



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Laboratório de Química de Superfícies

**Utilização do material híbrido orgânico-inorgânico
celulose-óxido de titânio para imobilização de alguns
catalisadores**

TESE DE DOUTORADO

Aluno: Sílvio Luís Pereira Dias

Orientador: Yoshitaka Gushikem

Campinas – SP

Fevereiro / 2003

UNIDADE	ICQ
Nº CHAMADA	I/unicamp
	17543H
V	EX
TOMBO BC/	54491
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	RS-11,00
DATA	29/06/03
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

CM0018674B-0

BIB ID 295332

D543p

Dias, Sílvio Luís Pereira

Utilização do material híbrido orgânico-inorgânico, celulose-óxido de titânio para imobilização de alguns catalisadores / Sílvio Luís Pereira Dias. -- Campinas, SP: [s.n], 2002.
Orientador: Yoshitaka, Gushikem.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Eletrodos modificados. 2. Imobilização de biocatalisadores. 3. Planejamento fatorial. 4. Porfirinas I. Gushikem, Yoshitaka. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

“Um químico além de ser polivalente, precisa ser multivariado.”

(Roy Edwards Bruns)

Dedico este trabalho a minha
esposa *Sonia* e ao meu filho *Artur*.

Agradecimentos

O meu agradecimento especial ao Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem, pela sua amizade, orientação competente, constante incentivo e confiança depositada em mim, o que sem dúvida, contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional, e para que eu pudesse alcançar os objetivos deste trabalho.

Agradeço a Sonia e ao Artur pela paciência, longa espera e incentivo para que eu pudesse concluir este trabalho.

Agradeço a minha mãe Juracy, a Sandra e a Dona Zenith por terem me substituído nos cuidados com a educação, segurança e lazer do Artur.

Agradeço ao meu colega Prof. Dr. Edilson pela sua amizade, apoio e constante incentivo durante a realização deste trabalho.

Agradeço especialmente ao Emerson, meu companheiro de trabalho, que com sua amizade, apoio e dedicação contribuiu decisivamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Também agradeço especialmente a Dona Enilda e ao Anderson, pelo excelente convívio nas tardes de domingo e por praticamente terem me aceito como um membro da família.

Aos Profs. Drs. Aníta J. Marsaioli e Roy E. Bruns pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Lauro T. Kubota pela amizade, conhecimentos transmitidos e pela contribuição para a correção final deste trabalho.

Ao Profs. Drs. Cláudio Airoidi, Ivo M. Raimundo Jr, pelos comentários qualificados que muito contribuíram para a redação final deste trabalho.

A todo o pessoal do laboratório: Prof. Dr. Aécio, Aécio, Akira, Alexandre, Almir, Ana Mauricéia, André, Angélica, Prof. Dr. Cajá, Christiana, Cláudia, César, Cícero, Claudemir, Gislene, Ilauro, Neusa, Lincoln, Suzana, Toshio, Vanusa, William e Zeca, pela agradável convivência e amizade durante a realização deste trabalho.

A todos os técnicos e servidores do Instituto de Química sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao pessoal da CPG e da biblioteca.

À CAPES/PICDT pela bolsa concedida.

Agradeço ao Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química da UFRGS pela oportunidade concedida de complementar os meus estudos acadêmicos.

RESUMO

Título: *“Utilização do material híbrido orgânico-inorgânico celulose-óxido de titânio para a imobilização de alguns catalisadores”*

Autor: Sílvio Luís Pereira Dias

Orientador: Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem

Palavras chave: celulose, óxido de titânio, oxigênio dissolvido, azul de metileno, planejamento fatorial, oxidação enantiosseletiva

No presente trabalho a celulose foi modificada com o óxido de titânio (IV) e utilizada como matriz para a realização de dois estudos eletroquímicos e um estudo biocatalítico. Primeiramente, a hematoporfirina IX e a protoporfirina IX foram imobilizadas sobre o suporte sólido com posterior metalação por Co (II). Estes dois materiais apresentaram a capacidade de eletrocatalisar a redução de oxigênio dissolvido a um potencial de $-0,15\text{ V}$ e $-0,20\text{ V}$ vs ECS em pH 7,0, respectivamente. Os potenciais de redução do O_2 permaneceram constantes entre pH 3,0 e 7,0, enquanto que os estudos utilizando-se eletrodo de disco rotatório indicaram que o material Cel/TiO₂/CoHMP é mais eficiente catalisador do que o material Cel/TiO₂/CoPP para a redução de oxigênio dissolvido.

No segundo estudo, o azul de metileno foi imobilizado sobre os materiais Cel/TiO₂ e Cel/TiO₂/HP0₄ e foram investigadas as propriedades eletroquímicas e o comportamento do corante como mediador de elétrons. O sistema eletródico quimicamente modificado foi estudado realizando-se um planejamento fatorial de dois níveis e três variáveis. As observações experimentais e a análise de dados

indicaram que o fator pH é uma variável inerte e não está envolvido em qualquer efeito importante. O uso de uma solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹ com uma superfície de celulose modificada Cel/Ti(MBPO₄) em ambos os valores de pH 4,0 ou 7,0 são as condições ótimas para este sistema.

A imobilização do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 sobre o material Celulose/TiO₂ focou a preparação de compostos sulfóxidos com alto teor de excesso enantiomérico, ee ≥ 95 %, através da oxidação enantiosseletiva de sulfetos. As células imobilizadas foram observadas por MEV indicando uma boa aderência do fungo sobre o suporte sólido. O rendimento do sulfóxido e o excesso enantiomérico indicaram que as células imobilizadas mantêm atividade por pelo menos 90 dias, com resultados comparáveis com os obtidos com células do microrganismo não imobilizado.

ABSTRACT

Title: *"Utilization of organic-inorganic hybrid material of cellulose and titanium oxide for the immobilization of some catalysts"*

Author: Sílvio Luís Pereira Dias

Promotor: Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem

Key words: cellulose, titanium oxide, dissolved oxygen, methylene blue, factorial design, enantioselective oxidation

In the present work cellulose-modified titanium oxide (IV) was prepared and used as a matrix for two electrochemical studies and one biocatalytic study. First, hematoporphyrin IX and protoporphyrin IX were immobilized on the solid support with subsequent metallation by Co (II). These materials showed their electrocatalyst capacity of dissolved oxygen reduction at a potential of -0.15 V and -0.20 V vs SCE at pH 7.0, respectively. The O_2 reduction potentials remained constant between pH 3.0 and 7.0 and studies with rotating disk electrode indicated that Cel/TiO₂/CoHMP material is more efficient catalyst than Cel/TiO₂/CoPP material for dissolved oxygen reduction.

In the second study, methylene blue was immobilized on Cel/TiO₂ and Cel/TiO₂/HPO₄ materials. The electrochemical properties and behavior of the dye as electron mediator were investigated. The chemically modified electrode system was evaluated using a factorial design with three variables in two levels. The experimental results and the analysis of the data indicated that pH is an inert

variable and is not involved in any important effect. Use a 0.5 mol L⁻¹ NaCl solution with the modified cellulose Cel/Ti(MBPO₄) at both pH 4.0 or 7.0 were the best conditions for this system.

The immobilization of the *Aspergillus terreus* CCT 3320 fungi on the Cel/TiO₂ focused on the preparation of sulfoxide compounds with a high enantiomeric excess, ee ≥ 95%, through the enantioselective oxidation of sulfides. The immobilized cells were observed by MEV, indicating a good adherence of the fungus on the solid support. The sulfoxide yield and the enantiomeric excess indicated that the immobilized cells maintained their activity for at least 90 days, with results comparable to those obtained with non-immobilized microorganisms cells.

CURRICULUM VITAE

1. Pós Graduação

Mestrado em Química, na área de Química Analítica – Universidade de São Paulo – USP (concluído em dezembro de 1994).

Título da tese: “Estudo potenciométrico sobre a determinação das constantes de formação entre o índio (III) e azoteto de sódio em meio aquoso e em diferentes temperaturas”.

Orientador: Roberto Tokoro

2. Formação superior

Bacharelado em Química – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS (1984-1987).

Licenciatura em Ciências de 1º e 2º Graus – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS (1980-1983).

3. Atividades profissionais

Professor Assistente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS (desde 1996).

Professor Assistente da Universidade Paulista - UNIP (1989 a 1995).

4. Trabalhos publicados e submetidos

1. S. L. P. Dias, Y. Gushikem, E. S. Ribeiro, E. V. Benvenutti, “Cobalt(II) hematoporphyrin (IX) and protoporphyrin (IX) complexes immobilized on highly dispersed on titanium (IV) oxide on a cellulose microfiber surface: electrochemical properties and dissolved oxygen reduction study”, *J. Electroanal. Chem.* 523, 2002, 64.

-
2. **S. L. P. Dias**, S. T. Fujiwara, Y. Gushikem, R. E. Bruns, "Methylene blue immobilized on cellulose surfaces modified with titanium dioxide and titanium phosphate: Factorial design optimization of redox properties", *J. Electroanal. Chem.* 531, **2002**, 141.

 3. A. L. M. Porto, F. Cassiola, **S. L. P. Dias**, I. Joekes, Y. Gushikem, J. A. R. Rodrigues, P. J. S. Moran, G. P. Manfio, A. J. Marsaioli, "*Aspergillus terreus* CCT 3320 immobilized on chrysotile or cellulose/TiO₂ for sulfide oxidation", *J. Molec Catal. B* 810, **2002**, 1.

 4. Vanusa S. O. Ruiz, **S. L. P. Dias**, Y. Gushikem, R. E. Bruns C. Airoidi, "Full factorial design applied to intercalation of amines in lamellar titanium phenylphosphonate and phenylarsenate", *J. Solid State Chem.* submetido (**2002**).

 5. E. S. Ribeiro, **S. L. P. Dias**, S. T. Fujiwara, Y. Gushikem, R. E. Bruns, "Electrochemical study and complete factorial design of toluidine blue immobilized on the binary oxide SiO₂/Sb₂O₃", *J. Appl. Electrochem.* submetido (**2002**).

4. Trabalhos apresentados em congressos e simpósios

1. E. S. Ribeiro, **S. L. P. Dias**, S. T. Fujiwara, Y. Gushikem, R. E. Bruns, "Electrochemical study and complete factorial design of toluidine blue immobilized on the binary oxide SiO₂/Sb₂O₃", **XV CBECIMAT**, Natal, RN (**novembro/2002**).

2. **S. L. P. Dias**, E. S. Ribeiro, Y. Gushikem, "Eletrorredução de oxigênio pela protoporfirina IX de cobalto (II) imobilizada sobre celulose/TiO₂", **XV SIBAE**, Congresso da Sociedade Ibero-Americana de Electroquímica, Évora, Portugal (**setembro/2002**).

3. Vanusa S. O. Ruiz, **S. L. P. Dias**, Y. Gushikem, R. E. Bruns C. Airoidi, "Full factorial design applied to intercalation of amines in lamellar titanium phenylphosphonate and phenylarsenate", **XI Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry**, Ouro Preto, MG (**setembro/2002**).

4. **S. L. P. Dias**, S. T. Fujiwara, Y. Gushikem, R. E. Bruns, "Azul de metileno imobilizado na superfície da celulose modificada com TiO_2 e $\text{Ti}(\text{HPO}_4)_2$: Otimização da propriedades redox do corante" **25ª Reunião Anual da SBQ**, Poço de Caldas, MG (**maio/2002**).

5. A. L. M. Porto, **S. L. P. Dias**, P. J. S. Moran, Y. Gushikem, A. Marsaioli, "Oxidação de vários arilalquiltioéteres com *Aspergillus terreus* CCT 3320 e imobilização em uma nova fase sólida de Celulose/ TiO_2 ", **Workshop Biocatálise em Química Orgânica**, USP, São Paulo, SP (**fevereiro/2002**).

6. A. L. M. Porto, **S. L. P. Dias**, P. J. S. Moran, Y. Gushikem, A. Marsaioli, "Immobilization of *Aspergillus terreus* CCT 3320 on a new cellulose/ TiO_2 solid phase", **Proceedings of the 5th Biotrans Conference**, Darmstadt University of Technology, Darmstadt, Germany (**setembro/ 2001**).

7. **S. L. P. Dias**, E. S. Ribeiro, Y. Gushikem, "Eletrorredução de oxigênio pela hematoporfirina IX de cobalto (II) imobilizada sobre celulose/ TiO_2 ", **11º ENQA**, UNICAMP, Campinas, SP (**setembro/2001**).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XXI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XXIV
PRINCIPAIS SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XXV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Materiais híbridos orgânicos e inorgânicos.....	1
1.2. Celulose.....	4
1.3. Materiais híbridos de celulose com óxidos metálicos.....	8
1.4. Imobilização de catalisadores.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
3. <i>SENSOR ELETROQUÍMICO PARA O OXIGÊNIO DISSOLVIDO</i>	17
3.1. INTRODUÇÃO.....	17
3.2. EXPERIMENTAL.....	21
3.2.1. Materiais.....	21
3.2.2. Preparação da matriz Cel/TiO ₂	21
3.2.3. Imobilização e metalação das porfirinas sobre a matriz Cel/TiO ₂	22
3.2.4. Análise gravimétrica e análise elementar.....	23
3.2.5. Determinação da quantidade de cobalto incorporado na estrutura das porfirinas.....	23
3.2.6. Medidas eletroquímicas.....	24

3.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	27
3.2.8. Espectrofotometria de Reflectância Difusa.....	27
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.3.1. Dispersão de TiO ₂ na superfície de celulose.....	28
3.3.2. Adsorção e posterior metalação das porfirinas na Cel/TiO ₂	30
3.3.3. Eletrorredução do oxigênio dissolvido.....	33
3.3.4. Aplicação como sensor para oxigênio dissolvido.....	40
3.3.5. Estudos com eletrodo de disco rotatório.....	44
3.4. CONCLUSÕES.....	46
4. OTIMIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES REDOX DO AZUL DE METILENO ADSORVIDO PELA APLICAÇÃO DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL.....	48
4.1. INTRODUÇÃO.....	48
4.2. EXPERIMENTAL.....	51
4.2.1. Materiais.....	51
4.2.2. Preparação da matriz Cel/TiO ₂	51
4.2.3. Imobilização do fosfato na matriz Cel/TiO ₂	51
4.2.4. Imobilização do corante azul de metileno nas matrizes Cel/TiO ₂ e Cel/Ti(HPO ₄).....	52
4.2.5. Medidas eletroquímicas.....	53
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.4. CONCLUSÕES.....	64

5. EFEITO DA IMOBILIZAÇÃO DO ASPERGILLUS TERREUS CCT 3320 EM CELULOSE/TiO ₂ NA OXIDAÇÃO DE SULFETO PRÓ-QUIRAL.....	65
5.1. INTRODUÇÃO.....	65
5.2. EXPERIMENTAL.....	68
5.2.1. Materiais.....	68
5.2.2. Preparação da matriz Cel/TiO ₂	68
5.2.3. Condições de crescimento para as culturas de microrganismos.....	69
5.2.4. Imobilização no suporte de Cel/TiO ₂	69
5.2.5. Síntese do aril alquil tioéter: (m-clorofenil-etil-sulfeto).....	69
5.2.6. Atividade enzimática e monitoração.....	70
5.2.7. Atividade enzimática do microrganismo imobilizado na matriz Cel/TiO ₂	71
5.2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	72
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.4. CONCLUSÕES.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da unidade de repetição básica da celulose denominada de celobiose.....	5
Figura 2. Estrutura básica das porfirinas (porfina).....	17
Figura 3. Esquema do eletrodo de pasta de carbono.....	25
Figura 4. Esquema da cela eletroquímica utilizada.....	26
Figura 5. Esquema do eletrodo de disco rotatório.....	27
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura para a) fibra de celulose pura (10000X); b) o material Cel/TiO ₂ (10000X) e c) mapeamento do elemento Ti (1500X).....	29
Figura 7. Espectros de UV-Visível da (1) hematoporfirina e (2) protoporfirina: a) imobilizada e não-metalada sobre Cel/TiO ₂ de simetria D _{2h} e b) imobilizada e metalada sobre Cel/TiO ₂ de simetria D _{4h}	31
Figura 8. Estrutura da hematoporfirina IX e da protoporfirina IX imobilizadas na matriz de Cel/TiO ₂ e o processo de metalação.....	32
Figura 9. Voltamogramas cíclicos para a) Cel/TiO ₂ /H ₂ HMP, [O ₂] = 9,5 mg L ⁻¹ ; b) Cel/TiO ₂ /H ₂ PP, [O ₂] = 9,6 mg L ⁻¹ ; c) Cel/TiO ₂ /CoHMP, [O ₂] = 9,3 mg L ⁻¹ ; d) Cel/TiO ₂ /CoPP, [O ₂] = 9,2 mg L ⁻¹ . Medições em KCl 1,0 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	34

Figura 10. Corrente de pico de redução catódico em relação a velocidade de varredura: (●) Cel/TiO ₂ /CoHMP, [O ₂] = 9,5 mg L ⁻¹ ; (■) Cel/TiO ₂ /CoPP, [O ₂] = 9,7 mg L ⁻¹ . Condições: KCl 1,0 mol L ⁻¹ e pH 6,0.....	40
Figura 11. Voltamogramas cíclicos para Cel/TiO ₂ /CoHMP (1) e Cel/TiO ₂ /CoPP (2) em várias concentrações de oxigênio dissolvido. Figuras inseridas: gráfico das correntes de pico catódico em função das concentrações de O ₂ . Condições: KCl 1,0 mol L ⁻¹ , pH 6,0 e velocidade de varredura 20 mV s ⁻¹	41
Figura 12. Cronoamperogramas para Cel/TiO ₂ /CoHMP E = - 0,18 V (1) e Cel/TiO ₂ /CoPP E = - 0,22 V (2) em várias concentrações de oxigênio dissolvido. Figuras inseridas: gráfico das correntes de pico catódico em função das concentrações de O ₂ . Condições: KCl 1,0 mol L ⁻¹ , pH 6,0 e velocidade de varredura 20 mV s ⁻¹	43
Figura 13. (A) Gráfico de Levich e (B) Koutecky-Levich para Cel/TiO ₂ /CoHMP. Condições: [O ₂] = 6,0 mg L ⁻¹ , KCl 1,0 mol L ⁻¹ , pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	46
Figura 14. Esquema do comportamento do corante azul de metileno em diferentes valores de pH.....	53
Figura 15. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de pasta de carbono com a) Cel/TiO ₂ e b) Cel/TiOMB, obtidos em solução de NaCl 0.5 mol L ⁻¹ , pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	55
Figura 16. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de pasta de carbono com a) Cel/Ti(HPO ₄) e Cel/Ti(MBPO ₄), obtidos em solução de NaCl 0.5 mol L ⁻¹ , pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	55

Figura 17 – Diagrama do planejamento fatorial 2^3 para os valores de resposta correspondentes a separação de pico (tipo arial) e razões de corrente (tipo itálico).....	63
Figura 18. Síntese do m-clorofenil-etil-sulfeto utilizado para a reação de biocatálise.....	70
Figura 19. Reação biocatalítica de oxidação do sulfeto a sulfóxido.....	71
Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura a) de várias colônias do microrganismo <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 (100X) e b) do microrganismo <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 imobilizado no suporte Cel/TiO ₂ imediatamente depois da avaliação enzimática (100X).....	75
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura 3 meses depois de estocagem a) do microrganismo <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 (100X) e b) do microrganismo <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 imobilizado no suporte Cel/TiO ₂ para reavaliação enzimática (100X).....	76
Figura 22. Compostos envolvidos nas reações de biocatálise (1) m-clorofenil-etil-sulfeto, (2) m-clorofenil-etil-sulfóxido e (3) m-clorofenil-etil-sulfona.....	76
Figuras 23. Cromatogramas obtidos para a reação de oxidação enzimática do tioéter com células do fungo <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 (a) 24 h de reação e (b) 72 h de reação.....	77
Figura 24. Cromatogramas obtidos para a reação de oxidação enzimática do tioéter com células do fungo <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 imobilizado na Cel/TiO ₂ (a) 24 h de reação e (b) 72 h de reação.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Análise de EDS do material Cel/TiO ₂	30
Tabela 2. Aplicações de eletrodos de pasta de carbono modificados com diferentes materiais suportes no estudo sobre a redução catódica do oxigênio dissolvido.....	36
Tabela 3. Dependência do potencial de redução do pico catódico, E _{p_c} , em função do pH da solução.....	37
Tabela 4. Número de ciclos contra a corrente de pico catódico.....	38
Tabela 5. Dependência da velocidade de varredura com a resposta da razão de corrente, utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com Cel/TiOMB e Cel/Ti(MBPO ₄).....	57
Tabela 6. Fatores, níveis, valores de resposta para a separação de pico e razão de corrente para o planejamento fatorial 2 ³	58
Tabela 7. Efeitos principais, interações, e valores de erro padrão para o planejamento fatorial 2 ³	59
Tabela 8. Monitoramento da atividade da oxidação do composto m-clorofenil-etil-sulfeto com <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 (AT) suportado em Celulose/TiO ₂	78

PRINCIPAIS SIGLAS E ABREVIATURAS

ECS - Eletrodo de Calomelano Saturado

EQM - Eletrodo Quimicamente Modificado

EPC - Eletrodo de Pasta de Carbono

ΔE_p - Diferença entre os Potenciais de Pico

E - Potencial Aplicado

E_m - Potencial Médio

E_p - Potencial de Pico

E_{pa} - Potencial de Pico Anódico

E_{pc} - Potencial de Pico Catódico

I - Corrente

I_p - Corrente de Pico

I_{pa} - Corrente de Pico Anódico

I_{pc} - Corrente de Pico Catódico

I_{pa}/I_{pc} - Razão das Correntes Anódica e Catódica

$v^{1/2}$ - Raiz Quadrada da Velocidade de Varredura

Cel - Celulose

TiO₂ - Dióxido de Titânio

H₂HMP - Hematoporfirina IX

H₂PP - Protoporfirina IX

CoHMP - Hematoporfirina de cobalto

CoPP - Protoporfirina de cobalto

Cel/TiO₂ - Celulose Modificada com o Óxido de Titânio

CelTiO₂/H₂HMP - Hematoporfirina Imobilizada Sobre a CelTiO₂

CelTi/H₂PP - Protoporfirina Imobilizada Sobre a CelTiO₂

CelTi/CoHMP - Hematoporfirina de Cobalto Imobilizada Sobre a CelTiO₂

CelTi/CoPP - Protoporfirina de Cobalto Imobilizada Sobre a CelTiO₂

MB⁺ - Corante Azul de Metileno na Forma Catiônica

Γ - Quantidade de Sítios Ativos do Corante Presentes na Superfície do Eletrodo

Cel/Ti(HPO₄) - Hidrogeno Fosfato Imobilizado Sobre a CelTiO₂

Cel/TiOMB - Azul de Metileno Imobilizado Sobre a CelTiO₂

Cel/Ti(MBPO₄) - Azul de Metileno Imobilizado Sobre CelTi(HPO₄)

ee - Excesso Enantiomérico

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

CG-FID - Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama

UV-Visível - Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível

EDS-RX - Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X

EDXRF - Fluorescência de Energia Dispersiva de Raios-X

1. INTRODUÇÃO

1.1. Materiais híbridos orgânicos e inorgânicos

A civilização contemporânea experimentou simultaneamente duas importantes revoluções a partir da 2ª Guerra Mundial, uma envolvendo o desenvolvimento da informática e outra o desenvolvimento da ciência dos materiais. Durante a década de 40, os polímeros sintéticos passaram a ser desenvolvidos com o objetivo de substituir os materiais tradicionalmente usados e também para novos tipos de aplicação, como por exemplo, a substituição na indústria elétrica de isolantes à base de papel por polímeros plásticos [1]. No decorrer da década de 70 foi observada uma desaceleração da produção comercial de novos polímeros sintéticos, acompanhada de um aumento acentuado no número de técnicas de modificação de polímeros já existentes. Este processo foi decorrente do alto custo envolvido na produção de novos polímeros tendo em vista a necessidade de investimentos no desenvolvimento de sistemas de polimerização e em equipamentos especiais [2].

