

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Thiago Guimarães Costa

**MELANINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS:  
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, CITOTOXICIDADE,  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INTERAÇÃO COM ESPÉCIES  
CATIÔNICAS**

Florianópolis

2015



Thiago Guimarães Costa

**MELANINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS:  
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, CITOTOXICIDADE,  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INTERAÇÃO COM ESPÉCIES  
CATIÔNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química, sob orientação do Prof. Dr. Bruno Szpoganicz.

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Thiago Guimarães

Melaninas quimicamente modificadas: preparação, caracterização, citotoxicidade, atividade antioxidante e interação com espécies catiônicas / Thiago Guimarães Costa ; orientador, Bruno Szpoganicz - Florianópolis, SC, 2015. 222 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Melaninas. 3. Aminoácidos. 4. Complexos de Cu(II) e Zn(II). 5. Adsorção. I. Szpoganicz, Bruno . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Thiago Guimarães Costa

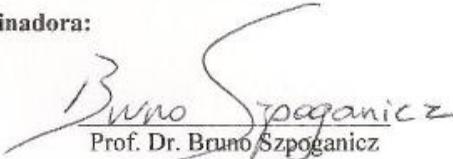
**MELANINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS:  
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, CITOTOXICIDADE,  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INTERAÇÃO COM ESPÉCIES  
CATIÔNICAS**

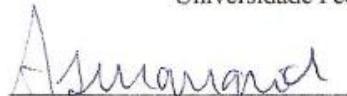
Tese de doutorado avaliada e aprovada pelo orientador e membros da banca, em sua forma final, como requerimento para obtenção do título de "Doutor em química" no Programa de Pós-Graduação em Química, na Universidade Federal de Santa Catarina.

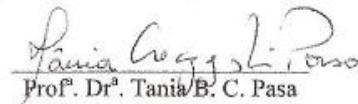
Florianópolis, 06 de março de 2015.

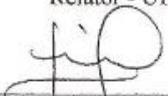
Prof. Dr. Hugo Gallardo  
Coordenador do Curso

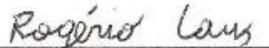
**Banca Examinadora:**

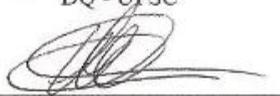
  
Prof. Dr. Bruno Szpoganicz  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Prof. Dr. Antonio Salvo Mangrich  
Relator - UFPR

  
Prof. Dr.ª Tania B. C. Pasa  
CCB - UFSC

  
Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos  
DQ - UFSC

  
Prof. Dr. Rogério Laus  
UDESC

  
Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke  
DQ - UFSC



*Época triste a nossa.  
É mais fácil quebrar um átomo do que um preconceito!*

Albert Einstein

*O poder de um ser humano não está nos seus  
músculos mas na sua inteligência.  
Os fracos usam a força, os fortes usam a sabedoria.*

*Dedico este trabalho a meus pais,  
Profs. Osires (in memorian) e Marília*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais Profs. Osires Guimarães Costa (*in memoriam*) e Marilia Terezinha Gomes Guimarães Costa, por todo conhecimento, amor e carinho que me foi passado.

Ao meu orientador Bruno Szpoganicz, pelos quase 10 anos de trabalho juntos; muito mais que um mero orientador acadêmico, um amigo.

A UFSC, e aos impostos pagos por toda a população que foram fundamentais para execução de todo o trabalho de pesquisa que desenvolvo, e me comprometo em devolver tudo que foi investido na minha formação em serviços de excelência na minha área de conhecimento em prol da sociedade.

A Família do Laboratório de Equilíbrio Químico especialmente ao nosso aluno de Iniciação Mateus Feldhaus, fundamental para este trabalho, melhor IC do mundo!

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina pelas análises de MEV-EDS.

Ao Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron pelos ensaios de SAXS.

Aos colaboradores: Profa. Dra. Tânia Pasa - Trabalho de Toxicidade; Profa. Dr. Inês Brighente - Ensaio Antioxidantes; Prof. Dr. Giovanni Caramori e Prof. Dr. Fábio Miranda - Cálculos Teóricos; Prof. Dr. Pedro Vaz, Profa. Dra. Maria Humannes, Profa. Dra. Carla Nunes - Universidade de Lisboa - e Prof. Dr. Rogério Laus pelas ideias sobre as interações com azul de metileno; Prof. Dr. Josiel Barbosa e M.Sc. Welman Elias pelas análises de UV-Vis, Prof. Dr. Almir Spinelli - Discussões eletroquímicas; Prof. Dr. Antonio Salvio Mangrich - experimentos de EPR e ainda a técnica Marli Soldi pelas análises de TGA.

A Secretaria de Estado de Turismo, Cultura e Esporte e Fundação Catarinense de Cultura, em especial ao Ateliê de Conservação-Restauração de Bens Culturais Móveis – ATECOR, Fátima, Marcelino, Marcia, Bruna, Karen, Marcelo, Letícia e Mariana por todo apoio incondicional dado à minha formação acadêmica e ainda meus amigos arquitetos, sempre parceiros.

A minha namorada Graziela Salvador, por toda compreensão e carinho nesses últimos anos de correria.

A todos os amigos e colegas que passaram, e/ou ainda estão ao meu lado que sempre me apoiaram meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Melaninas são bio-oligômeros de ocorrência natural que podem ser encontradas na pele, no cabelo, nos olhos, no cérebro e também em alguns animais marinhos. Entretanto, a extração das melaninas naturais nem sempre é viável devido ao custo elevado dos reagentes utilizados e normalmente obtém-se um baixo rendimento no processo. Neste contexto, destacam-se as melaninas sintéticas, que podem ser produzidas em laboratório com um custo mais baixo e considerável rendimento.

Um dos precursores das melaninas sintéticas é o L-3,4-dihidroxifenilalanina conhecido como L-DOPA que livre em condições reacionais produz a *eumelanina*, responsável pela coloração escura e em presença de cisteína produz a *feomelanina*, que dá origem a coloração mais clara, esses precursores se agregam entre 3 a 9 unidades indol para formar a estrutura oligomérica da melanina.

Neste contexto, este trabalho tem por objetivo descrever a preparação, purificação e caracterização de melaninas quimicamente modificadas pelos aminoácidos serina, treonina e cisteína (*feomelaninas*), a fim de se obter os compostos ser-DOPA, thr-DOPA e cys-DOPA respectivamente e seus complexos de Cu(II) e Zn(II), bem como descrever as interações com o corante catiônico azul de metileno avaliando suas toxicidades e atividades antioxidantes.

A caracterização espectroscópica das melaninas modificadas mostrou a presença de três grupamentos majoritários: ácido carboxílico, quinonimina e catecol. Estudos em solução por titulação potenciométrica mostraram a presença do grupamento tiol na melanina cys-DOPA, e todas as melaninas apresentaram baixa toxicidade em células NIH-3T3 com uma relevante atividade antioxidante tendo destaque para a ser-DOPA que apresentou um  $EC_{50}$  para o ensaio de DPPH de  $1,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ , valor esse próximo dos padrões utilizados.

Os estudos de interação com os íons Cu(II) e Zn(II) revelaram que a formação dos complexos é altamente dependente do pH, em que na faixa ácida para a ser-DOPA e thr-DOPA ocorre a formação das espécies  $[\text{M}(\text{QI})^+]$  e  $[\text{M}(\text{Ac})^+]$ , com o aumento do pH detectou-se a espécie  $[\text{M}(\text{Cat})]$  e  $[\text{M}(\text{QI})_2]$ , e em valores de pH acima de 8 as espécies  $[\text{M}(\text{Cat})_2^{2-}]$  e  $[\text{M}(\text{QI})(\text{Cat})]$  foram detectadas. Já com a melanina cys-DOPA ocorre a formação das espécies  $[\text{M}(\text{Tiol})^+]$ ,  $[\text{M}(\text{QI})^+]$  e  $[\text{M}(\text{QI})(\text{Tiol})]$ , com o aumento do pH foi evidenciado as espécies  $[\text{M}(\text{Cat})]$  e  $[\text{M}(\text{Cat})(\text{Tiol})]$ , sendo esta última não detectada para Cu(II), e em valores de pH acima de 7 as espécies  $[\text{M}(\text{QI})_2]$  e  $[\text{M}(\text{Cat})_2^{2-}]$  foram observadas.

Todos os complexos obtidos apresentaram uma baixa toxicidade em células HUVEC, e também uma relevante atividade antioxidante com destaque para o complexo cys-DOPA-Zn(II) com valor de 25,24  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o ensaio de DPPH.

As interações com o corante azul de metileno foram caracterizadas por métodos espectroscópicos, e os resultados obtidos revelaram que a adsorção do azul de metileno pelas melaninas é dependente do pH da solução. A maior adsorção ocorreu em pH 7 e 6 para a ser-DOPA e cys-DOPA respectivamente e a melanina thr-DOPA apresentou baixos valores de adsorção em toda faixa de pH. O modelo cinético que apresentou a melhor correlação entre os dados experimentais foi o de pseudo-segunda ordem para todos os sistemas estudados e os dados de equilíbrio de adsorção foram melhor correlacionados pela isoterma de Langmuir em sua forma linear apresentando  $q_m$  de 162,07 e 109,89  $\text{mg g}^{-1}$  para as melaninas cys-DOPA e ser-DOPA respectivamente.

**Palavras-chave:** Melaninas, Aminoácidos, Complexos de Cu(II) e Zn(II), Adsorção, Azul de Metileno

## ABSTRACT

Melanins are bio-oligomers occurring naturally. They can be found in skin, hair, eyes, brain, and also in some marine animals, however, the extraction of natural melanins is not always feasible due to the high cost of the reagents used and the low yield in the process. In this context, synthetic melanins can be a practical solution, which can be produced in the laboratory with a low cost and a high considerable yield.

One of the synthetic melanins precursor is L-3,4-dihydroxyphenylalanine, known as L-DOPA that when free in reaction conditions produces eumelanin, responsible for the dark coloring, and in the presence of cysteine produces pheomelanin, which leads to a lighter color pigment, these products are aggregated in 3 to 9 indol units to form the oligomeric structure of melanin.

In this context, this work aims to describe the preparation, purification and characterization of melanins chemically modified by the amino acids serine, threonine and cysteine (pheomelanins) resulting in compounds ser-DOPA, thr-DOPA and cys-DOPA respectively, and their complexes with Cu(II) and Zn(II) metal ions, evaluating their antioxidant activities and toxicities; as well as interactions with the cationic dye methylene blue.

The spectroscopic characterization of the modified melanins showed the presence of three major groups: carboxylic acid, quinone-imine and catechol, and studies in solution by potentiometric titration showed the presence of thiol grouping cys-DOPA melanin, all melanins presented low toxicity in NIH-3T3 cells and a significant antioxidant activity with emphasis on ser-DOPA which showed an  $EC_{50} = 1.02 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the DPPH assay, a value close to the standards used in this work.

Interaction studies with Cu(II) and Zn(II) ions proved that the formation of complexes is highly pH dependent, where in the acidic range for ser-DOPA and thr-DOPA the species  $[M(QI)^+]$  and  $[M(Ac)^+]$  were formed, the increase of the pH leads to the formation of  $[M(Cat)]$  and  $[M(QI)_2]$  species and pH above 8 the  $[M(Cat)_2^{2-}]$  and  $[M(QI)(Cat)^+]$  species were detected. On the other hand, in the cys-DOPA system at acidic pH the species  $[M(Tiol)^+]$ ,  $[M(QI)^+]$  and  $[M(QI)(Tiol)^+]$  were formed, with the increase of the pH the  $[M(Cat)]$  and  $[M(Cat)(Tiol)^+]$  species were evidenced, the latter is undetected for Cu(II) system, and for pH above 7 the species  $[M(QI)_2]$  e  $[M(Cat)_2^{2-}]$  were observed.

All complexes showed low toxicity in HUVEC cells, and also showed a significant antioxidant activity, highlighting for the complex cys-DOPA-Zn(II) with a value of  $25.24 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the DPPH assay.

The adsorption of methylene blue by melanins was characterized by spectroscopic methods, and the results showed that adsorption of methylene blue is dependent on the pH solution. The higher adsorption occurred in pH 7 and 6 for the ser-DOPA and cys-DOPA melanin respectively. Thr-DOPA showed low adsorption values independently of the pH. The kinetic model that showed the best correlation among the experimental data was the pseudo-second order for all systems studied and the adsorption equilibrium data were best correlated with the linear Langmuir isotherm presenting  $q_m$  values 162.07 and 109.89 mg g<sup>-1</sup> for cys-DOPA melanin ser-DOPA respectively.

**Keywords:** Melanins, Amino acids, Cu(II) and Zn(II) complexes, Adsorption, Methylene Blue

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura dos precursores naturais das melaninas.....  | 35 |
| <b>Figura 2.</b> Síntese das etapas da extração da melanina natural do cabelo.....  | 37 |
| <b>Figura 3.</b> Grupamentos majoritários presentes nas melaninas.....  | 38 |
| <b>Figura 4.</b> (A) Estrutura proposta por Bielawski e colaboradores: melaninas estruturadas por ligações de hidrogênios e sem participação covalente. (B) Estrutura de Lee e colaboradores: melaninas apresentando ligações de hidrogênio, mas sim entre seus oligômeros, com a participação de ligações covalentes intra-monomérica..... | 39 |
| <b>Figura 5.</b> Aminoácidos utilizados na modificação química das DOPA-melaninas.....  | 45 |
| <b>Figura 6.</b> Modelos estruturais propostos para os monômeros obtidos através da modificação química de DOPA-melaninas.....  | 46 |
| <b>Figura 7.</b> Fórmula estrutural de alguns polifenóis com ação antioxidante.....   | 47 |
| <b>Figura 8.</b> Par redox catecol/quinona, equilíbrio responsável pela ação antioxidante das melaninas.....  | 48 |
| <b>Figura 9.</b> Fórmula estrutural do azul de metileno.....  | 54 |
| <b>Figura 10.</b> Espectros de infravermelho dos precursores serina, L-DOPA e do produto ser-DOPA.....  | 74 |
| <b>Figura 11.</b> Espectros de infravermelho dos precursores cisteína, L-DOPA e do produto cys-DOPA.....  | 75 |
| <b>Figura 12.</b> Espectros de infravermelho dos precursores treonina, L-DOPA e   |    |

|  |    |
|--|----|
| do produto thr-DOPA.....   | 76 |
| <b>Figura 13.</b> Espectros de infravermelho das três DOPA-melaninas sintéticas modificadas com aminoácidos: cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA.....  | 77 |
| <b>Figura 14.</b> Termogramas das melaninas sintéticas.....  | 78 |
| <b>Figura 15.</b> Derivadas dm/dT dos termogramas das melaninas sintéticas.....  | 79 |
| <b>Figura 16a.</b> Imagens de MEV da melanina ser-DOPA com 85, 750, 2000 e 15000 vezes de aumento respectivamente.....   | 83 |
| <b>Figura 16b.</b> Imagens de MEV da melanina cys-DOPA com 80, 750, 2000 e 15000 vezes de aumento respectivamente.....   | 84 |
| <b>Figura 16c.</b> Imagens de MEV da melanina thr-DOPA com 80, 750, 2000 e 15000 vezes de aumento respectivamente.....   | 85 |
| <b>Figura 17.</b> Voltamogramas cíclicos de todas as melaninas obtidos em 100mV/s a 25°C em pH 7,4. Eletrólito suporte: 0,1mol.L <sup>-1</sup> tampão fosfato pH 7.4; trabalho: carbono vítreo, referência Ag/Ag <sup>+</sup> , contra eletrodo: fio de platina..... | 87 |
| <b>Figura 18.</b> Par redox catecol/quinona elucidado pela técnica de voltametria cíclica.....   | 88 |
| <b>Figura 19.</b> Curvas de titulação potenciométrica das melaninas cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA sob atmosfera inerte de argônio. T = 25°C, $\mu$ = 0,1 KCl, eletrodo de vidro combinado.....   | 89 |
| <b>Figura 20.</b> Equilíbrio ácido/base de cada grupo característico das melaninas. O pKa 3 é presente apenas na cys-DOPA.....   | 91 |
| <b>Figura 21.</b> Curvas de distribuição de espécies das melaninas modificadas por aminoácidos; (A) ser-DOPA, (B) cys-DOPA e (C) thr-DOPA.....   | 92 |
| <b>Figura 22.</b> Curvas de titulação para determinação da acidez carboxílica das  |    |

|  |     |
|--|-----|
| melaninas.....   | 93  |
| <b>Figura 23.</b> Espectros eletrônicos de cada melanina com adições sucessivas de KOH 4M e respectivas curvas pH vs Abs <sub>Max</sub> , onde (A) cys-DOPA; (B) ser-DOPA;(C)thr-DOPA..... | 97  |
| <b>Figura 24.</b> Curvas de SAXS no estado sólido das melaninas modificadas com aminoácidos.....   | 99  |
| <b>Figura 25.</b> Estrutura otimizada de um possível dímero presente no oligômero ser-DOPA.....  | 101 |
| <b>Figura 26.</b> Espectros vibracionais, FTIR, da melanina ser-DOPA - experimental e teórico da espécie dimérica respectivamente.....   | 102 |
| <b>Figura 27.</b> Estruturas otimizadas para os grupamentos majoritários presentes nas melaninas, onde: (a) carboxílico, (b) quinona-imina e (c) catecol.....                              | 103 |
| <b>Figura 28.</b> Estrutura otimizada de um possível dímero presente no oligômero cys-DOPA.....  | 104 |
| <b>Figura 29.</b> Espectros vibracionais, FTIR, da melanina cys-DOPA - experimental e teórico da espécie dimérica respectivamente.....   | 105 |
| <b>Figura 30.</b> Estrutura otimizada de um possível dímero presente no oligômero thr-DOPA.....  | 106 |
| <b>Figura 31.</b> Espectros vibracionais, FTIR, da melanina thr-DOPA - experimental e teórico da espécie dimérica respectivamente.....   | 107 |
| <b>Figura 32.</b> Gráficos de viabilidade celular das melaninas.....   | 108 |
| <b>Figura 33.</b> Curvas de quelção do íon Fe(II) pelas melaninas sintéticas.....  | 109 |
| <b>Figura 34.</b> Curvas de Captura de radicais livres – DPPH de cada melanina....   | 111 |
| <b>Figura 35.</b> Gráfico de correlação dos parâmetros EC <sub>50</sub> (DPPH), poder redutor e potencial de oxidação de cada melanina.....  | 113 |
| <b>Figura 36.</b> Espectros de infravermelho da melanina ser-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II) variando o pH.....  | 117 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 37.</b> Espectros de infravermelho da melanina cys-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II) variando o pH.....           | 120 |
| <b>Figura 38.</b> Espectros de infravermelho da melanina thr-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II) variando o pH.....           | 121 |
| <b>Figura 39.</b> Termogramas da melanina sintética ser-DOPA e dos seus complexos com Cu(II) e Zn(II).....                        | 123 |
| <b>Figura 40.</b> Derivadas dm/dT dos termogramas referentes aos complexos ser-DOPA-Cu(II) e ser-DOPA-Zn(II) respectivamente..... | 124 |
| <b>Figura 41.</b> Termogramas da melanina sintética cys-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II).....                              | 125 |
| <b>Figura 42.</b> Derivadas dm/dT dos termogramas referentes aos complexos cys-DOPA-Cu(II) e cys-DOPA-Zn(II) respectivamente..... | 125 |
| <b>Figura 43.</b> Termogramas dos complexos thr-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Zn(II)..   | 126 |
| <b>Figura 44.</b> Derivadas dm/dT dos termogramas referentes aos complexos thr-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Zn(II) respectivamente..... | 127 |
| <b>Figura 45a.</b> Imagens de MEV do complexo ser-DOPA Cu(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.....            | 130 |
| <b>Figura 45b.</b> Imagens de MEV do complexo ser-DOPA Zn(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.....            | 131 |
| <b>Figura 45c.</b> Imagens de MEV do complexo cys-DOPA Cu(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.....            | 132 |
| <b>Figura 45d.</b> Imagens de MEV do complexo cys-DOPA Zn(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.....            | 133 |
| <b>Figura 45e.</b> Imagens de MEV do complexo thr-DOPA Cu(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.....            | 134 |
| <b>Figura 45f.</b> Imagens de MEV do complexo thr-DOPA Zn(II) com 80, 750 e   |     |

|  |     |
|--|-----|
| 2000 vezes de aumento respectivamente.....   | 135 |
| <b>Figura 46.</b> Espectros de EDS dos complexos ser-DOPA Cu(II) e ser-DOPA Zn(II) respectivamente.....  | 136 |
| <b>Figura 47.</b> Espectros de EDS dos complexos cys-DOPA Cu(II) e cys-DOPA Zn(II) respectivamente.....  | 137 |
| <b>Figura 48.</b> Espectros de EDS dos complexos thr-DOPA Cu(II) e thr-DOPA Zn(II) respectivamente.....  | 138 |
| <b>Figura 49.</b> Voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura variando entre 50 e 250mV/s e voltamograma de onda quadrada do complexo ser-DOPA-Cu(II).....  | 139 |
| <b>Figura 50.</b> Voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura variando entre 50 e 250mV/s e voltamograma de onda quadrada do complexo cys-DOPA-Cu(II).....  | 141 |
| <b>Figura 51.</b> Voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura variando entre 50 e 250mV/s e voltamograma de onda quadrada do complexo thr-DOPA-Cu(II).....  | 142 |
| <b>Figura 52.</b> Curvas de titulação da melanina ser-DOPA em presença e ausência de Cu(II) e Zn(II). Dados experimentais e calculados pelo programa Best 7.....   | 144 |
| <b>Figura 53.</b> Curva de distribuição de espécies para o sistema ser-DOPA-Cu(II), onde (a) $[Cu(QI)^+]$ ; (b) $[Cu(Ac)^+]$ ; (c) $[Cu(Cat)]$ ; (d) $[Cu(QI)_2]$ ; (e) $[Cu(Cat)_2^{2-}]$ ; (f) $[Cu(QI)(Cat)^-]$ ..... | 146 |
| <b>Figura 54.</b> Curva de distribuição de espécies para o sistema ser-DOPA-Zn(II), onde (a) $[Zn(QI)^+]$ ; (b) $[Zn(Ac)^+]$ ; (c) $[Zn(Cat)]$ ; (d) $[Zn(QI)_2]$ ; (e) $[Zn(QI)(Cat)^-]$ ; (f) $[Zn(Cat)_2^{2-}]$ ..... | 147 |
| <b>Figura 55.</b> Curvas de titulação da melanina cys-DOPA em presença e ausência de Cu(II) e Zn(II). Dados experimentais e calculados pelo programa   |     |

|   |     |
|---|-----|
| Best 7.....   | 148 |
| <b>Figura 56.</b> Curva de distribuição de espécies para o sistema cys-DOPA-Cu(II), onde (a) $[\text{Cu}(\text{Tiol})^+]$ ; (b) $[\text{Cu}(\text{QI})^+]$ ; (c) $[\text{Cu}(\text{QI})(\text{Tiol})]$ ; (d) $[\text{Cu}(\text{Cat})]$ ; (e) $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$ ; (f) $[\text{Cu}(\text{QI})_2]$ .....  | 149 |
| <b>Figura 57.</b> Curva de distribuição de espécies para o sistema cys-DOPA-Zn(II), onde (a) $[\text{Zn}(\text{Tiol})^+]$ ; (b) $[\text{Zn}(\text{QI})^+]$ ; (c) $[\text{Zn}(\text{QI})(\text{Tiol})]$ ; (d) $[\text{Zn}(\text{Cat})]$ ; (e) $[\text{Zn}(\text{Cat})(\text{Tiol})^-]$ ; (f) $[\text{Zn}(\text{QI})_2]$ ; (g) $[\text{Zn}(\text{Cat})_2^{2-}]$ ..... | 150 |
| <b>Figura 58.</b> Curvas de titulação da melanina thr-DOPA em presença e ausência de Cu(II) e Zn(II). Dados experimentais e calculados pelo programa Best 7.....  | 151 |
| <b>Figura 59.</b> Curva de distribuição de espécies para o sistema thr-DOPA-Cu(II), onde (a) $[\text{Cu}(\text{QI})^+]$ ; (b) $[\text{Cu}(\text{Ac})^+]$ ; (c) $[\text{Cu}(\text{Cat})]$ ; (d) $[\text{Cu}(\text{QI})_2]$ ; (e) $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$ ; (f) $[\text{Cu}(\text{QI})(\text{Cat})^-]$ .....   | 152 |
| <b>Figura 60.</b> Curva de distribuição de espécies para o sistema thr-DOPA-Zn(II), onde (a) $[\text{Zn}(\text{QI})^+]$ ; (b) $[\text{Zn}(\text{Ac})^+]$ ; (c) $[\text{Zn}(\text{Cat})]$ ; (d) $[\text{Zn}(\text{QI})_2]$ ; (e) $[\text{Zn}(\text{QI})(\text{Cat})^-]$ ; (f) $[\text{Zn}(\text{Cat})_2^{2-}]$ .....   | 153 |
| <b>Figura 61.</b> Curvas de SAXS referentes a ser-DOPA livre e seu complexo com Cu(II) e Zn(II).....  | 156 |
| <b>Figura 62.</b> Curvas de SAXS referentes a cys-DOPA livre e seu complexo com Cu(II) e Zn(II).....  | 157 |
| <b>Figura 63.</b> Curvas de SAXS referentes a thr-DOPA livre e seu complexo com Cu(II) e Zn(II).....  | 158 |
| <b>Figura 64.</b> Citotoxicidade dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas em células NIH-3T3. As células foram expostas aos compostos por 24 horas.....  | 160 |
| <b>Figura 65.</b> Citotoxicidade dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas em células HUVEC. As células foram expostas aos compostos por  |     |

|  |     |
|--|-----|
| 24 horas.....  | 164 |
| <b>Figura 66.</b> Curvas de Captura de radicais livres – DPPH dos complexos de Cu(II) com as melaninas modificadas.....  | 169 |
| <b>Figura 67.</b> Curvas de Captura de radicais livres – DPPH dos complexos de Zn(II) com as melaninas modificadas.....  | 170 |
| <b>Figura 68.</b> Espectros de infravermelho da melanina ser-DOPA, do corante azul de metileno e da melanina modificada com serina adsorvida com o respectivo corante.....   | 175 |
| <b>Figura 69.</b> Espectros de infravermelho da melanina cys-DOPA, do corante azul de metileno e da melanina modificada com cisteína adsorvida com o respectivo corante..... | 176 |
| <b>Figura 70.</b> Espectros de infravermelho da melanina thr-DOPA, do corante azul de metileno e da melanina modificada com treonina adsorvida com o respectivo corante..... | 176 |
| <b>Figura 71a.</b> Imagens de MEV da melanina ser-DOPA com o corante azul de metileno adsorvido em sua superfície com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.....   | 178 |
| <b>Figura 71b.</b> Imagens de MEV da melanina cys-DOPA com o corante azul de metileno adsorvido em sua superfície com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.....   | 179 |
| <b>Figura 72.</b> Espectros de EDS das melaninas ser-DOPA e cys-DOPA com azul de metileno adsorvido.....   | 180 |
| <b>Figura 73.</b> Curvas de SAXS das melaninas cys-DOPA e ser-DOPA com azul de metileno adsorvido.....   | 181 |
| <b>Figura 74.</b> Efeito do pH na adsorção do azul de metileno pela melanina ser-DOPA.....   | 183 |
| <b>Figura 75.</b> Efeito do pH na adsorção do azul de metileno pela melanina cys-  |     |

|   |     |
|---|-----|
| DOPA.....   | 184 |
| <b>Figura 76.</b> Efeito do pH na adsorção do azul de metileno pela melanina thr-DOPA.....  | 185 |
| <b>Figura 77.</b> Cinética de adsorção do corante azul de metileno pelas melaninas ser-DOPA e cys-DOPA.....                                       | 186 |
| <b>Figura 78.</b> Linearização do modelo cinético de pseudo segunda ordem para a adsorção da melanina ser-DOPA pelo corante azul de metileno..... | 189 |
| <b>Figura 79.</b> Linearização do modelo cinético de pseudo segunda ordem para a adsorção da melanina cys-DOPA pelo corante azul de metileno..... | 189 |
| <b>Figura 80.</b> Isotermas de adsorção do corante azul de metileno pelas melanina ser-DOPA.....  | 190 |
| <b>Figura 81.</b> Isotermas de adsorção do corante azul de metileno pelas melanina cys-DOPA.....  | 191 |
| <b>Figura 82.</b> Linearização do modelo de isoterma de Langmuir na adsorção do corante azul de metileno pelas melanina ser-DOPA.....             | 194 |
| <b>Figura 83.</b> Linearização do modelo de isoterma de Langmuir na adsorção do corante azul de metileno pelas melanina cys-DOPA.....             | 194 |

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Esquema 1.</b> Mecanismo de formação das melaninas, Melanogênese, a partir da tirosina e em presença da tirosinase.....      | 41  |
| <b>Esquema 2.</b> Preparação da <i>pheomelanina</i> .....   | 43  |
| <b>Esquema 3.</b> Mecanismo simplificado de ação da tirosinase.....   | 44  |
| <b>Esquema 4a.</b> Equilíbrios envolvendo a melanina sintética DHI e íons divalentes.....                                       | 51  |
| <b>Esquema 4b.</b> Equilíbrios envolvidos entre a melanina natural extraída do cabelo e o íon Fe(III).....                      | 52  |
| <b>Esquema 5.</b> Processos reacionais para formação das melaninas quimicamente modificadas: cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA..... | 58  |
| <b>Esquema 6.</b> Equilíbrios envolvendo as melaninas modificadas por aminoácidos e os íons divalentes Cu(II) e Zn(II).....     | 155 |



## ÍNDICE DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Quantidades de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio presente nas três melaninas modificadas.....  | 71  |
| <b>Tabela 2.</b> Composição elementar das melaninas modificadas com aminoácidos preparadas neste trabalho comparados com outras da literatura.....  | 72  |
| <b>Tabela 3.</b> Resumo dos percentuais de perda de massa ( $\Delta m$ ) de cada melanina nos intervalos de temperatura ( $\Delta T$ ).....   | 80  |
| <b>Tabela 4.</b> Massas monitoradas e energia de ionização utilizada no espectrômetro de massas.....  | 81  |
| <b>Tabela 5.</b> Constantes de dissociação dos grupamentos majoritários presentes em cada melanina.....   | 90  |
| <b>Tabela 6.</b> Quantidade de $\text{mmoles.g}^{-1}$ determinados por titulação potenciométrica e pelo método de Schnitzer e Gupta.....  | 95  |
| <b>Tabela 7.</b> Parâmetros de fractais obtidos por SAXS para as melaninas.....   | 100 |
| <b>Tabela 8.</b> Atividade antioxidante das melaninas modificadas por aminoácidos e padrões conhecidos da literatura.....   | 112 |
| <b>Tabela 9.</b> Correlações entre as atividades antioxidantes das melaninas com suas propriedades físico-químicas.....   | 114 |
| <b>Tabela 10:</b> Resumo dos percentuais de perda de massa ( $\Delta m$ ) de cada complexo nos intervalos de temperatura ( $\Delta T$ ).....  | 128 |
| <b>Tabela 11.</b> Potenciais de oxidação/redução (V vs $\text{Ag/Ag}^+$ Voltametria cíclica e onda quadrada) para os complexos de $\text{Cu(II)}$ com cada melanina modificada. Valores obtidos em pH 7 (tampão fosfato 0,1M), velocidade de varredura 100mV/s..... | 143 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 12.</b> Constantes de formação para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas sintéticas.....   | 154 |
| <b>Tabela 13.</b> Parâmetros de fractais obtidos por SAXS para as melaninas e seus respectivos complexos de Cu(II) e Zn(II).....   | 159 |
| <b>Tabela 14.</b> Valores de $CC_{50}$ complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas em linhagens celulares HUVEC e NIH-3T3.....   | 163 |
| <b>Tabela 15.</b> Atividade antioxidante dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com melaninas modificadas por aminoácidos, comparativo com padrões utilizados no trabalho..... | 171 |
| <b>Tabela 16.</b> Correlações entre as atividades antioxidantes dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas modificadas.....                                       | 172 |
| <b>Tabela 17.</b> Parâmetros de fractais obtidos por SAXS para as melaninas com o corante azul de metileno adsorvido em sua superfície.....                              | 182 |
| <b>Tabela 18.</b> Parâmetros cinéticos de adsorção do corante azul de metileno pelas melaninas ser-DOPA e cys-DOPA.....  | 188 |
| <b>Tabela 19.</b> Parâmetros das isotermas de adsorção do corante azul de metileno pelas melaninas ser-DOPA e cys-DOPA.....  | 193 |
| <b>Tabela 20.</b> Capacidade de adsorção efetiva para alguns adsorventes de azul de metileno encontrados na literatura.....  | 195 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>Ac</b>              | Acetato  |
| <b>Cat</b>             | Catecol  |
| <b>CC<sub>50</sub></b> | 50% da concentração citotóxica   |
| <b>cm<sup>-1</sup></b> | Unidade de número de onda  |
| <b>Cys</b>             | Aminoácido cisteína  |
| <b>Cys-DOPA</b>        | Melanina sintética modificada com cisteína                             |
| <b>DHI</b>             | 5,6-Dihidroxi-indol  |
| <b>DHICA</b>           | Ácido 5,6-Dihidroxi-indol-2-Carboxílico                                |
| <b>DMSO</b>            | Dimetilsulfóxido   |
| <b>DOPA</b>            | 3,4-dihidroxi-fenilalanina   |
| <b>DPPH</b>            | 2,2-difenil-picril-hidrazil  |
| <b>D-R</b>             | Dubinin-Radushkevich   |
| <b>E</b>               | Energia livre de adsorção  |
| <b>EC<sub>50</sub></b> | 50% da concentração máxima efetiva                                     |
| <b>EDS</b>             | Espectrometria de energia dispersiva de Raios-X                        |
| <b>EDTA</b>            | Ácido Etileno Diamino Tetracético                                      |
| <b>E<sub>po</sub></b>  | Potencial de pico de oxidação  |
| <b>E<sub>pr</sub></b>  | Potencial de pico de redução   |
| <b><i>et. al.</i></b>  | e colaboradores  |
| <b>FTIV</b>            | Espectroscopia na região do Infravermelho com transformação de Fourier |
| <b>HUVEC</b>           | Células humanas endoteliais  |
| <b>I<sub>a</sub></b>   | Corrente anódica   |
| <b>I<sub>c</sub></b>   | Corrente catódica  |
| <b>K</b>               | Constante de D-R   |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>K</b>                  | Constante de equilíbrio                                    |
| <b>k<sub>1</sub></b>      | Constante de pseudo primeira-ordem                         |
| <b>k<sub>2</sub></b>      | Constante de pseudo segunda-ordem                          |
| <b>K<sub>L</sub></b>      | Constante de Langmuir                                      |
| <b>L</b>                  | Litro  |
| <b>LC-MS</b>              | Cromatografia líquida com detector espectrômetro de massas |
| <b>MEV</b>                | Microscopia Eletrônica de Varredura                        |
| <b>mmol</b>               | Milimoles  |
| <b>mol L<sup>-1</sup></b> | Concentração molar   |
| <b>MTT</b>                | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio           |
| <b>nm</b>                 | Nanômetros   |
| <b>PFO</b>                | Pseudo primeira ordem                                      |
| <b>pH</b>                 | Potencial hidrogeniônico                                   |
| <b>pK<sub>a</sub></b>     | Constante de dissociação ácida                             |
| <b>PSO</b>                | Pseudo segunda ordem                                       |
| <b>QI</b>                 | Quinona-Imina  |
| <b>R</b>                  | Constante dos gases  |
| <b>Ser</b>                | Aminoácido serina  |
| <b>Ser-DOPA</b>           | Melanina sintética modificada com serina                   |
| <b>T</b>                  | Temperatura  |
| <b>TGA</b>                | Análise Termogravimétrica                                  |
| <b>Thr</b>                | Aminoácido treonina  |
| <b>Thr-DOPA</b>           | Melanina sintética modificada com treonina                 |
| <b>UV-Vis</b>             | Espectroscopia na região do Ultravioleta – Visível         |
| <b>v</b>                  | Estiramento (IV)   |
| <b>λ</b>                  | Comprimento de onda  |

# SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>2. Revisão bibliográfica e Estado da Arte.....</b>                        | <b>35</b> |
| 2.1. Avanços na elucidação estrutural das melaninas.....                     | 35        |
| 2.2. Melanogênese.....   | 40        |
| 2.3. Melaninas quimicamente modificadas por aminoácidos                      | 42        |
| 2.4. Ação antioxidante das melaninas.....                                    | 46        |
| 2.5. Interação das melaninas por metais.....                                 | 49        |
| 2.6. Interação das melaninas por espécies catiônicas.....                    | 53        |
| <b>3. Objetivos.....</b>   | <b>55</b> |
| 3.1. Objetivo Geral.....   | 55        |
| 3.2. Objetivos Específicos .....   | 55        |
| <b>4. Materiais e Métodos.....</b>   | <b>57</b> |
| 4.1. Reagentes utilizados .....  | 57        |
| 4.2. Preparação e purificação das melaninas quimicamente<br>modificadas..... | 57        |
| 4.3. Preparação dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com<br>melaninas.....       | 58        |
| 4.4. Estudos de interação das melaninas por azul de<br>metileno.....         | 59        |
| 4.4.1. Efeito do pH.....   | 59        |
| 4.4.2. Cinética de adsorção.....   | 60        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4.3. Isotermas de adsorção.....                               | 62        |
| 4.5. Métodos de Caracterização.....                             | 64        |
| 4.5.1. Análise Elementar.....                                   | 64        |
| 4.5.2. Espectroscopia de Infravermelho .....                    | 64        |
| 4.5.3. Termogravimetria.....                                    | 64        |
| 4.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura.....                 | 65        |
| 4.5.5. Cromatografia Líquida com detector MS.....               | 65        |
| 4.5.6. Eletroquímica.....                                       | 65        |
| 4.5.7. Titulação Potenciométrica .....                          | 66        |
| 4.5.8. Titulação Espectrofotométrica .....                      | 66        |
| 4.5.9. Espectrometria de energia dispersiva de Raios-<br>X..... | 66        |
| 4.5.10. Cálculos Teóricos.....                                  | 67        |
| 4.5.11. Espalhamento de Raios-X a baixos ângulos<br>– SAXS..... | 67        |
| 4.5.12. Determinação da acidez total e<br>carboxílica.....      | 67        |
| 4.5.12.1. Determinação da acidez total...                       | 68        |
| 4.5.12.2. Determinação da acidez carboxílica                    | 68        |
| 4.6. Citotoxicidade.....  | 69        |
| 4.7. Atividade Antioxidante.....                                | 69        |
| 4.7.1. Captura de radicais livres utilizando DPPH.....          | 69        |
| 4.7.2. Determinação do poder redutor.....                       | 70        |
| 4.7.3. Capacidade Anitoxidante total.....                       | 70        |
| 4.7.4. Ensaios de quelação pelo íon Fe(II).....                 | 70        |
| <b>5. Resultados e discussão .....</b>                          | <b>71</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.1. Resultados e discussão – Caracterização, citotoxicidade e atividade antioxidante de DOPA-melaninas modificadas com aminoácidos.....</b> | <b>71</b> |
| 5.1.1. Análise elementar.....   | 71        |
| 5.1.2. Espectroscopia de infravermelho.....   | 73        |
| 5.1.3. Análise termogravimétrica.....   | 78        |
| 5.1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector MS – LC-MS .....   | 81        |
| 5.1.5. Microscopia eletrônica de varredura.....   | 82        |
| 5.1.6. Eletroquímica.....   | 86        |
| 5.1.7. Titulação potenciométrica.....   | 88        |
| 5.1.8. Determinação da acidez total e carboxílica pelo método de Schnitzer e Gupta.....   | 93        |
| 5.1.9. Titulação espectrofotométrica.....   | 96        |
| 5.1.10. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos – SAXS.....  | 98        |
| 5.1.11. Cálculos teóricos.....  | 101       |
| 5.1.12. Citotoxicidade.....   | 107       |
| 5.1.13. Ensaios antioxidantes.....  | 108       |
| 5.1.13.1. Atividade por quelação pelo íon Fe(II).....   | 108       |
| 5.1.13.2. Poder redutor.....  | 109       |
| 5.1.13.3. Capacidade antioxidante total.....  | 109       |
| 5.1.13.4. Captura de radicais livres utilizando DPPH.....   | 110       |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 5.1.13.5. Correlações..... | 113 |
|----------------------------|-----|

**5.2. Resultados e discussão – Caracterização, atividade antioxidante e citotoxicidade de complexos metálicos de Cu(II) e Zn(II) com DOPA-melaninas modificadas com aminoácidos.....** 116

|  |     |
|--|-----|
| 5.2.1. Espectroscopia de infravermelho.....                | 116 |
| 5.2.2. Análise termogravimétrica.....                      | 122 |
| 5.2.3. Microscopia eletrônica de varredura.....            | 129 |
| 5.2.4. Microanálise por energia dispersiva de raios-X..... | 136 |
| 5.2.5. Eletroquímica.....                                  | 138 |
| 5.2.6. Titulação potenciométrica.....                      | 144 |
| 5.2.7. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos.....       | 156 |
| 5.2.8. Citotoxicidade.....                                 | 160 |
| 5.2.9. Ensaio antioxidantes.....                           | 167 |
| 5.2.9.1. Atividade por quelação pelo íon Fe(II).....       | 167 |
| 5.2.9.2. Poder redutor.....                                | 167 |
| 5.2.9.3. Capacidade antioxidante total.....                | 167 |
| 5.2.9.4. Captura de radicais livres utilizando DPPH.....   | 168 |
| 5.2.9.5. Correlações.....                                  | 172 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>5.3. Resultados e discussão – Estudo da interação de DOPA-melaninas modificadas com aminoácidos com o corante catiônico azul de metileno.....</b> | <b>174</b> |
| 5.3.1. Espectroscopia de infravermelho.....  | 174        |
| 5.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....  | 177        |
| 5.3.3. Microanálise por energia dispersiva de raios-X.....   | 180        |
| 5.3.4. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos....  | 181        |
| 5.3.5. Estudo do efeito do pH.....   | 182        |
| 5.3.6. Cinética de adsorção.....   | 185        |
| 5.3.7. Isotermas de adsorção.....  | 190        |
| <br>   |            |
| <b>6. Conclusões e Perspectivas.....</b>   | <b>197</b> |
| 6.1. Melaninas modificadas com aminoácidos.....  | 197        |
| 6.2. Interação das melaninas modificadas por íons metálicos.   | 198        |
| 6.3. Estudo da adsorção do azul de metileno por melaninas..  | 199        |
| <br>   |            |
| <b>7. Referências bibliográficas.....</b>  | <b>200</b> |
| <br>   |            |
| <b>8. ANEXOS.....</b>  | <b>217</b> |
| 8.1. Anexo 1 – Artigo publicado Journal of Brazilian Chemical Society .....  | 217        |
| 8.2. Anexo 2 – Artigo publicado Journal of Coordination Chemistry .....  | 219        |



## 1. Introdução

O estudo das melaninas vem ganhando, nos últimos anos, uma grande relevância científica. No passado, a grande questão era saber qual a diferença entre tipos diferentes de pele e cabelo, qual o tipo de molécula era responsável por essas diferenças de coloração que intrigavam os cientistas no final do século XIX. O grande avanço científico contribuiu muito para os avanços no campo de caracterização molecular, possibilitando para que atualmente possamos propor uma estrutura para esta biomolécula. Vale lembrar que mesmo depois de cem anos de pesquisas e avanços, as estruturas das melaninas não são inteiramente conhecidas e modelos são propostos na literatura.

Atualmente, a melanina se apresenta como um bio-oligômero, agregando-se entre três a dez unidades monoméricas contendo três grupamentos funcionais distintos e majoritários: ácidos carboxílicos, quinona-iminas e difenóis (em sua maioria catecol). Aquelas melaninas responsáveis pela coloração escura de pele e cabelos são chamadas de *eumelaninas*, e aquelas responsáveis pelas colorações mais claras são chamadas de *pheomelaninas*, onde também são encontrados grupamentos contendo enxofre como tióis e tienfenóis.

A dificuldade de extrair as melaninas de fontes naturais como cabelo e pele, por exemplo, levou cientistas a proporem métodos de síntese deste bio-oligomero; as metodologias mais comuns encontradas na literatura utilizam os precursores 5,6-diacetoxindol (DAI) ou 3,4-dihidroifenilalanina (DOPA) como reagentes de partida para obtenção das *eumelaninas*. Já para as *pheomelaninas* utiliza-se do aminoácido cisteína como fonte de enxofre, já que esta molécula é adequada para a reação de oligomerização dos monômeros indólicos.

A principal justificativa deste trabalho paira sobre o desenvolvimento de melaninas modificadas com aminoácidos quimicamente compatíveis durante a melanogênese. Essas modificações proporcionam às melaninas diversas funções e características únicas como quelação seletiva de íons metálicos, atividades antioxidantes distintas, diferentes solubilidades em água, dentre outras características que serão estudadas.

Desta forma, este trabalho visa a síntese e caracterização de melaninas quimicamente modificadas utilizando o L-DOPA como precursor e aminoácidos compatíveis como modificantes, aplicando-as em ensaios antioxidantes e interagindo-a com metais divalentes e espécies catiônicas orgânicas.

As quatro grandes áreas de concentração da Química encontram-se aplicadas neste trabalho: a Química Inorgânica aplicada no estudo das interações das melaninas com os cátions metálicos Cu(II) e Zn(II), a Química Orgânica na preparação das melaninas modificadas, cálculo de  $pK_a$ 's e correlação de estrutura e atividade, e a Química Analítica e a Físico-Química nos métodos de caracterização e medidas das interações das melaninas com as espécies catiônicas.

## 2. Revisão Bibliográfica e Estado da Arte

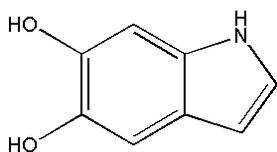
Este capítulo está dividido em tópicos que elucidam um pouco o histórico das melaninas, bem como as aplicações que serão abordadas nesta tese de doutorado. Além de uma revisão bibliográfica, este capítulo tem por objetivo refletir sobre o estado da arte em que as melaninas se inserem na atualidade.

### 2.1. Avanços na elucidação estrutural das melaninas

Propor uma data específica para quando as melaninas começaram a despertar a curiosidade de cientistas pode nos levar a cometer um grande erro. Entretanto, um dos relatos mais antigos encontrados na literatura é de autoria de Abel e Davis<sup>1</sup>, que numa publicação no ano de 1896 questionaram a existência de um pigmento diferente encontrado em diversas raças e que na época não chamava grande atenção. Destaca-se sua citação:

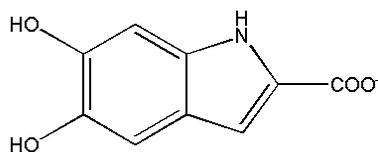
*“Outra classe importante de substâncias biológicas que possuem cor são ainda menos compreendidas. Destas substâncias sabemos atualmente pouco mais que elas existem nos tecidos do corpo, nenhuma delas tem sido o objeto de investigação da química.”*

Este artigo seria a inspiração para os químicos realizarem exaustivas pesquisas na área dos pigmentos naturais, sendo que em 1920, Young<sup>2</sup> publicou o primeiro artigo que relata a tentativa de extração das melaninas da pele. E, finalmente, em 1926 as subunidades das melaninas, 5,6-Dihidroindol e Ácido 5,6-Dihidroindol-2-Carboxílico (Figura 1) foram elucidadas por Raper<sup>3</sup>.



DHI

5,6-dihidroindol



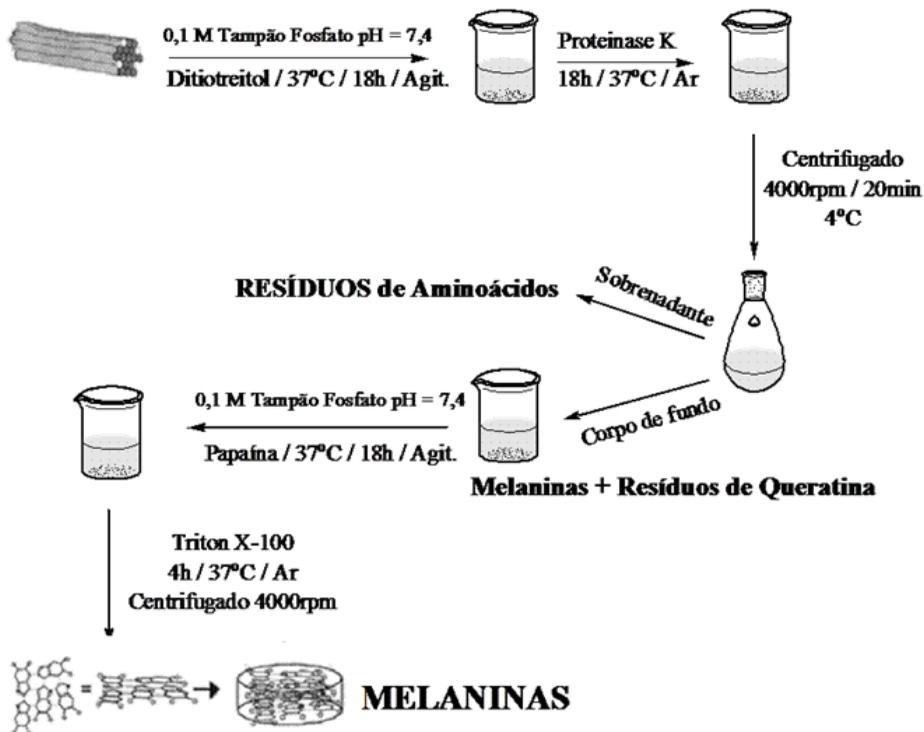
DHICA

5,6-dihidroindol-2-carboxilato

**Figura 1.** Estrutura dos precursores naturais das melaninas.

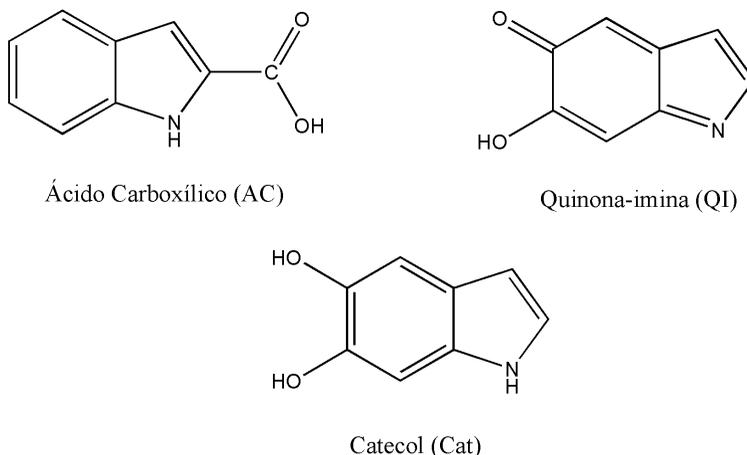
A partir deste momento inúmeras publicações são relatadas. Vários autores contribuíram neste campo de pesquisa como Giuseppe Prota com grandiosos trabalhos na área, destacando-se por realizar a primeira extração enzimática de melaninas do cabelo com alta pureza<sup>4</sup>, e por estudar as interações de metais na formação de melaninas sintéticas<sup>5</sup>. Suas grandiosas contribuições são lembradas em sua revisão sobre o tema<sup>6</sup>. A Figura 2 mostra um resumo das etapas da extração da melanina do cabelo proposto por Prota e colaboradores utilizando o método enzimático.

