

ESTUDO DA REDUÇÃO DE ÍONS Fe^{+3} POR COMPOSTOS ORGÂNICOS UTILIZANDO FERROZINA PARA DETECTAR ÍONS Fe^{+2}

André Aguiar¹ e André Ferraz²

Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Cp 116, 12600-000 Lorena-SP, Brasil; 1-amendes@alunos.fauenquil.br; 2-aferraz@debiq.fauenquil.br.

Abstract

The main objective of this work was to evaluate iron-reducing activity mediated by some organic compounds, mainly phenols, according to their structures using ferrozine as indicative chelant of ion Fe^{+2} . Of the compounds tested, dihydroxybenzenes were more effective, followed by guaiacol derivatives. Hydroxamates demonstrated the lower iron-reducing activity. For dihydroxybenzenes, the position of the hydroxyl groups on the aromatic ring was a decisive factor in the Fe^{+3} reduction.

Resumo

O principal objetivo deste trabalho foi o de avaliar a atividade redutora de íons Fe^{+3} promovida por alguns compostos orgânicos, principalmente fenóis, de acordo com suas estruturas utilizando ferrozina como quelante indicador da concentração de íons Fe^{+2} . Dos compostos testados, os di-hidróxi-benzenos foram mais eficientes, seguidos dos compostos derivados do guaiacol. Compostos com estruturas do tipo hidroxamato demonstraram as mais baixas atividades redutoras. Com relação ainda aos di-hidróxi-benzenos, a posição das hidroxilas no anel aromático foi o fator determinante na redução de Fe^{+3} .

Palavras-chave: ferro, fenóis, biodegradação de madeira, celulose e papel.

Área do Conhecimento: III- Engenharias

Introdução

Processos de oxi-redução desempenham um importante papel na degradação de matéria orgânica, tanto em processos naturais como em processos induzidos destinados a oxidação de matéria orgânica em efluentes e em água potável. Esses processos consistem na oxidação da matéria orgânica por um agente inorgânico como o ferro, o cobre e o manganês. O ferro apresenta dois estados de oxidação: a forma reduzida e solúvel Fe^{+2} , e a forma oxidada e menos solúvel Fe^{+3} (Pracht et al., 2001). Algumas substâncias fenólicas reduzem Fe^{+3} para Fe^{+2} , que na presença de H_2O_2 promovem a chamada reação de Fenton

(Figura 1), gerando radicais hidroxila ($\cdot OH$) que possuem um elevado potencial de oxidação. Alguns desses compostos são produzidos por fungos decompositores de madeira e também por bactérias (Kerem et al., 1999; Goodell et al., 1997), e atualmente são considerados como agentes importantes para a promoção da biodegradação de materiais lignocelulósicos. A degradação de um dos componentes da madeira, a lignina, também pode gerar esses agentes redutores (Aguiar et al., 2002; Ferraz et al., 2001).

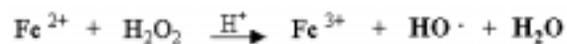


Figura 1- Reação de Fenton envolvendo a oxidação de Fe^{2+} por H_2O_2 .

A reação de Fenton tem sido considerada como uma boa alternativa para o tratamento de efluentes contendo altos teores de matéria orgânica, como os efluentes da indústria de celulose e papel (Rodríguez et al., 2001; 1999). Alguns estudos demonstraram que na presença de di-hidróxi-benzenos, a reação de Fenton é favorecida, demonstrando maior eficácia que a reação de Fenton não-catalisada (Rodríguez et al., 1999). Uma outra aplicação do sistema Fenton, utilizando di-hidróxi-benzenos e hidroxamatos, também tem sido reportada para o branqueamento de polpas celulósicas (Medeiros, 1999; Parra et al., 1998a).

Considerando que agentes redutores de Fe^{+3} podem apresentar aplicações em várias áreas e que até o momento não há um estudo sistemático sobre a atividade redutora de compostos estruturalmente correlatos, o principal objetivo desse trabalho é analisar a redução de Fe^{+3} promovida por vários compostos orgânicos, com estruturas do tipo catecol, guaiacol, siringol, hidroquinona e hidroxamato. A atividade redutora desses compostos foi comparada em condições experimentais idênticas (pH 4,5) e determinada a partir da complexação dos íons Fe^{+2} formados com ferrozina.

