

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

Thiago Guimarães Costa

**CARACTERIZAÇÃO DA MELANINA NATURAL EXTRAÍDA
DO CABELO (*eumelanina*): AFINIDADE PELO ÍON Fe(III) E
INTERAÇÕES COM ÁCIDO GÁLICO**

Florianópolis

2012

Thiago Guimarães Costa

**CARACTERIZAÇÃO DA MELANINA NATURAL EXTRAÍDA
DO CABELO (eumelanina): AFINIDADE PELO ÍON Fe(III) E
INTERAÇÕES COM ÁCIDO GÁLICO**

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

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte elaborada pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C837c Costa, Thiago Guimarães

Caracterização da melanina natural extraída do cabelo (eumelanina) [dissertação] : afinidade pelo íon Fe(III) e interações com ácido gálico / Thiago Guimarães Costa ; orientador, Bruno Szpoganicz. - Florianópolis, SC, 2012. 121 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Química. 2. Melanina. 3. Complexos de ferro. 4. Melanoma. 5. Ácido gálico. I. Szpoganicz, Bruno. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

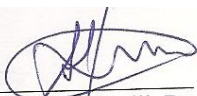
CDU 54

Thiago Guimarães Costa

**CARACTERIZAÇÃO DA MELANINA NATURAL EXTRAÍDA
DO CABELO (eumelanina): AFINIDADE PELO ÍON Fe(III) E
INTERAÇÕES COM ÁCIDO GÁLICO**

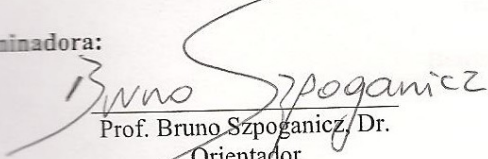
Dissertação avaliada e aprovada pelo orientador e membros da banca,
em sua forma final, como requerimento para obtenção do título de
"Mestre" em química no Programa de Pós-Graduação em Química, na
Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 31 de janeiro de 2012.



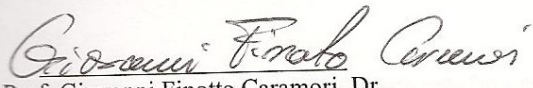
Prof. Almir Spinelli, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

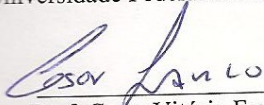


Prof. Bruno Szpoganicz, Dr.
Orientador

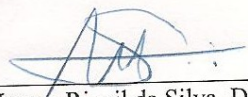
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Giovanni Finotto Caramori, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Cesar Vitorio Franco, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Marcos Rivail da Silva, Dr.
Universidade Regional de Blumenau

“Melanin pigmentation has aroused the curiosity
And attention of man since the beginning of
Recorded history.”

Lerner, A. B. *Physiol.*
Rev.2005, 950, 91–126.

“Melanin’s provide a unique
and rich environment for
Research, with many significant and
diverse implications for
Human health.”

Hearing, V. J. *Pigm.*
Cell Res. 2000, 13, 23–34.

Dedico este trabalho a meus
pais Osires (in memorian)
e Marilia.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Osires (in memorian) e Marília, professores exemplares, que sempre me inspiraram, a minha eterna gratidão pela vida e pelo amor;
- Ao meu orientador Bruno Szpoganicz, mais que um professor, um amigo durante esses 5 anos de iniciação científica e mestrado;
- Ao professor Giovanni Caramori, pela co-orientação não formal, e as longas discussões sobre os cálculos teóricos que foram de suma importância neste trabalho.
- A minha namorada Graziela Salvador por todo carinho durante esse período.
- Ao grande jornalista Sérgio Lino e a minha mãe Profa. Marília pelas correções gramaticais desta dissertação.
- Ao pessoal do Laboratório de Equilíbrio Químico: Anderson, Siara, Suéli, Mariani, Mateus e Camila (os melhores IC's do mundo), Mariana, Polliana, Bruna, Juliano e Fabiana;
- A raça do LABINC que sempre me deu um apoio em alguns experimentos deste trabalho;
- Ao Laboratório de Catálise Biomimética especialmente para o Welman pelas análises de UV-Vis;
- A raça do GEPEEA pelas discussões da eletroquímica;
- Ao professor Antonio Salvio Mangrich, pelos espectros de EPR;
- Para o pessoal do grupo da Profa. Tania Paza, pelas sugestões sobre o ácido gálico;
- À Central de Análises e aos técnicos que colaboraram para obtenção dos resultados;
- Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro;
- Ao Departamento de Química da UFSC pelo suporte estrutural;
- E a todos os professores e pessoas que de alguma maneira estiveram me apoiando neste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Melaninas naturais extraídas do cabelo (*eumelanina*) foram caracterizadas por análise elementar, espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica, espectroscopia paramagnética de ressonância e os pares redox identificados por eletroquímica. Os equilíbrios ácidos/básicos e de complexação da *eumelanina* na ausência e em presença do íon Fe(III) foram caracterizados por titulação potenciométrica. Os pKa's determinados são: 4,35; 6,30; 10,50 e 12,81; correspondendo aos grupos: carboxílico, quinona-imina e catecol respectivamente.

As constantes das interações detectadas com o íon Fe(III) são: $\log([\text{Fe}(\text{Ac})^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Ac}^-]) = 5,73$; $\log([\text{Fe}(\text{Qi})^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Qi}^-]) = 5,20$; $\log([\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Cat}^{2-}][\text{OH}^-]) = 23,53$; $\log([\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})]/[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})][\text{Qi}^-]) = 5,66$; $\log([\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})_2]^{2-}[\text{H}^+]/[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})^-]) = -8,89$ e $\log([\text{Fe}(\text{Cat})_2(\text{OH})_2]^{3-}/[\text{Fe}^{3+}][\text{Cat}^{2-}]^2[\text{OH}^-]^2) = 18,20$. Cálculos teóricos foram empregados para a comprovação das espécies detectadas por titulação potenciométrica; Uma, duas ou três moléculas de água coordenadas ao centro metálico foram utilizadas como estruturas de partida em uma configuração octaédrica.

No sistema ternário dois tipos majoritários de interações foram detectadas, envolvendo grupos da *eumelanina* com o íon Fe(III) em presença de ácido gálico: $\log([\text{Fe}(\text{Ac})(\text{AG})^+]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Ac}^-][\text{AG}^-]) = 4,60$; $\log([\text{Fe}(\text{Qi})(\text{AG})^+]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Qi}(\text{AG})]) = 8,09$. A distribuição das espécies mostra que o ácido gálico pode ser utilizado para carrear o íon Fe(III), liberando-o para a *eumelanina*. As espécies ternárias foram identificadas no estado sólido (pH ácido) por IV e EPR

Palavras-chave: Eumelanina. Complexos de Fe(III). Melanoma. Ácido Gálico.

ABSTRACT

Natural melanins extracted from hair (*eumelanin*) were characterized by elemental analysis, infrared spectroscopy, electronic microscopy – field emission gun, electron paramagnetic resonance and the redox systems were elucidated by electrochemistry technique. The acid/base and complexation equilibria of *eumelanin* in the absence and the presence of Fe(III) ion were characterized by potentiometric titrations. The pKa's are: 4.35, 6.30, 10.50 e 12.81; corresponding to the: carboxylic, quinone-imine and catechol groups, respectively.

The constants of the detected interactions with Fe(III) ion are: $\log([\text{Fe}(\text{Ac})^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Ac}^-]) = 5.73$, $\log([\text{Fe}(\text{Qi})^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Qi}^-]) = 5.20$, $\log([\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Cat}^{2-}][\text{OH}^-]) = 23.53$, $\log([\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})]/[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})][\text{Qi}^-]) = 5.66$, $\log([\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})_2]^{2-}[\text{H}^+]/[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})]) = -8.89$ e $\log([\text{Fe}(\text{Cat})_2(\text{OH})_2]^{3-}/[\text{Fe}^{3+}][\text{Cat}^{2-}]^2[\text{OH}^-]^2) = 18.20$. Theoretical calculations were employed with one, two and three water molecules coordinated to the metal center in an octahedral configuration. The results are in good agreement with the species detected by potentiometric titration.

In the ternary system, two kinds of interactions with iron(III) were detected, involving groups of *eumelanin* and gallic acid: $\log([\text{Fe}(\text{Ac})(\text{AG})^+]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Ac}^-][\text{AG}^-]) = 4,60$; $\log([\text{Fe}(\text{Qi})(\text{AG})^+]/[\text{Fe}^{3+}][\text{Qi}^-][\text{AG}^-]) = 8,09$. The distribution species curves show that gallic acid can be utilized to carry the iron(III) ion to *eumelanin*. The ternary species were elucidated in solid state (acid pH values) by IR and EPR.

Keywords: *Eumelanin*. Iron(III) complexes. Melanoma. Gallic Acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas das subunidades que dão origens às <i>eumelaninas</i> encontradas na pele e no cabelo escuros.....	28
Figura 2. Fórmula estrutural da tirosina.....	29
Figura 3. Fenômeno de tautomerismo presente nas melaninas mostrando a formação dos grupamentos quinona-imina.....	30
Figura 4. Estrutura mais aceita atualmente para as <i>eumelaninas</i> . Observam-se os três grupos majoritários presentes na molécula: no círculo azul o grupamento ácido carboxílico (Ac), em verde o grupamento quinona-imina (Qi) e em vermelho o grupamento Catecol (Cat).....	30
Figura 5. Quelantes terminais majoritários presentes nas eumelaninas....	35
Figura 6. Estruturas dos ditio-carbamatos de Zn(II) e Cu(II) utilizados como fonte de metal induzido em células melanoma.....	40
Figura 7. Estágios da formação e desenvolvimento do melanoma: (a) pequena lesão proveniente de modificações químicas ou físicas na pele; (b) ocupação dos melanócitos dendríticos na epiderme; (c) melanoma maligno em estágio avançado e migração dos melanócitos malignos.....	43
Figura 8. Fórmula estrutural do ácido gálico.....	44
Figura 9. Espectro de infravermelho da eumelanina extraída do cabelo pelo método de Protá modificado. Pastilha de KBr.....	60
Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de força de campo para as eumelaninas. Aumento de (a) 50000, (b) 150000, (c) 270000 e (d) 400000 vezes.....	61
Figura 11. Voltamogramas cíclicos da <i>eumelanina</i> extraída do cabelo	

obtidos a diferentes velocidades de varredura em DMSO, a 25°C. Eletrólito suporte: 0,1mol.L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺, contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: Fc/Fc⁺.....

62

Figura 12. Processos redox elucidando a formação eletroquímica de quinonas, e comprovando a existência de grupamentos catecol como precursores das *eumelaninas*.....

63

Figura 13. Voltamograma cíclico da *eumelanina* extraída do cabelo sem limpeza de eletrodo, obtido a 100mV/s em DMSO, a 25°C. Eletrólito suporte: 0,1mol.L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺, contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: Fc/Fc⁺.....

64

Figura 14. Voltamograma de onda quadrada da *eumelanina*, obtido em DMSO, a 25°C. Eletrólito suporte: 0,1mol.L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺, contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: Fc/Fc⁺.....

65

Figura 15. Curva de titulação potenciométrica reversa da *eumelanina* sob atmosfera inerte de argônio. T = 25°C, $\mu = 0,1$ KCl.....

66

Figura 16. Possível tautomerização do grupamento quinona, gerando quinona-imina suportado por estudos potenciométricos e eletroquímicos.....

68

Figura 17. Curvas de distribuição das espécies da *eumelanina*, onde: (a) corresponde aos grupos carboxílicos desprotonados; (b) grupamentos quinona-imina desprotonados; (c) e (d) representam os grupamentos catecol monoprotonado e desprotonado respectivamente.....

68

Figura 18. Espectros de infravermelho por refletância da *eumelanina*, variando-se o pD de 3 até 7,5 a temperatura ambiente.....

70

Figura 19. Curva mostrando a correlação entre intensidade em 1680cm⁻¹

e pD, o triângulo representa a primeira derivada da concentração de D ⁺ em relação à intensidade.....	71
Figura 20. Estruturas otimizadas para os grupamentos majoritários presentes nas <i>eumelaninas</i> , onde: (a) representa o grupamento carboxílico, (b) quinona-imina e (c) catecol. As distâncias de ligação são apresentadas em angstroms.....	72
Figura 21. Espectros de infravermelho teóricos para os grupamentos majoritários presentes nas <i>eumelaninas</i>	73
Figura 22. Curva de titulação da <i>eumelanina</i> livre e em presença de Fe(III) sob atmosfera inerte. T = 25°C, μ = 0,1 KCl, eletrodo de vidro combinado.....	75
Figura 23. Curva de distribuição de espécies para o sistema <i>eumelanina</i> -Fe(III), onde: (a) representa [Fe(Ac)] ²⁺ , (b) [Fe(Qi)] ²⁺ , (c) [Fe(Cat)OH], (d) [Fe(Cat)(Qi)(OH)], (e) [Fe(Cat)(Qi)(OH) ₂] ²⁻ , (f) [Fe(Cat) ₂ (OH) ₂] ³⁻ ...	76
Figura 24. Espectros de infravermelho da <i>eumelanina</i> livre e complexada com o íon Fe(III) em pH 3, 5 e 10. Pastilhas de KBr.....	79
Figura 25: Estruturas octaédricas iniciais consideradas para o calculo da espécie [Fe(OH)(Cat)(H ₂ O) ₃], considerando a hidroxila em três vértices diferentes do octaedro: duas na posição equatorial (x-y) e uma na posição axial (z).....	81
Figura 26. Estruturas otimizadas de (a) [Fe(Ac)(H ₂ O) ₄] ²⁺ ; (b) [Fe(Qi)(H ₂ O) ₄] ²⁺ ; (c) (d) (e) [Fe(Cat)(OH)(H ₂ O) ₃] estruturas otimizadas a partir das posições específicas do íon hidroxila mostrados na Figura 35; (f) [Fe(OH) ₂ (Cat) ₂] ³⁻	82
Figura 27. Espectro de infravermelho simulado para os complexos majoritários encontrados no sistema <i>eumelanina</i> :Fe(III).....	84
Figura 28. Espectros de EPR do complexo <i>eumelanina</i> :Fe(III) isolado	

em pH 3 e em pH 10 obtidos a 77K.....	86
Figura 29. Curva de titulação de 1mmol de ácido gálico sob atmosfera inerte. T = 25°C, $\mu = 0,1$ KCl, eletrodo de vidro combinado.....	89
Figura 30. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 3 - 12 de uma solução contendo 1mmol de ácido gálico a temperatura ambiente.....	90
Figura 31. Curva de titulação do ácido gálico (AG) em presença e ausência de Fe(III) na proporção 2:1 ligante:metal 0,1:0,05mmol sob atmosfera inerte. T = 25°C, $\mu = 0,1$ KCl, eletrodo de vidro combinado....	92
Figura 32. Curva de distribuição de espécies para o sistema Fe(III)-Ácido Gálico.....	93
Figura 33. Gráfico de Job para as interações entre ácido gálico e Fe(III) em solução aquosa.....	96
Figura 34. Curva de titulação do sistema ternário <i>eumelanina</i> -Fe(III)-Ácido Gálico. T = 25°C; 0,1 mmol de AG; 0,1 mmol de Fe(III) em presença de 0,1mmol de <i>eumelaninas</i> (considerando os grupamentos doadores detectados na sessão 3.1) atmosfera de Ar e $\mu = 0,1$ M KCl.....	97
Figura 35. Curvas de distribuição de espécies para o sistema ternário <i>eumelanina</i> -Fe(III)-Ácido Gálico.....	98
Figura 36. Espectros de infravermelho do ácido gálico livre, do sistema <i>eumelanina</i> :Fe(III) em pH 3 e do sistema ternário <i>eumelanina</i> :Fe(III):AG em pH 3. Pastilhas de KBr.....	102
Figura 37. Espectros de EPR do sistema ternário <i>eumelanina</i> :Fe(III):AG obtidos a 77K.....	103

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formação das feomelaninas.....	29
Esquema 2. Melanogenese: mecanismo de formação das <i>eumelaninas</i>	32
Esquema 3. Possíveis interações entre a melanina sintética DHI -Zn(II) e DHI -Cu(II).....	37
Esquema 4. Resumo das aplicações e funcionalidades das melaninas.....	41
Esquema 5. Formação dos melanomas (a) pele normal, (b) pequena lesão epitelial, (c) fase primária do crescimento do melanoma e (d) fase crítica do melanoma.....	42
Esquema 6. Produtos de interação do ácido gálico com Fe(III) aumentando a relação molar do íon metálico.....	46
Esquema 7. Cella termostatzada utilizada nos experimentos de titulação potenciométrica realizados neste trabalho.....	53
Esquema 8. Etapas da extração da <i>eumelanina</i>	57
Esquema 9. Equilíbrios ácidos/básicos presentes nas melaninas naturais “ <i>eumelaninas</i> ”.....	69
Esquema 10. Equilíbrios envolvidos no sistema <i>eumelanina</i> -Fe(III), constantes de formação e pKa’s.....	78
Esquema 11. Desprotonações do ácido gálico e seus respectivos valores de pKa.....	91
Esquema 12: Estruturas sugeridas detectadas no sistema Fe(III)-AG bem como suas constantes de formação.....	94
Esquema 13: Interações existentes no sistema ternário <i>eumelanina</i> -Fe(III)-Ácido Gálico em toda faixa de pH. Onde (a) = $[\text{Fe}(\text{Ac})]^{2+}$; (b) = $[\text{Fe}(\text{Ac})(\text{AG})]^{+}$; (c) = $[\text{Fe}(\text{AG})]^{2+}$; (d) = $[\text{Fe}(\text{Cat})]^{+}$ (e) = $[\text{Fe}(\text{AG})(\text{OH})]^{+}$; (f) = $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})]$; (g) = $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{AG})]^{+}$; (h) = $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{Cat})]$; (i) = $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{AG})]^{-}$ (j) = $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})]^{-}$; (k) = $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})_2]^{2-}$; (l)	



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre melanina e outros biopolímeros/ oligômeros.....	34
Tabela 2. Constantes de dissociação para o sistema melanina DHI publicado por Szpoganicz e colaboradores.....	38
Tabela 3. Constantes de formação para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com melanina sintética DHI.....	39
Tabela 4. Teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio para <i>eumelanina</i> extraída do cabelo.....	59
Tabela 5. valores de pKa encontrados para <i>eumelanina</i> extraída do cabelo.....	67
Tabela 6. Resumo das principais frequências experimentais e teóricas relacionadas com as principais bandas encontradas para a <i>eumelanina</i>	74
Tabela 7. Constantes de formação para os complexos detectados no sistema <i>eumelanina</i> -Fe(III).....	77
Tabela 8. Resumo dos principais estiramentos encontrados no sistema Fe(III)- <i>eumelanina</i> comparando os deslocamentos com os deslocamentos encontrados experimentalmente.....	85
Tabela 9. Variação de concentração de ácido gálico e Fe(III) em cada solução para montagem do gráfico de Job.....	95

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. $d_p = \lambda / \{2pn_1[\text{sen}^2(\theta) - (n_2/n_1)^2]^{1/2}\}$

Equação 2. $E = g \cdot \mu_B \cdot B \cdot m_s$

Equação 3. $i_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} \nu^{1/2}$

Equação 4. $pK(D_2O) - pK(H_2O) = 0,41 + 0,020 \cdot pK(H_2O)$

Equação 5. $pD - pH = 0,41 + 0,020 \cdot pH$

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DHI	5,6-Dihidroxi-indol
DHICA	Ácido 5,6-Dihidroxi-indol-2-Carboxílico
[TBA(PF₆)]	Hexafluorofosfato de Tetrabutilamônio
Ac	Acetato
QI	Quinone-Imina
Cat	Catecol
AG	Ácido gálico
UV-Vis	Espectroscopia na região do Ultravioleta – Visível
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
FTIV	Espectroscopia na região do Infravermelho com transformação de Fourier
FEG	Microscopia Eletrônica de Força de campo
ATR	Refletância Total Atenuada
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
Mmol	Milimoles
Y	Estiramento (IV)
λ	Comprimento de onda
D₂O	Óxido de deutério
DCI	Cloreto de deutério
NaOD	Hidróxido de sódio deuterado
Nm	Nanômetros
cm⁻¹	Comprimento de onda
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
<i>et. al.</i>	e colaboradores
G	Grama

L	Litro
NHE	Eletrodo normal de hidrogênio
E	Potencial
V	Volt
I	Corrente
K	Kelvin
A	Ampere
T	Temperatura
pH	Potencial hidrogênionico
mol.L⁻¹	Concentração molar
DMSO	Dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

Capítulo I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO.....	27
<i>1.1. INTRODUÇÃO.....</i>	<i>28</i>
1.1.1. Histórico e Fundamentação Teórica.....	28
1.2. <i>Importância, aplicações e caracterização das melaninas nos sistemas biológicos.....</i>	<i>33</i>
1.2.1. Importância das melaninas em sistemas biológicos.....	33
1.2.2. Melanina como quelante natural.....	35
1.2.3. Aplicações das interações de melaninas com centros metálicos e contribuições para a química Bioinorgânica.....	36
1.3. <i>Câncer Melanoma.....</i>	<i>41</i>
1.4. <i>Ácido Gálico: aspectos gerais e aplicações como droga antitumoral.....</i>	<i>43</i>
1.4.1. Ácido gálico: aspectos estruturais e interações com íons metálicos.....	45
1.5. <i>Objetivos do Trabalho.....</i>	<i>47</i>
Capítulo II – PARTE EXPERIMENTAL.....	48
2.1. <i>Reagentes, metodologia e instrumentação.....</i>	<i>49</i>
2.1.1. Reagentes utilizados no trabalho.....	49
2.2. <i>Metodologia e instrumentação.....</i>	<i>49</i>
2.2.1. Análise elementar (CHNS).....	49
2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	49
2.2.3. Espectroscopia de Infravermelho por Refletância.....	50
2.2.4. Microscopia Eletrônica de Força de Campo (FEG).....	51
2.2.5. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	51

2.2.6. Títulações Potenciométricas.....	52
2.2.7. Titulação Espectrofotométrica.....	54
2.2.8. Eletroquímica.....	55
2.2.9. Cálculos Teóricos.....	55
2.2.10. Extração da <i>eumelanina</i> do cabelo.....	56

Capítulo III – RESULTADOS E DISCUSSÃO: EXTRAÇÃO DA EUMELANINA DO CABELO E SUA AFINIDADE POR Fe(III)..... 58

3.1. <i>Caracterização da eumelanina extraída do cabelo.....</i>	59
3.1.1. Análise elementar (CHNS).....	59
3.1.2. Espectroscopia de Infravermelho.....	60
3.1.3. Microscopia Eletrônica de Força de Campo.....	61
3.1.4. Eletroquímica.....	62
3.1.5. Estudos potenciométricos de equilíbrio.....	65
3.1.6. Espectroscopia de Infravermelho por Refletância.....	69
3.1.7. Cálculos Teóricos.....	71
3.2. <i>Caracterização das interações entre Fe(III) e eumelaninas.....</i>	75
3.2.1. Titulação Potenciométrica.....	75
3.2.2. Espectroscopia de Infravermelho.....	79
3.2.3. Cálculos Teóricos.....	80
3.2.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	86

Capítulo IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO: AFINIDADE DA EUMELANINA POR Fe(III) EM PRESENÇA DE ÁCIDO GÁLICO... 88

4.1. <i>Caracterização do Sistema Fe(III)-Ácido Gálico.....</i>	89
---	----

4.1.1. Titulação potenciométrica e espectrofotométrica do ácido gálico.....	89
4.1.2. Titulação potenciométrica do sistema Fe(III)-AG.....	91
4.1.3. Gráfico de Job do sistema Fe(III)-AG.....	94
4.2. <i>Caracterização do Sistema Ternário eumelanina-Fe(III)-Ácido Gálico.....</i>	96
4.2.1. Titulação Potenciométrica.....	96
4.2.2. Espectroscopia de Infravermelho.....	102
4.2.3. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	103
Capítulo V – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
Capítulo VI – PERSPECTIVAS FUTURAS E CONTINUAÇÃO DO TRABALHO.....	108
Capítulo VII – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

Capítulo I

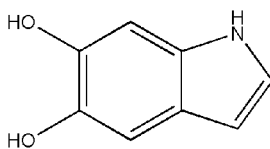
Introdução e Objetivos do Trabalho

1.1. INTRODUÇÃO

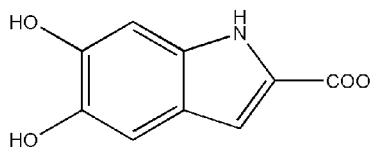
1.1.2. Histórico e Fundamentação Teórica

O estudo das melaninas começou a mais de 100 anos. Primeiramente, sem saber muito bem o que tal estudo representava, os biólogos Borquelot e Bertrand descobriram a enzima tirosinase, em fungos, em 1886, Bertrand identificou os amino-ácidos presentes na enzima e a detectou no substrato melanogênico.¹ No início do século XX, muitos cientistas, na tentativa de isolar e descobrir a diferença de pigmentos que originam as cores de pele e cabelo, começaram a realizar tratamentos químicos com o intuito de obter as moléculas responsáveis pela pigmentação. Mesmo antes de se isolar a enzima responsável pela formação das melaninas, tem-se relatos sobre obtenção de melaninas, publicados por Davis e colaboradores, em 1896, quando realizaram a primeira extração do pigmento do cabelo utilizando apenas lavagem com HCl e NaOH para a degradação do cabelo e da matriz queratina, obtendo assim um pigmento impuro.²

Em 1927, Raper elucidou os estágios iniciais da oxidação da tirosina em melanina, catalisada pela tirosinase. Ele identificou o vermelho intermediário dopacromo e isolou os intermediários 5,6-dihidroindol (DHI), e 5,6-dihidroxiindole-2-carboxilato (DHICA) apresentados na Figura 1.³



5,6-dihidroindol
DHI

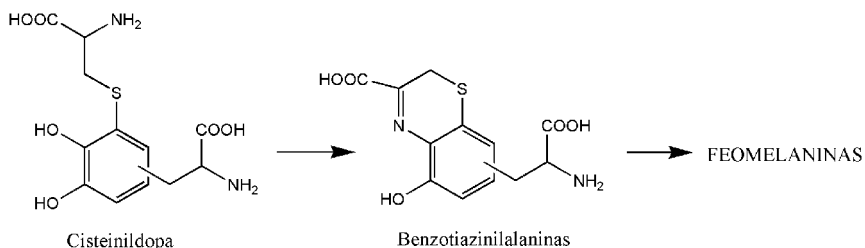


5,6-dihidroxiindol-2-carboxilato
DHICA

Figura 1. Estrutura das subunidades que dão origem às *eumelaninas* encontradas na pele e cabelo escuros.

