

MARIA DO CARMO ALBERTO

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pela candidata Sra. Maria
do Carmo Alberto e aprovada pela comissão
julgadora.

AM/6/85

Assilveira

ALTERAÇÕES MOLECULARES RESULTANTES DA AÇÃO DE OXIDANTES
SOBRE O TOCOFEROL, O CALCIFEROL E O COLESTEROL; SUAS
IMPLICAÇÕES NA REATIVIDADE HISTOQUÍMICA ADQUIRIDA POR
ESSAS SUBSTÂNCIAS.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para ob-
tenção do grau de Mestre em
Ciências.

ORIENTADORA

Profa. Dra. SIMELLI RITA SILVEIRA

AL14a

6429/BC

1985 -

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora SINELI RITA SILVEIRA manifesto minha gratidão pela valiosa orientação, apoio e dedicação em todos momentos deste trabalho.

Ao Professor Doutor WALTER AUGUST HADLER pelo incentivo e apoio durante toda a minha formação.

À Professora Doutora CONCETTA KASCHERS pelo auxílio na parte de espectrometria de massa e pelas sugestões apresentadas quando da leitura do manuscrito desta tese.

Aos Professores Doutores PAULO M. IMAMURA e ALDO FOCESI JUNIOR pela leitura do manuscrito desta tese, bem como pelas sugestões apresentadas.

A todos que, voluntariamente, auxiliaram no desenvolvimento do presente trabalho.

Aos meus pais
Fernando e Emília
dedico.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	13
1. Técnicas de extração e purificação.....	13
1.1. Acetato de DL α -tocoferol	13
1.2. Calciferol e colesterol	14
2. Preparo das soluções	14
3. Técnicas de oxidação	15
3.1. Técnica de oxidação com o ácido per <u>f</u> ormi <u>co</u>	16
3.2. Técnica de oxidação com a solução de per- manganato de potássio em meio alcalino ..	17
3.3. Técnica de oxidação com a solução de per- manganato de potássio em meio ácido	18
3.4. Técnica de oxidação com o ácido peracé- tico	18
3.5. Técnicas espectrofotométricas	19
4. Técnica de separação das substâncias provenien <u>tes</u> da oxidação do DL α -tocoferol, do calcife- rol e do colesterol	20
4.1. Substâncias provenientes da oxidação do DL α -tocoferol	20
4.2. Substâncias provenientes da oxidação do calciferol e do colesterol	22
RESULTADOS	23
1. Propriedades dos produtos resultantes do trata- mento do acetato de DL α -tocoferol por diver- sos oxidantes	26
1.1. Espectro de absorção ultravioleta apresen- tado pelo acetato de DL α -tocoferol e pe- lo acetato de DL α -tocoferol tratado por diversos agentes oxidantes	26

1.2. Espectro de absorção infravermelha apresentado pelo acetato de DL α -tocoferol e pelo acetato de DL α -tocoferol tratado por diversos agentes oxidantes	30
1.3. Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons apresentado pelo acetato de DL α -tocoferol e pelo acetato de DL α -tocoferol tratado por diversos agentes oxidantes	34
2. Propriedades dos produtos resultantes do tratamento do calciferol por diversos oxidantes ...	35
2.1. Espectro de absorção ultravioleta apresentado pelo calciferol e pelo calciferol tratado por diversos agentes oxidantes ..	35
2.2. Espectro da absorção infravermelha apresentado pelo calciferol e pelo calciferol tratado por diversos agentes oxidantes ..	42
2.3. Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do calciferol e do calciferol tratado pelos diferentes oxidantes	42
3. Propriedades dos produtos resultantes do tratamento do colesterol por diversos oxidantes ...	50
3.1. Espectro de absorção ultravioleta apresentado pelo colesterol e pelo colesterol tratado por diversos agentes oxidantes ..	50
3.2. Espectro de absorção infravermelha apresentado pelo colesterol e pelo colesterol tratado por diversos agentes oxidantes ..	55
3.3. Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do colesterol e do colesterol tratado por diversos agentes oxidantes ..	55
4. Isolamento cromatográfico do produto de oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido perfômico, responsável pela reatividade histológica	63

4.1. Análise do produto com Rf 0,08, resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico e separado por cromatografia em camada delgada	64
5. Separação cromatográfica dos produtos de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino, responsável pela reatividade histoquímica	73
5.1. Análise do produto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino	75
6. Isolamento cromatográfico dos produtos de oxidação do colesterol pelo ácido peracético, responsável pela reatividade histoquímica ...	78
DISCUSSÃO	80
RESUMO E CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

INTRODUÇÃO

A identificação histoquímica de uma substância ou de um grupo funcional pode ser efetuada, desde que a substância ou o grupo funcional sejam capazes de reagir, especificamente, com determinado reagente, produzindo com posto de cor própria; a identificação pode, também, ser efetuada quando a substância ou o grupo funcional são capazes de ligar-se a um corante ou a uma substância fluorescente, propriedade essa que também possibilita sua demonstração topoquímica. Muitas substâncias tissulares não apresentam essas propriedades e, portanto, não podem ser demonstradas dessa maneira. Neste caso, para que essas substâncias possam ser demonstradas, histoquimicamente, é necessário o emprego de pré-tratamentos, que lhes confirmam propriedades que possibilitem sua detecção. Dentre os pré-tratamentos usados destaca-se o emprego de oxidantes capazes de dar origem a produtos de oxidação dotados de reatividade, o que permite sua identificação.

Com a finalidade de tornar possível a identificação histoquímica de substâncias originalmente não reativas, ou destituídas de propriedades que permitam sua demonstração por métodos específicos, Hadler *et alii* (1968a) estudaram o efeito de vários oxidantes sobre o comportamento dessas substâncias. Dentre os oxidantes usados destacam-se: 1 - o permanganato de potássio em meio alcalino, neutro, ou ácido; 2 - alguns perácidos, tais como: o peracético, o perfórmico e o perclórico; 3 - o peróxido de hidrogênio; 4 - o bismutato de sódio; 5 - o

bromo. A ação desses oxidantes foi verificada em substâncias de diversas naturezas, quais sejam: 1 - hidrocarbonetos saturados; 2 - lípidos, inclusive fosfolípidos; 3 - esteróides; 4 - diversos compostos insaturados e aromáticos. Hadler *et alii* (1968b) verificaram que alguns oxidantes agiam de modo preferencial sobre algumas dessas substâncias e que os compostos oxidados tornavam-se capazes de corarem - se pela hematoxilina crômica ou pela aldeído-fucsina. A "coloração seletiva" apresentava interesse prático, pois o emprego de oxidantes adequados permitia caracterizar substâncias dotadas da estrutura Δ^5 -3-hidroxiesteróides (Hadler *et alii*, 1968c). Assim, usando-se como oxidante uma solução de permanganato de potássio em meio ácido ou, então, o ácido peracético, obtêm-se produtos resultantes da oxidação dos Δ^5 -3-hidroxiesteróides os quais coram-se seletivamente com azul de Alcian ou azul de toluidina, em solução fortemente ácida (pH = 0,3). As outras substâncias empregadas não apresentavam essa propriedade.

O ácido peracético, da mesma maneira que o permanganato de potássio em meio ácido, tem sido usado como oxidante também com a finalidade de determinar o aparecimento de grupos basófilos, que podem ser demonstrados histoquimicamente (Lison, 1960). Todavia, Hadler *et alii* (1968c) mostraram que o ácido peracético age especificamente sobre o colesterol e outros Δ^5 -3-hidroxiesteróides produzindo composto que se cora com o azul de toluidina e que reage positivamente ao reativo de Schiff. As reações do ácido peracético - azul de toluidina e do ácido peracético - Schiff são dotadas de especificidade, conforme foi de-

monstrado em modelos de papel de filtro e em cortes histológicos (Hadler & Silveira, 1981a).

Por outro lado, Hadler & Silveira (1981b) verificaram que o tocoferol, previamente oxidado pelo ácido perfôrmico, fornece produto que se cora por solução de azul de toluidina em pH fortemente ácido sendo, portanto, o produto da oxidação fortemente basófilo. Além disso, o tocoferol depois de oxidado adquire a propriedade de recorar o reativo de Schiff, sendo também redutor. Essas propriedades, porém, não são adquiridas pelo tocoferol previamente tratado com cloreto mercúrico adicionado a uma solução de formalina, usada como fixadora (Hadler & Silveira, 1977, 1981b). A especificidade desta reatividade foi analisada em fragmentos de papel de filtro contendo pequena quantidade de várias substâncias, tais como: ácidos graxos, triglicérides, fosfolípidos, esteróides, vitaminas, proteínas, aminoácidos e ácido ribonucléico. As reações do ácido perfôrmico - azul de toluidina e do ácido perfôrmico - Schiff mostraram-se específicas para o tocoferol, dentre as substâncias empregadas e, além disso, possuíam sensibilidade em grau adequado para a sua demonstração histoquímica, tanto em modelos de papel de filtro quanto em cortes histológicos.

Com base no efeito de oxidantes sobre as várias substâncias assinaladas precedentemente, Hadler & Silveira (1977) demonstraram, também, que o calciferol pode ser evidenciado histoquimicamente após pré-tratamento oxidante com solução de permanganato de potássio em meio alcalino. O produto formado, sob ação dessa oxidação, tem a proprie-

dade de se corar com solução de azul de toluidina em pH 0,3. Além disso, o produto oxidado também recora o reativo de Schiff. Essas propriedades não são reveladas quando o calciferol é previamente tratado por solução fixadora contendo cloreto mercúrico e formalina (Hadler & Silveira, 1981b). Portanto, produtos com reatividade histoquímica semelhante são obtidos a partir do tocoferol oxidado pelo ácido perfórmico ou do calciferol oxidado pelo permanganato de potássio em meio alcalino; contudo, esses oxidantes são específicos, pois o ácido perfórmico atua apenas sobre o tocoferol e o permanganato de potássio em meio alcalino apenas sobre o calciferol, dentre as substâncias utilizadas. Além disso, foi verificado que o colesterol oxidado pelo ácido peracético, ou pelo permanganato de potássio em meio ácido, fornece produtos de oxidação com reatividade histoquímica muito semelhante (Hadler *et alii*, 1968c; Hadler & Silveira, 1976; Silveira & Hadler, 1977, 1981).

Hadler *et alii* (1968b) estudaram as propriedades químicas do produto de oxidação do colesterol pelo permanganato de potássio em meio ácido. Sua basofilia foi demonstrada através da coloração pelo azul de toluidina ou pelo azul de Alcian, em solução fortemente ácida; testes histoquímicos, tais como: a redução da solução de argentodiamina, a reação da 2,4-dinitrofenilidrazina e a reatividade ao reagente de Schiff, demonstraram suas propriedades redutoras. Por outro lado, o bloqueio do grupo carbonila pela 2,4-dinitrofenilidrazina e dos grupos ácidos, através da esterificação, determinaram perda da reatividade dos produtos de oxidação, revelando a importância desses grupos no

comportamento histoquímico do colesterol oxidado. Além disso, o bloqueio das duplas ligações pelo bromo inibiu a formação do produto reativo do colesterol oxidado, revelando a importância da dupla ligação. Os ésteres do colesterol, quando submetidos à oxidação por solução de permanganato de potássio em meio ácido, não originam o produto reativo, o que indica que o grupo OH do carbono 3, deve estar livre para que a oxidação seja eficaz. Além disso, substâncias dotadas do anel cíclico do colesterol e que possuem o grupo OH no carbono 3, mas com dupla ligação entre os carbonos 4 e 5, não originam produtos de oxidação com a mesma reatividade dos fornecidos pela oxidação do colesterol.

Por outro lado, o produto resultante da oxidação do colesterol pela solução de permanganato de potássio, em meio ácido, apresenta a propriedade de corar-se pela hematoxilina-crômica e pela aldeído-fucsina, de reagir com a 2,4-dinitrofenilidrazina e de ser Schiff positivo; portanto, trata-se de substância redutora e fortemente basófila. Essas propriedades, que são inibidas pelo bloqueio do grupo carbonila e dos grupos ácidos, indicam que o grupo responsável pela reatividade possui características de grupo cetoácido (Hadler *et alii*, 1968b).

O permanganato de potássio tem sido usado em histoquímica como oxidante de grupos alcoólicos e de duplas ligações, os quais forneceria grupos aldeídos (Lisson, 1960); os grupos reativos assim formados são revelados pelo reativo de Schiff. A oxidação excessiva determinaria a oxidação dos grupos aldeídos que se transformariam em grupos carboxílicos. Como o glicogênio, após o trata-

mento pelo permanganato de potássio, torna-se Schiff positivo e passa a se corar pela aldeído-fucsina, Lison (1960) admite que se formem tanto grupos aldeídos quanto carboxílicos, devido à ação oxidante do permanganato de potássio. Porém, Hadler *et alii* (1968a) mostraram que várias substâncias alifáticas insaturadas e aromáticas, de estruturas diversas, tais como o ácido oléico, o m-dinitrobenzeno, a prednisona, a dicumarina, a menadiona e a quinona, todas elas dotadas de duplas ligações, não são capazes de fornecer produtos de oxidação reativos ao reagente de Schiff e coráveis pela aldeído-fucsina, indicando que a dupla ligação não deve ser considerada requisito indispensável à formação de produtos redutores e basófilos.

Por outro lado, substâncias que contêm grupos sulfidrila e dissulfeto, tais como as encontradas na camada córnea da epiderme (Scott & Clayton, 1953; Braun-Falco & Rathjens, 1954; Goslar, 1957) e nas granulações das células β das ilhotas de Langerhans (Scott & Clayton, 1953) após o tratamento pelo permanganato de potássio, se coram pela aldeído-fucsina. Lison (1960) interpreta a coloração pela aldeído-fucsina como consequência da formação de substâncias com caráter ácido pronunciado, devido à presença do grupo sulfônico, ou sulfínico, ou sulfúrico, que resultaria da oxidação pelo permanganato de potássio.

Tem sido admitido, por alguns histoquímicos, que as duplas ligações dos lípidos insaturados são passíveis de serem demonstradas usando-se a oxidação pelo ácido perfórmico (Lillie, 1952; Pearse, 1951). Esse oxidante romperia as duplas ligações promovendo o aparecimento do gru

po aldeído, que recora o reativo de Schiff, sendo os lípi-
des insaturados assim revelados. Essa asserção foi propos-
ta com base nos resultados de Lillie (1952) que, por meio
do tratamento dos lípidos insaturados pelo bromo, que de-
termina bloqueio das duplas ligações, obteve inibição da
formação do produto reativo. Além disso, a esterificação
e o tratamento pela fenilidrazina provocam inibição da rea-
tividade do produto de oxidação, resultante do tratamento
pelo ácido perfórmico. Contudo, Hadler & Silveira (1981b)
usando fitas de papel de filtro contendo ácido oléico, ca-
roteno, vitamina A e substâncias afins, que apresentam uma
ou várias ligações duplas, verificaram que esses compos-
tos, quando tratados pelo ácido perfórmico, não fornecem
produtos de oxidação capazes de recorar o reativo de
Schiff. Estes resultados sugerem que nem toda dupla liga-
ção tem participação efetiva na formação de produtos rea-
tivos, havendo necessidade de outras peculiaridades estru-
turais da molécula para que a substância adquira as pro-
priedades redutora e de caráter ácido, que lhes confirmam
reatividade ao reagente de Schiff e basofilia.

O grupo dissulfeto tem sido, também, interpreta-
do como capaz de originar produto intensamente basófilo ,
quando oxidado pelo ácido perfórmico; segundo Pearse (1951),
nestas circunstâncias, se formaria ácido sulfínico, o qual
seria responsável pela basofilia. Também, Lillie & Bangle
(1954) e Adams & Sloper (1956) admitiram que o grupo dis-
sulfeto seria responsável pela basofilia apresentada por
substâncias dotadas desse grupo, o qual sob a ação oxidan-
te do ácido perfórmico daria origem ao ácido cistéico. Po-

rêm, Hadler & Silveira (1981b) mostraram, em modelo de papel de filtro, que a cistina, quando oxidada pelo ácido perfórmico, não fornece substâncias reativas tanto ao reativo de Schiff quanto ao azul de toluidina. Com a finalidade de evitar o efeito da remoção da cistina contida nos modelos de papel de filtro, pelos reativos, o que seria responsável pela ausência de reatividade, esses autores usaram proteínas contendo alto teor de cistina, as quais mesmo após fixação fornecem resultados negativos, embora não sejam removidas dos papéis. Esses resultados, portanto, não permitem estabelecer relação entre o grupo dissulfeto e a basofilia apresentada por substâncias dotadas desse grupo.

Por outro lado, dentre os oxidantes estudados por Hadler & Silveira (1981b), o ácido perfórmico apresenta atividade oxidante peculiar sobre o tocoferol, originando substância reativa ao reagente de Schiff e fortemente basófila; a referida peculiaridade diz respeito à formação do produto proveniente do tocoferol oxidado, pois compostos de diversas naturezas, com estrutura química diferente da do tocoferol, quando submetidos à ação oxidante do ácido perfórmico, não fornecem produtos basófilos, nem capazes de reagir positivamente com o reativo de Schiff. A substância formada pela oxidação perfórmica do tocoferol, responsável por sua reatividade histoquímica, não é conhecida.

A literatura contém numerosas publicações relacionadas com a oxidação do tocoferol e com os produtos resultantes de sua oxidação, porém nenhuma delas refere-se ao emprego desses produtos com a finalidade de identifica-

ção histoquímica do tocoferol. A maioria dos produtos de oxidação pertence ao grupo das cetonas. Grams (1971) fotoxidando o tocoferol obteve a 4a, 6-epoxi-8a-metoxi- α -tocoferona, a α -tocoquinona - 2,3-óxido e a α -tocoquinona. Clough *et alii* (1979) sintetizaram a p-hidroperoxidienona, a partir da reação fotoquímica do tocoferol (a - 30°C). A oxidação do tocoferol efetuada em sistema contendo xantina-xantina oxidase também origina uma cetona, ou seja, a 8a-hidroxi- α -tocoferona (Nishikimi *et alii*, 1980). Outros produtos obtidos por meio da oxidação do tocoferol foram a dimetilcicloexadienona e a cicloexadienona (Urano & Matsuo, 1976; Urano *et alii*, 1977). Yamauchi & Matsushita (1979) obtiveram como produto da fotoxidação do tocoferol a 8a-5-hidroxi- δ -tocoferildienona e a 8a R-hidroxi- δ -tocoferildienona, as quais se decompõem em tocoferilquinona. Outros produtos de natureza quinônica são, também, formados quando o tocoferol é submetido à ação de diferentes oxidantes. Assim, através da autoxidação de lípidos insaturados dotados de tocoferol marcado com ^{14}C , Witting (1969) obteve a formação da tocoferilquinona radioativa. Resultado semelhante foi obtido por Porter *et alii* (1971), os quais verificaram a formação de quinona monomérica quando o tocoferol era submetido à ação do oxigênio atmosférico. De modo análogo, a atividade antioxidante do tocoferol é perdida em presença de Fe (III), ao mesmo tempo em que o tocoferol é convertido em vermelho de tocoferol e tocoferilquinona (Frampton *et alii*, 1960), os quais são compostos quinoides. O Fe (III) e o Cu (II) oxidam o tocoferol transformando-o em p-tocoferilquinona (Cort *et alii*, 1978).

Outros grupos, além do cetônico, também são formados pela oxidação dos tocoferóis. Boguth & Niemann (1971) e Ozawa *et alii* (1978, 1983) identificaram o grupo cromanoxil como consequência da oxidação do tocoferol pelo íon superóxido (O_2^-), ou por sua exposição à radiação ultravioleta. A oxidação do tocoferol por radiação de luz dentro do espectro visível ou após o tratamento pelo complexo bleomicina - Fe (II) dá origem a um composto dotado de grupo fenoxi (Kohl *et alii*, 1969; Svanholm *et alii*, 1974; Sugiura, 1979).

Nilsson *et alii* (1969) observaram que a oxidação do α -, do β -, do γ - e do δ -tocoferol, ou de seus compostos, pelo ferricianeto alcalino, origina dois diferentes produtos conforme o carbono 5 do anel benzênico contenha, ou não, o grupo metila; assim, um trímero é formado se o carbono 5 não contiver o grupo metila e um dímero é formado na presença do grupo metila ligado ao carbono 5 do anel benzênico. De forma semelhante, Luan *et alii* (1977) verificaram a formação de oligômeros, quando o tocoferol é submetido à oxidação por hidroperóxidos lipídicos, por sais de ferro ou pelo oxigênio atmosférico.

Ishikawa (1974) oxidou o tocoferol com o óxido de trimetilamina à temperatura de 180°C , sob atmosfera de nitrogênio. As substâncias obtidas foram o 7-formil- β -tocoferol, o 5-formil- γ -tocoferol-3-eno e o 5-formil- γ -tocoferol.

No que concerne à oxidação do calciferol e aos produtos resultantes de sua oxidação, constam da literatura trabalhos que abrangem, principalmente, a fotoxidação

do ergocalciferol e que, portanto, não estão diretamente relacionados com o objetivo da presente investigação. Windaus & Grundmann (1936) estudaram a ação oxidante do permanganato de potássio, assim como do ácido crômico e da ozonização sobre a vitamina D₂; esses autores identificaram os produtos de oxidação como pertencentes ao grupo das cetonas e aldeídos ou como produtos dotados de caráter ácido e do grupo aldeído. No entanto, a reatividade desses produtos nunca foi investigada sob o ponto de vista de sua aplicação em histoquímica.

Por outro lado, a ação oxidante do permanganato de potássio, em meio ácido ou alcalino, e de perácidos sobre vários esteróides, inclusive o colesterol, assim como as propriedades químicas dos produtos resultantes dessas oxidações, também, foram bastante estudadas (Windaus, 1907; Westphalen, 1915; Ehrenstein & Decker, 1940; Marker & Rohrmann, 1940; Baxter & Spring, 1943), porém todos os trabalhos são de natureza química e não foi estabelecido nenhum elo de ligação entre eles e a histoquímica.

Com base no que foi sumariado anteriormente depreende-se que os produtos que se formam por oxidação do tocoferol e que apresentam natureza diversa, conforme o oxidante usado, têm sido muito estudados quanto à sua natureza e suas propriedades químicas. No entanto, a reatividade histoquímica dos produtos de oxidação do tocoferol, até agora identificados, não foi analisada, o que impede que se estabeleça qualquer correlação entre esses produtos e os eventuais responsáveis pela reatividade histoquímica do tocoferol, quando submetido à oxidação pelo ácido

perf6rmico. Dificuldades semelhantes s6o encontradas na tentativa de estabelecer correla76o entre a reatividade , apresentada pelos produtos de oxida76o tanto do calciferol pelo permanganato de pot6ssio em meio alcalino quanto do colesterol pelo 6cido perac6tico, respons6vel pela identifica76o histoqu6mica dessas subst6ncias e os produtos de oxida76o do calciferol e do colesterol consignados na literatura.

Os compostos provenientes da oxida76o do acetato de DL α -tocoferol, do calciferol e do colesterol pelo 6cido perf6rmico, ou pelo permanganato de pot6ssio em meio alcalino, ou em meio 6cido, ou pelo 6cido perac6tico, foram estudados no presente trabalho, principalmente atrav6s da an6lise espectrofotom6trica. O objetivo primordial do presente trabalho consiste em identificar e estabelecer compara76o entre os produtos de oxida76o, os quais s6o respons6veis pela reatividade histoqu6mica do tocoferol, do calciferol e do colesterol. Outra finalidade 6 demonstrar que os diferentes oxidantes usados agem de modo preferencial e seletivo sobre certas subst6ncias, o que possibilita sua caracteriza76o histoqu6mica, atrav6s das seguintes rea76es: 1 - rea76o do 6cido perf6rmico - azul de toluidina e rea76o do 6cido perf6rmico - reativo de Schiff, usadas para a caracteriza76o do tocoferol; 2 - rea76o do permanganato alcalino - azul de toluidina e rea76o do permanganato alcalino - reagente de Schiff, empregadas para a detec76o do calciferol e do 7-deidrocolesterol; 3 - rea76o do 6cido perac6tico - azul de toluidina e do 6cido perac6tico - reativo de Schiff, utilizadas para a localiza76o histoqu6mica do colesterol.

MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de obter substâncias em estado de pureza compatível com os métodos de análise utilizados foram empregadas técnicas de extração e purificação adequadas. As seguintes substâncias purificadas foram utilizadas: 1 - acetato de DL α -tocoferol, extraído de produto farmacêutico de vitamina E, conforme será exposto oportunamente; 2 - calciferol, extraído de produto farmacêutico; 3 - colesterol pré-análise.

1. Técnicas de extração e purificação.

1.1. Acetato de DL α -tocoferol.

Comprimidos de preparação farmacêutica de vitamina E, contendo o total de 2 g de acetato de DL α -tocoferol, foram lavados várias vezes em água destilada para a remoção do envoltório. Após secagem e trituração em gral, o material pulverizado foi extraído com éter etílico e filtrado em papel de filtro; a extração com éter etílico foi repetida várias vezes. Os filtrados foram reunidos e o éter etílico foi evaporado a 60°C. O rendimento da extração foi cerca de 800 mg de acetato de DL α -tocoferol, ou seja, 40%.

Com a finalidade de verificar o grau de pureza do acetato de DL α -tocoferol obtido, foi efetuada cromatografia em placas de gel de sílica, cuja fase móvel foi uma solução contendo hexano e acetato de etila (97,5:2,5 vol./vol.). A preparação das placas para a cromatografia foi

efetuada da seguinte maneira: pasta homogênea, contendo sílica e água destilada na proporção de 1:2, foi rapidamente espalhada sobre placas de vidro (20 x 20 cm), de maneira a se obter camada uniforme do gel de sílica, com aproximadamente 0,5 mm de espessura. A secagem foi feita por exposição ao ar; a sílica não foi ativada por aquecimento, conforme recomenda Contreras (1980). Em placas previamente equilibradas com vapores do solvente, a substância foi depositada na linha de origem e a cromatografia foi desenvolvida até que a frente do solvente migrasse 15,0 a 16,0 cm a partir da linha de origem. A revelação foi efetuada com vapores de iodo. Como somente uma mancha foi verificada em repetidas cromatografias, nas quais foram usadas diversos sistemas de solventes, quais sejam: hexano-acetato de etila (92,5-7,5), hexano-acetato de etila (97,5-2,5), clorofórmio e benzeno-acetato de etila (3:2), a substância foi considerada cromatograficamente pura. O grau de pureza da substância foi confirmado pela análise através da espectrometria de massa e da espectrofotometria infravermelha.

1.2. Calciferol e colesterol.

O calciferol e o colesterol foram recristalizados várias vezes em acetona e, em seguida, submetidos à análise por meio da espectrofotometria ultravioleta e infravermelha e à cromatografia em camada delgada, em condições semelhantes às anteriormente descritas; através dessas técnicas pode-se comprovar o elevado grau de pureza de cada uma dessas substâncias.