O desenvolvimento da indústria de polímeros proporcionou uma retomada de interesse pelo estudo de materiais híbridos orgânico-inorgânicos. A possibilidade de combinar as propriedades de compostos orgânicos e inorgânicos em um único material com propriedades únicas e performances específicas é um velho desafio que teve início com o começo da era industrial. Alguns dos mais velhos e famosos materiais híbridos orgânico-inorgânicos são oriundos da indústria de tintas, onde pigmentos inorgânicos, como TiO_2 , são suspensos em misturas orgânicas como solventes e surfactantes [3]. Cargas ("fillers") ou agentes

modificadores inorgânicos como argilas, talcos e óxidos em geral, têm sido adicionados aos polímeros para melhorar algumas propriedades, como por exemplo, resistência mecânica e estabilidade térmica, bem como para introduzir cor [4,5].

O conceito de híbrido orgânico-inorgânico é relativamente recente, surgido em 1994 para atender às exigências encontradas no desenvolvimento de materiais mais sofisticados. Na literatura atual ainda ocorre alguma discordância entre os termos compósito e híbrido orgânico-inorgânico, sendo que a diferença fundamental entre um e o outro está relacionada com a dimensão da dispersão [6]. Usualmente os compósitos são materiais heterogêneos, consistindo de uma ou mais fases descontínuas (mais fortes e duras denominadas de materiais de reforço), embebidas ou dispersas em uma fase contínua (matriz), como por exemplo, a dispersão na forma particulada de um material inorgânico como a sílica em uma matriz de um polímero orgânico, enquanto que os materiais híbridos são homogêneos, como por exemplo, a formação de materiais de vidros transparentes, a partir da mistura de polímeros orgânicos e materiais inorgânicos [6].

O termo compósito ou material compósito é bastante abrangente e complexo, tendo sua origem na palavra inglesa "composite materials", que foi usada para definir a conjugação de materiais para alcançar as propriedades desejadas no produto final, sendo, portanto, utilizada como sinônimo de material conjugado. Embora existam várias definições na literatura com diferentes interpretações, pode-se defini-lo como sendo todo o material obtido por dispersão, mistura física ou reação química entre dois ou mais materiais distintos e com

propriedades físicas diferentes para a obtenção de um novo material que apresente propriedades notadamente diferentes das propriedades dos materiais constituintes, podendo ser esta dispersão ou mistura inclusive macroscópica, e que, por ser um material multifásico, exibe uma proporção significativa das propriedades das fases constituintes [7].

Desta forma, a classificação de um material como compósito é muitas vezes baseada em algumas características como a forma de uma das fases, se fibrosa ou laminar, na fração de volume de uma das fases $\geq 10\%$, ou quando alguma propriedade como elasticidade de um dos constituintes é ≥ 5 vezes em relação à do outro [8]. Um novo termo denominado de biocompósito passou também a ser empregado na literatura a partir de 1989 para definir os novos materiais em que pelo menos uma das fases é originária de fontes biológicas renováveis [9].

Nos materiais híbridos, a dispersão ou mistura dos componentes ocorre de forma homogênea e ao nível molecular, com tamanhos de fases variando de escala nanométrica à micrométrica, resultando em um material com um tamanho reduzido das fases, o que justifica o interesse na obtenção de materiais híbridos com alto grau de dispersão e homogeneidade [3]. As propriedades finais de um material híbrido são determinadas predominantemente em função da natureza da interface interna entre as fases orgânica-inorgânica, a qual tem sido empregada para classificar estes materiais em duas classes distintas [10]: **classe 1** – aquela em que os componentes orgânico e inorgânico estão homogeneamente dispersos, existindo apenas ligações fracas entre eles, como ligações de hidrogênio, forças

de Van der Waals, interações hidrofílicas e hidrofóbicas; **classe 2** – aquela em que os componentes orgânico e inorgânico estão fortemente ligados através de ligações químicas covalentes ou iônicas. Porém, além da natureza das interações químicas na interface do material híbrido, variações nas suas propriedades dos materiais híbridos também são determinadas em função das contribuições individuais de cada componente expressas pela natureza química das fases orgânica e inorgânica e pelo tamanho ou dimensões destas mesmas fases, com conseqüente alteração no comportamento térmico do híbrido, na reologia, na estabilidade e na morfologia do material. Sendo assim, a escolha dos componentes orgânico e inorgânico torna-se essencial para a definição das propriedades do material híbrido final [3].

1.2. Celulose

A celulose constitui-se no biopolímero mais abundante e renovável existente na natureza, sendo também encontrada em bactérias, fungos e em animais marinhos. A celulose é definida como um polímero linear de composição química $(C_6H_{10}O_5)_n$, cuja molécula primária chamada celobiose consiste na união de dois monômeros ligados através de ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, apresenta alta massa molecular e grau de polimerização variando entre 2000 a 15000 unidades de D-glicose conforme a sua origem, cujas cadeias poliméricas agregadas paralelamente resultam em regiões cristalinas ordenadas e regiões amorfas desordenadas [11-13].

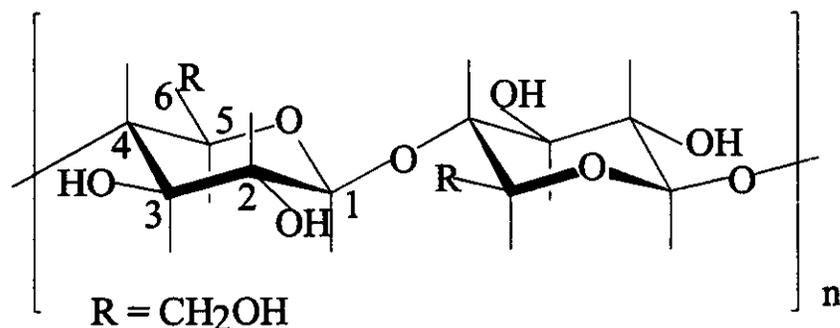
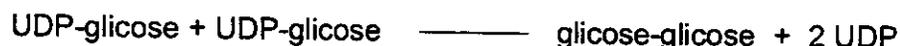


Figura 1. Fórmula estrutural da unidade de repetição básica da celulose denominada de celobiose.

Na parede celular das plantas a celulose é depositada em camadas denominadas de fibrilas embebidas em polímeros mais amorfos, os quais incluem polissacarídeos neutros e ácidos, glicoproteínas e substâncias aromáticas adesivas, resultando em um material compósito semipermeável bastante complexo. A fibrila típica da celulose pode ser idealizada como um cabo no qual as fibras longitudinais têm como função primordial servir de reforço estrutural à parede celular. A biossíntese ou biogênese da celulose se constitui em um processo altamente ordenado e estruturado, como consequência de uma série complexa de eventos, os quais devem ocorrer para gerar uma estrutura na forma de uma fita alongada, submicroscópica, semicristalina e termodinamicamente estável. A bactéria *Acetobacter xylinum* gram-negativa ainda é considerada como o sistema modelo para o estudo da biossíntese da celulose, onde apenas uma única célula do microrganismo polimeriza ao redor de 200.000 moléculas de glicose por segundo [13].

Embora a complexidade intrínseca envolvida no entendimento e controle da biomontagem da celulose, o processo segue por etapas seqüenciais de polimerização, cristalização e extrusão, catalisadas por enzimas macromoleculares complexas denominadas de celulose sintase, cuja unidade morfológica estrutural é conhecida por complexos terminais lineares ou hexagonais ou simplesmente pelo termo inglês “rosette TC”. Estas reações enzimáticas complexas afetam o tamanho ou grau de polimerização, a forma e a estrutura cristalina da celulose produzida. Um modelo proposto recentemente para explicar o mecanismo de polimerização derivado de um algoritmo genético considera que são necessárias duas moléculas substratos doadoras de UDP-glicose e de pelo menos três sítios catalíticos para iniciar o processo no citoplasma celular e adicionar a unidade de celobiose produzida a cadeia de crescimento, conforme está representada simplificadamente abaixo [11,12]:



onde UDP significa Uridina-5'-difosfoglicose

A celulose foi um dos primeiros polímeros naturais a atrair o interesse para a preparação de materiais híbridos, desde que estes materiais apresentam algumas vantagens frente a outros materiais, tais como baixo custo, razoável porosidade, facilidade de manuseio, biodegradabilidade devido a microrganismos presentes no solo, cupins ou enzimas presentes no estômago de ruminantes, estabilidade em uma extensa faixa de pH (3-13), capacidade de resistir à lavagem

alcalina, e razoável estabilidade térmica ao redor de 100 °C [14]. A matriz do biopolímero oferece outras vantagens como boa resistência mecânica, química e razoável área superficial, permitindo que sua superfície possa ser modificada através de processos químicos relativamente simples e de baixo custo. Assim, maiores quantidades de quelantes, catalisadores ou mediadores podem ser incorporados, ou mesmo, sua capacidade de troca iônica pode ser aumentada através da introdução de grupos carboxílicos, fosfatos ou sulfatos. A celulose apresenta também uma alta capacidade de intumescimento que desfavorece, por exemplo, a sua utilização na preparação de fases estacionárias [14].

A reatividade química da celulose é determinada em grande extensão pela estrutura supramolecular de seu estado sólido definitivamente estabelecida e aceita na década de 30, com base nas pesquisas de Haworth e nas evidências cinéticas de Freudenberg sobre a identificação das ligações glicosídicas β -1,4 na celulose com mais de 99% de certeza [15,16].

A celulose contém 31,48 % em massa de grupos hidroxilas, os quais podem sofrer reações de adição, substituição e oxidação. Como resultado do efeito indutivo dos substituintes vizinhos, a acidez e a tendência para a dissociação diminuem na ordem HO2>HO3>HO6, mas dependendo do meio reacional, ácido ou alcalino, esta ordem pode ser modificada. Embora os grupos hidroxilas sejam ativos, eles podem não estar inteiramente acessíveis para reações químicas, mesmo que os grupos localizados em regiões amorfas apresentem maior acessibilidade que os grupos localizados em regiões cristalinas.

As interações entre as cadeias de celulose dentro de uma microfibrila são usualmente atribuídas a ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Contudo, este tipo de proposição parece ser um fator minoritário na interação. Nos modelos mais recentes, somente uma ligação de hidrogênio intermolecular por glicose é prevista, sendo que a maior parte da energia de estabilização tem a sua origem em forças de Van der Waals, agregando as cadeias moleculares em arranjos geométricos perfeitos [13, 17,18].

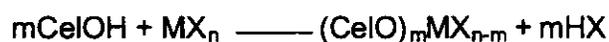
1.3. Materiais híbridos de celulose com óxidos metálicos

A preparação de óxidos metálicos dispersos como monocamadas ou como agregados isolados sobre a superfície da celulose têm sido uma área de crescente interesse nos últimos anos, devido à possibilidade destes grupamentos hidroxilas superficiais, -OH, reagirem com haletos e alcóxidos metálicos [19]. A metodologia experimental do processo de revestimento da celulose com óxidos metálicos pode variar dependendo da forma de celulose desejada. A partir do polímero acetilado pode-se obter a celulose modificada com óxidos metálicos na forma de fibras ou membranas, ou por modificação superficial direta nas fibras de celulose a partir da sua forma em pó utilizando o precursor em solvente aquoso ou não-aquoso [20-22].

Para preparar membranas, acetato de celulose é normalmente utilizado por ser muito solúvel em solventes orgânicos comuns como acetona [23-25]. No polímero acetilado solubilizado, as partículas dos óxidos são aprisionadas dentro da estrutura polimérica e protegidas contra o lixiviamento a partir da matriz quando imersas em um solvente. Utilizando a espectroscopia dispersiva de elétrons no

mapeamento de fraturas de membranas, tem-se observado que estas membranas de acetato de celulose não apresentam a ocorrência de separação de fases, mas sim, de uma dispersão homogênea das partículas dos óxidos metálicos no interior da matriz [26].

Embora as fibras de celulose sejam consideradas relativamente inertes, seus grupos hidroxilas superficiais podem reagir de acordo com a seguinte reação:



onde MX_n é um composto ativo do metal (haleto metálico, por exemplo) e CelOH corresponde aos grupos hidroxilas.

Uma hidrólise cuidadosa leva à formação de uma monocamada do óxido, na qual os metais estão presos à superfície através da ligação CelO-M . A reação de hidrólise está mostrada abaixo:



Nos óxidos metálicos, M_xO_y , altamente dispersos como monocamadas finas sobre a superfície da celulose (denominados para simplificação de $\text{Cel}/\text{M}_x\text{O}_y$), a mobilidade dos óxidos ancorados é restrita, resultando em óxidos metálicos coordenativamente insaturados (sítios ácidos de Lewis), além de sítios ácidos de Brønsted. A presença de sítios ácidos de Lewis e Brønsted no óxido incorporado foi determinada utilizando piridina como sonda molecular em um estudo criterioso

destes materiais híbridos à base de celulose e acetato de celulose modificados com diferentes quantidades do óxido de nióbio [26,27]. Estes sítios ácidos de Brønsted originam-se dos grupos MOH ou CelOH, sendo o último devido aos grupos CelOH que não reagiram.

No presente estudo foi utilizado o óxido de titânio, TiO_2 , que caracteriza-se por ser um sólido branco, estável ao ar e insolúvel em água, sendo geralmente empregado em inúmeras aplicações, tais como catálise, equipamentos electrocrômicos, equipamentos optoeletrônicos, agente assistente de combustão, fotocatalisadores, entre outras [28-32].

Recentemente, foram descritas a preparação e a caracterização do óxido de titânio (IV) imobilizado sobre a superfície de celulose visando estudar o grau de cristalinidade e a estrutura morfológica do material preparado [33]. Os resultados obtidos através da determinação experimental da área superficial pelo método BET e pelo método da difração de raios-X, em amostras de celulose pura e em quatro materiais de celulose modificada com TiO_2 contendo 1,2; 7,0; 10,0 e 16,0 % m/m de óxido imobilizado indicaram uma relação existente entre o aumento da quantidade de titânio imobilizado e os valores crescentes das áreas superficiais, sendo estas observações atribuídas ao caráter mais poroso e amorfo da estrutura do óxido disperso sobre a celulose. Estes resultados foram concordantes com os valores de cristalinidade obtidos por difração de raios-X, onde foi observada uma sensível redução do grau de cristalinidade dos materiais celulose-óxido de titânio com mais de 7,0 % m/m de óxido de titânio depositado.

Os estudos sobre a morfologia do material Cel/ TiO_2 examinada por MEV e o grau de dispersão do óxido metálico por EDS-RX permitiram verificar que o

material híbrido é fibroso, rugoso, com formas retorcidas e de tamanhos variados. Concomitantemente, as micrografias dos quatro materiais Cel/TiO₂ revelaram a formação de uma camada de óxido de titânio que se estende por toda a superfície da celulose, com aumento gradativo da espessura a partir do material Cel/TiO₂ com 7,0 % de óxido incorporado.

1.4. Imobilização de catalisadores

A incorporação de catalisadores ou biocatalisadores em materiais suportes insolúveis em água são métodos de imobilização antigos e bem conhecidos. Estes métodos normalmente envolvem a adsorção física ou química do catalisador ou biocatalisador sobre a superfície do material suporte. A escolha do processo de imobilização pode afetar a atividade catalítica da espécie ativa, catalisador ou biocatalisador, fazendo variar as condições da etapa de catálise como velocidade da reação, mecanismo da reação, pH ótimo de resposta, sensibilidade e seletividade [34].

É sempre desejável que a imobilização da espécie catalítica ocorra de tal forma que a espécie ativa se encontre em contato íntimo com o material suporte, sem ocorrer perda ou diminuição da atividade, proporcionando assim, fácil difusão dos substratos e produtos até a superfície catalítica. Portanto, é de fundamental importância a escolha do material suporte e do processo de imobilização para se possibilitar vantagens como aumento da seletividade ou sensibilidade, minimização de interferências, reutilização do material, baixo custo e maior estabilidade adquirida em função do material suporte [34].

Em particular, a modificação intencional das propriedades superficiais de materiais suportes ou de eletrodos pela imobilização de espécies químicas ativas, tem permitido o desenvolvimento de novos sensores e biossensores com uma variedade de recursos importantes para serem aplicados em análises eletroanalíticas tais como eletrocatalise, prevenção de envenenamento da superfície, a seletividade e a pré-concentração, oferecendo assim, maiores recursos para as técnicas eletroanalíticas e permitindo o desenvolvimento de novos sensores mais seletivos [35-36].

A imobilização de catalisadores sobre a superfície de materiais suportes ou de eletrodos pode facilitar a transferência de elétrons favorecendo o processo redox, fazendo com que o potencial de oxidação ou redução seja deslocado para valores menos extremos e muitas vezes promovendo um aumento do sinal amperométrico [37].

Os primeiros estudos envolvendo a modificação da superfície de eletrodos tidos como inertes tais como ouro, platina, carbono, sobre os quais foram depositados óxidos e polímeros, conferiram a estes novas propriedades catalíticas [38].

Dentre as possibilidades de modificações de eletrodos com catalisadores são utilizados filmes poliméricos, metais eletrodepositados, óxidos metálicos, compostos organometálicos como metalo ftalocianinas, metaloporfirinas, ferroceno, espécies orgânicas adsorvidas como quinonas e seus derivados, tetracianoquinodimetano, DNA, enzimas, anticorpos e uma variedade de outras espécies. Estas modificações podem ser por adsorção, ligação covalente,

recobrimento com membranas permeáveis, eletropolimerização ou por formação de materiais compósitos [39].

No processo de modificação por formação de materiais compósitos é utilizado carbono em pó, originando os eletrodos de pasta de carbono (EPC) [40-42]. Estes eletrodos são obtidos a partir da mistura do grafite na forma de pó com um agente aglutinante que promove a formação da pasta. O agente aglutinante é um líquido orgânico (óleo) constituído de hidrocarbonetos não condutores (nujol, parafina ou silicone). O líquido orgânico deve ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível em contato com soluções aquosas, pouco volátil, livre de impurezas eletroativas, tendo como função dar consistência à pasta de carbono, preencher as cavidades entre as partículas de grafite, isolar o grafite do contato com as soluções aquosas e agir como um meio para encapsular diferentes compostos [43].

Os EPCs preparados à base de pasta de carbono apresentam certas vantagens como versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, ampla faixa de potencial de trabalho, superfície facilmente renovável, possibilidade de miniaturização, além de permitirem uma fácil incorporação de suportes e mediadores que aumentam a variedade de aplicações, superando problemas como a baixa reprodutibilidade e baixa resistência a solventes orgânicos. Devido a essas propriedades, os eletrodos à base de pasta de carbono apresentam um extensivo uso em eletroanálise [43-46].

