



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

*Uso de metaloporfirinas como modelos do citocromo  
P450 no metabolismo de corantes azo*

Valéria Priscila de Barros

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilda das Dores Assis  
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Prepara pela Biblioteca Central do Campus Administrativo  
de Ribeirão Preto – USP

Barros, Valéria Priscila

Uso de metaloporfirinas como modelos do citocromo-  
P450 no metabolismo de corantes azo.

154 p.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP –  
Departamento de Química.

Orientadora: Assis, Marilda das Dores

1. Metaloporfirinas, 2. Corantes azo, 3. CLAE-UV, 4.CG-EM



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**

Folha de Aprovação

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Valéria Priscila de Barros, apresentada ao Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2008.

Comissão Julgadora:

---

(Nome / Instituição)

---

(Nome / Instituição)

---

(Nome / Instituição)

---

(Nome / Instituição)

---

(Nome / Instituição)

*"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo e posso evitar que ela vá à falência.*

*Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.*

*Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.*

*É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.*

*É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.*

*Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.*

*É saber falar de si mesmo.*

*É ter coragem para ouvir um "não".*

*É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.*

*Pedras no caminho?*

*Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."*

*(Fernando Pessoa)*

*Dedico este trabalho aos meus pais Lucia e Adelson, pelo esforço, dedicação e compreensão em todos os momentos desta e de outras caminhadas.*

## ***Agradecimentos***

A Professora Marilda, que foi um exemplo de pesquisadora e amiga. Agradeço a Deus pelo privilégio de ter convivido com você todos esses anos. Muito obrigada por ter acreditado em mim !!!

Aos professores Nelson R. Stradiotto e Maria Valnice B. Zanoni pelos ensinamentos.

Aos meus amigos do laboratório de Bioinorgânica: André Faria, Joicy, Patrícia, Tatiana, Thiago e Vinicius, pela colaboração, apoio e momentos inesquecíveis.

Ao meu irmão Júnior e a minha sobrinha Lívia, que eu amo muito.

Aos meus grandes amigos Daniela, Alessandro e Ana Paula. Pessoas especiais que dividiram comigo tempo, conhecimento, brincadeiras, experiências e que me ajudaram com seu apoio.

Aos amigos Daniela Maranhão, Fabiana, José Olavo, Juliana Steter, Juvenal, Lucas, Olímpia e Patrícia.

Aos professores Jair e Claudio Tedesco pelo carinho.

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e Prof. Dr. Luiz Alberto B. Moraes pela ajuda na elucidação dos compostos.

Cristina e Thomaz da FCFRP, pelas análises no CG-EM e CLAE-EM.

André, Bel, Emerson, Lâmia e Sônia, pelo carinho e atenção.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Essa conquista não é só minha porque ao meu lado estavam todos vocês, cada um ao seu modo me apoiando e incentivando sempre.

## Resumo

Neste trabalho foi estudada a atividade catalítica das ferroporfirinas cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina ferro III (FeTFPP), cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil) porfirina ferro III (FeTCPP) e cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(4-N-metilpiridil) porfirina ferro III (FeTMPyP), em meio homogêneo, e da FeTMPyP imobilizada em argila montmorilonita (FeP-K10), na oxidação de três corantes azo: preto disperso 3 (DB3), laranja disperso 3 (DO3) e amarelo de metila (MY), utilizando como oxidantes peróxido de hidrogênio, *tert*-butil hidroperóxido, ácido *meta*-cloroperbenzóico, iodosilbenzeno e hipoclorito de sódio.

A oxidação dos corantes foi inicialmente monitorada por espectroscopia UV-Vis, pelo desaparecimento da banda de absorção característica destes compostos na região de 400 nm. Os resultados mostraram que todos os sistemas foram eficientes para catalisar a oxidação dos corantes. As reações são dependentes do pH, sendo mais eficientes em meio ácido, principalmente para reações com peróxido de hidrogênio. O catalisador sólido pode ser reutilizado em cinco reações consecutivas, com rendimentos reprodutíveis até a terceira reciclagem.

As reações de oxidação também foram monitoradas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) em fase reversa, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM), o que possibilitou a identificação dos produtos de reação.

Na oxidação do corante DO3 foi produzido o 4,4'-dinitroazobenzeno e a 4-nitroanilina, com rendimento total de aproximadamente 100 %. A 4-nitroanilina é um dos produtos da reação de oxidação *in vivo* desta classe de corantes catalisado pelo



citocromo P450, indicando que os sistemas catalíticos utilizados são bons modelos biomiméticos do P450 na oxidação deste corante.

Na oxidação do corante MY foram obtidos três compostos: 4-nitrozobenzeno, 4-aminobenzeno e 4-metil-aminoazobenzeno (rendimentos totais de aproximadamente 100 %). O produto principal de oxidação do corante DB3 foi o 4,4'-dinitrozobenzeno (rendimentos da ordem de 80 %). Estes produtos indicam que a reação segue a rota biomimética do citocromo P450, via processo de N-desmetilação, seguida da oxidação do grupo amino a nitro.

Os altos rendimentos catalíticos indicaram que a oxidação desses corantes ocorre via mecanismo de clivagem heterolítica da ligação peróxido, com participação da espécie de alta valência, ferril radical porfirina  $\pi$ -cátion.

Este trabalho demonstrou a capacidade das metaloporfirinas em promover a oxidação dos corantes azo, bem como o potencial destes sistemas para serem utilizados como modelos do P450 e em estudos de toxicidade dessa classe de corantes.

Palavras chave: azo corantes, ferroporfirinas, montmorilonita, citocromo P450.

## **Abstract**

In this work we studied the catalytic activity of the ironporphyrins iron(III) 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin chloride (FeTFPP), iron(III) 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin chloride (FeTCPP) and iron(III) 5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin chloride (FeTMPyP) in homogeneous medium, as well as the catalytic activity of FeTMPyP immobilized on montmorillonite (FeP-K10) in the oxidation of the azo dyes disperse black 3 (DB3), disperse orange 3 (DO3) and methyl yellow (MY) by the oxidants hydrogen peroxide, *tert*-butyl hydroperoxide, *meta*-chloroperbenzoic acid, iodosylbenzene and sodium hypochlorite.

Dye oxidation was initially monitored by observing the disappearance of the typical absorption band of these compounds in the region of 400 nm of the UV-Vis spectrum. Results showed that all the systems catalyzed dye oxidation efficiently. The reactions are pH-dependent, being more effective in acidic medium, especially in the case of hydrogen peroxide. The solid catalyst can be recovered and reused in five consecutive reactions, with reproducible yields.

The oxidation reactions were also monitored by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC-UV), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS), which enabled identification of the reaction products.

The products generated from the oxidation of the dye DO3 were 4,4'-dinitroazobenzene and 4-nitroaniline, with total product yield close to 100 %. 4-nitroaniline is one of the products produced *in vivo* by the cytochrome P450-

catalyzed oxidation of this class of compounds, indicating that the catalytic systems employed here are good biomimetical models of P450.

The oxidation of the dye MY resulted in three compounds: 4-nitroazobenzene, 4-aminobenzene and 4-methyl-aminoazobenzene, with total product yield of approximately 100 %. The main product generated from the oxidation of the dye DB3 was 4,4'-dinitroazobenzene, with yields close to 80 %. The fact that these products were obtained indicates that the oxidation reactions follow the cytochrome P450 biomimetical route via N-demethylation, followed by oxidation of the amino group to nitro.

The high catalytic yields showed that the oxidation of these dyes occurred via heterolytic cleavage of the peroxide bond, which involves participation of the high-valent ferryl porphyrin  $\pi$ -cation radical species.

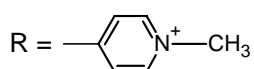
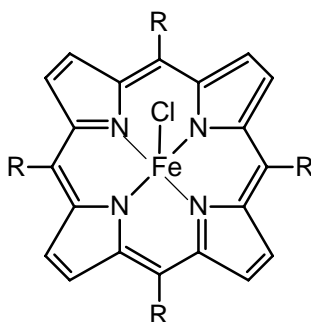
This work demonstrated that metalloporphyrins are able to promote azo dye oxidation. Therefore, these systems have potential application as P450 models and can be employed in studies on the toxicity of this class of dyes.

Keywords: azo dyes, ironporphyrins, montmorillonite K-10, cytochrome P450.

### ***Listas de Abreviaturas e símbolos***

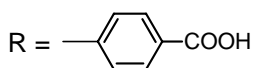
ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia no ultravioleta
DRX	difração de raio-X
DTG	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
FeP	Ferroporfirina
$m/z$	relação massa/carga
m-CPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NIST	National Institute of Standards and Technology
P450	Citocromo P450
PNA	4-nitroanilina
PhIO	Iodosilbenzeno
TBHP	<i>Terc</i> -butil hidroperóxido
TGA	Análise termogravimétrica
UV-Vis	Ultravioleta visível

## Lista de metaloporfirinas e corantes utilizados



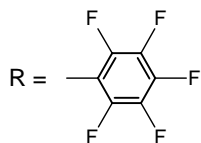
FeTMPyP

Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(4-N-metilpiridil)porfirina ferro III



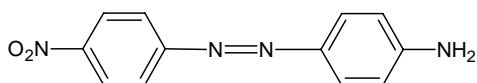
FeTCPP

Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis-(4-carboxifenil)porfirina ferro III

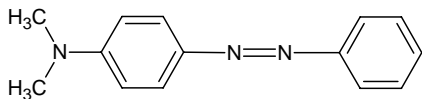


FeTFPP

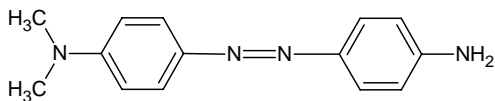
Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina ferro III



Corante vermelho disperso 3  
Disperse orange 3 – DO3



Corante amarelo de metila  
Methyl yellow – MY



Corante preto disperso 3  
Disperse Black 3 – DB3

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	14
1.1. Aspectos gerais .....	15
1.2. Citocromo P450 .....	16
1.2.1. Modelos biomiméticos do citocromo P450 .....	22
1.2.2. Histórico das principais contribuições de enzimas Citocromo P450 e modelos biomiméticos .....	25
1.3. História dos corantes .....	30
1.3.1. Estrutura dos corantes .....	32
1.3.2. Ecotoxicidade dos corantes azo .....	37
1.4. Corantes azo e citocromo P450 .....	38
<b>2. Objetivo</b> .....	43
<b>3. Materiais e Método</b> .....	45
3.1. Materiais .....	46
3.2. Equipamentos .....	47
3.3. Métodos .....	49
3.3.1. Inserção de íon metálico na porfirina base livre .....	49
3.3.2. Caracterização das metaloporfirinas por espectroscopia UV-Vis .....	52
3.3.3. Preparação e caracterização da FeTMPyP imobilizada na argila montmorilonita K10, FeP-K10 .....	53
3.3.4. Caracterização dos corantes por espectroscopia UV-Vis .....	54
3.3.5. Estudo por espectroscopia UV-vis da interação da FeTMPyP com os corantes DO3, DB3 e MY .....	54
3.3.6. Estudo da oxidação dos corantes por espectroscopia UV-vis .....	54
3.3.7. Preparação da mistura de reação para análise por CLAE-UV .....	56

3.3.8. Identificação dos produtos de oxidação dos corantes por CLAE-UV ..	56
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>57</b>
4.1. Síntese e caracterização das ferroporfirinas .....	58
4.2. Preparação e caracterização da FeTMPyP immobilizada na argila montmorilonita K10, FeP-K10 .....	62
4.3. Caracterização dos corantes dispersos por espectroscopia UV-Vis .....	68
4.4. Estudo por espectroscopia UV-Vis da oxidação dos corantes catalisada pelas ferroporfirinas .....	75
4.5. Desenvolvimento de método de análise dos corantes dispersos e seus produtos de oxidação por CLAE-UV .....	86
4.6. Análise dos produtos da oxidação dos corantes por TBHP catalisada pela FeTMPyP e FeP-K10 .....	90
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>114</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>117</b>
<b>7. Anexos</b> .....	<b>131</b>

# *Introdução*

*"O progresso é impossível sem mudança. Aquela que não consegue mudar a sua mente não consegue mudar nada."*

*(George Bernard Shaw)*



### **1.1. Aspectos gerais**

O aumento da produção industrial, em particular da indústria têxtil, tem gerado milhões de subprodutos indesejáveis. O setor têxtil merece destaque devido à geração de grandes volumes de efluentes contendo corantes que não se fixam na fibra durante o processo de tingimento, valores estes estimados entre 10 a 15 % do total de corante usado no processo (SYE *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2006). Muitos deles são degradados microbiologicamente, mas alguns desses corantes (da classe dos azo) e seus subprodutos podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos. A alta eficiência na degradação de diversos substratos de relevância ambiental se deve ao uso de enzimas ligninolíticas como, por exemplo, a lignina peroxidase (HRP) (DING *et al.*, 2008; SHEDBALKAR *et al.*, 2008). Porém, essas enzimas são de difícil purificação, tornando-se economicamente inviáveis e ainda são sensíveis ao excesso de peróxido de hidrogênio sendo, assim, desativadas (CHO *et al.*, 2008; SHAKERI; SHODA, 2008).

As propriedades naturais apresentadas pelos sistemas biológicos têm incentivado o estudo biomimético de metalocomplexos capazes de reproduzi-las. Um dos aspectos mais estimulantes e desafiadores, tanto do ponto de vista da reatividade quanto dos mecanismos de reação, é a atividade catalítica apresentada por vários sistemas biológicos frente a reações de oxidação e redução (GRAEVE *et al.*, 2008; MANSUY, 2007; ARBUS *et al.*, 2007).

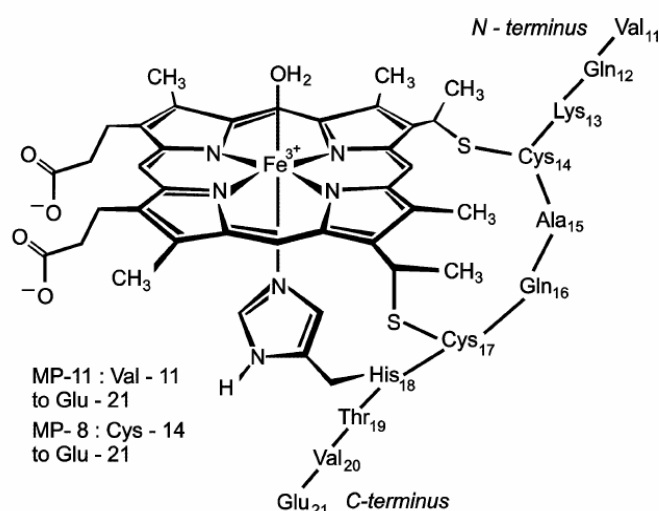
Sistemas contendo compostos macrocíclicos, tais como porfirinas e bases de Schiff, são capazes de complexar diferentes metais de transição, com variados estados de oxidação (NICOLAS *et al.*, 2008; STARUKHIN *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 2008). Tais compostos metalados apresentam capacidade de mimetizar o

comportamento catalítico de peroxidases e monooxigenases dependentes do citocromo P450, tanto em catálise homogênea quanto heterogênea, nas reações de oxidação de substratos orgânicos (BAGCHI; BANDYOPADHYAY, 2008; CHAUHAN; KUMARI, 2007; CORRÊA *et al.*, 2008).

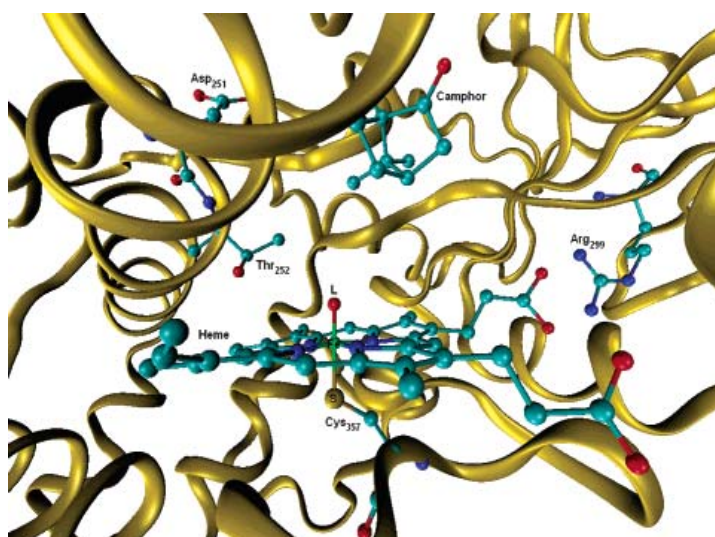
Nesse contexto, metaloporfirinas, que são capazes de catalisar reações redox sob condições brandas, têm gerado grande interesse para aplicações relacionadas à metabolização de compostos orgânicos como fármacos, pesticidas e corantes (CHAUHAN; KUMARI, 2007; GOTARDO *et al.*, 2006) buscando a elucidação do mecanismo e desenvolvimento de novos compostos para teste farmacológico e toxicológico.

## **1.2. Citocromo P450**

Muitos dos processos biológicos fundamentais envolvem reações que resultam em um acréscimo da reatividade e solubilidade de compostos relativamente inertes ou tóxicos, a fim de torná-los mais susceptíveis à degradação biológica ou excreção. Uma classe de enzimas responsáveis por este tipo de reação é o citocromo P450, contendo o ferro protoporfirina IX como grupo prostético (Figura 1), o qual é inserido dentro das cadeias de polipeptídeos da proteína, com um sítio de ligação bem definido que confere acessibilidade específica ao substrato (Figura 2) (GROVES, 2005).



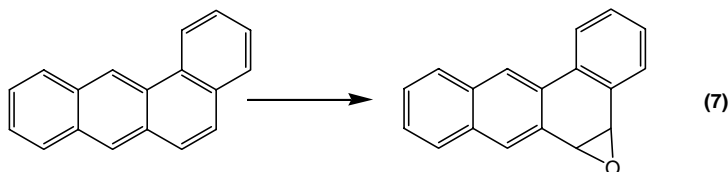
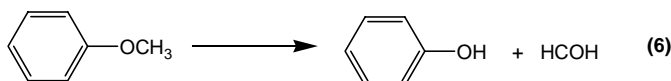
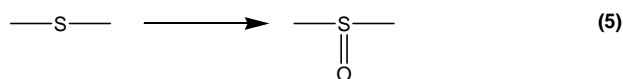
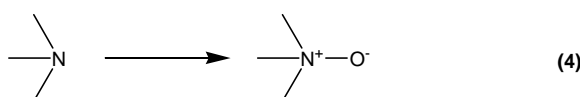
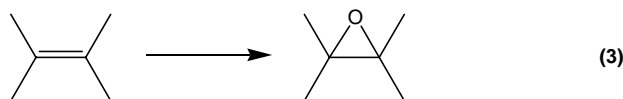
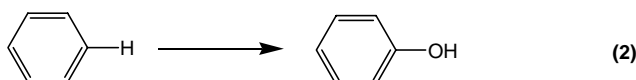
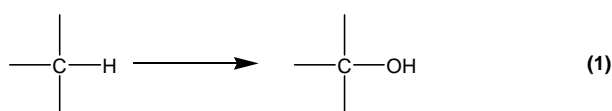
**Figura 1.** Ferroprotoporfirina IX na matriz protéica (VASHI; MARQUES, 2004).



**Figura 2.** Sítio ativo do P450 de cânfora, obtido a partir da estrutura de Raio X (SHAIK *et al.*, 2005)

Os citocromos P450 estão presentes em todos os organismos vivos. Nos mamíferos eles estão presentes em vários tecidos e órgãos, principalmente no fígado. As reações catalisadas pelo citocromo P450 são referidas como monooxigenações porque apenas um átomo de oxigênio é incorporado ao substrato. Por esse motivo, as enzimas que realizam essas reações são denominadas monooxigenases e desempenham papéis vitais na síntese e degradação de muitos compostos fisiologicamente importantes e xenobióticos (GRAEVE *et al.*, 2008;

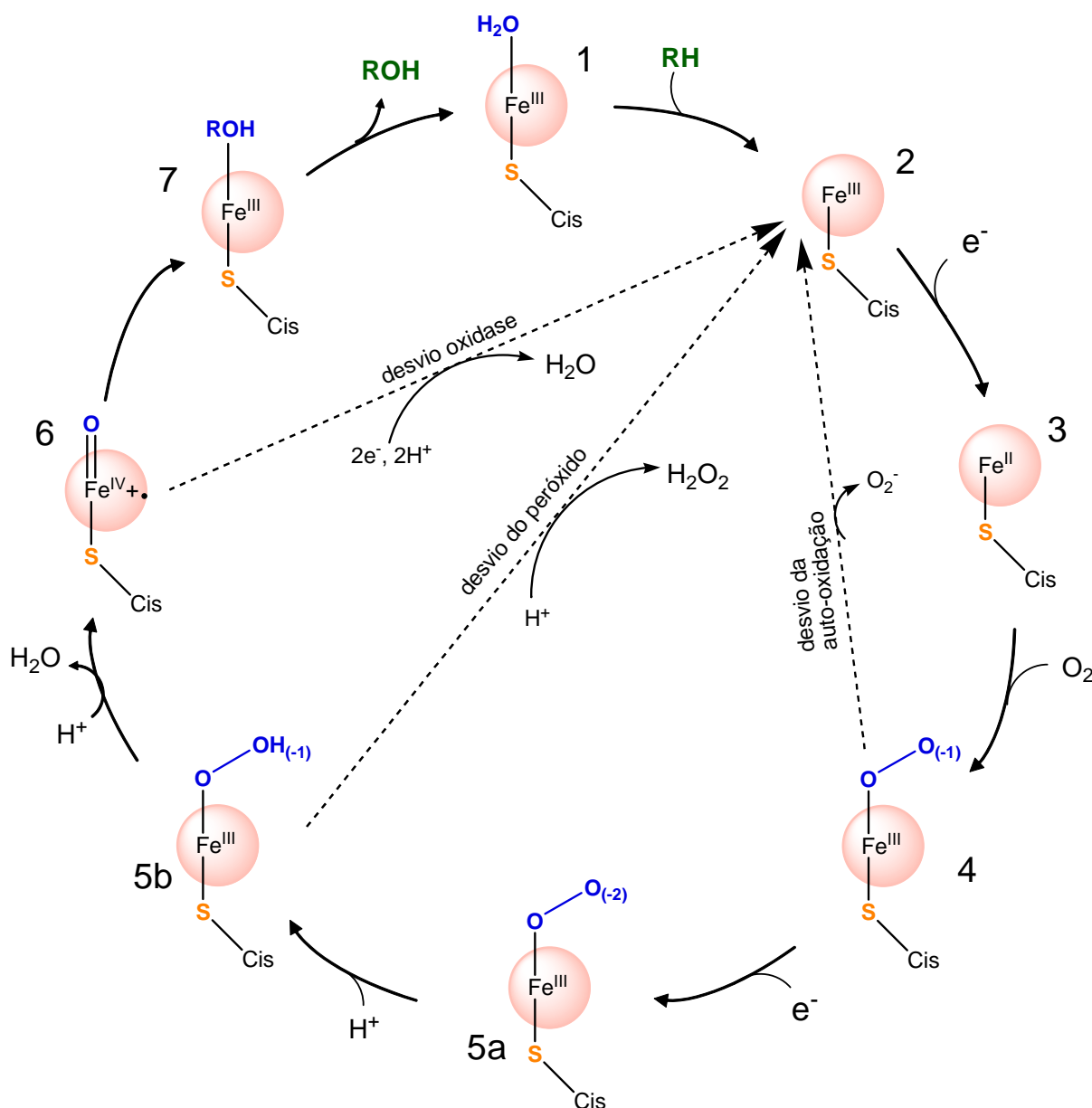
RICOUX *et al.*, 2007; ARBUS *et al.*, 2007). Exemplos de tais reações são: hidroxilação de compostos alifáticos (eq. 1) e anéis aromáticos (eq. 2), epoxidação de olefinas (eq. 3), oxidação de aminas a aminóxidos (eq. 4), oxidação de sulfetos a sulfóxidos (eq. 5) e desalquilação oxidativa de heteroátomos (eq. 6) (BERTINI *et al.*, 2007). O citocromo P450 também é conhecido por catalisar a transformação de certos compostos pré-carcinogênicos em suas formas carcinogênicas. O benzantraceno, por exemplo, presente nas fumaças de cigarro, sofre uma reação de epoxidação catalisada pelo citocromo P450 do fígado, resultando na forma epoxidada carcinogênica (eq. 7) (DELVIN, 1997).



Muitos membros da superfamília das hemeoproteínas citocromo P450 são conhecidos e o número continua a crescer à medida que mais genomas são seqüenciados (DENISOV *et al.*, 2005). Há quase 4000 genes de P450 identificados até agora. Em termos mais amplos, há dois papéis funcionais para estas oxigenases. Um é o metabolismo de xenobióticos (compostos estranhos ao organismo) como um papel protetor de degradação ou provisão de “braços” ou regiões polares em preparação para a excreção. Um segundo papel funcional amplo é na biossíntese de moléculas sinalizadoras usadas para controle de desenvolvimento e homeostase. Em mamíferos o P450 cumpre estes papéis através do metabolismo de drogas e xenobióticos, e a síntese de hormônios esteróides, metabolismo de vitaminas lipossolúveis e a conversão de ácidos graxos poli-insaturados em moléculas biologicamente ativas, respectivamente (DENISOV *et al.*, 2005). Papéis semelhantes são desenvolvidos em plantas (biossíntese de hormônios e degradação de herbicidas) e insetos (controle de desenvolvimento via biossíntese de hormônios ou resistência à inseticidas). Alguns P450 são altamente régio e estéreo específicos na oxigenação do substrato enquanto outros, tais como o do fígado humano (CYP3A4, onde CYP = citocromo P450, 3A4 designa a família, subfamília e isoforma respectivamente), metaboliza cerca de 50 % de todos os fármacos comerciais (DENISOV *et al.*, 2005).

Todos os Citocromos P450 descritos contém a ferroprotoporfirina IX (Figura 1) como centro ativo. O grupo prostético está situado em uma cavidade hidrofóbica na proteína, tendo a quinta posição de coordenação do metal ocupada por um átomo de enxofre de uma cisteína residual, responsável pela ligação do sítio ativo à enzima (Figura 2) (MAKRIS *et al.*, 2005). Apesar da diversidade de substratos que podem

ser oxidados e do tipo de reação, todos os citocromos P450 envolvem um ciclo catalítico comum (Figura 3).



**Figura 3.** Ciclo catalítico proposto para o citocromo P450 (adaptado de MAKRIS *et al.*, 2005).

O ciclo catalítico foi primeiramente desvendado para o citocromo bacteriano de cânfora (P450<sub>cam</sub>, CYP101). Ligação do substrato à enzima, em seu estado de repouso ferro(III) baixo spin (1), desloca a água coordenada como sexto ligante do ferro heme e muda o estado de spin para um complexo alto spin ligado ao substrato

(2). Este complexo tem um potencial de redução mais positivo e, assim, é mais facilmente reduzido ao estado ferroso (3) no CYP101. Foi observado em outros sistemas que a mudança de spin não é uma etapa obrigatória do ciclo (DENISOV *et al.*, 2005). A ligação do oxigênio leva a um complexo oxi-P450 (4), o qual é o último intermediário relativamente estável do ciclo. A redução deste complexo, formação seqüencial de um complexo férrico-peróxido (5a), sua forma protonada férrico-hidroperóxido (5b), segunda protonação do átomo de oxigênio distal com subsequente heterólise da ligação O-O e formação do composto I (6) e água, e oxigenação do substrato para formar um produto complexo (7), têm sido estudadas por muitos métodos experimentais, mas poucas medidas diretas têm sido possível devido à alta reatividade e impossibilidade de acúmulo suficiente destes intermediários em estudos cinéticos.

Cada intermediário pode desenvolver sua rica química, o que resulta em pelo menos três ramificações envolvendo reações laterais: i) autooxidação da enzima na forma oxo-ferro(II) (4), com concomitante produção de um ânion superóxido e retorno da enzima ao seu estado de repouso; ii) o desvio do peróxido (ou ciclo catalítico curto), em que o peróxido coordenado ou o ânion hidroperóxido (5a e 5b) dissocia do ferro, formando peróxido de hidrogênio, completando assim a improdutiva (em termos de substrato) redução de 2 elétrons do oxigênio; e iii) um desacoplamento tipo oxidase, através do qual o intermediário oxo-ferril (6) é oxidado à água ao invés de oxigenação do substrato, resultando assim em redução de 4 elétrons da molécula de dioxigênio, com a formação de 2 moléculas de água. A espécie oxo-ferril (6) tem sido aceita como o oxidante eletrofílico ativo do P450, embora não tenha sido ainda detectada, mesmo através das técnicas mais sofisticadas a ultra baixas temperaturas (CHANDRASENA *et al.*, 2004).

Recentemente, as espécies ferro(III)-hidroperoxo (5b) e ferro(III)-peroxo (5a) têm sido também propostas como intermediários capazes de oxidar substratos em algumas famílias de P450, embora sejam menos reativas que a espécie (6) (LI *et al.*, 2007; HIRAO *et al.*, 2006; CHANDRASENA *et al.*, 2004; DOWERS *et al.*, 2004; VOLZ *et al.*, 2002).

A utilização de múltiplas espécies oxidantes na catálise pelo P450 pode explicar a notável versatilidade desta família de enzimas em uma ampla variedade de transformações. A participação destas três espécies (peroxo, hidro-peróxido e oxo) é um parâmetro crucial no projeto farmacêutico de novas drogas. Como a natureza química dos três oxidantes varia significativamente em termos de caráter eletrofílico, há o desafio, por exemplo, de se prever em um futuro próximo, estratégias para se obter determinados produtos de oxidação de drogas, sabendo-se qual é o oxidante que está operando em determinada reação (DENISOV *et al.*, 2005).

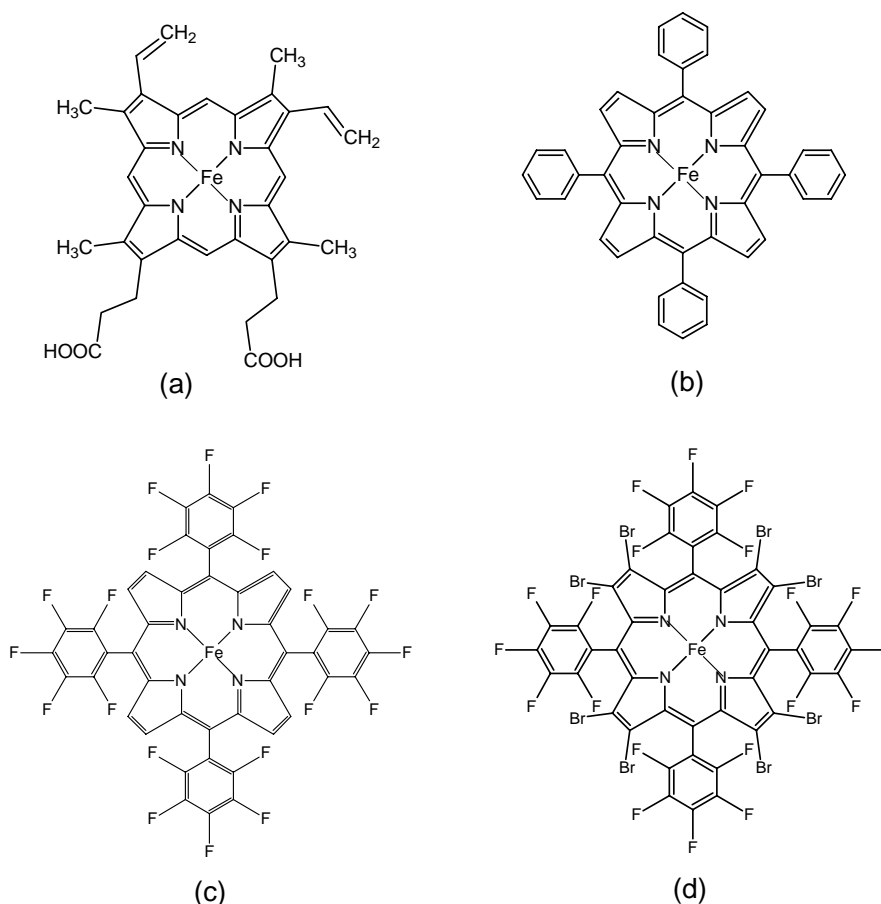
### **1.2.1. Modelos biomiméticos do citocromo P450**

Visando compreender o mecanismo das oxidações mediadas pelo citocromo P450, surgiu um campo de pesquisa em catálise oxidativa, na década de 70, utilizando metaloporfirinas sintéticas.

Na tentativa de desenvolver sistemas biomiméticos do citocromo P450 foram sintetizadas metaloporfirinas de diferentes gerações (Figura 4), visando uma maior estabilidade das mesmas, uma vez que os primeiros sistemas desenvolvidos eram rapidamente degradados no meio reacional (DOLPHIN *et al.*, 1997; SHELDON,



1994). A maior estabilidade à degradação oxidativa foi obtida através da introdução de substituintes halogenados ou outros substituintes ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{SO}_3\text{H}$ ) nas posições  $\beta$ -pirrólicas e *mesoaril* no anel porfirínico (SHELDON, 1994). Além de conferir estabilidade ao catalisador, são eficientes na promoção de reações de oxifuncionalização de hidrocarbonetos, já que os átomos de flúor e cloro presentes deslocam o potencial redox do metal, e assim confere ao intermediário da reação um caráter mais eletrofílico, e, conseqüentemente, mais reativo, principalmente em reações de oxidação de substratos mais inertes, como, por exemplo, alcanos (DOLPHIN *et al.*, 1997; MEUNIER, 1992).



**Figura 4.** Estruturas: (a) Ferroprotoporfirina IX, (b) metaloporfirinas de 1ª geração, (c) 2ª geração e (d) 3ª geração.

Apesar de serem os modelos mais fiéis do P450, os catalisadores metaloporfirínicos apresentam algumas desvantagens que inviabilizam sua utilização em larga escala: (i) são de difícil síntese e purificação, o que aumenta consideravelmente seu custo e (ii) embora apresentem alta atividade catalítica, não atingem níveis necessários para sua utilização industrial. Sendo assim, os catalisadores metaloporfirínicos possuem maior potencial de aplicação na química fina e em estudos biomiméticos de mecanismos.

Uma diferença significativa entre os modelos metaloporfirínicos e as enzimas é a presença de uma matriz protéica nos sistemas biológicos (Figura 2). Esta matriz controla o acesso do substrato à espécie ativa oxidante, tornando-a seletiva para a oxidação, proporcionando um ambiente hidrofóbico para a ligação do substrato, além de ser um isolante do centro catalítico, controlando sua reatividade e prevenindo sua inativação por agregação ou auto-oxidação biomolecular (LINDSAY, 1994).

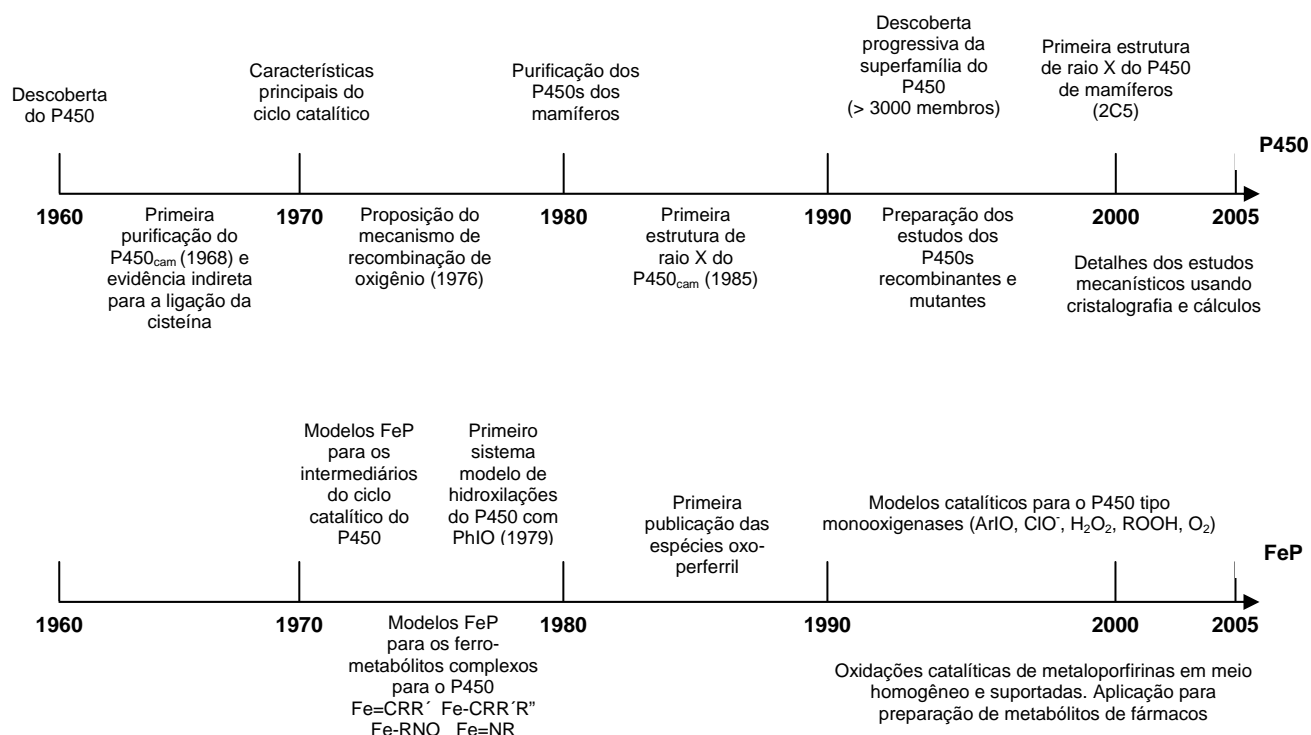
Estudos comparativos de seletividade e estabilidade com modelos sintéticos e sistemas naturais levaram à conclusão de que a seletividade origina-se dos efeitos estéricos impostos pelo ambiente do sítio ativo. Esse é o motivo pelo qual tem havido um intenso esforço no sentido de mimetizar a cavidade protéica das enzimas naturais (BEDIOUI, 1995; GOTARDO *et al.*, 2005).

Nos sistemas modelos permanecem algumas dificuldades a serem superadas: a recuperação, reutilização e o custo do catalisador. A heterogenização de catalisadores em suportes sólidos inertes prolonga a vida dos mesmos. Além disso, a catálise heterogênea oferece vantagens, como o maior controle do meio e condições reacionais, prevenindo a auto-destruição; grande dispersão do sítio ativo do catalisador graças às altas áreas superficiais fornecidas pelos suportes e ainda

fornece uma fácil separação do meio reacional, possibilitando a reutilização, assim, minimizando o seu custo e gerando menos poluição ambiental. Deste modo combinam-se as vantagens de um catalisador ancorado (catálise heterogênea) com a alta atividade catalítica exibida por catalisadores em solução (catálise homogênea) (NICOLAS *et al.*, 2008; ENTHALER *et al.*, 2008; EMMERT III *et al.*, 2008; CHAUHAN; KUMARI, 2007; GOTARDO *et al.*, 2006). Uma variedade de suportes sólidos têm sido testados, como as matrizes inorgânicas, tais como sílica, alumina, zeólitas, argilas aniônicas e catiônicas, bem como polímeros e resinas (CORRÊA *et al.*, 2008; CARBALLO *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2008; MAC LEOD *et al.*, 2007; ŠULÁKOVÁ *et al.*, 2007).

### **1.2.2. Histórico das principais contribuições de enzimas Citocromo P450 e modelos biomiméticos**

Em uma revisão recente Mansuy traça um paralelo entre o desenvolvimento dos conhecimentos sobre as enzimas citocromo P450 e os modelos metaloporfirínicos (MANSUY, 2007). Uma imensa quantidade de estudos tem sido desenvolvida nestes últimos trinta anos com modelos químicos baseados em metaloporfirinas, resultando em diversas contribuições importantes para entender os processos oxidativos relacionados ao citocromo P450, conforme mostra o esquema da Figura 5.



**Figura 5.** Esquema de comparação do histórico do desenvolvimento do P450 e do uso de modelos metaloporfirínicos (adaptado de MANSUY, 2007).

Mansuy destaca que historicamente houveram quatro contribuições principais dos estudos do P450 e metaloporfirinas (MANSUY, 2007). As principais contribuições da primeira fase, no início dos anos 70, incluem: (I) a proposta das etapas principais do ciclo catalítico do P450 na ativação do oxigênio para hidroxilação de substratos, baseado em estudos espectroscópicos e enzimáticos utilizando frações microssomais e P450<sub>cam</sub>; (II) a síntese de modelos estruturais de intermediários do ciclo catalítico do P450 sugere a presença de um ligante axial tiolato no ferro, baseado em dados espectrais do P450, muito antes da publicação da primeira estrutura de raios-X; (III) as ferroporfirinas foram aplicadas como modelos biomiméticos do P450 em epoxidações de alcenos e hidroxilação de alcanos utilizando iodosilbenzeno. Outros doadores de oxigênio, alquilhidroperóxidos, O<sub>2</sub> e ClO<sup>-</sup>, foram empregados para hidroxilar ligações C-H de

vários substratos na presença de quantidades catalíticas de P450 e metaloporfirinas; (IV) Groves e McClusky propuseram o mecanismo *rebound* para hidroxilações de ligação C-H catalisadas pelo P450 (MANSUY, 2007).

A segunda fase principal envolve a determinação de vários P450-ferro-metabólitos complexos (Fe-carbenos, Fe- $\sigma$ -alquilas, Fe- $\sigma$ -arilas) de natureza estável, devido à síntese e caracterização completa dos complexos correspondentes ferroporfirinas metabólitos. Estes estudos levaram à descoberta de uma rica química de coordenação e química organometálica de ferroporfirinas e P450. Tais estudos contribuíram, por exemplo, para interpretar os problemas dos efeitos da inibição do CYP2D6 pela paroxetina, consequência de uma interação P450-carbeno formado durante o metabolismo deste fármaco (BERTELSEN, 2003). Ainda nesta segunda fase, a estrutura do primeiro raio-X do citocromo P450<sub>cam</sub> a partir do *Pseudomonas putida* foi determinada. Desde então, muitas outras estruturas de P450s de diferentes origens foram publicadas (POULOS, 2005). Entretanto, a primeira estrutura do P450 proveniente de um mamífero foi determinada apenas em 2000 (WILLIAMS *et al.*, 2000), e mais recentemente, entre 2004 e 2005, a estrutura dos quatro principais P450s do fígado humano foram publicados (JOHNSON; STOUT, 2005).

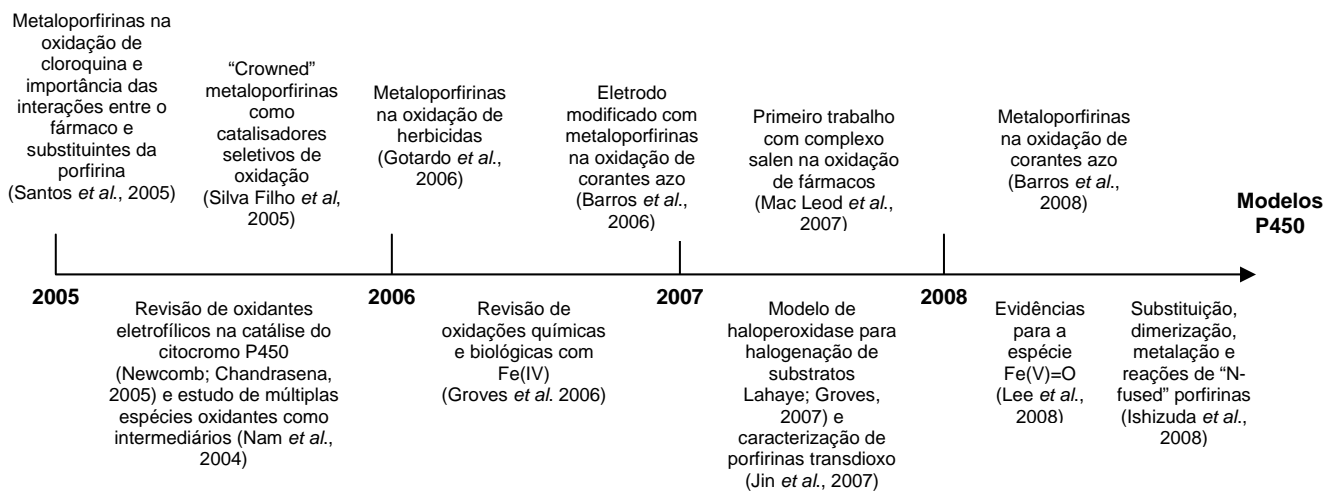
A terceira fase envolve a preparação de diversos complexos reativos ferro-peroxo, hidroperoxo e oxo-peroxo que correspondem a intermediários transientes do ciclo catalítico do P450 através do uso de ferramentas bioquímicas e biofísicas, como a mutagênese, criocristalografia de alta resolução e estudos espectroscópicos de intermediários isolados usando técnicas criogênicas ou de cinética "fast". Os estudos destes modelos complexos têm gerado importantes dados para a compreensão da estrutura eletrônica e reatividade dos correspondentes

intermediários instáveis do P450. Estes dados também foram cruciais para entender a estrutura e a reatividade dos complexos correspondentes de muitas outras hemeoproteínas que envolvem a ligação de dioxigênio e/ou ativação em diferentes reações oxidativas. Além disso, estes complexos foram importantes para o entendimento da natureza de complexos correspondentes oxo e peroxo envolvidos no ciclo catalíticos de ferro-oxigenases não-heme (MANSUY, 2007).

A quarta fase compreende: (I) o desenvolvimento de uma grande variedade de catalisadores seletivos para oxidações: sistemas utilizando principalmente ferro e manganêsporfirinas, em meio homogêneo ou suportado em diferentes materiais, usando doadores simples de oxigênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ClO}^-$ ,...) para epoxidar olefinas, hidroxilar alcanos e transferir o átomo de oxigênio para substratos contendo enxofre ou nitrogênio; (II) a preparação de metabólitos através da oxidação de fármacos utilizando metaloporfirinas como modelos biomiméticos do P450; (III) os sistemas seletivos para a transferência de oxigênio tem sido fonte de inspiração para modelos semelhantes de catalisadores metálicos não-porfirínicos (MANSUY, 2007).

Seguindo esta evolução, nosso grupo de pesquisa tem contribuído para a área investigando complexos modelos de P450, metaloporfirinas e complexos análogos salen, aplicados em estudos de oxidação de fármacos, herbicidas e corantes azo, bem como estudos de interação entre fármacos e substituintes ligados ao complexo metálico (BARROS *et al.*, 2008; 2006; MAC LEOD *et al.*, 2007; GOTARDO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2005; SILVA FILHO *et al.*, 2005). Assim, o esquema de Mansuy pode ser complementado para o período 2005-2008, incluindo a contribuição dos resultados de nossos estudos (Figura 6).

Catálise heterogênea utilizando metaloporfirinas e complexo salen com diferentes suportes: zeólitas aluminas, sílica, materiais poliméricos, resinas, dentre outros



**Figura 6.** Recentes contribuições do uso de metaloporfirinas e complexos salen como modelos do P450.

Graças à evolução na área de materiais nos últimos anos, a catálise heterogênea com os complexos metálicos tem sido objeto de intensas pesquisas com a finalidade de mimetizar a cavidade protéica do citocromo P450, conferindo estabilidade e possibilidade de reutilização do catalisador. O nosso grupo e outros pesquisadores têm trabalhado com metaloporfirinas de segunda e terceira geração e complexos salen imobilizados por ligação covalente, interações iônicas e hidrofóbicas em vários tipos de suportes (ex. alumina, sílica, materiais poliméricos, zeólitas) obtendo bons resultados catalíticos, mostrando a aplicabilidade desses sistemas (CORRÊA *et al.*, 2008; CARBALLO *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2008; MAC LEOD *et al.*, 2006; GUEDES *et al.*, 2005a).

Outras contribuições para a química de modelos do P450 que merecem destaque seriam: (I) modelos de haloperoxidase (LAHAYE; GROVES, 2007) para halogenação de substratos orgânicos utilizando  $H_2O_2$  como oxidante; (II) utilização de porfirinas supramoleculares em diversas aplicações (FUKUSHIMA; TATSUMI,

2007; ISHIZUKA *et al.*, 2008); (III) caracterização de intermediários e estudos de múltiplas espécies oxidantes eletrofilicas capazes de oxidar substratos (LEE *et al.*, 2007; JIN *et al.*, 2007; NEHRU *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2006; GROVES, 2006; NEWCOMB; CHANDRESENA, 2005; NAM *et al.*, 2004).

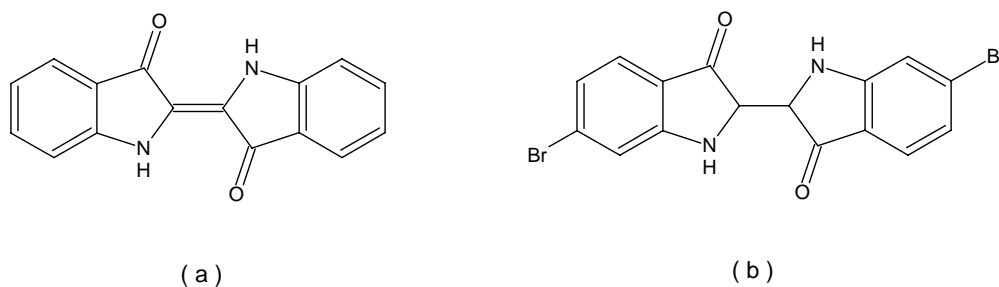
### **1.3. História dos corantes**

Cores sempre exerceram fascínio sobre a humanidade. Os corantes são compostos de moléculas naturais ou feitos pelo homem, cujas origens remontam a milhares de anos atrás (COUTEUR; BURRESON, 2006).

