoxal.¹³ O íon metálico Ga³⁺ forma o complexo ML₂, 12. Neste complexo os grupos fosfonatos das bases de Schiff estão coordenados ao íon metálico e os grupos



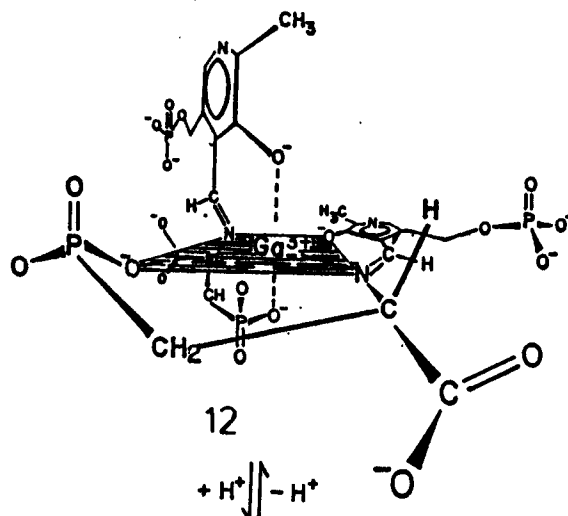
10



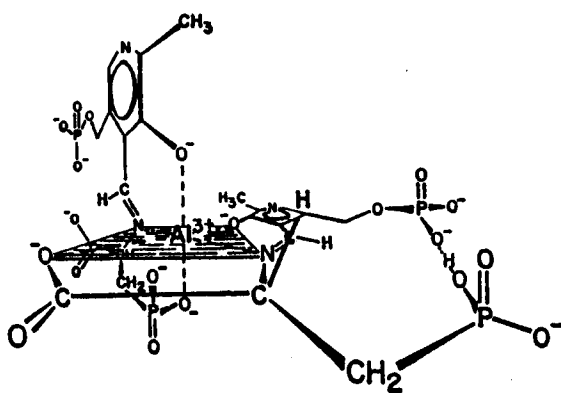
11



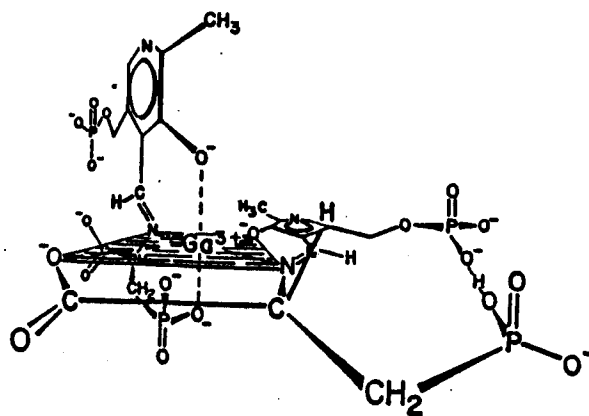
14



12



15



13

carboxilatos não. A protonação de um dos grupos fosfonatos remove-o da esfera de coordenação do íon metálico e o grupo carboxilato ocupa o lugar deste (estrutura 13). No complexo 14 um dos ligantes não é uma base de Schiff, mas uma car-

binolamina, um intermediário na formação de base de Schiff. Esse intermediário foi detectado por ressonância magnética nuclear (Fig.1). A ressonância do próton 4'-CH aparece em 6,28 ppm e somente um dos dois prótons 4'-CH da estrutura