Outra louvável contribuição na área é de John Simon que elucidou microscopicamente a morfologia de diferentes tipos de melaninas<sup>7</sup>, comprovando que as melaninas naturais se apresentam em formas de esferas ou bastonetes e as sintéticas são morfologicamente amorfas. Simon trabalhou também com interações com metais<sup>8</sup> e ainda com as primeiras atividades foto protetoras das melaninas<sup>9</sup> dentre outros trabalhos<sup>10</sup>.



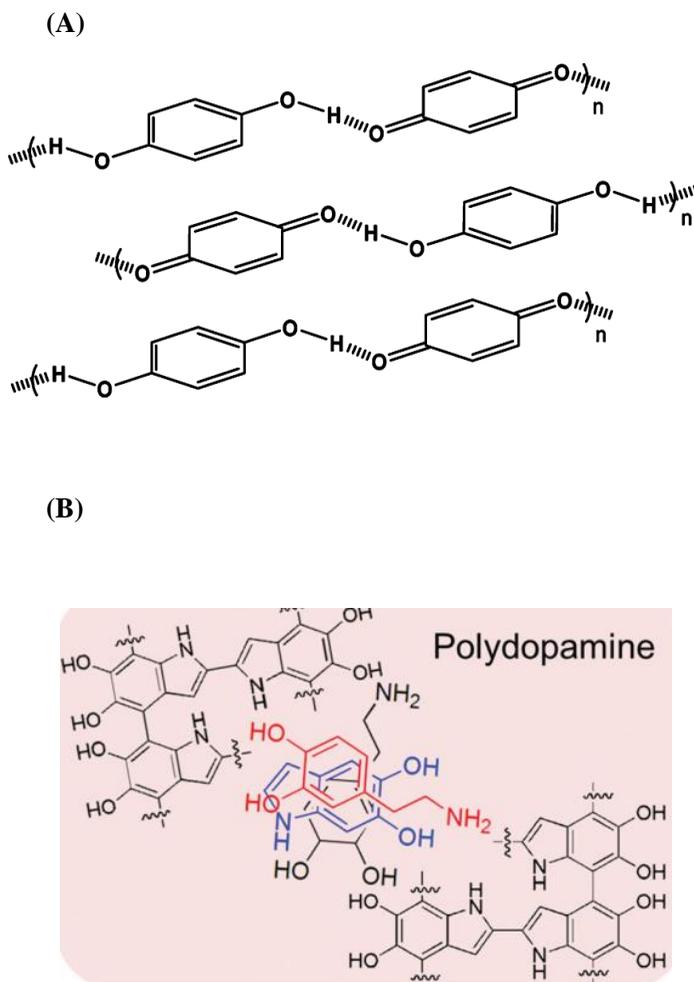
**Figura 2.** Síntese das etapas da extração da melanina natural do cabelo.

Já tendo conhecimento dos monômeros e ainda das propriedades físico químicas das melaninas, Szpoganicz e colaboradores<sup>11</sup>, por titulação potenciométrica, descobriram um novo grupamento que compunha a estrutura das melaninas, a quinona-imina. Assim, os três grupamentos majoritários presentes nas melaninas são: ácido carboxílico, quinona-imina e catecol (Figura 3). A elucidação dos grupamentos foi de suma importância para os avanços, no que se tratava da caracterização estrutural das melaninas; pode-se então propor com mais detalhes as características eletroquímicas das melaninas, suas afinidades por íons metálicos e ainda mapear com maior precisão a tipologia desses bio-oligômeros.



**Figura 3.** Grupamentos majoritários presentes nas melaninas.

Uma vez elucidado os grupamentos funcionais presentes nas melaninas, caracterizado seus monômeros, e tendo provas de que a sua agregação se apresenta na forma de oligômeros<sup>12</sup>, restava saber como essas melaninas estão organizadas no espaço. Prota<sup>10</sup> propôs uma agregação dos oligômeros por ligações de hidrogênio até a formação de uma estrutura complexa, que é o modelo mais aceito hoje em dia, entretanto, especulações sobre as agregações das melaninas são facilmente encontradas na literatura em trabalhos recentes. Bielawski e colaboradores<sup>13</sup> em 2012 relataram uma teoria diferente, onde foi proposto que os monômeros não se agregam por ligações covalentes e sim por ligações de hidrogênio e interações do tipo  $\pi$ -stacking entre si, se baseando em experimentos de ressonância magnética nuclear. Logo após esta publicação, Lee e colaboradores<sup>14</sup>, derrubaram a teoria proposta por Bielawski, utilizando novamente espectrometria de massas e ainda cálculos computacionais e mostraram, novamente, que as ligações de hidrogênio estão presentes entre os bio-oligômeros, mas apenas após a formação das ligações covalentes. Ambas as propostas estão apresentadas na Figura 4A e 4B.



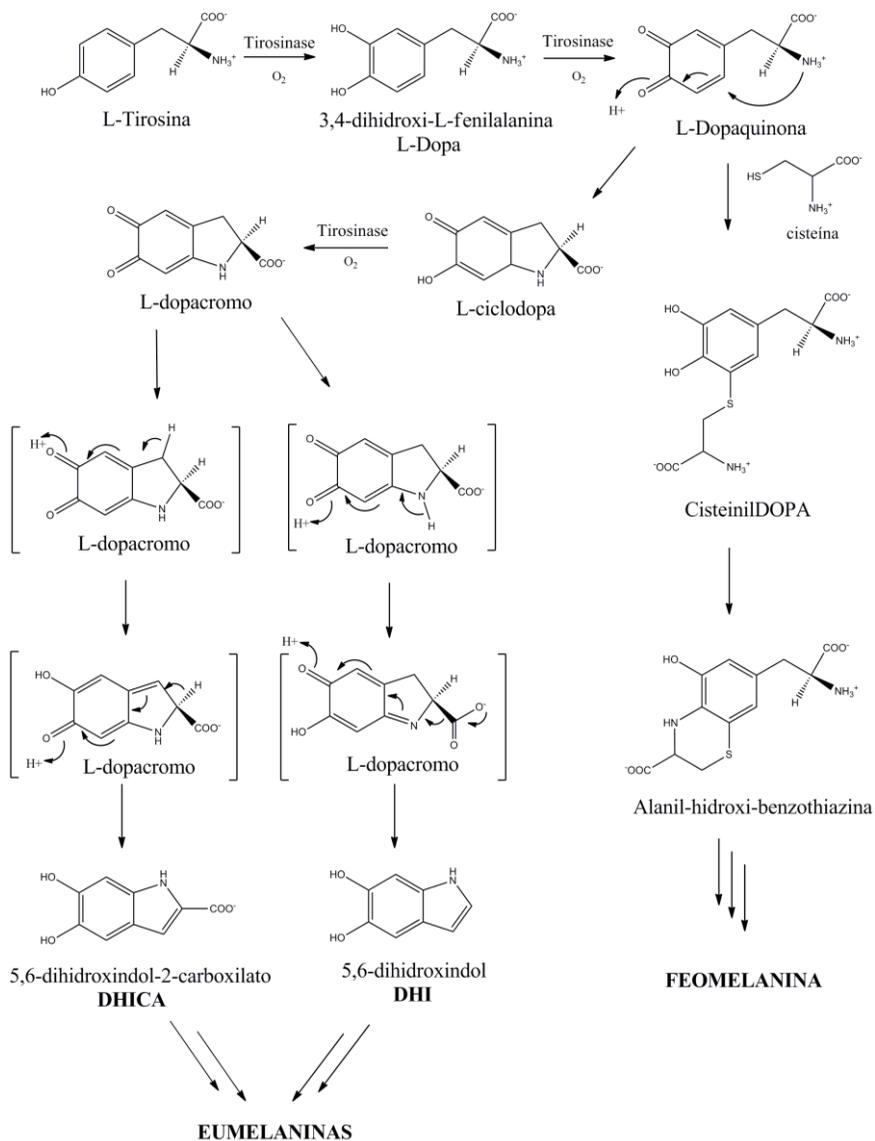
**Figura 4.** (A) Estrutura proposta por Bielawski e colaboradores: melaninas estruturadas por ligações de hidrogênio e sem participação covalente, retirada da referência 13 (B) Estrutura de Hong e colaboradores: melaninas apresentando ligações de hidrogênio, mas entre seus oligômeros, com a participação de ligações covalentes intramonomérica, retirada da referência 14.

## 2.2. Melanogênese

A melanogênese é o mecanismo proposto na literatura<sup>3,6</sup> para a formação das melaninas (*eumelanina* e *pheomelanina*) a partir da tirosina sob a ação da tirosinase, mostrado no Esquema 1. Esse mecanismo cujo ponto chave é a atividade enzimática é o mais aceito dentre todos os modelos propostos para a formação das melaninas, sendo um amplo processo que ocorre em todos os tipos de organismos ao longo da escala filogenética. Esse mecanismo consiste de uma série de reações que envolvem apenas uma enzima melanogênica na maioria das espécies, enquanto em mamíferos é regulamentada pela ação combinada de um conjunto de células: melanócitos.

O mecanismo proposto foi provado utilizando tirosinase em concentrações controladas e isolado o intermediário L-dopacromo, e observa-se no Esquema 1 que durante a biossíntese da *eumelanina*, a L-dopaquinona sofre uma reação química intramolecular de adição 1-4 ao anel aromático, e que o grupo amino da L-dopaquinona leva a um produto de adição de Michael ciclizando para produzir a L-ciclodopa, sendo este intermediário rapidamente e espontaneamente oxidado para o L-dopacromo. Nesta etapa duas reações podem ocorrer: a descarboxilação do L-dopacromo produzindo o 5-6-dihidroindol e o rearranjo intramolecular produzindo o 5-6-dihidroindol-2-carboxilato, ocorrendo espontaneamente a polimerização desses dois intermediários formando as *eumelaninas*.

Para as *pheomelaninas*, observa-se a adição do aminoácido cisteína após a formação da L-dopaquinona e para o sucesso desta reação necessita-se de moléculas de baixo peso molecular contendo grupamentos tióis ou hidroxílicos como o aminoácido citado ou como em nosso trabalho substituímos a cisteína por serina e treonina. Na presença desses compostos ocorre uma rápida conjugação entre o L-dopaquinona e o grupamento de entrada -OH ou -SH gerando intermediários contendo oxigênio ou enxofre. O mecanismo proposto para esta etapa, consiste no ataque nucleofílico do grupamento tiol a molécula de L-dopaquinona obtendo como produto o cisteinildopa, e por fim, este produto sofre diversos rearranjos e desidratação que levam a formação da alanil-hidroxi-benzotiazina que polimerizam naturalmente formando as *feomelaninas*.



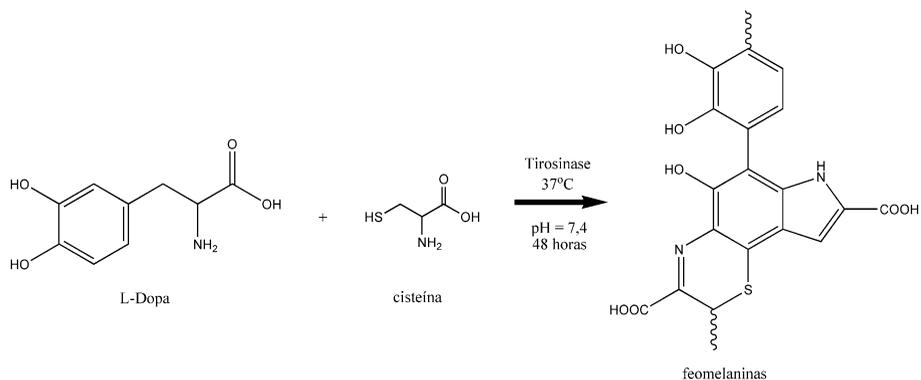
**Esquema 1.** Mecanismo de formação das melaninas, melanogênese, a partir da tirosina e em presença da tirosinase.

### 2.3. Melaninas quimicamente modificadas por aminoácidos

Melaninas modificadas por aminoácidos é um tema atual, no qual existe apenas um artigo publicado na literatura sobre o assunto<sup>15</sup>. Ele descreve um processo de modificação química de melaninas extraídas de fungos pelo aminoácido arginina. Em sua parte experimental, os autores descrevem simplificadaamente que os aminoácidos foram colocados em contato com as melaninas. A mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos e em seguida foi centrifugada para coletar a melanina. Esse processo pode representar apenas uma adsorção e não uma modificação química, levando em conta a capacidade das melaninas de interagirem com pequenas moléculas por adsorção.

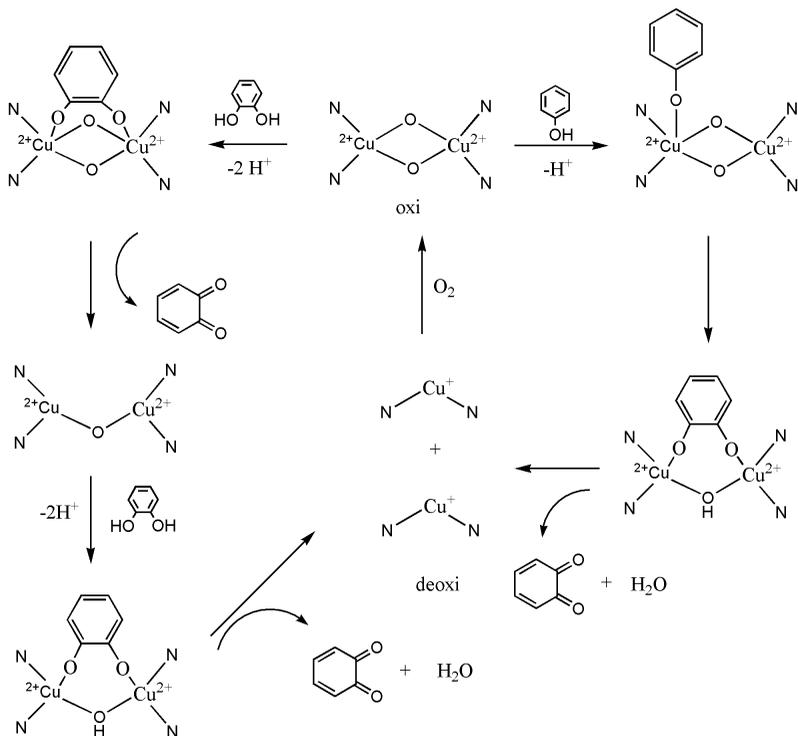
Entretanto, inspirado neste artigo, conhecendo-se o mecanismo de formação das melaninas, Esquema 1, e ainda, sabendo-se que as *pheomelaninas* sintéticas contêm a cisteína em sua rota<sup>10,16</sup>, sugerimos utilizar a mesma rota sintética para preparação de mais duas melaninas, aqui chamadas melaninas modificadas, com os aminoácidos serina e treonina. Basicamente, utiliza-se como reagente de partida o 3,4-dihidroxifenilalanina e com a adição da enzima tirosinase chega-se no precursor dopaquinona<sup>17</sup>. Nesta etapa, com a adição de cisteína chega-se às cisteinildopaquinonas, naturalmente formando as benzotiazinas por ciclização do grupamento cisteínico ligado ao dopa e, por fim, polimerizando e formando as *pheomelaninas*<sup>10,16</sup>. O processo de preparação simplificado é apresentado no Esquema 2.

Analogamente a rota proposta por Chedekel<sup>16</sup>, e utilizando aminoácidos com cadeia principal contendo três átomos de carbono, foram sintetizados outros dois tipos de melanina chamadas neste trabalho de ser-DOPA e thr-DOPA. A cys-DOPA (*pheomelanina*) também foi sintetizada e aplicada aos mesmos processos que foram submetidos às outras duas para comparação e elucidação de suas propriedades físico-químicas, atividades antioxidantes e ainda interação com espécies catiônicas.



### Esquema 2. Preparação da *feomelanina*.

Na etapa de síntese, vale lembrar, que a tirosinase desempenha um papel primordial na obtenção do produto com alto grau de pureza. Essa metaloenzima de Cu(II), classificada como monooxigenase é encontrada em organismos vivos como animais e plantas<sup>18</sup>. É responsável pela ação de cresolase e ainda catecol oxidase. O Esquema 3 mostra o mecanismo proposto por Solomon<sup>19</sup> da ação desta enzima.

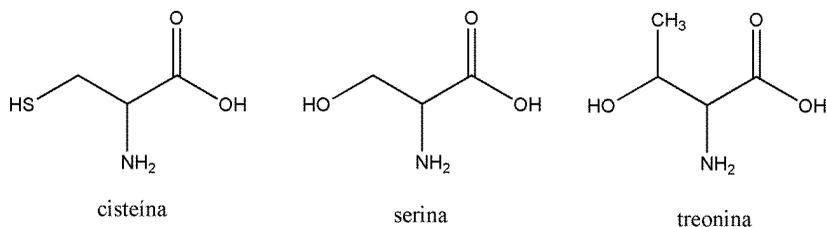


**Esquema 3.** Mecanismo simplificado de ação da tirosinase.

Como cresolase, o oxigênio do monofenol coordena-se primeiramente ao centro de cobre(II), então ocorre a ruptura da ponte oxo, promovendo a ligação com o oxigênio, por fim, ocorre a liberação da quinona correspondente e consequente regeneração do catalisador.

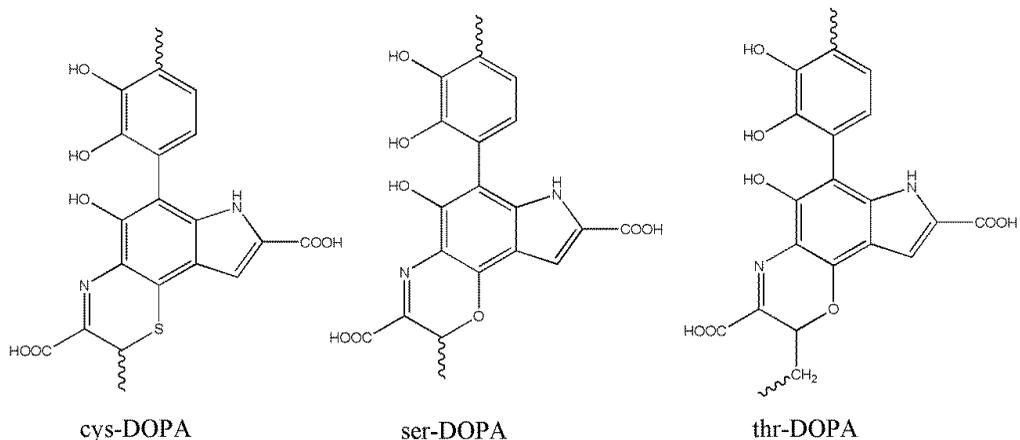
Já como catecol oxidase oxidando o DOPA ocorre a coordenação do difenol ao centro binuclear pelos dois oxigênios, a ponte oxo é rompida e subsequentemente ocorre a geração da quinona correspondente, todavia outra molécula de DOPA pode ser oxidada coordenando-se aos centros de cobre e gerando mais uma quinona, com formação da espécie deoxi da enzima que logo é regenerada para mais um ciclo catalítico.

Nossa visão acerca das melaninas modificadas por aminoácidos é promissora. As estruturas dos aminoácidos utilizados para esta modificação são apresentadas na Figura 5.



**Figura 5.** Aminoácidos utilizados na modificação química das DOPA-melaninas

Observam-se nas estruturas dos aminoácidos dois grupamentos diferentes ligados ao carbono  $\beta$  da cadeia, um grupamento hidroxila e outro tiol. A modificação das melaninas por esses aminoácidos promoverá características diferentes para os bio-oligômeros, principalmente no que diz respeito a quelação por íons metálicos. Uma melanina modificada pela cisteína (*pheomelanina*) ganha um caráter mais macio do que uma modificada pela serina, isso reflete na seletividade de coordenação por íons metálicos com dureza intermediária como Cu(II) e Zn(II); ou ainda na interação com pequenas moléculas catiônicas, onde o pKa da melanina é fundamental para haver maior ou menor interação. A Figura 6 mostra a proposta dos monômeros obtidos através das melaninas modificadas pelos aminoácidos, estruturas inspiradas no trabalho de Simon e colaboradores<sup>10</sup>.



**Figura 6.** Modelos estruturais propostos para as subunidades majoritárias obtidas através da modificação química de DOPA-melaninas com aminoácidos cisteína, serina e treonina respectivamente.

Nos modelos podemos observar os grupamentos majoritários que contém as melaninas como ácidos carboxílicos, mono e difenóis e ainda heterocíclicos contendo enxofre. Outro grupamento que também está presente nas melaninas foi identificado por Szpoganicz<sup>11</sup> e colaboradores, que é a quinona-imina, resultante da tautomerização dos grupamentos indólicos.

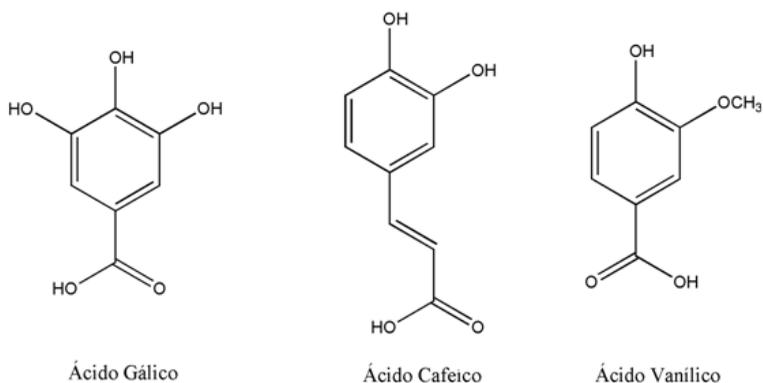
## 2.4. Ação antioxidante das melaninas

Os antioxidantes são definidos como compostos que são capazes de inibir a oxidação de um determinado átomo, molécula ou substrato. No organismo, evitam uma série de reações malélicas como a proliferação de radicais livres e ainda inibem outras reações de oxidação<sup>20</sup>. Uma das funções das melaninas no organismo é a de antioxidante<sup>21-22</sup>; presente na pele, cabelo, olhos e cérebro evitam danos a esses meios através das reações fotoquímicas e redox.

Definida como um antioxidante natural, as melaninas possuem grupamentos fenólicos que são os responsáveis pela ação antioxidante.

Outros compostos como ácido gálico, cafeico e demais polifenóis contendo grupamentos dihidróxidos possuem geralmente um grande poder redutor<sup>23-25</sup>.

A grande vantagem dos antioxidantes naturais é sua baixa toxicidade, podendo ser utilizado seguramente e apresentando baixos efeitos colaterais, servindo também como conservantes de alimentos e ainda como componentes de cremes na indústria de cosméticos e farmacêutica<sup>26</sup>. A Figura 7 mostra alguns polifenóis com atividade antioxidante.



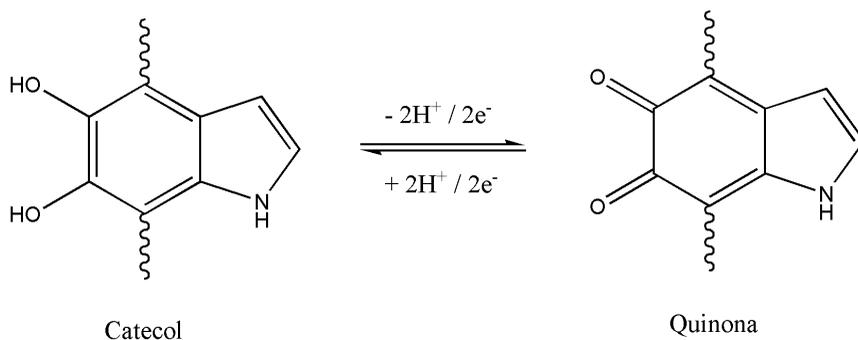
**Figura 7.** Fórmula estrutural de alguns polifenóis com ação antioxidante.

Entretanto, as fontes de melaninas são escassas e geralmente de difícil obtenção<sup>4</sup>, sendo necessários reagentes caros e exigindo uma exaustiva purificação. Sendo assim, as melaninas sintéticas tornam-se um meio viável para obtenção desses compostos de modo simplificado e de baixo custo quando comparado com a extração de meios naturais. Portanto, a modificação química dessas melaninas com aminoácidos poderá proporcionar uma baixíssima toxicidade e diferentes atividades antioxidantes. Hearing e colaboradores<sup>27</sup> relatam que alguns precursores envolvidos na Melanogênese exibem certa citotoxicidade como, por exemplo, o DHI livre que impediu o crescimento de 78% de células em

96 horas. Assim, é importante realizar o ensaio de citotoxicidade das melaninas sintetizadas neste trabalho.

Existem inúmeras maneiras de medir a atividade antioxidante de um determinado composto, que varia de ensaios envolvendo determinadas reações químicas a métodos instrumentais. Destacam-se na literatura ensaios envolvendo a captura de radicais livres utilizando o composto 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH)<sup>28</sup>, e também ensaios de poder redutor<sup>29-30</sup> onde se utiliza um padrão, geralmente ácido ascórbico, e é medido a capacidade do composto de reduzir o íon Fe(III); o resultado é expresso em mg de composto por grama de ácido ascórbico, sendo essas metodologias utilizadas em nosso trabalho. Nos métodos instrumentais destaca-se o uso de eletroquímica, voltametria cíclica e onda quadrada, pois processos redox que ocorrem na superfície do eletrodo podem ser correlacionados com processos biológicos via reações químicas. Baseado no fato que bons antioxidantes devem oxidar-se facilmente, parâmetro como potencial do pico de oxidação ( $E_{po}$ ) e potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) podem ser utilizados para prever a capacidade antioxidante de determinada molécula<sup>31-32</sup>.

No caso das melaninas, sua capacidade antioxidante é atribuída aos grupamentos catecolatos presentes na molécula que podem oxidar-se facilmente a o-quinonas (Figura 8).



**Figura 8.** Par redox catecol/quinona, equilíbrio responsável pela ação antioxidante das melaninas.

Estudos eletroquímicos e espectroeletroquímicos das melaninas foram reportados por Farmer<sup>33</sup>, Costa<sup>34</sup> e colaboradores. Esses estudos

elucidam o par redox apresentado na Figura 8 e ainda as diferenças eletroquímicas em presença de íons metálicos. Todavia, eles ressaltam a formação de filmes de melaninas na superfície do eletrodo que podem vir a dificultar as medidas eletroquímicas. Por fim, a realização de correlações entre medidas eletroquímicas e determinações *in situ* são fundamentais para se conhecer a capacidade antioxidante real de uma determinada molécula.

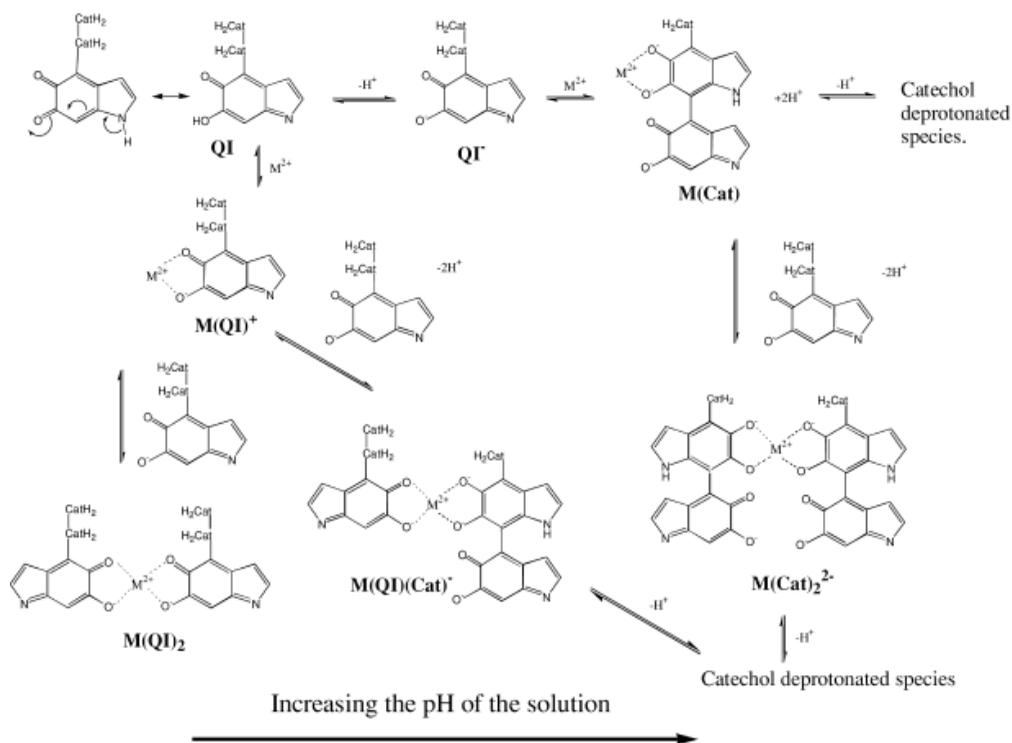
## 2.5. Interação das melaninas com íons metálicos

A capacidade das melaninas interagirem com íons metálicos é uma característica importantíssima, pois resulta em uma série de efeitos que alteram as propriedades biológicas destes pigmentos<sup>35</sup>, e ainda estas interações são utilizadas como ferramenta para elucidação estrutural da própria melanina<sup>11</sup>. Como mostrado na Figura 3, a melanina possui seus principais grupos quelantes derivados de monômeros contendo átomos de oxigênio doadores. Já foi mostrado em trabalhos anteriores, a grande capacidade de melaninas naturais extraídas do cabelo e sintéticas derivadas do DHI de interagirem com o íon Fe(III)<sup>34</sup>. Essa forte interação se deve as características ácidas e básicas do centro metálico e do ligante, respectivamente. Seus complexos são estabilizados termodinamicamente por efeito quelato<sup>36</sup>. E íons divalentes como Cu(II) e Zn(II) também exibem uma grande interação com as melaninas<sup>11</sup>. O estudo mais impressionante foi efetuado por Liu e colaboradores que relatam que a melanina exibe uma interação maior com os íons Mg(II), Ca(II), Sr(II) e Cu(II) quando comparada com o EDTA<sup>37</sup>.

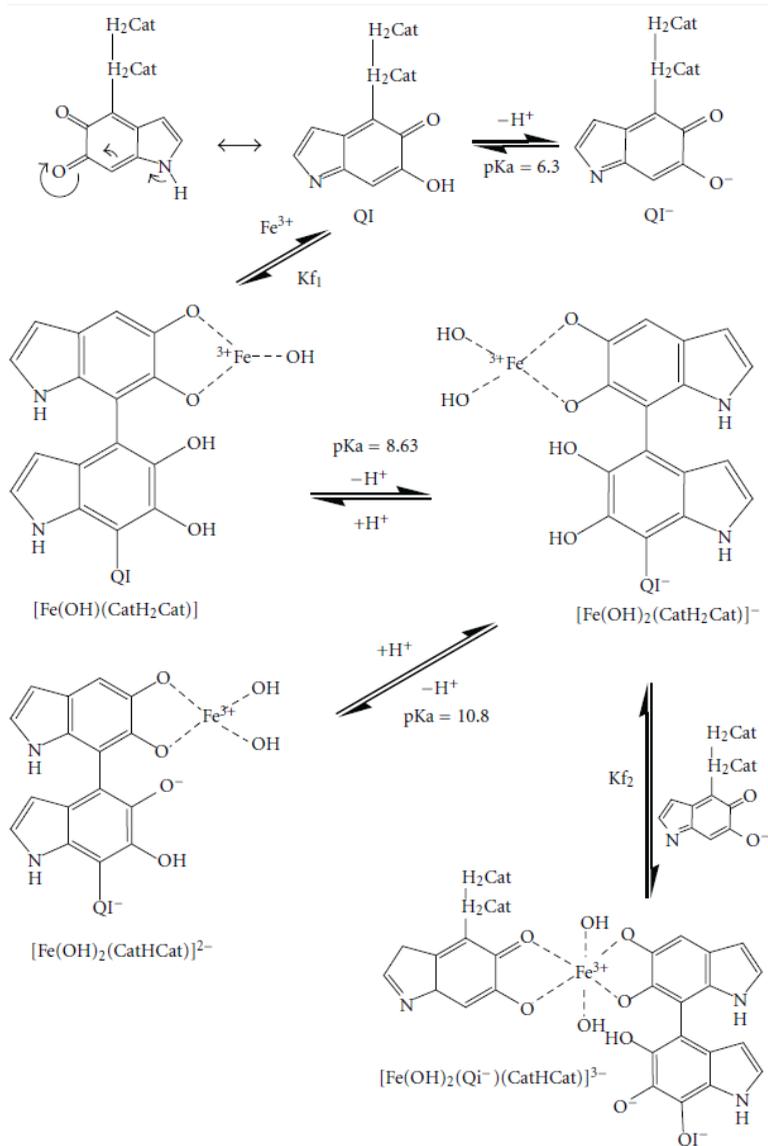
Entretanto, as interações das melaninas por centros metálicos dependem fundamentalmente do pH do meio e, geralmente, a coordenação é favorecida com o aumento do pH<sup>11</sup>, a variação da concentração hidrogeniônica do meio não apenas favorece a complexação mas também, rege o tipo de complexo que será formado e a proporção estequiométrica.

Observando apenas os grupamentos presentes nas *eumelaninas*, vemos uma predominância de grupos funcionais denominadas de bases duras que coordenam bem metais duros como, por exemplo, cátions trivalentes. Já as *pheomelaninas* que contém enxofre (Figura 6) podem favorecer a interação com metais como Cu(II) e Zn(II), sendo que um artigo recente relata a interação de complexos procedentes desses metais com DOPA melaninas<sup>38</sup>, entretanto sem investigar quais espécies eram formadas. Na farmacologia, melaninas são alvo de metalodrogas como relatado no trabalho anterior e até hoje não foi realizado nem um estudo

comparativo, detalhado, entre as interações de Cu(II) e Zn(II) com *-eu* e *pheomelaninas* utilizando os modelos monoméricos mais aceitos na literatura. Este estudo proposto nesta tese contribuirá de forma positiva para o entendimento da coordenação desses metais com as melaninas e mostrará a seletividade de interações metal-melanina em função do pH do meio e do tipo de melanina estudada. O Esquema 4 (a) mostra as principais interações reportadas na literatura das melaninas sintéticas DHI com Cu(II) e Zn(II)<sup>11</sup> como também mostra o trabalho das interações com o íon Fe(III)<sup>34</sup> recentemente publicado e apresentado no esquema 4 (b).



**Esquema 4a.** Equilíbrios envolvendo a melanina sintética DHI e íons divalentes, retirado da referência 11.



**Esquema 4b.** Equilíbrios envolvidos entre a melanina natural extraída do cabelo e o íon Fe(III), retirado da referência 34.

## 2.6. Interação das melaninas por moléculas orgânicas catiônicas

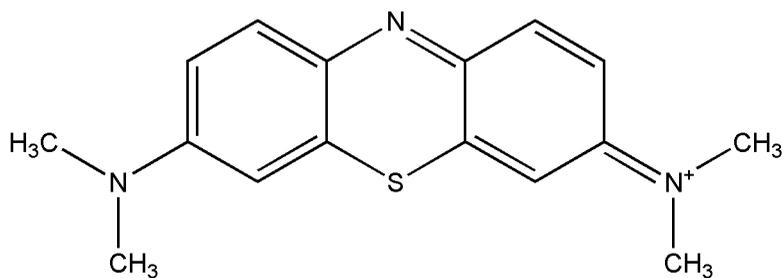
Os grupos majoritários presentes nas melaninas são classificados como ácidos fracos, como visto anteriormente, e sofrem grande influência do pH quando em solução, e até mesmo no estado sólido. Geralmente, como relatado na literatura, com o aumento do pH as melaninas se apresentam na forma aniônica e ficam mais susceptíveis às interações com íons metálicos como visto na sessão 2.5 e às interações com pequenas moléculas orgânicas neutras, por ligações de hidrogênio, e catiônicas, como relatado recentemente por Pescina e colaboradores<sup>39</sup>. Entretanto, eles apontam alguns aspectos interessantes e difíceis nesses estudos de interação: primeiro que melaninas extraídas de diferentes fontes possuem diferentes afinidades pela mesma espécie; segundo, que as melaninas naturais que eles utilizaram no trabalho podem trazer dificuldades em medir estas interações, pois necessitam de uma exausta caracterização e também uniformidade nos processos de extração para obter a mesma organização intermolecular em todas as amostras; e por último, há poucos estudos sobre as interações de espécies orgânicas com as melaninas. Neste trabalho foram relatadas as interações das melaninas com levofloxacin, prednisolona, propanolol e ainda azul de metileno.

As aplicações oriundas dessas interações são diversas e as interações com fármacos nos dão informações sobre como determinada molécula com alguma atividade específica pode ser retida no corpo pelas melaninas. Além disso, uma certa estabilidade de interação entre melanina-fármaco pode nos levar a um sistema promissor de liberação controlada de fármacos (drug-delivery)<sup>40</sup>.

Já as interações por azul de metileno, que é um corante largamente utilizado tanto na medicina para tratamento da metahemoglobinemia<sup>41</sup>, e na indústria para tingimento; a fronteira de aplicações se torna ainda maior podendo chegar até um remediador de resíduos nas indústrias têxteis, tendo em vista que até alguns tipos de cefalópodes produzem melaninas, tornando-as de fácil obtenção<sup>42</sup>.

Entretanto, há poucos experimentos que descrevem o sistema de interação entre as melaninas e essas moléculas, sendo que ainda temos poucas referências na literatura. Não se sabe, por exemplo, qual o mecanismo de adsorção, nem por qual grupamento a melanina irá interagir, e com o intuito de caracterizar essas interações, propomos neste trabalho estudar as interações das três melaninas sintetizadas pelo corante azul de metileno, estrutura apresentada na Figura 9. Os

resultados contribuirão nos estudos das interações de melaninas e espécies catiônicas.



**Figura 9.** Fórmula estrutural do azul de metileno.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Preparar, caracterizar e estudar as interações das três melaninas quimicamente modificadas por aminoácidos, cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA, com os íons Cu(II), Zn(II) e o corante azul de metileno, bem como, avaliar suas citotoxicidades e atividades antioxidantes.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Preparar e purificar as melaninas quimicamente modificadas utilizando como precursor o L-DOPA e os aminoácidos cisteína, serina e treonina.
- Investigar a presença residual de precursores por LC-MS.
- Sintetizar os complexos de Cu(II) e Zn(II) com cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA pelo método de Bilinska modificado.
- Caracterizar as melaninas e seus respectivos complexos no estado sólido por CHNS, FTIR, TGA, EDS, SAXS, cálculos teóricos e elucidar suas morfologias por microscopia eletrônica de varredura.
- Calcular os valores de  $pK_a$  dos grupamentos presentes em cada melanina e medir suas afinidades pelos íons Cu(II) e Zn(II) por titulação potenciométrica, espectrofotométrica e quantificar os grupamentos ácidos pelo método de Schnitzer e Gupta.
- Elucidar as espécies redox ativas nas melaninas e nos seus respectivos complexos por voltametria cíclica e onda quadrada.
- Avaliar as interações das melaninas pelo corante azul de metileno utilizando modelos cinéticos e isotermas de

Lagmuir e Freundlich no pH ideal de adsorção, e caracterizar os produtos finais por métodos espectroscópicos.

- Realizar ensaios de citotoxicidade dos compostos sintetizados frente a células NIH/3T3 de fibroblastos bovinos e células humanas endoteliais sadias - HUVEC.

- Medir as atividades antioxidantes de cada melanina pelos métodos de captura de radicais livres – DPPH e poder redutor, correlacionado-as com os respectivos potenciais eletroquímicos de oxidação.

## 4. Materiais e Métodos

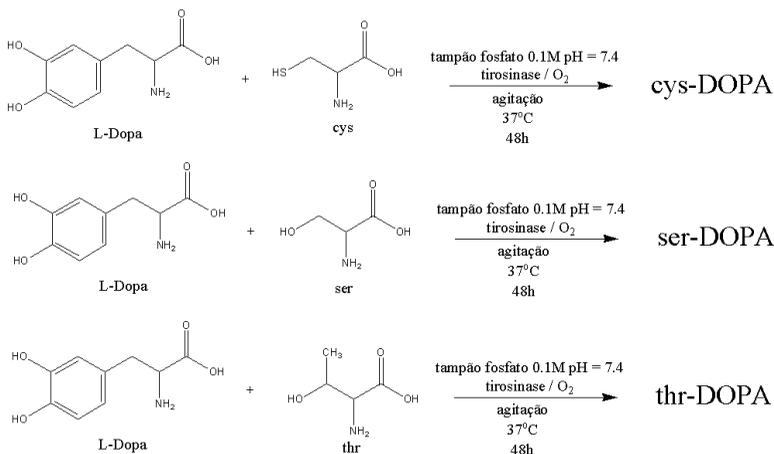
### 4.1. Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos de fontes comerciais e foram utilizados sem purificação prévia e sem outros procedimentos especiais: L-DOPA, L-cisteína, L-serina, L-treonina e enzima tirosinase em pó liofilizado extraída de fungos na concentração maior que 1000 unidades por mg de sólido, e todos obtidos da Sigma-Aldrich; ácido clorídrico 37% (Nuclear QMC), hidróxido de potássio livre de CO<sub>2</sub> em ampolas da Backer dilut-It, argônio e nitrogênio 99% de pureza (White Martins), ftalato ácido de potássio (Reagen S.A.), EDTA dissódico (Vetec), acetona P.A. (Nuclear QMC), hidrogênio fosfato de sódio mono/di básico (VETEC), cloreto de cobre dihidratado e nitrato de zinco hexahidratado, cloreto de potássio, brometo de potássio, acetato de cálcio, hidróxido de bário, ambos (VETEC); cloreto de 3,7-bis(dimetilamino)fenotiazínio – azul de metileno (Sigma-Aldrich); água bidestilada e fervida produzida em nosso laboratório. Células de soro fetal bovino(FBS), estreptomina, e meio dulbecco (DMEM) foram adquiridos por Invitrogen (Carlsbad, CA). (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), e dimetilsulfoxido (DMSO) adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

### 4.2. Preparação e purificação das melaninas quimicamente modificadas

A preparação das melaninas quimicamente modificadas foi inspirada no trabalho de Chedekel e colaboradores<sup>16</sup>, muito utilizado em trabalhos atuais na síntese das *pheomelaninas*. Esta síntese consiste na reação do L-DOPA com os aminoácidos L-cisteína, L-serina e L-treonina em presença de tirosinase. O Esquema 5 resume a preparação das melaninas modificadas. A preparação detalhada consiste em solubilizar 0,36 mmol de L-DOPA em uma solução aquosa de tampão fosfato 0,1M pH = 7,4 à 37°C. Após a solubilização completa do reagente de partida adiciona-se uma quantidade mínima de tirosinase e, um minuto após adição do catalisador, a solução apresenta uma cor alaranjada característica da formação de dopaquinonas<sup>10</sup>. Neste momento, adiciona-se uma quantidade de 0,71 mmol de aminoácido previamente dissolvido na mínima quantidade de tampão fosfato. Quando cisteína é adicionada à solução, ela torna-se marrom, e quando

serina ou treonina é adicionada, a solução torna-se preta. O tempo para finalizar estas reações está entre 36 a 48 horas.



**Esquema 5.** Processos reacionais para formação das melaninas quimicamente modificadas: cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA.

Após 48 horas de reação, adiciona-se 2 mL de HCl 1M e a solução é centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O sólido resultante é coletado e lavado intensamente com água bidestilada para eliminação total de vestígios de cloreto existentes, realizando sempre o teste com nitrato de prata. Depois da lavagem o sólido é colocado em 30 mL de uma solução acetona:água 2:1 a 50°C e filtrado a quente para eliminação de qualquer outro cátion que poderá estar presente e de dímeros dos aminoácidos e do L-DOPA. O sólido resultante purificado, então, foi submetido às caracterizações e utilizado para o estudo das interações com as espécies catiônicas, citotoxicidade e atividades antioxidantes.

### 4.3. Preparação dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com melaninas

As sínteses dos complexos de cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA com os íons Cu(II) e Zn(II) foram realizadas pelo método de Bilinska<sup>43</sup> com pequenas modificações. Massas de aproximadamente 100 mg de

cada melanina foram solubilizadas em soluções de Cu(II) e Zn(II) na proporção molar 2:1 melanina:metal e o pH foi ajustado em valores de 3, 7 e 10, pela adição de KOH 0,1M. As soluções permaneceram sob agitação por 24 horas sob atmosfera inerte e, posteriormente, a mistura reacional centrifugada a 4000 rpm e o sólido obtido foi submetido a secagem a vácuo para futuras caracterizações.

#### 4.4. Estudos de interação das melaninas por azul de metileno

Os estudos para uma avaliação detalhada da interação de cada melanina com o azul de metileno e uma explicação de um possível mecanismo de adsorção foram obtidos através de experimentos avaliando o efeito do pH, cinética e isotermas de adsorção detalhadas a seguir, seguindo a metodologia de Laus e colaboradores<sup>44</sup> com pequenas modificações:

##### 4.4.1. Efeito do pH

Como descrito na revisão bibliográfica, as melaninas sofrem grande influência do pH do meio, portanto, a avaliação do efeito da variação da concentração de íon  $H^+$  na solução, nunca estudada antes, em função da quantidade de azul de metileno que interage com a melanina é o primeiro passo que deve ser dado nesta etapa.

Utilizou-se massas variando entre 2-5 mg de melanina e colocá-las em 50mL de uma solução contendo  $100 \text{ mg L}^{-1}$  do corante azul de metileno sob agitação vigorosa e em ausência de luz por 24 h à temperatura ambiente, variando-se o pH entre 3 e 8 . Ao final de cada experimento a mistura final será centrifugada a 4000 rpm e o sobrenadante coletado e analisado por espectroscopia de UV-Vis em 664 nm. Será determinada a quantidade de azul de metileno na matriz de melanina em cada pH pela equação (1).

$$(1) \quad q = \frac{(C_o - C_e)V}{m}$$

Onde q é a quantidade de azul de metileno adsorvida ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_o$  e  $C_e$  é a concentração de corante azul de metileno, em solução, antes e depois

do processo de adsorção, respectivamente, ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $V$  é o volume da solução (em litros) e  $m$  é a massa de melanina utilizado (em gramas).

#### 4.4.2. Cinética de adsorção

A cinética de adsorção revela, além do mecanismo de adsorção, a quantidade de soluto que é retirada da solução em função do tempo, que é de grande importância para aplicações de interação de fármacos ou ainda, remediação de resíduos por adsorção em matrizes complexas.

Os estudos de cinética foram realizados utilizando massa de melanina entre 2-5 mg no valor de pH ajustado com aquele que obteve melhor adsorção, misturados em uma solução contendo 50 mL de solução aquosa de corante na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  e foi deixada sob agitação por 1 hora, inicialmente, para que o equilíbrio de adsorção seja atingido. Após períodos pré-estabelecidos, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram retiradas e diluídas para um volume adequado para a análise por UV-Vis em 664 nm.

Para verificação do mecanismo cinético da adsorção do corante na superfície da melanina foi utilizado o modelo linear de pseudo-primeira (PFO) e segunda (PSO) ordem. As equações de cada modelo são descritas a seguir em (2) e (3) respectivamente, onde  $q_e$  e  $q_t$  são as concentrações adsorvidas no equilíbrio e no tempo  $t$  (h) respectivamente,  $k_1$  ( $\text{h}^{-1}$ ) e  $k_2$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) são as constantes de primeira e segunda ordem respectivamente.

$$\frac{dq}{dt} = k_1(q_e - q_t); \text{ (2) equação diferencial de pseudo primeira}$$

**ordem**

$$\ln(q_e - q_t)_t = \ln(q_e - q_t)_{t_0} - k_1(t - t_0); \text{ (3) equação de PFO}$$

integrada;

aplicando as condições iniciais  $t_0 = 0$  e  $q_t$  em  $t_0 = 0$ , a equação final que será utilizada para o estudo do mecanismo de PFO (4) é:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (4);$$

Plotando-se um gráfico  $\ln(q_e - q_t)$  vs  $t$  obtém-se como coeficiente angular  $k_1$  e como coeficiente linear  $\ln q_e$ .

As equações que descrevem o modelo de PSO na forma diferencial e integral (5) e (6) respectivamente são:

$$\frac{dq}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2; \quad (5) \text{ equação diferencial de } \mathbf{pseudo\ segunda}$$

**ordem.**

$$\frac{1}{(q_e - q_t)_t} = \frac{1}{(q_e - q_t)_0} k_2 (t - t_o); \quad (6) \text{ equação de PSO}$$

integrada.

Aplicando as mesmas condições iniciais da equação anterior, obtém-se a equação que será utilizada para estudar este mecanismo (7):

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (7)$$

Plotando-se um gráfico  $t/q_t^{1/2}$  vs  $t$  obtemos como coeficiente angular  $q_e$  e como coeficiente linear  $k_2$ .

O modelo cinético mais apropriado será avaliado pelos modelos das equações linearizadas utilizando o coeficiente de correlação  $R^2$  para julgar a adequação de cada um. De posse dos valores de  $k$  e  $q_e$ , é

possível obter a velocidade de adsorção inicial,  $h$ , por meio da equação (8):

$$h = k \cdot q_e^2 \quad (8)$$

#### 4.4.3. Isotermas de adsorção

As isotermas descrevem quantitativamente o fenômeno de adsorção. Os resultados nos fornecem a quantidade do azul de metileno que é adsorvido por unidade de massa das melaninas e a concentração do corante em solução no equilíbrio a uma temperatura constante. Dois modelos matemáticos foram utilizados neste trabalho para relacionar a capacidade de adsorção e a concentração final do adsorvato. São eles a Isoterma de Langmuir que suporta a teoria de que a superfície do adsorvente é uniforme com sítios de adsorção iguais. A equação em sua forma linearizada que descreve esse processo é apresentada (9) a seguir:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_m} + \frac{1}{q_m} C_e; \quad (9) \text{ onde:}$$

$C_e$  e  $q_e$  são, respectivamente, a concentração do azul de metileno na solução em  $\text{mg.L}^{-1}$  e a quantidade adsorvida em  $\text{mg.g}^{-1}$ ,  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção em  $\text{mg.g}^{-1}$  e  $K_L$  é a constante de Langmuir em  $\text{mg L}^{-1}$ . O coeficiente angular da curva  $C_e/q_e$  vs  $C_e$  nos fornece  $q_m$  e o linear  $K_L$ .

Outro modelo matemático que utilizaremos é o de Freundlich que descreve o equilíbrio em superfícies heterogêneas, onde a quantidade adsorvida é a integração de todos os sítios. A equação que descreve esse modelo (10) é:

$$\log q_e = \log K_F + b_F \log C_e \quad (10); \text{ onde:}$$

$C_e$  e  $q_e$  são, respectivamente, a concentração do azul de metileno na solução em  $\text{mg L}^{-1}$  e a quantidade adsorvida em  $\text{mg g}^{-1}$  e  $b_F$  e  $K_F$  são as constantes de Freundlich. Os valores de  $b_F$  variam entre 0 e 1, sendo que, quanto mais heterogênea a superfície, mais o valor de  $b_F$  se aproximará de zero.

O último modelo utilizado neste trabalho é a isoterma de Dubinin-Radushkevich – DR, que é aplicado para avaliar se o mecanismo de adsorção é de natureza física ou química, a forma linear da isoterma de D-R é apresentada na equação 11:

$$\ln q_e = \ln q_m - k\varepsilon^2 ; (11) \text{ onde:}$$

$q_m$  e  $q_e$  são, respectivamente, a capacidade máxima de adsorção em  $\text{mg.L}^{-1}$  e a quantidade adsorvida em  $\text{mg.g}^{-1}$  e  $k$  é a constante de D-R, e  $\varepsilon$  é descrito na equação 12:

$$\varepsilon = RT \ln\left(1 + \frac{1}{C_e}\right) ; (12) \text{ onde:}$$

$R$  é a constante dos gases,  $8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ,  $T$  é a temperatura em escala absoluta e  $C_e$  é a concentração do azul de metileno na solução em  $\text{mg.L}^{-1}$ .