A extração e o preparo de corantes, mencionados na literatura chinesa em tempos que remontam a 3000 a.C., talvez tenham sido as primeiras tentativas humanas de praticar química (DRUDING, 2008). As tinturas mais antigas eram obtidas principalmente das plantas: de suas raízes, folhas, cascas ou bagas. Embora as primeiras tinturas fossem objeto de grande demanda e muito valiosas, freqüentemente era difícil obtê-las, sua variedade era limitada e as cores não eram fortes ou desbotavam rapidamente, tornando-se foscas e turvas à luz do sol (COUTEUR; BURRESON, 2006; GUARATINI; ZANONI, 2000).

O azul, em particular, era uma cor muito requisitada. Comparados ao vermelho e ao amarelo, os tons de azul não são comuns em plantas; uma delas, porém, a *Indigofera tinctoria*, da família das leguminosas, era conhecida como farta fonte do corante azul índigo (Figura 7a) (VANIN, 1994). Consta que 700 anos atrás, Marco Pólo viu em suas viagens o índigo usado no vale do Índio, daí o nome que deu à planta (COUTEUR; BURRESON, 2006).





**Figura 7.** Estrutura química dos corantes: (a) Azul Índigo e (b) Púrpura de Tiro ou Púrpura Real.

O índigo era uma substância muito valiosa, mas a matéria corante antiga mais cara era uma molécula muito semelhante a ele, conhecida como Púrpura de Tiro (derivado dibromo do índigo). Em algumas culturas, o uso da cor púrpura era restringido por lei ao rei ou imperador, daí o outro nome desse corante – Púrpura Real (Figura 7b) (DRUDING, 2008).

A púrpura de Tiro era obtida de um muco opaco secretado por várias espécies de moluscos marinhos, em geral do gênero *Murex*. Acredita-se que a fabricação da tintura começou na cidade portuária de Tiro (hoje parte do Líbano), no Mediterrâneo, durante o Império Fenício (COUTEUR; BURRESON, 2006).

A partir do final do século XVIII foram criados corantes sintéticos que mudaram as práticas seculares dos artesões. O primeiro feito pelo homem foi o ácido pícrico, a molécula tri-nitrada usada em munições na Primeira Guerra Mundial.

Em 1856, William Henry Perkin trabalhava na síntese de um composto com propriedades antimaláricas (quinina) e produziu uma substância preta que se dissolveu em etanol, resultando em uma solução de cor púrpura forte, chamada posteriormente de malveína (CLARK *et al.*, 1993).

As moléculas corantes mudaram a história. Procuradas a partir de suas fontes naturais durante milhares de anos, elas criaram algumas das primeiras indústrias da humanidade (NEWARK, 2008). À medida que a demanda de cor cresceu,

prosperaram também fábricas, cidades e comércio. Mas o advento de corantes sintéticos transformou o mundo. Os meios tradicionais de obtenção de corantes naturais desapareceram. Em seu lugar, menos de um século depois de Perkin ter sintetizado o malva pela primeira vez, conglomerados químicos gigantes dominaram não só o mercado de corantes, mas também a florescente indústria da química orgânica (DRUDING, 2008). Isso, por sua vez, forneceu o capital financeiro e o conhecimento químico para as enormes produções atuais de antibióticos, analgésicos e outros compostos farmacêuticos (DRUDING, 2008).

O Colour Index (CI), publicação da “American Association of Textile Chemists and Colorists” e da “British Society of Dyers and Colorists”, registra atualmente mais de 8 mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil. Tal diversidade se justifica pelo sucesso comercial dos produtos têxteis, que passam por um processo de tintura. Para atender a um mercado cada vez mais exigente, a indústria tem investido no desenvolvimento de corantes econômicos, com propriedades específicas, para obter boa fixação da coloração nos tecidos, oferecendo alta resistência aos agentes desencadeadores do desbotamento (CHRISTIE *et al.*, 2008; METWALLY *et al.*, 2008; YAZDANBAKHSI *et al.*, 2007).

### **1.3.1. Estrutura dos corantes**

Corantes são compostos que absorvem luz com comprimento de onda na região do visível (350 a 780 nm) (SANTOS *et al.*, 2007; ZOLLINGER, 1991). A principal estrutura responsável pela absorção da luz nas moléculas de corantes é o grupo cromóforo, um sistema de elétrons deslocalizado com dupla ligação

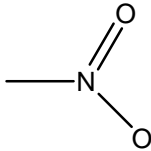
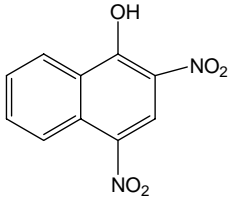
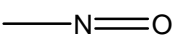
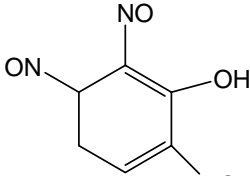
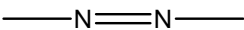
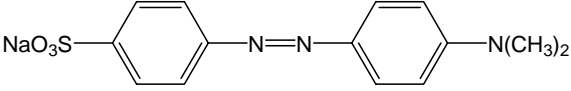
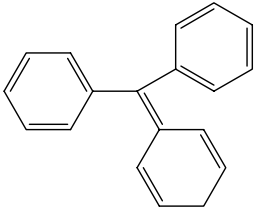
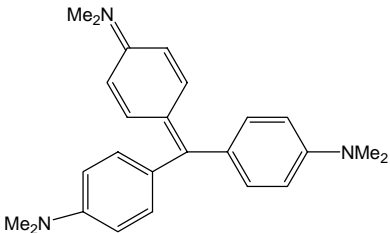
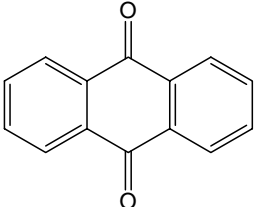
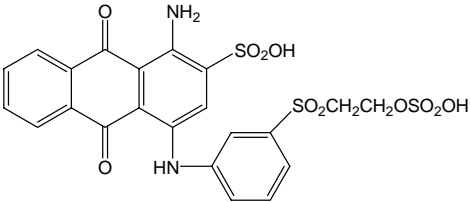
conjugada. A absorção da radiação UV-Vis pelas moléculas orgânicas está associada com a transição eletrônica entre os orbitais moleculares. A energia da radiação absorvida é dada por:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = hc / \lambda$$

onde  $E_0$  é a energia do estado fundamental da molécula (J),  $E_1$  é a energia do estado excitado (J),  $h$  é a constante de Planck ( $6,626 \times 10^{-34}$  Js),  $\nu$  é a frequência da radiação eletromagnética (Hz),  $c$  é a velocidade da luz ( $3 \times 10^8$  ms<sup>-1</sup>) e  $\lambda$  é o comprimento de onda (nm).

Quanto mais extensa a deslocalização eletrônica, menor a energia de transição e maior o comprimento de onda relacionado a transição. Para permitir a deslocalização eletrônica as duplas ligações devem se alternar com as ligações simples. No caso de corantes sintéticos, a deslocalização é promovida pelo anel benzênico ou naftalênico. Grupos cromóforos (Tabela 1) freqüentemente contêm heteroátomos como N, O e S com elétrons antiligantes. A incorporação desses elétrons pelo sistema deslocalizado no anel aromático modifica a energia da nuvem eletrônica, alterando o comprimento de onda da radiação absorvida para a região do visível, e tornando o composto colorido. Em muitos casos os corantes contêm grupos adicionais chamados auxocromos, que são substituintes retiradores ou doadores de elétrons que causam ou intensificam a cor do cromóforo pela alteração da energia total do sistema de elétrons. Os mais importantes grupos auxocromos são: hidroxila e derivados, -OH, OR; amino e derivados, -NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>; sulfônico, -SO<sub>3</sub>H; carboxílico, -COOH; e sulfeto, -SR (SANTOS *et al.*, 2007).

**Tabela 1.** Classificação e exemplo de corantes em função do grupo cromóforo presente (adaptado de SANTOS *et al.*, 2007).

Classe corante	Cromóforo	Exemplo
nitro		 Amarelo ácido 24
nitroso		 Verde rápido O
azo		 alaranjado de metila
trifenil metil		 Violeta básico 3
antraquinona		 Azul reativo 19

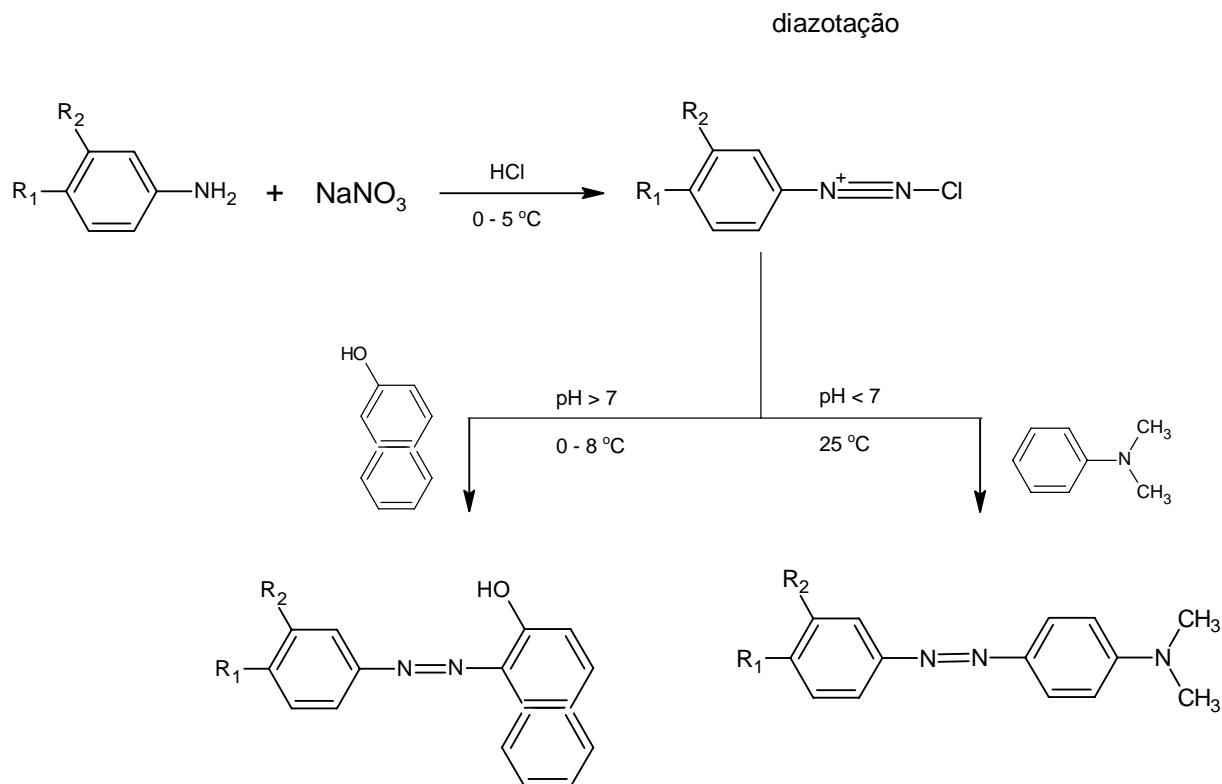
Corantes são utilizados na indústria têxtil, indústria de curtimento do couro, produção de papel, pesquisa agrícola, tecnologia alimentícia, cela fotoelétrica, coloração de cabelo, cosmética.

Em função do grande uso dos corantes na indústria têxtil, estes podem ser classificados de acordo com o método pelo qual é fixado à fibra (GUARATINI; ZANONI, 2000). A Tabela 2 mostra os principais tipos de corantes em relação a sua aplicação.

**Tabela 2.** Classificação e características de alguns corantes em função da suas aplicações (adaptado de GUARATINI; ZANONI, 2000).

<b>Tipos de corantes</b>	<b>Características</b>	<b>Substratos</b>
Ácido	Quando em solução possuem cargas negativas que se ligam a grupos catiônicos presentes na fibra	Nailon, lã, poliamida, seda, papel, tinta, couro
Básico	Compostos catiônicos que se ligam aos grupos ácidos da fibra	Fibra sintética, papel, seda
Direto	Compostos solúveis em água que interagem com a fibra através de interações de Van der Waals	Celulose, coton, viscose, papel, couro, náilon
Reativo	Possuem grupos eletrofílicos capazes de formar ligação covalente com grupos hidroxila, amino e tióis	Coton, lã, seda, nailon
Disperso	Compostos insolúveis em água aplicados em fibras hidrofóbicas através de suspensão	Poliéster, poliamida, acetato, acrílico, plástico
Azóico	Compostos coloridos, insolúveis em água, que são sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento	Coton, viscose, acetato de celulose, poliéster

Entre os corantes sintéticos, os corantes azo são os mais utilizados, representando quase 70 % da produção têxtil. Eles são fáceis de sintetizar, baixo custo, estáveis, podem ser utilizados em vários materiais (têxtil, couro, plástico e comida) e permitem uma grande variedade de cores (GUARATINI; ZANONI, 2000). Possuem em sua molécula um ou mais grupos azo. A síntese destes compostos é obtida pela reação de sais de diazônio com aminas aromáticas, fenóis, naftóis ou enol alifático (CONSTANTINO, 2005; ZOLLINGER, 1991). O acoplamento geralmente ocorre na posição *para* em relação ao grupo amino ou hidroxil ou na posição *orto* se a posterior estiver ocupada. Os sais de diazônio são obtidos pela reação de nitrato de sódio com uma solução de amina e um ácido mineral, preferencialmente ácido clorídrico, Figura 8.



**Figura 8.** Síntese de corante azo (CONSTANTINO, 2005).

### 1.3.2. Ecotoxicidade dos corantes azo

As indústrias de corantes são as mais problemáticas em relação à liberação de resíduos para o meio ambiente. A liberação descontrolada destes resíduos causa sérios problemas. Estes compostos são projetados para serem quimicamente estáveis e dificilmente degradados pela luz, sendo assim altamente persistentes em ambientes naturais. Por exemplo, a meia vida do Azul Reativo 19 hidrolisado é de aproximadamente 46 anos a pH 7,0 e 25 °C (WEBBER; STICKNEY, 1993).

Os corantes, quando presentes no meio aquático, afetam não só os aspectos estéticos do meio, mas a cor interfere na penetração da luz solar na água, retardando a fotossíntese, inibindo o crescimento da biota aquática e interferindo na solubilidade de gases na água. Além disso, podem ser tóxicos devido à presença de aromáticos e metais pesados (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ŠULÁKOVÁ *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2005). A possibilidade de bioacumulação em peixes foi considerada, mas os poucos estudos não confirmaram esta hipótese (LAW, 1995; ANLIKER *et al.*, 1988; ANLIKER; MOSER, 1987).

A toxicidade dos corantes azo, como definido pelos critérios da União Européia para a classificação de substâncias perigosas, é bastante baixa. Apenas alguns azo corantes apresentam valores LD50 (dose letal mediana) abaixo de 250 mg.Kg<sup>-1</sup> de massa corpórea (SEESURIYACHAN *et al.*, 2007; VAN DER ZEE *et al.*, 2001). Entretanto, são encontrados relatos de reação alérgica desde 1930. Alguns corantes dispersos com estrutura monoazo ou antraquinona causam, por exemplo, eczema ou dermatite de contato (GOON *et al.*, 2003; KOMERICKI *et al.*, 2001).

#### **1.4. Corantes azo e citocromo P450**

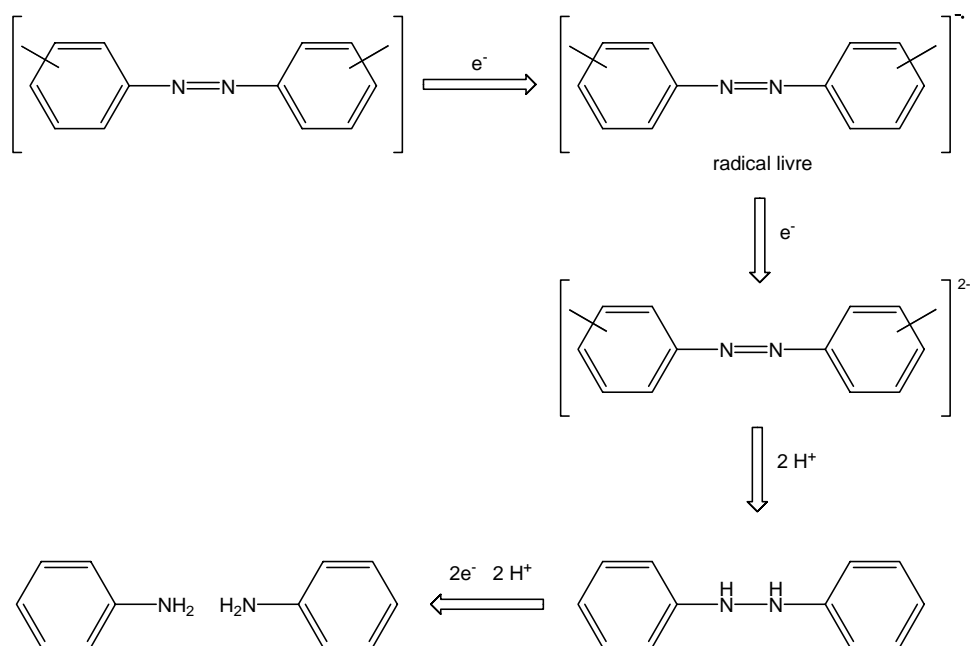
Estudos biocinéticos têm mostrado evidências de que corantes azo solúveis em água, se oralmente administrados, são metabolizados na microflora intestinal e excretados mais rapidamente do que os compostos menos solúveis. Por outro lado, os corantes insolúveis em água podem ser biodegradados no fígado, formando conjugados solúveis em água que seriam então transportados para o intestino e sujeitos a reduções por bactérias da flora normal. A biotransformação destes corantes pode ser responsável pela formação de aminas, benzidinas e outros intermediários com potencialidade carcinogênica e mutagênica (BAFANA *et al.*, 2008; JADHAV *et al.*, 2008; TSUBOY *et al.*, 2007; PRICELIUS *et al.*, 2007; RESS *et al.*, 2002; ZBAIDA *et al.*, 1989).

Os quatro principais mecanismos de biotransformação envolvendo este tipo de corante são baseados principalmente em modificações devido à processos de oxidação, hidrólise, conjugação e redução, cuja degradação é acelerada através de processos enzimáticos. Assim, reações tais como clivagem da ligação azo e formação de aminas nos processos de redução, hidroxilação da molécula ou parte dela em processos de oxidação, podem ocorrer rapidamente, sendo que as enzimas são incapazes de diferenciar se os produtos gerados são nocivos ou não ao organismo (TAUBER *et al.*, 2008; BAFANA *et al.*, 2008; JADHAVB *et al.*, 2008; QURESHI *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2003).

Vários corantes foram banidos da comercialização por serem potenciais produtores de benzidinas, o-toluidinas e anisidinas durante sua degradação, via biotransformação catalisada enzimaticamente pela azo redutase. Esta enzima é responsável pela clivagem redutiva das ligações azo deste tipo de compostos. Essa



redução ocorre preferencialmente com corantes solúveis em água catalisados pelo sistema microsomal NADPH citocromo P450, onde o NADPH funciona como doador de elétrons, sendo este sistema catalítico encontrado no fígado ou formado por muitas espécies de bactérias anaeróbicas no intestino grosso (ZBAIDA; LEVINE, 1990; ZIMMERMANN *et al.*, 1982). O mecanismo de redução deste sistema enzimático envolve a transferência de dois elétrons, com um radical livre como intermediário (Figura 9). A capacidade de redução depende do sistema enzimático e da estrutura do azo corante.



**Figura 9.** Mecanismo de redução de corante azo via citocromo P450 (HUNGER, 1994).

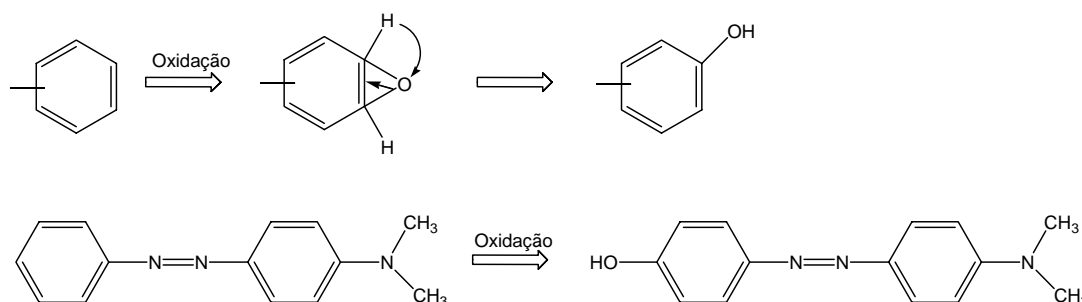
### **Metabolismo oxidativo**

Corantes com grande solubilidade em lipídios sofrem preferencialmente reações de oxidação. Processos oxidativos são catalisados principalmente por um sistema de monooxigenases representado pelo citocromo P450. O mecanismo geral

de oxidações metabólicas consiste em uma cadeia transportadora de elétrons, primeiramente transferindo um elétron para o complexo P450-Fe<sup>3+</sup>, que sobre redução, adquire oxigênio em etapas subseqüentes e leva finalmente ao produto de oxidação no organismo (HUNGER, 1994).

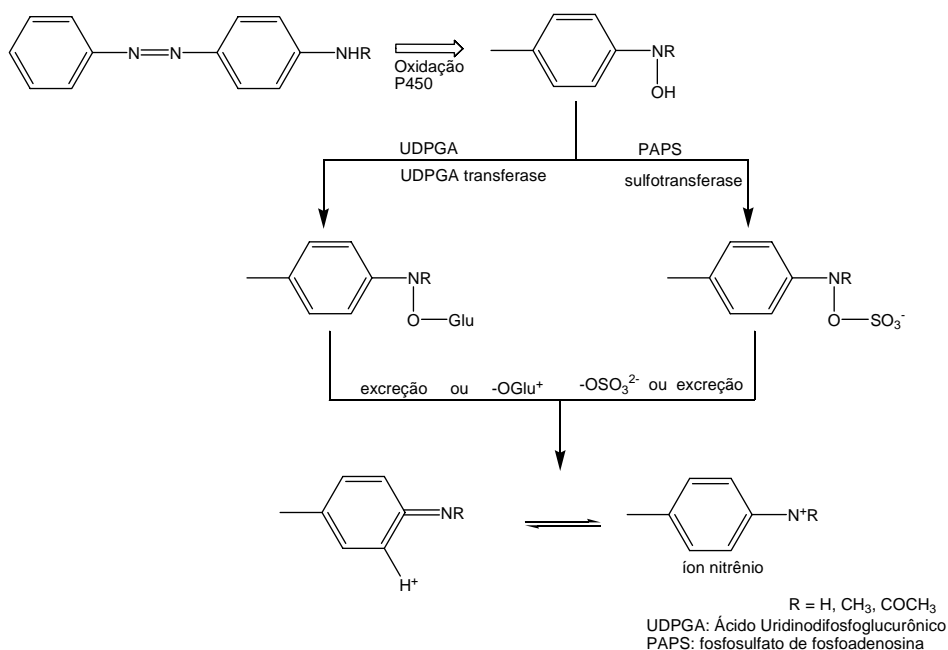
Três diferentes mecanismos de oxidação são importantes para corantes azo, todos deixando a ligação azo intacta (HUNGER, 1994):

*C – hidroxilação* no anel do corante azo, provavelmente ocorrendo via mecanismo de epoxidação e subseqüente arranjo a fenol, como mostra a Figura 10.

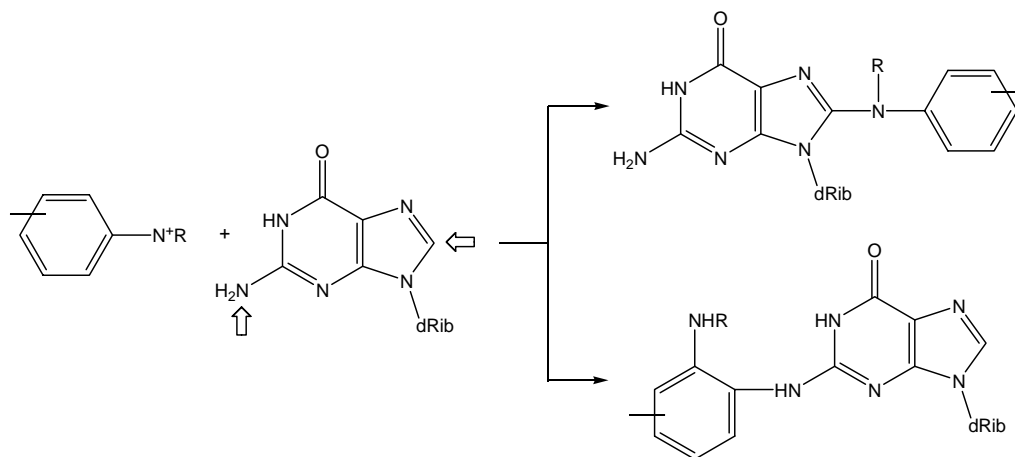


**Figura 10.** C-hidroxilação no anel aromático (HUNGER, 1994).

*N – hidroxilação*, ocorrendo em grupos amino primários, secundários ou com grupos acetilamino, no fígado. Esta reação é seguida por uma esterificação com glucoronato ou sulfato. Estes ésteres ativados podem levar à excreção das substâncias agora solúveis em água, ou dividir o grupamento éster levando à formação do composto nitrênio -NH<sup>+</sup> (Figura 11), que pode ligar-se covalentemente a um grupo nucleofílico do DNA (Figura 12).

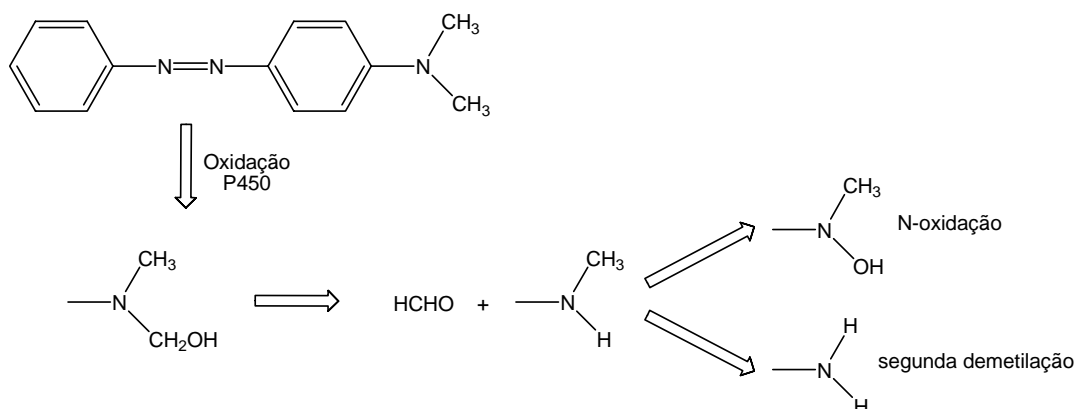


**Figura 11.** N-hidroilação e formação do íon nitrênio (HUNGER, 1994).



**Figura 12.** Reação do íon nitrênio com o DNA (guanosina) (HUNGER, 1994).

*Desmetilação* é a oxidação de grupos metil de dialquilamino compostos. O derivado N-hidroxi pode ser ainda desmetilado ou reagir formando um composto nitrênio (Figura 13).



**Figura 13.** Desmetilação, metabolismo oxidativo (HUNGER, 1994).

Assim, considerando a periculosidade dos produtos gerados, via biotransformação, um dos testes mais importantes sobre a toxicidade do corante envolve a avaliação prévia das prováveis interações e produtos obtidos durante redução ou oxidação enzimática. Estes estudos poderiam dar subsídios para uma catalogação prévia do grau carcinogênico do corante.

Metaloporfirinas têm sido estudadas como eficientes modelos biomiméticos da função oxidativa do citocromo P450 (EMMERT III *et al.*, 2008; HODGES *et al.*, 1999; SPADARO; RENGANATHAN, 1994) e têm grande potencial para serem empregados também como modelos da função redutiva destas enzimas. O conhecimento das transformações estruturais de corantes azo via oxidação ou redução na presença de metaloporfirinas pode ser útil para avaliação prévia de interações durante sua biodegradação.

# Objetivo

*"Gênio é um por cento de inspiração  
e noventa e nove por cento de  
transpiração"*

*(Thomas Edison)*

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade catalítica das metaloporfirinas comerciais, em solução e imobilizada em argila montmorilonita K10, como modelos das enzimas P450 na oxidação de três corantes dispersos azóicos (DO3, MY e DB3) por peróxido de hidrogênio, *tert*-butil hidroperóxido, ácido *m*-cloroperbenzóico, iodosilbenzeno e hipoclorito de sódio.

Os estudos com as metaloporfirinas visam compreender a participação do citocromo P450 na oxidação desses corantes e desenvolver metodologias para o estudo do potencial tóxico destes compostos.

# *Materiais e Método*

*“Os analfabetos do próximo século não são aqueles que não sabem ler ou escrever, mas aqueles que se recusam a aprender, reaprender e voltar a aprender.”*

*(Alvin Toffler)*

### 3.1. Materiais

#### **Solventes e Reagentes**

- ⇒ Os oxidantes TBHP e m-CPBA foram adquiridos da Acros Organics, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) da Fluka e o PhIO foi sintetizado através da hidrólise do iodobenzenodiacetato, segundo método descrito por (SHAREFKIN, 1973) e sua pureza de 95 % foi determinada por titulação iodométrica segundo técnica descrito por (LUCAS *et al.*, 1963).
- ⇒ Os solventes utilizados foram de grau CLAE e de procedência J.T. Baker, Mallinckrodt e Synth.
- ⇒ A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore.
- ⇒ Os corantes DO3, DB3 e MY e a PNA foram de procedência Acros Organics ou Sigma-Aldrich, com teor de pureza acima de 95 %.
- ⇒ As porfirinas H<sub>2</sub>TMPyP, H<sub>2</sub>T CPP e H<sub>2</sub>T FPP foram adquiridas da MID CENTURY.
- ⇒ O sal cloreto de ferro II tetrahidratado foram de procedência Acros Organics.
- ⇒ Os sais utilizados no preparo das soluções tampão foram de grau P.A., sendo o tampão NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl (pKa 9,2) de procedência Synth e o tampão ácido fosfórico e dihidrogenofosfato de potássio (pKa 2,12) de procedência Mallinckrodt.



### **3.2. Equipamentos**

#### ***Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)***

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro HP modelo 8452A. Foram empregadas células de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

#### ***Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia no ultravioleta (CLAE-UV)***

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em um equipamento da Shimadzu, com bomba LC-6AD, com amostrador de 20  $\mu\text{L}$  e detector de UV-Vis Diodo Array modelo SPD-M10A. Utilizou-se coluna C-18 da Merck (125 x 4 mm) a temperatura de 30 °C.

A eluição da fase móvel foi gradiente e o fluxo foi mantido em 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras foram dissolvidas na própria fase móvel.

#### ***Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)***

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC17A acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu modelo QP2010 cuja fonte de impacto de elétron opera com energia de ionização de 70 eV. Foi utilizada uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).

As temperaturas empregadas foram:

- Temperatura do injetor: 260 °C;
- Temperatura do detector: 270 °C;
- Programação de temperatura da coluna: 50 °C (5 min) a 270 °C (4 min), com velocidade de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>.

As amostras (1µL) foram injetadas por um auto-injetor, utilizando a técnica de injeção “splitless”. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com vazão de 1mL.min<sup>-1</sup>. Os picos dos cromatogramas foram indentificados pela comparação com os dados da literatura e perfis de fragmentação da biblioteca NIST (versão 1.10 beta) do equipamento.

As análises foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

### ***Difração de raio-X (DRX)***

As análises de difração de raio-X foram realizadas em um difractômetro Siemens modelo 5005 usando radiação CuK $\alpha$ , no laboratório da Profa. Dra. Rogéria Rocha Gonçalves, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

### ***Análise termogravimétrica***

A análise termogravimétrica foi realizada em um aparelho de análise térmica TA Instruments-SDT Q600 - Simultaneous DTA -TGA utilizando um gradiente de temperatura entre temperatura ambiente (~ 25 °C) até 1500 °C, em uma velocidade de 20 °C por minuto, com fluxo de N<sub>2</sub> em 100 mL.min<sup>-1</sup>.

As análises foram realizadas no laboratório da Prof. Dra. Kátia Jorge Ciuffi da Universidade de Franca.

### ***CLAE acoplado à espectrometria de massas (CLAE-EM)***

As análises por CLAE-EM foram realizadas em um cromatógrafo da Shimadzu, com bomba de alta pressão LC-20AD, com amostrador de 20  $\mu\text{L}$  e detector de UV-Vis “fotodiodo array” modelo SPD-M20A. Utilizou-se coluna C-18 da Merck (125 x 4 mm), à temperatura de 30 °C. A eluição da fase móvel foi gradiente e o fluxo foi mantido em 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras foram dissolvidas na própria fase móvel. O cromatógrafo é acoplado a espectrometria de massas da marca Bruker Daltonics, modelo ultrOTOFG-ESI-TOF Mass Spectrometer. As análises foram realizadas no modo de detecção positivo, com calibração interna antes das análises. O padrão para calibração foi uma solução de trifluoroacetato de sódio a 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (TOF)

As análises foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

## **3.3. Métodos**

### ***3.3.1. Inserção de íon metálico na porfirina base livre***

A reação de inserção de ferro nas porfirinas base livres foi realizada usando como solvente a água para a  $\text{H}_2\text{TMPyP}$  e dimetilformamida para a  $\text{H}_2\text{TCPP}$  e

H<sub>2</sub>TFPP, e o cloreto de ferro II tetrahidratado como sal fornecedor do íon metálico.

Em um balão de três bocas adaptado com um condensador foram colocados 40 mL do solvente adequado. Após 1 hora de borbulhamento de argônio no solvente foram adicionados  $n_1$  mols da porfirina base livre e levado a refluxo sob agitação magnética, em atmosfera de argônio e ausência de luz. Adicionou-se  $n_2$  mols do sal fornecedor do íon metálico, conforme mostra a Tabela 3.

**Tabela 3.** Solvente e números de mols utilizados do sal fornecedor do metal e da porfirina base livre para a reação de metalação.

<b>Porfirina base livre</b>	<b><math>n_1</math></b>	<b><math>n_2</math></b>	<b>Solvente</b>
H <sub>2</sub> TMPyP	0,11 mmol	1,1 mmol	água
H <sub>2</sub> TFPP	79 $\mu$ mol	0,79 mmol	dimetilformamida
H <sub>2</sub> T CPP	97 $\mu$ mol	0,97 mmol	dimetilformamida

$n_1$ : número de mols de porfirina base livre;  $n_2$ : número de mols do sal fornecedor do íon metálico

A mistura foi deixada em refluxo por 24 horas. O final da reação foi acompanhado pela perda da fluorescência vermelha característica da porfirina base livre sob luz ultravioleta e pelo monitoramento por espectroscopia UV-Vis. A H<sub>2</sub>TFPP também foi monitorada por cromatografia em camada delgada utilizando como eluente a mistura de diclorometano e metanol 1 %. A reação foi interrompida por resfriamento do balão.

A metaloporfirina foi purificada seguindo o método específico para cada complexo metálico.

**FeTMPyP**

A ferroporfirina foi inicialmente purificada pela adição do sal de hexafluorofosfato de amônio no meio reacional até se observar a precipitação do complexo metálico (VINHADO *et al.*, 2002). A ferroporfirina obtida foi centrifugada e lavada por 3 vezes com água mili-Q gelada. A seguir foi feita uma purificação adicional por recristalização em uma solução de metanol e clorofórmio. O complexo foi então dissolvido em acetona e tratado com uma ponta de espátula de cloreto de tetrabutylamônio, para obtenção da metaloporfirina contendo o íon cloreto como contra-íon.

**FeTFPP**

A dimetilformamida foi evaporada em um evaporador rotativo. O produto da reação de metalação foi dissolvido em diclorometano e purificado por cromatografia preparativa em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel. O eluente utilizado para a purificação da ferroporfirina foi uma mistura de diclorometano e metanol 1 %. Inicialmente foi eluída uma pequena quantidade de porfirina base livre, seguida da metaloporfirina. O excesso do sal ficou retido no topo da coluna. À metaloporfirina sólida foi adicionada uma solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  em diclorometano, para garantir o cloreto como contra-íon. Em seguida a solução foi levada à secura.

**FeTCPP**

A dimetilformamida foi evaporada em um evaporador rotatório. O produto da reação de metalação foi lavado várias vezes com água para retirar o excesso de sal

do metal, até teste negativo com tiocinato de amônio (para detectar a presença de ferro) no sobrenadante.

### 3.3.2. Caracterização das ferroporfirinas por espectroscopia UV-Vis

Os espectros UV-Vis dos complexos metálicos foram registrados nos solventes adequados a cada composto, conforme mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Solventes utilizados para caracterização das metaloporfirinas.

<b>Metaloporfirina</b>	<b>Solvente</b>
FeTCPP	H <sub>2</sub> O, pH 8,0
FeTMPyP	H <sub>2</sub> O
FeTFPP	ACN

O  $\epsilon$  dos complexos metálicos foram determinados em seus respectivos solventes, utilizando-se soluções nas concentrações:

FeTMPyP: 9,00; 13,00; 20,00; 27,00 e 32,00  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

FeTFPP: 2,00; 3,00; 5,20; 6,00 e 7,90  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

FeTCPP: 10,00; 17,00; 25,00; 30,00 e 37,00  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Em seguida foram registrados os espectros UV-Vis destas soluções. Os valores de  $\epsilon$  foram obtidos através da inclinação da reta no gráfico absorvância *versus* concentração do complexo metálico.

### **3.3.3. Preparação e caracterização da FeTMPyP immobilizada na argila montmorilonita K10, FeP-K10**

O catalisador sólido foi preparado em colaboração com o aluno de doutorado André Luiz de Faria.

A argila montmorillonita K10 foi primeiramente submetida a uma troca iônica com uma solução de NaCl, obtendo a forma sódica (JOSHI; GHOSH, 1989).

Em um balão de uma boca, colocou-se 25 g da argila montmorillonita K10 e 500 mL de uma solução de NaCl (5,0 mol.L<sup>-1</sup>). A mistura permaneceu sob agitação magnética por 4 dias. A seguir o sólido foi filtrado em funil de Buchner e lavado várias vezes com água deionizada para retirar o excesso de sal, até teste negativo com nitrato de prata (para detectar a presença de íons cloreto). O sólido foi seco em estufa por 24 h a 80 °C.

Em seguida 5,0 mg da FeTMPyP foi adicionada a 2,0 g da argila sódica em 50 mL de água deionizada, sob agitação magnética, a temperatura ambiente. Após 24 h o sólido resultante foi filtrado, lavado com água deionizada e lavado em Soxhlet com ACN por 24 h. O sólido foi seco a 80 °C por 8 h.

A quantidade de FeTMPyP ancorada no suporte (“loading”) foi determinada indiretamente, quantificando-se o material contido no filtrado e nos extratos através da absorvância destas soluções em 422 nm (banda Soret).

O catalisador foi caracterizado por espectroscopia UV-Vis, análise termogravimétrica, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial e difração de raio-X.

### **3.3.4. Caracterização dos corantes por espectroscopia UV-Vis**

Os espectros UV-Vis dos corantes foram registrados em ACN com solução de concentração  $6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . Os valores de  $\epsilon$  foram obtidos através da inclinação da reta no gráfico da absorbância *versus* concentração de solução de cada corante.

### **3.3.5. Estudo por espectroscopia UV-Vis da interação da FeTMPyP com os corantes DO3, DB3 e MY**

Este estudo foi realizado em ACN, registrando-se as variações no espectro de absorção da FeTMPyP com o aumento da concentração dos corantes e vice-versa, de acordo com o método descrito por Egan *et al.* (1997).

Em uma cela de quartzo, 4 alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de uma solução  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  da FeTMPyP em ACN foram adicionadas a 2,0 mL de uma solução  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante em ACN. Com o mesmo objetivo foram adicionadas 4 alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de uma solução  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante em ACN a uma solução  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  da FeTMPyP em  $\text{H}_2\text{O}$ . Os espectros foram registrados após a adição de cada alíquota.

### **3.3.6. Estudo da oxidação dos corantes por espectroscopia UV-Vis**

A condição padrão (relação molar) para o estudo da oxidação dos corantes catalisados pelas metaloporfirinas foi 1 : 60 : 10 de catalisador : oxidante : substrato, utilizando-se  $1,25 \times 10^{-7} \text{ mol}$  do complexo metálico,  $7,5 \times 10^{-6} \text{ mol}$  do oxidante e 1,25



$\times 10^{-6}$  mol dos corantes em 2,0 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1). Esta condição foi estabelecida após vários testes preliminares variando-se a proporção de oxidante : substrato e a relação entre ACN/H<sub>2</sub>O.

Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente, sob agitação magnética, em frascos de 3 mL com tampa. O tempo de reação foi de 4 horas, após o qual retirava-se uma alíquota da mistura de reação e analisava-se por espectroscopia UV-Vis. O estudo foi realizado com as metaloporfirinas solúveis em água (FeTMPyP e FeTCPP) e solvente orgânico (FeTFPP) e metaloporfirina suportada em argila montmorilonita (FeP-K10). Foram realizadas reações controle (branco), nas condições estabelecidas como padrão, na ausência do catalisador e na ausência do substrato. Utilizou-se como oxidantes: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBHP, PhIO, NaClO e m-CPBA.

As reações em diferentes pHs (3,0; 6,4 e 10,0) foram realizadas nas condições 1 : 60 : 10 de catalisador : oxidante : substrato, utilizando-se os oxidantes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TBHP, os quais podem apresentar homólise ou heterólise da ligação O-O, em meio de tampão conveniente de acordo com o seu valor de pKa, na concentração 5 mmol.L<sup>-1</sup> e ACN (2:1). Em pH 3,0 utilizou-se o tampão preparado com ácido fosfórico e dihidrogenofosfato de potássio (pKa 2,12), para reação em pH 6,4, utilizou-se apenas H<sub>2</sub>O e ACN (2:1) e para as reações em pH 10, o tampão amônia e cloreto de amônio (pKa 9,2).

Fez-se também o estudo da atividade catalítica de FeTMPyP na ausência de oxigênio (atmosfera de argônio) e na ausência de luz, na condição padrão citada acima 1 : 60 : 10.

### **3.3.7. Preparação da mistura de reação para análise por CLAE-UV.**

O procedimento empregado para preparação da mistura de reação para análises por CLAE-UV foi baseado na secagem da mistura reacional com um fluxo contínuo de ar quente, seguida da solubilização em 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. Para garantir completa solubilização o frasco foi submetido à agitação magnética por 10 min. Posteriormente a solução foi filtrada, utilizando um dispositivo plástico que contém um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Este dispositivo é acoplado na microseringa para que não ocorra perda dos analitos durante a filtração. A FeTMPyP não é solubilizada neste meio e fica retida no filtro. Para a remoção do clorofórmio o sobrenadante é exposto a uma corrente contínua de ar quente. A seguir a mistura de reação é solubilizada em ACN/H<sub>2</sub>O (3:1) e analisada por CLAE-UV.

### **3.3.8. Identificação dos produtos de oxidação dos corantes por CLAE-UV, CLAE-EM e CG-EM**

A otimização das condições de análise cromatográfica (CLAE e CG) foi realizada com soluções padrão dos corantes. Para a análise por CLAE-UV e CLAE-EM foi utilizada coluna de fase reversa C<sub>18</sub>. A fase móvel foi variada quanto à proporções de ACN e água Milli-Q, em condições gradientes. Para análise por CG-EM foi utilizada coluna DB5-MS. Os espectros de massas obtidos foram comparados com a biblioteca “National institute of Standards and Technology” (NIST) para a identificação dos produtos.

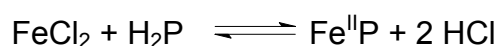
# *Resultados e Discussão*

*"Pensar é o trabalho mais pesado que há e talvez seja essa a razão para tão poucos se dedicarem a isso."*

*(Henry Ford)*

#### 4.1. Síntese e caracterização das ferroporfirinas

A inserção de íon ferro nas porfirinas H<sub>2</sub>TMPyP, H<sub>2</sub>T CPP e H<sub>2</sub>TFPP foi realizada como descrito por Adler (1964), utilizando dimetilformamida como solvente para a H<sub>2</sub>TFPP e H<sub>2</sub>T CPP e água para a H<sub>2</sub>TMPyP, e cloreto de ferro (II) tetra hidratado como sal fornecedor do íon metálico, como ilustrado na reação abaixo para a ferroporfirina.



O uso do metal no estado de oxidação + 2 deve-se ao fato de que, quanto maior a carga do metal, mais lentamente ele irá reagir devido à atração eletrostática pelo ânion. Assim, usando íon metálico no seu estado de oxidação mais baixo evita-se aquecimentos prolongados. Após o final da reação o íon metálico é facilmente oxidado ao estado de oxidação + 3 pelo oxigênio do ar (OCHIAI, 1985; SMITH, 1975).

A escolha de água ou dimetilformamida como solventes para a reação foi baseada na solubilidade da porfirina e do sal metálico. A dimetilformamida, além de bom solvente para a maioria das porfirinas e sais metálicos, é um solvente aprótico, sendo pouco coordenante e não compete com a porfirina pelo sítio metálico. Ainda uma outra vantagem da dimetilformamida como meio de reação é seu alto ponto de ebulição (153 °C), a alta temperatura de refluxo aumenta a velocidade de reação (ADLER *et al.*, 1964).

As reações de metalização foram monitoradas por espectroscopia UV-Vis e perda da fluorescência vermelha da porfirina base livre por irradiação com luz ultra violeta.

A FeTMPyP foi purificada pela adição do sal hexafluorofosfato de amônio no meio reacional, para promover a precipitação da ferroporfirina e garantir os íons hexafluorofosfato como contra-íons, seguida de lavagens com água gelada, para garantir a retirada do excesso de sal (VINHADO *et al.*, 2002). Em seguida a ferroporfirina foi recristalizada em metanol e clorofórmio, obtendo uma massa de 76 mg e rendimento de 90 %.

A FeTCPP foi lavada várias vezes com água para retirar o excesso de sal do metal, até teste negativo para íons ferro III com tiocianato de amônio no sobrenadante. A massa obtida foi de 68 mg e rendimento de 85 %.

Além da espectroscopia UV-Vis, discutida no item a seguir, foi possível confirmar que houve metalização para a FeTFPP pela diferença de  $R_f$  entre a porfirina base livre e a ferroporfirina. O eluente utilizado foi a mistura de solventes diclorometano e metanol 1%. Nesta mistura, em que predomina o solvente menos polar (diclorometano), a porfirina base livre tem  $R_f$  de 0,5 e a FeTFPP apresenta  $R_f$  de 0,09.

A FeTFPP foi purificada em coluna cromatográfica utilizando sílica como fase estacionária e como eluente a mesma mistura de solventes utilizada para a cromatografia em camada delgada (CCD). A FeTFPP foi eluída como 2ª banda e, após eliminação do solvente obteve-se 74 mg de FeTFPP que corresponde a um rendimento de 92 %.

As ferroporfirinas foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis. A espectroscopia UV-Vis é o método mais conveniente e sensível para se detectar a

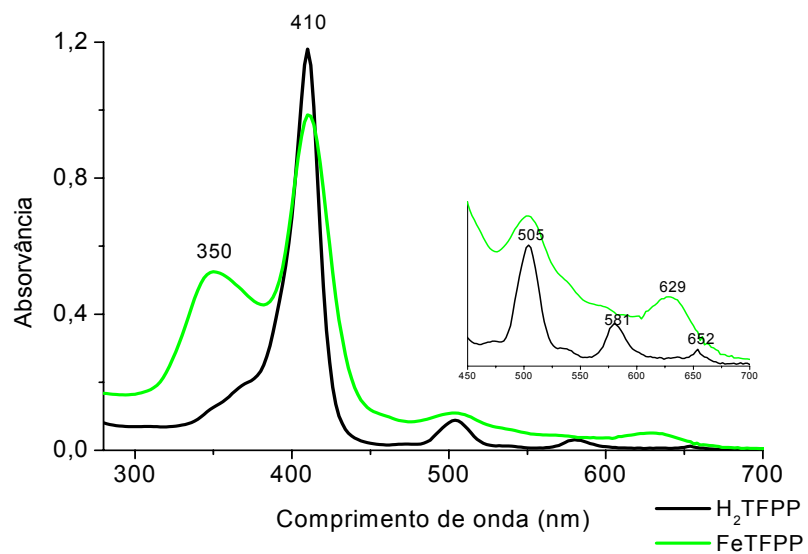
inserção do metal nas metaloporfirinas. Isto é devido ao fato de que as porfirinas base livre e metaloporfirinas possuem espectros eletrônicos característicos. As porfirinas base livre possuem simetria  $D_{2h}$  e geralmente o seu espectro eletrônico apresenta uma banda Soret bastante intensa na região de 380 a 450 nm (banda B) e entre 450 e 700 nm são observadas 4 bandas (bandas Q) de menor intensidade (OCHIAI, 1985). As ferroporfirinas apresentam uma simetria  $D_{4h}$  e o espectro de absorção é caracterizado por apenas duas bandas na região de 500 a 700 nm e a banda Soret em comprimento de onda semelhante ao da porfirina base livre, com pequeno deslocamento para a região do ultravioleta. Portanto, a transformação do espectro de quatro bandas em um espectro de duas bandas na região do visível é uma indicação de que ocorreu metalação (MILGRON, 1997).

Os complexos ferroporfirínicos apresentaram espectros UV-Vis (Figura 14, 15 e 16) similares aos espectros UV-Vis destes complexos descritos na literatura (OCHIAI, 1985; GOUTERMAN, 1978; BOUCHER, 1972), confirmando o sucesso das reações de inserção de metal.

