

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

JULIANA CASARES DE ARAUJO

**ESTUDO DA CAPACIDADE CATALÍTICA DE  
CATALISADORES CONTENDO  
HEMOPROTEÍNAS E HEMOPEPTÍDEOS NO  
PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE FENOL**

MOGI DAS CRUZES – SP

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

JULIANA CASARES DE ARAUJO

**ESTUDO DA CAPACIDADE CATALÍTICA DE  
CATALISADORES CONTENDO  
HEMOPROTEÍNAS E HEMOPEPTÍDEOS NO  
PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE FENOL**

Dissertação apresentada à  
Universidade de Mogi das Cruzes para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnológica

**Orientadora: Prof. Dra. Iseli Lourenço Nantes**

MOGI DAS CRUZES – SP

2008

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Araújo, Juliana Casares de

Estudo da capacidade catalítica de catalisadores contendo hemoproteínas e hemopeptídeos no processo de degradação de fenol / Juliana Casares de Araújo. -- 2008.

145 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -  
Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes

1. Citocromo c 2. Microperoxidase-11 3. Fenol 4.  
Ciclo das peroxidases I. Título II. Nantes, Iseli Lourenço

CDD 547.632

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às treze horas do dia vinte e sete de março de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "ESTUDO DA CAPACIDADE CATALÍTICA DE CATALISADORES CONTENDO HEMOPROTEÍNAS E HEMOPEPTÍDEOS NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE FENOL" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Juliana Casares Araújo**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Iseli Lourenço Nantes e André Fernando de Oliveira da Universidade de Mogi das Cruzes e Paulo Di Mascio da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA por UNANIMIDADE  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 27 de março de 2008.

Comissão Examinadora

  
Prof. Dr. Iseli Lourenço Nantes

  
Prof. Dr. André Fernando de Oliveira

  
Prof. Dr. Paulo Di Mascio

Julgamento

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Aprovada  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha mãe, Cida, pelo carinho e apoio incondicional. Sem ela eu jamais teria chegado tão longe. Ao meu noivo, Givaldo por ter me ajudado e incentivado a continuar mesmo diante de tantas dificuldades.

Agradeço também aos meus parentes mais próximos: Ivan, Teresa, André, Elisângela, Gabriel, Ivana, Marinho, Mariana, Marcos, Fernando, Simone, Vanessa e José, pois formamos uma família muito unida e sem a ajuda de todos seria muito mais complicado concluir mais essa etapa.

Aos meus colegas do CIIB (Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica da Universidade de Mogi das Cruzes), Felipe, Cesar, Carolina, Priscila, Cintia, Rafael, Vanessa, Rodrigo, Fabrício, Fabiane, Gabriel, Barbara, Débora, Tiago, Amílton, Daniela, Keila e Taís pela ajuda e dicas durante todas as fases desse projeto.

Às minhas amigas do CIIB Tatiana Prieto e Kátia Cristina Ugolini Mugnol e à Fernanda M. Prado (USP-SP), que dispuseram parte de parte do tempo que dedicavam aos seus próprios projetos no auxílio desinteressado ao desenvolvimento desse trabalho.

À minha querida orientadora e amiga Iseli Lourenço Nantes, pela ajuda, pelos conselhos, pelo apoio e pelo incentivo que me fizeram jamais desistir.

Aos professores doutores Otacíro Rangel Nascimento (Grupo de Física do Instituto de Física de São Carlos, USP-São Carlos) e Paolo Di Mascio pela colaboração em fases decisivas desse trabalho.

Aos professores que gentilmente participaram da minha banca de qualificação e de defesa Prof. Dr. André Fernando de Oliveira; Prof. Dr. Paolo Di Mascio e Prof. Dra. Astrea Filomena de Souza Silva pelas dicas que enriqueceram ainda mais esse trabalho.

Aos professores que doaram materiais para a realização do trabalho Prof. Dr. Nelson Duran (UNICAMP); Prof. Dra Yassuko Yamamoto (USP - Ribeirão Preto); Prof. Dr. Marcel Tabak (USP - São Carlos); Prof. Dr. Francisco L. Castro e Prof. Dr. Glauber J. T. Fernandes (Centro de Tecnologia do Gás - RN); Prof. Dr. Valter J. Fernandes Jr e Prof. Dr. Antônio S. Araújo (UFRN).

Agradeço também à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), à FAEP-UMC (Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade de Mogi das Cruzes) e à Secretaria de Educação do Estado de São Paulo pelo financiamento à minha pesquisa.

A todos MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

O fenol é um dos mais antigos agentes anti-sépticos usados pelo homem. Ele pode ser usado, por exemplo, como desinfetante, como produto intermediário para a fabricação de algumas fibras sintéticas, em cauterização de unhas e, na formulação de inseticidas, herbicidas e fungicidas. Porém, esse produto possui atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica sobre os seres humanos e por esse motivo deve ser degradado para evitar a contaminação de leitos e afluentes. As hemoproteínas e os hemopeptídeos utilizados nesse trabalho possuem a propriedade de formar compostos de alta valência quando ativados por peróxidos e estes compostos podem atuar na redução do fenol e na formação de compostos menos tóxicos. Tendo isso em vista, os estudos foram realizados em meio homogêneo, micelar e em nanopartículas, sendo utilizado como ativador dessas proteínas o peróxido de hidrogênio ou o *t*-butil hidroperóxido. As análises foram feitas utilizando as técnicas de Espectrofotometria de absorção no UV-visível, Espectrofluorimetria, EPR e Espectrometria de massa (ESI-MS e MALDI-ToF) para verificar o comportamento das hemoproteínas e dos hemopeptídeos bem como verificar os produtos da degradação do fenol. Os estudos realizados mostraram que houveram produtos dessas catálises porém nem todos puderam ser identificados até o momento. As reações com nanopartículas pareceram ser eficientes e um bom sistema para uso em processos de descontaminação do ambiente que apresente resíduos de fenol, pois as nanopartículas podem ser centrifugadas e separadas do meio para ser reaproveitada.

**Palavras chaves:** Citocromo *c*, microperoxidase-11, porfirinas, HRP, MCM-41, SBA-15, nanotubos, Fenol, Radicais Livres, Ciclo das Peroxidases.



## ABSTRACT

Phenol is one of the oldest anti-septic agents used for the man. It can be used, for example, as disinfecting, as intermediate product in the manufacture of some synthetic fibres, in cauterization of nails and, in the formularization of insecticides and weedkiller. However, this product can unleash problems as cancer on the human. It must be degraded to prevent the contamination of stream beds and tributaries. Hemoproteins and hemopeptides used in this work have the property to form composites of high valence when activated for peroxides and these composites can act to reduce phenol and produce less toxic composite. Having this in sight, the studies had been carried through, being used as activator of these proteins hydrogen peroxide or *t*-butil hidroperoxide. The analyses had been made using the techniques of UV-visible spectrometry, spectrofluorimetry, EPR and mass spectrometry (ESI-MS and MALDI-ToF) to verify the behavior of hemoproteins and hemopeptides as well as verifying the products of the phenol degradation. The carried through studies had shown that they had products of these catalyses however not all could have been identified until the moment. The reactions with nanostructured material had seemed to be efficient and a good system for use in processes of decontamination of the environment that presents phenol residues, therefore nanostructured material can be separate of the solution and it can be reused.

**Keywords:** Cytochrome *c*, microperoxidase-11, porphyrins, HRP, MCM-41, SBA-15, nanotubes, Phenol, Free Radicals, Peroxidase Cycle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura de um anel porfirínico.....	15
<b>Figura 2</b> - Estrutura de uma ferriprotoporfirina IX.....	17
<b>Figura 3</b> -(A) Leite, local onde pode a lactoperoxidase pode ser encontrada. (B) Estrutura da Lactoperoxidase.....	20
<b>Figura 4</b> - (A) reação positiva para mieloperoxidase se manifestando sob a forma de precipitados de cor marrom (B) Mieloperoxidase.....	20
<b>Figura 5</b> - Descrição do ciclo catalítico da HRP.....	23
<b>Figura 6</b> - Estrutura do citocromo <i>a</i> .....	24
<b>Figura 7</b> - Estrutura do citocromo <i>b</i> .....	25
<b>Figura 8</b> - Estrutura do citocromo <i>c</i> .....	25
<b>Figura 9</b> - Espectros de absorção dos citocromos <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> em sua forma oxidada e em sua forma reduzida.....	26
<b>Figura 10</b> - Espectros de um citocromo <i>c</i> nas suas formas alto e baixo <i>spin</i> .....	27
<b>Figura 11</b> - Microscopia eletrônica colorizada de mitocôndrias.....	28
<b>Figura 12</b> - Representação esquemática da cadeia respiratória.....	29
<b>Figura 13</b> - Estrutura nativa de citocromo <i>c</i> respiratório com os resíduos de histidina e metionina.....	30
<b>Figura 14</b> - Cadeia peptídica dos diversos tipos de MP.....	32
<b>Figura 15</b> - Fórmula estrutural do fenol.....	33
<b>Figura 16</b> - Algumas ligações químicas típicas da formação da lignina.....	36
<b>Figura 17</b> - Diagrama de formação de nanotubos de carbono a partir de uma folha de grafite.....	43
<b>Figura 18</b> - Geometrias de NCPS perfeitos: (a) armchair, (b) zig-zag, (c) chiral.....	43
<b>Figura 19:</b> Diagrama de blocos dos principais componentes de um fluorímetro.....	46
<b>Figura 20:</b> Principais componentes de um Espectrômetro de massa.....	48
<b>Figura 21:</b> Incorporação dos catalisadores nas sílicas mesoporosas MCM-41 e SBA-15.....	58

<b>Figura 22</b> - Espectros indicando as bandas do citocromo c e do fenol em água.....	67
<b>Figura 23</b> - Citocromo c em SDS (30 mM) e fenol.....	68
<b>Figura 24</b> - Citocromo c em água com posterior adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e de fenol.....	69
<b>Figura 25</b> - Citocromo c em tampão universal com posterior adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e de fenol.....	69
<b>Figura 26</b> - Citocromo c em SDS com posterior adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e de fenol.....	70
<b>Figura 27</b> - Citocromo c em SDS com posterior adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e de fenol.....	71
<b>Figura 28</b> - Citocromo c adsorvido em nanotubos de TiO <sub>2</sub> com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e fenol.....	72
<b>Figura 29</b> - Cromatograma dos produtos de degradação do fenol após catálise com citocromo c em água, indicando a saída dos produtos pelo HPLC.....	73
<b>Figura 30</b> - Espectro dos produtos de degradação do fenol após catálise com citocromo c em água, separados por HPLC.....	74
<b>Figura 31</b> - Cromatograma dos produtos de degradação do fenol após catálise com citocromo c em tampão fosfato indicando a saída dos produtos pelo HPLC.....	74
<b>Figura 32</b> - Espectro dos produtos de degradação do fenol após catálise com citocromo c em tampão fosfato, separados por HPLC.....	75
<b>Figura 33</b> - Espectros indicando o TiO <sub>2</sub> com fenol.....	76
<b>Figura 34</b> – Espectros de fluorescência do TiO <sub>2</sub> com e sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em tampão formiato de amônio.....	77
<b>Figura 35:</b> FeTDC(SO <sub>3</sub> Na)PP em tampão fosfato com posterior adição de t-BuOOH e de fenol.....	78
<b>Figura 36</b> - FeTDC(SO <sub>3</sub> Na)PP em SDS com posterior adição de t-BuOOH e de fenol.....	79
<b>Figura 37</b> - Porfirina em tampão fosfato com posterior adição de t-BuOOH e de fenol.....	80

<b>Figura 38</b> - Espectro de fluorescência do meio de reação da porfirina (FeTFPP)Cl em tampão fosfato com peróxido e fenol.....	81
<b>Figura 39</b> - Espectro de fluorescência do meio de reação da porfirina MnTMPyP em tampão fosfato com peróxido e fenol.....	81
<b>Figura 40</b> - Espectro de fluorescência do meio de reação da porfirina FeTMPyP em tampão fosfato com peróxido e fenol.....	82
<b>Figura 41</b> - Espectro de fluorescência do meio de reação da porfirina ZnTDC(SO <sub>3</sub> Na)PP em tampão fosfato com peróxido e fenol.....	82
<b>Figura 42</b> - Cromatograma indicando a saída dos produtos da degradação do fenol após separação por HPLC.....	83
<b>Figura 43</b> - Espectro indicando a massa dos produtos da reação da porfirina com fenol.....	84
<b>Figura 44:</b> Espectro da HRP em tampão universal com adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e fenol.....	85
<b>Figura 45</b> - Cromatograma indicando a saída dos produtos da reação do fenol com HRP, pelo HPLC.....	86
<b>Figura 46</b> - Espectro indicando a massa dos produtos da degradação do fenol por HRP.....	86
<b>Figura 47</b> - MP-11 em água com posterior adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e de fenol.....	87
<b>Figura 48</b> - MP-11 em CTAB com posterior adição de t-butil e de fenol.....	88
<b>Figura 49</b> - MP-11 em SDS com posterior adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e de fenol.....	88
<b>Figura 50</b> - MP-11 em SBA-15 antes da adição do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e do fenol.....	90
<b>Figura 51</b> - MP-11 em SBA-15 com adição de t-BuOOH e de fenol.....	90
<b>Figura 52</b> - Efeito do pH no espectro UV-visível da MP-11. Espectro UV-visível de 2µM de MP-11 obtida em pH 5,0; 6,0; 7,0; e 8,0.....	91
<b>Figura 53</b> - Efeito do pH no espectro UV-visível da MP-11. Suspensões tamponadas aquosas de MP-11 incorporada em MCM-41 em diferentes valores de pH.....	92
<b>Figura 54</b> - Variação absorbância no UV-visível em função do tempo durante a reação da MP-11/MCM-41 com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	93

<b>Figura 55</b> - Espectro da MP-11 em solução tampão, em pH 7,0 antes e 50, 240, e 700 s depois da adição de 100 $\mu\text{mol/L}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	95
<b>Figura 56</b> - Espectro da MP-11/MCM-41 em pastilhas de KBr antes e aproximadamente 120 s após a adição de 1 $\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ 1 $\mu\text{mol/L}$ .....	96
<b>Figura 57</b> - Espectro da MP-11/MCM-41, em pH 7,0, obtido antes, 30 s após a adição $\text{H}_2\text{O}_2$ e imediatamente após a adição de fenol.....	98
<b>Figura 58</b> - MP-11/MCM-41 durante a reação com $\text{H}_2\text{O}_2$ e fenol adicionados simultaneamente no meio.....	99
<b>Figura 59</b> - Espectro EPR onda contínua da MP-11/MCM-41. Amostra em pH 5,0.....	101
<b>Figura 60</b> - Espectro EPR onda contínua da MP-11/MCM-41. Amostra em pH 8,0.....	102
<b>Figura 61</b> - Espectro EPR onda contínua da MP-11/MCM-41. Amostra em pH 7,0.....	103
<b>Figura 62</b> - Espectro EPR onda contínua da MP-11/MCM-41. Zoom do espectro do radical obtido durante a reação descrita na figura 56.....	103
<b>Figura 63:</b> Análise realizada pelo MALDI-ToF.....	104
<b>Figura 64</b> - Análise da espectrometria HPLC-MS do produto da reação MP-11/MCM-41 com $\text{H}_2\text{O}_2$ e fenol.....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS

**LiP** – lignina peroxidase

**HRP** – peroxidase de raiz forte

**OH<sup>•</sup>** – radical hidroxil

**EROs** – espécies reativas de oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – radical superóxido

**PorFe(III)-OOR** – composto 0

**Por<sup>+</sup>Fe(IV)=O** – composto I

**PorFe(IV)=O** – composto II

**HOOH ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio

**PorFe(III)O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ↔ PorFe(II)O<sub>2</sub>** – composto III

**PorFe(III)** – porfirina em sua forma nativa

**EPR** – ressonância paramagnética eletrônica

***t*-BuOOH** – *tert*-butil hidroperóxido

**MP** – microperoxidase

**Cys** – cisteína

**Ala** – alanina

**Gln** – Glutamina

**His** – histidina

**Thr** – Treonina

**Glu** – glutamato

**Lys** – lisina

**Val** – valina

**CTAB** – brometo de cetilmetilamônio

**MCM-41** – sílica mesoporosa de peneira molecular com poros variando de 1,5 a 10 nm

**SBA-15** – sílica mesoporosa de peneira molecular com poros variando de 5 a 9 nm

**NC** – nanotubos de carbono

**NCPS ou SWNT** – nanotubos de carbono de paredes simples

**NCPM ou MWNT** – nanotubos de carbono de paredes múltiplas

**UV-visível** – ultravioleta e visível

**ε** – absorvidade molar

$\lambda$  – comprimento de onda

$m/z$  – relação massa/carga

**MALDI** – ionização/dessorção de matriz assistida por laser

**SDS** – dodecil sulfato de sódio

**CMC** – constante micelar crítica

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Hemoproteínas e Hemoperoxidases .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Porfirinas .....	15
1.1.2 Grupo heme.....	16
1.1.3 As peroxidases e sua ação como enzimas antioxidantes.....	19
1.1.4 HRP.....	22
1.1.5 Citocromo c.....	23
1.1.6 Microperoxidase.....	31
<b>1.2 Fenol.....</b>	<b>33</b>
1.2.1 Polimerização de fenóis para formação de lignina.....	34
1.2.2 Toxicologia.....	36
<b>1.3 Spin eletrônico do ferro hemínico presente no anel porfirínico.....</b>	<b>37</b>
<b>1.4 Nanomateriais.....</b>	<b>40</b>
1.4.1 MCM-41.....	41
1.4.2 SBA-15.....	41
1.4.3 Nanotubos de carbono.....	42
1.4.4 Nanotubos de TiO <sub>2</sub> .....	44
<b>1.5 Técnicas para o estudo da degradação do fenol.....</b>	<b>44</b>
1.5.1 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível.....	44
1.5.2 Espectroscopia de fluorescência molecular.....	46
1.5.3 Espectrometria de massa (MS).....	47
1.5.4 MALDO-ToF-MS.....	49
1.5.5 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	50
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>51</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>51</b>
<b>2.2 Estratégias de estudo.....</b>	<b>52</b>
<b>3. Método.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Reagentes e soluções.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Metodologia.....</b>	<b>55</b>



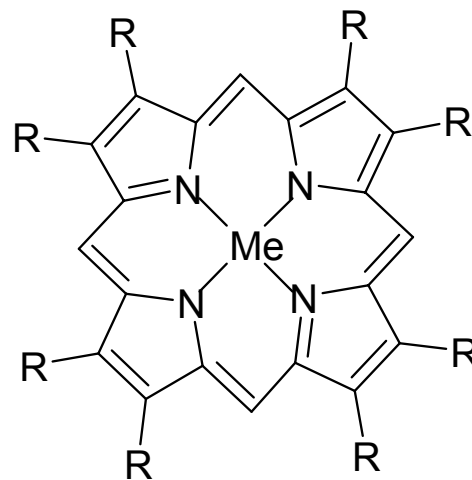
<b>3.3 Preparo das soluções.....</b>	<b>56</b>
<b>3.4 Técnicas analíticas utilizadas.....</b>	<b>59</b>
3.4.1 Estudo cinético da degradação do fenol usando espectrofotometria UV-visível.....	59
3.4.2 Espectrofotometria UV-visível de amostras no estado sólido.....	62
3.4.3 Medidas da intensidade da fluorescência.....	63
3.4.4 Análise das amostras de ferro Heme por EPR.....	63
3.4.5 Análise do espectro de massa por ionização eletrospray.....	64
3.4.6 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Tempo de Vôo (TOF) Espectro de Massa (MS).....	65
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>66</b>
<b>5. Conclusões e Sugestões.....</b>	<b>108</b>
<b>Referências.....</b>	<b>110</b>
<b>Trabalhos publicados:</b>	
<b>Peroxidase Catalytic Cycle of MCM-41-Entrapped Microperoxidase-11 as a Mechanism for Phenol Oxidation.....</b>	<b>121</b>
<b>Peroxidase model systems in heterogeneous media.....</b>	<b>131</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Hemoproteínas e Hemoperoxidasas

### 1.1.1 Porfirinas

Porfirinas são macrociclos tetrapirrólicos que ligam ferro, manganês, zinco e outros íons metálicos, formando um arranjo planar para os quatro átomos de nitrogênio. Além do íon metálico, os substituintes do anel porfirínico contribuem para suas propriedades químicas. A estrutura básica de uma porfirina é mostrada na figura 1 abaixo, sendo Me um metal.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Estrutura de um anel porfirínico com um metal (Me) ao centro coordenado com seus quatro átomos de nitrogênio.<sup>2</sup>

As porfirinas são integrantes de importantes biomoléculas tais como a clorofila, a ciacobalamina (vitamina B12) e hemoproteínas.

As porfirinas biológicas e sintéticas têm sido amplamente utilizadas em pesquisas que abrangem as mais diferentes áreas de atuação, visto suas propriedades básicas e a capacidade que possuem de interagir com outros compostos formando complexos ativos.

As metaloporfirinas têm sido sistematicamente sintetizadas em laboratório, sendo que o início da aplicação destas remete há mais de 30 anos, onde começou seu uso como catalisadores de uma variedade de reações de oxidação de hidrocarbonetos. Têm-se assim sistemas químicos que envolvem a transferência do átomo de oxigênio para substratos orgânicos, catalisados por metaloporfirinas, muito similarmente ao que ocorre nos organismos vivos em relação ao citocromo P-450. Estas porfirinas sintéticas com finalidades catalíticas podem incorporar como metais principalmente o Manganês, o Ferro, o Rutênio e o Cromo, sendo que uma grande variedade de oxidantes podem ser utilizados como doadores de oxigênio, como peroxiácidos, peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos entre outros.

A evidência de ciências como a Nanotecnologia e a Química Supramolecular elevaram ainda mais as aplicações das porfirinas biológicas e sintéticas. Drogas sintéticas e agentes alvos têm sido extremamente reconhecidos. Porfirinas altamente hidrofóbicas podem penetrar em regiões de membranas lipídicas, enquanto que as moderadamente hidrofóbicas são distribuídas dentro dos ambientes polares das células. Muitas porfirinas solúveis em água e suas formas metálicas podem atacar o DNA e a albumina.<sup>3</sup>

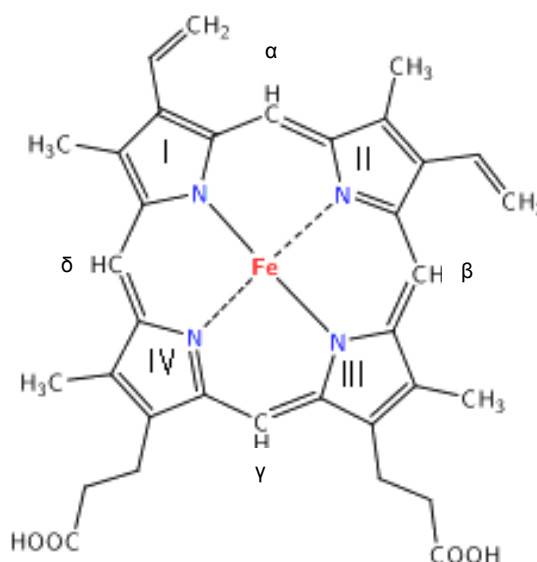
### **1.1.2 Grupo Heme**

Grupo heme é um grupo prostético que contém o íon ferro em seu sítio ativo. Esse grupo é o principal componente de várias proteínas, dentre elas, os citocromos, a mioglobina, a hemoglobina e uma série de peroxidases.<sup>4</sup>

Por possuir valências diferentes, o ferro do grupo heme pode ter denominações diferentes, como é o caso da ferriprotoporfirina IX, que contém ferro (III) e é um exemplo de hemina, enquanto que a ferroprotoporfirina IX, contendo ferro (II) é um heme. Porém, como há diferentes estados de oxidação para o grupo prostético das peroxidases, costuma-se designar esse grupo apenas como heme, não importando seu estado de oxidação.<sup>5</sup>

A ferriprotoporfirina IX (figura 2) é constituída por quatro anéis pirrólicos (marcados I – IV) unidos por pontes de meteno (um carbono que liga os anéis pirrólicos com uma ligação simples e uma ligação dupla), com ferro (III) no centro da molécula. Esse ferro (III) é coordenado por quatro nitrogênios pirrólicos que atuam

deslocando o ferro.<sup>4, 5</sup> Há oito cadeias laterais na ferriprotoporfirina IX. A seguir: quatro grupos metil (-CH<sub>3</sub>), dois grupos vinil (-CH=CH<sub>2</sub>), e dois grupos propionatos (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH). Os átomos de carbono das pontes de meteno são rotulados como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (outras porfirinas variam nos substituintes ligados aos anéis I – IV).



**Figura 2:** Estrutura de uma ferriprotoporfirina IX.<sup>6</sup>

O ferro III em compostos inorgânicos é geralmente hexacoordenado, fazendo, portanto, um total de seis ligações com ligantes. Quando falamos na química das peroxidases aceitamos que em sua forma nativa, o ferro III da enzima é pentacoordenado, pois possui cinco ligantes de campo forte e um ligante de campo fraco, porém, a adição de ligantes comuns como cianeto (CN<sup>-</sup>) e azida (N<sub>3</sub><sup>-</sup>) tornam essa enzima hexacoordenada.<sup>5</sup>

As posições de coordenação do ferro são numeradas. Nas proximidades, as posições 1 – 4 são ocupadas por quatro átomos de nitrogênio pirrólicos. A posição 5 está localizada no sítio proximal do heme e é geralmente ocupada por uma cadeia lateral imidazóica de resíduo de histidina. A posição 6 da enzima nativa não é ocupada e está localizada no sítio distal do heme. A cavidade distal é a região em que ocorrem muitas reações da peroxidase. Quando o cianeto é adicionado a uma solução de peroxidase, ele se difunde dentro da cavidade distal e se coordena ao ferro, mudando a coordenação do ferro de 5 para 6.<sup>5</sup>

Existem três tipos de ligações que mantêm o grupo heme ligado à apoproteína (proteína sem o grupo heme), a seguir: uma ligação covalente, que liga o grupo heme à apoproteína através de um elo em que um aminoácido de cadeia lateral é ligado à quinta posição de coordenação do ferro III. Esta ligação pode ser quebrada em uma solução ácida; a ligação através de pontes de hidrogênio, onde o propionato da cadeia lateral liga-se aos resíduos da vizinhança e, finalmente, a ligação de van der Waals, que é uma interação mais fraca e liga a porfirina aos aminoácidos hidrofóbicos, completando as pontes entre a ferriprotoporfirina IX e a proteína. O grupo heme que não é facilmente removido da apoproteína é chamado de grupo prostético. Ele permanece ligado à proteína durante a reação no ciclo enzimático.<sup>5</sup> Em algumas hemoproteínas a ancoragem do grupo heme não é feita apenas pela coordenação do ferro com os ligantes axiais, mas também por ligações covalentes entre o grupo prostético e cadeias laterais da apoproteína.<sup>7, 8</sup>

As hemoproteínas desempenham funções diversas nos sistemas biológicos. Assim sendo, a hemoglobina transporta oxigênio molecular para os tecidos, a mioglobina reserva oxigênio molecular nos músculos, os citocromos transportam elétrons na cadeia respiratória e as peroxidases clivam peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos. A clivagem destes compostos resulta em intermediários altamente reativos capazes de oxidar diferentes compostos tais como fenóis, aldeídos e cetonas. As afirmações acima nos levam a questionar como um mesmo grupo químico pode desempenhar funções tão distintas. De fato, tanto a compatibilidade biológica quanto a especificidade do grupo heme são propiciadas pelo microambiente fornecido pela apoproteína que o envolve. Normalmente as hemoproteínas apresentam seu grupo prostético ocupando uma cavidade hidrofóbica resultante da estrutura terciária de sua fração protéica. Além disto, a estrutura protéica fornece os ligantes axiais do ferro hemínico. Os ligantes axiais do ferro hemínico determinam a geometria e o estado de *spin* do ferro hemínico e conseqüentemente influem na reatividade do grupo prostético.

### **1.1.3 As peroxidases e sua ação como enzimas antioxidantes**

O nome peroxidase refere-se a uma importante classe de enzimas cuja especificidade é clivar peróxidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio.<sup>9</sup> Existem 3 classes de peroxidases:<sup>10</sup>

- Classe I: são enzimas intracelulares, incluindo citocromo *c*, peroxidase e ascorbato peroxidase de plantas.
- Classe II: inclui a peroxidase de secreção de fungo como a lignina peroxidase (LiP) que possui como principal função degradar a lignina.
- Classe III: inclui peroxidases secretoras de plantas, como a HRP; essas peroxidases são enzimas biossintéticas envolvidas no processo de formação da parede celular e lignificação.

A principal característica das heme peroxidases é que o seu sítio ativo contém grupos prostéticos muito similares. Em quase todas as peroxidases de plantas conhecidas o grupo prostético é a ferriprotoporfirina IX,<sup>5, 10, 11</sup> apresentada na figura 2.

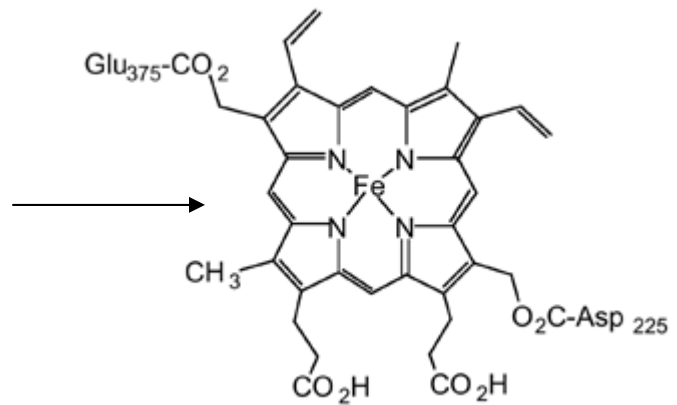
Os grupos prostéticos em algumas peroxidases de mamíferos como, por exemplo, as lactoperoxidases e as mieloperoxidases são diferentes e isso tem sido centro de algumas polêmicas.<sup>5</sup> Nas mieloperoxidases e nas lactoperoxidases, há ligações covalentes de duas pontes éster entre os resíduos de aminoácidos dos grupos aspártico ou glutâmico e grupos hidroxil nos grupos 1 e 5 do heme. As mieloperoxidases também têm uma terceira ligação covalente entre um dos grupos vinil e o resíduo de metionina.<sup>11</sup>

A lactoperoxidase (Figura 3) é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio. Este componente nutracêutico do leite e produtos de soro é uma enzima com propriedades antibacterianas.<sup>12</sup>

(A)



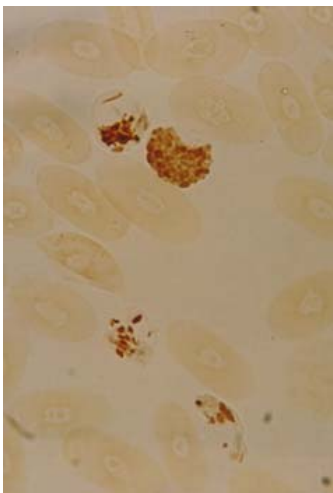
(B)



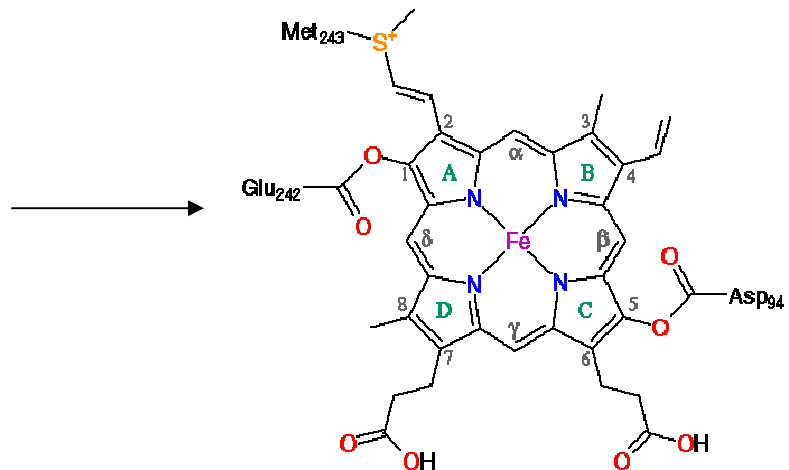
**Figura 3:** (A) Leite, local onde a lactoperoxidase pode ser encontrada.<sup>12</sup> (B) Estrutura da Lactoperoxidase.<sup>13</sup>

A mieloperoxidase é observada no citoplasma dos heterófilos e dos eosinófilos. A figura 4A mostra a reação positiva para mieloperoxidase se manifestando sob a forma de precipitados de cor marrom, como grânulos esféricos compactos nos eosinófilos, e, principalmente, com aspecto fusiforme ou puntiforme, nos heterófilos e a figura 4B mostra estrutura da mieloperoxidase.<sup>14</sup>

(A)



(B)



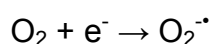
**Figura 4:** (A) reação positiva para mieloperoxidase se manifestando sob a forma de precipitados de cor marrom<sup>14</sup> (B) Mieloperoxidase.<sup>15</sup>

A especificidade de clivar o peróxido de hidrogênio confere às peroxidases a importante função antioxidante, pois, o peróxido de hidrogênio ao reagir com metais como o ferro e o cobre (reação de Fenton) produz o radical hidroxil (HO<sup>•</sup>), uma espécie altamente reativa e, portanto, deletéria para a célula.

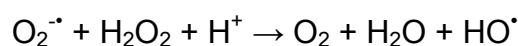


Por ação de peroxidases como a catalase e a glutathiona-peroxidase, esta última que utiliza a glutathiona (GSH) como agente redutor, o peróxido de hidrogênio é degradado em água e em oxigênio molecular que são inócuos para as células.<sup>16</sup>

A geração de peróxido de hidrogênio, assim como de outras espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radicais superóxidos ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), espécie produzida quando a redução completa do oxigênio molecular não é executada com eficiência



e o radical hidroxil, formado pela reação do superóxido com peróxido de hidrogênio,



ocorre no metabolismo normal das células vegetais e animais, podendo ser potencializado frente a um estresse celular. As peroxidases, junto com outras enzimas, como a superóxido dismutase, combatem as EROs de modo a livrar a célula dos efeitos deletérios, tais como a oxidação dos lipídeos poliinsaturados nas células que podem causar rompimento da estrutura de membrana, as lesões oxidativas no DNA que podem causar mutações potenciais e, as reações dos radicais com cadeias laterais dos aminoácidos que podem comprometer as funções enzimáticas.<sup>2</sup>

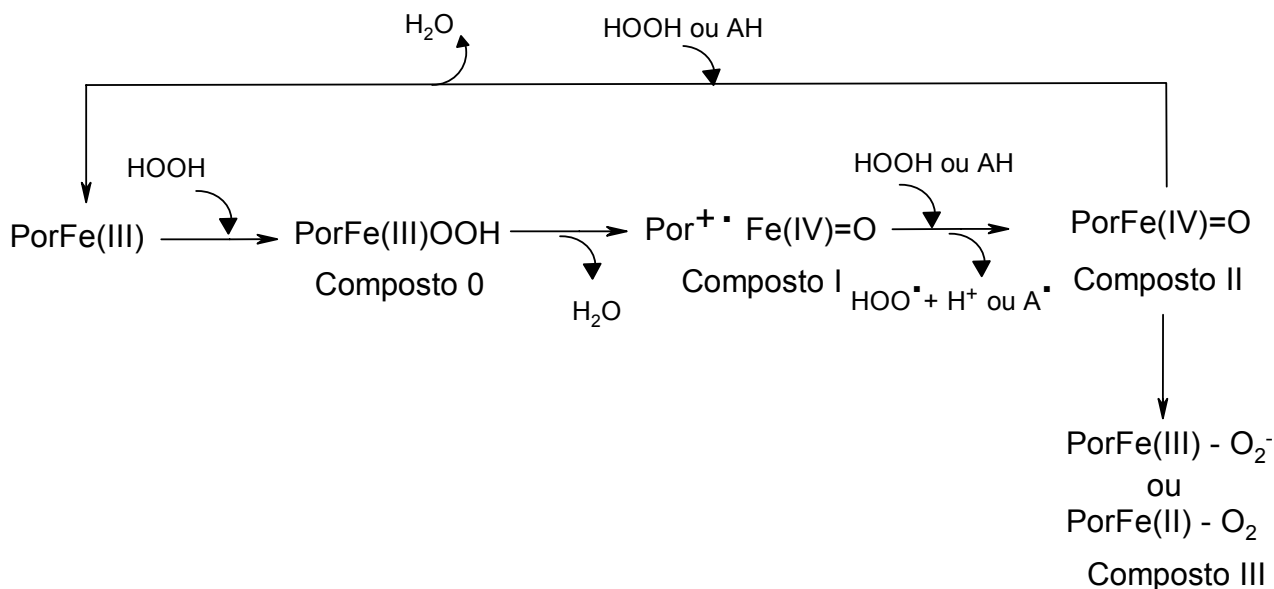
As diversas reações catalisadas por peroxidases ocorrem em diferentes locais da célula e acredita-se que a localização destas enzimas depende das reações que catalisam. Nas plantas, as peroxidases, além de catalisarem a quebra do peróxido de hidrogênio, participam também da biossíntese de lignina,<sup>17, 18</sup> incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina à parede celular<sup>19</sup> e destruição peroxidativa do ácido indolacético e de outros reguladores de crescimento.<sup>20</sup>



### 1.1.4 HRP

A peroxidase de raiz forte (HRP) é uma enzima de planta que possui características comuns a outras peroxidases, como por exemplo, o grupo heme como centro catalítico e resíduos catalíticos essenciais de histidina e arginina, nos centros ativos de sua estrutura proteica. Índícios importantes do comportamento estrutural e catalítico da HRP foram obtidos pela determinação dos prótons que ocuparam ou foram liberados quando uma espécie enzimática é convertida em outra.<sup>5</sup>

Todas as peroxidases estudadas até o momento possuem como base um mesmo ciclo catalítico que consiste de três etapas distintas e irreversíveis, chamado de ciclo das peroxidases.<sup>2, 5</sup> Nesse ciclo a enzima no estado férrico liga-se de forma reversível a um peróxido ROOH e forma o complexo conhecido como Composto 0 (PorFe(III)-OOR),<sup>2, 21</sup> o qual cliva o peróxido em um processo de dois elétrons gerando o intermediário conhecido como Composto I (Por<sup>+</sup> • Fe(IV)=O). Esse Composto I pode abstrair um único elétron oxidando uma segunda molécula de peróxido ou qualquer outro agente redutor para formar o Composto II (PorFe(IV)=O).<sup>2, 5, 10, 21</sup> A reação do Composto II com mais HOOH forma Composto III, um complexo entre peroxidase férrica e íon superóxido, conhecido como oxiperoxidase (PorFe(III)O<sub>2</sub><sup>-</sup> • ↔ PorFe(II)O<sub>2</sub>). Esse Composto II também pode receber um elétron e voltar a sua forma nativa (PorFe(III)), completando o chamado “turnover” da enzima na ausência de um substrato redutor normal; entretanto, quando reage com mais ROOH ocorre a inativação da enzima de maneira irreversível.<sup>2, 5, 10, 21</sup> A Figura 5, demonstra as etapas do ciclo catalítico da HRP.



**Figura 5:** Descrição do ciclo catalítico da HRP, utilizando ROOH como agente redutor e oxidante. Onde AH, pode ser qualquer substrato redutor como aldeídos e fenóis.<sup>2</sup>

Os prótons no sítio ativo distal do grupo heme influenciam na formação de espécies reativas catalíticas tanto para peroxidases quanto para citocromo P450.<sup>2, 22</sup> Em peroxidases, um resíduo distal de histidina atua como catalisador ácido/base que favorece a desprotonação do substrato peróxido de hidrogênio no sítio ativo da enzima (Composto 0) e sua subsequente clivagem heterolítica.<sup>23, 24, 25</sup>

A desprotonação do peróxido de hidrogênio no Composto 0 é uma etapa crucial no ciclo catalítico das peroxidases e do citocromo P450.

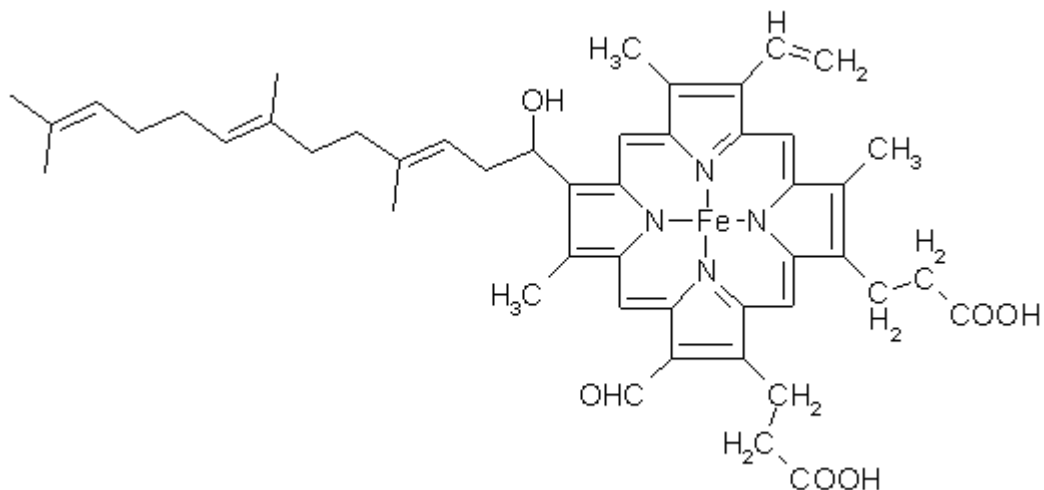
### 1.1.5 Citocromo c

Citocromos, termo que significa “pigmentos celulares”, são proteínas encontradas na membrana interna das mitocôndrias de plantas, animais e bactérias. O citocromo *c* respiratório foi descoberto em 1884 por MacMunn que observou quatro bandas espectroscópicas típicas na solução de numerosos tecidos e organismos vivos. Estudou também as fases de oxidação e de redução e postulou que os pigmentos envolvidos possuíam um papel respiratório no interior das células, mas, estas descobertas foram fortemente rejeitadas pelo químico e editor Hoppe-Seyler, que alegou que as bandas espectroscópicas detectadas eram decorrentes

de derivados de hemoglobina e não de outra proteína. O papel desta proteína no mecanismo de respiração celular foi redescoberto em 1925 por David Keilin<sup>1</sup> e caracterizado extensivamente por Hugo Theorell e sua escola.<sup>1, 7, 26</sup>

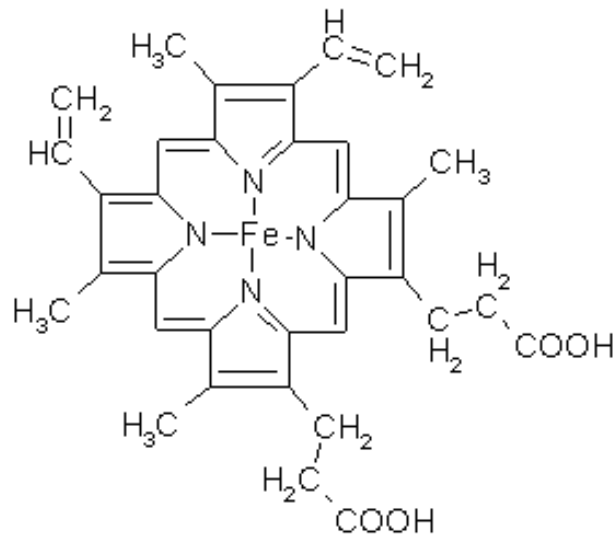
Inicialmente essas proteínas eram reconhecidas pela sua importância na respiração celular, pois, devido ao fato de possuírem o ferro do grupo heme em um ambiente do tipo porfirina, eles podem transportar os elétrons através da cadeia respiratória e liberar energia que pode ser armazenada na forma de ATP. Nesse processo, há a reação de oxirredução do ferro variando de Fe(II) para Fe(III).<sup>27</sup>

Existem vários tipos de citocromos ligados à cadeia respiratória, esses citocromos são denominados pelas letras *a*, *b* e *c*, e cada um possui um espectro de absorção característico que é detectada em um determinado comprimento de onda. O citocromo *a* (figura 6) possui um heme A e uma longa cauda isoprenóide ligada a um dos anéis porfirínicos, ele é similar à Ubiquinona (Coenzima Q) da cadeia respiratória.



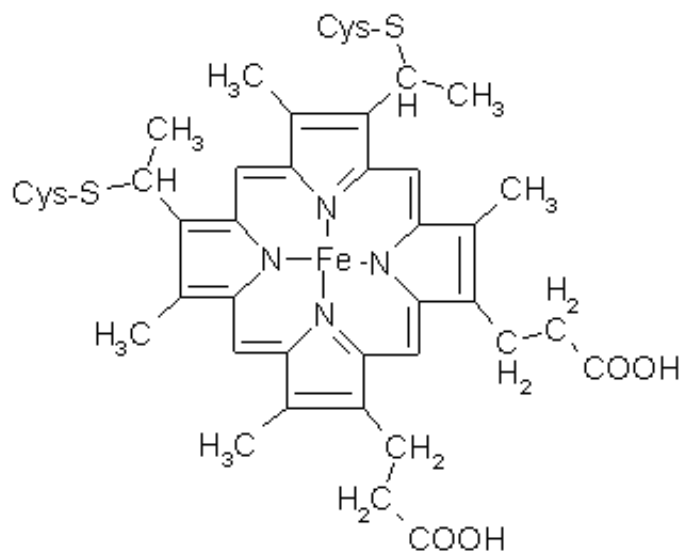
**Figura 6** - Estrutura do citocromo *a*.<sup>28</sup>

O citocromo *b* (figura 7) possui o heme ligado de forma covalente à porfirina e possui uma ferriprotoporfirina IX, similar à que ocorre na mioglobina e na hemoglobina.



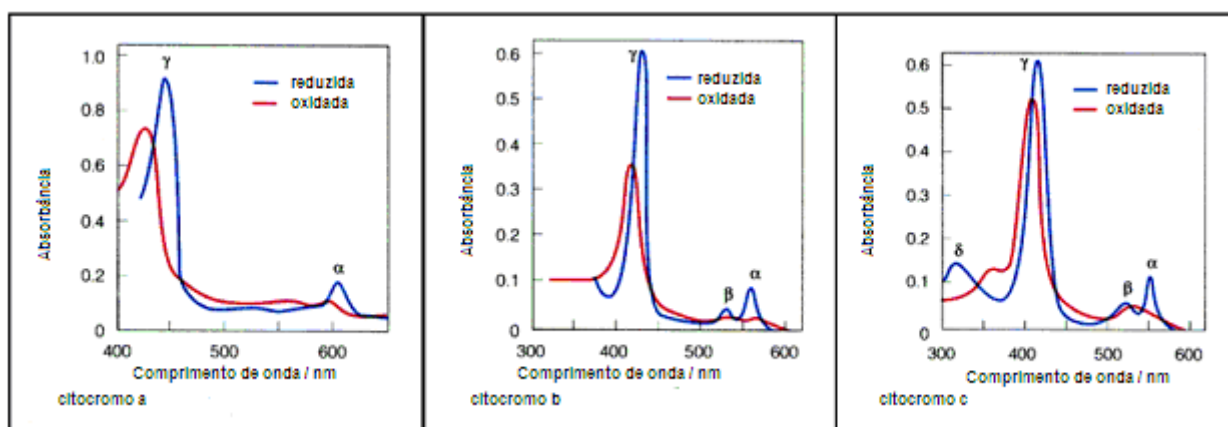
**Figura 7** - Estrutura do citocromo *b*.<sup>29</sup>

O termo citocromo *c* refere-se a uma classe de hemoproteínas com o grupo heme covalentemente ligado a sua cadeia polipeptídica por pontes tioéter com um ou dois resíduos de cisteína (figura 8). Esta classe inclui o citocromo *c* respiratório que possui um único grupo heme ligado a uma única cadeia polipeptídica de 103 a 113 aminoácidos e um potencial de redução de + 260 mV.<sup>4</sup>



**Figura 8** - Estrutura do citocromo *c*.<sup>30</sup>

Os citocromos podem ser detectados por espectrofotometria UV-visível, pois eles se diferenciam basicamente em seu espectro de absorção, uma vez que dependem fundamentalmente do grupo lateral que se encontra ao redor do anel porfirínico e da forma com que ele está conectado à cadeia protéica. Por essa técnica também é possível determinar se o citocromo se encontra em sua forma oxidada ou reduzida. A figura 9 mostra um exemplo dessas diferenças e traz na tabela 1 as variações no comprimento máximo de absorbância ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) nas bandas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  dos citocromos em sua forma reduzida.

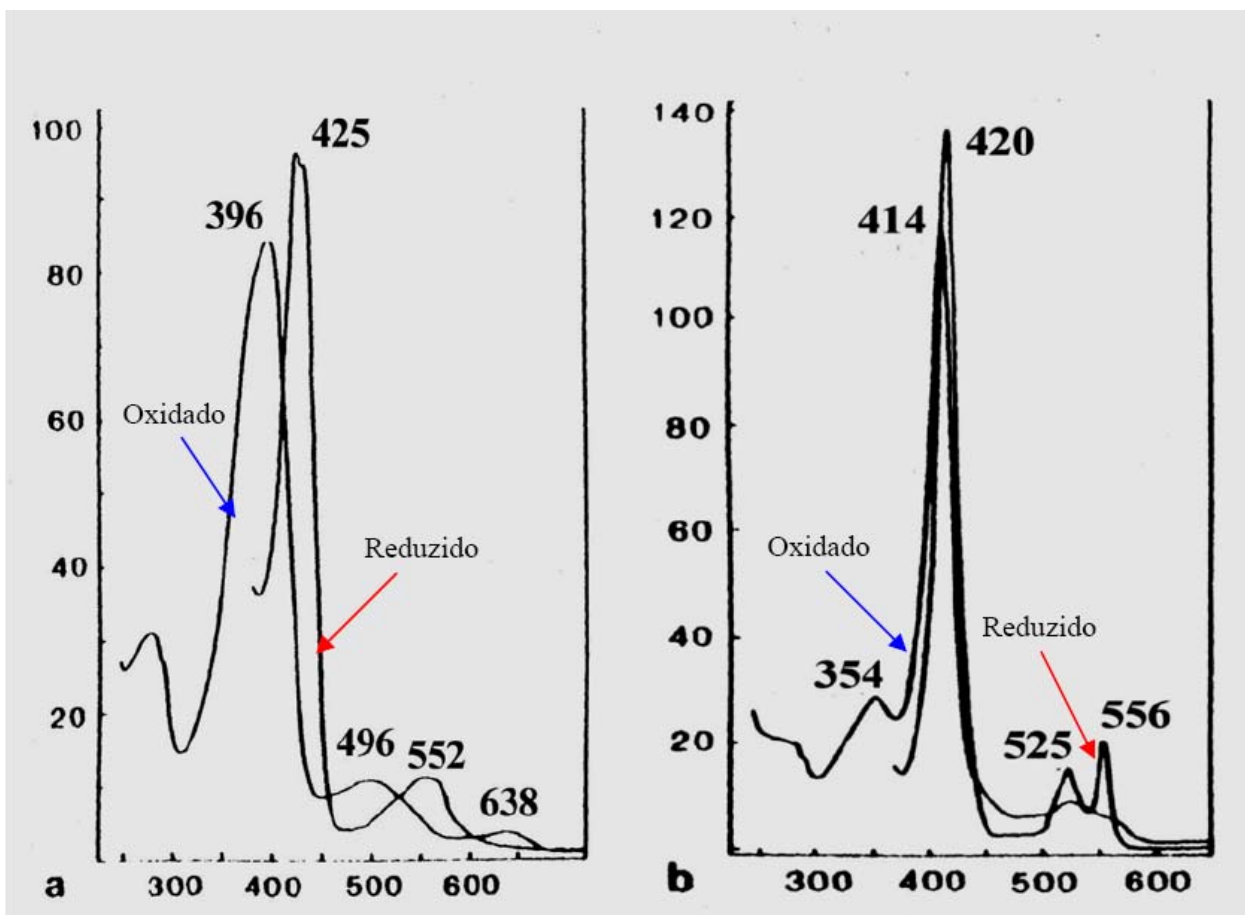


**Figura 9:** Espectros de absorção dos citocromos *a*, *b* e *c* em sua forma oxidada (vermelho) e em sua forma reduzida (azul).<sup>31</sup>

**Tabela 1:** Variações no comprimento máximo de absorbância ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) nas bandas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  dos citocromos em sua forma reduzida.<sup>31</sup>

<b>Citocromo reduzido</b>	<b>Banda <math>\alpha</math></b>	<b>Banda <math>\beta</math></b>	<b>Banda <math>\gamma</math> (Soret)</b>
<b>Citocromo a</b>	592 – 604 nm	Ausente	439 – 443 nm
<b>Citocromo b</b>	555 – 567 nm	526 – 546 nm	408 – 449 nm
<b>Citocromo c</b>	550 – 558 nm	521 – 527 nm	415 – 423 nm

Além do tipo de citocromo e do seu estado redox, os espectros obtidos por essa técnica também pode mostrar mudanças espectrais características de sua forma alto ou baixo *spin*. Os espectros abaixo (figura 10) mostram o citocromo *c* oxidado e reduzido na sua forma alto *spin* (a) e baixo *spin* (b). O espectro do citocromo *c* reduzido na sua forma alto *spin* (a) mostra banda evidente de absorbância em torno de 552 nm enquanto que a desse mesmo citocromo na forma baixo *spin* mostra duas bandas ao redor de 525 e 556 nm.<sup>27</sup>



**Figura 10:** Espectros de um citocromo *c* nas suas formas alto e baixo *spin*. Bandas do citocromo *c* oxidado e reduzido nas suas formas alto *spin* (a) e baixo *spin* (b).<sup>32</sup>

A absorvância medida na região Soret, entre 350 e 490 nm, reflete o estado de *spin* do ferro hemínico. Em seu estado nativo, onde o citocromo *c* tem o ferro hemínico  $\text{Fe}^{3+}$  com a presença dos dois ligantes axiais, Histidina 18 e Metionina 80, a espectroscopia revela Banda Soret com máxima intensidade ao redor de 410 nm e a molécula apresenta sua forma hexacoordenada, característica da forma baixo *spin*. Quando o citocromo *c* perde a Metionina 80, o ferro hemínico é convertido ao estado alto *spin*, apresentando Banda Soret com deslocamento para a região do azul em cerca de 15 nm. Assim, a transição deste baixo *spin* (molécula hexacoordenada) para alto *spin* (molécula pentacoordenada) também afeta a banda Soret, dado que a perda do ligante altera a geometria do heme.

Apesar de parecer algo simples, a identificação dos tipos de citocromos é ainda muito complexa e ainda não há uma regra específica. Por exemplo, quando nos referimos ao citocromo *c*, a primeira vista parece que estamos falando de apenas um tipo de citocromo que pode ser encontrado em várias espécies de

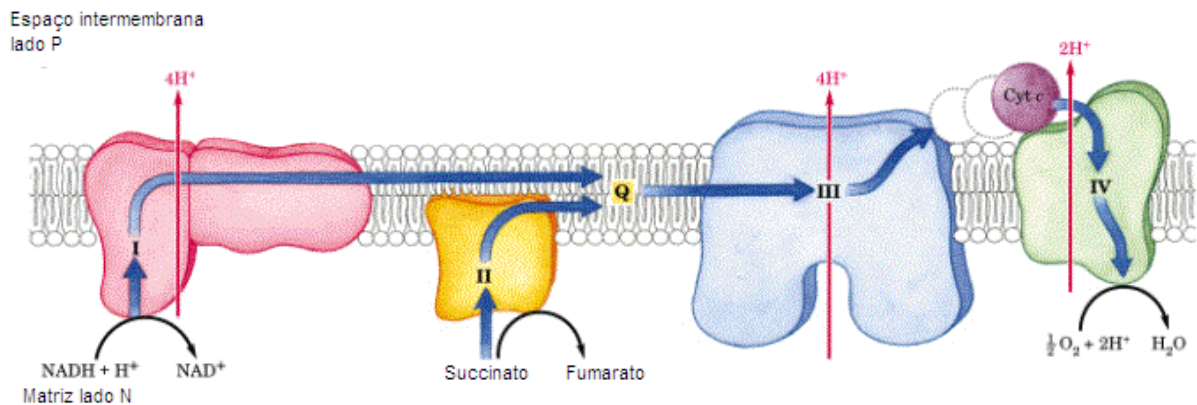
animais e vegetais, mas ao contrário do que se pensa, há uma muitas formas de citocromos c.

