

JONAS STAINSACK

**ESTUDO DE ESTRUTURAS DE MELANINAS SINTÉTICAS
ATRAVÉS DA INTERAÇÃO COM ÍONS METÁLICOS
PARAMAGNÉTICOS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do grau de Mestre em Química - Área de concentração "Química Inorgânica".

Orientador: Prof. Antonio Sálvio Mangrich

CURITIBA
1998

TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDO DE ESTRUTURAS DE MELANINAS SINTÉTICAS ATRAVÉS DA
INTERAÇÃO COM ÍONS METÁLICOS PARAMAGNÉTICOS**

por

JONAS STAINSACK

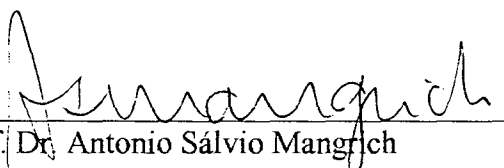
Dissertação aprovada como requisito

parcial para obtenção do grau de

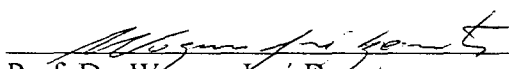
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão formada pelos Professores:

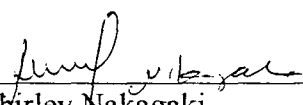
Orientador:



Prof. Dr. Antonio Sálvio Mangrich
Deptº de Química – UFPR



Prof. Dr. Wagner José Barreto
Deptº de Química – UEL



Profª Drª Shirley Nakagaki
Deptº de Química - UFPR

Curitiba, 16 de novembro de 1998.

As inescrutáveis e perfeitas maravilhas, desde o cosmos até o minúsculo átomo, não podem ser fruto de um mero acaso.

J. Stainsack

O Universo não pode ser satisfatoriamente explicado sem Deus.

A. Einstein

À minha esposa e aos meus filhos pelo apoio em todos os momentos, principalmente nas horas difíceis quando o objetivo parecia quase inalcançável.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder-me saber um “pouquinho” a respeito de Suas infinitas maravilhas.

Ao Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração “Química Inorgânica” , do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade concedida, para que eu pudesse aprimorar minha formação e dar os primeiros passos na área da pesquisa científica.

À CAPES pela bolsa de demanda social concedida durante o curso.

Ao professor Mangrich, por ter-me confiado o desenvolvimento deste trabalho, pela orientação, incentivo e amizade.

Às professoras Shirley, Sueli, Jaíza e aos professores Flávio, Fabio Nunes e Carlos Cunha, pela participação no processo de formação e também pelas críticas (construtivas) e sugestões no que diz respeito ao trabalho de pesquisa, bem como aos demais docentes do Curso de Pós-graduação, que contribuíram direta ou indiretamente para que essa dissertação se tornasse realidade.

Ao professor Wagner Barreto, pelo fornecimento de reagentes, materiais bibliográficos e pela atenção dispensada esclarecendo dúvidas ou dando sugestões.

Ao Angelo, pela amizade e paciência ao ensinar-me como utilizar alguns dos equipamentos do laboratório e também pelo auxílio prestado nos experimentos eletroquímicos.

À Claudia, única “colega de classe”, pela agradável convivência, pelas discussões e auxílio durante a resolução das “temidas” listas de exercícios e preparação de seminários, e pelo apoio nas “horas negras”.

Ao Ricardo, Tessaro, Ételvino, Piu, Marcus, Elisete, Lenise, Betânia e Sônia, companheiros do laboratório de Humus, pelo convívio, pela cooperação e auxílio na execução de tarefas e pelas divertidas conversas, que por muitas vezes trouxeram descontração e ânimo diante de situações estressantes.

Ao Davi, Alex, Fabiano, Ana Paula e aos demais colegas do curso de pós-graduação, pelo apoio e por compartilharem da tensão antes e durante os seminários.

Ao Anderson, amigo com quem eu pude sempre contar, na tristeza, na alegria, nas horas de reflexão e é claro, nos momentos “idiotas” onde o mais importante era esquecer a realidade e falar, inventar asneiras, rir, descontrair-se... só “cultura inútil”.

À minha mãe, que incentivou-me a estudar fazendo-me acreditar que eu poderia ir além do que eu acreditava ser minha capacidade; sempre que estive ao seu alcance, ajudou-me a marchar em frente.

Ao meu pai, que apesar de não ter um grau de instrução muito elevado, possuía um grande conhecimento prático das coisas. Ele ensinou-me a consertar, montar e mesmo construir determinados objetos, o que contribuiu para que eu conseguisse desenvolver alguns equipamentos que foram utilizados durante este trabalho.

Ao Daniel, pela amizade e auxílio prestado na batalha para dominar o computador.

À Dalila e ao Jomar pela colaboração e pelos momentos hilariantes.

Ao Sr. Amador e à Sra. Ondina (meus sogros) pelo incentivo e apoio financeiro durante a graduação.

Ao "Coroné", pela casa em que moramos, pela amizade e pelos bons momentos nostálgicos passados juntos.

E em especial à minha família: à Beth, minha esposa, que sempre está ao meu lado, auxiliando-me, incentivando-me, sendo meu braço direito em todas as situações, compartilhando dos melhores e também dos piores momentos da minha vida, e é claro, aos meus filhinhos, Aline e Jhonny, com os quais por muitas vezes eu não pude estar conversando, brincando, dando a atenção que eles merecem e precisam.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 <u>MELANINAS</u>	1
1.2 <u>ASPECTOS FUNDAMENTAIS SOBRE A ESPECTROSCOPIA DE RPE</u>	8
1.2.1 O HAMILTONIANO DE SPIN.....	10
1.2.2 A INTERAÇÃO ELETRÔNICA DE ZEEMAN.....	12
1.2.3 A INTERAÇÃO NUCLEAR HIPERFINA.....	16
1.2.4 REGRAS DE SELEÇÃO.....	17
1.2.5 A SEPARAÇÃO DE CAMPO ZERO (INTERAÇÃO FINA).....	18
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 <u>MÉTODOS EMPREGADOS NAS SÍNTESES DE MELANINAS</u>	20
3.1.1 SÍNTESE DA MS01.....	20
3.1.2 SÍNTESE DA MS02.....	22
3.1.2.1 Preparação do pirofosfato de manganês (III).....	22
3.1.2.2. Obtenção da melanina.....	23
3.1.3 SÍNTESE DA MS03.....	23
3.1.4 SÍNTESE DA MS04.....	24
3.2 <u>PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS COM ÍONS PARAMAGNÉTICOS</u>	25

3.3	<u>ESPECTROSCOPIA DE IVTF</u>	26
3.4	<u>ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA</u>	26
3.5	<u>ESPECTROSCOPIA DE RPE</u>	26
3.6	<u>ANÁLISE ELEMENTAR</u>	27
3.7	<u>DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GRUPOS ÁCIDOS</u>	27
3.7.1	FUNÇÃO DE FORMAÇÃO ÁCIDA.....	27
3.7.2	MODIFICAÇÃO DO PROCEDIMENTO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL E PARCIAL PELO MÉTODO SCHNITZER E GUPTA.....	29
3.7.2.1	Procedimento utilizado na determinação da acidez (sem modificações)....	30
3.7.2.1.1	<u>Acidez total</u>	30
3.7.2.1.2	<u>Acidez parcial</u>	31
3.7.2.2	Metodologia modificada.....	32
3.7.2.2.1	<u>Acidez total</u>	32
3.7.2.2.2	<u>Acidez parcial</u>	39
3.8	<u>DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DO PODER REDUTOR</u>	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	<u>DETERMINAÇÃO DE GRUPOS ÁCIDOS</u>	41
4.1.1	MÉTODO DA FUNÇÃO DE FORMAÇÃO ÁCIDA.....	41
4.1.2	MÉTODO DA ACIDEZ TOTAL E PARCIAL.....	48
4.1.2.1	Metodologia modificada.....	49
4.2	<u>ANÁLISE ELEMENTAR</u>	50
4.3	<u>DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR</u>	53
4.4	<u>ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IVTF)</u>	57
4.5	<u>ESPECTROSCOPIA DE (RPE)</u>	63
4.5.1	COMPLEXOS MELANINA-ÍON PARAMAGNÉTICO.....	66

4.5.1.1 Complexos melanina-Mn ²⁺	67
4.5.1.2 Complexos melanina-Fe ³⁺	70
4.5.1.3 Complexos melanina-Cu ²⁺	73
4.5.1.4 Complexos melanina-VO ²⁺	79
4.5.1.4.1 <u>Determinação dos parâmetros ligantes dos complexos melanina-VO²⁺</u> ..	82
4.6 <u>ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA</u>	72
4.6.1 A RAZÃO E ₄ /E ₆	87
4.6.2 UV-Vis DE COMPLEXOS MELANINA-ÍON METÁLICO.....	88
5. CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Rota proposta por Raper-Mason para a melanogênese, revisada e adaptada por Prota.....	03
2. Modelo proposto por Nicolaus para a estrutura de eumelaninas.....	04
3. Modelo proposto por Swan para a estrutura de eumelaninas.....	05
4. Modelo proposto por Blois para a estrutura de eumelaninas.....	06
5. Modelo proposto por Zajac et al. para a estrutura de eumelaninas.....	07
6. Comparação entre a curva de absorção, primeira derivada e segunda derivada de um experimento de RPE para uma amostra cujo $s = \frac{1}{2}$	10
7. Perda da degenerescência dos estados de spin para um sistema de $s = \frac{1}{2}$, pela aplicação de um campo magnético (efeito Zeeman).....	13
8. Esquema representativo do sistema utilizado na síntese da melanina MS01..	21
9. Representação esquemática do sistema utilizado na quantificação dos grupos ácidos pelo método da função de formação ácida.....	29
10. Frasco utilizado para preparar e armazenar $Ba(OH)_2$	33
11. Frasco utilizado para reagir a amostra com o $Ba(OH)_2$	35
12. Processo de adição de $Ba(OH)_2$ à amostra.....	36
13. Sistema utilizado para retirada de uma alíquota da solução contendo excesso de $Ba(OH)_2$, utilizando-se uma pipeta conectada a uma agulha hipodérmica de ponta esmerilhada, mantendo-se o sistema sob fluxo de argônio.....	37
14. Sistema utilizado na transferência da alíquota da solução contendo excesso de $Ba(OH)_2$ para a célula eletroquímica.....	38
15. sistema utilizado na titulação da alíquota retirada da solução contendo excesso de $Ba(OH)_2$, com HCl 0,1 mol/L.....	38

16. Compostos modelos utilizados na determinação da acidez pelo método da função de formação ácida: ácido para-hidroxibenzoico (a), ácido salicílico (b), catecol (c) e L-DOPA (d).....	42
17. Função de formação ácida para o ácido para-hidroxibenzoico.....	43
18. Função de formação ácida para o ácido salicílico.....	44
19. Função de formação ácida para o catecol.....	44
20. Função de formação ácida para a L-DOPA.....	45
21. Função de formação ácida para a MS01.....	47
22. Quebra oxidativa do anel benzênico de uma unidade indólica presente na estrutura de uma melanina.....	51
23. Oxidação do catecol (1) e da hidroquinona (2) a orto e paraquinona respectivamente.....	54
24. Esquema representativo da regeneração de um grupo catecol, a partir do acoplamento de 2 estruturas de melaninas de baixas massas moleculares.....	56
25. Espectros de infravermelho das melaninas sintéticas: MS01, MS02, MS03 e MS04.....	57
26. Espectros de IVTF da MS01 e seus compostos de coordenação: MnMS01, CuMS01, VOMS01 e FeMS01.....	60
27. Espectros de IVTF da MS02 e seus compostos de coordenação: MnMS02, CuMS02, VOMS02 e FeMS02.....	60
28. Espectros de IVTF da MS03 e seus compostos de coordenação: MnMS03, CuMS03, VOMS03 e FeMS03.....	61