Mason e colaboradores, no período de 1948 a 1955, tiveram participação importante na química das melaninas. Eles caracterizaram as subunidades DHI e DHICA por espectroscopia.⁴ Panizze e Nicolaus

detectaram as mesmas subunidades na urina humana,⁵ e Leonhardi que, mesmo sem sucesso, dedicou-se à obtenção do pigmento puro extraído da urina.¹ Em 1968, foram sintetizados derivados do 5-cisteinildopa. E esses agregados estão presentes em pigmentos ligados à coloração do cabelo e da pele clara.⁶ Um pequeno esquema da formação das feomelaninas é mostrado no Esquema 1.



Esquema 1: Formação das feomelaninas.

Em 1986, Prota e colaboradores desenvolveram um método de síntese para eventuais estudos da melanina, tendo em vista que até então era impossível isolar o pigmento puro.⁷

Ito e colaboradores, estabeleceram em 1985 um processo de microanálise para quantificar *eumelaninas* e *feomelaninas* com base na análise por HPLC dos produtos de degradação específica. Os métodos originais foram melhorados e agora são comumente utilizados como métodos padrão para análise de melaninas na urina. No mesmo ano, Chedekel e colaboradores conseguiram isolar o-quinonas específicas e identifica-las espectrofotometricamente e ajudaram na elucidação do mecanismo de formação das melaninas.^{8,9}

No ano de 2000 Prota e colaboradores desenvolveram um método de extração de *eumelaninas* puras do cabelo.¹⁰ Ele utilizou uma série de aminoácidos e banhos químicos no qual degradam a matriz queratina e a matriz L-Dopa, assim conseguindo extrair um pigmento puro e observando a presença de precursores da tirosina (Figura 2) através de retrosíntese.

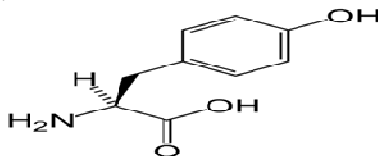


Figura 2. Fórmula estrutural da tirosina.

Até 2002, os grupamentos majoritários presentes nas melaninas naturais eram apenas catecol, fenol e o grupo carboxílico. Szpoganicz e colaboradores¹¹ identificaram um fenômeno de tautomerismo envolvendo o grupamento catecol presente nas melaninas sintéticas DHI, incluindo um outro grupamento doador do oligômero: a quinona-imina. A tautomerização é apresentada na Figura 3.

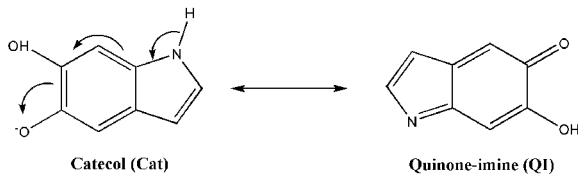


Figura 3. Fenômeno de tautomerismo presente nas melaninas mostrando a formação dos grupamentos quinona-imina.

Atualmente, com os grupamentos bem caracterizados por varias técnicas, o modelo mais aceito das *eumelaninas* é apresentado na Figura 4.

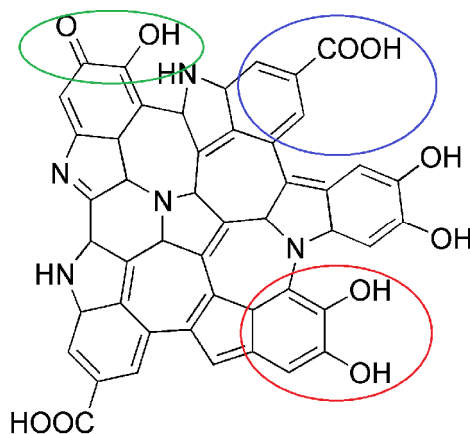
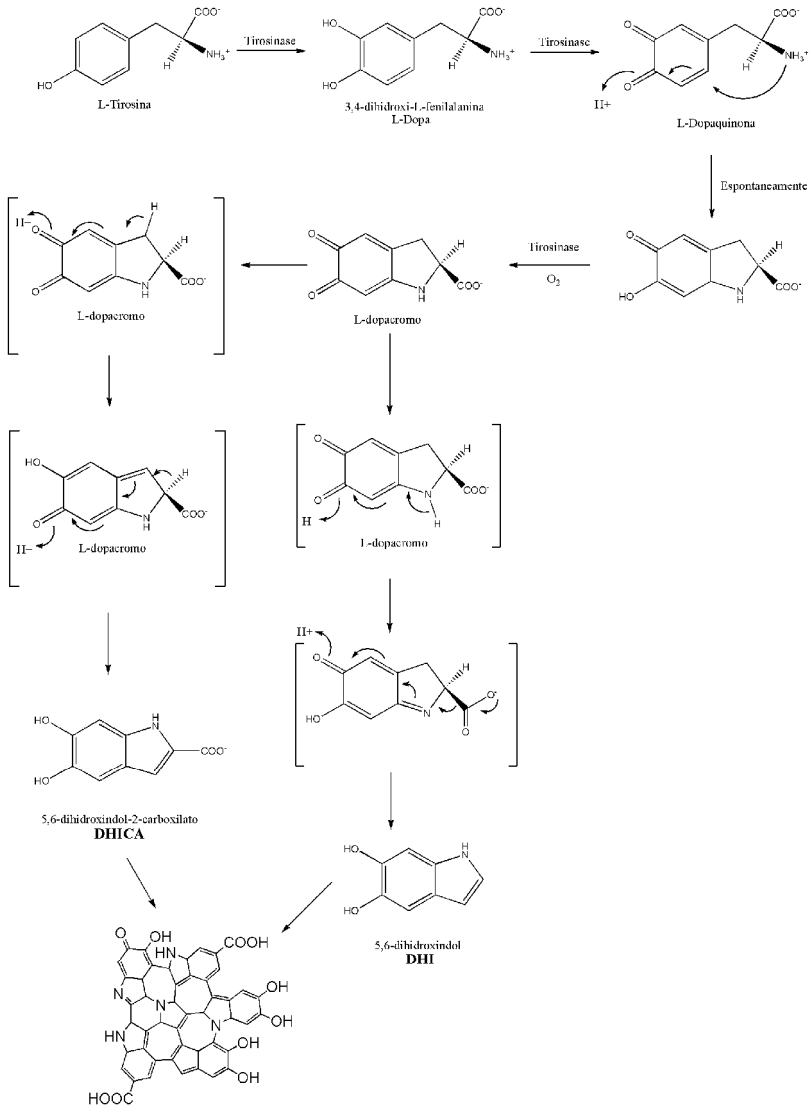


Figura 4. Na estrutura mais aceita atualmente para as *eumelaninas*, observam-se os três grupos majoritários presentes na molécula: no círculo azul o grupamento ácido carboxílico (Ac), em verde o grupamento quinona-imina (Qi) e em vermelho o grupamento Catecol (Cat).

Os principais mecanismos da formação da melanina natural foram estudados por Rosei e colaboradores.¹²⁻¹³ Eles propuseram o modelo que é utilizado nos dias de hoje sobre a formação e oligomerização da melanina através da oxidação, catalisada pela enzima tirosinase, da Tirosina e do L-Dopa (Esquema 2). Inicialmente ocorre a hidroxilação do anel aromático da L-Tirosina catalisada pela enzima tirosinase (agindo como cresolase) e formando o 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-Dopa) seguido de sua oxidação mais uma vez catalisada pela tirosinase (agindo como catecol oxidase). Observa-se a promiscuidade na função catalítica desta enzima.⁹ E por fim, ocorre o ataque nucleofílico intramolecular da amina terminal no carbono 6 do anel aromático seguido de oxidação, formando o L-dopacromo. Na etapa seguinte, podem ocorrer dois rearranjos intramoleculares distintos: o primeiro, com a transferência de um próton do carbono β em relação ao grupo carboxílico. E, posteriormente, o próton do carbono α migra para o meio. O subsequente rearranjo da molécula forma o 5,6-dihidroindol-2-carboxilato. Já o segundo rearranjo ocorre com a transferência do próton ligado à amina, formando uma imina, e subsequente transferência do elétron intramolecular, formando o 5,6-dihidroindol.

A estrutura das *eumelaninas* teve maior aceitação depois dos estudos realizados por Napolitano e colaboradores, em 1996.¹⁴ Anteriormente acreditava-se que as melaninas eram biopolímeros de grande peso molecular. Utilizando espectroscopia de massas “MALDI-TOF”, comprovou-se que, contrariamente do que era proposto, as melaninas se organizam em camadas e em subunidades mensuráveis, sendo oligômeros e não polímeros de alto peso molecular. Cada oligômero não excede 1.5kDa da massa molecular.



EUMELANINAS

Esquema 2. Melanogênese: mecanismo de formação das eumelaninas.

As funções biológicas dos pigmentos de melanina estão intimamente relacionadas às suas características estruturais. Portanto, após os grandes progressos na análise química das melaninas na última década, a multidisciplinaridade dos especialistas das áreas da química,

bioquímica, biofísica, biologia celular, genética e dermatologia é altamente desejada, a fim de desfrutar do crescimento dos conhecimentos acerca da química das melaninas que ainda está em processo de aprimoramento.

1.2. Importância, aplicações e caracterização das melaninas nos sistemas biológicos

1.2.1. Importância da melanina em sistemas biológicos

A cor do cabelo, pele e olhos nos animais depende principalmente da quantidade, qualidade e distribuição da melanina no organismo. Os melanócitos são responsáveis pela síntese das melaninas e são produzidos em organelas dentro de membranas, melanossomas, e o transporte de melanossomas para a camada epidérmica celular se dá pelos queratinócitos. Melanócitos em mamíferos e aves produzem dois tipos quimicamente distintos de pigmentos de melanina: o preto, das *eumelaninas*, e o marrom amarelado para o vermelho das *feomelaninas*¹⁵⁻¹⁸.

Dentre os biopolímeros/bioligómeros, as melaninas são únicas em muitos aspectos. Muitas macromoléculas biológicas são bem caracterizadas. Proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos são quimicamente bem caracterizados. Seus precursores (as unidades monoméricas) e modos de conexão entre as unidades monoméricas são conhecidos. E as seqüências das suas ligações podem ser determinadas com metodologias bem estabelecidas. Por outro lado, nós ainda não temos, por exemplo, um método para determinar com precisão a proporção de diversas unidades presentes nas melaninas. Isto é atribuído grande parte a propriedades químicas específicas das melaninas, tais como a sua baixa solubilidade em uma ampla gama de pH em condições normais, à heterogeneidade em suas características estruturais, e à falta de métodos para dividir os oligômeros da melanina em unidades monoméricas, com eficácia (todos os outros biopolímeros pode ser hidrolisados às correspondentes unidades de monômero).^{19,20} A Tabela 1 apresenta as comparações entre as melaninas e outros biopolímeros encontrados na maioria dos sistemas biológicos.

Tabela 1: Comparação entre a melanina e outros biopolímeros/oligômeros.

<i>Biopolímero/oligômero</i>	<i>Monômeros</i>	<i>Tipo de Ligação Covalente</i>
Proteínas	Aminoácidos	Ligação Peptídica (C-N)
Polissacarídeos	Glicose, frutose, maltose	Ligação Glicosídica (C-O)
Ácidos Nucleícos	Nucleotídeos	Ligação Fosfato Diester (P-O)
Melaninas	Dihidroindols Benzotiazinas	Ligação Carbono- Carbono (C-C)

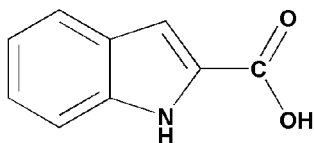
Outra aplicação descrita na literatura é da capacidade da melanina agir como anti-oxidante. Os avanços na descoberta dos grupamentos majoritários que constituem as melaninas levaram a uma hipótese de que ela pode agir como uma armadilha de radicais livres, protegendo as células dos efeitos desses radicais formados em reações biológicas de oxidação-redução.²¹ Evidências experimentais sugerem que a melanina nas células pode ser um sistema antioxidante importante.²²⁻²⁹ Um antioxidante é definido como: "quaisquer substâncias que, quando presentes em baixa concentração em relação às de um substrato oxidável, significativamente acabam ou inibem a oxidação desse substrato.

Há evidências experimentais e patológicas que um papel fundamental da melanina presente na pele é a imunossupressão da indução da luz UV em células epiteliais que podem desempenhar um

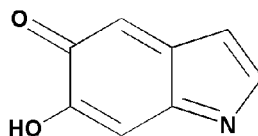
papel no câncer de pele. Estudos em animais também sugerem um papel para a suscetibilidade a doenças infecciosas.³⁰ Houve dois estudos em humanos sobre os efeitos fotoprotetores de melanina em presença da luz UV induzida para a checagem da imunossupressão,^{31,32} e ambos chegaram à conclusão de que a pigmentação, mesmo em pessoas de pele clara, tiveram efeito sobre a capacidade de UV para suprimir a fase de indução da hipersensibilidade, que é considerada modelo para alguns dos eventos fotoimunológicos que são importantes no câncer de pele. As razões para isto não são conhecidas, mas uma explicação seria que um cromóforo superficial proveniente da melanogênese exibisse o papel de absorver a luz.

1.2.2. Melanina como quelante natural

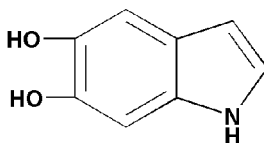
A estrutura da *eumelanina* apresentada na Figura 4 mostra os principais quelantes presentes na melanina: catecol, quinona-imina e ácido carboxílico. Uma característica importante é a presença de oxigênio em todos os quelantes, gerando um centro favorável para coordenação de um centro metálico. A Figura 5 apresenta as estruturas dos três quelantes terminais majoritários presentes nas *eumelaninas*.



Ácido Carboxílico (AC)



Quinona-Imina (QI)



Catecol (Cat)

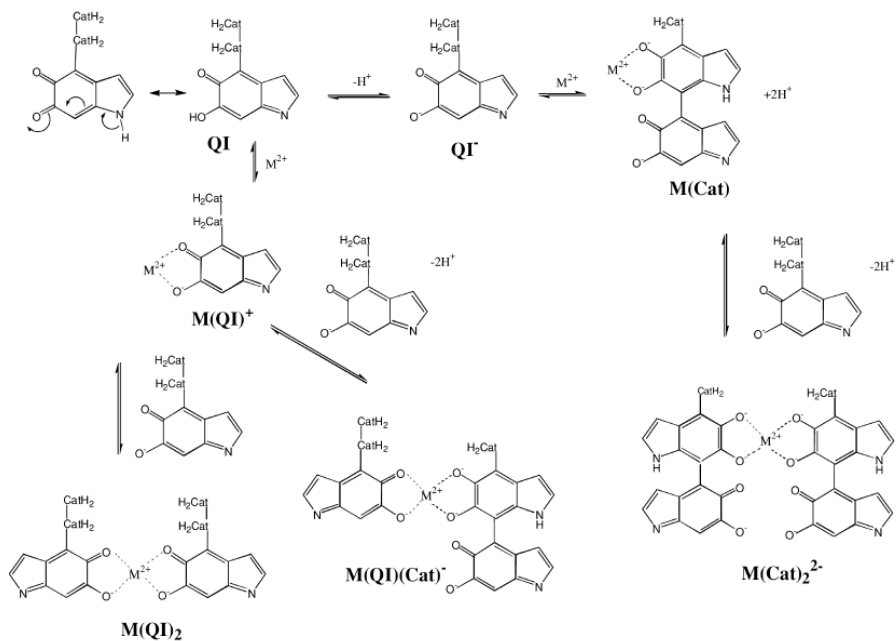
Figura 5. Quelantes terminais majoritários presentes nas *eumelaninas*.

Pelo conceito ácido-base de Pearson, os ligantes oxigenados com grupos carboxilatos como doadores são moderadamente duros.³³ Sua troca por grupos catecolatos (duros) aumenta a seletividade por íons metálicos com maior concentração de carga. Os catecolatos constituem uma classe que possui inúmeros derivados bidentados, que a julgar pelas suas constantes de estabilidade “in vitro”, devem servir de base para a formação de complexantes efetivos para íons trivalentes.³⁴ Já o grupamento quinona-imina, que possui um pKa menor do que os do catecol, tem sua coordenação com íons metálicos favorecida em valores de pH próximos da neutralidade.¹¹

1.2.3. Aplicação das interações de melaninas com íons metálicos e suas contribuições para a Química Bioinorgânica.

A capacidade das melaninas em complexar íons metálicos é uma das suas principais propriedades químicas que influencia os efeitos biológicos desse pigmento.³⁵⁻³⁷ Como objetivo de elucidação de outras propriedades das melaninas, o estudo das interações de íons metálicos tem sido valioso, tanto para entender os efeitos biológicos dessas interações, como para investigar as estruturas e propriedades das melaninas.

A coordenação, pelas melaninas, de íons metálicos multivalentes, é um fenômeno que depende do pH. As interações com íons metálicos normalmente aumenta com o aumento dos valores de pH. Este fenômeno indica que as melaninas se comportam como um ácido fraco de troca iônica. Isto é esperado porque o oligômero contém vários grupos funcionais que interagem com o centro metálico. Uma completa análise da complexação de íons metálicos pela melanina, exige controle preciso do pH da amostra. Grupos mais básicos coordenam melhor em valores mais elevados de pH. Enquanto grupos mais ácidos coordenam melhor em valores de pH menores. Usando o método potenciométrico, em combinação com programas computacionais e correlações espectroscópicas, Szpoganicz e colaboradores quantificaram os sítios de ligação de uma suspensão coloidal de melanina sintética DHI, e quantificaram as afinidades por íons divalentes Zn(II) e Cu(II).¹¹ Propuseram ainda modelos de complexação levando em consideração os grupos Catecol e Quinona-imina, conforme o Esquema 3:



Esquema 3. Possíveis interações entre a melanina sintética DHI e Zn(II) e Cu(II).

Observa-se no Esquema 3 a dependência do pH na coordenação da melanina com o íon metálico. O aumento do pH favorece à formação dos complexos. A Tabela 2 apresenta as constantes dos equilíbrios que aparecem no sistema melanina DHI publicadas por Szpoganicz. Com os valores encontrados na Tabela 3, as curvas de distribuição das espécies formadas podem ser calculadas em função do pH. A Tabela 3 mostra as constantes de formação para os complexos formados entre a melanina DHI e Cu(II), e DHI e Zn(II).

Tabela 2: Constantes de dissociação para o sistema melanina DHI publicadas por Szpoganicz e colaboradores.

<i>Equilíbrio</i>	<i>-log K_a</i>
$\frac{[H^+][QI^-]}{[HQI]}$	6,3
$\frac{[H^+][HCatH_2Cat^-]}{[H_2CatH_2Cat]}$	9,44
$\frac{[H^+][CatH_2Cat^{2-}]}{[HCatH_2Cat^-]}$	10,56
$\frac{[H^+][CatHCat^{3-}]}{[CatH_2Cat^{2-}]}$	11,7
$\frac{[H^+][CatCat^{4-}]}{[CatHCat^{3-}]}$	12,8

Tabela 3: Constantes de formação para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com melanina sintética DHI.

<i>Equilíbrio</i>	<i>Log K</i>	
	<i>Cu(II)</i>	<i>Zn(II)</i>
$\frac{[M(QI)^+]}{[M^{2+}][QI^-]}$	10,2	9,3
$\frac{[M(QI)_2]}{[M(QI)^+][QI^-]}$	7,9	5,6
$\frac{[M(Cat)]}{[M^{2+}][Cat^{2-}]}$	19,6	15,7
$\frac{[M(Cat)_2^{2-}]}{[M(Cat)][Cat^{2-}]}$	15,6	10,8
$\frac{[M(Cat)(QI)^-]}{[M(QI)^+][Cat^{2-}]}$	20,9	14,9

Inúmeras aplicações das interações das melaninas com centros metálicos são descritas na literatura.³⁹ Deziderio e colaboradores estabilizaram filmes de melaninas sintéticas com aplicações ambientais propondo um método eficaz de produção de melanina sintética, e aplicaram adsorção de metais poluentes em soluções aquosas.³⁹

As ligações de metais com melaninas em sistemas biológicos também afetam a capacidade de melaninas nativas de proteger as células de espécies nocivas de compostos redox-ativos, tais como espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais gerados fotoquimicamente. Cu(II) e Zn(II), em especial, tem sido estudado por ter afinidade com melaninas e comprovada capacidade de modificações eletroquímicas em sua estrutura.⁴⁰ Um trabalho recente mostrou que o cobre (II) tem um significativo efeito vinculativo sobre a estrutura dos agregados de melanina.⁴¹ O íon Cu(II) também é conhecido por acelerar processos de

Fenton e Haber-Weiss.⁴² Assim a ligação de metais às melaninas pode afetar dramaticamente sua capacidade redox.^{43,44}

Nesse contexto, Farmer e colaboradores estudaram o efeito de pequenos complexos mononucleares de Cu(II) e Zn(II) frente a células de melanomas.⁴⁵ Esses compostos tendo como ligante ditiocarbamatos demonstraram serem tóxicos para células de melanomas com IC₅₀ próximo a de drogas comerciais utilizadas no tratamento anti-melanomas. Mas, até agora, o mecanismo de ação dessas metalodrogas não é descrito na literatura. A estrutura dos complexos utilizados neste estudo é mostrada na Figura 6.

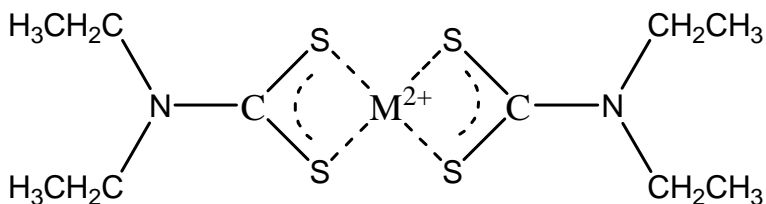
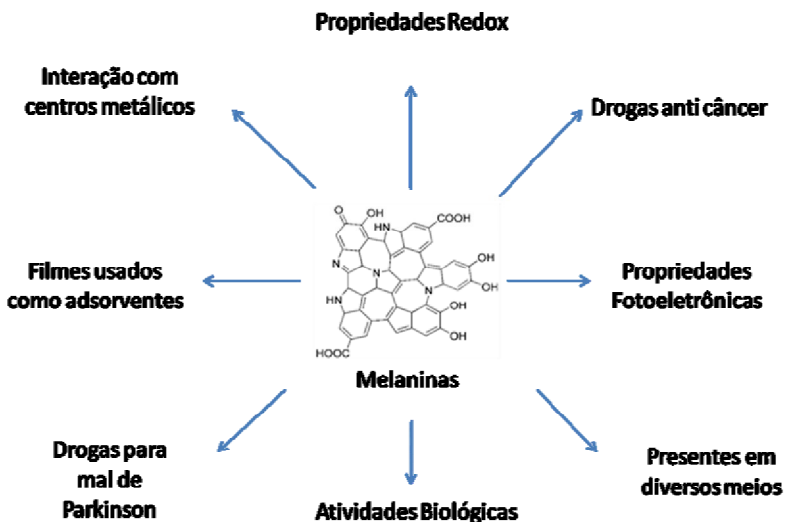


Figura 6: Estruturas dos Zn(II) e Cu(II) ditiocarbamatos utilizados como fonte de metal induzido em células de melanomas.

Estudos com Fe(III) são também descritos na literatura. Franz e colaboradores mais recentemente realizaram os primeiros estudos entre melaninas extraídas de cérebro, *neuromelanina*, e Fe(III).⁴⁶ Além do íon Fe(III) poder catalisar a produção de radicais hidroxila (ação potencial anti-câncer melanoma), estudos comprovam a capacidade do centro de ferro contribuir para redução de até 50% do mal de Parkinson em pacientes tratados com compostos contendo esse íon metálico.⁴⁸ Mesmo com esses estudos, ainda se sabe pouco como ocorrem as interações do Fe(III) pelas melaninas.