Existem outras espécies de citocromos, como é o caso do citocromo P-450, que apesar de não fazer parte da cadeia de respiração celular, também é muito estudado devido ao seu processo de catálise de adição do oxigênio para um substrato hidrocarboneto. Isso é muito importante, pois “é uma parte da defesa do corpo contra compostos hidrofóbicos como drogas precursores esteróides e pesticidas. A hidroxilação de RH para ROH torna-os compostos mais solúveis em água e assim ajuda sua eliminação.”<sup>33</sup>

Ao contrário das outras proteínas da cadeia respiratória que são grandes e estão inseridas na membrana, o citocromo c respiratório é uma pequena proteína periférica de membrana ligada ao lado externo da membrana mitocondrial interna. Estas características fazem com que citocromo c respiratório seja facilmente extraído de mitocôndrias isoladas cuja membrana externa tenha sido rompida (mitoplastos) e, por isto, foi o primeiro citocromo a ser extensivamente estudado.<sup>34, 35, 36, 37</sup> A figura 11 mostra uma microscopia eletrônica de mitocôndrias e a figura 12 mostra um esquema correspondente de uma mitocôndria com destaque para os componentes da cadeia respiratória e a topologia do citocromo c respiratório na organela.



**Figura 11:** Microscopia eletrônica colorizada de mitocôndrias ampliadas 11.160 vezes.<sup>38</sup>

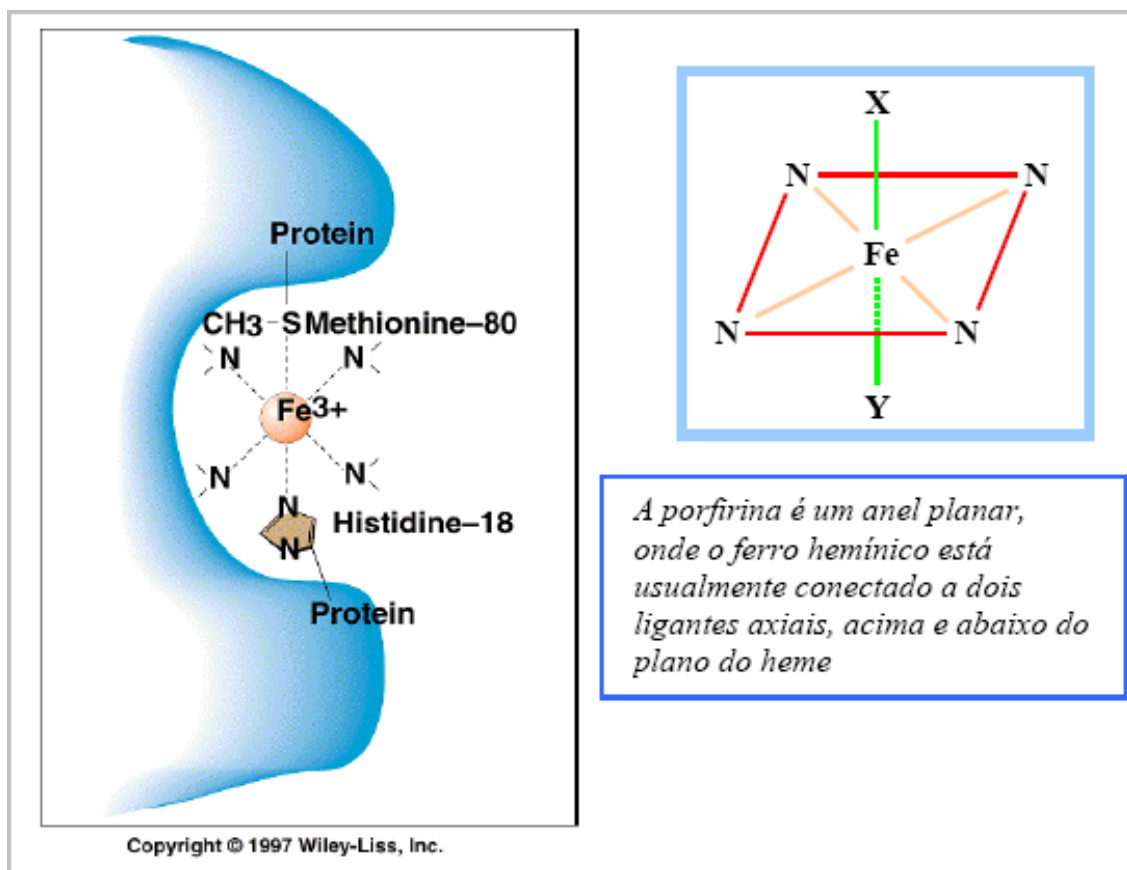


**Figura 12:** Representação esquemática da cadeia respiratória com um resumo do fluxo de elétrons e prótons por meio dos quatro complexos da cadeia respiratória.<sup>39</sup>

O citocromo *c* respiratório é codificado por um gene nuclear e traduzido por ribossomos citosólicos o que produz o apocitocromo *c* (citocromo *c* sem o grupo heme). Esta proteína é subsequentemente translocada para dentro do espaço intermembranas da mitocôndria onde recebe o grupo heme o qual é covalentemente ligado à sua estrutura por meio de uma reação catalisada pela enzima heme liase.<sup>40, 41</sup> Na mitocôndria, como carregador de elétrons da cadeia respiratória o citocromo *c* permanece ligado ao lado externo da membrana mitocondrial interna, mas sob estímulo apoptótico (morte celular programada) é liberado para o citosol, incorpora-se ao apoptossomo e participa da ativação das caspases.<sup>42, 43, 44</sup>

O citocromo *c* respiratório apresenta uma estrutura onde o grupo heme é rodeado por cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos dispostas de forma altamente empacotada. Na estrutura nativa de citocromo *c* respiratório, um nitrogênio da histidina 18 e o enxofre da metionina 80 (figura 13) ocupam as respectivas quinta e sexta posições de coordenação do ferro hemínico.<sup>4</sup> O citocromo *c* respiratório é uma proteína básica e apresenta *clusters* (grupos) de resíduos de lisina importantes para a interação da proteína com o complexo III (citocromo *c* redutase) e o complexo IV (citocromo *c* oxidase). Os resíduos de lisina 72, 86, 87 e 13 de citocromo *c* respiratório são cruciais para a interação com citocromo *c* redutase e citocromo *c* oxidase.<sup>40, 45</sup>





**Figura 13:** Estrutura nativa de citocromo c respiratório com o nitrogênio da histidina 18 na quinta posição de coordenação e o enxofre da metionina 80 na sexta posição.

### **Atividade peroxidase do citocromo c**

Os mecanismos pelos quais o citocromo c promove peroxidações são de interesse biológico, uma vez que estudos utilizando Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR – *Electron Paramagnetic Resonance*) com capacitores de *spin* demonstraram que as reações de citocromo c com peróxidos resultam no aparecimento de radicais do tipo peroxil, alcoxil e alquil, os quais possuem potencial para propagar danos biológico.<sup>2, 46, 47</sup>

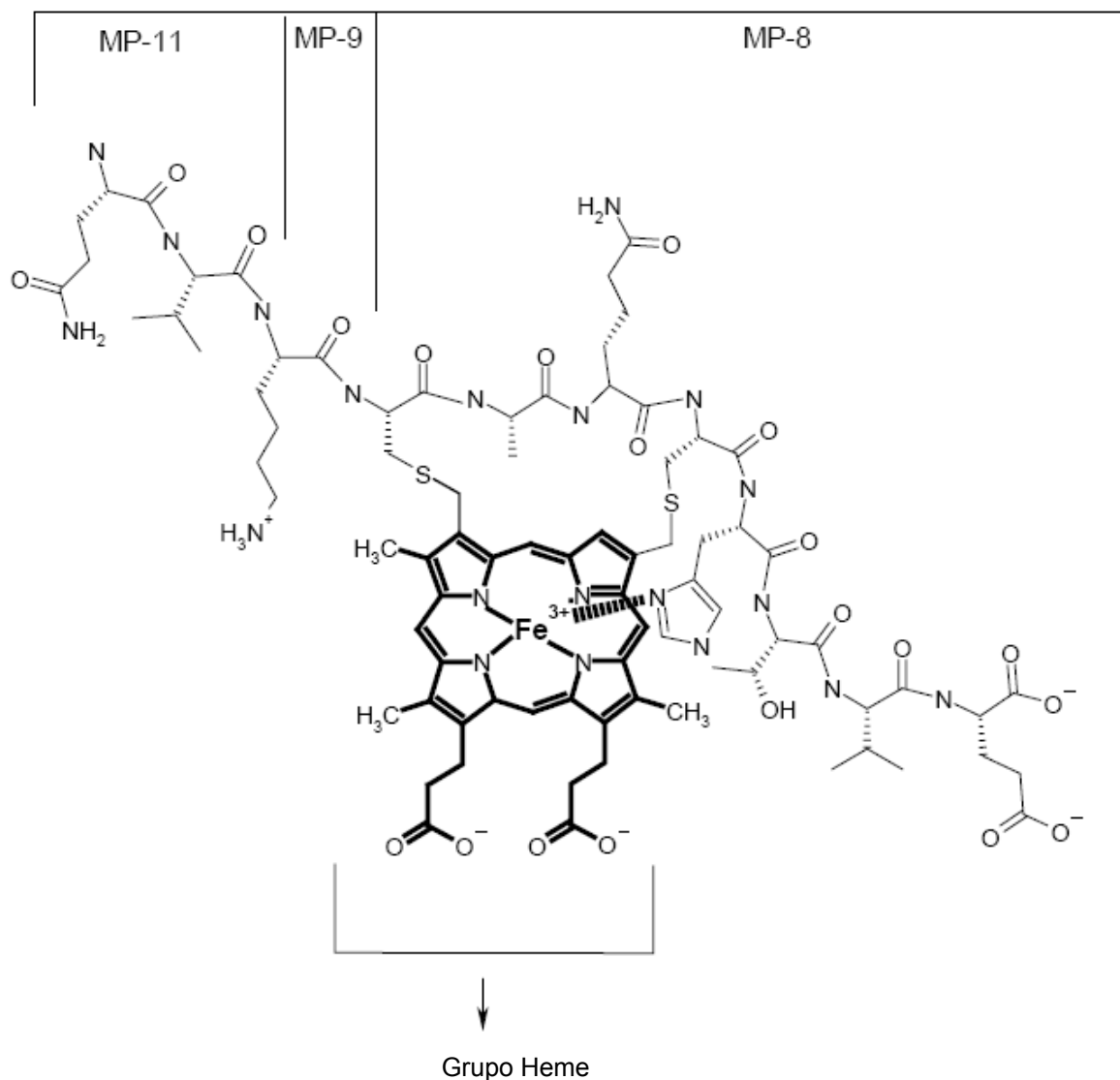
O progressivo deslocamento da absorção da banda Soret de 409 nm indo para 405 nm juntamente com a conversão do estado de *spin* do ferro de baixo *spin* para alto *spin* com simetria rômbrica é observado na reação do citocromo c com *tert*-butil hidroperóxido (t-BuOOH). A associação de citocromo c com interfaces carregadas negativamente, favorece sua atividade oxidase/peroxidase.<sup>2</sup>

Para acompanhar o mecanismo de reação do citocromo *c* com peróxidos incluindo seus intermediários de reação e as modificações químicas ocorridas no seu cromóforo, é necessário um modelo mais simples e o modelo escolhido foi o uso das microperoxidases, pois as microperoxidases além de possuírem a fração protéica do citocromo *c* ainda não possuem a sexta coordenação preenchida podendo ser facilmente ocupada pelo t-BuOOH, o que não ocorre com o citocromo *c*.<sup>2</sup>

### **1.1.6 Microperoxidase**

A digestão proteolítica da fração protéica de citocromo *c* resulta em hemopeptídios com 8 a 11 resíduos de aminoácidos conhecidos como microperoxidases (MP). A microperoxidase-8 (MP-8) possui uma cadeia peptídica que inclui os resíduos de aminoácidos de citocromo *c* de 14 a 21, (Cys, Ala, Gln, Cys, His, Thr, Val e Glu). A microperoxidase-9 (MP-9) possui os resíduos de aminoácidos de 13 a 21, (mesma seqüência da MP-8 acrescida de mais um resíduo de aminoácido, sendo este a Lys-13). A microperoxidase-11(MP-11) possui os resíduos 11 até 21 (mesma seqüência da MP-9 acrescida de dois resíduos de aminoácidos, (Gln-12 e Val-13). A cadeia peptídica de ambos os tipos mantém os resíduos de cisteína 14 e 17 que se ligam covalentemente ao grupo heme e a histidina 18 que é o ligante axial do ferro hemínico em pH acima de 3,4 (figura 14).<sup>48,</sup>  
49

Portanto, as microperoxidases não apresentam a sexta coordenação com um enxofre da metionina característico de citocromo *c* na faixa de pH entre 3 e 9.<sup>47</sup> Contudo, as MP-8 e MP-11 são excelentes modelos para o estudo de conformação e atividade peroxidase de hemoproteínas que possuem histidina como ligante axial. Nesta categoria enquadra-se citocromo *c*, pois em determinadas condições como redução do ferro hemínico, força iônica, pH alcalino e associação com membranas lipídicas carregadas negativamente levam à perda da sexta coordenação do ferro hemínico.<sup>50</sup>



**Figura 14:** Cadeia peptídica dos diversos tipos de MP.<sup>48</sup>

Por causa de suas características estruturais, as microperoxidases podem ser utilizadas para o estudo estrutural e de propriedades catalítica de peroxidases e citocromos<sup>51, 52</sup> e para o desenvolvimento de eletrodos.<sup>53</sup>

### ***Atividade catalítica das microperoxidases***

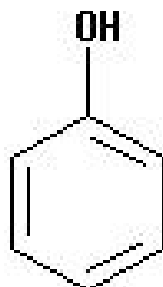
Devido às suas características estruturais, as microperoxidases são capazes de converter uma grande variedade de compostos orgânicos através de reações do tipo peroxidase (Figura 5, pág. 23) Intermediários de MP de alta valência têm sido

detectados durante a reação com peróxidos de hidrogênio, o que torna este hemopeptídeo um bom modelo para compostos 0, I, II e III de peroxidase de raiz forte (HRP).<sup>21, 54</sup> O Composto 0 tem sido detectado para HRP em baixas temperaturas e corresponde as espécies de porfirina ferro-hidroperóxido (PorFe(III)-OOH). Estas espécies precedem à formação do Composto I e II que são conhecidos como intermediários de alta valência da HRP.<sup>55</sup>

Recentemente também foram detectados intermediários de alta valência de MP associados a micelas de CTAB (brometo de cetil trimetil amônio).<sup>2, 56, 57</sup> Esses complexos MP/CTAB comportam-se como lipoenzimas e exibem interessantes características redox, incluindo a capacidade de reproduzir um típico ciclo das peroxidases. Usando o complexo MP/CTAB, é possível modular mecanismos de reação de oxidação de aldeído de acordo com a razão MP/CTAB, uma importante característica para as futuras aplicações dessa catalise.

## 1.2 Fenol

Os fenóis são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura química pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente ao anel benzênico. O fenol mais simples (hidroxi benzeno ou simplesmente fenol) tem fórmula molecular  $C_6H_6O$ . A sua fórmula estrutural está indicada na figura 15, abaixo. Por apresentar um caráter ácido, esse composto também é denominado ácido fênico, ou ácido carbólico.



**Figura 15:** Fórmula estrutural do fenol.

O fenol é um dos mais antigos agentes anti-sépticos usados pelo homem e, atualmente, ele é usado como desinfetante, como produto intermediário para a fabricação de algumas fibras sintéticas (nylon 6, por exemplo), em cauterização de unhas<sup>58, 59</sup> e, na formulação de inseticidas, herbicidas e fungicidas, que possuem atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica sobre os seres humanos.<sup>60</sup>

Apesar de ser industrialmente sintetizado, o fenol também é encontrado naturalmente em fezes de animais e em outros materiais orgânicos.<sup>59</sup> Nas plantas apresentam grande diversidade estrutural e funcional, podendo atuar, por exemplo, no metabolismo de defesa das plantas, na síntese da lignina ou como intermediários do metabolismo normal das plantas.<sup>2</sup>

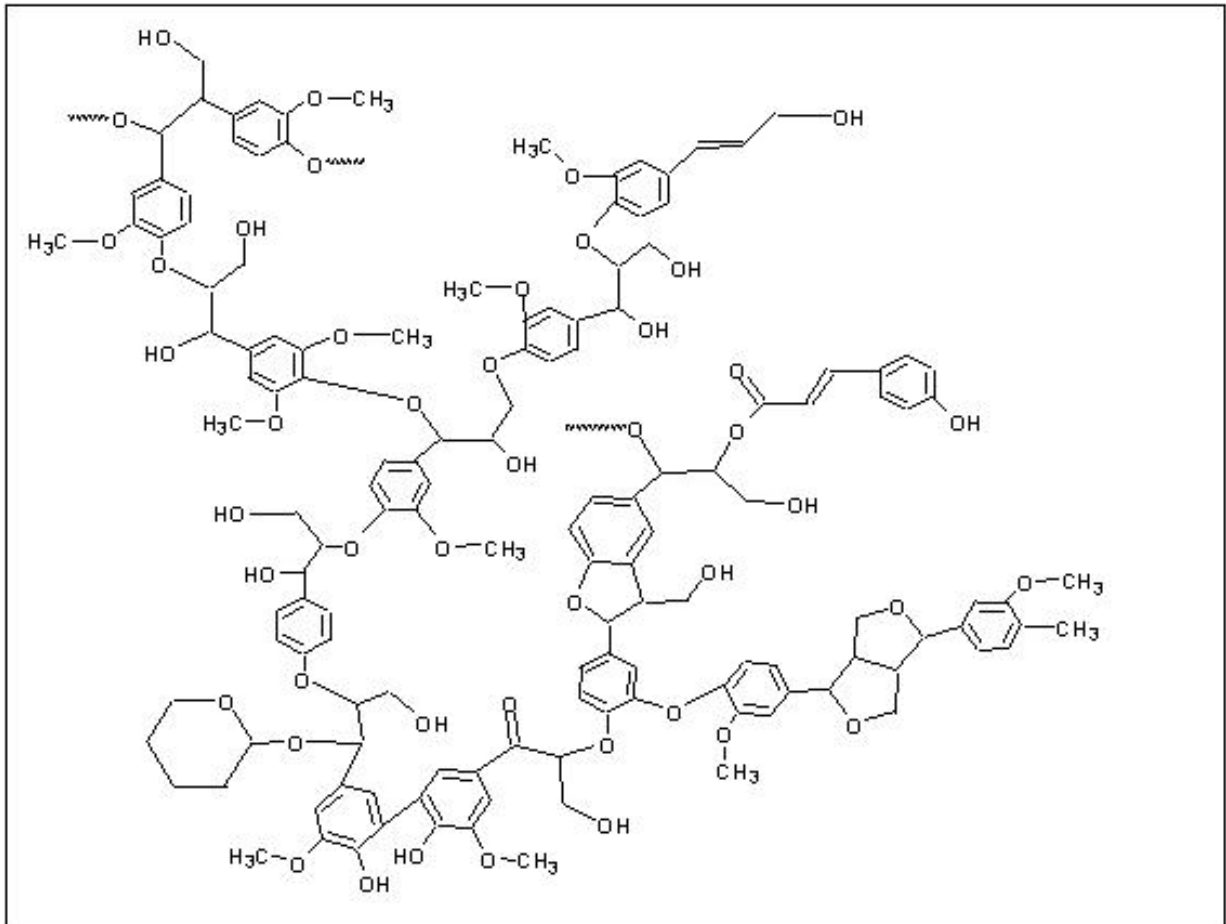
Os derivados do fenol são menos tóxicos que o fenol puro que, por ser um composto facilmente absorvido pela pele, por ingestão ou por inalação,<sup>48</sup> e por ser tóxico e em alguns casos até letal, justifica-se o estudo da sua decomposição.

### **1.2.1 Polimerização de fenóis para formação da lignina**

Após a produção de fenol pelas células especializadas das plantas, estes são armazenados em vesículas, na sua forma original ou na forma glicosilada. A saída dos fenóis pode levar à sua rápida oxidação, pela ação das peroxidases, em resposta a uma infecção. Os fenóis que se mantêm livres no citoplasma podem ter ação tóxica tanto sobre patógenos como sobre a própria célula vegetal. Isso é fundamental porque os fenóis são tóxicos e devem ser mantidos na sua forma reduzida (desprotonada).<sup>2</sup>

Em sua forma polimerizada, os fenóis formam a lignina, que é um dos principais constituintes da madeira e tem como função biológica proteger o tecido vegetal contra a oxidação e a ação de microorganismos.<sup>61</sup> Além dessa função biológica, as ligninas são os compostos que conferem força e rigidez às paredes celulares das plantas.<sup>2</sup> As ligninas estão presentes em muitas espécies vegetais, sendo a segunda classe química mais abundante nas plantas.<sup>2, 61</sup> Uma pequena porção do polímero lignina mostrado na Figura 16 abaixo, ilustra algumas ligações químicas típicas da formação da lignina, que não deve ser entendida como uma

substância com estrutura química definida uma vez que não possui a mesma estrutura química em todas as espécies.<sup>61</sup>



**Figura 16:** Algumas ligações químicas típicas da formação da lignina.<sup>62</sup>

O processo de lignificação é iniciado pela migração de vesículas armazenadoras de fenóis em direção à parede celular. Ao chegarem à parede, ocorre a descompartmentalização, através da reação enzimática. A porção glicosídica é separada da porção fenólica. Os fenóis livres podem sofrer oxidação, ligar-se à parede celular ou serem polimerizados. A ação do peróxido de hidrogênio, catalisada por uma peroxidase, leva à geração de radicais livres e à formação da lignina. Em paralelo à formação da lignina, alguns fenóis (ferulato, cafeato, sinapato) ligam-se à parede celular servindo como uma ponte de ligação entre a lignina e a parede celular.<sup>2</sup>

## 1.2.2 Toxicologia

As informações sobre os efeitos à saúde causados pelo fenol são derivadas de estudos de trabalhos e relatos de pessoas expostas a essa substância. Esses estudos indicam que o fenol é uma substância irritante e corrosiva, fazendo da pele e da mucosa de membranas seus alvos de toxicidade, mas outros efeitos também são reportados. Não se sabe ao certo qual a concentração letal dessa substância em seres humanos. Algumas fontes que dizem ser aproximadamente 70 mg/kg (em adultos), outras indicam que doses orais abaixo de 1 mg podem ser fatais em seres humanos, mas pacientes ocasionalmente sobrevivem com doses acima de 65 mg. Exames de autópsia revelam alterações sérias nas mucosas no trato gastrointestinal, outras indicam que a pele e as membranas da mucosa do fígado e do sistema cardiovascular podem ser considerados alvos da toxicidade do fenol. Um estudo epidemiológico com trabalhadores expostos ao fenol apontou um aumento no caso de incidência de doenças cardiovasculares. A ingestão de água contaminada com fenol e clorofenóis aumenta a incidência de náusea, diarreia e vômito.<sup>63</sup>

Alguns efeitos sistêmicos foram relatados durante os estudos sobre a toxicologia do fenol:

- Efeitos Respiratórios: Os estudos revelaram que não há um aumento significativo entre os trabalhadores que lidam diretamente com o fenol e a população em geral.<sup>63</sup>
- Efeitos Cardiovasculares: Estudo realizado em trabalhadores de uma grande empresa de borracha e pneus constatou um aumento significativo na mortalidade por doença cardíaca em trabalhadores expostos ao fenol. Dos 25 solventes usados na planta, a exposição por fenol mostrou uma associação fortíssima com a mortalidade por doenças do coração.<sup>63</sup>
- Efeitos Gastrointestinais: Alguns relatos do século 19 mostram que médicos e seus assistentes sofriam de uma doença ocupacional comum, pois trabalhavam com o ácido carbólico na assepsia das salas de operação. Dentre os sintomas dessa doença estão principalmente a anorexia com progressiva perda de peso e excesso de saliva.<sup>63</sup>
- Efeitos Hematológicos: Trabalhadores de uma refinaria de óleo no Egito expostos por um longo período a concentrações de 5,4 ppm de fenol no ar durante aproximadamente 13 a 15 anos, apresentaram pequenos mas significantes

aumentos na hemoglobina, o que não foi observado em grupos não expostos ao fenol.<sup>63</sup>

- Efeitos Hepáticos: O aumento do fígado e elevação do nível do soro em enzimas hepáticas indicativas de feridas no fígado foram observados em um indivíduo exposto diariamente a vapores e ao contato com o fenol durante mais de dez anos. Não se sabe ao certo a concentração do fenol porém o paciente relatou que sentia frequentemente um odor forte do fenol e que esse produto frequentemente caía em sua pele causando irritações. Esse produto foi facilmente absorvido por sua pele, o que pode ter contribuído com os efeitos sistêmicos apresentados. Estudos realizados com trabalhadores da refinaria de óleo no Egito também apresentaram elevações no nível do soro das enzimas hepáticas após 13-15 anos de exposição, porém esse nível de elevação foi menor do que o paciente observado acima.<sup>63</sup>
- Efeitos renais: Urina escura e glucose na urina foram notados em um homem exposto a um longo e intermitente período a vapores e solução de fenol. O teste de urina deu negativo para proteína e urobilinogina.<sup>63</sup>

### 1.3 *Spin* eletrônico do ferro hemínico presente no anel porfirínico

Além dos três números quânticos requeridos para especificar a distribuição espacial de um átomo (número quântico principal,  $n$ ; número quântico necessário para especificar um orbital  $l$  e número quântico magnético  $m_l$ ), mais dois números quânticos são necessários para definir completamente o estado de um elétron. Esses números quânticos referem-se ao seu *spin*, que é o momento angular intrínseco do elétron.<sup>33</sup>

O elétron possui um momento angular de *spin* responsável pelo chamado momento magnético, podendo ser visualizado girando como um pequeno ímã. Como uma carga elétrica em movimento gera um campo magnético, tem-se que este movimento do elétron faz dele um pequeno ímã. Na presença de um campo magnético, os *spins* eletrônicos tornam-se alinhados.<sup>27</sup>

De acordo com a mecânica quântica, cada orbital de um átomo pode ser ocupado por, no máximo, dois elétrons e estes devem encontrar-se emparelhados, isto é, com *spins* de sinais opostos, um com vetor voltado para cima, representado

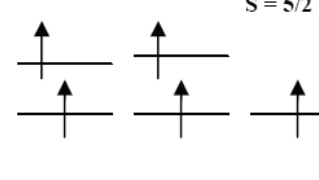
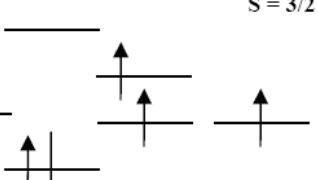
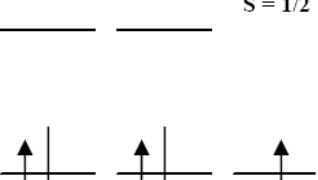
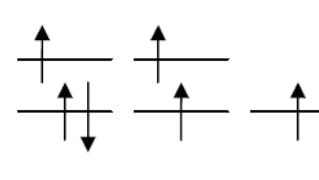
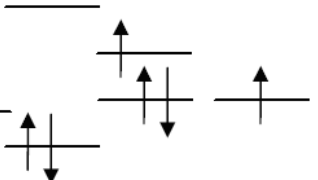
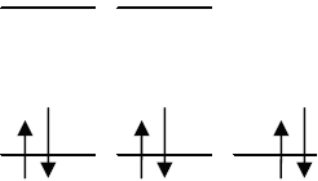


pela seta  $\uparrow$  e outro com vetor voltado para baixo, representado pela seta  $\downarrow$ , indicando-se que giram ao redor de seu eixo em sentidos opostos. Esses mesmos *spins* podem também serem representados pelas letras gregas  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente. Pode-se imaginar um elétron girando no sentido anti-horário a uma certa velocidade (o estado  $\uparrow$ ) ou no horário a exatamente a mesma velocidade (o estado  $\downarrow$ ). Esses dois estados de *spin* são distinguidos pelo quarto número quântico, o número quântico magnético *spin*,  $m_s$ . Este pode ter somente dois valores:  $+1/2$ , indicando um elétron  $\uparrow$ , e  $-1/2$ , indicando um elétron  $\downarrow$ .<sup>64</sup> A tendência natural é que os elétrons ocupem sempre as camadas de menor energia, passando para os orbitais de maior energia apenas quando os de menor já estão completamente ocupados ou quando existe um estímulo que os lance para estes.

Um átomo de ferro possui 26 elétrons, estando 18 em camadas fechadas e 8 na conformação orbital  $3d^64s^2$ . A camada 3d consiste de 5 orbitais capazes de aceitar a presença de no máximo 10 elétrons de *spins* opostos.

Como o átomo de ferro presente no anel porfirínico pode aparecer no estado férrico ( $Fe^{3+}$ ) ou ferroso ( $Fe^{2+}$ ), pode apresentar configurações orbitais  $3d^5$  e  $3d^6$  respectivamente, estando seus elétrons distribuídos entre os orbitais conforme demonstrado na Tabela 2, onde são também apresentados os possíveis valores de *spins*. Para cada um dos estados do ferro podem ser possíveis tanto as formas de alto quanto de baixo *spin*.

**Tabela 2** - Possíveis valores de spin e ocupação dos orbitais por elétrons do íon ferro na forma férrica e ferrosa.<sup>65</sup>

	<i>Spin Alto</i> $S = 5/2$	<i>Spin Intermediário</i> $S = 3/2$	<i>Spin Baixo</i> $S = 1/2$
5 elétrons d - $Fe^{3+}$			
6 elétrons d - $Fe^{2+}$			

No caso da hemoproteína citocromo *c*, três estados de *spin* podem ser observados, a seguir, o citocromo *c* nativo baixo *spin* com simetria rômica; citocromo *c* baixo *spin* com simetria menos rômica e citocromo *c* alto *spin*.<sup>27</sup> O citocromo *c* baixo *spin* com simetria menos rômica é dito estado de baixo *spin* alternativo. Esta menor rombicidade pode ser definida como uma conformação protéica menos distorcida, mais simétrica, que têm influências sobre a atividade do citocromo *c*.

Considerando a distribuição eletrônica do ferro hemínico e o desdobramento de seus orbitais *d* promovida pela interação com ligantes, temos a possibilidade de existência da forma baixo e alto *spin*, 1/2 e 5/2, respectivamente para o caso de ferricitocromo *c*. Conforme pode ser visto na Tabela 2, tanto a forma baixo *spin* quanto a forma alto *spin* apresentam um número ímpar de elétrons com *spins* desemparelhados e, portanto exibem sinal de EPR.<sup>27</sup>

No caso de ferrocitocromo *c*, como existem seis elétrons para serem distribuídos nos orbitais *d*, tanto na forma alto como na forma baixo *spin*, não há número ímpar de elétrons com *spins* desemparelhados de tal modo que as formas baixo *spin* e alto *spin* não são detectadas por EPR.<sup>27</sup>

A determinação do valor de *g*, definido como “tensor giromagnético” ou “*g* efetivo”, é fundamental para determinar os estados de *spin* da hemoproteína ou do hemopeptídeo analisado. Esse valor é determinado a partir da seguinte condição de ressonância:

$$g = (7,14 \times 10^{-7}) \cdot \nu/H$$

onde  $\nu$ , em Gauss, é a frequência da microonda empregada e **H** representa a linha de EPR presente, sendo o fator apresentado entre parênteses calculado através da relação entre a constante de *Plank* ( $h = 6,6262 \times 10^{-27}$ ) e o valor do *magneton* de Bohr ( $\beta = 9,2741 \times 10^{-21}$ ). Representa, comparativamente, uma espécie de identidade da espécie paramagnética que está sendo estudada, favorecendo sua identificação e está diretamente associado ao momento angular orbital do elétron desemparelhado.

A perda do sexto ligante do ferro hemínico, a metionina 80, ou sua substituição por um ligante de campo fraco, leva ao aparecimento de uma forma de ferro alto *spin*. Caso esta coordenação passe a ser ocupada pela lisina ou por

resíduos de histidina, entretanto, isso não ocorre. A presença de ligantes fortes como, por exemplo, o cianeto ( $\text{CN}^-$ ), favorece a configuração de baixo *spin* para o  $\text{Fe}^{3+}$ , enquanto que ligantes fracos, como a água, favorecem a configuração de alto *spin*.<sup>27</sup>

## 1.4 Nanomateriais

A Nanotecnologia, nascida oficialmente no final da década de 1950, e a Química Supramolecular têm se utilizado cada vez mais e de forma mais controlada de biomoléculas, explorando sua organização e seus efeitos cooperativos para as mais diversas finalidades.

Os nanomateriais têm sido estudados e usados para uma série de aplicações nas áreas biotecnológicas, bioeletrônicas e biomédicas, dentre outras, incluindo encapsulação de enzimas, biosensores para determinar poluentes ambientais ou vários materiais bioativados em baixas concentrações, células biocombustíveis que utilizam enzimas para converter a energia química armazenada de vários materiais orgânicos em energia elétrica, como vesículas de distribuição de DNA para dentro de células vivas, armazenamento e conservação de energia, sensores, dispositivos semicondutores, peneiras moleculares, material para armazenamento de hidrogênio, aditivos para materiais poliméricos e como suporte para materiais catalíticos, por exemplo.<sup>66, 67, 68</sup> Máquinas e dispositivos microscópicos, por exemplo, podem ser montados utilizando-se biomoléculas que, organizadas e adaptadas para uma determinada função, tornam-se capazes de executar atividades específicas, altamente eficientes e controladas, que vão desde a produção de alimentos até o tratamento de doenças, sejam refazendo moléculas presentes na natureza, seja criando novas.

Para tanto, estas nanoestruturas tendem a ser construídas utilizando-se do próprio poder intrínseco de uma molécula de se organizar e interagir com outras moléculas. Podem ser também devidamente trabalhadas para serem usadas como blocos de montagem visando gerar estruturas ainda mais estáveis, complexas e funcionais. A identidade de cada componente pode ser preservada, enquanto o

arranjo torna-se um método de interação simbiótica, conferindo ao complexo novas propriedades.

### **1.4.1 MCM – 41**

Recentemente o desenvolvimento de uma nova família de sílicas mesoporosa de peneira molecular MCM-41 tem recebido muita atenção. Trata-se de um material nanoestruturado sintetizado usando micelas surfactantes como *templetes*.<sup>69, 70</sup> Sua forma consiste em arranjos hexagonais altamente ordenados de canais dimensionais, com uma grande área superficial e distribuição de poros estreitos e uniformes. Devido aos poros serem grandes entre 1,5 a 10 nm, a MCM-41 tem o potencial de encapsular macromoléculas com a fitalocianina, azul de metileno e ferroceno<sup>71, 72, 73</sup> e também pequenas proteínas como citocromo *c*<sup>74, 75</sup> de maneira muito mais fácil do que as zeólitas microporosas, e isso oferece novos conceitos para sínteses moleculares e organizações moleculares usando poros altamente ordenados.<sup>71</sup>

O uso dessa sílica mesoporosa como hospedeira para várias metaloenzimas pode promover oxidações seletivas usando oxidantes baratos como, por exemplo, o O<sub>2</sub> e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em seus processos industriais, tornando o processos estável e sem a geração de lixos tóxicos.<sup>76</sup>

### **1.4.2 SBA – 15**

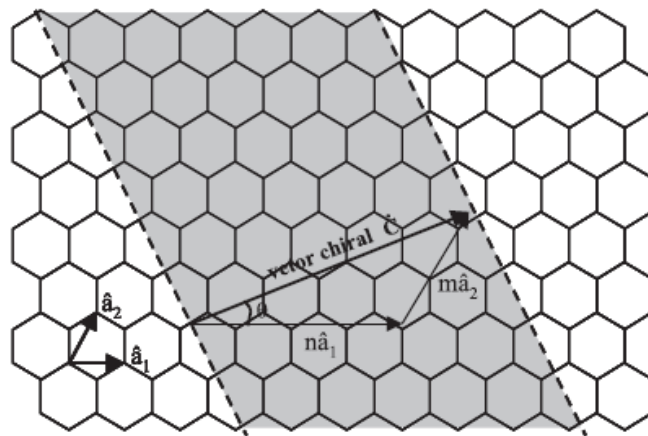
Recentes estudos conduziram à descoberta da sílica mesoporosa com estrutura hexagonal, que apresenta elevada área superficial (700 a 1000 m<sup>2</sup>/g), tamanho de poros grande (5 a 9 nm) e espessura fina de parede do poro (3,5 a 5,3 nm), chamado SBA-15. Assim como a SBA-15, uma vasta quantidade de materiais têm sido estudada para a introdução de alguns produtos farmacêuticos, principalmente os radiofarmacêuticos, para o tratamento de câncer, pois além de diminuir os efeitos causados pelos medicamentos, também liberam a droga no local correto (células cancerígenas), causando menos danos aos pacientes durante seu

tratamento.<sup>77</sup> A disponibilidade de vários tipos de materiais geralmente chamados de biomateriais que podem ser introduzidos em nosso corpo sem ser rejeitado como um processo inflamatório faz desses materiais veículos perfeitos para a condução de drogas para locais específicos de nosso corpo.

### **1.4.3 Nanotubos de carbono**

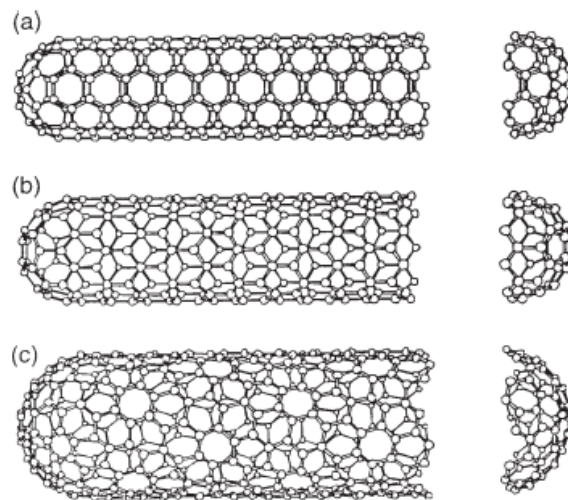
Os nanotubos de carbono (NC) são formados por arranjos hexagonais de átomos de carbono com aproximadamente 1-2 nm de diâmetro e 1-100  $\mu\text{m}$  de comprimento<sup>68, 78</sup>, dependendo do nanotubo. Do ponto de vista estrutural, há dois tipos de NC que podem apresentar alta perfeição: os nanotubos de carbono de paredes simples (NCPS, também conhecidos como *single-walled carbon nanotubes* – *SWNT*) e, os nanotubos de carbono de parede múltipla (NCPM, também conhecido como *multi-walled carbon nanotubes* – *MWNT*).<sup>66, 67, 68, 78</sup>

Os NCPS podem ser considerados como uma única folha de grafite enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico, eles frequentemente ocorrem como um maço fechado hexagonal onde os nanotubos são ligados por forças de van der Walls.<sup>67</sup> A maioria das propriedades dos NCPS depende do seu diâmetro e ângulo *chiral*, também chamado ângulo de helicidade,  $\Phi$ . Estes dois parâmetros resultam dos chamados índices de Hamada (n,m). Um NCPS pode ser construído a partir de uma folha de grafite enrolada de tal forma que coincidam dois sítios cristalograficamente equivalentes de sua rede hexagonal. O vetor **C** chamado *chiral*, que define a posição relativa dos dois sítios é definido mediante dois números inteiros (n,m) e pelos vetores unitários da rede hexagonal **a**<sub>1</sub> e **a**<sub>2</sub> ( $\mathbf{C} = n\mathbf{a}_1 + m\mathbf{a}_2$ ) como mostrado na Figura 17.<sup>66</sup>



**Figura 17** – Diagrama de formação de nanotubos de carbono a partir de uma folha de grafite. O vetor **C** chamado *chiral*, define a posição relativa dos dois sítios e é definido mediante dois números inteiros ( $n, m$ ) e pelos vetores unitários da rede hexagonal  $\mathbf{a}_1$  e  $\mathbf{a}_2$  ( $\mathbf{C} = n\mathbf{a}_1 + m\mathbf{a}_2$ ).<sup>66</sup>

A estrutura treliça dos NC pode formar três tipos de NCPS dependendo dos valores relativos do par ( $n, m$ ), os NCPS podem ser: *armchair* quando  $n = m$  e o ângulo *chiral* é de  $30^\circ$ , nanotubos *zig-zag*, quando  $n$  ou  $m = 0$  e o ângulo *chiral* é  $0^\circ$ , ou *tubo chiral* ( $n \neq m \neq 0$ ) e ângulos *chiral* intermediários entre  $0^\circ$  e  $30^\circ$ .<sup>66, 67</sup> As três variedades de NCPS são ilustradas na Figura 18.



**Figura 18** – Geometrias de NCPS perfeitos: (a) *armchair*, (b) *zig-zag*, (c) *chiral*.<sup>66</sup>

Os NCPS podem ser tanto metálicos como semimetálicos dependendo de seu diâmetro e helicidade. Todos os nanotubos *armchair* são metálicos, enquanto que os *zig-zag* e os *tubos chiral* podem ser metálicos ou semicondutores.<sup>66, 67</sup> Já os nanotubos de paredes múltiplas NCPM compreendem um conjunto de nanotubos concêntricos, num arranjo que lembra as tradicionais bonecas russas ocas que

trazem dentro outras bonecas russas idênticas.<sup>66</sup> As propriedades eletrônicas de NCPM perfeitos assemelham-se às propriedades dos NCPS, por causa do fraco acoplamento entre os cilindros de carbono concêntricos. Além disso, por se tratarem de estruturas *quasi*-unidimensionais, o transporte eletrônico nos NC metálicos (tanto NCPS como NCPM) ocorre de forma balística, isto é, sem espalhamento, o que possibilita a condução de correntes através de grandes extensões do nanotubo sem aquecimento. Do ponto de vista das investigações teóricas, os NCPS representam os sistemas mais adequados, em relação aos NCPM, devido à maior facilidade na descrição computacional. Por outro lado, os NCPM são produzidos com mais facilidade e com menor custo que os NCPS.<sup>66</sup>

#### **1.4.4 Nanotubos de $TiO_2$**

Após estudos com nanotubos de carbono realizados no início dos anos 90, novas pesquisas foram desenvolvidas nessa área e com isso houve o aparecimento de novos nanotubos, dentre eles o  $WS_2$ ,  $MoS_2$ , BN e  $NbS_2$ . Esses materiais foram aperfeiçoados e hoje em dia uma lista considerável de nanotubos inorgânicos já é conhecida. Essa lista vem aumentando vertiginosamente, e dentre esses materiais os nanotubos de dióxido de titânio são muito atrativo, pois essas nanoestruturas possuem aplicações como fotocatalisadores, suportes catalíticos, dispositivos de auto-limpeza, dentre outras.<sup>79</sup>

### **1.5 Técnicas para o estudo da degradação do fenol**

#### **1.5.1 Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta e Visível**

A radiação eletromagnética de comprimento de onda mais curto que a luz visível e mais longo que os raios X é chamado de luz ou radiação ultravioleta (UV). Essa radiação é invisível ao olho humano e está dividida em três regiões, a seguir: ultravioleta próximo, com comprimentos de ondas variando entre 300 a 400 nm,

afastado, que compreende a faixa de 200 a 300 nm e, no vácuo, com comprimentos variando na faixa de 4 a 200 nm. A região da luz visível possui seu comprimento de onda na faixa de 400 a 800 nm.

A técnica de espectrofotometria de absorção no UV-visível é baseada no princípio de absorção de parte da luz que incide na amostra e transmissão da restante. Desse modo, pode-se medir a quantidade de radiação absorvida em cada região do espectro.

A quantidade de luz que é absorvida pela solução depende da concentração a substância absorvente e da espessura da cubeta (local por onde a luz deve passar). Quanto maior a concentração, maior a quantidade de moléculas que irão absorver a luz. Isso mostra que há uma relação direta entre a concentração e a quantidade de moléculas presente na solução analisada.

As moléculas absorvem luz em diferentes comprimentos em função, por exemplo, das energias dos elétrons nos orbitais moleculares, visto que a energia incidente deve ser igual à diferença energética entre o orbital molecular fundamental e o orbital molecular excitado para que a transição ocorra.<sup>80</sup>

As bandas de absorção apresentam posições e intensidades diferentes para diferentes compostos. A posição corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para a ocorrência da transição eletrônica, enquanto que a absorção depende da polaridade do estado excitado e da possibilidade de interação entre a energia radiante e o sistema eletrônico, permitindo a passagem do estado fundamental a um estado excitado.<sup>81</sup>

O espectro de absorção de um composto, construído na forma de um gráfico que relaciona os comprimentos de onda com a respectiva absorção da energia luminosa, constitui-se um instrumento valioso para sua identificação bem como de sua estrutura. No estudo de proteínas, os principais parâmetros considerados são: o pico máximo de absorção em determinados comprimentos de onda ( $\lambda_{\text{máximo}}$ ) e a absorvidade molar ( $\epsilon$ ), definidos para diversas substâncias. Como estes parâmetros alteram-se, por exemplo, quando há modificações na estrutura química da molécula, a aplicação desse tipo de espectroscopia na caracterização de macromoléculas biológicas é bastante aplicada.

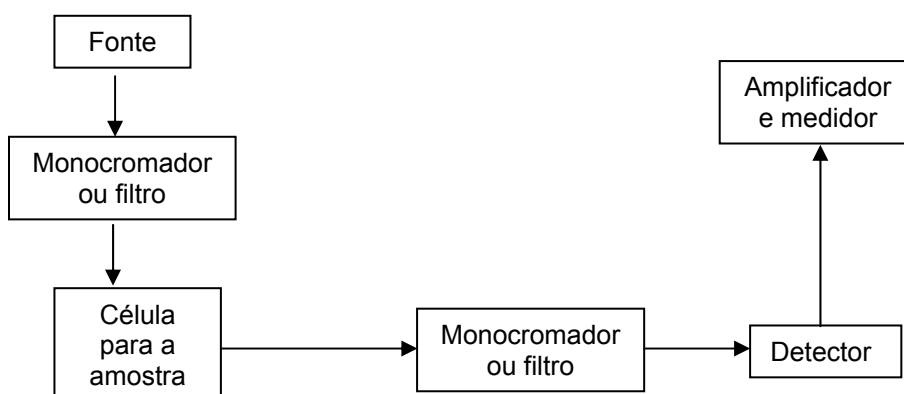


### 1.5.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

Muitos sistemas químicos podem ser excitados pela radiação eletromagnética e reemitir no mesmo ou em outro comprimento de onda. Esses sistemas são denominados fotoluminescentes e dentre esses sistemas pode-se distinguir os fluorescentes.<sup>82</sup>

A intensidade da radiação fluorescente permite determinar quantitativamente vestígios de muitas espécies orgânicas e inorgânicas, tendo o método limites de detecção bastante baixos, geralmente na ordem de  $\mu\text{g/L}$ . Contudo, esta técnica não é tão aplicada como os métodos de absorção porque só um número mínimo de sistemas emite radiação fluorescente.

Os aparelhos utilizados para medir a fluorescência (fluorímetros) são semelhantes aos espectrofotômetros, e necessitam basicamente de uma fonte de radiação que pode ser obtida com o uso de lâmpadas de arco de mercúrio, por exemplo. A radiação da fonte passa através de um monocromador, ou filtro, e em seguida pela amostra. A radiação fluorescente é emitida em todas as direções e é detectada a um ângulo de  $90^\circ$ , em relação ao feixe incidente. A radiação emitida atinge um detector, depois de passar por um sistema de filtros, ou de monocromadores, para selecionar o pico de fluorescência.<sup>82</sup> A figura 19 mostra os principais componentes de um fluorímetro.



**Figura 19:** Diagrama de blocos dos principais componentes de um fluorímetro.

### 1.5.3 Espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massa é uma técnica utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas, além de obter informações sobre a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, da estrutura e composição de superfícies sólidas e das proporções isotópicas de átomos em amostras. Através dessa técnica podem-se obter informações a respeito do peso molecular e de características estruturais da amostra. A detecção de compostos pode ser conseguida através de quantidades pequenas e concentrações muito baixas em misturas quimicamente complexas.<sup>83, 84</sup>

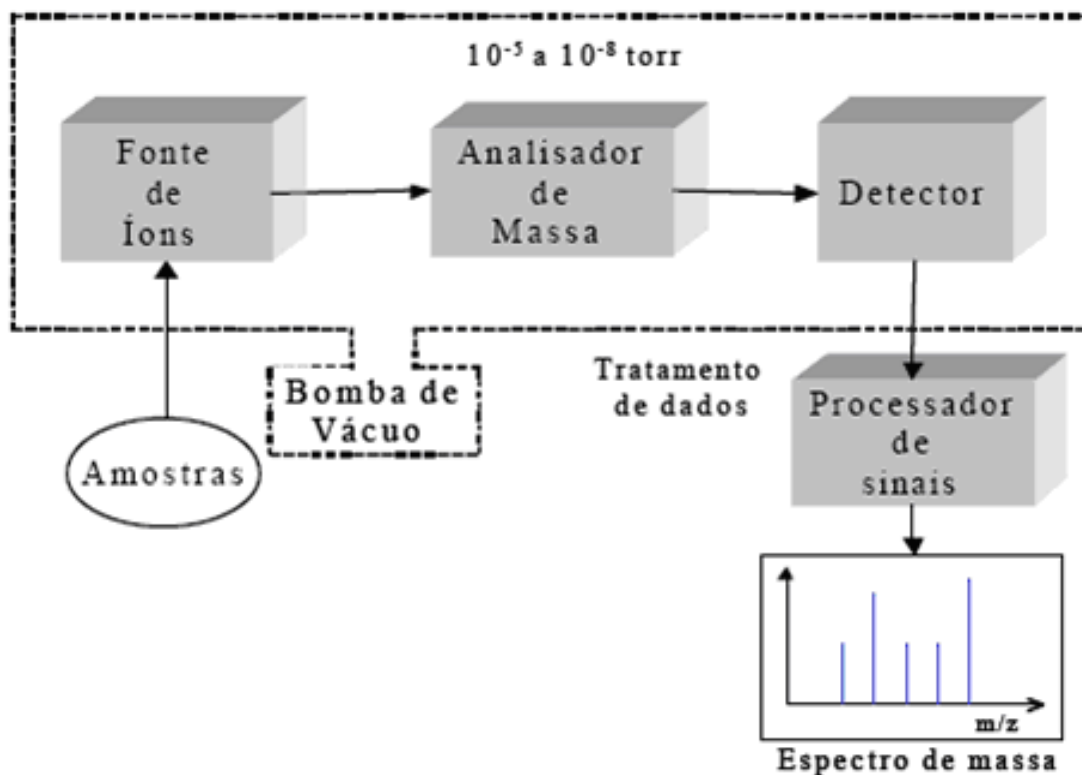
O espectrômetro de massa é um instrumento analítico que converte componentes de uma amostra para íons gasosos (moléculas que são eletricamente carregadas) e mede suas massas.<sup>85</sup> No espectrômetro de massa, os íons são separados baseados em suas razões massa/carga ( $m/z$ ).

A unidade de medida da massa é **u.m.a.** (unidade de massa atômica) ou **Da** (Dalton). Como muitos íons possuem apenas uma carga, o termo  $m/z$  é normalmente chamado de massa, mas essa relação só é verdadeira quando os íons possuem apenas uma carga. Por exemplo, se uma molécula tem massa molecular 1000 Da, o íon  $[M + H]^+$  dessa molécula irá aparecer em 1001 Da, mas se a carga do íon for dois  $[M + 2H]^{2+}$ , o íon terá um  $m/z$  igual a 501.<sup>86</sup>

Nessa técnica há a transferência da energia por uma fonte à amostra para causar a sua ionização. O requisito básico para uma análise por espectrometria de massa é a formação de íons livres em fase gasosa.<sup>84</sup> Esses íons são produzidos por colisões de elétrons, que se movem rapidamente com as moléculas do gás a ser analisado. As colisões entre elétrons e moléculas produzem quase sempre íons positivos em vez de íons negativos, podendo chegar à ordem de 1000:1 em moléculas orgânicas.<sup>85</sup> O alcance e a utilidade do método de espectrometria de massa é ditado pelo processo de ionização. A aparência do espectro de massa de uma espécie molecular é altamente dependente do método de ionização usado. Os agentes ionizantes empregados em espectrometria de massa podem ser distribuídos em duas categorias: as que requerem a amostra em fase gasosa e os agentes que

provocam dessorção em amostras sólidas ou líquidas. A vantagem dos últimos é que são aplicáveis a amostras não voláteis e termicamente instáveis.<sup>84</sup>

Os espectrômetros de massa possuem três componentes principais, como demonstrados na figura 20, a seguir: uma fonte de íons, o analisador de massa e o detector.



**Figura 20:** Principais componentes de um Espectrômetro de massa.

A fonte de íons é o componente responsável pela conversão dos compostos da amostra em íons, dependendo do método de ionização, isso pode ser feito com bombardeamento de elétrons, íons, moléculas e prótons ou com energia térmica/elétrica. Estes íons depois de formados são acelerados em direção ao analisador de massa. Os analisadores dependem em geral da aceleração dos íons por isso, a função do analisador de massa é separar os íons de acordo com a relação massa/carga ( $m/z$ ), e não apenas em função de suas massas. Dependendo do tipo de analisador de massa e de como ele separa os íons, o espectrômetro de massa pode ser classificado em diferentes categorias. Um exemplo seria o ToF (*time-of-flight analyzers*) que é um instrumento que separa os íons baseado no tempo de vôo desses íons em um tubo *flight*.<sup>80</sup> Para separar os íons, o analisador de

massa deverá permitir a passagem de cada íons por um sinal de detecção. Uma vez separados, pelo analisador de massas, os íons são detectados no detector. Após ser detectado, o sinal é processado e analisado pelo usuário.<sup>86</sup>

#### **1.5.4 MALDI ToF-MS**

MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* ou Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser) trata-se de um método que torna possível a vaporização e a ionização de macromoléculas biológicas tais como as proteínas que não são voláteis e que são difíceis de serem ionizadas.<sup>87</sup> Por esse método, essas moléculas passam da fase sólida diretamente para a fase gasosa.<sup>86</sup>

Para a identificação dos compostos presentes na amostra original é necessário a preparação de um MALDI que será introduzido no equipamento. Esse MALDI deve conter o analito (amostra original) misturado ao componente da matriz, que geralmente é constituído por pequenos compostos orgânicos que são cristalizados junto com o analito. Essa mistura é seca em um *probe* de amostra e é carregada no espectrômetro de massa.<sup>86</sup>

Uma radiação a laser é utilizada como fonte para a ionização e a desprotonação no MALDI. A matriz absorve o laser de nitrogênio (luz ultra-violeta, comprimento de onda = 337nm) convertendo-o em energia térmica. Ao mesmo tempo, uma pequena matriz é aquecida rapidamente (frações de nanosegundos) sendo vaporizada com a amostra.<sup>87</sup>

Após essa vaporização, as moléculas da amostra original são ionizadas e transferidas eletrostaticamente para um espectrômetro de massa com tempo-de-vôo (ToF-MS), onde essas moléculas são separadas baseado em suas razões massa/carga ( $m/z$ ) e são analisadas. A alta transmissão e sensibilidade, juntamente com uma gama de massas são algumas vantagens dos instrumentos ToF. A detecção dos íons no final do tubo está baseado em seu tempo de vôo.<sup>86</sup>

### **1.5.5 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)**

Esta técnica fundamenta-se no momento magnético associado à presença de elétrons desemparelhados em uma dada molécula e na observação de transições de elétrons entre os níveis de energia definidos pelas duas orientações do seu spin quando aplicado um campo magnético controlado. É assim utilizada para moléculas que possuem elétrons desemparelhados, já que as demais não geram sinal por possuírem um momento magnético igual a zero.<sup>27</sup> Muitas moléculas biológicas possuem elétrons desemparelhados, mas somente algumas proteínas possuem íons metálicos paramagnéticos em sua estrutura, o que as torna viáveis para análise por esta técnica. Seus elétrons desemparelhados podem demonstrar o estado de spin deste íon pela absorção da energia de microondas na presença de um campo magnético.<sup>27</sup>

Nos estudos por EPR somente o sinal do íon metálico é monitorado, evitando a superposição de outras ressonâncias, passível de ocorrer em outras técnicas que empregam uma metodologia similar, como a Ressonância Nuclear Magnética (NMR).