29. Espectros de IVTF da MS04 e seus compostos de coordenação: MnMS04, CuMS04, VOMS04 e FeMS04.....	61
30. Espectros de RPE das melaninas MS01, MS02, MS03 e MS04 (amostras em pó) em 1ª derivada.....	64
31. Espectros de RPE da MS01 em 2ª derivada: amostra em pó – amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 1,0 mW (10 varreduras somadas); amostra em solução – amplitude de modulação 1,0 G e potência de microondas 0,91 mW (100 varreduras somadas).....	66
32. Espectros de RPE em 1ª derivada do complexo MnMS01, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW	68
33. Espectros de RPE em 1ª derivada do complexo MnMS02, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	68
34. Espectros de RPE em 1ª derivada do complexo MnMS03, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	69
35. Espectros de RPE em 1ª derivada do complexo MnMS04, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	69
36. Espectros de RPE em 1ª derivada do complexo FeMS01, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	71
37. Espectros de RPE em 1ª derivada do complexo FeMS02, amplitude de modulação 14,3 G e potência de microondas 20 mW	71

38. Espectros de RPE em 1ª derivada do complexo FeMS03, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	72
39. Espectros de RPE em 1ª derivada do complexo FeMS04, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	72
40. Espectros de RPE do complexo CuMS01 1ª derivada e detalhe da região de g_{\perp} em 2ª derivada: a) sem tratamento com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; b) tratado com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; (amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).....	74
41. Espectros de RPE do complexo CuMS02 1ª derivada e detalhe da região de g_{\perp} em 2ª derivada (amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).....	74
42. Espectros de RPE do complexo CuMS03 1ª derivada e detalhe da região de g_{\perp} em 2ª derivada (amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).....	75
43. Espectros de RPE do complexo CuMS04 1ª derivada e detalhe da região de g_{\perp} em 2ª derivada (amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).....	75
44. Ligações entre as unidades indólicas pelas posições 2,7' (a) e 2,2' (b).....	77
45. Espectro de RPE do complexo VOMS01 em 1ª derivada com amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	80
46. Espectro de RPE do complexo VOMS02 em 1ª derivada com amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	80
47. Espectro de RPE do complexo VOMS03 em 1ª derivada com amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.....	81

48. Espectro de RPE do complexo VOMS04 em 1ª derivada com amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 Mw.....	81
49. Correlação entre os valores de A_{iso} e g_{iso} e o ambiente ligante do vanádio(IV). VOMS01 (a), VOMS02 (b), VOMS03 (c) e VOMS04 (d).....	82
50. Espectros de UV-Vis das melaninas sintéticas: MS01, MS02, MS03 e MS04, obtidos em solução 0,1 mol/l de KOH.....	86
51. Espectro de UV-Vis da MS01 e seus complexos com Mn^{2+} , Cu^{2+} , VO^{2+} e Fe^{3+} , obtidos em solução 0,05 mol/l de $NaHCO_3$	89

LISTA DE TABELAS

1. Valores teóricos e experimentais, obtidos pelo método da função de formação ácida, para os compostos modelos.....	45
2. Dados da análise elementar e da determinação do teor de grupos ácidos (valores experimentais para as melaninas sintéticas; valores teóricos para a L-DOPA e para os modelos propostos por: Swan G. A., Blois M. S. e Zajac G. W. et al., para estruturas de melaninas).....	50
3. Parâmetros de RPE para os compostos de coordenação entre melaninas sintéticas e íons metálicos paramagnéticos.....	67
4. Valores calculados para os parâmetros ligantes dos complexos melanina- VO^{2+}	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

L-DOPA	- L-3,4-DIHIIDROXIFENILALANINA
MS01	- MELANINA SINTÉTICA OBTIDA UTILIZANDO-SE O OXIGÊNIO DO AR COMO OXIDANTE
MS02	- MELANINA SINTÉTICA OBTIDA UTILIZANDO-SE O PIROFOSFATO DE MANGANÊS(III) COMO OXIDANTE
MS03	- MELANINA SINTÉTICA OBTIDA UTILIZANDO-SE O PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COMO OXIDANTE
MS04	- MELANINA SINTÉTICA OBTIDA UTILIZANDO-SE O HEXACIANOFERRATO(III) DE POTÁSSIO COMO OXIDANTE
MnMS01	- COMPLEXO ENTRE Mn^{2+} E MS01
MnMS02	- COMPLEXO ENTRE Mn^{2+} E MS02
MnMS03	- COMPLEXO ENTRE Mn^{2+} E MS03
MnMS04	- COMPLEXO ENTRE Mn^{2+} E MS04
CuMS01	- COMPLEXO ENTRE Cu^{2+} E MS01
CuMS01	- COMPLEXO ENTRE Cu^{2+} E MS01
CuMS02	- COMPLEXO ENTRE Cu^{2+} E MS02
CuMS03	- COMPLEXO ENTRE Cu^{2+} E MS03
CuMS04	- COMPLEXO ENTRE Cu^{2+} E MS04
FeMS01	- COMPLEXO ENTRE Fe^{3+} E MS01
FeMS01	- COMPLEXO ENTRE Fe^{3+} E MS01
FeMS02	- COMPLEXO ENTRE Fe^{3+} E MS02
FeMS03	- COMPLEXO ENTRE Fe^{3+} E MS03
FeMS04	- COMPLEXO ENTRE Fe^{3+} E MS04

- VOMS01 - COMPLEXO ENTRE VO^{2+} E MS01
- VOMS02 - COMPLEXO ENTRE VO^{2+} E MS02
- VOMS03 - COMPLEXO ENTRE VO^{2+} E MS03
- VOMS04 - COMPLEXO ENTRE VO^{2+} E MS04

RESUMO

A espectroscopia de RPE juntamente com os íons sonda VO^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} , as espectroscopias de IVTF e UV-Vis, a análise elementar e a determinação da acidez carboxílica e fenólica foram utilizadas para obter-se informações a respeito da estrutura de melaninas sintéticas, produzidas a partir da oxidação da L-DOPA (L-3,4-di-hidroxifenilalanina), através de quatro métodos diferentes: oxidação pelo oxigênio do ar; pelo pirofosfato de manganês (III); pelo H_2O_2 ; e pelo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Foram preparados complexos, reagindo-se cada uma das melaninas sintetizadas, com soluções de cada um dos diferentes íons sonda citados acima. Cada melanina e seus complexos foram então submetidos à análise. Os espectros de RPE apresentaram apenas uma única linha, característica de radicais livres com $g \sim 2$, para as quatro melaninas analisadas. Os espectros de RPE das melaninas obtidas pelo pirofosfato de manganês (III) e pelo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ apresentaram também uma linha em $g \sim 4.3$ indicando a presença de ferro (III) spin alto na estrutura da melanina, em sítios com distorções rômbricas, ferro esse oriundo dos reagentes utilizados no processo de síntese. Os espectros de RPE dos complexos, com cada um dos íons metálicos, foram similares para todas as melaninas. Os complexos com VO^{2+} indicaram simetria axial, com oxigênios como átomos ligantes. Para os complexos com o Cu^{2+} , os espectros de RPE também sugeriram simetria axial, e evidências da existência de sítios contendo dois nitrogênios próximos entre si. Os espectros de RPE para os compostos com o Fe^{3+} indicaram complexos de esfera interna com $g \sim 4,3$ característico de ferro (III) spin alto em ambiente com distorção rômbrica enquanto que para os complexos com Mn^{2+} sugeriram formação de complexo de esfera externa com alto caráter iônico (92%). Os dados de IVTF indicaram coordenação entre grupos fenólicos, carboxílicos e grupos nitrogenados das melaninas sintéticas com os íons sonda, bem como uma frequência relativamente baixa para o estiramento V-O (oxigênio apical) do complexos com VO^{2+} . A espectroscopia eletrônica resultou em baixos valores para a razão E_4/E_6 , principalmente para a melanina obtida por meio do pirofosfato de manganês (III), quando comparadas com os valores para substâncias húmicas, sugerindo maior grau de conjugação nas melaninas. Os resultados da análise elementar e da acidez total (metodologia modificada) sugerem a existência de um teor relativamente alto de unidades indólicas degradadas, principalmente para a MS04, e como consequência, razões O/C também elevadas, sendo em média, cerca de duas vezes maior que as dos modelos propostos pela literatura. Modificou-se o procedimento utilizado na determinação da acidez segundo o método proposto por SCHINITZER E GUPTA, diminuindo-se a quantidade de amostra necessária, reduzindo-se o número de transferências das soluções, de um frasco para outro. Substituiu-se o processo de filtragem por centrifugação, ao separar-se a amostra da solução a ser titulada, trabalhando-se sempre em atmosfera inerte. Os estudos também demonstraram que a determinação da acidez pelo método da função de formação ácida e a determinação do poder redutor, não são indicadas para serem aplicadas às melaninas.

ABSTRACT

Paramagnetic metal-ions probes VO^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} and Cu^{2+} with the electronic paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), FT-IR, and others chemical analyses have been used to get information about synthetic melanins structure obtained by oxidation of the L-dopa (3,4-dihydroxifenilalanin) through four different ways: by air-oxidation in alkali solution; by using manganese (III) pyrophosphate as oxidant; by using H_2O_2 as oxidant; and by using $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ as oxidant. It was made complexes with the paramagnetic probes reacting each one of the melanins with each one of the metal-ions described above. Then, the melanins and their complexes were analyzed. For the four melanins, the EPR spectra showed only one line characteristic from free radical at $g \sim 2$. The EPR spectra for the melanins obtained by mean of manganese (III) pyrophosphate and $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ also showed a line at $g \sim 4.3$ due iron (III) in rhombic environment, that came from the reactants in the syntheses processes. The EPR spectra of the complexes, for each kind of metal-ion, for all melanins were similar. The complexes with VO^{2+} indicated axial symmetry, and oxygen atoms as ligands. The EPR spectra of the complexes with Cu^{2+} also suggest axial symmetry with oxygen atoms as ligands and evidences of sites with two nitrogen atoms next each other. The EPR spectra of the complexes with Fe^{3+} indicated a inner-sphere complex with $g \sim 4.3$, characteristic from iron (III) in rhombic environment while the EPR parameters for the compounds with Mn^{2+} suggest a outer-sphere complex with high ionic character (92%). The FT-IR data indicated coordination between phenolic, carboxylic and nitrogenated-groups of the synthetic melanin with the metal-ions and a low frequency for the apical V-O stretching for those complexes. The electronic spectroscopy showed low E_4/E_6 ratios, mainly for melanins obtained by mean of manganese (III) pyrophosphate, when compared with the humic substances value, suggesting higher conjugation. The results of CHN analysis and total acidity determination (modified methodology), suggest that there are several degraded indole units in the melanins structure, mainly for MS04, and high O/C ratios, around twice higher than the ones for the proposed models. It was modified the procedure used in the acidity determinations applied to the humic substances, based on SCHINITZER and GUPTA method. It was reduced the amount of sample necessary, as well as the number of transferences of the solution from a flask to other; It was replaced the filtration process for centrifugation, during the separation of the sample from the solution to be titrated, working always in inert atmosphere. The studies also showed that the acidity determination by the acid formation function methodology and the reduction power determination are not indicated for the melanins.

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MELANINAS

As Melaninas constituem uma classe de pigmentos muito comuns na natureza. De acordo com Nicolaus¹, elas podem ser classificadas em três grupos:

a) Eumelaninas: São pigmentos negros ou marrons, geralmente insolúveis, os quais podem ser formados através de processos oxidativos, a partir da tirosina, di-hidroxfenilalanina (DOPA), dopamina, e outras catecolaminas². b) Feomelaninas: São pigmentos com cores mais claras, que apresentam maior solubilidade. Podem ser obtidos de maneira semelhante às eumelaninas, envolvendo porém no processo, também a cisteína ou a glutatiónina^{2,3}. c) Alomelaninas: Estas são mais comuns no reino vegetal. Esses pigmentos são formados durante a polimerização* oxidativa de substratos fenólicos, como o catecol e outros poli-hidroxiaromáticos, na presença da enzima polifenoloxidase⁴.