A partir da equação de D-R é possível obter a energia livre de adsorção,  $E$ , que descreve a energia envolvida na adsorção de um mol de soluto em solução na superfície do adsorvente. A energia é calculada a partir da equação 13:

$$E = \frac{1}{\sqrt{-2k}} ; (13) \text{ onde:}$$

E é a energia envolvida na adsorção e  $k$  é a constante de DR.

Os resultados de E definem se o processo de adsorção é químico ou físico, sendo que para valores inferiores de  $8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , indica um processo físico, em contrapartida valores acima de  $8 \text{ kJ.mol}^{-1}$  indicam que o processo é químico.

Experimentalmente, colocou-se uma massa de 5 mg de cada melanina em 10mL de soluções contendo concentrações de azul de metileno variando entre 10 e  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , ajustado para o valor de pH ideal, em frascos fechados por 24 horas sob agitação constante e em ausência da luz. Após esse tempo centrifugou-se as amostras e o sobrenadante analisado por UV-Vis em 664 nm.

## **4.5. Métodos de Caracterização**

### **4.5.1. Análise Elementar**

As análises dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foram realizadas em um analisador elementar modelo Flash EA 1112 series CHNS-O Marca: Thermo Electron Corporation no Laboratório de Análise e Caracterização Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

### **4.5.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier**

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Jasco FTIR-4100 no Laboratório de Materiais do Ateliê de Conservação-Restauração de Bens Culturais Móveis – ATECOR da Fundação Catarinense de Cultura, utilizando pastilhas de KBr e no modo de 64 scans.

### **4.5.3. Termogravimetria**

Os termogramas foram obtidos em um analisador termogravimétrico modelo TGA-50, marca Shimadzu, no Departamento de Química da UFSC. Amostras contendo cerca de 10 mg foram aquecidas e submetidas a análise em um intervalo de temperatura

variando de 100 até 700 C° com uma taxa de variação entre 3-5 C°/min dependendo da amostra.

#### **4.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura**

O estudo morfológico das melaninas modificadas, bem como seus complexos foi realizado utilizando MEV em um equipamento marca/modelo JEOL JSM-6390LV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

#### **4.5.5. Cromatografia Líquida com detector Espectrômetro de Massas**

As análises de aminoácidos residuais nas três melaninas sintetizadas foram realizadas por LC-MS utilizando uma coluna ZIC-HILIC (Merck) com a temperatura ajustada em 30 °C no Laboratório de Eletroforese Capilar da UFSC.

Neste experimento, a fase móvel foi constituída de ácido fórmico 0,1% e metanol, utilizando os modos de gradiente linear e isocrático, como segue: 10 min a 25% de ácido fórmico 0,1%, de 25 a 90% de ácido fórmico 0,1% em 20 min, 15 min a 75% de ácido fórmico 0,1%. Taxa de fluxo da fase móvel: 100 µL/min. Em todas as análises, o volume injetado foi 2,0 µL e o tempo total de análise 35 min, com pré-condicionamento de 10 min.

O cromatógrafo líquido (Agilent 1200; Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Germany) foi acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray (3200 Qtrap; Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada) e foi usado o modo negativo de ionização com os seguintes parâmetros da fonte: a interface íon-spray foi mantida em 350°C e voltagem do íon-spray 5500 V. O software Analyst (versão 1.5.1; Applied Biosystems) foi utilizado para o registro e tratamento dos dados.

#### **4.5.6. Eletroquímica**

A elucidação das espécies redox nas melaninas modificadas foi realizada utilizando um potenciostato-galvanostato modelo PAR VersaSTAT 3 com três eletrodos: trabalho – carbono vítreo, referência – Ag<sup>+</sup>/AgCl, eletrodo auxiliar – fio de platina. Todas as análises foram realizadas em solução aquosa utilizando cloreto de potássio como eletrólito suporte, sob atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente.

#### 4.5.7. Titulação Potenciométrica

As titulações potenciométricas foram realizadas em solução aquosa contendo 50 mg de cada melanina, solubilizadas em 30 mL de água bidestilada e fervida. Cada solução experimental foi titulada utilizando um titulador automático modelo Methrom TITRINO PLUS 350. Os valores de pH foram obtidos utilizando um eletrodo combinado Ag/AgCl. As soluções permaneceram em uma célula termostaticada a 25°C e atmosfera inerte com força iônica controlada por KCl 0,1M durante todos os experimentos. O pH inicial de cada experimento foi ajustado para 2,5 com HCl 0,100 M e titulado com uma solução 0,100 M de NaOH. O tempo para atingir o equilíbrio em cada valor de pH foi ajustado para 10 minutos. As constantes dos equilíbrios ácido/base presentes em cada melanina foram calculadas com a ajuda do programa Best<sup>745</sup> e as respectivas curvas de distribuição das interações foram desenhadas com o programa Species<sup>46</sup>.

Após a obtenção das constantes de acidez dos grupamentos presentes nas melaninas, foram conduzidos os experimentos na presença dos cátions Cu(II) e Zn(II) para medir as constantes de afinidade das melaninas com esses íons. Os experimentos foram conduzidos da mesma maneira que foram para as melaninas sozinhas, mas na presença de 1:1 e 1:2 equivalentes de metal.

#### 4.5.8. Titulação Espectrofotométrica

As titulações espectrofotométricas foram realizadas em soluções contendo 3 mg L<sup>-1</sup> de cada melanina e solubilizadas em soluções aquosas com valores de pH variando entre 7 e 14,5. Coletou-se espectros para cada solução na região entre 200 e 500nm em um Espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50Bio no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia - UFSC.

#### 4.5.9. Espectrometria de energia dispersiva de Raios-X

Também chamada de microanálise por energia dispersiva – EDS, consiste na incidência de um feixe de elétrons sobre o complexo metálico, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida que é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Um detector instalado na

câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron<sup>47</sup>. O experimento foi realizado paralelamente com o de microscopia eletrônica de varredura citado no item 4.5.4.

#### **4.5.10. Cálculos Teóricos**

Os cálculos teóricos dos possíveis dímeros presentes em cada melanina e seus respectivos espectros vibracionais, foram realizados empregando a Teoria do Funcional da Densidade e correlação de troca funcional BP86<sup>48-50</sup> em conjunto com a base TZVP<sup>51</sup>. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Gaussian03<sup>52</sup>. O trabalho foi desenvolvido nas dependências do Grupo de Estrutura Eletrônica Molecular do departamento de Química da UFSC, sob orientação do Prof. Dr. Giovanni Finoto Caramori e no Laboratório de Fotoquímica Molecular – LFQM da Universidade Federal Fluminense sob orientação do Prof. Dr. Fábio da Silva Miranda.

#### **4.5.11. Espalhamento de Raios-X a baixos ângulos - SAXS**

As análises de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas – São Paulo. Foram utilizadas as respectivas condições operacionais: 0,59 metros de distância da amostra para detector, fonte síncrotron de raios-X monocromáticos com fóton 8.0keV de energia correspondente ao comprimento de onda de raios-x 1.4 Å. As amostras foram medidas em tubos de quartzo capilares cilíndricos com um diâmetro interno de 1 mm.

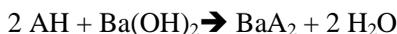
#### **4.5.12. Determinação da acidez total e carboxílica pelo método de Schnitzer e Gupta**

O método da determinação da acidez de Schnitzer e Gupta é utilizado, originalmente, para detecção da acidez total e carboxílica de substâncias húmicas<sup>53</sup>. Proposto em 1965 é utilizado até hoje<sup>54</sup>. As substâncias húmicas estão presentes no solo e apresentam estrutura contendo diversos grupamentos doadores como carboxilatos, ftalatos, salicilatos e catecolatos. A determinação desses grupamentos por essa técnica consiste em duas reações distintas, uma para determinação da acidez total e outra para determinação da acidez carboxílica, sendo a acidez fenólica obtida pela diferença entre as duas. Essa mesma metodologia será aplicada para as melaninas na tentativa de correlação

com os dados de titulação potenciométrica, e os dois experimentos serão descritos a seguir:

#### 4.5.12.1. Determinação da acidez total

A determinação da acidez total consiste na reação da melanina com excesso de hidróxido de bário que reagirá tanto com os grupamentos carboxílicos, bem como com as quinona-iminas e catecolatos, como mostrado na reação a seguir:



A solução permanece sob agitação constante por 24 horas e com atmosfera inerte. A suspensão formada é filtrada e lavada com H<sub>2</sub>O bidestilada e fervida, sendo o filtrado titulado com HCl 0,1M até a viragem. O mesmo volume de Ba(OH)<sub>2</sub> utilizado para reação também é utilizado no branco. A diferença entre os volumes de ácido gastos na titulação do excesso de Ba(OH)<sub>2</sub> do branco e da amostra, respectivamente, é utilizada no cálculo da acidez total das melaninas.

#### 4.5.12.2. Determinação da acidez carboxílica

Analogamente ao experimento anterior, a determinação da acidez carboxílica consiste na reação das melaninas com uma solução contendo excesso de acetato de cálcio segundo a reação:



A solução permanece em agitação durante 24 horas, sob atmosfera inerte e a suspensão é filtrada e lavada com água bidestilada e fervida. O filtrado, então, é titulado com NaOH até a viragem. O mesmo volume de acetato de cálcio adicionado à solução de melanina é também adicionado ao branco. A diferença entre os volumes de base gastos na titulação da amostra e do branco foram utilizados para o cálculo da acidez carboxílica das melaninas.

Como citado anteriormente, o resultado entre a diferença da acidez total e a acidez carboxílica resultará na acidez fenólica, representando os grupamentos catecolatos presentes nas melaninas.

#### **4.6. Citotoxicidade**

As células NIH/3T3 foram semeadas em placas de crescimento e, na sequência foram adicionadas soluções aquosas das melaninas modificadas, cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA em concentrações variando entre 10-500 mmol L<sup>-1</sup>. As células foram tratadas durante 24 h. Após a incubação, as células foram lavadas com meio de cultura fresco e 5 mg mL<sup>-1</sup> de MTT foi adicionado, seguido por incubação durante 2 horas a 37°C. O precipitado formatado foi dissolvido em 100 mL de DMSO e a absorvância foi medida a 540 nm, utilizando um micro-sistema de leitor de microplacas Biotekelx 800, todos os experimentos foram feitos em triplicata. Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da UFSC, sob orientação da Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa.

#### **4.7. Atividade Antioxidante**

##### **4.7.1. Captura de radicais livres utilizando DPPH**

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) baseia-se no método descrito por Bouchet e colaboradores<sup>28</sup>, com algumas modificações.

Uma solução metanólica de DPPH 0,004% foi preparada momentos antes do uso. A mistura de 2 mL de solução de DPPH com 1 mL de solução de cada composto em concentrações variando entre 10 - 50 ug.mL<sup>-1</sup> é agitada e após 30 minutos, é feita a leitura em um espectrofotômetro a 517 nm, comparando-se esta leitura a um branco que consistem em uma solução de DPPH na ausência de amostra. A percentagem de atividade antioxidante é dada pela fórmula  $(A_o - A_i / A_o) \times 100$ , onde,  $A_o$  e  $A_i$  correspondem a absorvância da solução na ausência e presença do composto. O gráfico da % de decréscimo na absorvância do DPPH em função da concentração do composto fornece a EC<sub>50</sub>, a concentração de amostra necessária para causar 50% de atividade antioxidante.

#### 4.7.2. Determinação do poder redutor

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price & Butler, proposto por Waterman e colaboradores<sup>30</sup>.

Em 100 µL dos compostos na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> são adicionados 8,5 mL de água deionizada. Adicionou-se posteriormente 1,0 mL da solução de FeCl<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e após 3 minutos 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,008 mol L<sup>-1</sup>. Após 15 minutos, é realizada a leitura da absorvância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. A análise deve ser feita em triplicata. Como branco, é utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da amostra. Faz-se uma curva de calibração utilizando soluções padrões de ácido ascórbico. O potencial redutor das amostras é expresso em mg de ácido ascórbico por g de amostra.

#### 4.7.3. Capacidade Antioxidante total

As capacidades antioxidantes totais foram avaliadas pelo método do fosfomolibdênio. Para 0,1 mL de várias concentrações de compostos, 1 mL da solução reagente de ácido sulfúrico (0,6 mol L<sup>-1</sup>), fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio a 4 mM foram adicionados e incubou-se a 95° C durante 90 min. Após resfriamento até à temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 695 nm. A atividade antioxidante foi expressa como o número de equivalentes de ácido ascórbico<sup>55</sup>.

#### 4.7.4. Ensaio de quelação pelo íon Fe(II)

Soluções dos compostos (1 mL) em diferentes concentrações foram misturadas de forma homogênea com 0,05 mL FeCl<sub>2</sub> (2 mmol L<sup>-1</sup>), e adicionou-se 0,2 mL de solução ferrozina (5 mmol L<sup>-1</sup>). As misturas foram agitadas e deixadas em repouso à temperatura ambiente durante 20 min, os valores de absorvância ( $A_{\text{amostra}}$ ) das misturas foi medida em 562 nm. Metanol foi utilizada como solução de controle, como em branco ( $A_{\text{branco}}$ ) e Na<sub>2</sub>EDTA foi usado como controle positivo. A porcentagem de quelação pelo íon Fe<sup>2+</sup> (%) =  $100 \times [(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{branco}}]$ <sup>56</sup>.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Resultados e discussão – Caracterização, citotoxicidade e atividade antioxidante de DOPA-melaninas modificadas com aminoácidos

#### 5.1.1. Análise elementar

As quantidades de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio presentes na cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA estão presentes na Tabela 1. Pode-se observar quantidades semelhantes nos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio em ambas melaninas. Entretanto, a quantidade de oxigênio presente na cys-DOPA é menor devido a presença do fragmento que possui o anel heterocíclico com enxofre e não com oxigênio como mostrado na Figura 6. Especula-se que o restante do oxigênio presente na cys-DOPA é todo da contribuição dos grupamentos ácidos carboxílicos, quinona-iminas e catecois, sendo que nas ser-DOPA e thr-DOPA existe a presença de heterocíclicos de oxigênio como mostrado nas estruturas da Figura 6.

**Tabela 1.** Quantidades de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio presente nas três melaninas modificadas.

| Sample     | C%   | H%  | N%  | S%   | O%*  |
|------------|------|-----|-----|------|------|
| cys - DOPA | 45,8 | 4,3 | 7,7 | 16,0 | 26,2 |
| ser - DOPA | 49,1 | 3,8 | 7,7 | -    | 39,4 |
| thr - DOPA | 44,5 | 3,8 | 7,6 | -    | 44,1 |

\* Obtido pela diferença de massa de C,H,N e S.

A Tabela 2 apresenta uma comparação entre a composição elementar de melaninas encontradas na literatura, e as sintetizadas neste trabalho.

**Tabela 2.** Composição elementar das melaninas modificadas com aminoácidos preparadas neste trabalho e comparadas com outras da literatura<sup>57</sup>.

| Melanina                                | Composição elementar / átomos de N      |
|---|---|
| ser-DOPA                                | $C_{7.43}H_{6.90}N_1O_{4.47}$           |
| cys-DOPA                                | $C_{12.04}H_{15.82}N_2S_{1.04}O_{6.78}$ |
| thr-DOPA                                | $C_{6.85}H_{6.03}N_1O_{5.09}$           |
| dopa-melanina                           | $C_{7.57}H_{6.78}N_1O_{4.72}$           |
| melanina DHI                            | $C_{7.78}H_{6.04}N_1O_{3.96}$           |
| melanina DHI +<br>DHICA                 | $C_{8.09}H_{6.43}N_1O_{5.15}$           |
| Melanina DHICA                          | $C_{8.41}H_{7.94}N_1O_{6.76}$           |
| <i>pheomelanina</i> sintética           | $C_{11.23}H_{12.93}N_2S_{0.95}O_{6.37}$ |
| Melanina derivada de<br>cisteinildopa   | $C_{11.51}H_{13.08}N_2S_{0.95}O_{6.17}$ |
| Melanina de animais<br>marinhos (sépia) | $C_{7.61}H_{5.75}N_1O_{6.59}$           |

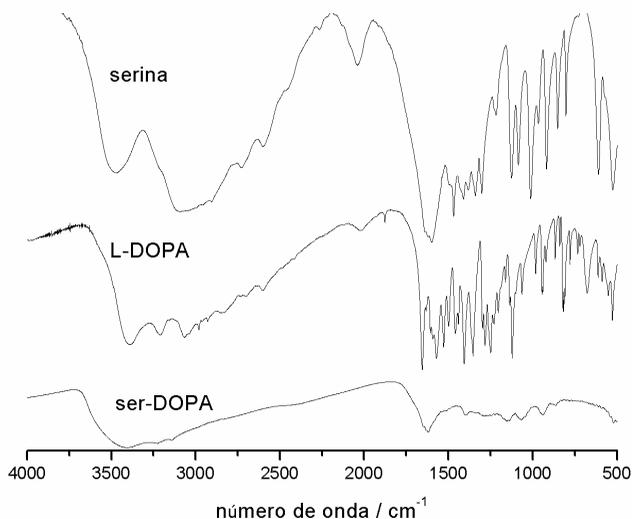
Pode-se observar na Tabela 2, que as quantidades de enxofre presente na cys-DOPA são condizentes com as *pheomelaninas* sintéticas encontradas na literatura e as quantidades dos outros elementos é proporcional a melaninas sintetizadas com o precursor DHI e DHICA, e ainda extraída de animais marinhos – sépia melanina. Sendo assim,

nossa proposta estrutural é condizente com a análise elementar e ainda com outros tipos de melaninas presentes na literatura.

### 5.1.2. Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho do precursor serina, L-DOPA e do produto ser-DOPA estão apresentados na Figura 10. Os espectros do aminoácido serina é muito semelhante ao do L-DOPA, tendo em vista que o último é derivado do aminoácido tirosina, apresentando características típicas desses aminoácidos<sup>58-60</sup>. O produto ser-DOPA apresenta bandas características em  $3407\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{O-H}$ ,  $1620\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{C=O}$  de ácidos carboxílicos, ombros em  $1520\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao  $\nu\text{C=O}$  do tautômeroquinona-imina e  $1052\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{C-O}$ .

A grande diferença entre os precursores é visível quando comparado com os aminoácidos livres, entretanto, vale destacar as principais mudanças espectrais. A banda fina em  $3484\text{cm}^{-1}$  e  $3406\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{O-H}$  da serina e L-DOPA livres não é mais observada no espectro da melanina, onde pode-se encontrar uma banda alargada com máximo em  $1407\text{cm}^{-1}$  referente aos  $\nu\text{O-H}$  dos grupamentos ácidos carboxílicos e catecóis. Ainda observa-se o deslocamento da banda da carbonila presente nos precursores de  $1628\text{cm}^{-1}$  e  $1661\text{cm}^{-1}$  da serina e L-DOPA para  $1620\text{cm}^{-1}$  no produto. Esse deslocamento espectroscópico para maiores números de onda pode estar associado ao menor grau de liberdade do grupamento carboxílico presente no produto final. Por último, citamos a ausência da banda em  $2045\text{cm}^{-1}$  referente ao  $\nu\text{N-H}$  do aminoácido livre, comprovando a existência do nosso produto sem impurezas de serina<sup>53</sup>.

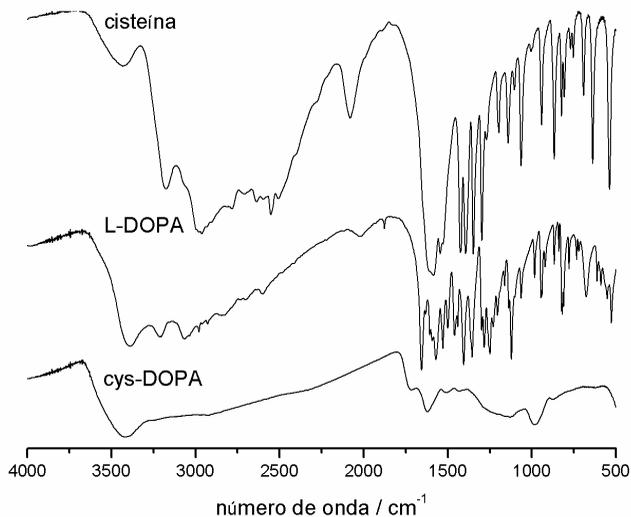


**Figura 10.** Espectros de infravermelho dos precursores serina, L-DOPA e do produto ser-DOPA.

A Figura 11 apresenta os espectros da cisteína pura, do L-DOPA e do produto cys-DOPA. Assim como a ser-DOPA, observam-se as bandas características dos grupamentos doadores majoritários. Bandas em  $3418\text{cm}^{-1}$  relativas ao estiramento  $\nu\text{O-H}$ ,  $1619\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{C=O}$  e  $1001\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{C-O}$  caracterizam os grupamentos catecol, ácido carboxílico e quinonimina. Outro detalhe importante é a presença de uma possível carbonila diferente com estiramento em  $1715\text{cm}^{-1}$  atribuída possivelmente a um ácido carboxílico ligado ao anel quinolinico contendo enxofre como heteroátomo. Destaca-se também o deslocamento em torno de  $40\text{cm}^{-1}$  da banda relativa ao  $\nu\text{C-O}$  devido a sobreposição com os estiramentos  $\nu\text{C-S}$  que são característicos nesta região do espectro<sup>61</sup>.

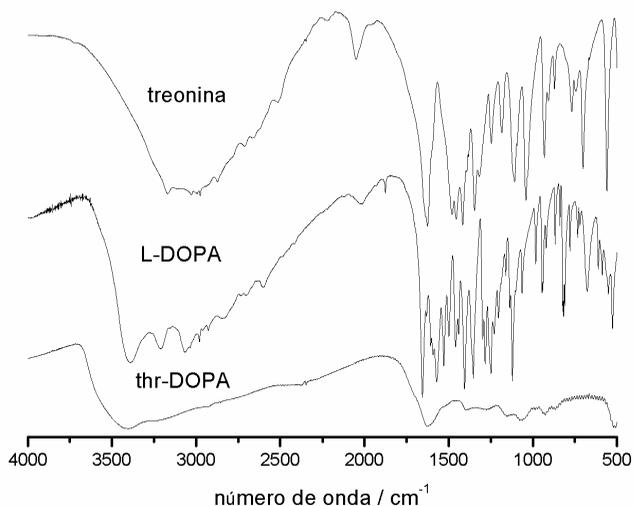
As diferenças espectrais dos precursores para o produto final são semelhantes aos discutidos anteriormente para a ser-DOPA, observa-se uma banda larga em  $1619\text{cm}^{-1}$  quando comparado com a cisteína e o L-

DOPA e também o deslocamento da banda da carbonila caracterizando um ambiente com menores graus de liberdade e maiores forças intermoleculares entre os oligômeros.



**Figura 11.** Espectros de infravermelho dos precursores cisteína, L-DOPA e do produto cys-DOPA.

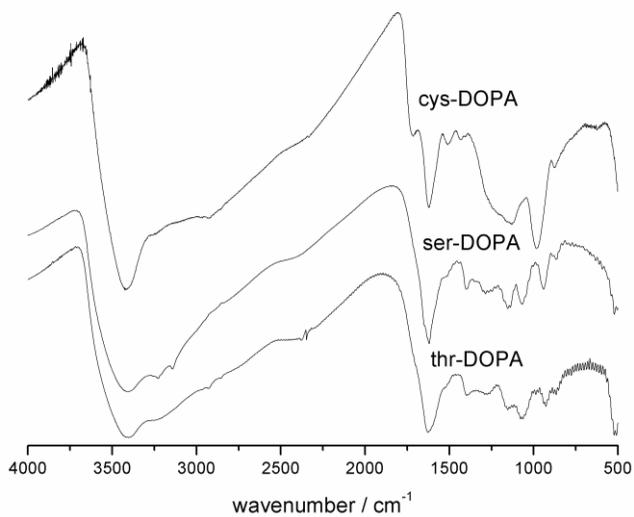
A Figura 12 apresenta os espectros dos precursores treonina, L-DOPA e do produto thr-DOPA. Este último apresentando bandas características em 3414, 1626 e 1062cm<sup>-1</sup> relativo aos estiramentos  $\nu$ O-H,  $\nu$ C=O e  $\nu$ C-O respectivamente caracterizando os grupamentos majoritários. Também apresenta uma banda fraca em 2960cm<sup>-1</sup> atribuído ao estiramento  $\nu$ C-H metilênico presente nesta melanina. Analogamente, nas outras melaninas modificadas observam-se a ausência das bandas peculiares dos precursores treonina e L-DOPA caracterizando o produto formado. A formação de uma banda larga com máximo em 3414cm<sup>-1</sup> também é observada além do deslocamento da banda da carbonila de 1635cm<sup>-1</sup> para a treonina livre e 1626cm<sup>-1</sup> para a thr-DOPA.



**Figura 12.** Espectros de infravermelho dos precursores treonina, L-DOPA e do produto thr-DOPA.

Os espectros das três melaninas para melhor comparação estão apresentados na Figura 13. É possível observar nos três espectros uma banda em  $2920\text{ cm}^{-1}$  atribuída aos estiramentos  $\nu\text{C-H}$  dos carbonos com hibridização  $\text{sp}^3$  presentes na estrutura (anel de 6 membros – Figura 6), comprovando assim a presença deste fragmento na estrutura oligomérica da melanina.

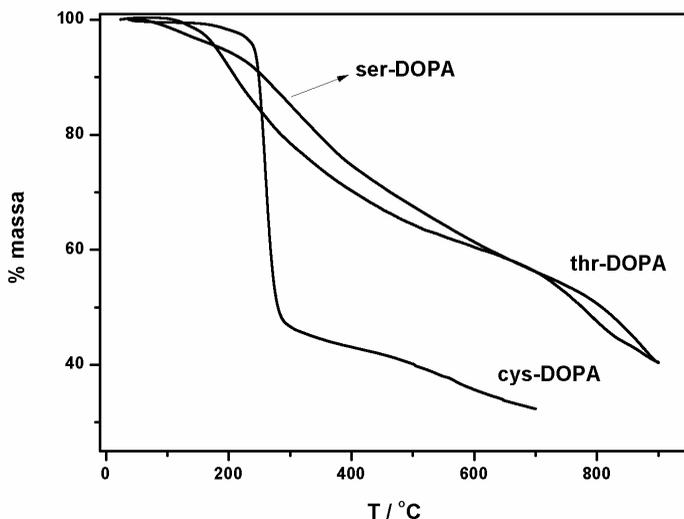
A atribuição das bandas relativas às melaninas livres é de suma importância para posterior caracterização dos seus respectivos complexos, e a atribuição de qual grupamento se coordena com o centro metálico, além da caracterização de alguns dos seus grupamentos.



**Figura 13.** Espectros de infravermelho das três DOPA-melaninas sintéticas modificadas com aminoácidos: cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA.

### 5.1.3. Análise termogravimétrica

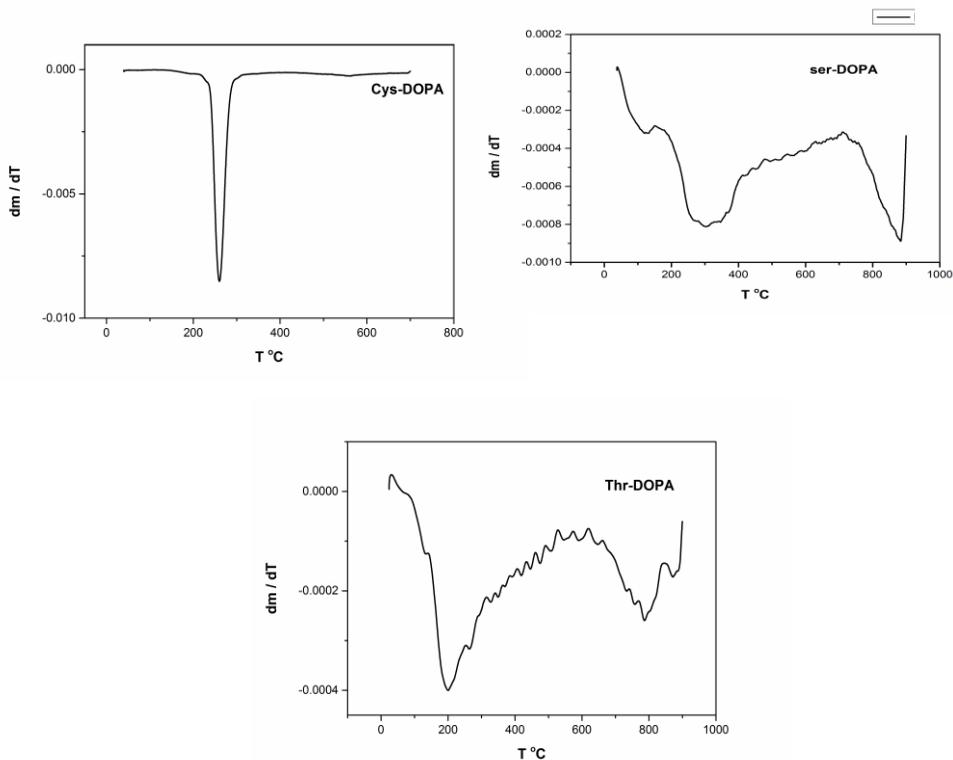
As curvas termogravimétricas e suas respectivas derivadas são apresentadas nas Figuras 14 e 15 respectivamente. A análise termogravimétrica é a melhor ferramenta na tentativa de caracterizar alguns grupamentos presentes nas melaninas, mesmo sabendo que a melanina é termicamente estável<sup>62</sup>. Podemos observar na Figura 14 que a ser-DOPA e a thr-DOPA são termicamente estáveis perdendo metade da sua massa em temperaturas maiores de 750°C, resultados esses de acordo com termogramas da da DOPA-melanina pura sem modificação com aminoácidos<sup>63</sup>. Entretanto, a cys-DOPA apresenta uma perda de massa maior que as outras duas melaninas sintetizadas neste trabalho.



**Figura 14.** Termogramas das melaninas sintéticas.

Entre 33 e 219°C a cys-DOPA apresenta uma pequena perda de massa, correspondente a 2,44% da inicial, entretanto em 250° C ocorre uma brusca perda de massa que atribuímos aos grupamentos contendo enxofre como heteroátomo e aos grupamentos tióis, esses podem

proporcionar uma menor interação intramolecular entre os oligômeros que consequentemente estão mais suscetíveis a sofrerem decomposição térmica.



**Figura 15.** Derivadas  $dm/dT$  dos termogramas das melaninas sintéticas.

Prado e colaboradores<sup>64</sup> realizaram estudos semelhantes com substâncias húmicas, que possuem estrutura semelhante as melaninas, e obtiveram o mesmo perfil de termograma, e atribuem as perdas de massas iniciais aos grupamentos funcionais terminais dessas estruturas. Uma vez que a ligação de hidrogênio presente nos grupamentos carboxílicos é mais forte que as presentes em grupamentos hidroxílicos livres, pode-se atribuir as perdas de massa até 400  $^{\circ}C$  aos grupamentos iminicos e catecóis.

A Tabela 3 apresenta um resumo da variação da temperatura com a variação de massa de cada intervalo de temperatura para as três melaninas. Observa-se que a ser-DOPA, cys-DOPA e thr-DOPA apresentam 40,86; 33,26 e 38,36% de formação de resíduo após a análise. Conclui-se que mesmo em altas temperaturas existe certa estabilidade térmica de ambos os produtos.

**Tabela 3.** Resumo dos percentuais de perda de massa ( $\Delta m$ ) de cada melanina nos intervalos de temperatura ( $\Delta T$ ).

| <b>Melanina</b> | <b><math>\Delta T</math> (°C)</b> | <b><math>\Delta m</math> (%)</b> |
|-----------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| <b>Ser-DOPA</b> | 37 - 125                          | 2,76                             |
|                 | 162 - 410                         | 22,29                            |
|                 | 414 - 749                         | 20,72                            |
|                 | 750 - 902                         | 14,37                            |
|                 | Resíduo                           | 39,86                            |
| <b>Cys-DOPA</b> | 33 - 219                          | 2,44                             |
|                 | 311 - 750                         | 64,30                            |
|                 | Resíduo                           | 33,26                            |
| <b>Thr-DOPA</b> | 30 - 140                          | 2,43                             |
|                 | 140 - 249                         | 16                               |
|                 | 250 - 320                         | 7,3                              |
|                 | 330 - 660                         | 18,7                             |
|                 | 700 - 902                         | 17,21                            |
|                 | Resíduo                           | 38,36                            |

### 5.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector MS – LC-MS

Com o objetivo de verificar a pureza das três melaninas cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA foi realizado o experimento de LC-MS afim de identificar possíveis resíduos de aminoácidos cisteína, serina e treonina respectivamente. A Tabela 4 apresenta os parâmetros utilizados para a realização desta análise.

**Tabela 4.** Massas monitoradas e energia de ionização utilizada no espectrômetro de massas

| Analíto  | Íon pai<br>( <i>m/z</i> ) | Íon<br>quantitativo<br>( <i>m/z</i> ) | DP* | EP*  | CEP* | CE* | CXP* |
|----------|---------------------------|---------------------------------------|-----|------|------|-----|------|
| Cisteína | 122,84                    | 75,9                                  | 16  | 7,5  | 10   | 15  | 4    |
| Serina   | 105,984                   | 65                                    | 41  | 10,5 | 10   | 15  | 4    |
| Treonina | 120,075                   | 74,1                                  | 21  | 4,5  | 10   | 13  | 4    |

\*DP – Potencial Inicial; EP – Potencial de Entrada; CE – Energia de Colisão; CEP – Potencial de colisão; CXP –Potencial de colisão na saída da célula.

Os resultados das análises cromatográficas revelaram que todas as amostras analisadas estão livres de aminoácidos residuais, evidenciando a pureza das três melaninas sintetizadas em relação aos precursores utilizados.

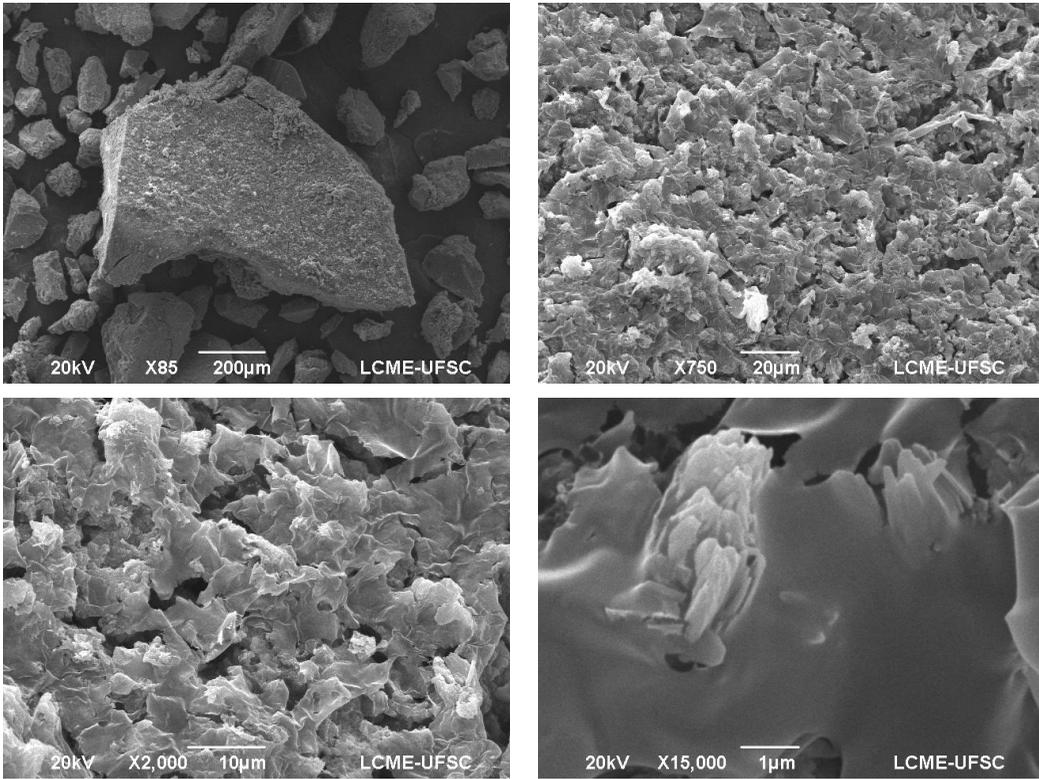
A motivação para realização desta análise foram os resultados obtidos por titulação potenciométrica, sessão 5.1.7, onde na curva de titulação da cys-DOPA observou-se um tampão em valores de pH próximos de 8 onde ficou-se em dúvida quanto a presença de cisteína livre, referente ao equilíbrio ácido-base do tiol presente em sua estrutura com pKa semelhante em torno de 8<sup>65</sup>. A importância da comprovação da ausência de aminoácidos residuais livres é fundamental para a

continuidade dos trabalhos, tanto no que tange a atividade antioxidante, quanto a interação com espécies catiônicas.

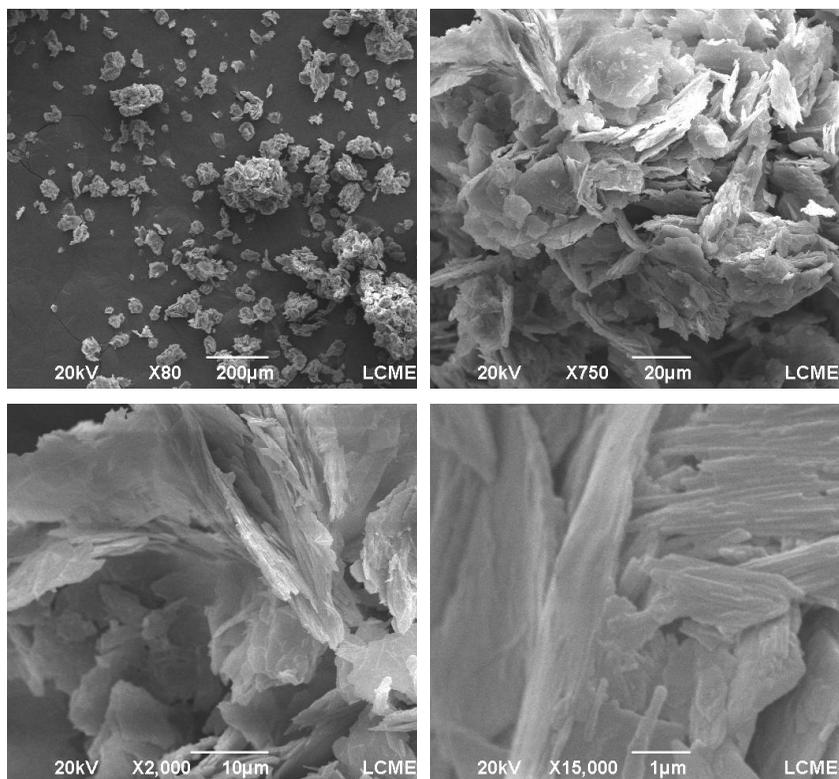
### 5.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura é utilizada com frequência para a verificação da morfologia de melaninas, tanto naturais, quanto sintéticas<sup>7,34,66</sup>. As micrografias da melanina ser-DOPA com 85, 750, 2000 e 15000 vezes de aumento são apresentadas na Figura 16a. Observa-se a 85 vezes de aumento que os fragmentos apresentam-se com valores entre 200-1000 $\mu\text{m}$ , e ainda com características amorfas em toda sua extensão comprovado pelas micrografias com aumentos maiores. Diferentemente da ser-DOPA, a melanina modificada com cisteína, cys-DOPA, apresenta partículas um pouco menores quando observadas a 85 vezes de aumento e observa-se na Figura 16b, o fragmento variando entre 20 e 200 $\mu\text{m}$ . As micrografias com maiores aumentos apresentam camada lateral variando de 20 a 40 $\mu\text{m}$  em uma estrutura amorfa. Outras melaninas sintéticas presentes na literatura apresentam essa característica diferente das melaninas naturais que possuem uma morfologia mais organizada, geralmente em formas esféricas ou em bastonetes<sup>67-69</sup>.

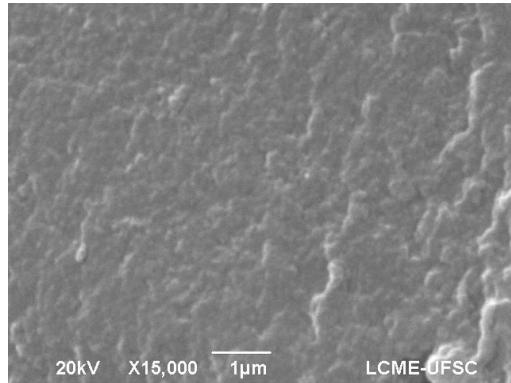
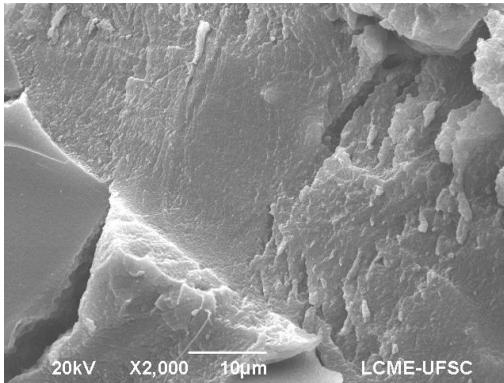
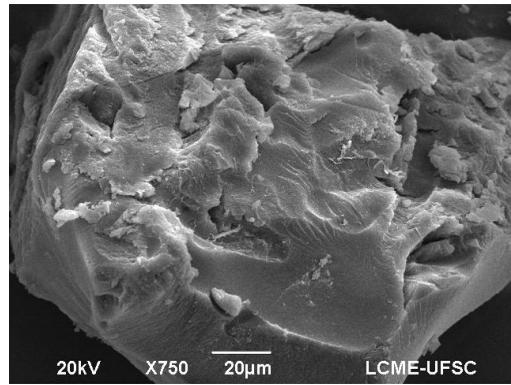
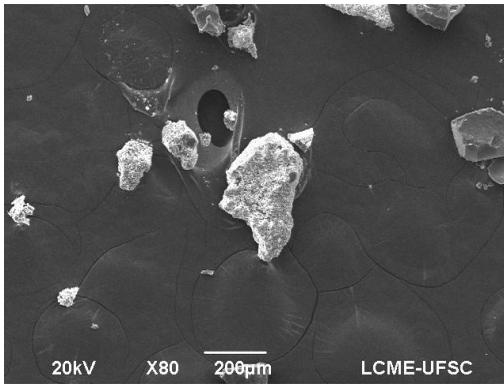
A melanina thr-DOPA apresenta peculiaridades morfológicas diferentes das outras melaninas como pode ser observado na Figura 16c. Com um aumento de 85 vezes pode-se observar que os fragmentos são menos uniformes com valores de tamanho variando entre 100 e 200 $\mu\text{m}$  e nos aumentos de 2 e 15mil vezes observa-se uma estrutura mais amorfa quando comparado com as duas melaninas, supostamente organizada em camadas, fenômeno esse inédito até o momento. Especula-se que pela característica da molécula de treonina utilizada como modificante e ainda observando a possível estrutura da thr-DOPA, as forças intermoleculares existentes entre os oligômeros seja muito menor quando comparado com a ser-DOPA e cys-DOPA e por existir pequena interação pode afetar a sua morfologia tornando a estrutura menos organizada que as demais.



**Figura 16a.** Imagens de MEV da melanina ser-DOPA com 85, 750, 2000 e 15000 vezes de aumento respectivamente.



**Figura 16b.** Imagens de MEV da melanina cys-DOPA com 80, 750, 2000 e 15000 vezes de aumento respectivamente.



**Figura 16c.** Imagens de MEV da melanina thr-DOPA com 80, 750, 2000 e 15000 vezes de aumento respectivamente.

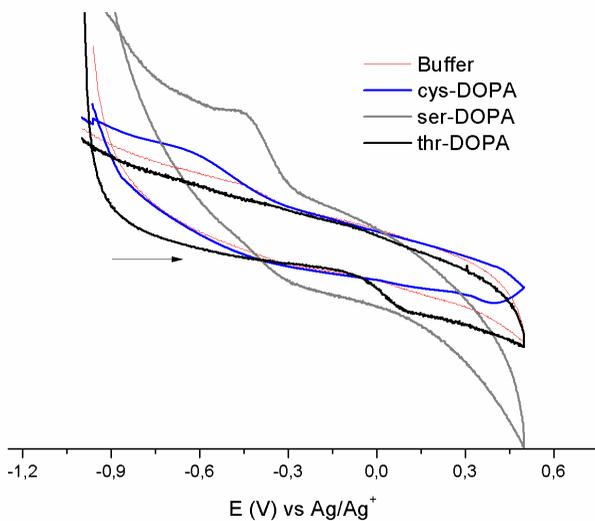
### 5.1.6. Eletroquímica

O perfil eletroquímico de cada melanina além de caracterizar o par redox catecol/quinona nos fornece informações acerca da facilidade de cada grupamento catecol presente na melanina de oxidar-se. Os voltamogramas cíclicos referentes às melaninas sintetizadas neste trabalho estão presentes na Figura 17. Os processos redox detectados foram classificados como quasi-reversíveis e irreversíveis, sendo o número de elétrons envolvidos próximo de 2 para o primeiro processo, correspondendo a oxidação do catecol em sua respectiva quinona – Figura 18.

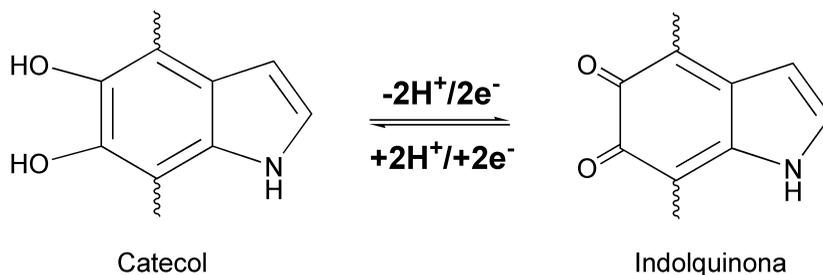
Pode-se observar no voltamograma que a melanina modificada com a serina apresenta um  $E_{po} = -0,362V$  seguido da cys-DOPA e thr-DOPA com potenciais  $E_{po} = -0,267V$  e  $E_{po} = 0,0669V$  respectivamente. Justifica-se o baixo potencial de oxidação da melanina modificada com a treonina, levando em consideração o efeito indutivo do grupamento metilênico na molécula, que pode dificultar a saída do hidrogênio ionizável do grupamento catecol para a formação da espécie oxidada. O processo redox envolvido neste caso é mostrado na Figura 8.

Comparado com o trabalho de Farmer e colaboradores<sup>33</sup>, que realizaram experimentos de eletroquímica de melaninas sintéticas DHI e DHICA e obtiveram um potencial de oxidação próximo de zero volt, podemos concluir que a ser-DOPA e a cys-DOPA oxidam-se mais facilmente que as melaninas DHI e DHICA e, em contrapartida, ao processo de oxidação da thr-DOPA ocorre com mais dificuldade quando comparado com o trabalho citado.

As propriedades eletroquímicas podem ser correlacionadas com as atividades antioxidantes das melaninas em estudo, sendo que uma boa aproximação pode ser obtida, levando em consideração o fato que bons agentes redutores oxidam-se facilmente, em outras palavras, quanto mais negativo o potencial necessário para promover a oxidação, teoricamente, pode representar uma maior atividade antioxidante<sup>31</sup>.



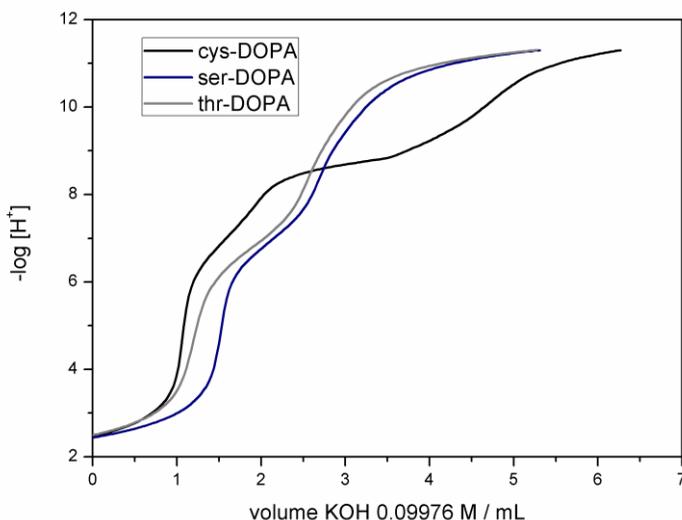
**Figura 17.** Voltamogramas cíclicos de todas as melaninas obtidos em 100 mV/s a 25°C em pH 7,4. Eletrólito suporte: 0,1 mol L<sup>-1</sup> tampão fosfato pH 7,4; trabalho: carbono vítreo, referência Ag/Ag<sup>+</sup>, contra eletrodo: fio de platina.



**Figura 18.** Par redox catecol/quinona elucidado pela técnica de voltametria cíclica.

### 5.1.7. Titulação potenciométrica

Os experimentos em solução são muito úteis para a determinação do  $\text{pK}_a$  das espécies presentes nas melaninas<sup>11</sup>, contribuindo para identificação dos equilíbrios ácido/base e conseqüentemente caracterizando cada espécie em solução. Os resultados desse estudo contribuem para o entendimento de propriedades e fenômenos associados a sua aplicabilidade; como a coordenação de íons metálicos, eletroquímica, elucidação estrutural, correlação com as atividades antioxidantes e explicar os fenômenos de adsorção<sup>66</sup>. A curva de titulação potenciométrica para as três melaninas sintetizadas é apresentada na Figura 19.



**Figura 19.** Curvas de titulação potenciométrica das melaninas cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA sob atmosfera inerte de argônio. T = 25°C,  $\mu = 0,1$  KCl, eletrodo de vidro combinado.

Observa-se na Figura 19 que a melanina ser-DOPA e thr-DOPA apresentam três regiões tamponadas bem definidas. A primeira região em valores de pH entre 3 e 4 devido ao equilíbrio do grupamento ácido carboxílico, a segunda região entre pH 6 e 7 característico da desprotonação dos grupamentos quinona-iminas, também identificado por Szpoganicz e colaboradores<sup>11</sup>, e por último, uma região tamponada entre pH 10 e 11 característico da desprotonação do grupamento catecol.