Contudo, algumas desvantagens podem ser encontradas quando são utilizados eletrodos de pasta de carbono tais como, instabilidade quando submetidos a um longo período de uso, presença de solventes orgânicos na

solução, ou quando utilizados em condições hidrodinâmicas. Um outro aspecto a considerar é que, em geral, os eletrodos de pasta de carbono são caracterizados pela falta de reprodutibilidade, devido a variações na composição da pasta. Na maioria dos casos, o grafite e aglutinante são misturados manualmente fornecendo muitas vezes um material não homogêneo, podendo ser difícil reproduzir as pastas [44,47]. O emprego dos materiais híbridos a base de celulose em eletrodos modificados somente foi possível devido ao desenvolvimento dos eletrodos a base de carbono [48].

Por outro lado, a busca pelo aprimoramento do desempenho de biocatalisadores imobilizados tem incentivado o desenvolvimento dos mais diversos tipos de processos biocatalíticos. Em geral, estas metodologias de imobilização de biocatalisadores são classificadas em três grandes categorias: ligação ao suporte sólido, reticulação por ligação cruzada, e aprisionamento [49]. O processo de aprisionamento em fibras consiste normalmente em submeter o suporte às células microbianas em suspensão aquosa sob suave agitação, com uma posterior filtração para eliminar as células não aderidas. Numerosos materiais orgânicos e inorgânicos têm sido utilizados como substratos podendo ser citados o carvão ativo, óxidos metálicos como alumínio, titânio e zircônio, terras diatomáceas, vidro poroso e resinas sintéticas [50,51]. Por exemplo, asbestos têm sido utilizados com sucesso para a adesão de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção em escalas de gramas de álcoois a partir de cetonas [52].

Neste contexto, os materiais híbridos a base de celulose tem atraído um crescente interesse como materiais suportes para a imobilização de espécies

Introdução

catalisadoras desde de que, o caráter anfótero de muitos óxidos imobilizados na superfície da celulose tem permitido a imobilização de várias espécies químicas, ácidas ou básicas, resultando em uma ampla aplicação destes materiais. Materiais híbridos a base de Cel/M_xO_y onde M = Zr^{IV}, Nb^V, Sb^{III}, Sb^V e Ti^{IV}, têm sido preparados na forma de fibras ou membranas e largamente utilizados em processos de separação [53-55], imobilização de enzimas [23,24,53,56-58], preparo de membranas semipermeáveis [22], e como suporte de espécies químicas eletroativas para uso como sensores eletroquímicos [59].

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral demonstrar que o material híbrido orgânico-inorgânico celulose-óxido de titânio, Cel/TiO₂, pode ser utilizado como um eficiente suporte sólido para a imobilização de alguns catalisadores.

Especificamente, o material Cel/TiO₂ foi utilizado como material suporte para a imobilização de três catalisadores diferentes. No primeiro estudo, duas porfirinas denominadas de hematoporfirina IX e protoporfirina IX foram imobilizadas sobre a superfície do suporte Cel/TiO₂ e posteriormente, metaladas com íons cobalto (II) resultando nos materiais Cel/TiO₂/HMPCo e Cel/TiO₂/PPCo. Com os dois materiais obtidos foram preparados eletrodos de pasta de carbono e foram realizados estudos comparativos sobre a eficiência dos compostos imobilizados de catalisar a redução do oxigênio dissolvido.

O segundo estudo envolveu a imobilização do corante azul de metileno na superfície de dois materiais suportes, Cel/TiO₂ e Cel/Ti(HPO₄), resultando nos materiais Cel/TiOMB e Cel/Ti(MBPO₄). Com os dois materiais obtidos foram preparados eletrodos de pasta de carbono e a eficácia da imobilização foi estudada através da otimização das propriedades eletroquímicas do azul de metileno adsorvido nos dois materiais por aplicação de um planejamento fatorial completo 2³.

No terceiro estudo, o suporte sólido Cel/TiO₂ foi utilizado para imobilizar o biocatalisador *Aspergillus terreus* CCT 3320. A capacidade catalítica do microrganismo imobilizado de produzir sulfóxidos quirais por oxidação enzimática de um sulfeto pró-quiral, foi comparada com a do microrganismo não imobilizado.

3. SENSOR ELETROQUÍMICO PARA OXIGÊNIO DISSOLVIDO

3.1. Introdução

As porfirinas correspondem a uma importante e extensa classe de compostos macrocíclicos que ocorrem naturalmente desempenhando um importante papel no metabolismo dos organismos vivos [60].

São moléculas altamente conjugadas, constituídas por quatro anéis pirrólicos, unidos por quatro grupos insaturados =CH- denominados de pontes de metina, e que possuem normalmente 22 elétrons π . O núcleo da porfirina é constituído de um ligante tetradentado, no qual o espaço disponível para um metal se coordenar tem um diâmetro máximo de aproximadamente 3,7 Å, conforme Figura 2 [60,61].

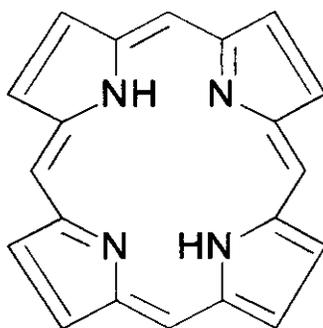


Figura 2. Estrutura básica das porfirinas (porfina).

Quando a coordenação ocorre, dois prótons são removidos dos átomos de nitrogênios pirrólicos, deixando duas cargas negativas. O anel porfirínico é um sistema bastante estável que apresenta um caráter aromático. Um aspecto

interessante da química das porfirinas está relacionado com a sua versatilidade e capacidade de coordenação. Por exemplo, os complexos de porfirina com íons metálicos de transição são muito estáveis, apresentando uma constante de estabilidade para a tetrafenilporfirina, ZnTPP, igual a 10^{29} [61].

Quase todos os metais formam complexos 1:1 embora os complexos de Na, K, Li sejam 2:1 no qual os átomos metálicos são incorporados ligeiramente acima e abaixo do plano do macrocíclico porfirínico. Quando íons metálicos divalentes como o Co(II), Ni(II), Cu(II) são complexados, o quelato tetracoordenado resultante não apresenta carga residual. Os complexos de porfirinas metaladas (metaloporfirinas) têm sido extensivamente estudados visando o entendimento da formação biossintética e da atividade biológica dos compostos naturais. As metaloporfirinas desenvolvem um papel fundamental em atividades biológicas como, por exemplo, o processo da fotossíntese envolvendo compostos de magnésio na síntese da clorofila, o transporte de oxigênio através de complexos de ferro nas hemoproteínas e hemoglobinas e a estocagem de energia através de complexos de cobalto na vitamina B12. Também, está bem estabelecido que os macrocíclicos porfirínicos são reagentes cromogênicos altamente sensíveis. Porfirinas e metaloporfirinas geralmente exibem um espectro bem característico e intensas bandas de adsorção na região do UV-Vível devido ao seu sistema π altamente conjugado. Uma intensa banda de adsorção é encontrada na região do UV compreendida entre 390 e 425 nm (se a porfirina é β ou meso substituída), denominada de banda B ou Soret (referente à transição $a_{1u} \rightarrow e_g$), cujo coeficiente de absorvidade molar é da ordem de

$10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e na região compreendida entre 480 e 700 nm, são observadas quatro bandas para as porfirinas de base livre (não metaladas), denominadas de bandas Q (referentes à transição $a_{2u} \rightarrow e_g$ do anel porfirínico), com coeficiente de absorvidade molar da ordem de $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [62,63]. Estas bandas são permitidas por simetria D_{2h} . De acordo com a literatura, a coordenação de um metal ao anel porfirínico substituindo os dois prótons dos átomos de nitrogênios pirrólicos, faz com que haja um aumento da simetria de D_{2h} para D_{4h} . Tal aumento de simetria leva a uma diminuição no número de bandas Q do espectro [62,63].

O desenvolvimento de novos materiais catalisadores para a eletrorredução de oxigênio dissolvido em solução aquosa tem-se constituído em um campo de intensa investigação em diversas áreas. Em particular, na área de eletroquímica, as metaloporfirinas adsorvidas em superfícies de grafite, carbono vítreo e em outros eletrodos inertes têm sido utilizadas como eletrocatalisadores para a redução ou oxidação eletroquímica de uma grande variedade de moléculas tais como para a redução de oxigênio, peróxido de hidrogênio, íons sulfeto e nitrito e para oxidação de ciclohexano e hidrazina. O estudo das porfirinas de cobalto adsorvidas em eletrodos de grafite realizado especialmente por Anson e colaboradores tem demonstrado que a posição e as espécies dos grupos substituintes do anel afetam de maneira significativa a atividade eletrocatalítica das porfirinas metaladas [64-69].

Na maioria dos casos, porfirinas de cobalto mononucleares com substituintes meso no anel porfirínico catalisam somente a redução de O_2 a H_2O_2 [69], enquanto que porfirinas de cobalto, sem substituintes meso ou como

Sensor eletroquímico para oxigênio dissolvido

pequenos grupos nesta posição, apresentam atividade catalítica através da redução de O_2 a H_2O , porém com a formação de peróxido de hidrogênio como um produto intermediário [67,68]. Comportamento similar, porém menos eficiente, é observado também para as porfirinas de cobalto mononucleares contendo substituintes nas posições β -pirrólicas do anel [69].

A redução direta do O_2 a H_2O (sem passar por H_2O_2) é normalmente catalisada por porfirinas de cobalto diméricas (cofaciais, pouco espaçadas) [70-73] e por porfirinas de cobalto multinucleares [66,74], ambas adsorvidas em eletrodo de grafite pirolítico. De fato, tem-se observado que a redução de oxigênio via quatro elétrons somente é catalisada por porfirinas diméricas, quando o material do eletrodo é grafite pirolítico (EGP), sendo que do contrário, uma redução via dois elétrons é observada [75]. Neste trabalho, foi investigada a eficiência catalítica de duas porfirinas imobilizadas no suporte CeI/TiO_2 , contendo substituintes pirrólicos no anel, hematoporfirina IX e protoporfirina IX, para eletrorreduzir o oxigênio dissolvido. Para tanto, os dois catalisadores porfirínicos metalados com cobalto (II) imobilizados no suporte foram incorporados em eletrodos de pasta de carbono.

3.2. EXPERIMENTAL

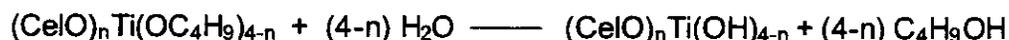
3.2.1. Materiais

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico. A água utilizada na preparação das soluções foi desionizada a partir do sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, USA) que produz água com resistividade de 18 MΩcm. As fibras de celulose, Fluka, são de originárias do algodão, possuindo comprimentos na faixa de 0,02 a 0,15 mm. O butóxido de titânio IV, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$, Synth, foi utilizado como solvente para a suspensão das fibras de celulose. A hematoporfirina IX, ácido 8,13-bis(1-hidroxietil)-3,7,12,17-tetrametil-21H-23H-porfina-2,18-dipropiônico (designada como H_2HMP) e a protoporfirina IX, ácido 8,13 – divinil – 3, 7, 12, 17 – tetrametil-21H-23H - porfina-2,18 - dipropiônico (designada como H_2PP) ambas da Aldrich, foram utilizadas neste estudo. O $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Vetec 98 %, foi utilizado no processo de metalação das duas porfirinas. O KCl, Ecibra 99,5 %, foi utilizado como eletrólito suporte. O álcool etílico absoluto, etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Synth 99,5 %, foi utilizado para preparar as soluções das duas porfirinas e do cloreto de cobalto (II).

3.2.2. Preparação da matriz Cel/ TiO_2

O material Cel/ TiO_2 foi preparado através da reação de uma solução de butóxido de titânio IV com fibras de celulose suspensas em heptano anidro. Cerca de 10,0 g de fibras de celulose foram suspensos sob agitação em 250 mL de heptano. A esta suspensão foram adicionados 7 mL de butóxido de titânio IV. A

preparação foi realizada com agitação mecânica constante por 1 h, em atmosfera de nitrogênio seco e a temperatura ambiente. A amostra foi, então, totalmente seca em linha de vácuo de 10^{-3} torr por 5 h. Em seguida, o material seco foi submetido a uma atmosfera de amônia gasosa por 10 min, seguido de lavagem com água desionizada e, finalmente, foi filtrado sob vácuo. Finalmente, o material Cel/TiO₂ foi seco em estufa a 60 °C por 1 h [22,27,56,57,59]. A reação de preparação do material Cel/TiO₂ pode ser representada pelas seguintes equações:



3.2.3. Imobilização e metalação das porfirinas sobre a matriz Cel/TiO₂

Uma massa de 30,0 mg de cada porfirina (1,0 mmol) foi dissolvida em 25 mL de solução etanólica e, em cada solução, foi adicionado aproximadamente 1,0 g de Cel/TiO₂. A mistura foi agitada mecanicamente durante 4 h e, posteriormente, o sólido resultante foi filtrado e lavado com etanol até que o filtrado estivesse claro para assegurar que toda a porfirina não imobilizada fosse removida. O material resultante foi seco em estufa a 60 °C por 30 min. Os materiais foram designados de Cel/TiO₂/H₂HMP e Cel/TiO₂/H₂PP. As porfirinas imobilizadas foram metaladas por adição de aproximadamente 1,0 g de Cel/TiO₂/H₂HMP ou Cel/TiO₂/H₂PP em 50 mL de solução etanólica de CoCl₂.6H₂O $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A mistura foi agitada mecanicamente por 2 h e deixada em repouso por uma noite. Posteriormente, os dois materiais Cel/TiO₂/CoHMP e

Cel/TiO₂/CoPP foram filtrados e lavados diversas vezes com etanol para assegurar que todo o cobalto livre fosse eliminado. Os materiais resultantes foram secos em estufa a 60 °C por 30 min.

3.2.4. Análise gravimétrica e análise elementar

A quantidade de óxido metálico incorporado na matriz de celulose foi determinada em triplicata por análise gravimétrica onde a queima do material ocorreu a 900 °C por 3 h e posterior pesagem do resíduo como TiO₂. O resultado obtido foi de 12,4 % de TiO₂ ou $1,6 \pm 0,1$ mmol g⁻¹ de Ti.

As quantidades de porfirinas imobilizadas nos materiais Cel/TiO₂/H₂HMP e Cel/TiO₂/H₂PP foram determinadas em replicata por análise elementar de nitrogênio, resultando em 240 ± 21 μmol g⁻¹ de H₂HMP e 150 ± 12 μmol g⁻¹ de H₂PP.

3.2.5. Determinação da quantidade de cobalto incorporado na estrutura das porfirinas

A quantidade de metal incorporado na estrutura das porfirinas foi determinada por ICP/OES. O equipamento utilizado foi um Espectromêtro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado ICP-OES Optima 3000DV – Perkin Elmer.

Foi preparada uma curva analítica de calibração utilizando-se soluções padrão na faixa de 5,0 mg L⁻¹ a 50,0 mg L⁻¹ de Co (II) em solução de HNO₃ 0,1 mol L⁻¹.

A abertura das amostras (Cel/TiO₂/CoHMP e Cel/TiO₂/CoPP) foi realizada em triplicata através da digestão a quente em ácido nítrico concentrado. Após a digestão, a amostra foi recolhida em um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água desionizada. A quantidade do metal cobalto imobilizado nos materiais Cel/TiO₂/CoHMP e Cel/TiO₂/CoPP resultou em $89,0 \pm 2,2 \mu\text{mol g}^{-1}$ e $65,0 \pm 0,9 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente.

3.2.6. Medidas eletroquímicas

Os eletrodos de pasta de carbono dos materiais, Cel/TiO₂/CoHMP e Cel/TiO₂/CoPP, foram preparados pela mistura de grafite de grau analítico (Fluka, grau 99,9 %) com as matrizes de Cel/TiO₂/CoHMP e Cel/TiO₂/CoPP, na proporção 1:1 (m / m) utilizando uma gota de óleo mineral (Nujol), resultando em uma massa de pasta homogênea de aproximadamente 20 mg. A pasta foi colocada dentro de uma cavidade na extremidade de um tubo de vidro cuja profundidade é de 0,2 cm e que possui internamente um disco de platina, selada para contato elétrico, com 3 mm de diâmetro interno, conforme está representado na Figura 3.

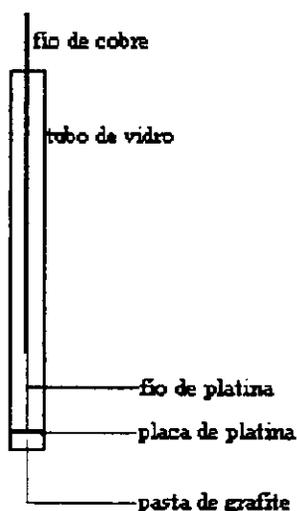


Figura 3. Esquema do eletrodo de pasta de carbono.

A pasta de carbono contendo o material preparado foi utilizada como eletrodo de trabalho, um fio de platina como contra-eletrodo e eletrodo calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência, conforme está representado na Figura 4.

Os estudos voltamétricos e amperométricos foram realizados em um potenciostato-galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 20 interfaciado a um microcomputador para controle do potencial, aquisição e tratamento dos dados. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada em um sistema fechado (cela eletroquímica de trabalho) contendo 20 mL de solução de KCl 1,0 mol L⁻¹ em pH 6,0, imersa em banho termostaticado a 25,0 ± 0,2 °C, utilizando um eletrodo de Clark 208-OXM Radiometer. A concentração de O₂ gerada a partir de um cilindro

de oxigênio, foi controlada purgando-se argônio puro na cela eletroquímica de trabalho.

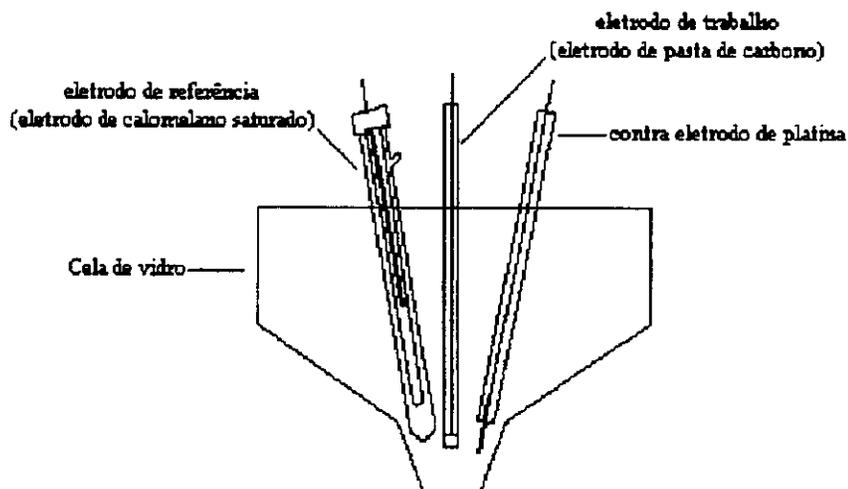


Figura 4. Esquema da cela eletroquímica utilizada.

Para os estudos envolvendo o eletrodo de disco rotatório (Figura 5), a pasta de carbono contendo os materiais foi colocada na extremidade do eletrodo de disco rotatório, dentro de uma cavidade com 1 mm de profundidade e uma área de $0,28 \text{ cm}^2$, em contato com a superfície de grafite. As velocidades de rotação foram variadas entre 4 e 1600 rpm. Os experimentos foram realizados com um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 20, acoplado a um acessório para disco rotatório (EG & G) PAR modelo 616.

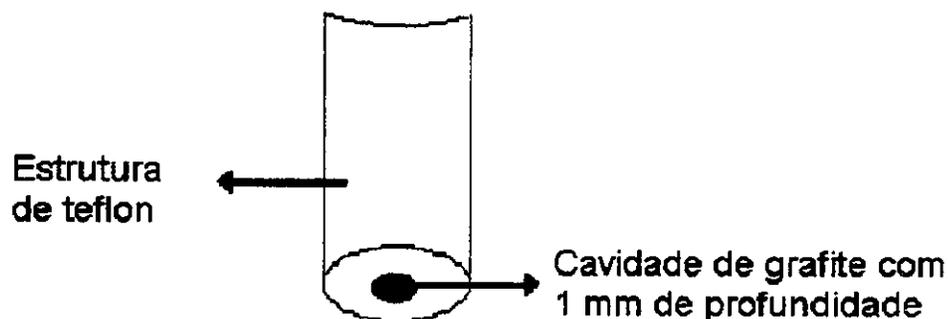


Figura 5. Esquema do eletrodo de disco rotatório

3.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A celulose pura na forma de pó, bem como o material CeI/TiO_2 foram depositados sobre uma fita de carbono condutora de dupla face aderida a um porta-amostras de latão. As amostras foram recobertas com um filme condutor de ouro em um metalizador Balzer, modelo MED 020. As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JXA 840A, equipado com microsonda de energia dispersiva (EDS) TRACOR Northern.