Melaninas naturais, bem como as sintéticas, principalmente aquelas pertencentes à classe das eumelaninas têm sido assunto de intensa pesquisa nos últimos anos. Existe grande interesse voltado para esta classe. Nos seres humanos, esses pigmentos são encontrados na pele, olhos e cabelos, atuando no mecanismo de fotoproteção celular e em áreas de intensa atividade nervosa como o ouvido interno, a retina e no cérebro^{5,6,7}. Elas apresentam grande afinidade por íons metálicos⁸ e também por uma variedade de substâncias carcinogênicas⁹. As diversas funções e disfunções nas quais as eumelaninas estão envolvidas ainda é uma questão aberta na literatura. Há evidências de seu envolvimento em doenças

*Os termos: polimerização, polímeros, biopolímeros e oligômeros não são adequados para estas substâncias. Na realidade elas são só macromoléculas e não polímeros. Porém, o seu uso é bastante difundido dentro da literatura, provavelmente, devido ao fato de não haver outros melhores para substituí-los.

como a esquizofrenia¹⁰, parkinsonismo¹¹, melanomas malignos e até mesmo em alguns tipos de surdez¹².

Na indústria de cosméticos, as melaninas tem sido empregadas na fabricação de “tinturas” para cabelos, bem como coadjuvantes em alguns bloqueadores solares. Também existem estudos com relação à inserção de melaninas em polímeros, utilizados na fabricação de lentes óticas, visando um material que proteja mais efetivamente os olhos contra radiações ultravioletas, as quais são extremamente danosas aos tecidos oculares^{13,14}.

Como citado acima, as eumelaninas são “polímeros” escuros, em geral insolúveis, sem massa molecular definida, que possuem diversas propriedades sem paralelo com os demais compostos orgânicos¹⁵. Adicionalmente, comportam-se como semicondutores amorfos^{16,17} e absorvem ondas ultrasônicas na região próxima a 1 MHz¹⁸; além da intensa absorção no ultravioleta e parte do espectro visível¹⁹.

Biologicamente, aceitava-se que esses pigmentos eram produzidos a partir da oxidação da tirosina, pela enzima tirosinase, seguindo a rota reacional proposta por Raper-Mason²⁰⁻²² (Fig. 01). Esta proposta foi baseada na identificação de compostos intermediários, isolados ao interromper-se o processo de oxidação das catecolaminas, estabelecendo-se assim, as etapas anteriores à formação do melanocromo[†]. Chegou-se então à conclusão que o DHI (5,6-di-hidroindol) seria o intermediário chave na formação do biopolímero¹⁵ eumelanina. Estudos posteriores^{23,24} evidenciaram que o DHICA (ácido 5,6-di-hidroindol-2-carboxílico) também era um importante intermediário no processo de melanização, e não uma estrutura formada após a polimerização como sugerido anteriormente¹⁵.

† O termo melanocromo é utilizado para designar os oligômeros solúveis, de coloração púrpura, que precedem as melaninas, no processo de melanização.

Porém, a tirosinase, frente a esse substrato, apresenta baixíssima atividade oxidativa²³, sugerindo que, se esse composto fosse um dos intermediários, deveria haver um outro agente oxidante responsável pela sua conversão em melaninas.

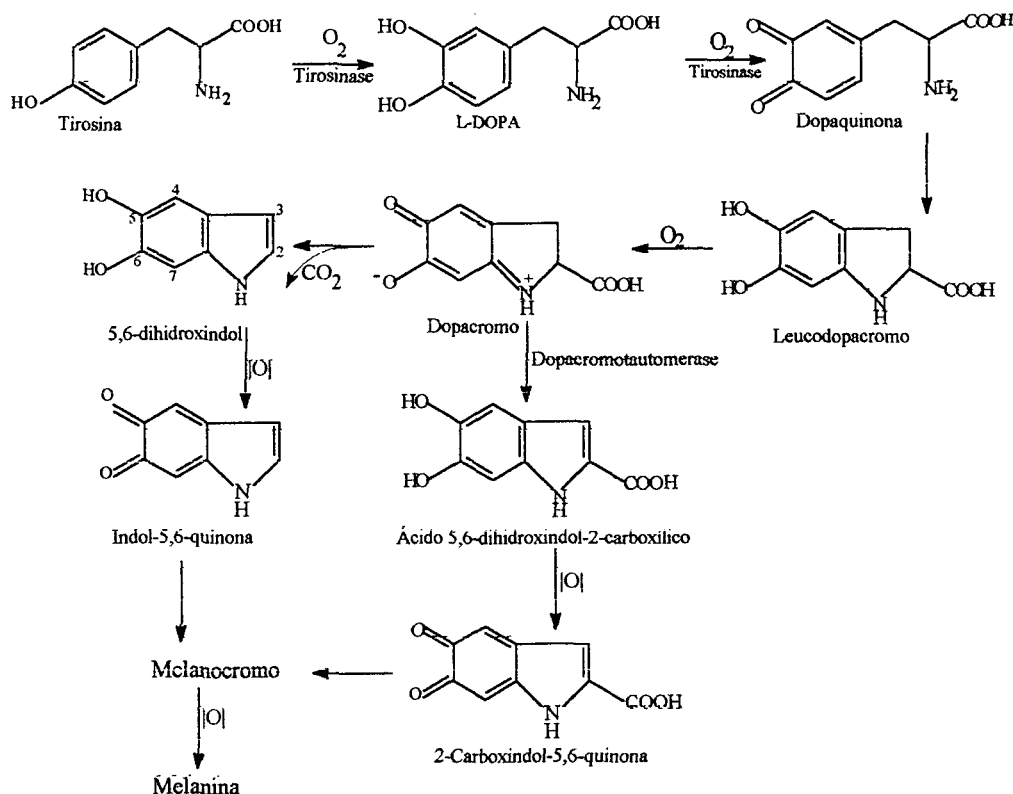


FIGURA 01 - Rota proposta por Raper-Mason para a melanogênese²⁰⁻²², revisada e adaptada por Prota^{25,26}.

Trabalhos mais recentes²⁷ evidenciaram que o sistema peroxidase / H_2O_2 é altamente efetivo em induzir a conversão do DHI em melaninas, bem como o DHICA e deve portanto, desempenhar um papel importante na melanogênese. Além dos processos enzimáticos, a ação de oxidantes químicos, presentes nos organismos, como radicais livres ou cátions metálicos, também pode desencadear o processo de melanização²⁸.

Um dos primeiros modelos para estruturas de eumelaninas foi proposto por Nicolaus¹, resultando de investigações, onde foram isolados ácidos pirrolicarboxílicos, provenientes da degradação de eumelaninas naturais, através da oxidação com o KMnO_4 em meio alcalino. O modelo proposto é constituído de diversas unidades DHI ligadas entre si, de maneira aleatória, pelas posições 2, 3, 4 e 7, com maior predominância das duas últimas, podendo parte das unidades indólicas estar oxidadas a quinonas (Fig. 02).

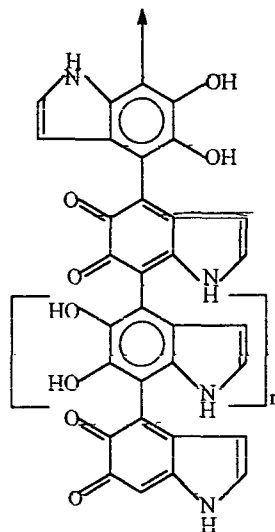


FIGURA 02 - Modelo proposto por Nicolaus para a estrutura de eumelaninas¹.

Swan² estudou as estruturas de melaninas sintetizadas a partir da L-DOPA marcada isotopicamente com deutério e oxigênio-18. A partir desses estudos, propôs como modelo um biopolímero heterogêneo, onde as unidades indólicas encontrar-se-iam ligadas entre si aleatoriamente, apresentando diversos estados de oxidação, bem como a existência de unidades pirrólicas, provenientes da fissão oxidativa de anéis benzênicos de estruturas indólicas²⁹ (Fig. 03).

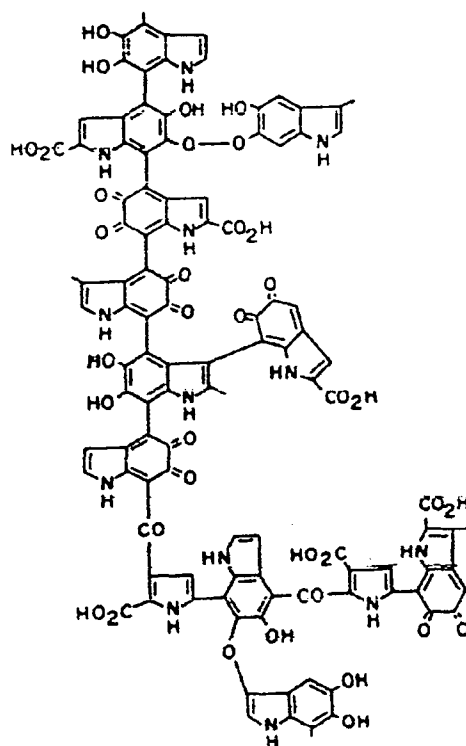


FIGURA 03 - Modelo proposto por Swan para a estrutura de eumelaninas^{2,29}.

Também fora proposto³⁰⁻³⁴ que as melaninas sintéticas poderiam conter, em suas estruturas, outros tipos de unidades como a L-DOPA não ciclizada, o leucodopacromo, bem como aquelas formadas pela “quebra” oxidativa de anéis benzênicos, provenientes de unidades indólicas. Confirmou-se ainda, a presença do DHIAC nas melaninas naturais, e sua formação durante a melanogênese³⁵⁻³⁹. Levando em consideração alguns desses fatos, Blois³⁸ propôs também um modelo para as eumelaninas, o qual não era muito diferente dos anteriores, destacando-se apenas a existência de unidades não ciclizadas da L-DOPA, bem como a perda de alguns dos oxigênios, oriundos de grupos fenólicos, cujas posições encontram-se envolvidas em ligações entre as unidades fundamentais (Fig. 04).

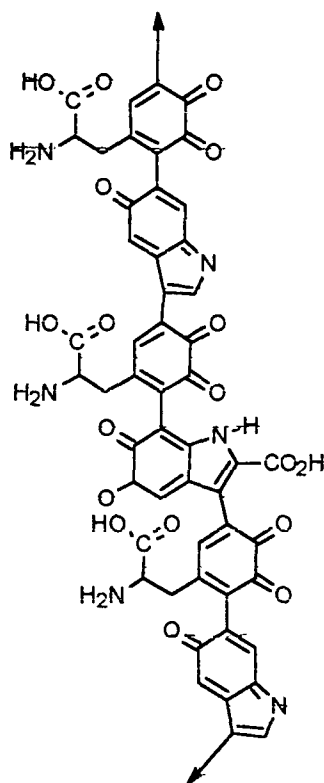


FIGURA 04 - Modelo proposto por Blois para a estrutura de eumelaninas³⁸.

Diversas técnicas instrumentais como o RPE, raios-X, Mössbauer, infravermelho, RNM, espectroscopia eletrônica, microscopia eletrônica têm sido empregadas para investigar as estruturas dessas substâncias. Porém, devido às suas propriedades (amorfismo, baixíssima solubilidade, massa molar indefinida, intensa absorvidade ótica) e às dificuldades encontradas no processo de extração e purificação de eumelaninas naturais, não se chegou à elucidação das estruturas dessas substâncias. Estudos realizados utilizando-se microscopia de tunelamento e varredura levaram Zajac et al.^{39,40} a propor uma outra estrutura para as eumelaninas, apresentando maior número de ligações entre as unidades indólicas, formando uma cadeia semelhante a um porfíceno, contendo quatro nitrogênios em seu centro (Fig. 05).

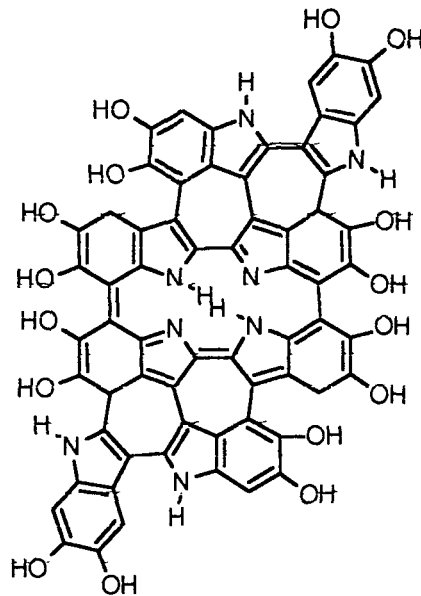


FIGURA 05 - Modelo proposto por Zajac et al. para a estrutura de eumelaninas^{39,40}.

