



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDOS VISANDO A SÍNTESE DE HÍBRIDOS DE  
TOCOFEROL COM ÁCIDO ASCÓRBICO**

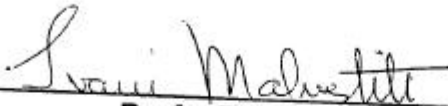
**ROSANNE PINTO DE ALBUQUERQUE MELO**

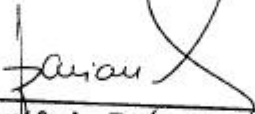
**Recife- PE**

**Abril, 2003**

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Aprovada:

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Ivani Malvestiti**  
(Orientadora)  
Departamento de Química Fundamental

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria**  
Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Paulo Henrique Menezes da Silva**  
Departamento de Química Fundamental da UFPE

***“Estudos Sintéticos Visando a Síntese de Híbridos de Tocoferol com Ácido Ascórbico”***

por

**ROSANNE PINTO DE ALBUQUERQUE MELO**

Departamento de Química Fundamental  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza  
Universidade Federal de Pernambuco  
Recife-PE-Brasil  
09 de Maio de 2003



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ROSANNE PINTO DE ALBUQUERQUE MELO**

**ESTUDOS VISANDO A SÍNTESE DE HÍBRIDOS DE  
TOCOFEROL COM ÁCIDO ASCÓRBICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador: Prof. Dr. Wilhelm F. Joachim Demnitz**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ivani Malvestiti**

**Recife- PE**

**Abril, 2003**

Aos meus pais, **Ronaldo e Nivalda**,  
pelo incentivo, amor e confiança  
ao longo destes anos.

Esta vitória dedico a vocês!!.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **DEUS** pelo dom da vida, pela oportunidade de hoje estar agradecendo a pessoas maravilhosas e que me ajudaram bastante durante esses anos, principalmente, por ter me dado forças para suportar a distância da minha família. É muito difícil estar distante de pessoas que amamos!!. Obrigada **SENHOR** por tudo!!;

À minha mãe **Nivalda**, exemplo de mulher, mãe, esposa e amiga, por ter estado sempre ao meu lado. E ao meu querido pai **Ronaldo**, o meu verdadeiro AMIGO, pelos sinceros ensinamentos e incentivo. **VOCÊS SÃO TUDO PARA MIM!!;**

Às minhas irmãs, **Roseanne; Roseneyde; Sônia e Rosely** pela grande torcida durante esses anos. **AMO VOCÊS!!;**

À minha Tia **Val**, minha segunda mãe, pelas orações e carinho;

Ao meu namorado **João Augusto**, pela confiança e apoio. A distância jamais vai nos separar, **AMO VOCÊ!!;**

À minha linda sobrinha **Luana**, pelos momentos de descontração e alegria;

Aos meus cunhados **André; Fernando e Luciano** pelo carinho e torcida. Valeu!!;

À **D. Helena e D. Marlene**, pela amizade e companheirismo;

À minha grande amiga **Valdenice**, pelo maravilhoso acolhimento. O meu sincero agradecimento!!;

Ao professor **Joaquim**, pelas orientações prestadas e indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho;

À professora **Ivani**, mais do que uma orientadora uma verdadeira amiga. Sua orientação foi muito importante para mim, obrigada por tudo!!;

Ao professor **Paulo Henrique**, por todo o apoio;

Aos amigos de Aracaju pelo verdadeiro incentivo e torcida;

Aos meus grandes amigos: **Aderivaldo, Glória, Maryene, Paula Teresa, Tupolevck e Valdeci**, pelas palavras de conforto, carinho e companheirismo. Agradeço a DEUS por ter conhecido vocês!!;

À minha amiga **Juliana Alves**, pelos primeiros ensinamentos no laboratório. O meu sincero agradecimento!!;

Ao meu amigo **Ricardo Guimarães** pela boa vontade e paciência em corrigir cada frase dessa dissertação. Valeu!!;

Aos amigos do DQF pelo companheirismo durante esses anos: **Andréa(s); Antenor; Ayron; Ceça; Clécio; Dimas; Diogo; Elisângela; Fernando; Gilmara; Idália; Joacy; João Carlos; Jorge, Keuner; Ladjane; Lourinaldo; Márcio; Mary; Patrícia(s); Paula Souza; Ribamar; Robson; Ronaldo; Saulo; Sidney; Silvânia; Wagner(s)**.

Aos amigos: **Chelito; Iracema, Marie, e Patrícia**, por toda amizade e apoio;

A todos da central analítica, o meu verdadeiro agradecimento!!;

A **Celso**, pelas ajudas prestadas;

A todos os professores do DQF e a coordenação da pós-graduação;

À CNPq, pela bolsa concedida.

*“DEUS existe. Não deveríamos prová-lo, negar a DEUS é loucura. DEUS vive em minha consciência, na consciência de toda humanidade, em todo o nosso universo, e falamos com DEUS nos momentos mais importantes de tristeza e de alegria.”*

Giuseppe Mazzini

## RESUMO

A atividade antioxidante do tocoferol e ácido ascórbico, bem como a capacidade deste último em regenerar o tocoferol, gerou o grande interesse na preparação de compostos que tivessem estas duas unidades ligadas e atuasse como *captador autoregenerável de radical livre*.

Com o intuito de obter uma molécula híbrida do  $\alpha$ -tocoferol e do ácido ascórbico, onde a hidroxila fenólica do  $\alpha$ -tocoferol e o sistema 2,3-enediol do ascorbato estão livres de substituição, foram realizados estudos modelos que levassem à síntese convergente de unidades de tocoferol e ascorbato unidas por vários espaçadores entre a posição 5 do tocoferol e a posição 6 do ácido ascórbico.

Considerando o 5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico (**11**) como material de partida, obteve-se primeiramente em 78% o 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico (**12**), com as hidroxilas 2 e 3 protegidas por grupos benzoíla. A desproteção das hidroxilas 5 e 6 do composto (**12**) nos forneceu em 58% o 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico (**13**), que através de uma reação com cloreto de tosila e piridina leva em 75% ao composto 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (**18**).

Na reação de halogenação realizada no  $\alpha$ -tocoferol, utilizando Br<sub>2</sub> em hexano seco, obtivemos exclusivamente o 5a-bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) em 98% de rendimento.

Foram realizados vários estudos com a finalidade de verificar a viabilidade de introduzir nucleófilos, tais como, benzilamina e tiofenol, aos compostos (**15**) e (**18**), e assim possibilitar o acoplamento entre as unidades ascorbato e tocoferol.

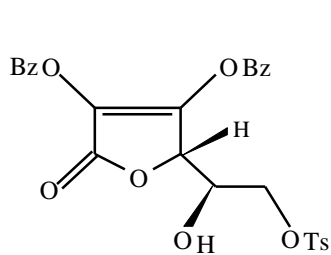


Não foi possível obter os produtos de substituição no grupo tosilato (**18**), pois se acredita que tenha ocorrido decomposição do material de partida nas condições reacionais. Reações com o substituinte brometo no lugar do grupo tosilato estão sendo propostas como rota alternativa para a substituição, por exemplo, por aminas primárias.

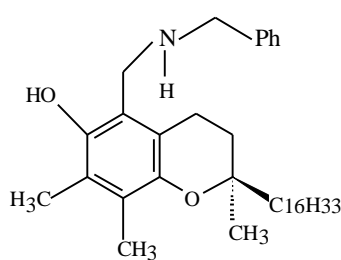
A substituição por nucleófilos mostrou-se viável para o sistema 5a-bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**), onde obtivemos o produto de substituição por benzilamina em 86% de rendimento (**28**) e em 30% com o tiofenol (**29**).

A obtenção dos compostos (**28**) e (**29**), bem como do intermediário (**18**), demonstra a possibilidade do acoplamento das unidades ascorbato e tocoferol com espaçadores contendo grupos quimicamente distintos, como por exemplo, tiol e amina.

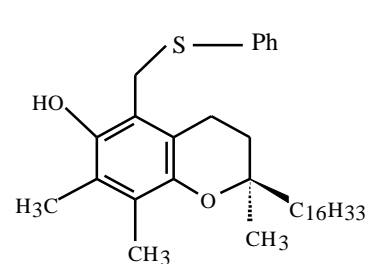
Os resultados obtidos mostram a flexibilidade da rota sintética, já que é possível utilizar diferentes espaçadores com diferentes funcionalidades, permitindo a síntese de várias moléculas híbridas.



**18**



**28**



**29**

## ABSTRACT

The antioxidant activity of tocopherol and ascorbic acid, as well as the capacity of the latter to regenerate tocopherol from the tocopheroxyl radical has generated great interest in the synthesis of hybrid molecules containing both of the above moieties in the same molecule. We term such species as potentially autoregenerable radical scavengers.

With the intention to develop a synthetic route to such a hybrid molecule, where the phenolic-OH of  $\alpha$ -tocopherol and the 2,3-enediol system of ascorbate are free of substitution, model studies have been carried. The aim was to devise a convergent synthesis linking intact units of tocopherol and ascorbate by means of a spacer joining the 5-position of tocopherol to C-6 of ascorbic acid.

Starting from 5,6-*O*-isopropylidene-L-ascorbic acid (**11**), 2,3-*di-O*-benzoyl-5,6-*O*-isopropylidene-L-ascorbic acid (**12**) was prepared in 78%, with the enediol protected as the dibenzoate. The deprotection of OH-5 and -6 of (**12**) supplied, in 58%, the 2,3-*di-O*-benzoyl-L-ascorbic acid (**13**). Tosylation led to 2,3-*di-O*-benzoyl-6-*O*-tosyl-L-ascorbic acid (**18**).

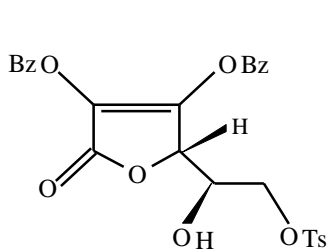
Halogenation of  $\alpha$ -tocopherol, using bromine in dry hexane, provided exclusively 5-*α*-bromo- $\alpha$ -tocopherol (**15**) in 98% yield.

Several studies have been carried out with the purpose of verifying the viability of introducing nucleophiles such as benzylamine and thiophenol into (**15**) and (**18**), and thus probe the suitability of these intermediates to act as substitution substrates in a sequential coupling strategy.

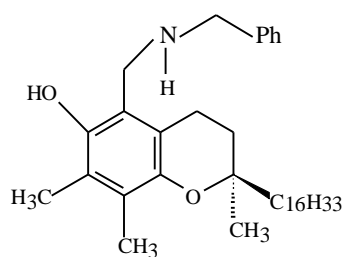
It was not possible to obtain benzylamine or thiophenyl substitution products in the ascorbate (**18**). However, the bromotocopherol substrate (**15**) readily yielded the respective substitution products (**28**, 86%) and (**29**, 30%).

The preparation of compounds (**28**) and (**29**), as well as of the intermediary (**18**), demonstrates to the possibility of the coupling of the ascorbate and tocopherol units with different spacers containing distinct group.

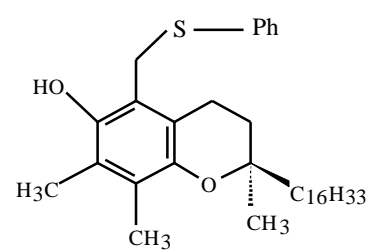
The results show the flexibility of the synthetic route, since it should be possible to use different spacers with different functionalities, allowing the synthesis of some hybrid molecules.



**18**



**28**



**29**

## SUMÁRIO

	Página
<b>Capítulo 1:</b>	
Introdução	1
1.1- Radicais Livres	2
1.2- Antioxidantes	8
1.2.1- Vitamina C	10
1.2.2- Vitamina E	12
1.3- Captadores Autoregeneráveis de Radicais Livres (CARL)	17
<b>Capítulo 2:</b>	
Objetivo	24
<b>Capítulo 3:</b>	
Estratégia Sintética	28
<b>Capítulo 4:</b>	
Discussão dos Resultados	35
4.1- Reações com L-ácido ascórbico	36
4.2- Reações com $\alpha$ -tocoferol	46
<b>Capítulo 5:</b>	
Conclusões e Perspectivas	55
5.1- Conclusões	56
5.2- Perspectivas	57
<b>Capítulo 6:</b>	
Procedimento Experimental	59
6.1- Generalidades	60

6.2- Análises Cromatográficas	60
6.3- Análises Espectroscópicas	60
6.4- Reações	61
6.4.1-Síntese de 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico (12)	62
6.4.2- Síntese de 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico (13)	67
6.4.3- Síntese de 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (18)	72
6.4.4- Síntese de 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (15)	77
6.4.5- Síntese de 5a-benzilamino- $\alpha$ -tocoferol (28)	81
6.4.6- Síntese de 5a-fenilsulfenil- $\alpha$ -tocoferol (29)	84
<b>Capítulo 7:</b>	
Referências Bibliográficas	87

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Provável mecanismo de proteção do organismo por EAO	7
<b>Figura 2:</b> Ácido Ascórbico (Vitamina C)	11
<b>Figura 3:</b> Classificação dos Tocoferóis (Vitamina E)	13
<b>Figura 4:</b> Valores do $\theta$ para o $\alpha$ -Tocoferol	15
<b>Figura 5:</b> 3- O- [( $\alpha$ - tocoferyloxy)- 2- hidroxipropil]- L- ácido ascórbico (2)	17
<b>Figura 6:</b> Híbrido produzido por “ <i>Senjo Pharmaceuticals</i> ”	19
<b>Figura 7:</b> 5a- tocoferil ascorbato (5)	20
<b>Figura 8:</b> Configuração absoluta do centro estereoquímico dos dezesseis híbridos	21
<b>Figura 9:</b> CARL com unidades tocoferol e ascorbato unidas por um espaçador (E)	25
<b>Figura 10:</b> Possível rearranjo numa membrana celular da molécula híbrida, com espaçadores hidrofílico e lipofílico	26
<b>Figura 11:</b> Suposto mecanismo de ação dos CARLs	33
<b>Figura 12:</b> Híbrido do ácido ascórbico e $\alpha$ -tocoferol	37

## LISTA DE ESPECTROS

	Página
<b>Espectro 1:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico ( <b>12</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .	64
<b>Espectro 2:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico ( <b>12</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .	65
<b>Espectro 3:</b> Espectro de IV do composto 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico ( <b>12</b> ) em KBr.	66
<b>Espectro 4:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico ( <b>13</b> ) em $\text{DMSO-d}^6$ .	69
<b>Espectro 5:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico ( <b>13</b> ) em $\text{CD}_3\text{OD}$ .	70
<b>Espectro 6:</b> Espectro de IV do composto 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico ( <b>13</b> ) em KBr.	71
<b>Espectro 7:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico ( <b>18</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .	74
<b>Espectro 8:</b> Espectro de Massa do composto 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico ( <b>18</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .	75
<b>Espectro 9:</b> Espectro de IV do composto 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico ( <b>18</b> ) em KBr.	76

<b>Espectro 10:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol ( <b>15</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .	78
<b>Espectro 11:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol ( <b>15</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .	79
<b>Espectro 12:</b> Espectro de IV do composto 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol ( <b>15</b> ) em KBr.	80
<b>Espectro 13:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 5a-benzilamino- $\alpha$ -tocoferol ( <b>28</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .	82
<b>Espectro 14:</b> Espectro de IV do composto 5a-benzilamino- $\alpha$ -tocoferol ( <b>28</b> ) em KBr.	83
<b>Espectro 15:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 5a-fenilsulfenil- $\alpha$ -tocoferol ( <b>29</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .	85
<b>Espectro 16:</b> Espectro de IV do composto 5a-fenilsulfenil- $\alpha$ -tocoferol ( <b>29</b> ) em KBr.	86



## ABREVIATURAS

Asc <sup>-</sup>	Monoânion ascorbato
Asc <sup>•-</sup>	Radical Semidehidroascorbato
BOC	t-butoxicarbonil
BzCl	Cloreto de benzoíla
CARL	Captador Autoregenerável de Radicais Livres
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DIBAL-H	Hidreto de diisobutilalumínio
DMAP	4-N,N- dimetilaminopiridina
DMF	N,N- dimetilformamida
ERN	Espécies Reativas de Nitogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GC	Cromatografia Gasosa
IC <sub>50</sub>	Concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo
IV	Infravermelho
Py	Piridina
RL	Radical Livre
RMN	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear
RSE	Ressonância de Spin Elétron
THF	Tetrahidrofurano

Toc-O <sup>·</sup>	Radical tocoferoxila
Toc-OH	Tocoferol
Ts	p-toluenosulfonila
TsCl	Cloreto de tosila
TsOH	Ácido p-toluenosulfônico

## CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

*“Nossa alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.*

*Não na vitória propriamente dita.”*

Autor desconhecido

Estudos de reações que envolvem radicais livres, correspondem a uma área bastante promissora e de grande interesse, já que tem sido mostrado que as reações radicalares implicam em mais de 50 doenças humanas. Isto sugere que os radicais participam como componente fundamental em lesões de células<sup>1</sup>.

### 1.1- Radicais Livres

Um aporte suficiente de energia (luminosa, térmica, ou, mais freqüentemente, química), pode romper uma ligação química, originando moléculas ou átomos com elétrons desemparelhados que são chamados de “radicais livres” (RL). Estas espécies são muito instáveis e por conseqüência são mais reativas do que as espécies não radicalares. Os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila ( $\cdot OH$ ), peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ ), alcoxila ( $RO^{\cdot}$ ) e hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) são exemplos de RL de oxigênio, já o óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) e dióxido de nitrogênio ( $\cdot NO_2$ ) são radicais livres de nitrogênio. Esses radicais, tanto do oxigênio quanto do nitrogênio, podem ser convertidos em outras espécies reativas não radicalares, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), ácido hipobromoso ( $HOBr$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ). Espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de cloro são produzidas em animais e humanos sob condições fisiológicas e patológicas e incluem espécies radicalares e não radicalares<sup>2</sup>.

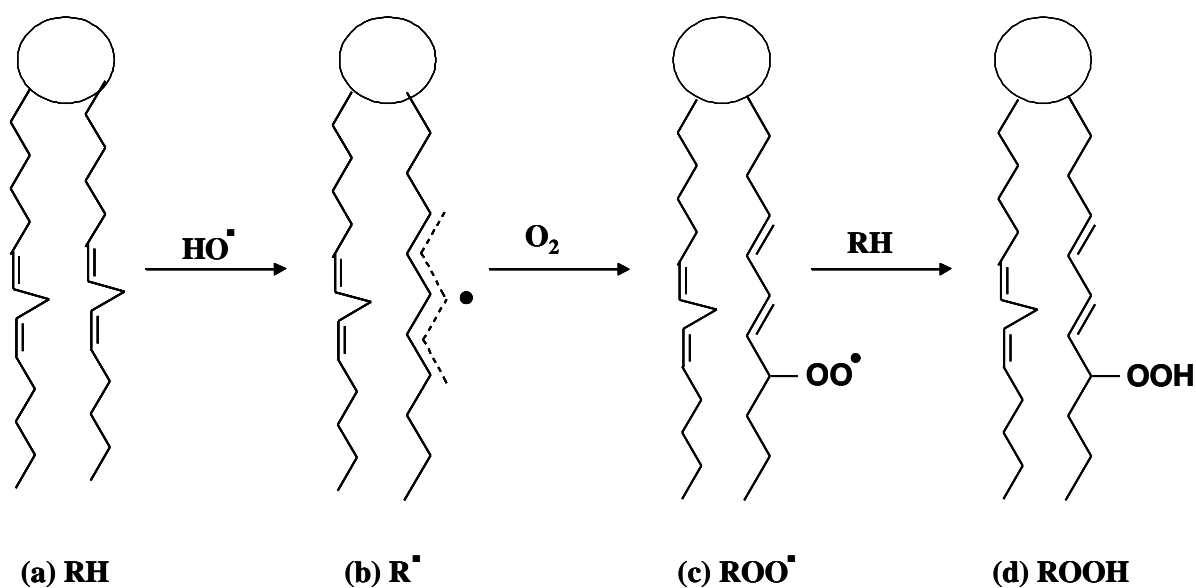
Merecem destaque as ERO e os RL de oxigênio, pois este elemento está presente em todo metabolismo celular, como por exemplo, no processo de respiração celular, onde a célula adquire a energia indispensável para a realização das suas atividades.

Os radicais podem reagir com outras moléculas em um processo de reação em cadeia. Um radical pode doar o seu elétron desemparelhado para outra molécula (elétron doação), ou receber um elétron de uma outra molécula (elétron remoção), e isso faz gerar outras espécies radicalares. Portanto um radical gera outro<sup>3, 4</sup>. Somente quando dois radicais se encontram eles podem combinar os seus elétrons desemparelhados e unir-se formando uma ligação covalente, ocorrendo assim o término da reação em cadeia.

Em muitos casos, os pares de radicais livres sobre cadeias saturadas, pela passagem de fótons ou de partículas, recombina-se imediatamente, o que não acontece se a cadeia é insaturada. As ligações duplas, como as que existem nos ácidos graxos polinsaturados, constituem caminhos de fuga para o elétron desemparelhado. Nessas moléculas, o elétron é deslocalizado. Tais radicais, com um elétron desemparelhado deslocalizado, são muito mais estáveis do que os outros, e por essa razão, menos reativos.

O radical livre mais reativo é o hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ). Ele ataca muitas moléculas encontradas em células vivas através de um processo em cadeia chamado de “peroxidação lipídica” (Esquema 1), onde o referido radical ataca o material lipídico (RH) das membranas fosfolipídicas, dando origem a um novo radical ( $\text{R}\cdot$ ), que na presença do oxigênio formará o radical peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ), que por sua vez reage com o material lipídico (RH) originando o hidroperóxido lipídico ( $\text{ROOH}$ ).

Isso faz com que a estrutura das membranas seja totalmente alterada, sobretudo a permeabilidade e a capacidade de transporte, o que pode acarretar a liberação de enzimas que degradam os lisossomos (organela que contém enzimas aptas a digerir microorganismos) e rapidamente destroem a célula<sup>4,5</sup>.



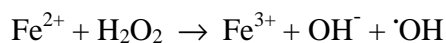
**Esquema 1:** Processo de “Peroxidação Lipídica”.

O radical hidroxila é produzido em organismos vivos por dois mecanismos principais<sup>3</sup>:

Fissão homolítica da água, causada por exposição à radiação ionizante;

- I. Reação de íons de metais de transição com peróxido de hidrogênio, proveniente do próprio metabolismo celular ou de origem extracelular.

Esta reação é conhecida como “Reação de Fenton”



Um outro tipo de radical que merece destaque é o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) que, apesar de ser muito menos reativo que o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), afeta sistemas biológicos.

Sua forma protonada  $\text{HO}_2^\cdot$  não mostra efeitos danosos *in vivo*, sendo também, muito menos reativa *in vitro* do que o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ <sup>3</sup>.

Os íons de metais de transição participam das reações que envolvem radicais, (Tabela 1), pois convertem espécies pouco reativas em espécies mais reativas. Esta autooxidação dependerá da quantidade do íon metálico<sup>6</sup>.

Espécies pouco reativas	Metais	Espécies muito reativas
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Fe/Cu	$\text{HO}^\cdot$
$\text{H}_2\text{O}_2$		$\text{HO}^\cdot$
Peróxido lipídico (ROOH)		$\text{RO}^\cdot$ (alcoxila), $\text{RO}_2^\cdot$ (peroxila)
Tióis (RSH)		$\text{O}_2^{\cdot-}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{HO}^\cdot$
NAD(P)H		NAD(P) $^\cdot$ , $\text{O}_2^{\cdot-}$ , $\text{HO}^\cdot$

**Tabela 1:** Reações radicalares envolvendo Fe/Cu

A única técnica analítica capaz de medir diretamente os RL é a Ressonância de Spin Elétron (RSE). Como esta técnica é relativamente pouco sensível, é de valor limitado para uso *in vivo*.

A RSE pode ser usada para analisar amostras *in vivo* somente através da técnica da armadilha do spin. Isso envolve a adição à amostra de um composto conhecido como *spin trap*, que reage rapidamente com os RL para formar um composto muito estável e de vida mais longa que a espécie original, em concentrações mais fáceis de se detectar. Os *Spin traps* têm sido usados em cobaias para demonstrar a produção de RL *in vivo*<sup>7</sup>.

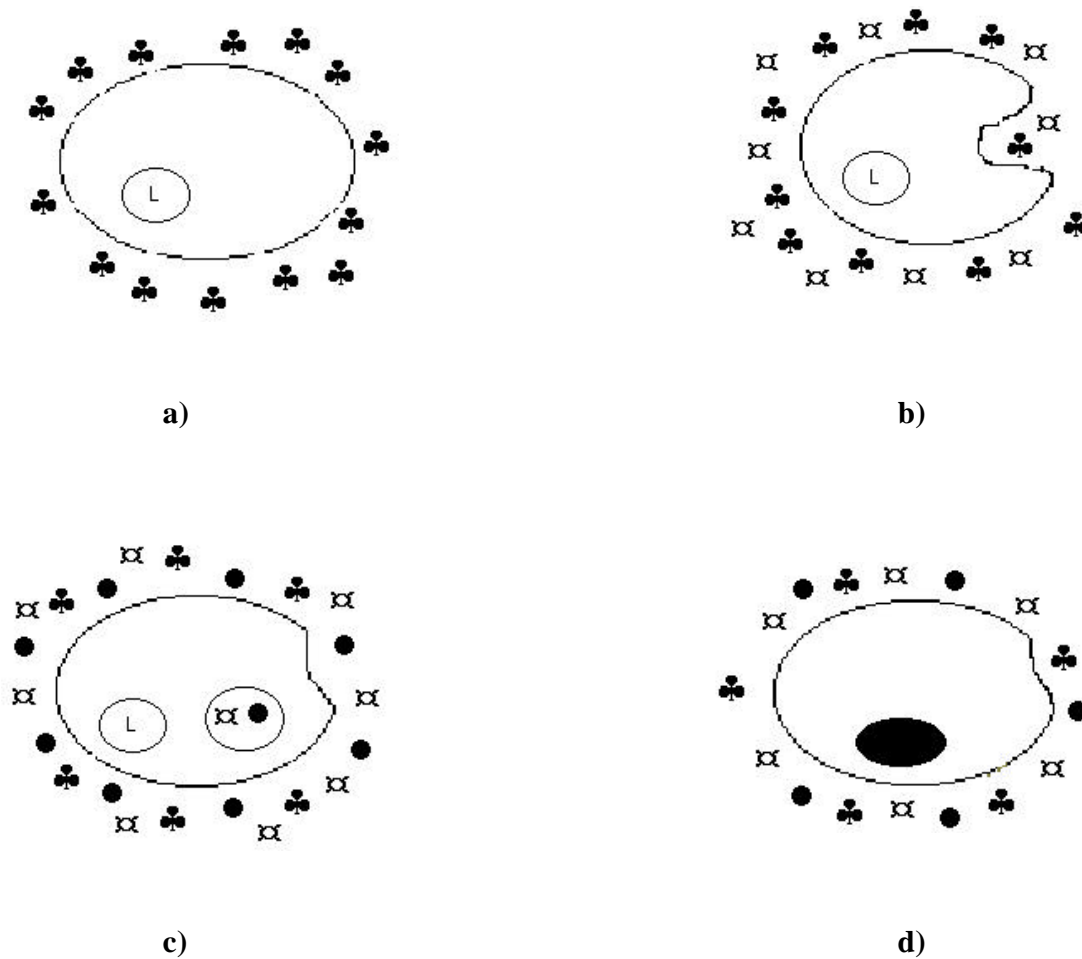
As espécies de oxigênio, reativas como são, não escolhem o tipo de molécula biológica que vão atacar. Podem causar perda ou alterações inclusive no DNA, onde se

armazenam informações para todos os eventos metabólicos.  $H_2O_2$  e  $O_2$  são efetivamente mutagênicos em bactérias, pois atacam o DNA, alterando-lhe a estrutura. Em relação às células de organismos superiores, os poucos dados existentes são ainda conflitantes, mas tendem a confirmar a capacidade mutagênica dessas espécies ativas de oxigênio<sup>5</sup>.

