UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE QUÍMICA

ARARAQUARA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

THIAGO MESCOLOTO LIZIER

JUNHO/2009

THIAGO MESCOLOTO LIZIER

OCORRÊNCIA DE AMINAS AROMÁTICAS COMO SUBPRODUTOS DA DEGRADAÇÃO DOS CORANTES SUDAN III E DISPERSO AMARELO 9

Dissertação apresentada no Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni

Araraquara
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Lizier, Thiago Mescoloto
L789o Ocorrência de aminas aromáticas como subprodutos da degradação dos corantes sudan III e disperso amarelo 9 / Thiago Mescoloto Lizier. – Araraquara : [s.n], 2009
205 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Valnice Boldrin

1. Química analítica. 2. Corantes. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

THIAGO MESCOLOTO LIZIER

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 09 de junho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Maria Valnice Boldrin (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profª Drª Ângela Regina Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profª Drª Danielle Palma de Oliveira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

DEDICATÓRIA

À Deus por me dar sabedoria, força e garra para vencer na vida, com muita saúde e responsabilidade.

Aos meus pais, Conceição e Wagner por todos os ensinamentos, dedicação e confiança.

Ao meu irmão, Matheus, por todos os momentos alegres.

AMO MUITO VOCÊS.

Agradecimentos

Aos meus pais, por todo o apoio, dedicação, durante toda a minha vida, sem vocês nada disso seria possível, muito obrigado por acreditarem em mim e sempre me ajudar quando precisei. A meu irmão Matheus, sempre me dando apoio. Obrigado a minha cunhada Thabata por sempre me apoiar e ajudar em todos os momentos.

A professora Valnice, pela oportunidade de trabalhar no grupo, que nestes dois anos me ajudou em muitas coisas, sempre disposta a ensinar, tirar as dúvidas e incentivar quando todos os experimentos estão dando errado. Mais que uma orientadora, uma mãe do laboratório; Val você foi e continuará sendo uma pessoa muito especial na minha vida, obrigado por tudo, adoro você.

Aos professores, Nelson, Hideko e Pilar, pela grande colaboração nesses dois anos. Agradeço também a professora Danielle, pelo apoio na pesquisa e a professora Marilda Assis pela disponibilidade de trabalhar no seu laboratório.

Agradeço a Valeria Barros pela realização dos experimentos no laboratório da professora Marilda Assis na USP Ribeirão Preto.

A todos os amigos do IQ, que nesses 7 anos sempre juntos em todos os momentos. Agradeço em especial aos amigos que fiz na graduação, Michelle, Priscila, Kinho, Adriano, Fernando, DDD, Suelen, Mola, Jão, Jim Andréa, Stephane e todos outros que em todos esses anos.

Aos amigos do grupo de eletroanalítica, Priscila, Michelle, Claudia, Elaine (Pessoa), Paula, Diana, Marcelo Faber, Marcelo, Juliano, Luciano, Fabiana, Magno, Leandro, Daniela, Thais Tasso, Thais Gulim, Leonardo Paim, André, Regina, sem vocês esse mestrado não seria o mesmo.

Um agradecimento especial à Michelle e a Priscila por me agüentar durante toda a graduação e ainda no mestrado. Adoro vc Mi. Agradeço também em especial a Claudia por todo o apoio durante o mestrado, nem tem como agradecer.

Um agradecimento especial aos meus amigos de Tietê e região, Taffa, Thalles, Benhur, Paulo, Tuto, Gregory, João, Alessandro, Marcelo, Valdívia, Lívia, Lara, Gih, Wesley Silva, Thiago Bete, Renan Foltran, Renata Foltran, Murilo Martins, Evandro Saconi, DJ Cowboy, Daniel (Alemão), Guilherme, Brecha, Bruninho, João Victor, Priscila, Tupi, Joel, Bruno (Panda), Ciganinho, Marcos, Felipe Pavan, Evandro (Van), Fernando Beloto, Ana, Lívia e todos mais que fizeram parte da minha vida ate hoje. Muito obrigado, sem vocês eu não seria o mesmo. Valeu mesmo.

Agradeço também a toda a minha família que amo tanto. As minhas primas Nancy, Joana Cecília, Cidinha, Marisa, Danusa, Karina, Flavia, Rosana. Aos meus primos Ricardo, Renato, Marquino, Marcos, Amadeu, Carlos, Cisinho, Junior, Lucas, Mario Sergio, Dalmo, Nelsinho, Renato, Rafael, Gustavo Nelson e Gustavo. Às minhas tias e tios, Terezinha, Santo, Pedro, Tere, Joana, Ciso, Helena, Mario, Ana, Antonia, Juca, José, Ângela, Edval, Edson, Nilson, Claudia, Fátima, Alda. Vocês são muito especiais na minha vida, sempre me ensinando o lado certo da vida e sem dedicando a minha educação.

Agradeço a todos os funcionários e professores do Instituto de Química.

Agradeço a FAPESP, Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

"Procure ser um homem de valor ao invés de ser um homem de sucesso".
(Albert Einstein)

“Sejamos como o Sol, simplesmente brilha sem pedir nada em troca”.
(Anônimo)

“Os ventos que às vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar. Por isso não devemos chorar pelo que foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado. Pois tudo aquilo que é realmente nosso nunca se vai para sempre”.
(Bob Marley).

"A amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da felicidade um do outro"
(Platão)

"O homem não morre quando deixa de viver, mas sim quando deixa de amar"
(Charles Chaplin)

"Cada dia que passa sem um riso é um dia perdido".
(Charles Chaplin)

RESUMO

O presente trabalho investiga os subprodutos de oxidação e redução dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 (DA9) usando os processos de redução e oxidação eletroquímica sobre eletrodo de rede de platina, redução com hidrossulfito de sódio, oxidação com cloro ativo, oxidação com terc-butilhidroperóxido catalisado por ferroporfirina (FeTMPyP) e ação do complexo enzimático S9, com o objetivo de identificar aminas aromáticas carcinogênicas. O corante Sudan III é usado como adulterante em alimentos, e o corante DA9 usado na indústria têxtil e foram escolhidos no presente estudo por ostentar em sua estrutura grupos azo e grupos nitros, respectivamente passíveis de formarem amino derivados. A oxidação eletroquímica de ambos os corantes, foi investigada em potenciais de +1,5V, e as seguintes aminas foram detectadas como subprodutos: 2-naftilamina, 4-aminobifenil, 2-metoxi-5-metilanilina, benzidina, 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina, e o precursor fast garnet gbc, para o corante Sudan III e para o corante DA9 foram identificadas as seguintes aminas: anilina, 4,4'-oxidianilina, 3,3'-dimetilbenzidina, 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina e o precursor fast garnet gbc. Na redução eletroquímica foi utilizado um potencial de -1,2V para ambos os corantes e os subprodutos identificados foram: 2,6-dimetilanilina, 4,4'-oxidianilina, o-toluidina, benzidina, 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina e 4-aminobifenil para o corante Sudan III e para o DA9 foram identificadas os seguintes subprodutos: 2,4-diaminotoluidina, o-toluidina, 2,6-dimetilanilina, 2-nitroanisol, 4-aminobifenil. Para a redução com hidrossulfito de sódio foram identificados: anilina e o-toluidina para o Sudan III e anilina, o-toluidina e 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina para DA9. Na cloração química dos corantes não se observou a formação de nenhuma das 25 aminas carcinogênicas usadas como padrão. No entanto, a cloração posterior a prévia oxidação eletroquímica do Sudan III formou 2-naftilamina, 4-cloroanilina, α,α,α-triclorobenzidina, 3,3'-diclorobenzidina e 4,4'-metileno-bis-2-cloroanilina enquanto que para DA9 foi detectado anilina, 4,4'-oxidianilina, 3,3'-dimetilbenzidina, fast garnet gbc e 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina. A cloração após redução eletroquímica do corante Sudan III formou anilina, 4-cloroanilina e 4-cloro-o-toluidina enquanto que para o corante DA9 observou-se a formação de benzidina, 3,3'-diclorobenzidina, 4-cloroanilina e α,α,α-triclorobenzidina. Processos de cloração do corante Sudan reduzido previamente com hidrossulfito de sódio promoveram a formação de anilina e o-toluidina enquanto para o DA9 foi identificado a formação de 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina. Ambas as reações de oxidações catalisadas por ferroporfirina e citocromo P-450 levaram a formação de produtos idênticos, tais como 4,4'-oxidianilina, nitrobenzeno, 2-nitroanisol, 3,3-diclorobenzidina e precursor fast garnet gbc, para o corante Sudan III, e benzidina, 4-cloro-o-toluidina e o precursor fast garnet gbc para o corante DA9. Os resultados comprovam que os subprodutos gerados após degradação ou outras rotas de metabolização destes corantes podem ser mais nocivos ao ser humano e ambiente que o próprio corante original.

ABSTRACT

This work investigates the by products of oxidation and reduction of dyes Sudan III and Disperse Yellow 9 (DA9) using the processes of electrochemical oxidation and reduction on platinum electrode network, reduction with sodium hydrosulphite, oxidation with active chlorine, oxidation with tert-butylhydroperoxide catalyzed by Ironporphyrin (FeTMPyP) and action of the enzyme complex S9, to identify carcinogenic aromatic amines. The dye Sudan III is used as in food adulterate and DA9 dye used in textile industry and in this study were chosen for display in its structure azo groups and nitro groups, respectively, likely to form amino derivatives. The electrochemical oxidation of both dyes, was investigated in potential of +1.5 V, and the following amines were detected as by-products: 2-naphthylamine, 4-aminobiphenyl, 2-methoxy-5-methylaniline, benzidine, 4,4'-methylene-bis-2-methylaniline, and precursory fast Garnet gbc to the dye Sudan III and for the dye DA9 were identified the following amines: aniline, 4,4'-oxydianiline, 3,3'-dimethylbenzidine, 4,4'-methylene-bis-2-methylaniline and precursory fast garnet gbc. Was used in the electrochemical reduction potential of -1.2 V for both dyes and by products identified were: 2,6-dimethylaniline, 4,4 '-oxydianiline, o-toluidine, benzidine, 4,4'-methylene-bis-2-methylaniline and 4-aminobiphenyl to the dye Sudan III and the DA9 were identified the following products: 2,4-diaminotoluidina, o-toluidine, 2,6-dimethylaniline, 2-nitroanisole, 4-aminobiphenyl. For the reduction with sodium hydrosulphite were identified as aniline and o-toluidine for Sudan III and aniline, o-toluidine and 4,4'-methylene-bis-2-methylaniline in DA9. In chlorination chemistry of dyes was not observed the formation of any of 25 carcinogenic amines used as standard. However prior to chlorination after electrochemical oxidation of Sudan III formed 2-naphthylamine, 4-chloroaniline, α,α,α-trichlorobenzidine, 3,3'-dichlorobenzidine and 4,4'-methylene-bis-2-chloroaniline while DA9 was detected for aniline, 4,4-oxydianiline, 3,3'-dimethylbenzidine, fast garnet gbc and 4,4'-methylene-bis-2-methylaniline. The chlorination after electrochemical reduction of the dye Sudan III formed aniline, 4-chloroaniline and 4-chloro-o-toluidine while for the dye DA9 there was the formation of benzidine, α,α,α-trichlorobenzidine, 3,3'-dichlorobenzidine, 4-chloroaniline. Processes of chlorination of the dye Sudan previously reduced with sodium hydrosulphite promoted the formation of aniline and o-toluidine while DA9 was identified for the formation of 4,4'-methylene-bis-2-methylaniline. Both of oxidation reactions catalyzed by Ironporphyrin and cytochrome P-450 led to formation of identical products, such as 4,4'-oxydianiline, nitrobenzene, 2-nitroanisole, 3,3'-dichlorobenzidine and precursory fast garnet gbc to the dye Sudan III, benzidine, 4-chloro-o-toluidine and the precursory to the fast garnet gbc dye in DA9. The results show that the sub products generated after degradation or other routes of metabolism of these dyes may be more harmful to humans and environment than the original dye

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: em (A) estrutura do Corante Disperso Amarelo 9 e em (B) estrutura do Corante Sudan III. 41

Figura 2: Em (A) estrutura da porfirina FeTMPyP (cloreto de 5,10,15, 20-tetraquis-(4-N-metilpiridil) porfirina ferro III) e em (B) estrutura química do oxidante terc-butilhidroperóxido..... 45

Figura 3: (**A**) cromatograma obtido para o corante sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da solução padrão solubilizada em metanol na concentração de $1x10^{-4}$ mol.L^{-1}, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/ACN 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, o qual apresenta dois picos com tempo de retenção de 5,7 e 6,5 minutos monitorado em 500nm; **Pico 1:** Sudan II; **Pico 2:** Sudan III; (**B, C**) espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para os picos 1 e 2 do corante Sudan III que eluem em 5,7 e 6,5 minutos respectivamente; Fase móvel MeOH/ACN 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 57

Figura 4: Estrutura química dos corantes Sudan II, Sudan III e Sudan IV..... 58

Figura 5: Cromatograma obtido para a mistura dos corantes Sudan II, III e IV, correspondentes à injeção de 20μL da solução padrão solubilizada em metanol na concentração de $1x10^{-4}$ mol L^{-1}, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/ACN 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm;..... 58

Figura 6: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para os corantes que eluem em 5,7; 6,3 e 7,4 minutos respectivamente; Fase móvel MeOH/ACN 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm..... 59

Figura 7: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondente à injeção de 20 μL da solução padrão de corante Sudan III na faixa de concentração desejada solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/ACN 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, e fase estacionária C18. (A) curva analítica pico 1 – Sudan II; (B) curva analítica pico 2 – Sudan III. 60

Figura 8: (A) cromatograma obtido para 20μL de solução $1,00x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 em metanol. Fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 400nm; (B) espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para o pico do corante Disperso Amarelo 9 que elue em 3,8 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm..... 61

Figura 9: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondente à injeção de 20 μL da solução padrão do corante Disperso amarelo em metanol. Fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 62

Figura 10: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da solução padrão solubilizada em metanol na concentração de $5x10^{-5}$ mol.L^{-1}, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol L^{-1} (pH= 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitoradas em 280nm. 68

Figura 11: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da solução padrão solubilizada em metanol na concentração de $5x10^{-5}$ mol L^{-1}, a partir da otimização da fase

móvel: MeOH/Tampão fosfato 5,00x10^{-5} mol L^{-1} (pH= 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitoradas em 280nm. 69

Figura 12: Voltamograma cíclico obtido para a oxidação do corante Sudan III. (a) eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01 mol L^{-1}, e (b) solução 1,00x10^{-4} mol.L^{-1} do corante Sudan III na presença de tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01mol.L^{-1}. velocidade de varredura 100 mV s^{-1}. 70

Figura 13: Voltamogramas cíclicos registrados para oxidação eletroquímica de 1,0×10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III sobre carbono vítreo em meio 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tretrabutilamonio em diferentes valores de υ. (a) 10 mV s^{-1}; (b) 20 mV s^{-1}; (c) 30 mV s^{-1}; (d) 40 mV s^{-1}; (e) 50 mV s^{-1}. 71

Figura 14: Em (A) influência da velocidade de varredura sobre o potencial e em (B) influência da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre a corrente de pico anódica na oxidação do corante Sudan III em presença de 0,01mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sob eletrodo de carbono vítreo..... 72

Figura 15: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletrooxidada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) sem tratamento; (b) após 1 hora; (c) após 1,5 horas; (d) após 2 horas. 73

Figura 16: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletrooxidada que eluem em 5,7 minutos (Sudan II – A) e 6,3 minutos (Sudan III – B); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 74

Figura 17: Porcentagem de descoloração do corante Sudan III após 2 horas de eletrólise à potencial controlado (oxidação), aplicando-se 1,5V sob eletrodo de trabalho de rede de platina, contra eletrodo de platina e referência Ag/AgCl. Pico 1 em preto; Pico 2 em vermelho. 75

Figura 18: Cromatograma CLAE/DAD obtido para 20μL de amostra do corante antes (a) e após 1h (b), 1,5h (c) e 2h (d) de eletrolise sob potencial de +1,5V em eletrodo de rede de platina.Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18..... 76

Figura 19: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,0 minutos (2-naftilamina); 4,7 minutos (benzidina) e 9,3 minutos (2-metoxi-5-metilanilina); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 77

Figura 20: Cromatograma CLAE/DAD obtido para 20μL de amostra do corante antes (a); após 1h (b); e 2h (c) de eletrolise sob potencial de +1,5V em eletrodo de rede de platina.Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 78

Figura 21: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,8 minutos (4,4'-metilen-bis-2-metilanilina); 4,4 minutos (4-aminobifenil) e 8,4 minutos (fast garnet gbc); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v)

(pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 79

Figura 22: Esquema das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado (oxidação) para o corante Sudan III, sob potencial de 1,5V sobre eletrodo de rede de platina..... 80

Figura 23: Voltamograma cíclico obtido para a redução do corante Sudan III. (a) eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01 mol L^{-1}, e (b) solução 1,00x10^{-4} mol.L^{-1} do corante Sudan III na presença de tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01mol.L^{-1}. velocidade de varredura 100 mV s^{-1}. 81

Figura 24: Voltamogramas cíclicos registrados para redução eletroquímica do corante Sudan III 1,0×10^{-4} mol L^{-1} sobre a superfície de carbono vítreo em meio de tetrafluorborato de tretrabutilamonio 0,01 mol L^{-1} para diferentes valores de υ. (a) 10 mV s^{-1}; (b) 20 mV s^{-1}; (c) 30 mV s^{-1}; (d) 40 mV s^{-1}; (e) 50 mV s^{-1}..... 82

Figura 25: Em (A) influência da velocidade de varredura sobre o potencial e em (B) influência da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódica na redução do corante Sudan III em presença de 0,01mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sob eletrodo de carbono vítreo..... 83

Figura 26: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) sem tratamento; (b) após 1h; (c) após 1,5h; (d) após 2h. 84

Figura 27: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletroreduzida que eluem em 5,7 minutos (Sudan II – A) e 6,3 minutos (Sudan III – B); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 85

Figura 28: Porcentagem de descoloração do corante Sudan III após 2 horas de eletrólise à potencial controlado (redução), aplicando-se -1,2V sob eletrodo de trabalho de rede de platina, contra eletrodo de platina e referência Ag/AgCl. Pico 1 em preto; Pico 2 em vermelho. 86

Figura 29: Cromatograma CLAE/DAD obtido para 20μL de amostra do corante antes (a) e após 1h (b), 1,5h (c) e 2h (d) de eletrolise sob potencial de +1,5V em eletrodo de rede de platina. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18..... 87

Figura 30: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 4,7 minutos (benzidina); 6,5 minutos (o-toluidina); 7,0 minutos (4,4'-oxidianilina) e 11,2 minutos (2,6-dimetilanilina). Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 5,00x10^{-5} mol L^{-1} (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 88

Figura 31: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1 hora; (c) após 1,5 horas; (d) após 2 horas... 89

Figura 32: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,8 minutos (4,4'-metilen-bis-2-metilanilina) e 4,4 minutos (4-aminobifenil); fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 89

Figura 33: Estruturas dos principais subprodutos formados a partir da reducao eletroquimica do corante Sudan III sob um potencial de -1,2V. 90

Figura 34: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) sem tratamento; (b) após 2 horas de reação química. 91

Figura 35: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra reduzida quimicamente que eluem em 5,7 minutos (Sudan II – A) e 6,3 minutos (Sudan III – B); Fase móvel ACN/MeOH 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 92

Figura 36: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 2 horas de reação química. 93

Figura 37: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,2 minutos (anilina) e 6,5 minutos (o-toluidina). Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 93

Figura 38: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 2 horas de reação química. 94

Figura 39: Estruturas das aminas formadas a partir da redução química para o corante Sudan III. . 95

Figura 40: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) amostra original; (b) amostra clorada. 96

Figura 41: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra clorada que eluem em 5,7 (Sudan II – A) e 6,3 minutos (Sudan III – B), respectivamente; Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 97

Figura 42: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) sem tratamento; (b) após reação; (c) após reação + cloração. 98

Figura 43: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as amostras reduzidas quimicamente e posteriormente cloradas que eluem em 5,7 minutos (Sudan II – A) e 6,3 minutos (Sudan III – B); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 98

Figura 44: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após reação + cloro..... 99

Figura 45: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,2 minutos (anilina) e 10,8 minutos (4-cloroanilina), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9) (v/v) e 20mM de trietilamina., T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm..... 99

Figura 46: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra e reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após reação + cloro.....100

Figura 47: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que elue em 4,1 minutos (4-cloro-o-toluidina); fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.....100

Figura 48: Estruturas das aminas formadas a partir da redução eletroquímica seguida de cloração convencional para o corante Sudan III.....101

Figura 49: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletrooxidada e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) após 2 horas; (b) após 2 horas + cloração. 102

Figura 50: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletrooxidada e posteriormente clorada que eluem em 5,7 minutos (Sudan II – A) e 6,3 minutos (Sudan III – B); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 103

Figura 51: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletrooxidada e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1h + cloro; (c) após 1,5h + cloro; (d) após 2h + cloro. 104

Figura 52: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,0 minutos (2-naftilamina); 4,9 minutos (4,4'-metileno-bis-cloroanilina) e 10,3 minutos (4-cloroanilina); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 105

Figura 53: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletrooxidada e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1h + cloro; (c) após 1,5h + cloro; (d) após 2h + cloro. 106

Figura 54: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos (3,3'-diclorobenzidina) e 10,0 minutos (α,α,α-triclorobenzidina); fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.....106

Figura 55: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado seguida de cloração para o corante Sudan III.....107

Figura 56: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) após 1,5 hora de eletroredução; (b) após 2 horas de eletroredução + cloração.....108

Figura 57: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletroreduzida e posteriormente clorada que eluem em 5,7 minutos (Sudan II – A) e 6,3 minutos (Sudan III – B); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 109

Figura 58: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1h + cloro; (c) após 1,5h + cloro; (d) após 2h + cloro. 109

Figura 59: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 9,3 minutos (2-metoxi-5-metilanilina); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.....110

Figura 60: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1h + cloro; (c) após 1,5h + cloro; (d) após 2h + cloro. 111

Figura 61: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos (3,3'-diclorobenzidina); fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.....111

Figura 62: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado seguida de cloração para o corante Sudan III.....112

Figura 63: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase

móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) sem tratamento; (b) após 4 horas; (c) após 15 horas. 114

Figura 64: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP) que eluem em 5,7 minutos (Sudan II – A) e 6,3 minutos (Sudan III – B); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 114

Figura 65: Porcentagem de degradação do corante Sudan III após 4 e 15 horas de reação, sob agitação à temperatura ambiente. Pico 1 em preto; Pico 2 em vermelho. 115

Figura 66: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 4h; (c) após 15h. 116

Figura 67: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 6,7 minutos (4,4'-oxidianilina); 8,4 minutos (2-nitroanisol) e 12,0 minutos (nitrobenzeno), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 117

Figura 68: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 4h; (c) após 15h. 118

Figura 69: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos (3,3'-diclorobenzidina) e 8,4 minutos (fast garnet gbc), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 118

Figura 70: Estruturas das aminas formadas a partir da reação química com porfirinas para o corante Sudan III. 119

Figura 71: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catálise do citocromo P-450, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (a) sem tratamento; (b) após 1,5 horas de incubação. 120

Figura 72: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra oxidada pela catálise do citocromo P-450 que eluem em 5,7 e 6,3 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 121

Figura 73: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catálise pelo citocromo P-450, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL

min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 4h; (c) após 15h. 121

Figura 74: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 6,7 minutos (4,4'-oxidianilina); 8,4 minutos (2-nitroanisol) e 12,0 minutos (nitrobenzeno), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 122

Figura 75: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 4h; (c) após 15h. 123

Figura 76: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos (3,3'-diclorobenzidina) e 8,4 minutos (fast garnet gbc), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.....123

Figura 77: Estruturas das aminas formadas a partir da reação química com citocromo P-450 para o corante Sudan III.....124

Figura 78: Voltamograma cíclico obtido para a oxidação do corante Disperso Amarelo 9. (a) eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01 mol L^{-1}, e (b) solução $1{,}00x10^{-4}$ mol.L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 na presença de tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01mol.L^{-1}. velocidade de varredura 100 mV s^{-1}.....125

Figura 79: Voltamogramas cíclicos registrados para oxidação eletroquímica de $1{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1} corante Disperso Amarelo 9 sobre carbono vítreo em meio de 0,01 mol L^{-1} tetrafluorborato de tretrabutilamonio em diferentes valores de υ. (a) 10 mV s^{-1}; (b) 20 mV s^{-1}; (c) 30 mV s^{-1}; (d) 40 mV s^{-1}; (e) 50 mV s^{-1}; (f) 100 mV s^{-1}. 126

Figura 80: Em (A, C e E) influência da velocidade de varredura sobre o potencial e em (B, D e F) influência da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre a corrente de pico anódica e catódica (varredura reversa) na oxidação do corante Disperso Amarelo 9 em presença de 0,01mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sob eletrodo de carbono vítreo. 127

Figura 81: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletrooxidada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, o qual apresentam picos nos tempos de retenção de 3,7 minutos, monitorado em 370nm; (a) sem tratamento; (b) após 1 hora; (c) após 1,5 horas; (d) após 2 horas; (e) após 3 horas. 129

Figura 82: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletrooxidada que elue em 3,7 minutos (Disperso Amarelo 9); Fase móvel ACN/MeOH 80:20 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.....129

Figura 83: Percentagem de degradação do corante Disperso Amarelo 9 após 3 horas de eletrólise à potencial controlado (oxidação), aplicando-se 1,5V sob eletrodo de trabalho de rede de platina, contra eletrodo de Platina e referência Ag/AgCl.....130

Figura 84: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletrooxidada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 0,5 hora; (c) após 1 hora; (d) após 2 horas; (e) após 3 horas; (B, C, D) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,8 minutos (anilina); 6,7 minutos (4,4'-oxidianilina) e 9,2 minutos (3,3'=dimetilbenzidina); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 131

Figura 85: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletrooxidada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; Pico 1: 4,4'-metileno-bis-(2-metilanilina) tr = 3,8min.; Pico 2: Fast garnet gbc tr = 8,4min.; (a) sem tratamento; (b) após 0,5 hora; (c) após 1 hora; (d) após 2 horas; (e) após 3 horas; (B, C) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,8 e 8,4 minutos, respectivamente; fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 132

Figura 86: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado (oxidação) para o corante Disperso Amarelo 9, aplicando um potencial de 1,5V.....133

Figura 87: Voltamograma cíclico obtido para a redução do corante Disperso Amarelo 9. (a) eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01 mol L^{-1}, e (b) solução 1,00x10^{-4} mol.L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 na presença de tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01mol.L^{-1}. velocidade de varredura 100 mV s^{-1}.....134

Figura 88: Voltamogramas cíclicos registrados para redução eletroquímica do corante Disperso Amarelo 9 1,0×10^{-4} mol L^{-1} sobre a superfície de carbono vítreo em meio de tetrafluorborato de tretrabutilamonio 0,01 mol L^{-1} para diferentes valores de υ. (a) 10 mV s^{-1}; (b) 20 mV s^{-1}; (c) 30 mV s^{-1}; (d) 40 mV s^{-1}; (e) 50 mV s^{-1}.....135

Figura 89: (A) influência da velocidade de varredura sobre o potencial; (B) influência da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódica na redução do corante Disperso Amarelo 9 em presença de 0,01mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sob eletrodo de carbono vítreo.....136

Figura 90: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (a) sem tratamento; (b) após 0,5h; (c) após 1h; (d) após 2h; (e) após 3h. 137

Figura 91: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletroreduzida que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.....138

Figura 92: Porcentagem de degradação do corante Disperso Amarelo 9 após 180 minutos de eletrólise à potencial controlado (redução), aplicando-se -1,2V sob eletrodo de trabalho de rede de platina, contra eletrodo de Platina e referência Ag/AgCl.....139

Figura 93: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem

tratamento; (b) após 1h; (c) após 2h; (d) após 3h; (B, C, D, E) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,7; 6,5; 11,2 e 11,2 minutos. 140

Figura 94: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1 hora; (c) após 1,5 horas; (d) após 2 horas; (B, C) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que elue em 4,4 minutos; fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 141

Figura 95: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado (redução) para o corante Sudan III, aplicando um potencial de -1,2V. 142

Figura 96: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (a) sem tratamento; (b) após reação. 143

Figura 97: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra reduzida quimicamente que eluem em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm; (a) sem tratamento; (b) após reação. 144

Figura 98: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após reação; (B, C) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,2 e 6,5 minutos, respectivamente; (a) sem tratamento; (b) após reação. 145

Figura 99: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após reação; (B) Espectro de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,8 minutos; (a) sem tratamento; (b) após reação. 146

Figura 100: Estruturas das aminas formadas a partir da redução química para o corante Disperso Amarelo 9. 146

Figura 101: Cromatograma obtido para o corante disperso amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, o qual apresenta os picos nos tempos de retenção de 3,7 minutos, monitorado em 380nm; (a) amostra original; (b) amostra clorada. 148

Figura 102: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra clorada que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. a) amostra original; (b) amostra clorada. 148

Figura 103: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (a) sem tratamento; (b) após reação; (c) após reação + cloração. 149

Figura 104: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra reduzidas quimicamente e posteriormente clorada que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. (a) sem tratamento; (b) após reação; (c) após reação + cloração. 150

Figura 105: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após reação + cloro; (a) sem tratamento; (b) após reação + cloro; (B, C) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 4,7 e 10,8 minutos, respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 151

Figura 106: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra e reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após reação + cloro; (B, C) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 e 10,0 minutos, respectivamente; fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 152

Figura 107: Estruturas das aminas formadas a partir da redução eletroquímica seguida de cloração convencional para o corante Disperso Amarelo 9. 153

Figura 108: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletrooxidada e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (a) após 0,5h; (b) após 0,5h + cloração; (c) após 1h; (d) após 1h + cloração; (e) após 2h; (f) após 2h + cloração; (g) após 3h; (h) após 3h + cloração. 154

Figura 109: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletrooxidada e posteriormente clorada que eluem em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 155

Figura 110: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado seguida de cloração para o corante Disperso Amarelo 9. 156

Figura 111: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (a) após 0,5h; (b) após 0,5h + cloração; (c) após 1h; (d) após 1h + cloração; (e) após 2h; (f) após 2h + cloração; (g) após 3h; (h) após 3h + cloração. 157

Figura 112: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletroreduzida e posteriormente clorada que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 158

Figura 113: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1h + cloro; (c) após 2h + cloro; (d) após 3h + cloro; (B) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 7,0 minutos; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 159

Figura 114: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 0,5h + cloro; (c) após 1h + cloro; (d) após 2h + cloro; (e) após 3h + cloro; (B) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos; fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 160

Figura 115: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado seguida de cloração para o corante Disperso Amarelo 9. 161

Figura 116: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (a) sem tratamento; (b) após 4 horas; (c) após 15 horas. 162

Figura 117: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra reduzidas quimicamente e posteriormente clorada que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 162

Figura 118: Percentagem de descoloração do corante Disperso Amarelo 9 reação catalisada pela ferroporfirina (FeTMPyP) em presença do oxidante terc-butilhidroperóxido sob agitação. 163

Figura 119: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catálise com a ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 4 horas; (c) após 15 horas; (a) sem tratamento; (b) após 4 horas; (c) após 15 horas; (B) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a benzidina; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 164

Figura 120: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catálise com a ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 4 horas; (c) após 15 horas; (a) sem tratamento; (b) após 4 horas; (c) após 15 horas; em (B) Espectros de absorbância

na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que elue em 4,1 minutos; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 165

Figura 121: Estruturas das aminas formadas a partir da reação química com porfirinas para o corante Disperso Amarelo 9. 166

Figura 122: (A) Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catálise do citocromo P-450, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (a) sem tratamento; (b) após 1,5 horas. 167

Figura 123: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra oxidada pela catálise do citocromo P-450 que elue em 3,7; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm; (a) sem tratamento; (b) após 1,5 horas. 168

Figura 124: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catálise pelo citocromo P-450, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1,5hora; (B) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amina que elue em 4,7 minutos; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 169

Figura 125: (A) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20μL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (a) sem tratamento; (b) após 1,5h; (B) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amina que elue em 4,1 minutos; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. 169

Figura 126: Estruturas das aminas formadas a partir da reação química com citocromo P-450 para o corante Disperso Amarelo 9. 170

Figura 127: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de benzidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 192

Figura 128: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de o-toluidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 192

Figura 129: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 3,3'-diclorobenzidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 193

Figura 130: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 2,4-diaminotoluidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 193

Figura 131: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 4,4'-diaminobifenilmetano solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 194

Figura 132: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 4-cloro-o-toluidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 194

Figura 133: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 4,4metileno-bis-2-cloroanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 195

Figura 134: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 2-naftilamina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 195

Figura 135: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 4,4-oxidianilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 196

Figura 136: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 2-nitroanisol solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 196

Figura 137: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 2-isopropil-3-metoxipirazina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 197

Figura 138: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 2-isobutil-3-metoxipirazina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 197

Figura 139: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de α,α,α-triclorotoluidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 198

Figura 140: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 2,6-dimetilanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 198

Figura 141: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de o-anisidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 199

Figura 142: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de o-anisidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 199

Figura 143: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 2-metoxi-5-metilanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 200

Figura 144: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 4-cloroanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 200

Figura 145: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 4,4'-metilene-bis-2-metilanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 201

Figura 146: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de Fast garnet gbc solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 201

Figura 147: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de Nitrobenzeno solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 202

Figura 148: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 3,3-dimetilbenzidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 202

Figura 149: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de Anilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 203

Figura 150: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 2-cloro-4-nitroanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 203

Figura 151: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μl da solução padrão de 4-aminobifenil solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18. 204

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas das aminas estudadas, e seus respectivos CAS number e classificação segundo IARC e NTP..... 49

Tabela 2: Estrutura química de algumas aminas e nitrobenzeno, respectivo tempo de retenção obtido de cromatograma CLAE/DAD. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol L^{-1} (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina..... 63

Tabela 3: Estruturas químicas de algumas aminas e precursor fast garnet gbc, respectivo tempo de retenção obtido de cromatogramas CLAE/DAD. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol L^{-1} (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina..... 64

Tabela 4: Parâmetros correspondentes às respectivas curvas analíticas obtidas para cada padrão selecionado por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20μL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1mL min^{-1}, detectados em 230nm. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol.L^{-1} (pH=6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina..... 65

Tabela 5: Parâmetros correspondentes às respectivas curvas analíticas obtidas para cada padrão selecionado por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20μL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1mL min^{-1}, detectados em 230nm. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol.L^{-1} (pH=6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina..... 65

Tabela 6: Recuperação de aminas selecionadas e outros derivados em amostras fortificadas pelo método da adição de padrão analisadas por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20μL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, detectados em 230nm. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol.L^{-1} (pH=6,9) 50/50 (v/v) e 20mM de trietilamina..... 66

Tabela 7: Recuperação de aminas selecionadas e outros derivados em amostras fortificadas pelo método da adição de padrão analisadas por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20μL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, detectados em 230nm. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol.L^{-1} (pH=6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina..... 67

Tabela 8: Parâmetros voltamétricos obtidos para a oxidação eletroquímica do corante Sudan III $1,0x10^{-4}$ mol L^{-1} em meio de tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,01 mol L^{-1}..... 72

Tabela 9: Aminas formadas a partir da oxidação do corante por eletrolise a potencial controlado após 3 horas aplicando potencial de 1,5V, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original..... 80

Tabela 10: Parâmetros voltamétricos obtidos para a redução eletroquímica de $1,0x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Sudan III em meio de tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,01 mol L^{-1}..... 83

Tabela 11: Principais subprodutos gerados na reducao do corante durante 2 horas de eletrolise a potencial controlado sob potencial de -1,2V..... 90

Tabela 12: Aminas formadas a partir da redução química do corante e a percentagem de formação em relação ao corante original. 95

Tabela 13: Aminas formadas a partir da redução quimica do corante seguida de cloração convencional, e a percentagem de formação em relação ao corante original. 101

Tabela 14: Aminas formadas a partir da oxidação do corante seguida de cloração convencional, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original. 107

Tabela 15: Aminas formadas a partir da redução do corante seguida de cloração convencional, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original. 112

Tabela 16: Aminas formadas a partir de oxidação por terc-butilhidroperoxido catalisada pela ferroporfirina (FeTMPyP).....119

Tabela 17: Aminas formadas a partir de oxidação catalisada pelo citocromo P-450. 124

Tabela 18: Parâmetros voltamétricos obtidos para a oxidação eletroquímica do corante Disperso Amarelo 9 $1,0\times10^{-4}$ mol L^{-1} em meio de tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,01 mol L^{-1}. 128

Tabela 19: Aminas formadas a partir da oxidação do corante por eletrolise a potencial controlado do corante Disperso Amarelo 9 após 3 horas aplicando potencial de 1,5V, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original. 133

Tabela 20: Parâmetros voltamétricos obtidos para a redução eletroquímica do corante Disperso Amarelo 9 $1,0\times10^{-4}$ mol L^{-1} em meio de tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,01 mol L^{-1}. 136

Tabela 21: Aminas formadas a partir da redução do corante Disperso Amarelo 9 por eletrolise a potencial controlado após 3 horas aplicando potencial de -1,2V, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original. 142

Tabela 22: Aminas formadas a partir da redução química do corante Disperso Amarelo 9 e a percentagem de formação em relação ao corante original. 147

Tabela 23: Aminas formadas a partir da redução quimica do corante seguida de cloração convencional, e a percentagem de formação em relação ao corante original. 153

Tabela 24: Aminas formadas a partir da oxidação do corante Disperso Amarelo9 seguida de cloração convencional, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original.....156

Tabela 25: Aminas formadas a partir da redução do corante seguida de cloração convencional, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original. 161

Tabela 26: Aminas formadas a partir da oxidação catalisada pela ferroporfirina (FeTMPyP) do corante Disperso Amarelo 9 após 4 e 15 horas de reação em temperatura ambiente na presença do oxidante terc-butilhidroperóxido. 166

Tabela 27: Aminas formadas a partir de oxidação catalisada pelo citocromo P-450 para o corante Disperso Amarelo 9. 170

Tabela 28: Subprodutos formados a partir dos métodos de degradação do corante Sudan III. 171

Tabela 29: Subprodutos formados a partir dos métodos de degradação do corante Disperso Amarelo 9. 172

ÍNDICE DE ESQUEMA

Esquema 1: Processo de redução metabólica de corantes azo aromáticos via ação enzimática (citocromo P450) [15]. 37

Esquema 2: Mecanismo de oxidação envolvendo citocromo P 450 onde o substrato é um corante azo. 38

Esquema 3: Processo de oxidação metabólica envolvendo formação de espécies radicalares. 39

ÍNDICE ANALÍTICO

1. INTRODUÇÃO 32

1.1. CORANTES TÊXTEIS 32

1.2. ROTAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA REDUÇÃO E OXIDAÇÃO DOS CORANTES AZO 36

1.3. CORANTE SUDAN III E DISPERSO AMARELO 9 40

1.4. OXIDAÇÃO QUÍMICA DOS CORANTES SUDAN III E DISPERSO AMARELO 9 43

1.5. DETERMINAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS DERIVADAS DE CORANTES AZOS 45

2. OBJETIVOS 51

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 52

3.1. INSTRUMENTAÇÃO 52

3.2. REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS 53

3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 54
3.3.1. Análises Cromatográficas para as Aminas 54
3.3.2. Análises Cromatográficas para os Corantes 54
3.3.3. Eletrólise a Potencial Controlado 54
3.3.4. Redução Química dos Corantes com Hidrossulfito de Sódio 55
3.3.5. Oxidação Química dos Corantes por Cloração 55
3.3.6. Oxidação dos Corantes com Terc-Butilhidroperóxido catalisado por Ferroporfirina (FeTMPyP) 56
3.3.7. Reações dos Corantes com Preparado S9 Contendo Citocromo P450 (Fração Microssomal de Fígado de Rato) 56

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 57

4.1. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CORANTE SUDAN III POR CLAE/DAD 57

4.2. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9 POR CLAE/DAD 60

4.3. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS POR CLAE/DAD 62

4.4. CORANTE SUDAN III 70

4.4.1. Oxidação Eletroquímica do Corante Sudan III 70
4.4.1.1. Oxidação Voltamétrica do Corante Sudan III 70
4.4.1.2. Oxidação Eletroquímica do Corante Sudan III por Eletrólise à Potencial Controlado 73
4.4.2 Redução Eletroquímica do Corante Sudan III 81
4.4.2.1. Redução Voltamétrica do Corante Sudan III 81
4.4.2.2. Redução Eletroquímica do Corante Sudan III por Eletrólise à Potencial Controlado 84
4.4.3. Redução Química com Hidrossulfito de Sódio 91
4.4.4. Oxidação Química do Corante Sudan III por Cloração 96
4.4.5. Cloração após Redução Química do Corante Sudan III 97
4.4.6. Cloração após Eletrooxidação do Corante Sudan III 102
4.4.7. Cloração após Eletroredução do Corante Sudan III 108
4.4.8. Oxidação Química do Corante Sudan III por Terc-Butilhidroperóxido Catalisada pela Ação da Porfirina (FeTMPyP) 113
4.4.9. Oxidação do Corante Sudan III pela Ação do Citocromo P-450 (Fração Microssomal de Fígado de Rato) 120

4.5. DISPERSO AMARELO 9 125

4.5.1. Oxidação Eletroquímica do Corante Disperso Amarelo 9 125
4.5.1.1. Oxidação Voltamétrica do Corante Disperso Amarelo 9 125
4.5.1.2. Oxidação Eletroquímica do Corante Disperso Amarelo 9 à PotencialL Controlado 128
4.5.2. Redução Eletroquímica do Corante Disperso Amarelo 9 134
4.5.2.1.Redução Voltamétrica do Corante Disperso Amarelo 9 134
4.5.2.2. Redução Eletroquímica do Corante Disperso Amarelo 9 por Eletrólise à Potencial Controlado 137
4.5.3. Redução Química com Hidrossulfito de Sódio 143
4.5.4. Oxidação Química do Corante Disperso Amarelo 9 por Cloração 147
4.5.5. Cloração após Redução Química do Corante Disperso Amarelo 9 149
4.5.6. Cloração após Eletrooxidação do Corante Disperso Amarelo 9 154
4.5.7. Cloração após Eletroredução do Corante Disperso Amarelo 9 157
4.5.8.Oxidação Química do Corante Disperso Amarelo 9 por Terc-Butildriperóxido Catalisada pela Ação da Porfirina (FETMPYP) 161
4.5.9. Oxidaçao do Corante Disperso Amarelo 9 pela ação do Citocromo P-450 (Fração Microssomal de Fígado de Rato) 167

5. CONCLUSÃO 173

REFERÊNCIAS.....175

6. APÊNDICE.....192

6.1. CURVAS ANALÍTICAS DAS AMINAS.....192

1. INTRODUÇÃO

1.1. CORANTES TÊXTEIS

Os corantes são substâncias orgânicas com alto grau de coloração aplicados em uma grande diversidade de indústrias, com maior destaque na indústria têxtil, farmacêutica, cosméticos, plásticos, fotográfica, automobilística, papel e alimentícia [1].

A tintura de tecidos é uma arte que começou há milhares de anos e o número de corantes disponíveis comercialmente é enorme. A tecnologia moderna envolvida no tingimento consiste de dúzias de etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras [1,2].

Até a metade do século XIX, todos os corantes eram derivados de folhas, ramos, raízes, frutos ou flores de várias plantas e substâncias extraídas de animal. Embora a indústria de corantes têxteis tenha se originado na Europa desde o século XVI, o primeiro corante sintético foi descoberto apenas em 1856 na Inglaterra [3,4]. Com a intensa inovação tecnológica ao redor de 1915, a Alemanha manteve o monopólio sobre a produção de corante sintético até a Segunda Guerra Mundial. Hoje, o grande mercado de corantes é proveniente da China e Índia que são responsáveis por 80% dos corantes disponíveis comercialmente. O Brasil embora seja um fabricante de corantes com exportação anual crescente ao redor de 40% ao ano [5] ainda não é auto-suficiente e importa uma grande quantidade de corantes da China e Índia. No entanto, o aumento de sua aplicação em tinturarias e curtumes no país tem sido relevante e levantado algumas preocupações.

Durante o processo de tingimento três etapas são consideradas importantes: a montagem, a fixação e o tratamento final [6,7]. A fixação do corante à fibra é feita através de reações químicas, da simples insolubilização do corante ou de derivados gerados. Entretanto, todo processo de tintura envolve como operação final uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas precedentes. A forma de fixação da molécula do corante a essas fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode

envolver basicamente 4 tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de Van der Waals e covalentes, dependendo do tipo de fibra e da finalidade de uso. As classes de corantes que existem no mercado são: Corantes Reativos, Diretos, Azóicos, Ácidos, à cuba, de Enxofre, Dispersos, Pré Metalizados e Branqueadores ópticos e outras [1].

Os corantes dispersos são pouco solúveis em água e utilizados na tintura de fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas através de suspensão (partículas entre 1 a 4 μm). Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre o corante e a fibra hidrofóbica. Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para tinturas de fibras sintéticas, tais como: acetato, celulose, náilon, poliéster e poliacrilonitrila [2].

Este grupo de corantes tem atraído maior atenção uma vez que grande parte desses corantes é baseado em compostos contendo a função azo-aromático como cromóforos. As principais rotas de biotransformação de corantes são oxidação, redução, hidrólise e conjugação [1,2]. O processo de hidrólise consiste em alguma mudança na estrutura da molécula fazendo com que a mesma fique mais solúvel e deste modo interaja com a fibra têxtil. Porém, no caso dos corantes azo, os processos de oxidação e redução são os mais importantes mecanismos de biodegradação destes [2].

Embora dados da EPA (US Environmental Protection Agency) e OECD (Organization for Economic Cooperation Development) tenham divulgado que em média grandes percentagens das diferentes classes de corantes têxteis são usualmente descartadas nos efluentes industriais sem tratamento adequado, poucos são os estudos direcionados para identificar e quantificar esses corantes em águas superficiais. Este problema é ampliado se considerarmos que estas águas podem ser submetidas á processos de cloração, ozonização, reações com compostos químicos diversos, e outras reações que podem levar á formação de subprodutos danosos ao ambiente e organismos vivos [1,2].

Um trabalho interessante sobre este assunto reporta alarmante atividade mutagênica de alguns corantes do tipo disperso portadores de grupo azo [8]. Durante avaliação da atividade mutagênica do resíduo final descartado por uma indústria têxtil

do Estado de São Paulo, sob supervisão da $Prof_a$. Dr_a. Gisela de Aragão Umbuzeiro foi demonstrado resultados positivos de mutagenicidade obtidos para as linhagens da bactéria *Samonella tiphymurium* TA98, TA100 e YG1041. Estas respostas positivas foram correlacionadas ao descarte industrial do corante disperso Dianix Preto CC3R, que é comercializado como mistura de três outros corantes sintéticos. Os resultados obtidos evidenciam resposta mutagênica tanto para os corantes coletados no efluente quanto para amostras de águas coletadas em superfícies localizadas a 6 km após o lançamento do rejeito [9,10]. Ainda observou-se resultado positivo de mutagenicidade na água tratada por métodos convencionais. Alguns estudos correlacionam os resultados positivos obtidos para mutagenecidade destas águas devido a resíduos destes corantes ainda presentes tanto no efluente quanto na água tratada e servida a população, bem como de seus derivados após reações de redução e/ou oxidação química ou biológica provenientes de degradações incompletas [12-13]. Estes resultados são preocupantes se considerarmos que os valores de revertentes mutagênicos encontrados estão muito acima daqueles permitidos para águas superficiais [14].

Nos últimos anos outros autores têm demonstrado que a indústria têxtil também é responsável por produzir alguns efluentes genotóxicos, devido às propriedades carcinogênicas e mutagênicas apresentada por alguns corantes e/ou metabólitos [11-15]. Uma análise comparativa tem ainda demonstrado que efluentes da indústria têxtil têm apresentado maior resposta mutagênica do que outras indústrias analisadas [16], constituindo assim, um problema sério que tem merecido muita atenção.

Alguns estudos têm associado alguns corantes com o câncer de bexiga em humanos, alguns sarcomas, hepatocarcinomas, anomalias nucleares em experimentos com animais e aberrações cromossômicas em células de mamíferos [15,17-21].

É importante destacar que vários dos azo corantes requerem ativação metabólica para exibir mutagenicidade, a saber redução e clivagem da ligação azo em aminas aromáticas, daí a importância de investigar processos oxidativos mimetizando as funções hepáticas, empregando o sistema de metabolização com as isoformas do complexo do citocromo P-450 acoplados aos testes de mutagenicidade.

Segundo Cramer e Ford [24], os corantes derivados de antraquinonas e trifenilmetano podem atuar como agente de eventuais disfunções celulares, além de serem tóxicas as células de mamíferos. [22,23].

Na literatura, ainda há muita controvérsia sobre a origem da mutagenicidade destes corantes. Isto pode ocorrer devido à catálise redutiva do grupo azo ou processos de redução do grupo nitro por azoredutases e nitroredutases da microflora intestinal ou enzimas do fígado [24,26] formando *N*-hidroxiderivados. Ainda podem ser acetilados por enzimas como *O*-acetiltransferase gerando íon nitrênio, capaz de reagir com o DNA e formar adutos [26,27].

Em adição, a literatura especializada mostra que devido a problemas econômicos, países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não cessaram completamente a produção de alguns corantes à base de aminas aromáticas carcinogênicas, usualmente por serem de baixo custo e boa fixação sendo encontrados em efluentes lançados por indústria de tingimento [28,29].

Deste modo, sabe-se que diversos são os efeitos causados pela exposição a esses compostos e, muitos deles podem se manifestar mesmo em baixas concentrações. Assim, métodos analíticos cada vez mais sensíveis são requeridos para monitorar a presença destes compostos em matrizes deste tipo, onde os corantes são sucessivamente diluídos nos corpos de água, que muitas vezes acabam sendo utilizados como águas de captação em estações de tratamento de água municipais [30].

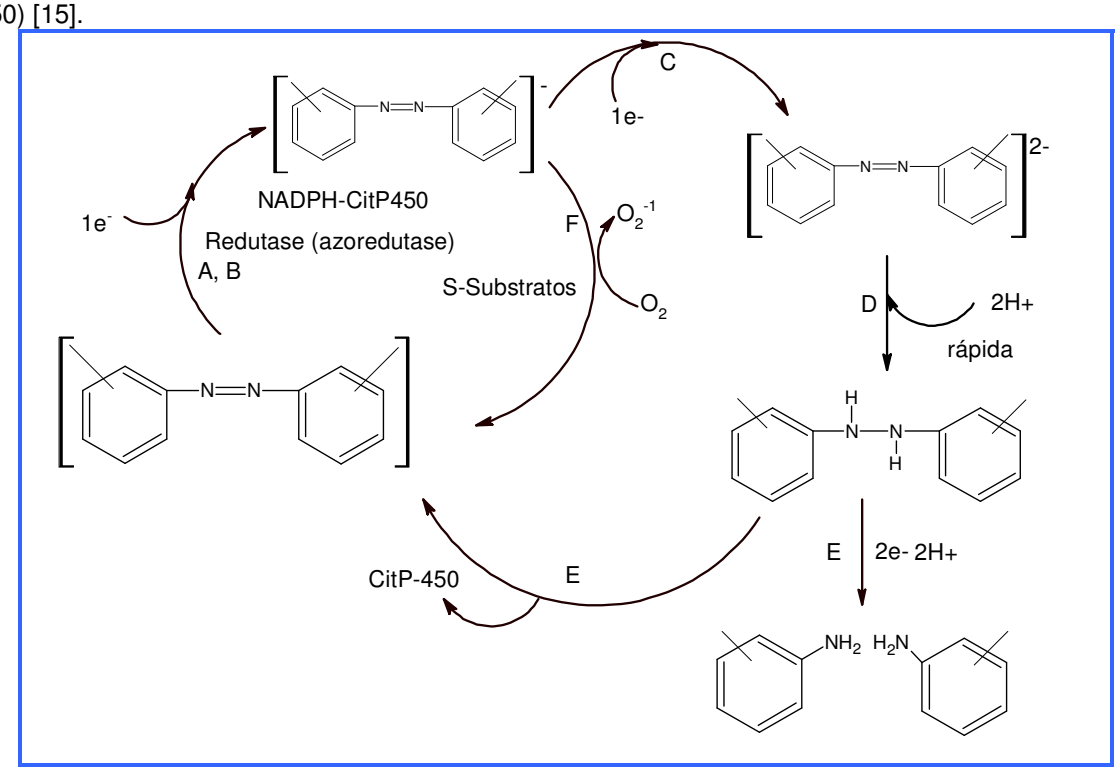
Os corantes e seus derivados apresentam diferenças significativas em suas propriedades físico-químicas. Em adição, os corantes azos e seus produtos de descoloração têm atraído uma grande atenção como poluentes devido ao seu alto impacto ambiental e suas propriedades toxicológicas, e à alta comercialização de seus produtos. Este tipo de corante representa aproximadamente 65% dos corantes utilizados na indústria têxtil, farmacêutica, alimentos e cosméticos [30]. Embora o assunto se mostre altamente relevante para avaliação das propriedades toxicológicas de determinada classe de corantes, os trabalhos envolvendo o diagnóstico dos produtos formados durante rotas metabólicas ou degradação no ambiente são escassos.

Em adição podem ainda gerar subprodutos algumas vezes mais danosos quando sujeitos a situações ambientais diferenciadas ou quando ingerido pelo ser humano ou outros organismos, e o grande desafio é conhecer as possíveis rotas de biotransformação destes corantes, com o objetivo de correlacionar sua estrutura química com o caráter toxicológico ou mutagênico de alguns corantes e seus subprodutos, visando prever o seu dano toxicológico antes de sua comercialização.

1.2. ROTAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA REDUÇÃO E OXIDAÇÃO DOS CORANTES AZO

As principais rotas de biotransformação de corantes azo são processos envolvendo redução, oxidação, hidrólise e conjugação que são catalisadas enzimaticamente [15,20]. Dentre elas, as reações de degradação via redução e oxidação são as mais importantes e os produtos gerados são preocupantes a nível toxicológico [31]. O citocromo P-450 monoxigenases estão entre os vários sistemas enzimáticos responsáveis pelos processos metabólicos. As enzimas P-450 pertencem a uma superfamília de heme proteínas que estão presentes em todos os organismos vivos, e elas estão envolvidas no metabolismo de uma ampla variedade de compostos químicos [38-41]. Exemplo é mostrado no **Esquema 1** e **Esquema 2** a seguir.

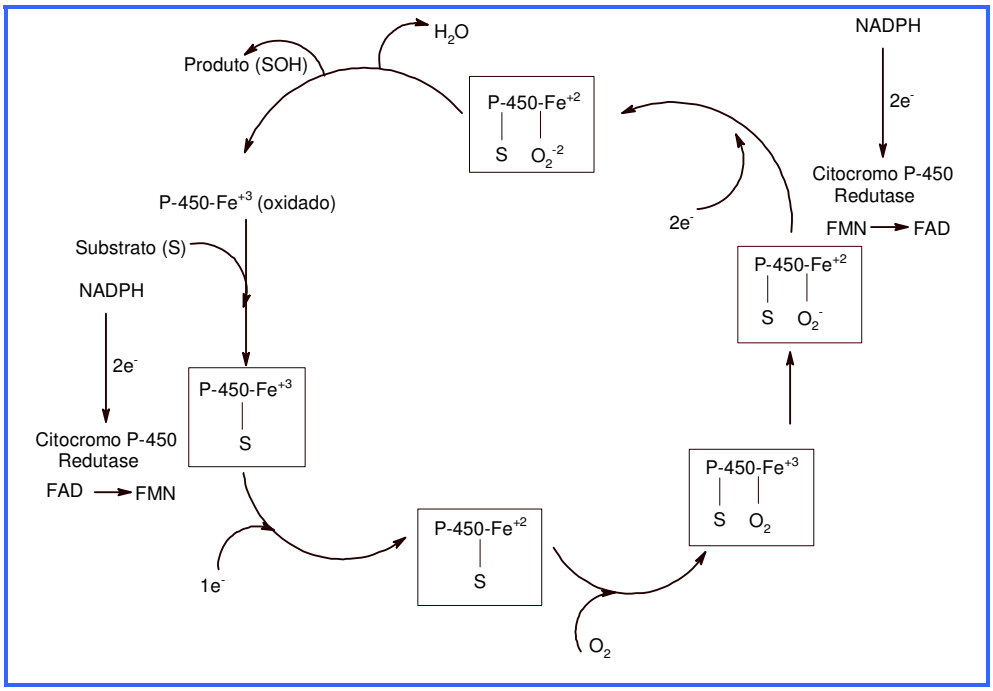
Esquema 1: Processo de redução metabólica de corantes azo aromáticos via ação enzimática (citocromo P450) [15].



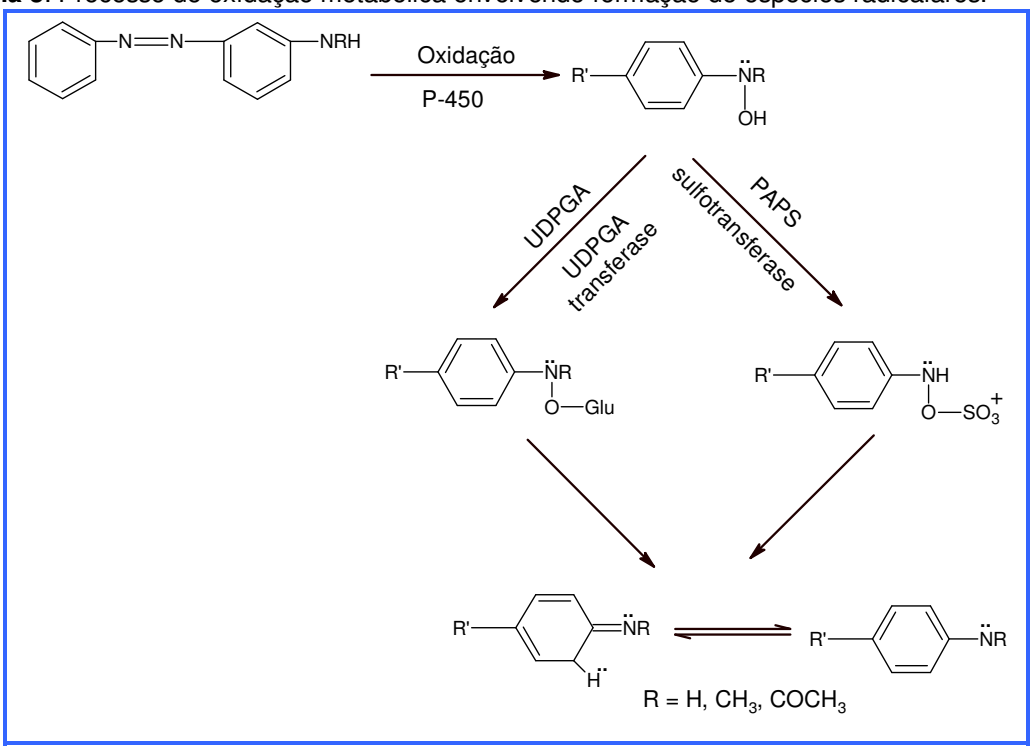
De acordo com Hunger [15], a redução de corantes azo pode ocorrer no fígado, via citocromo P-450, gerando aminas aromáticas com propriedades carcinogênicas, embora algumas aminas não apresentem caráter carcinogênico, como mostrado no **Esquema 1**. Deste modo, a geração de aminas aromáticas poderia ocorrer via redução destes grupos azos ou algumas vezes estar presente na formulação do corante azo devido a reduções parciais incompletas durante o processo de síntese. As propriedades carcinogênicas e mutagênicas de alguns corantes azos podem estar correlacionadas aos metabólitos formados sob condições de redução [15,32,33]. A toxicidade e carcinogenicidade de certos corantes azos em mamíferos podem resultar através da sua biotransformação catalisada por reações enzimáticas, incluindo as catalisadas por azoredutase presente no intestino dos mamíferos. Os produtos gerados podem ser mais ou menos tóxicos que a molécula original [15,32]. Esses compostos podem ser formados pela clivagem da ligação azo, e muitos deles são conhecidos pelo seu potencial carcinogênico e mutagênico [32,34].

Por outro lado, corantes azos com estruturas químicas contendo grupos amino, alquilamino ou acetilamino, sem nenhum grupo sulfonado são mais propensos à intensa ação de um metabolismo oxidativo. O processo não envolve a clivagem da ligação azo, porém leva a reações de hidroxilação, como mostrado no **Esquema 2** durante oxidação catalisada pelo citocromo P-450 ou outras modificações tais como formação de espécies radicalares, mostradas no **Esquema 3**. Como consequência pode-se formar compostos com alta potencialidade mutagênica ou carcinogênica devido às interações com grupos nucleofílicos das bases nitrogenadas presentes no DNA, mudança de polaridade, ou alteração na lipossolubilidade [15].

Esquema 2: Mecanismo de oxidação envolvendo citocromo P 450 onde o substrato é um corante azo.



Esquema 3: Processo de oxidação metabólica envolvendo formação de espécies radicalares.



O corante comporta-se como xenobióticos em geral. O processo metabólico oxidativo envolvendo o complexo do citocromo P-450 tem o intuito de converter esses corantes em intermediários biológicos menos lipossolúveis. Depois de serem absorvidos, eles se distribuem através do organismo, onde exercem algum tipo de ação ou se tornam alvo de mecanismos metabólicos secundários. Esses mecanismos podem produzir compostos menos nocivos; entretanto, eles podem sofrer bioativação, gerando compostos de maior toxicidade. A biotransformação de drogas compreende duas fases. Na **fase 1** promove mudanças na molécula original, como adição de um grupo funcional, os quais incluem reações de oxidação, hidrolise e redução. Com isso torna-se possível a **fase 2**, onde ocorrerá a conjugação [35-37]. O objetivo das **fases 1** e **2** é de tornar o composto mais polar para facilitar a eliminação do organismo. As fases 1 e 2 não necessariamente ocorrem nessa ordem e também não há a necessidade de ocorrer a fase 1 para ocorrer a fase 2, isso depende do composto que irá ser biotransformado e das enzimas presentes.[35-37].

Em virtude da alta probabilidade de formação de aminas aromáticas como subprodutos durante a redução de corantes azo, a união Européia publicou uma lista

com 22 aminas aromáticas classificadas como carcinogênicas e os respectivos corantes azos que após as clivagens podem levar a essas aminas [32]. No Brasil, podemos destacar a diretriz 2004/21/CE do INMETRO [42], em vigor desde 01/2005 que limita a colocação no mercado europeu de artigos acabados como têxteis e couro tintos com corantes portadores de grupos azo, que por clivagem redutiva possam liberar determinadas aminas aromáticas, detectáveis em concentrações superiores a 30 ppm. Esta diretriz tem por objetivo atender as exigências da comunidade européia preocupadas em proteger a saúde da população que, numa exposição prolongada a estas substâncias, se tornaria suscetível à instabilidade genômica, que pode induzir à formação de tumores. Preocupada com eventuais prejuízos para os exportadores brasileiros, a Associação Brasileira de Indústrias Têxteis e Confecções (ABIT) [43] e Associação Brasileira da Indústria Química (Abiquim) tem solicitado às empresas produtoras de corantes que atenda a Diretriz, coibindo a fabricação e comercialização destes corantes para artigos têxteis e couros.

Deste modo, estudos sobre os processos de degradação de corantes envolvendo reações de reduções e oxidações poderiam ser altamente relevantes por permitir a simulação de processos passíveis de ocorrem na biota aquática ou no metabolismo humano. Dentro deste contexto, pretende-se investigar sistemas miméticos dos processos de redução e oxidação do corante Disperso Amarelo 9 e Sudan III por métodos eletroquímico, químicos e biológicos, tais como o uso de sistemas porfirínicos mimetizando processos oxidativos e reações de redução com hidrossulfito de sódio.

1.3. CORANTE SUDAN III E DISPERSO AMARELO 9

Os corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 (**Figura 1**), foram escolhidos como modelo de corantes pertences á família de corantes dispersos sendo que o Sudan III apresenta um grupo azo como cromóforo e o Disperso Amarelo 9 apresentam grupos nitros na estrutura além de uma amina secundária central.

Segundo a Agência Internacional para a Investigação do Câncer (IARC – International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization) e ainda

o Relatório Anual do Programa de Toxicologia (NTP - us Government's Annual Report on Carcinogens from the National Toxicology Program) esses corantes são classificados como substâncias pertencentes ao grupo 3 e grupo 2B, para o Sudan III e o Disperso Amarelo 9, respectivamente. Segundo a IARC o grupo 2A são prováveis cancinogênicos, o grupo 2B são possíveis carcinogênicos e o grupo 3 não apresenta caráter carcinogênico em humanos, mas sim em animais. Já suas aminas derivadas da sua redução são pertencentes ao grupo 2A e 2B.

A escolha destes corantes se justifica, pois aminas aromáticas seriam esperadas para ambos os corantes devido a diferentes reações. No corante Sudan III poderiam ser geradas durante reações de redução e conseqüente clivagem do grupo azo. No corante Disperso Amarelo 9, aminas aromáticas poderiam ser geradas devido à redução do grupo nitro. No entanto, sabe-se que outras reações poderiam ser formadas devido à formação de espécies radicalares após transferência eletrônica em ambos os corantes quando submetidos à redução ou oxidação.

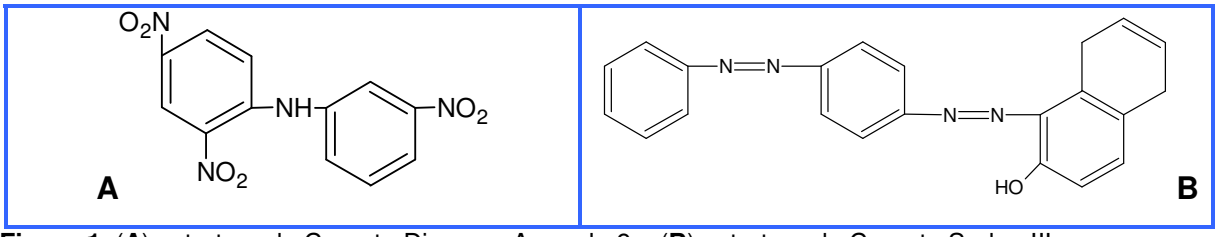


Figura 1: (**A**) estrutura do Corante Disperso Amarelo 9 e (**B**) estrutura do Corante Sudan III.