Experimentos de espectrometria de massa, de melaninas sintetizadas a partir da Dopamina, DHI, DHICA e da 5,6-dihidroxitriptamina⁴¹⁻⁴⁴, pela ação da tirosinase, bem como de seus intermediários no processo de melanização, indicam diferentes graus de “polimerização” para cada precursor, sendo mais efetiva a ação da enzima para os dois primeiros substratos. Também foi observado que o aumento do peso molecular não correspondia à soma das massas de várias unidades fundamentais, evidenciando que deve haver “quebra” oxidativa das unidades indólicas, com concomitante oxigenação, devido a formação de H_2O_2 durante a reação⁴³. A adição de catalase fez com que a ação desse oxidante fosse reduzida, podendo ser detectado “oligômeros” com até 6 unidades fundamentais (DHI) não degradadas. Porém, a partir desse ponto, a degradação já começa a ser observada, dificultando o processo de análise e caracterização das espécies. Isso, mais uma vez, confirma o fato de que, embora exista uma grande quantidade de

informações a respeito das melaninas, ainda há muito mais para ser descoberto e a real estrutura dessas substâncias continua sendo uma incógnita.

1.2 ASPECTOS FUNDAMENTAIS SOBRE A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

Visto que esta técnica não é tão difundida como a espectroscopia eletrônica ou a de infravermelho, julgou-se conveniente incluir uma seção contendo os princípios fundamentais da mesma, para que, se alguém que não a domina vir a ler este trabalho, possa ter uma idéia mais clara a respeito de seu funcionamento e interpretação de resultados.

O princípio da RPE é a absorção de radiações eletromagnéticas, na faixa de frequência de microondas, por uma amostra (sólida, líquida ou gasosa) submetida a um campo magnético, que apresenta elétrons desemparelhados na estrutura, e possui portanto um momento magnético de spin diferente de zero (paramagnetismo)^{45,46}. Os dois pontos-chaves desta técnica são: detectar a existência de elétrons desemparelhados e fazer a caracterização do "ambiente" no qual o mesmo se encontra.

O fato de que se uma substância é diamagnética (não possui elétrons desemparelhados e o momento magnético resultante de spin é igual a zero) e portanto não pode ser analisada por RPE, nem sempre é uma verdade. A interação de substâncias diamagnéticas com espécies químicas possuindo elétrons desemparelhados (como íons metálicos paramagnéticos por exemplo), bem como a conversão dessas em espécies radicalares, pela exposição à radiação ultravioleta ou pela oxirredução eletroquímica acoplada ao experimento de RPE, tornam possível analisar um grande número de compostos diamagnéticos.

Através da espectroscopia de RPE, amostras sólidas, líquidas bem como gasosas podem ser analisadas de forma não destrutiva. Por ser uma técnica muito sensível, em condições adequadas, o limite de detecção pode chegar ao intervalo de 10^{11} a 10^{12} spins g^{-1} (equivalente à parte por bilhão)⁴⁷. Em geral, pequenas quantidades de amostra são suficientes para desenvolver o experimento (5 a 50 mg). Também, não é conveniente analisar amostras magneticamente concentradas. A resolução do espectro cai quando há centros paramagnéticos próximos entre si o suficiente para que ocorra interação dipolar entre eles. Logo, esta técnica é aplicada, primariamente, à caracterização de espécies magneticamente diluídas^{47,48}. Há maneiras de se diluir amostras magneticamente concentradas. Uma delas, é dissolvendo o material a ser analisado em um solvente de baixa constante dielétrica, fazendo-se o experimento em solução ou solução congelada, conforme for mais indicado. Solventes com altas constantes dielétricas como a água, não são recomendados, pois ocorre perda da potência de microondas aplicada, pela interação do solvente com a componente elétrica desta, gerando assim aquecimento e outros problemas^{46,47}.

As frequências mais utilizadas nos experimentos de RPE, situam-se ao redor de 9 GHz (banda-X) e de 35 GHz (banda-Q).

As espécies paramagnéticas mais comumente observadas por RPE incluem radicais livres orgânicos e complexos metálicos paramagnéticos^{47,48}.

Por apresentar melhor resolução, geralmente os espectros de RPE são adquiridos na forma de primeira derivada do espectro de absorção. A resolução pode ainda ser melhorada através da aquisição de espectros em segunda derivada⁴⁶, mas com o inconveniente do decréscimo da relação sinal-ruído, a qual diminui geometricamente com sucessivas derivações⁴⁹. A Fig. 06 apresenta os

espectros de absorção, primeira derivada e segunda derivada, para uma espécie paramagnética com $S = \frac{1}{2}$.

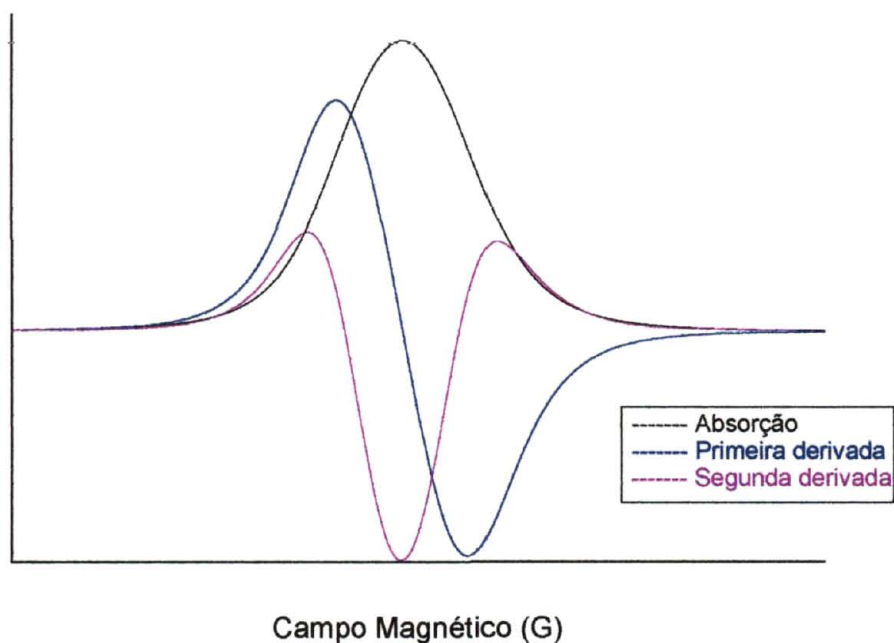


FIGURA 06 – Comparação[‡] entre a curva de absorção, primeira derivada e segunda derivada de um experimento de RPE para uma amostra cujo $s = \frac{1}{2}$.

1.2.1 O HAMILTONIANO DE SPIN

O espectro de RPE por si só, não fornece muitas informações a respeito da amostra em estudo. Para obter informações químicas e estruturais da amostra é necessário representar o espectro, matematicamente, e encontrar valores paramétricos que possam ser relacionados aos detalhes da amostra, tais como natureza dos radicais livres, espécies metálicas e estado de oxidação, simetria dos sítios paramagnéticos e ligações envolvidas, além de outras informações⁵⁰.

[‡] As intensidades das curvas foram alteradas pois, caso contrário, as curvas de primeira e principalmente de segunda derivada seriam insignificantes comparadas à curva de absorção.

O "Hamiltoniano de spin" é uma representação matemática conveniente do espectro de RPE. Se for possível ajustar um Hamiltoniano de spin para um espectro experimental, pode-se utilizar os parâmetros obtidos para se fazer inferências a respeito das propriedades químicas e estruturais da amostra em estudo⁵⁰. O Hamiltoniano é uma descrição fenomenológica pela qual o espectro de RPE pode ser descrito em termos de um pequeno número de parâmetros. Uma vez que estes parâmetros são determinados experimentalmente, cálculos relacionando-os à configuração eletrônica e ao estado de energia do centro paramagnético são geralmente possíveis^{45,47}.

Para um grande número de casos, apenas alguns termos do Hamiltoniano de spin são suficientes para descrever os fenômenos:

$$\hat{H} = (g B \hat{S}) + (A \hat{S} \hat{I}) \quad (1)$$

O primeiro termo corresponde à interação de Zeeman e o segundo à interação hiperfina. g e A são os parâmetros de RPE (discutidos na próxima seção), B é o campo magnético externo, ao qual a amostra está sendo submetida e S e I são os operadores de spin eletrônico e nuclear, respectivamente^{47,50}.

A partir do espectro experimental, g e A podem ser estimados, e com o auxílio do Hamiltoniano, pode-se fazer inferências sobre o ambiente químico em que se encontra o elétron desemparelhado.

Outro Hamiltoniano importante, é aquele que expressa a separação de campo zero⁴⁵.

$$\hat{H} = D(S_z^2 - 1/3 S^2) + E(S_x^2 - S_y^2) \quad (2)$$

Este Hamiltoniano expressa apenas os operadores de spin eletrônico e a interação entre spins, de onde pode-se estimar os parâmetros D e E, os quais serão discutidos à frente.

1.2.2 A INTERAÇÃO ELETRÔNICA DE ZEEMAN

O principal fenômeno físico relacionado à espectroscopia de RPE é o efeito Zeeman, que envolve a interação entre o spin de um elétron desemparelhado e um campo magnético externo⁵⁰. Este efeito está representado no primeiro termo do Hamiltoniano de spin (1). Quando os elétrons não são submetidos a campos cristalinos ou campos magnéticos externos, eles encontram-se distribuídos aleatoriamente e os dois possíveis estados de spin ($m_s = \pm 1/2$) estão degenerados (energias equivalentes). Porém, quando colocados na presença de um campo magnético externo, uma parte dos elétrons alinha-se paralelamente ao campo ($m_s = -1/2$, estado de menor energia) e uma outra parte, antiparalelamente ($m_s = +1/2$, estado de maior energia). As energias relativas destes dois níveis são proporcionais ao campo magnético aplicado, dadas pela expressão:

$$E_{ms} = g \mu_B B m_s \quad (3)$$

onde μ_B é o magneton de Bohr ($9,2731 \times 10^{-24}$ J/T), B é o campo magnético e g é uma constante de proporcionalidade, conhecida como fator-g. A separação de energia entre os estados de spins (Fig. 07) é chamada de separação de Zeeman. Caso exista mais de um elétron desemparelhado no átomo, haverá interações entre eles, resultando em um número maior de estados não degenerados, dados pela expressão de multiplicidade $2S + 1$, onde S é o spin total.

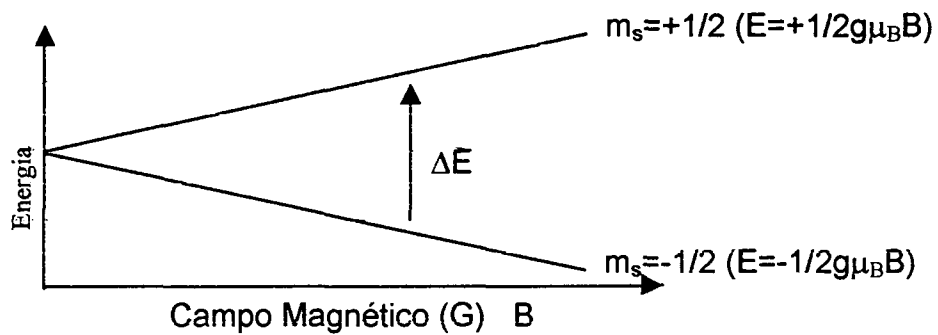


FIGURA 07 – Perda da degenerescência dos estados de spin para um sistema de $s = \frac{1}{2}$, pela aplicação de um campo magnético (efeito Zeeman).

Se as populações dos dois estados fossem exatamente iguais, não seria possível realizar experimentos de RPE, pois durante a aplicação da microondas, haveria apenas uma troca dos estados de spins pelas duas populações, sem que houvesse absorção efetiva de radiação, e portanto, sua detecção. Mas, como a população do estado de menor energia é um pouco maior, o experimento torna-se possível. A razão entre as populações de spins dos dois estados, antes da aplicação da microondas, pode ser descrita satisfatoriamente pela distribuição de Boltzmann:

$$n^+/n^- = \exp(-h\nu/kT) \cong 1 - g \mu_B B / kT \quad \text{⊗} \quad (4)$$

onde n^+ e n^- são as populações dos níveis de maior e menor energia respectivamente, k é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta da amostra em estudo⁴⁸. Inference-se da expressão, que um aumento no campo magnético aplicado, ou então, uma redução da temperatura, faz com que o nível de menor energia torne-se mais populado, alcançando dessa forma um aumento na intensidade do sinal, durante a aquisição de espectros de RPE, uma vez que existe proporcionalidade entre esses dois fatores.