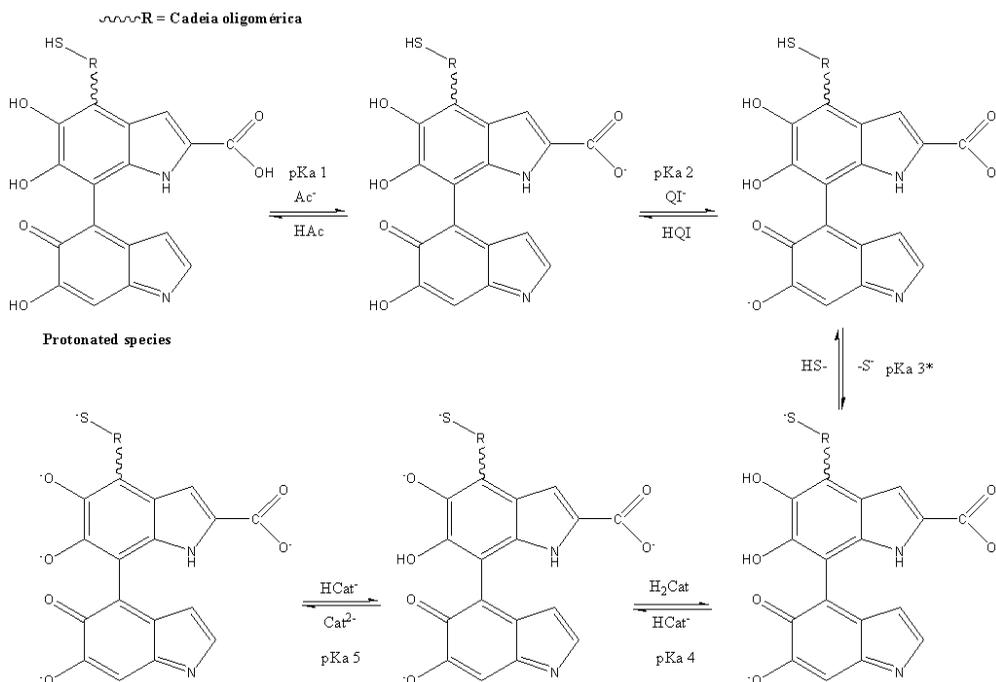
Já na cys-DOPA todas as regiões tamponadas presentes nas outras duas melaninas são observadas na sua curva de titulação, entretanto, nota-se também que a cys-DOPA apresenta uma quarta região tamponada próximo de pH 8,5. Atribuiu-se essa região ao grupamento tiol que possivelmente está presente na estrutura, condizente com a proposta apresentada na Figura 6 e relatada na literatura, que por este experimento pode-se detectar que aquele grupamento está protonado em meio ácido. Especula-se a ocorrência de

uma hidrólise ácida resultando na abertura do anel de seis membros, e consequentemente gerando um tiofenol substituído cujo pKa relatado na literatura é em torno de 8<sup>65</sup>. Após a titulação, foram calculadas as constantes de equilíbrio ácido base para cada melanina, presentes na Tabela 5. Todos os experimentos foram realizados em condições iguais.

**Tabela 5.** -Log das constantes de dissociação dos grupamentos majoritários presentes em cada melanina.

| <i>Equilíbrio*</i>                                   | <i>Cys-</i><br><i>DOPA**</i> | <i>Ser-</i><br><i>DOPA**</i> | <i>Thr-</i><br><i>DOPA**</i> |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| $[\text{Ac}^-][\text{H}^+]/[\text{HAc}]$             | 3,33                         | 3,36                         | 4,25                         |
| $[\text{QI}^-][\text{H}^+]/[\text{HQI}]$             | 6,83                         | 6,96                         | 6,94                         |
| $[\text{R-S}^-][\text{H}^+]/[\text{R-SH}]$           | 8,29                         | -                            | -                            |
| $[\text{HCat}^-][\text{H}^+]/[\text{H}_2\text{Cat}]$ | 10,99                        | 10,85                        | 11,06                        |
| $[\text{Cat}^{2-}][\text{H}^+]/[\text{HCat}^-]$      | 14,28***                     | 14,07***                     | 14,45***                     |

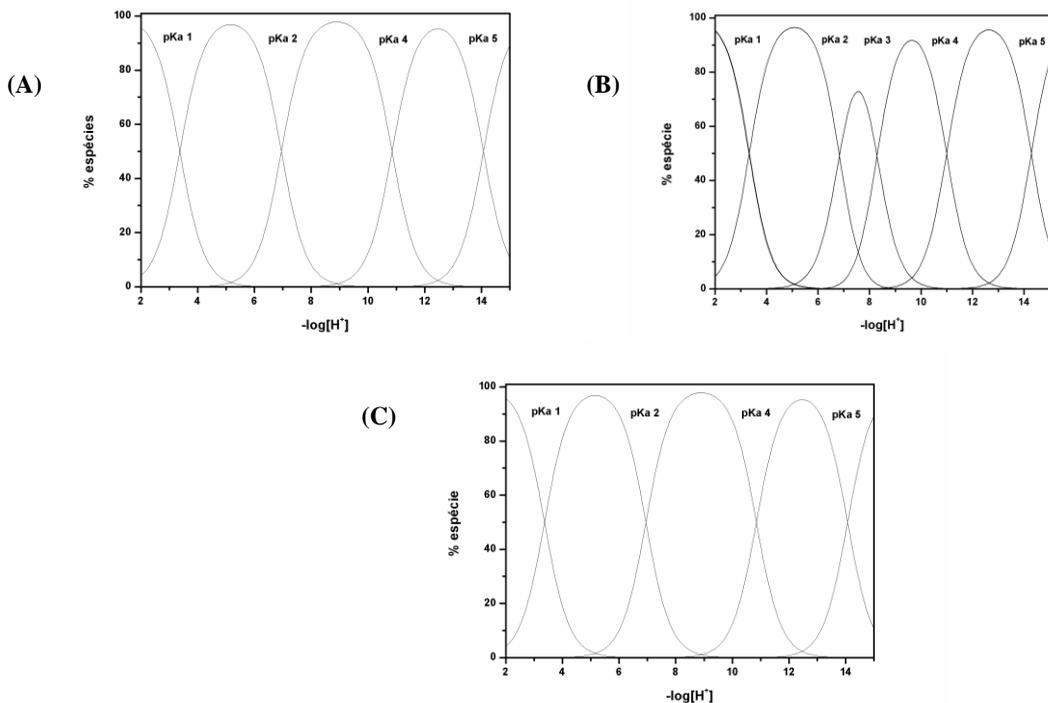
\*Ac – acetato, QI – quinona-imina, Cat – Catecol \*\*valores obtidos pela media de três titulações \*\*\*valores de pKa obtidos por titulação espectrofotométrica.



**Figura 20.** Equilíbrio ácido/base de cada grupo característico das melaninas. O pKa 3 é presente apenas na *cys*-DOPA.

A partir dos valores de pKa dos grupamentos presentes em cada melanina, podemos propor os respectivos equilíbrios – Figura 20 e fazer algumas considerações em relação a sua estrutura e previsão das atividades antioxidantes. Estruturalmente, podemos admitir que a presença da metila na estrutura da *thr*-DOPA influencia os valores de pKa devido ao efeito indutivo presente neste grupamento, que acarreta na formação de uma base conjugada menos estável que as duas outras melaninas. Além das considerações estruturais, os valores de pKa dos grupamentos catecol, que são os maiores responsáveis pela ação

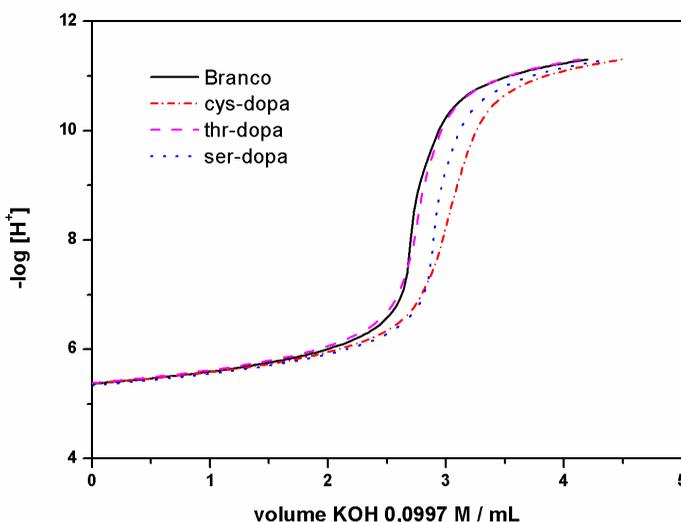
antioxidante, poderão nos levar a uma previsão de qual melanina terá melhor atividade. Para que ocorra a oxidação do grupamento catecol a sua respectiva quinona, há liberação de dois prótons; sendo assim, aquela melanina que possivelmente apresentará a melhor atividade antioxidante será aquela que exibe o menor pKa do grupamento catecol que neste caso é a ser-DOPA. A Figura 21 apresenta a curva de distribuição de espécies em solução para as três melaninas estudadas.



**Figura 21.** Curvas de distribuição de espécies das melaninas modificadas por aminoácidos; (A) ser-DOPA, (B) cys-DOPA e (C) thr-DOPA.

### 5.1.8. Determinação da acidez total e carboxílica pelo método de Schnitzer e Gupta

A determinação da acidez carboxílica pelo método de Schnitzer e Gupta<sup>53-54</sup> é um método rápido, prático e barato para a avaliação quantitativa de grupamentos carboxílicos e outros com pKa na faixa ácida e neutra utilizado para substâncias húmicas. Observa-se na Figura 22 as curvas de titulação dos filtrados em presença de acetato de cálcio resultantes da mistura com cada melanina. Verifica-se que os filtrados que mais consumiram base em ordem crescente foram a cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA respectivamente.



**Figura 22.** Curvas de titulação para determinação da acidez carboxílica das melaninas.

A Tabela 6 apresenta os valores de  $\text{mmol g}^{-1}$  de cada grupamento determinados por titulação potenciométrica e pelo método de Schnitzer e Gupta, comparado com a quantidade de grupamentos ácidos carboxílicos – Ac. Observa-se uma boa correlação com os valores

encontrados pelo método de Schnitzer e Gupta, respeitando as quantidades em ordem crescente de cada grupamento.

Já para a acidez total, o método de Schnitzer e Gupta não se mostrou eficiente para o cálculo dos mmols presentes nas melaninas sem uma correlação com os encontrados por titulação potenciométrica. Obteve-se como resultado pelo método potenciométrico valores de acidez total de 0,3606; 0,3552; 0,3528mmol/g de melanina e o método de Schnitzer e Gupta 0,45750; 0,4999; 0,43650mmol/g de melanina para ser-DOPA, cys-DOPA e thr-DOPA respectivamente. Pode-se justificar a não eficiência a uma possível hidrólise básica da estrutura das melaninas em presença do hidróxido de bário, entretanto, não tentamos caracterizar esses produtos de degradação.

**Tabela 6.** Quantidade de mmoles  $\text{g}^{-1}$  determinados por titulação potenciométrica e pelo método de Schnitzer e Gupta.

|                 | <i>Ac</i> | <i>QI</i> | <i>Tiol</i> | <i>Cat</i> | <i>Acidez<br/>Carboxil<br/>ica***</i> | <i>Acidez<br/>Total**<br/>*</i> |
|-----------------|-----------|-----------|-------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Ser-DOPA</b> | 0,04024   | 0,13693   | -           | 0,18343    | 0,04078                               | 0,45750                         |
| <b>Cys-DOPA</b> | 0,03577   | 0,09303   | 0,03671     | 0,18970    | 0,03679                               | 0,49999                         |
| <b>Thr-DOPA</b> | 0,02666   | 0,09589   | -           | 0,23030    | 0,01931                               | 0,43650                         |

\*Ac – acetato, QI – quinona-imina, Cat – Catecol \*\*valores obtidos pela media de três experimentos \*\*\* Método de Schnitzer e Gupta

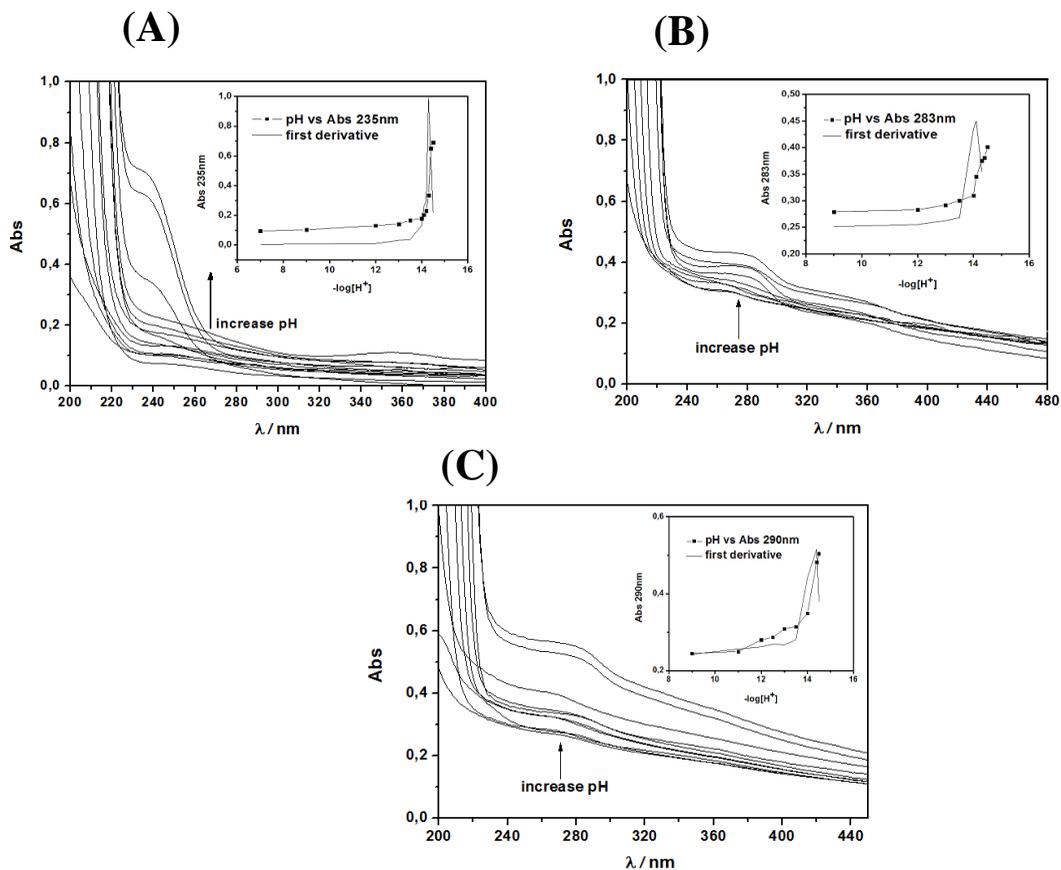
### 5.1.9. Titulação espectrofotométrica

O estudo de titulação espectrofotométrica é fundamental para a determinação de valores de  $pK_a$  acima de 12, onde é o limite da titulação potenciométrica. Os espectros eletrônicos em função do pH, bem como o gráfico de Abs vs pH com sua respectiva derivada primeira estão apresentados na Figura 23.

Os valores de  $pK_a$  para a desprotonação do segundo átomo de hidrogênio ionizado presente no grupo catecol são muito importantes, uma vez que podem ser correlacionadas com a atividade anti-oxidante, e foram determinados por titulação espectrofotométrica apresentando valores de 14,28; 14,07 e 14,45 para a cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA e valores de  $\lambda_{max} = 235$ , 283 e 290nm, respectivamente. Estes valores foram detectados com base nas maiores alterações nos valores de absorvância com a adição de uma base e são relativos as transições  $\pi-\pi^*$  características de compostos contendo catecol em sua estrutura<sup>67-73</sup>.

Os valores de  $\lambda_{max}$  para a ser-DOPA e thr-DOPA são próximo, entretanto, para a cys-DOPA tem um valor de  $\lambda_{max} = 235$ nm podendo estar associado a um processo mais energético do que a ressonância observada nas outras duas melaninas. Por essa melanina apresentar grupamentos tióis e sabendo-se que podem estar livres ou ciclizados na forma de benzothiazinones<sup>6</sup>, e sendo o tiol mais ácido que o hidróxido conseqüentemente possui um deslocamento hipsocrômico quando comparado com as outras duas melaninas.

Além disso, o aumento na absorvância é proporcional ao aumento do pH, fato esse atribuído a susceptibilidade para a formação do grupamento catecolato, que apresenta ressonância quando em sua forma básica.



**Figura 23.** Espectros eletrônicos de cada melanina com adições sucessivas de KOH 4M e respectivas curvas pH vs Abs<sub>MAX</sub>, onde (A) cys-DOPA; (B) ser-DOPA; (C) thr-DOPA.

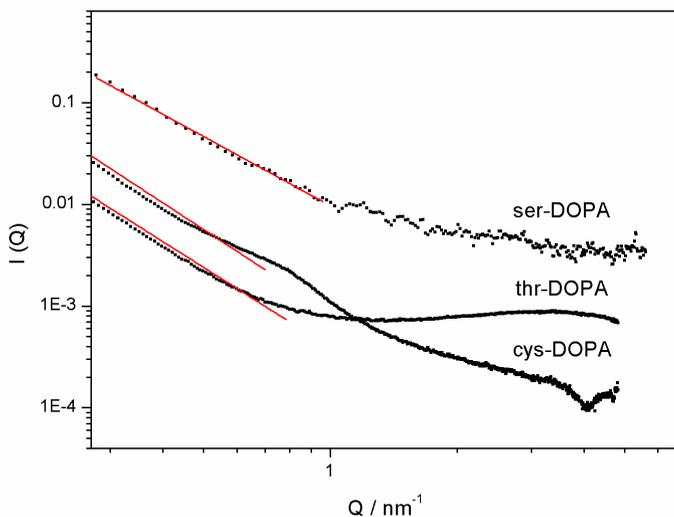
Os valores de pKa para a desprotonação do segundo átomo de hidrogênio ionizado presente no grupo catecol são muito importantes, uma vez que podem ser correlacionadas com a atividade anti-oxidante, e foram determinados por titulação espectrofotométrica apresentando valores de 14.28, 14.07 e 14.45 para a cys-DOPA, ser-DOPA e thr-DOPA e valores de  $\lambda_{\max}$  = 235 , 283 e 290nm, respectivamente. Estes valores foram detectados com base nas maiores alterações nos valores de absorvância com a adição de uma base e são relativos as transições  $\pi$ - $\pi^*$  características de compostos contendo catecol em sua estrutura<sup>67-73</sup>.

Os valores de  $\lambda_{\max}$  para a ser-DOPA e thr-DOPA são próximo, entretanto, para a cys-DOPA tem um valor de  $\lambda_{\max}$ =235nm podendo estar associado a um processo mais energético do que a ressonância observada nas outras duas melaninas. Por essa melanina apresentar grupamentos tióis e sabendo-se que podem estar livres ou ciclizados na forma de benzotiazinonas<sup>6</sup>, e sendo o tiol mais ácido que o hidróxido consequentemente possui um deslocamento hipsocrômico quando comparado com as outras duas melaninas.

Além disso, o aumento na absorvância é proporcional ao aumento do pH, fato esse atribuído a susceptibilidade para a formação do grupamento catecolato, que apresenta ressonância quando em sua forma básica.

### 5.1.10. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos – SAXS

As curvas de SAXS para as três melaninas sintetizadas nesse trabalho são apresentadas na Figura 24. Estudos de espalhamento de raios-X é um dos métodos mais efetivos para o estudo de estruturas de macromoléculas em especial de melaninas e substâncias húmicas<sup>75-80</sup>. A organização molecular das melaninas no espaço determinada por SAXS apresentou propriedades de sistemas fractais. Para esses sistemas é muito utilizada a lei de potência, *power-law*, que é uma função da intensidade do espalhamento  $I(q) = q^{-\alpha}$ , que é associado com a dimensão fractal do sólido, sendo  $D_m = \alpha$  para  $\alpha < 3$ ;  $D_s = 6 - \alpha$  for  $3 < \alpha < 4$ , onde  $D_m$  e  $D_s$  são fractais de massa e superfície respectivamente<sup>68</sup>.



**Figura 24.** Curvas de SAXS no estado sólido das melaninas modificadas com aminoácidos.

O termo fractal foi introduzido pelo matemático Benôit Mandelbrot para designar objetos e estruturas complexas dotadas da propriedade de autosimilaridade<sup>71</sup>. Estruturas que possuem detalhe em uma certa faixa de escala de comprimento, com sua forma igualitária em cada escala de observação, sendo assim, uma parte da estrutura ampliada terá a mesma forma em qualquer grau de aumento<sup>74</sup>. No caso das melaninas são bio-oligômeros formados por repetições de unidades DHI e DHICA, sendo realmente a estrutura fractal um modelo apropriado para a descrição desse tipo de moléculas.

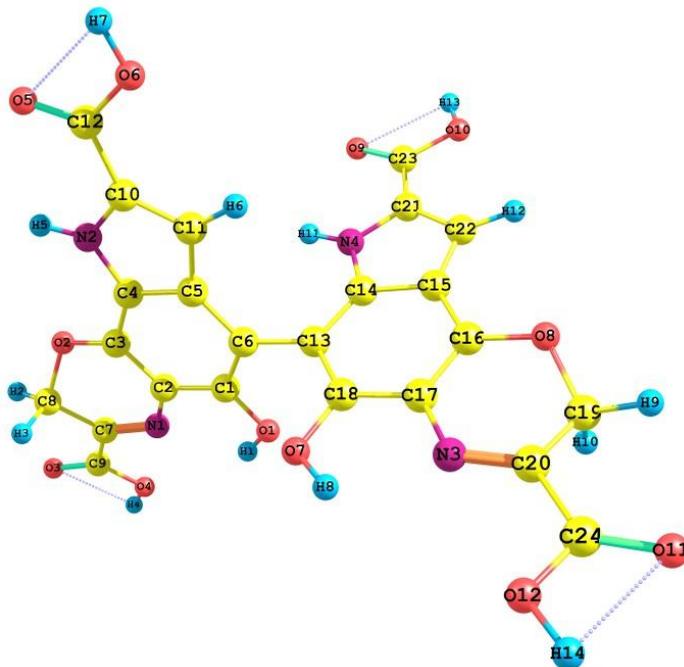
A Tabela 7 apresenta os parâmetros fractais obtidos por SAXS neste estudo, e concluímos que todas as melaninas apresentam fractais de massa, isto é, sistema onde a sua massa é proporcional a área superficial, resultados que confirmam os estudos de microscopia eletrônica onde pode-se observar toda sua extensão amorfa e com área superficial constante.

**Tabela 7.** Parâmetros de fractais obtidos por SAXS para as melaninas

| <i>Melanina</i> | $ \alpha $ | <b>D</b>     | <b>R<sup>2</sup></b> |
|-----------------|------------|--------------|----------------------|
| Ser-DOPA        | 2,26       | $D_m = 2,26$ | 0,9951               |
| Cys-DOPA        | 2,70       | $D_m = 2,70$ | 0,9893               |
| Thr-DOPA        | 2,62       | $D_m = 2,62$ | 0,9902               |

### 5.1.11. Cálculos teóricos

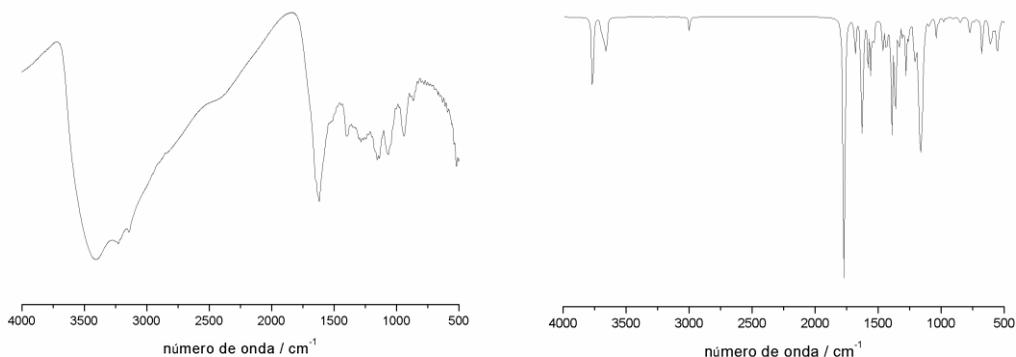
A química computacional nos ajuda a elucidar a otimização de estruturas propostas e prever suas propriedades físico-químicas<sup>81</sup>. Observa-se na Figura 25 a estrutura otimizada para um provável dímero presente na ser-DOPA.



**Figura 25.** Estrutura otimizada de um possível dímero presente no oligômero ser-DOPA.

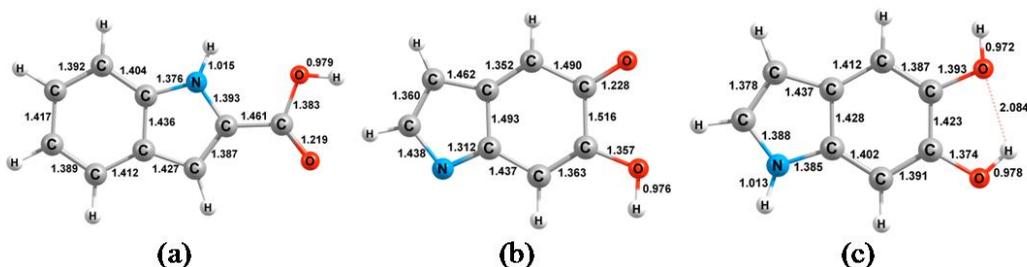
No caso das melaninas, é uma ferramenta importantíssima pois aliada às técnicas de caracterização experimentais nos fornecem informações acerca da composição de prováveis dímeros, grupamentos doadores e seu comportamento no espaço, sendo parte dos resultados utilizados na discussão da sessão 5.1.11 dessa tese publicados por Costa e colaboradores<sup>82</sup> estando presente na Figura 27. A Figura 26 apresenta o

espectro vibracional teórico e experimental respectivamente para o dímero da ser-DOPA



**Figura 26.** Espectros vibracionais, FTIR, da melanina ser-DOPA - experimental e teórico da espécie dimérica respectivamente.

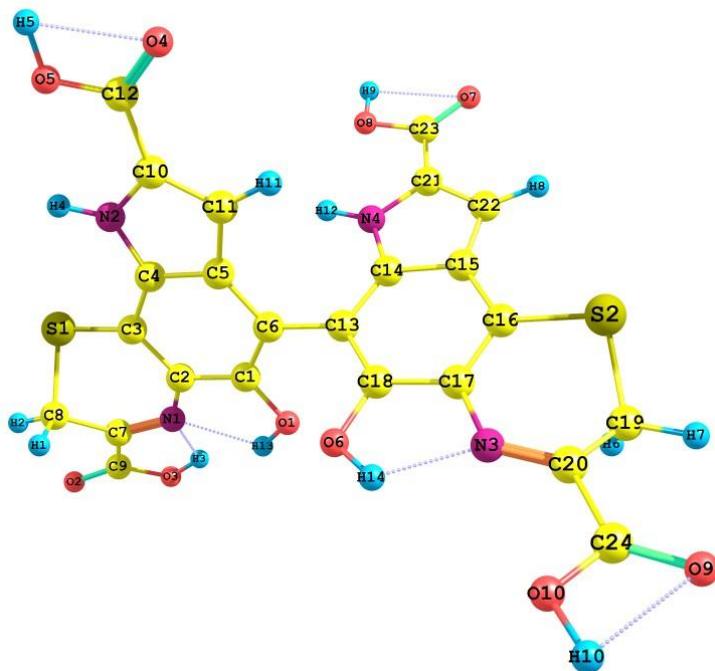
Observa-se no espectro teórico sem correções os seguintes modos vibracionais/números de onda:  $\nu$ O-H ( $3754\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu$ N-H ( $3665\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu$ C-H<sub>CH<sub>3</sub></sub> ( $2990\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu$ C=O ( $1771\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu$ C-O ( $1100\text{cm}^{-1}$ ) e  $\nu$ Aromáticos ( $684\text{cm}^{-1}$ ). Todos os modos vibracionais observados na sessão 5.1.2 confirmando a presença do dímero sugerido e ainda dos grupamentos majoritários presentes nas melaninas: ácido carboxílico, quinona-imina e catecol também simulados<sup>76</sup>.



**Figura 27.** Estruturas otimizadas para os grupamentos majoritários presentes nas melaninas, onde: (a) carboxílico, (b) quinona-imina e (c) catecol.

As Figuras 28 e 29 apresentam a otimização estrutural do possível dímero presente na estrutura da cys-DOPA, bem como seu espectro vibracional – FTIR simulado e teórico. Observa-se que a simulação contou com a presença de um heterocíclico contendo um éter de enxofre, oriundo da adição da cisteína a molécula de L-DOPA, proposta essa coerente com a Melanogênese.

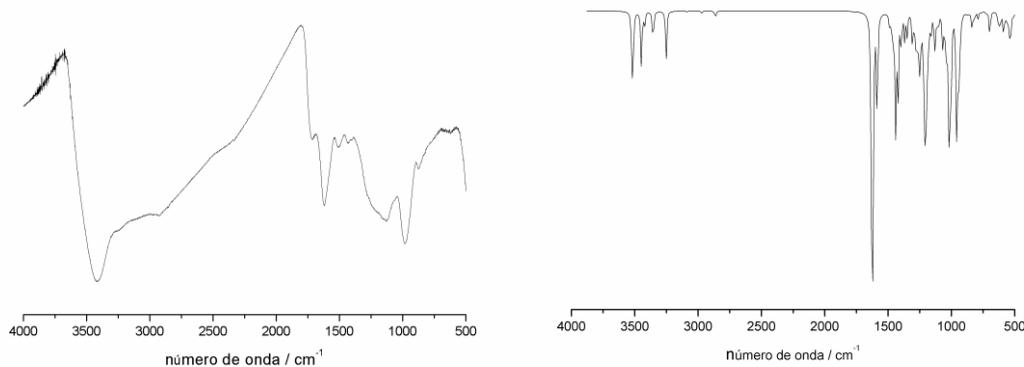
Para a cys-DOPA a otimização estrutural foi fundamental para o entendimento de como essa espécie dimérica se apresenta. Observa-se dois tipos de ácidos carboxílicos diferentes na estrutura, essa proposta foi evidenciada após a caracterização experimental por FTIR discutida na sessão 5.1.2. Esses ácidos carboxílicos estão ligados ao C7 e C20 – ligados diretamente ao anel contendo enxofre como heteroátomo e os ligados ao C10 e C21 que correspondem ao anel imínico.



**Figura 28.** Estrutura otimizada de um possível dímero presente no oligômero cys-DOPA.

Ao observarmos o espectro de infravermelho teórico para esta melanina, notamos as seguintes bandas:  $3634\text{cm}^{-1}$  relativo ao estiramento  $\nu\text{O-H}$  dos ácidos carboxílicos ligados ao anel imínico,  $3554\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{N-H}$ ,  $3475\text{cm}^{-1}$  relativo ao  $\nu\text{O-H}$  do ácido carboxílico vizinho do anel heterocíclico contendo o éter de enxofre e por último, nesta região  $3363\text{cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu\text{O-H}$  dos fenóis e catecóis, no espectro experimental ocorre uma sobreposição de bandas nesta região, onde foi possível uma atribuição mais sensível após a realização dos cálculos teóricos. Ainda neste sistema, pode-se atribuir a banda em  $1694\text{cm}^{-1}$  ao  $\nu\text{C=O}$  do ácido carboxílico adjacente ao anel contendo enxofre e outra banda em  $1742\text{cm}^{-1}$  relativo aos outros carboxílicos. Estas bandas também foram observadas no espectro

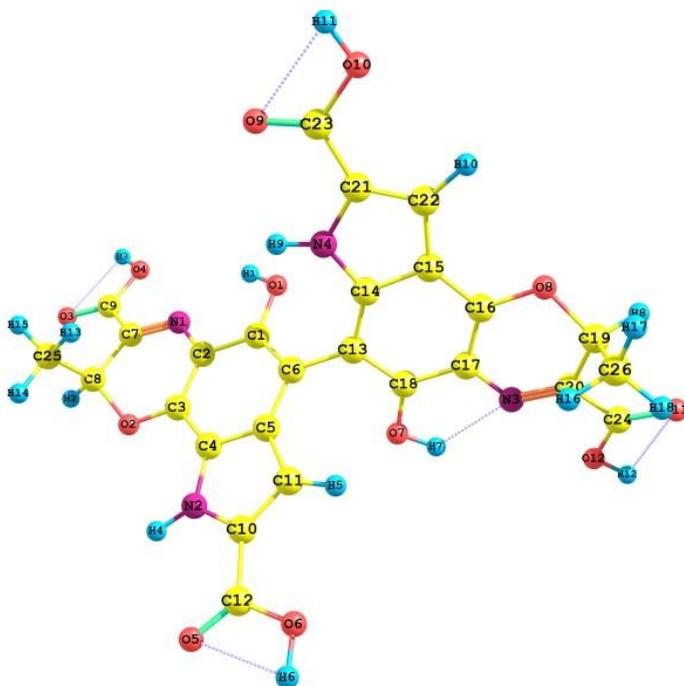
experimental e comprovaram a existência de dois ácidos carboxílicos diferentes presentes na estrutura da cys-DOPA.



**Figura 29.** Espectros vibracionais, FTIR, da melanina cys-DOPA - experimental e teórico da espécie dimérica respectivamente.

Por último, observa-se os estiramentos  $\nu\text{C-O}$  e  $\nu\text{C-S}$  em  $1100\text{cm}^{-1}$  e  $1042\text{cm}^{-1}$  respectivamente e os modos de vibração de anéis aromáticos substituídos em  $652\text{cm}^{-1}$ .

Os resultados dos cálculos da thr-DOPA são apresentados nas Figuras 30 e 31, onde mostram a otimização estrutural e os espectros de infravermelho experimental e teórico respectivamente.



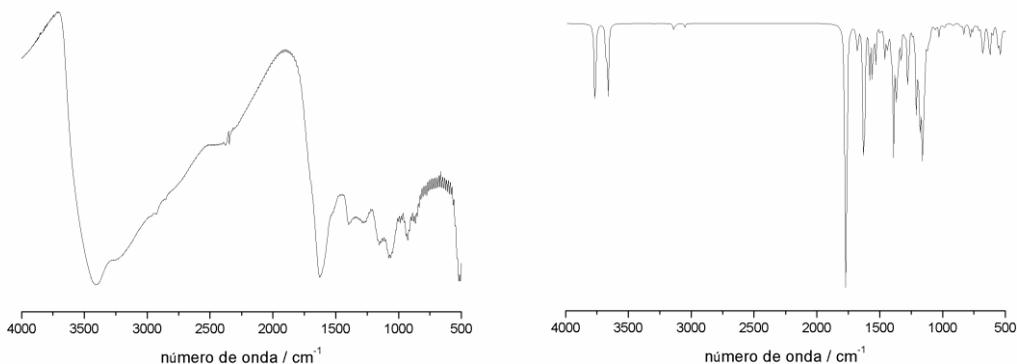
**Figura 30.** Estrutura otimizada de um possível dímero presente no oligômero thr-DOPA.

Observa-se na estrutura do dímero da thr-DOPA estrutura semelhante a ser-DOPA, entretanto, com a presença de um grupamento metilênico  $-\text{CH}_3$  oriundo do aminoácido treonina que está ligado no carbono  $\beta$  em relação a carbonila, essa estrutura do provável dímero obedece ao mecanismo proposto para a formação das DOPA melaninas.

Os estiramentos característicos no espectro teórico de infravermelho são observados em  $3760\text{cm}^{-1}$  relativo ao  $\nu\text{O-H}$ ,  $3664\text{cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu\text{N-H}$ ,  $1753\text{cm}^{-1}$  referente ao  $\nu\text{C=O}$ ,  $1161\text{cm}^{-1}$  e  $623\text{cm}^{-1}$  correspondente aos estiramentos presentes em anéis aromáticos substituídos. A presença de um possível  $-\text{CH}_3$  terminal é atribuído a banda em  $2990\text{cm}^{-1}$  observada também no espectro experimental, dando suporte à existência deste possível dímero na estrutura da thr-DOPA.

Os resultados encontrados para os cálculos teóricos das melaninas sintetizadas neste trabalho estão em consonância com poucos trabalhos

encontrados na literatura sobre o assunto<sup>84-86</sup>, mostrando que métodos computacionais aliados à química são ferramentas importantíssimas para a caracterização de sistemas complexos como as melaninas.

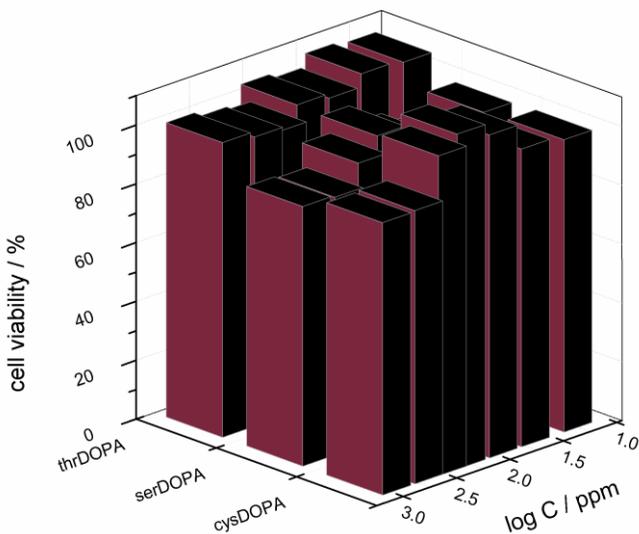


**Figura 31.** Espectros vibracionais, FTIR, da melanina thr-DOPA - experimental e teórico da espécie dimérica respectivamente.

### 5.1.12. Citotoxicidade

Uma das justificativas da preparação de melaninas quimicamente modificadas é a sua aplicação como antioxidante, sendo que esses produtos devem ter uma baixa toxicidade. Com base na justificativa e em diversos trabalhos encontrados na literatura que relatam relevante toxicidade em células sadias<sup>27,87-90</sup> de subprodutos da Melanogênese, optou-se pela realização desses ensaios.

A Figura 32 apresenta os gráficos de citotoxicidade das três melaninas preparadas neste estudo em concentrações variando de 10 a 1000mg L<sup>-1</sup>. Observa-se que não houve diminuição considerável na porcentagem de células testadas mesmo acima de 500 mg L<sup>-1</sup>. A melanina que demonstrou maior toxicidade foi a ser-DOPA com viabilidade celulares de 87,623 e 88,283% em 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, sendo que em concentrações menores não se observou esse efeito.



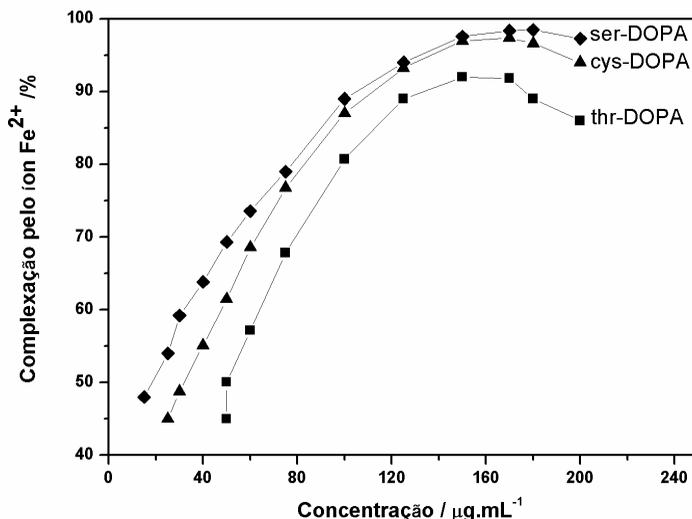
**Figura 32.** Gráficos de viabilidade celular das melaninas.

### 5.1.13. Ensaio antioxidantes

#### 5.1.13.1. Atividade por quelatão pelo íon Fe(II)

As três melaninas avaliadas através da quelatão pelo íon Fe(II) apresentaram dependência da concentração e um considerável resultado de  $EC_{50}$  com valores de 18,80; 31,12 e 50,72 g/mL para a ser-DOPA, cys-DOPA e thr-DOPA respectivamente. A Figura 33 apresenta o gráfico da concentração de melanina *vs* a porcentagem de complexação com o íon Fe(II) e a Tabela 8 apresenta os valores obtidos comparados com outros padrões presentes na literatura. Observa-se que a ser-DOPA apresenta  $EC_{50}$  quatro vezes maior que o padrão EDTA e melhor atividade que a Rutina e o BHT, já a cys-DOPA apresenta valores de  $EC_{50}$  melhores que o padrão Rutina e por último, o thr-DOPA também

apresenta um valor considerável de quelação pelo íon Fe(II) entretanto, com menor eficiência quando comparado com os outros padrões.



**Figura 33.** Curvas de quelação do íon Fe(II) pelas melaninas sintéticas.

### 5.1.13.2. Poder redutor

Os valores do ensaio de poder redutor para ser-DOPA, cys-DOPA e thr-DOPA são 2162,09; 1411,77 e 540,70mg de ácido ascórbico / g de melanina respectivamente - Tabela 8. Quando comparado com os padrões utilizados em nosso trabalho observa-se um poder redutor da ser-DOPA maior que a Rutina e o BHT, já as outras melaninas apresentaram valores abaixo dos padrões.

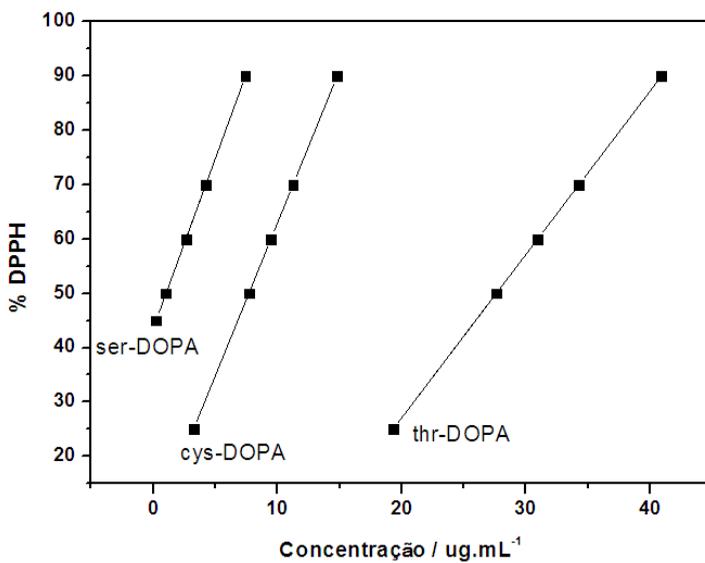
### 5.1.13.3. Capacidade antioxidante total

O resultado da análise da capacidade antioxidante total avaliada pelo método de fosfomolibdeno é observado na Tabela 8. Valores de 752,36; 495,89 e 302,78 mg de ácido ascórbico / g de melanina para a

ser-DOPA, cys-DOPA e thr-DOPA respectivamente. Quando comparado com os padrões Rutina e BHT novamente a ser-DOPA apresenta valores superiores que ambos, entretanto, a cys-DOPA apresenta melhores valores do que o padrão BHT.

#### **5.1.13.4. Captura de radicais livres utilizando DPPH**

O uso do DPPH na avaliação antioxidante de compostos modelo é muito utilizada, principalmente no estudo de polifenóis, modelos estruturais semelhantes as melaninas<sup>91-94</sup>. A Figura 34 apresenta um gráfico variando a concentração de melanina e o seu respectivo valor da % de DPPH restante em solução, observa-se que os valores dependem da concentração. Os valores de EC<sub>50</sub> obtidos para ser-DOPA, cys-DOPA e thr-DOPA são 1,02; 7,69; 27,60 respectivamente. A melanina modificada com a serina apresenta valor mais expressivo que os padrões testados Rutina e BHT, todavia, as outras duas melaninas apresentam valores superiores.



**Figura 34.** Curvas de Captura de radicais livres – DPPH de cada melanina.

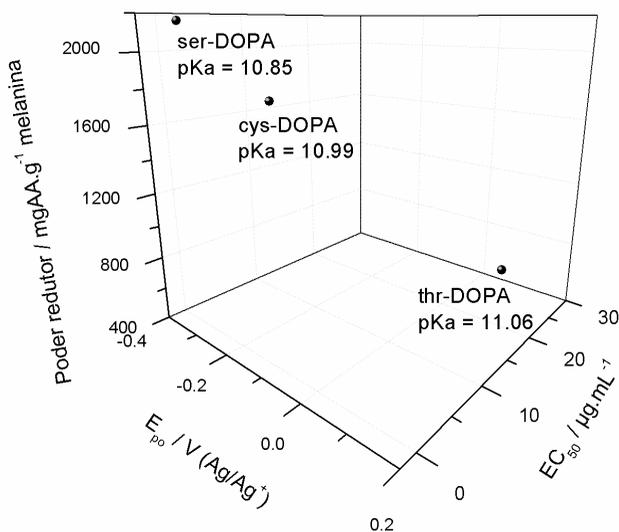
**Tabela 8.** Atividade antioxidante das melaninas modificadas por aminoácidos e padrões conhecidos da literatura

| <b>Amostra</b>  | <b>Complexação por Fe(II) (EC<sub>50</sub>g mL<sup>-1</sup>)<sup>1</sup></b> | <b>Poder Redutor (mg AAE g<sup>-1</sup>)<sup>2</sup></b> | <b>Capacidade antioxidant e total (mg AAE g<sup>-1</sup>)<sup>2</sup></b> | <b>DPPH (EC<sub>50</sub>µg mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>CV E<sub>po</sub> (V)</b> |
|-----------------|--|--|---|---|------------------------------|
| <b>Cys-DOPA</b> | 31,12 ± 0,45   | 1411,77 ± 13,57  | 495,89 ± 1,05   | 7,69 ± 0,12                                     | -0,345                       |
| <b>Ser-DOPA</b> | 18,80 ± 0,25   | 2162,09 ± 10,08  | 752,36 ± 1,17   | 1,02 ± 0,01                                     | -0,362                       |
| <b>Thr-DOPA</b> | 50,72 ± 0,74   | 540,70 ± 1,12  | 302,78 ± 0,99   | 27,60 ± 0,17                                    | +0,067                       |
| <b>Rutin</b>    | 41,35 ± 0,16   | 1622,10 ± 11,76  | 310,43 ± 1,87   | 2,78± 0,17                                      | ----                         |
| <b>BHT</b>      | 20,65 ± 0,29   | 1641,89 ± 14,23  | 548,24 ± 1,23   | 6,74± 0,21                                      | ----                         |
| <b>EDTA</b>     | 4,65 ± 0,02  | ---  | ---   | ---   | ---                          |

1. Valores de EC<sub>50</sub> para 50% de quelação com o íon Fe(II); 2. Resultados em mg de ácido ascórbico g<sup>-1</sup> de composto. Cada resultado é expressado em termos de ± SD.

### 5.1.13.5. Correlações

Uma das metodologias utilizadas para discussão dos dados das atividades antioxidantes e a origem dessa atividade são as correlações com as propriedades químicas que essas moléculas possuem<sup>96-97</sup>. O gráfico presente na Figura 35 mostra a melhor correlação obtida utilizando três parâmetros:  $E_{po}$ , poder redutor e a medida de  $EC_{50}$  com relação ao DPPH, apresentando um  $R^2 = 0,9811$ .



**Figura 35.** Gráfico de correlação dos parâmetros  $EC_{50}$  (DPPH), poder redutor e potencial de oxidação de cada melanina.

A Tabela 9 apresenta os valores de  $R^2$  e os coeficientes de correlação de Pearson utilizados para avaliação de correlação entre atividades antioxidantes e estrutura<sup>98-100</sup> para as diversas correlações envolvendo os valores de pKa do grupamento catecol,  $E_{po}$  e as atividades antioxidantes. Observa-se uma ótima correlação linear entre o valor do pKa do catecol e a atividade antioxidante total, quanto menor o

valor o pKa do grupamento catecol maior a atividade antioxidante total, 10,85; 10,99 e 11,06 para ser-DOPA, cys-DOPA e thr-DOPA respectivamente, mostrando a grande contribuição desse grupamento para a atividade antioxidante. Para o parâmetro de potencial de pico de oxidação a melhor correlação foi com a % de captura do DPPH, onde a melanina que teve o menor potencial de oxidação apresentou o melhor EC<sub>50</sub>.

Todavia, após a análise dos coeficientes lineares, questionou-se os valores das atividades antioxidantes teriam relação direta entre si, ou entre os valores das propriedades físico químicas de todas as melaninas e optou-se pelo método de correlação de Pearson para realizar essa avaliação. Esse método consiste na mensuração do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas<sup>101</sup>. Esse coeficiente varia de -1 a 1, onde o sinal indica a direção positiva ou negativa entre as variáveis. Uma correlação perfeita (-1 ou 1) indica que o valor de uma variável pode ser estimado ao se saber o valor da outra, por outro lado, valores próximos de zero indicam que não existe relação alguma entre as variáveis.

Observam-se na Tabela 9, bons coeficientes de Pearson para todas as correlações propostas, apresentando valores acima de 0,8, onde Dancey e colaboradores<sup>102</sup> classificam como uma correlação forte. Portanto, existe uma relação intrínseca entre as atividades antioxidantes avaliadas por diversos métodos e as propriedades físico-químicas de cada melanina.

**Tabela 9.** Correlações entre as atividades antioxidantes das melaninas com suas propriedades físico-químicas.

| Correlação                     | R <sup>2</sup> | r (Pearson) |
|--------------------------------|----------------|-------------|
| Fe(II) x Poder redutor         | 0,9845         | -0,9961     |
| Fe(II) x Antioxidante<br>total | 0,9613         | -0,9775     |

---

|  |        |         |
|--|--------|---------|
| Fe(II) x DPPH                                | 0,9558 | 0,9889  |
| Fe(II) x E <sub>po</sub>                     | 0,7548 | 0,9367  |
| Fe(II) x pK <sub>a(cat)</sub>                | 0,8008 | 0,9489  |
| Poder redutor x<br>Antioxidante total        | 0,9693 | 0,9923  |
| Poder redutor x DPPH                         | 0,8896 | -0,9720 |
| Poder redutor x E <sub>po</sub>              | 0,6284 | -0,9023 |
| Poder redutor x pK <sub>a(cat)</sub>         | 0,8936 | -0,9729 |
| Antioxidante total x<br>DPPH                 | 0,7501 | -0,9354 |
| Antioxidante total x E <sub>po</sub>         | 0,6179 | -0,8420 |
| Antioxidante total x<br>pK <sub>a(cat)</sub> | 0,9763 | -0,9940 |
| DPPH x E <sub>po</sub>                       | 0,9145 | 0,9783  |
| DPPH x pK <sub>a(cat)</sub>                  | 0,6895 | 0,8914  |

---

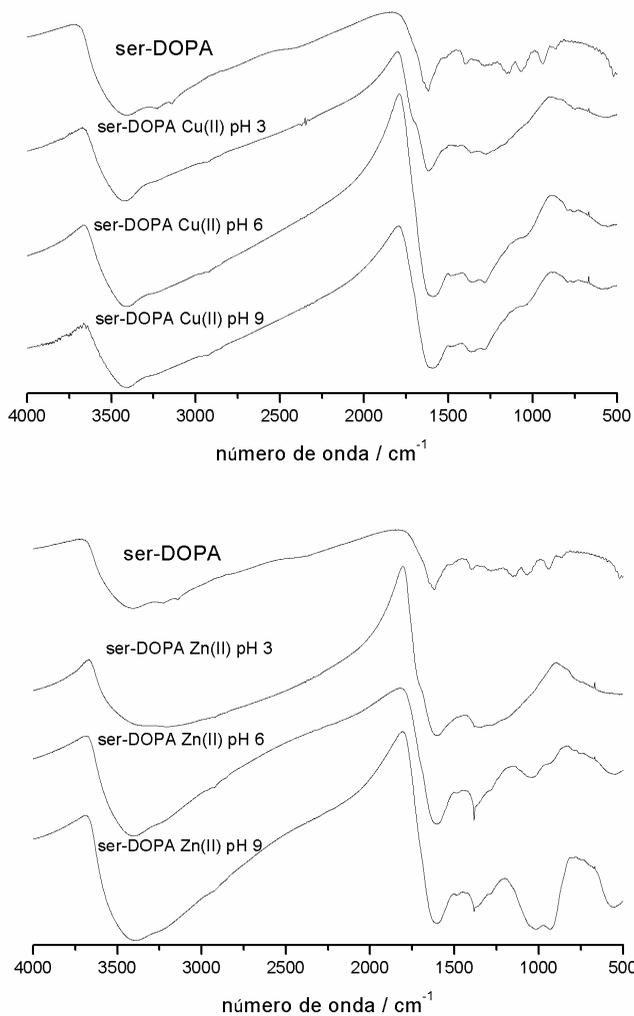
## ***5.2. Resultados e discussão – Caracterização, atividade antioxidante e citotoxicidade de complexos metálicos de Cu(II) e Zn(II) com DOPA-melaninas modificadas com aminoácidos***

### **5.2.1. Espectroscopia de infravermelho**

A espectroscopia de infravermelho é uma potente ferramenta para caracterização de complexos metálicos, quando os espectros são comparados com o ligante livre, principalmente no caso das melaninas que se pode caracterizar qual grupamento está interagindo com o íon metálico e comparar com outras técnicas de caracterização. Sendo que geralmente, o modo vibracional estudado, sofre um deslocamento para menores comprimentos de onda quando complexado com o metal<sup>103</sup>.