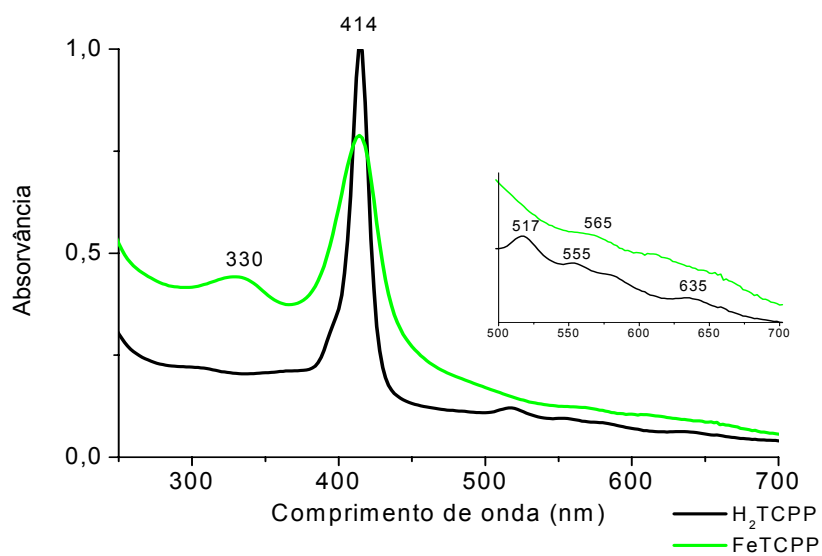
Os coeficientes de absorvidade molar,  $\epsilon$ , das ferroporfirinas foram determinados a partir da absorvância destes complexos para várias soluções de concentração conhecida. Os valores de  $\epsilon$  encontrados estão na Tabela 5.

**Tabela 5.** Valores do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) das ferroporfirinas.

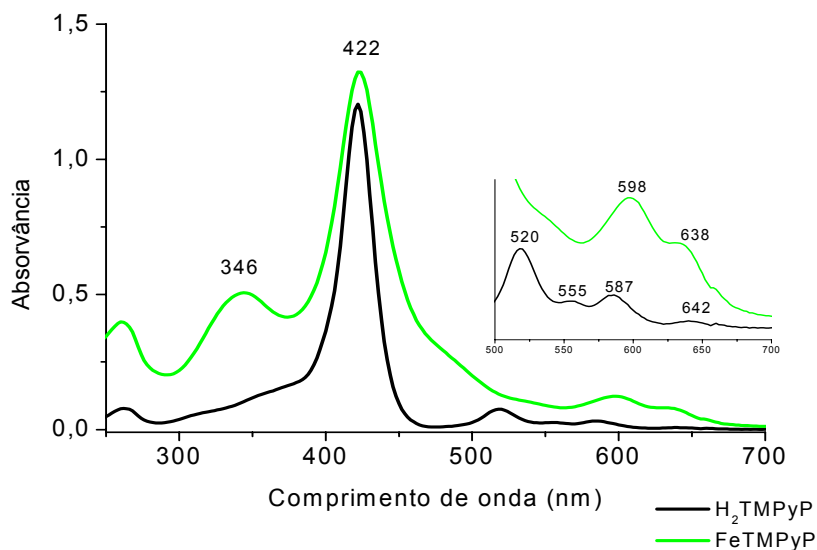
<b>Ferroporfirinas/solvente</b>	$\lambda_{\text{máx/nm}}$	$\epsilon \text{ (mol.L}^{-1}\text{.cm}^{-1}\text{)}$
FeTMPyP/H <sub>2</sub> O	422	$7,7 \times 10^4$
FeTCPP/H <sub>2</sub> O pH 8,0	414	$3,1 \times 10^4$
FeTFPP/ACN	410	$1,5 \times 10^5$



**Figura 14.** Espectros UV-Vis da  $H_2TFPP$  e  $FeTFPP$ , em ACN. Em destaque a região de 500 a 700 nm, ampliada.



**Figura 15.** Espectros UV-Vis da  $H_2TCPP$  e  $FeTCPP$  em  $H_2O$  (pH 8,0). Em destaque a região de 500 a 700 nm, ampliada.



**Figura 16.** Espectros UV-Vis da H<sub>2</sub>TMPyP e FeTMPyP em H<sub>2</sub>O. Em destaque a região de 500 a 700 nm ampliada.

#### **4.2. Preparação e caracterização da FeTMPyP imobilizada na argila montmorilonita K10, FeP-K10**

Nos anos recentes houve um crescimento no uso de argilas como suportes para transformações orgânicas (FARIA *et al.*, 2008; BONGIOVANNI *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2008; KAMEYAMA *et al.*, 2006). As principais razões para esse interesse são a ampla variedade de argilas existente e a facilidade com que esses materiais podem ser modificados. Além disso, argilas são materiais baratos, não corrosivos e recicláveis.

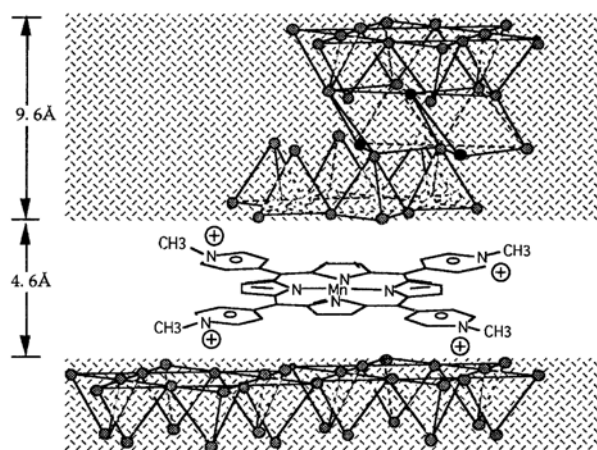
As argilas montmorilonita, como a K10, pertencem ao grupo das esmectitas e apresentam estrutura lamelar formada pela intercalação de uma camada octaédrica (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou MgO) entre duas camadas tetraédricas (SiO<sub>2</sub>).



Materiais argilosos possuem propriedades de trocar íons, situados nos espaços interlamelares. Montmorilonita K10 pode ter íons  $\text{Al}^{3+}$  substituídos por íons  $\text{Mg}^{2+}$  dentro dos sítios octaédricos, resultando em lamelas com cargas negativas residuais que podem ser neutralizadas por intercalação de grupos catiônicos, tais como metaloporfirinas catiônicas (Figura 17) ou corantes iônicos (SANTOS, 1992). Em função desta propriedade, preparou-se um catalisador sólido pela troca dos íons sódio presentes na matriz da montmorilonita pela FeTMPyP catiônica.

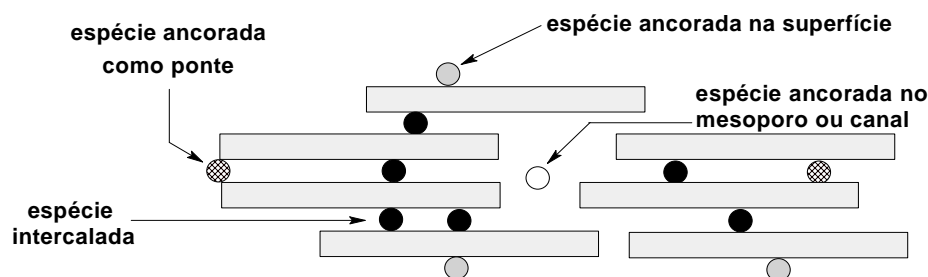
Para se ter uma troca catiônica quantitativa entre as camadas da montmorilonita é preciso primeiro que os íons  $\text{K}^+$  da montmorilonita K10 sejam trocados por íons  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+$ -K10) e, posteriormente, pela FeTMPyP.

A quantidade de FeP ancorada no suporte (“loading”) foi determinada indiretamente, quantificando-se a ferroporfirina contida no filtrado e nos extratos da reação de imobilização através da absorvância destas soluções no comprimento de máxima absorção da FeTMPyP (banda Soret). Obteve-se um material contendo 5,5  $\mu\text{mol}$  de FeTMPyP por grama de montmorilonita.



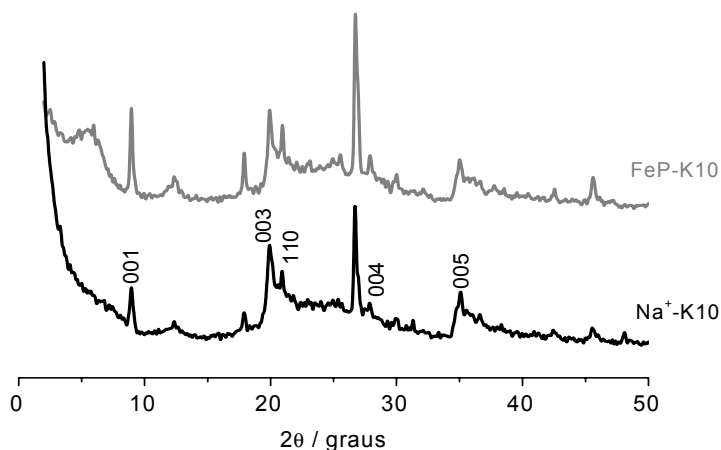
**Figura 17.** Esquema da FeP intercalada entre as camadas da montmorilonita (BEDIOUI, 1995).

A técnica de difração de raio-X de pó é utilizada em estudos de sistemas intercalados e encapsulados para verificar a ocorrência de alteração nas distâncias interlamelares. Utilizou-se esta técnica para investigar como a FeTMPyP poderia estar imobilizada na montmorilonita, ou seja, ancorada na superfície, entre lamelas ou ainda nos defeitos deste sólido (Figura 18).



**Figura 18.** Representação esquemática de diferentes sítios para a incorporação de complexos em argilas sólidas (BEDIOUI, 1995).

Os DRX referentes à FeP-K10 e à Na<sup>+</sup>-K10 foram obtidos registrando os valores de 2θ de 5 ° a 50 ° (Figura 19). As análises dos difratogramas revelam que a FeP-K10 possui estrutura similar a Na<sup>+</sup>-K10, indicando que a metaloporfirina não está intercalada entre as camadas desta argila.

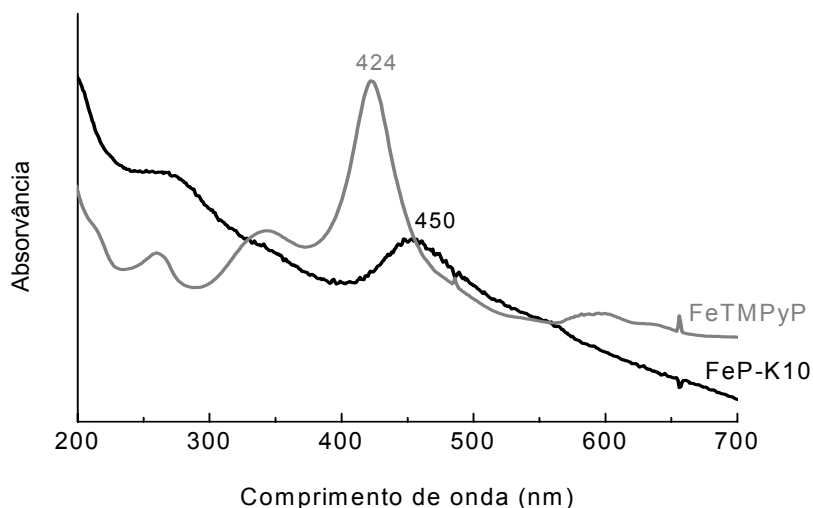


**Figura 19.** DRX da montmorilonita na forma sódica (Na<sup>+</sup>-K10) e montmorilonita com a FeTMPyP (FeP-K10).

A FeTMPyP está fortemente ligada no sólido, o que foi confirmado pela ausência de FeTMPyP nos extratos. A não variação na distância interlamelar da argila, indica que a ferroporfirina se encontra imobilizada provavelmente nos defeitos da argila e/ou na sua superfície, como observado por Bedioui (1995) e outros (MACHADO *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2000) para sistemas semelhantes.

A área superficial da montmorilonita foi determinada antes e após a imobilização da FeTMPyP, e os valores obtidos foram de 250,56 e 225,50 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> respectivamente. Esta pequena diminuição na área superficial pode ser atribuída à presença do catalisador na montmorilonita.

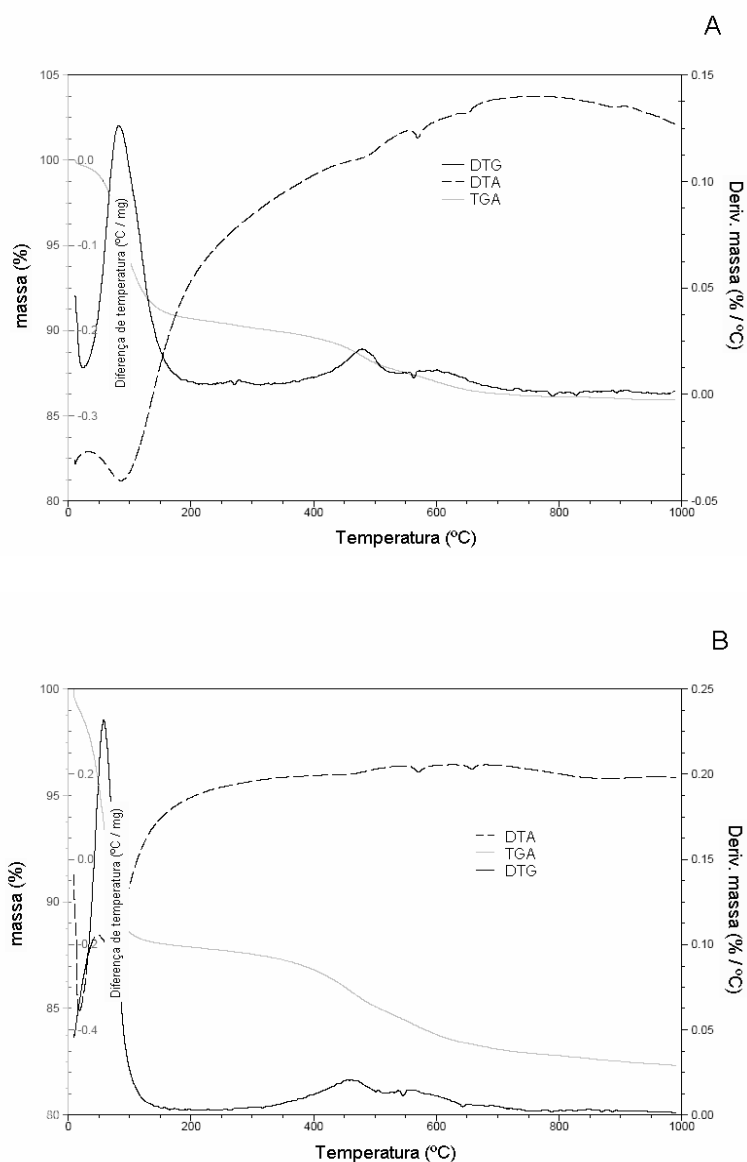
A presença da FeTMPyP no sólido foi confirmado por espectroscopia UV-Vis de uma suspensão aquosa do material (Figura 20).



**Figura 20.** Espectro UV-Vis de uma solução aquosa da FeTMPyP e de uma suspensão da FeP-K10 em água.

O espectro UV-Vis da FeP-K10 mostrou uma banda Soret (450 nm) deslocada para o vermelho quando comparado com a banda Soret desta ferroporfirina em solução aquosa (424 nm). Este deslocamento para maiores comprimentos de onda é resultado de uma interação  $\pi$  entre o anel aromático da metaloporfirina e a superfície do suporte (átomos de oxigênio planares do aluminossilicato) (CRESTINI *et al.*, 2004; BEDIQUI, 1995). Este comportamento é esperado para as metaloporfirinas suportadas e foi observado por nós com outros catalisadores sólidos (GOTARDO *et al.*, 2005; GUEDES *et al.*, 2005; FARIA *et al.*, 2004), e reportado por outros autores que estudaram sistemas similares (EVANS *et al.*, 2001; COOKE *et al.*, 1995).

A estabilidade térmica do catalisador sólido foi investigado por termogravimetria (TGA e DTG) e análise térmica diferencial (DTA). As curvas de TGA-DTA-DSC da Na<sup>+</sup>-K10 e FeP-K10 são mostradas nas Figuras 21 A e B, respectivamente.



**Figura 21.** A) Curvas TGA-DTG-DTA para a Na<sup>+</sup>-K10. B) Curvas TGA-DTG-DTA para a FeP-K10. Razão de aquecimento: 20 °C.min<sup>-1</sup>.

As curvas TGA-DTG para a Na<sup>+</sup>-K10 e FeP-K10 são similares (Figuras 21A e B) e mostram que as perdas de massa ocorrem principalmente entre 50 e 200 °C, as quais podem ser atribuídas à saída de moléculas de água fisicamente adsorvidas na superfície do sólido. Dois picos endotérmicos em 70 e 120 °C nas curvas DTA confirmam esta atribuição. Uma segunda perda de massa na região de 400 a 600 °C correspondente à saída de moléculas de água ligadas na montmorilonita por pontes de hidrogênio, o que pode ser comprovado por um pico endotérmico pequeno em

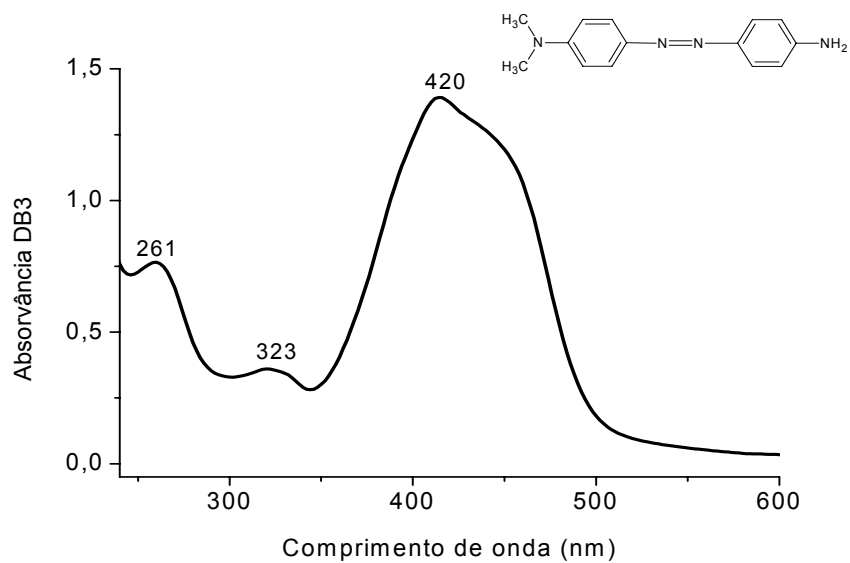
aproximadamente 570 °C nas curvas DTA. Perda de grupos OH da fase defeituosa da montmorilonita (produzida pela deformação mecânica) acontece próximo a 600 °C (BRUNAUER *et al.*, 1938), sendo observada neste estudo por um pico endotérmico pequeno a aproximadamente 650 °C na curva DTA. As curvas TGA e DTG para a FeP-K10 não mostraram qualquer evidência da perda de material orgânico, devido a quantidade do catalisador orgânico ser bem menor que a precisão da termobalança (erro padrão estimado ~ 1 %). A pequena diferença nos rendimentos para a Na<sup>+</sup>-K10 e FeP-K10 está relacionado ao grau de hidratação do material.

Em conclusão, não foi observada nenhuma mudança na estabilidade térmica da argila após a incorporação do catalisador em sua estrutura.

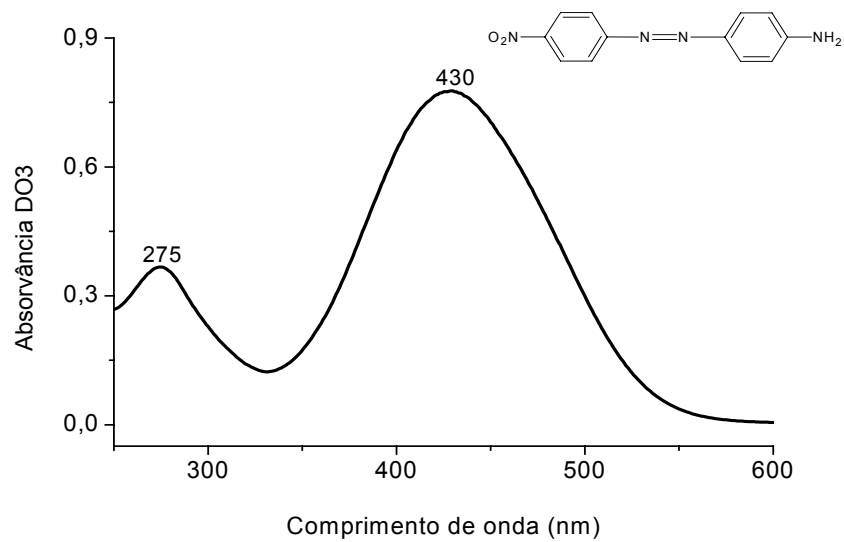
#### **4.3. Caracterização dos corantes azo por espectroscopia UV-Vis**

Em geral o monitoramento de processos de oxidação ou degradação de corantes azo baseia-se em investigações espectrofotométricas na região do UV-Vis, devido à banda de absorção do grupo azo nesta região (PANIZZA; CERISOLA, 2007; ZHAO *et al.*, 2006). Assim, foi necessário a caracterização inicial dos corantes DB3, DO3 e MY por espectroscopia UV-Vis. Optou-se nestes estudos por trabalhar com ACN como solvente, em função da solubilidade destes compostos e facilidade de evaporação deste solvente a baixa temperatura.

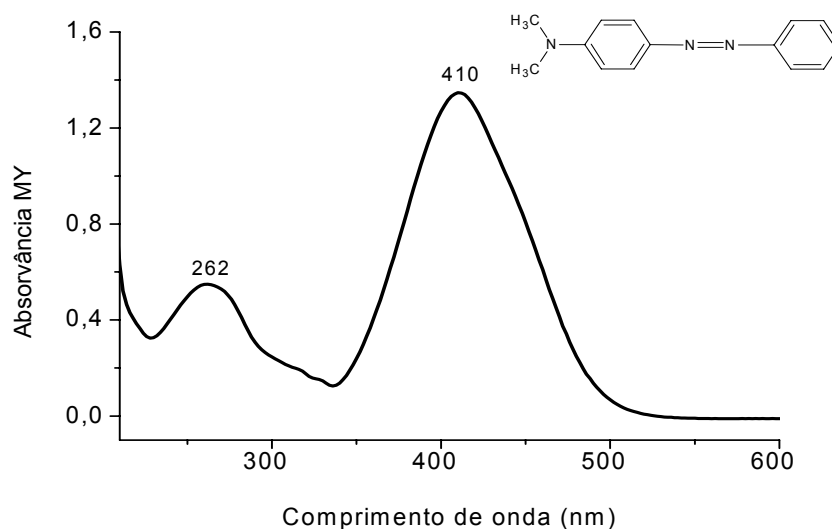
As Figuras 22, 23 e 24 mostram os espectros UV-Vis dos corantes DB3, DO3 e MY, respectivamente, em ACN, com bandas de absorção na região de 250 a 330 nm e na região de 400 nm.



**Figura 22.** Espectro UV-Vis de uma solução  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante DB3 em ACN.



**Figura 23.** Espectro UV-Vis de uma solução  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante DO3 em ACN.



**Figura 24.** Espectro UV-Vis de uma solução  $2,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> do corante MY em ACN.

A banda de absorção na região do visível é devido a uma transição  $n \rightarrow \pi^*$ , denominada de “banda azo”, e as bandas na região do UV são atribuídas a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  relacionado ao anel aromático (LI *et al.*, 2008; HSUEH; CHEN, 2007; LIU; SUN, 2007; HOU *et al.*, 2007; WANG, 2007; JAYAKANNAN, *et al.*, 2006).

Perfis espectroscópicos permitem a classificação dos azo compostos em três grandes subgrupos. Os principais parâmetros de classificação estão relacionados com a ordem relativa de energia das transições  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ , sensíveis à presença de substituintes doadores ou receptores de elétrons os quais alteram a densidade eletrônica do grupo azo e resultam, assim, em mudanças espectrais (RAU, 1990; 1988).

Esta classificação permite definir compostos do tipo azobenzeno no qual não há grupos substituintes, compostos do tipo aminoazobenzeno contendo, no mínimo, um grupo substituinte com um significativo caráter doador de densidade eletrônica ao grupo azo e, por último, os compostos do tipo pseudoestilbenos, nos quais



existem, no mínimo, dois grupos substituintes, um doador e outro retirador de densidade eletrônica (RIVERA *et al.*, 2006; SEKKAT; KNOLL, 1995; RAU, 1990).

Assim, como resultado dos grupos substituintes, os perfis espectrais dos corantes DB3 e MY (Figuras 22 e 24 respectivamente) podem ser classificados como do tipo aminobenzeno, enquanto que o DO3 pode ser incluído na classe do pseudoestilbeno.

Os coeficientes de absorvidade molar dos corantes foram determinados a partir da absorvância destes compostos para as várias soluções de concentração conhecida. Os valores de  $\epsilon$  encontrados estão na Tabela 6.

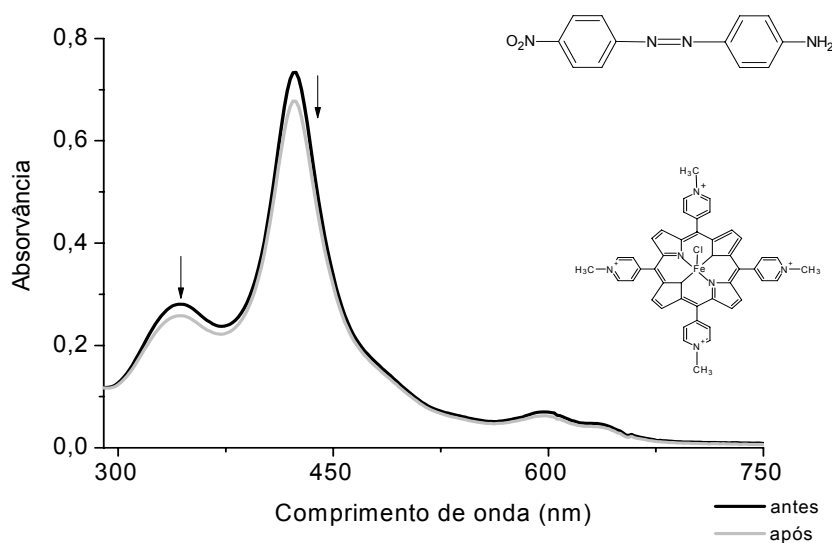
**Tabela 6.** Valores dos coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) e comprimento de onda máximo de absorção para os corantes DB3, DO3 e MY, em ACN.

Corante	$\lambda_{\text{max/nm}}$ ( $\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
DB3	420 ( $2,8 \times 10^4$ )
DO3	430 ( $8,5 \times 10^3$ )
MY	410 ( $3,8 \times 10^4$ )

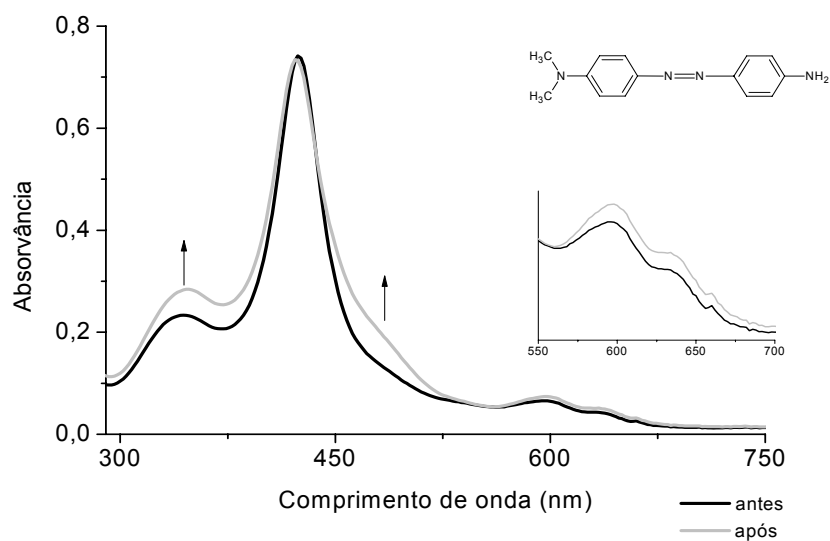
Após a caracterização espectroscópica das ferroporfirinas e corantes, foi realizado um estudo espectroscópico da FeTMPyP na presença dos corantes (e vice-versa) com o objetivo de verificar possíveis interações entre os dois compostos que pudessem bloquear o sítio catalítico da ferroporfirina. As moléculas dos corantes DO3, DB3 e MY possuem grupos que poderiam coordenar ao ferro da metaloporfirina (SANTOS, 2005; EVANS, 2000) e, com isso, impedir a reação desta com o oxidante, para formar a espécie catalítica. A escolha pela FeTMPyP para os estudo de interação se deve aos bons resultados catalíticos observados e a fácil solubilidade desta FeP em água.

Como pode ser observado nas Figuras 25, 26 e 27, não foi verificada nenhuma alteração significativa nos espectros da FeTMPyP com a adição dos corantes DO3, DB3 e MY.

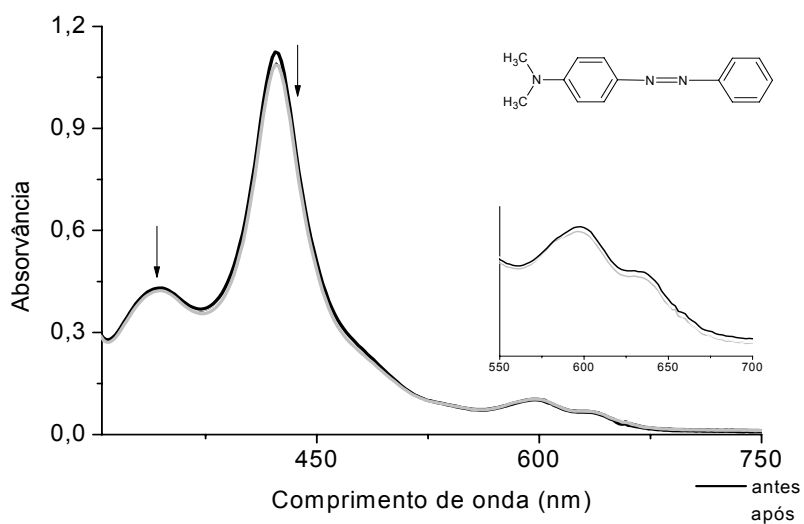
Nos espectros dos corantes DO3 (Figura 28) e MY (Figura 29) não foi observada nenhuma mudança com a adição da ferroporfirina, indicando que não ocorre interação entre o metal e o corante, ou qualquer outro tipo de interação entre estes compostos. No caso do DB3 (Figura 30) observa-se uma melhor definição da banda em 420 nm, com a adição da ferroporfirina, no entanto não há outras alterações nas bandas de absorção deste composto que indiquem interações significativas com a FeP.



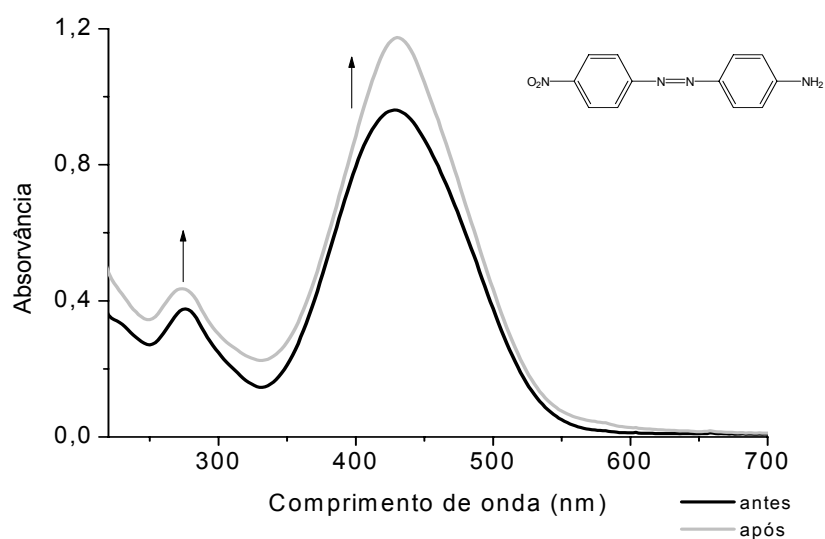
**Figura 25.** Espectros de absorção de uma solução  $3,0 \times 10^{-4}$  mol.L $^{-1}$  de FeTMPyP em H $_2$ O, antes e após a adição de quatro alíquotas de 10  $\mu$ L de uma solução  $1,5 \times 10^{-4}$  mol.L $^{-1}$  do corante DO3 em ACN.



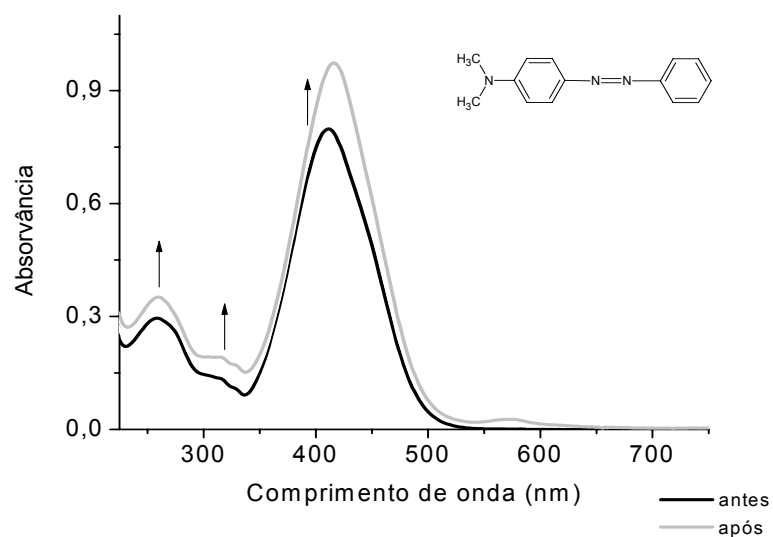
**Figura 26.** Variação do espectro de absorção de uma solução  $3,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de FeTMPyP em H<sub>2</sub>O, antes e após adição de quatro alíquotas de 10 μL de uma solução  $1,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> do corante DB3 em ACN. Em destaque a região de 550 a 700 nm, ampliada.



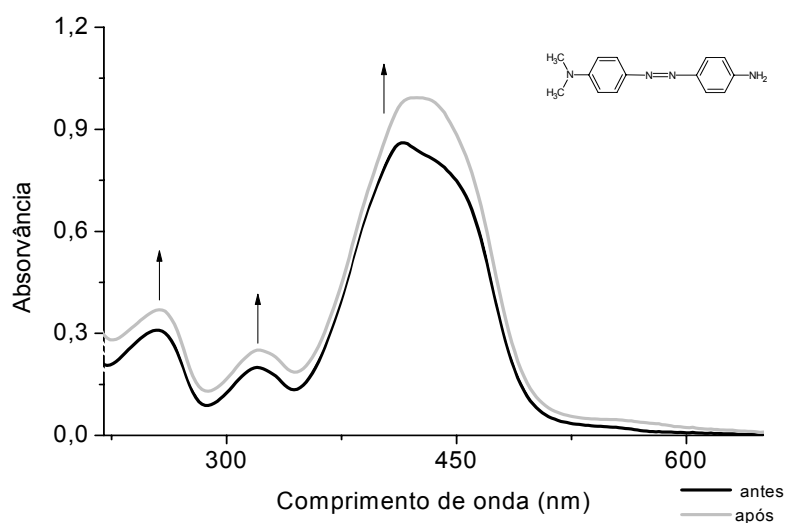
**Figura 27.** Variação do espectro de absorção de uma solução  $3,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de FeTMPyP em H<sub>2</sub>O, antes e após adição de quatro alíquotas de 10 μL de uma solução  $1,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> do corante MY em ACN. Em destaque a região de 550 a 700 nm ampliada.



**Figura 28.** Variação do espectro de absorção de uma solução  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante DO3 em ACN, antes e após adição de quatro alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  de uma solução  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  FeTMPyP em  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Figura 29.** Variação do espectro de absorção de uma solução  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante MY em ACN, antes e após adição de quatro alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  de uma solução  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  FeTMPyP em  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Figura 30.** Variação do espectro de absorção de uma solução  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante DB3 em ACN, antes e após adição de quatro alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  de uma solução  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  FeTMPyP em  $\text{H}_2\text{O}$ .

Conclui-se que não há competição entre o oxidante e o corante pela coordenação ao sítio metálico da FeP que resultasse em bloqueio do catalisador, ou mascaramento da banda de absorção do corante pela FeP, que pudesse interferir no monitoramento da reação de oxidação por espectroscopia UV-Vis.

#### 4.4. Estudo por espectroscopia UV-Vis da oxidação dos corantes catalisada pelas ferroporfirinas

Os estudos da atividade catalítica das metaloporfirinas na oxidação dos corantes foram realizados utilizando metaloporfirinas solúveis e insolúveis em água e FeTMPyP ancorada na argila montmorilonita.

Inicialmente os estudos de oxidação destes corantes foram desenvolvidos nas mesmas condições estabelecidas como padrão pelo grupo em trabalhos anteriores (SILVA FILHO *et al.*, 2005; FARIA *et al.*, 2004; SCHIAVON, *et al.*, 2001), nos quais a

razão molar FeP : oxidante : substrato era de 1 : 100 : 2000. Em consequência dos baixos rendimentos obtidos foram investigadas outras condições, sendo a relação molar otimizada para 1 : 60 : 10 em ACN: H<sub>2</sub>O 3:1 (v:v).

A escolha pelo TBHP como oxidante inicial nos estudos da oxidação dos corantes pelos diversos catalisadores se deve aos bons resultados descritos na literatura na oxidação de vários substratos com este composto (RAYATI *et al.*, 2008; MAHDAVI *et al.*, 2008; RAYATI *et al.*, 2008; ESCOLA *et al.*, 2008) e, em especial, pelos trabalhos anteriores do grupo (GUEDES *et al.*, 2006; MACLEOD *et al.*, 2006; GUEDES *et al.*, 2005; GUEDES; MACLEOD *et al.*, 2005).

A oxidação dos corantes foi monitorada por espectroscopia UV-Vis pelo desaparecimento da banda de absorção máxima do corante na região de 400 nm (Tabela 5).

Foram realizadas reações branco na ausência do oxidante e na ausência da FeTMPyP. Não foi observada mudança no espectro UV-Vis do corante, indicando que o catalisador é essencial para promover a oxidação destes compostos.

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos.

**Tabela 7.** Porcentagem de oxidação dos corantes pelo TBHP na presença de diversas ferroporfirinas, monitoradas por espectroscopia UV-Vis.

Corantes	DB3	DO3	MY
Complexos			
FeTFPP	5	5	5
FeTCPP	99	98	99
FeTMPyP	98	98	99
FeP-K10	98	98	99

Condição de reação:  $1,25 \times 10^{-7}$  mol da FeP,  $7,5 \times 10^{-6}$  mol de TBHP e  $1,25 \times 10^{-6}$  mol de corantes em 2,0 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1)

Embora o complexo FeTFPP (catalisador de segunda geração) seja considerado eficiente na catálise de diversos substratos (FARIA *et al.*, 2008; MACLEOD, *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2005), não levou à alteração significativa nos espectros UV-Vis dos corantes na presença do TBHP, indicando que estes complexos metálicos não estavam promovendo a oxidação dos mesmos, pelo menos no que se refere à quebra da ligação azo. Ao contrário, os complexos com substituintes iônicos na periferia do anel porfirínico levaram ao desaparecimento quase completo da banda de absorção do corante (Tabela 7), indicando alterações significativas da estrutura do corante e/ou quebra da ligação azo. Estes resultados indicam que a presença de grupos iônicos é importante para favorecer a catálise, provavelmente devido a interações eletrostáticas catalisador/corante, deixando este substrato mais próximo do sítio ativo da ferroporfirina.

Outros oxidantes também foram avaliados nesses estudos. O iodosilbenzeno (PhIO), oxidante de dois elétrons, foi utilizado por ser um oxidante “padrão” dos sistemas catalíticos metaloporfirínicos (GROVES, 2006). Utilizou-se também o m-CPBA, um perácido solúvel em solventes orgânicos, NaClO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dois oxidantes solúveis em água. Os resultados de oxidação dos corantes pelos diferentes oxidantes, catalisados pela FeTMPyP são mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Porcentagem de degradação dos corantes por diversos oxidantes, na presença da FeTMPyP, em ACN:H<sub>2</sub>O (3:1).

Oxidantes	Corantes		
	DB3	DO3	MY
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35	42	50
m-CPBA	98	99	98
NaOCl	12	11	10
PhIO	70	69	73
TBHP	98	99	99

Condição de reação:  $1,25 \times 10^{-7}$  mol da FeTMPyP,  $7,5 \times 10^{-6}$  mol de oxidante e  $1,25 \times 10^{-6}$  mol de corantes em 2,0 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1)

Observa-se que todos os compostos foram capazes de oxidar os corantes, sendo o hipoclorito de sódio o menos eficiente.

Os relativamente altos rendimentos obtidos com PhIO, um oxidante simples (apenas um átomo de oxigênio) indicam que a reação segue o mecanismo geral proposto para as metaloporfirinas e outros substratos, envolvendo a espécie catalítica de alta valência,  $^{*+}PFe^{IV}=O$  (MACHADO *et al.*, 2008; GOTARDO *et al.*, 2006; GUEDES *et al.*, 2005).

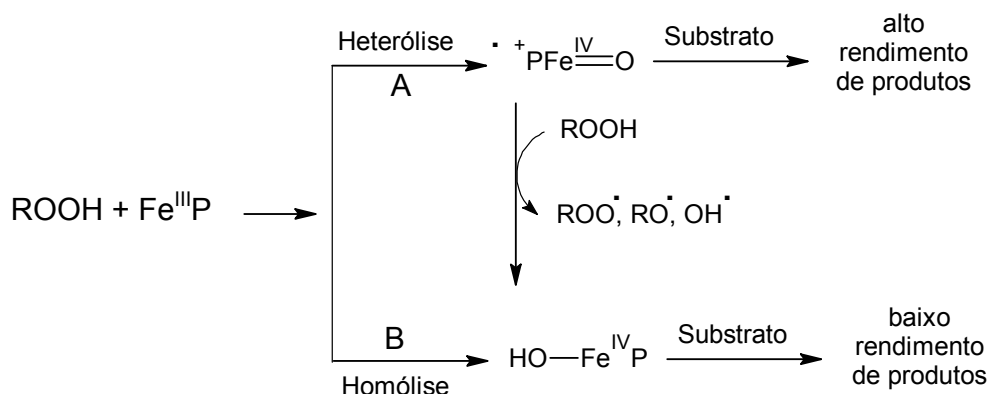
O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é o menos eficiente entre os peróxidos, provavelmente devido à decomposição deste oxidante catalisada pela FeP de maneira análoga à enzima catalase (MUKHERJEE; RAY, 2007; MASUOKA, *et al.*, 1996).

Os oxidantes TBHP e m-CPBA são capazes de oxidar praticamente 100 % dos corantes nestas condições.

De acordo com Nam e colaboradores (2000), oxidantes peróxidos, ao coordenarem ao metal central da metaloporfirina, podem sofrer cisão heterolítica da ligação O-O, que leva à formação da espécie oxidante de alta valência, radical ferril porfirina  $\pi$ -cátion,  $Fe^{IV}OP^{*+}$ , responsável por altos rendimentos de produtos oxidados (Figura 31, rota A). Pode ocorrer também cisão homolítica da ligação O-O, levando à



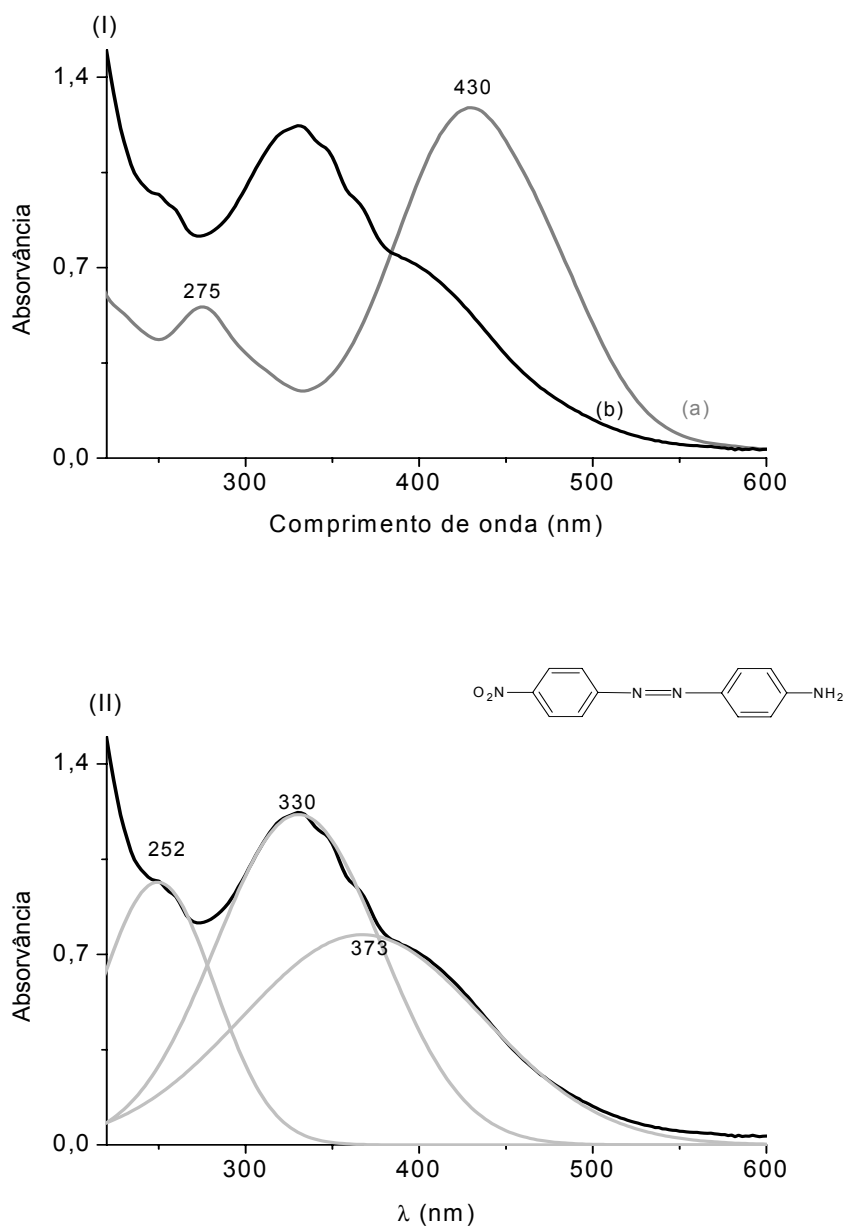
formação de um intermediário pouco reativo, o  $\text{FeP}^{\text{IV}}\text{-OH}$  (Figura 31, rota B), com baixos rendimentos de produtos e radicais  $\text{RO}^\bullet$ , favorecendo a ocorrência de mecanismos radicalares (NAM, 2000).



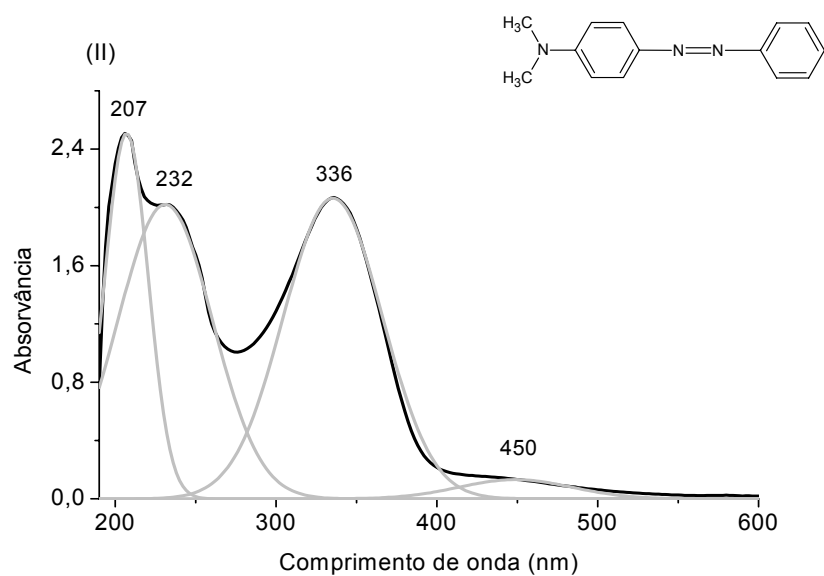
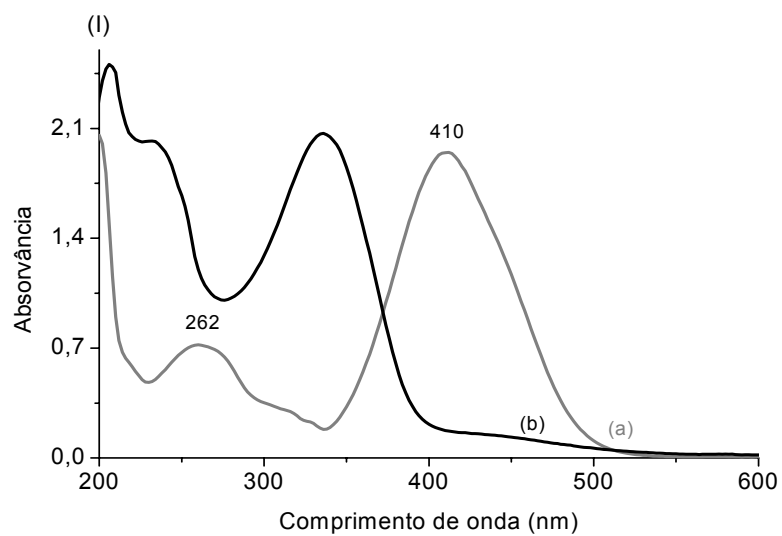
**Figura 31.** Possíveis caminhos para a reação da FeP com peróxidos (NAM, 2000).

Os altos rendimentos obtidos com o TBHP e m-CPBA indicam a predominância da rota A nas reações, ocorrendo, portanto a clivagem heterolítica da ligação O-O.