Metodologia

A capacidade que alguns agentes orgânicos possuem de quelar e reduzir Fe^{+3} foi avaliada pela reação com $FeCl_3$ em solução contendo ferrozina (Ferraz et al., 2001). A mistura reacional continha 0,8 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), 0,75 mL de amostra contendo o agente redutor, 0,4 mL de solução de ferrozina 1% e 0,05 mL de solução de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM, recentemente preparada. Os compostos redutores analisados nesse estudo estão listados na Tabela 1. A concentração das soluções estoques dos agentes redutores foi de 20 μM (concentração final na reação de 7,5 μM), exceto para o desferal e o ácido aceto-hidroxâmico, que foi de 100 μM (concentração final na reação de 37,5 μM). A quantidade de íons Fe^{+2} gerados foi determinada pela ferrozina, um reagente colorimétrico que forma um complexo

magenta estável com Fe^{+2} (Stookey, 1970). A absorvância foi medida em 562 nm por 10 minutos utilizando um espectrofotômetro UV/Visível GBC-Cintra 20. Foi feita uma curva de calibração utilizando $FeSO_4$ como padrão. Para o controle das medidas espectrofotométricas, substituiu-se a ferrozina e as amostras por água destilada. Uma reação controle também foi realizada para descontar o nível de íons Fe^{+2} do equilíbrio natural Fe^{+2}/Fe^{+3} , com solução de $FeCl_3$ e ferrozina.

Resultados e discussão

Na Tabela 1, são apresentados os valores de concentração de íons Fe^{+2} em μM gerados durante a oxidação dos compostos orgânicos analisados. Os compostos estão listados em ordem decrescente de atividade redutora. Como pode ser visto, os di-hidróxi-benzenos demonstraram maior atividade, principalmente os ácidos 2,5-di-hidróxi-tereftálico, 3,4-di-hidróxi-fenilacético (3,4-DHFA) e gálico (ácido 3,4,5- tri-hidróxi-benzóico). Os derivados do guaiacol também apresentaram resultados positivos, mas os catecolatos foram mais eficientes. Isso se deve ao fato que as duas hidroxilas vicinais dos catecóis foram mais suscetíveis a oxidação por Fe^{+3} do que a hidroxila e metoxila vicinais dos guaiacóis. Esse fato também foi observado por Pracht et al. (2001), verificando maior atividade de redução de Fe^{+3} para o catecol (1,2-benzenodiol), seguido do guaiacol (*o*-metóxi-fenol) e da hidroquinona (1,4-benzenodiol).

Com relação aos isômeros do ácido di-hidróxi-benzóico (DHB), 2,5-DHB demonstrou maior atividade redutora (22,8 μM) em comparação aos ácidos 2,3-DHB (19,1 μM) e 3,4-DHB (14,2 μM) (Figura 2). De acordo com o modelo descrito para a oxidação do ácido 2,3-DHB por Xu e Jordan (1988), o íon Fe^{+3} é reduzido pela hidroxila do carbono 2 do anel aromático com o auxílio da carboxila vicinal. A partir disso fica fácil explicar por que os ácidos 2,5-DHB e 2,3-DHB demonstraram maior atividade redutora que o ácido 3,4-DHB. Reforçando ainda mais essa explicação, com a presença de uma outra carboxila no carbono 4 do ácido 2,5-DHB, tem-se o ácido 2,5-di-hidróxi-tereftálico, o qual demonstrou maior eficiência na

redução de Fe^{+3} dentre todos os compostos testados ($34,4 \mu M$).

Os produtos da oxidação do catecol e do guaiacol são do tipo *o*-quinonas, os quais podem ser mineralizados a CO_2 . Já o produto da oxidação da *p*-hidroquinona não sofre mineralização por Fe^{+3} (Pracht et al., 2001). Nesse mesmo trabalho, a resorcina, um composto fenólico contendo uma outra hidroxila na posição meta, não desempenhou atividade redutora, pois não pode ser convertido a quinona. Os ácidos 2,4-DHB e 2,6-DHB também não demonstraram redução de Fe^{+3} por esse mesmo motivo (Figura 2).