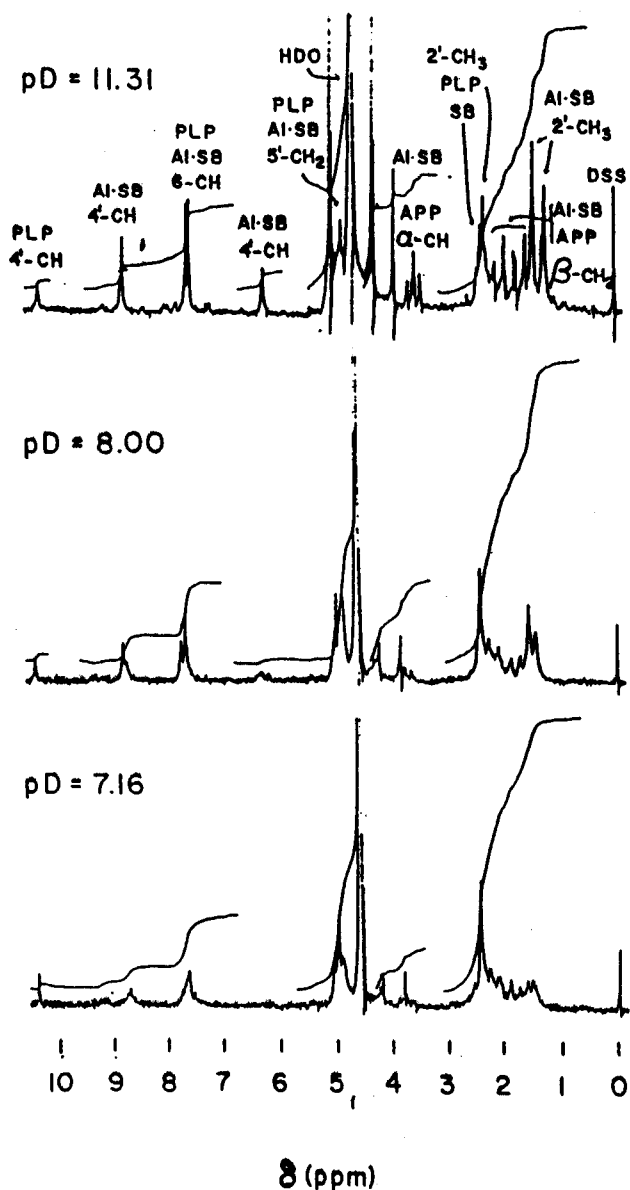


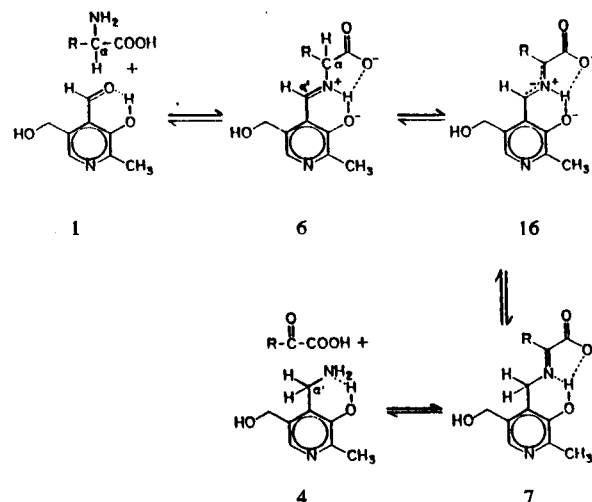
Figura 1. Espectros de RMN do próton (90 MHz) de soluções contendo uma razão molar 1:2:2 de Al (III) 5'-fosfato de piridoxal (PLP), e o ác. 2-amino-3-fosfonopropiônico (APP) em D₂O, a valores de pD iguais a 11,31; 8,00 e 7,16. A concentração inicial do íon Al (III) foi 0,050 M e as do PLP e APP foram 0,10 M (t=35,0 C, μ=1,00 M, ajustada com KCl).

carbinolamina aparece porque o outro é um deutério. É interessante notar que a integração deste próton e a do próton azometínico (8,80 ppm), assim como também as integrações do 2'-CH₃ (1,26 e 1,47 ppm), mostram uma proporção de 1:1, indicando que no complexo com o íon Al³⁺ um ligante é uma aldimina e o outro é uma carbinolamina. Protonação do complexo 14 origina a estrutura 15. Em 15 os dois ligantes são aldiminas; uma com o grupo fosfonato coordenado com o Al³⁺ e a outra com o carboxilato coordenado e o fosfonato protonado formando uma ponte de hidrogênio com o fosfato da vitamina.

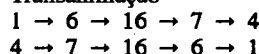
TRANSAMINAÇÃO, RACEMIZAÇÃO E TROCA DOS PRÓTONS α E α'

Estas reações foram primeiramente estudadas por Metzler, Ikawa e Snell.² O mecanismo para a conversão de um ami-

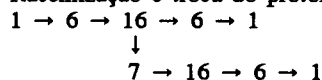
noácido em cetoácido catalisada pelo piridoxal, e da reação inversa catalisada pela piridoxamina, é ilustrado no Esquema 1. Inicialmente a aldimina 6 é formada. A α-desprotonação da aldimina origina o intermediário 16. A importância do próton azometínico em ativar o hidrogênio α do aminoácido e do efeito análogo de um íon metálico coordenado foi ressaltada por Martell,¹⁴ e um intermediário carbânion, 16, comum para ambas as reações, foi sugerido. Protonação no carbono α' origina a cetimina 7, que hidrolisando forma piridoxamina e um cetoácido.