Dentro deste contexto, os trabalhos encontrados na literatura sobre a provável formação de aminas durante processos de redução ou oxidação de corantes são poucos. Dentre eles destacamos aqueles envolvendo a formação de aminas aromáticas via redução química de alguns corantes, descrito por Wlochowicz e colaboradores [44]. Eles estudaram a ação de hidrossulfito de sódio como agente redutor de vários corantes dispersos em meio alcalino e encontraram grande concentração de benzidina, p-fenilenodiamina e anilina como principais produtos.

Em adição, Garrigós e colaboradores [45], estudaram a determinação de aminas aromáticas formadas a partir da redução dos corantes Dispersos Vermelho1 e 13,

Disperso Laranja 25, Solvente Preto 3, Solvente Laranja 7, Solvente Vermelho 24, Solvente Amarelo 2, 3 e 14 usando hidrossulfito de sódio como agente redutor.

Embora o uso de técnicas eletroquímicas como processo mimético de oxidação e redução de corantes seja limitado, a técnica tem sido bastante utilizada com grande relevância como método de degradação de corantes. Em geral, os corantes apresentam grupos funcionais passíveis de sofrerem oxidação ou redução direta do substrato [46]. O uso de processos eletrolíticos diretos tem demonstrado que vários tipos de corantes de efluentes têxteis podem ser degradados por oxidação parcial sobre eletrodos de platina, aço inoxidável e ferro, fornecendo boa eficiência na remoção da cor. Estes resultados são exemplos de que a eletroquímica poderia contribuir para o desenvolvimento de metodologias simples para remoção de corantes em águas de rejeitos através da degradação total, da transformação parcial do poluente pelo simples processo de transferência eletrônica. Todavia, a eletrooxidação ou eletroredução de corantes sintéticos funciona apenas como instrumento transformador de compostos tóxicos e refratários (baixa biodegradabilidade) em compostos de maior ou menor toxicidade. Atualmente, sabe-se que uma simples modificação da estrutura molecular pode reduzir consideravelmente a toxicidade de um composto.

Assim, o uso de processos de eletrólise direta de corantes têxteis poderia ser uma valiosa ferramenta para diagnóstico de sistema de degradação da molécula que sob potencial ou corrente controlada indicaria a principal fonte de reagentes secundários gerados eletroliticamente, mimetizando reação redox importantes presentes no metabolismo humano ou meio ambiente, ressaltando a possível formação de subprodutos mais tóxicos que os corantes originais [47-49].

Outros tratamentos eletroquímicos de poluentes orgânicos é a eletrólise indireta gerando *in situ* agente oxidante para reagir com o poluente, assim como cloro e/ou hipoclorito e peróxido de hidrogênio. Cloro eletro gerados e/ou hipoclorito, é usado para desinfecção de água potável e de piscina, assim como aplicado como mediadores de eletrooxidação para tratamento de efluentes, entretanto, com o uso deles ocorre a formação de organoclorados [50-54].

Diversos pesquisadores têm investigado a eficiência da degradação eletroquímica de corantes selecionados usando uma grande diversidade de materiais

eletródicos, por exemplo, eletrodo titânio [55], eletrodo de platina [56], diamante e eletrodos de outros metais [57] e eletrodo de diamante dopado com boro [58,59]. Esses métodos estão sendo aplicados em escala laboratorial com boa remoção das substâncias orgânicas em diferentes condições experimentais [60,61].

Yousuf e colaboradores [61] desenvolveram um método de eletro coagulação onde o metal ferro é oxidado a Fe (II) ou Fe (III) e em meio básico forma o hidróxido correspondente. Esse hidróxido formado reage com o corante de interesse formando assim um complexo estável o qual é detectado pelo eletrodo.

Já Du, Han e colaboradores [63] desenvolverem um método para determinar Sudan I em molho de pimenta reduzindo eletroquimicamente Sudan I com eletrodo de carbono vítreo, sabendo que as ligações azo do mesmo podem ser reduzidas, obtendo nesse método uma linearidade de $2,4x10^{-6}$ a $1,8x10^{-5}$ mol L^{-1} e limite de detecção de $7,1x10^{-7}$mol L^{-1}. Também compararam esse método usando agora nanotubo de carbono, onde obtiveram uma melhor sensibilidade do método chegando a um limite de detecção de $4,5x10^{-7}$ mol L^{-1} foi conseguido.

No entanto a maioria destes estudos é realizada em pequena escala e não foram testados em escala industrial ou no tratamento de efluentes. Esses métodos não reportam os principais produtos gerados após o tratamento eletroquímico, como por exemplo, as aminas aromáticas, que são mais tóxicas que o corante original na grande maioria. Portanto esse trabalho tem interesse de realizar a oxidação e redução eletroquímica com estudo das aminas que foram formadas.

1.4. OXIDAÇÃO QUÍMICA DOS CORANTES SUDAN III E DISPERSO AMARELO 9

O uso de metaloporfirinas como sistema biomimético capaz de mimetizar as enzimas P-450 tem sido reportado na literatura [38,64-67]. As principais contribuições nessa área consistem na busca por diferentes estratégias e sistemas catalíticos seletivos, sensíveis e especificade [38,68]. Metaloporfirinas tem sido usada como modelo de citocromo P-450 e tem obtido alta eficiência em catálise homo e heterogênea para oxidação de alcenos, alcanos e xenobióticos assim praguicidas,

corantes e outros poluentes, na presença de oxidantes tais como hipoclorito de sódio, periodato de sódio, terc-butilhidroperóxido e peróxido de hidrogênio [68-70].

Embora a porfirina tetrafenilporfirina de ferro III com iodosilbenzeno tenha sido usada há mais de 25 anos como modelo funcional para citocromo P-450 em oxidação de hidrocarbonetos, o avanço na área tem sido relevante. O sucesso deste trabalho pioneiro levou à síntese de outras metalo tetrarilporfirinas e do desenvolvimento de três gerações de catalisadores, que variam dependendo do grau de substituição sobre o anel porfirínicos [71,72]. Embora as sínteses das últimas gerações de porfirinas envolvam matérias-primas mais caras e sínteses mais complexas, o produto tem apresentado maior robustez para degradação oxidativa e maior eficiência catalítica, permitindo estudos detalhados sobre oxidações catalisadas por estes complexos [72-76]. Na presença de oxidantes, metalo porfirinas são conhecidas por mimetizar as diversas reações de enzimáticas do citocromo P-450, tais como a oxidação de várias drogas e compostos biologicamente ativos. Alguns exemplos incluem a lidocaína, aminopireno [77], acetoaminofenol [78,79], entre outros [80-82].

É interessante notar que alguns peroxidases como a lignina-peroxidase, manganês peroxidase, catalisam a descoloração de corantes azo porque elas são agentes clareadores mais ativos do que os atualmente disponíveis e também são ambientalmente seguras [82].

Um grande número de sistemas catalíticos tem sido usado para melhorar a eficiência para descoloração dos corantes azos. Complexos de manganês não porfirínicos tem mostrado baixa capacidade de destruir os corantes azóicos [84].

A maioria deles envolve estudos com complexos metálicos imobilizados em matrizes sólidas [34,85,86]. Hage e coloboradores [82] estudaram a catálise do íon complexo de manganês em baixa temperatura para descoloração de corantes dispersos pelo peróxido de hidrogênio.

Namboodri e colaboradores [86] estudaram a descoloração de corantes azos catalisada pela ftalocianina de cobre na presença de peróxido quente. Entretanto, não existem trabalhos observando o efeito catalítico na síntese do complexo de porfirina para descoloração dos corantes azo em condições de pH neutro e em temperatura ambiente. Mamoru e colaboradores estudaram oxidação biomimética de corantes azo

catalisadas por polietileno glicol ligada por manganês porfirina ou mesoporfirina com peróxido de hidrogênio em solução aquosa. Esse complexo foi escolhido por causa da sua solubilidade em água e pelas propriedades bem definidas. Com esse complexo obteve-se a degradação de hidrocarbonetos aromáticos como tolueno e assim elucidar o mecanismo catalítico da porfirina [88].

Dentro deste contexto, seria altamente relevante testar a possível oxidação dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 pela ação da porfirina FeTMPyP catalisada pelo oxidação terc-hidrobutilhidroperóxido (**Figura 2A e B**), a qual mimetiza o citocromo P-450 [82], com o intuito de mimetizar o que pode ocorrer na biota aquática e nas rotas metabólicas do corpo humano. A análise dos produtos gerados durante o processo de oxidação poderia ser comparada com aqueles obtidos pelo método eletroquímico, visando principalmente detectar a ocorrência de aminas aromáticas como subproduto desta degradação.

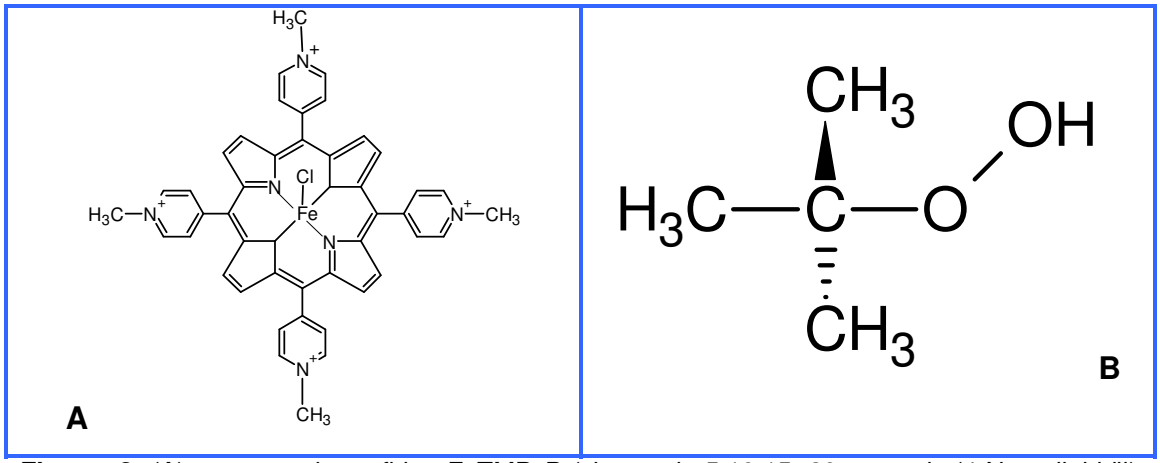


Figura 2: (A) estrutura da porfirina FeTMPyP (cloreto de 5,10,15, 20-tetraquis-(4-N-metilpiridil) porfirina ferro III) e (B) estrutura química do oxidante terc-butilhidroperóxido.

1.5. DETERMINAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS DERIVADAS DE CORANTES AZOS

Desde os primórdios do século XIX tem se observado uma crescente preocupação com a exposição do ser humano a aminas aromáticas carcinogênicas provenientes da indústria de fabricação e aplicação de corantes [89] Dentre as inúmeras possibilidades de geração de aminas aromáticas como contaminantes em águas superficiais, uma das mais difundidas na literatura é aquela em que a amina

aromática pode ser derivada da redução do grupo azo em corantes têxteis. Isto pode ocorrer em uma grande variedade de condições ecológicas, inclusive durante o trato digestivo em mamíferos [90]. Como consequência, estudos sobre situações onde a redução de corantes azo pode levar a geração de aminas aromáticas entre seus produtos químicos nocivos a saúde humana tem se tornado relevante para órgãos de inspeção e fabricantes de corantes em geral [91-93].

Aminas aromáticas podem entrar no meio ambiente como subprodutos de outros processos industriais, tais como branqueamento de papel, tintura de plásticos, coloração de alimentos e fármacos, produção de tintura e vernizes e entre outros [94]. Ainda podem estar presentes na formulação original dos corantes. Isto pode ocorrer, pois durante o processo de fabricação de corantes azos há muitas etapas químicas e muitas vezes o processo de purificação é deficiente e caro. Quanto maior o grau de pureza requerido do produto final maior é o número de etapas envolvidas durante a sua fabricação, assim formulações comerciais de corantes disponibilizados para a indústria têxtil usualmente apresentam baixo grau de pureza (35% á 90% m/m) e podem apresentar aminas aromáticas como contaminantes na sua composição como resquícios de reações ineficientes durante seu manufaturamento.

É importante ressaltar que a indústria têxtil é um setor de alta importância econômica no mundo, sendo responsável por uma produção de aproximadamente 700.000 toneladas de corantes e pigmentos anuais. Dentre eles, estima-se que pelo menos 3000 corantes pertencem a família de corantes contendo grupo azo como cromóforo [1,95]. Em vista disso, na última década muito esforço tem sido dispensado para a regulamentação de normas e leis com o objetivo de harmonizar uma visão internacional sobre a emissão de aminas aromáticas oriundas de corantes azo.

Estudos recentes têm mostrado que o aumento do consumo tão bem como o uso sem controle dos corantes e consequentemente a exposição das pessoas a eles e a seus produtos de degradação por via oral e por absorção pela pele, podem causar câncer na garganta e em outras partes do aparelho digestivo [96].

O reconhecimento de aminas aromáticas nocivas a saúde tem sido notória e alarmante se considerarmos o aumento no uso de corantes azo e a possibilidade desse cromóforo estar presente nos corantes de diversos tipos de classificação. Dentre eles, a

literatura reporta os derivados halogenados de anilinas, que são intermediários importantes na produção de corantes e produtos agrícolas [96,97]. A ocorrência de cloro anilinas, como por exemplo, a 3,5-dicloroanilina, que tem sido quantificada em amostras de água coletadas em rios. Estes estudos são relevantes, pois mostram que alguns derivados de anilina, principalmente monocloroanilina tem maior potencial nefrotóxicos que as monohaloanilinas [96-97].

Existem mais de 1000 formulações de corantes de cabelo registradas nos EUA [98], e sua grande maioria pode apresentar aminas aromáticas como contaminante tendo como exemplo, 2-naftilamina, 4-aminobifenil e benzidina [99].

Outros estudos reportam que a ocorrência de algumas aminas aromáticas presentes em fumaças de cigarro são responsáveis pela alta incidência de câncer de pulmão [100,101]. Após 100 anos de pesquisas sobre as aminas aromáticas podemos ter como conclusões gerais que a estrutura química é a determinante do potencial carcinogênico dessas substâncias. Por exemplo, a presença de uma metila na posição *orto* em relação ao grupo amino aumenta a mutagenicidade. Por outro lado, a presença de grupos N-acetil, reações de acetilação e desacetilação; oxidações bioquímicas, compostos hidroxilados, catalisadas pelas enzimas do citocromo P-450 podem provocar mutagenicidade além de danos na formação de hemoglobinas. A maioria das aminas aromáticas são genotóxicas, ou seja, podem reagir com o DNA e genes específicos, provocando assim mutações; além de aumentar a velocidade de duplicação celular por outros mecanismos e induzindo a mutagênese celular [101].

Varney e colaboradores [108] têm detectado benzidina e diclorobenzidina em nível de traços em águas de rejeito por cromatografia gasosa e detector de massas após derivatização das mesmas. Outros estudos, também reportaram a ocorrência de aminas aromáticas em efluentes da indústria têxtil como espécies responsáveis pela alta atividade mutagênica detectada nesses rejeitos [109].

Sugimura reporta a ocorrência de aminas heterocíclicas como produtos tóxico na fumaça emitida do cozimento de carnes e peixes [102]. Nesse estudo foi realizado o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* [103] e foi comprovada a atividade mutagênica desses compostos [104,105].

Weisburger e seus associados [106,107], têm estudado dietas ricas em gorduras na alta incidência de neoplasias em colón, próstata e pâncreas, pois esses alimentos podem atuar como promotores porém não se conhece até o momento como é a sua atuação, mas tem a possibilidade que essas substâncias mutagênicas formam-se durante o cozimento da mesma. Os autores têm desenvolvido um método para separação dos componentes por CLAE onde identificam o composto 2-amino-3-metilimidazol [4,5-f] quinolina como principal composto mutagênico.

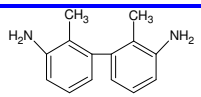
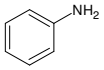
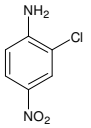
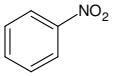
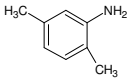
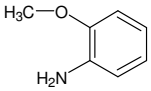
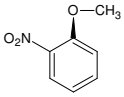
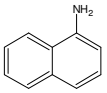
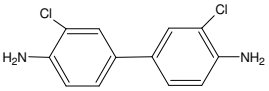
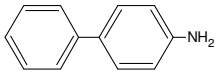
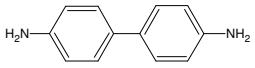
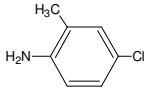
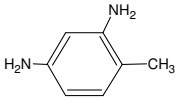
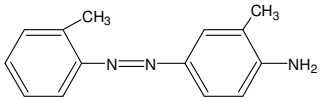
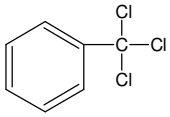
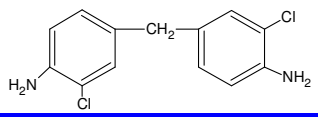
Em vista disso, a necessidade de métodos analíticos rápidos e confiáveis para avaliação de aminas tem sido de alta importância, assim como para avaliação da possibilidade de sua formação em situações que mimetizam aquelas submetidas rotineiramente quando os corantes azos estão no meio ambiente.

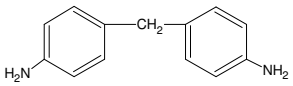
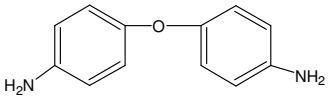
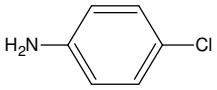
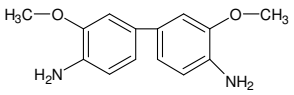
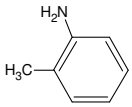
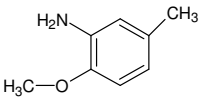
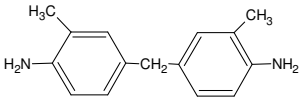
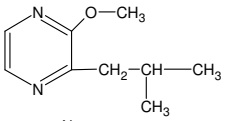
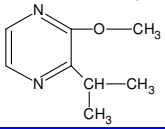
Os métodos analíticos mais frequentemente usados para quantificação de aminas são aqueles baseados em eletroquímica [108-112], espectrofotometria após reação de derivatização [113-115], cromatografia de camada delgada [116], cromatografia gasosa [117,118], cromatografia líquida com diversos tipos de detectores: UV-Vis [119,120], fluorescência [121] e eletroforese capilar [122,123], entre outros.

Dentre eles, podemos ressaltar a determinação de aminas em matrizes específicas, como por exemplo, em efluentes industriais [124,125], de tinturarias [126,127] e curtumes [128].

Dentro deste contexto, seria relevante otimizar um método analítico capaz de quantificar diversas aminas aromáticas e subprodutos de corantes têxteis. Assim, escolheu-se essas 25 aminas desta natureza e listadas na **Tabela 1** com o objetivo de otimizar uma metodologia para esses padrões e identificar sua ocorrência como possíveis contaminantes a serem gerados durante as reações de oxidação e redução dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9. As respectivas aminas aromáticas escolhidas para esta finalidade são condenadas pela CETESB. Essas aminas são classificadas pela IARC, a partir de testes realizados em animais e a evidência do aparecimento de câncer em humanos. A **Tabela 1** apresenta a lista das aminas escolhidas para o estudo. Em adição escolheu-se nitrobenzeno e outros corantes bases usados na formulação de corantes (fast garnet) também para acompanhar sua ocorrência com subprodutos após redução ou oxidação dos corantes de interesse.

Tabela 1: Estruturas das aminas estudadas, e seus respectivos CAS number e classificação segundo IARC e NTP.

Substância	Estrutura	CAS Number	Classificação NTP/IARC*
3,3'-dimetilbenzidina		119-93-7	B/2B
Anilina		62-53-3	--/3
2-cloro-4-nitroanilina		121-87-9	--/--
Nitrobenzeno		98-95-3	B/2B
2,5-dimetilanilina		87-62-7	--/2B
o-anisidina		90-04-0	--/2B
2-nitroanisol		91-23-6	B/2B
2-naftilamina		91-59-8	A/1
3,3'-diclorobenzidina		91-94-1	B/2B
4-aminobifenila		92-67-1	A/1
Benzidina		92-87-5	A/1 Corante 2A
4-cloro-2-metilanilina		95-69-2	B/2A
2,4-diaminotoluidina		95-80-7	--/2B
Fast Garnet GBC		97-56-3	B/--
α,α,α- triclorotolueno		98-07-7	B/2B
4,4'- metilenebis (2-cloroanilina)		101-14-4	B/2A

4,4'-diaminodifenilmetano		101-77-9	B/2B
4,4'-oxidianilina		101-80-4	B/2B
4-cloroanilina		106-47-8	--/2B
o-dianisidine		119-90-4	--/2B
o-toluidina		95-53-4	B/2A
2-metoxi-5-metilanilina		120-71-8	--/2B
4,4'-metileno-bis(2-metilanilina)		101-14-4	B/--
2-isobutil-3-metoxipirozina		24683-00-9	B/2B
2-isopropil-3-metoxipirozina		25773-40-4	B/2B

*Segundo a IARC o grupo 1 são compostos comprovadamente carcinogênicos, o grupo 2A provável carcinogênico em humanos, grupo 2B possível carcinogênico humano, grupo 3 não carcinogênico em humanos porém carcinogênico em animais. Segundo a NTP o grupo A são carcinogênico humano e B é provável carcinogênico humano.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar a ocorrência de aminas aromáticas como subprodutos da degradação dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 submetidos à redução e oxidação eletroquímica, oxidação por ação da porfirina FeTMPyP catalisada pelo oxidante terc-hidrobutilhidroperóxido e redução com hidrossulfito de sódio, com o intuito de mimetizar prováveis reações destes corantes via ciclo catalítico do citocromo P-450, ou modificações estruturas passíveis de ocorrerem na biota aquática e/ou rotas metabólicas do corpo humano.

Para atingir esses objetivos otimizou-se um método cromatográfico de Cromatografia Liquida de Alta Eficiência acoplado com Detector de Arranjo de Diodos para monitoramento dos corantes Disperso Amarelo 9 e Sudan III (**Figura 2A e Figura 2B**) e as 25 aminas aromáticas selecionadas (**Tabela 1**).

Posteriormente foi realizado o estudo de redução e oxidação dos corantes via eletrólise à potencial controlado sobre eletrodo de platina, submetendo-os à potencial constante, a fim de investigar a possível formação de aminas. Os resultados foram comparados com a redução química usando hidrossulfito de sódio, como agente redutor.

Subsequentemente foi realizado a reação de oxidação dos corantes por ação da porfirina FeTMPyP catalisada pela oxidação terc-butilhidroperóxido, a qual mimetiza o citocromo P-450, presente nas células do fígado, e os produtos foram comparados com aqueles submetidos à oxidação via reação com a fração microssomal de fígado de ratos, denominadas S9.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato EG&G PAR (Princeton Aplied Reserch) modelo 283, acoplado a um sistema de três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}); como eletrodo auxiliar platina e um eletrodo de carbono vítreo (área = 3,14 mm^2) como eletrodo de trabalho. As eletrólises à potencial controlado foram realizadas utilizando-se como eletrodo de trabalho uma rede de platina, eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}) como referência e platina como auxiliar.

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro com arranjo de diodos da HP modelo 8453, com cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico e faixa espectral monitoradas entre 200 à 800nm.

Agitador magnético TE 085 Tecnal Marconi, com aquecimento.

As curvas analíticas para os corantes e aminas padronizadas, os estudos de recuperação e a análise dos subprodutos gerados após os diferentes tipos de tratamento foram obtidos por análise cromatográfica usando um cromatografo líquido Shimadzu HPLC SCL-10AVP. A separação dos componentes foi efetuada utilizando-se uma coluna Shimadzu CLC-ODS (C18) com 25 cm de comprimento, 4,6mm de diâmetro interno e sílica com diâmetro de 5 μm com porosidade de 100 Å. Utilizou-se nas medidas uma pré-coluna do mesmo material, de 1,00 cm de comprimento, acoplada à mesma com o intuito de proteger a coluna principal de impurezas e partículas. Todas as amostras foram filtradas, antes de cada injeção com auxílio de uma seringa em filtros MILLEX Millipore (0,45 μm).

As condições utilizadas para as análises das aminas foram similares às mesmas descritas na literatura por Garrigós e colaboradores [45]. Os dados obtidos foram tratados utilizando o software OriginPro 7.5, além do Excel 2003.

O limite de detecção e quantificação foi calculado segundo as seguintes equações:

$$L.D. = 3{,}3\frac{erro\ de\ A}{coeficiente\ angular} \qquad L.Q. = 10\frac{erro\ de\ A}{coeficiente\ angular}$$

Sendo L.D. limite de detecção e L.Q. limite de quantificação. Erro de A é o erro obtido após a regressão linear dos pontos experimentais da curva. Coeficiente angular é o coeficiente obtido após a regressão linear dos pontos experimentais da curva.

Os estudos de recuperação foram realizados em água pelo método de adição de padrão para todas as aminas estudadas.

3.2. REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

- ✓ Sudan II (Sigma-Aldrich);
- ✓ Sudan III (Sigma-Aldrich);
- ✓ Sudan IV (Sigma-Aldrich);
- ✓ Disperso Amarelo 9 (Sigma-Aldrich);
- ✓ Dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) (Sigma-Aldrich);
- ✓ Monohidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich);
- ✓ Hidrossulfito de sódio (Sigma-Aldrich);
- ✓ Filtro de Membrana ME 25 (0,45μm) com ∅ 47 ± 0,5mm;
- ✓ Filtro MILLEX Millipore (0,45 μm);
- ✓ Metanol (J.T. Baker - grau HPLC);
- ✓ Acetonitrila (J.T. Baker - grau HPLC);
- ✓ 25 aminas (Sigma-Aldrich);
- ✓ Terc-butilhidroperóxido (Sigma-Aldrich);
- ✓ Tetrafluorborato de tetrabutilamônio (Sigma-Aldrich);
- ✓ Ferroporfirina (FeTMPyP);
- ✓ Água sanitária;
- ✓ Fração microssomal de células de fígado de rato;
- ✓ Glicose-6-fosfato;
- ✓ NADPH;
- ✓ Cloreto de potássio KCl;
- ✓ Cloreto de magnésio $MgCl_2$;

Soluções de hidrossulfito de sódio 0,1 mol.L^{-1} foram preparadas em água Milli-Q.

3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS PARA AS AMINAS

As aminas selecionadas foram preparadas em metanol (J.T. Baker), na faixa de concentração desejada, e estas em seguida analisadas em CLAE/DAD para obtenção da curva analítica. Para o estudo de recuperação da mesma, estas foram primeiramente solubilizadas em metanol e em seguida diluídas em água potável. As soluções foram filtradas em filtro MILLEX Millipore (0,45µm). Soluções de tampão fosfato (30µM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, pH = 6,9) com adição de 20mM de trietilamina, foram utilizadas como fase móvel. Após filtração em filtro de membrana ME25 (0,45µm), com ∅ 47 ± 0,5mm de diâmetro.

3.3.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS PARA OS CORANTES

A solução dos corantes Sudan II, III, IV e Disperso Amarelo 9 foram preparadas em metanol (J.T. Baker), na concentração de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} e posteriormente diluídas em água quando necessário e as análises foram conduzidas após filtração em filtro MILLEX Millipore (0,45µm).

3.3.3. ELETRÓLISE A POTENCIAL CONTROLADO

As medidas voltamétricas, foram realizadas transferindo-se 40mL da solução do corante em metanol após 10 minutos de desaeração com N_2. As eletrólises a potencial controlado foram conduzidas em potencias mais negativos ou positivos que aquele obtido dos voltamogramas. Nas eletrólises transferiu-se 40mL da solução do corante Sudan III em metanol, e a mesma foi submetida à potencial de

-1,2V para a redução e +1,5V para a oxidação. Ambos os corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 foram eletrolisados e as alíquotas da solução foram removidas após 0 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas para o Sudan III e para o corante Disperso Amarelo 9, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas. Essas alíquotas foram filtradas em filtro MILLEX Millipore (0,45μm) e injetadas no sistema CLAE/DAD após otimização da análise cromatográfica para cada corante.

3.3.4. REDUÇÃO QUÍMICA DOS CORANTES COM HIDROSSULFITO DE SÓDIO

Solução padrão 0,01 mol L^{-1} do redutor hidrossulfito de sódio foi preparada pela dissolução de 1,74 g em 1L água deionizada. A reação foi seguida transferindo-se 2,5mL dos corantes Sudan III ou Disperso Amarelo 9 nas concentrações desejadas a um béquer de 50mL onde adicionou-se a seguir 2,00mL da solução padrão de hidrossulfito de sódio 0,1 mol L^{-1}. A solução foi submetida à agitação sob aquecimento de 40°C em agitador magnético durante 2 horas em sistema coberto. Após resfriamento da solução, as mesmas foram filtradas em filtro MILLEX Millipore (0,45μm) e em seguida submetidas à análise no sistema CLAE/DAD. As mesmas alíquotas foram também tratadas pelo método de cloração convencional como descrito no item cloração convencional e então injetadas em CLAE/DAD após filtragem em filtro MILLEX Millipore (0,45μm).

3.3.5. OXIDAÇÃO QUÍMICA DOS CORANTES POR CLORAÇÃO

Os corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 foram submetidos à cloração química utilizando solução de hipoclorito de sódio 2,0% em cloro ativo previamente padronizado pelo método iodométrico. A 2,50mL da solução de cada corante adicionou-se 2,00mL de hipoclorito de sódio 2,0% produzindo uma solução 2,2 mmol L^{-1} em cloro ativo na amostra. Após 10 horas de reação amostras da solução foram analisadas por CLAE/DAD, após filtragem em filtro MILLEX Millipore (0,45μm).

3.3.6. OXIDAÇÃO DOS CORANTES COM TERC-BUTILHIDROPERÓXIDO CATALISADO POR FERROPORFIRINA (FeTMPyP)

Alíquotas de 1,00mL de solução $4,6x10^{-4}$ mol L^{-1} dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 foram tratadas com 10μL da ferroporfirina ($5,00x10^{-8}$ mol L^{-1}) e 50μL do oxidante terc-butilhidroperóxido concentrado em um frasco com capacidade de 5mL. Após submeter às amostras à agitação constante durante 4 e 15 horas, respectivamente as amostras foram analisadas para monitoramento do sinal cromatográfico do corante e das respectivas aminas utilizadas como padrão, seguindo procedimento previamente otimizado [82].

3.3.7. REAÇÕES DOS CORANTES COM PREPARADO S9 CONTENDO CITOCROMO P450 (Fração microssomal de fígado de rato)

Em alíquota de 2mL de solução $5,00x10^{-5}$ mol L^{-1} do corante Sudan III e Disperso Amarelo 9 foi adicionado uma alíquota de 1,6mL de preparo do S9 contendo complexo enzimático extraído do fígado de rato. Essa solução foi preparada dissolvendo-se 200μL de S9 em tampão fosfato 0,2 mol L^{-1}, NADPH 1,0 mol L^{-1}, glicose-6-fosfato 1,0 mol L^{-1}, KCl 1,65 mol L^{-1}, $MgCl_2$ 0,4 mol L^{-1} conforme protocolo previamente estabelecido [14]. Todas as análises foram comparadas a um branco submetendo-se às amostras à mesma solução, porém sem S9. A solução contida em um frasco de 5,00mL foi incubada em uma estufa a 37°C por 1,5 horas sob agitação constante e submetida à análise de espectrofotometria na região do UV-Vis. Outra alíquota das amostras foi submetida à extração líquido-líquido e analisadas por CLAE/DAD. Neste procedimento 2,0mL de amostra foi adicionada em um funil de separação e foram realizados 3 repetições com 2,0mL de diclorometano cada. Posteriormente foi feita a evaporação do solvente e o resíduo foi solubilizado em metanol e por fim analisado por CLAE/DAD.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CORANTE SUDAN III POR CLAE/DAD

Após vários ensaios preliminares com diferentes composições de fase móvel e fluxo obteve-se uma condição experimental ótima para a análise cromatográfica CLAE/DAD do corante Sudan III, que consiste em metanol/acetonitrila 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, fase estacionária C18, e detector de arranjos de diodos operando no intervalo de 200 a 800nm. A **Figura 3A** apresenta o cromatograma obtido nas condições acima para a amostra de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III em metanol. O espectro UV-Vis obtido nos tempos de retenção correspondentes aos picos 1 e 2 são apresentados nas **curvas B** e **C** da **Figura 3**.

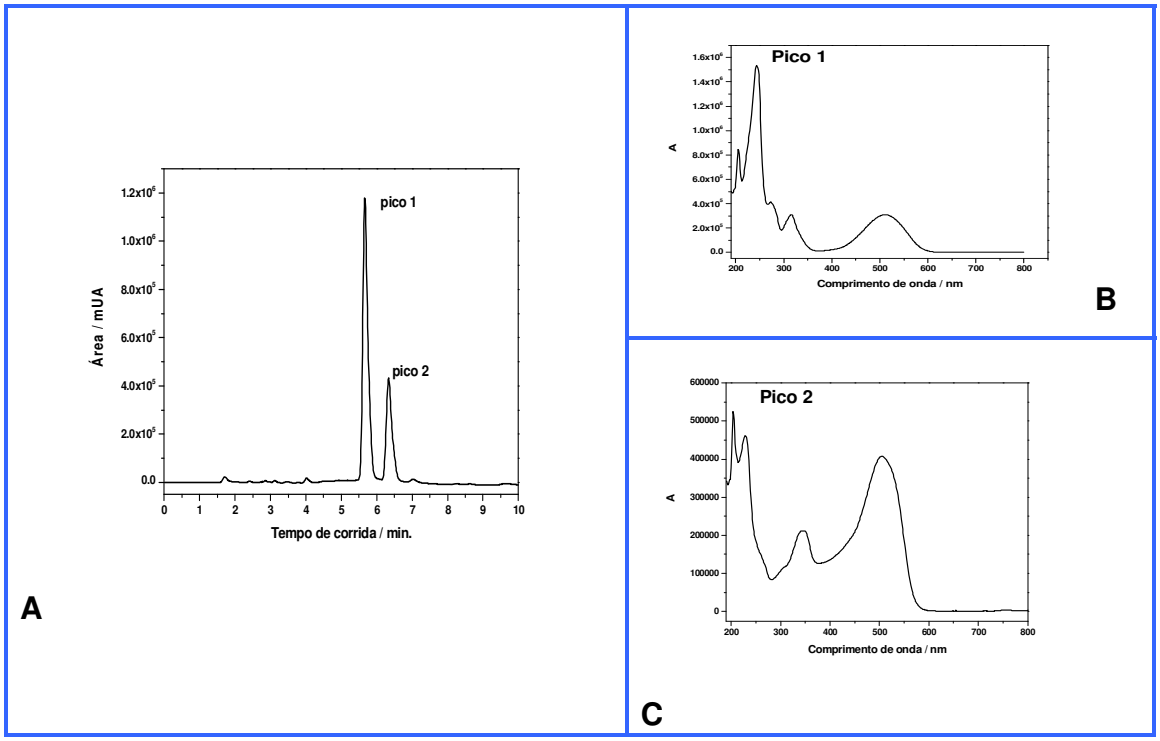


Figura 3: (**A**) cromatograma obtido para o corante sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da solução padrão solubilizada em metanol na concentração de 1x10^{-4} mol L^{-1}, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/ACN 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, o qual apresenta dois picos com tempo de retenção de 5,7 e 6,5 min. **Pico 1:** Sudan II; **Pico 2:** Sudan III; (**B, C**) espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para os picos 1 e 2 do corante Sudan III que eluem em 5,7 e 6,5 min. respectivamente; $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Como se pode observar na **Figura 3A** amostras do corante Sudan III apresentam dois picos distintos em tempos de retenção de 5,7 minutos (**pico 1**) e 6,5 minutos (**pico 2**), respectivamente. Os respectivos espectros obtidos para cada pico exibem máximo comprimento de onda em 250, 310 e 520nm (**pico 1**) e 230, 350 e 500nm (**pico 2**). Levando-se em consideração que as amostras de Sudan III podem apresentar resíduos dos outros derivados tais como Sudan II e Sudan IV, estruturas mostrada na **Figura 4**.

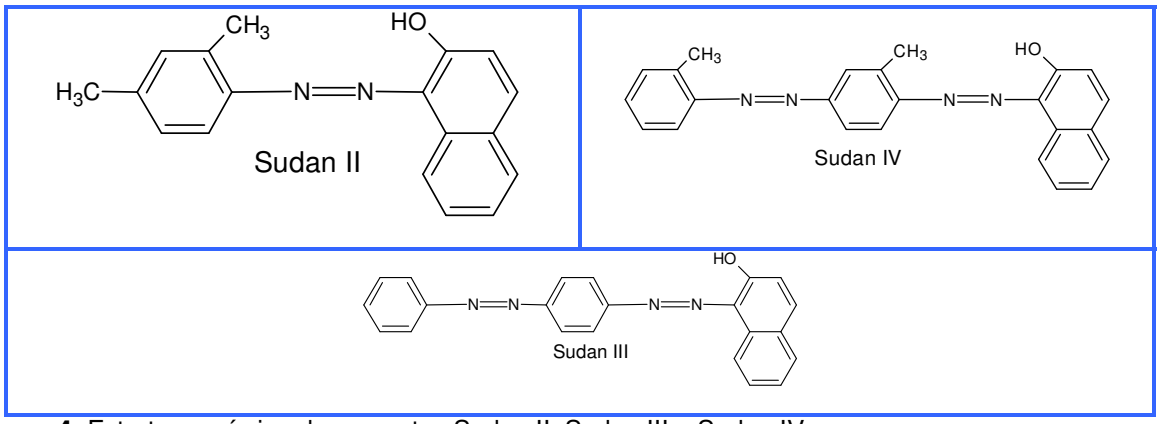


Figura 4: Estrutura química dos corantes Sudan II, Sudan III e Sudan IV.

A **Figura 5** compara os cromatogramas CLAE/DAD obtido para as amostras de cada corante comercial. O tempo de retenção obtido para cada corante foi de 5,7 minutos (**Sudan II**), 6,5 minutos (**Sudan III**) e 7,4 minutos (**Sudan IV**).

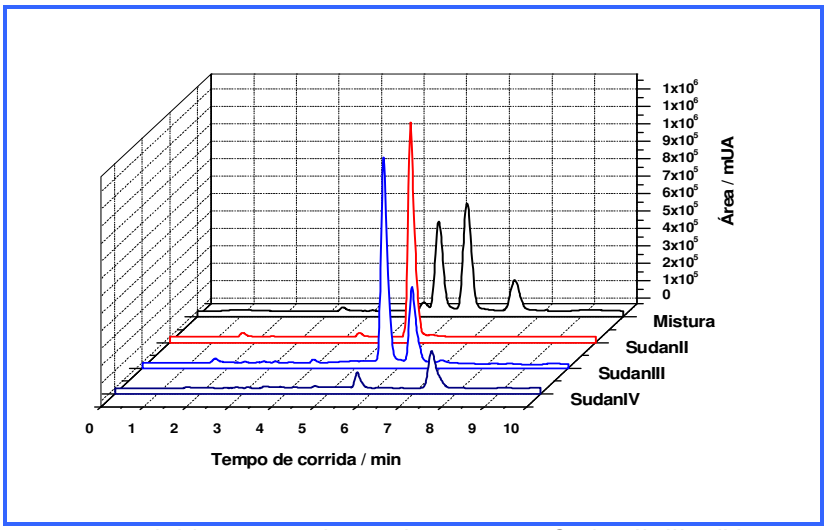


Figura 5: Cromatograma obtido para a mistura dos corantes Sudan II, III e IV, correspondentes à injeção de 20µL da solução padrão solubilizada em metanol na concentração de $1x10^{-4}$ mol L^{-1}, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/ACN 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm;

A **Figura 6** apresenta os espectros de UV-Vis obtidos no pico principal dos cromatogramas para cada corante.

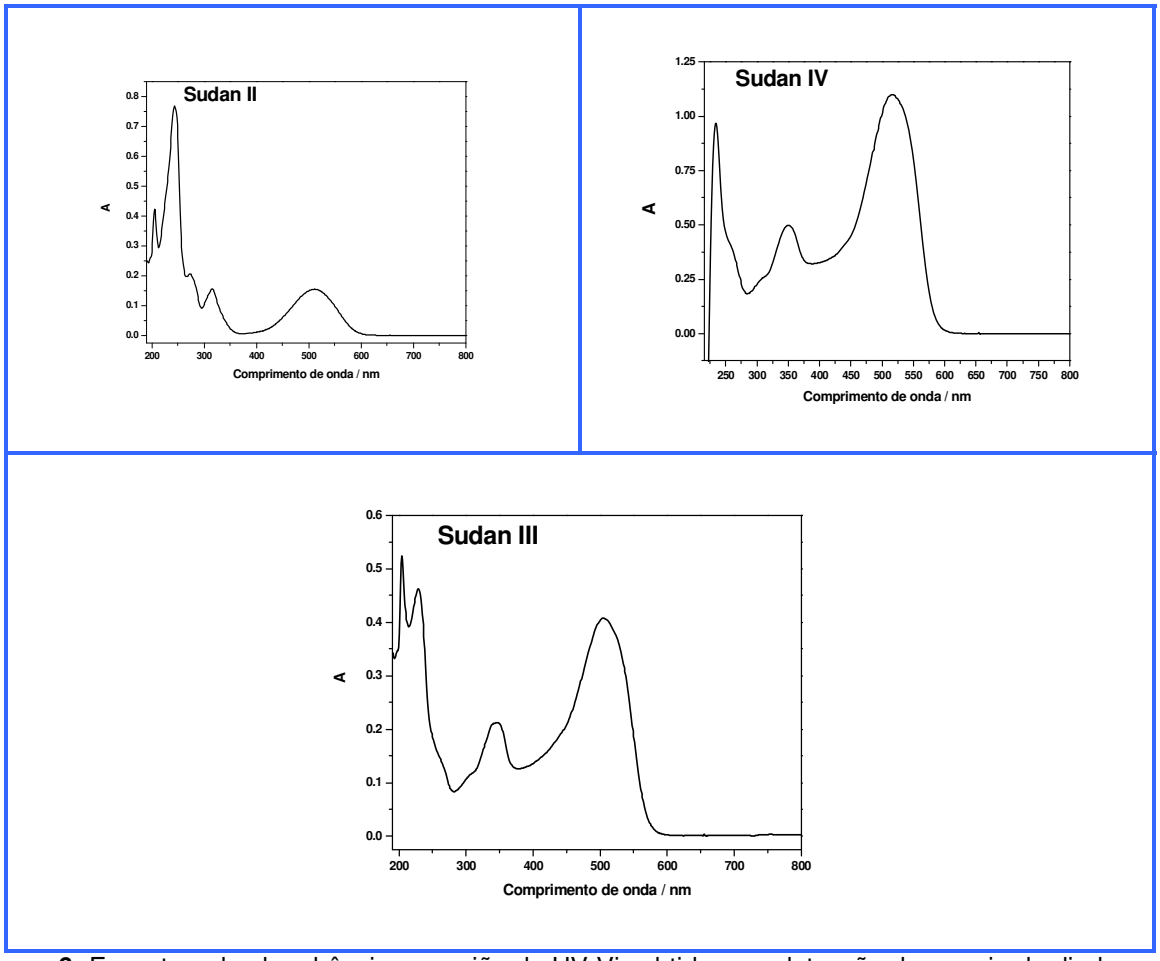


Figura 6: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para os corantes que eluem em 5,7; 6,3 e 7,4 minutos respectivamente; Fase móvel MeOH/ACN 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando-se estas figuras e os respectivos tempos de retenção e o espectro UV-Vis de cada corante e possível constatar que o corante comercializado como Sudan III apresenta em sua composição quantidades significantes do corante Sudan II como contaminante. A relação entre as concentrações de cada pico obtido pela medida de área indica que o corante Sudan III encontra-se em concentração de 40% (m/m), discordando assim da indicação nominal de 95% (m/m) no grau de pureza da amostra comercial.

A seguir construiu-se uma curva analítica para o corante Sudan III e Sudan II no intervalo de 2,44x10^{-9} mol L^{-1} a 1,00x10^{-4} mol L^{-1} para cada corante e as curvas estão mostradas na **Figura 7** representadas pelos picos 1 e 2 na **Figura 3A**.

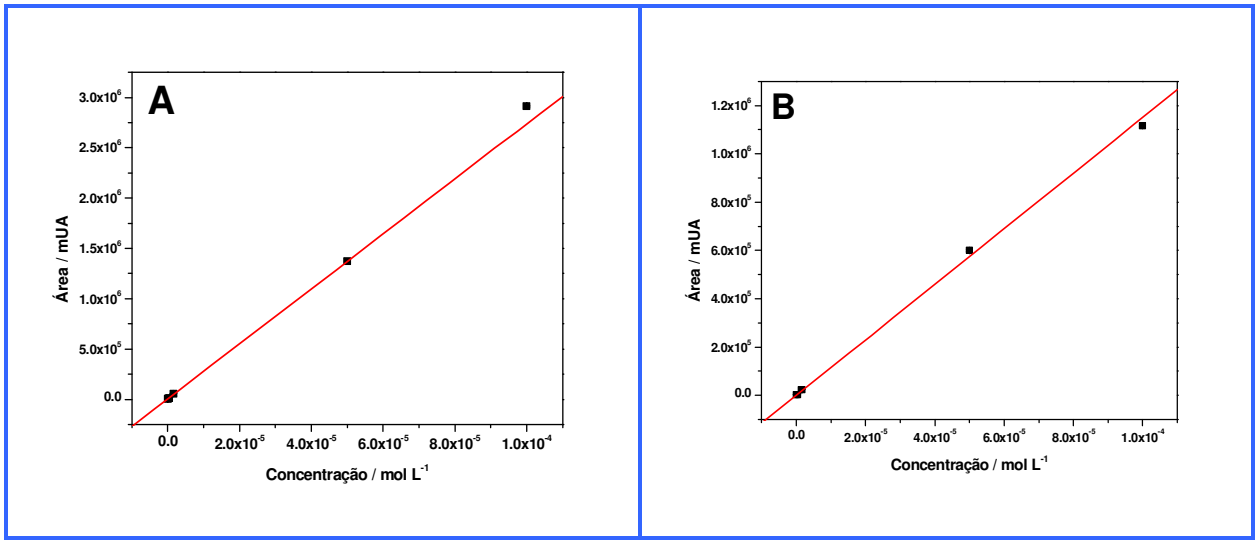


Figura 7: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondente à injeção de 20 µL da solução padrão de corante Sudan III na faixa de concentração desejada solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/ACN 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, e fase estacionária C18. (**A**) **curva analítica pico 1:** Sudan II; (**B**) **curva analítica pico 2**: Sudan III.

Curvas lineares foram obtidas e ambas seguem as equações: **Sudan II:** Área = 4778,12 + 2,73x10^{10}x[Corante (mol L^{-1})], n = 5, R= 0,999 (pico 1), e **Sudan III:** Área = 18754,44 + 1,12x10^{10}x[Corante (mol L^{-1})], n = 4, R = 0,999. Usando as curvas analíticas calculou-se os limites de detecção e quantificação do corante que mostrou valores de L.D. = 3,73ppb e L.Q. = 11,28ppb (**Sudan II**) e L.D. = 0,46ppb e L.Q. = 13,95ppm (**Sudan III**).

4.2. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9 POR CLAE/DAD

As melhores condições cromatográficas CLAE/DAD para identificação do corante Disperso Amarelo 9, foi em fase móvel de acetonitrila/metanol 80:20 (v/v); T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, fase estacionária C18, e detector de arranjos de diodos operando entre 200 e 800nm. A **Figura 8**, representa o cromatograma obtido nas condições acima para uma amostra de 1,00x10^{-4} mol. L^{-1} do corante Disperso Amarelo

9 e o espectro UV-Vis, obtido simultaneamente para este corante. O corante apresenta pico bem definido em tempo de retenção de 3,8 minutos, o qual apresenta espectro com máxima absorção em 380nm, além de pico em 200nm e 240nm. Também nesta amostra observa-se um pequeno pico em tempo de retenção de 4,4 minutos correspondente a algum contaminante na amostra.

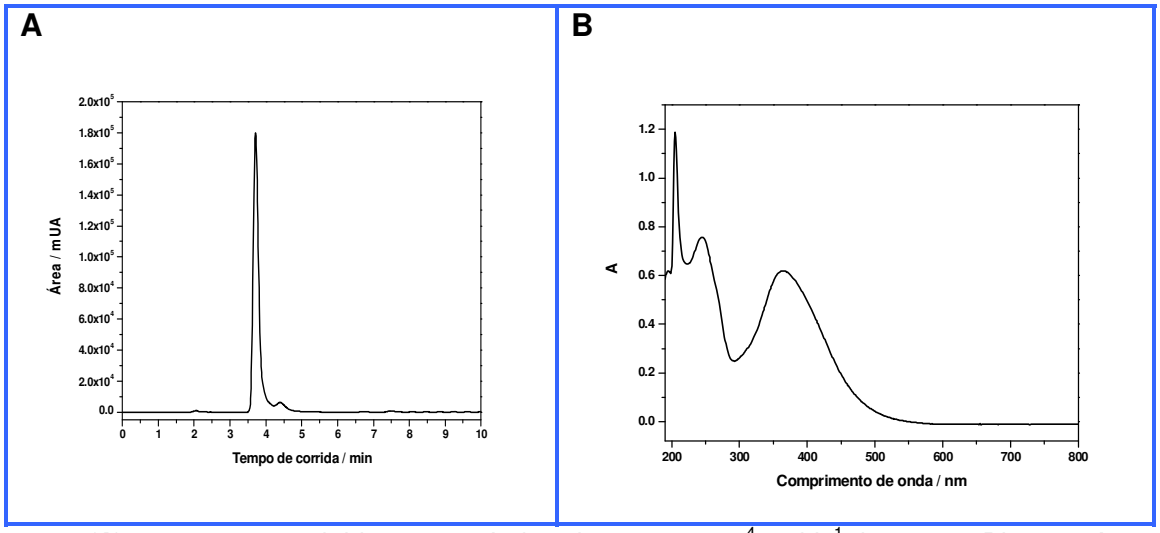


Figura 8: (**A**) cromatograma obtido para 20µL de solução 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 em metanol. Fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 400nm; (**B**) espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para o pico do corante Disperso Amarelo 9 que elue em 3,8 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A construção da curva analítica para o corante Disperso Amarelo 9 foi realizada tomando-se os valores de área do pico para concentrações entre 2,44x10^{-9} mol L^{-1} a 1,00x10^{-4} mol L^{-1}, cuja curva está representada na **Figura 9**.

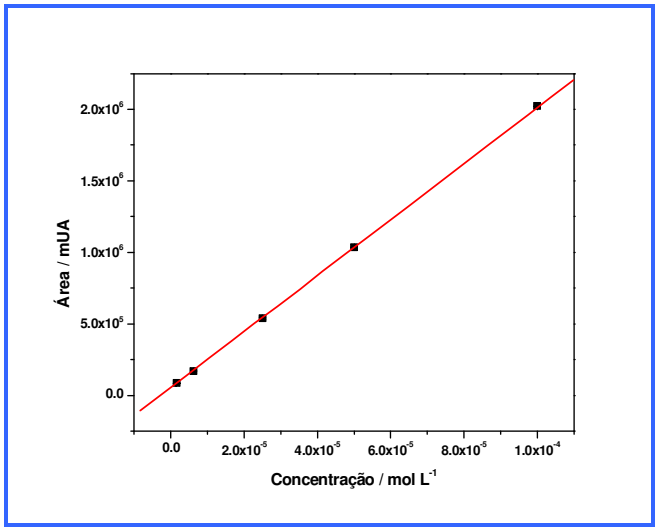


Figura 9: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondente à injeção de 20 µL da solução padrão do corante Disperso amarelo em metanol. Fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

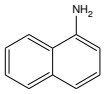
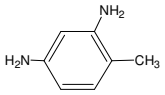
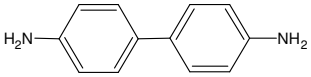
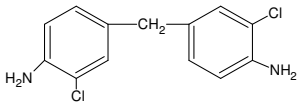
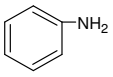
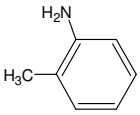
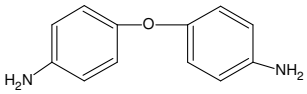
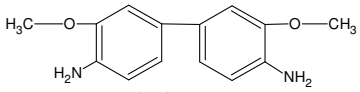
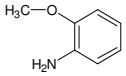
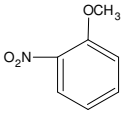
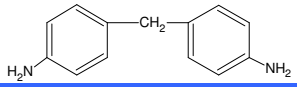
A relação é linear em todo o intervalo e os valores obtidos para a equação da reta foi: Área = 55022,02 + 1,96x10^{10}x [Corante], n = 5, SD = 7,40, R = 0,999. Os valores de limite de detecção e quantificação foram calculados e indicam valores de L.D. = 6,63ppb e L.Q. = 20,10ppb.

4.3. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS POR CLAE/DAD

Considerando a proposta inicial do trabalho que foi investigar a possível formação de aminas aromáticas condenadas pela CETESB durante processos de redução e/ou oxidação dos corantes Sudan III e Dispersos Amarelo 9, realizou-se primeiramente a otimização de analise para aminas aromáticas selecionadas e derivados consideradas perigosas ao ambiente e ao ser humano por CLAE/DAD. As estruturas químicas dos respectivos padrões analisados neste trabalho estão apresentadas na **Tabela 2** e na **Tabela 3**. Cromatogramas obtidos para as aminas 2-naftilamina, 2,4-diaminotoluidina, benzidina, 4,4'-metileno-bis-(2-cloroanilina), anilina, o-toluidina, 4,4'-oxidianilina, o-dianisidina, o-anisidina, 2-nitroanisol, 4,4'-diamino-bis-fenilmetame, 3,3'-dimetilbenzidina, 2-metoxi-5-metilanilina, 4-cloroanilina, 2,6-dimetilanilina, 2-cloro-4-nitro anilina e nitrobenzeno, em fase móvel de metanol/tampão

fosfato 5,00x10^{-5} mol L^{-1} (pH = 6,9) e composição de 50:50 apresentam picos definidos para cada amina, cujo tempo de retenção é mostrado na **Tabela 2**. As aminas 4,4'-metileno-bis-(2-metilanilina), 4-cloro-o-toluidina, 4-aminobifenil, 3,3'-diclorobenzidina, 2-isopropil-3-metoxipirozina, 2-isobutil-3-metoxipirozina, fast garnet gbc (precursor) e α,α,α-triclorotoluidina, são melhor separadas nas mesmas condições experimentais porém usando composição da fase móvel de 80:20, cujo tempo de retenção é mostrado na **Tabela 3**, T= 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, fase estacionaria C18.

Tabela 2: Estrutura química de algumas aminas e nitrobenzeno, respectivo tempo de retenção obtido de cromatograma CLAE/DAD. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato 5,00x10^{-5} mol L^{-1} (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina.

Substância	Estrutura	Tempo de Retenção (min.)
2-naftilamina		3,0
2,4-diaminotoluidina		3,7
Benzidina		4,7
4,4'- metilenebis (2-cloroanilina)		4,9
Anilina		5,2
o-toluidina		6,5
4,4'-oxidianilina		6,7
o-dianisidine		7,4
o-anisidina		8,0
2-nitroanisol		8,4
4,4'-diaminodifenilmetano		8,6

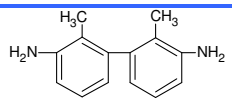
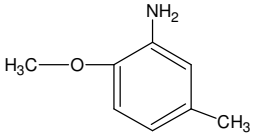
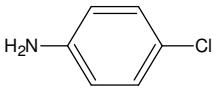
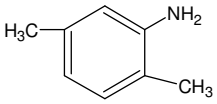
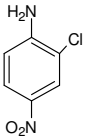
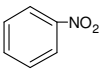
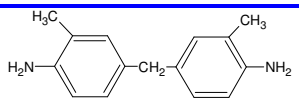
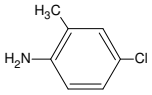
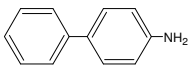
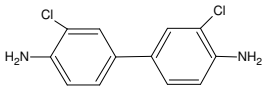
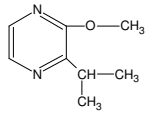
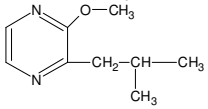
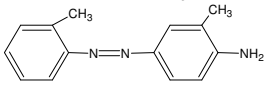
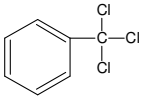
3,3'-dimetilbenzidina		9,0
2-metoxi-5-metilanilina		9,3
4-cloroanilina		10,3
2,6-dimetilanilina		11,2
2-cloro-4-nitroanilina		11,5
nitrobenzeno		12,0

Tabela 3: Estruturas químicas de algumas aminas e precursor fast garnet gbc, respectivo tempo de retenção obtido de cromatogramas CLAE/DAD. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato 5,00x10^{-5} mol L^{-1} (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina.

Substância	Estrutura	Tempo de Retenção (min.)
4,4'-metileno-bis(2-metilanilina)		3,8
4-cloro-2-metilanilina		4,1
4-aminobifenila		4,4
3,3'-diclorobenzidina		4,7
2-isopropil-3-metoxipirozina		5,9
2-isobutil-3-metoxipirozina		6,2
fast Garnet GBC		8,4
α,α,α- triclorotolueno		10,0

Curvas analíticas para cada amina aromática e outros compostos passíveis de serem formadas na oxidação e/ou redução dos corantes (**Tabela 2 e Tabela 3)** foram construídas usando medidas de área de cada pico nos cromatogramas individuais CLAE/DAD e os parâmetros são apresentados na **Tabela 4**. Essa tabela também compila os valores de limite de detecção e quantificação para cada padrão das aminas.

Tabela 4: Parâmetros correspondentes às respectivas curvas analíticas obtidas para cada padrão selecionado por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20µL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1mL min^{-1}, detectados em 230nm. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5{,}00x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ (pH=6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina.

Aminas	A	B	Faixa de Linearidade**	N	R	SD	L.D.*	L.Q.*
2-naftilamina	- 12290,42	$5{,}03x10^{10}$	$6{,}10x10^{-7}$ a $6{,}25x10^{-4}$	5	0,998	1,98	0,003	0,009
2,4-diaminotoluidina	3898,75	$8{,}18x10^{9}$	$6{,}10x10^{-7}$ a $2{,}44x10^{-3}$	7	0,998	3,12	0,041	0,12
Benzidina	-42,00	$4{,}20x10^{9}$	$3{,}05x10^{-7}$ a $5{,}00x10^{-3}$	8	0,991	8,08	0,003	0,010
4,4'-metilenebis (2-cloroanilina)	5990,31	$1{,}42x10^{10}$	$6{,}23x10^{-7}$ a $6{,}38x10^{-4}$	6	0,999	4,99	0,006	0,017
Anilina	82195,13	$1{,}37x10^{11}$	$7{,}10x10^{-7}$ a $1{,}82x10^{-4}$	4	0,999	1,37	0,036	0,108
o-toluidina	3406,41	$1{,}58x10^{10}$	$1{,}22x10^{-6}$ a $5{,}00x10^{-3}$	7	0,990	2,70	0,032	0,099
4,4'-oxidianilina	-2550,23	$1{,}94x10^{10}$	$6{,}10x10^{-7}$ a $2{,}50x10^{-3}$	8	0,997	7,32	0,045	0,14
o-dianisidine	-574,28	$1{,}54x10^{10}$	$6{,}17x10^{-7}$ a $5{,}06x10^{-3}$	7	0,999	7,50	0,004	0,012
o-anisidina	7913,16	$2{,}24x10^{10}$	$2{,}44x10^{-6}$ a $5{,}00x10^{-3}$	7	0,999	7,50	0,054	0,16
2-nitroanisol	273,10	$1{,}06x10^{10}$	$6{,}10x10^{-7}$ a $5{,}00x10^{-3}$	8	0,996	10,6	0,008	0,024
4,4'diaminobifenilmetame	-813,57	$1{,}60x10^{10}$	$6{,}10x10^{-7}$ a $2{,}50x10^{-3}$	6	0,999	3,95	0,027	0,083
3,3'-dimetilbenzidina	- 8173,30	$9{,}98x10^{9}$	$1{,}00x10^{-5}$ a $5{,}17x10^{-3}$	6	0,998	10,0	0,088	0,27
2-metoxi-5-metilanilina	-65686,21	$7{,}70x10^{9}$	$9{,}84x10^{-6}$ a $5{,}04x10^{-3}$	6	0,998	12,5	0,34	1,02
4-cloroanilina	-80955,37	$1{,}05x10^{10}$	$3{,}98x10^{-5}$ a $5{,}09x10^{-3}$	5	0,998	12,1	0,038	0,12
2,6-dimetilanilina	3574,61	$1{,}31x10^{10}$	$2{,}44x10^{-6}$ a $5{,}00x10^{-3}$	6	0,999	9,67	0,018	0,055
2-cloro-4-nitroanilina	76292,25	$3{,}86x10^{10}$	$2{,}84x10^{-6}$ a $1{,}82x10^{-4}$	4	0,999	0,65	0,25	0,77
Nitrobenzeno	25752,63	$7{,}43x10^{9}$	$9{,}77x10^{-6}$ a $5{,}00x10^{-3}$	6	0,998	12,6	0,051	0,15

*L.D. e L.Q. em ppm; ** Faixa de linearidade em mol L^{-1};

Tabela 5: Parâmetros correspondentes às respectivas curvas analíticas obtidas para cada padrão selecionado por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20µL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1mL min^{-1}, detectados em 230nm. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5{,}00x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ (pH=6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina.

Aminas	A	B	Faixa de Linearidade**	N	R	SD	L.D.*	L.Q.*
4,4'-metileno-bis-(2-metilanilina)	-373,55	$1{,}70x10^{10}$	$6{,}12x10^{-7}$ a $2{,}51x10^{-3}$	5	0,999	9,40	0,003	0,009
4-cloro-o-toluidina	70751,41	$1{,}09x10^{10}$	$9{,}77x10^{-6}$ a $5{,}00x10^{-3}$	6	0.997	9,21	0,11	0,34
4-aminobifenila	30152,18	$5{,}71x10^{9}$	$9{,}77x10^{-6}$ a $5{,}00x10^{-3}$	6	0.999	1,35	0,47	1,43
3,3'-diclorobenzidina	174317,37	$1{,}06x10^{10}$	$5{,}06x10^{-5}$ a $8{,}10x10^{-4}$	5	0.998	8,20	0,69	2,10
2-isopropil-3-metoxipirozina	-4771,69	$2{,}17x10^{9}$	$9{,}77x10^{-6}$ a $5{,}00x10^{-3}$	6	0.999	6,60	0,062	0,19
2-isobutil-3-metoxipirozina	-11409,36	$2{,}21x10^{9}$	$1{,}56x10^{-4}$ a $5{,}00x10^{-3}$	4	0.999	1,68	0,88	2,66
Fast Garnet gbc	8203,80	$7{,}28x10^{9}$	$9{,}80x10^{-6}$ a $5{,}02x10^{-3}$	6	0,999	11,4	0,024	0,071
α,α,α-triclorotolueno	-8891,41	$9{,}24x10^{9}$	$2{,}44x10^{-6}$ a $5{,}00x10^{-3}$	7	0,998	12,9	0,028	0,084

*L.D. e L.Q. em ppm; ** Faixa de linearidade em mol L^{-1};

Espectros UV-Vis na região de 190 a 800nm foram também registrados para cada tempo de retenção e os padrões apresentaram picos bem definidos e reconhecidos na literatura.

As amostras estoques de todos os padrões foram diluídas em água em concentrações compatíveis com a detecção do método proposto e submetidas a analise cromatográfica CLAE/DAD segundo as condições previamente estabelecidas, com o intuito de verificar o índice de recuperação dos compostos pelo método proposto. Na **Tabela 6** e na **Tabela 7** mostram os valores de concentração dos compostos nas amostras, a concentração encontrada e o índice de recuperação para todos os compostos estudados.

Tabela 6: Recuperação de aminas selecionadas e outros derivados em amostras fortificadas pelo método da adição de padrão analisadas por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20µL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, detectados em 230nm. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato 5,00x10^{-5} mol.L^{-1} (pH=6,9) 50/50 (v/v) e 20mM de trietilamina.

Aminas	Concentração adicionada (mol L^{-1})	Concentração encontrada (mol L^{-1}) ± SD	% Recuperação ± SD
2-naftilamina	6,10x10^{-7}	6,71x10^{-7} ± 7,4	110 ± 7,4
2,4-diaminotoluidina	6,10x10^{-7}	6,09x10^{-7} ± 8,2	100 ± 8,2
Benzidina	6,10x10^{-7}	6,09x10^{-7} ± 6,6	100 ± 6,6
4,4'-metilene-bis-(2-cloroanilina)	6,23x10^{-7}	5,61x10^{-7} ± 6,6	90 ± 6,6
Anilina	6,20x10^{-7}	6,21x10^{-7} ± 4,2	100 ± 4,2
o-toluidina	6,10x10^{-7}	6,28x10^{-7} ± 2,3	103 ± 2,3
4,4'-oxidianilina	6,10x10^{-7}	5,86x10^{-7} ± 6,1	96 ± 6,1
o-dianisidine	6,18x10^{-7}	6,01x10^{-7} ± 6,9	98 ± 6,9
o-anisidina	6,10x10^{-7}	5,55x10^{-7} ± 4,7	91 ± 4,7
2-nitroanisol	6,10x10^{-7}	7,32x10^{-7} ± 8,2	120 ± 8,2
4,4'-diaminobifenilmetame	6,10x10^{-7}	6,59x10^{-7} ± 10,2	108 ± 10,2
3,3'-dimetilbenzidina	6,10x10^{-7}	6,53x10^{-7} ± 7,4	107 ± 7,4
2-metoxi-5-metilanilina	6,15x10^{-7}	6,16x10^{-7} ± 4,5	100 ± 4,5
4-cloroanilina	6,10x10^{-7}	5,92x10^{-7} ± 10,4	97 ± 10,4
2,6-dimetilanilina	6,10x10^{-7}	5,86x10^{-7} ± 4,8	96 ± 4,8
2-cloro-4-nitroanilina	6,10x10^{-7}	5,93x10^{-7} ± 3,6	97 ± 3,6
Nitrobenzeno	6,10x10^{-7}	5,98x10^{-7} ± 6,5	98 ± 6,5

Tabela 7: Recuperação de aminas selecionadas e outros derivados em amostras fortificadas pelo método da adição de padrão analisadas por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20μL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1,00 mL min^{-1}, detectados em 230nm. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ (pH=6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina.

