



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Francisco de Assis da Silva

**ESTUDO DA OXIDAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO
CATALISADA POR MODELOS BIOINSPIRADOS**

**STUDY OF THE OXIDATION OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC
ACID CATALYZED BY BIOINSPIRED MODELS**

São Cristóvão
2017





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Francisco de Assis da Silva

**ESTUDO DA OXIDAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO
CATALISADA POR MODELOS BIOINSPIRADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Priscila de Barros

**STUDY OF THE OXIDATION OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID
CATALYZED BY BIOINSPIRED MODELS**

Master dissertation presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.

São Cristóvão
2017



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586e Silva, Francisco de Assis da
Estudo da oxidação do ácido 2,4-Diclorofenoxiacético catalisada por modelos bioinspirados = Study of the oxidation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid catalyzed by bioninspired models / Francisco de Assis da Silva ; orientador Valéria Priscila de Barros. – São Cristóvão, 2017.
61 f. : il.

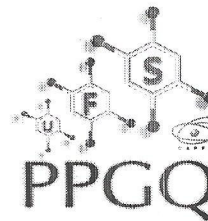
Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Química. 2. Catalisadores. 3. Ácido diclorofenoxiacético. 4. Citocromos. 5. Sistema enzimático do citocromo P-450. I. Barros, Valéria Priscila de, orient. II. Título

CDU: 547-3



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE
Programa de Pós-graduação em
Química - PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Francisco de Assis da Silva apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 28/04/2017.

Valéria Priscila de Barros

Prof.^a Dr.^a Valeria Priscila de Barros
Departamento de Química do Campus de Itabaiana-UFS

Renata Cristina Kiatkoski Kaminski

Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Kiatkoski Kaminski
Departamento de Química do Campus de Itabaiana-UFS

Joice Santamálvina dos Santos

Prof.^a Dr.^a Joice Santamálvina dos Santos
Universidade Federal da Bahia Instituto de Química

*Dedico esse trabalho a minha família,
que por mais que estejam longe,
sempre estão em meus pensamentos!!!*

Agradecimentos

A Profa. Dra. Valéria Priscila de Barros pela orientação e diversos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior por ter dado acesso ao laboratório de cromatografia a gás e por participado do desenvolvimento do método de análise no GC-MS.

Ao Prof. Dr. Sandro Navickiene por ter dado acesso ao laboratório de cromatografia líquida.

A Profa. Dra. Eliana Midori Sussuchi por ter cedido o espaço para realizar os experimentos.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento por ter financiado a compra de alguns reagentes.

Ao graduando Wenes Ramos da Silva por ensinar a operar o equipamento de GC-MS e graduando Matheus Liniker de Jesus Santos por ensinar a operar o Espectrofotômetro UV-Vis.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização desse trabalho.

Resumo

Inspirados em sistemas catalíticos naturais, metaloporfirinas e complexos salen têm sido utilizados como catalisadores para a oxidação de xenobióticos na presença de diversos doadores de oxigênio, tanto em catálise homogênea quanto heterogênea. Esses catalisadores têm se mostrado altamente eficientes e seletivos nas reações de diferentes substratos, tais como fármacos e pesticidas. Dentro desse contexto, o trabalho desenvolvido nessa dissertação apresenta os estudos da oxidação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) utilizando ferroporfirinas e catalisador de Jacobsen como catalisadores dessas reações com diversos doadores de oxigênio.

Os resultados mostram que a metaloporfirina e o complexo salen empregados nesse estudo são eficientes catalisadores para a oxidação do 2,4-D na presença dos doadores de oxigênio iodossilbenzeno (PhIO), ácido metacloroperbenzóico (m-CPBA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tanto em meio homogêneo como heterogêneo. As reações com os catalisadores não suportados alcançaram rendimentos mais altos do que os obtidos com os catalisadores suportados, o que está possivelmente relacionado as dificuldades de acesso ao centro catalítico imposta pelo suporte.

A conversão de 2,4-D atingiu mais de 50% em alguns sistemas, e, em geral, as reações de oxidação com os três doadores de oxigênio foram seletivas promovendo a formação de hidroquinona (reações com PhIO e H_2O_2) e 3,5-diclorocatecol (reações com m-CPBA).

Um dos produtos identificados nas reações é um metabólito do 2,4-D produzido sistemas *in vivo*, indicando que os catalisadores utilizados nesse estudo podem ser considerados bons modelos do citocromo P450 na oxidação do 2,4-D.

Palavras-chave: ferroporfirina, catalisador de Jacobsen, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, hidroquinona, 3,5-diclorocatecol, citocromo P450

Abstract

Inspired by natural catalytic systems, metalloporphyrins and Salen complexes have been used as catalysts for the oxidation of xenobiotics in the presence of several oxygen donors, both in homogeneous and heterogeneous catalysis. These catalysts have been highly efficient and selective in the reactions of different substrates, such as pharmaceuticals and pesticides. In this context, the work developed in this dissertation presents the oxidation studies of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide using ferroporphyrins and Jacobsen catalyst as catalysts of these reactions with several oxygen donors.

The results shows that the metalloporphyrin and the complex employed in this study are efficient catalysts for oxidation of 2,4-D in the presence of oxygen donors iodosilbenzene (PhIO), metachloroperbenzoic acid (m-CPBA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) both in homogeneous and heterogeneous. The reactions with the unsupported catalysts achieved higher yields than those obtained with the supported catalysts, which is possibly related to the difficulties of access to the catalytic center imposed by the support.

The conversion of 2,4-D reached more than 50% in some systems, and, in general, oxidation reactions with the three oxygen donors were selective promoting the formation of hydroquinone (reactions with PhIO and H_2O_2) and 3,5-dichlorocatechol (reactions with m-CPBA).

One of the products identified in the reactions is a metabolite of 2,4-D produced *in vivo* systems, indicating that the catalysts used in this study can be considered good models of cytochrome P450 in the oxidation of 2,4-D.

Keywords: ironporphyrin, Jacobsen catalyst, 2,4-dichlorophenoxyacetic, hydroquinone, 3,5-dichlorocatechol, cytochrome P450.

Lista de abreviaturas e siglas

λ	comprimento de onda
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4-DCP	2,4-diclorofenol
3,5-DCC	3,5-diclorocatecol
ACN	acetonitrila
C ₁₈	Fase sólida à base de sílica modificada com grupos octildecil
GC-MS	do inglês Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
FeTFPP	cloreto de [5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)porfirina ferro(III)]
FeTFPP-APS	FeTFPP suportada em aminopropilsílica
H ₂ TFPP	5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)porfirina
HAc	ácido acético
ACN/HAc	solvente composto de 70% ACN/29,4% H ₂ O/0,6% HAc v/v
Hdr	hidroquinona
HPLC	do inglês High Performance Liquid Chromatography
m-CPBA	ácido metacloroperbenzóico
MeOH	metanol
Mn-salen	cloreto de N,N'-bis(3,5-di-terc-butilsalícido)-1,2diaminocicloexil manganês(III) – catalisador de Jacobsen
Mn-salenK10	Mn-salen suportado em montmorilonita K10
P450	citocromo P450
PhIO	iodosilbenzeno
r	coeficiente de correlação
UV-vis	ultravioleta-visível
V _{inj}	volume de injeção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Aspectos gerais	11
1.2 Citocromo P450	12
1.2.1 Metaloporfirinas e Complexo salen como modelos biomiméticos do citocromo P450	16
1.3 Agrotóxicos	21
1.4. Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	22
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Reagentes	25
3.2 Equipamentos	26
3.3 Estudos das condições de reação de oxidação do 2,4-D	26
3.4 Análise do 2,4-D e seus possíveis produtos de oxidação por HPLC	27
3.5 Análises das reações de oxidação do 2,4-D por GC-MS	28
4 Resultados e Discussão	29
4.1 Análises dos catalisadores FeTFPP e Mn-salen por espectroscopia UV-vis.	29
4.2 Padronização das condições de análise do 2,4-D e seus possíveis produtos de oxidação por HPLC/UV	31
4.3 Estudo da oxidação do 2,4-D catalisada pela FeTFPP e Mn-salen monitorada por HPLC/UV .	35
4.3.1 Análise dos produtos da oxidação do 2,4-D utilizando os catalisadores FeTFPP e Mn-salen por HPLC-UV.	39
4.3.2 Análise dos produtos de oxidação do 2,4-D utilizando os catalisadores suportados FeTFPP-APS e Mn-salenK10 por HPLC-UV	45
5 CONCLUSÕES	53
6 REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

O organismo humano está constantemente exposto a uma variedade de compostos estranhos ao organismo, chamados de xenobióticos. Eles são produzidos pelo homem e incluem fármacos, aditivos alimentares, toxinas, agrotóxicos, substâncias químicas de uso industrial e poluentes ambientais de diversos tipos [1-3].

Dentre os diversos tipos de xenobióticos, os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas, praguicidas ou defensivos agrícolas são substâncias ou misturas de substâncias químicas que têm a função de prevenir, inibir, repelir e/ou eliminar a presença de organismos vivos capazes de prejudicar as lavouras agrícolas. Os pesticidas podem ser agrupados de acordo com as pragas combatidas, sendo classificados como herbicidas, fungicidas, inseticidas, raticida, acaricidas, entre outros [4].

Atualmente, existem mais de 600 tipos de pesticidas na agricultura, sendo os herbicidas os mais empregados em larga escala, destacando-se os princípios ativos: glifosato, 2,4-D e atrazina [4].

Os herbicidas, assim como outros xenobióticos, devem ser metabolizados pelo organismo humano para serem transformados em produtos menos lipofílicos, e então excretados. Esse processo de metabolização é chamado de biotransformação, sendo dividido em duas fases [2]. Reações de fase I têm como objetivo introduzir grupos funcionais no xenobiótico através de reações de oxidação, redução ou hidrólise. Estes grupos funcionais os tornarão mais solúveis em água. As reações de fase II têm como objetivo conjugar o xenobiótico com vários tipos de moléculas, como ácido glicurônico, sulfato, glutathione reduzida, aminoácidos ou acetato. O conjugado formado normalmente é inativo ou menos ativo. Contudo o produto a ser excretado pode ser formado na fase I e/ou na fase II [2].

De um modo geral, os processos de biotransformação de xenobióticos são catalisados por uma diversidade de enzimas distribuídas em vários tecidos e órgãos,

tais como, fígado, pâncreas, coração, cérebro, testículos, placenta e ovários [5]. Uma classe de enzima responsável por este tipo de reação são os citocromos P450 [5].

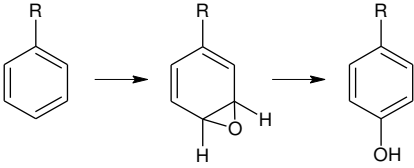
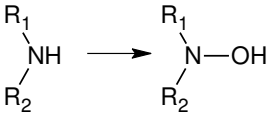
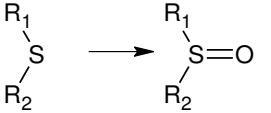
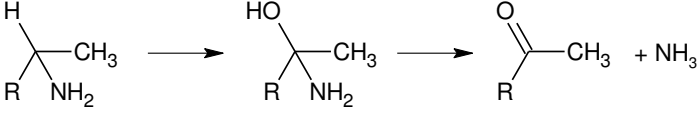
1.2 Citocromo P450

O Citocromo P450 constitui uma superfamília de enzimas hemecisteinato presentes em todas as formas de vida (plantas, mamíferos, insetos, bactérias). São responsáveis em biotransformar e eliminar diversos xenobióticos, sendo capazes de transferir um átomo de oxigênio proveniente do O_2 a praticamente qualquer substrato orgânico [5,6].

As reações catalisadas por essas enzimas são referidas como mono-oxigenações, uma vez que apenas um átomo de oxigênio permanece ligado ao substrato [5]. Algumas das diversas reações efetuadas pelas enzimas P450 dos mamíferos são: N-desalquilação, O-desalquilação, hidroxilação aromática, N-oxidação, S-oxidação, desaminação e a desalogenação (Quadro 1) [7].

O primeiro relato sobre a descoberta da família de enzimas P450 foi feito em 1958, quando um pigmento extraído do fígado de ratos e porcos, apresentou picos nos espectros de absorção no UV-vis em 450 nm, na presença de NADPH e CO [5,8]. Na década de 60, este pigmento foi identificado como um citocromo e foi denominado citocromo P450 [8].

Quadro 1 – Principais reações envolvendo as enzimas P450 nos mamíferos [7].

Reações oxidativas	
N-desalquilação	$\text{RNHCH}_3 \longrightarrow \text{RNH}_2 + \text{CH}_2\text{O}$
O-desalquilação	$\text{ROCH}_3 \longrightarrow \text{ROH} + \text{CH}_2\text{O}$
Hidroxilação alifática	$\text{RCH}_2\text{CH}_3 \longrightarrow \text{RCHOHCH}_3$
Hidroxilação aromática	
N-oxidação	$\text{RNH}_2 \longrightarrow \text{RNHOH}$ 
S-oxidação	
Desaminação	

Todos os citocromos P450 têm como sítio catalítico uma ferroprotoporfirina IX (Figura 1), o qual está inserido dentro das cadeias de polipeptídeos da proteína. A ferroprotoporfirina IX se liga à proteína através de um ligante proximal do tipo cisteínato. As enzimas que compõem a superfamília P450 diferem entre si pela natureza do ambiente proteico, o qual é capaz de selecionar o substrato e mantê-lo próximo ao sítio ativo [5,8].

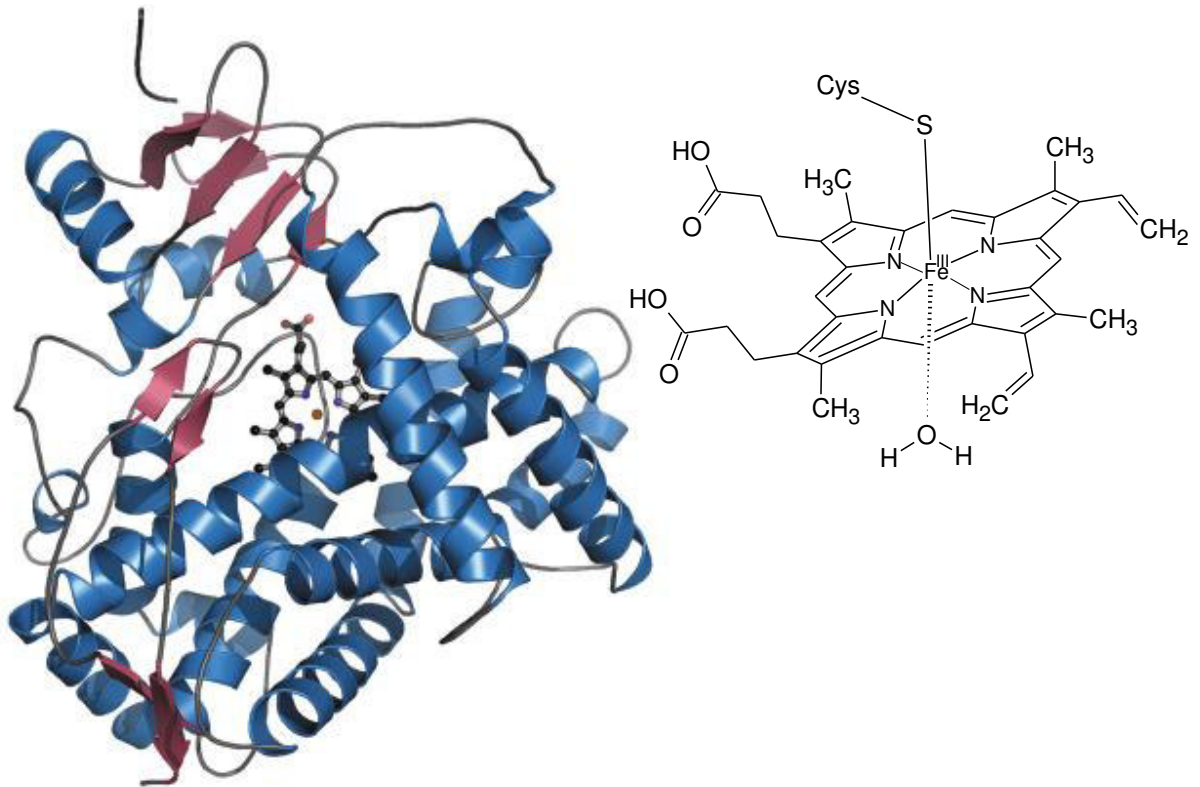
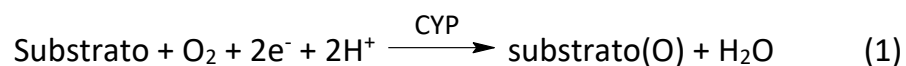


Figura 1 – Estrutura do citocromo P450 (CYP2D6) em humano com a presença do sítio catalítico – ferroprotoporfirina IX. O íon de ferro (III) encontra-se hexacoordenado a quatro átomos de nitrogênio do macrociclo, cisteína e uma molécula de água [9].