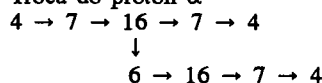
Transaminação



Racemização e troca do próton α

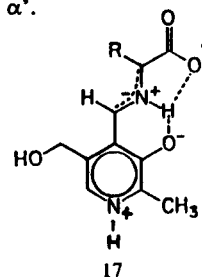


Troca do próton α'



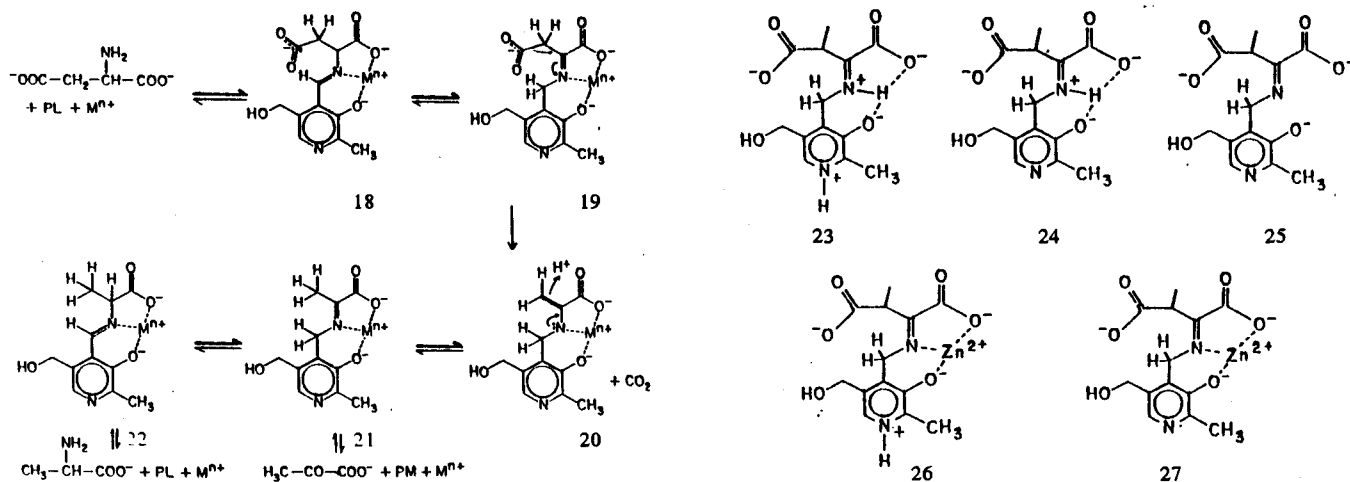
Esquema 1. Transaminação, racemização e troca dos prótons α e α' de aminoácidos catalisadas pelo piridoxal.

Essa protonação é facilitada se o nitrogênio piridínico estiver protonado como mostra a estrutura 17; o efeito elétron-atraente do nitrogênio piridínico positivo aumenta a densidade eletrônica no carbono α'.



β-DESCARBOXILAÇÃO

Sakkab e Martell¹⁵ estudaram a descarboxilação do ácido aspártico sugeriram o mecanismo no Esquema 2, envolvendo a conversão da aldimina 18 para a cetimina 19, que possui um caminho eletrônico favorável à quebra da ligação na des-



Esquema 2. Descarboxilação do ácido aspártico catalisada pelo piridoxal e íons metálicos.

carboxilação. Reprotonação do intermediário 20 forma primeiro a cetimina 21, que transamina para formar a aldimina 22. Esta reação estudada em solução ácida produziu ácido pirúvico, provavelmente por causa da rápida hidrólise do grupo imino da cetimina nas condições empregadas para estudar essa reação. Em outras condições poder-se-ia esperar a conversão da cetimina 21 a aldimina 22 e a produção do α -aminoácido descarboxilado como principal produto, como normalmente ocorre em sistemas biológicos.

