



UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
CFM - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Laboratório de Equilíbrio Químico

Estudo da afinidade da Melanina pelo íon Fe(III)

Aluno: Thiago Guimarães Costa
Orientador: Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

Florianópolis, novembro de 2009.

THIAGO GUIMARÃES COSTA

Estudo da afinidade da Melanina pelo íon Fe(III)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química sob orientação do Prof. Dr. Bruno Szpoganicz.

Florianópolis, 2009

Melanin and melanogenesis have been fascinating subjects for Chemists not only because of the widespread presence of pigments in nature but also because of the complexity of their structures and functions.

Prota, 1992

Dedico este trabalho a meus pais Osires e Marilia.

Agradecimentos

- Aos meus pais por todo apoio e motivação nesta caminhada.
- Ao Professor Bruno Szpoganicz não apenas pela orientação, mas pela grande amizade que fizemos durante a minha vida acadêmica.
- À minha namorada Graziela Salvador pelo carinho.
- Aos colegas do laboratório de Equilíbrio Químico: Anderson, Mariane, Gledir, Ana, Tamara, Suelen, Bruna, e um agradecimento especial ao Fábio da Silva Miranda, Juliano Viencete, Maria Luiza e Aline Signori por me ajudarem e me receberem de braços abertos no começo da minha Iniciação Científica.
- Aos amigos que fiz durante o curso, especialmente Daniel, Leko, Jahn, Ivan, Welman, Juan e Larissa que sempre estiveram do meu lado na reta final da jornada.
- A todos os Professores do Departamento de Química da UFSC que me ajudaram nesta formação.
- Ao LABINC, especialmente a Prof^a Rosely e ao mestrando Victor pelas análises eletroquímicas e UV-Vis.
- Ao GEPEEA, especialmente a Geovana, pelos testes eletroquímicos.
- Ao Laboratório de Catálise Biomimética, especialmente para o Welman pelas análises de UV-Vis.
- À Central de Análises e aos técnicos que colaboraram para obtenção dos resultados.
- Ao PIBIC/CNPq pela bolsa de iniciação científica.
- Ao Departamento de Química da UFSC pelo suporte estrutural.
- E a todos de que, de alguma maneira, estiveram do meu lado, meus sinceros agradecimentos.

Índice

Resumo	9
1. Introdução	10
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1. Fundamentação Teórica, Histórico e Relevância do Assunto	12
2.2. Classificação das Melaninas	15
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. Materiais e métodos	18
4.1. Materiais, métodos e instrumentação	18
4.1.1. Materiais	18
4.2. Métodos e Instrumentação	18
4.2.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	18
4.2.2. Espectroscopia no UV-Vis	18
4.2.3. Titulação potenciométrica	19
4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura e Força de Campo	21
4.2.5. Eletroquímica	21
4.3. Síntese da melanina DHI e Fe(III)-(DHI)	22
5. Resultados e discussões	23
5.1. Caracterização da melanina DHI	23
5.1.1 Espectroscopia no infravermelho	23
5.2. Caracterização das interações com Fe(III)	24
5.2.1. Espectroscopia no infravermelho	24
5.2.2. Espectroscopia na região do UV-Vis	25
5.2.3. Estudo de equilíbrio potenciométrico	26
5.2.4. Microscopia Eletrônica	29
5.2.5. Eletroquímica	31
6. Conclusões e perspectivas	32
7. Referências Bibliográficas	33

Índice de Figuras

Figura 1: Fórmula estrutural da tirosina	12
Figura 2: Reação de síntese do precursor da melanina sintética.....	12
Figura 3: Mecanismo de oxidação da tirosina à melanina – Melanogênese	
Figura 4: Diferença dos agregados segundo Simon; a direita a melanina sintética e a esquerda a melanina natural.....	13
Figura 5: Fenômeno de tautomerismo existente na molécula precursora da melanina sintética, representando o grupo quinone-imina.....	14
Figura 6: Estrutura proposta para a eumelanina.....	15
Figura 4: Esquema proposto para a formação das feomelaninas.....	16
Figura 8: Experimento da reação de hidrólise do DAI ao DHI. (A) Mostra o começo da reação onde pode ser visto em branco o DAI que não reagiu; (B) com o avanço da reação o DAI é consumido formando a melanina DHI; (C) no final da reação com todo DAI consumido temos o produto.....	22
Figura 9: Espectroscopia no infravermelho do composto de partida DAI em comparação com as melaninas quimicamente sintetizadas DHI.....	23
Figura 10: Espectroscopia no infravermelho da melanina DHI pura e em presença de Fe(III) em pH 4 e 10.....	24
Figura 11: Espectros no UV-Vis da melanina sintética com adições de alíquotas de Fe(III), à esquerda em pH 7 e à direita em pH 10.....	25
Figura 12: Curva de titulação reversa da melanina DHI em presença e ausência de íons metálicos.....	27
Figura 13: Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema DHI-Fe(III), (2:1 equivalentes).....	28
Figura 14: Imagem de Microscopia de Força de Campo das melaninas DHI utilizadas neste trabalho.....	30
Figura 15: Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada com EDX do complexo melanina DHI - Fe(III).....	30
Figura 16: Voltamograma cíclico (a esquerda), obtidos a diferentes velocidades de varredura, voltamograma de onda quadrada (a direita) para o sistema DHI-Fe(III) em DMSO, a 25°C. Eletrólito suporte: 0,1 mol.L ⁻¹	

TBAP; eletrodo de trabalho trabalho: eletrodo de carbono vítreo; eletrodo de referência: Ag/Ag^+ , contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: Fc/Fc^+ 31

Figura 17: Processo redox envolvendo a oxidação do catecol a quinona.... 32

Índice de Tabelas

Tabela 1: Quantidades molares dos grupos doadores por grama de melanina DHI calculadas a partir de titulação potenciométrica.....	26
Tabela 2: Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas no sistema melanina DHI-Fe(III).....	28

Índice de abreviaturas

DAI- 5,6-Diacetoxi-indol

DHI- 5,6-Dihidroxi-indol

DHICA- Ácido 5,6-Dihidroxi-indol-2-Carboxílico

[TBA(PF₆)] - Hexafluorofosfato de Tetrabutilamônio

Cat- Catecol

QI- Quinone-Imina

EDTA- Ácido Etileno Diamino Tetracético

UV-Vis- Espectroscopia na região do Ultravioleta - Visível

FTIV- Espectroscopia na região do Infravermelho com transformação de Fourier

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

FEG- Microscopia Eletrônica de Força de campo

EDX- Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X

mmol- milimoles

ν - estiramento (IV)

Resumo

Melanina é um pigmento escuro formado pela oligomerização de moléculas, com grupos majoritários catecol e quinone-imina, provenientes da oxidação da tirosina sob ação de enzimas, este oligômero possui grande afinidade por íons metálicos. Os íons metálicos associados às melaninas induzem a formação de espécies oxigenadas reativas nos melanócitos, que contribuem para a morte de células com melanomas.

Neste trabalho, utilizamos melaninas sintéticas derivadas da hidrólise básica do 5,6-diacetoxi-indol(DAI), caracterizando-as e utilizando para estudar sua afinidade por Fe(III). O estudo de caracterização foi realizado em estado sólido por espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de energia dispersiva de Raios X e a morfologia do oligômero estudada por microscopia eletrônica de varredura e força de campo. Em solução foram estudados os equilíbrios envolvendo os grupos doadores da melanina com o centro metálico.

Com o objetivo de confirmar as espécies resultantes do estudo de equilíbrio, foram realizadas caracterizações em solução por espectroscopia no UV-Visível. E o comportamento redox do sistema DHI-Fe(III) foi elucidado por voltametria cíclica e de onda quadrada.

Os resultados obtidos no IV do estado sólido mostraram que o oligômero precipitado em pH ácido coordena ao centro metálico pelos grupos catecol, já em pH alcalino a coordenação ocorre pelos grupos quinone-imina. Resultado semelhante foi obtido em solução onde as constantes de formação para as duas interações foram calculadas. As espécies também foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis.