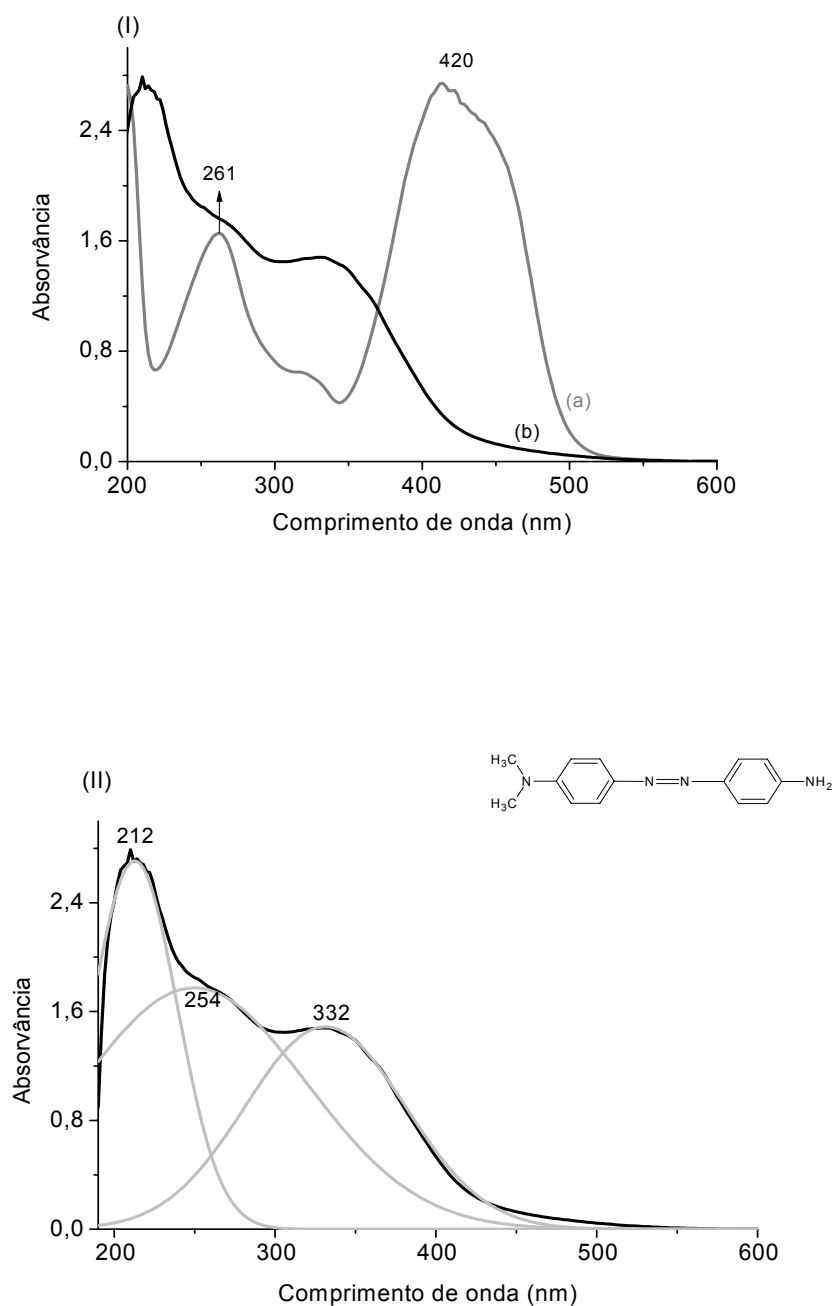
Os espectros UV-Vis das reações de oxidação dos corantes pelo TBHP, na presença da FeTMPyP, apresentaram, além do desaparecimento da banda de absorção na região de 400 nm, novas bandas e ombros sobrepostos, como pode ser observado nas Figuras 32, 33 e 34. Esses espectros foram submetidos à deconvolução gaussiana, com o objetivo de verificar a presença de bandas no comprimento de onda referentes ao grupo azo dos corantes estudados.



**Figura 32.** (I) Espectro UV-Vis da mistura de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante DO3 com  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  da FeTMPyP antes (a) e 2 h após a adição de  $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  do oxidante TBHP em ACN/H<sub>2</sub>O (3:1), (b). (II) Deconvolução do espectro da Figura 32 b.



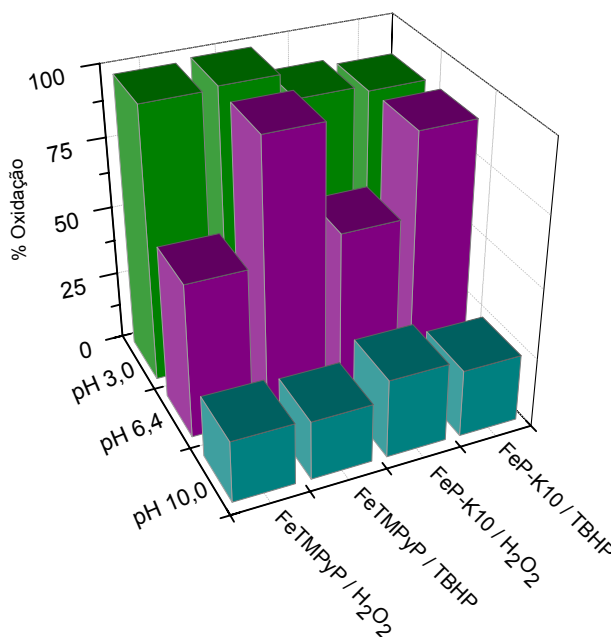
**Figura 33. (I)** Espectro UV-Vis da mistura de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante MY com  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  da FeTMPyP antes (a) e 2 h após a adição de  $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  do oxidante TBHP em ACN/H<sub>2</sub>O (3:1), (b). **(II)** Deconvolução do espectro da Figura 33 b.



**Figura 34. (I)** Espectro UV-Vis da mistura de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante DB3 com  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  da FeTMPyP antes (a) e 2 h após a adição de  $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  do oxidante TBHP em ACN/H<sub>2</sub>O (3:1), (b). **(II)** Deconvolução do espectro da Figura 34 b.

Como pode ser observado nas Figuras 32-33(II)b, não há qualquer indício das bandas de absorção do corante original após 2 h de reação com TBHP, indicando a obtenção de produtos que apresentam novas bandas de absorção na região abaixo de 400 nm.

A oxidação de corantes azo é normalmente muito sensível ao pH, devido à presença de átomos de nitrogênio com diferentes caráter básico. Em baixos valores de pH a oxidação acontece preferencialmente no grupo azo, principalmente em meio fortemente oxidante, enquanto que em altos valores de pH a oxidação ocorre preferencialmente no grupo amina, mais básico (OAKES; GRATTON, 1998; PENTIMALLI, 1959). Devido a este comportamento, foi estudado a influência do pH na oxidação do corante DO3 em três condições: 3,0; 6,4 e 10,0, utilizando dois oxidantes, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o TBHP e na presença da FeTMPyP e FeP-K10. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 35.



**Figura 35.** Porcentagem de oxidação do corante DO3 pelo TBHP e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença da FeTMPyP e FeP-K10 em ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:2) em pH 3,0; 6,4 e 10,0.

Observa-se que em pH 3,0 a porcentagem de oxidação foi maior que 90 % para ambos oxidantes e catalisadores, enquanto que apenas cerca de 25 % do corante foi oxidado em pH 10,0 para ambos os oxidantes nos dois sistemas estudados. Estes resultados mostram que a protonação do nitrogênio do grupo azo

é um importante passo no processo de degradação, como foi relatado em estudos anteriores (OAKES; GRATTON, 1998; PENTIMALLI, 1959). Também foi possível observar que o oxidante  $H_2O_2$  é mais eficiente em baixos valores de pH.

Como discutido anteriormente, quando se utiliza um peróxido é possível a ocorrência de dois mecanismos para a ativação do oxigênio: um mecanismo que envolve a clivagem homolítica da ligação O-O, com formação de  $RO\cdot$  e de intermediários pouco reativos,  $PFe^{IV}-OH$ , e outro que envolve a clivagem heterolítica da ligação O-O, com formação da espécie ativa  $^{*+}PFe^{IV}=O$ , que é responsável por altos rendimentos na catálise. A clivagem heterolítica da ligação O-O é favorecida pela protonação do O terminal, ajudando a estabilizar a separação de cargas no estado de transição, com formação da espécie  $^{*+}PFe^{IV}=O$ , mais reativa, explicando os altos rendimentos de oxidação com o abaixamento do pH do meio (NAM *et al.*, 2000a; NAM *et al.*, 1999; YANG; NAM, 1998).

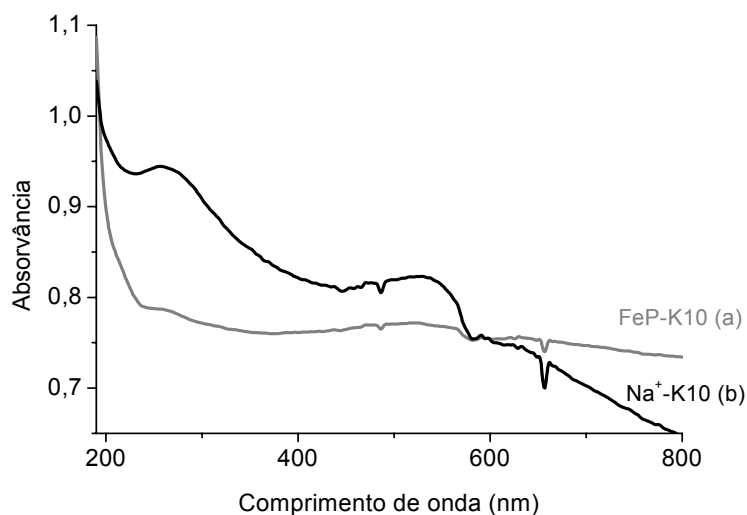
A influência do pH é pequena para o TBHP, mostrando que a presença dos substituintes ligados ao grupo  $-OOH$  exerce maior efeito na catálise.

Em pH 10,0 os resultados com ambos oxidantes são semelhantes. Em altos valores de pH existe o predomínio da homólise, que resulta em espécies radicalares e intermediários  $PFe^{IV}-OH$ , os quais apresentam baixa reatividade.

Observa-se também na Figura 35 que a FeP-K10 é tão eficiente quanto a FeTMPyP (em solução) em promover a oxidação do corante. No caso da FeP-k10, para comprovar que o desaparecimento da banda do corante era devido à sua oxidação e não pela adsorção do mesmo no sólido, foram realizadas reações controle na ausência do catalisador (apenas com a FeP-K10) e na ausência do oxidante.

Nas reações na presença da Na<sup>+</sup>-K10 e ausência da FeTMPyP observou-se que parte do corante é adsorvido pela argila, deixando este sólido com a mesma cor da solução do corante. Não houve mudança, contudo, na coloração do sobrenadante. A alta capacidade de troca catiônica da montmorilonita favorece a adsorção do corante, mantendo intacta, no entanto, a estrutura da molécula na ausência do catalisador. Espectro UV-Vis da Na<sup>+</sup>-K10 isolada após reação mostrou a presença da banda de absorção do corante na região de 400 nm, provando que o processo de oxidação ocorre somente na presença da FeP (Figura 36).

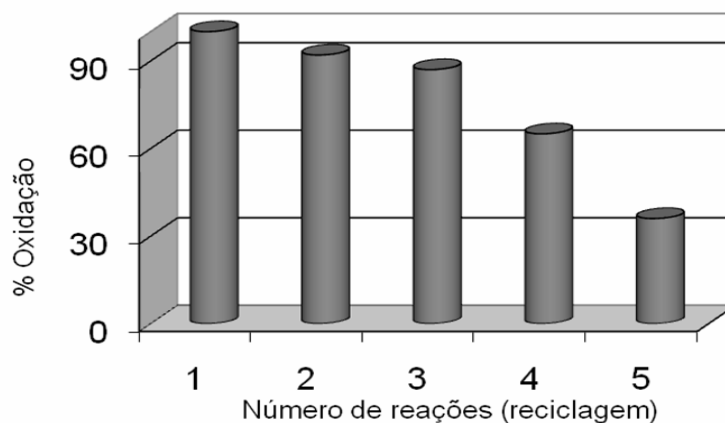
Espectro UV-Vis do catalisador sólido isolado (FeP-K10) após reação não apresentou nenhuma banda de absorção do corante DO3 (Figura 36a), comprovando também que a diminuição da banda de absorção do mesmo é devido à catálise pela FeP-K10 e não pela sua adsorção na superfície da montmorilonita.



**Figura 36.** Espectro UV-Vis da suspensão do corante DO3 em ACN / H<sub>2</sub>O (1:2), pH 3,0, após 6 h de reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de FeP-K10 (a) e Na<sup>+</sup>-K10 (b).

A estabilidade da FeP-K10 e a possibilidade de reutilização do catalisador foram investigadas por meio de cinco reações de reciclagem, nas quais o catalisador, após cada reação, foi recuperado por filtração, lavado e usado em uma

nova reação de oxidação. A FeP-K10 mostrou bons resultados até a quinta reação (Figura 37). Além de comprovar a estabilidade do catalisador, estes resultados mostram mais uma vez que a oxidação do corante é um processo catalítico.



**Figura 37.** Reações de reciclagem da FeP-K10 na oxidação do corante DO3 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ACN / H<sub>2</sub>O (1:2), pH 3,0.

#### **4.5. Desenvolvimento do método de análise dos corantes e seus produtos de oxidação por CLAE-UV.**

Após os estudos de oxidação dos corantes por espectroscopia UV-Vis, foi necessário o desenvolvimento de métodos de análise por CLAE-UV para identificação dos produtos de oxidação desses compostos.

A cromatografia líquida em fase reversa utiliza fase estacionária não polar, sílica quimicamente ligada a grupos apolares, e fase móvel polar. Sua utilização tem se intensificado desde 1974, quando surgiram materiais comercialmente confiáveis para a fase reversa, e hoje é a técnica mais utilizada em CLAE. Uma das vantagens



é a utilização de água (ou solução tampão) como um dos eluentes, diminuindo a exposição dos analistas a compostos tóxicos (CASS; DEGANI, 2001).

A escolha da fase móvel é de extrema importância na separação dos analitos, devido a interação que ocorre entre ambos, resultando em um efeito significativo no tempo de retenção dos compostos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a não interferir na detecção dos analitos de interesse, não absorver radiação UV no comprimento de onda selecionado, manter a capacidade tamponante no decorrer das análises e estabilizar as espécies iônicas de interesse.

Para a análise dos produtos de oxidação dos corantes é necessário extrair os catalisadores do meio de reação, pois não se pode injetar na coluna cromatográfica complexos metálicos, uma vez que esses compostos podem interagir com o material da coluna, danificando-a. A extração foi realizada levando-se a solução à secura, e solubilizando o resíduo em clorofórmio, seguida de filtração do extrato. A metaloporfirina não é solubilizada neste meio e fica retida no filtro. Em seguida o solvente foi evaporado e os produtos da reação foram solubilizados em ACN.

Para verificar a eficiência do método de extração e, conseqüentemente, do método de análise, foram preparadas soluções de concentração conhecida dos corantes e da (4-nitroanilina) PNA, um possível produto de oxidação dos corantes, e injetou-se no CLAE após o processo de extração.

Os corantes e a PNA apresentaram recuperações próximas de 94 %, estando de acordo com os valores aceitos para a validação analítica.

A escolha dos solventes para fase móvel foi baseada em diversos métodos descritos na literatura (PIELESZ *et al.*, 2002; CHIVUKULA *et al.*, 1995) e otimizada variando a força de eluição da fase móvel.

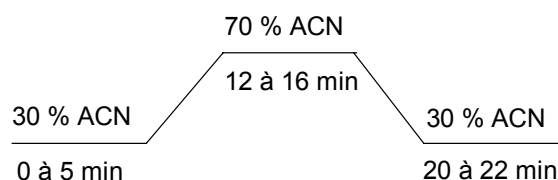
Inicialmente todos os possíveis produtos foram injetados isoladamente no CLAE-UV, utilizando como fase móvel a mistura H<sub>2</sub>O e ACN em condição gradiente, coluna cromatográfica C<sub>18</sub>, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e análise dos compostos em 320 nm.

A escolha do gradiente foi realizada por tentativas, variando-se as proporções de água Milli-Q e ACN durante a análise, visando à resolução cromatográfica de todos os picos.

Verificou-se que os compostos como a PNA são mais polares que o corante e interagem pouco com a coluna, sendo eluídos rapidamente. Para aumentar a interação desses compostos mais polares com a fase estacionária diminui-se o caráter apolar da fase móvel. A porcentagem ótima de ACN na mistura foi de 30 % nos primeiros 5 minutos. No entanto, os corantes apresentaram maior interação com a coluna nestas condições, sendo eluídos tardiamente, e aumentando o tempo de análise. Assim, optou-se por aumentar o caráter apolar da fase móvel de forma lenta e gradual, para que a variação da linha de base não prejudicasse a análise. Ao final o equilíbrio da coluna era restabelecido com o retorno da proporção de ACN para a condição inicial de 30 % (Figura 38).

Temperatura: 30 °C

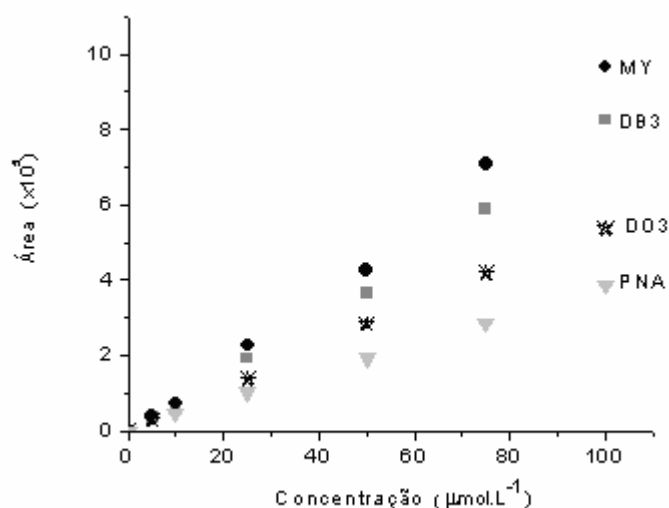
Tempo de análise: 22 min



**Figura 38.** Condição gradiente utilizada para análise dos corantes e seus produtos de oxidação por CLAE-UV.

Foram desenvolvidas curvas de calibração apenas para os corantes. Não foram traçadas curvas para os possíveis produtos de oxidação por não possuímos os padrões. Foram preparadas cinco soluções de cada corante, em ACN, com concentrações variando de  $5 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>.

As curvas de calibração foram feitas lançando na abscissa a concentração do corante e na ordenada as áreas do pico obtidas nos respectivos cromatogramas, conforme mostra a Figura 39.



**Figura 39.** Curvas de calibração para a PNA e os corantes DO3, DB3 e MY.

A equação da reta obtida para a padronização dos corantes e a PNA são mostradas abaixo.

$$A_{\text{PNA}} = 5,4 \cdot 10^9 \times [\text{PNA}] \quad (R = 0,9998)$$

$$A_{\text{DO3}} = 8,7 \cdot 10^9 \times [\text{DO3}] \quad (R = 0,9998)$$

$$A_{\text{MY}} = 9,4 \cdot 10^9 \times [\text{MY}] \quad (R = 0,9997)$$

$$A_{\text{DB3}} = 7,5 \cdot 10^9 \times [\text{DB3}] \quad (R = 0,9998)$$

A quantificação dos produtos foi feita com base na proporção molar 1:60:10 de catalisador:oxidante:substrato utilizada nas reações, levando em consideração que o limitante da reação é a quantidade de corante ( $1,25 \times 10^{-6}$  mol;  $6,25 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>). Desta forma, a diferença da concentração inicial e final do corante fornece a porcentagem que foi convertido em produto.

Os tempos de retenção dos corantes DB3, DO3 e MY e da PNA são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Tempo de retenção dos compostos analisados por CLAE-UV.

Composto	Tempo de retenção (min)
DB3	11,0
DO3	12,6
MY	12,4
PNA	3,6

Coluna C18, fase móvel ACN/H<sub>2</sub>O (3:1), eluição gradiente conforme Figura 38

#### **4.6. Análise dos produtos da oxidação dos corantes por TBHP catalisada pela FeTMPyP e FeP-K10**

Os estudos de oxidação dos corantes catalisada pelas metaloporfirinas, monitorado por CLAE-UV, foram realizados em meio de ACN e H<sub>2</sub>O (3:1), nas mesmas condições estabelecidas como padrão para os estudos monitorados por espectroscopia UV-Vis, ou seja, na proporção molar 1:60:10 de catalisador:oxidante:substrato, utilizando-se  $1,25 \times 10^{-7}$  mol de catalisador,  $7,5 \times 10^{-6}$  mol de oxidante e  $1,25 \times 10^{-6}$  mol de substrato, em 2 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1).

Inicialmente foram realizados os estudos das reações em pH 3,0, utilizando como oxidante o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a FeTMPyP como catalisador, devido aos bons resultados observados na análise por UV-Vis e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ser um oxidante barato e limpo.

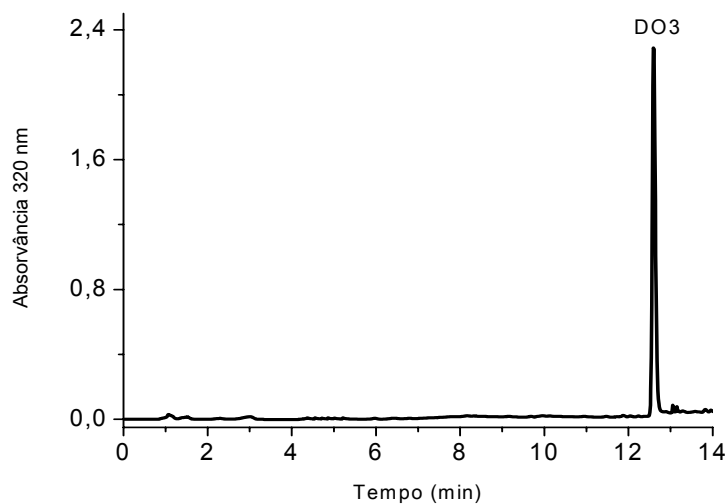
No entanto, os cromatogramas obtidos por CLAE-UV e também por CG-EM das reações dos corantes com  $\text{H}_2\text{O}_2$  neste pH apresentaram uma quantidade extremamente elevada de picos, a maioria de baixa intensidade, dificultando a identificação dos compostos. Ainda assim foi possível detectar entre os produtos a presença de 4-nitrofenol, 4-nitroanilina e 1,4-benzenodiol, indicando que ocorre a quebra da ligação azo nestas condições de pH. Diversas tentativas em melhorar as condições de análise foram realizadas, mas não se obteve sucesso. Assim, optou-se por trabalhar em pH 6,4 e utilizar como oxidante o TBHP, condições que também levaram a bons resultados catalíticos conforme estudado por UV-Vis.

### ***Corante disperso alaranjado 3 (DO3)***

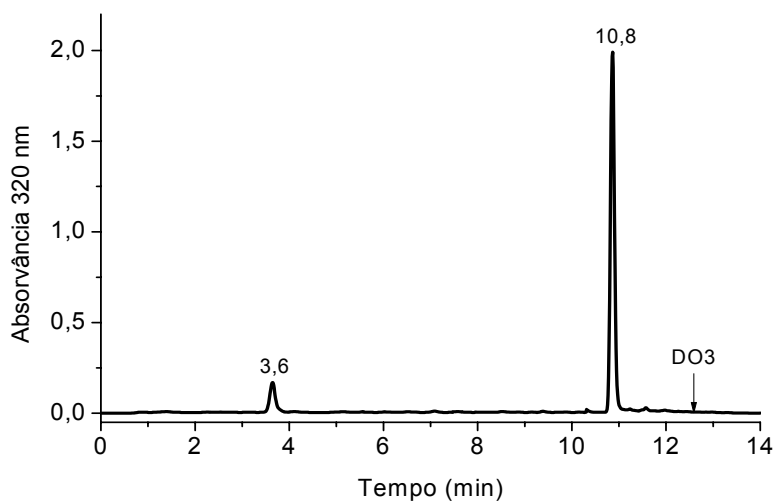
Inicialmente foram realizadas reações controle, na ausência do catalisador e do oxidante, e analisadas por CLAE-UV. Não se observou a formação de produtos na ausência de catalisador e na ausência de oxidante, conforme mostra a Figura 40.

Na reação do corante DO3 com TBHP, utilizando como catalisador a FeTMPyP, observou-se a formação de dois produtos (Figura 41) com tempo de retenção em 3,6 e 10,8 min, sendo este último o produto obtido em maior quantidade.

Este cromatograma foi comparado com aqueles obtidos para a amostra padrão da 4-nitroanilina (3,6 min) e do corante DO3 (12,6 min), o que permitiu identificar o produto com  $t_r = 3,6$  min como a PNA.



**Figura 40.** Cromatograma da reação do corante DO3 utilizando como oxidante o TBHP na ausência da FeTMPyP em meio de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1).

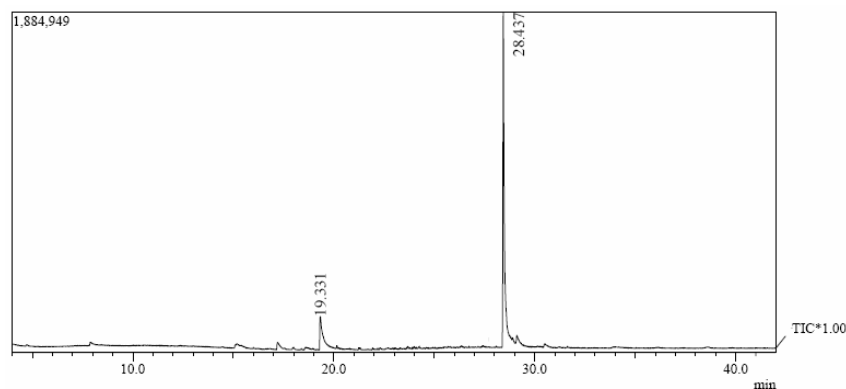


**Figura 41.** Cromatograma da reação do corante DO3 com TBHP catalisada pela FeTMPyP, fase móvel gradiente de ACN e H<sub>2</sub>O.

Para auxiliar na identificação do composto com tempo de retenção em 10,8 min foram realizadas análises por CG-EM e por CLAE-EM.

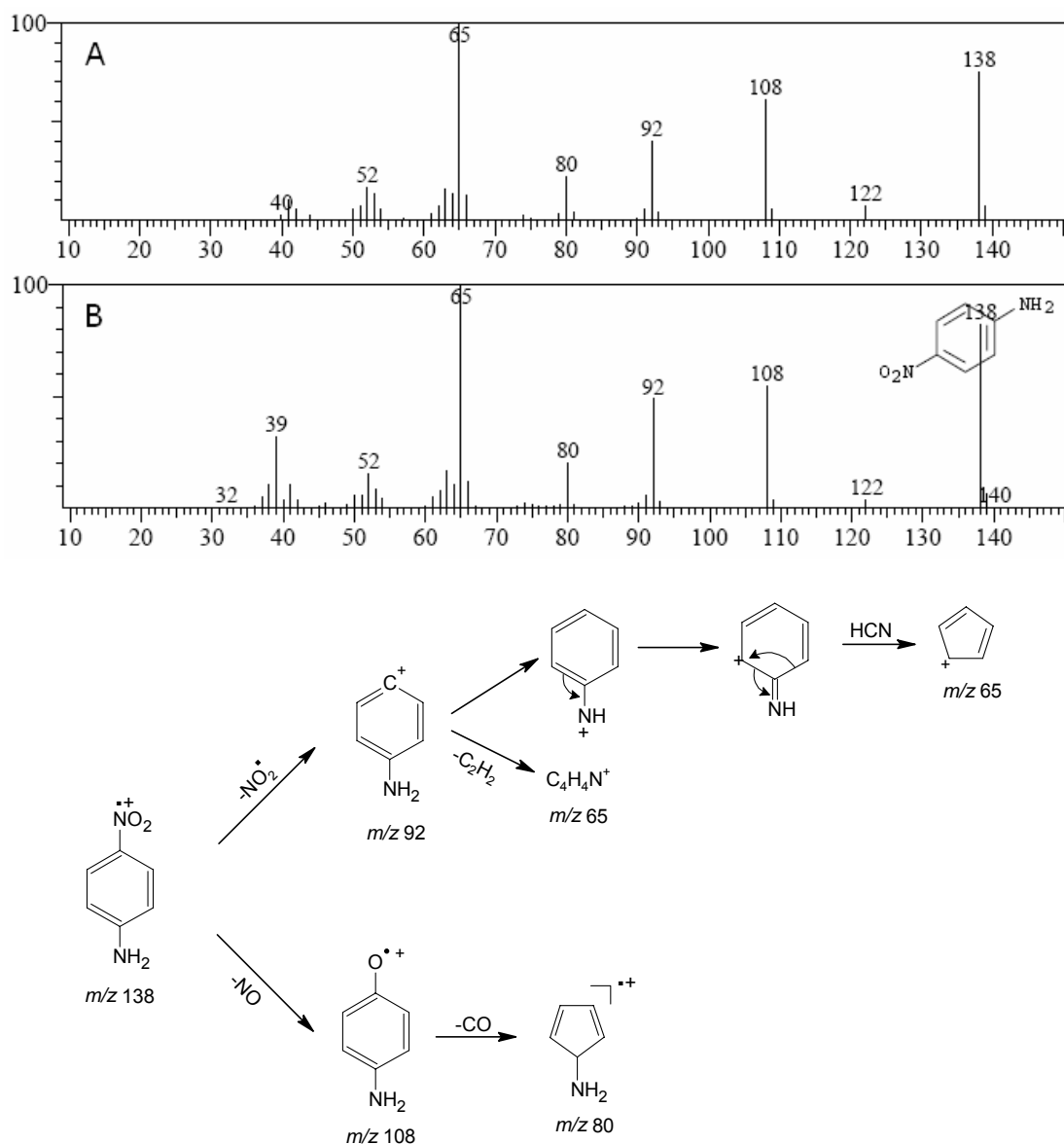
A Figura 42 mostra o cromatograma CG-EM da reação do corante DO3 com TBHP na presença da FeTMPyP. Assim como na análise por CLAE-UV, a análise

por CG-EM também mostrou a presença de dois picos com tempos de retenção de 19,3 min e 28,4 min.



**Figura 42.** Cromatograma CG-EM da reação do corante DO3 com o TBHP, na presença da FeTMPyP.

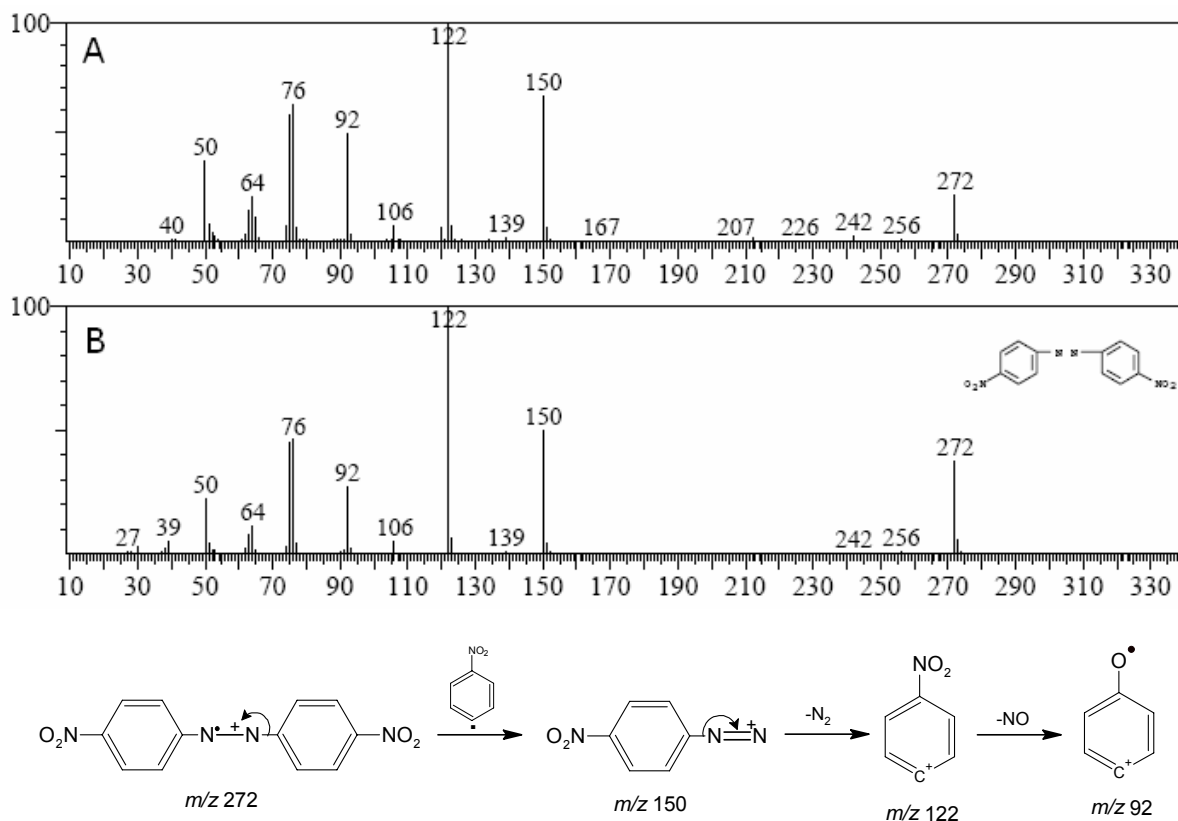
O pico observado em 19,3 min foi comparado com aquele obtido para a amostra padrão da PNA e com a biblioteca NIST, com similaridade de 95 %, sendo referente à PNA. A Figura 43A mostra o espectro de massas do composto eluído em 19,3 min e a Figura 43B mostra o banco de dados da biblioteca de espectros NIST e os principais fragmentos esperados para a PNA. A concordância dos fragmentos obtidos e dos tempos de retenção confirma uma vez mais que este produto eluído em 19,3 min no CG-EM (e em 3,6 min no CLAE-UV) corresponde à PNA.



**Figura 43.** Espectro de massas: A) composto eluído em  $t_r = 19,3$  min no CG; b) banco de dados da biblioteca de espectros NIST, similaridade de 95 %, e os principais fragmentos esperados para a PNA.

O espectro de massas do composto eluído como segundo pico no CG, com tempo de retenção em 28,4 min, foi comparado com a biblioteca NIST. A Figura 44A, mostra o espectro de massas do composto eluído em tempo de retenção 28,4 min e a Figura 44B mostra o banco de dados da biblioteca NIST, para o 4,4'-dinitroazobenzeno, similaridade de 91 %, e os principais fragmentos esperados para este composto.

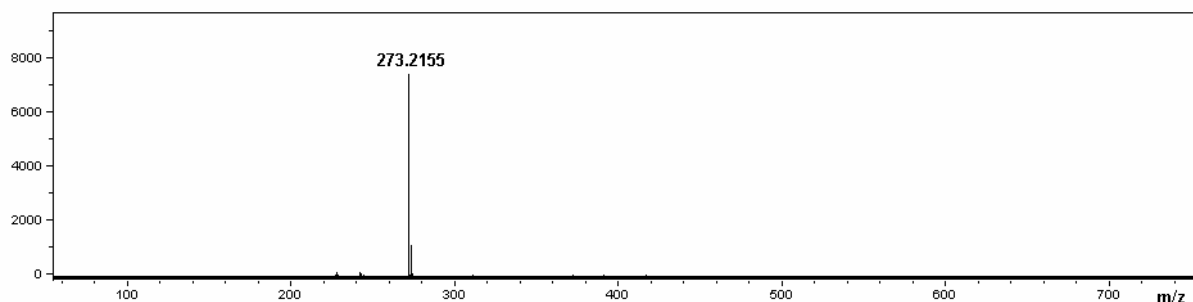




**Figura 44.** Espectro de massas: A) composto eluído com  $t_r = 28,4$  min no CG; b) banco de dados da biblioteca de espectros NIST, similaridade de 91 % e os principais fragmentos esperados para o 4,4'-dinitroazobenzeno.

A boa concordância do espectro de massas obtido e dos fragmentos esperados para o 4,4'-dinitroazobenzeno permite identificar este produto como responsável pelo pico em 28,4 min no cromatograma CG da mistura de reação.

Para confirmar a estrutura proposta para este produto também foi realizada a análise por CLAE-EM. O perfil do cromatograma do CLAE-EM é semelhante ao observado por CLAE-UV, e o espectro de massas para o produto referente ao pico com tempo de retenção em 10,8 min forneceu um íon (sinal) de  $m/z$  273, o qual corresponde à molécula protonada  $(M+H)^+$  do 4,4'-dinitroazobenzeno, uma vez que as análises foram realizadas no modo positivo (Figura 45).



**Figura 45.** Espectro de massas referente ao composto eluído em tempo de retenção 10,8 min no CLAE.

Como conclusão de todas as análises realizadas, pode-se atribuir os picos observados por CLAE-UV como sendo a PNA ( $t_r = 3,6$  min) e o 4,4'-dinitroazobenzeno ( $t_r = 10,8$  min), obtidos pela oxidação do corante DO3 por TBHP, catalisada pela FeTMPyP.

A Tabela 10 mostra os tempos de retenção no CG e CLAE, íon molecular e a fragmentação do corante DO3 e seus produtos de oxidação.

**Tabela 10.** Tempo de retenção, íon molecular e fragmentação do corante DO3 e seus produtos de oxidação catalisada pela FeTMPyP.

Composto	$t_r$ (min)		Íon molecular	m/z (Intensidade relativa, %)
	CLAE-UV	CG		
corante DO3	12,6	29,0	242	242 (20), 212 (22), 120 (35), 92 (100), 65 (51)
PNA	3,6	19,3	138	138 (75), 122 (12), 108 (67), 92 (41), 80 (21), 65 (100)
4,4'-dinitroazobenzeno	10,8	28,4	272	272 (22), 150 (68), 122 (100), 92 (50), 76 (63)

Após a identificação foi realizada a quantificação dos produtos gerados.

A Tabela 11 mostra os resultados das reações de oxidação do DO3 em termos dos rendimentos dos produtos.

**Tabela 11.** Porcentagem de produtos formados na oxidação do corante DO3 nos diferentes sistemas catalíticos, após 2 h de reação.

Condição	Porcentagem de produto formado	
	4-nitroanilina	4,4'-dinitroazobenzeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /FeTMPyP	12	33
TBHP/FeTMPyP	17	79
TBHP/FeP-K10	15	83
TBHP/ausência O <sub>2</sub> /FeTMPyP	18	78

Condição: corante DO3 ( $1,25 \times 10^{-6}$  mol); oxidante ( $7,5 \times 10^{-6}$  mol); FeTMPyP ( $1,25 \times 10^{-7}$  mol) em 2 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1).

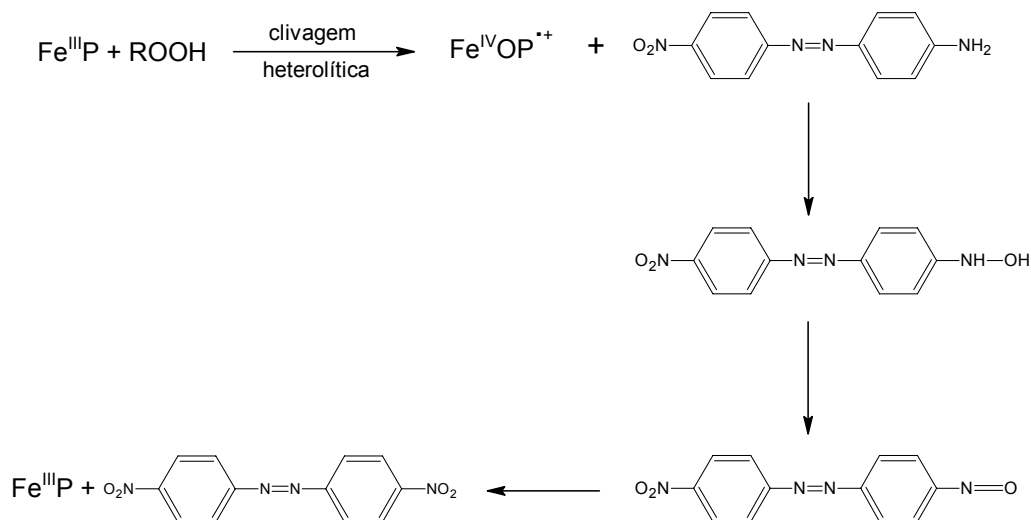
Os altos rendimentos com o TBHP na presença da FeTMPyP e da FeP-K10 para a formação do composto 4,4'-dinitroazobenzeno comprovam que a diminuição da banda de absorção do corante referente ao grupo azo, observado nos estudos por espectroscopia UV-Vis, não está associada à destruição deste grupo e, sim, oxidação do substituinte amina ligado ao anel benzênico. Trabalhos da literatura (SUNG-SUH *et al.*, 2004; WU *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 1998) confirmam alterações nos espectros UV-Vis durante processo de catálise de corantes podem estar associados à mudança dos grupos ligados ao anel benzênico e não à destruição do grupo cromóforo.

Uma importante evidência de mecanismo radicalar em reações catalisadas por metaloporfirinas é a influência do oxigênio na reação. O oxigênio em solução reage com radicais gerados pela FeP, aumentando o número de espécies radicalares e ocasionando um maior rendimento para os produtos provenientes desse tipo de reação (GROVES, 1994). A FeP, neste caso, atuaria apenas como um iniciador da reação radicalar.

Em sistemas com baixa concentração de oxigênio espera-se que ocorra uma diminuição dos produtos provenientes do mecanismo radicalar e que haja uma maior formação de produtos via intermediário ferroporfirínico. Como mostra a Tabela 11, os resultados obtidos na reação na ausência e presença de O<sub>2</sub> são semelhantes, evidenciando que a oxidação do DO3 por TBHP ocorre via espécie catalítica de alta valência,  $\cdot^+PFe^{IV}=O$  não envolvendo mecanismo radicalar.

Estudos mostram que a PNA é um dos produtos da oxidação do corante DO3 *in vitro* catalisada por sistemas que envolvem enzimas lignolíticas / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do fungo *Ostreatus Pleurotus* (ZHAO *et al.*, 2006; 2007). Assim, o sistema estudado é um bom modelo desta classe de enzimas.

A Figura 46 mostra o esquema reacional proposto para a oxidação do corante DO3 catalisada pela FeTMPyP nas condições estabelecidas nesse estudo.



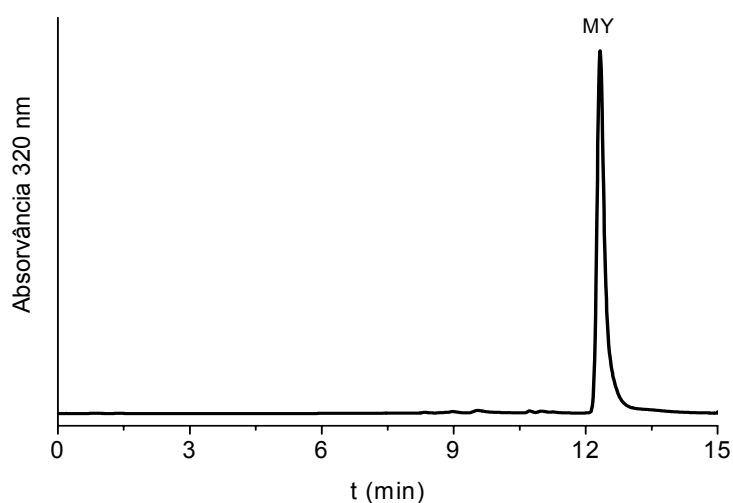
**Figura 46.** Esquema proposto para a oxidação do corante DO3 catalisada pela FeTMPyP.

Como discutido anteriormente no item 4.4, oxidantes peróxidos, ao coordenarem ao metal central da ferroporfirina, podem sofrer cisão heterolítica da ligação O-O, que leva à formação da espécie oxidante, radical ferril porfirina  $\pi$ -

cátion,  $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{OP}^{*+}$  (NAM, 2000). O oxigênio mais eletrofílico pode ser transferido para a diamina, de maneira similar ao observado com complexo molibdênio oxo diperoxido (PORTA *et al.*, 1996), gerando um intermediário hidroxilamino (Figura 47), que pode ser facilmente oxidado ao grupo nitro, como já foi observado para aminas aromáticas (KUHN; HERRMANN, 2000; PORTA *et al.*, 1996).

### **Corante disperso amarelo de metila (MY)**

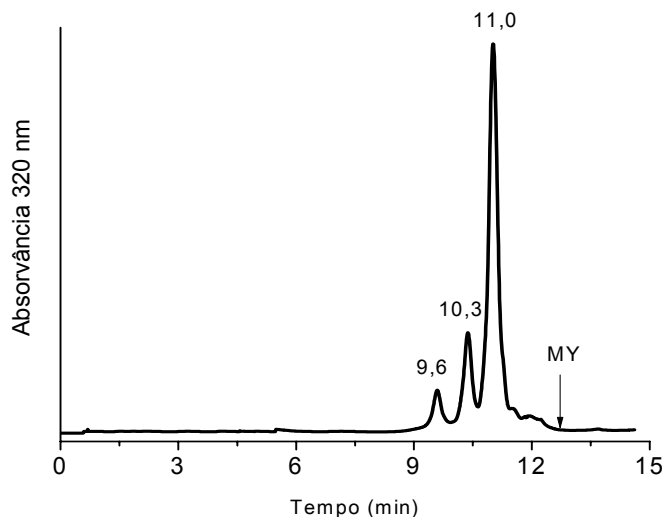
Foram realizadas reações controle na ausência do catalisador e do oxidante e analisadas por CLAE-UV. Não se observou a formação de produtos na ausência de catalisador e na ausência de oxidante, conforme mostra a Figura 47.



**Figura 47.** Cromatograma da reação do corante MY ( $t_r = 12,4$  min) utilizando como oxidante o TBHP na ausência da FeTMPyP em meio de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1).

Na reação do corante MY com TBHP utilizando como catalisador a FeTMPyP observou-se a formação de três produtos (Figura 48), com tempos de retenção em 9,6; 10,3 e 11,0 min, sendo este último o produto obtido em maior quantidade.

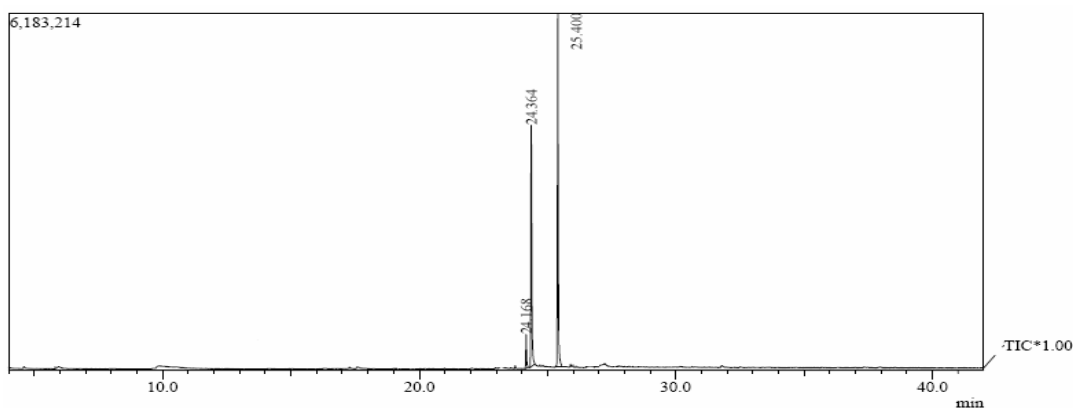
A comparação com o cromatograma da amostra autêntica da PNA (3,6 min) nas mesmas condições indicou a ausência deste produto.



**Figura 48.** Cromatograma CLAE-UV da reação do corante MY com o TBHP, na presença da FeTMPyP.

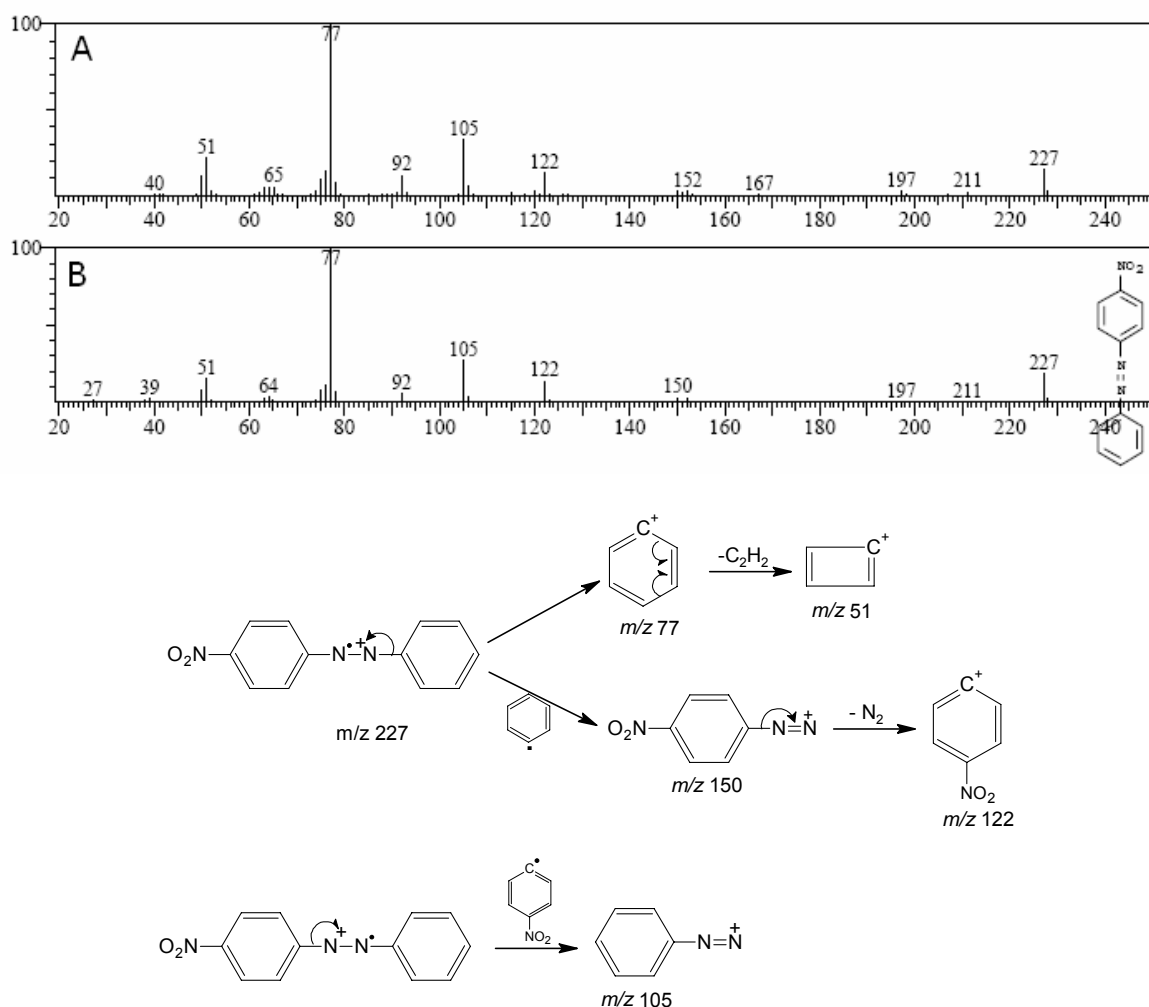
Para auxiliar na identificação dos três compostos, foram realizadas análises por CG-EM e por CLAE-EM.