⊗ Na condição de ressonância, $h\nu = g\mu_B B$.

O Fator-g é um dos parâmetros mais importantes na espectroscopia de RPE. Para um hipotético elétron livre, apresenta um valor igual a 2,0023. Quando um elétron desemparelhado se encontra em um orbital num átomo, ele pode apresentar maior ou menor grau de localização; dependendo do sistema (íon, molécula, radical), ele pode apresentar um elevado grau de deslocalização. O fator-g reflete a natureza desse orbital. Ele pode variar de acordo com a orientação do orbital que contém o elétron desemparelhado em relação ao campo magnético externo aplicado (anisotropia). Nesse caso, haveria três valores distintos para g: g_x , g_y e g_z , os quais forneceriam informações a respeito dos eixos principais de simetria do orbital. Há um caso específico onde $g_x = g_y$. Esta condição determina uma simetria axial onde $g_x = g_y$ é definido como g_{\perp} (g perpendicular) e g_z é designado por g_{\parallel} (g paralelo)⁴⁸. Em solução, as moléculas possuem movimento de rotação. Nesse caso, a agitação térmica pode atingir taxas consideravelmente maiores do que a frequência de operação do espectrômetro, fazendo com que, no tempo necessário para se excitar o sistema, as moléculas possuam todas as orientações possíveis em relação ao campo magnético externo, resultando numa perda aparente de anisotropia, aparecendo somente um fator-g que seria um valor médio entre g_x , g_y e g_z . Se a solução é congelada, ou se a amostra é um pó, todas as possíveis orientações ocorrerão aleatoriamente contudo, as posições moleculares são mantidas. Cada molécula com uma orientação particular tem seu próprio fator-g e o espectro resultante é a soma do espectro individual de cada molécula. No caso de simetria axial, estatisticamente falando, haverá menos moléculas com o eixo principal de simetria orientado na direção do campo magnético externo, e mais moléculas com o eixo principal orientado perpendicularmente ao campo, de modo que, nesse caso, a intensidade de absorção do sinal correspondente ao g_{\parallel} será menos intensa, e em primeira

derivada passará por um máximo, enquanto o sinal do g_{\perp} será de maior intensidade, e em primeira derivada, passará por zero ⁴⁶.

Ao substituir-se o valor de m_s na equação (3), obtém-se os valores das energias para cada estado de spin ($\pm 1/2 g \mu_B B$). A separação de energia entre os dois estados será igual a:

$$\Delta E = g \mu_B B \quad (5)$$

A separação de energia ΔE aumenta linearmente com o aumento de B (Fig. 07). Transições de dipolo magnético podem ocorrer, entre os dois estados de spins, do menor para o maior estado de energia, quando faz-se incidir radiações eletromagnéticas cujos fótons possuem energia $h\nu$ igual a ΔE , como mostra a expressão:

$$h\nu = \Delta E = g \mu_B B \quad (6)$$

Esta equação representa a condição de ressonância num experimento de RPE^{47,50}.

Para a aquisição de um espectro de RPE, a amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante, com dimensões ajustadas à frequência de microondas utilizada. Logo, é impossível variar a frequência sem variar as dimensões da cavidade. Portanto, por questões práticas, torna-se mais conveniente submeter-se a amostra à uma radiação de microondas de frequência fixa, e conhecida, e variar o campo magnético B ⁴⁶.

Se um elétron, promovido ao nível de maior energia, retorna ao seu estado fundamental emitindo radiação, não é possível detectar a absorção líquida de energia pois, cada fóton absorvido seria reemitido. Existem porém, mecanismos de relaxação, que possibilitam dissipar a energia absorvida, sem a emissão de fóton durante a transição do spin de volta ao nível de menor energia. O mais importante deles é conhecido como relaxação spin-rede, onde a energia absorvida é dissipada

pelo sistema na forma de energia térmica. Esse mecanismo possui um tempo característico para ocorrer (T_1), que é dependente dos acoplamentos existentes⁵¹. O número de spins em processo de excitação não pode exceder ao número de spins em processo de relaxação pois, nesse caso, haverá saturação no sistema⁵⁰. Por outro lado, a largura de uma linha espectral está inversamente relacionada ao tempo de relaxação⁴⁵, ou seja, quanto menor T_1 , mais larga será a linha de RPE, perdendo-se resolução, e até mesmo, impossibilitando o registro do espectro. Dependendo do sistema, essas situações podem ser contornadas reduzindo-se a temperatura do sistema pois, além de aumentar a população do nível de menor energia, aumenta-se também T_1 .

1.2.3 A INTERAÇÃO NUCLEAR HIPERFINA

Prótons, bem como nêutrons, possuem número quântico de spin ($\pm 1/2$) e, dependendo de como estas partículas estão no núcleo, pode ou não haver um spin nuclear resultante (I) diferente de zero⁴⁵. Átomos com número atômico (Z) e de massa (A) pares, possuem $I = 0$; exemplos ${}_6\text{C}^{12}$ e ${}_8\text{O}^{16}$. Nos casos em que Z for ímpar e A for par, I será inteiro; exemplo: ${}_7\text{N}^{14}$ ($I = 1$) e ${}_5\text{B}^{10}$ ($I = 3$). Nos casos onde A for ímpar, I será fracionário, com denominador igual a dois; exemplo: ${}_{13}\text{Al}^{27}$ ($I = 5/2$) e ${}_1\text{H}^1$ ($I = 1/2$)⁵². Spins nucleares desemparelhados produzem um momento magnético nuclear, que quando submetido a um campo magnético externo, sofre perda da degenerescência. Os diferentes estados (m_I) são todos os valores entre $+I$ e $-I$, que distam entre si por uma unidade ($\Delta m_I = 1$). Se $I = 1/2$, teremos $m_I = +1/2$ e $-1/2$ ($+1/2 - 1$). Quando $I = 1$, os valores de m_I serão: $+1$, 0 ($+1 - 1$) e -1 ($0 - 1$). Para o caso dos núcleos, o valor positivo é o de menor energia⁴⁵. Quando um elétron desemparelhado pertence a um átomo com spin nuclear total diferente de

zero, e esta amostra é submetida a um campo magnético externo, este elétron estará submetido também a um campo magnético proveniente do núcleo atômico, que pode ser somado (m_I positivo) ou subtraído (m_I negativo) ao campo magnético externo, fazendo com que o campo magnético efetivo experimentado pelo elétron desemparelhado seja a soma do campo aplicado e o campo local gerado pelo spin nuclear. Este efeito está representado pelo segundo termo do Hamiltoniano de spin, dado pela equação (1). Neste caso, a linha de RPE é desdobrada em duas ou mais linhas, e a separação entre elas corresponde ao valor da constante de interação hiperfina (A). O número de linhas da interação hiperfina é dado pela multiplicidade dos estados de spin nuclear: $2I + 1$ ⁴⁷. Há casos em que o desdobramento do espectro é causado pelo núcleo de outro átomo, que não aquele que possui o elétron desemparelhado. Neste caso, a constante A passa a ter o nome de constante de interação super-hiperfina.

1.2.4 REGRAS DE SELEÇÃO

As condições para que a matéria absorva radiação eletromagnética estão sumarizadas nas regras de seleção. As transições que são possíveis, de acordo com estas regras, são chamadas de permitidas, enquanto as transições que não obedecem estas regras são chamadas de proibidas. É importante ressaltar entretanto, que o termo proibido refere-se a regras estabelecidas para um modelo simples, de modo que transições proibidas podem ocorrer por mecanismos não incluídos neste modelo simples. Porém, a intensidade de absorção ou emissão que ocorre com uma transição está relacionada à probabilidade deste evento (transição) ocorrer. Quanto mais provável for o evento, mais intensa será a

absorção, de modo que, transições proibidas são de baixa probabilidade e consecutivamente, as absorções apresentarão intensidade muito baixas^{45,47}.

As regras de seleção para RPE são: $\Delta m_l = 0$ e $\Delta m_s = 1$. Estas regras restringem o número de transições, facilitando assim a interpretação dos espectros, o que seria muito mais difícil se todas as prováveis transições ocorressem⁴⁷.

1.2.5 A SEPARAÇÃO DE CAMPO ZERO (INTERAÇÃO FINA)

No caso em que íons ou moléculas apresentam mais de um elétron desemparelhado próximos ($S > 1/2$), haverá uma interação entre os seus momentos magnéticos. O campo magnético efetivo experimentado pelos elétrons desemparelhados será a soma do campo magnético aplicado e o campo magnético gerado pelo(s) spins(s) eletrônicos(s) do(s) outros(s) elétrons(s) desemparelhado(s). Esta interação magnética dipolo-dipolo é chamada de interação fina e remove a degenerescência (provoca a separação de energia entre os estados de spin), mesmo na ausência de campo magnético externo. Esta quebra de degenerescência é denominada de *separação de campo zero*. Nestes casos, os parâmetros do Hamiltoniano de campo zero podem ser representados por duas constantes independentes, que são os parâmetros de campo cristalino: E (distorção rômica) e D (distorção axial). Assim, no caso de simetria axial, $E = 0$, e para simetria cúbica, não se observa a separação de campo zero, ou seja, $D = E = 0$ ⁴⁵.

2 - OBJETIVOS

Este trabalho objetivou: 1º) Estudar a estrutura de melaninas sintéticas (obtidas a partir da L-DOPA, através de 4 diferentes processos oxidativos) pela caracterização de seus sítios ligantes, através da interação com os íons paramagnéticos: Cu^{2+} , VO^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} , fazendo uso das espectroscopias de RPE e IVTF, e pela utilização de outras técnicas comumente aplicadas a substâncias húmicas do solo: UV-Vis, dosagem dos grupos carboxílicos e fenólicos, análise elementar e a capacidade redutora frente ao hexacianoferrato(III) de potássio; 2º) modificar a metodologia utilizada na dosagem de grupos ácidos de substâncias húmicas, reduzindo-se ao máximo o contato do material em análise com o ar, bem como reduzindo também a quantidade de amostra necessária para a análise.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MÉTODOS EMPREGADOS NA SÍNTESE DE MELANINAS

As melaninas foram obtidas a partir da oxidação da L-DOPA (proveniente da Aldrich Chemical Company, utilizada sem purificação adicional), através de quatro diferentes métodos, trabalhando-se em todos eles, à temperatura ambiente.

3.1.1 SÍNTESE DA MS01

Esta melanina foi sintetizada utilizando-se o oxigênio do ar como agente oxidante. A metodologia empregada, sofreu uma alteração em relação à literatura^{53,54}. Adicionou-se 5,00 gramas de L-DOPA em um bequer contendo 1L de água desionizada. Em seguida, gotejou-se hidróxido de amônio concentrado (Merck), até que a solução atingisse pH 8,2 (pH controlado potenciométricamente). Transferiu-se o conteúdo para um balão de vidro de fundo chato de 1,5 L (Fig. 08-3), o qual foi envolvido com papel alumínio, para evitar-se o contato com a luz, e então fechado com uma rolha perfurada, contendo dois tubos de vidro (3 mm de diâmetro interno), sendo um para a entrada e outro para a saída do fluxo de ar. O tubo de entrada, o qual se encontrava mergulhado na solução, estava conectado à saída de um frasco de segurança (Fig. 08-2), que por sua vez, estava conectado a um frasco lavador de gás (Fig. 08-1), contendo NaOH 5 mol/L (Vetec) em seu interior, para reter o gás carbônico proveniente do ar. No tubo de entrada desse frasco lavador, também havia um filtro de lã de vidro, para impedir a entrada de partículas sólidas. O tubo de saída, proveniente do balão, encontrava-se com a extremidade inferior 10 cm acima do nível da solução e com a extremidade

superior conectada a um outro frasco de segurança (Fig 08-4), que por sua vez, estava ligado a uma trompa d'água (Fig. 08-5). Quando o sistema (Fig. 08) era submetido a uma redução da pressão interna, promovia-se um fluxo contínuo de ar através da solução contendo L-DOPA.