1. Introdução

Melanina é obtida naturalmente da polimerização de um aminoácido chamado tirosina sob ação de enzimas.¹⁻² São oligômeros e um dos pigmentos com maior atenção atual. Na última década pode se entender que as melaninas são agregados e não polímeros de cadeia longas: as subunidades fundamentais, dihidroxindol (DHI) e dihidroxindol-carboxilato (DHICA) oligomerizam para formar protomoléculas de 3 a 10 unidades indol que se agrupam em camadas, formando agregados nano moleculares.³

Acredita-se que os raios ultravioleta provocam o aumento da atividade da tirosinase nos melanossomas.⁴ Células com melanomas têm demonstrado sensibilidade acentuada quanto à indução de íons metálicos, que pode ser consequência do comportamento pró-oxidante do pigmento melanina.⁵

Íons Zn(II), Cu(II) e Fe(III) são tóxicos para as melanomas. Foi sugerido que fragmentos de melanina nos melanomas acumulam íons metálicos, aumentando o processo oxidativo, produzindo ROS (espécies oxigenadas reativas), que vence as defesas dos melanomas.^{5,6}

Szpopanicz e colaboradores caracterizaram as interações da melanina sintética com os íons Cu(II) e Zn(II).⁴ Nesse estudo, as constantes dos equilíbrios detectados foram determinadas.

Pela dificuldade de isolar a melanina natural, utilizam-se melaninas sintéticas com a mesma unidade indol para realização dos experimentos. A síntese da melanina foi realizada pelo método de Protá que consiste na hidrólise básica do diacetoxindol (DAI) produzindo o dihidroxindol (DHI).⁷

Foi planejado o estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de emissão de campo (FEG)⁸ acoplado com o analisador por energia dispersiva (EDS) para determinação elementar da melanina.

O estudo modelo das interações do íon Fe(III) com a melanina sintética foi acompanhado por titulação potenciométrica, que é muito eficaz na determinação de interações químicas e por isso, a potenciometria é a técnica escolhida para caracterizar os equilíbrios ácido-base e de complexação envolvendo as melaninas e o íon Fe(III). Além do estudo potenciométrico foram realizadas espectroscopias no infra-vermelho e UV-Visível para comprovação dessas interações.⁹⁻¹³

Estudos de eletroquímica envolvendo a melanina em presença do íon metálico foram realizados com o intuito de observarmos a presença do metal no

sistema, estudos eletroquímicos como voltametria cíclica e EPR foram realizados por Farmer e colaboradores envolvendo íons Cu(II) e Zn(II) complexados em meio celular.⁵⁻¹⁴

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Fundamentação Teórica, Histórico e Relevância do Assunto

Os primeiros relatos sobre a obtenção da melanina foram publicados por Davis e colaboradores¹⁵ em 1869, onde 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.

Gortner e colaboradores¹ estudaram a origem da melanina natural (eumelanina) presente na pele e no cabelo e obtiveram como resultado a polimerização de um aminoácido, a tirosina (Figura 1).

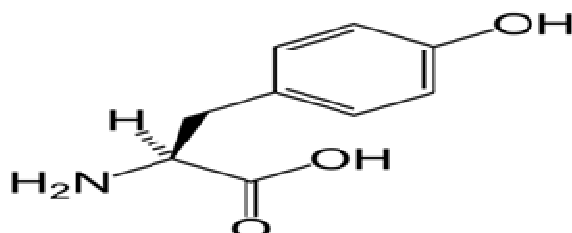


Figura 1: Fórmula estrutural da tirosina.

Já tendo conhecimento que a melanina é proveniente da tirosina Young e colaboradores² realizaram a primeira análise elementar do pigmento extraído por Davis, sendo C = 53.56 %, H= 5.11 %, N= 15.47 %, S = 2.53 %.

Em 1986 Prota e colaboradores⁷ desenvolveram um método de síntese para eventuais estudos da melanina, tendo em vista que até então era impossível isolar o pigmento puro. Devido à oxidação da tirosina, foi desenvolvida a síntese a partir da hidrólise básica do Diacetoxiindol obtendo assim o dihidroxiindol, que se oligomeriza na presença do dioxigênio (Figura 2).

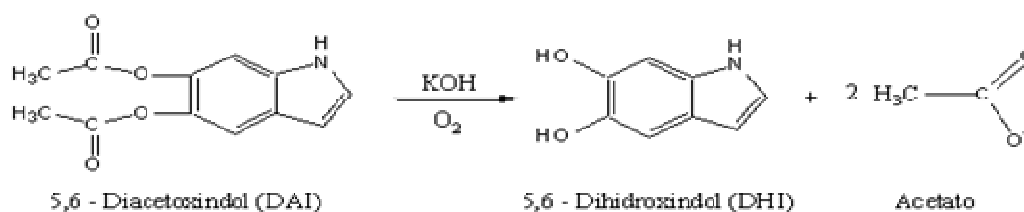


Figura 2: Reação de síntese do precursor da melanina sintética.

Uma análise mais detalhada sobre a superfície e estrutura das melaninas só foi possível após o desenvolvimento de novos equipamentos e aperfeiçoamento nas técnicas de extração e síntese. Entre 1994 e 1997 foram estudados os principais mecanismos da formação da melanina natural. Rosei e colaboradores¹⁶⁻¹⁸ 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 (Figura 3).

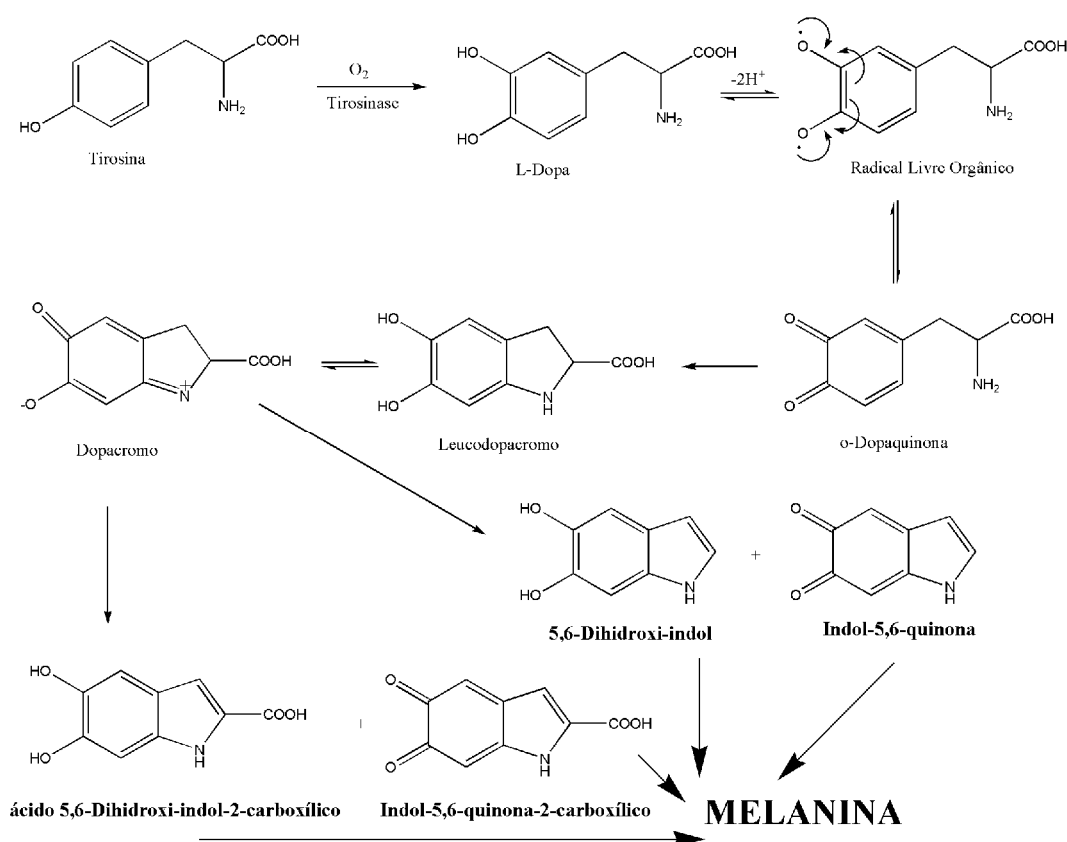


Figura 3: Mecanismo de oxidação da tirosina à melanina – Melanogênese.

Somente em 2000, Prota¹⁹ realizou a extração da melanina natural do cabelo e da pele sem impurezas. 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; porém a extração é uma técnica que exige alto custo e muito tempo, sendo grande parte dos estudos realizados com melaninas sintéticas e depois expandidos para as naturais extraídas de mamíferos.