Tendo em vista as inúmeras aplicações que as melaninas exibem, é viável salientar que este estudo torna-se altamente interdisciplinar, promovendo uma interação entre as mais diversas áreas como: Química, Física, Biologia, Bioquímica, Medicina, Ciências Tecnológicas e Ambientais. O Esquema 4 mostra um resumo de todas as aplicações citadas anteriormente e algumas funcionalidades presentes nas melaninas.

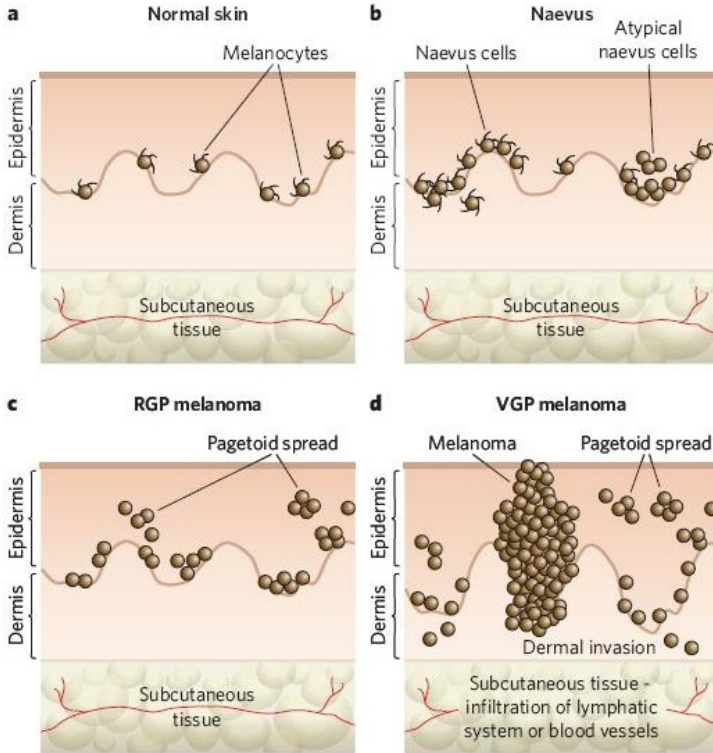


Esquema 4: Resumo das funcionalidades das melaninas.

1.3. Câncer Melanoma

O melanoma de pele em estágio mais avançado é o tipo de malignidade mais fácil de ser prevenida. Entretanto, nos últimos anos vem crescendo desenfreadamente, e representa hoje em dia quase um terço de todos os tipos de cânceres diagnosticados. Estatísticas comprovam que ocorre principalmente em pessoas jovens.⁴⁷ Pessoas de pele mais clara possuem uma quantidade muito grande de *feomelaninas*, e estão mais suscetíveis a contrair este tipo de câncer.

De acordo com a WHO (*World Health Organization*) existe no mundo um aumento de 2-3 milhões de casos por ano de melanoma. O Brasil contribui com cerca de 8-10% desta estimativa. A região Sul e Sudeste, mesmo tendo menor incidência de raios solares, exibe maior número de descendentes europeus. Assim, esta porcentagem da população está menos protegida, contendo quantidades muito significativas de *feomelanina* presentes na pele. Já no norte e nordeste, mesmo exibindo uma grande e intensa exposição de radiação solar, a população na sua grande maioria é descendente de indígenas e africanos, possuindo maior proteção e mais imune a esse tipo de doença.⁴⁸ O Esquema 5 apresenta a formação e proliferação do melanoma nas células publicado na Nature por Marais e colaboradores.⁴⁹



Esquema 5: Formação dos melanomas (a) pele normal, (b) pequena lesão epitelial, (c) fase primária do crescimento do melanoma e (d) fase crítica do melanoma.

Existem vários estágios de lesão melanocítica (Figura 7), cada um dos quais é marcado por um novo clone de células, com vantagens sobre o crescimento dos tecidos saudáveis. (a) Pele normal. Isso mostra uma distribuição uniforme dos melanócitos na camada da epiderme. (b) Pequena lesão, nos estágios iniciais, os melanócitos benignos após sofrerem algum tipo de lesão ou indução química reagem aumentando o número de melanócitos dendríticos (morfologicamente atípicos) que são aqueles ligados à defesa do organismo. Um excesso desse tipo de melanócitos pode trazer problemas à camada cutânea. (c) Fase primária do crescimento-melanoma. Esta é considerada o estágio maligno primário, onde os melanócitos dendríticos começam a ocupar o lugar dos sãos na camada da epiderme. (d) Fase crítica do crescimento-melanoma. Esta é a etapa que é considerada como tendo potencial de

maligndade, levando diretamente ao melanoma maligno metastático, a fase mais mortal, pela infiltração dos sistemas vascular e linfática. Descreve a migração para cima ou empilhamento vertical de melanócitos, que é uma característica histológica do melanoma. A Figura 12 mostra os três estágios do desenvolvimento do melanoma, fazendo analogia com o esquema apresentado anteriormente.

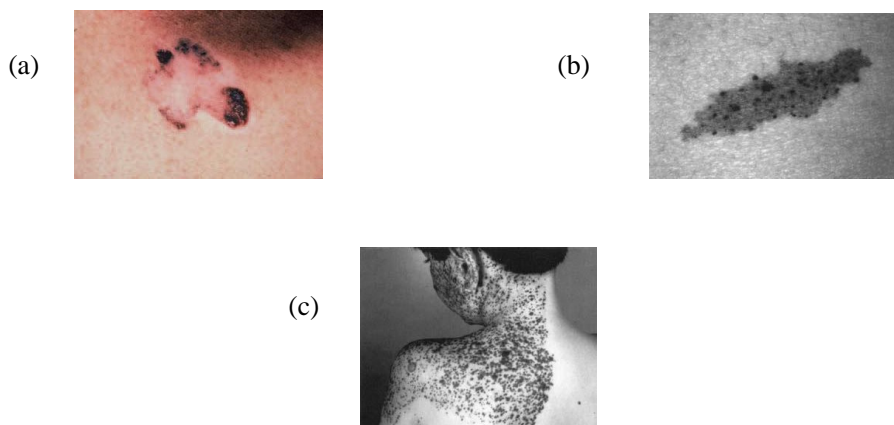


Figura 7: Estágios da formação e desenvolvimento do melanoma (a) pequena lesão proveniente de modificações químicas ou físicas na pele; (b) ocupação dos melanócitos dendríticos na epiderme; (c) melanoma maligno em estágio avançado, migração dos melanócitos malignos.

1.4. Ácido Gálico: aspéctos gerais e aplicação como droga anti tumoral

O ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico também conhecido como ácido gálico é um ácido orgânico de fórmula molecular ($C_6H_2(OH)_3COOH$) e sua fórmula estrutural plana é apresentada na Figura 8.

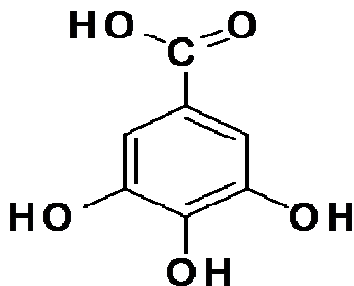


Figura 8: Fórmula estrutural do ácido gálico.

É encontrado amplamente em todo o reino vegetal. Altos teores de ácido gálico são encontrados em uvas, folhas de chá, lúpulo, e casca de carvalho. O ácido gálico existe em duas formas: como molécula livre e como parte dos taninos. O ácido gálico puro é um sólido orgânico cristalino, e seus sais e ésteres derivados do ácido gálico são chamados de galatos.⁵⁰ Existem muitas aplicações na pesquisa química e na indústria, sendo usado como um padrão para a determinação do teor de fenóis totais em diversas substâncias encontradas na natureza,⁵¹ e também usado para fazer tinturas.⁵² O ácido gálico é comumente utilizado na indústria farmacêutica, pois muitos estudos in vivo e in vitro em humanos, animais, e de cultura de células têm fornecido evidências para as seguintes ações de ácido gálico: (1) mostra uma citotoxicidade contra células cancerosas, sem prejudicar as saudáveis;⁵³ (2) pode ser usado para tratar albuminúria e diabetes;⁵⁴ (3) ainda exibe potencial para ser um antifúngica e ter propriedades antivirais;⁵⁵ (4) usado como antioxidante, ajuda a proteger as células contra danos oxidativos humanos;⁵⁶ (5) pode ser utilizado como um adstringente remoto em casos de hemorragia interna⁵⁷ e (6) utilizados para tratar hemorróidas externas.⁵⁸

Mais especificamente como aplicação anti-tumoral, Kawada e colaboradores⁵⁹ mostraram que o ácido gálico pode induzir morte em linhagens celulares de câncer de pulmão humano. Associado com a cisplatina, o ácido gálico apresentou um aumento na morte das células tumorais, quando comparado ao tratamento apenas com cisplatina. Esses estudos mostram que uma combinação do ácido gálico com outros fármacos que apresentam atividade antitumoral, pode ser mais efetiva do que o tratamento isolado. Ainda neste contexto, Sakaguchi e colaboradores⁶⁰ mostraram que derivados do ácido gálico apresentaram maior citotoxicidade do que o ácido gálico sozinho, em algumas linhagens

cancerosas. Esses derivados inibem a proliferação celular em cultura de células de tumor metastático, como melanoma, mastócito e linfoma.⁶¹

1.4.1. Ácido gálico: aspectos estruturais e interações com íons metálicos

Grande parte das aplicações citadas acima está relacionada com a estrutura molecular do ácido gálico, tanto em sua função de estabilizar um radical fenoxil por ressonância, gerado pela doação do hidrogênio fenólico, quanto a sua função de interagir com metais, fazendo desta molécula um potencial quelante.

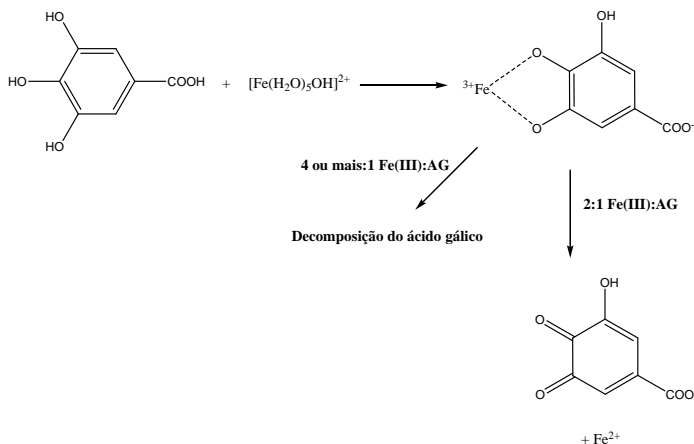
Análises conformacionais por métodos *ab initio* (otimização da geometria da molécula e cálculo de suas frequências vibracionais, por meio de métodos computacionais), mostram que as energias calculadas para o ácido gálico e moléculas similares sugerem uma clara preferência por uma geometria planar em um sistema completamente conjugado.^{62,63} Segundo estes estudos, esta preferência pela planaridade é previsível, uma vez que favorece o deslocamento de elétrons através de um sistema p expandido. Esta estabilidade molecular por deslocamento de elétrons em sistemas p conjugados, está fortemente correlacionada à capacidade antioxidante do ácido gálico, principalmente no que diz respeito à estabilização do radical fenoxil. Mesmo estudos iniciais sobre a relação estrutura/atividade de ácidos gálicos e derivados terem se concentrado na importância dos grupamentos fenólicos, indicando ser este um grupo importante tanto na estabilização de radicais livres⁶⁴ quanto na complexação de metais,⁶⁵ a função do grupo carboxílico deve também ser avaliada.

Em relação à complexação do ácido gálico por metais, estudos realizados sobre o grupo carboxílico têm demonstrado sua participação nessas reações,⁶⁶ uma vez que essa interação tende a ser facilitada em meio neutro ou levemente alcalino. Estudos espectroscópicos por UV e IR realizados por estes autores confirmam a existência de estruturas metal:AG, nas proporções 1:1 (no caso do metal Pb^{2+}), 1:2 (no caso dos metais Cu^{2+} e Zn^{2+}), 2:1 (também no caso dos metais Pb^{2+} e Cu^{2+}) e 1:3 (no caso de Al^{3+}); vale lembrar que a estequiometria da interação depende de condições específicas como temperatura, pH e concentração do ligante e do metal.

Em relação aos grupamentos fenolatos, estudos revelam que a interação ocorre com metais trivalentes em valores de pH neutro e alcalino, na proporção de 1:2 e 1:3. Com metais divalentes citados anteriormente, a interação 1:1 é predominante até pH elevado, ainda

podendo formar espécies 1:2 mistas, um centro mononuclear coordenado pelo carboxilato em uma molécula e pelos fenolatos de outra. É cabível argumentar que os diversos estudos da interação do ácido gálico com diferentes metais demonstram justamente que extrapolações de um complexo para outro não podem ser utilizadas, no que diz respeito ao sítio ligante e aos mecanismos de complexação, posto que a natureza do complexo varia com o íon considerado.

Por fim, vale mencionar que a capacidade do ácido gálico em interagir com metais trivalentes como Fe(III) e Al(III) depende da concentração deste metal. Conforme reportado por Deiana,⁶⁷ o ácido gálico é capaz de reduzir Fe(III), formando o-quinona ou decompondo-se completamente. A literatura relata ainda uma decomposição gradual de complexos M(III)-AG, conforme o mecanismo proposto no Esquema 6.



Esquema 6: Produtos de interação do ácido gálico com Fe(III) aumentando a relação molar do íon metálico.

1.5. Objetivos do trabalho

Com a finalidade de se obter informações e entendimento acerca da caracterização estrutural da melanina natural extraída do cabelo (*eumelanina*), sua afinidade pelo íon Fe(III), e a competição dessas interações em presença de ácido gálico, visando aplicações anti-câncer, este trabalho tem os objetivos específicos:

- Extração da melanina natural (*eumelanina*) do cabelo preto pelo método de Prota modificado.
- Caracterização da *eumelanina* no estado sólido por análise elementar CHN, espectroscopia de infravermelho e análise da morfologia por microscopia eletrônica de força de campo. Caracterização em solução por titulação potenciométrica (determinação dos pKa's), espectroscopia de infravermelho por refletância e eletroquímica (voltametria cíclica e onda quadrada). Cálculos computacional dos principais grupamentos presentes.
- Medir as interações do íon Fe(III) com a *eumelanina*, por titulação potenciométrica e calcular a distribuição das interações em função do pH.
- Isolar o complexo Fe(III)-*eumelanina* no estado sólido e caracterizá-lo por espectroscopia de infravermelho e EPR, comparando com os resultados obtidos em solução. Efetuar os cálculos de simulação computacional das interações detectadas no estado sólido e em solução.
- Estudar o comportamento do ácido gálico em solução por titulação potenciométrica, espectrofotométrica e por voltametria cíclica e de onda quadrada.
- Realizar titulações potenciométricas do ácido gálico em presença de Fe(III) para calcular as constantes de formação das espécies do complexo Fe(III)-AG em solução.
- Calcular a distribuição das espécies do sistema ternário Fe(III)-AG-*eumelanina* e avaliar as interações em função do pH, determinando onde a complexação do íon Fe(III) é mais favorecida.

Capítulo II

Parte Experimental

2.1. Reagentes, metodologia e instrumentação

2.1.1. Reagentes utilizados no trabalho

Os reagentes, materiais, gases e solventes utilizados neste trabalho foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia e ausência de tratamentos especiais: ácido clorídrico 37% (Nuclear QMC Ltada), hidróxido de potássio livre de CO₂ em ampolas da Backer Dilut-It, argônio (White Martins), ftalato ácido de potássio (Reagen S.A.), EDTA dissódico (Vetec), dimetil sulfóxido e acetona P.A. (Nuclear QMC Ltada), cloreto de ferro(III) hexahidratado (Vetec), hidrogenio fosfato de sódio mono/di básico (Vetec), ácido gálico (Vetec), ditiotreitól extra puro (Sigma-Aldrich), protease K extra purificada (Sigma-Aldrich), papaína 99,8% (Sigma-Aldrich), triton X-100 (Sigma-Aldrich). Os seguintes reagentes deuterados foram utilizados para o experimento de infravermelho em solução: D₂O, DCl e NaOD 99,9% átomos D (Acros-Organics). Por sua vez, foram utilizados hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (recristalização em etanol), cabelo negro coletado de um doador caucasiano, e lavado exaustivamente com acetona para extração da *eumelanina*.

2.2. Metodologia e instrumentação

2.2.1. Análise elementar (CHNS)

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um analisador elementar de CHNS – Carlo Erba modelo E-1110, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC.

2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR 1600 com sistema de registro computadorizado, na região de 4000 a 400cm⁻¹, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. As amostras de melanina pura, em presença do metal e do sistema ternário, foram analisadas em pastilhas de KBr.

2.2.3. Espectroscopia de Infravermelho por Refletância

A espectroscopia de Reflexão Interna ou Refletância Total Atenuada (ATR) é uma técnica utilizada para se obter espectros no infravermelho de amostras como: pastas, adesivos e pó que não podem ser analisados pelos métodos normais, como filmes e amostras em solução.

O princípio deste tipo de espectroscopia baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão. A fração do feixe de luz incidente que é refletida, aumenta conforme o ângulo de incidência. E quando excede a um determinado ângulo crítico, a reflexão é completa. No ponto de reflexão (de acordo com observações experimentais), o feixe atua como se penetrasse uma pequena distância dentro da amostra. A profundidade de penetração (dp) é dada pela equação abaixo:

$$dp = \frac{\lambda}{\left\{2\pi n_1 [\text{sen}^2(\theta) - (n_2/n_1)^2]^{1/2}\right\}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

n_1 = índice de refração (cristal ATR);

n_2 = índice de refração (amostra);

θ = o ângulo de incidência;

λ = o comprimento de onda da radiação.

A radiação de penetração é chamada onda evanescente. Se a amostra absorve em certo comprimento de onda evanescente, há uma atenuação do feixe a comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção no infravermelho, originando o espectro.

Em nosso trabalho utilizou-se a técnica de ATR para detectar a desprotonação dos grupamentos carboxílicos na molécula de melanina, evidenciando assim este grupo e seu respectivo pKa. Uma quantidade de 5mg de *eumelanina* foi dissolvida em uma solução de D₂O em um banho ultra-sonico, e seu pH ajustado para 7, com uma solução 0,001 de NaOD. Alíquotas de 20µL de DCI foram adicionadas à solução. E à cada adição foi registrado um espectro. No final, montou-se um gráfico pH vs intensidade para obtenção do respectivo pKa.

2.2.4. Microscopia Eletrônica de Força de Campo (FEG)

Microscopia eletrônica de força de campo (FEG) foi aplicada para o estudo nanomolecular e morfológico da estrutura da melanina isolada, comparando com outras encontradas na literatura. A vantagem deste tipo de microscopia está no filamento utilizado para a descarga do feixe de elétrons na amostra. Na microscopia de varredura (comumente utilizada) utiliza-se filamento de tungstênio. E na força de campo utiliza-se o chamado “Field Emission Gun”. Em aplicações onde o alto brilho da fonte não é muito necessário, como para médios aumentos (na faixa de 10.000 vezes e que são os aumentos normalmente usados para a análise de materiais), e onde se deseja um feixe bastante estável (caso da micro-análise), o filamento de tungstênio pode ser considerado como a melhor opção de fonte⁷⁰.

Em nosso caso, estaria viável o uso do MEV, pois se adequa bem à micro-análise. Mas o aumento de cerca de 50-200 mil vezes necessita o uso do FEG que dispõe altos brilhos da fonte e melhor resolução de imagem.

As amostras serão colocadas em “stubs” e fixadas com cola prata. Após a secagem, será recoberta com ouro para a análise no microscópio eletrônico marca Phillips, modelo XL 30 no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

2.2.5. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Também conhecida como ressonância de spin eletrônico, a ressonância paramagnética eletrônica (EPR) é o nome dado ao processo de absorção de microondas por átomos, íons ou moléculas paramagnéticas, com no mínimo um elétron desemparelhado, em presença de um campo magnético. Esta técnica tem por objetivo mapear a distribuição de elétrons desemparelhados de uma molécula, fornecendo várias informações sobre os estados de spin nos mais diversos sítios paramagnéticos.

A energia, devido à interação do momento magnético do elétron desemparelhado com o campo magnético externo, é descrita pela equação 2:

$$E = g \cdot \mu_B \cdot B \cdot m_s \text{ (Equação 2)}$$

Onde,
E = energia

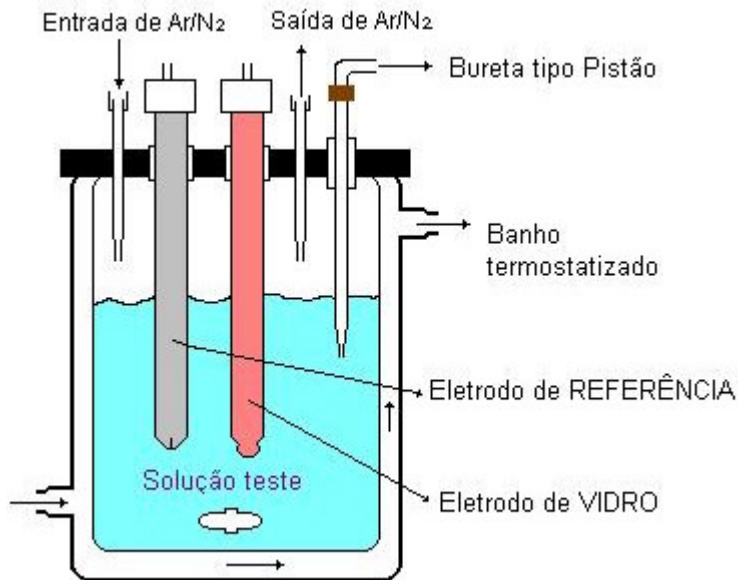
g = constante conhecida como fator g , para o elétron livre g_e é igual a 2,0023
 μ_b = magnéton de Bohr para o elétron ($9,2740154 \times 10^{-24}$ J.T⁻¹)
 m_s = número quântico de spin

Para as aquisições dos espectros de EPR, uma quantidade das amostras é colocada dentro de uma cavidade cujas dimensões são ajustadas. E em seguida, a amostra é submetida à radiação de microondas com frequência fixa e conhecida. O fluxo do campo magnético aplicado é modificado, provocando uma variação de energia até ocorrer ressonância e também a transição de spin com a absorção de energia, que é detectada pelo equipamento.

2.2.6. Titulações Potenciométricas

A técnica de titulação potenciométrica é muito empregada para estudos de medidas de equilíbrio de complexos metálicos em solução. O eletrodo de vidro é utilizado nas medidas de concentração de íons hidrogênio. Nesse tipo de titulação, adiciona-se uma base padronizada, em incrementos de volume conhecidos, a um sistema contendo um ligante conhecido na ausência ou na presença do íon metálico. A potenciometria nos fornece as espécies formadas em solução. Para comprovação das espécies detectadas, utilizam-se medidas espectroscópicas como absorbâncias espectrofotométricas ou ressonância magnética nuclear.

Os experimentos foram realizados em sistema aquoso devido à solubilidade do ligante e dos complexos formados na faixa de pH estudada. Cada sistema em consideração foi estudado em uma célula termostatizada a $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$ refrigerada mecanicamente por um banho de circulação termostatizado (Microquímica Ind. Com. Ltda), utilizando um titulador automatizado da Metrohm modelo Titrino Plus 848 acoplado com um eletrodo de vidro e outro de referência do tipo Ag-AgCl e calibrados na célula com soluções diluídas de HCl para a leitura direta do pH ($\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$) (Esquema 6).



Esquema 7: Cela termostatazada utilizada nos experimentos de titulação potenciométrica realizados neste trabalho.

As medidas foram feitas indiretamente devido à baixa solubilidade da melanina e dos complexos formados em pH abaixo de quatro; com soluções contendo 10mg de *eumelanina* em ausência e presença de Fe(III); 17,8 mg de ácido gálico em presença e ausência de 2:1 ligante:metal de Fe(III) e na proporção 1:1:1 eumelanina : AG : Fe(III), sendo utilizada força iônica ajustada para 0,100 mol.L⁻¹ com KCl, sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO₂ atmosférico. As soluções foram preparadas com água (bidestilada previamente na presença de KMnO₄ e fervida). As soluções tituladas tiveram os pHs ajustados próximos de 12 com adição de uma solução padrão de KOH 0,100 mol.L⁻¹ isenta de CO₂. As titulações foram realizadas com uma solução padrão de HCl 0,100mol.L⁻¹ com adição de alíquotas de 0,1mL até pH ~ 4 com o auxílio da microbureta acoplada ao titulador. As adições sucessivas de ácido foram realizadas após a obtenção de valores constantes de pH (quando o equilíbrio é alcançado).

O pK_w da água contendo 0,100 mol.L⁻¹ de KCl utilizado para os cálculos é de 13,78⁶⁹.