Comparando os ácidos 3,4-di-hidróxi-benzóico e vanílico (ácido 4-hidróxi-3-metóxi-benzóico) o primeiro, como derivado do catecol, demonstrou maior atividade redutora que o segundo ($10,0 \mu M$), derivado do guaiacol. No entanto, com a adição de uma metoxila no carbono 5 tem-se o ácido siríngico, o qual proporcionou um aumento na atividade redutora ($11,39 \mu M$) em relação ao ácido vanílico.

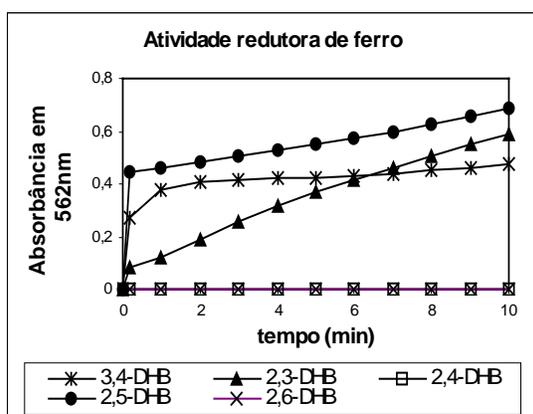


Figura 2- Atividade redutora de Fe^{+3} promovida pelos ácidos di-hidróxi-benzóicos.

Outro fator que também exerceu influência foi o grupo funcional no carbono 1 dos derivados do guaiacol. O álcool vanílico (álcool 4-hidróxi-3-metóxi-benzílico) demonstrou maior atividade que os ácidos ferúlico (ácido 4-hidróxi-3-metóxi-cinâmico) e vanílico (Figura 3). Já a vanilina (4-hidróxi-3-

metóxi-benzaldeído) proporcionou uma baixa atividade redutora ($3,28 \mu M$ de íons Fe^{+2}). Comparando as atividades do siringaldeído (4-hidróxi-3,5-di-metóxi-benzaldeído) e dos ácidos siríngico (ácido 4-hidróxi-3,5-di-metóxi-benzóico) e sinápico (4-hidróxi-3,5-di-metóxi-cinâmico) a quantidade de Fe^{+3} reduzido em 10 minutos foi praticamente a mesma.

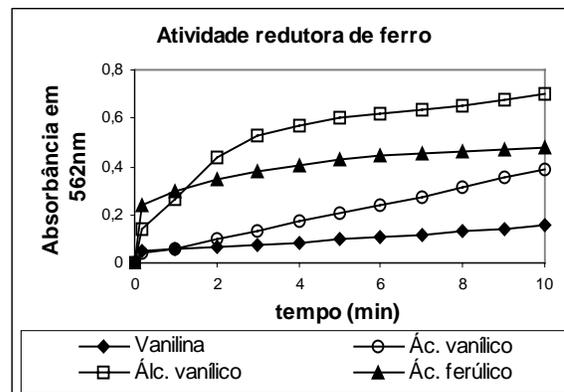


Figura 3- Atividade redutora promovida pelos derivados do guaiacol.

Os reagentes *o*-dianisidina (3,3'-di-metóxi-benzidina), siringol (2,6-di-metóxi-fenol) e ácido clorogênico são comumente utilizados nas determinações de atividades enzimáticas de lacases e peroxidases e também demonstraram atividade redutora de Fe^{+3} . Um outro substrato enzimático que também demonstrou atividade foi a siringaldazina (4-hidróxi-3,5-di-metóxi-benzaldeído-azina). Porém sua baixa solubilidade em água não permitiu uma análise quantitativa. ECOL (4-metil-amino-fenol-sulfato), um outro composto aromático possuindo um grupo hidroxila e um grupo amina na posição *para* também apresentou redução de Fe^{+3} . Já os compostos aromáticos com duas metoxilas vicinais como o álcool veratrílico (álcool 3,4-di-metóxi-benzílico) e o veratraldeído (3,4-di-metóxi-benzaldeído) não reduziram Fe^{+3} .