3.2.8. Espectrofotometria de Reflectância Difusa

Os espectros de UV-Visível dos materiais sólidos $\text{CeI/TiO}_2/\text{H}_2\text{HMP}$, $\text{CeI/TiO}_2/\text{H}_2\text{PP}$, $\text{CeI/TiO}_2/\text{CoHMP}$ e $\text{CeI/TiO}_2/\text{CoPP}$ foram obtidos pela técnica de espectrofotometria de reflectância difusa no equipamento Spectrophotometer Varian Cary 5G UV-Vis NIR. O acessório utilizado para realizar as medições de

reflectância ou transmitância dos materiais porfirínicos foi uma esfera de integração cujo diâmetro possui 110 mm. Devida a sua geometria, o dispositivo apresenta uma alta eficiência para coletar a luz espalhada refletida ou transmitida pela superfície dos materiais sólidos. Como as medições de reflectância ou transmitância de um material são determinações relativas, foi utilizado como material de referência neste trabalho o suporte sólido Cel/TiO₂.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Dispersão de TiO₂ na superfície de celulose

A morfologia da celulose pura e do material híbrido Cel/TiO₂ foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as imagens são apresentadas nas Figuras 6a, 6b e 6c, respectivamente. A uniformidade da dispersão das partículas de TiO₂ pode ser observada através do mapeamento por energia dispersiva (EDS) do titânio. A imagem do material Cel/TiO₂ (Figura 6c) indica que o filme de TiO₂ está altamente disperso sobre a superfície da fibra mas de forma heterogênea, conforme pode ser verificado na Figura 6b. As linhas de emissões utilizadas foram de Ti $k\alpha = 5,52$ keV e Ti $k\beta = 4,93$ keV. A análise de EDS (espectroscopia dispersiva de elétrons) mostrou um valor médio para os elementos, C = 48 % e Ti = 7 % de átomos na superfície. Alguns particulados de aglomerados brancos, como indicado pelos círculos na Figura 6b, são devido ao TiO₂ e podem ser detectados na superfície modificada. Entretanto, como estes particulados ocorrem como ilhas isoladas, isso não impede a adsorção de

moléculas de porfirina. A Tabela 1 resume os resultados da análise EDS realizada ao longo da superfície Cel/TiO₂ em ordem para obter os valores médios de átomos de C e Ti.

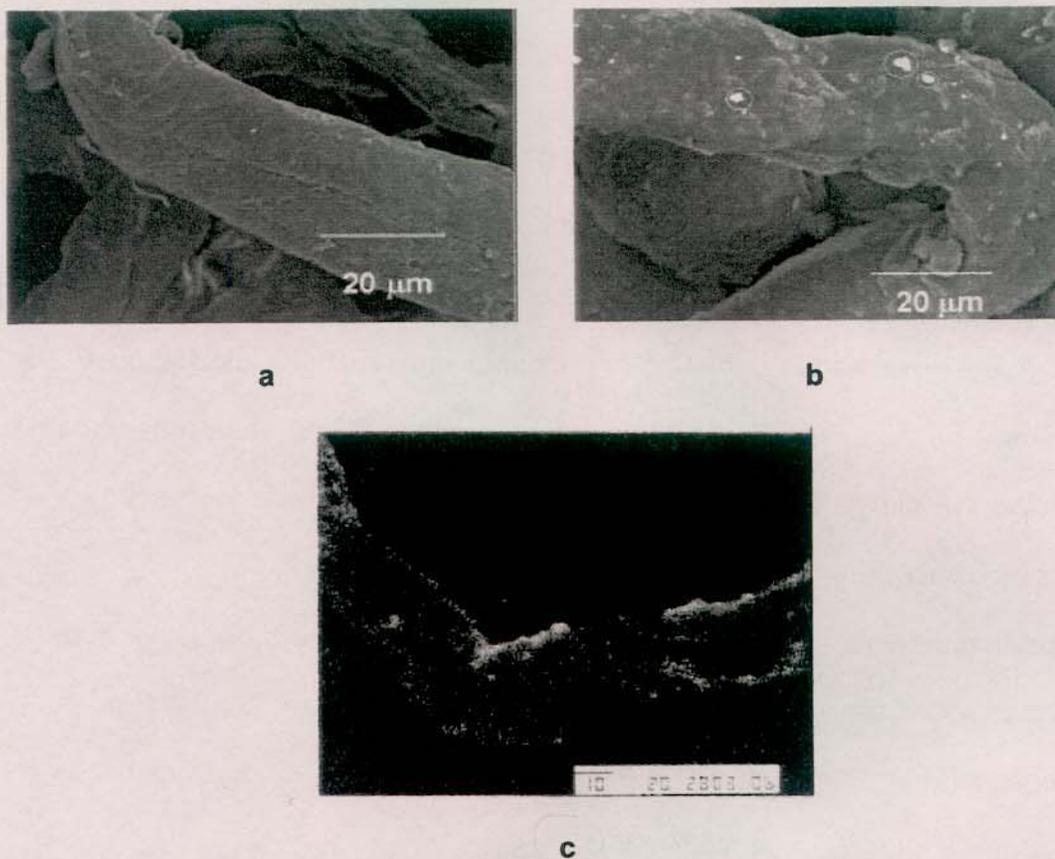


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (10000X) **a)** da fibra de celulose pura; **b)** do material Cel/TiO₂ (10000X) e **c)** mapeamento do elemento Ti (1500X).

Tabela 1. Análise de EDS do material Cel/TiO₂

Amostragem	imagem^a EDS	átomo C (%)	Átomo Ti (%)	proporção Ti/C
Média em toda a superfície	500x	48	7	0,14
No aglomerado (círculo)	10.000x	38	19	0,50

^a ampliação da imagem de EDS

3.3.2. Adsorção e posterior metalação das porfirinas na Cel/TiO₂

O espectro de absorção eletrônico da hematoporfirina IX não metalada no suporte, Cel/TiO₂/H₂HMP (Figura 7.1a) apresenta 4 bandas Q em 504, 537, 570 e 620 nm. Após a metalação com Co²⁺, resultando em Cel/TiO₂/CoHMP, ocorre uma mudança no espectro (Figura 7.1b) e duas bandas Q são observadas, em 531 e 562 nm. A diminuição no número de bandas é resultado da metalação do anel porfirínico cuja simetria local aumenta de D_{2h} para D_{4h} [76,77].

Um comportamento similar foi observado para o sistema da protoporfirina IX. Para a protoporfirina IX não metalada, Cel/TiO₂/H₂PP (Figura 7.2a), 4 bandas Q são observadas em 506, 540, 577 e 631 nm e para a protoporfirina IX metalada Cel/TiO₂/CoPP (Figura 7.2b), em 534 e 565 nm.

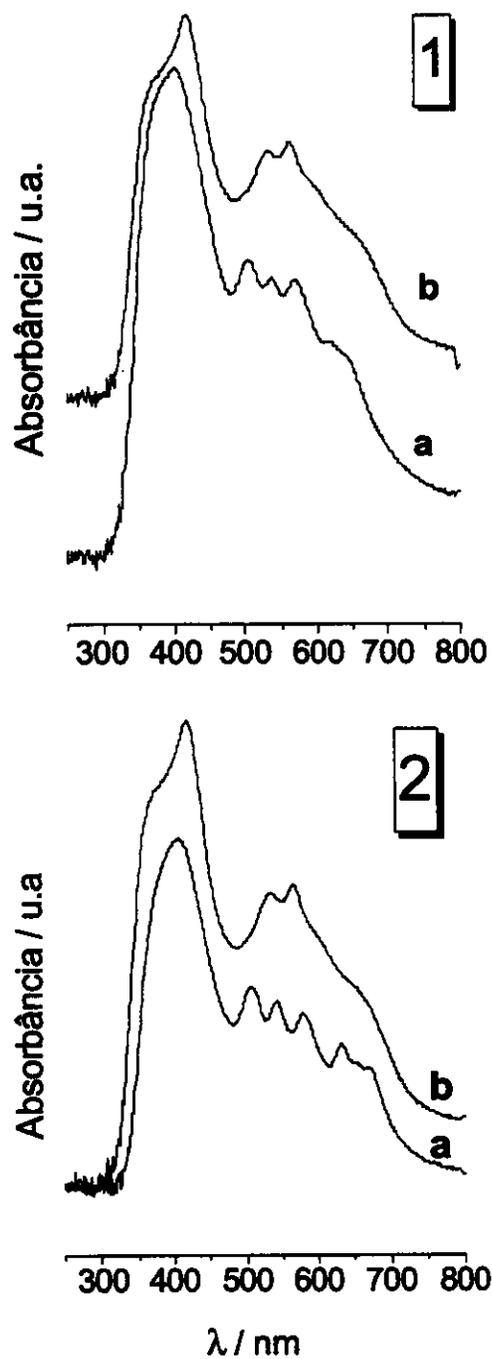


Figura 7. Espectros de UV-Visível da (1) hematóporfirina e (2) protoporfirina: a) imobilizada e não-metalada sobre CeI/TiO₂ de simetria D_{2h} e b) imobilizada e metalada sobre CeI/TiO₂ de simetria D_{4h}.

A hematóporfirina IX e a protoporfirina IX possuem grupos carboxílicos que podem ligar-se aos sítios na superfície do TiO_2 , presumivelmente através de uma ligação química tal como $\text{Ti}(-\text{OOC}-)_2$, imobilizando fortemente a molécula orgânica à superfície de uma forma similar a imobilização do complexo porfirínico de cobalto sobre Nb_2O_5 disperso na membrana de acetato de celulose [26] e a imobilização do ácido ascórbico sobre o Nb_2O_5 [78,79]. O processo de metalação das porfirinas imobilizadas ocorre com a saída de dois hidrogênios dos nitrogênios pirrólicos e a entrada posterior do íon metálico no centro da porfirina conforme a Figura 8.

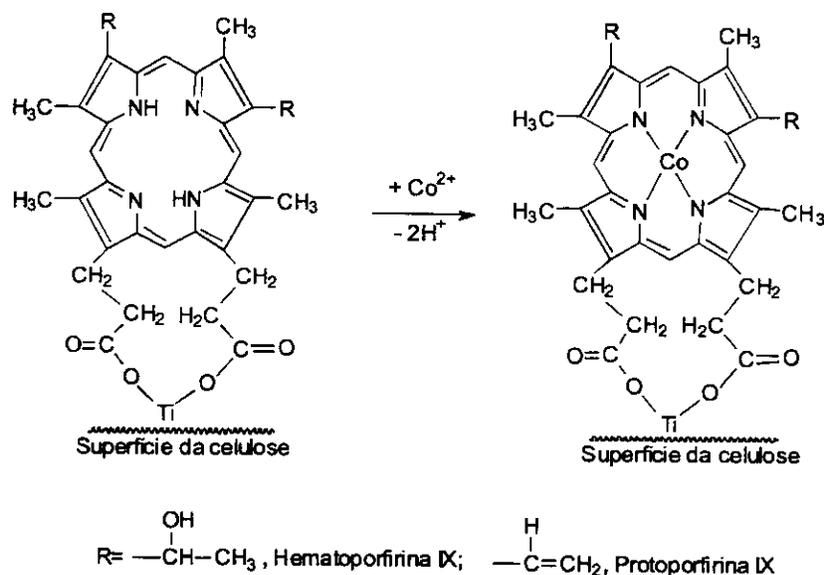


Figura 8. Estrutura da hematóporfirina IX e da protoporfirina IX imobilizadas na matriz Cel/ TiO_2 e o processo de metalação.

3.3.3. Eletrorredução do oxigênio dissolvido

As Figuras 9a e 9b mostram as curvas de voltametria cíclica obtidas usando eletrodos de pasta de carbono preparados com as porfirinas não-metaladas Cel/TiO₂/H₂HMP e Cel/TiO₂/H₂PP. As medições foram realizadas em pH 6,0 com concentrações de oxigênio dissolvido de 9,5 mg L⁻¹ e nenhuma definição de pico foi observada na região de potencial negativo estudado para a eletrorredução do oxigênio dissolvido para ambas porfirinas não-metaladas. Por outro lado, a eletrorredução do oxigênio dissolvido na superfície do grafite em eletrodo de pasta de carbono (KCl 0,5 mol L⁻¹, pH 6,0) ocorre ao redor de - 0,5 V vs ECS [80].

Diferentemente, após a metalação e sob condições similares, dois potenciais de pico catódico irreversíveis são observados em potenciais mais positivos, -0,15 e -0,20 V vs ECS para Cel/TiO₂/CoHMP e Cel/TiO₂/CoPP, respectivamente (Figura 9c e 9d). Isto é uma indicação de que a redução do O₂ nos eletrodos modificados é resultado da metalação de ambas porfirinas, capacitando-as a eletrocatalisar a redução do O₂ em potenciais aproximadamente 300 a 350 mV vs ECS mais positivos do que com as porfirinas não metaladas.

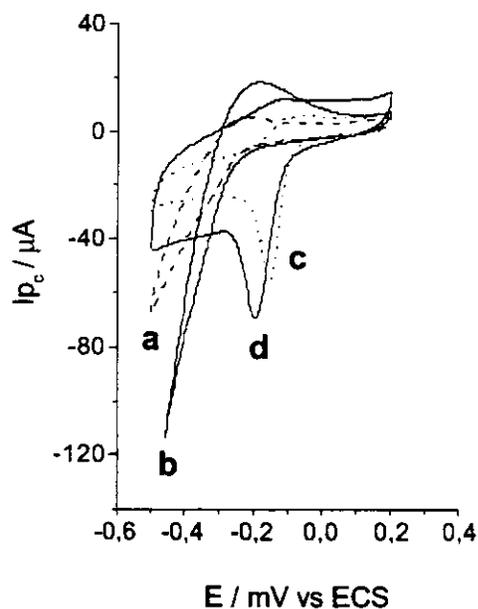


Figura 9. Voltamogramas cíclicos para (a) Cel/TiO₂/H₂HMP, [O₂] = 9,5 mg L⁻¹; (b) Cel/TiO₂/H₂PP, [O₂] = 9,6 mg L⁻¹; (c) Cel/TiO₂/CoHMP, [O₂] = 9,3 mg L⁻¹; (d) Cel/TiO₂/CoPP, [O₂] = 9,2 mg L⁻¹. Medições em KCl 1,0 mol L⁻¹, velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

Para efeitos de comparação, a Tabela 2 apresenta alguns eletrodos de pasta de carbono recentemente desenvolvidos a partir da imobilização de catalisadores porfirínicos metalados com cobalto em diferentes materiais suportes. Constata-se que os valores de potenciais de pico catódico encontrados no presente trabalho são concordantes com os valores citados na literatura apresentando-se deslocados para regiões mais positivas, sendo este resultado de grande importância prática, pois minimiza o efeito de espécies interferentes que são normalmente reduzidas em potenciais mais negativos. Um outro aspecto vantajoso decorrente do deslocamento observado do potencial de pico catódico é

Sensor eletroquímico para oxigênio dissolvido

o aumento da seletividade do sensor eletroquímico com relação ao oxigênio dissolvido. Embora o eletrodo de Clark seja o dispositivo mais utilizado para medições diretas de oxigênio dissolvido com a aplicação de baixos potenciais (-0,60 V vs Ag/AgCl ou -0,55 V vs ECS), há necessidade da utilização de uma membrana semipermeável para evitar a interferência de outras espécies presentes no meio. Assim, o desenvolvimento de novos materiais é um assunto de grande interesse para a preparação e aplicação de novos dispositivos na determinação específica de oxigênio dissolvido em ambientes aquosos.

Tabela 2. Aplicações de eletrodos de pasta de carbono modificados com diferentes materiais suportes no estudo sobre a redução catódica do oxigênio dissolvido

Material modificado	Meio de detecção (pH e concentração)	- E_{pc} vs ECS (mV)	Referência
Cel/TiO ₂ /CoHMP	KCl (pH 6,0, 1,0 mol L ⁻¹)	150	Presente trabalho
Cel/TiO ₂ /CoPP	KCl (pH 6,0, 1,0 mol L ⁻¹)	200	
SiNb/CoHMP	KCl (pH 6,8, 1,0 mol L ⁻¹)	180	81,82
SiNb/CoPP	KCl (pH 6,8, 1,0 mol L ⁻¹)	160	
SiTiP/CoTmPyP	KCl (pH 6,8, 1,0 mol L ⁻¹)	220	83,84
SiTi/CoHMP	KCl (pH 6,8, 1,0 mol L ⁻¹)	180	
Acel/Nb ₂ O ₅ /CoHMP	KCl (pH 1,0, 1,0 mol L ⁻¹)	390	59

Materiais modificados:

SiNb/CoHMP: SiO₂/Nb₂O₅/Cobalto(II)hematoporfirina IX;

SiNb/CoPP: SiO₂/Nb₂O₅/Cobalto(II)protoporfirina IX;

SiTiP/CoTmPyP: SiO₂/TiO₂/fosfato/Cobalto(II)tetrametilpiridilporfirina;

SiTi/CoHMP: SiO₂/TiO₂/Cobalto(II)hematoporfirina IX;

Acel/Nb₂O₅/CoHMP: Acetato de celulose/Nb₂O₅/Cobalto(II)hematoporfirina IX

O potencial de redução do oxigênio em um eletrodo de carbono modificado com complexos porfirínicos pode ser consideravelmente afetado por mudanças no pH da solução em potenciais que variam entre -0,2 a -0,4 V vs ECS [66,71,85,86]. Entretanto, no presente caso, os potenciais de pico para Cel/TiO₂/CoHMP e Cel/TiO₂/CoPP, no intervalo de pH entre 3,0 e 7,0, permanecem praticamente constantes ao redor de - 0,15 e - 0,20 V, permitindo que o processo seja independente do pH até 3,0 (Tabela 3).

Tabela 3. Dependência do potencial de redução do pico catódico, E_{pc} , em função do pH da solução

Ph	- E_{pc} / mV vs ECS	
	Cel/TiO ₂ /CoHMP	Cel/TiO ₂ /CoPP
7	151	207
6	146	205
5	153	205
4	148	207
3	134	202

Condições: Cel/TiO₂/CoHMP, [O₂] = 9.7 mg L⁻¹; Cel/TiO₂/CoPP, [O₂] = 9.5 mg L⁻¹ em KCl 1,0 mol L⁻¹, velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

As medições não foram estendidas abaixo de pH 3,0 devido a uma perda de definição dos voltamogramas para uma mesma concentração de oxigênio, concomitante com uma diminuição significativa das correntes de pico catódico. Abaixo deste pH, tal comportamento pode ser atribuído a protonação do TiO₂ na superfície da matriz, resultando nas espécies $\equiv\text{TiOH}_2^+$ cujo ponto isoelétrico se

encontra entre 3,4 e 4,0, levando posteriormente à lixiviação das espécies suportadas sobre a superfície da celulose [87].

Desde que as espécies eletroativas podem ser lixiviadas da superfície do eletrodo durante vários ciclos de redução-oxidação, foi medida a resposta do eletrodo para o oxigênio dissolvido em $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ na solução de eletrólito suporte de KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. O potencial foi varrido entre 0,2 e $-0,5 \text{ V}$ com uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . A Tabela 4 mostra que por volta de 160 ciclos as correntes de pico catódico permaneceram praticamente constantes para ambos complexos porfirínicos. A lixiviação das espécies eletroativas não foi observada mesmo quando o eletrodo foi exposto por longos períodos de tempo ao eletrólito suporte sob vários ciclos redox, indicando que os eletrodos apresentam uma boa estabilidade, como é mostrado na Tabela 4 [88].

Tabela 4. Número de ciclos contra a corrente de pico catódico

Material	Número de ciclos	$-I_{pc} / \mu\text{A}$
Cel/TiO ₂ /CoHMP	20	24
	160	22
Cel/TiO ₂ /CoPP	20	52
	160	50

Condições: Cel/TiO₂/CoHMP, $[\text{O}_2] = 9,5 \text{ mg L}^{-1}$; Cel/TiO₂/CoPP, $[\text{O}_2] = 10,0 \text{ mg L}^{-1}$, em KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0 e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

Construindo o gráfico das correntes de pico catódico, I_{pc} versus $v^{1/2}$ (Figura 10), em que v é a velocidade de varredura, uma correlação linear foi obtida para ambos os sistemas, Cel/TiO₂/CoPP e Cel/TiO₂/CoHMP. Este resultado é muito similar àqueles onde as reações ocorridas são controladas por processos de difusão das espécies [89,90]. A comparação das retas ajustadas para os dois sistemas estudados, possibilita verificar a maior inclinação da reta e os maiores valores de corrente de pico catódicos obtidos para o sistema Cel/TiO₂/CoPP. Isso é uma indicação de que o sistema Cel/TiO₂/CoPP é mais eficiente para catalisar a redução do O₂ na superfície do eletrodo, embora este apresente uma menor quantidade de incorporada no suporte Ce/TiO₂ e possivelmente, uma menor quantidade de sítios ativos na superfície do suporte. A maior quantidade de HMPCo imobilizada no suporte Cel/TiO₂, resultando provavelmente em um maior número de sítios eletroativos do complexo porfirínico, deve ser a causa responsável pelo deslocamento de 50 mV do pico catódico para potenciais mais positivos, aumentando a seletividade do sistema Cel/TiO₂/CoHMP para o oxigênio dissolvido.