No arquivo de entrada para o cálculo das constantes de estabilidade dos sistemas em estudo, envolvendo metal, necessita-se fornecer as constantes de hidrólise do metal. Foram utilizados os valores calculados para as condições experimentais deste trabalho, conforme Baes.⁶⁸ A solução metálica de Fe(III) foi preparada a partir do sal metálico comercial e padronizada por titulação com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).⁶⁹ No frasco contendo o metal trivalente, foi adicionado ácido clorídrico para evitar a hidrólise. O excesso de ácido foi determinado pelo método de Gran's.⁷²

As titulações foram realizadas em triplicata e os valores apresentados referem-se à média dos experimentos. As constantes foram calculadas com o programa BEST7 e os diagramas de distribuição de espécies presentes em solução, em função do pH, foram obtidos com o programa SPECIES⁷³. O programa BEST7 utiliza curvas de titulação para determinar as constantes de estabilidade e/ou as constantes de protonação dos ligantes e complexos, bem como a correta concentração do ligante utilizado. A entrada de dados para o programa consiste em fornecer o número de milimoles de cada componente, as constantes de equilíbrio inicialmente estimadas de todas as espécies que podem ser formadas a partir dos componentes da solução, e o perfil de pH determinado experimentalmente *versus* a composição da solução (HCl adicionado). O programa emprega equações de balanço de massa para todas as espécies presentes a cada incremento de ácido adicionado e resolve a concentração de cada espécie presente. As espécies sugeridas são aquelas adquiridas ou observadas a partir de evidências espectrofotométricas e que podem ser justificadas com base em princípios estabelecidos na química de coordenação em solução. Convencionalmente, este programa emprega constantes globais de protonação e de formação de complexos metálicos, designadas por β .

Nos cálculos, deve-se sempre buscar a minimização do desvio padrão (ajuste s) do sistema entre os valores experimentais de pH encontrados na titulação e os calculados. O desvio padrão é calculado como um fator de peso de modo a aumentar a sensibilidade dos cálculos computacionais nas regiões de tamponamento do sistema, e diminuir a importância das inflexões.⁷³

2.2.7. Titulação espectrofotométrica

A titulação é acompanhada pelas mudanças ocorridas no espectro eletrônico do ácido gálico, na região entre 200 e 500nm, com o aumento

contínuo do pH do meio. O experimento foi realizado em um equipamento Varian modelo CARY 50BIO no Laboratório de Catálise Biomimética - Departamento de Química da UFSC, acoplado com uma sonda em solução.

As titulações foram realizadas em solução aquosa, sob atmosfera inerte. Trabalhou-se em uma temperatura constante de 25°C, controlada pela circulação de água termostaticada. Diluiu-se 0,1mmol de ácido gálico em 100mL de água bidestilada e fervida, utilizou-se KOH 2M como titulante, adicionaram-se alíquotas de 20µL à solução, e a leitura do pH foi feita após estabilização do equilíbrio. As determinações dos pKa's foram realizadas pelo método gráfico (pH vs intensidade).

2.2.8. Eletroquímica

As investigações de espécies redox da melanina foram realizadas utilizando voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada em um potenciostato-galvanostato PAR modelo 273, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Os experimentos foram realizados em solução de dimetilsulfóxido, sob atmosfera de argônio à temperatura ambiente. Neste experimento foram utilizados hexafluorofosfato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte e uma célula eletrolítica com três eletrodos: eletrodo de trabalho – carbono vítreo, eletrodo auxiliar – platina e eletrodo de referência – Ag/Ag⁺. Para calibrar o eletrodo de referência, utilizou-se o ferroceno como padrão interno.⁷⁴

2.2.9. Cálculos Teóricos

Os cálculos de estrutura eletrônica para os ligantes e os complexos de ferro (III), incluindo otimizações de geometria e as frequências de alongamento, foram realizados empregando a Teoria da Funcional da Densidade, empregando o funcional de correlação de Becke e de troca de Perdew, BP86, em conformação com as bases TZVP⁷⁵⁻⁷⁸. Os cálculos teóricos foram realizados utilizando o software Gaussian03.⁷⁹ Os cálculos foram realizados nas dependências do Grupo de Estrutura Eletrônica Molecular do departamento de Química da UFSC, sob orientação do Prof. Dr. Giovanni Finoto Caramori.

2.2.10. Extração da *eumelanina* do cabelo

A extração da melanina natural do cabelo (*eumelanina*) foi realizada pelo método enzimático de Prota¹⁰, com pequenas modificações, e é descrita a seguir:

um montante de 4g de cabelo (lavado com acetona para retirada de possíveis contaminantes naturais e óleos) foi inicialmente homogeneizado em 50mL de um tampão fosfato 0,1M pH 7,5 e submetido aos seguintes tratamentos:

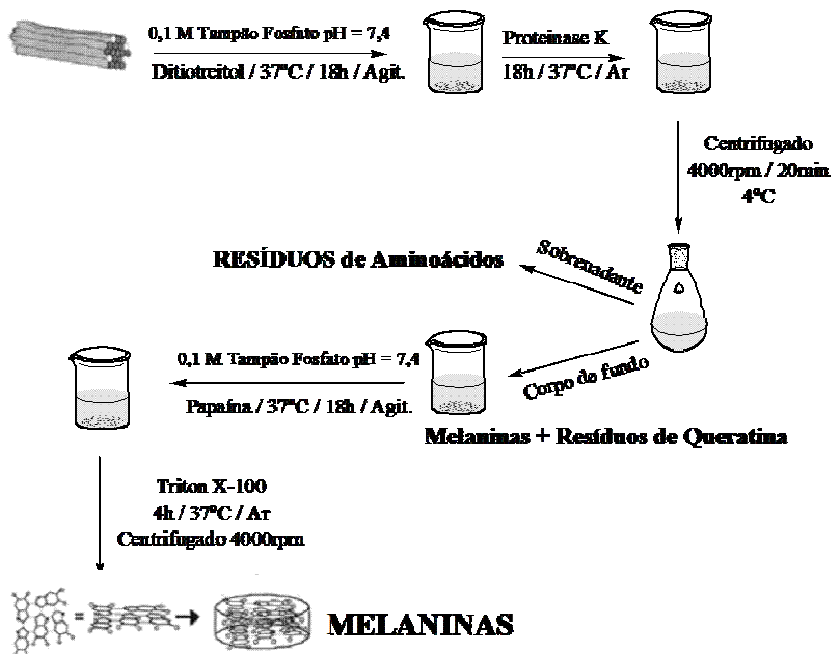
(I) 1g de Ditiotriteritol foi adicionado ficando sob agitação em 37°C em atmosfera inerte de argônio durante 18horas. 50mg de Protease K e mais 0,2g de Ditiotriteritol foram adicionadas e o sistema ficou mais 18horas em agitação. A mistura resultante foi centrifugada durante 30minutos(3300rpm) a 4°C.

(II) O corpo de fundo foi lavado com água e colocado em 30mL de uma solução tampão fosfato 0,1M e adicionados 100mg de papaína. A mistura ficou sob agitação durante 18horas, sob atmosfera de argônio. Novamente foi centrifugada a mistura.

(III) A suspensão preta foi coletada após lavagem e colocada novamente em 30ml do tampão, foram adicionados mais 100mg de protease K e cerca de 200mg ditiotriteritol. E novamente colocada sob 18horas de agitação em atmosfera inerte.

(IV) A suspensão preta foi novamente centrifugada e colocada em 30ml de tampão fosfato, e todo oxigênio presente retirado com argônio. Na solução livre de oxigênio foi adicionado TRITON X-100 no valor de 1% m/v da concentração final e ficou sobre agitação durante 4 horas, mistura centrifugada (2500rpm).

Após lavagem com MeOH e água, a suspensão foi tratada como no item (III). O pigmento final foi coletado, centrifugado e seco com NaOH uma noite, repousando com CaCl₂ por 24horas para posteriores análises e experimentos. O Esquema 8 apresenta as etapas de extração com seus produtos e subprodutos.



Esquema 8: Etapas da extração da *eumelanina* do cabelo

2.2.11. Preparação dos complexos de Fe(III)-(*eumelanina*)

Os complexos de Fe(III)-(*eumelanina*) foram preparados analogamente aos M(II)-(*feomelaninas*) descritos por Bilinska⁴¹ e colaboradores, com pequenas modificações. 100mg de *eumelanina* foram homogeneizadas em H₂O bidestilada e fervida e ultrassonicado a 80°C por 15 minutos, adicionaram-se 10mL de uma solução de Fe(III) 0,01M e controlou-se o pH com HCl e NaOH 0,1M. Este procedimento foi repetido em diversos valores de pH, deixando-se a mistura sobre vigorosa agitação por 24h, para haver a interação necessária. E o produto foi isolado posteriormente para realização das análises. O complexo Fe(III)-*eumelanina* foi precipitado a 0°C em um banho de gelo, após o tempo de reação.

Capítulo III

**Resultado e Discussão: Extração e
Caracterização da *eumelanina* do
cabelo e sua afinidade por Fe(III)**

3.1. Caracterização da *eumelanina* extraída do cabelo

3.1.1. Análise elementar (CHNS)

Antes de qualquer outro tipo de estudo ou aplicação de melaninas extraídas de fontes naturais, é preciso garantir seu grau de pureza, visto a complexidade da sua matriz e a gama de enzimas envolvidas na melanogênese.⁹ A análise de CHNS nos ajuda em dois aspectos: o primeiro, na análise da ausência de enxofre na amostra, tendo em vista que enzimas envolvidas no processo de produção possuem grupos cisteínicos¹⁰ garantindo que o oligômero isolado está livre de contaminantes contendo enxofre, como os próprios reagentes utilizados na extração. O segundo aspecto é a análise quantitativa, que nos permite comparar a melanina extraída do cabelo com outras fontes de *eumelanina* descritas na literatura. Mesmo que haja diferença nas unidades monoméricas formadoras das melaninas, ainda haverá quantidades semelhantes de carbono, nitrogênio e oxigênio. A Tabela 4 apresenta os teores desses átomos no oligômero extraído.

Tabela 4: Teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio para *eumelanina* extraída do cabelo

<i>Valores em % de C,H,N</i>		
<i>Carbono</i>	<i>Hidrogênio</i>	<i>Nitrogênio</i>
70,12	3,88	8,90
% DP*		
0,91	0,70	1,31

* % de desvio padrão das análises

Resultados semelhantes são reportados por Mosca¹² e Sarna²⁸ para *eumelaninas* puras extraídas da pele e do cérebro, respectivamente. Vale ainda lembrar que a pureza do pigmento, bem como a natureza do oligômero, varia de cabelo para cabelo e ainda de acordo com as condições experimentais de extração e purificação.

3.1.2. Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de infravermelho da melanina natural (*eumelanina*) extraída do cabelo é mostrado na Figura 17.

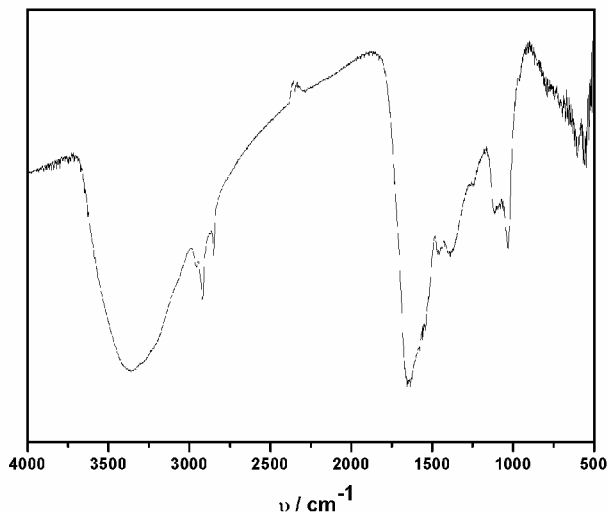


Figura 9: Espectro de infravermelho da eumelanina extraída do cabelo pelo método de Prota modificado. Pastilha de KBr.

As principais bandas de absorção responsáveis pela caracterização da *eumelanina* são: banda alargada em 3365cm^{-1} relativa ao estiramento $\nu\text{O-H}$, e uma outra com intensidade elevada em 1664cm^{-1} , atribuída ao $\nu\text{C=O}$. A razão da grande intensidade deve-se ao fato que são os três grupamentos majoritários presentes na melanina que exibem esses grupamentos funcionais característicos. Ainda vale lembrar que a ausência de ombros na banda característica dos grupamentos carbonila nos indica que os grupamentos carboxilatos encontram-se protonados.⁸⁰ Ainda notam-se duas bandas próximas, de fraca intensidade, em 1490 e 1400cm^{-1} , características das vibrações $\nu\text{C=C}$ aromático e $\nu\text{C=N}$ de grupamentos imínicos presentes em anéis heterocíclicos, também presentes em moléculas derivadas da *o*-hidroxiquinolina,⁸⁰ aqui caracterizada pelos grupamentos quinona-imina. Por fim destacamos uma banda de média intensidade em 1050cm^{-1} que é mencionada por Bilinska e colaboradores,⁴¹ atribuída a anéis aromáticos substituídos

também presentes em sistemas macromoleculares como substâncias húmicas, e ainda a sobreposição de um estiramento $\nu\text{C-O}$, encontrado em *eumelaninas* extraídas do cérebro.

3.1.3. Microscopia Eletrônica de Força de Campo

A morfologia que assume as *eumelaninas* é outra forma importante de caracterização, pois se podem comparar melaninas extraídas de outras fontes. Simon e colaboradores⁸¹ realizaram os primeiros trabalhos de microscopia eletrônica de melaninas extraídas da pele e de animais marinhos. Comparando com melaninas DHI sintéticas, foi observada a diferença discrepante entre as duas morfologias. Enquanto as melaninas sintéticas se agregam em camadas amorfas, as *eumelaninas* extraídas de *Sepia officinalis* apresentam-se em pequenas esferas de 50-100nm, devido à limitação da microscopia eletrônica de varredura, não se podendo avaliar sua morfologia com um aumento maior. Com a microscopia eletrônica de força (Field Emission Gun) de campo, é possível um grande aumento sem perda significativa de resolução da imagem. As imagens de FEG das *eumelaninas* extraídas do cabelo estão apresentadas na Figura 10.

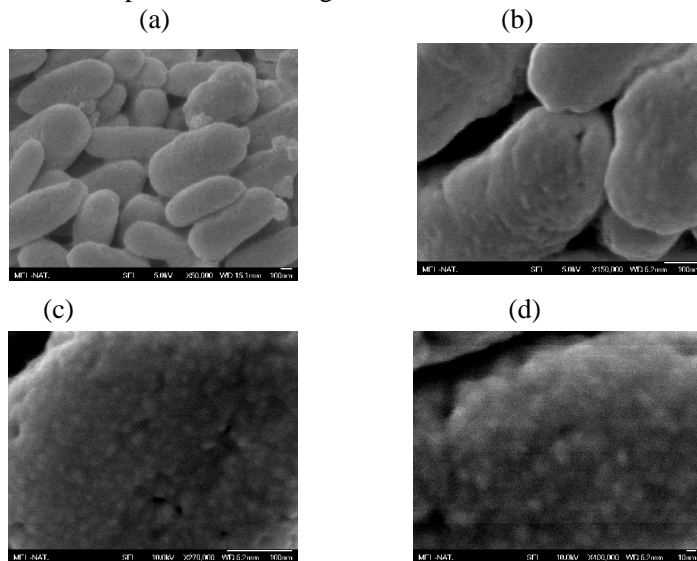


Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica de força de campo para as eumelaninas, aumento de (a) 50000, (b) 150000, (c) 270000 e (d) 400000 vezes.

Observa-se uma morfologia diferenciada em relação às publicadas por Simon em trabalhos anteriores. As *eumelaninas* extraídas do cabelo apresentam-se na forma de bastonetes com tamanhos que variam de 0,5 até 1 μm (Figura 18 a,b). Entretanto, pode-se ver que com aumentos maiores nota-se a presença de nanobastonetes na estrutura maior (Figura 18 c,d) com tamanhos em torno de 10nm. Morfologia semelhante foi observada por Chio,⁸² que realizou trabalhos com *eumelaninas* extraídas da pele. Pode-se com essa análise observar que diferentes tipos de melaninas exibem morfologias diferentes em escala micrométrica, mas em escala nanométrica as melaninas extraídas de fontes naturais exibem formas semelhantes.

3.1.4. Eletroquímica

O comportamento eletroquímico das *eumelaninas* foi avaliado por voltametria cíclica e de onda quadrada. O voltamograma cíclico é apresentado na Figura 11.

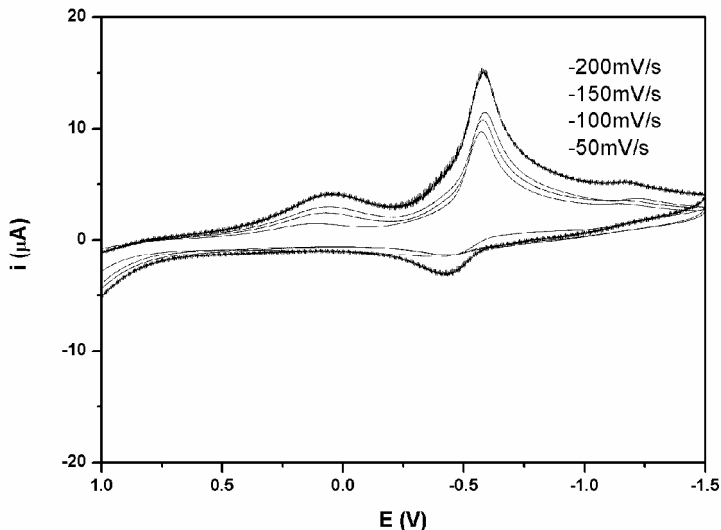


Figura 11: Voltamogramas cíclicos da *eumelanina* extraída do cabelo, obtidos a diferentes velocidades de varredura em DMSO, a 25°C. Eletrólito suporte: 0,1mol.L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺, contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: Fc/Fc⁺.

Com base no comportamento da variação da corrente de cada pico (i_p) em função da velocidade de varredura (v) (curvas i_p vs. $v^{1/2}$), as reações redox evidenciadas neste trabalho foram caracterizadas como quase-reversíveis e irreversíveis, de acordo com a equação de Randles-Sevcik (Equação 3).⁸³

$$i_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: i_p é a corrente do pico em A
 n é o número de elétrons envolvidos na semi-reação
 A é a área do eletrodo em cm^2
 D refere-se ao coeficiente de difusão em cm^2/s
 C é a concentração em mol/cm^3
 V é a velocidade de varredura em V/s

O voltamograma cíclico evidencia dois processos distintos: um irreversível com $E_{pc} = 55\text{mV}$ vs NHE atribuído à formação de uma espécie semi-quinona, e outro, que exibe um aumento na reversibilidade com o aumento da velocidade de varredura com $E_{1/2} = -479\text{mV}$ vs NHE atribuído ao par redox semi-quinona/quinona. Esse processo reforça as evidências da presença de grupamentos catecol como uma das subunidades monoméricas presentes nas *eumelaninas*.

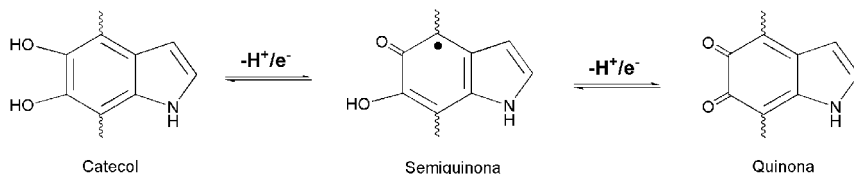


Figura 12: Processos redox elucidando a formação eletroquímica de quinonas, e comprovando a existência de grupamentos catecol como precursores das *eumelaninas*.

Para cada corrida eletroquímica, limpou-se o eletrodo de trabalho para a posterior análise. Um processo bastante utilizado para realizar o estudo de espécies eletroquimicamente estáveis é realizar uma corrida com o eletrodo sujo. A Figura 21 apresenta o voltamograma cíclico da *eumelanina* com o eletrodo sem limpeza entre as corridas.

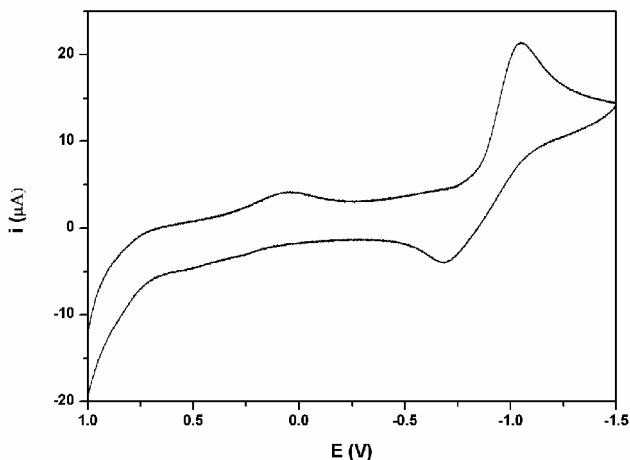


Figura 13: Voltamograma cíclico da *eumelanina* extraída do cabelo sem limpeza de eletrodo, obtidos a 100mV/s em DMSO, a 25°C. Eletrólito suporte: 0,1mol.L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺, contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: Fc/Fc⁺.

Observa-se na Figura 21 em comparação com os voltamogramas da Figura 19, uma diminuição na intensidade do processo redox atribuído à formação de semi-quinona e um aumento de intensidade seguido de um deslocamento do E_{pc} referente ao processo semi-quinona/quinona. Essas modificações são atribuídas a espécies eletroquimicamente estáveis depositadas na superfície do eletrodo de trabalho.

Processos semelhantes são evidenciados em melaninas sintéticas derivadas da L-Dopa⁴⁰, evidenciando também a formação de semi-quinonas. Vale salientar que estudos redox envolvendo *feomelaninas* elucidam potenciais de meia onda menores que os encontrados neste trabalho, sendo assim mostrando sua fraca atuação como anti-oxidante, tornando o indivíduo com grandes quantidades de *feomelanina* sujeito mais facilmente a danos oxidativos na pele e no cabelo.

Para comprovação dos processos redox envolvendo as eumelaninas foi realizada também voltametria de onda quadrada. O voltamograma é apresentado na Figura 14.

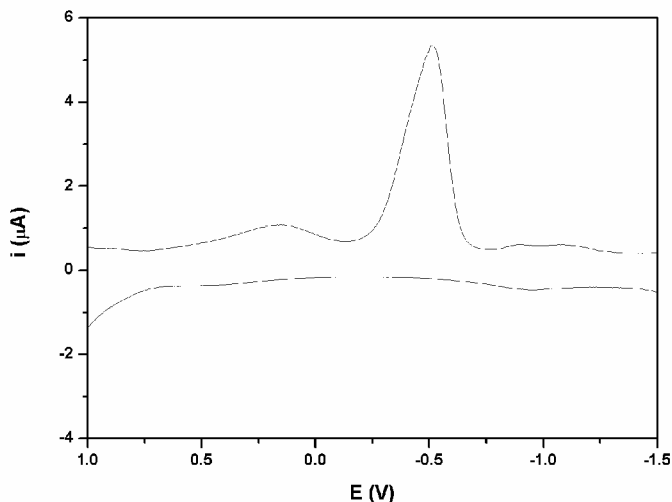


Figura 14: Voltamograma de onda quadrada da *eumalnina*, obtidos em DMSO, a 25°C. Eletrólito suporte: 0,1mol.L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺, contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: Fc/Fc⁺.

Observam-se duas ondas: a primeira com $E_{pr} = 50\text{mV}$ vs NHE, correspondente à formação da semi-quinona também evidenciada por voltametria cíclica, e a segunda com $E_{pr} = -499\text{mV}$ vs NHE relativa ao par semi-quinona/quinona. Nota-se também a assimetria da onda. Farmer e colaboradores⁴¹ associam esse fenômeno a processos redox múltiplos envolvendo oligômeros com quantidades diferentes de monômeros. No caso das melaninas, este estudo nos leva a ter mais uma prova que a molécula se agrega em unidades mensuráveis e não em polímeros de cadeia longa.

3.1.5. Estudos potenciométricos de equilíbrio

O estudo dos equilíbrios das *eumelaninas* é de suma importância para que possamos entender de que forma a molécula se comporta em solução, visto que dependendo da forma que a molécula se encontra é suscetível a mudanças de propriedades físicas e químicas como, por exemplo, diferentes atividades redoxes e diferentes modos de coordenação com íons metálicos. A Figura 15 mostra a curva de titulação da *eumelanina*.

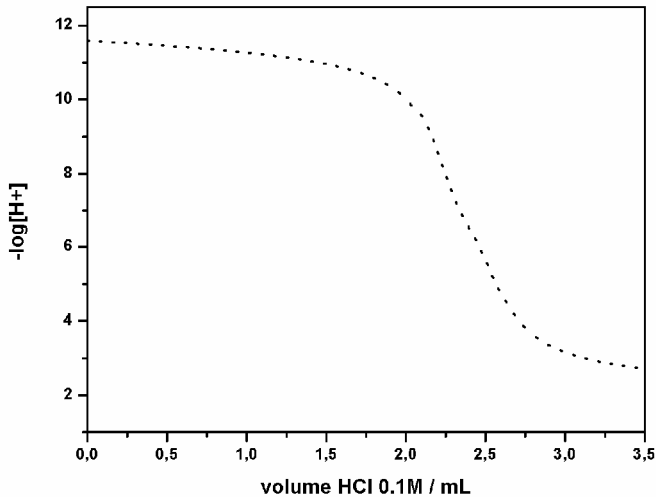


Figura 15: Curva de titulação potenciométrica reversa da eumelanina sob atmosfera inerte. $T = 25^{\circ}\text{C}$, $\mu = 0,1 \text{ KCl}$, eletrodo de vidro combinado.