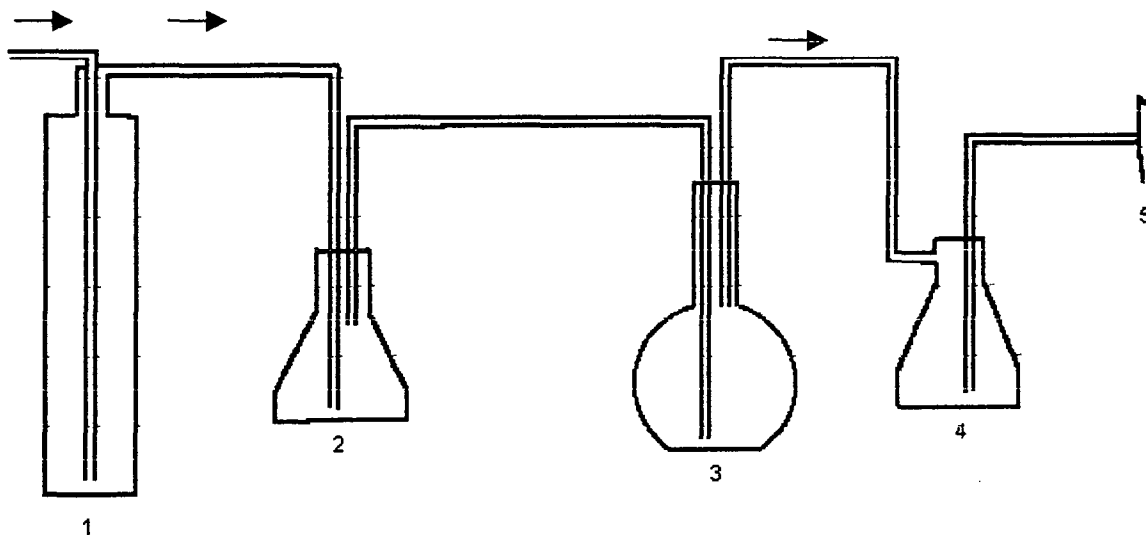


FIGURA 08 – Esquema representativo do sistema utilizado na síntese da melanina MS01: frasco lavador de gás(1); frasco de segurança(2); balão contendo os reagentes(3); frasco de segurança(4); e trompa d'água(5). As setas indicam o sentido do fluxo de ar.

Deixou-se a solução reagindo sob agitação e fluxo de ar durante quatro dias. Como esta reação liberava íons H^+ , fazendo com que o pH da solução diminuísse paulatinamente, foram feitas sucessivas adições de NH_4OH concentrado durante o período de reação, de tal forma, que o pH manteve-se entre 8,0 e 8,2[§]. Após 4 dias, a suspensão negra resultante foi tratada com HCl concentrado (Ecibra) até atingir pH 2,0 e deixada em repouso por uma hora. Em seguida, centrifugou-se o conteúdo do balão a 4000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi recolhido e lavado 4 vezes com HCl 0,01 mol/L, sendo recuperado através da centrifugação após cada lavagem. O material foi então lavado dez

[§] Utilizando-se o oxigênio como oxidante, a velocidade da reação diminui significativamente com a redução do pH.

vezes com água desionizada e secado a 60° C sob pressão reduzida, por 30 horas. A massa final de melanina sintética, obtida segundo este método, foi de 3,36g.

3.1.2 SÍNTESE DA MS02

Esta melanina foi obtida empregando-se o pirofosfato de manganês (III) como agente oxidante.

3.1.2.1 Preparação do pirofosfato de manganês (III)

Este reagente foi preparado através de uma reação de proporcionamento ($\text{Mn}^{2+} + \text{Mn}^{4+} \rightarrow 2 \text{Mn}^{3+}$), conforme descrito pela literatura⁵⁵. Dissolveu-se 6,00 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck) em 100 mL de água desionizada, transferindo-se em seguida, esta solução para um bequer de capacidade igual a 2 L. Adicionou-se 1 L de solução tampão pirofosfato de sódio (Vetec) pH 7,0 0,1 mol/L, previamente tratada para eliminar-se íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , presentes como contaminantes⁵⁶. Juntou-se à mistura 5,32 g de MnO_2 (Merck) e deixou-se a mesma sob agitação por 24 horas. Após esse período, a mistura foi centrifugada, desprezando-se a parte sólida. A solução obtida, de cor avermelhada, característica de Mn^{3+} , foi recuperada e filtrada em funil de vidro sinterizado. Para determinar-se a concentração da solução de pirofosfato de manganês (III), utilizou-se o método espectrofotométrico ($\epsilon = 6,20 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ para 257 nm)⁵⁷. O valor encontrado foi $\approx 0,02 \text{ mol/L}$.

3.1.2.2 Obtenção da melanina

Dissolveu-se 1,00 g de L-DOPA em 1 L de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,2 (obtido a partir de soluções 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 [Carlo Erba] e NaOH [Merck]). Dividiu-se a solução de L-DOPA obtida em cinco alíquotas de 200 mL^{**}, em bequeres de 550 mL de capacidade. A cada alíquota (uma por vez), adicionou-se 200 mL da solução de pirofosfato de manganês (III). Cada mistura obtida foi mantida sob agitação por 10 minutos, sendo em seguida centrifugada, para eliminação dos óxidos e hidróxidos de manganês (II) formados nos primeiros passos da oxidação da L-DOPA. Os sobrenadantes foram recuperados e transferidos para dois erlemmeyers de polietileno de 1 L de capacidade, com tampa rosqueada. Os erlemmeyers foram fechados hermeticamente, através do uso de parafilme nas roscas, envolvidos com papel alumínio e mantidos sob agitação durante 24 horas. Efetuou-se então a centrifugação da suspensão formada nesse período, tomando-se o sólido e desprezando-se a parte aquosa. O precipitado obtido foi lavado oito vezes com HCl 0,01 mol/L e 10 vezes com água desionizada, sendo recuperado por centrifugação após cada lavagem. A melanina obtida foi seca a 60°C sob pressão reduzida durante 30 horas. A massa de melanina sintética obtida por este método foi de 0,62 g.

3.1.3 SÍNTESE DA MS03

Para obter-se esta melanina, utilizou-se o peróxido de hidrogênio para oxidar a L-DOPA, adaptando-se o método citado pela literatura, para o substrato 5,6-di-hidroindol⁵⁸: Adicionou-se 2,00 g de L-DOPA a 100 mL de solução tampão

^{**} A solução foi dividida em alíquotas visto não ser possível centrifugar-se volumes superiores a 400 mL numa única vez.

fosfato 0,1 mol/L, pH 7,2 , num bequer de 250 mL de capacidade. Deixou-se a mistura sob agitação por 20 minutos, para solubilizar-se parte da L-DOPA adicionada. Em seguida adicionou-se à mistura, 40 mL de uma solução de H₂O₂ (Grupo Química) a 15% (4,4 mol/L). O bequer foi então envolvido com papel alumínio, deixando-se apenas parte da extremidade superior aberta. Numa bureta volumétrica, colocou-se 30,00 mL de uma solução 0,11 mol/L de iodeto de potássio (Merck), cuja função foi catalisar a decomposição do H₂O₂. Esta bureta foi posicionada sobre o bequer contendo as soluções de L-DOPA e H₂O₂, e a solução de KI foi então adicionada à mistura, gota a gota, de tal forma que o período total de adição foi igual a 30 minutos. Transferiu-se então o conteúdo do bequer para um erlemmeyer de polietileno de 250 mL de capacidade, com tampa rosqueada, fechando-se o mesmo hermeticamente. A solução foi mantida sob agitação durante um período de 24 horas. Em seguida, a suspensão obtida foi acidificada com HCl concentrado até pH 2,0 e deixada em repouso por um período de uma hora. Após esse período, centrifugou-se a suspensão, tomando-se o sólido e desprezando-se a parte aquosa. O precipitado obtido foi lavado 8 vezes com HCl 0,01 mol/L e 10 vezes com água desionizada, sendo sempre recuperado através da centrifugação. Secou-se a melanina obtida a 60° C, sob pressão reduzida, por um período de 30 horas. A massa de melanina obtida por este método foi de 1,32 g.

3.1.4 SÍNTESE DA MS04

O oxidante empregado na obtenção dessa melanina foi o hexacianoferrato (III) de potássio. Adicionou-se 1,00 g de L-DOPA em 400 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 , num erlemmeyer de polietileno de 500 mL de capacidade, com tampa rosqueada. Acrescentou-se 100 mL de solução 1,01 mol/L de K₃[Fe(CN)₆]

(Synth). O erlemmeyer foi então fechado hermeticamente e mantido sob agitação durante 24 horas. Após esse período, o conteúdo do erlemmeyer foi centrifugado, desprezando-se a parte aquosa. O precipitado formado foi recolhido e lavado 15 vezes com água desionizada, sendo em seguida lavado 10 vezes com HCl 0,01 mol/L e então, lavado novamente 10 vezes com água desionizada. A melanina obtida foi seca a 60° C sob pressão reduzida por 30 horas. A massa resultante desta síntese foi de 0,72 g.

3.2 PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE MELANINAS COM ÍONS PARAMAGNÉTICOS

Os complexos foram preparados reagindo-se cada uma das melaninas sintetizadas, com soluções aquosas de cada um dos seguintes íons: Mn^{2+} , Cu^{2+} , VO^{2+} e Fe^{3+} . Para cada uma das quatro melaninas, procedeu-se da seguinte forma: Tomou-se quatro frascos plásticos de 30 mL de capacidade, cada um deles contendo 25 mL de solução 0,1 mol/L, de um dos seguintes sais: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Merck), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Merck), $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ (Aldrich) e $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Merck). Adicionou-se a cada frasco 100 mg de Melanina. Os frascos foram então fechados, deixando-se o conteúdo reagir por 24 horas. Após esse período, o conteúdo de cada frasco foi centrifugado e os complexos melanina-íon-metálico foram recuperados. Lavou-se cada complexo três vezes com HCl 0,01 mol/L (para eliminar-se íons metálicos não complexados que poderiam estar adsorvidos à melanina)⁵⁹, e diversas vezes com água desionizada. O material foi seco a 60° C sob pressão reduzida.

Alguns dos compostos de coordenação ($CuMSO_3$, $MnMSO_4$, $CuMSO_4$, $VOMSO_4$ e $FeMSO_4$) necessitaram lavagens adicionais com HCl 0,05 mol/L, para

hidrolisar parte dos íons metálicos complexados. A concentração relativamente alta destes íons fez com que houvesse perda da resolução nos experimentos de RPE (alargamento das linhas).

3.3 ESPECTROSCOPIA DE IVTF

Os espectros de infravermelho com transformadas de Furié (IVTF) foram adquiridos à temperatura ambiente, num equipamento Bomem FT-IR, série MB, somando-se 10 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} , entre 4000 e 400 cm^{-1} , utilizando-se pastilhas de KBr (1:100).

3.4 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

Os espectros na região do ultravioleta-visível foram adquiridos à temperatura ambiente, de amostras em solução (1 mg de amostra / 20 mL de solução 0,05 mol/L de NaHCO_3 ou solução 0,1 mol/L de NaOH), num espectrofotômetro HP, Diode Array 8452, operando-se na faixa de 190 a 800 nm.

3.5 ESPECTROSCOPIA DE RPE

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica foram obtidos em tubos de quartzo, para amostras no estado sólido (em pó) e em célula plana (flat), também de quartzo, para soluções (10 mg melanina sintética dissolvidos em 1 mL de solução 0,1 mol/L de KOH [Vetec] degasada), num espectrômetro BRUKER, modelo ESP 300 E, banda X (9,5 GHz) com modulação de frequência de 100 kHz para 1ª derivada e 50 kHz para 2ª derivada, à temperatura ambiente. Para as medidas efetuadas em solução, trabalhou-se com amplitudes de modulação de

0.142 a 1.01 Gauss e potência de microondas na faixa de 0,505 a 20 mW. Utilizou-se também os programas **WINEPR**[®] para tratamento de dados e **Simfonia**[®] para simulação de espectros.