Duas das principais funções desempenhadas pelas enzimas P450 relacionam-se ao metabolismo oxidativo e desintoxicação de xenobióticos. Algumas enzimas P450 são extremamente específicas catalisando apenas as reações de determinado substrato, enquanto outras são capazes de catalisar oxidações de diversos substratos. Isso só é possível devido às mudanças de conformação da cavidade proteica que orientam o sítio ativo em torno do substrato e isolam a reação conferindo boa atividade catalítica e regiosseletividade [5,7,10]. O ciclo catalítico da enzima é representado, de forma geral, pela equação 1.



Sendo composto por cinco etapas:

1. Ligação do substrato e redução do ferro do estado III para II;
2. Ligação do oxigênio molecular à enzima;
3. Clivagem do oxigênio molecular (ativação);
4. Oxidação do substrato;
5. Liberação do produto oxidado.

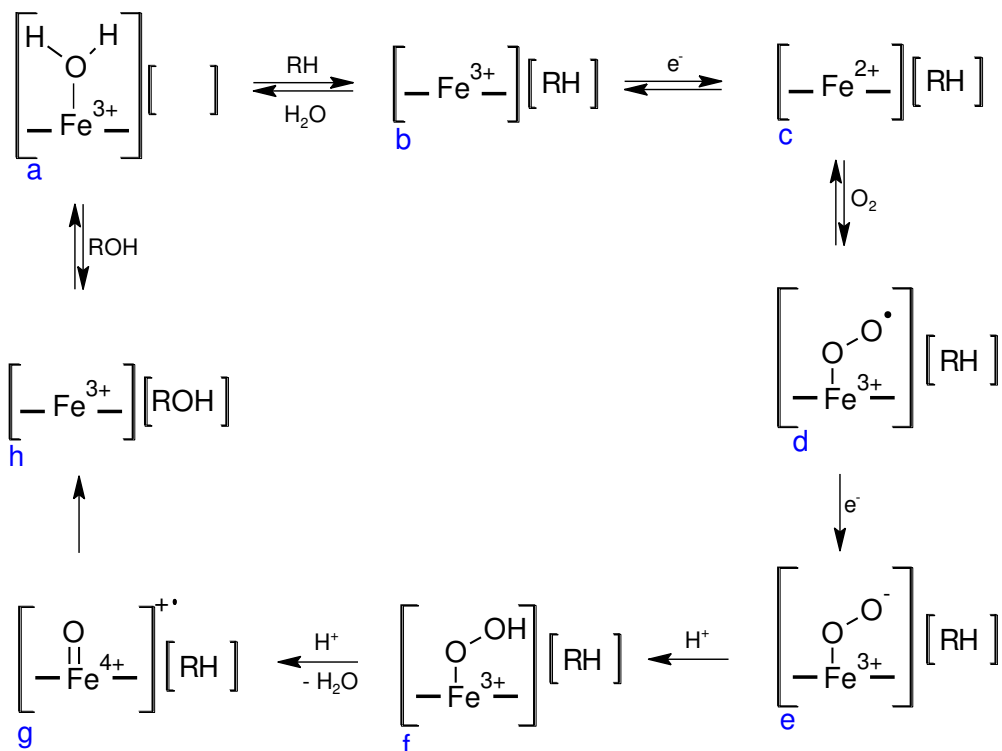


Figura 2 - Ciclo catalítico do citocromo P450 [5, 11-13].

No estado inicial, Figura 2(a), o íon metálico (Fe^{3+}) do grupo prostético está em estado de baixo spin, coordenado a quatro átomos de N dos anéis imidazólicos, ao S da cisteína e uma molécula de água, o que perfaz um número de coordenação igual a 6. O substrato R-H se liga à enzima, paralelo ao deslocamento da molécula de água (b), tornando o complexo pentacoordenado alto spin. A transferência de elétron para o ferro pelo NADPH reduz o Fe^{3+} para Fe^{2+} (c) permitindo a ligação do oxigênio em estado triplete e formando um complexo hexacoordenado baixo spin (d). A segunda transferência de elétron reduz este intermediário levando a formação da espécie (e)

que é muito lábil. A protonação do oxigênio terminal nesse complexo produz um complexo Fe^{3+} hidropéroxido (**f**) que rapidamente submete-se a uma cisão heterolítica da ligação O-O, dando origem à espécie química Fe^{4+} oxoporfirina- π -cátion $[\text{Fe}^{4+}\text{O}]^{*+}$ (**g**) que é considerado o intermediário responsável por catalisar a maioria das reações do citocromo P450. No passo final, a oxidação do substrato por esta espécie reativa dá origem ao produto oxidado (**h**) e, após a dissociação do produto, regenera a enzima Fe^{3+} . Na presença de oxidantes simples como PhIO entre outros, a espécie (**a**) pode ser transformada diretamente na espécie (**h**), esta etapa recebe o nome de desvio do peróxido (“peróxido shunt”), porém essa reação em meio biológico requer a ligação do oxigênio e um agente redutor [5, 11-13].

1.2.1 Metaloporfirinas e Complexo salen como modelos biomiméticos do citocromo P450

Os modelos biomiméticos reproduzem uma ou mais propriedades significativas de um sítio ativo de uma proteína, tais como: estrutura eletrônica e atividade catalítica. Esses sistemas são compostos por moléculas de massa molecular relativamente baixas, idealmente sintetizadas nas formas cristalinas e que imitam as características biológicas em termos de composição, tipo de ligantes, estrutura e estados de oxidação. Estes modelos possuem limitações, uma vez que não podem simular os efeitos ambientais e impedimentos estéricos impostos pela conformação da proteína [5,10,14-16].

Além de uma melhor compreensão dos fenômenos *in vivo*, os modelos biomiméticos visam também desenvolver sistemas catalíticos regios e estereoespecíficos para a produção de fármacos e outras aplicações na química fina, buscando atingir a eficiência e a seletividade de enzimas [15-17].

Os sistemas biomiméticos mais eficientes no desenvolvimento da química do citocromo P450 são as metaloporfirinas (Figura 3), que possuem características

análogas ao grupo prostético ferroprotoporfirina IX. As metaloporfirinas na presença de doadores de oxigênio são capazes de mimetizar as oxidações de maneira semelhante às reações realizadas pela família P450. Diversas metaloporfirinas foram sintetizadas (Figura 3) ao longo dos anos, sempre com o objetivo de alcançar uma maior estabilidade, devido ao fato das primeiras metaloporfirinas (1ª geração) serem degradadas no meio reacional [11,14,18].

Para solucionar o problema de estabilidade apresentado pelas metaloporfirinas de primeira geração, foram sintetizadas metaloporfirinas com a introdução de substituintes halogenados nas posições mesoaril do anel porfirínico (2ª geração) [14]. Esses substituintes favorecem a estabilidade do catalisador uma vez que protegem o macrociclo porfirínico com aumento do impedimento estérico e, além disso, a presença desses substituintes elétrons-aceptores confere ao intermediário da reação uma maior eletrofilicidade e reatividade [14]. Diante do sucesso da segunda geração de catalisadores, foram sintetizadas as metaloporfirinas de terceira geração com a substituição dos hidrogênios das posições β -pirrólicas do macrociclo porfirínico por substituintes halogenados. Contrariamente ao esperado, esse fato ocasionou a diminuição da atividade catalítica das metaloporfirinas [14]. Dessa forma, a segunda geração de metaloporfirinas apresentaram os melhores resultados em termos de estabilidade e atividade catalítica quando comparados com a primeira e terceira geração [14-17].

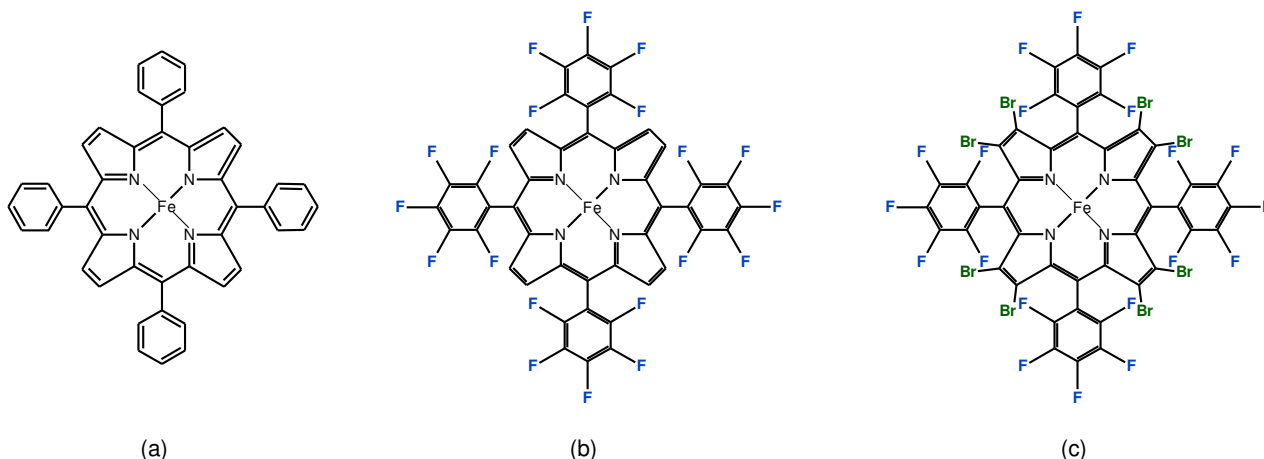


Figura 3 - Ferroporfirinas de 1ª geração **(a)**, 2ª geração **(b)** e 3ª geração **(c)**. A presença de grupos eletronegativos nestes metalocomplexos faz com que a correspondente espécie ativa metal-oxo seja mais eletrofílica e assim mais reativa.

As metaloporfirinas são excelentes modelos do citocromo P450, mas apresentam algumas desvantagens, tais como: difícil síntese e purificação, o que aumenta muito o custo de produção. Dessa forma, esses catalisadores possuem maior aplicação na química fina e em estudos biomiméticos de mecanismos [15-17].

Com o intuito de superar alguns dos problemas associados aos catalisadores metaloporfirínicos, pesquisas vêm sendo realizadas para desenvolvimento de catalisadores que sejam de baixo custo, de fácil síntese e purificação, capazes de realizar reações químicas semelhantes ao citocromo P450. Algumas dessas qualidades são encontradas nas bases de Schiff que apresentam atividade catalítica semelhante aos sistemas metaloporfirínicos [19-21].

Além da estabilidade e facilidade de síntese, as bases de Schiff permitem o controle das propriedades estéricas e eletrônicas através de alterações nos substituintes precursores, tornando-os capazes de catalisar diversas reações de acordo com o íon metálico central, tais como: epoxidação de alcenos, hidroxilação de alcanos, oxidação de álcoois e derivados fenólicos, oxidação de fármacos, entre outras [20-23].

As bases de Schiff possuem fórmula geral $R_1R_2C=N-R_3$ (R_1 , R_2 e/ou R_3 = grupos alquil ou aril), são conhecidas como iminas ou azometinas e foram sintetizadas por Hugo Schiff em 1864 [23-25].

Nas bases de Schiff, o grupo C=N apresenta propriedades básicas e uma forte tendência a formar complexos com metais. A presença de apenas um grupo C=N é insuficiente para que sozinho forme complexos com íons metálicos através do par de elétrons livres. Assim, é necessário a presença de outros sítios de coordenação para formar um anel de cinco a seis membros quando reage com um íon metálico, dando ao complexo formado alta estabilidade termodinâmica e cinética [25].

Dentre as bases de Schiff já estudadas, a mais conhecida é a N,N'(bis-salicideno)-etilenodiamina, também conhecida como salen. O salen é o ligante mais simples da família tetradentados (N₂O₂), sendo sintetizado através da reação de condensação (Figura 4) entre o salicilaldeído e a etilenodiamina [25].

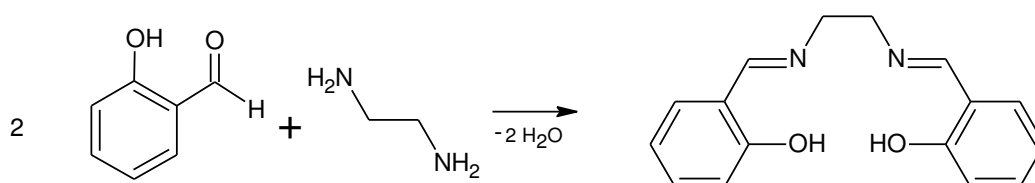


Figura 4 – Representação da reação de condensação entre o salicilaldeído e o ligante bidentado - etilenodiamina para formação do salen [23].

Utilizando diferentes derivados de salicilaldeído e aminas é possível chegar a uma extensa variedade de compostos da família salen. O catalisador de Jacobsen (Figura 5) é um tipo especial de complexo salen, sintetizado na década de 1990 por Jacobsen e Katsuki, que apresenta como metal central o Mn, grupos *terc*-butil e substituinte cicloexano. Este catalisador foi avaliado comercialmente como o “reagente do ano de 1994” e até hoje é considerado um catalisador eficiente para epoxidação enantiosseletiva de olefinas fornecendo rendimentos da ordem de 97 % com 98 % de excesso enantiomérico, dependendo do substrato [22,26,27].