Observam-se duas regiões tamponadas bem definidas e um tampão discreto. A região com valores de pH entre 10 e 12 é atribuída à desprotonação do grupo Catecol (Cat). E em valores de pH entre 3 e 5, a região tamponada é devida à desprotonação dos grupos Acéticos (Ac). Já a região tamponada discreta em pH próximo de 6 é atribuída ao tautômero quinona-imina (QI) evidenciado por Szpoganicz e colaboradores, nas melaninas sintéticas DHI.¹¹ A Tabela 5 mostra os valores de pKa calculados com o programa Best 7 para as *eumelaninas* levando em consideração as regiões tamponadas e grupos presentes no sistema.

Tabela 5: valores de pKa encontrados para a eumelanina extraída do cabelo.

<i>Equilíbrio</i>	<i>-LogKa*</i>
$\frac{[Ac^-][H^+]}{[HAc]}$	4,35 (0,10)
$\frac{[Qi^-][H^+]}{[HQi]}$	6,30 (0,08)
$\frac{[HCat^-][H^+]}{[H_2Cat]}$	10,50 (0,12)
$\frac{[Cat^{2-}][H^+]}{[H Cat^-]}$	12,81 (0,09)

* Valores obtidos pelas médias de três titulações, os valores em parênteses representam o desvio padrão de cada resultado.

Os valores de pKa dos grupamentos quinona-imina e catecol para o sistema *eumelanina* foram muito semelhantes aos encontrados por Szpoganicz e colaboradores para as melaninas sintéticas, fato este pode estar associado com o número de monômeros por unidade oligomérica de ambas as melaninas, isto é, mesmo possuindo morfologias diferentes as melaninas naturais extraídas do cabelo *eumelaninas* e as sintética DHI possuem quantidades de subunidades semelhantes.

A presença de quinona-imina também detectada pode sugerir uma explicação para a deposição de uma espécie estável no eletrodo de trabalho no estudo eletroquímico. Com a oxidação dos grupamentos catecol gerando quinonas, pode estar havendo a tautomerização agora não mais pelo catecol como apresentado na Figura 3, e sim pela quinona como apresentado na Figura 16, e com fundamentação teórica nos estudos de Szpoganicz em melaninas sintéticas DHI.

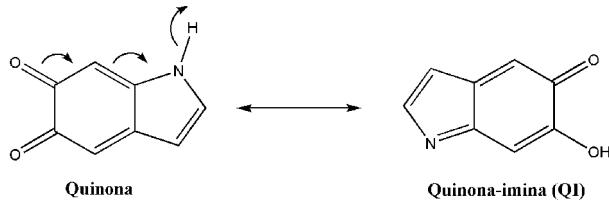


Figura 16: Possível tautomerização do grupamento quinona, gerando quinona-imina suportado por estudos potenciométricos e eletroquímicos.

A distribuição de espécies em função do pH para a *eumelanina* é apresentada na Figura 17.

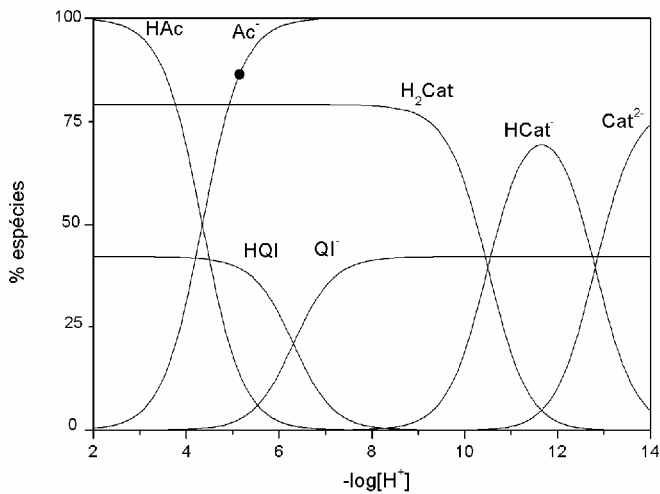
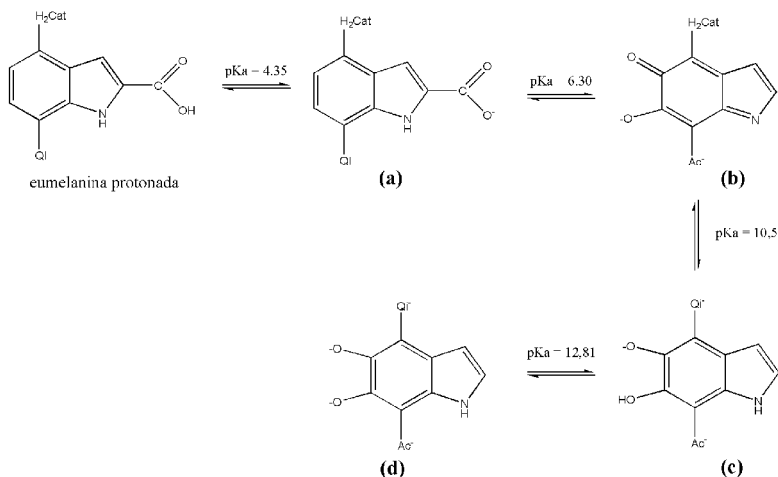


Figura 17: Curvas de distribuição dos grupos protonados e não protonados da *eumelanina* em função do pH, acetato = 1,98mmol, quinona-imina = 0,83mmol e catecol = 1,34mmol por grama de *eumelanina*.

A representação dos equilíbrios apresentados na curva de distribuição de espécies é mostrado no Esquema 9.



Esquema 9: Equilíbrios ácido/base presentes nas melaninas naturais “*eumelaninas*”.

3.1.6. Espectroscopia de Infravermelho por refletância

A prática de espectroscopia de infravermelho por refletância é bastante utilizada para caracterização de macromoléculas em solução. Nakamoto e colaboradores reportam a detecção de pKa's do EDTA, das interações com metais e de sistemas enzimáticos contendo grupamentos carboxílicos por infravermelho em solução. Vale salientar que o uso do D_2O no lugar da H_2O é possível observar no espectro de infravermelho bandas nas regiões de 4000-2900, 2000-1300 e 1100-900 cm^{-1} . Na prática, pode-se relacionar os resultados de determinação dos pKa's por titulação potenciométrica com os encontrados por infravermelho em solução.

Os espectros de infravermelho coletados variando o pD de 3 até 7,5 estão apresentados na Figura 18.

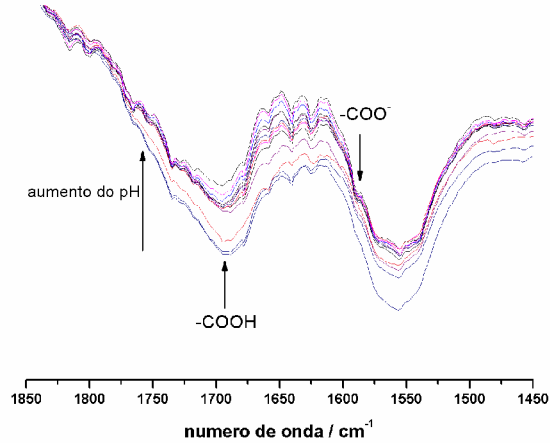


Figura 18: Espectros de infravermelho por refletância da *eumelanina*, variando-se o pD de 3 até 7,5 a temperatura ambiente.

Observa-se um decaimento da banda em 1680cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$, dos grupamentos presentes na *eumelanina* citados na sessão 3.1.2, com o aumento do pH da solução ocorre respectivamente uma diminuição da banda e a formação de um ombro em 1590cm^{-1} atribuído ao estiramento de grupamentos $\nu\text{C}=\text{O}$ de ácido carboxílico desprotonado, evidenciados por Nakamoto realizando estudos de equilíbrio do EDTA.⁸⁰ Este fato está associado à desprotonação dos grupamentos carboxílicos presentes na *eumelanina*. Foi realizado também a correlação entre intensidade do sinal em 1680cm^{-1} e o pD, a relação pH e pD é apresentada na Equações 3 e 4.⁸⁴

$$\text{pK}(\text{D}_2\text{O}) - \text{pK}(\text{H}_2\text{O}) = 0,41 + 0,020 \cdot \text{pK}(\text{H}_2\text{O}) \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{pD} - \text{pH} = 0,41 + 0,020 \cdot \text{pH} \quad (\text{Equação 5})$$

O gráfico correlacionando o pD com a intensidade da banda em 1680cm^{-1} é mostrado na Figura 19.

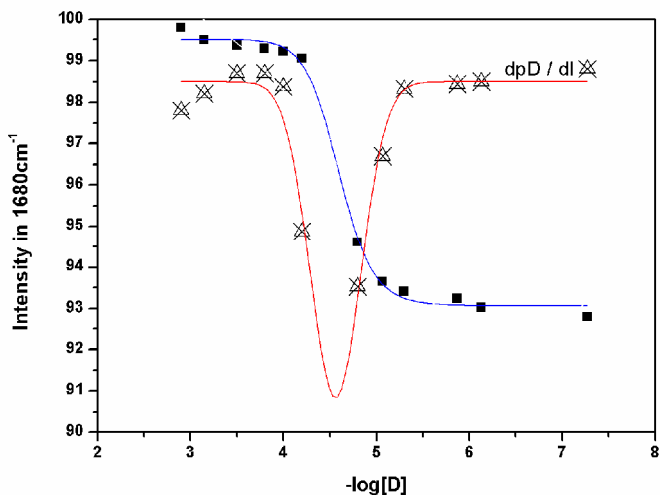


Figura 19: Curva mostrando a correlação entre intensidade em 1680cm^{-1} e pD , o triângulo representa a primeira derivada da concentração de D^+ em relação a intensidade.

Observa-se na Figura 19 uma curva de formato sigmoideal, também reportada por Nakamoto e colaboradores nesses sistemas.⁸⁰ Este formato de curva nos permite calcular o pK_D da espécie através da derivada primeira (gráfico em triângulo), o valor encontrado foi de 4,81. Aplicando a equação 4 pode-se chegar a um valor de $\text{pK}_a = 4,31$; o valor encontrado por titulação potenciométrica para o pK_a do grupamento carboxílico foi de 4,35. Vale lembrar também que o experimento de titulação por infravermelho foi realizado apenas uma vez, e não em triplicata como o potenciométrico devido a dificuldade da técnica.

3.1.7. Cálculos teóricos

As estruturas dos três grupos majoritários presentes na *eumelanina* (carboxílico, catecol e quinona-imina) foram otimizadas, e também realizado o estudo de espectroscopia vibracional, correlacionando com os dados experimentais. As estruturas otimizadas são apresentadas na Figura 20.

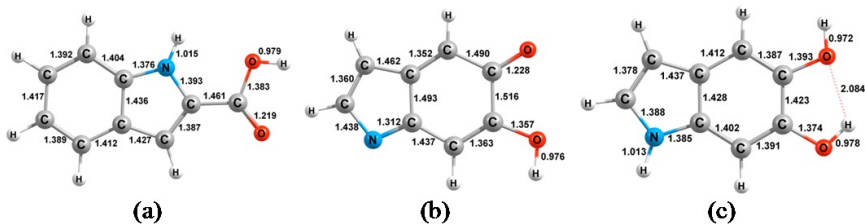


Figura 20: Estruturas otimizadas para os grupamentos majoritários presentes nas *eumelaninas*, onde: (a) representa o grupamento carboxílico, (b) quinona-imina e (c) catecol. As distâncias de ligação são apresentadas em angstroms.

Analisando a Figura 20 podemos tirar considerações importantes referentes a estrutura das *eumelaninas*. Observa-se que os quelantes terminais apresentam-se na forma planar, característica essa que favorece a complexação com centros metálicos. Ainda podemos comparar a distância de ligação carbono-nitrogênio dos grupamentos iminicos e observa-se uma distancia de $1,312\text{Å}$ nos grupamentos quinona-imina tendo um maior caráter de dupla ligação quando comparado com os grupamentos catecol e acetato observando distancias de $1,385$ e $1,376\text{Å}$ respectivamente; sendo assim com uma estrutura de mínimo podemos provar a existência do tautomero nas *eumelaninas* por otimização estrutural, estudo inédito na literatura.

Também para efeito de comparação com os resultados experimentais, foram simulados os espectros de infravermelho para as três estruturas otimizadas. Os espectros eletrônicos estão apresentados na Figura 21.

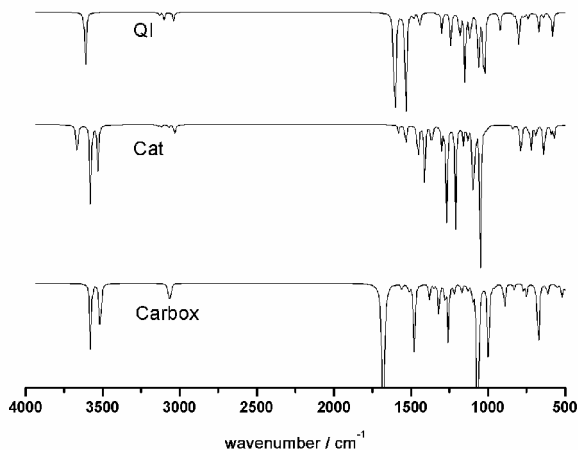


Figura 21: Espectros de infravermelho teóricos para os grupamentos majoritários presentes nas *eumelaninas*.

O espectro calculado para o grupamento quinona-imina apresenta um estiramento ν O-H em 3666cm^{-1} , seguido de dois pequenos picos em 3052 e 3088cm^{-1} , respectivamente, atribuídos as vibrações ν C-H de grupamentos indólicos, também apresenta bandas em 1605 e 1532cm^{-1} , representando estiramentos ν C=C e ν C=O respectivamente. Por último, e com grande importância o estiramento ν C-O em 1051cm^{-1} . Esses estiramentos são também evidenciados no espectro experimental caracterizando o grupamento em estudo.

O grupamento catecol apresenta uma banda característica da vibração ν O-H na molécula. Vimos novamente um pequeno estiramento em 3000cm^{-1} atribuído ao grupamento ν C-H do anel indólico, e uma pequena banda atribuída ao estiramento ν C=C do anel presente na molécula em 1532cm^{-1} . Por último, uma banda em 1052cm^{-1} atribuída ao estiramento ν C-O presente na molécula. Vale lembrar que no espectro experimental mostrado na sessão 3.1.2. a banda alargada em $1530\text{-}1688\text{cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento das ν C=O e não há contribuição dos grupos catecol para este estiramento, visto a ausência de carbonila em sua estrutura.

O último espectro simulado foi do grupo carboxílico. Observa-se uma banda relativa ao estiramento ν O-H em 3583cm^{-1} . O espectro exibe também vibrações fracas em ν 3020 cm^{-1} , relacionadas ao C-H do anel indólico. A banda com maior intensidade corresponde ao

$\nu\text{C=O}$ em 1681cm^{-1} , muito mais intensa que do grupamento quinonimina. E, por último, a vibração correspondente ao estiramento C-O em $\nu 1052\text{cm}^{-1}$. A Tabela 6 apresenta a comparação das principais frequências relacionadas aos estiramentos observados experimentalmente e calculados.

Em resumo, o espectro experimental exibe uma sobreposição de bandas relacionadas aos principais estiramentos relacionados com os três grupamentos majoritários presentes nas *eumelaninas*.

Tabela 6: Resumo das principais frequências experimentais e teóricas relacionadas com as principais bandas encontradas para a *eumelanina*.

<i>Grupamento</i>	<i>(v)</i>	<i>Teórico (cm⁻¹)</i>	<i>Experimental (cm⁻¹)</i>
Ac	(C=C)	-	
	(C-O)	1070	1051
	(C=O)	1614	1530-1688 (large)
QI	(C=C)	1532	1530-1688 (large)
	(C-O)	1022	1051
	(C=O)	1605	1530-1688 (large)
Cat	(C=C)	1532	1530-1688 (large)
	(C-O)	1052	1051

3.2. Caracterização das interações entre Fe(III) e *eumelaninas*

3.2.1. Titulação Potenciométrica

A curva de titulação da *eumelanina* em presença e na ausência do íon Fe(III) é mostrada na Figura 22.

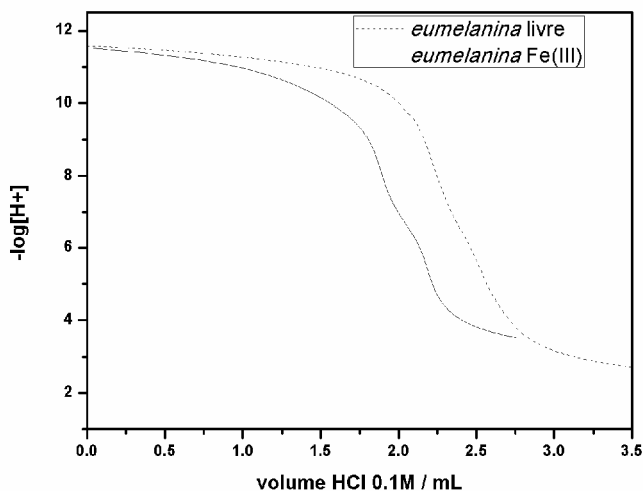


Figura 22: Curva de titulação da *eumelanina* livre e em presença de Fe(III) sob atmosfera inerte de argônio. T = 25°C, $\mu = 0,1$ KCl.

Como na melanina livre, observa-se na curva em presença do íon metálico três regiões tamponadas. O tampão em valores de pH acima de 10 é relativo a protonação do grupamento catecol; o que aparece entre os valores de pH 3 e 5 é devido ao grupamento carboxílico e um tampão discreto aparece em pH 6-7 referente ao grupo quinona-imina.

Observa-se o deslocamento da curva quando comparada a melanina livre, devido a complexação do íon Fe(III) por esses grupamentos. Observa-se também um aumento no tampão relativo aos grupamentos quinona-imina no sistema *eumelanina*-Fe(III), mostrando uma moderada interação por esses grupamentos também. Todas as interações detectadas através dos tampões apresentados na Figura 22 foram calculados e aparecem na Tabela 7. No cálculo destas constantes

o programa Best7 leva em conta a hidrólise do íon metálico e os pKa's dos grupos presentes na eumelanina. As constantes determinadas permitiram calcular as curvas de distribuição de espécies em função do pH.

Tabela 7: Constantes de formação para os complexos detectados no sistema *eumelanina*-Fe(III).

	Equilibria	log K*
(a)	$\frac{[Fe(Ac)]^{2+}}{[Fe^{3+}][Ac^-]}$	5,73 (0,12)
(b)	$\frac{[Fe(Qi)]^{2+}}{[Fe^{3+}][Qi^-]}$	5,20 (0,11)
(c)	$\frac{[Fe(Cat)(OH)]}{[Fe^{3+}][Cat^{2-}][OH^-]}$	23,53 (0,85)
(d)	$\frac{[Fe(Cat)(Qi)(OH)]^-}{[Fe(Cat)(OH)][Qi^-]}$	5,66 (0,12)
(e)	$\frac{[Fe(Cat)(Qi)(OH)_2]^{2-}[H^+]}{[Fe(Cat)(Qi)(OH)]^-}$	-8,89 (0,18)
(f)	$\frac{[Fe(Cat)_2(OH)_2]^{3-}}{[Fe^{3+}][Cat^{2-}]^2[OH^-]^2}$	18,20 (0,20)

Na curva de distribuição das espécies em função do pH (Figura 23) observa-se a formação das espécies $[Fe(Ac)]^{2+}$ e $[Fe(Qi)]^{2+}$ em pH 2 com máximos de 41 e 58% respectivamente em pH 2,5; complexos envolvendo esses dois grupamentos em solução são favoráveis nesses valores de pH devido a facilidade com que o metal desprotona esses grupamentos em valores de pH ácido. A interação $[Fe(Cat)OH]$ aparece em valores de pH acima de 2 com máximo de 98% em pH 4,9. É evidente a interação do grupo catecol em valores de pH abaixo de 4 em presença de Fe(III), com uma constante elevada (Tabela 7). Em valores de pH acima de 4 ocorre uma interação mista, $[Fe(Cat)(Qi)(OH)]^-$, com máximo de 80% em pH 7,80. Acima de pH 7 aparecem mais duas maneiras do íon Fe(III) interagir com a *eumelanina*. A desprotonação da segunda molécula de água do centro metálico da espécie mista origina um centro dihidróxido, $[Fe(Cat)(Qi)(OH)_2]^{2-}$, com um máximo de ocorrência de 63% em pH 9,10. A outra interação ocorre acima de pH 9,

$[\text{Fe}(\text{Cat})_2(\text{OH})_2]^{3-}$. A Tabela 7 apresenta os valores das constantes dos equilíbrios das interações detectadas.

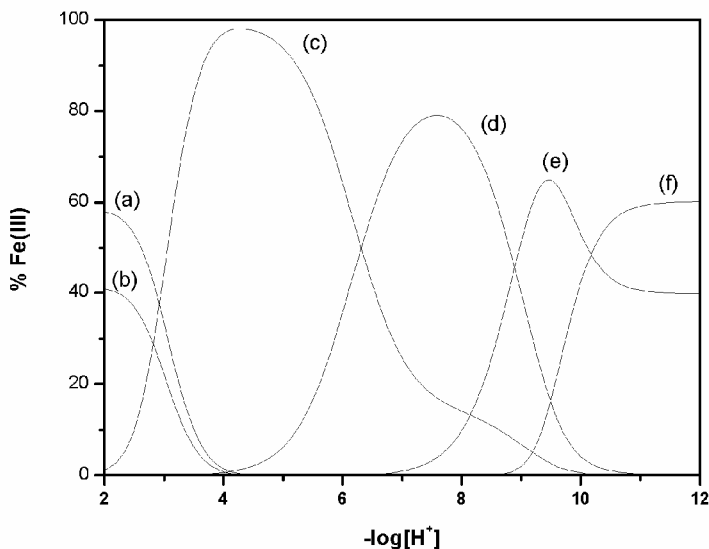
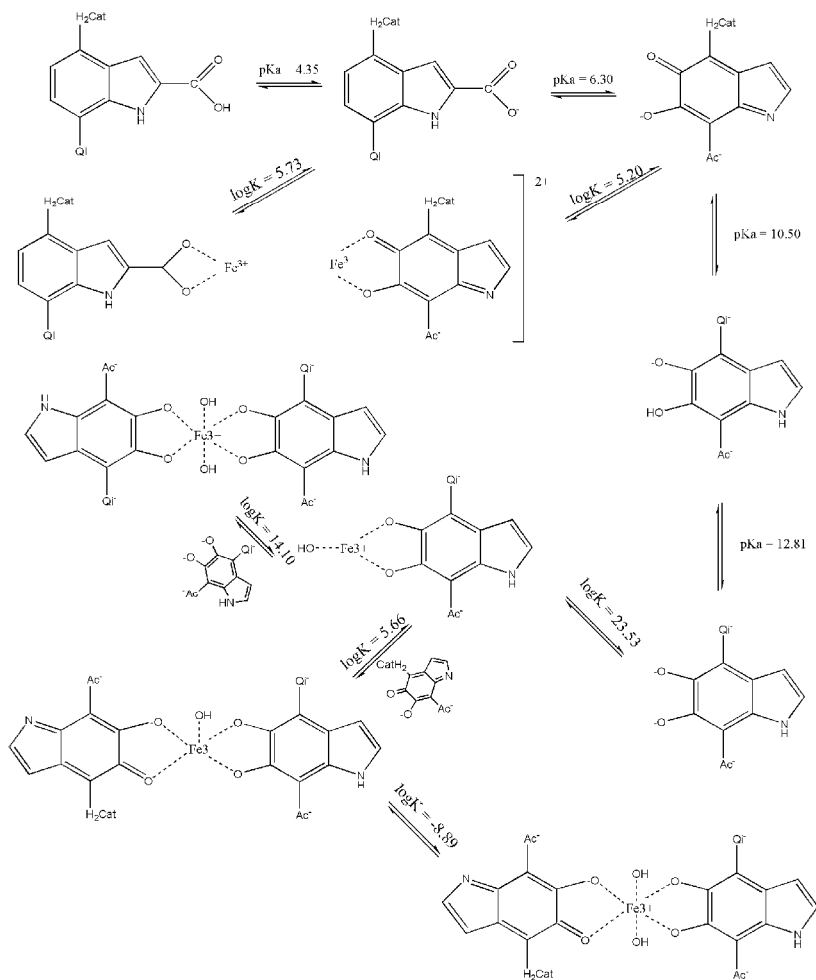


Figura 23: Curva de distribuição de espécies para o sistema *eumelanina*-Fe(III), onde: (a) $[\text{Fe}(\text{Ac})]^{2+}$, (b) $[\text{Fe}(\text{Qi})]^{2+}$, (c) $[\text{Fe}(\text{Cat})\text{OH}]$, (d) $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})]$, (e) $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})_2]^{2-}$, (f) $[\text{Fe}(\text{Cat})_2(\text{OH})_2]^{3-}$.