Essa técnica permite avaliar a estrutura de moléculas biológicas via centro paramagnético e também de várias de suas propriedades. Pode ser utilizada, por exemplo, para a determinação da simetria em que o sítio paramagnético está inserido ou mesmo para comprovar a produção de radicais livres produzidos durante reações de oxirredução.

Para o uso da técnica descrita faz-se necessário o uso do espectrômetro de EPR que consiste na emissão de radiação, com frequência de microondas, em uma amostra, a qual absorve e transmite uma resposta sobre a excitação a um detector. Para obter o espectro de EPR, a amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante cujas dimensões são ajustadas à frequência de microondas utilizada, ficando impossível variar a frequência sem variar as dimensões da cavidade.<sup>2</sup>

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Comparar a capacidade catalítica dos catalisadores contendo ferro, zinco e manganês porfirínicos no processo de degradação de fenol em meio aquoso. Esse estudo pode futuramente ser aplicado em processos de descontaminação dos ambientes que apresentem resíduos de fenol.

### 2.2 Estratégias de estudo:

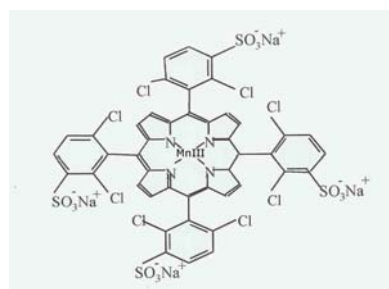
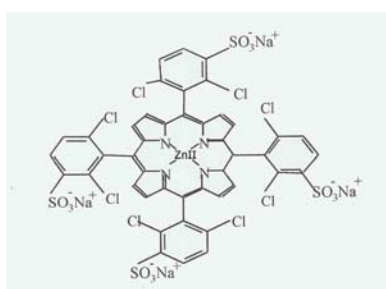
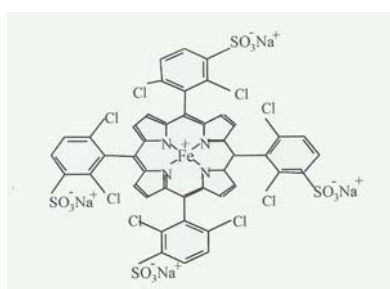
- Analisar a decomposição do fenol com e sem peróxido na presença de citocromo *c* e meio homogêneo (tampão e H<sub>2</sub>O) e, verificar os possíveis produtos formados, identificando-os sempre que for possível. Repetir o procedimento substituindo o citocromo *c* pela MP-11 e pela HRP.
- Analisar a decomposição do fenol com e sem peróxido na presença de citocromo *c* e em SDS e, verificar os possíveis produtos formados, identificando-os sempre que for possível. Repetir o procedimento substituindo o citocromo *c* pelas porfirinas FeTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP, MnTMPyP e FeTMPyP e pela MP-11.
- Analisar a decomposição do fenol com e sem peróxido na presença da MP-11 em CTAB e, verificar os possíveis produtos formados, identificando-os sempre que for possível.
- Analisar a decomposição do fenol com e sem peróxido na presença de FeTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP em tampão fosfato e, verificar os possíveis produtos formados, identificando-os sempre que for possível. Repetir o procedimento substituindo a porfirina acima pelas seguintes porfirinas: ZnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP, (FeTFPP)Cl, MnTDC(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)PP, MnTMPyP e FeTMPyP.
- Incorporar a MP-11 nos poros da sílica mesoporosa MCM-41, resultando em um material que pode ser ativado com peróxidos, degradando assim o fenol.

- Incorporar a MP-11 nos poros da sílica mesoporosa SBA-15, resultando em um material que pode ser ativado com peróxidos, degradando assim o fenol. Repetir o mesmo procedimento substituindo a MP-11 pelo citocromo *c*.
- Incorporar o citocromo *c* na superfície dos nanotubos de TiO<sub>2</sub> e verificar se houve incorporação e degradação do fenol.
- Analisar o comportamento do fenol em suspensão de TiO<sub>2</sub> com e sem presença de peróxidos.
- Verificar os sistemas catalíticos mais eficientes para futuros trabalhos envolvendo a degradação do fenol.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

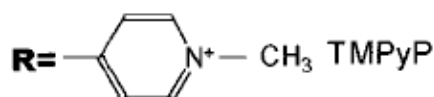
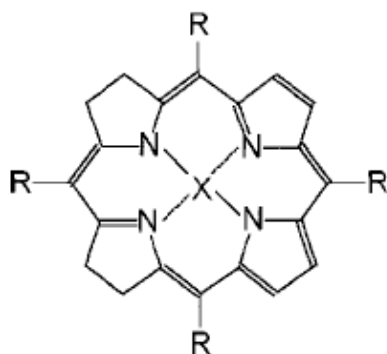
#### 3.1 Reagentes e soluções:

- Microperoxidase-11, adquirida da Sigma Chemical Co. (ST Louis, MO, EUA), MM = 1861,9 g/mol,  $\epsilon_{395} = 1,76 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;
- Citocromo *c*, adquirido da Sigma Chemical Co. (ST Louis, MO, EUA), MM = 12400 g/mol,  $\epsilon_{549} = 0,89 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;
- HPR (tipo VI A), adquirido da Sigma Chemical Co. (ST Louis, MO, EUA), MM = 44000,  $\epsilon_{403} = 1,02 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;
- Porfirinas: **meso-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfonatophenyl) porphyrin**

FeTDC(SO<sub>3</sub>Na)PPZnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PPMnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP

todas doadas pela professora doutora Yassuco Iamamoto do departamento de química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP

- Porfirinas MnTMPyP e FeTMPyP (*meso-tetrakis porphyrins* (TMPyP)), doados pelo professor doutor Marcel Tabak do Instituto de Química de São Carlos – USP.





- Peróxido de hidrogênio, adquirido do LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 34 g/mol. A concentração da diluição das soluções de HOOH foi sempre checada espectroscopicamente usando a  $\varepsilon_{240} = 39,4 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;
- t-Buti hidroperóxido  $[(\text{CH}_3)_3\text{COOH}]$ , adquirido da Sigma Chemical Co. (ST Louis, MO, EUA), MM = 90,12 g/mol, d = 0,94 g/mL, 70%;
- Fenol, adquirido do LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 94,11 g/mol;
- Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), adquirido do LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 98 g/mol, d = 1,7 g/mL, 85,5%;
- Ácido acético ( $\text{H}_3\text{CCOOH}$ ), adquirido da Dinâmica (Ind. Brasileira), MM = 60,05 g/mol, d = 1,05 g/mL, 99,7%;
- Hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), adquirido da F. MAIA S/A Ind. e Com. Divisão Q.M, MM = 35,05 g/mol, d = 0,9 g/mL, 28 – 30%;
- Fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), MM = 138 g/mol, 99,3%, pH 4,2, t = 25°C e dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), MM = 268,1 g/mol, 99,2%, pH = 9,1, t = 25 °C adquiridos da Sigma Chemical Co. (ST Louis, MO, EUA);
- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), adquirido do LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 63,01 g/mol, d = 1,25 g/mL, 64 – 66 %;
- Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), adquirido do LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 40 g/mol;
- Ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ), adquirido do LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 36,5 g/mol;
- Ácido fórmico ( $\text{HCOOH}$ ), adquirido do Carlo Erba Milano (Itália), MM = 46 g/mol, d = 1,22 g/mL, 88%;
- SDS [*sodium dodecyl sulfate* (dodecilsulfato de sódio) –  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}^+$ ], adquirido da Sigma Chemical Co. (ST Louis, MO, EUA), MM = 288,38 g/mol;
- CTAB [*cetyl trimethylammonium bromide* (brometo de cetiltrimetilamônio) –  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$ ], adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e purificado como descrito por Dearden (referência 88), MM = 320 g/mol;
- Cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), adquirido da LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 74,55 g/mol;
- Brometo de potássio ( $\text{KBr}$ ), adquirido da LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 119 g/mol;

- Perclorato de sódio ( $\text{NaClO}_4$ ), adquirido da LabSynth (Diadema, SP, Brasil), MM = 122,55 g/mol;
- Chelex 100 (chelating resin (iminodiacetic acid)), adquirido da Sigma Chemical Co. (ST Louis, MO, EUA);
- Nanotubos de carbono, doados pelo professor doutor Nelson Duran do Instituto de Química de Campinas – UNICAMP.
- Nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , sintetizados pelo grupo do professor doutor Oswaldo L. Alves e doados pelo professor doutor Nelson Duran, ambos do Instituto de Química de Campinas – UNICAMP.
- Sílica mesoporosa MCM-41, gentilmente cedida pelos professores Francisco L. Castro, Glauber J. T. Fernandes (Centro de Tecnologia do Gás) e pelos professores Valter J. Fernandes Jr, Antônio S. Araújo (UFRN);
- Sílica mesoporosa SBA-15, gentilmente cedida pelos professores Francisco L. Castro, Glauber J. T. Fernandes (Centro de Tecnologia do Gás) e pelos professores Valter J. Fernandes Jr, Antônio S. Araújo (UFRN);

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (trocaador de íons de leito misto, Millipore) e o pH foi medido usando um eletrodo combinado de vidro (Orion Glass pH SURE-FLOW™). O eletrodo de referência (ROSS™, modelo 8102) foi preenchido com Orion Filling Solution (ROSS™). O pHmetro foi calibrado usando solução tampão padrão METREPAK pHydriion (Brooklyn, NY).

### **3.2 Metodologia**

Os estudos foram realizados em meio homogêneo, em micelas e em nanopartículas. O centro ativo dos catalisadores estava exposto ao meio ou contidos em nanotubos, nanopartículas, peptídeos e proteínas e foram previamente ativados por peróxido de hidrogênio ( $\text{HOOH}$ ) e t-butil hidroperóxido (t-BuOOH).

### **3.3 Preparo das soluções**

#### **Tampão Fosfato**

Preparado a partir de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e de fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Para preparar 50 mL de solução 5 mmol/L, pH = 7,4, foram adicionados 7,6 mg de fosfato de sódio monobásico (22%) e, 52,3 mg de fosfato de sódio dibásico em um balão volumétrico. Foi adicionado água deionizada até o volume de 50 mL. A solução foi ajustada para o pH = 7,4 utilizando soluções de NaOH 0,1 mol/L e HCl 0,1 mol/L e leituras no pHmetro. O tampão foi armazenado sob refrigeração.

#### **Tampão Universal**

Preparado a partir de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), ácido acético ( $\text{H}_3\text{CCOOH}$ ) e, hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Para preparar 300 mL de solução estoque 50 mmol/L, foram adicionados em um béquer de 500 mL: 296,1 mL de água deionizada (medido em uma proveta), 1 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,9 mL de  $\text{H}_3\text{CCOOH}$  e 2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (os reagentes foram medidos em pipetas). A solução foi agitada e separada em alíquotas. Essas alíquotas receberam mais água deionizada até adquirir a concentração necessária para os trabalhos e o ajuste do pH foi feito utilizando soluções de NaOH 0,1 mol/L e HCl 0,1 mol/L e leituras no pHmetro. O tampão foi armazenado sob refrigeração.

#### **Purificação do Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) e preparação das amostras de MP-11.**

Para a purificação foram dissolvidos 5,0 g de CTAB em 42,5 mL de acetona, sob aquecimento e agitação, no momento do refluxo, foram adicionados 7,5 mL de etanol em alíquotas até obter uma solução translúcida, após filtrada, a solução ficou

em repouso para evaporação do solvente. O precipitado foi filtrado a vácuo, e lavado com acetona, depois de filtrado o CTAB estava cristalino e purificado.<sup>2</sup>

Após a purificação, o estoque de CTAB foi preparado dissolvendo-se o CTAB em tampão fosfato (pH=7,4; 5 mmol/L) para uma concentração estoque de 30 mmol/L. As amostras de CTAB/MP-11 foram preparadas a partir das suas concentrações micelares críticas – CMC. Duas soluções de 20 mmol/L de CTAB em tampão fosfato foram preparadas. Uma com a adição de 3 µmol/L de MP-11 (pois nessa concentração não há formação de micelas) e, outra com a adição de 33 µmol/L de MP-11 (pois nessa concentração há formação de micelas).<sup>2</sup> A solução foi armazenada sem refrigeração e para as análises foram adicionados ao meio 20 µmol/L de t-BuOOH e 100 µmol/L de fenol.

### **Solução de SDS em tampão fosfato**

Para preparar 20 mL de solução estoque de SDS ( dodecil sulfato de sódio) 30 mmol/L, foram pesados 173 mg de SDS e adicionados em um béquer contendo 20 mL de água deionizada (medida em uma proveta). A solução foi agitada e armazenada sem refrigeração.

As análises com citocromo *c* foram feitas adicionando-se 2,5 µmol/L de citocromo *c* em SDS 30 mmol/L. A essa solução foram adicionados também 25 µmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 100 µmol/L de fenol.

Para as porfirinas MnTMPyP e FeTMPyP, a solução de SDS foi preparada na concentração de 60 mmol/L e foram adicionados 100 µmol/L de porfirina. A essas soluções foram adicionados 1 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 500 µmol/L de fenol. A porfirina FeTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP foi preparada adicionando-se 100 µmol/L de porfirina a SDS (concentrações: 30 mmol/L, 15 mmol/L e 3 mmol/L) a essa solução foram adicionadas 1 mmol/L de t-BuOOH e 500 µmol/L de fenol.

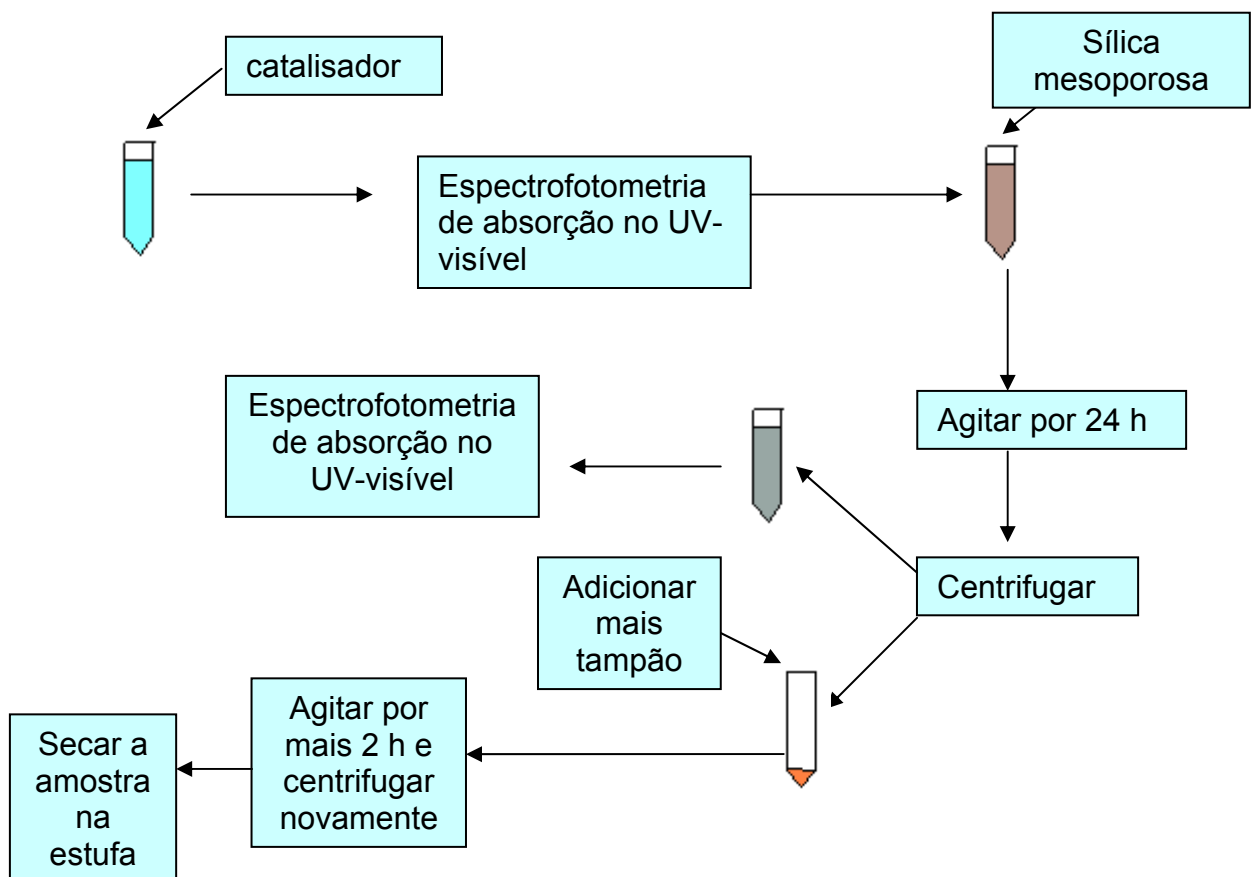
As amostras de MP-11 foram preparadas adicionando-se 2,5 µmol/L à solução de SDS (30 mmol/L). As análises foram realizadas adicionando-se 100 µmol/L de t-BuOOH e 100 µmol/L de fenol.

### Solução de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ )

Para preparar 100 mL de  $\text{HNO}_3$  2,5 mol/L, adicionou-se 19,7 mL de  $\text{HNO}_3$  em um béquer contendo 80,3 mL de água deionizada. A solução foi agitada e armazenada sem refrigeração.

### Incorporação em sílicas mesoporosas (MCM-41 e SBA-15)

A MP-11 foi incorporada à MCM-41 em tampão universal (10 mmol/L) nos seguintes valores de pH: 5,0; 6,0; 7,0; 7,5; 8,0 e 9,0 e seguiu a seqüência apresentada na figura 21, abaixo.



**Figura 21:** Incorporação dos catalisadores nas sílicas mesoporosas MCM-41 e SBA-15.

Para essa incorporação foi medido um volume de 3,5 mL de suspensão de MCM-41 (1mg/mL) com 58  $\mu\text{mol/L}$  de MP-11 (prática repetida para todos os valores de pH). A suspensão foi agitada por 24 horas em um agitador Labquake e centrifugada a 6000 RPM, 20 °C e 15 minutos para a retirada do sobrenadante. O precipitado (MP-11/MCM-41) foi lavado três vezes nos tampões com os valores de pH mencionados acima, sendo que, em cada lavagem, as suspensões foram agitadas por aproximadamente 8 horas e centrifugadas (nas condições já mencionadas) para a retirada do sobrenadante. Ao final desse procedimento, esse composto foi seco em uma estufa a 60 °C e, observou-se que a melhor incorporação foi em pH 5,0 e a massa final de MP-11 incorporada na sílica mesoporosa nesse pH foi estimado em 60  $\mu\text{mol/L}$  do peptídeo /mg de MCM-41.

O processo foi repetido para incorporar as porfirinas MnTDC(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)PP, MnTMPyP e FeTMPyP à MCM-41 porém, os valores de pH do tampão foram de 5, 7,5 e 9, onde verificou-se uma melhor incorporação em pH mais ácido. No caso da HRP, utilizamos a concentração inicial de 30  $\mu\text{mol/L}$  e os valores de pH foram 5, 6 e 7. Ao contrário das demais incorporações, a incorporação com HRP não foi muito eficiente pois grande parte da peroxidase continuou em solução.

O processo foi repetido substituindo a sílica mesoporosa MCM-41 pela sílica mesoporosa SBA-15.

### **3.4 Técnicas analíticas utilizadas**

#### **3.4.1 Estudo cinético da degradação do fenol usando espectrofotometria UV-visível**

As absorvâncias das amostras foram registradas no espectrofotômetro Shimadzu Model1501 MultiSpec (Tokio, Jp). A resolução espectral foi em torno de 0,5 nm e os espectros obtidos com um tempo de intervalo de 1 segundo durante o tempo necessário para a catálise. O comprimento do caminho óptico foi 0,1 cm para as medidas das porfirinas e 1 cm para as demais medidas . A absorvância foi

medida em 270 nm, que representa o comprimento de onda de absorção máxima do Fenol.

### **Citocromo c**

Para a análise da capacidade catalítica do citocromo *c* na degradação do fenol foram utilizados os seguintes sistemas: i) citocromo *c* (2,5 µmol/L) em água com posterior adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/L) e de fenol (100 µmol/L); ii) citocromo *c* (2,5 µmol/L) em tampão universal (5 mmol/L, pH 7,5) com posterior adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/L) e de fenol (100 µmol/L); iii) citocromo *c* (2,5 µmol/L) em SDS (30 mmol/L) com posterior adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/L) e de fenol (100 µmol/L); iv) citocromo *c* incorporado em SBA-15. Para utilizar essa resina incorporada foi preparado uma suspensão estoque a partir de 3,5 mg da zeólita ressuspensa em 1,5 mL de tampão universal pH 9,0, 5 mmol/L. Dessa suspensão foram retirados 100 µL para a catálise que ocorreu em tampão universal (5 mmol/L, pH 9,0) com volume final de 1 mL. A essa nova suspensão foram adicionados 100 µmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e após a formação do Composto II, foram adicionados também 100 µmol/L de fenol; v) citocromo *c* adsorvido em nanotubos de TiO<sub>2</sub>. Para utilizar esses nanotubos também foi necessário ressuspendê-los em tampão universal só que dessa vez o pH trabalhado foi 10,0 (5 mmol/L) e a massa de citocromo *c*/TiO<sub>2</sub> foi 1,0 mg em 1,0 mL de tampão universal. Dessa suspensão foram retirados 100 µL para a catálise que ocorreu em tampão universal (5 mmol/L, pH 10,0) com volume final de 1 mL. A essa nova suspensão foram adicionados 100 µmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e após a formação do Composto II, foram adicionados também 100 µmol/L de fenol.

O mesmo procedimento foi realizado para todos os sistemas sem a presença de peróxidos. O sistema citocromo *c* em H<sub>2</sub>O também foi testado substituindo-se o peróxido de hidrogênio para o t-BuOOH.

### **TiO<sub>2</sub>**

Para utilizar esses nanotubos foi feito uma suspensão estoque seguindo o mesmo procedimento dado ao citocromo *c* acrescido de TiO<sub>2</sub>. Dessa suspensão

foram retirados 100  $\mu\text{L}$  para a catálise que ocorreu em tampão universal (5 mmol/L, pH 10,0) com volume final de 1 mL. A essa nova suspensão foi adicionado apenas o fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e essa suspensão foi deixada sob luz UV em baixo comprimento de ondas por 1 hora sob agitação e as leituras foram registradas no espectrofotômetro.

O procedimento foi repetido mudando-se para o comprimento de ondas alto.

## Porfirinas

**FeTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP:** Para analisar a capacidade catalítica dessa porfirina na degradação do fenol foram utilizados os seguintes sistemas: i) porfirina (100,0  $\mu\text{mol/L}$ ) em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com posterior adição de t-BuOOH (1 mmol/L) e de fenol (500  $\mu\text{mol/L}$ ); ii) porfirina (100,0  $\mu\text{mol/L}$ ) em SDS (30 mmol/L) com posterior adição de t-BuOOH (1 mmol/L) e de fenol (500  $\mu\text{mol/L}$ );

As análises foram repetidas sem a presença do peróxido.

**(FeTFPP)Cl, ZnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP:** Foi analisado apenas a amostra com porfirina (100,0  $\mu\text{mol/L}$ ) em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com posterior adição de t-BuOOH (1,5 mmol/L) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ).

Após essa cinética foi adicionado mais fenol para atingir a concentração de 500  $\mu\text{mol/L}$  e houve uma nova cinética para verificar se há degradação do fenol.

**MnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP:** Foi analisado apenas a amostra com porfirina (100,0  $\mu\text{mol/L}$ ) em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com posterior adição de t-BuOOH (1,5 mmol/L) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ).

A análise foi repetida sem a presença do peróxido.

**FeTMPyP e MnTMPyP:** Foram analisados os seguintes sistemas: i) porfirina (100  $\mu\text{mol/L}$ ) em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com posterior adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (500  $\mu\text{mol/L}$ ); ii) porfirina (100  $\mu\text{mol/L}$ ) em SDS (60 mmol/L) com posterior adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (500  $\mu\text{mol/L}$ ).



## HRP

Para analisar a capacidade catalítica da HRP na degradação do fenol foi analisada a amostra contendo HRP (5,0  $\mu\text{mol/L}$ ) em formiato de amônio com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) e de fenol (100  $\mu\text{M}$ ).

## MP-11

Para a análise da capacidade catalítica da MP-11 na degradação do fenol foram utilizados os seguintes sistemas: i) MP-11 (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em água deionizada com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ); ii) MP-11 (0,9  $\mu\text{mol/L}$ ) em CTAB (20 mmol/L) com posterior adição de t-butil (20  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ); iii) MP-11 (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em SDS (30 mmol/L) com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ); iv) MP-11 (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em SDS (30 mmol/L) com posterior adição de t-BuOOH (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ); v) MP-11 incorporado em SBA-15. Para utilizar essa resina incorporada foi preparado uma suspensão estoque a partir de 3,5 mg da zeólita (utilizei a incorporada em pH 5,0, pois foi a que melhor incorporou) ressuspensa em 1,5 mL de tampão universal pH 7,5, 10 mmol/L. Dessa suspensão foram retirados 100  $\mu\text{L}$  para a catálise que ocorreu em tampão universal (10 mmol/L, pH 7,5) com volume final de 1 mL. A essa nova suspensão foram adicionados 100  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e após a formação do Composto II, foram adicionados também 100  $\mu\text{mol/L}$  de fenol; o mesmo procedimento foi repetido substituindo-se o  $\text{H}_2\text{O}_2$  por t-BuOOH; vi) suspensões de MP-11/MCM-41. Para essas suspensões foi adotada a mesma técnica descrita para a sílica mesoporosa SBA-15, utilizando tanto o peróxido de hidrogênio quanto o t-BuOOH.

### 3.4.2 Espectrofotometria UV-visível de amostras no estado sólido

Foram preparadas amostras sólidas com MP-11/MCM-41 incorporada em pH 5,0 (que teve maior incorporação) em KBr. Essa mistura MP-11/MCM-41 + KBr foi

triturada e pressionada para formar pastilhas. Os valores da absorbância foram lidos e salvos no espectrofotômetro Varian Carry 50 UV-visible, na região de 200 a 800 nm. O Composto II foi obtido quando repetimos esse processo e adicionamos 1  $\mu\text{L}$  de solução de HOOH (1 mmol/L) logo após a trituração da amostra. Após a adição do peróxido, a amostra foi pressionada até virar uma pastilha e sua absorbância foi medida novamente no espectrofotômetro mencionado acima.

### 3.4.3 Medidas da intensidade da Fluorescência

Foram preparadas amostras com porfirinas (ZnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP, (FeTFPP)Cl, MnTMPyP e FeTMPyP) em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4), peróxidos e fenol para verificar a degradação do fenol pela queda na sua intensidade de fluorescência. Para isso, todas as amostras continham a porfirina a ser analisada a 25  $\mu\text{mol/L}$ , os peróxidos a 250  $\mu\text{mol/L}$  e o fenol a 100  $\mu\text{mol/L}$ .

A intensidade da fluorescência foi medida e registrada no Espectrofluorímetro Hitachi F2500 (Tóquio, Jp), utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de excitação em 272 nm, comprimento de fluorescência medido no intervalo de 280 a 500 nm, velocidade da leitura em 300 nm/min com intervalo dos dados de 1 nm, voltagem em 400 V e fenda nos dois comprimentos fixada em 5 nm. O comprimento do caminho óptico foi 1 cm em todas as medidas.

### 3.4.4 Análise das amostras de ferro Heme por EPR

As medidas diretas no EPR das soluções e pastilhas de KBr com MP-11/MCM-41 foram obtidas em um Bruker ELEXSYS EPR system E-580 sob as seguintes condições: ganho  $5 \times 10^3$ , modulação de amplitude 1,0 mT, potência de microondas 4mW, temperatura 4K, constante de tempo 20,48 ms e tempo de conversão 81,92 ms. Após misturar, as soluções foram rapidamente introduzidas no tubo de quartzo do EPR que foi previamente resfriado com nitrogênio líquido. Para analisar as pastilhas de KBr, as amostras foram trituradas e adicionadas ao tubo de quartzo previamente resfriado com nitrogênio líquido, 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de

hidrogênio 0,1mmol/L foi adicionado em seguida e, após congelada, a amostra analisada.

### 3.4.5 Análise do espectro de massa por ionização eletrospray (ESI)

Foram analisados produtos das seguintes reações: i) FeTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP com t-butil e fenol em meio SDS; ii) HRP com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fenol em H<sub>2</sub>O; iii) citocromo c com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fenol em SDS; iii) MP-11 com t-butil e fenol em meio CTAB; iv) MnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP com t-butil e fenol em H<sub>2</sub>O; v) citocromo c/TiO<sub>2</sub> com e sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com fenol em Tampão Universal pH 10; vi) citocromo c/SBA-15 com t-BuOOH e com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fenol em Tampão Universal pH 9,0; vii) MP-11/SBA-15 com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fenol em Tampão Universal pH 7,5. A análise dos compostos foi obtida pelo Espectrômetro de massa Quattro II Micromass com Z-spray<sup>TM</sup> fonte íon (Manchester, UK). As massas dos derivados do fenol foram adquiridas pela ionização eletrospray (ESI) no modo íon negativo. Os parâmetros do aparelho foram: fonte e temperatura de solvatação em 100 e 200°C, respectivamente, voltagem do cone da amostra a 5, 10, 30 e 50 V, voltagem do cone da extração a 10 V potencial de capilaridade em 4,5 kV. Os dados de scan máximo foram adquiridos abaixo de uma gama de massa de 50-500 m/z. Os dados foram processados com um Mass Lynx NT data system, Versão 3.2 (Micromass, Manchester, UK). As amostras foram separadas em uma coluna LC-18-DB Supelcosil (Supelco, 30 cm x 4,6 mm, 5 µm) usando trietilamina 0,05 (solvente A) e metanol (solvente B) em 270 nm. A taxa de fluxo usada foi 1 mL/min o gradiente linear foi de 5% a 95% do solvente B durante 30 minutos, 95% do solvente B por 5 minutos e de 95% a 5% do solvente B até 40 minutos.

O produto da reação da MP-11/MCM-41 com HOOH e fenol foi analisado no mesmo aparelho. A massa dos derivados do fenol foi adquirida pela ionização eletrospray (ESI) no modo íon positivo. Os parâmetros do aparelho foram: fonte e temperatura de solvatação em 100 e 200°C, respectivamente, voltagem do cone da amostra a 50 V, voltagem do cone da extração a 4 V potencial de capilaridade em 4 kV. Os dados de scan máximo foram adquiridos abaixo de uma gama de massa de 100-300 m/z. Os dados foram processados com um Mass Lynx NT data system,

Versão 3.2 (Micromass, Manchester, UK). As amostras foram separadas em uma coluna LC-18-DB Supelcosil (Supelco, 30 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) usando TFA 0,1% (solvente A) e acetonitrila-TFA 0,1% (8:2. v/v) (solvente B) em 270 nm. A taxa de fluxo usada foi 1 mL/min o gradiente linear foi de 5% a 95% do solvente B durante 30 minutos, 95% do solvente B por 5 minutos e de 95% a 5% do solvente B até 40 minutos.

### **3.4.6 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Tempo de Vôo (TOF) Espectro de Massa (MS)**

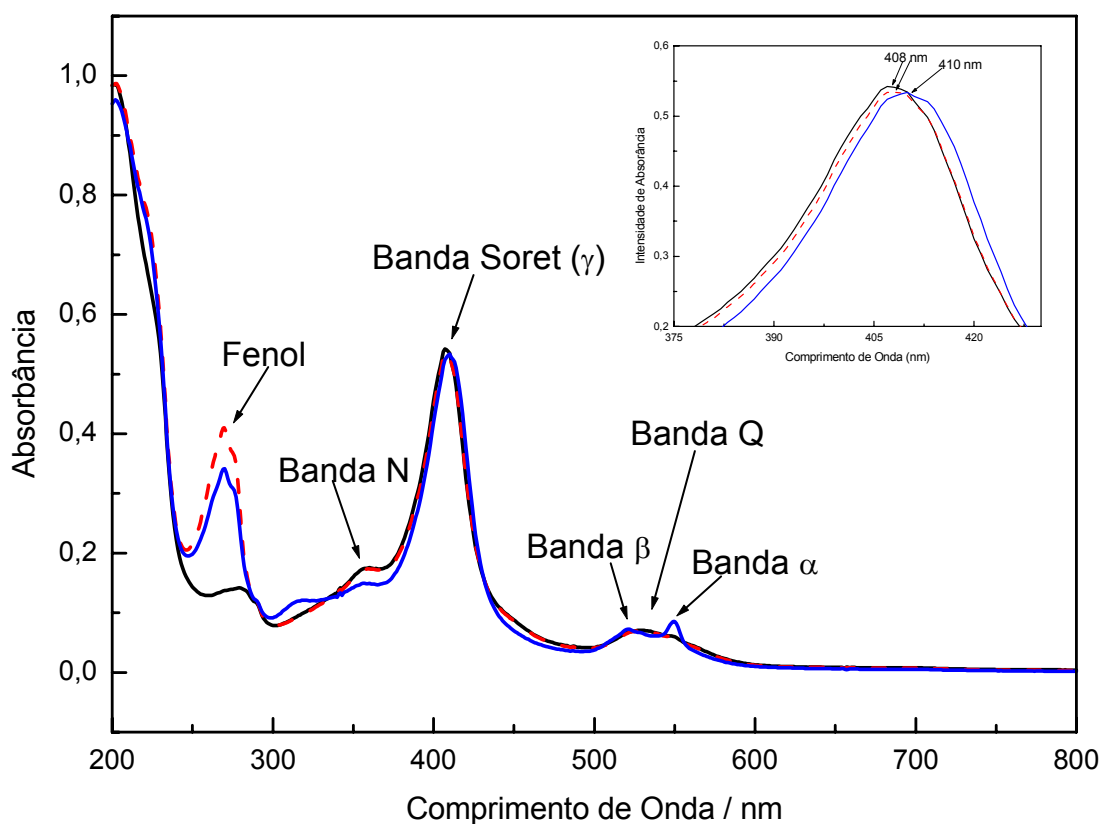
Após a reação catalítica da MP-11/MCM-41 com HOOH e fenol, a MP-11 foi extraída da sílica MCM-41 com o aumento do valor de pH e foi analisada usando um Ettan MALDI-TOF Pro system equipado com um *quadratic-field reflectron* e um medidor de tempo para passagem de íons. A identificação da proteína foi conduzida no modo *reflectron*, com ionização positiva a 20 kV. As amostras foram, nesse caso, misturadas com um volume de 50% de acetonitrila e 0,5% de ácido trifluoracético saturado com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxiciânico. Uma alíquota de 0,5  $\mu$ L da mistura contendo 8 pmol de proteína foi colocada sobre o aço inox do MALDI *slides* para análise. A calibração externa foi feita antes com a identificação da proteína AngIII e hACTH-(18-36). Os dados foram analisados usando o Ettan MALDI-ToF Pro software system.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Citocromo *c*

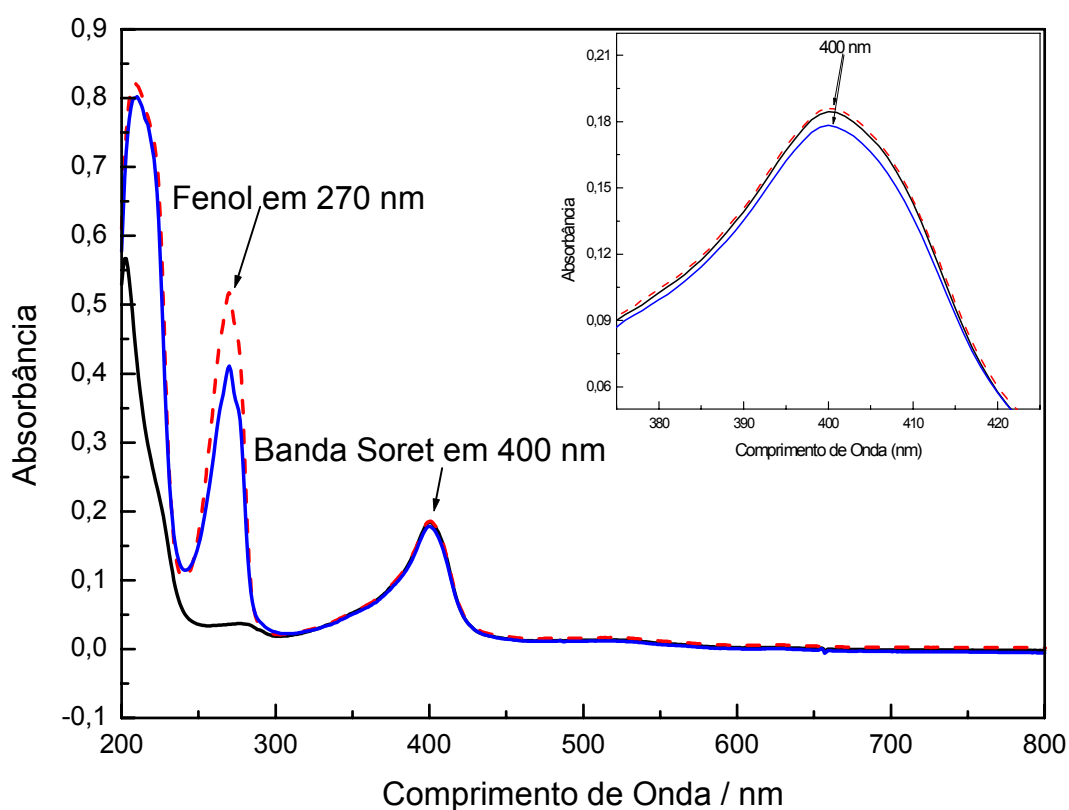
Será apresentado o espectro característico do citocromo *c* e do fenol. A figura 22 mostra três espectros da reação do citocromo *c* com fenol. O espectro na cor preta mostra o citocromo *c* em sua forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) antes da adição do fenol. Observa-se que nessa forma o citocromo *c* não possui banda  $\alpha$ . O espectro na cor vermelha tracejada mostra a entrada do fenol na solução e sua banda característica em 270 nm. Nesse espectro o citocromo *c* ainda conserva sua forma oxidada, mas já começa a se deslocar para a região do vermelho, indo para sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Após 1 hora de reação temos o espectro em azul que mostra o citocromo *c* em sua forma reduzida. Essa forma é marcada pela mudança na banda N e pelo aparecimento da banda  $\alpha$  em 550 nm. Durante a reação o citocromo *c* conservou a sua forma hexacoordenada com a presença dos dois ligantes axiais, Histidina 18 e Metionina 80, pois durante toda a reação a banda Soret se encontrou na faixa de 350-490 com máxima intensidade da Banda Soret ao redor de 410 nm (inserto), refletindo assim o seu estado baixo *spin*, característico do ferro hemínico.

Esses tipos de espectros também foram observados em todas as reações de citocromo *c* em meio homogêneo.



**Figura 22:** Espectros indicando as bandas do citocromo *c* e do fenol em água. Espectro preto: citocromo *c* em sua forma nativa ( $\text{Fe}^{3+}$ ); espectro cor vermelha tracejada: citocromo *c* com fenol (banda em 270 nm); espectro na cor azul: citocromo *c* com banda  $\alpha$ , característica da sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Inseto: banda Soret ao redor de 410 nm, característico do citocromo *c* em seu estado baixo *spin*, característico do ferro hemínico.

Em meio heterogêneo com SDS o citocromo *c* perde a coordenação com a Metionina 80 e torna-se pentacoordenado, sendo convertido para a forma alto *spin* (figura 23). Isso é visualizado através da banda Soret do citocromo *c* que sofre um deslocamento para a região do azul em cerca de 10 nm indo de 410 para 400 nm, como pode-se observar no inserto. Apesar dessas alterações na banda Soret do citocromo *c*, a banda do fenol continua no mesmo comprimento de onda, como pode-se observar nos espectros vermelho (logo após a adição do fenol) e azul (após 1 hora de reação).

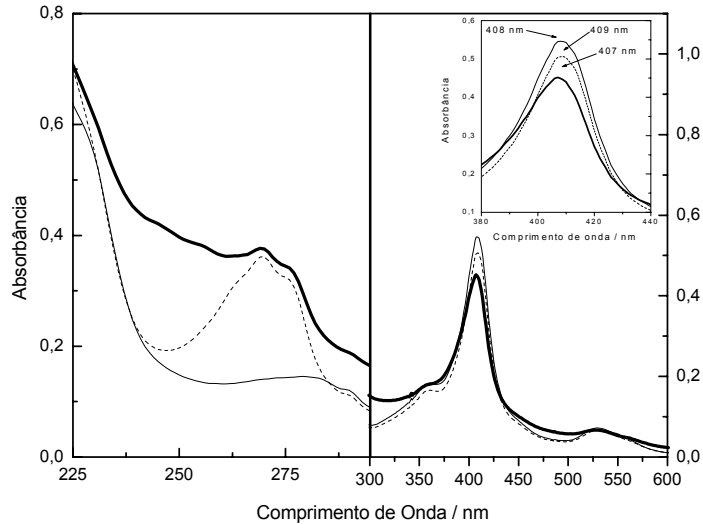


**Figura 23:** Citocromo *c* em SDS (30 mM) apresenta-se em sua forma *alto spin* (400 nm). Apesar desse deslocamento da banda da proteína, o fenol continua com sua banda no mesmo comprimento de onda.

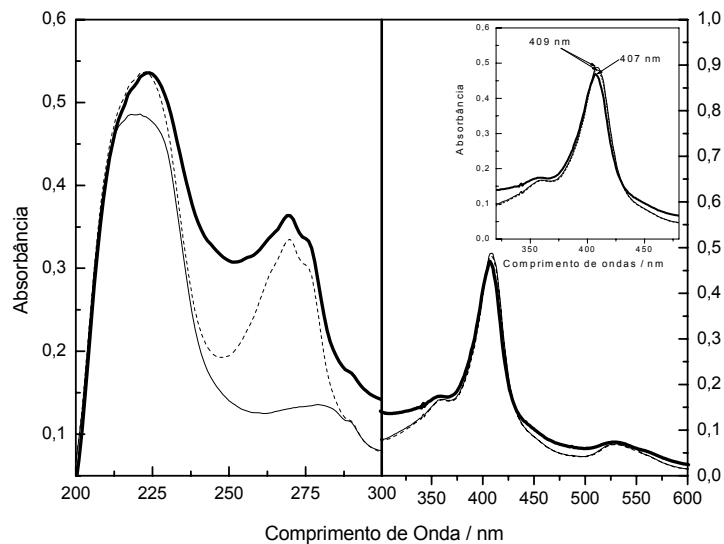
As figuras 24, 25, 26, 27 e 28 referem-se às mudanças espectrais do citocromo *c* no decurso da reação com fenol em presença de peróxido de hidrogênio.

Após analisar os espectros UV-visível do citocromo *c* em meio homogêneo (não tamponado e tampão universal) e em meio heterogêneo (SDS, SBA-15 e TiO<sub>2</sub>) em diferentes valores de pH com peróxido de hidrogênio, pode-se observar que em todos os casos parece ter havido degradação do fenol, pois houveram mudanças espectrais em 270 nm, região de absorção desse composto. Porém, em água (figura 24) foi observado um *bleaching* (mudança na intensidade da absorbância do cromóforo) mais intenso na banda Soret do citocromo *c* em comparação ao meio

tampão universal (figura 25), sugerindo que o meio tamponado deve propiciar uma vida útil mais longa para o catalisador.



**Figura 24:** Citocromo *c* (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em água com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Os espectros mostram apenas o citocromo *c* em  $\text{H}_2\text{O}$  (linha sólida fina), após a adição do fenol (linha tracejada) e uma hora após a reação (linha sólida grossa).



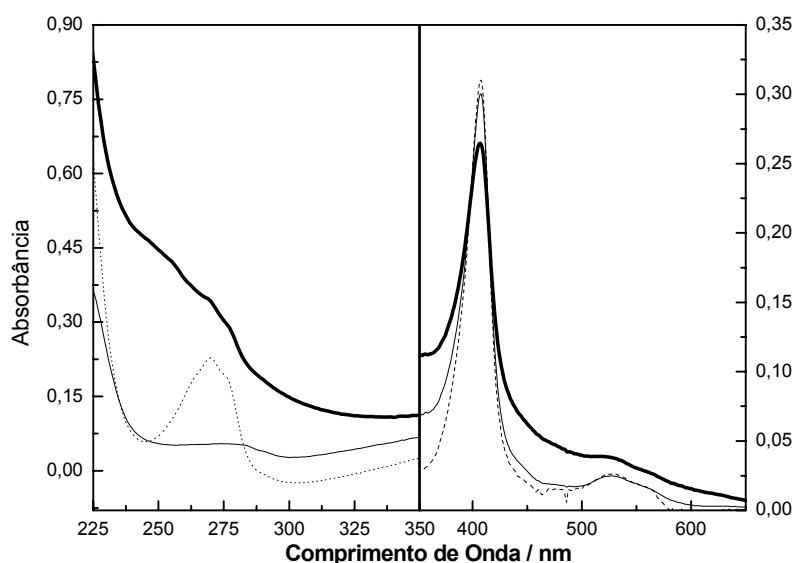
**Figura 25:** Citocromo *c* (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em tampão universal (5 mmol/L, pH 7,5) com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Os espectros mostram apenas o citocromo *c* em tampão universal (linha sólida fina), após a adição do fenol (linha tracejada) e uma hora após a reação (linha sólida grossa).

Em meio heterogêneo não deu para verificar a presença das bandas N e Q, devido à turbidez do meio, mas, pode-se observar, como já era esperado, que em SDS o citocromo *c* passa da forma baixo *spin* para a forma alto *spin*, com desvio da



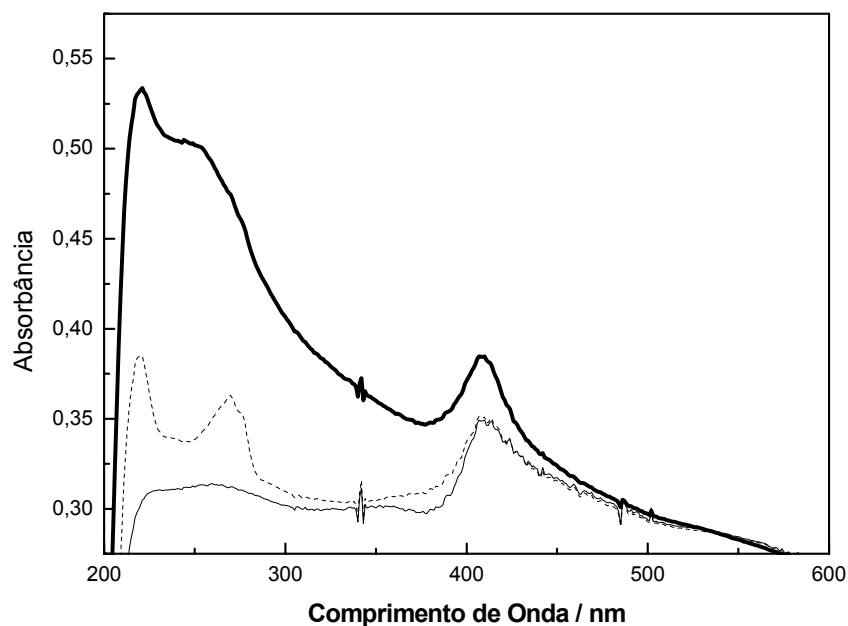
banda Soret para região espectral do azul. Os demais meios mantiveram o citocromo *c* em sua forma baixo *spin*.

A figura 26 mostra o citocromo *c* em meio SDS (30 mmol/L) e parece que nesse sistema houve uma degradação muito acentuada do fenol com pouco *bleaching* da banda Soret do citocromo *c*, o que pode sugerir que esse pode ser um sistema onde poderemos utilizar várias vezes o mesmo catalisador sem degradá-lo.



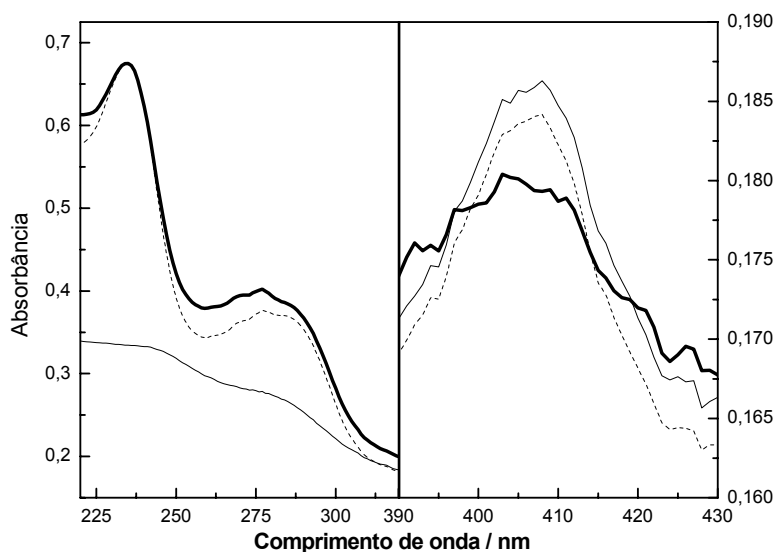
**Figura 26:** Citocromo *c* (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em SDS (30 mmol/L) com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Os espectros mostram apenas o citocromo *c* em SDS (linha sólida fina), após a adição do fenol (linha tracejada) e uma hora após a reação (linha sólida grossa).

Em SBA-15 (figura 27), observa-se que apesar da turbidez do meio, a banda do fenol em 270 nm também modificou bastante. Nesse caso o pico característico do fenol em 270 nm subiu muito, o que pode ser um sinal de que boa parte desse material degradou. Não dá para saber se houve ou não muito *bleaching* da banda Soret do citocromo *c* nesse caso, pois trata-se de um sistema em suspensão onde fica difícil analisar a diminuição na intensidade das suas bandas, mas como parece ter ocorrido degradação do fenol, esse poderia ser um bom sistema para ser utilizado, uma vez que a proteína está incorporada e pode ser removida por centrifugação e reaproveitada.



**Figura 27:** Citocromo *c* (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em SDS (30  $\text{mmol/L}$ ) com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Os espectros mostram apenas o citocromo *c* em SBA-15 (linha sólida fina), após a adição do fenol (linha tracejada) e uma hora após a reação (linha sólida grossa).

No caso da figura 28, onde temos citocromo *c* adsorvido em nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , pode-se observar que mesmo com uma quantidade menor de catalisador parece que ainda houve a degradação do fenol, pois houve mudança na sua banda. Não dá para saber se houve ou não *bleaching* muito acentuado, pois o meio estava muito turvo. O inserto da figura mostra um possível *bleaching* da banda Soret do citocromo *c*, porém ainda serão necessárias novas análises para ter certeza se realmente há esse *bleaching*.



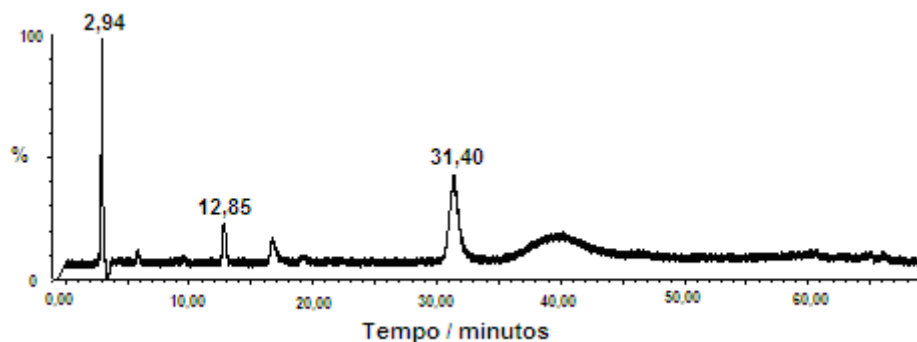
**Figura 28:** Citocromo *c* adsorvido em nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . Os espectros mostram apenas o citocromo *c* adsorvido em nanotubos de  $\text{TiO}_2$  em tampão universal (linha sólida fina), após a adição do fenol (linha tracejada) e uma hora após a reação (linha sólida grossa).

Os mesmos sistemas foram testados sem a presença de peróxidos e, parece que não houve degradação de fenol, pois não houve mudanças em sua banda.

Mudando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para o  $t\text{-BuOOH}$ , parece que também não houve degradação do fenol pois novamente não surgiram mudança no espectro UV-visível que indicaria a presença de novos produtos (não mostrado).

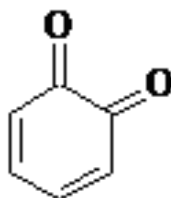
Após a catálise registrada no espectrofotômetro UV-visível, as amostras foram congeladas e submetidas à técnica de espectrometria de massa no intuito de verificar se há novos compostos de degradação e se há a possibilidade de sua identificação. Para isso, as amostras foram previamente submetidas à técnica de HPLC para a separação dos compostos.

- Citocromo *c* +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + fenol em  $\text{H}_2\text{O}$ : após a injeção de trietil amina 0,05% (A) e metanol/trietilamina 0,05% (8:2, v/v) (B) na fase móvel, apareceram três picos no espectro. Um em 2,94 minutos, um em 12,85 minutos e outro em 31,4 minutos (figura 29).

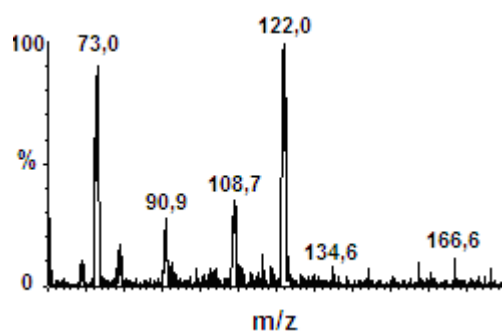


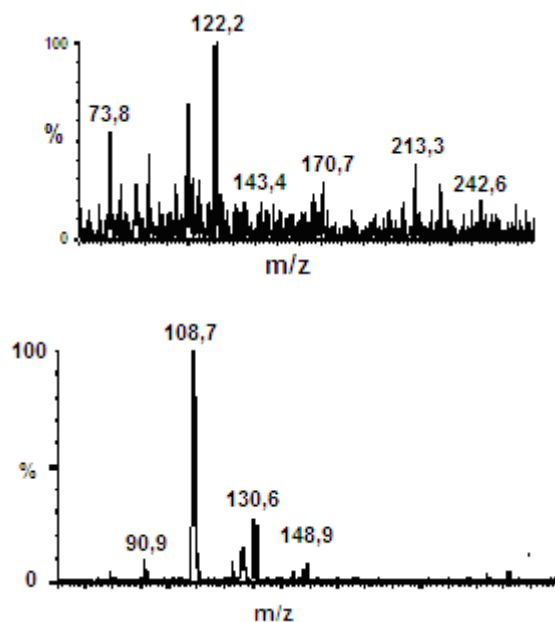
**Figura 29:** Cromatograma indicando a saída dos produtos pelo HPLC nos tempos de 2,98, 12,85 e 31,4 minutos.

O espectro de massa detectou os picos abaixo (figura 30). O primeiro espectro corresponde ao tempo de 2,94 minutos e surgiram os picos de  $m/z$  73,0; 90,9; 108,7; 122,0 e outros muito pequenos que podem inclusive ser ruídos. O segundo espectro corresponde ao tempo de 12,85 minutos e apresentou os picos  $m/z$  73,8; 122 e outros menos intensos e, o terceiro espectro corresponde ao tempo 31,4 e apresentou o pico com  $m/z$  108,8. Esse  $m/z$  108,8 pode ser atribuída à molécula abaixo, como sugerido na referência 89.



