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

**“Metaloporfirinas como modelos biomiméticos do citocromo P450
na oxidação de pesticidas”**

Maria Carolina Alves de Freitas Gotardo

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

2006

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

**“Metaloporfirinas como modelos biomiméticos do citocromo P450
na oxidação de pesticidas”**

Maria Carolina Alves de Freitas Gotardo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilda das Dores Assis

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

2006

Eu pedi forças.... e Deus me deu dificuldades para me fazer forte.

Eu pedi sabedoria.... e Deus me deu problemas para resolver.

Eu pedi prosperidade..... e Deus me deu perigo para superar.

Eu pedi amor..... e Deus me deu pessoas com problemas para ajudar.

Eu pedi favores.... e Deus me deu oportunidades.

Eu não recebi nada do que pedi mas recebi tudo o que precisava.

DEDICO ESSA TESE AOS AMORES DA MINHA VIDA:

Eduardo,

*meu maior incentivador, por me ajudar sempre a ver o lado bom das coisas, e pela
linda família que construímos juntos.*

Maria Eduarda, José Guilherme e Maria Clara,

*meus filhos, que nasceram e cresceram durante a realização deste trabalho, por
todos os momentos em que deixei de estar presente na vida de
vocês.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha MÃE,

pelo exemplo e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu PAI,

por todos os princípios que me ensinou na vida.

À Tia Maria Lúcia,

Pelo carinho e apoio.

***À Profa. MARILDA, QUE FOI MUITO MAIS QUE UMA ORIENTADORA,
TENHO MUITO A AGRADECER:***

Agradeço à Deus por tê-la colocado no meu caminho, quando fui a sua sala pedir orientação, o que foi fundamental para continuidade dos meus estudos e minha formação profissional.

Agradeço pela oportunidade de ter entrado no grupo, por ter acreditado em mim e no meu trabalho.

Agradeço também por sempre me animar frente aos resultados que me pareciam sem valor.

E acima de tudo, agradeço sua paciência e os conselhos frente aos meus “imprevistos” nesses 6 anos.

AGRADEÇO, AINDA:

Aos meus amigos do laboratório de Bioinorgânica: Ádamo, Débora, Faria, Guedes, Juvenal, Marina, Tati, e Valéria pela colaboração, apoio, passeios e festas.....

À Cynthia pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, deste Departamento, pela colaboração para identificação dos produtos desconhecidos.

Ao Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento, do Departamento de Biofísica, do Instituto de Física da USP de São Carlos, pela realização das medidas de EPR.

À Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato do Departamento de Química e Física da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela realização da análise por CLAE-MS.

À Novartis representada pelo Dr. Akira Ueda por ter cedido o herbicida atrazina para realização dos experimentos.

Aos funcionários e professores do departamento de química da FFCL-RP.

À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida, fundamental para realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho foi investigado o potencial de modelos metaloporfirínicos em mimetizar a ação do citocromo P450 na oxidação de um herbicida, a atrazina. Foram utilizadas as metaloporfirinas comerciais de segunda geração solúveis em solvente orgânico, cloreto de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-diclorofenil)porfirina metal(III) [M(TDCPP)Cl] e cloreto de 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina metal(III) [M(TFPP)Cl] (metal = ferro e manganês), tanto em solução homogênea como suportadas em montmorilonita K-10 aminofuncionalizadas; e metaloporfirinas solúveis em água, como a cloreto de 5,10,15,20-tetrakis-(N-metil-4-piridil) porfirina ferro(III), [Fe(TMPy)Cl], e cloreto de [5,10,15,20-tetra(4-carboxifenil)porfirina] ferro(III), [Fe(TCPP)Cl]. Os oxidantes testados foram iodosilbenzeno, ácido metacloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio em água, metanol e acetonitrila.

Os produtos de oxidação da atrazina foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os resultados mostraram que as metaloporfirinas foram capazes de oxidar a atrazina, um herbicida com características de persistência no meio ambiente, e mimetizar a ação da enzima *in vivo* e *in vitro* com formação de dois metabólitos: DEA e DIA, resultado da N-desalquilação das cadeias etila e propila do substrato, respectivamente. O DEA correspondeu a um dos principais produtos da reação, e formou-se apenas traços de DIA, mostrando a preferência das metaloporfirinas em oxidar a cadeia etila da atrazina.

Verificou-se também a formação de cinco produtos desconhecidos, sendo possível a identificação de apenas um deles por espectrometria de massas, devido à baixa concentração dos demais, o qual corresponde à formação de uma amida na cadeia etila da atrazina (COA). Esse composto correspondeu ao produto de maior rendimento na maioria das reações.

O monitoramento das reações em diferentes intervalos de tempo e a variação nas condições reacionais mostraram que os principais produtos de oxidação do herbicida, DEA e COA, são formados por mecanismos independentes e por espécies catalíticas distintas. O DEA é formado via espécie ativa Me(V)OP

[Mn(V)OP ou Fe(IV)OP^{•+}], enquanto o COA é originado via Me(IV)OP [Mn(IV)OP ou Fe(IV)OP]. Estudos de intermediários por UV-Vis e EPR mostraram que a espécie ferril predomina como intermediário de reação para os sistemas Fe(TFPP)Cl/ACN com os dois oxidantes, iodosilbenzeno e ácido metacloroperbenzóico.

Para as metaloporfirinas Fe(TCPP)Cl e Fe(TMPy)Cl o estudo da oxidação do herbicida ficou comprometido devido à baixa solubilidade da atrazina em água, o que provocava sua precipitação e destruição do catalisador.

Para as metaloporfirinas suportadas em montmorilonita K-10 aminofuncionalizada também não foi observada formação de produtos, resultado atribuído à dificuldade do substrato, considerado bastante inerte, atingir o sítio catalítico.

Todos esses resultados mostraram o potencial de aplicação desses modelos biomiméticos em estudos que buscam elucidar o metabolismo de herbicidas *in vivo*, tendo em vista a dificuldade de se trabalhar com as enzimas *in vitro*, e resultaram na proposição de um esquema de reação da oxidação da atrazina catalisada pelas metaloporfirinas nas condições estudadas.

ABSTRACT

In this work we investigated the ability of metalloporphyrin model systems to mimic the action of cytochrome P450 in the oxidation of a herbicide, atrazine. To this end, we employed the second generation commercially available metalloporphyrins metal (III) 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichlorophenyl)porphyrin chloride [M(TDCPP)Cl] and metal (III) 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin chloride [M(TFPP)Cl] (metal = iron or manganese), all soluble in organic solvents, as well as the water soluble metalloporphyrins iron (III) 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin chloride [Fe(TMPy)Cl] and iron (III) 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin chloride [Fe(TCPP)Cl]. These metalloporphyrins were used both in homogeneous solution and supported on montmorillonite K-10. Iodosylbenzene, metachloroperbenzoic acid, and hydrogen peroxide were tested as oxidants, using one of the following reaction media: water, methanol, and acetonitrile.

Products generated during atrazine oxidation were identified by high performance liquid chromatography.

Our results show that the metalloporphyrins are able to oxidize atrazine, a highly persistent herbicide in the environment, as well as mimic the action of P450 enzymes both *in vivo* and *in vitro*, with formation of two metabolites, namely DEA and DIA, which result from the N-dealkylation of the ethyl and propyl chains of the substrate, respectively.

We also detected the formation of five unknown products, and we were able to identify only one of them by means of mass spectrometry, which corresponds to the formation of an amide on the atrazine ethyl chain (COA) and was the compound obtained in highest yields in most of the reactions. The other four unknown products were obtained in very low concentrations, which prevented us from determining their structures.

By monitoring the reactions at different time intervals and varying the reactional conditions, we were able to see that the main herbicide oxidation products, DEA and COA, are generated via distinct mechanisms and different

active catalytic species. DEA is formed via the species Me(V)OP [Mn(V)OP or Fe(IV)OP^{•+}], while COA results from the action of the species Me(IV)OP [Mn(IV)OP or Fe(IV)OP]. Studies of the reaction intermediates by UV-VIS and EPR showed that the ferryl species is the main reaction intermediate in the case of Fe(TFPP)Cl/ACN systems and the oxidants, iodosylbenzene and metachloroperbenzoic acid.

Studies of herbicide oxidation were difficult to carry out in the case of the metalloporphyrins Fe(TCPP)Cl and Fe(TMPy)Cl due to the low solubility of atrazine in water, which led to its precipitation and catalyst destruction.

With respect to the metalloporphyrins supported on montmorillonite K-10, no reaction products were observed because of the difficult diffusion of the inert substrate into the catalytic site.

All these results demonstrate the potential application of these biomimetic model systems in studies that pursue the elucidation of herbicide metabolism *in vivo*, especially when one bears in mind the difficulty in working with enzymes *in vitro*. Our data enabled the proposition of a scheme for metalloporphyrin-catalyzed atrazine oxidation under the conditions used herein.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	01
I.1 Aspectos Gerais	01
I.2 Citocromo P450	03
I.3 O Citocromo P450 e o Metabolismo de Detoxificação Enzimática nas Plantas	09
I. 4 Mecanismo de Resistência e o P450	14
I.5 Modelos Químicos do P450	16
I.6 Atrazina	20
II. OBJETIVOS	28
III. PARTE EXPERIMENTAL	30
III.1 Materiais utilizados	30
III.2 Equipamentos e dispositivos utilizados	31
III.3 Métodos	33
III.3.1 Determinação do método de análise da atrazina e metabólitos por CLAE	33
III.3.2 Determinação do método de extração das metaloporfirinas	34
III.3.3 Padronização do método de análise	35
III.3.4 Estudo espectrocópico da interação da Fe(TFPP)Cl com ATZ	36
III.3.5 Estudo da oxidação da atrazina	37
III.3.5.1 Metaloporfirinas solúveis em solvente orgânico	38
III.3.5.2 Fe(TFPP)Cl e Mn(TFPP)Cl suportadas em montmorilonita K-10	40
III.3.5.3 Metaloporfirinas solúveis em água	40

III.3.6 Estudo dos intermediários da reação de oxidação da atrazina catalisada pelas metaloporfirinas	39
III.3.6.1 Estudo preliminar dos intermediários por espectrofotometria UV-vis	41
III.3.6.2 Identificação por EPR da espécie intermediária formada na reação de oxidação da ATZ catalisada pela Fe(TFPP)Cl em MeOH e ACN	41
III.3.7 Identificação por MS dos produtos desconhecidos gerados nos estudos da oxidação da ATZ catalisada pelas MeP	41
III.3.7.1 Determinação do novo método de análise dos produtos de oxidação da ATZ por CLAE	42
III.3.7.2 Análise por MS	43
III.3.7.3 Análise por CLAE-MS	43
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
IV.1 Determinação do método de análise da atrazina e metabólitos por CLAE	45
IV.2 Determinação do método de extração das metaloporfirinas	48
IV.3 Padronização do método de análise	50
IV.4 Estudo espectrocópico da interação da Fe(TFPP)Cl com ATZ em MeOH	51
IV.5 Estudo da oxidação da atrazina catalisada pelas metaloporfirinas	53
IV.5.1 Metaloporfirinas insolúveis em água	55
IV.5.1.1 Monitoramento da concentração dos produtos de oxidação da ATZ pelo sistema Fe(TFPP)Cl/PhIO em função do tempo	62
IV.5.1.2 Estudo da oxidação da ATZ pelas MeP na presença de Imidazol (Im)	63

IV.5.1.3 Estudo da oxidação da ATZ catalisada pela Fe(TFPP)Cl usando excesso de oxidante	68
IV.5.1.4 Estudo da oxidação da ATZ catalisada pela Fe(TFPP)Cl na ausência de O ₂	70
IV.5.2 Oxidação da ATZ pelos sistemas envolvendo a Fe(TFPP)Cl e Mn(TFPP)Cl ancoradas em montmorilonita K-10 aminofuncionalizada	72
IV.5.3 Oxidação da ATZ pelos sistemas envolvendo metaloporfirinas solúveis em água	74
IV.6 Estudo preliminar dos intermediários da reação de oxidação da ATZ pelas metaloporfirinas por UV-vis e EPR	76
IV.7 Elucidação estrutural dos compostos desconhecidos formados na oxidação da ATZ catalisada pelas metaloporfirinas	80
IV.8 Esquema para as reações de oxidação da ATZ catalisada pelas metaloporfirinas Me(TFPP)Cl e Me(TDCPP)Cl (Me = Fe ou Mn)	89
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
m-CPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CYP	Citocromo
P450	Citocromo P450
FeP	Ferroporfirina
MnP	Manganêsporfirina
MeP	Metaloporfirina
MeOH	Metanol
Im	Imidazol
PhIO	Iodosilbenzeno
PhI	Iodobenzeno
PhIO ₂	Iodoxibenzeno
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
CLAE/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetria de massas
MS/ESI	Espectrometria de massas pela técnica de “electronspray”
UV/Vis	Espectroscopia de absorbância Ultra Violeta / Visível
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona s-transferase
P	Produto desconhecido

Estrutura e nomenclatura das metaloporfirinas utilizadas neste estudo

Nome: Cloreto de (5,10,15,20-tetrafenilporfirina) ferro (III)

Abreviatura: Fe(TPP)Cl

Nome: Cloreto de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-diclorofenil)porfirina metal(III)(M=Fe ou Mn)

Abreviatura: Fe(TDCPP)Cl ou Mn(TDCPP)Cl

Nome: Cloreto de 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina metal(III) (M=Fe ou Mn)

Abreviatura: Fe(TFPP)Cl ou Mn(TFPP)Cl

Nome: Cloreto de 5,10,15,20-tetrakis-(N-metil -4-piridil) porfirina ferro (III)

Abreviatura: Fe(TMPy)Cl₅

Nome: Cloreto de [5,10,15,20-tetra(4-carboxifenil)porfirina]ferro(III)

Abreviatura: Fe(TCPP)Cl

Nomenclatura e estrutura da atrazina e metabólitos

Abreviações	Nomenclatura	R ₁	R ₂	R ₃
ATZ	2-Cloro-4-(isopropilamino)-6-(etilamino)-s-triazina (ATRAZINA)	-Cl	-CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
DEA	2-Cloro-4-(isopropilamino)-6-amino-s-triazina (DESETILATRAZINA)	-Cl	-H	-CH(CH ₃) ₂
DIA	2-Cloro-4-(etilamino)-6-amino-s-triazina (DESIISOPROPILATRAZINA)	-Cl	-CH ₂ CH ₃	-H
DAA	2-Cloro-4,6-diamino-s-triazina (DESETILDESIISOPROPILATRAZINA)	-Cl	-H	-H
OHA	2-Hidroxi-4-(isopropilamino)-6-(etilamino)-s-triazina (HIDROXIATRAZINA)	-OH	-CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
OHDEA	2-Hidroxi-4-(isopropilamino)-6-amino-s-triazina (HIDROXIDESETILATRAZINA)	-OH	-H	-CH(CH ₃) ₂
OHDA	2-Hidroxi-4,6-diamino-s-triazina (HIDROXIDESETILDESIISOPROPILATRAZINA)	-OH	-H	-H
COA	2-Cloro-4-(acetamido)-6-(isopropilamino)-s-triazina	-Cl	-NHCOCH ₃	-NHCH(CH ₃) ₂

I.1 Aspectos Gerais

Pesticida é o nome dado a um conjunto de substâncias tóxicas que tem como função a eliminação de pragas que prejudicam a agricultura ou que causam doenças no homem. Os pesticidas são agrupados dependendo do seu organismo alvo em herbicidas (matam plantas), inseticidas (matam insetos), fungicidas (matam fungos) [RAVEN,1993].

Apesar de todos os benefícios proporcionados por esses compostos, como a produção de alimentos na agricultura a um custo acessível, vários problemas estão associados à sua intensa utilização, destacando-se o desenvolvimento de **resistência** nas espécies alvos, após repetidas aplicações do pesticida [RAVEN,1993].

A resistência corresponde à habilidade inerente de um dado organismo em sobreviver a doses de tóxicos elevadas, as quais matariam a maioria dos organismos de uma população normal da mesma espécie [SCOTT,1999].

O desenvolvimento de resistência corresponde a um dos mais sérios problemas enfrentados pela agricultura e uma das principais preocupações da indústria química que pesquisa, produz e vende pesticidas. O surgimento de populações pragas resistentes normalmente leva o agricultor a aumentar a dose, o

número de aplicações e, eventualmente, substituir o produto ineficaz por um novo. Além disso, o custo do desenvolvimento de novos produtos é alto [FRAGOSO, 2003].

Assim, entender como acontecem os mecanismos de resistência à pesticidas, como os compostos são metabolizados pelos organismos e o potencial de desenvolvimento de resistência de novos compostos pelas espécies alvo, tornaram-se prioridades para o correto manejo nas culturas, retardamento do processo, e na pesquisa de novos compostos ativos [FRAGOSO, 2003; REICHHART, 2000; SCOTT, 1999].

Um dos mecanismos de resistência a herbicidas mais comuns nas plantas corresponde ao aumento do metabolismo de detoxificação enzimática, no qual uma ou mais enzimas atuam na detoxificação dos compostos, com velocidade de reações altas, impedindo sua interação com seus sítios de ação (sítio-alvo). Várias enzimas estão envolvidas nesse processo, sendo a atividade da **superfamília dos citocromos P450** uma das responsáveis pela transformação desses compostos nas plantas [COLEMAN, 1997; REICHHART, 2000].

Nos últimos 20 anos, vários estudos têm sido desenvolvidos buscando elucidar o papel das enzimas P450 no metabolismo de detoxificação dos herbicidas nas plantas [COLEMAN, 1997; REICHHART, 2000]. Da mesma forma, metaloporfirinas vêm sendo estudadas nas últimas três décadas como modelos biomiméticos do P450, auxiliando no entendimento do mecanismo de ação dessas enzimas, principalmente no metabolismo de fármacos [MANSUY, 1989; GUNTER, 1990; MEUNIER, 1992; MANSUY, 1993; SHELDON, 1994; FEITERS, 2000; MEUNIER, 2000; BERNADOU, 2004].

A utilização desses complexos biomiméticos pode ser uma importante ferramenta nos estudos que buscam elucidar o metabolismo dos herbicidas nas plantas e no desenvolvimento de novos compostos ativos.

I.2 Citocromo P450

Os citocromos P450 (P450) constituem uma grande família de hemoproteínas encontradas em todas as formas de vida (bactérias, fungos, plantas, insetos, pássaros e mamíferos), apresentando um papel importante na transformação oxidativa de moléculas endógenas e xenobióticos [NELSON, 1996; MILES, 2000; DENISOV, 2005; MEYER, 2005].

Essas enzimas são as principais representantes das monooxigenases, sendo capazes de catalisar seletivamente uma grande diversidade de reações de oxidação, como a hidroxilação de carbonos saturados, a epoxidação em ligações duplas, a oxidação de heteroátomos, reações de desalquilação e oxidação de aromáticos, entre outras. Os P450 usam dois elétrons (fornecidos por enzimas redox) para ativar o oxigênio molecular e transferir apenas um átomo de oxigênio ao substrato [MONTELLANO, 2004; DENISOV, 2005].

O número total de membros dessa superfamília vem crescendo rapidamente, sendo que mais de 4000 genes de P450 foram isolados e identificados, de acordo com DENISOV *et al* (2005).

A nomenclatura utilizada corresponde a uma revisão proposta por NELSON *et al* (1996), na qual as sequências de genes são chamadas de *CYP* (para “cytochrome” P450), seguido pelo número que indica a família, subfamília e isoforma, respectivamente. A sequência de proteínas dentro de uma dada família é pelo menos 40 % idêntica (por exemplo CYP 2A6 e CYP 2B8), e a sequência dentro de uma subfamília é mais de 55 % idêntica (por exemplo CYP 2A6 e CYP 2A8). Uma vez que a nomenclatura é baseada na similaridade total da sequência, nenhuma informação relacionada à função do P450 pode ser assumida nessa classificação [SCOTT, 1999].

O grande interesse nesta enzima baseia-se na notável característica dessas monooxigenases que corresponde a grande variação na especificidade de substrato dos diferentes P450. O **CYP1A1** pode metabolizar mais de 20 substratos, e apresentam como função a detoxificação de xenobióticos nos seres humanos, enquanto o **CYP7A1** tem apenas um substrato conhecido, sendo responsável pela hidroxilação do colesterol. Alguns P450 têm uma coincidente especificidade por um determinado substrato, o qual pode ser metabolizado por múltiplos P450. Alguns P450 produzem somente um metabólito para um dado substrato, enquanto outros podem produzir uma diversidade de metabólitos [SCOTT, 1999].