Geralmente a mutação causa danos ao organismo, mas é preciso distinguir duas condições: (1) pode ocorrer numa célula germinativa, que dará origem a um novo organismo; esta é uma situação especialmente perigosa, pois nesse caso a mutação será transmitida a todas as células do novo organismo; (2) pode ocorrer numa célula somática (qualquer célula não germinativa, como do cérebro, do fígado, da pele), caso em que, de maneira geral, não advirão conseqüências danosas, uma vez que a mutação ficará restrita a uma única célula ou a poucas que dela se originarem.

Estudos mostram<sup>3, 8</sup> que os RL estão envolvidos na causa de diversas patologias como, por exemplo: aterosclerose, catarata, câncer, inflamações cutâneas, mal de Parkinson, doença de Alzheimer, doenças cardíacas, depressão, hipertensão, artrite. É preciso destacar, no entanto, que a natureza soube aproveitar estas espécies para a própria proteção do organismo, pois quando a célula reconhece um ser estranho, RL são liberados para atacar o invasor (Figura 1), embora este mecanismo ainda seja um tanto quanto obscuro<sup>5</sup>.



**Figura 1:** Provável mecanismo de proteção do organismo por ERO.

♣: bactérias vivas

⊠: espécies ativas de oxigênio (EAO)

•: bactérias mortas

L: lisossomo

●: vacúolo digestivo

a) Os sinais químicos produzidos por uma infecção bacteriana atraem as células fagocitárias, criando o sítio inflamatório; b) há início de fagocitose, ao mesmo tempo em que se cria um estímulo para produção de ERO nas membranas da célula fagocitária; c) forma-se a vesícula fagocitária englobando a bactéria morta, outras bactérias também são mortas; d) a vesícula fagocitária funde-se ao lisossomo, cujas enzimas digerem a bactéria.

Houve nestes últimos anos um crescimento de conhecimento na área de RL, representando muitos investimentos em diversos setores como, por exemplo, na área médica; nas indústrias alimentícias para a preservação de alimentos e nas indústrias de cosméticos para a obtenção de produtos para combater o envelhecimento precoce causado por RL. Isso faz com que o uso de antioxidantes ou captadores de RL como princípios terapêuticos tenham aceitação crescente na comunidade científica<sup>1,2,8</sup>.

## 1.2- Antioxidantes

“Antioxidantes” podem ser definidos como substâncias que retardam ou previnem a oxidação de um determinado substrato, ou seja, inibem o processo de peroxidação lipídica, evitando a ação deletéria dos RL<sup>1,3,4</sup>. O termo substrato inclui quase tudo encontrado em células vivas, incluindo proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. Quando a defesa dos antioxidantes não é completamente eficiente, ocorrerá um aumento na formação de RL e este efeito é chamado de “estresse oxidativo”, que sendo severo, acarretará em lesões na célula e até mesmo em sua morte<sup>9</sup>.

Os antioxidantes podem ser divididos em duas amplas classes:

- i. **Biológicos:** São meios de defesa endógeno, produzido pelo próprio organismo. Dentro desta classe destacam-se os catalisadores biológicos - enzimas, como por exemplo, a superóxido dismutase (SOD) que converte o radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio:  $O_2^- \rightarrow H_2O_2$ ; a catalase que reduz o peróxido de hidrogênio formando água:  $H_2O_2 \rightarrow H_2O$  e glutathiona peroxidase que também reduz o peróxido

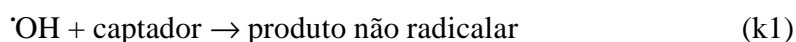
de hidrogênio em água e o hidroperóxido lipídico (ROOH) no correspondente álcool:



- ii. Não biológicos: São meios de defesa exógeno, e como o organismo não os produz, é necessário adquirí-los através da alimentação.

Para ser considerado como um bom antioxidante, deve responder a certos requisitos:

- Após a reação com o radical, deve gerar um produto incapaz de formar RL;
- A constante de velocidade (k) entre o captador de radicais e o radical deve ser maior do que aquela entre o radical e o substrato a ser protegido. Assim, teríamos,  $k_1 \gg k_2$



Um captador não é eficaz contra todos os radicais, há um grau de especificidade que se explica por certas incompatibilidades estéricas ou por diferenças de solubilidade: quando o radical é lipossolúvel e o elemento captador é hidrófilo. Assim, por exemplo, o ácido úrico é um elemento captador eficaz do radical hidroxila, porém fica sem ação nos radicais lipídicos que são  $\text{R}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$  e  $\text{ROO}\cdot$ <sup>10</sup>.

Dentro desta classe de antioxidantes não biológicos, destacam-se:

- Os carotenóides que são pigmentos, tais como o  $\beta$ - caroteno, presente nos tecidos fotossintéticos de vegetais e são adquiridos pelo organismo humano através da dieta, principalmente pela ingestão de frutas e legumes. Podem

atuar como inibidores de peroxidação lipídica, sendo sua ação bastante complexa<sup>1,11</sup>;

- Os bioflavonóides, que são substâncias químicas vegetais – fitoquímicos.

Estudos sugerem que os fitoquímicos podem ser usados como antioxidantes eficientes para melhorar a saúde humana e prevenir carcinogenesis e doenças cardiovasculares<sup>2</sup>;

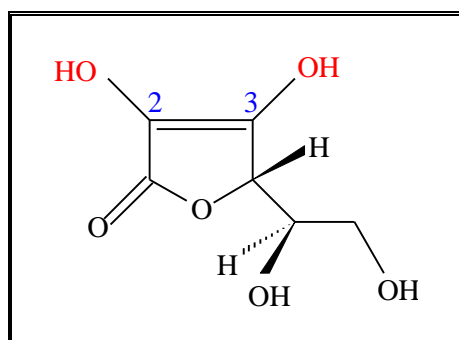
- As vitaminas de um modo geral.

O ácido ascórbico (vitamina C) e o tocoferol (vitamina E) têm recebido atenção no que tange aplicações clínicas e nutricionais em saúde humana.

### **1.2.1- Vitamina C**

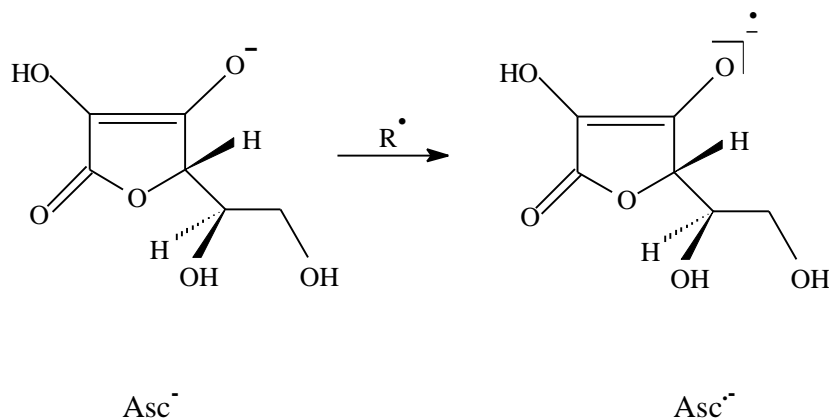
O ácido ascórbico é um poderoso antioxidante solúvel em água e está presente em diversas frutas e verduras<sup>11, 12</sup>. Esta característica antioxidante deve-se a estrutura enodiol (Figura 2) com forte habilidade em doar elétrons<sup>13</sup>, onde os grupos hidroxilas nas posições 2 e 3 são classificados como “pontos críticos” para uma favorável atividade antioxidante. Dessa forma, faz-se necessário que estas hidroxilas estejam livres de substituição.

Existe considerável evidência que a vitamina C é importante na prevenção de um grande número de doenças crônicas, tais como, câncer, diabetes, infarte do miocárdio, e AIDS<sup>8, 13</sup>.



**Figura 2:** Ácido Ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico, que numa situação *in vivo* geralmente se encontra como monoânion ( $\text{Asc}^-$ ) é bastante eficiente em reações com RL, pois resulta em radical semidehidroascorbato ( $\text{Asc}^{\cdot-}$ ) que é pouco reativo (Esquema 2).



**Esquema 2:** Formação do radical  $\text{Asc}^{\cdot-}$  a partir do  $\text{Asc}^-$ .

Sistemas enzimáticos, existentes *in vivo*, reduzem o  $\text{Asc}^{\cdot-}$  para o ascorbato ( $\text{Asc}^-$ ), com isso a vitamina C por sua vez também pode ser regenerada.

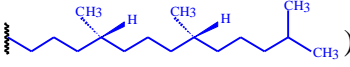
### 1.2.2- Vitamina E

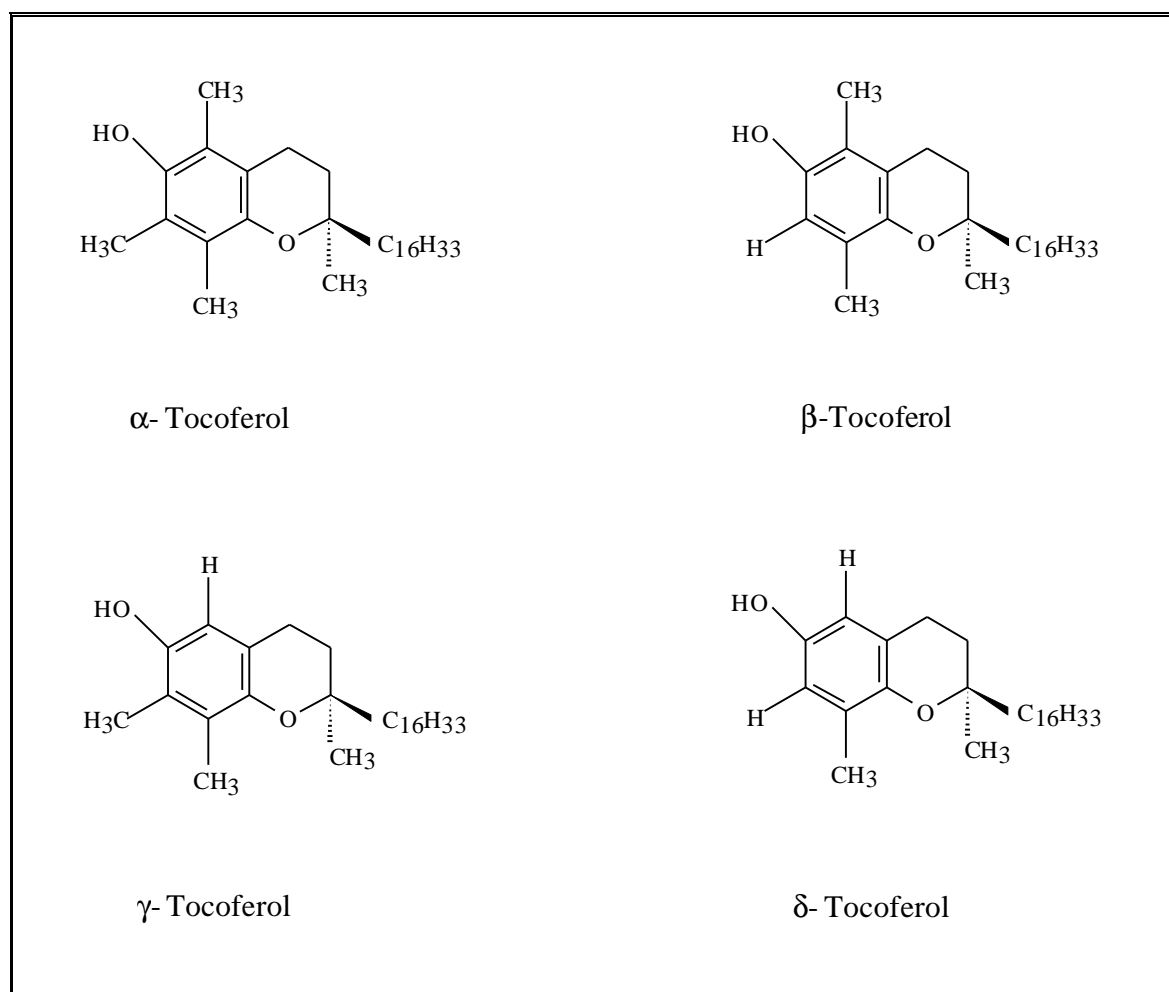
Apesar do amplo emprego industrial de antioxidantes em áreas de medicina, cosmética, alimentícia e até agricultura, os tocoferóis (Toc-OH) (Figura 3) continuam sendo os mais eficazes de que quase todos os antioxidantes disponíveis comercialmente<sup>14-17</sup>.

São eficientes inibidores de peroxidação lipídica e a captura de RL tais como,  $\text{ROO}^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$  e  $^\cdot\text{OH}$ , é atribuída à reação inicial do grupo hidroxila fenólico com a produção do radical tocoferoxila ( $\text{Toc-O}^\cdot$ ), que é estabilizado por ressonância<sup>4, 18-20</sup>:



A atividade antioxidativa dos tocoferóis aumenta de acordo com o número de substituintes metila na posição orto à hidroxila fenólica, levando à interpretação de que esta atividade depende do caráter doador total de elétrons destas metilas. Por outro lado, substituintes retiradores de elétrons retardam a atividade de fenóis antioxidativos. O  $\alpha$ -tocoferol é o componente biologicamente mais ativo da vitamina E e um dos mais potentes antioxidantes fenólicos naturais conhecidos. A ordem de atividade antioxidativa dos tocoferóis é  $\alpha > \beta \approx \gamma > \delta$ , refletindo fielmente a ordem decrescente de substituição metílica nessas substâncias<sup>15, 16, 21</sup>.

A cadeia lateral fitílica ( $\text{R} = (\text{C}_{16}\text{H}_{33})$ )  é necessária para a atividade biológica, porque seu caráter lipofílico permite a penetração do tocoferol nas membranas celulares.



**Figura 3:** Classificação dos Tocoferóis (Vitamina E).

Existem outros fatores, a considerar, que estão envolvidos na eficiência dos tocoferóis em capturar espécies radicalares, dentre eles: i) a constante de velocidade ( $k$ ) da reação do tocoferol com um determinado radical; ii) e o ângulo diedro ( $\theta$ ) formado entre o plano do anel aromático e a ligação O-C<sub>2</sub> (Figura 4, pg.15).

**i) Constante de velocidade k:**

Em uma dada reação de captura de RL por tocoferol (Toc-OH), quanto maior o valor de k, maior será a atividade antioxidativa do Toc-OH em sistemas biológicos.

Nestas reações tem-se a rápida formação do radical tocoferoxila (Toc-O<sup>•</sup>) que é estabilizado por ressonância e geralmente não continua a reação em cadeia, sendo eventualmente destruído por reação com um determinado radical, originando um produto molecular<sup>4,22</sup>.



A reação do  $\alpha$  - tocoferol com radicais livres possui um valor de k maior do que os outros componentes da vitamina E (Tabela 2), sendo portanto o mais eficiente para capturar espécies radicalares<sup>22</sup>.

Fenol	k ( $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
$\alpha$ -Toc-OH	320
$\beta$ -Toc-OH	130
$\delta$ -Toc-OH	140
$\gamma$ -Toc-OH	44

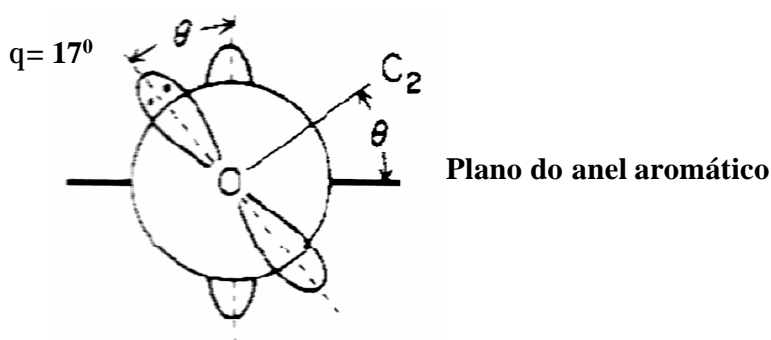
**Tabela 2:** Valores de k a 30<sup>0</sup> C para tocoferóis



**ii) Ângulo diedro  $q$ :**

É um fator importante no que diz respeito à eficiência antioxidativa dos tocoferóis. Na figura 4, observa-se que o anel contendo o “oxigênio do grupo éter” adota a conformação cadeira, de tal forma que  $\theta = 17^\circ$ , com isso o par de elétron isolado deste oxigênio pode sobrepor-se com o orbital do radical fenoxila que contém elétrons desemparelhados, estabilizando-o<sup>23</sup>.

Esta estabilização será máxima para  $\theta = 0^\circ$  e mínima quando  $\theta = 90^\circ$ <sup>4, 22</sup>.



**Figura 4:** Valor do  $\theta$  para o  $\alpha$ -Tocoferol.

Portanto, a atividade antioxidante dos tocoferóis será máxima para um valor de  $k$  grande e  $q$  pequeno.

São conhecidas na literatura<sup>24, 25</sup> atividades complementares entre os antioxidantes naturais ácido ascórbico e  $\alpha$ - tocoferol, embora apresentem estruturas diferentes entre si e atuem em regiões distintas no interior do organismo, onde o ácido ascórbico tende a permanecer no meio extracelular enquanto que o  $\alpha$ - tocoferol no meio intracelular.

Acredita-se que o radical Toc-O<sup>·</sup> precisa do ácido ascórbico como coadjuvante sinérgico para ser regenerado em Toc-OH e poder continuar a sua ação como captador de RL e que o ácido ascórbico, por ele mesmo, não evita o processo de peroxidação lipídica<sup>25, 26</sup>.

A conversão do radical estabilizado tocoferoxila (Toc-O<sup>·</sup>) em tocoferol (Toc-OH) deve-se ao fato de que este radical formado dentro da camada lipídica sobe até a superfície da membrana, onde é interceptado por uma molécula de ácido ascórbico, que se encontra no meio aquoso extracelular<sup>25</sup>. Essa interação ocorre na interface entre o ambiente lipofílico da membrana celular (contendo o  $\alpha$ - tocoferol lipofílico) e o ambiente hidrofílico da fase extracelular aquosa (contendo o ácido ascórbico)<sup>27</sup> e assim é regenerada a vitamina E através de redução, com formação concomitante do radical semidehidroascorbato (Asc<sup>·-</sup>).

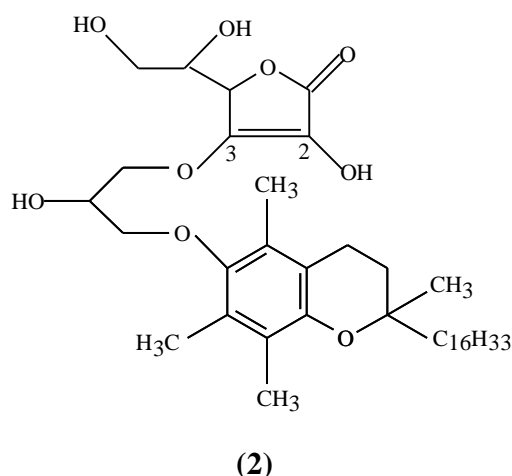
Considerando essa sinergismo que há entre o tocoferol e ascorbato, é possível termos um agente antioxidante que reúna numa só substância as reconhecidas propriedades destes antioxidantes naturais. Esta molécula “híbrida” que contém uma unidade tocoferol que captura RL e uma unidade ascorbato que regenera o  $\alpha$ - tocoferol é denominada de *Captador Autoregenerável de Radicais Livres (CARL)*.

### 1.3- Captadores Autoregeneráveis de Radicais Livres (CARL)

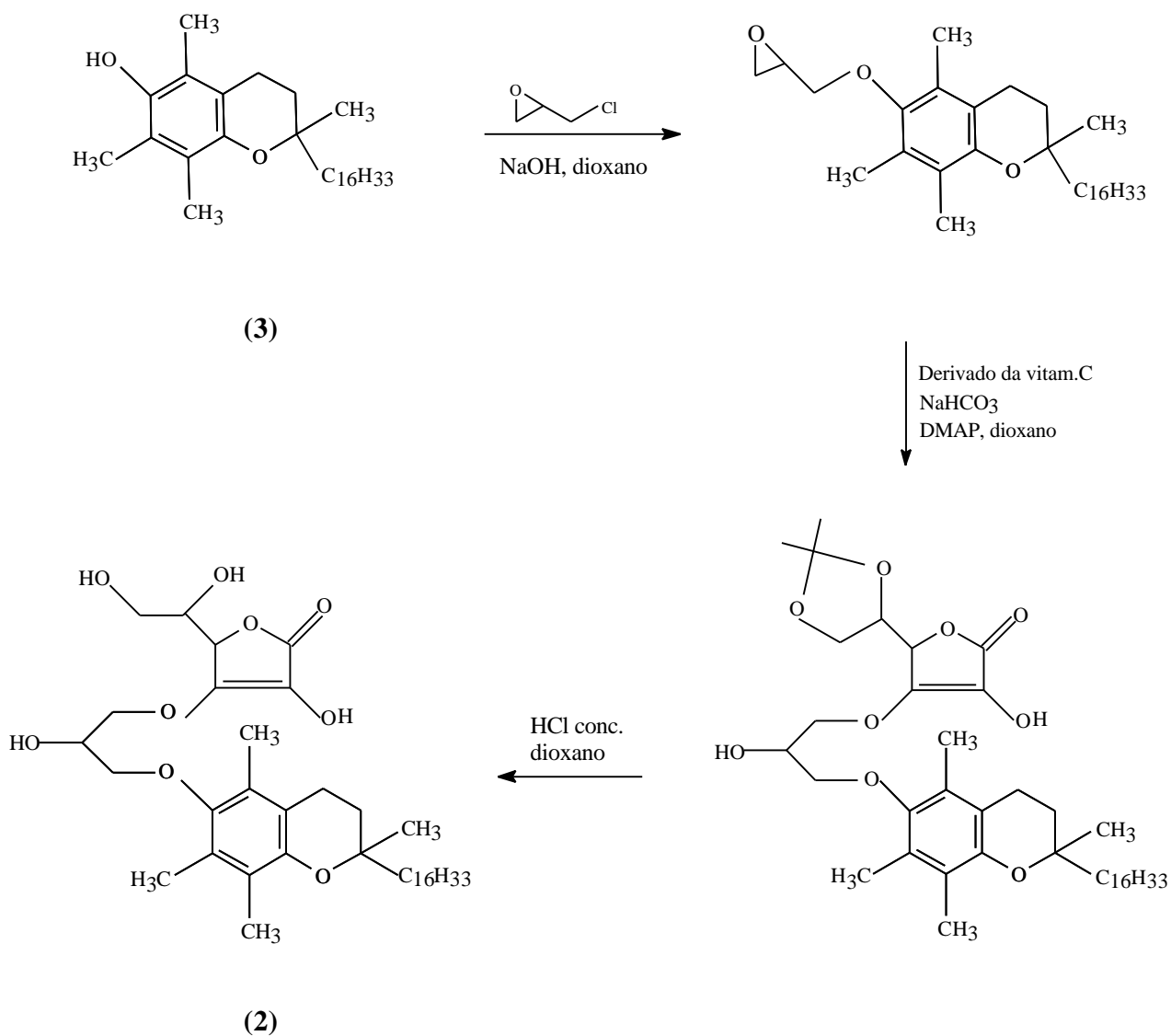
A literatura descreve poucos casos em que se tentou especificamente unir as atividades do ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol, reunindo estas duas moléculas em uma só molécula híbrida. Os compostos que já foram sintetizados são mostrados a seguir:

O derivado lipofílico (**2**) sintetizado por Morizaki<sup>13</sup>, possui a hidroxila 3 do ascorbato e a hidroxila fenólica substituídas (Figura 5). Este derivado foi obtido com rendimento global de 51% (Esquema 3) e apresentou maior estabilidade térmica em relação as vitamina C e E, pois estudos mostraram que 80% do composto lipofílico permaneceu intacto após três meses a uma temperatura de 60°C.

Este híbrido apresentou baixa capacidade em capturar espécies radicalares, sendo justificado pelo fato da mascarar o grupo 3-hidroxila da vitamina C e o grupo 6-hidroxila da vitamina E.



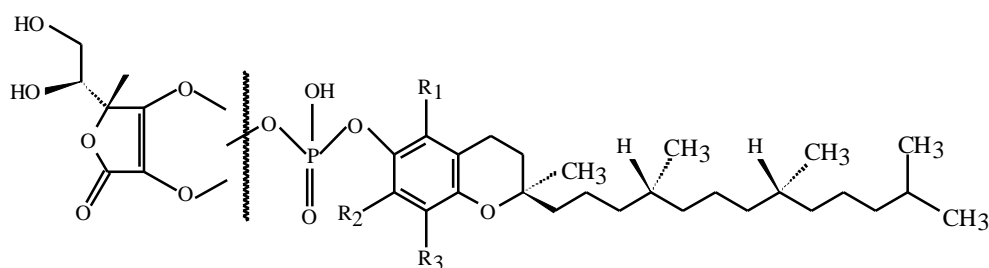
**Figura 5:** 3- O- [( $\alpha$ - tocoferyloxy)- 2- hidroxipropil]- L- ácido ascórbico (**2**).



**Esquema 3:** Síntese de 3-O-[( $\alpha$ - tocoferyloxy)- 2- hidroxipropil]- L- ácido ascórbico (2).

Híbridos do tipo (4) do ácido ascórbico com  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, e  $\gamma$ -tocoferóis ligados através de um diéster fosfórico (Figura 6) foram sintetizados pela firma japonesa “*Senjo Pharmaceuticals*”. Esses compostos, assim como o descrito anteriormente, encontram o sistema 2,3-enodiol do ascorbato e a hidroxila fenólica dos tocoferóis ligados.

Foram alegadas atividades profilática e terapêutica em indicações de cataratas, assim como ingrediente para “embelezar a pele” quando empregado em cosméticos.



**R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H ou Me**

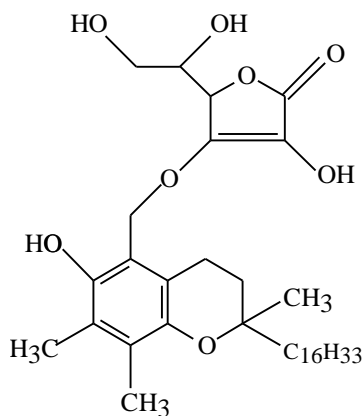
**(4)**

**Figura 6:** Híbrido produzido por “*Senjo Pharmaceuticals*”

A molécula híbrida (5) sintetizada por Rosenau<sup>28</sup> é diferente das anteriores possuindo a hidroxila fenólica da unidade tocoferol livre de substituição (Figura 7). Este híbrido foi obtido a partir do 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol e ascorbato de sódio, com um rendimento global de 63% (Esquema 4). O composto não é estável em condições básicas, pois ocorre a desprotonação imediata da hidroxila fenólica, eliminando o ascorbato como ânion. O procedimento experimental foi otimizado misturando ascorbato de sódio com excesso de

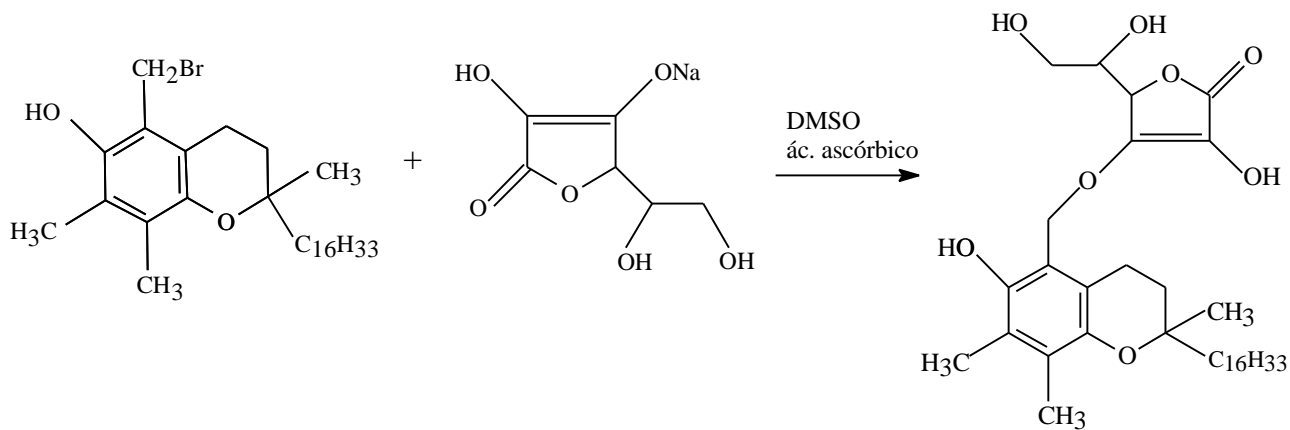
ácido ascórbico para evitar condições básicas. A reação procedeu com rendimento de 85%.