No caso das melaninas, esse estudo é de suma importância, pois os melanomas demonstraram ser excepcionalmente sensíveis a aumentos de determinados sais de metal bivalente; por exemplo, Zn(II) e de Cu(II), estes que podem induzir a morte do melanoma em concentrações mínimas<sup>104-105</sup> e tendo em vista qual grupamento interagem com o metal, pode-se propor um mecanismo de ação de miméticos de melaninas como os compostos estudados neste trabalho.

Os espectros de infravermelho da melanina ser-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II) estão presentes na Figura 36. Para o sistema ser-DOPA-Cu(II) observa-se deslocamentos no estiramento  $\nu\text{C}=\text{O}$ , onde na ser-DOPA livre este modo é observado em  $1620\text{cm}^{-1}$  e em pH 3, 6 e 9 em  $1600$ ,  $1558$  e  $1580\text{cm}^{-1}$  respectivamente, revelando uma interação com o grupamento carboxílico e quinona-imina nesses valores de pH. O estiramento  $\nu\text{C}-\text{O}$  que livre é  $1052\text{cm}^{-1}$ , já em valores de pH 6 e 9 são de  $1015$  e  $1000\text{cm}^{-1}$ , sendo o último mais deslocado devido a interação com o grupamento catecol que é observado também em solução por titulação potenciométrica.



**Figura 36.** Espectros de infravermelho da melanina ser-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II) variando o pH.

Para o sistema ser-DOPA-Zn(II) observa-se deslocamentos menores que o complexo de Cu(II), apresentando  $\nu\text{C}=\text{O}$  de 1612, 1605 e  $1602\text{cm}^{-1}$  em valores de pH 3, 6 e 9 respectivamente. Já para o  $\nu\text{C}-\text{O}$  valores de 1046 e  $1021\text{cm}^{-1}$  para pH 6 em 9 são observados.

O estiramento  $\nu\text{O}-\text{H}$  não sofreu mudança significativa em ambos casos devido ao grupamento catecol protonado na faixa de pH estudado.

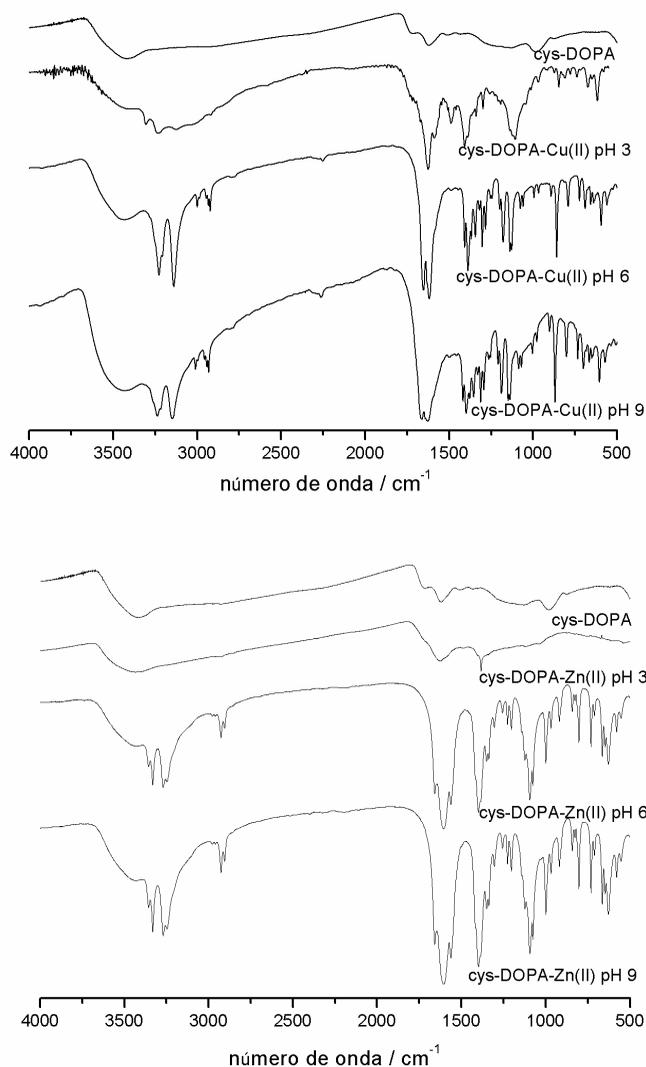
Os valores de deslocamento estão de acordo com a série de Irving-Williams, sendo que os valores da variação entre grupamento livre e grupamento complexado são maiores para o íon Cu(II) quando comparado com o Zn(II).

Os espectros da melanina cys-DOPA, bem como de seus respectivos complexos de Cu(II) nos valores de pH 3, 6 e 9 estão apresentados na Figura 37. Ao observarmos os espectros de infravermelho dos complexos e compararmos com os da ser-DOPA-Cu(II), observamos que existe uma diminuição de simetria da estrutura da cys-DOPA complexada, devido ao grande número de estiramentos observados. Para a caracterização dos complexos nos três diferentes valores de pH utilizamos as principais bandas que caracterizam os grupamentos majoritários das melaninas. Observa-se em todos os espectros pelo menos duas bandas características de cada estiramento, evidenciando claramente que existem diferentes tipos de ambientes químicos envolvidos na estrutura complexada.

No sistema cys-DOPA-Cu(II) observa-se que em valores de pH 3 existem bandas em  $3404$  e  $3328\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{O}-\text{H}$ ,  $1625\text{cm}^{-1}$  e  $1588\text{cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu\text{C}=\text{O}$  e  $1105$  e  $967\text{cm}^{-1}$  relativos a estiramentos  $\nu\text{C}-\text{O}$ . Para este valor de pH existe os maiores deslocamentos nas bandas referentes ao estiramento  $\nu\text{C}=\text{O}$  e  $\nu\text{C}-\text{O}$  quando comparado com a cys-DOPA livre podendo o centro metálico estar coordenado pelo grupamento quinona-imina. Já em valores de pH 6 observa-se uma quebra maior de simetria em comparação com pH 3, sendo as principais bandas observadas em  $3233$  e  $3141\text{cm}^{-1}$  referente ao  $\nu\text{O}-\text{H}$ ,  $2917$  e  $2997\text{cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu\text{C}-\text{H}$ ,  $1610$  e  $1580\text{cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu\text{C}=\text{O}$  e bandas em  $1172$  e  $998\text{cm}^{-1}$  referentes ao  $\nu\text{C}-\text{O}$ . Esses valores revelam que possivelmente as melaninas estão coordenadas por diferentes grupamentos doadores, no caso ácido carboxílico e quinona-aminas. Em pH 9 observam-se estiramentos característicos dos grupamentos majoritários em  $3233$  e  $3131\text{cm}^{-1}$  relativos ao  $\nu\text{O}-\text{H}$ ,  $2997$  e  $2927\text{cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu\text{C}-\text{H}$ ,  $1619$  e  $1580\text{cm}^{-1}$  referente ao  $\nu\text{C}-\text{O}$  e  $1170$  e  $950\text{cm}^{-1}$  referentes ao  $\nu\text{C}-\text{O}$ , quando comparado com a melanina livre pode-se concluir que existem valores de deslocamento maiores do

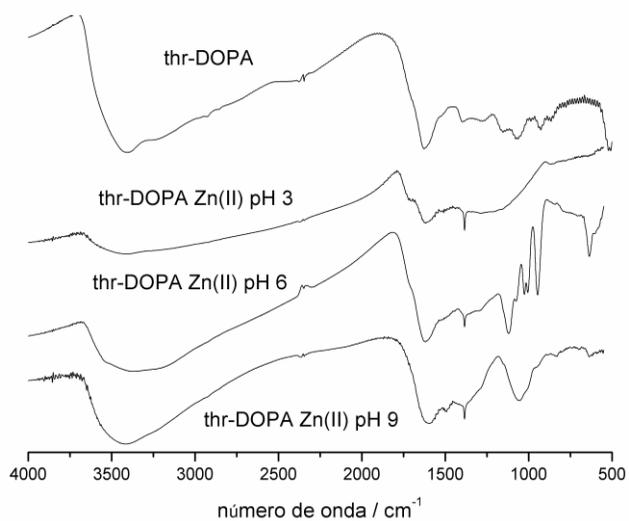
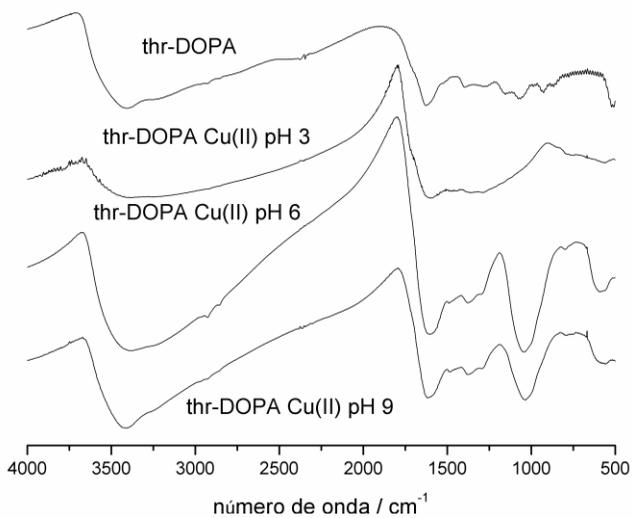
estiramento  $\nu\text{C-O}$  podendo estar atribuído a interação com o grupamento catecol, e a presença de possíveis espécies mistas nesse valor de pH envolvendo grupamentos catecol e quinona-imina.

No complexo *cys-DOPA-Zn(II)* observa-se pouca alteração na simetria do complexo em pH 3 quando comparado com o sistema *cys-DOPA-Cu(II)*, neste valor de pH observa-se bandas características em 3420, 1609 e  $990\text{cm}^{-1}$  relativo aos estiramentos  $\nu\text{O-H}$ ,  $\nu\text{C=O}$  e  $\nu\text{C-O}$  respectivamente. Em pH 6 se observa uma diminuição da simetria estrutural do complexo sendo observado um aumento no número de estiramentos em 3233 e  $3228\text{cm}^{-1}$  atribuídos ao estiramento  $\nu\text{O-H}$ , 2917 e  $2997\text{cm}^{-1}$  relativos ao estiramento  $\nu\text{C-H}$ , 1606 e  $1560\text{cm}^{-1}$  atribuídos ao  $\nu\text{C=O}$ , 1093 e  $1004\text{cm}^{-1}$  relativo ao  $\nu\text{C-O}$ . Esses valores revelam que a melanina *cys-DOPA* pode estar coordenada com mais de um grupamento doador, neste pH possivelmente carboxílico e quinona-imina. Em valores de pH 9, observa-se pouca variação de simetria quando comparado com o pH 6, onde destaca-se as bandas que representam os grupamentos majoritários presentes nas melaninas em 3327 e  $3264\text{cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu\text{O-H}$ , 2923 e  $2902\text{cm}^{-1}$  relativo ao  $\nu\text{C-H}$ , 1601 e  $1550\text{cm}^{-1}$  relativo ao estiramento  $\nu\text{C=O}$ , 1093 e  $955\text{cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu\text{C-O}$ . Analogamente ao complexo de *Cu(II)* pode-se verificar que existem valores de deslocamentos superiores relativo ao  $\nu\text{C-O}$  quando comparados com o pH 3 e 6, associando-se a interação com o grupo catecol neste valor de pH e ainda possível espécie mista envolvendo catecol e quinona-imina.



**Figura 37.** Espectros de infravermelho da melanina cys-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II) variando o pH.

Os espectros de infravermelho da thr-DOPA livre e dos sistemas thr-DOPA-Zn(II) e thr-DOPA-Cu(II) podem ser observados na Figura 38.



**Figura 38.** Espectros de infravermelho da melanina thr-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II) variando o pH.

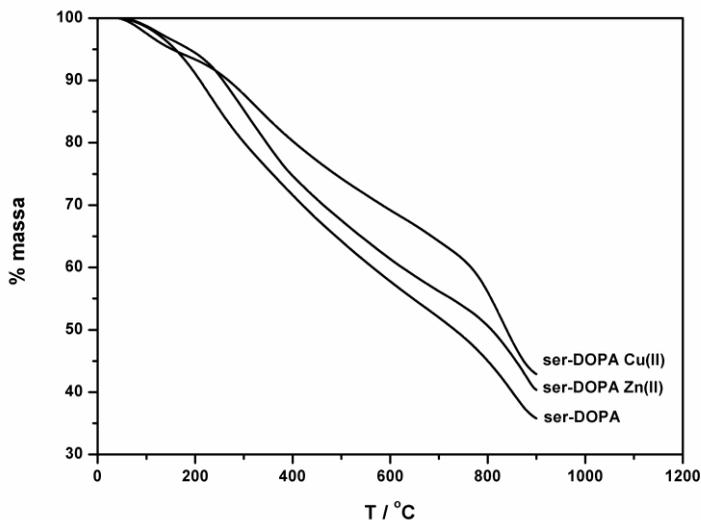
Para o sistema thr-DOPA-Cu(II) pode-se acompanhar os deslocamentos das bandas comparados com o ligante livre em três valores de pH, para a banda relativa ao estiramento  $\nu$ -OH observa-se bandas em 3417, 3381 e 3400 $\text{cm}^{-1}$  para valores de pH 3, 6 e 9 respectivamente. As bandas referentes ao  $\nu$ -C=O se apresentam em 1620, 1611 e 1606 $\text{cm}^{-1}$  para os valores de pH 3, 6 e 9 respectivamente. O estiramento  $\nu$ -C-O é observado em valores de 1060, 1038 e 1033 $\text{cm}^{-1}$  para os valores de pH 3, 6 e 9 respectivamente. Analisando os valores de estiramento e comparando-os com os da thr-DOPA livre pode-se concluir que em valores de pH ácidos ocorre a coordenação pelos grupamentos carboxílicos, em pH 6 o maior aumento de deslocamento do estiramento  $\nu$ -C=O indica uma coordenação pelo grupamento quinona-imina e em valores de pH alcalinos pelo grupamento catecol.

No sistema thr-DOPA-Zn(II) analogamente aos outros complexos, acompanhou-se a formação do complexo variando os valores de pH observou-se bandas relativas ao estiramento  $\nu$ -OH em 3416, 3382 e 3328 $\text{cm}^{-1}$  para os valores de pH 3, 6 e 9 respectivamente. Estiramentos em 1624, 1615 e 1620 $\text{cm}^{-1}$  atribuídos ao  $\nu$ -C=O são verificados em valores de pH 3, 6 e 9 respectivamente. Os estiramentos  $\nu$ -C-O são observados em 1058 e 1052 para valores de pH 6 e 9 respectivamente. Em pH 6 verificou-se duas bandas em 1031 e 1012 $\text{cm}^{-1}$  sendo atribuídos a possíveis interações por mais de uma espécie neste valor de pH. Analisando as principais bandas e comparando-as com as presentes na melanina thr-DOPA livre, pode-se concluir que em valores de pH 3 ocorre uma interação com os grupamentos carboxílicos, em valores de pH 6 pode estar ocorrendo interação com o grupamento carboxílico e quinona-imina devido a formação de duas bandas e em valores de pH 9 ocorre a coordenação pelo grupamento catecol.

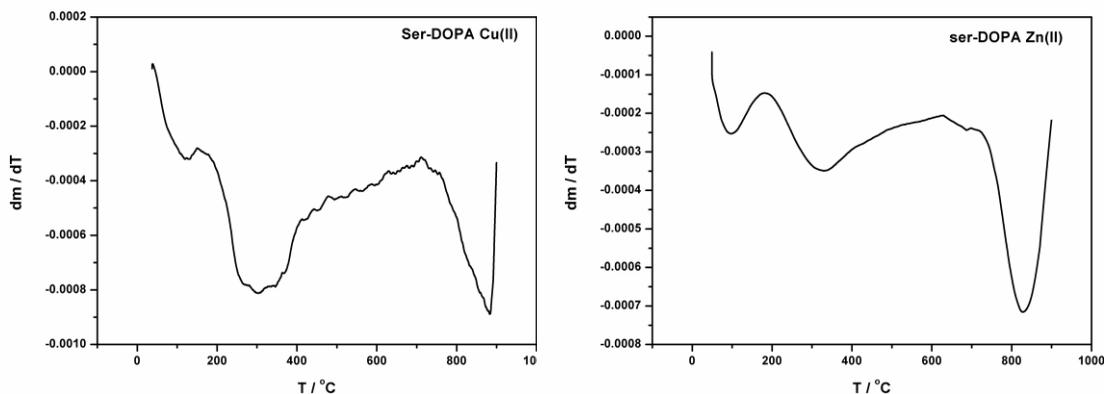
### 5.2.2. Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas e as derivadas para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com a melanina ser-DOPA estão apresentadas nas Figuras 39 e 40 respectivamente. Assim, como apresentado na sessão 5.1.3, novamente observamos a estabilidade térmica das melaninas<sup>55</sup>. Ambos os complexos apresentam perdas de massa semelhantes e com temperaturas maiores que a melanina livre, evidenciando a interação e estabilidade térmica em presença dos íons metálicos. Para o complexo de Cu(II) observa-se uma perda de massa inicial até 435 $^{\circ}\text{C}$  referente a

21,98% da massa original e até 902°C uma perda de massa de 33,03%, podendo ser atribuídas a descarboxilação dos grupamentos ácidos e pirólise dos outros grupamentos doadores respectivamente. Entretanto, para o complexo de Zn(II) essas temperaturas são menores, onde em 416°C ocorre uma perda de massa de 20,72% e até 902°C uma perda de 37,20%. Ainda evidencia-se a presença de 44,99 e 42,04% de resíduos para a ser-DOPA Cu(II) e Zn(II) respectivamente atribuído aos óxidos metálicos e resíduos de melaninas.



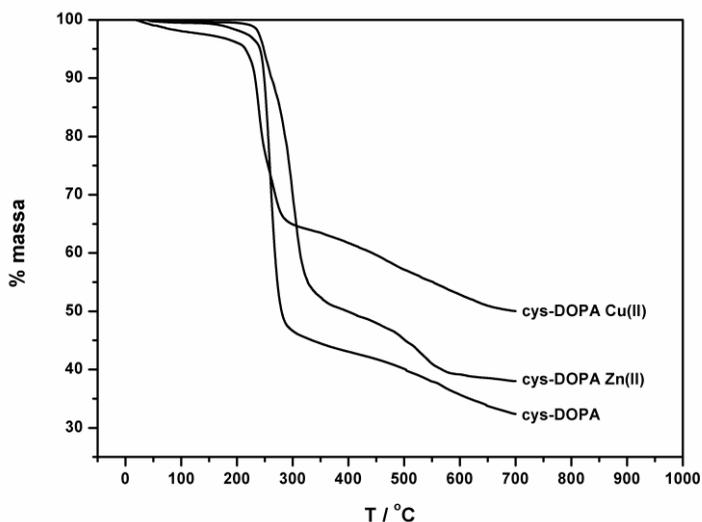
**Figura 39.** Termogramas da melanina sintética ser-DOPA e dos seus complexos com Cu(II) e Zn(II).



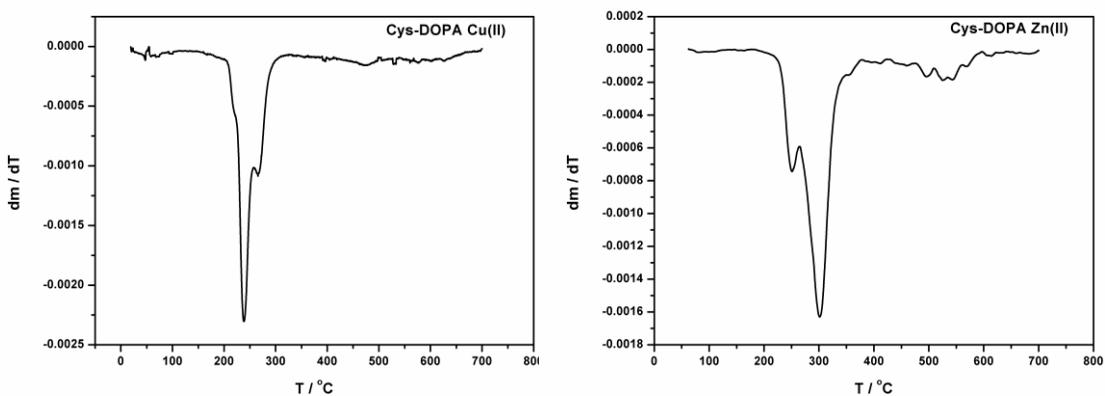
**Figura 40.** Derivadas  $dm/dT$  dos termogramas referentes aos complexos ser-DOPA-Cu(II) e ser-DOPA-Zn(II) respectivamente.

Os termogramas e derivadas para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com a melanina cys-DOPA estão presentes nas Figuras 41 e 42 respectivamente. Analogamente a ser-DOPA os termogramas dos complexos são muito semelhantes ao do ligante livre, observando-se perdas de massa com temperaturas superiores, correspondentes a estabilidade térmica dos complexos formados com a cys-DOPA. Para o complexo cys-DOPA-Cu(II) observa-se uma primeira perda de massa até 303°C referente a 47,5% da massa inicial e mais 15,18% até 700°C. Para o complexo cys-DOPA-Zn(II) a mesma tipologia de perda de massa é observada com 47,5% de perda até 354°C e 13,39% até 700°C, restando 50,08 e 39,11% de resíduos respectivamente para os complexos de Cu(II) e Zn(II) referentes aos óxidos metálicos e resíduos termoestáveis de melaninas.

Recentemente, Novikova<sup>106</sup> e colaboradores realizaram estudos de caracterização da formação do complexo de Sn(II) com cisteína livre utilizando análises termogravimétricas e observaram um perfil de perda de massa referente a descarboxilação do aminoácido semelhante ao encontrado em nosso estudo, sendo mais uma evidência da caracterização da primeira perda de massa observada nas melaninas.

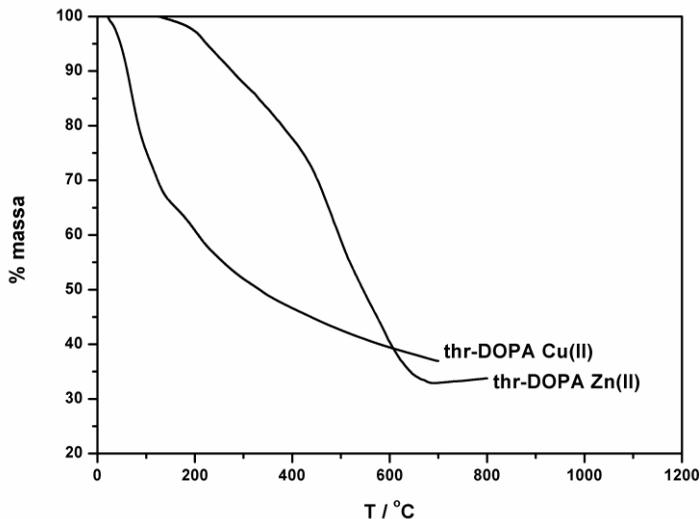


**Figura 41.** Termogramas da melanina sintética cys-DOPA e dos complexos de Cu(II) e Zn(II).



**Figura 42.** Derivadas  $dm/dT$  dos termogramas referentes aos complexos cys-DOPA-Cu(II) e cys-DOPA-Zn(II) respectivamente.

Os termogramas e as derivadas para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com a melanina thr-DOPA estão apresentados nas Figuras 43 e 44 respectivamente. Assim, como as outras melaninas, observa-se um perfil semelhante ao ligante livre, todavia com temperaturas de decomposição maiores relativa à estabilidade térmica do complexo.

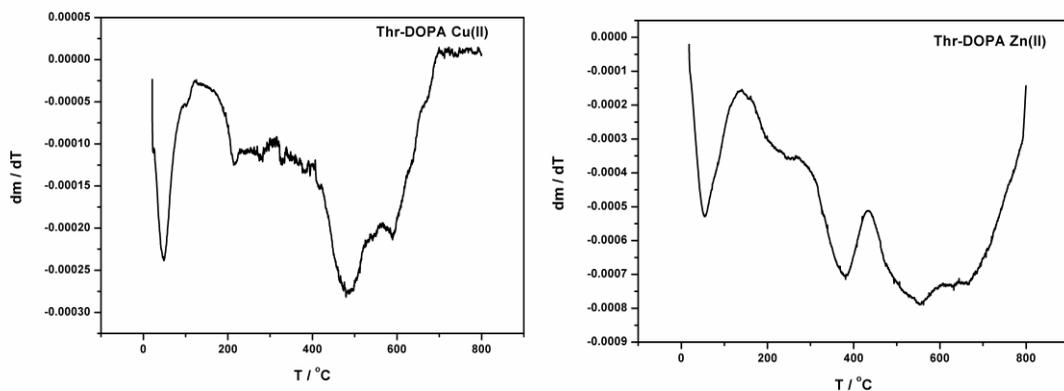


**Figura 43.** Termogramas dos complexos thr-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Zn(II).

O complexo thr-DOPA Cu(II) apresenta duas perdas de massa representativas até 409°C relativo a 20,94% da massa original e até 750°C relativo 36,99% da massa inicial. Entretanto, o complexo de Zn(II) apresenta até 449°C uma perda de 24,58% da massa inicial e até 750°C uma perda de 34,8%. Por último, observa-se a formação de 42,07 e 40,62% de resíduos respectivamente para os complexos de Cu(II) e Zn(II) referentes aos óxidos metálicos e resíduos de melaninas.

De modo geral, pode-se dizer avaliando os resíduos dos metais e comparando-os com as das melaninas livres e com outros trabalhos utilizando TGA para caracterização de complexos<sup>108-109</sup> que os grupamentos doadores representam um pouco mais de 15% em massa da estrutura das melaninas. O detalhamento dos percentuais de perda de

massa ( $\Delta m$ ) de cada complexo nos intervalos de temperatura ( $\Delta T$ ) está presente na Tabela 10.



**Figura 44.** Derivadas  $dm/dT$  dos termogramas referentes aos complexos thr-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Zn(II) respectivamente.

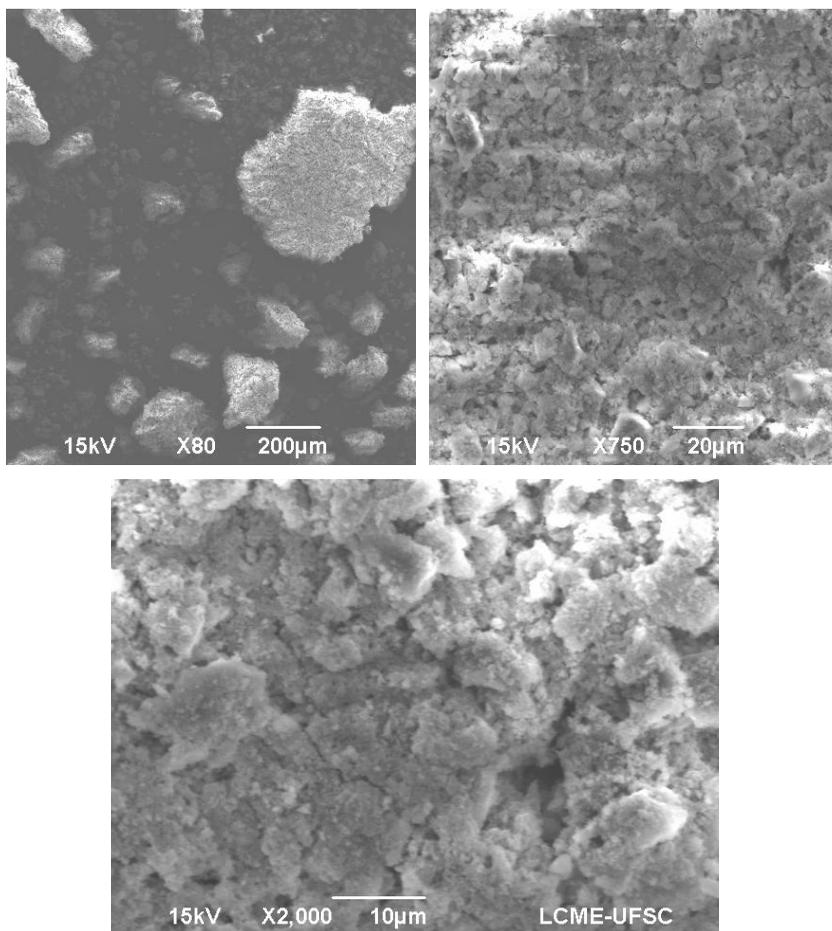
**Tabela 10:** Resumo dos percentuais de perda de massa ( $\Delta m$ ) de cada complexo nos intervalos de temperatura ( $\Delta T$ ).

| <b>Melanina</b>        | <b><math>\Delta T</math> (<math>^{\circ}C</math>)</b> | <b><math>\Delta m</math> (%)</b> |
|------------------------|---|----------------------------------|
| <b>Ser-DOPA Cu(II)</b> | 45 – 153  | 3,13                             |
|                        | 153 – 435   | 18,85                            |
|                        | 435 – 727   | 15,65                            |
|                        | 727 – 902   | 17,38                            |
|                        | Resíduo   | 44,99                            |
| <b>Ser-DOPA Zn(II)</b> | 45 – 172  | 5,94                             |
|                        | 172 – 416   | 14,78                            |
|                        | 416 – 715   | 23,81                            |
|                        | 715 – 902   | 13,43                            |
|                        | Resíduo   | 42,04                            |
| <b>Cys-DOPA Cu(II)</b> | 43 – 205  | 4,32                             |
|                        | 205 – 302   | 30,42                            |
|                        | 302 – 700   | 15,18                            |
|                        | Resíduo   | 50,08                            |
| <b>Cys-DOPA Zn(II)</b> | 43 – 217  | 0,99                             |
|                        | 217 – 354   | 46,51                            |
|                        | 354 – 700   | 13,39                            |
|                        | Resíduo   | 39,11                            |
| <b>Thr-DOPA Cu(II)</b> | 30 – 120  | 2,85                             |
|                        | 120 – 409   | 18,09                            |
|                        | 409 – 585   | 34,29                            |
|                        | 585 – 750   | 2,7                              |
|                        | Resíduo   | 42,07                            |

|                        |           |       |
|------------------------|-----------|-------|
| <b>Thr-DOPA Zn(II)</b> | 35 – 142  | 2,01  |
|                        | 142 – 292 | 4,17  |
|                        | 292 – 449 | 18,4  |
|                        | 449 – 750 | 34,8  |
|                        | Resíduo   | 40,62 |

### 5.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

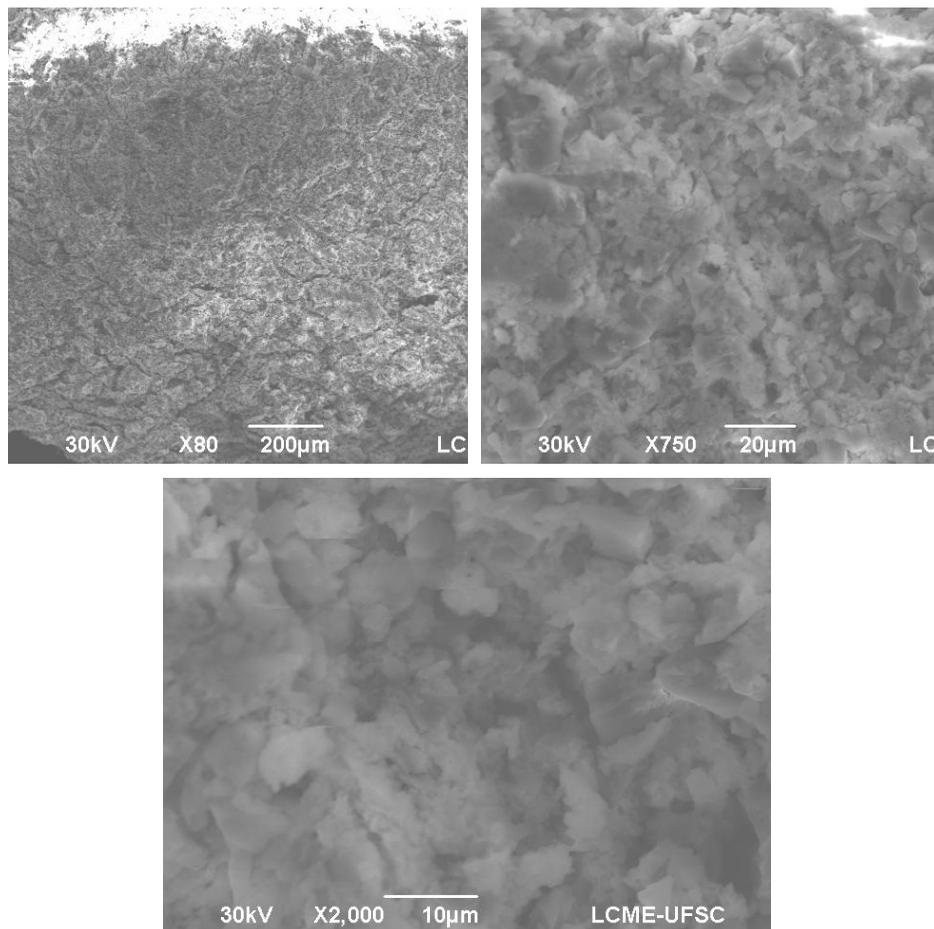
Analogamente às melaninas livres, sessão 5.1.5. utilizou-se a técnica de MEV para caracterização dos complexos de Cu(II) e Zn(II). As Figuras 45a e 45b apresentam as micrografias dos complexos ser-DOPA-Cu(II) e ser-DOPA-Zn(II) com aumentos de 85, 750 e 2000 vezes.



**Figura 45a.** Imagens de MEV do complexo ser-DOPA Cu(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.

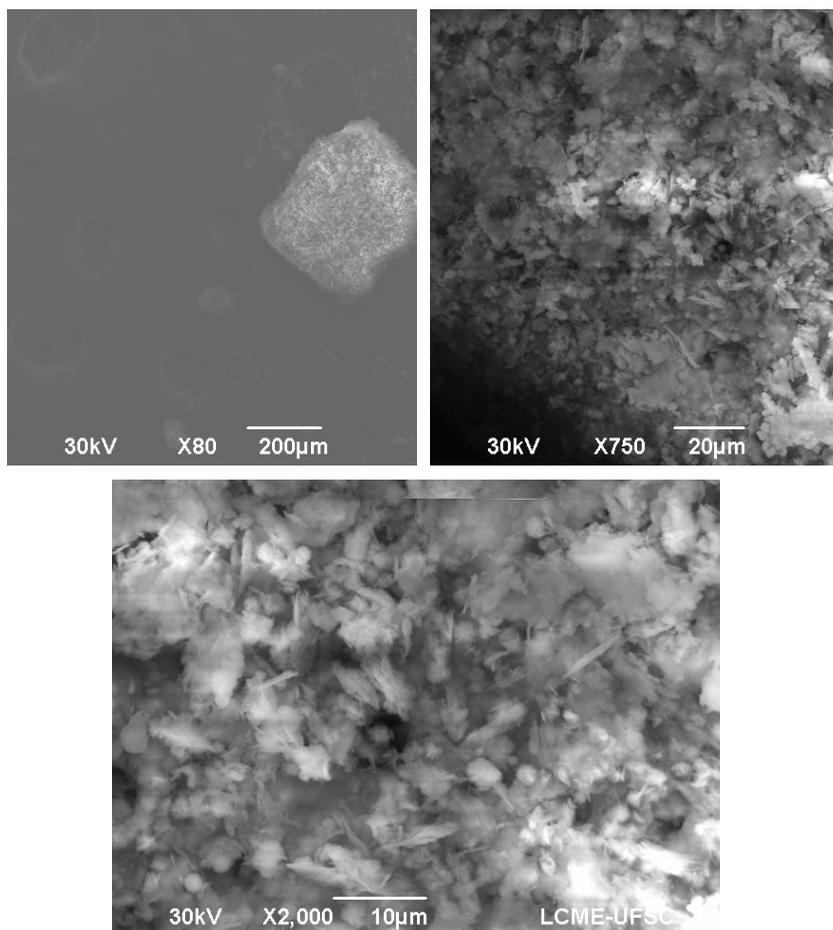
Observa-se nas Figuras 45a e 45b regiões amorfas interfolhadas com estruturas laminares variando de 5 a 20 μm com alta rugosidade – Aumento de 2,000 vezes. Uma correlação com sua fractalidade pode ser obtida analisando os resultados de espalhamento de raios-X, sessão 5.2.7, onde observa-se a passagem da estrutura de fractal de massa

presente na melanina livre para fractal de superfície, tanto no complexo ser-DOPA-Zn(II) quanto no ser-DOPA-Cu(II).

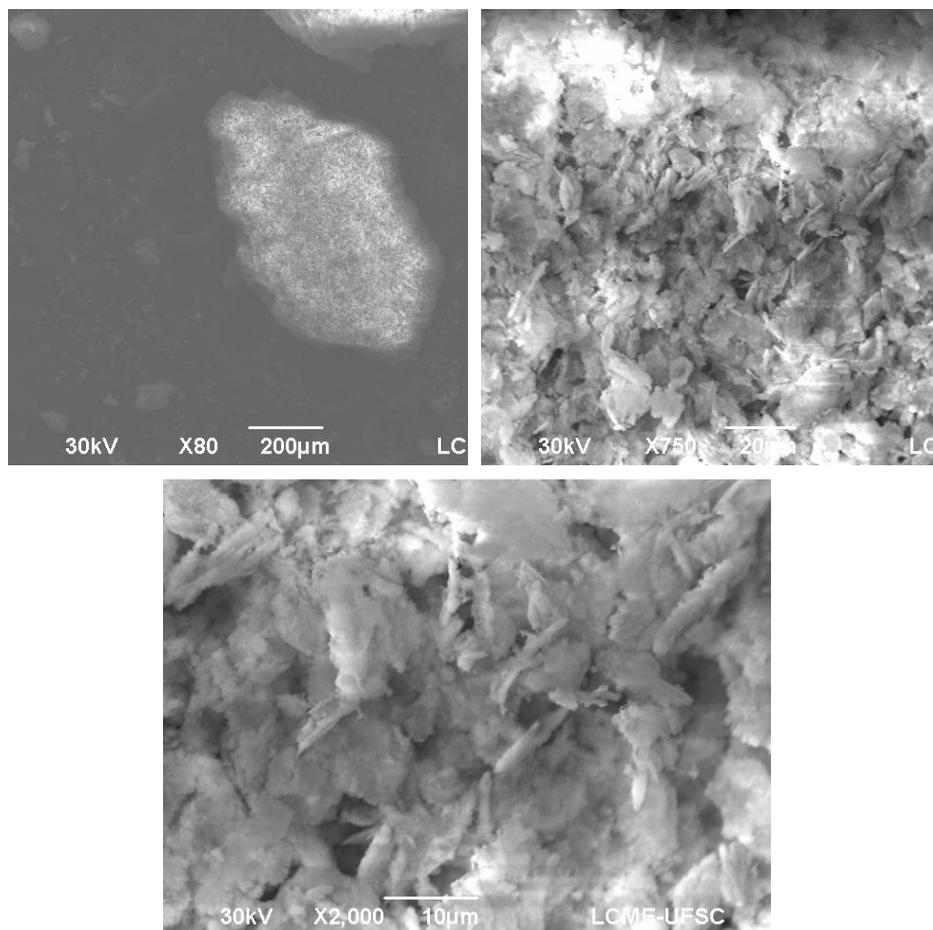


**Figura 45b.** Imagens de MEV do complexo ser-DOPA Zn(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.

As Figuras 45c e 45d apresentam as micrografias dos complexos cys-DOPA-Zn(II) e cys-DOPA-Cu(II). Observa-se que foram estruturas altamente amorfas sem uma sequência pré-definida, diferente da cys-DOPA livre que apresentava estrutura fragmentada.



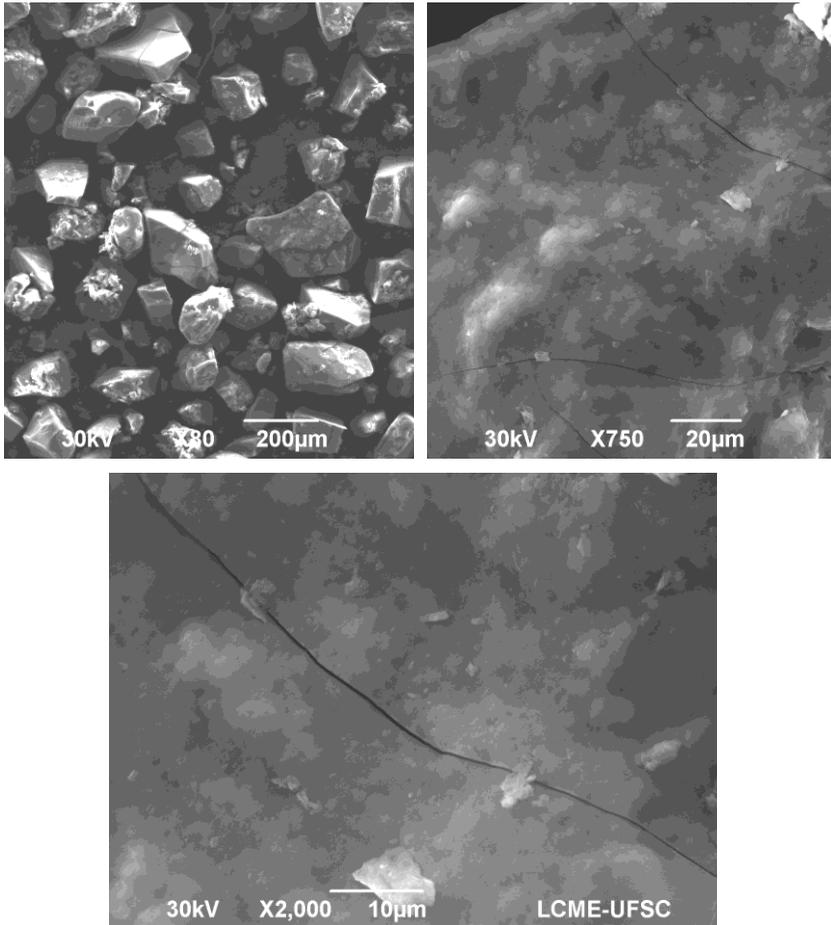
**Figura 45c.** Imagens de MEV do complexo cys-DOPA Cu(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.



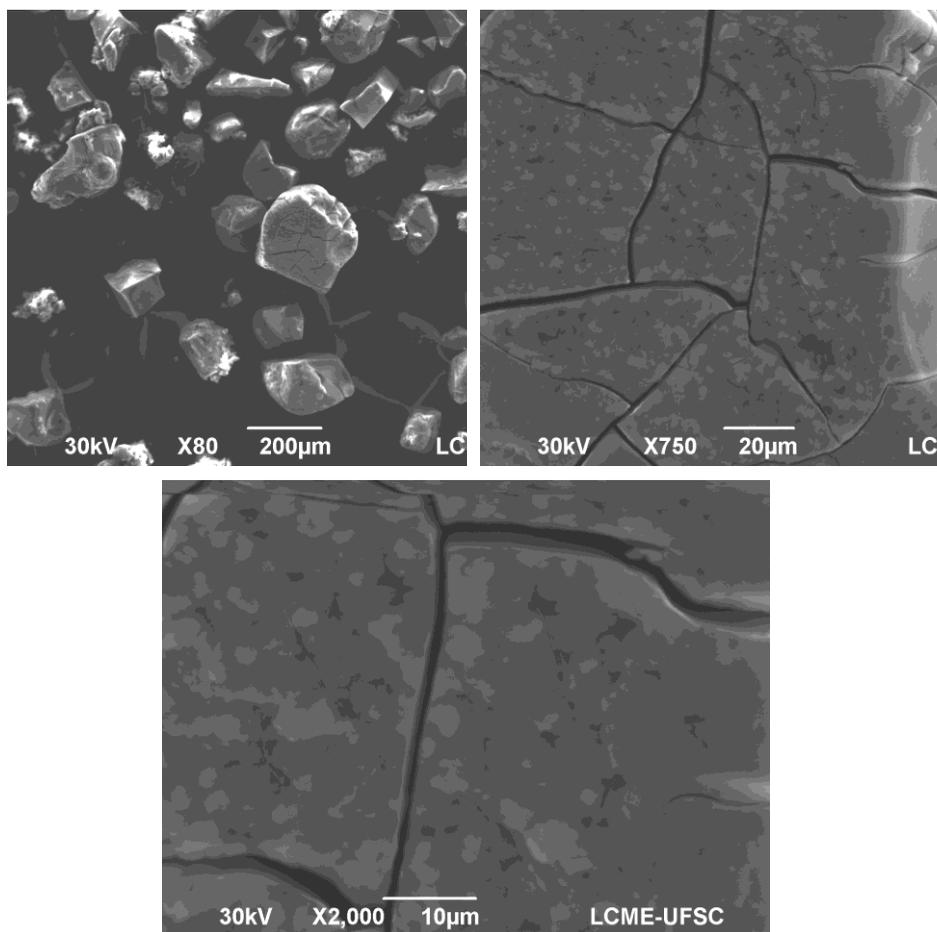
**Figura 45d.** Imagens de MEV do complexo cys-DOPA Zn(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.

As Figuras 45e e 45f apresentam as micrografias dos complexos thr-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Zn(II). Morfologicamente, observa-se diferença entre os dois complexos, pois o complexo de cobre apresenta

uma superfície completamente lisa e o de zinco apresentando pequenas rugosidades em sua estrutura.



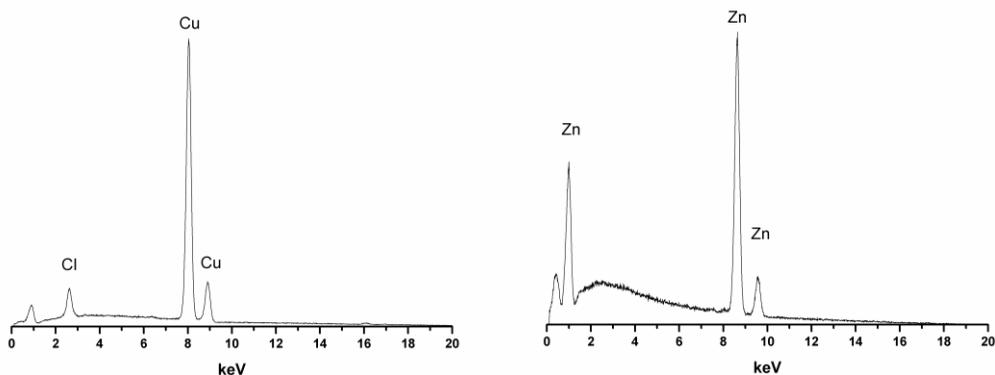
**Figura 45e.** Imagens de MEV do complexo thr-DOPA Cu(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.



**Figura 45f.** Imagens de MEV do complexo thr-DOPA Zn(II) com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.

### 5.2.4. Microanálise por Energia Dispersiva de Raios-X

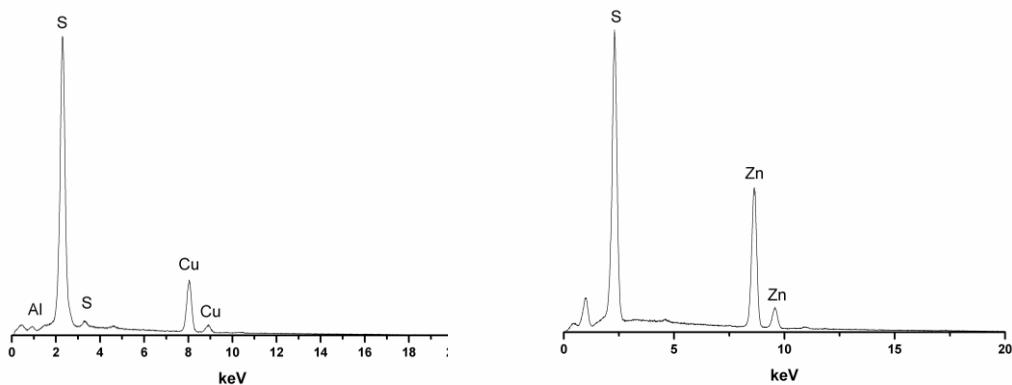
A técnica de microanálise por energia dispersiva de Raios-X é amplamente utilizada na caracterização qualitativa de sistemas complexos<sup>110-115</sup>, neste contexto foi utilizada para identificação de Cu(II) e Zn(II) nos compostos de coordenação isolados com as melaninas. A Figura 46 apresenta os espectros de EDS dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com a ser-DOPA.



**Figura 46.** Espectros de EDS dos complexos ser-DOPA Cu(II) e ser-DOPA Zn(II) respectivamente.

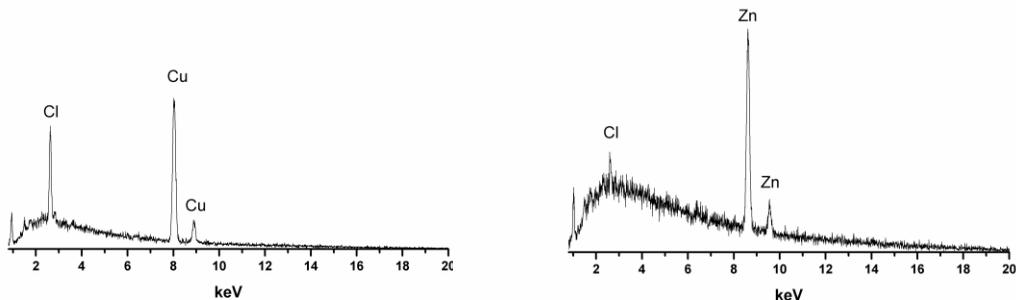
Observa-se a presença de Cu(II) no complexo ser-DOPA-Cu(II) e Zn(II) no complexo ser-DOPA-Zn(II), sendo comprovada a presença desses metais nas amostras. Verifica-se a presença de Cl em pequenas quantidades no complexo ser-DOPA-Cu(II), podendo estar associado como contra íon na forma de cloreto.

Na Figura 47 observa-se os espectros de EDS para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com a cys-DOPA, a identificação dos íons metálicos e ainda a presença de enxofre típico em melaninas do tipo *pheomelanina*, que contém enxofre como precursor, dando suporte também a estrutura do ligante livre.



**Figura 47.** Espectros de EDS dos complexos cys-DOPA Cu(II) e cys-DOPA Zn(II) respectivamente.

A Figura 48 mostra os espectros de EDS dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com a melanina thr-DOPA. Observa-se a presença dos dois íons metálicos nos complexos comprovando sua formação e ainda em ambos compostos a presença de Cl, sendo atribuído como contra íon tanto no thr-DOPA-Cu(II) quanto no thr-DOPA-Zn(II).