2. Preparo de soluções.

As substâncias, cromatograficamente puras, fo-

ram dissolvidas em éter etílico, de maneira a fornecerem soluções com as seguintes concentrações: 0,045 M de acetato de DL α -tocoferol; 0,045 M de calciferol e 0,025 M de colesterol; estas foram as concentrações utilizadas.

3. Técnicas de Oxidação.

As técnicas de oxidação, assim como a verificação das propriedades químicas utilizadas para a identificação histoquímica dos produtos resultantes da oxidação foram efetuadas em fragmentos de papel de filtro, através da técnica do "spot test", conforme Hadler *et alii* (1964). As mesmas substâncias não submetidas à oxidação foram usadas como controle. Com o objetivo de promover a oxidação das substâncias, anteriormente citadas, foram empregados os seguintes oxidantes: ácido perbórico, permanganato de potássio, em meio ácido ou em meio alcalino, ou ácido peracético.

O papel de filtro utilizado no "spot test" foi previamente preparado da seguinte maneira: fitas de papel de filtro Whatman nº 1, com 2,5 x 15 cm, foram metiladas, segundo a técnica de Wigglesworth (1952); posteriormente, foram lavadas com água destilada, durante 2 horas e secas a 80°C. Fragmentos de 1,0 x 2,5 cm de papel de filtro, assim tratados, foram utilizados para a verificação das propriedades adquiridas pelas substâncias usadas, quando submetidas aos diversos oxidantes referidos. Em cada fragmento foram depositados 3 μ l das soluções de acetato de DL α -tocoferol, de calciferol ou de colesterol. As soluções foram colocadas de maneira a não ultrapassar área de 0,5 cm de diâmetro; o solvente foi evaporado à temperatura am-

biente.

Os fragmentos de papel de filtro, contendo as substâncias a serem submetidas aos testes, foram tratados por um dos oxidantes usados, de acordo com as técnicas descritas subseqüentemente.

3.1. Técnica de oxidação com o ácido perfórmico.

O ácido perfórmico foi preparado conforme Lillie (1954) e empregado após o tempo suficiente para adquirir a concentração máxima (2 horas). A oxidação foi efetuada durante 4 horas, conforme preconizado por Hadler & Silveira (1981b). Em seguida os fragmentos de papel foram lavados em água destilada, durante 30 minutos e secos a 60°C.

Após a oxidação pelo ácido perfórmico vários fragmentos de papel de filtro, contendo cada uma das substâncias utilizadas, foram respectivamente reunidos e eluídos com acetona a 4°C, durante 24 horas; os eluatos foram concentrados e usados nas análises espectrofotométricas. Essa análise teve por objetivo identificar grupos reativos responsáveis pelas propriedades adquiridas pelas substâncias empregadas, quando submetidas à oxidação pelo ácido perfórmico.

Soluções contendo as substâncias não submetidas ao tratamento prévio pelo ácido perfórmico foram utilizadas como controle.

Para a verificação das propriedades histoquímicas adquiridas, após a oxidação pelo ácido perfórmico, alguns fragmentos de papel de filtro após terem sido lavados em água destilada, durante 20-30 minutos, foram mergulhados

em solução a 1% de azul de toluidina, em H_2SO_4 2N (pH 0,3), durante 25 minutos; subsequentemente foram lavados durante 20 minutos e secos a $60^{\circ}C$. Outros fragmentos de papel de filtro, também oxidados pelo ácido perfórmico e lavados em água destilada, foram tratados, durante 10 minutos, pelo reativo de Schiff; a seguir, esses papéis foram transferidos para uma solução de bissulfito de sódio a 0,5%, durante 3 minutos; esta última operação foi repetida por mais 2 vezes e em seguida foi efetuada lavagem em água destilada, durante 10 minutos (3 trocas). Fragmentos de papel de filtro contendo essas mesmas substâncias, porém, não submetidos ao tratamento prévio pelo ácido perfórmico, foram tratados com a solução de azul de toluidina ou com o reativo de Schiff, sendo, então, usados como controle.

3.2. Técnica de oxidação com a solução de permanganato de potássio em meio alcalino.

Volumes iguais de solução de permanganato de potássio 0,038 N e de solução de hidróxido de sódio 0,125 N foram adicionados e a solução final foi usada como oxidante, durante 25 minutos, conforme Hadler *et alii* (1968c) e Hadler & Silveira (1977, 1984b). Decorrido esse período, foi escoada a solução oxidante e efetuado o descoramento com solução de bissulfito de sódio a 5%, durante alguns segundos (até descoloração do fragmento de papel); foram, então, efetuadas várias lavagens com água destilada. Diversos fragmentos de papel de filtro, assim oxidados e contendo uma das substâncias utilizadas, foram reunidos e eluídos com acetona a $4^{\circ}C$, por 24 horas. Essa mesma operação foi

efetuada para todas as substâncias. Os respectivos eluatos foram concentrados e submetidos à análise espectrofotométrica.

As propriedades que conferem reatividade histoquímica às substâncias utilizadas, adquiridas como decorrência da oxidação pela solução de permanganato de potássio em meio alcalino, foram verificadas em fragmentos de papel de filtro; após a oxidação os fragmentos de papel foram lavados e corados com solução de azul de toluidina ou tratados pelo reativo de Schiff, conforme descrito no item 3.1.

3.3. Técnica de oxidação com a solução de permanganato de potássio em meio ácido.

Solução contendo permanganato de potássio 0,038N e solução de ácido sulfúrico 0,125 N, adicionados na proporção de 1:1, foi também usada como oxidante, durante 25 minutos, segundo Hadler *et alii.* (1968c). Subsequentemente, foram realizados os mesmos tratamentos, conforme o procedimento efetuado após a oxidação pela solução de permanganato de potássio em meio alcalino (descrito no item 3.2).

3.4. Técnica de oxidação com o ácido peracético.

O ácido peracético foi preparado segundo Greenspan (1946), pela técnica modificada por Lillie (1954). Após a preparação do ácido a solução foi mantida a 4°C, durante 12 horas, com a finalidade de obter alta concentração desse perácido. Subsequentemente, esse perácido foi usado como oxidante, durante 2 horas, conforme Hadler & Silveira (1981a, 1984a).

Em seguida ao tratamento pelo ácido peracético, os fragmentos de papel de filtro foram lavados com água destilada, durante 20-30 minutos e secos a 60°C; foram, então, submetidos aos mesmos tratamentos, conforme o procedimento efetuado após a oxidação pelo ácido perfórmico, descrito no ítem 3.1.

3.5. Técnicas espectrofotométricas.

As eventuais alterações sofridas pelas substâncias empregadas, como decorrência da reação de oxidação, foram analisadas por meio da espectrofotometria ultravioleta, infravermelha e da espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons e espectrometria de massa, comparando-se os produtos de oxidação com as substâncias não oxidadas.

A determinação da curva de absorbância ultravioleta de cada uma das substâncias tratadas pelos oxidantes referidos, ou não submetidas a tratamento prévio (controle), foi efetuada na faixa de comprimentos de onda entre 360 e 200 nm, usando-se como solvente o éter etílico.

O acetato de DL α -tocoferol não submetido a tratamento prévio e os produtos resultantes do tratamento do acetato de DL α -tocoferol, por uma das soluções oxidantes, foram submetidos à espectrofotometria infravermelha; cada amostra foi analisada sob a forma de filme, entre duas células de cloreto de sódio. O calciferol, o colesterol e seus produtos de oxidação, provenientes do tratamento prévio por uma das soluções oxidantes empregadas foram, também, submetidos à espectrofotometria infravermelha, a qual

foi efetuada nas mesmas condições anteriormente descritas exceto que, neste caso, as substâncias foram dissolvidas em Nujol.

Todas as substâncias, usadas no presente trabalho, tanto tratadas pelas soluções oxidantes quanto não sujeitas a tratamento prévio, foram submetidas à espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons; o tetracloreto de carbono e o deuterochloroformio foram os solventes utilizados e o tetrametilselano como referência interna.

O acetato de DL α -tocoferol e o calciferol, assim como seus produtos de oxidação provenientes do tratamento do DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico e do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino, foram também analisados por meio do espectrômetro de massa. A espectrometria de massa foi efetuada sob energia eletrônica de 70 ev., aplicando-se a amostra por meio de entrada direta de sólido, a 75°C, sendo a temperatura da fonte ajustada a 160°C.

4. Técnica de separação das substâncias provenientes da oxidação do DL α -tocoferol, do calciferol e do colesterol.

4.1. Substâncias provenientes da oxidação do DL α -tocoferol.

Com a finalidade de isolar as substâncias que se formam pela oxidação perfórmica do acetato de DL α -tocoferol e de identificar a fração que apresenta basofilia e reatividade ao reagente de Schiff, foi empregada a cromatografia em camada delgada; este tipo de cromatografia foi

empregado para a obtenção de quantidade adequada da substância reativa purificada, a qual foi posteriormente analisada. O gel de sílica, não ativado por aquecimento, conforme a recomendação de Contreras (1980), foi usado como fase fixa e uma solução de hexano e acetato, de etila (97,5:2,5 vol/vol) foi usada como fase móvel. Após a migração da fase móvel a placa foi exposta a vapores de iodo, com a finalidade de localizar as substâncias separadas pela cromatografia. Por meio desta técnica foram reveladas três substâncias com Rf diferentes. Outras cromatografias do tipo preparativa, foram efetuadas, nessas mesmas condições; nesse caso, as placas não foram expostas a vapores de iodo. Com essa técnica foram obtidas faixas correspondentes aos três Rf e que continhas as substâncias em quantidade conveniente para as análises subsequentes. O gel correspondente a cada faixa foi removido da placa de cromatografia e a substância foi eluída com acetona, a 4^oC, durante 24 horas e concentrada.

A verificação da basofila e da reatividade ao reativo de Schiff, das substâncias separadas dessa forma, foi efetuada em fragmentos de papel de filtro previamente impregnados com essas substâncias. Com essa finalidade, solução de cada substância foi depositada sobre o fragmento de papel de filtro e após secagem ao ar, realizou-se coloração com azul de toluidina, em pH 0,3 ou o tratamento com o reativo de Schiff, conforme descrito no item 3.1. Apenas uma das três substâncias separadas por meio da cromatografia apresentou a restividade (basofilia e positividade ao reagente de Schiff) utilizada para a demonstração histoquímica do acetato de DL α -tocoferol. Essa

substância foi, então, submetida à espectrofotometria ultravioleta, infravermelha e espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons e espectrometria de massa, com a finalidade de identificação ou caracterização dos grupos reativos que lhes conferem as propriedades assinaladas.

4.2. Substâncias provenientes da oxidação do calciferol e do colesterol

Os produtos de oxidação do calciferol, pelos oxidantes usados, foram separados por técnica semelhante à usada para o tocoferol (descrita no item 4.1.), usando-se placas cujo gel de sílica foi previamente ativado a 110°C, durante 1 hora, e o mesmo sistema de solvente citado no item 4.1. A revelação foi feita por aspensão com ácido sulfúrico a 50%.

Os produtos fornecidos pela oxidação do colesterol pelos oxidantes usados também foram separados por cromatografia em camada fina de gel de sílica, usando-se uma solução contendo benzeno e acetato de etila, na proporção de 3:2, como fase móvel, conforme a recomendação de Kimura *et alii* (1979). A revelação foi feita por aspensão com ácido sulfúrico a 50%.

A verificação de produtos de oxidação do calciferol e do colesterol dotados de basofilia e de propriedades redutoras foi feita em fragmentos de papel de filtro, através das técnicas usadas a propósito do acetato do DL α -tocoferol (item 4.1.).

RESULTADOS

A oxidação do acetato DL α -tocoferol (vitamina E), do calciferol (vitamina D₂) e do colesterol com os agentes oxidantes utilizados produz compostos que, submetidos ao tratamento pela solução de azul de toluidina ou pelo reativo de Schiff, em modelos de papel de filtro, fornecem resultados diferentes, os quais estão sumariados nos três itens relacionados a seguir.

1. O produto resultante da oxidação do acetato DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico, é fortemente basófilo e tem caráter redutor; por esse motivo, cora-se intensamente pelo azul de toluidina e reage positivamente com o reativo de Schiff. Os produtos resultantes da oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo permanganato de potássio em meio alcalino, ou pelo ácido peracético, não apresentam essas propriedades, assim como o produto da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo permanganato de potássio em meio ácido.
2. O produto proveniente da oxidação do calciferol, pelo permanganato de potássio em meio alcalino, apresenta basofilia demonstrada pela coloração com solução de azul de toluidina e propriedades redutoras, pois é reativo ao reagente de Schiff. Ao contrário, os produtos provenientes do tratamento do calciferol pelo ácido perfórmico, ou pelo ácido peracético, não apresentam essas propriedades. No entanto, a vitamina D₂ oxidada pelo permanganato de potássio em meio ácido também fornece pro

dutos dotados de basofilia e de propriedades redutoras.

3. O produto de oxidação do colesterol pelo ácido peracético é também basófilo, corando-se pela solução de azul de toluidina, e redutor, pois reage positivamente com o reagente de Schiff; o mesmo acontece com o produto de oxidação do colesterol pelo permanganato de potássio em meio ácido. Contudo, os produtos provenientes do tratamento do colesterol pelo ácido perfórmico, ou pelo permanganato de potássio em meio alcalino, não apresentam essas características.

Convém salientar que o acetato de DL α - tocoferol, o calciferol e o colesterol, não submetidos à ação de oxidantes, são destituídos de basofilia e de propriedades redutoras, demonstráveis através do tratamento por solução de azul de toluidina ou pelo reagente de Schiff. Deve ser, também, destacado que a solução de azul de toluidina foi sempre usada em pH muito baixo (0,3), com o intuito da coloração ser mais seletiva e, portanto, apresentar maior significado histoquímico. Por outro lado, a ausência de reatividade ao reagente de Schiff, tanto do DL α -tocoferol quanto do calciferol e do colesterol só ocorre em substâncias recém-preparadas, ou melhor, não sujeitas à exposição ao ar.

A tabela 1 mostra o comportamento dos produtos de oxidação das três substâncias empregadas, resultantes do tratamento prévio dessas substâncias pelos agentes oxidantes usados e subsequentemente submetidos à coloração pela solução de azul de toluidina ou ao tratamento pelo reagente de Schiff. Diante destes resultados, os produtos da

oxidação pelo ácido perf \bar{o} rmico, ou pelo permanganato de potássio em meio alcalino, ou pelo ácido perac \bar{e} tico, dotados de reatividade e que permitem a demonstração histoquímica das três substâncias estudadas no presente trabalho, foram analisados quanto às características espectrais.

Tabela 1 - Comportamento dos produtos de oxidação do acetato de DL α -tocoferol, do calciferol e do colesterol, diante do tratamento pela solução de azul de toluidina ou pelo reativo de Schiff.

Substâncias Oxidantes	Basofilia demonstrável pela solução de azul de toluidina (pH 0,3)			Reatividade ao reagente de Schiff		
	Tocofe- rol	Calcife- rol	Coleste- rol	Tocofe- rol	Calcife- rol	Coleste- rol
Nihil	-	-	-	-	-	-
Ácido Perf \bar{o} r- mico	+++	-	-	+++	-	-
Permanganato de Potássio em meio alca- lino	-	+++	-	-	+++	-
Permanganato de Potássio em meio áci- do	-	+++	+++	-	+++	+++
Ácido Perac \bar{e} - tico	-	-	+++	-	-	+++

OBS.: +++: Intensa reatividade.

- : Ausência de reatividade.

1. Propriedades dos produtos resultantes do tratamento do acetato de DL α -tocoferol por diversos oxidantes.

O tratamento do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido perfórmico, provoca, além do aparecimento de reatividade histoquímica, modificação de suas propriedades espectrais, que são evidenciadas através do espectro ultravioleta, infravermelho e de ressonância magnética nuclear de prótons.

1.1. Espectro de absorção ultravioleta apresentado pelo acetato de DL α -tocoferol e pelo acetato de DL α -tocoferol tratado por diversos agentes oxidantes.

A figura 1, que serve de termo de comparação para a figura 2, mostra a curva de absorção ultravioleta apresentada pelo acetato de DL α -tocoferol não submetido a nenhum tratamento prévio por agentes oxidantes; nestas circunstâncias, o acetato de DL α -tocoferol apresenta picos de absorção do espectro ultravioleta em 286, 284 e 278 nm. O produto resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido perfórmico, submetido à espectrofotometria ultravioleta mostra picos em 286, 283, 278 e 272 nm, além de forte absorção na região de 270 a 250 nm (Figura 2).

Os picos de absorção do espectro ultravioleta fornecidos pelos produtos resultantes do tratamento do acetato de DL α -tocoferol, pelos outros oxidantes usados, constam da tabela 2.

Figura 1 - Espectro de absorção ultravioleta do acetato de DL α -tocoferol não submetido à oxidação.

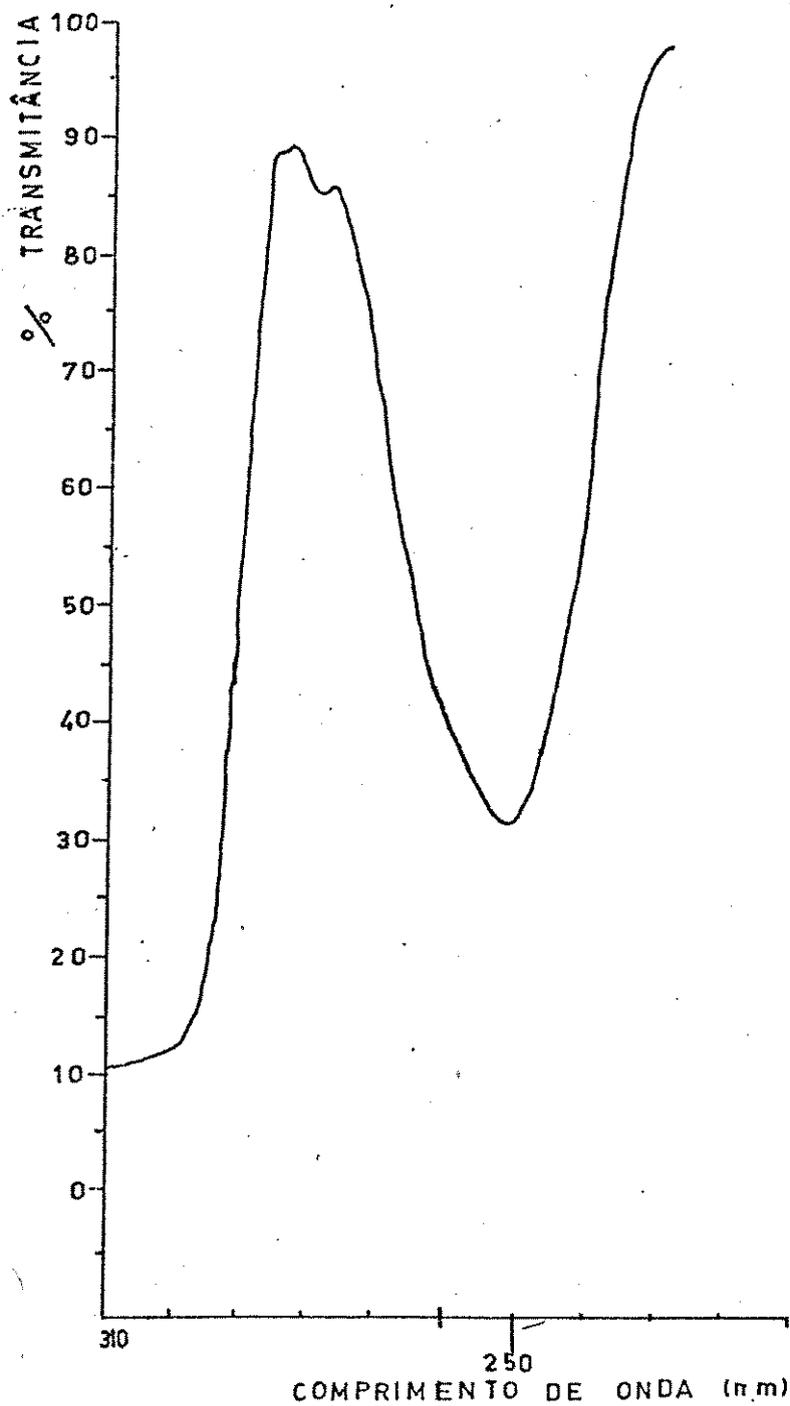


Figura 2 - Espectro de absorção ultravioleta do produto de oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfômico.

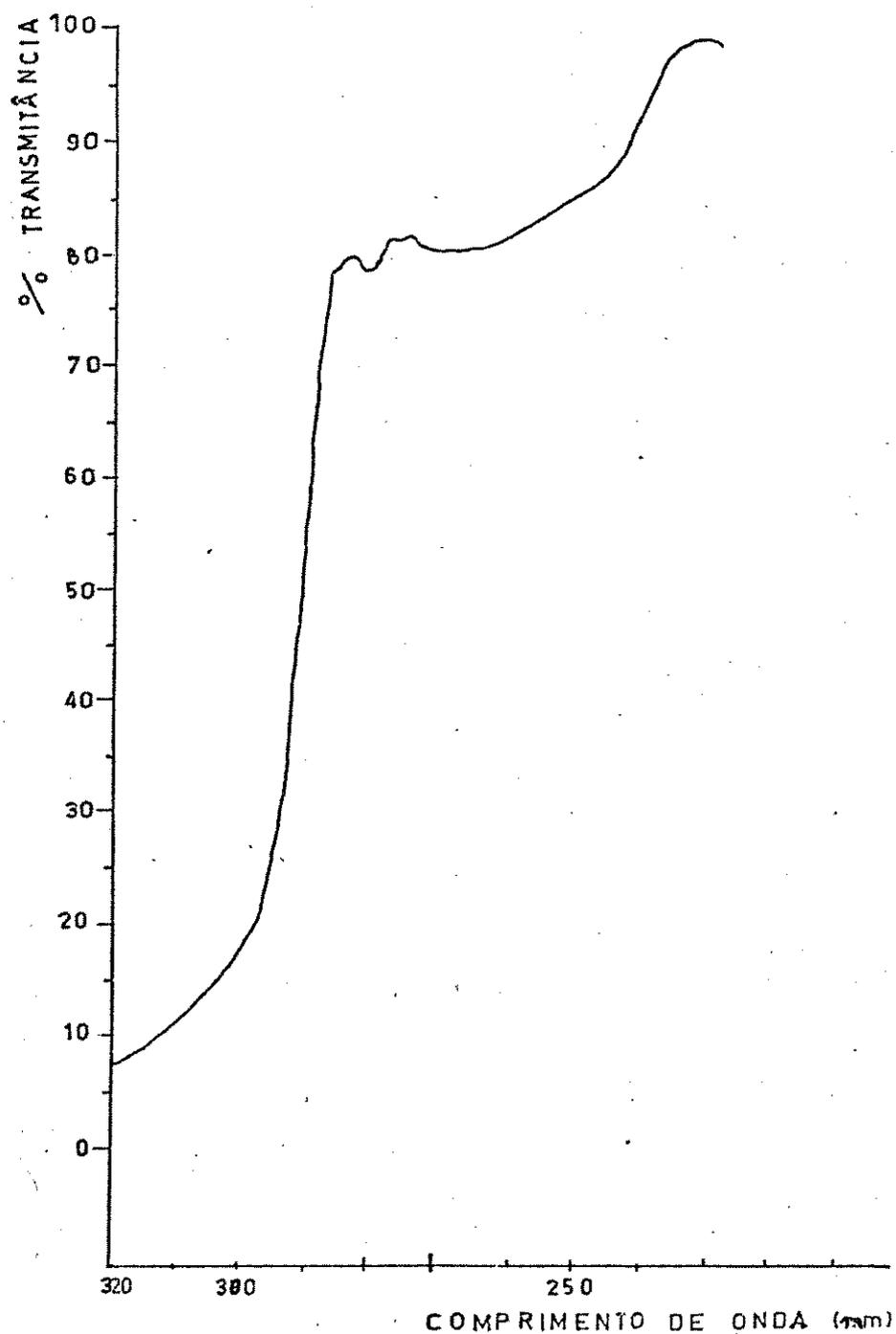


Tabela 2 - Picos de absorção ultravioleta apresentados pelo acetato de DL α -tocoferol não oxidado e tratado por diversos agentes oxidantes.

Oxidantes	Absorção em (nm)			
Nihil	286;	284;	278	
Ácido Perfôrmico	286;	283;	278;	272 (270 a 250)
Permanganato de Potássio em meio alcalino	286;	284;	278	
Permanganato de Potássio em meio ácido	286;	284;	278	
Ácido Peracético	287;	284;	278	

Esses resultados mostram que a oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido perfôrmico, determina o aparecimento de novo pico em 272 nm e forte absorção na região de 270 a 250 nm, o que não ocorre com o acetato de DL α -tocoferol previamente tratado com os outros oxidantes usados. Correlacionando estes resultados com os da tabela 1, é possível verificar que apenas o ácido perfôrmico fornece produto de oxidação do acetato DL α -tocoferol dotado de reatividade histoquímica; além disso, os resultados permitem deduzir que o produto reativo seja responsável pelo pico em 272 nm e pela intensa absorção na região espectral de 270-250 nm.

1.2. Espectro de absorção infravermelha apresentado pelo acetato de DL α -tocoferol e pelo acetato de DL α -tocoferol tratado por diversos agentes oxidantes.

O produto resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido perfórmico, assim como os produtos resultantes do tratamento do acetato de DL α -tocoferol pelos demais agentes oxidantes usados foram submetidos à espectrofotometria infravermelha e os resultados obtidos, expostos na tabela 3, foram comparados entre si.

O produto resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido perfórmico, apresenta as seguintes propriedades: 1 - absorve a radiação infravermelha sob a forma de faixa em 3440 cm^{-1} , indicando a presença de grupos hidróxilas responsáveis por essa absorção; 2 - forte absorção em 790 cm^{-1} o que indica a ocorrência de grupo epóxido; 3 - pico de 1.750 cm^{-1} se apresenta alargado e pouco deslocado, sugerindo a existência de outros grupos carbonilas (Figuras 3 e 4). As propriedades adquiridas pelo acetato de DL α -tocoferol, após tratamento pelo ácido perfórmico, não são observadas pelos produtos que se originam quando o acetato de DL α -tocoferol é tratado pelos outros agentes oxidantes usados, indicando que o produto reativo ao azul de toluidina e ao reativo de Schiff, que é formado apenas pelo tratamento com o ácido perfórmico, seja responsável pelas modificações verificadas através da espectrofotometria infravermelha.

Figura 3 - Espectro de absorção infravermelha do acetato de DL α -tocoferol não submetido a tratamento por oxidantes (Filme).