Os autores não comentam as atividades antioxidantes do híbrido.



(5)

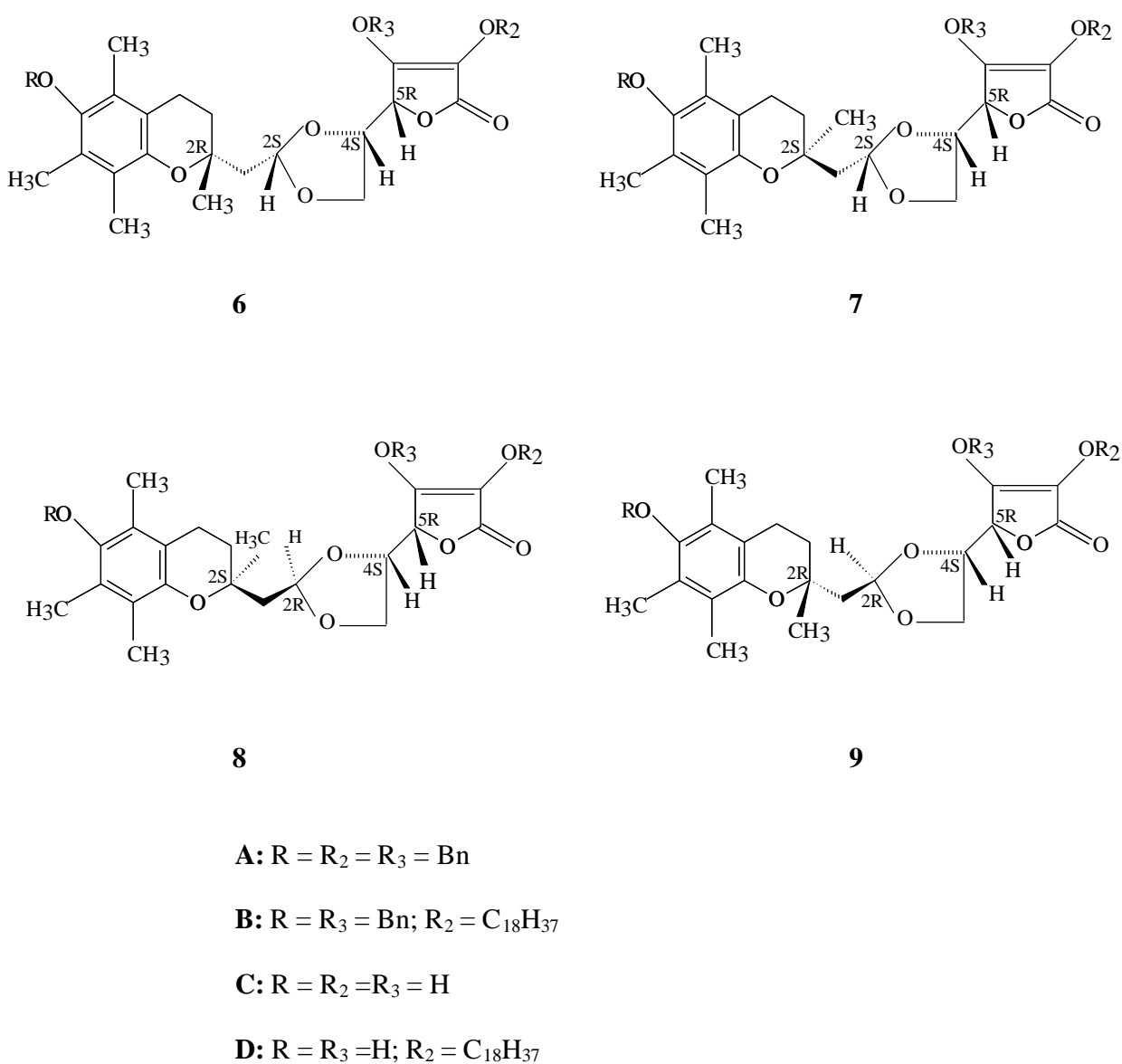
**Figura 7:** 5a- tocoferil ascorbato (5).



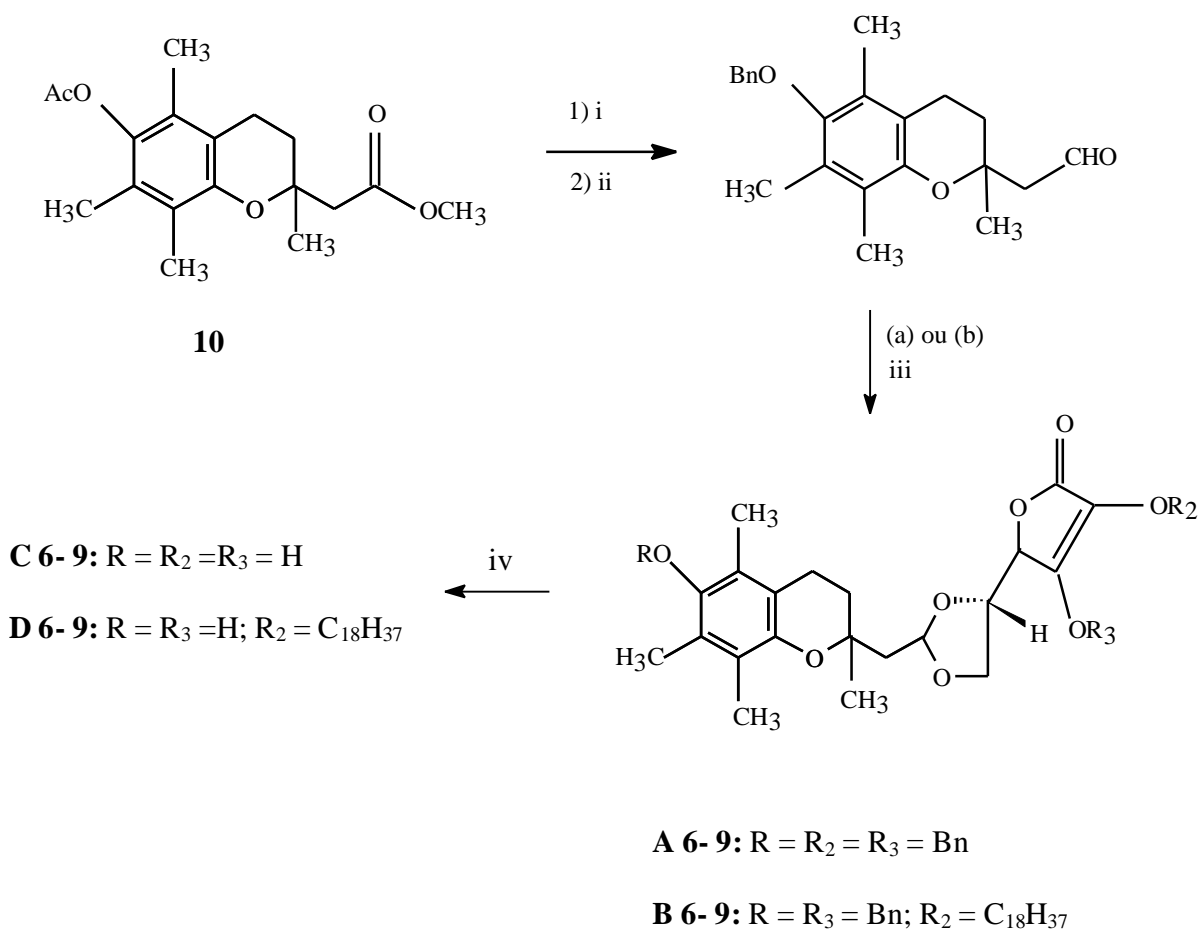
(5)

**Esquema 4:** Síntese de 5a- tocoferil ascorbato (5).

Os dezesseis híbridos sintetizados por Manfredini<sup>26</sup> (Figura 8), não apresentam precisamente a unidade  $\alpha$ -tocoferol, mas sim um derivado fenólico, que é ligado diretamente ao derivado do ácido ascórbico, de acordo com o esquema 5.



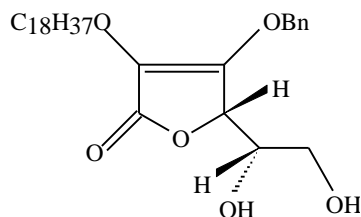
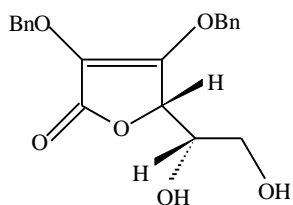
**Figura 8:** Configuração absoluta do centro estereoquímico dos dezesseis híbridos.



i) DIBAL-H, hexano, -70°C

ii) brometo de benzila, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 25°C

iii) TsOH, tolueno, refluxo

iv) H<sub>2</sub>, Pd/C, AcOEt, 25°C**Esquema 5:** Síntese dos compostos A 6-9 a D 6-9.



Estes compostos híbridos foram utilizados com a finalidade de inibir radicais peroxila formados a partir da lipoperoxidação de membranas microsossomais em fígados de ratos.

A peroxidação lipídica nestas membranas foi iniciada por 2,2'-azobis (2-amidinopropano)-dehidrocloro (AAPH), produzindo radicais peroxila por decomposição térmica e sendo observada através da formação de malondialdeído (MDA). Estas reações foram conduzidas a uma temperatura de 37°C com 25 mM de AAPH durante 15 minutos<sup>26</sup>.

Os resultados mostraram que os derivados **C 6-9**, que são uma combinação molecular entre o análogo do  $\alpha$ - tocoferol e ácido ascórbico, exibiram maior eficiência antioxidante ( $IC_{50}$ <sup>1</sup> 12 e 7 $\mu$ M), no que se refere a inibição da produção de MDA induzida por AAPH, do que os antioxidantes naturais,  $\alpha$ - tocoferol ( $IC_{50}$  37 $\mu$ M) e ácido ascórbico ( $IC_{50}$  14 $\mu$ M). Os derivados **D 6- 9** não se mostraram eficientes no que diz respeito a propriedades antioxidantes, devido a posição 2 do resíduo ascorbil não estar livre de substituição.

Observa-se com isso que os poucos híbridos existentes encontram-se com a unidade tocoferol (hidroxila fenólica) e/ou a unidade ascorbato (sistema 2,3- enodiol) substituídas, unidades estas responsáveis pela a atividade antioxidante.

---

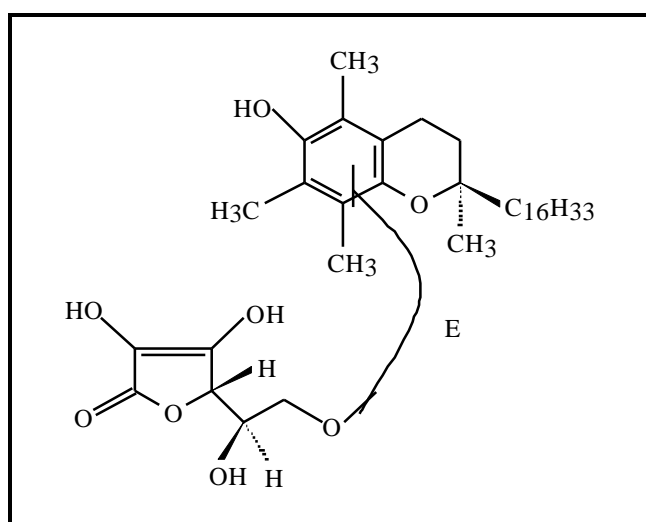
<sup>1</sup>  $IC_{50}$ : Concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo.

## CAPÍTULO 2- OBJETIVO

*“A fé é um guia mais seguro que a razão.  
A razão só pode ir até certo ponto, mas a fé não tem limites.”*

Blaise Pascoal

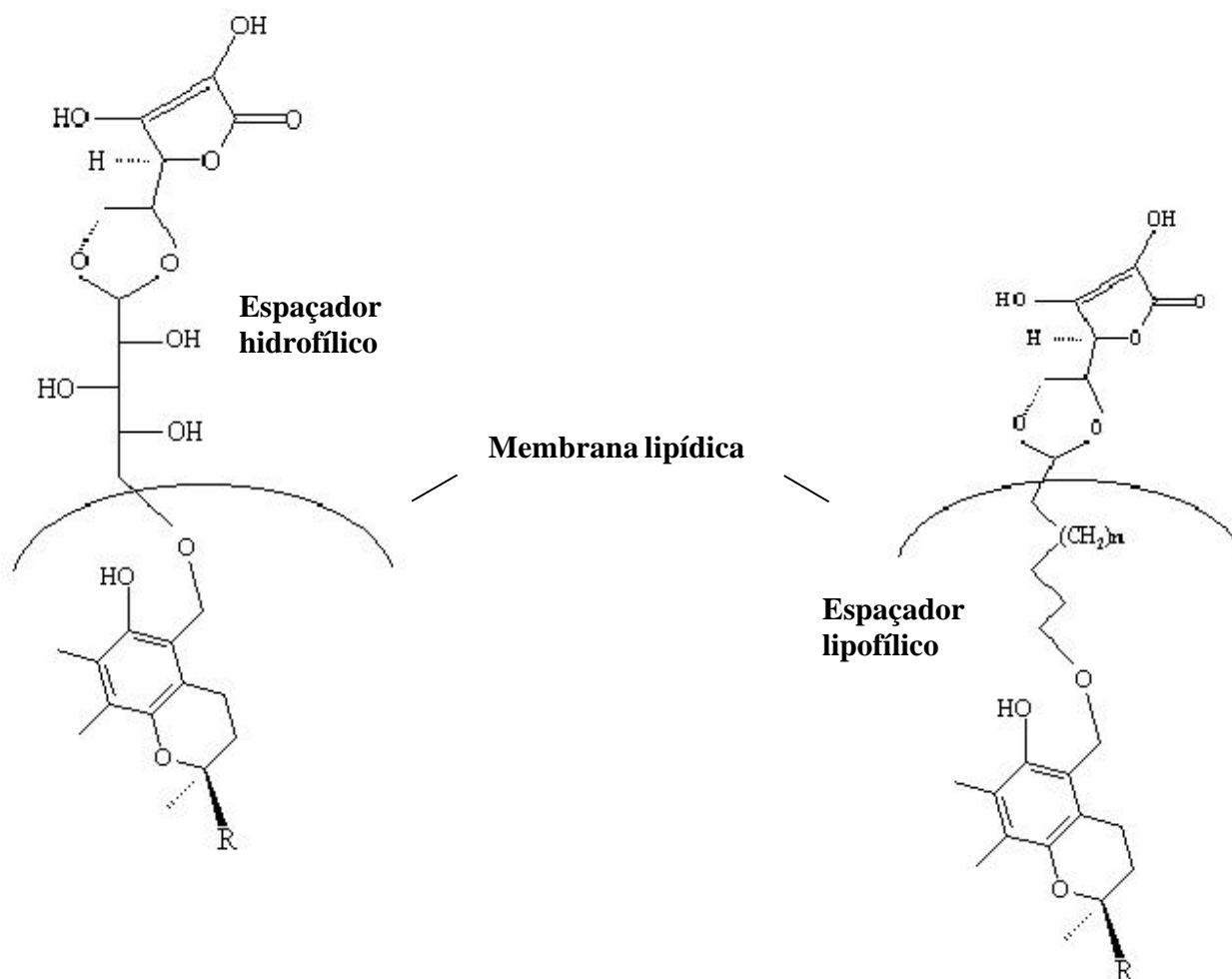
Com o intuito de obter uma molécula híbrida com alto poder antioxidante e diferente das até então existentes, elaborou-se estudos modelos visando a síntese de um *Captador Autoregenerável de Radicais Livres* (CARL) onde a hidroxila fenólica e o sistema 2,3-enodiol do ascorbato estão livres de substituição e que as unidades ascorbato e tocoferol encontram-se ligadas por um determinado espaçador (E) (Figura 9).



**Figura 9:** CARL com unidades tocoferol e ascorbato unidas por um espaçador (E).

A escolha do espaçador permite a variação da distância entre tocoferol e ascorbato. Presume-se que, quanto maior o espaçador, maior será a flexibilidade do híbrido, facilitando a sua penetração numa camada bilipídica celular. As características físico-químicas do espaçador podem influenciar o comportamento do próprio híbrido. Dessa forma, um espaçador “lipofílico” possivelmente permitiria uma inserção mais profunda do

CARL numa membrana lipídica, enquanto que um espaçador “hidrofílico” não entraria na membrana, segurando assim a cabeça fenólica do tocoferol perto da superfície (Figura 10).



**Figura 10:** Possível rearranjo numa membrana celular da molécula híbrida, com espaçadores hidrofílico e lipofílico.

A molécula híbrida proposta é inédita, já que nenhum híbrido existente até o momento apresenta tanto as unidades ascorbato e tocoferol unidas através de um espaçador, quanto a hidroxila fenólica da unidade tocoferol e o sistema 2,3-enodiol do ascorbato livres

de substituição, já que estas são as posições importantes para uma favorável atividade antioxidante.

Com isso, acredita-se que a nossa molécula híbrida deverá apresentar uma maior eficiência de capturar espécies reativas, quando comparada com os híbridos que estão descritos na literatura.

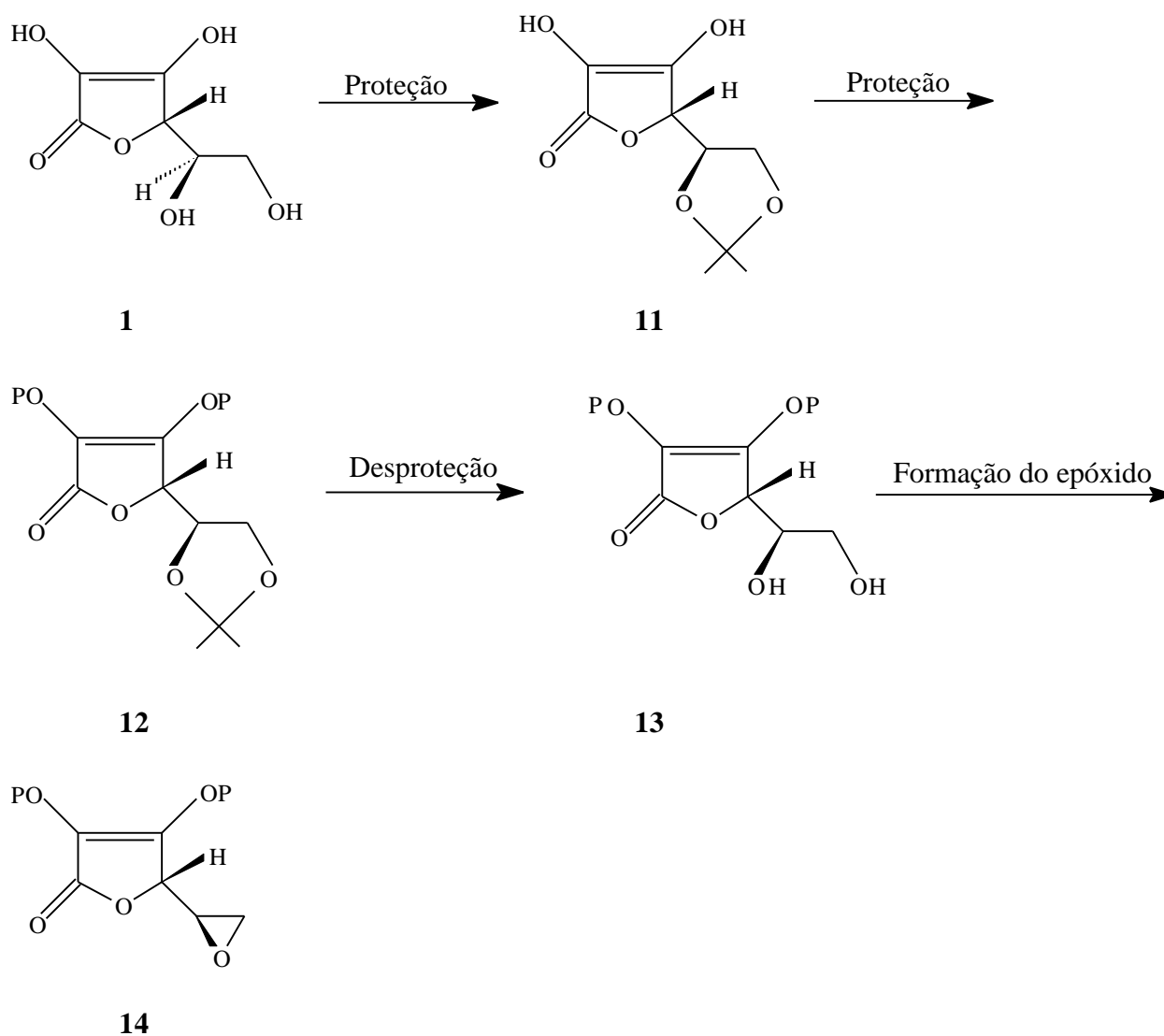
## CAPÍTULO 3- ESTRATÉGIA SINTÉTICA

*“O maior erro que um homem pode cometer, é viver com medo de cometer um erro.”*

Hebbard

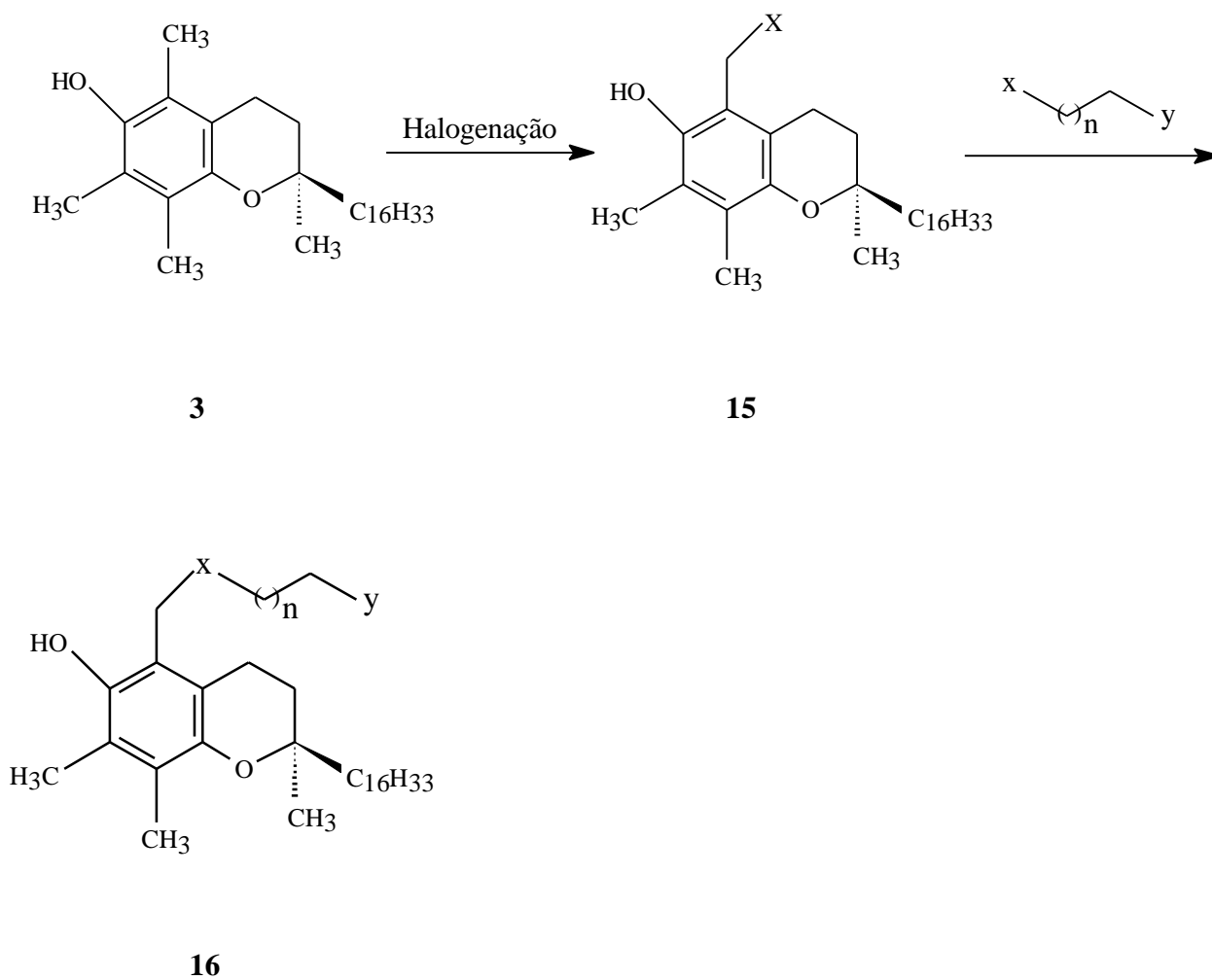
A síntese proposta para a obtenção do CARL é descrita da seguinte maneira:

A primeira parte consiste em sintetizar o 2,3-di-O-benzoil-5,6-epóxi-L-ácido ascórbico (**14**) partindo do ácido ascórbico (**1**) (Esquema 6).



**Esquema 6:** Síntese de 2,3-di-O-benzoil-5,6-epóxi-L-ácido ascórbico (**14**).

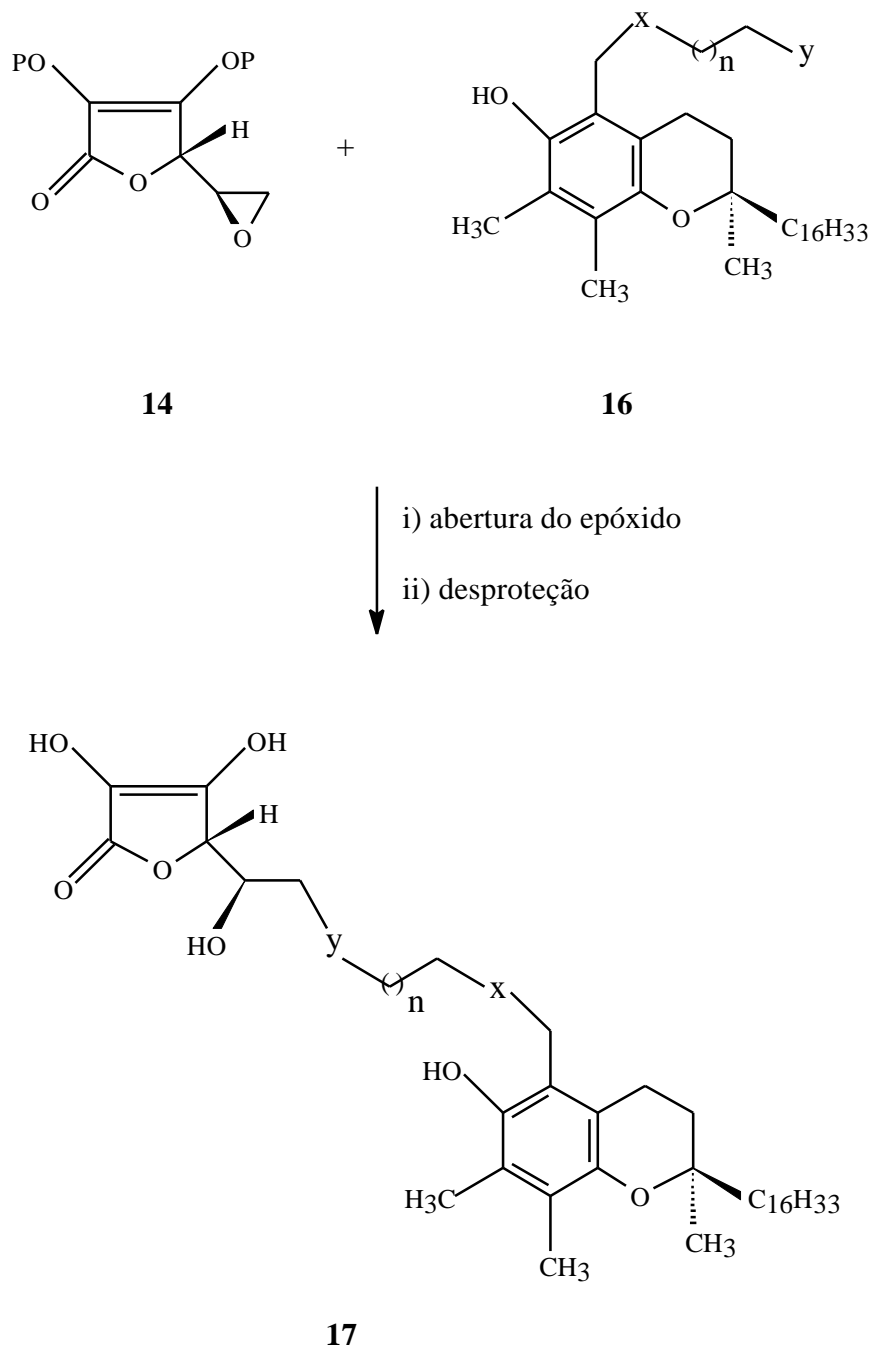
A segunda parte corresponde a síntese de 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**), tendo como material de partida o  $\alpha$ -tocoferol (**3**). Em seguida, pretende-se fazer uma reação do composto (**15**) com um determinado espaçador, que pode ser uma diamina, etanolamina ou um diol, estando todos monoprotégidos (Esquema 7).