Com os avanços de Prota, foram realizadas análises mais detalhadas utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de melaninas naturais e sintéticas. Simon e colaboradores⁸ conduziram os experimentos para a diferenciação dos dois oligômeros. Como resultado, observaram que a melanina natural se comporta de forma ordenada e a sintética de forma amorfa (Figura 5). As melaninas naturais apresentam oligômeros em torno de 15nm enquanto a sintética DHI se aglomera em camadas (Figura 5).

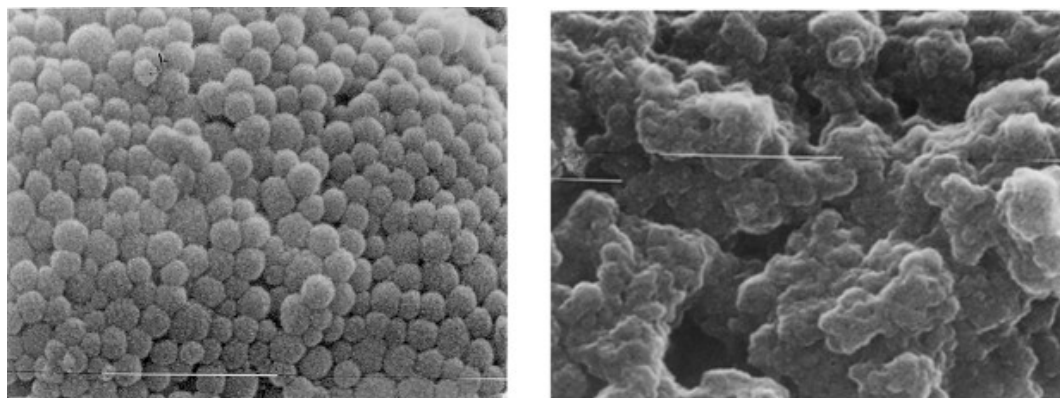


Figura 4: Diferença dos agregados segundo Simon; a direita a melanina sintética e à esquerda a melanina natural.

Outras caracterizações foram realizadas, como a de Bilinska, que foi um dos primeiros estudos de infravermelho da melanina natural e sintética.^{9,20} Foi constatado em seu trabalho três bandas características: uma banda em 3300cm^{-1} atribuída aos grupamentos catecois, outra banda em 1625cm^{-1} atribuída a ν C=C e/ou grupos carbonilas contendo nitrogênio heterocíclico, e 1470cm^{-1} relativo aos grupos o-hidroxiquinolina (ν C-N de iminas), esta última estrutura, proposta por Szpoganicz e colaboradores, é relativa ao tautomerismo da molécula (Figura 6).

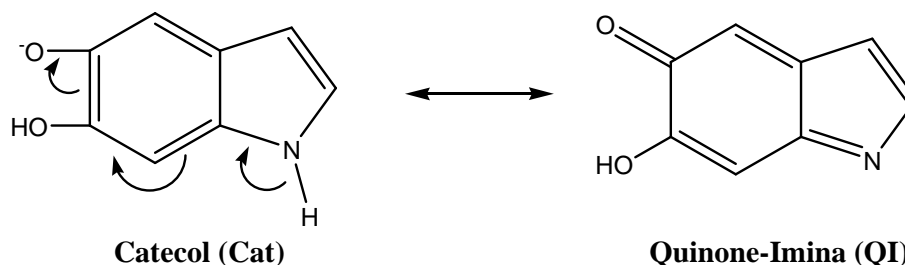


Figura 5: Fenômeno de tautomerismo existente na molécula precursora da melanina sintética, representando o grupo quinone-imina.

Farmer e colaboradores mostraram que a interação metal-melanina consegue extinguir as células melanoma, isto é, células cancerígenas⁵. Neste trabalho foi demonstrado o EPR aplicado a análise da interação metal-melanina e que os complexos formados com Zn^{2+} e Cu^{2+} sob meio oxidativo induzem a produção de espécies peróxidas e radicais hidroxil, responsáveis pela degradação das células melanomas.

2.2 Classificação das Melaninas

Na natureza existem vários tipos de melaninas existentes mas três destacam-se por serem as mais encontradas: (i) as Eumelaninas, (ii) as Feomelaninas e (iii) as Alomelaninas.

As eumelaninas (i) são as mais comuns encontradas nos animais. São compostos formados a partir da oxidação da tirosina, dopa, dopamina, via reação entre os derivados indólicos de unidades DHI e DHICA (Figura 3). Apresentam-se geralmente como pigmentos de tonalidade negra a marrom, responsáveis pela coloração escura dos cabelos e pele.²¹

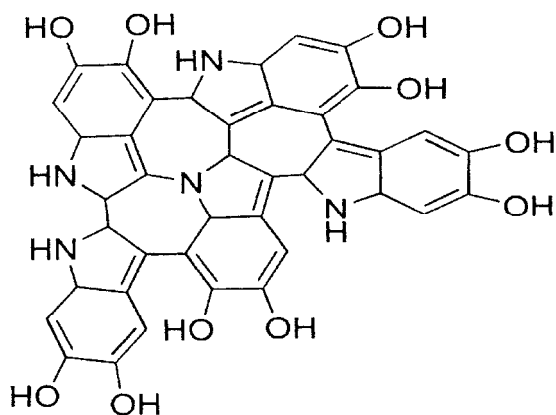


Figura 6: Estrutura proposta para as eumelaninas.

Feomelaninas (ii) constituem os pigmentos mais claros, de tonalidade que variam de amarelo a vermelho. São obtidas a partir de reações envolvendo cisteína, geralmente estruturadas em monômeros benzotiazidas (Figura 7).²¹

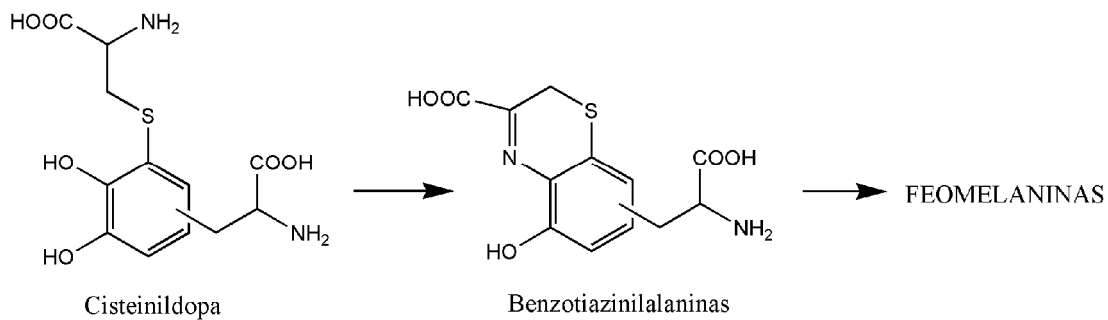


Figura 7: Esquema proposto para a formação das feomelaninas.

Mais comuns no reino vegetal estão as alomelaninas (iii), que são formadas durante a “polimerização” oxidativa de substratos fenólicos, como catecol e outros polihidroxiaromáticos na presença da enzima poli-fenoloxidades.²²

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar a melanina sintética DHI, e determinar suas interações com o íon Fe(III).

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar a melanina DHI através da hidrólise básica do Diacetoxindol (DAI) que oligomeriza e dá origem a melanina sintética, e seus complexos formados com o íon Fe(III).
- Purificar o composto sintetizado para posteriores análises.
- Utilizar microscopia eletrônica de varredura e de força de campo para observar a morfologia do bio-oligomero e as diferenças da presença do íon Fe(III).
- Aplicar o analisador por energia dispersiva para identificar a presença do íon Fe(III) no material.
- Realizar titulações potenciométricas para determinar as constantes de formação e as interações com o íon metálico.
- Caracterizar a melanina sintética em presença e ausência do íon metálico por espectroscopia de infravermelho e UV-Visível.
- Elucidar as espécies redox presentes no sistema melanina DHI-Fe(III) por voltametria cíclica e de onda quadrada.

4. Materiais e métodos

4.1 Materiais, métodos e instrumentação

4.1.1 Materiais

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes empregados na síntese e nas análises foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: diacetoxindol obtido da TCI América, Portland, OR., 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 Diclorometano (Nuclear QMC Ltada), cloreto de ferro(III) hexahidratado (Vetec).

4.2 Métodos e instrumentação

4.2.1 Espectroscopia no 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 e em presença do metal foram analisadas em pastilhas de KBr.