Aminas	Concentração adicionada (mol L^{-1})	Concentração encontrada (mol L^{-1}) ± SD	% Recuperação ± SD
4,4'-metilen-bis-(2-metilanilina)	$6,10x10^{-7}$	$6,04x10^{-7}$ ± 12,2	99 ± 12,2
4-cloro-o-toluidina	$5,18x10^{-7}$	$4,87x10^{-7}$ ± 9,5	94 ± 9,5
4-aminobifenila	$6,10x10^{-7}$	$5,92x10^{-7}$ ± 8,7	97 ± 8,7
3,3'-diclorobenzidina	$6,10x10^{-7}$	$6,15x10^{-7}$ ± 10,2	101 ± 10,2
2-isopropil-3-metoxipirozina	$6,10x10^{-7}$	$6,41x10^{-7}$ ± 2,8	105 ± 2,8
2-isobutil-3-metoxipirozina	$6,10x10^{-7}$	$6,22x10^{-7}$ ± 10,5	102 ± 10,5
Fast Garnet gbc	$6,10x10^{-7}$	$6,11x10^{-7}$ ± 8,3	100 ± 8,3
α,α,α-triclorotolueno	$6,10x10^{-7}$	$6,34x10^{-7}$ ± 11,0	104 ± 11,0

Os valores encontrados apresentam excelente nível de recuperação confirmando que o método CLAE/DAD pode ser utilizado para determinação dessas aminas em meio aquoso com boa precisão. Na **Figura 10** e **Figura 11** estão representados os cromatogramas obtido para soluções contendo os padrões dos seguintes compostos: **Pico 1:** 2-naftilamina tr= 3,0 minutos; **Pico 2:** 2,4-diaminotoluidina tr= 3,7 minutos; **Pico 3:** benzidina tr = 4,7 minutos; **Pico 4:** 4,4'-metileno-bis-cloroanilina tr= 4,9 minutos; **Pico 5:** anilina tr= 5,2 minutos; **Pico 6:** o-toluidina tr= 6,5 minutos; **Pico 7:** 4,4'-oxidianilina tr= 6,7 minutos; **Pico 8:** o-dianisidina tr= 7,4 minutos; **Pico 9:** o-anisidina tr= 8,0 minutos; **Pico 10:** 2-nitroanisol tr= 8,4 minutos; **Pico 11:** diaminobifenilmetame tr= 8,5 minutos; **Pico 12:** 3,3'-dimetilbenzidina tr= 9,0 minutos; **Pico 13:** 2-metoxi-5-metilanilina tr= 9,3 minutos; **Pico 14:** 4-cloroanilina tr= 10,8 minutos; **Pico 15:** 2,6-dimetilanilina tr= 11,2 minutos; **Pico 16:** 2-cloro-4-nitroanilina tr= 11,5 minutos; **Pico 17:** nitrobenzeno tr= 12,0 minutos, utilizando fase móvel MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol L^{-1} (pH= 6,9) 50:50 (v/v) + 20mM de trietilamina e para fase móvel MeOH/tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol L^{-1} (pH= 6,9) 80:20 (v/v) + 20mM de trietilamina os compostos: **Pico 1:** 4,4'-metileno-bis-(2-metilanilina) tr= 3,8 minutos; **Pico 2:** 4-cloro-o-toluidina tr= 4,1 minutos; **Pico 3:** 4-aminobifenil tr= 4,4 minutos; **Pico 4:** 3,3'-diclorobenzidina tr= 5,0 minutos; **Pico 5:** 2-isopropil-3-metoxipirozina tr= 5,9 minutos; **Pico 6:** 2-isobutil-3-metoxipirozina tr= 6,2 minutos; **Pico 7:** fast garnet gbc tr= 8,4 minutos; **Pico 8:** α,α,α-triclorotoluidina tr= 10,0 minutos.

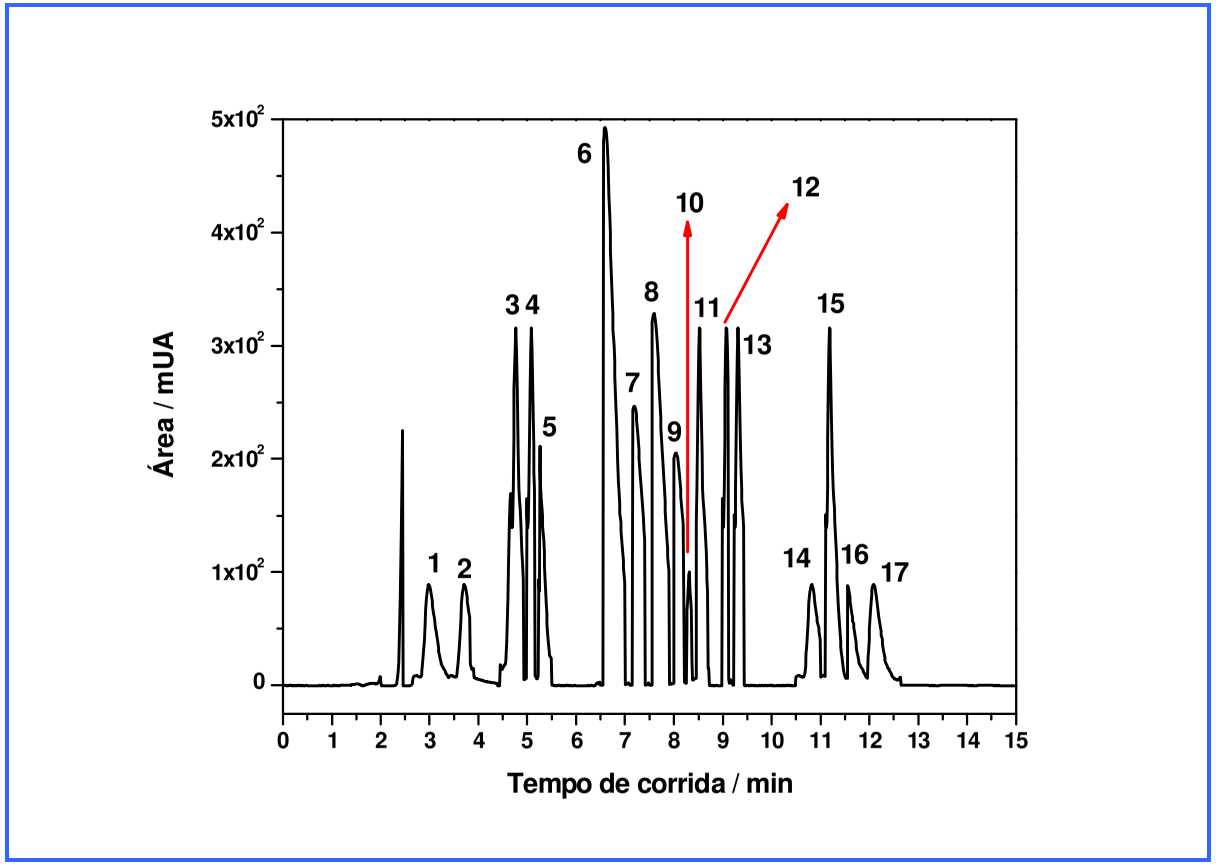


Figura 10: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da solução padrão solubilizada em metanol na concentração de $5x10^{-5}$ mol L^{-1}, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol L^{-1} (pH= 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitoradas em 280nm. **Pico 1:** 2-naftilamina tr= 3,0 minutos; **Pico 2:** 2,4-diaminotoluidina tr= 3,7 minutos; **Pico 3:** benzidina tr = 4,7 minutos; **Pico 4:** 4,4'-metileno-bis-cloroanilina tr= 4,9 minutos; **Pico 5**: anilina tr= 5,2 minutos; **Pico 6:** o-toluidina tr= 6,5 minutos; **Pico 7:** 4,4'-oxidianilina tr= 6,7 minutos; **Pico 8:** o-dianisidina tr= 7,4 minutos; **Pico 9:** o-anisidina tr= 8,0 minutos; **Pico 10:** 2-nitroanisol tr= 8,4 minutos; **Pico 11:** diaminobifenilmetame tr= 8,5 minutos; **Pico 12:** 3,3'-dimetilbenzidina tr= 9,0 minutos; **Pico 13:** 2-metoxi-5-metilanilina tr= 9,3 minutos; **Pico 14:** 4-cloroanilina tr= 10,8 minutos; **Pico 15:** 2,6-dimetilanilina tr= 11,2 minutos; **Pico 16:** 2-cloro-4-nitroanilina tr= 11,5 minutos; **Pico 17:** nitrobenzeno tr= 12,0 minutos

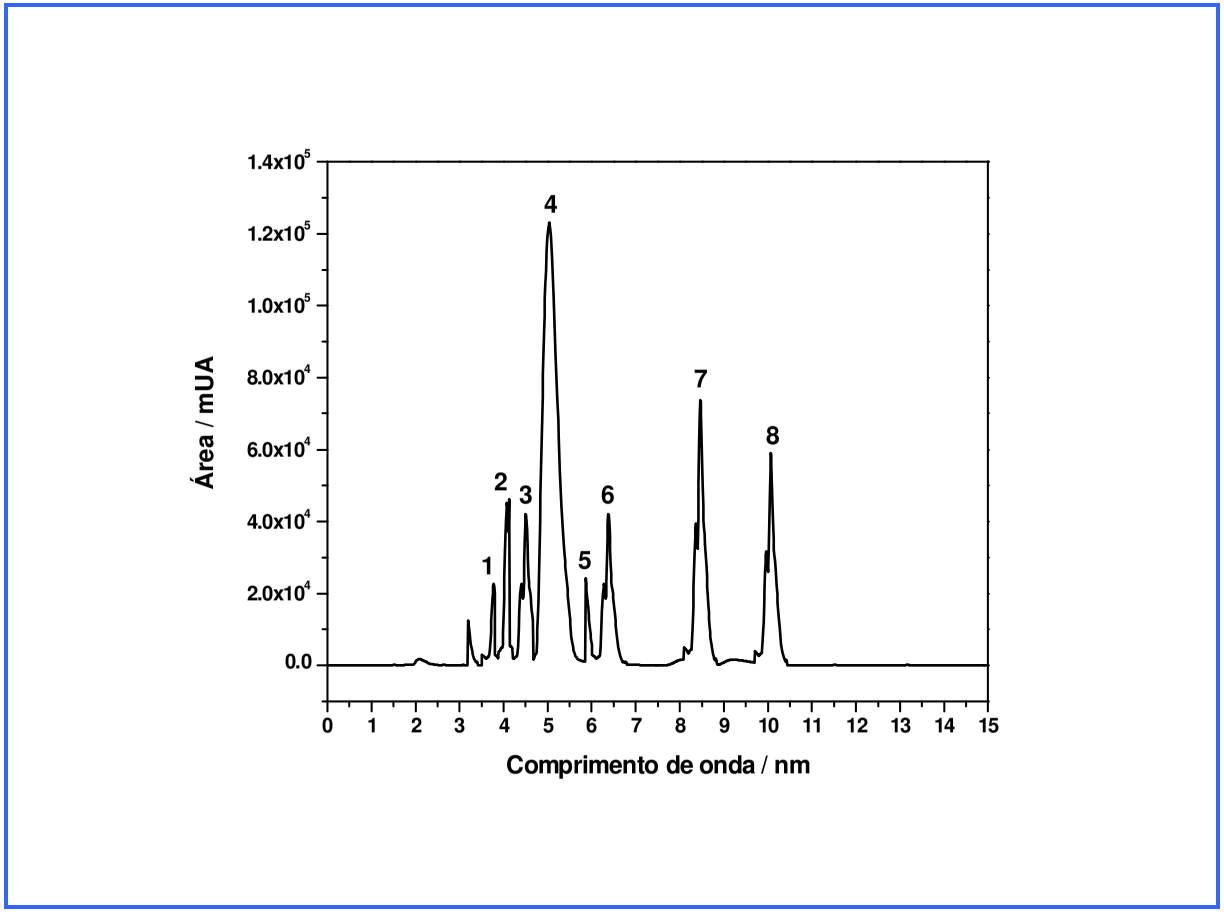


Figura 11: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da solução padrão solubilizada em metanol na concentração de $5x10^{-5}$ mol L^{-1}, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,00x10^{-5}$ mol L^{-1} (pH= 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitoradas em 280nm. **Pico 1:** 4,4'-metileno-bis-(2-metilanilina) tr= 3,8 minutos; **Pico 2:** 4-cloro-o-toluidina tr= 4,1 minutos; **Pico 3:** 4-aminobifenil tr= 4,4 minutos; **Pico 4:** 3,3'-diclorobenzidina tr= 5,0 minutos; **Pico 5:** 2-isopropil-3-metoxipirozina tr= 5,9 minutos; **Pico 6:** 2-isobutil-3-metoxipirozina tr= 6,2 minutos; **Pico 7:** fast garnet gbc tr= 8,4 minutos; **Pico 8:** α,α,α-triclorotoluidina tr= 10,0 minutos.

4.4. CORANTE SUDAN III

4.4.1. OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DO CORANTE SUDAN III

4.4.1.1. OXIDAÇÃO VOLTAMÉTRICA DO CORANTE SUDAN III

A oxidação eletroquímica de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III em metanol com 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sobre eletrodo de carbono vítreo pode ser observado na **Figura 12**.

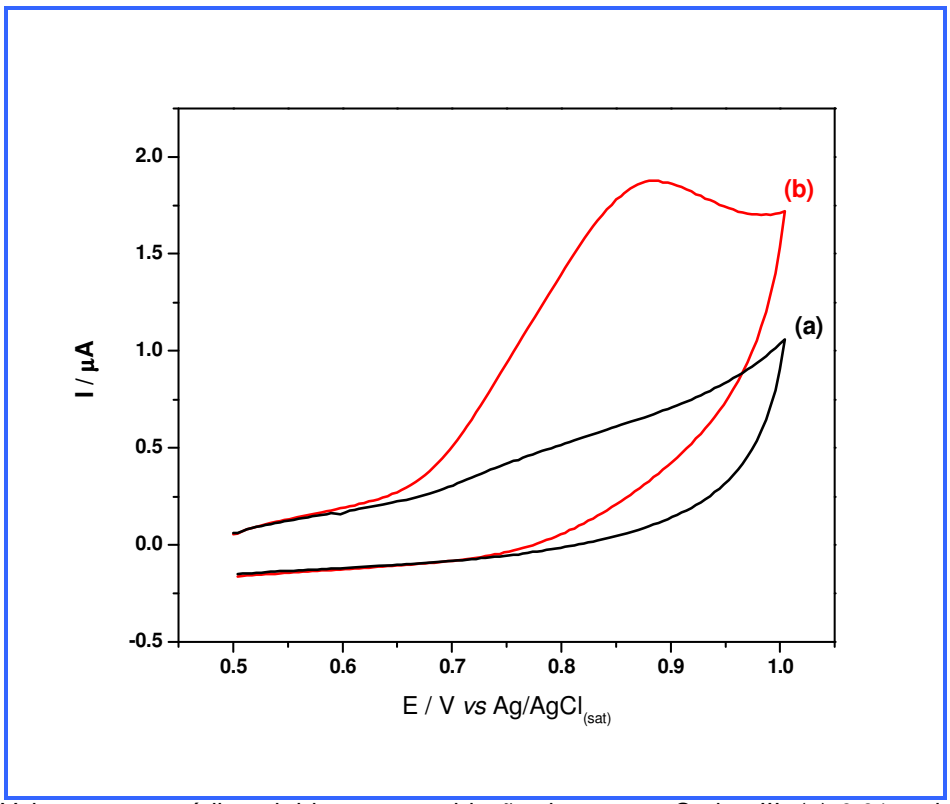


Figura 12: Voltamograma cíclico obtido para a oxidação do corante Sudan III. (a) 0,01 mol L^{-1} eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$), e (b) solução 1,00x10^{-4} mol.L^{-1} do corante Sudan III na presença de 0,01mol.L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$). velocidade de varredura 100 mV s^{-1}.

A oxidação do corante Sudan III caracteriza-se por um pico em aproximadamente +0,85V atribuído à oxidação do grupo R-OH à R=O [129] após transferência de dois elétrons, conforme oxidação de outros compostos fenólicos.

O estudo da variação da velocidade de varredura de potencial (υ) no intervalo de 0 à 50mV s^{-1} para oxidação eletroquímica de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III em 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio permitiu obter maiores informações sobre o processo eletródico é mostrado na **Figura 13**.

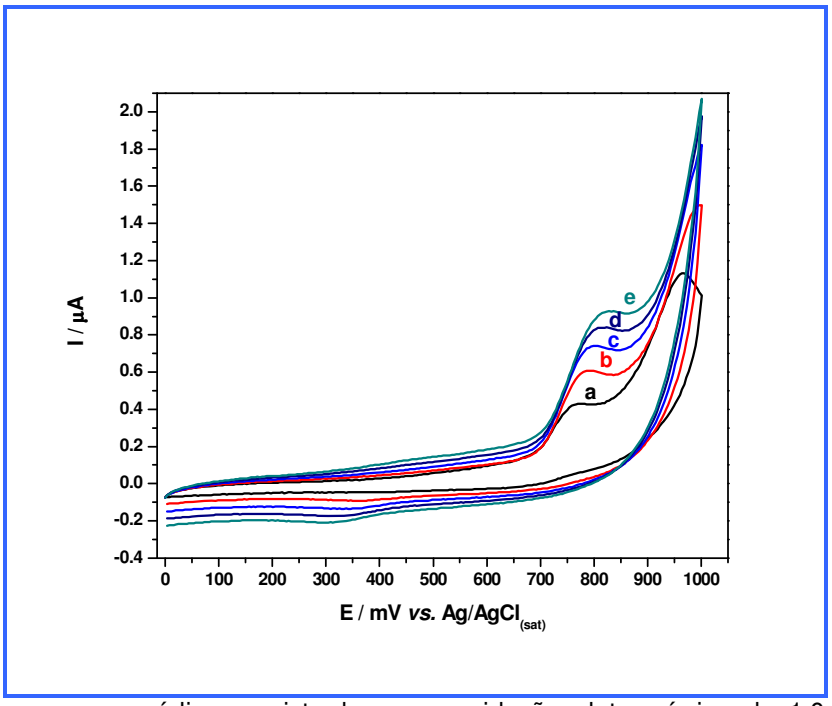


Figura 13: Voltamogramas cíclicos registrados para oxidação eletroquímica de 1,0×10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III sobre carbono vítreo em meio 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tretrabutilamonio em diferentes valores de υ. (a) 10 mV s^{-1}; (b) 20 mV s^{-1}; (c) 30 mV s^{-1}; (d) 40 mV s^{-1}; (e) 50 mV s^{-1}.

Os voltamogramas cíclicos são caracterizados por um pico anódico bem definido em todo intervalo de υ estudado e ocorrência de um pequeno pico catódico na varredura reversa, apenas em velocidade maior que 40 mV s^{-1}. A **Figura 14A** mostra que os valores de potencias do pico de oxidação deslocam-se para valores mais positivos com aumento da velocidade de varredura, indicando que o processo eletródico envolve a transferência de carga, perturbada por reações químicas acopladas e/ou processos adsortivos [130]. Ainda pode-se observar que a corrente de pico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (**Figura**

14B), no entanto, não passa pela origem, como mostra a equação: $I_{pa}(\mu A) = 0,015 + 0,13_{\times}\upsilon^{1/2}$ [$(mV\ s^{-1})^{1/2}$], com r = 0,998 (**Figura 14B**). Este comportamento é indicativo de que o processo eletródico apresenta fraca adsorção do corante no eletrodo.

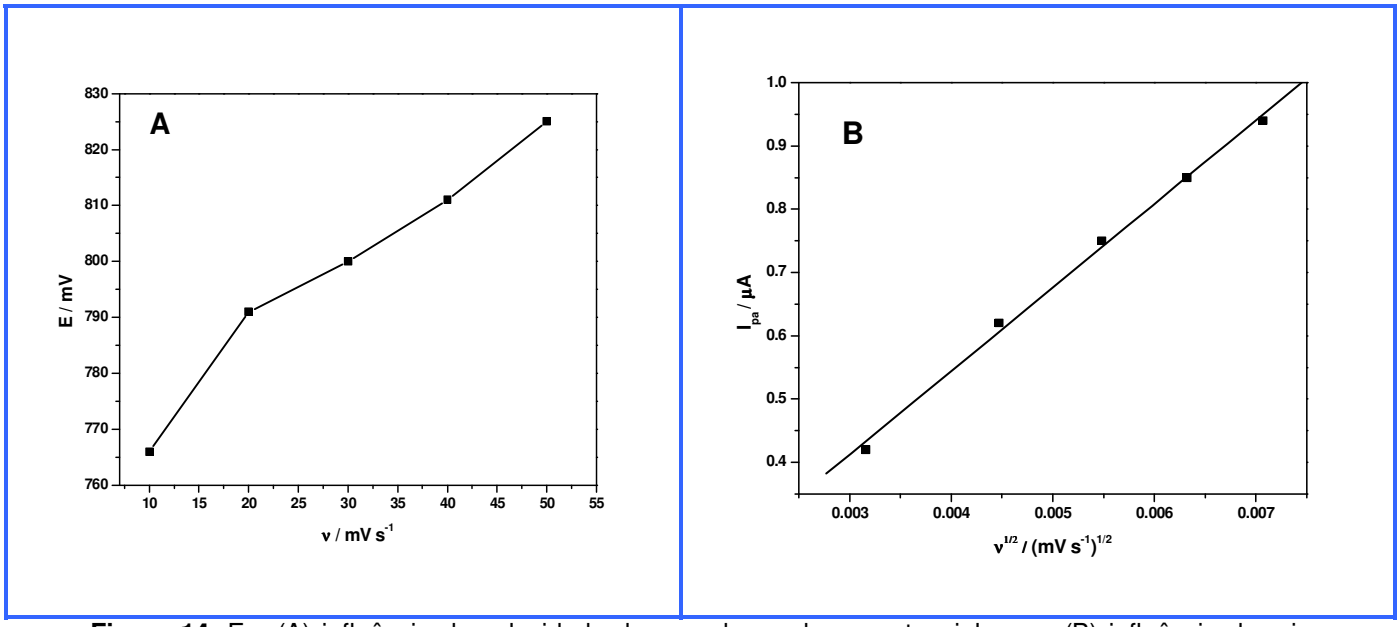


Figura 14: Em (A) influência da velocidade de varredura sobre o potencial e em (B) influência da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre a corrente de pico anódica na oxidação do corante Sudan III em presença de 0,01mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sob eletrodo de carbono vítreo.

Os parâmetros eletroquímicos referentes à análise dos voltamogramas cíclicos obtidos nas diferentes υ estão reunidos na **Tabela 8**.

Tabela 8: Parâmetros voltamétricos obtidos para a oxidação eletroquímica do corante Sudan III $1,0\times10^{-4}$ mol L^{-1} em meio de 0,01 mol L^{-1} tetrafluorborato de tetrabutilamonio.

υ ($mV\ s^{-1}$)	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μ A)	$I_{pa} / \upsilon^{1/2}$ [$\mu A / (mV\ s^{-1})^{1/2}$]
10	766	0,42	0,13
25	791	0,62	0,14
50	800	0,75	0,14
40	811	0,85	0,13
50	825	0,94	0,13

4.4.1.2. OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DO CORANTE SUDAN III POR ELETRÓLISE À POTENCIAL CONTROLADO

A seguir, soluções do corante Sudan III foram submetidas à oxidação eletroquímica sob potencial de +1,5V durante 2 horas de eletrolise a potencial controlado sobre eletrodo de carbono vítreo, com o intuito de detectar os subprodutos principais gerados nestas condições experimentais. A **Figura 15** mostra os respectivos cromatogramas obtidos para as amostras do corante antes e após serem eletrolisadas durante 2 horas, sendo que o **pico 1** corresponde ao Sudan II e o **pico 2** ao Sudan III.

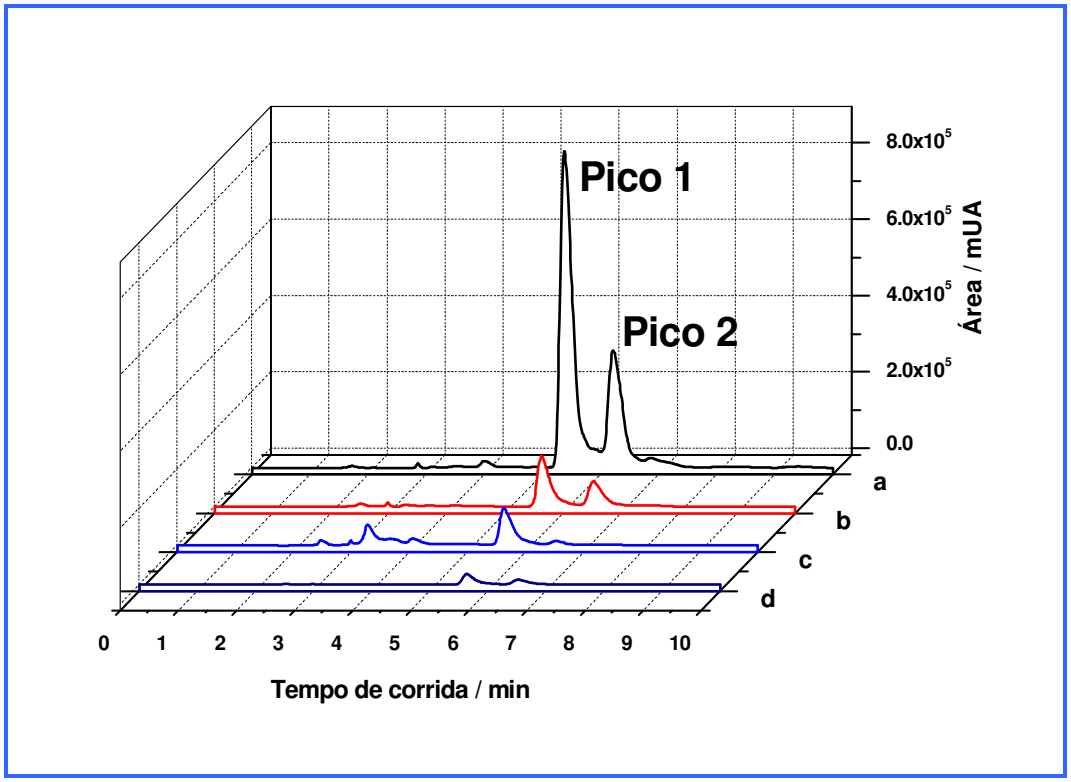


Figura 15: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletrooxidada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1 hora; (**c**) após 1,5 horas; (**d**) após 2 horas.

A análise dos cromatogramas mostra significativa supressão de ambos os picos, atingindo 95 e 98% de supressão na área do **pico 1** e **pico 2** respectivamente. Os respectivos espectros na região de UV-Vis registrados para ambos os picos antes e após 2 horas de oxidação eletroquímica são apresentados na **Figura 16**, em **A**: Sudan

II e em **B**: Sudan III. A percentagem de descoloração dos corantes Sudan II e Sudan III foram monitoradas em diferentes tempos de eletrolise em comprimento de onda do visível e os resultados são apresentados na **Figura 17**.

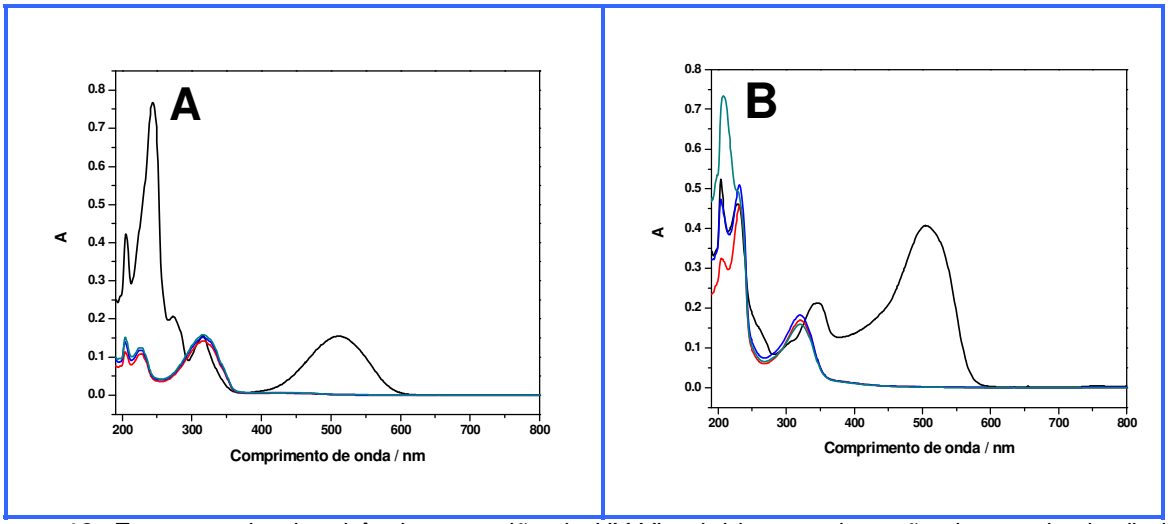


Figura 16: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletrooxidada que eluem em 5,7 minutos (**Sudan II – A**) e 6,3 minutos (**Sudan III – B**); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando-se a **Figura 16** observa-se que há uma significativa diminuição das bandas em 500nm, característica do cromóforo azo, bem como a diminuição das bandas ao redor de 250nm. Concomitantemente há a presença de uma banda em aproximadamente 310nm, no produto eletrolisado indicando que embora o corante esteja sendo degradado, outros subprodutos estão sendo formados no processo. É interessante observar que embora eletroquimicamente o grupo passível de oxidação seja o grupo hidroxila sua proximidade ao grupo azo promove descoloração da molécula como mostra a **Figura 17**, onde expressam a percentagem de descoloração da solução do corante Sudan II e Sudan III no λ = 500nm.

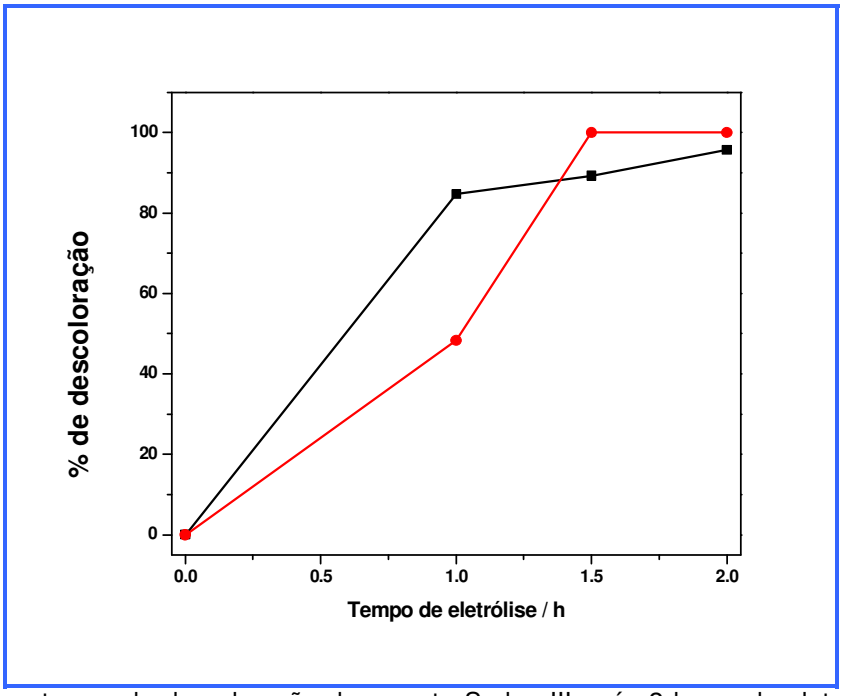


Figura 17: Porcentagem de descoloração do corante Sudan III após 2 horas de eletrólise à potencial controlado (oxidação), aplicando-se 1,5V sob eletrodo de trabalho de rede de platina, contra eletrodo de platina e referência Ag/AgCl. **Pico 1** em preto; **Pico 2** em vermelho.

Observa-se que a oxidação eletroquímica promove 90% de descoloração do corante Sudan II e 100% do corante Sudan III. A provável ocorrência de aminas aromáticas, e nitrobenzeno e resíduos do corante base foi investigado submetendo-se a amostra obtida durante 1, 1,5 e 2 horas à analise cromatográfica utilizando procedimento e condições previamente otimizadas e descritas no item 4.3. Os respectivos cromatogramas CLAE/DAD e os subprodutos identificados como compostos principais formados na oxidação eletroquímica estão representados na **Figura 18**.

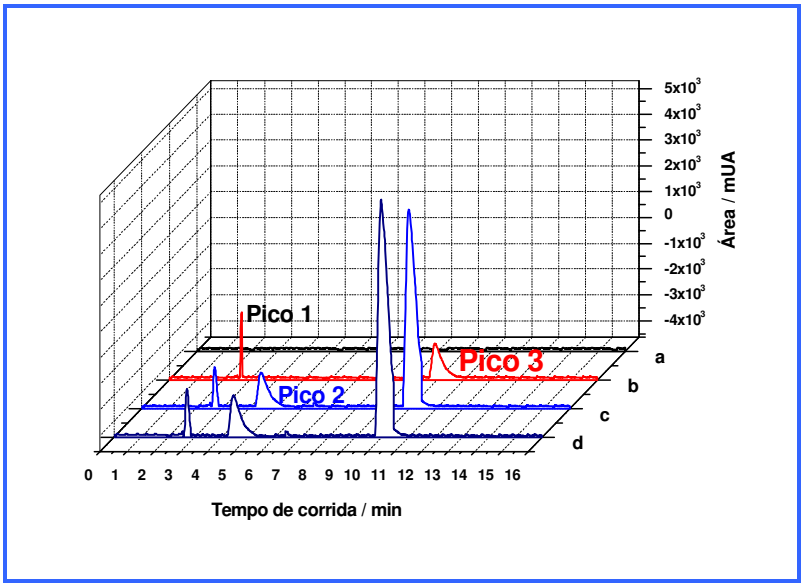


Figura 18: Cromatograma CLAE/DAD obtido para 20µL de amostra do corante antes (a) e após 1h (b), 1,5h (c) e 2h (d) de eletrolise sob potencial de +1,5V em eletrodo de rede de platina.Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

Analisando a **Figura 18**, observa-se que os compostos formados após a eletrooxidação do corante Sudan III são: **Pico 1:** 2-naftilamina tr= 3,0 minutos; **Pico 2:** benzidina tr= 4,7 minutos; **Pico 3:** 2-metoxi-5-metilanilina tr= 9,3 minutos. Para confirmação dessas aminas os espectros UV-Vis obtidos a partir dos compostos formados com seus respectivos padrões são mostrados na **Figura 19**. Nessa figura a curva em preto representa o padrão de cada composto e a em vermelho corresponde ao composto encontrado na amostra analisada por CLAE/DAD.

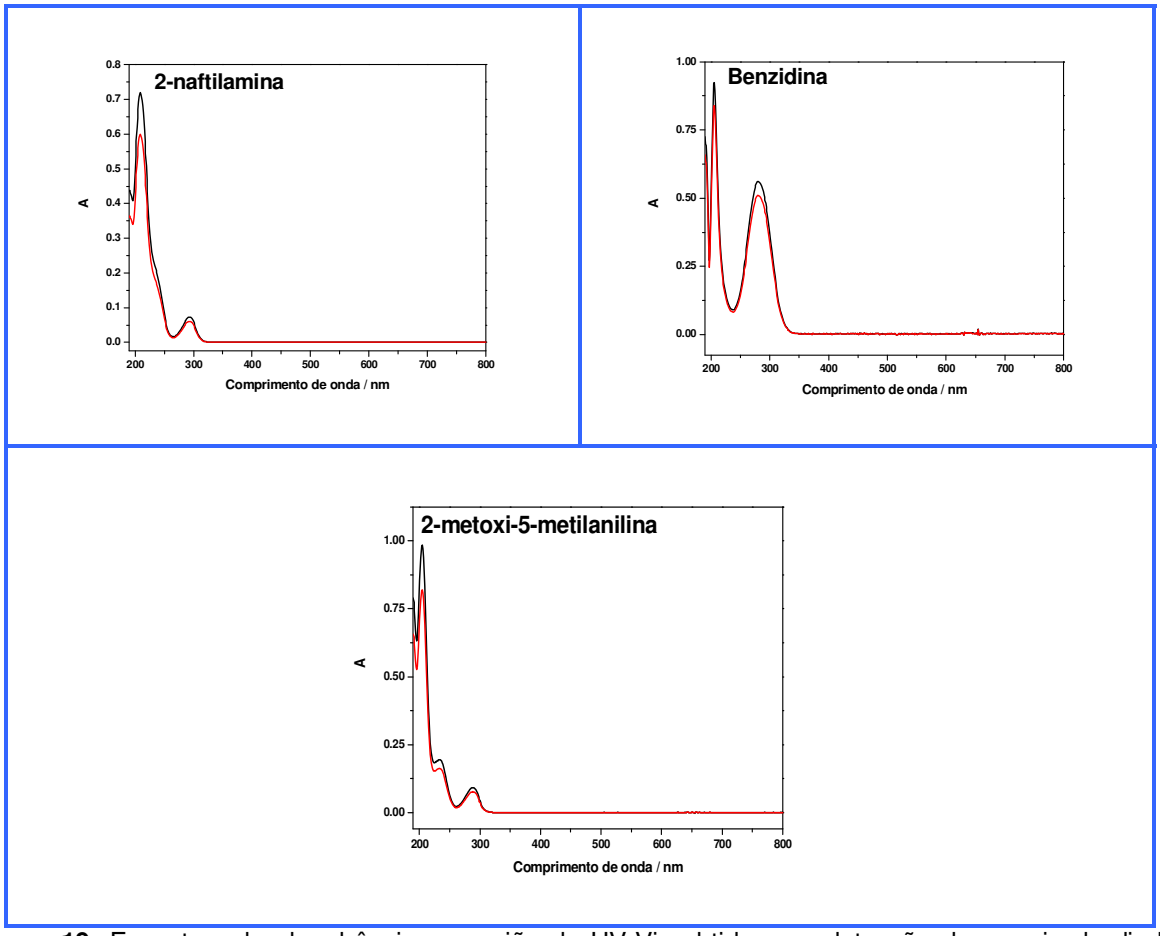


Figura 19: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,0 minutos (2-naftilamina); 4,7 minutos (benzidina) e 9,3 minutos (2-metoxi-5-metilanilina); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Do mesmo modo, as amostra eletrolisadas foram submetidas à analise cromatográfica usando as condições: Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, λ = 230nm e o perfil cromatográfico é mostrado na **Figura 20**.

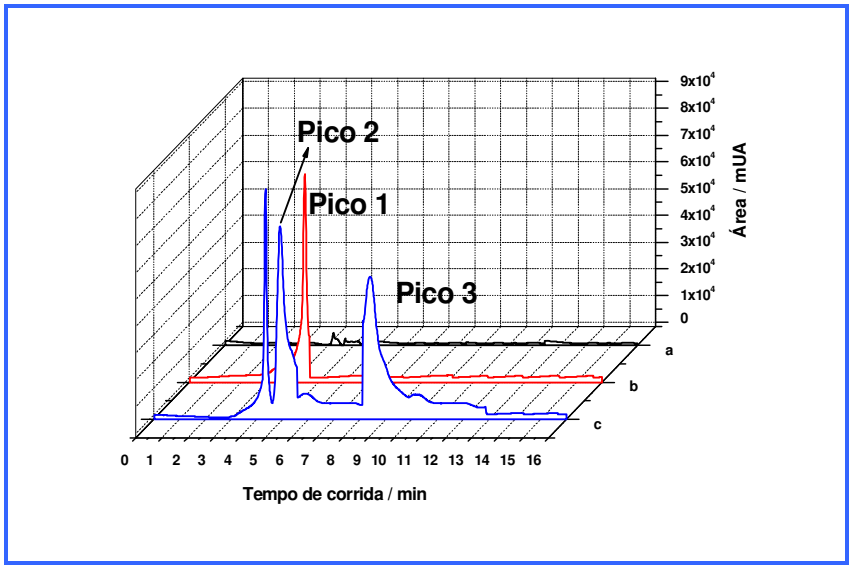


Figura 20: Cromatograma CLAE/DAD obtido para 20µL de amostra do corante (**a**) antes; (**b**) após 1h e (**c**) após 2h de eletrolise sob potencial de +1,5V em eletrodo de rede de platina.Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

Analisando a **Figura 20**, observa-se que os compostos formados após a eletrooxidação do corante Sudan III são: **Pico 1:** 4,4'-metilen-bis-2-metilanilina tr= 3,8 minutos; **Pico 2:** 4-aminobifenil tr= 4,4 minutos; **Pico 3:** fast garnet gbc tr= 8,4 minutos. Para confirmação dessas aminas os espectros UV-Vis obtidos a partir dos compostos formados com seus respectivos padrões são mostrados na **Figura 21**. Nessa figura a curva em preto representa o padrão de cada composto e a em vermelho corresponde ao composto encontrado na amostra analisada por CLAE/DAD.

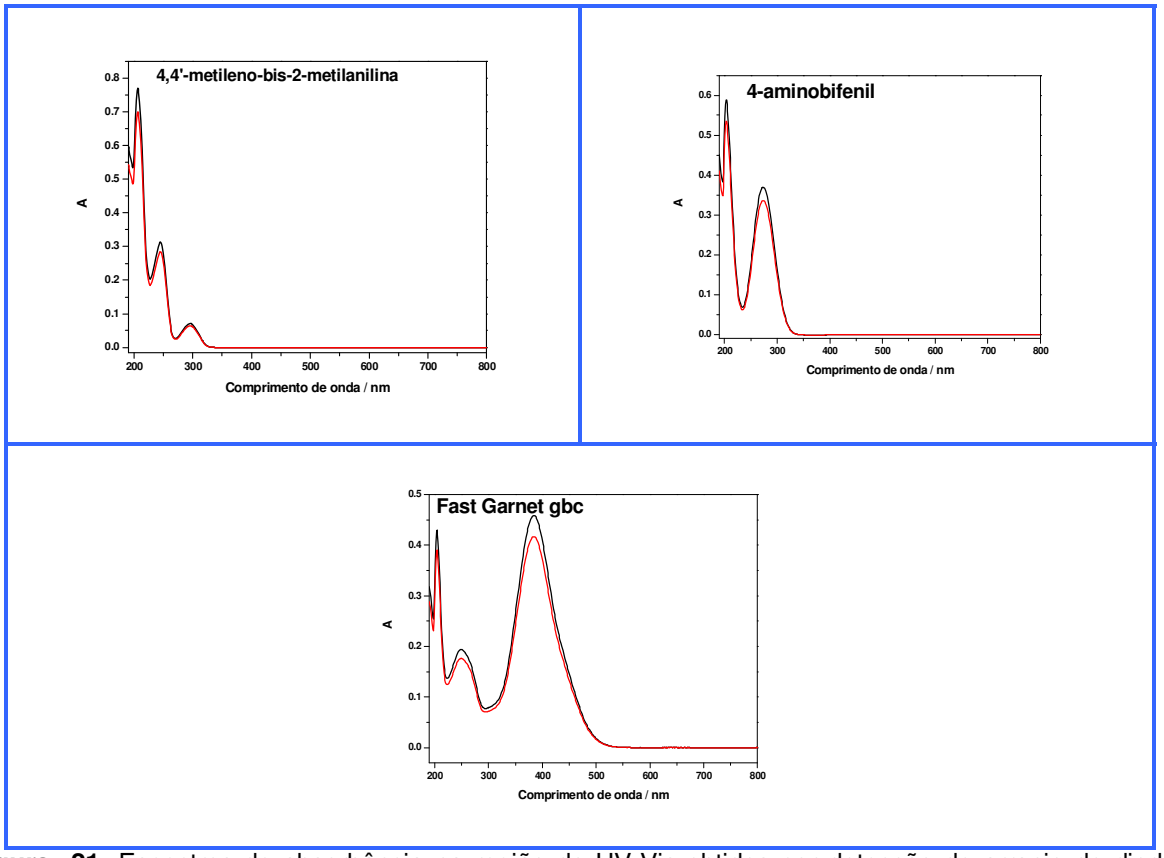


Figura 21: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,8 minutos (4,4'-metilen-bis-2-metilanilina); 4,4 minutos (4-aminobifenil) e 8,4 minutos (fast garnet gbc); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Estes resultados indicam que o corante quando submetido a oxidacao eletroquimica gera 5 produtos principais identificados como aminas carcinogênicas e o corante base usado na síntese do mesmo Fast garnet gbc; como mostra o esquema apresentado na **Figura 22**.

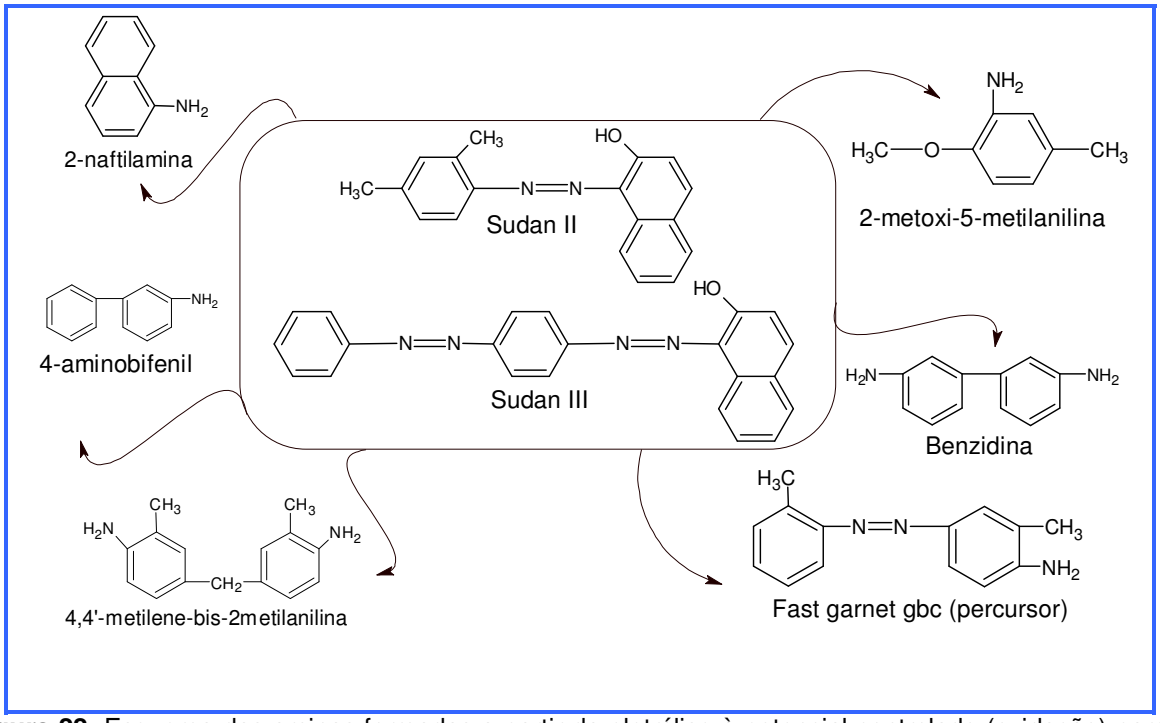


Figura 22: Esquema das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado (oxidação) para o corante Sudan III, sob potencial de 1,5V sobre eletrodo de rede de platina.

A quantidade de cada um destes subprodutos principais gerados foi estimado através de curva de calibração construída para cada um dos padrões invividuais (item 4.3), os resultados são apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9: Aminas formadas a partir da oxidação do corante por eletrolise a potencial controlado após 3 horas aplicando potencial de 1,5V, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Subprodutos Gerados	Início (ppm)	Após 2 horas de oxidação eletroquimica (ppm)	% de subproduto formado
2-naftilamina	0	0,11	0,20
4-aminobifenil	0	0,92	0,95
2-metoxi-5-metilanilina	0	13,9	13,5
Benzidina	0	0,83	0,79
4,4'-metilene-bis-2-metilanilina	0	14,1	12,0
Fast garnet gbc	0	32,8	44,0

Estes resultados indicam que o corante submetido a reações de oxidação pode gerar aminas carcinogênicas em proporções significantes além do fast garnet gbc, o

que torna-se preocupante o consumo sem controle do corante Sudan III, muitas vezes usados como colorante de molhos de vermelhos, uma vez que o mesmo poderia agir como precursor de aminas carcinogenicas quando submetido à processos de oxidação. Analisando a percentagem de subproduto formado em relação ao corante original observa-se para a benzidina cerca de 0,79%, apesar de que esse valor ser muito pequeno é importante destacar que como a mesma é comprovadamente carcinogênica em humanos, qualquer quantidade formada é preocupante pois não se tem limite considerado seguro.

4.4.2 REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DO CORANTE SUDAN III

4.4.2.1. REDUÇÃO VOLTAMÉTRICA DO CORANTE SUDAN III

A redução eletroquimica do corante Sudan III em metanol e tetrafluorborato de tetrabutilamonio como eletrolito suporte é mostrado na **Figura 23**.

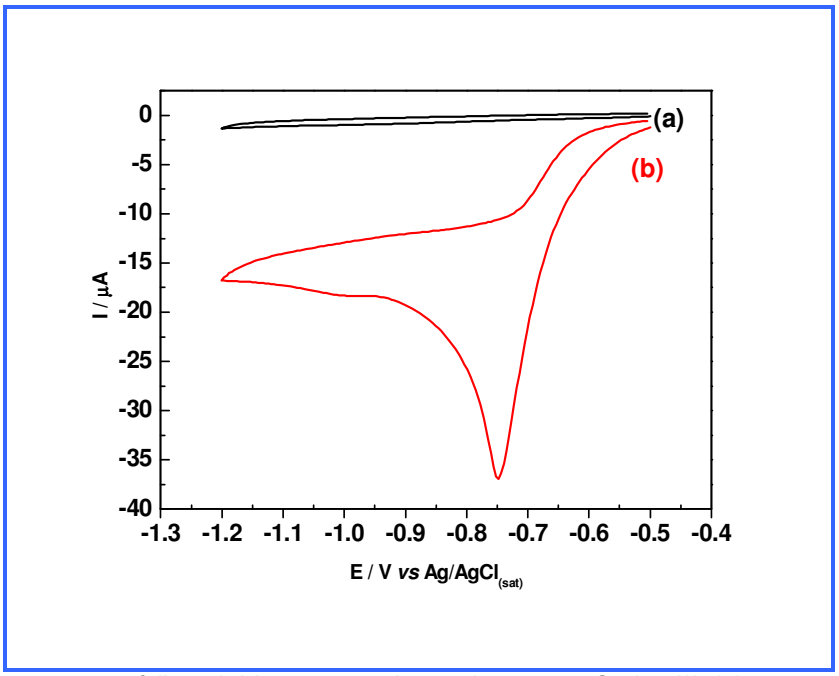


Figura 23: Voltamograma cíclico obtido para a redução do corante Sudan III. (a) 0,01 mol L^{-1} de eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$), e (b) solução 1,00x10^{-4} mol.L^{-1} do corante Sudan III na presença de 0,01 mol L^{-1} tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$). velocidade de varredura 100 mV s^{-1}.

O corante Sudan III caracteriza-se por um pico em aproximadamente -0,75V atribuído à redução do grupo azo, à aminas correspondentes como descrito previamente na literatura [129].

Voltamogramas cíclicos sob diferentes velocidades de varredura de potencial (υ) para a redução eletroquímica do corante Sudan III $1{,}00\times10^{-4}$ mol L^{-1} em metanol e 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio é mostrado na **Figura 24**.

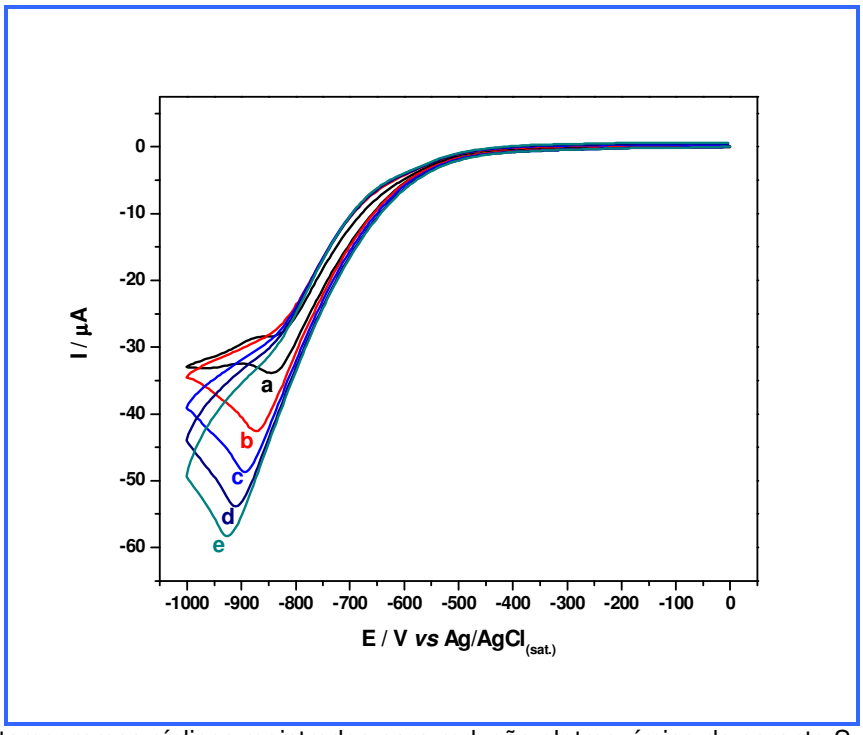


Figura 24: Voltamogramas cíclicos registrados para redução eletroquímica do corante Sudan III $1{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1} sobre a superfície de carbono vítreo em meio de 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tretrabutilamonio para diferentes valores de υ. (**a**) 10 mV s^{-1}; (**b**) 20 mV s^{-1}; (**c**) 30 mV s^{-1}; (**d**) 40 mV s^{-1}; (**e**) 50 mV s^{-1}.

Conforme pode ser observado os voltamogramas cíclicos são caracterizados por um único pico catódico, porem não se observa a ocorrência de nenhum pico anódico na varredura reversa de potencial. A **Figura 25** mostra que os valores de potencias do pico de redução deslocam-se para valores mais negativos com aumento da velocidade de varredura, indicando assim que o processo eletródico envolve a transferência de carga, perturbada por reações químicas acopladas e/ou processos adsortivos [130]. Ainda pode-se observar que a corrente de pico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (**Figura 25B**), no entanto,

não passa pela origem, indicando que o processo eletródico apresenta fraca adsorção do corante.

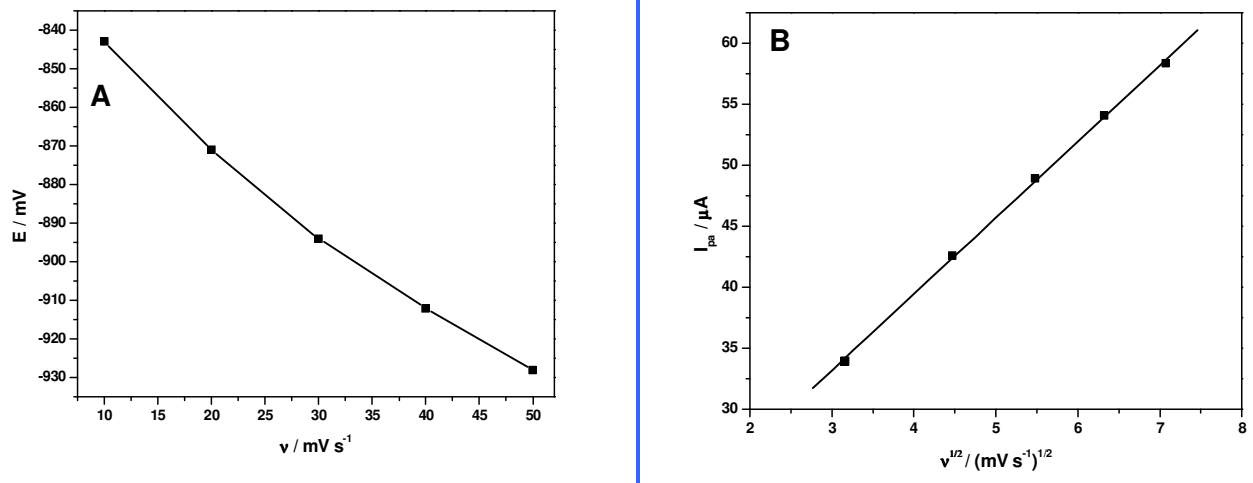


Figura 25: (**A**) influência da velocidade de varredura sobre o potencial e (**B**) influência da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódica na redução do corante Sudan III em presença de 0,01mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sob eletrodo de carbono vítreo.

Os parâmetros eletroquímicos referentes à análise dos voltamogramas cíclicos obtidos nas diferentes υ estão reunidos na **Tabela 10**. Uma relação linear foi observada entre a corrente de pico catódica (I_{pc}) e a $\upsilon^{1/2}$, segundo a equação $I_{pc}(\mu A) = 14{,}45 + 6{,}25_{\times}\upsilon^{1/2}$ [$(mV\ s^{-1})^{1/2}$], com r = 0,999 (**Figura 25B**). O fato de a I_p varia linearmente com a raiz da υ e não passar pela origem dos pontos indica que o processo de redução eletroquímica do corante Sudan III não é controlado apenas por difusão.

Tabela 10: Parâmetros voltamétricos obtidos para a redução eletroquímica de $1{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Sudan III em meio de 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio.

υ (mV s^{-1})	E_{pc} (mV)	I_{pc} (µ A)	$I_{pc} / \upsilon^{1/2}$ [µA / $(mV\ s^{-1})^{1/2}$]
10	-843	-33,96	10,74
25	-871	-42,59	9,52
50	-894	-48,92	8,93
40	-912	-54,07	8,55
50	-928	-58,35	8,25

A seguir investigou-se a redução por eletrolise à potencial controlado, com o intuito de identificar aminas aromáticas como possíveis subprodutos.

4.4.2.2. REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DO CORANTE SUDAN III POR ELETRÓLISE À POTENCIAL CONTROLADO

Soluções 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III em metanol e 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio foram submetidos à eletrolise a potencial controlado sob potencial de -1,2V durante 2 horas. Amostras eletrolisadas foram removidas e analisadas por CLAE/DAD. Os cromatogramas obtidos após e antes a eletrolise do corante em tempos de 1, 1,5 e 2 horas são mostrados na **Figura 26**.

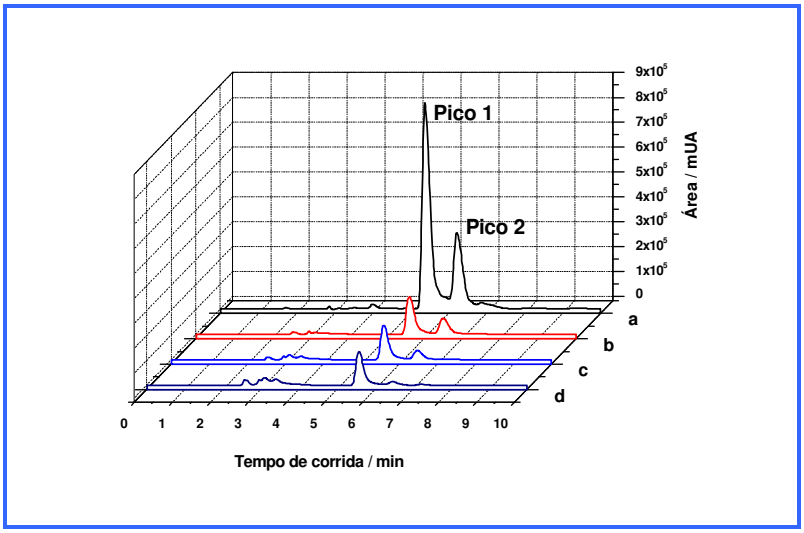


Figura 26: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1h; (**c**) após 1,5h; (**d**) após 2h.

Analisando-se a **Figura 26** observa-se que há uma significativa diminuição do pico correspondente aos corantes identificados previamente com Sudan II (**pico 1**) e Sudan III (**pico 2**), respectivamente. Os espectros UV-Vis obtidos para os compostos separados cromatograficamente antes e após redução eletroquímica são mostrados na **Figura 27**.

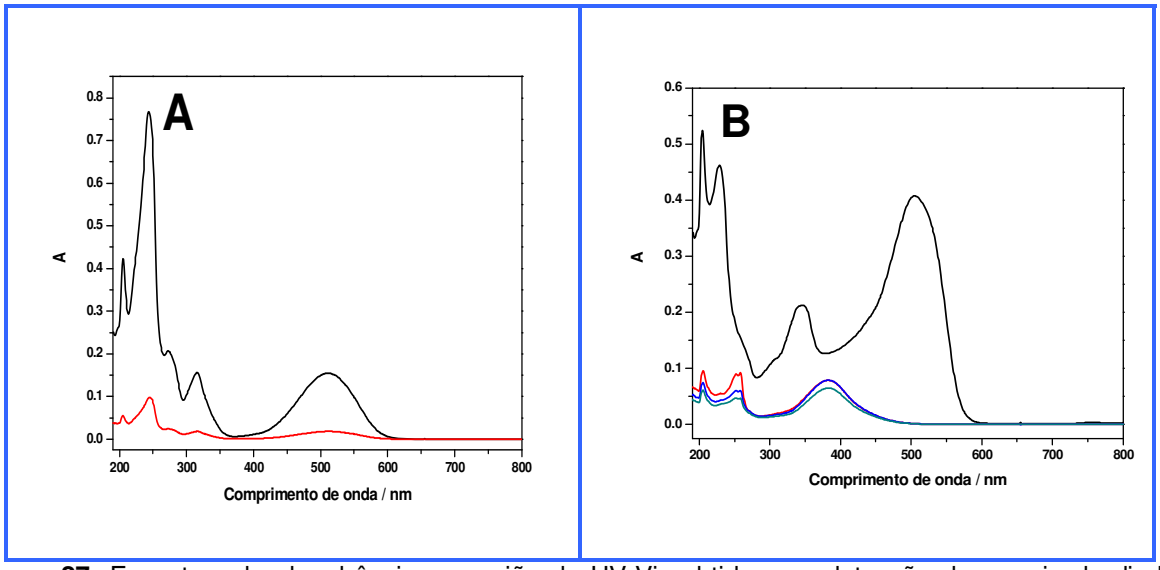


Figura 27: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletroreduzida que eluem em 5,7 minutos (**Sudan II – A**) e 6,3 minutos (**Sudan III – B**); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Observa-se nesta figura a total supressão da banda em 500nm característica do cromóforo azo. Concomitantemente observa-se a diminuição da banda ao redor de 250nm e formação de uma nova banda em aproximadamente 400nm evidenciando a presença de subprodutos principalmente após degradação do Sudan III. A descoloração do corante Sudan II e Sudan III após 2 horas de tratamento é mostrado na **Figura 28**, pelo monitoramento das bandas em λ= 500nm.

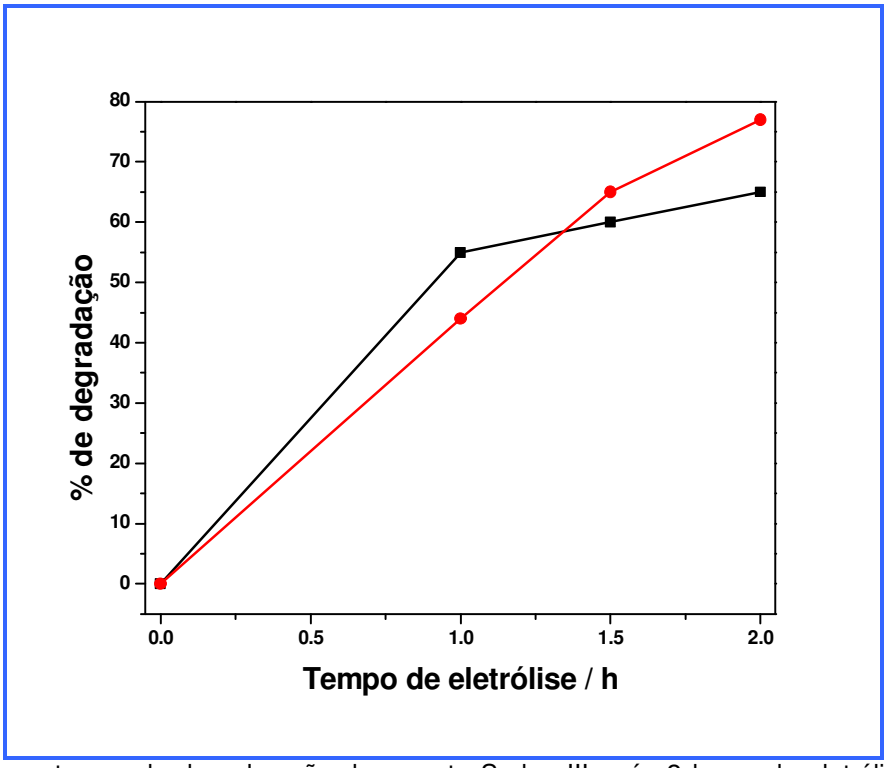


Figura 28: Porcentagem de descoloração do corante Sudan III após 2 horas de eletrólise à potencial controlado (redução), aplicando-se -1,2V sob eletrodo de trabalho de rede de platina, contra eletrodo de platina e referência Ag/AgCl. **Pico 1** em preto; **Pico 2** em vermelho.

Observa-se cerca de 65% de remoção da cor para o **pico 1** (Sudan II) e 78% para o **pico 2** (Sudan III). Posteriormente estas amostras foram submetidas à analise por CLAE/DAD usando procedimento previamente otimizado e descrito no **item 3.3.3.** do procedimento experimental.