A Figura 49 mostra o cromatograma CG-EM da reação do corante MY com TBHP na presença da FeTMPyP. Assim como na análise por CLAE-UV, a análise por CG-EM também mostrou a presença de três picos com tempos de retenção de 24,1; 24,3 e 25,4 min.

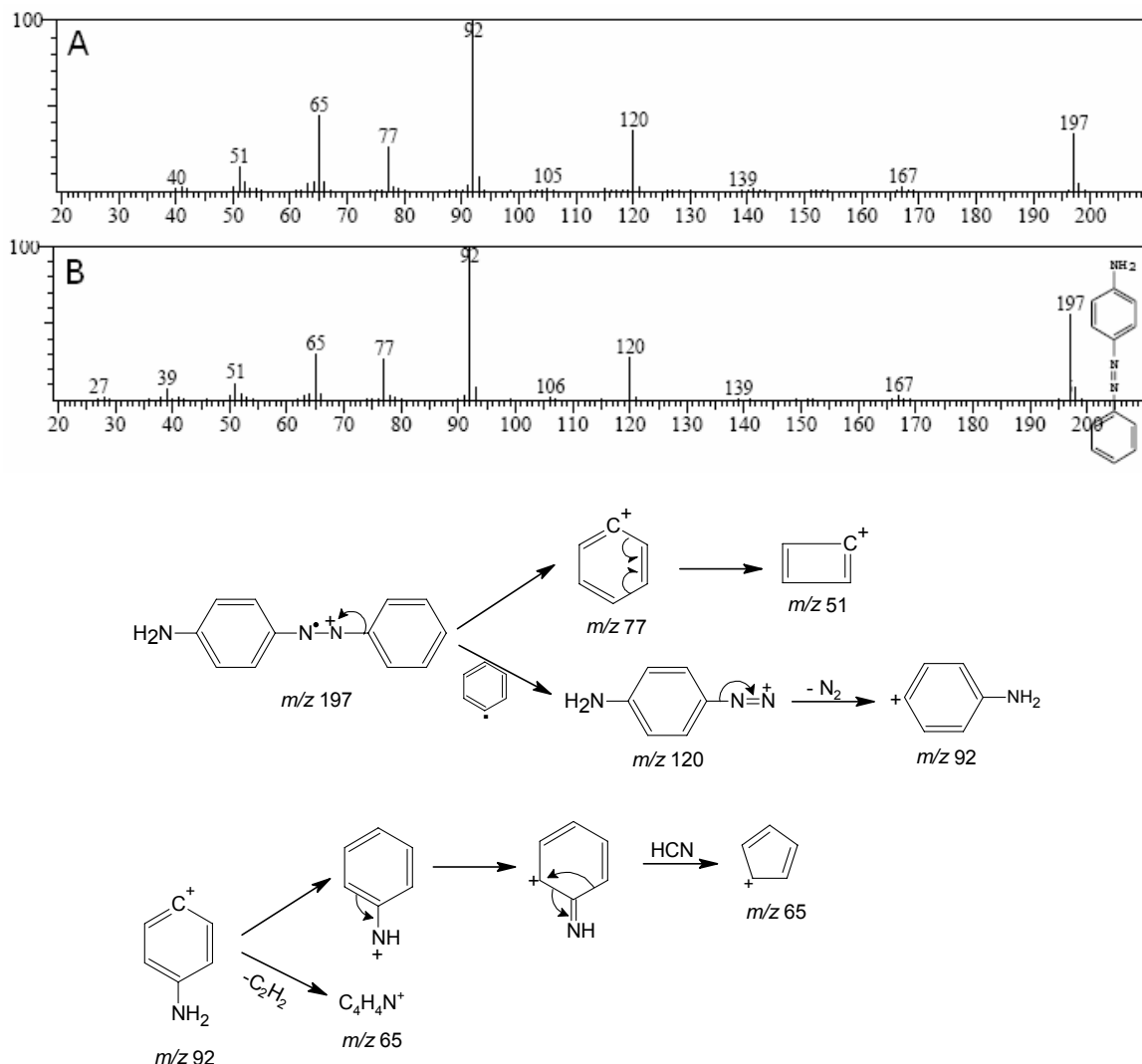


**Figura 49.** Cromatograma CG-EM da reação do corante MY com o TBHP, na presença da FeTMPyP.

Os picos observados na análise por CG-EM foram comparados com a biblioteca NIST. As Figura 50A, 51A e 52A mostram os espectros de massas dos compostos eluídos em tempos de retenção de 24,1; 24,3 e 25,4 min, respectivamente, e as Figuras 50B, 51B e 52B mostram o banco de dados da biblioteca NIST, para 4-nitrozobenzeno, 4-aminobenzeno e 4-metilaminoazobenzeno, respectivamente, e os principais fragmentos esperados para estes compostos.

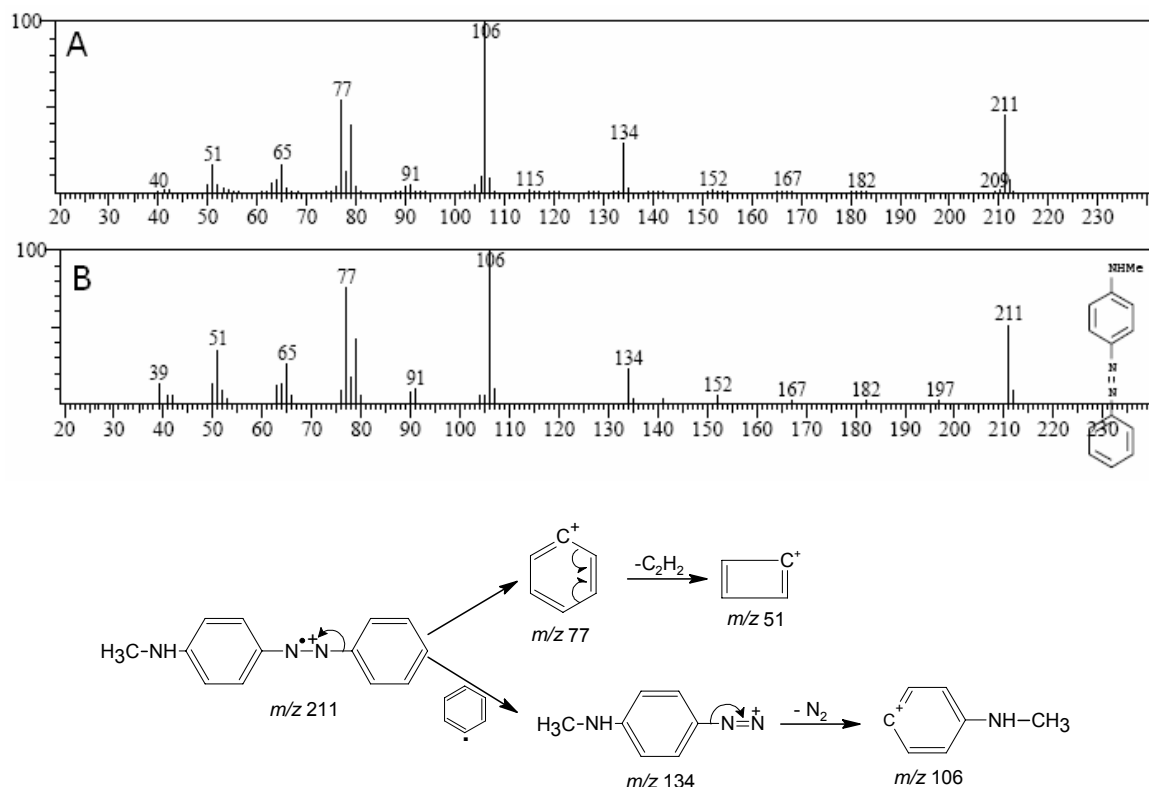


**Figura 50.** Espectro de massas: A) composto eluído em  $t_r = 24,1$  min no CG; B) banco de dados da biblioteca de espectros NIST, similaridade de 94 %, e os fragmentos esperados para o 4-nitrozobenzeno.



**Figura 51.** Espectro de massas: A) composto eluído em  $t_r = 24,3$  min no CG; B) banco de dados da biblioteca de espectros NIST, similaridade de 95 %, e os fragmentos esperados para o 4-aminoazobenzeno.

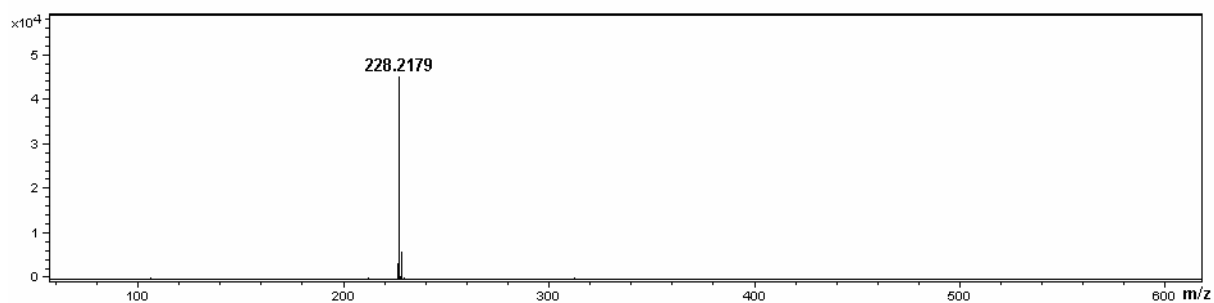




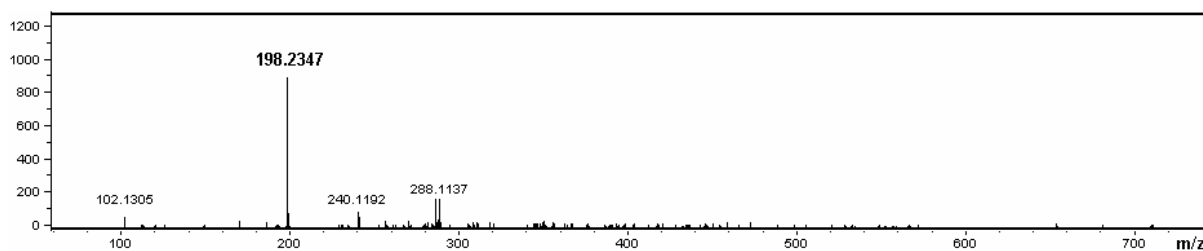
**Figura 52.** Espectro de massas: A) composto eluído em  $t_r = 25,4$  min no CG; B) banco de dados da biblioteca de espectros NIST, similaridade de 90 %, e os fragmentos esperados para o 4-metil-aminoazobenzeno.

A similaridade dos espectros de massas obtidos e dos fragmentos esperados para os compostos 4-nitroazobenzeno, 4-aminoazobenzeno e 4-metil-aminoazobenzeno permitiram identificar estes produtos como responsáveis pelos picos em 24,1; 24,3 e 25,4 min, respectivamente, no cromatograma CG da mistura de reação.

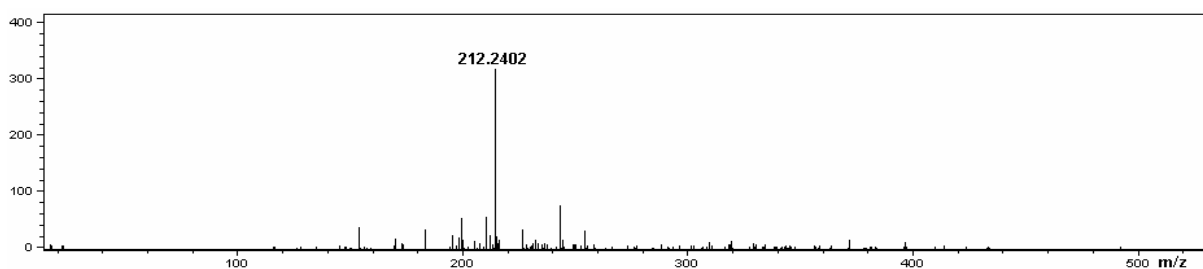
Para confirmar as estruturas propostas para estes produtos também foram realizadas as análises por CLAE-EM. O perfil do cromatograma do CLAE-EM é semelhante ao observado por CLAE-UV, e os espectros de massas para os produtos referentes aos picos com tempo de retenção 9,6; 10,3 e 11,0 min forneceram os íons (sinal) com  $m/z$  228, 198 e 212, respectivamente, referentes as moléculas protonadas  $(M+H)^+$  dos compostos 4-nitroazobenzeno (Figura 53), 4-aminoazobenzeno (Figura 54) e 4-metil-aminoazobenzeno (Figura 55).



**Figura 53.** Espectro de massas referente ao composto eluído em tempo de retenção 9,6 min no CLAE-EM.



**Figura 54.** Espectro de massas referente ao composto eluído em tempo de retenção 10,3 min no CLAE-EM.



**Figura 55.** Espectro de massa referente ao tempo de retenção no CLAE 11,0 min na análise por CLAE-EM.

Como conclusão das análises realizadas, pode-se atribuir os picos observados por CLAE-UV como sendo o 4-nitrozobenzeno ( $tr = 9,6$  min), 4-aminoazobenzeno ( $tr = 10,3$  min) e 4-metil-aminoazobenzeno ( $tr = 11,0$  min).

A Tabela 12 mostra o tempo de retenção no CG-EM e CLAE-UV, íon molecular e a fragmentação do corante MY e seus produtos de oxidação.

**Tabela 12.** Tempo de retenção,  $m/z$  e fragmentação do corante MY e seus produtos de oxidação na análise por CG-EM.

Composto	$t_r$ (min)		$m/z$	$m/z$ (Intensidade relativa, %)
	CLAE-UV	CG EM		
corante MY	12,6	25,7	225	225 (89), 148 (25), 120 (100), 105 (27), 91 (14), 77 (50), 42 (58)
4-metil-aminoazobenzeno	9,6	25,4	211	211 (46), 134 (30), 106 (100), 77 (57), 65 (19), 51 (17)
4-aminoazobenzeno	10,8	24,3	197	197 (32), 120 (38), 92 (100), 77 (39), 65 (48), 51 (15)
4-nitroazobenzeno	11,0	24,1	227	227 (20), 122 (15), 105 (35), 77 (100), 51 (23)

Após a identificação foi realizada a quantificação dos produtos gerados.

A Tabela 13 mostra os resultados das reações de oxidação do MY em termos dos rendimentos dos produtos.

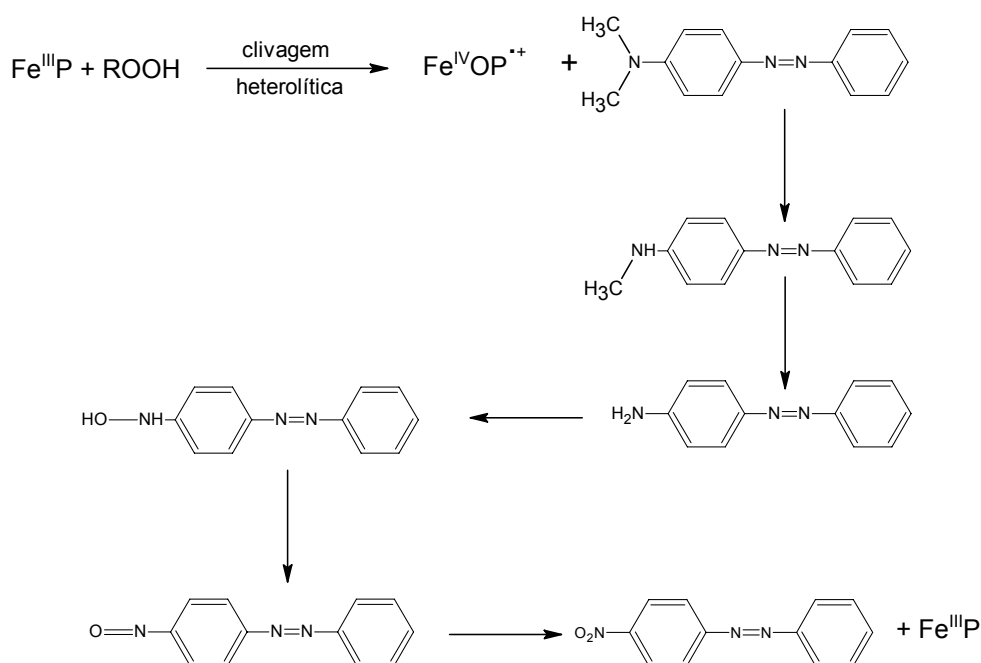
**Tabela 13.** Porcentagem de produtos formados na oxidação do corante MY nos diferentes sistemas catalíticos, após 2 h de reação.

Condição	Porcentagem de produto formado		
	4-nitroazobenzeno	4-aminoazobenzeno	4-metil-aminoazobenzeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /FeTMPyP	10	13	30
TBHP/FeTMPyP	14	26	56
TBHP/FeP-K10	12	24	60
TBHP/ausência O <sub>2</sub> /FeTMPyP <sub>2</sub>	13	25	58

Condição: corante MY ( $1,25 \times 10^{-6}$  mol); oxidante ( $7,5 \times 10^{-6}$  mol); catalisador ( $1,25 \times 10^{-7}$  mol) em 2 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1).

Assim como discutido na oxidação do DO3, os altos rendimentos com o TBHP na presença da FeTMPyP e da FeP-K10 para a formação de produtos da N-desmetilação comprovam que a diminuição da banda de absorção do corante referente ao grupo azo, observado nos estudos por espectroscopia UV-Vis, não está associada à destruição deste grupo e, sim, à desmetilação oxidativa da amina terciária e oxidação do substituinte amina ligado ao anel benzênico.

A Figura 56 mostra o esquema reacional proposto para a oxidação do corante MY catalisada pela FeTMPyP nas condições estabelecidas nesse estudo.



**Figura 56.** Esquema proposto para a oxidação do corante MY catalisada pela FeTMPyP.

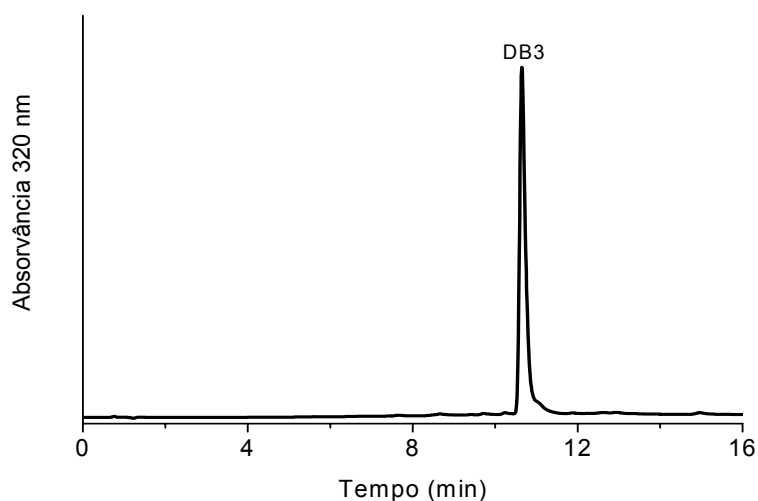
Como observado no esquema da Figura 56, o corante MY sofre um processo de desmetilação seguido de formação do grupo amina e posterior oxidação a nitro, assim como observado e discutido para o corante DO3.

Aminas terciárias podem ser desmetiladas por enzimas monooxigenases, envolvendo múltiplas reações enzimáticas. Desta forma, a natureza realiza

elegantemente reações de desmetilação/desalquilação de aminas terciárias utilizando vias oxidativas conduzidas no citocromo P450 (EMMERT III *et al.*, 2008) e os sistemas catalíticos estudados podem ser considerados bons modelos destas enzimas na oxidação deste corante.

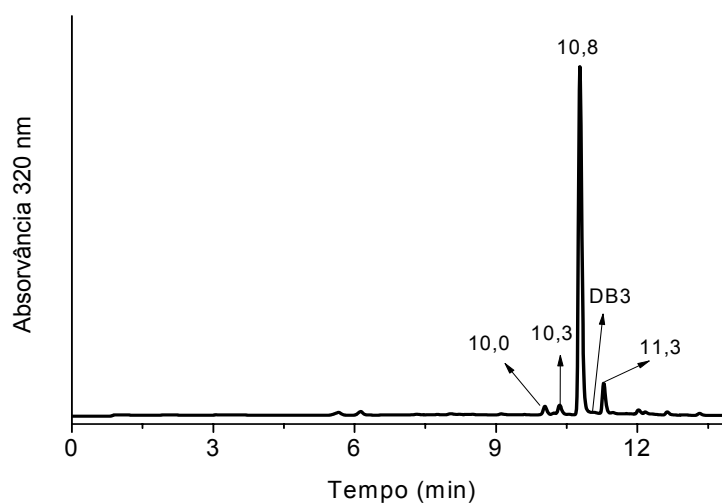
### **Corante disperso preto 3 (DB3)**

Assim como para os corantes DO3 e MY, também foram realizadas para o MY reações branco na ausência do catalisador e do oxidante e analisadas por CLAE-UV. Não se observou a formação de produtos na ausência de catalisador e na ausência de oxidante, conforme mostra a Figura 57, confirmando o que foi observado para os corantes DO3 e MY, de que a ferroporfirina é responsável pela catálise da oxidação evidenciada por espectroscopia UV-Vis.



**Figura 57.** Cromatograma da reação do corante MY utilizando como oxidante o TBHP na ausência da FeTMPyP em meio de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1).

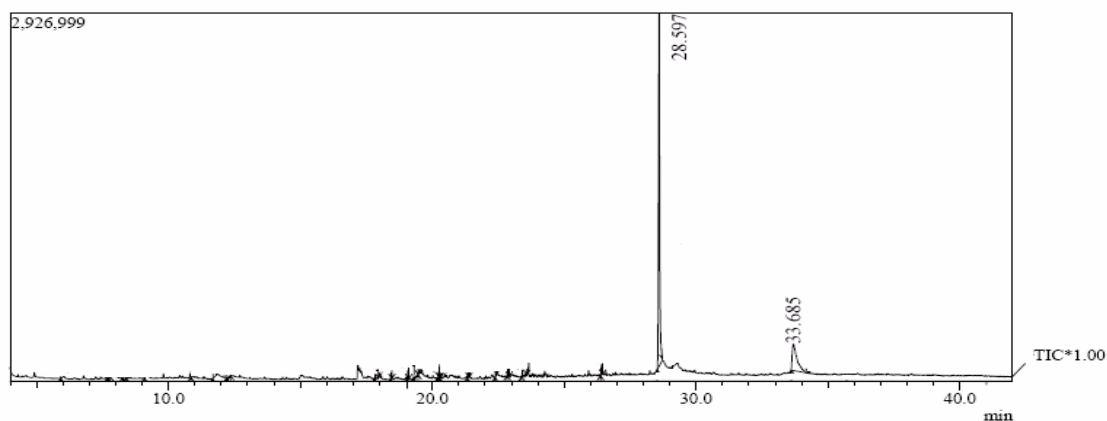
Na reação do corante DB3 com TBHP utilizando como catalisador a FeTMPyP observou-se a formação de quatro produtos (Figura 58), com tempos de retenção em 10,0; 10,3; 10,8 e 11,3 min, sendo o composto eluído em 10,8 min o principal produto da reação.



**Figura 58.** Cromatograma da reação do corante DB3 com TBHP catalisada pela FeTMPyP, fase móvel gradiente de ACN e H<sub>2</sub>O

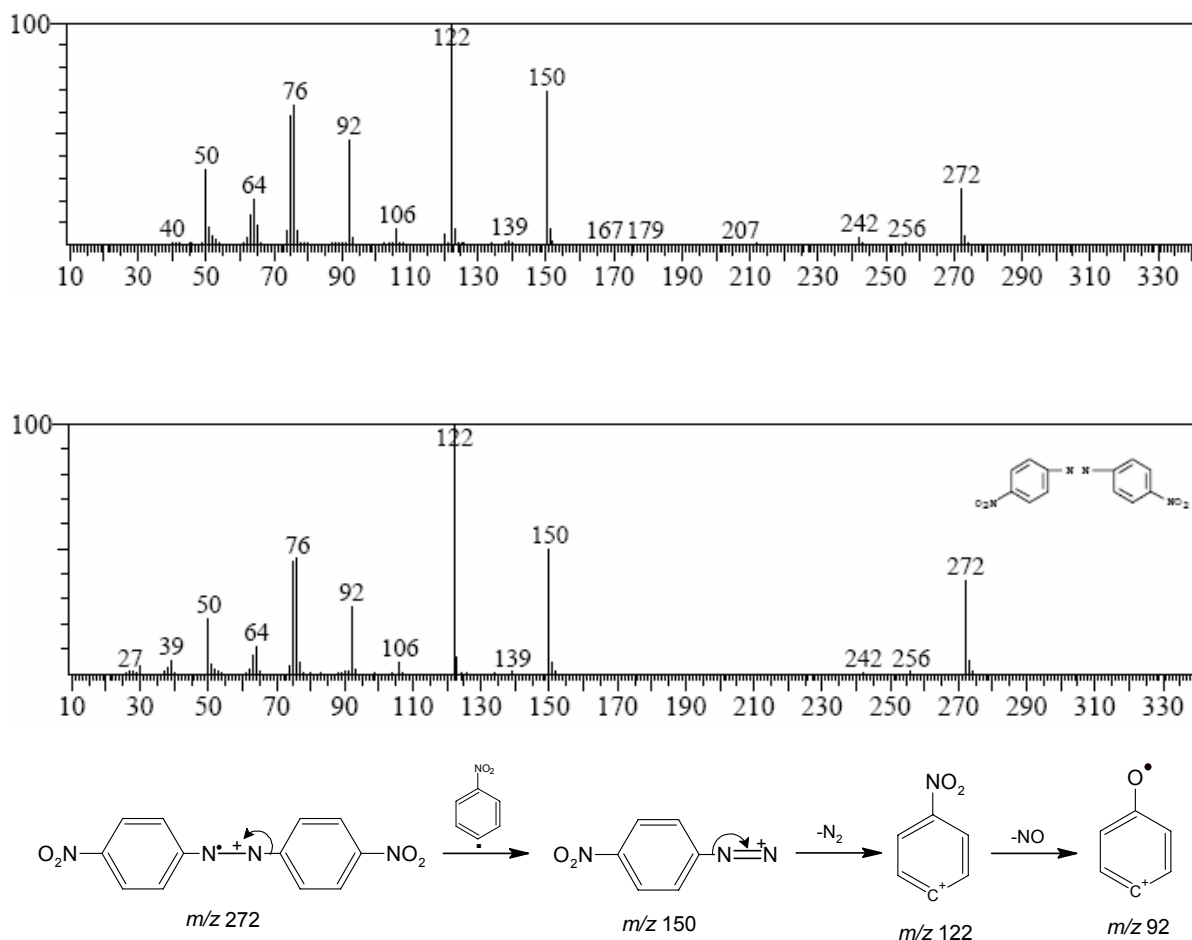
Para auxiliar na identificação dos compostos foram realizadas análises por CG-EM e CLAE-EM.

A Figura 59 mostra o cromatograma CG-EM da reação do corante DB3 com TBHP na presença da FeTMPyP. Ao contrário da análise por CLAE-UV, que apresentou 4 produtos com diferentes tempos de retenção, a análise por CG-EM mostrou a presença de dois picos, com tempos de retenção em 28,6 e 33,7 min.



**Figura 59.** Cromatograma CG-EM da reação do corante DB3 com o TBHP, na presença da FeTMPyP.

Os picos observados na análise por CG-EM foram comparados com a biblioteca NIST, sendo possível apenas a identificação apenas do composto responsável pelo pico em 28,6 min. O espectro de massas foi comparado com a biblioteca NIST e apresentou similaridade de 90 % para o espectro de massas do 4,4'-dinitroazobenzeno. A Figura 60A mostra o espectro de massas do composto eluído em 28,6 min e a Figura 60B mostra o banco de dados da biblioteca de espectros NIST e os principais fragmentos esperados para o 4,4'-dinitroazobenzeno.



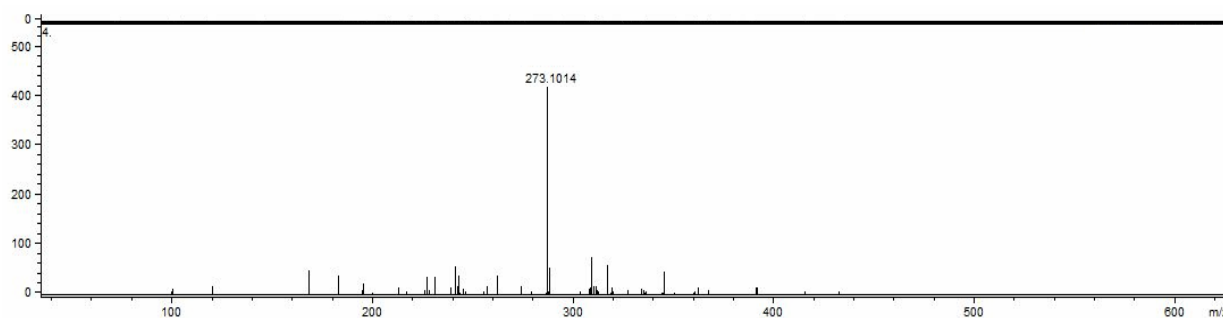
**Figura 60.** Espectro de massas: A) composto eluído com  $t_r = 28,6$  min no CG; b) banco de dados da biblioteca de espectros NIST, similaridade de 90 % e os principais fragmentos esperados para o 4,4'-dinitroazobenzeno.

Para confirmar a estrutura proposta para este produto também foi realizada a análise por CLAE-EM. O perfil do cromatograma do CLAE-EM é semelhante ao observado por CLAE-UV, e o espectro de massas para o produto referente ao pico com tempo de retenção 28,6 min forneceu um íon (sinal) de  $m/z$  273, o qual corresponde a molécula protonada  $(M+H)^+$  do 4,4'-dinitroazobenzeno (Figura 61).

A formação deste composto também foi observada na oxidação do corante DO3, apresentando a mesma similaridade no tempo de retenção nas análises por CLAE-UV e CG-EM, confirmando assim a identificação do 4,4'-dinitroazobenzeno, como produto principal da oxidação do corante DB3.



Não foi possível a identificação dos demais produtos responsáveis pelos picos de baixa intensidade observados no cromatograma CLAE-UV da mistura da reação de oxidação do DB3.



**Figura 61.** Espectro de massas referente ao composto eluído em tempo de retenção 28,6 min no CLAE.

Os espectros de massas do composto eluído em 33,7 min no cromatograma CG apresentaram picos  $m/z$  pouco intensos, que não possibilitaram a identificação.

As análises por CLAE-EM também não forneceram bons resultados, não sendo possível chegar a qualquer conclusão sobre a estrutura deste composto, provavelmente devido à baixa concentração do mesmo.

A Tabela 14 mostra o tempo de retenção no CG-EM e CLAE-UV, íon molecular e a fragmentação do corante DB3 e seu produto principal de oxidação.

**Tabela 14.** Tempo de retenção,  $m/z$  e fragmentação do corante DB3 e seus produtos de oxidação na análise por CG-EM.

Composto	$t_r$ (min)		$m/z$	$m/z$ (Intensidade relativa, %)
	CLAE-UV	CG EM		
corante DB3	11,0	30,1	240	240 (100), 148 (10), 120 (89), 105 (14), 92 (46), 77 (17), 65 (23), 42 (58)
Produto 1	10,0	----	----	não identificado
Produto 2	10,3	----	----	não identificado
Produto 3	11,3	----	----	não identificado
4,4'- dinitroazobenzeno	10,8	28,6	272	227 (25), 150 (77), 122 (100), 92 (27), 76 (56), 50 (22)

Após a identificação do principal produto de oxidação como 4,4'-dinitroazobenzeno foi realizada a sua quantificação.

A Tabela 15 mostra os resultados das reações de oxidação do DB3 em termos do rendimento do 4,4'-dinitroazobenzeno.

**Tabela 15.** Porcentagem de produto formado na oxidação do corante DB3 nos diferentes sistemas catalíticos, após 2 h de reação.

Condição	Porcentagem do 4,4'-dinitroazobenzeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /FeTMPyP	40
TBHP/FeTMPyP	82
TBHP/FeP-K10	84
TBHP/ausência O <sub>2</sub> /FeTMPyP <sub>2</sub>	80

Condição: corante DB3 ( $1,25 \times 10^{-6}$  mol); oxidante ( $7,5 \times 10^{-6}$  mol); catalisador ( $1,25 \times 10^{-7}$  mol) em 2 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (3:1).

Os resultados da Tabela 15 comprovam que o 4,4'-dinitroazobenzeno é o produto majoritário da oxidação do corante DB3 e confirmam, como observado para

os outros corantes, que o desaparecimento da banda de absorção do corante não está associado à destruição da ligação azo.

Também com este corante, os resultados catalíticos semelhantes na presença e ausência de oxigênio evidenciam a participação da  $\bullet^+PFe^{IV}=O$  como principal espécie catalítica.

A obtenção do 4,4'-dinitroazobenzeno como principal produto da oxidação do DB3 indica que o mecanismo desta oxidação ocorre via N-desalquilação, como geralmente ocorre nos sistemas “*in vivo*” catalisada pelo P450. Provavelmente os compostos responsáveis pelos picos pouco intensos observados nos cromatogramas CLAE-UV correspondem aos intermediários formados pela mono e bis-desmetilação da amina terciária. Portanto, também para este corante os sistemas catalíticos estudados seguem a rota biomimética do P450.

# Conclusões

*“Por sabedoria entendo a arte de tornar a vida o mais agradável e feliz possível.”*

*(Arthur Schopenhauer)*

Uma das principais questões que surgem no desenvolvimento de novos corantes diz respeito à possibilidade dos mesmos apresentarem potencial carcinogênico e mutagênico, evidenciando a importância da elucidação dos mecanismos de oxidação e/ou redução destes compostos nos organismos.

Neste contexto, estudos que visam elucidar o papel da superfamília do citocromo P450, uma das enzimas responsáveis pela biodegradação dos corantes nos organismos, são de grande importância, uma vez que pouco se conhece sobre estes processos.

Metaloporfirinas têm sido estudadas como eficientes modelos biomiméticos da função oxidativa do citocromo P450, principalmente na área de fármacos, o que nos motivou a investigar seu potencial biomimético também para os corantes da classe azo.

Os resultados mostraram que as ferroporfirinas estudadas foram eficientes para catalisar a oxidação dos corantes, com rendimentos totais de produtos que podem chegar a 100 %. As reações são dependentes do pH, devido à presença de átomos de nitrogênio com diferentes caráter básico. Em baixos valores de pH a oxidação ocorreu preferencialmente no grupo azo, enquanto que em valores de pH mais altos os grupos amina, mais básicos, foram preferencialmente oxidados, resultando em produtos da N-desmetilação e oxidação a nitro, seguindo, assim, a rota biomimética para oxidação destes corantes.

Reações realizadas na ausência  $O_2$  levaram aos mesmos rendimentos que na presença de ar, evidenciando a ausência de mecanismos radicalares, como resultado da predominância da cisão heterolítica da ligação O-O do peróxido e formação da espécie catalítica radical ferril porfirina  $\pi$ -cátion,  $Fe^{IV}OP^{*+}$ .

Visando a utilização de metaloporfirinas para degradação dessa classe de corantes, a FeTMPyP foi imobilizada em montmorilonita e utilizada em reações consecutivas em pH ácido, no qual a ligação azo é preferencialmente quebrada. Os resultados de degradação foram reprodutíveis, mostrando a estabilidade do catalisador e seu potencial de aplicação.

Os sistemas catalíticos estudados levaram à oxidação dos grupos amina terciária dos corantes em pH próximo do pH fisiológico, o que resulta em um aumento da solubilidade destes compostos. Este fato está de acordo com o que ocorre nos sistemas biológicos, no fígado humano, por exemplo, sendo este tipo de reação uma das maneiras de favorecer a excreção destes metabólitos. Portanto, também quanto a este aspecto, os sistemas estudados comportam-se como bons modelos das enzimas P450, viabilizando a utilização dos mesmos para avaliar previamente o grau de toxicidade desta classe de corantes.

# *Referências*

*"O começo da sabedoria é encontrado na dúvida; duvidando começamos a questionar, e procurando podemos achar a verdade."*

*(Pierre Abelard)*

- ADLER, D.A.; LONGO, F.R.; SHERGALIS, W. Mechanistic Investigations of Porphyrin Syntheses. I. Preliminary Studies on ms-Tetraphenylporphin. *Journal of American Chemical Society*, v.86, n.15, p.3145-9, 1964.
- ANLIKER, R.; MOSER, P. The limits of bioaccumulation of organic pigments in fish: Their relation to the partition coefficient and the solubility in water and octanol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.13, n.1, p.43-52, 1987.
- ANLIKER, R.; MOSER, P.; POPPINGER, D. Bioaccumulation of dyestuffs and organic pigments in fish. Relationships to hydrophobicity and steric factors. *Chemosphere*, v.17, n.8, p.1631-44, 1988.
- ARBUS, C.; BENYAMINA, A.; LORCA, P-M.; BAYLÉ, F.; BROMET, N.; MASSIERE, F.; GARAY, R.P.; HAMEG, A. Characterization of human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of cyamemazine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.32, n.4-5, p.357-66, 2007.
- BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K.; DEVI, S.S.; CHAKRABARTI, T. Biological decolourization of C.I. Direct Black 38 by *E. gallinarum*. *Journal of Hazardous Materials*, v.157, n.1, p.187-93, 2008.
- BAGCHI, V.; BANDYOPADHYAY, D. The porphyrin complex catalyzed dioxygen activation in presence of solid inorganic phosphates and small quantities of t-BuOOH. *Polyhedron*, v.27, n.5, p.1387-92, 2008.
- BARROS, V.P.; FARIA, A.L.; MacLEOD, T.C.O.; MORAES, L.A.B.; ASSIS, M.D. Ironporphyrin immobilized onto montmorillonite as a biomimetical model for azo dye oxidation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.61, n.4, p.337-44, 2008.
- BARROS, V.P.; ZANONI, M.V.B.; ASSIS, M.D. Characterization of electrodes chemically modified with Mn(III) porphyrin/polypyrrole films as catalytic surfaces for an azo dye. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v.10, p.962-70, 2006.
- BEDIOUI, F. Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and Schiff-base complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview. *Coordination Chemical Review*, v.144, p.39-68, 1995.
- BERTELSEN, K.M.; VENKATAKRISHNAN, K.; MOLTKE, L.L.; OBACH, R.S.; GREENBLATT, D.J. Apparent Mechanism-based Inhibition of Human CYP2D6 in Vitro by Paroxetine: Comparison with Fluoxetine and Quinidine. *Drug Metabolism and Disposition*, v.31, n.3, p.289-93, 2003.
- BERTINI, I.; GRAY, H.B.; STIEFEL, E.I.; VALENTINE, J.S. *Biological Inorganic chemistry – Structure & Reactivity*. California: University Science Books, 2007, 766p.
- BONGIOVANNI, R.; TURCATO, E.A.; DI GIANNI, A.; RONCHETTI, S. Epoxy coatings containing clays and organoclays: Effect of the filler and its water



- content on the UV-curing process. *Progress in Organic Coatings*, v.62, n.3, p.336-43, 2008.
- BOUCHER, L.J. Manganese porphyrin complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, v.7, n.3, p.289-329, 1972.
- BRUNAUER, S., EMMETT, P.H., TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, v.60, p.309-19, 1938.
- CARBALLO, R.R.; CAMPODALL' ORTO, V.; REZZANO, I.N. Supported bimetallic polymers of porphyrins as new heterogeneous catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.280, n.1-2, p.156-63, 2008.
- CARNEIRO, P.A.; OSUGI, M.E.; FUGIVARA, C.S.; BORALLE, N.; FURLAN, M.; ZANONI, M.V.B. Evaluation of different electrochemical methods on the oxidation and degradation of Reactive Blue 4 in aqueous solution. *Chemosphere*, v.59, n.3, p.431-9, 2005.
- CASS, Q.B.; DEGANI, A.N.G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos, Ed. UFSCAR, 2001.
- CHANDRASENA, R.E.P.; VATSIS, K.P.; COON, M.J.; HOLLENBERG, P.F.; NEWCOMB, M. Hydroxylation by the Hydroperoxy-Iron Species in Cytochrome P450 Enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, v.126, n.1, p.115-26, 2004.
- CHAUHAN, S.M.S.; KUMARI, P. Biomimetic oxidation of metribuzin with hydrogen peroxide catalyzed by 5,10,15,20-tetraarylporphyrinatoiron(III) chlorides. *Tetrahedron Letters*, v.48, n.29, p.5035-8, 2007.
- CHIVUKULA, M.; SPADARO, J.T.; RENGANATHAN, V. Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Sulfonated Azo Dyes Generates Novel Sulfophenyl Hydroperoxides. *Biochemistry*, v.34, p.7765-72, 1995.
- CHO, S-H.; SHIM, J.; YUN, S-H., MOON, S-H. Enzyme-catalyzed conversion of phenol by using immobilized horseradish peroxidase (HRP) in a membraneless electrochemical reactor. *Applied Catalysis A: General*, v.337, n.1, p.66-72, 2008.
- CHRISTIE, R.M.; MORGAN, K.M.; ISLAM, M.S. Molecular design and synthesis of N-arylsulfonated coumarin fluorescent dyes and their application to textiles. *Dyes and Pigments*, v.76, n.3, p.741-7, 2008.
- CLARK, R.J.H.; COOKSEY, C.J.; DANIELS, M.A.M.; WITHNALL, R. Indigo, woad, and Tyrian Purple: important vat dyes from antiquity to the present. *Endeavour*, v.17, n.4, p.191-9, 1993.
- CONSTANTINO, M.G. Química Orgânica – Curso Básico Universitário. São Paulo: EDUSP, 2005, v.1, p.421.

- COOKE, P.R.; GILMARTIN, C.; GRAY, G.W.; SMITH, J.R.L. Characterisation of iron tetraarylporphyrins co-ordinatively bound to solid supports. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, p.1573-8, 1995.
- CORRÊA, R.J.; SALOMÃO, G.C.; OLSEN, M.H.N.; CARDOZO FILHO, L.; DRAGO, V.; FERNANDES, C.; ANTUNES, O.A.C. Catalytic activity of MnIII(Salen) and FeIII(Salen) complexes encapsulated in zeolite Y. *Applied Catalysis A: General*, v.336, n.1-2, p.35-9, 2008.
- COSTA, A.A.; GHESTI, G.F.; MACEDO, J.L.; BRAGA, V.S.; SANTOS, M.M.; DIAS, J.A.; DIAS, S.C.L. Immobilization of Fe, Mn and Co tetraphenylporphyrin complexes in MCM-41 and their catalytic activity in cyclohexene oxidation reaction by hydrogen peroxide. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.282, n.1-2, p.149-57, 2008.
- COUTEUR, L.P.; BURRESON, J. Corantes têxteis. In: \_\_\_\_\_. *Os Botões de Napoleão*. São Paulo: Jorge Zahar Editor Ltda, 2006. p.149-66.
- CRESTINI, C.; PASTORINI, A.; TAGLIATESTA, P. Metalloporphyrins immobilized on motmorillonite as biomimetic catalysts in the oxidation of lignin model compounds. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.208, n.1-2, p.195-202, 2004.
- DELVIN, T.M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. Trad. Yara M. Michelacci. 4º ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1997, 1007p.
- DENISOV, L.G.; MAKRIS, T.M.; SLIGAR, S.G.; SCHLICHTING, L. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chemical Reviews*, v.105, n.6, p.2253- 78, 2005.
- DIAS, P.M., FARIA, D.L.A., CONSTANTINO, V.L.R. Spectroscopic Studies on the Interaction of Tetramethylpyridylporphyrins and Cationic Clays. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.38, n.1-4, p.251-66, 2000.
- DING, J.; CONG, J.; ZHOU, J.; GAO, S. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Sciences*, v.20, n.1, p.88-93, 2008.
- DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T.G.; XIE, L.Y. Polyhaloporphyrins: Unusual Ligands for Metals and Metal-Catalyzed Oxidations. *Accounts of Chemical Research*, v.30, n.6, p.251-9, 1997.
- DOWERS, T.S.; ROCK, D.A.; ROCK, D.A.; JONES, J.P. Kinetic Isotope Effects Implicate the Iron-Oxene as the Sole Oxidant in P450-Catalyzed N-Dealkylation. *Journal of the American Chemical Society*, v.126, n.29, p.8868-9, 2004.
- DRUDING, S.C. Dye History from 2600 BC to the 20th Century, 1982. Disponível em: <<http://www.straw.com/sig/dyehist.html>>. Acesso em: 03 março 2008.

- ESCOLA, J.M.; BOTAS, J.A.; AGUADO, J.; SERRANO, D.P.; VARGAS, C.; BRAVO, M. Modified Wacker TBHP oxidation of 1-dodecene. *Applied Catalysis A: General*, v.335, n.2, p.137-44, 2008.
- EGAN, T.J.; MAVUSO, W.W.; ROSS, D.C.; MARQUES, H.M. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.68, p.137-45, 1997.
- EMMERT III, F.L.; THOMAS, J.; HON, B.; GENGENBACH, A.J. Metalloporphyrin Catalyzed Oxidation of Methyl Yellow and Related Azo Compounds. *Inorganica Chimica Acta*, v.361, n.8, p.2243-51, 2008.
- ENTHALER, S.; SPILKER, B.; ERRE, G.; JUNGE, K.; TSE, M.K.; BELLER, M. Biomimetic transfer hydrogenation of 2-alkoxy- and 2-aryloxyketones with iron-porphyrin catalysts. *Tetrahedron*, v.64, n.17, p.3867-76, 2008.
- EVANS, S., SMITH, J.R.L. The oxidation of ethylbenzene by dioxygen catalysed by supported iron porphyrins derived from iron(III) tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, p.174-80, 2001.
- FARIA, A.L., AIROLDI, C., DORO, F.G., FONSECA, M.G., ASSIS, M.D. Anchored ironporphyrins—the role of talc-aminofunctionalized phyllosilicates in the catalysis of oxidation of alkanes and alkenes. *Applied Catalysis A: General*, v.268, n. 1-2, p.217-26, 2004.
- FARIA, A.L.; MAC LEOD, T.C.O.; ASSIS, M.D. Carbamazepine oxidation catalyzed by iron and manganese porphyrins supported on aminofunctionalized matrices. *Catalysis Today*, v.133-135, p.863-9, 2008.
- FUKUSHIMA, M.; TATSUMI, K. Degradation of pentachlorophenol in contaminated soil suspensions by potassium monopersulfate catalyzed oxidation by a supramolecular complex between tetra(p-sulfophenyl)porphineiron(III) and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Hazardous Materials*, v.144, n.1-2, p.222-8, 2007.
- GOON, A.T.-J.; GILMOUR, N.J.; BASKETTER, D.A.; WHITE, I.R.; RYCROFT, R.J.G.; McFADDEN, J.P. High frequency of simultaneous sensitivity to Disperse Orange 3 in patients with positive patch tests to para-phenylenediamine. *Contact Dermatitis*, v.48, p.248-50, 2003.
- GOTARDO, M.C.A.F.; GUEDES, A.A.; SCHIAVON, M.A.; JOSÉ, N.M.; YOSHIDA, I.V.P.; ASSIS, M.D. Polymeric membranes: the role this support plays in the reactivity of the different generations of metalloporphyrins. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.229, n.1-2, p.137-43, 2005.
- GOTARDO, M.C.A.F.; MORAES, L.A.B.; ASSIS, M.D. Metalloporphyrins as biomimetic models for cytochrome P-450 in the oxidation of atrazine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.26, p.10011-8, 2006.