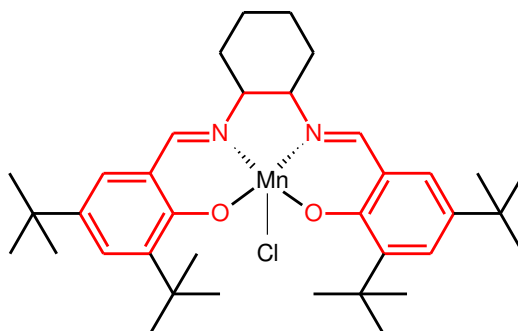


Figura 5 – Estrutura química do catalisador de Jacobsen. Em vermelho destaca-se uma base de Schiff do tipo salen com esfera de coordenação N_2O_2 .

Nos últimos dez anos as pesquisas utilizando o catalisador de Jacobsen como modelo bioinspirado nas enzimas P450 vêm crescendo e cada vez mais trabalhos são publicados aplicando-o em alguns tipos de substratos, por exemplo: fármacos e hidrocarbonetos [19-21, 27,28]. Esses estudos relatam bons resultados, atingindo altos rendimentos e formando alguns dos metabólitos produzidos pelas as enzimas P450 com o mesmo substrato. Isso demonstra capacidade do catalisador de Jacobsen em mimetizar a atividade catalítica dessas enzimas. Além disso, esse complexo apresenta algumas vantagens sobre os sistemas metaloporfirínicos, tais como: facilidade de síntese, estabilidade e custo muito menor.

A diferença fundamental entre estes modelos, metaloporfirinas e complexos salen, e as enzimas é a presença de matriz proteica nos sistemas biológicos. A matriz isola o centro catalítico, controla o acesso do substrato a espécie ativa oxidante, tornando-a seletiva para oxidação, condiciona um ambiente hidrofóbico para a ligação do substrato, controla a reatividade e previne a inativação por agregação ou alto-oxidação biomolecular [14].

Na tentativa de desenvolver as propriedades da matriz proteica, publicações de trabalhos usando metaloporfirinas e complexos salen imobilizados em uma variedade suportes, tais como: alumina, sílica, materiais poliméricos, zeólitas, montmorilonita e argila vêm sendo cada vez mais frequentes [27-30]. A utilização de catalisadores suportados confere maior estabilidade e a possibilidade de reutilização dos

catalisadores após o final da reação por simples filtração ou centrifugação. Já reaproveitamento dos catalisadores não suportados é inviável devido a difícil recuperação do catalisador.

1.3 Agrotóxicos

Os agrotóxicos ou defensivos agrícolas são desenvolvidos com o objetivo de conservação de produtos ou do meio ambiente, através do controle de espécies consideradas indesejáveis [31,33].

De acordo com os tipos de organismo-alvo envolvidos no uso desses defensivos agrícolas, pode-se agrupá-los em várias classes, tais como: herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, raticidas entre outros [31].

Embora a função dos agrotóxicos seja direcionada, eles também podem causar danos fora do seu alvo, contaminando os solo e mananciais hídricos, culminando em degradação ambiental com prejuízos a saúde e alterações significativas no ecossistema.

A produção de defensivos agrícolas cresce em todo o mundo em grandes proporções. Estatísticas mostram que nos últimos 10 anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93 %. O Brasil se destaca no cenário mundial como o maior consumidor de agrotóxicos, respondendo, na América Latina, por 86 % do consumo e ultrapassando os Estados Unidos. A utilização de agrotóxicos nas lavouras do país saltou de 600 milhões de litros em 2002 para 850 milhões de litros em 2011. Este aumento está relacionado a dois fatores: diminuição dos preços e isenção dos impostos sobre tais produtos [32,33].

A classe dos agrotóxicos de maior aplicação é a dos herbicidas (mais de 50 % do total), seguidos pelos inseticidas, fungicidas e acaricidas. Dentre os herbicidas, os princípios ativos mais utilizados são: glifosato, 2,4-D e atrazina [31,32].

Os agrotóxicos representam um importante problema para a saúde humana e ambiental devido ao seu potencial de toxicidez, podendo até mesmo ser mutagênico, cancerígeno, teratogênico e mimetizador de hormônios [34-37]. Geralmente, possuem grande persistência no meio ambiente, geram sérios problemas de qualidade das águas superficiais e subterrâneas e a eventual falta de seletividade dessas substâncias também pode atingir espécies não-alvo.

No Brasil, o uso de agrotóxicos normalmente não é feito com orientação e conhecimento adequado e, assim, problemas sérios de saúde pública e ambientais são gerados. Em 2011, foram registrados 4436 atendimentos de casos de intoxicação humana no uso agrícola e 2406 atendimentos de intoxicação por agrotóxicos de uso domésticos, correspondendo a 7 % de todos os casos registrados de intoxicação humana em território nacional [38].

1.4. Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

O 2,4-D (Figura 6 a) possui caráter polar e foi sintetizado em 1941 através da reação entre 2,4-diclorofenol e ácido monocloroacético e passou a ser comercializado a partir de 1944 [39].

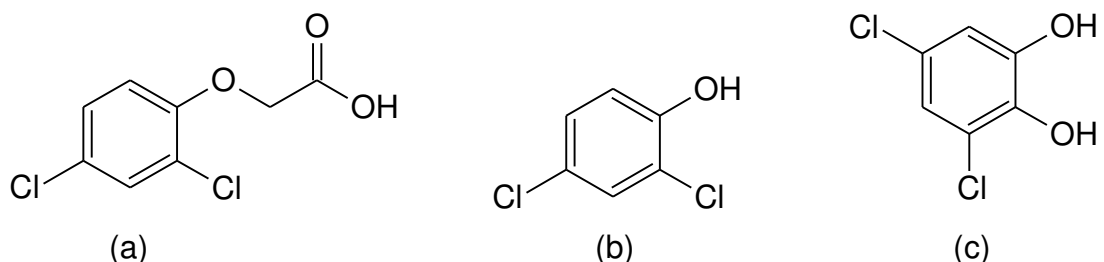


Figura 6 – Estrutura química: (a) 2,4-D; (b) 2,4-DCP e (c) 3,5-DCC.

É utilizado em diversos países, inclusive o Brasil, como herbicida e controlador de crescimento de espécies vegetativas. Existem cerca de 1500 produtos registrados que contém o 2,4-D em sua composição. Muito utilizado na agricultura, destaca-se pela

facilidade de aquisição e manipulação, agindo como inibidor da ação da enzima acetilcolinesterase, causando a morte de ervas daninhas de folhas largas nas culturas de arroz, café, cana-de-açúcar, milho, pastagens, soja e trigo [39,40].

Este herbicida juntamente com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético formou o agente laranja, usado como arma química na guerra do Vietnã [40].

Sua classificação toxicológica é de classe 1, ou seja, extremamente tóxico e perigoso ao meio ambiente [34,36].

A exposição humana ao 2,4-D pode ocorrer durante a manufatura, transporte e aplicação ou pela ingestão de água e alimentos contaminados. Este herbicida é rapidamente absorvido quando ingerido e não é facilmente decomposto em ambientes naturais quando presente em concentrações maiores que 1 mg L^{-1} . No Brasil, a portaria número 518 do ministério da saúde indica que o limite máximo para o 2,4-D é de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ [41].

Estudos sobre a toxicidade do 2,4-D levaram a resultados que permitem classificá-lo como carcinogênico, teratogênico, desregulador endócrino, tóxico para o sistema reprodutivo e imunossupressor. Além disso, também induz a formação de radicais livres, causa mudanças nos processos fisiológicos e de comunicação celular, liga-se a enzimas interferindo na sua atividade e induz alterações físicas na membrana celular [34-37].

A degradação do 2,4-D é bastante estudada em sistemas como, por exemplo: fenton, fotocatalise, fotoeletroquímico, eletroquímico e bacteriológico [1,42-44]. De forma geral, a oxidação deste herbicida gera alguns produtos com toxicidade elevada, destacando-se o 2,4-diclorofenol (precursor na síntese do 2,4-D) e o 3,5-diclorocatecol [45-47].

No entanto, há poucas informações na literatura a respeito do mecanismo de oxidação do 2,4-D pelas enzimas P450 [46,47] e não há relatos do uso de modelos bioinspirados na catálise oxidativa do 2,4-D.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a atividade catalítica da FeTFPP e Mn-salen em meio homogêneo e suportados, como modelos das enzimas P450 na oxidação do herbicida 2,4-D utilizando como doadores de oxigênio o H₂O₂, m-CPBA e PhIO.

Objetivos Específicos

- Investigar a atividade catalítica da FeTFPP e do Mn-salen em meio homogêneo na oxidação do 2,4-D;
- Investigar a atividade catalítica da FeTFPP-APS e do Mn-salenK10 em meio heterogêneo na oxidação do 2,4-D;
- Analisar o comportamento dos oxidantes (PhIO, H₂O₂ e m-CPBA) nas reações catalíticas;
- Determinar as melhores condições de reações, em relação à razão molar, oxidante, tempo de reação e solvente;
- Estabelecer condições de análise por HPLC-UV e/ou CG dos produtos provenientes da oxidação do 2,4-D;
- Identificar os produtos formados por HPLC-MS e/ou CG-MS;
- Comparar os produtos encontrados em outros sistemas na literatura com os produtos encontrados pelos modelos das enzimas P450;
- Entender a participação do citocromo P450 na metabolização deste herbicida no organismo humano e em plantas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

- 2,4-D; 2,4-DCP; 3,5-DCC; Hdr e Mn-salen (R) – Sigma Aldrich;
- H₂TFPP - MID CENTURY;
- ACN e MeOH - J.T. Baker;
- Ácido acético grau HPLC, H₂O₂ (30%) – Dinâmica;
- m-CPBA – Acros Organics;
- FeTFPP: a inserção do íon ferro na porfirina H₂TFPP foi realizada pela Profa. Dra. Valéria Priscila de Barros, utilizando a metodologia descrita por Adler et al. [48] a partir do FeCl₂.4H₂O.
- FeTFPP-APS: FeTFPP foi imobilizado em aminopropilsílica pelo Prof. Dr. André Luiz de Faria [49]. O material contém 1 mmol de FeTFPP por grama de aminopropilsílica.
- Mn-salenK10: Mn-salen foi imobilizado em montmorilonita K10 pelo Prof. Dr. André Luiz de Faria, através do procedimento desenvolvido por Barros et al. [49,50]. O material contém 15,7 μmol de Mn-salen por grama de montmorilonita.
- O PhIO foi sintetizado pela Profa. Dra. Valéria Priscila de Barros, utilizando metodologia adaptada da literatura [51] a partir da hidrólise do iodobenzenodiacetato com NaOH. Sua pureza de 95 % foi determinada por titulação iodométrica com Na₂S₂O₃ [52]. O PhIO foi armazenado na ausência de luz e a temperatura de - 4 °C.

Os reagentes foram utilizados sem qualquer purificação prévia. Após o uso, todos os reagentes foram descartados em recipientes apropriados para posterior tratamento para reutilização ou descarte final.

3.2 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu, equipado com duas bombas de solvente modelo LC-6AD, com detector espectrofotométrico SPD-20, injetor automático SIL-20A. Coluna C₁₈ LiChrospher (Merck), com tamanho de partícula de 5 µm (125 x 4 mm). A coluna analítica foi precedida de pré-coluna C₁₈ LiChrospher (4 x 4 mm), e as injeções foram feitas em um loop de 20 µL. Software LC Solution.
- Espectrofotômetro HP modelo 8452A, células de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, software UVProbe 2.35.
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas, marca DANI, com cromatógrafo gasoso modelo Master GC (Fast Gas Chromatograph) e espectrômetro de massas modelo Master TOF-MS. Coluna DN-Wax FAST (polietilenoglicol), dimensões 10 m x 0,1 mm x 0,1 µm. Software MasterLab.
- Cuba ultrassom ALTsonic clean.
- Agitador magnético GOstirrer.
- Balança analítica OHAUS.
- Água ultrapura Milli-Q, Millipore.

3.3 Estudos das condições de reação de oxidação do 2,4-D

As reações foram realizadas em frascos de 5,0 mL com septos e tampas rosqueadas, temperatura ambiente e com agitação magnética.

Para as oxidações do 2,4-D foram estudadas variações na quantidade de matéria do substrato (2,4-D) e do oxidante, mantendo a quantidade de catalisador inalterada.

Foram determinadas duas razões molares padrões de catalisador/substrato/oxidante para a oxidação do 2,4-D de acordo com o doador de oxigênio utilizado. Nas reações com PhIO e m-CPBA utilizou-se a razão molar 1:10:30 e

nas reações com H₂O₂ a molar 1:10:1000 [19,20]. Assim, foi adicionado $1,25 \times 10^{-7}$ mol de catalisador, $1,25 \times 10^{-6}$ mol de 2,4-D e $3,75 \times 10^{-6}$ mol (PhIO ou m-CPBA) ou $1,25 \times 10^{-4}$ mol (H₂O₂) de oxidante ao recipiente de reação contendo 1 mL de solvente. Após isso foi adicionado solvente até o volume da mistura reacional atingir 2 mL [19,20,49].

A conversão catalítica foi avaliada após 2h de reação, retirando-se uma alíquota da mistura reacional e analisando-a por HPLC/UV e/ou CG/MS.

Todas as reações catalíticas foram realizadas em duplicatas.

Reações controle foram realizadas usando o mesmo procedimento, mas na presença de: (I) catalisador e substrato, (II) catalisador e oxidante, (III) substrato e oxidante.

3.4 Análise do 2,4-D e seus possíveis produtos de oxidação por HPLC

As reações foram acompanhadas por HPLC-UV. A condição estabelecida para análise do 2,4-D e seus produtos de oxidação foi obtida utilizando-se o método isocrático, fase móvel com 70% de MeOH e 30% de uma solução aquosa 2% de HAc com fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ à temperatura ambiente. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 280 nm e o tempo total da análise foi de 15 min [42,53].

A conversão do 2,4-D, Hdr e 3,5-DCC foram quantificadas a partir de uma curva analítica padrão, utilizando-se soluções com concentrações entre 0,009 a $8,32 \text{ mmol L}^{-1}$. Essas soluções foram injetadas separadamente no cromatógrafo e as áreas relativas a cada concentração foram anotadas. Com os dados obtidos foi construído um gráfico de concentração versus área, e a partir da equação da reta foram calculadas as concentrações do 2,4-D em cada reação.

3.5 Análises das reações de oxidação do 2,4-D por CG-MS

Os produtos de oxidação foram identificados por CG-MS a partir da injeção de uma alíquota reacional [43]. Os parâmetros estabelecidos para análise das reações foram:

- Programação de temperatura da coluna: 150 °C por 3 min, 150 °C – 250°C ($50^{\circ}\text{C min}^{-1}$) e 250 °C por 7 min;
- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Gás de arraste e fluxo: He, $0,3 \text{ mL min}^{-1}$;
- Modo: Split (1:100);
- Volume de injeção: 1 μL ;
- Temperatura da interface: 200°C;
- Ionização: Impactos de elétrons (70 eV);
- Faixa de massa: 40 – 550 daltons;
- Solvente delay: 35 sec;
- Tempo de análise: 12 min.

Os picos dos cromatogramas foram identificados por comparação com os dados da literatura e perfis de fragmentação da biblioteca NIST do equipamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises dos catalisadores FeTFPP e Mn-salen por espectroscopia UV-vis

A FeTFPP e o Mn-salen foram analisados por espectroscopia UV-vis com o objetivo de verificar a estabilidade destes catalisadores após um longo período de armazenamento. Estes compostos são comerciais e possuem seus espectros eletrônicos estudados e caracterizados em diversos trabalhos da literatura [27,49,54]. As Figuras 7 e 9 mostram, respectivamente, os espectros de absorção dos catalisadores FeTFPP e Mn-salen em ACN.