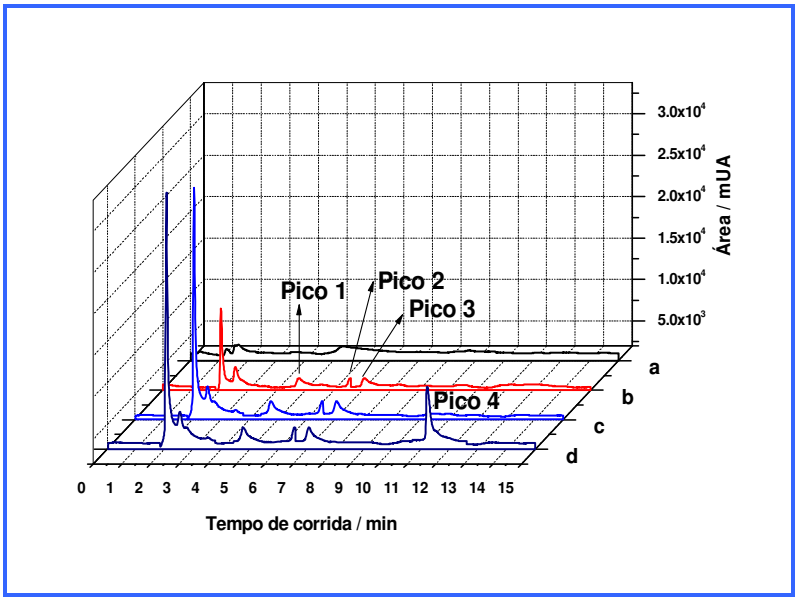


Figura 29: Cromatograma CLAE/DAD obtido para 20µL de amostra do corante Sudan III (**a**) antes (**b**) e após 1h, (**c**) após 1,5h (**d**) após 2h de eletrolise sob potencial de +1,5V em eletrodo de rede de platina. Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

Identifica-se nos cromatogramas a ocorrência de 4 picos em tempos de retenção 4,7 minutos; 6,5 minutos; 7,0 minutos; 11,2 minutos, os quais são coincidentes com os padrões de benzidina, o-toluidina, 4,4'-oxidianilina, 2,6-dimetilanilina, respectivamente. Os espectros de UV-Vis obtido para as amostras e os respectivos padrões para as amostras e os respectivos padrões foram comparados nas curvas A, B, C e D da **Figura 30**.

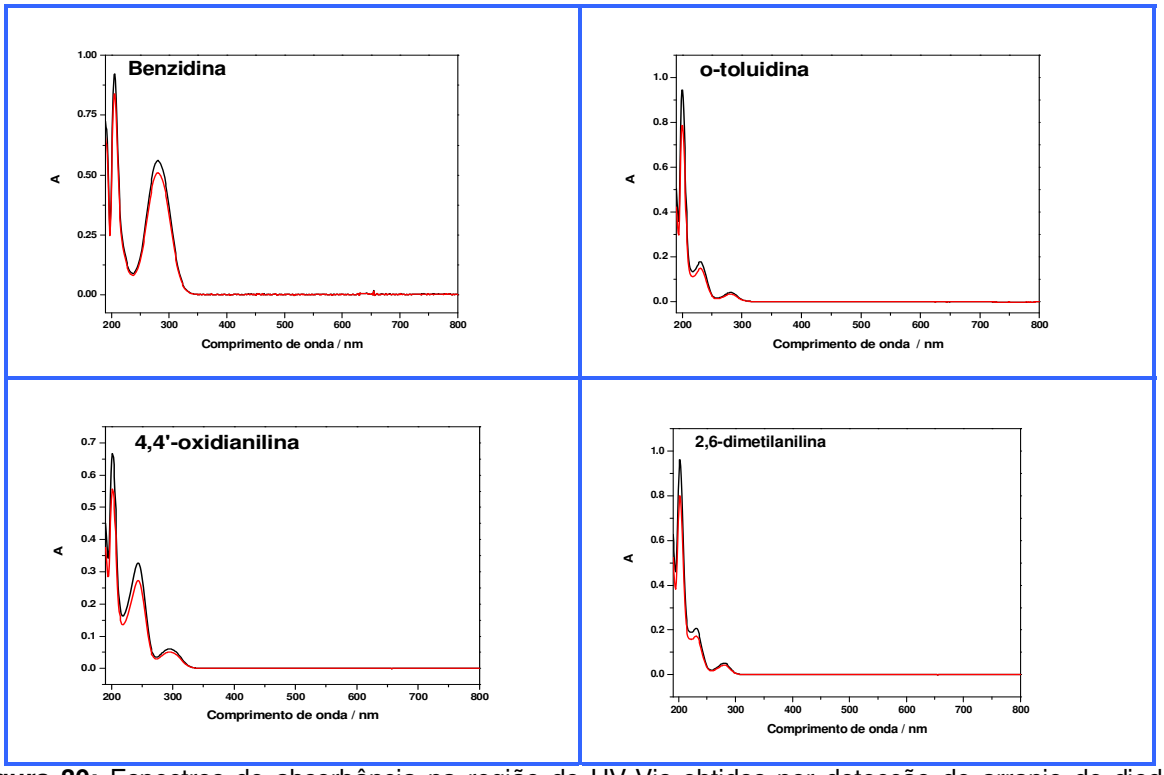


Figura 30: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 4,7 minutos (benzidina); 6,5 minutos (o-toluidina); 7,0 minutos (4,4'-oxidianilina) e 11,2 minutos (2,6-dimetilanilina). Fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5{,}00 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Estes resultados indicam que as aminas formadas, benzidina, o-toluidina, 4,4'-oxidianilina e 2,6-dimetilanilina são formadas na redução eletroquímica. A seguir as amostras eletrolisadas foram submetidas a analise cromatográfica usando as condições: Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, λ = 230nm. Os resultados são apresentados na **Figura 31**.

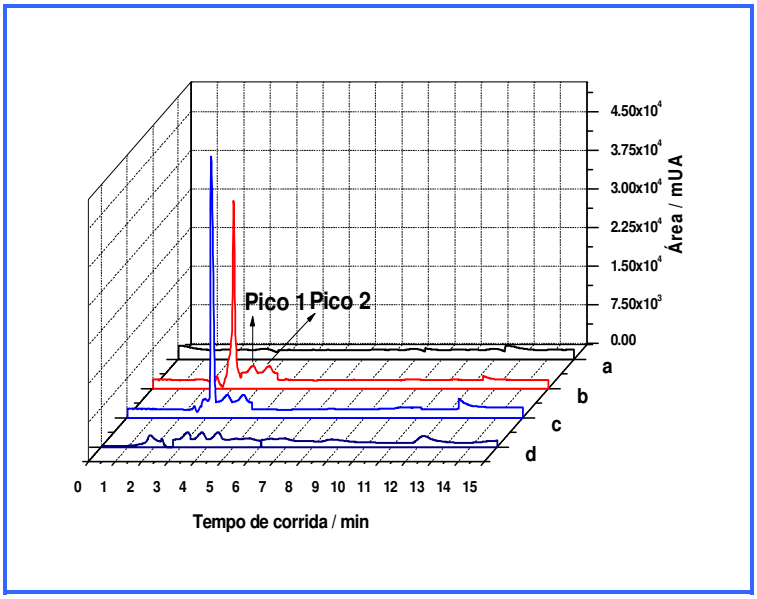


Figura 31: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1 hora; (**c**) após 1,5 horas; (**d**) após 2 horas.

Nesta figura identificam-se dois produtos principais em tempos de retenção de 3,8 e 4,4 minutos atribuídos a 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina e 4-aminobifenil. Os respectivos espectros para os compostos identificados no cromatograma e os padrões são mostrados na **Figura 32**.

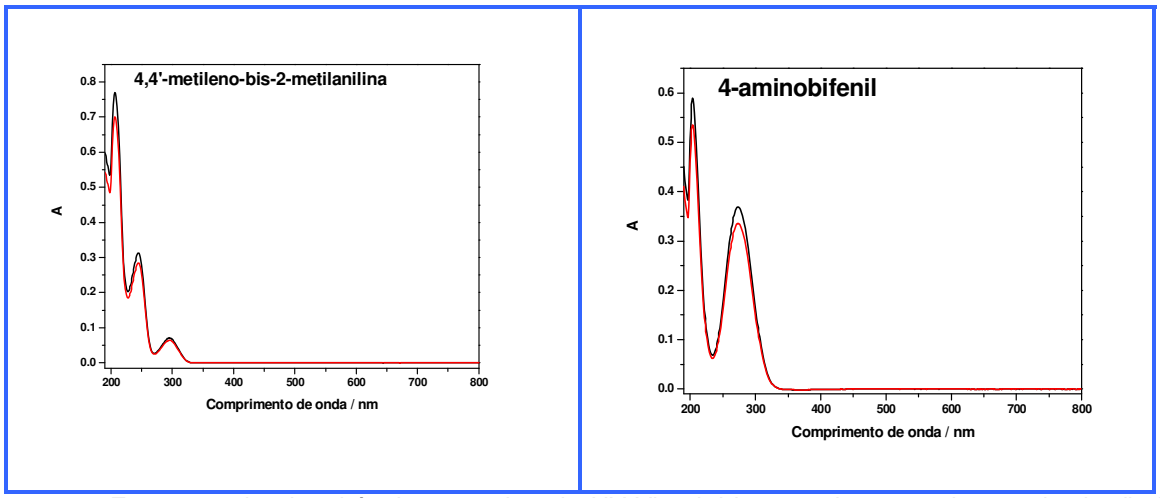


Figura 32: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,8 minutos (4,4'-metilen-bis-2-metilanilina) e 4,4 minutos (4-aminobifenil); fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Estes resultados confirmam que o corante quando submetido à redução eletroquímica gera seis produtos principais identificados como aminas carcinogênicas sendo elas: benzidina, o-toluidina, 4,4'-oxidianilina, 2,6-dimetilanilina, 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina e 4-aminobifenil, como mostra o esquema da **Figura 33**.

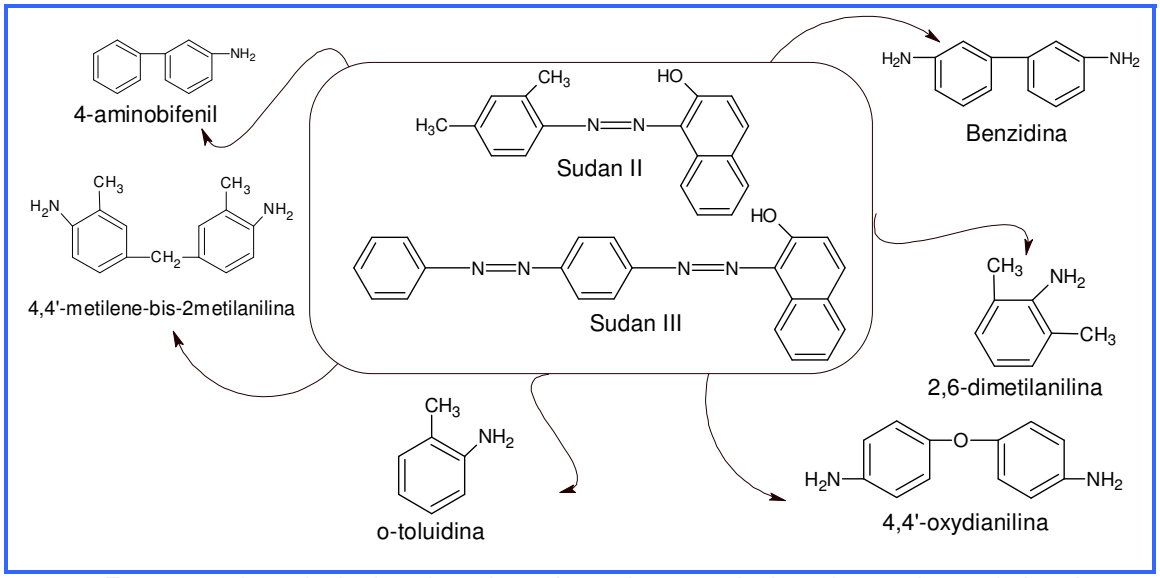


Figura 33: Estruturas dos principais subprodutos formados a partir da reducao eletroquimica do corante Sudan III sob um potencial de -1,2V.

A quantidade de cada um destes componentes gerados após eletrolises foi calculada usando a curva analitica previamente construida para cada um dos padroes e os resultados são apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Principais subprodutos gerados na reducao do corante durante 2 horas de eletrolise a potencial controlado sob potencial de -1,2V.

Subprodutos Gerados	Início (ppm)	Após 2 horas de oxidação eletroquimica (ppm)	% de subproduto formado
Benzidina	0	0,11	0,32
o-toluidina	0	0,92	0,93
4,4'-oxidianilina	0	0,22	0,21
2,6-dimetilanilina	0	0,83	0,74
4,4'-metileno-bis-2-metilanilina	0	0,44	0,33
4-aminobifenil	0	0,21	0,23

Estes resultados indicam que soluções contendo $1{,}00 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} do corante submetido a redução eletroquímica pode gerar aminas carcinogênicas em proporções significantes. Um dado preocupante é em relação a formação de benzidina que embora

seja uma percentagem pequena cerca de 0,32% é perigoso para a saúde humana pois é considerada carcinogênica, logo não há quantidade segura.

4.4.3. REDUÇÃO QUÍMICA COM HIDROSSULFITO DE SÓDIO

A redução química do corante Sudan III com hidrossulfito de sódio foi investigada a seguir no intuito de verificar se os subprodutos formados sob ação do redutor químico é semelhante aqueles formados durante redução eletroquímica. Para isto soluções $1{,}00x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante foram tratadas com hidrossulfito de sódio de acordo com metodologia descrita no item 3.3.4. do procedimento experimental. Os cromatogramas obtidos antes e após 2 horas de reação química sob agitação são apresentados na **Figura 34**.

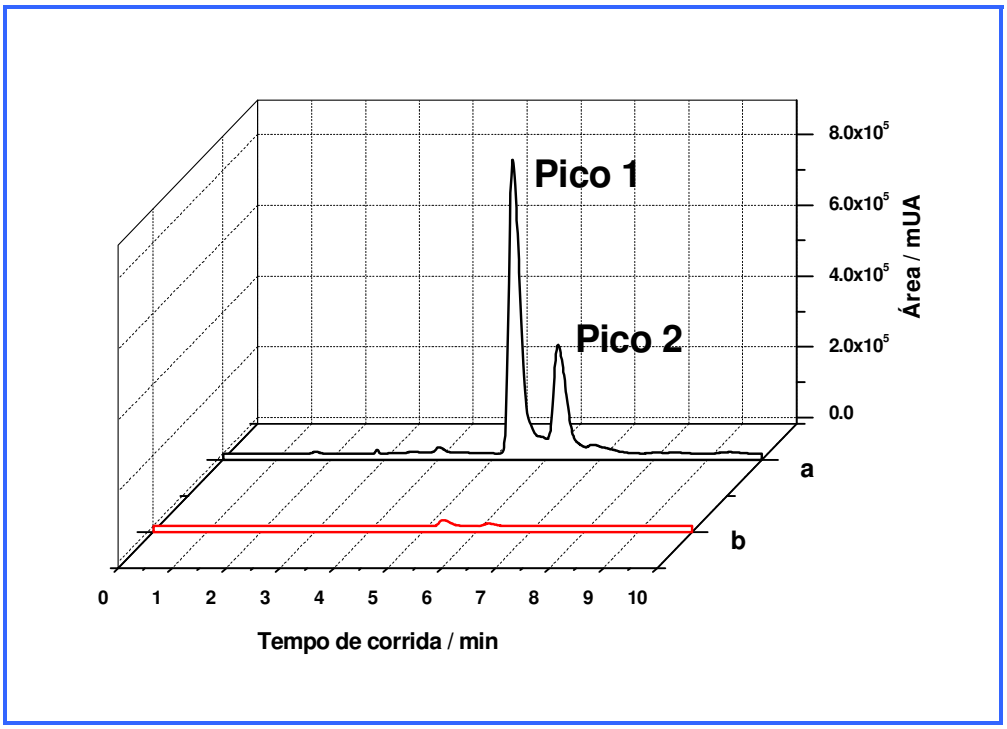


Figura 34: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 2 horas de reação química.

Observa-se quase total supressão dos picos em 5,7 e 6,3 minutos dos corantes Sudan II e Sudan III identificados previamente, respectivamente. Na **Figura 35**

apresenta-se os respectivos espectros de UV-Vis obtidos antes e após redução química.

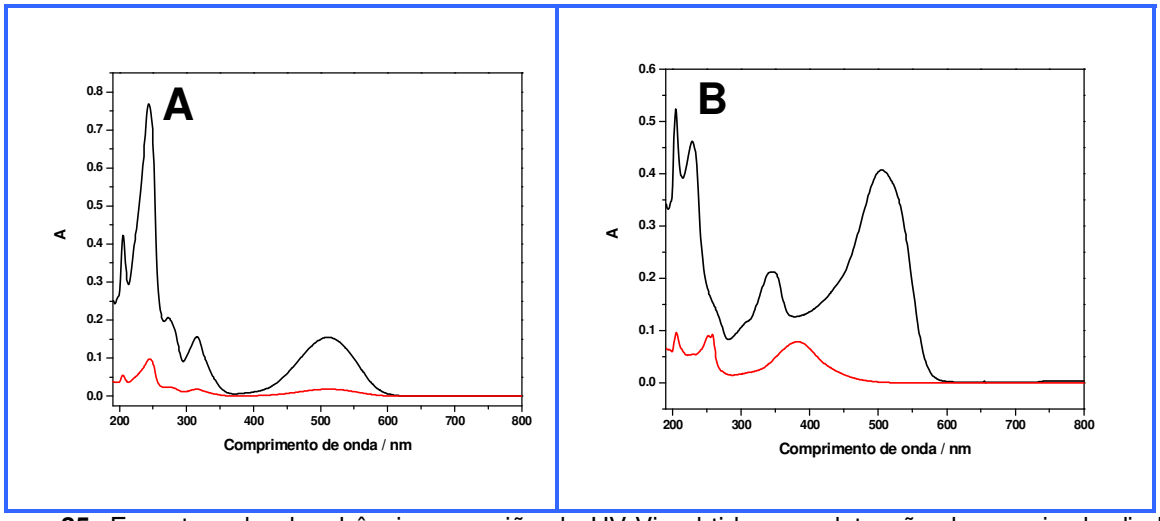


Figura 35: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra reduzida quimicamente que eluem em 5,7 minutos (**Sudan II – A**) e 6,3 minutos (**Sudan III – B**); Fase móvel ACN/MeOH 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Os espectros indicam que a redução química promove a supressão da banda em 500nm, característica do cromóforo azo. Em adição observa-se uma diminuição significativa nas bandas em torno de 250nm, porem há a formação de uma banda em aproximadamente 400nm evidenciando a presença de subprodutos formados de forma semelhante ao verificado na redução eletroquímica. A percentagem de descoloração do corante Sudan III após 2 horas de reação atinge 90% para Sudan II (**pico 1**) e 98% para Sudan III (**pico 2**). Os resultados obtidos para as amostras analisadas segundo procedimento experimental por CLAE/DAD são apresentados na **Figura 36**.

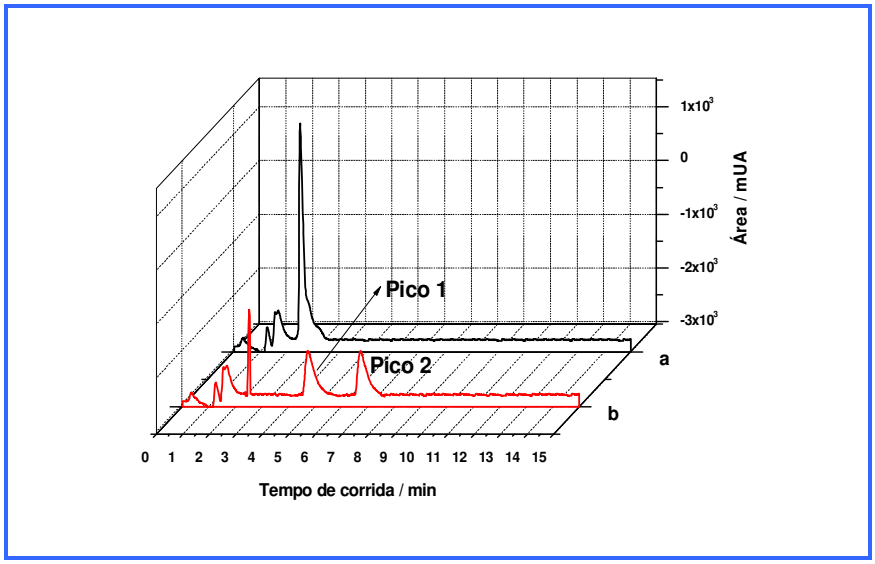


Figura 36: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 2 horas de reação química.

Nesta figura identificam-se dois produtos principais em tempos de retenção de 5,2 e 6,5 minutos atribuídos a anilina e o-toluidina. Os respectivos espectros para os compostos identificados no cromatograma e os padrões são mostrados na **Figura 37**.

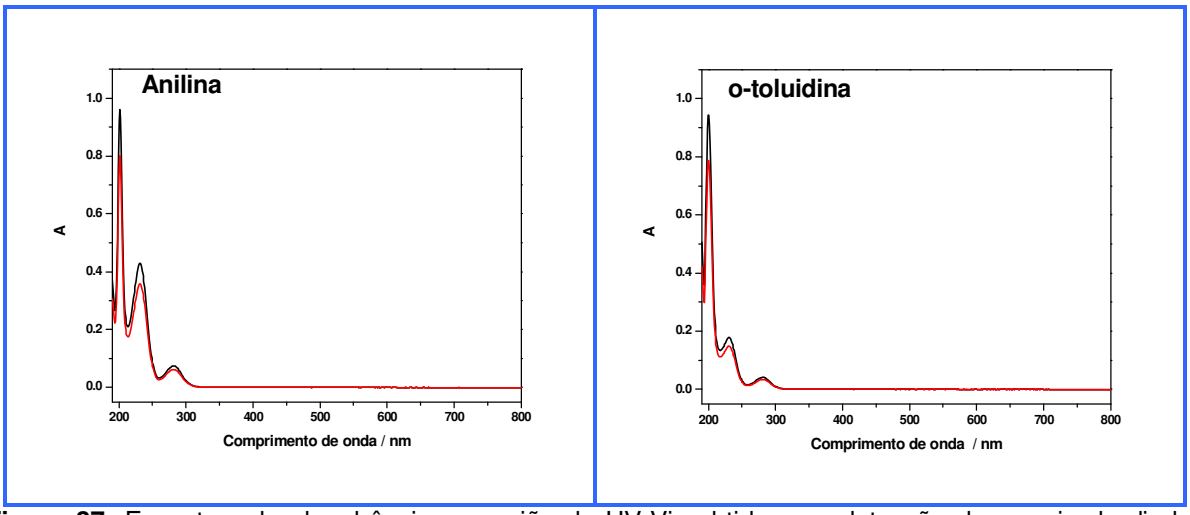


Figura 37: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,2 minutos (anilina) e 6,5 minutos (o-toluidina). Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A seguir as amostras eletrolisadas foram submetidas a analise cromatográfica usando as condições: Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, λ = 230nm. Os resultados são apresentados na **Figura 38**.

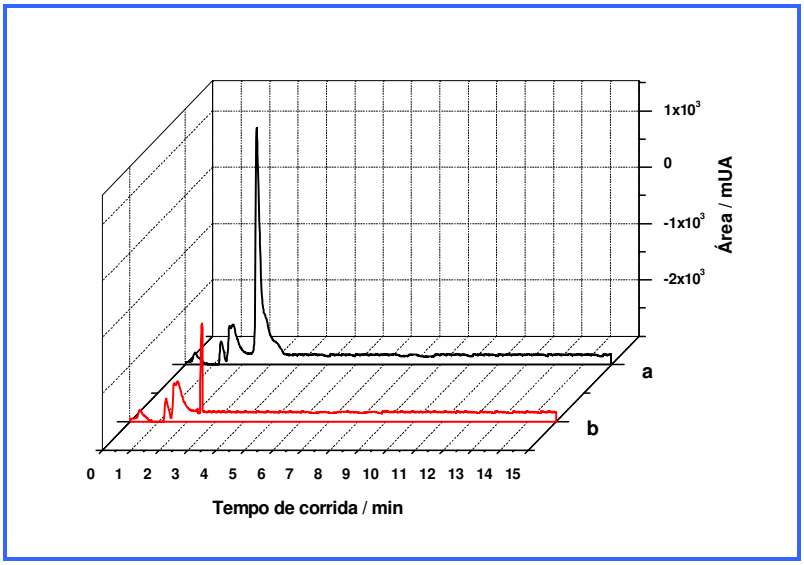


Figura 38: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 2 horas de reação química.

Estes resultados confirmam que o corante quando submetido a um agente redutor pode gerar 2 subprodutos principais, identificados como as seguintes aminas: anilina (tr= 5,2 minutos) e o-toluidina (6,5 minutos), como mostra o esquema da **Figura 39**.

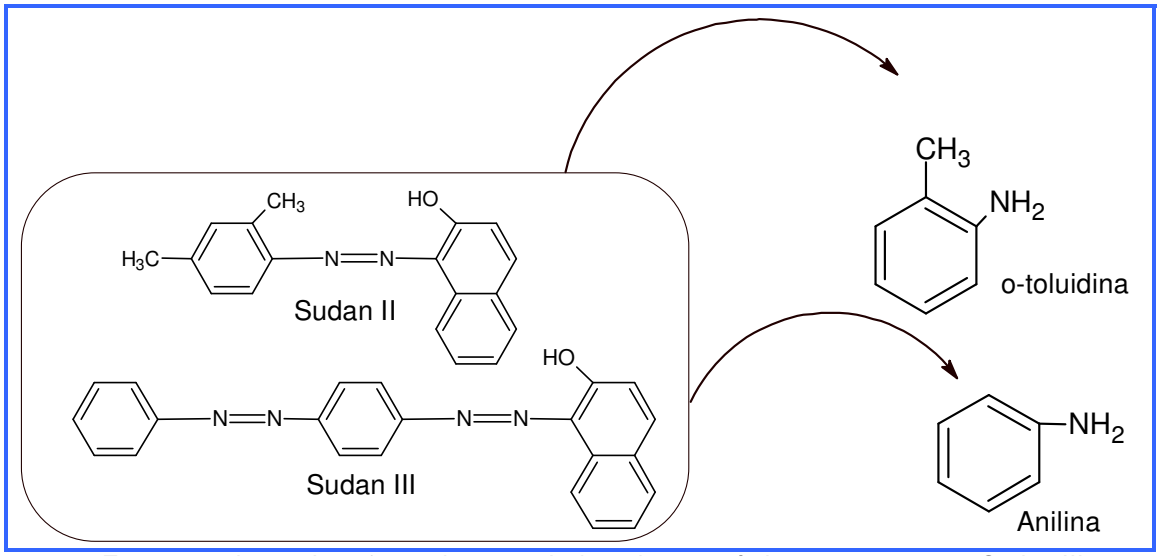


Figura 39: Estruturas das aminas formadas a partir da redução química para o corante Sudan III.

A analise quantitativa dessas amostras pode ser feita com os dados apresentados na **Tabela 12**. Estes resultados indicam que o mecanismo de redução química favorece a formação de 2 aminas principais, sendo a o-toluidina também identificada como subproduto da redução eletroquímica, em quantidades compatíveis em ambos os metodos. A possibilidade de formar espécies radicalares durante a redução eletroquímica pode favorecer a formação de intermediários diferentes mostrando que os processos podem ser diferentes, mas ambos comprovam a formação de produtos nocivos ao ser humano.

Tabela 12: Aminas formadas a partir da redução química do corante e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Subprodutos Gerados	Início (ppm)	Após 2 horas de redução quimica (ppm)	% subproduto formado
Anilina	0	0,56	0,23
o-toluidina	0	0,92	0,56

A partir da redução química desse corante houve a formação da o-toluidina que é considerada provável carcinogênicos em humanos, pois a mesma apresenta carcinomas em animais, embora a percentagem seja considerada pequena em relação ao corante original.

4.4.4. OXIDAÇÃO QUÍMICA DO CORANTE SUDAN III POR CLORAÇÃO

A cloração de amostras contendo 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III foi conduzida submetendo-se a amostra à reação com hipoclorito de sódio (2% m/v) durante 10 horas, de acordo com procedimento descrito na parte experimental. Após 10 horas de reação a amostra foi analisada por CLAE/DAD nas condições experimentais que permitam detecção do corante. A **Figura 40** e a **Figura 41** mostram os cromatogramas obtidos e os respectivos espectros de UV-Vis, correspondente as amostras de Sudan II e Sudan III.

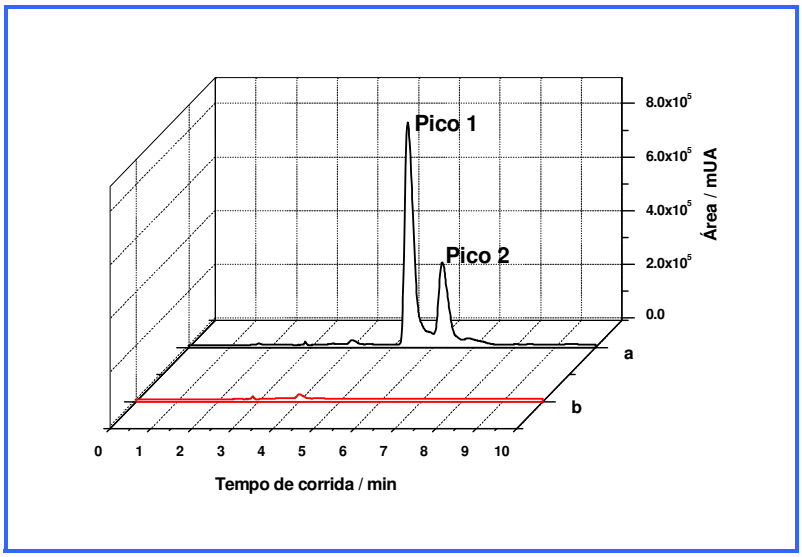


Figura 40: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) amostra original; (**b**) amostra clorada.

Observa-se na **Figura 40** que o método de cloração convencional comumente utilizado nas estações de tratamento de esgoto é eficiente na remoção da cor do mesmo. Do mesmo modo, amostras extraídas após a cloração e submetidas a analise das aminas aromáticas selecionadas no trabalho por CLAE/DAD não apresentaram nenhum sinal cromatográfico passível de serem atribuído as aminas carcinogênicas estudadas. Isso indica que o processo de tratamento do corante poderia estar formando outros derivados clorados que poderiam ate ser mais tóxicos que a molécula original, no entanto esses possíveis derivados não foram estudados no trabalho, e deverão ser estudados posteriormente por outros métodos de analise tal como LC/MS-MS.

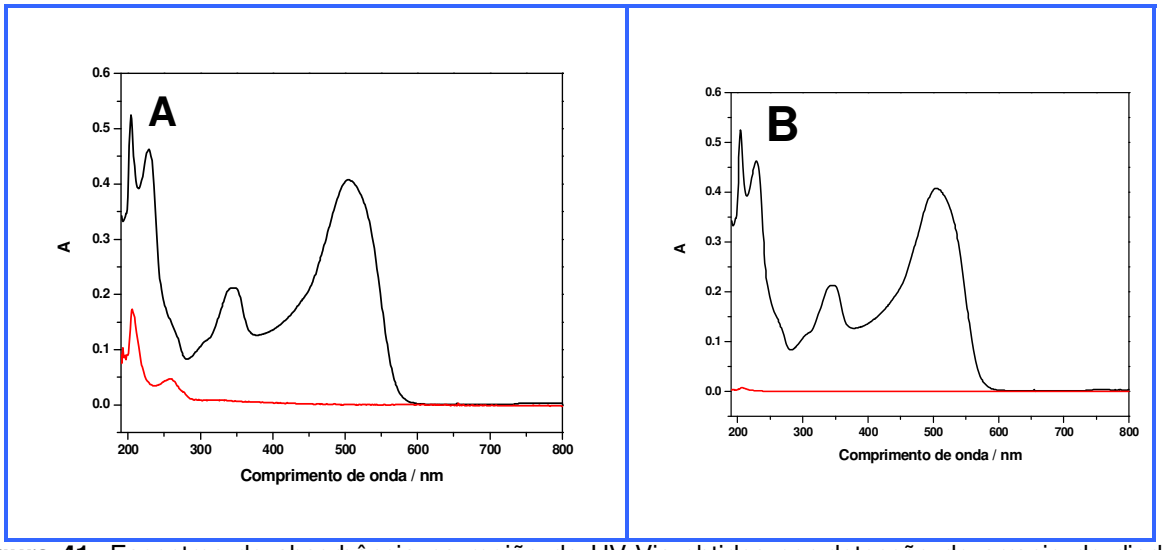


Figura 41: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra clorada que eluem em 5,7 (**Sudan II – A**) e 6,3 minutos (**Sudan III – B**), respectivamente; Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

4.4.5. CLORAÇÃO APÓS REDUÇÃO QUÍMICA DO CORANTE SUDAN III

Considerando que o processo de cloração pode ser utilizado nas estações de tratamento de água e o corante presente no efluente pode estar na forma reduzida investigou-se nesta etapa, a influência da cloração no corante previamente reduzido co hidrossulfito de sódio. As amostras de $1{,}00x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Sudan III foram reduzidas quimicamente com hidrossulfito de sódio durante 2 horas e posteriormente submetidas à cloração com hipoclorito de sódio 2% durante 10 horas. A **Figura 42** apresenta os cromatogramas antes e após redução e nova oxidação com hipoclorito de sódio.

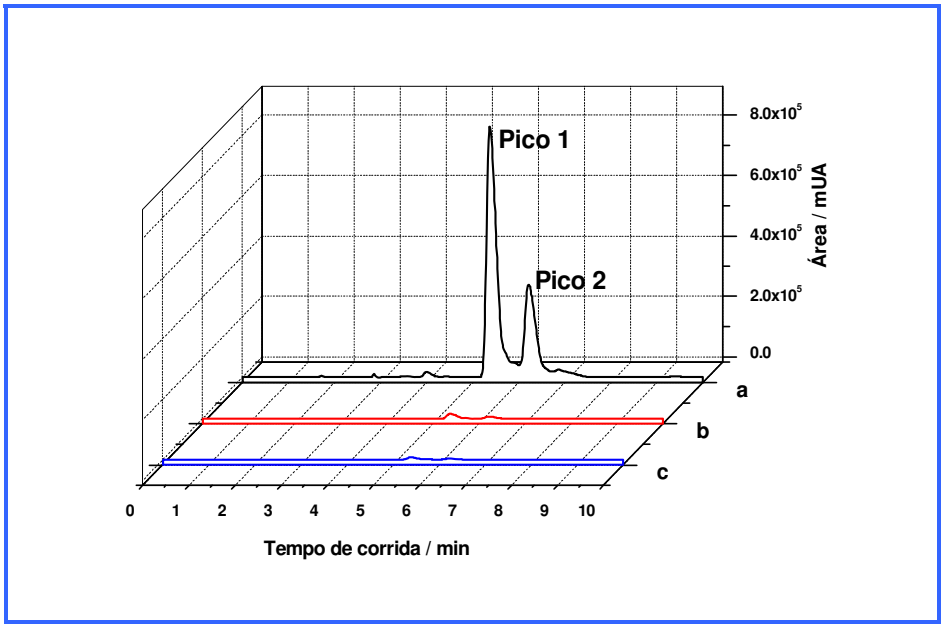


Figura 42: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação; (**c**) após reação + cloração.

Analisando-se a **Figura 42**, observa-se que após a cloração há total supressão do pico 1 ainda persistente após a etapa de redução química e observa-se clara ocorrência de subprodutos ainda presentes no espectro de UV-Vis ao redor de 380nm. Os espectros UV-Vis desse processo são mostrados na **Figura 43**.

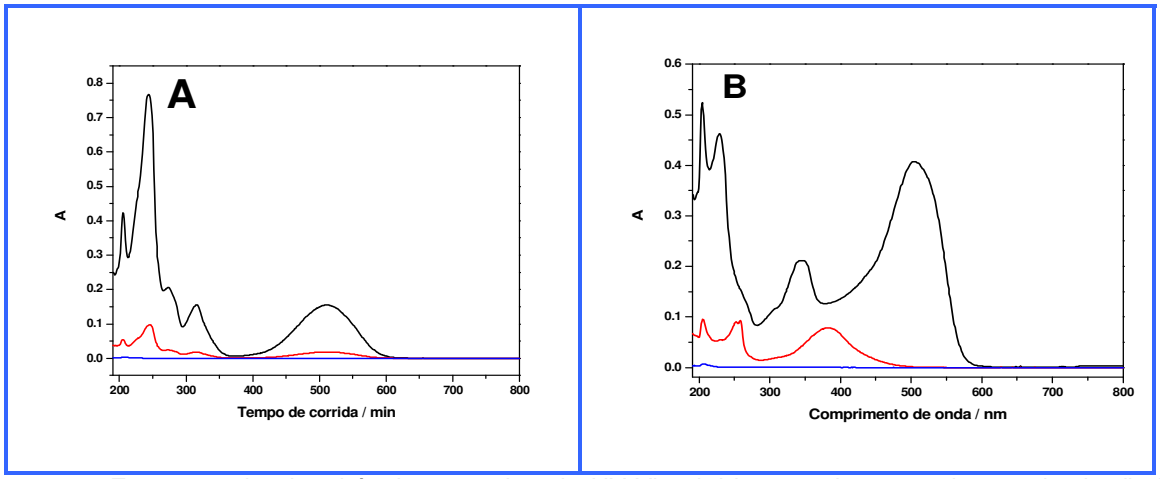


Figura 43: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as amostras reduzidas quimicamente e posteriormente cloradas que eluem em 5,7 minutos (**Sudan II – A**) e 6,3 minutos (**Sudan III – B**); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Amostras analisadas por CLAE/DAD para as aminas são mostradas mostrados na **Figura 44** e na **Figura 46**, respectivamente. A **Figura 44** mostra que foram formadas as aminas anilina e 4-cloroanilina que eluem nos tempos de retenção de 5,2 e 10,8 minutos, respectivamente.

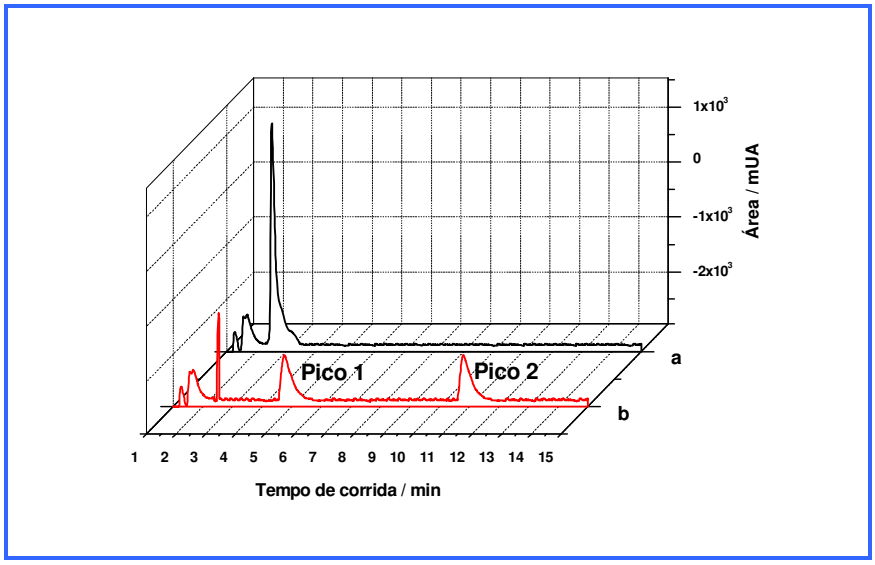


Figura 44: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação + cloro.

Os espectros UV-Vis dos compostos observados no cromatograma CLAE/DAD estão mostrados na **Figura 45**.

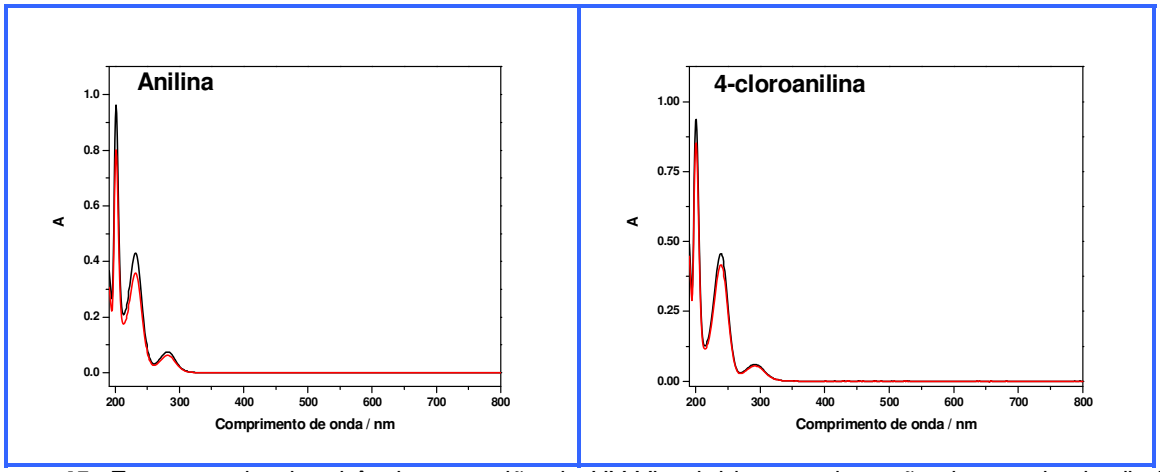


Figura 45: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,2 minutos (anilina) e 10,8 minutos (4-cloroanilina), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9) (v/v) e 20mM de trietilamina., T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A seguir essas amostras foram submetidas a analise cromatográfica usando as condições: Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, λ = 230nm. Os resultados são apresentados na **Figura 46**, sendo que o pico 1 corresponde a amina 4-cloro-o-toluidina que elue no tempo de retenção de 4,1 minutos.

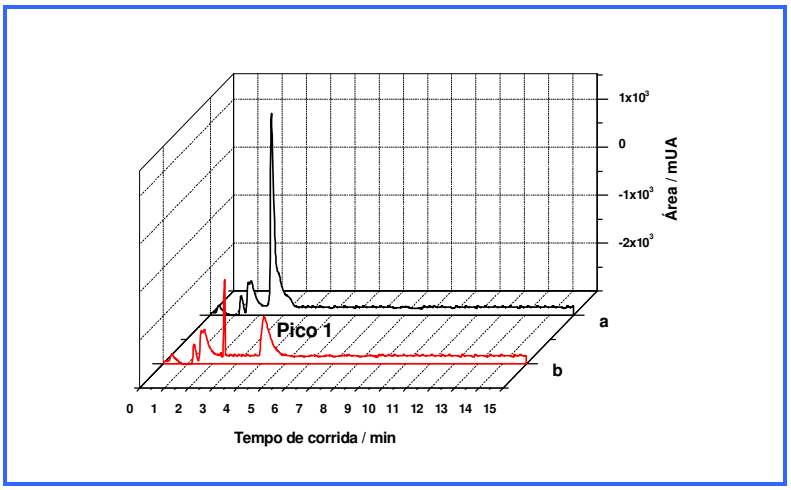


Figura 46: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra e reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação + cloro.

O espectro UV-Vis do composto observado no cromatograma CLAE/DAD da **Figura 46** está mostrada na **Figura 47**.

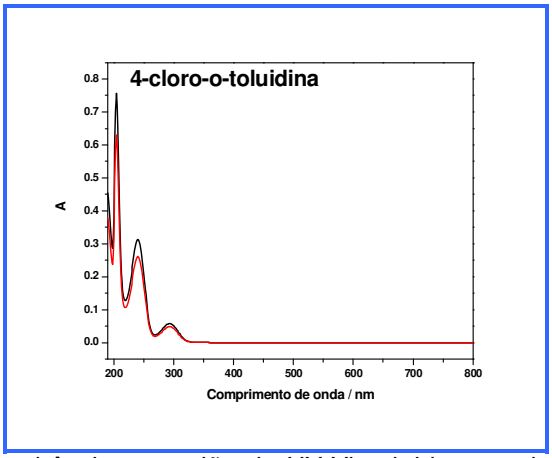


Figura 47: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que elue em 4,1 minutos (4-cloro-o-toluidina); fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Ambos os cromatogramas apresentados na **Figura 44** e na **Figura 46** indicam a formação de anilina e outras aminas cloradas identificadas como 4-cloroanilina e 4-cloro-o-toluidina, estas são confirmadas pelos espectros apresentados na **Figura 45** e na **Figura 47**, respectivamente. Estes resultados indicam que a cloração de derivados do corante pode formar outros subprodutos diferentes daqueles clorados na forma original do corante. Este é um dado preocupante para a saúde da população que faz uso da água muitas vezes clorada como método de desinfecção. A **Figura 48** apresenta um esquema com as possíveis aminas formadas após a redução química seguida da cloração convencional.

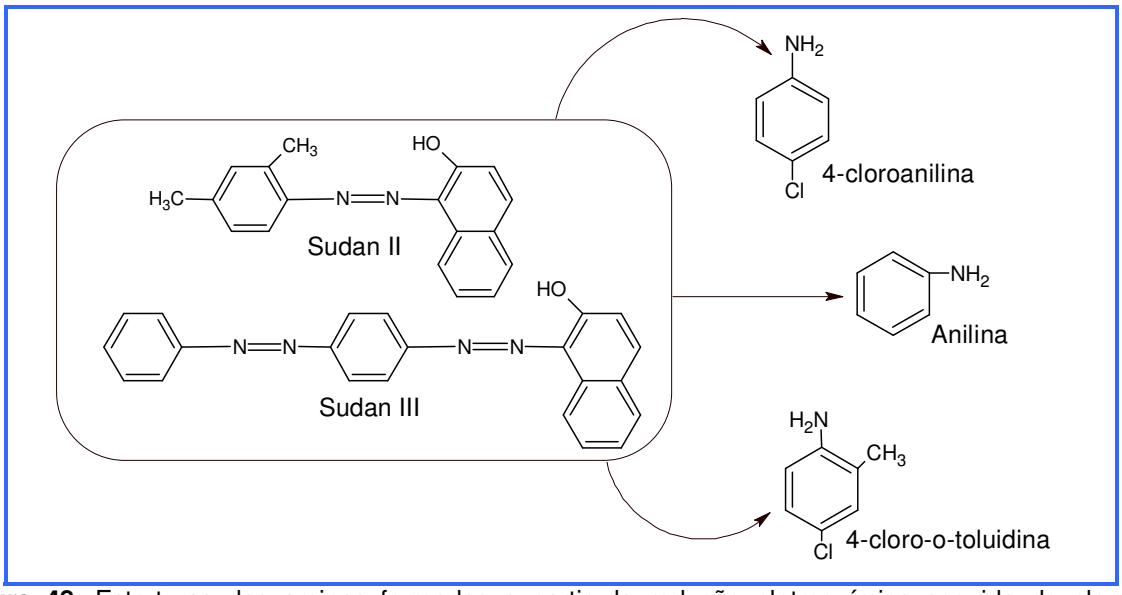


Figura 48: Estruturas das aminas formadas a partir da redução eletroquímica seguida de cloração convencional para o corante Sudan III.

A quantidade de cada amina gerada foi calculada através de curva analítica construída para cada um dos padrões e os resultados são apresentados na **Tabela 13.**

Tabela 13: Aminas formadas a partir da redução quimica do corante seguida de cloração convencional, e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Subprodutos Gerados	Início (ppm)	Após redução quimica seguida de cloração (ppm)	% subprodutos gerados
Anilina	0	0,87	0,87
4-cloroanilina	0	0,92	0,93
4-cloro-o-toluidina	0	0,97	0,78

Estes resultados indicam que o corante submetido a redução química seguida da cloração convencional gera aminas cloradas, o que é preocupante pois esse método é utilizado nas estações de tratamento de água e pode assim estar sendo gerado e passado para a população.

4.4.6. CLORAÇÃO APÓS ELETROOXIDAÇÃO DO CORANTE SUDAN III

Nesta etapa analisou-se as amostras de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III previamente oxidadas em potencial de +1,5V e submetidas à posterior cloração. Na **Figura 49** pode-se observar o cromatograma obtido para a amostra que apresenta 2 picos que são atribuídos ao corante Sudan II (**pico1**) e ao corante Sudan III (**pico 2**), que eluem em tempo de retenção de 5,7 e 6,3 minutos, respectivamente.

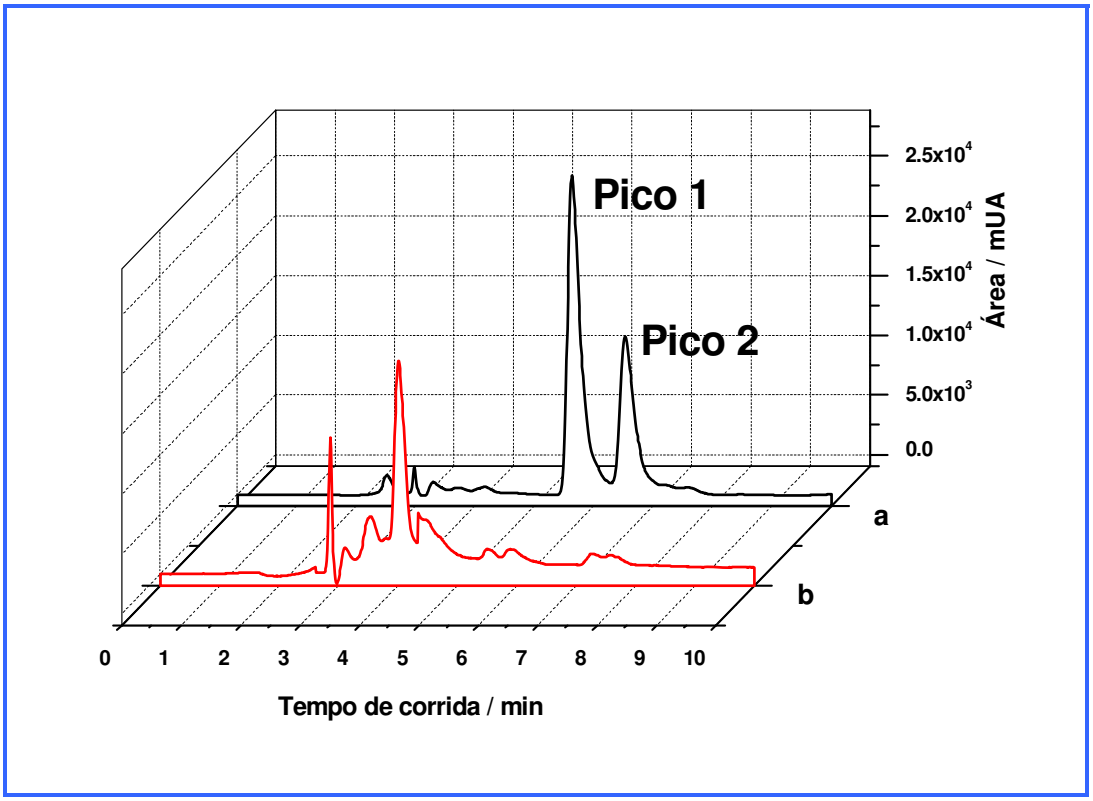


Figura 49: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletrooxidada e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) após 2 horas; (**b**) após 2 horas + cloração.

Os respectivos espectros obtidos para as amostras antes e após cloração são mostrados na **Figura 50**.

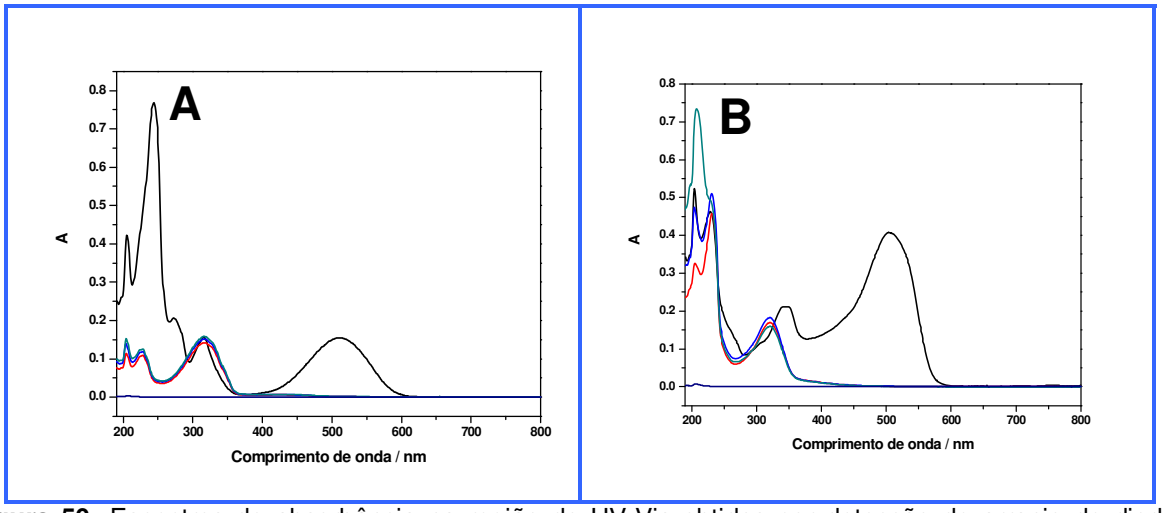


Figura 50: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletrooxidada e posteriormente clorada que eluem em 5,7 minutos (**Sudan II – A**) e 6,3 minutos (**Sudan III – B**); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando-se a **Figura 49** observa-se que a cloração do produto eletrooxidado promove a supressão total do pico que havia persistido após a eletrooxidação (**pico 1** e **pico 2**). A **Figura 50** mostra que após a cloração da amostra previamente eletrooxidada houve a supressão total das bandas ao redor de 200nm, em 300nm alem da banda do cromóforo em 500nm. Em seguida analisou-se a amostra por CLAE/DAD nas condições otimizadas para identificação de aminas, mostrada na **Figura 51**.

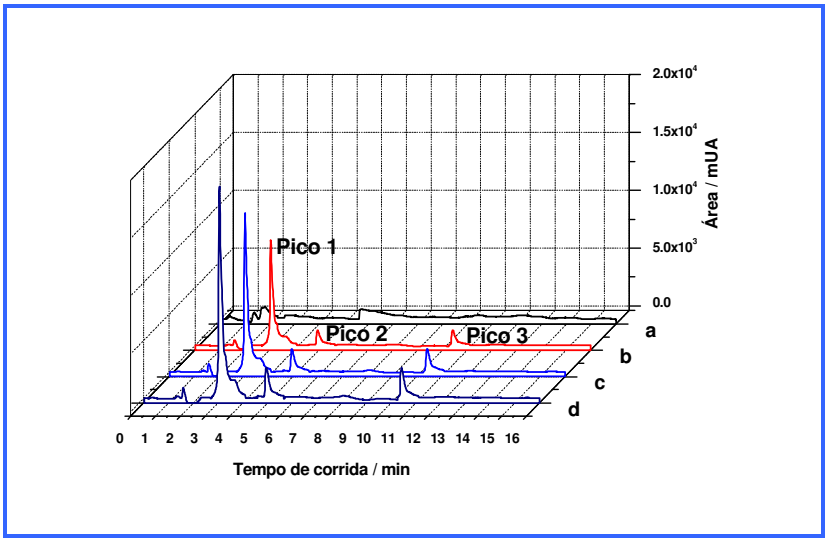


Figura 51: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletrooxidada e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1h + cloro; (**c**) após 1,5h + cloro; (**d**) após 2h + cloro.

A **Figura 51** mostra o cromatograma obtido para a amostra antes e após cloração. Nesse cromatograma mostra a presença de 3 aminas principais identificados como: **pico 1:** 2-naftilamina; **pico 2:** 4,4-metileno-bis-cloroanilina e no **pico 3:** 4-cloroanilina que eluem nos tempos de retenção de: 3,0, 4,9 e 10,3 minutos, respectivamente. Os espectros dos compostos formados após a cloração posterior a eletrooxidação do corante Sudan III estão mostrados na **Figura 52**, confirmando assim o resultado encontrado.

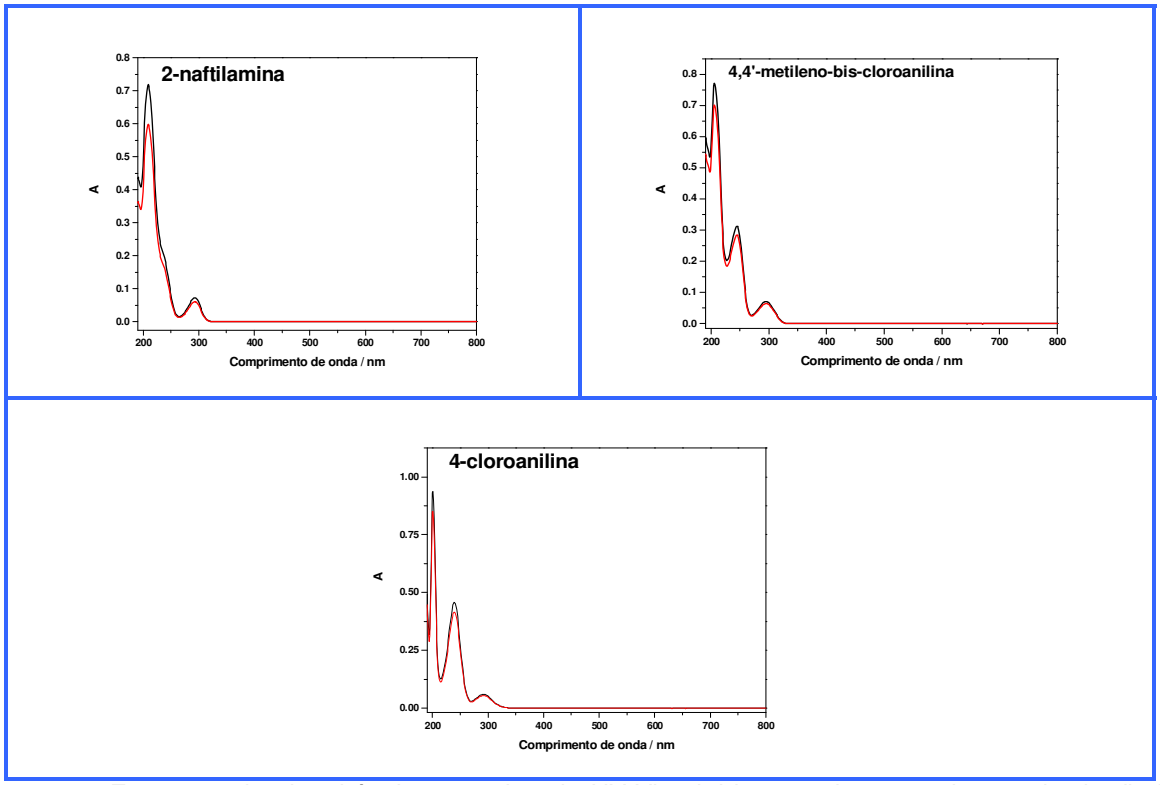


Figura 52: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,0 minutos (2-naftilamina); 4,9 minutos (4,4'-metileno-bis-cloroanilina) e 10,3 minutos (4-cloroanilina); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A seguir essas amostras foram submetidas a analise cromatográfica usando as condições: Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, λ = 230nm. Os resultados são apresentados na **Figura 53** sendo que o **pico 1** corresponde a 3,3'-diclorobenzidina e o **pico 2** corresponde a α,α,α-triclorobenzidina que elue no tempo de retenção de 5,0 e 10,0 minutos, respectivamente.

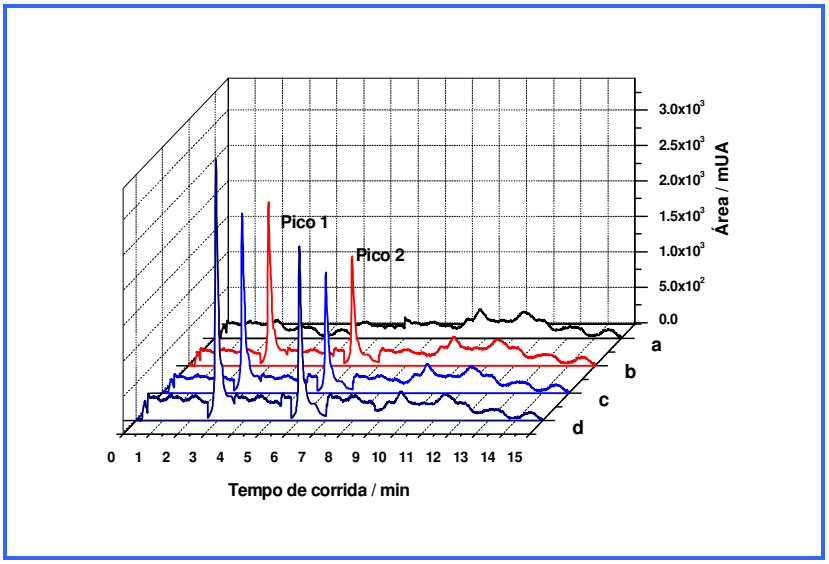


Figura 53: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletrooxidada e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1h + cloro; (**c**) após 1,5h + cloro; (**d**) após 2h + cloro.

Para confirmação dos compostos presentes no **pico 1** e pico **2** da **Figura 53**, foi obtido os espectros UV-Vis para os mesmos e estes estão representados na **Figura 54**.

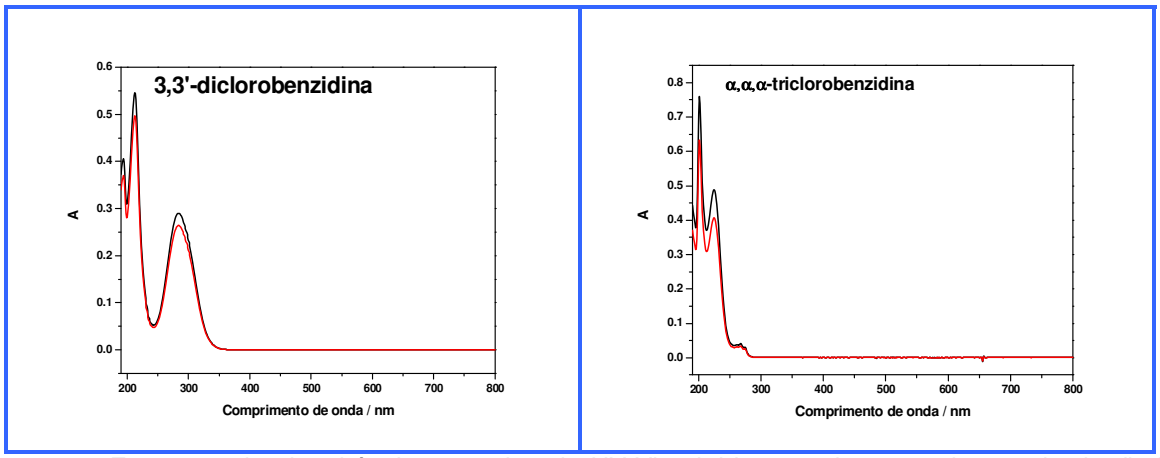


Figura 54: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos (3,3'-diclorobenzidina) e 10,0 minutos (α,α,α-triclorobenzidina); fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Como podemos observar pela analise dos cromatogramas mostrados na **Figura 51** e na **Figura 53** que a cloração da solução eletrooxidada promove a formação de

aminas cloradas. A **Figura 55** apresenta um esquema com as principais aminas formadas após a cloração da amostra submetida à eletrooxidação.

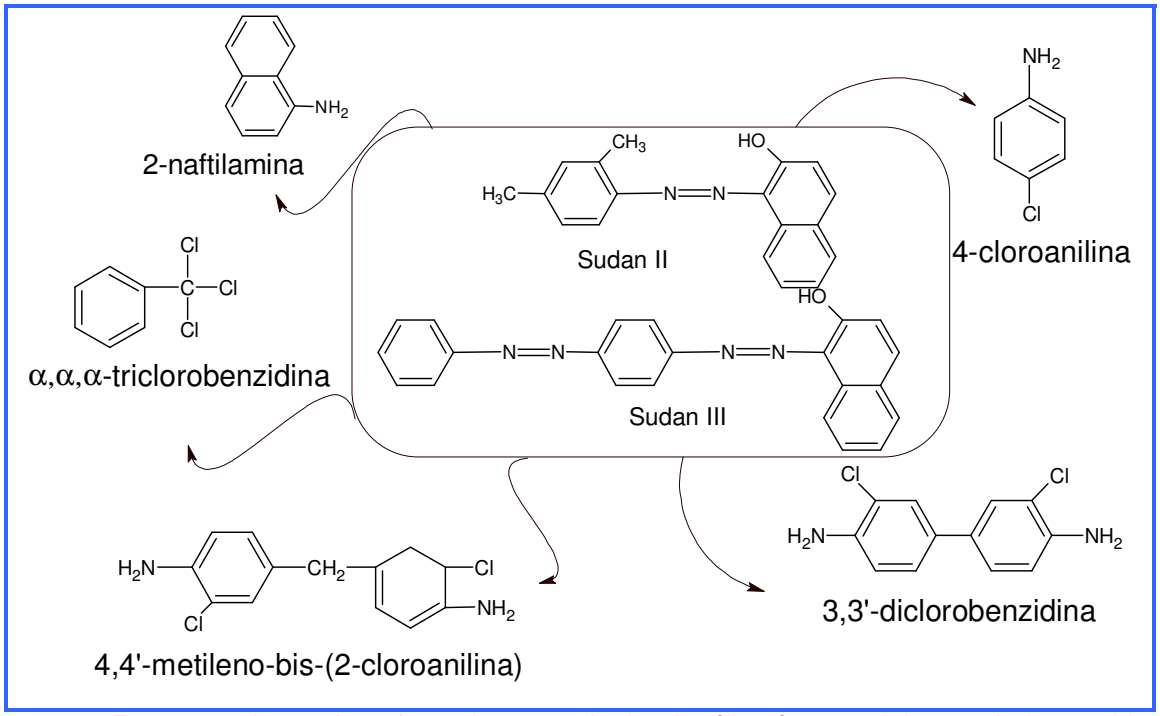


Figura 55: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado seguida de cloração para o corante Sudan III.