- GOUTERMAN, M. Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings. In: DOLPHIN, D. The porphyrins. New York: Academic Press, 1978, v.3, cap.1, p.62-65.
- GRAEVE, J.; VAN HEUGEN, J.C.; ZORZA, G.; FAHY, J.; PUOZZO, C. Metabolism pathway of vinorelbine (Navelbine®) in human: Characterisation of the metabolites by HPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.47, n.1, p.47-58, 2008.
- GROVES, J.T. High-valent iron in chemical and biological oxidations. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.100, n.4, p.434-47, 2006.
- GROVES, J.T. Models and mechanisms of cytochrome P450 action. In: Montellano, P.R.O. Cytochrome P450. 3<sup>o</sup> ed. New York: Klumer Academic/Plenum Publishers, 2005. cap.1, p.1-34.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis, *Química Nova*, v.23, n.1, p.71-8, 2000.
- GUEDES, A.A., SMITH, J.R.L., NASCIMENTO, O.R., GUEDES, D.F.C., ASSIS, M.D. Catalytic Activity of Halogenated Iron Porphyrins in Alkene and Alkane Oxidations by Iodosylbenzene and Hydrogen Peroxide. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16, n.4, p.835-43, 2005.
- GUEDES, A.A.; SANTOS, A.C.M.A.; ASSIS, M.D. Some Factors Influencing the Selectivity of Styrene Oxidation by Active Oxygen Donors Catalyzed by Three Generations of Ironporphyrins. *Kinetics and Catalysis*, v.47, n.4, p.555-63, 2006.
- GUEDES, D.F.C.; MAC LEOD, T.C.O.; GOTARDO, M.C.A.F.; SCHIAVON, M.A.; YOSHIDA, I.V.P.; CIUFFI, K.J.; ASSIS, M.D. Investigation of a new oxidative catalytic system involving Jacobsen's catalyst in the absence of organic solvents. *Applied Catalysis A: General*, v.296, n.1, p.120-7, 2005a.
- HIRAO, H.; KUMAR, D.; SHAIK, S. On the identity and reactivity patterns of the "second oxidant" of the T252A mutant of cytochrome P450<sub>cam</sub> in the oxidation of 5-methylenenylcamphor. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.100, n.12, p.2054-68, 2006.
- HODGES, G.R.; SMITH, J.R.L.; OAKES, J. The oxidation of azo dyes by peroxy acids and tert-butylhydroperoxide in aqueous solution catalysed by iron(III) 5,10,15,20-tetra(2,6-dichloro-3-sulfonatophenyl)porphyrin: product studies and mechanism. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, n.9, p.1943-52, 1999.
- HOU, M.; LI, F.; LIU, X.; WANG, X.; WAN, H. The effect of substituent groups on the reductive degradation of azo dyes by zerovalent iron. *Journal of Hazardous Materials*, v.145, n.1-2, p.305-14, 2007.

- HSUEH, C-C.; CHEN, B-Y. Comparative study on reaction selectivity of azo dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Journal of Hazardous Materials*, v.141, n.3, p.842-9, 2007.
- HUANG, T.; WANG, R.; SHI, L.; LU, X. Montmorillonite K-10: An efficient and reusable catalyst for the synthesis of quinoxaline derivatives in water. *Catalysis Communications*, v.9, n.6, p.1143-7, 2008.
- HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. *Chimia*, v.48, n.11, p.520-2, 1994.
- ISHIZUKA, T.; IKEDA, S.; TOGANO, M.; YOSHIDA, I.; ISHIKAWA, Y.; OSUKA, A.; FURUTA, H. Substitution, dimerization, metalation, and ring-opening reactions of N-fused porphyrins. *Tetrahedron*, v.64, n.18, p.4037-50, 2008.
- JADHAV, S.U.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. Biodegradation of Methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *International Biodeterioration & Biodegradation*, in press, 2008.
- JAYAKANNAN, M.; ANILKUMAR, P.; SANJU, A. Synthesis and characterization of new azobenzenesulfonic acids doped conducting polyaniline. *European Polymer Journal*, v.42, n.10, p.2623-31, 2006.
- JIN, N.; IBRAHIM, M.; SPIRO, T.G.; GROVES, J.T. Trans-dioxo Manganese(V) Porphyrins. *Journal of the American Chemical Society*, v.129, n.41, p.12416-7, 2007.
- JOHNSON, E.F.; STOUT, C.D. Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.338, n.1, p.331-6, 2005.
- JOSHI, V.; GHOSH, P.K. Spectral evidence of spontaneous racemic and pseudoracemic interactions between optically active poly(pyridyl) metal chelates adsorbed on smectite clays. *Journal of the American Chemical Society*, v.111, n.15, p.5604-12, 1989.
- KAMEYAMA, H.; NARUMI, F.; HATTORI, T.; KAMEYAMA, H. Oxidation of cyclohexene with molecular oxygen catalyzed by cobalt porphyrin complexes immobilized on montmorillonite. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.258, n.1-2, p.172-7, 2006.
- KANG M.J.; SONG W.J.; HAN A.R.; CHOI Y.S.; JANG H.G.; NAM W. Mechanistic insight into the aromatic hydroxylation by high-valent Iron(IV)-oxo porphyrin pi-cation radical complexes. *Journal of Organic Chemistry*, v.72, p.6301-4, 2007.
- KOMERICKI, P.; ABERER, W.; ARBAB, E.; KOVACEVIC, Z.; KRÄNKE, B. Pigmented purpuric contact dermatitis from Disperse Blue 106 and 124 dyes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.45, n.3, p.456-8, 2001.

- KUHN, F.E.; HERRMANN, W.A. Rhenium-Oxo and Rhenium-Peroxo Complexes in catalytic oxidations. In: MEUNIER, B. *Metal-Oxo and Metal-Peroxo Species in Catalytic Oxidations*. New York: Springer, 2000, p.227.
- LAHAYE, D. GROVES, J.T. Modeling the haloperoxidases: Reversible oxygen atom transfer between bromide ion and an oxo-Mn(V) porphyrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.101, n.11-12, p.1786-97, 2007.
- LAW, R.J. 3,3'-Dichlorobenzidine: a candidate for inclusion in marine monitoring programmes? *Chemosphere*, v.30, n.9, p.1791-7, 1995.
- LEE S.H.; HAN J.H.; KWAK H.; LEE S.J.; LEE E.Y.; KIM H.J.; LEE J.H.; BAE C.; LEE S.N.; KIM Y.; KIM, C. Biomimetic hydrocarbon oxidation catalyzed by Nonheme Iron(III) complexes with peracids: Evidence for an Fe-V=O species. *Chemistry - A European Journal*, v.13, n.33, p.9393-8, 2007.
- LI, C.; ZHANG, L.; ZHANG, C.; HIRAO, H.; WU, W.; SHAIK, S. Which Oxidant Is Really Responsible for Sulfur Oxidation by Cytochrome P450? *Angewandte Chemie International Edition*, v.46, n.43, p.8168-70, 2007.
- LI, J.; JIANG, P.; WEI, C.; SHI, J. Linear and nonlinear optical properties of covalently bound C.I. Disperse Red 1 chromophore/silica hybrid film. *Dyes and Pigments*, v.78, n.3, p.219-24, 2008.
- LINDSAY, J.R.S. *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*, 1<sup>a</sup> ed., New York: Marcel Dekker, ch. 11, 1994.
- LIU, Y.; SUN, D. Development of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-CeO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as catalyst for catalytic wet air oxidation of methyl orange azo dye under room condition. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.72, n.3-4, p.205-11, 2007.
- LUCAS, H.J.; KENNEDY, E.R.; FORMO, M.W. Iodosobenzene. *Organic Synthesis Collective*, John Wiley & Sons: New York, v.3, p.483, 1963.
- MAC LEOD, T.C.O.; BARROS, V.P.; FARIA, A.L.; SCHIAVON, M.A.; YOSHIDA, I.V.P.; QUEIROZ, M.E.C.; ASSIS, M.D. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.273, n.1-2, p.259-64, 2007.
- MAC LEOD, T.C.O.; GUEDES, D.F.C.; LELO, M.R.; ROCHA, R.A.; CAETANO, B.L.; CIUFFI, K.J. ASSIS, M.D. Catalytic activity of Jacobsen catalyst encapsulated in an alumina matrix by the sol-gel process. *Journal of Molecular Catalysis: Chemical*, v.259, n.1-2, p.319-27, 2006.
- MACHADO, A.M., WYPYCH, F., DRECHSEL, S.M., NAKAGAKI, S. Study of the catalytic behavior of montmorillonite/iron(III) and Mn(III) cationic porphyrins. *Journal of Colloid and Interface Science*, v254, n.1, p.158-64, 2002.
- MACHADO, G.S.; CASTRO, K.A.D.F.; WYPYCH, F.; NAKAGAKI, S. Immobilization of metalloporphyrins into nanotubes of natural halloysite toward selective

- catalysts for oxidation reactions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.283, n.1-2, p.99-107, 2008.
- MAHDAVI, V.; MARDANI, M.; MALEKHOSSEINI, M. Oxidation of alcohols with tert-butylhydroperoxide catalyzed by Mn (II) complexes immobilized in the pore channels of mesoporous hexagonal molecular sieves (HMS). *Catalysis Communications*, v.9, n.13, p.2201-4, 2008.
- MAKRIS, T.M.; DENISOV, I.; SCHLICHTING, I.; SLIGAR, S.G. Activation of Molecular Oxygen by Cytochrome P450. In: MONTELLANO, P.O. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. 3<sup>o</sup> Ed. New York: Ed. Klumer Academic/Plenum Publishers, 2005, p.149-157.
- MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. *Comptes Rendus Chimie*, v.10, n.4-5, p.392-413, 2007.
- MASUOKA, N.; WAKIMOTO, M.; UBUKA, T.; NAKANO, T. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide: catalase activity and rates of hydrogen peroxide removal by erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, v.254, n.2, p.101-12, 1996.
- METWALLY, M.A.; KHALIFA, M.E.; AMER, F.A. New azodisperse dyes with 4-hydroxymethyl-2-pyrazolin-5-one ring for dyeing polyester fabrics, Part 5. *Dyes and Pigments*, v.76, n.2, p.379-85, 2008.
- MEUNIER, B. Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. *Chemical Reviews*, v.92, n.6, p.1411-56, 1992.
- MILGRON, L.R. *The Colours of Life*. New York: Oxford University Press, 1997.
- MOREIRA, M.S.M.; MARTINS, P.R.; CURI, R.B.; NASCIMENTO, O.R.; IAMAMOTO, Y. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.233, n.1-2, p.73-81, 2005.
- MUKHERJEE, M.; RAY, A.R. Biomimetic oxidation of L-arginine with hydrogen peroxide catalyzed by the resin-supported iron (III) porphyrin. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.266, n.1-2, p.207-14, 2007.
- NAM, W.; HAN, H.J.; OH, S-Y.; LEE, Y.J.; CHOI, M-H.; HAN, S-Y.; KIM, S.; WOO, S.K.; SHIN, W. New Insights into the Mechanisms of O-O Bond Cleavage of Hydrogen Peroxide and tert-Alkyl Hydroperoxides by Iron(III) Porphyrin Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, v.122, n.36, p.8677-84, 2000.
- NAM, W.; CHOI, H.J.; HAN, H.J.; Cho, S.H.; Lee, H.J.; HAN, S.Y. Use of 2-methyl-1-phenylpropan-2-yl hydroperoxide (MPPH) as a mechanistic probe for the heterolytic versus homolytic O-O bond cleavage of tert-alkyl hydroperoxide by iron(III) porphyrin complex. *Chemical Communications*, v.4, p.387-8, 1999.

- NAM, W.; RYU, Y.O.; SONG, W.J. Oxidizing intermediates in cytochrome P450 model reactions. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v.9, n.6, p.654-60, 2004.
- NEHRU, K.; JANG, Y.; OH, S.; DALLEMER, F.; NAM, W.; KIM, J. Oxidation of hydroquinones by a nonheme iron(IV)-oxo species. *Inorganica Chimica Acta*, v.361, n.8, p.2557-61, 2008.
- NEWARK, N.J. Colorants Industry History. Disponível em: <<http://www.colorantshistory.org/>>. Acesso em: 10 julho 2008.
- NEWCOMB, M.; CHANDRASENA, R.E.P. Highly reactive electrophilic oxidants in cytochrome P450 catalysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.338, p.394-403, 2005.
- NICOLAS, I.; LE MAUX, P.; SIMONNEAUX, G. Intermolecular asymmetric cyclopropanation with diazoketones catalyzed by chiral ruthenium porphyrins. *Tetrahedron Letters*, v.49, n.13, p.2111-3, 2008.
- OAKES, J., GRATTON, P. Kinetic investigations of the oxidation of Methyl Orange and substituted arylazonaphthol dyes by peracids in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, p.2563-8, 1998.
- OCHIAI, E. *Química Bioinorgânica*. Barcelona: Editorial Reverté, 1985, p. 81-100.
- OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent—Identification of the mutagenic components. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.626, n.1-2, p.135-42, 2007.
- PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Electrocatalytic materials for the electrochemical oxidation of synthetic dyes. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.75, n.1-2, p.95-101, 2007.
- PARK, M. J.; LEE, J.; SUH, Y.; KIM, J.; NAM, W. Reactivities of mononuclear non-heme iron intermediates including evidence that iron(III)-hydroperoxo species is a sluggish oxidant. *Journal of the American Chemical Society*, v.128, p.2630-4, 2006.
- PENTIMALLI, L. Researches on the aromatic azocompounds: The oxidation of the 4-dimethylamino-azobenzene. *Tetrahedron*, v.5, p.27-37, 1959.
- PIELESZ, A.; BARANOWSKA, I.; RYBAK, A.; WOCHOWICZ, A. Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.53, p.42-7, 2002.
- PORTA, F.; COLONNA, F.; ARCIPRETE, F.; BANFI, S.; COPPA, F. Catalytic oxidation reactions of aromatic diamines by transition metal complexes. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.113, n.1-2, p.359-68, 1996.



- POULOS, T.L.; JOHNSON, E.F. In: P.R. Ortiz de Montellano (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, 3<sup>a</sup> ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2005, p.87.
- PRICELIUS, S.; HELD, C.; SOLLNER, S.; DELLER, S.; MURKOVIC, M.; ULLRICH, R.; HOFRICHTER, M.; CAVACO-PAULO, A.; MACHEROUX, P.; GUEBITZ, G.M. Enzymatic reduction and oxidation of fibre-bound azo-dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, n.7, p.1732-8, 2007.
- QURESHI, A.; VERMA, V.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H.J. Degradation of 4-nitroaniline by *Stenotrophomonas* strain HPC 135. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.60, n.4, p.215-8, 2007.
- RAU, H. Azocompounds. In *Photochromism: Molecules and Systems*, H. Dürr and H. Bouas-Laurent (Ed.), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1990) 165.
- RAU, H. Photoisomerization of Azobenzenes. In *Photochemistry and Photophysics*, J. F. Rabek (Ed.), Vol-II, CRC Press, Boca Raton (1988) 119.
- RAYATI, S.; KOLIAEI, M.; ASHOURI, F.; MOHEBBI, S.; WOJTCZAK, A.; KOZAKIEWICZ, A. Oxovanadium(IV) Schiff base complexes derived from 2,2'-dimethylpropandiamine: A homogeneous catalyst for cyclooctene and styrene oxidation. *Applied Catalysis A: General*, v.346, n.1-2, p.65-71, 2008.
- RESS, N.B.; WITT, K.L.; XU, J.; HASEMAN, J.K.; BUCHER, J.R. Micronucleus induction in mice exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.521, n.1-2, p.201-8, 2002.
- RICOUX, R.; RAFFY, Q.; MAHY, J-P. New biocatalysts mimicking oxidative hemoproteins: Hemoabzymes. *Comptes Rendus Chimie*, v.10, n.8, p.684-702, 2007.
- RIVERA, E.; CARREÓN-CASTRO, M.DP.; BUENDÍA, I.; CEDILLO, G. Optical properties and aggregation of novel azo-dyes bearing an end-capped oligo(ethylene glycol) side chain in solution, solid state and Langmuir-Blodgett films. *Dyes and Pigments*, v.68, n.2-3, p.217-26, 2006.
- SANTOS, A.B.; CERVANTES, F.J.; van LIER, J.B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*, v.98, p.2369-85, 2007.
- SANTOS, A.C.M.A.; SMITH, J.R.L.; ASSIS, M.D. Chloroquine-iron(III) tetraarylporphyrin interactions and their effect on the oxidations catalysed by iron(III) tetra-arylporphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v.9, p. 326-33, 2005.
- SANTOS, O.S. *Ciência e tecnologia de argilas*. Edgard Blucher, São Paulo, 1992.

- SCHIAVON, M.A.; IAMAMOTO, Y.; NASCIMENTO, O.R.; ASSIS, M.D. Catalytic activity of nitro- and carboxy-substituted iron porphyrins in hydrocarbon oxidation: Homogeneous solution and supported systems. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.174, n.1-2, p.213-22, 2001.
- SEESURIYACHAN, P.; TAKENAKA, S.; KUNTIYA, A.; KLAYRAUNG, S.; MURAKAMI, S.; AOKI, K. Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization. *Water Research*, v.41, n.5, p.985-92, 2007.
- SEKKAT, Z.; KNOLL, W. Creation of second-order nonlinear optical effects by photoisomerization of polar azo dyes in polymeric films: theoretical study of steady-state and transient properties. *Journal of the Optical Society of America B*, V.12, n.10, p. 1855-67, 1995.
- SHAIK, S.; KUMAR, D.; VISSER, S.P.; ALTUN, A.; THIEL, W. Theoretical Perspective on the Structure and Mechanism of Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews*, v.105, n.6, p. 2279-328, 2005.
- SHAKERI, M.; SHODA, M. Decolorization of an anthraquinone dye by the recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) immobilized on mesoporous materials. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.54, n.1-2, p.42-9, 2008.
- SHAREFKIN, J.G.; SALTZMAN, H. Iodosobenzene, *Organic Synthesis Collective*, New York: John Wiley & Sons, v.5, 1963, p.658.
- SHEDBALKAR, U.; DHANVE, R.; JADHAV, J. Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *Journal of Hazardous Materials*, v.157, n.2-3, p.472-9, 2008.
- SHELDON, R.A. *Metalloporphyrins in catalytic oxidations*. New York: Marcel Dekker, 1994.
- SILVA FILHO, J.C.; FERREIRA, A.G.; GOTARDO, M.C.A.F.; ASSIS, M.D. Mono-crowned Substituted Ironporphyrin: Synthesis, Analytical Properties and Catalytic Activity. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v.9, n.9, p.637-45, 2005.
- SMITH, K. *Porphyrins and metalloporphyrins*. New York: Elsevier Scientific Publishing Company, 1975, p.34-160.
- SPADARO, J.T.; RENGANATHAN, V. Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Azo Dyes: Mechanism of Disperse Yellow 3 Degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.312, n.1, p.301-7, 1994.
- STARUKHIN, A.; KRUK, M.; CZERWIENIEC, R. Observation of the distorted form of Pd-porphin in single site spectra at low temperatures. *Journal of Luminescence*, v.128, n.3, p.531-6, 2008.

- ŠULÁKOVÁ, R.; HRDINA, R.; SOARES, G.M.B. Oxidation of azo textile soluble dyes with hydrogen peroxide in the presence of Cu(II)-chitosan heterogeneous catalysts. *Dyes and Pigments*, v.73, n.1, p.19-24, 2007.
- SUNG-SUH, H.M.; CHOI, J.R.; HAH, H.J.; KOO, S.M.; BAE, Y.C. Comparison of Ag deposition effects on the photocatalytic activity of nanoparticulate TiO<sub>2</sub> under visible and UV light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v.163, n.1-2, p.37-44, 2004.
- SYE, W.F.; LU, L.C.; TAI, J.W.; WANG, C.I. Applications of chitosan beads and porous crab shell powder combined with solid-phase microextraction for detection and the removal of colour from textile wastewater. *Carbohydrate Polymers*, v.72, n.3, p.550-6, 2008.
- TAUBER, M.M.; GÜBITZ, G.M.; REHOREK, A. Degradation of azo dyes by oxidative processes – Laccase and ultrasound treatment. *Bioresource Technology*, v.99, n.10, p.4213-20, 2008.
- TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.46, n.1, p.1-15, 2003.
- TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicology in Vitro*, v.21, n.8, p.1650-5, 2007.
- VAN DER ZEE, F.P.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. *Chemosphere*, v.44, n.5, p.1169-76, 2001.
- VANIN, J.A. Os plásticos e as fibras sintéticas. In: *Alquimistas e Químicos: o passado, o presente e o futuro*. São Paulo: Editora Moderna, 1994, p.75-7.
- VASHI, P.R.; MARQUES, H.M. The coordination of imidazole and substituted pyridines by the hemeoctapeptide N-acetyl-ferromicroperoxidase-8 (Fe<sup>II</sup>NAcMP8). *Journal Inorganic Biochemistry*, v.98, p.1471-82, 2004.
- VINHADO, F.S.; MARTINS, P.R.; MASSON, A.P.; ABREU, D.G.; VIDOTO, E.A.; NASCIMENTO, O.R.; IAMAMOTO, Y. Supported iron(III) porphyrins pentafluorophenyl-derivatives as catalysts in epoxidation reactions by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: the role of the silica-support and sulfonatophenyl residues in the activation of the bond. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.188, n1-2, p.141-151, 2002.
- VOLZ, T.J.; ROCK, D.A.; JONES, J.P. Evidence for Two Different Active Oxygen Species in Cytochrome P450 BM3 Mediated Sulfoxidation and N-Dealkylation Reactions. *Journal of the American Chemical Society*, v.124, n.33, p.9724-5, 2002.
- WANG, C-T. Photocatalytic activity of nanoparticle gold/iron oxide aerogels for azo dye degradation. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.353, n.11-12, p. 1126-33, 2007.

- WEBBER, E.J.; STICKNEY, V.C. Hydrolysis kinetics of reactive blue 19 — vinyl sulfone. *Water Research*, v. 27, n.1, p.63–7, 1993.
- WILLIAMS, P.A.; COSME, J.; SRIDHAR, V.; JOHNSON, E.F.; MC REE, D.E. Mammalian Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenase: Structural Adaptations for Membrane Binding and Functional Diversity. *Molecular Cell*, v.5, n.1, p.121-31, 2000.
- WU, T.; LIN, T.; ZHAO, J.; HIDAKA, H.; SERPONE, N. TiO<sub>2</sub>-Assisted Photodegradation of Dyes. 9. Photooxidation of a Squarylium Cyanine Dye in Aqueous Dispersions under Visible Light Irradiation. *Environmental Science & Technology*, v.33, n.9, p.1379-87, 1999.
- YANG, S. J.; NAM, W. Water-Soluble Iron Porphyrin Complex-Catalyzed Epoxidation of Olefins with Hydrogen Peroxide and tert-Butyl Hydroperoxide in Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry*, v.37, p.606-7, 1998.
- YAZDANBAKHSH, M.R.; GHANADZADEH, A.; MORADI, E. Synthesis of some new azo dyes derived from 4-hydroxy coumarin and spectrometric determination of their acidic dissociation constants. *Journal of Molecular Liquids*, v.136, n.1-2, p.165-8, 2007.
- ZBAIDA, S.; LEVINE, W.G. Characteristics of two classes of azo dye reductase activity associated with rat liver microsomal cytochrome P450. *Biochemical Pharmacology*, v.40, n.11, p.2415-23, 1990.
- ZBAIDA, S.; STODDART, A.M.; LEVINE, W.G. Studies on the mechanism of reduction of azo dye carcinogens by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Chemico-Biological Interactions*, v.69, n.1, p.61-71, 1989.
- ZHAO, J.; WU, T.; WU, K.; OIKAWA, K.; HIDAKA, H.; SERPONE, N. Photoassisted Degradation of Dye Pollutants. 3. Degradation of the Cationic Dye Rhodamine B in Aqueous Anionic Surfactant/TiO<sub>2</sub> Dispersions under Visible Light Irradiation: Evidence for the Need of Substrate Adsorption on TiO<sub>2</sub> Particles. *Environmental Science & Technology*, v.32, n.16, p.2394-2400, 1998.
- ZHAO, X.; HARDIN, I.R. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes and Pigments*, v.73, n.3, p.322-5, 2007.
- ZHAO, X.; HARDIN, I.R.; HWANG, H-M. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.57, n.1, p.1-6, 2006.
- ZIMMERMANN, T.; KULLA, H.G.; LEISINGER, T. Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal Biochemistry*, v.129, n.1, p.197-203, 1982.
- ZOLLINGER, H. Color Chemistry. 2° Ed. Alemanha: Ed. VCH, 1991, 496p.

*Alexos*

*"Quem pensa pouco erra muito."*

*(Leonardo da Vinci)*

# Ironporphyrin immobilized onto montmorillonite as a biomimetical model for azo dye oxidation

Valéria P. Barros, André L. Faria, Tatiana C.O. MacLeod,  
Luiz A.B. Moraes, Marilda D. Assis\*

*Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP 14040-901, Brazil*

Received 14 September 2007; received in revised form 23 October 2007; accepted 24 October 2007

Available online 20 December 2007

## Abstract

In this work, we studied the oxidation of the azo dye Disperse Orange 3 (DO3) by hydrogen peroxide, catalyzed by 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-methylpyridyl)porphyrin iron(III) chloride immobilized onto montmorillonite K10, FeP-K10. Results showed that the FeP-K10/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system is efficient for discoloration of the DO3 dye, especially at pH 3.0. The catalyst was shown to be relatively stable and could be recycled many times, leading to good yields. DO3 oxidation products were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry, being 4-nitroaniline the main product. *Tert*-butylhydroperoxide and iodossylbenzene were also used as oxidants, giving rise to 4-nitroaniline as product too. The studied system is a good biomimetic model of oxidative enzymes, being a promising discoloring agent for azo dyes.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Azo dye; Supported catalysts; Ironporphyrins; Montmorillonite; Biomimetical models

## 1. Introduction

A number of biomimetic systems have been developed to mimic the function of P-450 enzymes (Mansuy, 2007; Nam et al., 2003; Schiavon et al., 2000; Doro et al., 2000; MacLeod et al., 2007). Development in this area is based on different strategies, and aims at designing selective, stable, and high-turnover catalytic systems (Mansuy, 2007; Vinhado et al., 2002). Metalloporphyrins have been used as cytochrome P450 models and they have been found to be highly efficient homogeneous and heterogeneous catalysts for the oxidation of alkenes, alkanes and xenobiotics such as drugs, pesticides, dyes and other pollutants, in the presence of terminal oxidants like iodossylbenzene, sodium hypochlorite, sodium periodate, *tert*-butylhydroperoxide and hydrogen peroxide (Armijo et al., 2007; Faria et al., 2004; Vinhado et al., 2002).

Pollutants such as azo dyes and their discoloration products have undoubtedly attracted a lot of attention

because of their high environmental impact and toxicological properties, which is an undesired result of their widespread use. Disperse azo dyes account for 65% weight of the dyes used in the textile, pharmaceutical, food, brewing, and cosmetic industries (Lima et al., 2007). The carcinogenic and mutagenic properties of some azo dyes and/or metabolites formed under reducing or oxidizing conditions have been discussed (Oliveira et al., 2007; Zeiner et al., 2006; Hunger, 1994). The toxicity and carcinogenicity of certain azo dyes in mammalian systems may result mainly from their biotransformation via oxidation, hydrolysis, conjugation or reduction catalyzed by enzymatic reactions, including those catalyzed by cytochrome P-450. The generated product can be either more toxic or less toxic than the parent molecule (Oliveira et al., 2007; Hunger, 1994). These compounds can be formed by the cleavage of the azo bond, and many of them are known to be mutagenic and carcinogenic (Oliveira et al., 2007). In addition, an increase in the levels of mutagenic activity can be detected when dye factory effluents are submitted to primary and secondary biological treatment (Kim et al., 2005). The European Union has published a list of 22

\*Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3799; fax: +55 16 3602 4838.  
E-mail address: mddassis@usp.br (M.D. Assis).

aromatic amines classified as carcinogenic, and azo dyes that may lead to any of these amines by cleavage of their azo bond have been banned (Oliveira et al., 2007).

A lot of catalytic systems have been studied with a view to establish more efficient strategies for azo dye discoloration. The majority of these studies have involved metallic complexes immobilized onto solid matrices (Suláková et al., 2007; Aravindhhan et al., 2006; Kim et al., 2005). Heterogeneous catalysis is more advantageous than the homogeneous one because the catalyst can be easily separated from the reaction medium and reaction products, the stability of the catalytic species is increased, and the catalyst is protected against self-destruction. Manganese salen complexes supported on solid matrices such as zeolites (Aravindhhan et al., 2006; Bedioui, 1995) and Cu(II) complexes supported on chitosane are examples of promising alternatives for dye discoloration (Suláková et al., 2007; Wu et al., 2001).

Montmorillonite K10, belonging to the commercially available smectite group, has received a lot of attention recently as an interesting catalyst support (Lei et al., 2007). This mineral combines the properties of interchangeable cations with intercalation and expansion, thus allowing chemists to develop the well-known host–guest chemistry.

Although there is a considerable number of studies on the use of metalloporphyrins in solution or immobilized

onto different supports as biomimetic systems for drug oxidation (Mansuy, 2007; Santos et al., 2005; Melo et al., 2005), there are relatively few studies reporting the application of these catalysts to dye oxidation (Serra et al., 2005; Häger et al., 2001).

Aiming at bridging this gap, in the present study, Disperse Orange 3 (DO3), a monoazo dye (Fig. 1), was chosen as a representative substrate to investigate the oxidation of azo dyes by hydrogen peroxide catalyzed by 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-methylpyridyl)porphyrin iron(III) pentachloride, FeP (Fig. 2), immobilized onto montmorillonite K10. The catalytic results were compared with reactions carried out in homogeneous media and with reactions using other oxidants.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All compounds used in this study were commercially available from Aldrich or Sigma and were of analytical grade purity unless otherwise stated. Hydrogen peroxide (30% w/v, in water) was stored at 5 °C and titrated periodically for purity assessment. Montmorillonite K10 was purchased from Fluka. The free base porphyrin 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-methylpyridyl)porphyrin was purchased from MidCentury. Acetonitrile (ACN) was HPLC grade.

### 2.2. Equipment

The X-ray power diffraction (XRD) spectra were recorded on a Siemens D5005 diffractometer using a graphite monochromator and Cu K $\alpha$  emission lines. The solid samples were placed on a glass plate, and the data were collected at room temperature over the range 2–50°. UV–vis spectra were obtained with a Hewlett-Packard 8452 diode array spectrophotometer. The spectra were recorded in 2 mm path length quartz cells (Hellma). Thermogravimetric analysis (TGA) and differential thermal analysis (DTA) were carried out using a Thermal Analyst TA Instrument SDT Q 600 Simultaneous DTA-TGA-DSC, in nitrogen, at a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>, from 25 to 850 °C. Specific surface areas were determined by analysis of nitrogen adsorption isotherms on a Micromeritics AccSorb 2100E physical adsorption analyzer, according to the BET method (Brunauer et al., 1938).

### 2.3. Immobilization of ironporphyrin onto montmorillonite K10

The FeP was prepared through reaction of the free base porphyrin with iron chloride, following the method of Kachadourian (Kachadourian et al., 1999), and characterized by UV–vis spectroscopy. UV–vis data for FeP in water:  $\lambda_{\text{max}}$  (nm) ( $\epsilon$ ; L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) = 344; 422(7.7 × 10<sup>4</sup>); 598; 638 nm.

The commercial clay montmorillonite K10 was firstly submitted to ion exchange with a NaCl solution (5.0 mol L<sup>-1</sup>), to obtain its sodium form (Na<sup>+</sup>-K10). The solid was then filtered and washed with deionized water until neutral pH was reached, as described in the literature Martinez-Lorente et al. (1996).

FeP (5 mg; 5.5  $\mu$ mol) was added to a suspension of Na<sup>+</sup>-K10 (2 g) in deionized water (50 mL), under magnetic stirring at room temperature. After 24 h, the resulting solid was filtered, washed with deionized water (20 mL), and Soxhlet-extracted with ACN for 24 h. The solid catalyst (FeP-K10) was then dried at 80 °C for 8 h. FeP loading on the supports was determined by using UV–vis spectroscopy to measure the total amount of unloaded FeP in the reaction solution and washings.

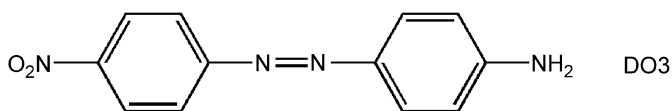


Fig. 1. Structure of the studied azo dye (Disperse Orange 3; DO3).

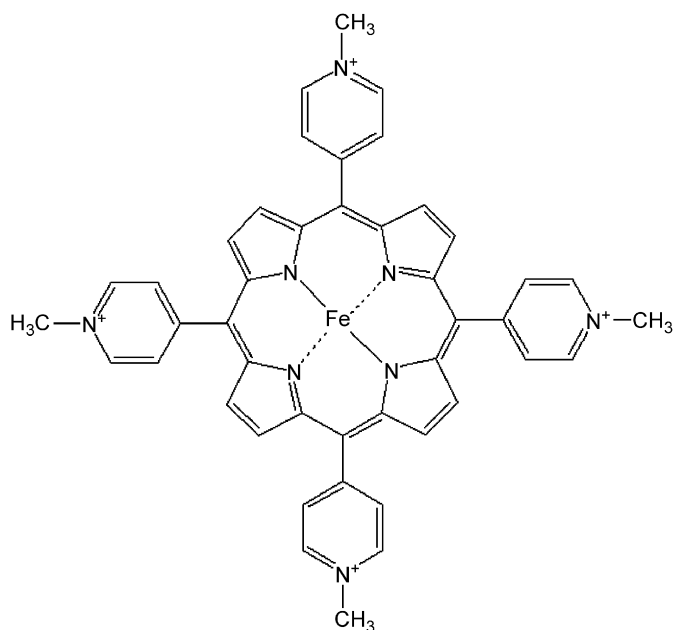


Fig. 2. 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-methylpyridyl)porphyrin iron(III) pentachloride, FeP.

## 2.4. Oxidation reactions

Reactions were carried out in a 3-mL vial covered with a screw cap. A solution of disperse dye in ACN (125  $\mu\text{L}$ ;  $1.25 \times 10^{-6}$  mol) and the oxidant (30% an aqueous hydrogen peroxide,  $7.5 \times 10^{-6}$  mol) were added to a suspension of FeP-K10 (22.7 mg,  $1.25 \times 10^{-7}$  mol of FeP) in buffered aqueous solution and ACN 2:1 (2 mL). Reactions at pH 3.0 were performed in phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ), at pH 6.4 in deionized water, at pH 10.0 in ammonium buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Reactions were accomplished under magnetic stirring, at room temperature, for 12 h. The catalyst/oxidant/dye molar ratio was 1:60:10. After reaction completion, the mixture was filtered and the supernatant was analyzed by visible spectroscopy, through the dye's absorption band at 430 nm. An aliquot of the reaction mixture was also analyzed by gas chromatography–mass spectroscopy (GC–MS).

Recycling of the supported catalyst was performed with the solid recovered from the reaction media through filtration, followed by washing with ACN and drying at room temperature.

The dye discoloration percentage was calculated by the equation

$$\% \text{ discoloration} : \left( \frac{A_i - A_f}{A_i} \right) \times 100,$$

where  $A_i$  is the initial absorbance (before adding the oxidant),  $A_f$  is the final absorbance.

Control reactions were carried out using unloaded montmorillonite ( $\text{Na}^+$ -K10) and also using the supported catalyst in the absence of the oxidant.

## 2.5. GC–MS analyses

GC–MS was performed using a QP2010 mass spectrometer (Shimadzu) fitted with a GC17A gas chromatograph (Shimadzu). The ionization voltage was 70 eV. Gas chromatography was conducted in the temperature-programming mode with a DB-5MS column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ). The initial column temperature was 50  $^\circ\text{C}$  for 5 min, it was then increased linearly at a rate of 10  $^\circ\text{C min}^{-1}$  to 270  $^\circ\text{C}$ , and held at this temperature for 4 min. The temperature of the injection port was 260  $^\circ\text{C}$ , and the GC–MS interface was maintained at 300  $^\circ\text{C}$ . The helium carrier gas flow rate was 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ . Reaction products were identified by comparison of their retention times with known reference compounds, and by comparing their mass spectra to fragmentation patterns observed in the NIST spectral library stored in the computer software (version 1.10 beta; Shimadzu) of the mass spectrometer.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Preparation and characterization of the supported catalyst FeP-K10

Montmorillonite K10 can have  $\text{Mg}^{2+}$  ions substituting  $\text{Al}^{3+}$  ions inside the octahedral sites, leading to lamellas with residual negatives charges that can be neutralized by intercalation of cationic groups such as cationic metalloporphyrins. Taking advantage of this property, the supported FeP was obtained by exchanging the sodium ions present on the montmorillonite matrix with the cationic ironporphyrin  $[\text{Fe}(\text{TMPyP})]^{4+}$ . This procedure rendered a material containing 5.5  $\mu\text{mol}$  of FeP per gram of clay, as determined indirectly by measuring the concentration of FeP in the washing extracts.

The XRD patterns of FeP-K10 and  $\text{Na}^+$ -K10 (for comparison) were recorded at  $2\theta$  values ranging from 5 $^\circ$  to 50 $^\circ$  (Fig. 3). Analysis of the diffractograms revealed that

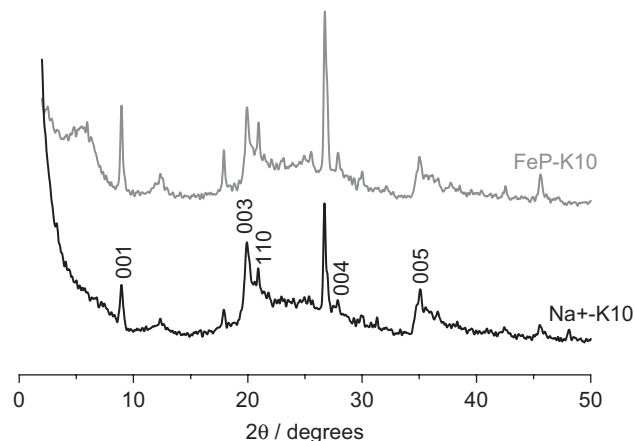


Fig. 3. XRD patterns of montmorillonite K10:  $\text{Na}^+$ -montmorillonite K10,  $\text{Na}^+$ -K10;  $\text{Na}^+$ -montmorillonite K10 with FeP, FeP-K10.

FeP-K10 is structurally similar to  $\text{Na}^+$ -K10, which indicates that the metalloporphyrin is not intercalated between the layers. Since the FeP is strongly attached to the solid, as confirmed by the absence of FeP in the washing extracts, one can conclude that the FeP is present in broken bonds at the edges or defects of the crystal surface, as observed by Bedioui (1995) and others (Machado et al., 2002; Dias et al., 2000) for similar systems.

The surface area of the clay was determined before and after immobilization of the FeP, and values of 250.56 and 225.50  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  were obtained, respectively. Although we observed a decrease in the surface area after catalyst immobilization, this still is a material with relatively high surface area for catalysis, as can be seen through the good results concerning dye discoloration, as discussed below.

The presence of the FeP on the solid was also confirmed by UV–vis spectroscopy of an aqueous suspension of the material (Fig. 4). The spectrum displays the characteristic FeP Soret band at 450 nm. This band is red-shifted when compared to that of the parent FeP in aqueous solution (424 nm), which is a result of the  $\pi$  interaction of the metalloporphyrin aromatic ring with the surface of the support (oxygen-atom planes of the aluminosilicates) (Crestini et al., 2004). This behavior is expected for supported metalloporphyrins, and it has been observed by us for other solid catalysts (Gotardo et al., 2005; Guedes et al., 2005; Faria et al., 2004), as well as reported by many other authors who studied similar systems (Evans et al., 2001; Cooke et al., 1995).

The thermal stability of the solid catalyst was investigated by thermogravimetry (TGA and DTG) and DTA. The TGA–DTA–DTG data obtained for the  $\text{Na}^+$ -K10 and FeP-K10 materials are shown in Fig. 5A and B, respectively.

The TGA–DTG curves for  $\text{Na}^+$ -K10 and FeP-K10 are similar (Fig. 5A and B) and show that weight losses occur mainly between 50 and 200  $^\circ\text{C}$ , which can be attributed to the loss of water molecules that are physically adsorbed onto the surface of the solid. Two endothermic peaks at 70



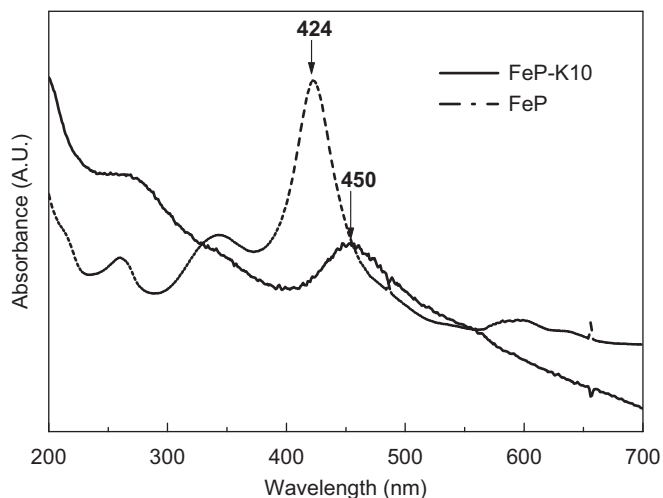


Fig. 4. UV-vis spectrum of a FeP-K10 suspension in water (—) and of a FeP aqueous solution (---).

and 120 °C in the DTA curves confirm this attribution (Fig. 5B). Second mass losses from 400 to 600 °C correspond to the loss of water molecules that are hydrogen-bonded to the clay sheets, as evidenced by a small endothermic peak at about 570 °C in the DTA curves. OH loss from a defective montmorillonite phase (produced by mechanical deformation) continuously occurs up to 600 °C, as seen from a small endothermic peak at about 650 °C in the DTA curve (Brunauer et al., 1938). The FeP-K10 TGA, DTG curves do not give any evidence of organic material loss, which is easily explained by the fact that the amount of loaded organic catalyst is much lower than the accuracy of the thermobalance (estimated S.E.~1%). Therefore, the differences in the final yields of both Na<sup>+</sup>-K10 and FeP-K10 can just be related to the degree of material hydration. In conclusion, no changes in the thermal stability of the clay after catalyst incorporation into the support structure can be observed.

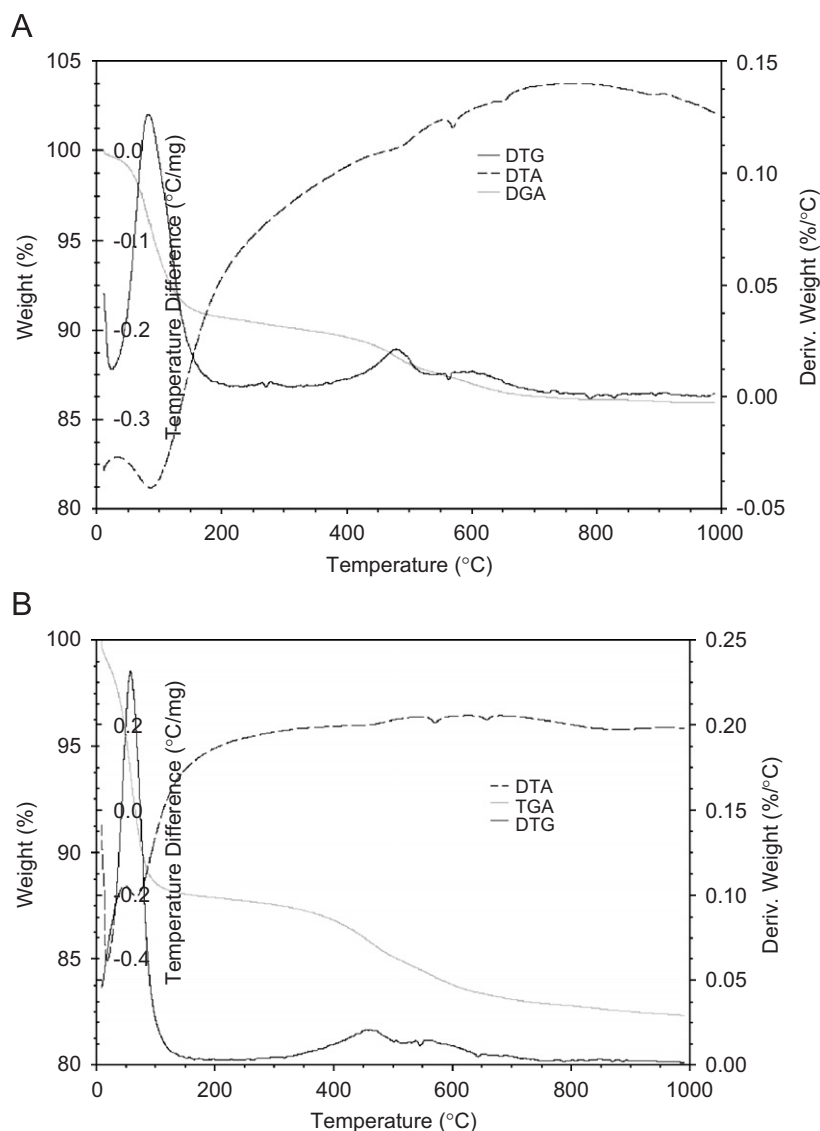


Fig. 5. (A) TGA–DTG–DTA curves for Na<sup>+</sup>-K10. Heating rate: 20 °C min<sup>-1</sup>. (B) TGA–DTG–DTA curves for FeP-K10. Heating rate: 20 °C min<sup>-1</sup>.

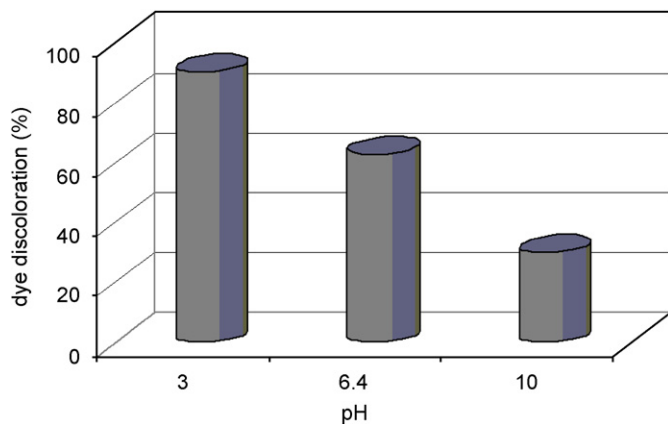


Fig. 6. DO3 dye discoloration in ACN/H<sub>2</sub>O (1:2), at pH 3.0, 6.4 and 10.0.

### 3.2. DO3 oxidation as monitored by UV–vis

Azo dye oxidation is normally very sensitive to pH, due to the presence of nitrogen atoms with different base characters. At low pH values, oxidation generally occurs on the azo group, mainly in strongly oxidizing medium. In higher pH media, oxidation occurs on the more basic amino group (Oakes and Gratton, 1998; Pentimalli, 1959). Because of these reported effects, we firstly investigated the pH influence on the dye oxidation by selecting three pH conditions: 3.0, 6.4, and 10.0.

Rupture of an azo bond during azo dye oxidation results in the disappearance of the absorption band at ~400 nm, which is due to the  $\pi \rightarrow \pi^*$  transition of the azo group (Kim et al., 2005). This enables the monitoring of DO3 oxidation through its maximum absorption band at 430 nm ( $\epsilon = 8.5 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Fig. 6 shows the dependence of the DO3 percent discoloration on pH in the presence of the FeP-K10 catalyst and hydrogen peroxide. While only 30% of dye discoloration occurs at higher pH, up to 90% is degraded in acid medium (pH 3.0), as monitored through the dye absorption band at 430 nm. These results show that the protonation of the azo nitrogen is an important step of the oxidation process, which agrees with previously reported data (Oakes and Gratton, 1998; Pentimalli, 1959).

On the basis of these results, the oxidation of DO3 monitored by UV–vis was investigated at pH 3.0 using ACN/phosphate buffer medium, at room temperature.

Fig. 7 shows that the absorption band of the dye disappears after 6 h of reaction when the dye is oxidized by hydrogen peroxide in the presence of FeP-K10. The dye color fades off and the solid, which was dark brown at first, acquires a light brown or yellowish color. No discoloration is observed when control reactions are carried out in the absence of either the catalyst or the oxidant. If the reaction occurs in the presence of unloaded K10; that is, Na<sup>+</sup>-K10, part of the dye adsorbs onto the solid, maintaining the same color it had in solution. However, the supernatant still exhibits the dye color, thus indicating saturation of

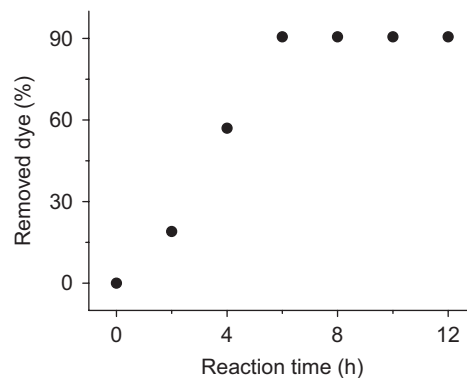


Fig. 7. Percentage of azo dye removal as a function of time in ACN/H<sub>2</sub>O (1:2), pH 3.0, in the presence of FeP-K10.

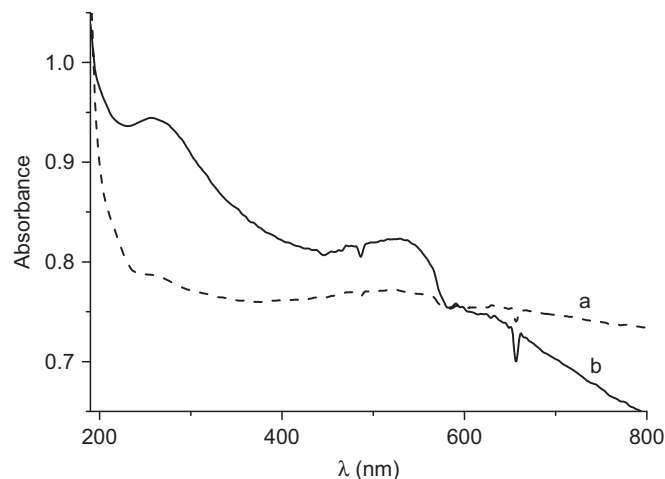


Fig. 8. UV–vis spectra of a suspension of DO3 in ACN/H<sub>2</sub>O (1:2) in pH 3.0, after 12h of reaction with hydrogen peroxide in the presence of (a) FeP-K10 and (b) Na<sup>+</sup>-K10.

dye adsorption. Therefore, although the high cationic change capacity of the dye favors its adsorption onto the support, the azo bond remains intact in the absence of the catalyst.

An additional proof to the fact that depletion of the dye absorption band is due to its discoloration catalyzed by FeP-K10 and not to its adsorption onto the clay is that the solid catalyst recovered after the reaction and analyzed by UV–Vis spectroscopy does not display any absorption band due to DO3 (Fig. 8a), which confirms that the azo bond was really cleaved. When the same control reaction is carried out using the unloaded K10 (Na<sup>+</sup>-K10) in the same conditions, the absorption band due to DO3 is still present, thus proving that dye discoloration occurs in the presence of the FeP only (Fig. 8b).