Esta grande variedade na especificidade de substratos dos P450 pode estar associada à possibilidade de ação de diferentes espécies catalíticas, dependendo das condições e/ou substratos [DENISOV, 2005; MEYER, 2005].

Todos os citocromos P450 descritos têm como sítio catalítico uma **ferroprotoporfirina IX** (Figura 1) ligada à proteína através de um ligante proximal cisteinato. O ferro (III) central, além de estar ligado ao grupo tiolato da cisteína

(ligante proximal), está ligado a uma molécula de água (ligante distal), no estado de repouso, que é o sítio onde ocorre a ativação do oxigênio molecular, como mostrado na Figura 2 [MONTELLANO, 2004] .

As enzimas diferem entre si na natureza da matriz protéica, que é constituída de uma cadeia polipeptídica com peso molecular entre 40 e 60 kD. Esta estrutura é responsável por fornecer um ambiente hidrofóbico para ligação e orientação do substrato. Assim, a seletividade é resultado da variação da seqüência dos aminoácidos da cadeia polipeptídica e, conseqüentemente, da estrutura da apoproteína na qual o substrato se fixa [MONTELLANO, 2004; DENISOV, 2005].

Figura 1 : Ferroprotoporfirina IX

Figura 2: Estrutura esquemática do citocromo P-450 [MONTELLANO, 1995].

O ciclo catalítico é assumido ser comum para todos os P450, Figura 3, sendo ainda objeto de muitas investigações e controvérsias. As informações mecanísticas são oriundas, em sua maioria, de estudos realizados para o sistema P450 da cânfora da *Pseudomonas putida* (CYP 450_{cam}) [DENISOV, 2005].

No estado de repouso, o citocromo P-450 existe na forma de dois complexos de Fe^{III} em equilíbrio: **1** e **2** (Figura 3). O complexo **1** contém Fe^{III} baixo-spin, hexacoordenado com o resíduo cisteinato ocupando uma das coordenações axiais e, na outra, liga-se uma molécula de água. O complexo **2** é um complexo de Fe^{III} alto-spin, o qual contém o resíduo cisteinato como único ligante axial. Com a aproximação do substrato à região próxima ao heme, verifica-se o deslocamento da molécula de água e conseqüentemente, um deslocamento do equilíbrio em direção à formação do complexo **2**. Nessas condições esse metal é facilmente reduzido à ferro (II) (**3**) que coordena rapidamente ao oxigênio molecular (**4**). A redução do complexo ocorre em etapas: primeiro tem-se a formação do intermediário ferro (III) peroxo (**5**); em seguida este é protonado ao respectivo hidropoxo (**6**). Uma segunda protonação leva à quebra heterolítica da ligação O-O e à formação de um intermediário radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion, Fe(IV)OP^{•+} ou Fe(V)OP (similar ao composto I das peroxidases), e a liberação de uma molécula de água (**7**). Esta espécie oxo-ferril tem sido aceita como o oxidante eletrofílico ativo do P450, embora não tenha sido ainda detectada, mesmo através das técnicas criogênicas mais sofisticadas [CHANDRASENA, 2004].

O intermediário radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion transfere o átomo de oxigênio ao substrato, resultando na sua monooxigenação (**7**). Recentemente as espécies ferro(III)-peroxo (**5**) e ferro(III)-hidroperoxo (**6**), têm sido também propostas como intermediários capazes de oxidar substratos em algumas famílias de P-450, embora sejam menos reativas que a espécie **7** [DENISOV, 2005; CHANDRASENA, 2004].

Uma etapa mecanística que compete com a formação do complexo **5**, é a chamada “desvio da auto-oxidação”, na qual o complexo **4** libera a molécula de oxigênio, regenerando o complexo **2** (FIGURA 3).

Outro desvio corresponde ao “desvio da oxidase” no qual o complexo **7** dá origem ao complexo **2** liberando uma molécula de água (FIGURA 3).

Figura 3: Ciclo catalítico do P450 [Adaptado de DENISOV, 2005]

Na metade da década de 70, vários grupos demonstraram que os citocromos P-450 podem catalisar a hidroxilação de hidrocarbonetos saturados por doadores simples de oxigênio, como por exemplo, PhIO , H_2O_2 , NaOCl , sem a presença de um corredutor, ou a presença das proteínas transferidoras de elétrons. Este caminho foi chamado de “desvio do peróxido” ou “ciclo catalítico curto” do P450 , Figura 3 [DENISOV, 2005].

I.3 O Citocromo P450 e o Metabolismo de Detoxificação Enzimática nas Plantas

Uma das características mais notáveis observadas nos projetos de sequenciamento de genomas de plantas corresponde à grande diversidade na família do P450, considerada atualmente a maior classe de enzimas nas plantas [REICHHART, 2000]. De acordo com DENISOV *et al.* (2005) mais de 1000 sequências já foram registradas.

As funções fisiológicas essenciais do P450 são comuns na maioria das plantas, incluindo a síntese de hormônios, esteróides e ácidos graxos. Entretanto, a maior parte dos P450 estão envolvidos no metabolismo secundário e no metabolismo de detoxificação de xenobióticos, o qual difere de planta para planta. Conseqüentemente, o número de P450 e a especificidade de substratos também diferem de planta para planta [HALKIER, 1996; REICHHART, 2000].

O metabolismo de detoxificação enzimática de xenobióticos nas plantas corresponde a um dos mecanismos de tolerância à herbicidas, no qual os compostos tóxicos são metabolizados, impedido sua interação com os sítios alvo. Esse processo é composto

de duas etapas sequenciais: a transformação química e a compartimentação

[COLEMAN,1997; REICHHART, 2000].

A transformação química envolve uma ou mais enzimas, e resulta na produção de compostos menos fitotóxicos e mais hidrofílicos que os compostos originais. O aumento na solubilidade desses compostos na água é uma modificação de grande importância na natureza da molécula, uma vez que reduz a habilidade do composto em penetrar nas membranas biológicas e, portanto, restringem sua distribuição entre as células e tecidos. Conseqüentemente, como resultado dessa modificação há redução na meia-vida do composto tóxico na planta, evitando seu acúmulo. Assim, a velocidade com que essas reações ocorrem e os tipos de metabólitos formados diferem de planta para planta e é a base da seletividade dos herbicidas nas diferentes espécies [REICHHART, 2000].

As reações responsáveis pela modificação química são divididas em duas fases: a fase I (ativação) e a fase II (conjugação). A fase I envolve reações de hidrólise e oxidações, sendo a maioria delas reações catalisadas pela família dos P450. A principal função dessa etapa é criar um sítio reativo nos compostos pela adição ou exposição de grupos funcionais, preparando o compostos para a fase II. Embora os metabólitos formados sejam mais hidrofílicos, nem sempre é esperada a redução da fitotoxicidade, e em alguns casos os metabólitos tornam-se mais tóxicos que os compostos originais (ativação). Caso os compostos tóxicos já apresentem os grupos funcionais necessários à fase II, o processo pode ocorrer sem a fase I [COLEMAN,1997].

A fase II corresponde à etapa de desativação das moléculas tóxicas pela ligação covalente com moléculas hidrofílicas endógenas como a glucose, malonatos e a glutathione, sendo a glutathione s-transferase a principal enzima envolvida no processo. Essa etapa

resulta em compostos sem toxicidade quando comparados à molécula inicial [MARRS, 1996; COLEMAN,1997].

A compartimentação corresponde a segunda etapa do processo, e é denominada fase III. Nessa etapa, os compostos inativos são convertidos em conjugados secundários ou resíduos insolúveis e depositados nos vacúolos ou nas paredes celulares das plantas [COLEMAN,1997].

Assim, os P450 presentes nas plantas têm papel importante no metabolismo de detoxificação do herbicida, na seletividade e no desenvolvimento de resistência. Muitos herbicidas como o prosulfuron, diclofop e clortoluron são convertidos pelos P450 em vários metabólitos, como observados nas Figuras 4 e 5. No caso do clortoluron a metabolização pode ser via hidroxilação do anel metila, ou via di-*N*-desmetilação. Neste último o produto mono-*N*-desmetilado permanece fitotóxico [REICHHART, 2000]. Esse herbicida é um dos exemplos do metabolismo associado à seletividade dos herbicidas nas plantas daninhas e nas culturas. A cultura de trigo é tolerante ao herbicida, o qual apresenta meia-vida menor que 24 h na planta, sendo o principal metabólito o produto da hidroxilação do anel metila. Já na planta daninha susceptível *Alopecurus myosuroides*, o principal metabólito é o produto da mono-*N*-desmetilação. Em contraste, na planta daninha tolerante *Veronica persica*, o herbicida apresenta uma meia- vida maior que 6 h e é convertido ao produto di-*N*-desmetilado (Figura 5).

Figura 4: Exemplos de reações catalisadas pelo P-450 [REICHHART, 2000].

Figura 5: Metabolismo herbicida clortoluron pelo P450 [REICHHART, 2000].

A primeira indicação de que os P450 estariam envolvidos no metabolismo de detoxificação enzimática de herbicidas veio das análises dos resíduos obtidos do metabolismo de herbicidas *in vivo*. A maioria dos metabólitos formados são produtos de uma aril- ou alquil- hidroxilação e *N*-, *S*- ou *O*- desalquilação oxidativa [REICHHART, 2000].

Uma das provas diretas foi obtida em 1969, quando foi mostrado que o monuron fenilurea era ativamente desalquilado em microsossomos de algodão. Essa foi uma das primeiras reações associadas à relação P450 – herbicida em plantas superiores. Este trabalho foi confirmado 20 anos mais tarde, e deu início a uma exploração mais sistemática da importância do P450 no metabolismo oxidativo de outras classes de herbicidas [REICHHART, 2000].

A maioria dos estudos que tentam evidenciar a relação do P450 na transformação dos herbicidas em plantas daninhas é realizado *in vivo*, utilizando inibidores dessas enzimas, devido à grande dificuldade de se isolar frações microsossomais dessas plantas. No entanto, para investigar a participação do P450 no metabolismo de plantas superiores, são realizados ensaios *in vitro*, utilizando os microsossomos dessas plantas [REICHHART, 2000].

Uma vez que a participação dos P450 na seletividade dos herbicidas foi confirmada, o isolamento desses genes tornou-se de grande interesse comercial tanto para o controle na tolerância de herbicidas nas culturas e plantas daninhas, como na otimização de novos compostos [OHKAWA, 1999; REICHHART, 2000; INUI, 2005; KAWAHIGASHI, 2006].

Os genes de várias plantas foram isolados recentemente. Os genes CYP73A1 e CYP81B1 foram isolados da alcachofra jerusalém (*Helianthus tuberosus*). Essas enzimas atuam na biossíntese de fenilpropanóides e ácidos graxos oxigenados, apresentando também habilidade de detoxificar o herbicida clortoluron. CYP71A10 foi isolado da soja, mostrando também grande capacidade de detoxificar o clortoluron. Entretanto, apesar do grande número de genes purificados, informações moleculares dessas enzimas são limitadas em consequência da dificuldade em identificar as funções de cada uma, principalmente àquelas ligadas ao metabolismo de xenobióticos, os quais são produzidos em baixas concentrações [REICHHART, 2000; MORANT, 2003; KAWAHIGASHI, 2006]. Assim, o metabolismo enzimático de vários herbicidas ainda não foi esclarecido [REICHHART, 2000; MORANT, 2003; KAWAHIGASHI, 2006].

I. 4 Mecanismo de Resistência e o P450

A resistência corresponde à capacidade herdável de uma planta sobreviver e reproduzir após a exposição a um herbicida, que normalmente seria letal para a população original. Esse fenômeno é causado principalmente por seleção natural, uma vez que, numa determinada espécie existem, numa frequência muito baixa (uma em um milhão), determinadas plantas que são tolerantes ao herbicida. A utilização do composto promove a oportunidade das espécies tolerantes se proliferarem. Assim, após anos de uso, o número de

plantas suscetíveis diminui drasticamente, passando a prevalecer a população tolerante [CHRISTOFFOLETI, 2006]. A Figura 6 mostra o esquema do desenvolvimento de resistência nas plantas.

Figura 6: Esquema do desenvolvimento da resistência à herbicidas [CHRISTOFFOLETI, 2006].

Mutações genéticas casuais que resultam na resistência também podem ocorrer, porém numa menor frequência. Não há evidências de mutações genéticas causadas por herbicidas, ou seja, as plantas não mudam para se tornar resistente a um determinado composto [CHRISTOFFOLETI, 2006].

Os mecanismos mais comuns de resistência correspondem a modificações no sítio de ação do herbicida, impedindo a interação composto-planta, e o aumento no metabolismo enzimático, através do qual o composto é detoxificado.

O aumento no metabolismo do P450 é o fator responsável pela resistência de várias classes de herbicidas. O primeiro caso foi mostrado por HOLT et al. em

1993, em populações de *Lolium rigidum* da Austrália, as quais passaram a ser resistentes ao herbicida simiazina [REICHHART, 2000].

O mecanismo pelo qual as plantas passam a metabolizar rapidamente os compostos tóxicos ainda não foi determinado nas plantas. Nos seres humanos e insetos, essa habilidade tem sido demonstrada ser resultado de uma duplicação de genes específicos do P450 responsáveis pelo processo de detoxificação. Uma mutação na estrutura do gene e uma alteração no mecanismo de “stress”-resposta, na qual um ou mais isoformas de P450 são induzidos, também são descritos [REICHHART, 2000].

I.5 Modelos Químicos do P450

A descoberta do “desvio do peróxido” ou “ciclo catalítico curto do citocromo P450” aliadas às dificuldades de se trabalhar com enzimas, como por exemplo a regeneração dos co-fatores levaram ao desenvolvimento de sistemas modelo para o P450, inaugurando uma nova área na química denominada “Química Biomimética” [MEUNIER, 1992; MEUNIER, 1999].

As metaloporfirinas sintéticas são análogas ao grupo prostético do P450 e têm sido sintetizadas e estudadas há mais de 30 anos como modelos destas e de outras hemoproteínas. Estes modelos biomiméticos auxiliam no entendimento do mecanismo da enzima, bem como na reprodução da atividade catalítica destas usando doadores de oxigênio simples, na busca de catalisadores mais seletivos

para utilização na química fina [GUNTER, 1990; MEUNIER, 1992; MANSUY, 1993; SHELDON, 1994; GONSALVES, 1996; FEITERS, 2000; MEUNIER, 2000; BERNADOU, 2004; BALOGH, 2004].

O primeiro sistema catalítico utilizando metaloporfirinas foi descrito por GROVES *et al.* em 1979, utilizando o cloreto de 5,10,15,20- tetrafenilporfirinato de ferro (III) e o iodosilbenzeno (PhIO) como doador de oxigênio, obtendo rendimentos de 55 % do óxido na epoxidação do cicloexeno, e 8 % de cicloexanol da hidroxilação do cicloexano [GROVES, 1979]. Entretanto, as tetrafenilporfirinas simples, denominadas de **catalisadores de primeira geração** (Figura 7a), são rapidamente destruídas pela degradação oxidativa do anel porfirínico no meio reacional fortemente oxidante utilizado nessas reações [MANSUY, 1994; GUNTER, 1990].

Complexos tendo como substituintes grupos alquílicos volumosos como a tetramesitilporfirina ou com grupos sacadores de elétrons no núcleo fenílico como a pentafluorofenilporfirina, mostraram maior estabilidade, devido à efeitos estéricos e eletrônicos. A presença desses substituintes no anel torna a espécie ativa metal-oxo mais eletrofílica e, portanto, mais reativa. Esses complexos são denominados **catalisadores de segunda geração** (Figura 7b) e os principais representantes dessa classe são **Fe(TDCPP)Cl** e **Fe(TFPP)Cl** [TRAYLOR, 1984; MEUNIER, 2000].

No final dos anos 80 houve o aparecimento dos **catalisadores de terceira geração** (Figura 7c) nos quais, além da substituição no grupo fenílico, os hidrogênios dos carbonos pirrólicos também foram substituídos por grupos eletronegativos. As metaloporfirinas tornaram-se mais resistentes, entretanto, não

se mostraram necessariamente melhores catalisadores que as de segunda geração. A excessiva substituição pelos grupos eletronegativos pode interferir na formação da espécie ativa, tornando os complexos menos reativos [TRAYLOR, 1991; MEUNIER, 2000; GUEDES, 2005; GUEDES, 2006].

Figura 7: Três gerações das Metaloporfirinas

Assim, as propriedades químicas e físicas como potencial de redução, atividade catalítica, solubilidade e estabilidade das espécies ativas são fortemente influenciadas pelos grupos substituintes no macrociclo [FAJER, 1991].

A introdução de substituintes como aminoácidos e éteres coroa (“crown” éteres) no anel porfirínico, pode favorecer a interação com o substrato, orientando

seu acesso ao sítio catalítico. Essa tem sido uma das estratégias utilizadas em nosso grupo na busca de catalisadores mais eficientes e seletivos. As metaloporfirinas com essas características (“crowned” porfirinas) podem ser consideradas a quarta geração de catalisadores [SANTOS, 2005; GOTARDO, 2003; SILVA FILHO, 2005].

Outra estratégia para se obter catalisadores mais estáveis e seletivos envolve a heterogenização do sistema catalítico, por imobilização das metaloporfirinas em suportes sólidos [DORO, 2000; FARIA, 2004; GOTARDO, 2005; ZAMPRONIO, 2005; MAC LEOD, 2005; MOREIRA, 2005; VINHADO, 2006]. ALÉM DE AUMENTAR A VIDA ÚTIL do catalisador, impedindo sua degradação e facilitando sua recuperação do meio reacional, busca-se também mimetizar a régio- e estereosseletividade obtida pela presença da matriz protéica do P450.

Metaloporfirinas têm sido muito utilizadas como catalisadores biomiméticos na oxidação de fármacos, auxiliando no entendimento do metabolismo desses compostos nos seres humanos, nos quais o P450 é peça fundamental do metabolismo [MANSUY, 1989; MANSUY, 2000; MAURIN, 2003; BERNADOU, 2004; MELO, 2005]. A utilização destes modelos biomiméticos podem levar a obtenção de diferentes metabólitos, em quantidades suficientes para caracterização e utilização em testes farmacológicos e toxicológicos [BERNADOU, 2004] .

As vantagens na utilização de complexos modelos são: i) estudos com animais são dispendiosos e necessitam do sacrifício do animal; ii) o uso de microsossomos leva à rendimentos não reprodutíveis; iii) o isolamento de intermediários reativos que podem se ligar aos polímeros biológicos em oxidações

catalisadas por enzimas é difícil e os metabólitos primários são freqüentemente hidrofílicos, dificultando sua separação, especialmente daqueles compostos desconhecidos [BERNADOU, 2004] .

Apesar dos bons resultados com fármacos, poucos estudos têm direcionado a aplicação de metaloporfirinas no estudo de pesticidas. Como um dos poucos relatos da literatura, KESERÜ *et al* (1999) demonstraram que a Fe(TFPP)Cl mimetiza a ação do P450 de insetos na transformação de inseticidas da classe dos carbamatos.

Recentemente, FUKUSHIMA *et al.* (2005) compararam o metabolismo *in vivo* de um inseticida utilizado na cultura de tomate, “pyriproxyfen”, com os resultados obtidos com modelos metaloporfirínicos, mostrando a habilidade desses complexos em mimetizar a ação do P450 *in vivo*.

A atividade catalítica de complexos metaloporfirínicos também pode ser investigada do ponto de vista ambiental, visando a degradação dos pesticidas. HÉQUET *et al.* (2000) relataram recentemente resultados interessantes sobre a fotodegradação da atrazina, utilizando metaloporfirinas e metaloftalocianinas imobilizadas em resina Amberlite IRA -910, abrindo assim uma nova perspectiva na purificação de águas utilizando esse sistema catalítico.

I.6 Atrazina

A atrazina (2-cloro, 4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina, ATZ) (Figura 8) é um seletivo herbicida pré e pós-emergente da classe das triazinas, que atua no controle de plantas daninhas de folhas largas [TOPAL, 1996; HANIOKA, 1998; CHERIFI, 2001]. A importância desse herbicida é consequência da sua tolerância em culturas de milho [OHKAWA, 1999; CHERIFI, 2001] .

Figura 8: Estrutura da atrazina (ATZ).

A atrazina representa 12 % de todos os pesticidas empregados nos Estados Unidos em culturas de milho, sorgo, cana-de-açúcar e abacaxi. No Brasil, principalmente nas culturas de cana-de-açúcar e milho, são utilizadas elevadas quantidades desse herbicida. [JACOMINI, 2002; ROSS, 2006]. Esse herbicida também foi muito utilizado na Europa embora tenha sido banido em alguns países.