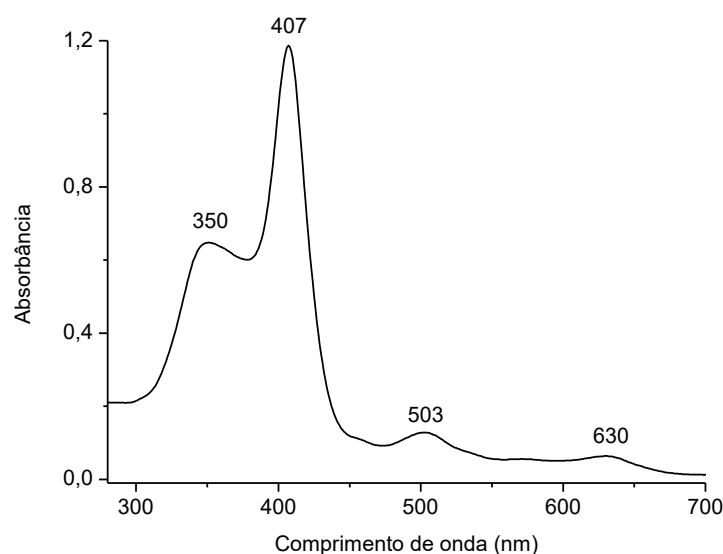


Figura 7 – Espectro UV-vis de uma solução $2,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de FeTFPP em ACN.

As transições eletrônicas que ocorrem na faixa de comprimento de onda de 350 a 750 nm do espectro eletrônico, são atribuídas ao elevado número de ligações duplas conjugadas presentes no macrociclo tetrapirrólico. A banda mais intensa em 407 nm, chamada de Soret, é característica das porfirinas e metaloporfirinas e são decorrentes de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel porfirínico, para que essa banda desapareça é necessário que o anel porfirínico sofra abertura ou que a conjugação seja interrompida [8,55-58].

Para as porfirinas, na região de 500 a 650 nm existem quatro bandas que são designadas de bandas Q, e a intensidade dessas bandas varia de acordo com o número e posição relativa dos grupos substituintes que se encontram nas posições periféricas do macrociclo [55].

Os espectros de absorção de porfirinas são explicados pela teoria dos quatro orbitais de fronteira, modelo de Gouterman [55,56], em que as bandas são devido às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ entre os orbitais HOMO e LUMO. Essas transições são polarizadas ao longo dos eixos x e y do anel porfirínico [55-58].

As porfirinas complexadas ou com os azotos centrais reduzidos apresentam uma maior simetria (D_{4h}) que as porfirinas livres (D_{2h}), por essa razão possuem apenas duas bandas Q, que são designadas de α e β , conforme é observado na Figura 7, duas bandas com absorção de 503 e 630 nm [57-58].

Para o Mn-salen há a presença de três bandas características em comprimento de onda de 240, 318 e 430 nm.

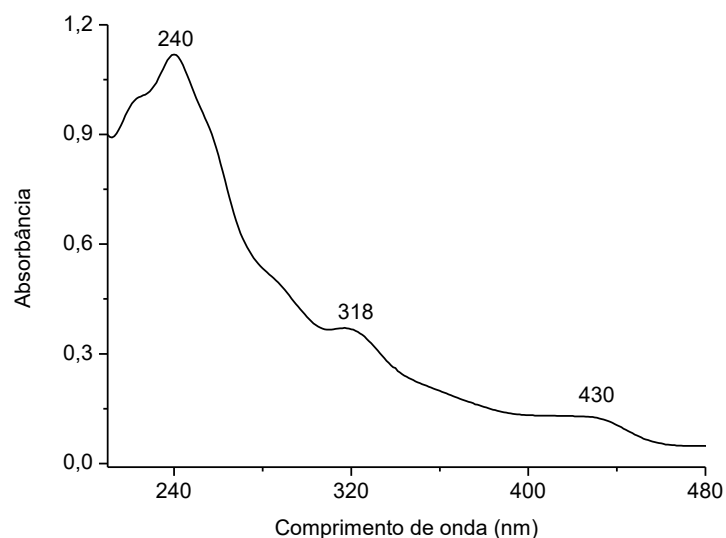


Figura 9 – Espectro UV-vis de uma solução $3,94 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do Mn-salen em ACN.

A banda em 240 nm é atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel benzênico do salicilaldeído, a banda em 318 nm é atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ do cromóforo azometileno e em 430 nm à transição $d \rightarrow d$ [49,54]. Ambos os catalisadores apresentam os espectros eletrônicos sem alterações nas bandas de absorção, o que mostra a estabilidade destes catalisadores após um longo período de armazenamento.

4.2 Padronização das condições de análise do 2,4-D e seus possíveis produtos de oxidação por HPLC/UV

O metabolismo do 2,4-D em *in vivo* pelo citocromo P450 envolve a formação de um único produto, 2,4-diclorofenol. Em estudos de degradação deste herbicida utilizando outros sistemas verifica-se a formação de outros produtos, tais como: hidroquinona, 3,5-diclorocatecol, entre outros [1,42-45].

Com base nessas informações da literatura, para o estudo da oxidação do 2,4-D catalisada pela FeTFPP e Mn-salen foram utilizados os seguintes compostos comerciais: 2,4-D, Hdr, 3,5-DCC, como padrões para auxiliar na identificação dos produtos obtidos nas reações.

Buscando desenvolver a melhor condição de análise por HPLC-UV para as reações de oxidação do 2,4-D, foram estudados diversos métodos descritos na literatura [42,43,45,47,59], optando-se inicialmente pelo método descrito por Sanchis et. al. [42] que analisa a oxidação do 2,4-D por processo Fenton e biológico.

Este método utiliza como fase móvel gradiente 80 \rightarrow 65 % ACN (0 a 15 min) e 65 \rightarrow 25 % ACN (15 a 30 min), fluxo de 0,6 mL min⁻¹, comprimento de onda 280 nm, e temperatura ambiente. Essa condição de análise mostrou-se se ineficiente na separação dos compostos e, além disso, também apresentou variação no tempo de retenção do 2,4-D.

Outras condições foram testadas variando-se o gradiente, solvente, fluxo e fase móvel (gradiente ou isocrático) durante as análises, com o objetivo de melhorar a

resolução cromatográfica de todos os picos. Assim, como descrito na seção 3.4, para a detecção dos compostos 2,4-D, 3,5-DCC e Hdr, foi utilizado o método isocrático com fase móvel MeOH/HAc 2%. O método isocrático além de ser um método mais simples apresentou os melhores resultados na separação dos analitos sem aumento no tempo de análise e estabilização dos tempos de retenção.

Foram efetuadas injeções individuais das soluções padrão dos analitos na condição otimizada de análise para reconhecimento dos tempos de retenção. Em seguida, para verificar a possibilidade de interação entre os analitos ou a mudança nos tempos de retenções, foi injetada uma mistura das soluções padrão dos três analitos, como mostra a Figura 10.

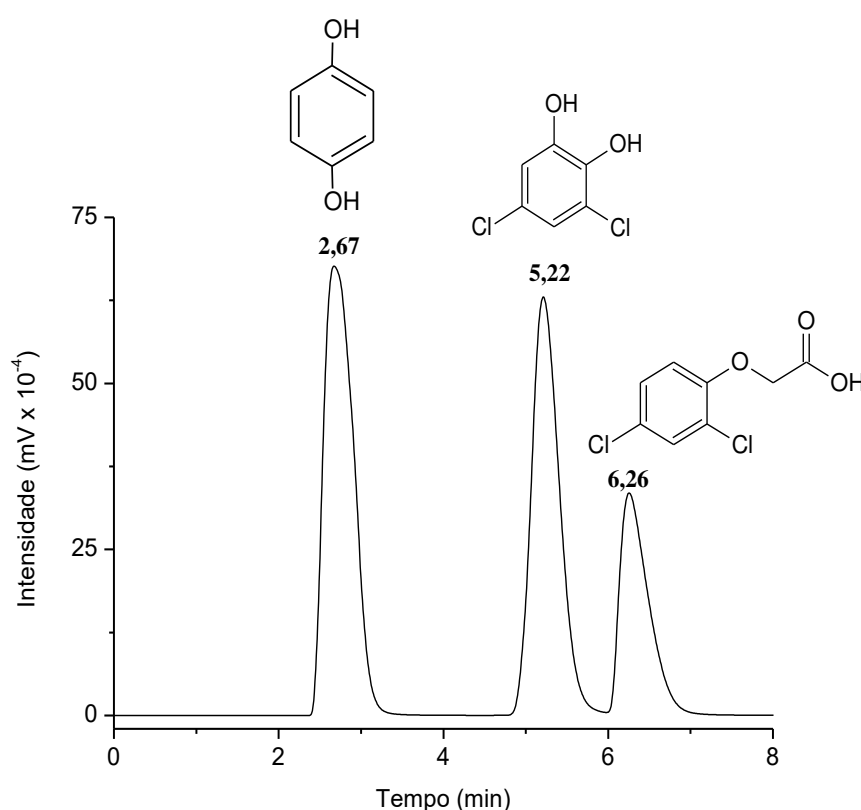


Figura 10 – Cromatograma da mistura dos três analitos (Hdr, 3,5-DCC e 2,4-D) em ACN. Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente. Concentração das soluções padrão: [2,4-D] = 4,52 x 10⁻³ mol L⁻¹, [Hdr] = 9,09 x 10⁻³ mol L⁻¹ e [3,5-DCC] = 5,59 x 10⁻³ mol L⁻¹.

Os compostos Hdr, 3,5-DCC e o 2,4-D apresentaram picos com boa resolução cromatográfica e com tempo de eluição satisfatório [60].

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância, dentro de uma faixa aplicada [61]. Para os estudos de linearidade foram utilizadas soluções padrão dos compostos e por diluição novas soluções foram preparadas na faixa de concentração de 0,009 a 8,32 mmol L⁻¹. Injetou-se cada uma das soluções em triplicata e as curvas analíticas foram construídas lançando na abscissa a concentração dos compostos e na ordenada a área obtida, como mostram as Figuras 11(a), (b) e (c).

A relação matemática entre a área e a concentração da espécie de interesse, pode ser expressa como uma equação da reta: $y = ax + b$

Em que: y = área do pico

x = concentração da espécie

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade

b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

Matematicamente, os coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r) podem ser estimados utilizando o método estatístico conhecido como regressão linear. O coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes (a) e (b). Nas análises das regressões lineares das curvas de calibração apresentadas nas Figuras 11a, 11b e 11c, todos os coeficientes de correlação possuem valores superiores a 0,996, confirmando a linearidade do método [61].

Convém ressaltar, entretanto, que para comprovar a eficiência do método desenvolvido seria necessário realizar a sua validação, avaliando a seletividade, exatidão, precisão, linearidade, sensibilidade entre outros fatores. A validação encontra-se além dos objetivos deste trabalho, devido ao tempo necessário para sua realização.

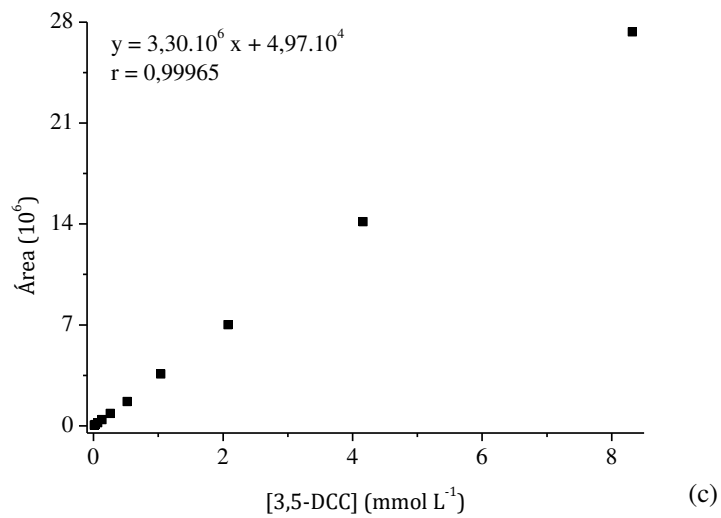
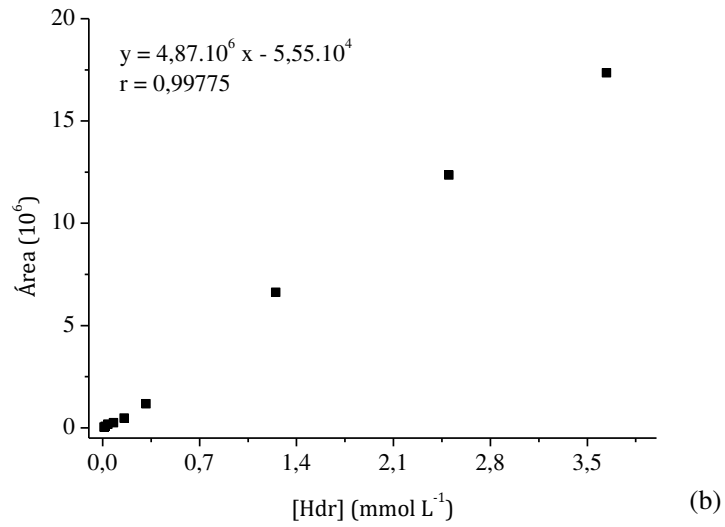
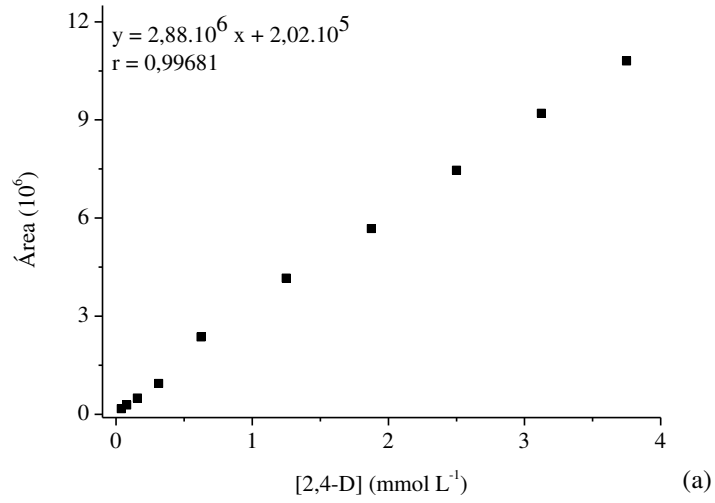


Figura 11 - Curvas analíticas obtidas para: (a) 2,4-D; (b) Hdr; c) 3,5-DCC em ACN para o método de análise por HPLC/UV.

4.3 Estudo da oxidação do 2,4-D catalisada pela FeTFPP e Mn-salen monitorada por HPLC/UV

Na otimização das condições para oxidação do 2,4-D foram realizados diversos testes, variando-se a quantidade de matéria do substrato (2,4-D) e do oxidante (PhIO, m-CPBA e H₂O₂), mantendo a quantidade de catalisador inalterada. As reações foram analisadas em intervalos de tempo de 1, 2, 4 e 24 h.