FeP-K10 stability and the possibility of catalyst reuse were investigated by means of five recycling reactions, carried out by recovering the solid catalyst from the reaction medium and using it again in a new oxidation. Good dye discoloration reproducibility is observed until

the fifth reaction, as shown in Fig. 9. These results once more show that the dye discoloration is a catalyzed process.

### 3.3. DO3 oxidation as monitored by GC–MS

In order to investigate the products generated from FeP-K10-catalyzed DO3 oxidation by hydrogen peroxide, the reaction supernatants were analyzed by GC coupled with MS. Because it is easier to work at pH 6.4, we chose to analyze the reactions carried out at this pH value.

Control reactions in the absence of the catalyst did not lead to any product formation, so only the peak corresponding to the DO3 dye with a retention time of 29.0 min and a signal in  $m/z$  242 were detected by GC–MS. Dye identification was accomplished by comparison between this signal and NIST spectral library data. Also, the retention time and fragmentation profile were compared with those of an authentic DO3 solution.

The control reaction carried out in the absence of the dye generated a single product with a retention time of 13.6 min in the GC chromatogram and MS signal in  $m/z$  185. Comparison with the NIST spectral library allowed identification of this product as tributylamine, which was confirmed by comparison with an authentic sample analyzed in the same conditions. To verify whether

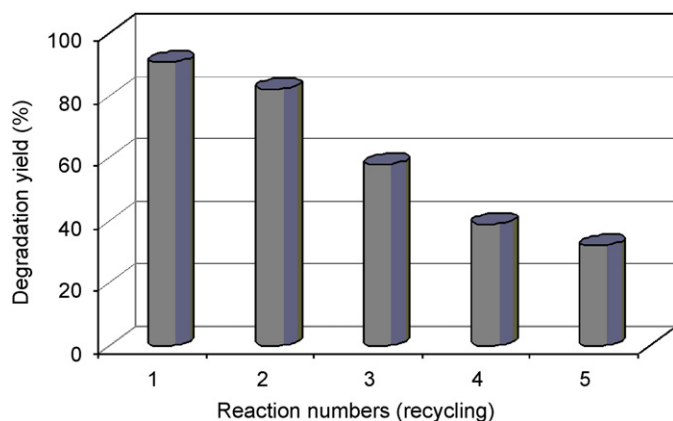


Fig. 9. FeP-K10 recycling in azo dye discoloration reactions (6 h) ACN/H<sub>2</sub>O 1:2, pH 3.0.

tributylamine resulted from reaction of the catalyst with the solvent ACN, another reaction was performed in methanol. The same product was obtained in the latter solvent. However, no tributylamine formation was observed in another control reaction in the absence of FeP, leading to the conclusion that tributylamine is generated from the destruction of a small amount of metalloporphyrin as a result of the attack of excess oxidant to the catalyst when the substrate (dye) is absent.

GC–MS analysis of the reaction supernatant resulting from the FeP-K10-catalyzed DO3 oxidation by hydrogen peroxide is shown in Fig. 10.

Chromatogram reveals the presence of three peaks with retention times 13.59, 19.24 and 29.0 min (I, II and III, respectively). Peaks I and III correspond to tributylamine and DO3, respectively, as described above. Peak II corresponds to a signal in  $m/z$  138 in the mass spectrum. Comparison with NIST spectral library data allowed us to identify this product as 4-nitroaniline. This attribution was confirmed by comparing both the retention time and fragmentation profile of the product with those of an authentic 4-nitroaniline sample. 4-Nitroaniline is also the main product from the *in vitro* DO3 oxidation catalyzed by systems involving H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* (Zhao et al., 2006). So the system studied by us is a good model of this class of enzymes.

DO3 oxidation reactions by *tert*-butylhydroperoxide carried out in the same conditions also lead to 4-nitroaniline as the sole product. This same compound is obtained in homogeneous medium in the case of both hydrogen peroxide and *tert*-butylhydroperoxide (Fig. 11).

Reactions carried out in the absence of oxygen lead to the same results above, indicating that the mechanism of 4-nitroaniline production is not radicalar. So, heterolytic cleavage of the peroxide O–O bond probably occurs, with formation of the high-valent ferryl porphyrin  $\pi$ -cation radical species, Fe<sup>IV</sup>(O)P<sup>•+</sup>, which is the species generally responsible for oxygen transfer in catalytic systems involving FePs (Groves, 2006; Mansuy, 2007).

Apart from 4-nitroaniline as the main product, we can also observe generation of a compound with retention time of 28.51 min and signal in  $m/z$  272 in the mass spectrum

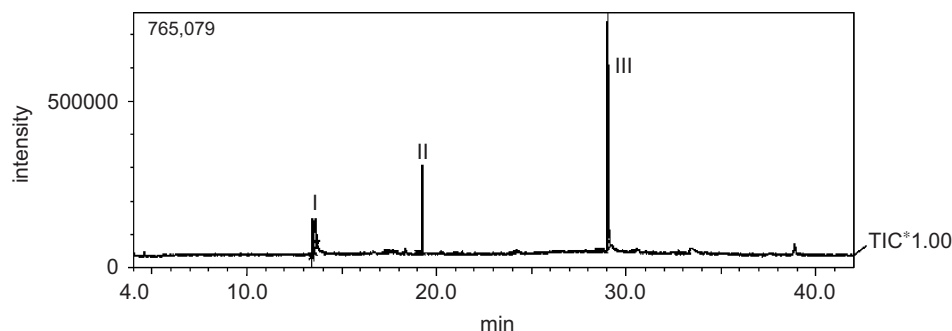


Fig. 10. Chromatogram of the metabolites generated from discoloring of Disperse Orange 3 in the presence of FeP-K10/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 6.4. Peak I, tributylamine; peak II, 4-nitroaniline; and peak III, Disperse Orange 3.

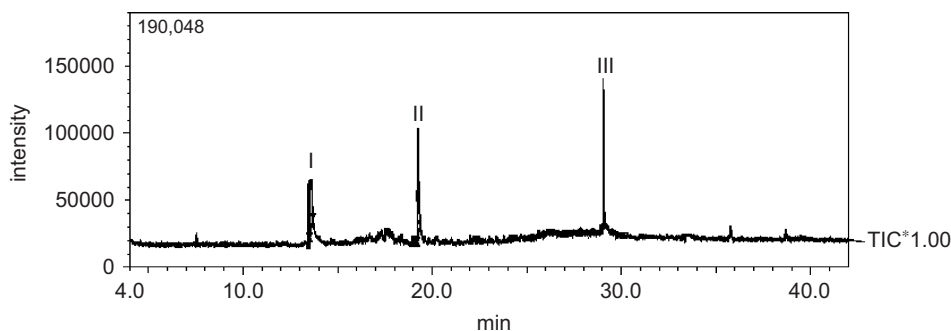


Fig. 11. Chromatogram of the metabolites generated from discoloring of Disperse Orange 3 in the presence of FeP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 6.4. Peak I, tributylamine; peak II, 4-nitroaniline; and peak III, Disperse Orange 3.

Table 1  
Retention times, molecular ion, DO3 dye fragments, and DO3 oxidation products in the presence of various oxidants

Compounds	R <sub>t</sub> (min)	Molecular ion (MI)	Fragment ( <i>m/z</i> )
Tributylamine	13.59	185	185 (8%), 142 (100%), 100 (90%), 84 (10%), 57 (25%), 44 (60%), 41 (40%), 40 (20%)
4-Nitroaniline	19.24	138	138 (71%), 122 (10%), 108 (63%), 92 (40%), 80 (33%), 65 (100%), 52 (17%), 41 (12%)
4,4'-Dinitroazobenzene	28.51	272	272 (38%), 182 (10%), 150 (77%), 122 (100%), 106 (15%), 92 (50%), 76 (73%), 63 (27%), 50 (48%)
Disperse Orange 3	29.03	242	242 (20%), 212 (22%), 120 (35%), 92 (100%), 65 (51%)

when iodosylbenzene is employed as oxidant. Comparison with an authentic sample showed that this compound is 4,4'-dinitroazobenzene. This result evidences that iodosylbenzene is not as efficient as peroxides when azo dye bond cleavage is concerned.

Table 1 shows the retention times, molecular ions and fragmentations of the DO3 dye and its oxidation products obtained in the presence of various oxidants.

Analysis of the reaction supernatant obtained after azo dye oxidation by hydrogen peroxide in pH 3.0 shows that 4-nitroaniline ( $t = 19.2$  min) is the main product. However, other compounds are also formed in trace amounts, but it was not possible to carry out their identification due to their low concentration. These results corroborate those obtained by UV–vis spectroscopy, which had shown that DO3 oxidation is pH-dependent.

#### 4. Conclusion

FeP-K10/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is an efficient system for DO3 dye discoloration. The catalyst is relatively stable, can be easily separated from the reaction products, and leads to good yields when recycled. The dye discoloration is pH-dependent, being the best results achieved in pH 3.0, where the azo bond is more easily cleaved. The main product generated from DO3 oxidation by various oxidants is 4-nitroaniline (~35% conversion), as in the case of the naturally occurring ligninolytic enzymes described in the literature. Therefore, the studied system is a good biomimetic model of this class of oxidative enzymes, and

it offers promising future applications in azo dye discoloration.

Studies using other azo dye are underway in our laboratory, and other catalytic systems are also being investigated, aiming at elucidating the oxidation/discoloration mechanisms of this class of compounds, which result in the formation of aromatic amines.

#### Acknowledgments

The authors thank CNPq, CAPES and FAPESP for financial support, Dr. Cynthia Maria de Campos Prado Manso for linguistic advice, Dr. Kátia Jorge Ciuffi (University of Franca) and Marco A. Schiavon (University of São João del Rei) for the TGA, DTA analyses, and Izabel Cristina C. Turatti (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP) for the GC–MS analyses.

#### References

- Aravindhan, R., Fathima, N.N., Rao, J.R., Nair, B.U., 2006. Wet oxidation of acid brown dye by hydrogen peroxide using heterogeneous catalyst Mn-salen-Y zeolite: a potential catalyst. *Journal of Hazardous Materials* 138, 152–159.
- Armijo, F., Goya, M.C., Canales, M.R., Arévalo, M.J., Aguirre, M.J., 2007. Electrocatalytic oxidation of nitrite to nitrate mediated by Fe(III) poly-3-aminophenyl porphyrin grown on five different electrode surfaces. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 268, 148–154.
- Bedioui, F., 1995. Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and schiff-base complexes as models for

- biomimetic oxidation catalysts: an overview. *Coordination Chemistry Reviews* 144, 39–68.
- Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* 60, 309–319.
- Cooke, P.R., Gilmartin, C., Gray, G.W., Smith, J.R.L., 1995. Characterisation of iron tetraarylporphyrins co-ordinatively bound to solid supports. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1573–1578.
- Crestini, C., Pastorini, A., Tagliatesta, P., 2004. Metalloporphyrins immobilized on montmorillonite as biomimetic catalysts in the oxidation of lignin model compounds. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 208, 195–202.
- Dias, P.M., Faria, D.L.A., Constantino, V.L.R., 2000. Spectroscopic studies on the interaction of tetramethylpyridylporphyrins and cationic clays. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 38, 251–266.
- Doro, F.G., Smith, J.R.L., Ferreira, A.G., Assis, M.D., 2000. Oxidation of alkanes and alkenes by iodosylbenzene and hydrogen peroxide catalysed by halogenated manganese porphyrins in homogeneous solution and covalently bound to silica. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 164, 97–108.
- Evans, S., Smith, J.R.L., 2001. The oxidation of ethylbenzene by dioxygen catalysed by supported iron porphyrins derived from iron(III) tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 174–180.
- Faria, A.L., Airoidi, C., Doro, F.G., Fonseca, M.G., Assis, M.D., 2004. Anchored ironporphyrins—the role of talc-aminofunctionalized phyllosilicates in the catalysis of oxidation of alkanes and alkenes. *Applied Catalysis A: General* 268, 217–226.
- Gotardo, M.C.A.F., Guedes, A.A., Schiavon, M.A., José, N.M., Yoshida, I.V.P., Assis, M.D., 2005. Polymeric membranes: the role this support plays in the reactivity of the different generations of metalloporphyrins. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 229, 137–143.
- Groves, J.T., 2006. High-valent iron in chemical and biological oxidations. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100, 434–447.
- Guedes, A.A., Smith, J.R.L., Nascimento, O.R., Guedes, D.F.C., Assis, M.D., 2005. Catalytic activity of halogenated iron porphyrins in alkene and alkane oxidations by iodosylbenzene and hydrogen peroxide. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16, 835–843.
- Häger, M., Holmberg, K., Gonsalves, A.M.d'A.R., Serra, A.C., 2001. Oxidation of azo dyes in oil-in-water microemulsions catalyzed by metalloporphyrins in presence of lipophilic acids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 183–185, 247–257.
- Hunger, K., 1994. On the toxicology and metabolism of azo dyes. *Chimia* 48, 520–522.
- Kachadourian, R., Batini-Haberle, I., Fridovich, I., 1999. Syntheses and superoxide dismuting activities of partially (1-4)  $\alpha$ -chlorinated derivatives of manganese(III) meso-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin. *Inorganic Chemistry* 38, 391–396.
- Kim, G.Y., Lee, K.B., Cho, S.H., 2005. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. *Journal of Hazardous Materials* 126, 183–188.
- Lei, Z., Ma, G., Jia, C., 2007. Montmorillonite (MMT) supported tin(II) chloride: an efficient and recyclable heterogeneous catalyst for clean and selective Baeyer–Villiger oxidation with hydrogen peroxide. *Catalysis Communications* 8, 305–309.
- Lima, R.O.A., Bazo, A.P., Salvadori, D.M.F., Rech, C.M., Oliveira, D.P., Umbuzeiro, G.A., 2007. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 626, 53–60.
- Machado, A.M., Wypych, F., Drechsel, S.M., Nakagaki, S., 2002. Study of the catalytic behavior of montmorillonite/iron(III) and Mn(III) cationic porphyrins. *Journal of Colloid and Interface Science* 254, 158–164.
- Mac Leod, T.C.O., Barros, V.P., Faria, A.L., Schiavon, M.A., Yoshida, I.V.P., Queiroz, M.E.C., Assis, M.D., 2007. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 273, 259–264.
- Mansuy, D., 2007. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. *Comptes Rendus Chimie* 10, 392–413.
- Martinez-Lorente, M.A., Battioni, P., Kleemiss, W., Bartoli, J.F., Mansuy, D., 1996. Manganese porphyrins covalently bound to silica and montmorillonite K10 as efficient catalysts for alkene and alkane oxidation by hydrogen peroxide. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 113, 343–353.
- Melo, A.J.B., Iamamoto, Y., Maestrin, A.P.J., Smith, J.R.L., Santos, M.D., Lopes, N.P., Bonato, P.S., 2005. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphyrins. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 226, 23–31.
- Nam, W., Park, S.E., Lim, I.K., Lim, M.H., Hong, J., Kim, J., 2003. First direct evidence for stereospecific olefin epoxidation and alkane hydroxylation by an oxoiron(IV) porphyrin complex. *Journal of the American Chemical Society* 125, 14674–14675.
- Oakes, J., Gratton, P., 1998. Kinetic investigations of the oxidation of methyl orange and substituted arylazonaphthol dyes by peracids in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2563–2568.
- Oliveira, D.P., Carneiro, P.A., Sakagami, M.K., Zanoni, M.V.B., Umbuzeiro, G.A., 2007. Chemical characterization of a dye processing plant effluent—identification of the mutagenic components. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 626, 135–142.
- Pentimalli, L., 1959. Researches on the aromatic azocompounds: the oxidation of the 4-dimethylamino-azobenzene. *Tetrahedron* 5, 27–37.
- Santos, A.C.M.A., Smith, J.R.L., Assis, M.D., 2005. Chloroquinone-iron(III) tetra-rylporphyrin interactions and their effect on chloroquinone oxidations catalyzed by iron(III) tetra-rylporphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 9, 326–333.
- Schiavon, M.A., Iwamoto, L.S., Ferreira, A.G., Iamamoto, Y., Zanoni, M.V.B., Assis, M.D., 2000. Synthesis and characterization of a novel series of meso (nitrophenyl) and meso (carboxyphenyl) substituted porphyrins. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11, 458–466.
- Serra, A.C., Docal, C., Gonsalves, A.M.d'A.R., 2005. Efficient azo dye degradation by hydrogen peroxide oxidation with metalloporphyrins as catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 238, 192–198.
- Suláková, R., Hrdina, R., Soares, G.M.B., 2007. Oxidation of azo textile soluble dyes with hydrogen peroxide in the presence of Cu(II)–chitosan heterogeneous catalysts. *Dyes and Pigments* 73, 19–24.
- Vinhado, F.S., Martins, P.R., Masson, A.P., Abreu, D.G., Vidoto, E.A., Nascimento, O.R., Iamamoto, Y., 2002. Supported iron(III)porphyrins pentafluorophenyl-derivatives as catalysts in epoxidation reactions by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: the role of the silica-support and sulfonatophenyl residues in the activation of the peroxidic bond. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 188, 141–151.
- Wu, F.C., Tseng, R.L., Juang, R.S., 2001. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan. *Water Research* 35, 613–618.
- Zeiner, M., Rezić, I., Steffan, I., 2006. TLC determination of allergenic and carcinogenic dyes. *Toxicology Letters* 164, S184.
- Zhao, X., Hardin, I.R., Hwang, H.M., 2006. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57, 1–6.

## Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug

T.C.O. Mac Leod<sup>a</sup>, V.P. Barros<sup>a</sup>, A.L. Faria<sup>a</sup>, M.A. Schiavon<sup>b</sup>,  
I.V.P. Yoshida<sup>c</sup>, M.E.C. Queiroz<sup>a</sup>, M.D. Assis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup> DCNAT, Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, MG, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Química, UNICAMP, CP 6154, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Received 5 March 2007; received in revised form 2 April 2007; accepted 3 April 2007

Available online 7 April 2007

### Abstract

In this work, we investigated carbamazepine (CBZ) oxidation by 3-chloroperoxybenzoic acid (*m*-CPBA), *tert*-butyl hydroperoxide 70 wt.% (*t*-BuOOH) or hydrogen peroxide 30 wt.%, mediated by a salen complex in homogeneous medium or encapsulated in a polymeric matrix based on poly(dimethylsiloxane) (PDMS). The formation of carbamazepine 10,11-epoxide (CBZ-EP) is highly dependent on the oxidant, pH, solvent and co-catalyst. CBZ oxidation by *m*-CPBA, *t*-BuOOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is more efficient at low pH values, although the pH influence is small in the case of *m*-CPBA and *t*-BuOOH, in the entire pH range. This shows that the presence of substituents linked to the –OOH group of *m*-CPBA and *t*-BuOOH affects the catalytic activity of the studied system significantly. The encapsulated Jacobsen catalyst proved to be an efficient catalyst for carbamazepine oxidation by the oxidants *t*-BuOOH and *m*-CPBA. However, the hybrid polymeric membrane acted as a barrier against the oxidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, preventing it from reaching the bulk of the membrane, making substrate oxidation impossible in this case.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Carbamazepine; Salen complex; Catalysis; Biomimetic models

### 1. Introduction

A number of biomimetic systems have been developed to mimic the function of P-450 enzymes [1]. Development in this area is based on different strategies with the aim of designing selective, stable and high-turnover catalytic systems [2]. Salen complexes, such as the Jacobsen catalyst, and metalloporphyrins have been used as cytochrome P450 models and have been found to be highly efficient homogeneous catalysts for alkene and alkane oxidation in the presence of terminal oxidants such as iodosylbenzene, sodium hypochlorite, sodium periodate, *tert*-butylhydroperoxide and hydrogen peroxide [3–14]. However, there are relatively few reported studies on drug oxidation using metalloporphyrins as catalyst; some examples include carbamazepine [15,16], lidocaine, odapipam, aminopyrine [17],

acetaminophen [18,19], and others [20,21]. Recent reviews by Bernadou and Meunier [22] and Mansuy [23] have compiled most of these studies. As for salen complexes, reports on their use as catalysts for drug oxidations are even scarcer in the literature.

Carbamazepine (CBZ), 5-H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide (Fig. 1) is an antiepileptic drug used in clinical practice as first-line treatment for generalized tonic–clonic and partial seizures [24]. This anticonvulsant is a suitable substrate for epoxidation studies, and it was first used by Meunier in *in vitro* studies using water-soluble metalloporphyrins as catalyst. Over the last two decades, 33 CBZ metabolites have been isolated and identified in the urine from patients on an oral dose [25,26]. Of these metabolites, carbamazepine 10,11-epoxide (CBZ-EP) is the most important from a clinical point of view (Fig. 1). In experimental animals, CBZ-EP is as pharmacologically active as the parent compound.

Homogeneous catalysis often provides the best results in terms of product yield, whereas heterogeneous catalysis offers advantages such as easy product purification, potential cat-

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3799; fax: +55 16 3602 4838.  
E-mail address: [mddassis@usp.br](mailto:mddassis@usp.br) (M.D. Assis).

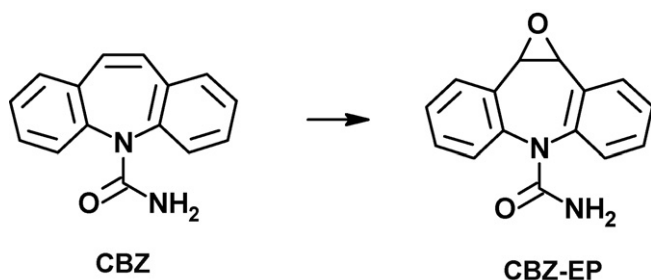


Fig. 1. Carbamazepine (CBZ) and its major metabolite (CBZ-EP).

alyst recycling, and ability to mimic the protein active site of the enzyme [27–30] with regard to the Jacobsen catalyst, another advantage of supporting this complex is obtaining increased stability, since the main deactivation process observed in homogeneous phase, formation of inactive dimeric  $\mu$ -oxo manganese(IV) species, is hindered when the complex is immobilized on a matrix [31]. A variety of solid supports have been tested, including inorganic matrices such as silica, alumina, zeolites, cationic and anionic clays, as well as polymeric supports [32–36].

Polymeric membranes have been considered innovative materials for immobilization of salen complexes. This support offers many advantages, such as its higher affinity for reagents. The hydrophobic membrane acts as a barrier, isolating and controlling the access of both the substrate and the oxidant to the active site, thus avoiding the presence of excess polar substances in its vicinity, and rendering a hydrophobic environment for substrate binding [30,37,38].

In the present study, we have investigated carbamazepine oxidation mediated by the Jacobsen catalyst, Mn(salen), in homogeneous medium, in order to understand the effect of the axial ligand, solvent, oxidant and pH on the catalytic activity of this complex. We also investigated the role of the polymeric

membrane on the reactivity of the encapsulated Jacobsen catalyst in CBZ epoxidation. Although the metabolic pathways of CBZ epoxidation are known, this is the first report on use of the Jacobsen catalyst immobilized on a solid support for drug oxidation.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

The Jacobsen catalyst was purchased from Acros Organics. The synthetic procedure employed for the encapsulation of the catalyst into a polymeric PDMS-based membrane, Mn(salen)-PM (Fig. 2) and the characterization of Mn(salen)-PM by UV–vis spectroscopy, TGA, DTA, DSC, and SEM techniques have been described elsewhere [30].

Carbamazepine (CBZ) and 10,11-carbamazepine oxide (CBZ-EP) were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Co. *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH), 70 wt% solution in water, and 3-chloroperoxybenzoic acid (*m*-CPBA) were acquired from Acros Organics. Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30% in water) was supplied by Fluka and stored at 5 °C; it was periodically titrated to confirm its purity. Acetonitrile (ACN) HPLC grade was purchased from Mallinckrodt. Water used in the experiments was purified by a Milli-Q, Millipore system. Imidazole, 4-*tert*-butylpyridine, trimethylamine *N*-oxide, ammonium acetate, and sodium bicarbonate were acquired from Acros Organics. Pyridine was obtained from Fluka.

### 2.2. CBZ epoxidation

In a typical experiment, reactions were carried out in a 3 mL vial containing a screw cap. Briefly, to a vial containing the Jacobsen catalyst ( $6.0 \times 10^{-7}$  mol) in solution or immobilized on a polymeric membrane containing 0.02% or 2%

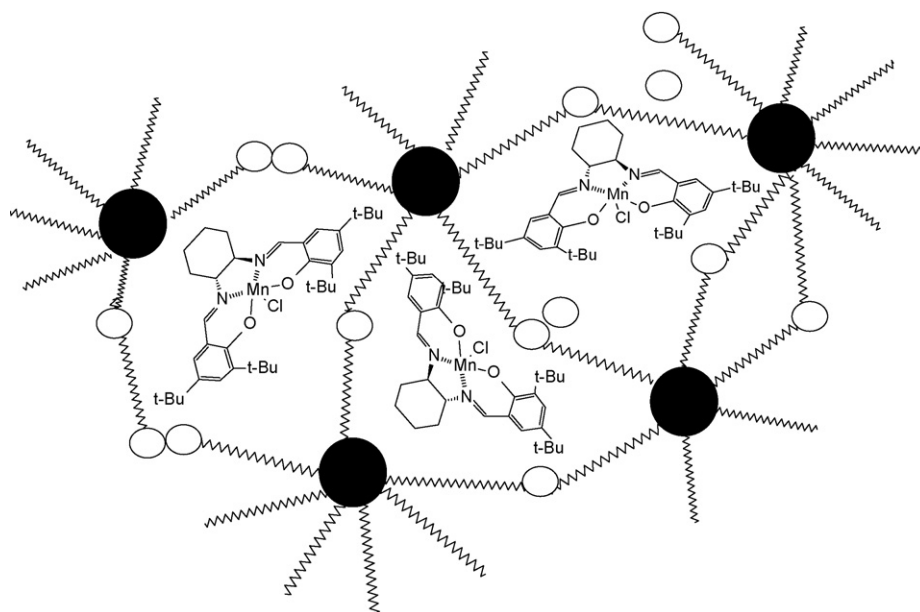


Fig. 2. Jacobsen catalyst encapsulated in a polymeric PDMS-based membrane. Black circle: silica oligomers; white circle: PETA/AS clusters; zigzag line: PDMS.

of Mn(salen) in relation to the total mass of the polymeric membrane (1800 and 18 mg, respectively) we added 5.0 mg of carbamazepine ( $2.1 \times 10^{-5}$  mol) and  $2.4 \times 10^{-5}$  mol of the oxidant (*m*-CPBA, *t*-BuOOH or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in buffered aqueous solution and acetonitrile 1:1 (2 mL). Reactions at pH 2 were performed in phosphate buffer, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 mol L<sup>-1</sup>), at pH 4 in acetate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>), at pH 6–8 in phosphate buffer, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.1 mol L<sup>-1</sup>), and the pH of the reaction solution was adjusted by adding either HCl (0.5 mol L<sup>-1</sup>) or NaOH (0.5 mol L<sup>-1</sup>) solutions whenever it was necessary. Reactions were carried out for 2 h homogeneous medium or 24 h heterogeneous medium, under magnetic stirring at room temperature, at a catalyst:oxidant:drug molar ratio of 1:40:35. At the end of the reaction, magnetic stirring was interrupted, and an aliquot of the reaction mixture (50 μL) was withdrawn. After Mn(salen) extraction, this aliquot was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Mn(salen) extraction was carried out by addition of hexane (500 μL) and a mobile phase (500 μL). The mixture was vortex-mixed and centrifuged; the aqueous phase (mobile phase) was then injected into the chromatographic system. This clean-up procedure did not remove unreacted carbamazepine or the oxidation products. The oxidation product was identified by comparing its retention time with those of an authentic CBZ-EP standard. Yields are based on the added drug and were determined by a calibration curve.

The axial ligand effect was investigated for reactions performed in the presence of imidazole, pyridine, 4-*tert*-butylpyridine, trimethylamine *N*-oxide, ammonium acetate or sodium bicarbonate, at a Mn(salen):axial ligand molar ratio of 1:10.

Control reactions were carried out under the same conditions in the absence of the catalyst and in the presence of the polymeric membrane alone.

### 2.3. HPLC analyses

The HPLC analyses were performed on a SHIMADZU liquid chromatograph equipped with an LC-10AS solvent pump, an SPD-M 10A VP spectrophotometric detector coupled to a CTO-10A VP column oven, and an SCL-10A VP system controller. Separation of the carbamazepine and the oxidation product (CBZ-EP) was carried out in a Lichrospher 100RP-18 column, with a particle size of 5 μm (125 mm × 4 mm), supplied by Merck. The analytical column was protected by a Lichrospher guard column (4 mm × 4 mm). The mobile phase consisted of Milli-Q water/acetonitrile 70:30 (v/v), flow rate of 1 mL/min, detection was carried out at 210 nm. The isocratic system was operated at ambient temperature and required less than 15 min of chromatographic time.

## 3. Results and discussion

### 3.1. The effect of different solvents on the epoxidation of carbamazepine by *m*-CPBA catalyzed by Mn(salen)

In order to choose the best reaction medium, acetonitrile, methanol, ethanol, dichloromethane and dichloroethane were

Table 1

The effect of different solvents on carbamazepine epoxidation catalyzed by Mn(salen) using *m*-CPBA as oxidant

Entry	Solvent	Epoxide yield (%) <sup>a</sup>
1	Acetonitrile (CAN)	69
2	Methanol (MeOH)	44
3	Ethanol (EtOH)	41
4	Dichloromethane (DCM)	9
5	Dichloroethane (DCE)	13

Catalyst:co-catalyst:substrate:oxidant molar ratio = 1:10:40:35. Blank reactions (absence of catalyst): CBZ-EP not detected.

<sup>a</sup> Epoxide yields (%) were measured relative to the CBZ at pH 4.

tested for carbamazepine oxidation reactions. The results are shown in Table 1.

Carbamazepine solubility was a determinant of the epoxide yield, once the studied drug is a solid with limited solubility in apolar solvents. Therefore, in the case of dichloromethane and dichloroethane, in which carbamazepine could not dissolve completely, low catalytic activity was obtained (Table 1, entries 4 and 5). In contrast, high CBZ-EP yields were obtained in polar solvents, where the drug was soluble (Table 1, entries 1–3).

Among the polar solvents, the efficiency of the Jacobsen catalyst in methanol and ethanol was lower compared to acetonitrile. This is because the alcohol can act as a substrate, thus competing with carbamazepine for the catalytic species, leading to the formation of unwanted by-products. In acetonitrile, which does not compete with CBZ for the catalytically active species, the Jacobsen catalyst was able to oxidize the drug with yields as high as 69%. Such high yields are due to the higher ability of ACN to stabilize the intermediate catalytic species oxo-manganese (V) since this solvent has a high donor number (DN = 14.1) [39,40]. ACN was also the most efficient in several other reported systems involving salen complexes [14,41,42].

### 3.2. The effect of different oxidants and pH on carbamazepine epoxidation catalyzed by Mn(salen)

Several oxygen donors such as KHSO<sub>5</sub>, *m*-CPBA and *t*-BuOOH have been used for carbamazepine oxidation in systems involving water-soluble metalloporphyrins [43,44]. These studies showed the important dependence of CBZ-epoxide formation on the pH of the reaction solutions. CBZ conversion was above 70% in acidic solutions, with a decrease in the catalytic efficiency above pH 6 [43]. In contrast, when iron and manganese complexes of cross-bridged tetraazamacrocycles were used as catalyst, the oxidation at pH 10 produced four more times CBZ-EP compared to the reaction at pH 7, using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as oxidant [45]. In studies with cobalt-containing polyoxotungstate [Co(PW<sub>11</sub>O<sub>39</sub>)]<sup>5-</sup> and KHSO<sub>5</sub> as oxidant, the oxide product yield was high at pH 5, whereas only small amounts of CBZ-EP were obtained at low and high pH values (e.g., pH <3 and >6). As for the oxidants *t*-BuOOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> they did not produce any CBZ-EP in the presence of [Co(PW<sub>11</sub>O<sub>39</sub>)]<sup>5-</sup> as catalyst [46]. In view of these contrasting results, we decided to study the pH effect on carbamazepine oxidation by *m*-CPBA, *t*-BuOOH and



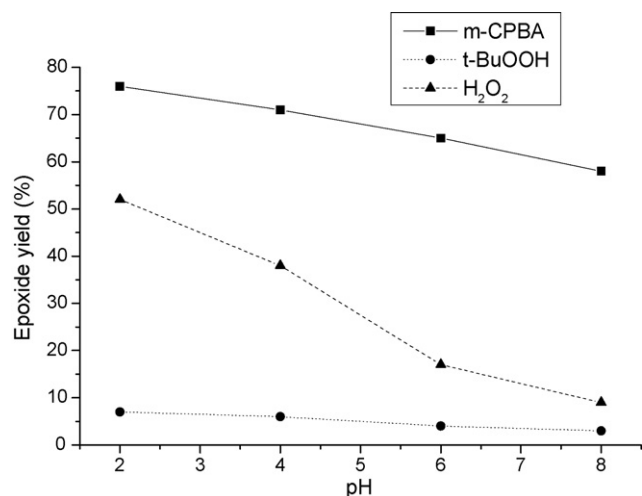


Fig. 3. The effect of pH on the epoxide yield in carbamazepine oxidation catalyzed by the Jacobsen catalyst with different oxidants, in acetonitrile media. Blank reactions under similar acidic conditions (absence of catalyst): CBZ-EP not detected.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyzed by the Jacobsen catalyst, in order to understand the pH influence on the O–O bond cleavage.

Fig. 3 shows that the pH dependence is related to the oxidant. There is slight pH dependence in the case of *m*-CPBA and *t*-BuOOH in the entire pH range, while the pH effect is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This may imply that the O–O bond cleavage depends on solution pH. O–O bond homolysis, which leads to low epoxide yields, prevails at high pH, while O–O bond heterolysis, responsible for high epoxide formation, becomes a predominant pathway at low pH. The presence of a high proton concentration helps stabilize the charge-separated heterolytic transition state, with formation of Mn<sup>V</sup>(O)salen species, which efficiently promote oxygen transfer to CBZ, producing CBZ-EP [43].

Fig. 3 also shows that peroxide O–O bond cleavage is sensitive to the substituents linked to the –OOH group. The O–O bond containing an electron-donating *tert*-alkyl group tends to be cleaved homolytically, resulting in low epoxide yields (Fig. 3). In contrast, an electron-withdrawing substituent such as an acyl group in *m*-CPBA facilitates O–O bond heterolysis, resulting in the formation of oxo-manganese (V) species, which lead to higher epoxide yields (76%, pH 2, Fig. 3).

### 3.3. The effect of different co-catalysts on carbamazepine epoxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyzed by Mn(salen)

The effect of various axial ligands such as imidazole, pyridine, 4-*tert*-butylpyridine, trimethylamine *N*-oxide, ammonium acetate and sodium bicarbonate as co-catalyst was investigated in carbamazepine epoxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, to mimic the effect of the axially coordinated histidine and thiolate residue in peroxidase and cytochrome P-450 enzymes, respectively. Results are presented in Table 2.

Good yields were achieved in reactions carried out in the presence of the nitrogen bases imidazole, 4-*tert*-butylpyridine, and trimethylamine *N*-oxide (Table 2, entries 2, 4 and 5, respectively). These ligands can coordinate to the manganese ion in

Table 2

The effect of different axial ligands on carbamazepine epoxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyzed by Mn(salen)

Entry	Co-catalyst	Epoxide yield (%) <sup>a</sup>
1	Absence of co-catalyst	38
2	Imidazole	59
3	Pyridine	39
4	4- <i>tert</i> -Butylpyridine	47
5	Trimethylamine <i>N</i> -oxide	53
6	Ammonium acetate	66
7	Sodium bicarbonate	61

Catalyst:co-catalyst:substrate:oxidant molar ratio = 1:10:40:35. Blank reactions (absence of catalyst): CBZ-EP not detected.

<sup>a</sup> Epoxide yields (%) were measured relative to CBZ at pH 4.

the position *trans* to the metal–oxo bond, thus stabilizing the intermediate catalytic species Mn<sup>V</sup>(O)salen [47]. This intermediate is responsible for efficient, stereoselective oxidations. The presence of these axial ligands also prevent reduction of the Mn<sup>V</sup>(O)salen species to Mn<sup>IV</sup>(O)salen, which is responsible for non-selective and little efficient radical reactions. Imidazole also acts as an acid–base catalyst, favoring heterolytic cleavage of the peroxide bond, with formation of the high-valent oxo–metal intermediate. As expected, pyridine has no significant effect on the epoxide yields, because it has weaker ligand affinity for the Mn(III) ion [47]. The donor strength of the *trans*-axial ligand influences the electron density on the metal–oxo moiety of the active complex, either through  $\sigma$ - or  $\pi$ -charge donation, and is responsible for the different activities observed with the different co-catalysts.  $\sigma$ -Donation is expected to increase the rate of oxygen loss from the catalyst. Conversely, significant axial  $\pi$ -donation should decrease the ability of the catalyst to epoxidize a given substrate, by raising the energy of the catalyst's critical acceptor orbital [48]. Pyridine is a better  $\pi$ -donor than imidazole, which may account for the poorer results obtained when the former was employed as co-catalyst.

Carboxylate salts, such as ammonium acetate and sodium bicarbonate, were more efficient co-catalysts than the nitrogen bases (Table 2, entries 6 and 7 versus 1–5) for salen-catalyzed carbamazepine epoxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Similar results were reported in the literature [49] when carboxylate salts (ammonium acetate) were employed for alkene epoxidation in metalloporphyrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems. The role of the carboxylate salts in Mn(salen) catalyzed oxidation reactions is not fully clear.

Carboxylate salts can promote the formation of HO<sub>2</sub><sup>−</sup> from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which facilitates Mn<sup>V</sup>(O)salen complex formation via a peroxyacylmanganese species. This peroxyacylmanganese can also oxidize carbamazepine as shown in Fig. 4 [50–53]. The peroxyacylmanganese species have been proposed by Yamada and other researchers as being the active species in other catalytic systems [51,54–56]. A similar catalytic route such as nos. 1–4 (Fig. 4) has been proposed for the Mn-porphyrin catalyzed oxidation of alkenes in the presence of a carboxylic acid co-catalyst [57,58].

The best results obtained with carboxylate salts can be also due to the larger stability of these ligands when compared with the nitrogen bases. Amine bases such as imidazole could themselves be oxidized to *N*-oxides [59,60]. Furthermore, there is

Table 3

Results obtained for carbamazepine oxidation reactions catalyzed by Mn(salen), Mn(salen)-PM-0.02% and Mn(salen)-PM-2%

Entry	Catalyst	Oxidant	Sorption measurements <sup>a</sup>	Epoxide yield (%) <sup>b</sup>
1	Mn(salen)-PM-0.02%	<i>m</i> -CPBA	3.3	73
2	Mn(salen)-PM-2%	<i>m</i> -CPBA	3.3	65
3	Mn(salen)-PM-0.02%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.9	nd
4	Mn(salen)-PM-2%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.9	nd
5	Mn(salen)-PM-0.02%	<i>t</i> -BuOOH	2.6	44
6	Mn(salen)-PM-2%	<i>t</i> -BuOOH	2.6	37

<sup>a</sup> mmol of oxidant/g of membrane. For the sorption measurements, membranes without catalyst were immersed in the oxidants. Membrane swelling was monitored until the film had reached a constant weight.

<sup>b</sup> Epoxide yields (%) were measured relative to the CBZ. Catalyst:substrate:oxidant molar ratio = 1:40:35. Blank reactions (absence of catalyst): CBZ-EP not detected.

the possibility that the acetonitrile used as solvent could participate in the epoxidation or destruction of imidazole through acetylperoxyimidic acid formation (Payne-type oxidation) [61].

### 3.4. Carbamazepine epoxidation by *m*-CPBA, *t*-BuOOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyzed by Mn(salen) occluded in a hybrid polymeric membrane

The hybrid polymeric membrane was evaluated because it mimics the protein cavity of cytochrome P450. Therefore, this support could provide a change of mechanism or selectivity of the biomimetic reaction when compared to the conventional homogeneous catalysts. This material was prepared by a polycondensation reaction between poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and the alkoxyde groups of pentaerythritoltri-acrylate (PETA), 2-aminoethyl-3-aminopropyltrimethoxysilane (AS) and tetraethoxysilane (TEOS). The Jacobsen catalyst was encapsulated in the free volume of the PDMS polymeric network. The synthetic procedure and the characterization of Mn(salen)-PM by UV–vis spectroscopy, TGA, DTA, DSC and SEM techniques have already been described elsewhere [30].

In order to investigate whether catalyst leaching could occur during the oxidation reactions, the supernatant was filtered at the end of the oxidation and allowed to react further in the same conditions. No additional epoxide was produced from the carbamazepine oxidation, indicating that the catalytic activity of this supported material is truly heterogeneous in nature and this complex was not leached from the matrix.

In this catalytic system, product yields are essentially controlled by the sorption of reagents in the polymeric membrane. *m*-CPBA and *t*-BuOOH have a moderate hydrophobic character, which favours their sorption in the polymeric membrane (Table 3, entries 2 and 7). As a result, the systems involving these oxidants proved to be efficient for carbamazepine oxidation, as shown in Table 3. However, with a more hydrophilic oxidant such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Mn(salen)-PM is an inefficient catalyst since the hydrophobic polymeric membrane acts as a barrier against the hydrophilic oxidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, preventing its sorption in the membrane (sorption H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 0.9 mmol g<sup>-1</sup>, Table 3, entries 3 and 4).

The higher *m*-CPBA sorption value compared to that of *t*-BuOOH accounts for the higher epoxide yield obtained with the first oxidant (Table 3, entries 1 and 5). The polymeric membrane also exhibits lower affinity for the more polar oxidation product (CBZ-EP), promoting its fast desorption to the reaction media.

In order to investigate the effect of the membrane sorption capability on the oxidation reaction without changing the number of mol of catalyst, two membranes with different catalyst contents were prepared. These membranes enabled us to compare the influence of sorption using membrane pieces of different size, but maintaining the same number of mol of catalyst on each size. In Table 3 we can see there is a decrease of 7–8% in epoxide yields for reactions with Mn(salen)-PM 2%, when compared to the reactions using the membrane containing 0.02% catalyst, although both of them contain the same amount of catalyst (6.0 × 10<sup>-7</sup> mol Mn(salen); Experimental, Section 2.2). Since the size of the more concentrated membrane (Mn(salen)-PM 2%) used in the reactions necessary to achieve 6.0 × 10<sup>-7</sup> mol Mn(salen) was smaller than the size of the membrane Mn(salen)-PM 0.02%, there was lower substrate and/or oxidant sorption capacities, which seems to be the limiting reaction factor in these systems compared to the Mn(salen)-PM 0.02%.

## 4. Conclusions

Carbamazepine oxidation mediated by the Jacobsen catalyst in homogeneous medium and encapsulated in a polymeric PDMS-based membrane was investigated. CBZ-EP formation is highly dependent on the oxidant, pH, solvent and co-catalyst. The oxidants *m*-CPBA, *t*-BuOOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are more efficient at low pH values, although the influence of the pH is small for

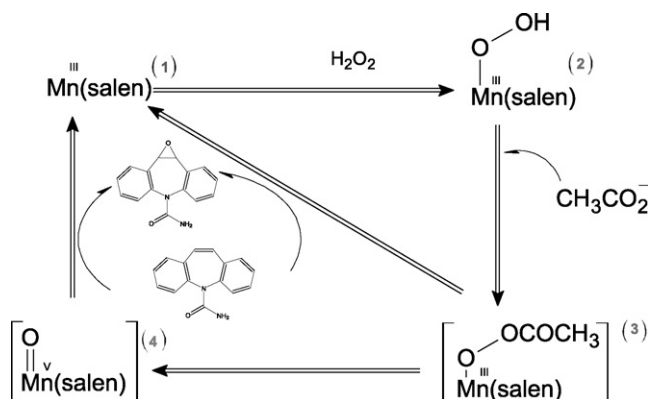


Fig. 4. Possible catalytic route for carbamazepine epoxidation catalyzed by the Jacobsen catalyst using carboxylate salts by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as oxidant.

*m*-CPBA and *t*-BuOOH in the entire pH range. This shows that the presence of substituents linked to the –OOH group of *m*-CPBA and *t*-BuOOH significantly affect the catalytic activity of the studied system. Carboxylate salts, such as ammonium acetate and sodium bicarbonate, are more efficient co-catalysts than nitrogen bases.

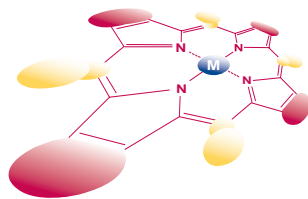
Despite the typical limitations of heterogeneous systems, the catalytic results show that the support is able to concentrate the reagents close to the catalyst in the case of the oxidants *m*-CPBA and *t*-BuOOH. The polymeric membrane used in this work is capable of controlling both the oxidant access to the active site and the reactivity of the active species, leading to selective oxidation reactions with *m*-CPBA and *t*-BuOOH as oxidant, so the support acts as a good model for the protein cavity of cytochrome P450, preventing inactivation via dimer formation. However, the oxidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not able to epoxidize CBZ in this catalytic system because the hydrophobic membrane creates a barrier against the hydrophilic hydrogen peroxide, preventing its sorption and, therefore, making carbamazepine oxidation impossible in this case.

## Acknowledgements

We thank FAPESP, CAPES and CNPq for financial support. We also acknowledge Dr. Cynthia Maria de Campos Prado Manso for linguistic advice.

## References

- [1] W. Nam, S.E. Park, I.K. Lim, M.H. Lim, J. Hong, J. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14674.
- [2] J.L. McLain, J. Lee, J.T. Groves, B. Meunier, *Biomimetic Oxidation Catalysed by Transition Metal Complexes*, Imperial College Press, London, 2000, Chapter 3.
- [3] B. Meunier, *Chem. Rev.* 92 (1992) 1411.
- [4] D. Mansuy, *Coord. Chem. Rev.* 125 (1993) 129.
- [5] J. Yang, R. Breslow, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 2692.
- [6] J.T. Groves, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 4 (2000) 350.
- [7] N.S. Finney, P.J. Pospisil, S. Chang, M. Palucki, R.G. Konler, K.B. Hansen, E.N. Jacobsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36 (1997) 1720.
- [8] W. Zhang, E.N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 2296.
- [9] Y. Ito, T. Katsuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 72 (1999) 603.
- [10] T. Katsuki, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 113 (1996) 87.
- [11] T. Katsuki, *Coord. Chem. Rev.* 140 (1995) 189.
- [12] R. Irie, K. Noda, Y. Ito, N. Matsumoto, T. Katsuki, *Tetrahedron: Asym.* 2 (1991) 481.
- [13] T.C.O. Mac Leod, D.F.C. Guedes, M.R. Lelo, R.A. Rocha, B.L. Caetano, K.J. Ciuffi, M.D. Assis, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 259 (2006) 319.
- [14] V. Mirkhani, M. Moghadam, S. Tangestaninejad, H. Kargar, *Appl. Catal. A: Gen.* 303 (2006) 221.
- [15] J.T. Groves, J. Lee, S.S. Marla, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 6269.
- [16] T.J. Hubin, J.M. McCormick, S.R. Collinson, M. Buchalova, C.M. Perkins, N.W. Alcock, P.K. Kahol, A. Raghunathan, D.H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 2512.
- [17] M.S. Chorghade, D.R. Hill, E.C. Lee, R.J. Pariza, D.H. Dolphin, F. Hino, L.Y. Zhang, *Pure Appl. Chem.* 68 (1996) 753.
- [18] M. Vidal, M. Bonnafous, S. Defrance, P. Loiseau, J. Bernadou, B. Meunier, *Drug Metab. Dispos.* 21 (1993) 811.
- [19] J. Bernadou, M. Bonnafous, G. Labat, P. Loiseau, B. Meunier, *Drug Metab. Dispos.* 19 (1991) 360.
- [20] M. Komuro, T. Higuchi, M. Hirobe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 18 (1996) 2309.
- [21] A.J.B. Melo, Y. Yamamoto, A.P.J. Maestrin, J.R.L. Smith, M.D. Santos, N.P. Lopes, P.S. Bonato, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 226 (2005) 23.
- [22] J. Bernadou, B. Meunier, *Adv. Synth. Catal.* 346 (2004) 171.
- [23] D. Mansuy, *CR Chimie* 10 (2007) 1.
- [24] H. Breton, M. Cociglio, F. Bressolle, H. Peyriere, J.P. Blayac, D.H. Buys, *J. Chromatogr. B* 828 (2005) 80.
- [25] K. Lertratanakoon, M.G. Horing, *Drug. Metab. Dispos.* 10 (1982) 1.
- [26] Y. Zhu, H. Chiang, M.W. Radcliffe, R. Hilt, P. Wong, C.B. Kissinger, P.T. Kissinger, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 119.
- [27] T.S. Reger, K.D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 6929.
- [28] R.I. Kureshy, N.H. Khan, S.H.R. Abdi, S. Singh, I. Ahmad, R.V. Jasra, A.P. Vyas, *J. Catal.* 224 (2004) 229.
- [29] V. Ayala, A. Corma, M. Iglesias, F. Sánchez, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 221 (2004) 201.
- [30] D.F.C. Guedes, T.C.O. Mac Leod, M.C.A.F. Gotardo, M.A. Schiavon, I.V.P. Yoshida, K.J. Ciuffi, M.D. Assis, *Appl. Catal. A: Gen.* 296 (2005) 120.
- [31] A.R. Silva, J.L. Figueiredo, C. Freire, B. Castro, *Micropor. Mesopor. Mater.* 68 (2004) 83.
- [32] L. Barloy, P. Battioni, D. Mansuy, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1990) 1365.
- [33] E.F. Murphy, L. Schmid, T. Bürgi, M. Maciejewski, A. Baiker, D. Günther, M. Schneider, *Chem. Mater.* 13 (2001) 1296.
- [34] E. Möllmann, P. Tomlinson, W.F. Hölderich, *J. Mol. Catal.* 206 (2003) 137.
- [35] D. Disalvo, D.B. Dellinger, J.W. Gohdes, *React. Funct. Polym.* 53 (2002) 103.
- [36] L. Canali, E. Cowan, H. Deleuze, C.L. Gibson, D.C. Sherrington, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (2000) 2055.
- [37] R.F. Parton, I.F.J. Vankelecom, D. Tas, K.B.M. Janssen, P.P.K. Gerrits, P.A. Jacobs, *J. Mol. Catal.* 113 (1996) 283.
- [38] P.E.F. Neys, A. Severeys, I.F.J. Vankelecom, E. Ceulemans, W. Dehaen, P.A. Jacobs, *J. Mol. Catal.* 144 (1999) 373.
- [39] K.A. Goldsby, J.K. Blaho, L.A. Hoferkamp, *Polyhedron* 8 (1989) 113.
- [40] N.H. Lee, C.S. Lee, D.S. Jung, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 1385.
- [41] B. Bahramian, V. Mirkhani, S. Tangestaninejad, M. Moghadam, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 224 (2005) 139.
- [42] B. Bahramian, V. Mirkhani, M. Moghadam, S. Tangestaninejad, *Catal. Commun.* 7 (2006) 289.
- [43] W. Nam, I. Kim, M.H. Lim, H.J. Choi, J.S. Lee, H.G. Jang, *Bull. Korean Chem. Soc.* 17 (1996) 625.
- [44] S.J. Yang, W. Nam, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 606.
- [45] T.J. Hubin, J.M. McCormick, S.R. Collinson, M. Buchalova, C.M. Perkins, N.W. Alcock, P.K. Kahol, A. Raghunathan, D.H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2005) 2512.
- [46] S.K. Choi, H.J. Lee, H. Kim, W. Nam, *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002) 1039.
- [47] F.G. Doro, J.R.L. Smith, A.G. Ferreira, M.D. Assis, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 164 (2000) 97.
- [48] M.J. Gunter, P. Turner, *J. Mol. Catal.* 66 (1991) 121.
- [49] A. Thellend, P. Battioni, D. Mansuy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1994) 1035.
- [50] T. Yamada, K. Imagawa, T. Nagata, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* (1992) 2231.
- [51] T. Yamada, K. Imagawa, T. Nagata, T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67 (1994) 2248.
- [52] P. Pietikäinen, *Tetrahedron* 54 (1998) 4319.
- [53] P. Pietikäinen, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 165 (2001) 73.
- [54] A.M.A.R. Gonsalves, A.C. Serra, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 168 (2001) 25.
- [55] K.A. Lee, W. Nam, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 1916.
- [56] K. Kamaraj, D. Bandyopadhyay, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 8099.
- [57] P.L. Anelli, S. Banfi, F. Montanari, S. Quici, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1989) 779.
- [58] S. Banfi, A. Maiocchi, F. Montanari, S. Quici, *Gazz. Chim. Ital.* 120 (1990) 123.
- [59] A.M.A.R. Gonsalves, R.A.W. Johnstone, M.M. Pereira, J. Shaw, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1991) 645.
- [60] P. Battioni, J.P. Renaud, J.F. Bartoli, M. Reina-Artiles, M. Fort, D. Mansuy, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 8462.
- [61] G.P. Payne, P.H. Deming, P.H. Williams, *J. Org. Chem.* 26 (1966) 659.