Em consequência da sua baixa reatividade química, a atrazina (ATZ) é persistente no solo, sendo o principal contaminante de águas subterrâneas e superficiais na Europa e Estados Unidos. Além disso, quantidades residuais desse herbicida e seus metabólitos têm sido encontrados na água de consumo e

produtos alimentícios industriais, muito tempo depois de sua aplicação [ARNOLD, 1995; CHAN, 2005; KAWAHIGASHI, 2006].

A ATZ atua como um inibidor da fotossíntese, uma vez que esse composto liga-se a um dos componentes do fotossistema II, impedindo o fluxo normal de elétrons [TOPAL, 1996; HANIOKA, 1998; CHERIFI, 2001]. Essa etapa corresponde à fase fotoquímica, na qual a energia luminosa é transformada em energia química armazenada na molécula de ATP e NADPH. A outra fase do processo fotossintético é aquela na qual essa energia é utilizada para a fixação do CO₂ (fase bioquímica).

A etapa fotoquímica começa com a absorção de energia luminosa pelos sistemas coletores antena. A captura da energia luminosa possibilita a transferência de elétrons da molécula de água até o NADP⁺, com a formação de NADPH. A fotólise da molécula de água e o transporte de elétrons permitem a síntese de ATP, via complexo ATP-sintase. A etapa fotoquímica resulta, então, em armazenamento de poder redutor (NADPH), liberação de oxigênio (subproduto da dissociação da molécula da água), e formação de ATP por meio do complexo ATP-sintase. O ATP e NADPH são utilizados na fixação do CO₂. [NELSON, 2004; LOUREIRO, 2006].

Na fase fotoquímica há participação de 4 grandes complexos protéicos: 1) fotossistema II, onde ocorre a fotólise da molécula de água; 2) complexo citocromo *b6-f*, o qual participa no transporte de elétrons entre o fotossistema I e II; 3) fotossistema I, onde os elétrons provenientes da água são utilizados para a redução do NADP⁺; 4) complexo sintase do ATP, onde é transformada a energia

química potencial devido ao gradiente prótônico entre o lúmen do tilacóide e o estroma (gerado na fotólise da água), em ATP. A Figura 9 e 10 mostram o esquema geral das reações fotoquímicas e do fotossistema II.

Fig. 9: Esquema geral das reações fotoquímicas, mostrando os quatro grandes complexos proteicos envolvidos nas reações fotoquímicas [LOUREIRO, 2006].

Fig. 10: Estrutura do fotossistema II. Em destaque a etapa de redução da plastoquinona B (Q_B) ligada à proteína D1 [LOUREIRO, 2006].

No Fotossistema II (FS II) a molécula de água é oxidada até oxigênio e os elétrons gerados permitem a redução da plastoquinona B (Q_B - destaque na Figura 10), a qual está ligada à proteína D_1 . A Q_B atua como molécula transportadora de elétrons da Q_A até o citocromo ***b6 /f***. É justamente nessa etapa que ocorre a interferência do herbicida atrazina.

O herbicida liga-se à proteína D_1 , impedindo a redução da Q_B e interferindo no fluxo de elétrons, como mostrado na Figura 11. Como consequência, as reações da fase fotoquímica são interrompidas e, com isso, todo o processo da fotossíntese.

Fig. 11: Esquema do modo de ação da atrazina [LOUREIRO, 2006].

A seletividade da ATZ nas diferentes plantas baseia-se em pequenas diferenças na sequência de aminoácidos da proteína D_1 , na região peptídica a

qual liga a Q_B e a atrazina. Nas plantas tolerantes somente a Q_B liga-se à proteína. Nas plantas susceptíveis ocorre a ligação da ATZ.

Outro mecanismo que explica a tolerância da ATZ nas culturas corresponde ao metabolismo de detoxificação enzimática. Estudos do metabolismo *in vivo* em diferentes culturas tolerantes como milho, mostram que a detoxificação da ATZ pode ocorrer por dois mecanismos, como mostrado na Figura 12 [TOPAL, 1996; HANIOKA, 1998; OHKAWA, 1999; CHERIFI, 2001; INUI, 2005; KAWAHIGASHI, 2006]. No primeiro, mais eficiente, rápida detoxificação ocorre via conjugação com a glutathiona (GSH), catalisada pela glutathiona s-transferase. O segundo mecanismo ocorre via N-desalquilação. A mono-N-desalquilação reduz a afinidade da ATZ pela proteína D1, reduzindo parcialmente a fitotoxicidade. A remoção das duas cadeias N-alkil completa a detoxificação [OHKAWA, 1999] .

Figura 12: Metabolismo de detoxificação da atrazina no milho [OHKAWA, 1999].

Embora a reação de N-desalquilação da atrazina nas plantas seja atribuída ao P450, ainda não foi demonstrada *in vitro*. Já em outros organismos vivos essa enzima é a principal responsável por essas reações, como mostrado em estudos com genes de mamíferos e microssomas de bactérias. De acordo com a literatura o CYP1A2 humano é o responsável pela reação de N-desalquilação desse composto [KAWAHIGASHI, 2006].

O mecanismo pelo qual ocorre a N-desalquilação catalisada pelo P450 inicia-se com a oxidação da ferro (III) porfirina, formando a espécie catalítica de alta valência, radical ferro (IV) oxo porfirina π -cátion, $\text{Fe(IV)OP}^{\bullet+}$. A partir daí existem dois mecanismos propostos para reação, mostrados na Figura 13. Em geral, a ocorrência de um mecanismo ou outro depende do tipo de substituintes presentes no nitrogênio [SMITH, 1986; KARKI, 1995; BHAKTA, 2002].

O primeiro mecanismo (A), conhecido como mecanismo de transferência eletrônica, propõe a transferência de um elétron do substrato para a espécie catalítica $\text{Fe(IV)OP}^{\bullet+}$, formando a espécie ferril (Fe(IV)OP). Após essa etapa ocorre abstração de um átomo de H do substrato e posterior transferência do grupo $-\text{OH}$ para o mesmo. Após a ocorrência da hidroxilação no carbono adjacente ao nitrogênio, forma-se uma carbinolamina instável, que se decompõe em uma amina e um derivado do carbonil (Figura 13).

No segundo mecanismo (B), conhecido como mecanismo de abstração do hidrogênio, não ocorre a transferência de elétrons, mas a abstração do hidrogênio

do substrato diretamente pela espécie catalítica. As etapas seguintes são semelhantes.

Figura 13: Mecanismo de N-desalquilação catalisada pelo P-450 (adaptado de KARKI, 1995).

II. OBJETIVOS

Na busca de entendimento da função do P450 no metabolismo de herbicidas em plantas várias lacunas permanecem. Respostas claras são necessárias, visando a elucidação do mecanismo de tolerância e resistência nas plantas e o desenvolvimento de novos compostos ativos.

Tendo em vista as dificuldades associadas ao trabalho com enzimas, o potencial de metaloporfirinas em mimetizar a atividade catalítica do P450 e os poucos estudos nessa área, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de modelos metaloporfirínicos em mimetizar a ação dos P450 na oxidação da atrazina.

A atrazina foi escolhida como substrato em consequência do seu metabolismo via P450 nos diferentes organismos vivos ser conhecido. Além disso, alguns de seus metabólitos obtidos *in vivo* são disponíveis comercialmente, o que auxilia na identificação dos possíveis produtos de oxidação no estudo com compostos modelos.

Foram utilizadas metaloporfirinas comerciais como cloreto de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-diclorofenil)porfirina metal(III) [M(TDCPP)Cl] e cloreto de 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina metal(III) [M(TFPP)Cl] (M= Fe ou Mn); metaloporfirinas solúveis em água como a cloreto de 5,10,15,20-tetrakis-(N-metil -4-

piridil) porfirina ferro(III) e 5,10,15,20-tetrakis-(4-carboxifenil) porfirinato ferro(III); e M(TFPP)Cl (M= Fe ou Mn) imobilizada em motmorillonita. Os oxidantes utilizados foram iodosilbenzeno, peróxido de hidrogênio e ácido metacloroperbenzóico.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Materiais Utilizados

Todos os reagentes utilizados foram de procedência Merck, Aldrich, Acros, Fluka, Mallinckrodt ou Synth e grau de pureza P.A. Nos experimentos envolvendo CLAE foram utilizados solventes com grau pureza CLAE. Os solventes foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

- Acetonitrila: MALLINCKRODT, MERCK.
- Ácido acético: MERCK.
- Argônio: WHITE MARTINS
- Atrazina, desetil atrazina, deisopropil atrazina, desetil deisopropil atrazina, hidróxi atrazina, desetil hidróxi atrazina, desetil deisopropil hidróxi atrazina: SUPELCO.
- Atrazina: NOVARTIS
- $\text{Fe}(\text{TFPP})\text{Cl}$, $\text{Fe}(\text{TCPP})\text{Cl}$, $\text{Fe}(\text{TMPy})\text{Cl}_5$: MID CENTURY.
- Formaldeído: ACROS

- $H_2(TDCPP)$, $H_2(TFPP)$: MID CENTURY. Estas porfirinas foram metaladas de acordo com metodologia descrita por ADLER E LONGO *et al.* (1970) utilizando $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ e $Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ como o sal fornecedor do metal.
- Hexano: MALLINCKRODT
- Iodobenzeno diacetato: ACROS
- Iodobenzeno: ALDRICH
- Iodosilbenzeno (sintetizado neste laboratório), 90 % de pureza.
- Imidazol: ACROS
- m-CPBA: ACROS
- Metanol: MALLINCKRODT, MERCK.

III.2 Equipamentos e Dispositivos Utilizados

- Agitador por ultrassom Minisom Thornton, Impec Eletrônica;
- Balança Analítica Mettler Toledo AG245;
- Células de quartzo para espectroscopia UV-Vis de 1 cm de caminho óptico - Hellma e Beckmann.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, com detector Diode Array SPD-M 10A VP acoplado ao forno de coluna CTO-10A VP e controlador de sistema SCL-10A VP. Coluna Lichrospher 100RP – 18, 5 μ m (125x4mm) - MERCK

- Espectrofotômetro HP 8452A Diode Array acoplado ao microcomputador HP Vectra Es/12, impressora Think Jet HP e ploter 7475A HP;
- Microseringas Hamilton de 5,10,25,50,100,250,500,1000, 1250 e 2500 μL ;
- Placas de agitação e aquecimento Corning
- As medidas de EPR foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento, do Departamento de Biofísica, do Instituto de Física da USP de São Carlos. Os espectros de EPR foram obtidos em um espectrômetro de EPR Varian E-109, equipado com cavidade retangular Varian E-231 e termômetro digital Fluke 2100-A conectado a um termopar cobre-constantan. O equipamento opera na frequência da banda X, 100 KHz, amplitude de modulação 10 gauss com ganho de 10^3 e 200 mW.
- As análises por espectrometria de massas (MS) foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, deste Departamento. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro Quattro LC (Micromass, UK), equipado com fonte de ionização Eletrospray operando em modo positivo (ESI+).
- As análises por CLAE-MS foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato do Departamento de Química e Física da Faculdade de Ciências Farmacêuticas deste campus, utilizando o equipamento citado anteriormente.

III.3 Métodos

III.3.1 Determinação do método de análise da atrazina e metabólitos por CLAE

A análise da atrazina e de seus metabólitos por CLAE foi baseada no método descrito por HÉQUET *et al.* (2000), o qual utiliza como fase móvel mistura tampão fosfato (pH 7) e MeOH (7:3), fluxo de 1 mL/min, temperatura da coluna de 40 °C e análise dos compostos em 220 nm.

Para determinação do método foram preparadas soluções de concentração aproximadamente 1×10^{-4} mol/L da atrazina e dos metabólitos e estes foram injetados separadamente no CLAE, utilizando coluna C18 da Merck (125x4 mm) e como fase móvel a mistura tampão fosfato (pH 7) e MeOH relação 7:3 (corrida isocrática), fluxo de 1 mL/min e análise dos compostos em 220 nm. Como nesta condição não foi possível a separação dos metabólitos e a análise apresentava-se com tempo superior a 60 min, foi utilizado o gradiente de fase móvel durante a análise. A força de eluição da fase móvel foi modificada variando-se o teor de MeOH na sua composição, a qual é descrita na Tabela I.

Tabela I: Variação da porcentagem de MeOH na fase móvel tampão fosfato:MeOH utilizado na análise da atrazina e metabólitos.

Tempo (min)	% de MeOH
1-5	10
6-23	25
25-35	50
37-40	10

O fluxo da fase móvel (1 mL/min), a temperatura da coluna (40 °C) e o comprimento de onda de análise (220 nm) permaneceram constantes durante todo o tempo de análise (40 min). Após injeção da mistura equimolar de todos os compostos estabeleceu-se o método de análise.

III.3.2 Determinação do método de extração das metaloporfirinas

O procedimento de extração da metaloporfirina do meio reacional foi adaptado do método proposto por MAURIN *et al.* (2003) para análise de fármacos por CLAE, em estudos de oxidação com metaloporfirinas. O método modificado consistiu na retirada de 200 µL da mistura de reação, adição de 600 µL de hexano e posterior adição de 400 µL da fase móvel (tampão fosfato 90 %:MeOH 10 %). A solução contendo as duas fases é agitada por 10 min e, após esse período retira-

se a fase superior contendo a metaloporfirina dissolvida em hexano. Filtra-se a fase inferior composta pela fase móvel, ATZ e metabólitos, e faz-se a injeção no cromatógrafo.

III.3.3 Padronização do método de análise

Para padronização do método foram preparadas soluções estoques ($\sim 1 \times 10^{-3}$ mol/L) dos metabólitos em MeOH. Retirando-se uma alíquota de cada uma das soluções estoques, foram preparadas seis soluções de concentrações diferentes e conhecidas contendo todos os compostos, completando-se o volume para 1500 μ L com MeOH. O número de mols de cada um dos metabólitos nas respectivas soluções está descrito na Tabela II.

Todas as seis soluções foram submetidas à etapa de extração descrita anteriormente (item III.3.2) e, após esse procedimento, 20 μ L de cada uma delas foi injetada no CLAE, determinando-se as áreas dos picos. O fator resposta (F) do detector foi determinado a partir da inclinação das retas nos gráficos da relação de áreas (produto) *versus* a concentração (produto/padrão).

Tabela II: Número de mols dos metabólitos nas soluções de padronização.

SOLUÇÃO	METABÓLITOS (mol)
1	$1,0 \cdot 10^{-8}$
2	$5,0 \cdot 10^{-8}$
3	$7,5 \cdot 10^{-8}$
4	$1,0 \cdot 10^{-7}$
5	$2,5 \cdot 10^{-7}$
6	$5,0 \cdot 10^{-7}$

III.3.4 Estudo espectrocópico da interação da Fe(TFPP)Cl com ATZ

Este estudo foi realizado em MeOH, registrando-se as variações no espectro de absorção da **Fe(TFPP)Cl** com o aumento da concentração da atrazina e vice-versa, de acordo com método descrito por EGAN *et al.* (1997).

Em uma cela de quartzo 4 alíquotas de 10 μL de uma solução $2,8 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} da Fe(TFPP)Cl em MeOH foram adicionadas a 2,5 mL de uma solução $1,8 \times 10^{-5}$ mol.L^{-1} de ATZ em MeOH. Com o mesmo objetivo foram adicionadas 4 alíquotas de 10 μL de uma solução de ATZ em MeOH a uma solução 2×10^{-6} mol.L^{-1} de Fe(TFPP)Cl em MeOH. Os espectros eram registrados após adição de cada alíquota.

III.3.5 Estudo da oxidação da atrazina

A condição padrão (relação molar) para o estudo da oxidação da atrazina catalisada pelas metaloporfirinas foi 1:60:120 de catalisador:oxidante:substrato, utilizando-se $2,5 \times 10^{-7}$ mol do complexo metaloporfirínico, $1,5 \times 10^{-5}$ mol do oxidante e 3×10^{-5} mol de ATZ em 1500 μ L de solvente. Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente, sob agitação magnética, em frascos de 2 mL com tampa rosqueada de topo aberto, contendo septo de silicone-teflon. O tempo de reação foi de 24 h, após o qual retirava-se uma alíquota do sistema de reação, realizava-se a extração da MeP e injetava-se no CLAE. O estudo foi realizado com as metaloporfirinas solúveis em solvente orgânico, metaloporfirinas suportadas e metaloporfirinas solúveis em água. Foram realizadas reações controle (branco) nas condições estabelecidas como padrão na ausência do catalisador e na ausência do substrato.

III.3.5.1 Metaloporfirinas solúveis em solvente orgânico

O estudo da oxidação da ATZ foi realizado utilizando a Fe(TFPP)Cl, Fe(TDCPP)Cl, Mn(TFPP)Cl e Mn(TDCPP)Cl como catalisadores em dois solventes, MeOH e ACN, e os oxidantes PhIO, m-CBPA e peróxido de hidrogênio, nas condições estabelecidas como padrão. Fez-se também o estudo da atividade catalítica da Fe(TFPP)Cl na ausência de oxigênio (atmosfera de argônio), nas condições padrão e aumentando-se a concentração do oxidante para se obter uma relação molar 1:240:120 de catalisador:oxidante:substrato, utilizando-se $2,5 \times 10^{-7}$ mol do complexo metaloporfirínico, 6×10^{-5} mol do oxidante e 3×10^{-5} mol de ATZ em 1500 μ L de ACN.

Foi realizado um monitoramento da reação de oxidação da ATZ com o sistema Fe(TFPP)Cl/ PhIO em ACN, nas condições padrão, com retiradas de alíquotas da mistura de reação após 10 min, 20 min, 1h, 2h, 3h e 5h para análise.

O efeito da presença de imidazol também foi avaliado para os sistemas Fe(TFPP)Cl/m-CPBA, Mn(TFPP)Cl/m-CPBA e Mn(TDCPP)Cl/m-CPBA. O imidazol foi adicionado em uma relação molar de 1:10 catalisador: ligante. A Tabela III descreve todas as reações realizadas.

Tabela III: Esquema das reações de oxidação da ATZ catalisadas pelas MeP.

	Catalisador	Oxidante	Solvente	Relação molar cat:ox:sub
1.	Fe(TFPP)Cl	PhIO	MeOH	1:60:120

2.	Fe(TFPP)Cl	m-CPBA	MeOH	1:60:120
3.	Fe(TFPP)Cl	PhIO	ACN	1:60:120
4.	Fe(TFPP)Cl	m-CPBA	ACN	1:60:120
5.	Fe(TFPP)Cl	H ₂ O ₂	ACN	1:60:120
6.	Fe(TFPP)Cl	PhIO	ACN	1:240:120
7.	Fe(TFPP)Cl	m-CPBA	ACN	1:240:120
8.	Fe(TFPP)Cl (Ausência de O ₂)	m-CPBA	ACN	1:60:120
9.	Fe(TFPP)Cl (Adição de imidazol)	m-CPBA	ACN	1:60:120
10.	Fe(TDCPP)Cl	PhIO	MeOH	1:60:120
11.	Fe(TDCPP)Cl	m-CPBA	MeOH	1:60:120
12.	Fe(TDCPP)Cl	PhIO	ACN	1:60:120
13.	Fe(TDCPP)Cl	m-CPBA	ACN	1:60:120
14.	Mn(TFPP)Cl	PhIO	MeOH	1:60:120
15.	Mn(TFPP)Cl	m-CPBA	MeOH	1:60:120
16.	Mn(TFPP)Cl	PhIO	ACN	1:60:120
17.	Mn(TFPP)Cl	m-CPBA	ACN	1:60:120
18.	Mn(TFPP)Cl (Adição de imidazol)	m-CPBA	ACN	1:60:120
19.	Mn(TDCPP)Cl	PhIO	MeOH	1:60:120
20.	Mn(TDCPP)Cl	m-CPBA	MeOH	1:60:120
21.	Mn(TDCPP)Cl	PhIO	ACN	1:60:120
22.	Mn(TDCPP)Cl	m-CPBA	ACN	1:60:120
23.	Mn(TDCPP)Cl (Adição de imidazol)	m-CPBA	ACN	1:60:120

III.3.5.2 Fe(TFPP)Cl e Mn(TFPP)Cl suportadas em montmorilonita K-10

O estudo da oxidação da ATZ pelo PhIO, catalisada pelas metaloporfirinas suportadas em montmorilonita K-10 aminofuncionalizada foi realizado em ACN, nas condições estabelecidas como padrão. Para atender essas condições foram utilizados 33 mg do suporte contendo a Fe(TFPP)Cl e 22 mg do suporte contendo a Mn(TFPP)Cl (massa suficiente para obtenção de $2,5 \times 10^{-7}$ mols de MeP) . Esses sistemas suportados foram preparados pelo aluno André Luis de Faria durante a realização do mestrado [FARIA, 2004].