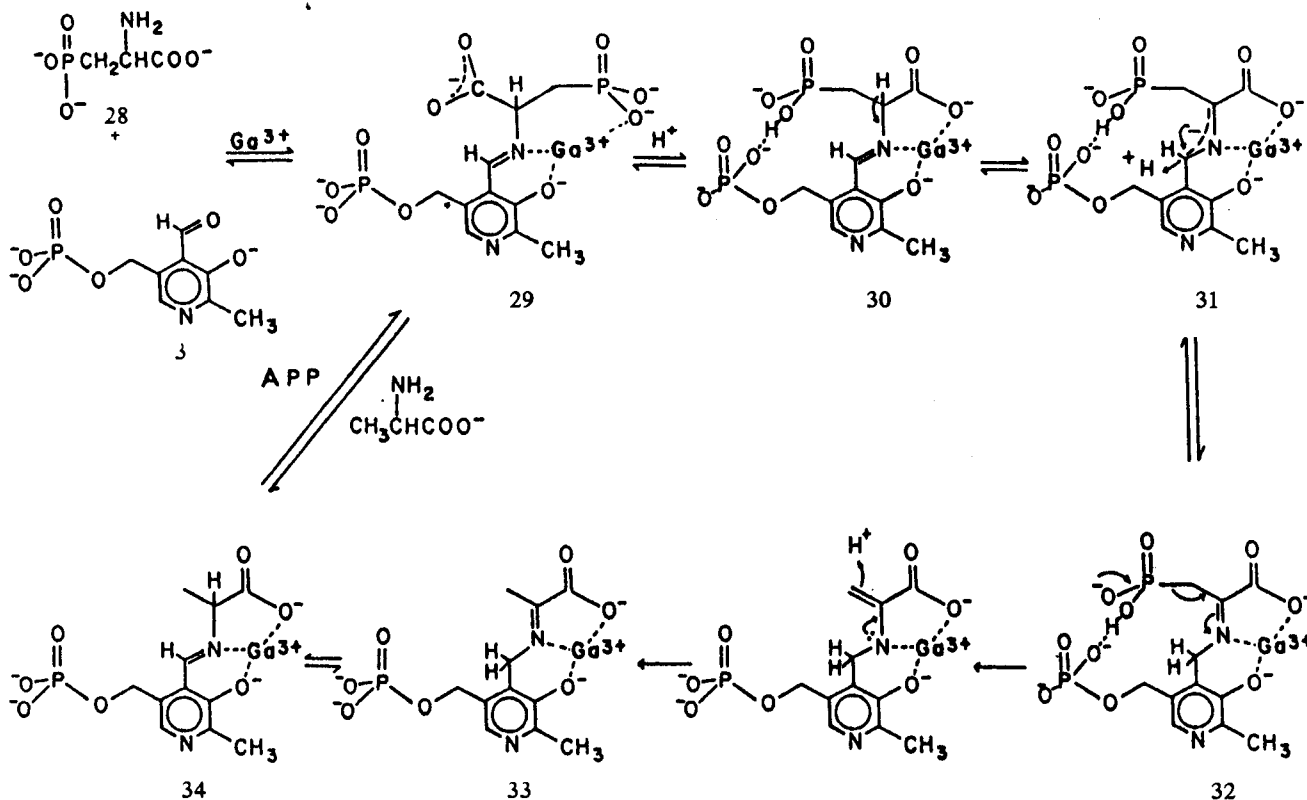
Estudo detalhado da descarboxilação do ácido 2-oxalopropiônico revelou que a base de Schiff diprotonada, 23, é mais reativa (aproximadamente o dobro) do que a monoprotionada, 24, e que a deprotonada, 25, tem muito pouca reatividade.¹⁶ As constantes de velocidades são: 4,2 s⁻¹; 1,9 s⁻¹ e 0,35 s⁻¹; respectivamente. Em presença de Zn (II), este forma um que-

lato com a cetimina, e o quelato metálico protonado, 26, é mais reativo do que o deprotonado, 27.¹⁷

β -DESFOSFONILAÇÃO

Embora ainda não se tenha descoberto uma enzima que catalise a desfosfonilação de ácidos aminofosfônicos, a desfosfonilação do ácido 2-amino-3-fosfonopropiônico (APP) é catalisada pelo 5'-fosfato de piridoxal (PLP), 3, e íons metálicos, como também pelo PLP sozinho. Esta reação é importante porque APP é um ácido aminofosfônico natural e é utilizado pelos microorganismos no processo de crescimento, indicando que a ligação carbono-fósforo pode ser quebrada em sistema biológicos.¹⁸

Szopanicz e Martell⁶⁻⁹ apresentaram o mecanismo ilustrado no Esquema 3 para a reação de desfosfonilação do APP catalisada pelo 5'-fosfato de piridoxal e íons metálicos. De



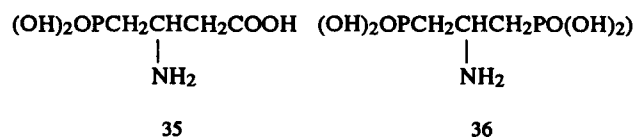
Esquema 3. Desfosfonilação do ácido 2-amino-3-fosfonopropiônico catalisada pelo 5' fosfato de piridoxal e íon Ga (III).