A **Tabela 14** mostra as respectivas concentrações dos componentes gerados calculados através da curva analítica construída para cada um a partir dos padrões.

Tabela 14: Aminas formadas a partir da oxidação do corante seguida de cloração convencional, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Subprodutos Gerados	Início (ppm)	Após eletrooxidação seguida de cloração (ppm)	% subprodutos gerados
2-naftilamina	0	0,76	0,32
4-cloroanilina	0	1,21	0,49
α,α,α-triclorobenzidina	0	18,9	16,7
3,3'-diclorobenzidina	0	0,93	0,89
4,4'-metilene-bis-(2-cloroanilina)	0	21,1	18,2

Estes resultados indicam que o corante oxidado quando submetido a reações de cloração com hipoclorito de sódio gera aminas cloradas em quantidades significantes

indicando que embora o corante apresente perda de coloração no processo de oxidação seguida de cloração, os subprodutos formados são preocupantes para a saúde humana.

4.4.7. CLORAÇÃO APÓS ELETROREDUÇÃO DO CORANTE SUDAN III

As amostras de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III em metanol e 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabultilamonio foram eletroreduzidas sob potencial controlado de -1,2V e posteriormente tratadas pelo método de cloração. A **Figura 56** apresenta os cromatogramas obtidos após a cloração.

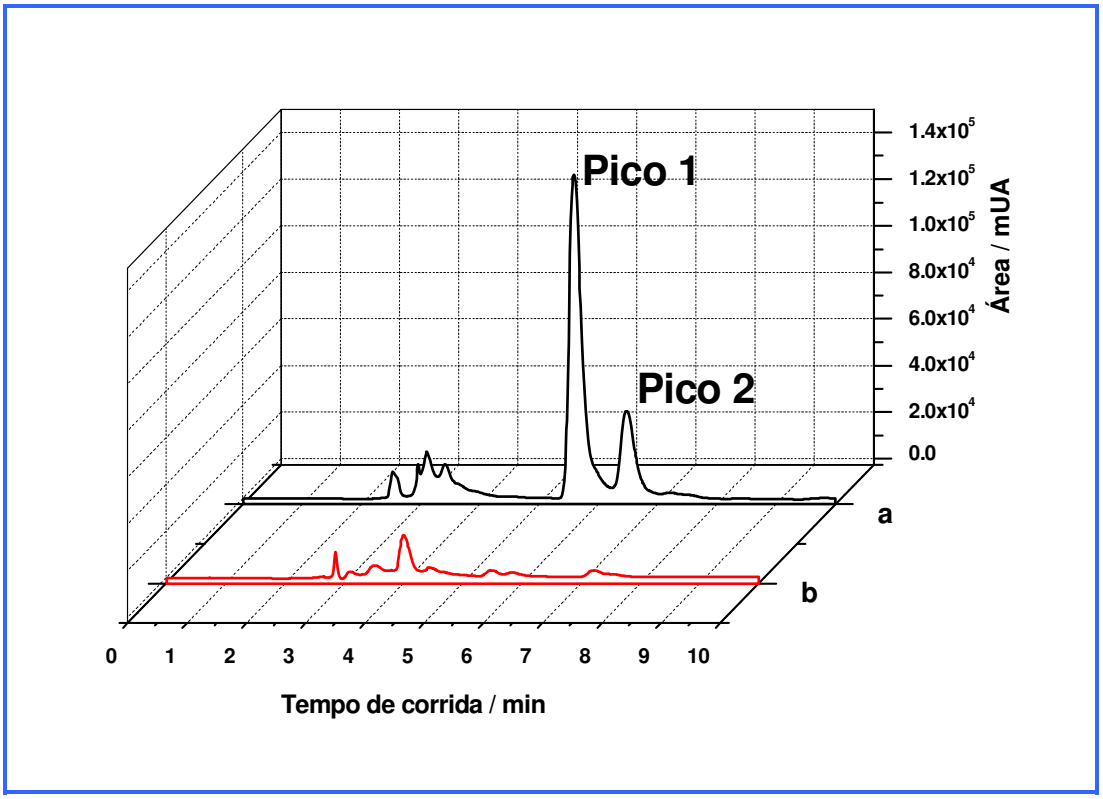


Figura 56: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) após 1,5 hora de eletroredução; (**b**) após 2 horas de eletroredução + cloração.

Analisando a **Figura 56** observa-se que após a cloração há a supressão total dos **picos 1** e **2** que haviam persistido após a eletroredução. A **Figura 57** apresenta os

espectro UV-Vis para cada um dos picos correspondentes ao corante Sudan II (**pico 1**) e ao corante Sudan III (**pico 2**).

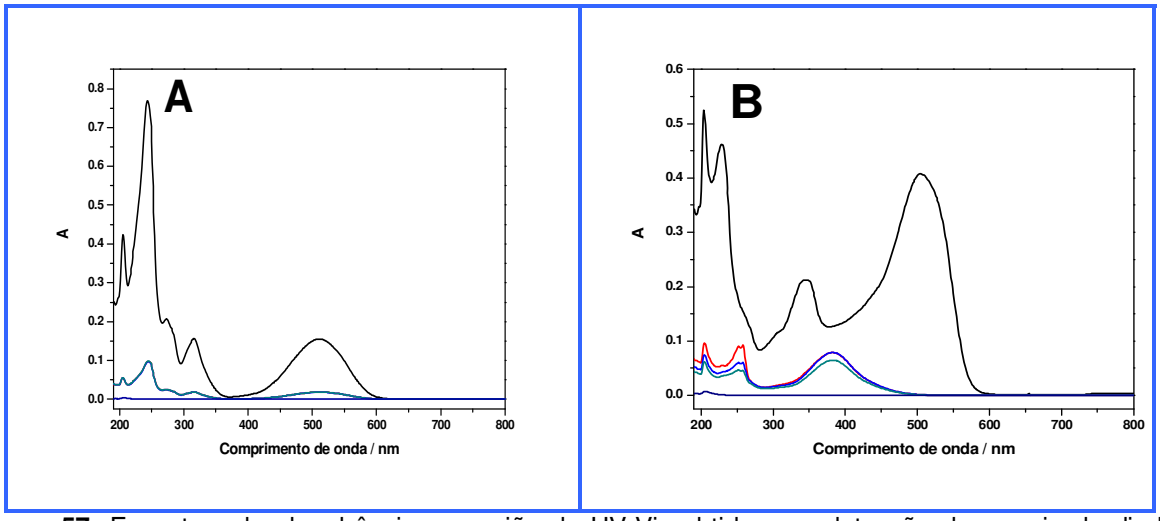


Figura 57: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletroreduzida e posteriormente clorada que eluem em 5,7 minutos (**Sudan II – A**) e 6,3 minutos (**Sudan III – B**); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

As amostras foram em seguida analisadas por CLAE/DAD em condições de identificação das aminas, sendo mostradas na **Figura 58** e na **Figura 59** esta representada o espectro UV-Vis do composto encontrado no cromatograma.

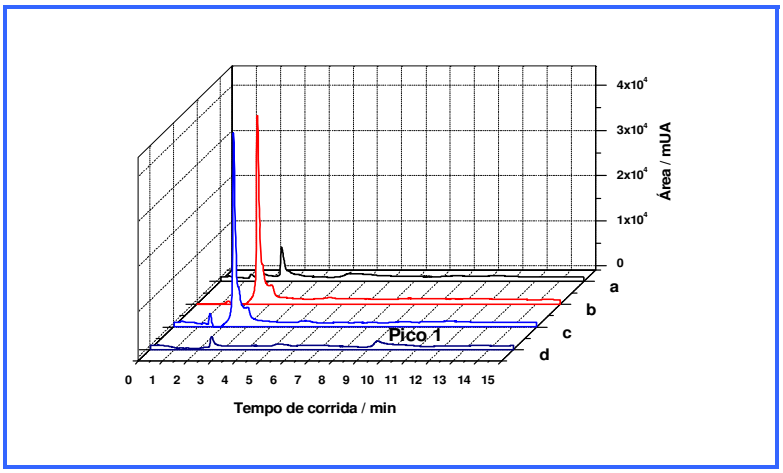


Figura 58: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1h + cloro; (**c**) após 1,5h + cloro; (**d**) após 2h + cloro.

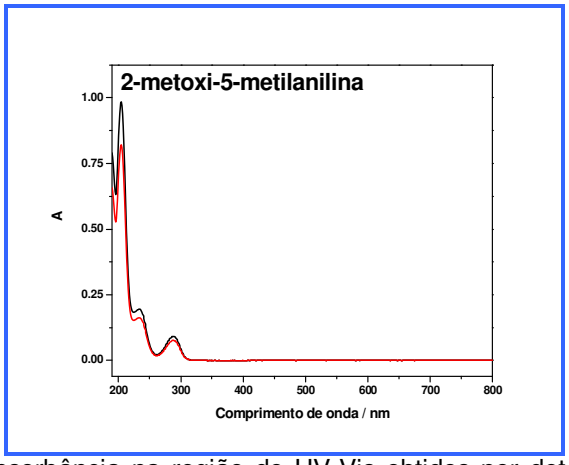


Figura 59: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 9,3 minutos (2-metoxi-5-metilanilina); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando a **Figura 58** observa-se a formação de apenas uma amina que nesse caso é a 2-metoxi-5-metilanilina que elue em 9,3 minutos, após a cloração posterior a eletroredução do corante Sudan III. A confirmação dessa amina foi realizada comparando o espectro UV-Vis da mesma com o seu respectivo padrão, o qual esta representado na **Figura 59**. A mesma amostra foi submetido a analise cromatográfica na condição cromatográfica 80:20 MeOH/Tampão fosfato $5{,}00x10^{-5}$ mol L^{-1} (pH= 6,9), T = 40°C, fase estacionária C18, vazão = 1,00 mL min^{-1}, e esta representado na **Figura 60**.

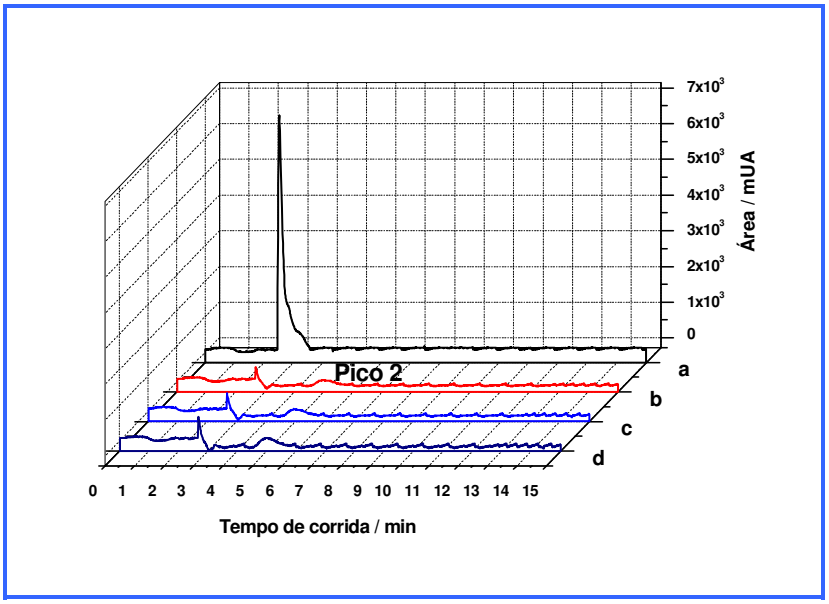


Figura 60: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1h + cloro; (**c**) após 1,5h + cloro; (**d**) após 2h + cloro.

O espectro UV-Vis do composto detectado na amostra eletroreduzida seguida de cloração, está representado na **Figura 61**.

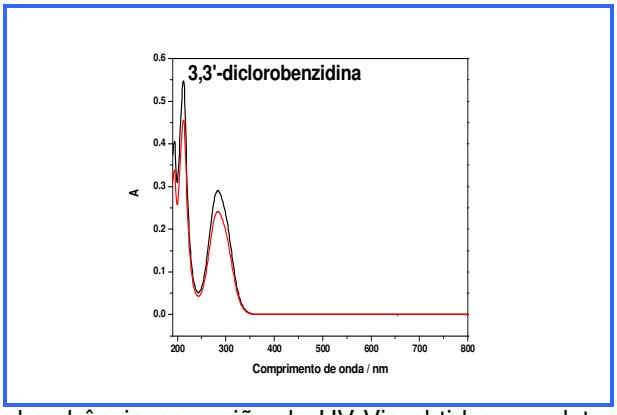


Figura 61: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos (3,3'-diclorobenzidina); fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

O cromatograma da **Figura 60**, mostra a formação de uma amina clorada após a cloração, que foi identificada como 3,3'-diclorobenzidina que elue em tempo de retenção de 5,0 minutos. A formação dessa amina foi confirmada pelo espectro UV-Vis obtido simultaneamente a analise o qual esta representado na **Figura 61**. A **Figura 62**

apresenta um esquema com as principais aminas formadas após a cloração da amostra submetida à eletroredução.

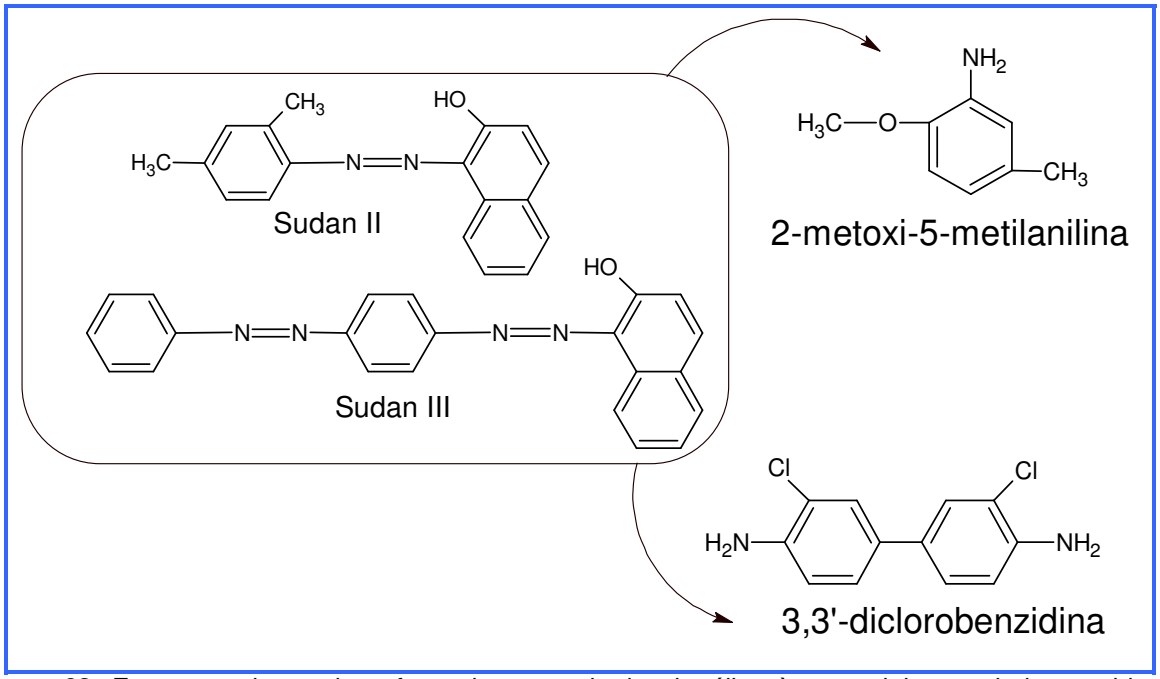


Figura 62: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado seguida de cloração para o corante Sudan III.

A quantidade de cada componente gerado foi calculado através de curva analítica construída para cada um dos padrões, e apresentado na **Tabela 15**.

Tabela 15: Aminas formadas a partir da redução do corante seguida de cloração convencional, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Aminas	Início (ppm)	Após tratamento (ppm)	% em relação ao corante orginal
2-metoxi-5-metilanilina	0	0,09	0,08
3,3'-diclorobenzidina	0	0,07	0,06

Estes resultados indicam que o corante submetido a reações de redução seguida da cloração convencional também gera aminas cloradas. A análise dos resultados obtidos para cloração das amostras submetidas à prévia redução e/ou oxidação quimica e/ou eletroquímica indica a formação de aminas cloradas não detectadas na

cloração do corante original, como mostra os espectros UV-Vis obtidos e nos cromatogramas, o qual mostra a presença de intermediários mais polares. Estes resultados confirmam que o corante na forma original pode ser menos nocivo que a amostra submetida à redução ou oxidação parcial que pode formar produtos mais suscetíveis à cloração.

4.4.8. OXIDAÇÃO QUIÍMICA DO CORANTE SUDAN III POR TERC-BUTILHIDROPERÓXIDO CATALISADA PELA AÇÃO DA PORFIRINA (FeTMPyP)

A porfirina utilizada para catalise da reação de oxidação do corante pelo oxidante terc-butilhidroperóxido que no caso foi a FeTMPyP (cloreto de 5, 10, 15, 20-tetraquis-(4-N-metilpiridil) porfirina de Ferro III) que mimetiza a reação do citocromo P-450 presente na célula do figado dos mamíferos [82]. As condições reacionais para oxidação do corante Sudan III foram baseadas em procedimento previamente estabelecido na literatura [82].

Amostras de $1{,}00x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Sudan III em metanol foram tratados conforme descrito no procedimento experimental e as aliquotas recolhidas durante a reação foi submetida a extração após o tempo de reação. Aliquotas das amostras que foram analisadas por CLAE/DAD em condições estabelecidas para monitorar a degradação do corante e a formação de aminas derivadas como subprodutos. Na **Figura 63** o cromatograma do corante Sudan III antes e após oxidação quimica.

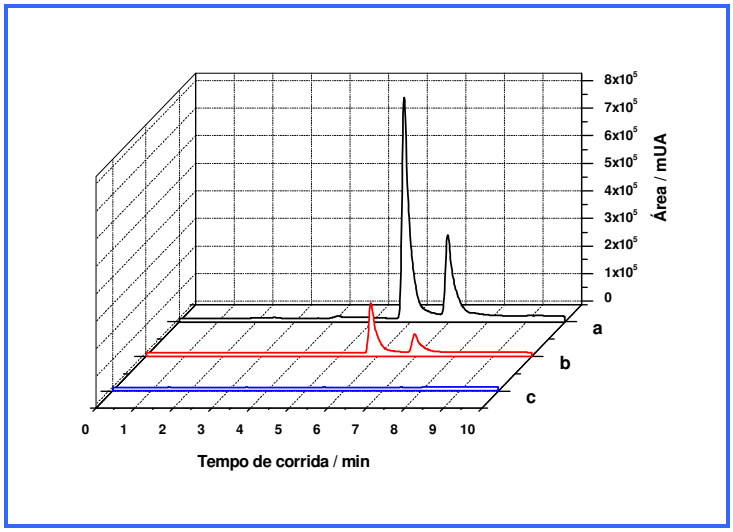


Figura 63: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 4 horas; (**c**) após 15 horas.

A analise do cromatograma da **Figura 63** indica que o corante Sudan III é plenamente oxidado após 15 horas de reação, diagnosticado pelo desaparecimento dos picos 1 e 2 presentes nos tempos de retenção de 5,7 e 6,3 minutos, respectivamente. Na **Figura 64** estão representados os espectros UV-Vis dos compostos identificados.

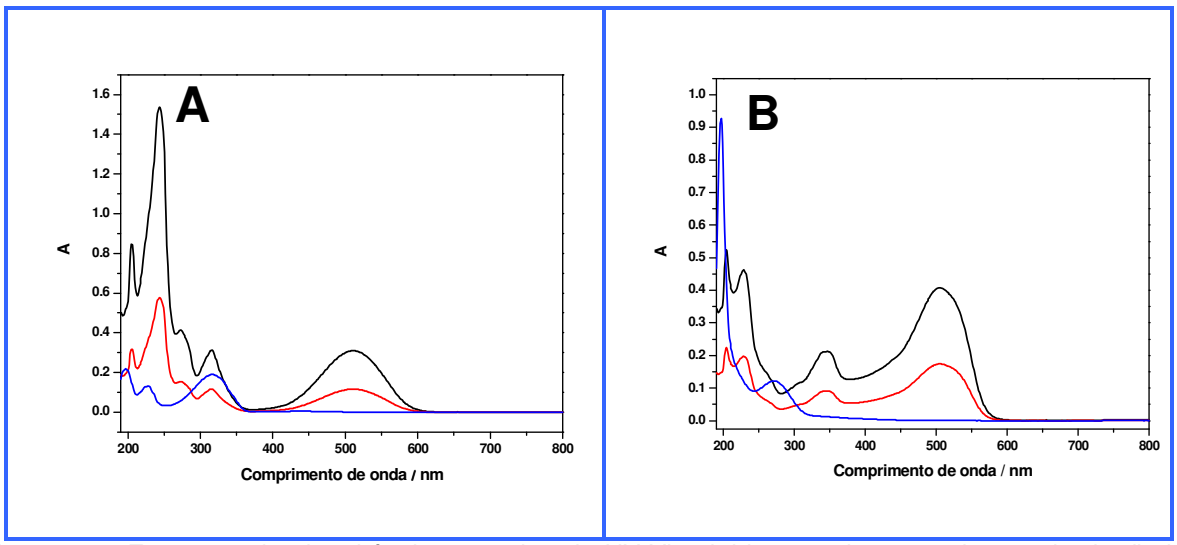


Figura 64: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP) que eluem em 5,7 minutos (**Sudan II – A**) e 6,3 minutos (**Sudan III – B**); Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Os respectivos espectros de UV-Vis na **Figura 64** obtido para ambos os picos correspondentes aos corantes Sudan II e Sudan III mostram diminuição das bandas ao redor de 500nm após 4 e 15 horas de reação indicando a total descoloração da amostra com 100% de descoloração como mostra a **Figura 65**.

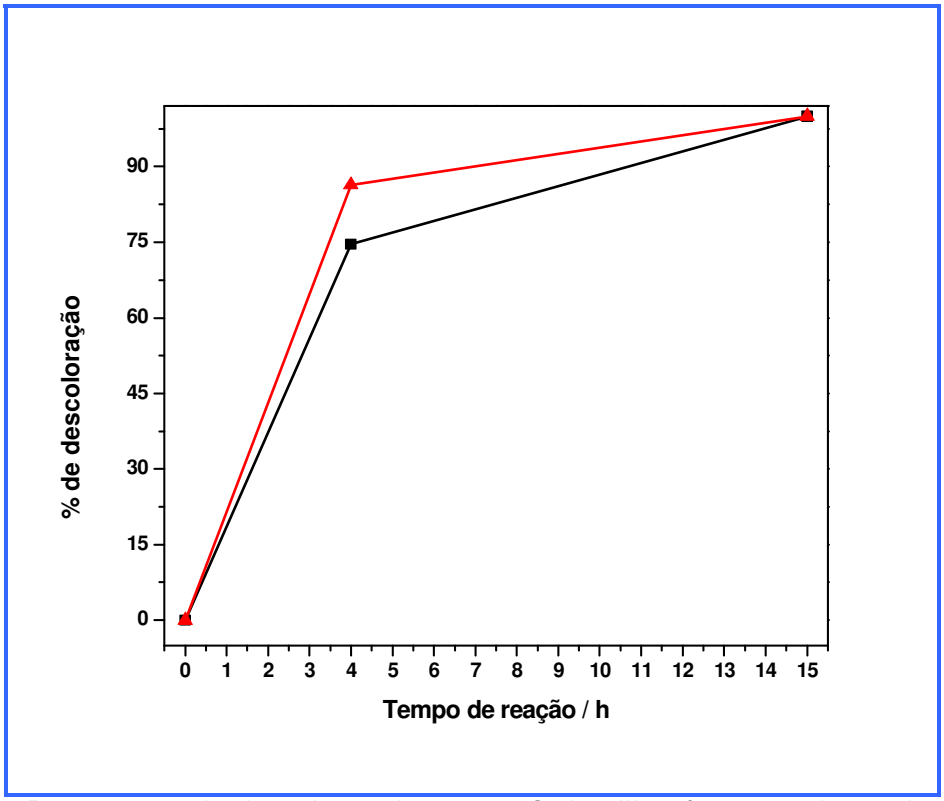


Figura 65: Porcentagem de degradação do corante Sudan III após 4 e 15 horas de reação, sob agitação à temperatura ambiente. **Pico 1** em preto; **Pico 2** em vermelho.

A seguir as amostras foram analisadas por CLAE/DAD para monitorar as possíveis aminas geradas estão representados na **Figura 66**.

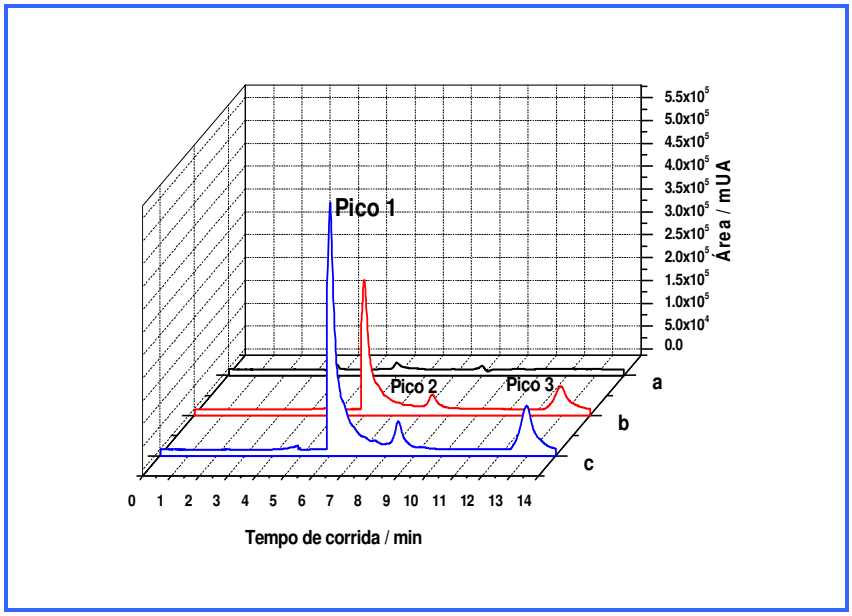


Figura 66: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 4h; (**c**) após 15h.

Observando esta figura verifica-se a formação de 3 aminas que são: **pico 1:** 4,4'-oxidianilina; **pico 2:** 2-nitroanisol e **pico 3:** nitrobenzeno que eluem nos tempos de retenção de 6,7, 8,4 e 12,0 minutos, respectivamente. A seguir na **Figura 67** foram obtidos os espectros UV-Vis dos componentes formados a partir de oxidação por terc-butilhidroperóxido catalisada pela Ferroporfirina (FeTMPyP).

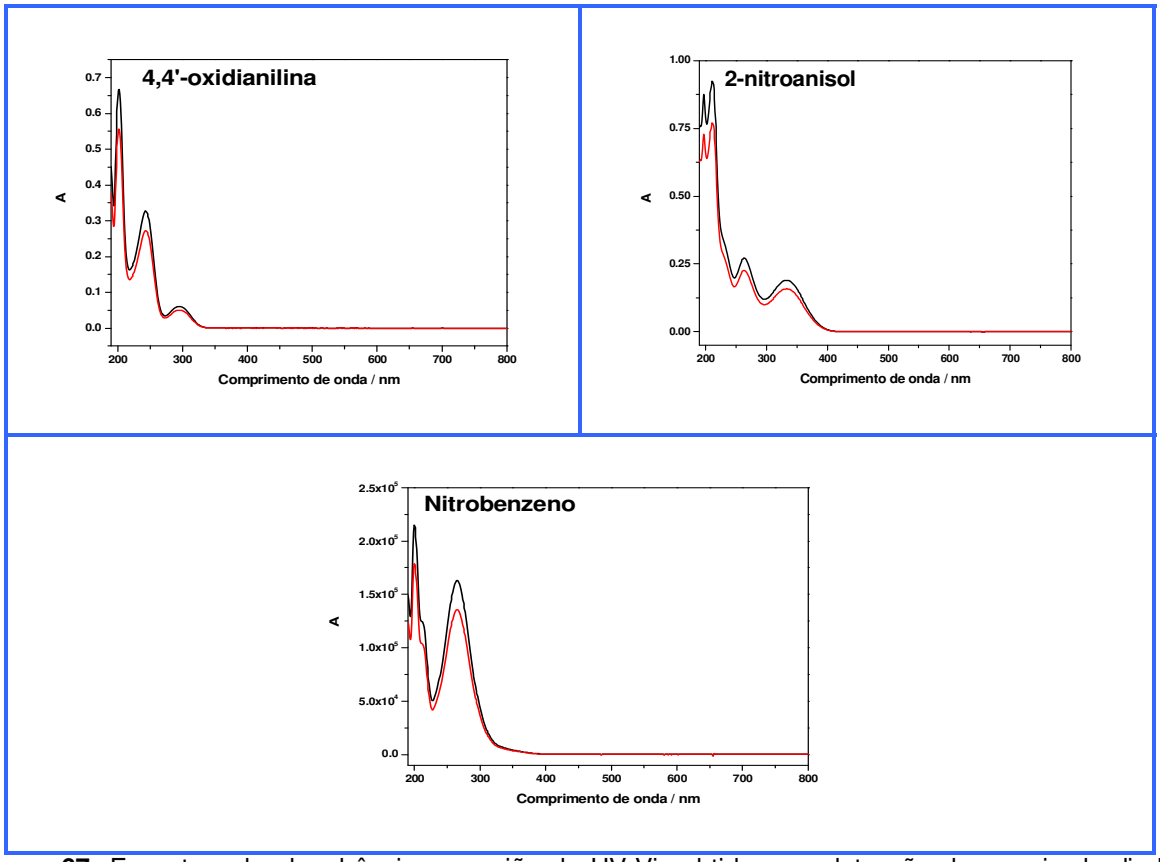


Figura 67: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 6,7 minutos (4,4'-oxidianilina); 8,4 minutos (2-nitroanisol) e 12,0 minutos (nitrobenzeno), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A seguir essas amostras foram submetidas a analise cromatográfica usando as condições: Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, λ = 230nm. Os resultados são apresentados na **Figura 68**, sendo que o pico 1 corresponde a 3,3'-diclorobenzidina e o pico 2 corresponde a fast garnet gbc que eluem no tempo de retenção de 5,0 e 8,4 minutos, respectivamente.

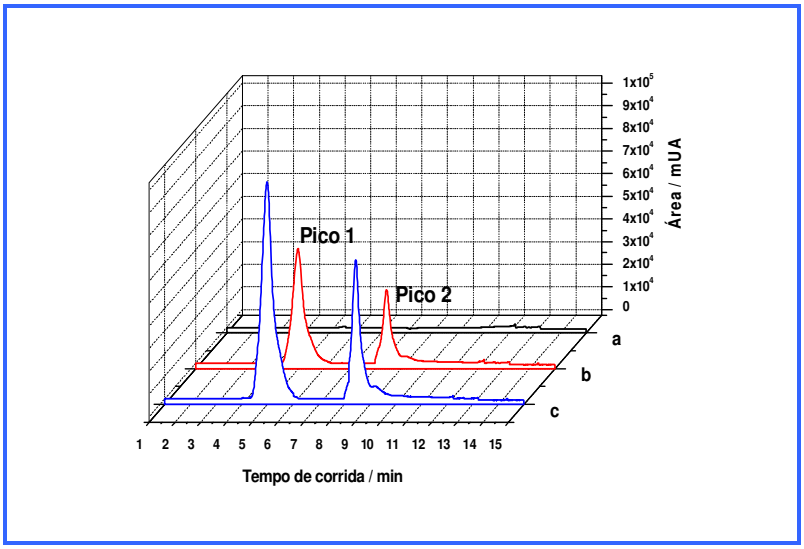


Figura 68: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 4h; (**c**) após 15h.

A seguir na **Figura 69** esta representado os espectros UV-Vis dos 2 compostos obtidos após a reação de oxidação por terc-butilhidroperoxido catalisada pela Ferroporfirina (FeTMPyP).

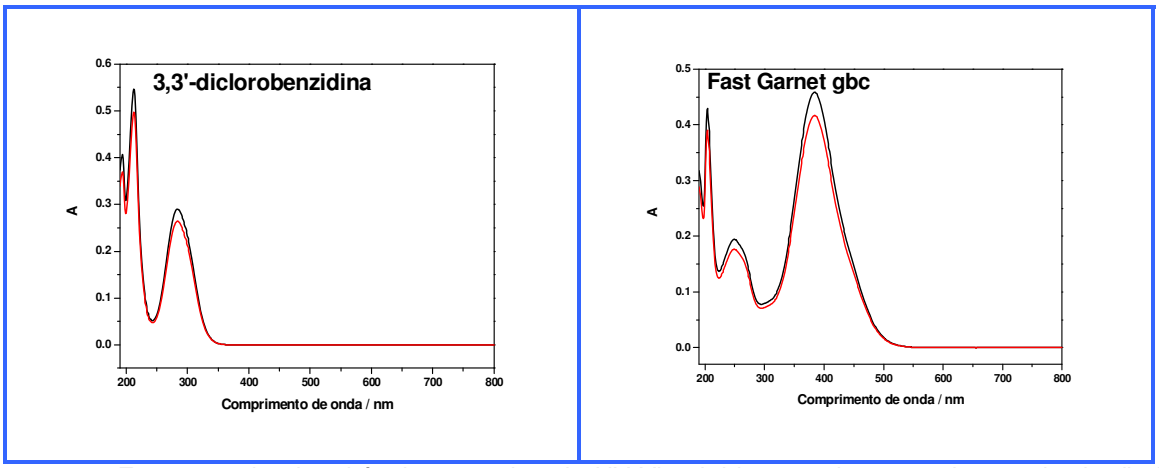


Figura 69: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos (3,3'-diclorobenzidina) e 8,4 minutos (fast garnet gbc), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

No esquema da **Figura 70** compila os principais subprodutos gerados nesta oxidação.

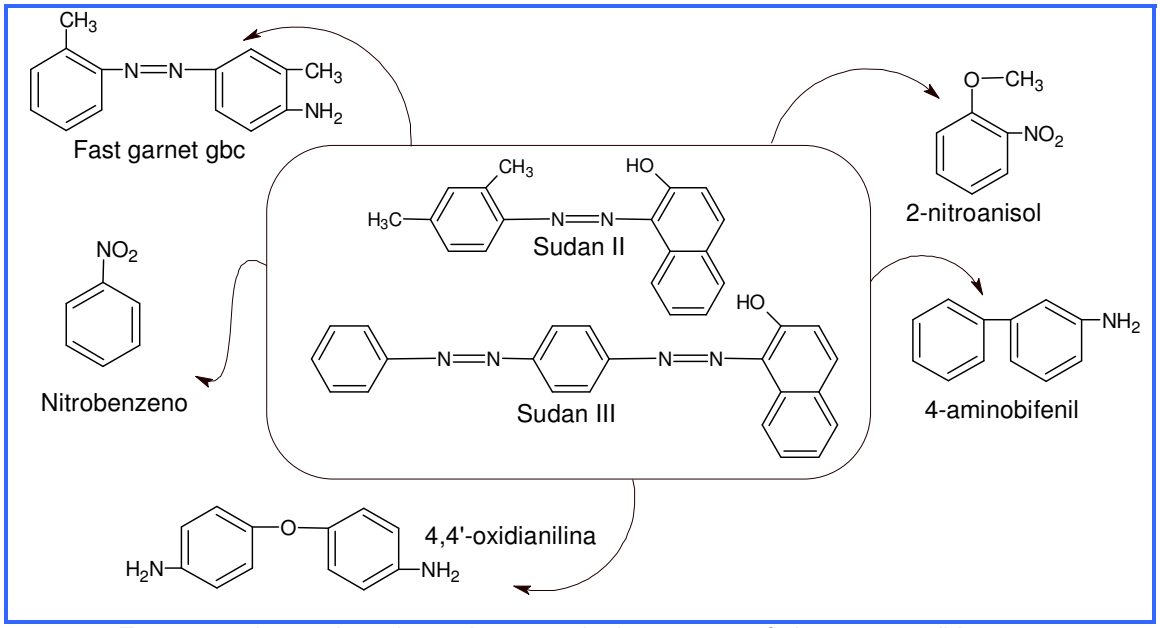


Figura 70: Estruturas das aminas formadas a partir da reação química com porfirinas para o corante Sudan III.

A respectiva quantidade dos subprodutos formados durante a oxidação catalisada pela porfirina foi determinada pela curva analítica dos padrões e as concentrações estão representadas na **Tabela 16**.

Tabela 16: Aminas formadas a partir de oxidação por terc-butilhidroperoxido catalisada pela ferroporfirina (FeTMPyP).

Subprodutos Gerados	Inicio (ppm)	4h (ppm)	% subprodutos gerados	15h (ppm)	% subprodutos gerados
4,4'-oxidianilina	0	4,36	48,3	4,99	51,3
Nitrobenzeno	0	0,46	8,17	5,34	20,5
2-nitroanisol	0	4,20	55,7	6,36	46,4
3,3'-diclorobenzidina	0	2,45	26,7	3,61	30,4
Fast garnet gbc	0	0,87	10,6	4,40	34,8

A reação oxidativa catalisada pela ferroporfirina FeTMPyP leva a formação de duas aminas e dois nitro derivados, além da presença do corante base fast garnet gbc. Esses resultados comprovam que a metabolização destes corantes é complexo e compostos carcinogênicos podem ser formados, pois os subprodutos gerados na eletrooxidação são distintos dos gerados nesse processo.

4.4.9. OXIDAÇÃO DO CORANTE SUDAN III PELA AÇÃO DO CITOCROMO P-450 (FRAÇÃO MICROSSOMAL DE FÍGADO DE RATO)

Finalmente, amostras de $5{,}00x10^{-5}$ mol L^{-1} do corante Sudan III foram submetidos à oxidação com complexo enzimático extraído do fígado de rato (S9), visando identificar a possível formação de aminas aromáticas após metabolização do corante durante metabolismo de um mamífero. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito na parte experimental e as amostras submetidas a analise cromatográfica segundo procedimento previamente descrito. A **Figura 71** representa o cromatograma correspondente ao corante Sudan III, antes e após incubação por 1,5 horas.

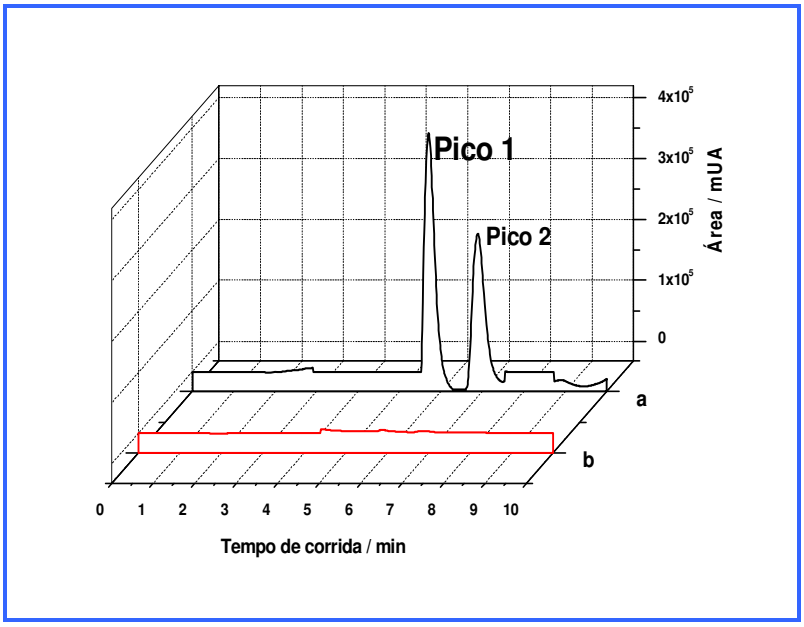


Figura 71: Cromatograma obtido para o corante Sudan III, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catálise do citocromo P-450, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 500nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1,5 horas de incubação.

A seguir, na **Figura 72** esta representado o espectro UV-Vis correspondente aos 2 picos presentes no corante Sudan III, sendo que o pico 1 corresponde ao Sudan II e o pico 2 corresponde ao Sudan III, sendo que eluem em 5,7 minutos e 6,3 minutos, respectivamente.

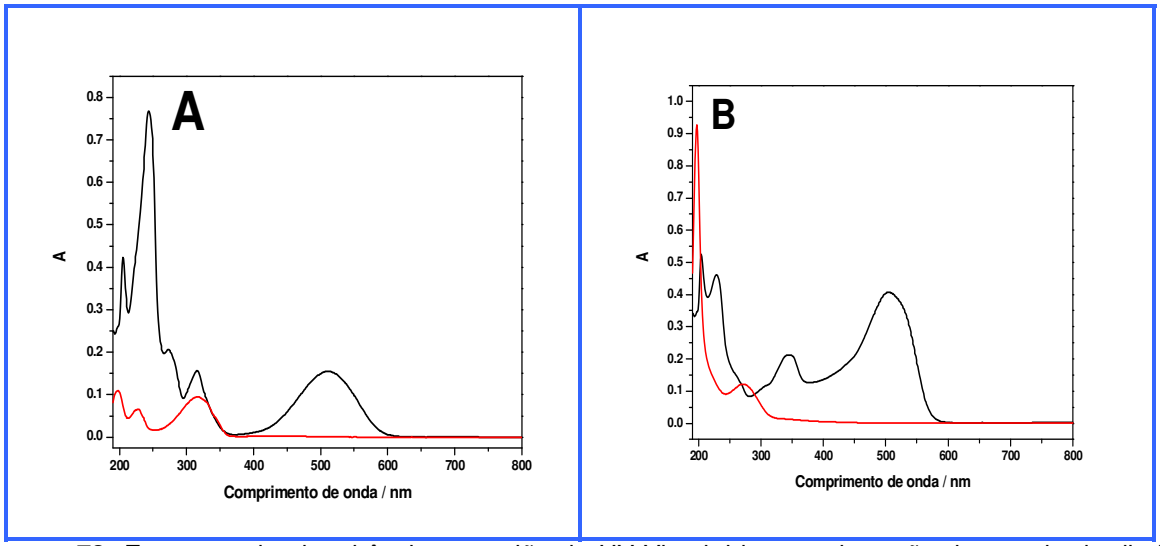


Figura 72: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra oxidada pela catálise do citocromo P-450 que eluem em 5,7 e 6,3 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 50:50 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Pode-se observar no cromatograma da **Figura 71** que após 1,5 horas de reação há oxidação completa do corante, mas os espectros de UV-Vis indicam a formação de subprodutos identificados ao redor de 290nm. Essas amostras foram analisadas por CLAE/DAD para monitorar as possíveis aminas e os cromatogramas estão representados na **Figura 73** e na **Figura 75**, segundo metodologia previamente descrita no procedimento experimental.

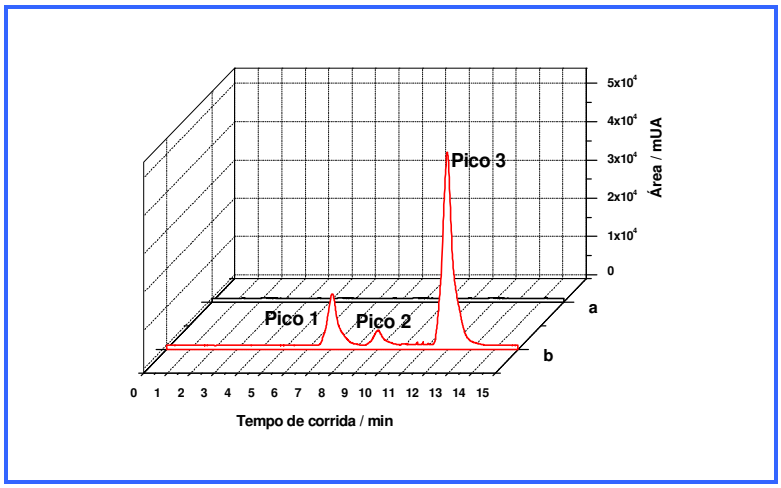


Figura 73: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catálise pelo citocromo P-450, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 4h; (**c**) após 15h.

O cromatograma da **Figura 73** indica a ocorrência de 3 subprodutos em tempos de retenção de 6,7, 8,4 e 12,0 minutos, que são atribuídos a 4,4'-oxidianilina, 2-nitroanisol e nitrobenzeno, respectivamente. Os espectros UV-Vis estão representados na **Figura 74**, os quais comprovam os compostos formados após a oxidação com o complexo enzimático S9.

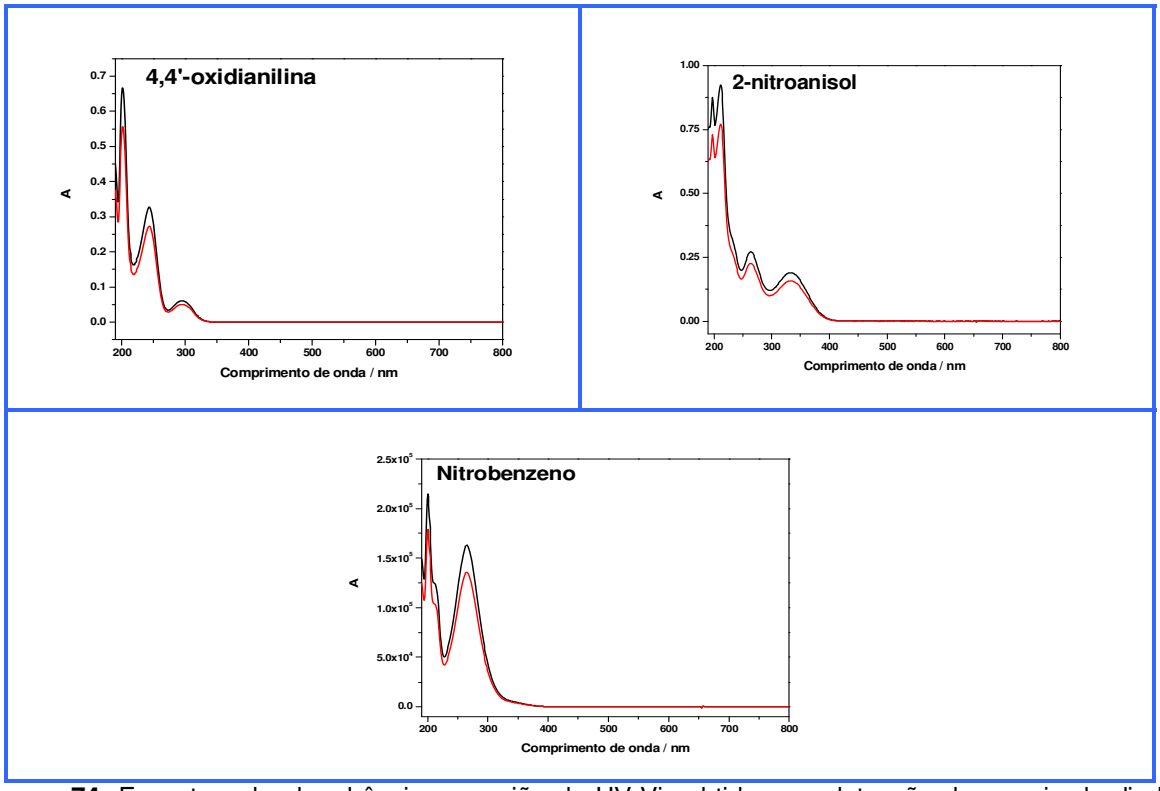


Figura 74: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 6,7 minutos (4,4'-oxidianilina); 8,4 minutos (2-nitroanisol) e 12,0 minutos (nitrobenzeno), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A seguir essas amostras foram submetidas a analise cromatográfica usando as condições: Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, λ = 230nm. Os resultados são apresentados na **Figura 75**.

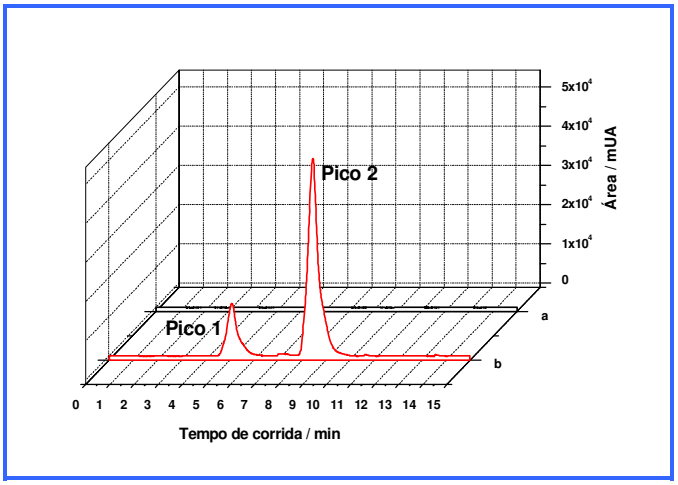


Figura 75: Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20 (v/v) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 4h; (**c**) após 15h.

O cromatograma da **Figura 75** indica a ocorrência de 2 subprodutos em tempo de retenção de 5,0 e 8,4 minutos, que são atribuídos a 3,3'-diclorobenzidina e a fast garnet gbc. O espectro UV-Vis correspondentes aos compostos formados estão representados na **Figura 76**.

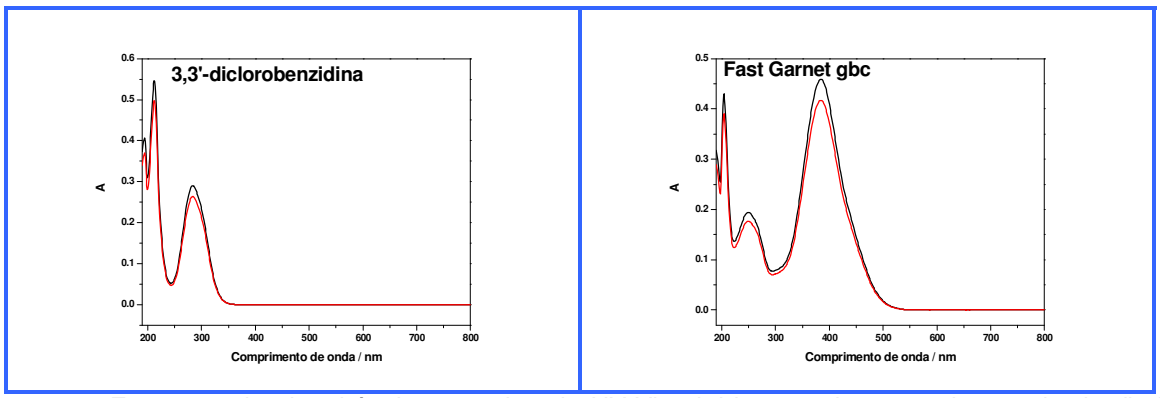


Figura 76: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos (3,3'-diclorobenzidina) e 8,4 minutos (fast garnet gbc), respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (v/v) (pH = 6,9) e 20mM de trietilamina, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Assim a metabolização do corante pelo complexo enzimático S9 promove a formação de 2 aminas aromáticas, 2 compostos nitro e resíduos de corante base fast garnet gbc. O esquema da **Figura 77** mostra as estruturas das substancias formadas após a reação com o complexo enzimático.

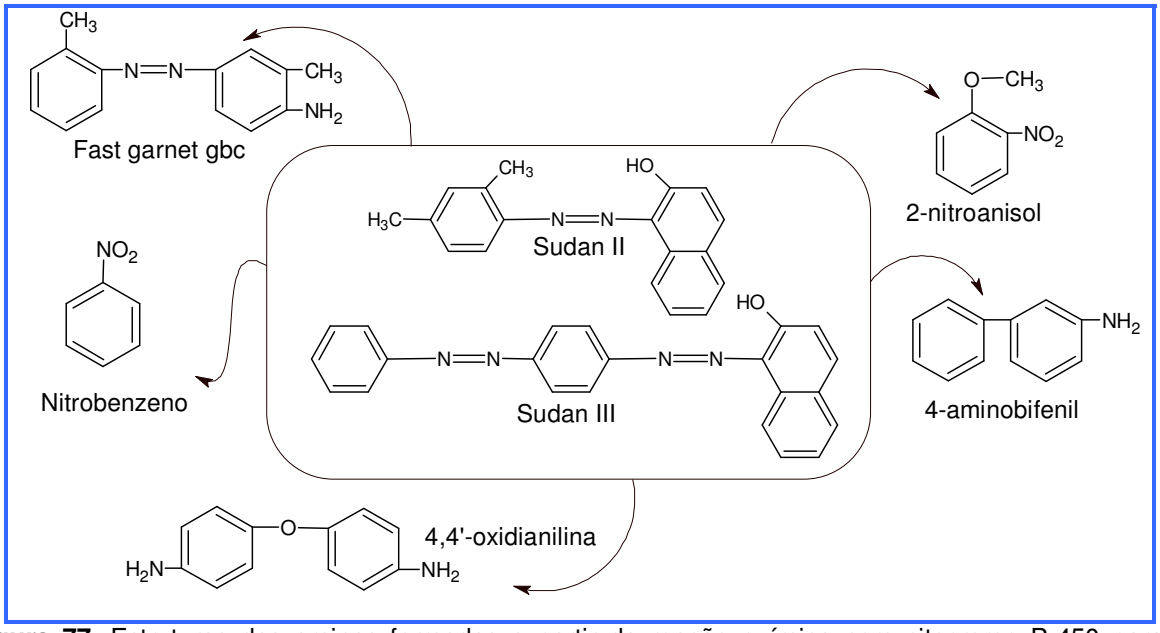


Figura 77: Estruturas das aminas formadas a partir da reação química com citocromo P-450 para o corante Sudan III.

A concentração dos subprodutos formados durante a oxidação de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Sudan III pelo complexo S9 estão representadas na **Tabela 17**.

Tabela 17: Aminas formadas a partir de oxidação catalisada pelo citocromo P-450.

Aminas	Inicio (ppm)	4h (ppm)	% em relação ao corante orginal	15h (ppm)	% em relação ao corante orginal
4,4'-oxidianilina	0	5,36	20,5	5,98	21,3
Nitrobenzeno	0	0,46	0,56	5,34	19,4
2-nitroanisol	0	8,21	22,4	9,36	23,5
3,3'-diclorobenzidina	0	32,5	54,7	33,6	55,2
Fast garnet gbc	0	17,1	32,6	21,4	35,6

Pode-se observar que houve um significativo número de subprodutos nocivos ao ser humano formados durante a reação oxidativa catalisada pelo citocromo P-450. Em adição podemos observar que os subprodutos aqui gerados são idênticos ao gerado pela oxidação catalisada pela ferroporfirina. Esses dados são relevantes pois o mecanismo de biotransformação é o mesmo que ocorre no fígado dos mamíferos em geral.

4.5. DISPERSO AMARELO 9

4.5.1. OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9

4.5.1.1. OXIDAÇÃO VOLTAMÉTRICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9

A oxidação eletroquímica de $1{,}00x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 em metanol com 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio, sobre eletrodo de carbono vítreo pode ser observado na **Figura 78.**

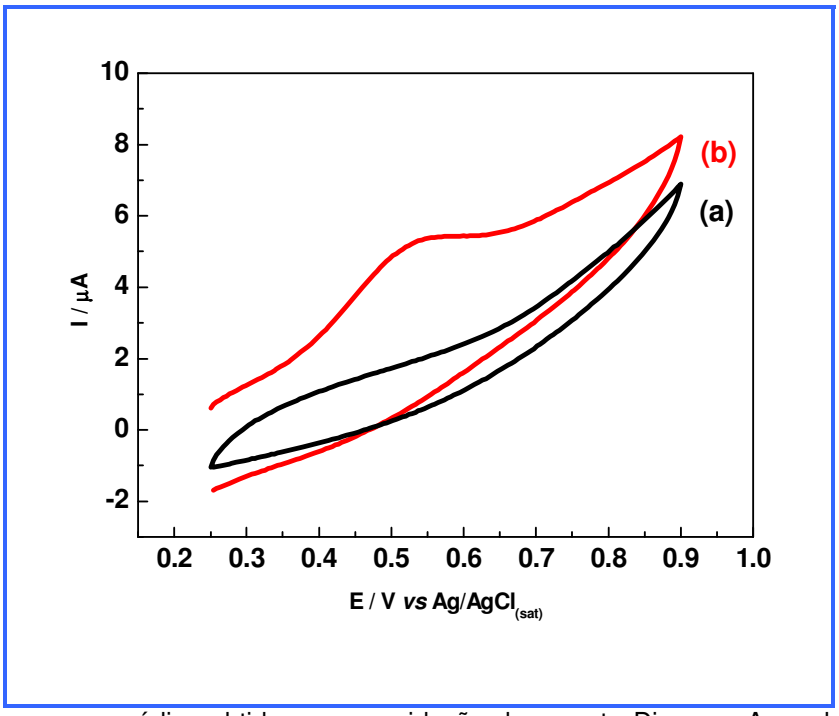


Figura 78: Voltamograma cíclico obtido para a oxidação do corante Disperso Amarelo 9. (**a**) eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01 mol L^{-1}, e (**b**) solução $1{,}00x10^{-4}$ mol.L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 na presença de tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01mol.L^{-1}. velocidade de varredura 100 mV s^{-1}.

A oxidação do corante Disperso Amarelo 9 caracteriza-se por um pico em aproximadamente 0,55V atribuído à oxidação do grupo amina presente no grupo aromático.

O estudo da variação da velocidade de varredura de potencial (υ) no intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} para oxidação eletroquímica de $1,0\times10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 em 0,01 mol L^{-1} em tetrafluorborato de tetrabutilamonio permitiu obter maiores informações sobre o processo eletródico é mostrado na **Figura 79**.

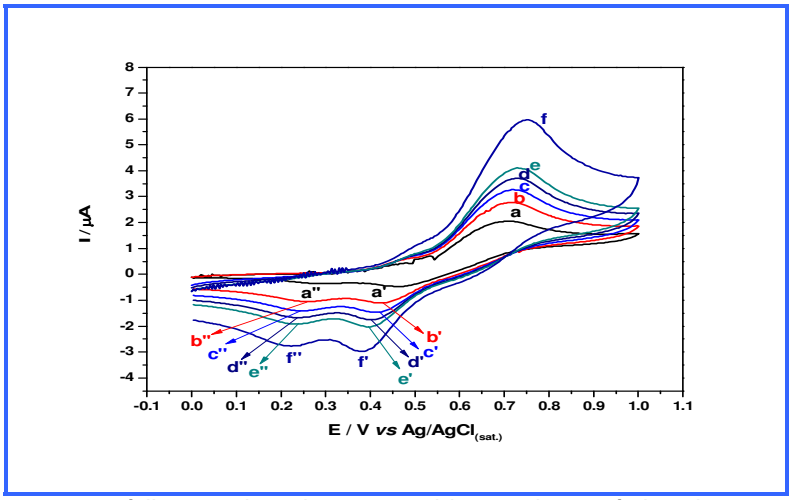


Figura 79: Voltamogramas cíclicos registrados para oxidação eletroquímica de $1,0\times10^{-4}$ mol L^{-1} corante Disperso Amarelo 9 sobre carbono vítreo em meio de 0,01 mol L^{-1} tetrafluorborato de tretrabutilamonio em diferentes valores de υ. (**a**) 10 mV s^{-1}; (**b**) 20 mV s^{-1}; (**c**) 30 mV s^{-1}; (**d**) 40 mV s^{-1}; (**e**) 50 mV s^{-1}; (**f**) 100 mV s^{-1}.

Os voltamogramas cíclicos são caracterizados por um pico anódico bem definido em todo intervalo de υ estudado, e ocorrência de dois picos catódicos na varredura reversa, o que mostra o produto da oxidação é reversível. A **Figura 79A** mostra que os valores de potencias do pico de oxidação deslocam-se para valores mais positivos com aumento da velocidade de varredura, indicando que o processo eletródico envolve a transferência de carga, perturbada por reações químicas acopladas e/ou processos adsortivos. Os picos presentes na varredura reversa deslocam-se para potencial mais negativos com aumento da velocidade de varredura, mostrando assim que pode estar ocorrendo reação química e/ou processos adsortivos como mostra a **Figura 80C** e a **Figura 80E** [130]. Ainda pode-se observar que a corrente de pico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (**Figura 80B, D e F**), no entanto, não passa pela origem. Este comportamento é indicativo de que o processo eletródico apresenta fraca adsorção do corante no eletrodo.

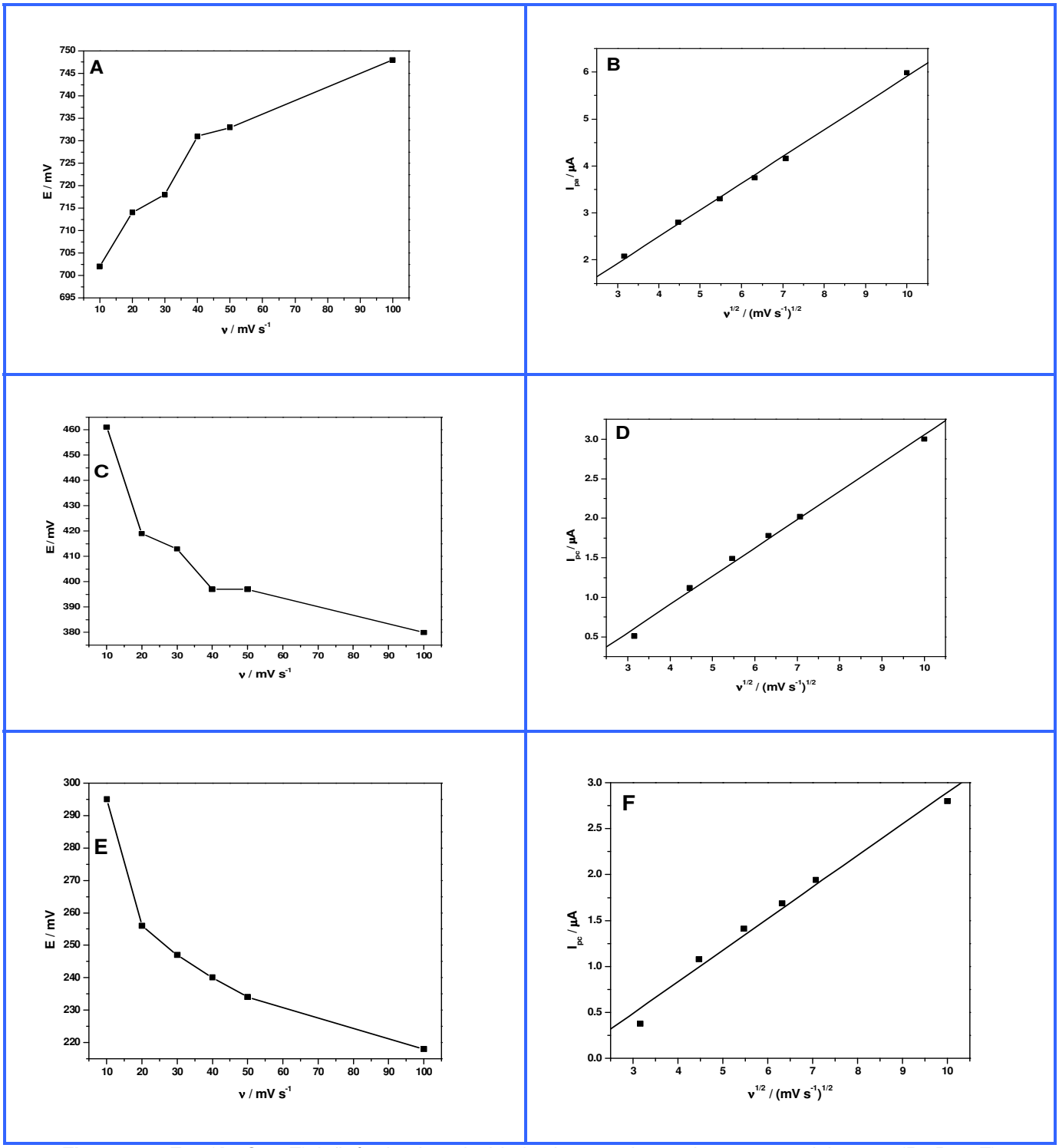


Figura 80: Em (**A, C e E**) influência da velocidade de varredura sobre o potencial e em (**B, D e F**) influência da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre a corrente de pico anódica e catódica (varredura reversa) na oxidação do corante Disperso Amarelo 9 em presença de 0,01mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sob eletrodo de carbono vítreo.

Os parâmetros eletroquímicos referentes à análise dos voltamogramas cíclicos obtidos nas diferentes υ estão reunidos na **Tabela 18**

Uma relação linear foi observada entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e a $\upsilon^{1/2}$, segundo a equação $I_{pa}(\mu A) = 0,22 + 0,57_{\times}\upsilon^{1/2}$ [(mV s^{-1})$^{1/2}$], com r = 0,998 (**Figura 80B**). Para a corrente de pico catódica (I_{pc}) e a $\upsilon^{1/2}$ foi também uma relação linear segundo a equação $I_{pc}(\mu A) = -0,52 + 0,36x\upsilon^{1/2}$ [(mV s^{-1})$^{1/2}$] para o primeiro pico da varredura reversa e $I_{pc}(\mu A) = -0,54 + 0,34x\upsilon^{1/2}$ [(mV s^{-1})$^{1/2}$] para o segundo pico da varredura reversa (**Figura 80D e F**). O fato de a I_p varia linearmente com a raiz da υ e não passar pela origem dos pontos indica que o processo de redução eletroquímica do corante Disperso Amarelo 9 não é controlado apenas por difusão.

Tabela 18: Parâmetros voltamétricos obtidos para a oxidação eletroquímica do corante Disperso Amarelo 9 $1,0\times10^{-4}$ mol L^{-1} em meio de tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,01 mol L^{-1}.