III.3.5.3 Metaloporfirinas solúveis em água

O estudo da oxidação da ATZ foi realizado utilizando Fe(TCPP)Cl e Fe(TMPy)Cl₅, como catalisadores, água e MeOH como solventes da reação, e PhIO como oxidante nas condições estabelecidas como padrão.

III.3.6 Estudo dos intermediários da reação de oxidação da atrazina catalisada pelas metaloporfirinas

III.3.6.1 Estudo preliminar dos intermediários por espectrofotometria UV-Vis.

Este estudo foi realizado utilizando o sistema Fe(TFPP)Cl/PhIO em MeOH e ACN, registrando-se as variações no espectro de absorção por UV-Vis da Fe(TFPP)Cl na presença e ausência do oxidante.

Numa cela de quartzo foi adicionado 1000 μL de uma solução de Fe(TFPP)Cl e ATZ de concentração $2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente, em MeOH ou ACN e os espectros foram registrados. Posteriormente, adicionou-se uma solução de PhIO previamente solubilizada em MeOH ou ACN (3,3 mg/mL), registrando-se o segundo espectro.

III.3.6.2 Identificação por EPR da espécie intermediária formada na reação de oxidação da ATZ catalisada pela Fe(TFPP)Cl em MeOH e ACN.

Os intermediários da reação de oxidação da ATZ para o sistema Fe(TFPP)Cl/ ATZ/ PhIO em MeOH e ACN foram investigados por EPR.

Em um tubo de EPR foi adicionado aproximadamente 100 μL de solução da Fe(TFPP)Cl e ATZ em $3,3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente, em MeOH ou ACN. O tubo foi previamente resfriado em um banho de gelo seco e acetona. Após atingir a temperatura de equilíbrio ($\sim 200 \text{ K}$), o tubo foi transferido para a cavidade do espectrômetro de EPR, a temperatura foi abaixada para $4,4 \text{ K}$ e foi realizada a medida.

No mesmo tubo foi adicionado aproximadamente 100 μL de solução de PhIO em MeOH ou ACN ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$). Repetiu-se o procedimento de resfriamento para realização da primeira medida na presença do oxidante (tempo zero). Em seguida a amostra foi retirada da cavidade, levada à temperatura do banho de gelo seco/ acetona ($\sim -70^\circ\text{C}$) e posteriormente à temperatura ambiente por pequenos intervalos de tempo (10 s, 15 s e 1 min) sendo a seguir resfriada novamente e transferida para a cavidade (4 K) para uma nova medida. Ao final dessas medidas a reação foi mantida à temperatura ambiente por 3 h e novamente registrado o espectro de EPR.

III.3.7 Identificação por MS dos produtos desconhecidos gerados nos estudos da oxidação da ATZ catalisada pelas MeP.

A identificação dos produtos desconhecidos (P) gerados nas reações de oxidação da atrazina, catalisadas pelas metaloporfirinas, foi realizada utilizando a técnica de espectrometria de massas (MS/ESI).

Para que fosse possível a realização dessas análises foi necessário o desenvolvimento de um novo método de separação dos produtos por CLAE, com o objetivo de substituir o tampão fosfato utilizado como fase móvel, o qual é inadequado para o MS.

III.3.7.1 Determinação do novo método de análise dos produtos de oxidação da ATZ por CLAE

O novo método correspondeu a uma adaptação daquele proposto por HANIOKA *et al.* (1998), que analisa a atrazina e os metabólitos DEA, DIA e OHA utilizando como fase móvel a mistura ACN: MeOH: água.

A adaptação foi a utilização de uma solução de ácido acético (0,1 %) em substituição à água. O fluxo da fase móvel foi estabelecido em 1 mL/min, temperatura da coluna 40 °C, análise dos compostos em 228 nm. Nessas condições o tempo de análise foi de 25 min. A Tabela IV mostra a composição da fase móvel.

Tabela IV: Composição da fase móvel (em porcentagem)

Tempo (min)	MeOH: ACN (2 :3 v/v)	HAc (0,1 %)
0 – 10	20 %	80 %
12 – 18	50 %	50 %
22 – 25	20 %	80 %

III.3.7.2 Análise por MS

O volume total da mistura de reação (1500 μL) com o sistema $\text{Fe}(\text{TFPP})\text{Cl}/\text{ACN}/\text{PhIO}$ foi submetido à extração utilizando 4500 μL de hexano e 3000 μL da fase móvel. Após a eliminação da metaloporfirina do meio reacional foram realizadas 4 injeções no CLAE, utilizando o método descrito acima. Os 4 produtos obtidos na reação foram coletados separadamente por meio do coletor de amostras e analisados posteriormente por ESI/MS modo positivo por infusão direta.

III.3.7.3 Análise por CLAE-MS

Os produtos obtidos na reação de oxidação da ATZ utilizando os sistemas $\text{Fe}(\text{TFPP})\text{Cl}/\text{PhIO}$ e $\text{Fe}(\text{TFPP})\text{Cl}/\text{m-CPBA}$, em ACN, foram analisados por CLAE-MS utilizando o modo varredura full scan e o modo SIR (select ion recording). As reações foram realizadas nas condições padrão para os dois oxidantes PhIO e m-CPBA. Após a etapa de extração da FeP, alíquotas reacionais foram injetadas no cromatógrafo utilizando o método de análise desenvolvido para identificação dos produtos por MS.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O metabolismo da atrazina *in vivo* pelo P450 envolve a formação de três metabólitos principais: DEA, DIA e DAA. Em estudos de degradação deste herbicida utilizando sistemas catalíticos como $O_3-H_2O_2$, O_3 -UV, H_2O_2 -UV, TiO_2 -UV e associações entre estes sistemas, [HÉQUET, 2000; CHAN, 2005] verifica-se a formação de outros produtos além destes, tais como OHA, OHDEA, OHDIA, OHDA, entre outros.

Considerando estas informações da literatura, para o estudo de oxidação da atrazina catalisada pelas metaloporfirinas foram utilizados os seguintes compostos comerciais DEA, DIA, DAA, OHA, OHDEA e OHDA (Merck), como padrões para auxiliar na análise e identificação dos produtos obtidos nas reações.

IV.1 Determinação do Método de Análise da Atrazina e Metabólitos por CLAE

Para que fosse possível a análise dos produtos da oxidação da atrazina, catalisadas pelas metaloporfirinas, foi necessário o desenvolvimento do método de análise para os metabólitos conhecidos deste herbicida.

A análise foi baseada em método descrito por HÉQUET *et al.* (2000) e otimizada variando-se a força de eluição da fase móvel.

Inicialmente todos os metabólitos e a atrazina foram injetados isoladamente no CLAE utilizando como fase móvel a mistura tampão fosfato (pH 7) e MeOH, relação 7:3 (corrida isocrática), fluxo de 1 mL/min, análise dos compostos em 220 nm e temperatura do forno a 40 °C. Após essas primeiras injeções dos compostos verificou-se que a ATZ apresentava o maior tempo de retenção na coluna, eluindo somente após 60 min de análise. Verificou-se também que alguns metabólitos como OHDA, DAA e OHDEA interagem pouco com a coluna, eluindo rapidamente, e que poderia ocorrer sobreposição dos picos.

Assim, para obtenção de um método de separação eficiente e rápido foram feitas algumas modificações do método da literatura [HÉQUET, 2000], utilizando-se gradientes de concentração da fase móvel. Para aumentar a interação dos metabólitos mais polares com a fase estacionária da coluna diminuiu-se inicialmente o caráter apolar da fase móvel, diminuindo-se a porcentagem de MeOH na mistura para 10 %. Nessas condições foram eluídos os metabólitos OHDA, DAA e OHDEA com boa separação entre os picos.

Aumentando a porcentagem de MeOH para 25 % foram eluídos os metabólitos DIA, DEA e OHA. Para finalizar utilizou-se uma porcentagem de 50 % de MeOH, aumentando assim o caráter apolar da fase móvel e, com isso, diminuindo o tempo de retenção da ATZ. O tempo de análise foi estabelecido como 40 min. O Esquema 1 mostra a variação da fase móvel no decorrer da análise e o tempo de retenção dos metabólitos e da ATZ. A Figura 14 mostra o cromatograma de análise de uma alíquota da solução equimolar dos metabólitos e atrazina.

Figura 14: Cromatograma de análise dos metabólitos da atrazina por CLAE, Detector UV-vis à 220 nm, tempo de análise 40 min, velocidade do fluxo 1 mL/min, temperatura do forno 40°C.

Esquema 1: Método de análise da atrazina e metabólitos

OHA	22,3
ATZ	32,4

Observando o cromatograma da Figura 14 verifica-se que a quantificação do metabólito OHDAF ficou comprometida em consequência desse composto não interagir com a coluna cromatográfica, eluindo com t_R próximo ao do pico do MeOH. No entanto, esse fato não representou um problema uma vez que, nos estudos com a MeP, não foi observada a formação desse metabólito, assim como no metabolismo *in vivo* e *in vitro* do P-450 [TOPAL, 1996; HANIOKA, 1998; OHKAWA, 1999; CHERIFI, 2001; INUI, 2005; KAWAHIGASHI, 2006].

IV.2 Determinação do Método de Extração das Metaloporfirinas

A extração da MeP do meio reacional para injeção na coluna cromatográfica é uma etapa importante no desenvolvimento do método de análise. A injeção das MeP, juntamente com os produtos de oxidação, levaria a uma rápida degradação da fase estacionária, uma vez que esses complexos poderiam precipitar no interior da coluna, causando o entupimento ou obstrução da mesma.

O método de extração utilizado foi adaptado do método descrito por MAURIN *et al.* (2003) no estudo de oxidação dos fármacos albendazol e disopirâmida, considerando as diferentes solubilidades da ATZ, metabólitos e MeP em solventes orgânicos apolares. A ATZ e seus metabólitos são solúveis em água e solventes orgânicos altamente polares como MeOH e ACN e insolúveis em

solventes como diclorometano, dicloroetano e hexano. Portanto, as MeP foram eliminadas da mistura de reação adicionando-se hexano a uma alíquota da reação e, posteriormente, adicionando-se a fase móvel (tampão fosfato pH 7: MeOH – 90:10). Formam-se duas fases, sendo que o complexo metaloporfirínico permanece na fase orgânica apolar (hexano) e os analitos na fase altamente polar.

Para verificar a eficiência do método de extração e, conseqüentemente, do método de análise, foi preparada uma solução de concentração conhecida contendo todos os metabólitos previstos e a ATZ. Essa mistura foi submetida ao processo de extração descrito acima e, posteriormente, injetou-se no CLAE a fase aquosa contendo os metabólitos. A Tabela V mostra a eficiência do método de análise para cada um dos metabólitos. Todos os compostos apresentaram recuperação acima de 80 %.

Tabela V: Eficiência do método de extração dos metabólitos

<i>Metabólitos</i>	Eficiência (%)
DEA	95
DIA	94
OHA	85
DAA	99
OHDEA	82
OHDA	---

IV.3 Padronização do Método de Análise

A análise quantitativa com maior exatidão requer a presença de um padrão interno conhecido, que tenha como principal característica a habilidade de ser extraído conjuntamente com os demais metabólitos presentes na amostra. Esta característica é garantida pela similaridade de estrutura e reatividade entre padrão e os analitos. No entanto, encontrar um padrão com estas características e que não interfira na análise é bastante difícil. Por este motivo optou-se pela não utilização de padrão interno, como geralmente é proposto nos trabalhos da literatura [MAURIN, 2003; KESERÜ, 1999]. Embora os resultados, nesse caso, não sejam quantitativos, em termos qualitativos o método possui maior confiabilidade.

Na padronização do método de análise por CLAE foi determinado o valor do fator resposta do detector (F_1) para os metabólitos da ATZ, através da construção de curvas de calibração, lançando na abscissa o número de mols dos compostos e na ordenada a área do pico. Através de regressão linear determinou-se o coeficiente linear da curva, que corresponde ao fator resposta do detector. Esse valor foi utilizado na determinação da massa dos produtos e substrato após a etapa de extração, através da equação:

$$n = A_p/F_1 \quad (\text{eq. 1})$$

Onde n corresponde ao número de mols do metabólito e A_p a área do pico do composto. O valor de F_1 encontrado para cada um dos compostos é mostrado na Tabela VI.

Tabela VI: Fator resposta do detector (F_1) para os vários metabólitos

Composto	F_1
DEA	$6,18 \times 10^{12}$
DIA	$6,15 \times 10^{12}$
OHA	$5,24 \times 10^{12}$
DAA	$3,12 \times 10^{12}$
OHDEA	$4,18 \times 10^{12}$
OHDA	-----

IV.4 Estudo Espectroscópico da Interação da Fe(TFPP)Cl com ATZ em MeOH

Foi realizado um estudo espectroscópico da Fe(TFPP)Cl na presença de ATZ (e vice-versa) com o objetivo de verificar possíveis interações entre os dois compostos que pudessem bloquear o sítio catalítico da FeP. A molécula de ATZ possui grupos amino que poderiam coordenar ao Fe da metaloporfirina [EVANS, 2000; SANTOS, 2005] e, com isso, impedir a reação desta com o oxidante, para formar a espécie catalítica.

Como pode ser observado na Figura 15 e 16, não foi verificada nenhuma alteração no espectro da FeP com a adição de ATZ, assim como no espectro da ATZ com a adição da FeP, indicando que não ocorre interação entre o metal e os grupos amino do substrato, ou qualquer outro tipo de interação entre estes compostos.

Figura 15: Variação do espectro de absorção de uma solução $2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ de Fe(TFPP)Cl em MeOH, pela adição de quatro alíquotas de $10 \mu\text{L}$ de uma solução $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ mols/L ATZ em MeOH.

Figura 16: Variação do espectro de absorção de uma solução $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ATZ pela adição de quatro alíquotas de $10 \mu\text{L}$ de uma solução $2,8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ Fe(TFPP)Cl em MeOH.

IV.5 Estudo da Oxidação da Atrazina Catalisada pelas Metaloporfirinas

O estudo da atividade catalítica das metaloporfirinas na oxidação da ATZ foi realizado utilizando metaloporfirinas insolúveis em água, metaloporfirinas solúveis em água e metaloporfirinas suportadas por ligação covalente em montmorilonita aminofuncionalizada.

O iodosilbenzeno (PhIO), oxidante de dois elétrons, foi utilizado inicialmente nas reações, uma vez que esse composto é considerado um “oxidante padrão” dos sistemas catalíticos metaloporfirínicos [GROVES, 2006]. Utilizou-se posteriormente também o ácido metacloroperbenzóico (m-CPBA), um perácido solúvel em solventes orgânicos, muito estudado como oxidante nas reações catalisadas por metaloporfirinas e peróxido de hidrogênio.

De acordo com NAM *et al.* (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, radical ferril ou manganil porfirina π -cátion, $\text{Me(IV)OP}^{\bullet+}$. Pode ocorrer também cisão homolítica da ligação O-O, levando à formação de um intermediário pouco reativo, o MeP(IV)-OH , e radicais $\text{RO}^{\bullet}$, favorecendo a ocorrência de

mecanismos radiculares [NAM, 2000]. A Figura 17 mostra o esquema com os possíveis caminhos para a reação do perácido com as MeP.

Fig.17: Possíveis caminhos para a reação da ferro(III) porfirina com peróxidos [NAM, 2000].

As reações de oxidação da ATZ foram realizadas em MeOH, ACN e água, solventes escolhidos considerando a solubilidade da ATZ e metabólitos. A solubilidade também foi determinante na escolha das condições reacionais, uma vez que o substrato de estudo corresponde a um sólido e apresenta uma solubilidade limitada no volume utilizado para reação (1,5 mL). Inicialmente foi estabelecida a relação molar catalisador: oxidante : substrato de 1: 60: 120, que correspondia a $2,5 \times 10^{-8}$ mol de ferroporfirina, $1,5 \times 10^{-6}$ mol de oxidante e 3×10^{-6} mol de ATZ. Em consequência dos baixos rendimentos obtidos em MeOH (como será discutido no item IV.5.1), com valores de concentrações dos produtos fora da faixa de linearidade do método de análise desenvolvido no CLAE, o número de mols de todos os reagentes foi aumentado por um fator de 10. A relação molar manteve-se a mesma e passou-se a utilizar $2,5 \times 10^{-7}$ mol de ferroporfirina, $1,5 \times 10^{-5}$ mol de oxidante e

3×10^{-5} mol de ATZ (~ 7 mg ATZ /1,5 mL de solvente). Essa condição foi considerada padrão nesses estudos.

IV.5.1 Metaloporfirinas insolúveis em água

O estudo da oxidação da ATZ foi realizado utilizando a Fe(TFPP)Cl, Fe(TDCPP)Cl, Mn(TFPP)Cl e Mn(TDCPP)Cl, metaloporfirinas comerciais de segunda geração, consagradas na literatura como bons catalisadores para oxidação de hidrocarbonetos e fármacos [MEUNIER, 2000]. PhIO, m-CPBA e H₂O₂ foram usados como oxidantes nos meios de MeOH e ACN. A razão molar catalisador: oxidante: substrato foi de 1:60:120 (condição padrão).

A Tabela VII mostra o rendimento total (R %) das reações para cada um dos sistemas, nas diferentes condições, utilizando o PhIO e m-CPBA. As Figuras 18 e 19 mostram os gráficos da distribuição relativa dos produtos, em porcentagem, nas reações em ACN.

Tabela VII: Rendimento total das reações de oxidação da ATZ catalisada pelas metaloporfirinas nas diferentes condições de reação.

Catalisador		Oxidante	MeOH R (%)	ACN R (%)
Fe(TFPP)Cl	1.	PhIO	~1	10
	2.	m-CPBA	2	10
Fe(TDCPP)Cl	3.	PhIO	~1	8
	4.	m-CPBA	~1	14
Mn(TFPP)Cl	5.	PhIO	~1	32
	6.	m-CPBA	~1	11
Mn(TDCPP)Cl	7.	PhIO	~1	3
	8.	m-CPBA	~1	10

Rendimento (%) baseado na quantidade de oxidante inicial após 24 h de reação; relação molar 1:60:120 de catalisador:oxidante:substrato, utilizando-se $2,5 \times 10^{-7}$ mol do complexo metaloporfirínico, $1,5 \times 10^{-5}$ mol do oxidante e 3×10^{-5} mol de ATZ em 1500 μ L de solvente.

Observando a Tabela VII verifica-se que, em MeOH, os sistemas metaloporfirínicos foram ineficientes na oxidação da atrazina, com rendimentos totais de produtos da ordem de 1 %. A atividade catalítica permaneceu baixa mesmo variando-se o ligante porfirínico (TFPP e TDCPP), o metal (Fe e Mn), e o oxidante (PhIO e m-CPBA), indicando que estes fatores não são os responsáveis pelos baixos rendimentos.

Na tentativa de explicar estes resultados foi realizado um estudo espectroscópico da Fe(TFPP)Cl na presença de ATZ, com o objetivo de verificar possíveis interações entre os dois compostos que pudesse impedir a aproximação do oxidante ao sítio metálico, justificando os baixos rendimentos nesse solvente. No entanto, não foi verificada nenhuma interação significativa entre a FeP e a ATZ em MeOH, conforme discutido no item IV.4.

Uma possível explicação para os baixos resultados catalíticos seria que o MeOH estaria agindo como substrato e competindo com o herbicida na reação de oxidação. Nessa competição a oxidação do herbicida seria desfavorável, uma vez que a ATZ é um composto considerado inerte no meio ambiente [ARNOLD, 1995; CHAN, 2005; KAWAHIGASHI, 2006]. Para investigar essa hipótese a mistura de reação foi analisada visando a detecção e quantificação do formaldeído, produto de oxidação do MeOH, por meio do teste de Nash [NASH, 1953], para os sistemas Fe(TFPP)Cl e Mn(TFPP)Cl /PhIO. O teste de Nash consiste na determinação espectrofotométrica do formaldeído que, na presença de uma dicetona e um sal de amônio, forma diacetil-hidrolutidina (DDL), a qual apresenta uma absorção em 412 nm.

Utilizando-se uma curva de calibração previamente construída a partir de soluções padrões, a concentração de formaldeído obtido na reação pode ser calculada e, conseqüentemente, a porcentagem de metanol oxidado foi estimada. Verificou-se que, tanto na presença quanto na ausência da ATZ, o rendimento de formaldeído foi de 75 % para as duas MeP. Esse resultado mostrou que os baixos rendimentos obtidos na oxidação da ATZ em MeOH ocorrem em consequência deste solvente ser preferencialmente oxidado nessas condições, consumindo 75% do oxidante presente no meio.