Tabela 1- Redução de íons Fe^{+3} mediada pela oxidação de compostos orgânicos utilizando o teste da ferrozina para detecção de íons Fe^{+2} .

Compostos quelantes de ferro analisados	Concentração (μM) de íons Fe^{+2} gerados em 10 min	% de íons Fe^{+3} reduzidos em 10 min de reação
Ácido 2,5-di-hidróxi-tereftálico	34,4 \pm 0,2	6,9
Ácido 3,4-di-hidróxi-fenilacético	34,1 \pm 0,1	6,8
Ácido cromotrópico	32,8 \pm 0,5	6,6
Ácido gálico	29,6 \pm 0,1	5,9
ECOL	28,6 \pm 0,6	5,7
Ácido 2,5-di-hidróxi-benzóico	22,8 \pm 0,5	4,6
Álcool vanílico	21 \pm 1	4,3
Ácido sinápico	21,39 \pm 0,03	4,3
Siringaldeído	21,3 \pm 0,6	4,3
Ácido siríngico	20,8 \pm 0,3	4,2
Ácido 2,3-di-hidróxi-benzóico	19,1 \pm 0,4	3,8
Ácido ascórbico	17,83 \pm 0,02	3,6
o-dianisidina	17,8 \pm 0,8	3,6
Catecol	16,08 \pm 0,09	3,2
Siringol	15,7 \pm 0,5	3,1
Hidroquinona	14,9 \pm 0,3	3,0
Ácido 3,4-di-hidróxi-benzóico	14,2 \pm 0,9	2,9
Ácido clorogênico	14,7 \pm 0,3	2,9
Ácido ferúlico	14,4 \pm 0,3	2,9
Ácido vanílico	10,0 \pm 0,8	2,0
Cisteína	5,4 \pm 0,5	1,1
Alizarina S	4,5 \pm 0,7	0,9
Vanilina	3,28 \pm 0,01	0,7
Ácido aceto-hidroxâmico	7,4 \pm 0,8	1,5
Desferal	2,4 \pm 0,3	0,5

Os ácidos 2,4- e 2,6-di-hidróxi-benzóico, álcool veratrílico, veratraldeído e a siringaldazina não apresentaram atividade redutora detectável em 10 minutos de reação.

O ácido aceto-hidroxâmico e o desferal (mesilato de desferoxamina ou desferoxamina B), compostos do tipo hidroxamato que apresentam em suas estruturas ligações de hidroxilamina, geraram as mais baixas quantidades de íons Fe^{+2} durante as reações. Medeiros (1999) também observou menores valores para esses compostos quando comparados às atividades dos ácidos 2,3-DHB e 3,4-DHFA.

Apesar de apresentar uma baixa atividade redutora, Parra et al. (1998b) observou uma eficiente oxidação de lignina e clorolignina pelo complexo ácido aceto-hidroxâmico- Fe^{+3} . Em um outro trabalho do mesmo grupo (Parra et al., 1998c) o ácido 2,3-DHB foi eficiente na degradação de um efluente de branqueamento de polpa celulósica na presença de Fe^{+3} . Estudando a

degradação de compostos clorados, comumente gerados pelas indústrias de celulose e papel, e de um efluente real e proveniente do branqueamento de polpa, Rodríguez et al. (1999; 2001) demonstraram uma maior eficiência na reação de Fenton catalisada pelo catecol e pelos ácidos 2,3-DHB e 3,4-DHB, comparada à reação de Fenton convencional. Esse fato pode ser esclarecido por Nappi e Vass (1997), demonstrando maior geração de radicais hidroxila durante a reação de Fenton catalisada pelos quelantes ácido ascórbico, os tióis cisteína e glutatona, e alguns derivados do catecol. O sistema DHB/ H_2O_2 / Fe^{+3} também promoveu diminuições da toxicidade e do teor de matéria orgânica de um efluente de branqueamento de polpa, principalmente

com o ácido 2,3-DHB (Rodríguez et al., 1999).