Comparando os valores das constantes de equilíbrio com as encontradas por nosso grupo com melaninas DHI sintéticas coordenadas com Fe(III), observa-se similaridades quanto à distribuição dessas interações e com os valores de suas constantes de equilíbrio.⁸⁵ As primeiras espécies a serem formadas em pH ácido são com o grupo quinona-imina seguido do catecol. O grupo acetato nas melaninas sintéticas é ausente.

O Esquema 10 mostra todas as interações envolvendo os equilíbrios detectados no sistema *eumelanina*-Fe(III).



Esquema 10: Equilíbrios e suas constantes envolvidos no sistema eumelanina-Fe(III).

3.2.2. Espectroscopia de Infravermelho

Conhecendo as espécies encontradas em solução no sistema *eumelanina*-Fe(III), realizamos o estudo no estado sólido, isolando os complexos formados em três valores diferentes de pH. Os espectros de infravermelho da *eumelanina* livre, e complexada pelo íon Fe(III) isolada em valores de pH 3, 5 e 10 são apresentados na Figura 24.

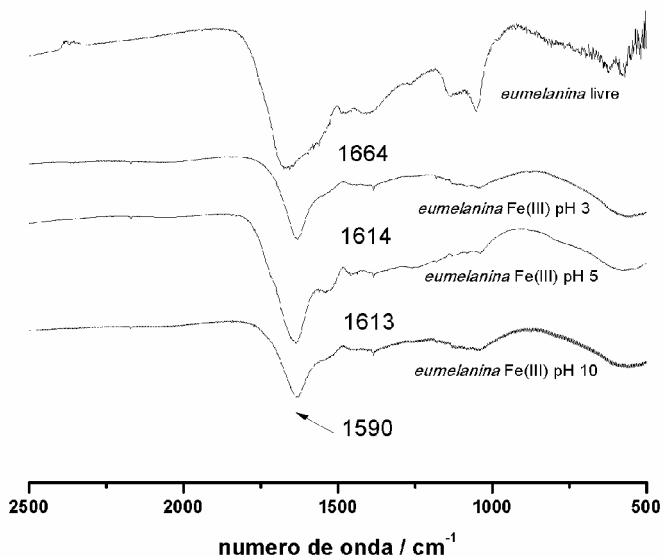


Figura 24: Espectros de infravermelho da *eumelanina* livre e complexada com o íon Fe(III) em pH 3, 5 e 10. Pastilhas de KBr.

Como discutido na sessão 3.1.2. e 3.1.7. a *eumelanina* apresenta uma banda alargada com um mínimo em 1664cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ e $\nu\text{C}=\text{C}$ relacionada a sobreposição dos grupamentos majoritários (Ac, Qi e Cat) e ainda uma banda em 1050cm^{-1} associada a estiramentos $\nu\text{C}-\text{O}$. Observa-se nos espectros dos complexos os deslocamentos característicos referentes a complexação com o íon Fe(III). No espectro *eumelanina* Fe(III) pH 3, um deslocamento de 50cm^{-1} na banda atribuída aos estiramentos $\nu\text{C}=\text{O}$ e um deslocamento na banda relativa ao modo $\nu\text{C}-\text{O}$ de 8cm^{-1} . Já no espectro em pH 5, observa-se uma banda em 1613cm^{-1} , muito semelhante a encontrada em

pH 3, mas também um deslocamento de 15cm^{-1} na banda referente ao modo $\nu\text{C-O}$. Levando em consideração as espécies encontradas em solução em pH 3, as espécies majoritárias são $[\text{Fe}(\text{Ac})]^{2+}$ e $[\text{Fe}(\text{Qi})]^{2+}$ tendo cerca de 20% da espécie $[\text{Fe}(\text{Cat})\text{OH}]$ esses deslocamentos podem ser associados à formação dessas espécies no estado sólido. Entretanto em pH 5 a espécie majoritária é apenas $[\text{Fe}(\text{Cat})\text{OH}]$ onde foi observado um maior deslocamento atribuído ao estiramento $\nu\text{C-O}$ e a banda deslocada referente aos estiramentos $\nu\text{C=O}$ e $\nu\text{C=C}$ se mantiveram constantes levando a crer a interação pelo grupamento catecol neste pH em estado sólido.

Todavia em pH 10, as bandas relacionadas aos estiramentos $\nu\text{C=O}$ e $\nu\text{C=C}$ encontram-se bastante deslocadas quando comparadas a *eumelanina* livre, neste pH as espécies 2:1 ligante:metal ($[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})_2]^{2-}$ e $[\text{Fe}(\text{Cat})_2(\text{OH})_2]^{3-}$) são predominantes, e esperava-se este grande deslocamento referente a esses grupos, devido a contribuição dos grupamentos quinona-imina e catecol.

3.2.3. Cálculos Teóricos

Para obtenção de informações estruturais e confirmação das espécies propostas em equilíbrio apresentadas no Esquema 10, realizou-se otimização estrutural das principais espécies encontradas em toda a faixa de pH. Utilizando o método e função BP86/TZVP, foram inicialmente consideradas estruturas com geometria octaédrica devido a característica do sistema, íon Fe(III) contendo ligantes oxigenados, contendo os ligantes bidentados nas posições equatoriais e moléculas de água ou hidróxido (dependendo do pH que a espécie se encontra) nas posições axiais. Para as espécies $[\text{Fe}(\text{Ac})]^{2+}$ e $[\text{Fe}(\text{Qi})]^{2+}$ formadas em pH ácido foram utilizadas quatro moléculas de água para obtenção da estrutura octaédrica $[\text{Fe}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$. Para a espécie $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{Cat})]$ foram consideradas três moléculas de água e diferentes situações iniciais para avaliarmos o efeito da hidroxila coordenada ao centro metálico. As posições iniciais de entrada no cálculo estão apresentadas na Figura 25.

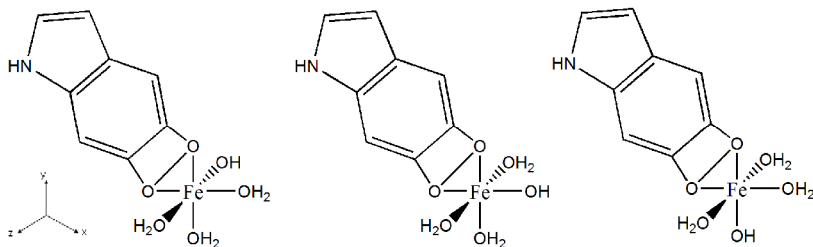


Figura 25: Estruturas octaédricas iniciais consideradas para o cálculo da espécie $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{Cat})(\text{H}_2\text{O})_3]$, considerando a hidroxila em três vértices diferentes do octaedro: duas na posição equatorial (x-y) e uma na posição axial (z).

Em pH alcalino foi considerada a espécie $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{Cat})_2]^{3-}$ com uma geometria inicial octaédrica, e visto a camada fechada contendo dois íons hidroxila coordenados ao centro de Fe(III) pela influência do pH, não houve a necessidade da utilização de moléculas de água coordenadas ao metal. As estruturas otimizadas para as espécies consideradas nos cálculos estão apresentadas na Figura 26.

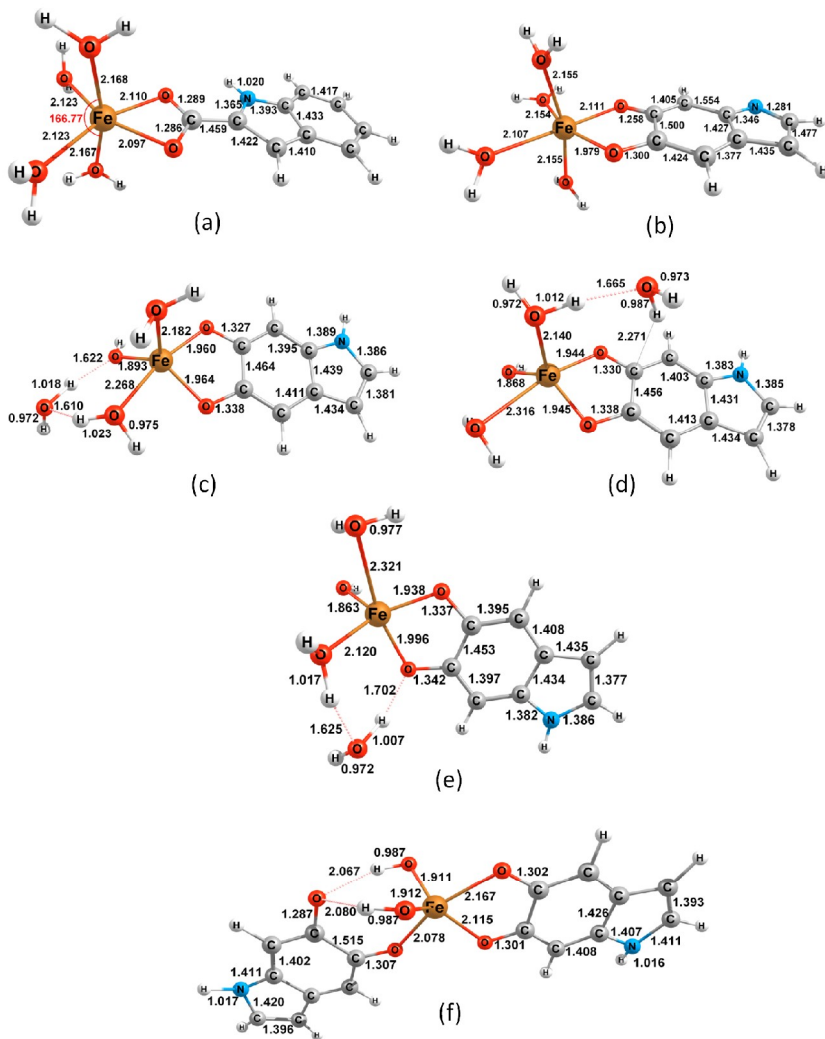


Figura 26: Estruturas otimizadas de (a) $[\text{Fe}(\text{Ac})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; (b) $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; (c) (d) (e) $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]$ estruturas otimizadas a partir das posições específicas do íon hidroxila mostrados na Figura 35; (f) $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{Cat})_2]^{3-}$.

De acordo com a Figura 26, podemos observar que as estruturas para as espécies $[\text{Fe}(\text{Ac})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ e $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ otimizadas formam complexos com geometria octaédrica distorcida, já esperado

para esses tipos de complexos. Já para o complexo $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]$ considerações importantes podem ser feitas: primeiramente no cálculo da geometria octaédrica para o complexo com a hidroxila na posição axial, obtendo-se como resultado uma migração deste grupo para posição equatorial, com estes dados fizemos as outras possibilidades de conformação inicial apresentadas na Figura 25. Em todos os casos a hidroxila ficou em posição equatorial, e houve a saída de uma molécula de água coordenada ao centro metálico para realização de uma ligação de hidrogênio ou com a própria hidroxila, ou com o oxigênio do grupamento catecol coordenado ao centro metálico.

Uma conformação mais exata simulando o ambiente de coordenação em solução poderia ser feita utilizando moléculas de água solvatando o complexo, mas para isto, exige um grande tempo para otimização estrutural. Estudos serão realizados no futuro, mesmo assim, podemos fazer uma comparação acerca da constante de formação para a espécie 1:1 catecol:Fe(III) em relação ao grupamento acetato e quinonimina. Observa-se um $\log K$ mais alto para a espécie $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})]$ (Tabela 7, sessão 3.2.1), podendo ser supostamente correlacionado com a estabilidade proporcionada pela ligação de hidrogênio entre as moléculas de água do meio obtida pelos cálculos de otimização estrutural.

A última espécie simulada computacionalmente foi a $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{Cat})_2]^{3-}$, neste caso agora com dois íons hidroxila e observa-se também a saída de um oxigênio do grupamento catecol para formação de uma ligação de hidrogênio com os grupamentos hidróxidos; também podendo ser atribuído sua alta constante de formação a este fato. Altas constantes de formação para este grupamento também foram identificadas em melaninas sintéticas DHI⁸⁵, e como essas espécies tem seu máximo em pH geralmente maior que 4, a desprotonação de uma molécula de água ligada ao centro metálico pode estar correlacionada com possíveis ligações de hidrogênio como apresentadas aqui, e assim terem também elevadas constantes de formação.

Para se obter uma maior correlação entre os dados teóricos e experimentais também foram calculadas as vibrações dos complexos simulados e comparados com os experimentais apresentados na sessão 3.2.2. A Figura 27 mostra os espectros de infravermelho simulados para as espécies majoritárias utilizando matrix Hessiana com valores baseados na função/método BP88/TZVP.

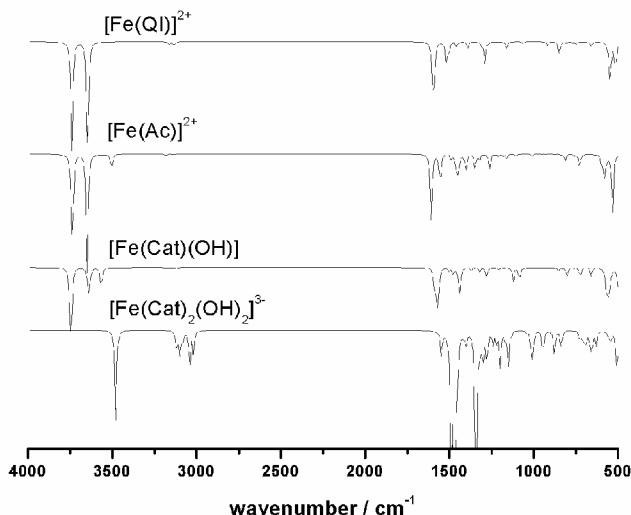


Figura 27: Espectro de infravermelho simulado para os complexos majoritários encontrados no sistema *eumelanina*:Fe(III).

No espectro teórico do complexo $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ e $[\text{Fe}(\text{Ac})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ pode-se destacar como estiramentos relevantes: $\nu\text{C}=\text{O}$ em 1541 e 1540cm^{-1} respectivamente, com deslocamento de 64 e 74cm^{-1} em comparação com o ligante livre. Também se destaca um deslocamento de 11 e 18cm^{-1} relativo ao grupamento $\nu\text{C}-\text{O}$ indicando a coordenação ao centro metálico por esses grupos, também encontradas no espectro teórico mostrando a interação por esses grupamentos no pH isolado.

Os modos $\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}-\text{O}$ encontrados para a espécie $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]$ estão em 1572 e 1118cm^{-1} , respectivamente, há apenas uma ligeira mudança em relação à espécie anterior, o que indica a coordenação do grupo catecolatos e confirma os dados obtidos experimentalmente.

De acordo com os espectros simulados, observou-se que as mudanças no número de onda relacionados aos estiramentos $\nu\text{C}=\text{C}$ das $\nu\text{C}-\text{O}$ do complexo $[\text{Fe}(\text{Cat})_2(\text{OH})_2]^{3-}$ são maiores que no $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]$, levando a indícios de uma formação 2:1 catecol:metal. Essas mudanças em 1500 e 1016cm^{-1} mostram a interação entre os grupos quelantes presentes na melanina e o centro metálico, como observado anteriormente na parte experimental. Um resumo das

principais mudanças observadas nos estiramentos é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Resumo dos principais estiramentos encontrados no sistema Fe(III):*eumelanina* comparando os deslocamentos com os deslocamentos encontrados experimentalmente.

<i>Espécie</i>	<i>pH</i>	<i>(ν)</i>	<i>ν / Δν(cm⁻¹) Teórico</i>	<i>Δν(cm⁻¹) Experimental</i>
[Fe(Qi)] ²⁻	3	(C=C) (C=O)	1541/64	50
		(C-O)	1006/16	8
[Fe(Ac)] ²⁻		(C=C) (C=O)	1540/74	50
		(C-O)	1059/11	8
[Fe(Cat)(OH)]	5	(C=C)	1512/20	17
		(C-O)	1037/15	15
[Fe(Cat) ₂ (OH) ₂] ³⁻	10	(C=C)	1503/29	25
		(C-O)	1032/20	16

Simon e Hong⁸⁶ estudaram as interações entre *eumelaninas* extraídas de animais marinhos com cátions divalentes, e também foram observados e reportados os decaimentos de energia relacionadas com os estiramentos ν C=O e ν C-O devido à complexação com o centro metálico. Em nosso trabalho também foi visto este decaimento e as interações caracterizadas, e sugerido os grupamentos envolvidos nestas interações.

3.2.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Os espectros de EPR da melanina isolada em pH 3 e 10 são apresentado na Figura 38.

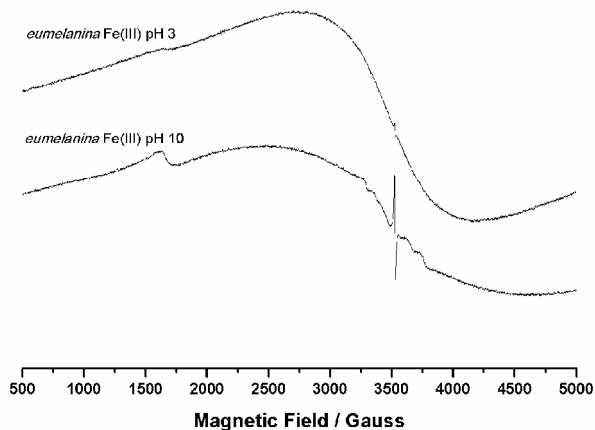


Figura 28: Espectros de EPR do complexo eumelanina:Fe(III) isolado em pH 3 e 10, obtidos a 77K.

Observa-se nos espectros apresentados na Figura 38 que em pH 3, há um sinal em $g = 4,140$, característico de um centro de Fe(III) alto spin. Há também o sinal discreto em $g = 2,003$ correspondente a um elétron, neste caso atribuído a um radical semi-quinona. Esta espécie também foi observada no estudo de eletroquímica e caracteriza os grupos de doadores estudados e suporta a estrutura de melanina proposta com a formação de espécies radiculares evidenciado neste trabalho e em outros descritos na literatura.⁸⁷ O espectro de EPR em pH 10, revela um sinal em $g = 4,141$, também atribuído a um centro de Fe(III) com configuração de alto spin, mas com um ambiente de coordenação diferentes que estão sendo vinculados aos grupos catecol e quinona-imina. O sinal característico da espécie radicalar, revela a formação acentuada de semi-quinonas caracterizando uma interação entre catecol e Fe (III) em pH 10. Barreto e colaboradores⁸⁷ em estudos sobre a interação de metais com ligantes dioxolanos observaram um espectro similar, com ambos os sinais que mostram a interação de metais

divalentes e trivalentes por estes grupos. As interações observadas em pH 3 a partir dos resultados de EPR é suportada pela análise de espectroscopia de infravermelho e por titulação potenciométrica e aqui é atribuída a coordenação do centro metálico com os grupamentos quinona-imina e carboxílico.

Capítulo IV

Resultado e Discussão: Afinidade da *eumelanina* por Fe(III) em presença de ácido gálico

4.1. Caracterização do Sistema Fe(III)-Ácido Gálico

4.1.1. Titulação potenciométrica e espectrofotométrica do ácido gálico

Medir as constantes de equilíbrio do ácido gálico e o íon Fe(III) é necessário para avaliar a competição deste pelo íon metálico.

Inicialmente foram calculados os valores de pKa para o ácido gálico livre, a curva de titulação está mostrada na Figura 29.

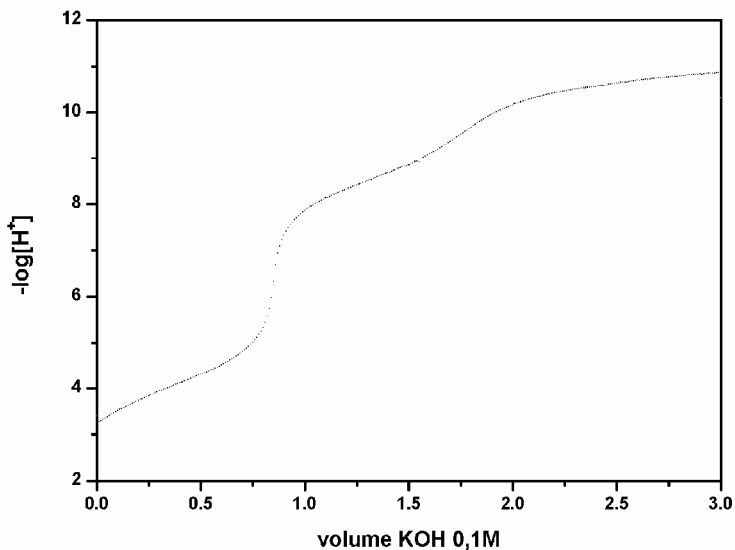


Figura 29: Curva de titulação de 1mmol de ácido gálico sob atmosfera inerte. T = 25°C, $\mu = 0,1$ KCl.

Observa-se na curva três regiões tamponadas, relativas aos 3 pKas existentes no ácido gálico, uma região em pH em torno de 4 relativo a desprotonação dos grupamentos ácido presentes; outra região em pH próximo de 8 relativa a desprotonação de uma das hidroxilas presentes na molécula e a terceira região em torno de 11, relativo a desprotonação do segundo hidrogênio de uma das hidroxilas restantes.

Para uma comparação dos valores de pKa do ácido gálico também foi realizado a titulação espectrofotométrica, acompanhando o deslocamento das bandas relativa as espécies geradas no meio com o aumento do pH. Os espectros eletrônicos obtidos estão apresentados na Figura 40.

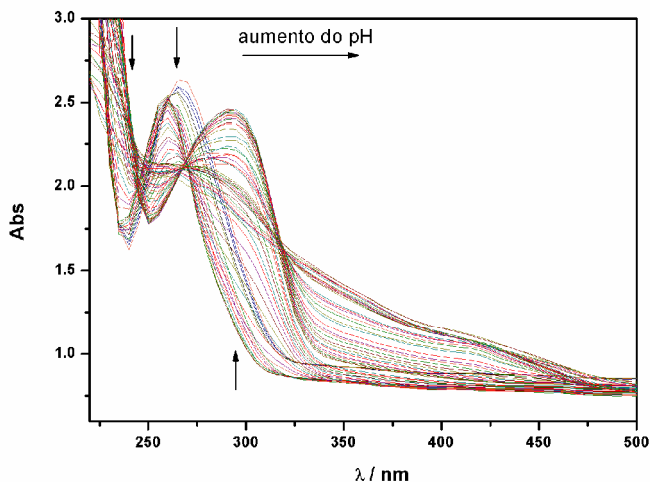
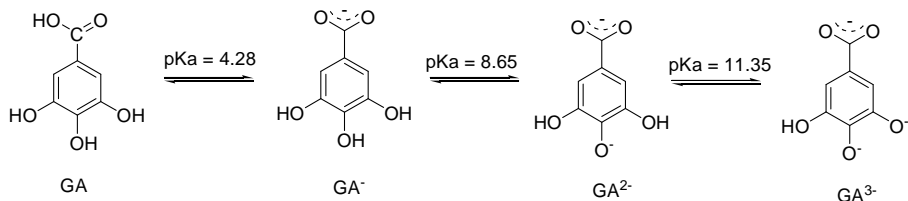


Figura 30: Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 3 - 12 de uma solução contendo 1 mmol de ácido gálico em 20mL de solução a temperatura ambiente.

Observa-se que com o aumento de pH ocorre um deslocamento batocromico. No espectro do ácido gálico foi plotado três gráficos Abs vs pH, utilizando valores de absorbância de 230, 260 e 293nm para o cálculo do pKa de cada equilíbrio. Também observa-se dois pontos isobésticos: um mal definido em 240nm e um bem definido em 268 nm. Os valores de pKa apresentados são a média dos valores encontrados por titulação potenciométrica e espectrofotométrica.

O Esquema 11 apresenta um esquema mostrando as desprotonações e os respectivos pKa's calculados para este sistema.



Esquema 11: Desprotonações do ácido gálico e seus respectivos valores de pKa.

Os valores de pKa da literatura encontrados para o ácido gálico são 4,25; 8,62 e 11,33 respectivamente,⁸⁸ validando os valores encontrados. Eles serão utilizados no cálculo das constantes de equilíbrio das espécies formadas entre o ácido gálico e o íon Fe(III).