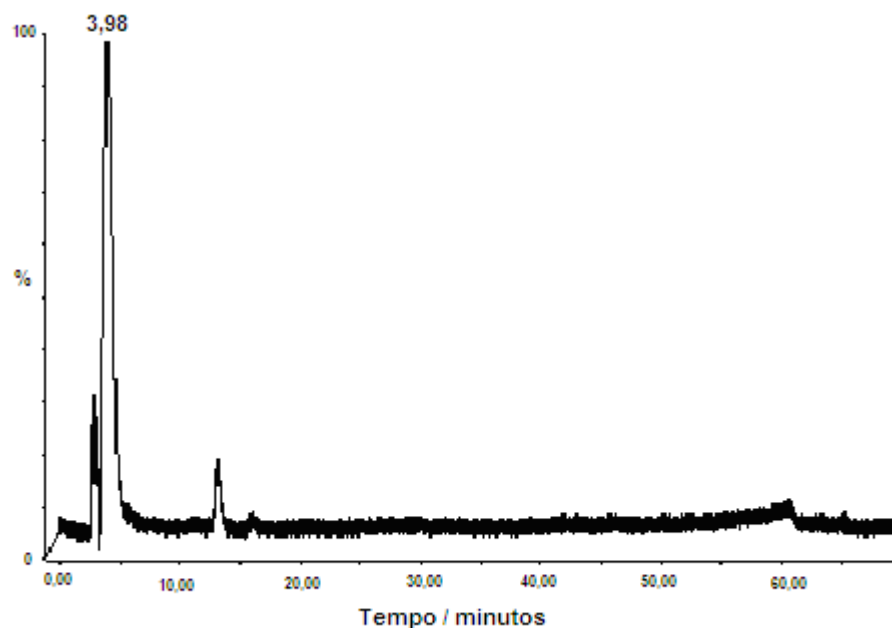
MM = 108,8 g/mol





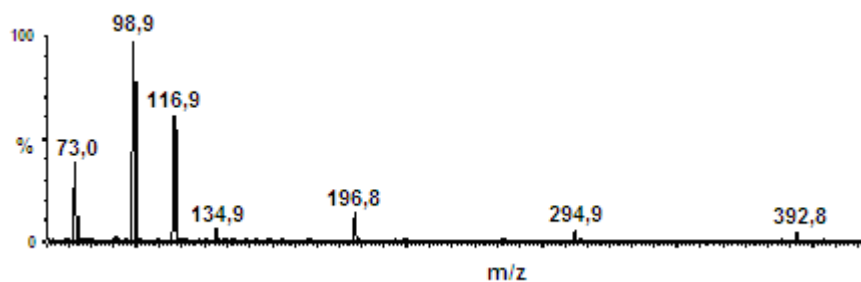
**Figura 30:** Espectro dos produtos de degradação do fenol, separados por HPLC. O primeiro espectro corresponde aos produtos que saíram em 2,94 minutos, o segundo corresponde aos produtos que saíram em 12,85 minutos e o terceiro aos produtos que saíram em 31,4 minutos.

- Citocromo c +  $H_2O_2$  + fenol em Tampão Universal 5 mM, pH7,5: após a injeção de trietil amina 0,05% (A) e metanol/trietilamina 0,05% (8:2, v/v) (B) na fase móvel, apareceram dois picos no espectro. Um mais intenso em 3,98 minutos e outro em 13 minutos (figura 31).



**Figura 31:** Cromatograma indicando a saída dos produtos pelo HPLC no tempo de 3,98 minutos.

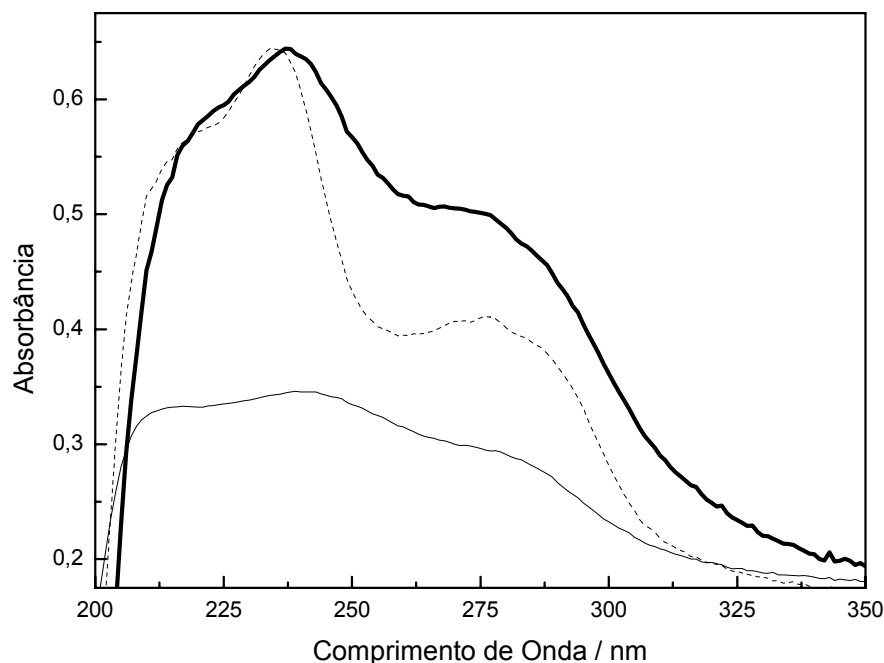
O espectro de massa (figura 32) detectou picos com m/z 197; 295 e 393 que são o dímero, o trímero e o tetrâmero da molécula m/z 99, ainda não identificada.



**Figura 32:** Espectro com massas obtidas após 3,98 minutos da separação da amostra por HPLC.

## TiO<sub>2</sub>

Após analisar o citocromo *c* adsorvido nos nanotubos de TiO<sub>2</sub>, foram realizados espectros apenas com TiO<sub>2</sub> para verificar se ele degradaria o fenol sem a ajuda do citocromo *c* e do peróxido. O resultado pareceu ser positivo tanto quando a amostra foi submetida ao comprimento de ondas curtas (não mostrado) quanto quando submetida ao comprimento de ondas longo, pois em ambos os casos a banda do fenol pareceu ter sofrido modificações que nos levou a crer que houve formação de novos compostos. A figura 33 mostra os espectros apenas com TiO<sub>2</sub> (linha sólida fina), 5 minutos após a adição do fenol (linha tracejada) e 55 minutos após a adição do fenol (linha sólida grossa) e sua degradação.

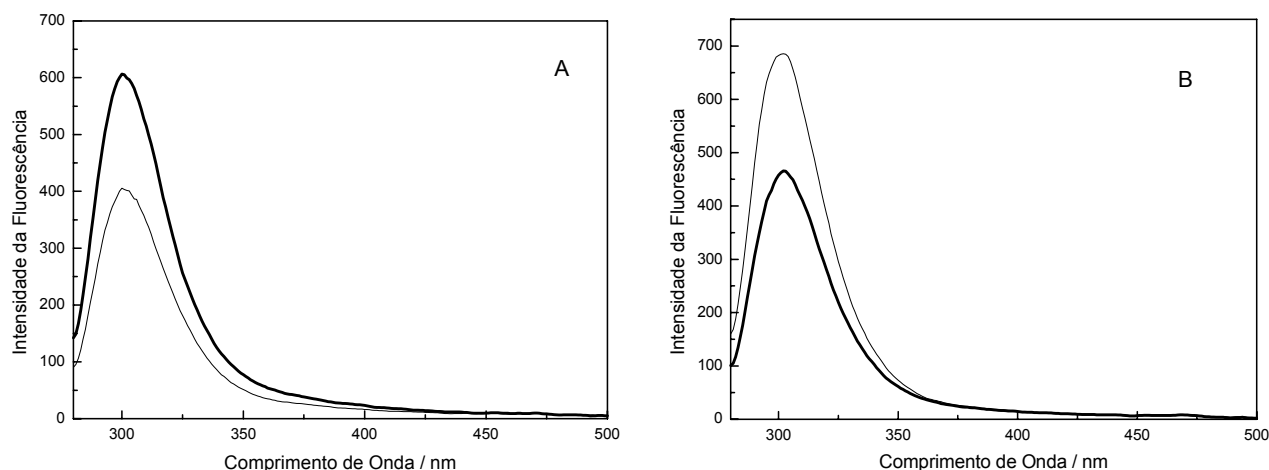


**Figura 33:** Espectros indicando apenas o TiO<sub>2</sub> (linha sólida fina), 5 minutos após a adição do fenol (linha tracejada) e 55 minutos após a adição do fenol (linha sólida grossa). Suspensão de TiO<sub>2</sub> em tampão universal (5 mM, pH 10,0) com 100 µM de fenol.

Após essas análises, as amostras foram separadas por HPLC e, foram analisadas no espectrômetro de massa, onde não apresentaram os picos característicos de produtos vindos da degradação do fenol<sup>83</sup>, que são m/z 109,113, 123, 139, 155 (não mostrado), por esse motivo a cinética foi refeita no utilizando-se a técnica da fluorescência para verificar se havia queda da intensidade da fluorescência, característica da degradação do fenol.<sup>90</sup>

Com essa nova análise foi observado que a intensidade da fluorescência aumenta quando temos apenas o nanotubo de TiO<sub>2</sub> com o fenol (figura 34 A), fato já observado em algumas reações com porfirinas que será discutida adiante.

O experimento foi repetido adicionando-se 500 µmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 34 B) e, observa-se claramente que a intensidade da fluorescência diminuiu após essa adição, fato que sugere que para haver formação de novos produtos, é necessário o uso de peróxido de hidrogênio.



**Figura 34:** (A)  $\text{TiO}_2$  com fenol ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) em tampão formiato de amônio ( $5 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH } 7,4$ ). (B)  $\text{TiO}_2$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $500 \mu\text{mol/L}$ ) e fenol ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) em tampão formiato de amônio ( $5 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH } 7,4$ ). A linha sólida fina indica o início da reação e a linha sólida grossa indica o final da reação.

## Porfirinas

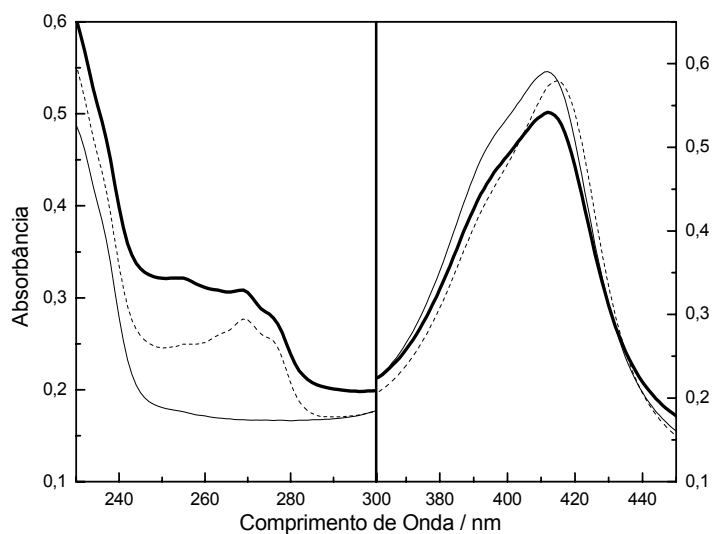
Foram analisadas as seguintes porfirinas para verificar sua capacidade de degradação do fenol:  $\text{FeTDC}(\text{SO}_3\text{Na})\text{PP}$ ,  $\text{ZnTDC}(\text{SO}_3\text{Na})\text{PP}$ ,  $(\text{FeTFPP})\text{Cl}$ ,  $\text{MnTDC}(\text{SO}_3\text{Na})\text{PP}$ ,  $\text{MnTMPyP}$  e  $\text{FeTMPyP}$ . Dessas, apenas a  $\text{FeTDC}(\text{SO}_3\text{Na})\text{PP}$  e a  $\text{MnTDC}(\text{SO}_3\text{Na})\text{PP}$  não possuíam bandas no mesmo comprimento de onda do fenol e, dessa forma, foi possível verificar pelo espectrofotômetro UV-visível se elas provocaram mudanças na banda do fenol. As demais, por possuírem bandas também em  $270 \text{ nm}$  impediram a verificação dessas mudanças e, por esse motivo, houve a necessidade de utilizar a técnica da fluorescência.

- Porfirina  $\text{FeTDC}(\text{SO}_3\text{Na})\text{PP}$ : Essa porfirina parece ser um bom catalisador para a degradação do fenol em presença de  $t\text{-BuOOH}$  nos meios tampão fosfato e SDS, pois em ambos os meios dá para notar que a banda do fenol em  $270 \text{ nm}$  modificou bastante, o que sugere a formação de novos compostos. Ao mesmo tempo, dá para verificar que a porfirina não teve muito *bleaching* na sua banda Soret (localizada em  $411 \text{ nm}$ ), e nesse caso esse catalisador pode ser reutilizado novamente.

Em tampão fosfato (figura 35), foi possível verificar que logo após a adição do fenol sua banda parece já ter mudado, sugerindo que nessas condições o catalisador da reação pode acelerar ainda mais o processo de degradação do fenol gerando possíveis novos compostos. Quanto à banda Soret da porfirina, inicialmente



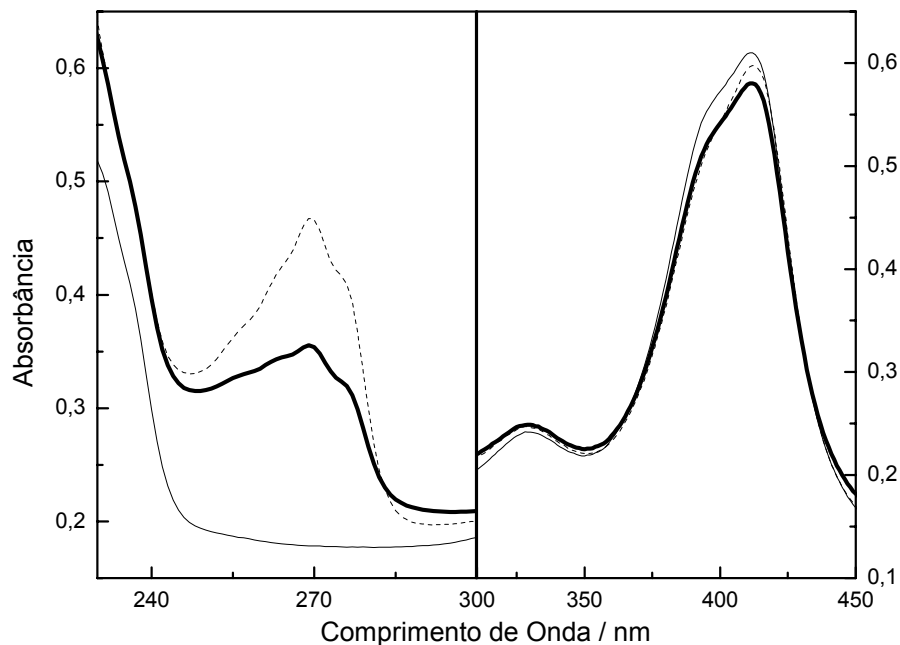
em 410 nm (linha sólida fina), o que se pode notar é que após a adição do peróxido houve um deslocamento para o vermelho, indo de 410 para 414 nm, com formação de Composto II (linha pontilhada) e, após a reação com o fenol essa porfirina volta à sua forma nativa com pouco *bleaching*. Isso nos faz pensar que caso essa catálise realmente forme novos produtos da degradação do fenol, essa porfirina pode ser um bom instrumento para esse tipo de reação, pois como houve pouco *bleaching*, ela pode ser reutilizada várias vezes antes de perder sua atividade catalítica.



**Figura 35:** FeTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP (100,0 μmol/L) em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com posterior adição de t-BuOOH (1 mmol/L) e de fenol (500 μmol/L). Os espectros mostram apenas a porfirina em tampão fosfato, com sua banda Soret em 410 nm (linha sólida fina), após a adição do t-BuOOH e do fenol, onde houve a formação de Composto II, mudando sua banda Soret para 414 nm (linha tracejada) e uma hora após a reação, onde a banda Soret da porfirina volta a sua forma nativa (linha sólida grossa).

Comparando-se os meios tampão fosfato (figura 35) e SDS (figura 36) também foi possível verificar que em tampão universal a banda do fenol sofreu mudanças maiores o que pode sugerir que nesse meio há talvez mais produtos formados ou que em SDS o tempo necessário para a decomposição do fenol é maior.

Em ambos os casos a banda Soret da porfirina não teve um *bleaching* muito acentuado.



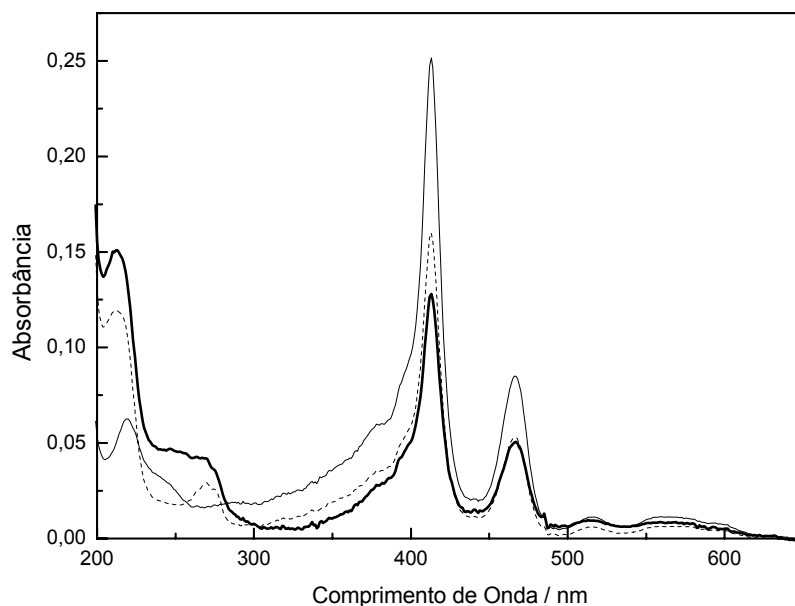
**Figura 36:** FeTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP (100,0 μmol/L) em SDS (30 mmol/L) com posterior adição de t-BuOOH (1 mmol/L) e de fenol (500 μmol/L). Os espectros mostram apenas a porfirina em SDS (linha sólida fina), após a adição do fenol (linha tracejada) e uma hora após a reação (linha sólida grossa).

Nas amostras sem adição de peróxido parece não ter ocorrido degradação do fenol, pois não houve mudanças aparentes em sua banda (não demonstrado). Não foram realizados testes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois a quantidade do catalisador disponível era limitada.

- Porfirina MnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP: Essa porfirina foi testada apenas em tampão fosfato em presença e ausência de t-BuOOH e posterior adição do fenol.

A figura 37 mostra que em presença de t-BuOOH a solução parece ter reagido e degradado o fenol, pois seus espectros mudaram significativamente na região 270nm.

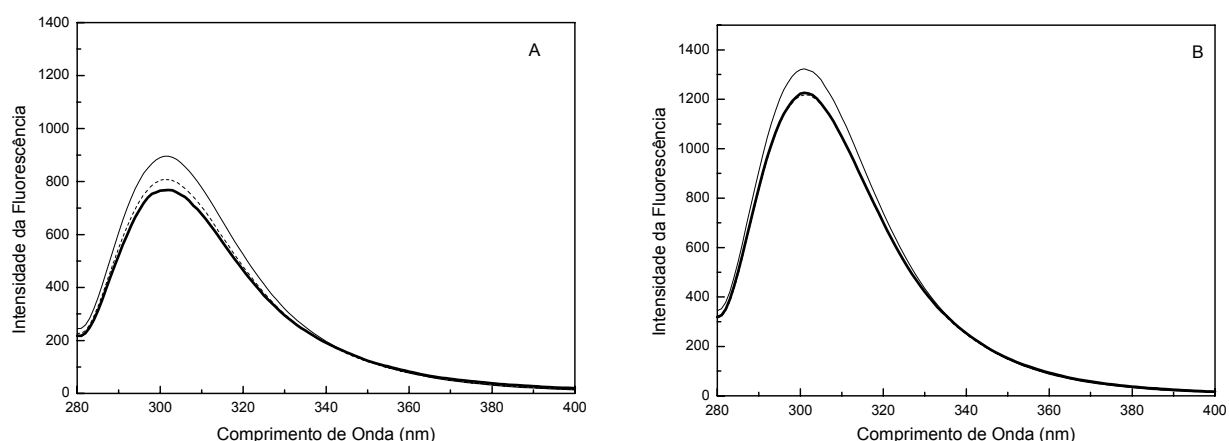
Nesse caso em especial verificou-se claramente que essa porfirina sofreu muito *bleaching* na sua banda Soret, pois a intensidade da queda da sua banda foi muito maior do que as intensidades das quedas apresentadas até o momento. Caso esse sistema realmente degrade o fenol, isso poderá ser um problema, pois a vida útil desse catalisador nessas condições parece ser inferior à vida útil dos demais.



**Figura 37:** Porfirina (100,0  $\mu\text{mol/L}$ ) em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com posterior adição de t-BuOOH (1,5 mmol/L) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Os espectros mostram apenas a porfirina em tampão fosfato (linha sólida fina), após a adição do fenol (linha tracejada) e uma hora após a reação (linha sólida grossa).

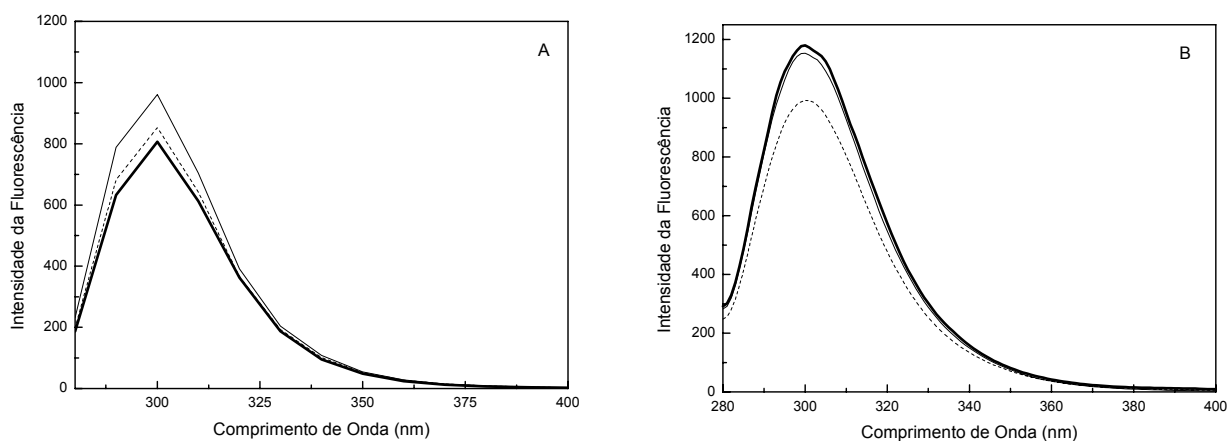
Assim como na porfirina  $\text{FeTDC}(\text{SO}_3\text{Na})\text{PP}$ , as amostras sem o t-BuOOH parecem não ter degradado, pois também não houveram mudanças aparentes na banda do fenol (não demonstrado).

Quanto às porfirinas  $\text{ZnTDC}(\text{SO}_3\text{Na})\text{PP}$ ,  $(\text{FeTFPP})\text{Cl}$ ,  $\text{MnTMPyP}$  e  $\text{FeTMPyP}$ , não foi possível visualizar a banda do fenol em 270 nm mesmo com uma concentração maior do reagente fenol. Isso se deve ao fato dessas porfirinas possuírem bandas nessa região (não mostrado). Por esse motivo, a degradação do fenol por essas porfirinas foi observada no Espectrofluorímetro, onde verificou-se que embora em intensidades diferentes, todos os sistemas envolvendo porfirinas e peróxidos apresentaram mudanças na intensidade da fluorescência do fenol. Abaixo são apresentados os espectros dessas porfirinas com t-BuOOH e com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por esses espectros percebe-se que a  $(\text{FeTFPP})\text{Cl}$  reagiu com ambos os peróxidos e pelos espectros obtidos parece que houve degradação do fenol em ambos os casos (figuras 38 A e 38 B).



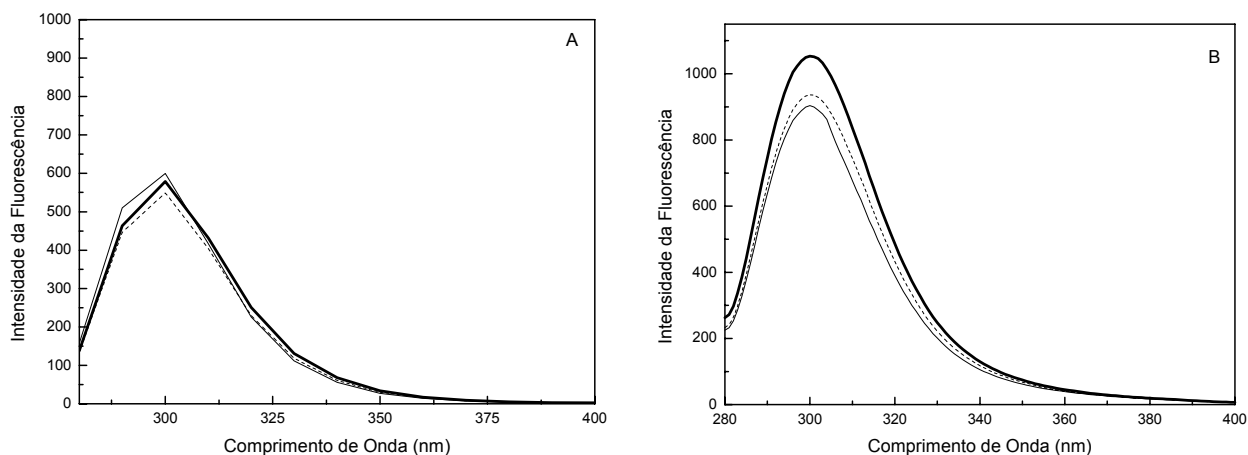
**Figura 38:** Espectro de fluorescência do meio de reação da porfirina (FeTFPP)Cl em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com peróxido e fenol. (A) reação com peróxido de hidrogênio mostrando o início da reação (linha sólida fina), 10 minutos após o início da reação (linha tracejada) e, 60 minutos após o início da reação (linha sólida grossa). (B) reação com t-BuOOH mostrando o início da reação (linha sólida fina), 10 minutos após o início da reação (linha tracejada) e, 60 minutos após o início da reação (linha sólida grossa).

A MnTMPyP parece ter degradado muito bem o fenol com  $H_2O_2$  (figura 39 A) porém o mesmo parece não ter ocorrido quando o peróxido de hidrogênio foi substituído pelo t-BuOOH. Observa-se nesse caso que a intensidade da fluorescência aumentou após os 60 minutos de reação (figura 39 B).



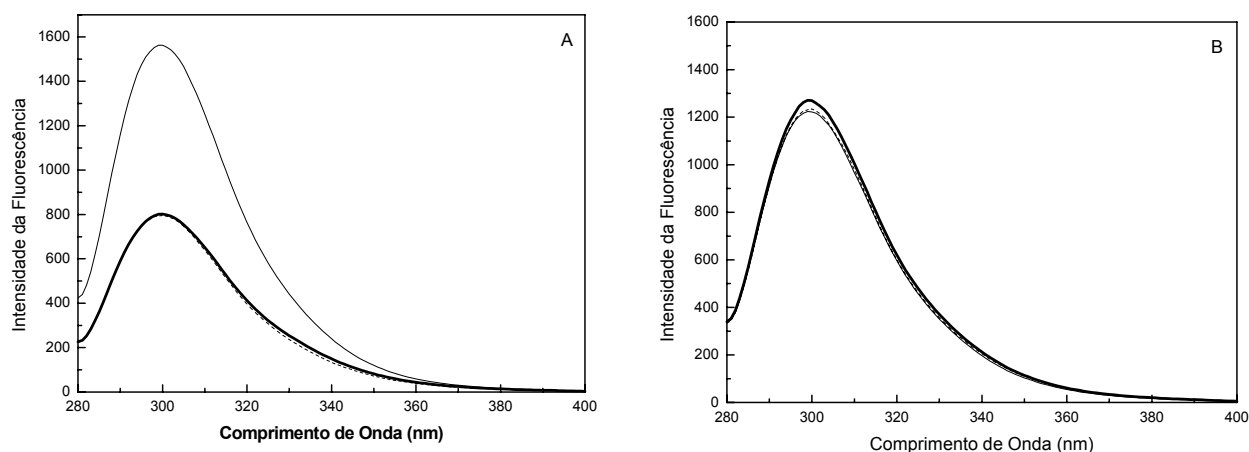
**Figura 39:** Espectro de fluorescência do meio de reação da porfirina MnTMPyP em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com peróxido e fenol. (A) reação com peróxido de hidrogênio mostrando o início da reação (linha sólida fina), 10 minutos após o início da reação (linha tracejada) e, 40 minutos após o início da reação (linha sólida grossa). (B) reação com t-BuOOH mostrando o início da reação (linha sólida fina), 10 minutos após o início da reação (linha tracejada) e, 40 minutos após o início da reação (linha sólida grossa).

O sistema com FeTMPyP, parece ter apresentado o pior desempenho pois além de quase não variar a intensidade da fluorescência com peróxido de hidrogênio (figura 40 A), também apresentou um aumento considerável em sua intensidade da fluorescência em presença de t-BuOOH (figura 40 B).



**Figura 40:** Espectro de fluorescência do meio de reação da porfirina FeTMPyP em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com peróxido e fenol. (A) reação com peróxido de hidrogênio mostrando o início da reação (linha sólida fina), 10 minutos após o início da reação (linha tracejada) e, 50 minutos após o início da reação (linha sólida grossa). (B) reação com t-BuOOH mostrando o início da reação (linha sólida fina), 10 minutos após o início da reação (linha tracejada) e, 50 minutos após o início da reação (linha sólida grossa).

Já a porfirina ZnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP agiu da mesma forma que a porfirina MnTMPyP. Ela parece ter degradado bem o fenol com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 41 A) e também apresentou uma fluorescência maior do que a inicial com t-BuOOH (figura 41 B).

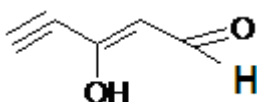


**Figura 41:** Espectro de fluorescência do meio de reação da porfirina ZnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP em tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7,4) com peróxido e fenol. (A) reação com peróxido de hidrogênio mostrando o início da reação (linha sólida fina), 10 minutos após o início da reação (linha tracejada) e, 60 minutos após o início da reação (linha sólida grossa). (B) reação com t-BuOOH mostrando o início da reação (linha sólida fina), 10 minutos após o início da reação (linha tracejada) e, 60 minutos após o início da reação (linha sólida grossa).

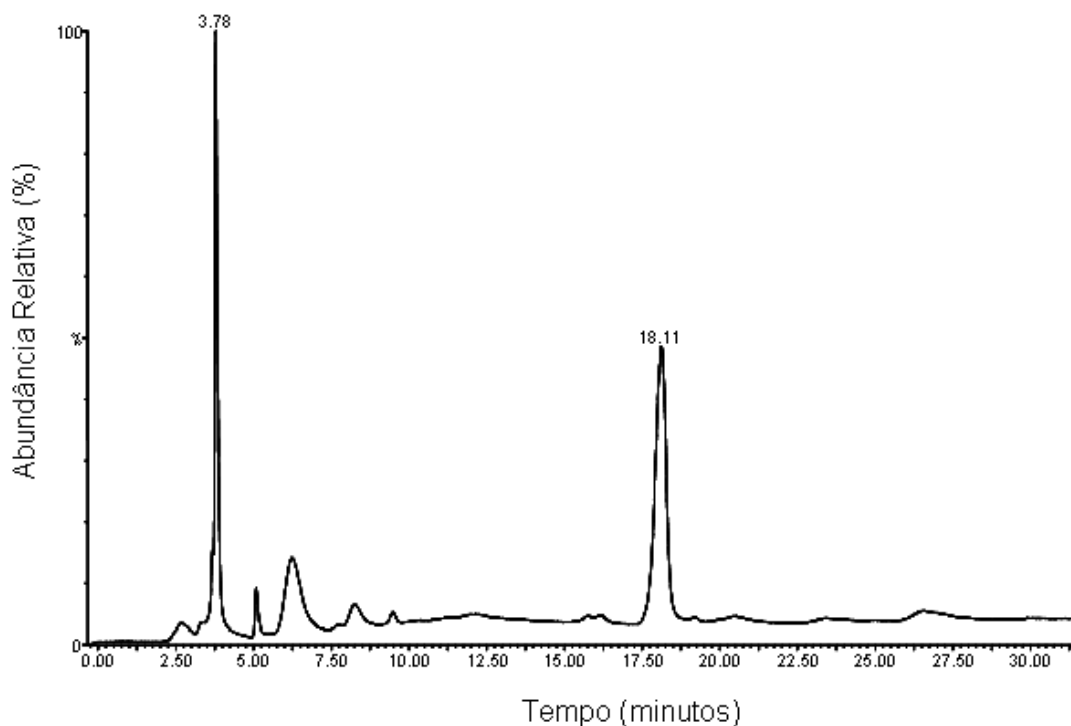
As amostras foram congeladas, separadas por HPLC e analisadas no espectrômetro de massa, para a verificação dos produtos formados e sua possível identificação.

Após a fase móvel de trietil amina 0,05% (A) e metanol/trietilamina 0,05% (8:2, v/v) (B) na fase móvel, apareceram dois picos mais intensos no cromatograma. Um em 3,78 minutos e outro em 18,11 minutos (figura 42) esse ponto que sai em 18,11 minutos é o fenol, já mostrado na figura 24. O espectro de massa detectou em 3,78 minutos dois picos um com  $m/z$  96,7 e outro em 79,0 (figura 43).

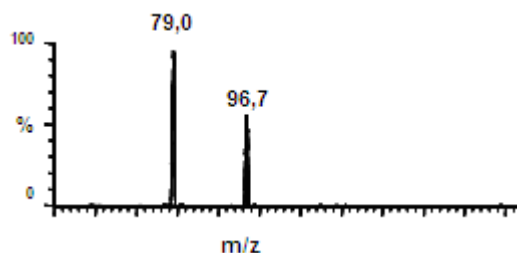
O pico de relação  $m/z$  96,7 pode corresponder à molécula abaixo e o outro pico pode ser fragmento da molécula citada  $m/z$  79 (1-OH)



MM = 79 g/mol

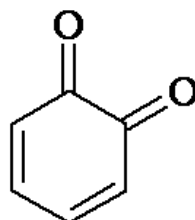


**Figura 42:** Cromatograma indicando a saída dos produtos pelo HPLC nos tempos de 3,78 e 18,11 minutos.



**Figura 43:** Espectro indicando a massa dos produtos que saíram em 3,78 minutos.

Das amostras com porfirinas analisadas no fluorímetro, a que mais gerou produtos foi a ZnTDC(SO<sub>3</sub>Na)PP com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fenol. Essa amostra apresentou picos em 4,1, 9,8, 12,7, 18,1 e 26,9 minutos onde apareceram várias massas, dentre elas a 108,5/108,9 que pode ser a molécula



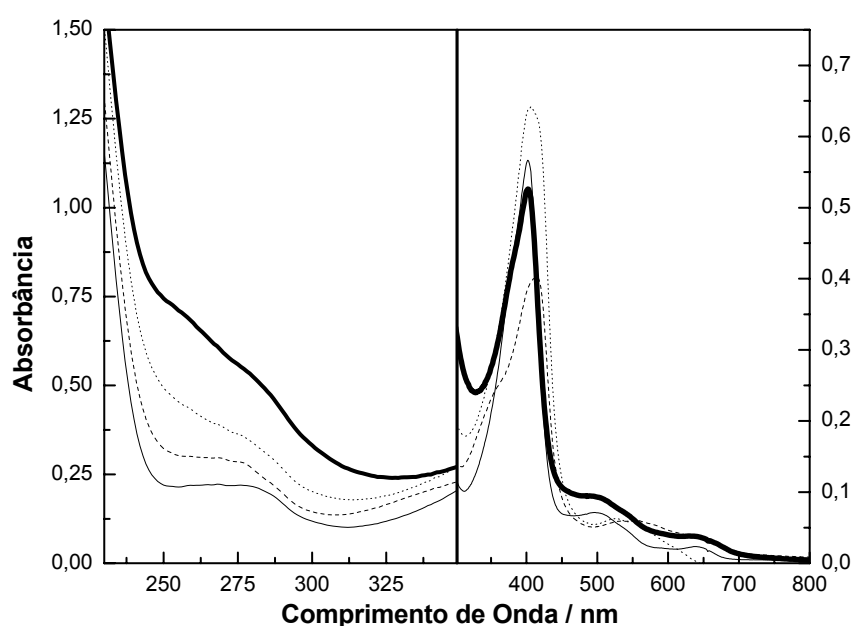
MM = 108,8 g/mol

As demais massas ainda precisam ser estudadas para saber quais os produtos formados. As porfirinas que apresentaram aumento na fluorescência não apresentaram picos característicos de produtos da degradação do fenol, sendo necessário talvez deixa-las mais tempo reagindo ou mudando as concentrações dos reagentes.

## HRP

A HRP foi analisada em tampão universal (10 mmol/L, pH=7,5) durante uma hora e meia e, após esse período observou-se que houve uma mudança espectral na região próxima aos 270 nm, indicando uma possível degradação do fenol (figura 44). O produto dessa reação foi guardado para análises posteriores no espectrômetro de massa, porém não foi possível verificar o produto da reação, pois provavelmente o meio estivesse interferindo no resultado. Por esse motivo a análise

foi repetida usando como meio o formiato de amônio. Após analisar os espectros UV-visível da HRP em tampão formiato de amônio (5 mmol/L, pH 7,4) com peróxido de hidrogênio e posterior adição de fenol, pode-se observar que houve mudanças espectrais na região de absorção do fenol (não demonstrado), similares às mostradas em tampão universal. Essa solução foi congelada e analisada no fluorímetro onde observou-se que a amostra após catálise não apresenta mais fluorescência, indicando que provavelmente não há mais fenol nessa amostra (não demonstrado).

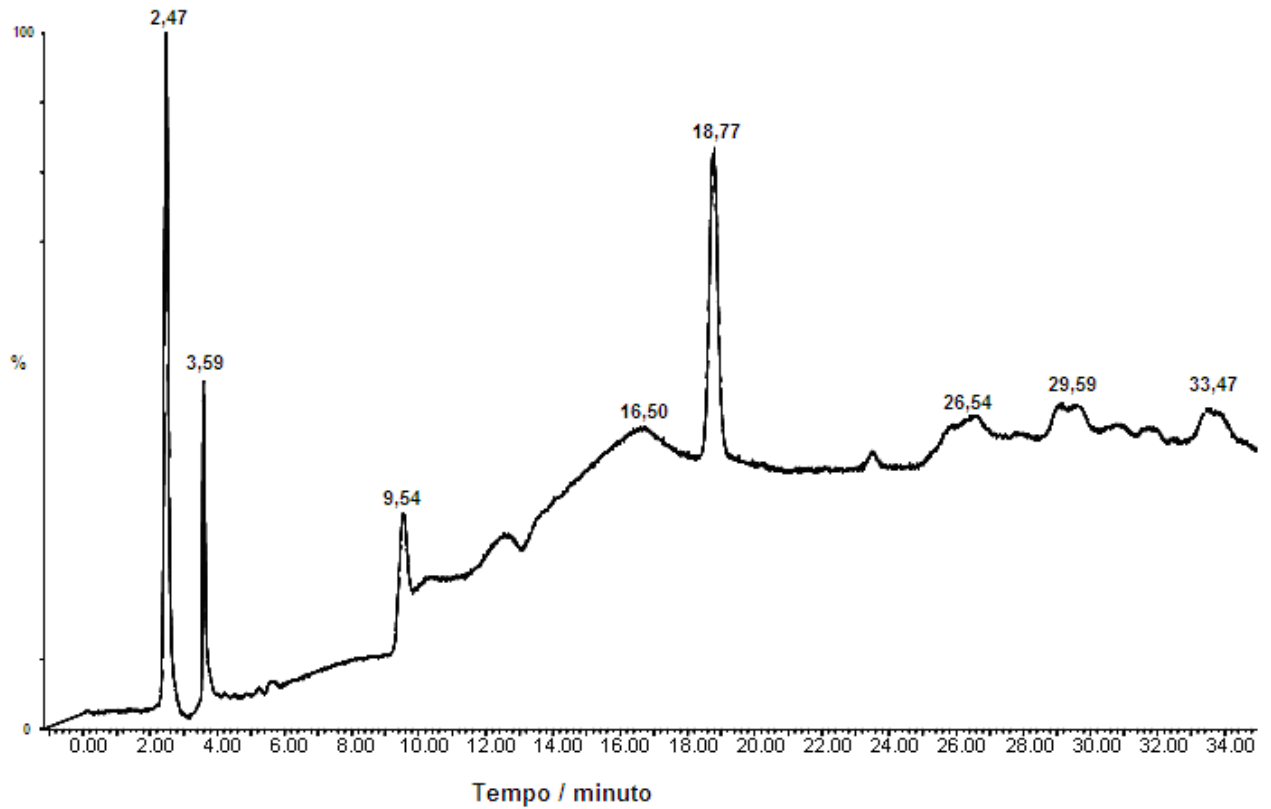


**Figura 44:** Espectro da HRP em tampão universal (linha sólida fina), após a adição de  $H_2O_2$  e fenol (linha tracejada), após 05 s de reação (linha pontilhada) e após 1 h e 30 s e reação (linha sólida grossa).

Essa amostra foi novamente congelada e separada por HPLC. Em seguida, a amostra foi analisada no espectrômetro de massa.

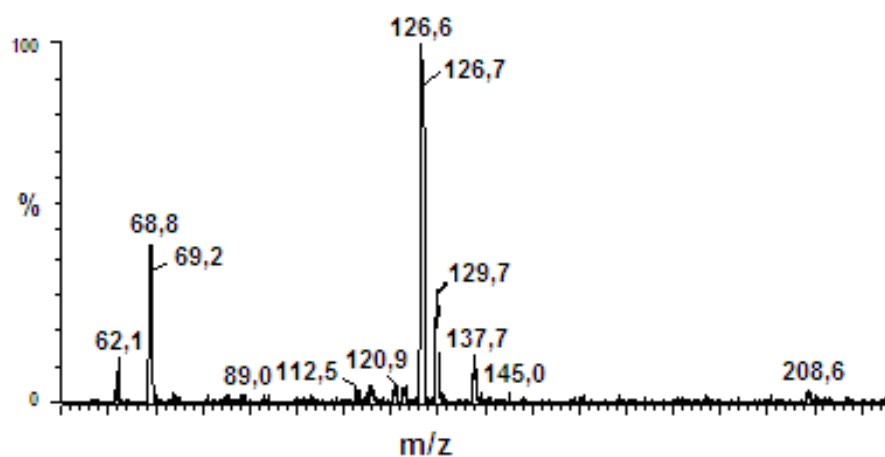
Após a injeção de trietil amina 0,05% (A) e metanol/trietilamina 0,05% (8:2, v/v) (B) na fase móvel, apareceram quatro picos mais intensos no cromatograma. Os picos saíram em: 2,47; 3,59; 9,54 e em 18,77 minutos (figura 45).





**Figura 45:** Cromatograma indicando a saída dos produtos pelo HPLC nos tempos de 2,47; 3,59; 9,54 e em 18,77 minutos.

O espectro de massa revelou a presença da espécie com pico  $m/z$  127,0, que pode ser um composto formado pela degradação do fenol (figura 46).

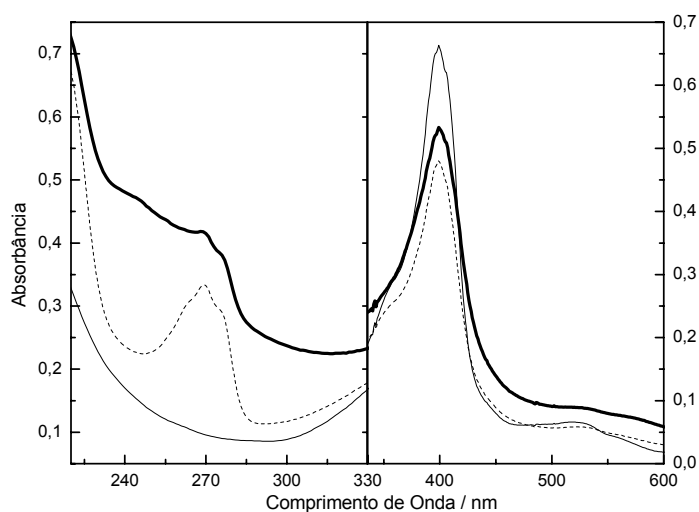


**Figura 46:** Espectro indicando a massa dos produtos que saíram em 2,47 minutos.

## MP-11

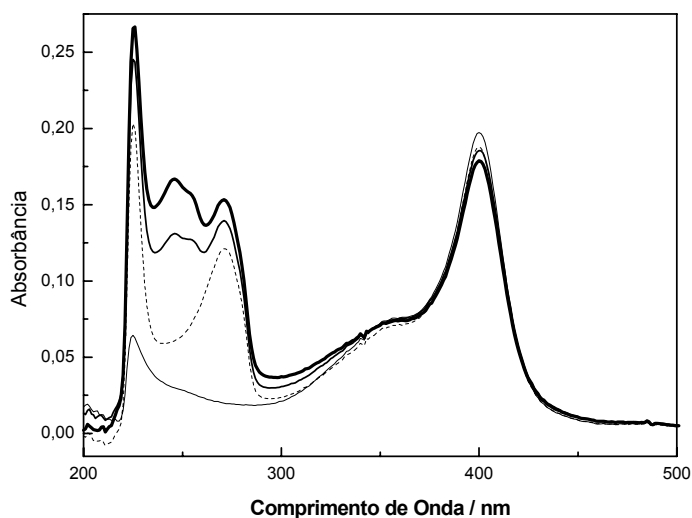
As análises realizadas em meios H<sub>2</sub>O, CTAB, SDS e SBA-15 sugerem que em todos os meios houve degradação do fenol, porém parece que há formação de produtos diferentes, uma vez que os picos formados após a reação não são nem ao menos parecidos.

Em água (figura 47) pode-se observar que há um *bleaching* bem acentuado da banda Soret da MP-11, localizada em 399 nm, mas em 270 nm observa-se que houve mudanças significativas na banda do fenol, que pode ser os produtos da reação. Nesse caso a banda praticamente some.



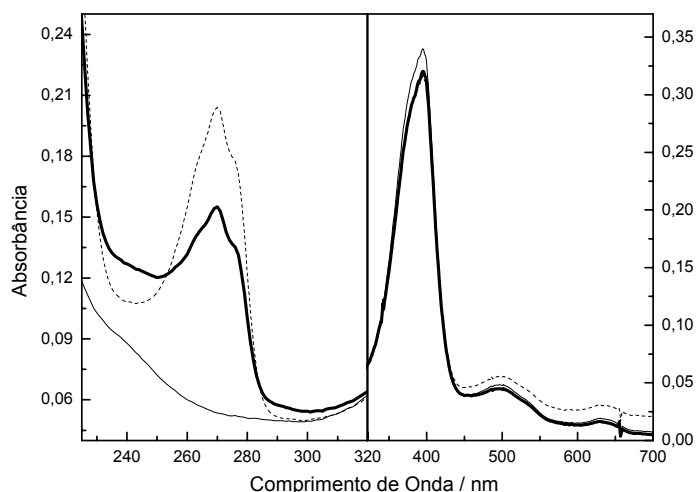
**Figura 47:** MP-11 (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em água com posterior adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e de fenol (100  $\mu\text{mol/L}$ ). A figura mostra a MP-11 antes da adição do peróxido e do fenol (linha sólida fina), logo após a adição do fenol (linha tracejada) e, após 700 segundos de reação (linha sólida grossa)

Em CTAB (figura 48), observou-se que o sistema não sofreu tanto *bleaching* e que também houve mudança espectral que sugere novos produtos dessa reação, pois onde tínhamos a banda do fenol surgiu mais uma banda.



**Figura 48:** MP-11 ( $0,9 \mu\text{mol/L}$ ) em CTAB ( $20 \text{ mmol/L}$ ) com posterior adição de t-butil ( $20 \mu\text{mol/L}$ ) e de fenol ( $100 \mu\text{mol/L}$ ). A figura mostra a MP-11 antes da adição do peróxido e do fenol (linha sólida fina), logo após a adição do fenol (linha tracejada), 100 minutos após a reação (linha pontilhada) e, após 700 segundos de reação (linha sólida grossa).

O sistema com SDS e peróxido de hidrogênio (figura 49) parece não ser muito eficiente, pois aparentemente não houve uma mudança muito significativa na banda do fenol.

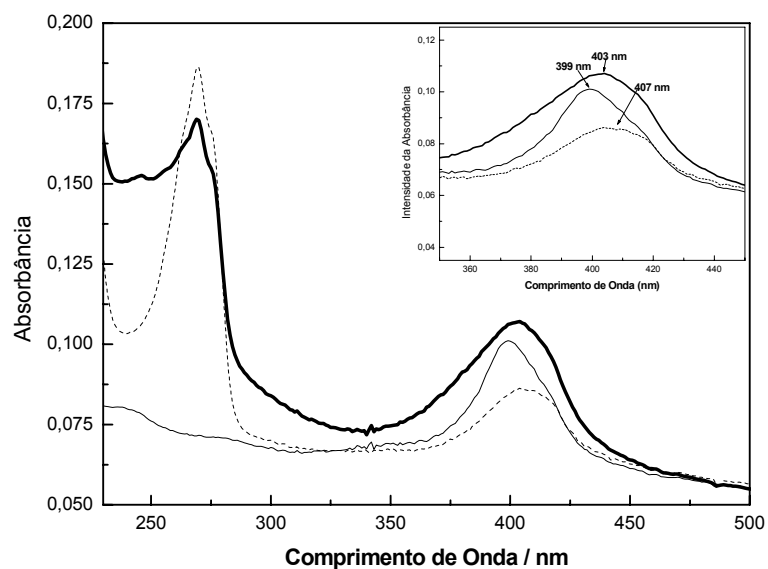


**Figura 49:** MP-11 ( $2,5 \mu\text{mol/L}$ ) em SDS ( $30 \text{ mmol/L}$ ) com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) e de fenol ( $100 \mu\text{mol/L}$ ). A figura mostra a MP-11 antes da adição do peróxido e do fenol (linha sólida fina), logo após a adição do fenol (linha tracejada) e, após 700 segundos de reação (linha sólida grossa).

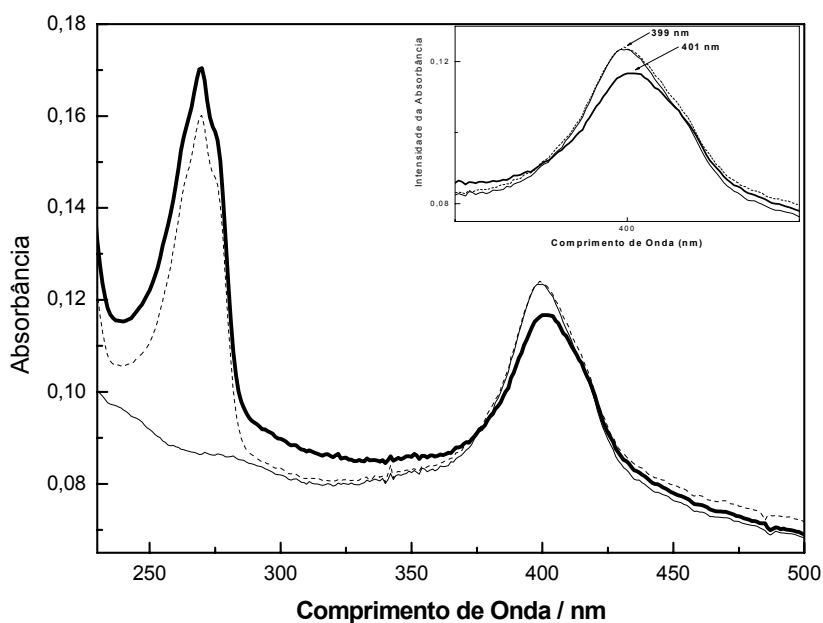
Os procedimentos acima foram repetidos substituindo o peróxido de hidrogênio pelo t-BuOOH porém em todos os casos parece que não houve degradação do fenol (resultado não mostrado), pois não houveram mudanças aparentes em seus espectros.

Analisando o caso da MP-11/SBA-15 com  $H_2O_2$  e com t-BuOOH, observou-se que o sistema contendo  $H_2O_2$  como ativador (figura 50) parece ser muito mais eficiente do que o sistema contendo t-BuOOH (figura 51), pois pelos espectros pode-se notar que no sistema contendo  $H_2O_2$  houve alguma mudança na banda do fenol que pode sugerir a formação de novos produtos, apesar de ainda haver um pouco do seu pico original, que pode indicar a presença de fenol na amostra. Já no sistema com t-BuOOH como ativador essa mudança passa quase despercebida isso porque houve apenas uma leve mudança no espectro do fenol. Nesse caso, o que pode sugerir a presença de algum composto em concentração muito inferior às concentrações dos demais sistemas apresentados até o momento é que além dessa pequena mudança na banda do fenol, também houve um deslocamento na banda Soret da MP-11 indo para a região do vermelho, como podemos observar no inserto da figura 51.

Esse deslocamento também ocorre com o sistema contendo  $H_2O_2$  como ativador, porém, nesse caso, a MP-11 sai da sua forma nativa (399 nm), vai para a região do vermelho em 407 nm, logo após a adição do peróxido, onde há a formação do Composto II (linha tracejada) e retorna novamente para a região do azul após a reação (linha sólida grossa). O inserto da figura 50 mostra essas mudanças. Algo interessante também e que precisa ser estudado com mais detalhes é o fato da MP-11 sofrer um *bleaching* muito alto quando é deslocado para a região do vermelho e em seguida recuperar esse cromóforo quando retorna para a região do azul.



**Figura 50:** MP-11 em SBA-15 antes da adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do fenol (linha sólida fina), logo após a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do fenol (linha tracejada) e após 700 segundos de reação (linha sólida grossa). Inseto mostra mudanças espectrais na banda Soret da MP-11.

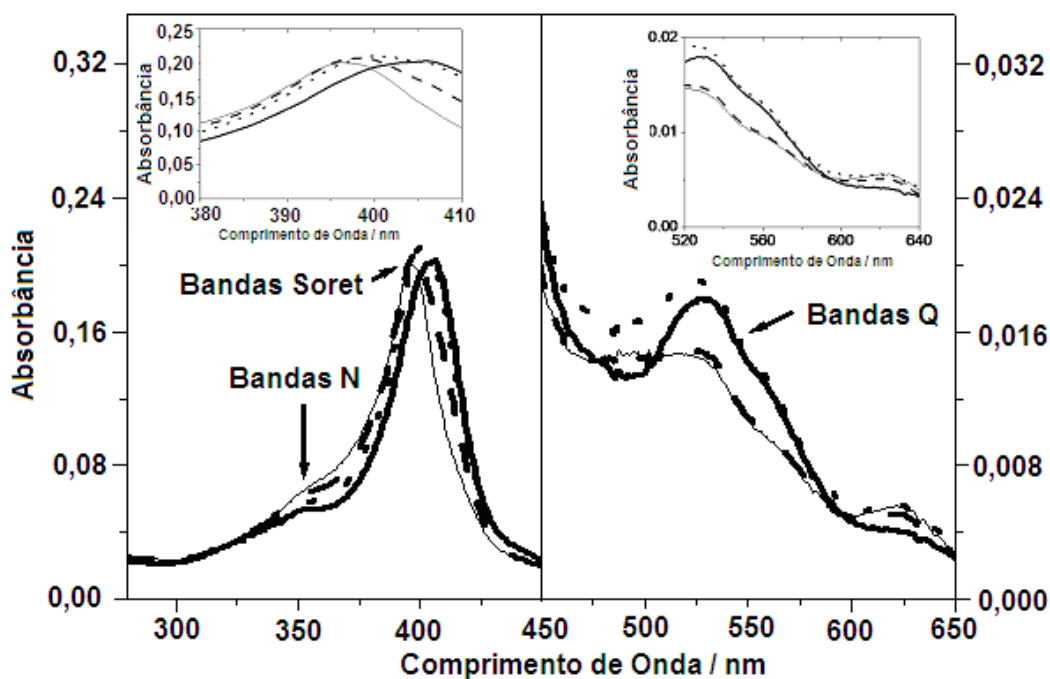


**Figura 51:** MP-11 em SBA-15 (linha sólida fina), logo após a adição do t-BuOOH e do fenol (linha tracejada) e após 700 segundos de reação (linha sólida grossa). Durante a reação houve desvio da banda Soret da MP-11 saindo da sua forma nativa em 399 nm e indo para o vermelho (401 nm) como podemos observar nos insertos

MP-11/MCM-41 (*paper publicado no Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 7, 1-10, 2007)

Antes de analisar as possíveis degradações do fenol por esse sistema, foram estudados os efeitos do pH nas soluções contendo MP-11, uma vez que até o presente momento todas as análises haviam sido feitas em pH fisiológico (pH 7,4).