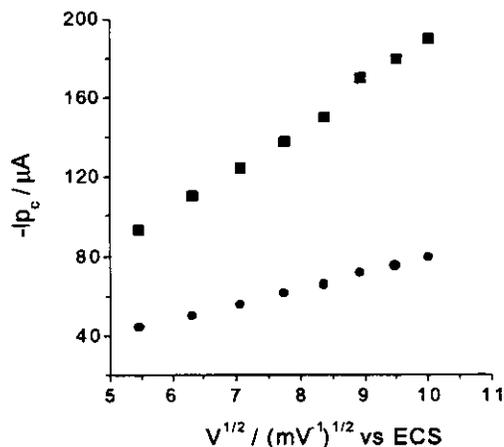


Figura 10. Corrente de pico de redução catódico em função da velocidade de varredura: (●) Cel/TiO₂/CoHMP, [O₂] = 9,5 mg L⁻¹; (□) Cel/TiO₂/CoPP, [O₂] = 9,7 mg L⁻¹. Condições: KCl 1,0 mol L⁻¹ e pH 6,0.

3.3.4. Aplicação como sensor para oxigênio dissolvido

Com o propósito de verificar a potencialidade de uso destes eletrodos como sensores para oxigênio dissolvido, foram obtidos voltamogramas em KCl 1,0 mol L⁻¹ contendo oxigênio em várias concentrações, medidas com eletrodo de Clark. Inicialmente, a solução do eletrólito suporte foi borbulhada com argônio, seguido de adições controladas de oxigênio na solução conforme está representado na Figura 11. Construindo-se o gráfico das correntes de pico catódico contra as concentrações de O₂ (inserido na Figura 11), uma resposta linear foi obtida entre 0,6 e 8,2 mg L⁻¹ para Cel/TiO₂/CoHMP, ajustada pela equação: $I_{pc}/\mu A = 2,15 (\pm 0,02) + 2,72 (\pm 0,01) [O_2]$ ($r = 0,999$, $n = 13$) e entre 0,9 e 9,8 mg L⁻¹ para Cel/TiO₂/CoPP, ajustada pela equação: $I_{pc}/\mu A = 7,11 (\pm 0,02) +$

5,42 ($\pm 0,01$) [O₂] (r = 0,998, n = 8). Estes resultados também demonstram que ambos os sensores eletroquímicos bastante seletivos para o oxigênio dissolvido.

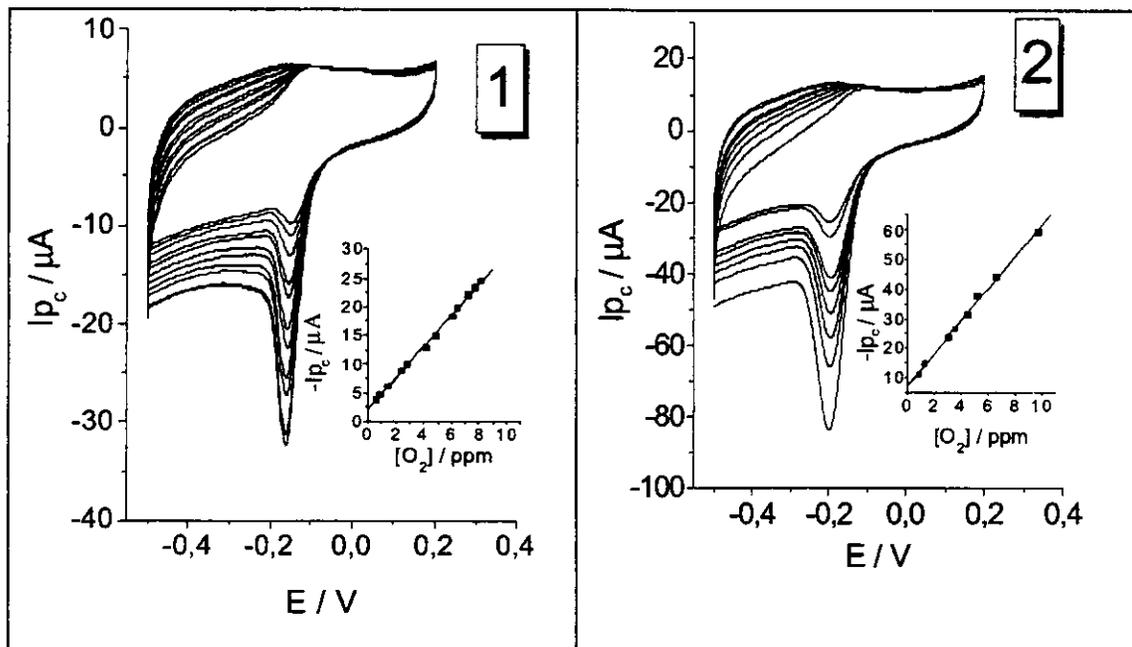


Figura 11. Voltamogramas cíclicos para Cel/TiO₂/CoHMP (1) e Cel/TiO₂/CoPP (2) em várias concentrações de oxigênio dissolvido. Figuras inseridas: gráfico das correntes de pico catódico contra as concentrações de O₂. Condições: KCl 1,0 mol L⁻¹, pH 6,0 e velocidade de varredura 20 mV s⁻¹.

Para os experimentos de cronoamperometria, o potencial foi fixado em um valor mais negativo tanto para a Cel/TiO₂/CoHMP como para a Cel/TiO₂/CoPP, respectivamente em, - 0,18 V e - 0,22 V, com o intuito de garantir que todo o oxigênio dissolvido presente na superfície dos eletrodos fosse eletrorreduzido. Os cronoamperogramas obtidos para a Cel/TiO₂/CoHMP e Cel/TiO₂/CoPP estão ilustrados na Figura 12, tão bem como os respectivos gráficos das intensidades de corrente contra as concentrações de O₂ (inseridos na Figura 12). Uma correlação linear foi obtida para ambos os eletrodos, segundo as equações: $i_{pc}/\mu A = - 0,12 (\pm 0,02) + 0,66 (\pm 0,02) [O_2]$ ($r = 0,999$, $n = 7$) para Cel/TiO₂/CoHMP e $i_{pc}/\mu A = - 0,11 (\pm 0,02) + 0,74 (\pm 0,02) [O_2]$ ($r = 0,999$, $n = 7$) para Cel/TiO₂/CoPP. A resposta dos dois sensores foi muito rápida, alcançando 95 % de sua resposta máxima em cerca de 1,0 s, tempo que pode ser considerado bastante curto considerando que os eletrodos são preparados à base de pasta de carbono.

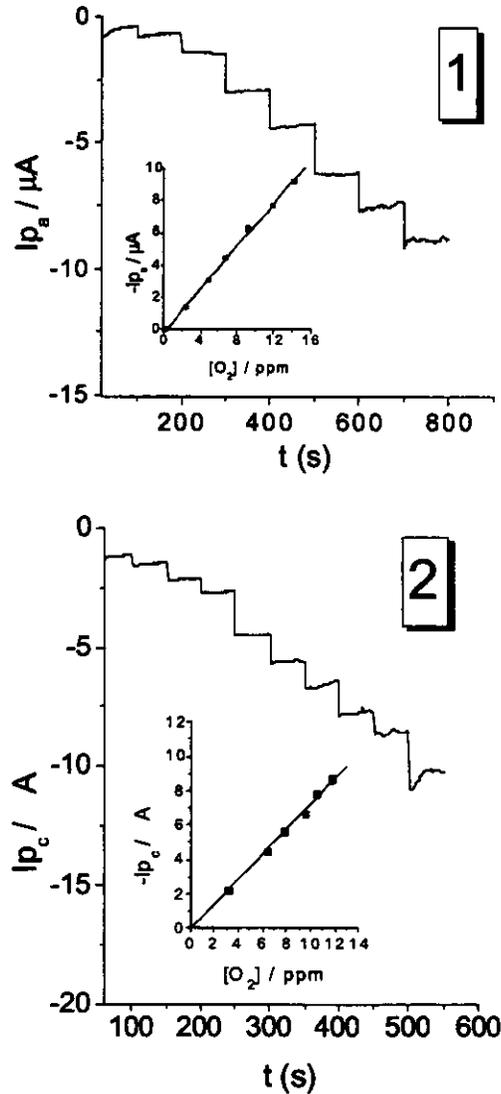


Figura 12. Cronoamperogramas para Cel/TiO₂/CoHMP, $E_{p_c} = -0,18$ V (1) e Cel/TiO₂/CoPP, $E_{p_c} = -0,22$ V (2) em várias concentrações de oxigênio dissolvido. Figuras inseridas: gráfico das correntes de pico catódico contra as concentrações de O₂. Condições: KCl 1,0 mol L⁻¹, pH 6,0.

3.3.5. Estudos com eletrodo de disco rotatório

Estudos com eletrodos de disco rotatório são realizados com o intuito de se determinar o mecanismo da redução do oxigênio em tais eletrodos, sendo que normalmente são utilizados eletrodos sólidos, e, mais recentemente, também têm sido realizados com eletrodos de pasta de carbono [81-84,91].

A redução de oxigênio dissolvido com porfirinas metálicas pode ocorrer via dois mecanismos distintos: um envolvendo dois elétrons que leva à formação de H_2O_2 , ou outro que envolve quatro elétrons e que leva à formação de moléculas de H_2O [92], enquanto que um mecanismo envolvendo um elétron é termodinamicamente desfavorável [93,94].

Em sistemas hidrodinâmicos, onde há conjuntamente a convecção e a difusão, o transporte para a superfície do eletrodo é aumentado pela convecção forçada resultando em um aumento do fluxo de espécies para um ponto correspondendo à espessura da camada de difusão do eletrodo. Neste trabalho não foi calculado o número de elétrons envolvidos no mecanismo de redução do oxigênio dissolvido, pois haveria a necessidade de se fazer uma investigação mais detalhada dos dois sistemas estudados, CeI/TiO_2CoHMP e CeI/TiO_2CoPP . Entretanto foi realizado um estudo com o objetivo de determinar qual dos dois sistemas é mais eficiente para transferir elétrons. Assim, fazendo-se a varredura do potencial em diferentes velocidades de rotação para ambos eletrodos modificados, a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} , foi observado um aumento nas correntes de pico catódico com relação à velocidade de rotação até 1225 rpm para a $CeI/TiO_2/CoHMP$ e de até 100 rpm para a $CeI/TiO_2/CoPP$, em uma concentração de O_2 fixada em $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ em pH 7,0. O gráfico de Levich

(I vs $\omega^{1/2}$) para o eletrodo Cel/TiO₂/HMPCo (Figura 13A) apresentou um desvio da linearidade somente em altas velocidades de rotação, o que pode sugerir a ocorrência de uma etapa química independente do potencial como fator limitante da corrente, precedendo a etapa de redução do oxigênio. Por outro lado, o eletrodo Cel/TiO₂/PPCo apresentou um desvio da linearidade em velocidades baixas de rotação, o que pode ser um indicativo da maior influência da etapa cinética na transferência de carga durante a redução do oxigênio neste eletrodo.

A corrente limite de difusão, $L_{(d)}$, é dada pela equação de Levich[89,90]:

$$L_{(d)} = 0,620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}[O_2]$$

onde ν é a viscosidade cinemática da solução igual a 0,01 cm² s⁻¹; ω é a velocidade de rotação e D é o coeficiente de difusão igual a 1,8 x 10⁻⁵ cm² s⁻¹ [65,75]. Na equação de Levich, não está representada a contribuição cinética, já que em um processo global de eletrodo existem dois tipos de contribuições, transporte de massa e transferência de carga (e⁻), que em conjunto alteram o comportamento dos sistemas eletroquímicos. Construindo o gráfico de Koutecky-Levich, $1/L$ versus $1/\omega^{1/2}$, para Cel/TiO₂/CoHMP e Cel/TiO₂/CoPP, conforme é mostrado na Figura 13, pode-se obter os valores das inclinações das retas experimentais. O resultado obtido para o material Cel/TiO₂/CoHMP apresentaram uma inclinação da curva experimental de $B_{exp} = 0,54$ e para Cel/TiO₂/CoPP onde $B_{exp} = 0,26$. O valor de B_{calc} para o material Cel/TiO₂/CoHMP, indica claramente que este sistema apresenta uma maior eficiência para transferir elétrons durante o processo de

redução do oxigênio dissolvido, isto é, a cinética de transferência de elétrons deste sistema é mais rápida do que Cel/TiO₂/CoPP.

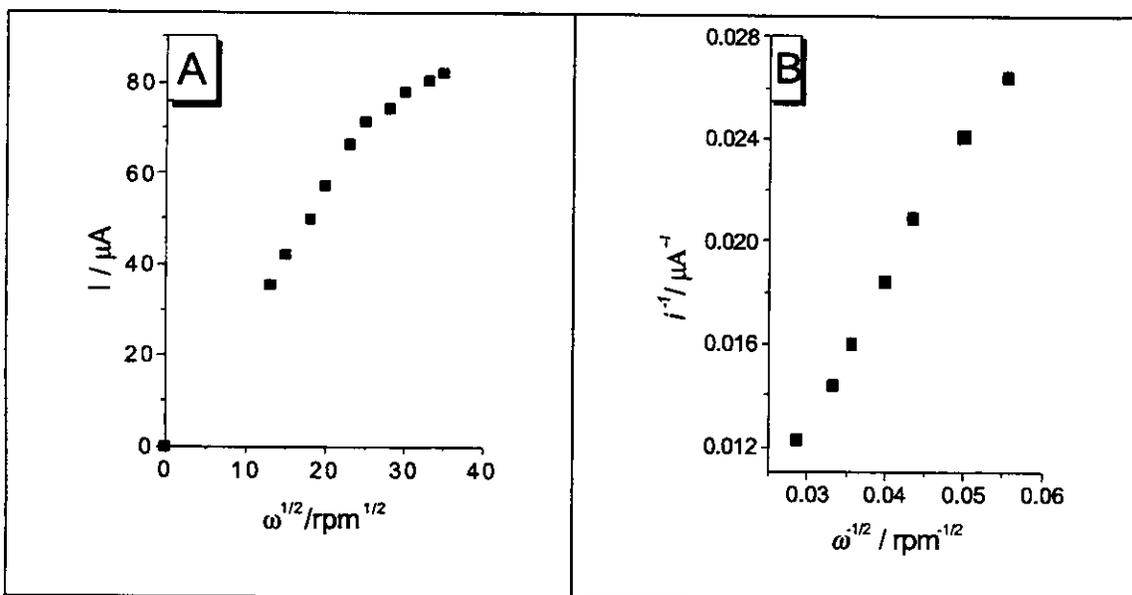


Figura 13. (A) Gráfico de Levich e (B) Koutecky-Levich para Cel/TiO₂/CoHMP. Condições: [O₂] = 6,0 mg L⁻¹, KCl 1,0 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

3.4. CONCLUSÕES

As imagens de microscopia de varredura eletrônica da Cel/TiO₂ mostraram que o TiO₂ se encontra heterogênea mas altamente disperso na superfície da matriz. A hematoporfirina IX e a protoporfirina IX foram eficientemente imobilizadas na superfície da matriz Cel/TiO₂, provavelmente devido ligação entre os grupos carboxílicos das porfirinas e os sítios do óxido de titânio, resultando em um alto grau de aderência na superfície e, por conseqüência, em complexos porfirínicos eletroativos altamente dispersos na matriz. Esta é uma importante

característica do material, desde que, devido à formação desta ligação, estes materiais não são facilmente lixiviados a partir da superfície da matriz durante vários ciclos de redução-oxidação. Como as metaloporfirinas estão ligadas na superfície, a eletrorredução do O_2 dissolvido na superfície dos eletrodos ocorre em potenciais mais positivos comparados com a redução na superfície do eletrodo de grafite. A resposta linear da intensidade de corrente de pico em função das concentrações de oxigênio dissolvido, demonstra que os materiais são potencialmente úteis para aplicações como sensores para a determinação de oxigênio dissolvido.

4. OTIMIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES REDOX DO AZUL DE METILENO ADSORVIDO POR APLICAÇÃO DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL

4.1. INTRODUÇÃO

O azul de metileno (MB^+) é um corante catiônico da classe das fenotiazinas descoberto por Caro em 1876 e que, inicialmente, ganhou prestígio como um corante citológico e como indicador de óxido-redução [95,96].

O composto é muito importante em processos fotodinâmicos, principalmente o da geração de oxigênio singleto [97] e, devido às suas propriedades fotoquímicas, pesquisas têm sido desenvolvidas visando a sua aplicação na inativação de bactérias e vírus [98], utilização do corante em células fotogalvânicas [99,100] e na área de eletrodos modificados [101-103]. Estas últimas aplicações demonstram a importância de um conhecimento detalhado a respeito das propriedades redox do corante. O azul de metileno sofre uma redução de dois elétrons em solução aquosa. Essa redução procede via um mecanismo eletroquímico-químico-eletroquímico, onde ocorrem duas sucessivas transferências de um elétron, com uma rápida protonação interposta entre elas [104,105]. Os estudos clássicos das propriedades redox e ácido-base do sistema MB^+/LMB , onde MB^+ é a forma oxidada de coloração azul e a LMB é a forma reduzida incolor do corante denominada de leucometileno, foram conduzidos por Clark, Cohen e Gibbs [96].

As propriedades eletroquímicas do azul de metileno são muito bem conhecidas em solução aquosa onde o potencial formal do indicador redox se encontra na faixa de $-0,1$ a $-0,4$ V vs ECS em meio de pH 4 a 11 [102]. Este

potencial redox é muito próximo dos potenciais redox da maioria das biomoléculas e eletrodos modificados quimicamente baseados neste corante como um sistema mediador de elétrons pode ser de grande interesse no desenvolvimento de biossensores [101-103,106]. A otimização da transferência de elétrons entre o azul de metileno e o eletrodo pode ser muito importante no desenvolvimento novos de biossensores. Neste sentido, os planejamentos estatísticos de experimentos são uma ferramenta de grande utilidade na pesquisa científica, pois fornecem com uma menor quantidade de experimentos uma maior quantidade de informações e de indicações sobre a influência das variáveis e principalmente das implicações de suas interações sobre a variável dependente de estudo [107]. Segundo Montgomery, um planejamento de experimentos consiste em testes que investigam um processo produtivo ou um determinado sistema, onde são alteradas as variáveis de entrada e observadas as respostas obtidas, com o objetivo de determinar as variáveis que mais influenciam o resultado de um determinado processo. Esta metodologia, além de ser mais racional, possibilita economia de tempo, material e recursos quando comparada a experimentos feitos por tentativa [108]. Com o desenvolvimento dos recursos computacionais que também se tornaram mais acessíveis, os métodos estatísticos de planejamento experimental e sistemas de otimização, tais como planejamento fatorial e análise da superfície de resposta, passaram a ser amplamente utilizados [109-114].

Um planejamento experimental deve passar por várias etapas, sendo uma exploratória, uma de refinamento e outra de análise estatística dos resultados finais. Na fase exploratória pode-se empregar planejamentos fatoriais de dois níveis, os quais permitem avaliar quantitativamente a influência de uma ou mais

variáveis sobre uma resposta de interesse, bem como suas possíveis interações, com a execução de um número mínimo de experimentos. Planejamentos deste tipo são de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta, e não se está preocupado ainda com uma descrição muito rigorosa dessa influência. São planejamentos de fácil execução e podem ser ampliados para formar um planejamento mais sofisticado quando se deseja conhecer melhor a relação funcional existente entre a resposta e os fatores [115].

Para executar um planejamento fatorial é necessário, em primeiro lugar, especificar os fatores e os níveis que serão estudados bem como selecionar a variável resposta. Os fatores, isto é, as variáveis controladas pelo pesquisador, tanto podem ser qualitativas como quantitativas. Os níveis são os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos. Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar a influência dessa variação no resultado. Isso implica a realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Desta forma, a execução de um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis para K fatores (K variáveis controladas) será necessário a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo denominado por isso de planejamento fatorial 2^k .

Tendo selecionado as variáveis importantes, os ensaios delineados por uma matriz de experimentos são executados e os registros das respostas, para todas as possíveis combinações dos níveis e fatores, efetuados. Os resultados obtidos no planejamento são interpretados a partir do cálculo dos efeitos dos fatores isolados (efeitos principais) e dos efeitos de interação entre os fatores.

Tanto os efeitos principais quanto os efeitos de interação são calculados a partir de todas as respostas observadas. A existência de um efeito de interação significativo indica que estes valores devem ser interpretados conjuntamente. Finalmente, os efeitos calculados podem ser melhor visualizados e interpretados como contrastes geométricos, pela construção de um diagrama contendo as respostas médias em todas as combinações de níveis das variáveis.

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. Materiais

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico. A água utilizada na preparação das soluções foi desionizada a partir do sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, USA) que produz água com resistividade de 18 M Ω cm. O corante azul de metileno, C₁₆H₁₈N₃SCl.3H₂O, Aldrich, foi utilizado como mediador de elétrons. O ácido fosfórico, H₃PO₄, Nuclear 85 %, para a fosfatação do material Cel/TiO₂.

4.2.2. Preparação da matriz Cel/TiO₂

Conforme descrito no item 3.2.2.