**Esquema 7:** Síntese de 5a (espaçador)- $\alpha$ -tocoferol (**16**).



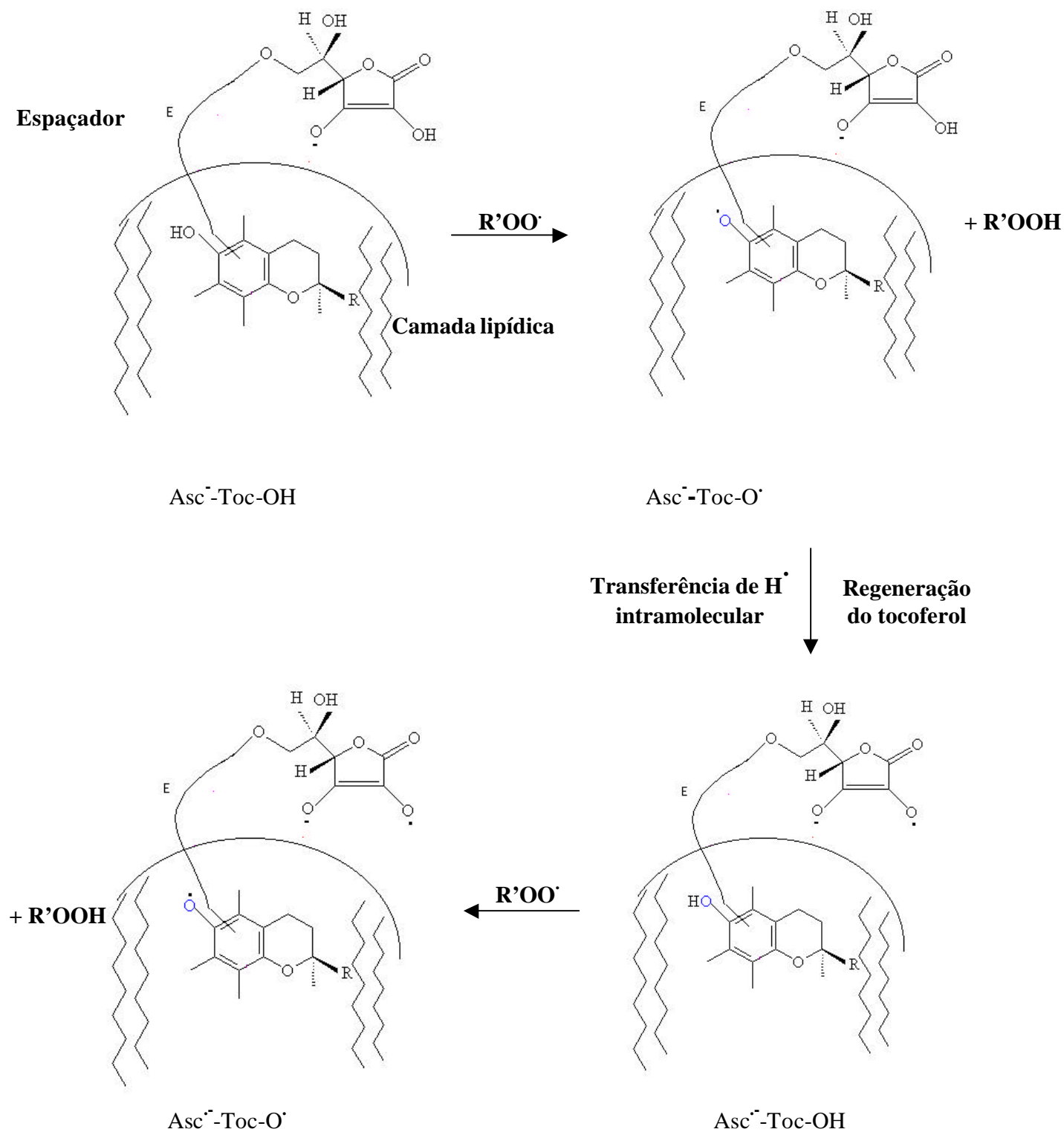
O último passo é unir os compostos (14) e (16), obtendo assim o CARL de interesse (17), (Esquema 8).



**Esquema 8:** Síntese de um provável CARL (17).

Um possível mecanismo de ação de captura de RL pelas cogitadas moléculas híbridas, leva em consideração as propriedades individuais do  $\alpha$ -tocoferol e do ácido ascórbico, ou seja, o fato que a hidroxila fenólica da unidade tocoferol e o sistema 2,3-enodiol do ascorbato encontram-se livres de substituição. Tal mecanismo consiste em quatro passos principais (Figura 11).

- 1) Inserção da unidade tocoferol numa membrana biológica, devido ao caráter lipofílico da cadeia lateral fitílica (R). O monoânion ascorbato ( $\text{Asc}^-$ ) estende-se no meio extracelular;
- 2) A unidade tocoferol, que estaria na camada lipídica, capturaria um radical livre, formando o radical Ascorbato- Tocoferoxila ( $\text{Asc}^-$ -Toc-O $\cdot$ );
- 3) O ascorbato reduz o radical Toc-O $\cdot$  de volta em termos de oxidação ao tocoferol (Toc-OH), numa reação intramolecular rápida e energeticamente favorável:  $\text{AscH}^- + \text{Toc-O}\cdot \rightarrow \text{Asc}^- + \text{Toc-OH}$ , formando o radical semidehidroascorbato- tocoferol ( $\text{Asc}^{\cdot-}$ -Toc-OH);
- 4) O tocoferol, por sua vez, tendo sido regenerado pelo ascorbato, estaria novamente em condições de agir como captador de radical livre e formaria um diradical estabilizado semidehidroascorbato- tocoferoxila ( $\text{Asc}^{\cdot-}$ -Toc-O $\cdot$ ).



**Figura 11:** Suposto mecanismo de ação dos CARLs.

A reconversão enzimática de qualquer unidade radicalar  $\text{Asc}^{\cdot-}$ -Toc-OH e/ou  $\text{Asc}^{\cdot-}$ -Toc-O $\cdot$  aos ascorbatos ( $\text{AscH}^-$ ) completaria o ciclo regenerativo do CARL.

Além da dependência de enzimas, tem-se a possibilidade dessa reconversão ser promovida por biomoléculas endógenas como o ácido lipóico e o ácido úrico, o primeiro é conhecido por sua habilidade de regenerar outros antioxidantes endógenos. Numa situação *in vivo* o próprio ácido ascórbico extracelular e livre pode regenerar o ascorbato nos CARLs.

A detecção do  $\text{Asc}^{\cdot-}$ , através de ensaios envolvendo 2,4-dinitrofenilhidrazina, ao tratar um CARL com RL, seria uma indicação da atividade antioxidativa, já que o  $\text{Asc}^{\cdot-}$  só seria formado se a unidade  $\text{AscH}^-$  reagisse com um radical Toc-O $\cdot$ .

## CAPÍTULO 4- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

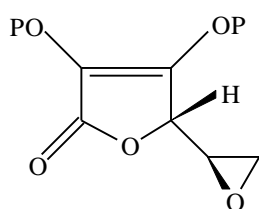
*“Os momentos mais difíceis são os nossos melhores professores.”*

Autor desconhecido

Com o intuito de obter a molécula híbrida de interesse, que apresenta a hidroxila fenólica e o sistema 2,3-enodiol do ascorbato livre de substituição, a síntese desenvolvida neste projeto foi dividida em etapas de reações realizadas nos dois sistemas diferentes: i) L-ácido ascórbico, ii)  $\alpha$ -tocoferol.

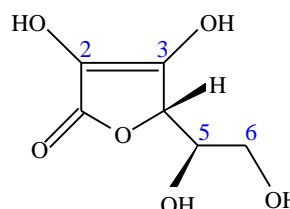
#### 4.1- Reações com L-ácido ascórbico

De acordo com a estratégia de síntese, é necessário obter o composto 2,3-di-O-benzoil-5,6-epóxi-L-ácido ascórbico (**14**), tendo como material de partida o ácido ascórbico (**1**).



P= grupo protetor

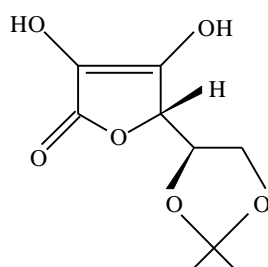
**14**



**1**

No ácido ascórbico (**1**), tem-se as hidroxilas 5 e 6 que são mais reativas como nucleófilos do que as hidroxilas 2 e 3. Esta diferença de reatividade impossibilitaria a proteção das hidroxilas 2 e 3 através de uma reação direta, sendo necessário efetuar uma prévia proteção das hidroxilas mais reativas (5 e 6).

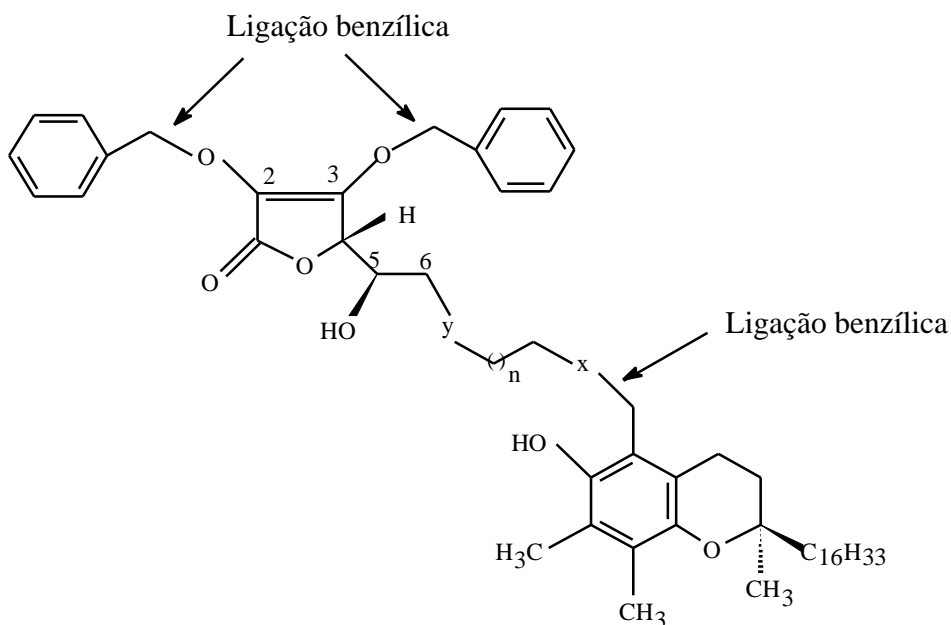
Como se dispõe do composto 5,6-O-isopropilideno cetal (**11**), onde as hidroxilas reativas 5 e 6 encontram-se protegidas com o isopropilideno cetal, optou-se por iniciar a síntese a partir deste composto (**11**), reduzindo assim, em uma etapa, a síntese proposta.



11

A escolha do grupo protetor das hidroxilas 2 e 3 é importante, pois a desproteção deste grupo será a última etapa da síntese proposta.

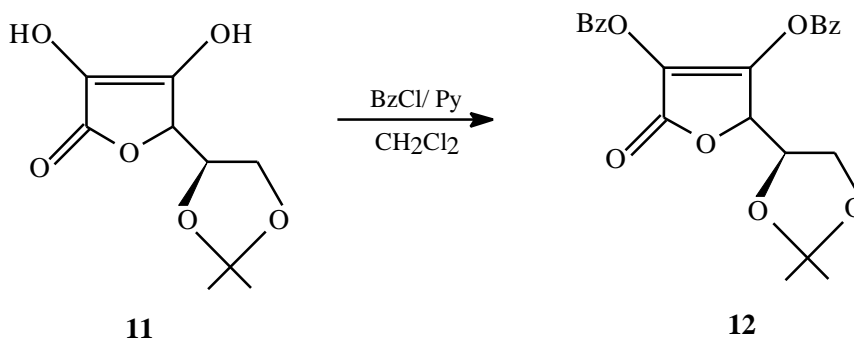
A proteção com o grupo benzila, bastante utilizado em trabalhos com ácido ascórbico, não seria adequada na nossa proposta de síntese, já que a sua remoção poderia levar a clivagem da ligação benzílica entre o espaçador e uma unidade de tocoferol eventualmente introduzida (Figura 12).



**Figura 12:** Híbrido do ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol.

Dessa maneira, utilizou-se as condições empregadas por Souza<sup>29</sup>, onde a proteção das hidroxilas 2 e 3 do L-ácido ascórbico foi realizada de acordo com o esquema 9. Isolou-se o produto por cromatografia em 78% de rendimento e a caracterizou-se sua formação pelos sinais no espectro de RMN <sup>1</sup>H : (δ) 8,15-8,05; 7,69-7,60 e 7,51-7,44 ppm, correspondentes a prótons aromáticos, sendo possível também observar a presença de duas novas bandas de deformação axial (ν) no espectro de IV na faixa de 1700- 1790 cm<sup>-1</sup> que corresponde a uma região característica de grupos carbonilas.

Estes novos sinais e bandas confirmam a presença dos grupos benzoílas.



**Esquema 9:** Proteção das hidroxilas 2 e 3 do L-ácido ascórbico.

A próxima etapa consiste na hidrólise do composto (12) ao composto 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico (13) para desproteger as hidroxilas 5 e 6. Apesar desta hidrólise estar descrita na literatura<sup>30</sup>, testou-se várias condições, tais como: HCl (conc.) em THF, etileno glicol e ácido p-toluenosulfônico, solução aquosa de HCl (2M) em THF, solução aquosa de HCl (1M) em THF e uma solução aquosa de ácido acético (80%).

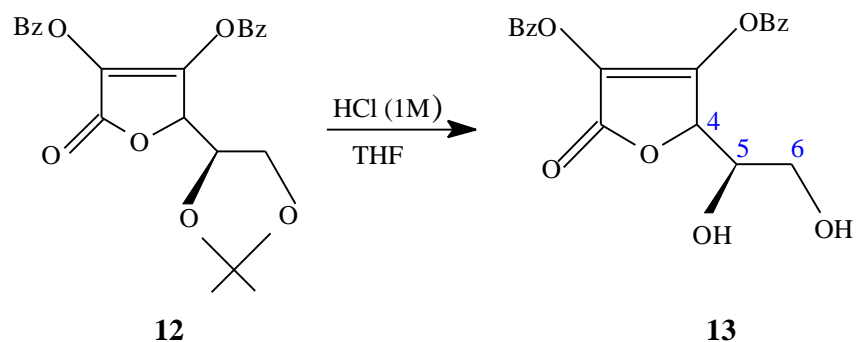


Com a utilização de HCl concentrado em THF como solvente, observou-se uma decomposição do material. Conseqüentemente optou-se para condições mais brandas, como as descritas acima.

Obteve-se apenas material de partida com a utilização do etileno glicol e ácido p-toluenosulfônico. Observou-se o produto desejado utilizando as condições de solução aquosa de HCl (2M) em THF, solução aquosa de HCl (1M) em THF ou solução aquosa de ácido acético (80%), obteve-se os melhores rendimentos com solução aquosa de HCl (1M) em THF como solvente (Esquema 10), sendo isolado o diol (**13**) após a recristalização em 58%.

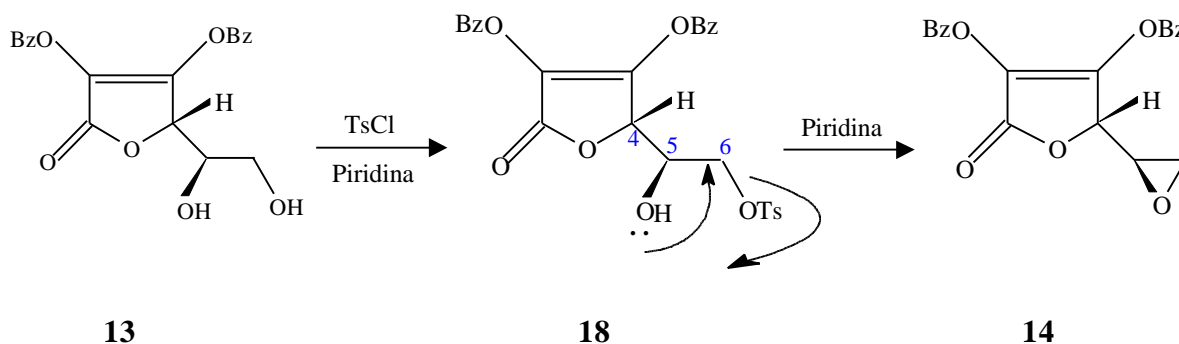
Caracterizou-se a formação de **13** pelos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\delta$ ) 8,10- 8,05 e 7,79- 7,53 ppm referentes aos prótons aromáticos do grupo benzoíla, 5,18 e 4,26 ppm que correspondem aos prótons nas posições 4 e 5 respectivamente, sendo menos desblindados do que os prótons dessas mesmas posições do composto **12** e um multiplete na região de 4,66-4,34 ppm referentes aos prótons da posição 5, sendo possível também observar a inexistência dos sinais do tipo singleto em 1,42 e 1,37 ppm referentes aos grupos metilas do composto **12**, indicando a ocorrência da desproteção das hidroxilas 5 e 6.

A análise de IV também apresentou banda de formação axial ( $\nu$ ) em  $3442\text{ cm}^{-1}$  referente aos grupos -OH.



**Esquema 10:** Reação de hidrólise do composto (12).

A formação do composto 2,3-di-O-Benzoil-5,6-epóxi-L-ácido ascórbico (14), a partir do composto (13) em diclorometano seco com cloreto de tosila e piridina, teve como intermediário o 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (18) (Esquema 11).



**Esquema 11:** Obtenção do 2,3-di-O-Benzoil-5,6-epóxi-L-ácido ascórbico (14).

Testou-se diversas condições alterando a quantidade de piridina e tempo de reação. Após muitos ensaios observou-se que era necessário um grande excesso de piridina (12 equivalentes), observando-se a formação de um único produto em 75% de rendimento. O

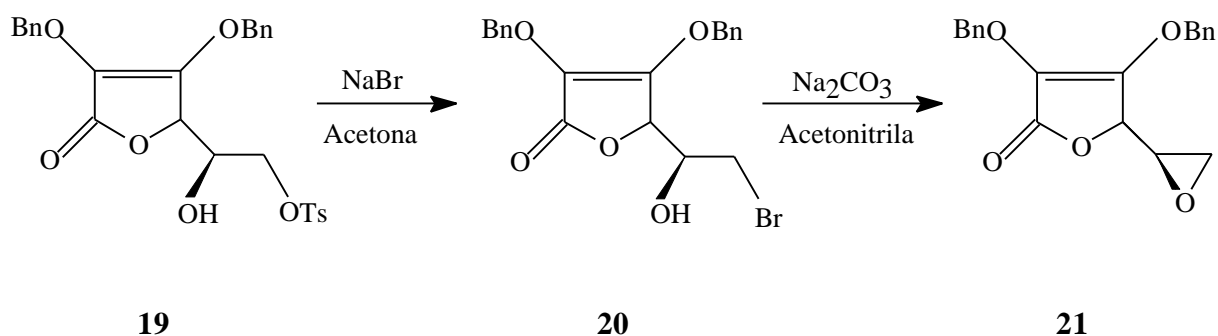
produto obtido mostrou ser o composto 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (**18**) e não o epóxido desejado (**14**).

Caracterizou-se a formação de **18** pelos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\delta$ ) 8,07; 7,95; 7,79; 7,68-7,58; 7,48 e 7,23 ppm referentes aos prótons aromáticos, 5,25 e 4,45 ppm que correspondem aos prótons nas posições 4 e 5 respectivamente, sendo mais desblindados do que os prótons dessas mesmas posições do composto **13** e ao sinal em 2,29 ppm que aparece como um singlete referente à metila do grupo tosil (Ts).

Confirmou-se também a formação de **18** através da presença das bandas de deformação axial ( $\nu$ ) no espectro de IV em  $3460$  e  $1119\text{ cm}^{-1}$  que indicam respectivamente a presença dos grupos hidroxila (-OH) e sulfônico (-SO<sub>2</sub>).

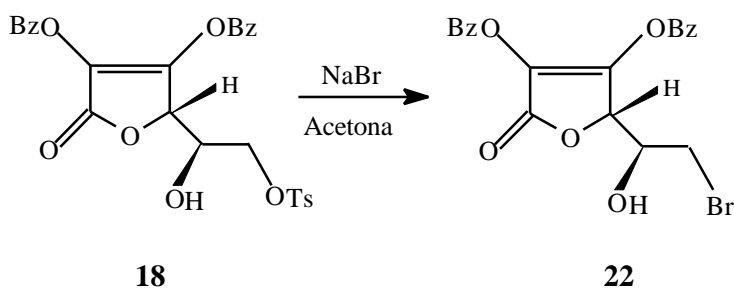
Raic- Malic<sup>31</sup> sintetizou o 2,3-di-O-benzil-5,6-epóxi-L-ácido ascórbico (**21**) em duas etapas, de acordo com o esquema 12, e não diretamente a partir do tosilato (**19**). Isso sugere a dificuldade em obter um epóxido a partir do tosilato.

O composto (**19**) é muito similar ao nosso produto (**18**), diferindo apenas nos grupos protetores das hidroxilas 2 e 3.



**Esquema 12:** Formação do epóxido (**21**) a partir de 2,3-di-O-benzil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (**19**) (Raic- Malic *et al*, 2000).

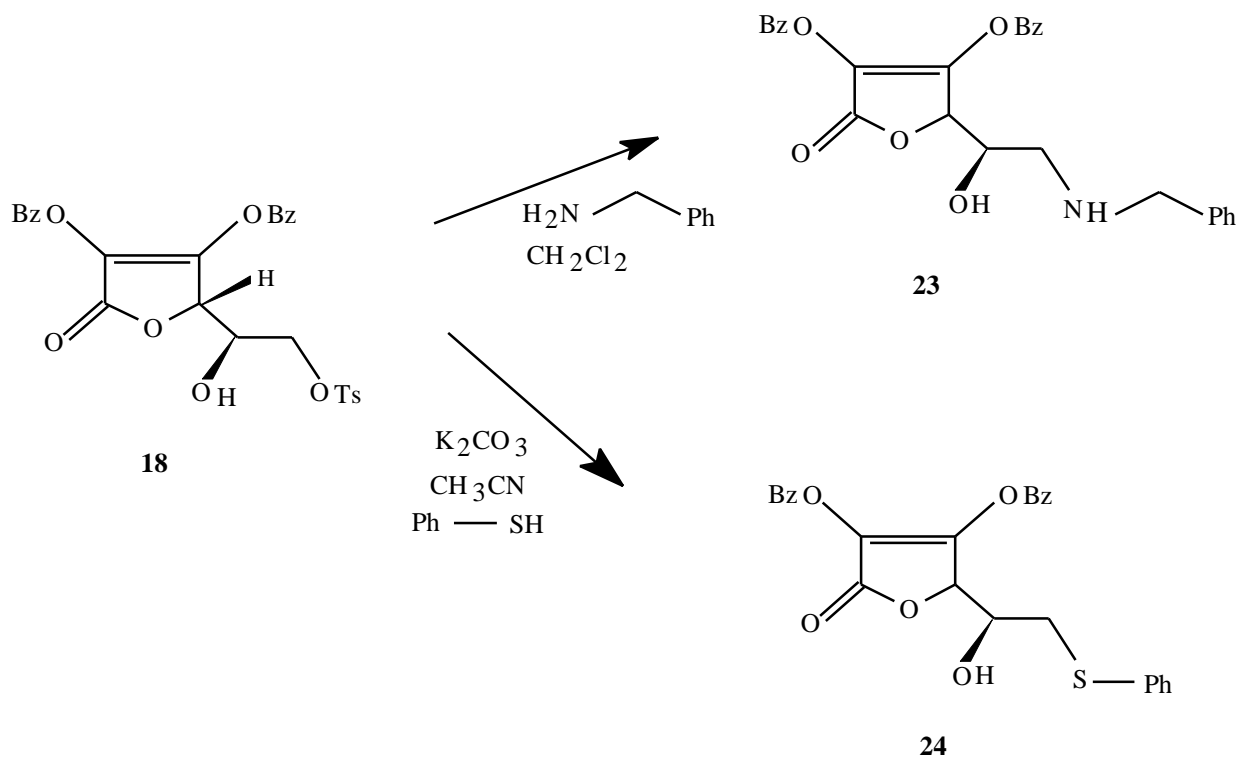
A obtenção do epóxido (**14**), de acordo com o esquema 12, implicaria em mais duas etapas em nossa rota sintética. Com o objetivo de reduzir o número de etapas, poderia-se gerar o brometo **22** (Esquema 13) e testar reações de substituição com nucleófilos como descrito na literatura<sup>32</sup> ou testar diretamente a substituição no tosilato (**18**).



**Esquema 13:** Formação de 6-bromo-2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico (**22**).

Apesar de reações de substituição de nucleófilos diretamente em tosilatos (R-OTs) serem conhecidas com grupos haleto ( $X^-$ ), hidróxidos ( $OH^-$ ), cianetos ( $CN^-$ ), alcóxidos ( $RO^-$ ) e amônia ( $NH_3$ ),<sup>33, 34</sup> pois o mesmo é considerado um bom grupo de saída, não existe na literatura dados referentes a este tipo de substituição em sistemas como o composto (**18**), exceto a reação com brometo.

Optou-se, portanto, em testar a substituição do tosilato, sendo escolhido dois possíveis nucleófilos: amina primária e tiofenol (Esquema 14).



**Esquema 14:** Reações de substituição no composto (**18**).

Iniciou-se a reação do composto (**18**) com a benzilamina, sendo utilizado diclorometano como solvente e dois equivalentes da amina primária.

Nas diversas tentativas realizadas, variando o tempo de reação, observou-se através de cromatografia em camada delgada (CCD) o consumo do material de partida (**18**) e a presença de um produto principal.

Realizou-se diversas tentativas de purificação desta amostra utilizando acetato de etila e hexano (1:2) como eluente em presença de dietilamina. Nessas condições, isolou-se uma fração em baixo rendimento (24%), que através de cromatografia gasosa mostrou ser uma mistura de dois compostos principais que não correspondem ao material de partida (**18**) e nem benzilamina.

Para identificar quais produtos foram formados, faz-se necessário encontrar as condições ideais para a purificação da amostra, já que vários eluentes foram testados sem sucesso.

Teve-se então a necessidade de testar a reação de substituição do composto **18** com outros nucleófilos, onde iniciou-se com a utilização de tiofenol.

A reação do composto **18** com excesso de tiofenol, realizada em  $\text{CH}_3\text{CN}$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  foi acompanhada por CCD, sendo observado o consumo do material de partida (**18**). Neutralizou-se a reação com solução de HCl e extraiu-se a fase orgânica com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Analizou-se a amostra bruta por RMN  $^1\text{H}$  e observou-se o tiofenol como composto principal, já que utilizou-se este em excesso. Portanto, reextraiu-se a fase aquosa com acetato de etila e esta fração, através de CCD utilizando acetato de etila e metanol (4:1) como eluente, mostrava a presença de vários compostos.