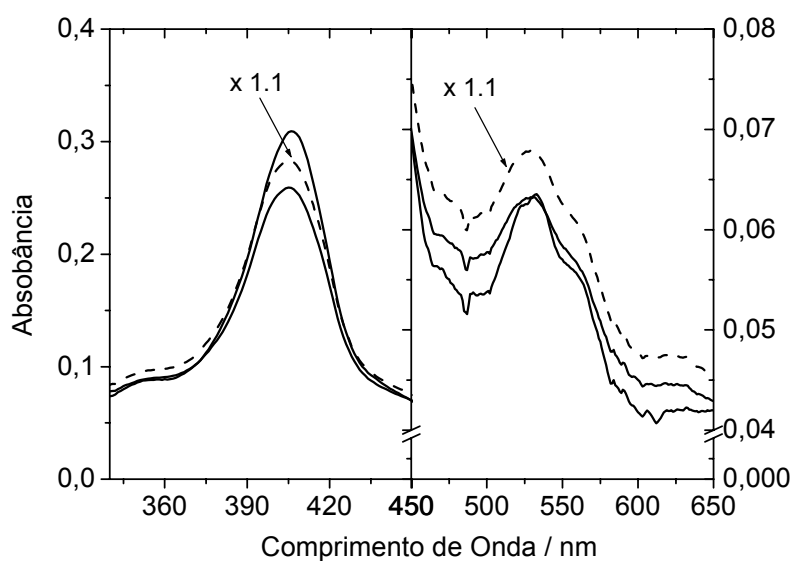
Após as leituras no espectrofotômetro UV-visível, os espectros eletrônicos da MP-11 em tampão fosfato mostram que estes dependem do pH da solução, como apresentado na figura 52. A absorção eletrônica das bandas N, Soret e Q do hemopeptídeo típico são indicadas pelas setas. Com o aumento do pH do meio, o espectro da MP-11 muda sendo compatível com a conversão do ferro heme do estado alto para o estado baixo *spin*. Similarmente ao observado em soluções de MP-9,<sup>91</sup> o aumento do pH promoveu mudanças nos grupos da MP-11 produzidas pela coordenação intracadeia com grupo  $\epsilon$ -amino da Lys 13. A mudança da MP-11 promovida pelo aumento do pH foi confirmada pela diminuição da intensidade da banda N<sup>92</sup> (Figura 52). Na Figura 52 a mudança da banda Soret e as mudanças nas transferências de bandas associadas com a intensificação das bandas Q<sub>0</sub> e Q<sub>v</sub> são compatíveis com o estado baixo *spin*.



**Figura 52:** Efeito do pH no espectro UV-visível da MP-11. MP-11 em solução tampão. Espectro UV-visível de 2 $\mu$ M de MP-11 obtida em pH 5,0 (linha sólida fina), 6,0 (linha tracejada), 7,0 (linha pontilhada), e 8,0 (linha sólida espessa). Os gráficos inseridos acima mostram o zoom das bandas

Soret e Q mais claramente. Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente e tampão universal ajustado para diferentes valores de pH.

Análises para verificar o comportamento da suspensão MP-11/MCM-41 em tampão universal nos diversos valores de pH também foram realizadas para verificar se o fato da MP-11 estar incorporada afeta de alguma forma os seus espectros e, como pode-se observar na figura 53, os espectros da MP-11/MCM-41, suspenso em tampão universal 10 mM nos pH 7,0; 7,5 e 8,0 (linhas sólida fina, tracejada e sólida espessa, respectivamente), não exibiram mudanças significativas em diferentes valores de pH. Associado à sílica mesoporosa, os espectros da MP-11 apresentaram pico na banda Soret em 406 nm e desse modo, houve um deslocamento para o vermelho com os espectros obtidos em pH abaixo de 8,0. Considerando que o deslocamento para o vermelho independe do pH, este resultado é compatível com as moléculas MP-11 imobilizadas em um meio mais hidrofóbico, como é o caso do interior da sílica mesoporosa MCM-41. Os espectros das suspensões MP-11/MCM-41 não foram obtidos em pH 5,0 e 6,0 porque nestes valores de pH as partículas não produziram suspensões estáveis e eram rapidamente precipitadas no fundo da cubeta. Nos valores de pH mais alto do que 8,0, a incorporação da MP-11 em MCM-41 foi muito baixa, não apresentando resultados significativos.

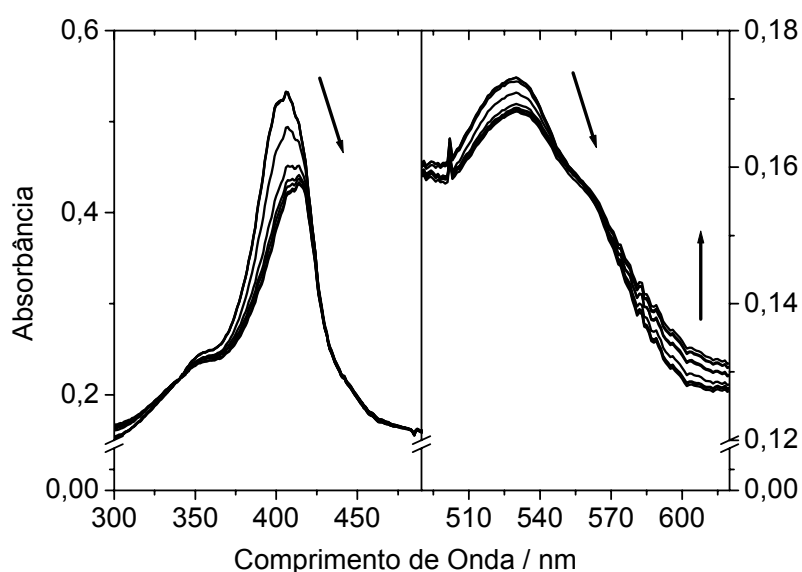


**Figura 53:** Efeito do pH no espectro UV-visível da MP-11. Suspensões tamponadas aquosas de MP-11 incorporada em MCM-41 em diferentes valores de pH. Os espectros foram obtidos em pH 7,0 (linha sólida fina), 7,5 (linha tracejada), e 8,0 (linha sólida espessa). O espectro obtido em pH 7,5 foi

multiplicado por 1,1 para melhor clareza. O espectro UV-visível de 0,035mg de MP-11 contendo MCM-41 foi obtida em temperatura ambiente em tampão universal 10mmol/L ajustado para diversos valores de pH.

A análise elementar da MP-11/MCM-41 indicou a presença de C 1,8%; H 1,8% e 0,35% N e, de acordo com esta análise, na MCM-41, a relação H/C e N/C eram 1,0 e 0,195, respectivamente. Estes valores estão perto das relações de MP-11 H/C e de N/C que são 1,38 e 0,23, respectivamente.

A reatividade da MP-11/MCM-41 foi testada com o peróxido de hidrogênio e o t-BuOOH, e ao contrário da MP-11 livre, a MP-11/MCM-41 não reagiu com o peróxido orgânico. Acreditamos que isso se deu pelo fato da molécula de t-BuOOH ser muito grande e não conseguir entrar na sílica quando esta está ocupada com MP-11. A adição de 100  $\mu\text{mol/L}$  de peróxido de hidrogênio em um meio contendo MP-11/MCM-41 promoveu um deslocamento da banda Soret para o vermelho (406 a 413 nm) e a diminuição da absorbância. Nesta condição, *bleaching* do cromóforo (grupo heme), o ataque dos radicais livres pôde contribuir parcialmente com a diminuição da banda Soret. Estas alterações espectrais sugeriram a conversão de Fe (III) MP-11 ao Composto II (forma oxoferril) em um intervalo do tempo de 50 s (figura 54). Porém, nesta circunstância, as bandas Q não exibiram as características espectrais do Composto II o que pode ser atribuído ao microambiente da MCM-41.

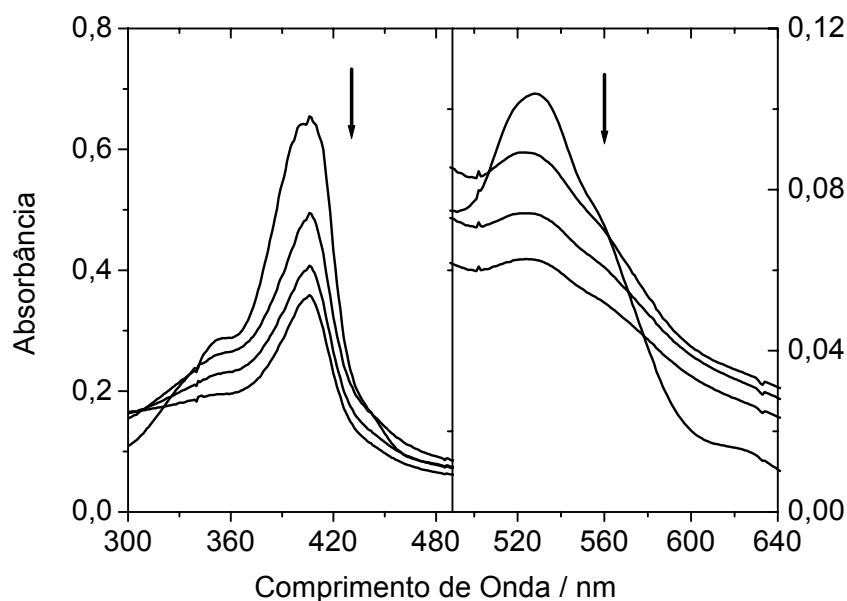


**Figura 54:** Variação absorbância no UV-visível em função do tempo durante a reação da MP-11/MCM-41 com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Espectro da MP-11/MCM-41, em pH 7,0 antes e 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 s após a adição de 100  $\mu\text{mol/L}$  de peróxido de hidrogênio como indicado pelas setas. As reações foram



realizadas em tampão universal 10 mmol/L nos valores indicados de pH, com 2  $\mu\text{mol/L}$  de MP-11, em temperatura ambiente.

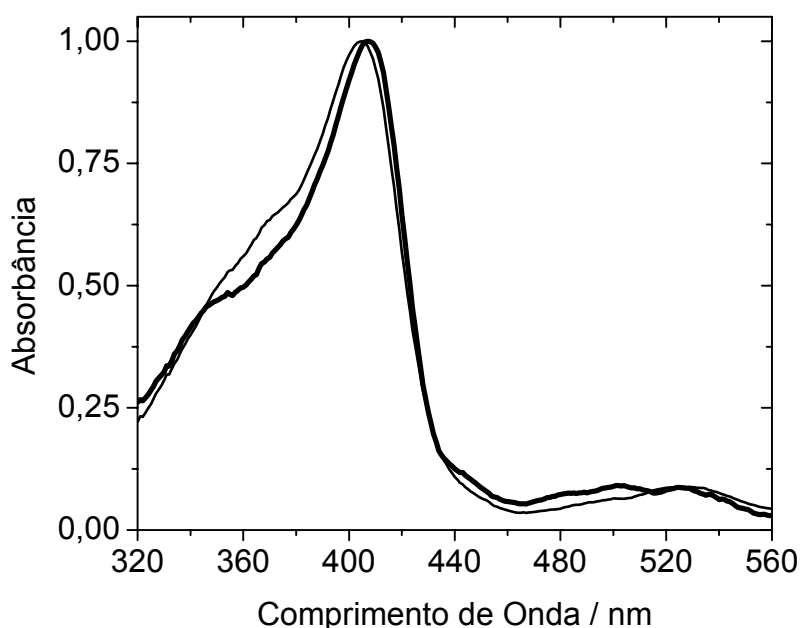
A figura 54 mostra as mudanças espectrais para as soluções MP-11 no curso da reação com peróxido de hidrogênio. A largura da banda Soret exibida pela MP-11 em solução tampão pH 7,0 indica a presença de duas populações do hemo-peptídeo: uma forma alto *spin* com ferro heme no sexto ligante e uma forma baixo *spin* produzida pela ocorrência de uma coordenação intra-cadeia.<sup>93</sup> Nesta condição, a adição de peróxido de hidrogênio promove um *bleaching* significativa na banda Soret sem ocorrência de mudança para o vermelho (figura 55). O *bleaching* da banda Soret, parcialmente exibido 50 segundos após a adição do peróxido de hidrogênio, foi mais estreita do que aquela obtida antes da reação e mostrou claramente uma diminuição mais intensa da absorvância nos comprimentos de onda mais baixos. Este resultado sugere que as formas alto *spin* foram preferencialmente atacadas pelos radicais livres produzidos durante a reação. Esta proposta é coerente com a reatividade mais elevada das formas alto *spin*, onde a sexta posição de coordenação do ferro do grupo heme está livre e, portanto, mais acessível ao peróxido. Também coerente com este modelo, após a diminuição da banda Soret, o ponto isobéptico mudou de 337 para 310 nm. Para MP-11/MCM-41, nenhuma mudança no ponto isobéptico (342 nm) foi detectada no curso da reação, sendo compatível com apenas uma espécie sendo convertida à forma incolor. Nos pH 7,5 e 8,0, resultados similares foram obtidos (resultados não mostrados). Porém o aumento do pH promoveu diferenças no pico da banda Soret e das bandas Q do composto II.



**Figura 55:** Espectro da MP-11 em solução tampão, em pH 7,0 antes (tempo zero) e 50, 240, e 700 s depois da adição de 100  $\mu\text{mol/L}$  de peróxido de hidrogênio como indicado pelas setas. As reações foram realizadas em tampão universal 10 mmol/L nos valores indicados de pH, com 2  $\mu\text{mol/L}$  de MP-11 e 0,05 mg de MCM-41/mL, em temperatura ambiente.

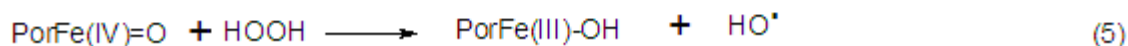
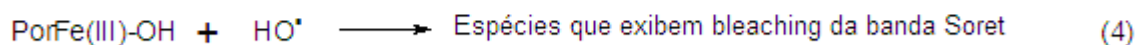
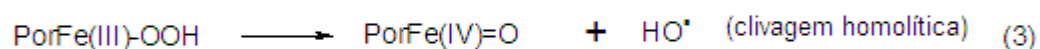
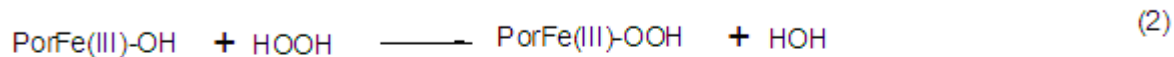
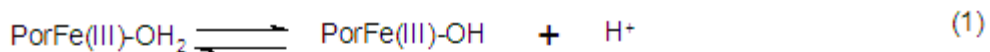
O aumento do pH diminuiu o grau de deslocamento da banda Soret para a região do vermelho e aumentou o grau de *bleaching* das bandas Soret e Q. O espectro da MP-11/MCM-41 independente de pH e, o correspondente espectro de reatividade com peróxido de hidrogênio dependente de pH podem ser relacionados com um modelo em que a MP-11 foi imobilizada dentro da sílica mesoporosa. A mudança da banda Soret para a região do vermelho foi causada pelo meio constante e altamente hidrofóbico e não por uma coordenação intra-cadeia modulado por pH dependente de ionização da lisina de cadeias laterais. De fato, com a exposição do grupo heme da MP-11 para o meio e a reatividade tornou-a mais sensível aos valores de pH. O alto grau de *bleaching* da banda Soret em pH 7,5 e 8,0 é compatível com o aumento do rendimento de radicais livres. Após a investigação a reatividade da MP-11/MCM-41 em uma fase sólida com o uso de pastilhas de KBr, percebeu-se que as mudanças espectrais observadas durante a reação com peróxido de hidrogênio não vieram das moléculas MP-11 fora das sílicas mesoporosas. As pastilhas de KBr que continham a MP-11/MCM-41 foram

analisadas pelo espectrofotômetro UV-visível antes e após a adição do peróxido de hidrogênio (figura 56). Na fase sólida, após a adição do peróxido de hidrogênio, também foram exibidas mudanças espectrais compatíveis com a formação do Composto II. A análise correspondente ao espectro do EPR mostrou que a MP-11/MCM-41 foi convertida à forma alto *spin* após a adição peróxido de hidrogênio.

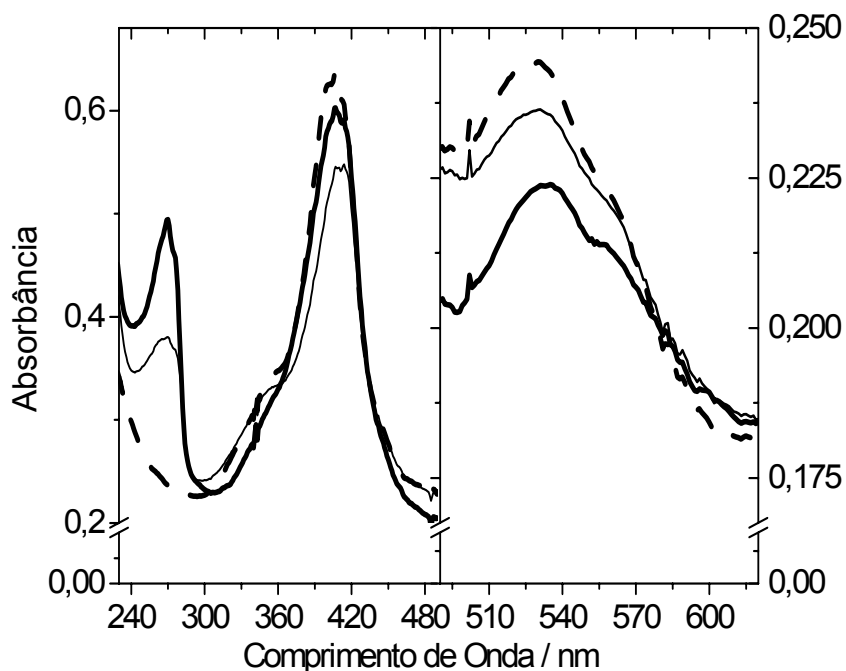


**Figura 56:** Espectro da MP-11/MCM-41 em pastilhas de KBr antes (linha fina sólida) e aproximadamente 120 s após a adição de 1  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 1  $\mu\text{mol/L}$  na pastilha KBr com MP-11/MCM-41 (linha sólida espessa). As reações foram realizadas em tampão universal 10 mmol/L nos valores indicados de pH, com 2  $\mu\text{mol/L}$  de MP-11 e 0,05 mg de MCM-41/mL, em temperatura ambiente.

Considerando os resultados prévios obtidos com complexos de MP/CTAB,<sup>94</sup>  
<sup>95</sup> o mecanismo catalítico para a ativação de MP-11 a Composto II deve ser a clivagem homolítica do peróxido (Eq. 1 a 5).



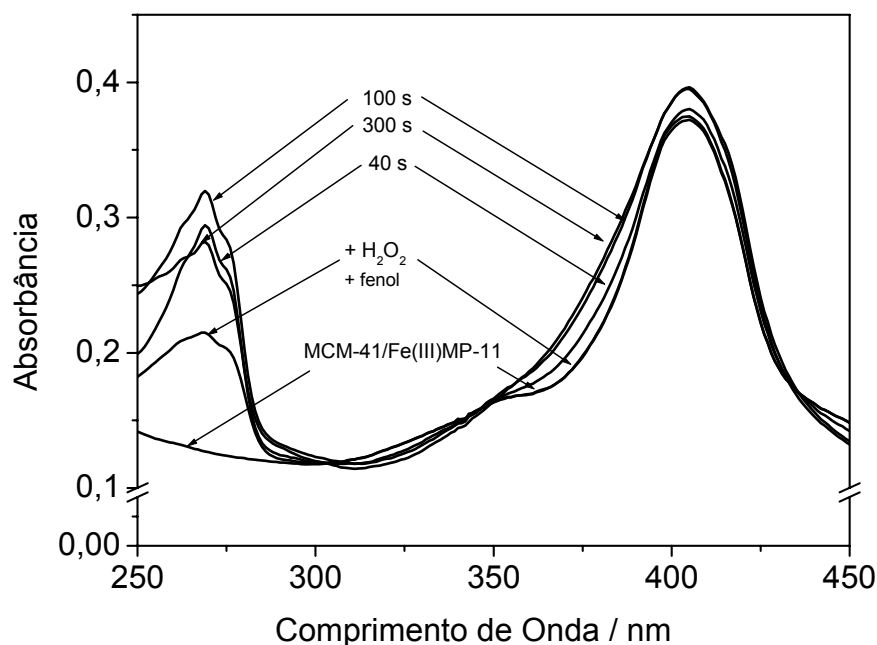
Como demonstrado na figura 54, a adição de 100  $\mu\text{mol/L}$  de peróxido de hidrogênio em suspensão de MP-11/MCM-41 e tampão fosfato (figura 57, linha tracejada espessa) levou à conversão do Fe(III)MP-11 para MP-11Composto II, a forma oxiferril (figura 57, linha sólida fina) dentro de 50 s. A adição de 125  $\mu\text{mol/L}$  de fenol imediatamente após da formação do Composto II, converteu a forma de alta valência de MP-11 para o estado de oxidação do ferro heme (linha sólida espessa), que caracterizou um ciclo catalítico característico das peroxidases (figura 57). Resultados similares foram obtidos para pH 7,5 e 8,0. Porém, a intensidade da banda Soret para recuperar o estado nativo da enzima foi progressivamente diminuído. O espectro UV-visível da enzima no estado nativo, obtida após a adição do fenol (figura 57, linha sólida espessa) não exibiu a banda N. Neste caso, as mudanças na banda N sugerem modificações na coordenação da esfera do ferro heme. Porém, esta forma de enzima foi ativada desde a adição do peróxido de hidrogênio até a adição do fenol, trazendo mudanças sugestivas da formação do Composto II e a oxidação do fenol. Durante a reação, o pico da banda em 270 nm, atribuídos ao fenol, apresentou um aumento significativo na intensidade da absorbância, sugerindo a formação de derivados oxidados de fenol. Também foi observado que a degradação do fenol foi acelerada com o aumento dos valores de pH (7,5 e 8,0).



**Figura 57:** Espectro da MP-11/MCM-41, em pH 7,0, obtido antes (linha tracejada), 30 s após a adição de 125  $\mu\text{mol/L}$  de peróxido de hidrogênio e imediatamente após a adição de 125  $\mu\text{mol/L}$  de fenol (linha sólida fina) e 400 s após a adição de fenol (linha sólida espessa). A reação foi realizada em tampão universal 10 mmol/L no valor de pH indicado, com 0,05 mg de MCM-41/mL, em temperatura ambiente.

A figura 58 mostra o espectro obtido no curso da reação da adição simultânea de fenol e peróxido de hidrogênio em suspensões de MP-11/MCM-41 no pH 7,0. Nessas condições, as constatações mais importantes foram: i) O deslocamento para a região do vermelho da banda Soret atribuído ao Composto II não foi detectado; ii) A banda Soret não exibiu *bleaching*; iii) A região espectral da banda N exibiu mudanças no curso da reação. Nestas condições, em que o *bleaching* da banda Soret estava ausente, sua ampliação sugeriu que a banda N, melhor que desaparecer, parece tornar-se sobreposta à banda Soret devido ao seu deslocamento para a região do vermelho. A decomposição espectral da banda Soret da MP-11 antes e após o processo catalítico revela um deslocamento para a região do vermelho da banda N sem alterações significativas nos componentes da banda Soret; iv) O pico da banda do fenol em 270 nm foi provavelmente realçado devido ao

aparecimento de derivados oxidados cujas bandas sobrepõem às bandas remanescentes do fenol.



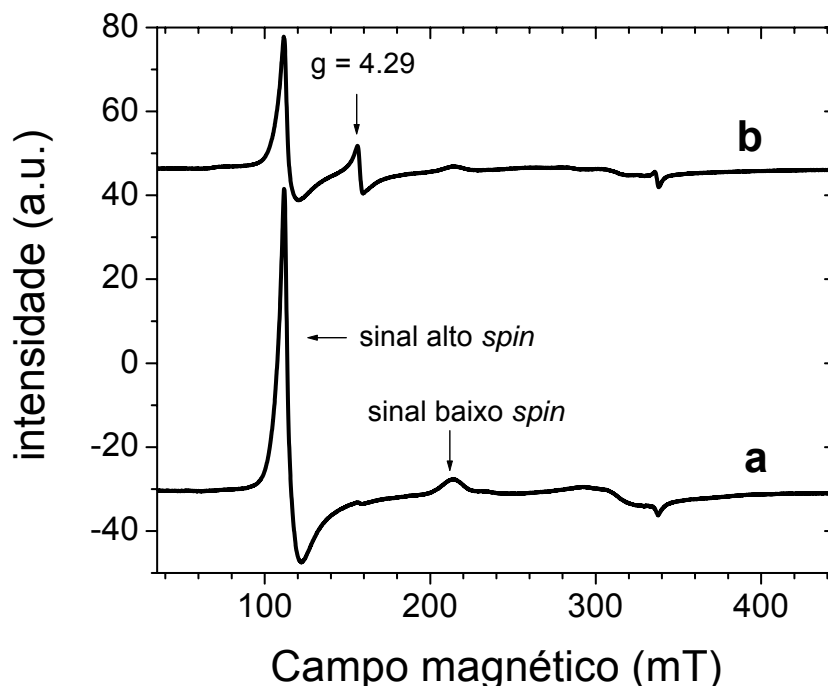
**Figura 58:** MP-11/MCM-41 durante a reação com peróxido de hidrogênio e fenol adicionados simultaneamente no meio. O espectro mostra que a figura foi obtida em intervalos e condições indicadas pelas setas. A reação foi realizada em com 0,05 mg MCM-1/mL, 100  $\mu\text{mol/L}$  de peróxido de hidrogênio, 125  $\mu\text{mol/L}$  de fenol em 10 mM de tampão universal pH 7,0 e temperatura ambiente.

A banda do fenol não exibiu nenhuma mudança quando este reagente foi adicionado a uma suspensão com a MCM-41 sozinha, ou com MP-11/MCM-41 na ausência do peróxido. A adição concomitante de agente oxidante (peróxido de hidrogênio) e agente redutor (fenol) parecem manter um estado constante de MP-11 como Fe (III) MP-11 e impede a *bleaching* da banda Soret, devido ao ataque da radical hidroxil ao anel porfirínico. Apesar da ausência do *bleaching* da banda Soret nessas condições, a banda N foi afetada. Este resultado sugere que a interação do ferro heme com o fenol ou com seus derivados foi responsável por essa alteração espectral.

O processo de clivagem catalítica da peroxidase com MP-11/MCM-41, em presença e em ausência de fenol, foi acompanhada pela evolução do oxigênio. A evolução do oxigênio pode ser designada pela oxidação do peróxido de hidrogênio

por radicais hidroxil, o produto da clivagem homolítica por peróxido de hidrogênio por oxiferril MP-11 (Eq. 7). Na ausência de fenol, a concentração de oxigênio molecular no meio aumenta em torno de 40  $\mu\text{mol/L}$  no final da reação. Esses valores decaem pela metade em presença de fenol (18  $\mu\text{mol/L}$ ) sugerindo que o ataque do fenol funciona como uma armadilha para os radicais hidroxil e competem com o peróxido de hidrogênio para a reação de oxidação.

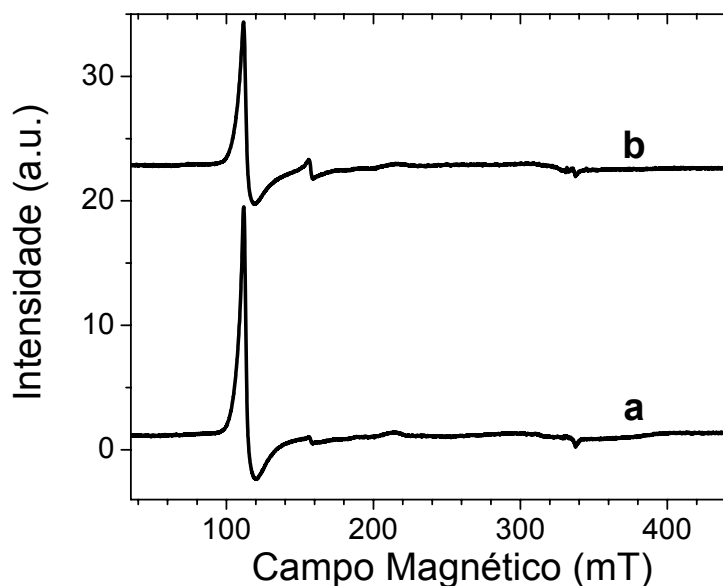
A reação do fenol no sistema MP-11/MCM-41 com peróxido de hidrogênio foi acompanhada por CW-EPR de ferro heme. A figura 55 mostra o espectro de EPR da MP-11/MCM-41, incorporada em pH 5,0 e pressionada em pastilha de KBr. As linhas *a* e *b* da figura 59, correspondem respectivamente ao espectro EPR obtido antes e 1 min após a adição do peróxido de hidrogênio. Com MCM-41, o espectro EPR da MP-11 (Figura 59 linha *a*) exibe um sinal a  $g = 6,0$ , típico da forma MP-11 alto *spin* com ferro heme pentacoordenado com simetria axial e um sinal baixo *spin*, da forma MP-11 hexacoordenado. A figura 59, linha *b*, mostra que 1 min após a adição do peróxido de hidrogênio, ambos os sinais de formas alto e baixo *spin* do ferro heme decresceram, o que é consistente com a conversão da Fe(III)MP-11 para Composto II, uma espécie silenciosa no EPR.<sup>96</sup> Simultaneamente, houve o aparecimento de um sinal  $g = 4,290$  com simetria rômica (figura 59, linha *b*). A ausência de um  $g = 3,290$ , característico da MP oxo-ferril  $\pi$ -cátion (MP-Composto I),<sup>97, 98</sup> sugere que a clivagem heterolítica das ligações O-O do peróxido de hidrogênio não é um mecanismo enzimático adotado para enzimas incorporada. O sinal com  $g = 4,290$  tem sido atribuído ao anel porfirínico quimicamente modificado por radicais livres. As espécies alto *spin* ( $g = 4,290$ ) foram previamente detectadas por medidas de EPR durante a reação de citocromo *c* com t-BuOOH,<sup>47</sup> com cardiolipina oxidada e durante a reação de t-BuOOH e peróxido de hidrogênio com MP-8 e MP-9, associadas a micelas de CTAB.<sup>99</sup>



**Figura 59:** Espectro EPR onda contínua da MP-11/MCM-41. Linha *a*: pastilha KBr da MP-11/MCM-41, incorporada em pH = 5,0; linha *b*: um minuto após a adição de 0,1 mol de peróxido de hidrogênio.

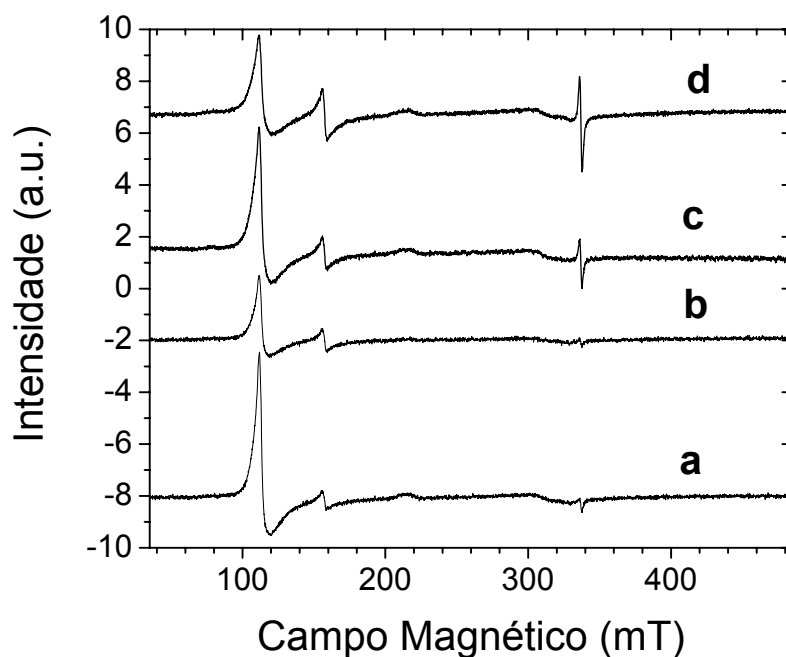
A figura 60 mostra os resultados para a MP-11/MCM-41 em pH 8,0. Houve uma diminuição significativa entre a forma baixo *spin* do ferro heme no espectro de EPR para Fe(III)MP-11 obtida antes da adição de peróxido de hidrogênio. A MP-11 é um peptídeo ácido, com  $pK_a = 4,7$  e desse modo deveria exibir alta afinidade por MCM-41 em baixos valores de pH. Portanto, em pH 5,0, uma grande quantidade de MP-11 associada a sílica mesoporosa deveria favorecer as coordenações inter e intra cadeias das moléculas de MP-11 aumentando principalmente a forma baixo *spin* do ferro heme. Um minuto após a adição do peróxido de hidrogênio, o sinal alto *spin* do Fe(III) abaixou e um sinal  $g = 4,290$  apareceu. O espectro EPR da suspensão aquosa da MP-11/MCM-41 em tampão universal pH 7,0 foi similar ao obtido em pastilhas de KBr (não mostrados).



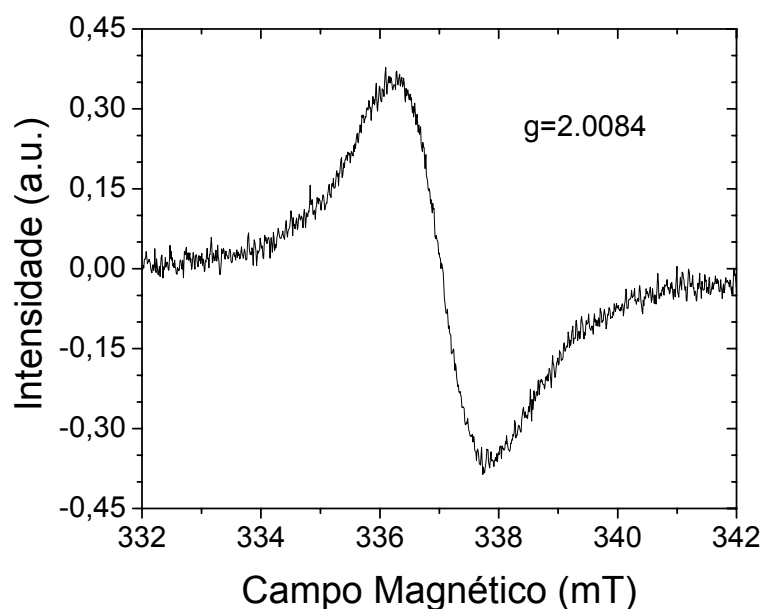


**Figura 60:** Espectro EPR onda contínua da MP-11/MCM-41. Linha *a*: pastilha de KBr contendo MP-11/MCM-41 em pH = 8,0; linha *b*: um minuto após a adição de 0,1 mol de peróxido de hidrogênio.

Trinta segundos após a adição do peróxido de hidrogênio, um sinal fraco de  $g = 4,290$  foi observado, como apresentado na figura 61, linha *a*. Cinco minutos após a adição de peróxido de hidrogênio, houve a conversão parcial do ferro heme de Fe(III) para a forma oxiferril (EPR silencioso) levando à diminuição do sinal  $g = 6,0$  (figura 61, linha *b*). Durante esse período o sinal  $g = 4,290$  permaneceu constante (figura 61, linha *b*). A subsequente adição do fenol restaurou parcialmente a intensidade do sinal do Fe(III)MP-11, que se combinou com o ciclo das peroxidases, tendo o fenol como agente redutor (figura 61, linha *c*). A presença do fenol também levou ao aparecimento de um sinal ( $g = 2,0089$ ) indicando radicais livres de fenol. Simultaneamente ao aumento do sinal  $g = 2,0089$ , o sinal de Fe(III)MP-11 abaixou e o sinal  $g = 4,2900$  aumentou sugerindo que o último sinal foi produzido à custa da forma nativa alto *spin* (figura 61, linha *d* e zoom na figura 62).



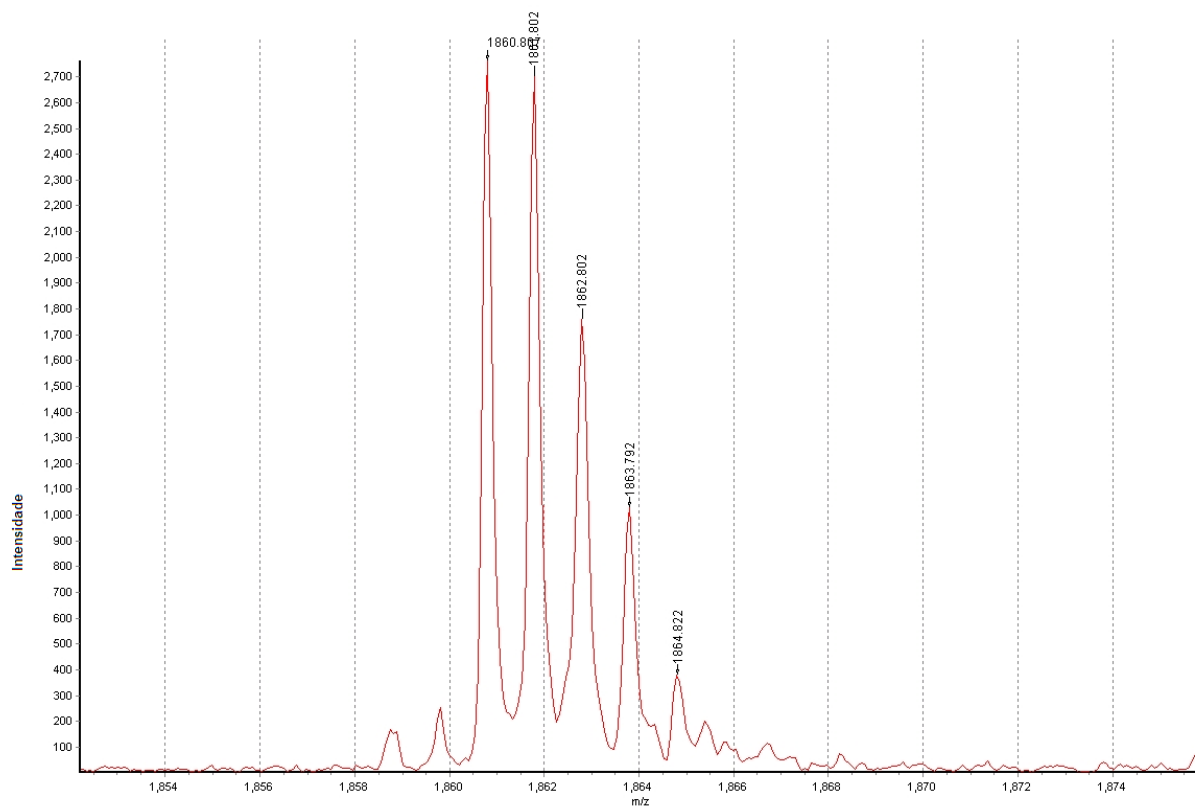
**Figura 61:** Espectro EPR onda contínua da MP-11/MCM-41. Linha *a*: suspensão da MP-11/MCM-41 em pH 7,0, 30 minutos após a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; linha *b*: 5 minutos após a adição de 0,5 mmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; linha *c*: imediatamente após a adição de 0,63 mmol de fenol e linha *d*: 30 minutos após a adição de fenol.



**Figura 62:** Espectro EPR onda contínua da MP-11/MCM-41. Zoom do espectro do radical obtido durante a reação descrita na figura 56. Os experimentos foram realizados em 4,2 K e 9,485501 GHz. Condições do espectrômetro: ganho 5,103, amplitude de modulação 1,0 mT, potência de microondas 4 mW, constante de tempo 10,24 ms e conversão de tempo 81,92 ms.

O sinal  $g = 4,290$  pode ser gerado pela conversão da MP-11 para a forma quimicamente modificada produzida pelo ataque dos radicais livres de fenol.

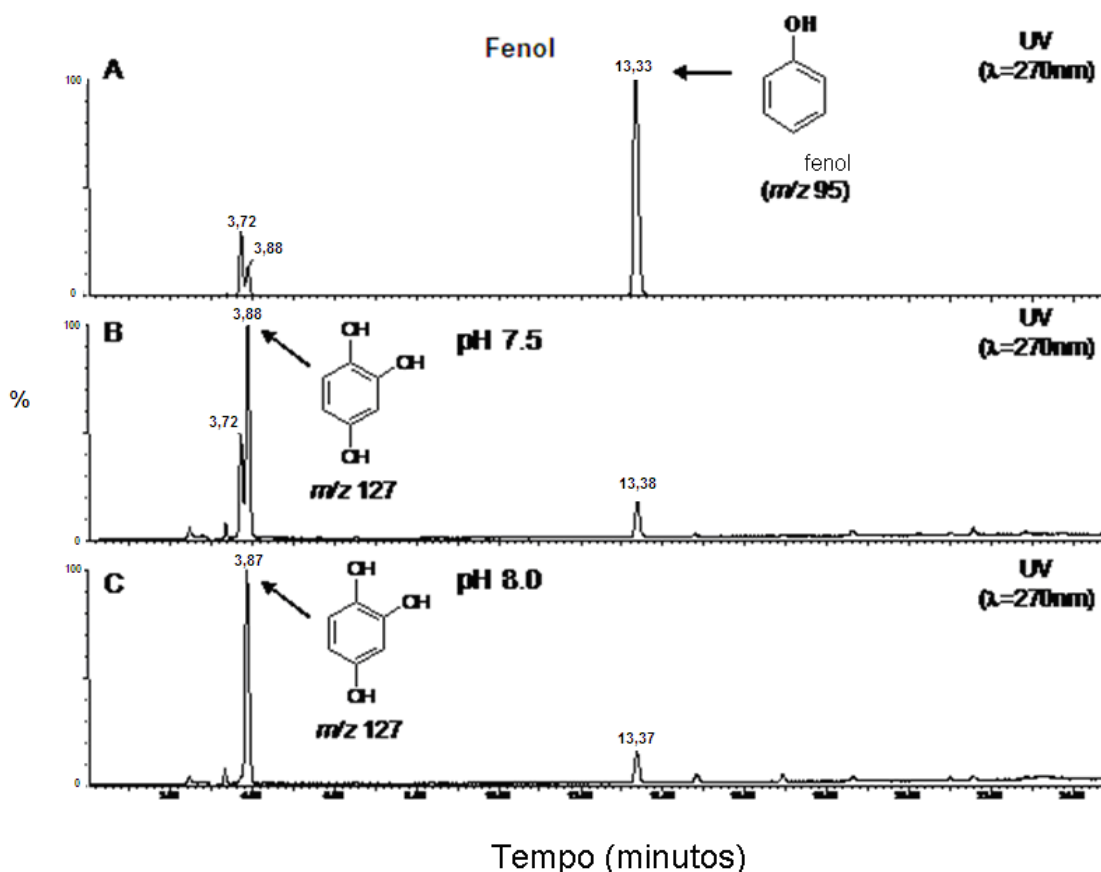
A análise feita pelo MALDI-ToF da MP-11 retirada das partículas MCM-41 causada pelo aumento do pH do meio (Figura 63) não revelou mudanças na massa da MP-11 em comparação com sua forma nativa. Conseqüentemente, a enzima quimicamente modificada ( $g = 4,290$ ) pode ser produzida em baixo rendimento e exibir alta afinidade pela MCM-41 mesmo em pH mais elevados. Então, as alterações espectrais observadas na banda N, já descritas, podem ser produzidas por alterações conformacionais do peptídeo devido à interação com os produtos derivados de fenol.



**Figura 63:** Análise realizada pelo MALDI-ToF. Espectro comprova que não houve mudança na massa da MP-11 após incorporação com a MCM-41 quando comparada com a sua forma nativa (1860 D).

Considerando que os resultados do EPR apontam para a oxidação do fenol pela MP-11/MCM-41, é necessário confirmar tal oxidação pela identificação dos produtos de reação. A determinação dos produtos oxidados do fenol e sua consumação após a reação com MP-11 foi realizada com cromatografia líquida de

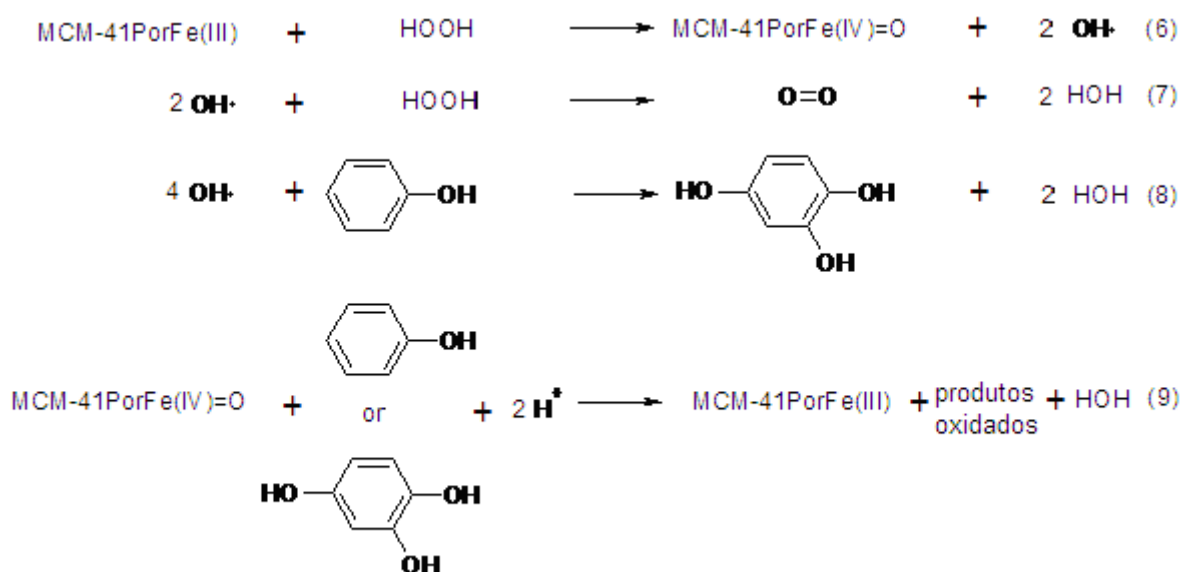
alta performance acompanhado de um espectrômetro de massa (HPLC/MS) (Figuras 64 A, 64 B, e 64 C). A figura 64 A mostra o cromatograma da amostra padrão de fenol obtida com absorção de UV monitorada a 270 nm. O tempo de retenção obtido nessas condições foi 13,33 min e foi associado com um íon  $m/z$  massa = 95 Da. As figuras 64 B e 64 C mostram cromatogramas dos sobrenadantes das reações que ocorreram em pH = 7,5 e 8,0, respectivamente. Em ambas as condições, o cromatograma revela uma diminuição significativa do sinal de fenol e aumento do sinal de retenção em 3,88 min (figura 64). O tempo de retenção de 3,88 min foi associado com  $m/z$  127 designado 2,4-diidroxifenol. Baseado nos dados do HPLC/MS, propõem-se o mecanismo de reação descrito nas equações de 6 a 9. A clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio com MP-11/MCM-41 gerou radicais hidroxil e converteram a enzima em um intermediário de alta valência, o Composto II. De forma similar ao descrito no sistema de oxidações heterogêneas ferro/magnetita/peróxido de hidrogênio,<sup>61</sup> os radicais hidroxil gerados pela MP-11 podem atacar as posições 2 e 4 do anel do fenol produzindo produtos hidroxilados. Radicais hidroxil podem também atacar o peróxido de hidrogênio restante desenvolvendo o oxigênio molecular, imitando a atividade catalítica. O fenol e os produtos hidroxilados podem atuar como agentes redutores do Composto II para completar o ciclo catalítico. Na adição de 2,4-diidroxifenol, outros produtos oxidados tais como derivados de quinonas e hidroquinonas, podem ser esperados. Há produtos que não podem ser detectados pela análise com HPLC/MS provavelmente devido ao baixo rendimento ou à adsorção dentro da sílica mesoporosa.



**Figura 64:** Análise da espectrometria HPLC-MS do produto da reação MP-11/MCM-41 com HOOH e fenol. (A) Cromatograma do padrão de fenol obtido pela absorção UV em 270 nm. (B) Produto da reação realizado em pH = 7,5. (C) Produto da reação realizada em pH = 8,0. Sinal corresponde a  $m/z$  127 que indica 2,4-diidroxifenol.

Com relação ao mecanismo proposto, é interessante notar que a catálise da MP-11/MCM-41 imita o sistema hepático do citocromo P-450 que catalisa a hidroxilação de anéis aromáticos e atua no mecanismo de drogas e esteróides vindos de medicamentos ingeridos. A diferença mais impressionante entre o mecanismo MP-11/MCM-41 e o sistema citocromo P-450 para promover a hidroxilação de compostos aromáticos é que o primeiro usa peróxido de hidrogênio e o segundo usa oxigênio molecular como agente de ativação do ferro heme. Trabalhos prévios descrevem o citocromo P-450<sup>100, 101</sup> e atividades de catálise<sup>102, 103</sup> da MP em solução, isto é, hidroxilação de anéis aromáticos e conversão de peróxido de hidrogênio em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Esses autores sugerem que a hidroxilação de compostos aromáticos catalisados por essas microenzimas ocorre via transferência de oxigênio do oxoferril (Fe(IV)=O) para os anéis aromáticos junto com a redução do ferro heme para restaurar a enzima no estado nativo. Por outro lado, a atividade catalítica da MP ainda não é entendida.<sup>101, 102</sup> Porém, trabalhos prévios não

consideram que ao contrário das peroxidases, a MP cliva o peróxido de hidrogênio preferencialmente por cisão homolítica e, dessa forma, gera radicais hidroxil. Assumindo que a clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio produz radicais hidroxil, é possível entender tanto o citocromo P-450 quanto as atividades catalíticas da MP (Equações 6 – 9).



A geração de uma espécie altamente reativa, o radical do hidroxil, pela MP-11 poderia responder pela considerável *bleaching* da banda Soret da MP-11 e a inativação da microenzima durante a reação com peróxido de hidrogênio em meio homogêneo (Figura 55). Apesar do fato da MP-11/MCM-41 também clivar o peróxido de hidrogênio pela cisão homolítica (Figuras 59, 60 e 61), um aumento no *bleaching* e uma inativação significativa da enzima não foram observadas nessas condições. Além da elevada estabilidade do catalisador, uma outra vantagem para a incorporação da MP-11 na sílica mesoporosa (MCM-41) torna-se evidente quando nós consideramos o uso desse catalisador para a degradação do fenol, um produto tóxico indesejável nos efluentes. Neste caso, é importante ter um catalisador que permita a fácil separação deste produto da água, isto é, a sua decantação, um procedimento que não é possível usando as MP-11 em solução.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

- Os sistemas contendo t-Butil hidroperóxido como ativadores parecem ser menos eficientes na degradação do fenol se comparado aos sistemas contendo peróxido de hidrogênio.
- Os sistemas contendo citocromo *c* e microperoxidase – 11 parecem degradar o fenol na presença do ativador peróxido de hidrogênio, o que parece não ocorrer quando mudamos o ativador para t-BuOOH.
- Porfirinas parecem não ser tão eficientes na degradação do fenol, porém se compararmos as porfirinas estudadas, parece que a que melhor desempenhou o papel de catalisador na degradação do fenol é a porfirina com zinco na presença de peróxido de hidrogênio.
- O sistema contendo HRP é um bom modelo, porém nas mesmas condições de concentração, ativador, tampão e tempo de reação este parece ser menos eficiente quando comparado aos sistemas contendo citocromo *c* e MP-11.
- A associação de Fe(III)MP-11 com MCM-41 resulta em um catalisador que, ao contrário da MP-11 em solução, não sofre inativação durante a reação com peróxido de hidrogênio. Este material conjugado possui propriedades catalíticas das duas subclasses: as peroxidases e as monooxygenases. Esta característica peculiar é possível porque o ferro do grupo heme da MP-11 promove a clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio que gera o radical do hidroxil, uma espécie ativada do oxigênio, capaz de promover a hidroxilação de compostos aromáticos, como por exemplo, o fenol.
- Considerando as características da Fe(III)MP-11/MCM-41 esboçado acima considera-se que este catalisador é um promissor dispositivo nanobiotecnológico.

Apesar de todas essas conclusões apresentadas, novas análises podem ser feitas visando melhorar a degradação do fenol. Algumas sugestões e perspectivas para trabalhos futuros são:

Testar sistemas contendo HRP e citocromo *c* incorporadas à sílica mesoporosa SBA-15 e verificar se mesmo encapsuladas essas proteínas são capazes de

degradar o fenol com pouco *bleaching* em suas bandas Soret, assim como ocorreu com a MP-11.

Otimizar as condições para identificar os produtos formados pela degradação do fenol, onde eles não foram identificados.

Analisar e testar a catálise com MP-11 e com citocromo *c* adsorvidos nos nanotubos de carbono.

Publicar os resultados obtidos nesse trabalho.

Desenvolver de catalisadores fotoquímicos contendo porfirinas para a degradação de peróxidos (Doutorado).



## REFERÊNCIAS

01. BATTERSBY, A. R., FOOKES, C. J. R., MATCHAM, G. W. J. e McDONALD, E. Biosynthesis of the pigments of life: formation of a macrocycle. **Nature**, v. 285, 17-21, 1980.
02. PRIETO, T. **Microperoxidases associadas a micelas de CTAB: uma lipoenzima com atividade de peroxidase**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, 2004.
03. NEPOMUCENO, M. F., TABAK, M.; e VERCESI, A. E. Opposite Effects of Mn(III) and Fe(III) forms of *meso*-Tetrakis(4-N-methyl pyridiniumyl) Porphyrins on Isolated Rat Liver Mitochondria. **Journal of Bioenergetics**, v. 34, n. 1, p. 41-17, 2002.
04. VOET, D.; VOET, J. G. e CHARLOTTE, W. P. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000 p. 162-163, 286, 651-654. Capítulo 20
05. DUNFORD H. B. **Heme Peroxidases**, Wiley-VCH, 1999, New York p.1-24.
06. **Porfirina**. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Porfiria>>. Acesso em: 17/11/2007.
07. FURTMÜLLER, P. G., ZEDERBAUER, M., JANTSCHKO, W., Helm, J., BOGNER, M., JAKOPITSCH, C. e OBINGER, C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, 199-213, 2006.
08. DICHERSON, R. E. The structure and history of an ancient protein. **Sci. Am.** v. 226, p. 58-72, 1972.
09. GASPAR, T. H.; PENEL, C. L.; THORPE, T. e GREPPIN, H. **Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève: Université de Genève, Centre de Botanique, Genève, p.313 , 1982.
10. HINER, N. P. A.; RUIZ, J. H.; LÓPEZ, J. N. R.; CÁNOVAS, F. G.; BRISSET, N. C.; SMITH, A. T.; ARNAO, M. B. e ACOSTA, M. Reactions of the class II peroxidases, lignin peroxidase and *Arthromyces ramosus* peroxidase, with hydrogen

peroxide. Catalase-like activity, compound III formation, and enzyme inactivation. **Journal of Biological Chemistry** v. 277, n. 9, p. 26879-26885, 2002.