4.1.2. Titulação potenciométrica do sistema Fe(III)-AG

Com os valores obtidos para os pKa's do ácido gálico e com a curva de titulação do ácido gálico em presença de Fe(III) é possível calcular as constantes de formação que serão utilizadas para a análise do sistema melanina-Fe(III)-ácido gálico. A curva de titulação do ácido gálico em presença de Fe(III) é mostrada na Figura 31. Observa-se um deslocamento da curva em presença do íon metálico devido a interação com o ligante. O deslocamento pelo íon metálico das regiões tamponadas dos segundo e terceiro pKa's do AG mostra que o Fe(III) está coordenando com duas das três hidroxilas do anel aromático. O deslocamento da região tamponada relativa ao grupamento ácido do AG, indica que o íon Fe(III) coordena-se com o grupamento ácido desprotonado em valores de pH ácidos.⁷⁰

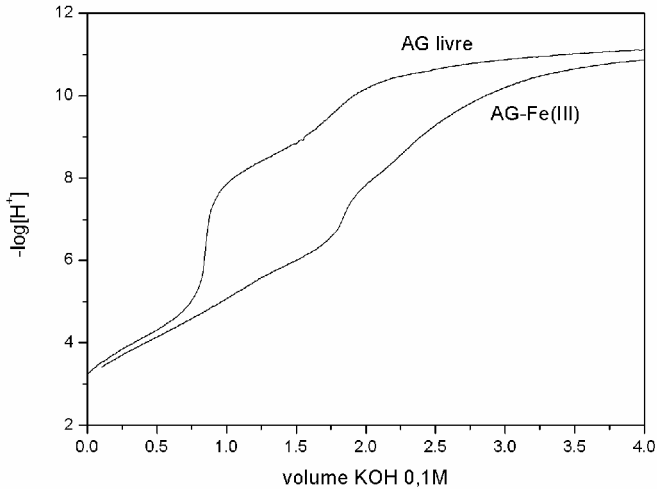


Figura 31: Curva de titulação do ácido gálico (AG) em presença e ausência de Fe(III) na proporção 2:1 ligante:metal 0,1:0,05mmol sob atmosfera inerte. $T = 25^{\circ}\text{C}$, $\mu = 0,1$ KCl, eletrodo de vidro combinado.

Estas colocações foram levadas em consideração para realização do cálculo das constantes dos equilíbrios envolvidos neste sistema: $\log([FeL]/[Fe][L]) = 14,93$; $\log([Fe(OH)L][H^+]/[FeL]) = -4,00$, e $\log([Fe(OH)L_2]/[Fe(OH)L][L]) = 12,70$, onde L = AG. A distribuição de espécies é apresentada no Esquema 12.

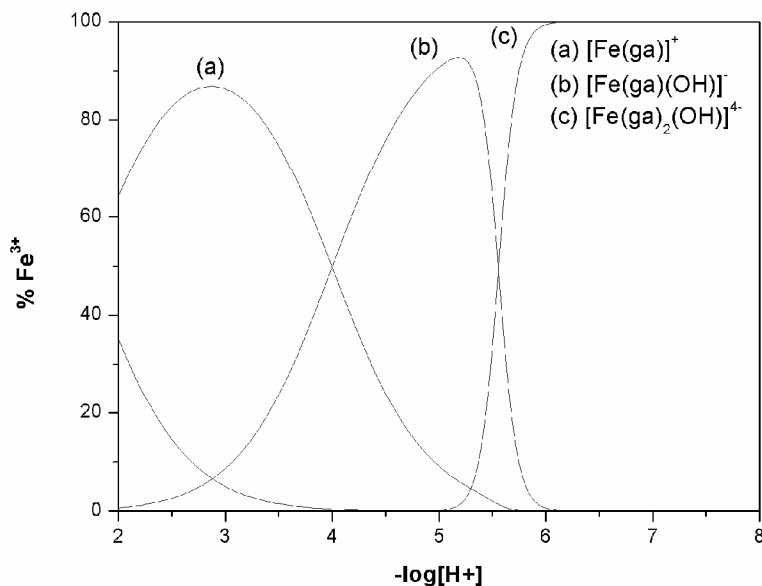
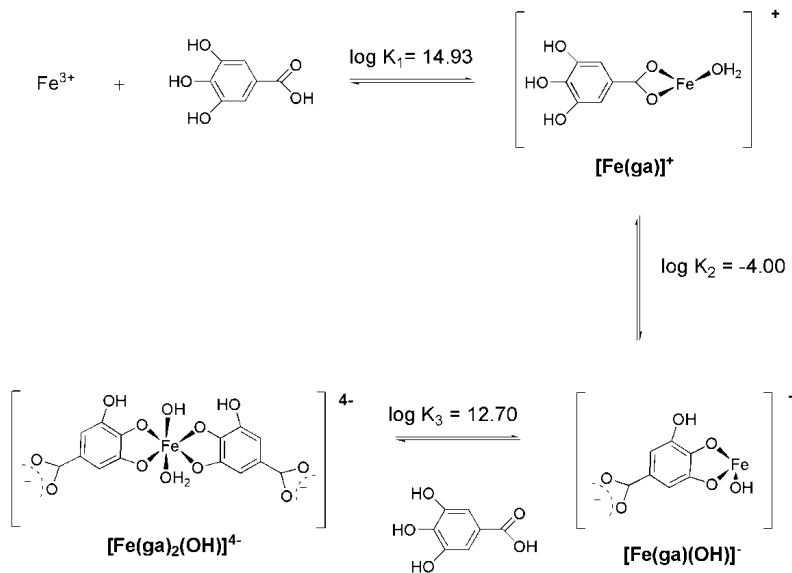


Figura 32: Curva de distribuição de espécies metálicas para o sistema Fe(III)-AG 1:2, onde a curva inicial em pH ácido representa Fe(III) livre.

Na Figura 32 aparecem as curvas de distribuição das espécies existentes no sistema Fe(III)-AG. Observa-se a formação da espécie 1:1 entre ácido gálico e Fe(III) com máximo de formação em pH 2,93. Essa espécie apresenta o metal coordenado ao grupo carboxílico. Com o aumento do pH, ocorre a desprotonação de uma molécula de água ligada ao centro metálico, gerando a espécie $[\text{Fe}(\text{GA})(\text{OH})]^-$, com máximo de formação de 93% em pH 5. Estudos na literatura sugerem que em sistemas semelhantes contendo catecolatos e fenolatos, neste pH, a desprotonação desses grupamentos ocorre com maior facilidade pela sua coordenação com o centro metálico.⁸⁹ De acordo com a curva de titulação, também pode-se observar essa interação, conforme descrito anteriormente. A adição de uma segunda molécula de AG na esfera de coordenação do metal origina a espécie 2:1 ligante:metal. Um esquema mostrando as possíveis espécies detectadas em solução para o sistema Fe(III)-AG, bem como suas constantes de equilíbrio são apresentadas no Esquema 12.



Esquema 12: Estruturas sugeridas detectadas no sistema Fe(III)-AG bem como suas constantes de equilíbrio.

4.1.3. Gráfico de Job do sistema Fe(III)-AG

Os gráficos de Job, ou “Job plots” em inglês, são úteis para se obter informação sobre a estequiometria de formação de complexos, adutos ou compostos de inclusão. Saber por exemplo se um metal coordena-se com um, dois, ou mais ligantes em determinadas condições. Basicamente, varia-se a concentração de metal e ligante e mede-se uma propriedade físico-química, para obtenção do gráfico: propriedade vs fração molar do componente que será acompanhada. Com base na Figura 33, escolheu-se dois valores de pH 4,5 e 7,5 (tampão acetato e fosfato respectivamente) onde foram feitos os experimentos, a Tabela 9 mostra a variação de concentração de cada solução em cada pH.

Tabela 9: Variação de concentração de ácido gálico e Fe(III) em cada solução para montagem do gráfico de Job.

<i>Solução</i>	X_{AG}	$X_{Fe(III)}$	<i>Relação AG/Fe(III)</i>
1	0,1	0,9	0,11
2	0,2	0,8	0,25
3	0,3	0,7	0,43
4	0,4	0,6	0,67
5	0,5	0,5	1
6	0,6	0,4	1,5
7	0,7	0,3	2,33
8	0,8	0,2	4
9	0,9	0,1	9

Foi acompanhado a absorvância em $\lambda = 300\text{nm}$ atribuída a transferência de carga ligante metal do ácido gálico para o centro de Fe(III).

O gráfico de Job para o sistema Fe(III)-AG é mostrado na Figura 33.

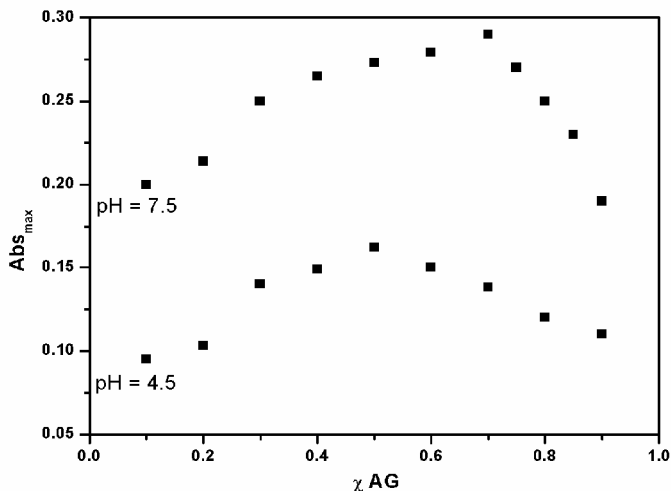


Figura 33: Gráfico de Job para as interações entre ácido gálico e Fe(III) em solução aquosa.

Observa-se no gráfico de Job que em pH 4,5 ocorre a formação de uma espécie 1:1 AG:Fe(III) e em pH 7,5 pode-se atribuir o máximo a formação de 2:1 ligante:metal; esses dados vem a confirmar a estequiometria encontrada por titulação potenciométrica para o sistema Fe(III)-AG.

Com as constantes e estequiometria desse sistema confirmadas podemos realizar os cálculos da distribuição das espécies no sistema ternário *eumelanina*-Fe(III)-ácido gálico.

4.2. Caracterização do Sistema Ternário *eumelanina*-Fe(III)-Ácido Gálico

4.2.1. Titulação Potenciométrica

Com as constantes de formação determinadas para os sistemas *eumelanina*-Fe(III) e Fe(III)-AG, foi realizado o estudo em solução do sistema ternário, *eumelanina*-Fe(III)-Ácido Gálico, verificando a formação de espécies mistas. Este estudo permitiu prever a preferência de coordenação do íon Fe(III) com relação aos dois ligantes, relação

essa que será útil no entendimento dos mecanismos de drogas anti-melanomas.

Para a especiação do sistema ternário, foram levadas em consideração todas as espécies coordenadas pela *eumelanina* através dos três grupamentos majoritários (acetato, quinona-imina e catecol) na proporção 1:1 e 2:1 ligante metal. As espécies Fe(III)-AG foram consideradas nas mesmas proporção e as espécies de coordenação mistas, contendo *eumelanina* e ácido gálico coordenados simultaneamente ao centro de Fe(III) também foram consideradas. Em todos os cálculos a hidrólise do íon metálico foi levada em consideração.

A curva de titulação para o sistema ternário é apresentada na Figura 34.

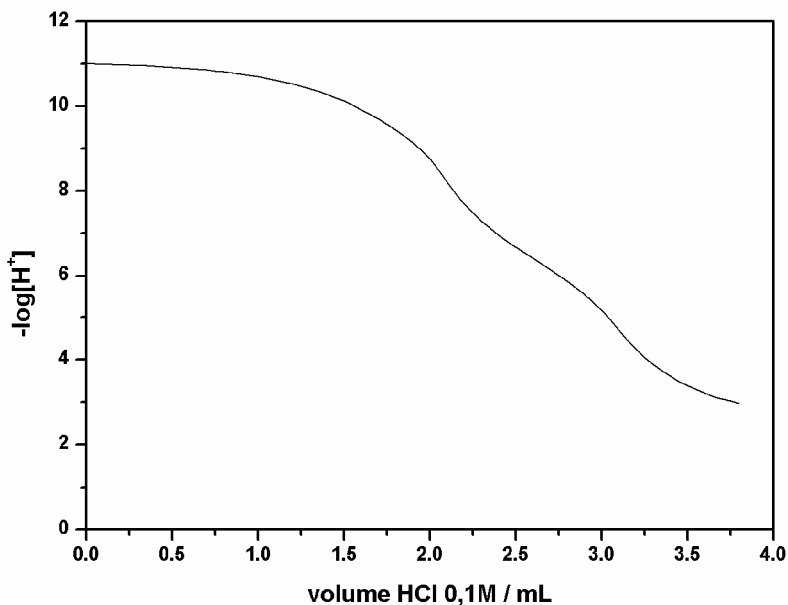


Figura 34: Curva de titulação do sistema ternário *eumelanina*-Fe(III)-Ácido Gálico. T = 25°C; 0,1 mmol de AG; 0,1 mmol de Fe(III) em presença de 0,1mmol de *eumelaninas* (considerando os grupamentos doadores detectados na sessão 3.1) atmosfera de argônio e $\mu = 0,1M$ KCl.

Observa-se na Figura 34 três regiões tamponadas distintas: a primeira em valores de pH 9-11 atribuída as interações do centro Fe(III) com os grupamentos catecol das *eumelaninas*. Uma segunda região

tamponada atribuída a interação do centro metálico com os grupamentos quinona-imina e com o ácido gálico, e por último em pH próximo de 4 as interações com os grupamentos acetato e também pelo ácido gálico.

A curva de distribuição de espécies para o sistema ternário *eumelanina*-Fe(III)-Ácido Gálico e um esquema mostrando as principais espécies detectadas neste sistema são apresentadas nas Figuras 35 e Esquema 13, respectivamente.

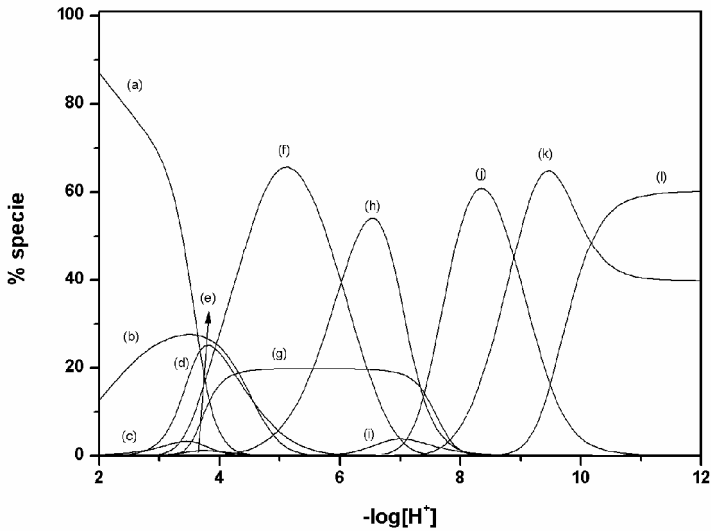
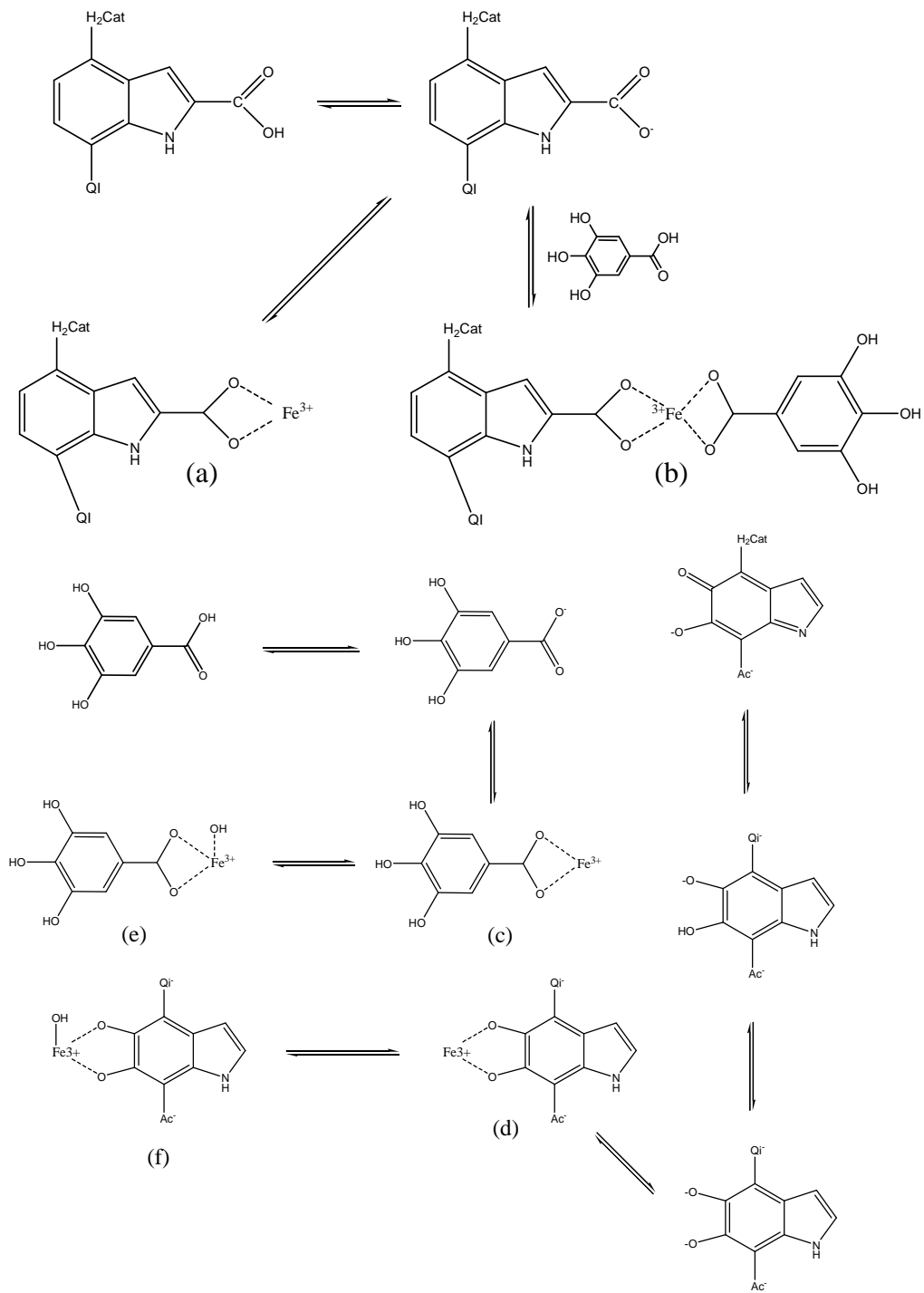
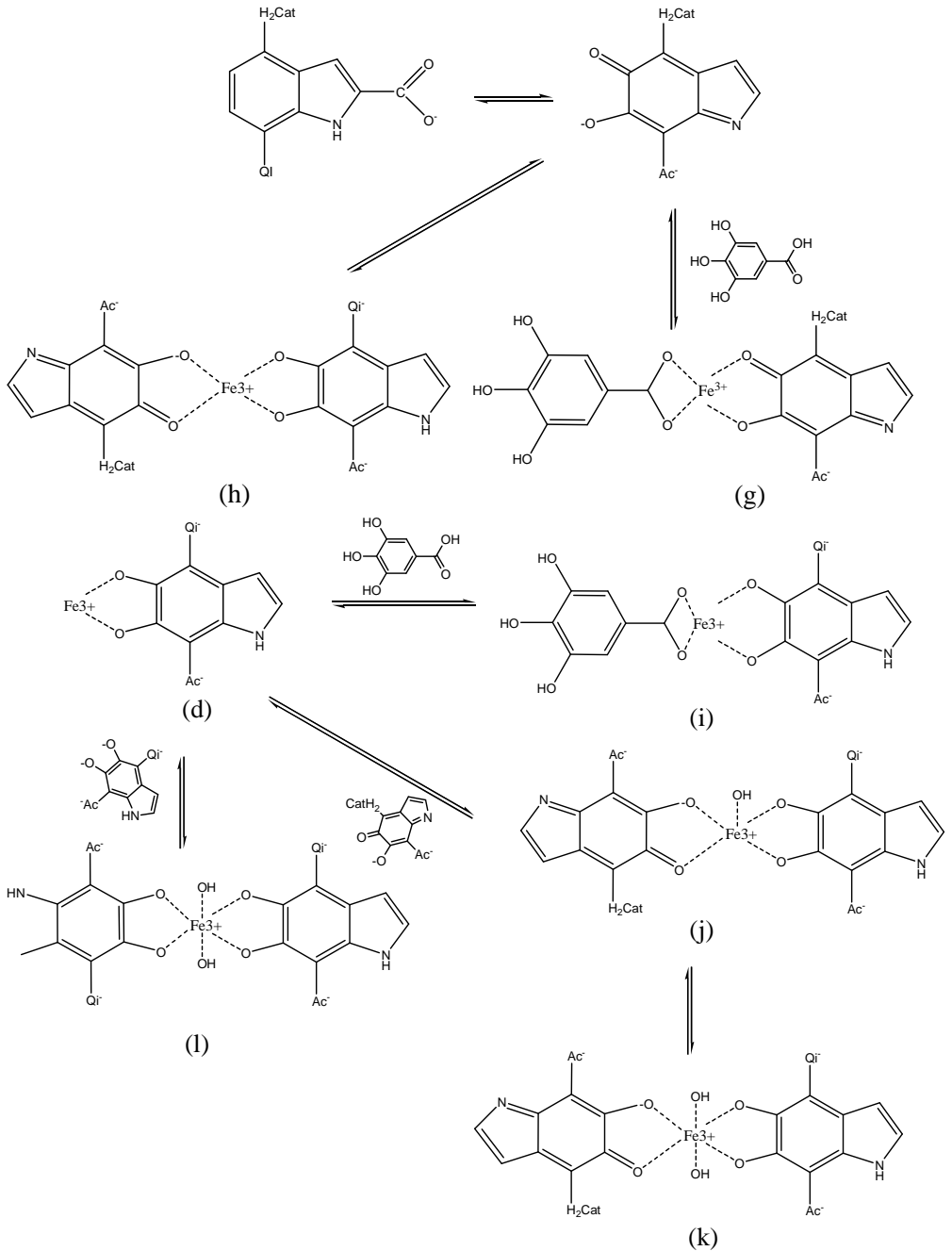


Figura 35: Curvas de distribuição de espécies para o sistema ternário *eumelanina*-Fe(III)-Ácido Gálico. Onde (a) = $[\text{Fe}(\text{Ac})]^{2+}$; (b) = $[\text{Fe}(\text{Ac})(\text{AG})]^{+}$; (c) = $[\text{Fe}(\text{AG})]^{2+}$; (d) = $[\text{Fe}(\text{Cat})]^{+}$ (e) = $[\text{Fe}(\text{AG})(\text{OH})]^{+}$; (f) = $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})]$; (g) = $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{AG})]^{+}$; (h) = $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{Cat})]$; (i) = $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{AG})]$; (j) = $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})]^{-}$; (k) = $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})_2]^{2-}$; (l) = $[\text{Fe}(\text{cat})_2(\text{OH})_2]^{3-}$.





Esquema 13: Interações existentes no sistema ternário *eumelanina*-Fe(III)-Ácido Gálico em toda faixa de pH.

A Figura 35 e o esquema 13 mostram as interações existentes no sistema ternário. Observamos que em valores de pH abaixo de 4, o íon Fe(III) interage com *eumelanina* (espécie “a” e “d”), destaque para a interação do íon Fe(III) com o grupo acetato da *eumelanina*, $[\text{Fe}(\text{Ac})]^{2+}$, com máximo de formação de 88% em pH 2. A espécie 1:1 AG-Fe(III) (espécie “c” e “e”) e as espécies mistas contendo tanto a *eumelanina* quanto o ácido gálico também são formadas (espécie “b”).

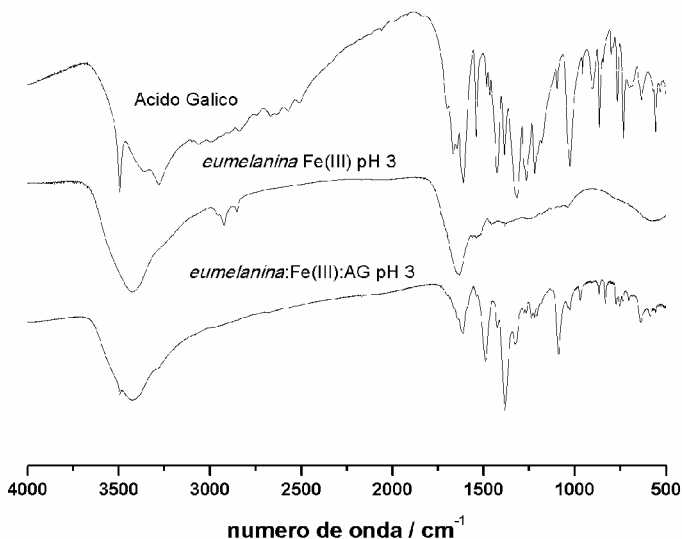
Em valores de pH entre 5 e 7, destacam-se duas interações fundamentais que revelam que o centro de Fe(III) majoritariamente está coordenado com as *eumelaninas* e não com o ácido gálico: $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{OH})]$ com máximo de formação de 70% em pH 5,10 e a espécie $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{Cat})]$ com máximo de 56% em valor de pH 6,67. Já em valores de pH entre 7 e 8 que são os de interesse biológico aparecem três tipos de interações com o centro metálico: $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{AG})]^+$, $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{Cat})]$ e $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})]$, mostrando que as interações majoritárias do íon Fe(III) ocorrem pelos grupamentos doadores da *eumelanina*. Estas interações poderão ser úteis para o entendimento do mecanismo envolvendo complexos de Fe(III) com o AG e derivados em células melanoma, que contém resíduos de melanina. Pode-se ver que parte do íon Fe(III) está complexado com a melanina livre e não com o ácido gálico.