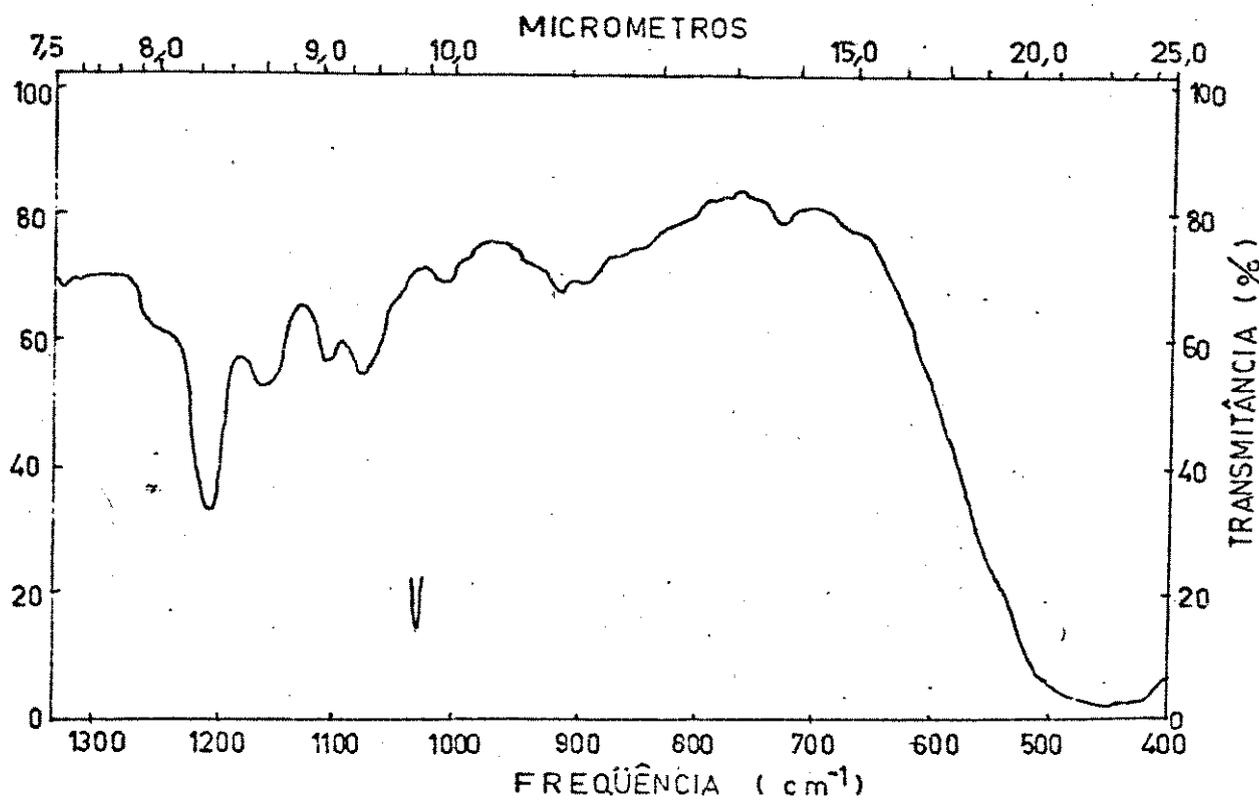
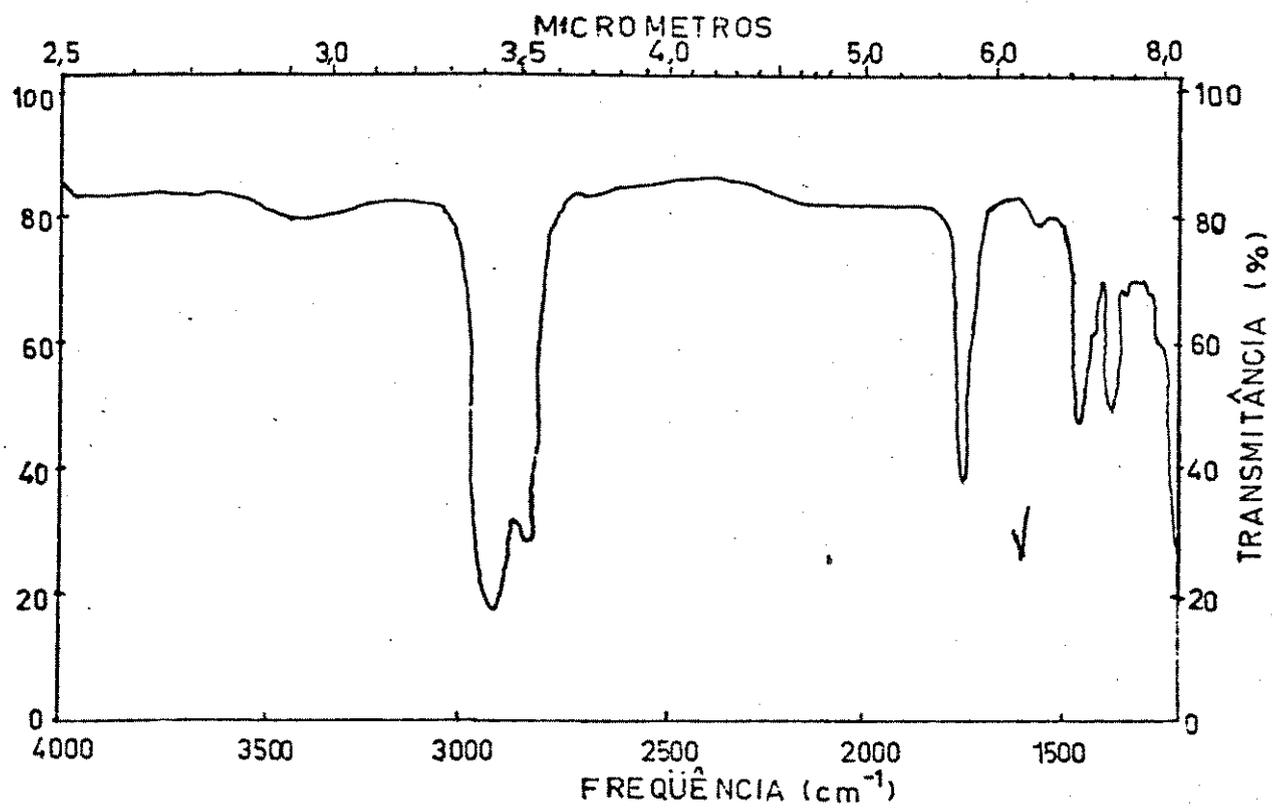
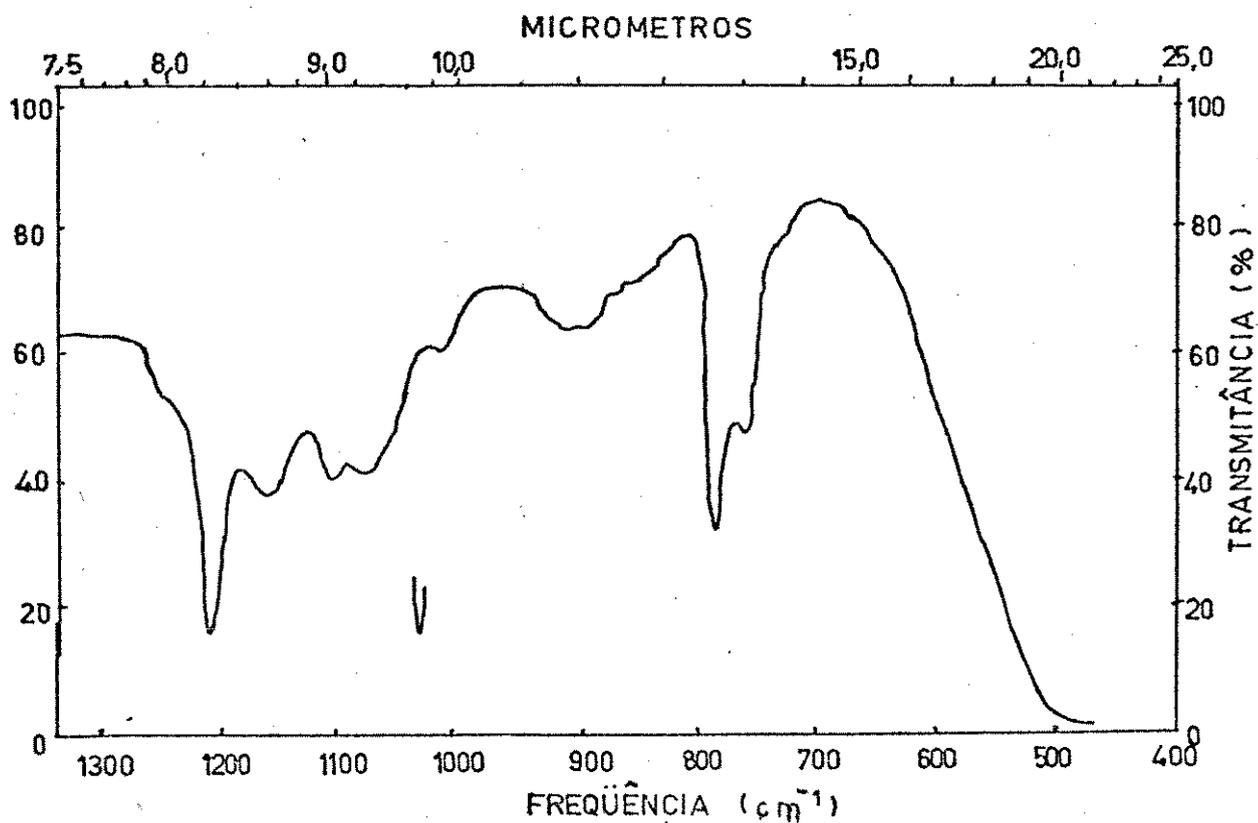
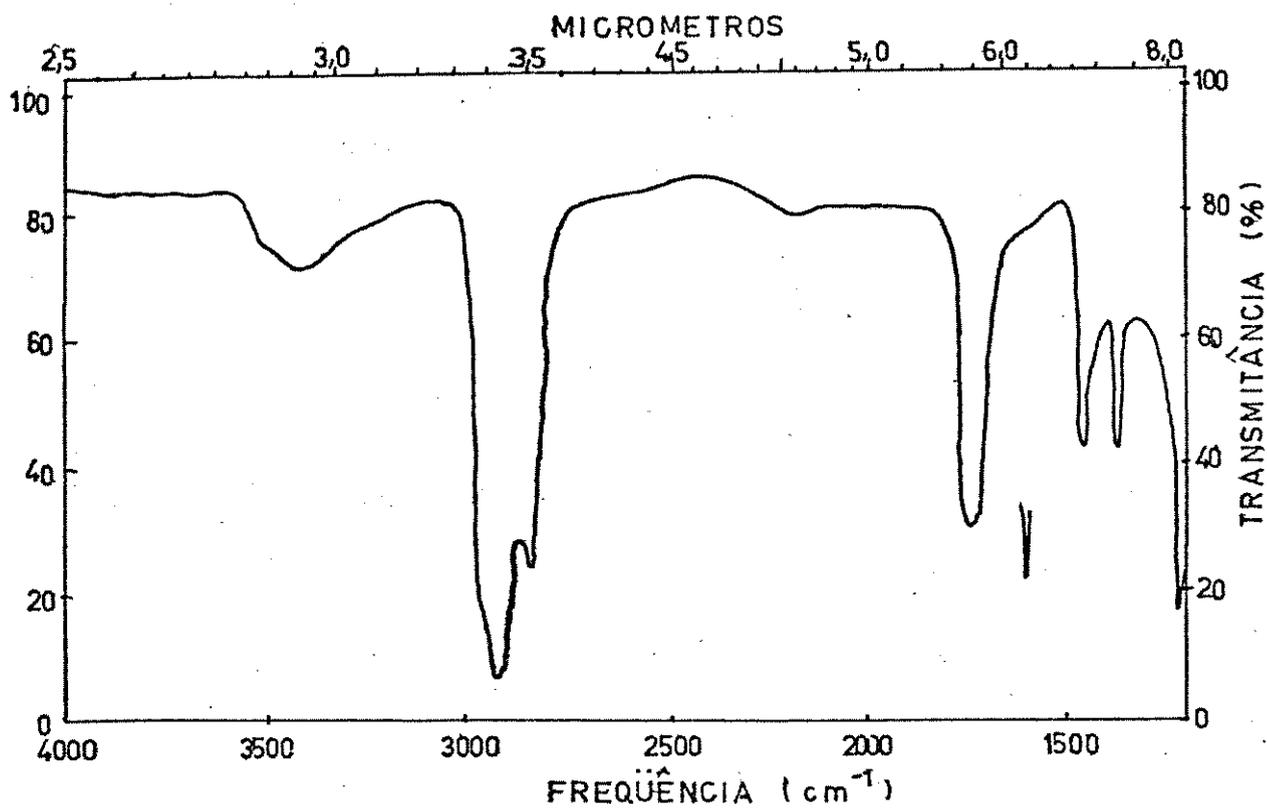


Figura 4 - Espectro de absorção infravermelha do produto de oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfômico (Filme).



1.3. Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons apresentado pelo acetato DL α -tocoferol e pelo acetato de DL α -tocoferol tratado por diversos agentes oxidantes.

O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do produto de oxidação do acetato DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico (Figura 6) mostra alterações em relação ao espectro de acetato de DL α -tocoferol não oxidado (Figura 5), tomado como termo de comparação. Após a oxidação há ausência de prótons ressonantes na região de 2,60 p.p.m. e diferenças quanto a altura relativa dos picos na região de 1,90 p.p.m. (Figuras 5 e 6).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons dos produtos resultantes do tratamento do acetato de DL α -tocoferol pelos demais agentes oxidantes usados estão expostos na tabela 4. Esta tabela revela que o único oxidante cujo efeito determina alteração do espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do acetato de DL α -tocoferol é o ácido perfórmico.

Em resumo, os resultados expostos anteriormente mostram que o ácido perfórmico é o único oxidante, dentre os usados no presente trabalho que confere propriedades químicas passíveis de serem utilizadas para a demonstração histoquímica do acetato de DL α -tocoferol. Além disso, esse oxidante é o único capaz de determinar modificações nos espectros do acetato de DL α -tocoferol tanto no que diz respeito à absorção da radiação ultravioleta e infravermelha quanto na de ressonância magnética nuclear de prótons; estes resultados sugerem que o produto resultante dessa

oxidação seja o responsável pela basofila e pela reatividade de ao reagente de Schiff, propriedades essas que são adquiridas pelo acetato de DL α -tocoferol após sua oxidação pelo ácido perfórmico.

2. Propriedades dos produtos resultantes do tratamento do calciferol por diversos oxidantes.

A oxidação do calciferol (vitamina D₂) pelo permanganato de potássio, em meio alcalino, fornece produtos reativos que foram utilizados com o propósito de identificar essa vitamina, histoquimicamente. Esses produtos são basófilos e redutores. Essa oxidação promove, simultaneamente, modificações espectrais, as quais são verificadas quando se estabelece comparação com o espectro fornecido pelo calciferol não submetido à oxidação.

2.1. Espectro de absorção ultravioleta apresentado pelo calciferol e pelo calciferol tratado por diversos agentes oxidantes.

O espectro ultravioleta do calciferol oxidado pelo permanganato de potássio, em meio alcalino, não apresenta o pico de 242 nm, apresentado no espectro do calciferol não submetido à oxidação, permanecendo somente o pico de 210 nm (Figuras 7 e 8). Os picos de absorção ultravioleta encontrados nos espectros correspondentes ao calciferol tratado pelos oxidantes usados estão expostos na tabela 5; dentre estes, com exceção do permanganato de potássio em meio alcalino, apenas o ácido perfórmico determina

Tabela 4 - Regiões de deslocamentos químicos verificadas no espectro de ressonância magnética nuclear de prótons dos produtos resultantes do tratamento do acetato de DL α -tocoferol, pelos diversos agentes oxidantes usados.

Oxidantes	Deslocamentos Químicos (em δ p.p.m.)
Nihil	0,83; 1,26; 2,10; 2,60. (CCl ₄)
Ácido Perfórmico	0,83; 1,26; 2,10; (CCl ₄)
Permanganato de Potássio em meio alcalino	0,83; 1,26; 2,10; 2,60. (CCl ₄)
Permanganato de Potássio em meio ácido	0,83; 1,26; 2,10; 2,60. (CCl ₄)
Ácido Peracético	0,83; 1,26; 2,10; 2,60. (CCl ₄)

Figura 5 - Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do acetato de DL α -tocoferol não submetido à oxidação.

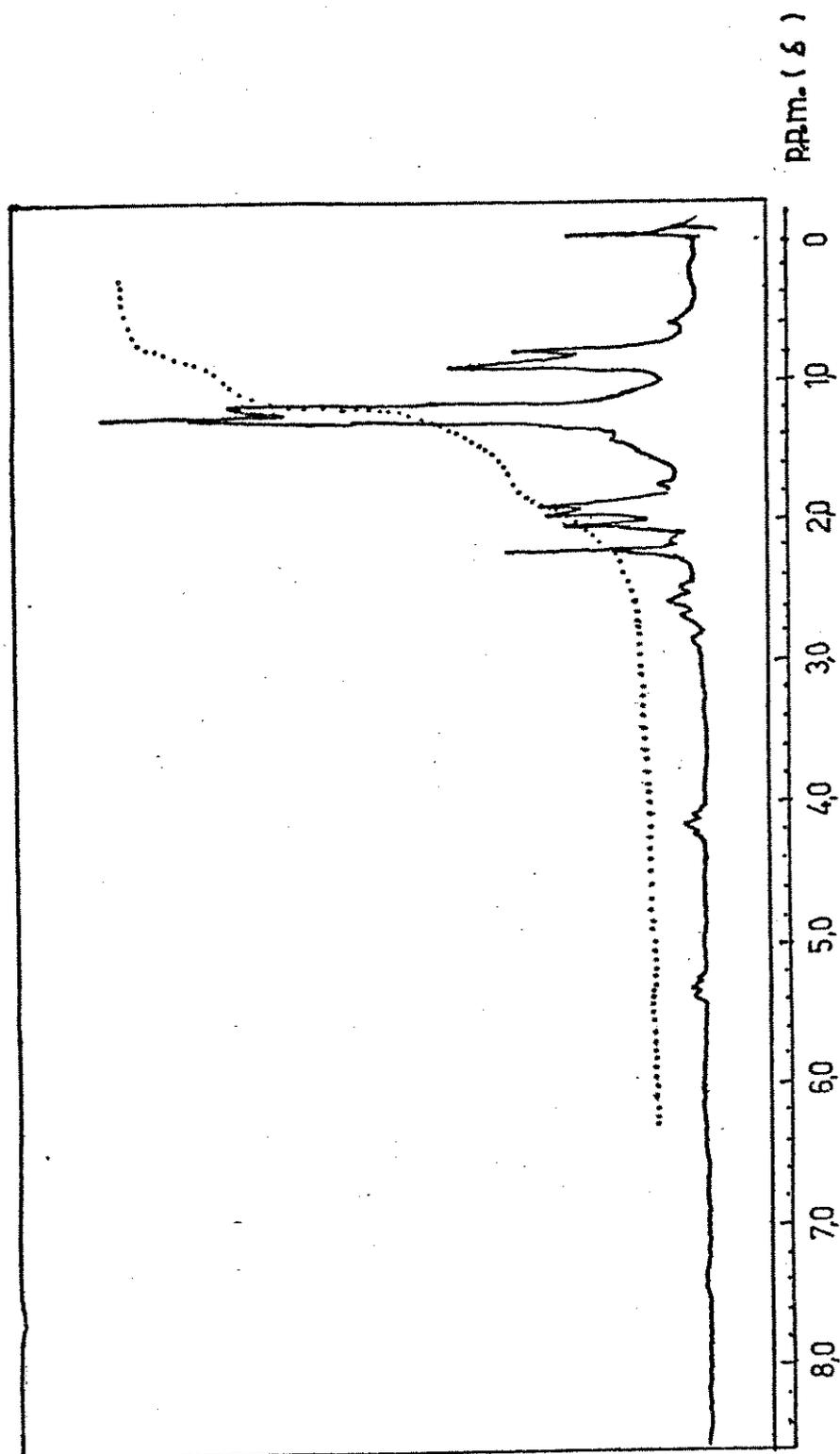
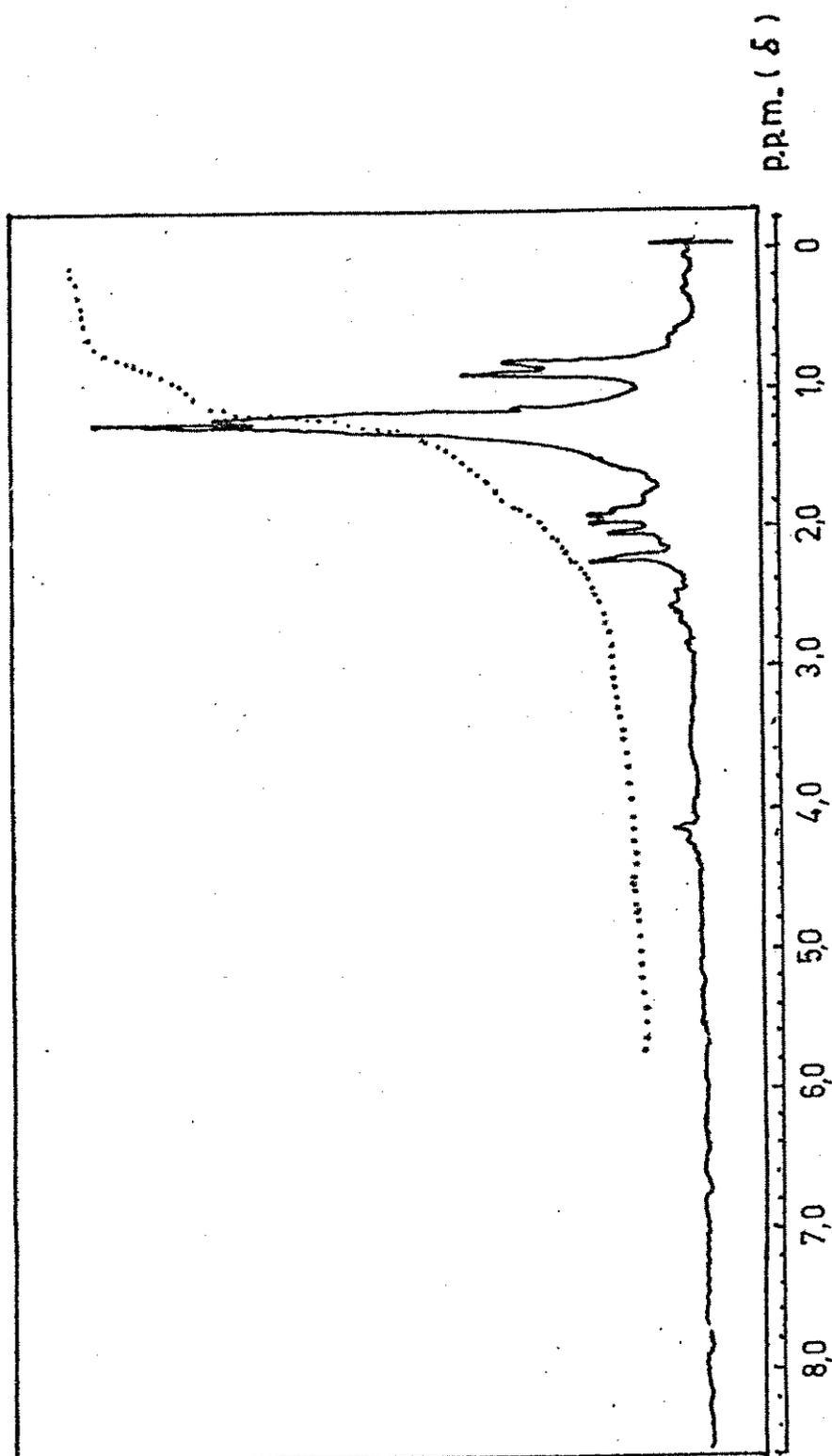


Figura 6 - Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do produto resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico.



alteração espectral do calciferol, eliminando o pico de 210 nm.

Tabela 5 - Absorção ultravioleta do calciferol e dos produtos resultantes do tratamento do calciferol pelos diversos agentes oxidantes.

Oxidantes	Comprimento de Onda (em nm)	
Nihil	242;	210.
Ácido Perfôrmico	242.	
Permanganato de Potássio em meio alcalino		210.
Permanganato de Potássio em meio ácido	242;	210.
Ácido Peracético	242;	210.

Figura 7 - Espectro de absorção ultravioleta do calciferol não submetido a oxidação.