11. JORGE S. G., **Porfirinas Hepáticas**. Hepcentro. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/porfiria.htm>>. Acesso em: 20/11/2007

12. **Propriedades benéficas à saúde das proteínas de soro e frações de soro**. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/propriedadesbeneficas.htm>>. Acesso em 03/06/2008

13. ORTIZ de MONTELLANO, P. R. e NISHIDA, C. **Peroxidases and protein radicals**. Department of Pharmaceutical Chemistry, San Francisco, CA, USA. Disponível em: <<http://www.sacs.ucsf.edu/home/Ortiz/res-po.htm>>. Acesso em 11/02/2008

14. MOURA, W. L.; MATUSHIMA, E. R.; OLIVEIRA, L. W. e EGAMI, M. I. **Morphological and cytochemical observations of blood cells of *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia)**. Disponível em : <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-95961999000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es)> acesso em 02/07/2008 Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science v.36 n.1 São Paulo 1999

15. PROMISE – The Prosthetic groups and Metal Ions in Protein Active sites Database Version 2.0. **Haem proteins**. University of Leeds, 1998. Disponível em: <<http://metallo.scripps.edu/PROMISE/ANPEROXIDASE.html>>. Acesso em : 11/02/2008.

16. RAHMAN, I.; BISWAS, S. K. e KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **Eur Journal of Pharmacology**. v. 533, n. 1-3, p.222-239, 2006.

17. GRISEBACH, H.; LIGNINS. In: CON, E.E.; STUMPF, P.K. (Ed.) The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise. **New York: Academic Press**, v.7, c.15, p. 457-479, 1981.

18. STRACK, D. Phenolic metabolism In: Dey, P.M.; Harborne, J.B. (Ed.) Plant biochemistry. **London: Academic Press**, c. 10, p. 387-416, 1997.

19. TENHAKEN, R.; LEVINE, A.; BRISSON, L. F.; DIXON, R. A. e LAMB, C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proc. Natl. Ac. Science (USA)** v. 92, p. 4158-4163, 1995.

20. BARZ, W. e KOSTER, J. Turn over and degradation of secondary (natural) products. In: Con, E. E.; Stumpf, P. K. (Ed.) *The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. **New York: Academic Press**, v.7, cap.15, p. 457-479, 1981.

21. BAEK, H. K. e VAN WART, H. E. Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound O, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum. **Biochemistry**, v. 28, p. 5714-5719, 1989.

22. MUKAI, M.; NAGANO, S.; TANAKA, M.; ISHIMORI, K.; MORISHIMA, I.; OGURA, T.; WATANABE, Y. e KITAGAWA, T. Effects of concerted hydrogen bonding of distal histidine on active site structures of horseradish peroxidase. Resonance raman studies with Asn70 mutants **Journal American Chemical Society**, v. 119, p. 1758-1766, 1997.

23. ORTIZ de MONTELLANO, P.R. Catalytic Sites of Hemoprotein Peroxidases **Annual Reviews Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 89-107, 1992.

24. SAVENKOVA, M.I.; KUO, J.M. e ORTIZ de MONTELLANO, P.R. Improvement of peroxxygenase activity by relocation of a catalytic histidine within the active site of horseradish peroxidase. **Biochemistry**, v. 37, p. 10828-10836 1998.

25. SMITH, A. T. e VEITCH, N. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases (review). **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 2, p. 269-278, 1998.

26. SCOTT, T. A.; MAUK, A.G. **Cytochrome c: a multidisciplinary approach**. California: University of Science Book, 1996. 738 p.

27. MUGNOL, K. C. U. **Caracterização espectroscópica de citocromo c e baixo spin com baixo grau de rrombicidade através de uso de micelas reversas de AOT/Hexano e micelas aquosas de SDS**. Mogi das Cruzes, 2004 108 p. Mestrado (Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes.

28. REDOVICH, M.; CURTH, S.; DEAN, J.; TURNER, D.; BOBRICK, M.; WILLIAMS, T.; WILLIAMS, S. **Molecules**. Disponível em: <<http://www.steve.gb.com/images/molecules/porphyrins/cytochrome-a.png>>. Acesso em: 13/10/2007

29. REDOVICH, M.; CURTH, S.; DEAN, J.; TURNER, D.; BOBRICK, M.; WILLIAMS, T.; WILLIAMS, S. **Molecules**. Disponível em: <<http://www.steve.gb.com/images/molecules/porphyrins/cytochrome-b.png>>. Acesso em: 13/10/2007

30. REDOVICH, M.; CURTH, S.; DEAN, J.; TURNER, D.; BOBRICK, M.; WILLIAMS, T.; WILLIAMS, S. **Molecules**. Disponível em: <<http://www.steve.gb.com/images/molecules/porphyrins/cytochrome-c.png>>. Acesso em: 13/10/2007

31. TZAGOLOFF, A. **Mitochondria**. New York:Plenum; 1982.

32. **Spectroscopic properties of cytochromes**. Disponível em <<http://www.cerm.unifi.it/CHBIOIN/lez5a.htm>>. Acesso em: 05/06/08.

33. SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**, 3 ed. Porto Alegre, editora Bookman, 2003, c. 19, p. 684-710.

34. KEILIN, D., **The history of cell respiration and cytochrome**. Cambridge Univ. Press, London and New York, 1966.

35. MARGOLIASH, E. e SCHEJTER, A. Cytochrome c. (Review) **Advan. Protein Chem.** v. 21, p. 113-286, 1966.

36. LEMBERG, R. e BARRET, J. The cytochromes. **New York: Academic Press**, Julho 1973, 580 pp.

37. MARGOLIASH, E. e WALASEK, O. F. Cytochrome c from Vertebrate and Invertebrate Sources. **Meth. in Enzimol.**, v. 10, p. 339-348, 1967.

38. KUNKEL, D. **Microscopy**. Disponível em: <<http://student.cbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/proeu/images/1537a.jpg>>. Acesso em: 17/09/2007

39. NELSON, D. L.; COX, M. M., **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3 ed., São Paulo, editora Sarvier, 2002, c. 515, p. 525.

40. NICHOLLS, P. Cytochrome *c* binding to enzymes and membranes. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 346, p. 261-310, 1974.

41. DICKERSON, R. E. e TIMKOVICH, R. The Porphyrins (Dolphin, D., ed.), **New York : Academic Press**, p. 397-547, 1979.

42. KLUCK, R. M.; BOSSY-WETZEL, E; GREEN, R. D. e NEWNEYER, D. D. The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, p. 1132-1136, 1997.

43. YANG, J.; LIU, X. S.; BHALLA, K.; KIN, C. N.; IBRADO, A. M.; CAI, J.; PENG, T.; JONES, D. P. e WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. **Science**, v. 275, p. 1129-1132, 1997.

44. PAN, Z.; VOEHRINGER, D. W. e MEYN, R. E. Analysis of redox regulation of cytochrome *c*-induced apoptosis in a cell-free system. **Cell Death Differ.** , v. 7, p. 683-688, 1999.

45. PELLETIER, H. e KRAUT, J. Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*. **Science**, v. 258, p. 1748-1755, 1992.

46. BARR, D. P. e MANSON, R. P. Mechanism of Radical Production from the Reaction of Cytochrome *c* with Organic Hydroperoxides. An EPR spin Trapping Investigation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 12709 – 12716, 1995.

47. NANTES, I. L.; FALJONI-ALARIO, A.; NASCIMENTO, O. R.; BANDY, B.; GATTI, R. e BEACHARA, E. J. H. Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome *c* by tert-butyl hydroperoxide: a magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation. **Free Radical Biol. Med.**, v. 28, n.5, p. 786-796, 2000.

48. PRIETO, T.; MUGNOL, K. C. U.; ARAUJO, J. C.; SOUZA, F. L.; SOARES, V. A.; CILENTO, G. e NANTES, I. L. Peroxidase model systems in heterogeneous media. **Research Signpost**, Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media, p. 1-29, 2007.

49. LOW, D. M.; GRAY, H. B. e DUUS, J. O. Paramagnetic NMR Spectroscopy of Microperoxidase-8. **Journal American Chemical Society**, v. 119, n. 1, p. 1-5, (1997) 1.

50. DICKERSON, R. E.; TAKANO, T.; EISENBERG, D.; KALLAI, O. B.; SAMSON, L.; Cooper, A. e MARGOLIASH, E. Ferricytochrome c. I. General features of horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 5, p. 1511-1535, 1971.

51. SHARMA, V. S.; SCHIMIDT, M. R. e RANNEY, H. M. Dissociation of CO from Carboxyhemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 4267-4272, 1976.

52. KIMURRA, K.; PETERSON, J.; WILSON, M. T.; COOKSON, D. J. e WILLIAMS, R. J. **Journal of Inorganic Chemistry**, v. 15, p. 11-25, 1981.

53. TATSUMA, T. e WATANABE, T. Peroxidase Model Electrodes: Sensing of Imidazole Derivatives with Heme Peptide-Modified Electrodes. **Anal. Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 143-147, 1992.

54. WANG, J. S.; HAESUN, K. B. e VAN WART, H. E. High-valent intermediates in the reaction of N<sub>α</sub>-acetyl microperoxidase-8 with hydrogen peroxide: Models for compounds O, I and II of horseradish peroxidase. **Biochemical and Biophysical Res. Commun**, v. 179, n. 3, p. 1320-1324, 1991.

55. BAADER, W. J.; BOHNE, C.; CILENTO, G. e DUNFORD, H. B. Peroxidase-catalyzed formation of triplet acetone and chemiluminescence from isobutyraldehyde and molecular oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 10217-10225, 1985.

56. PRIETO, T.; NASCIMENTO, O. R.; TERSARIOL, I. L. S.; FALJONI-ALARIO, A. e NANTES, I. L. Microperoxidase-8 Associated to CTAB Micelles: A New Catalyst with Peroxidase Activity. **J. Phys. Chem. B.**, v. 108, n. 30, p. 11124-11132, 2004.

57. PRIETO, T.; NASCIMENTO, O. R. e NANTES, I. L. Microperoxidase-9 cycle in the presense of cetyltrimethylammonium bromide micelles: *tert*-butyl hidroperoxide as both na oxidizing and a reducing agent. **Prog. Colloid. Polym. Sci.** v. 128, p. 1-5, 2004.

58. TODOROVIC, V. Acute Phenol Poisoning. **Méd. Pregl.** v. 56, n. 1, p. 37-41, 2003.

59. BELL, J.; YOUNG, E. e STEPHENS, S. **Phenol Phartway (Anaerobic)** University of Minnesota, 2006. Disponível em: <[http://umbbd.ahc.umn.edu/phe/phe\\_map.html](http://umbbd.ahc.umn.edu/phe/phe_map.html)>. Acesso em: 28/11/2007

60. ARAUJO, B. S.; CHARLWOOD, B. V. e PLETSCH, M. **Estudos sobre o metabolismo degradativo do fenol e seus cloroderivados em raízes geneticamente transformadas de cenoura.** Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal de Alagoas. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0876-2/index.html>>. Acesso em: 28/11/2007

61. **Lignina e Compostos Modelos.** Universidade Federal de São João Del-Rei – UFSJ Departamento de Ciências Naturais – DCNAT. Disponível em: <[http://www.ufsj.edu.br/Pagina/dcnat/lignina\\_e\\_compostos\\_modelo.php](http://www.ufsj.edu.br/Pagina/dcnat/lignina_e_compostos_modelo.php)>. Acesso em: 28/11/2007

62. AGOSTIN, E. **Lignina, un recurso que promete.** Figura do site reproduzida com permissão da "*Real-World Cases in Green Chemistry*," da Sociedade Americana de Química. Disponível em: <<http://html.rincondelvago.com/fabricacion-del-papel.html>>. Acesso em: 28/11/2007.

63. **Draft Toxicological Profile for Phenol,** U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, September 2006, disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp115-p.pdf>> Acesso em: 30/05/2008

64. ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente.** Bookman, Porto Alegre, 2005, cap. 1, 148-154.

65. ZUCCHI, M. R.; **Existência de diferentes estados de *spin* dos íons  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  do citocromo c resultantes da interação com lipossomos modelos.** São Carlos, 2001.

66. HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, vol. 27, nº6, 986-992, 2004.

67. BEKYAROVA, E.; NI, Y.; MALARKEY, E. B.; MONTANA, V.; McWILLIAMS, J. L.; HADDON, R. C. e PARPURA, V. Applications of carbon nanotubes in biotechnology and biomedicine. **J. Biomed. Nanotech.**, v. 1, n1, p. 3-17, 2005.

68. LEE, Y. M.; KWON, O. Y.; YOON, Y. J. e RYU, K. Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties. **Biotechnology Letters**, n 28, p. 39-43, 2006.

69. BECK, J.S.; VARTULI, J. C.; ROTH, W. J.; LEONOWICZ, M. E.; KRESGE, C. T.; SCHMITT, K. D.; CHU, C. T. W.; OLSON, D. H.; SHEPPARD, E.W.; McCULLEN, S.B.; HIGGINS, J. B. e SCHLENKER, J. L., A New Family of Mesoporous Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. **J. Am. Chem.Soc.** v. 114, n. 27, p. 10834-10843, 1992.

70. KRESGE, C. T.; LEONOWICZ, M. E.; ROTH, W. J.; VARTULI, J. C. e BECK, J.S Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid – cristal template mechanism. **Nature** v. 359, p. 710-712, 1992.

71. TANAMURA, Y.; UCHIDA, T.; TERAMAE, N.; KIKUCHI, M.; KUSABA, K. e ONODERA, Y. Ship-in-a-Bottle Synthesis of Copper Phthalocyanine Molecules within Mesoporous Channels of MCM-41 by a Chemical Vapor Deposition Method. **Nano Lett.** v. 1, n. 7, p. 387- 390, 2001.

72. BOBOARDO, S.; BORELLO, L.; FIORILLI, S.; GARRONE, E.; ONIDA, B.; AREAN, C. O.; PENAZZI, N. e PALOMINO, G. T. Methylene blue encapsulated in sílica-based mesophases: characterisation and eletrochemical activity. **Micropor. Mesopor. Mater.** v. 79, p. 275-281, 2005.

73. ROHLFING, D. F.; RATHOUSKY, J.; ROHLFING, Y.; BARTELS, O. e WARK, M. Functionalized Mesoporous Silica Films as a Matrix for Anchoring Electrochemically Active Guests **Langmuir**, v. 21, n. 24, p. 11320-11329, 2005.

74. DEERE, J.; MAGNER, E.; WALL, J. G. e HODNETT, B. K. Mechanistic and Structural Features of Protein Adsorption onto Mesoporous Silicates. **J. Phys. Chem. B** v. 106, n. 29, p. 7340-7347, 2002.

75. DÍAZ, J. F. e BALKUS Jr., K. J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v.2, n. 2-3, p. 115-126, 1996.

76. SCHÜNEMANN, V.; TRAUTWEIN, A. X.; RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; Bahl, K.; COLAPIETRO, C.; PIECH, M. e AUSTIN, R. N. Characterization of Iron (III) Tetramesitylporphyrin and Microperoxidase-8 Incorporated into the Molecular Sieve MCM-41. **Inorg. Chem.** v. 38, n. 21, p. 4901-4905, 1999.

77. SOUSA, A. e SOUSA, E. M. B. Ordered Mesoporous Silica Carrier System Applied in nanobiothecnology, **Brazilian Archives of Biology and Tecnology.** v. 48, p. 243-250, 2005.



78. SINHA, N. e YEOW, J. W., Carbon nanotubes for biomedical applications. **IEEE Transactions on nanobioscience**, v. 4, n 2, p. 180-195, 2005.

79. FERREIRA, O. P.; SOUZA FILHO, A. G.; MENDES FILHO, J. e ALVES, O. L. Unveiling the Structure and Composition of Titanium Oxide Nanotubes through Íon Exchange Chemical Reactions and Thermal Decomposition Processes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 2, p. 393-402, 2006.

80. CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. **Biological spectroscopy**. The Benjamin / Cimmungs. Publishing Company Ind., California, 1984.

81. CIENFUGIS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 30-35, 2000.

82. GONÇALVES, M. L. S. S.; **Métodos Instrumentais para análise de soluções**. Fundação Calouste Gulbernian, Lisboa, cap. 5, 173-182.

83. DUARTE, M. F. **Espectrometria de Massa de Electrospray – Técnica do presente e do futuro**. Disponível em: <[http://www.dqb.fc.ul.pt/docentes/fduarte/espectrometria\\_de\\_massa\\_de\\_elect.htm](http://www.dqb.fc.ul.pt/docentes/fduarte/espectrometria_de_massa_de_elect.htm)>. Acesso em: 28/01/2008.

84. **Breve Revisão de Espectrometria de Massa e da Técnica de PDMS**. c. 2 Certificação digital n. 0124802/CA. PUC-Rio Disponível em: <[http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0124802\\_03\\_cap\\_02.pdf](http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0124802_03_cap_02.pdf)>, Acesso em: 28/01/2008.

85. EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. 1ª ed. Brasil: Editora Edgard Blücher Ltda, 1972, p. 41.

86. PALMA, M. S.; MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R. **MALDI-ToF-MS: Theory and Practice**. LSBZ, Rio Claro, cap. 1.

87. **Teoria de MALDI-ToF/MS**. SHIMADZU do Brasil. Disponível em: <<http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/biotech/maldi-teoria.aspx>>. Acesso em: 28/01/2008.

88. DEARDEN, L. V.; WOOLLEY, E. M. Osmotic coefficient of CTAB in water and in aqueous sodium bromide solutions at 55°C. **J. Phys. Chem.**, v. 91, n. 9, p. 2404-2408, 1987.

89. MOURA, F. C. C.; ARAUJO, M. H.; DALMÁZIO, I.; ALVES, T. M.A.; SANTOS, L. S.; EBERKIN, M. N.; AUGUSTI, R. e LAGO, R. M. Investigation of reaction mechanisms by electrospray ionization mass spectrometry: characterization of intermediates in the degradation of phenol by a novel iron/magnetite/hydrogen peroxide heterogeneous oxidation system. **Rapid Communications in mass spectrometry**, v. 20, p. 1859-1863, 2006.
90. TCHAIKOVSKAYA, O. N.; MIKHALEVA, I. A. Optics and spectroscopy. Phenol and anisol fluorescence quenching in aqueous micellar solutions. **Russian Physics Journal**, v. 49, n. 4, p. 427-434, 2006.
91. RIPOSATI, A.; PRIETO, T.; SHIDA, C. S.; NANTES, I. L.; NASCIMENTO, O. R. Low spin states of microperoxidases produced by inter-and intra-peptide chain sixth ligands: Effect of pH and the oligopeptide type. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 226-238, 2006.
92. URRY, D. W. e PETTEGREW, J. W. Model systems for interacting heme moieties. II. Ferriheme octapeptide of cytochrome c. **J. Am. Soc.**, v. 89, n. 20, p. 5276-5283, 1967.
93. KRESGE, C. T.; LRONOWICZ, M. E., ROTH, W.J.; VARTULI, J. C. e BECK, J. S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. **Nature**, v. 359, p.710-712, 1992.
94. BALDWIN, D. A.; MARQUES, H. M. e PRATT, J.M. Hemes and Hemoproteins. 5: Kinetics of the Peroxidatic Activity of Microperoxidase-8: Model for the Peroxidase Enzymes **J. Inorg. Biochem.**, v. 30, p. 203-217, 1987.
95. CHEECK, J.; LOW, D.W.; GRAY, H. B. e DAWSON, J. H. Histidine-Tailed Microperoxidase-10: A pH-Dependent Ligand Switch **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v, 253, n. 2, p. 195-198, 1998.
96. DUNFORD, H. B. e STILLMAN, J. S. On the function and mechanism of action of peroxidases **Coord.Chem. Rev.**, v. 19, n. 3, p. 187-251, 1976.
97. ASSIS, M. D.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. e NASCIMENTO, O. R. An EPR and electronic spectroscopy study of intermediates in a mono o-nitro substituted iron porphyrin reaction with iodosylbenzene. **Inorg. Chim. Acta**, v. 187, n. 1, p. 107-14, 1991

98. KHINDARIA, A. e AUST, S. D. EPR Detection and Characterization of Lignin Peroxidase Porphyrin  $\pi$ -Cation Radical. **Biochemistry**, v. 35, n. 40, p. 13107-13111, 1996.
99. ZUCCHI, M. R.; NASCIMENTO, O. R.; FALJONI-ALARIO, A., PRIETO, T. e NANTES, I. L. Modulation of cytochrome *c* spin states by lipid acyl chains: a continuous-wave electron paramagnetic resonance (CW-EPR) study of haem iron. **Biochem. J.**, v. 370, p. 671-678, 2003.
100. RICOUX, R.; BOUCHER, J. L.; MANSUY, D. e MAHY, J. P. Microperoxidase 8 catalyzed nitration of phenol by nitrogen dioxide radicals. **Eur. J. Biochem.**, v.268, n. 13, 3783-3788, 2001.
101. SPEE, J. H.; BOERSMA, M. G.; VEEGER, C.; SAMYN, B.; VAN BEEUMEN, J.; WARMERDAM, G.; CANTERS, G. W.; VAN DONGEN, W. M. e RIETJENS, I. M. The Influence of the Peptide Chain on the Kinetics and Stability of Microperoxidases. **Eur. J. Biochem.**, v. 241, n. 1, p. 215-220, 1996.
102. CLORE, G. M.; HOLLAWAY, M. R.; PETERSON, J.; e WILSON, M. T. The kinetics of the reactions of low spin ferric haem undecapeptide with hydrogen peroxide **Inorg. Chim. Acta**, v. 56, p. 143-148, 1981.
103. JENG, W.-Y.; TSAI, Y. -H. e CHUANG, W. -J. The catalase activity of *N*<sup>α</sup>-acetyl-microperoxidase-8 **Journal of Peptide Research**, v. 64, n. 3, 104-109, 2004.

# Peroxidase Catalytic Cycle of MCM-41-Entrapped Microperoxidase-11 as a Mechanism for Phenol Oxidation

Juliana C. Araujo<sup>1</sup>, Tatiana Prieto<sup>1</sup>, Fernanda M. Prado<sup>2</sup>, Fabiane J. Trindade<sup>1</sup>,  
Gabriel L. C. Nunes<sup>1</sup>, Jean G. dos Santos<sup>1</sup>, Paolo Di Mascio<sup>2</sup>, Francisco L. Castro<sup>3</sup>,  
Glauber J. T. Fernandes<sup>3</sup>, Valter J. Fernandes, Jr.<sup>4</sup>, Antônio S. Araujo<sup>4</sup>, Mário J. Politi<sup>2</sup>,  
Sergio Brochsztain<sup>1</sup>, Otaciro R. Nascimento<sup>5</sup>, and Iseli L. Nantes<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica-CIIB Universidade de Mogi das Cruzes-UMC, Mogi das Cruzes – SP, Brazil

<sup>2</sup>Depto de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP-São Paulo – SP, Brazil

<sup>3</sup>Centro de Tecnologia do Gás, Av. Capitão-Mor Gouveia, 1480, Natal-RN, 59063-400, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, S/N, Natal-RN, 59078-970, Brazil

<sup>5</sup>Grupo de Biofísica, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP-São Carlos, São Carlos – SP, Brazil

The encapsulation of microperoxidases (MPs) into molecular sieves with controlled pore size, such as the mesoporous silica MCM-41, represents a nanotechnology strategy to control the catalytic properties of MPs and mimic the enzymatic activity of hemoproteins. In this work, the ferric microperoxidase-11 (MP-11), obtained from trypsin-catalyzed hydrolysis of horse-heart cytochrome *c*, was entrapped in MCM-41, thus resulting in a catalyst (Fe(III)MP11MCM41) with catalase and monooxygenase properties. The entrapment of MP-11 inside MCM-41 was confirmed by elemental analysis and UV-visible spectrum, with a red shift in the Soret band indicating that the heme group was in a hydrophobic microenvironment. Similarly to catalase, the catalyst Fe(III)MP11MCM41 exhibited specificity for hydrogen peroxide to be converted to a high-valence oxidized intermediate, Compound II. Also mimicking catalase, the cleavage of hydrogen peroxide by MP11MCM41 resulted in O<sub>2</sub> production detected by a Clark electrode. Phenol was able to act as reducing agent of MP11MCM41 Compound II leading to the completion of a peroxidase cycle, as confirmed by UV-visible spectrometry and EPR measurements. The analysis of the reaction products by high performance liquid chromatogram coupled to tandem mass spectrometry (HPLC/MS) revealed 2,4-dihydroxyphenol as the product of phenol oxidation by MP11MCM41. Therefore, in addition to catalase activity, the catalyst MP11MCM41 also displayed monooxygenase properties, which was possible because the MP-11 heme iron promotes homolytic cleavage of the hydrogen peroxide generating hydroxyl radicals. With such characteristics, MCM-41-entrapped MP-11 is a promising catalyst for nanobiotechnological devices.

**Keywords:** Microperoxidase-11, MCM-41, Phenol, Free Radicals, Peroxidase Cycle.

## 1. INTRODUCTION

Microperoxidases (MP) are hemepeptides obtained by proteolytic digestion of cytochrome *c*,<sup>1–4</sup> which can be prepared with various amino acid residues comprising the polypeptide chain attached to the heme group.<sup>5,6</sup> According to the sequence of native cytochrome *c*, from which these peptide fragments are derived, four types of microperoxidase were identified: microperoxidase-6

(CAQCHT), -8 (CAQCHTVE), -9 (KCAQCHTVE) and -11 (VQKCAQCHTVE). In a similar way to cytochrome *c*, in the MP structure the heme moiety remains covalently linked to Cys-14 and Cys-17 by thioether bridges and histidine is maintained as the fifth heme iron ligand but not methionine at the sixth coordination position. The absence of methionine sulfur at the sixth coordination position of heme iron allows this site to be occupied by a number of ligands,<sup>7</sup> since in aqueous solutions it is coordinated with a water molecule. Due to these structural characteristics, MP are considered a realistic model for studying the

\*Author to whom correspondence should be addressed.

redox mechanism of hemoproteins such as cytochromes,<sup>8</sup> hemoglobin,<sup>9</sup> myoglobin<sup>5</sup> and peroxidases.<sup>10–13</sup> MP are able to convert a wide variety of organic compounds at the expense of hydrogen peroxide in a peroxidase type chemistry.<sup>12–14</sup> Three oxidation states of horseradish peroxidase (HRP), ferric (native form and Compound 0), Compounds I and II, are known and formed during the peroxidase cycle of the enzyme. In the peroxidase cycle, the first step is the conversion of the resting enzyme Compound 0 that exhibits Fe(III) coordinated with a deprotonated hydrogen peroxide molecule. This species has been detected for HRP at low temperature and corresponds to the porphyrin iron-hydroperoxide (PorFe(III)-OOH) species.<sup>15</sup> Compound 0 is converted into Compound I (oxoferryl  $\pi$ -cation radical) by the heterolytic cleavage of peroxides. This step generates the reduced form of the peroxide (water for HOOH and alcohol-derived for ROOH). Compound I is converted to Compound II (oxoferryl heme iron) by attacking another peroxide molecule or another reducing agent as depicted in Scheme 1.

High-valence intermediates (Compounds I and II) of MP have been detected during the reaction with hydrogen peroxide, which makes this hemepeptide a good model for Compounds 0, I and II of HRP.<sup>15, 16</sup> Recently, we have also detected the high-valence intermediates of MP associated to CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) micelles.<sup>12, 13</sup> These MP/CTAB complexes behave as lipoenzymes and exhibit interesting redox characteristics including the ability to reproduce a typical peroxidase cycle. By using MP/CTAB complexes it is possible to modulate the reaction mechanism of aldehyde oxidation according to the MP/CTAB ratio, an important characteristic for future application of this catalyst.

In the present work, we report the inclusion of MP-11 in the channels of mesoporous silica MCM-41 and the ability of MP-11, in the resulting material, to be activated by hydrogen peroxide and degrade phenol, an undesirable

waste product in effluents. MCM-41 is a molecular sieve synthesized using surfactant micelles as templates.<sup>17, 18</sup> This nanostructured material consists of highly ordered hexagonal arrays of one-dimensional channels, with large surface area and narrow pore size distribution. Owing to the large pore size, ranging from 1.5 to 10 nm, MCM-41 has the ability to encapsulate large aromatic organic molecules, such as phthalocyanines, methylene blue and ferrocene,<sup>19–21</sup> and even small proteins such as cytochrome *c*.<sup>22, 23</sup> Recently, a report appeared in the literature describing the encapsulation of MP-11 in MCM-41, but studies about the use of the materials as catalysts were not included in that article.<sup>24</sup>

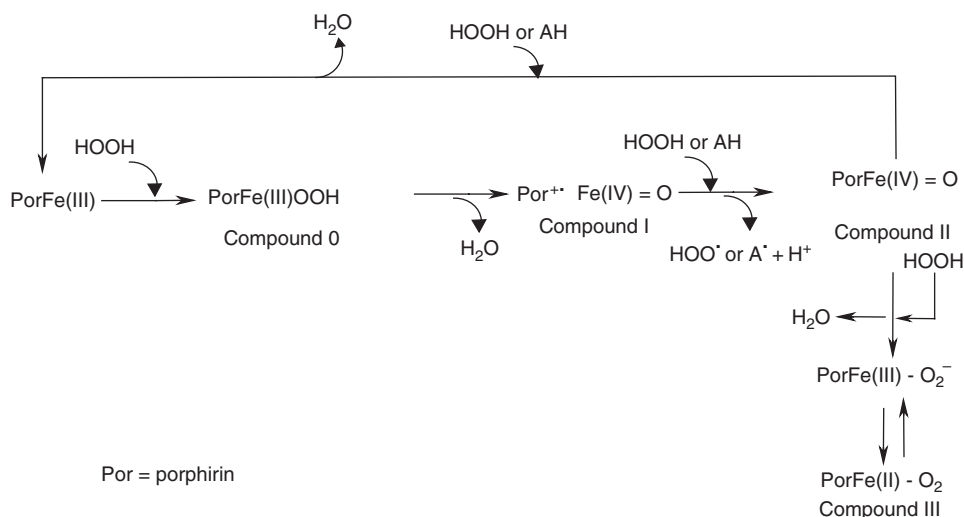
## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemicals

Microperoxidase-11 and HOOH were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); phenol was obtained from LabSynth (Diadema, SP, Brazil). The concentration of the dilute HOOH solutions was always checked spectrophotometrically using the molar extinction coefficient at 240 nm,  $\epsilon_{240} = 39.4 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Ref. [25]). All aqueous solutions were prepared with deionized water (mixed bed of ion exchanger, Millipore) and the pH was measured using a combined glass electrode (Orion Glass pH SURE-FLOW<sup>TM</sup>). The reference electrode (ROSS<sup>TM</sup>, model 8102) was filled with Orion Filling Solution (ROSS<sup>TM</sup>). The pH meter was calibrated using METREPAK pHydrion standard buffer solutions (Brooklyn, NY).

### 2.2. MCM-41 Synthesis

MCM-41 was synthesized starting from silica gel (Merck), sodium silicate solution containing 63% SiO<sub>2</sub> and 18% Na<sub>2</sub>O (Hiedel de Haen), CTAB, Vetec, and distilled water.



Scheme 1.

For adjusting the pH 30% acetic acid in ethanol solution was used. In a typical synthesis the gel was prepared by adding 5.62 g of silica to an aqueous solution containing 1.45 g of Na<sub>2</sub>O and 42.16 mL of water. After stirring for 2 hours at 60.0 °C, a solution prepared from 8.53 g of CTAB and 42.16 mL of distilled water was added and the mixture was aged for 1 h at room temperature. The resulting homogeneous mixture was crystallized under static hydrothermal conditions at 100.0 °C in a Teflon-lined stainless steel autoclave for 120 hours. The molar composition of the initial gel mixture was 1.00 CTAB: 4.00 SiO<sub>2</sub>: 1.00 Na<sub>2</sub>O: 200 H<sub>2</sub>O. The solid product was obtained by filtration, washed with 2% HCl: EtOH solution and dried overnight at 100.0 °C. Finally the material was calcined at 500.0 °C for 1 hour under nitrogen atmosphere and an additional hour in air to remove the template. Scheme 2, adapted from Ref. [17], summarizes the MCM-41 synthesis.

### 2.3. Entrapment of Fe(III)MP-11 in MCM-41 Mesoporous Silica

The Fe(III)MP-11/MCM-41 complexes were prepared by direct encapsulation. 3.5 ml of a MCM-41 suspension (1 mg/ml) were stirred with 58 μM Fe(III)MP-11 at pH 5.0 at least for 12 hours, then centrifuged, washed three times at the appropriate pH before drying the pellet. The final mass of MP-11 incorporated into the mesoporous silica was estimated as being 60 μg of peptide/mg MCM-41.

### 2.4. UV-Vis Kinetic Measurements

Fe(III)MP-11 solutions and Fe(III)MP-11/MCM41 suspensions were buffered with a mixture (universal buffer) composed by 10 mM acetate, phosphate and ammonium hydroxide buffers and adjusted to different pH values. All measurements were performed under pseudo-first-order conditions with at least a 10-fold excess of peroxide with respect to the Fe(III)MP-11 concentration at the temperature of 25 ± 0.3 °C.

Time-resolved spectra were recorded on a Shimadzu Model 1501 MultiSpec (Tokyo, Japan), employing the photodiode array scan mode. The spectral resolution was around 0.5 nm and the spectra were obtained with a time interval of 1 second. The optical path length was 1 cm for all measurements. The kinetic data were recorded at 415 nm for Fe(III)MP-11/MCM-41, the region of strong absorbance for Compound II species.

### 2.5. Solid State UV-Visible Spectra

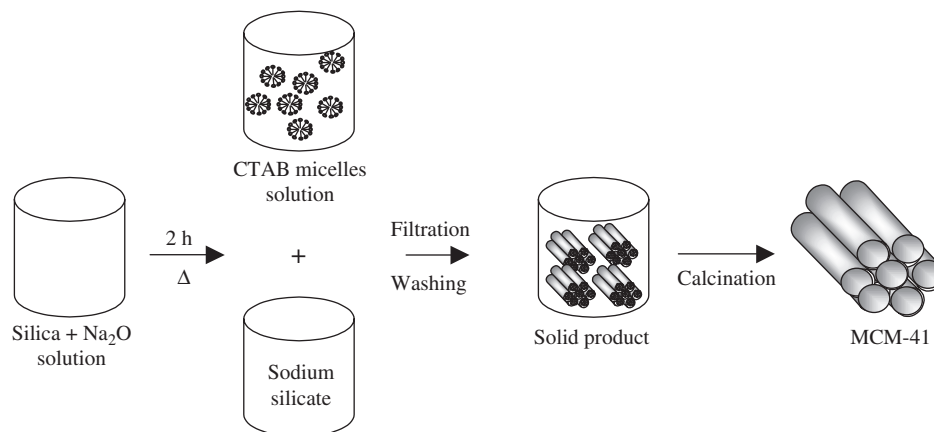
Solid state spectra of the samples were recorded on a Varian Carry 50 UV-visible spectrophotometer, in the region between 200 and 800 nm. The Fe(III)MP-11/MCM-41 spectra were obtained with the samples pressed in KBr pellets. Compound II was obtained, under this condition, by adding 1 μl of 1 mM HOOH solution to the powder just before the mixture was pressed.

### 2.6. Heme Iron EPR Measurements

Direct EPR measurements of solutions and KBr pellets of Fe(III)MP-11/MCM-41 were obtained in a Bruker ELEXSYS EPR system E-580 under the following conditions: gain 5 × 10<sup>3</sup>, modulation amplitude 1.0 mT, microwave power 4 mW, temperature 4 K, time constant 20.48 ms and conversion time 81.92 ms. After mixing, solutions were quickly introduced into an EPR quartz tube that was previously cooled in liquid nitrogen. For the analysis of KBr pellets, the sample was powdered into the EPR quartz tube, 10 μL of hydrogen peroxide 0.1 mM was added and previously cooled in liquid nitrogen. After freezing, the sample was introduced into the microwave cavity at low temperature and the EPR measurements performed.

### 2.7. Mass Spectrometry Analysis

The product of the reaction of Fe(III)MP-11/MCM-41 with HOOH and phenol was analyzed by a Quattro II Micromass mass spectrometer with Z-spray<sup>TM</sup> ion source (Manchester, UK). The mass of phenol derivatives was



Scheme 2.

acquired by electrospray ionization (ESI) in the positive ion mode. The parameters of the equipment were: source and desolvation temperatures at 100 and 200 °C, respectively, sample cone voltage at 50 V, extraction cone voltage at 4 V and capillary potential at 4 kV. Full scan data were acquired over a mass range of 100–300 *m/z*. The data were processed by the Mass Lynx NT data system, Version 3.2 (Micromass, Manchester, UK). The samples were separated in an LC-18-DB Supelcosil column (Supelco, 30 cm × 4.6 mm, 5 μm) using TFA 0.1% (solvent A) and acetonitrile-TFA 0.1% (8 : 2, v/v) (solvent B) at 270 nm. The flow rate used was 1 mL/min and the linear gradient varied from 5% to 95% of solvent B during 30 minutes, 95% of solvent B for 5 minutes and 95% to 5% of solvent for 40 minutes.

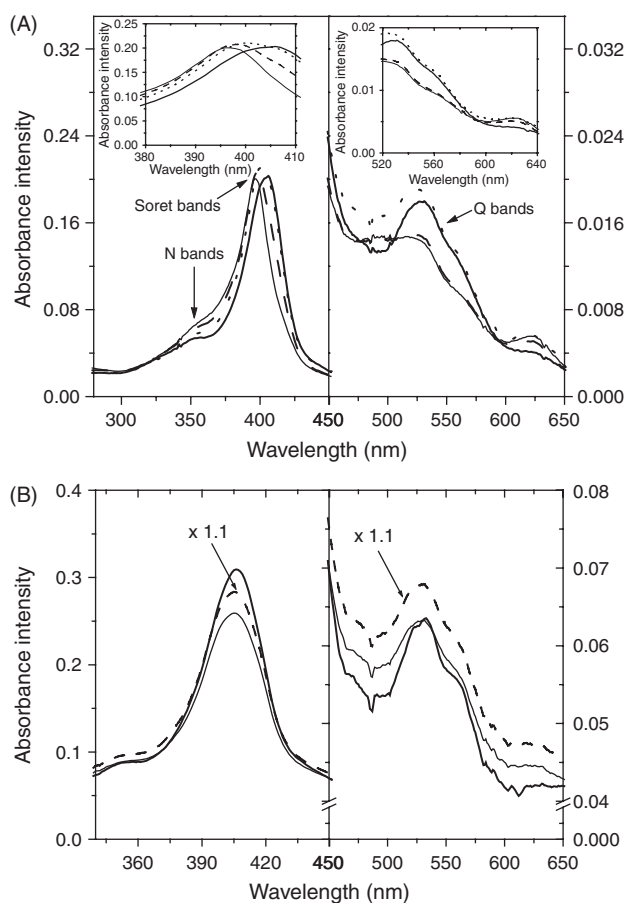
### 2.8. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Time-of-Flight (TOF) Mass Spectrometry (MS)

After the catalytic reaction of Fe(III)MP-11/MCM-41 with HOOH and phenol, the Fe(III)MP-11 was extracted from the silica MCM-41 by increasing the pH and analyzed using an Ettan MALDI-TOF Pro system equipped with a quadratic-field reflectron and a timed ion gate. Protein identification was conducted in reflectron mode with positive ionization at 20 kV. The sample was, in this case, mixed with an equal volume of 50% acetonitrile, and 0.5% trifluoroacetic acid saturated with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid. A 0.5 μl of the mixture (containing 8 pmol of protein) was loaded onto the stainless steel MALDI slides for analysis. The external calibration was performed before protein identification with AngIII and hACTH-(18–36). The data were analyzed using the Ettan MALDI-ToF Pro software system.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The pH dependence of the electronic spectra of MP-11 in aqueous phosphate buffer is shown in Figure 1(A) and insets. The typical hemepeptide electronic absorption bands N, Soret and Q are indicated by the arrows. By increasing the pH of the medium, MP-11 electronic spectral changes were compatible with the conversion of the heme iron from high to low spin state. Similarly to the observed for MP-9 solutions,<sup>26</sup> the increase in pH promoted disassembly of MP-11 clusters produced by intra-chain coordination with the  $\epsilon$ -amino group of Lys13. The MP-11 disassembly promoted by pH increase was confirmed by the decrease of the N band intensity<sup>27</sup> (Fig. 1(A)). In Figure 1(A) (see insets for clarity) the red shift of the Soret and charge transfer bands associated with the intensification of Q<sub>0</sub> and Q<sub>v</sub> bands are compatible with the formation of the low spin state.

The spectra of MCM-41-entrapped MP-11, suspended in universal buffer 10 mM at pH 7.0, 7.5, and 8.0 (Fig. 1(B),



**Fig. 1.** Effect of pH on the UV-visible spectra of MP-11. (A) MP-11 in aqueous buffered solution. UV-visible spectra of 2 μM MP-11 obtained at pH 5.0 (thin solid line), 6.0 (dashed line), 7.0 (dotted line), and 8.0 (thick solid line). The insets show zoom of Soret and Q bands for clarity. The spectra were obtained at room temperature in 10 mM universal adjusted to different pH values. (B) Aqueous buffered suspension of MCM-41-entrapped MP11 at different pH values. The spectra were obtained at pH 7.0 (thin solid line), 7.5 (dashed line) and 8.0 (thick solid line). The spectrum obtained at pH 7.5 was multiplied by 1.1 for clarity. UV-visible spectra of 0.035 mg of MP-11-containing MCM-41 were obtained at room temperature in 10 mM universal adjusted to different pH values.

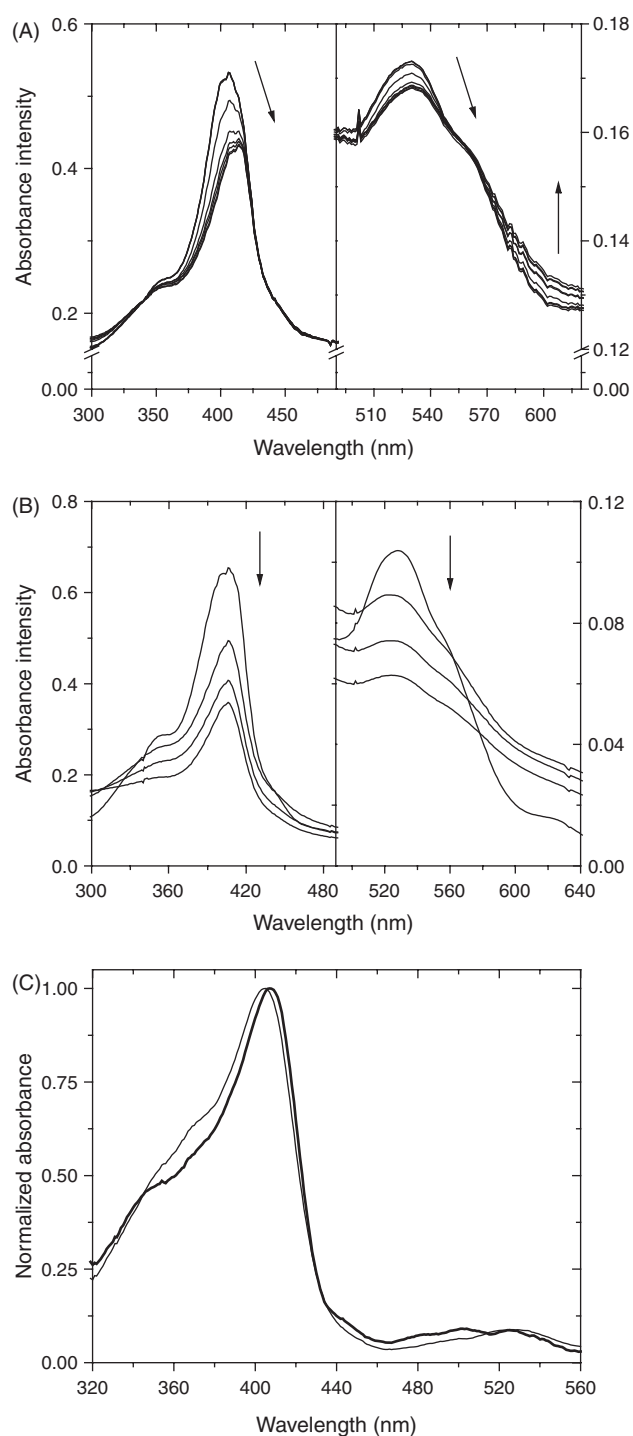
thin solid, dashed and thick solid lines, respectively) did not vary significantly with pH. Associated to the mesoporous silica, the MP-11 visible spectra presented the Soret band peaking at 406 nm and thereby, red shifted in comparison with the spectra obtained at pH below 8.0. Considering that the red shift was pH-independent, this result is compatible with MP-11 molecules immobilized in a more hydrophobic microenvironment as expected for the inside of the mesoporous silica MCM-41. The spectra of MCM-41-entrapped MP-11 buffered suspensions were not obtained at pH 5.0 and 6.0 because at these pH values the particles did not form stable suspensions and rapidly precipitated at the bottom of the cuvette. At pH > 8.0, MP-11 exhibited low affinity to MCM-41 and detached significantly from the mesoporous silica.

The elemental analysis of MCM-41-entrapped MP11 indicated the presence of 1.8% C, 1.8% H and 0.35% N.

According to this analysis, in MCM-41 the ratios H/C and N/C were 1.0 and 0.195, respectively, which are close to the MP-11 H/C and N/C ratios (1.38 and 0.23, respectively).

The reactivity of MCM-41-entrapped MP-11 was tested for hydrogen peroxide and *t*-BuOOH. Contrary to free MP-11, MCM-41-entrapped MP-11 did not react with the organic peroxide (not shown). The addition of 100  $\mu$ M hydrogen peroxide to a medium containing MCM-41-entrapped MP-11 promoted a red shift (406 to 413 nm) in the MP-11 Soret band and a decrease in absorbance. In this condition, bleaching of the heme group chromophore arising from attack of free radicals could partially contribute to the Soret band decrease. These spectral changes point to the conversion of Fe(III)MP-11 to MP-11 Compound II (oxoferryl form) in a time interval of 50 s (Fig. 2(A)). However, the Q bands did not exhibit the spectral characteristics of Compound II, which could be attributed to the microenvironment of MCM-41. Figure 2(B) shows the spectral changes for MP-11 solutions in the course of the reaction with hydrogen peroxide. The broad Soret band of MP-11 in aqueous buffered solutions at pH 7.0 indicates the presence of two hemepeptide populations: a high spin form that presents water as the sixth heme iron ligand and a low spin form produced by intra-chain coordination.<sup>26</sup> Under this condition, the addition of hydrogen peroxide promoted significant bleaching of the Soret band with no red shift (Fig. 2(B)). The partially bleached Soret band 50 s after hydrogen peroxide addition was narrower than before the reaction, with a larger decrease in absorbance in the lower wavelengths. This result suggests that the high spin form was preferentially attacked by the free radicals produced during the reaction. This proposal is consistent with the higher reactivity expected for the high spin form in which the heme iron sixth coordination position is more accessible to the peroxide. Also consistent with this model, after the Soret band narrowing, the isosbestic shifted from 337 to 310 nm. For MCM-41-entrapped MP-11, no change in the isosbestic point (342 nm) was detected in the course of the reaction, compatible with only one species being converted to the colorless form. At pH 7.5 and 8.0 similar results were obtained (results not shown). However, the increase in pH promoted differences in the Soret band peak (Table I) and the Q bands (not shown) of Compound II.

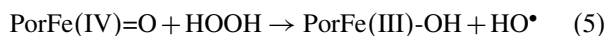
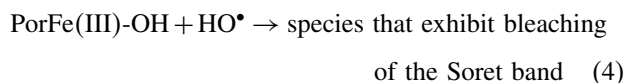
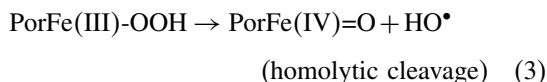
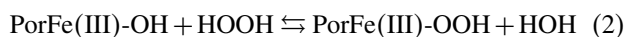
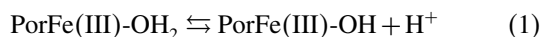
With increased pH, the red shift of the Soret band decreased and bleaching of Soret and Q bands increased (not shown). The pH-independent spectra of MP-11 associated to MCM-41 and the corresponding pH-dependent reactivity with hydrogen peroxide can be rationalized by a model in which MP-11 was immobilized inside the mesoporous silica. The red shift in the Soret band was caused by a medium with high, constant hydrophobicity and not by the intra-chain coordination modulated by pH-dependent ionization of lysine lateral chains. In fact, with the exposure of the MP-11 heme group to the medium, the reactivity was expected to be sensitive to



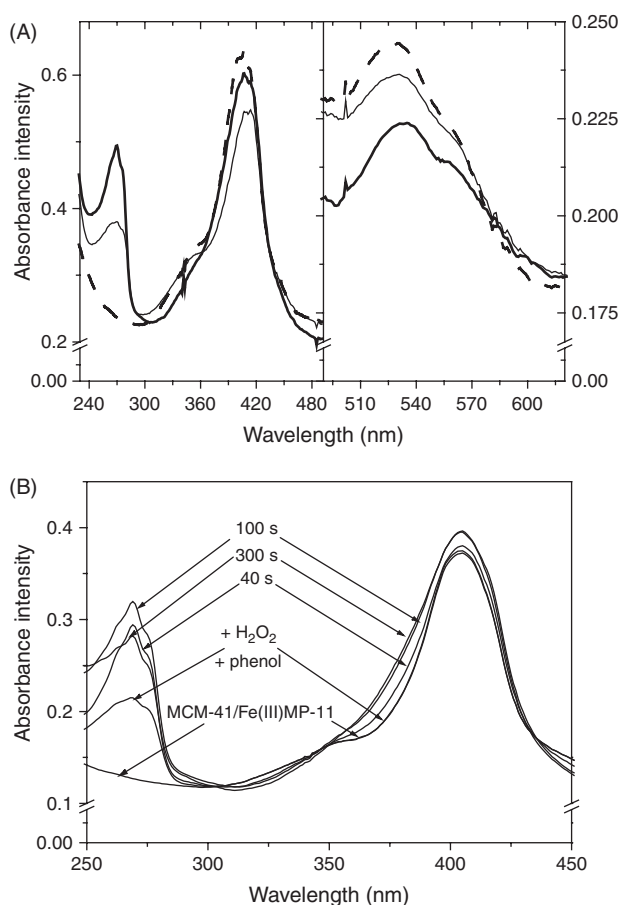
**Fig. 2.** Time course of the UV-visible spectra of MP-11 during the reaction with hydrogen peroxide. (A) Spectra of MCM-41-entrapped MP-11, at pH 7.0, before and 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, and 50 s after the addition of 100  $\mu$ M hydrogen peroxide as indicated by the arrows. (B) Spectra of aqueous buffered MP-11 solution, at pH 7.0, before (time zero) and 50, 240, and 700 s after the addition of 100  $\mu$ M hydrogen peroxide as indicated by the arrows. (C) Spectra of MCM-41-entrapped MP-11 in KBr pellets before (thin solid line) and  $\sim$ 120 s after the addition of 1  $\mu$ L of 1 mM hydrogen peroxide on the pellet of KBr plus MCM-41-entrapped MP-11 (thick solid line). The reactions were carried out in 10 mM universal buffer at the indicated pH value, with 2  $\mu$ M MP-11 (A) and 0.05 mg MCM-41/mL (B and C), at room temperature.



the pH. The higher degree of Soret band bleaching at pH 7.5 and 8.0 is compatible with an increased yield of free radicals. In order to confirm that the spectral changes caused by reaction with hydrogen peroxide did not come from MP-11 molecules detached from the mesoporous silica, we investigated the reactivity of MCM-41-entrapped MP-11 in a solid phase. Tablets of KBr containing the complex MP-11/MCM-41 were analyzed by UV-visible spectrometry before and after the addition of hydrogen peroxide (Fig. 2(C)). In the solid phase, after addition of hydrogen peroxide, MCM-41-entrapped MP-11 also exhibited spectral changes compatible with the formation of Compound II. The corresponding EPR spectrometry analysis of the system corroborated that MP-11 associated to MCM-41 was converted to the high valence form by hydrogen peroxide (see below). Considering previous results obtained with MP/CTAB complexes,<sup>12, 13</sup> the catalytic mechanism for the activation of MP-11 to the Compound II should be the homolytic cleavage of the peroxide (Eqs. (1 to 5)).



As presented in Figure 2(A), the addition of 100  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide to the phosphate buffered suspension of MP-11 associated to MCM-41 (Fig. 3(A), *thick dashed line*) led to the conversion of Fe(III)MP-11 to MP-11 Compound II, the oxoferryl form, (Fig. 3(A) *thin solid line*) within 50 s. The addition of 125  $\mu\text{M}$  phenol, immediately after the Compound II formation, converted the high valence form of MP-11 back to the resting heme iron oxidation state (*thick solid line*), which characterized a typical peroxidase catalytic cycle (Fig. 3(A)). Similar results were obtained at pH 7.5 and 8.0 (not shown). However, the Soret band intensity of the recovered resting enzyme was progressively lowered (not shown). The UV-visible spectrum of the recovered resting enzyme obtained after phenol addition (Fig. 3(A), *thick solid line*) did not exhibit the N-band. In this case, the changes in the N band suggest modifications in the sphere coordination of the heme iron. But the enzyme in this form was still active since new addition of hydrogen peroxide and phenol led to spectral changes indicative of formation of Compound II and phenol oxidation (not shown). During the reaction, the band peaking at 270 nm assigned to phenol increased significantly, suggesting formation of oxidized phenol derivatives. Also, phenol degradation was



**Fig. 3.** Time course of the UV-visible spectra of MCM-41-entrapped MP-11 during the reaction with hydrogen peroxide and phenol. (A) Spectra of MCM-41-entrapped MP-11, at pH 7.0, were obtained before (dashed line), 30 s after the 100  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide addition and immediately after the addition of 125  $\mu\text{M}$  phenol (thin solid line) and 400 s after phenol addition (thick solid line). The reaction was carried out in 10 mM universal buffer at the indicated pH value, with 0.05 mg MCM-41/mL, at room temperature. (B) MCM-41-entrapped MP-11 during the reaction with hydrogen peroxide and phenol added simultaneously in the medium. The spectra showed in this figure were obtained in the intervals and conditions indicated by the arrows. The reaction was carried out with 0.05 mg MCM-41/mL, 100  $\mu\text{M}$  hydrogen, 125  $\mu\text{M}$  phenol in 10 mM universal buffer, at pH 7.0 at room temperature.

accelerated at higher pH values (7.5 and 8.0) since the phenol band at 270 nm increased immediately after addition of this reducer agent of the heme iron (not shown).

Figure 3(B) shows the MCM-41-entrapped MP-11 spectra obtained in the course of the reaction with hydrogen peroxide and phenol added simultaneously in the medium at pH 7.0. For this latter condition, the most important findings were:

- (i) the red shift in the Soret band assigned to Compound II was no longer detected;
- (ii) there was no bleaching of the Soret band;
- (iii) the N band was affected during the reaction. Rather than disappearing the N band seems to overlap with the Soret band due to a red shift. Indeed, the spectral decomposition of the MP-11 Soret band before and after the

catalytic process reveals a red shift of the N band without significant changes in the Soret band (not shown); (iv) the phenol band at 270 nm was enhanced probably due to oxidized derivatives whose bands overlap those of the remaining phenol band.

The phenol band was not affected by incubation with MCM-41 alone or with the MCM-41-entrapped MP-11 in the absence of peroxide. The concomitant addition of the oxidizing (hydrogen peroxide) and reducer (phenol) agents seems to maintain the steady state of MP-11 as Fe(III)MP-11 and to prevent the Soret band bleaching due to the attack of hydroxyl radicals to the porphyrin ring. Despite the absence of bleaching in the Soret band, the N band was affected, which suggests that the interaction of heme iron with phenol or derivatives caused the spectral changes.