Em ACN, solvente que não compete com o substrato pela espécie ativa, as MeP foram capazes de oxidar o herbicida, com rendimentos de até 32 % (sistema Mn(TFPP)Cl/ PhIO – Tabela VI - entrada 5). Esse resultado mostra que esses complexos são bons catalisadores, uma vez que se trata de um substrato considerado persistente no meio ambiente e de difícil degradação, até por processos oxidativos avançados [CHAN,2005].

Figura 18: Distribuição em porcentagem dos produtos formados na oxidação da ATZ em ACN, utilizando PhIO como oxidante, nas condições padrão.

Figura 19: Distribuição em porcentagem dos produtos formados na oxidação da ATZ em ACN, utilizando m-CPBA, como oxidante nas condições padrão.

Analisando os resultados pela distribuição relativa dos produtos nas reações de oxidação da ATZ em ACN (Figuras 18 e 19), verifica-se que em todas as reações houve formação de DEA como um dos produtos principais. Em algumas reações observou-se também a formação de DIA. Esses dois compostos correspondem aos principais metabólitos obtidos no metabolismo do P450 *in vivo*, indicando que esses complexos podem ser considerados modelos biomiméticos da enzima.

Além dos metabólitos DEA e DIA, verificou-se também a formação de 5 produtos desconhecidos na oxidação da ATZ, os quais foram denominados P I, P II, P III, P IV e P V, de acordo com a ordem de eluição. O P V correspondeu ao produto formado em maior quantidade para todos os sistemas metaloporfirínicos com os diferentes oxidantes, com exceção do sistema Mn(TFPP)Cl/m-CPBA, em que o DEA foi o mais abundante (Figura 19).

O produto P V foi identificado como um composto contendo uma amida na cadeia etila da ATZ, denominado COA, conforme estrutura da Figura 20. A identificação deste composto será discutida no item IV.7.

Figura 20: Estrutura do COA

Não foi possível a identificação dos demais produtos desconhecidos (P II-IV), em consequência da baixa concentração desses compostos na reação, embora o P IV seja o segundo produto formado em maior quantidade para os sistemas FeP/m-CPBA. Esse composto é provavelmente formado via mecanismo radicalar, uma vez que sua ocorrência nas reações está diretamente relacionada às condições favoráveis à mecanismos radicalares, conforme será discutido posteriormente.

Apesar do sistema P450 *in vivo* ser capaz de eliminar as duas cadeias N-alquílicas laterais do herbicida, com formação dos metabólitos DEA, DIA e DAA [OHKAWA, 1999], os sistemas metaloporfirínicos mostraram preferência em atacar somente a cadeia etila da ATZ, formando como produtos principais os compostos COA e DEA, e apenas traços do metabólito DIA.

Para confirmar essa observação utilizou-se os metabólitos DEA e DIA como substratos para o sistema FeTFPP/ PhIO/ ACN nas condições estabelecidas como padrão. Os resultados destas reações mostraram que a oxidação do DIA levou à formação do metabólito DAA, como esperado, com 10 % de rendimento. Entretanto, quando o substrato era o DEA não foi verificada a formação do metabólito DAA, e observou-se como produto traços do composto OHDEA (rendimento ~1 %). Esses resultados confirmam que o ataque da espécie catalítica à cadeia propila não é favorecido. Provavelmente a cadeia propila impõe um maior impedimento estérico à aproximação da espécie catalítica metalo-oxo de alta valência, responsável pela transferência do oxigênio ao substrato. Os complexos modelos utilizados neste estudo apresentam substituintes volumosos (-Cl e -F) nos anéis fenílicos do macrociclo, dificultando a interação substrato-espécie catalítica.

Na tentativa de confirmar essa hipótese realizou-se uma reação de oxidação da ATZ na presença da Fe(TPP)Cl, metaloporfirina de primeira geração e que não possui substituintes volumosos no anel fenílico. A reação foi realizada nas condições padrão, utilizando o PhIO como oxidante, em ACN. Embora esse complexo seja menos impedido, não foi observado formação de produtos nessas condições, em consequência da MeP ser preferencialmente oxidada (destruição auto-oxidativa). A destruição dos sistemas catalíticos porfirínicos de primeira geração é muito comum em meios reacionais fortemente oxidantes [MEUNIER,2000]. Essa destruição é ainda mais favorecida neste caso pelo fato da ATZ ser um substrato inerte, como já discutido acima.

A diferença nos resultados catalíticos entre os modelos e a enzima mostram a importância da matriz protéica que envolve o sítio catalítico do P450, a qual é responsável por direcionar o substrato, controlando o sítio de oxidação e proteger o sítio catalítico contra a auto-oxidação catalítica. Os modelos biomiméticos são incapazes de reproduzir esse controle por não terem grupos específicos, como os aminoácidos, para interagir com o substrato.

A atividade catalítica do sistema Fe(TFPP)Cl/ACN também foi avaliada utilizando H_2O_2 como oxidante nas condições estabelecidas como padrão. Esse oxidante tem sido muito utilizado em estudos com metaloporfirinas e fármacos por ser considerado um “oxidante limpo”, pois o produto formado na redução do peróxido é a água. Entretanto, não foi observado formação de produtos na oxidação da ATZ, além da destruição do complexo catalisador. Embora o complexo seja de segunda geração, contendo átomos de flúor nos anéis fenilas, estes grupos não foram capazes de evitar a destruição auto-oxidativa do catalisador, provavelmente por envolver radicais $\text{OH}\bullet$ gerados na cisão homolítica da ligação O-O do peróxido.

Na tentativa de compreender o mecanismo de formação dos produtos na oxidação da ATZ, catalisada pelas MeP, em ACN, foram avaliados algumas variáveis de reação como tempo, quantidade de oxidante, presença do ligante imidazol e ausência de O_2 (atmosfera de Ar).

IV.5.1.1 Monitoramento da concentração dos produtos de oxidação da ATZ pelo sistema Fe(TFPP)Cl/PhIO em função do tempo.

Em alguns estudos de degradação da ATZ utilizando outros sistemas catalíticos tais como sistemas envolvendo processos oxidativos avançados, o composto COA corresponde a um intermediário na formação do metabólito DEA [ARNOLD, 1995; CHAN, 2005; KAWAHIGASHI, 2006]. Assim, com o objetivo de verificar se nos sistemas estudados neste trabalho a formação do DEA ocorria via consumo do COA, a reação com o sistema FeTFPP/PhIO/ACN (condições padrão) foi monitorada analisando os produtos após 10, 20 min, 1 h, 2 h, 3 h e 5 h. A Figura 21 mostra o gráfico da variação do número de mols dos produtos principais da reação, COA e DEA, em função do tempo de reação.

Figura 21: Variação do número de mols de COA e DEA em função do tempo na oxidação da ATZ pelo sistema FeTFPP/PhIO/ACN (condições padrão).

Observando o gráfico da Figura 21 verifica-se que para esse sistema catalítico nestas condições, a formação dos compostos COA e DEA são independentes, indicando mecanismos distintos. A formação do DEA nestes sistemas, portanto, ocorre de maneira semelhante aquela catalisada pelo P-450 *in*

vivo e *in vitro*, nos quais o metabólito é formado diretamente, sem a ocorrência de intermediários.

IV.5.1.2 Estudo da oxidação da ATZ pelas MeP na presença de Imidazol (Im)

A influência do ligante imidazol (Im) na atividade catalítica das MeP foi avaliada para os sistemas Mn(TFPP)Cl, Mn(TDCPP)Cl e Fe(TFPP), utilizando o m-CPBA como oxidante.

Para os sistemas envolvendo as MnP, ligantes nitrogenados como imidazol (Im) agem como co-catalisadores, levando a um considerável acréscimo nas velocidades de reação, nos rendimentos catalíticos, e na seletividade [MEUNIER, 1992]. Isso ocorre em consequência da habilidade que esses ligantes nitrogenados possuem em coordenarem à MnP na posição trans- à ligação metal-oxo, estabilizando a espécie intermediária catalítica, Mn(V)OP [GUNTER, 1991]. Esse intermediário é o responsável pelas oxidações estereoseletivas eficientes. A presença do ligante também previne a formação do intermediário Mn(IV)OP, formado pela rápida reação do Mn(V)OP com a Mn(III)P, e responsável por reações do tipo radicalares, não seletivas e pouco eficientes [BATTIONI, 1988; MEUNIER, 1988].

O Im também atua como catalisador ácido-base, favorecendo a cisão heterolítica da ligação peróxido, com a formação do intermediário metal-oxo de alta valência, como mostrado na Figura 22 [BATTIONI, 1988].

Figura 22: Efeito co-catalítico do imidazol para os sistemas mangâneporfirina.

Para os sistemas ferroporfirínicos não é esperado o efeito co-catalítico, uma vez que a bis-coordenação axial é favorecida com esse metal, bloqueando o sítio catalítico e a formação da espécie ativa [EVANS, 2000]. Assim, o objetivo da utilização do imidazol nos sistemas ferroloporfirínicos foi o de favorecer a cisão heterolítica da ligação O-O do perácido, que leva à formação da espécie $Fe(IV)OP^{\bullet+}$, evitando a formação de radicais.

As reações foram realizadas na condição padrão e a relação molar catalisador: ligante foi 1:10.

A Tabela VIII mostra o rendimento total (R %) das reações na presença e ausência do Im, para cada um dos sistemas estudados, e as Figuras 23 e 24 mostram os gráficos da distribuição relativa dos produtos, em porcentagem.

Tabela VIII: Rendimento total das reações de oxidação da ATZ catalisada pelas metaloporfirinas na presença e ausência de Im.

Oxidante	Fe(TFPP)Cl	Mn(TFPP)Cl	Mn(TDCPP)Cl
m-CPBA	10	11	10
m-CPBA + Im	4	2	5

Rendimento (%) baseado na quantidade de oxidante inicial após 24 h de reação; Relação molar 1:10: 60:120 de catalisador:ligante:oxidante:substrato, utilizando-se $2,5 \times 10^{-7}$ mol do complexo metaloporfirínico em 1500 μL de ACN.

Figura 23: Distribuição em porcentagem dos produtos formados na oxidação da ATZ no sistema MnP/m-CPBA/ACN, nas condições padrão e na presença de imidazol.

Figura 24: Distribuição em porcentagem dos produtos formados na oxidação da ATZ no sistema FeP/m-CPBA/ACN, nas condições padrão, e na presença de imidazol.

Observando a Tabela VIII verifica-se que a presença do ligante nitrogenado levou a uma diminuição do rendimento total das reações para todos os sistemas estudados. Esses resultados indicam que o Im pode estar coordenando em ambos os sítios axiais dos metais, bloqueando a reação com o oxidante e substrato. Outra hipótese seria que, assim como o MeOH, o Im estaria atuando como substrato, competindo com a ATZ [COLLMAN, 2000].

Em termos da distribuição de produtos (Figuras 23 e 24), os resultados catalíticos na presença do Im trouxeram informações importantes quanto ao mecanismo da reação.

Para os sistemas MnP verifica-se que a presença de imidazol favoreceu a formação do metabólito DEA, com concomitante diminuição na quantidade do composto COA [sistema Mn(TDCPP)Cl], ou o total desaparecimento desse produto [sistema Mn(TFPP)Cl]. Esses resultados mostram que os dois produtos são formados por mecanismos distintos e competitivos, envolvendo diferentes espécies catalíticas.

Provavelmente o metabólito DEA é formado via espécie Mn(V)OP, a qual é estabilizada na presença do ligante nitrogenado, e o COA é formado via intermediário Mn(IV)OP, o qual é formado pela redução do intermediário Mn(V)OP na ausência do ligante nitrogenado, conforme discutido anteriormente.

Analogamente, para as FeP, o metabólito DEA seria formado via espécie Fe(IV)OP^{•+}, mimetizando o metabolismo do P-450 *in vivo*, e o COA via espécie Fe(IV)OP.

A participação do intermediário Fe(IV)OP nas reações na ausência do ligante nitrogenado, pode ser confirmada pela coloração vermelho brilhante da solução de reação, característica dessa espécie, após a adição do oxidante, e também pela análise dos intermediários por UV-Vis e EPR à baixa temperatura, discutidos no item IV.6.

Nenhuma alteração significativa na relação DEA: COA foi observada na presença de imidazol para o sistema Fe(TFPP)Cl/m-CPBA/ACN. No entanto, observando o gráfico da Figura 24, verifica-se que não ocorreu formação do produto P IV na presença do ligante nitrogenado, e houve um aumento no rendimento do COA. Considerando que a presença do Im desfavorece a produção de radicais e que o P IV é formado apenas nas reações utilizando o perácido como oxidante, concluí-se que esse composto é formado por mecanismo radicalar, resultado da quebra homolítica da ligação O-O.

IV.5.1.3 Estudo da oxidação da ATZ catalisada pela Fe(TFPP)Cl usando excesso de oxidante.

A atividade catalítica da Fe(TFPP)Cl foi avaliada utilizando-se excesso de oxidante em relação ao substrato (relação molar 1:240:120 de catalisador:oxidante:substrato) para os oxidantes PhIO e m-CPBA.

A Tabela IX mostra o rendimento total (R %) destas reações. A Figura 25 mostra a distribuição relativa dos produtos, em porcentagem.

Tabela IX: Rendimento total das reações de oxidação da ATZ catalisada pela Fe(TFPP)Cl na condição de excesso de oxidante.

	R (%)
PhIO ¹	10
PhIO ²	~1
m-CPBA ¹	10
m-CPBA ²	11

Rendimento (%) baseado na quantidade de oxidante inicial após 24 h de reação;

¹ Relação molar 1: 60:120 de catalisador:oxidante:substrato.

² Relação molar 1: 240:120 de catalisador:oxidante:substrato.

Figura 25: Distribuição em porcentagem dos produtos formados na oxidação da ATZ em ACN, catalisadas pela Fe(TFPP)Cl utilizando PhIO e m-CPBA como oxidantes, nas condições padrão (1) e na condição de excesso de oxidante (2).

Verifica-se que o excesso de PhIO leva a um decréscimo no rendimento total das reações, explicado pelo favorecimento da reação competitiva de desproporcionamento catalisado do PhIO, que leva à formação do iodóxibenzênio (PhIO_2) e iodobenzênio (PhI) – reação I [TRAYLOR, 1984].

Ao contrário, o excesso de m-CPBA resultou em um aumento do rendimento total da reação, uma vez que não há reações de desproporcionamento com este oxidante.

Alteração na distribuição relativa dos produtos em função da quantidade de oxidante foi observada somente para o sistema Fe(TFPP)Cl/PhIO, com um aumento na porcentagem do metabólito DEA, e diminuição do metabólito COA na reação com excesso de oxidante (Figura 25). Nestas condições, é provável que o composto COA sofra oxidação adicional, em consequência do excesso de oxidante, levando à produção do DEA.

IV.5.1.4 Estudo da oxidação da ATZ catalisada pela Fe(TFPP)Cl na ausência de O₂.

Uma importante evidência de mecanismo radicalar é a influência do oxigênio na reação. O oxigênio em solução reage com radicais gerados pela ferroporfirina, aumentando o número de espécies radicalares e ocasionando um maior rendimento para os produtos provenientes desse tipo de reação [GROVES,1994]. A ferroporfirina, 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.

Com objetivo de investigar a ocorrência deste tipo de mecanismo foi estudada a atividade catalítica do sistema Fe(TFPP)Cl/m-CPBA na ausência de O₂, utilizando atmosfera de argônio, nas condições padrão.

Nenhuma alteração foi observada nos rendimentos totais das reações na presença e ausência de O_2 . Entretanto, em termos de distribuição dos produtos da reação verifica-se, no gráfico da Figura 26, que houve um aumento no rendimento do COA e não houve formação do produto P IV na ausência de O_2 . Uma vez que o P IV é formado somente no sistema FeP/m-CPBA, esses resultados confirmam a hipótese de que o P IV é formado via mecanismo radicalar, iniciado pela cisão homolítica da ligação O-O do peróxido e propagado pelo O_2 do meio.

Figura 26: Distribuição em porcentagem dos produtos formados na oxidação da ATZ pelo m-CPBA em ACN, catalisadas pela Fe(TFPP)Cl nas condições padrão (1) e na ausência de O_2 (2).

IV.5.2 Oxidação da ATZ pelos sistemas envolvendo a Fe(TFPP)Cl e Mn(TFPP)Cl ancoradas em montmorilonita K-10 aminofuncionalizada

A Fe(TFPP)Cl e Mn(TFPP)Cl ancoradas por ligação covalente em montmorilonita K-10 aminofuncionalizada, FeMONT1 e MnMONT1, foram preparadas pelo aluno André Luis de Faria durante a realização do mestrado (Projeto Fapesp 00/14694-4) [FARIA, 2004].

A montmorillonita corresponde a um silicato cristalino com estrutura lamelar, também conhecido como filossilicato. Esta argila possui um cátion em sua camada lamelar, que trocado por um composto orgânico tal como o grupamento amino (Figura 27), torna-se um suporte adequado para ancoragem de qualquer porfirina que contenha um bom grupo fugitivo. No caso da Me(TFPP)Cl ocorre substituição do átomo de flúor em *para* do anel *meso*-fenila, através de uma reação de substituição nucleofílica aromática com o grupo amino da aminopropilmontmorilonita [LORENA, 1996; FARIA, 2004].

Figura 27: Esquema da estrutura da montmorilonita K-10 funcionalizada com o grupamento amino [FARIA, 2004].

Esses catalisadores mostraram-se eficientes na oxidação do cicloocteno e cicloexano pelo PhIO, com bons rendimentos de produtos quando comparados com os mesmos em solução e com outros sistemas heterogêneos similares descritos na literatura [LORENA,1996].

A atividade catalítica da FeMONT1 e MnMONT1 foi avaliada na oxidação da ATZ pelo PhIO, em ACN, na condição padrão. Para isto utilizou-se 30 mg da FeMONT1 e 22 mg da MnMONT1 em cada reação, suficientes para fornecer $2,5 \times 10^{-7}$ mols de MeP.

Apesar dos excelentes resultados observados na oxidação de hidrocarbonetos, para a ATZ não foi observado formação de produtos com estes sistemas. A ineficiência dos catalisadores suportados na oxidação do herbicida pode ser justificada pela dificuldade do substrato atingir o sítio catalítico, que encontra-se entre as camadas lamelares do suporte.

IV.5.3 Oxidação da ATZ pelos sistemas envolvendo metaloporfirinas solúveis em água

O estudo da oxidação da ATZ foi realizado também utilizando as metaloporfirinas Fe(TCPP)Cl e Fe(TMPy)Cl₅, como catalisadores.

Inicialmente o estudo foi realizado em meio aquoso, utilizando PhIO como oxidante. O PhIO foi escolhido por ser um oxidante padrão para os sistemas metaloporfirínicos e, além disso, os resultados poderiam ser comparados com as

metaloportirinas insolúveis em água. A condição reacional foi estabelecida como a condição padrão utilizada nos estudos com a metaloportirinas solúveis em solvente orgânico (item IV.5.1). A ATZ e o PhIO eram adicionados ao meio reacional por meio de uma solução metanólica de concentração 0,3 mol. L⁻¹ e 0,15 mol. L⁻¹, respectivamente.

Em consequência da baixa solubilidade da ATZ em água (28 mg/L), verificou-se a precipitação do composto após sua adição no meio aquoso, e destruição das ferroportirinas durante a reação, constatada pelo clareamento da solução de reação e confirmada pela ausência da banda Soret no espectro UV-Vis da solução após a reação.

Na tentativa de evitar a precipitação do substrato, as concentrações dos reagentes foram reduzidas por um fator de 10, mantendo a mesma relação molar de 1:60:120 de catalisador: oxidante: substrato. Novamente foi observada a precipitação do substrato e destruição das ferroportirinas.

O solvente de reação foi trocado para MeOH, meio em que ocorreria a solubilização do substrato e catalisadores. As reações foram realizadas nas condições estabelecidas como padrão.

Para as duas metaloportirinas avaliadas foi observado rendimento total abaixo de 1 %, embora não tenha ocorrido destruição das ferroportirinas. Houve formação principal do metabólito DEA, seguido pelo metabólito DIA.

A baixa atividade desses catalisadores pode ser atribuída à competição do MeOH com a ATZ pelo sítio catalítico, sendo preferencialmente oxidado, como já discutido para as metaloportirinas solúveis em solvente orgânico.

O estudo de oxidação da ATZ em meio aquoso ficou comprometido, uma vez que a baixa solubilidade do substrato em água inviabiliza as reações neste solvente. A utilização do MeOH como alternativa para solubilização do substrato e catalisadores também é inviável, uma vez que este solvente é melhor substrato que a ATZ, sendo preferencialmente oxidado.

IV.6 Estudo Preliminar dos Intermediários da Reação de Oxidação da ATZ pelas Metaloporfirinas por UV-Vis e EPR.