4.2.3. Imobilização do fosfato na matriz Cel/TiO₂

A imobilização do fosfato foi realizada reagindo 1,0 g de Cel/TiO₂ com 50 mL de solução tampão de fosfato 1,0 mol L⁻¹, pH 4,0 a 25 °C, seguindo-se a agitação da mistura por 30 min. O sólido resultante foi filtrado, lavado várias vezes

com água desionizada e seco na estufa a 60 °C por 2 h. A quantidade de fósforo adsorvido na matriz de Cel/TiO₂ foi determinado em triplicata por espectroscopia de fluorescência de raios-X de energia dispersiva (EDXRF) resultando em $0,15 \pm 0,02$ mmol g⁻¹. Considerando que a quantidade de TiO₂ na matriz é $0,96 \pm 0,03$ mmol g⁻¹, a relação molar resultante é praticamente igual a Ti/P = 6,4, o que indica um elevado número de sítios ácidos de Brønsted na superfície da celulose. Portanto, pode-se assumir que todo o fosfato que reage com TiO₂ em pH 4,0 está presente como espécies HPO₄⁻² [116, 117]. Este material foi então designado como Cel/Ti(HPO₄).

4.2.4. Imobilização do corante azul de metileno nas matrizes Cel/TiO₂ e Cel/Ti(HPO₄)

Em 25 mL de solução aquosa de azul de metileno, $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em pH 6,0, foram adicionados separadamente 0,5 g de Cel/TiO₂ e 0,5 g de Cel/Ti(HPO₄). A mistura foi agitada por 30 min e o sólido resultante foi filtrado, lavado várias vezes com água desionizada e seco em estufa por 30 min a 60 °C. A quantidade de azul de metileno imobilizado no suporte foi determinada por análise elementar baseada no elemento nitrogênio (N). Ambos materiais resultaram em um produto final de coloração azul e foram designados de Cel/TiOMB e Cel/Ti(MBPO₄).

4.2.5. Medidas eletroquímicas

A preparação dos eletrodos de pasta de carbono dos materiais (Cel/TiO₂, Cel/Ti(HPO₄), Cel/TiOMB, Cel/Ti(MBPO₄) e o desenvolvimento dos estudos voltamétricos foram realizados conforme descrito no item 3.2.6.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imobilização do azul de metileno na Cel/TiO₂ e Cel/Ti(HPO₄) foi realizada em pH 6,0, portanto, a forma de azul de metileno imobilizado é MB⁺. A estrutura do azul de metileno em diferentes valores de pH é mostrada na Figura 14.

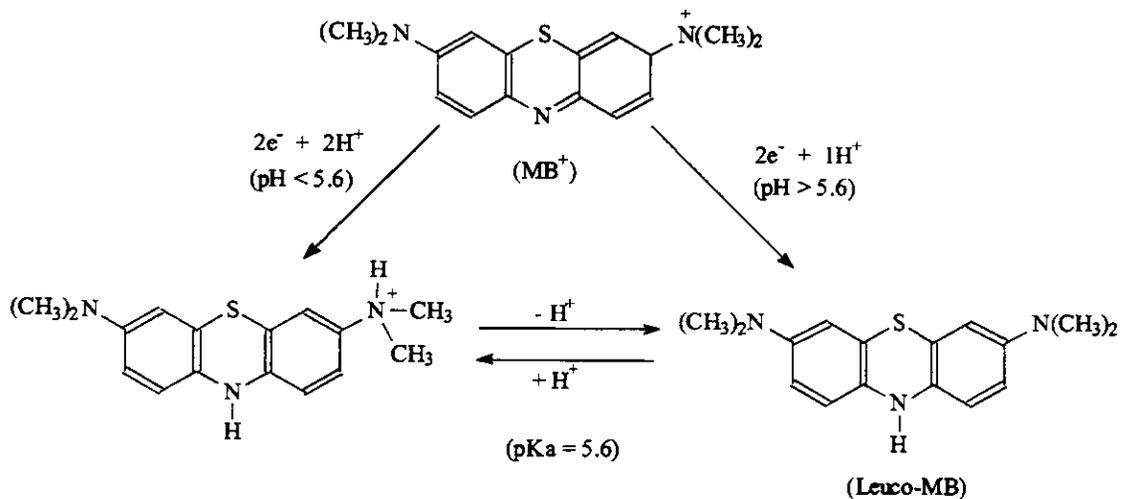
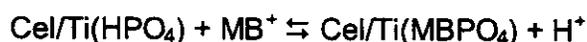
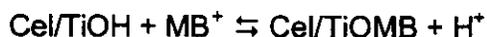


Figura 14. Esquema do comportamento do azul de metileno em diferentes valores de pH.

A imobilização da forma oxidada do azul de metileno na superfície dos materiais Cel/TiO₂ e Cel/Ti(HPO₄) ocorre por reação de troca iônica, e pode visualmente ser observada pela coloração azul assumida por ambos os materiais, sendo representada pelas seguintes equações:



A quantidade de azul de metileno (MB⁺) adsorvido na Cel/TiO₂ e Cel/Ti(HPO₄) foi determinada por análise elementar C, H, N, resultando em 167 ± 6 μ mol g⁻¹ e 173 ± 6 μ mol g⁻¹, respectivamente.

As Figuras 15a e 15b mostram os voltamogramas cíclicos para a Cel/TiO₂ e Cel/TiOMB e as Figuras 16a e 16b mostram os voltamogramas cíclicos para Cel/Ti(HPO₄) e Cel/Ti(MBPO₄). Os potenciais médios, E_m [E_m = (E_{pa} + E_{pc})/2], em que E_{pa} e E_{pc} são os potenciais de pico anódico e catódico respectivamente foram – 201 mV para Cel/TiOMB e – 124 mV para Cel/Ti(MBPO₄). A diferença de 77 mV pode ser atribuída à interação entre o corante e a superfície, desde que a densidade eletrônica na superfície do material Cel/Ti(MBPO₄) deve ser mais alta devido à capacidade dos grupos fosfatos de estabilizar o estado reduzido do corante, mudando o potencial médio para valores mais positivos. Esta mudança do potencial médio para valores mais positivos sugere que o corante apresenta uma alta interação com a matriz fosfatada [112].

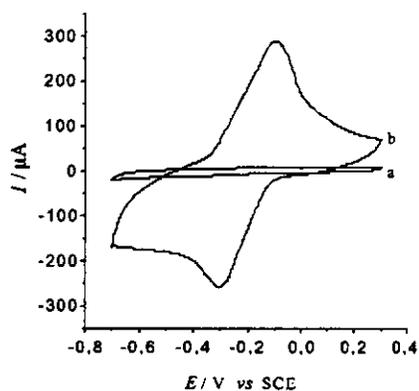


Figura 15. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de pasta de carbono com a) Cel/TiO₂ e b) Cel/TiOMB, obtidos em solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

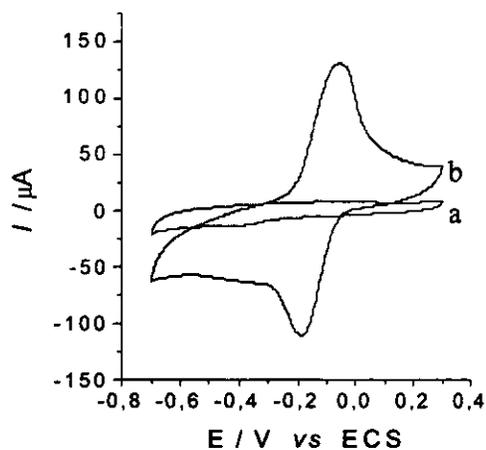


Figura 16. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de pasta de carbono com a) Cel/Ti(HPO₄) e Cel/Ti(MBPO₄), obtidos em solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

A quantidade de sítios ativos de corante presente na superfície do eletrodo, Γ , expresso como mol por unidade de área, pode ser calculado aplicando a equação:

$$\Gamma = Q/(nFA),$$

em que Q é a carga obtida a partir do cálculo da área integrada sob pico anódico, F é constante de Faraday, $n = 2$ é o número de elétrons envolvidos e A é a área do eletrodo. Os valores obtidos foram $6,1 \times 10^{-8}$ e $2,6 \times 10^{-8}$ mol cm^{-2} para os materiais, Cel/TiOMB e Cel/Ti(MBPO₄), respectivamente, resultando que as intensidades de corrente para o material Cel/TiOMB são mais altas do que para o material Cel/(MBPO₄). Este resultado demonstra que mesmo imobilizando quantidades equivalentes de azul de metileno sobre a superfície dos materiais Cel/TiO₂ e Cel/Ti(HPO₄) necessariamente não é obtido quantidades equivalentes de sítios eletroativos na superfície dos materiais.

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} , pois nesta velocidade de varredura, a razão de corrente $|i_{pa}/i_{pc}|$ é aproximadamente igual à unidade, como mostrado na Tabela 5. Esta é uma importante característica para os sistemas reversíveis.

Tabela 5. Dependência da velocidade de varredura com a resposta da razão de corrente, utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com Cel/TiOMB e Cel/Ti(MBPO₄).

$V / \text{mV s}^{-1}$	I_{pa}/I_{pc}	
	Cel/TiOMB	Cel/Ti(MBPO ₄)
5	1,127	1,098
10	1,080	1,036
20	1,000	0,932
30	0,936	0,917
50	0,832	0,877
70	0,793	0,857
100	0,763	0,840

* Os valores de razão de corrente foram obtidos em solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹ e pH 7,0.

Neste estudo, um planejamento fatorial completo com três variáveis e dois níveis foi utilizado com o objetivo de determinar a importância dos fatores, tipo de superfície de celulose modificada, concentração do eletrólito e pH na otimização do processo redox do azul de metileno adsorvido na superfície de celulose modificada. As definições dos fatores e níveis usados no planejamento fatorial são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Fatores, níveis, valores de resposta para a separação de pico e razão de corrente para o planejamento fatorial 2³.

Experimentos	Fatores			$\Delta E / \text{mV}$	$ I_{pa}/I_{pc} $
	1	2	3		
1	-	-	-	318	0.418
2	+	-	-	203	0.885
3	-	+	-	313	0.443
4	+	+	-	203	0.932
5	-	-	+	277	0.731
6	+	-	+	126	1.020
7	-	+	+	273	0.676
8	+	+	+	126	1.000

Fatores:	1 – [NaCl] / mol L ⁻¹	(-) 0,1	(+) 0,5
	2 – pH	4,0	7,0
	3 – Celulose modificada	Cel/TiOMB	Cel/Ti(MBPO ₄)

A Tabela 6 também mostra os resultados do planejamento fatorial 2³ para o sistema. Os fatores escolhidos para o procedimento de otimização são aqueles que podem afetar a reversibilidade de transferência de elétrons tais como, concentração do eletrólito, pH e tipo de matriz suporte para imobilizar o mediador. Duas propriedades foram estudadas: a separação do potencial de pico, ΔE_p , [$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$], e a razão de corrente $|I_{pa}/I_{pc}|$ (onde I_{pa} e I_{pc} são as intensidades de corrente anódica e catódica, respectivamente). Os parâmetros foram analisados usando o programa FATORIAL [118], o qual calcula os valores dos efeitos principais e de interação, e que são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Efeitos principais, interações, e valores de erro padrão para o planejamento fatorial 2³.

	$\Delta E / Mv$	$ I_{pa} / I_{pc} $
Média	230,0 ± 0,8	0,76 ± 0,01
Efeitos principais		
1	-131,0 ± 1,6 ^a	0,39 ± 0,02 ^b
2	-2,3 ± 1,6	-0,01 ± 0,02
3	-59,0 ± 1,6	0,19 ± 0,02
Interações de dois fatores		
12	2,3 ± 1,6	0,01 ± 0,02
13	-18,3 ± 1,6	-0,09 ± 0,02
23	0,3 ± 1,6	-0,04 ± 0,02
Interações três fatores		
123	-0,3 ± 1,6	-0,01 ± 0,02

a – intervalo de confiança com 95% de ± 4,4

b – intervalo de confiança com 95% de ± 0,06

Para ambas as respostas, a separação de pico, ΔE_p , e a razão de corrente, $|I_{pa}/I_{pc}|$, os efeitos principais relacionados à concentração do eletrólito e o tipo de superfície de celulose modificada, tão bem como, seus efeitos de interação têm valores absolutos altos. O pH não está envolvido em qualquer efeito importante. Desde que o pH é uma variável inerte, o planejamento fatorial 2³ para cada resposta pode ser tratado como um planejamento fatorial 2² para a concentração do eletrólito e o tipo de superfície de celulose.

Assim, os experimentos 1 e 3 na Tabela 6 podem ser tratados como um experimento em duplicata desde que o nível pH não afeta ΔE_p e $|I_{pa}/I_{pc}|$. Cada par de resultados, 318 e 313 mV para ΔE_p e 0,418 e 0,443 para $|I_{pa}/I_{pc}|$, podem ser usados como uma estimativa do erro experimental para estas duas respostas. Outras estimativas de erro podem ser obtidas usando os resultados das corridas 2 e 4, 5 e 7 e 6 e 8. Agrupando os resultados, são obtidas as estimativas do erro experimental do processo $\pm 2,3$ mV e 0,028 para as respostas de ΔE_p e $|I_{pa}/I_{pc}|$, respectivamente. As variações ocorridas nas respostas da concentração do eletrólito e na superfície da celulose modificada devidos às mudanças de níveis são superiores a 110 mV e a 40 mV, respectivamente.

Erros padrão e incertezas com intervalo de confiança de 95 % para os valores dos efeitos, propagados a partir da estimativa do erro estão incluídos na Tabela 7. A comparação dos valores dos efeitos com seus erros e incertezas mostram que somente os efeitos da concentração do eletrólito e a superfície de celulose bem como as suas interações são significativos.

Na Tabela 6 pode ser observado que a separação de pico, ΔE_p , diminui com o aumento da concentração do eletrólito suporte. Isto é consistente com o valor do efeito principal negativo na Tabela 7 para esta concentração. Este comportamento pode ser atribuído ao transporte de massa desde que com o aumento da concentração do eletrólito suporte é esperado que o processo de transferência de elétrons seja mais eficiente, favorecendo um aumento na razão de corrente e uma menor separação entre os potenciais de pico. Também na Tabela 6 os valores de separação de pico são menores para a superfície de

Cel/Ti(MBPO₄) do que para a superfície de Cel/TiOMB. Isto corresponde ao efeito principal negativo na Tabela 7 para o fator celulose modificada. Este processo é favorecido pela menor resistência apresentada pelo Cel/Ti(MBPO₄), que favorece sistemas redox mais reversíveis [88, 119].

A maior magnitude absoluta na Tabela 7 ocorre para o efeito principal da concentração do eletrólito suporte, sendo aproximadamente duas vezes o valor obtido para a matriz de celulose modificada. A interação binária entre estes dois fatores apresenta um efeito combinado, isto é, a separação de pico torna-se menor quando ambos os fatores, concentração do eletrólito suporte e tipo de superfície de celulose modificada são variados para os seus níveis mais altos, simultaneamente.

Comparando os pares de corridas que diferem no sinal do fator 3, corridas 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, pode ser observada uma tendência importante na separação do pico, ΔE_p , que é dependente do tipo de superfície de celulose modificada. O valor absoluto da separação do pico diminui aproximadamente 40 mV quando a concentração do eletrólito suporte é 0,1 mol L⁻¹ e a superfície de celulose modificada varia a partir Cel/TiOMB para Cel/Ti(MBPO₄), sendo isto independente do valor do pH. Comportamento similar é também observado quando a concentração do eletrólito é 0,5 mol L⁻¹, exceto que ocorre uma diminuição de 77 mV na separação do pico. Esta diminuição ao redor de 37 mV (duas vezes no valor absoluto do efeito de interação) para os dois materiais é independente do pH e pode ser atribuído à forte interação do corante com a superfície do material Cel/Ti(MBPO₄). Em ambos materiais Cel/TiOMB para

Cel/Ti(MBPO₄), não ocorre lixiviação do corante da superfície nestes experimentos, independente se o pH é 4,0 ou 7,0.

Os resultados obtidos para a razão de corrente $|I_{pa}/I_{pc}|$ são similares àqueles obtidos para a separação de pico. Somente os efeitos principais da concentração do eletrólito suporte e da superfície de celulose modificada e o efeito de interação binária envolvendo estes dois fatores influenciam a resposta da razão $|I_{pa}/I_{pc}|$ significativamente. Os valores absolutos obtidos para os efeitos principais da concentração do eletrólito suporte também são aproximadamente duas vezes maior que para a superfície de celulose, ao passo que os efeitos de interação são muitos menores que os efeitos principais.

A observação do diagrama do planejamento fatorial na Figura 17 confirma este simples comportamento para os valores de ΔE_p e $|I_{pa}/I_{pc}|$. O valor do efeito negativo - 131,0 mV indica que todos os valores de ΔE_p para a concentração de NaCl 0,1 mol L⁻¹ (face do lado esquerdo do cubo) são 100 e 150 mV mais altos que os correspondentes valores em 0,5 mol L⁻¹ (face do lado direito do cubo).

Analogamente, o valor do efeito da concentração é positivo, + 0,39, e isto é consequência do fato que as relações na face do cubo 0,1 mol L⁻¹ são todos menores ao redor de 0,3 a 0,5 que seus correspondentes valores na face 0,5 mol L⁻¹. Argumentos similares usando as faces da anterior e posterior do cubo, para as superfícies Cel/TiOMB para Cel/Ti(MBPO₄) respectivamente, podem ser usadas para obter uma interpretação física do efeito principal da superfície para ΔE e $|I_{pa}/I_{pc}|$.

A análise dos valores das respostas é facilitada usando o diagrama do planejamento fatorial na Figura 17. Se somente a separação do pico é considerado, a melhor série de condições a partir do estudo fatorial é + - + (NaCl 0,5 mol L⁻¹, pH 4,0, Cel/Ti(MBPO₄)) e + + + (NaCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0, Cel/Ti(MBPO₄)), mostrando que o fator pH não afeta o ΔE_p . Valores de I_{pa}/I_{pc} próximos da unidade são também encontrados para esta mesma série. Portanto, estas condições são recomendadas como aquelas que devem ser usadas para obter um comportamento mais reversível para estes eletrodos.

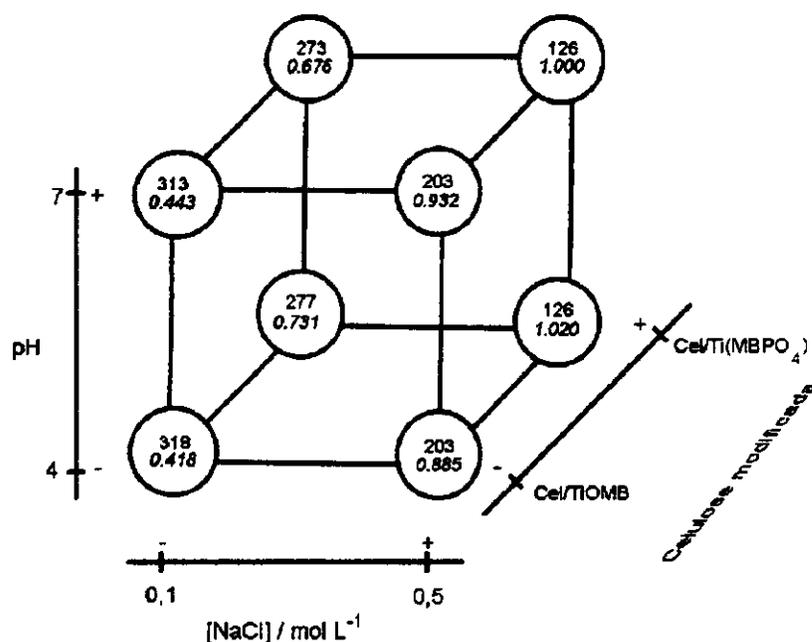


Figura 17 – Diagrama do planejamento fatorial 2³ para os valores de resposta correspondentes a separação de pico (tipo arial) e razões de corrente (tipo itálico).

4.4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a aplicação de um método estatístico pode proporcionar um modo eficiente de extrair informações relevantes de um planejamento experimental envolvendo o corante azul de metileno (MB) imobilizado na superfície de celulose modificada para otimização das características de reversibilidade do mediador adsorvido. O planejamento fatorial completo permitiu uma investigação simultânea de três fatores selecionados executando somente oito experimentos. Desde que o planejamento experimental mostrou que o pH não influencia a reversibilidade de transferência de elétrons, os erros experimentais podem ser determinados sem a realização de experimentos em replicata. Deste modo, o planejamento fatorial multivariado é mais econômico que procedimentos univariados. Somente a concentração do eletrólito e o tipo de superfície de celulose modificada são importantes para este sistema eletrodo quimicamente modificado. As observações experimentais e a análise de dados indicam que uma solução NaCl 0,5 mol L⁻¹, a superfície de celulose modificada Cel/Ti(MBPO₄) em ambos pH 4,0 ou 7,0 são as condições ótimas para este sistema.

5. EFEITO DA IMOBILIZAÇÃO DO FUNGO *ASPERGILLUS TERREUS* CCT 3320 EM CELULOSE EM TiO_2 NA OXIDAÇÃO DE SULFETO PRÓ-QUIRAL

5.1. INTRODUÇÃO

O fungo *Aspergillus terreus* é classificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, com ocorrência em zonas tropicais e temperadas e com ampla distribuição geográfica em diferentes solos. Um dos lugares mais comuns de ser encontrado é na raiz das plantas (rizosfera), sendo também encontrado na batata, algodão e juta, isolado a partir do ar e da poeira caseira. As colônias de *Aspergillus terreus* em meio de agar Czapek alcançam um diâmetro 3,4 a 4,0 cm em 10 dias de incubação, à temperatura de 25 °C. Em meio de agar com extrato de malte crescem rapidamente e esporulam mais densamente. O intervalo de temperatura de crescimento varia de 10 a 48 °C, com um ponto ótimo de crescimento em 28 °C. A cor das colônias varia entre o amarelo e o marrom, mas escurece com o tempo.