υ (mV s^{-1})	10	*20*	30	40	50	100
E_{pa} (mV)	702	714	718	731	733	748
I_{pa} (µA)	2,08	2,80	3,30	3,75	4,16	5,99
$I_{pa} / \upsilon^{1/2}$ [µA / (mV s^{-1})$^{1/2}$]	0,65	0,63	0,60	0,59	0,58	0,60
E_{pc} (mV)	461	419	413	397	397	380
I_{pc} (µA)	-0,51	-1,12	-1,49	-1,78	-2,02	-3,00
$I_{pc} / \upsilon^{1/2}$ [µA / (mV s^{-1})$^{1/2}$]	0,16	0,25	0,27	0,28	0,29	0,30
E_{pc} (mV)	295	256	247	240	234	218
I_{pc} (µA)	-0,38	-1,08	-1,41	-1,69	-1,94	-2,80
$I_{pc} / \upsilon^{1/2}$ [µA / (mV s^{-1})$^{1/2}$]	0,12	0,24	0,26	0,27	0,27	0,28

4.5.1.2. OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9 À POTENCIAL CONTROLADO

A seguir, soluções do corante Disperso Amarelo 9 foram submetidas à oxidação eletroquímica sob potencial de +1,5V durante 3 horas de eletrolise à potencial controlado sob eletrodo de rede de platina, com o intuito de detectar os subprodutos principais gerados nestas condições experimentais. A **Figura 81** mostra o respectivo cromatograma obtido para amostra do corante submetidos à eletrooxidação.

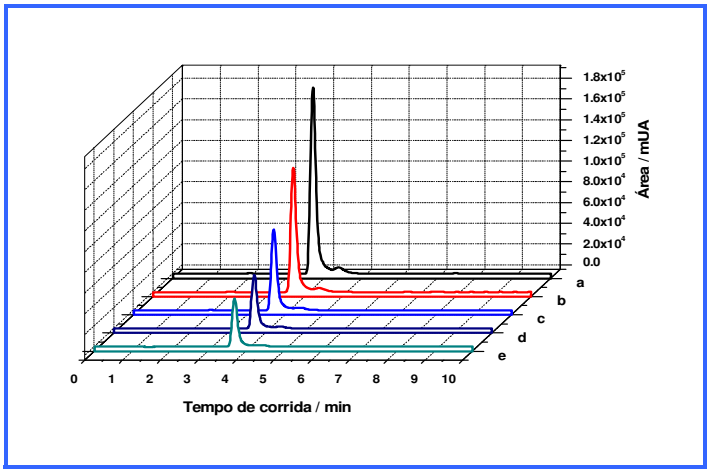


Figura 81: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletrooxidada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, o qual apresentam picos nos tempos de retenção de 3,7 minutos, monitorado em 370nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1 hora; (**c**) após 1,5 horas; (**d**) após 2 horas; (**e**) após 3 horas.

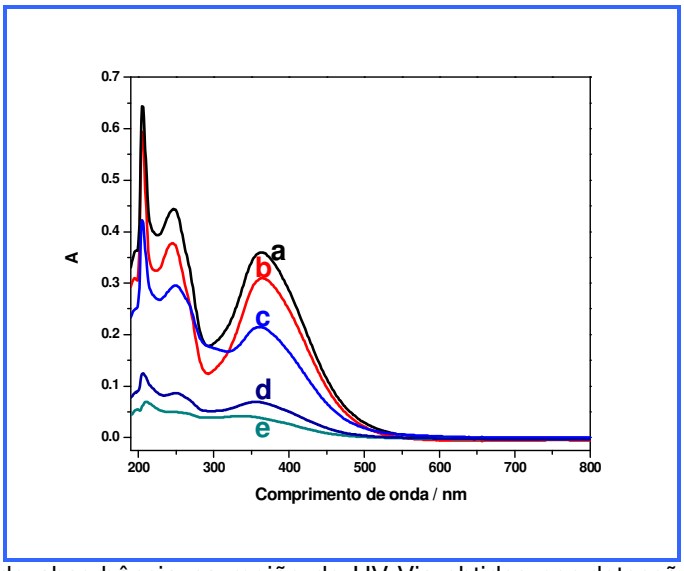


Figura 82: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletrooxidada que elue em 3,7 minutos (**Disperso Amarelo 9**); Fase móvel ACN/MeOH 80:20 (v/v), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Após 120 minutos de eletrólise (**curva e, Figura 82**) é possível observar a supressão da banda em 370nm e ao redor de 250nm, presentes na amostra antes do tratamento, (**curva a, Figura 82**) devido à insaturações do anel. Isso mostra que a oxidação da função amina durante as eletrolises promove mudança não apenas no

cromóforo, mas também nas bandas relativas aos grupos aromáticos da molécula. A **Figura 83**, mostra a percentagem de descoloração do corante Disperso Amarelo 9.

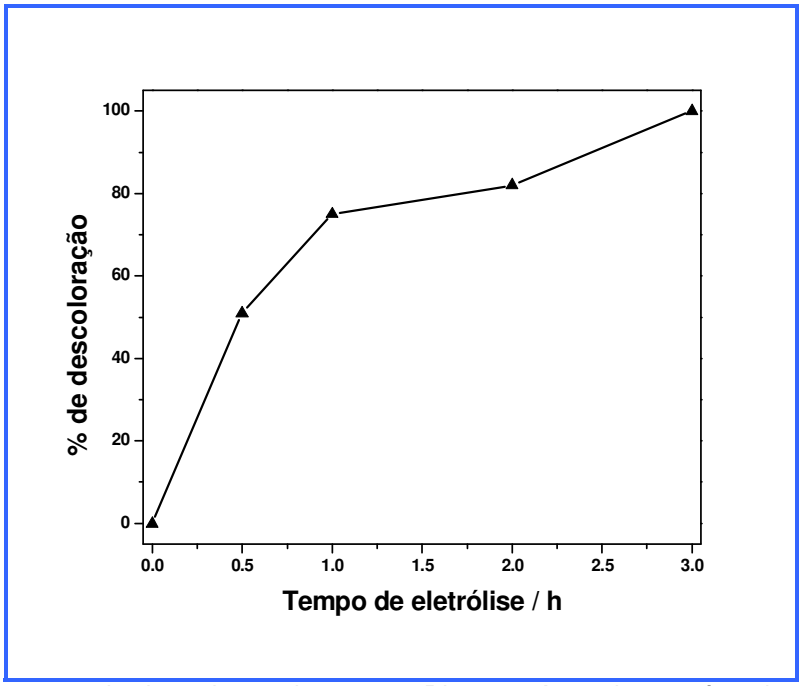


Figura 83: Percentagem de degradação do corante Disperso Amarelo 9 após 3 horas de eletrólise à potencial controlado (oxidação), aplicando-se 1,5V sob eletrodo de trabalho de rede de platina, contra eletrodo de Platina e referência Ag/AgCl.

A analise da **Figura 83** apresenta 90% de descoloração da solução após 3 horas de eletrólise. Amostras coletadas durante a eletrólise foram submetidas a analise cromatografica CLAE/DAD. Os respectivos gráficos para detecção das possíveis aminas formadas como subprodutos estão representados na **Figura 84A** e na **Figura 85A**, respectivamente.

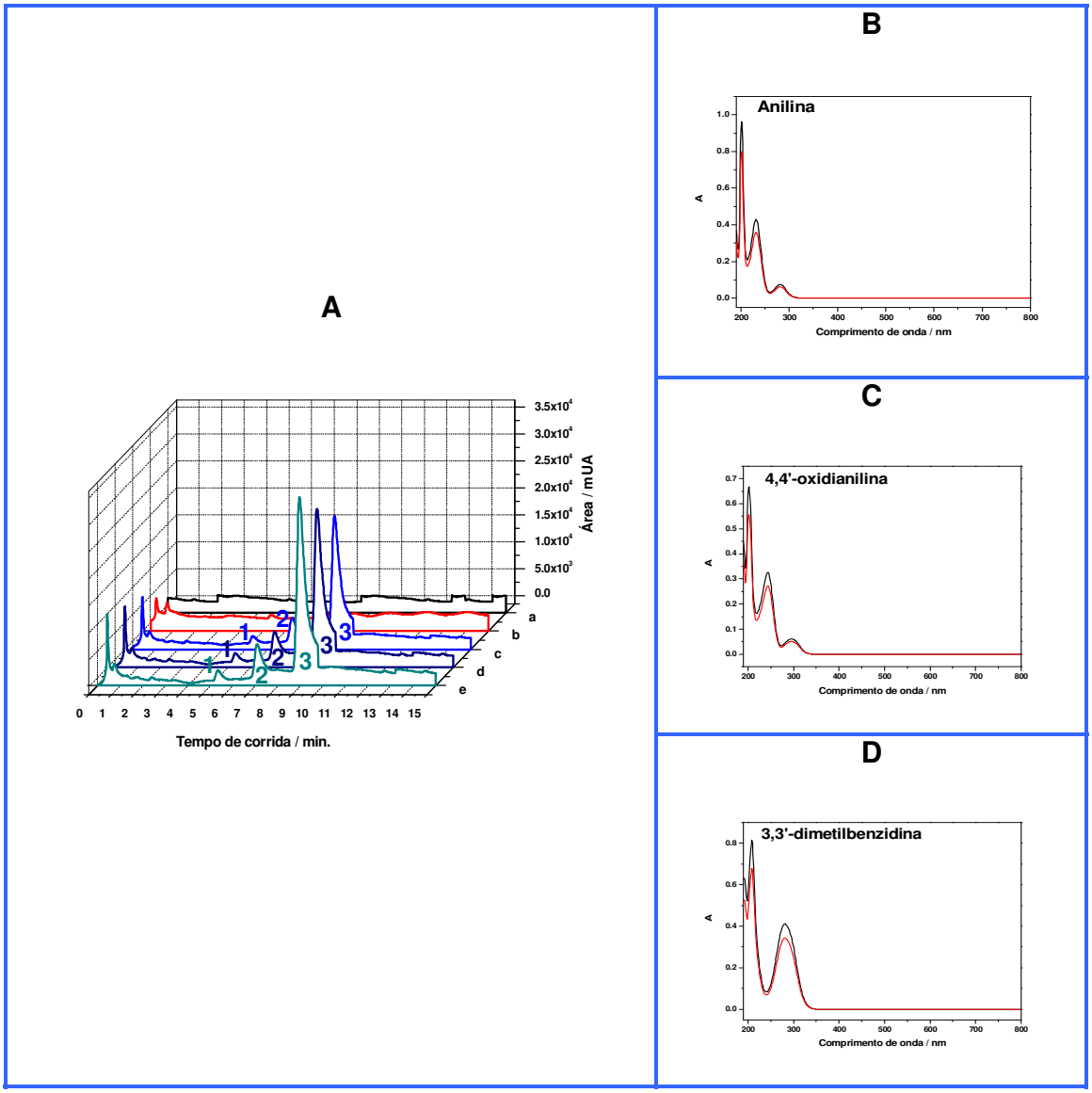


Figura 84: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletrooxidada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 0,5 hora; (**c**) após 1 hora; (**d**) após 2 horas; (**e**) após 3 horas; (**B, C, D**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,8 minutos (anilina); 6,7 minutos (4,4'-oxidianilina) e 9,2 minutos (3,3'=dimetilbenzidina); Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A analise da **Figura 84A**, mostra a identificação de 3 subprodutos eletro gerados após o processo de oxidação sendo identificados como: **Pico 1:** anilina, Pico 2: 4,4'-oxidianilina, Pico 3: 3,3'-dimetilbenzidina, que eluem nos tempos de retenção de 5,8, 6,7 e 9,2 minutos, respectivamente. Na **Figura 84 (B, C e D)**, estão representados os

espectros de UV-Vis dos subprodutos que foram identificados na amostra eletrooxidada.

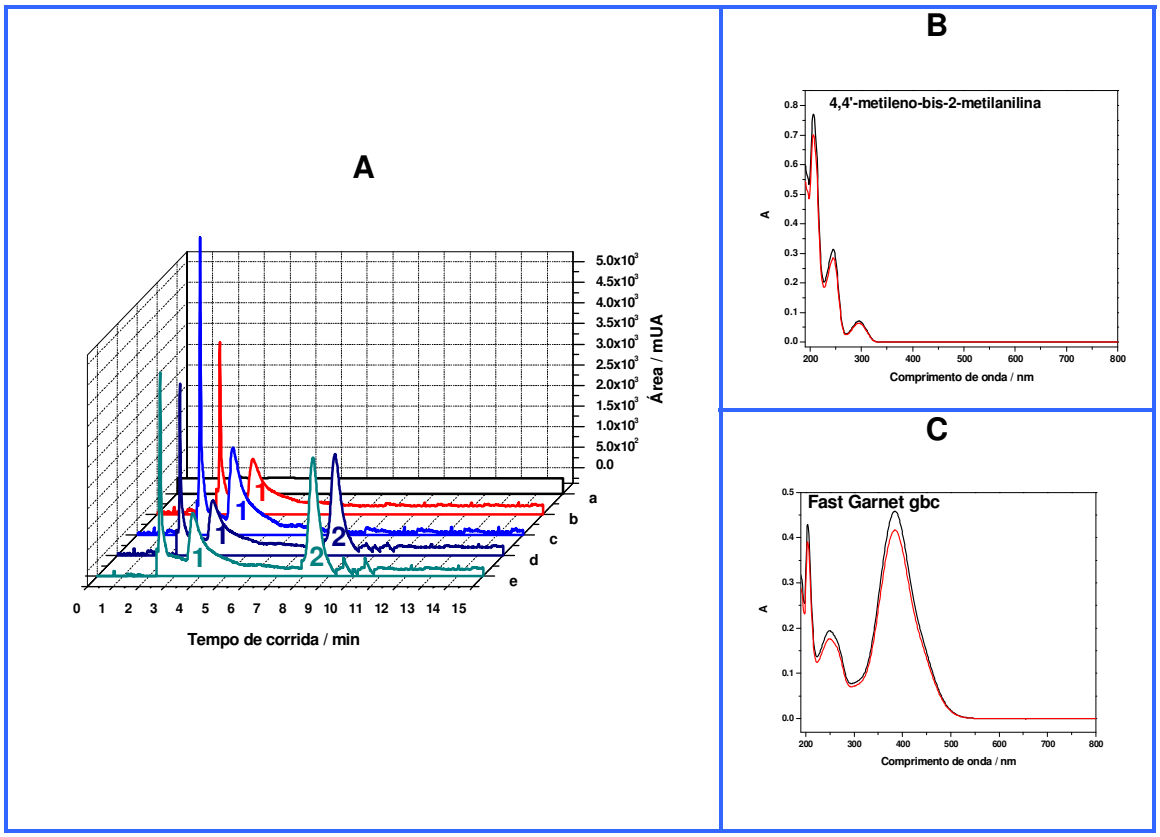


Figura 85: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletrooxidada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; Pico 1: 4,4'-metileno-bis-(2-metilanilina) tr = 3,8min.; Pico 2: Fast garnet gbc tr = 8,4min.; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 0,5 hora; (**c**) após 1 hora; (**d**) após 2 horas; (**e**) após 3 horas; (**B, C**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,8 e 8,4 minutos, respectivamente; fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Na **Figura 85A** observa-se então a formação de uma amina que foi identificada como 4,4'-metileno-bis-(2-metilanilina) que elue em 3,8 minutos, além do precursor de síntese fast garnet gbc que elue em 8,4 minutos. Na **Figura 86** esta representada o esquema com as estruturas químicas dos subprodutos formados.

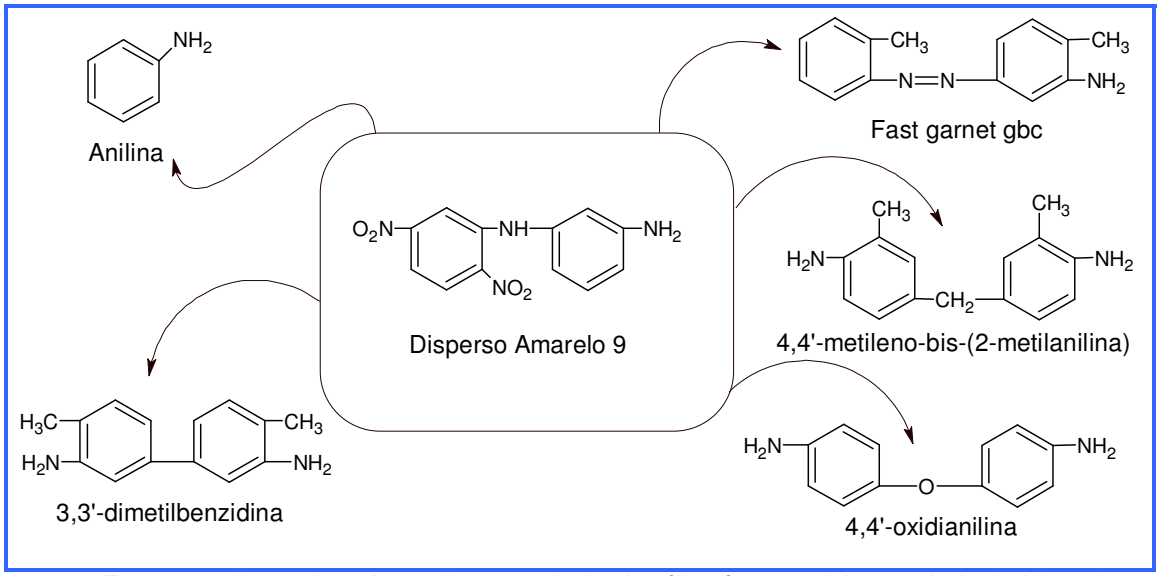


Figura 86: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado (oxidação) para o corante Disperso Amarelo 9, aplicando um potencial de 1,5V.

A quantidade de um destes componentes gerados foi calculado através de curva de calibração construída para cada um dos padrões, os resultados são apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19: Aminas formadas a partir da oxidação do corante por eletrolise a potencial controlado do corante Disperso Amarelo 9 após 3 horas aplicando potencial de 1,5V, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Aminas	Início (ppm)	Após tratamento (ppm)	% em relação ao corante orginal
Anilina	0	0,11	0,18
4,4'-oxidianilina	0	0,92	0,93
3,3'-dimetilbenzidina	0	13,9	13,1
4,4'-metilene-bis-2-metilanilina	0	0,83	0,74
Fast garnet gbc	0	14,1	12,5

Estes resultados indicam que o corante Disperso Amarelo 9 submetido a oxidação eletroquímica pode gerar aminas carcinogênicas, em uma proporção preocupante em relação ao corante original e embora pode-se considerar essas percentagens em relação ao corante original pequenas é preocupante pois esses subprodutos são tóxicos ao organismos e não se tem uma quantidade segura que possa ser ingerida sem danos ao organismo.

4.5.2. REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9

4.5.2.1.REDUÇÃO VOLTAMÉTRICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9

A redução eletroquímica de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 em metanol com 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio, sobre eletrodo de carbono vítreo pode ser observado na **Figura 87**.

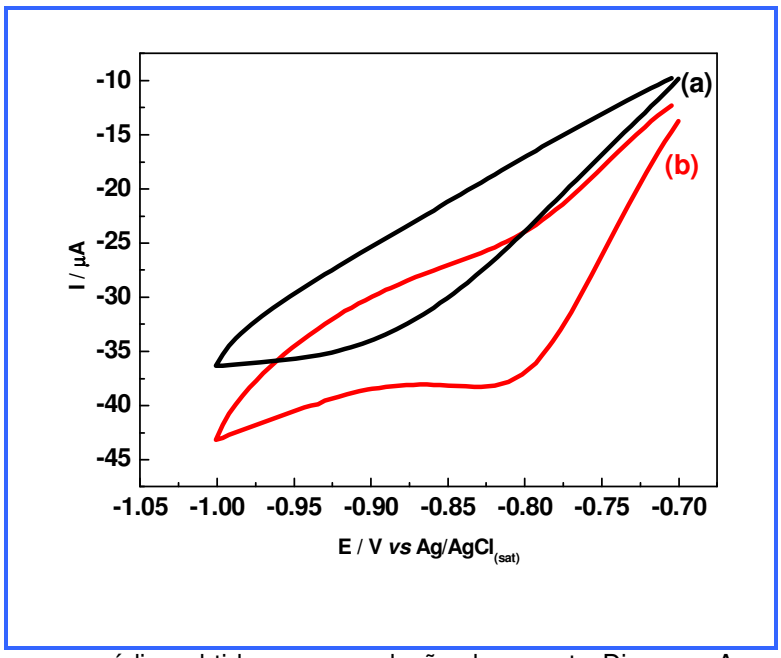


Figura 87: Voltamograma cíclico obtido para a redução do corante Disperso Amarelo 9. (**a**) eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$) 0,01 mol L^{-1}, e (**b**) solução 1,00x10^{-4} mol.L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 na presença de 0,01mol.L^{-1} tetrafluorborato de tetrabutilamonio ($C_{16}H_{36}NBF_4$). velocidade de varredura 100 mV s^{-1}.

O corante Disperso Amarelo 9 caracteriza-se por um pico em aproximadamente -0,80V devido à redução do grupo nitro.

O estudo da variação da velocidade de varredura de potencial (υ), no intervalo de 10 a 50 mV s^{-1} para redução eletroquímica de 1,00×10^{-4} mol L^{-1} corante Disperso Amarelo 9 em 0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio **Figura 88**

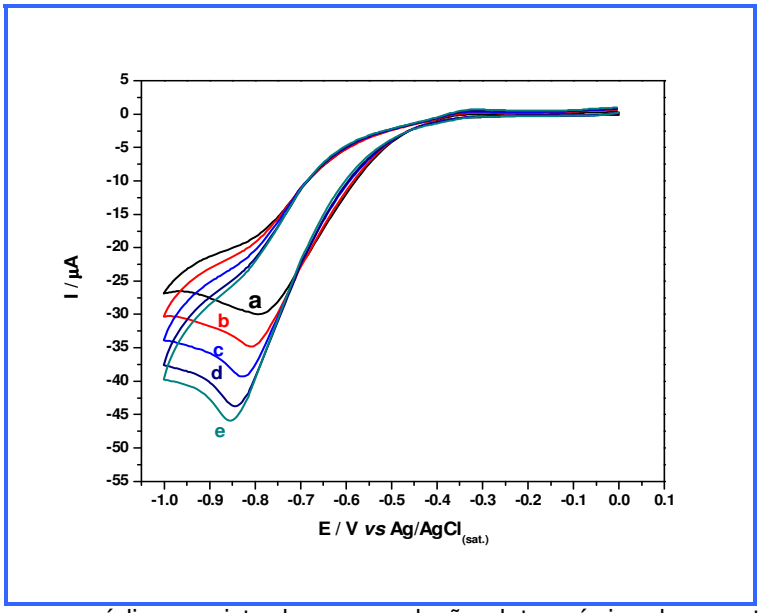


Figura 88: Voltamogramas cíclicos registrados para redução eletroquímica do corante Disperso Amarelo 9 $1{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1} sobre a superfície de carbono vítreo em meio de 0,01 mol L^{-1} tetrafluorborato de tretrabutilamonio, para diferentes valores de υ. (**a**) 10 mV s^{-1}; (**b**) 20 mV s^{-1}; (**c**) 30 mV s^{-1}; (**d**) 40 mV s^{-1}; (**e**) 50 mV s^{-1}.

Conforme pode ser observado os voltamogramas cíclicos são caracterizados por um único pico catódico, porém não se observa a ocorrência de nenhum pico anódico na varredura reversa de potencial. A **Figura 89A** mostra que os valores de potencias do pico de redução deslocam-se para valores mais negativos com aumento da velocidade de varredura, indicando que o processo eletródico envolve a transferência de carga, perturbado por reações químicas acopladas e/ou processos adsortivos [130]. Ainda pode-se observar que a corrente de pico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (**Figura 89B**), no entanto, não passa pela origem, indicando que o processo eletródico apresenta fraca adsorção do corante.

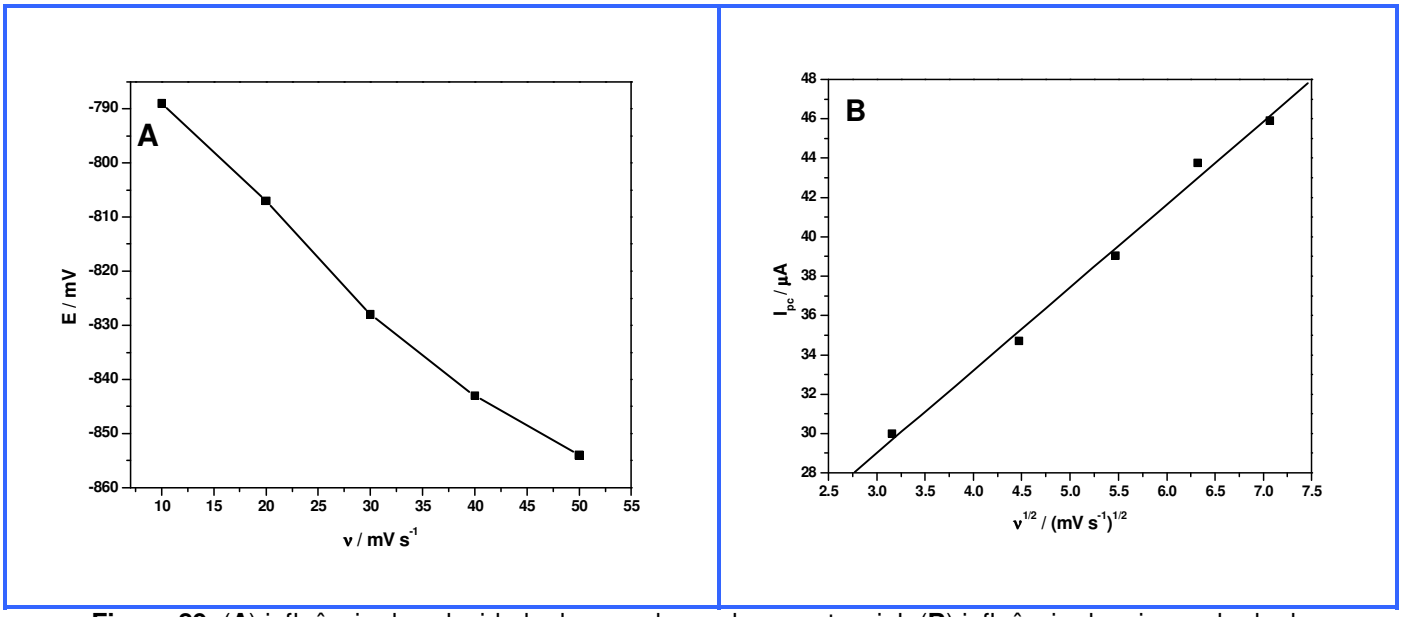


Figura 89: (**A**) influência da velocidade de varredura sobre o potencial; (**B**) influência da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódica na redução do corante Disperso Amarelo 9 em presença de 0,01mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio sob eletrodo de carbono vítreo.

Os parâmetros eletroquímicos referentes à análise dos voltamogramas cíclicos obtidos nas diferentes υ estão reunidos na **Tabela 20**. Uma relação linear foi observada entre a corrente de pico catódica (I_{pc}) e a $\upsilon^{1/2}$, segundo a equação $I_{pc}(\mu A)$ = 16,34 + 4,22$_{\times}\upsilon^{1/2}$ [(mV s^{-1})$^{1/2}$], com r = 0,996 (**Figura 89B**). O fato de a I_p varia linearmente com a raiz da υ e não passar pela origem dos pontos indica que o processo de redução eletroquímica do corante Sudan III não é controlado apenas por difusão.

Tabela 20: Parâmetros voltamétricos obtidos para a redução eletroquímica do corante Disperso Amarelo 9 1,0×10^{-4} mol L^{-1} em meio de tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,01 mol L^{-1}.

υ (mV s^{-1})	E_{pc} (mV)	I_{pc} (μ A)	I_{pc} / $\upsilon^{1/2}$ [μA / (mV s^{-1})$^{1/2}$]
10	-789	-29,99	9,48
25	-807	-34,72	7,76
50	-828	-39,04	7,13
40	-843	-43,76	6,92
50	-854	-45,92	6,49

A seguir investigou-se a redução do corante por eletrolise à potencial controlado, com o intuito de identificar aminas aromáticas como possíveis subprodutos.

4.5.2.2. REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9 POR ELETRÓLISE À POTENCIAL CONTROLADO

Soluções 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Disperso amarelo 9 em metanol/0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio foram submetidos à eletrolise a potencial controlado sob potencial de -1,2V durante 3 horas. Amostras eletrolisadas foram removidas e analisadas por CLAE/DAD. Os cromatogramas obtidos após eletrólise do corante em tempos 0,5, 1, 2 e 3 horas são mostrados na **Figura 90**, e na **Figura 91**, estão representado os espectros UV-Vis antes e após eletrolise.

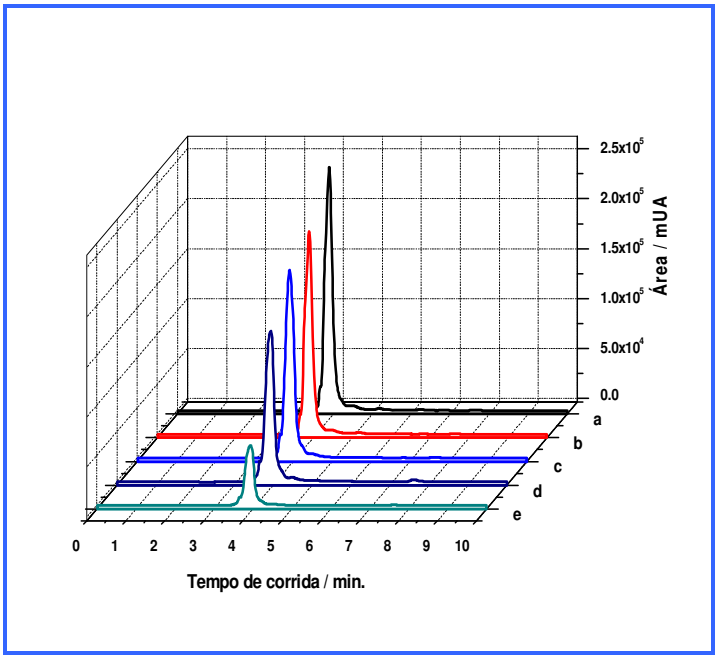


Figura 90: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 0,5h; (**c**) após 1h; (**d**) após 2h; (**e**) após 3h.

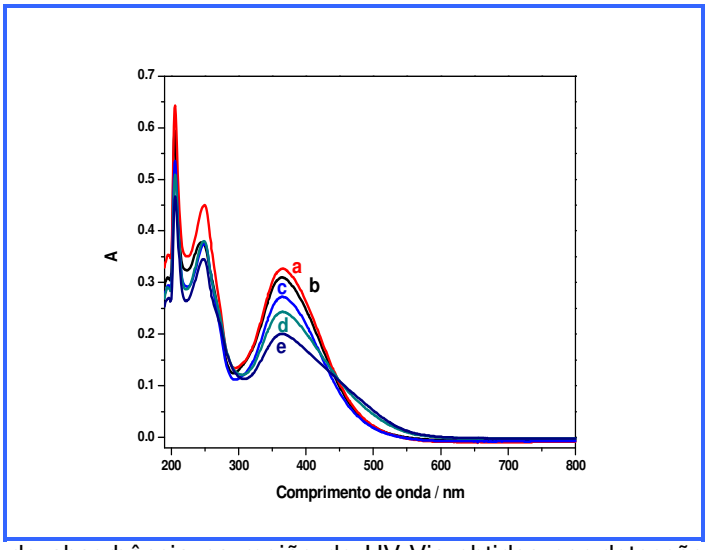


Figura 91: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletroreduzida que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Observa-se que durante a redução do corante há uma diminuição da absorbância da banda em 370nm e ao redor de 250nm. A percentagem de redução foi avaliada monitorando a diminuição do sinal em 370 nm e observa-se que há apenas 39% de redução. Estes resultados indicam que o corante sofre apenas parcial redução durante este tempo de eletrólise. É possível constatar que o pico do corante sofre uma significativa queda durante a eletrólise, cuja percentagem de redução esta representada na **Figura 92** Observa-se pelos dados cromatográficos que apenas 56% do corante foi reduzido após 3 horas de eletrólise.

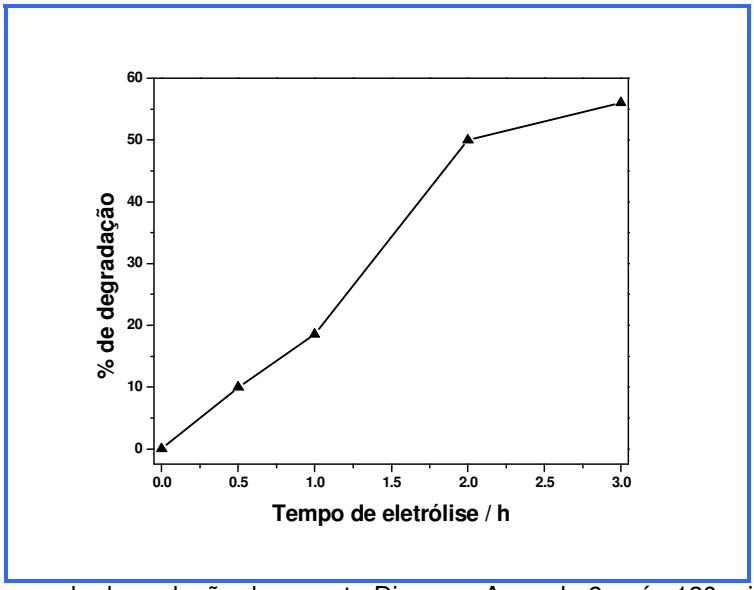


Figura 92: Porcentagem de degradação do corante Disperso Amarelo 9 após 180 minutos de eletrólise à potencial controlado (redução), aplicando-se -1,2V sob eletrodo de trabalho de rede de platina, contra eletrodo de Platina e referência Ag/AgCl.

Na **Figura 93**, mostra o cromatograma obtido para as amostras retiradas durante o processo de eletroredução.

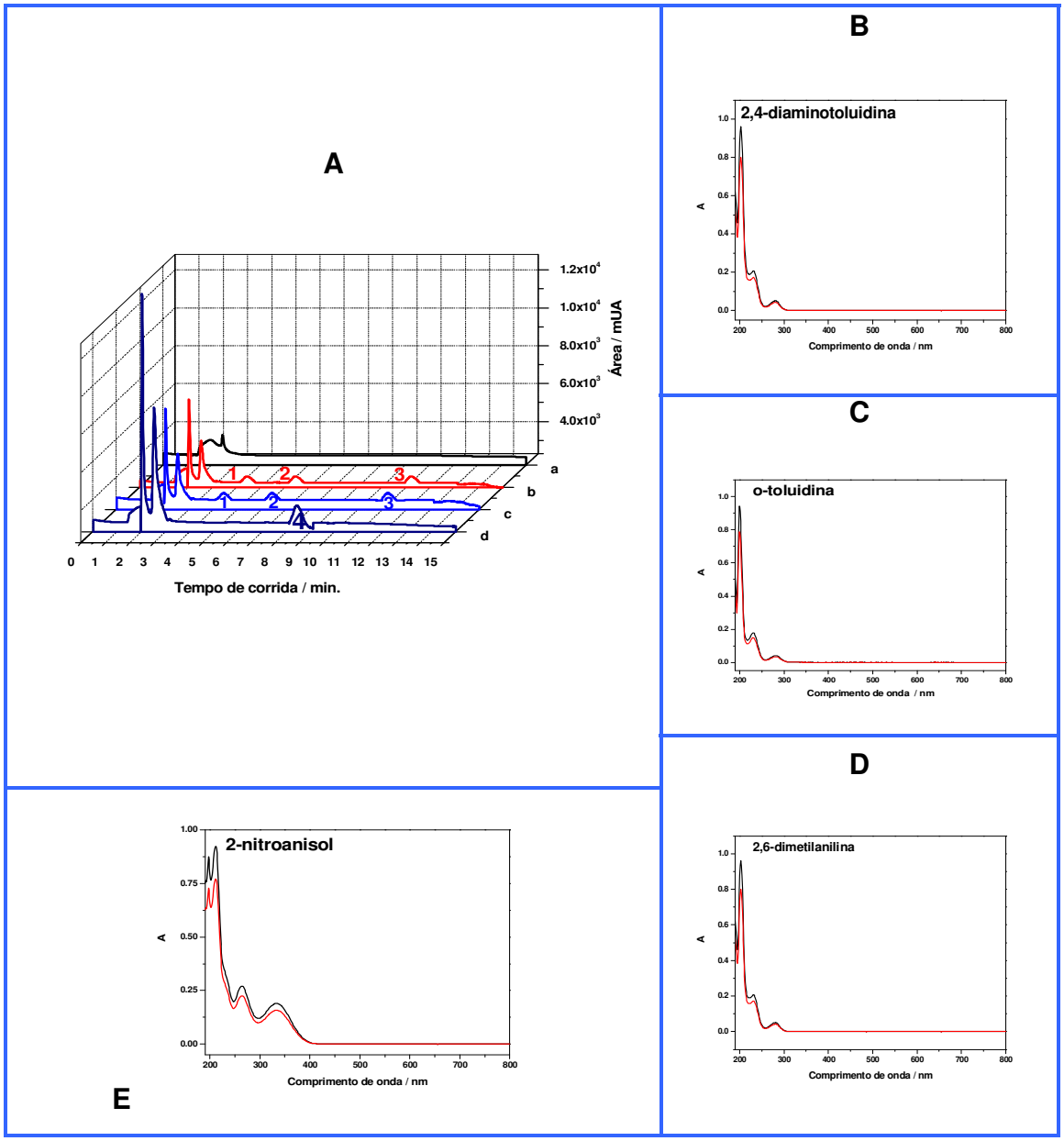


Figura 93: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1h; (**c**) após 2h; (**d**) após 3h; (**B, C, D, E**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,7; 6,5; 11,2 e 11,2 minutos.

Analisando a **Figura 93A**, observa-se a formação de 4 subprodutos que foram identificados como sendo: 2,4-diaminotoluidina, o-toluidina, 2-nitroanisol e 2,6-dimetilanilina, as quais eluem em 3,7, 6,5, 8,4 e 11,2 minutos, respectivamente. Na

Figura 93B, tem-se os espectros UV-Vis obtidos a partir dos cromatogramas realizados, confirmando assim as aminas presentes.

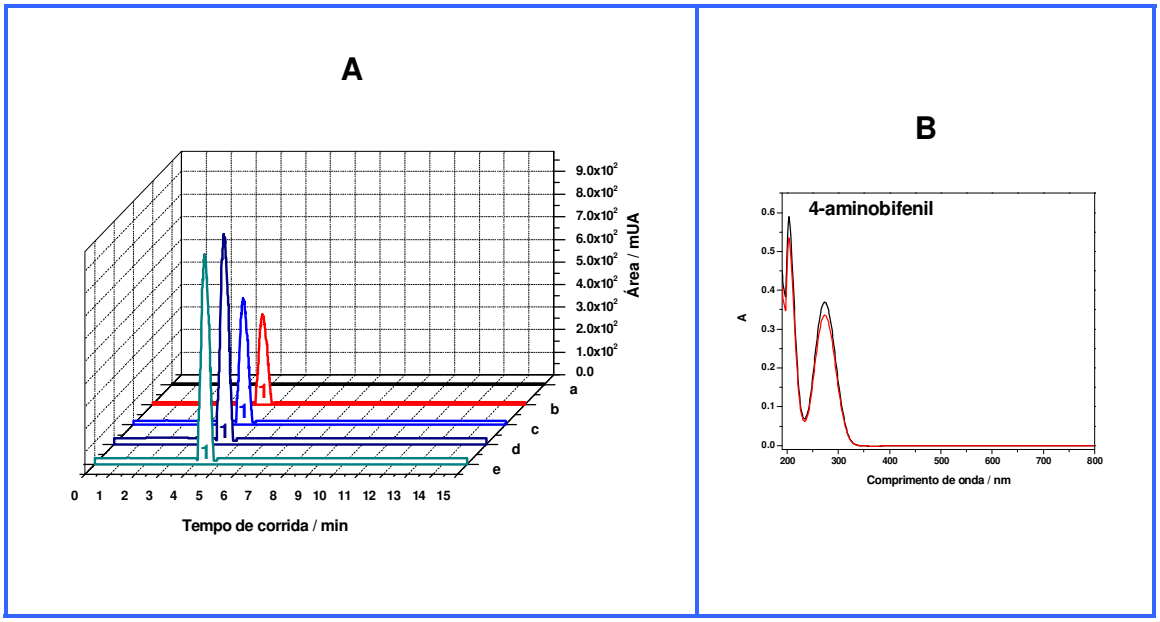


Figura 94: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1 hora; (**c**) após 1,5 horas; (**d**) após 2 horas; (**B, C**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que elue em 4,4 minutos; fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

O mesmo observa-se no cromatograma da **Figura 94A** onde observou-se a presença da 4-aminobifenil que elue em 4,4 minutos e foi confirmada pelo espectro UV-Vis representado na **Figura 94B**. No esquema da **Figura 95** está representado as estruturas dos subprodutos formados.

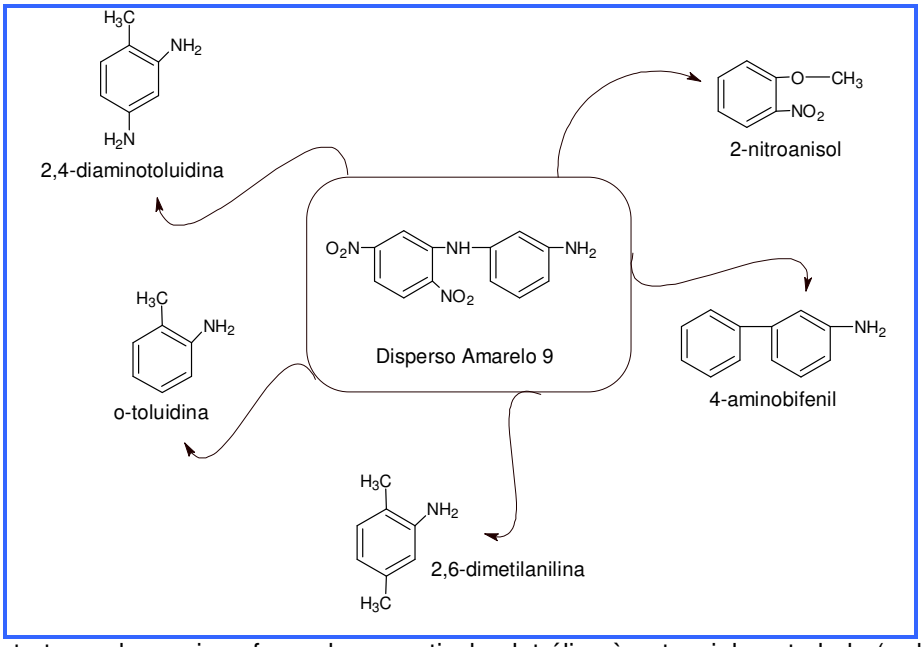


Figura 95: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado (redução) para o corante Sudan III, aplicando um potencial de -1,2V.

A quantidade de um destes componentes gerados foi calculado através de curva de analítica construída para cada um dos padrões, os resultados são apresentados na **Tabela 21**.

Tabela 21: Aminas formadas a partir da redução do corante Disperso Amarelo 9 por eletrolise a potencial controlado após 3 horas aplicando potencial de -1,2V, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Aminas	Início (ppb)	Após tratamento (ppb)	% em relação ao corante orginal
2,4-diaminotoluidina	0	1,34	0,0022
o-toluidina	0	12,3	0,023
2,6-dimetilanilina	0	4,46	0,0074
2-nitroanisol	0	1730,5	2,3
4-aminobifenil	0	11065,7	13,1
2,4-diaminotoluidina	0	1,34	0,0022

Como podemos observar mesmo sob redução parcial do corante há uma quantidade considerável de aminas formadas após 3 horas de eletrólise a potencial controlado, sugerindo que amostra em condições ambientais naturais podem levar à formação de diferentes subprodutos com alto grau carcinogênico como as aminas detectadas durante um processo de redução eletroquímica

4.5.3. REDUÇÃO QUÍMICA COM HIDROSSULFITO DE SÓDIO

A redução química do corante Disperso Amarelo 9 com hidrossulfito de sódio foi investigado a seguir no intuito de verificar os subprodutos formados sob ação do redutor químico é semelhante aqueles formados durante redução eletroquímica. Para isto soluções de 1,00 x10^{-4} mol L^{-1} do corante foram tratados com hidrossulfito de sódio, de acordo com metodologia descrita na parte experimental. Os cromatogramas obtidos antes e após tempo de reação química sob agitação são apresentados na **Figura 96**, e em B observa-se o espectro UV-Vis.

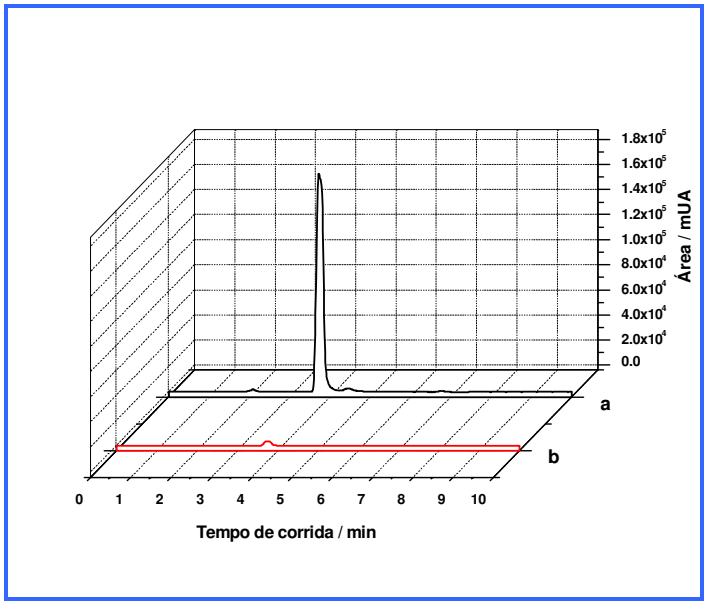


Figura 96: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação.

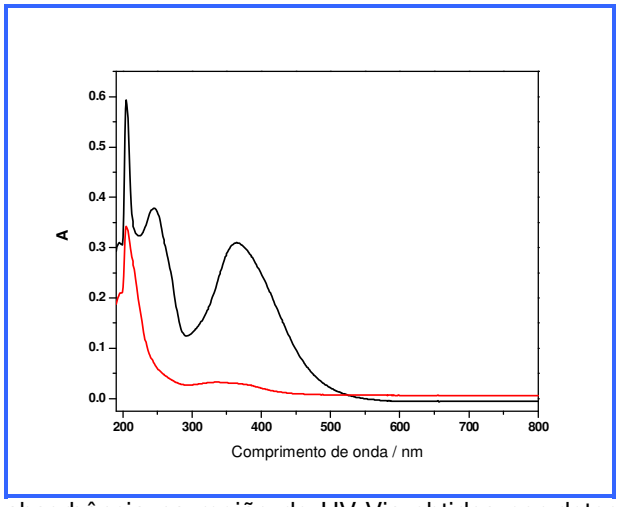


Figura 97: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra reduzida quimicamente que eluem em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Após a redução com hidrossulfito de sódio houve a supressão total do pico correspondente ao corante, como mostra a **Figura 96**. Já na **Figura 97** esta representado o espectro UV-Vis onde observa-se a supressão da bando do cromóforo em 380nm assim como a banda em aproximadamente 250nm que é características dos anéis aromáticos presentes na estrutura. A banda em 210nm aproximadamente sofreu apenas uma pequena queda de intensidade, mostrando que não ocorreu a ruptura do anel aromático. Em seguida, foi calculado a porcentagem de descoloração do corante Disperso Amarelo 9 após 2h de reação, obtendo-se 90% de degradação e então essas amostras foram injetadas em CLAE/DAD para monitorar as possíveis aminas e os cromatogramas estão representados na **Figura 98A** e na **Figura 99A**.

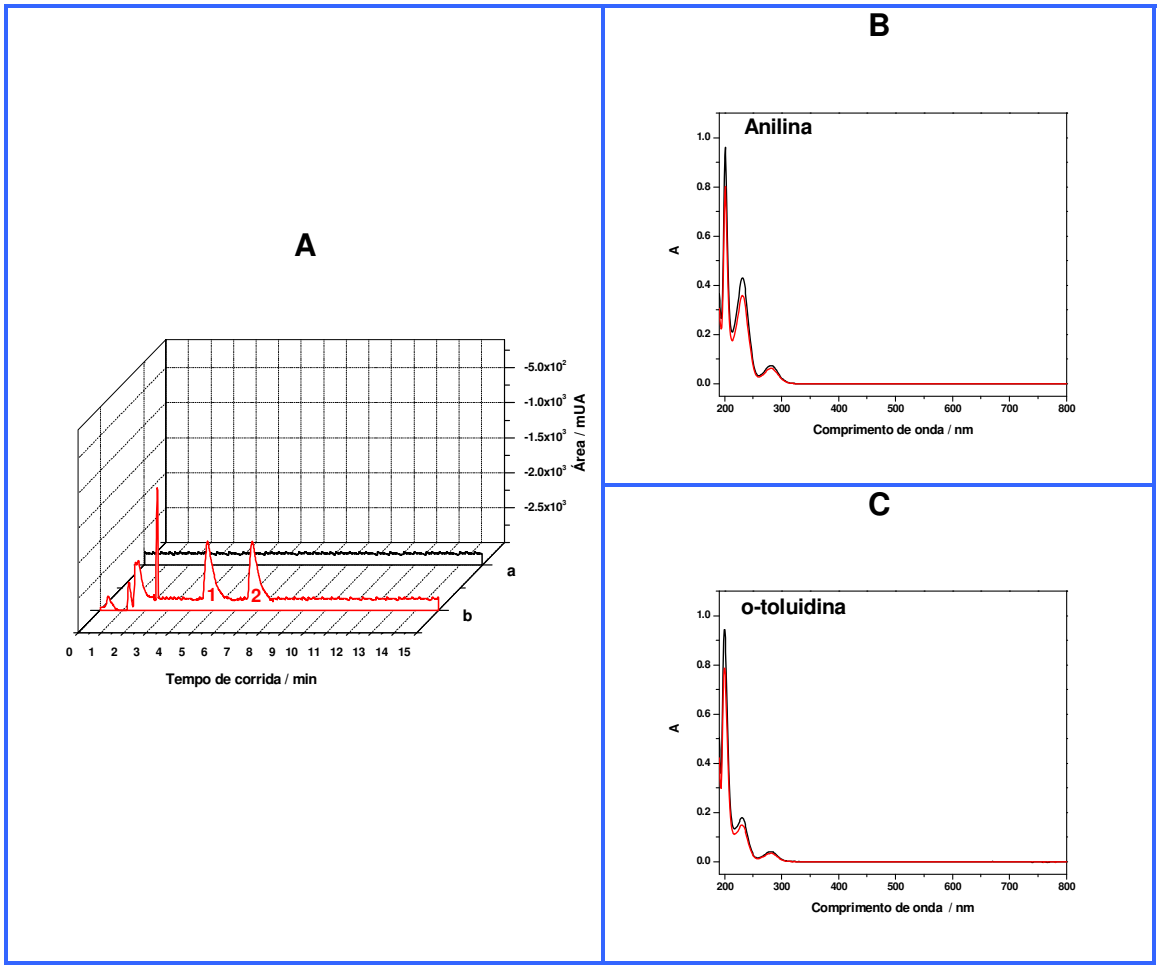


Figura 98: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação; (**B, C**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,2 e 6,5 minutos, respectivamente.

Observa-se na **Figura 98A** que houve a formação de 2 aminas que foram identificadas como: anilina e o-toluidina para o **pico 1** e **pico 2**, respectivamente, sendo que os tempos de retenção foram de 5,2 e 6,5 minutos. Foi também obtido os espectros UV-Vis desses compostos que estão representados na **Figura 98B** e na **Figura 98C**.

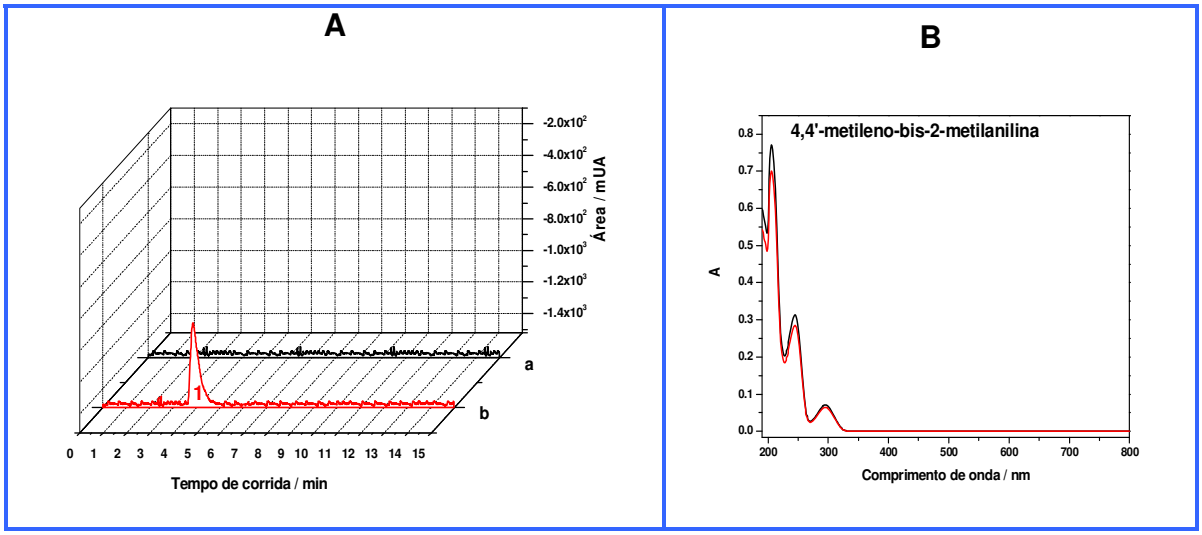


Figura 99: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação; (**B**) Espectro de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 3,8 minutos.

Na **Figura 99A** verifica-se a formação de um subproduto identificado como 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina que elue em 3,8 minutos. Foi obtido também seu espectro UV-Vis que esta representado na **Figura 99B**. Na **Figura 100** apresenta-se um esquema das estruturas quimicas dos subprodutos gerados na redução quimica.

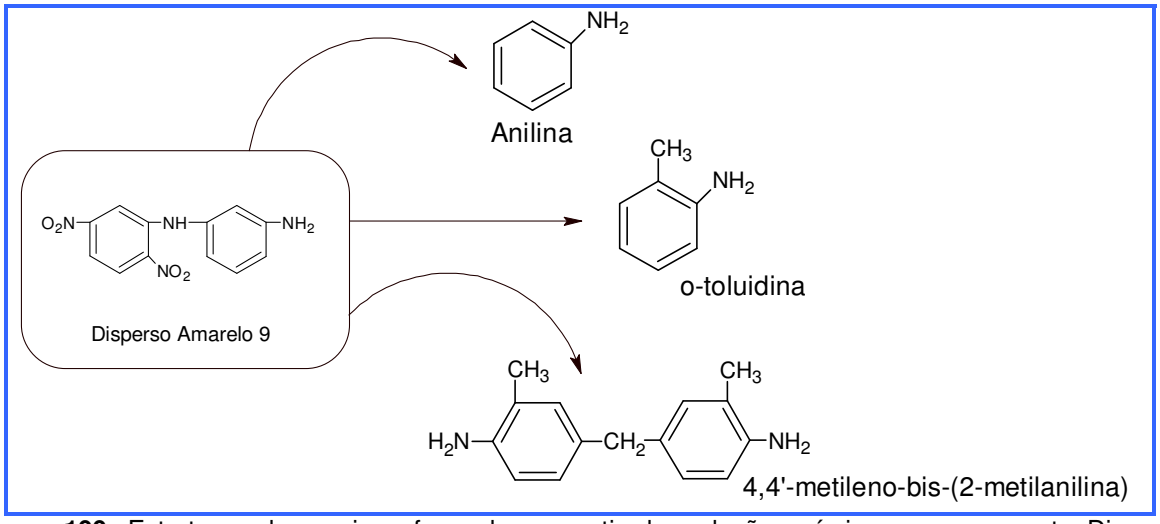


Figura 100: Estruturas das aminas formadas a partir da redução química para o corante Disperso Amarelo 9.

A quantidade de um destes componentes gerados foi calculado através de curva analítica construída para cada um dos padroes, os resultados são apresentados na **Tabela 22**.

Tabela 22: Aminas formadas a partir da redução química do corante Disperso Amarelo 9 e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Aminas	Início (ppm)	Após tratamento (ppm)	% em relação ao corante orginal
Anilina	0	0,65	0,54
o-toluidina	0	1,54	1,32
4,4'-metileno-bis-(2-metilanilina)	0	2,54	4,20

Estes resultados indicam que o corante submetido a reações de redução química, gera aminas carcinogênicas em proporções preocupantes em relação ao corante original, embora as percentagens possam ser consideradas pequenas, mas esses subprodutos são tóxicos e não se tem parâmetros seguros para os mesmos.

4.5.4. OXIDAÇÃO QUÍMICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9 POR CLORAÇÃO

A cloração de amostras contendo $1{,}00 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 foi conduzido submetendo-se a amostra à reação com hipoclorito de sódio (2% m/v) durante 10 horas de reação de acordo com procedimento descrito na parte experimental. Após 10 horas de reação a amostra foi analisada por CLAE/DAD nas condições experimentais que permitam detecção do corante. A **Figura 101**, mostra os cromatogramas obtidos e na **Figura 102**, mostra o respectivo espectro UV-Vis, correspondente a amostra do corante Disperso Amarelo 9.

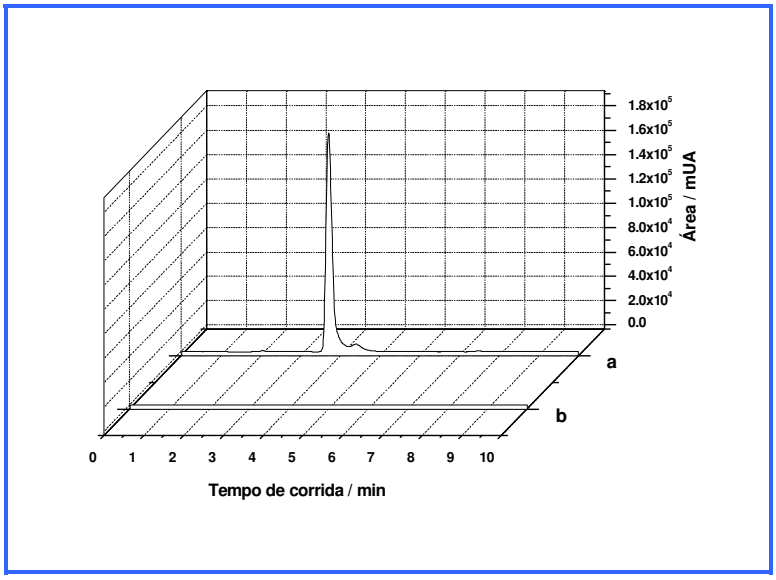


Figura 101: **C**romatograma obtido para o corante disperso amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, o qual apresenta os picos nos tempos de retenção de 3,7 minutos, monitorado em 380nm; (**a**) amostra original; (**b**) amostra clorada.

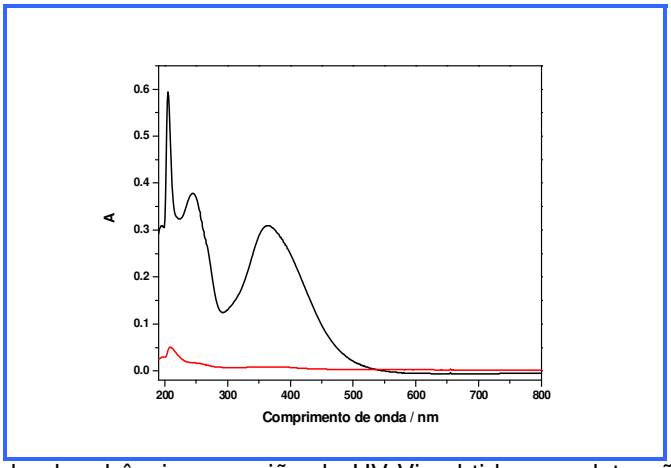


Figura 102: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra clorada que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Observa-se na **Figura 101** que o método de cloração convencional comumente utilizado nas estações de tratamento de esgoto é eficiente na remoção da cor do mesmo. Do mesmo modo, amostras extraídas após 10 horas de reação e submetidas a analise das aminas aromáticas selecionadas no trabalho por CLAE/DAD não apresentam nenhum sinal cromatográfico passível de ser atribuído às aminas carcinogênicas estudadas. Isso indica que o processo de tratamento do corante poderia

estar formando outros derivados clorados que poderiam ate ser mais tóxicos que a molécula original, no entanto esses possíveis derivados não foram estudados no trabalho, e deverão ser estudados posteriormente por outros métodos de análise tal como. LC/MS/MS.

4.5.5. CLORAÇÃO APÓS REDUÇÃO QUÍMICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9

Considerando que o processo de cloração pode ser utilizado nas estações de tratamento de água e o corante presente no efluente pode estar na forma reduzida investigou-se nesta etapa, a influência da cloração no corante previamente reduzido com hidrossulfito de sódio. As amostras de $1{,}00x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 foram reduzidas quimicamente com hidrossulfito de sódio durante 2 horas e posteriormente submetidas à cloração com hipoclorito de sódio 2% durante 10 horas de reação. A **Figura 103** apresenta os cromatogramas antes e após redução e nova oxidação com hipoclorito de sódio. Os espectros UV-Vis são mostrados na **Figura 104**.

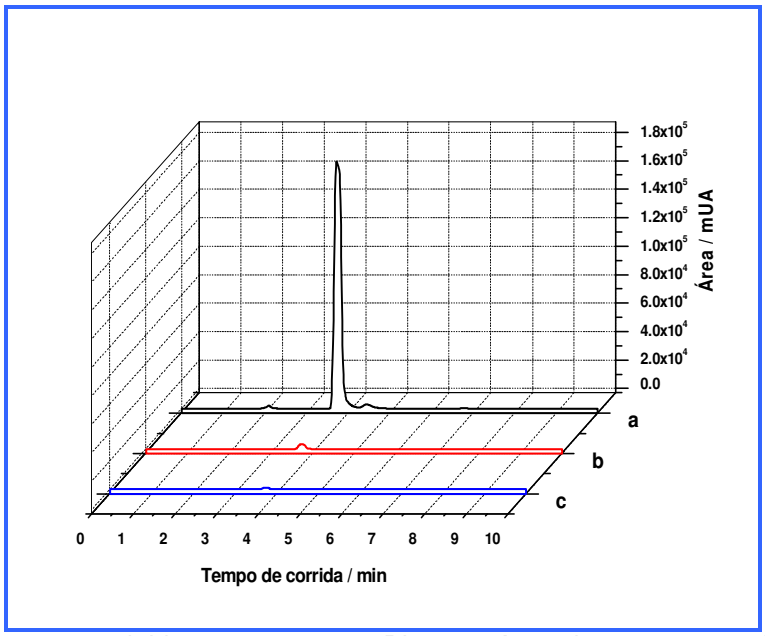


Figura 103: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação; (**c**) após reação + cloração.

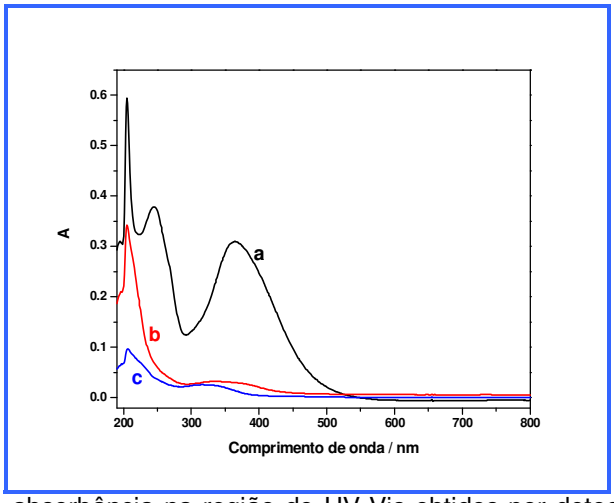


Figura 104: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra reduzidas quimicamente e posteriormente clorada que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm. (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação; (**c**) após reação + cloração.

Analisando o cromatograma da **Figura 103** mostra que houve a supressão do pico correspondente ao corante, mesmo antes do processo de cloração. Na **Figura 104** observa-se que houve a supressão da banda em 370nm correspondente ao grupo cromóforo da molécula assim como uma diminuição significativa da banda em aproximadamente 200nm correspondente aos anéis aromáticos. Concomitantemente ocorreu a formação após a cloração de uma banda em aproximadamente em 300nm, o que mostra a formação de intermediários. Em seguida foi injetada em CLAE/DAD essas amostras para verificar as aminas formadas. Na **Figura 105A** e na **Figura 106A** estão representados os cromatogramas obtidos.