Com o objetivo de investigar o papel do solvente nos mecanismos de reação de oxidação da ATZ, foi feita uma investigação preliminar dos intermediários de reação, através de um acompanhamento espectroscópico das reações em ACN e MeOH, utilizando como oxidante o PhIO.

As Figuras 28 e 29 mostram os espectros UV-Vis da solução contendo a Fe(TFPP)Cl e a ATZ em MeOH e ACN respectivamente, na presença e na ausência do oxidante.

Verifica-se que em MeOH, na ausência do oxidante (Figura 28 linha preta), o espectro apresenta uma banda em 580 nm, característica da coordenação deste solvente ao íon ferro (III).

Não há evidências no espectro UV-Vis da Fe(TFPP)Cl em ACN (Figura 29 linha preta) de coordenação deste solvente ao ferro central. Esse espectro mostra uma banda de absorção em 510 nm, além de outra absorção em 350 nm, que são características de ferroporfirinas contendo o íon cloreto como ligante axial.

Apesar destas diferenças no micro-ambiente do sítio metálico, após a adição de PhIO à mistura de reação (Figura 28 e 29 – linha vermelha), observa-se para ambos os solventes, o aparecimento de uma banda em 545 nm, característica da espécie ferril, Fe(IV)OP [NAN, 2000; FUJI, 2002], indicando que ocorre formação do mesmo intermediário de reação para ambos os solventes.

Esses resultados são confirmados pela observação da mudança de coloração da solução reacional após a adição do oxidante, de marrom para vermelho brilhante, característica da espécie ferril, Fe(IV)OP [BELL, 1991].

Figura 28: Espectro UV-Vis da Fe(TFPP)Cl e ATZ em MeOH na ausência () e presença (—).

Figura 29: Espectro UV-Vis da Fe(TFPP)Cl e ATZ em ACN na ausência () e presença (—).

Os espectros de EPR dos intermediários de reação, à baixa temperatura, confirmam a presença das espécies observadas por espectroscopia UV/Vis. Os

espectros de EPR da ferroporfirina inicial em ambos os solventes (Figura 30a e 31a) apresentam os sinais em $g=6,0$ e $g=2,0$, característicos de Fe(III) alto spin ($S=5/2$) [ASSIS, 1991]. Após a adição do PhIO verifica-se um decréscimo na intensidade do sinal em $g=6,0$, indicando a formação de uma espécie EPR “silent”, provavelmente a espécie ferril, Fe(IV)OP (Figura 30a e 31a), como observado por espectroscopia UV/Vis. Observa-se também que em MeOH, ocorre a formação de uma outra espécie intermediária, caracterizada por sinais na região de $g > 6,0$ no espectro de EPR (Figura 30c-e) característicos de Fe (III) com distorção rômica, presente até 60 s de reação e que posteriormente gera a espécie EPR “silent”. Esta espécie distorcida poderia corresponder à Fe(III)P tendo o MeOH coordenado em uma das posições axiais, como indicado pela banda de absorção em 580 nm no espectro UV/Vis do intermediário de reação neste solvente.

Em ACN, os espectros de EPR apresentam evolução semelhante, porém não se observa a formação da espécie com distorção rômica. Estes resultados estão de acordo com a atribuição dos sinais em $g > 6$ à espécie coordenada no MeOH e com os resultados obtidos por UV-Vis, os quais também não indicam coordenação da ACN ao ferro central da ferroporfirina.

Portanto, os resultados preliminares de intermediários da reação de oxidação da ATZ por UV-Vis e EPR confirmam a espécie ferril, Fe(IV)OP como a principal espécie catalítica nestes sistemas.

Figura 30: Espectro de EPR à baixa temperatura (4,4 K) da reação da Fe(TFPP)Cl ($3,3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), ATZ ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$) e PhIO ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$) em MeOH . a) Fe(TFPP)Cl/ATZ b) Adição de PhIO (0s) c) 10 s d) 15 s e) 60 s f) 3 h.

Figura 31: Espectro de EPR à baixa temperatura (4,4 K) da reação da Fe(TFPP)Cl ($3,3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), ATZ ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$) e PhIO ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$) em ACN . a) Fe(TFPP)Cl/ATZ b) Adição de PhIO (0s) c) 15 s d) 60 s e) 3 h f) 5 h.

IV.7 Elucidação Estrutural dos Compostos Desconhecidos Formados na Oxidação da ATZ Catalisada pelas Metaloporfirinas

Para a análise dos produtos desconhecidos obtidos na oxidação da ATZ por espectrometria de massas (MS) foi necessária a eliminação do tampão fosfato presente na fase móvel, utilizada para separação dos produtos por CLAE. A presença dos íons sódio e potássio, presentes no tampão, inibem o processo de ionização por “eletrospray”.

A alternativa para análise das reações por CLAE foi baseada no método de HANIOKA *et al.* (1998). Esse método utiliza como fase móvel a mistura ACN: MEQH: água e analisa a atrazina e os metabólitos DEA, DIA e OHA. Como esses eram os principais produtos formados nas reações catalisadas pelas metaloporfirinas, não houve problemas em excluir os compostos OHDA, OHDEA e DAA.

A adaptação no método de HANIOKA *et al.* envolveu a utilização de gradiente de concentração da fase móvel para obtenção de uma separação eficiente e rápida. Foi utilizada também uma solução aquosa de ácido acético (0,1 %) em substituição à água, para favorecer a ionização dos compostos no espectrômetro de massas. O fluxo da fase móvel foi estabelecido como 1 mL/min, temperatura da coluna 40 °C e tempo de análise 25 min.

Inicialmente, amostras autênticas dos metabólitos e da atrazina foram injetadas separadamente para determinação dos respectivos tempos de retenção. Fez-se a seguir a injeção de uma amostra de reação (após etapa de extração – sistema Fe(TFFPP)Cl/ACN/PhIO) para determinação dos tempos de retenção dos

produtos desconhecidos. Não foi necessária a padronização desse método, uma vez que ele foi utilizado apenas para análise qualitativa dos produtos gerados na oxidação da ATZ.

O Esquema 2 mostra a variação da composição da fase móvel e os respectivos tempos de retenção dos produtos gerados nas reações. As Figuras 32 e 33 mostram o cromatograma de análise dos padrões e da mistura de reação utilizando o sistema $\text{Fe}(\text{TFPP})\text{Cl}/\text{ACN}/\text{PhIO}$, nas condições padrão.

Figura 32: Cromatograma de análise dos metabólitos da atrazina por CLAE. Detector UV-vis à 228 nm, tempo de análise 25 min, velocidade do fluxo 1 mL/min, temperatura do forno 40°C.

Figura 33: Cromatograma da análise por CLAE dos produtos da reação de oxidação da ATZ pelo sistema Fe(TFPP)Cl/ ACN/ PhIO. Detector UV-vis à 228 nm, tempo de análise 25 min, velocidade do fluxo 1 mL/min, temperatura do forno 40°C.

Esquema 2: Método alternativo de análise da atrazina, metabólitos e produtos desconhecidos por CLAE

Composto	T _R (min)	OHA
	0 a 10 min. 20% MeOH:ACN (2:3 v/v)	
	12 a 18 min. 50% MeOH:ACN (2:3 v/v)	1.3
	22 a 25 min. 20% MeOH:ACN (2:3 v/v)	
P I		2.8
DIA		3.9
P III		6.2
DEA		8.5

P V 13.4

ATZ 18.0

No método anterior de análise das reações (item VI.1) a ordem de eluição dos metabólitos era DIA, seguido pelo DEA e OHA. No método modificado para análise dos produtos por MS foi introduzida a ACN, solvente pertencente a outro grupo de polaridade, causando uma alteração na ordem de eluição do metabólito OHA, permanecendo constante os tempos de retenção dos demais compostos. Os produtos gerados na reação de oxidação da ATZ pelo PhIO, catalisada pela Fe(TFPP)Cl, em ACN, foram coletados através do coletor CLAE. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas (ESI+) em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Alberto de Moraes, desse Departamento.

A Tabela X mostra os sinais m/z obtidos na análise dos produtos coletados por ESI/MS e ESI-MS/MS modo positivo. Os respectivos espectros são mostrados nas Figuras 34-39.

Tabela X: Principais fragmentos dos produtos de oxidação da ATZ catalisada pela Fe(TFPP)Cl determinados por ESI-ms e ESI-ms/ms.

Composto	Tempo de retenção (min)	[M+H ⁺]	ESI-ms/ms (m/z)
P I	2.8	----	----
DIA	3.9	174 (Figura 34)	174,146,132,110,104,96,79,68 (Figura 35)

PDIII	6.2	----	----
DEA	8.5	188 (Figura 36)	188,146,110,104,79,68 (Figura 37)
PDV	13.4	230 (Figura 38)	230, 188,146,110,104,79,68 (Figura 39)

Figura 34: Espectro de massas obtido por ESI/MS modo positivo da amostra contendo o produto DIA.

Figura 35: Espectro de massas obtido por ESI/MS/MS modo positivo referente ao sinal m/z 174 da amostra contendo o produto DIA.

Figura 36: Espectro de massas obtido por ESI/MS modo positivo da amostra contendo o produto DEA.

Figura 37: Espectro de massas obtido por ESI/MS/MS modo positivo referente ao sinal m/z 188 da amostra contendo o produto DEA.

Figura 38: Espectro de massas obtido por ESI/MS modo positivo da amostra contendo o produto P V.

Figura 39: Espectro de massas obtido por ESI/MS/MS modo positivo referente ao sinal m/z 230 da amostra contendo o produto P V.

Como se observa na Tabela X e nas Figuras de 34-37, o padrão de fragmentação permitiu comprovar as estruturas dos compostos DIA e DEA para os produtos eluídos com tempo de retenção 3,9 e 8,5 min respectivamente. Em consequência dos produtos PD I e PD III apresentarem-se muito diluídos, não foi possível sua identificação.

O espectro do produto P V apresentou um sinal de m/z 230 e um padrão de fragmentação no ms/ms semelhante ao DEA (Tabela X, Figura 39). Este resultado permitiu a comparação na literatura com fragmentos de compostos formados na degradação da ATZ [ARNOLD, 1995; CHAN, 2005; KAWAHIGASHI, 2006; ROSS, 2006], e a identificação do produto PD V como resultado da formação de uma amida na cadeia lateral etila da atrazina (COA), conforme mostrado na Figura 20.

O composto COA foi o principal produto obtido nas reações de oxidação da atrazina catalisadas pelas metaloporfirinas e é também descrito na literatura para a degradação do

herbicida por processos oxidativos avançados, os quais envolvem o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) [ARNOLD, 1995; CHAN, 2005]. Nesses sistemas, a formação do COA ocorre via abstração do H do carbono secundário da cadeia lateral etilamino da atrazina, produzindo um radical, o qual pode levar a vários intermediários, como mostrado na equação 2 e Figura 35.

Figura 40: Mecanismo de degradação da ATZ por processos oxidativos avançados – etapa de formação do composto COA [ARNOLD, 1995; CHAN, 2005].

A obtenção do COA como principal produto na oxidação da ATZ catalisada pelas MeP nesse estudo é mais uma evidência da participação da espécie Fe(IV)OP como principal espécie catalítica, como indicado pelos estudos de UV-vis e EPR.

Na tentativa de identificar os outros produtos desconhecidos (P I – P IV) utilizou-se a técnica CLAE-MS. As análises foram realizadas em colaboração com a Profa. Pierina Bonato do Departamento de Química e Física da Faculdade de Ciências Farmacêuticas deste campus.

As análises foram realizadas para o sistema Fe(TFPP)Cl/ACN com ambos os oxidantes, PhIO e m-CPBA, nas condições estabelecidas como padrão. O método de análise foi semelhante àquele utilizado para coletar os produtos na análise por espectrometria de massas. Foram utilizados dois modos de varredura, o full scan e o SIR (Select Ion Recording).

Pelo método de varredura full scan não foi possível visualizar os sinais de nenhum dos produtos obtidos na oxidação da ATZ, em consequência da baixa concentração dos mesmos.

Pelo modo SIR, fixando os valores de massa correspondente aos produtos DEA (m/z 188), DIA (m/z 174), e COA (m/z 230), foi possível apenas confirmar as estruturas propostas anteriormente.

Embora tenham sido utilizadas técnicas sofisticadas de análise, a identificação dos produtos desconhecidos P I-IV não foi possível dada à baixa concentração em que são formados nas reações.

IV.8 Esquema para as reações de oxidação da ATZ catalisada pelas metaloporfirinas Me(TFPP)Cl e Me(TDCPP)Cl (Me = Fe ou Mn).

Resumindo as informações obtidas na distribuição relativa dos produtos de oxidação da ATZ nas diferentes condições reacionais, nas hipóteses discutidas e no estudo de intermediários, pode-se propor um esquema para a oxidação do herbicida ATZ, catalisada pelas metaloporfirinas Me(TFPP)Cl e Me(TDCPP)Cl (Me = Fe ou Mn), nas condições estabelecidas nesse estudo. A Figura 43 mostra o esquema reacional proposto.

Figura 41: Esquema proposto para oxidação da ATZ catalisada pelas MeP.

No esquema **A**, utilizando como doador de oxigênio o PhIO, após a formação da espécie ativa, Me(V)OP (ou Me(IV)OP^{•+}), a reação segue por duas vias. A primeira via é biomimética, envolvendo a reação desta espécie catalítica com a ATZ, e levando à formação do metabólito DEA. A segunda via corresponde à reação do intermediário com outra molécula do catalisador, levando à formação da espécie Me(IV)OP. Esta reage novamente com a ATZ, originando o COA. Uma vez que a ATZ corresponde a um substrato pouco reativo e a espécie Me(V)OP é extremamente reativa, a segunda via é favorecida, com o COA predominando na reação. Como o COA pode ser um intermediário do DEA, é possível que, em determinadas condições, como em excesso de oxidante, ele seja novamente oxidado, gerando o DEA.

No esquema **B**, utilizando como oxidante o perácido, a formação da espécie Me(V)OP (ou Me(IV)OP^{•+}), depende da clivagem heterolítica da ligação metal-oxo, favorecida na presença de Im. A formação dessa espécie leva à primeira etapa do esquema **A**, já discutido. A clivagem homolítica da ligação metal-oxo leva à formação da espécie Me(IV)POH e de radicais do tipo RO• que, associados ao oxigênio molecular presente no meio de reação, formariam o composto P IV e outros subprodutos de reação radicalar.

O predomínio da espécie Fe(IV)OP , como detectado por UV-Vis e EPR, além de gerar como produto principal o COA, pode indicar também que o mecanismo de oxidação da ATZ catalisada pelas MeP ocorre via transferência de elétrons. Esse mecanismo propõe a transferência de um elétron do substrato para a espécie catalítica $\text{Fe(IV)OP}^{\bullet+}$, formando a espécie ferril (Fe(IV)OP).

Não pode ser descartada a hipótese de que o produto COA possa ser formado pelo escape do radical do “cage”, de maneira semelhante àquela descrita na literatura para degradação da ATZ pelos processos oxidativos avançados (Figura 40) [ARNOLD, 1995; CHAN, 2005].

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente um dos questionamentos realizados no desenvolvimento de um novo pesticida corresponde à possibilidade do desenvolvimento de resistência pelas espécies alvo, mostrando a importância na elucidação dos mecanismos de resistência e no entendimento do metabolismo desses compostos nos organismos.

Neste contexto, vários estudos têm sido desenvolvidos buscando elucidar o papel da superfamília do citocromo P450, uma das enzimas responsáveis pela seletividade dos herbicidas nas plantas e pelo desenvolvimento da resistência nas plantas daninhas. Entretanto, pouca atenção têm sido dada à utilização de metaloporfirinas, modelos químicos reconhecidos na literatura por mimetizar a ação do P450.

Assim, dada essa lacuna e associando as dificuldades em se trabalhar com a enzima, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de modelos metaloporfirínicos em mimetizar a ação dos P450 na oxidação de um herbicida, a atrazina.

Foram utilizadas metaloporfirinas comerciais de segunda geração consagradas na literatura como catalisadores eficientes na oxidação de hidrocarbonetos e em estudos que visam a elucidar o metabolismo de fármacos.

Os resultados mostraram que as metaloporfirinas foram capazes de oxidar a atrazina, um herbicida com características de persistência no meio ambiente, e mimetizar a ação da enzima *in vivo* e *in vitro*, com formação de dois metabólitos isolados nas plantas: DEA e DIA, resultado da N-desalquilação das cadeias etila e propila do substrato, respectivamente. Embora essa reação não tenha sido demonstrada *in vitro* nas plantas, ela é atribuída ao P450, baseada em estudos com isoformas isoladas de outras espécies.

O DEA correspondeu a um dos principais produtos da reação, e formou-se apenas traços de DIA, mostrando a preferência das metaloporfirinas em oxidar a cadeia etila do composto.

Verificou-se também a formação de cinco produtos desconhecidos, sendo possível apenas a identificação de um deles por espectrometria de massas e CLAE/ES, devido à baixa concentração dos demais, o qual corresponde à formação de uma amida na cadeia etila da atrazina (COA). Esse composto foi o produto de maior rendimento na maioria das reações, confirmando a preferência das metaloporfirinas em reagir com a cadeia etila do herbicida.

A formação de apenas traços do DIA e a não formação do DAA, como ocorre *in vivo*, mostra uma das limitações no uso de modelos químicos, que corresponde à ausência da matriz protéica que envolve o sítio catalítico do P450, responsável por direcionar o substrato, controlando o sítio de oxidação. Os modelos biomiméticos desenvolvidos até agora são incapazes de reproduzir esse controle, por não terem grupos específicos, como os aminoácidos, para interagir com o substrato.

É valido ressaltar também que, embora os produtos de oxidação da atrazina não tenham sido formados em grandes concentrações, em consequência da inércia do substrato, informações importantes foram obtidas a partir das variações da distribuição relativa dos produtos nas diferentes condições, resultando na proposta de um esquema de reação da oxidação da atrazina catalisada pelas metaloporfirinas.

Todos esses resultados mostram o potencial das metaloporfirinas em mimetizar o P450 na transformação dos pesticidas *in vivo*, podendo atuar como importantes ferramentas em estudos que tentam elucidar o metabolismo desses compostos, principalmente nas plantas, nas quais o isolamento de isoformas das enzimas responsáveis pelo metabolismo de detoxificação são extremamente difíceis.

No desenvolvimento de novos compostos ativos, as metaloporfirinas podem também auxiliar na identificação de grupos funcionais susceptíveis ao metabolismo, bem como na identificação de outros produtos que podem ser gerados em quantidades menores, mostrando que outros mecanismos de reação podem estar presentes dependendo das condições de reação.

Finalmente, um dos méritos desse trabalho foi estabelecer no grupo a metodologia para estudos de oxidação de pesticidas, abrindo um novo campo de pesquisa, que, como dito anteriormente é ainda pouco explorado.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, N.H.; LEVI, P.E.; HODGSON, E. In vitro studies of the metabolism of atrazine, simazine, and terbutryn in several vertebrate species. **J. Agric. Foods Chem.** vol. 38, p. 1411-1417, 1990.

ADLER, A.D.; LONGO, F.R.; KAMPAS, F.; KIM, J. **J. Inorg. Nucl. Chem.**, v.32, p.2443, 1970.

ARNOLD, S.M.; HICKEY, W.J.; HARRIS, R.F. Degradation of atrazine by fenton's reagent: Condition optimization and product quantification. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 29, p. 2038-2089, 1995.

ASSIS, M. D.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y.; NASCIMENTO, O. R. An EPR and electronic spectroscopy study of intermediates in a mono *o*-nitro substituted iron porphyrin reaction with iodosylbenzene. **Inorg. Chim. Acta**, vol.187, p 107-114, 1991.

BALOGH, G.T.; KESERU, G.M., Metalloporphyrin mediated biomimetic oxidations. A useful tool for the investigation of cytochrome P450 catalysed oxidative metabolism **ARKIVOC**, vii, p.124-139, 2004.

BATTIONI, P.; RENAUD, J. P.; BARTOLI, J. F.; ARTILES. M. R.; FORT M.; MANSUY, D. Monooxygenase-like oxidation of hydrocarbons by hydrogen peroxide catalyzed by manganese porphyrins and imidazole: selection of the best catalytic system and nature of the active oxygen species. **J. Am Chem. Soc.**, vol.110, p. 8462 - 8463,1988.

BELL, S.E.J.; COOKE, P.R.; INCHLEY, P.; LEANORD, D.R.; SMITH, J.R.L. Oxoiron (IV)Porphyrins derived from charged iron (III) tetraarylporphyrin and chemical oxidations in aqueous and methanolic solutions. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.** vol. 2, p. 549-559, 1991.