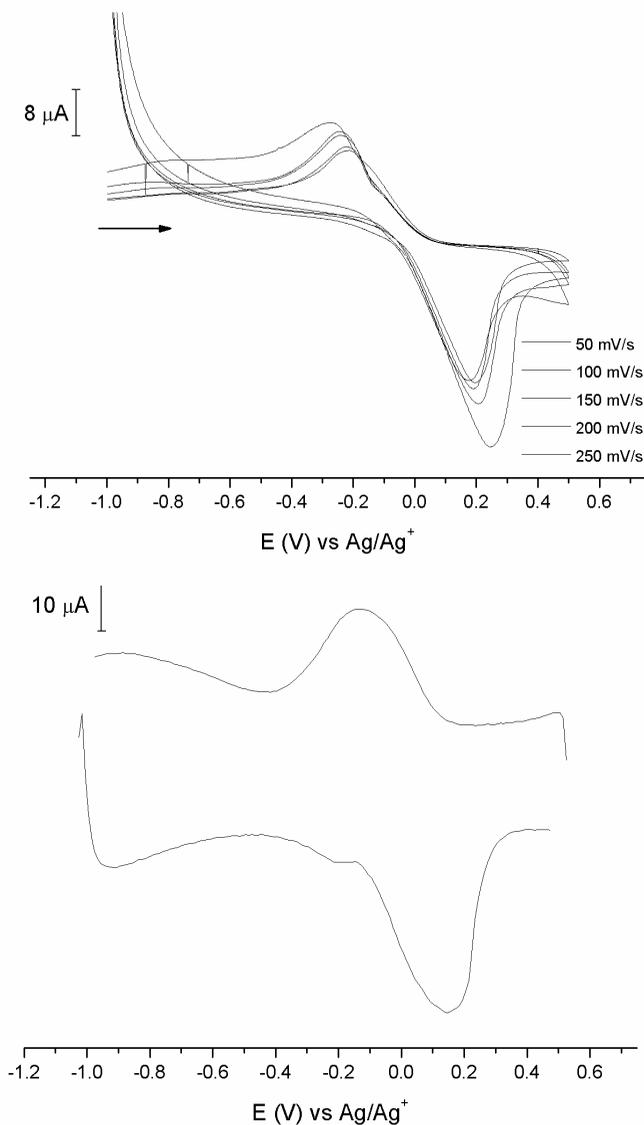


**Figura 48.** Espectros de EDS dos complexos thr-DOPA Cu(II) e thr-DOPA Zn(II) respectivamente.

### 5.2.5. Eletroquímica

Os voltamogramas cíclicos e de onda quadrada do complexo ser-DOPA-Cu(II) podem ser observados na Figura 49.

Verifica-se que variando a velocidade de varredura não possuímos uma relação direta e proporcional com os potenciais de redução e oxidação, sendo que a relação  $i_p/v^{1/2}$  não é constante levando a um processo eletroquímico quasi-reversível<sup>116</sup>. Os voltamogramas apresentam  $E_{pa} = 0,194$  e  $0,152V$  para a voltametria cíclica a  $100mV/S$  e onda quadrada respectivamente, e  $E_{pc}$  de  $-0,212$  e  $-0,185$  para cíclica e onda quadrada nas mesma condições. Esses pares são atribuídos ao processo redox Cu(II)/Cu(I) e ainda a oxidação do ligante deslocado para valores mais positivos de  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$ .

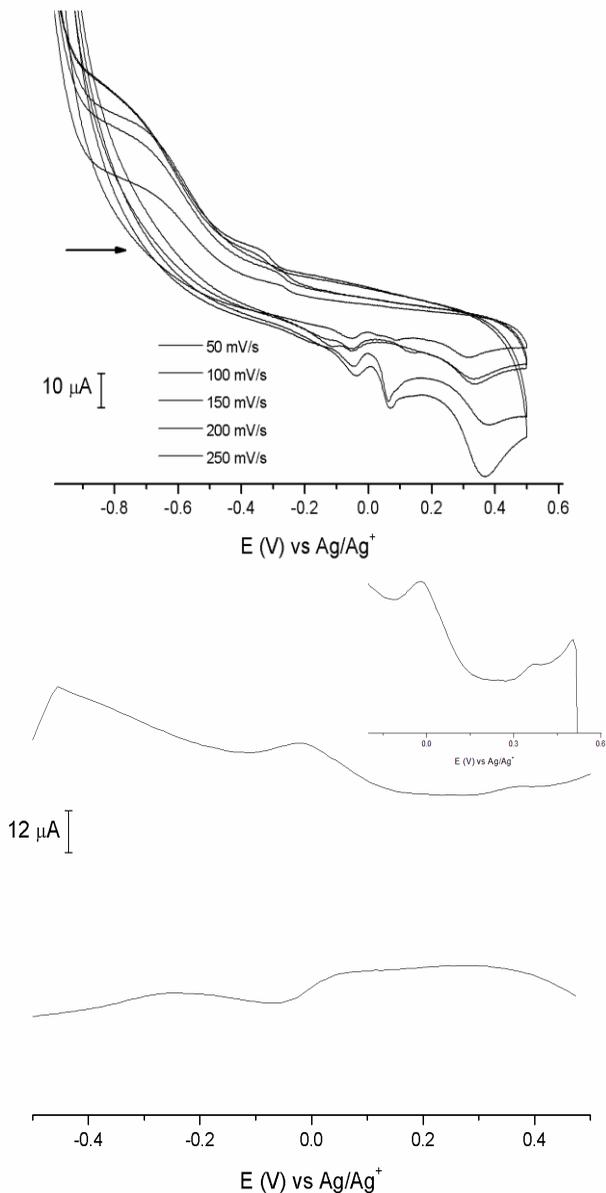


**Figura 49.** Voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura variando entre 50 e 250mV/s e voltamograma de onda quadrada do complexo ser-DOPA-Cu(II).

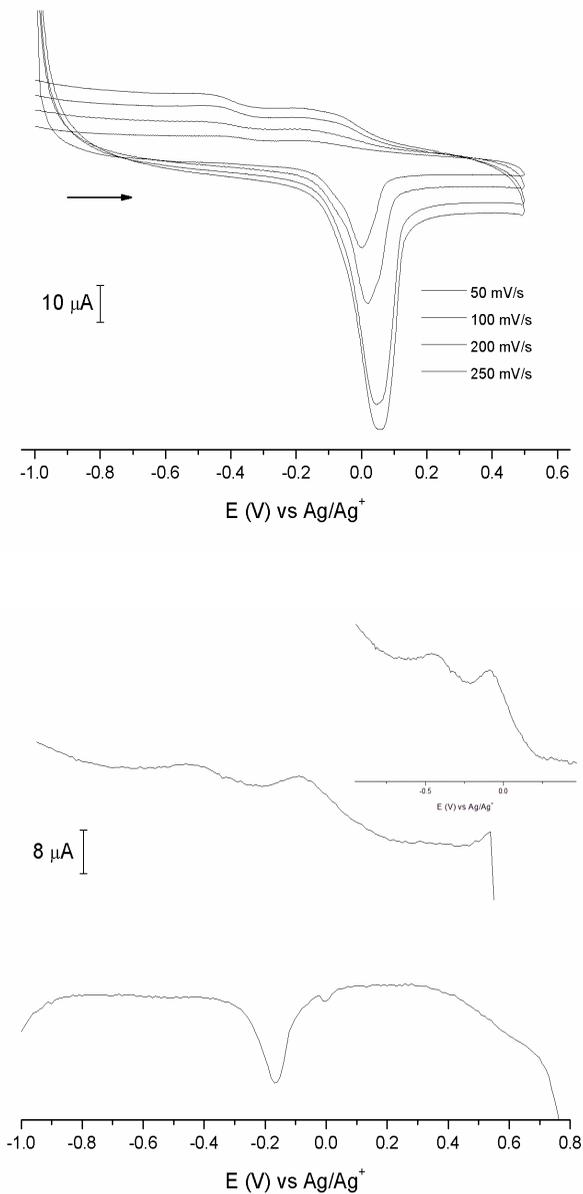
A Figura 50 apresenta os voltamogramas cíclicos e de onda quadrada para o complexo *cys*-DOPA-Cu(II), com um pico de oxidação em 0,322V relativo ao processo Cu(I)/Cu(II) irreversível com  $E_{pa}$  de 0,322 e 0,331V referente ao voltamograma cíclico a 100mV/s e o de onda quadrada, e observamos o pico de redução utilizando a técnica de onda quadrada que apresentou um  $E_{pc}$  de 0,327V. Outros dois processos redox podem ser vistos no voltamograma cíclico atribuídos ao ligante, sendo um irreversível  $E_{pa}$  de 0,0614V e outro quasi-reversível com  $E_{pa}$  de -0,050V e  $E_{pc}$  de -0,280V a 100mV/s, onde o par redox quase-reversível atribuído a reação catecol/quinona é deslocado para valores mais positivos de  $E_{pa}$  quando comparados com a *cys*-DOPA livre, e o processo irreversível atribuído a formação de semiquinonas que geralmente são observadas em outros estudos eletroquímicos de melaninas com o mesmo perfil<sup>33,117,118</sup>.

Os voltamogramas cíclicos e de onda quadrada da *thr*-DOPA-Cu(II) estão apresentados na Figura 51. Observa-se no voltamograma cíclico  $E_{pc} = -0,168$  e  $E_{pa} = 0,04$ V referente ao par redox Cu(II)/Cu(I) que ainda é visto um potencial catódico em -0,429V com valores de corrente maiores em velocidade de varredura superior a 100mV/s que também é evidenciado na voltametria de onda quadrada, podendo ser relacionado com a redução do ligante, sendo que o pico de oxidação pode estar sobreposto com o da oxidação do metal. Ressalta-se que o efeito indutivo eletrodoador do grupo metilênico da *thr*-DOPA foi observado pela mudança do potencial de oxidação para valores menos positivos, quando comparado com as outras melaninas.

A Tabela 11 apresenta os valores de potencial de redução e oxidação do metal nos complexos de Cu(II) com as três melaninas modificadas.



**Figura 50.** Voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura variando entre 50 e 250mV/s e voltamograma de onda quadrada do complexo cys-DOPA-Cu(II).



**Figura 51.** Voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura variando entre 50 e 250mV/s e voltamograma de onda quadrada do complexo thr-DOPA-Cu(II).

**Tabela 11.** Potenciais de oxidação/redução (V vs Ag/Ag<sup>+</sup> Voltametria cíclica e onda quadrada) para os complexos de Cu(II) com cada melanina modificada. Valores obtidos em pH 7 (tampão fosfato 0,1M), velocidade de varredura 100mV/s.

| Cu(I)/Cu(II) | E <sub>pc</sub> |        | E <sub>pa</sub> |       |
|--------------|-----------------|--------|-----------------|-------|
|              | CV              | SW     | CV              | SW    |
| Ser-DOPA     | -0,215          | -0,185 | 0,194           | 0,152 |
| Cys-DOPA     | -               | 0,327  | 0,322           | 0,331 |
| Thr-DOPA     | -0,168          | -0,07  | 0,04            | -0,01 |

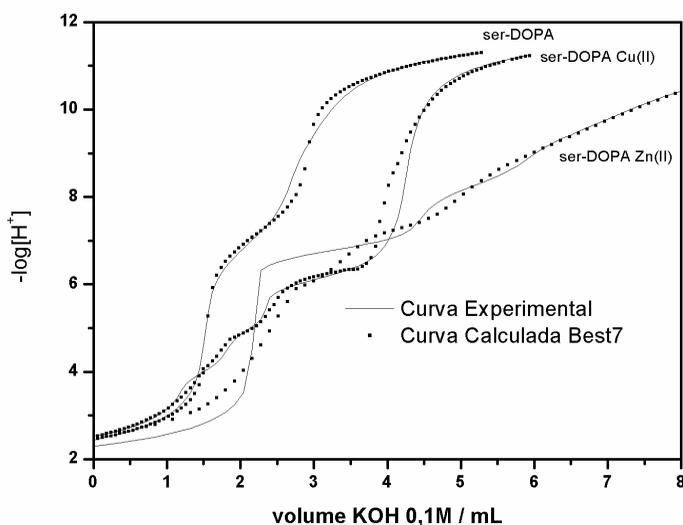
A eletroquímica aplicada para caracterização de centros redox ativos tanto nas melaninas livres quanto nos complexos não foi trivial. Pode-se ver nos experimentos dificuldades, principalmente devido a baixa taxa de difusão explicado pelo alto peso molecular resultando em correntes faradaicas pequenas e ainda a contaminação dos eletrodos devido adsorção em sua superfície, que exigiu exaustiva limpeza entre as leituras.

Além dos parâmetros eletroquímicos, os estudos de voltametria cíclica e onda quadrada são elucidativos no que diz respeito à estrutura dos complexos de Cu(II) com as melaninas, quando comparado com outras macromoléculas contendo centros de Cu(II) como metaloproteínas. Nesses sistemas são relatados que os potenciais de oxidação para o centro metálico são geralmente positivos<sup>119-121</sup> o que ocorre também em nosso sistema, como podemos observar na Tabela 11.

Com o comportamento eletroquímico apresentado pelas melaninas neste trabalho abre-se a possibilidade de aplicações em biosensores e eletrodos modificados, sendo que trabalhos iniciais já foram publicados com esse tipo de aplicação utilizando compostos semelhantes<sup>122-124</sup>.

### 5.2.6. Titulação potenciométrica

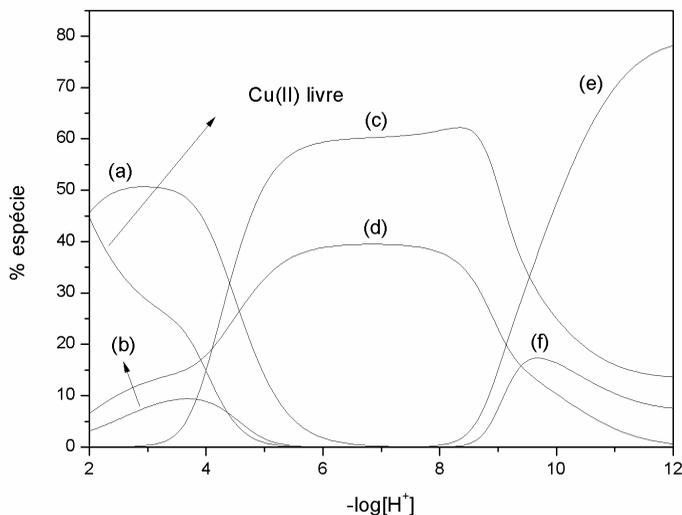
A Figura 52 apresenta as curvas de titulação experimental e calculada da melanina ser-DOPA em presença e ausência dos íons Cu(II) e Zn(II). Observa-se que as regiões tamponadas em presença dos metais apresentam-se deslocadas devido a interação que ocorre com os íons metálicos. Em trabalhos anteriores com metais divalentes o grupamento carboxílico não foi considerado<sup>11</sup>, devido a característica do precursor não conter esse grupo.



**Figura 52.** Curvas de titulação da melanina Ser-DOPA em presença e ausência de Cu(II) e Zn(II). Dados experimentais e calculados pelo programa Best 7.

Com a adição de mais um grupamento que interage com os metais, no caso o carboxílico, a porcentagem de complexo formado com os grupamentos quinona-imina e catecol tendem a diminuir. Esse fato pode ser comparado com outros trabalhos de equilíbrio com melaninas onde os diagramas de espécies dos grupamentos da melanina estão em menores proporções, quando comparados com eles livres<sup>11,34,125</sup> e a região tamponada grande do Zn(II) na faixa de pH alcalino pode ser atribuída a dificuldade de chegar no equilíbrio dos complexos e também é observado quando feito experimentos com ligantes macrocíclicos como o BMXD<sup>126</sup>.

A Figura 53 apresenta a curva de distribuição de espécies para o sistema ser-DOPA-Cu(II), onde observa-se a formação da espécie  $[\text{Cu}(\text{QI})^+]$  em valores de pH ácido com máximo de formação em pH 3,09 e  $\log K = 9,40$ , também em valores ácidos existe a espécie  $[\text{Cu}(\text{Ac})^+]$  com máximo de formação em pH 3,8 e 9,3% da espécie formada com  $\log K = 4,99$ . A formação desta espécie é limitada pela quantidade pequena de grupamentos carboxílicos em comparação com os outros grupos, devido a descarboxilação das melaninas em meio oxidativo. Em valores de pH próximo de 7 existem duas espécies majoritárias competindo,  $[\text{Cu}(\text{Cat})]$  e  $[\text{Cu}(\text{QI})_2]$  com máximos de formação em valores de pH 8,3 e 7,03 respectivamente e valores de constante  $\log K = 20,72$  e 8,55 respectivamente, já em valores de pH acima de 9 existe a formação das espécies  $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$  e  $[\text{Cu}(\text{QI})(\text{Cat})^-]$  com máximos de formação em pH 11,84 e 9,6 e  $\log K$  10,29 e 21,40 respectivamente.

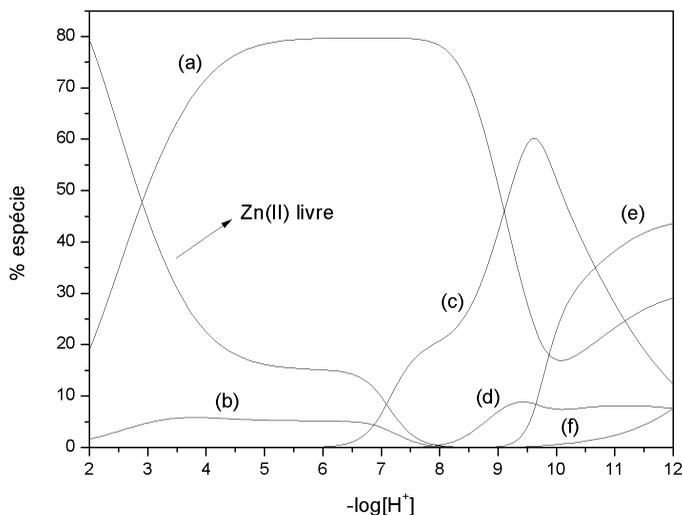


**Figura 53.** Curva de distribuição de espécies para o sistema ser-DOPA-Cu(II), onde (a)  $[\text{Cu}(\text{QI})^+]$ ; (b)  $[\text{Cu}(\text{Ac})^+]$ ; (c)  $[\text{Cu}(\text{Cat})]$ ; (d)  $[\text{Cu}(\text{QI})_2]$ ; (e)  $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$ ; (f)  $[\text{Cu}(\text{QI})(\text{Cat})^-]$ .

A curva de distribuição de espécies do sistema ser-DOPA-Zn(II) é apresentada na Figura 54. Pode-se observar a espécie  $[\text{Zn}(\text{QI})^+]$  como majoritária em valores de pH ácidos com máximo em valor de pH 6,1 e  $\log K = 8,33$ ; também é observada a espécie  $[\text{Zn}(\text{Ac})^+]$  com máximo em pH 3,8 e apenas 6,05% devido a baixa concentração de grupamentos carboxílicos nesta melaninas. Em valores de pH alcalino destaca-se a espécie  $[\text{Zn}(\text{Cat})]$  com máximo de formação em pH 9,54 com  $\log K = 14,45$  e as espécies  $[\text{Zn}(\text{QI})(\text{Cat})^-]$  e  $[\text{Zn}(\text{Cat})_2^{2-}]$  com valores de  $\log K = 13,75$  e  $8,96$  respectivamente e máximos de formação e valores de pH 11,8.

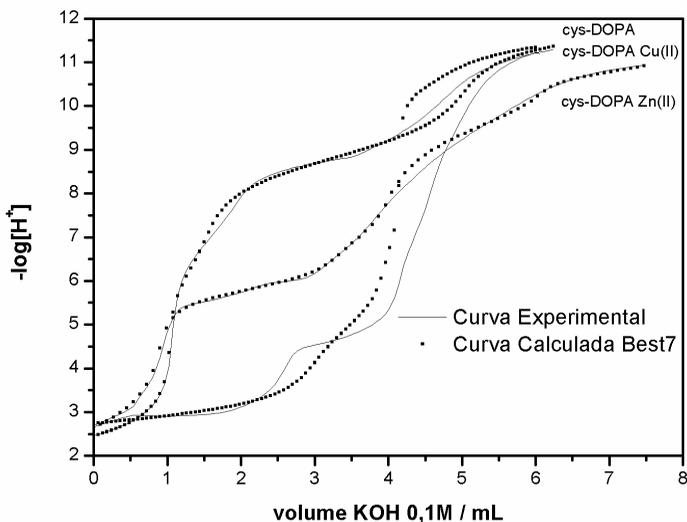
Neste sistema verifica-se que as constantes de formação obedecem a série de Irving-Williams para Cu(II) e Zn(II) como reportado por Szpoganicz e colaboradores<sup>11</sup>, e ainda esses dados em associação com os espectros de infravermelho, sessão 5.2.1., para os complexos em diferentes valores de pH sugere-se que as estruturas são

semelhantes em estado sólido e em solução, nos valores de pH estudados.



**Figura 54.** Curva de distribuição de espécies para o sistema ser-DOPA-Zn(II), onde (a)  $[Zn(QI)^+]$ ; (b)  $[Zn(Ac)^+]$ ; (c)  $[Zn(Cat)]$ ; (d)  $[Zn(QI)_2]$ ; (e)  $[Zn(QI)(Cat)^-]$ ; (f)  $[Zn(Cat)_2^{2-}]$ .

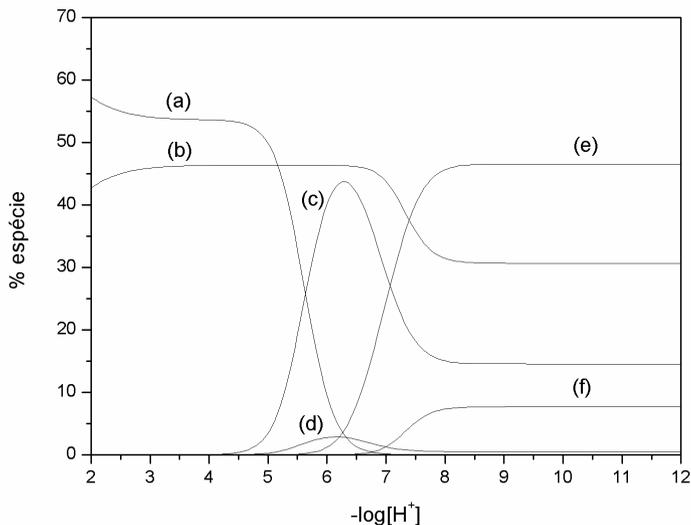
As curvas de titulação para a melanina cys-DOPA em presença e ausência dos íons Cu(II) e Zn(II) são observadas na Figura 55.



**Figura 55.** Curvas de titulação da melanina cys-DOPA em presença e ausência de Cu(II) e Zn(II). Dados experimentais e calculados pelo programa Best 7.

Analogamente ao sistema metálico envolvendo a ser-DOPA observa-se na Figura 55 que as curvas em presença dos íons metálicos encontram-se deslocadas quando comparadas com a melanina livre. Esse efeito é atribuído a interação com os cátions metálicos.

A curva de distribuição de espécies para o sistema cys-DOPA-Cu(II) é apresentada na Figura 56, onde verifica-se que na região ácida ocorre a formação das espécies  $[\text{Cu}(\text{Tiol})^+]$  e  $[\text{Cu}(\text{QI})^+]$  com máximos em pH 2,1 e 4,8 e  $\log K = 9,01$  e  $14,68$  respectivamente, com o aumento do pH se observa a espécie  $[\text{Cu}(\text{QI})(\text{Tiol})]$  formando em valores de pH acima de 4,5 com máximo em 6,2 e  $\log K = 18,58$  e ainda  $[\text{Cu}(\text{Cat})]$  com máximo de formação em pH 6,3; em valores acima de pH 7 predominam as espécies  $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$  e  $[\text{Cu}(\text{QI})_2]$  com máximo de formação em pH 8,3 para ambas as espécies e valores de  $\log K = 13,53$  e  $11,72$  respectivamente.

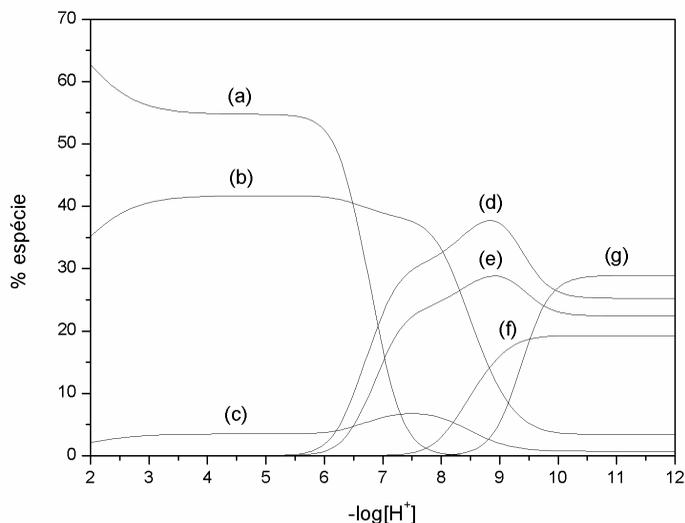


**Figura 56.** Curvas de distribuição de espécies para o sistema cys-DOPA-Cu(II), onde (a)  $[\text{Cu}(\text{Tiol})^+]$ ; (b)  $[\text{Cu}(\text{QI})^+]$ ; (c)  $[\text{Cu}(\text{QI})(\text{Tiol})]$ ; (d)  $[\text{Cu}(\text{Cat})]$ ; (e)  $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$ ; (f)  $[\text{Cu}(\text{QI})_2]$ .

A curva de distribuição de espécies do sistema cys-DOPA-Zn(II) pode ser observada na Figura 57. Observa-se que em pH ácido ocorre a formação de três espécies,  $[\text{Zn}(\text{Tiol})^+]$ ,  $[\text{Zn}(\text{QI})^+]$  e  $[\text{Zn}(\text{QI})(\text{Tiol})]$  com valores máximos de formação em pH 2,1; 5,88 e 7,5 e  $\log K = 8,15$ ; 13,16 e 16,49 respectivamente. Em valores de pH acima de 6 ocorre a formação das espécies  $[\text{Zn}(\text{Cat})]$  e  $[\text{Zn}(\text{Cat})(\text{Tiol})]$  com máximos de formação em pH 8,87 e 8,99 e valores de  $\log K = 19,00$  e 22,95 respectivamente; já em valores acima de 8,5 ocorre a formação da espécie  $[\text{Zn}(\text{Cat})_2^{2-}]$  com máximo em pH 10,5 e  $\log K = 10,33$ .

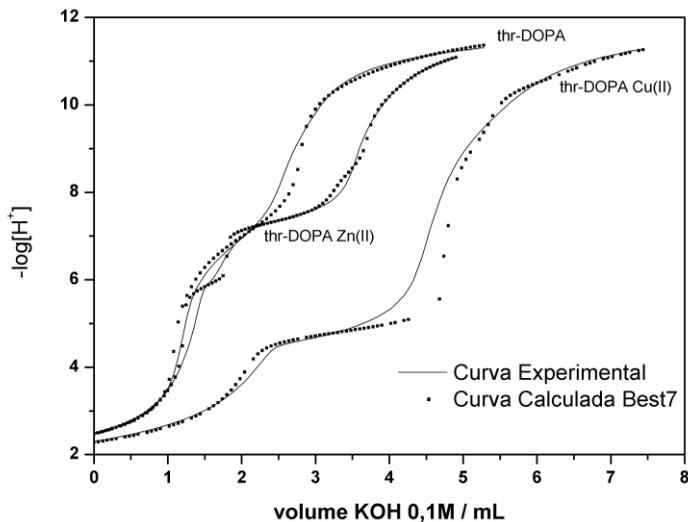
Em comparação com os sistemas ser-DOPA e thr-DOPA notamos nitidamente que a presença do grupamento tiol afeta drasticamente a formação das espécies em solução da cys-DOPA, ficando evidente a acidez de Pearson quando detectamos a espécie  $[\text{Zn}(\text{Cat})(\text{Tiol})]$  e a ausência desta espécie para o sistema Cu(II), onde neste valor de pH a

espécie majoritária é  $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$  mostrando que o centro de  $\text{Cu}(\text{II})$  é mais duro que o centro de  $\text{Zn}(\text{II})$ .



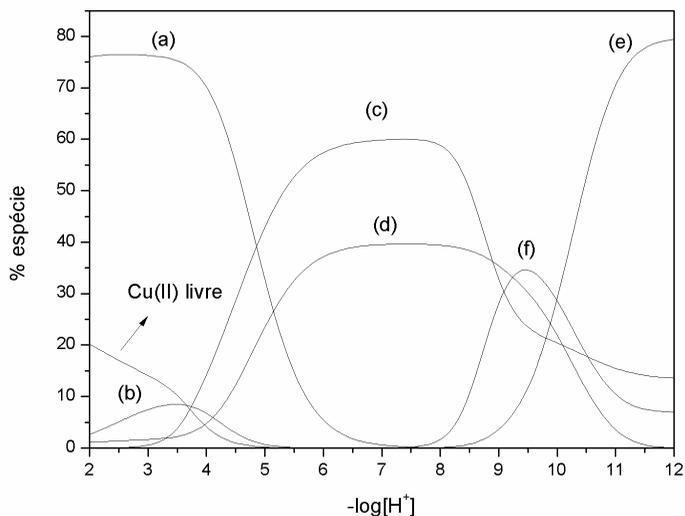
**Figura 57.** Curva de distribuição de espécies para o sistema cys-DOPA-Zn(II), onde (a)  $[\text{Zn}(\text{Tiol})^+]$ ; (b)  $[\text{Zn}(\text{QI})^+]$ ; (c)  $[\text{Zn}(\text{QI})(\text{Tiol})]$ ; (d)  $[\text{Zn}(\text{Cat})]$ ; (e)  $[\text{Zn}(\text{Cat})(\text{Tiol})]$ ; (f)  $[\text{Zn}(\text{QI})_2]$ ; (g)  $[\text{Zn}(\text{Cat})_2^{2-}]$ .

As curvas de titulação experimental e calculada da thr-DOPA em ausência e presença dos cátions  $\text{Cu}(\text{II})$  e  $\text{Zn}(\text{II})$  são apresentadas na Figura 58. Analogamente a melanina ser-DOPA nota-se um deslocamento das curvas em presença dos metais devido a interação com os grupamentos funcionais da melanina.



**Figura 58.** Curvas de titulação da melanina thr-DOPA em presença e ausência de Cu(II) e Zn(II). Dados experimentais e calculados pelo programa Best 7.

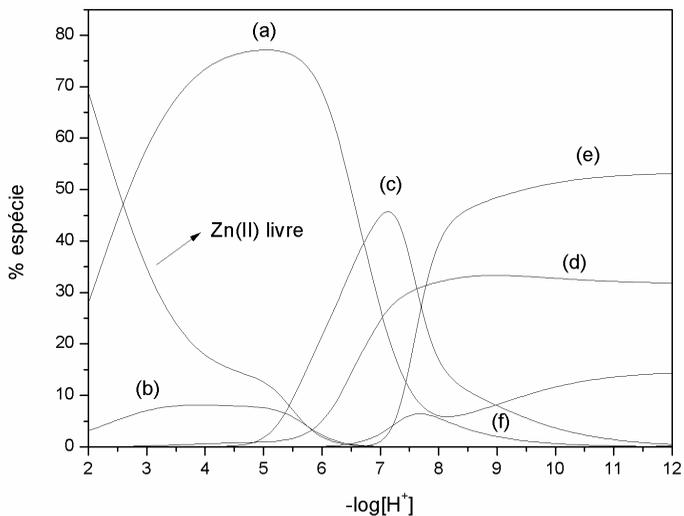
A Figura 59 mostra a distribuição de espécies para o sistema thr-DOPA-Cu(II), onde observa-se que em valores de pH ácidos existe duas espécies majoritárias,  $[\text{Cu}(\text{QI})^+]$  e  $[\text{Cu}(\text{Ac})^+]$  com valores de  $\log K = 11,12$  e  $5,25$  e máximos de formação em pH  $3,1$  e  $3,6$  respectivamente. Em valores de pH próximo de  $7$  existem também duas espécies principais  $[\text{Cu}(\text{Cat})]$  e  $[\text{Cu}(\text{QI})_2]$  com máximos de formação em pH  $7,6$  e  $7,4$  e  $\log K$   $8,92$  e  $21,25$  respectivamente. Já em valores de pH alcalinos as espécies majoritárias são  $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$  e  $[\text{Cu}(\text{QI})(\text{Cat})^-]$  com máximos de formação em pH  $11,7$  e  $9,4$  e  $\log K$   $9,8$  e  $15,51$  respectivamente.



**Figura 59.** Curva de distribuição de espécies para o sistema thr-DOPA-Cu(II), onde (a)  $[\text{Cu}(\text{QI})^+]$ ; (b)  $[\text{Cu}(\text{Ac})^+]$ ; (c)  $[\text{Cu}(\text{Cat})]$ ; (d)  $[\text{Cu}(\text{QI})_2]$ ; (e)  $[\text{Cu}(\text{Cat})_2^{2-}]$ ; (f)  $[\text{Cu}(\text{QI})(\text{Cat})^-]$ .

A Figura 60 apresenta as curvas de distribuição de espécies para o sistema thr-DOPA-Zn(II). Observa-se em valores de pH ácidos a formação das espécies  $[\text{Zn}(\text{QI})^+]$  e  $[\text{Zn}(\text{Ac})^+]$  com máximo de formação em valores de pH 5,05 e 4,3 e  $\log K = 8,61$  e  $4,80$  respectivamente. A espécie  $[\text{Zn}(\text{Cat})]$  pode ser observada com um máximo em pH 7,11 sendo predominante neste valor de pH. Em valores de pH básico existem as espécies  $[\text{Zn}(\text{QI})_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{QI})(\text{Cat})^-]$  e  $[\text{Zn}(\text{Cat})_2^{2-}]$  com máximos em pH 8,86; 10,94 e 7,70 respectivamente e  $\log K = 5,91$ ; 15,51 e 9,8 respectivamente.

Analogamente às outras melaninas, as constantes dos complexos de Cu(II) possuem valores maiores quando comparados com as de Zn(II) e ainda as constantes do sistema thr-DOPA são um pouco superiores quando comparadas com os mesmos complexos envolvendo a ser-DOPA, provavelmente ligado ao efeito indutivo da metila presente nesta melanina.

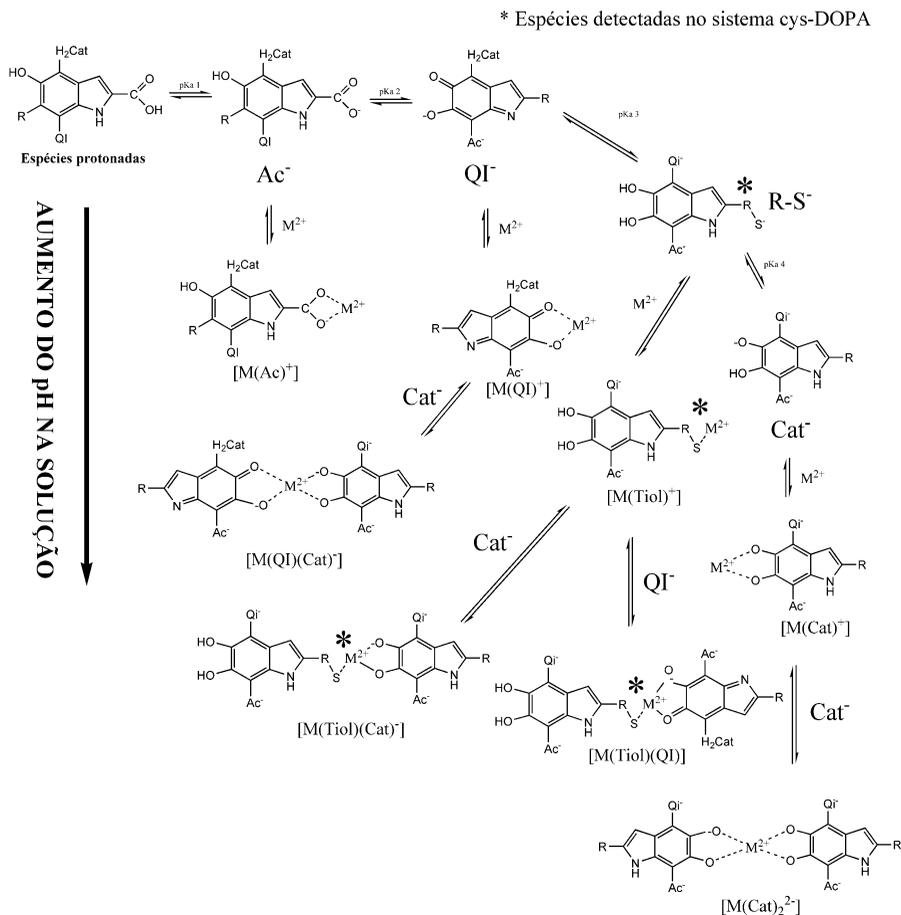


**Figura 60.** Curva de distribuição de espécies para o sistema thr-DOPA-Zn(II), onde (a) [Zn(QI)<sup>+</sup>]; (b) [Zn(Ac)<sup>+</sup>]; (c) [Zn(Cat)]; (d) [Zn(QI)<sub>2</sub>]; (e) [Zn(QI)(Cat)<sup>-</sup>]; (f) [Zn(Cat)<sub>2</sub><sup>2-</sup>].

A Tabela 12 apresenta um sumário com os valores das constantes de formação calculadas para cada sistema, e o Esquema 6 mostra as propostas estruturais para os equilíbrios identificados por titulação potenciométrica e espectrofotométrica.

**Tabela 12.** Constantes de formação para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas sintéticas. Onde Ac - acetato, QI – quinonimina e Cat – Catecol

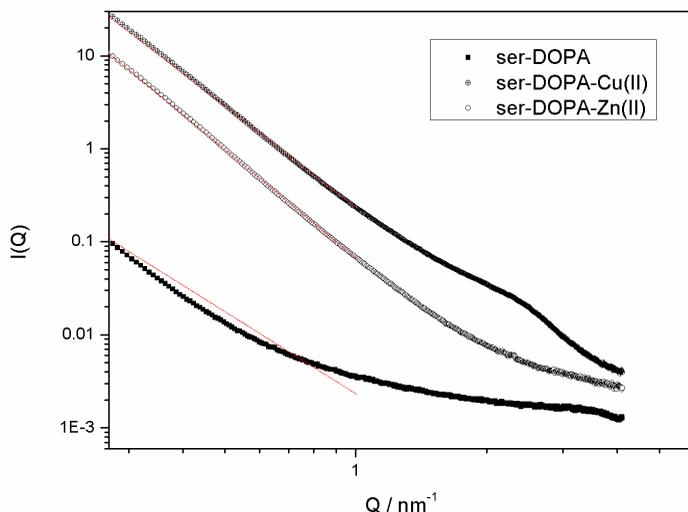
| Equilíbrio / log K                               | Ser-<br>DOPA<br>Cu(II) | Ser-<br>DOPA<br>Zn(II) | Cys-<br>DOPA<br>Cu(II) | Cys-<br>DOPA<br>Zn(II) | Thr-<br>DOPA<br>Cu(II) | Thr-<br>DOPA<br>Zn(II) |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| $\frac{[M(Ac)^+]}{[M^{2+}][Ac^-]}$               | 4,99                   | 4,10                   | -                      | -                      | 5,25                   | 4,80                   |
| $\frac{[M(QI)^+]}{[M^{2+}][QI^-]}$               | 9,40                   | 8,33                   | 14,68                  | 13,16                  | 11,12                  | 8,61                   |
| $\frac{[M(QI)_2]}{[M(QI)^+][QI^-]}$              | 8,55                   | 4,6                    | 11,72                  | 7,11                   | 8,92                   | 5,91                   |
| $\frac{[M(Cat)]}{[M^{2+}][Cat^{2-}]}$            | 20,72                  | 14,45                  | 21,12                  | 19,00                  | 21,25                  | 17,88                  |
| $\frac{[M(Cat)_2^{2-}]}{[M(Cat)][Cat^{2-}]}$     | 10,29                  | 8,96                   | 13,53                  | 10,33                  | 10,47                  | 9,8                    |
| $\frac{[M(Cat)(QI)^-]}{[M(QI)^+][Cat^{2-}]}$     | 21,40                  | 13,75                  | -                      | -                      | 23,25                  | 15,51                  |
| $\frac{[M(Tiol)^+]}{[M^{2+}][Tiol^-]}$           | -                      | -                      | 9,01                   | 8,15                   | -                      | -                      |
| $\frac{[M(Cat)(Tiol)^-]}{[M(Tiol)^+][Cat^{2-}]}$ | -                      | -                      | -                      | 22,95                  | -                      | -                      |
| $\frac{[M(QI)(Tid)]}{[M(QI)^+][Tiol^-]}$         | -                      | -                      | 18,58                  | 16,49                  | -                      | -                      |



**Esquema 6.** Equilíbrios envolvendo as melaninas modificadas por aminoácidos e os íons divalentes Cu(II) e Zn(II).

### 5.2.7. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos – SAXS

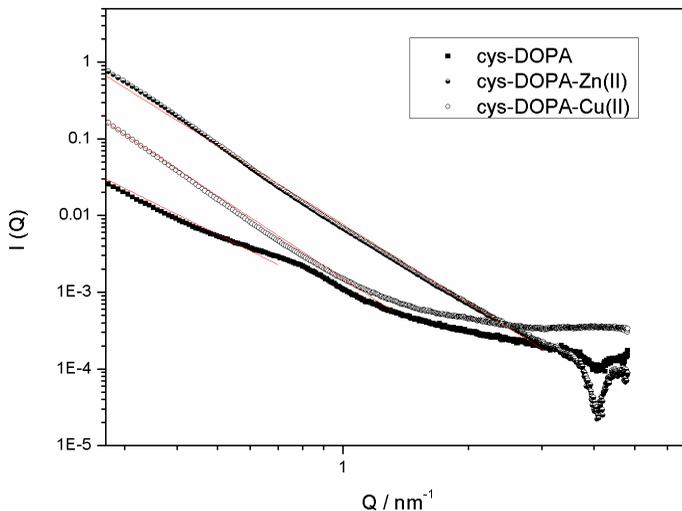
Analogamente aos experimentos realizados com as melaninas livres, utilizou-se a técnica de SAXS para se obter informações de seus agregados e demonstrou ser promissora para explicar as mudanças conformacionais dos agregados moleculares que compõe as melaninas. A Figura 61 apresenta as curvas de SAXS para a melanina ser-DOPA e seus complexos de Cu(II) e Zn(II). Obteve-se como resultado para os complexos fractais de superfície com valores de  $D_s$  2,39 e 2,13 para os complexos de Cu(II) e Zn(II) respectivamente.



**Figura 61.** Curvas de SAXS referentes a ser-DOPA livre e seu complexo com Cu(II) e Zn(II)

A natureza fractal de superfície pode ser descrita como conjuntos cujos interiores são compactos e apenas suas superfícies são fragmentadas e irregulares<sup>72</sup>, onde pode ser observada por microscopia eletrônica de varredura.

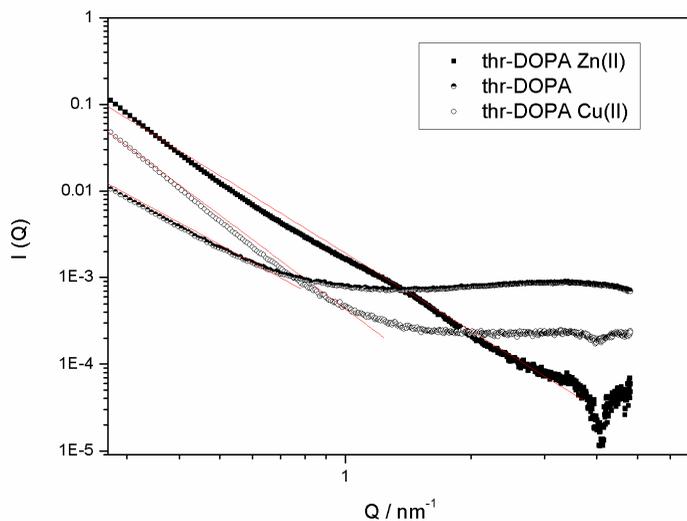
As curvas de SAXS para cys-DOPA e os complexos de Cu(II) e Zn(II) são apresentadas na Figura 62.



**Figura 62.** Curvas de SAXS referentes a cys-DOPA livre e seu complexo com Cu(II) e Zn(II).

Observa-se valores de  $D_m$  2,11 e 2,81 para os complexos de Cu(II) e Zn(II) respectivamente. A diminuição nos valores de  $D_m$  para o complexo de Cu(II) quando comparado com a cys-DOPA livre indica a passagem de estruturas compactas, para estruturas mais expandidas<sup>127</sup>, que pode ser observado nos ensaios de MEV - Figura 45 a e b.

Os resultados dos ensaios de SAXS para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com a melanina thr-DOPA podem ser observados na Figura 63. O complexo thr-DOPA-Cu(II) exhibe um fractal de superfície com valor de  $D_s$  de 2,64, e essa passagem pode ser explicada pela variação na conformação, passando de formas menos alongadas para mais alongadas, fragmentadas e irregulares<sup>72,127</sup>.



**Figura 63.** Curvas de SAXS referentes a thr-DOPA livre e seu complexo com Cu(II) e Zn(II).

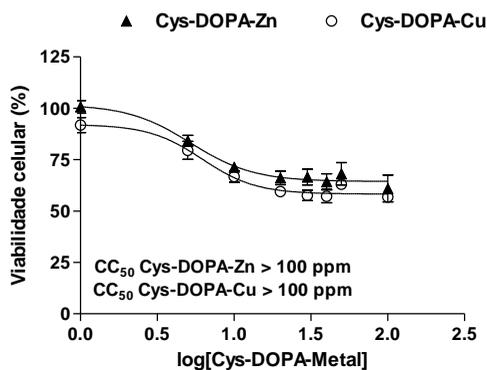
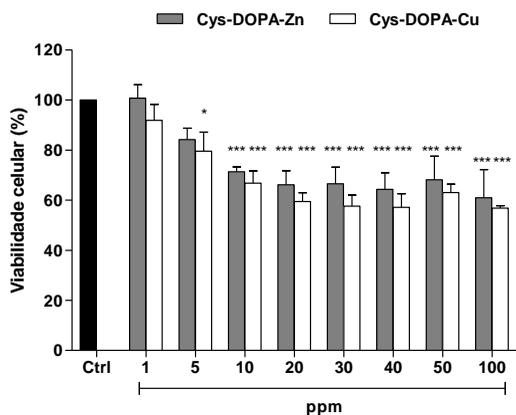
O complexo com Zn(II) apresenta conformação espacial mais compacta que o ligante livre, e ainda observa-se um pico em valores de  $Q$  igual a 4,2 e 4,0 em ambos os complexos, sendo mais evidente no complexo de Zn(II) que pode ser atribuído a uma estrutura de treonina terminal ligada a estrutura da melanina modificada como mostrado por Stovgaard e colaboradores<sup>128</sup> em ensaios de SAXS utilizando aminoácidos livres, entretanto necessita-se de mais estudos estruturais para investigação desta proposta. Todavia, a técnica de SAXS se mostrou útil na elucidação estrutural das melaninas em diferentes escalas de tamanhos, sendo esta a primeira contribuição desta técnica para caracterização deste tipo de complexos que apenas era utilizado para substâncias húmicas<sup>127-129</sup>, combinada com outras técnicas<sup>130</sup> aminoácidos e proteínas<sup>128</sup>. A Tabela 13 apresenta um resumo de todos os dados obtidos por SAXS para os complexos de Cu(II) e Zn(II).

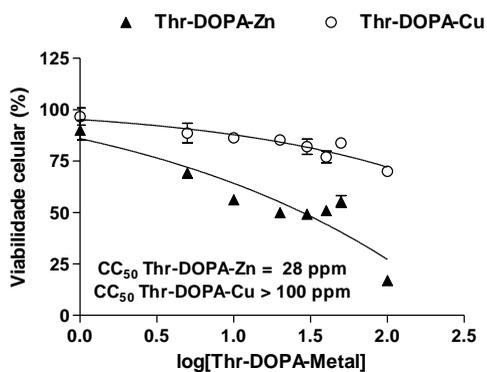
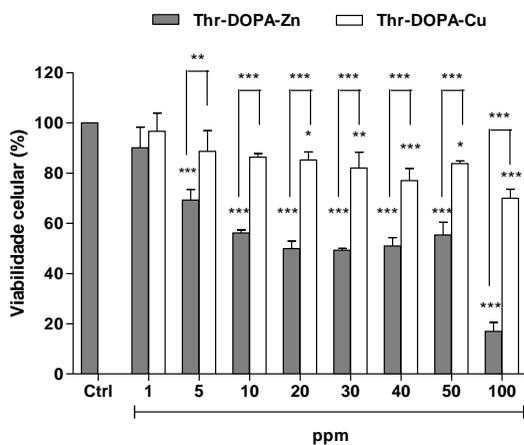
**Tabela 13.** Parâmetros de fractais obtidos por SAXS para as melaninas e seus respectivos complexos de Cu(II) e Zn(II)

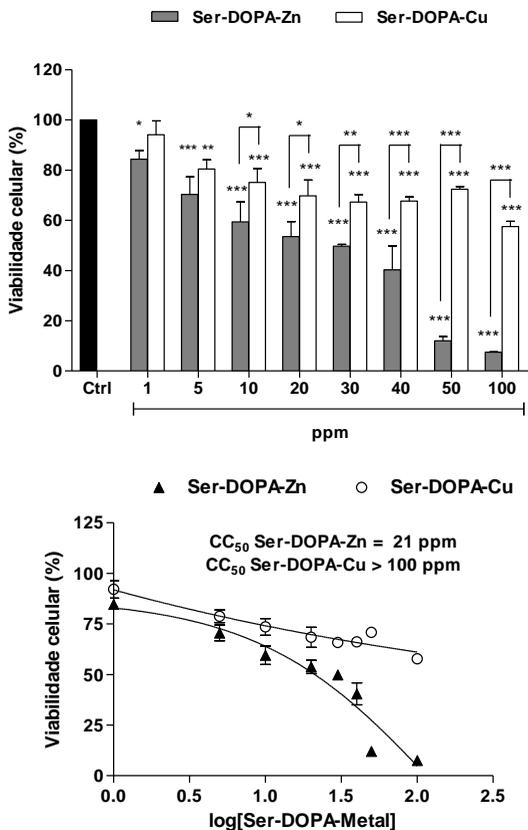
| <i>Melanina</i> | $ \alpha $ | <b>D</b>     | <b>R<sup>2</sup></b> |
|-----------------|------------|--------------|----------------------|
| Ser-DOPA        | 2,26       | $D_m = 2,26$ | 0,9951               |
| Ser-DOPA Cu(II) | 3,61       | $D_s = 2,39$ | 0,9990               |
| Ser-DOPA Zn(II) | 3,87       | $D_s = 2,13$ | 0,9980               |
| Cys-DOPA        | 2,70       | $D_m = 2,70$ | 0,9893               |
| Cys-DOPA Cu(II) | 2,11       | $D_m = 2,11$ | 0,9963               |
| Cys-DOPA Zn(II) | 2,81       | $D_m = 2,81$ | 0,9984               |
| Thr-DOPA        | 2,62       | $D_m = 2,62$ | 0,9902               |
| Thr-DOPA Cu(II) | 3,36       | $D_s = 2,64$ | 0,9927               |
| Thr-DOPA Zn(II) | 2,71       | $D_m = 2,81$ | 0,9924               |

## 5.2.8. Citotoxicidade

Os gráficos de citotoxicidade dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas em células NIH-3T3 estão apresentados na Figura 64.







**Figura 64.** Citotoxicidade dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas em células NIH-3T3. As células foram expostas aos compostos por 24 horas.