3.6 ANÁLISE ELEMENTAR

A análise química elementar de carbono hidrogênio e nitrogênio (CHN) foi efetuada utilizando-se um equipamento Perkin-Elmer analyser , model 240. Os experimentos foram realizados pelo LAC (Laboratório Central de Pesquisa e Desenvolvimento, COPEL/UFPR).

3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GRUPOS ÁCIDOS (CARBOXÍLICOS E FENÓLICOS)

A determinação do teor de grupos fenólicos e carboxílicos das melaninas sintéticas foi realizada através do método proposto por Schinitzer e Gupta⁶⁰, modificado conforme descrito na seção 3.7.2.

3.7.1 MÉTODO DA FUNÇÃO DE FORMAÇÃO ÁCIDA

O experimento foi realizado com base na literatura⁶¹: Transferiu-se 50 mg de amostra para uma célula eletroquímica de 125 mL de capacidade (Fig. 9-3). Adicionou-se 100 mL de água desionizada e uma barra magnética para agitação. Fechou-se a célula com uma tampa de borracha, contendo: um eletrodo de vidro para medir-se o pH, 2 tubos de teflon de 2 mm de diâmetro, para manter o sistema sob fluxo de argônio e uma abertura de 3 mm de diâmetro para introduzir-

se uma cânula de teflôn de 2 mm, para a adição de base ou de ácido. Manteve-se o sistema sob agitação magnética (Fig. 9-2) e fluxo de argônio (Fig. 9-6) até total dissolução da amostra. Com o auxílio de uma bureta semi-automática (Fig. 9-4), adicionou-se, através da cânula, solução de KOH 0,1102 mol/L, até atingir pH 11,000 (o volume gasto de base, em média, era de 5 mL). Esperou-se cerca de 20 minutos até que o pHmetro estabilizou-se. Em seguida, inseriu-se na célula uma cânula conectada à bureta semi-automática, para adição do ácido. Titulou-se a solução com HCl 0,1076 mol/L. O volume de HCl utilizado, por adição, foi de 0,020 mL (20 μ L). O tempo entre uma adição, medida do pH e outra adição, foi de aproximadamente 1 minuto (os valores de pH foram medidos com a agitação magnética desligada e com o tubo de entrada do argônio suspenso acima do nível da solução, para se evitar perturbações da mesma). O número de adições variou entre 90 e 120, dependendo da amostra.

As soluções de KOH e HCl utilizadas, foram preparadas e acondicionadas em frascos de polietileno flexíveis, fechados por septos de borracha, atravessados por um tubo de teflon de 5 mm de diâmetro, que ia até o fundo da solução (Fig. 9-5). Esse tubo possuía duas funções: degasar a solução, através da conexão com uma linha de argônio (introduzia-se também uma agulha hipodérmica no septo para circulação do gás) e transferir a solução para a bureta (como o frasco era flexível, ele murchava durante a transferência, sem que houvesse a necessidade de injetar-se gás em seu interior) (Fig. 9-5). Na extremidade superior do tubo de teflon, havia 3 cm de tubo de tygon, para facilitar a conexão com a bureta e também para fechar o frasco, quando fora de uso, através de uma pinça de Mohr.

Como a parte superior da bureta podia ser destacada e trocada, utilizava-se um kit (conexões, reservatório e cânula de adição) para a base e outro para o ácido. Antes da bureta ser utilizada nas titulações, ela era preenchida e esvaziada

cerca de 6 vezes, com todas as conexões montadas, apenas faltando inserir-se a cânula na célula de titulação. Esse procedimento era realizado para se evitar a contaminação das soluções com oxigênio, já que ao preencher-se a bureta pela primeira vez, uma pequena quantidade de ar que se encontrava nos tubos e na parte superior da mesma, entrava em contato com as referidas soluções.

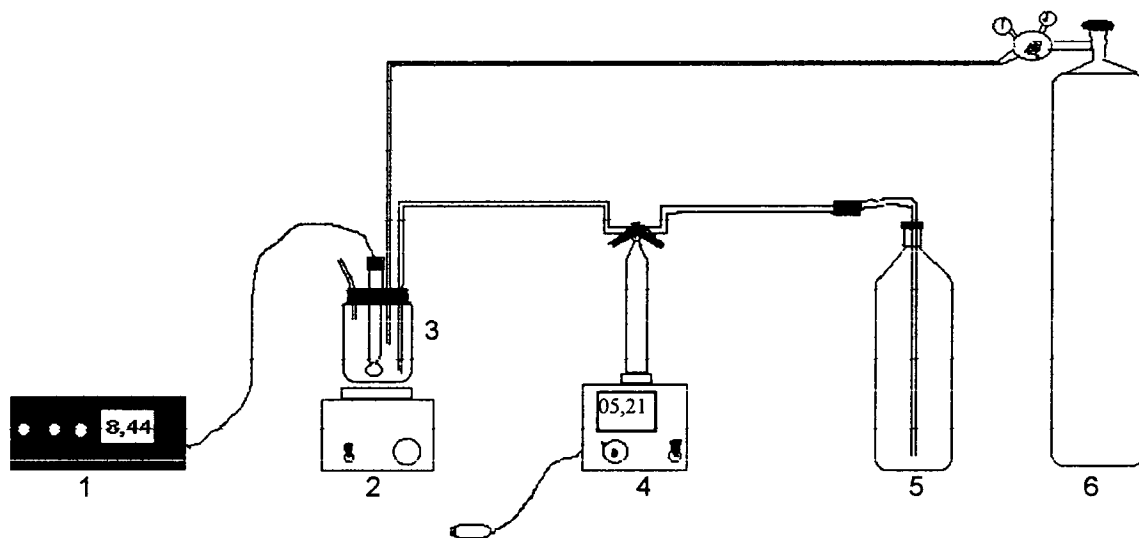


FIGURA 09 – Representação esquemática do sistema utilizado na quantificação dos grupos ácidos pelo método da função de formação ácida: pHmetro (1), agitador magnético(2), célula eletroquímica (3), bureta semi-automática (4), frasco flexível de polietileno para acondicionar base ou ácido (5) e cilindro contendo argônio (6).

3.7.2 MODIFICAÇÃO DO PROCEDIMENTO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL E PARCIAL PELO MÉTODO SCHINITZER E GUPTA

Antes de discorrer sobre as modificações no procedimento, pareceu conveniente descrever-se a metodologia que era empregada anteriormente, para fins comparativos.

3.7.2.1 Procedimento utilizado na determinação da acidez (sem modificações)

3.7.2.1.1 Acidez total

Transferia-se, entre 50 e 100 mg de amostra para um frasco de polietileno. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, adicionava-se 20 mL de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,125 mol/L. O frasco era então fechado com uma tampa perfurada, na qual se inseria um tubo de teflon de 3 mm de diâmetro, que se encontrava conectado ao reservatório de argônio, para degasar o sistema. Também introduzia-se na tampa, uma agulha hipodérmica para permitir-se a circulação do gás. Após 20 minutos, a tampa perfurada era retirada e substituída por outra sem orifício algum. O frasco era então colocado numa mesa agitadora e mantido sob agitação por 24 horas. Depois desse período, vertia-se o conteúdo desse frasco num funil de separação, contendo na sua saída lã de vidro compactada, que servia de filtro, separando-se o sólido da solução contendo excesso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, a qual era coletada num recipiente colocado abaixo do funil. O frasco de polietileno era lavado cerca de 3 vezes com 10 mL de água desionizada, sendo essa água vertida também sobre o funil de separação e acrescentada à solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$. O funil também recebia jatos de água desionizada, os quais eram coletados e somados à solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Essa solução, mantida em recipiente semi-aberto e submetida a um fluxo de argônio, era então titulada com HCl 0,1 mol/L, com o auxílio de uma bureta manual até pH 8,00⁶⁰, sendo que o pH era monitorado potenciometricamente.

Subtraindo-se o número de mols de base não consumidos do total adicionado, determinava-se o quanto fora consumido pela amostra.

Nesse tipo de experimento, não se costuma padronizar o $\text{Ba}(\text{OH})_2$ antes da titulação. O que se faz, é usar uma “amostra em branco”⁶⁰, onde num frasco,

coloca-se apenas a base (sem amostra). O conteúdo desse frasco é submetido às mesmas condições que as demais amostras, sendo também titulado com HCl, onde se dá a padronização da base. O número de milimols de H⁺ total por grama de amostra pode ser obtido pela equação:

$$\{(V_B - V) \cdot C_{\text{HCl}} \cdot 1000\} / m_{(\text{mg})} \quad (7)$$

onde V_B é o volume de HCl gasto para titular-se a amostra em branco, V é o volume de HCl gasto para titular-se uma amostra qualquer (volumes expressos em mL), C_{HCl} é a concentração do ácido utilizado (em mol/L) na titulação e m é a massa (expressa em mg) da amostra em análise.

3.7.2.1.2 Acidez parcial (carboxílica)

Transferia-se, entre 50 e 100 mg de amostra para um frasco de polietileno. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, adicionava-se 20 mL de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0,3 mol/L e 40 mL de água desionizada. O frasco era então fechado, degasado e mantido sob agitação, como descrito acima, para a acidez total. Após um período de 24 horas, o conteúdo do frasco era filtrado em funil de separação contendo lã de vidro, coletando-se a parte solúvel num recipiente, semelhante ao descrito para a acidez total. Essa solução era então titulada, com NaOH 0,1 mol/L, com o auxílio de uma bureta manual, até pH 8,00⁶⁰.

Novamente, fazia-se uso de uma “amostra em branco”⁶⁰, onde num frasco, colocava-se apenas a solução de acetato de cálcio (sem amostra). O conteúdo

desse frasco era submetido às mesmas condições que as demais amostras, sendo também titulado com NaOH.

Cada milimol de H⁺ titulado da solução de ácido acético formado era proveniente de grupos carboxílicos da amostra. O número de milimols de H⁺ carboxílico por grama de amostra pode ser obtido pela equação:

$$\{(V - V_B) \cdot C_{\text{NaOH}} \cdot 1000\} / m_{(\text{mg})} \quad (8)$$

onde V é o volume de solução de NaOH gasto para titular-se uma amostra qualquer, V_B é o volume de NaOH gasto para titular-se a amostra em branco (volumes expressos em mL), C_{NaOH} é a concentração da base utilizada na titulação (em mol/L) e m é a massa de amostra em análise (expressa em mg).

3.7.2.2 Metodologia modificada

3.7.2.2.1 Acidez total

As principais preocupações nesta parte do trabalho foram: diminuir a quantidade de amostra necessária para a análise e evitar-se ao máximo o contato do ar com o sistema, uma vez que o hidróxido de bário reage rapidamente com o gás carbônico, sem contar as reações da amostra com o oxigênio, geralmente favorecidas em pHs alcalinos. Como esse contato se dava principalmente durante os processos de transferência, procurou-se isolar do ar, as transferências que fossem realmente necessárias.

O primeiro passo dado foi: em lugar de adicionar-se o Ba(OH)₂ à amostra e depois degasar-se o sistema, adicionou-se o Ba(OH)₂ previamente degasado à

amostra, também fechada e sob atmosfera inerte, procedendo-se da seguinte forma:

Preparação da solução de $Ba(OH)_2$ 0,25 mol/L: Transferiu-se 32 g de $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ (Merck) para um frasco de polietileno de 1L. Adicionou-se água desionizada até completar-se o volume. Colocou-se dentro do frasco uma barra magnética para agitação. O frasco foi fechado com um septo de borracha perfurado, atravessado por um tubo de teflon de 4 mm de diâmetro interno, cuja extremidade inferior localizava-se a 1/3 da altura do frasco, contendo em sua extremidade superior 3 cm de tubo flexível de tygon (para facilitar conexões e também a obstrução do tubo de teflon), o qual estava obstruído por uma pinça de Mohr (Fig. 10).

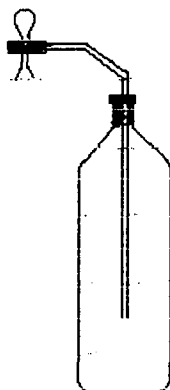


FIGURA 10 – Frasco utilizado para preparar e armazenar $Ba(OH)_2$.