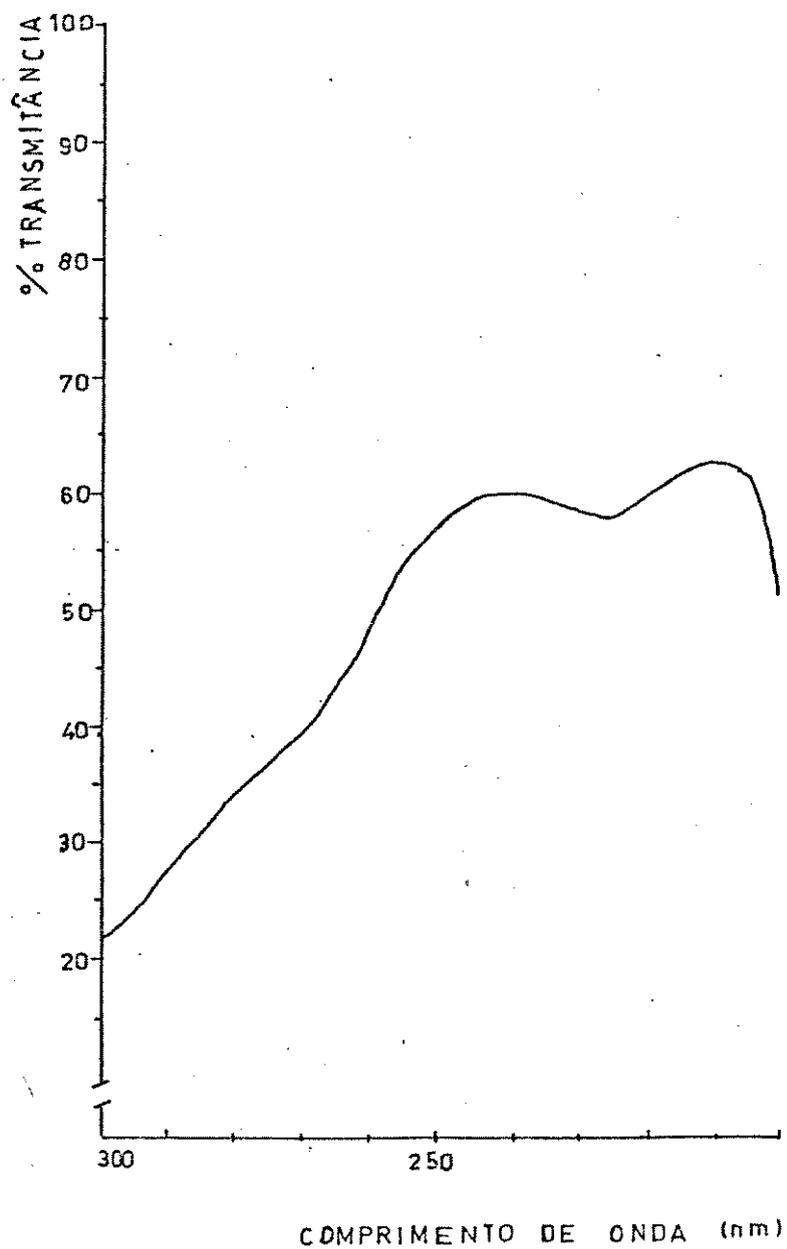
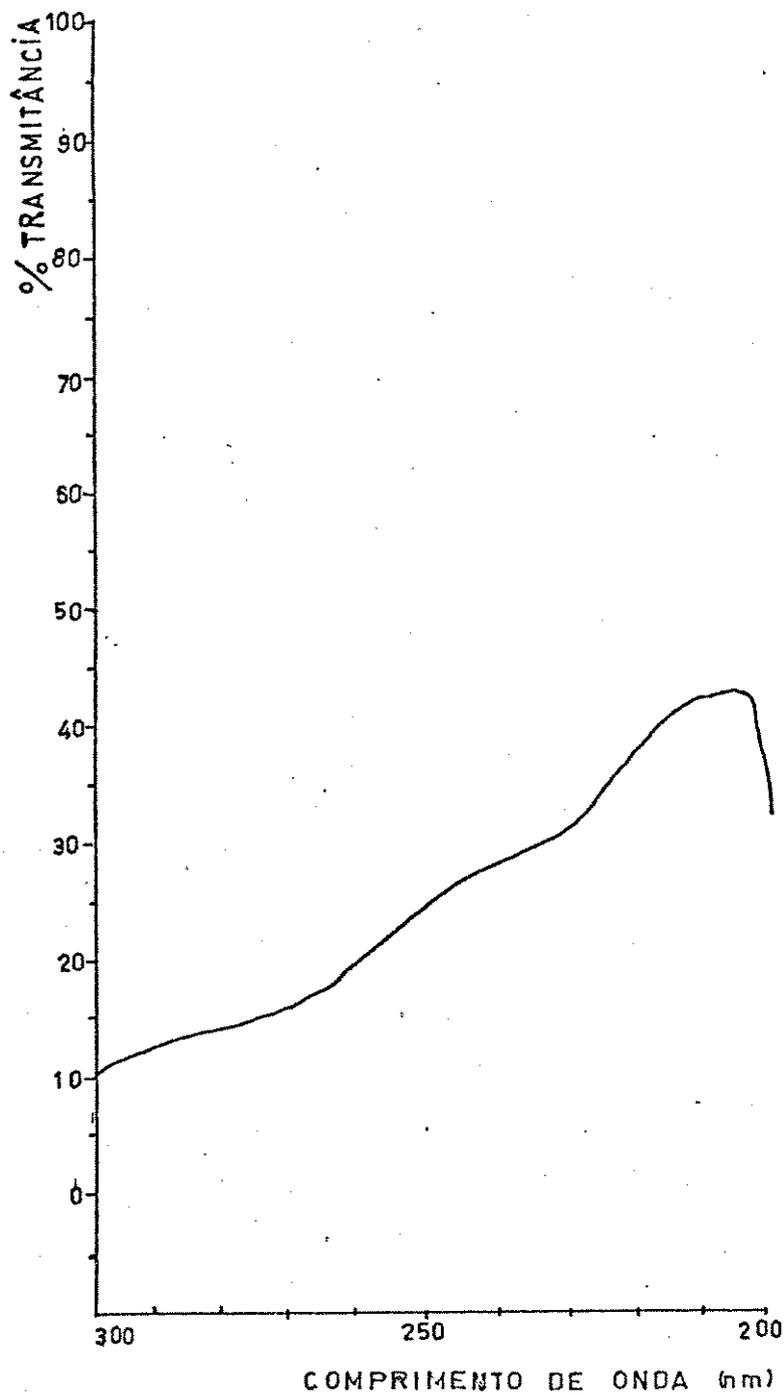


Figura 8 - Espectro de absorção ultravioleta do produto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino.



2.2. Espectro de absorção infravermelha apresentado pelo calciferol e pelo calciferol tratado por diversos agentes oxidantes.

A oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio, em meio alcalino, produz alterações no seu espectro infravermelho, principalmente na região de 1300 a 400 cm^{-1} , onde desaparecem picos relativamente pronunciados. Na região de 1640 a 1700 cm^{-1} surge um pico de intensa absorção que não ocorre no espectro do calciferol não oxidado e que indica a presença de grupo carbonila (Figuras 9 e 10). O permanganato de potássio em meio alcalino produz efeito semelhante, no que diz respeito aos resultados do espectro infravermelho, quando comparado com o efeito do permanganato de potássio em meio ácido (Tabela 6). Os picos de absorção da radiação infravermelha do calciferol tratado pelos agentes oxidantes usados constam da tabela 6.

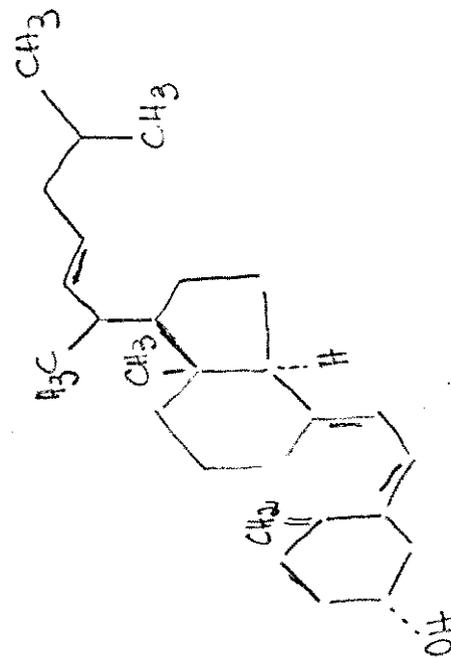
2.3. Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do calciferol e do calciferol tratado pelos diferentes oxidantes.

O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do calciferol, não submetido à oxidação prévia, mostra três regiões ressonantes: 0,86; 1,23 e 5,20 p.p.m. O espectro do calciferol oxidado pelo permanganato de potássio, em meio alcalino, revela nova área de ressonância a 4,20 p.p.m., além das três já mencionadas. (Figuras 11 e 12).

O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do calciferol oxidado pelo ácido perfórmico mostra somente uma região ressonante (1,23 p.p.m.), pois as

Tabela 6 - Absorção infravermelha apresentada pelo calciferol e pelos produtos resultantes do tratamento do calciferol pelos diferentes oxidantes.

Oxidantes	Absorção (em cm^{-1})
Nihil	3410; 2890; 1640; 1460; 1380; 1260; 1220; 1160; 1060; 1000; 970; 870; 860; 830; 710.
Ácido Perfórmico	3420; 2930; 2880; 1730; 1460; 1390; 1180; 900.
Permanganato de Potássio em meio alcalino	3450; 2920; 1720; 1460; 1380; 970.
Permanganato de Potássio em meio ácido	3460; 2900; 1730; 1460; 1390; 970.
Ácido Peracético	3460; 2900; 1720; 1460; 1380; 1040; 970.



FÓRMULA ESTRUTURAL DO
CALCIFEROL

outras duas, apresentadas pelo calciferol não submetido a tratamento por oxidante, desaparecem. O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do produto originado pela oxidação do calciferol, pelo ácido peracético, apresenta duas regiões ressonantes em 0,86 e 1,23 p.p.m. O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do produto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio, em meio ácido, mostra-se idêntico ao do calciferol não submetido a oxidação (Tabela 7).

Figura 9 - Espectro de absorção infravermelha do calcife-
rol não submetido à oxidação (Nujol).

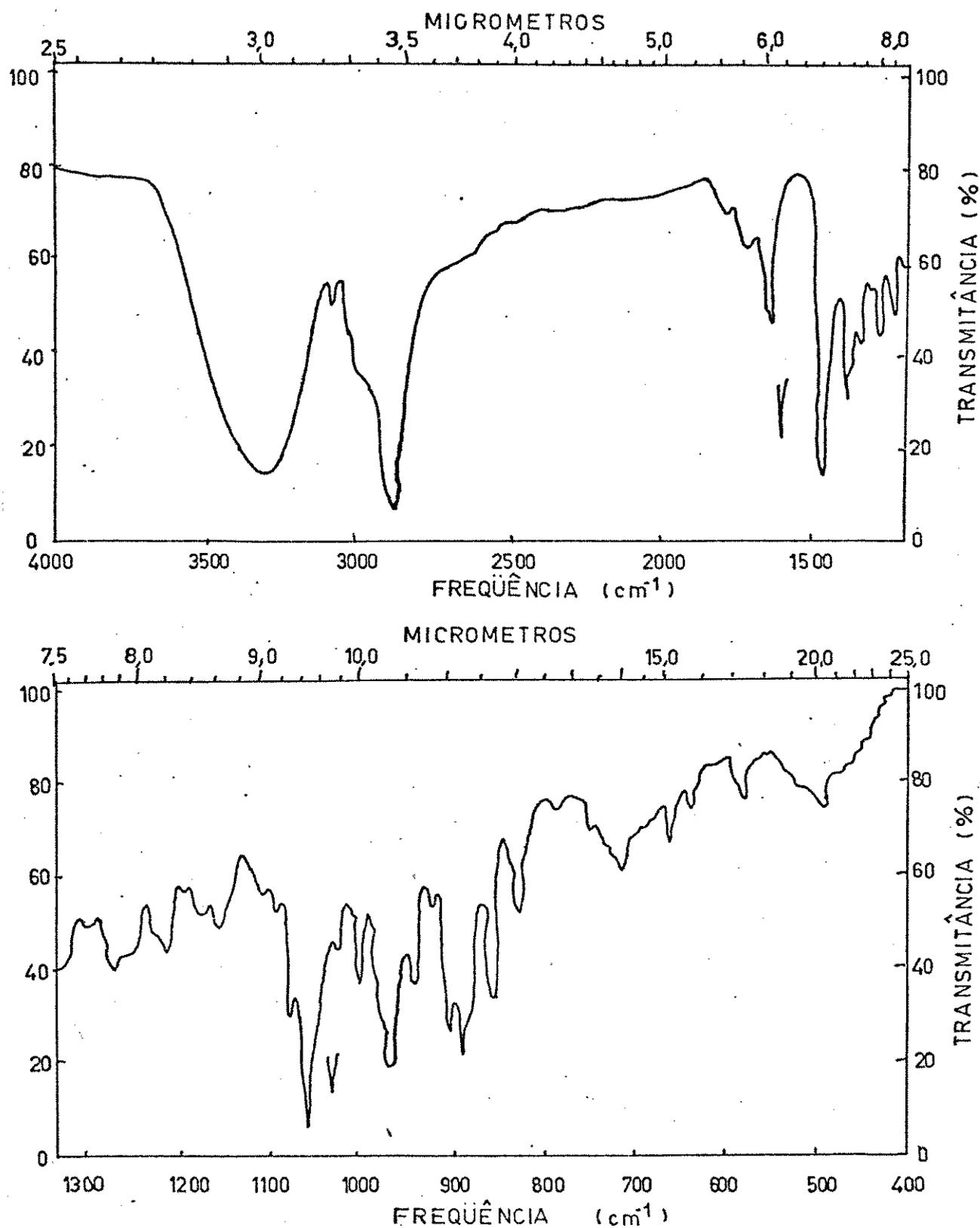


Figura 10 - Espectro de absorção infravermelha do produto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino (Nujol).

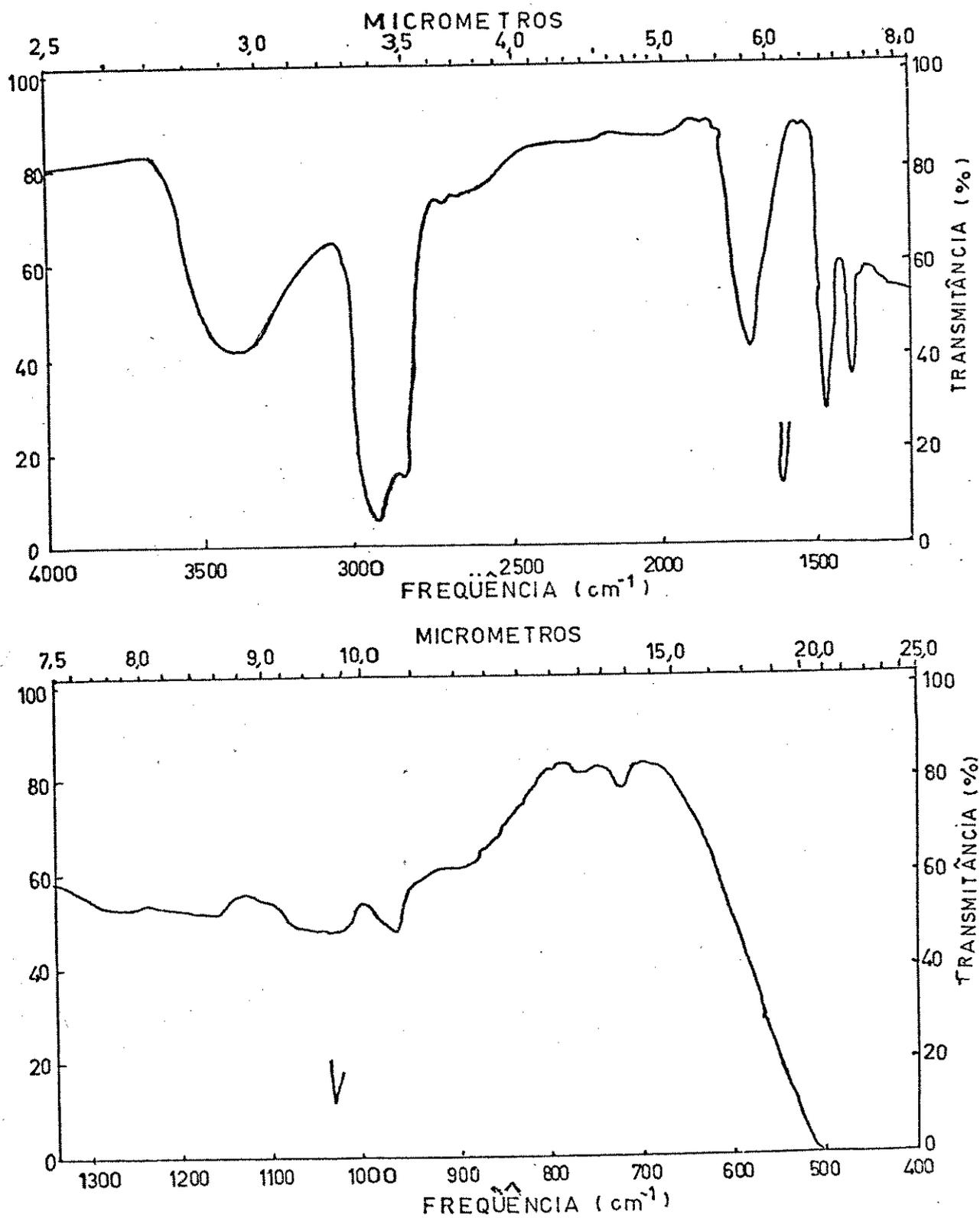


Tabela 7 - Regiões de deslocamentos químicos verificadas no espectro de ressonância magnética nuclear de prótons, do calciferol não submetido à oxidação e após tratamento pelos diversos oxidantes.

Oxidantes	Deslocamentos químicos (em δ p.p.m.)			
Nihil	0,86;	1,23;		5,20. (CCl_4)
Ácido Perfórmico		1,23.		($CDCl_3$)
Permanganato de Potássio em meio alcalino	0,86;	1,23;	4,20;	5,20. ($CDCl_3$)
Permanganato de Potássio em meio ácido	0,86;	1,23;		5,20. ($CDCl_3$)
Ácido Peracético	0,86;	1,23.		(CCl_4)

Figura 11 - Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do calciferol não submetido à oxidação.

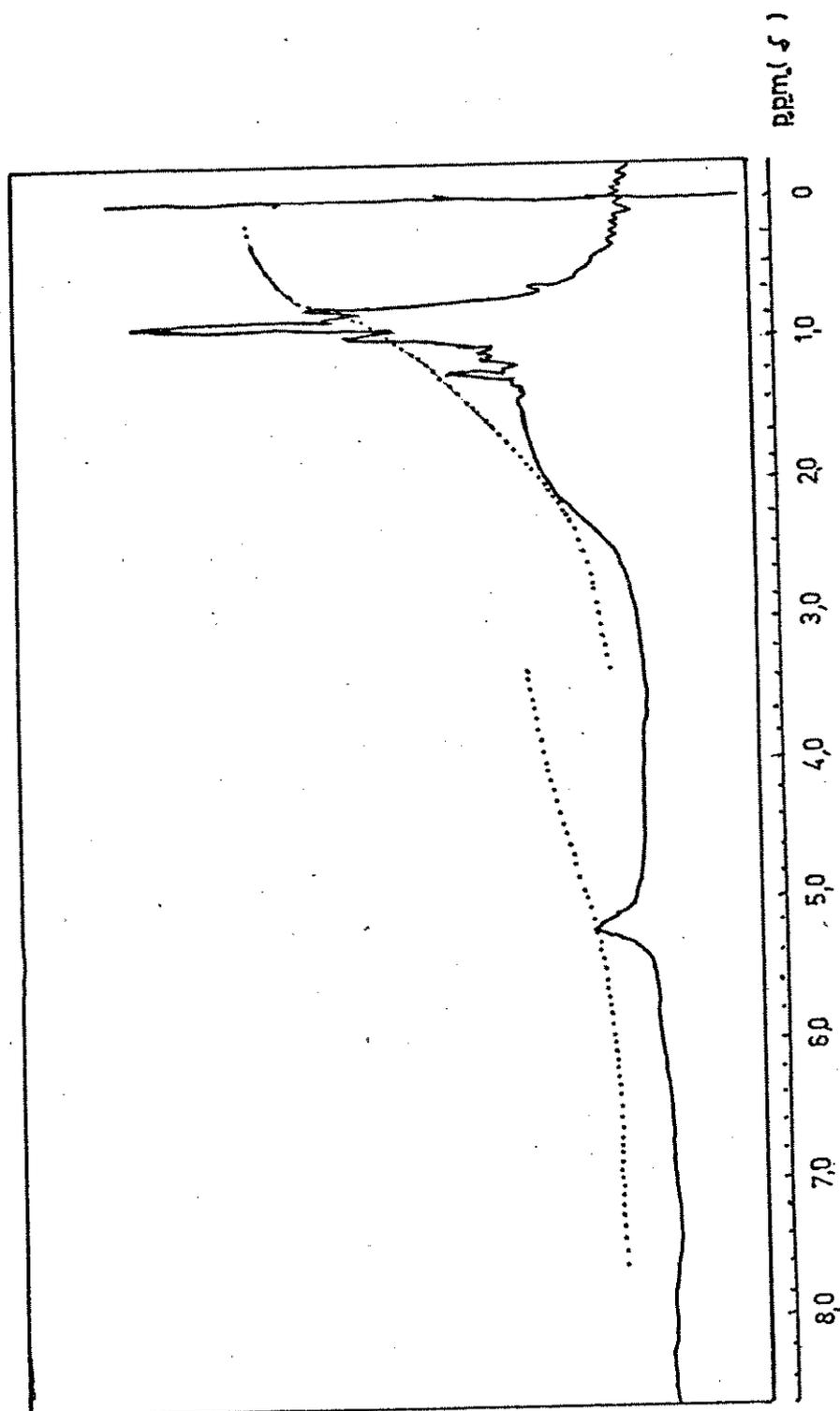
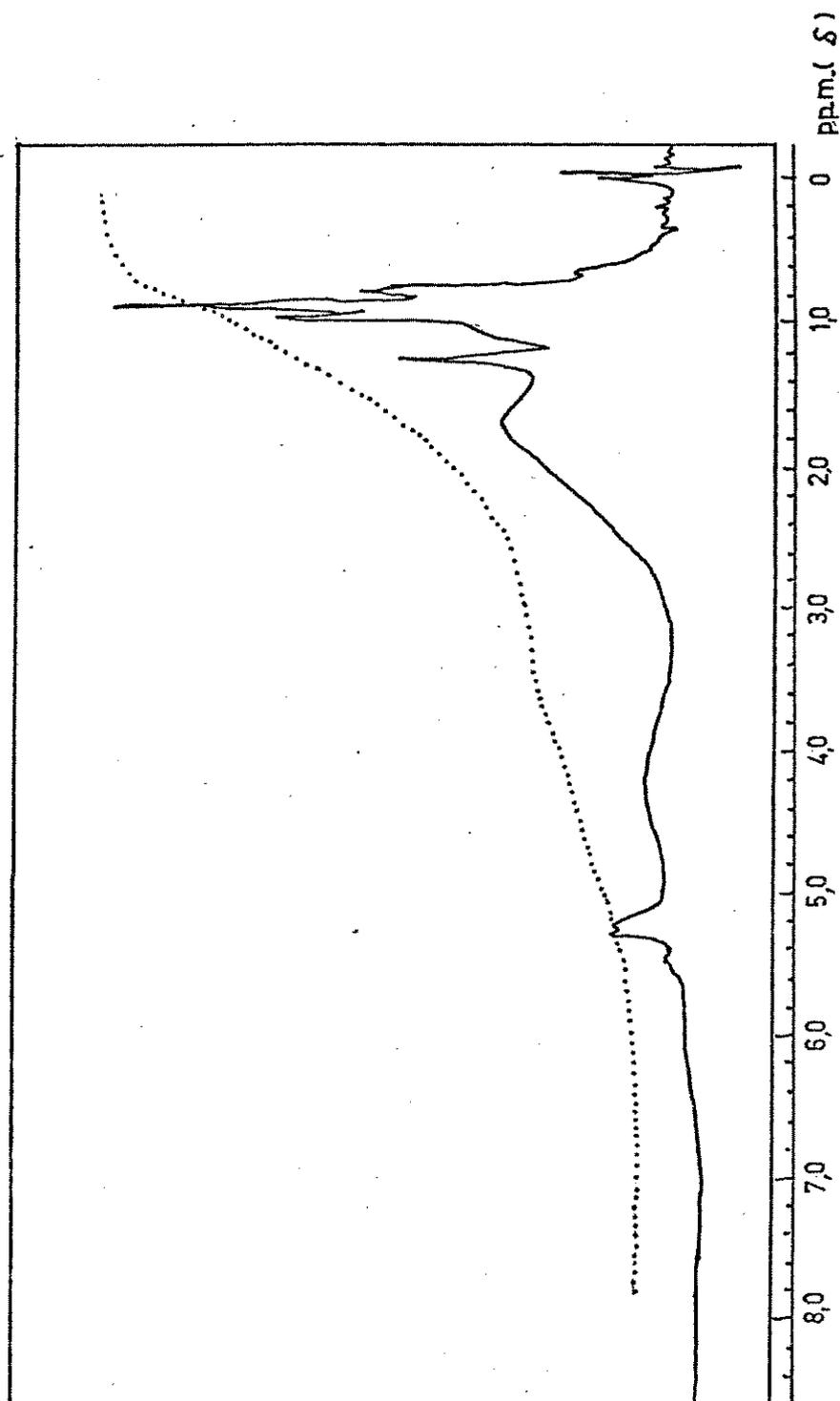


Figura 12 - Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do produto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino.



3. Propriedades dos produtos resultantes do tratamento do colesterol por diversos oxidantes.

O colesterol oxidado pelo ácido peracético fornece produto de oxidação demonstrável através da coloração pelo azul de toluidina ou pelo tratamento com o reativo de Schiff, o que permite sua evidencição histoquímica. Essa oxidação produz modificações das propriedades espectrofotométricas do colesterol, demonstradas por meio da absorção da radiação ultravioleta, infravermelha e das propriedades espectrométricas de ressonância magnética nuclear de prótons.

3.1. Espectro de absorção ultravioleta apresentado pelo colesterol e pelo colesterol tratado por diversos agentes oxidantes.

A oxidação do colesterol pelo ácido peracético fornece produto cujo espectro ultravioleta se apresenta alterado quando comparado com o espectro ultravioleta do colesterol não oxidado. Quando comparados entre si o colesterol não oxidado apresenta dois picos de absorção ultravioleta, em 230 e 223 nm, (Figura 13), enquanto que seu produto de oxidação pelo ácido peracético apresenta somente um pico de absorção em 228 nm (Figura 14). Os produtos resultantes do tratamento do colesterol pelo ácido peracético, ou pelo permanganato de potássio em meio alcalino, também apresentam somente um pico de absorção, mas que difere do pico de absorção ultravioleta apresentado pelo colesterol oxidado pelo ácido peracético. Após o tratamento do co

lesterol por permanganato de potássio em meio ácido, também ocorrem alterações do espectro ultravioleta quando comparado com o espectro ultravioleta do colesterol não oxidado; nestas circunstâncias, também ocorrem dois picos de absorção da radiação ultravioleta (228 e 207 nm), porém em comprimentos de onda diferentes dos picos fornecidos pelo colesterol não submetido a tratamento prévio por oxidantes (Tabela 8).

O ácido peracético, atuando sobre o colesterol nas condições empregadas, além de determinar o aparecimento da basofilia e de propriedades redutoras, desloca o pico principal do colesterol de 230 para 228 nm. Por outro lado, o permanganato de potássio em meio ácido, que também determina basofilia e propriedades redutoras quando atua sobre o colesterol, produz efeito semelhante sobre o espectro ultravioleta, fazendo deslocar o pico principal para 228 nm; simultaneamente, determina o aparecimento de um novo pico em 207 nm (Figura 14). Esses resultados sugerem que o produto dotado de reatividade histoquímica, oriundo da oxidação do colesterol, pelo ácido peracético ou pelo permanganato de potássio em meio ácido, apresenta absorção ultravioleta com pico em 228 nm. Os outros oxidantes usados, que não determinam a formação de produtos dotados de reatividade (basofilia e propriedades redutoras), também não provocam o aparecimento de pico de absorção ultravioleta em 228 nm.

Tabela 8 - Absorção ultravioleta do colesterol não oxidado e do colesterol submetido ao tratamento por diversos agentes oxidantes.

Oxidantes	Absorção (em nm)	
Nihil	230;	223.
Ácido Perfórmico		220.
Permanganato de Potássio em meio alcalino	230.	
Permanganato de Potássio em meio ácido	228;	207.
Ácido Peracético	228.	

Figura 13 - Espectro de absorção ultravioleta do colesterol não submetido à oxidação.