acordo com esse mecanismo o ácido 2-amino-3-fosfonopropiônico, **28**, 5'-fosfato de piridoxal, **3**, e o íon Ga(III) formam o quelato 1:2 Ga(III)-base de Schiff. No Esquema 3 o segundo ligante base de Schiff ligado ao íon Ga(III) não é mostrado por clareza. Há duas possibilidades para o quelato de Ga(III), diferindo quanto ao grupo doador coordenado ao íon metálico, **29** e **30**. Em **29** o Ga(III) está coordenado com o grupo fosfonato, com o nitrogênio azometínico e o oxigênio fenólico. A protonação do grupo fosfonato remove-o da esfera de coordenação do íon metálico ficando o carboxilato coordenado, como indicado em **30**. O grupo fosfonato protonado fica então ligado ao fosfato da vitamina por uma ponte de hidrogênio. Deprotonação de **30** forma o carbânion **31**, e reprotonação no carbono α' produz a cetimina **32**. A etapa de transaminação **30** - **32** é seguida pela perda do grupo fosfonato da cetimina **32** para formar **33**. A formação de alanina requer uma transaminação reversa para a aldimina **34**.

β -DESCARBOXILAÇÃO VS β -DESFSOSFONILAÇÃO

As reações de descarboxilação do ácido aspártico e a desfosfonilação do APP catalisadas pela vitamina B₆ possuem mecanismos análogos. Ambos requerem transaminação de uma estrutura aldimina para cetimina. Na cetimina existe um caminho eletrônico para o deslocamento da carga negativa do grupo carboxilato ou do fosfonato na posição β , pelo deslocamento dos pares eletrônicos através das ligações em direção ao centro metálico positivo. Entretanto, a reação de descarboxilação é 10⁶ vezes mais rápida do que a reação de desfosfonilação.¹⁹

Até o momento somente esses dois sistemas foram estudados com detalhes. Outros substratos como o ácido 3-amino-4-fosfobutírico (APB), **35**, e o ácido 3-amino-4-fosfonopropilfosfônico, **36**, foram sugeridos por Szpoganicz e Martell.¹⁹ Enquanto o composto **36** possui dois grupos fosfônicos equidistantes do grupo amino, APB, **35**, possui um grupo fosfônico e um carboxílico também equidistantes do grupo amino. Neste caso, é interessante notar que as duas reações, a β -descarboxilação e a β -desfosfonilação podem ocorrer no mesmo substrato.



AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao CNPq pelo auxílio de pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Martell, A.E.; *Adv. Enzymol.* (1982), **53**, 163.
2. Metzler, D.E.; Ikawa, M.; Snell, E.E.; *J. Am. Chem. Soc.* (1954), **76**, 648; Snell, E.E.; *Vitamins and Hormones* (1958), **16**, 77.
3. Braunstein, A.E.; Shemyakin, M.M.; *Biokhimiya* (1953), **8**, 393.
4. Heinert, D.; Martell, A.E. *J. Am. Chem. Soc.* (1962), **84**, 3257.
5. Heinert, D.; Martell, A.E.; *J. Am. Chem. Soc.* (1963), **85**, 183.
6. Heinert, D.; Martell, A.E.; *J. Am. Chem. Soc.* (1963), **85**, 188.
7. Martell, A.E., in *Chemical and Biological Aspects of Vitamin B₆ catalysis; Part A*, Ed. Evangelopoulos, A.E.; Alan R. Liss, Inc.: New York, (1984), p.63-78
8. Leussing, D.L., in *Pyridoxal Phosphate: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Part A*, Ed. Dolphin, D.; John Wiley: New York; (1968), pp. 69-151.12
9. Szpoganicz, B.; Martell, A.E. *Inorg. Chem.* (1984) **23**, 4442
10. Szpoganicz, B.; Martell, A.E.; *Inorg. Chem.* (1985), **24**, 2414.
11. Szpoganicz, B.; Martell, A.E.; *Inorg. Chem.* (1986), **25**, 327.
12. Szpoganicz, B.; Martell, A.E.; *J. Am. Chem. Soc.* (1984), **106**, 5513.
13. Szpoganicz, B.; Martell, A.E.; *Inorg. Chem.* (1989), **28**, 4149.
14. Martell, A.E.; *Proceedings of Symposium on Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis*, Rome, 1962, Pergamon Press, London, (1963), pp. 13-28.
15. Sakkab, N.; Martell, A.E.; *Bioinorg.* (1975), **5**, 67.
16. Kubala, G.; Martell, A.E.; *J. Am. Chem. Soc.* (1983), **105**, 449.
17. Szpoganicz, B.; Basak, A.; Martell, A.E.; *Inorg. Chem.*, submitted.
18. Harkness, D.R.; *J. Bacteriol.* (1966), **92**, 623.
19. Szpoganicz, B.; Martell, A.E.; *Biochimie*, (1989), **71**, 591.