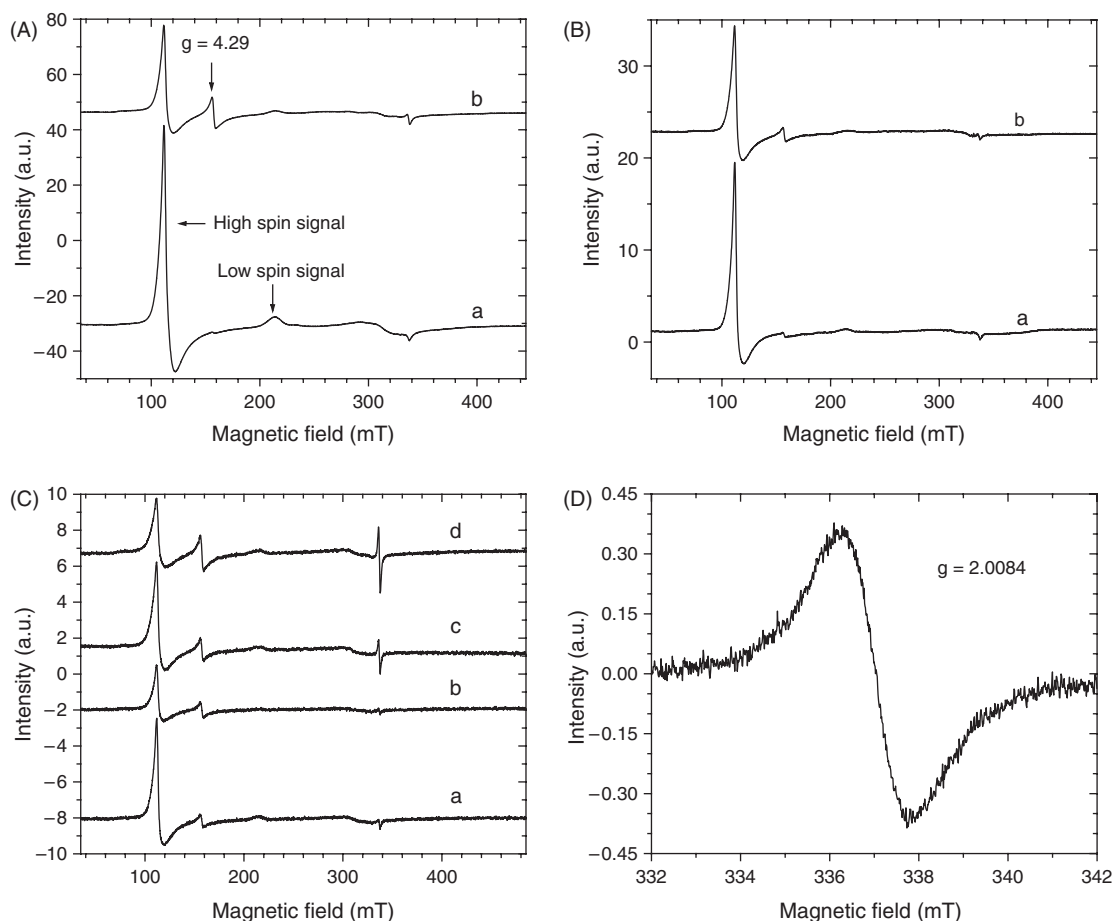
The process of peroxide cleavage catalyzed by the MCM-41-entrapped MP-11, in the presence and in the absence of phenol, was accompanied by oxygen evolution (not shown). The oxygen evolution could be assigned to the oxidation of hydrogen peroxide by the hydroxyl radicals, the product of the homolytic cleavage of hydrogen peroxide by oxoferryl MP-11 (Eq. (7)). In the absence of phenol the concentration of molecular oxygen in the medium increased around 40  $\mu\text{M}$  at the end of the reaction. This value decayed to a half in the presence phenol (18  $\mu\text{M}$ ) suggesting that phenol acted as a trap of hydroxyl radicals and competed with hydrogen peroxide for the oxidation reaction.

The reaction of hydrogen peroxide and phenol with MCM-41-entrapped MP-11 was accompanied by CW-EPR of the heme iron. Figure 4(A) shows the EPR spectra of MCM-41-entrapped MP-11, incorporated at pH 5.0 and pressed in KBr pellets. In Figure 4(A), lines *a* and *b* correspond respectively to the EPR spectra obtained before and 1 min after the addition of hydrogen peroxide. In the MCM-41, the Fe(III)MP-11 EPR spectrum (Fig. 4(A), line *a*) exhibited a signal at  $g = 6.0$  typical of the high spin form of MP-11 with pentacoordinated heme iron with axial symmetry and the signal of the low spin form of hexacoordinated MP-11. Figure 4(A), line *b*, shows that 1 min after addition of hydrogen peroxide, both the high and low spin state signals of heme iron decreased, which is consistent with the conversion of Fe(III)MP-11 to Compound II, an EPR silent species.<sup>14</sup> Simultaneously, there is the appearance of a signal  $g = 4.290$  with rhombic symmetry (Fig. 4(A), line *b*). The absence of a  $g = 3.904$ , characteristic of MP oxo-ferryl  $\pi$ -cation (MP-Compound I),<sup>28, 29</sup> suggests that the heterolytic cleavage of hydrogen peroxide O—O bond is not the enzymatic mechanism adopted by the entrapped enzyme. The signal with  $g = 4.290$  has been attributed to the porphyrin ring chemically modified by free radicals. This high spin species ( $g = 4.290$ ) was previously detected by EPR measurements during the reaction of cytochrome *c* with *t*-BuOOH,<sup>30</sup> with oxidized

cardiolipin and during the reaction of *t*-BuOOH and hydrogen peroxide with MP-8 and MP-9 associated to CTAB micelles.<sup>31</sup> Figure 4(B) shows the results for MP-11 incorporated inside MCM-41 at pH 8.0. There was a significantly lower amount of the low-spin form of heme iron in the EPR spectrum for Fe(III)MP-11 obtained before addition of hydrogen peroxide. MP-11 is an acidic peptide with  $pK_a = 4.7$  and thereby should exhibit higher affinity for MCM-41 at low pH values. Therefore, at pH 5.0, the large amount of MP-11 associated to the mesoporous silica should favor the inter- and intra-chain coordination of MP-11 molecules leading to the increase of the heme iron low spin form. One min after addition of hydrogen peroxide, the high-spin signal of Fe(III) decreased and a  $g = 4.290$  signal appeared. The EPR spectrum of aqueous buffered suspensions of MCM-41-entrapped MP-11 at pH 7.0 was similar to that obtained in KBr pellets (not shown). Thirty seconds after the addition of hydrogen peroxide, a slight  $g = 4.290$  signal was observed, as depicted in Figure 4(C), line *a*. Five min after adding hydrogen peroxide, the partial conversion of Fe(III) heme iron to the oxoferryl form (EPR silent) led to the decrease of the  $g = 6.0$  signal (Fig. 4(C), line *b*). During this period the signal at  $g = 4.290$  remained constant (Fig. 4(C), line *b*). The subsequent addition of phenol partially restored the intensity of the Fe(III) MP-11 signal, which agrees with a peroxidase cycle having phenol as the reducer agent (Fig. 4(C), line *c*). The presence of phenol also led to the appearance of a signal ( $g = 2.0089$ ) assigned to a free radical of phenol. Simultaneously to the increase of the  $g = 2.0089$  signal, the Fe(III) MP-11 signal decreased and the  $g = 4.2900$  signal increased, suggesting that the latter signal was produced at the expenses of the native high-spin form (Fig. 4(C), line *d* and zoom in Fig. 4(D)).

The signal  $g = 4.290$  could be generated by the conversion of MP-11 to a chemically modified form produced by the attack of phenol free radicals. The MALDI-ToF analysis of MP-11 detached from MCM-41 particles caused by increasing the pH of the medium did not reveal changes in the MP-11 mass as compared with the native form (1860 D, not shown). Therefore, the chemically modified enzyme ( $g = 4.290$ ) should be produced in low yield and exhibited high affinity to MCM-41 even at high pHs. Then, the spectral changes in the N-band already described could be produced by conformational alterations of the peptide due to the interaction with phenol derivatives.

Considering that the EPR results pointed to phenol oxidation by MP-11 associated to MCM-41, it is necessary to confirm such oxidation by identifying the reaction products. The determination of phenol oxidized products and phenol consumption by the reaction with MP-11 was carried out with high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC/MS) (Figs. 5(A, B, and C)). Figure 5(A) shows the chromatogram of a phenol standard sample



**Fig. 4.** Continuous-wave EPR spectra of MCM-41 entrapped MP-11. (A) Line *a*: KBr pellets of the MCM-41 entrapped MP-11 incorporated at pH 5.0; line *b*: one minute after 0.1 M hydrogen peroxide addition. (B) Line *a*: KBr pellets containing MCM-41 entrapped MP-11 incorporated at pH 8.0; line *b*: one minute after 0.1 M hydrogen peroxide addition. (C) Line *a*: MCM-41 entrapped MP-11 suspension at pH 7.0; line *b*: 5 minutes after 0.5 mM hydrogen peroxide addition; line *c*: immediately after 0.63 mM phenol addition and line *d*: 30 minutes after the phenol addition. (D) Zoom of the radical spectrum obtained during the reaction described in Figure 4(C). The experiments were carried out at 4.2 K and 9.485501 GHz. Spectrometer conditions: gain 5.103, modulation amplitude 1.0 mT, microwave power 4 mW, time constant 10.24 ms and conversion time 81.92 ms.

obtained by monitoring the UV absorption at 270 nm. The retention time obtained in this condition was 13.33 min and was associated with an ion  $m/z$  mass = 95 Da. Figures 5(B and C) show the chromatograms of the supernatant of reaction assay that was run at pH 7.5 and 8.0, respectively. In both conditions, the chromatogram reveals significant decrease of the phenol signal and increase signals with retention time at 3.88 min (Fig. 5). The retention time of 3.88 min was associated with  $m/z$  127 assigned to 2,4-dihydroxyphenol. Based on the HPLC/MS data, we propose the following reaction mechanism (Eqs. (6–9)). The homolytic cleavage of hydrogen peroxide by MCM-41-entrapped MP-11 generated hydroxyl radicals and converted the enzyme to the high valence intermediate Compound II. In a similar way described for the iron/magnetite/hydrogen peroxide heterogeneous oxidation system,<sup>32</sup> hydroxyl radicals generated by MP-11 could attack the 2 and 4 positions of the phenol ring to produce the hydroxylated product. Hydroxyl radicals could also attack the remaining hydrogen peroxide leading to

molecular oxygen evolution, mimicking catalase activity. Phenol and the hydroxylated products could act as reducing agents of Compound II to complete the catalytic cycle. In addition to 2,4-dihydroxyphenol, other oxidized products such as quinone and hydroquinone derivatives could be expected. These products were not detected by HPLC/MS analysis probably due to the low yield or adsorption inside the mesoporous silica.

Regarding the proposed reaction mechanism, it is interesting to note that the catalyst MCM-41-entrapped MP-11 mimics the hepatic detoxifying cytochrome P450 system that catalyzes hydroxylation of aromatic rings and play a central role in the metabolism of medicinal drugs and steroids. The most striking difference between MCM-41-entrapped MP-11 mechanism to promote hydroxylation of aromatic compounds and cytochrome P450 system is that the former uses hydrogen peroxide and the latter uses molecular oxygen as the activating agent of heme iron. Previous works described cytochrome P450<sup>33–36</sup> and catalase<sup>37, 38</sup> activities for MP

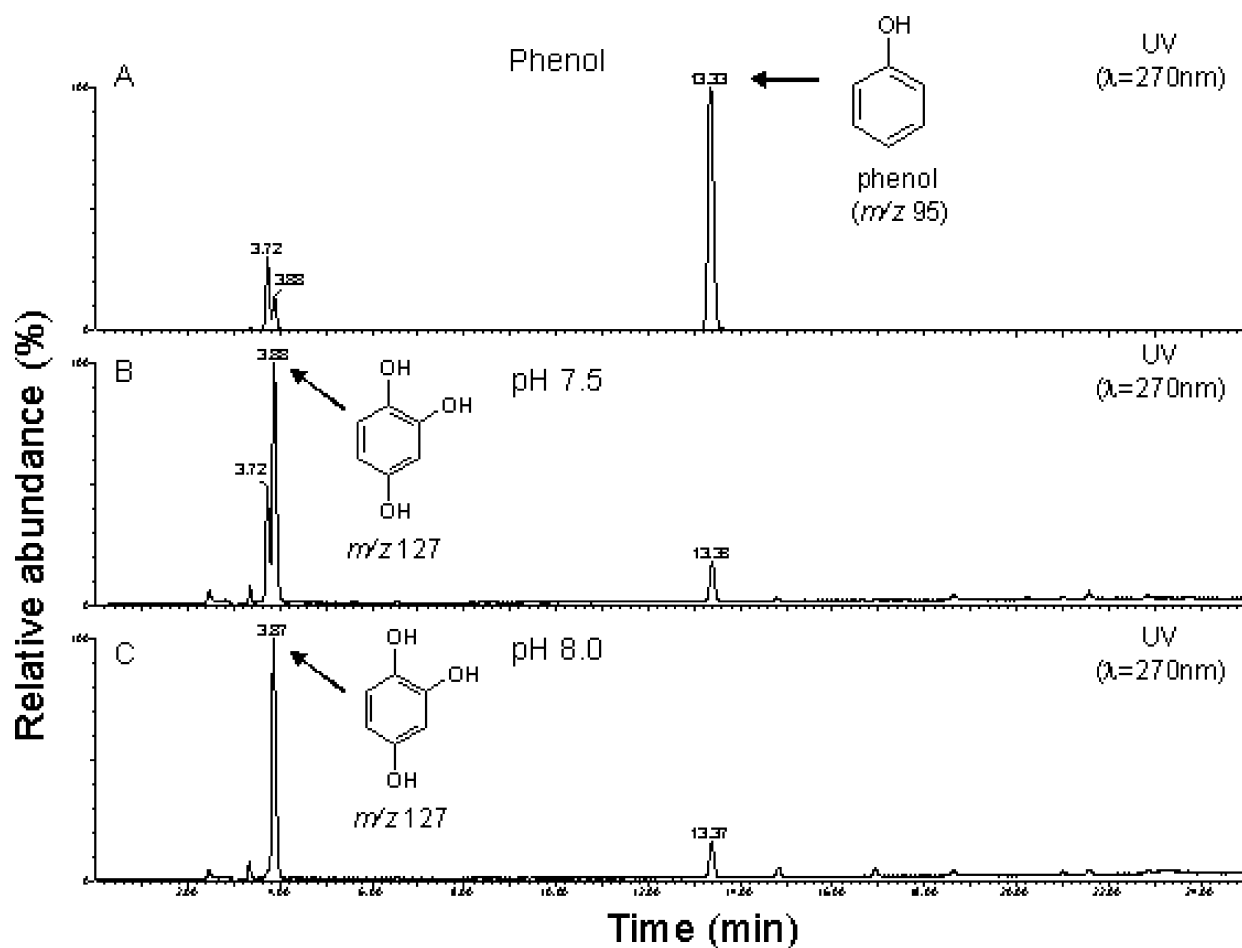
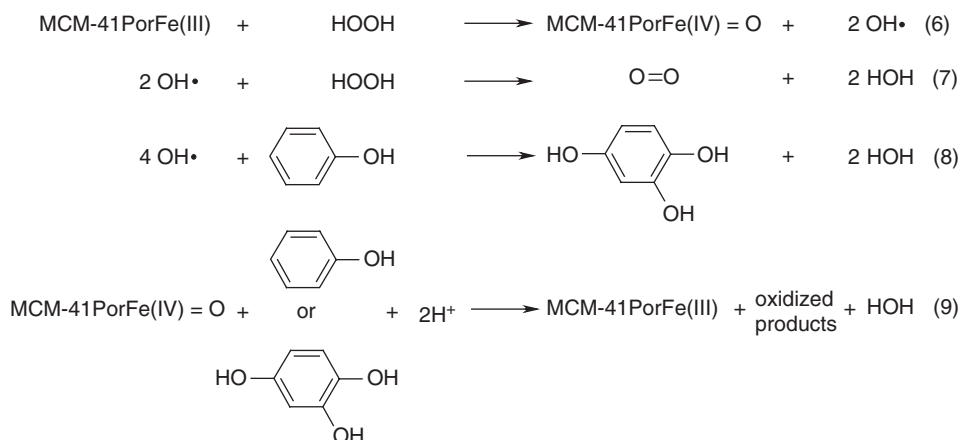


Fig. 5. HPLC–mass spectrometry analysis of the product from the reaction of Fe(III)MP-11/MCM-41 with HOOH and phenol. (A) Chromatogram of a standard of phenol obtained by UV absorption at 270 nm. (B) Product from the reaction carried out at pH 7.0. (C) Product from the reaction carried out at pH 8.0. The signal corresponding to  $m/z$  127 indicates 2,4-dihydroxyphenol.

in solution, i.e., hydroxylation of aromatic rings and hydrogen peroxide conversion to  $H_2O$  and  $O_2$ . Those authors suggested that hydroxylation of aromatic compounds catalyzed by these microenzymes occurs via oxygen transfer from oxoferryl ( $Fe(IV)=O$ ) to the aromatic rings, together with heme iron reduction to restore the resting enzyme. On the other hand, the catalase

activity of MP is still not fully understood.<sup>37, 38</sup> However, the previous works it was not considered that, contrary to peroxidases, MP cleave hydrogen peroxide preferentially by homolytic scission and thus generate hydroxyl radicals. By assuming the homolytic cleavage of hydrogen peroxide rendering hydroxyl radicals, it is possible to understand both P450 and catalase activities of MP (Eqs. (6–8)).



The generation of a highly reactive species, the hydroxyl radical, by MP could account for the extensive bleaching of the MP Soret band and microenzyme inactivation during the reaction with hydrogen peroxide in a homogeneous medium (Fig. 2(B)). Despite the fact that MCM-41-entrapped MP-11 also cleaves hydrogen peroxide by homolytic scission (Figs. 4(A, B and C)), extensive bleaching and significant enzyme inactivation was not observed under this condition. Besides the high stability of the catalyst, another advantage to entrap MP in mesoporous silica become evident when we consider to use the catalyst for degradation of phenol, an undesirable waste product in effluents. In this case, it is important to have the catalyst in a form that permits easy separation from the water, i.e., decantation, a procedure that is not possible by using MP-11 solutions.

#### 4. Conclusion

In this work, we demonstrated that the association of Fe(III)MP-11 with MCM-41 results in a catalyst that, in contrast to MP-11 in solution, does not suffer inactivation during the reaction with hydrogen peroxide. This material conjugates the catalytic properties of two subclasses of the enzymatic oxidoreductase class: the peroxidases and the monooxygenases. This peculiar characteristic was possible because MP-11 heme iron promotes homolytic cleavage of the hydrogen peroxide generating hydroxyl radicals, the activated oxygen species, able to promote hydroxylation of aromatic compounds. Also, similarly to the enzymes, the catalyst presented here exhibited specificity for one type of substrate, viz. hydrogen peroxide, since *t*-BuOOH was unable to activate the enzyme. Considering the characteristics of MP-11 entrapped in MCM-41 outlined above we consider that this catalyst is a promising nanobiotechnological device.

**Acknowledgments:** The authors thank to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq: Proc. 476119/2004-9 and CT-FVA/CNPq 01/2003 Proc. 400618/2004-4) and Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade de Mogi das Cruzes (FAEP-UMC) for the financial supporting. J.C.A. is fellow of Secretaria da Educação do Governo do Estado de São Paulo, F.J.T. is fellow of FAPESP and T.P. is fellow of CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior).

#### References and Notes

- H. A. Harbury and P. A. Loach, *J. Biol. Chem.* 235, 3646 (1960).
- J. Aron, D. A. Baldwin, H. M. Marques, J. M. Pratt, and P. A. Adams, *J. Inorg. Biochem.* 27, 227 (1986).
- P. A. Adams, M. P. Byfield, R. D. Goold, and A. E. Thumser, *J. Inorg. Biochem.* 37, 55 (1989).
- D. W. Low, H. B. Gray, and J. O. J. Duus, *Am. Chem. Soc.* 119, 1 (1997).
- V. S. Sharma, M. R. Schmidt, and H. M. Ranney, *J. Biol. Chem.* 251, 4267 (1976).
- W. Chuang, Y. Chang, and W. Jeng, *J. Inorg. Biochem.* 75, 93 (1999).
- H. A. Harbury and P. A. Loach, *J. Biol. Chem.* 235, 3640 (1960).
- D. W. Urry, *J. Am. Chem. Soc.* 2, 4190 (1967).
- D. A. Baldwin, H. M. Marques, and J. M. Pratt, *J. Inorg. Biochem.* 30, 203 (1987).
- J. Cheek, D. W. Low, H. B. Gray, and J. H. Dawson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 195 (1998).
- L. Casella, L. De Gioia, G. F. Silvestri, E. Monzani, C. Redaelli, R. Roncone, and L. Santagostini, *J. Inorg. Biochem.* 79, 31 (2000).
- T. Prieto, O. R. Nascimento, I. L. S. Tersariol, A. Faljoni-Alario, and I. L. Nantes, *J. Phys. Chem. B* 108, 11124 (2004).
- T. Prieto, O. R. Nascimento, and I. L. Nantes, *Prog. Coll. Polym. Sci.* 128, 193 (2004).
- H. B. Dunford and J. S. Stillman, *Coord. Chem. Rev.* 19, 187 (1975).
- H. K. Baek and H. E. Van Wart, *Biochemistry* 28, 5714 (1989).
- J. S. Wang, K. B. Haesun, and H. E. Van Wart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1320 (1991).
- J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, and J. L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10834 (1992).
- C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, and J. S. Beck, *Nature* 359, 710 (1992).
- Y. Tanamura, T. Uchida, N. Teramae, M. Kikuchi, K. Kusaba, and Y. Onodera, *Nano Lett.* 1, 387 (2001).
- S. Boboardo, L. Borello, S. Fiorilli, E. Garrone, B. Onida, C. O. Arean, N. Penazzi, and G. T. Palomino, *Micropor. Mesopor. Mater.* 79, 275 (2005).
- D. F. Rohlfing, J. Rathousky, Y. Rohlfing, O. Bartels, and M. Wark, *Langmuir* 21, 11320 (2005).
- J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, and B. K. Hodnett, *J. Phys. Chem. B* 106, 7340 (2002).
- J. F. Díaz and K. J. Balkus, Jr., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2, 115 (1996).
- P. B. Zhang, M. T. Janicke, W. H. Woodruff, and J. A. Bailey, *J. Phys. Chem. B* 42, 19547 (2005).
- D. P. Nelson and L. A. Kiesow, *Anal. Biochem.* 49, 474 (1972).
- A. Ripsati, T. Prieto, C. S. Shida, I. L. Nantes, and O. R. Nascimento, *J. Inorg. Biochem.* 100, 226 (2006).
- D. W. Urry and J. W. Pettegrew, *J. Am. Chem. Soc.* 27, 5276 (1967).
- M. D. Assis, O. A. Serra, Y. Yamamoto, and O. R. Nascimento, *Inorg. Chim. Acta* 187, 107 (1991).
- A. Khindaria and S. D. Aust, *Biochemistry* 35, 13107 (1996).
- I. L. Nantes, A. Faljoni-Alario, O. R. Nascimento, B. Bandy, R. Gatti, and E. J. H. Bechara, *Free Radical Biol. Med.* 28, 786 (2000).
- M. R. Zucchi, O. R. Nascimento, A. Faljoni-Alario, T. Prieto, and I. L. Nantes, *Biochem. J.* 370, 671 (2003).
- F. C. C. Moura, M. H. Araujo, I. Dalmazio, T. M. A. Alves, L. S. Santos, M. N. Eberlin, R. Augusti, and R. M. Lago, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 1859 (2006).
- R. Ricoux, J. L. Boucher, D. Mansuy, and J. P. Mahy, *Eur. J. Biochem.* 268, 3783 (2001).
- P. A. Adams, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2*, 1407 (1990).
- L. Casella, L. DeGioia, G. F. Silvestri, E. Monzani, C. Redaelli, R. Roncone, and L. Santagostini, *J. Inorg. Biochem.* 79, 31 (2000).
- J. H. Spee, M. G. Boersma, C. Veeger, B. Samyn, J. Van Beeumen, G. Warmerdam, G. W. Canters, W. M. Van Dongen, and I. M. Rietjens, *Eur. J. Biochem.* 241, 215 (1996).
- G. M. Clore, M. R. Hollaway, J. Peterson, and M. T. Wilson, *Inorg. Chim. Acta* 56, 143 (1981).
- W. Y. Jeng, Y. H. Tsai, and W. J. Chuang, *J. Peptide Res.* 64, 104 (2004).

Received: 15 February 2007. Revised/Accepted: 7 March 2007.



Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media, 2007: 1-29  
ISBN: 978-81-308-0168-1 Editors: Iseli L. Nantes and Sergio Brochsztain

## Peroxidase model systems in heterogeneous media

**Tatiana Prieto, Katia C. U. Mugnol, Juliana C. Araujo  
Francisco L. Souza, Vanessa A. Soares, Giuseppe Cilento<sup>†</sup>  
and Iseli L. Nantes**

Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica - CIIB, Universidade de  
Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes - SP, Brazil

### Abstract

*Peroxidases are enzymes that exhibit protoporphyrin IX, the heme group, as the catalytic center. These enzymes are activated by peroxides to high valence states that are able to oxidize a wide variety of substrates. The catalytic activity of peroxidases can be mimicked by microperoxidases, the tryptic products of cytochrome c, and even by porphyrins in different conditions. Particularly interesting peroxidase model systems have been obtained by the association of microperoxidases with cationic micelles and liposomes and also by the entrapment of these peptides in mesoporous silica.*

<sup>†</sup>*In memoriam*

Correspondence/Reprint request: Dr<sup>a</sup>. Iseli L. Nantes, Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica - CIIB, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes - SP, Brazil. Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200, 08780-911. E-mail: [ilnantes@umc.br](mailto:ilnantes@umc.br)

---

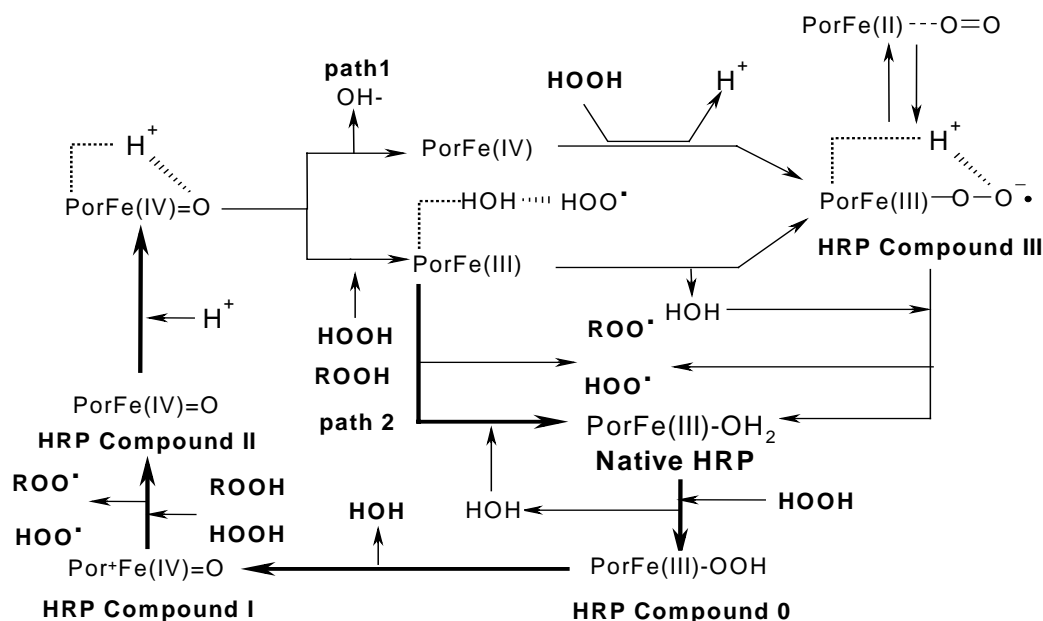
*Different heterogeneous media permit to control microperoxidase reaction route and substrate affinity as well as vulnerability of the catalyst to free radical attack.*

## **1. Introduction**

### **Overview of peroxidases and microperoxidases**

Peroxidases are enzymes that contain the heme group as catalytic center and use peroxides as oxidizing agents to generate their reactive high-valence intermediates. Two superfamilies of peroxidases are known: the first one includes plant, fungal and (archae) bacterial peroxidases and the second one, the mammalian peroxidases. Secondary and tertiary structures of mammalian peroxidases as well as the prosthetic group differ significantly from those of plant or fungal peroxidases [1]. The presence of covalent bonds between the heme group and the apoprotein is a peculiar characteristic of the mammalian peroxidases. In myeloperoxidase, lactoperoxidase, eosinophil peroxidase, and probably thyroid peroxidase these covalent links are two ester bonds between aspartic or glutamic amino acid residues and hydroxyl groups on the 1- and 5-methyl groups of the heme [2,3]. Myeloperoxidase has also a third covalent bond between one of its vinyl groups and the methionine residue. Peroxidases also differ by the nature of the proximal heme iron ligand [1–5]. These structural characteristics influence the catalytic properties of the peroxidases [1,4,5].

Among the peroxidases, horseradish peroxidase has been extensively studied due to the ability to act on a wide variety of substrates and also due to the application in nanotechnology [6,7,8]. The term horseradish peroxidase is generical since the root of horseradish (*Armoracia rusticana*) contains a number of distinctive peroxidase isoenzymes of which the C isoenzyme (HRP C) is the most abundant [9]. The HRP C comprises a single polypeptide chain with 308 amino acid residues. Five oxidation states of horseradish peroxidase, ferrous, ferric, Compounds I and II, oxy-ferrous, are known and formed during the peroxidase and oxidase cycles of the enzyme. In the peroxidase cycle the heme Fe(III) of the resting enzyme coordinates a desprotonated hydrogen peroxide molecule to form Compound 0. Literature data suggest that His42 acts, in this step, as a proton acceptor (base catalyst) and then as a donor (acid catalyst) at neutral pH. This mechanism is consistent with the observed slower rate and lower efficiency of heterolytic cleavage exhibited by HRP at acid pH. Arg38 is influential in lowering the  $pK_a$  of His42, as well as in aligning HOOH in the active site, but it does not play a direct role in proton transfer. After the formation, Compound 0 is converted in Compound I (oxoferryl  $\pi$ -cation radical) by the heterolytic cleavage of HOOH and generates the reduced form of the peroxide (water for HOOH and alcohol-derived for ROOH). Compound I is converted to Compound II (oxoferryl heme iron) by attacking another peroxide

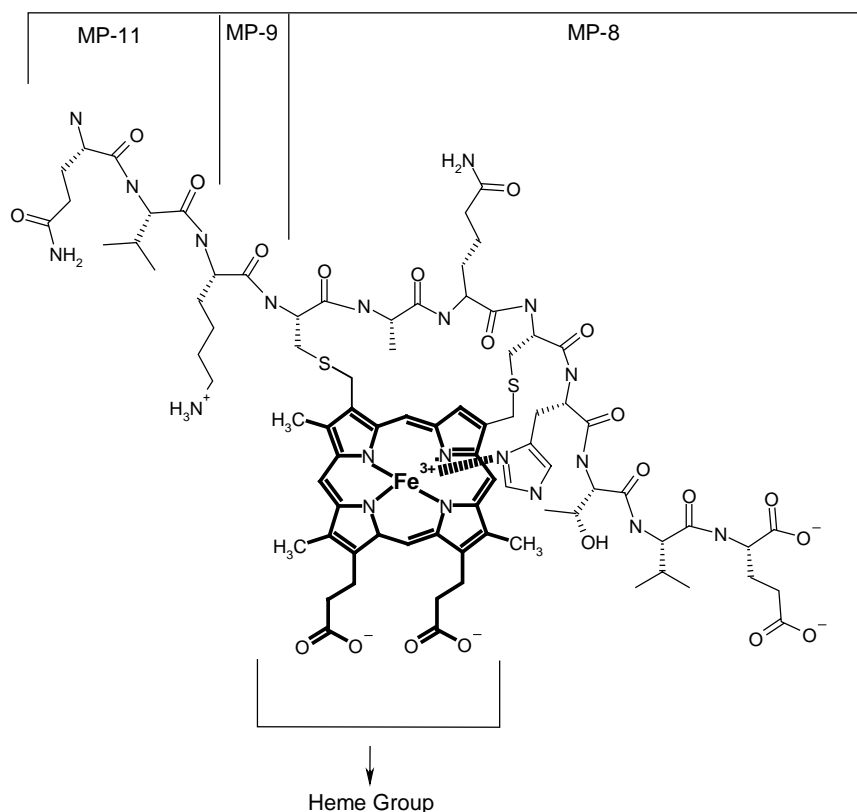


**Scheme 1.** HRP catalytic cycle by using HOOH as both oxidizing and reducer agents.

molecule or another reducing agent as depicted by Scheme 1. The peroxidase cycle is completed when Compound II attacks another molecule of the reducing agent and the enzyme returns to the native form. In the oxidase cycle the ferric enzyme can be reduced to the ferrous form and, in the presence of molecular oxygen, converted to Compound III. The electronic structure of Compound III of HRP is similar to that of oxymyoglobin and oxyhemoglobin and can be described as  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$  or the isoelectronic  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$ . The dioxygen bound to HRP has a significant superoxide character and is highly reactive. Compound III can also be generated by the reaction of Compound II with excess of peroxide and can return to the native form by the detachment of the superoxide ion [9,10,11]. Scheme 1, illustrates the peroxidase (thick arrows) and oxidize (thin arrows) cycles of HRP.

Interesting models of peroxidases can be obtained by sequential pepsin- and trypsin-catalyzed hydrolysis of horse-heart cytochrome *c* and they are known as microperoxidases. These peptides retain the heme group covalently attached to cysteine residues 14 and 17 and histidine as the fifth heme iron ligand but not methionine at the sixth coordination position which, at neutral pH, is occupied by a water molecule [12,13,14]. Four microperoxidase types were identified according to the sequence of native cytochrome *c*, from which these peptide fragments are derived: microperoxidase-6, (CAQCHT), -8, (CAQCHTVE), -9 (KCAQCHTVE) and -11 (VQKCAQCHTVE). Microperoxidases exist in the ferric resting state and due to the absence of methionine 80 at the sixth coordination position exhibit peroxidase activity [12-14]. Scheme 2 shows the structure of microperoxidases.



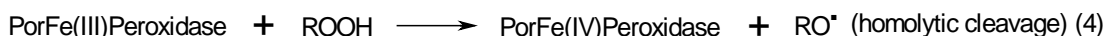
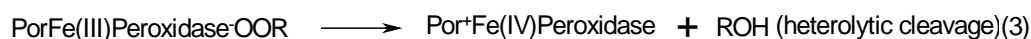
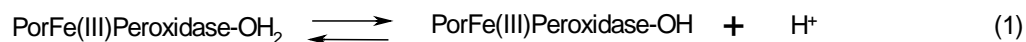


**Scheme 2.** Microperoxidases structures.

Because these structural characteristics, microperoxidases have been extensively used to study structural and catalytic properties of peroxidases and cytochromes [15,16], as well as, to the development of electrode sensors [17].

Similarly to biological peroxidases, microperoxidase-8 is able to convert a wide variety of organic compounds at the expense of hydrogen peroxide (HOOH) in a type of peroxidase chemistry [18]. Previous studies have shown that acetylated microperoxidases (Ac-MPs) exhibit much less tendency to aggregate in aqueous solution than their unacetylated precursor and the modified peptide has been object of the studies about structure and catalysis [19,20,21]. Both microperoxidases and Ac-microperoxidases exhibit the peroxidase activities and can convert a wide variety of organic compounds at the expense of hydrogen peroxide (HOOH) in a peroxidase-type reaction [22,23]. Therefore, microperoxidases and Ac-microperoxidases are also activated by peroxides and converted to the intermediate Compounds 0, I and II [24,25]. The first step of the peroxide cleavage promoted by microperoxidases is the formation of Compound 0 in which the deprotonated water at the sixth coordination position was replaced by the hydroperoxide (Eq 1 and 2). After the formation of Compound 0, there are two possible mechanisms for the cleavage of peroxides (ROOH): a heterolytic cleavage

generating the alcohol derivative (ROH) and Compound I (Eq. 3), which reacts with another peroxide molecule generating Compound II and the peroxy radical (ROO<sup>•</sup>) (Eq. 5) or a homolytic cleavage of ROOH to form Compound II directly (Eq. 4). Whatever the mechanism for peroxide cleavage, native Fe(III) microperoxidase can be regenerated after the reaction of Compound II with another ROOH molecule or another reducing agent (Eq. 6) [24-26].

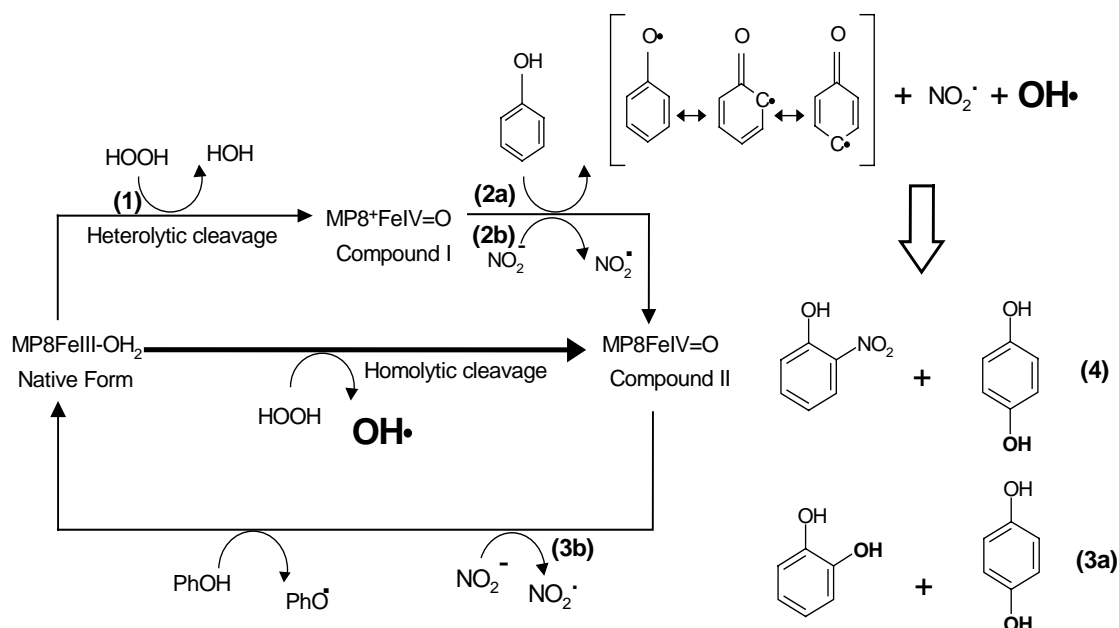


It is known that protons in the distal heme active site influence the formation of the catalytic reactive species for both peroxidases and cytochrome P450 [27]. In HRP, the distal His42 ligand acts as an acid/base catalyst that favors the deprotonation of the hydroperoxide substrate at the enzyme active site (Compound 0) and the subsequent heterolytic cleavage [28,29,30]. Therefore, the deprotonation of the hydroperoxide in Compound 0 is a crucial step in the catalytic cycle of peroxidases and cytochrome P450. Literature data show that protons are competitive inhibitors for the reaction of Fe(III) or Mn(III)MP-8 with hydrogen peroxide, leading to the postulate that Compound 0 precedes the formation of a high valence intermediate of Fe(III) or Mn(III)MP-8 [31]. However, MP-8 in aqueous medium does not exhibit a site pocket with a distal basic residue participating in the peroxide deprotonation and favoring the O–O peroxide bond cleavage. These characteristics could explain the low reactivity of MP-8 at low pH values. In aqueous medium, alkaline pH leads to deprotonation of the MP-8 bound water, which then either assists concerted hydrogen peroxide deprotonation and coordination of the hydroperoxo group to the metal center or is directly oxidized by hydrogen peroxide to a metal-hydroperoxo MP-8 [31].

The high valence intermediates of microperoxidases are able to perform the oxidation of several co-substrates like o-methoxyphenol, 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzo-6-thiazolinesulfonic acid) (ABTS), and p-cresol [19,22,32,33]. MP8 is also able to catalyze another type of reaction: the nitration of aromatic

compounds like phenol by nitrite in the presence of HOOH in mildly conditions, i.e., at room temperature and neutral pH. The nitration of phenol by  $\text{NO}_2^-$  in the presence of HOOH catalyzed by MP8 is very similar to the already reported nitration reactions by  $\text{NO}_2^-/\text{HOOH}$  of: (a) tyrosines, catalyzed by myeloperoxidase, horseradish peroxidase [34,35] or lactoperoxidase [34], (b) dopamine, catalyzed by horseradish peroxidase and lactoperoxidase [36], (c) 20-deoxyguanosine catalyzed by myeloperoxidase [37] and (d) mitoxantrone catalyzed by lactoperoxidase [38]. Ricoux *et al.* [39] propose a mechanism (Scheme 3) in which the first step could be the reaction of HOOH with resting MP8Fe(III) which leads to the Compound I formation. Compound I could then be reduced into Compound II, in two ways: either it could be reduced by phenol with formation of phenoxy radicals (Scheme 3, step 2a), as already proposed for the hydroxylation of phenol by HOOH catalyzed by MP8 [40], or it could be reduced by  $\text{NO}_2^-$  leading to  $\text{NO}_2^\bullet$  radicals (Scheme 3, step 2b). In this regard, the reduction of Compound II of horseradish peroxidase, myeloperoxidase and lactoperoxidase by  $\text{NO}_2^-$  has been described [38,41,42]. In the following step of the reaction, Compound II of MP8 could either be reduced by nitrite into MP8Fe(III) with formation of  $\text{NO}_2^\bullet$  (Scheme 3, step 3b), or could react with the already formed phenoxy radicals to give minor amounts of hydroquinones (Scheme 3, step 3a) [40]. Finally, the reaction of  $\text{NO}_2^\bullet$  radicals with phenoxy radicals should lead to 2- and 4-nitrophenols (Scheme 3, step 4) as proposed for the last step of the nitration of phenol by peroxyxynitrite catalyzed by microperoxidase 11 and cytochrome P450 [43]. It is important to notice that in the mechanism proposed by Ricoux *et al.*, the authors unconsidered the formation of hydroxylated phenol derivatives by the attack of hydroxyl radical generated by homolytic cleavage of HOOH that was demonstrated by works from our laboratory and described below [44,45,46]. In fact, the homolytic scission of HOOH is the predominant route for MP activation and renders Compound II as the predominant high valence species [44-46].

The proximal ligands of the heme including a histidine in peroxidase, a tyrosinate in the catalase and a cysteinate in cytochrome P450 of the heme respond for the different catalytic mechanisms exhibited by these enzymes. Although Ac-MP-8 has a histidyl ligand, it still contains reasonable catalase activity and exhibits cytochrome P450 activity. Jeng *et al.* [48] demonstrated that due to the presence of histidyl at the fifth coordination position of the heme iron, peroxidase-type reaction is favored over catalase- and cytochrome P450-type reactions. This work also suggests that the proximal ligands of hemoproteins influence the ratio of the three types of reactions. MP catalyzes cytochrome P450-type oxygen-transfer reactions such as the aromatic hydroxylation, *N*-demethylation, *S*-oxygenation, and alkoxylating dehalogenation of halophenol [40,49,50,51,52,53]. On the other hand, the catalase activity of MP is not well



Scheme adapted from Ref 41.

**Scheme 3.** Mechanism of nitration of aromatic compounds catalyzed by MP-8. The steps represented in black are that proposed by Ricoux *et al.* [39] and the steps represented in bold are according to the mechanism proposed by Araujo *et al.* for MP-11 [47].

understood [21,54]. In order to understand the role of histidyl ligand of Ac-MP-8 in the three different types of reactions, it was determined the kinetic parameters of catalase-type reaction catalyzed by Ac-MP-8 and compared with those of peroxidase-type and cytochrome P450-type reactions catalyzed by MPs. The MPs have an open active site, responsible for broad substrate specificity in both peroxidase-type and cytochrome P450-type reactions [19,22,32,33,55].

Spee *et al.* [33] studied the influence of the peptide chain on the kinetics and stability of microperoxidases and the study indicates that microperoxidases are relatively efficient catalysts. Specificity constants ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) for the microperoxidases used in this study for the hydroxylation of anilines vary in the range 550-1200 M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. The kinetic parameters for the microperoxidases derived from horse-heart cytochrome *c* (microperoxidases 6, 8, and 11) show that the increase of the size of the peptide chain attached to the heme moiety has no effect on the  $V_{\text{max}}$  for the hydroxylation of aniline, but does result in a 50% decrease of the  $K_{\text{m}}$ . Obviously, a larger size of the attached peptide chain in these microperoxidases creates an environment around the heme-iron that is more suitable for the fairly hydrophobic substrate, but does not influence the actual rate of hydroxylation. MP-17, which is derived from *T. vevsutus* cytochrome *c*<sub>550</sub>, as a twofold higher  $V_{\text{max}}$ , in this reaction, but the  $K_{\text{m}}$  is lower than that of the microperoxidases derived from horse-heart cytochrome *c*.

## 2. Microperoxidases in heterogeneous media: The recreation of peroxidases

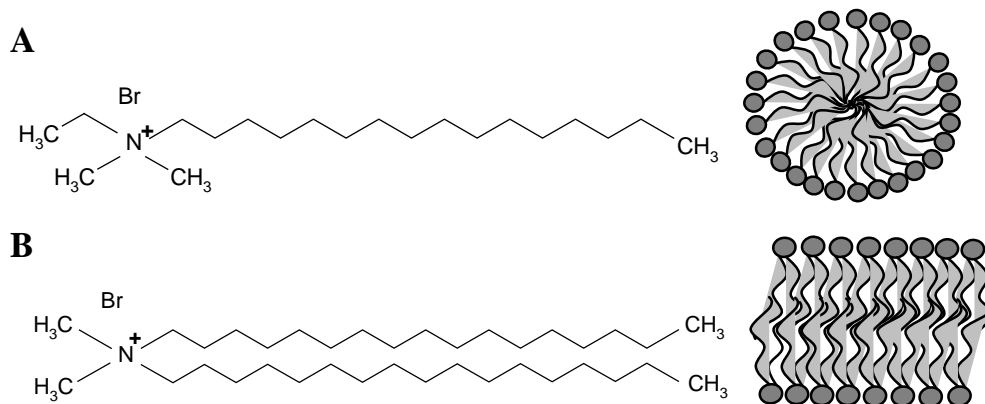
### Cationic surfactants

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) (Scheme 4, A and B, respectively) are surfactant that in aqueous media, form micelles and liposomes, respectively. The properties of these surfactants have been extensively studied and include the ability to provide special environmental conditions for catalysis [45,46,56,57].

### Effect of cationic surfaces on the activity of peroxidases

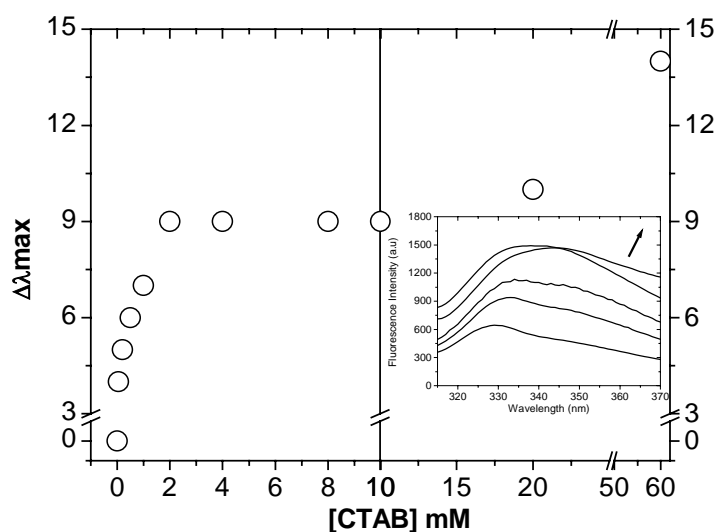
Data from our laboratory have demonstrated that cationic surfaces provided by aggregates of CTAB and DODAB exhibit affinity for acidic hemeproteins and hemepeptides [44-46] but not for alkaline hemeproteins, such as cytochrome *c*. CTAB micelles exhibit affinity to the acidic HRP C and promote changes in the protein structure as demonstrated by changes in the Trp fluorescence (Fig 1). Figure 1 shows the effect of CTAB concentration on the Trp 117 fluorescence of HRP C. The increase of CTAB concentration led to the  $\lambda_{\max}$  red shift and enhancement of the Trp 117 fluorescence band (Fig. 1 and inset). The turning point around 0.5 mM CTAB should correspond to the surfactant CMC in the presence of HRP. Above 20 mM of CTAB a new increment in the Trp fluorescence was observed. The inset shows that in high CTAB concentrations the  $\lambda_{\max}$  red shift was not accompanied by increase of fluorescence intensity. In high concentrations, it is expected that CTAB forms worm-like micelles [58,59] with hexagonal array and this surfactant behavior probably responds for the change in the HRP fluorescence observed in this condition.

CTAB-induced conformational alterations of the enzyme were also investigated by near-UV circular dichroism (Fig. 2). CD spectra of native and

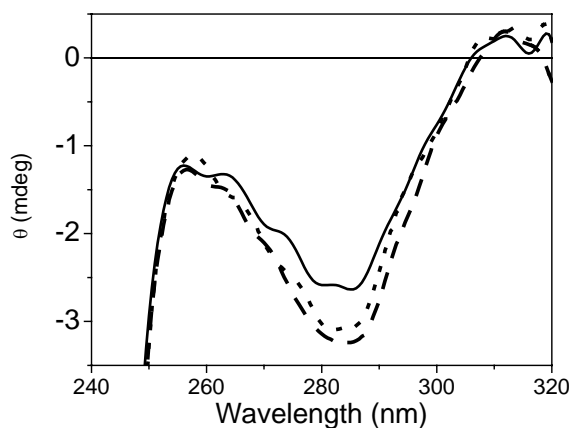


**Scheme 4.** **A** – CTAB molecular and micellar structure. **B** – DODAB molecular and bilayer structure.

CTAB-bound HRP in near-UV (240-320) region are shown in Fig. 2. In the near UV-region, CD spectra of proteins reflect mainly the contribution of aromatic amino acids and disulfide bonds to protein tertiary structure and are very sensitive to structural changes. The near-UV CD spectrum of HRP is characterized by a strong negative band centered at 284 nm, which is attributable to the presence of Trp and Tyr in asymmetric environments. In the case of CTAB-bound HRP, the band peaking at 284 nm was more intense as compared with that of native one. The fluorescence and CD data suggests that the association of HRP to CTAB micelles led to enhanced aromatic packing and

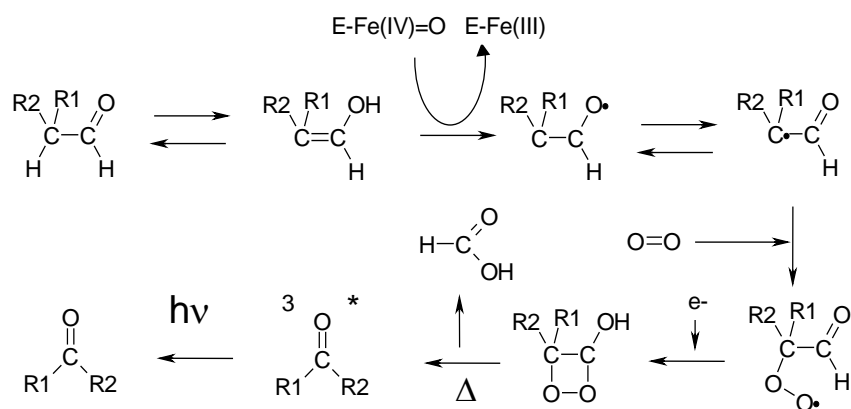


**Figure 1.** Trp  $\Delta \lambda_{\max}$  of HRP in the presence of different CTAB concentration. The experiments were carried out with 2  $\mu$ M HRP, excitation at 292 nm, at 36  $^{\circ}$ C. The inset represents the fluorescence spectra obtained at the following CTAB concentrations 0, 0.5, 2.0, 20, 60 mM as indicated by the arrow.

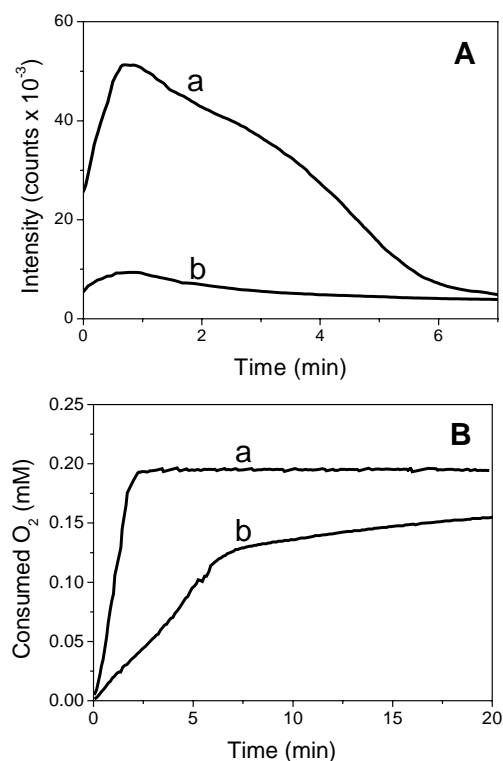


**Figure 2.** Near-UV CD spectra of HRP in the absence of CTAB (solid line) and in the presence of 20 mM (dotted line) and 60 mM (dashed line) CTAB.

more buried hydrophobic patches as compared with the native enzyme. Similar results were obtained by Mogharrab *et al.* [60] by chemical modification of HRP with anthraquinone 2-carboxylic acid. The chemically-induced HRP packing promoted enhancement of the enzyme catalytic efficiency.



**Scheme 5.** Reaction route of the HRP-catalyzed oxidation of aldehydes to generate triplet excited carbonyl products.



**Figure 3.** Effect of CTAB on the catalytic activity of HRP by using PPA as reducing agent. **A-** Quiluminescence in the course of the PPA oxidation by HRP associated to CTAB micelles (3 mM, line a) and in the absence of the surfactant (line b). **B-** Oxygen consumption in the same conditions above. The experiments were carried out with 1  $\mu$ M HRP, 1 mM HOOH, 1,8 mM PPA, at 37°C.

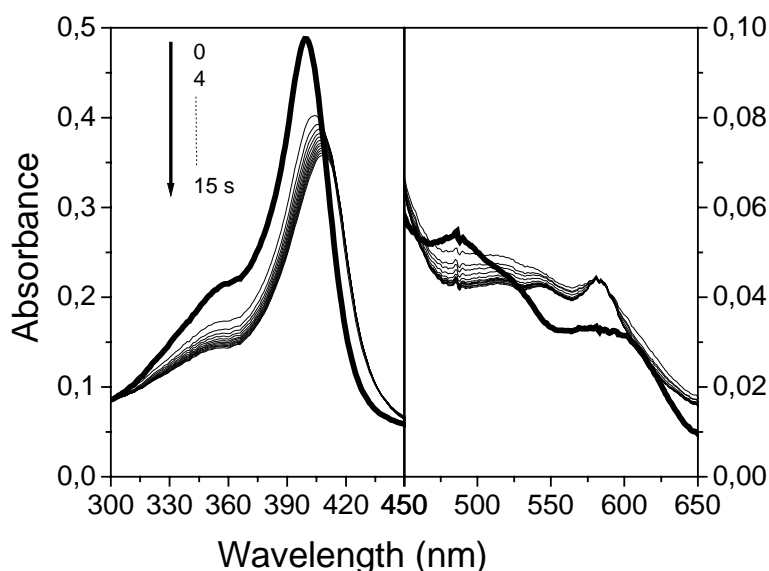
CTAB-induced HRP packing also led to the enhancement of the enzyme activity on the aldehydes: 2-phenylpropionaldehyde (PPA) and diphenylacetaldehyde (DPAA). The high valence states of HRP generated by the reaction with hydrogen peroxide oxidize the enol form of aldehydes to alkyl radicals prone to react with molecular oxygen to render a dioxetane intermediate that cleaves at 37°C and produces formic acid and a triplet carbonyl compound. The triplet excited state, produced by the aldehyde oxidation, decays to the ground state via quimiluminescence (Scheme 5). Figure 3A and B shows, respectively, the light emission and oxygen consumption from the reaction of high valence states of HRP with PPA in the absence and in the presence of CTAB micelles. In these conditions, it is evident the enhancement of HRP catalytic activity promoted by the association to CTAB micelles. Similar results were obtained with DPAA (not shown).