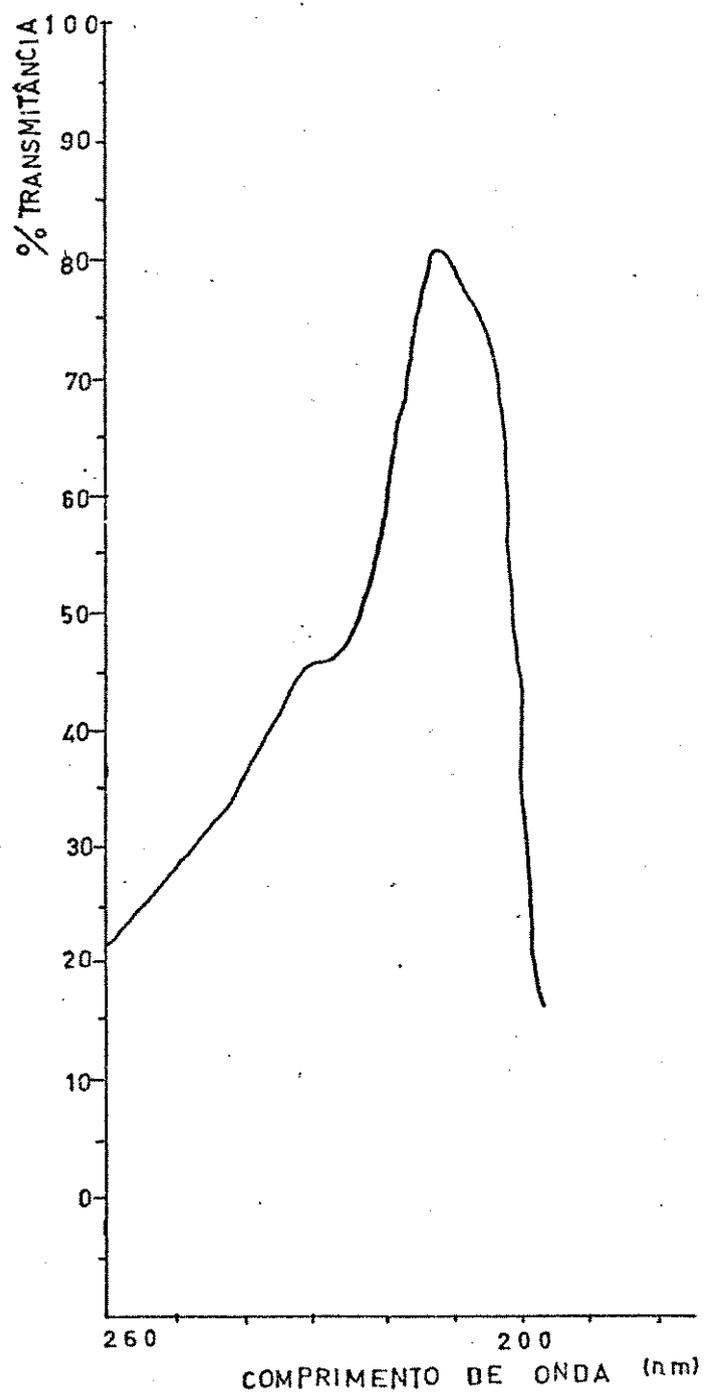
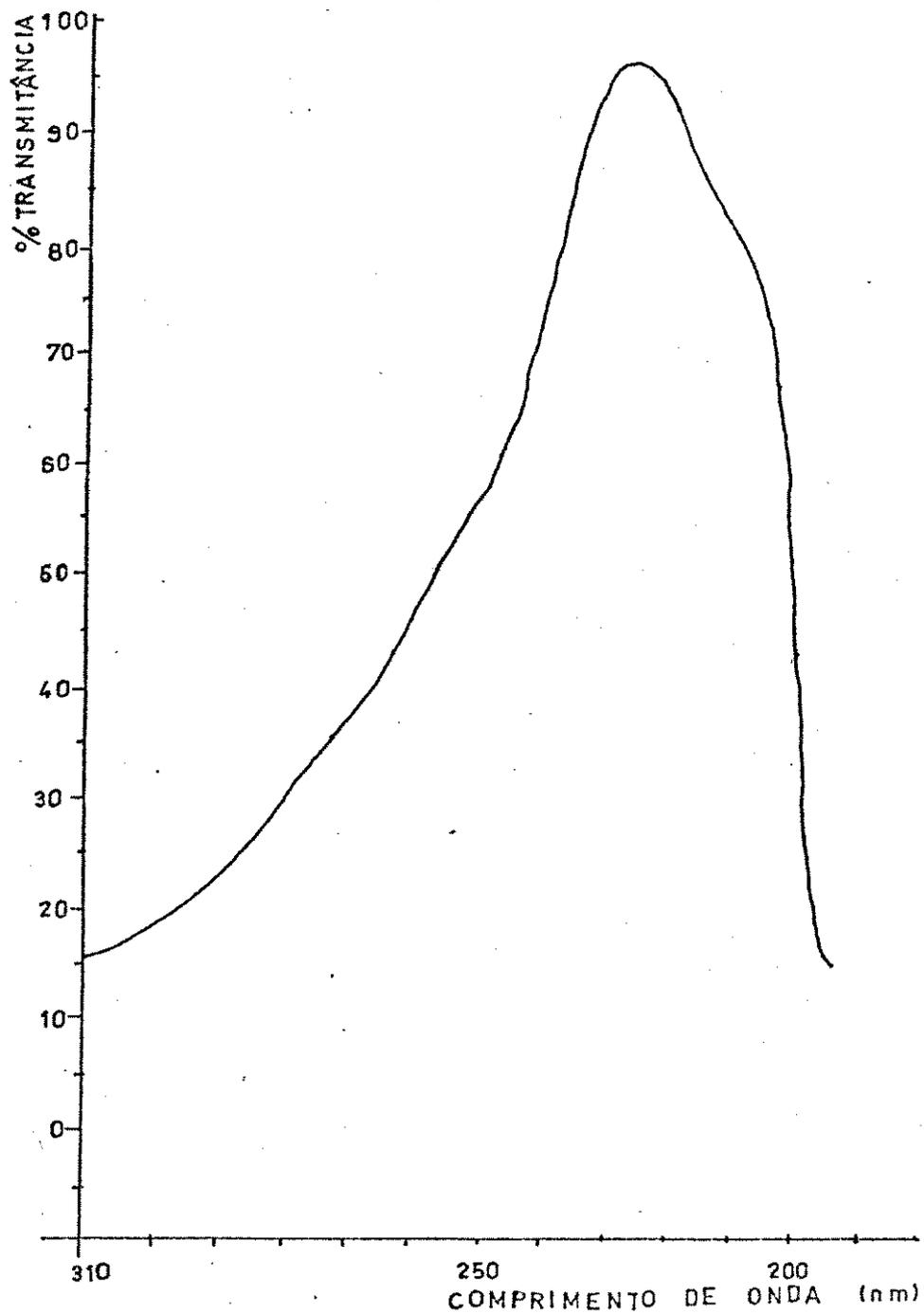


Figura 14 - Espectro de absorção ultravioleta do produto resultante da oxidação do colesterol pelo ácido peracético.



3.2. Espectro de absorção infravermelha apresentado pelo colesterol e pelo colesterol tratado por diversos agentes oxidantes.

A oxidação do colesterol pelo ácido peracético ao mesmo tempo em que determina alterações de suas propriedades químicas com aparecimento de basofilia e atividade redutora, modifica seu espectro de absorção infravermelha em comparação com o colesterol não submetido ao tratamento oxidante. Na região de 1070 cm^{-1} o colesterol oxidado apresenta larga faixa de absorção infravermelha; ao contrário, o colesterol não oxidado apresenta apenas faixa estreita de absorção, nesta região do espectro (Figuras 15 e 16). Por outro lado, o tratamento do colesterol pelo ácido peracético também determina alteração do seu espectro infravermelho, nas regiões de 1720 e 1180 cm^{-1} , onde aparecem uma faixa estreita e uma larga, respectivamente. Devido ao efeito desse mesmo tratamento a faixa de 1060 cm^{-1} desaparece (Tabela 9).

O tratamento pelos demais agentes oxidantes usados não altera o espectro infravermelho do colesterol (Tabela 9).

3.3. Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do colesterol e do colesterol tratado por diversos agentes oxidantes.

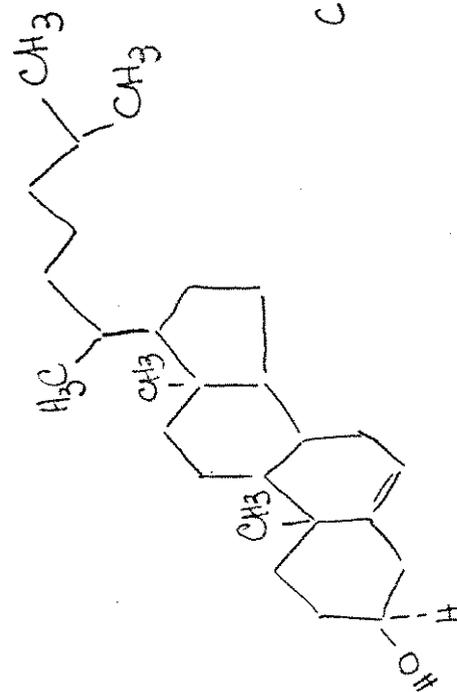
A comparação entre os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons fornecidos pelo colesterol e pelo colesterol tratado pelo ácido peracético revela que o produto de oxidação do colesterol, pelo ácido peracéti-

co, apresenta modificações nos deslocamentos químicos nas regiões de 0,86, 1,06, 3,46 e 5,40 p.p.m. (Figuras 17 e 18). O desaparecimento do pico em 5,40 p.p.m. indica ausência da dupla ligação na posição 3.

O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do produto resultante do tratamento do colesterol pelo ácido perfórmico mostra somente uma região de deslocamento químico em 1,2 p.p.m. O tratamento do colesterol pelo permanganato de potássio em meio alcalino fornece produto cujo espectro de ressonância magnética nuclear de prótons não apresenta deslocamento químico na região de 5,40 p.p.m. (Tabela 10); ao contrário, deslocamento químico muito próximo a esta região é fornecido pelo colesterol tratado pelo permanganato de potássio em meio ácido.

Tabela 9 - Espectro de absorção infravermelho apresentado pelo colesterol e pelos produtos resultantes do tratamento do colesterol pelos agentes oxidantes.

Oxidantes	Absorção (em cm^{-1})		
Nihil	3380;	2920; 2860;	1480; 1380; 1060.
Ácido Perfórmico	3420;	2910; 2860; 1720;	1480; 1390; 1180.
Permanganato de Potássio em meio alcalino	3370;	2910; 2840;	1460; 1380; 1055.
Permanganato de Potássio em meio ácido	3400;	2910; 2850;	1460; 1380; 1055.
Ácido Peracético	3420;	3360; 2910; 2860;	1480; 1390; 1070.



FÓRMULA ESTRUTURAL DO

COLESTEROL

Figura 15 - Espectro de absorção infravermelha do colesterol não submetido a oxidação (Nujol).

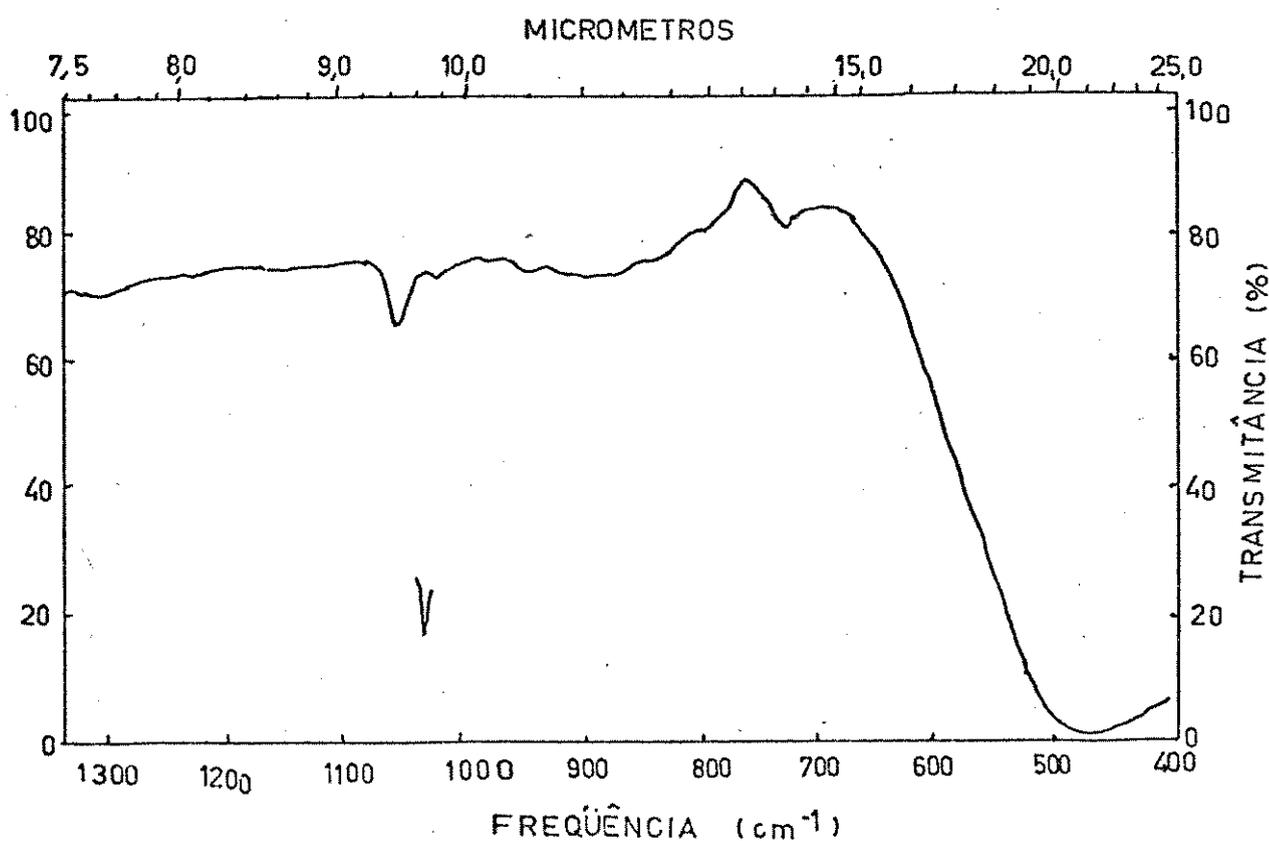
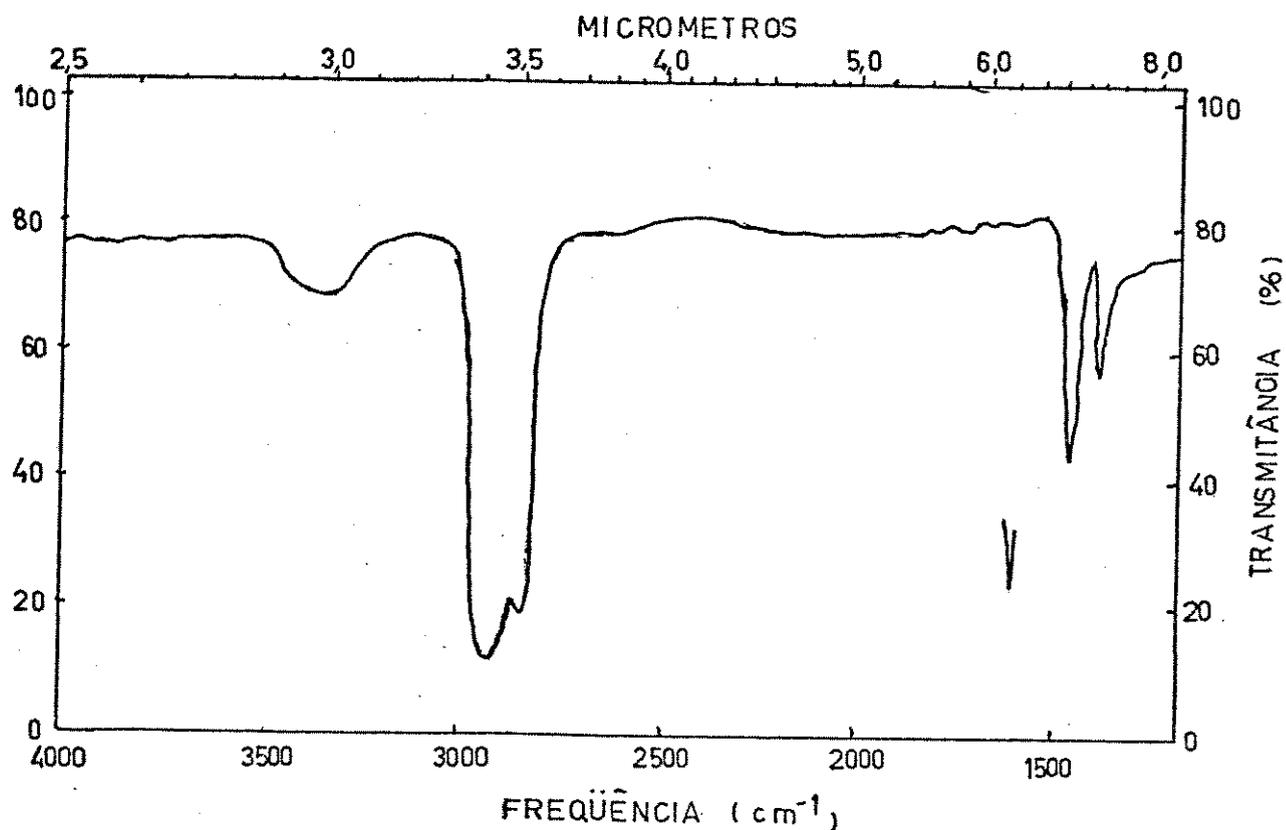


Figura 16 - Espectro de absorção infravermelha do produto de oxidação do colesterol pelo ácido peracético (Nujol).

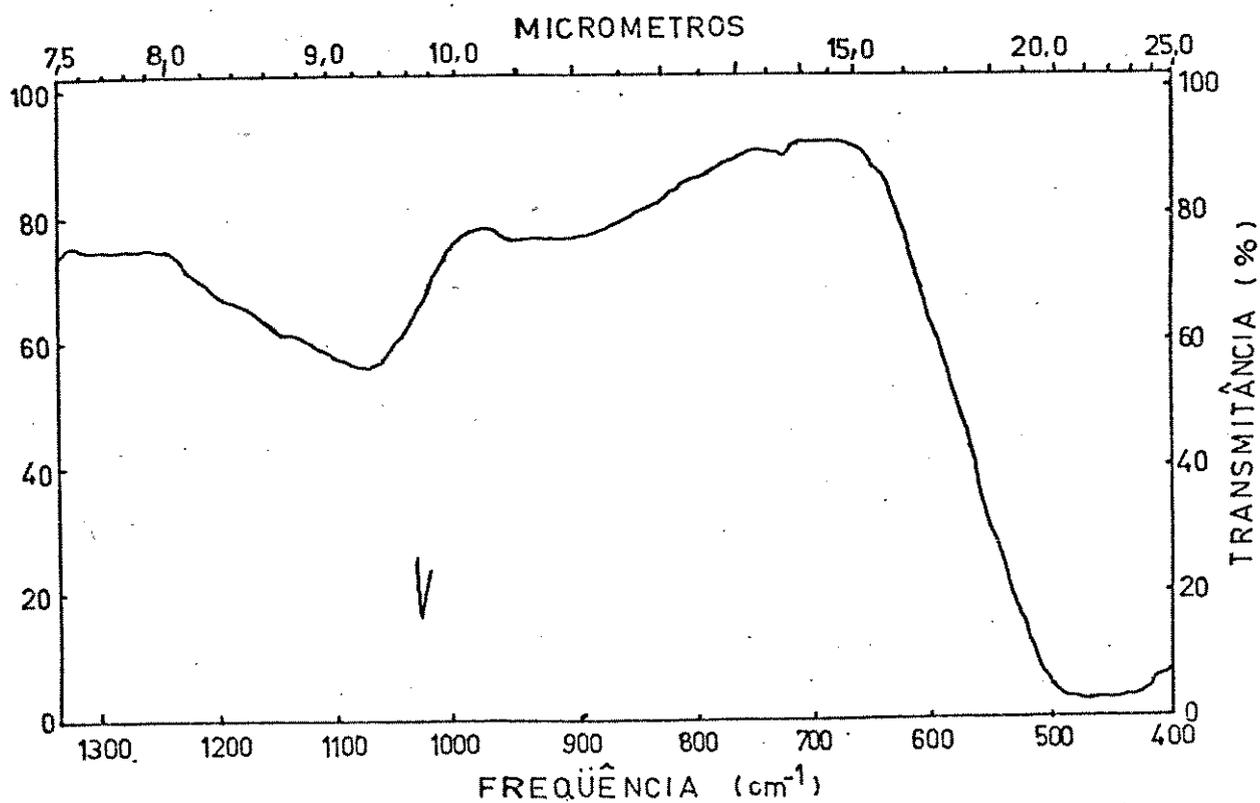
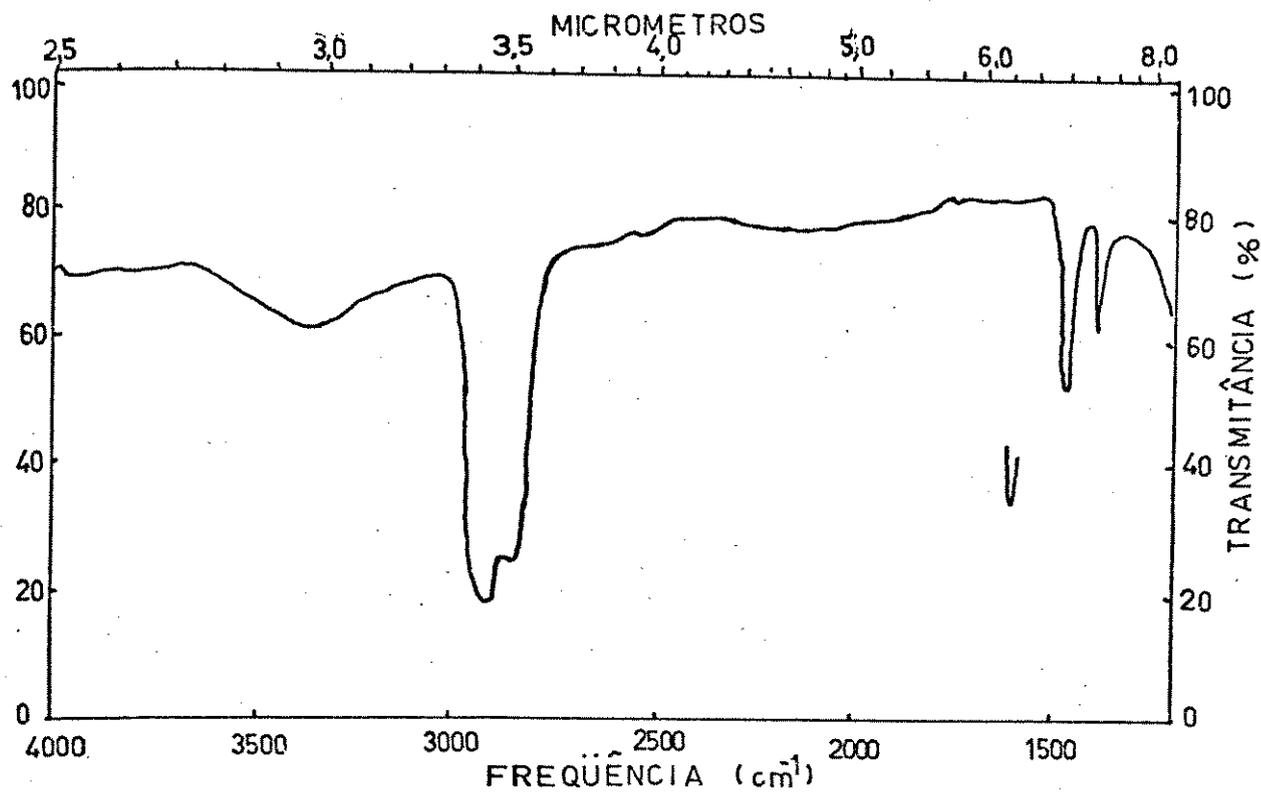


Tabela 10 - Regiões de deslocamentos químicos verificados no espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do colesterol e do colesterol tratado por diversos agentes oxidantes.

Oxidantes	Deslocamentos Químicos (em δ p.p.m.)					
Nihil	0,73;	0,86;	1,00;	1,06;	3,46;	5,40. (CCl ₄)
Ácido Perfórmico					1,20.	(CDCl ₃)
Permanganato de Potássio em meio alcalino	0,70	0,86;	1,00;	1,06;	3,40;	(CDCl ₃)
Permanganato de Potássio em meio ácido	0,70	0,83;	0,96;	1,03;	3,43;	5,36. (CCl ₄)
Ácido Peracético	0,73;		1,00.			(CDCl ₃)

Figura 17 - Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do colesterol não submetido à oxidação.