Foram realizadas reações controle na ausência do oxidante e na ausência do catalisador e não foi observado formação de produtos nem diminuição da concentração do substrato, indicando que o catalisador é essencial para promover a oxidação do 2,4-D.

Na razão molar 1 : 10 : 30 foram obtidos os melhores resultados de conversão com os oxidantes PhIO e m-CPBA. Nas reações com H₂O₂ a melhor razão molar estabelecida foi 1 : 10 : 1000. Dessa forma, estas relações molares foram escolhidas para o estudo da oxidação do 2,4-D catalisada por FeTFPP e Mn-salen.

Foram efetuados estudos com mudança do solvente, uma vez que os rendimentos de oxidação na catálise biomimética podem ser fortemente influenciados pelo solvente, o que acarreta em um aumento ou diminuição dos percentuais de conversão de acordo com suas características, tais como: polaridade, capacidade doadora e solubilidade dos constituintes reacionais [62]. Os solventes utilizados foram: ACN, MeOH e ACN/HAc, para a escolha dos solventes foram analisadas as solubilidades do catalisador, substrato e oxidante.

As Figuras 12 e 13 apresentam a conversão do 2,4-D em função dos solventes nas reações com a FeTFPP e Mn-salen.

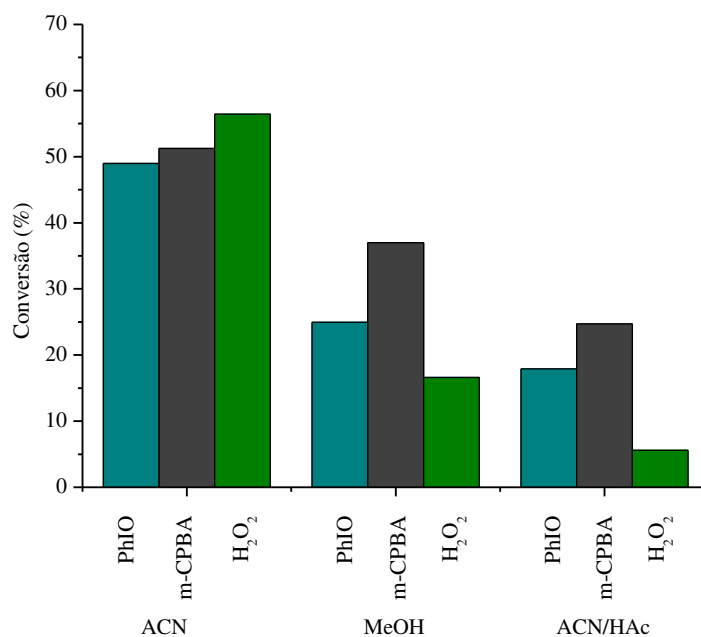


Figura 12 – Percentual de conversão do 2,4-D nas reações de oxidação catalisadas pela FeTFPP com H₂O₂, PhIO e m-CPBA como doares de oxigênio. Solventes utilizados: ACN, MeOH e ACN/HAc. Razão molar (FeTFPP:2,4-D:oxidante) = 1:10:30 (PhIO ou m-CPBA) e 1:10:1000 (H₂O₂) após 2 h de reação.

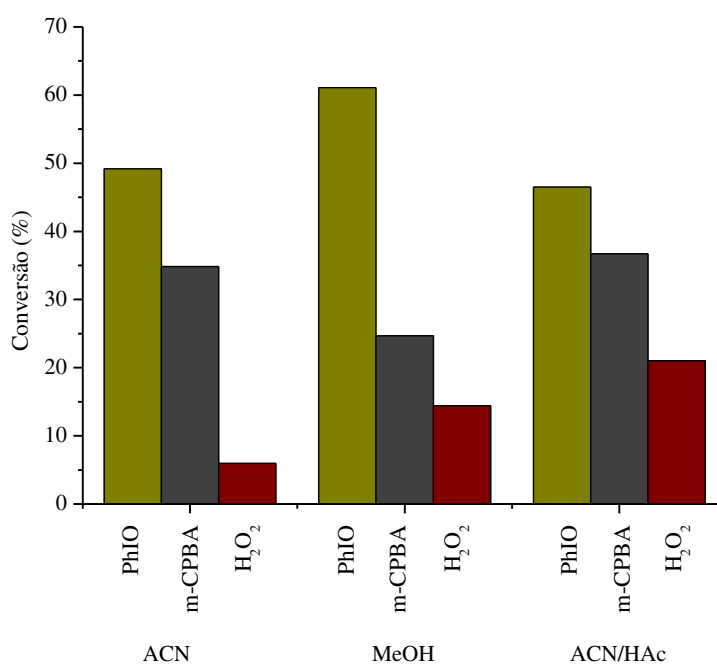


Figura 13 – Percentual de conversão do 2,4-D nas reações de oxidação catalisadas pelo Mn-salen com H₂O₂, PhIO e m-CPBA como doares de oxigênio. Solventes utilizados: ACN, MeOH e ACN/HAc. Razão molar (Mn-salen:2,4-D:oxidante) = 1:10:30 (PhIO ou m-CPBA) e 1:10:1000 (H₂O₂) após 2 h de reação.

Como mostram as Figuras 12 e 13, as atividades catalíticas dos sistemas aparentam ser dependentes da quantidade e da identidade dos doadores de oxigênio utilizados, sendo que os sistemas FeTFPP/H₂O₂/ACN e Mn-salen/PhIO/MeOH foram os mais eficientes, com cerca de 55 e 60% de conversão, respectivamente.

O H₂O₂ é um dos oxidantes mais versáteis que existe e apresenta diversas vantagens, tais como, baixo custo, é um dos metabólitos naturais em muitos organismos e quando decomposto há a formação de água como único subproduto da reação ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$, 1,77 V) [63,64]. Por essa razão, este oxidante é considerado limpo e de aplicação em reações catalisadas por modelos biomiméticos. De acordo com Nam e colaboradores [65] quando oxidantes peróxidos são utilizados em sistemas com ferroporfirinas é possível à ocorrência de duas rotas (Figura 14) para a ativação do oxigênio: (I) o mecanismo que envolve a clivagem homolítica da ligação O-O do peróxido, levando à formação de intermediários menos reativos tais como Fe^{IV}(OH)P, bem como radical RO[•], favorecendo, assim, a ocorrência de mecanismos radicalares; (II) envolve a espécie metal-oxo produzida após a clivagem heterolítica da ligação O-O, com formação da espécie reativa oxoferril porfirina π-cátion radical, Fe^{IV}(O)P^{•+}, responsável pela oxidação. As altas porcentagens de conversão observadas com os sistemas FeTFPP/H₂O₂/ACN indicam que este oxidante pode estar agindo via clivagem heterolítica da ligação O-O. Outro fator que indica a participação da espécie Fe^{IV}(O)P^{•+} é a alteração da cor inicial de marrom para verde o que é característica desta espécie intermediária [65,66].

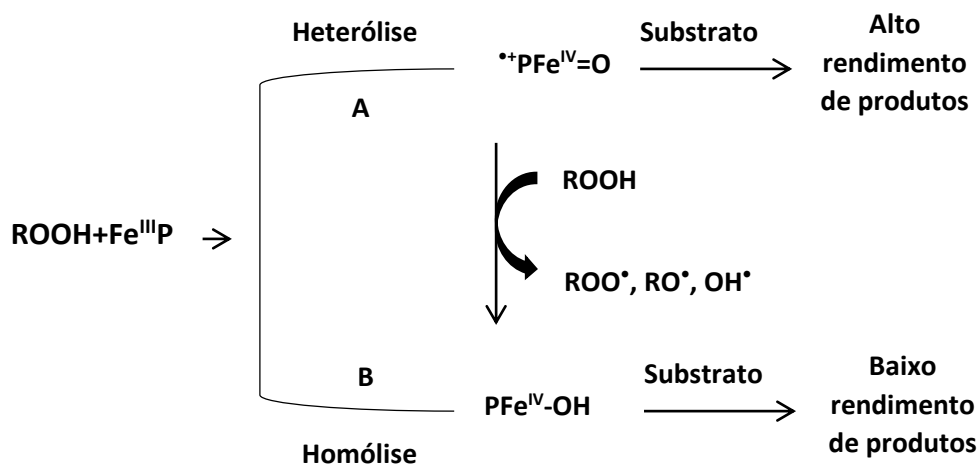


Figura 14 – Possíveis mecanismos de cisão da ligação O-O nos oxidantes peróxidos. Rota A, cisão heterolítica da ligação O-O e rota B, cisão homolítica da ligação O-O [65].

Os altos rendimentos obtidos com os três oxidantes mostram o favorecimento da rota A nas reações, indicando assim a clivagem heterolítica da ligação O-O.

Quando utilizamos o catalisador Mn-salen, o oxidante PhIO foi o mais eficiente em oxidar o substrato. Apesar desse oxidante apresentar toxicidade, dificuldade de purificação e insolubilidade na maioria dos solventes orgânicos por ser polimérico [67], é considerado um doador de oxigênio simples, pois contém apenas um átomo de oxigênio, o que leva geralmente à formação de espécies intermediárias de mais alta valência $\text{Mn}^{\text{V}}(\text{O})\text{salen}$, mais eficiente e seletiva em transferir o oxigênio para o substrato [68].

Os resultados das Figuras 12 e 13 mostraram também que os solventes utilizados nas reações influenciaram nas porcentagens de oxidação do 2,4-D. Em ACN foram obtidas altas conversões do 2,4-D para o sistema $\text{FeTFPP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ACN}$ (56%), o que está relacionado com a capacidade da ACN em estabilizar o alto estado de oxidação dos intermediários reativos por possuir alto valor de capacidade doadora (DN 14,1) [68].

O MeOH apresentou o melhor resultado na conversão do 2,4-D no sistema Mn-salen/PhIO, este fato pode ser explicado devido a alta solubilidade do PhIO neste

solvente, favorecimento a clivagem heterolítica O-O e formação do intermediário catalítico “escape of the cage”.

O ACN/AHc propiciou os melhores resultados nas reações com os oxidantes m-CPBA e H₂O₂, o que pode estar relacionado com o abaixamento do pH do meio que favorece a clivagem heterolítica da ligação O-O através da protonação do O terminal, gerando o complexo metálico mais reativo, Mn^V(O)salen [69].

4.3.1 Análise dos produtos da oxidação do 2,4-D utilizando os catalisadores FeTFPP e Mn-salen por HPLC-UV.

As análises dos produtos de oxidação do 2,4-D foram realizadas utilizando como solvente a ACN e ACN/AHc para os catalisadores FeTFPP e Mn-salen, respectivamente, uma vez que nesses solventes foram obtidos os melhores valores de conversão, com exceção do sistema Mn-salen/PhIO (Figuras 12 e 13).

As reações foram analisadas por HPLC-UV e os produtos foram identificados por comparação com os tempos de retenção das amostras padrão. A conversão do 2,4-D foi calculada a partir da curva analítica (Figura 11a) e as porcentagens relativas dos produtos foram calculadas a partir das áreas dos produtos obtidos.

Foram realizadas reações controle, na ausência do catalisador e do oxidante nas condições estabelecidas, mas nenhum produto foi detectado nestes dois casos.

As Figuras 15 a 20 apresentam os cromatogramas das reações de oxidação do 2,4-D utilizando os oxidantes PhIO, m-CPBA e H₂O₂ na presença dos catalisadores FeTFPP e Mn-salen.

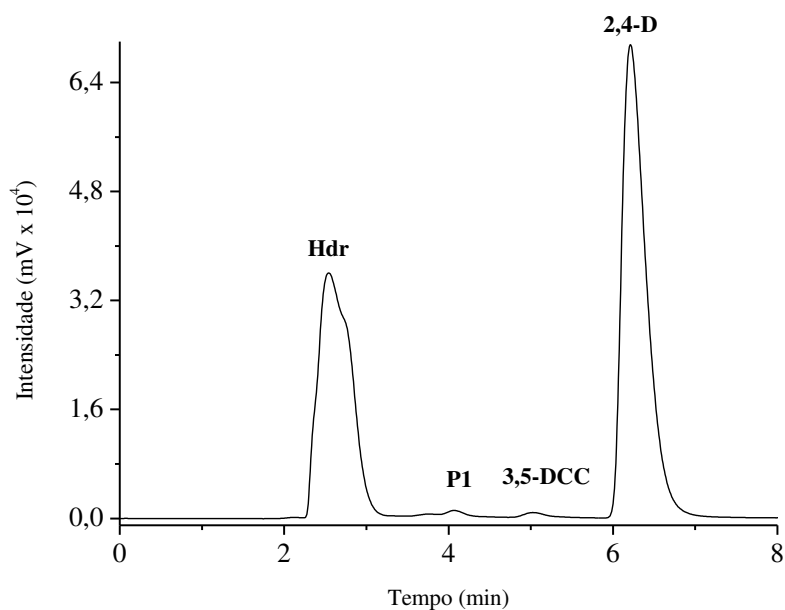


Figura 15 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença do sistema FeTFPP/PhIO/ACN após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (FeTFPP:2,4-D:PhIO). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

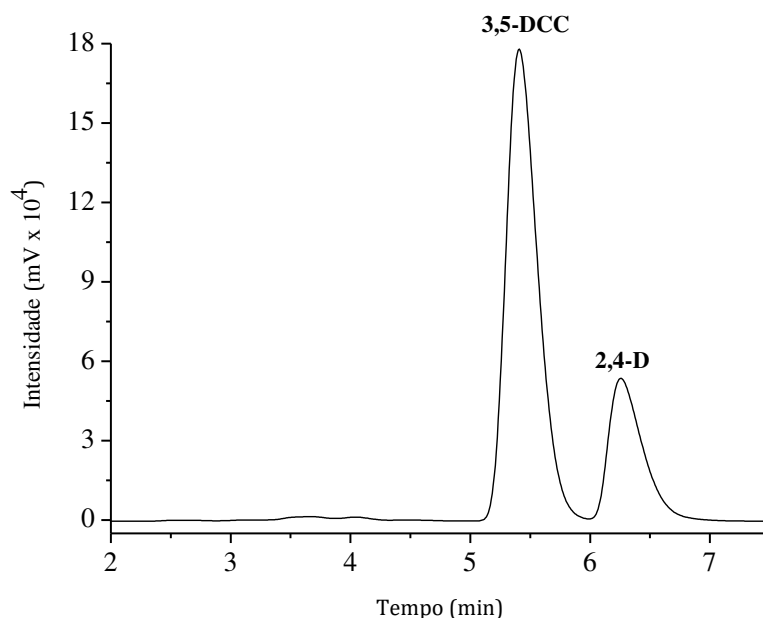


Figura 16 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença pelo sistema FeTFPP/m-CPBA/ACN após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (FeTFPP:2,4-D:m-CPBA). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