# Characterization of electrodes chemically modified with Mn(III) porphyrin/polypyrrole films as catalytic surfaces for an azo dye

Valéria P. Barros<sup>a</sup>, Maria Valnice B. Zanon<sup>ib</sup> and Marilda das D. Assis<sup>\*a◇</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP 14040-901, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal 355, Araraquara-SP 14800-900, Brasil

Received 24 April 2006

Accepted 9 July 2006

**ABSTRACT:** In this study we describe the electrochemical behavior of 5,10,15,20-tetrakis(2'-aminophenylporphyrin)manganese(III) chloride supported on a glassy carbon electrode, as well as the electrochemical preparation and characterization of thin films based on pyrrole-3-carboxylic acid. The electrocatalytic action of the electrode modified with the Mn(III) porphyrin toward an azo dye was tested, and the characteristic strong interaction between the incorporated metalloporphyrin and RR120 dye was verified. Copyright © 2006 Society of Porphyrins & Phthalocyanines.

**KEYWORDS:** manganese porphyrin, azo dye, electrodes modified, electrodeposition, RR120 dye.

## INTRODUCTION

An important challenge in the field of catalysis is to build systems capable of reproducing the main reactions catalyzed by cytochromes P450, an important class of enzymes responsible for various types of reaction in living organisms, including the selective oxidation of hydrocarbons, drugs, and pollutants [1-9].

Synthetic metalloporphyrins are analogous to the prosthetic group of cytochromes P450 and they have been used for more than 30 years as catalysts in a variety of oxidation reactions, in the search for more selective catalytic systems that could lead to interesting products for use in fine chemistry, such as the synthesis of drug metabolites [1-6, 10-12].

Various metalloporphyrins containing Mn(III), Fe(III), Ru(III), or Cr(III) have been synthesized and

studied in the last decades [13-17]. Mn(III)porphyrin appears to be the best in terms of yield and efficiency [11, 18, 19].

Throughout the development of these catalysts as functional models, an important strategy has been to immobilize metalloporphyrins on solid matrices, such as silica [20-22], clays [23-26], and zeolites [27-31], so as to prevent metalloporphyrin autooxidation, responsible for catalyst deactivation. Good catalytic results have been obtained with these immobilized systems, which furnish selectivity distinct from that obtained with homogeneous systems, besides the advantage that the supported catalyst can be recycled [3].

Immobilization of synthetic metalloporphyrins on electrode surfaces is a fast-growing research area in electrochemistry because they can function as redox mediators, catalysts, or selective centers via the axial ligand [32, 34]. Various work in the literature describe the use of various substituted metalloporphyrins, electrodes, and solvents [35-40].

Sensors based on electrodes modified with

◇SPP full member in good standing

\*Correspondence to: Marilda D. Assis, email: mddassis@usp.br, fax: +55 16-36024838

metalloporphyrins and polymers have been developed for the determination of NO, leading to good results with respect to stability, speed of the determination, and selectivity [41-45]. Metalloporphyrin films functionalized with conducting polymers have been studied and led to good results in the oxidation of drugs and in the preparation of their oxidized metabolites [46-48]. One example is the glassy carbon electrode modified by electrochemical polymerization of manganese porphyrins functionalized with pyrrole. These systems have also been used for the oxidation of alcohols, as well as epoxidation of styrene and other olefins. Nickel(II), cobalt(II) and manganese(III) tetraphenylporphyrins, as well as hemin (iron protoporphyrin IX) can be applied to the oxidation of alcohols, pollutants, histidine and hydrogen peroxide, respectively [45, 49, 50].

Azo dyes and their degradation products have undoubtedly attracted attention with regard to their high environmental impact and toxicological properties, because of their widespread use. They account for 65% weight of the dyes used in the textile, pharmaceutical, food, brewing, and cosmetic industries. The carcinogenic and mutagenic properties of some kinds of azo dyes and/or metabolites formed under reducing or oxidizing conditions have been discussed [51-56]. Several authors [51, 53-56] have pointed that textile and other dye-related industries produce consistent genotoxic effluents. In addition, an increase in the levels of mutagenic activity can be detected when dye factory effluents are submitted to primary and secondary biological treatment [57].

The toxicity and carcinogenicity of certain azo dyes in mammalian systems may result mainly from their biotransformation via oxidation, hydrolysis, conjugation, or reduction catalyzed by enzymatic reactions. The generated product can be either more toxic or less toxic than the parent molecule [58-64].

Procion Red HE-3B (RR120) is an azo dye (Fig. 1) widely employed in the textile industry because of its higher reactivity toward the fiber. The bis-azo groups of the RR120 dye in aqueous solution pH 7 are reduced at potentials around -0.50 V vs Ag/AgCl in one single four-electron step, generating its corresponding hydrazo derivative [65, 66]. The dye can be quantified by differential pulse polarography in the concentration range  $1 \times 10^{-6}$  to  $1 \times 10^{-5}$  M by monitoring the reduction of the chromophore group. Nevertheless, the voltammetric signal is not obtained on the glassy carbon electrode in aprotic medium.

Preparation of electrodes modified with thin metalloporphyrin films has given rise to a new approach in electroanalytical chemistry, and this new methodology has been applied to the study and

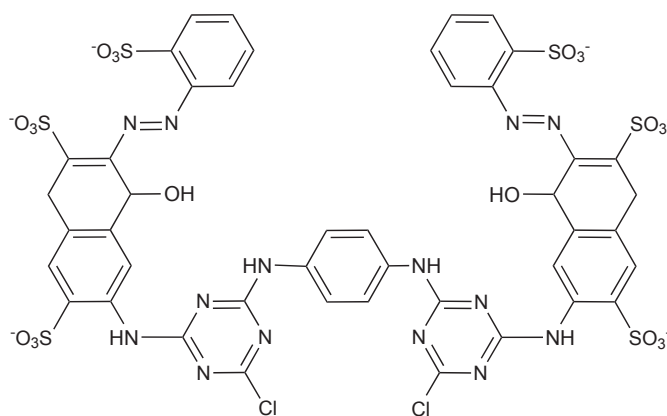


Fig. 1. Chemical Structure of the Procion Red HE-3B (RR120) dye

determination of metals and organic compounds based on the preconcentration, electrocatalytic activity, and other properties of the coating. Therefore, electrodes modified with Mn(III) porphyrins could be a tool for understanding the mechanism of microsomal biodegradation [41], not to mention its analytical potential for the development of electroanalytical sensors [67-72].

In this study we briefly describe the electrochemical behavior of 5,10,15,20-tetrakis(2'-aminophenylporphyrin)manganese(III)chloride (Fig. 2) supported on a glassy carbon electrode, as well as the electrochemical preparation and characterization of thin films based on pyrrole-3-carboxylic acid. The electrocatalytic action of the electrode modified with the Mn(III) porphyrin toward an azo dye was tested, and the characteristic strong interaction between the incorporated metalloporphyrin and RR120 is reported, in order to evaluate the potential use of these novel systems as mimetic compounds and their further use as electrochemical sensors for the azo dye.

## EXPERIMENTAL

### Materials

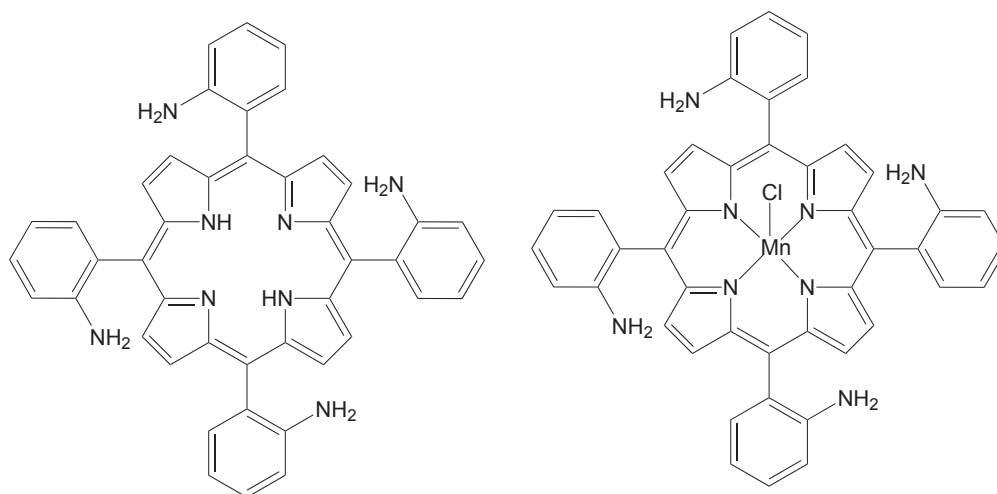
Commercially available chemicals and solvents were obtained from Aldrich, Mallinckrodt and Merck, unless otherwise stated. Tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) and N,N'-dimethylformamide (DMF) were of reagent grade and used as received.

The manganese porphyrin was prepared from the free-base porphyrins (Mid Century) by the method of Adler *et al.* [73], and characterized by UV-vis spectroscopy.

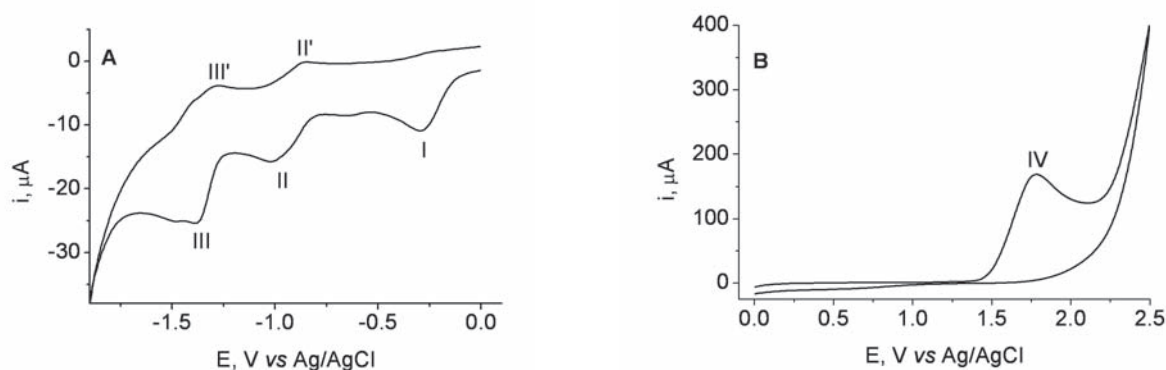
UV-vis data for (2TAPP)Mn(III)Cl in DMF ( $\epsilon$ ,  $M^{-1}.cm^{-1}$ ):  $\lambda_{max}$ , nm 374; 470 (3.42); 576; 612.

### Electrochemical instrumentation and procedure

Cyclic voltammograms were obtained with an Eco



**Fig. 2.** Molecular structure of 5,10,15,20-tetrakis(2'-aminophenyl)porphyrin, (2TAPP) $H_2$  and its corresponding manganese(III) chloride, (2TAPP)Mn(III)Cl



**Fig. 3.** Cyclic voltammograms of  $1 \times 10^{-3}$  M (2TAPP)Mn(III)Cl in 0.1 M DMF/TBAP on glassy carbon electrode. Scan rate 100  $mV \cdot s^{-1}$ . Curve A: reduction, Curve B: oxidation

Chimie Potentiostat/galvanostat PGSTAT30. A three-electrode system (EG&G PARC) consisting of an Ag/AgCl reference electrode, a platinum wire auxiliary electrode, and a glassy carbon working electrode was used. The glassy carbon electrode (3 mm diameter) was polished with alumina (0.3  $\mu m$ , Buehler), washed, and dried at room temperature before use.

### Working electrode preparation

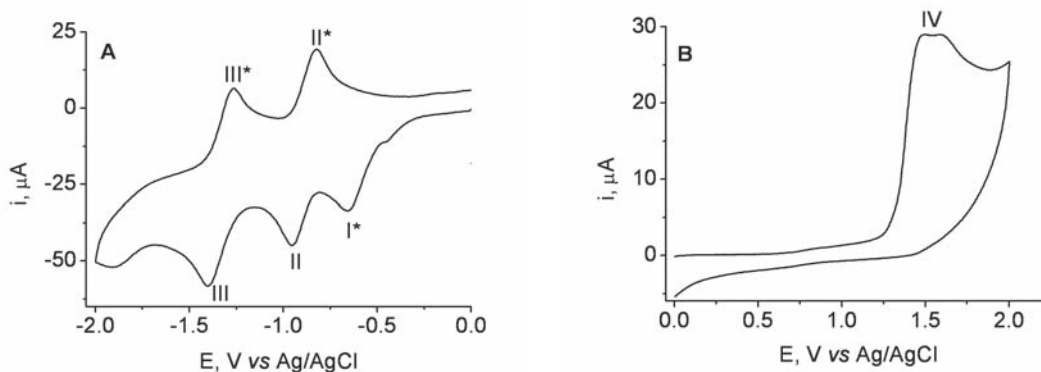
The preparation of the modified electrode was tested by two procedures. Firstly, it was tested via electrostatic incorporation. The electrode was coated by electropolymerization of pyrrole-3-carboxylic acid using 0.1 M pyrrole-3-carboxylic acid in 0.1 M DMF/TBAP. Cyclic voltammograms under a successive scan rate of 100  $mV \cdot s^{-1}$  were obtained in the range -1 V to 1 V (100 cycles). The modified electrode was immersed into a solution containing (2TAPP)Mn(III)Cl ( $1 \times 10^{-3}$  M) and accumulated while the solution was stirred under time control. After this step, the modified electrode was immersed in blank solution containing DMF/TBAP (0.1 M).

After a standing time of 10 s, the voltammogram was recorded. The second method was based on the entrapment of the metalloporphyrin as counterions during the process of electrochemical film formation. The glassy carbon electrode was immersed directly into a solution containing pyrrole-3-carboxylic acid (0.1 M) in DMF/TBAP (0.1 M) and (2TAPP)Mn(III)Cl ( $1 \times 10^{-3}$  M). Films were electrolytically deposited on the glassy carbon electrode using the same procedure described above. The electrode was then washed and transferred to either a solution containing DMF/TBAP (0.1 M) or an azo dye solution before recording the voltammograms.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Electrochemical characterization of (2TAPP) $H_2$ and (2TAPP)Mn(III)Cl deposited on a glassy carbon electrode

Typical cyclic voltammograms obtained for the reduction of (2TAPP)Mn(III)Cl ( $1 \times 10^{-3}$  M) in DMF



**Fig. 4.** Cyclic voltammograms of  $1 \times 10^{-3}$  M  $[H_2(2TAPP)]$  in 0.1 M DMF/TBAP on glassy carbon electrode. Scan rate  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Curve A: reduction, Curve B: oxidation

and TBAP (0.1 M) are shown in Fig. 3.

As observed previously [74] for a variety of Mn(III) porphyrins in aprotic solvents, three well-defined reduction steps can be seen. The first reduction wave (peak I) at  $-0.28 \text{ V}$  is a typical nonreversible process. The cyclic voltammogram does not exhibit any anodic peaks on the reverse scan, and  $(E_p - E_{pc})/2 = 80 \text{ mV}$ . The cathodic wave increases linearly with the square root of the scan rate ( $i_p (\mu\text{A}) = 0.05 + 0.46 \cdot v^{1/2} (\text{mV}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2}, n = 9, r = 0.990)$ ), suggesting the occurrence of a diffusion-controlled process [75]. The peak potential shifts to more negative values with increasing scan rate from 10 to  $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , while the current function decreases markedly. This indicates that a one-electron process (Mn(III)/Mn(II)) is taking place, followed by a chemical reaction, probably because of the loss of the axial ligand, Cl<sup>-</sup>, which has low affinity for the Mn(II) ion [76].

The subsequent reductions in the porphyrin ring of (2TAPP)Mn(III)Cl at  $-1 \text{ V}$  ( $i_p^{\text{II}}$ ) and  $-1.4 \text{ V}$  ( $i_p^{\text{III}}$ ) are totally reversible, with  $i_{pa}/i_{pc} = 1$  and  $E_{pc}/2 - E_{pa}/2 = 59 \text{ mV}$  for all the scan rates investigated in the range 10 to  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . The reduction potentials are practically independent of the scan rate, indicating that each step involves a reversible one-electron transfer.

Both peaks are diffusion-controlled, with a linear  $i_p$  vs  $v^{1/2}$ , [ $i_p^{\text{I}} (\mu\text{A}) = 11 + 13 \cdot v^{1/2} (\text{mV}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2}, n = 8, r = 0.993)$  and  $i_p^{\text{III}} (\mu\text{A}) = 0.62 + 0.54 \cdot v^{1/2} (\text{mV}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2}, n = 9, r = 0.990)$ ] relationship. These results indicate the formation of a stable  $\pi$  anion-radical  $[P^{\cdot-}\text{Mn(III)}]$  after the second reduction step (peak II, Fig. 3), and the subsequent dianion radical  $[P^{2-}\text{Mn(III)}]$  is generated at more negative potentials (peak III, Fig. 3).

Cyclic voltammograms obtained for the oxidation of (2TAPP)Mn(III)Cl ( $1 \times 10^{-3}$  M) in DMF and TBAP (0.1 M) are also shown in Fig. 3. The porphyrin is oxidized in one anodic process, assigned as peak IV. This peak is diffusion-controlled, as shown by the relationship  $i_p^{\text{IV}} (\mu\text{A}) = 11 + 13 \cdot v^{1/2} (\text{mV}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2}, n = 8, r = 0.993)$ . There is no cathodic peak in any of the investigated scan rates.

The voltammetric behavior of the parent free-base porphyrin (2TAPP) $H_2$  was also investigated under the same experimental conditions for comparison (Fig. 4). (2TAPP) $H_2$  is reduced on the glassy carbon electrode following three well-defined steps at  $-0.62 \text{ V}$  (peak I<sup>\*</sup>),  $-0.95 \text{ V}$  (peak II), and  $-1.4 \text{ V}$  (peak III), as shown in Fig. 4A. Peaks II and III are similar to those observed for (2TAPP)Mn(III)Cl, and they are attributed to the reductions  $\text{PH}_2/\text{P}^{\cdot-}\text{H}_2$  and  $\text{P}^{\cdot-}\text{H}_2/\text{P}^{2-}\text{H}_2$ , respectively.

Cyclic voltammograms obtained from 10 to  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  prove that both reduction steps involve a reversible one electron transfer [75-79] with peak ratios IIa/IIc and IIIa/IIIc close to 1, and values close to 52 mV for  $E_{pa} - E_{pc}$  in the case of both peaks. The intensity of the peak currents (peak II and peak III) is linear to  $v^{1/2}$ , following the equation:

$$i_p^{\text{II}} (\mu\text{A}) = 1.1 + 3 \cdot v^{1/2} (\text{mV}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2}, n = 7, r = 0.991) \quad (1)$$

and

$$i_p^{\text{III}} (\mu\text{A}) = 1.7 + 3.2 \cdot v^{1/2} (\text{mV}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2}, n = 7, r = 0.990) \quad (2)$$

Nevertheless, the first reduction step is associated with reduction of one nitrogen from the pyrrole group, which could be reduced to  $\text{NH}^+/\text{N}^{\cdot-}$  when present in the protonated form. This is similar to the behavior of compounds such as pyrimidine [80, 81], and this peak is absent in the cyclic voltammograms obtained for the metalated porphyrin, as shown in Fig. 3. For scan rates ranging from 10 to  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , it is observed that the first reduction peak presents a small peak in the reverse scan, whose  $i_{pa}/i_{pc}$  ratio increases with the scan rate, but is always smaller than 1. In addition, the peak potential shifts to more negative values, suggesting the occurrence of a non-reversible electrodic process with a coupled chemical reaction, probably attributed to the protonation equilibrium required to produce the electroactive species. The cathodic peak increases with increasing scan rate, following the equation:

$$i_p^{I*} (\mu\text{A}) = 1.6 + 0.3.v \quad (v = \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}) \quad (3)$$

where  $n = 6$ ,  $r = 0.994$ . This indicates that the generated product is reduced and adsorbed on the electrode surface.

Figure 4B also shows that the free-base porphyrin is oxidized at 1.5 V, and it displays a shoulder due to adsorptive problems, as diagnosed by the linear relationship between  $i_p$  vs  $v$ , following the equation:

$$i_p^{III} (\mu\text{A}) = 3.9 + 0.4.v \quad (v = \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}) \quad (4)$$

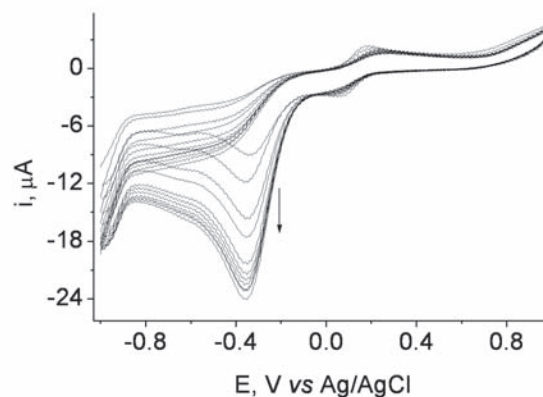
where  $n = 9$ ,  $r = 0.982$ .

All assignments are corroborated by the expected difference of  $2.25 \pm 0.15$  V in the potentials involving first reduction/first oxidation processes of the porphyrin ring [82]. This corresponds to the energy gap between the HOMO/LUMO orbitals and to values of 0.3 V for removal or addition of a second electron after the first reduction/first oxidation of the porphyrin ring. In agreement with what is reported in the literature for  $(2\text{TAPP})\text{H}_2$ , the difference between the position of peaks II and IV is 2.45 V, and the difference between peaks II and III is 0.4 V, thus confirming the previous assignments [76, 83, 84].

From the comparison between the electrochemical behaviors of both forms,  $(2\text{TAPP})\text{H}_2$  and  $(2\text{TAPP})\text{Mn(III)Cl}$ , it is possible to conclude that the introduction of Mn(III) into the free-base porphyrin promotes an increase of 300 mV in the oxidation process toward more positive potentials, confirming that it is more difficult to remove electrons from the porphyrin ring when it is metalated. Moreover, adsorption of the porphyrin ring in the metalated form on the electrode surface is minimal, if compared with the adsorption of the free-base porphyrin. This fact indicates that the protonated pyrrole group is the one responsible for the reduction wave in the voltammogram of  $(2\text{TAPP})\text{H}_2$  and favours porphyrin adsorption on the electrode.

### Electrochemical incorporation of manganese porphyrin into polypyrrole films

In order to obtain a  $(2\text{TAPP})\text{Mn(III)Cl}$ -modified glassy carbon electrode, the electrochemical behavior of this metalloporphyrin was investigated using the classic redox cycles for manganese porphyrin. Because there was no stable film formation to be applied on reductive potential, we investigated the possibility of incorporating the manganese porphyrin into polypyrrole films. Testing both procedures described in the experimental section, it was possible to see that the best results were obtained for the glassy carbon electrode immersed into a  $(2\text{TAPP})\text{Mn(III)Cl}$  solution treated with carboxypyrrole monomers and submitted to electrochemical polymerization from -1



**Fig. 5.** Cyclic voltammogram obtained after successive cyclings of  $1 \times 10^{-3}$  M  $(2\text{TAPP})\text{Mn(III)Cl}$  in 0.1 M DMF/TBAP and pyrrole-3-carboxylic acid 0.25 M on glassy carbon electrode. Scan rate =  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (100 cycles)

to 1 V.

Figure 5 shows a set of cyclic voltammograms obtained after successive scans on glassy carbon electrode immersed in  $(2\text{TAPP})\text{Mn(III)Cl}$  ( $1 \times 10^{-3}$  M) in DMF/TBAP (0.1 M) containing pyrrole-3-carboxylic acid solution (0.1 M). The well-defined peak at  $-0.36$  V is related to the porphyrin Mn(III)/Mn(II) redox couple being slightly shifted to a more negative potential than that verified for the bare electrode. The increasing peak currents upon repetitive cyclings reflect the incorporation of manganese porphyrin anions into the film, and the successive decrease in the small peak in the positive potential region indicates that the fact that they are formed on the electrode surface is a consequence of the anodic electropolymerization of the porphyrin/pyrrole complex. This could be attributed to the formation of an ionic pair  $(\text{PNH}_3^+)_n \cdot (\text{OOCpi})_n$  between carboxylic-pyrrole  $(\text{pi-COO}^-)_n$  and the amine group on the porphyrins  $(\text{PNH}_3^+)_n$ . This assignment is corroborated by TLC analysis comparing three samples: a)  $(\text{PNH}_3^+)_n \cdot (\text{OOCpi})_n$ ; b) a sample treated with a strong base, 4-dimethylaminepyridine, (DMAP); and c) the parent porphyrin,  $[(2\text{TAPP})\text{H}_2]$ . DMAP is able to neutralize the cation  $\text{PNH}_3^+$  [14], destroying the ionic pair and resulting in a TLC spot with the same  $R_f$  of the parent  $[(2\text{TAPP})\text{H}_2]$  in the case of sample b. Growth of the polymer layer visualized from the electrochemically-induced polymerization of  $(2\text{TAPP})\text{Mn(III)Cl}$  shows that film growth is fast up to 5 cycles, and it stops growing after 20 cycles, remaining constant up to 100 cycles. Further studies were carried out fixing 50 cycles as being enough for the formation of a stable film. The small peak current of the redox couple present in the voltammogram around  $+0.1$  V vs Ag/AgCl arises from the polymer bridge functional group generated after polymerization process, as described previously in the literature [85-87].



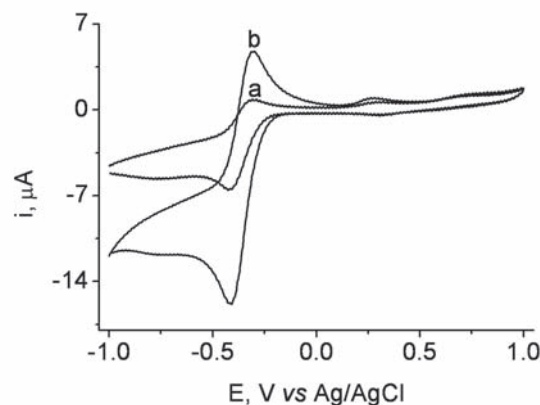
The retention capability of the Mn(III)P/pyrrole-3-carboxylic acid film coating was determined by loading a film-coated electrode for a period corresponding to 100 scans followed by washing of the electrode with DMF and its placing into a supporting electrolyte solution of 0.1 M DMF/TBAP. Then successive cyclic voltammograms were produced. The typical cyclic voltammogram recorded from -1 to 1 V (Fig. 6, Curve a) exhibits an redox peak at -0.36 V and a small peak on the reverse scan, can be assigned to the redox activity of Mn(III)/Mn(II) in the porphyrin immobilized onto the electrode surface. Constant current values were obtained over 50 repetitions, with a variation coefficient of 4%. This reproducibility clearly shows that the crosslinking between the polypyrrole and the metalloporphyrin improves film adherence to the electrode surface and maintains the Mn(III) properties of the modified electrode, while response from the other porphyrin is not seen in the voltammograms.

The scan rate dependence of the cyclic voltammetric peak currents was evaluated using an electrode for which electrochemical incorporation was carried out during 50 cycles. The electrode was then transferred to a fresh supporting electrolyte consisting of DMF/TBAP. Scan rates in the range of 0.01 to 0.2 V.s<sup>-1</sup> gave a straight line for the plot of the peak current vs the square root of the scan rate ( $v^{1/2}$ ), suggesting that a diffusion-controlled process occurs through the film.

Nevertheless, a small peak is seen in the anodic scan after the first peak, with  $i_{pa}/i_{pc} = 0.4$ , and it decreases at higher scan rates, as can be seen in Fig. 4. This indicates the occurrence of a coupled chemical reaction involving Mn(II) incorporated in the film. From the comparison with the cyclic voltammograms obtained with the bare electrode, it is possible to conclude that immobilized Mn(II)/Mn(III) is also complicated by chemical reactions that consumes Mn(II), but the rate of such reactions is slower than the rate of the reactions occurring in solution.

#### Catalytic reduction of RR120 dye on manganese-porphyrin/polypyrrole films

Additional information about the electrochemical properties of the modified electrodes was obtained by comparing the current and potential parameters obtained from the cyclic voltammograms recorded for each (2TAPP)Mn(III)Cl/pyrrole-3-carboxylic acid-modified electrode with and without  $1 \times 10^{-6}$  M RR120 dye in DMF/TBAP. The electrochemical behavior is compared in Fig. 6, Curve b. The data clearly shows that the film electrode behaves similarly in both cases, indicating that there is effective interaction between the supported manganese porphyrin and the RR120 dye. Under the same experimental conditions, it was



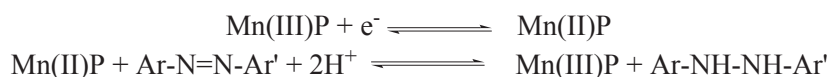
**Fig. 6.** Cyclic voltammogram obtained for a glassy carbon electrode modified with (2TAPP)Mn(III)Cl/pyrrole-3-carboxylic acid films in DMF/PTBA 0.1 M (Curve a) and in the presence of RR120 dye  $1 \times 10^{-6}$  M. Scan rate = 100 mV.s<sup>-1</sup>

noted that there is no reduction wave for the RR120 dye on the bare glassy carbon electrode. In addition, it was observed that films formed by successive cycling of pyrrole-3-carboxylic acid do not promote any signal for the azo dye. Nevertheless, the presence of the azo dye leads to a marked increase in the reversibility of the Mn(III)/Mn(II) pair of peaks, increasing the  $i_{pa}/i_{pc}$  relationship from 0.42 (without dye) to 0.80 (dye presence). This behavior indicates that the electrochemical interaction between the dye and the manganese immobilized on the film is preferential with relation to other possible chemical reactions that consume Mn(II), as previously detected for the Mn(III)/Mn(II) reduction both in solution and in the film, in the absence of the azo dye.

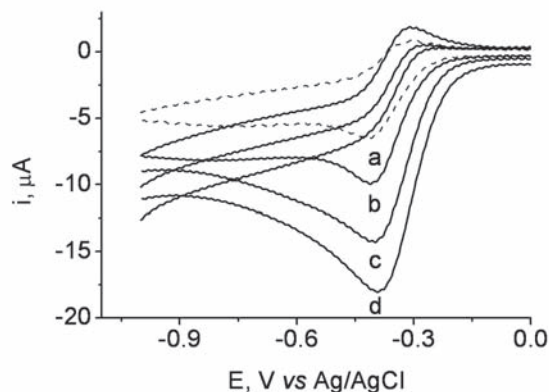
To the best of our knowledge, no data on the reactivity of electropolymerized manganese porphyrin films toward azo compounds have been reported in the literature, but they can be considered extremely important since this interaction can help understand the association and biodegradation routes involving reactive azo dyes and biological models [64, 71, 88]. In addition, from an analytical point of view, this film could be used to develop specific voltammetric sensors for the determination of azo dyes, which is also important in the analyses of effluents, dye baths, and other matrices.

So, in agreement with previous catalytic systems involving azo dyes [88], the electrochemical response observed in this system could be attributed to the catalytic reaction of the azo group in the dye during the reduction of Mn(III)/Mn(II) immobilized in the film, as shown in Scheme 1.

In order to test the interaction of the dye with the manganese porphyrin films, an electrode modified with (2TAPP)Mn(III)Cl/pyrrole-3-carboxylic acid coated with RR120 (15 cycles) film was washed with



Scheme 1.



**Fig. 7.** Cyclic voltammograms obtained for a glassy carbon electrode modified with (2TAPP)Mn(III)Cl/pyrrole-3-carboxylic acid films in DMF/PTBA 0.1 M (Curve a) and in the presence of: (b)  $1 \times 10^{-8}$  M; (c)  $1 \times 10^{-7}$  M; (d)  $5 \times 10^{-7}$  M of the RR120 dye. Scan rate =  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

DMF and transferred to a new electrolyte solution. The successive cyclic voltammograms did not show any significant change in the peak current at  $-0.38 \text{ V}$ , but the peak is slightly higher and more reversible than the one verified for the modified electrodes in the absence of the dye. This indicates that there probably is a strong interaction between Mn and the azo dye, which promotes an increase in the retention of the azo dye on the electrode surface.

The peak currents at the polymer-coated electrode in a solution containing RR120 dye  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  changed linearly with the square root of the scan rate in the measured range 10 to  $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , following the equation:

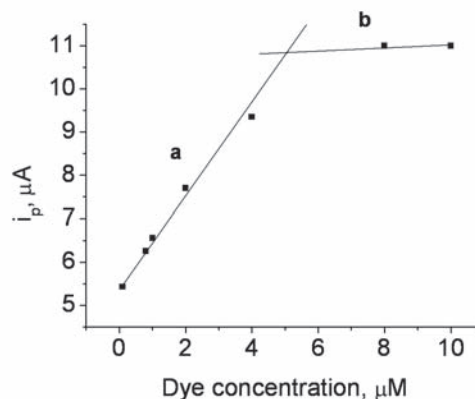
$$i_p(\mu\text{A}) = 0.5 + 1.3 \cdot v^{1/2} \quad (v = \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}) \quad (5)$$

where  $r = 0.996$  and  $n = 6$ . The cathodic and anodic peaks ratio  $i_{pa}/i_{pc}$  was approximately 0.85, and the separation between the peak potentials ( $E_{pa}/2 - E_{pc}/2$ ) was found to be 50–60 mV at a scan rate no faster than  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . These results indicate that the electrode reaction rate is controlled by diffusion through the film.

Cyclic voltammograms obtained from the polymer-coated electrode at different concentrations of the RR120 dye are shown in Fig. 7.

The  $i_{pc}$  is proportional to the RR120 concentration, following the equation:

$$i_p(\mu\text{A}) = 5.48 + 0.996 \cdot C \quad (C = 1 \times 10^{-4} \text{ M}) \quad (6)$$



**Fig. 8.** Analytical curve obtained by the mean current values from the cyclic voltammograms of a glassy carbon electrode modified with (2TAPP)Mn(III)Cl/pyrrole-3-carboxylic acid films in DMF/PTBA 0.1 M. Scan rate =  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

where  $r = 0.997$ ,  $n = 5$ , as shown in Fig. 8. Nevertheless, there is no further increase in  $i_{pc}$  when the concentration is increased above  $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ , suggesting that saturation of the polymer film in relation to the azo dye takes place. The detection limit evaluated by statistical analysis ( $3\rho/\eta$ ; where  $\eta$  = slope and  $\rho$  = relative standard detection) is  $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ .

## CONCLUSION

Our findings give a new example of manganese porphyrin film electrode prepared by electrochemical polymerization in pyrrole-3-carboxylic acid. This easy-to-build modified electrode leads to sensitive, fast-responding and sufficiently stable sensor for determination of a bis-azo dye with a complex structure. Although results are preliminary, it is possible to conclude that the electrode modified with a (2TAPP)Mn(III)Cl/pyrrole-3-carboxylic acid film could be an excellent alternative to prove that the manganese porphyrin promotes the electrocatalytic oxidation of azo dyes. In addition, they could be used to determine the RR120 dye with high sensitivity. Future work will be directed toward the further characterization of the catalytic reaction by testing other metalloporphyrin compounds and other dye species.

## Acknowledgements

The authors thank CNPq and CAPES for financial support and Dr. Cynthia Maria de Campos Prado

Manso for help with the English language.

## REFERENCES

1. Meunier B, Visser SP and Shaik S. *Chem. Rev.* 2004; **104**: 3947-80.
2. Doro FG, Smith JRL, Ferreira AG and Assis MD. *J. Mol. Catal. A.* 2000; **164**: 97-108.
3. Faria AL, Airoidi C, Doro FG, Fonseca MG and Assis MD. *Appl. Catal. A.* 2004; **268**: 217-226.
4. Mansuy D and Battioni P. *European J. Biochem.* 1989; **184**: 267-285.
5. Trytek M, Fiedurek J, Polska K and Radzki S. *Catal. Lett.* 2005; **105**: 119-126.
6. Mansuy D. *Coord. Chem. Rev.* 1993; **125**: 129-142.
7. Meyer D, Leifels T, Sbaragli L and Woggon W-D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; **338**: 372-377.
8. Newcomb M and Chandrasena EP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; **338**: 394-403.
9. Shaik S, Kumar D, Visser PS, Altun A and Thiel W. *Chem. Rev.* 2005; **105**: 2279-2328.
10. Tabor JP, Pamin K and Haber J. *Inorg. Chem.* 2005; **8**: 1125-1127.
11. Nunes GS, Mayer I, Toma HE and Araki K. *J. Catal.* 2005; **236**: 55-61.
12. Rebelo SLH, Pereira MM, Simões MQ, Graça M, Neves PMS and Cavaleiro AS. *J. Catal.* 2005; **234**: 76-87.
13. Gotardo MCAF, Guedes AA, Schiavon MA, José NM, Yoshida VP and Assis MD. *J. Mol. Catal. A.* 2005; **229**: 137-143.
14. Schiavon MA, Iamamoto Y, Nascimento OR and Assis MD. *J. Mol. Catal. A.* 2001; **174**: 213-222.
15. Sun W and Kuhn FE. *Tetrahedron Lett.* 2004; **45**: 7415-7418.
16. Nakagaki S, Benedito FL and Wypych F. *J. Mol. Catal. A.* 2004; **217**: 121-131.
17. Kurek SS, Michorczyk P and Balisz A-M. *J. Mol. Catal. A.* 2003; **194**: 237-248.
18. Naik R, Joshi P, Umbarkar S and Deshpande RK. *Catal. Commun.* 2005; **6**: 125-129.
19. Li Z and Xia C-G. *J. Mol. Catal. A.* 2004; **214**: 95-101.
20. Ferreira ADQ, Vinhado FS and Iamamoto Y. *J. Mol. Catal. A.* 2006; **243**: 111-119.
21. Iamamoto Y, Ciuffi KJ, Sacco HC, Iwamoto LS, Nascimento OR and Prado CMC. *J. Mol. Catal. A.* 1997; **116**: 405-420.
22. Damme H, Crespín M, Obrecht F, Cruz MI and Fripiat JJ. *Colloid Interface Sci.* 1978; **66**: 43-54.
23. Hassan SA, Hassan HA, Hashem KM and Dayem HMA. *Appl. Catal. A.* 2006; **300**: 14-23.
24. Neys EF, Severeys A, Vankelecom IFJ, Ceulemans E, Dehaen W and Jacobs PA. *J. Mol. Catal. A.* 1999; **144**: 373-377.
25. Tong Z, Shichi T and Takagi K. *Mater. Lett.* 2003; **57**: 2258-2261.
26. Bedioui F. *Coord. Chem. Rev.* 1995; **144**: 39-68.
27. Eguchi M, Takagi S, Tachibana H and Inoue H. *J. Phys. Chem. Solids.* 2004; **65**: 403-407.
28. Crestini C, Pastorini A and Tagliatesta P. *J. Mol. Catal. A.* 2004; **208**: 195-202.
29. Haber J, Pamin K and Połtowicz J. *J. Mol. Catal. A.* 2004; **224**: 153-159.
30. Skrobot FC, Valente AA, Neves G, Rosa I, Rocha J and Cavaleiro JAS. *J. Mol. Catal. A.* 2003; **201**: 211-222.
31. Nakagaki S, Xavier CR, Wosniak AJ, Mangrich AS, Wypych F, Cantão MP, Denicoló I and Kubota LT. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2000; **168**: 261-276.
32. Assis MD and Smith JRL. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1998; **210**: 2221-2226.
33. Takashima W, Pandey SS and Kaneto K. *Thin Solid Films.* 2003; **438**: 339-345.
34. Hosono K, Matsubara I, Murayama N, Shin W, Izu N and Kanzaki S. *Thin Solid Films.* 2003; **441**: 72-75.
35. Cosnier S, Gondran C, Wessel R, Montforts F-P and Wedel M. *J. Electroanal. Chem.* 2000; **488**: 83-91.
36. Amini MK, Khorasani JH, Khaloo SS and Tangestaninejad S. *Anal. Biochem.* 2003; **320**: 32-38.
37. Bedioui F, Trevin S, Albin V, Guadalupe M, Villegas G and Devynck J. *Anal. Chim. Acta.* 1997; **341**: 177-185.
38. Bettelheim A, White BA and Murray RW. *J. Electroanal. Chem.* 1987; **217**: 271-286.
39. Shamsipur M, Hosseini M, Alizadeh K, Eskandari MM, Sharghi H, Mousavi MF and Ganjali MR. *Anal. Chim. Acta.* 2003; **486**: 93-99.
40. Bettelheim A, Reed R, Hendricks NH, Collman JP and Murray RW. *J. Electroanal. Chem.* 1987; **238**: 259-276.
41. Diab N and Schuhmann W. *Electrochim. Acta.* 2001; **47**: 265-273.
42. Park CO and Miura N. *Sens. Actuators B.* 2006; **113**: 316-319.
43. Onawa EK, Iwai H and Oki S. *Surf. Sci.* 2004; **557**: 31-40.
44. Furuya N, Murase K and Shibata M. *J. Electroanal. Chem.* 1997; **436**: 281-283.
45. Chi Y, Chen J and Miyake M. *Electrochem. Commun.* 2005; **7**: 1205-1208.
46. Jego-Evanno P, Moinet C and Simonneaux G.

- C. R. Acad. Sci. Paris, Série IIC*. 2000; **3**: 711-716.
47. Bedioui F, Devynck J and Bied-Charreton C. *J. Mol. Catal. A*. 1996; **113**: 3-11.
  48. Cauquis G, Cosnier S, Deronzier A, Galland B, Limosin D, Bizot J-CMJ, Deprez D and Pulicani J-P. *J. Electroanal. Chem.* 1993; **352**: 181-195.
  49. Meskar A, -Gautier EP, Amet Y, Berthou F and Lucas D. *Path. Biol.* 2001; **49**: 696-702.
  50. Pottowicz J, Tabor E, Pamin K and Haber J. *Inorg. Chem. Commun.* 2005; **8**: 1125-1127.
  51. Zbaida S. *Drug Metab. Rev.* 1995; **27**: 497-516.
  52. Houk VS. *Mutat. Res.: Rev. Genet. Toxicol.* 1992; **277**: 91-138.
  53. Sanchez PS, Sato MIZ, Paschoal CMRB, Alves MN, Furlan EV and Martins MT. *Toxic. Assess.* 1988; **3**: 55-80.
  54. Coelho MCLS, Coimbrão CA, Valent GU, Sato MIZ, Sanchez PS and Targa H. *Environ. Mol. Mutagen.* 1992; **20**: 199-211.
  55. Rajaguru P, Vidya L, Baskarathupathi B, Kumar PA, Palanivel M and Kalaiselvi K. *Mutat. Res.* 2002; **517**: 29-37.
  56. Sato MIZ, Valent GU, Coimbrão CA, Coelho MCLS, Sanchez PS, Alonso CD and Martins MT. *Mutat. Res.* 1995; **33**: 317-330.
  57. Fracasso ME, Leone R, Brunello F, Monastra C, Tezza F and Storti PV. *Mutat. Res.* 1992; **298**: 91-95.
  58. Hunger K. *Chimia*. 1994; **48**: 520-522.
  59. Collier SW, Storm JE and Bronaugh RL. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993; **118**: 73-79.
  60. Zabaida S, Stoddart AM and Levine WG. *Chem. -Biol. Interact.* 1989; **69**: 61-71.
  61. Zanoni MVB, Sene JJ and Anderson MA. *J. Photochem. Photobiol. A*. 2003; **157**: 55-63.
  62. Mohan SV, Prasad KK, Rao NC and Sarma PN. *Chemosphere*. 2005; **58**: 1097-1105.
  63. Papinutti LL and Forchiassin F. *Bioresour. Technol.* 2004; **94**: 169-176.
  64. Okazaki S-Y, Nagasawa S-I, Goto M, Furusaki S, Wariishi H and Tanaka H. *Biochem. Eng. J.* 2002; **12**: 237-241.
  65. Guaratini CCI, Fogg AG and Zanoni MVB. *Dyes Pigments*. 2001; **50**: 211-221.
  66. Guaratini CCI, Fogg AG and Zanoni MVB. *Microchem. J.* 2002; **71**: 65-72.
  67. Zanoni MVB, Sousa WR, Lima JP, Carneiro PA and Fogg AG. *Dyes Pigments*. 2006; **68**: 19-25.
  68. Viana ERC, Pereira FC and Zanoni MVB. *Dyes Pigments*. 2006; **71**: 145-152.
  69. Carneiro PA, Osugi ME, Fugivara CS, Boralle N, Furlan M and Zanoni MVB. *Chemosphere*. 2005; **59**: 431-439.
  70. Biswas SJ and Khuda-Bukhsh AR. *Muta. Res.* 2005; **587**: 1-8.
  71. Ress NB, Witt KL, Xu J, Haseman JK and Bucher JR. *Mutat. Res.* 2002; **521**: 201-208.
  72. Kim S-C, Jeong B-Y and Lee D-K. *Top. Catal.* 2005; **33**: 149-154.
  73. Adler DA, Longo FR and Shergalis W. *J. Am.Chem. Soc.* 1964; **86**: 3145-3149.
  74. Guilard R, Perie K, Barbe JM, Nurco DJ, Smith KM, Calmelbecke EV and Kadish KM. *Inorg. Chem.* 1998; **37**: 973-981.
  75. Bard AJ and Faulkner LR. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. (2nd edn). John Wiley: New York, 2001.
  76. Kadish KM, Smith KM and Guilard R. *The Porphyrin Handbook*. vol. 8. Academic Press: New York, 2000; 3-10.
  77. kadish KM, Araullo C, Maiya GB, Sazou D, Barbe JM and Guilard R. *Inorg. Chem.* 1989; **28**: 2528-2533.
  78. Fry AJ. *Synthetic Organic Electrochemistry*. (2nd edn). John Wiley: New York, 1989; 338.
  79. Brett AMO and Brett CMA. *Eletroquímica. Princípios, métodos, e aplicações*. Almeida: Coimbra, 1996; 470.
  80. Elving PJ, Pace SJ and O'Reilly JE. *J. Am. Chem. Soc.* 1973; **95**: 647-658.
  81. Baizer MM and Lund H. *Organic Electrochemistry*. (2nd edn). Marcel Dekker: New York, 1983; 533-577.
  82. Smith K. *Porphyrins and metalloporphyrins*. Elsevier Scientif: New York, 1975; 593-620.
  83. Kadish KM, Smith KM and Guilard R. *The porphyrins handbook*. vol. 9. Academic Press: New York, 2000; 134.
  84. Bedioui F, Devynck J and Bied-Charreton C. *Acc. Chem. Res.* 1995; **28**: 30-36.
  85. Chen S-M and Lin K-C. *J. Electroanal. Chem.* 2002; **523**: 93-105.
  86. Chen S-M and Lin K-C. *J. Electroanal. Chem.* 2001; **511**: 101-114.
  87. Chen S-M and Lin K-C. *J. Electroanal. Chem.* 2004; **573**: 277-287.
  88. Bechtold T, Gutmann R, Burtscher E and Bobleter O. *Electrochim. Acta* 1997; **42**: 3483-3487.

# 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](#)