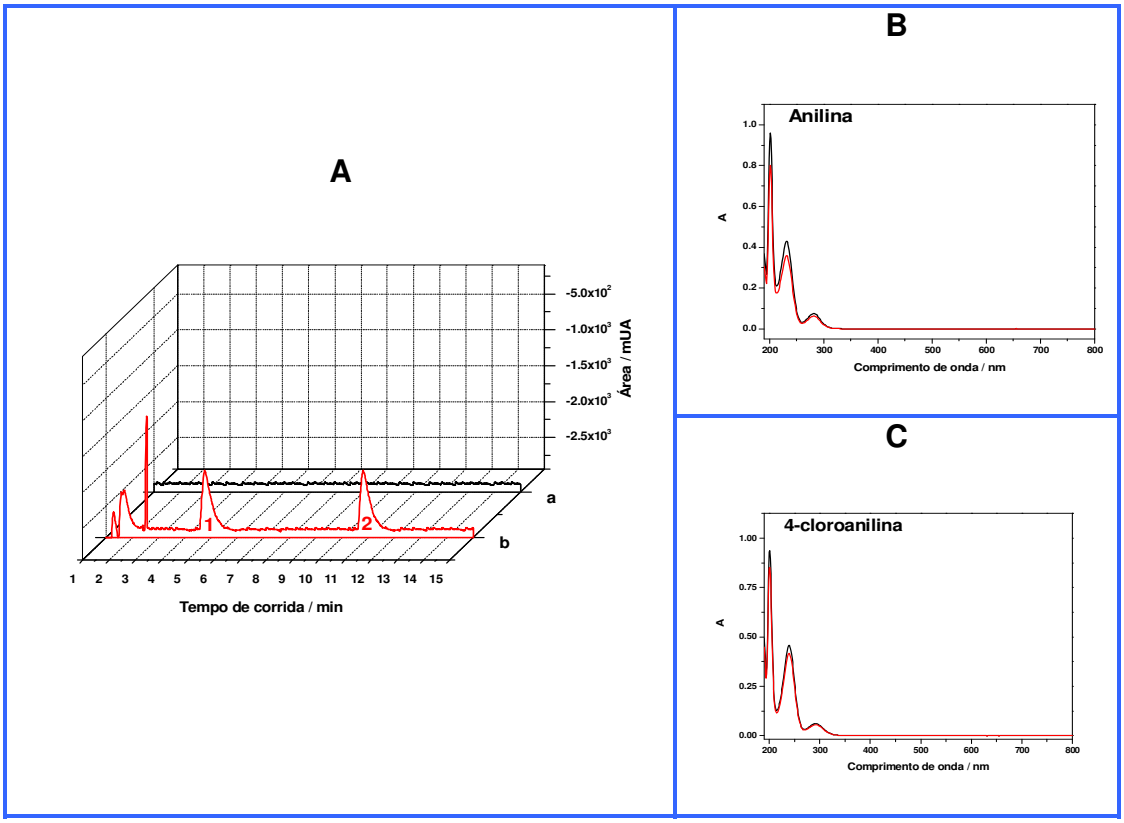


Figura 105: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação + cloro; (**B, C**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 4,7 e 10,8 minutos, respectivamente; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando a **Figura 105A** observa-se então que após a redução química ocorre uma maior facilidade de cloração dos subprodutos, pois foram identificadas a benzidina e a 4-cloroanilina que eluem em 4,7 e 10,8 minutos, respectivamente, que foram confirmadas pelo espectro UV-Vis obtido e mostrado na **Figura 105B**.

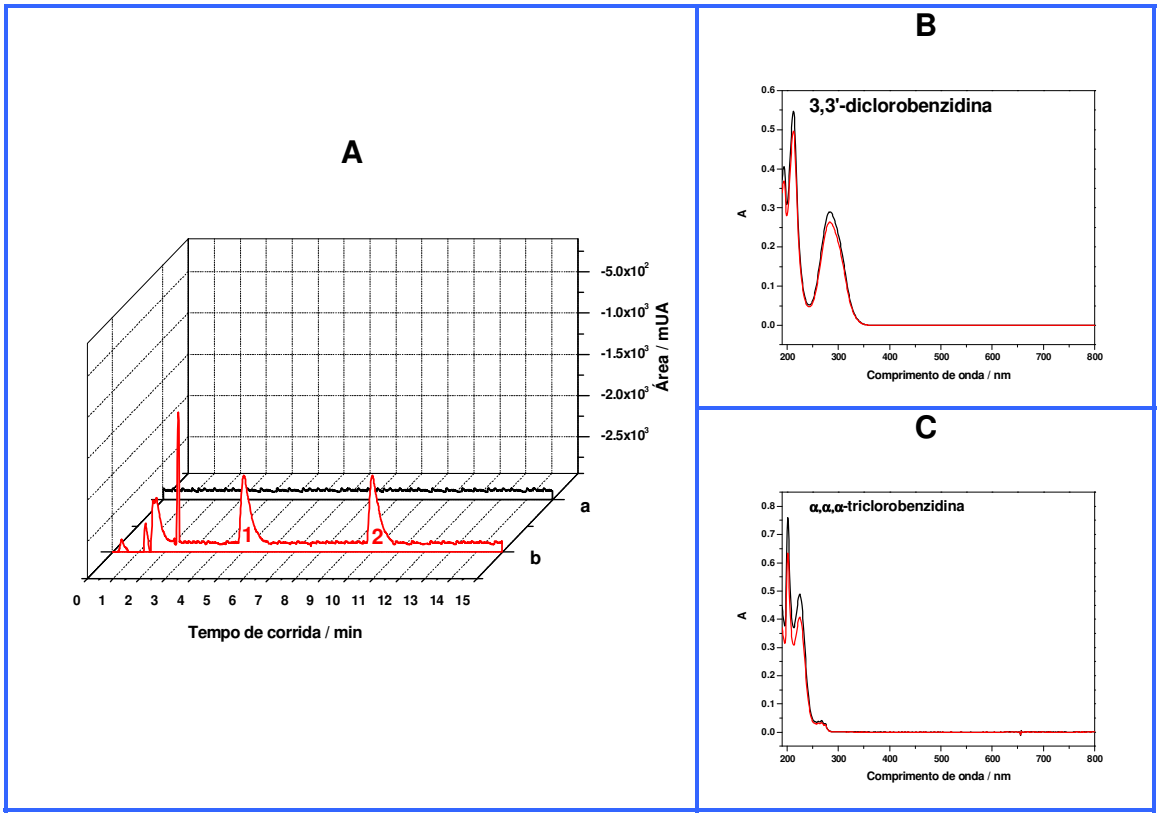


Figura 106: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra e reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após reação + cloro; (**B, C**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 e 10,0 minutos, respectivamente; fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Como podemos observar no cromatograma da **Figura 106A**, houve a formação de aminas cloradas após a cloração, que foram identificadas como 3,3'-diclorobenzidina e α,α,α-triclorotoluidina, que eluem em 5,0 e 10,0 minutos, respectivamente e foram confirmadas pelo espectro UV-Vis obtido que esta apresentado na **Figura 106B**. A **Figura 107** apresenta um esquema com as estruturas dos subprodutos formados durante o processo.

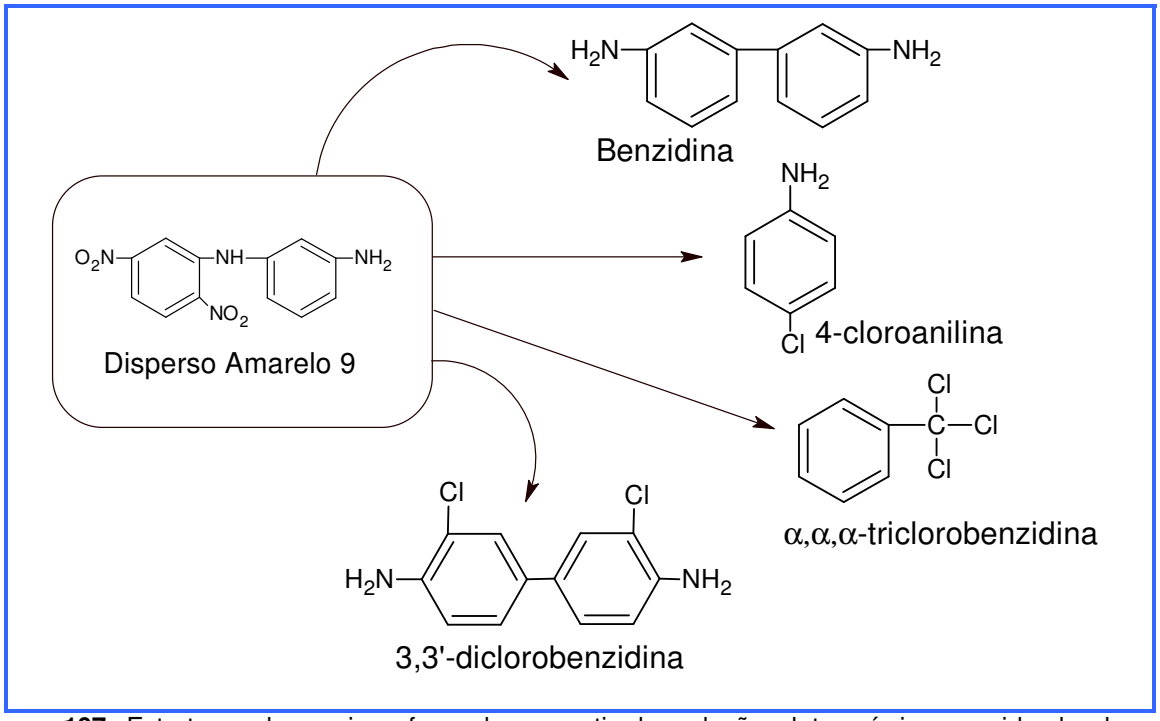


Figura 107: Estruturas das aminas formadas a partir da redução eletroquímica seguida de cloração convencional para o corante Disperso Amarelo 9.

A quantidade de cada um destes compostos gerados foi calculado através de curva analítica construída para cada padrão, os resultados são apresentados na **Tabela 23**.

Tabela 23: Aminas formadas a partir da redução quimica do corante seguida de cloração convencional, e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Aminas	Início (ppm)	Após tratamento (ppm)	% em relação ao corante orginal
Benzidina	0	3,86	8,18
4-cloroanilina	0	4,67	2,93
3,3'-diclorobenzidina	0	5,76	3,65
α,α,α-triclorobenzidina	0	2,98	9,54

Como podemos observar com esses resultados a maior facilidade de oxidação dos subprodutos previamente formados durante a redução química. Isso é preocupante, pois como esse processo de redução pode ocorrer na biota aquática e subsequentemente essa água ser ingerida por mamíferos após ter sido realizado a cloração nas estações de tratamento de água. Um dado preocupante para esse processo é a geração de benzidina como subproduto, pois como a mesma é

classificada como comprovadamente carcinogênica em humanos não a quantidade considerada segura.

4.5.6. CLORAÇÃO APÓS ELETROOXIDAÇÃO DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9

Nesta etapa analisou-se as amostras de 1,00x10^{-4} mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 previamente oxidado em potencial de +1,5V e submetidos à posterior cloração. Na **Figura 108** pode-se observar o cromatograma obtido para a amostra.

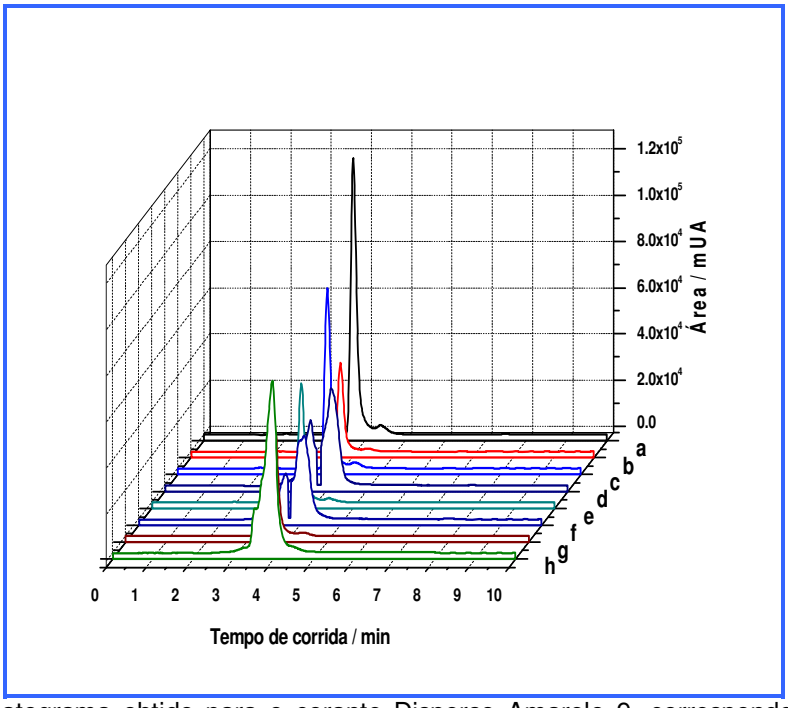


Figura 108: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletrooxidada e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (**a**) após 0,5h; (**b**) após 0,5h + cloração; (**c**) após 1h; (**d**) após 1h + cloração; (**e**) após 2h; (**f**) após 2h + cloração; (**g**) após 3h; (**h**) após 3h + cloração.

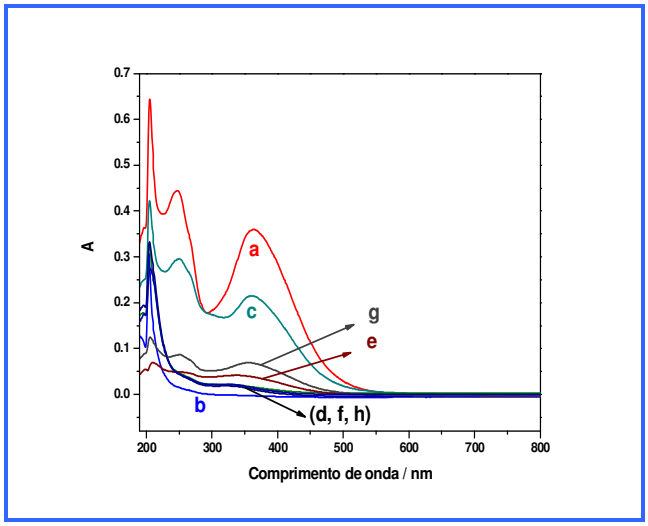


Figura 109: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletrooxidada e posteriormente clorada que eluem em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando cromatograma mostra que após a cloração houve uma diminuição na intensidade do pico (**curva b, Figura 108**) o que é verificado também observando o espectro (**curva b, Figura 109**), ambas comparando com a curva a da **Figura 108** e **Figura 109**. No entanto, nas curvas (**d, f, h**) **Figura 108** e da **Figura 109** houve a formação de um intermediário, mais polar que o corante original porem com estrutura química bem parecida provavelmente com adição de átomo de cloro como pode-se verificar no espectro UV-Vis a formação de uma banda de baixa intensidade em aproximadamente 320nm. Em seguida foi injetada em CLAE/DAD essas amostras para verificar as aminas formadas e não foi verificada nenhuma alteração dos subprodutos formados em relação à eletrooxidação e por isso não serão apresentado. Na **Figura 110**, esta apresentado um esquema com as estruturas dos subprodutos formados após a cloração subsequente a eletrooxidação.

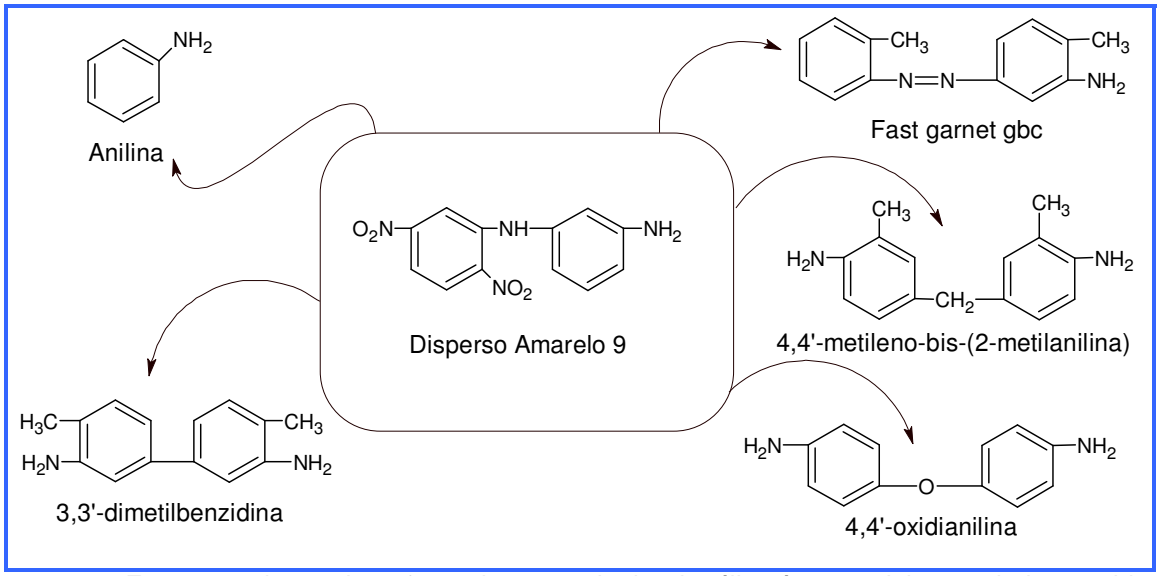


Figura 110: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado seguida de cloração para o corante Disperso Amarelo 9.

A quantidade de cada um destes componentes gerados foi calculado através de curva analítica construída para cada padrão, os resultados são apresentados na **Tabela 24**.

Tabela 24: Aminas formadas a partir da oxidação do corante Disperso Amarelo9 seguida de cloração convencional, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Aminas	Início (ppm)	Após tratamento (ppm)	% em relação ao corante orginal
Anilina	0	0,09	0,05
4,4'-oxidianilina	0	0,78	0,80
3,3'-dimetilbenzidina	0	13,9	18,1
4,4'-metilene-bis-2-metilanilina	0	0,78	1,06
Fast garnet gbc	0	18,9	20,7

Podemos verificar então, que a cloração do corante subsequente a oxidação eletroquímica, não alterou os subprodutos formados na mesma, porém como mostram os cromatogramas e os espectros Uv-Vis obtidos provavelmente ocorre a formação de intermediários clorados derivados do corante, o qual não foi objeto de estudado no trabalho.

4.5.7. CLORAÇÃO APÓS ELETROREDUÇÃO DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9

As amostras de $1,00x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 em metanol/0,01 mol L^{-1} de tetrafluorborato de tetrabutilamonio foram eletroreduzidas sob potencial controlado de -1,2V e posteriormente tratadas pelo método de cloração como descrito no procedimento experimental. Na **Figura 111** pode-se observar o cromatograma após a adição de hipoclorito de sódio.

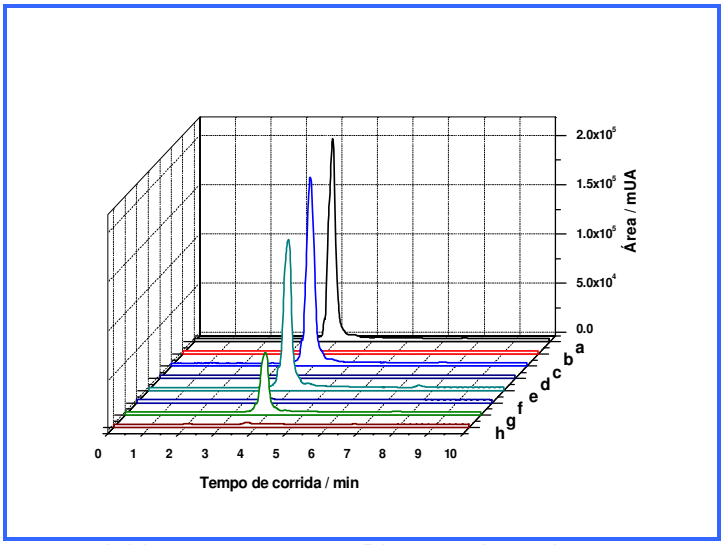


Figura 111: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (**a**) após 0,5h; (**b**) após 0,5h + cloração; (**c**) após 1h; (**d**) após 1h + cloração; (**e**) após 2h; (**f**) após 2h + cloração; (**g**) após 3h; (**h**) após 3h + cloração.

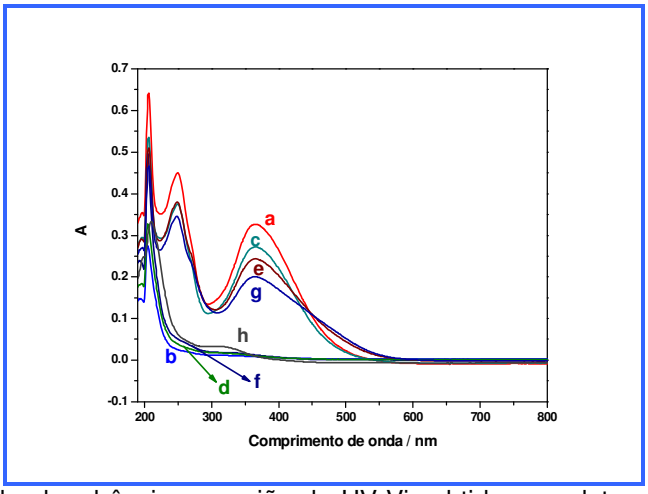


Figura 112: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra eletroreduzida e posteriormente clorada que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando a **Figura 111** observa-se que após a adição de hipoclorito de sódio houve a supressão total do pico do corante e isso pode ser observado também no espectro da **Figura 112** onde as curvas (**b, d, f e h**) representam o espectro após cloração, o que mostra a supressão da banda do cromóforo tornando-se presente apenas uma banda em aproximadamente 200nm que é característica dos aromáticos presentes na estrutura do mesmo. Em seguida foi injetada em CLAE/DAD essas amostras para verificar as aminas formadas. Na **Figura 113A** e na **Figura 114A** estão representados os cromatogramas obtidos.

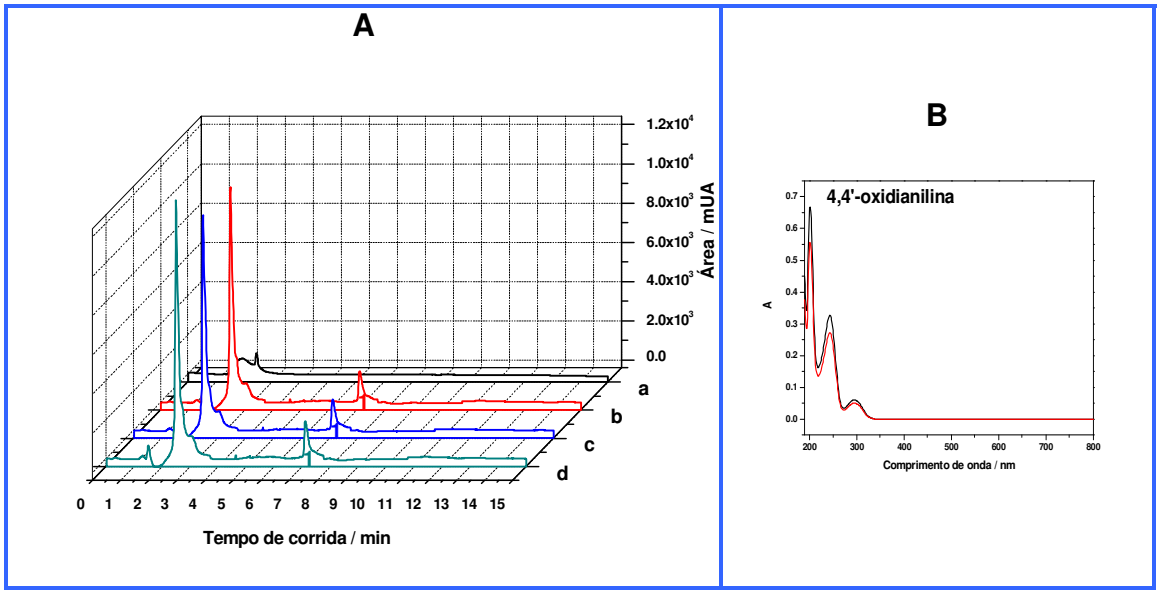


Figura 113: **(A)** Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1h + cloro; (**c**) após 2h + cloro; (**d**) após 3h + cloro; (**B**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 7,0 minutos; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando a **Figura 113A**, pode-se observar que houve a formação da amina identificada como 4,4'-oxidianilina que elue em 7,0 minutos, a qual foi confirmada pelo espectro UV-Vis obtido que esta apresentado na **Figura 113B**.

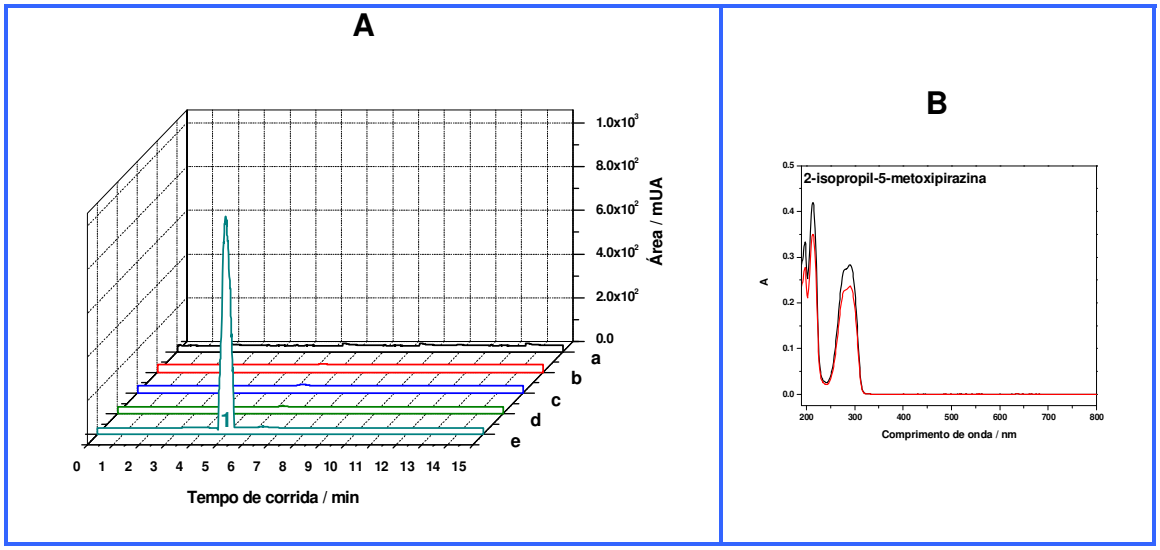


Figura 114: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra eletroreduzida e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 0,5h + cloro; (**c**) após 1h + cloro; (**d**) após 2h + cloro; (**e**) após 3h + cloro; (**B**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que eluem em 5,0 minutos; fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Como pode-se observar no cromatograma da **Figura 114A**, houve a formação de amina clorada que foi identificada como 3,3'-diclorobenzidina que elue no tempo de retenção de 5,0 minutos, a qual foi confirmada pelo espectro UV-Vis obtido para a mesma, como mostra a **Figura 114B**. Na **Figura 115**, esta representado um esquema com as estruturas das aminas formadas após a cloração subsequente a eletroredução.

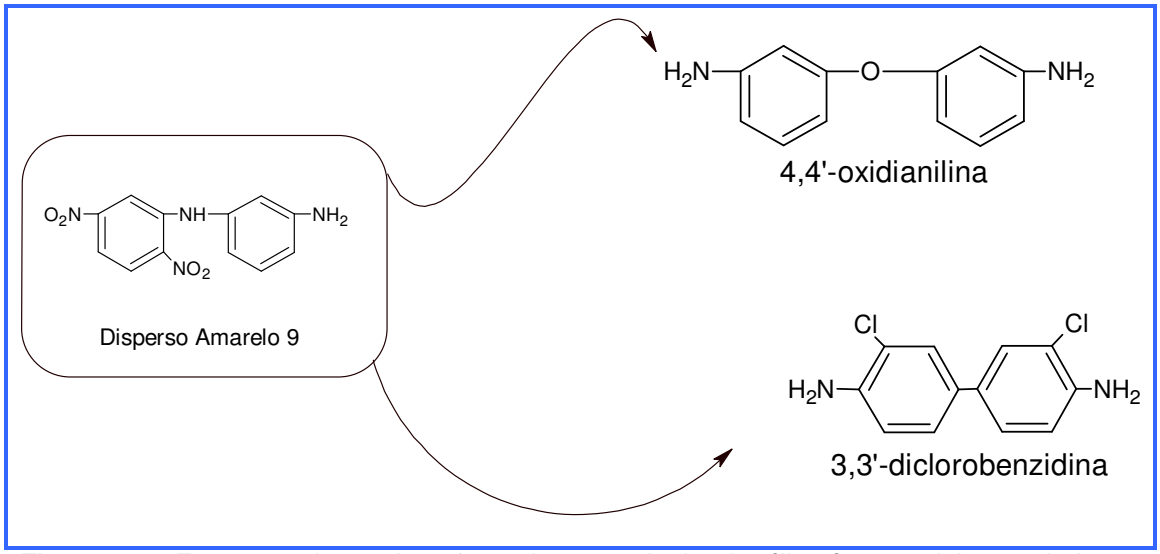


Figura 115: Estruturas das aminas formadas a partir da eletrólise à potencial controlado seguida de cloração para o corante Disperso Amarelo 9.

A quantidade de cada uma desses subprdutos gerados foi calculado através de curva analítica construída para cada padrão, os resultados são apresentados na **Tabela 25**.

Tabela 25: Aminas formadas a partir da redução do corante seguida de cloração convencional, usando eletrodo de rede de platina como eletrodo de trabalho, platina como auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência e a percentagem de formação em relação ao corante original.

Aminas	Início (ppm)	Após tratamento (ppm)	% em relação ao corante orginal
4,4'-oxidianilina	0	0,33	0,18
3,3-diclorobenzidina	0	0,76	0,93

Estes resultados indicam que o corante submetido a eletroredução seguida da cloração gera aminas cloradas em proporções significantes em relação ao corante original. Isso é preocupante pois água com esse tipo de contaminação pode ser consumida pela população e com isso provocar sérios danos a saúde humana.

4.5.8.OXIDAÇÃO QUÍMICA DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9 POR TERC-BUTILHIDROPERÓXIDO CATALISADA PELA AÇÃO DA PORFIRINA (FeTMPyP)

A ferroprofirina utilizada para a catalise da reação de oxidação do corante pelo oxidante terc-butilhidroperoxido que no caso foi a FeTMPyP (cloreto de 5,10,15,20-

tetraquis-(4-N-metilpiridil) porfirina ferro III), que mimetiza a reação do citocromo P-450 presente na célula do figado dos mamíferos. Após a reação as amostras foram analisadas por CLAE/DAD, e a **Figura 116**, apresenta o cromatograma obtido após a oxidação e na **Figura 117** o espectro UV-Vis correspondente.

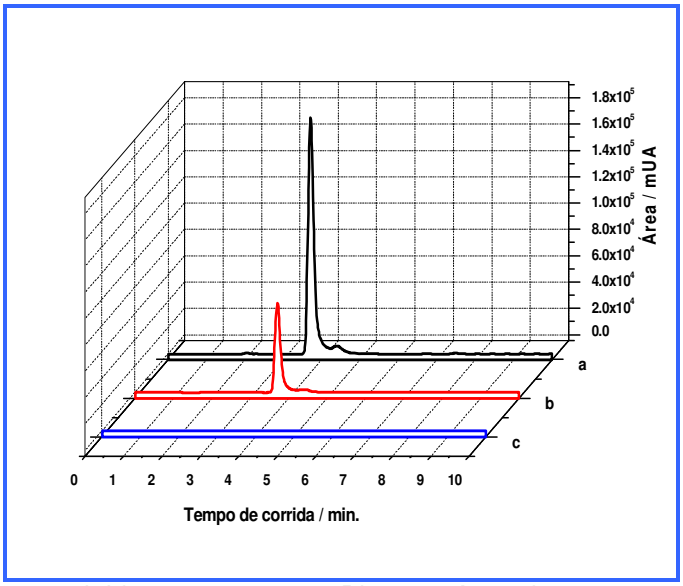


Figura 116: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra reduzida quimicamente e posteriormente clorada, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 4 horas; (**c**) após 15 horas.

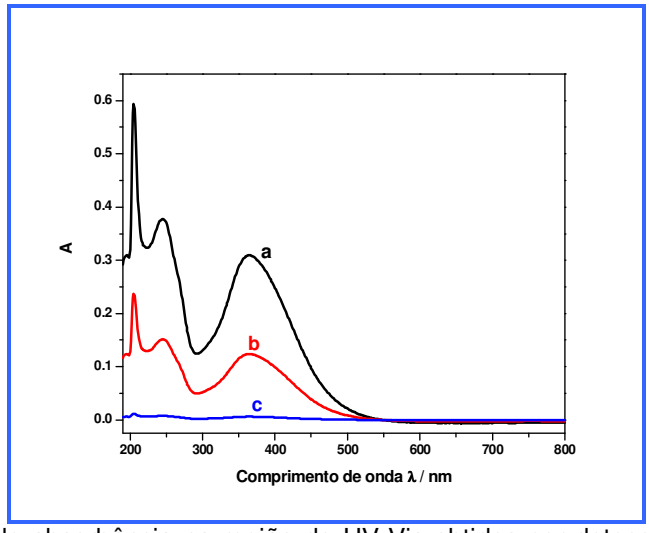


Figura 117: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra reduzidas quimicamente e posteriormente clorada que elue em 3,7 minutos; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

O cromatograma da **Figura 116** mostra que após 4 horas de reação houve uma significativa dimuição do pico correspondente ao corante porém somente após 15 horas de reação houve a supressão total do pico. Os espectros de UV-Vis mostram que há diminuição da banda em aproximadamente 370nm após 4h de reação correspondente aos grupos azos, a qual é suprimida após 15h de reação. As bandas na região de 230nm foram tambem suprimidas após 15 horas de reação. A percentagem de descoloração do corante está representado na **Figura 118**.

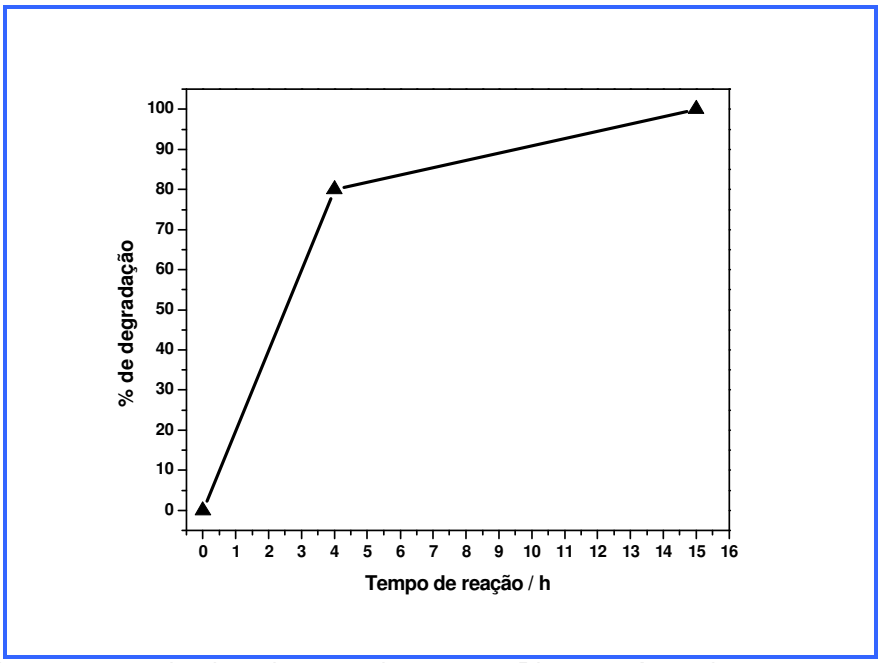


Figura 118: Percentagem de descoloração do corante Disperso Amarelo 9 reação catalisada pela ferroporfirina (FeTMPyP) em presença do oxidante terc-butilhidroperóxido sob agitação.

Como mostra a **Figura 116** e a **Figura 118**, a reação de oxidação promove 80% de degradação após 4 horas de reação e alcança 100% após 15 horas de reação, sugerindo que estas condições experimentais são efetivas para promover 100% de degradação do corante. Os subprodutos gerados foram analisados por CLAE/DAD e os resultados são apresentados nos cromatogramas da **Figura 119A** e da **Figura 120A**.

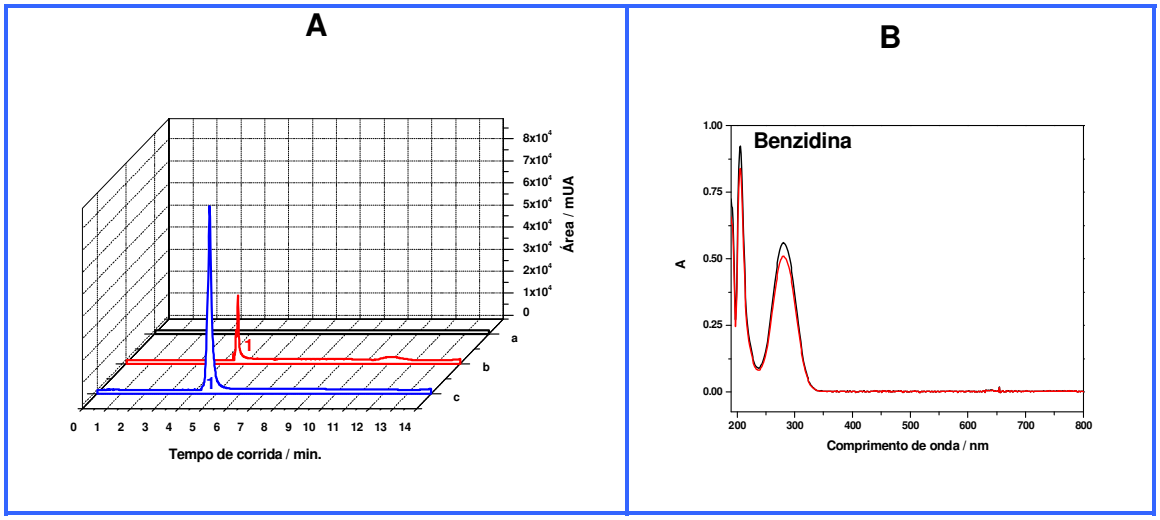


Figura 119: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catálise com a ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 4 horas; (**c**) após 15 horas; (**B**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a benzidina; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando a **Figura 119A**, observa-se a formação de uma amina que foi identificado como benzidina a qual elue em 4,7 minutos, e foi confirmada pelo espectro UV-Vis obtido, que está representado na **Figura 119B**.

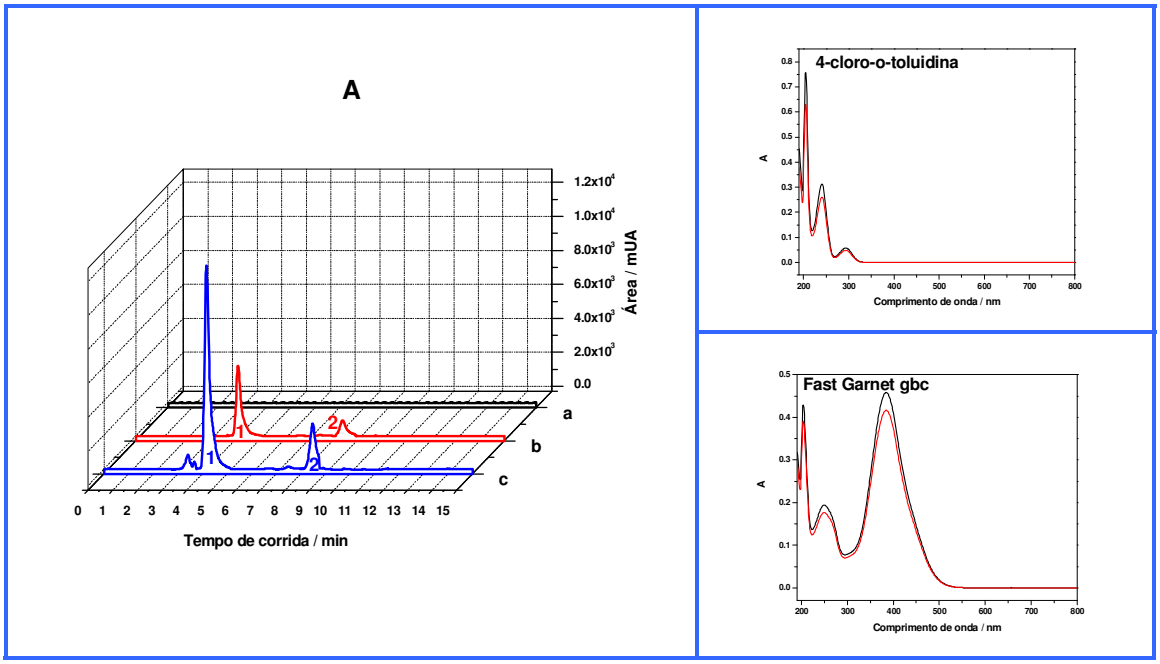


Figura 120: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catálise com a ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 4 horas; (**c**) após 15 horas; (**B**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para as aminas que elue em 4,1 minutos; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A **Figura 120A** mostra que foram detectadas 1 amina que foi identificada como 4-cloro-o-toluidina, a qual elue em 4,1 minutos, além do precursor de síntese fast garnet gbc o qual elue em 8,4 minutos. Ambos os subprodutos foram confirmados pelos espectros UV-Vis obtido, como mostra a **Figura 120B** O esquema dos subprutos formados está representado na **Figura 121**.

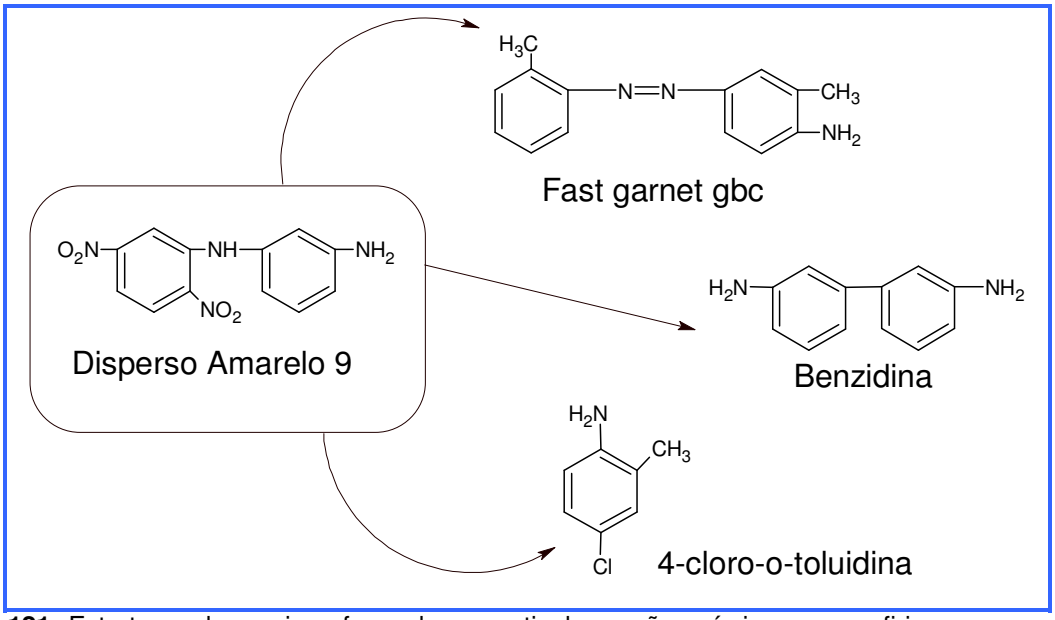


Figura 121: Estruturas das aminas formadas a partir da reação química com porfirinas para o corante Disperso Amarelo 9.

Calculou-se a concentração de cada amina formada, além do precursor fast garnet gbc pela equação obtida através da curva analítica e os dados estão apresentados na **Tabela 26**.

Tabela 26: Aminas formadas a partir da oxidação catalisada pela ferroporfirina (FeTMPyP) do corante Disperso Amarelo 9 após 4 e 15 horas de reação em temperatura ambiente na presença do oxidante terc-butilhidroperóxido.

Aminas	Inicio (ppm)	4h (ppm)	% em relação ao corante orginal	15h (ppm)	% em relação ao corante orginal
Benzidina	0	4,93	5,83	5,50	6,50
4-cloro-o-toluidina	0	5,32	8,17	6,14	9,43
Fast garnet gbc	0	1,21	1,17	1,38	1,33

A análise desses dados da oxidação do corante pela catálise com a ferroporfirina mostra a formação de subprodutos preocupantes para a saúde humana e mamíferos em geral, pois como mostra a Tabela 26 foi gerado benzidina e esta é comprovadamente carcinogênica em humanos. Além disso foi gerada aminas cloradas e o precursor de síntese fast garnet gbc que pode ser altamente tóxico pois o mesmo ainda apresenta grupos passíveis de redução e oxidação.

4.5.9. OXIDAÇÃO DO CORANTE DISPERSO AMARELO 9 PELA AÇÃO DO CITOCROMO P450 (FRAÇÃO MICROSSOMAL DE FÍGADO DE RATO)

Finalmente, amostras de $4{,}6x10^{-4}$ mol L^{-1} do corante Disperso Amarelo 9 foi submetido à oxidação com complexo enzimático extraído do fígado de rato (S9), visando identificar a possível formação de aminas aromáticas após metabolização do corante durante metabolismo de um mamífero. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito na Parte experimental e as amostras submetidas a analise cromatográfica segundo procedimento previamente descrito. A **Figura 122** apresenta o cromatograma correspondente ao corante Disperso Amarelo 9 antes e após a incubação por 1,5 horas.

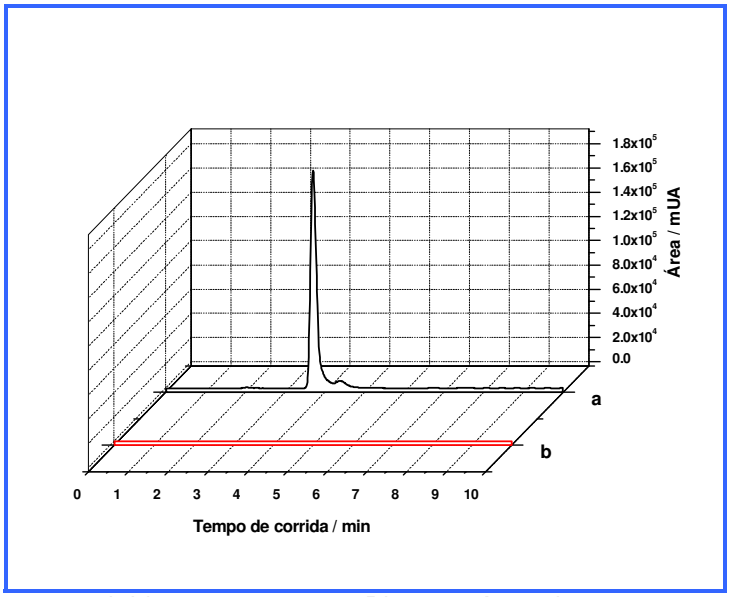


Figura 122: Cromatograma obtido para o corante Disperso Amarelo 9, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catálise do citocromo P-450, a partir da otimização da fase móvel: ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 370nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1,5 horas.

Espectros de UV-Vis obtidos para as amostras antes e após oxidação, correspondente ao corante Disperso Amarelo 9 presentes na amostra está apresentado na **Figura 123**.

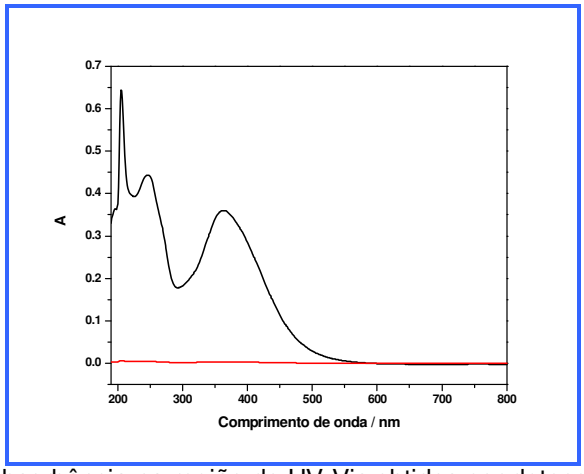


Figura 123: Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra oxidada pela catálise do citocromo P-450 que elue em 3,7; Fase móvel ACN/MeOH 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Pode-se observar na **Figura 122** que após 1,5 horas de reação foi suficiente para a oxidação completa do corante, obtendo-se assim 100% de degradação do corante. Os espectros de UV-Vis (**Figura 123**) mostram que há supressão de todas as bandas do espectro, incluindo as bandas características dos aromáticos. Essas amostras então foram injetadas em CLAE/DAD a fim de monitorar as possíveis aminas e estão representadas na **Figura 124** e **Figura 125**.

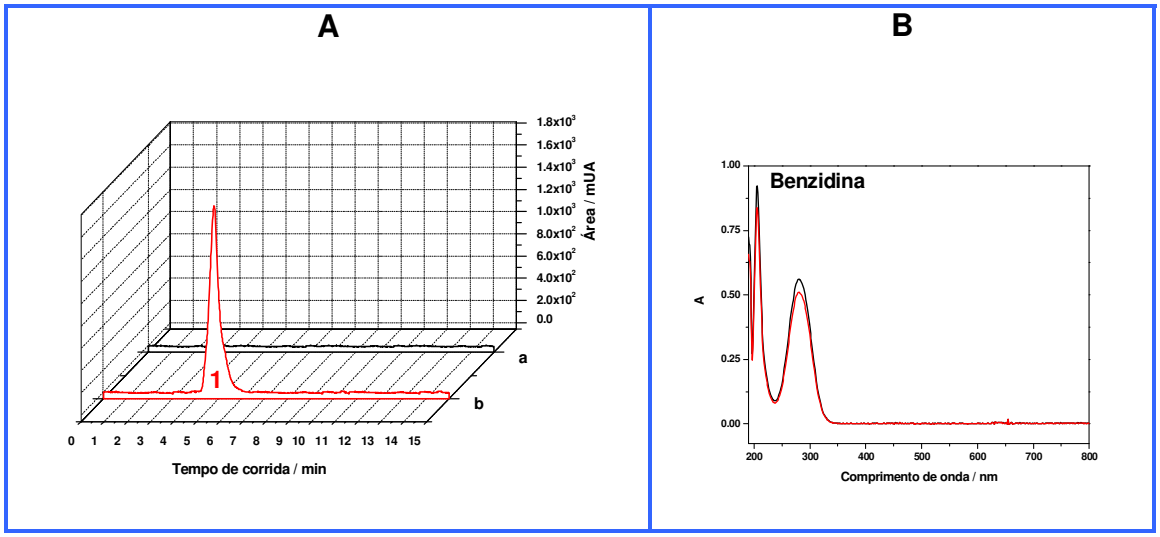


Figura 124: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catálise pelo citocromo P-450, a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 50:50, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1,5hora; (**B**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amina que elue em 4,7 minutos; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 50:50 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

A **Figura 124A**, mostra a identificação de benzidina que elue em 4,7 minutos, o qual foi confirmado pelo espectro UV-Vis obtido para esse pico, como mostra a **Figura 124B**.

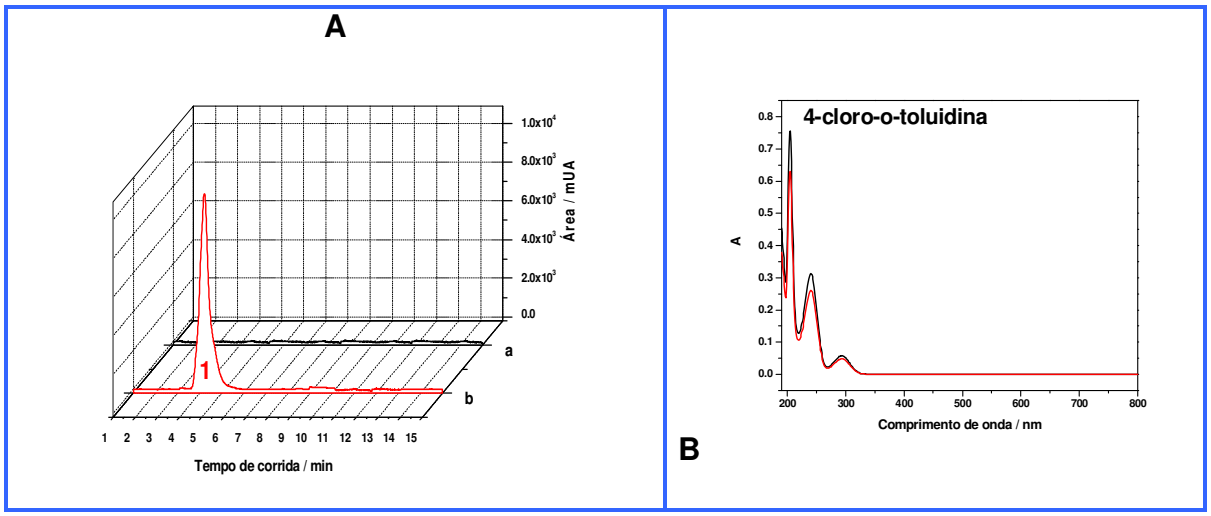


Figura 125: (**A**) Cromatograma obtido para as aminas, correspondentes à injeção de 20µL da amostra oxidada pela catalise da ferroporfirina (FeTMPyP), a partir da otimização da fase móvel: MeOH/Tampão fosfato (pH = 6,9) 80:20, T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}, e fase estacionária C18, monitorado em 280nm; (**a**) sem tratamento; (**b**) após 1,5h; (**B**) Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amina que elue em 4,1 minutos; Fase móvel MeOH/Tampão fosfato 80:20 (pH = 6,9), T = 40°C, vazão = 1,00mL min^{-1}. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800nm.

Analisando-se a **Figura 125A**, observa-se que houve a formação de 1 amina que foi identificada como 4-cloro-o-toluidina a qual elue em 4,1 minutos e foi confirmado pelo espectro UV-Vis, o qual esta apresentado na **Figura 125B** concordantes com o ensaio realizado com a ferro porfirina, com exceção do precursor para síntese de corantes Fast garnet gbc, como pode-se observar na **Figura 126**.

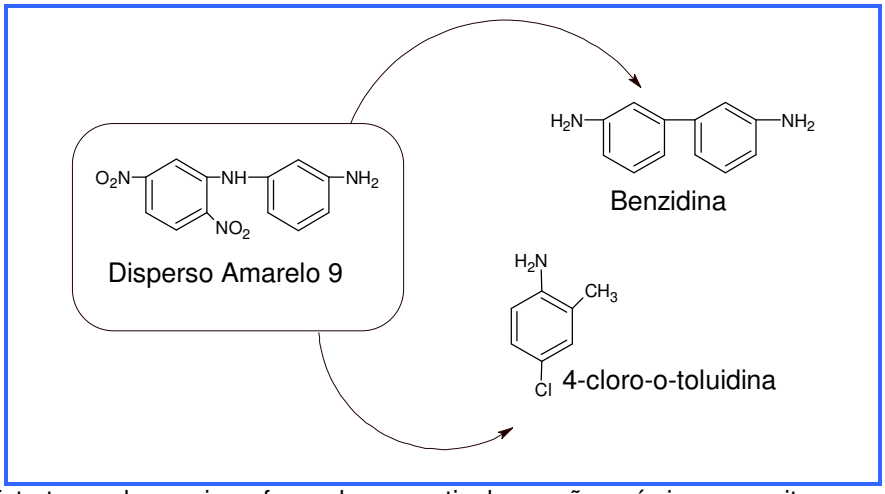


Figura 126: Estruturas das aminas formadas a partir da reação química com citocromo P-450 para o corante Disperso Amarelo 9.

Foi possível então calcular a concentração das aminas que foram formadas durante a oxidação catalisada pelo citocromo P-450. As concentrações estão representadas na **Tabela 27**.

Tabela 27: Aminas formadas a partir de oxidação catalisada pelo citocromo P-450 para o corante Disperso Amarelo 9.

Aminas	Inicio (ppm)	4h (ppm)	% em relação ao corante orginal
Benzidina	0	5,43	6,44
4-cloro-o-toluidina	0	7,45	10,3

Pode-se observar que houve formação de aminas em quantidades significativas formadas após a oxidatição catalisada pelo citocromo P-450. Essas resultados mostram o perigo da ingestão desses corantes pelo homem, pois esses produtos podem ser formados no fígado de mamíferos. E em adição a ocorrência de benzidina que é comprovadamente carcinogênicas em humanos. Os resultados estão resumidos na **Tabela 28**, para o corante Sudan III e na **Tabela 29**, para o corante Disperso Amarelo 9

Tabela 28: Subprodutos formados a partir dos métodos de degradação do corante Sudan III.

Oxidação Eletroquímica	Redução Eletroquímica	Redução Química	Oxidação Química por cloração	Cloração após Redução Química	Cloração após Eletrooxidação	Cloração após Eletroredução	Oxidação Química catalisada por FeTMPyP	Oxidação catalisada por ação do Citocromo P- 450
2-naftilamina	2,6-dimetilanilina	Anilina		Anilina	2-naftilamina	2-metoxi-5-metilanilina	4,4'-oxidianilina	4,4'-oxidianilina
4-aminobifenil	4,4'-oxidianilina			4-cloroanilina	4-cloroanilina		Nitrobenzeno	Nitrobenzeno
2-metoxi-5-metilanilina	o-toluidina				α,α,α-triclorobenzidina		2-nitroanisol	2-nitroanisol
Benzidina	Benzidina				3,3'-diclorobenzidina	3,3'-diclorobenzidina	3,3'-diclorobenzidina	3,3'-diclorobenzidina
4,4'-metileno-bis-2-metilanilina	4,4'-metileno-bis-2-metilanilina	o-toluidina		4-cloro-o-toluidina				
Fast garnet gbc (precursor)	4-aminobifenil				4,4'-metileno-bis-2-cloroanilina		Fast garnet gbc (precursor)	Fast garnet gbc (precursor)

Tabela 29: Subprodutos formados a partir dos métodos de degradação do corante Disperso Amarelo 9.

Oxidação Eletroquímica	Redução Eletroquímica	Redução Química	Oxidação Química por cloração	Cloração após Redução Química	Cloração após Eletrooxidação	Cloração após Eletroredução	Oxidação Química catalisada por FeTMPyP	Oxidação catalisada por ação do Citocromo P- 450
Anilina	2,4-diaminotoluidina	Anilina		Benzidina	Anilina	4,4'-oxidianilina	Benzidina	Benzidina
4,4'-oxidianilina	o-toluidina	o-toluidina		3,3'-diclorobenzidina	4,4'-oxidianilina		4-cloro-o-toluidina	
3,3'-dimetilbenzidina	2,6-dimetilanilina			4-cloroanilina	3,3'-dimetilbenzidina			
Fast garnet gbc (precursor)	2-nitroanisol	4,4'-metileno-bis-2-metilanilina		α,α,α-triclorobenzidina	Fast garnet gbc (precursor)	3,3'-diclorobenzidina	Fast garnet gbc (precursor)	4-cloro-o-toluidina
4,4'-metileno-bis-2-metilanilina	4-aminobifenil				4,4'-metileno-bis-2-metilanilina			

5. CONCLUSÃO

A análise dos subprodutos formados durante os três métodos de oxidação para o corante Sudan III, que são eletrooxidação, porfirinas e S9, indicam que a oxidação do corante via catálise da porfirina FeTMPyP produz os mesmos compostos presentes na oxidação pelo citocromo P-450, confirmando que a metodologia poderia ser utilizada como alternativa na mimetização do metabolização do corante Sudan III. Em adição pode-se verificar a presença de nitrobenzeno que é considerado altamente tóxico ao organismo e além dele o precursor de síntese (fast garnet) que tem grande potencial tóxico. A eletrooxidação produz subprodutos diferentes evidenciando que a rota da eletrooxidativa é diferente daquela observada pelos processos químicos.

Os subprodutos gerados a partir da redução eletroquímica são bem distintos com exceção apenas da o-toluidina que é comum aos dois. Comparando a oxidação e a redução eletroquímica observa-se que tem-se 3 subprodutos em comum, que são benzidina, 4,4'-metileno-bis-2-metilanilina e 4-aminobifenil, mostrando-se assim que o mecanismo de ambos os processos são até certo ponto semelhante.

Para os estudos utilizando a cloração, pode-se observar que clorando o corante in natura, não houve formação das aminas estudados em nível de detecção, embora quando este foi previamente eletrooxidado, eletroreduzido ou reduzido quimicamente houve uma facilitação de cloração dos compostos que já haviam sido formados anteriormente nos processos.

Já para o corante Disperso Amarelo 9 a analise dos subprodutos gerados pelos três métodos de oxidação, que são eletrooxidação, porfirinas e S9, indicam que oxidação do corante via catálise da porfirina FeTMPyP forma os mesmos subprodutos na oxidação pelo citocromo P-450, confirmando que metodologia poderia ser utilizada como alternativa na mimetização do corante Disperso Amarelo 9. Um fato preocupante no caso desse corante é a formação de benzidina, pois como a mesma é considerada carcinogênica ao homem e foi detectada após oxidação catalisada tanto pela ferroporfirina quanto pelo citocromo P-450 é um fato de grande importância pois esse

mecanismo mostra o que pode ocorrer quando algum mamífero e principalmente o homem entrar em contato com esse corante ou similar.

Os subprodutos gerados a partir da redução eletroquímica são bem distintos, sendo que somente a o-toluidina é comum em ambos os experimentos (redução eletroquímica e química). Comparando-se a oxidação e a redução não há nenhum subproduto em comum.

Para a oxidação química por cloração não identificou-se subprodutos formados, isso mostra que a estrutura química do corante é estável. Porém já os experimentos onde as amostras previamente eletrooxidadas ou reduzidas, além da amostra reduzida quimicamente, verificou-se a presença de algumas aminas cloradas, mostrando assim que o processo anterior a cloração facilita a cloração e isso é preocupante uma vez que esse método é utilizado comumente em estações de tratamento de água.

Como analise geral de todos os processos estudados no decorrer desse trabalho é a importância de conhecer os subprodutos que podem ser gerados tanto na biota aquática quanto no organismo de mamíferos em geral, o qual apresenta o citocromo P-450 e que foi mimetizado nesse estudo.

REFERÊNCIAS

1 ZOLLINGER, H. **Color chemistry**: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. 2nd ed. New York: VCH, 1991. p. 496.

2 ABRAHANT, E. N. **Dyes and their intermediates**. New Jersey: Edward Arnold, 1977.

3 ESTLANDER, T. Allergic dermatoses and respiratory-diseases from reactive dyes. **Contact Dermatitis**, v. 18, p. 290-297, 1988.

4 SACHER, F.; LENZ, S.; BRAUCH, H. Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v. 764, p. 85-93, 1997.

5 TERASHI, A.; HANADA, Y.; KIDO, A.; SHINOHARA, R. Determination of primary and secondary aliphatic amines in the environment as sulphonamide derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 503, p. 369-375, 1990.

6 PETERS, R. H. Textile chemistry. **Química Nova**, v. 45, p. 67-72, 1975.

7 ALCÂNTARA, M. R.; DALTIN, D. Textile chemistry. **Química Nova**, v. 19, p. 320-330, 1996.

8 KIRKLAND, D. J.; HENDERSON, L.; MARZIN, D.; MUELLER, L.; PARRY, J. M.; SPEIT, G.; TWEATS, D. J.; WILLIAMS, G. M. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 588, p. 88-105, 2005.

9 LYNCH, B. S.; DANIELS, J.; NESTMANN, E.; WILSON, R.; MUNRO, I.; SHARMA,

R.; GRABARZ, R.; DREASSLER, W. What does the clinician want to know from the toxicologist **The Toxicologist**, v. 42, p. 225, 1998.

10 LYNCH, B. S.; DELZELL, E. S.; BECHTEL, D. H. Toxicology review and risk assessment of resorcinol: thyroid effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p.198-210, 2002.

11 UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; RECH, C. M.; SATO, M. I. Z.; CLAXTON, L. D. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 54, p. 1589-1597, 2003.

12 UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H. S.; WARREN, S. H.; OLIVEIRA, D. P.; TERAO, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L. D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais river. **Chemosphere**, v. 60, p. 55-64, 2005.

13 UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; RECH, C. M.; SATO, M. I. Z.; CLAXTON, L. D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, v. 54, p. 1589-1597, 2004.

14 OLIVEIRA, P. A. C.; RECH, C. M.; ZANONI, M. V. B.; CLAXTON, L.; UMBUZEIRO, G. A. Mutagenic compounds generated from the chlorination of disperse azo-dyes and their presence in drinking water. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 6682-6689, 2006.

15 HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, v. 48, p. 520-522, 1994.

16 HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial-wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

17 JOHANSSON, S. L.; COHEN, S. M. Epidemiology and etiology of bladder cancer. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 13, p. 291-298, 1997.

18 RAJARAJESWARI, G. R. **Studies on advanced oxidation process for the treatment of textile dye bearing wastewater and recycling the treated water**. 2001. 296 f. Thesis (Doctor in Chemistry) - Department of Chemistry, Oxford University, London, 2001.

19 RALFII, F.; HALL, J. D.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by Clostridium species from the human intestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 897-901, 1997.

20 ZBAIDA, S. The mechanism of microsomal azoreduction-predictions based on electronic aspects of structure-activity-relationships. **Drug Metabolims Reviews**, v. 27, p. 497-516, 1995.

21 ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A.; FURLAN, M.; DUARTE, E. S.; GUARATINI, C. C. I.; FOGG, A. G. Determination of the vinylsulphone azo dye, remazol brilliant orange 3R, by cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 385, p. 385-392, 1999.

22 YOUNG, H. L.; SPYROS, G. P. Azo dyes in the wastewater. **Water Residual**, v. 38, p. 1838-1842, 2004.

23 ALLEN, J. L.; MEINERTZ, J. R.; GOFUS, J. E. Determination of malachite green and its leuco from in water. **Journal of AOAC International**, v. 75, p. 646-650, 1992.

24 CRAMER, G. M.; FORD, R. A. Determination of azo dyes in wastewater in the textile industry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 16, p. 255-260, 1976.

25 UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H.; WARREN, S. H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L. D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI disperse blue

291 using different protocols of the *Salmonella* assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

26 LIMA, R. O. A.; BAZO, A. P.; SALVADORI, D. M. F.; RECH, C. M.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A. Evaluation of level of DNA damage in blood leukocytes of non-diabetic and diabetic rat exposed to cigarette smoke. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, p. 53-60, 2007.

27 ZANONI, M. B. V.; MAZZO, T. M.; UMBUZEIRO, G. A.; SACZK, A. A. Analysis of aromatic amines in surface waters receiving wastewater from a textile industry by liquid chromatographic with electrochemical detection. **Analytical Letters**, v. 39, p. 2671-2685, 2006.

28 UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; SANCHEZ, P. S.; SATO, M. I. Z. The *Salmonella* mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20 year survey. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 491, p.119-126, 2001.

29 UMBUZEIRO, G. A., VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese ambiental**. Lisboa: ULBRA, 1987. Cap. 4, p. 81-112.

30 GAMBARRA NETO, F. F.; LIMA, R. S.; LIRA, W. S.; MARINO, G.; ARAUJO, M. C. U.; MEDEIROS, E. P.; NASCIMENTO, V. B. Biamperometric determination of tetracycline in pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 40, p. 3070-3079, 2007.

31 RUI, Y.; McDERMOTT, J.; BARKLIS, E.; WILKENS, S.; THOMPSON, D. H. Structural analysis of histidine tagged capsid proteins using Ni^{2+} chelating lipid monolayers. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 213, p. 36-37,1997.