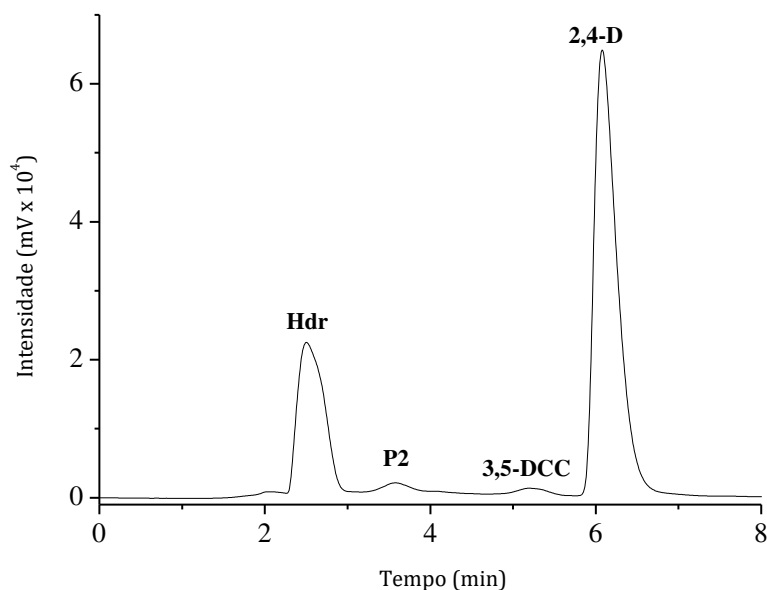


Figura 17 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença pelo sistema FeTFPP/H₂O₂/ACN após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:1000 (FeTFPP:2,4-D: H₂O₂). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 µL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

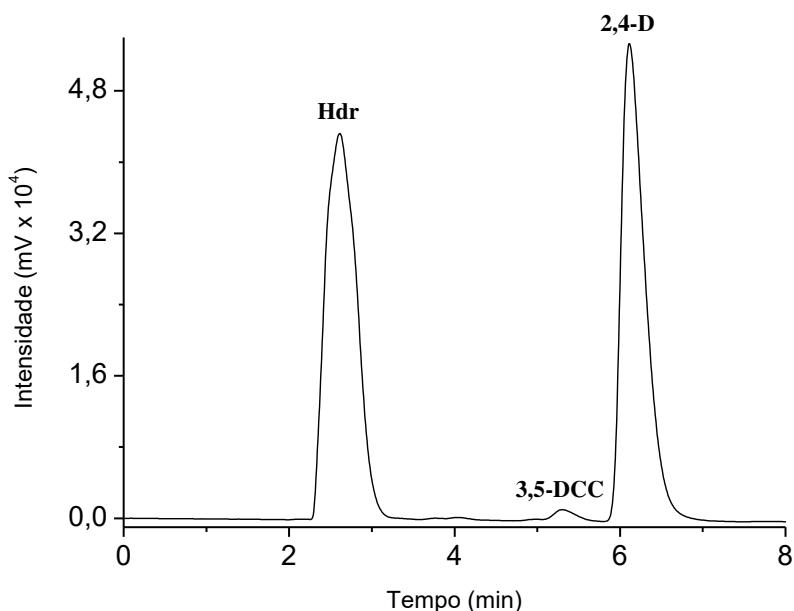


Figura 18 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença do sistema Mn-salen/PhIO/ ACN/HAc pós 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (Mn-salen:2,4-D:PhIO). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 µL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

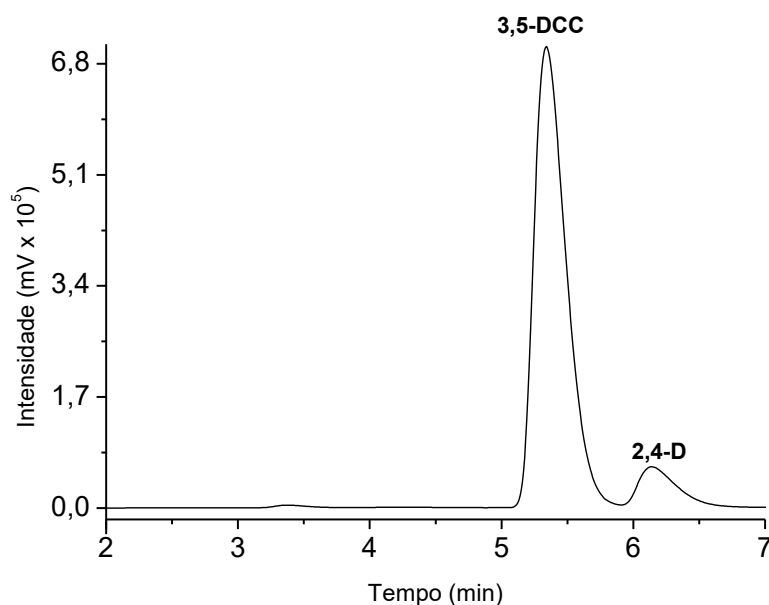


Figura 19 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença do sistema Mn-salen/m-CPBA/ACN/AHc pós 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (Mn-salen:2,4-D: m-CPBA). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

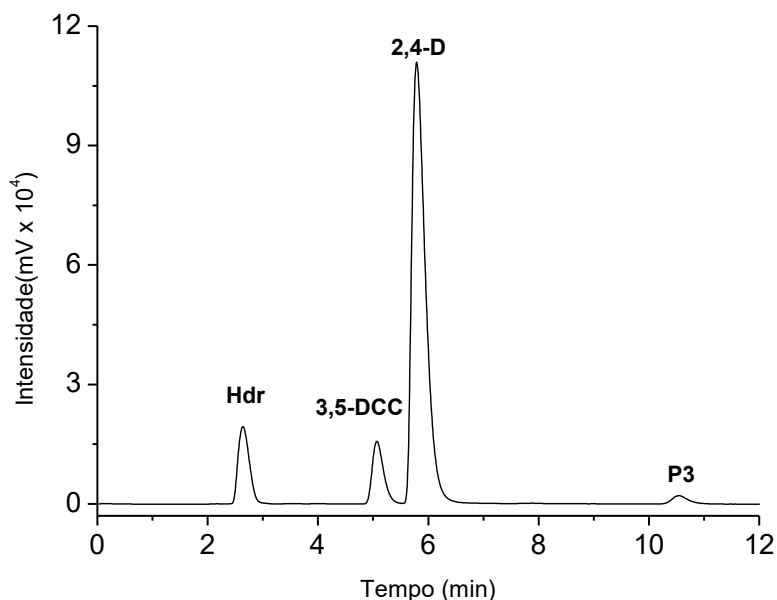


Figura 20 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença do sistema Mn-salen/H₂O₂/ACN/AHc após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:1000 (Mn-salen:2,4-D:H₂O₂). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

Tabela 1 – Porcentagem de conversão e seletividade nas reações de oxidação do 2,4-D na presença de PhIO, m-CPBA e H₂O₂ catalisada por FeTFPP e Mn-salen. Razão molar FeTFPP ou Mn-salen/2,4-D/PhIO ou m-CPBA = 1:10:30. Razão molar FeTFPP ou Mn-salen/2,4-D/H₂O₂ = 1:10:1000. Tempo de reação 2 h.

Catalisador	Oxidante	Seletividade (%) (tempo de retenção – min)			Conversão 2,4-D (%)
		Hdr	3,5-DCC	desconhecido	
FeTFPP	PhIO	97	traços	traços (4,07)	49
	m-CPBA	-	100	-	51
	H ₂ O ₂	82	4	14 (3,58)	56
Mn-salen	PhIO	98	2	-	51
	m-CPBA	-	100	-	37
	H ₂ O ₂	51	41	8 (10,54)	23

A Tabela 1 apresenta a conversão total do 2,4-D, em porcentagem, nas reações com os diversos doadores de oxigênio, na presença da FeTFPP e Mn-salen. Os resultados mostram que ambos os catalisadores são capazes de catalisar a oxidação do 2,4-D quando PhIO, m-CPBA e H₂O₂ são utilizados como oxidantes, chegando a atingir mais de 50% de conversão em alguns sistemas reacionais.

As oxidações do 2,4-D por PhIO utilizando FeTFPP e Mn-salen foram seletivas para ambos os catalisadores, levando a formação de hidroquinona como principal produto. Como discutido anteriormente, o PhIO é um oxidante que favorece intermediários de alta valência, os quais são muito reativos, e provavelmente são os responsáveis pela catálise altamente seletiva observada com este oxidante.

As reações com o m-CPBA foram extremamente seletivas para ambos os catalisadores, formando como produto o 3,5-DCC. Como já discutido no item 4.3, as reações envolvendo o m-CPBA com metaloporfirinas e Mn-salen pode ocorrer a formação de dois intermediários diferentes que são responsáveis pela a oxidação do substrato. A formação dos intermediários mais reativos e seletivos, Fe^{IV}(O)P^{•+} e Mn^V(O)Salen, ocorre via clivagem heterolítica da ligação O-O. A formação das espécies menos reativas, Fe^{IV}(OH)P e Mn^{IV}(OH)salen, ocorre via clivagem homolítica da ligação O-O. Assim, a ocorrência da formação das espécies intermediárias mais reativas, Fe^{IV}(O)P^{•+} e Mn^V(O)Salen, pode explicar a alta seletividade observada nas reações com esse oxidante.

O H₂O₂ foi seletivo na formação de hidroquinona, quando utilizando como catalisador FeTFPP, no caso Mn-salen houve a formação da hidroquinona e 3,5-DCC em quantidades semelhantes. Assim como o m-CPBA, as reações com H₂O₂ podem ocorrer tanto via clivagem heterolítica quanto via clivagem homolítica da ligação O-O. Nas reações com FeTFPP/H₂O₂ a formação do intermediário mais reativo, Fe^{IV}(O)P^{•+}, via clivagem heterolítica, pode explicar o alto rendimento e seletividade observados. Já nas com o conjunto Mn-salen/H₂O₂ pode estar ocorrendo ambos os intermediários, explicando a baixa seletividade obtida.

4.3.2 Análise dos produtos da oxidação do 2,4-D utilizando os catalisadores suportados FeTFPP-APS e Mn-salenK10 por HPLC-UV.

Catálise homogênea frequentemente fornece os melhores resultados em termos de rendimento e formação de produtos, ao passo que a catálise heterogênea oferece vantagens, tais como a facilidade de purificação do produto, reciclagem potencial catalisador, aumento da estabilidade da espécie catalítica, e a capacidade de imitar o local ativo da enzima [49,70,71]. Dessa forma, torna-se muito relevante as pesquisas com catalisadores suportados.

As análises dos produtos de oxidação do 2,4-D catalisada por FeTFPP-APS e Mn-salenK10 foram realizados nas mesmas condições estabelecidas para os catalisadores não suportados. Assim, as reações com FeTFPP-APS foram feitas em ACN e as com Mn-salenK10 em ACN/AHc.

As reações foram analisadas por HPLC-UV e os produtos foram identificados por comparação com os tempos de retenção das amostras padrão. A conversão do 2,4-D foi calculada a partir da curva analítica (Figura 11a) e as porcentagens relativas dos produtos foram calculadas a partir das áreas dos produtos obtidos.

Foram realizadas reações controle, na ausência do catalisador e do oxidante nas condições estabelecidas, mas nenhum produto foi detectado nestes dois casos.

As Figuras 21 a 26 apresentam os cromatogramas das reações de oxidação do 2,4-D utilizando os oxidantes PhIO, m-CPBA e H₂O₂ na presença dos catalisadores FeTFPP-APS e Mn-salenK10.

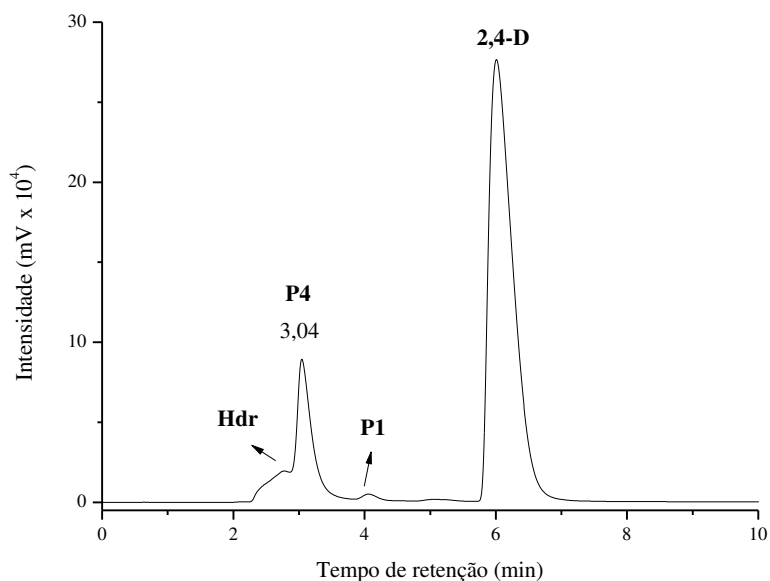


Figura 21 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença pelo sistema FeTFPP-APS/PhIO/ACN após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (FeTFPP-APS:2,4-D:PhIO). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

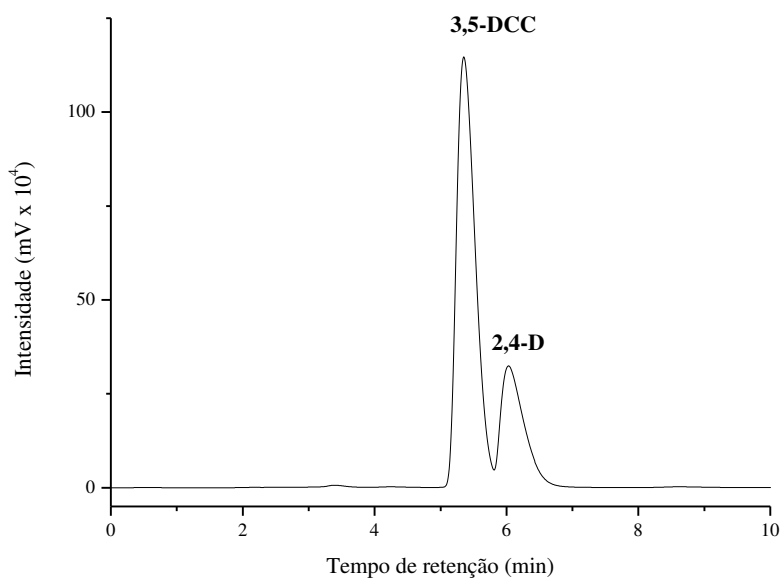


Figura 22 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença pelo sistema FeTFPP-APS/m-CPBA/ACN após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (FeTFPP-APS:2,4-D:m-CPBA). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

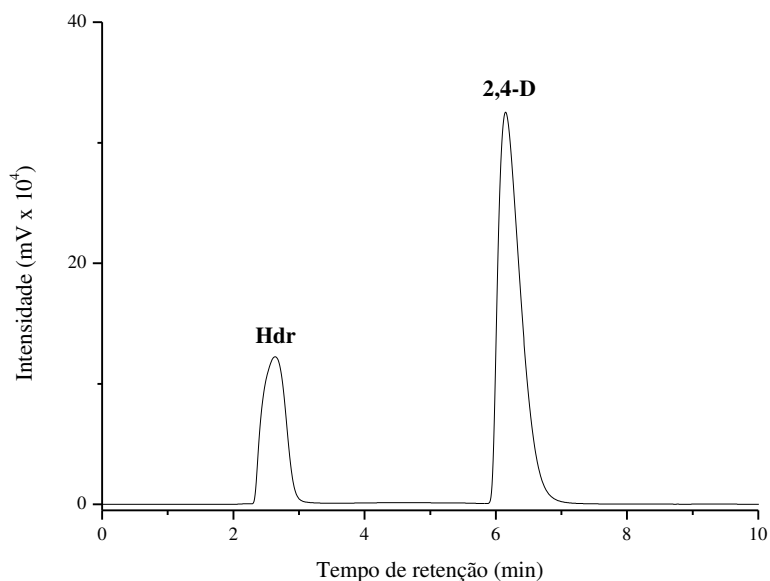


Figura 23 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença pelo sistema FeTFPP-APS/H₂O₂/ACN após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:1000 (FeTFPP-APS:2,4-D: H₂O₂). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