### The model of the catalyst

The association of MP to CTAB micelles provides a protein-like hydrophobic environment to the heme group, which allows this complex to exhibit the catalytic properties of the peroxidases [44,45]. MP have a net negative charge provided by the heme propionate groups and the carboxy group of the C-terminal oligopeptide chain prone to establish electrostatic interaction with the cationic CTAB micelle and DODAB liposome surfaces. However, the hydrophobic groups present in the oligopeptide chain as well as the hydrophobic heme group exhibit affinity for the micelle core. This model is in accordance with the UV-vis and EPR spectral changes observed when MP-9 was bound to CTAB micelles [45]. The bathochromic effect observed for the Soret band is typical of the heme group in a hydrophobic microenvironment [61]. Changes in the EPR parameters for the high spin state of MP-9 indicate the possibility that, inside the micelle, MP-9 was not coordinated with water but probably with OH<sup>-</sup> or with the ε-amino group of its N-terminal lysine residue. In this model, the micelle constitutes an artificial enzymatic active site that exhibits high affinity for hydrophobic substrates.

The CTAB micelles provide for MP a microenvironment with an alkaline interface and a hydrophobic core that gives special characteristics to the Fe(III)MP/peroxide reaction as compared to homogeneous medium. The reaction of CTAB-bound Fe(III)MP-8 with *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) and HOOH produced alkoxy and hydroxyl radicals as the initial radicals, respectively. These free radicals are produced presumably by homolytic scission of the O–O bond by Fe(III)MP-8/CTAB. The UV-visible spectral changes detected for Fe(III)MP-8 during the reaction with peroxides point to the formation of Compound II as the species that exhibits subsequent bleaching (Fig. 4).





**Figure 4.** Time-resolved UV-visible spectra of the reaction of 4.25  $\mu\text{M}$  Fe(III)MP-8/CTAB with 0.8 mM HOOH at pH 7.4.

Primus *et al.* [31], demonstrated that, in aqueous buffered solutions, protons act as competitive inhibitors for the microenzymes Fe(III) and Mn(III)MP-8. This result suggests that, similar to that is observed for peroxidases, Compound 0 precedes the formation of high-valent intermediates of Fe(III) or Mn(III)MP-8. Different of HRP, MPs do not exhibit a site pocket with a distal basic residue participating in the peroxide deprotonation and favoring the O-O peroxide bond cleavage. These characteristics could somehow be responsible for the low reactivity of MP at low pH values. In aqueous medium, alkaline pH leads to deprotonation of MP bound water, which then either assists concerted hydrogen peroxide deprotonation and coordination of the hydroperoxo group to the metal center or is directly oxidized by hydrogen peroxide to a metal hydroperoxo MP [31].

Prieto *et al.* [44], demonstrated that the association of Fe(III) MP-8 with CTAB micelles gives special characteristics to the Fe(III)MP-8/peroxide reaction as compared with homogeneous medium. The peculiarity of the CTAB micellar microenvironment allowed circumvention of rapid kinetics (milliseconds scale) previously observed for the MP-catalyzed cleavage of HOOH in buffered aqueous solution [31], permitting the reaction to be accompanied in the scale of seconds [44].

### The reaction mechanism in CTAB micelles

The saturation kinetics observed for the reaction of CTAB-bound MP-8 with peroxides, HOOH or *t*-BuOOH strongly suggested that the reaction follows the same mechanism proposed by Primus *et al.* [31] for oxidation of

Fe(III)MP-8 by HOOH in homogeneous medium. The proposed reaction mechanism for the reaction of MPs with peroxides is shown in Scheme 6, considering that all MP-8 molecules associated to CTAB micelles are coordinated with deprotonated water and D is the MP-8 form that exhibits Soret band bleaching.

Scheme 6 depicts a comparison between the reaction of Fe(III)MP-8 in aqueous and in micellar media that is in accordance with equations 7 and 8, since  $k_{obs}$  in aqueous medium encompasses also  $K_a$ , the PrFe(III)-OH<sub>2</sub> deprotonation step.

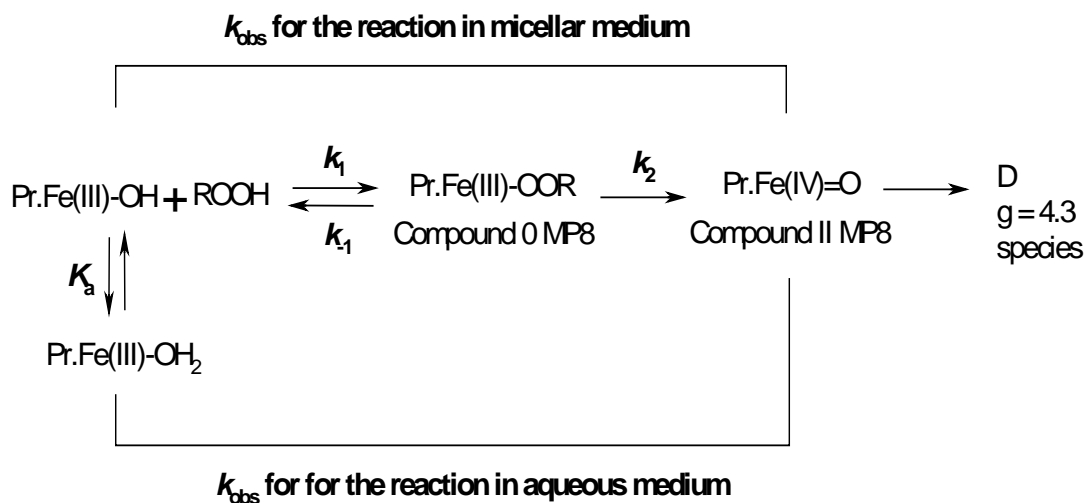
The influence of peroxide concentration on the conversion rate of Fe(III)MP-8 into Compound II obeys Equation 7,

$$k_{obs} = \frac{k_2 \cdot [ROOH]}{K_{mapp} + [ROOH]} \quad (7)$$

where  $k_{obs}$  is the observed conversion rate of Fe(III)MP-8 into Compound II,  $k_2$  is the maximum rate, [ROOH] is the concentration of peroxide and  $K_{mapp}$  is the apparent dynamic or pseudoequilibrium constant for complexation between Fe(III)MP-8/CTAB and peroxides.

$K_{mapp}$  is defined in Eq. 8.

$$K_{mapp} = \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right) \left( \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \quad (8)$$



**Scheme 6.** Reaction route of Fe(III)MP-8 in aqueous and micellar media.

For the reaction occurring in the micellar system,

$$\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right) = 1 \quad (9)$$

since all Fe(III)MP-8 was localized into the micelles and therefore,

$$K_{m_{app}} = \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right) = K_m \quad (10)$$

In homogeneous medium [31], linear fits of  $1/k_{\text{obs}}$  at different pH values exhibited a different slope and a common intercept on the vertical axis, indicating that protons played a competitive role in the formation of Compound 0 and subsequent forms of oxidized MP-8. In Prieto *et al.* work [44], the effect of protons was further confirmed by the results of  $k_{\text{obs}}$  as a function of the proton concentration for a specific hydrogen peroxide concentration. The data provided by Primus *et al.* (<http://pubs.acs.org>) (Table 1) pointed to no significant alteration in the  $K_m$  value exhibited by MP-8 associated to CTAB upon decreasing the pH from 9.1 to 8.0. Otherwise, in the presence of CTAB micelles, different results were obtained for both substrates when the medium pH value was decreased from 9.1 to 7.4 (Table 1) i.e., the  $K_m$  value for both substrates decreased with the pH. The change of the  $K_m$  HOOH/*t*-BuOOH ratio from 1.6 to 0.5 at pH 7.4 and 9.1, respectively, suggested that at high pH (above 9.1), both peroxides exhibit similar partition coefficients in CTAB micelles. In this condition ( $\text{pH} \geq 9.1$  in the bulk phase), the higher pH values found at the CTAB micellar interface (around 11.0) might lead to the ionization of *t*-BuOOH and HOOH molecules with consequent loss of the affinity to the micelle core. However, at lower pH values (below 9.1), protonated HOOH, being more polar than *t*-BuOOH, remained partitioned preferentially into the water while non ionized *t*-BuOOH gained affinity to the micelle core. In fact, according to literature data [62], at pure water pH value, *t*-BuOOH was found to be 40% incorporated into the micellar pseudophase of CTAC micelles, while HOOH was 15% in the same conditions. In this regard, at pH 7.4, the  $k_2$  for the reaction with *t*-BuOOH was two fold higher than for HOOH (Table 1).

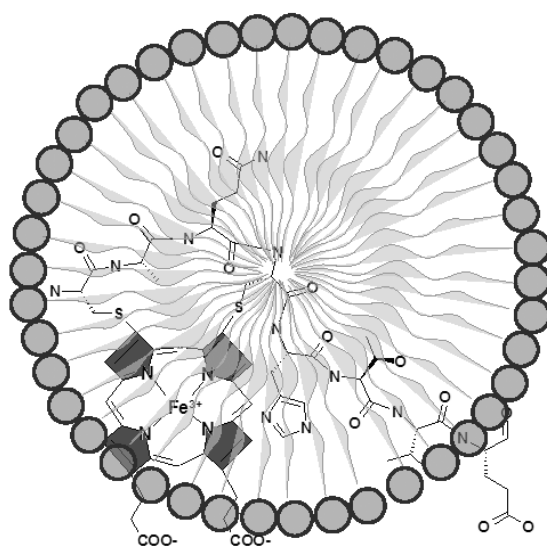
MP-8 has a net negative charge due to its heme propionate groups and the carboxy group of the C-terminal oligopeptide chain, providing electrostatic affinity for the cationic CTAB micelle surface. However, the hydrophobic groups present in the oligopeptide chain with the also hydrophobic heme group must exhibit affinity for the micelle core. Hence,

it was proposed a model for MP-8 associated with CTAB, where the heme propionate groups are associated to the micelle surface and the phorphyrin ring and oligopeptide chain side is partially inserted into the micelle (Scheme 7).

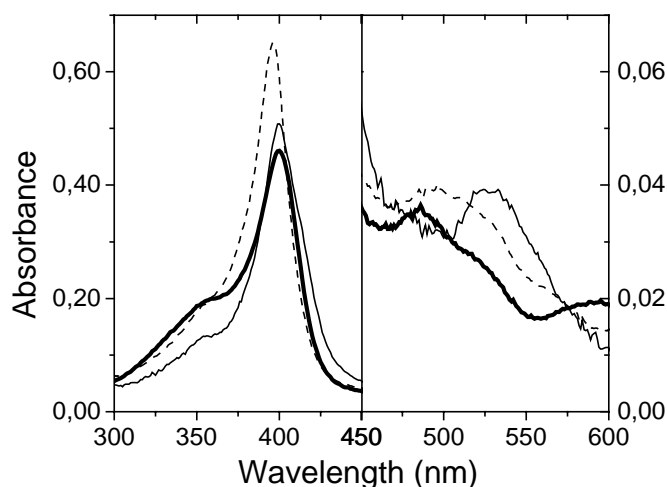
**Table 1.** Fe(III)MP8 peroxides reaction kinetic parameters.

pH 7,4			
	$K_m$	$k_2$	$k_2/K_m$
	mM	$s^{-1}$	$M^{-1} \cdot s^{-1}$
<b>t-BuOOH</b>	$0,17 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	808
<b>HOOH</b>	$0,28 \pm 0,03$	$0,066 \pm 0,002$	233
<b>HOOH<sup>a</sup></b>	0,28	222	589.000
pH 9,1			
	$K_m$	$k_2$	$K_2/K_m$
	mM	$s^{-1}$	$M^{-1} \cdot s^{-1}$
<b>t-BuOOH</b>	$0,9 \pm 0,2$	$0,17 \pm 0,02$	189
<b>HOOH</b>	$0,45 \pm 0,04$	$0,069 \pm 0,002$	154
<b>HOOH<sup>a</sup></b>	0.20	167	825.000

**a** - according to data from ref [63] at pH 8.0



**Scheme 7.** Model proposed for the MP-8/CTAB micelle lipoenzyme.



**Figure 5.** UV-vis spectra of 4  $\mu\text{M}$  Fe(III)MP-8 in different media: 5 mM phosphate buffer pH 7.4 (dashed line); 20 mM CTAB in phosphate buffer pH 7.4 (thick solid line); and ethanol (thin solid line).

This model is in accordance with the spectral changes observed when MP-8 is bound to CTAB micelles (Fig. 5). The bathochromic effect observed for the Soret band is typical of the heme group in a hydrophobic microenvironment [61]. In this model, the micelle constitutes an artificial enzymatic active site for which hydrophobic substrates will exhibit higher affinity. When the bulk pH is alkaline the local pH at the micelle surface is certainly higher, perhaps enough to promote deprotonation of peroxides, impairing their access to the “enzyme” active site (micelle interior) and decreasing their affinity for the “enzyme active site”. This proposal is consistent with the increase of  $K_m$  for both substrates at pH 9.1. In agreement with this model, the more significant effect of pH observed for *t*-BuOOH can be attributed to differences in the partitioning of the substrates molecules in this heterogeneous medium.

### The catalytic efficiency

A question arises upon comparison of the  $k_2/K_m$  values shown in Table 1: Why does the enzyme constructed via the association of MP-8 with CTAB micelles exhibit so low a catalytic efficiency? According to Primus *et al.* [31], His42 could be responsible for the heme iron bound water deprotonation in HRP. Recent literature data [31] suggest that His42 acts initially as a proton acceptor (base catalyst) and then as a donor (acid catalyst) at neutral pH, consistent with the observed slower rate and lower efficiency of heterolytic cleavage observed at acid pH. Arg38 is influential in lowering the  $pK_a$  of His42, as well as in aligning HOOH in the active site, but it does not play a direct role in proton transfer. The role of distal Arg was also demonstrated to the reaction of Fe(III)MP-8 with HOOH in aqueous medium. In that case, the

peroxidase activity of MP-8 was increased more than tenfold by the presence of the guanidinium ion able to form the ion-pair  $\text{GuaH}^+\text{HO}_2^-$ . [22] In homogeneous medium, exposure of the oxo-ferryl to the medium could facilitate the access to proton donors, such as water and neighboring amino acid groups of MP-8. For the enzyme MP-8/CTAB, the formation of the hydroperoxo species in the micellar enzymatic active site impairs the access to proton donors, slowing the catalytic process. It is noticeable that in both homogeneous and micellar medium, the different catalytic efficiencies observed at the different pH values are due to the differences between the  $K_m$  values.

The lowering of the catalytic efficiency observed after the association of MP with CTAB micelles pointed the challenge to improve this enzymatic model.

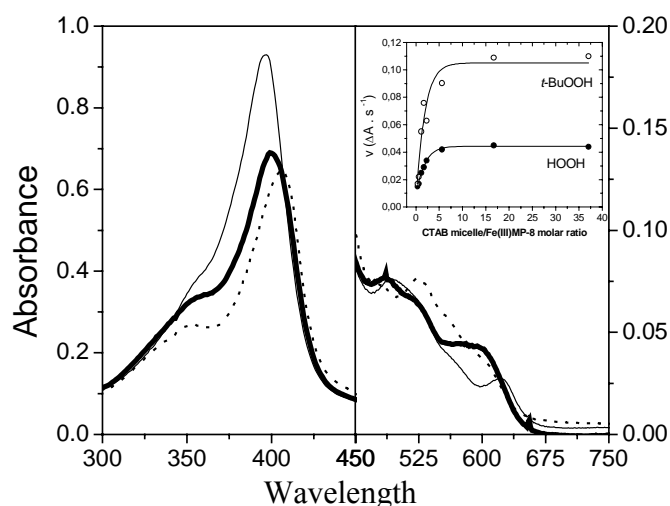
### **Reaction routes determined by different micelle/CTAB ratios**

In this model of catalyst the CTAB micelle/Fe(III)MP-8 molar ratio is another important factor in determining the efficiency of the reaction (Fig. 6). Figure 6 suggests that, in low CTAB micelle/Fe(III)MP-8 molar ratios (below five), Fe(III)MP-8 and CTAB micelles might form aggregates with probably two Fe(III)MP-8 molecules associated to the one micelle. In this condition, the spectral changes (red shift of the Soret band and decreasing of 1.4 fold in  $\epsilon$  value) are in accordance with previous results obtained with Fe(III)MP-11 in high concentration (18.9  $\mu\text{M}$ ) in aqueous medium [64]. In the case of Fe(III)MP-8 dimers in CTAB micelles, the spectral alterations are thought to occur by intermolecular coordination of the metal by the *N*-terminal group at Cys14 which has been previously deprotonated in the alkaline microenvironment of the micellar interface. In high CTAB micelle/Fe(III)MP-8 molar ratios (above five) the monomer forms of Fe(III)MP-8 associated to CTAB micelles are favored and the system exhibits the catalytic properties described in this work (Fig. 6 inset). Thus, the most interesting characteristic of this enzyme is that the active site is not a pocket formed by a structured polypeptide chain, but by a detergent aggregate. This aggregate provides the hydrophobic microenvironment commonly found in peroxidases. Based on these results, further studies were realized to better characterize and improve this catalytic complex.

Therefore, in another work, Prieto *et al.* [45] demonstrated the occurrence of a peroxidase catalytic cycle during the reaction of MP-9/CTAB with *t*-BuOOH. The ability to act as a reversible catalyst corroborated that this heme peptide/micelle aggregate behaves as an artificial enzyme, named lipoenzyme. The catalytic cycle observed when peroxide, in this case *t*-BuOOH, was the only available substrate could implicate that the peroxide acts as an oxidizing (formation of Compound I) and a reducing agent (formation of Compound II and regeneration of the native form) of the prosthetic group. Concerning the reaction mechanism, an interesting question raised: what is the reaction mechanism

for the MP-9 enzymatic cycle in the absence of other reducing substrates? In the presence of CTAB micelles, the enzymatic cycle occurs efficiently at pH 7.4, a condition in which probably all MP-9 molecules associated to CTAB micelles are coordinated with deprotonated water, favoring the formation of Compound 0. The micellar alkaline interface favors the deprotonation of the water molecule bound to heme iron and subsequent change for the substrate molecule with formation of MP-9 Compound 0. After the formation of MP-9 Compound 0, there are two possible mechanisms for the cleavage of *t*-BuOOH: a heterolytic cleavage generating *t*-BuOH and Compound I, which reacts with another peroxide molecule generating compound II and *t*-BuOO<sup>•</sup> or a homolytic cleavage of *t*-BuOOH to form Compound II directly. Whatever the mechanism for peroxide cleavage, native Fe(III)MP-9 can be regenerated after the reaction of Compound II with another *t*-BuOOH molecule. The fact that Compound I has not been detected during the MP-9/CTAB peroxidase cycle could somehow induce to accept the first possibility. However, MP-9/CTAB lipoenzyme can also be oxidized to Compound I as attested EPR measurements in the presence of both *t*-BuOOH and HOOH at high concentration and in the presence of iodoso benzene.

The reduction potential of MP-9 and MP-11 associated to CTAB micelles is shifted positively by 100 mV (from -346 to -276 mV) due to low polarity of the micelle core microenvironment [46]. In this work [46], it was demonstrated that the addition of diphenylacetaldehyde (DPAA) to MP-9/CTAB Compound II regenerated the native form of the enzyme, Fe(III)MP-9/CTAB, what characterizes



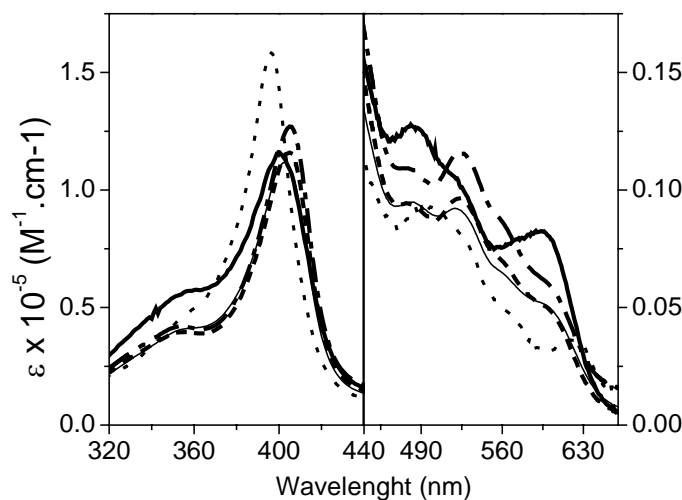
**Figure 6.** UV-vis spectra of 4.25  $\mu\text{M}$  Fe(III)MP-8 in 5 mM phosphate buffered water (thin solid line), 0.15 mM CTAB (dashed line), and 20 mM CTAB (thick solid line). The inset shows the variation of the rate of reaction for Fe(III)MP-8/CTAB and 0.8 mM HOOH (solid circles) or *t*-BuOOH (open circles) at pH 7.4 as a function of the CTAB micelle/Fe(III)MP-8 molar ratio. The experiments were carried out at 25  $^{\circ}\text{C}$ .

the occurrence of a peroxidase cycle. Fe(III)MP-9/CTAB regenerated during the peroxidase cycle reacted with residual DPAA in the medium to form Fe(II)MP-9/CTAB, which indicates that both Fe(III)MP-9/CTAB and its oxyferryl form can use aldehydes as reducing agents. In fact, according to the determined reduction potential, it was expected Fe(III)MP-9 and Fe(III)MP-9/CTAB were able to oxidize DPAA (reduction potential -630 mV). The reaction of MP-9/CTAB with DPAA produced benzophenone as final product, detected by infrared spectroscopy and mass spectrometry. The hydrophobic core provided by CTAB micelles changed the redox potential of the microperoxidases to more positive values and made the lipoenzyme a better oxidizing agent as compared with microperoxidases in homogeneous medium. The decrease of the catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) previously observed for the cleavage of peroxides was due to the partition of these compounds inside and outside the micelles. In the case of DPAA, the highly hydrophobic compound, the partition occurs preferentially inside the micelles and the redox potential of the enzyme was the limiting factor of the catalytic efficiency. Interestingly, a significant difference was observed in the benzophenone yield according to the micelle/MP-9 molar ratio. At low CTAB micelle/MP-9 ratio ( $\sim 6.0$ ) the oxidation of DPAA produced benzophenone in high yield leading the product to precipitate at the bottom of the cuvette (Fig. 7). At high CTAB micelle/MP-9 ratio ( $\sim 66$ ), DPAA oxidation resulted in the formation of Schiff base adducts. This difference was assigned to the accessibility of the amino group to the aldehyde. Due to the spectral changes observed by decreasing the CTAB micelle/MP-9 ratio (Fig. 8), the authors suggest that low micelle/MP ratios favor the association of hemepeptide pairs into the micelle. In a dimeric association with CTAB micelles, MP-9 Lys13 amino groups could be forced to locate out of the micelle where the concentration of DPAA was significantly lower due to the partition of the aldehyde, preferentially inside the micelle core. In this condition, DPAA free radical derivatives, formed in the course of the reaction, react preferentially with molecular oxygen and form benzophenone (Scheme 8).

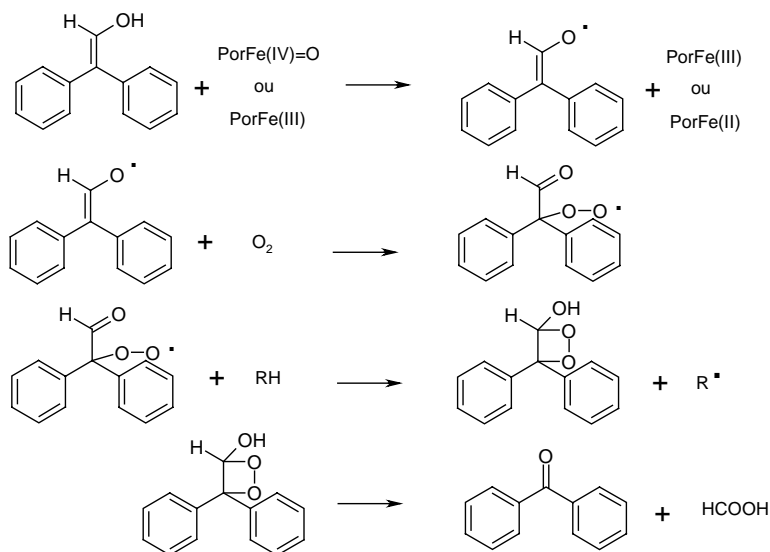


**Figure 7.** The product of the reaction at low micelle/MP9 ratio.



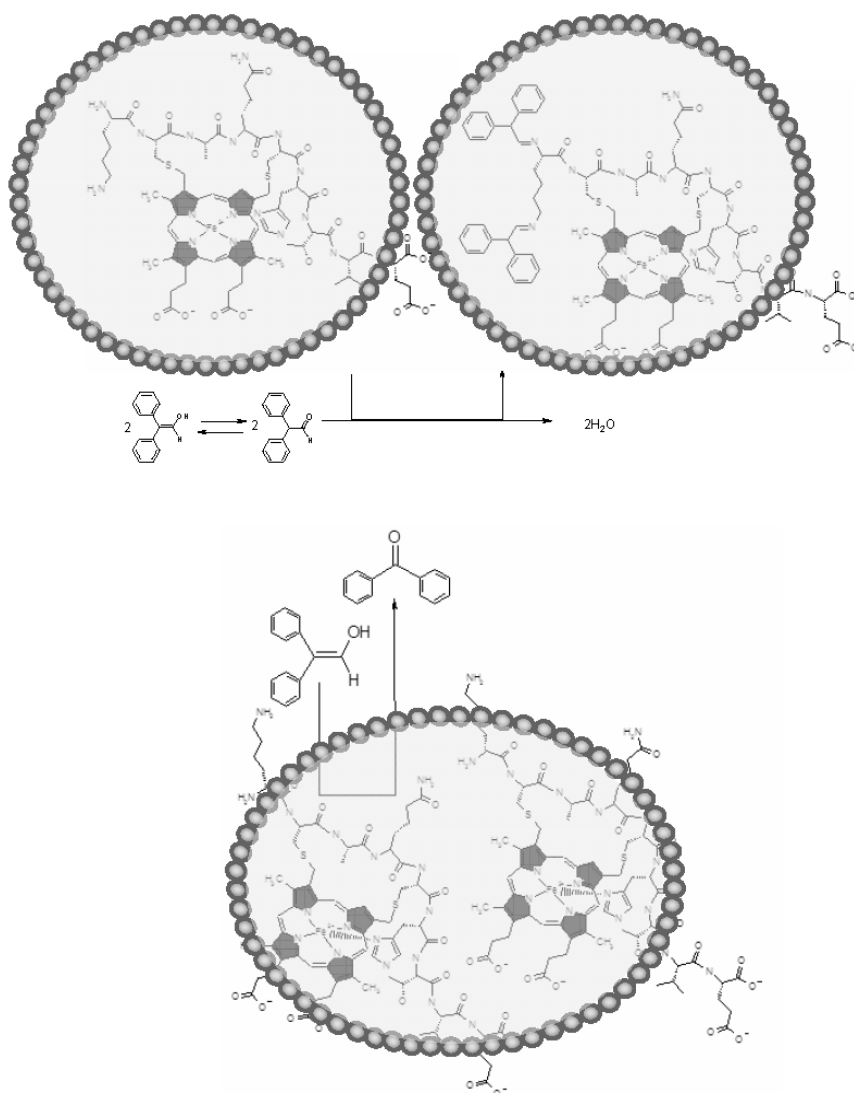


**Figure 8.** Effect of the micelles/hemepeptide ratio on the MP-9 Soret and Q bands. Dotted line: Fe(III)MP-9 absence of CTAB at pH 7.4. Thick solid line: Fe(III)MP-9/CTAB when the CTAB/hemepeptide ratio was 50.0. Thin solid line: the ratio was 5.0. Dashed line: the ratio was 0.5. Dashed-dotted line: the ratio was 0.25. The spectra were obtained with 100  $\mu$ M MP-9 and presented in  $\epsilon$  units.



**Scheme 8.** Possible mechanism of diphenylacetaldehyde oxidation.

However, in the monomeric form, the peptide chain of MP-9, being preferentially inside the micelle, could be also prone to be attacked by the intermediate free radicals formed in the course of the reaction generating Schiff base adducts. The trapping of the intermediate radicals would decrease the yield of benzophenone without the impairment of the heme iron reduction, a process that precedes the formation of these radicals. Scheme 9 illustrates the putative structures of MP-9/CTAB aggregates obtained in low and high micelle/hemepeptide



**Scheme 9.** Effect of MP-9/CTAB micelles ratios on the reaction route for the DPAA oxidation.

ratios. The existence of dimeric MP-9 associated to CTAB micelles in low CTAB micelles/MP ratios was reinforced by the heme iron EPR spectrum obtained in this condition [45]. In the presence of CTAB (micelle/MP ratio = 6.0), only the high spin form of MP-9 was found but with different EPR parameters compared to the high spin state observed in aqueous medium. In CTAB micelles, the prosthetic group exhibits a subtle rhombic distortion, probably due to interactions between the porphyrin rings paired inside the micelle.

### The improvement of the catalyst

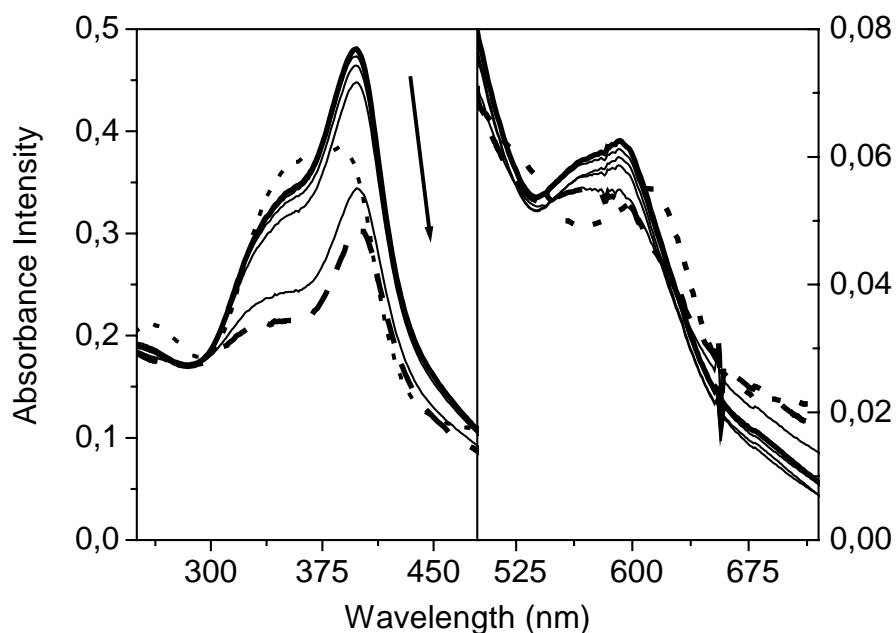
As described before, the lipoenzyme MP-CTAB presented low catalytic efficiency in the reaction with peroxides and pointed out the challenge to

improve this enzymatic model. This characteristic was attributed to the impairment of the access of proton donors to the micelle core. The association of histidine to the lipoenzyme MP-CTAB promised to be a way to improve the catalytic efficiency. However, the coordination of the imidazol ring with heme iron promoted a steric impairment for the peroxide access (unpublished results). Promising results have been obtained with the catalytic device formed by MP associated to cationic liposomes in the presence of histidine (unpublished results).

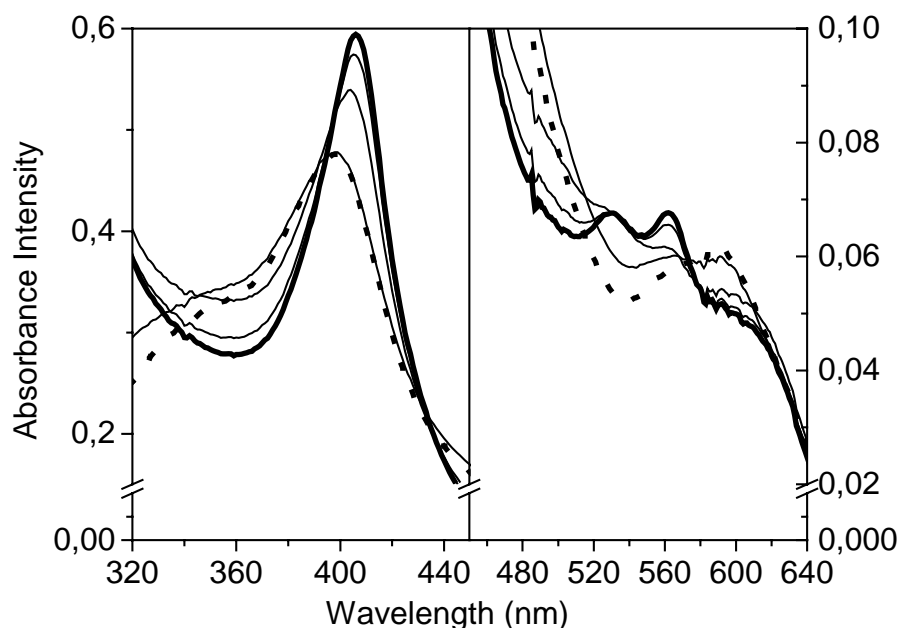
### Catalysts formed by porphyrins associated to cationic surfactants

The ability to cleave peroxides and to oxidize DPAA is not an exclusive property of hemepeptides and heme proteins associated to cationic micelles and liposomes. The inclusion of the  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX and  $\text{Fe}^{3+}$ MTDPP ( $\text{Fe}^{3+}$  meso-tetrakis-dicloro phenylsulfonate porphyrin, respectively) in CTAB micelles allows working with high porphyrin concentrations in mildly buffered aqueous solutions.

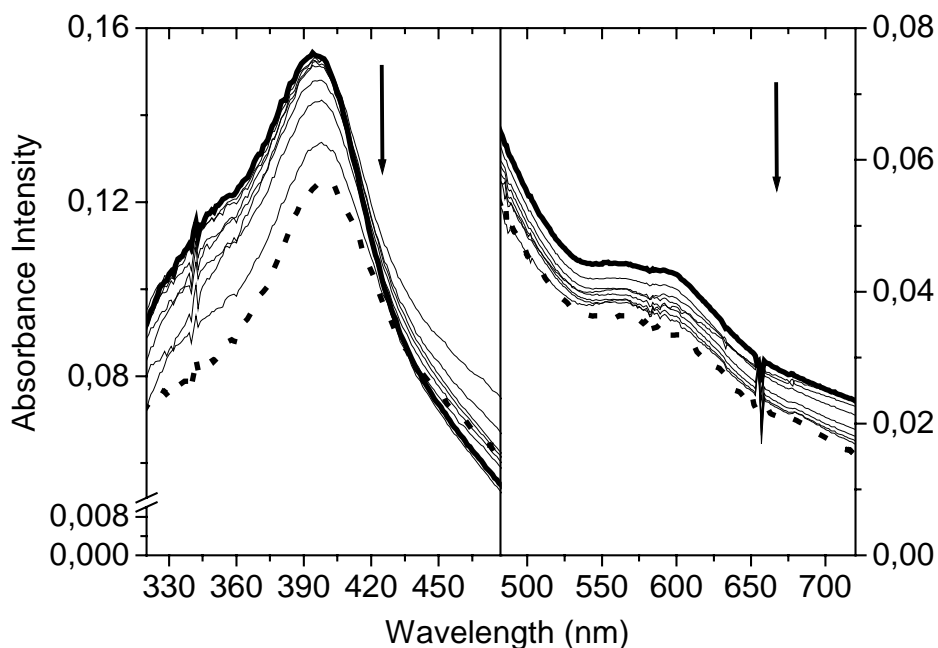
Figure 9 shows the spectrum of  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX in aqueous buffered solution (dotted line) and associated to CTAB micelles (thick solid line). The spectral changes, i.e., Soret band narrowing,  $\epsilon$  increase and red shift,



**Figure 9.** Spectral changes that accompany the association of  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX with CTAB micelles and the conversion to Compound II. Black dotted line:  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX in 5 mM phosphate buffer, pH 7.4. Thick solid line:  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX associated to CTAB micelles (60 mM) in 5 mM phosphate buffer, pH 7.4. Black lines: 1.5, 3.0, 10, 50 (thin lines) and 100 min (dotted line) after the addition of 0.3 mM *t*-butyl hydroperoxide as indicated by the arrow.



**Figure 10.** Spectral changes that accompany the reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX by DPAA in the presence of CTAB micelles. Dotted line:  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX associated to CTAB micelles (60 mM) in 5 mM phosphate buffer, pH 7.4. Black lines: 3.0, 16, 33 (thin lines) and 50 min (thick line) after the addition of 20 mM DPAA.



**Figure 11.** Spectral changes that accompany the reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX by DPAA in the presence of DODAB vesicles. Thick line:  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX associated to DODAB vesicles (1 mM) in 5 mM HEPES buffer, pH 7.4. Black lines: 1.0, 1.5, 2.0, 10, 12, 16, 33 (thin lines) and 60 min (dotted line) after the addition of 20 mM DPAA.

are indicative that, in the presence of CTAB, the porphyrin is buried in the micelle core. Figure 9 shows also the spectral changes that accompany the reaction of  $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX with *t*-BuOOH hydroperoxide in CTAB micelles. In this condition, after *t*-BuOOH addition, it was observed a slight (2 nm) red shift of the Soret band that characterizes the formation of Compound II. However, protoporphyrin IX Compound II formation was also accompanied by Soret band bleaching due to the attack of free radical generated by peroxide cleavage. In this condition, the Q bands  $\alpha$  and  $\beta$  are not well defined as observed for hemeproteins and hemepeptides (Fig. 4). Similar results were obtained with  $\text{Fe}^{3+}$ MTDPP (unpublished results).

Figure 10 shows the spectra of protoporphyrin IX before and at different times after the addition of DPAA in CTAB micelles. In this condition, despite the absence of a peptide chain to provide heme iron ligands, the Q bands  $\alpha$  and  $\beta$  are well defined. Considering the alkaline interface provided by CTAB micelles, it is probable that  $\text{OH}^-$  can occupy the heme iron axial position.

Figure 11 shows also the spectral changes that accompany the reduction of protoporphyrin IX by DPAA in DODAB liposomes. In this condition, the spectral changes are suggestive of the reduced heme iron in the high spin state.

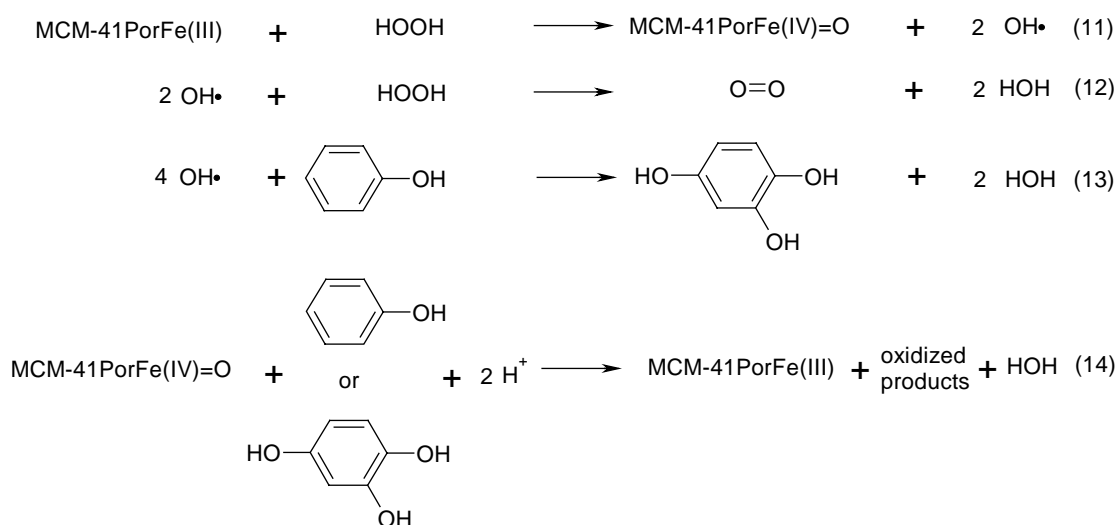
## The amazing catalyst MP11-MCM41

Another interesting catalyst was obtained by the inclusion of MP-11 in the channels of mesoporous silica MCM-41. MCM-41 is a molecular sieve synthesized by using surfactant micelles as templates [65,66]. This nanostructure material consists of highly ordered hexagonal arrays of one-dimensional channels, with large surface area and narrow pore size distribution. Owing to the large pore size, ranging from 1.5 to 10 nm, MCM-41 has the ability to encapsulate large aromatic organic molecules, such as phthalocyanines, methylene blue and ferrocene [67,68,69], and even small proteins, like cytochrome *c* [70,71]. Recently, a report appeared in the literature describing the encapsulation of MP-11 in MCM-41, but no studies about the use of the materials as catalysts were included in that article [72]. Ferric Microperoxidase-11 (MP-11) entrapped in the mesoporous silica MCM-41 resulted in a catalyst (Fe(III)MP11-MCM41) with catalase and monooxygenase properties. Similarly to catalase, the catalyst Fe(III)MP11MCM41 exhibited specificity for hydrogen peroxide to be converted to the high valence oxidized intermediate, Compound II. Also similarly to catalase, the cleavage of hydrogen peroxide by MP11-MCM41, resulted in  $\text{O}_2$  production detected by Clark electrode. Phenol, an undesirable waste product in effluents, was able to act as reducing agent of MP11-MCM41 Compound II leading to the completion of the peroxidase cycle. Analysis of the reaction products by high performance liquid chromatogram coupled with

tandem mass spectrometry (LCMS) revealed that 2,4-dihydroxyphenol was the product resulting from phenol oxidation by MP11-MCM41. This result pointed out that the catalyst MP11-MCM41 exhibits also monooxygenase property. The peculiar characteristic to conjugate two subclasses of the enzyme oxidoreductase class, peroxidases and monooxygenases, was possible because MP-11 heme iron promotes homolytic cleavage of the hydrogen peroxide generating hydroxyl radical.

The homolytic cleavage of hydrogen peroxide by MCM-41-entrapped MP-11 generated hydroxyl radical and converted the enzyme to the high valence intermediate Compound II. In a similar way described for the iron/magnetite/hydrogen peroxide heterogeneous oxidation system [73], hydroxyl radical generated by MP-11 could attack the 2 and 4 positions of the phenol ring to produce the hydroxylated product. Hydroxyl radical could also attack reminiscent hydrogen peroxide leading to molecular oxygen evolution, mimicking catalase activity. Phenol and the hydroxylated products could act as reducing agents of Compound II to complete the catalytic cycle. Besides 2,4-dihydroxyphenol, other oxidized products such as quinone and hydroquinone derivatives could be expected to be formed. These products were not detected by LCMS analysis probably due to the low yield or adsorption inside the mesoporous silica.

Regarding the proposed reaction mechanism, it is interesting to note that the catalyst MCM-41-entrapped MP-11 mimics the hepatic detoxifying cytochrome P450 system that catalyzes the hydroxylation of aromatic rings and play a central role in the metabolism of medicinal drugs and steroids. The most striking difference between MCM-41-entrapped MP-11 mechanism to promote hydroxylation of aromatic compounds and cytochrome P450 system is that the former uses hydrogen peroxide and the latter uses molecular oxygen as the activating agent of heme iron. Previous works have described cytochrome P450 [32,33,39,55] and catalase [48,54] activities for MP in solution, i.e., hydroxylation of aromatic rings and hydrogen peroxide conversion to H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub>. These works proposed that hydroxylation of aromatic compounds catalyzed by these microenzymes occurs via oxygen transfer from oxoferryl (Fe(IV)=O) to the aromatic rings concomitant with heme iron reduction to restore the resting enzyme. On the other hand, the catalase activity of MP is not yet well understood [33,54]. However, the previous works did not considered that, contrary to peroxidases, microperoxidases cleave hydrogen peroxide preferentially by homolytic scission and thus, generate hydroxyl radical. By assuming the homolytic cleavage of hydrogen peroxide rendering hydroxyl radical, it is possible to understand both P450 and catalase activities of MP (Eq. 11-14).



An important characteristic is achieved by MP-11 when entrapped in MCM-41: the resistance to the attack of free radicals. The generation of a highly reactive species, the hydroxyl radical, by microperoxidases could respond for the extensive bleaching of the MP Soret band and microenzyme inactivation during the reaction with hydrogen peroxide in homogeneous medium [47]. Despite the fact that MCM-41-entrapped MP-11 also cleaves hydrogen peroxide by homolytic scission, extensive bleaching and significant enzyme inactivation was not observed in this condition. Besides the high stability of the catalyst, another advantage to entrap MP in mesoporous silica become evident when we consider to use the catalyst for degradation of phenol and other undesirable waste product in effluents: the easy separation from water solutions. The entrapment of MP-11 in MCM-41 permits easy separation from the water, i.e. decantation, a procedure that is not possible by using free microperoxidases. The characteristics of MP-11 entrapped in MCM-41 outlined above point this catalyst is a promising nanobiotechnological device.

### 3. Concluding remarks

The activity of peroxidases and microperoxidases can be modulated by the association with surfactants and silica. Important characteristics can be achieved in the catalysts obtained by this way: i) high catalytic efficiency due to packing of the enzyme structure; ii) high affinity for hydrophobic substrates that exhibit low solubility in aqueous medium; iii) specificity for substrate that was not exhibited in aqueous medium; iv) possibility to control the reaction route according to the catalyst/micelle ratio; v) conjugation of multiple enzymatic activities in one catalyst; vi) improvement of the catalyst stability.

These characteristics point out the peroxidase model systems in heterogeneous media as important nanotechnological devices.

## 4. Acknowledgments

These results were obtained from research carried out over several years and supported by the following sources: Capes, CNPq, rede Biomat, FAPESP and FAEP-UMC.

## 5. References

1. P. G. Furtmuller, M. Zederbauer, W. Jantschko, J. Helm, M. Bogner, C. Jakopitsch and C. Obinger, **Arch. Biochem. Biophys.**, 2006, 445, 199–213.
2. C. Colas, J.M. Kuo and P.R. Ortiz de Montellano, **J. Biol. Chem.**, 2002, 277, 7191–7200.
3. L. Huang, G. Wojciechowski and P.R. Ortiz de Montellano, **J. Am. Chem. Soc.**, 2005, 127, 5345–5353.
4. B. Bhaskar and T.L. Poulos, **J. Biol. Inorg. Chem.**, 2005, 10, 425–430.
5. R. Perera, M. Sono, J. A. Sigman, T.D. Pfister, Y. Lu and J.H. Dawson, **Proc. Acad. Natl. Sci. U. S. A.**, 2003, 100, 3641–3646.
6. J.M. Perez, F.J. Simeone, A. Tsourkas, L. Josephson. and R. Weissleder, **Am. Chem. Soc.**, 2004, 4, 119-122.
7. Xin Yu, D. Chathopadhyay, I. Galestea, F. Papadimitrakopoulos and J. F. Rusling, **Electrochem. Comm.**, 2003, 5, 408-411.
8. V. Sanz, S. Marcos, J.R. Castillo and J. Galban, **J. Am. Chem. Soc.**, 2005, 127, 1039-1048.
9. N.C. Veitch, **Phytochemistry**, 2004, 65, 249-259.
10. H.B. Dunford, *Peroxidases in chemistry and biology*, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991, 1-24.
11. H.B. Dunford, *Heme peroxidases*. Wiley-VCH, New York, 1999.
12. A.D. Carraway, S.L. Povlock, M.L. Houston, D.S. Johnston and J. Peterson, **J. Inorg. Biochem.**, 1995, 60, 267–276.
13. C. Veeger, **J. Inorg. Biochem.**, 2002, 91, 35–45.
14. J. Peterson, M.M.M. Saleem, J. Silver and M. T. Wilson, **J. Inorg. Biochem.**, 1983, 19, 165–178.
15. V.S. Sharma, M.R. Schimidt and H.M. Ranney, **J. Biol. Chem.**, 1976, 251, 4267–4272.
16. K. Kimura, J. Peterson, M.T. Wilson, D.J. Cookson and R.J. Williams, **J. Inorg. Biochem.**, 1981, 15, 11–25.
17. T. Tatsuma and T. Watanabe, **Anal. Chem.**, 1992, 64, 143–147.
18. H.B. Dunford and J.S. Stillman, **Coord. Chem. Rev.**, 1975, 19, 187–251.
19. W.J. Chuang, Y.D. Chang and W.Y. Jeng, **J. Inorg. Biochem.**, 1999, 75, 93–97.
20. J.S. Wang and H.E. Van Wart, **J. Phys. Chem.**, 1989, 93, 7925–7931.
21. A.D. Carraway, M.G. McCollum and J. Peterson, **Inorg. Chem.**, 1996, 35, 6885–6891.
22. D.A. Baldwin, H.M. Marques and J.M. Pratt, **J. Inorg. Biochem.**, 1987, 30, 203–217.
23. I.D. Cunningham, J.L. Bachelor and J.M. Pratt, **J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2**, 1991, 1839–1843.
24. H.K. Baek and H.E. Van Wart, **Biochemistry**, 1989, 29, 5714–5719.
25. J.S. Wang, K.B. Haesun and H.E. Van Wart, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1991, 179, 1320–1324.



26. G. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, A. Szoeki Henriksen and J. Hajdu, **Nature**, 2002, 417, 463–468.
27. M. Mukai, S. Nagano, M. Tanaka, K. Ishimori, I. Morishima, T. Ogura, Y. Watanabe and T. Kitgawa, **J. Am. Chem. Soc.**, 1997, 119, 1758–1766.
28. P.R. Ortiz de Montellano, **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 1992, 32, 89–107.
29. M.I. Savenkova, J.M. Kuo and P.R. Ortiz de Montellano, **Biochemistry**, 1998, 37, 10828–10836.
30. A.T. Smith and N. Veitch, **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 1998, 2, 269–278.
31. J.L. Primus, S. Grunenwald, P.L. Hagedoorn, A.M. Albrecht-Gary, D. Mandon and C. Veeger, **J. Am. Chem. Soc.**, 2002, 124, 1214–1221.
32. P.A. Adams, **J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2**, 1990, 1407–1414.
33. J.H. Spee, M.G. Boersma, C. Veeger, B. Samyn, J. Van Beeumen, G. Warmerdam, G.W. Canters, W.M. Van Dongen and I.M. Rietjens, **Eur. J. Biochem.**, 1996, 241, 215–220.
34. A. Van der Vliet, J.P. Eiserich, B. Halliwell and C.E. Cross, **J. Biol. Chem.**, 1997, 272, 7617–7625.
35. J.B. Sampson, Y. Ye, H. Rosen and J.S. Beckman, **Arch. Biochem. Biophys.**, 1998, 356, 207–213.
36. A. Palumbo, A. Napolitano, P. Barone and M. d'Ischia, **Chem. Res. Toxicol.**, 1999, 12, 1213–1222.
37. J. Byun, J.P. Henderson, D.M. Mueller and J.W. Heinecke, **Biochemistry**, 1999, 38, 2590–2600.
38. K.J. Reszka, Z. Matuszak and C.F. Chignell, **Chem. Res. Toxicol.**, 1997, 10, 1325–1330.
39. R. Ricoux, J.L. Boucher, D. Mansuy and J.P. Mahy, **Eur. J. Biochem.**, 2001, 268, 3783–3788.
40. A.M. Osman, J. Koerts, M.G. Boersma, S. Boeren, C. Veeger and I. Rietjens, **Eur. J. Biochem.**, 1996, 240, 232–238.
41. L. Gebicka, **Acta Biol. Pol.**, 1999, 46, 919–927.
42. U. Burner, P.G. Furtmüller, A.J. Kettle, W.H. Koppenol and C. Obinger, **J. Biol. Chem.**, 2000, 275, 20597–20601.
43. M. Mehl, A. Daiber, S. Herold, H. Shoun and V. Ullrich, **Biol. Chem.**, 1999, 3, 142–152.
44. T. Prieto, O. R. Nascimento, I. L. S. Tersariol, A. Faljoni-Alario and I. L. Nantes, **J. Phys. Chem. B**, 2004, 108, 11124–11132.
45. T. Prieto, O. R. Nascimento and I. L. Nantes, **Prog. Colloid Polym. Sci.**, 2004, 128, 193–198.
46. T. Prieto, R.O. Marcon, F.M. Prado, A.C.F. Caíres, P. Di Mascio, S. Brochsztain, O.R. Nascimento and I.L. Nantes, **Phys. Chem. Chem. Phys.** 2006, 8, 1963–1973.
47. J. C. Araujo, T. Prieto, F. M. Prado, F. J. Trindade, G. L. C. Nunes, J. G. Santos, P. Di Mascio, F. L. Castro, G. J. T. Fernandes, V. J. Fernandes Jr, A. S. Araujo, M. J. Politi, S. Brochsztain, O. R. Nascimento, I. L. Nantes, **J. Nanosci. Nanotechnol.**, 2007, in Press.
48. W.Y. Jeng, Y.H. Tsai and W.J. Chuang, **J. Peptide Res.**, 2004, 64, 104–109.
49. D.A. Baldwin, H.M. Marques and J.M. Pratt, **J. Inorg. Biochem.**, 1986, 27, 245–254.

50. V. Dorovska-Taran, M.A. osthumus, S. Boeren, M.G. Boersma, C.J. Teunis, I.M. Rietjens and C. Veeger, **Euro. J. Biochem.**, 1998, 253, 659-668.
51. E. Rusvai, M. Vegh, M. Kramer and I. Horvath, **Biochem. Pharmacol.**, 1988, 37, 4574-4577.
52. S. Nakamura, T. Mashino and M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, 1992, 33, 5409-5412.
53. A.M. Osman, S. Boeren, M.G. Boersma, C. Veeger and I.M. Rietjens, **Proc. Natl Acad. Sci. U S A**, 1997, 94, 4295-4299.
54. G.M. Clore, M.R. Hollaway, J. Peterson and M.T. Wilson, **Inorg. Chim. Acta**, 1981, 56, 143-148.
55. L. Casella, L. DeGioia, G.F. Silvestri, E. Monzani, C. Redaelli, R. Roncone and L. Santagostini, **J. Inorg. Biochem.**, 2000, 79, 31-40.
56. X. Huang, Z. Dong, J. Liu, S. Mao, J. Xu, G. Luo, J. Shen, **Langmuir**, 2007, 23, 1518-1522.
57. X. Liu, L. Shang, Z. Sun and G.Li, **J. Biochem. Biophys. Methods**, 2005, 28, 143-151.
58. P. Sen, S. Mukherjee, A. Halder, P. Dutta and K. Bhattacharyya, **Res. Chem. Intermed.**, 2005, 31, 135-144.
59. T.S. Davies, A.M. Ketner and S.R. Raghavan, **J. Am. Chem. Soc.**, 2006, 128, 6669-6675.
60. N. Mogharrab, H. Ghourchian and M. Amininasab, **Biophys. J.**, 2007, 92, 1192-1203.
61. M. Makarska, St. Radzki, J. Legendziewicz, **J. Alloy Compd.**, 2002, 341, 233-238.
62. M. V. Encinas and E.A. Lissi, **Photochem. Photobiol.**, 1983, 37, 251-255.
63. D. Barr, R.P. Mason, **J. Biol. Chem.**, 1995, 270, 12709-12716.
64. H.M. Marques, C.B. Perry, **Inorg. Biochem.**, 1999, 75, 281-291.
65. J.S. Beck, J.C. Vartuli, W.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.W. Chu, D.H. Olson, E.W. Sheppard, S.B. McCullen, J.B. Higgins and J.L. Schlenker, **J. Am. Chem. Soc.**, 1992, 114, 10834-10843.
66. C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli and J.S. Beck, **Nature**, 1992, 359, 710-712.
67. Y. Tanamura, T. Uchida, N. Teramae, M. Kikuchi, K. Kusaba and Y. Onodera, **Nano Lett.**, 2001, 1, 387-390.
68. S. Boboardo, L. Borello, S. Fiorilli, E. Garrone, B. Onida, C. O. Arean, N. Penazzi and G. T. Palomino, **Micropor. Mesopor. Mater.**, 2005, 79, 275-281.
69. D.F. Rohlfling, J. Rathousky, Y. Rohlfling, O. Bartels and M. Wark, **Langmuir**, 2005, 21, 11320-11329.
70. J. Deere, E. Magner, J.G. Wall and B.K. Hodnett, **J. Phys. Chem. B**, 2002, 106, 7340-7347.
71. J.F. Díaz and K.J. Balkus Jr., **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 1996, 2, 115-126.
72. B.P. Zhang, M.T. Janicke, W.H. Woodruff and J.A. Bailey, **J. Phys. Chem. B**, 2005, 109, 19547-19549.
73. F.C.C. Moura, M.H. Araujo, I. Dalmazio, T.M.A. Alves, L.S. Santos, M.N. Eberlin, R. Augusti and R.M. Lago, **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 2006, 20, 1859-1863.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)