Por último, observa-se as interações em valores de pH acima de 8: $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})_2]^{2-}$ e $[\text{Fe}(\text{Cat})_2(\text{OH})_2]^{3-}$.

Ao final da titulação reversa do sistema ternário em pH ácido, houve a precipitação de um sólido de cor escura. Esse sólido foi filtrado, seco a vácuo e armazenado em um dessecador. Para uma possível comparação com as espécies detectadas neste pH, foram feitas análise por espectroscopia de infravermelho e ressonância paramagnética eletrônica do sólido obtido, sendo os resultados apresentados nas sessões 4.2.2. e 4.2.3, respectivamente.

4.2.2. Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho do ácido gálico, do sistema *eumelanina*:Fe(III) e do sistema ternário em estudo é apresentado na Figura 36.



]

 Figura 36: Espectros de infravermelho do ácido gálico livre, do sistema *eumelanina*:Fe(III) em pH 3 e do sistema ternário *eumelanina*:Fe(III):AG em pH 3. Pastilhas de KBr.

Um dos principais estiramentos observados no sistema ternário foi 1606cm^{-1} relativo aos estiramentos $\nu\text{C}=\text{O}$ atribuído ao grupamento carboxílico do ácido gálico e também presente nas *eumelaninas*. Pode-se observar que no sistema *eumelanina* Fe(III), em pH 3, este estiramento ocorre em 1614cm^{-1} e no sistema ternário, é mais deslocado devido a interação do centro de Fe(III) com o ácido gálico. Também em solução neste pH foram encontradas as interações $[\text{Fe}(\text{Ac})]^{2+}$ e $[\text{Fe}(\text{Ac})(\text{AG})]^+$, levando a crer que estas espécies se mantêm no estado sólido.

Outro estiramento importante do ácido gálico e das *eumelaninas* foi em 1039cm^{-1} , atribuído ao $\nu\text{C}-\text{O}$ que aparece deslocado 11cm^{-1} da melanina livre devido a interação com o centro de Fe(III). No espectro do sistema ternário aparece também uma banda muito intensa em 1381cm^{-1} , atribuída aos grupamentos hidróxidos. A mesma banda é visível no espectro do ácido gálico livre, mostrando que a interação neste valor de pH ocorre pelo grupamento carboxílico e não pelos grupamentos fenólicos. Com a atribuição das bandas e comparação com o deslocamento do ligante livre, pode-se compreender de como o centro de Fe(III) está coordenado no estado sólido em pH 3.

4.2.3. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Com o objetivo de comprovar o ambiente de coordenação do centro de Fe(III) na amostra e termos conhecimento acerca do seu estado de spin quando complexado com os ligantes estudados, o sólido isolado em pH 3 foi analisado por EPR. O espectro de EPR para o sistema ternário está apresentado na Figura 37.

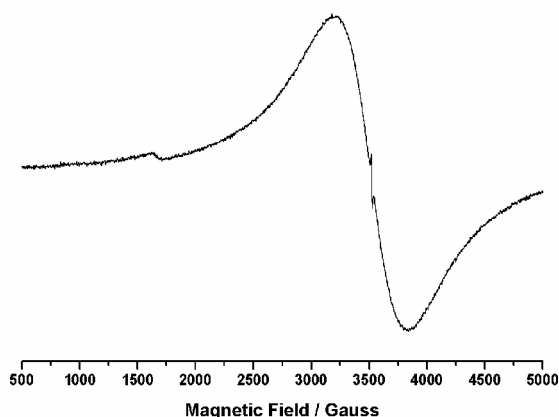


Figura 37: Espectros de EPR do sistema ternário *eumelanina*:Fe(III):AG obtidos a 77K.

Observa-se na Figura 37, um sinal de $g = 4,145$ ($S = 5/2$) atribuído a um centro de Fe(III) mononuclear de baixa simetria e alto spin como relata Barros e colaboradores.⁸⁷ Sinais semelhantes foram encontrados também no estudo da interação com as *eumelaninas* e Fe(III) descritos na sessão 3.2.4 deste trabalho. Outro sinal de destaque em $g = 2,005$ atribuído ao radical orgânico proveniente da natureza dos ligantes em estudo. Observa-se também um desdobramento deste sinal, atribuído a coordenação mista entre a *eumelanina* e o ácido gálico neste pH. Chsteen e colaboradores,⁹⁰ descrevem este tipo de desdobramento atribuído também a radicais orgânicos em centros metálicos mononucleares de Fe(III) com ligantes mistos como em nosso caso. Com os valores de g encontrados para este sistema juntamente com os

dados obtidos por espectroscopia de infravermelho é possível verificar que o ambiente de coordenação do complexo proposto em solução é o mesmo no estado sólido neste pH. Os estudos em outros valores de pH estão sendo realizados, visto a dificuldade de se precipitar os complexos em soluções mais alcalinas.

Capítulo IV

Considerações Finais

Extração e caracterização das eumelaninas extraídas do cabelo

A extração da *eumelanina* do cabelo pelo método de Protá com pequenas modificações foi efetuada com sucesso. As melaninas foram caracterizadas por análise elementar CHNS que mostrou ausência de enxofre e percentagens coerentes com melaninas extraídas de outras fontes descritas na literatura, espectroscopia de infravermelho que mostrou os principais estiramentos característicos dos três grupamentos majoritários presentes nas eumelaninas: acetato, quinona-imina e carboxílico. Com a microscopia de força de campo foi possível analisar a morfologia das *eumelaninas* que se mostram na forma de bastonetes.

Em solução o comportamento eletroquímico foi analisado por voltametria cíclica e onda quadrada que evidenciaram o processo redox que ocorre nas melaninas: catecol/semi-quinona/quinona, e também a deposição de espécies estáveis no eletrodo de trabalho. A titulação potenciométrica foi útil para determinação dos pKa's da melanina e na determinação das constantes de formação com centros metálicos. As eumelaninas apresentam quatro valores de pKa: $pK_{a1} = 4,35$; $pK_{a2} = 6,30$; $pK_{a3} = 10,50$ e $pK_{a4} = 12,81$ relativos a desprotonação dos grupos carboxílicos, quinona-imina e catecol respectivamente, e a espectroscopia de infravermelho por refletância nos permitiu comprovar o primeiro pKa. Por fim os cálculos teóricos elucidaram os grupamentos majoritários e estudos de espectroscopia vibracional que puderam ser comparados com o experimental.

Interação das eumelaninas com o íon Fe(III)

Os estudos em solução mostraram que em pH ácido existem três interações majoritárias: $[Fe(Ac)]^{2+}$, $[Fe(Qi)]^{2+}$ e $[Fe(Cat)OH]$ com máximos de 58, 41 e 98% em pH 2,5; 2,4 e 4,9 respectivamente, em pH 7 a espécie majoritária é a mista $[Fe(Cat)(Qi)(OH)]$ com máximo de 80% em pH 7,8; por último se formam duas espécies dihidróxidas em pH acima de 8: $[Fe(Cat)(Qi)(OH)_2]^{2-}$ e $[Fe(Cat)_2(OH)_2]^{3-}$ com máximos de 62 e 60% em valores de pH 9,4 e 11 respectivamente, os valores das constantes de formação e pKa para o sistema Fe(III)-*eumelanina* também foram calculados.

Foram também isolados os complexos em três valores de pH diferentes para comparação com as estruturas propostas em solução. O sólido foi analisado por espectroscopia de infravermelho e foi possível correlacionar os deslocamentos das bandas características da *eumelanina* depois de complexadas com o metal. Cálculos teóricos

também foram feitos para comparação dos estudos experimentais e revelaram uma boa correlação com as interações encontradas em solução. Por último, foi realizada espectroscopia de EPR que nos mostrou diferentes ambientes de coordenação quando a melanina foi isolada em pH 3 e em pH 10, confirmando os dados obtidos por IV.

Estudo do Sistema Ternário Eumelanina:Fe(III):AG

Os estudos em solução da interação das *eumelaninas* por Fe(III) em presença de ácido gálico nos mostraram que em valores de pH entre 7 e 8 que são os de interesse biológico existem a competição de três espécies: $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{AG})]^+$, $[\text{Fe}(\text{Qi})(\text{Cat})]$ e $[\text{Fe}(\text{Cat})(\text{Qi})(\text{OH})]^-$, mostrando também que as interações majoritárias do íon Fe(III) ocorrem pelos grupamentos doadores da *eumelanina* sendo a principal conclusão deste sistema. Essas interações comprovam que o centro metálico tem afinidade pelas melaninas mesmo complexado com o ácido gálico. Sendo assim, o uso de derivados do AG podem ser potenciais ligantes para metais trivalentes que tenham como alvo a interação com as melaninas. A viabilidade deste estudo pode ser amparada também em trabalhos anteriores descritos na literatura, que mostram que este ligante tem importante potencial anti-melanoma.

Capítulo VI

Perspectivas Futuras e Continuação do Trabalho

O trabalho apresentado nessa dissertação de caracterização das *eumelaninas* extraídas do cabelo e interações por Fe(III) na presença e ausência de ácido gálico nos encorajam a continua-lo.

Para uma caracterização mais completa da *eumelanina*, principalmente dos monômeros que a compõe é viável realizar experimentos de ESI-MS, que nos elucidaria o peso molecular e os fragmentos que podem ser utilizados para o cálculo da massa molar dos monômeros. Também outro estudo importante que deve ser realizado é a degradação ácida do oligômero seguida de análise por CG-MS, destacando os produtos de degradação e assim podendo ser associado com os grupos majoritários; pode-se realizar também estudos eletroquímicos variando o pH em função do potencial para determinação dos pKa's fenólicos e também da relação número de prótons/elétrons envolvidos nas reações redox.

Para uma melhor caracterização das interações com Fe(III), estudos eletroquímicos podem ser realizados para avaliar possíveis deslocamentos de potencial do ligante e identificar o sinal de redução do íon Fe(III). O estudo da variação do pH em função do potencial permitirá a determinação dos pKa's dos componentes sistema. Estudo de microscopia eletrônica possibilitará comparar as morfologias das *eumelaninas* complexadas e livres. Cálculos teóricos permitirão verificar o efeito da solvatação, adicionando-se moléculas de água para verificar as possíveis interações existentes entre solvente-complexo.

Já com parte do estudo do sistema ternário *eumelanina*:Fe(III):GA efetuado pode-se realizar testes com diferentes solventes e diferentes temperaturas para tentar-se obter os sólidos em diferentes valores de pH's para termos mais informações sobre as características dessas interações no estado sólido, realizando outros estudos como eletroquímica, microscopia eletrônica e ESI-MS para uma elucidação maior para se propor um mecanismo de interação entre Fe(III) e as *eumelaninas* a partir de um complexo desse metal.

Por último, esses resultados nos encorajam a pesquisar e realizar a síntese e caracterização de complexos de Fe(III) com ligantes derivados do ácido gálico, medindo suas constantes de equilíbrio com o íon metálico, selecionando aqueles que possam liberar o íon Fe(III) para a melanina e, por fim, realizando atividade biológica sobre as células melanoma.

Capítulo VII

Referências Bibliográficas

1. NORDLUNDET, J. J. et al. **The Pigmentary System Physiology and Pathophysiology**. USA, 2006, p.283.
2. DAVIS, W. S., ABEL, J. J. On the pigment of the negro's skin and hair. **The Journal of Experimental Medicine**, v1, p24-40, 1896.
3. RAPER, H. S. The tyrosinase-tyrosine reaction. VI. Production from tyrosine of 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2- carboxylic acid—the precursors of melanin. **Journal of Biochemistry**. v21, p89–96, 1927.
4. MASON, H. S., D. J. E. Ingram, and B. Allen. The free radical property of melanin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.86 p.225–230, 1949.
5. NICOLAUS, R. A. Melanins. **Paris: Hermann Press**, 1952
6. WOERT, M. H. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidation by melanin: inhibition by phenothiazines. **Biological Medicine**. v129, p165–171, 1968.
7. D'ISCHIA, M., G. Prota. Photooxidation of 5,6-dihydroxy-1-methylindole. **Tetrahedron**. V.43 p.431–434, 1987.
8. DEIBEL, R. M. B., M. R. Chedekel. Biosynthetic and structural studies on pheomelanin. **Journal of the American Chemical Society**. V.106 p.5884–5888, 1984.
9. ITO, S., A. Palumbo, and G. Prota. Tyrosinase-catalyzed conjugation of dopa with glutathione. **Experientia**. v.41, p.960–961, 1985.
10. NOVELINO, L.; NAPOLITANO, A.; PROTA, G.; Isolation and characterization of mammalian *eumelanins* from hair and irides. **Biochimica et. Biophysica Acta**, v.475 p.295-306, 2000.

11. SZPOGANICZ, Bruno, et al. Metal Binding by melanins: studies of colloidal DHI and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions. **Inorganic Biochemistry**, v.89 p.45-53, 2002.
12. ROSEI, M.A.; MOSCA, L.; GALLUZZI, F. Photoelectronic properties of synthetic melanins. **Synthetic Metals**, v.76 p.331-335, 1996.
13. ROSEI, M. A.; Blarzino C.; Foppoli C.; Mosca L.; Coccia R. Lipoxigenase-Catalyzed Oxidation of Catecholamines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.215 p.344-350, 1994.
14. NAPOLITANO, A., A. PEZZELLA, G. PROTA, R. SERAGLIA. A reassessment of the structure of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid melanins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. v.10 p.204–208, 1996.
15. PROTA, G., M. d'Ischia, and NAPOLITANO, A. **The chemistry of melanins and related metabolites. In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**, 1998a, pp. 307–332.
16. KUZUMAKI, T. ITO, S. Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinated expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes. **Experimental. Cell Research**. V.207, p.33–40, 1993.
17. PALUMBO, A., SOLANO, S., PROTA, G. Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement of dopachrome. **Biochemistry and Biophysics Acta**. v,1115 p.1–5, 1991.
18. del MARMOL, V., ITO, S., BOUCHARD, B.,. Cysteine deprivation promotes eumelanogenesis in human melanoma cells. **Journal. Investigation. Dermatology**. v.107 p.698–702, 1996.
19. Di DONATO, P., NAPOLITANO, A. 1,4-Benzothiazines as key intermediates in the biosynthesis of red hair pigment pheomelanins. **Pigment Cell Research**. V.16, p.532–539, 2003.

20. D'ISCHIA, M., NAPOLITANO, A., TSIAKAS, K.. New intermediates in the oxidative polymerization of 5,6-dihydroxyindoles to melanin promoted by the peroxidase/H₂O₂ system. **Tetrahedron**. v.46. p.5789–5796, 1990.
21. MASON, H. S. The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. **Journal of Biological Chemistry**. v.172 p.83–99, 1948.
22. BUSTAMENTE, J. MORDOH, J. Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. **Pigment Cell Research**. v.6, p.348–353, 1993.
23. DONTSOV, A., et al. Retinal pigment epithelium pigment granules stimulate the photo-oxidation of unsaturated fatty acids. **Free Radical Biological Medicine**. v.26, p.1436–1446, 1999.
24. RESZKA, K., and CHIGNELL, C. G.. EPR and spin-trapping investigation of free radicals from the reaction of 4-methoxybenzediazonium tetrafluoroborate with melanin and melanin precursors. **Journal of American Chemical Society**. v.115 p.7752–7760, 1993.
25. SCALIA, M., GEREMIA, C. Antioxidant Enzymatic Systems in Pigment Tissue of Amphibia. **Pigment Cell Research**. v.2, p.208–212, 1989.
26. SLAWINSKA, D. et. al. The inhibition of peroxyradical-induced chemiluminescence by melanins. **Physiologic Medicinal Chemistry**. v.15 p.209–222, 1983.
27. STEPIEN, K. B., WILCZOK, T.. Studies of the mechanism of chloroquine binding to synthetic dopa-melanin. **Biochemistry. Pharmacology**. v.31 p.3359–3365, 1982.
28. SARNA, T. et. al. Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. **Experimental Eye Research**. v.76 p.89–98, 2003.

29. SCALIA, M. et. al. Lipid peroxidation in pigmented and unpigmented liver tissues: Protective role of melanin. **Pigment Cell Research**. v.3, p.115–119, 1990.
30. SLEIJFFERS, A., GARSSSEN, J. Ultraviolet radiation, resistance to infectious diseases, and vaccination responses. **Methods** v. 28, p.111–121, 2002.
31. SELGRADE, M. K., et. al. Dose response for UV-induced immune suppression in people of color: differences based on erythral reactivity rather than skin pigmentation. **Photochemistry and Photobiology**. p.74 v.88–95, 2001.
32. VERMEER, M., et. al. Effects of ultraviolet B light on cutaneous immune responses of humans with deeply pigmented skin. **Journal of Investigation. Dermatology**. v.97 p.729–734, 1991.
33. ATKINS, P. W., SHRIVER, D. F. **Inorganic Chemistry, 3th Edition**. USA, 2003, 480p.
34. COTTON, F. A. et al. **Advanced Inorganic Chemistry, 6th Edition**. 1999, 1376p.
35. ENOCHS, W. S. et. al. Purified human neuromelanin, synthetic dopamine melanin as a potential model pigment, and the normal human substantia nigra: characterization by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Journal of Neurochemistry**. v.61 p.68–79, 1993.
36. DUNFORD, R. et. al. Interaction of melanin with carbon- and oxygen-centered radicals from methanol and ethanol. **Free Radical Biologic Medicine**. v.19 p.735–740, 1995.
37. SWARTZ, A. A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. **Pigment Cell Research**. v.6 p.91–99, 1993.
38. LARSON, B. S. The toxicology and pharmacology of melanins. **The Pigmentary System, Physiology and Pathophysiology**. c.27, New York: Oxford University Press. p. 373–389, 1998.
39. DEZIDÉRIO, et. al. The films of synthetic melanin. **Journal of Non-Crystalline Solids**. v. 338, p.634–638, 2004.

40. GIDANIAN, S., FARMER, P. Redox behavior of melanins: direct electrochemistry of dihydroxyindole-melanin and its Cu and Zn adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.89, p.54-60, 2002.
41. BILINSKA, B. On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interactions with Cu²⁺ ion. **Spectrochimica Acta Part A**, v.57 p.2525-2533, 2001,.
42. GRISHAM, M. B. Role of reactive oxygen metabolites in pathophysiology. In: Grisham MB. Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen in Biology and Medicine. **Austin: R.G. Landes Company**. C. 7, 1992.
43. DEXTER, D.T. et. al. Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease. **Journal of Neurochemistry**. v.52, p.1830-1836, 2009.
44. ZECCA, L., et. al. X-ray absorption fine-structure spectroscopy studies of Fe sites in natural human neuromelanin and synthetic analogues. **Biochemical and Biophysical. Acta**. v.1138, p.6-10, 1992.
45. FARMER, Patrick J. et al. Melanin as a target for melanoma chemotherapy: pro-oxidant effect of oxygen and metals on melanoma viability. **Pigment Cell Research**, v.16 p.273-279, 2003.
46. FRANZ, K. J. et. al. Fe(III)-Coordination Properties of Neuromelanin Components: 5,6-Dihydroxyindole and 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid. **Inorganic Chemistry**. v.45, p.3657-3664, 2006.
47. PARKIN, D.M., WHELAN, S.L., FERLAY, J., TEPPLO L., THOMAS D.B. Cancer Incidence in Five Continents v. VIII. n. 155 International Agency for Research on Cancer Lyon, France, 2002.
48. WHO - World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update.
49. MARAIS, R. et. al. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**. v.445, p.851-857, 2007.

50. INOUE, M., SUZUKI, R., et al. Selective induction of cell death in câncer by gallic acid. **Biological Pharmaceutical Bull.** v.18(11), p. 526-530, 1995.
51. DELIGIANNAKIS, Y., et. al. Influence of Pb(II) on the Radical Properties of Humic Substances and Model Compounds. **Journal of Physical Chemistry A.** v.109, p.2223-2232, 2005.
52. JAKUBÍKOVÁ, Z. et. al. Interactions in Iron Gall Inks. **Chemistry of Paper.** v. 61, p.391-397, 2007.
53. ELVIRA, G. et. al. Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. **Food Chemistry Toxicology.** v.44, p.1191–1203, 2006.
54. CHIU-LAN, H., et. al. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against R-dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. **Food Chemistry.** v.103 p.528–535, 2007.
55. MISAO, U., et. al. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. **AntiViral Research.** v.73, p.85–91, 2007.
56. JITTAWAN, K.; SIRITHION, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. **Food Chemistry.** v110, p881–890, 2008.
57. HURRELL, R. F.; REDDY, M.; COOK, J. D. Inhibition of non-heme iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. **Journal of Nutrition.** v.81, p.289–295, 1999.
58. COOK, J. D.; REDDY, M. B.; HURRELLI, R. F. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition.** v.61, p.800-804, 1995.
59. KAWADA, M., OHNO, Y., et al.. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anticancer Drugs.** v.12, p. 847-852, 2001.

60. SAKAGUCHI, N., INOUE, M., et al. Cell death-inducing activity by gallic acid derivatives. **Biological Pharmaceutical Bull.** v.22, p.471-475, 1999.
61. PASA, T. B. et. al. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chemico-Biological Interactions.** v.181, p.175–184, 2009.
62. FIUZA S.M. et al. Conformational analysis of trihydroxylated derivative of cinnamic acid – a combined Raman spectroscopy and Ab initio study. **Journal of Molecular Structure.** v.693, p.103-118, 2004.
63. Van BESIE E., MARQUES M.P.M. Ab initio conformational study of caffeic acid. **Theo Chemical.** v.625, 265-275, 2003.
64. HOTTA H. et al. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. **Biochimica Biophysica Acta.** v.1526, p.159-167, 2001.
65. HYNES, M. J., MAIRTIN, O., The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry.** v.98, p.1457-1464, 2004.
66. Boilet L. et. al. Determination of the chelating site preferentially involved in the complex of Lead (II) with caffeic acid : A spectroscopic and structural study. **Journal of Physical Chemistry A.** v.109, p.1952-1960, 2005.
67. Deiana S. et al. Phenolic acid redox properties : pH influence on iron (III) reduction by caffeic acid. **Soil Science Society: An American Journal.** v.59, p.1301-1307, 1995.
68. BAES JR, C. F., MESMER, R. E., The Hydrolysis of Cations, John-Wiley & Sons, Interscience Publishers, New York, 1976.
69. MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J. Determination and Use of Stability Constantes. 2ed., New York: VCH Publishers, 200p. 1992.

70. MALISKA, A. M. *Apostila de Microscopia Eletrônica de Varredura*. UFSC, Santa Catarina, p.13-15, 2004.
71. SCHWARZENBACH, G., FLASCHKA, H., *Complexometric Titrations*, Methuen & Co., London, 1967.
72. ROSSOTTIM F. J. C. R., Potentiometric titrations using Gran's plot, **Journal of Chemical Education**, v. 42, p. 375-379, 1965.
73. 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.
74. LISENSKY, G. C. et. al. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**. v. 19, p.2854-2855, 1980.
75. BECKDE, A.D. Density Functional Methods Available in Gaussian 03 and MN-GFM. **Physics Review A**. v.38, p.3098, 1988.
76. PERDEW, J.P. Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy: Generalized gradient approximation. **Physics Review B**. v.34 p.7406, 1986.
77. PERDEW, J.P., YUE, W. Density-functional approximation for the correlation energy. **Physics Review B**. v.33, p.8800, 1986.
78. 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
79. 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.

80. NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. USA, 1986, p.231.

81. SIMON, C. Moss, et al. X-Ray characterization of melanins. **Pigment Cell Research**, v.7 p. 255-262, 1994.

82. CHIO, B. Characterization of port wine stain skin erythema and melanin content. **Lasers Surg Med.** v.34, p.174-81, 2004.

83. ZANELLO, P. Voltammetric Techniques. Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice and Application. British, 2003, p.50-60.

84. SZPOGANICZ, B., MOTEKAITIS, R. J., MARTELL, A. E. Equilibrium studies and molecular recognition in the catechol- and TIRON-bridged binuclear cobalt(II)1,4,7,13,16,19-hexaaza-10,22-dioxacyclotetracosane dioxygen complexes. **Inorganic Chemistry**, v.29, p.1467-1474, 1990.

85. COSTA, T.G. Estudo da afinidade do íon Fe(III) por melaninas sintéticas DHI. Trabalho de Conclusão de Curso, Departamento de Química, UFSC, 2009.

86. SIMON, J. D., HONG, L. Binding of Metal Ions to Melanin and Their Effects on the Aerobic Reactivity. Photochemistry and Photobiology. v.8, p.477-481, 2004.

87. BARRETO, J. W. et. al. Preparation, UV-vis, IR, EPR and resonance Raman study of Fe, Ni, Co and Zn dioxolene complexes. **Spectrochimica Acta Part A.** v. 68, p.612-618, 2007.

88. ARAUJO, P. Z. et. al. Interaction of Catechol and Gallic Acid with Titanium Dioxide in Aqueous Suspensions: Equilibrium Studies. **Langmuir**, v.21, p.3470-3474, 2005.
89. FAZARY, A. E. et. al. Iron Complexation Studies of Gallic Acid. **Journal of Chemical and Engineering Data**. v. 54, p.35-42, 2009.
90. CHSTEEN, N. D., ABDALLAH, F.B. Spin concentration measurements of high-spin iron(III) ions in biological samples: theory and application. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**. v. 13, p.15-24, 2008.