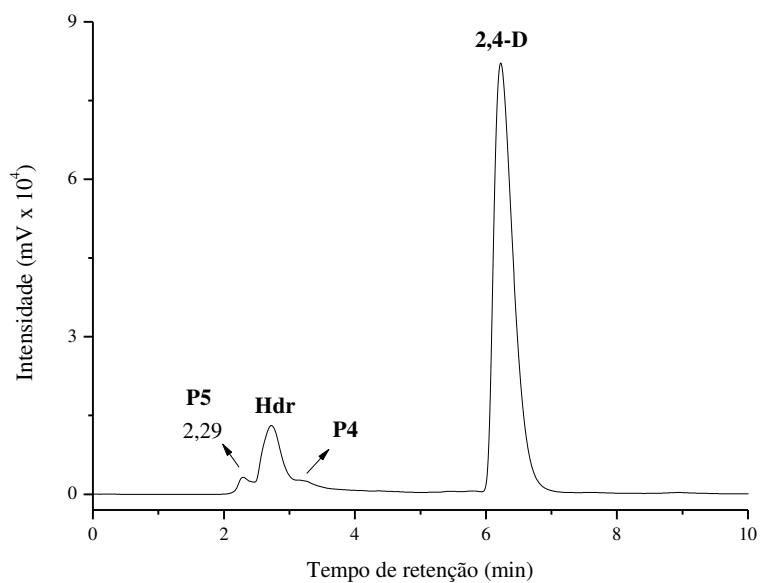


Figura 24 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença pelo sistema Mn-salenK10/PhIO/ACN/AHc após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (Mn-salenK10:2,4-D:PhIO). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

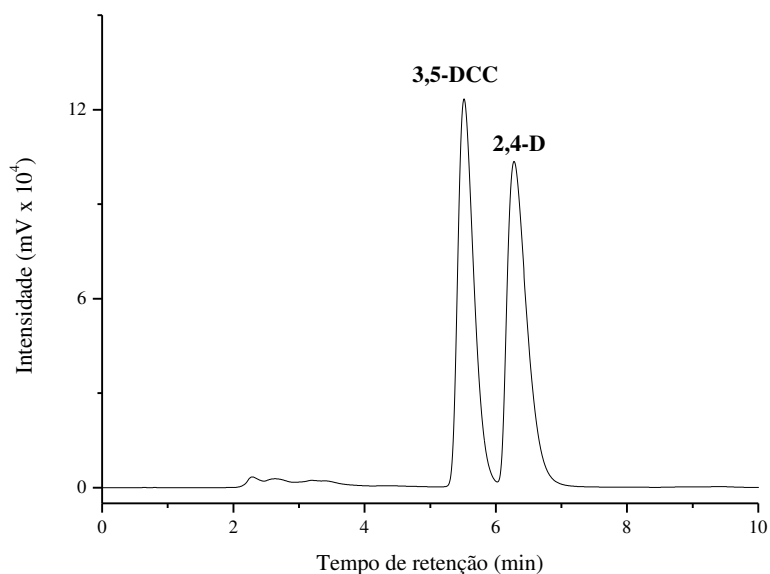


Figura 25 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença pelo sistema Mn-salenK10/m-CPBA/ACN/AHc após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (Mn-salenK10:2,4-D:m-CPBA). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

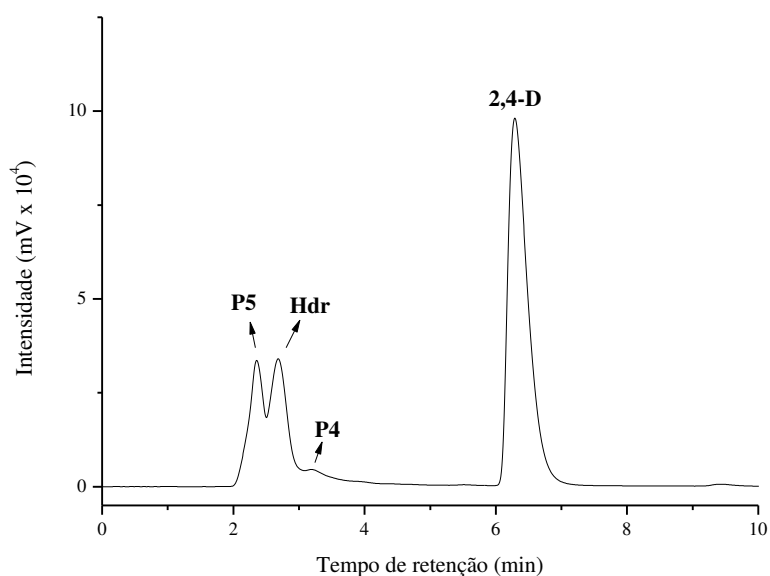


Figura 26 – Cromatograma da reação de oxidação do 2,4-D na presença pelo sistema Mn-salenK10/H₂O₂/ACN/AHc após 2 h de reação. Razão molar: 1:10:30 (Mn-salenK10:2,4-D:H₂O₂). Condições cromatográficas: coluna C₁₈, método isocrático, fase móvel MeOH/H₂O adicionada de 2% HAc (70:30 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, V_{inj} = 20 μL, λ = 280 nm à temperatura ambiente.

A Tabela 2 apresenta a conversão total de 2,4-D, em porcentagem, nas reações catalisadas por FeTFPP-APS e Mn-salenK10 na presença de diversos oxidantes. Os resultados mostram que os dois catalisadores suportados são capazes de catalisar a oxidação do 2,4-D quando PhIO, m-CPBA e H₂O₂ são utilizados como doadores de oxigênio. Os rendimentos obtidos são menores quando comparados as reações com os catalisadores em meio homogêneo, atingindo conversão máxima de 29% na reação com sistema FeTFPP-APS/m-CPBA. Essa diminuição na conversão do substrato é natural devido as limitações imposta pelo suporte.

Geralmente os rendimentos de produtos são menores nas reações quando se utiliza catalisadores imobilizados devido as limitações naturais dos sistemas catalíticos heterogêneos, tais como: a lenta difusão dos reagentes para o sítio catalítico e a baixa solubilidade do oxidante no meio. Isto é observado nas reações com PhIO e H₂O₂ com os dois catalisadores.

Em alguns sistemas, os suportes condicionaram a formação de produtos não observados nas reações com os catalisadores em fase homogênea. Houve a produção de dois compostos ainda não identificados (Figuras 21, 23 e 25), nomeados de P4 e P5. Esses compostos precisam ser identificados para melhor discussão devido sua relevância nas reações com os sistemas FeTFPP-APS/PhIO e Mn-salenK10/H₂O₂, sendo produzidos em boa quantidade.

Tabela 2 – Porcentagem de conversão e seletividade nas reações de oxidação do 2,4-D na presença de PhIO, m-CPBA e H₂O₂ catalisada por FeTFPP-APS e Mn-salenK10. Razão molar FeTFPP-APS ou Mn-salenK10/2,4-D/PhIO ou m-CPBA = 1:10:30. Razão molar FeTFPP-APS ou Mn-salenK10/2,4-D/H₂O₂ = 1:10:1000. Tempo de reação 2 h.

Catalisador	Oxidante	Seletividade (%) (tempo de retenção – min)			Conversão de 2,4-D (%)
		Hdr	3,5-DCC	desconhecido	
FeTFPP-APS	PhIO	22	-	76 (3,04) traço (4,07)	18
	m-CPBA	-	100	-	29
	H ₂ O ₂	100	-	-	20
Mn-salenK10	PhIO	68	-	11 (2,29) 31 (3,04)	14
	m-CPBA	-	100	-	17
	H ₂ O ₂	48	-	40 (2,29) 12 (3,04)	13

Os produtos formados na oxidação do 2,4-D via catálise homogênea e heterogênea em todos os sistemas estudados são mostrados na Figura 27. Comparando as reações catalisada em meio homogêneo e heterogêneo observa-se a redução no número de produtos formados quando partimos do meio homogêneo para o heterogêneo. Por exemplo, as reações com H_2O_2 catalisadas por FeTFPP-APS não formaram dois produtos observados nas reações com FeTFPP. Além disso, uma das principais diferenças foi a não formação do 3,5-DCC em meio heterogêneo nas reações com PhIO e H_2O_2 . Isso pode ser explicado pela menor acessibilidade do substrato ao catalisador condicionada pelo suporte que orienta o substrato e limita as formas de interação entre catalisador/substrato [49,50,72].

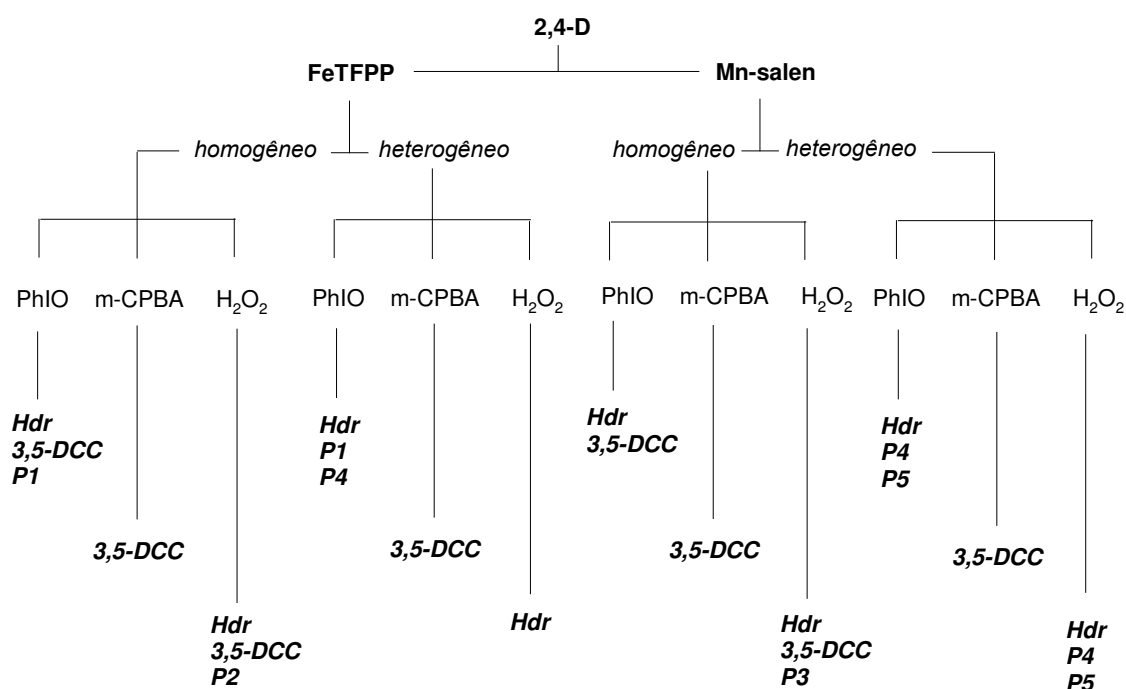


Figura 27 – Produtos formados na oxidação do 2,4-D via catálise homogênea e heterogênea utilizando diversos oxidantes.

As reações com m-CPBA mostraram-se extremamente seletivas. Em todas as reações envolvendo esse oxidante houve somente a formação do 3,5-DCC, tanto em meio homogêneo como no heterogêneo. Isso mostra que a natureza do oxidante, ou

seja, a presença de substituintes ligados ao grupo –OOH exerce efeito sobre a catálise. A presença do substituinte cloro no m-CPBA (Figura 28) retira elétrons do anel aromático por indução, e, conseqüentemente, remove densidade eletrônica do grupo carboxílico do oxidante, tornando-o mais eletrofílico, e assim, favorecendo a clivagem heterolítica da ligação O-O que produz os intermediários $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})\text{P}^{*+}$ e $\text{Mn}^{\text{V}}(\text{O})\text{salen}$, que podem ser os responsáveis pela alta seletividade nas reações com este oxidante [49].

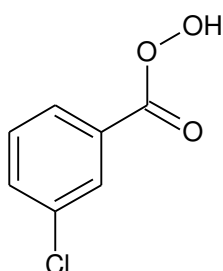


Figura 28 – Fórmula estrutural do ácido metacloroperbenzóico (m-CPBA).

Os produtos identificados nesse estudo são encontrados em alguns processos de oxidação do 2,4-D. A hidroquinona é formada em sistemas eletroquímicos e fotoeletroquímicos [43]. O 3,5-diclorocatecol é apenas relatado em sistemas *in vivo* como metabólito produzidos por bactérias [45].

5 CONCLUSÕES

A metaloporfirina e o complexo salen empregados nesse estudo mostraram-se eficientes catalisadores para a oxidação do 2,4-D, tanto em meio homogêneo como heterogêneo. As reações com os catalisadores não suportados alcançaram rendimentos mais altos do que os obtidos com os catalisadores suportados. Conversões menores na catálise heterogênea são esperadas devido as dificuldades de acesso ao centro catalítico imposta pelo o suporte.

Na maioria dos sistemas estudados, a FeTFPP mostrou-se mais eficaz que Mn-salen, alcançando conversões mais altas. Dessa forma, as metaloporfirinas apresentam-se como melhores catalisadores para a oxidação do 2,4-D com os oxidantes utilizados.

Os solventes utilizados influenciam na atividade catalítica dos complexos devido as diferentes formas de interação catalisador/oxidante/solvente que geram diferentes espécies intermediárias catalíticas de acordo com o tipo de clivagem da ligação O-O.

As reações com m-CPBA mostraram-se extremamente seletivas, formando o 3,5-DCC como único produto de oxidação do 2,4-D. Esse fato possivelmente está relacionado com a natureza deste oxidante que facilita a formação de intermediários catalíticos mais seletivos.

As reações com PhIO e H₂O₂ também foram seletivas, formando, na maioria das reações, a hidroquinona como principal produto. Em alguns sistemas com esses oxidantes também houve a formação de 3,5-DCC, porém apenas em nível traço. Isto permite concluir que estes oxidantes favorecem a formação de hidroquinona.

Os produtos identificados neste estudo (Hdr e 3,5-DCC) são encontrados em alguns sistemas de oxidação do 2,4-D. A hidroquinona é normalmente encontrada em sistemas eletroquímicos e fotoeletroquímicos. O 3,5-DCC é metabólito do 2,4-D produzido sistemas microbiológicos.

Os resultados indicam que os catalisadores utilizados nesse estudo podem ser considerados bons modelos do citocromo P450 na oxidação do 2,4-D, considerando que um dos produtos obtidos é formado *in vivo* através do metabolismo de microorganismos. Dessa forma, estes modelos podem ser úteis para a elucidação dos mecanismos de detoxificação *in vivo*, sem apresentar as desvantagens éticas e econômicas que envolvem o estudo de metabolismo com enzimas ou animais.