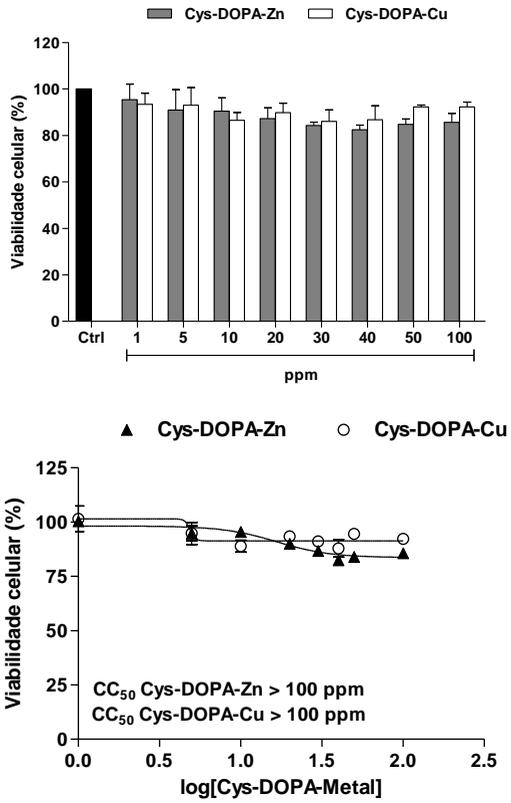
Observa-se na Figura 64 que o complexo thr-DOPA-Zn(II) e ser-DOPA-Zn(II) apresentam um  $CC_{50}$  de 28 e 21  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente, se mostrando citotóxicos e reduzindo a viabilidade celular em mais de 80% na concentração de 100  $\text{mg L}^{-1}$  sugerindo um efeito causado pelo zinco. Por outro lado, para o complexo Cys-DOPA-Zn(II)/Cu(II) não foi observado o mesmo perfil de resposta. Dessa forma, o aminoácido presente no complexo também pode influenciar o efeito do composto sobre a viabilidade celular, os outros complexos apresentam  $CC_{50}$  maiores que 100  $\text{mg L}^{-1}$ .

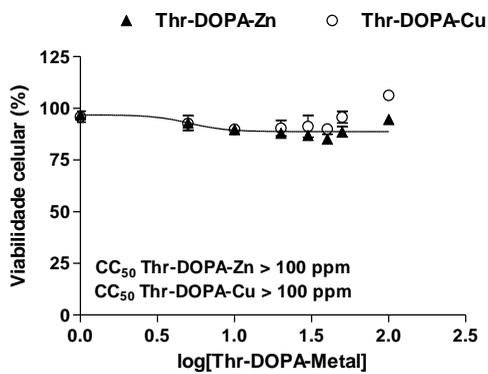
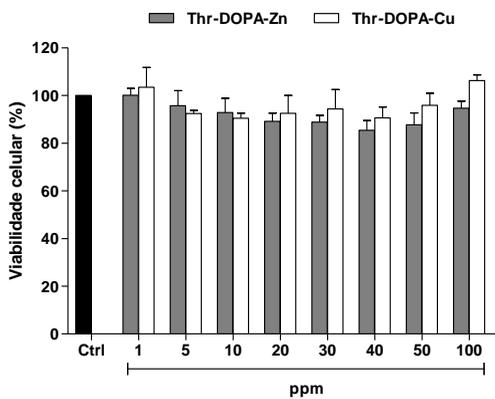
Devido a citotoxicidade encontrada partimos para os experimentos utilizando células HUVEC, célula endotelial da veia umbilical humana, onde todos os compostos apresentaram  $CC_{50}$  acima de 100  $\text{mg L}^{-1}$  – Figura 65. A Tabela 14 resume os valores de  $CC_{50}$  encontrados nas análises realizadas.

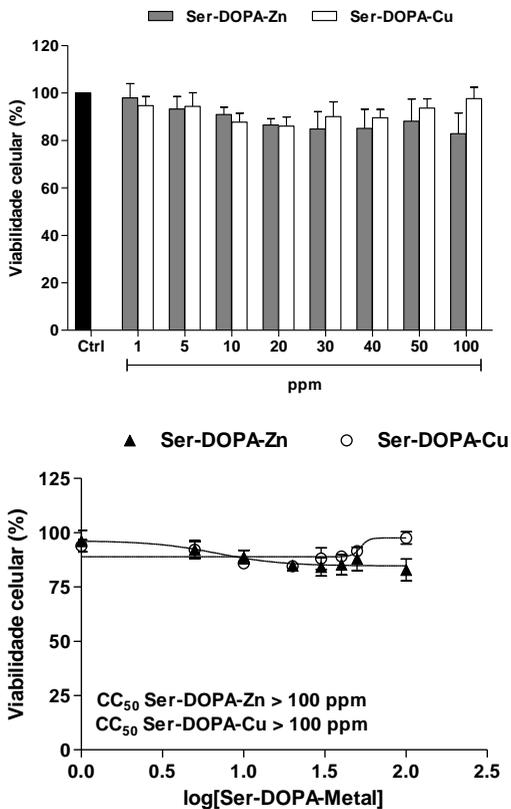
**Tabela 14.** Valores de  $CC_{50}$  complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas em linhagens celulares HUVEC e NIH-3T3.

| Composto               | $CC_{50}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )* |         |
|------------------------|-----------------------------------|---------|
|                        | HUVEC                             | NIH-3T3 |
| <b>Cys-DOPA-Zn(II)</b> | > 100                             | > 100   |
| <b>Cys-DOPA-Cu(II)</b> | > 100                             | > 100   |
| <b>Thr-DOPA-Zn(II)</b> | > 100                             | 28      |
| <b>Thr-DOPA-Cu(II)</b> | > 100                             | > 100   |
| <b>Ser-DOPA-Zn(II)</b> | > 100                             | 21      |
| <b>Ser-DOPA-Cu(II)</b> | > 100                             | > 100   |

\* Valores expressos em média.







**Figura 65.** Citotoxicidade dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas em células HUVEC. As células foram expostas aos compostos por 24 horas.

## **5.2.9. Ensaios antioxidantes**

### **5.2.9.1. Atividade por quelação pelo íon Fe(II)**

Observam-se na Tabela 15 os valores de  $EC_{50}$  para os ensaios de quelação pelo íon Fe(II), que apresentaram 547,49; 508,26 e 230,78 g mL<sup>-1</sup> para ser-DOPA-Cu(II), cys-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Cu(II) respectivamente, e para os complexos de zinco apresentaram os valores 91,42; 102,12 e 121,82 g mL<sup>-1</sup> para ser-DOPA-Zn(II), cys-DOPA-Zn(II) e thr-DOPA-Zn(II) respectivamente. Todas as amostras ficaram acima dos padrões rutina, BHT e EDTA, e pode-se observar que os complexos de Zn(II) apresentam valores de  $EC_{50}$  menores que os complexos de Cu(II), tendo destaque para o complexo ser-DOPA-Zn(II) apresentando valores de apenas 2 vezes menos ativo que o padrão rutina; pode-se associar esse fenômeno as menores constantes de formação dos complexos com o centro de Zn(II), que em presença do Fe(II) sofre troca com o metal, mostrando que são menos estáveis não apenas termodinamicamente mas cineticamente também.

### **5.2.9.2. Poder redutor**

Os ensaios de poder redutor revelaram valores de 80,26; 86,44 e 190,78 mg de ácido ascórbico / g de composto para os complexos ser-DOPA-Cu(II), cys-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Cu(II) respectivamente e 480,58; 430,23 e 360,65mg de ácido ascórbico / g de composto para os complexos ser-DOPA-Zn(II), cys-DOPA-Zn(II) e thr-DOPA-Zn(II) respectivamente, valores encontrados na Tabela 15. Os valores mostram uma tendência que foi observada também na quelação com o íon Fe(II), mostrando agora que o metal pode inibir o poder redutor das melaninas quando comparado com elas livres, e que o poder de inibição do íon Cu(II) é maior que o do Zn(II), sendo que analisando os resultados observamos que os metais não participam no mecanismo do poder redutor. Todos os valores encontrados foram menores que para os padrões rutina e BHT utilizados no trabalho.

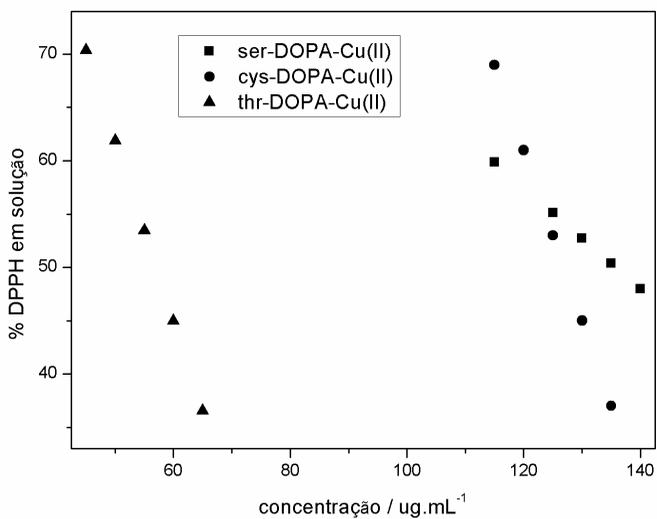
### **5.2.9.3. Capacidade antioxidante total**

Os valores da capacidade antioxidante total encontrados foram de 28,19; 30,45 e 67,02 mg de ácido ascórbico / g de composto para os complexos ser-DOPA-Cu(II), cys-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Cu(II)

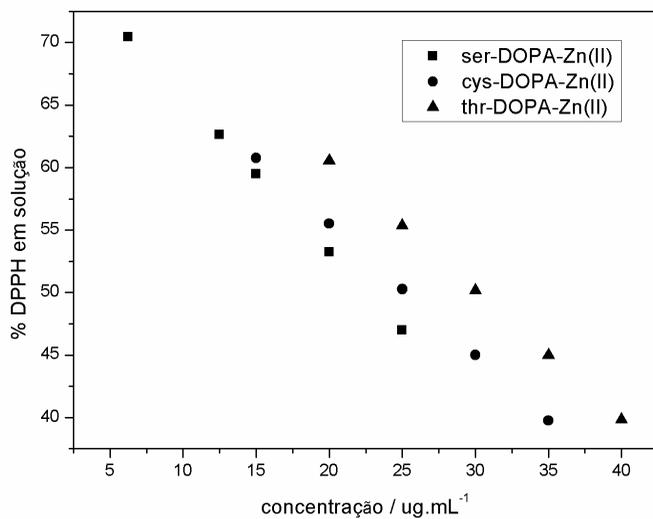
respectivamente; já para os complexos de Zn(II) os valores obtidos foram 168,81; 151,12 e 126,79 mg de ácido ascórbico / g de composto para os complexos ser-DOPA-Zn(II), cys-DOPA-Zn(II) e thr-DOPA-Zn(II). Neste ensaio observa-se novamente que o metal promove uma inibição da atividade antioxidante das melaninas quando comparado com elas livres, entretanto, destaca-se a ser-DOPA-Zn(II) e a thr-DOPA-Zn(II) com valores superiores a menos da metade do padrão BHT, os outros valores foram inferiores quando comparados com os padrões rutina e BHT.

#### **5.2.9.4. Captura de radicais livres utilizando DPPH**

Os resultados de  $EC_{50}$  obtidos no ensaio de captura de radicais livres utilizando DPPH para os complexos ser-DOPA-Cu(II), cys-DOPA-Cu(II) e thr-DOPA-Cu(II), Figura 66, foram 135,78; 126,87; 57,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente; já para os complexos de Zn(II) foram obtidos valores de  $EC_{50}$  de 22,60; 25,24; 30,18  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para ser-DOPA-Zn(II), cys-DOPA-Zn(II) e thr-DOPA-Zn(II), Figura 67, respectivamente. Neste ensaio destaca-se o complexo ser-DOPA-Zn(II) com valor de  $EC_{50}$  aproximadamente 3 vezes maior que o do padrão BHT, mostrando a considerável atividade de complexo, já elucidada pelo método da capacidade antioxidante total – Tabela 15. Todas as amostras apresentaram  $EC_{50}$  maiores que os padrões rutina e BHT. Ressalta-se ainda que a ordem das atividades realizadas por captura de radicais livres utilizando DPPH seguiu a ordem das melaninas livres sendo os complexos de ser-DOPA com maiores atividades, seguidos dos cys-DOPA e thr-DOPA. Assim, mais uma vez nota-se a inibição da atividade antioxidante em presença do centro metálico, mostrando que o metal não participa do mecanismo de atividade antioxidante.



**Figura 66.** Curvas de Captura de radicais livres – DPPH dos complexos de Cu(II) com as melaninas modificadas.



**Figura 67.** Curvas de Captura de radicais livres – DPPH dos complexos de Zn(II) com as melaninas modificadas.

**Tabela 15.** Atividade antioxidante dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com melaninas modificadas por aminoácidos, comparativo com padrões utilizados no trabalho.

| <b>Amostra</b>         | <b>Complexação por Fe(II) (EC<sub>50</sub>g mL<sup>-1</sup>)<sup>1</sup></b> | <b>Poder Redutor (mg AAE /g)<sup>2</sup></b> | <b>Capacidade antioxidante total (mg AAE g<sup>-1</sup>)<sup>2</sup></b> | <b>DPPH (EC<sub>50</sub>µg mL<sup>-1</sup>)</b> |
|------------------------|--|--|--|---|
| <b>Ser-DOPA-Cu(II)</b> | 547,49 ± 1,55  | 80,26 ± 0,05                                 | 28,19 ± 0,02   | 135,78 ± 0,54                                   |
| <b>Ser-DOPA-Zn(II)</b> | 91,42 ± 0,17   | 480,58 ± 0,24                                | 168,81 ± 0,88  | 22,60 ± 0,07                                    |
| <b>Cys-DOPA-Cu(II)</b> | 508,26 ± 1,23  | 86,44 ± 0,19                                 | 30,45 ± 0,18   | 126,87 ± 0,22                                   |
| <b>Cys-DOPA-Zn(II)</b> | 102,12 ± 0,53  | 430,23 ± 0,25                                | 151,12 ± 0,67  | 25,24 ± 0,03                                    |
| <b>Thr-DOPA-Cu(II)</b> | 230,70 ± 1,34  | 190,78 ± 0,95                                | 67,02 ± 0,55   | 57,04 ± 0,23                                    |
| <b>Thr-DOPA-Zn(II)</b> | 121,82 ± 0,73  | 360,65 ± 0,55                                | 126,79 ± 0,04  | 30,18 ± 0,93                                    |
| <b>Rutin</b>           | 41,35 ± 0,16   | 1622,10 ± 11,76                              | 310,43 ± 1,87  | 2,78 ± 0,17                                     |
| <b>BHT</b>             | 20,65 ± 0,29   | 1641,89 ± 14,23                              | 548,24 ± 1,23  | 6,74 ± 0,21                                     |

**EDTA**      4,65 ± 0,02      ---      ---      ---

1. Valores de EC<sub>50</sub> para 50% de quelação com o íon Fe(II); 2. Resultados em mg de ácido ascórbico g<sup>-1</sup> de composto. Cada resultado é expresso em termos de ± SD.

### 5.2.9.5. Correlações

Analogamente as melaninas livres, sessão 5.1.13.5., realizou-se estudos de correlações, Tabela 16, dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com cada melanina. Neste caso, optou-se apenas pelo método de correlação de Pearson, devido à complexidade do sistema.

**Tabela 16.** Correlações entre as atividades antioxidantes dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas modificadas

| Correlação                         | r (Pearson) |
|------------------------------------|-------------|
| Fe(II) x Poder redutor             | -0,9352     |
| Fe(II) x Antioxidante total        | -0,9354     |
| Fe(II) x DPPH                      | 0,9999      |
| Poder redutor x Antioxidante total | 0,9999      |
| Poder redutor x DPPH               | -0,9348     |
| Antioxidante total x DPPH          | -0,9354     |

Observa-se na Tabela 16 uma boa correlação entre as atividades antioxidantes dos complexos metálicos com as melaninas, havendo uma correlação linear positiva para as plotagens de Fe(II) x DPPH e poder

reduzidor x antioxidante total com correlações de 0,9999. Para as outras plotagens existe uma relação linear negativa com coeficientes acima de  $r > -0,9$ , mostrando também a boa correlação dos dados.

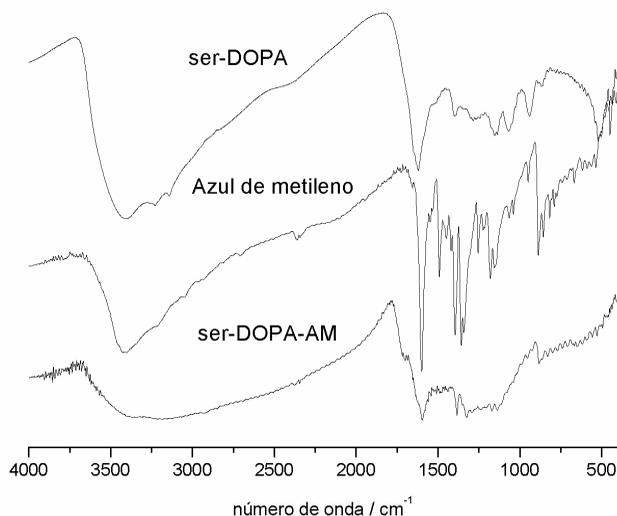
### **5.3. Resultados e discussão – Estudo da interação de DOPA-melaninas modificadas com aminoácidos com o corante catiônico azul de metileno**

#### **5.3.1. Espectroscopia de infravermelho**

Os métodos de caracterização da estrutura das melaninas contendo o corante azul de metileno adsorvido em sua superfície foram realizados após os estudos de efeito do pH e cinética, utilizando os valores de pH ideal de adsorção para cada melanina. A Figura 68 apresenta os espectros de infravermelho da ser-DOPA, do azul de metileno e do produto resultante após adsorção, ser-DOPA-AM.

No espectro de infravermelho presente na Figura 68, observa-se o deslocamento da banda da carbonila de  $1623\text{cm}^{-1}$  da ser-DOPA para  $1602\text{cm}^{-1}$ , podendo estar a adsorção relacionada com os grupamentos carboxílicos desprotonados e possivelmente o AM desprotona a quinona-imina em valores de pH abaixo de 7, originando uma interação eletrostática como citado por Olivella e colaboradores.<sup>131</sup> Pode-se observar também a ausência da banda em  $1590\text{cm}^{-1}$  relativo ao estiramento  $\nu\text{N-H}$  da amina heterocíclica, comprovando a hipótese do AM estar na sua forma catiônica. Verificamos ainda nos espectros do AM puro e do ser-DOPA-AM bandas em  $1339\text{cm}^{-1}$  atribuído aos estiramentos  $\nu\text{C-N}$  presentes no corante.

Para o sistema cys-DOPA-AM, Figura 69, observa-se um deslocamento da região da carbonila da cys-DOPA de  $1621\text{cm}^{-1}$  para  $1596\text{cm}^{-1}$  na amostra de melanina com o AM adsorvido e ainda uma outra banda de intensidade moderada em  $1500\text{cm}^{-1}$ , podendo estar associado a uma carbonila de uma quinona-imina com AM adsorvido, portanto analogamente a ser-DOPA, a adsorção no pH ideal também ocorre pelos grupamentos carboxilatos e quinonas-iminas desprotonadas, ainda existe uma banda em  $1339\text{cm}^{-1}$  nos espectros do AM puro e cys-DOPA-AM atribuído ao estiramento  $\nu\text{C-N}$ .

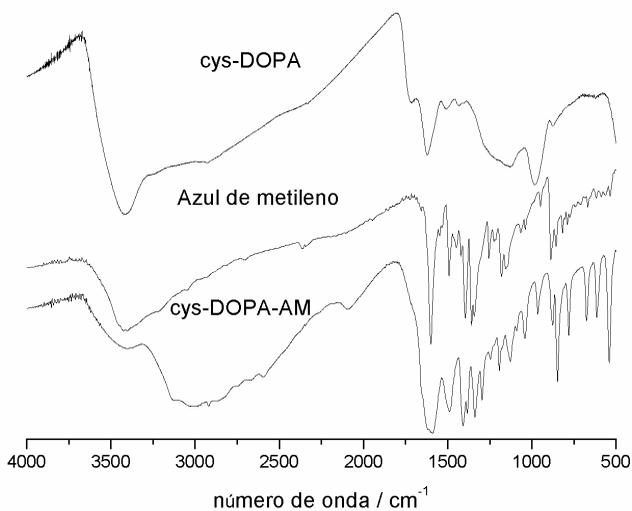


**Figura 68.** Espectros de infravermelho da melanina ser-DOPA, do corante azul de metileno e da melanina modificada com serina adsorvida com o respectivo corante.

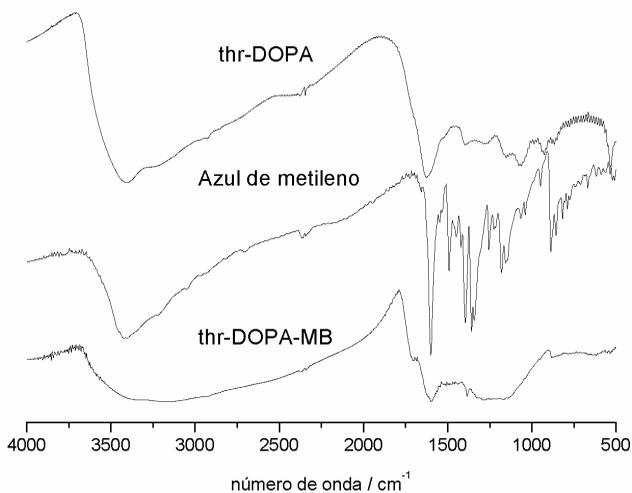
Um fato interessante é o aumento dos modos vibracionais na região da impressão digital. Especula-se que a adsorção do AM no pH 6 possa ocorrer também pelos grupamentos tióis, gerando múltiplos deslocamentos nas bandas do AM e consequentemente sobreposição de bandas, sendo o corante catiônico responsável pelo abaixamento do pKa do grupo tiol.

Por último, observa-se na Figura 70, os espectros para o sistema thr-DOPA-AM, onde verifica-se o deslocamento da banda da carbonila de  $1626$  para  $1603\text{cm}^{-1}$  da thr-DOPA livre e em presença de AM respectivamente, e a presença de um ombro em  $1704\text{cm}^{-1}$  podendo ser supostamente atribuído a uma carbonila do grupamento carboxílico que está interagindo com o corante, sendo que o experimento foi realizado em pH 3.

Em todas as amostras a técnica de FTIR demonstrou ser eficaz na caracterização da presença do corante na matriz da melanina, entretanto necessita-se de outras técnicas para se propor um mecanismo correto de adsorção, sendo que se trata de um sistema muito complexo.



**Figura 69.** Espectros de infravermelho da melanina cys-DOPA, do corante azul de metileno e da melanina modificada com cisteína adsorvida com o respectivo corante.



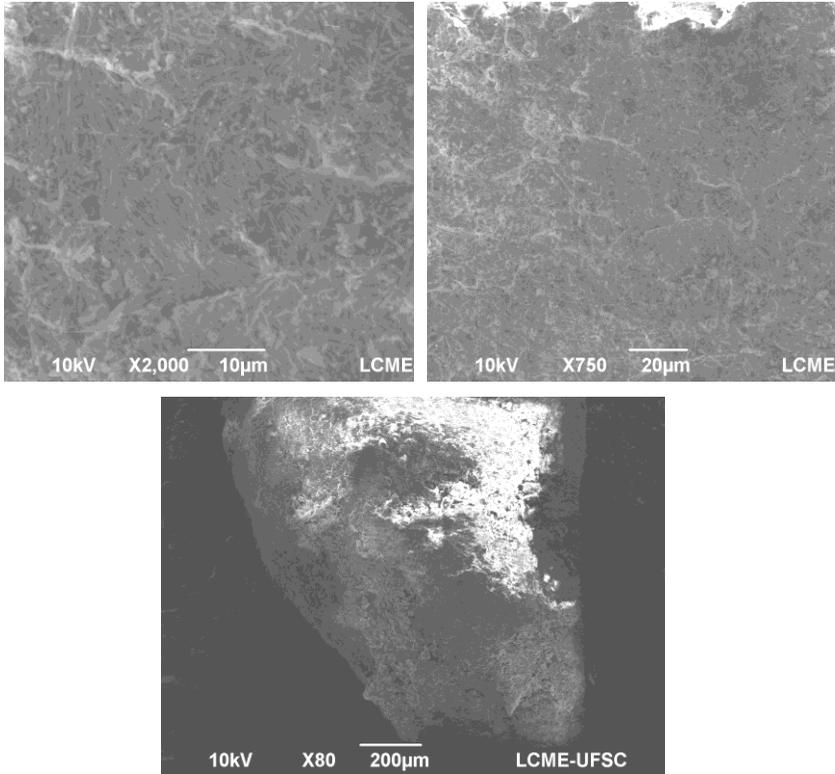
**Figura 70.** Espectros de infravermelho da melanina thr-DOPA, do corante azul de metileno e da melanina modificada com treonina adsorvida com o respectivo corante.

### 5.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

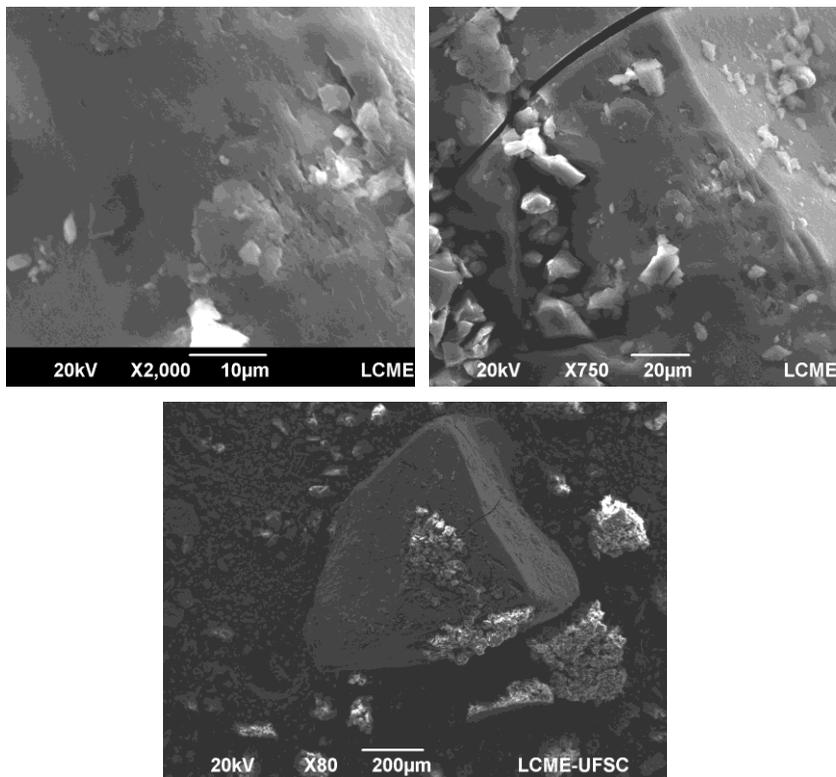
As micrografias do compósito ser-DOPA-AM com aumentos de 80, 720 e 2000 vezes estão apresentadas na Figura 71. Diferentemente da morfologia da ser-DOPA livre, quando em sua superfície está adsorvido o azul de metileno observa-se uma maior compactação formando um aglomerado mais fragmentada e não organizada, estrutura essa que reflete em sua fractalidade como também observado nos ensaios de SAXS na sessão 5.3.4.

Em contrapartida, o compósito cys-DOPA-AM, cujas micrografias estão presentes na Figura 71b, com aumentos de 80, 750 e 2000 vezes apresenta uma estrutura mais lisa e com uma superfície com menos imperfeições quando comparado com a cys-DOPA livre.

As referências do estudo morfológico de melaninas modificadas, seus complexos e ainda interação com espécies catiônicas por MEV ainda é limitado na literatura, por isso, com essas análises aqui descritas, pioneiras para este fim, mostramos que ocorrem modificações morfológicas nas melaninas dependendo do material que está interagindo com o sistema e pode-se fazer algumas correlações com a técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos.



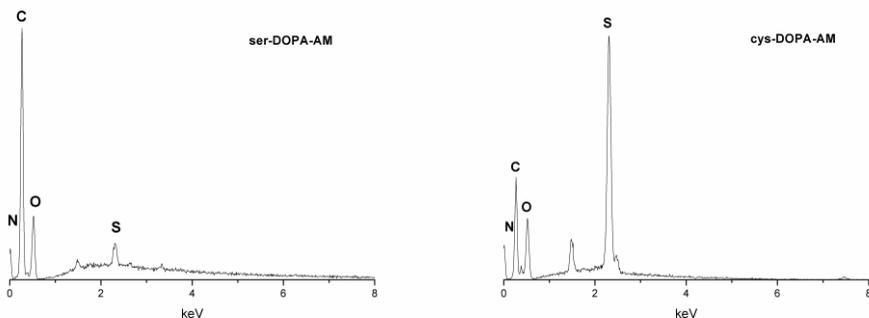
**Figura 71a.** Imagens de MEV da melanina ser-DOPA com o corante azul de metileno adsorvido em sua superfície com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.



**Figura 71b.** Imagens de MEV da melanina cys-DOPA com o corante azul de metileno adsorvido em sua superfície com 80, 750 e 2000 vezes de aumento respectivamente.

### 5.3.3. Microanálise por Energia Dispersiva de Raios-X

Observam-se na Figura 72 os espectros de EDS das melaninas ser-DOPA e cys-DOPA com azul de metileno adsorvido em suas superfícies.



\*O pico não caracterizado é referente ao Al do stubie

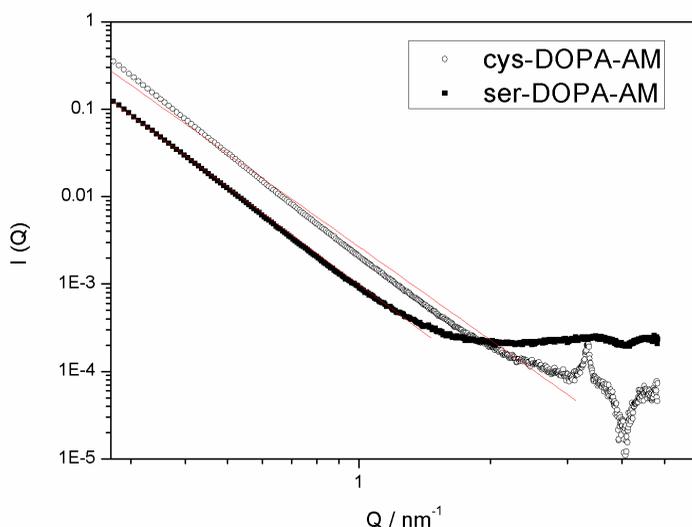
**Figura 72.** Espectros de EDS das melaninas ser-DOPA e cys-DOPA com azul de metileno adsorvido.

O experimento de EDS foi importante para caracterização da presença de azul de metileno na amostra em ambas as melaninas, onde observamos na Figura 9 que sua estrutura possui um átomo de enxofre e foi possível identificar a presença deste nos sólidos adsorvidos, assim mostrando que o corante está adsorvido nas melaninas.

No espectro da ser-DOPA-AM verificamos a ausência do átomo de enxofre na melanina livre, já em presença do corante existe o pico deste elemento, em contrapartida na cys-DOPA-AM o pico de enxofre é maior que o da melanina livre.

### 5.3.4. Espalhamento de Raios-X a baixos ângulos - SAXS

O experimento de SAXS para caracterização do sólido resultante da interação entre o azul de metileno e as melaninas é importante para identificação de alterações em suas estruturas. Observamos o modelo fractal para as melaninas livres, sessão 5.1.10, e aqui interpretamos os dados da mesma maneira, as curvas são apresentadas na Figura 73.



**Figura 73.** Curvas de SAXS das melaninas cys-DOPA e ser-DOPA com azul de metileno adsorvido.

Para a melanina ser-DOPA livre foi identificado um  $D_m = 2,26$  e já no compósito ser-DOPA-AM houve uma mudança em sua estrutura apresentando um fractal de superfície com  $D_s = 2,30$ , sendo a passagem atribuída pela variação na conformação, passando de formas menos alongadas para mais alongadas, fragmentadas e irregulares<sup>79</sup>, como visto em alguns complexos de melaninas estudados neste trabalho.

Em contrapartida a cys-DOPA-AM apresenta um fractal de massa, entretanto com valor menor que na melanina livre passando de  $D_m = 2,70$  para  $D_m = 2,63$ , essa diminuição foi observada também quando a melanina encontrava-se complexada com os íons metálicos

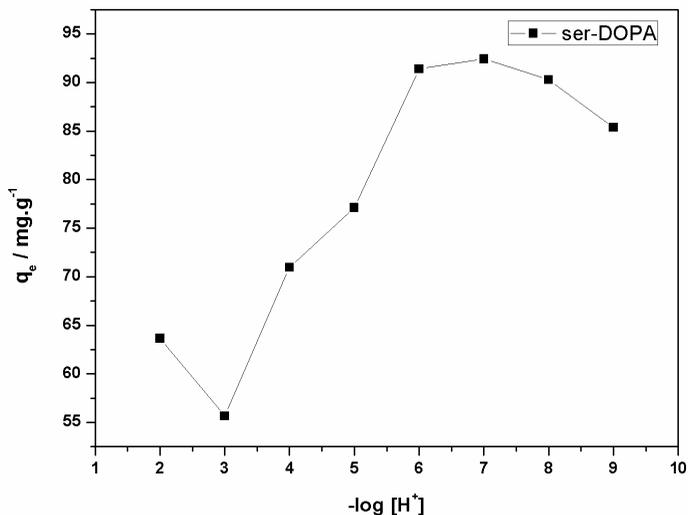
indicando a passagem de estruturas compactas para estruturas mais expandidas, lisas e sem muitas imperfeições como pode ser observado nos experimentos de MEV na sessão 5.3.2. A Tabela 17 apresenta um resumo dos valores fractais calculados para as melaninas adsorvidas com azul de metileno.

**Tabela 17.** Parâmetros de fractais obtidos por SAXS para as melaninas com o corante azul de metileno adsorvido em sua superfície.

| <i>Melanina</i> | $ \alpha $ | D            | $R^2$  |
|-----------------|------------|--------------|--------|
| Ser-DOPA-AM     | 3,70       | $D_s = 2,30$ | 0,9984 |
| Cys-DOPA-AM     | 2,63       | $D_m = 2,63$ | 0,9979 |

### 5.3.5. Estudo do Efeito do pH

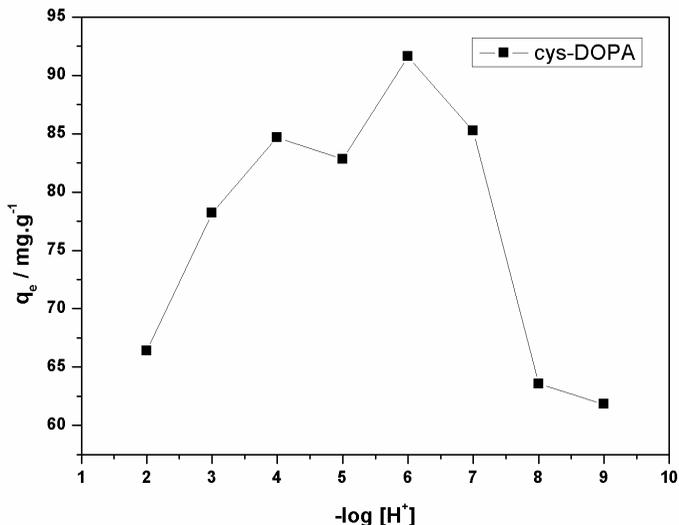
Como se pode observar na sessão 5.1.7. as melaninas sofrem modificações com a alteração do pH, e conseqüentemente mudanças também em suas capacidades adsorptivas. A Figura 74 mostra o efeito do pH para a melanina ser-DOPA, onde observa-se que em valores de pH entre 2 e 5 a capacidade de adsorção varia entre 55 e 76 mg g<sup>-1</sup>, já a partir de pH 6 temos um aumento da adsorção do AM pelas melaninas, com máximo em pH 7 exibindo um q<sub>e</sub> de 92,66 mg g<sup>-1</sup>. Em valores de pH maiores que 8 observa-se a diminuição dos valores de q<sub>e</sub>. Esses dados podem ser explicados quando se observa os valores de pKa's da melaninas ser-DOPA, onde em pH ácido encontra-se todos os grupamentos protonados, já com o aumento do pH ocorre a desprotonação dos grupamentos ácidos carboxílicos e quinona-imina aumentando a capacidade adsorptiva de grupamentos catiônicos. Em valores de pH maiores ocorre a desprotonação de todos os grupamentos, tornando a estrutura mais solúvel e assim diminuindo drasticamente a capacidade de adsorção como suspensão coloidal. Portanto, optou-se pela realização dos experimentos de cinética e isotermas de adsorção da ser-DOPA no pH 7.



**Figura 74.** Efeito do pH na adsorção do azul de metileno pela melanina ser-DOPA.

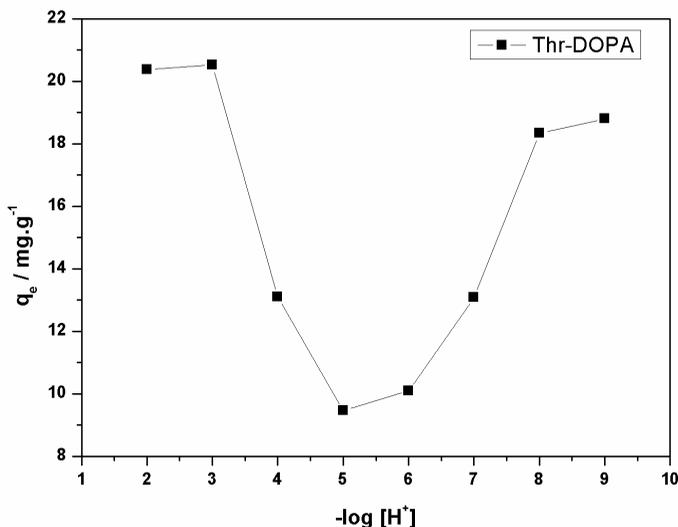
Analogamente a ser-DOPA, observa-se nos estudos de efeito do pH da cys-DOPA, Figura 75, fenômeno semelhante, apresentando um máximo de adsorção em pH 6, com  $q_e$  equivalente a  $91,69 \text{ mg g}^{-1}$ . Especula-se que pela presença dos grupamentos tióis identificados nesta melanina, em valores de pH acima de 7 ocorre o aumento da solubilidade da cys-DOPA, prejudicando a adsorção e consequentemente levando a diminuição do valor de  $q_e$ . Portanto, para esta melanina o pH escolhido para os estudos de cinética e isotermas é 6.

O aumento do valor de  $q_e$  proporcional ao pH está associado aos valores de pKa da melanina calculados, onde a desprotonação favorece a interação eletrostática com o corante azul de metileno, fenômeno este observado também por Olivella e colaboradores<sup>131</sup> em trabalhos com adsorvatos que contém grupamentos ácidos, em valores de pH 6 a adsorvidade diminui devido ao aumento da solubilidade da melanina.



**Figura 75.** Efeito do pH na adsorção do azul de metileno pela melanina cys-DOPA.

Diferente das outras duas melaninas estudadas antes, a thr-DOPA apresentou um perfil da variação da capacidade adsorvente em função do pH totalmente diferenciado, Figura 76, com máximos de adsorção em valores de pH 3 e 8 exibindo um  $q_e$  de 20,58 e 18,52  $\text{mg g}^{-1}$  respectivamente. Não procuramos nos aprofundar na justificativa deste fenômeno, mas pode estar relacionado com os grupamentos metilênicos presentes em alguns dímeros desta melanina identificado por cálculos teóricos, que possivelmente podem reprimir interações intermoleculares fortes do tipo ligações de hidrogênio e  $\pi$ -stacking existentes entre os monômeros.<sup>131</sup> Após a realização dos ensaios de efeito de pH para essa melanina, decidiu-se a não realização dos ensaios de cinética e isotermas até que outros estudos elucidativos fossem realizados para explicar esse fenômeno.



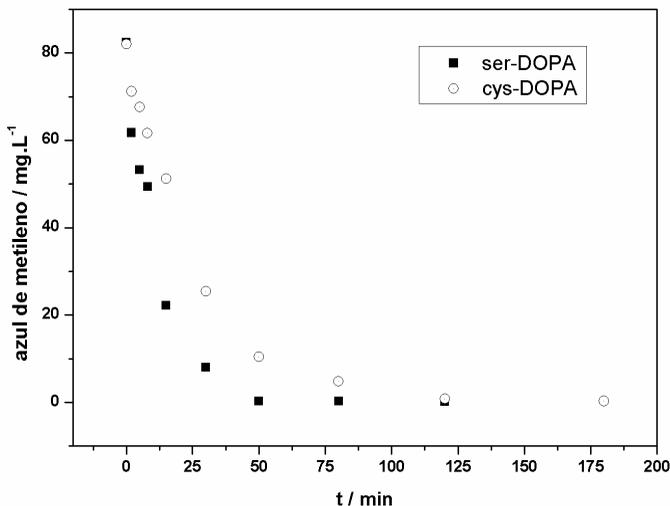
**Figura 76.** Efeito do pH na adsorção do azul de metileno pela melanina thr-DOPA.

### 5.3.6. Cinética de Adsorção

Os experimentos de cinética foram realizados nos valores de pH ótimo de adsorção de cada melanina, sendo 7 para a ser-DOPA e 6 para a cys-DOPA. Uma boa correlação de  $R^2$  elucidou o mecanismo de adsorção do AM pelas melaninas.<sup>132</sup> Para avaliação de qual mecanismo cinético se ajusta ao processo de adsorção foram utilizados os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e difusão intrapartícula. A validade do melhor modelo foi avaliada através dos gráficos lineares  $\log (q_e - q_t)$  em função de  $t$ ,  $t/q_t$  em função de  $t$  e  $q_t$  em função de  $t^{1/2}$  respectivamente.

A curva do decaimento da concentração do azul de metileno em função do tempo na presença da ser-DOPA e da cys-DOPA é apresentada na Figura 77. Observa-se, que os tempos para chegar ao máximo de adsorção são diferentes 50 e 120 minutos para a ser-DOPA e

cys-DOPA respectivamente. A partir dos valores presentes neste gráfico são calculados os parâmetros discutidos acima.



**Figura 77.** Cinética de adsorção do corante azul de metileno pelas melaninas ser-DOPA e cys-DOPA.

Observa-se na Tabela 18 os valores dos parâmetros cinéticos do sistema melanina-AM, sendo que os modelos de pseudo-segunda ordem se mostraram mais significativos, apresentando valores de  $R^2$  de 0,9962 e 0,9992 para a ser-DOPA e cys-DOPA respectivamente.

Além disso, os valores de  $q_e$  encontrados pelos modelos de pseudo-segunda ordem são equivalentes aos calculados experimentalmente, com uma mínima alteração, sendo 100 e 97,37  $\text{mg.g}^{-1}$  para ser-DOPA e cys-DOPA respectivamente, os valores experimentais são 92,66 e 91,96  $\text{mg.g}^{-1}$  para cada melanina.

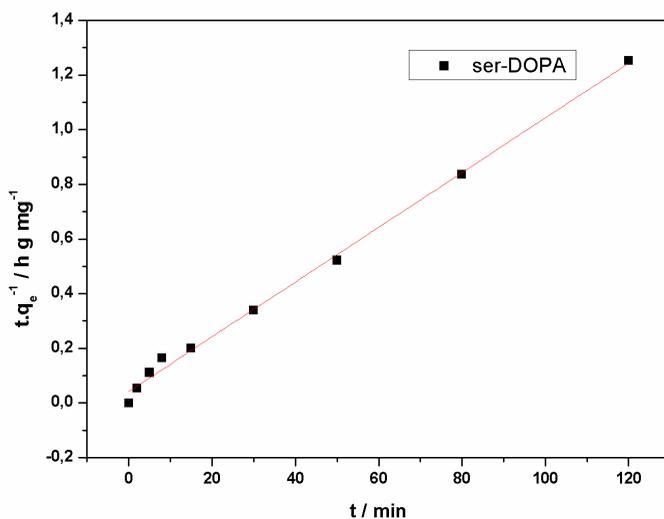
Sendo o modelo de pseudo segunda-ordem o mais adequado para explicar o mecanismo cinético, podemos afirmar que a adsorção depende da concentração do adsorvato em solução e dos sítios de

adsorção do adsorvente. Ressalta-se que a velocidade de adsorção é dependente da quantidade de azul de metileno na superfície do adsorvente, sendo a quimissorção a etapa determinante do mecanismo cinético.<sup>133</sup> Por último, calculamos a velocidade de adsorção inicial (h) com valores de 23,76 e 33,37mg.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para a ser-DOPA e cys-DOPA respectivamente.

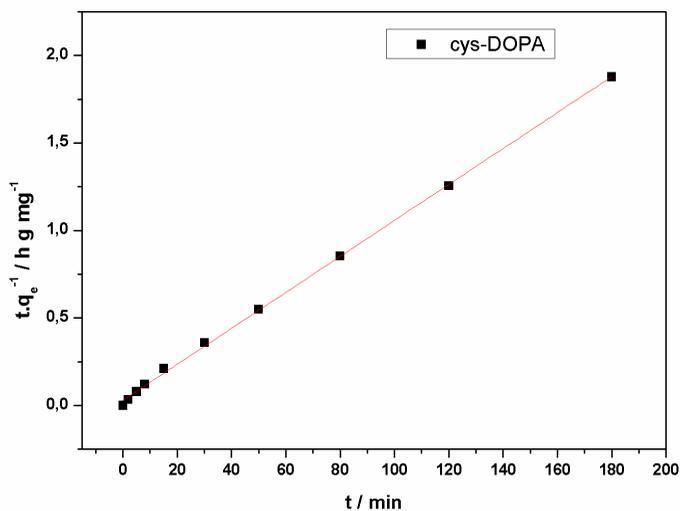
As curvas linearizadas utilizando o modelo de pseudo segunda-ordem para as melaninas ser-DOPA e cys-DOPA são apresentadas nas Figuras 78 e 79.

**Tabela 18.** Parâmetros cinéticos de adsorção do corante azul de metileno pelas melaninas ser-DOPA e cys-DOPA.

| <b>Modelo cinético</b> | <b>Parâmetros</b>                         | <b>Ser-DOPA</b>       | <b>Cys-DOPA</b>       |
|------------------------|---|-----------------------|-----------------------|
| Pseudo primeira ordem  | $q_e(\text{mg g}^{-1})$                   | 3,906                 | 4,202                 |
|                        | $k_1(\text{min}^{-1})$                    | 0,1320                | 0,0461                |
|                        | $R^2$                                     | 0,8234                | 0,6321                |
| Pseudo segunda ordem   | $q_e(\text{mg g}^{-1})$                   | 100                   | 97,37                 |
|                        | $k_2(\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1})$   | $2,38 \times 10^{-3}$ | $3,52 \times 10^{-3}$ |
|                        | $h(\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1})$     | 23,76                 | 33,37                 |
|                        | $R^2$                                     | 0,9962                | 0,9992                |
|                        |   |                       |                       |
| Difusão intraparticula | $k_i(\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2})$ | 0,036                 | 0,012                 |
|                        | $R^2$                                     | 0,4869                | 0,6510                |
|                        |   |                       |                       |



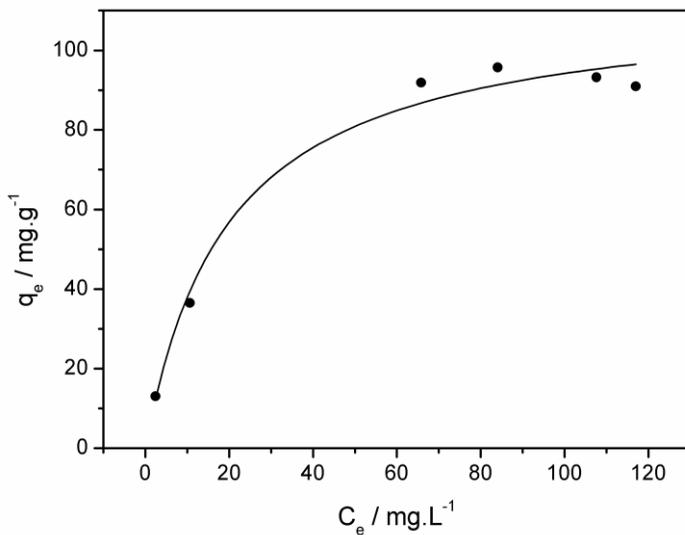
**Figura 78.** Linearização do modelo cinético de pseudo segunda ordem para a adsorção da melanina ser-DOPA pelo corante azul de metileno.



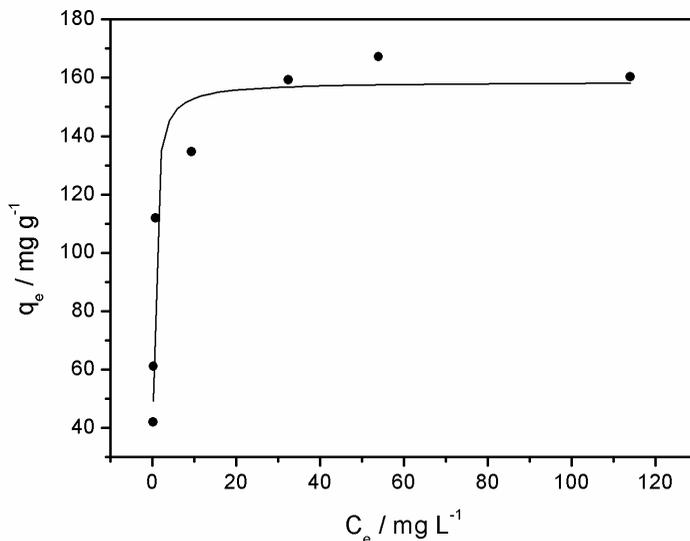
**Figura 79.** Linearização do modelo cinético de pseudo segunda ordem para a adsorção da melanina cys-DOPA pelo corante azul de metileno.

### 5.3.7. Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção foram analisadas variando a concentração do AM em solução e mantendo as massas de melanina constante. Observa-se nas Figuras 80 e 81 as isotermas de adsorção da ser-DOPA e cys-DOPA respectivamente, onde mostra a relação entre a quantidade adsorvida  $q_e$  na superfície da melanina e a concentração remanescente em solução do AM. Os gráficos mostram que a concentração de AM aumenta com o aumento da capacidade adsortiva da melanina, chegando a um máximo de saturação em concentrações acima de  $90 \text{ mg.L}^{-1}$  para a ser-DOPA e  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  para a cys-DOPA, onde todos os sítios já estão ocupados.



**Figura 80.** Isotermas de adsorção do corante azul de metileno pela melanina ser-DOPA.



**Figura 81.** Isotermas de adsorção do corante azul de metileno pela melanina cys-DOPA.

Os dados experimentais foram tratados utilizando os modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich e D-R, os mais utilizados em estudos deste tipo, a escolha do melhor modelo, como na cinética, foi avaliada observando os valores de correlação  $R^2$ . Os parâmetros calculados estão presentes na Tabela 19. Pode-se observar que os valores de correlação para as isotermas utilizando o modelo de Langmuir linear foram os mais relevantes, sendo 0,9886 e 0,9991 para a ser-DOPA e cys-DOPA respectivamente.

Um dos principais parâmetros para avaliação da qualidade do adsorvente é a capacidade efetiva de adsorção ( $q_m$ ) que apresentou valores de 109,89 e 162,07  $\text{mg.g}^{-1}$  para a ser-DOPA e cys-DOPA, verificando-se que a cys-DOPA adsorve aproximadamente 1,6 vezes mais o AM do que a ser-DOPA.