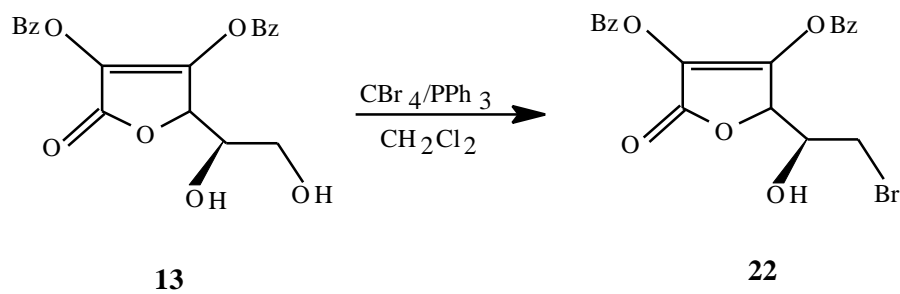
O RMN  $^1\text{H}$  desta amostra bruta apresentava sinais na região ( $\delta$ ) 5,34- 3,71 ppm que poderiam estar associados à presença da unidade ascorbato. No entanto, a amostra após a purificação por coluna, gerou duas frações principais, que analisadas por RMN  $^1\text{H}$  não apresentava os sinais característicos desta unidade, sendo observado principalmente sinais na região do aromático ( $\delta$ ) 8,13- 7,20 ppm. Isso sugere que o material esteja degradando-se durante a cromatografia em coluna.

A substituição no composto **18** com outros nucleófilos, tais como  $\text{I}^-$  e  $\text{CN}^-$  em condições não básicas, precisam ser ainda testadas.

Considerando as dificuldades encontradas na reação de substituição do grupo tosila, passou-se a testar a reação de formação do 6-bromo-2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico

(22) a partir do composto **13** (Esquema 15), de acordo com as condições descritas na literatura<sup>31</sup>, no entanto observou-se apenas material de partida.

Pretende-se otimizar as condições desta reação, realizando outras possíveis tentativas.



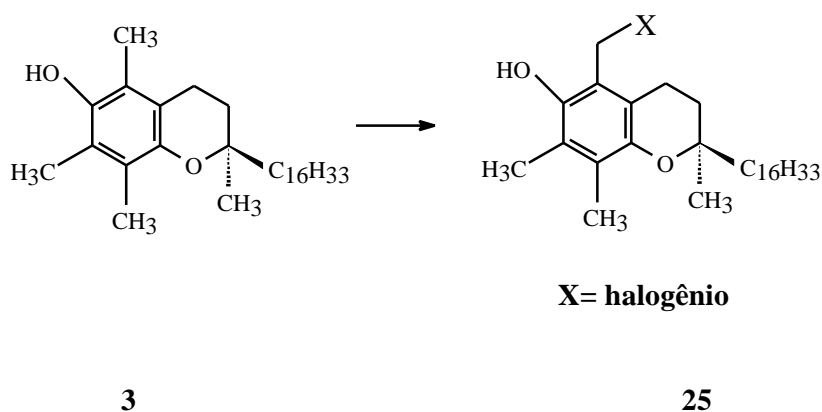
**Esquema 15:** Reação de bromação do composto (**13**).

## 4.2- Reações com $\alpha$ -tocoferol

Considerando a nossa estratégia de síntese convergente de híbridos de  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico, selecionou-se o  $\alpha$ -tocoferol por ser o componente biologicamente mais ativo da vitamina E e um dos mais potentes antioxidantes fenólicos naturais conhecidos<sup>23</sup>.

Para um possível acoplamento entre as unidades ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, com o intuito de gerar uma molécula híbrida (CARL), faz-se necessário funcionalizar o  $\alpha$ -tocoferol. A reação de halogenação é um dos poucos exemplos de funcionalização do  $\alpha$ -tocoferol descrita na literatura<sup>35, 36</sup>.

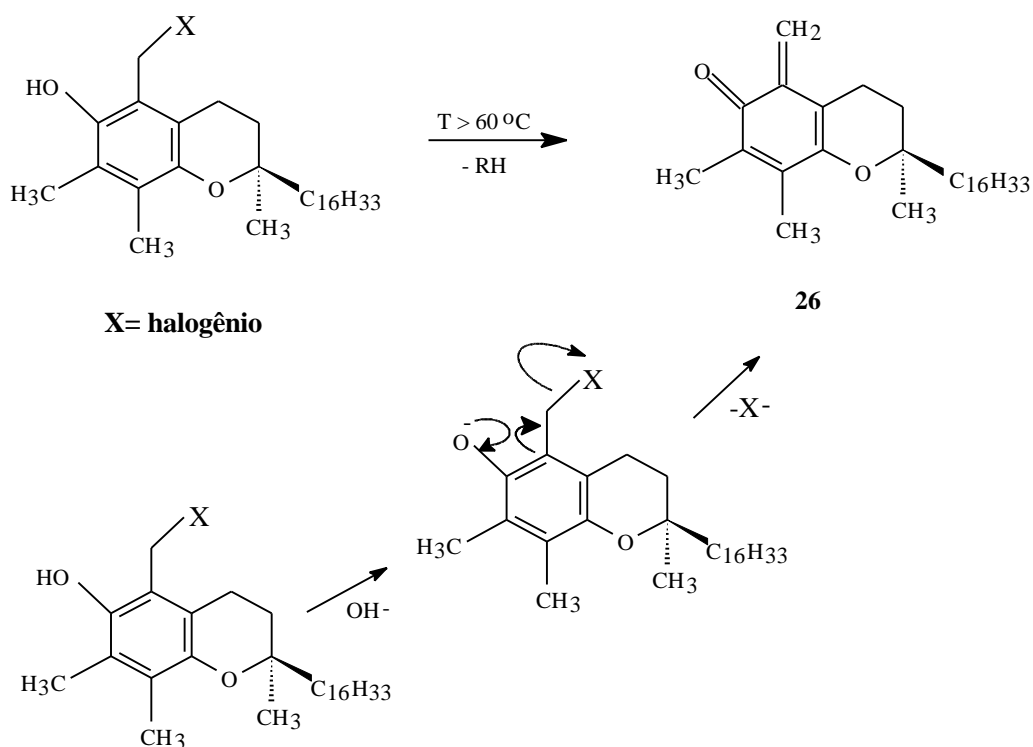
A reação do  $\alpha$ -tocoferol com halogênio tem como objetivo introduzir um bom grupo de saída, que poderia ser substituído por grupo RO ou RNH, onde R é a unidade ascorbato. Sendo possível, dessa maneira, a união entre o  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico.



**Esquema 16:** Síntese do  $\alpha$ -tocoferol-5a substituído (25).

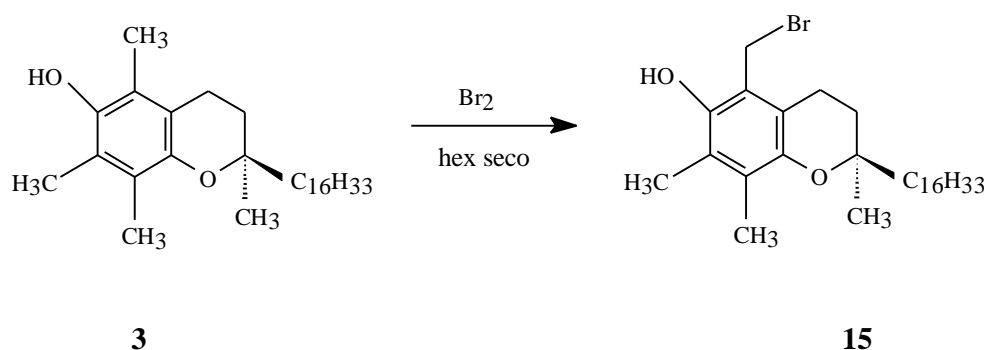


O produto (**25**) sofre facilmente reação de eliminação (Esquema 17) gerando o composto (**26**) quando aquecido ou por tratamento com base<sup>36</sup>. Com a formação do composto (**26**) não é possível o acoplamento entre as unidades ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol.



**Esquema 17:** Formação do composto **26**, a partir de reações de eliminação.

A reação do  $\alpha$ -tocoferol com  $\text{Br}_2$  na ausência de água (Esquema 18) leva a formação do derivado 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) em excelentes rendimentos<sup>35</sup>. Este tipo de reação é um dos poucos casos existentes, pois a maioria das reações estudadas do  $\alpha$ -tocoferol são oxidações ou reações de captura de radicais livres.

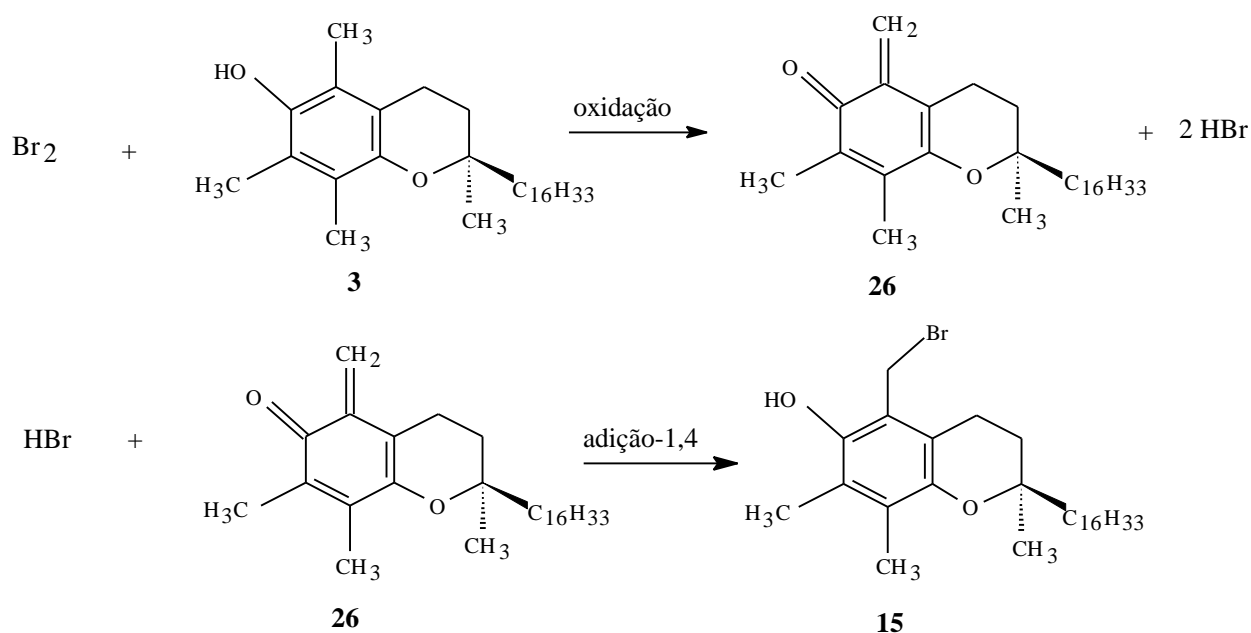


**Esquema 18:** Síntese de 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**).

A princípio, o mecanismo proposto para a bromação do  $\alpha$ -tocoferol, estava baseado na analogia com a formação do produto 5a-substituído, obtido na reação do  $\alpha$ -tocoferol com diversos radicais. No entanto, alguns pontos importantes foram levantados por Rousenau<sup>35</sup>.

A obtenção do 5a-bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) em hexano seco como solvente e bromo ( $\text{Br}_2$ ) como agente bromante, através do mecanismo radicalar, requer como passo inicial a clivagem fotolítica da molécula do bromo. Porém, este mecanismo não se adapta as condições utilizadas, já que a reação é conduzida a temperaturas baixas ( $-78^\circ\text{C}$ ) e na ausência de luz. Além disso, um mecanismo radicalar em cadeia deveria gerar subprodutos, como a bromação em outras posições, mesmo que em pequenas quantidades.

Rosenau<sup>35</sup> postulou um novo mecanismo para a bromação do  $\alpha$ -tocoferol que consiste em dois passos: i) oxidação; ii) adição-1,4 (Esquema 19).

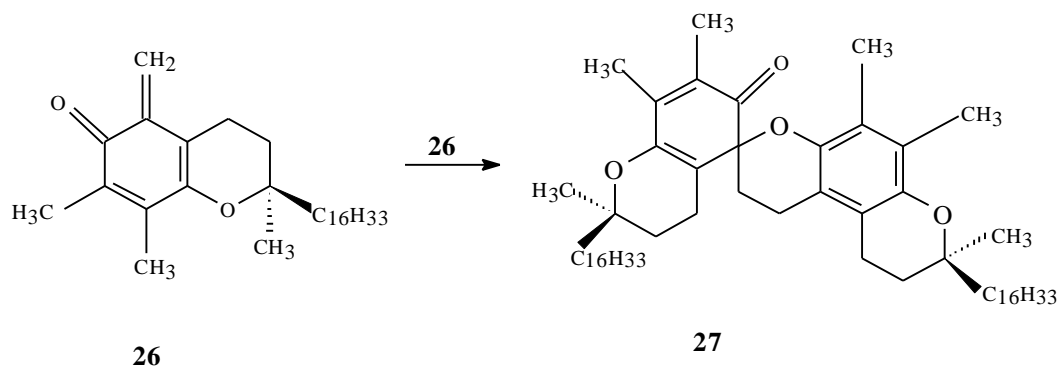


**Esquema 19:** Mecanismo de reação para a bromação do  $\alpha$ -tocoferol.

O bromo oxida o  $\alpha$ -tocoferol ao composto (**26**), que em seguida sofre uma adição do brometo de hidrogênio formado no primeiro passo.

A formação exclusiva de um único produto não é surpreendente, desde que uma quantidade suficiente de  $\text{HBr}$  esteja presente para reagir com **26**. A clivagem homolítica da molécula do bromo não é envolvida e nenhum intermediário radicalar é formado nesta reação.

Se uma quantidade insuficiente de  $\text{HBr}$  estiver presente para reagir com o intermediário **26**, a formação do 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) não procederá, pois duas moléculas de **26** reagirão entre si, formando o dímero **27**<sup>17, 35, 36</sup>.

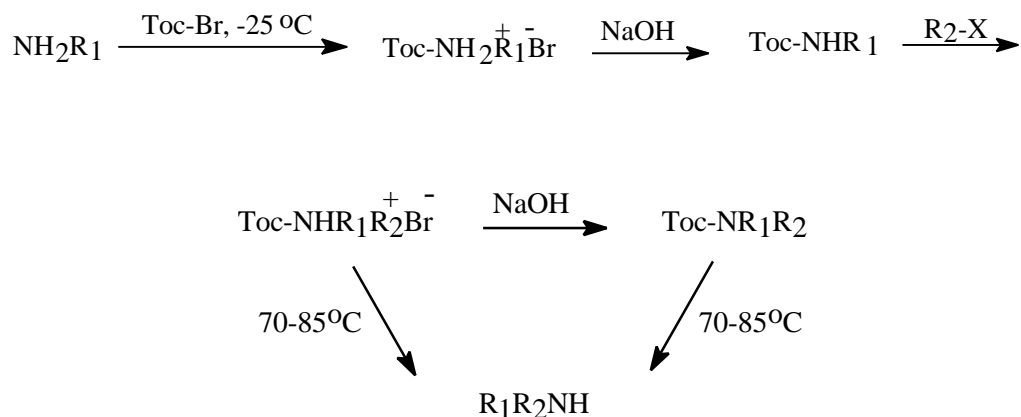


Testou-se a reação de halogenação do  $\alpha$ -tocoferol, utilizando  $\text{Br}_2$  e hexano seco como solvente, de acordo com o esquema 18 e obteve-se também um único produto com 98% de rendimento.

Caracterizou-se a formação do 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) pelo sinal ( $\delta$ ) 4,65 ppm no RMN  $^1\text{H}$  que aparece como um singlete referente aos prótons da posição 5a-substituída, sendo mais desblindado do que os prótons desta mesma posição no  $\alpha$ -tocoferol ( $\delta$ : 4,16 ppm) apresentando também sinais na faixa de ( $\delta$ ) 1,87- 1,02 ppm correspondentes aos prótons na região dos alifáticos. Estes dados encontram-se de acordo com a literatura<sup>34</sup>.

Em seguida, iniciou-se um estudo modelo com a intenção de verificar uma possível introdução de nucleófilos ao derivado 5a-substituído do  $\alpha$ -tocoferol (**15**), escolhendo-se inicialmente como nucleófilo uma amina primária.

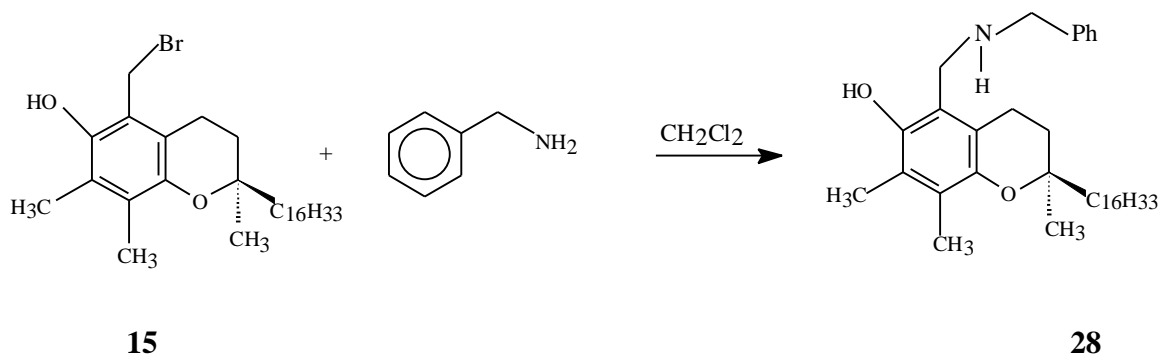
A reação do 5a-bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) com aminas primárias está descrita na literatura<sup>36</sup>, sendo esta metodologia desenvolvida para a preparação de aminas secundárias. Neste processo o derivado 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol atua como grupo protetor para aminas primárias como descrito no esquema 20. As aminas primárias utilizadas foram alifáticas e aromáticas.



**Esquema 20:** Síntese de aminas secundárias, utilizando bromo-tocoferol como grupo protetor de aminas secundárias.

Nesta reação descreve-se a formação de um precipitado branco referente ao sal de amônio (Toc-NH<sub>2</sub>R<sub>1</sub><sup>+</sup>Br<sup>-</sup>), que tratando com base (NaOH), obtém-se então o composto Toc-NHR<sub>1</sub> que pode então ser alquilado, levando a amina secundária após aquecimento ou tratamento com base<sup>37</sup>.

Realizou-se a reação de substituição do 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) com benzilamina em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como solvente (Esquema 21) e observou-se a formação de um precipitado e de uma fase líquida. Após 30 minutos de reação adicionamos NaOH, de acordo com as condições descritas na literatura<sup>37</sup>, e deixou-se agitando por 20 minutos. Filtrou-se a amostra e removeu-se o solvente.



**Esquema 21:** Reação de substituição do 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol através de benzilamina.

Através de RMN  $^1\text{H}$  da amostra bruta, observou-se apenas sinais principalmente na região dos alifáticos ( $\delta$ : 2,16- 1,14 ppm) e ausência do sinal em ( $\delta$ ) 4,65 ppm no RMN  $^1\text{H}$  referente aos prótons da posição 5a-substituída do composto **15**. Isso sugere a formação do dímero **27**, onde estes dados encontram-se compatíveis com os da literatura<sup>39</sup>.

Tentou-se novamente a mesma reação de substituição do 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) com benzilamina, onde optou-se por condições mais brandas utilizando apenas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e obteve-se novamente duas fases, a fase líquida e o precipitado. Após a amostra ser centrifugada, separou-se as fases, concentrou-se a fase líquida e analisou-se cada fase.

Através de RMN  $^1\text{H}$ , utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente, observou-se que o precipitado correspondia à amina protonada, apresentando apenas os sinais na região do aromático e um singlete em 4,11 ppm, sendo este sinal mais desblindado do que o da benzilamina ( $\delta$ = 3,82 ppm).

Concentrou-se a fase líquida e observou por CCD a presença de um produto principal. Purificou-se esta amostra por cromatografia em coluna utilizando acetato de etila e hexano

(1:1) como eluente em presença de dietilamina, obtendo o composto **28** em 86% de rendimento.

Caracterizou-se o composto **28** por um singlete em ( $\delta$ ) 4,83 no RMN  $^1\text{H}$  equivalente a quatro prótons, sendo este sinal mais desblindado do que o material de partida **15** ( $\delta$ = 4,65 ppm), além dos sinais na região dos aromáticos ( $\delta$ = 7,80- 7,76; 7,44- 7,24 ppm) e na faixa de ( $\delta$ ) 1,54- 1,07 ppm correspondentes aos prótons alifáticos.

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  indicam que a amostra não está totalmente pura, pois a integração dos sinais na região dos aromáticos não está compatível com a estrutura do produto, sendo necessário encontrar as condições favoráveis para a sua purificação.

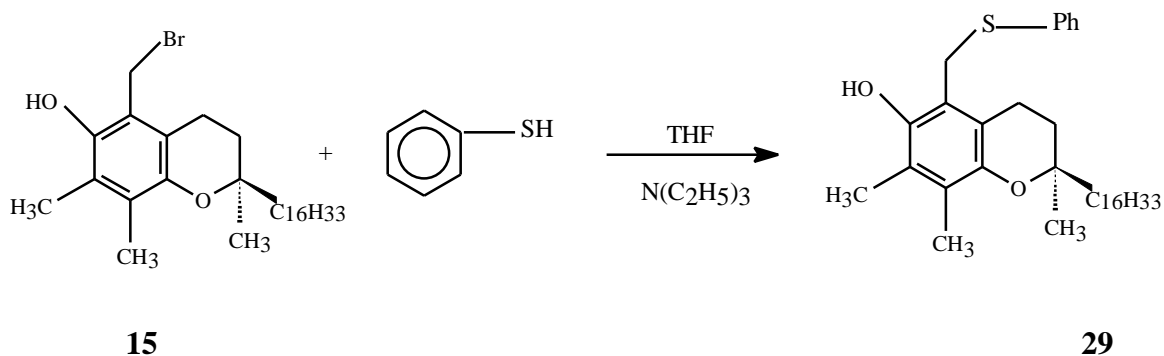
No espectro de IV, observa-se a presença de uma banda larga de deformação axial ( $\nu$ ) correspondente ao grupo -OH em  $3350\text{ cm}^{-1}$  que pode estar mascarando a banda referente ao grupo -NH do composto **28** que é na região de  $3310\text{-}3350\text{ cm}^{-1}$ .

Realizou-se também a reação do composto **15** com tiofenol na presença de trietilamina e THF como solvente (Esquema 22). Através de CCD utilizando acetato de etila e hexano (1:9), observou-se a presença de dois produtos. Purificou-se esta amostra por cromatografia em coluna e isolou-se duas frações.

Observou-se que uma das frações (a mais apolar) apresentava apenas sinais na região dos alifáticos ( $\delta$ : 1,72- 1,07 ppm) e aromáticos ( $\delta$ : 7,68- 7,20 ppm) e portanto não corresponde nem ao produto desejado **29** e nem ao material de partida **15**. Por GC, esta fração mostrou ser uma mistura de compostos, onde o composto principal era o tiofenol e em pequenas porcentagens o dímero **27**.

A segunda fração isolada por cromatografia em coluna em aproximadamente 30% apresentou no espectro de RMN  $^1\text{H}$  um singlete em ( $\delta$ ) 4,08 ppm, além dos sinais na região

dos aromáticos ( $\delta$ ) 7,43- 7,11 ppm e alifáticos ( $\delta$ ) 1,75- 1,10 ppm, indicando ser o produto desejado (**29**) (Esquema 22).



**Esquema 22:** Reação de substituição do 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol através de tiofenol.

As reações de substituição no 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) podem ainda ser melhoradas através de um controle mais cuidadoso do pH destas reações.

Os resultados obtidos nas reações de substituição do grupo tosila do composto **18** indicam a necessidade de trabalhar com outro derivado do ácido ascórbico, como por exemplo, o brometo **22**, para realizar a união das unidades ascorbato e tocoferol.

Em relação ao sistema tocoferol, os resultados positivos obtidos nas reações do 5a-bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) mostram a viabilidade do uso de espaçadores com grupos funcionais tais como amina e tiol.

Isto torna mais versátil a rota proposta, permitindo a síntese de moléculas híbridas com diversos espaçadores.



## **CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

*“Não existe um caminho para a paz; a paz é o caminho.”*

Mahatma Gandhi

## 5.1- Conclusões

Considerando a importância de agentes antioxidantes que reúnam numa só substância as reconhecidas qualidades dos antioxidantes naturais tocoferol e ácido ascórbico, elaborou-se estudos modelos visando a síntese desse tipo de molécula híbrida.

A partir de reações realizadas no 5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico (**11**) como material de partida, obteve-se primeiramente em 78% o 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico (**12**), com as hidroxilas 2 e 3 protegidas por grupos benzoíla.

Em seguida, uma desproteção das hidroxilas 5 e 6 do composto (**12**) nos forneceu em 58% o 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico (**13**), que através de uma reação com cloreto de tosila e piridina observou-se o material 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (**18**) em 75% de rendimento.

Obteve-se o intermediário (**18**) em três etapas com 34% de rendimento global, o que mostra a viabilidade da metodologia aplicada na obtenção do intermediário do ácido ascórbico.

A substituição no grupo tosila (Ts) do composto (**18**) não foi possível nas condições e nucleófilos testados, observando-se a decomposição do material de partida.

Esta etapa mostrou ser o ponto mais crítico na proposta de síntese do CARL de interesse. No entanto, este problema pode ser contornado com a utilização do brometo (**22**). A síntese de compostos análogos ao **22** está descrito na literatura<sup>31, 32</sup>, bem como a sua reatividade frente à substituição com aminas primárias<sup>32</sup>.

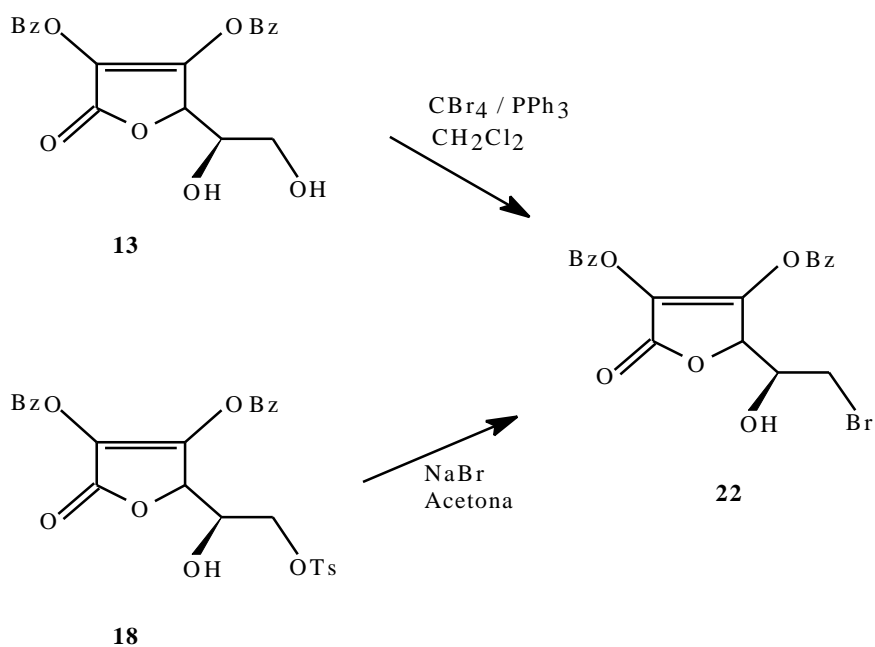
Obteve-se o 5a-bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) em 98% a partir do  $\alpha$ -tocoferol em apenas uma etapa. O composto (**15**) se mostrou versátil diante das reações de substituição, o que

torna viável a sua utilização para o acoplamento com o derivado do L-ácido ascórbico, além de permitir o uso de espaçadores com diferentes funcionalidades, por exemplo, tióis e aminas.

Os resultados obtidos mostram a flexibilidade da rota sintética, já que é possível utilizar diferentes espaçadores com diferentes funcionalidades, permitindo a síntese de várias moléculas híbridas.

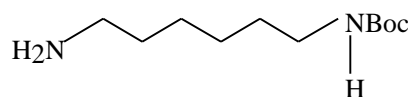
## 5.2- Perspectivas

Propõe-se testar outros nucleófilos, como  $\text{CN}^-$  e  $\text{I}^-$ , com o composto (**18**), bem como obter o brometo (**22**) a partir do diol (**13**) e do tosilato (**18**), já que esta reação é conhecida para sistemas modelos<sup>31,32</sup>.