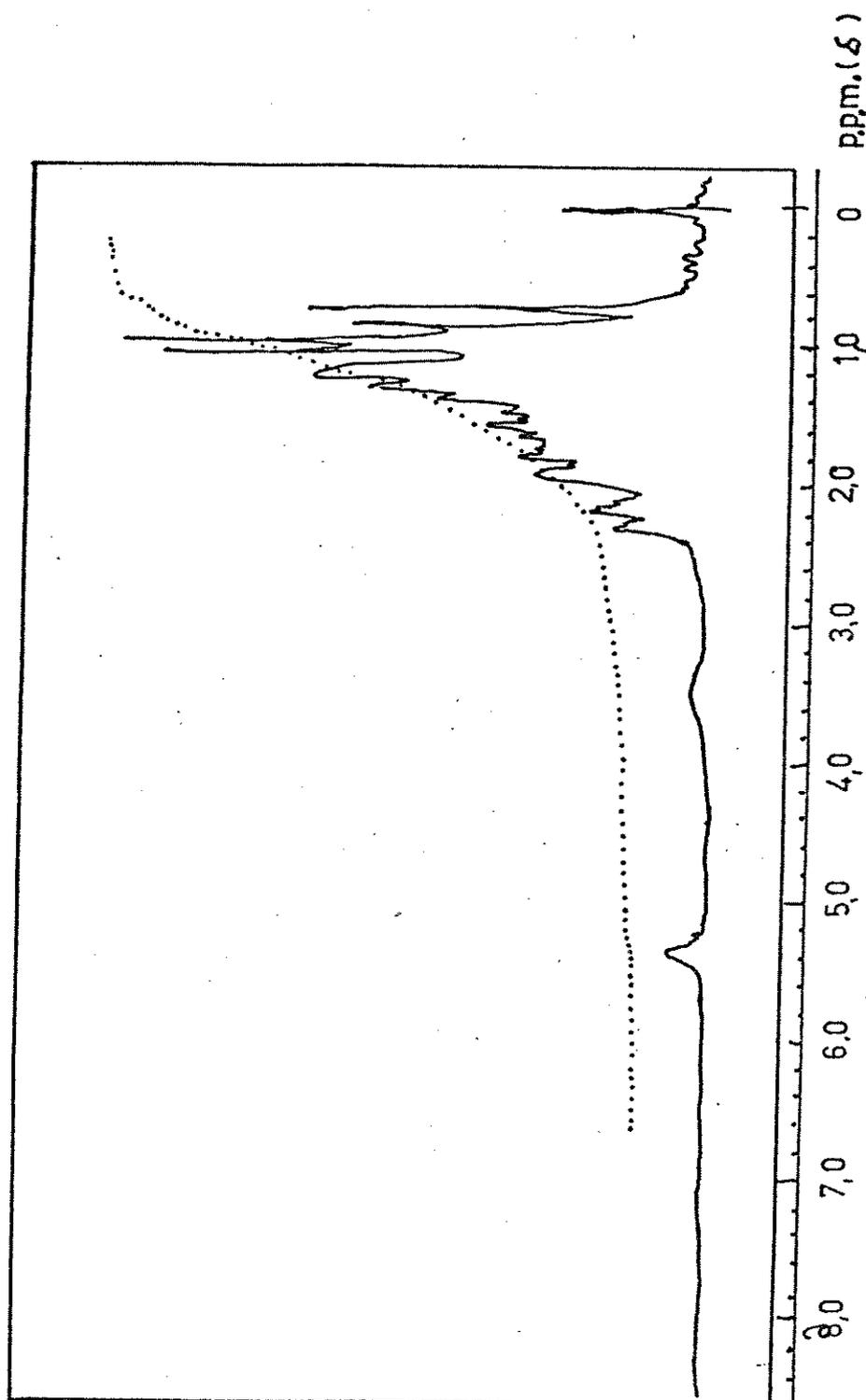
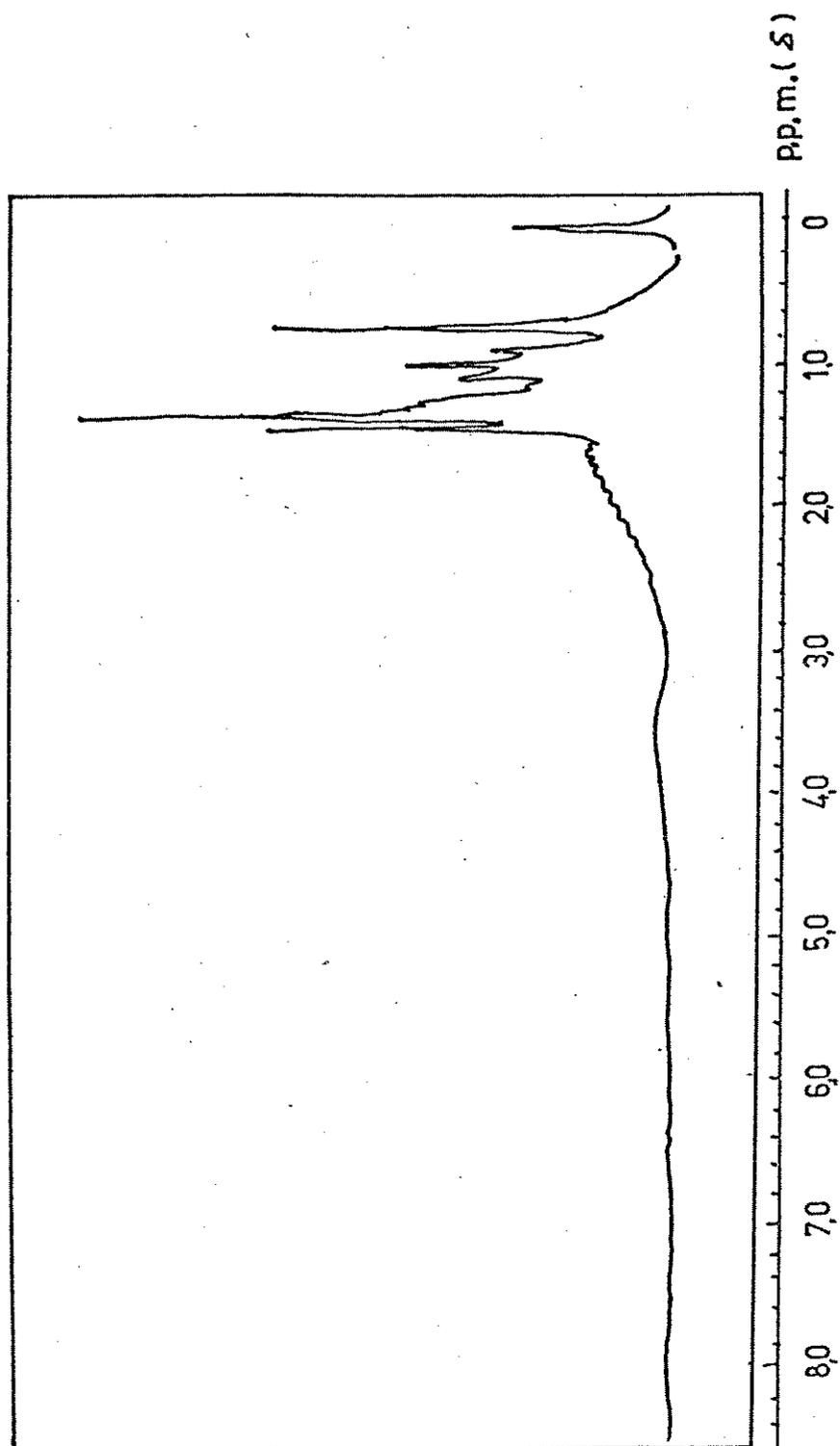


Figura 18 - Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do produto de oxidação do colesterol pelo ácido peracético.



4. Isolamento cromatográfico do produto de oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido perfórmico, responsável pela reatividade histoquímica.

Os produtos de oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido perfórmico, ou resultantes do tratamento pelos outros oxidantes usados, separados por cromatografia em camada delgada, apresentam os resultados que estão expostos na figura 19. O acetato de DL α -tocoferol quando oxidado pelo ácido perfórmico fornece dois compostos com propriedades cromatográficas diferentes do acetato de DL α -tocoferol não submetido à oxidação. Esses compostos apresentam Rf 0,08 e 0,18, enquanto o acetato de DL α -tocoferol possui Rf 0,30. O tratamento do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido peracético, fornece um produto com Rf 0,10, porém este produto não apresenta basofilia, nem reduz o reativo de Schiff, ou seja, não apresenta as propriedades utilizadas para a demonstração histoquímica do acetato de DL α -tocoferol.

O acetato de DL α -tocoferol submetido ao tratamento pelos outros oxidantes utilizados não apresenta alteração de sua propriedade cromatográfica.

Os produtos resultantes da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico (Rf 0,08 e 0,18) separados por cromatografia em camada delgada, foram eluídos, concentrados e depositados em fragmentos de papel de filtro. Esses papéis foram submetidos à coloração por solução de azul de toluidina e ao tratamento pelo reativo de Schiff. Os resultados revelam que somente a substância com

Rf 0,08 apresenta-se basófila e é capaz de recorar o reativo de Schiff (Tabela 11), propriedades estas utilizadas para a demonstração histoquímica do acetato de DL α -tocoferol.

4.1. Análise do produto com Rf 0,08, resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico e separado por cromatografia em camada delgada.

O produto da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico, que apresenta Rf 0,08, submetido á espectrofotometria ultravioleta, infravermelha e espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons e espectrometria de massa apresenta os resultados descritos a seguir. O espectro ultravioleta não apresenta picos definiudos, porém, possui forte absorção na região de 270 a 250nm, conforme pode ser verificado á figura 20. A comparação deste espectro, com o apresentado pelo acetato de DL α -tocoferol não submetido á oxidação (Figura 1) revela eliminação dos picos: 286, 284 e 278 nm.

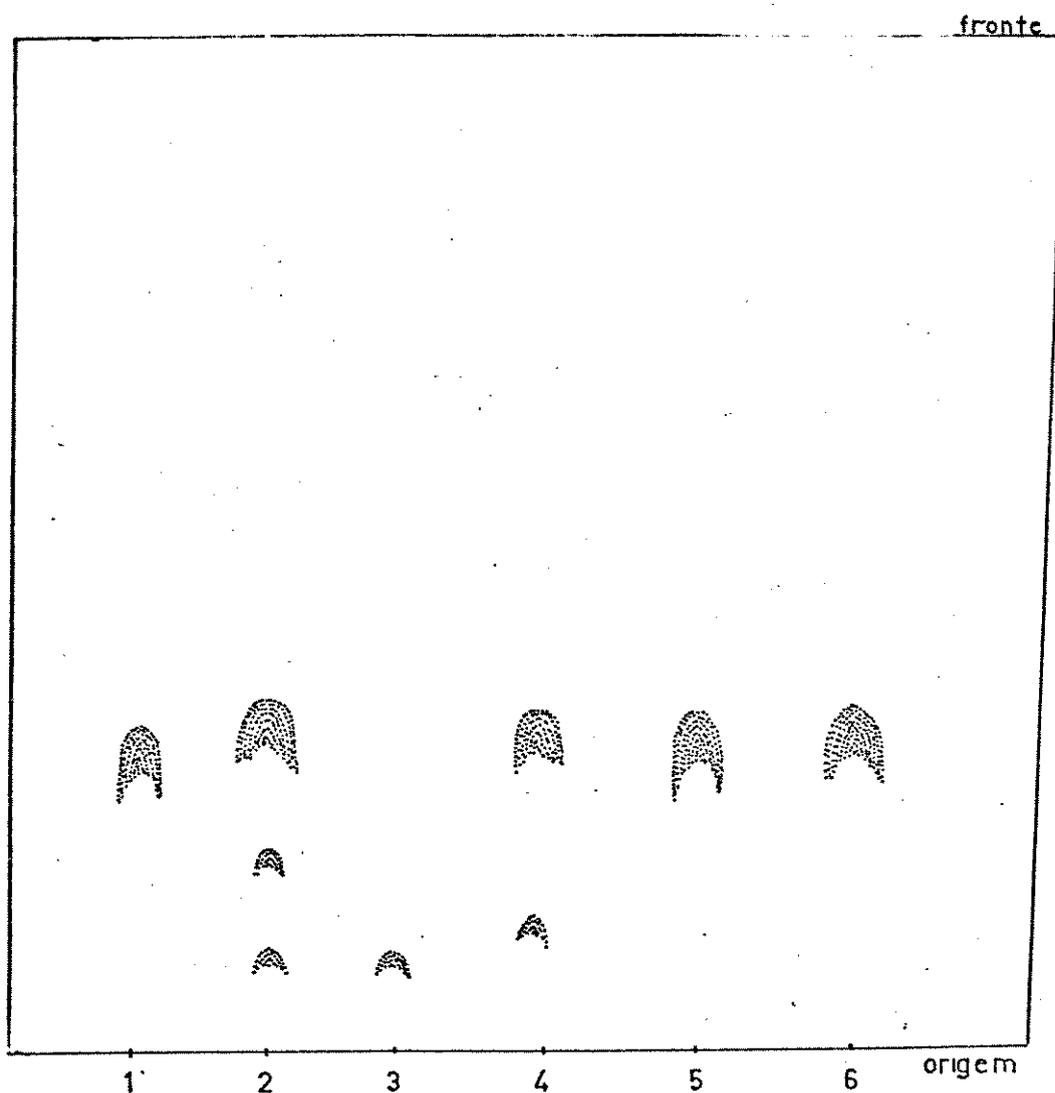
O espectro de absorção infravermelha do produto de oxidação perfórmica do acetato de DL α -tocoferol, separado por cromatografia e que apresenta Rf 0,08, mostra forte absorção na região de 3.400 cm^{-1} (Figura 21). Quando comparado com o espectro de absorção infravermelha apresentado pelo acetato de DL α -tocoferol não oxidado (Figura 3) revela intensificação da absorção infravermelha na região de 3.400 cm^{-1} e ausência de picos definidos na região de $1.200\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$.

Alterações do espectro de ressonância magnética

nuclear de prótons também são verificadas quando se estabelece comparação entre o espectro apresentado pelo composto proveniente da oxidação perfôrmica do acetato de DL α -tocoferol, que apresenta Rf 0,08 e do acetato de DL α -tocoferol não oxidado (Figuras 22 e 5). Assim, o espectro do produto oxidado (Rf 0,08) revela ausência de prótons ressonantes apenas na região de 2,60 p.p.m., uma vez que os outros deslocamentos químicos correspondem aos encontrados no espectro do acetato de DL α -tocoferol não oxidado.

O espectro de massa do produto resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol, que apresenta Rf 0,08 (Figura 24), revela massa igual a 462 m/e e fragmentos a m/e: 444, 418, 256, 195, 149, 126, 114, 111, 99, 98, 85, 83, 81, 71, 70, 69, 57, 56, 55, 42 e 41. Quando comparado com o espectro de massa registrado à figura 23, verifica-se que a massa apresentada pelo produto de oxidação perfôrmica do acetato de DL α -tocoferol é inferior à massa do acetato de DL α -tocoferol não oxidado, que é de 472 m/e (Figura 23). Além disso, verificam-se diferenças quanto aos fragmentos revelados no espectro do acetato de DL α -tocoferol não oxidado, que são a m/e: 430, 256, 241, 213, 207, 185, 171, 164, 156, 148, 145, 129, 83, 68, 54, 42, 28. O pico base do composto com Rf 0,08 é o pico de 99, enquanto que o pico base do acetato de DL α -tocoferol não oxidado é o de 54.

Figura 19 - Cromatograma em camada delgada. Eluente: hexano-acetato de etila (97,5 : 2,5).



- 1 - Acetato de DL α -tocoferol não submetido à oxidação.
- 2 - Acetato de DL α -tocoferol oxidado pelo ácido perfórmico.
- 3 - Substância correspondente ao Rf 0,08 previamente separada.
- 4 - Produto resultante do tratamento do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido peracético.
- 5 - Produto resultante do tratamento do acetato de DL α -tocoferol pelo permanganato do potássio em meio alcalino.
- 6 - Produto resultante do tratamento do acetato de DL α -tocoferol pelo permanganato de potássio em meio ácido.

Tabela 11 - Reatividade ao azul de toluidina e ao reagente de Schiff dos produtos de oxidação do acetato de DL α -tocoferol, pelo ácido performico.

Produtos de Oxidação	Basofilia Demonstrável pelo Azul de Toluidina	Reatividade ao Reagente Schiff
Rf 0,08	+++	+++
Rf 0,18	+	-
Acetato de DL -tocoferol (Rf 0,30)	-	-

Figura 20 - Espectro de absorção ultravioleta do produto dotado de Rf 0,08 resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perf \bar{o} rmico e separado por cromatografia em camada delgada.

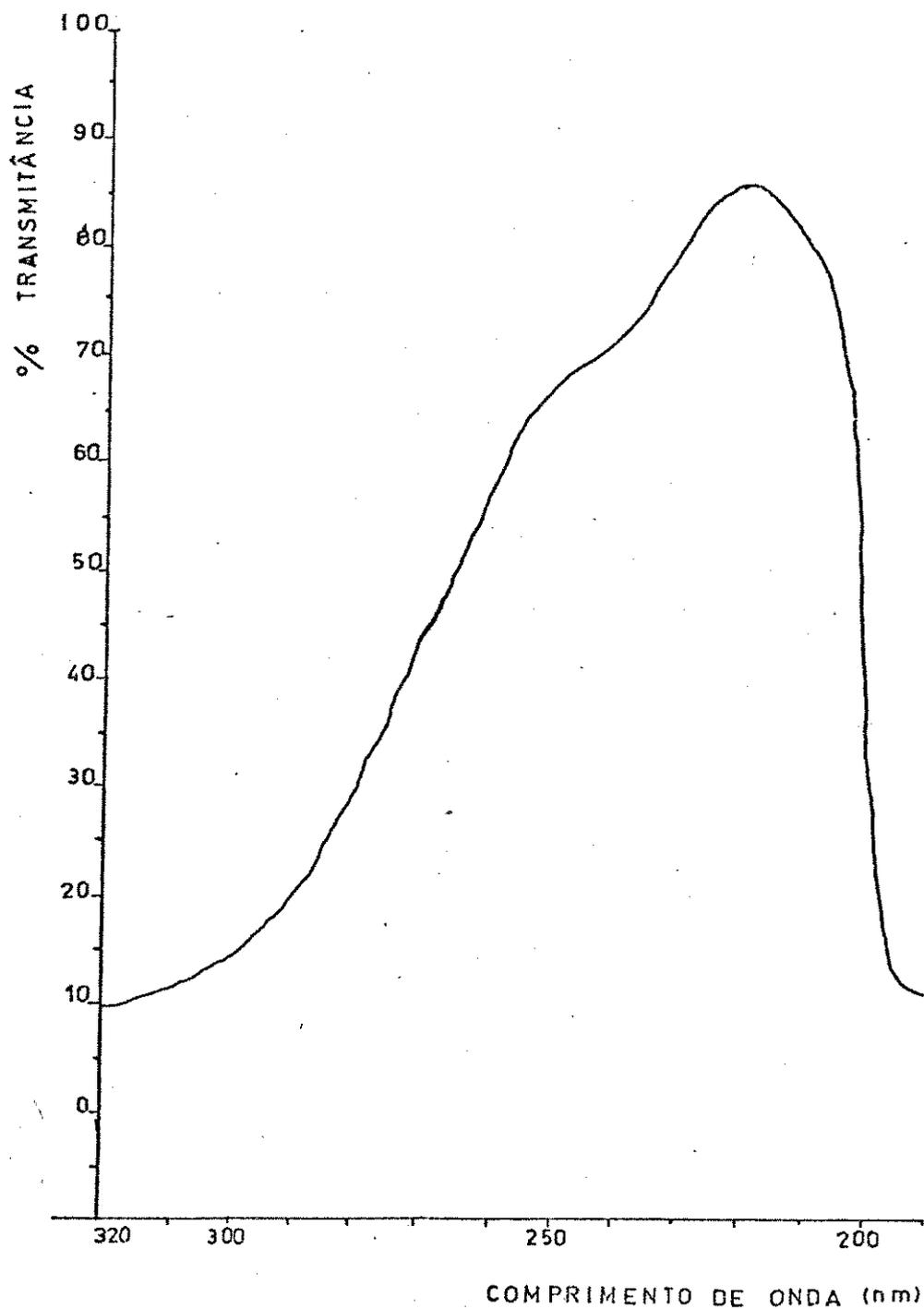


Figura 21 - Espectro de absorção infravermelha do produto dotado de Rf 0,08, resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perf \bar{o} rmico e separado por cromatografia em camada delgada (Filme).

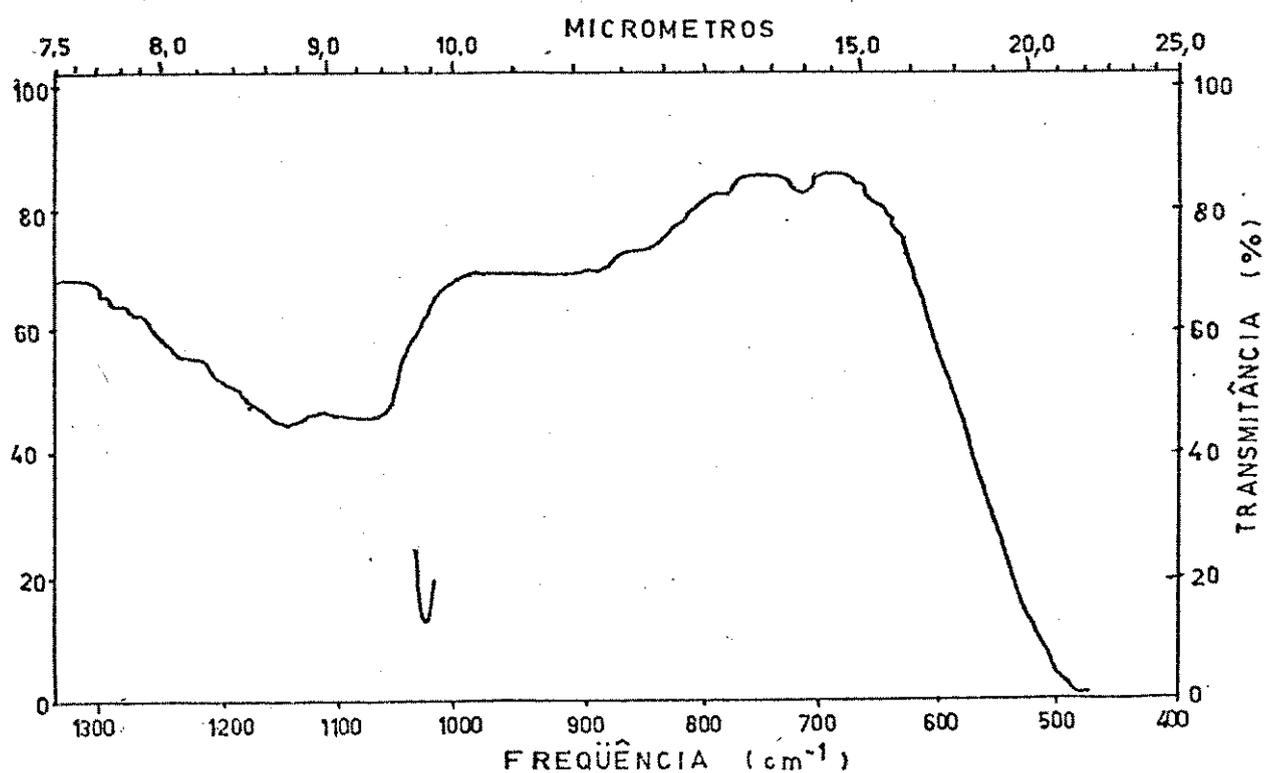
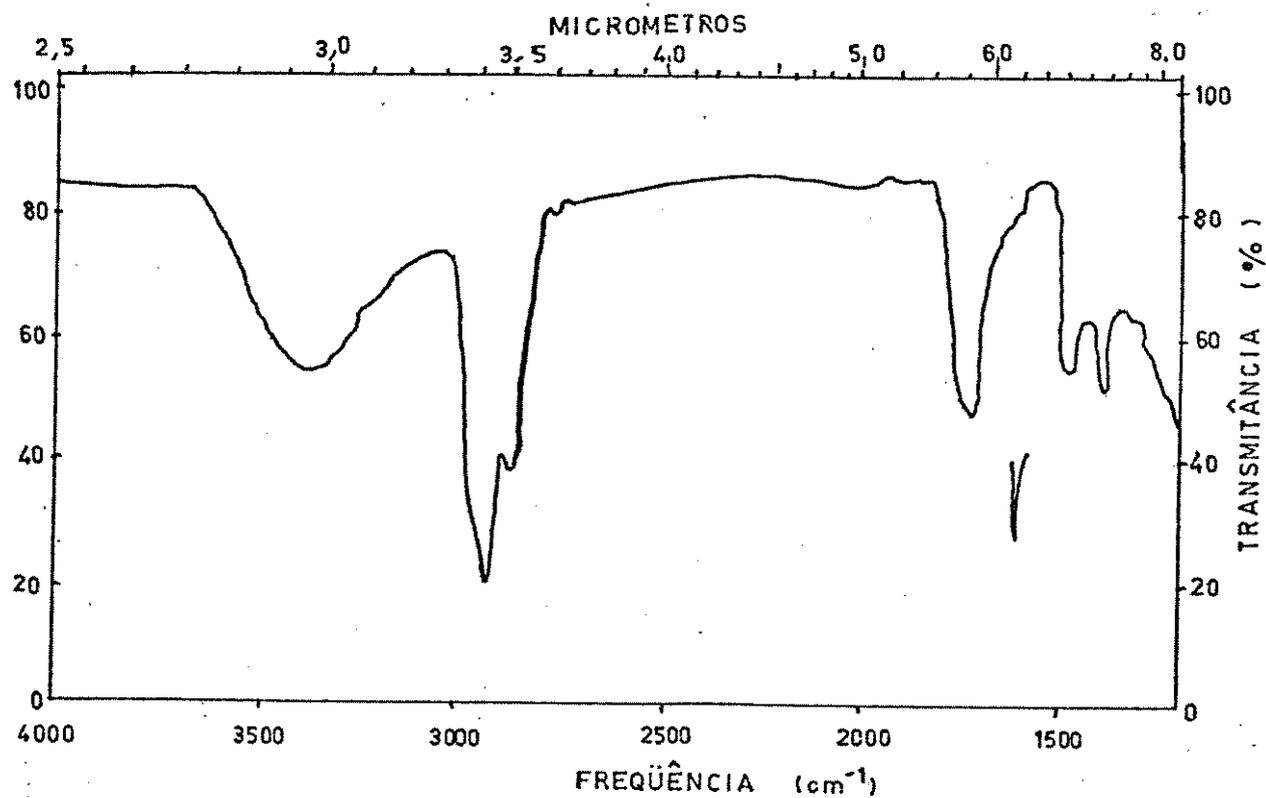


Figura 22 - Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons do produto resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico, que apresenta Rf 0,08 quando submetido à cromatografia em camada delgada.

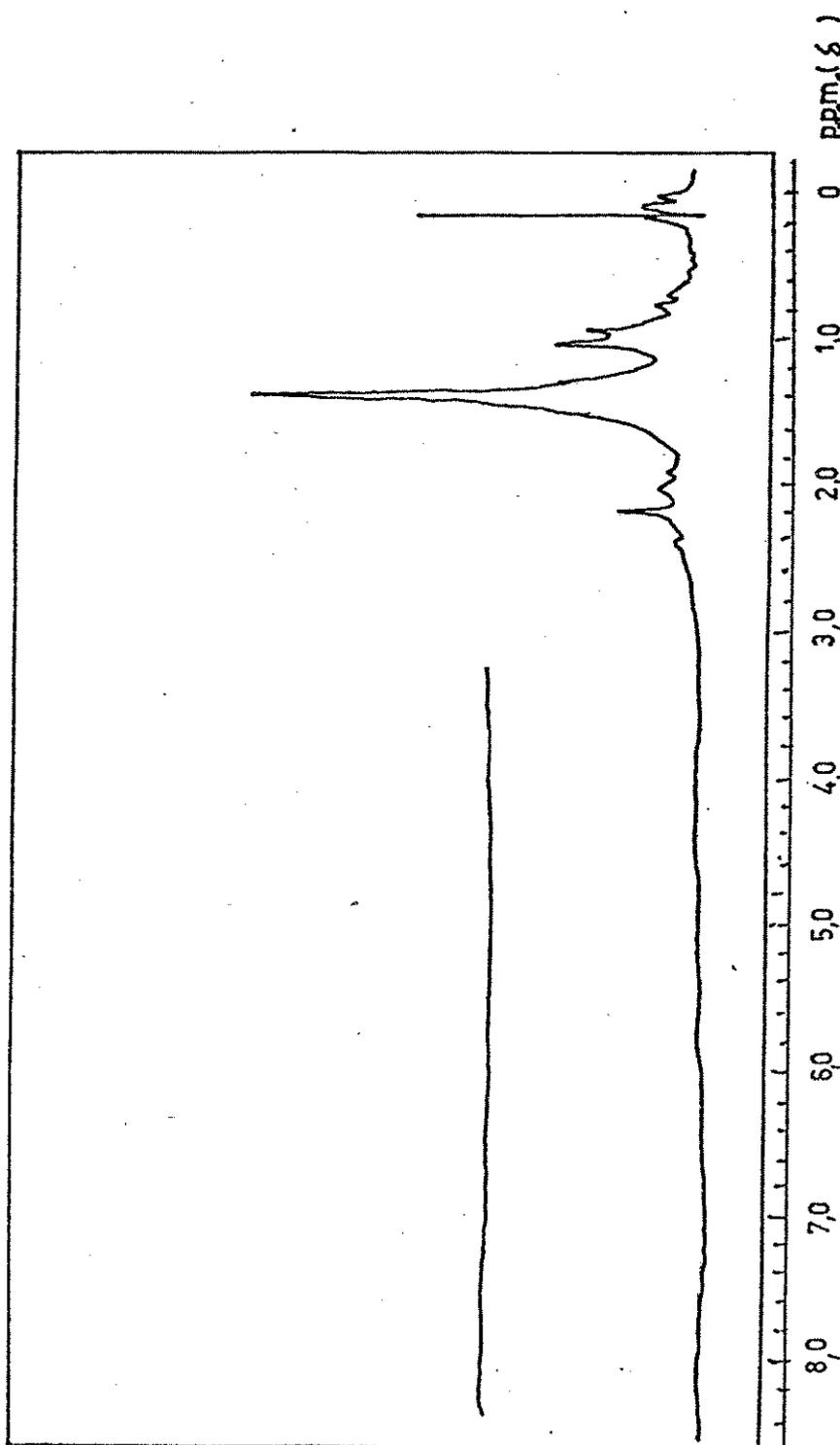


FIGURA 23 - Espectro de massa do acetato de DL α -tocoferol
não oxidado.