4.2.2 Espectroscopia no UV-Vis

Os espectros na região do ultravioleta-visível foram obtidos em um espectrofotômetro da Varian modelo CARY 50BIO no Laboratório de Catálise Biomimética - Departamento de Química da UFSC. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com capacidade para 4mL e 1cm de caminho ótico. Uma série de soluções contendo concentrações apropriadas de melanina DHI na faixa de pH compreendida entre 7 e 10 foram medidas em presença e ausência de alíquotas de metal entre 200 e 400nm.⁴

4.2.3 Titulação potenciométrica

A técnica de titulação potenciométrica é muito empregada para estudos de medidas de equilíbrio de complexos metálicos em solução, podendo-se usar o eletrodo de vidro, muito preciso nas medidas de concentração de íons hidrogênio. Nesse tipo de titulação, adiciona-se uma base ou um ácido padronizados, em incrementos de volume conhecidos, ao sistema contendo um ligante, na ausência ou na presença de íon metálico. A potenciometria nos fornece as espécies formadas em solução, para comprovação dessas espécies utilizam-se medidas espectroscópicas como estudos de absorvâncias espectrofotométricas ou ressonância magnética nuclear.²³

Os experimentos foram realizados em sistema totalmente aquoso devido a solubilidade da melanina DHI 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). Foi utilizado um titulador automatizado da Metrohm modelo Titrino Plus 848 acoplado com um eletrodo de vidro e outro de referência do tipo Ag-AgCl, calibrados na célula com soluções diluídas de HCl para a leitura direta do pH ($\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$). As medidas foram feitas indiretamente devido a baixa solubilidade da melanina em pH abaixo de quatro; com soluções contendo 20ml de melanina DHI e força iônica ajustada para $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ com KCl, sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO_2 atmosférico. As soluções foram preparadas com água (bidestilada na presença de KMnO_4 e previamente fervida). As soluções tituladas tiveram os valores de pH ajustados próximo de 12 com adição de uma solução padrão de KOH $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ isenta de CO_2 . Para as titulações foi utilizada uma solução padrão de HCl $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$, 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.

O pK_w da água contendo $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl utilizado para os cálculos foi de 13,78.²⁴

No arquivo de entrada para o cálculo das constantes de estabilidade dos sistemas em estudo, envolvendo metal, é necessário também fornecer as constantes de hidrólise do metal. Os valores dessas constantes foram calculados para as condições experimentais deste trabalho, conforme Baes.²⁵ A solução metálica de

Fe(III) foi preparada a partir do sal metálico comercial e padronizada por titulação com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).²⁶ Para evitar a hidrólise do metal trivalente, adiciona-se ácido clorídrico na solução. A quantidade de ácido adicionado é determinada quantitativamente pelo método de Gran's.²⁷

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 SPECIES.^{24,28} 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 cada interação que possa existir a partir dos componentes da solução e o perfil de pH determinado experimentalmente *versus* o volume de 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, minimizando o erro entre a curva experimental e a calculada. As interações 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 (ajustes) 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 aumentar a sensibilidade dos cálculos computacionais nas regiões de tamponamento do sistema e diminuir a importância das inflexões.²⁸

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Força de Campo (FEG)

Foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de força de campo (FEG) para o estudo nanomolecular e morfológico da estrutura da melanina isolada e diferenciá-la em ausência e presença do íon metálico. A principal diferença dos dois tipos de microscopia está no filamento utilizado para a descarga do feixe de elétrons na amostra, na microscopia de varredura 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 000x 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 fonte.²⁹

Em nosso caso, estaria viável o uso do MEV, pois se adapta bem à micro-análise, mas o aumento de 50-200 mil vezes necessita o uso do FEG que dispõe de altos brilhos da fonte e melhor resolução de imagem. As amostras foram colocadas em “stubs” e fixadas com cola prata. Após a secagem, foi recoberta com ouro para a análise no microscópio eletrônico marca Phillips, modelo XL 30 no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

4.2.5 Eletroquímica

A investigação de espécies redox da melanina em presença de Fe(III) foi realizada 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 a temperatura ambiente. Neste experimento utilizou-se hexafluorofosfato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte e uma célula eletrolítica com três eletrodos: eletrodo de trabalho – carbono vítreo; eletrodo auxiliar – platina; eletrodo de referência – Ag/Ag⁺, calibrado com o ferroceno como padrão interno.³⁰

4.3 Síntese da melanina DHI e Fe(III)-(DHI)

A síntese da melanina DHI segue o método de Prota e colaboradores⁷ onde 120mg (0.5145mmol) de 5,6-diacetoxindol (DAI) foi hidrolisada em presença de 250ml de uma solução aquosa contendo um excesso molar de 20% de KOH (1.28mmol). A mistura reacional é deixada sob agitação por aproximadamente 6 horas. O DAI não é solúvel em água (Figura 8 A e B) e fica precipitado em meio aquoso, entretanto com o decorrer da reação o DAI é consumido formando o DHI e oligomerizando formando uma solução escura (melanina DHI) (Figura 8 C). O isolamento do material é feito em meio ácido em baixas temperaturas onde a solubilidade da melanina é diminuída.

Para o estudo da interação com Fe(III) a melanina sintetizada foi deixada em presença de 1:2 molar Fe(III)/DAI utilizando $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por 24h em 2 diferentes pHs seguindo o procedimento realizado por Bilinska⁹ com os íons Cu(II) e Zn(II) para haver a interação necessária e isolado posteriormente para realização das análises, o Fe(III)-DHI é precipitado a 0°C. Vestígios de DAI ainda presentes no material isolado são retirados por recristalização da melanina em diclorometano.



Figura 8: Experimento da reação de hidrólise do DAI ao DHI. (A) Mostra o começo da reação onde pode ser visto em branco o DAI que não reagiu. (B) Com o avanço da reação o DAI é consumido formando a melanina DHI. (C) No final da reação com todo o DAI consumido temos o produto.

5. Resultados e discussões

5.1 Caracterização da melanina DHI

5.1.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho mostra que, em virtude da oligomerização, o DAI é convertido em DHI sofrendo uma mudança muito brusca em sua estrutura, como conseqüência, o espectro do produto final resultante do processo de hidrólise é muito diferente quando comparado ao do composto inicial (Figura 9). Contudo, o produto final possui características espectroscópicas típicas da melanina referente a grupos catecol em $\nu(-OH)3300\text{cm}^{-1}$ e quinone-imina em $\nu(C=O)1630\text{cm}^{-1}$ e $\nu(C-N)1472\text{cm}^{-1}$ como referenciadas por Bilinska^{9,20} e a principal diferença em relação ao DAI é o desaparecimento da banda em $\nu(C=O)1750\text{cm}^{-1}$ relativo a carbonila do ester. O aumento destes grupamentos funcionais na estrutura da melanina pode aumentar a possibilidade de quelação desta estrutura a espécies metálicas.

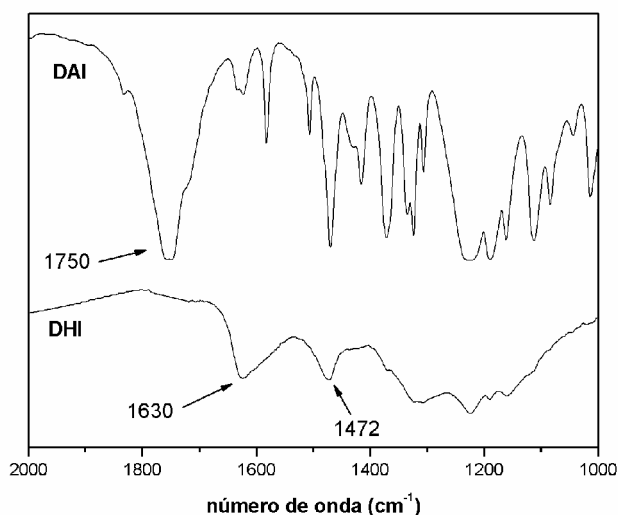


Figura 9: Espectroscopia de infravermelho do composto de partida DAI em comparação com as melaninas quimicamente sintetizadas DHI.