Pretende-se também testar as reações de substituição com diferentes nucleófilos tanto no brometo (**22**) como no 5a-bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**).

Como a formação de produtos substituídos a partir da unidade 5a-bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) se mostrou viável, espera-se realizar neste sistema, reações com espécies bifuncionalizadas, como por exemplo, N-Boc-1,6-diamino-hexano (**30**), visando o acoplamento entre os derivados ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, testando também outros espaçadores de funcionalidades diferentes.

**30**

## CAPÍTULO 6- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

*“Levante todos aqueles que estiverem caídos em seu redor.  
Você não sabe onde seus pés tropeçarão.”*

André Luís

## 6.1-Generalidades

Purificou-se previamente os solventes utilizados nas sínteses, como o diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), piridina, hexano como descrito na literatura<sup>40</sup> sendo guardados sobre peneiras moleculares 4A, 8-12 mesh da marca Aldrich. Utilizou-se outros reagentes e solventes na sua forma comercial P.A., sendo os seguintes os fornecedores: Aldrich, Fluka, Merck, Vetec.

Para concentrar as soluções ou eliminar solventes, utilizou-se um rotoevaporador Buchi Rotovapor R-114 conectado a uma bomba de vácuo KNF Neuberger.

Obteve-se a temperatura equivalente a  $-78^{\circ}\text{C}$  necessária em determinadas sínteses, através da mistura de gelo seco e acetona comercial.

## 6.2-Análises Cromatográficas

Acompanhou-se as reações por cromatografia de camada fina com placas comercialmente de Polygram sílica-gel sobre suporte de plástico UV<sub>252</sub> 40x80 mm e folha de alumínio 20x20 cm de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> Merck. Para a revelação das placas, utilizou-se uma lâmpada de UV.

Preparou-se as colunas cromatográficas com sílica-gel 60 230- 400 mesh ASTM Merck eluídas sob pressão.

## 6.3- Análises Espectroscópicas

Determinou-se os espectros de RMN em um espectrômetro *Varian Unity Plus* 300 MHz para hidrogênio e 75,4 MHz para carbono 13. Os deslocamentos químicos estão

expressos por partes por milhão (ppm) e na descrição dos sinais atribuídos nos espectro de RMN  $^1\text{H}$ , utilizou-se como abreviações **d** (dubleto), **dd** (duplo dubleto), **dt** (duplo tripleto), **m** (multiplete), **s** (singleto) e **t** (tripleto).

Realizou-se os espectros de absorção na região do infravermelho em um espectrômetro *Brucker IFS66 FT-IR* em pastilhas de KBr. Na descrição das bandas de absorção nestes espectros, utilizou-se como abreviações **u** (deformação axial) e **d** (deformação angular).

Realizou-se os espectros de cromatografia gasosa em um cromatógrafo a gás *HP5890 Series II* com detector de ionização de chamas (FID) e detector de condutividade térmica (TCD).

Realizou-se o espectro de massa em um espectrômetro *QTOF- Time of Flight Mass Spectrometer*.

Mediu-se o ponto de fusão dos produtos em um aparelho do tipo *Eletrothermal 9100*.

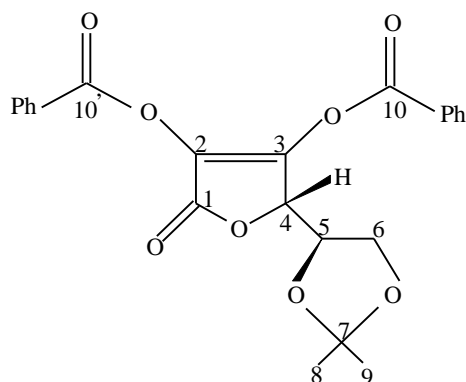
#### 6.4- Reações

Os compostos 5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico (**11**) e o  $\alpha$ -tocoferol (**3**) são disponíveis comercialmente, utilizando-se as marcas Fluka e Aldrich respectivamente.

#### 6.4.1-Síntese de 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico- $C_{23}H_{20}O_8$ (12).

Dissolveu-se 5,6-O-isopropilideno cetal (**11**) (500 mg; 2,3 mmol) em 50 mL de  $CH_2Cl_2$  seco e purificado, adicionou-se piridina seca (0,6 mL; 7,4 mmol) e cloreto de benzoila (1,0 mL; 8,6 mmol), agitou-se sob temperatura ambiente durante 2 dias. Acrescentou-se à reação 5,0 mL de solução aquosa de HCl (2M), deixou-se agitar por 20 minutos e separou-se as fases. Lavou-se a fase orgânica com solução saturada de  $NaHCO_3$  e secou-se com  $MgSO_4$  anidro, filtrou-se e concentrou-se, fornecendo um óleo escuro que purificou-se por cromatografia em coluna (eluente AcOEt: ciclohexano 1:4). Obteve-se um óleo incolor 760 mg (78%).

#### Dados espectroscópicos:



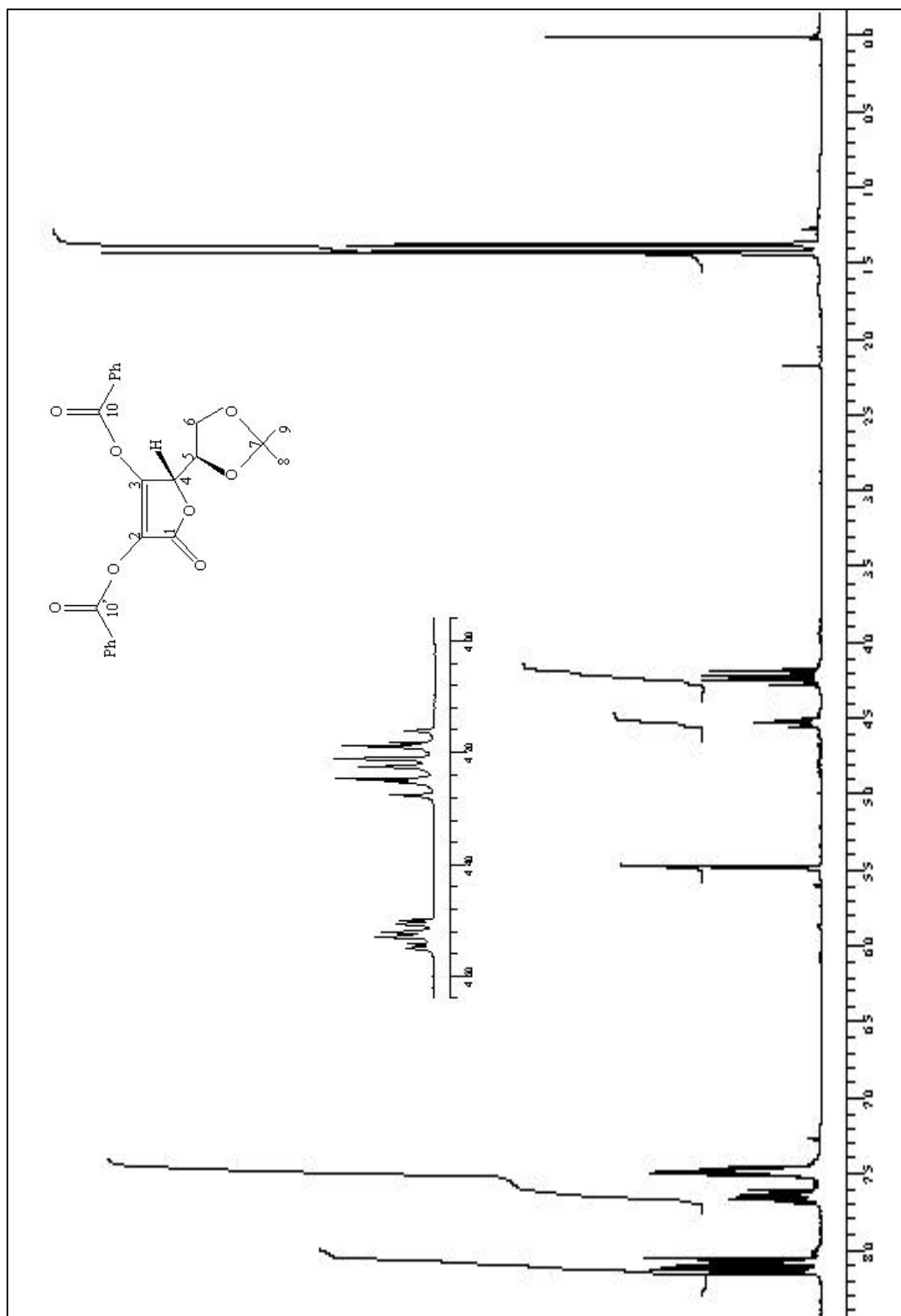
(12)

**RMN  $^1H$  (300 MHz) (d):** 8,15- 8,05 (m, 4H); 7,69- 7,60 (m, 2H); 7,51- 7,44 (m, 4H); 5,48 (d, J= 2,3 Hz, 1H); 4,53 (dt, J= 2,4; 6,4; 6,4 Hz, 1H); 4,23 (dd, J= 8,7; 6,5 Hz, 1H); 4,19 (dd, J= 8,7; 6,5 Hz, 1H); 1,42 (s, 3H); 1,37 (s, 3H).

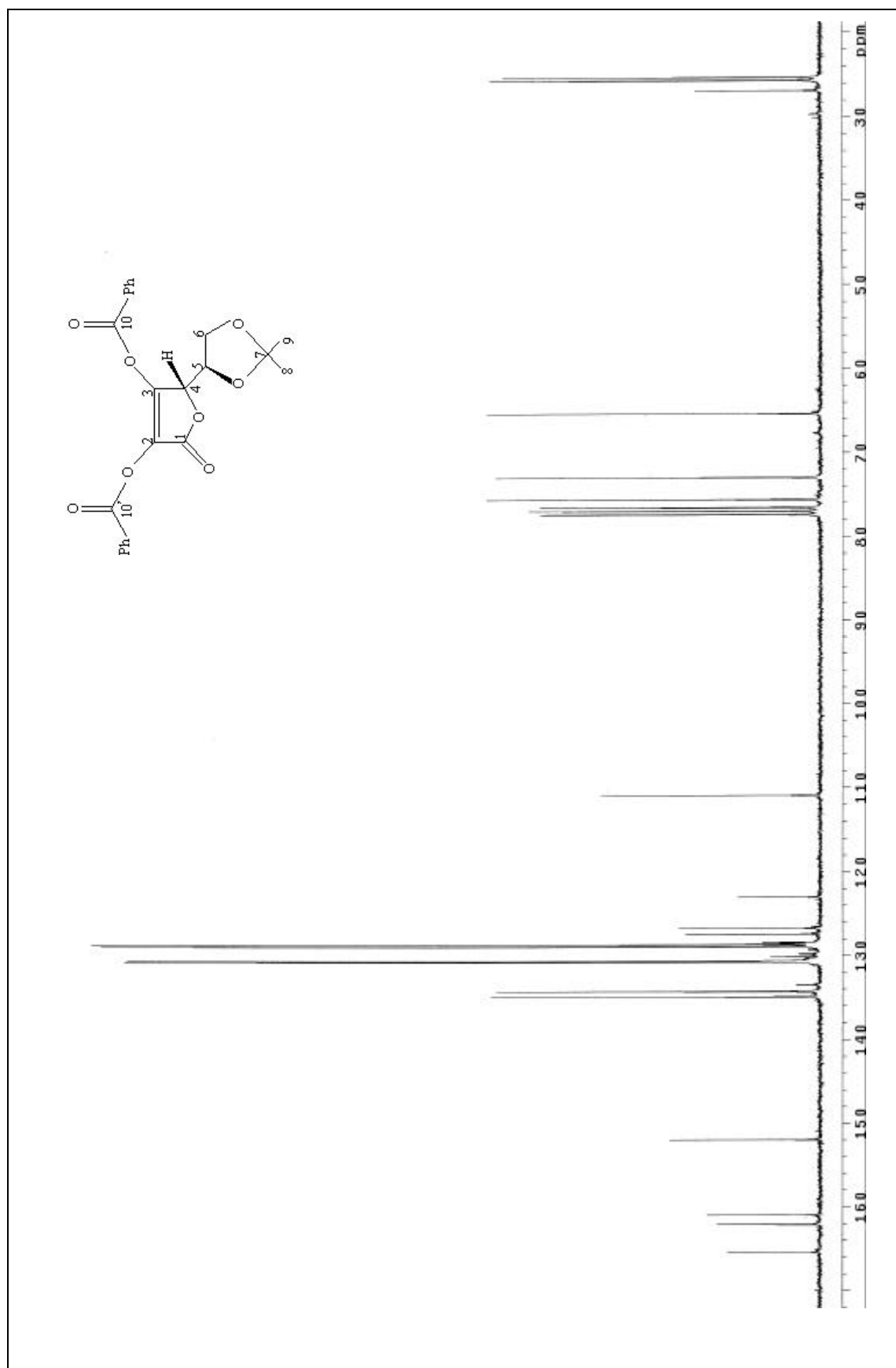


**RMN  $^{13}\text{C}$  (75,4 MHz) (d): 165,4 (C1); 162,05, 160,93 (C10; C10'); 151,9 (C3); 134,9; 134,2; 130,7; 130,6; 128,8; 128,6; 127,3; 126,6 (C aromáticos); 122,9 (C2); 110,8 (C7); 75,6 (C4); 72,9 (C5); 65,3 (C6); 25,3; 25,6 (C8; C9).**

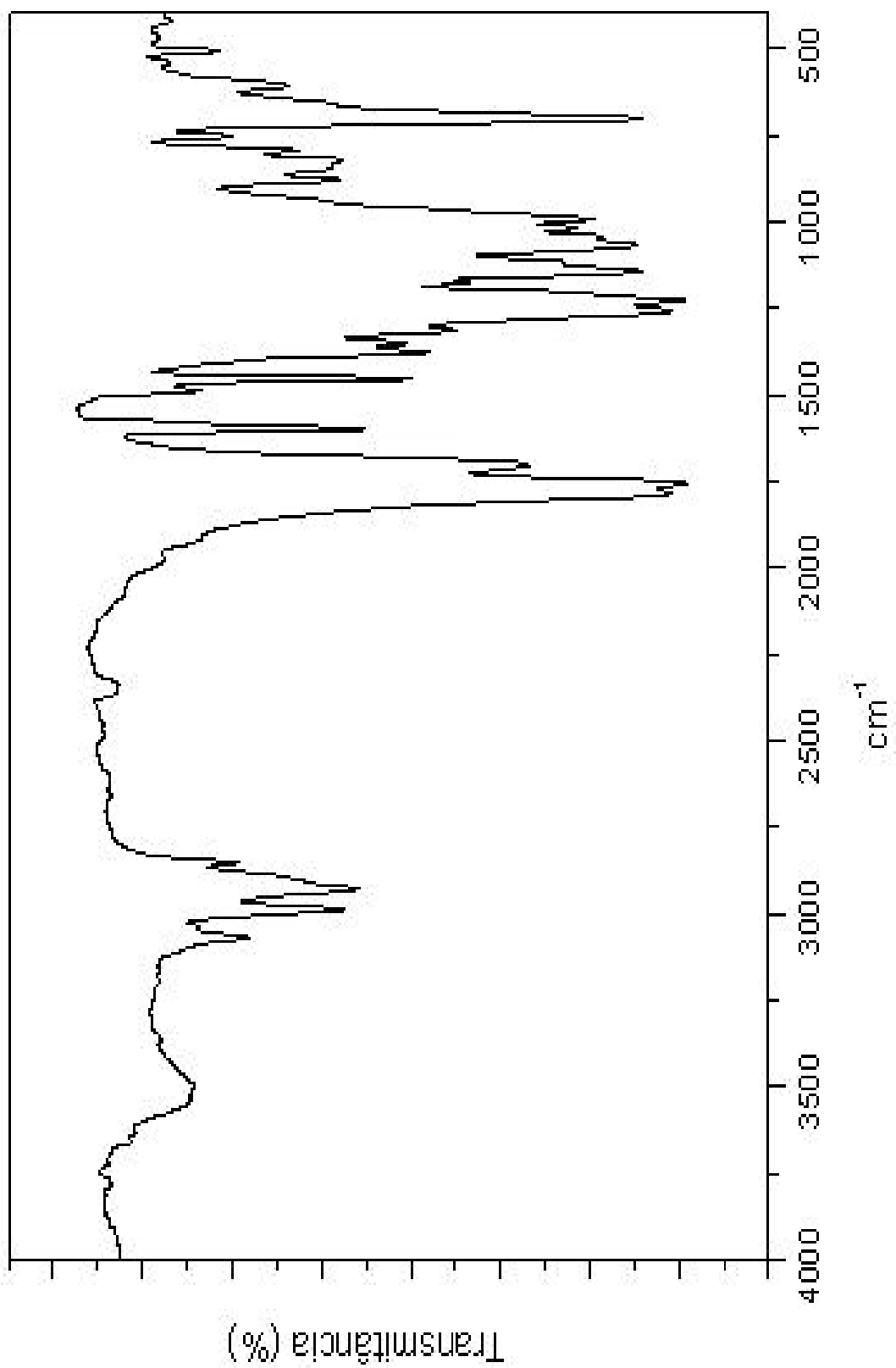
**IV (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3068 ( $\nu$ , ArC-H); 2988-2929 ( $\nu$ , C-H); 1786, 1755 e 1703 ( $\nu$ , C=O); 1600 ( $\nu$ , C=C), 702 ( $\delta$ , ArC=C).**



**Espectro 1.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 2,3-di-O-benzoi-5,6-O-isopropilideno-L-ácido ascórbico (**12**) em CDCl<sub>3</sub>.



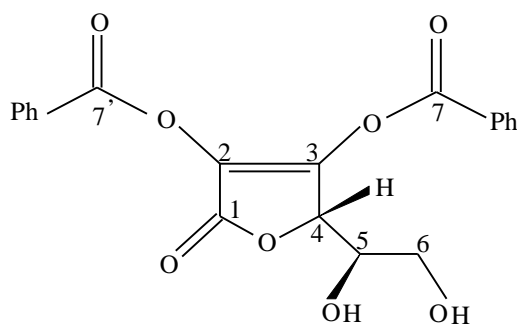
**Espectro 2:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-i-isopropilideno-L-ácido ascórbico (**12**) em CDCl<sub>3</sub>.



**Espectro 3:** Espectro de IV do composto 2,3-di-O-benzoil-5,6-O-isopropilideno-L-ácido  
ascórbico (**12**) em KBr.

**6.4.2-Síntese de 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico- C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub> (13).**

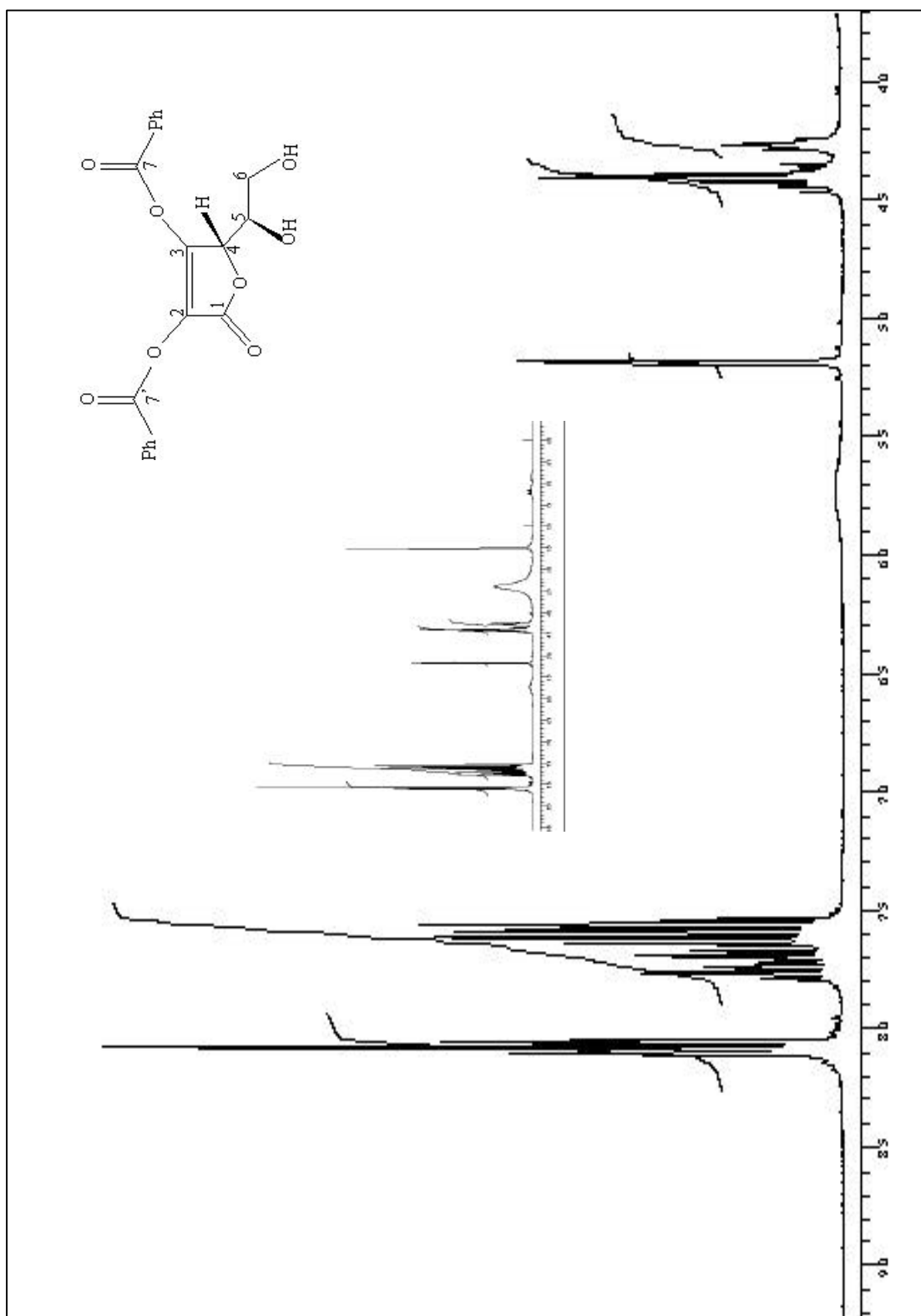
Adicionou-se HCl 1M (35 mL) a uma solução contendo o cetal (**12**) (1,14 g; 2,7 mmol) dissolvido em THF (140 mL) e agitou-se sob temperatura ambiente durante 27 horas. Acrescentou-se à reação uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, gota a gota e AcOEt. Separou-se as fases. Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrou-se e concentrou-se. Obteve-se um óleo incolor que purificou-se por cromatografia em coluna (eluente AcOEt: ciclohexano 1:1). Obteve-se um sólido branco que recristalizou-se com CHCl<sub>3</sub>; P.f. 140- 146<sup>o</sup>C, forneceu-se uma massa de 603 mg (58%).

**Dados espectroscópicos:****(13)**

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) (d):** 8,10-8,05 (m, 4H); 7,79-7,53 (m, 6H); 5,18 (d, J= 1,5 Hz, 1H); 4,66- 4,34 (m, 2H); 4,26 (dt, J= 6,9; 1,5 Hz; 1H)

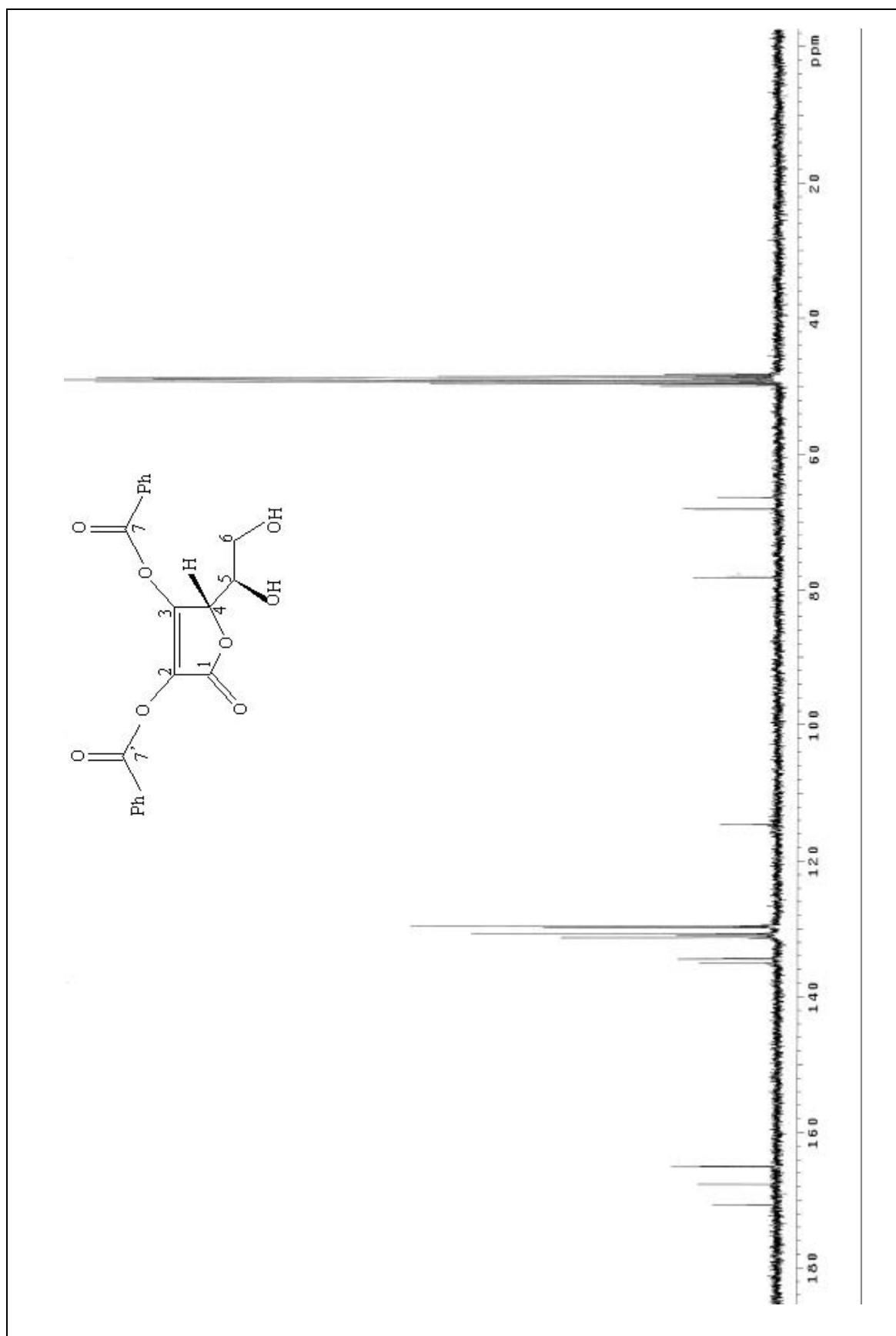
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75,4 MHz) (d): 170,6 (C1); 167,6; 165,0 (C10; C10'); 164,9 (C3); 135,1; 134,3; 131,6; 131,0; 130,6; 129,7; 129,5 (C aromáticos); 114,5 (C2); 66,3 (C6); 68,0 (C5); 79,1 (C4).**

**IV (KBr) n ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3442 (v, OH); 3067 (v, ArC-H); 2959 (v, C-H); 1756, 1718 e 1682 (v, C=O); 1602 (v, C=C); 709 ( $\delta$ , ArC=C)**