32 OLIVEIRA, D. P.; CARNEIRO, P. A.; SAKAGAMI, M. K.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent-identification of the mutagenic components. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, p. 135-142, 2007.

33 ZEINER, M.; REZIC, I.; STEFFAN, I. Determination of allergenic and carcinogenic dyes. **Toxicology Letters**, v. 164, p. S184-186, 2006.

34 KIM, G.Y.; LEE, K. B.; CHO, S. H. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. Journal of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. **Journal of Hazardous Materials**, v. 126, p. 183-188, 2005.

35 MATSUO, A. Y. O.; GALLAGHER, E. P.; TRUTE, M.; STAPLETON, P. L.; LEVADO, R.; SCHLENK, D. Characterization of phase I biotransformation enzymes in coho salmon (Oncorhynchus kisutch). **Comparative Biochemistry and Physiology c-toxicology & Pharmacology**, v. 147, p. 78-84, 2008.

36 LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology c-Toxicology & Pharmacology**, v.120, p. 43-49, 1998.

37 KLEINOW, K. M.; MELANCON, M. J.; LECH, J. J. Biotransformation and induction implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. **Environmental Health Perspectives**, v. 71, p. 105-119, 1987.

38 MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, v. 10, p. 392-413, 2007.

39 KIM, D.; CRYLE, M. J.; DE VOSS, J. J.; MONTELLANO, P. R. O. Functional expression and characterization of cytochrome P450 52A21 from Candida albicans. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 464, p. 213-220, 2007.

40 MONTELLANO, P. R. O. Cytochrome P450: structure. **Mechanism and Biochemistry**, v. 3, p. 34-54, 2004.

41 DENISOV, I. G.; MAKRIS, T. M.; SLIGAR, S. G.; SCHICHTING, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 2253-2277, 2005.

42 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Diretriz 2004/21/CE - Corantes Azóicos - EU**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/Exigencias/corante/corante.asp>. Acesso em: 17 abr. 2008.

43 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO. **Normas técnicas para descartes de efluentes têxteis**. Disponível em: <http://www.abit.org.br>. Acesso em: 25 abr. 2008.

44 PIELESZ, A.; BARANOSWSKA, I.; RYBAK, A.; WLOCHOWICZ, A. Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 4247-4250, 2002.

45 GARRIGÓS, M. C.; RECHE, F.; MARÍN, M. L.; JIMÉNEZ, A. Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. **Journal of Chromatography**, v. 976, p. 309-317, 2002.

46 RAJESHWAR, K.; IBANEZ, J. G. **Environmental electrochemistry, fundamentals and applications in pollution abatement**. New York: Academic Press, 1997. v. 10.

47 GHERARDINI, L.; MICHAUD, P. A.; PANIZZA, M.; COMNINELLIS, C.; VATISTAS, N. Electrochemical oxidation of 4-chlorophenol for wastewater treatment. Definition of normalized current efficiency. **Journal Electrochemistry Society**, v. 148, p. D78-D85, 2001.

48 RODRIGO, M. A.; MICHAUD, P. A.; DUO, I.; PANIZZA, M.; CERISOLA, G.; COMNINELLIS, C. Oxidation of 4-chlorophenol at boron doped diamond electrodes for wastewater treatment. **Journal Electrochemistry Socity**, v. 148, p. D60-D64, 2001.

49 CANIZARES, P.; SAEZ, C.; LOBATO, J.; RODRIGO, M. A. Electrochemical treatment of 2,4-dinitrophenol aqueous wastes using boron-doped diamond anodes. **Electrochimical Acta**, v. 49, p. 4641-4650, 2004.

50 BONFATTI, F.; FERRO, S.; LAVEZZO, F.; MALACARNE, M.; LODI, G.; BATTISTI, A. de. Electrochemical incineration of glucose as a model organic substrate. Role of active chlorine mediation. **Journal Electrochemistry Society**, v. 147, p. 592-596, 1999.

51 PANIZZA, M.; BOCCA, C.; CERISOLA, G. Electrochemical treatment of wastewater containing poliaromatic organic pollutants. **Water Research**, v. 34, p. 2601-2605, 2000.

52 INIESTA, J.; GARCIA, J. G.; EXPOSITO, E.; MONTIEL, V.; ALDAZ, A. Influence of chloride ion on electrochemical degradation of phenol in alkaline medium using bismuth doped and pure PbO2 anodes. **Water Research**, p. 3291-3300, 2001.

53 PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Electrochemical oxidation of 2-naphthol with *in situ* electrogenerated active chlorine. **Electrochimical Acta**, v. 48, p. 1515-1519, 2003.

54 PANIZZA, M.; LUCCHI, M. de; CERISOLA, G. Electrochemical degradation of anionic surfactants. **Journal Application Electrochemistry**, v. 35, p. 357-361, 2005.

55 SZPYRKOWICZ, L.; JUZZOLINO, C.; KAUL, S. N.; DANIELE, S.; FAVERI, M. D. de. Electrochemical oxidation of dyeing baths bearing disperses dyes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 3241-3248, 2000.

56 SANROMAN, M. A.; PAZOS, M.; RICART, M. T.; CAMESELLE, C. Electrochemical decolourisation of structurally different dyes. **Chemosphere**, v. 57, p. 233-239, 2004.

57 RIVERA, M. C.; JIMENEZ, M. M. D.; GONZALEZ, M. P. E. Degradation of the textile dyes basic yellow 28 and reactive black 5 using diamond and metal alloys electrodes. **Chemosphere**, v. 55, p. 1-10, 2004.

58 CHEN, X.; CHEN, G.; YUE, P. L. Anodic oxidation of dyes at novel Ti/B diamond electrodes. **Chemical Engineering Society**, v. 58, p. 995-1001, 2003.

59 FERNANDES, A.; MORAO, A.; MAGRINHO, M.; GONÇALVES, I. Electrochemical degradation of C.I. acid orange 7. **Dyes and Pigments**, v. 61, p. 287-296, 2004.

60 LIN, S. H.; PENG, C. F. Treatment of textile wastewater by electrochemical method. **Water Research**, v. 28, p. 277-282, 1994.

61 OSUTVEREN, U. B.; KOPARAL, S. Color removal from textile effluents by electrochemical destruction. **Journal Environmental Science Health**, v. 29, p.1-16, 1994.

62 YOUSUF, M.; MOLLAH, A.; SCHENNACH, R.; PARGA, J. R.; COCKE, D. L.; HAZARD, J. Electrocoagulation (EC)-science and applications. **Material**, v. 84, p. 29-41, 2001.

63 DU, M. J.; HAN, X. G.; ZHOU, Z. H.; WU, S. G. Determination of Sudan I in hot chili powder by using an activated glassy carbon electrode. **Food Chemical**, v. 105, p. 883-888, 2007.

64 NAM, W.; PARK, S. E.; LIM, I. K.; LIM, M. H.; HONG, J.; KIM, J. First direct evidence for stereospecific olefin epoxidation and alkane hydroxylation by an

oxoiron(IV) porphyrin complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 14674-14675, 2003.

65 SCHIAVON, M. A.; IWAMOTO, L. S.; FERREIRA, A. G.; IAMAMOTO, Y.; ZANONI, M. V. B.; ASSIS, M. D. Synthesis and characterization of a novel series of meso (nitrophenyl) and meso (carboxyphenyl) substituted porphyrins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 458-466, 2000.

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

67 MacLEOD, T. C. O.; BARROS, V. P.; FARIA, A. L.; SCHIAVON, M. A.; YOSHIDA, I. V. P.; QUEIROZ, M. E. C.; ASSIS, M. D. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 273, p. 259-264, 2007.

68 VINHADO, F. S.; MARTINS, P. R.; MASSON, A. P.; ABREU, D. G.; VIDOTO, E. A.; NASCIMENTO, O. R.; IAMAMOTO, Y. Supported iron(III)porphyrins pentafluorophenyl-derivatives as catalysts in epoxidation reactions by H_2O_2: the role of the silica-support and sulfonatophenyl residues in the activation of the peroxidic bond. **Journal of Molecular Catalysis**, v.188, p. 141-151, 2002.

69 ARMIJO, F.; GOYA, M. C.; CANALES, M. R.; AREVALO, M. J.; AGUIRRE, M. J. Electrocatalytic oxidation of nitrite to nitrate mediated by Fe(III) poly-3-aminophenyl porphyrin grown on five different electrode surfaces. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 268, p.148-154, 2007.

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

71 GROVES, J. T.; NEMO, T. E.; MYERS, R. S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes oxygen transfer from iodosylbenzene. **Journal of the American Chemical Society**, v.101, p.1032-1033, 1979.

72 MEUNIER, B. Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. **Chemical Reviews**, v. 92, p. 1411-1456, 1992.

73 IWANEJKO, R.; BATTIONI, P.; MANSUY, D.; MIODNICKA, T. Reactivity of polyhalogenated and zeolite encapsulated metalloporphyrins in oxidation with dioxygen. **Journal of Molecular Catalysis a-Chemical**, v. 109, p. 91-98, 1996.

74 BATTIONI, P.; BARTOLI, J. F.; MANSUY, D.; BYUN, Y. S.; TRAYLOR, T. G. Manganese porphyrins covalently bound to silica and montmorillonite K10 as efficient catalysts for alkene and alkane oxidation by hydrogen peroxide. **Journal of Molecular Catalysis a-Chemical**, v.113, p. 343-353, 1996.

75 GROSS, Z.; SIMKHOVICH, L. Hydroxylation of simple alkanes by iodosylbenzene is catalyzed more efficiently by second than by third generation iron(III) porphyrins. **Tetrahedron Letters**, v. *39*, p. 8171, 1998.

76 GUEDES, A. A.; SMITH, J. R. L.; NASCIMENTO, O. R.; COSTA, D. F.; ASSIS, M. D. Catalytic activity of halogenated iron porphyrins in alkene and alkane oxidations by iodosylbenzene and hydrogen peroxide. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 835-843, 2005.

77 CHORGHADE, M. S.; HILL, D. R.; LEE, E. C.; PARIZA, R. J.; DOLPHIN, D. H.; HINO, F.; ZHANG, L. Y. Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 systems. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, p. 753-756, 1996.

78 VIDAL, M.; BONNAFOUS, M.; DEFRANCE, S.; LOISEAU, P.; BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Model systems for oxidative drug-metabolism studies-catalytic behavior of water-soluble metalloporphyrins depends on both the intrinsic robustness

of the catalyst and the nature of substrates. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 21, p. 811-817,1993.

79 BERNADOU, J.; BONNAFOUS, M.; LABAT, G.; LOISEAU, P.; MEUNIER, B. Model systems for metabolism studies-biomimetic oxidation of acetaminophen and ellipticine derivatives with water-soluble metalloporphyrins associated to potassium monopersulfate. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 19, p. 360-365, 1991.

80 KOMURO, M.; HIGUCHI, T.; HIROBE, M. Application of chemical P-450 model systems to studies on drug metabolism .10. Novel hydroxylactonization of gamma, delta and beta, gamma- unsaturated carboxylic acids with an iron porphyrin-iodosylbenzene system. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, v. 18, p. 2309-2313,1996.

81 MELO, A. J. B.; IAMAMOTO, Y.; MAESTRIN, A. P. J.; SMITH, J. R. L.; SANTOS, M. D.; LOPES, N. P.; BONATO, P. S. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphynins. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, v. 226, p. 23-31, 2005.

82 FARIA, A. L.; BARROS, V. P.; QUEIROZ, M. E. C; LEOD, M, ASSIS, M. D. Primidone oxidation catalyzed by metalloporphyrins and Jacobsen catalyst T.C.O. **Journal of Molecular Catalysis A**, v. 296, p. 54-60, 2008.

83 HAGE, R.; IBURG, J.; KERSCHNER, J.; KOEK, J.; LEMPERS, L.; MARTENS, R.; RACHERLA, U.; RUSSELL, S.; SWARTHOFF, T.; VAN VLIET, M.; WARNAAR, J.; VAN DER WOLF, L.; KRIJNEN, B. Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching. **Nature**, v. *369*, p. 637-639, 1994.

84 GILBERT, B. C.; SMITH, J. R. L.; NEWTON, M. S.; OAKES, J.; PONSI PRATS, R. Azo dye oxidation with hydrogen peroxide catalysed by manganese 1,4,7-triazacyclononane complexes in aqueous solution. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 1568-1777, 2003.

85 SULAKOVA, R.; HRDINA, R.; SOARES, G. M. B. Oxidation of azo textile soluble dyes with hydrogen peroxide in the presence of Cu(II) chitosan heterogeneous catalysts. **Dyes and Pigments**, v. 73, 19-24, 2007.

86 ARAVINDHAN, R.; FATHIMA, N. N.; RAO, J. R.; NAIR, B. U. Wet oxidation of acid brown dye by hydrogen peroxide using heterogeneous catalyst Mn-salen-Y zeolite: a potential catalyst. **Journal of Hazardous Materials**, v.138, p. 152-159, 2006.

87 NAMBOODRI, C. G.; WALSH, W. K. Decolorizing spent dyebath with hot peroxide. **American Dyestelly Research**, v. 84, p. 86-95, 1995.

88 NANGO, M.; IWASAKI, T.; TAKEUCHI, Y.; KURONO, Y.; TOKUDA, J.; OURA, R. Peroxide decoloration of azo dyes catalyzed by polyethylene glycol-linked manganese halogenated porphyrins. **Langmuir**, v. 14, p. 3272-3278, 1998.

89 WEISBURGER, J. H. A perspective on the history and significance of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human health. **Mutation Research**, v. 376, p. 261-266, 1997.

90 CHUNG, K. T.; CERNIGLIAB, C. E. Mutagenicity of azo dyes: structure activity relationships. **Mutation Research Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, p. 201-220, 1992.

91 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Emergency planning and community right-to-know**: section 313, list of toxic chemicals. Cincinnati, 2001.

92 ECOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ASSOCIATION OF DYES AND ORGANIC PIGMENTS MANUFACTURERS. **Information on the 19th amendment of the restrictions on the marketing and use of certain azo colourants**. New York, 2003.

93 INSTITUTE OF AMERICAN IN THE RESEARCH OF CANCER. **Overall evaluations of carcinogenity to humans**. New York, 2003. v. 1-82.

94 PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 61, p. 121-139, 2004.

95 VENKATARAMAN, K. The chemistry of synthetic dyes the reactive dyes. **Academic Press European Commission**, v. 15, p. L243-L245, 2002.

96 EUROPEN COMMISSION. **Offer Journal Europe Communication**. London, 2002. v. 15, p. L243.

97 CLAYSON, D. B. **Chemical carcinogenesis**. London: Little Brown, 1962. v. 32, p. 65-76.

98 SABBIONI, G.; RICHTER, E. Aromatic amines, nitroarenes, and heterocyclic aromatic amines. In: MARQUARDT, H.; SCHAFER, S. G.; McCLELLAN, R.; WELSCH, F. **Toxicology**. New Jersey: Elsivier, 1990. p. 729-741.

99 FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. **Voluntary filing of cosmetic product ingredient composition statements (21 CFR 720)**. Washington, D.C., 2002.

100 YU, M. C.; ROSS, R. K. Carcinoma of the bladder. In: BRADY, L. W. **Carcinoma of the bladder**: innovations in management. New York: Springer, 1998. p. 1-13.

101 PATRIANAKOS, C.; HOFFMANN, D. Chemical studies on tobaccosmoke. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke. **Journal Analytical Toxicologic**, v. 3, p. 150-154, 1979.

102 SUGIMURA, F. History, present and future of heterocyclic amines, cooked food mutagens. In: ADAMSON, R. H.; GUSTAFSSON, N.; ITO, M.; NAGAO, T.; SUGIMURA, K.; WAKABAYASHI, Y.; YAMAZOE, R. (ED.). **Heterocyclic amines**:

possible human carcinogens. New York: Princeton Scientific Publishing, 1995. p. 214-231.

103 AMES, B. N.; GURNEY, E. G.; MILLER, J. A.; BARTSCH, H. Carcinogens as framshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, p. 3128-3132, 1972.

104 SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 387-395, 2000.

105 NAGAO, M.; HONDA, M.; SEINO, Y.; KAWACHI, T.; SUGIMURA, T. Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. **Cancer Letters**, v. 2, p. 221-226, 1977.

106 WEISBURGER, J. H. Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. **Journal American Dietetic Association**, v. 97, p. S16-S23, 1997.

107 TIEMERSMA, E. W.; KAMPMAN, E.; BAS BUENO DE MESQUITA, H.; BUNSCHOTEN, P.; VAN SCHOTHORST, E. M.; KOK, F. J.; KROMHOUT, D. Meat consumption, cigarette smoking, and genetic susceptibility in the etiology of colorectal cancer: results from a Dutch prospective study. **Cancer Causes Control**, v. 13, p. 383-393, 2002.

108 VARNEY, M. S.; PRESON, M. R. Measurement of trace aromatic amines in seawater using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 348, p. 265-274, 1985.

109 SCHIMIDT, T. C.; LESS, M.; HAAS, R.; LOW, E. V.; STEINBACH, K. Determination of aromatic amines in ground and waste water by two new derivatization methods. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 74, p. 25-41, 1999.

110 CHANG, W. Y.; SUNG, Y. H.; HUANG, S. D. Analysis of carcinogenic amines in water samples by solid-phase micro- extraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 495, p. 109-122, 2003.

111 CHEY, W. M.; ADAMS, R. N. Anodic differential pulse voltammetry of aromatic amines and phenols at trace levels. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 75, p. 731-738, 1977.

112 VYTRAS, K.; KALOUS, J.; KALÁBOVÁ, A.; REMES, M. Ion-selective electrodes in titrations involving azo-coupling reactions. **Analytica Chimica Acta**, v. 141, p. 163-171, 1982.

113 NORWITZ, G.; KELIHER, P. N. Continued investigation of the diazotization and coupling spectrophotometric technique for the determination of aromatic amines with 8-amino-1-hydroxynaphtalene-3,6-disulphonic acid and N-1-naphtyethylene diamine as coupling agents. **Talanta**, v. 33, p. 311-314, 1986.

114 VERMA, K. K.; SANGHI, S. K.; JAIN, A. Spectrophotometric determination of primary aromatic amines with 4-N-methylaminophenol and 2-iodylbenzoate. **Talanta**, v. 35, p. 409-411, 1988.

115 ZATAR, N. A.; ABU-ZUHRI, A. Z.; ABU-SHAWEEH, A. A. Spectrophotometric determination of some aromatic amines. **Talanta**, v. 47, p. 883-890, 1998.

116 FRAC, J.; KOUDELKOVÁ, V. Thin layer chromatography of aromatic amines and their derivatives after reactions with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. **Journal of Chromatography A**, v. 170, p. 89-97, 1979.

117 CHIAVARI, G.; GIUMANINI, A. G. Gas chromatographic analysis of aromatic amines as N-permethylated derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 206, p. 555-561, 1981.

118 SKARPING, G.; RENMAN, L.; DALENE, M. Traces analysis of amines an isobyantes using glass capillary gas chromatography and selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 270, p. 207-218, 1983.

119 BJÖRKQVIST, B. Separation and determination of aliphatic and aromatic amines by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 204, p. 109-114, 1981.

120 ZHU, L.; TAY, C. B.; LEE, H. K. Liquid-liquid micro-extraction of aromatic amines from water samples combined with high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 963 p. 231-237, 2002.

121 ASTHANA, A.; BOSE, D.; DURGBANSHI, A.; SANGHI, S. K.; KOK, W. T. Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with electrochemical and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 895, p.197-203, 2000.

122 SHIN, D. C.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A.; MUCK, A.; CHEN, G.; WANG, J. Microchip capillary electrophoresis with a boron doped diamond electrochemical detection for analysis of aromatic amines. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3017-3023, 2004.

123 HUANG, X. J.; YOU, T. Y.; YANG, X. R.; WANG, E. K. End column electrochemical detection for aromatic amines with high performance capillary electrophoresis. **Electroanalysis**, v. 11, p. 969-972, 1999.

124 CHUNG, K. T.; STEVENS, S. E.; CERNIGLIA, C. E. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 18, p.175-190,1992.

125 LEVINE, W. G. Metabolism of azo dyes-implication for detoxication and activation. **Drug Metabolism Reviews**, v. 23, p. 253-309, 1991.

126 SAX, N. I. **Cancer causing chemicals**. Barcelona: Van Nostrand Reinhold, p. 457-459, 1986.

127 PÜNTENER, A.; MÄUSEZAHL, D.; PAGE, C. How to test for benzidine dyes in dye mixtures. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v.77, p. 1-2, 1993.

128 CIONI, F.; BARTOLUCCI, G.; PIERACCINI, G.; MELONI, S.; MONETI, G. Development of a solid phase microextraction method for detection of the use of banned azo dyes in coloured textiles and leather. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, p. 1833-1837, 1999.

129 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods**: fundamentals and applications. New York: John Wiley & Sons, 1970. p. 718.

130 FRY, A. J. **Synthetic organic electrochemistry**. New York**:** Harper & Row, 1972. p. 336.

6. APÊNDICE

6.1. CURVAS ANALÍTICAS DAS AMINAS

Curvas Analíticas das Aminas estudadas neste trabalho.

1 - Benzidina

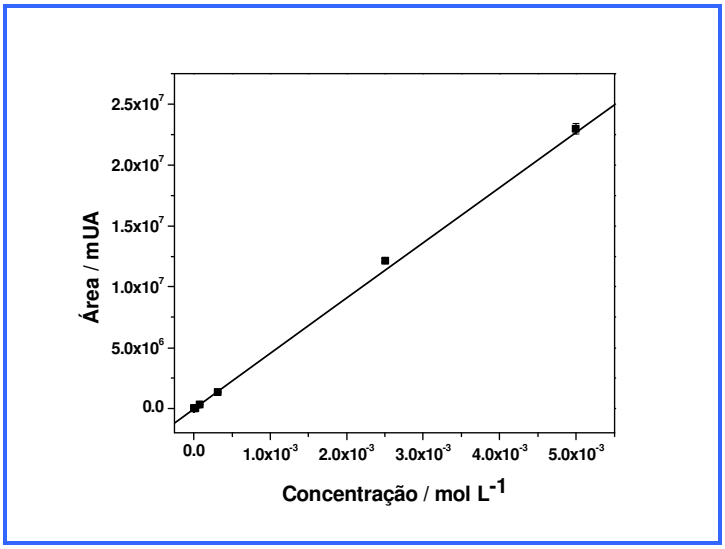


Figura 127: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de benzidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

2 - o-toluidina

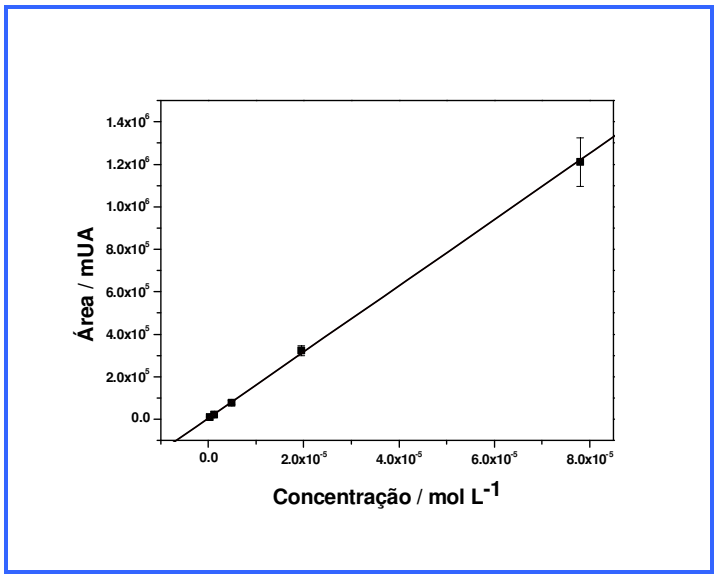


Figura 128: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de o-toluidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

3 - 3,3-diclorobenzidina

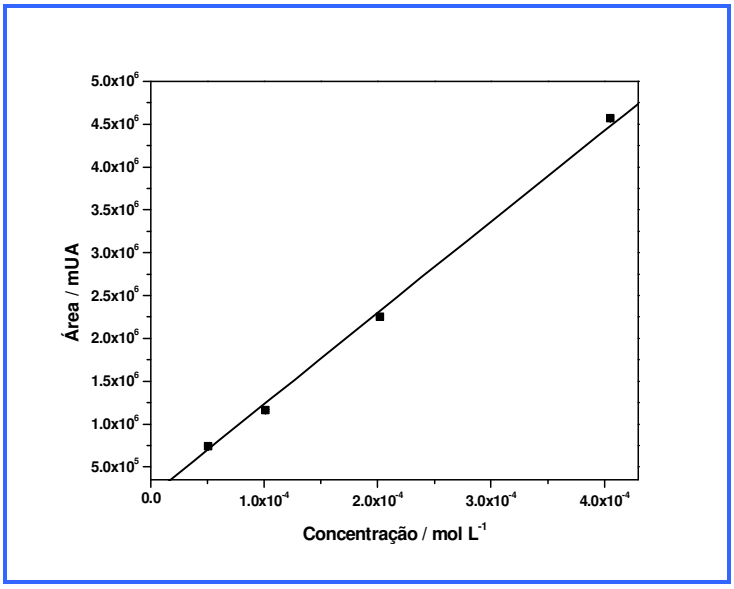


Figura 129: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 3,3'-diclorobenzidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

4- 2,4-diaminotoluidina

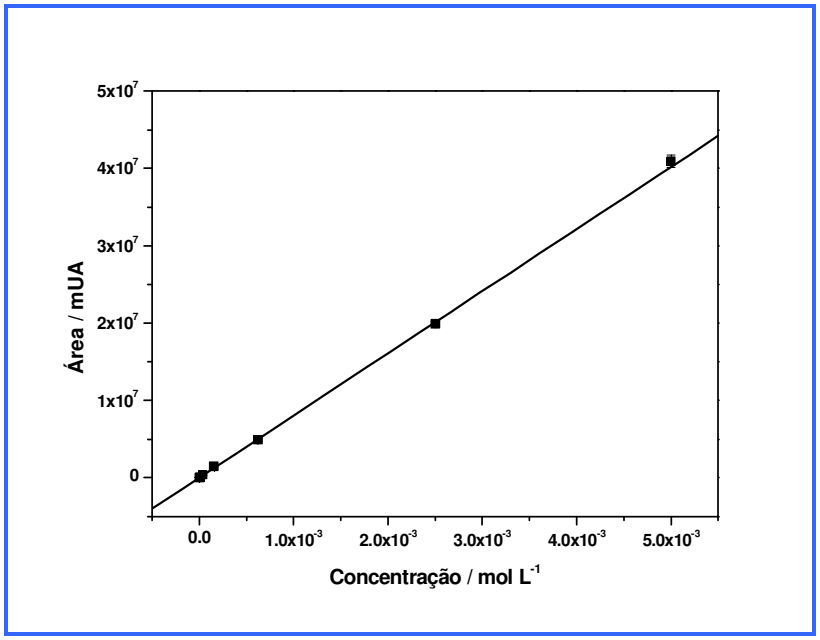


Figura 130: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 2,4-diaminotoluidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

5 - 4,4'-diaminobifenilmetano

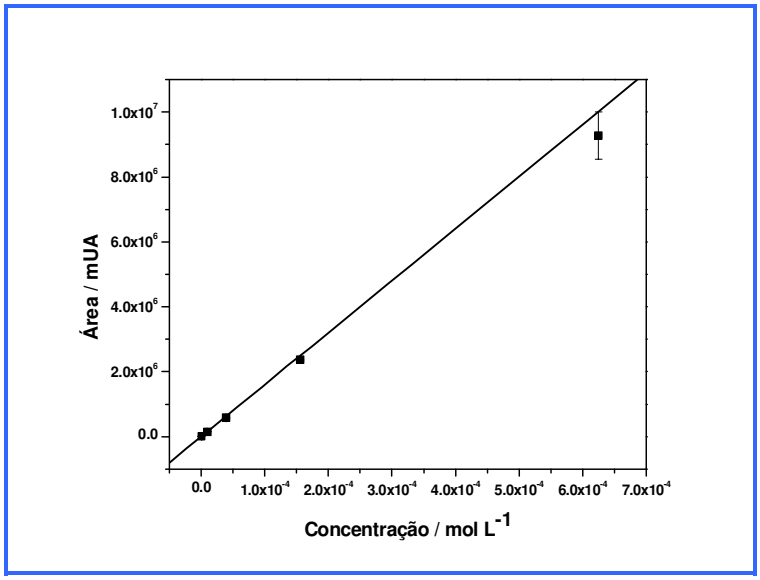


Figura 131: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 4,4'-diaminobifenilmetano solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

6 - 4-cloro-o-toluidina

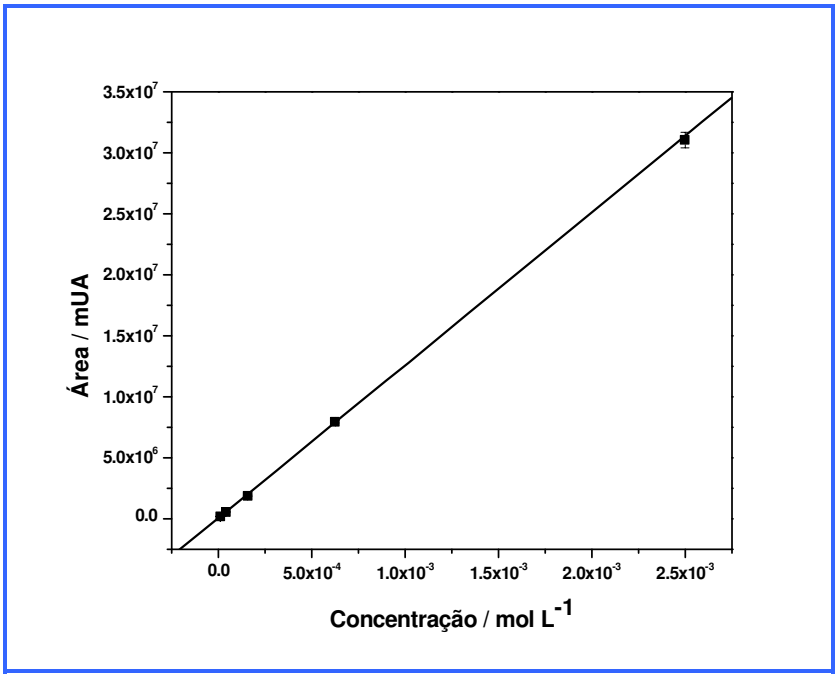


Figura 132: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 4-cloro-o-toluidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

7 - 4,4metileno-bis-2-cloroanilina

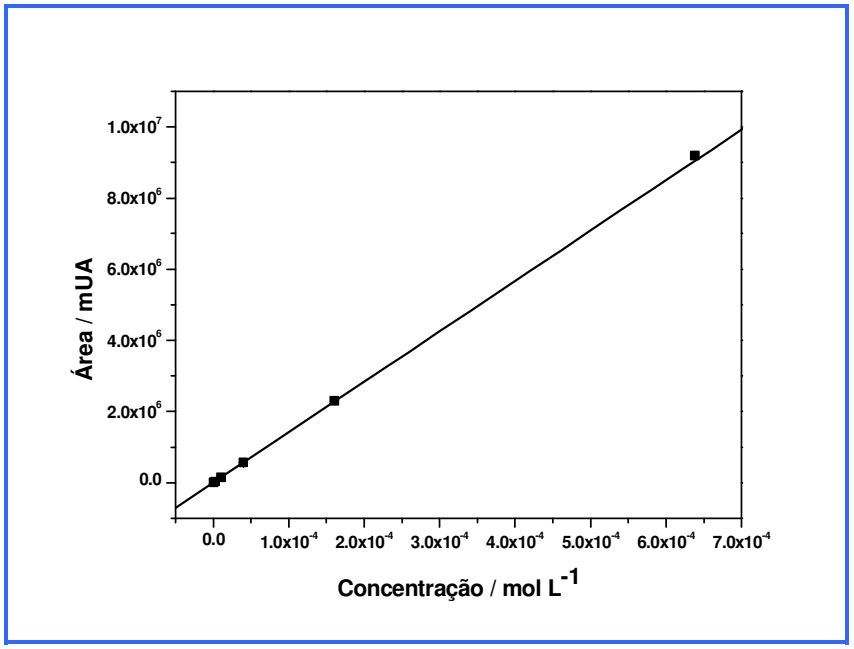


Figura 133: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 4,4metileno-bis-2-cloroanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

8 - 2-naftilamina

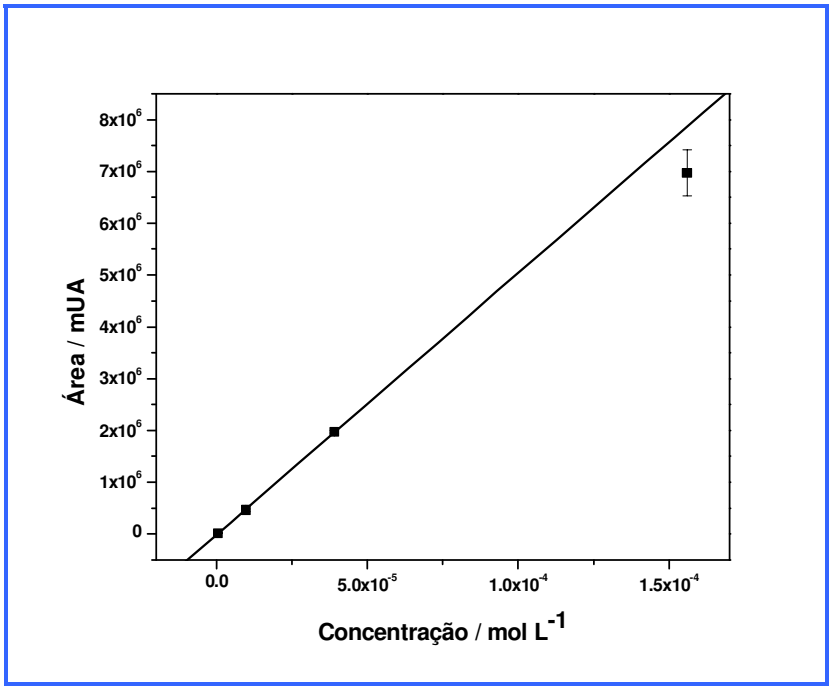


Figura 134: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 2-naftilamina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

9 - 4,4-oxidianilina

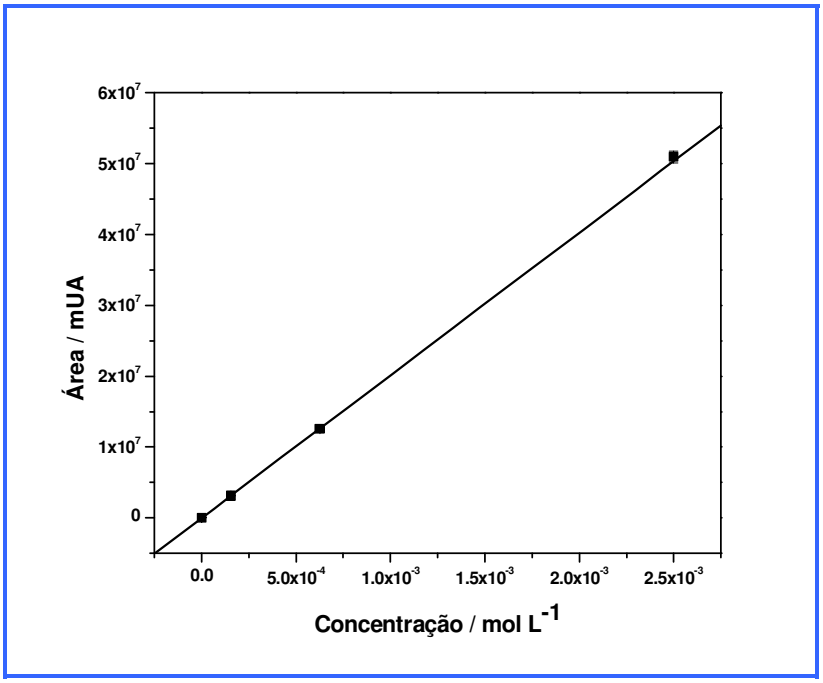


Figura 135: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 4,4-oxidianilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

10 - 2-nitroanisol

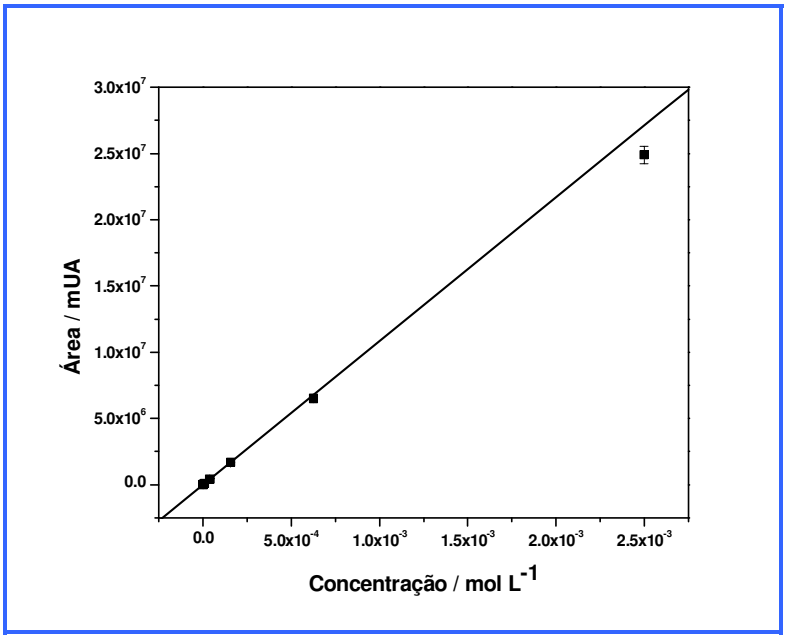


Figura 136: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 2-nitroanisol solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

11- 2-isopropil-3-metoxipirazina

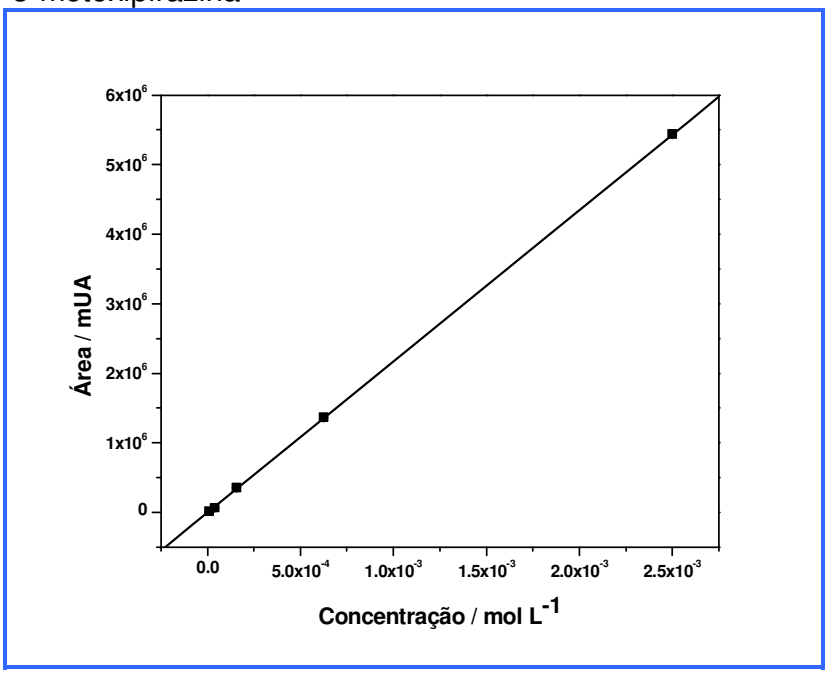


Figura 137: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 2-isopropil-3-metoxipirazina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

`

12 - 2-isobutil-3-metoxipirazina

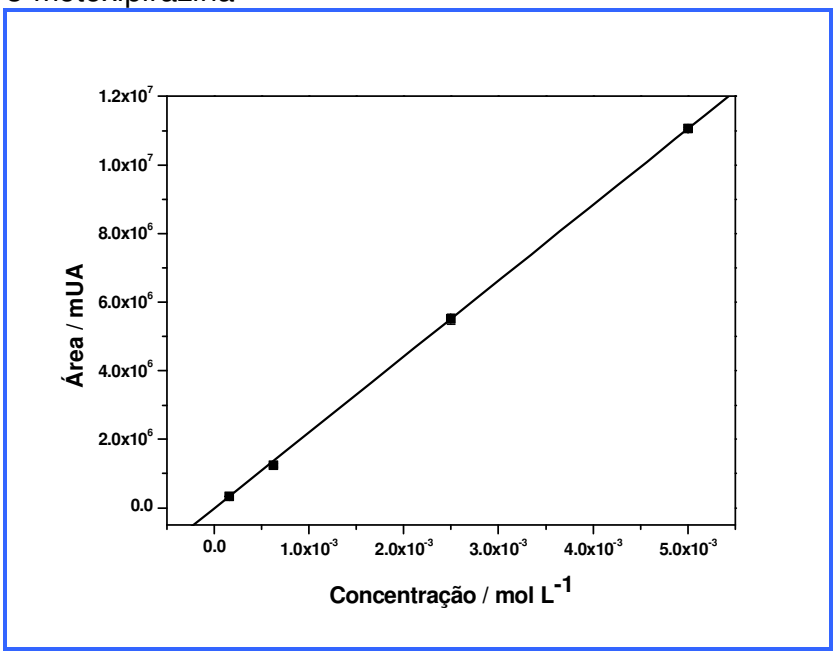


Figura 138: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 2-isobutil-3-metoxipirazina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

13 - α,α,α-triclorotoluidina

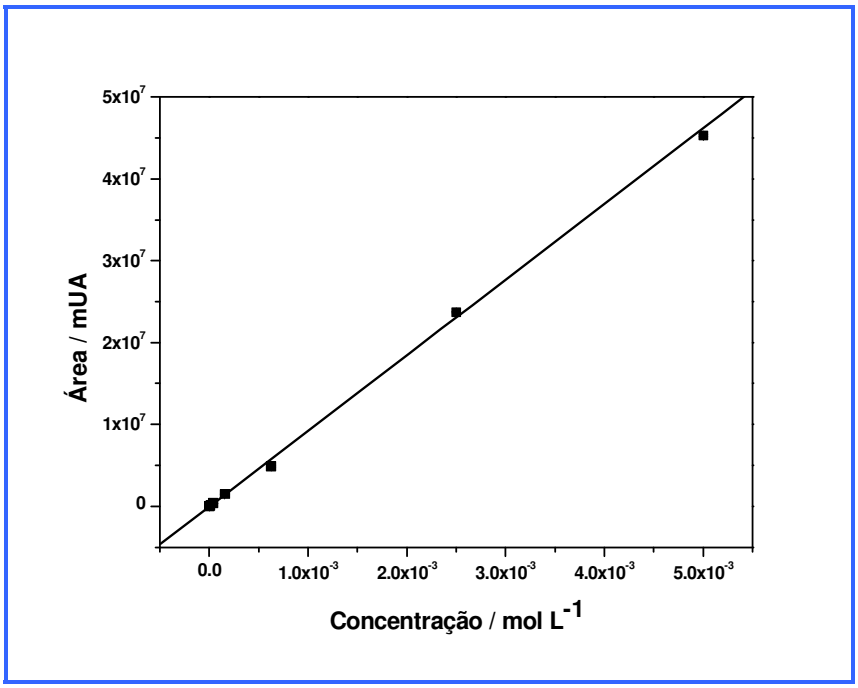


Figura 139: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de α,α,α-triclorotoluidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

14 - 2,6-dimetilanilina

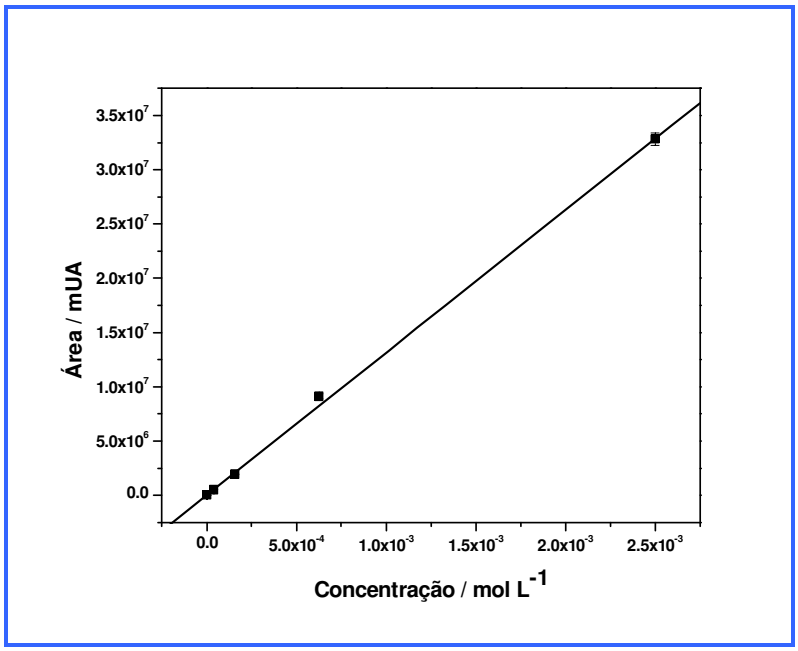


Figura 140: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 2,6-dimetilanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

15 - o-anisidina

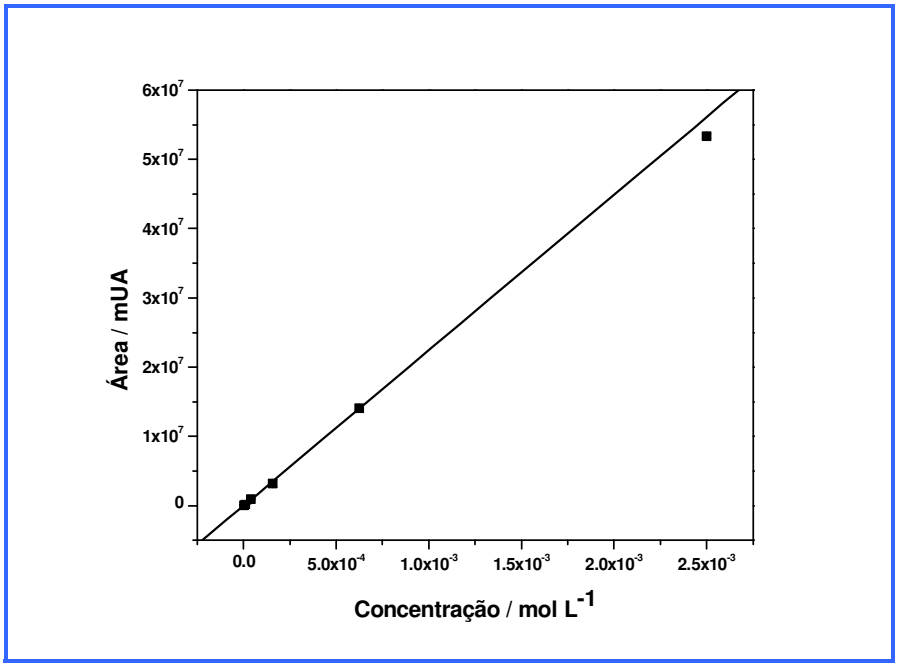


Figura 141: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de o-anisidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

16 - o-dianisidina

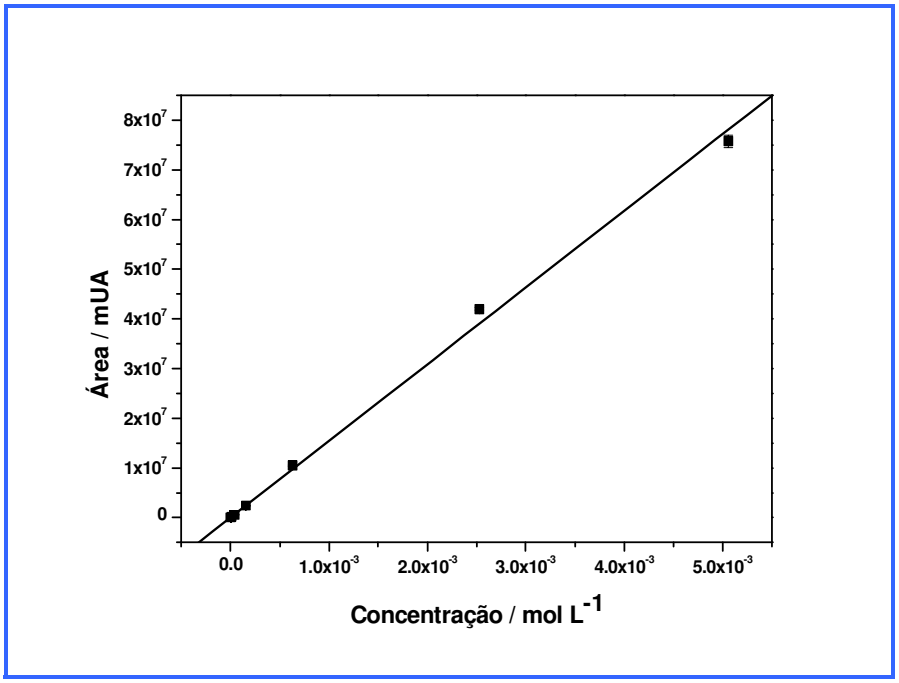


Figura 142: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de o-anisidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

17 - 2-metoxi-5-metilanilina

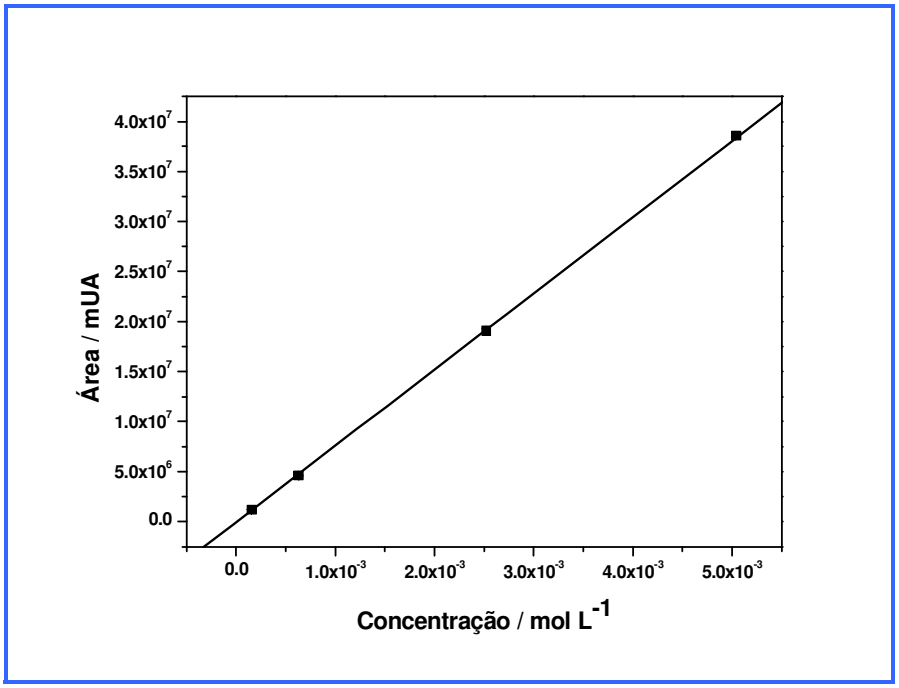


Figura 143: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 2-metoxi-5-metilanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

18 - 4-cloroanilina

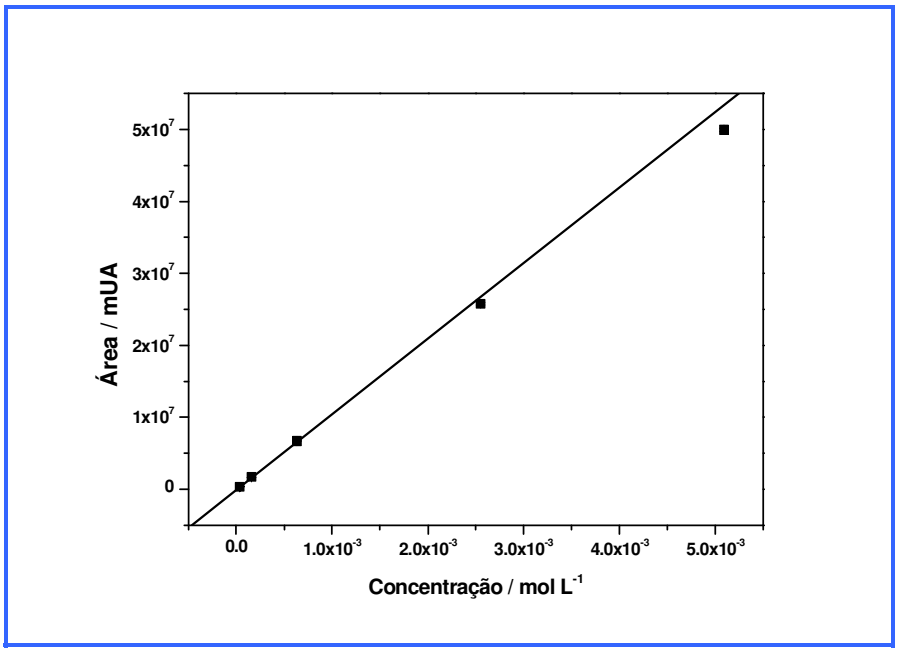


Figura 144: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 4-cloroanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

19 - 4,4'-metilene-bis-2-metilanilina

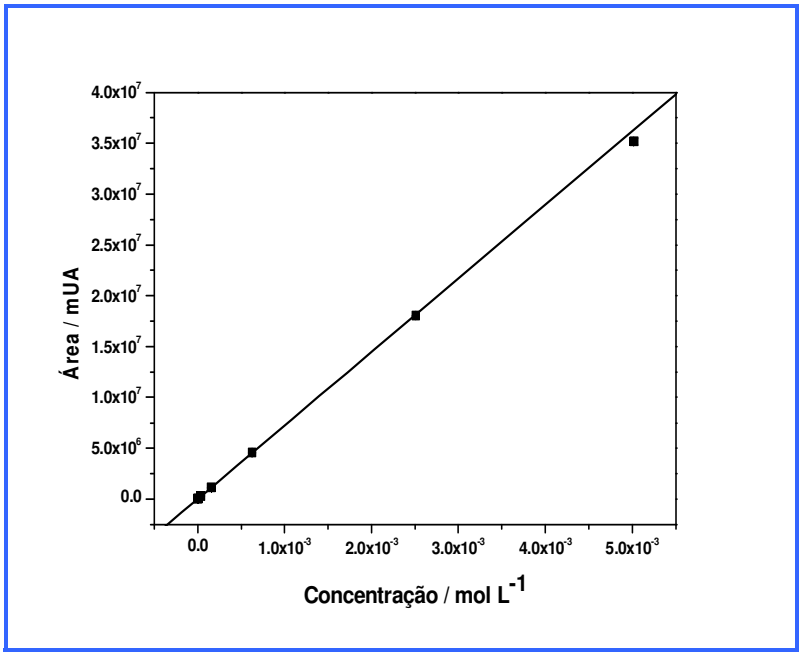


Figura 145: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 4,4'-metilene-bis-2-metilanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

20 - Fast garnet gbc

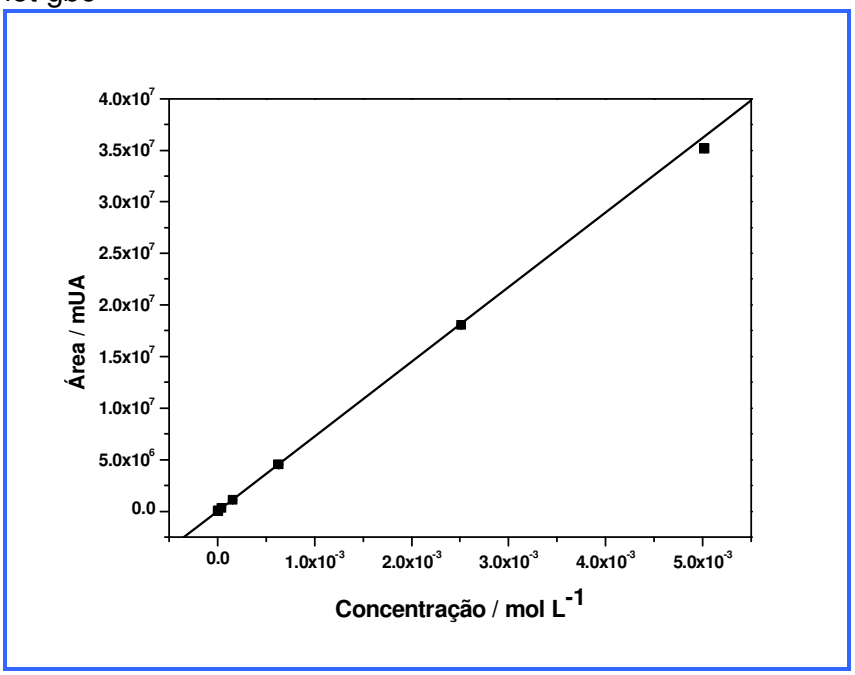


Figura 146: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de Fast garnet gbc solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

21 – Nitrobenzeno

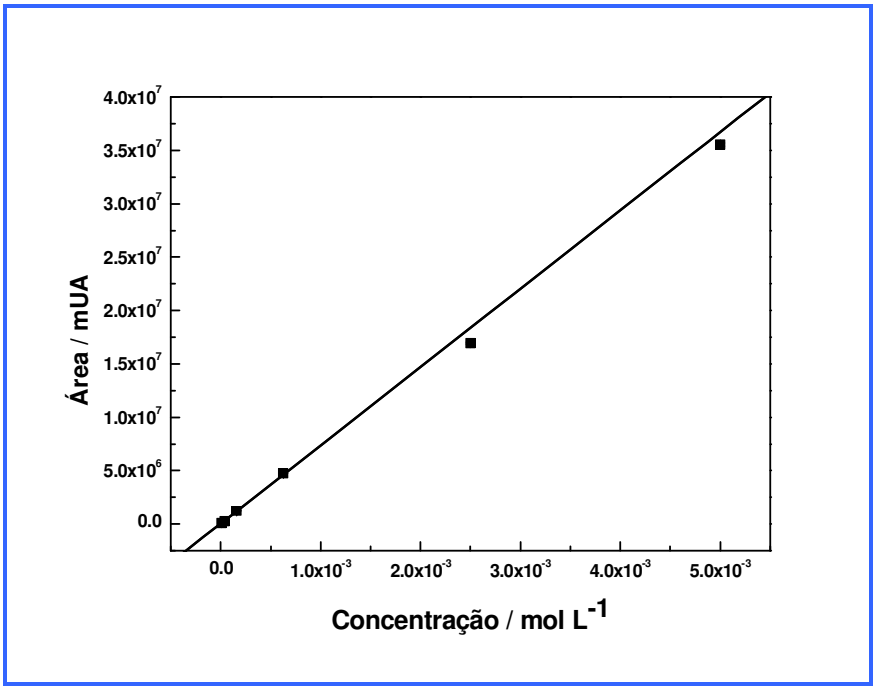


Figura 147: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de Nitrobenzeno solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

22 - 3,3-dimetilbenzidina

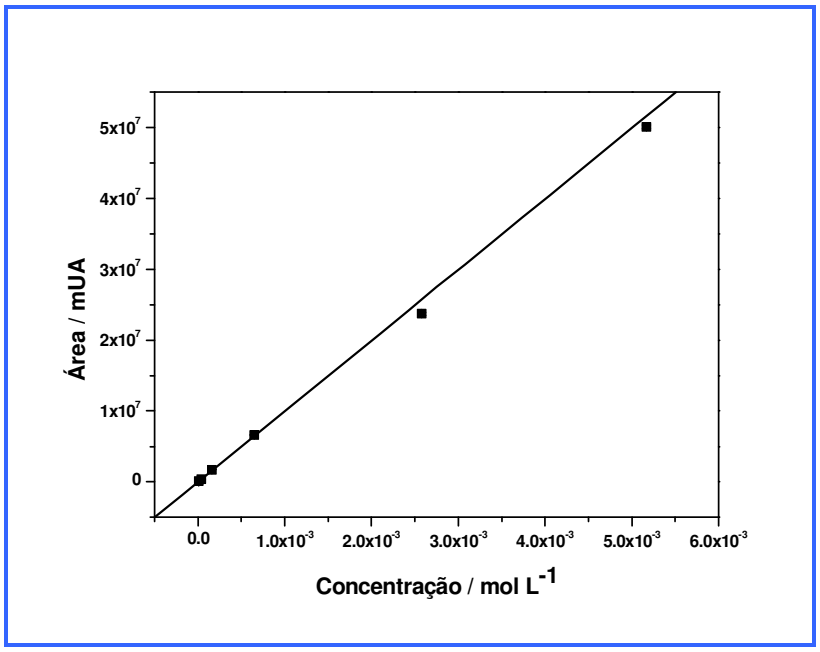


Figura 148: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 3,3-dimetilbenzidina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

23 – Anilina

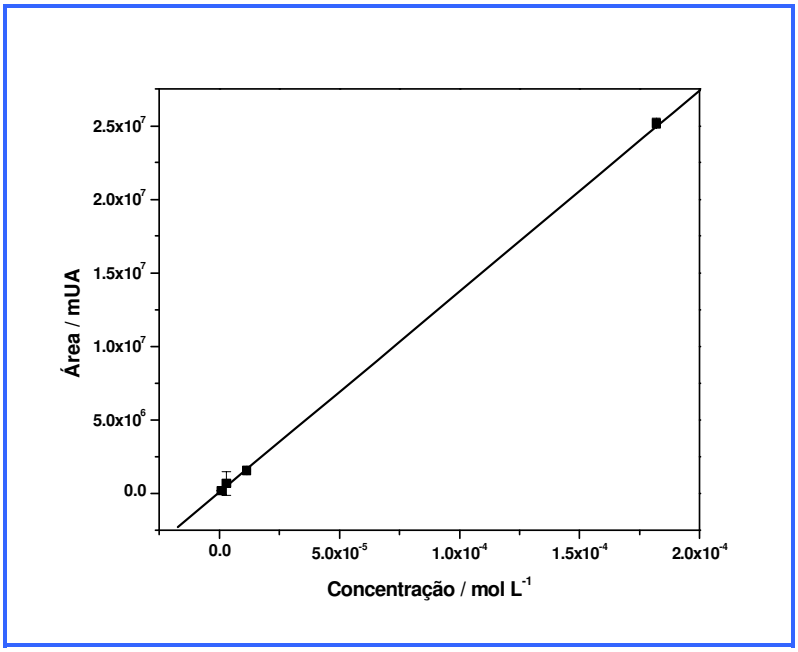


Figura 149: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de Anilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

24 - 2-cloro-4-nitroanilina

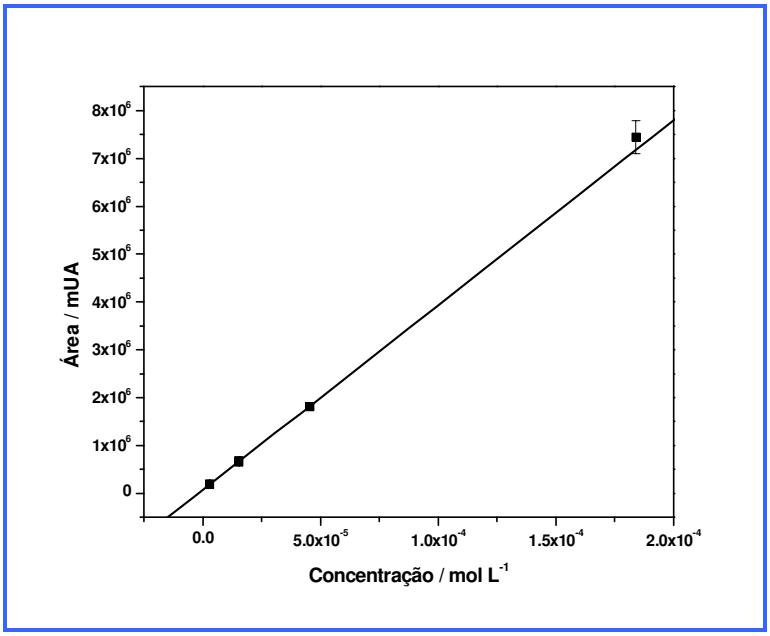


Figura 150: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 2-cloro-4-nitroanilina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.

25 - 4-aminobifenil

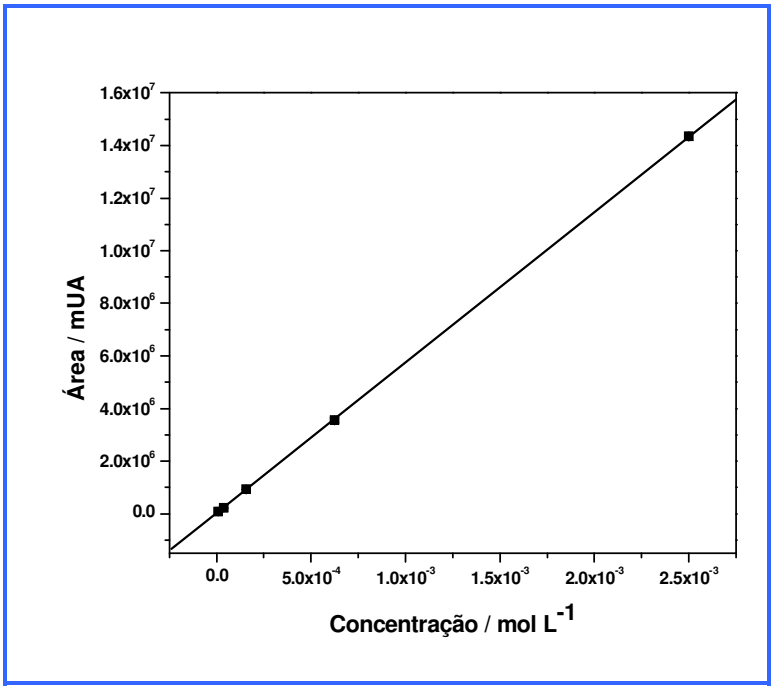


Figura 151: Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 µl da solução padrão de 4-aminobifenil solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80/20, T = 40°C, fluxo = 1mL min^{-1}, e fase estacionária C18.