5.2 Caracterização das interações com Fe(III)

5.2.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

O espectro de IV da melanina sintética isolada em presença e ausência de íons metálicos em pH 4 e 10 é mostrado na Figura 10. Bilinska e colaboradores⁹ fizeram os primeiros estudos de IV da melanina e identificaram grupos característicos presentes em melaninas sintéticas. Uma banda em 3300cm^{-1} atribuída aos grupamentos catecois, outra banda em 1625cm^{-1} atribuída a $\nu\text{C}=\text{C}$ e/ou grupos carboxilatos contendo nitrogênio heterocíclico, e 1470cm^{-1} relativo a $\nu\text{C}-\text{N}$ de grupos imina, também presentes em moléculas derivadas da o-hidroxiquinolina.

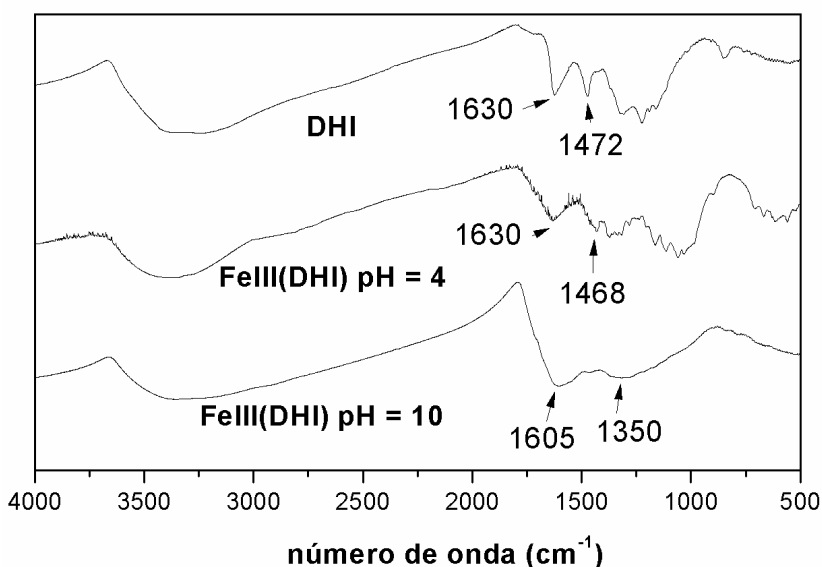


Figura 10: Espectroscopia de infravermelho da melanina DHI pura e em presença de Fe(III) em pH 4 e 10.

A complexação do metal é identificada pelo deslocamento da banda em 1625cm^{-1} e 1470cm^{-1} para valores de freqüências menores relativos à coordenação do metal pelos grupos quinona-imina. Em pH 4 não ocorre deslocamento indicando que em valores de pH ácidos apenas existe a coordenação do metal pelo grupo catecol. Já em pH 10 ocorre um deslocamento dessas bandas, devido à coordenação do metal pelos grupamentos quinone-imina. Nakamoto³¹ reporta o deslocamento de $\nu\text{C}=\text{O}$ para menores números de onda quando complexados por íons metálicos e é visível em nosso sistema. Esses resultados estão de acordo com

os estudos de equilíbrio potenciométrico mostrando onde ocorre a coordenação do metal em diferentes valores de pH.

5.2.2 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros de UV-Vis com adição de alíquotas de Fe(III) estão representados na Figura 10. Szpoganicz e colaboradores⁴ reportaram uma banda em $\lambda = 230\text{nm}$ relativa aos grupos catecol presentes na melanina sintética. Mosca e colaboradores¹⁶ mostraram em seu trabalho uma banda em $\lambda = 235\text{nm}$ relativa ao grupamento catecol e um ombro em $\lambda = 280\text{nm}$ relativo a modificações estruturais no bio-oligômero, e relataram a diferença espectral de diferentes tipos de melaninas sintetizadas de variados modos.

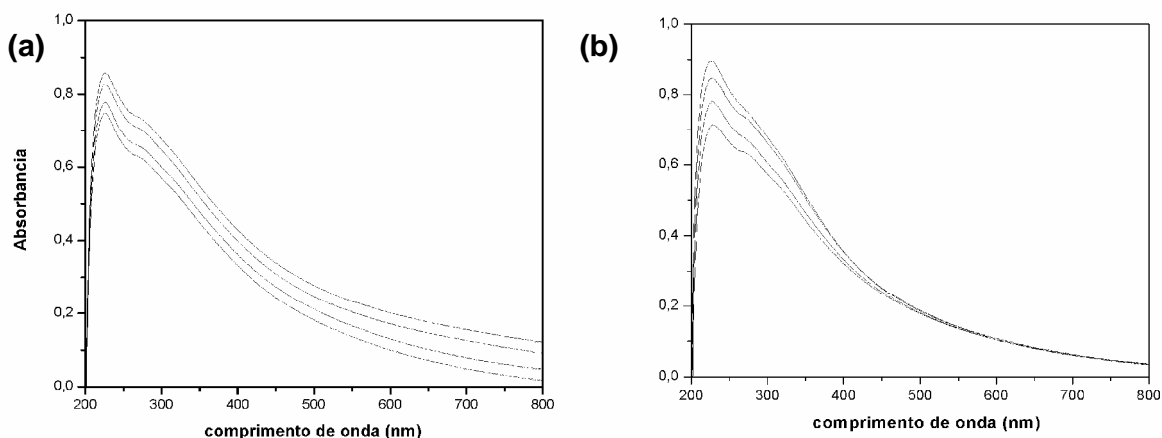


Figura 11: Espectros de UV-Vis contendo $0,713\mu\text{mol}$ (na proporção 2 : 1 catecol : quinone-imina) de melanina sintética com adições de alíquotas de $0,1\mu\text{mol}$ de Fe(III), em pH 7 (a) e em pH 10 (b).

Os espectros mostrados acima revelam uma banda em $\lambda = 228\text{nm}$ e um ombro em $\lambda = 270\text{nm}$, atribuídas a transição $p \rightarrow p^*$ aromática do grupamento catecol em sistemas condensados e um deslocamento batocromico devido a presença de quinone-imina respectivamente. O comportamento da interação do metal com os grupamentos catecol que são majoritários no sistema melanina DHI se mostra no aumento da absorbância com a adição de alíquotas de Fe(III) que podem ser vistas em ambos os espectros. Já a interação do metal com a quinona-imina pode ser observado no espectro em pH 10 no desaparecimento do ombro com a adição de alíquotas de íon metálico.

Essas mudanças estão de acordo com os estudos de equilíbrio potenciométrico e espectroscopia no infravermelho, que nos mostram que em pH neutro e ácido, a interação do metal é dada pelos grupamentos catecóis. E, em pH alcalino acima de 9, ocorre a interação de um grupamento quinona-imina na esfera de coordenação do íon metálico.

5.2.3 Estudo de equilíbrio potenciométrico

As curvas de titulação potenciométrica em presença e ausência de íons metálicos são mostradas na Figura 12. A melanina DHI livre apresenta duas regiões tamponadas distintas: um tampão em pH entre 9 e 12 relativo a protonação dos grupos catecóis (Cat) e próximo de 6 devido relativo a protonação dos grupos quinona-imina (QI)⁴. As curvas envolvendo os sistemas metálicos estão localizadas abaixo da curva da melanina livre, indicando a coordenação do íon metálico com os grupos doadores da molécula da melanina.

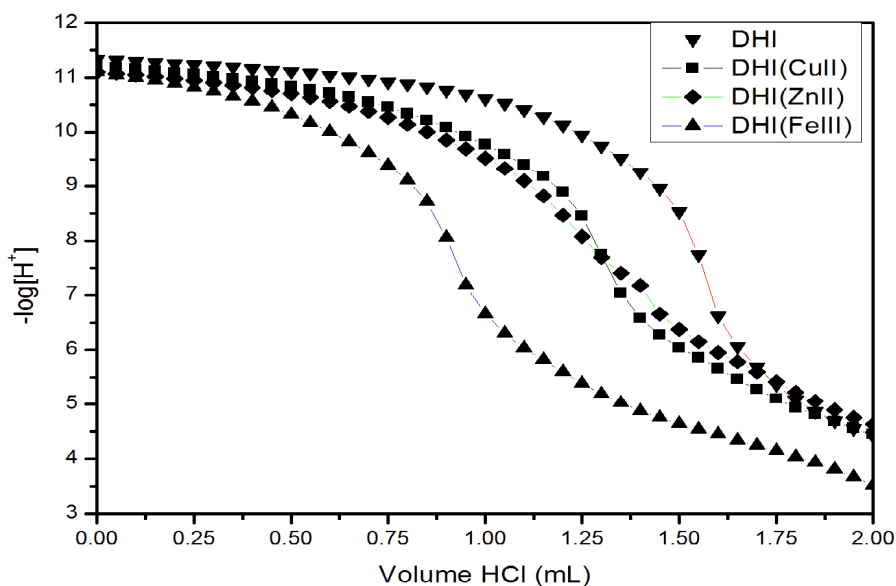


Figura 12: Curva de titulação reversa da melanina DHI em presença e ausência de íons metálicos.