O microrganismo pode ser encontrado como um parasita no ouvido humano, é capaz de atacar as unhas e pele humana, sendo também encontrado nos pulmões de pequenos mamíferos. O fungo *Aspergillus terreus* produz o ácido itacônico e a mevinolina, que é capaz de abaixar o nível de colesterol no sangue, sendo esta droga o primeiro composto desta espécie a ser aprovado pelo U. S. Food and Drug Administration (FDA). A mevinolina é vendida sob o nome comercial de Mevacor ou Lovastatin [120].

A química orgânica moderna está predominantemente fundamentada em métodos sintéticos altamente seletivos, especialmente os enantiosseletivos, os

quais dependem de reagentes ou catalisadores quirais. Conseqüentemente, busca-se o aprimoramento do desempenho dos catalisadores, imitando a natureza ou fazendo com que os organismos naturais e suas enzimas transformem, enantiosseletivamente, substratos que não são naturais para o meio bioquímico. Os estudos científicos das biotransformações tiveram seu início na primeira metade do século XIX, podendo-se citar a lista de processos catalíticos feita por Berzelius em 1838 [50].

Em anos recentes, a oxidação enantiosseletiva de sulfetos pró-quirais através de métodos biocatalíticos tem despertado considerável interesse, com o objetivo de produzir sulfóxidos quirais, os quais são ferramentas úteis em sínteses orgânicas para a formação de ligações carbono-heteroátomo e carbono-carbono assimétricos [121-125]. Apesar das metodologias descritas na literatura para a síntese de sulfóxidos quirais, poucas mostram a utilização de microrganismos [126,127].

A tendência atual na indústria de química fina é a de substituir os métodos orgânicos sintéticos por alternativas catalíticas que evitem reagentes perigosos e que produzam compostos enantiomericamente puros. Métodos biocatalíticos ou reações baseadas em enzimas certamente preenchem a maioria destes requisitos. Atualmente, a biocatálise (aplicação de enzimas em sínteses) representa uma alternativa viável em síntese orgânica para a chamada “química ecologicamente correta” (green chemistry), principalmente para o controle ambiental. *A aplicação de enzimas em síntese permite reações com alta quimio-, regio-, diastereo e enantiosseletividade, tornando as biotransformações recomendadas na obtenção de compostos enantiomericamente puros [128].*

Outras vantagens das reações catalisadas por enzimas são as condições brandas das reações, como temperatura abaixo de 40 °C, pH próximo do neutro, pressão normal e meio aquoso, cujas condições evitam a decomposição de substratos e a epimerização de centros esterogênicos. Neste contexto, os microrganismos são vantajosos, pois apresentam um sistema multienzimático de fácil formação [129].

A metodologia envolvida no uso de enzimas isoladas ou células microbianas inteiras, ambas ativas, emprega células em crescimento, em repouso ou imobilizadas. Quando em repouso, os problemas associados com cofatores são evitados, mas cuidados devem ser tomados na manutenção dos microrganismos e quanto à reprodutibilidade da reação. Quando reações em escala de gramas são o objetivo, o uso de grandes reatores de fermentação nem sempre é o mais adequado. Desta forma, a imobilização de células microbianas inteiras têm-se apresentado como uma alternativa para resolver estes problemas, permitindo vários meses de estocagem e desta forma comportando-se como um reagente de bancada [51]. Os microrganismos quando imobilizados apresentam outras vantagens como processamento através de regime multienzimático, maior densidade celular por litro do meio reacional, possibilidade de operação em sistemas contínuos com maior controle sobre a permanência dentro do reator, maior porcentagem de conversão, menor tempo reacional, maior controle do crescimento dos microrganismos, dentre outros.

O crescente interesse na aplicação de sulfóxidos quirais em sínteses assimétricas requer sua preparação em grande escala, a qual pode ser obtida por oxidação enzimática enantiosseletiva de sulfetos pró-quirais. A preparação de sulfóxidos quirais por biotransformação usando células microbianas inteiras de

Aspergillus terreus CCT 3320 imobilizadas na Celulose/TiO₂, pode possibilitar a utilização destes suportes depois da estocagem sem que ocorra uma diminuição significativa da atividade catalítica do microrganismo produzindo assim, sulfóxidos com altos excessos enantioméricos, ee > 95 %.

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. Materiais

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico. A água utilizada na preparação das soluções foi desionizada a partir do sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, USA) que produz água com resistividade de 18 MΩcm. Os seguintes reagentes foram utilizados neste estudo: o composto 3-clorobenzenotiol, ClC₆H₄SH 97 %, para a síntese do aril alquil tioéter; Iodeto de etila, CH₃CH₂I, Aldrich 99 %; Trietilamina, (C₂H₅)₃, Merck 99,5 %; Diclorometano, CH₂Cl₂, Synth 99,5 %; K₂CO₃, Carlo Erba, 99 %; Na₂SO₄ anidro, Vetec, 99 %; Hexano, CH₃(CH₂)₄CH₃, grau HPLC 100 %; CH₃COOCH₂CH₃, Allkimia destilado. Para a preparação da solução tampão foram utilizados os sais de Na₂HPO₄, Synth, 99 % e KH₂PO₄, Merck, 99,5 % ,

5.2.2. Preparação da matriz Cel/TiO₂

Conforme descrito no item 3.2.2.

5.2.3. Condições de crescimento para as culturas de microrganismos

As células do microrganismo *Aspergillus terreus* CCT 3320 foram obtidas a partir da Coleção de Culturas da Fundação Tropical “André Tosello”. As células do fungo foram crescidas a 28 °C em frascos de agitação de cultura (erlenmeyers de 500 mL) contendo 100 mL de extrato de malte Merck a 2 % por 72 h. As células foram colhidas por filtração e lavadas duas vezes com tampão fosfato (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , pH 7,0, 0,1 mol L⁻¹). O material estéril foi usado para realizar os experimentos e os microrganismos foram manipulados em capela de fluxo laminar.

5.2.4. Imobilização no suporte de Cel/TiO₂

As células do microrganismo *Aspergillus terreus* CCT 3320 foram crescidas como previamente descrito. As células foram colhidas por filtração e ressuspensas em tampão fosfato (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , pH 7,0, 25 mL) em erlenmeyers de 125 mL, no qual Cel/TiO₂ foi adicionado. As proporções relativas entre Cel/TiO₂: *Aspergillus terreus* CCT 3320 foram 1 : 1 e 1 : 2 (g/g). As misturas foram agitadas adicionalmente por 24 h a 120 rpm e 28 °C. As células do fungo imobilizadas foram colhidas por filtração e estocadas em frascos plásticos no refrigerador a 5 °C.

5.2.5. Síntese do aril alquil tioéter: (m-clorofenil-etil-sulfeto) [130]

O composto m-clorofenil-etil-sulfeto (aril alquil tioéter) foi preparado em um frasco de fundo redondo de 50 mL, onde foram adicionados 0,5 mL aril alquil tiofenol 1 mol L⁻¹, 10 –15 mL de CH₂Cl₂ e K₂CO₃ 3 mols L⁻¹, e posteriormente foi agitado a 0 °C por 5 min. A esta mistura foram adicionados 2 mols L⁻¹ de haleto de

alquila (CH_3I ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{I}$, seguido por adição lenta de trietilamina 1 M. As reações se processaram num período de 2 h a 4 h e foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada eluída com hexano 100 % e reveladas com anisaldeído. O produto de reação foi extraído com CH_2Cl_2 (3 x 50 mL), seco com Na_2SO_4 anidro e concentrado sob vácuo em rotaevaporador. A purificação do produto foi realizada por cromatografia em coluna, utilizando como eluente hexano 100%. O produto da reação resultou em composto de sulfeto com 90 – 95 % de rendimento.

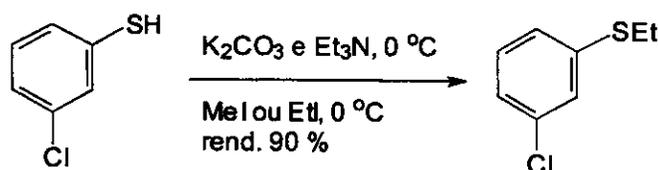


Figura 18. Síntese do m-clorofenil-etil-sulfeto utilizado para a reação de biocatálise.

5.2.6. Atividade enzimática e monitoração

A oxidação do composto m-clorofenil-etil-sulfeto foi realizada em frasco de 125 mL com agitação orbital (120 rpm). Em um frasco de fundo redondo foram adicionados, tampão fosfato pH 7,0 (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , $0,1\text{ mol L}^{-1}$, 25 mL), células lavadas (1,0 g de peso líquido) e 20 μL do composto m-clorofeniletilsulfeto. A mistura foi agitada a $28\text{ }^\circ\text{C}$ e a reação foi monitorada periodicamente. Ao alcançar o grau apropriado de conversão (50 %), as células foram separadas por filtração, a solução aquosa foi extraída com acetato de etila e a camada orgânica

foi seca com Na_2SO_4 anidro. O excesso enantiomérico (ee) foi determinado em um cromatógrafo HP 5890 CG/FID, utilizando hidrogênio como gás condutor equipado com uma coluna capilar quiral de sílica fundida contendo uma fase estacionária heptakis-(2,3-dimetil-6-fenil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,20 mm x 0,33 μm).

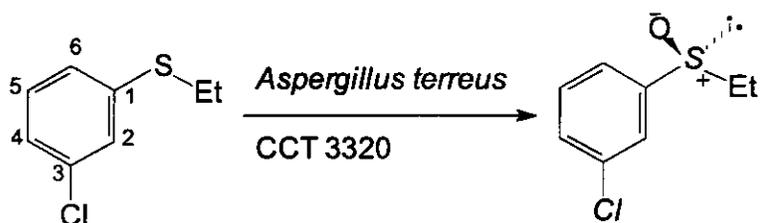


Figura 19. Reação biocatalítica de oxidação do sulfeto a sulfóxido.

5.2.7. Atividade enzimática do microrganismo imobilizado na matriz Ce/TiO_2

A atividade enzimática foi monitorada por 3 meses, fazendo-se a ressuspensão das células imobilizadas no tampão fosfato pH 7,0 (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , 0,1 mol L^{-1} , 25 mL) em erlenmeyers de 125 mL e adição de 20 μL do composto m-clorofenil-etil-sulfeto. O progresso da reação foi monitorado a cada 24 h, utilizando 500 μL de amostra extraída com acetato de etila, seca com Na_2SO_4 anidro, e posterior injeção de 1 μL de amostra em um cromatógrafo GC/FID equipado com uma coluna capilar quiral de sílica fundida contendo uma fase estacionária heptakis-(2,3-dimetil-6-fenil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,20 mm x 0,33 μm).

5.2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Em geral, amostras biológicas apresentam detalhes morfológicos que podem entrar em colapso facilmente quando observados por MEV, sendo portanto, necessário realizar um tratamento químico na amostra a fim de preservar a sua estrutura tridimensional. Neste sentido, as amostras do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 não imobilizado e imobilizado receberam um tratamento adequado antes de serem observadas no MEV. O tratamento envolve a utilização do glutaraldeído que tem a função de fixação do material biológico através dos seus grupos aldeídicos, bem como o OsO₄ também apresenta a mesma função fixação do sistema microbiano através de seus sítios ativos superficiais, resultando assim, em uma rede tridimensional do material a ser observado. A etapa de secagem ao ponto crítico tem por finalidade minimizar a tensão superficial do solvente de secagem, no caso o etanol, já que este solvente poderia vir a destruir detalhes superficiais ou mesmo causar um colapso das amostras durante as observações por MEV.

A imobilização das células foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram preparadas em 5 etapas:

- fixação das amostras por 24 h com glutaraldeído 2,5 %, em tampão fosfato Na₂HPO₄ 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2, seguido por 3 min de centrifugação e lavagem com solução tampão de fosfato (2 x 15 min);
- tratamento das amostras com tetróxido de ósmio 1 %, por 1 h a 4 °C, seguido por 3 min de centrifugação e lavagem com tampão fosfato Na₂HPO₄ 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2 (2 x 15 min);

- desidratação com etanol PA (30, 50, 70, 95, 100 %, v/v), permanecendo as amostras por 20 min em cada uma das soluções alcoólicas e posterior centrifugação por 3 min;
- secagem das amostras em ponto crítico utilizando o equipamento BALZER CPD 030. As amostras desidratadas foram embrulhadas em papel fino e imersas em etanol a 4 °C. Em seguida, o etanol foi trocado por CO₂ líquido, a temperatura foi elevada a 40 °C para a eliminação de todo CO₂.
- finalmente, as amostras foram dispersas em uma fita condutora de dupla face sob um suporte de cobre (stubs) e revestidas com ouro em um equipamento BALZER MED SCD 050. A metalação com ouro por 3 min resulta em uma camada de ouro de 10 – 20 nm. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um modelo JEOL JSM 5800 LV, com voltagem de aceleração de 10 kV.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320, isolado a partir da Floresta de Mata Atlântica (Brasil), foi selecionado a partir de um estudo para avaliação enzimática de microrganismos brasileiros quanto ao potencial de oxidar sulfetos pró-quirais a sulfóxidos quirais [131]. O *Aspergillus terreus* CCT 3320 se caracteriza por ser um fungo filamentoso, cujas colônias possuem formas circulares, conforme Figuras 20a e 21a [120].

As fibras de celulose revestidas com um óxido metálico, como por exemplo, Cel/TiO₂, constituem-se em um suporte que ainda não tinha sido testado para a imobilização de microrganismos. A imobilização de *Aspergillus terreus* CCT 3320 na Cel/TiO₂ foi acompanhada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Como pode ser visualizado na Figuras 20 e 21, o material Cel/TiO₂ e o fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 encontram-se bastante entrelaçados, imediatamente após a avaliação enzimática (Figura 20b), e mesmo depois de 3 meses de tempo de estocagem para posterior reavaliação enzimática (Figura 21b).

A Figura 22 apresenta os compostos envolvidos nas reação biocatalítica do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320. As análises cromatográficas foram realizadas a cada 24 h com o composto m-clorofenil-etil-sulfeto e o *Aspergillus terreus* CCT 3320 não-imobilizado e immobilizado na Cel/TiO₂, no sentido de obter uma melhor conversão do sulfeto pró-quiral em sulfóxidos quirais conforme está representado nas Figuras 23 e 24. Os resultados obtidos a partir estudo biocatalítico estão apresentados na Tabela 8. Comparando os resultados obtidos da bioconversão do sulfeto^a com os dados obtidos do sulfeto^b, verifica-se que tanto a produção de sulfóxidos bem como à produção de sulfonas são bastante equivalentes, indicando que a atividade biocatalítica do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 manteve-se praticamente inalterada mesmo immobilizado. O fungo immobilizado (sulfeto^b) apresentou uma alta taxa de conversão do sulfeto pró-quiral já nas primeiras 24 h, resultando em uma produção média de 80 % em sulfóxidos quirais e baixa produção de sulfona em torno de 17 %. Um excesso enantiomérico alto foi obtido também nas primeiras 24 h. Comparando-se agora os resultados da bioconversão do sulfeto^c com os resultados do sulfeto^d, verifica-se que o fungo immobilizado (sulfeto^d) apresentou um leve decréscimo na sua atividade biocatalítica. Embora ainda ocorra uma alta taxa de conversão do sulfeto pró-quiral já nas primeiras 24 h, a produção média de sulfóxidos quirais diminui para 69 % enquanto que, a produção de sulfona aumenta para um valor médio de aproximadamente 28 %. O

excesso enantiomérico alto também foi obtido nas primeiras 24 h. Os resultados obtidos para o sulfeto^e são indicativos que o microrganismo *Aspergillus terreus* CCT 3320 imobilizado ainda mantém atividade biocatalítica por pelo menos 90 dias, embora possa ser observável uma diminuição apreciável da sua capacidade oxidativa com produção de sulfóxidos ficando em torno de 50 %.

Portanto, pode-se concluir que em todos os experimentos os sulfóxidos foram produzidos com um bom excesso enantiomérico, embora a produção de sulfona tenha ficado um pouco mais alta do que com as células não imobilizadas durante a fase de avaliação da atividade oxidativa do fungo.

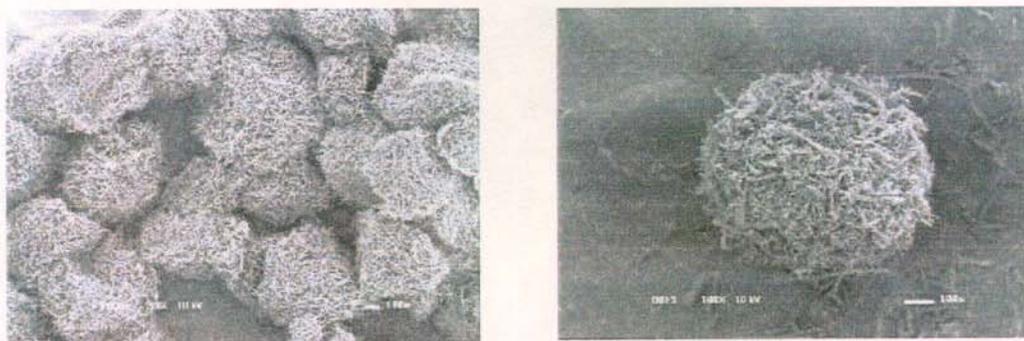


Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura **a)** de várias colônias do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 (100X) e **b)** do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 imobilizado no suporte Cel/TiO₂ imediatamente depois da avaliação enzimática (100X).

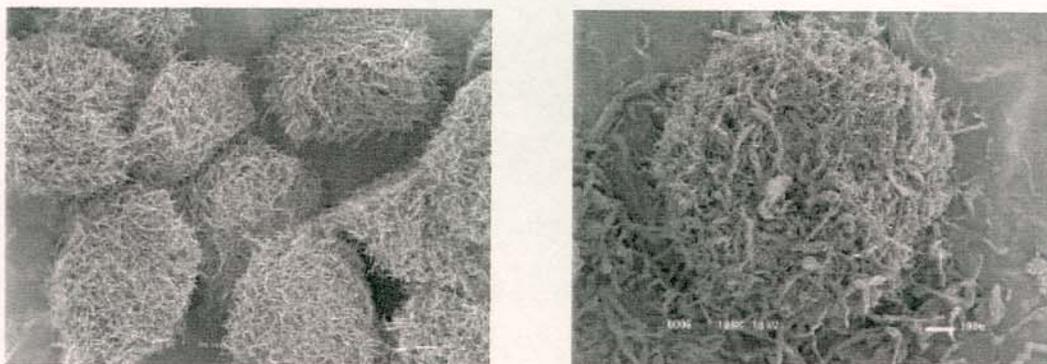


Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura 3 meses depois de estocagem a) do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 (100X) e b) do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 imobilizado no suporte Cel/TiO₂ para reavaliação enzimática (100X).

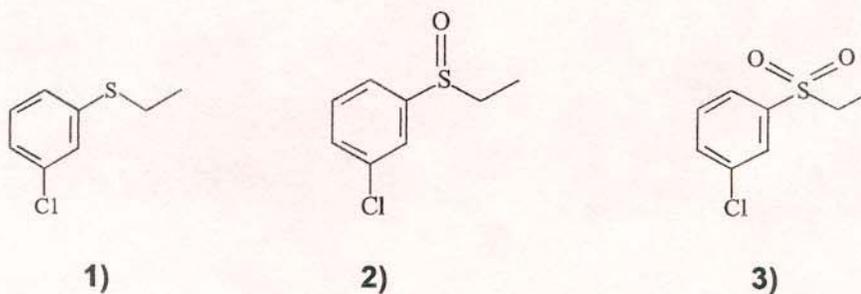
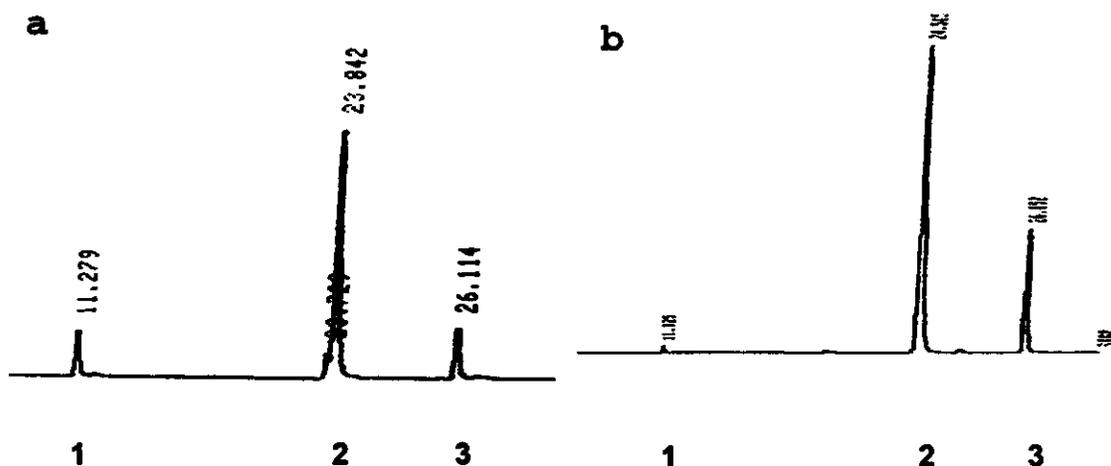


Figura 22. Compostos envolvidos nas reações de biocatálise (1) m-clorofenil-etil-sulfeto, (2) m-clorofenil-etil-sulfóxido e (3) m-clorofenil-etil-sulfona.