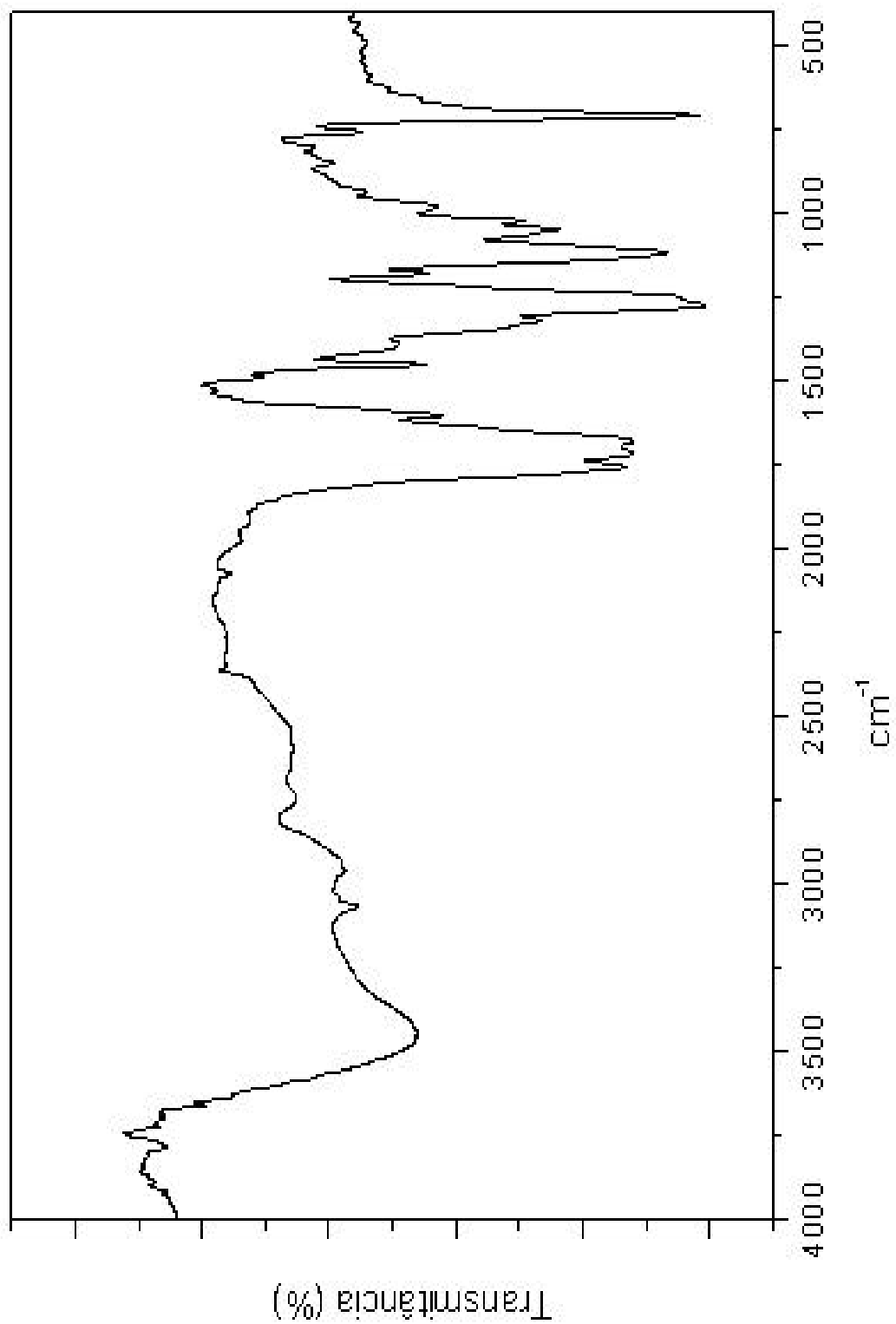
**Espectro 4:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico (13)

em  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Espectro 5:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico (13) em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

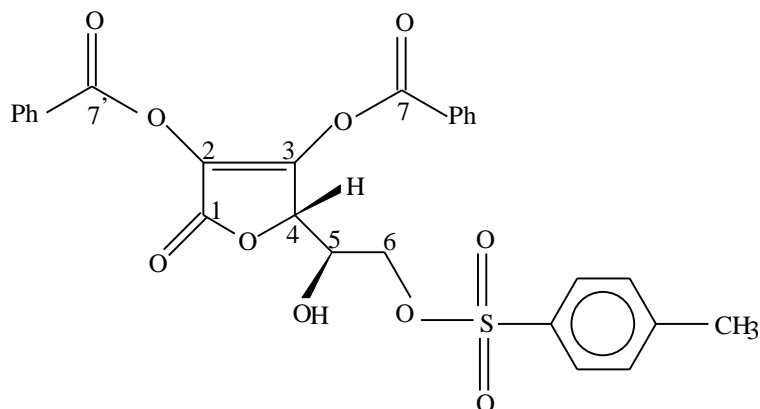




**Espectro 6** : Espectro de IV do composto 2,3-di-O-benzoil-L-ácido ascórbico (**13**) em KBr.

**6.4.3- Síntese de 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico- C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>S (18).**

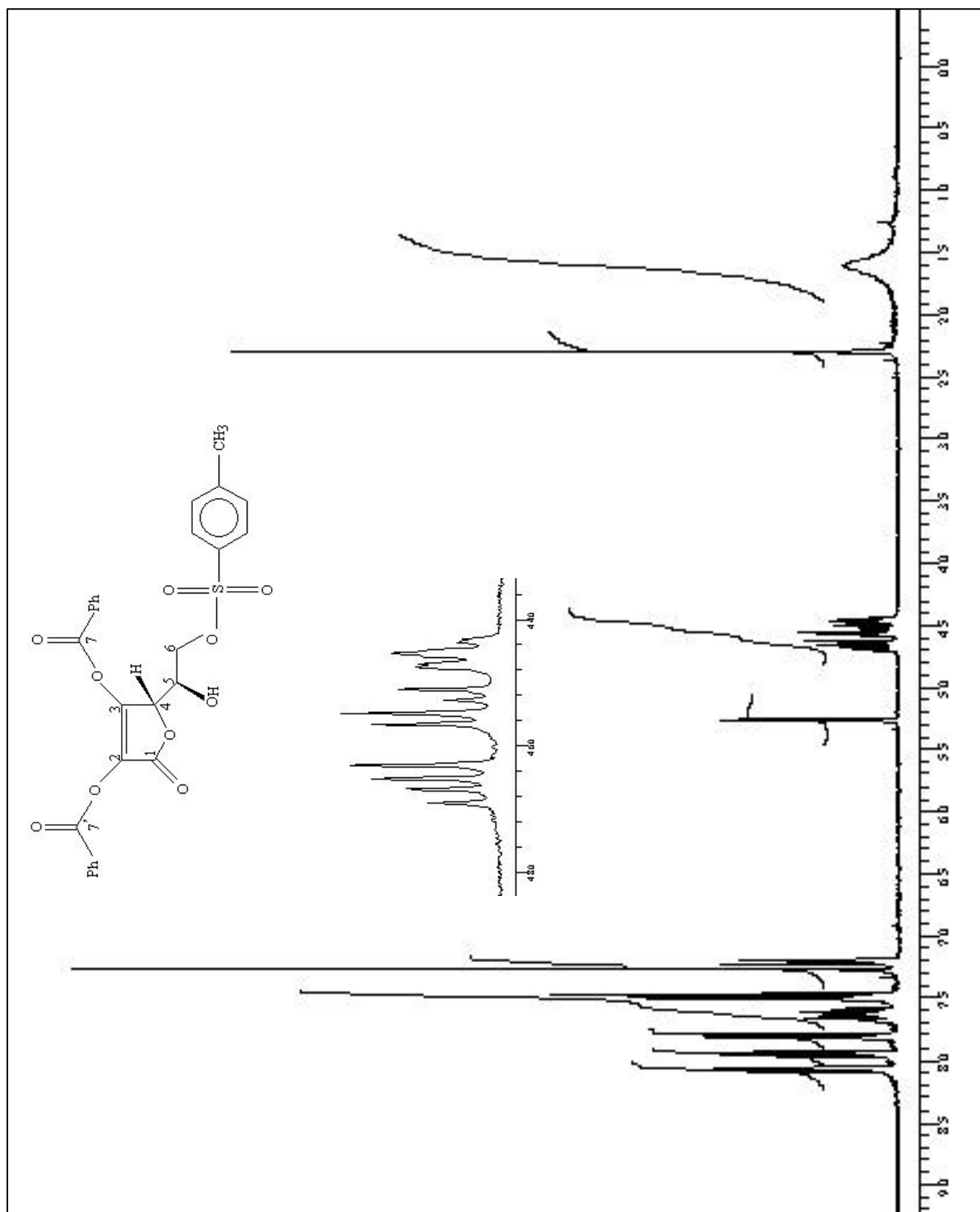
Dissolveu-se o diol (**13**) (218 mg; 0,56 mmol) em 8,0 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, adicionou-se piridina seca (0,5 mL; 6,2 mmol) e agitou-se em temperatura ambiente durante 10 minutos. Acrescentou-se à reação cloreto de tosil (110 mg; 0,58 mmol) dissolvido em 8,0 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Agitou-se sob temperatura ambiente durante 2 dias. Acrescentou-se à reação CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e água e separou-se as fases. Lavou-se a fase orgânica várias vezes com HCl (1M) e secou-se com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrou-se e concentrou-se. Obteve-se um óleo escuro que purificou-se por cromatografia em coluna (eluente AcOEt: ciclohexano 1:1). Obteve-se um sólido alaranjado, que recristalizou-se com hexano; P.f. 160- 163<sup>0</sup>C, forneceu-se uma massa de 229 mg (75%).

**Dados espectroscópicos:****(18)**

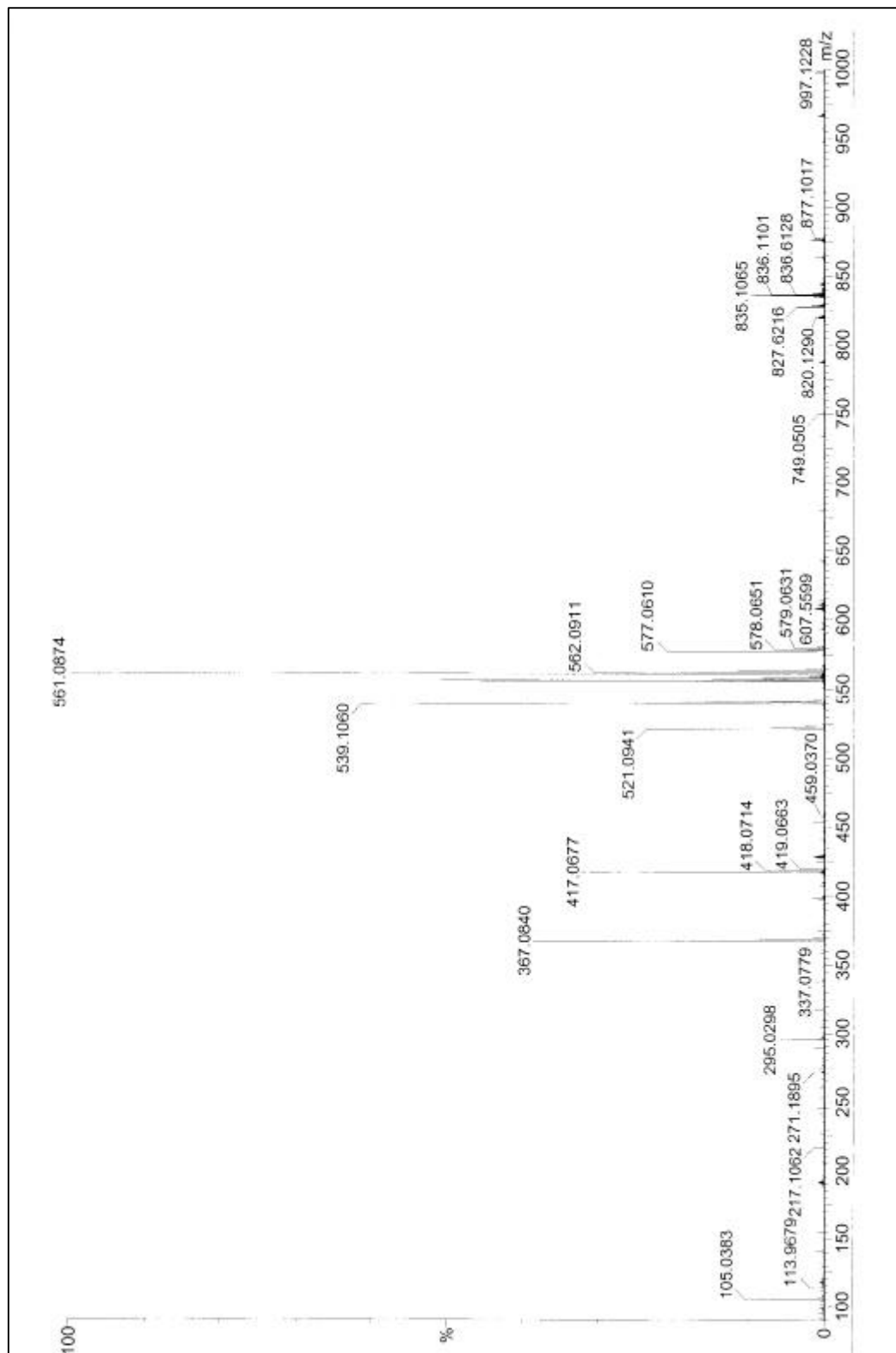
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) ( d):** **8,07** (d, J= 8,4 Hz, 2H); **7,95** (d, J= 2,7 Hz, 2H); **7,79** (d, J= 8,7 Hz, 2H); **7,68-7,58** (m, 2H); **7,48** (t, J= 15,6 Hz, 4H); **7,23** (t, J= 20,4 Hz, 2H); **5,25** (d, J= 1,5 Hz, 1H); **4,66** (dd, J= 11,4; 6,6 Hz, 1H); **4,54** (dd, J= 11,4; 5,4 Hz, 1H); **4,45** (dt, J= 6,6; 5,4; 1,5 Hz; 1H); **2,29** (s, 3H).

**IV (KBr) n (cm<sup>-1</sup>):** **3460** (ν, OH); **3073** (ν, ArC-H); **1792; 1749 e 1693** (ν, C=O); **1119** (ν, SO<sub>2</sub>); **704** (δ, Ar C=C).

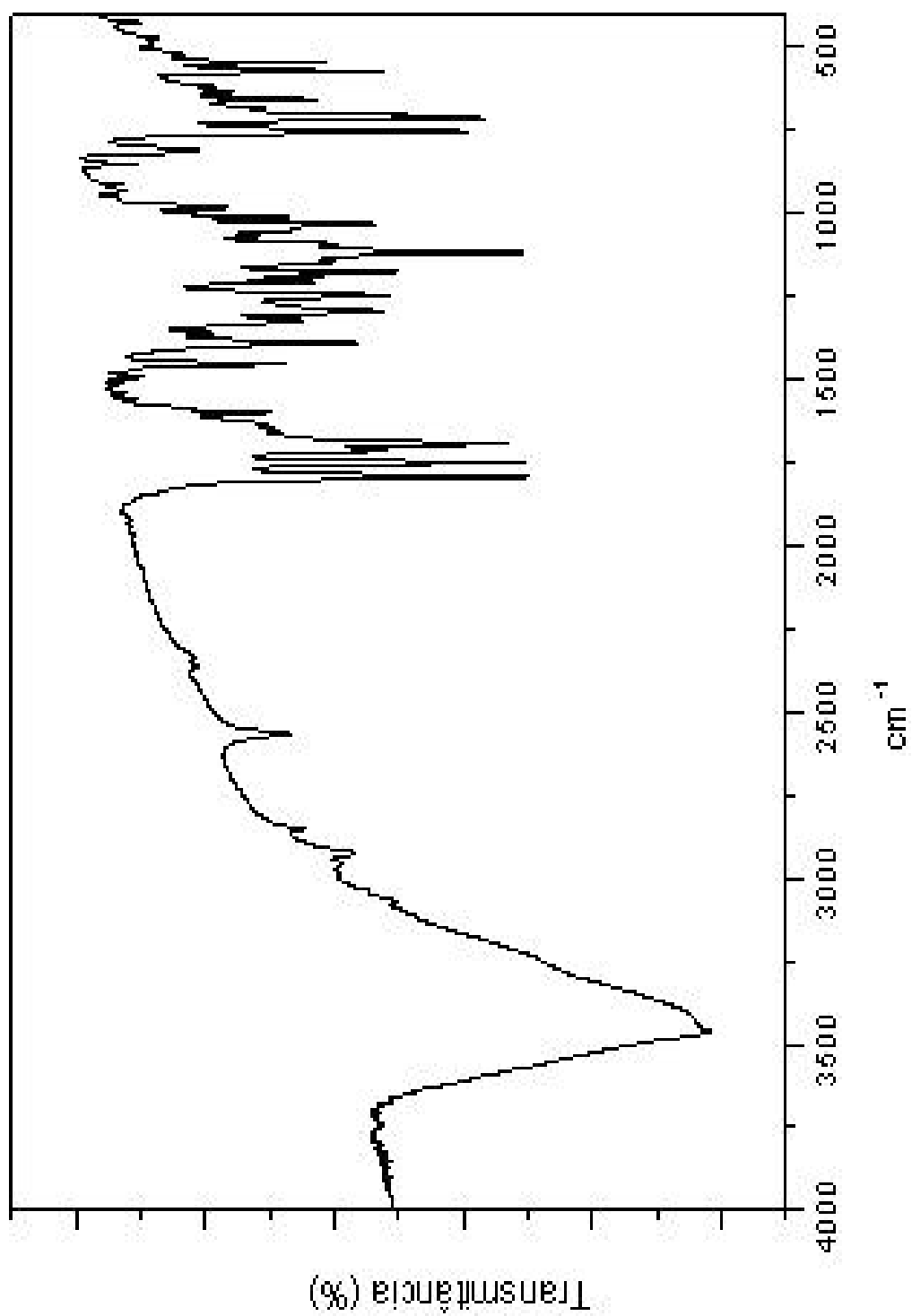
**EM m/z:** **521** ('OH); **417** (PhCO<sub>2</sub>'); **367** (H<sub>3</sub>CPhSO<sub>3</sub>)



**Espectro 7:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (**18**) em CDCl<sub>3</sub>.



**Espectro 8:** Espectro de massa do composto 2,3-di-O-benzoiil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (IS) em CDCl<sub>3</sub>.

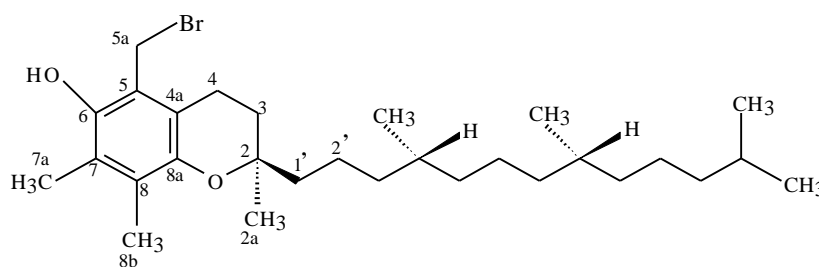


**Espectro 9:** Espectro de IV do composto 2,3-di-O-benzoil-6-O-tosil-L-ácido ascórbico (18) em KBr.

#### 6.4.4- Síntese de 5a-Bromo-a-tocoferol- C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>O<sub>2</sub>Br (15)

Dissolveu-se o  $\alpha$ -tocoferol (**3**) (1,29 g; 3,0 mmol) em 50 mL de hexano seco e adicionou-se vagarosamente bromo (0,16 mL; 3,13 mmol) em 20 mL de hexano seco, envolveu-se o sistema reacional com papel de alumínio e agitou-se sob temperatura de -78°C durante 2 horas. Removeu-se o solvente e o bromo remanescente através de vácuo. Obteve-se 1,5 g de um óleo escuro (98 %).

#### Dados espectroscópicos:

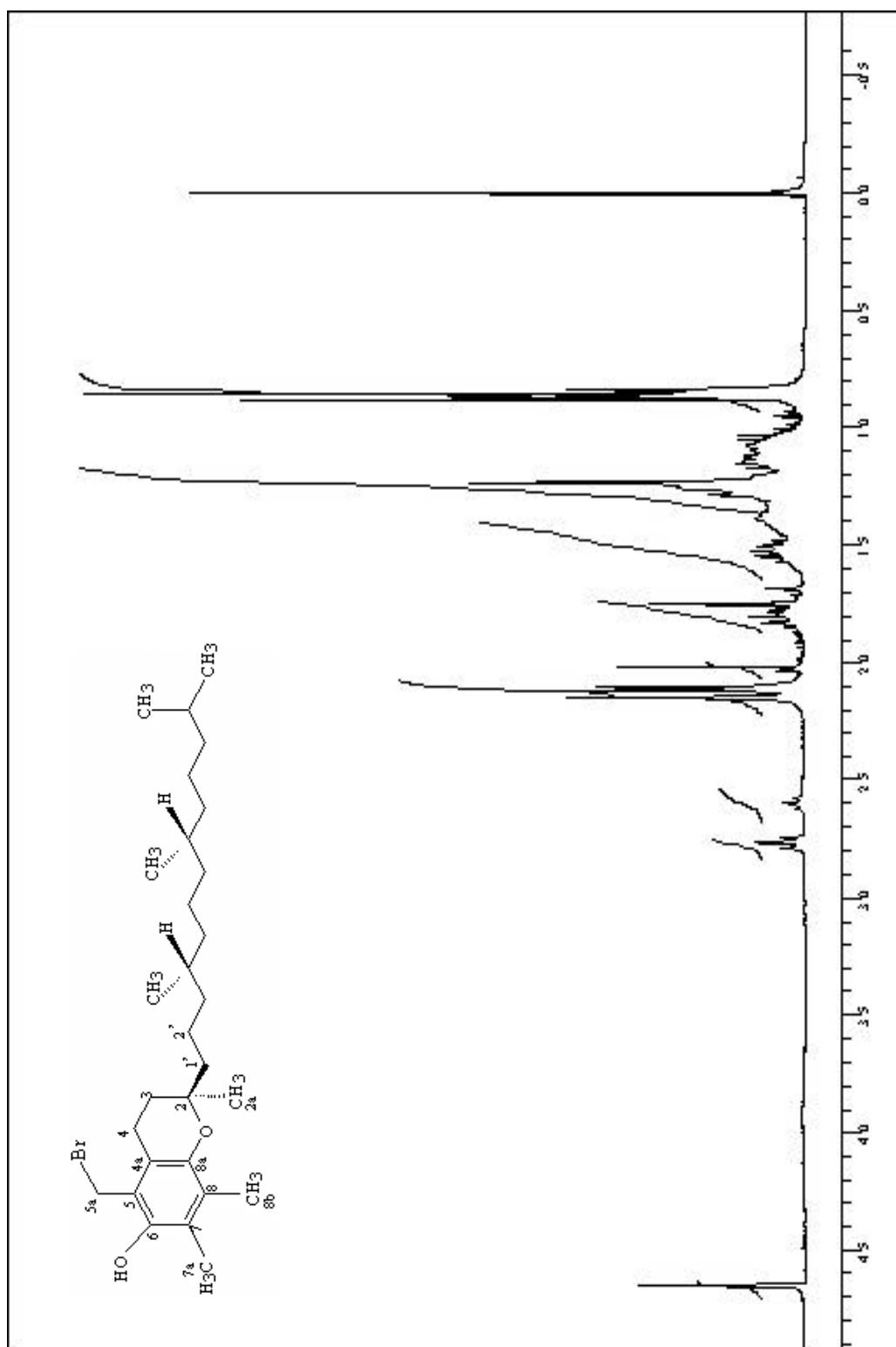


(15)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) (d):** 4,65 (s, 2H); 2,76 (t, J= 13,8 Hz, 2H); 2,59 (t, J= 13,8 Hz, 2 H); 2,11 (s, 3H); 2,14 (s, 3H); 1,87- 1,02 (H alifáticos).

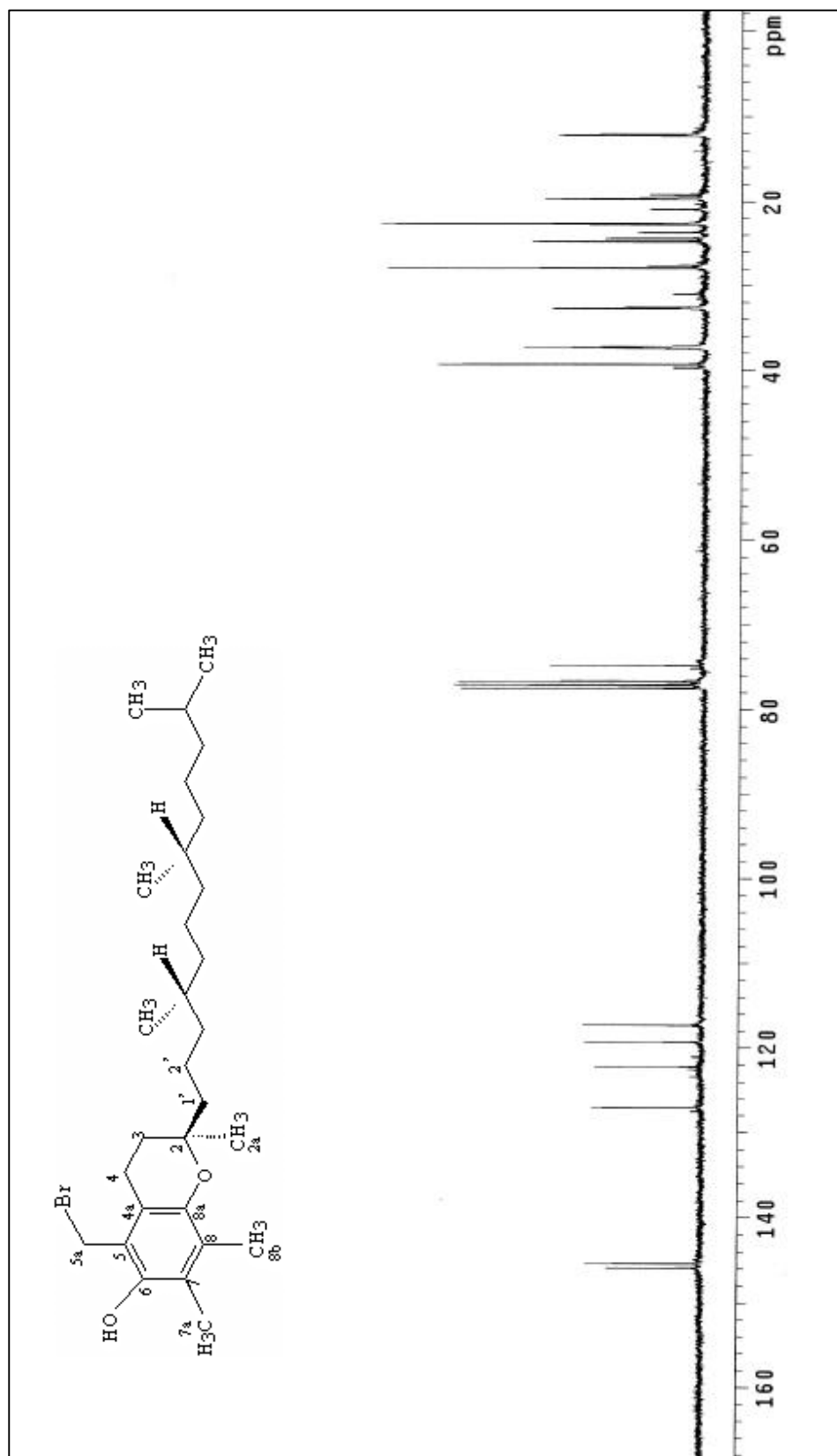
**RMN <sup>13</sup>C (75,4 MHz) (d):** 145,88 (C8a); 145,35 (C6); 127,03 (C8); 122,21 (C7); 119,26 (C5); 117,28 (C4a); 74,79 (C2); 32,68 (C3); 27,89 (C5a); 22,58 (C2a); 19,68 (C2'); 19,62 (C4); 12,17 (C7a); 12,07 (C8b).