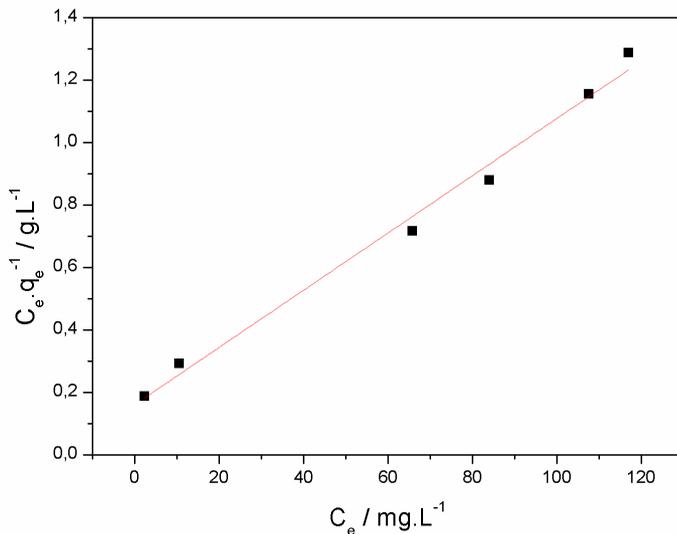
Comparando a capacidade máxima de adsorção de ambas as melaninas, podemos especular que essa diferença entre as duas esteja atribuída a presença de tióis na estrutura da cys-DOPA, sendo mais um grupamento funcional que pode estar influenciando na adsorção de

espécies catiônicas. Os gráficos obtidos utilizando a equação de Langmuir em sua forma linear estão presentes nas Figuras 82 e 83. Inúmeros trabalhos na literatura também relatam o modelo linear da isoterma de Langmuir como o mais adequado para descrever sistemas semelhantes.<sup>137-140</sup>

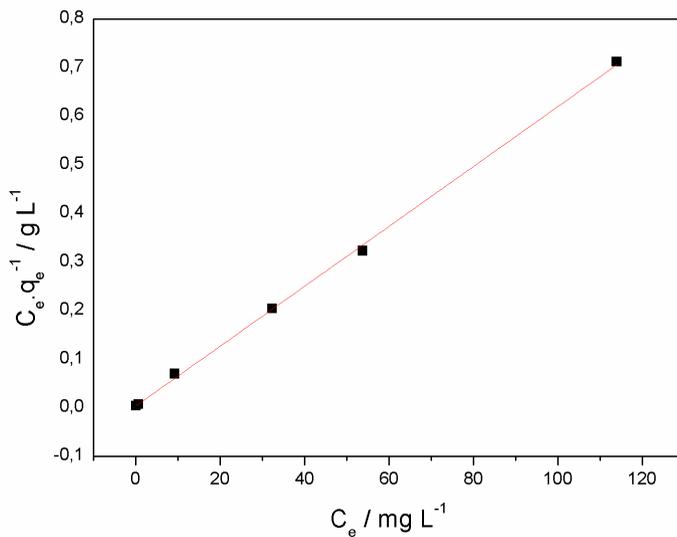
A partir da constante de D-R pode-se calcular a energia livre de adsorção, onde foram obtidos os valores de 16,48 e 14,54 kJ mol<sup>-1</sup> para a ser-DOPA e cys-DOPA respectivamente, caracterizando que os processos de adsorção do azul de metileno na superfície da melanina é de natureza química.

**Tabela 19.** Parâmetros das isotermas de adsorção do corante azul de metileno pelas melaninas ser-DOPA e cys-DOPA.

| Isoterma                 | Parâmetros                        | Ser-DOPA               | Cys-DOPA              |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Langmuir<br>não linear   | $q_m(\text{mg g}^{-1})$           | 112,72                 | 158,64                |
|                          | $K_L (\text{L mg}^{-1})$          | $5,083 \times 10^{-2}$ | 2,703                 |
|                          | $R^2$                             | 0,9861                 | 0,9651                |
| Langmuir<br>linear       | $q_m(\text{mg g}^{-1})$           | 109,89                 | 162,07                |
|                          | $K_L (\text{L mg}^{-1})$          | $5,690 \times 10^{-2}$ | 2,085                 |
|                          | $R^2$                             | 0,9886                 | 0,9991                |
| Freundlich<br>não linear | $K_F (\text{mg g}^{-1})$          | 14,420                 | 89,881                |
|                          | $b_F$                             | 0,4085                 | 0,1457                |
|                          | $R^2$                             | 0,9409                 | 0,8590                |
| Freundlich<br>linear     | $K_F (\text{mg g}^{-1})$          | 5,106                  | 18,690                |
|                          | $b_F$                             | 1,030                  | 0,2218                |
|                          | $R^2$                             | 0,8591                 | 0,9788                |
| D-R<br>linear            | $q_m (\text{mg g}^{-1})$          | 88,86                  | 52,60                 |
|                          | $k (\text{mol}^2 \text{kJ}^{-2})$ | $-1,84 \times 10^{-3}$ | $-2,5 \times 10^{-3}$ |
|                          | $R^2$                             | 0,9466                 | 0,9814                |



**Figura 82.** Linearização do modelo de isoterma de Langmuir na adsorção do corante azul de metileno pelas melaninas ser-DOPA.



**Figura 83.** Linearização do modelo de isoterma de Langmuir na adsorção do corante azul de metileno pelas melaninas cys-DOPA.

A Tabela 20 mostra valores de capacidade máxima de adsorção para outros adsorventes de azul de metileno e também os valores encontrados neste estudo.

**Tabela 20.** Capacidade de adsorção máxima para alguns adsorventes de azul de metileno encontrados na literatura.

| Adsorvente         | $q_m$ (mg g <sup>-1</sup> ) | Referência    |
|--------------------|-----------------------------|---------------|
| Alga Marrom        | 38,61                       | 141           |
| Alga Verde         | 40,2                        | 142           |
| Madeira pirolisada | 80,0                        | 143           |
| Carvão ativado     | 227,27                      | 144           |
| Minerais Argilosos | 85,0                        | 145           |
| Zeolita            | 53,1                        | 146           |
| Biomassa Bruta     | 1,17                        | 147           |
| Biomassa Ativada   | 256,41                      | 148           |
| Diatomita          | 198,0                       | 149           |
| Ocular Melanin     | 280,50                      | 39            |
| ser-DOPA           | 109,89                      | Este trabalho |
| cys-DOPA           | 162,07                      | Este trabalho |

Observam-se na Tabela 20 adsorventes oriundos de diversas fontes, como por exemplo, matrizes inorgânicas zeolitas, diatomitas e minerais argilosos; matrizes naturais algas, madeira e melaninas. Os valores de  $q_m$  da ser-DOPA e cys-DOPA são valores que competem com outros adsorventes de matrizes orgânicas até mesmo com melaninas extraídas de fontes naturais. Comparando-se a metodologia sintética para preparação das melaninas modificadas com aminoácidos e obtenção de outras matrizes, concluímos que a relação de custo e mão de obra é mais baixa em nossas melaninas. Outro ponto positivo é a baixa toxicidade, cujos resultados foram apresentados na sessão 5.1.12. e ainda a versatilidade e seletividade em valores de pH 6 e 7.



## 6. Conclusões e Perspectivas

### 6.1. Melaninas modificadas com aminoácidos

No que tange as DOPA melaninas sintéticas modificadas por aminoácidos, concluímos que a serina e a treonina são modificadores eficientes segundo o mecanismo de Melanogênese descrito na literatura para as *pheomelaninas* (cys-DOPA). As três melaninas foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas com sucesso por técnicas espectroscópicas, termogravimétricas, microscópicas, computacionais, eletroquímicas, de espalhamento e de separação; sendo que as melaninas ser-DOPA e thr-DOPA são inéditas na literatura. Destaca-se a caracterização por SAXS que elucidou as estruturas fractais de ambas as melaninas, comprovando mais uma vez sua similaridade estrutural com as substâncias húmicas e ainda pode-se correlacionar os resultados com sua morfologia elucidada por microscopia eletrônica de varredura.

Os estudos em solução e espectroscópicos confirmaram os principais grupos presentes nas melaninas: ácido carboxílico, quinonimina e catecol. A melanina cys-DOPA apresentou um grupamento tiol livre detectado por titulação potenciométrica, sendo o primeiro estudo na literatura a evidenciar esse grupo presente nesta melanina; esses grupamentos e seus respectivos dímeros foram calculados computacionalmente e apresentaram uma boa correlação com os dados experimentais.

Todas as melaninas sintetizadas neste trabalho apresentaram uma baixa citotoxicidade mesmo em concentrações acima de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  e ainda uma boa atividade antioxidante que pode estar ligada a presença dos grupamentos fenólicos em sua estrutura. Essas atividades antioxidantes tiveram um bom coeficiente de correlação de Pearson entre si, e ainda uma boa correlação com os potenciais de oxidação e pKas do grupamento catecol de cada melanina.

A primeira etapa de modificar quimicamente, purificar e caracterizar as melaninas durante a melanogênese foi vencida, neste momento se faz necessário a ampliação deste estudo para outras moléculas que podem gerar compostos com atividades antioxidantes ainda maiores. A perspectiva e próxima etapa do trabalho será aplicar esses pigmentos sintetizados na área biológica realizando ensaios de fotocitotoxicidade, podendo ser promissoras moléculas a serem utilizadas para evitar reações fotoquímicas no organismo e, ainda aplicações tecnológicas como utilização do pigmento para produção de

tintas e como modificador químico de eletrodos para identificação de metais.

## 6.2. Interação das melaninas modificadas por íons metálicos

No tocante as interações das melaninas modificadas por íons metálicos, foram sintetizados os complexos de Cu(II) e Zn(II) com as melaninas ser-DOPA, cys-DOPA e thr-DOPA e caracterizados por métodos espectroscópicos, termogravimétricos, microscópicos, eletroquímicos, de espalhamento e os equilíbrios em solução foram estudados por titulação potenciométrica. De modo geral, concluiu-se que as interações dos íons Cu(II) e Zn(II) com os grupamentos majoritários das melaninas são dependentes do pH do meio. Para as melaninas ser-DOPA e thr-DOPA observou-se que em valores de pH ácidos ocorre a coordenação pelos grupamentos carboxílico e quinona-imina; com o aumento do pH ocorre a interação com os grupos catecol e em valores alcalinos existe a presença de espécies mistas contendo catecol e quinona imina complexados.

A melanina cys-DOPA por apresentar um grupamento tiol em sua estrutura apresentou interações um pouco distintas. Em valores de pH ácidos ocorre a interação com os grupamentos quinona-imina e tiol, e com o aumento do pH ocorre a interação com espécies mistas envolvendo tiol e quinona imina, e em valores de pH alcalinos a interação com os grupamentos catecol.

Com relação a morfologia dos complexos, concluiu-se um aumento da rugosidade dos complexos de melaninas quando comparados com elas livres e ainda todas as melaninas mantiveram as estruturas fractais mesmo complexadas com os íons metálicos.

Para os complexos thr-DOPA-Zn(II) e ser-DOPA-Zn(II) foi observada toxicidade em células do tipo NIH-3T3, entretanto, para células HUVEC não foi observado esse efeito, a toxicidade foi atribuída possivelmente ao centro de zinco. Na melanina cys-DOPA-Zn(II) não foi observada toxicidade expressiva, o que nos levou a concluir que não apenas o metal utilizado influencia a toxicidade mas também o aminoácido utilizado na modificação química de cada melanina.

Todos os complexos apresentaram uma boa atividade antioxidante, entretanto, com uma menor atividade quando comparado com as melaninas livres, concluindo-se que o centro metálico não participa do mecanismo e ainda devido a interação com as melaninas interfere sua capacidade antioxidante, e ainda as atividades

apresentaram uma ótima correlação de Pearson entre elas com valores de  $r > 0,9$ .

Este estudo foi fundamental, pois mostrou que mesmo as melaninas modificadas por aminoácidos exibem uma ótima afinidade por íons metálicos, e abriu um leque de opções para aplicações tecnológicas como na área de armazenamento de energia; ambientais contribuindo para interação de metais em águas residuais e por último, aplicações em cosmetologia onde pode ser realizado estudos com  $\text{TiO}_2$  aumentando a capacidade de absorção de radiação e assim sendo estruturas potenciais para composição de cremes e protetores solares.

### **6.3. Estudos da adsorção do azul de metileno por melaninas**

No que diz respeito a adsorção do azul de metileno a superfície das melaninas, este trabalho contribuiu para uma área em que existia, até agora, apenas um trabalho na literatura.<sup>39</sup> Caracterizou-se a presença do corante na melanina depois de adsorvido por técnicas espectroscópicas e a morfologicamente observou-se uma maior compactação formando um aglomerado mais fragmentado e não organizado. Estrutura essa que reflete em sua fractalidade, como também observado nos ensaios de espalhamento de raios-X.

Os estudos de efeito do pH mostraram que o fenômeno de adsorção é dependente do pH, onde a ser-DOPA e a cys-DOPA exibem um melhor pH de adsorção em valores de 7 e 6 respectivamente e a melanina thr-DOPA apresenta baixos valores de adsorção em toda faixa de pH.

Concluiu-se, com os experimentos cinéticos que a melhor equação que descreve os dados experimentais foi a de pseudo-segunda ordem em todos os sistemas estudados, apresentando coeficientes de correlação  $r > 0,99$ .

Os ensaios de equilíbrio de adsorção mostram que a melhor equação que ajusta os dados experimentais foi a isoterma de Langmuir linear com  $r = 0,9991$ , onde a cys-DOPA e a ser-DOPA obtiveram valores de  $q_m$  de 162,07 e 109,89  $\text{mg g}^{-1}$  respectivamente e ainda a isoterma de D-R revelou que a adsorção trata-se de um processo de natureza química em ambas as melaninas.

Com esses resultados aumentaram as perspectivas da utilização de melaninas como adsorventes naturais e sintéticos, sendo que a continuidade do trabalho pode objetivar a utilização de outros corantes e ainda fármacos para aplicações de liberação controlada de drogas, utilizando as melaninas como estrutura ancoradora.

## **7. Referências Bibliográficas**

1. John Abel, M.D.; Davis, S.B. **On the pigment of the negro's skin and hair.** The Journal of Experimental Medicine, v. 1, n. 3, p. 1-41, 1896.
2. Young, W. J. **The extraction of melanin from skin with dilute alkali.** Journal of Biological Chemistry, v.8 p.460, 1920.
3. Raper, H. S. **Production from tyrosine of 5,6-Dihydroxyindol and 5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylic Acid – The precursors of Melanin.** Journal of Biochemistry. v. 20 p. 89-96, 1926.
4. Novellino, L.; Napolitano, A; Prota, G. **Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides.** Biochimica et biophysica acta. v. 1475, n. 3, p. 295-306, 2000.
5. DI donato, P.; Napolitano, A.; Prota, G. **Metal ions as potential regulatory factors in the biosynthesis of red hair pigments: a new benzothiazoleintermediate in the iron or copper assisted oxidation of 5-S-cysteinyldopa.** Biochimica et biophysica acta, v. 1571, n. 2, p. 157-66, 2002.
6. Prota, G. **Melanins, Melanogenesis and Melanocytes: Looking at Their Functional Significance from the Chemist's Viewpoint.** Pigment Cell Research, v. 13, n. 4, p. 283-293, 2000.
7. Liu, Y.; Simon, J. D. **Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy.** Pigment cell research, v. 16, n. 6, p. 606-18, 2003.
8. Liu, Y.; Simon, J. D. **Metal-ion interactions and the structural organization of Sepia eumelanin.** Pigment cell research, v. 18, n. 1, p. 42-8, 2005.
9. Samokhvalov, A.; Hong, L.; Liu, Y. et al. **Oxidation Potentials of Human Eumelanosomes and Chemical analysis.** Photochemistry and Photobiology, p. 145-148, 2005.

10. Simon, J. D.; Peles, D. N. **The red and the black.** Accounts of chemical research, v. 43, n. 11, p. 1452-60, 2010.
11. Szpoganicz, B.; Gidanian, S.; Kong, P.; Farmer, P. **Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions.** Journal of inorganic biochemistry, v. 89, n. 1-2, p. 45-53, 2002.
12. Rundström, A.; Kågedal, B. **Gas chromatography – mass spectrometry analysis of pheomelanin degradation products.** Journal of Chromatography A , v. 1216, p. 5730-5739, 2009.
13. Dreyer, D. R.; Miller, D. J.; Freeman, B. D.; Paul, D. R.; Bielawski, C. W. **Elucidating the structure of poly(dopamine).** Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, v. 28, n. 15, p. 6428-35, 2012.
14. Hong, S.; Na, Y. S.; Choi, S. et al. **Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation.** Advanced Functional Materials, v. 22, n. 22, p. 4711-4717 2012.
15. Ye, M.; Wang, Y.; Guo, G.-YI; et al. **Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from Lachnum YM-346.** Food chemistry, v. 135, n. 4, p. 2490-7, 2012.
16. Chedekel, M. R.; Subbarao, K. V.; Bhan, P.; Schultz, T. M. **Biosynthetic and structural studies on pheomelanin.** Biochimica et biophysica acta, v. 912, n. 2, p. 239-43, 1987.
17. Slominski, A.; Zmijewski, M. A; Pawelek, J. **L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions.** Pigment cell & melanoma research, v. 25, n. 1, p. 14-27, 2012.
18. Falguera, V.; Pagán, J.; Ibarz, A. **A kinetic model describing melanin formation by means of mushroom tyrosinase.** Food Research International, v. 43, n. 1, p. 66-69, 2010.
19. Op't holt, B. T.; Vance, M. A; Mirica, L. M. et al. **Reaction coordinate of a functional model of tyrosinase: spectroscopic and**

**computational characterization.** Journal of the American Chemical Society, v. 131, n. 18, p. 6421-38, 2009.

20. Sies, H. **Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants Experimental.** Physiolog, v.82, p.291 – 295, 1997.

21. Tu, Y.-GANG; Sun, Y.-ZHEN; Tian, Y.-GANG; Xie, M.-YONG; Chen, J. **Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (*Gallus gallusdomesticus*Brissou).** Food Chemistry, v. 114, n. 4, p. 1345-1350, 2009.

22. DE cássia r goncalves, R.; Pombeiro-sponchiado, S. R. **Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillusnidulans*.** Biological & pharmaceutical bulletin, v. 28, n. 6, p. 1129-31, 2005.

23. Kilmartin, P. A. **Electrochemical Detection of Natural Antioxidants: Principles and Protocols.** ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING , v. 3, n. 6, p. 941-955, 2001.

24. Abdel-hamid, R.; Newair, E. F. **Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 657, n. 1-2, p. 107-112, 2011.

25. Giacomelli, C.; Ckless, K.; Galato, D.; Miranda, F. S.; Spinelli, A. **Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 13, n. 3, p. 332-338, 2002.

26. Borges, L. L. et. al. **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais.** Enciclopédia Biosfera. v. 7, n. 12 p. 1-20, 2011.

27. Urabe, K.; Aroca, P.; Tsukamoto, K. et al. **The inherent cytotoxicity of melanin precursors : a revision.** Biochem. etBiophysicaActa. , v. 1221, p. 272-278, 1994.

28. Bouchet, N.; Barrier, L.; Fauconneau, B. **Radical Scavenging Activity and Antioxidant Properties of Tannins from Guierasenegalensis(Combretaceae ).** PHYTOTHERAPY RESEARCH , v. 12, p. 159-162, 1998.
29. Henrique, M.; Batista, L. **Influencia da torrefação sobre a atividade antioxidante do café.** Química Nova, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.
30. Waterman, P. G.; Mole, S. **Analysis of phenolic plant metabolites.** Oxford: Blackwell Scientific, 238p. 1994.
31. Galato, D. **Correlação entre os dados eletroquímicos, fotométricos e de cálculos teóricos obtidos para avaliar a atividade antioxidante.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina – DQ UFSC, 108p. 2004.
32. Masek, A.; Chrzescijanska, E.; Zaborski, M.; Maciejewska, M. **Characterisation of the antioxidant acitivity of riboflavin in an elastomeric composite.** ComptesRendusChimie, v. 15, n. 6, p. 524-529, 2012.
33. Gidanian, S.; Farmer, P. J. **Redox behavior of melanins: direct electrochemistry of dihydroxyindole-melanin and its Cu(II) and Zn(II) adducts.** Journal of inorganic biochemistry, v. 89, n. 1-2, p. 54-60, 2002.
34. Costa, T. G.; Younger, R.; Poe, C.; Farmer, P. J.; Szpoganicz, B. **Studies on Synthetic and Natural Melanin and Its Affinity for Fe(III) Ion.** Bioinorganic chemistry and applications, v. 2012, n. Iii, p. 712, 2012.
35. Farmer, P. J.; Gidanian, S.; Shahandeh, B. et al. **Melanin as a target for melanoma chemotherapy: pro-oxidant effect of oxygen and metals on melanoma viability.** Pigment cell research, v. 16, n. 3, p. 273-9, 2003.
36. Martell, E. Arthur. Hancock, D. Robert. **Metal Complexes in Aqueous Solutions.** Springer, Mar 31, 1996.

37. Llu, Y.; Hong, L.; Kempf, V. R. et al. **Ion-exchange and adsorption of Fe(III) by Sepia melanin**. Pigment cell research, v. 17, n. 3, p. 262-9, 2004.
38. Zdybel, M.; Pilawa, B.; Buszman, E.; Wrześniok, D. **Effect of oxygen on free radicals in DOPA–melanin complexes with netilmicin, diamagnetic Zn(II), and paramagnetic Cu(II)**. Chemical Physics Letters, v. 556, n. 1i, p. 278-286, 2013.
39. Pescina, S.; Santi, P.; Ferrari, G. et al. **Ex vivo models to evaluate the role of ocular melanin in trans-scleral drug delivery**. European journal of pharmaceutical sciences, v. 46, n. 5, p. 475-83, 2012.
40. Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S.; Schenkelayland, K. **Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications**. Advanced drug delivery reviews, v. 63, n. 4-5, p. 352-66, 2011.
41. Souza, T.; Otávio, R.; Pereira, L. et al. **Methemoglobinemia : from Diagnosis to Treatment**. Rev Bras Anestesiol, v. 58, p. 651-664, 2008.
42. Boyle, P. **Ecology and Fisheries**. 1<sup>st</sup>. Edition, 472p. United Kingdom, 2005.
43. Bilińska, B. **On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interactions with Cu<sup>2+</sup> ions**. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, v. 57, n. 12, p. 2525-33, 2001.
44. Laus, R.; Costa, T. G.; Szpoganicz, B.; Fávere, V. T. **Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent**. Journal of hazardous materials, v. 183, n. 1-3, p. 233-41, 2010.
45. Motekaitis, R. J., Martell, A. E., BEST 7 – **A new program for rigorous calculation of equilibrium parameters of complex multicomponent systems**, Canadian journal of chemistry, v. 60, p. 2403-2409, 1982.
46. Pettit, L.D. Academic Software. ver.3.2. <http://www.acadsoft.co.uk>.

47. Maliska, A. M. **Apostila de Microscopia Eletrônica de Varredura**. UFSC, Santa Catarina, p.13-15, 2004.
48. Beckde, A.D. **Density Functional Methods Available in Gaussian 03 and MN-GFM**. Physics Review A. v.38, p.3098, 1988.
49. Perdew, J.P. **Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy: Generalized gradient approximation**. Physics Review B.v.34 p.7406, 1986.
50. Perdew, J.P., Yue, W. **Density-functional approximation for the correlation energy**. Physics Review B.v.33, p.8800, 1986.
51. Weigend, F.; Ahlrichs, R. **Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design an assessment of accuracy**. Chemical Physics. v.7, p.3297-3305, 2005.
52. Gaussian 03, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
53. Schnitzer, M.; Skinner, S. I.; **Soil Science**. 105, 392, 1968.
54. Prado, A. G. S.; Souza, S. M.; Lopes, W. T. et al. **Desenvolvimento de um sistema de filtração e titulação para determinação de acidez de ácidos húmicos**. Química Nova v. 22, n.6, p. 894-896, 1999.

55. Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. **Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E.** *Analytical Biochemistry*. 269, 337, 1999.
56. Wang, J.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Li, Z. **The polysaccharide content and reducing power of proteins and of their digest products.** *Int. J. Biol. Macromol.* 42, 2, 127, 2008.
57. Marco d'Ischia, Kazumasa Wakamatsu, Alessandra Napolitano, Stefania Briganti, Jose-Carlos Garcia-Borron, Daniela Kovacs, Paul Meredith, Alessandro Pezzella, Mauro Picardo, Tadeusz Sarna, John D. Simon and Shosuke Ito. **Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols.** *Pigment Cell Melanoma Res.* 26; 616–633, 2013.
58. M.T.S. Rosado, M.L.R.S. Duarte, R. Fausto, J. **Vibrational spectra (FT-IR, Raman and MI-IR) of  $\alpha$ - and  $\beta$ -alanine.** *Mol. Struct.* 410, 343, 1997.
59. S. Jarmelo, I. Reva, M. Rozenberg, P.R. Carey, R. Fausto, **Low-temperature infrared spectra and hydrogen bonding in polycrystalline dl-serine and deuterated derivatives.** *Vibrat. Spectrosc.* 41, 73, 2006.
60. S. Jarmelo, I. Reva, P.R. Carey, R. Fausto, **Infrared and Raman spectroscopic characterization of the hydrogen-bonding network in L-serine crystal.** *Vibrational Spectroscopy* 43, 395–404, 2007.
61. A. Pawlukojać, J. Leciejewicz, A.J. Ramirez-Cuesta, J. Nowicka-Scheibe. **L-Cysteine: Neutron spectroscopy, Raman, IR and ab initio study.** *Spectrochimica Acta Part A.* 61, 2474–2481, 2005.
62. B. Simonovic, V. Vucelic, A. Hadzipavlovic, K. Stepien, T. Wilczok, and D. Vucelic, **Thermogravimetry and differential scanning calorimetry of natural and synthetic melanins.** *J. Therm. Anal.* 36, 2475, 1990.
63. P. J. Gonçalves, O. Baffa Filho, and C. F. O. Graeff. **Effects of hydrogen on the electronic properties of synthetic melanin.** *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS.* 99, 10470-1, 2006.

64. Alexandre G.S. Prado, Jocilene D. Torres, Paolla C. Martins, Jonas Pertusatti, Lucas B. Bolzon, Elaine A. Faria. **Studies on copper(II)- and zinc(II)-mixed ligand complexes of humic acid.** Journal of Hazardous Materials B 136, 585–588, 2006.
65. Parameswaran, N.; Danehy, J. P. Acidic Dissociation Constants of Thiols, **JOURNAL OF CHEMICAL AND ENGINEERING DATA**, v.13, n.3, 385-389, 1968.
66. Geradino; et al. **Atypical Structural and pi-Electron Features of a Melanin Polymer That Lead to Superior Free-Radical-Scavenging Properties.** ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION. v.52-48 p. 12684-12687, 2013.
67. Vitkin IA, Woolsey J, Wilson BC, Anderson RR. **Optical and thermal characterization of natural (*Sepia officinalis*) melanin.** PhotochemPhotobiol 59:455–462, 1994.
68. Zeise L, Murr BL, Chedekel MR. **Melanin standard method: particle description.** Pigment Cell Res. 5:132–142, 1992.
69. Zeise L. **Analytical methods for characterization and identification of melanins.** In: Zeise L, Chedekel MR, Fitzpatrick TB. Melanin: Its Role in Human Photoprotection. Kansas: Valdenmar Publishing Company; pp. 65–79, 1995.
70. Prashant Kumar Jha, Gary P Halada. **The catalytic role of uranyl in formation of polycatechol complexes.** Chemistry Central Journal, 5:12 doi:10.1186/1752-153X-5-12, 2011.
71. M. Piacenti-Silva, E.S. Bronze-Uhl, J.V. Paulin, C.F.O. Graef. **Temperature-enhanced synthesis of DMSO-Melanin.** Journal of Molecular Structure 1056–1057, 135–140, 2014.
72. M. Linh Tran, Ben J. Powel, Paul Meredith. **Chemical and Structural Disorder in Eumelanins: A Possible Explanation for Broadband Absorbance.** Biophysical Journal. V. 90-3, p. 743–752, 2006.

73. M. D'Ischia, O. Crescenzi, A. Pezzella, M. Arzillo, L. Panzella, A. Napolitano, V. Barone. **Structural Effects on the Electronic Absorption Properties of 5,6-Dihydroxyindole Oligomers: The Potential of an Integrated Experimental and DFT Approach to Model Eumelanin Optical Properties.** Photochem. Photobiol., 84, pp. 600–607, 2008.

74. G. BEAUCAGE. **Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension.** J. Appl. Co,st. 29, 134-146, 1996.

75. Chao Shang, James A. Rice. **Investigation of humate-cetyltrimethylammonium complexes by small-angle X-ray scattering.** Journal of Colloid and Interface Science 305, 57–61, 2007.

76. J. M. Gallas, K. C. Littrell, S. Seifert, G. W. Zajac, and P. Thiyagarajan. **Solution Structure of Copper Ion-Induced Molecular Aggregates of Tyrosine Melanin.** Biophysical Journal. v.77 p.1999 1135–1142, 1999.

77. A. C. SILVA, E. S. MENDONÇA, M. L. MARTINS, C. REIS. **A Natureza Fractal de Ácidos Húmicos.** R. Bras. Ci. Solo, 24:759-766, 2000.

78. Alessandro Costa da Silva, Eduardo Sá Mendonça. **Dimensão Fractal de Ácidos Húmicos em Diferentes Condições Experimentais.** Quim. Nova, Vol. 26, No. 3, 344-346, 2003.

79. Vicsek, T. **Fractal growth phenomena,** World Scientific Publishing: Singapore, 1992.

80. Harrison, A. **Fractals in chemistry,** Science Publications: Oxford, 1992.

81. Smith, S. J.; Sutcliffe B. T. **The development of Computational Chemistry in the United Kingdom.** Reviews in Computational Chemistry 10 271–316, 1997.

82. Costa, T.G., Szpoganicz, B. Caramori, G. F., Almeida, V.R., Mangrich, A.S., Mangoni, A.P. **Spectroscopy and theoretical studies of natural melanin (eumelanin) and its complexation by iron(III).**

Journal of Coordination Chemistry, DOI:  
10.1080/00958972.2014.905686, 2014.

83. Rong Chen, Zhiwei Huang, Harvey Lui , Iltefat Hamzavi, David I. McLean, Shusen Xie, Haishan Zeng. **Monte Carlo simulation of cutaneous reflectance and fluorescence measurements – The effect of melanin contents and localization.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 86, 219–226, 2007.

84. Salvatore Profeta Jr., V.S. Senthil Kumar, Richard Austin, S. Stanley Young. **Differential reactivity of thiophene-2-carboxylic and thiophene-3-carboxylic acids Results from DFT and Hartree–Fock theory.** Journal of Molecular Graphics and Modelling 28, 540–547, 2010.

85. Maziar Noei, Marziyeh Holoosadi, Hossein Anaraki-Ardakani. **Design of methyldopa structure and calculation of its properties by quantum mechanics.** Arabian Journal of Chemistry xxx, xxx–xxx. DOI. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.021>, 2013.

86. Powell, B.G. **5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid: a first principles density functional study.** Chemical Physics Letters 402, 111–115, 2005.

87. Hochstein, P. and Cohen, G. **The cytotoxicity of melanin precursors.** Ann. NY Acad. Sci. 100, 876-886, 1963.

88. Pawelek, J.M. and Lerner, A.B. **5,6-dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity.** Nature 276, 627-628, 1978.

89. Graham, D.G., Tiffany, S.M. and Vogel, F.S. **The toxicity of melanin precursors.** J. Invest. Dermatol. 70, 113-116, 1978.

90. Pawelek, J.M., K6rner, A.M., Bergstrom, A. and Bolognia, J. **New regulators of melanin biosynthesis and the autodestruction of melanoma cells.** Nature 286, 617-619, 1980.

91. Om P. Sharma, Tej K. Bhat. **DPPH antioxidant assay revisited.** Food Chemistry 113, 1202–1205, 2009.

92. Mickaël Laguerre, Virginie Hugouvieux, Nükhet Cavusoglu, Fabien Aubert, Aurélie Lafuma, Hélène Fulcrand, Céline Poncet-Legrand. **Probing the micellar solubilisation and inter-micellar exchange of polyphenols using the DPPH free radical.** Food Chemistry. 149, 114–120, 2014.
93. R.K. Ameta, Man Singh. **A thermodynamic in vitro antioxidant study of vitamins B (niacin and niacin amide) and C (ascorbic acid) with DPPH through UV spectrophotometric and physicochemical methods.** Journal of Molecular Liquids. 195, 40–46, 2014.
94. G.S. Suresh Kumar, A. Antony Muthu Prabhu, P.G. Seethalashmi, N. Bhuvanesh, S. Kumaresan. **Self-catalyzed syntheses, structural characterization, DPPH radical scavenging-, cytotoxicity-, and DFT studies of phenoxyaliphatic acids of 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives.** Journal of Molecular Structure. 1059, 51–60, 2014.
95. Santos, G. M., Maia, G. A. Souza, P. H., Figueiredo, R.W., Costa, J.M.C., Fonseca, A.V.V. **Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu.** Ciência Rural, Santa Maria, online, 2010.
96. Xican Li, Xiaoting Wu, Ling Huang. **Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui).** Molecules. 14, 5349-5361; doi:10.3390/molecules14125349, 2009.
97. Ines Sifaoui, Atteneri López-Arencibia, Carmen Ma Martín-Navarro, Nadia Chammemd, María Reyes-Batlle, Mondher Mejri, Jacob Lorenzo-Morales, Manef Abderabba, José E. Piñero. **Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of Leishmania species and their correlation with the antioxidant activity.** Experimental Parasitology 141, 106–111, 2014.
98. M.R.V. Fernandes, A.L.T. Dias, R.R. Carvalho, C.R.F. Souza, W.P. Oliveira. **Antioxidant and antimicrobial activities of Psidium guajava L. spraydried extract.** Industrial Crops and Products. 60, 39–44, 2014.
99. Xiao-Hui Yao, Dong-Yang Zhang, Yuan-Gang Zu, Yu-jie Fu, Meng Luoa, Cheng-Bo Gua, Chun-Ying Lia, Fan-Song Mua, Thomas Efferth.

**Free radical scavenging capability, antioxidant activity and chemical constituents of *Pyrola incarnata* Fisch leaves.** *Industrial Crops and Products* 49, 247–255, 2013.

100. Haifeng Zhao, Wei Fan, Jianjun Dong, Jian Lu, Jian Chen, Lianju Shan, Yan Lin, Weibao Kong. **Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties.** *Food Chemistry*. 107, 296–304, 2008.

101. MOORE, David S. **The Basic Practice of Statistics.** New York, Freeman, 2007.

102. DANCEY, Christine & REIDY, John. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows.** Porto Alegre, Artmed, 2006.

103. W. L. Driessen and W. L. Groeneveld, *Recl. Trav. Chim.* **Complexes with ligands containing the carbonyl group. Part III: Metal (II) acetaldehyde, propionaldehyde and benzaldehyde solvates.** *Recueil Pays-Bas* 90, 87 1971.

104. Borovansky J, Mirejovsky P, Riley PA. **The effect of divalent cations on Cloudman melanoma cells.** *Eur J Cancer Clin Oncol*;19: 91–99, 1983.

105. Borovansky J, Blasko M, Siracky J, Schothorst AA, Smit NPM, Pavel S. **Cytotoxic interactions of  $Zn^{2+}$  in vitro: melanoma cells are more susceptible than melanocytes.** *Mel Res.* 7:449–453, 1997.

106. Galina V. Novikova, Alexander I. Petrov, Natalya A. Staloverova, Alexander A. Shubin, Ilya D. Dergachev. **Complex formation of Sn(II) with L-cysteine: An IR, DTA/TGA and DFT Investigation.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 122, 565–570, 2014.

107. L.S. Prabhumirashi, L.K. Khoje. **TGA and DTA studies on em and tmn complexes of Cu(II) chloride, nitrate, sulphate, acetate and oxalate.** *Thermochimica Acta.* (2002) 109-118, 2002.

108. G.J. Puts , P.L. Crouse. **The influence of inorganic materials on the pyrolysis of polytetrafluoroethylene. Part 1: The sulfates and**

**fluorides of Al, Zn, Cu, Ni, Co, Fe and Mn.** Journal of Fluorine Chemistry xxx, xxx–xxx, 2014.

109. Sawsan M.S. Haggag, A.A.M. Farag, Mohamed Abdelrafea. **Spectral, thermal and optical–electrical properties of the layer-by-layer deposited thin film of nano Zn(II)-8-hydroxy-5-nitrosoquinolate complex.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 110, 14–19, 2013.

110. Robson C. Oliveira, Peter Hammer, Eric Guibal, Jean-Marie Taulemesse, Oswaldo Garcia Jr. **Characterization of metal–biomass interactions in the lanthanum(III) biosorption on Sargassum sp. using SEM/EDX, FTIR, and XPS: Preliminary studies.** Chemical Engineering Journal. 381–391, 2014.

111. Chee H. Chia, Bin Gong, Stephen D. Joseph, Christopher E. Marjo, Paul Munroe, Anne M. Rich. **Imaging of mineral-enriched biochar by FTIR, Raman and SEM–EDX.** Vibrational Spectroscopy. 62, 248–257, 2012.

112. Ray L. Frosta, Yunfei Xi, Barry J. Wood. **Thermogravimetric analysis, PXRD, EDX and XPS study of chrysocolla(Cu,Al)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>(OH)<sub>4</sub>•nH<sub>2</sub>O-structural implications.** Thermochemica Acta. 545, 157–162, 2012.

113. R. Moreno-Tovara, E. Terrés, J. Rene Rangel-Mendez. **Oxidation and EDX elemental mapping characterization of an orderedmesoporous carbon: Pb(II) and Cd(II) removal.** Applied Surface Science 303 (2014) 373–380.

114. M.A. Ahmed, E. García, L. Alonso, J.M. Palacios. **A MS, SEM-EDX and XRD study of Ti or Cu-doped zinc ferrites as regenerable sorbents for hot coal gas desulfurization.** Applied Surface Science. 156, 115–124, 2000.

115. Martine D. Buatier, Sophie Sobanska, Françoise Elsass. **TEM-EDX investigation of Zn- and Pb-contaminated soils.** Applied Geochemistry. 16, 1165–1177, 2001.

116. Allen J. Bard, Larry R. Faulkner. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.** Wiley; 2 edition. 864p.

117. Charles-Louis Serpentine, Cécile Gauchet, Dominique de Montauzon, Maurice Comtat, Jose Ginestar, Nicole Paillous. **First electrochemical investigation of the redox properties of DOPA-melanins by means of a carbon paste electrode.** *Electrochimica Acta*. 4, 1663–1668, 2000.
118. Stanislaw Lukiewicz, Krzysztof Reszka, Zenon Matuszak. **Simultaneous Electrochemical-Electron Spin Resonance (SEESR) Studies on Natural and Synthetic Melanins.** *Electroanal Chem.* 116, 153-165, 1980.
119. H.B. Gray and E.I. Solomon, **Copper Proteins**, T.G. Spiro, ed., Wiley, New York, 1981.
120. Adrian W. Bot. **Redox Properties of Electron Transfer Metalloproteins.** *Current Separations*. 18:2, 1999.
121. Guss JM, Freeman HC. **Structure of oxidized poplar plastocyanin at 1.6 Å resolution.** *J Mol Biol.* Sep 15;169(2):521-63, 1983.
122. A. González Orive, Y. Gimeno, A. Hernández Creus, D. Grumelli, C. Vericat, G. Benitez, R.C. Salvarez. **Electrochemical preparation of metal-melanin functionalized graphite surfaces.** *Electrochimica Acta*. 54, 1589–1596, 2009.
123. G. Steven Huang, Meng-Te Wang, Chia-Wei Su, Yu-Shiun Chen, Meng-Yen Hong. **Picogram detection of metal ions by melanin-sensitized piezoelectric sensor.** *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 319–325, 2007.
124. Alejandro González Orive, Alberto Hernández Creus, P. Carro, Roberto C. Salvarez. **Melanin films on Au(111): Adsorption and molecular conductance.** *Organic Electronics* 13,10, 1844–1852, 2012.
125. K. Franz and L. Charkoudian. **Fe(III)-coordination properties of neuromelanin components: 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid.** *Inorganic Chemistry*, vol. 45, pp. 3657–3664, 2006.

126. Guoqiang Shangguan, Arthur E. Martell, Zongren Zhang, Joseph H. Reibenspies. **The synthesis, crystal structure and metal complexes of a new macrocyclic dinucleating ligand, 3,6,9,17,20,23-hexaaza-29,30-dihydroxy-13,27-dimethyl-tricyclo[23,3,1,111,15]triaconta-1(28),11,13,15(30),25,26-hexaene.** *Inorganica Chimica Acta.* 299, 47–58, 2000.
127. Senesi, N.; Rizzi, F. R.; Dellino, P.; Acquafredda, P.; **Fractal dimension of humic acids in aqueous suspension as a function of pH e time.** *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1996, 60, 1773.
128. Kasper Stovgaard, Christian Andreetta, Jesper Ferkinghoff-Borg, Thomas Hamelryck. **Calculation of accurate small angle X-ray scattering curves from coarse-grained protein models.** *BMC Bioinformatics.* 11:429, 2010.
129. Senesi, N.; Rizzi, F. R.; Dellino, P.; Acquafredda, P. **Fractal humic acids in aqueous suspensions at various concentrations, ionic strengths, and pH values.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 127, 57-68, 1997.
130. Fanny d'Orlyé, Pascal E. Reiller. **Contribution of capillary electrophoresis to an integrated vision of humic substances size and charge characterizations.** *Journal of Colloid and Interface Science.* 368, 231–240, 2012.
131. Olivella, M. A., Fiol, N., de la Torre, F., Poch, J., Villaescusa, I. **A mechanistic approach to methylene blue sorption on two vegetable wastes: cork brak and grape stalks.** *BioResources* 7(3), 3340-3354, 2012.
132. Ho, Y. S.; McKay, G. **The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss peat.** *Water Research,* v. 34, p. 735-742, 2000.
133. Rangel-mendez, J. R.; Monroy-Zepeda, R.; Leyvaramos, E.; Diaz-Flores, P. E.; Shirai, K. **Chitosan selectivity for removing cadmium(II), copper(II), and lead(II) from aqueous phase: pH and organic matter effect.** *Journal of Hazardous Materials,* v. 162, p. 503-511, 2009.

134. Chen, A. H.; Yang, C. Y.; Chen, C. Y.; Chen, C. Y.; Chen, C. W. **The chemically crosslinked metal-complexed chitosans for comparative adsorptions of Cu(II), Zn(II), Ni(II) and Pb(II) ions in aqueous medium.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 163, p. 1068-1075, 2009.
135. Popuri, S. R.; Vijaya, Y.; Boddu, V. M.; Abburi, K. **Adsorptive removal of copper and nickel ions from water using chitosan coated PVC beads.** *Bioresource Technology*, v. 100, p. 194-199, 2009.
136. Ngah, W. S. W.; Kamari, A.; Koay, Y. J. **Equilibrium and kinetics studies of adsorption of copper(II) on chitosan and chitosan/PVA beads.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34, p. 155- 161, 2004.
137. Babel, S.; Kurniawan, T. A. **Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review.** *Journal of Hazardous Materials*, v. B97, p. 219-243, 2003.
138. Birlik, E.; Ersöz, A.; Denizli, A.; SAY, R. **Preconcentration of copper using double-imprinted polymer via solid phase extraction.** *Analytica Chimica Acta*, v. 565, p. 145-151, 2006.
139. J. Yamashita, M. Shioya, T. Kikutani, T. Hashimoto, **Activated carbon fibersand films derived from poly(vinylidene fluoride),** *Carbon*. 39, 207– 214, 2001.
140. N. Kannan, M.M. Sundaram, **Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption on various carbons—a comparative study.** *Dyes Pigments*. 51, 25–40, 2001.
141. D. Caparkaya, L. Cavas, **Biosorption of methylene blue by a brown alga *Cystoseira barbatula* Kützinger,** *ActaChim. Slov.* 55, 547–553, 2008.
142. A. El Sikaily, A. Khaled, A. El Nemr, O. Abdelwahab, **Removal of methyleneblue from aqueous solution by marine green alga *Ulvalactuca*,** *Chem. Ecol.* 22(2), 149–157, 2006.
143. Saniz-Diaz, A. Griffiths, **Activated carbon from solid wastes using a pilotscalebatch flaming pyrolyser,** *Fuel*. 79, 1863–1871, 2000.

144. B.H. Hameed, F.B.M. Daud, **Adsorption studies of basic dye on activated carbon derived from agricultural waste: Hevea brasiliensis seed coat**, Chem. Eng. J. 139, 48–55, 2008.
145. M. Hajjaji, A. Alami, A. El Bouadili, **Removal of methylene blue from aqueous solution by fibrous clay minerals**, J. Hazard. Mater. 135, 188–192, 2008.
146. M. Dogan, M. Alkan, Y. Onager, **Adsorption of methylene blue from aqueous solution onto perlite**, Water Air Soil Pollut. 120, 229–248, 2009.
147. Y. Fu, T. Viraraghavan, **Removal of a dye from an aqueous solution by the Fungus Aspergillus niger**, Water Qual. Res. J. Can. 35 (1) 95–111, 2000.
148. O. Gulnaz, A. Kaya, F. Matyar, B. Arıkan, **Sorption of basic dyes from aqueous solution by activated sludge**, J. Hazard. Mater. 108, 183–188, 2004.
149. M.A. Al-Ghouti, M.A.M. Khraisheh, S.J. Allen, M.N. Ahmad, **The removal of dyes from textile wastewater: a study of the physical characteristics and adsorption mechanisms of diatomaceous earth**, J. Environ. Manage. 69, 229–238, 2003.

# **ANEXO I**

## Preparation, Characterization, Cytotoxicity and Antioxidant Activity of DOPA Melanin Modified by Amino Acids: Melanin-Like Oligomeric Aggregates

Thiago G. Costa,<sup>a</sup> Mateus J. Feldhaus,<sup>a</sup> Felipe S. Vilhena,<sup>a</sup> Melina Heller,<sup>b</sup>  
Gustavo A. Micke,<sup>b</sup> Aldo S. Oliveira,<sup>c</sup> Inês M. C. Brighente,<sup>c</sup> Fabiola B. F. Monteiro,<sup>d</sup>  
Tânia B. Creczynski-Pasa<sup>d</sup> and Bruno Szpoganicz<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Equilíbrio Químico and <sup>b</sup>Laboratório de Eletroforese Capilar, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), CP 476, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário, Bairro Trindade, CP 5069, 88040-970 Florianópolis-SC, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), CP 476, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil

Two new synthetic melanin-like oligomers inspired by the synthesis of *pheomelanin* (cys-DOPA) were prepared using L-DOPA as a precursor and the amino acids serine (ser-DOPA) and threonine (thr-DOPA) for modifications. The products obtained exhibited appreciable antioxidant activity. The compounds were characterized by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), elemental analysis and infrared spectroscopy. The pKa values of the groups present in each melanin suspension were determined in aqueous solution by potentiometric and spectrophotometric titration. Cytotoxicity assays showed an IC<sub>50</sub> > 500 mg L<sup>-1</sup> resulting in non-toxic compounds for living cells. Finally, cys-DOPA, ser-DOPA and thr-DOPA exhibited antioxidant activity determined by the DPPH scavenging assay, with EC<sub>30</sub> = 7.69, 1.02 and 27.60 mg L<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** synthetic melanins, amino acid modification, antioxidant activity

### Introduction

Melanin is a natural pigment produced through the oligomerization of 5,6-dihydroxyindole (DHI) and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) catalyzed by tyrosinase. It contains between 3 to 9 monomer units.<sup>1</sup> It can be found in different species in nature including fungus,<sup>2</sup> humans,<sup>3</sup> vegetables<sup>4</sup> and marine life.<sup>5</sup> These organisms produce melanin for protective application in biological systems. In the literature, two major types of melanin pigments are described: eumelanin and *pheomelanin*, which exhibit dark and brown colors, respectively.<sup>6</sup> Figure 1 shows the most accepted melanin chemical structure described in the literature.<sup>7</sup>

Besides their biological functions, melanins have a wide range of applications, including technological, dermatological, medicinal and pharmacological, and they are also being used in food products.<sup>8-10</sup> Recently, Ye *et al.*<sup>11</sup> described a method for fungal melanin extraction and

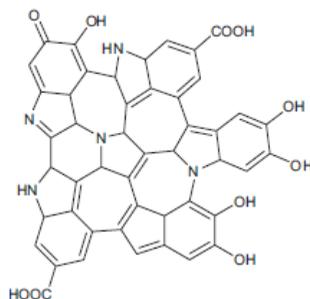


Figure 1. Most accepted melanin structure.

modification with amino acids, and the sample obtained showed antioxidant activity. Other authors have described the antioxidant efficiency of other types of melanin<sup>11,12</sup> and other oligomeric compounds with phenolic groups.<sup>13,14</sup> The antioxidant activity can be attributed to the presence of catechol groups in the structure,<sup>7,9</sup> as shown in Figure 1.

\*e-mail: bruno.s@ufsc.br

## **ANEXO II**

## Spectroscopy and theoretical studies of natural melanin (*eumelanin*) and its complexation by iron(III)

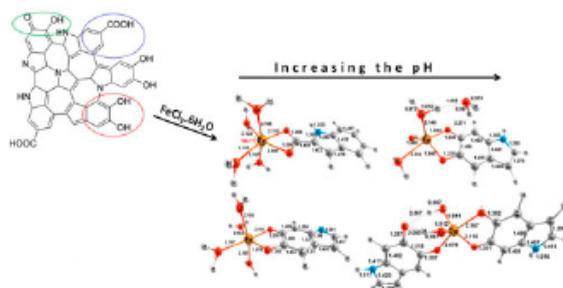
THIAGO G. COSTA†, BRUNO SZPOGANICZ\*†, GIOVANNI F. CARAMORI‡, VICENTE R. DE ALMEIDA†, ANTÔNIO S. MANGRICH§ and ANA P. MANGONI§

†Laboratório de Equilíbrio Químico, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

‡Grupo de Estrutura Eletrônica Molecular, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

§Laboratório de Química Inorgânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

(Received 12 November 2013; accepted 14 February 2014)



*Eumelanin* is an oligomeric pigment that has a high affinity for metal ions, which induces the formation of reactive oxygen species, causing melanoma cell apoptosis due to the acceleration of intracellular or extracellular oxidative stress. Melanin in the skin and in dark hair, known as *eumelanin*, has three main groups that serve as donors: carboxylic acid, catechol, and quinone-imine. In this study, *eumelanin* was extracted and purified from dark hair using a modified Protá method and characterized by elemental analysis. The sample shows the absence of sulfur-containing groups, and the infrared spectrum shows characteristic  $\nu$ O-H,  $\nu$ C-H,  $\nu$ C=C,  $\nu$ C=O, and  $\nu$ C-O stretches, which are confirmed by electronic structure calculations. The major interactions with Fe(III) in solution are at acidic pH values:  $[\text{Fe}(\text{Ac})]^{2+}$  and  $[\text{Fe}(\text{Qi})]^{2+}$ , and at neutral and alkaline pH values:  $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{Cat})]$  and  $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{Cat})_2]^{2-}$ , evaluated by electronic structure calculations. Electron paramagnetic resonance measurements in the solid state showed that the species isolated at acidic pH provided  $g=4.3$ , characteristic for high-spin Fe(III) and the presence of a discrete semi-quinone with  $g=2.003$ ; at alkaline pH, it was observed that  $g=4.3$ , and there was also a large increase in the radical species, suggesting interaction of the metal ion with the catechol.

**Keywords:** *Eumelanin*; Metal-binding interactions; Fe(III) complexes

\*Corresponding author. Email: bruno.s@ufsc.br