A quantidade de grupos doadores Catecol e Quinone-imina calculada em nosso estudo está mostrada na Tabela 1.

Tabela1: Quantidades molares dos grupos doadores por grama de melanina DHI, calculadas a partir de titulação potenciométrica*

Grupo presente na melanina sintética	Quantidades em mmol/g (DP)**
Quinone-imina	1,402 (0,012)
Catecol	2,799 (0,016)

*Valores obtidos através da média de 3 titulações.

**Desvio Padrão dos Resultados.

Uma comparação entre as interações de metais divalentes como Cu(II) e Zn(II) estudada por Szpoganicz e colaboradores, e este estudo envolvendo Fe(III) pode ser observada na curva, em presença de Fe(III) o deslocamento é maior, evidenciando uma complexação mais forte com a melanina, em comparação aos íons divalentes.

O diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o sistema DHI-Fe(III) é mostrado na Figura 13, e apontam as possíveis espécies formadas resultantes da interação da melanina com o íon metálico na faixa de pH estudado. A formação das espécies, mono e binuclear, protonados, não protonados e espécies hidróxidas foram investigados sob as condições experimentais desse trabalho, ambos formam espécies hidróxidas.

A formação das espécies, mono e binuclear, protonadas e não protonadas, e espécies hidróxidas foram investigadas sob as condições experimentais deste trabalho, ambas formas espécies hidróxidas.

Em pH ácido a espécie monohidroxida $\text{Fe(OH)(CatH}_2\text{Cat)}$ é predominante. Com a elevação do pH, a espécie dihidroxida $[\text{Fe(OH)}_2(\text{CatH}_2\text{Cat})]$ é favorecida, com um máximo de 80% em pH próximo de 9,5. Em valores de pH acima de 9, duas novas espécies são formadas: a espécie contendo um catecol monoprotonado $[\text{Fe(OH)}_2(\text{CatHCat})]^{2-}$ e ainda a associação de uma molécula de quinone-imina, $[\text{Fe(OH)}_2(\text{Qi})(\text{CatHCat})]^{3-}$.

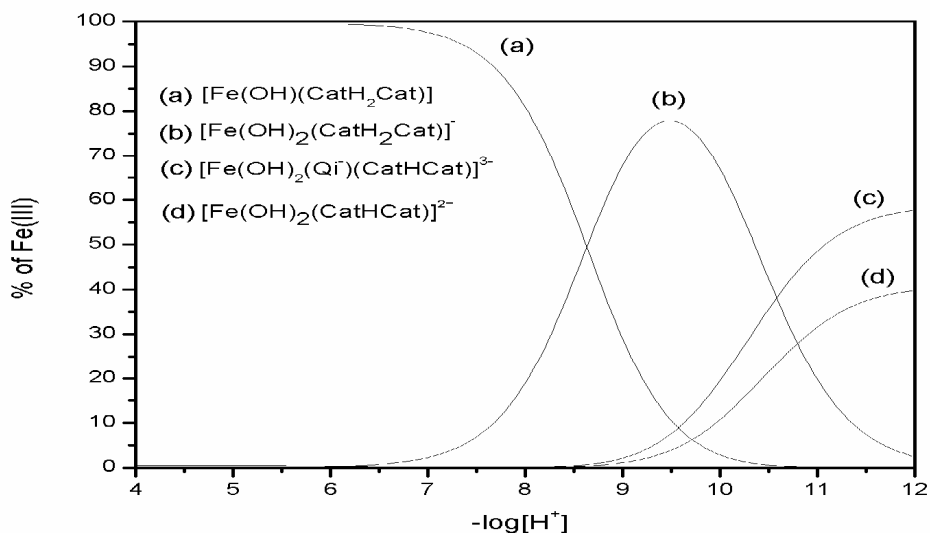


Figura 13: Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema DHI-Fe(III), (2:1 equivalentes).

As constantes de estabilidade das espécies identificadas por titulação potenciométrica estão mostradas na Tabela 2.

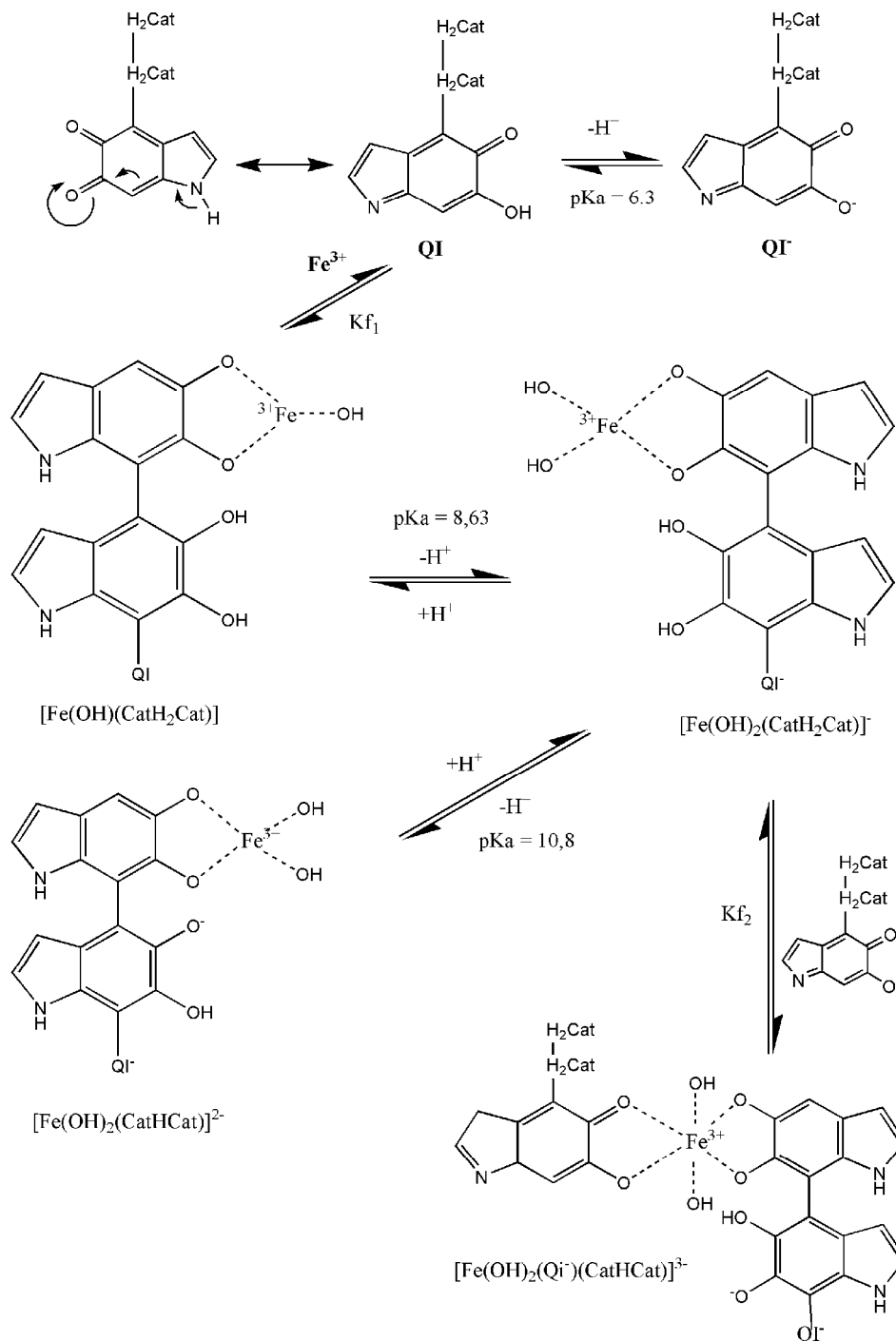
Tabela2: Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para o sistema melanina DHI-Fe(III)*

Equilíbrio	LogK (DP)**
$[\text{Fe}(\text{OH})(\text{CatH}_2\text{Cat})] / [\text{Fe}^{3+}][\text{CatH}_2\text{Cat}^2][\text{OH}^-]$	42.52 (1.03)
$[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{CatH}_2\text{Cat})]^- [\text{H}^+] / [\text{Fe}(\text{OH})(\text{CatH}_2\text{Cat})]$	-8.63 (0.11)
$[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{CatHCat})]^{2-} [\text{H}^+] / [\text{Fe}(\text{OH})(\text{CatH}_2\text{Cat})]^-$	-10.80 (0.09)
$[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{Qi}^-)(\text{CatHCat})]^{3-} / [\text{Fe}^{3+}][\text{CatHCat}^2][\text{OH}^-]^2[\text{Qi}^-]$	26.31 (1.22)

*Obtidas a partir da média de três ou mais titulações.