6 REFERÊNCIAS

- [1] LEE, H. et al. Photocatalytic reactions of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a microwave-assisted photocatalysis system. *Chemical Engineering Journal*, v.278, p.259–264, 2015. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.086>)
- [2] PARKINSON, A. *Biotransformation of xenobiotics*. In: *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, (C. D., KLAASSEN, org). 9ª Ed. New York: McGraw_Hill, 2001.
- [3] VISIOLI, F. Xenobiotics and human health: A new view of their pharma-nutritional role. *PharmaNutrition*, v.3, p.60-64, 2015. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2015.04.001>)
- [4] SILVA, C.M.M.S. et al. Biotransformação de agrotóxicos e biorremediação. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Silva_C_M_+AgrotoxicosAmbiente_000fdqgazezq02wx5eo0a2ndxy0ul2duj.pdf. Acessado em: 01 de abr. 2016.
- [5] MONTELLANO, P.R.O. *Cytochrome P450. Structure, mechanism, and biochemistry*. 4ª Ed. New York: Springer, 2015.
- [6] VOET, D.; VOET, J.G. *Bioquímica*. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- [7] BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 12ª Ed. New York: McGraw-Hill, 2011.
- [8] MILGROM, L.R. *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. 1ª Ed. New York: Oxford University Press, 1997.
- [9] The European Synchrotron. Disponível em: <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2006/SB/SB09>. Acessado em: 05 de abr. 2017.
- [10] GROVES, J.T. *Models and mechanisms of cytochrome P450 action*. In: Montellano, P.R.O. *Cytochrome P450*. 3ª Ed. New York: Klumer Academic/Plenum Publishers, 2005.
- [11] GUENGERICH, F.P. Mechanisms of Cytochrome P450 Substrate Oxidation: MiniReview. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. v.21, n.4, p.163-168, 2007. ([DOI 10:1002/jbt](https://doi.org/10.1002/jbt))

- [12] BAVISHI, K. et al. Application of nanodisc technology for direct electrochemical investigation of plant cytochrome P450s and their NADPH P450 oxidoreductase. *Scientific Reports* 6, n.29459, 2016. ([DOI 10.1038/srep29459](https://doi.org/10.1038/srep29459))
- [13] MUNRO, A.W. et al. What makes a P450 tick?. *Trends in Biochemical Sciences*, v.38, n.3, p.140-150, 2013. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2012.11.006>)
- [14] SHELDON, R.A. *Metalloporphyrins in catalytic oxidations*. New York: Marcel Dekker, 1994.
- [15] TABOR, E. et al. Influence of substituents in meso-aryl groups of iron μ -oxo porphyrins on their catalytic activity in the oxidation of cycloalkanes. *Polyhedron*, v.119, p.342-349, 2016. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2016.08.048>)
- [16] ZHAO et al. Biomimetic oxidative desulfurization of fuel oil in ionic liquids catalyzed by Fe (III) porphyrins. *Applied Catalysis A: General*, v.532, p.26-31, 2017. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2016.12.008>)
- [17] XU et al. Solvent and additive-free selective aerobic allylic hydroxylation of β -pinene catalyzed by metalloporphyrins. *Chinese Chemical Letters*, v.28, n.3, p.575-578, 2017. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.11.020>)
- [18] 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. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2006.11.001>)
- [19] NIEHUES, M. et al. Biomimetic in vitro oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the in vivo phase I metabolism of bioactive compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.54, p.804-812, 2012. (doi: [10.1016/j.ejmech.2012.06.042](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.042))
- [20] ROCHA, B.A. et al. Jacobsen Catalyst as a Cytochrome P450 Biomimetic Model for the Metabolism of Monensin A. *BioMed Research International*, v.2014, p.1-8, 2014. (doi: [10.1155/2014/152102](https://doi.org/10.1155/2014/152102))
- [21] BOLZON et al. Apigenin-7-O-glucoside oxidation catalyzed by P450-bioinspired systems. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.170, p.117-124, 2017. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.02.016>)
- [22] JACOBSEN, E.N. et al. Enantioselective catalytic epoxidation of cinnamate esters. *Tetrahedron*, v.50, p.4323-4334, 1994. ([https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)89369-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)89369-8))

- [23] BALEIZÃO, C.; GARCIA, H. Chiral Salen Complexes: An Overview to Recoverable and Reusable Homogeneous and Heterogeneous Catalysts. *Chemical Reviews*, v.106, p.3987–4043, 2006. ([DOI: 10.1021/cr050973n](https://doi.org/10.1021/cr050973n))
- [24] COZZI, P. G. Metal-Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. *Chemical Society reviews*, v.33, n.7, p.410–21, 2004. ([DOI: 10.1039/B307853C](https://doi.org/10.1039/B307853C))
- [25] TIDWELL, T.T. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of β -lactam synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, v.47, n.6, p.1016-1020, 2008. ([DOI: 10.1002/anie.200702965](https://doi.org/10.1002/anie.200702965))
- [26] KATSUKI, T. Mn-salen catalyst, competitor of enzymes, for asymmetric epoxidation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.113, p.87-107, 1996. ([https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(96\)00106-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(96)00106-9))
- [27] HUANG, J.; IUO, Y.; CAI, J. Enantioselective epoxidation of unfunctionalized olefins by Jacobsen's catalyst immobilized on amino-modified ZnPS-PVPA. *Chinese Journal of Catalysis*, v.37, n.9, p.1539-1548, 2016. ([http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2067\(16\)62489-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2067(16)62489-0))
- [28] HUANG, J. et al. Layered crystalline chiral salen Mn(III) complexes immobilized on organic polymer–inorganic hybrid zinc phosphonate-phosphate as efficient and reusable catalysts for the unfunctionalized olefin epoxidation. *Inorganic Chemistry Communications*, v.65, p.4-8, 2016. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.inoche.2016.01.001>)
- [29] ELHAMIFAR, D.; BADIN, P.; KARIMIPOOR, G. Alkyl-imidazolium based organosilica supported Fe/porphyrin complex: As novel, highly efficient and reusable catalyst for the unsymmetrical Hantzsch reaction. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.499, p.120-127, 2017. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.084>)
- [30] UCOSKI, G.M. et al. Heterogeneous oxidation of the dye Brilliant Green with H₂O₂ catalyzed by supported manganese porphyrins. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.408, p.123-131, 2015. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2015.07.020>)
- [31] IBAMA. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil – Uma abordagem ambiental. Disponível em: <http://docplayer.com.br/7853213-lbama-m-m-a-produtos-agrotoxicos-e-afins-comercializados-em-2009no-brasil-uma-abordagem-ambiental.html> . Acessado em: 30 de jan. 2017.
- [32] IBGE. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável Brasil 2010. Disponível em: <http://www.ecodesenvolvimento.org/biblioteca/pesquisas/indicadores-de-desenvolvimento-sustentavel-brasil> . Acessado em: 30 de jan. 2017.

- [33] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. Dossiê abrasco: Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/UserFiles/File/ABRASCODIVULGA/2012/DossieAGT.pdf>. Acessado em: 03 de abr. 2016.
- [34] MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. Parecer Técnico sobre riscos para a saúde humana e animal associados ao uso de herbicidas à base de 2,4-D em plantas convencionais e transgênicas Tolerantes a Herbicidas. Disponível em: http://aspta.org.br/wp-content/uploads/2014/04/Dossie_GEA-ANVISAMar2014.pdf. Acessado em: 03 de mar. 2016.
- [35] IARC MONOGRAPHS. Evaluate DDT, lindane, and 2,4-D. Disponível em: http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr236_E.pdf. Acessado em: 20 de mar. 2016.
- [36] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Parecer Técnico: Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer após o uso do herbicida 2,4-D. Disponível em: <http://antigo.contraosagrototoxicos.org/index.php/materiais/relatorios/parecer-sobre-o-herbicida-2-4-d-incqs-fiocruz/download>. Acessado em: 12 de out. 2016.
- [37] BUKOWSKA, B. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid – Molecular Mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, v.15, n.3, p.365-374, 2006.
- [38] SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS. Dados de intoxicação. Disponível em: www.fiocruz.br/sinitox/. Acessado em: 30 de jan. 2017.
- [39] MONACO, T.J.; WELLER, S.C.; ASHTON, F.M. *Weed Science: principles & practices*. 4ª Ed. New York: John Wiley & Sons, INC. 2002. (ISBN 0-471-37051-7)
- [40] IARC MONOGRAPHS. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol113/mono113-03.pdf>. Acessado em: 17 de fev. 2017.
- [41] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria MS nº 518/2004. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf. Acessado em: 17 de fev. 2017.
- [42] SANCHIS, S. et al. Degradation of chlorophenoxy herbicides by coupled Fenton and biological oxidation. *Chemosphere*, v.93, p.115-122, 2013. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.097>)

- [43] FONTMORIN, J. et al. Electrochemical oxidation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: Analysis of by-products and improvement of the biodegradability. *Chemical Engineering Journal*, v.195-196, p.208-217, 2012. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.04.058>)
- [44] SOUZA, F.L. et al. Removal of pesticide 2,4-D by conductive-diamond photoelectrochemical oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.180, p.733-739, 2016. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.07.038>)
- [45] LERCH, T.Z. et al. Tracing 2,4-D metabolism in *Cupriavidus necator* JMP134 with ¹³C-labelling technique and fatty acid profiling. *Journal of Microbiological Methods*, v.71, p.162-174, 2007. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.003>)
- [46] TOPAL, A. et al. Purification and Herbicide Metabolism Studies on Tulip (*Tulipa gesneriana*) Cytochrome P450. *Pest Management Science*, v.38, p.9-15, 1993. (DOI: [10.1002/ps.2780380103](https://doi.org/10.1002/ps.2780380103))
- [47] MEHMOOD, Z. et al. Human cytochrome P450 3A4 is involved in the biotransformation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.2, p.397-401, 1996. ([https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(96\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(96)00077-4))
- [48] ADLER, A. D.; 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 – 3149, 1964. (DOI: [10.1021/ja01069a035](https://doi.org/10.1021/ja01069a035))
- [49] FARIA, A. L. *Complexos salen e metaloporfirínicos como catalisadores na oxidação de hidrocarbonetos e fármacos em meio homogêneo e heterogêneo*. 2010. 156 p. Tese (Doutorado em Química) — Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- [50] BARROS, V.P. et al. Ironporphyrin immobilized onto montmorillonite as a biomimetic model for azo dye oxidation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.61, p.337-344, 2008. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.10.008>)
- [51] SHAREFKIN, J. G.; SALTZMAN, H. Iodosobenzene. *Organic Synthesis Collective*, v.5, p. 658, 1963.
- [52] LUCAS, H. J.; KENNEDY, E. R.; FORMO, M. W. Iodosobenzene. *Organic Synthesis Collective*, v.3, p. 483, 1963.

- [53] REBELO, S.L.H. et al. Catalytic oxidative degradation of s-triazine and phenoxyalkanoic acid based herbicides with metalloporphyrins and hydrogen peroxide: Identification of two distinct reaction schemes. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.297, p.35-46, 2009. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2008.09.005>)
- [54] WANG, Z. et al. Chemiluminescence detection of hydroquinone with flow-injection analysis of luminol-hydrogen peroxide system catalyzed by Jacobsen's catalyst. *Journal of Luminescence*, v.145, p.818-823, 2014. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.08.052>)
- [55] GOUTERMAN, M. Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin. *The Journal of Chemical Physics*, v.30, n.5, p.1139 – 1161, 1959. (<http://dx.doi.org/10.1063/1.1730148>)
- [56] GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*, v.6, p.138 – 163, 1961. ([https://doi.org/10.1016/0022-2852\(61\)90236-3](https://doi.org/10.1016/0022-2852(61)90236-3))
- [57] CORWIN, A.H.; CHIVVIS, A.B.; POOR, R.W.; WHITTENY, D.G.; BAKER, E.W., The Interpretation of Porphyrin and Metalloporphyrin Spectral, *Journal of the American Chemical Society*, v.90, n.24, p. 6577-6583, 1968. (DOI: [10.1021/ja01026a001](https://doi.org/10.1021/ja01026a001))
- [58] MINAEV, B.; ÅGREN, H. Theoretical DFT study of phosphorescence from porphyrins. *Chemical Physics*, v.315, n.3, p.215 – 239, 2005. ([Http://doi.org/10.1016/j.chemphys.2005.04.017](http://doi.org/10.1016/j.chemphys.2005.04.017))
- [59] AMARANTE JUNIOR, O.P. et al. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). *Química Nova*, v.26, n.2, p.223-229, 2003. (<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000200015>)
- [60] LANDER, B.J.J; SVIRBELY, W.J. The Dipole Moments of Catechol, Resorcinol and Hydroquinone. Disponível em: <http://assets.openstudy.com/updates/attachments/4f0d5cb6e4b084a815fccd72-chmvijay-1326448458607-dipolemoment.pdf>. Acessado em: 7 de abr. 2017.
- [61] RIBANI, et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004. (<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>)
- [62] ANTUNES, O.A.C. et al. Influência do solvente na utilização do sistema catalítico clorocromato de *peridinium*/hidroperóxido de t-butila em oxidações alílicas e benzílicas. *Revista Universidade Rural Série Ciências Exatas e da Terra*, v.17, n.27-31, 1995.

- [63] MATTOS, I.L. et al. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Química Nova*, v.26, n3, 373-380, 2003. (<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000300015>)
- [64] EVONIK. Peróxido de Hidrogênio – Estabilidade e decomposição. Disponível em: <http://h2o2.evonik.com/product/h2o2/pt/about/stability-decomposition/pages/default.aspx>. Acessado em: 10 de abr. 2017.
- [65] NAM, W. et al. 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. (DOI: [10.1021/ja994403e](https://doi.org/10.1021/ja994403e))
- [66] KADISH, K.M. et al. The Porphyrin Handbook. v.4, New York: Academic Press. 2000.
- [67] BANKS, D.F. Organic polyvalent iodine compounds. *Chemical Reviews*, v.66, n.3, p. 243-266, 1966. (DOI: [10.1021/cr60241a001](https://doi.org/10.1021/cr60241a001))
- [68] MARCUS, Y. The effectivity os solvents as electron pair donors. *Journal os solution chemistry*, v.13, n.9, p.599-624, 1984. (DOI: [10.1007/BF00650369](https://doi.org/10.1007/BF00650369))
- [69] NAM, W. et al. 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.387-388, 1999.
- [70] LEOD, T. C. O. M. et al. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, vol. 273, p. 259-264, 2007. ([Http://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.04.003](http://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.04.003))
- [71] LEOD, T. C. O. M. et al. Jacobsen catalyst immobilized on chitosan membrane as interface catalyst in organic/aqueous system for alkene oxidation. *Applied Catalysis A: General*, v.361, p.152-159, 2009. (<http://doi.org/10.1016/j.apcata.2009.04.012>)
- [72] FARIA, A. L.; LEOD, T. C. O. M.; ASSIS, M. D. Carbamazepine oxidation catalyzed by iron and manganese porphyrins supported on aminofunctionalized matrices. *Catalysis Today*, v.133-135, p.863-869, 2008. (<http://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.12.022>)