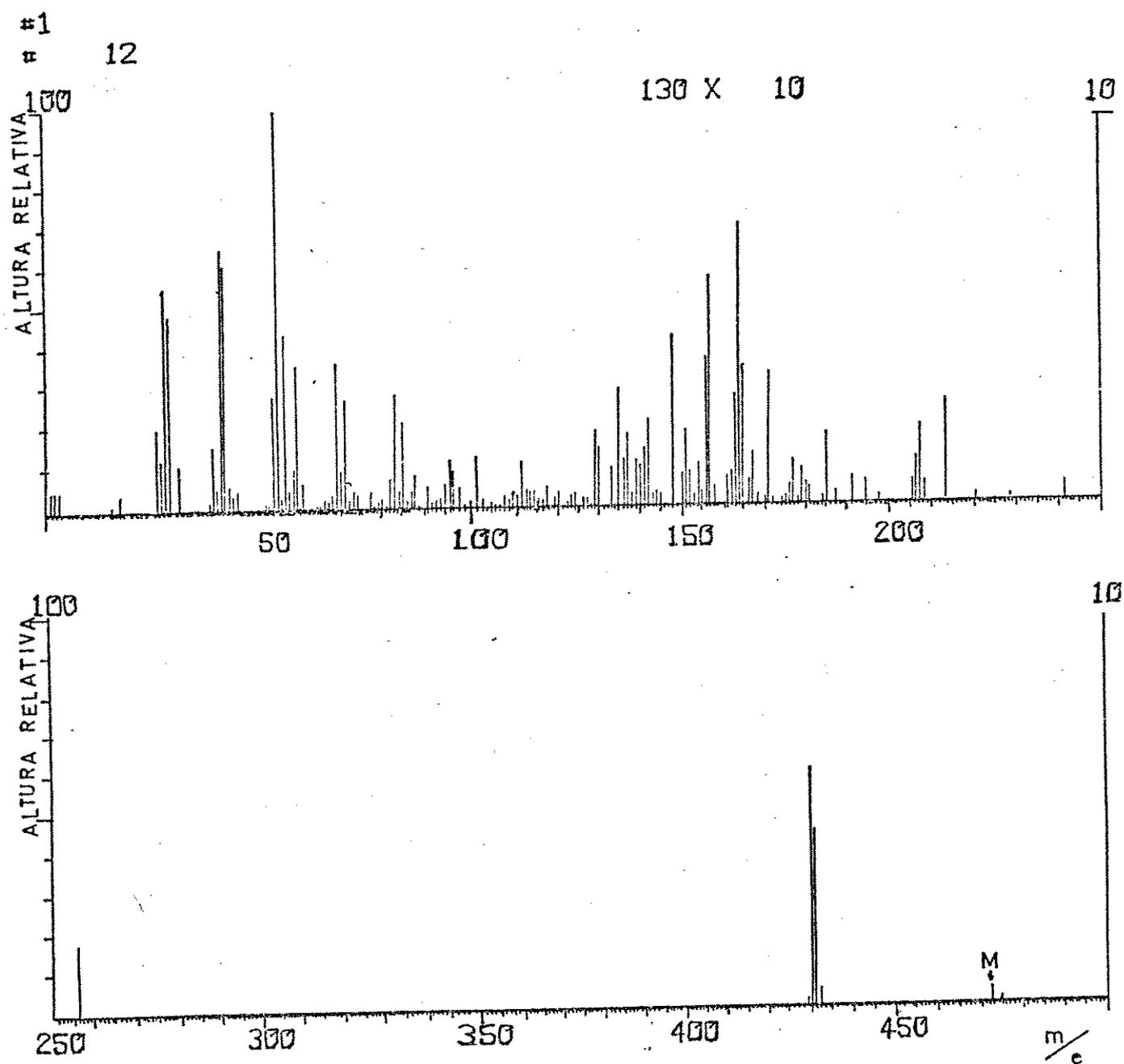
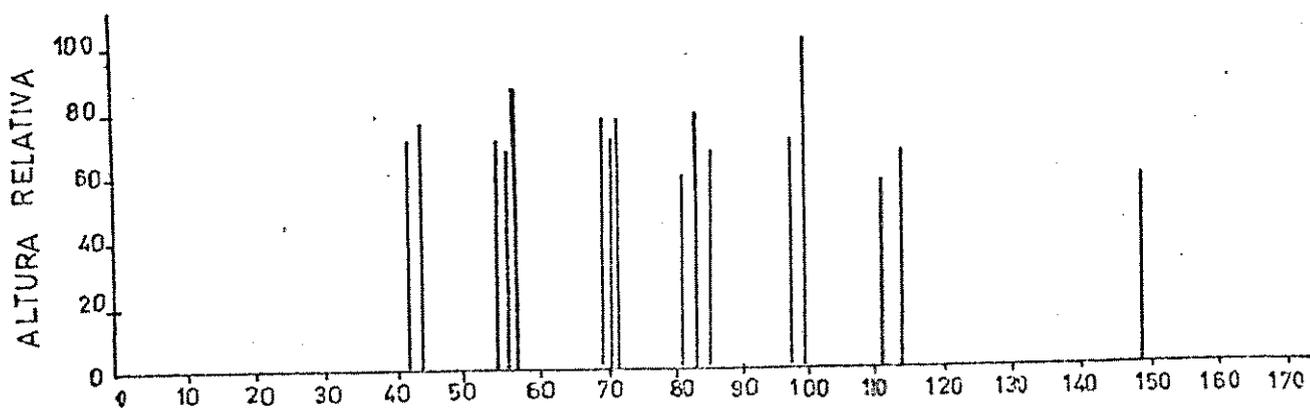
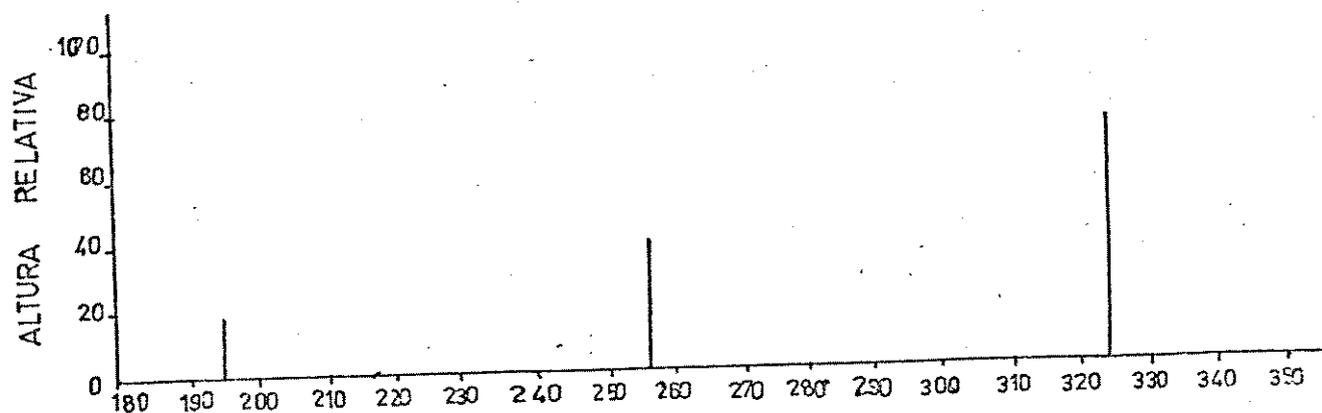
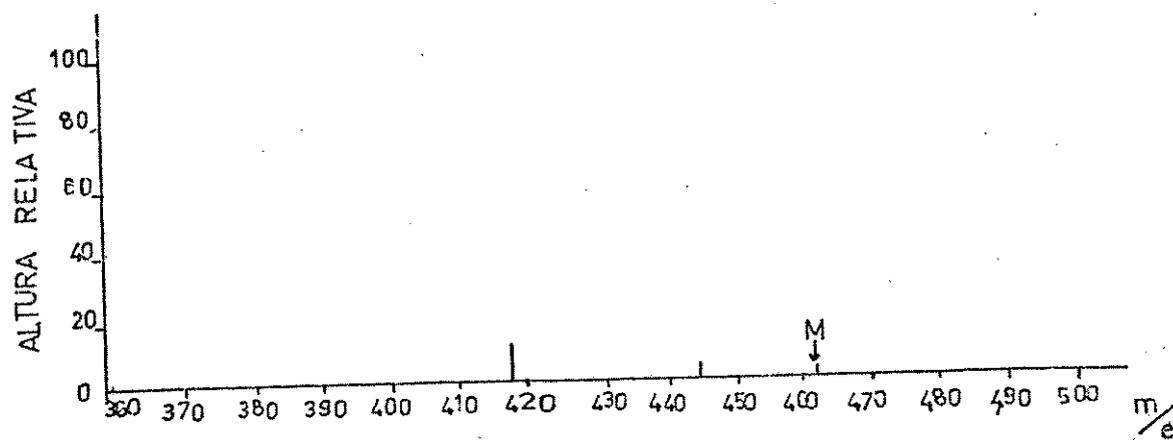


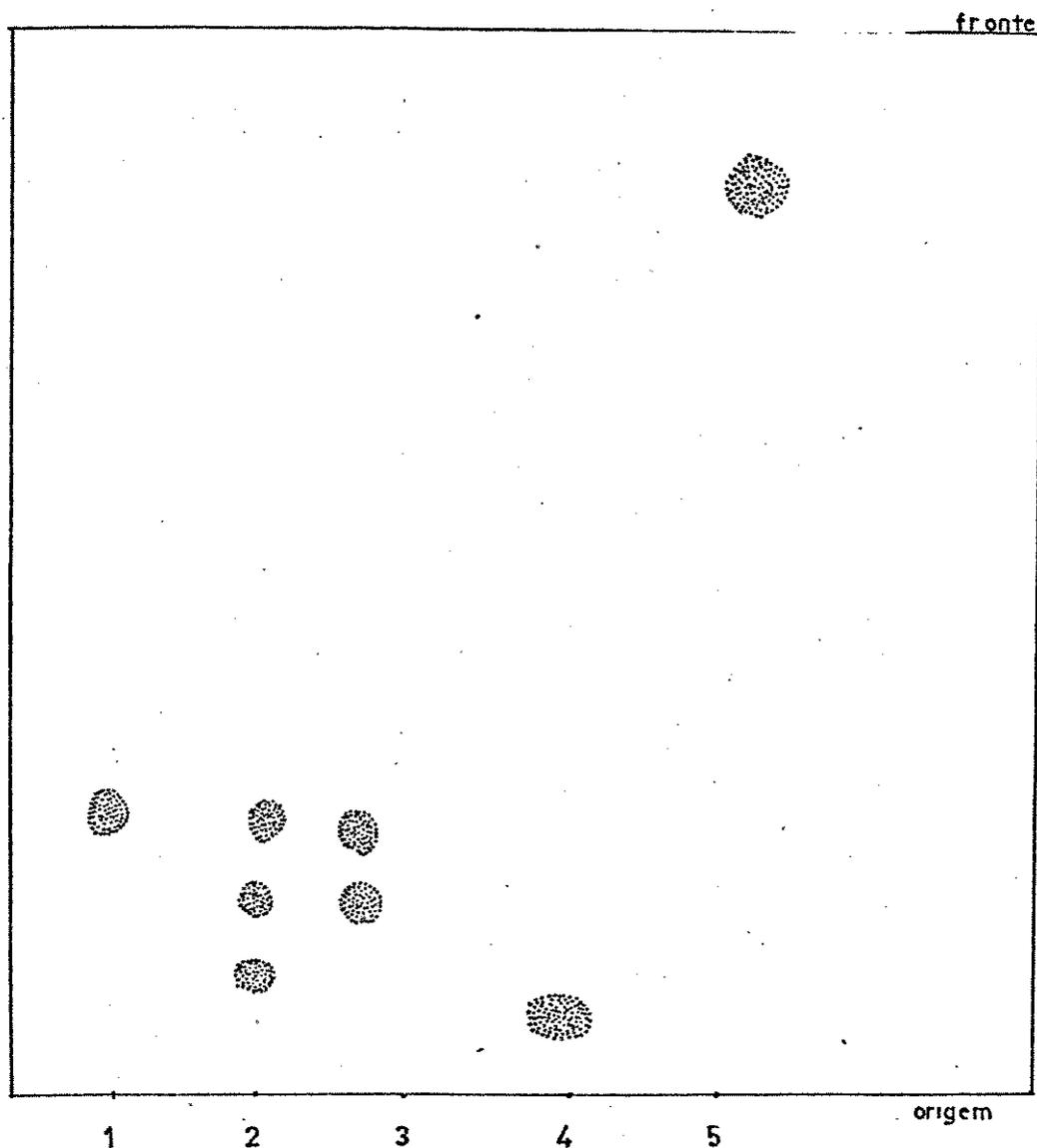
Figura 24 - Espectro de massa do produto com Rf 0,08, resultante da oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfômico e separado por cromatografia em camada delgada.



5. Separação cromatográfica dos produtos de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino, responsável pela reatividade histoquímica.

Os produtos resultantes do tratamento do calciferol pelos diferentes oxidantes usados foram cromatografados em sílica gel, usando-se como eluente uma solução de hexano e acetato de etila na proporção de 97,5 : 2,5. A separação cromatográfica do produto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio, em meio alcalino, permite isolar três componentes cujos Rf são: 0,14, 0,16 e 0,27 (Figura 25). Cada componente foi eluído separadamente, concentrado e depositado em fragmentos de papel de filtro; subsequentemente, foi submetido aos testes com solução de azul de toluidina e tratados pelo reativo de Schiff. Os produtos de Rf 0,14 e 0,16 são basófilos e reagem positivamente ao reativo de Schiff, indicando que esses componentes devem ser responsáveis pela reatividade histoquímica do calciferol oxidado. O tratamento do calciferol pelo permanganato de potássio em meio ácido fornece composto com migração cromatográfica em Rf 0,16, que também é basófilo e reage positivamente ao reativo de Schiff. Esses produtos, que apresentam reatividade histoquímica, exibem migração cromatográfica diferente dos produtos provenientes do tratamento do calciferol pelos outros oxidantes usados. Além disso, os produtos resultantes do tratamento do calciferol pelo ácido peracético, ou pelo ácido perfórmico, não são redutores nem se coram pela solução de azul de toluidina.

Figura 25 - Cromatograma em camada delgada. Eluente: hexano-acetato de etila (97,5 : 2,5).



- 1 - Calciferol não submetido à oxidação.
- 2 - Calciferol oxidado pelo permanganato de potássio em meio alcalino.
- 3 - Produto resultante do tratamento do calciferol pelo permanganato de potássio em meio ácido.
- 4 - Produto resultante do tratamento do calciferol pelo ácido peracético.
- 5 - Produto resultante do tratamento do calciferol pelo ácido perfórmico.

5.1. Análise do produto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino.

A eluição, após separação cromatográfica dos produtos de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino, não foi bem sucedida pelo fato de os compostos isolados apresentarem contaminação pelo ftalato, composto este presente na sílica, não sendo possível, então, a identificação desses produtos; contudo, analisando-se os espectros infravermelho, de ressonância magnética nuclear de prótons e de massa do produto bruto de oxidação pode-se verificar algumas características do produto de oxidação.

A análise do espectro de absorção infravermelha, do espectro de ressonância magnética nuclear de prótons e de massa revela que o produto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino, apresenta grupo carbonila detectado através do espectro de absorção infravermelha na região de 1700 cm^{-1} (Figura 10) e através do espectro de massa (Figura 27), no qual há duas unidades de massa a menos do que no espectro de massa do calciferol não oxidado (Figura 26), o que indica a oxidação do grupo hidroxila a cetona. Além disso, há indícios de grupos hidroxilas revelados pelo espectro de ressonância magnética nuclear de prótons na região entre 4,0 e 5,0 p.p.m. (Figura 12).

Figura 26 - Espectro de massa do calciferol não oxidado.

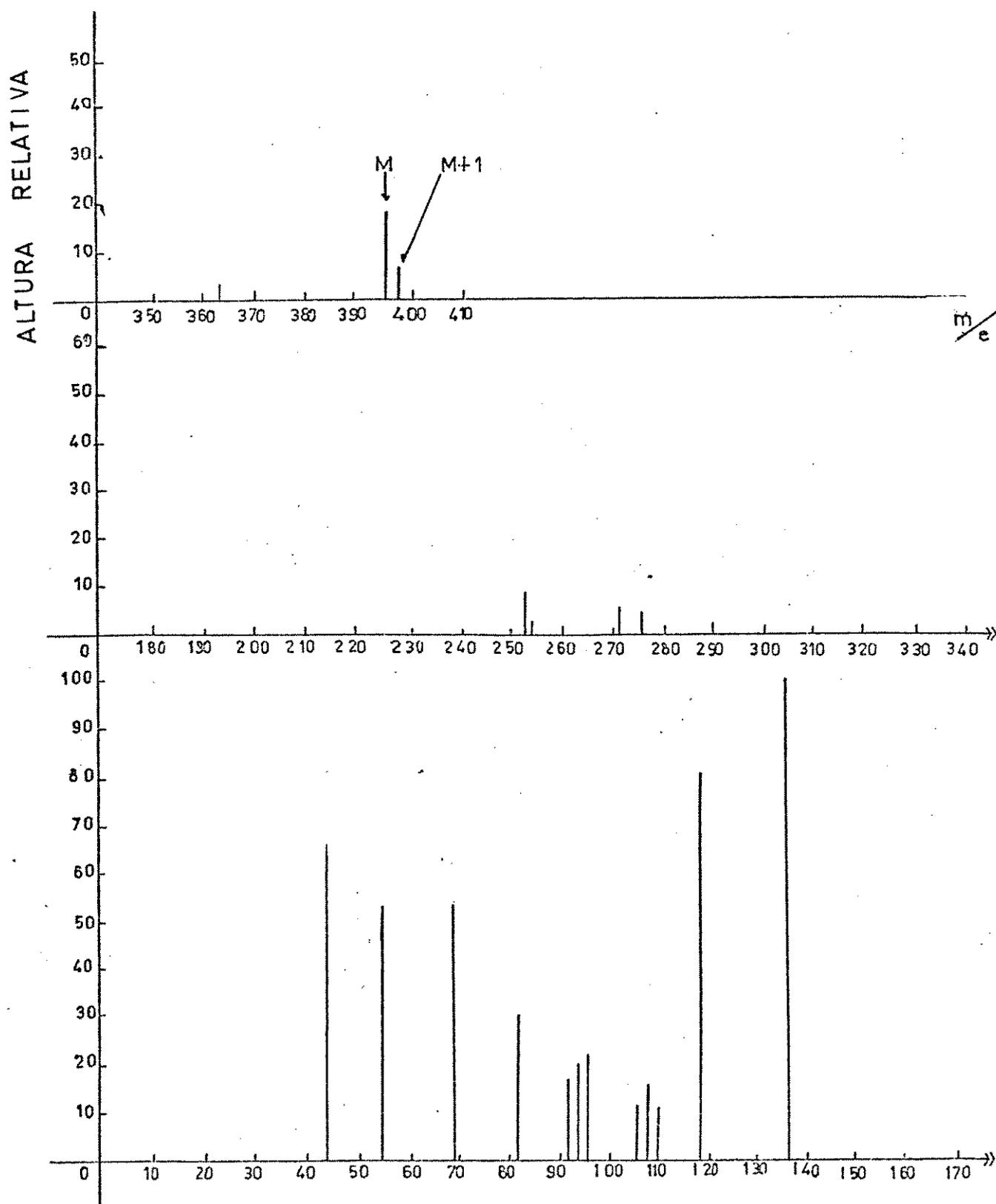
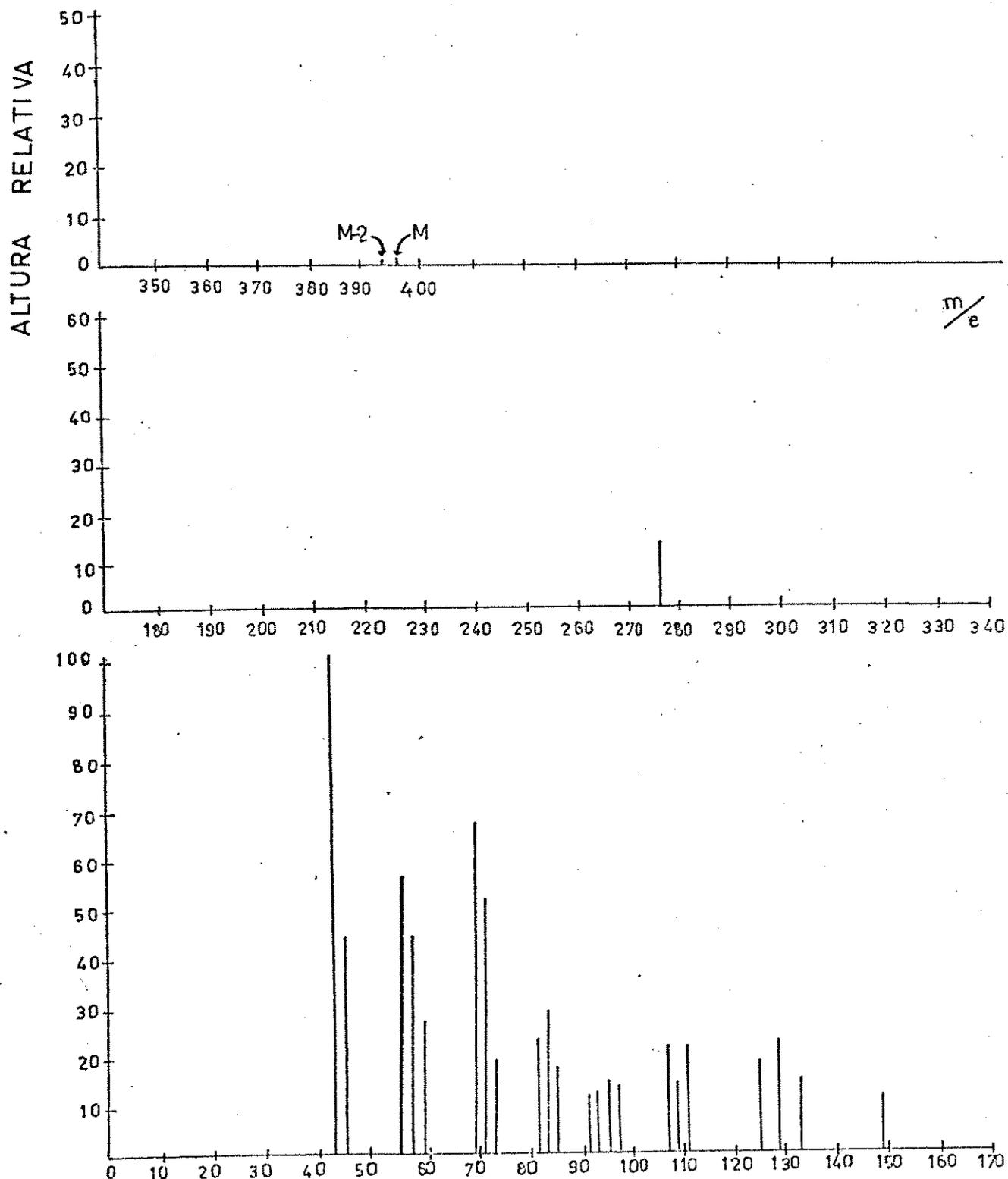


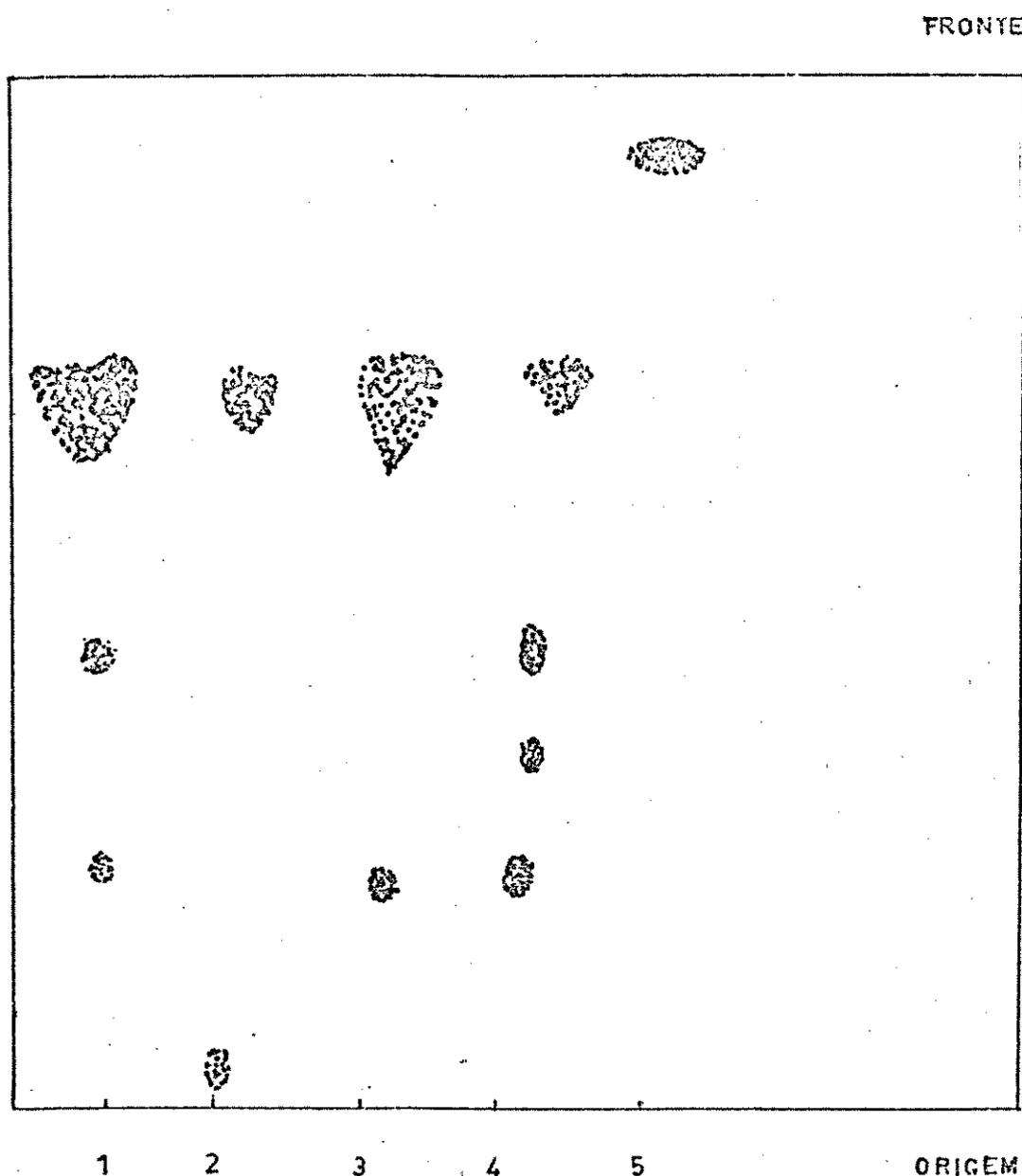
Figura 27 - Espectro de massa do produto bruto de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino.