**Desvio Padrão dos Resultados

As altas constantes de formação para as espécies Cat e QI se deve ao grande efeito quelato existente no oligômero, e aos grupos doadores oxigenados que favorecem a formação de complexos com Fe(III) devido ao grande caráter ácido duro do centro metálico. Essas espécies formadas são evidenciadas no esquema a seguir.



Esquema 1: Modelos estruturais para as espécies formadas no sistema DHI-Fe(III).

5.2.4 Microscopia eletrônica

A Figura 14 mostra a imagem de FEG das melaninas sintetizadas e utilizadas neste trabalho com aumento de 50 e 150 mil vezes, vemos que elas se apresentam em forma de camadas amorfas que está de acordo com o estudo de Simon. A forma

lateral das camadas assimétricas tem comprimento de 3 a 300 μm , mostrando a morfologia do oligômero. Simon ainda relata que essa morfologia característica se dá devido a molécula precursora (DHI) ser planar.

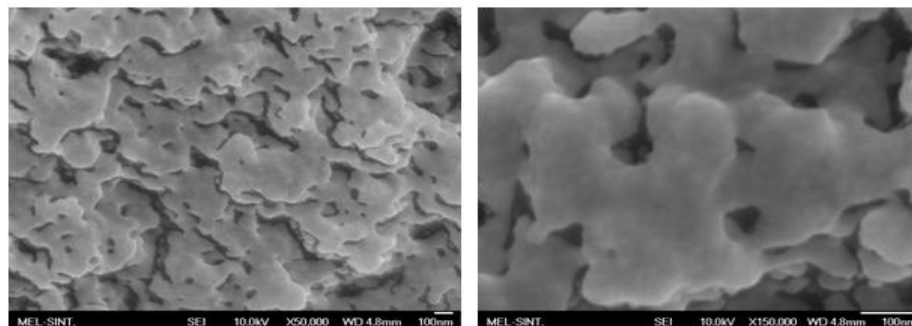


Figura 14: Imagem de Microscopia de Força de Campo das melaninas DHI utilizadas neste trabalho.

Com a presença de Fe(III) as melaninas se comportam em uma morfologia diferente, apenas a melanina DHI se apresenta na forma de camadas; em presença do íon metálico essas camadas são transformadas em aglomerados. A imagem de MEV acoplado com EDX (Figura 15) mostra os aglomerados com aumento de 15 e 20mil vezes. O espectro de EDX revela que a quantidade de Fe(III) é muito pequena comparada com a do ligante, devido a interação Fe(III)-DHI acontecer apenas pelos grupos catecol e quinone-imina, preservando o resto da estrutura do oligômero. A presença de potássio no espectro de EDX é relativa a neutralização de ânions gerados em solução antes da precipitação do material.

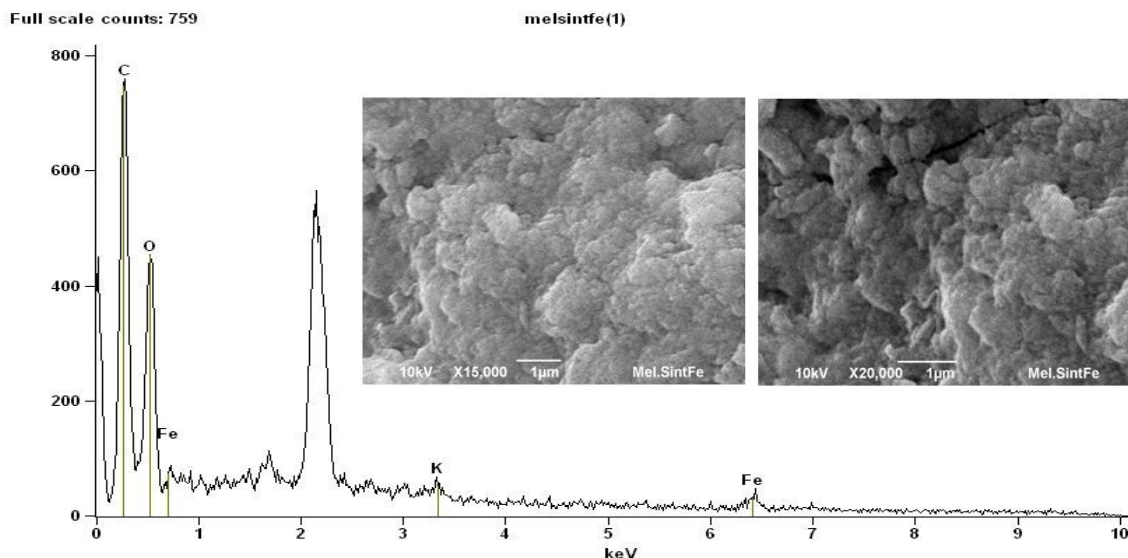


Figura 15: Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada com EDX do complexo melanina DHI-Fe(III).

5.2.5 Eletroquímica

O comportamento eletroquímico da melanina DHI em presença de Fe(III) foi avaliado em uma solução de DMSO à temperatura ambiente sob atmosfera de argônio. Os voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura e de onda quadrada são mostrados na Figura 16.

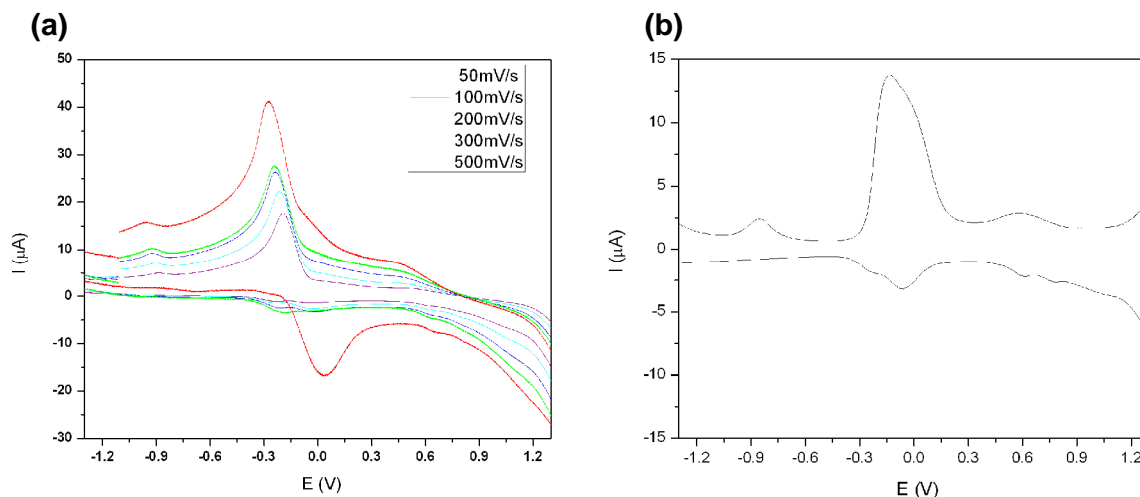


Figura 16: Voltamogramas cíclicos (a), obtidos a diferentes velocidades de varredura, e o voltamograma de onda quadrada (b) para o sistema DHI-Fe(III) em DMSO, a 25°C. Eletrólito suporte: 0,1 mol.L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺, contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: 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 de acordo com a equação de Randles-Sevcik (Equação 1).³²

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

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 cm²

D refere-se ao coeficiente de difusão em cm²/s

C é a concentração em mol/cm³

V é a velocidade de varredura em V/s

O voltamograma apresenta três regiões bem definidas mostrando os processos redox: o primeiro em $E_{pa} = -0,948V$ vs NHE relativo ao processo de oxidação dos grupos quinone-imina a semi-quinona, com o aumento da variação para potenciais mais positivos observamos o segundo processo redox em $E_{pa} = -0,200V$ vs NHE que aumenta com a velocidade de varredura relativo ao par catecol/semi-quinona³³, no voltamograma de onda quadrada observa-se a não simetria da onda, isto pode ter ocorrido devido a processos múltiplos envolvendo catecol e quinone-imina em algumas unidades indol gerando semi-quinona (Figura 17), e um em $E_{pa} = 0,74V$ vs NHE com $E_{1/2} = 0,77V$ relativo ao par redox Fe(II)/Fe(III), o processo envolvendo o centro metálico é evidenciado no voltamograma de onda quadrada.