Uma outra aplicação de agentes quelantes e redutores de Fe^{+3} tem sido descrita no branqueamento de polpas celulósicas. No tratamento de polpas kraft, Parra et al. (1998a) observaram uma redução do número kappa, mas também com perda da viscosidade da polpa. Isso se deveu ao fato de que após a etapa de branqueamento com H_2O_2 , o ferro presente nas polpas pode ter reagido com os catecóis gerando íons Fe^{+2} , que ao reagir com o peróxido geram radicais hidroxila, os quais podem atacar tanto a celulose quanto à lignina presente na polpa, sem apresentar seletividade. Utilizando compostos com características de catecóis, parcialmente purificados de cultivos do fungo *Ganoderma applanatum*, pôde-se observar uma preservação da viscosidade, mesmo com bons níveis de deslignificação das polpas estudadas (Parra et al., 1998a).

Medeiros (1999) estudou o tratamento de polpas kraft de eucalipto com os ácidos aceto-hidroxiâmico, 2,3-DHB e 3,4-DHFA e também com o desferal. Tanto na presença quanto na ausência de ferro, o ácido 3,4-DHFA demonstrou maior eficiência na deslignificação, sem que houvesse uma redução significativa da viscosidade.

A literatura mostra ainda que muitos agentes quelantes de ferro são produzidos por fungos decompositores de madeira. Goodell et al. (1997) identificaram vários compostos derivados do catecol, produzidos pelo fungo *Gloeophyllum trabeum*. Dois anos depois, Paszczyński et al. (1999) e Kerem et al. (1999) isolaram em meios de cultura do mesmo fungo dois di-hidróxi-benzenos capazes de reduzir Fe^{+3} : 2,5-di-metóxi-hidroquinona e 4,5-di-metóxi-catecol. O mecanismo sugerido por Kerem et al. (1999) consiste na redução do íon Fe^{+3} por esses compostos gerando Fe^{+2} e um radical semiquinona. Esse radical pode ser oxidado às custas de um outro íon Fe^{+3} ou pode utilizar O_2 como acceptor de elétrons gerando uma benzoquinona e H_2O_2 , o outro "ingrediente" da reação de Fenton. A benzoquinona pode ser convertida a sua respectiva hidroquinona através de enzimas específicas produzidas pelo próprio fungo (Figura 4). Esse tem sido um dos mecanismos sugeridos para a degradação de

celulose e modificação da lignina por fungos de decomposição parda.

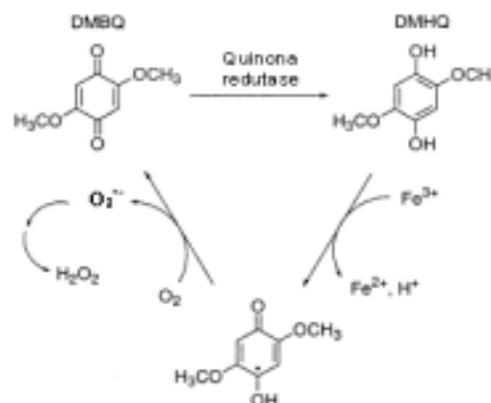


Figura 4- Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe^{+3} e produção de H_2O_2 pelo fungo *G. trabeum* (Kerem et al., 1999)

Além do radical semiquinona, carboxilato (CO_2^-) e superoxiânion (O_2^-), gerados pela oxidação de ácidos orgânicos de cadeia curta como o oxálico também demonstram atividade redutora de Fe^{+3} . O radical carboxilato reduz íons Fe^{+3} somente sob condições anaeróbicas. Sob condições opostas, esse radical utiliza O_2 molecular como acceptor de elétrons, gerando superoxiânion, o qual também possibilita a redução de Fe^{+3} (Khindaria et al., 1994).

De acordo com os resultados apresentados, novos compostos com atividade redutora de Fe^{+3} foram determinados utilizando ferrozina como indicador de íons Fe^{+2} . Dentre eles destacam-se os ácidos 2,5-di-hidróxi-terftálico e cromotrópico, produtos de degradação da lignina (vanilina, ácido vanílico) e alguns substratos que são utilizados na determinação de atividades enzimáticas, como a *o*-dianisidina e a siringaldazina. As posições das hidroxilas no anel aromático determinaram a capacidade de redução de Fe^{+3} dos di-hidróxi-benzenos. Compostos com duas hidroxilas vicinais ou posicionadas na posição *para*; uma hidroxila e uma metoxila vicinais; ou ainda contendo um grupo amina ao invés de hidroxila tanto nas posições *orto* ou *para* expressaram redução de Fe^{+3} . Dando continuidade a esse trabalho, esforços serão feitos para analisar a geração de H_2O_2 durante essas reações,

além de analisar o potencial oxidativo do sistema quelante/ $\text{Fe}^{+3}/\text{H}_2\text{O}_2$ e determinação dos radicais hidroxila também gerados.