**IV (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3414 ( $\nu$ , OH); 2948 ( $\nu$ , C-H).

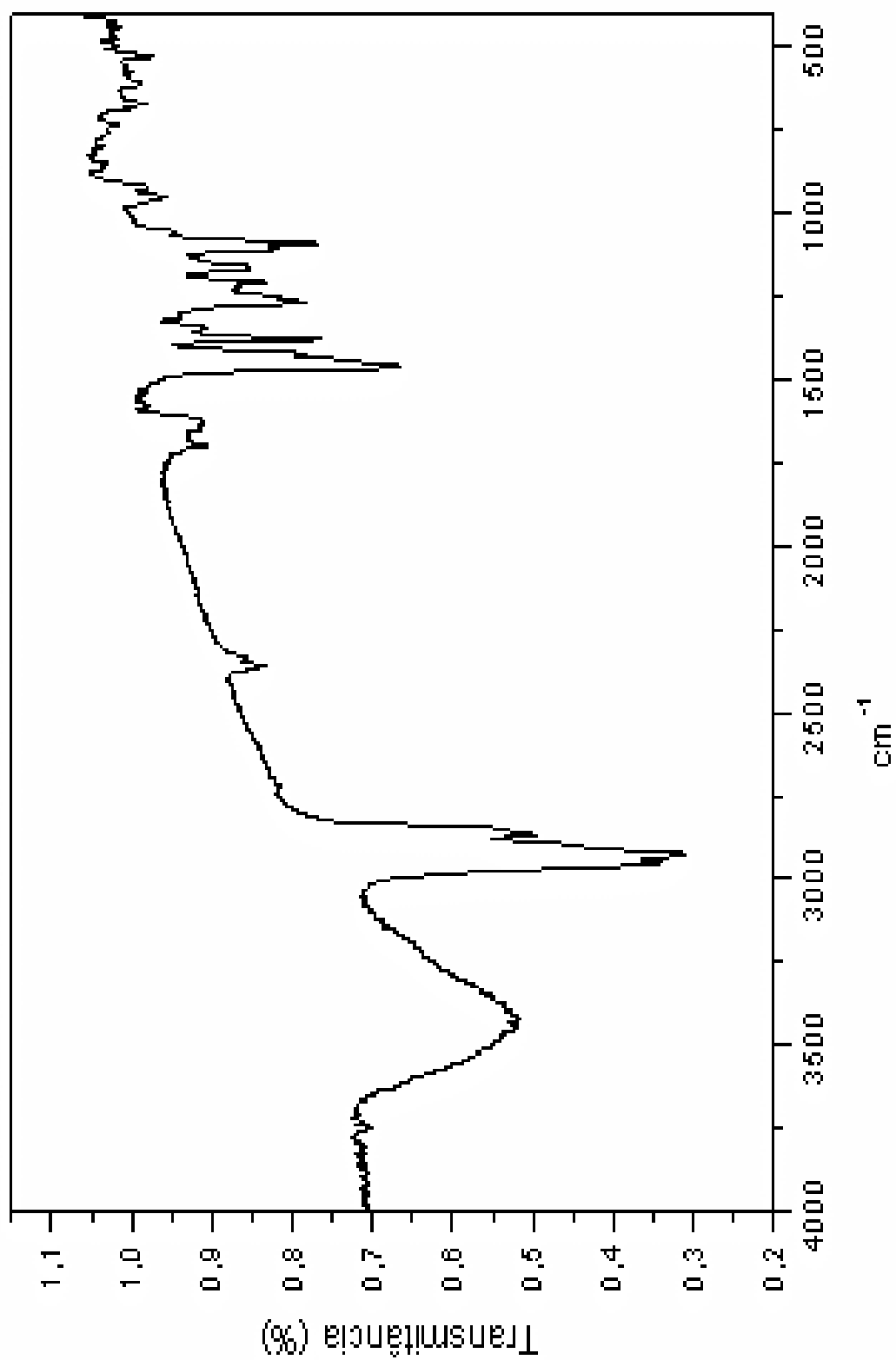


**Espectro 10.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (15) em  $\text{CDCl}_3$ .





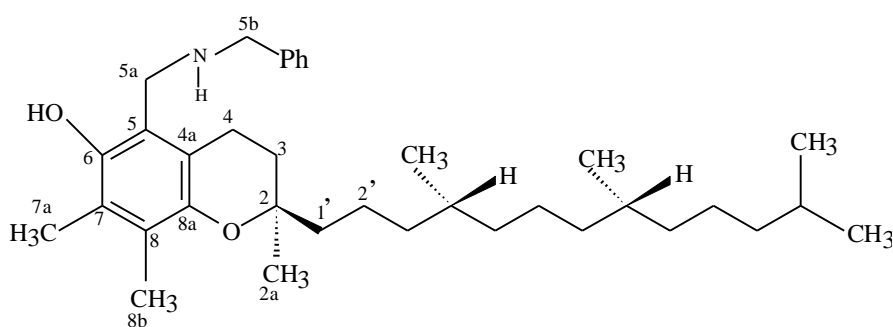
**Espectro 11.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 5a-Bromo- $\alpha$ -tocopherol (15) em  $\text{CDCl}_3$ .



Espectro 12: Espectro de IV do composto 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (15) em KBr.

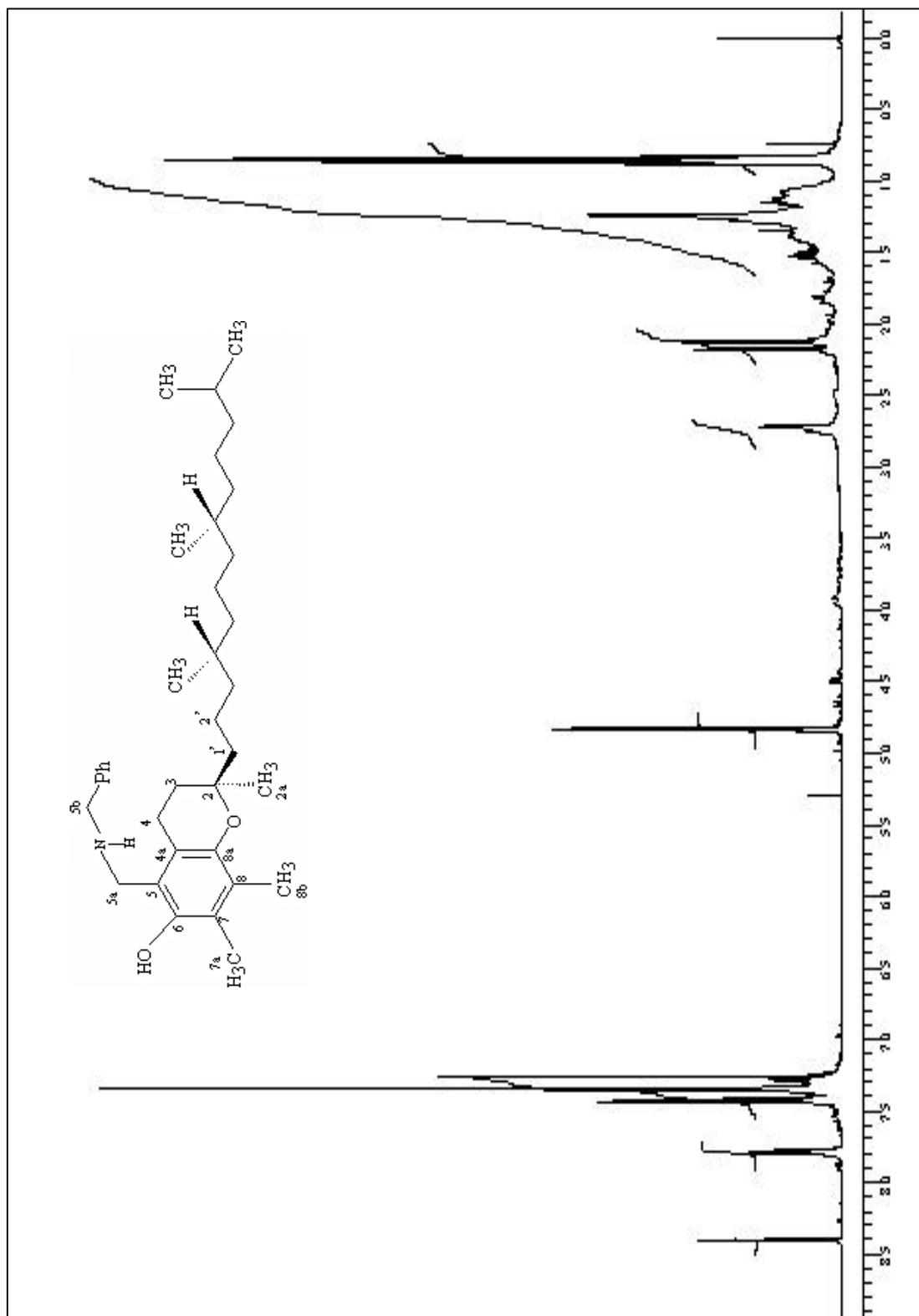
**6.4.5- Síntese de 5a-benzilamino- $\alpha$ -tocoferol - C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>N (28)**

Dissolveu-se 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (**15**) (155 mg; 0,3 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, adicionou-se à reação benzilamina (0,05 mL; 0,45 mmol) e agitou-se sob atmosfera de nitrogênio. E agitou-se durante 14 dias. Centrifugou-se o material obtido, concentrou-se a fase líquida e purificou-se por cromatografia em coluna (eluente Acetato de etila e ciclohexano 1:1 em presença de dietilamina). Obteve-se 140 mg de um óleo escuro (86%).

**Dados espectroscópicos:****(28)**

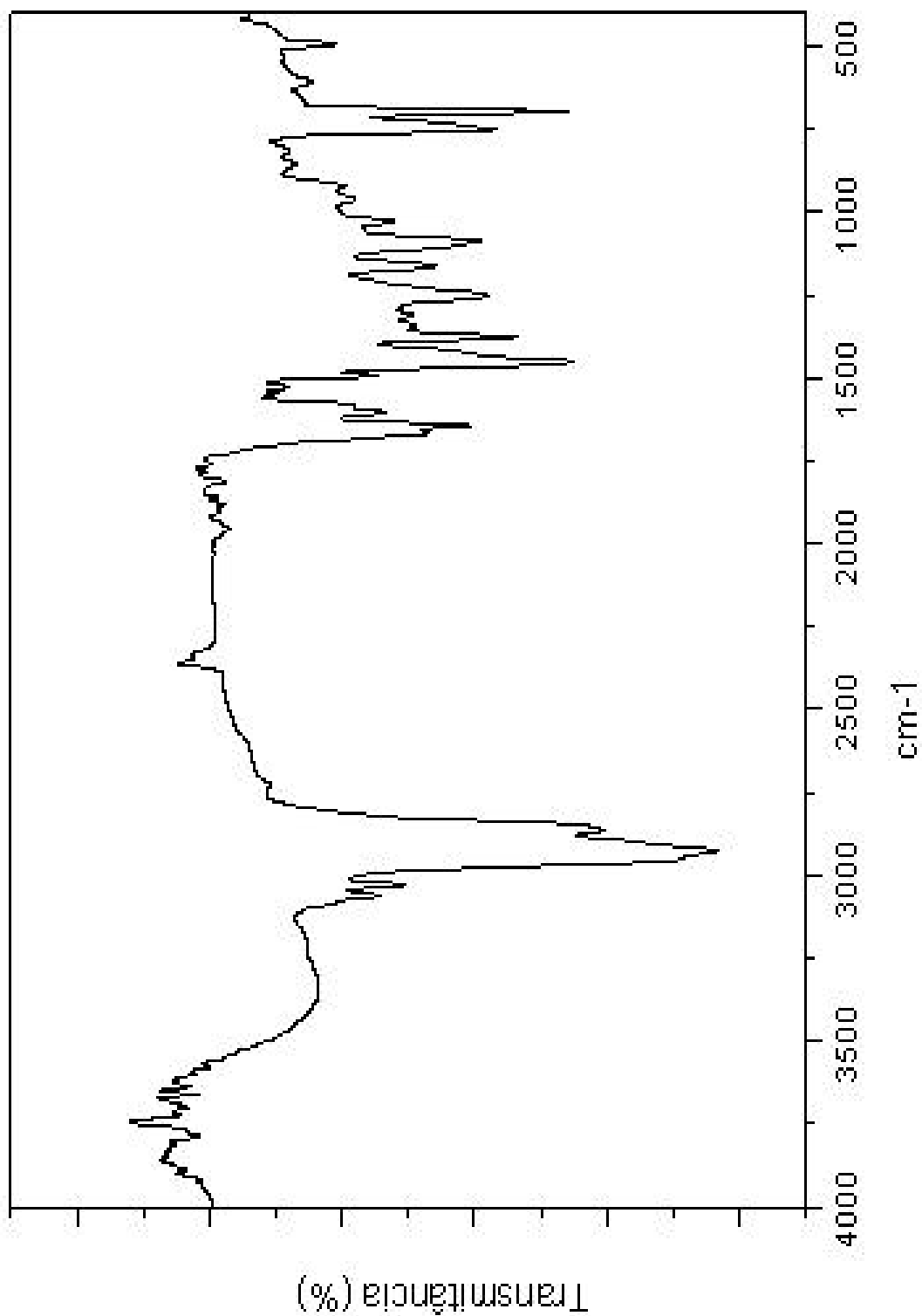
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) (d):** 7,80- 7,76 (m, H aromáticos); 7,44- 7,24 (m, H aromáticos); 4,83 (s, 4H); 2,17 (s, 3H); 2,12 (s, 3H); 1,54- 1,07 (m, H alifáticos).

**IV (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3350 ( $\nu$ , OH); 2926 ( $\nu$ , C-H).



**Espectro 13:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 5a-benzilamino- $\alpha$ -tocopherol (**28**)

em  $\text{CDCl}_3$ .

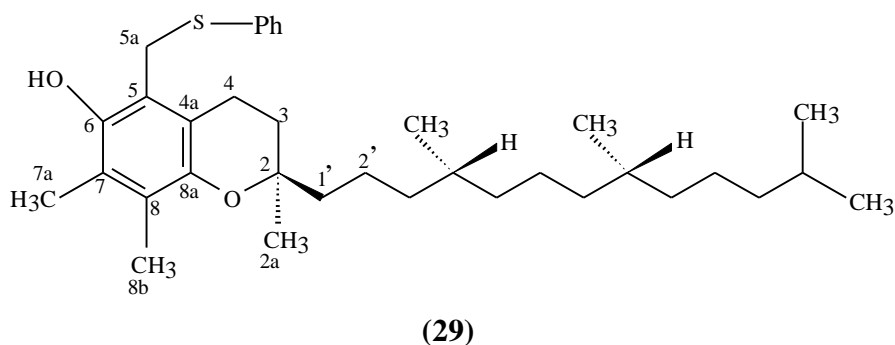


**Espectro 14:** Espectro de IV do composto 5a-benzilamino- $\alpha$ -tocoferol (**28**) em KBr.

#### 6.4.6- Síntese de 5a-fenilsulfenil- $\alpha$ -tocoferol - $C_{35}H_{54}O_2S$ (29)

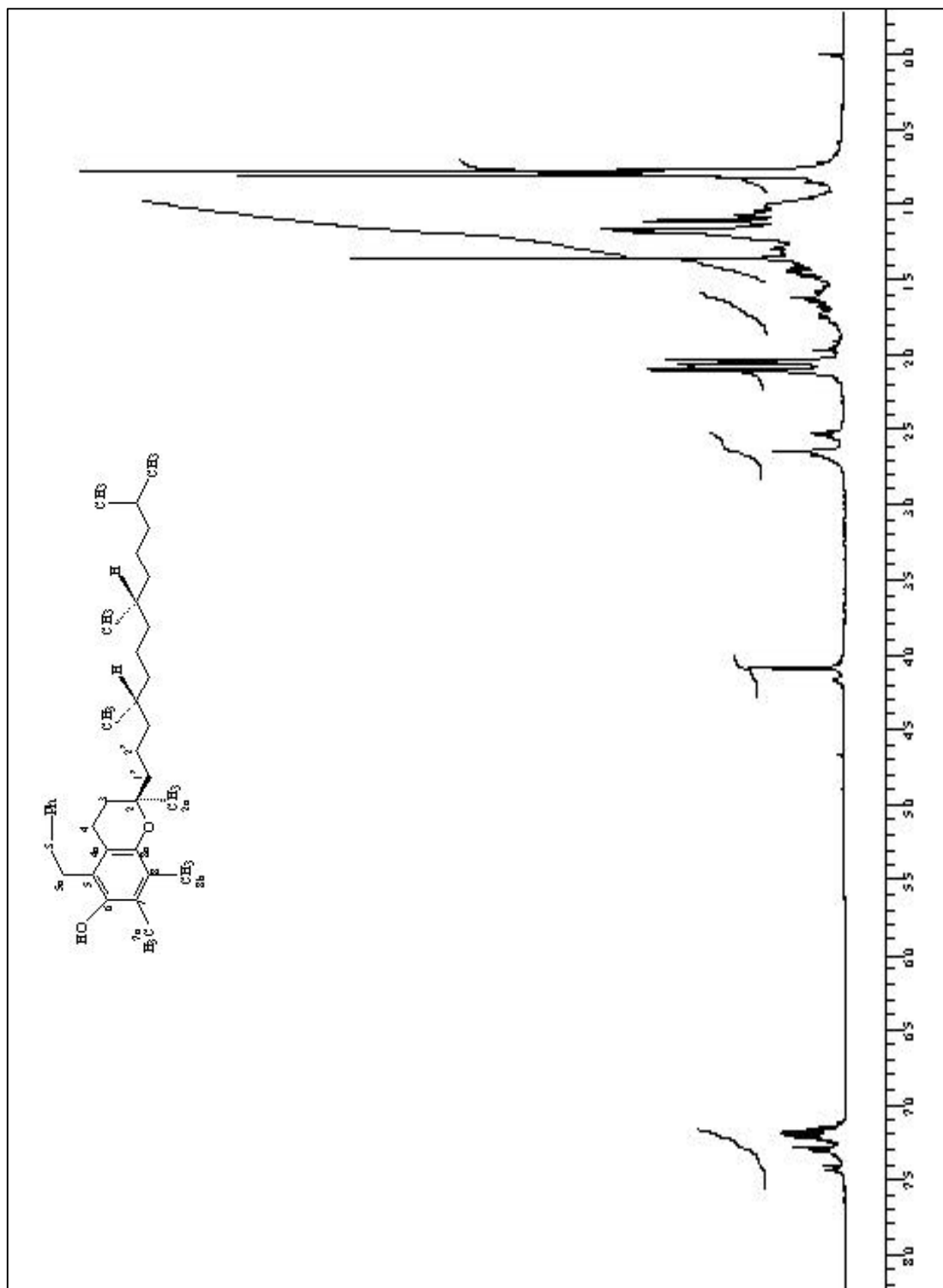
Dissolveu-se tiofenol (0,1 mL; 0,97 mmol) e trietilamina (0,14 mL; 1,0 mmol) em THF e agitou-se durante 30 minutos. Adicionou-se à reação 5a-Bromo- $\alpha$ -tocoferol (15) (260 mg; 0,5 mmol) dissolvido em THF. Agitou-se durante 24 horas e separou-se as fases com acetato de etila. Concentrou-se a fase orgânica e purificou-se por cromatografia em coluna (eluente AcOEt: ciclohexano 1:9). Obteve-se um óleo escuro 80 mg (30%).

#### Dados Espectroscópicos:

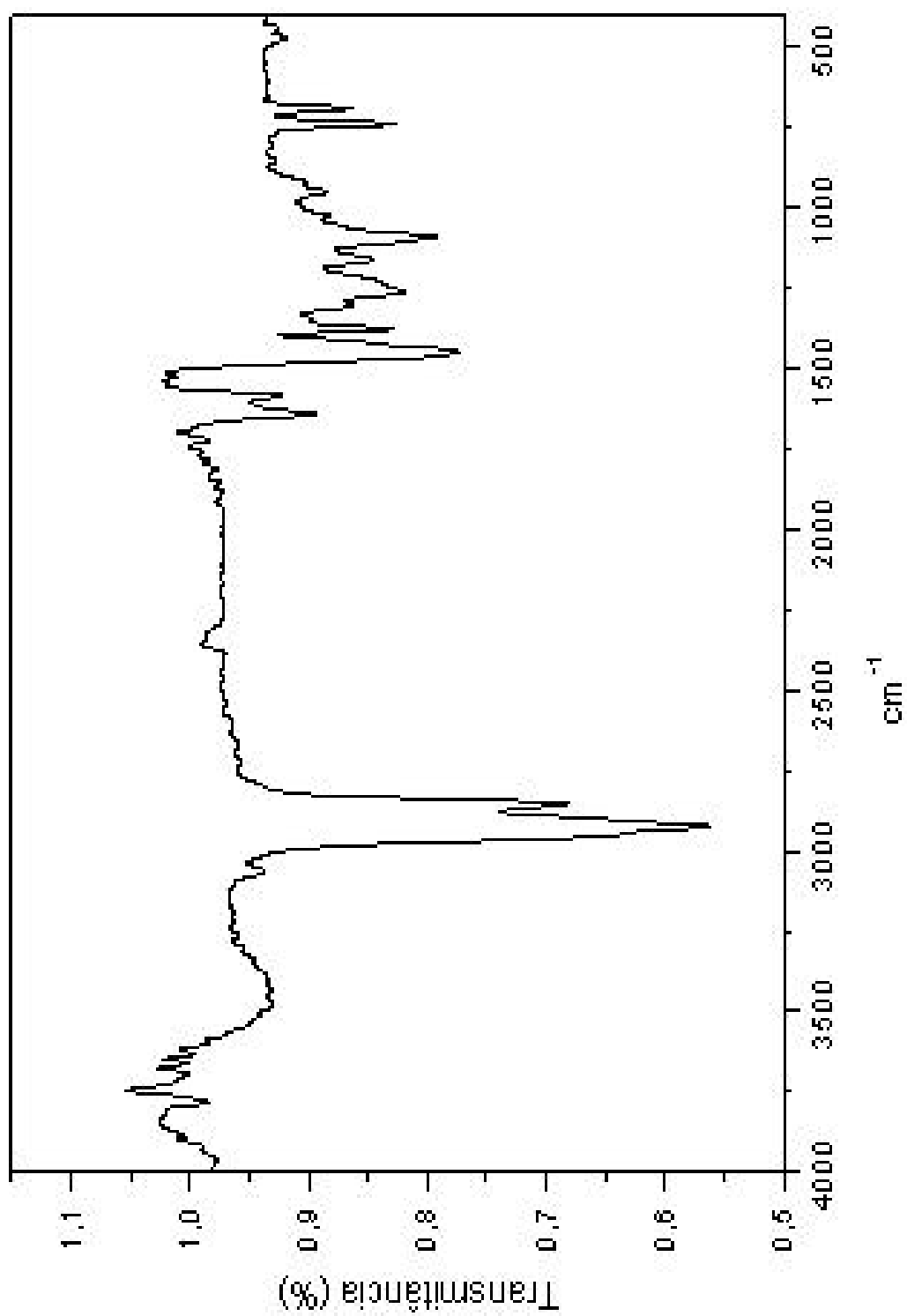


**RMN  $^1H$  (300 MHz)** (d): **7,43- 7,11** (m, H aromáticos); **4,08** (s, 2H); **2,18** (s, 3H); **2,13** (s, 3H); **1,75- 1,10** (m, H alifáticos).

**IV (KBr)  $\bar{\nu}$  ( $cm^{-1}$ ):** **3482** ( $\nu$ , OH); **2926** ( $\nu$ , C-H).



**Espectro 15:** Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  do composto 5a-fenilsulfenil- $\alpha$ -tocoferol (29) em  $\text{CDCl}_3$



**Espectro 16:** Espectro de IV do composto 5a-fenilsulfenil- $\alpha$ -tocopherol (**29**) em KBr.



## CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*“Perguntaram a um sábio: “Como sabe que DEUS existe? ” Ele respondeu: “Seria necessária uma tocha para podermos ver o sol? “. Não precisamos ter palavras suficiente para explicar o que DEUS é, mas sabemos sem palavras que ele existe.”*

Provérbio Árabe

- 1) Halliwell, B. *Am. J Med.*, **1991**, 91, 14S.
- 2) Fang, Y. Z.; Yang, S.; Wu, G. *Nutrition*, **2002**, 18, 872.
- 3) Halliwell, B.; Gutteridge, M. C.; Cross, C. E. *J. Lab. Cli. Med.*, **1992**, 119, 598.
- 4) Burton, G. W.; Foster, D. o.; Perly, B.; slater, T. F.; Smith, I. C.; Ingold, K. U. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **1985**, 311, 565.
- 5) Maneghini, R. *Ciência Hoje*, **1988**, 5, 57.
- 6) Halliwell, B. *FASEB J.*, 1 (5), **1987**, 358.
- 7) Holley, A. E.; Cheeseman, K. H. “Radicais Livres em Medicina”, Editores Científicos, 1<sup>a</sup> edição, 1996, p.16.
- 8) Poppel, G.; Berg, H. *Cancer Letters*, **1997**, 114, 195.
- 9) Halliwell, B. *Lancet*, **1994**, 344, 722.
- 10) Deby, C.; Pincemail J.; Hans P.; Braquet P.; Lion Y.; Deby- Dupomt G.; Goutier R. Cerebral Ischemia Bes., *Eds Excerpta Medica*, **1984**, 249.
- 11) Halliwell, B. *Drugs*, **1991**, 42, 569.
- 12) Mcardle, F.; Rhodes, L. E.; Parslew, R.; Jack, C. I.; Friedmann, P. S.; Jackson, M. J. *Free Radical Biology & Medicine*, **2002**, 33, 1355.
- 13) Morisaki, K.; Ozaki, S. *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, 44, 1647.

- 14) Matsuo, M.; Matsumoto, S. *Lipids*, **1983**, 18, 81.
- 15) Mukai, K.; Okabe, K.; Hososo, H. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 557.
- 16) Mukai, K.; Fukuda, K.; Ishizu, K. *Chemistry and Physics of Lipids*, **1988**, 46, 31.
- 17) Rosenau, T.; Habicher, W. *Synlett*, **1996**, 208.
- 18) Mukai, K.; Takamatsu, k.; Ishizu, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1984**, 57, 3507.
- 19) Mukai, K.; Watanabe, Y.; Uemoto, Y.; Ishizu, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1986**, 59, 3113.
- 20) Mukai, K.; Yokoyama, S.; Fukuda, K.; Uemoto, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, 60, 2163.
- 21) Mukai, K.; Kageyama, Y.; Ishida, T.; Fukuda, K. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 552.
- 22) Burton, G. W.; Ingold, K. U. *Acc. Chem. Res.*, **1986**, 19, 194.
- 23) Burton, G. W.; Hughes, L.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 5950.
- 24) Lambelet, P.; Saucy, F.; Loliger, J. *Experientia*, **1985**, 41, 1384.
- 25) Buettner, G. R. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1993**, 300, 535.
- 26) Manfredini, S.; Vertuani, S.; Manfredi, B.; Rossoni, G.; Calviekllo, G.; Palozza, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2000**, 8, 2791.

- 27) Fukuzawa, K.; Ikebata, W.; Sohmi, K. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **1993**, 39 (suppl.), 59, (*Chem. Abstr.* **1994**, 120, 184838e); Fukuxawa, K.; Vitamin; **1994**, 68, 263, (*Chem. Abstr.* **1994**, 121, 229505h).
- 28) Rosenau, T.; Habicher, W. *Chem..Pharm. Bull.*, **1997**, 45, 1080.
- 29) Souza, A. C. *Estudo modelo para a síntese de captadores autoregeneráveis de radicais livres*, **1999**, Monografia de graduação- Universidade Federal de Pernambuco.
- 30) Morisaki, K.; Ozaki, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1996**, 69, 725.
- 31) Raic- Malic, S.; Svedruzic, D.; Gazivoda, T.; Marunovic, A.; Brundic, A.; Nagl, A.; Balzarini, J.; Clercq, E.; Mintas, M. *J Med. Chem.*, **2000**, 43, 4806.
- 32) Grisar, J. M.; Marciniak, G.; Bolkenius, F. N.; Verne- Mismar, J.; Wagner, E. R. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 2880.
- 33) Wade, L. "Organic Chemistry", 3<sup>a</sup> edição, Ed. Prentice Hall, **1995**, p.443.
- 34) Warren, S. "Organic Synthesis: The Disconnection Approach", Ed. John Wiley & Sons, **1986**, p.96.
- 35) Rosenau, T., Habicher, W. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 7919.
- 36) Rosenau, T.; Habicher, W.; Chen, C. *Heterocycles*, **1996**, 43, 787.
- 37) Rosenau, T.; Chen, C.; Habicher, W. *J. Org.; Chem.*, **1985**, 60, 8120.
- 38) Fales H.; Davis D.; Kon H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1990**, 2, 1005.

39) Kralj, M.; Kojic- Prodis, B.; Grdisa, M.; Vela., V.; Suskovic, B.; Pavelic, K. *Eur. J. Méd. Chem.*, **1996**, 31, 23.

40) Perrin, D.; Armarego, W. “Purification of Laboratory Chemicals”, **1982**.