BERNADOU, J., MEUNIER, B., Biomimetic Chemical Catalysis in the Oxidative Activation of Drugs **Adv. Synth. & Catal.**, vol. 346, p. 171-184, 2004.

BHAKTA, M. N.; WIMALASENA, K. Microsomal P450-Catalyzed N-Dealkylation of *N,N*-Dialkylanilines: Evidence for a C-H Abstraction Mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 124, p. 1844-1845, 2002.

CHAN, K. H., CHU, W. Atrazine removal by catalytic oxidation processes with or without UV irradiation Part II: an analysis of the reaction mechanisms using LC/ESI-tandem mass spectrometry. **Applied Catalysis B: Environmental** v. 58, p. 165-174, 2005.

CHANDRASENA, R.E.P.; VATSIS, K.P.; COON, M.J.; HOLLENBERG, P.F. ; NEWCOMB, M. Hydroxylation by the hydroperoxy-iron species in cytochrome P-450 enzymes. **J. Am. Chem. Soc.** vol. 126, n. 1, p. 115-126, 2004.

CHERIFI, M. ; RAVETON, M. ; PICCIOCCHI, A. ; RAVANEL, P. ; TISSUT, M. Atrazine metabolism in corn seedlings.**Plant Physiol. Biochem.** vol. 39, p. 665-672, 2001.

CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. Disponível em www.hrac-br.com.br/arquivos/RESIST.ppt. Acesso em 05 de maio de 2006.

COLEMAN, J.; BLAKE-KALFF, M.; DAVIES, E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in Plant Science**, vol.2, p.144-151, 1997.

COLLMAN, J.P.; CHIEN, A. S.; EBERSPACHER, T. A.; ZHONG, M.; BRAUMAN, J.I. Competitive Reaction of Axial Ligands during Biomimetic Oxygenations. **Inorg. Chem.**, vol. 39, p. 4625-4629, 2000.

DENISOV, I. G.; MAKRIS, T. M.; SLIGAR, S. G. ; SCHLICHTING, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450 **Chem. Rev.**, vol.105, p. 2253-2278, 2005.

DORO, F. G.; SMITH, J. R. L.; FERREIRA, A. G.; ASSIS, M. D., Oxidation of alkanes and alkenes by iodosylbenzene and hydrogen peroxide catalysed by halogenated manganese porphyrins in homogeneous solution and covalently bound to silica, **J. Molec. Catal. A: Chem.**, vol. 164, p. 97-108, 2000.

EGAN, T.J.; MAVUSO, W.W.; ROSS, D.C.; MARQUES, H.M. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. **J. Inorg. Biochem.**, vol. 68, p. 137-145, 1997.

EVANS, S.; LINDSAY-SMITH, J.R. The oxidation of ethylbenzene and other alkylaromatics by dioxygen catalysed by iron(III) tetrakis(pentafluorophenyl) porphyrin and related iron porphyrins. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p. 1541 – 1551, 2000.

FAJER J. Mysteries of porphyrin chemistry. **Chem. & Ind.**, p. 869-873, 1991.

FARIA, A.L. Síntese, caracterização e atividade catalítica de novos catalisadores metaloporfirínicos suportados. 2004. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FARIA, A. L.; AIROLDI, C.; DORO, F. G.; FONSECA, M. G. AND ASSIS, M. D. Anchored ironporphyrins—the role of talc-aminofunctionalized phyllosilicates in the catalysis of oxidation of alkanes and alkenes. **Applied Catalysis A: General**, vol. 268, p. 217-226, 2004.

FRAGOSO, D. B.; GUEDES, R.N.C.; LADEIRA, J.A. Selection in the evolution of resistance to organophosphates in *leucoptera coffeella*. **Neotrop. Entomol.** , vol 32, n. 2, 2003.

FUJII, H., Eletronic structure and reactivity of high-valent oxo iron porphyrin, **Coord. Chem. Rev.**, vol. 226, p. 51-60, 2002.

FUKUSHIMA, M.; FUJISAWA, T.; KATAGI, T. Tomato Metabolism and porphyrin catalysed oxidation of pyriproxyfen. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 53, p. 5353-5358, 2005.

GONSALVES, A. D. M. R.; PEREIRA, M. M., State of the art in the development of biomimetic oxidation catalysts. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 113, p. 209, 1996.

GOTARDO, M.C.A. F., SACCO, H.C., SILVA FILHO, J.C.; FERREIRA, A.G.; TEDESCO, A.C.; ASSIS, M.D. A novel crowned porphyrin derived from meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin **J. Porphyrins Phthalocyanines**, vol. 7, p. 399-404, 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. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 229, p. 137-143, 2005.

GROVES, J.T.; NEMO, T.E.; MYERS, R.S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphyrin complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 101, p. 1032-1033, 1979.

GROVES J. T.; HAN, Y. Z.; MONTELANO, P. R. O. **Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry**. P. R. Ortiz de Montellano Ed., Plenum Press, New York, 1995.

GROVES, J. T., High-valent iron in chemical and biological oxidations. **J. Inorg. Biochem.**, 2006, in press.

GUEDES, A. A.; 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. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 16, p. 835-843, 2005.

GUEDES, A. A.; SANTOS, A. C. M. A.; ASSIS, M. D. Evaluation of some parameters in the mechanism for the oxidation of styrene catalyzed by three generations of ironporphyrins, **Kin. Cat**, 2006, in press.

GUNTER, M.J.; TURNER, P. Metalloporphyrins as models for the cytochromes P-450. **Chem. Rev.**, vol. 108, p. 115-160, 1990.

GUNTER, M.J.; TURNER, P. The role of the axial ligand in mesotetraarylmetalloporphyrin models of the P-450 cytochromes. **J. Mol. Catal.**, vol. 66, p. 121-126, 1991.

HALKIER, B.A. Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry**, vol. 43, n. 1 p. 1-21, 1996.

HANIOKA, N.; JINNO, H.; KITAZAWA, K.; TANAKA-KAGAWA, T.; NISHIMURA, T.; ANDO, M.; OGAWA, K. In vitro biotransformation of atrazine by rat liver microsomal cytochrome P450 enzymes. **Chemico-biological interactions**, vol. 116, p. 181-198, 1998.

HATANO, K., K. M. SAFO, A. WALKER AND W. R. SCHEIDT, Models of cytochromes b. Attempts to control axial ligand orientation with a "hindered" porphyrin system. **Inorg. Chem.**, vol. 30, p.1643-1648. 1991.

HÉQUET, V; CLOIREC, P. L.; GONZALEZ, C. ; MEUNIER, B., Photocatalytic degradation of atrazine by porphyrin and phthalocyanine complexes. **Chemosphere**, vol. 41, p. 379-386, 2000.

HOLM, R.H.; SOLOMON, E.I. Preface: biomimetic inorganic chemistry. **Chem. Rev**, vol.104, p.347-348, 2004.

IAMAMOTO Y.; ASSIS, M. D.; CIUNFFI, K. J.; SACCO, H. C.; IWAMOTO, L.; MELO, A. J. B.; NASCIMENTO, O. R.; PRATO, C. M. C. Factors which affect the catalytic activity of iron(III) meso tetrakis(2,6-dichlorophenyl) porphyrin chloride in homogeneous system. **J. Mol. Cat. A: Chem.**, vol. 109, p. 189 - 200, 1996.

INUI, H.; OHKAWA,H. Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian P450 monooxygenase genes. **Pest Manag. Sci.** vol. 61, p. 286-291, 2005.

JACOMINI, A. E. Bioacumulação do herbicida atrazina pelas espécies de bivalves límnicos *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) e *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) 2002. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

KADISH, K. M. in **The Porphirin Handbook**, Smith K. M., Guillard R. Kadish K. M., Eds Academic Press, New York, vol. 4, ch. 30, 2000.

KARKI, S. B.; DINNOCENZO, J. P.; JONES, J. P.; KORZEKWA, K. R. Mechanism of oxidative amine dealkylation of substituted N,N-Dimethylanilines by Cytochrome P-450: application of isotope effects profiles. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 117, p. 3657-3664, 1995.

KHATISASHVILI, M.; GORDEZIANI, G.; KVESITADZE, A.; KORTE, F. Plant Monooxygenases: Participation in Xenobiotic Oxidation. **Ecotoxicol. Environm. Safety**, vol. 36, p. 118-122 G, 1997.

KAWAHIGASHI, H.; HIROSE, S.; OHKAWA, H. OHKAWA, Y. Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 54, p. 2985-2991, 2006.

KESERÜ, G. M., BALOGH, G., CZUDOR, I., KARANCSI, T., FEHER, A., BERTOK, B. Chemical Models of Cytochrome P450 Catalysed Insecticide Metabolism. Application to the Oxidative Metabolism of Carbamate Insecticides **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 762-769, 1999.

LANG, D.H.; RETTIE, A.E.; BOCKER, R.H. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbutylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. **Chem. Res. Toxicol.** vol. 10, p. 1037-1044, 1997.

LIPPARD S.J.; BERG, J.M. **Principles of bioinorganic chemistry**. University Science Book, 1994.

LORENA, M. A. M, P. BATTIONI, W. KLEEMIS, J. F. BARTOLI, D. MANSUY, Manganese porphyrins covalently bound to silica and montmorillonite K10 as efficient catalysts for alkene and alkane oxidation by hydrogen peroxide. **J. Molec. Catal. A: Chem.**, vol 113, p. 343–353, 1996.

LOUREIRO, M.E.; MARTINEZ,C. Fotossíntese – Parte 2 - Material didático de apoio à disciplina BVE 270. Disponível em <http://www.ufv.br/dbv/pgfvg/Bve%20270/pdf/fotossintese2.pdf>. Acesso em 20 de Maio de 2006.

MAC LEOD, T.C.O.; GUEDES, D.F.C.; GOTARDO, M.C.A.F.; SCHIAVON, M.A.; YOHIDA, I.V.P.; CIUFFI, K.J; ASSIS. M.D., Investigation of a new oxidative catalytic system involving Jacobsen`s catalytic in the absence of organic solvents. **Applied Catalysis A: General**, vol. 296, p. 120-127, 2005.

MANSUY, D. Activation of alkanes : The biomimetic Approach. **Coord. Chem. Rev.** vol. 125, p. 129 - 142, 1993.

MANSUY D. AND BATTIONI P. **Metalloporphyrins in catalytic oxidations**. New York: Marcel Dekker Inc., Cap.4, 1994.

MANSUY, D., P. BATTIONI AND J.P. BATTIONI, Chemical model systems for drugmetabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases. **Eur J. Biochem.**, vol. 184, p.267 – 273, 1989.

MANSUY, D., BATTIONI P.; **Bioinorganic Catalysis**, 2nd ed., New York: Marcel Dekker, New York, 1999.

MANSUY, D.; OTHMAN, S.; MOURIES, V. M.; BENSOUSSAN, C.; BATTIONI, PIERRETTE, Hydroxylation of diclofenac: an illustration of the complementary roles of biomimetic metalloporphyrin catalysts and yeasts expressing human cytochromes P450 in drug metabolism studies, **Bioorganic and medicinal chemistry**, vol. 3, p.751–755, 2000.

MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** vol. 47, p. 127-158, 1996.

MAURIN, A.J.M.; IAMAMOTO, Y.; LOPES, N. P.; LINDSAY-SMITH, J.R.; BONATO, P.S. LC-MS-MS Identification of Drug Metabolites Obtained by Metalloporphyrin Mediated Oxidation. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 14, p. 322-328, 2003.

MELO, A. J. B.; IAMAMOTO, Y.; MAESTRIN, A. P. J.; SMITH. J. R. L., SANTOS, M. D.; LOPES, N. P.; BONATO, P. S. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphyrins, **J. Mol. Cat. A: Chem.**, vol. 226, p. 23-31, 2005.

MEUNIER, B. Metalloporphyrin as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. **Chem. Rev.** v. 92, p.1411-1456,1992. *

MEUNIER, B.; ROBERT, A. ; PRATVIEL G. Metalloporphyrins in catalytic oxidations and oxidative DNA cleavage. In: KADISH, K. M.; SMITH, K.M.; GUILARD, R. **The Porphyrin Handbook**. New York: New York Academic Press, 2000. vol.4, cap. 31, p.119- 187.

MEUNIER, B. **Biomimetic Oxidations Catalized by Transition Metal Complexes**. ed. 1, London: Imperial College Press, 1999.

MEYER, D.; LEIFELS, T; SBARAGLI, L. AND WOGGON, W.D. Reactivity of a new class of P450 enzyme models. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 338, p. 372-377, 2005.

MILES, C. S.; OSAT, T. W. B.; NOBLE, M. A.; MUNRO, A. W.; CHAPMAN, S. K. Protein engineering of cytochromes P-450, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. vol. 1543, p. 383-407, 2000.

MONTELLANO, P.R.O. **Cytochrome P450 structure, mechanism biochemistry**. New York: Plenum Press, 1995.

MONTELLANO, P. R. O.; **Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and biochemistry** ed. 3, New York: Plenum Press 2004.

MORANT, M.; BAK, S.; MOLLER, B. L.; REICHHART, D.W. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 14, p. 151-162, 2003.

MOREIRA, M. S. M.; MARTINS, P. R.; CURI, R. B.; NASCIMENTO, O. R.; IAMAMOTO, Y. Iron porphyrins immobilised on silica surface and encapsulated in silica matrix: a comparison of their catalytic activity in hydrocarbon oxidation, **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 233, p. 73-81, 2005.

NAM, W., HAN, H. J., OH, S. Y., LEE, Y. J., CHOI, M. H., HAN, S.Y., KIM, C., 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) Porphyrins Complexes. **J. Am. Chem Soc.**, vol. 122, p. 8677-8684, 2000.

NASH, T. **Biochem.**, vol. 55, p. 146, 1953.

NELSON, D.L.; COX, M.C. **Lehninger, Principles of Biochemistry**, ed. 4 New York: W.H. Freeman and Company 2004.

NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS, I.C.; NEBERT, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, vol. 6, p. 1 - 42, 1996.

NELSON, D.R. Cytochrome P450 and the Individuality of Species **Arch. of Biochem. and Biophys.**, vol. 369, p. 1-10, 1999.

OHKAWA, H.; TSUJII, H.; OHKAWA, Y. The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops: a review. **Pesticide Science** v.55, p. 867-874, 1999.

RAVEN, P. H.; BERG, L.R.; JOHNSON, G.B. **Environment – 1995 version**. Saunders College Publishing, 1993, cap. 22, p. 493-517.

REICHHART, D.W.; HEHN, A.; DIDIERIEAN, L. Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in plant science**, vol.5, n.3, p.116-123, 2000.

ROSS, M.K.; FILIPOV, N.M. Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis. **Analytical Biochemistry**, vol.351, p. 161-173, 2006.

SANTOS, A.C.M.A. Investigação das propriedades de interação e propriedades catalíticas de ferro(III) porfirinas na oxidação de um fármaco antimalárico. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SANTOS, A.C.M.A., SMITH, J.R.L.; ASSIS, M.D. Chloroquine-iron(III) tetra-arylporphyrin interactions and their effect on chloroquine oxidations catalysed by iron(III) tetra-arylporphyrin. **J. Porphyrins Phthalocyanines**, vol. 9, n. 5 p. 326-333, 2005.

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. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol 174, p.213-222, 2001.

SCOTT, J.G. Cytochrome P450 and insecticide resistance **Insect Biochem. And Molecular Biology**, vol.29, p.757-777, 1999. *

SHAREFKIN, J.G; SALTZMAN, H. Iodosobenzene **Org. Syntheses Coll.**, v.5, p.658, 1973.

SHELDON, R.A. **Metalloporphyrins in catalytic oxidations**, 1a ed. New York: Marcel Deckker, Inc. ch. 1, 1994.

SILVA FILHO, J.C., FERREIRA, A.G., GOTARDO M.C.A.F, ASSIS, M.D. monocrowned substituted ironporphyrin: synthesis, analytical properties and catalytic activity. **J. Porphyrin and Phthalocyanines**, vol. 9, p. 637-645, 2005.

SMITH, J.R.L.; MONTIMER, D. N. Model systems for cytochrome P450. Part 5¹ Amine Oxidation. Parte 17² Oxidative N-dealkylation of tertiary amines by metalloporphyrin-catalysed mode systems for Cytochrome P450 monooxygenases. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II**, p.1743-1749, 1986.

TRAYLOR, P.S.; DOLPHIN, D.;TRAYLOR, T.G. Sterically protected hemins with electronegative substituents: efficient catalysts for hydroxylation and epoxidation. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, 279, 1984.

TRAYLOR T.G., Kinetics and mechanism studies in biomimetic chemistry: metalloenzyme model systems, **Pure and Appl. Chem.**, vol. 63, p. 265-274, 1991.

TOPAL, A.; ADAMS, N.; HODGSON, E.; KELLY, S.L. In vitro metabolism of atrazine by tulip cytochrome P450. **Chemosphere**. vol. 32, n.7, p.1445-1451,1996.

VINHADO, F. S.; SMITH, J. R. L.; IAMAMOTO, Y. Oxidation of alkanes by iodosylbenzene (PhIO) catalysed by supported Mn(III) porphyrins: Activity and mechanism. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 252, p. 23-30, 2006.

VINHADO, F. S.; MARTINS, P. R.; IAMAMOTO, Y. Metalloporphyrins as efficient models of heme-enzymes in oxidation reactions. **Current Topics in Catalysis**, vol. 3, p. 199-213, 2002.

WOGGON, W. D. Metalloporphyrins as active site analogues – lessons from enzymes and enzyme models. **Acc. Chem. Res.**, vol. 38, p. 127-136, 2005.

ZAMPRONIO, E.C.; GOTARDO, M.C.A.F.; ASSIS, M.D.; OLIVEIRA, H.P. Catalytic oxidation of cyclohexane and cyclooctene over a new metalloporphyrin supported on VOPO₄ catalyst. **Catalysis Letters**, vol. 104, n. 1-2, p.53-56, 2005.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, N.H.; LEVI, P.E.; HODGSON, E. In vitro studies of the metabolism of atrazine, simazine, and terbutryn in several vertebrate species. **J. Agric. Foods Chem.** vol. 38, p. 1411-1417, 1990.

ADLER, A.D.; LONGO, F.R.; KAMPAS, F.; KIM, J. **J. Inorg. Nucl. Chem.**, v.32, p.2443, 1970.

ARNOLD, S.M.; HICKEY, W.J.; HARRIS, R.F. Degradation of atrazine by fenton's reagent: Condition optimization and product quantification. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 29, p. 2038-2089, 1995.

ASSIS, M. D.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y.; NASCIMENTO, O. R. An EPR and electronic spectroscopy study of intermediates in a mono *o*-nitro substituted iron porphyrin reaction with iodosylbenzene. **Inorg. Chim. Acta**, vol.187, p 107-114, 1991.

BALOGH, G.T.; KESERU, G.M., Metalloporphyrin mediated biomimetic oxidations. A useful tool for the investigation of cytochrome P450 catalysed oxidative metabolism **ARKIVOC**, vii, p.124-139, 2004.

BATTIONI, P.; RENAUD, J. P.; BARTOLI, J. F.; ARTILES. M. R.; FORT M.; MANSUY, D. Monooxygenase-like oxidation of hydrocarbons by hydrogen peroxide catalyzed by manganese porphyrins and imidazole: selection of the best catalytic system and nature of the active oxygen species. **J. Am Chem. Soc.**, vol.110, p. 8462 - 8463,1988.

BELL, S.E.J.; COOKE, P.R.; INCHLEY, P.; LEANORD, D.R.; SMITH, J.R.L. Oxoiron (IV)Porphyrins derived from charged iron (III) tetraarylporphyrin and chemical oxidations in aqueous and methanolic solutions. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.** vol. 2, p. 549-559, 1991.

BERNADOU, J., MEUNIER, B., Biomimetic Chemical Catalysis in the Oxidative Activation of Drugs **Adv. Synth. & Catal.**, vol. 346, p. 171-184, 2004.

BHAKTA, M. N.; WIMALASENA, K. Microsomal P450-Catalyzed N-Dealkylation of *N,N*-Dialkylanilines: Evidence for a C-H Abstraction Mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 124, p. 1844-1845, 2002.

CHAN, K. H., CHU, W. Atrazine removal by catalytic oxidation processes with or without UV irradiation Part II: an analysis of the reaction mechanisms using LC/ESI-tandem mass spectrometry. **Applied Catalysis B: Environmental** v. 58, p. 165-174, 2005.

CHANDRASENA, R.E.P.; VATSIS, K.P.; COON, M.J.; HOLLENBERG, P.F. ; NEWCOMB, M. Hydroxylation by the hydroperoxy-iron species in cytochrome P-450 enzymes. **J. Am. Chem. Soc.** vol. 126, n. 1, p. 115-126, 2004.