Figuras 23. Cromatogramas obtidos para a reação de oxidação enzimática do tioéter com células do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 (a) 24 h de reação e (b) 72 h de reação.

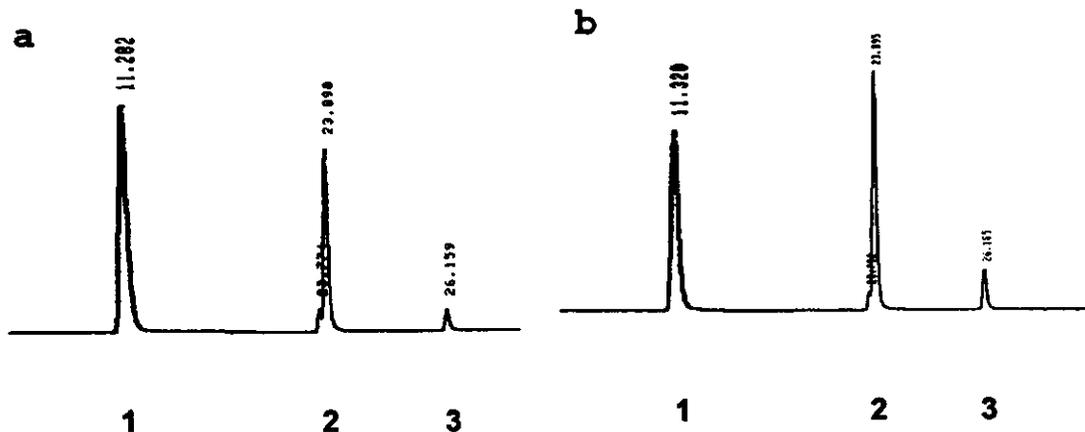


Figura 24. Cromatogramas obtidos para a reação de oxidação enzimática do tioéter com células do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 imobilizado na Cel/TiO₂ (a) 24 h de reação e (b) 72 h de reação.

Tabela 8. Monitoramento da atividade da oxidação do composto m-clorofenil-etil-sulfeto com *Aspergillus terreus* CCT 3320 (AT) suportado em Celulose/TiO₂

Parâmetros	Sulfeto ^a				Sulfeto ^b			
	24	48	72	96	24	48	72	96
Tempo(h)	24	48	72	96	24	48	72	96
Conversão (%)	88	96	98	-	95	96	100	-
Rendimento do sulfóxido (%)	74	76	74	-	79	79	80	-
Rendimento de sulfona (%)	14	20	24	-	16	17	20	-
ee (%)	88	97	>98	-	>98	>98	>98	-

Parâmetros	Sulfeto ^c				Sulfeto ^d			
	24	48	72	96	24	48	72	96
Tempo(h)	24	48	72	96	24	48	72	96
Conversão (%)	94	100	100	-	94	99	100	-
Rendimento do sulfóxido (%)	78	76	70	-	69	69	69	-
Rendimento de sulfona (%)	16	24	30	-	25	30	31	-
ee (%)			>98	-	>98	>98	>98	-

Parâmetros	Sulfeto ^e			
	24	48	72	96
Tempo(h)	24	48	72	96
Conversão (%)	66	71	77	82
Rendimento do sulfóxido (%)	51	47	45	49
Rendimento de sulfona (%)	15	24	32	33
ee (%)	73	85	95	>98

excesso enantiomérico (ee):

^a - *Aspergillus terreus* CCT 3320 1 g;

^b - *Aspergillus terreus* CCT 3320 : Cel/TiO₂ (1g : 1g);

^c - *Aspergillus terreus* CCT 3320 2 g;

^d - *Aspergillus terreus* CCT 3320 : Cel/TiO₂ (2g : 1g);

^e - sistema depois de 90 dias de estocagem, *Aspergillus terreus* CCT 3320 : Cel/TiO₂ (2 g : 1 g).

5.4. CONCLUSÕES

O fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 pode ser empregado como biocatalisador enantiosseletivo para a oxidação de sulfetos pró-quirais a sulfóxidos racêmicos. Os resultados obtidos indicam que é possível preparar compostos quirais enantiopuros a partir do uso de células de *Aspergillus terreus* CCT 3320 imobilizadas em Cel/TiO₂ comparadas com os resultados obtidos com células do fungo não-imobilizadas. As células imobilizadas na proporção *Aspergillus terreus* CCT 3320 : Cel/TiO₂ (1g : 1g) apresentaram um rendimento médio de sulfóxidos em torno de 80 % superior ao rendimento médio obtido pelas células imobilizadas na proporção *Aspergillus terreus* CCT 3320 : Cel/TiO₂ (2g : 1g) em torno de 69 %. As células imobilizadas mantêm atividade por pelo menos 90 dias.

Contudo, o aumento da produção de sulfona pela oxidação do sulfeto com *Aspergillus terreus* CCT 3320 imobilizado na Cel/TiO₂ indicou um aumento da atividade oxidativa, o que não é desejável na presente reação, já que a sulfona não apresenta quiralidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Alper, G. L. Nelson, "*Polymeric Materials Chemistry for the Future*", American Chemical Society, Washington, 1989.
- [2] E. Hage Jr, "*Compósitos e Blendas Poliméricas*", ed. Instituto Latino-Americano de Tecnologia, IBM Brasil, Campinas, 1989.
- [3] P. Judeinstein, C. Sanchez, *J. Mater. Chem.* **1996**, 6, 511.
- [4] D. A. Loy, K. J. Shea, *Chem Rev.* **1995**, 95, 1431.
- [5] D. Feldman, "*Polymeric Building Materials*", Elsevier Applied Science, 1989, p 74.
- [6] T. Saegusa, *Pure & Appl. Chem.* **1995**, 67, 1965.
- [7] F. L. Mathews, R. D. Rawlings, "*Composite Materials:Engineering and Science*", Chapman & Hall, London, 1994, p 1.
- [8] B. D. Agarwal, L. J. Broutman "*Analysis and Performance of Fiber Composite*", John Wiley & Sons Inc., New York, 1990, p 1.
- [9] A. S. Hermann, J. Nickel, U. Riedel, *Polym. Degrad. and Stabil.* **1998**, 59, 251.
- [10] S. Sanchez, F. Ribot, *New J. Chem.* **1994**, 18, 1007.
- [11] R. M. Brown Jr., *Pure Appl. Chem.* **1996**, 10, 1345.
- [12] R. M. Brown Jr., I. M. Saxena, *Plant Physiol Biochem.* **2000**, 38, 57.
- [13] D. P. Delmer, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **1999**, 50, 245.
- [14] M. Leonard, *J. Chromat. B* **1997**, 699, 3.
- [15] B. Rånby, *Cellulose Chem. Technol.* **1995**, 31, 3.
- [16] J. F. Kadla, R. D. Gilbert, *Cellulose Chem. Technol.* **2000**, 34, 197.

Referências bibliográficas

- [17] D. N. S. Hon, "Cellulose and Its Derivatives: Structure, Reactions and Medical Uses", in: *Polysaccharides in medicinal applications*, ed. S. Dumitriu, Marcel Dekker Inc, New York, 1996, Ch 4, p 87.
- [18] N. V. Ivanova, E. A. Korolenko, E. V. Korolik, R. G. Zhabankov, *J. Appl. Spectr.* **1989**, 52, 847.
- [19] Y. Gushikem, E. A. Toledo, "Preparation of oxide-coated cellulose fibers Polymer", in: *Polymers Interfaces and Emulsions*, ed. K. Esumi, Marcel Dekker Inc, New York, 1999, Ch 13, p. 509.
- [20] M. S. B. Brandão, F. Galembeck, *Colloids Surf.* **1990**, 48, 351.
- [21] H. Hatayama, T. Swabe, Y. Kurokawa, *J. Sol-Gel. Sci. Technol.* **1996**, 7, 13.
- [22] U. P. Rodrigues Filho, Y. Gushikem, M. C. Gonçalves, R. C. Cachichi, S. C. de Castro, *Chem Mat.* **1996**, 8, 1375.
- [23] Y. Kurokawa, T. Sano, H. Ohta, Y. Nakagawa, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 394.
- [24] Y. Kurokawa, H. Ohta, M. Okubo, M. Takahashi, *Carbon Polym.* **1994**, 23, 1.
- [25] Y. Kurokawa, *Polym. Gels Network* **1996**, 4, 153.
- [26] E. A. Campos, Y. Gushikem, *J. Colloids Interf. Sci.* **1997**, 193, 121.
- [27] E. A. Campos, Y. Gushikem, M. C. Gonçalves, S. C. de Castro, *J. Colloids Interf. Sci.* **1996**, 180, 453.
- [28] F. Lefebvre, J. M. Basset, *J. Mol. Catal. A: Chemical* **1999**, 146, 3.
- [29] E. da Costa, C. O. Avellaneda, A. Pawlicka, *J. Mater. Sci.* **2001**, 36, 1407.
- [30] K. Kalyanasundaram, M. Gratzel, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 177, 347.
- [31] J. Mizuguchi, *J. Electrochem. Soc.* **2001**, 148, 155.

Referências bibliográficas

- [32] T. Yamaki, T. Sumita, S. Yamamoto, A. Miyashita, *J. Cryst. Growth* **2002**, 237, 574.
- [33] L. R. D. da Silva, Y. Gushikem, M. C. Gonçalves, U. P. Rodrigues Filho, S. C. de Castro, *J. Appl. Pol. Sci.* **1995**, 58, 1669.
- [34] G. G. Guilbault, *“Handbook of Enzymatic Methods of Analysis”*, Marcel Dekker, New York, 4, 1976.
- [35] J. A. Cox, R. K. Jaworski, P. J. Kuleska, *Electroanalysis* **1991**, 3, 869.
- [36] A. J. Bard, *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 302.
- [37] J. Wang, T. Golden, *Anal. Chem. Acta*, **1989**, 217, 343.
- [38] E. F. Perez, G. Oliveira Neto, A. A. Tanaka, L. T. Kubota, *Electroanalysis* **1998**, 10, 111.
- [39] M. F. B. Souza, *Quím. Nova* **1997**, 2, 91.
- [40] A. Ivaska ed., R. Sara, *“Contemporary Electroanalytical Chemistry”*, Plenum, New York, 1990.
- [41] J. Labuda, M. Hudáková, *Electroanalysis* **1997**, 9, 239.
- [42] M. J. Lobo, A. J. Miranda, J. M. Lopez-Fonseca, P. Tuñon, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 325, 33.
- [43] J. Kulys, L. Gorton, E. Dominguez, J. Emnéus, H. Jarskog, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 372, 49.
- [44] K. Kalcher, J. M. Kauffmann, J. Wang, I. Svancara, K. Vytras, C. Neuhold, Z. Yang, *Electroanalysis* **1995**, 7, 5.
- [45] K. Kalcher, *Electroanalysis* **1990**, 2, 419.
- [46] P. T. Kissinger, *Electroanalysis* **1992**, 4, 359.
- [47] L. Gorton, *Electroanalysis* **1995**, 7, 23.

Referências bibliográficas

- [48] A. Walcarius, *Electroanalysis*, **1998**, 10, 1217.
- [49] E. Kokofuta, *Prog. Polym. Sci*, **1992**, 17, 647.
- [50] S. M. Roberts, N. J. Turner, A. J. Willets, M. K. Turner, "Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-organisms", Cambridge University Press, 1995.
- [51] I. Chibata, L. B. Wingard, *Adv. Biotechnol. Proc.* **1983**, 10, 203.
- [52] R. Wendhausen, P. J. S. Moran, I. Joekes, J. A. R. Rodrigues, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **1998**, 5, 57.
- [53] L. R. D. Silva, U. P. Rodrigues Filho, C. R. M. Peixoto, Y. Gushikem, *Quim. Nova* **1995**, 18, 337.
- [54] L. Z. Meng, C. Q. Du, Y. Y. Chen, *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, 84, 61.
- [55] L. R. D. Silva, C. R. M. Peixoto, Y. Gushikem, *Sep. Sci. Technol.* **1996**, 31, 1045.
- [56] L. R. D. Silva, Y. Gushikem, L.T. Kubota, *Colloid Surf. B Biointerfaces* **1996**, 6, 309.
- [57] U. P. Rodrigues Filho, Y. Gushikem, F. Y. Fujiwara, S. C. Castro, I. C. L. Torriani, L. P. Cavalcanti, *Langmuir* **1994**, 10, 4357.
- [58] Y. Ohmori, Y. Kurokawa, *J. Biotechnol.* **1994**, 33, 205.
- [59] E. A. Campos, Y. Gushikem, *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, 9, 273.
- [60] M. Biesaga, K. Pyrzynska, M. Trojanowicz, *Talanta* **2000**, 51, 209.
- [61] J. E. Falk, "Porphyrins and Metalloporphyrins", Elsevier, New York, 1975.
- [62] P. D. Beer, M. G. B. Drew, R. J. Jagessar, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 5, 881.

Referências bibliográficas

- [63] L. R. Milgrom, "The Colours of Life", Oxford University Press, New York, 1997, p 85.
- [64] C. L. Ni, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 4754.
- [65] R. R. Durand, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1982**, 134, 273.
- [66] B. Steiger, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 5767.
- [67] C. Shi, B. Steiger, M. Yuasa, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 4294.
- [68] C. Shi, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 1037.
- [69] E. Song, C. Shi, F. C. Anson, *Langmuir* **1998**, 14, 4315.
- [70] H. Liu, I. Abdalmuhdi, C. K. Chang, F. C. Anson, *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 665.
- [71] R. R. Durand Jr., C. S. Bencosme, J. P. Collman, F. C. Anson, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 2710.
- [72] J. P. Collman, M. Marrocco, P. Denisevich, C. Koval, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1979**, 101, 117.
- [73] J. P. Collman, P. Denisevich, Y. Conai, M. Marrocco, C. Koval, F. C. Anson, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6027.
- [74] F. C. Anson, C. Shi, B. Steiger, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 437.
- [75] J. E. Hutchison, T. A. Postlethwaite, C. H. Chen, K. W. Hathcock, R. S. Ingram, W. Ou, R. W. Linton, R. W. Murray, D. A. Tyvoll, L. L. Chng, J. P. Collman, *Langmuir* **1997**, 13, 2143.
- [76] A.H. Corwin, A.B. Chivvis, R.W. Poor, D.G. Whitten, E.W. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 6577.
- [77] R.H. Pottier, J.C. Kennedy, Y.F.A. Chow, F. Cheung, *Can. J. Spectrosc.* **1988**, 33, 57.

Referências bibliográficas

- [78] S. Denofre, Y. Gushikem, C.U. Davanzo, *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.* **1991**, 28, 1295.
- [79] R. N. Gupta, B. K. Sen, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1975** 37, 1548.
- [80] E. S. Ribeiro, Y. Gushikem, *Electrochim. Acta* **1999**, 44, 3549.
- [81] C.A. Pessoa, Y. Gushikem, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 477, 158.
- [82] C.A. Pessoa, Y. Gushikem, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, 5, 537.
- [83] A.M. Castelani, Y. Gushikem, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 230, 195.
- [84] A.M. Castelani, Y. Gushikem, *Electroanalysis* **2001**, 13 1165.
- [85] R. J. H. Chan, Y. O. Su, T. Kuwana, *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 3777.
- [86] C. Shi, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 4298.
- [87] X. Fu, S. Qutubuddin, *Colloids and Surf. A* **2001**, 178, 151.
- [88] L.T. Kubota, Y. Gushikem, J. Perez, A. Tanaka, *Langmuir* **1995**, 11, 1009.
- [89] A. M. O. Brett, C. Brett, "*Eletroquímica – Princípios, Métodos e Aplicações*", Almedina, Coimbra, 1996.
- [90] A. J. Bard, L. R. Faulkner, "*Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*", John Wiley & Sons, New York, 1980.
- [91] S. M. Golabi, J. B. Raoof, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 416, 75.
- [92] M. Yuasa, T. Nagaiwa, M. Kato, I. Sekine, S. Hayashi, *J. Electrochem. Soc.* **1995**, 142, 2612.
- [93] K.D. Karlin, Y. Gultneh, "*Progress in Inorganic Chemistry*", S. J. Lippard (Ed.), John Wiley & Sons, New York, **1987**, 35, 219.
- [94] R.R. Durand, F.C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1982**, 134, 273.
- [95] P. F. Gordon, P. Gregory, "*Organic Chemistry in Colour*", Springer-Verlag, Manchester, 1983.

Referências bibliográficas

- [96] W. M. Clark, B. Cohen, H. D. Gibbs, *Public Health Rept. (U.S.)* **1925**, 40, 1131.
- [97] R. Nilson, P. B. Merkel, D. R. Kearns, *Photochem. Photobiol.* **1972**, 16, 109
- [98] E. M. Tuite, J. M. Kelly, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, 21, 103.
- [99] D. W. Hay, S. A. Martin, S. Hay, N. N. Lichtin, *J. Phys. Chem.* **1981**, 85, 1474.
- [100] T. Ohno, N. N. Lichtin, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4636.
- [101] S. A. John, K. V. Gobi, A. Ramasubbu, R. Ramaraj, *Res. Chem. Intermed.* **1992**, 18, 203.
- [102] Y. Ye, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2263.
- [103] C. A. Pessoa, Y. Gushikem, L. T. Kubota, *Electroanalysis* **1997**, 9, 800.
- [104] R. Zhan, S. Song, Y. Liu, S. Dong, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, 86, 3125.
- [105] R. H. Wopschall, I. Shain, *Anal. Chem.* **1967**, 39, 1527.
- [106] C. A. Pessoa, Y. Gushikem, L. T. Kubota, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 431, 23.
- [107] G. E. P. Box, W. S. Hunter, J. S. Hunter, "Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building", New York: Wiley & Sons Inc., 1978.
- [108] D. C. Montgomery, "Design and Analysis of Experiments", John Wiley & Sons, New York, 1991.
- [109] G. Liu, B. J. V. Wie, D. Leatzow, B. Weyrauch, T. Tiffany, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 408, 21.
- [110] E. R. Pereira-Filho, R. J. Poppi, M. A. Z Arruda, *Quím. Nova* **2002**, 25, 246.
- [111] A. A. Ensofi, T. Khayamian, B. Hemmateenejad, *Anal. Lett.* **1999**, 32, 111.

Referências bibliográficas

- [112] R. F. Rocha, S. S. Rosatto, R. E. Bruns, L. T. Kubota, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 433, 73.
- [113] M. E. P. Hows, D. Perrett, J. Kay, *J. Chromat. A.* **1997**, 768, 97.
- [114] N. Nagata, P. G. Peralta-Zamora, L. T. Kubota, *Anal. Sci.* **1999**, 15, 761.
- [115] B. Barros Neto, I. S. Scarminio, R. E. Bruns, "Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria", ed. UNICAMP, Campinas, 1995.
- [116] A. S. Alfaya, Y. Gushikem, S. C. Castro, *Chem Mater.* **1998**, 10, 909.
- [117] H. Nakayama, T. Eguchi, N. Nakamura, S. Yamaguchi, M. Danjvo, M. Tshako, *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 1063.
- [118] S. V. Crowder, K. L. Jensen, W. R. Stephenson, S. Vardemir, *J. Qual. Tech.* **1988**, 20, 140.
- [119] L. T. Kubota, F. Gouveia, A. N. Andrade, B. G. Milagres, G. Oliveira Neto, *Electrochim. Acta* **1996**, 91, 1465.
- [120] S. Gravesen, J. C. Frisvad, R. A. Samson, "Microfungi", HighTech PrePress A/S, Copenhagen, 1994.
- [121] D. R. Boyd, N. D. Sharma, S. A. Haughey, M. A. Kennedy, B. T. McMurray, G. N. Sheldrake, C. C. R. Allen, H. Dalton, K. Sproule, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1998**, 112, 1929.
- [122] H. L. Holland, F. M. Brown, G. Lakshmaiah, B. G. Larsen, M. Patel, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 683.
- [123] V. Alphand, N. Gaggero, S. Colonna, P. Pasta, R. Furstoss, *Tetrahedron* **1997**, 53, 9695.
- [124] J. Beecher, a. Willetts, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 1899.

Referências bibliográficas

- [125] H. L. Holland, F. M. Brown, A. Kerridge, C. D. Turner, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **1999**, 6, 463.
- [126] M. C. Carreño, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1717.
- [127] B. M. Trost, I. Fleming, *Comprehensive Organic Synthesis*, Oxford, New York, vol. 6, 1993.
- [128] J. B. Jones, G. Desantis, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 99.
- [129] I. Chibata, L. B. Wingard, *Adv. Biochem. Bioeng.* **1983**, 4, 1.
- [130] H. L. Holland, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 171.
- [131] J. R. Cagnon, A. L. M. Porto, G. P. Manfio, S. Y. Eguchi, A. J. Marsaioli, *Chemosphere* **1999**, 38, 2237.