Referências bibliográficas

AGUIAR, A., SOUZA-CRUZ, P. e FERRAZ, A. Uso da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas na identificação de compostos de baixa massa molar produzidos por *Ceriporiopsis subvermispota* durante a biodegradação de *Pinus taeda*. X Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP - SIICUSP, São Carlos, 6-8 de novembro de 2002.

FERRAZ, A., PARRA, C., FREER, J., BAEZA, J. e RODRIGUEZ, J. 2001. Occurrence of iron-reducing compounds in biodelignification "palo podrido" wood samples. Int. Biodet Biodegr, 47:203-208.

GOODELL, B., JELLISON, J., LIU, J., DANIEL, G., PASZCZYNSKY, A., FEKETE, F., KRISHNAMURTHY, S., JUN, L. e XU, G. 1997. Low Molecular Weight Chelators and Phenolic Compounds Isolate from Wood Decay Fungus and Their Role in the Fungal Biodegradation of Wood. J. Biotechnol., 53:133-152.

KEREM, Z., JENSEN, K.A. e HAMMEL, K.E. 1999. Biodegradative mechanism of the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. FEBS Letters, 446: 49-54.

KHINDARIA, A., GROVER, T. e AUST, S. 1994. Oxalate-dependent reductive activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., 314:301-306.

MEDEIROS, C. L. 1999. Tratamento de polpas com compostos de baixa massa molar, produzidos por fungos e compostos modelo de sideróforos. Dissertação de mestrado, FAENQUIL, Lorena.

NAPPI, A. J. e VASS, E. 1997. Comparative studies of enhanced iron-mediated

production of hydroxyl radical by glutathione, cysteine, ascorbic acid, and selected catechols. Biochim. Biophys. Acta, 1336:295-301.

PRACT, J., BOENIGK, J., ISENBECK-SCHOTER, M., KEPPLER, F. e SCHOLER, H.F. 2001. Abiotic Fe(III) induced mineralization of phenolic substances. Chemosphere, 44:613-619.

PARRA, C., OSES, R., RUIZ, J., URTUBIA, I., BAEZA, J., FREER, J. e RODRIGUEZ, J. 1998a. Kraft pulp bleaching by dihydroxybenzenes and siderophores from White rot fungi. 7^o International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vancouver, Canadá. Proceedings, Vol A: 161-164.

PARRA, C., SANTIAGO, M.F., RODRÍGUEZ, J. e DURÁN, N. 1998b. Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin and chlorolignin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 249:719-722.

PARRA, C., RODRÍGUEZ, J., BAEZA, J., FREER, J., e DURÁN, N. 1998c. Iron binding catechols oxidizing lignin and chlorolignin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 251:399-402.

PASZCZYNSKI, A., CRAWFORD, FUNK, D. e GOODELL, B. 1999. De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. Appl. Environ. Microbiol., 65:674-679.

RODRÍGUEZ, J., CONTRERAS, D., PARRA, C., FREER, J. e BAEZA, J. 2001. Dihydroxybenzenes-Driven Fenton reactions. Water Sci. Technol., 44:251-256.

RODRÍGUEZ, J., CONTRERAS, D., PARRA, C., FREER, J., BAEZA, J. e DURÁN, N. 1999. Pulp mill effluent treatment by Fenton-type reactions catalyzed by iron complexes. Water Sci. Technol., 40:351-355.

STOOKEY, L. L. 1970. Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron. Anal. Chemistry, 42: 779-781.

XU, J. e JORDAN, R. B. 1998. Kinetics and mechanism of the oxidation of 2,3-dihydroxybenzoic acid by iron (III). Inorg. Chem., 27:4563-4566.

Agradecimentos à FAPESP (Processo 01/08734-6), CAPES e CNPQ