6. Isolamento cromatográfico dos produtos de oxidação do colesterol pelo ácido peracético, responsável pela reatividade histoquímica.

Os produtos resultantes do tratamento do colesterol pelos diversos agentes oxidantes usados foram cromatografados em camada fina de sílica gel, usando-se como eluente uma solução contendo benzeno e acetato de etila, na proporção de 3 : 2. O colesterol após oxidação pelo ácido peracético mostra apenas duas manchas, sendo uma correspondente ao colesterol não oxidado (Figura 28). O produto resultante da oxidação do colesterol, pelo ácido peracético, que apresenta Rf 0,05, foi eluído da placa cromatográfica e concentrado. Subsequentemente, foi submetido à coloração por solução de azul de toluidina e ao tratamento pelo reativo de Schiff; os resultados foram positivos, revelando que esse produto é basófilo e apresenta propriedades redutoras.

Figura 28 - Cromatograma em camada delgada. Eluente: benzeno - acetato de etila (3:2).



- 1 - Colesterol não oxidado.
- 2 - Produto da oxidação do colesterol pelo ácido peracético.
- 3 - Produto da oxidação do colesterol pelo permanganato de potássio em meio alcalino.
- 4 - Produto da oxidação do colesterol pelo permanganato de potássio em meio ácido.
- 5 - Produto da oxidação do colesterol pelo ácido perfórmico.

DISCUSSÃO

Conforme os resultados anteriormente assinalados, a oxidação do acetato de DL α -tocoferol, do calciferol e do colesterol, por meio do emprego de agentes oxidantes adequados, fornece produtos adotado de caráter ácido e redutor, propriedades essas que possibilitam a identificação histoquímica destas substâncias. Por outro lado, existe comportamento específico dos oxidantes usados, em relação a essas substâncias, de tal forma que cada substância empregada foi oxidada com eficiência apenas por um oxidante.

O colesterol é oxidado pelo permanganato de potássio em meio ácido e o produto dessa oxidação cora-se pela aldeído-fucsina e pela hematoxilina-crômica; porém, produtos com características semelhantes são também obtidos quando a vitamina A e o calciferol são submetidos a ação desse oxidante (Hadler *et alii*, 1968a) o que indica ausência de especificidade. Ao contrário, o ácido perfórmico atua somente sobre o acetato de DL α -tocoferol fornecendo produto basófilo e de caráter redutor (Hadler & Silveira, 1981b). Por outro lado, além do colesterol oxidado pelo ácido peracético fornecer produtos coráveis pela aldeído-fucsina e pela hematoxilina-crômica (Hadler *et alii*, 1968c); contudo, o ácido peracético age especificamente sobre o colesterol, fornecendo produtos dotados de propriedade ácida e caráter redutor que são utilizados na sua detecção histoquímica (Hadler & Silveira, 1984a).

O calciferol é oxidado por diversos agentes oxi

dantes, quais sejam, o permanganato de potássio em meio ácido, o ácido perclórico e o ácido periódico. Alguns produtos formados nessas oxidações apresentam reatividade ao reagente de Schiff e outros mostram capacidade de se corar pela aldeído-fucsina (Hadler *et alii*, 1968a). Porém, somente o permanganato de potássio em meio alcalino oxida seletivamente o calciferol, fornecendo produtos que apresentam basofilia e caráter redutor (Hadler e Silveira, 1977).

Os produtos resultantes da oxidação do acetato de DL α -tocoferol, do calciferol e do colesterol, pelos diversos agentes oxidantes, quais sejam: o ácido perfórmico, o ácido peracético, o permanganato de potássio em meio alcalino e o permanganato de potássio em meio ácido foram analisados, no presente trabalho, através da espectrofotometria ultravioleta, infravermelha e espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons e da espectrometria de massa. Os resultados obtidos permitem verificar: 1 - o efeito provocado pelos vários oxidantes usados, nas três substâncias investigadas; 2 - as características espectrográficas do produto de oxidação de cada uma das três substâncias, produto esse responsável pela basofilia e pelo efeito redutor revelado pelo reativo de Schiff; 3 - as eventuais semelhanças químicas entre produtos de oxidação provenientes de substâncias diversas, mas que apresentam propriedades semelhantes (basofilia e propriedade redutora revelada pelo reativo de Schiff).

Os resultados fornecidos pelas técnicas espectrofotométricas confrontados com os resultados obtidos com a coloração pela solução de azul de toluidina e com o tra

tamento pelo reativo de Schiff, mostram que somente o produto de oxidação do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico possui características espectrofotométricas diferentes das apresentadas pelo acetato de DL α -tocoferol não submetido à oxidação e, simultaneamente, exibe basofilia e reage positivamente com o reativo de Schiff. Esses resultados indicam que apenas um dos oxidantes é ativo, no sentido de modificar a estrutura molecular do acetato de DL α -tocoferol e, concomitantemente, transformá-lo em uma substância histoquimicamente reativa. Fato semelhante ocorre com o calciferol e com o colesterol, pois o calciferol só é, eficientemente, oxidado quando tratado pelo permanganato de potássio em meio alcalino e pelo permanganato de potássio em meio ácido, enquanto que o colesterol só é oxidado com eficácia pelo ácido peracético e pelo permanganato de potássio em meio ácido. Por outro lado, os oxidantes eficazes, além de modificarem a estrutura molecular desses produtos, conferem reatividade química adequada para sua caracterização histoquímica. Esses resultados concordam com os obtidos por Hadler *et alii* (1968b) e Hadler & Silveira (1977). Esses resultados sugerem, além disso, alguma especificidade entre o oxidante e a substância a ser oxidada, o que era esperado.

Diante desses resultados e como o acetato de DL α -tocoferol só é oxidado eficazmente pelo ácido perfórmico, seu produto de oxidação foi melhor analisado, tendo sido identificado.

Após separação cromatográfica dos produtos contidos em fragmentos de papel de filtro previamente impreg-

nados com acetado de DL α -tocoferol e tratados pelo ácido perf \bar{o} rmico foi verificado que somente a substância dotada de Rf de menor valor apresentava reatividade ao azul de toluidina e ao reativo de Schiff. Essa substância submetida à espectrometria de massa se comportou como a α -tocoquinona 2,3- \bar{o} xido, tanto no que diz respeito à sua massa molecular quanto aos fragmentos fornecidos pela espectrometria de massa. Os resultados dos espectros ultravioleta, infravermelho e de ressonância magnética nuclear de prótons são também favoráveis a essa interpretação, uma vez que o produto oxidado, que apresenta Rf 0,08, assim como a α -tocoquinona 2,3- \bar{o} xido apresentam : 1 - absorção ultravioleta na faixa de 270nm; 2 - absorção infravermelha nas faixas de 3500, 2950, 1680 e 1435 cm^{-1} ; 3-deslocamentos químicos nas faixas de 0,80-0,90 e 1,00-1,66 p.p.m. Essas características indicam semelhança quanto à natureza química desses dois compostos.

A α -tocoquinona 2,3- \bar{o} xido foi obtida por Grams (1971) e Grams *et alii* (1972) a partir do tocoferol o qual foi submetido à oxidação pelo oxigênio nascente, em presença de próflavina dissolvida em metanol. Esse composto, embora não possua grupos ácidos clássicos, contém um grupo -C-O-C-, que pode ser responsável por sua basofilia, pois esse grupo pode ser ionizado pelo baixo pH da solução de azul de toluidina, empregada para efetuar a coloração. O caráter redutor da molécula, responsável pela reação positiva com o reativo de Schiff, poderia advir da presença de dois grupos cetônicos no anel cíclico. Dessa forma, esse produto pode ser interpretado como o responsável

pela reatividade histoquímica do acetato de DL α -tocoferol oxidado pelo ácido perfórmico.

Os produtos de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino, responsáveis pelas propriedades histoquímicas adquiridas pelo calciferol assim oxidado, apresentam Rf diferentes. Ambos foram considerados responsáveis pela reatividade histoquímica. Deve ser salientado que o calciferol oxidado pelo permanganato de potássio em meio ácido origina um produto de oxidação com propriedades cromatográficas muito semelhantes a um dos produtos de oxidação do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino. Esse produto também apresenta reatividade histoquímica (Hadler *et alii*, 1968a). Assim sendo, deve ser considerado como o mais provável responsável pela reatividade histoquímica adquirida pelo calciferol oxidado pelo permanganato de potássio. Os resultados fornecidos pelos espectros infravermelho, de ressonância magnética nuclear de prótons e pelo espectro de massa indicam que os compostos oxidados apresentam grupo carbonila; esse grupo foi identificado por Amer *et alii* (1970) em composto proveniente da autooxidação do ergocalciferol. Além disso, sabe-se que o permanganato de potássio, que é um forte agente oxidante, pode romper ligações carbono-carbono quando usado em meio neutro; porém, em meio alcalino ataca principalmente as duplas ligações, introduzindo grupos hidroxilas, ou seja, dióis (House, 1972); indícios de grupos hidroxilas são observados no produto de oxidação analisando-se o espectro de ressonância magnética nuclear de prótons.

As características espectrográficas do produto de oxidação do colesterol pelo ácido peracético, responsáveis pela basofilia e pela reatividade ao reativo de Schiff, são semelhantes às apresentadas pelo colestano 3β , 5α , 6β triol, composto esse que se forma quando o colesterol é submetido à ação de diferentes oxidantes, tais como: o permanganato de potássio (Windaus, 1907), o dicromato de potássio (Ellis & Petrow, 1939), a autooxidação em presença de um catalisador metálico (Kawata *et alii*, 1976), a peroxidação em presença de β -mercaptoetilamina e de NADPH (Martin & Nicholas, 1973) ou o oxigênio molecular (Kimura *et alii*, 1979). O colestano 3β , 5α , 6β -triol, oriundo da oxidação do colesterol pelo oxigênio molecular, foi isolado e estudado por Kimura *et alii* (1979); apresenta características cromatográficas semelhantes ao produto obtido pela oxidação peracética do colesterol, sendo 0,5 seu Rf. Por outro lado, Lieberman & Fukushima (1950) e Jailer *et alii* (1952) mostraram que os carbonos 4 e 7, em posição alílica, podem ser atacados pela N-bromosuccinamida e que na reação do acetato de colestera em presença de N-bromosuccinamida em excesso, forma-se um triol, o qual por oxidação dá origem a um grupo cetônico ligado ao carbono 7. Aliás, Prelog & Tagmann (1944) já haviam assinalado que o grupo triol do colestano 3β , 5α , 6β -triol é facilmente convertido em dicetona; esse grupo pode ser considerado como responsável pela basofilia e pela reatividade ao reativo de Schiff, o que não estaria em desacordo com a hipótese de Hadler *et alii* (1968b), os quais consideraram a possibilidade de um grupo cetoácido ser responsável pelas pro

priedades histoquímicas adquiridas pelo colesterol, quando oxidado pelo permanganato de potássio em meio ácido ou pelo ácido peracético.

Em síntese, as propriedades químicas dos produtos de oxidação do acetato de DL α -tocoferol, do calciferol e do colesterol, responsáveis por sua basofilia e reatividade ao reagente de Schiff, advêm de grupos químicos diferentes, embora lhes confirmam reatividade histoquímica semelhante. As propriedades do produto de oxidação de α -tocoferol pelo ácido perfórmico advêm do grupo $-C-O-C-$, que ao ser ionizado confere caráter ácido, enquanto que o caráter redutor é consequência da presença de dois grupos cetônicos presentes no anel cíclico. No que concerne ao produto de oxidação do calciferol, pelo permanganato de potássio em meio alcalino, a reatividade ao reagente de Schiff é conferida por grupo carbonila, enquanto que a basofilia resulta da presença de grupos hidroxilas. Por outro lado, grupos redutores, formados a partir do grupo triol, presente no produto de oxidação do colesterol pelo ácido peracético, seriam os responsáveis por suas propriedades redutoras e pela basofilia. Além disto, cada substância usada foi oxidada com eficiência, ou seja, de maneira a fornecer produtos dotados de reatividade e passíveis de serem demonstrados histoquimicamente, apenas por um oxidante, o que indica a existência de interação entre o oxidante e a substância a ser oxidada, de modo a conferir comportamento específico aos oxidantes usados, em relação às substâncias.

RESUMO E CONCLUSÕES

Os produtos resultantes da oxidação seletiva do acetato de DL α -tocoferol, do calciferol e do colesterol, por oxidantes diferentes, que constituíram a base para a padronização de três técnicas dotadas de especificidade de histoquímica e que permitem a demonstração topoquímica dessas substâncias, foram estudados no presente.

A análise dos produtos de oxidação, efetuada com base em resultados fornecidos pela espectrofotometria ultravioleta e infravermelha, pela espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons e espectrometria de massa, permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1. A comparação entre os produtos dotados da mesma reatividade histoquímica, mas provenientes da oxidação seletiva do acetato de DL α -tocoferol pelo ácido perfórmico, do calciferol pelo permanganato de potássio em meio alcalino e do colesterol pelo ácido peracético mostra que substâncias quimicamente diversas, dotadas de grupos reativos diferentes, são responsáveis por essa reatividade. Essa reatividade, portanto, embora seja semelhante, é exibida por grupos reativos diferentes.
2. Os grupos reativos responsáveis pelas propriedades histoquímicas adquiridas pela oxidação seletiva de cada uma das substâncias usadas foram identificadas, sendo os seguintes: 1 - grupo epóxido e grupos cetônicos ligados ao anel cíclico, encontrados no α -tocoferol oxidado pelo ácido perfórmico; 2 - grupo carbonila e grupos

hidroxilas presentes no calciferol oxidado pelo permanganato de potássio em meio alcalino; 3 - grupos redutores oriundos do grupo triol, presente no produto de oxidação do colesterol pelo ácido peracético.

3. A interação do produto a ser oxidado com um oxidante adequado é necessária para que se possa obter um produto final de oxidação dotado de reatividade histoquímica.
4. A interação entre a substância a ser oxidada e oxidante confere especificidade aos resultados embora o produto final de oxidação apresente reatividade muito semelhante, partindo de substâncias e de oxidantes diferentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.W.M. & SLOPER, J.C. The hypothalamic elaboration of posterior pituitary principles in man, the rat and dog. Histochemical evidence from a performic acid-Alcian blue reaction for cystine. *J. Endocr.*, 13:221-228, 1956.
- AMER, M.M., AHMAD, A.K. & UAIDA, S.P. On autoxidation of vitamin D preparations. II. The oxidation of ergocalciferol. *Fette, Seifen. Anstrichin*, 72:1040-1045, 1970.
- BAXTER, R.A. & SPRING, F.S. β -cholesterol oxide. *J. Am. chem. Soc.* 613, 1943.
- BOGUTH, W. & NIEMANN, H. Electron spin resonance of chromoxy free radicals from α - ζ - β - γ - δ -tocopherol and tocol. *Biochim. biophys. Acta* 248:121-130, 1971.
- BRAUM-FALCO, V.O. & RATHJENS, B. Beitrag zum Studium histochemischer Reaktionen an Keratin und anderen cutanen Gewebsanteilen. *Acta histochem.* 1:82-94, 1954.
- CLOUGH, R.L., YEE, B.G. & FOOTE, C.S. Chemistry of singlet oxygen.30. The unstable primary product of tocopherol photooxidation. *J. Am. chem. Soc.* 101:683-686, 1979.

CONTRERAS, G.E. Determinação de tocoferóis e tocotrienóis em extratos lipídicos por redução de íons cúpricos. Tese de doutoramento, Fac. de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Unicamp, 1980.

CORT, W.M.; MERGENS & GREENE, A. Stability of alpha- and gamma-tocopherol: Fe^{3+} and Cu^{2+} interactions. *J. Food Science* 43:797-798, 1978.

EHRENSTEIN, M. & DECKER, M.T. Investigations on steroids. III. Partial oxidation of 3,5,6-triols and oxidation with permanganate of 5-6-unsaturated steroids. *J. org. Chem.* 5:544-560, 1940.

ELLIS, B. & PETROW, V. Steroids and related compounds. Part IV. The stereochemical configuration of cholestane-3:5:6-triols. *J. Am. chem. Soc.* 1078, 1939.

FRAMPTON, V.L., SKINNER, W.A., CAMBOUR, P. & BAYLEY, P.S. α -tocopurple. An oxidation product of α -tocopherol. *J. Am. chem. Soc.* 82:4632, 1960.

GOSLAR, H.G. Ein Beitrag zur elektiven Darstellung derkeratine und zum histochemischen Verhalten anderer Disulfidverbindungen in der Haut. *Acta histochem.* 5: 39, 1957.

GRAMS, G.W. Oxidation of alpha-tocopherol by singlet oxygen. *Tetrahedron Letters* 50:4823, 1971.

- GRAMS, G.W., ESKINS, K. & INGLETT, G.E. Dye-sensitized photooxidation of α -tocopherol. *J. Am. chem. Soc.* 94: 866-868, 1972.
- GREENSPAN, F.P. The convenient preparation of per-acids. *J. Am. chem. Soc.* 68: 907-908, 1946.
- HADLER, W.A., LUCCA, O. de; ZITI, L.M., PATELLI, A.S. & VOZZA, J.A. The chemical reactivity of the products resulting from a permanganate oxidation of cholesterol and some other unsaturated compounds, accounted for their aldehyde-fuchsin and chromealum hematoxylin staining. *Acta histochem.* 30: 54-69, 1968b.
- HADLER, W.A. & SILVEIRA, S.R. Identificação histoquímica de alguns lipídeos e esteróis nos epitélios queratinizados. *Ciência e Cultura* 28(supl.): 325, 1976.
- HADLER, W.A. & SILVEIRA, S.R. Novas técnicas para a demonstração histoquímica de tocoferol e de vitamina D. *Ciência e Cultura* 29(supl.): 584, 1977.
- HADLER, W.A. & SILVEIRA, S.R. Técnica histoquímica que permite discriminar o colesterol de substâncias afins e de seus ésteres. *Ciência e Cultura* 33(supl.): 586, 1981a.
- HADLER, W.A. & SILVEIRA, S.R. A technique to tocopherol (vitamin E) histochemical detection. *Acta histochem.* 68: 1-10, 1981b.

- HADLER, W.A. & SILVEIRA S.R. A histochemical method suitable to discriminate free cholesterol from its esthers and both from 7-dehydrocholesterol and vitamins D. *Acta histochem.* 74:25-32, 1984a.
- HADLER, W.A. & SILVEIRA, S.R. A histochemical method able to detect vitamins D and to discriminate it from cholesterol and its esthers. *In Press*, 1984b.
- HADLER, W.A., VOZZA, J.A., LUCCA, O. de, ZITI, L.M. & PATELLI, A.S. Effect of some oxidizing agents on the aldehyde-fuchsin and chromealum hematoxylin staining of some steroids and unsaturated compounds. *Acta histochem.* 30:41-53, 1968a.
- HADLER, W.A., ZITI, L.M., LUCCA, O. de & PATELLI, A.S. A new technique for histochemical detection of cholesterol-like compounds. *Acta histochem.* 30:70-78, 1968c.
- HADLER, W.A., ZITI, L.M., PATELLI, A.S., VOZZA, J.A. & LUCCA, O. de. Significado histoquímico das colorações pela hematoxilina-crônica e pela aldeido-fucsina. *Ciência e Cultura* 16:178-179, 1964.
- HOUSE, H.O. Modern Synthetic Reactions. 2nd. ed., California, W.A. Benjamin, Jnc. 1972.
- ISHIKAWA, Y. Yellow reaction products from tocopherols and trimethylamine oxide. *Agric. Biol. Chem.* 28:2545-2547, 1974.

- JAILER, R.W., FUKUSHIMA, D.K. & LIEBERMAN, S. 4 β -acetoxy- Δ^5 -cholestene-3 β , 7 α -diol. *J. Am. chem. Soc.* 74: 5220, 1952.
- KAWATA, M., TOHMA, M., SAWAYA, T. & KIMURA, M. A new product of cholesterol by metal-free autoxidation in aqueous dispersion. *Chem. pharm. Bull.* 24:3109-3113, 1976.
- KIMURA, M., JIN, Y. & SAWAYA, T. Autoxidation of cholesterol and behavior of its hydroperoxide in aqueous media. *Chem. pharm. Bull.* 27:710-714, 1979.
- KOHL, D.H., WRIGHT, J.R. & WEISSMAN, M. Electron spin resonance studies of free radicals derived from plastoquinone, α - and γ -tocopherol and their relation to free radicals observed in photosynthetic materials. *Biochim. biophys. Acta* 180:536-544, 1969.
- LIEBERMAN, S. & FUKUSHIMA, D.K. Δ^5 -cholestene- 3 β , 4 β , 7 α -triol and inhibition of oxidation of hydroxyl group by vicinal substituents. *J. Am. chem. Soc.* 72:5211, 1950.
- LILLIE, R.D. Ethylenic reaction of ceroid with performic acid and Schiff reagent. *Stain technol.* 27:37-45, 1952.
- LILLIE, R.D. Histopathologic technic and practical histochemistry. 2nd ed., New York, Blakinston, 1954.

- LILLIE, R.D. & BANGLE JR, R. The peracetic-acid - Schiff reaction of hair cortex. *J. Histochem. Cytochem.* 2: 301-312, 1954.
- LISON, L. Histochimie et Cytochimie animales. Paris, Gaunthier-Villars Ed., 1960.
- LUAN, N.T., POKORNY, J., COUPEK, J. & POKORNY, S. Fractionation of the oxidation products of α -tocopherol and their condensation products with L lysine by combined thin-layer and gel chromatography. *J. Chromat.* 130:378-383, 1977.
- MARKER, R.E. & ROHRMANN, E. Sterols. LXXXVII. Cholesterol and sitosterol derivatives. *J. Am. chem. Soc.* 62:516-517, 1940.
- MARTIN, C.M. & NICHOLAS, H.J. Metabolism of cholesteryl palmitate by rat brain in vitro; formation of cholesterol epoxides and cholestane 3β , 5α , 6β -triol. *J. Lipid Res.* 14:618-624, 1973.
- NILSSON, J.L.G., SIEVERTSSON, H. & SELANDER, H. Oxidation of tocopherols and related chromanols with alkaline ferricianide. *Acta chem. scand.* 23:268-278, 1969.
- NISHIKIMI, M., YAMADA, H. & YAGI, K. Oxidation by superoxide of tocopherols dispersed in aqueous media with deoxycholate. *Biochim. biophys. Acta* 627:101-108, 1980.

- OZAWA, T., HANAKI, A., MATSUMOTO, S. & MATSUO, M. Electron spin resonance studies of radicals obtained by the reaction of α -tocopherol and its model compound with superoxide ion. *Biochim. biophys. Acta* 531:72-78, 1978.
- OZAWA, T., HANAKI, A. & MATSUO, M. Reactions of superoxide ion with tocopherol and its model compounds: correlation between the physiological activities of tocopherols and the concentration of chromanoxyl-type. *Biochem. Int.* 6:685-692, 1983.
- PEARSE, A.G.E. The histochemical demonstration of keratin by methods involving selective oxidation. *Quart. J. Microsc. Sci.* 92:393-402, 1951.
- PORTER, W.L., LEVASSEUR, L.A. & HENICK, A.S. An addition compound of oxidized tocopherol and linoleic acid. *Lipids* 6:1-8, 1971.
- PRELOG, V. & TAGMANN, E. Steroid und Sexualhormone. Über die Konfiguration des, cis cholestan-triols (3 β , 5 α , 6 β). *Helv. chim. Acta* 27:1867-1871, 1944.
- SCOTT, H.R. & CLAYTON, B.P. A comparison of the staining affinities of aldehyde-fuchsin and the Schiff reagent. *J. Histochem. Cytochem.* 1:336, 1953.
- SILVEIRA, S.R. & HADLER, W.A. Demonstração histoquímica da presença de vitamina D, colesterol e tocoferol, em epitélios queratinizados. *Ciência e Cultura* 29(supl.):583, 1977.

- SILVEIRA, S.R. & HADLER, W.A. Destino do colesterol sintetizado na epiderme: Estudo histoquímico. *Ciência e Cultura* 33(supl):586, 1981.
- SUGIURA, Y. Production of free radicals from phenol and tocopherol by bleomycin-iron(II) complex. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 8:649-650, 1979.
- SVANHOLM, U., BECHGAARD, K. & PARKER, V.D. The electrochemistry in media intermediate acidity compound. Cation radical, cation and dication. *J. Am. chem. Soc.* 96:2409-2413, 1974.
- URANO, S. & MATSUO, M. A radical scavenging reaction of α -tocopherol with methyl radical. *Lipids* 11:380-383, 1976.
- URANO, S., YAMANOI, S., HATTORI, Y. & MATSUO, M. Radical scavenging reaction of α -tocopherol II. The reaction with some alkyl radicals. *Lipids* 12:105-108, 1977.
- WESTPHALEN, T. Über die Einwirkung von Benzopersäure auf Cholesterin (Zurkenntnis des Cholesterins XXII; mitgeteilt von A. Windaus). *Ber.* 48:1064, 1915.
- WIGGLESWORTH, V.B. The role of iron in histological staining. *Quart. J. Microsc. Sci.* 93:105-118, 1952.
- WINDAUS, A. Über Cholesterin. VIII. *Ber.* 40:257, 1907.

WINDAUS, A. & GRUNDMANN, W. Über die Konstitution des Vitamins D₂. II. *Justus Liebigs Annln. Chem.* 524:295-299, 1936.

WITTING, L.A. The oxidation of α -tocopherol during the autoxidation of ethyl oleate, linoleate and arachidonate. *Archs. Biochem. Biophys.* 129:142-151, 1969.

YAMAUCHI, R. & MATSUSHITA, S. Products formed by photosensitized oxidation of tocopherols. *Agric. Biol. Chem.* 43:2151-2156, 1979.