CHERIFI, M. ; RAVETON, M. ; PICCIOCCI, A. ; RAVANEL, P. ; TISSUT, M. Atrazine metabolism in corn seedlings.**Plant Physiol. Biochem.** vol. 39, p. 665-672, 2001.

CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. Disponível em www.hrac-br.com.br/arquivos/RESIST.ppt. Acesso em 05 de maio de 2006.

COLEMAN, J.; BLAKE-KALFF, M.; DAVIES, E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in Plant Science**, vol.2, p.144-151, 1997.

COLLMAN, J.P.; CHIEN, A. S.; EBERSPACHER, T. A.; ZHONG, M.; BRAUMAN, J.I. Competitive Reaction of Axial Ligands during Biomimetic Oxygenations. **Inorg. Chem.**, vol. 39, p. 4625-4629, 2000.

DENISOV, I. G.; MAKRIS, T. M.; SLIGAR, S. G. ; SCHLICHTING, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450 **Chem. Rev.**, vol.105, p. 2253-2278, 2005.

DORO, F. G.; SMITH, J. R. L.; FERREIRA, A. G.; ASSIS, M. D., Oxidation of alkanes and alkenes by iodosylbenzene and hydrogen peroxide catalysed by halogenated manganese porphyrins in homogeneous solution and covalently bound to silica, **J. Molec. Catal. A: Chem.**, vol. 164, p. 97-108, 2000.

EGAN, T.J.; MAVUSO, W.W.; ROSS, D.C.; MARQUES, H.M. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. **J. Inorg. Biochem.**, vol. 68, p. 137-145, 1997.

EVANS, S.; LINDSAY-SMITH, J.R. The oxidation of ethylbenzene and other alkylaromatics by dioxygen catalysed by iron(III) tetrakis(pentafluorophenyl) porphyrin and related iron porphyrins. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p. 1541 – 1551, 2000.

FAJER J. Mysteries of porphyrin chemistry. **Chem. & Ind.**, p. 869-873, 1991.

FARIA, A.L. Síntese, caracterização e atividade catalítica de novos catalisadores metaloporfirínicos suportados. 2004. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FARIA, A. L.; AIROLDI, C.; DORO, F. G.; FONSECA, M. G. AND ASSIS, M. D. Anchored ironporphyrins—the role of talc-aminofunctionalized phyllosilicates in the catalysis of oxidation of alkanes and alkenes. **Applied Catalysis A: General**, vol. 268, p. 217-226, 2004.

FRAGOSO, D. B.; GUEDES, R.N.C.; LADEIRA, J.A. Selection in the evolution of resistance to organophosphates in *leucoptera coffeella*. **Neotrop. Entomol.** , vol 32, n. 2, 2003.

FUJII, H., Eletronic structure and reactivity of high-valent oxo iron porphyrin, **Coord. Chem. Rev.**, vol. 226, p. 51-60, 2002.

FUKUSHIMA, M.; FUJISAWA, T.; KATAGI, T. Tomato Metabolism and porphyrin catalysed oxidation of pyriproxyfen. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 53, p. 5353-5358, 2005.

GONSALVES, A. D. M. R.; PEREIRA, M. M., State of the art in the development of biomimetic oxidation catalysts. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 113, p. 209, 1996.

GOTARDO, M.C.A. F., SACCO, H.C., SILVA FILHO, J.C.; FERREIRA, A.G.; TEDESCO, A.C.; ASSIS, M.D. A novel crowned porphyrin derived from meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin **J. Porphyrins Phthalocyanines**, vol. 7, p. 399-404, 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. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 229, p. 137-143, 2005.

GROVES, J.T.; NEMO, T.E.; MYERS, R.S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphyrin complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 101, p. 1032-1033, 1979.

GROVES J. T.; HAN, Y. Z.; MONTELANO, P. R. O. **Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry**. P. R. Ortiz de Montellano Ed., Plenum Press, New York, 1995.

GROVES, J. T., High-valent iron in chemical and biological oxidations. **J. Inorg. Biochem.**, 2006, in press.

GUEDES, A. A.; 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. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 16, p. 835-843, 2005.

GUEDES, A. A.; SANTOS, A. C. M. A.; ASSIS, M. D. Evaluation of some parameters in the mechanism for the oxidation of styrene catalyzed by three generations of ironporphyrins, **Kin. Cat**, 2006, in press.

GUNTER, M.J.; TURNER, P. Metalloporphyrins as models for the cytochromes P-450. **Chem. Rev.**, vol. 108, p. 115-160, 1990.

GUNTER, M.J.; TURNER, P. The role of the axial ligand in mesotetraarylmetalloporphyrin models of the P-450 cytochromes. **J. Mol. Catal.**, vol. 66, p. 121-126, 1991.

HALKIER, B.A. Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry**, vol. 43, n. 1 p. 1-21, 1996.

HANIOKA, N.; JINNO, H.; KITAZAWA, K.; TANAKA-KAGAWA, T.; NISHIMURA, T.; ANDO, M.; OGAWA, K. In vitro biotransformation of atrazine by rat liver microsomal cytochrome P450 enzymes. **Chemico-biological interactions**, vol. 116, p. 181-198, 1998.

HATANO, K., K. M. SAFO, A. WALKER AND W. R. SCHEIDT, Models of cytochromes b. Attempts to control axial ligand orientation with a "hindered" porphyrin system. **Inorg. Chem.**, vol. 30, p.1643-1648. 1991.

HÉQUET, V; CLOIREC, P. L.; GONZALEZ, C. ; MEUNIER, B., Photocatalytic degradation of atrazine by porphyrin and phthalocyanine complexes. **Chemosphere**, vol. 41, p. 379-386, 2000.

HOLM, R.H.; SOLOMON, E.I. Preface: biomimetic inorganic chemistry. **Chem. Rev**, vol.104, p.347-348, 2004.

IAMAMOTO Y.; ASSIS, M. D.; CIUNFFI, K. J.; SACCO, H. C.; IWAMOTO, L.; MELO, A. J. B.; NASCIMENTO, O. R.; PRATO, C. M. C. Factors which affect the catalytic activity of iron(III) meso tetrakis(2,6-dichlorophenyl) porphyrin chloride in homogeneous system. **J. Mol. Cat. A: Chem.**, vol. 109, p. 189 - 200, 1996.

INUI, H.; OHKAWA,H. Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian P450 monooxygenase genes. **Pest Manag. Sci.** vol. 61, p. 286-291, 2005.

JACOMINI, A. E. Bioacumulação do herbicida atrazina pelas espécies de bivalves límnicos *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) e *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) 2002. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

KADISH, K. M. in **The Porphirin Handbook**, Smith K. M., Guillard R. Kadish K. M., Eds Academic Press, New York, vol. 4, ch. 30, 2000.

KARKI, S. B.; DINNOCENZO, J. P.; JONES, J. P.; KORZEKWA, K. R. Mechanism of oxidative amine dealkylation of substituted N,N-Dimethylanilines by Cytochrome P-450: application of isotope effects profiles. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 117, p. 3657-3664, 1995.

KHATISASHVILI, M.; GORDEZIANI, G.; KVESITADZE, A.; KORTE, F. Plant Monooxygenases: Participation in Xenobiotic Oxidation. **Ecotoxicol. Environm. Safety**, vol. 36, p. 118-122 G, 1997.

KAWAHIGASHI, H.; HIROSE, S.; OHKAWA, H. OHKAWA, Y. Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 54, p. 2985-2991, 2006.

KESERÜ, G. M., BALOGH, G., CZUDOR, I., KARANCSI, T., FEHER, A., BERTOK, B. Chemical Models of Cytochrome P450 Catalysed Insecticide Metabolism. Application to the Oxidative Metabolism of Carbamate Insecticides **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 762-769, 1999.

LANG, D.H.; RETTIE, A.E.; BOCKER, R.H. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbutylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. **Chem. Res. Toxicol.** vol. 10, p. 1037-1044, 1997.

LIPPARD S.J.; BERG, J.M. **Principles of bioinorganic chemistry**. University Science Book, 1994.

LORENA, M. A. M, P. BATTIONI, W. KLEEMIS, J. F. BARTOLI, D. MANSUY, Manganese porphyrins covalently bound to silica and montmorillonite K10 as efficient catalysts for alkene and alkane oxidation by hydrogen peroxide. **J. Molec. Catal. A: Chem.**, vol 113, p. 343–353, 1996.

LOUREIRO, M.E.; MARTINEZ,C. Fotossíntese – Parte 2 - Material didático de apoio à disciplina BVE 270. Disponível em <http://www.ufv.br/dbv/pgfvg/Bve%20270/pdf/fotossintese2.pdf>. Acesso em 20 de Maio de 2006.

MAC LEOD, T.C.O.; GUEDES, D.F.C.; GOTARDO, M.C.A.F.; SCHIAVON, M.A.; YOHIDA, I.V.P.; CIUFFI, K.J; ASSIS. M.D., Investigation of a new oxidative catalytic system involving Jacobsen`s catalytic in the absence of organic solvents. **Applied Catalysis A: General**, vol. 296, p. 120-127, 2005.

MANSUY, D. Activation of alkanes : The biomimetic Approach. **Coord. Chem. Rev.** vol. 125, p. 129 - 142, 1993.

MANSUY D. AND BATTIONI P. **Metalloporphyrins in catalytic oxidations**. New York: Marcel Dekker Inc., Cap.4, 1994.

MANSUY, D., P. BATTIONI AND J.P. BATTIONI, Chemical model systems for drugmetabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases. **Eur J. Biochem.**, vol. 184, p.267 – 273, 1989.

MANSUY, D., BATTIONI P.; **Bioinorganic Catalysis**, 2nd ed., New York: Marcel Dekker, New York, 1999.

MANSUY, D.; OTHMAN, S.; MOURIES, V. M.; BENSOUSSAN, C.; BATTIONI, PIERRETTE, Hydroxylation of diclofenac: an illustration of the complementary roles of biomimetic metalloporphyrin catalysts and yeasts expressing human cytochromes P450 in drug metabolism studies, **Bioorganic and medicinal chemistry**, vol. 3, p.751–755, 2000.

MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** vol. 47, p. 127-158, 1996.

MAURIN, A.J.M.; IAMAMOTO, Y.; LOPES, N. P.; LINDSAY-SMITH, J.R.; BONATO, P.S. LC-MS-MS Identification of Drug Metabolites Obtained by Metalloporphyrin Mediated Oxidation. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 14, p. 322-328, 2003.

MELO, A. J. B.; IAMAMOTO, Y.; MAESTRIN, A. P. J.; SMITH. J. R. L., SANTOS, M. D.; LOPES, N. P.; BONATO, P. S. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphyrins, **J. Mol. Cat. A: Chem.**, vol. 226, p. 23-31, 2005.

MEUNIER, B. Metalloporphyrin as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. **Chem. Rev.** v. 92, p.1411-1456,1992. *

MEUNIER, B.; ROBERT, A. ; PRATVIEL G. Metalloporphyrins in catalytic oxidations and oxidative DNA cleavage. In: KADISH, K. M.; SMITH, K.M.; GUILARD, R. **The Porphyrin Handbook**. New York: New York Academic Press, 2000. vol.4, cap. 31, p.119- 187.

MEUNIER, B. **Biomimetic Oxidations Catalized by Transition Metal Complexes**. ed. 1, London: Imperial College Press, 1999.

MEYER, D.; LEIFELS, T; SBARAGLI, L. AND WOGGON, W.D. Reactivity of a new class of P450 enzyme models. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 338, p. 372-377, 2005.

MILES, C. S.; OSAT, T. W. B.; NOBLE, M. A.; MUNRO, A. W.; CHAPMAN, S. K. Protein engineering of cytochromes P-450, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. vol. 1543, p. 383-407, 2000.

MONTELLANO, P.R.O. **Cytochrome P450 structure, mechanism biochemistry**. New York: Plenum Press, 1995.

MONTELLANO, P. R. O.; **Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and biochemistry** ed. 3, New York: Plenum Press 2004.

MORANT, M.; BAK, S.; MOLLER, B. L.; REICHHART, D.W. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 14, p. 151-162, 2003.

MOREIRA, M. S. M.; MARTINS, P. R.; CURI, R. B.; NASCIMENTO, O. R.; IAMAMOTO, Y. Iron porphyrins immobilised on silica surface and encapsulated in silica matrix: a comparison of their catalytic activity in hydrocarbon oxidation, **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 233, p. 73-81, 2005.

NAM, W., HAN, H. J., OH, S. Y., LEE, Y. J., CHOI, M. H., HAN, S.Y., KIM, C., 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) Porphyrins Complexes. **J. Am. Chem Soc.**, vol. 122, p. 8677-8684, 2000.

NASH, T. **Biochem.**, vol. 55, p. 146, 1953.

NELSON, D.L.; COX, M.C. **Lehninger, Principles of Biochemistry**, ed. 4 New York: W.H. Freeman and Company 2004.

NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS, I.C.; NEBERT, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, vol. 6, p. 1 - 42, 1996.

NELSON, D.R. Cytochrome P450 and the Individuality of Species **Arch. of Biochem. and Biophys.**, vol. 369, p. 1-10, 1999.

OHKAWA, H.; TSUJII, H.; OHKAWA, Y. The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops: a review. **Pesticide Science** v.55, p. 867-874, 1999.

RAVEN, P. H.; BERG, L.R.; JOHNSON, G.B. **Environment – 1995 version**. Saunders College Publishing, 1993, cap. 22, p. 493-517.

REICHHART, D.W.; HEHN, A.; DIDIERIEAN, L. Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in plant science**, vol.5, n.3, p.116-123, 2000.

ROSS, M.K.; FILIPOV, N.M. Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis. **Analytical Biochemistry**, vol.351, p. 161-173, 2006.

SANTOS, A.C.M.A. Investigação das propriedades de interação e propriedades catalíticas de ferro(III) porfirinas na oxidação de um fármaco antimalárico. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SANTOS, A.C.M.A., SMITH, J.R.L.; ASSIS, M.D. Chloroquine-iron(III) tetra-arylporphyrin interactions and their effect on chloroquine oxidations catalysed by iron(III) tetra-arylporphyrin. **J. Porphyrins Phthalocyanines**, vol. 9, n. 5 p. 326-333, 2005.

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. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol 174, p.213-222, 2001.

SCOTT, J.G. Cytochrome P450 and insecticide resistance **Insect Biochem. And Molecular Biology**, vol.29, p.757-777, 1999. *

SHAREFKIN, J.G; SALTZMAN, H. Iodosobenzene **Org. Syntheses Coll.**, v.5, p.658, 1973.

SHELDON, R.A. **Metalloporphyrins in catalytic oxidations**, 1a ed. New York: Marcel Deckker, Inc. ch. 1, 1994.

SILVA FILHO, J.C., FERREIRA, A.G., GOTARDO M.C.A.F, ASSIS, M.D. monocrowned substituted ironporphyrin: synthesis, analytical properties and catalytic activity. **J. Porphyrin and Phthalocyanines**, vol. 9, p. 637-645, 2005.

SMITH, J.R.L.; MONTIMER, D. N. Model systems for cytochrome P450. Part 5¹ Amine Oxidation. Parte 17² Oxidative N-dealkylation of tertiary amines by metalloporphyrin-catalysed mode systems for Cytochrome P450 monooxygenases. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II**, p.1743-1749, 1986.

TRAYLOR, P.S.; DOLPHIN, D.;TRAYLOR, T.G. Sterically protected hemins with electronegative substituents: efficient catalysts for hydroxylation and epoxidation. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, 279, 1984.

TRAYLOR T.G., Kinetics and mechanism studies in biomimetic chemistry: metalloenzyme model systems, **Pure and Appl. Chem.**, vol. 63, p. 265-274, 1991.

TOPAL, A.; ADAMS, N.; HODGSON, E.; KELLY, S.L. In vitro metabolism of atrazine by tulip cytochrome P450. **Chemosphere**. vol. 32, n.7, p.1445-1451,1996.

VINHADO, F. S.; SMITH, J. R. L.; IAMAMOTO, Y. Oxidation of alkanes by iodosylbenzene (PhIO) catalysed by supported Mn(III) porphyrins: Activity and mechanism. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 252, p. 23-30, 2006.

VINHADO, F. S.; MARTINS, P. R.; IAMAMOTO, Y. Metalloporphyrins as efficient models of heme-enzymes in oxidation reactions. **Current Topics in Catalysis**, vol. 3, p. 199-213, 2002.

WOGGON, W. D. Metalloporphyrins as active site analogues – lessons from enzymes and enzyme models. **Acc. Chem. Res.**, vol. 38, p. 127-136, 2005.

ZAMPRONIO, E.C.; GOTARDO, M.C.A.F.; ASSIS, M.D.; OLIVEIRA, H.P. Catalytic oxidation of cyclohexane and cyclooctene over a new metalloporphyrin supported on VOPO₄ catalyst. **Catalysis Letters**, vol. 104, n. 1-2, p.53-56, 2005.

DADOS CURRICULARES

1. Dados Pessoais

Nome: Maria Carolina Alves de Freitas Gotardo

Filiação: Marisa H. D. Alves de Freitas e Vatercides Vilela de Freitas

Nascimento: 15/05/1978

Naturalidade: Franca-SP

Estado Civil: Casada

Documento de Identidade: 21189609-3

Cadastro de pessoa Física: 269050778-10

Endereço residencial: Rua do Professor, 600 Apto. 192 Jd. Irajá - Ribeirão Preto

Telefone: 16 3623 8859

e-mail: gotardo_carol@hotmail.com

Endereço profissional: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia

Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química

Av. Bandeirantes, 3900 - Laboratório de Bioinorgânica

Monte Alegre - Ribeirão Preto

14040-901, SP - Brasil

Telefone: 16 3602 4374

2. Formação Acadêmica

GRADUAÇÃO

- **BACHARELADO em QUÍMICA** – Instituto de Química de Araraquara - UNESP
- Campus de Araraquara. Concluído em 1999.

PÓS-GRADUAÇÃO

- **MESTRADO EM CIÊNCIAS – ÁREA :QUÍMICA**

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP - Campus de Ribeirão Preto. Bolsista
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Concluído em 2002.

- **MBA EM GESTÃO AMBIENTAL - ESPECIALIZAÇÃO (LATO SENSU)**

FUNDACE - Fundação para Pesquisa e Desenvolvimento da Administração, Contabilidade e Economia.
Fundação vinculada a Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da USP – Campus Ribeirão Preto.

Concluído em 2003.

- **DOUTORADO EM CIÊNCIAS – ÁREA :QUÍMICA**

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP - Campus de Ribeirão Preto. Bolsista FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

3. Trabalhos científicos publicados

- **M.C.A.F. Gotardo**, H.C. Sacco, J.C.S. Filho, A.G. Ferreira, A.C. Tedesco, M.D. Assis “A novel crowned porphyrin derived from the meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin”. **J. Porphyrins Phthalocyanines** 7 (2003) p.399-404.
- **M.C.A.F. Gotardo**, A.A. Guedes, M.A. Schiavon, N.M. José, I.V.P. Yoshida, M.D. Assis “Polymeric membranes: the role this support plays in the reactivity of the different generations of metalloporphyrins.” **Journal of Molecular Catalysis: Chemical** 229 (2005) p. 137-143.
- A.C. Pelegrino, **M.C.A.F. Gotardo**, A. R. Simioni, M.D. Assis, A.C. Tedesco, “Photophysical Properties of Crowned Porphyrins” *Photochemistry and Photobiology*, 81, (2005) p. 771–776.
- E. C. Zampronio, **M. C. A. F. Gotardo**, M. D. Assis, H. P. Oliveira “Catalytic oxidation of cyclohexane and cyclooctene over a new metalloporphyrin supported on VOPO₄ catalyst”. **Catalysis Letters** 104 (2005) p. 53-56.
- J.C.S. Filho, A.G. Ferreira, **M.C.A.F. Gotardo**, M.D. Assis “Mono-crowned substituted ironporphyrin: synthesis, analytical properties and catalytic activity” **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** vol. 9, p. 637-645, 2005.

- T.C.O. Mac Leod, D.F.C. Guedes, **M.C.A.F. Gotardo**, M.A. Schiavon, I.V.P. Yoshida, K.J. Ciuffi, M.D. Assis. "Investigation of a new oxidative catalytic system involving Jacobsen's catalyst in the absence of organic solvents". **Applied Catalysis A: General** vol. 296, p. 120-127, 2005.

4. Trabalho científico enviado para publicação

- Metalloporphyrins as biomimetic models for cytochrome P-450 in the oxidation of atrazine – M.C.A.F. Gotardo, L.A. B. de Moraes, M. D. Assis. Enviado para publicação na **J. Agric. Food Chem.** em Junho de 2006.