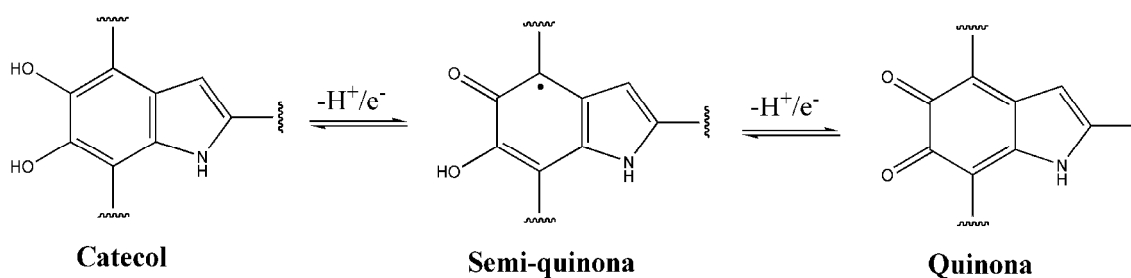


Figura 17: Processo redox envolvendo a oxidação do catecol a quinona.

6. Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho estudou-se a coordenação de íons Fe(III) com melaninas sintetizadas a partir da hidrólise básica 5,6-diacetoxi-indol. As melaninas DHI foram caracterizadas por análise elementar e espectroscopia na região do infravermelho pelo surgimento de duas bandas características do grupamento quinone-imina.

A interação com o íon metálico foi caracterizada por espectroscopia no IV, correlacionando o deslocamento das bandas de absorção dos grupamentos em ausência e presença do metal. Em solução as interações metal-melanina foram caracterizadas no UV-Vis onde se observou a variação espectral com a adição de alíquotas de uma solução de Fe(III) e observou-se a interação com os diferentes grupos doadores. Os equilíbrios, e as espécies formadas em diferentes pHs foram estudados por titulação potenciométrica que junto com UV-Vis demonstraram que em pH ácido a melanina coordena-se pelos grupamentos catecol e em pH alcalino pelos grupos quinone-imina. As elevadas constantes de formação são atribuídas ao efeito quelato proporcionado pelo oligômero, característico dos grupos doadores e os pKa's foram calculados para o sistema. O estudo eletroquímico mostrou os processos redox envolvendo a melanina sintética em presença de Fe(III), mostrando a interação Fe(III)-melanina.

A morfologia das melaninas sintéticas foi observada por MEV e FEG aonde vimos o comportamento amorfo em camadas. Na presença do metal se comportava na forma de aglomerados, mas sem evidências de uma estrutura cristalina.

Como perspectivas deste trabalho estão os estudos in vitro de células melanoma, com a indução de Fe(III). A procura de ligantes de baixa toxicidade que possam bombear metais para dentro de células com melanoma, e o cálculo das constantes de formação desses complexos para certificar-se que possam liberar o íon metálico para a melanina natural.

7. Referências Bibliográficas

1. GORTNER, A. Studies on Melanin: Methods of Isolation, the Effect of Alkali on Melanin **Journal of Biological Chemistry**, v8, p341, 1910.
2. YOUNG, William. The extraction of melanin from skin with dilute alkali. **Journal of Biological Chemistry**, v.8 p.460, 1920.
3. SIMON, C. Moss, et al. X-Ray characterization of melanins. **Pigment Cell Research**, v.7 p. 255-262, 1994.
4. 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.
5. 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.
6. BEDRICK, A.E; RAMASWAMY, G; TCHERTKOFF, V. Histochemical determination of copper, zinc, and iron in some benign and malignant tissues. **American Journal of Clinical Pathology**, v.86 p.637-640, 1986.
7. CORRADINE, M.G.; NAPOLITANO, A.; PROTA, G. Tyrosinase-promoted oxidation of 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin. Isolation and characterization of oligomer intermediates. **Tetrahedron**, v.43 p.2083-2088, 1986.
8. SIMON, John D. et al. Probing the Building Blocks of Eumelanins Using Scanning Electron Microscopy. **Pigment Cell Research**, v13 p.179-189, 2000.
9. 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,.

10. KORYTOWSKI, W. Infrared Spectroscopy used to examine the macromolecular structure of natural and synthetic melanins. 1982, 184f. Ph.D. Tesis, Jagiellonian University, Cracow.
11. SHURYGINA, E.A.; LARINA, M.A.; CHUBAROVO, M.M.; Differential thermal analysis (DTA) and thermogravimetry (TG) of soil humus substances. **Geoderma**, v.6 p.169-172, 1971.
12. HARKI, E.; TALOU, T.; DARGENT, R. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. **Food Chemistry**, v. 58, p.69-73, 1997.
13. BABITSKAYA, V.G.; MALAMA, A.A.; FILIMONOVA, T.V.; SHCHYERBA, V.V. Comparative characteristics of melanin complexes produced by *Phellinus robustus* and *Alternaria alternate*. **Mycology & Phytopathology**, v.32 p.25-29, 1998.
14. GIDANIAN, S.; FARMER, P. J. 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.
15. ABEL, John J.; DAVIS, Walter S. On the Pigment of the Negro's Skin and Hair. **The Journal of Experimental Medicine**, v.1, p.361-400, 1896.
16. ROSEI, M.A.; MOSCA, L.; GALLUZZI, F. Photoelectronic properties of synthetic melanins. **Synthetic Metals**, v.76 p.331-335, 1996.
17. ROSEI, M. A.; Blarzino C.; Foppoli C.; Mosca L.; Coccia R. Lipoxygenase- Catalyzed Oxidation of Catecholamines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.215 p.344-350, 1994.
18. De MARCO, F.; FOPPOLI, C.; Coccia, R.; Blarzino, C.; MARCANTE, M.L. Ectopic deposition of melanin pigments as detoxifying mechanism: a paradigm for basal nuclei pigmentation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.314 p.631-637, 2004.

19. 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.
20. BURKE, J.M. et al. Effects of Photodegradation on the Physical and Antioxidant Properties of Melanosomes Isolated from Retinal Pigment Epithelium. **Photochemistry and Photobiology**, v.82 p.1024-1029, 2006.
21. BOREGES, C.R. et al. Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: application to human hair. **Anal. Biochem.** v.290 p.116-125, 2001
22. MAYER, A.M., HAREL, E. *Phytochemistry*, v.18 p.193-199, 1979.
23. SILVA de SOUZA, M. **Estudos em solução (Reconhecimento Molecular) entre complexos homobinucleares e moléculas de interesse biológico.** 2006. 156f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
24. MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J. *Determination and Use of Stability Constants.* 2ed., **New York: VCH Publishers**, 200p. 1992.
25. BAES JR, C. F., MESMER, R. E., *The Hydrolysis of Cations*, John-Wiley & Sons, **Interscience Publishers**, New York, 1976.
26. SCHWARZENBACH, G., FLASCHKA, H., *Complexometric Titrations*, Methuen & Co., London, 1967.
27. ROSSOTTIM F. J. C. R., Potentiometric titrations using Gran's plot, **Journal of Chemical Education**, v. 42, p. 375-379, 1965.
28. MOTEKAITIS, R. J., MARTELL, A. E., BEST – A new program for rigorous calculation of equilibrium parameters of complex multicomponent systems, **Canadian journal of chemistry**, v. 60, p. 2403-2409, 1982.

29. MALISKA, A. M. Apostila de Microscopia Eletrônica de Varredura. UFSC, Santa Catarina, p.13-15, 2004.
30. GAGNE, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 2854-2855, 1980.
31. NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. USA, 1986, p.231.
32. ZANELLO, P. Voltammetric Techniques. **Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice and Application**. British, 2003, p.50-60.
33. GOMES, C.M. et al. Studies on the Redox Centers of the Terminal Oxidase from *Desulfovibrio gigas* and Evidence for Its Interaction with Rubredoxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 36, p.22502-22508, 1997.