Manteve-se a solução sob agitação por 1 hora, para dissolução do $Ba(OH)_2$. Conectou-se o tubo de tygon a uma linha de argônio para degasar-se a solução, introduzindo-se também uma agulha hipodérmica no septo para circulação do gás. Manteve-se o sistema sob fluxo de argônio por 1 hora. Obstruiu-se a extremidade do tubo com a pinça e retirou-se então a agulha hipodérmica, ficando o frasco

hermeticamente fechado, podendo ser então desconectado da linha de argônio. O frasco foi mantido em repouso por 3 dias para que o BaCO_3 presente como contaminante, que é insolúvel, decantasse. Para se utilizar a solução de Ba(OH)_2 , conectou-se o tubo de tygon a outro tubo de teflon de 5 cm de comprimento por 5 mm de diâmetro interno, contendo em seu interior lã de vidro (para reter partículas de BaCO_3 que porventura fossem arrastadas), que por sua vez estava conectado à bureta semi-automática. Acionava-se o sistema para encher a bureta, concomitantemente com a retirada da pinça que obstruía o tubo de tygon. Como o frasco era flexível, ele murchava, com a saída da base, não havendo necessidade de injetar-se gás para compensar o volume. A bureta era preenchida e esvaziada cerca de 6 vezes, com todas as conexões montadas, antes da utilização da base para a reação com as amostras.

Acondicionamento da amostra num recipiente para processar-se a reação com a base: Transferiu 25 mg de amostra para um frasco de vidro de 30 mL (dimensões, vide Fig. 11) de capacidade. Fechou-se o frasco com um septo de borracha (Fig. 11-a), o qual se ajustava por fora da borda da abertura do mesmo. Este septo continha um pequeno furo, que era atravessado por um tubo de tygon de 2 mm de diâmetro interno, cuja extremidade inferior distava 1 cm do fundo do frasco (Fig. 11-b). Este tubo estava prensado pelo septo, de tal forma que se encontrava obstruído. Somente introduzindo-se uma agulha hipodérmica com a ponta esmerilhada através dele, era possível desobstruí-lo. O sistema assemelhava-se a uma válvula de uma bola de futebol.

Com o auxílio da agulha hipodérmica de ponta esmerilhada, conectou-se o frasco, através do tubo de tygon a uma linha de argônio (Fig. 11-d). Também introduziu-se outra agulha no septo para saída do gás (Fig. 11-e). Manteve-se o sistema sob fluxo de argônio por 15 minutos, para purgar-se o ar contido no frasco.

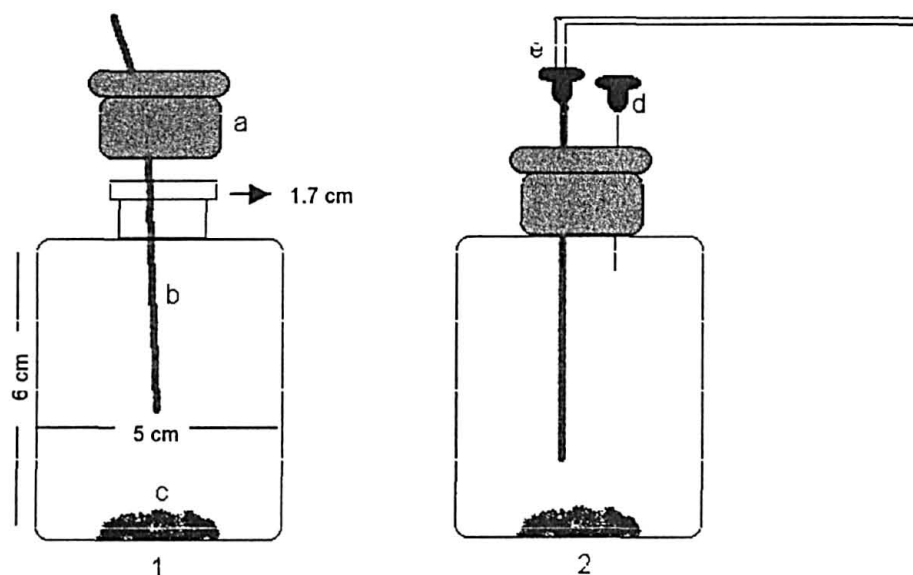


FIGURA 11 – Frasco utilizado para reagir a amostra com o $\text{Ba}(\text{OH})_2$: aberto (1), fechado (2); septo (a), tubo de tygon (b), amostra (c), agulha hipodérmica para saída de gás (d) e agulha hipodérmica com ponta esmerilhada conectada à linha de argônio (e).

Em seguida, mantendo-se ainda o fluxo de argônio, e com o auxílio de uma bureta semi-automática (Fig 12-2), com uma agulha hipodérmica adaptada na cânula de adição, adicionou-se à amostra 20,00 mL de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,25 mol/L (Fig. 12). Após a adição, retirou-se primeiramente a agulha conectada à cânula da bureta e em seguida, retirou-se, simultaneamente, a agulha de saída de gás e a agulha esmerilhada pela qual o argônio penetrava no frasco. Colocou-se o frasco em uma mesa agitadora e manteve-se o mesmo sob agitação por 24 horas. Após esse período, em lugar de filtrar-se o conteúdo do frasco em funil de separação contendo lã de vidro, o frasco foi submetido à centrifugação, a 4000 rpm, por 15 minutos. Em seguida, mantendo-se o frasco sob fluxo de argônio, com o auxílio de 2 agulhas hipodérmicas (uma para entrada e outra para saída do gás), através do uso de uma pipeta volumétrica, com uma agulha de ponta esmerilhada adaptada em sua extremidade, a qual foi introduzida pelo orifício do tubo de tygon, retirou-

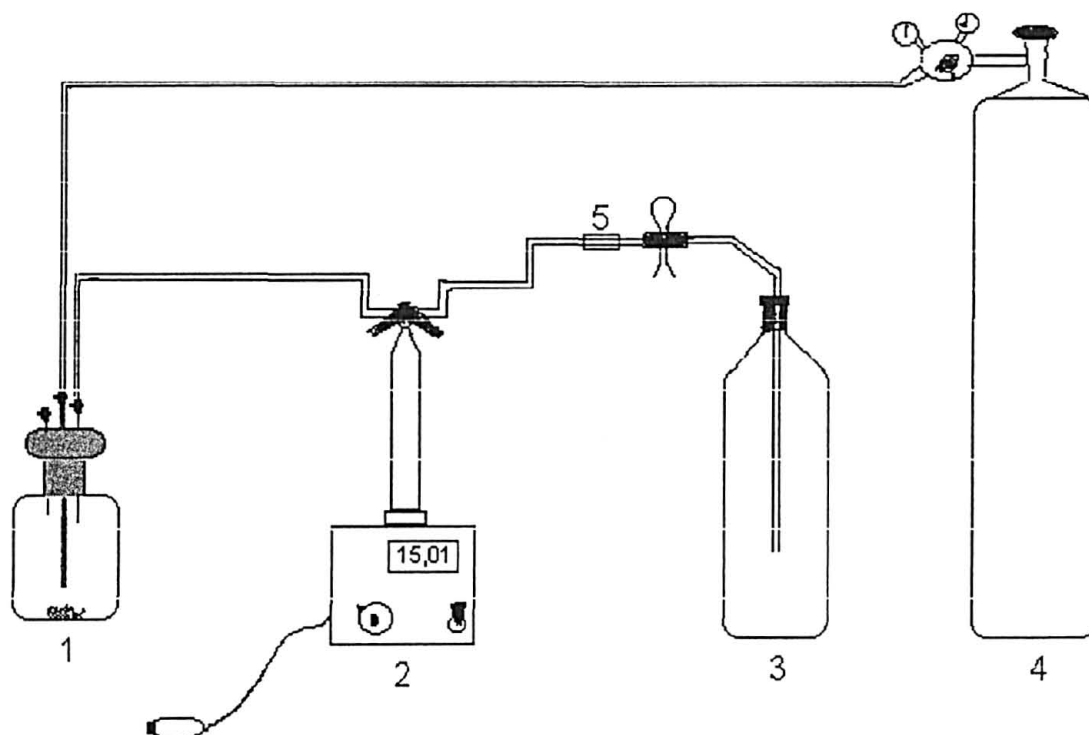


FIGURA 12 – Processo de adição de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ à amostra: frasco contendo amostra (1), bureta (2), frasco de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (3), cilindro de argônio (4); filtro de lã de vidro (5).

se uma alíquota de 10,00 mL da solução contendo o excesso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (que não reagira com a amostra) (Fig. 13), transferindo-se a mesma diretamente para uma célula eletroquímica, previamente degasada, contendo um eletrodo de vidro para medir-se pHs (Fig. 14).

Antes de utilizar-se a pipeta para retirar alíquotas, conectou-se a agulha de sua extremidade inferior à linha de argônio, mantendo-se a pêra acoplada à sua extremidade superior aberta, com o auxílio de duas pinças, para que o fluxo de argônio purgasse o ar de seu interior. Após 10 minutos, a pinça da parte superior da pêra foi retirada, interrompendo-se o fluxo. Para conectar a pipeta ao tubo de tygon do frasco contendo a amostra e a solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, desconectou-se a linha de argônio da agulha acoplada à sua extremidade inferior, pressionou-se a pêra, fazendo com que o argônio de seu interior fosse expelido e ela pudesse

então ser usada para fins de sucção, inserindo-se logo em seguida a agulha no frasco através do tubo de tygon.

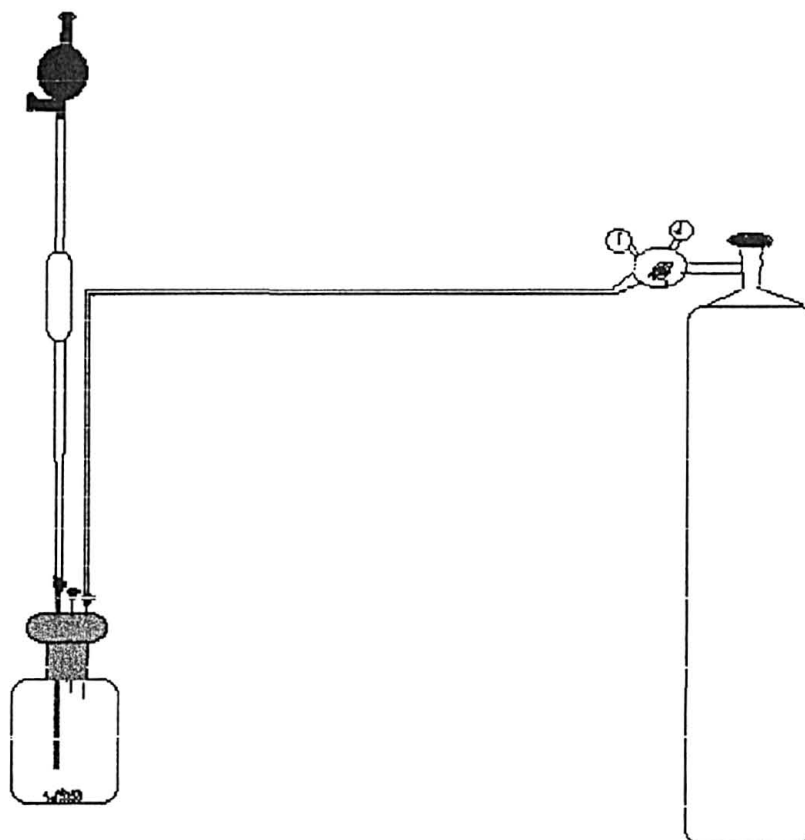


FIGURA 13 – Sistema utilizado para retirada de uma alíquota da solução contendo excesso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, utilizando-se uma pipeta conectada a uma agulha hipodérmica de ponta esmerilhada, mantendo-se o sistema sob fluxo de argônio.

A cânula para adição de ácido foi introduzida na célula pelo mesmo orifício pelo qual se realizou a transferência da solução a ser titulada. Titulou-se a solução com HCl (Ecibra) $0,1076 \text{ mol/L}$ (Fig. 15). Como foi titulado apenas metade do volume inicial de $20,00 \text{ mL}$ de base adicionados à amostra, o resultado obtido foi multiplicado por dois, encontrando-se dessa forma quanto da base não fora consumida pelos grupos ácidos da amostra.

O uso da amostra em branco foi mantido apesar das demais modificações, submetendo-se esta às mesmas condições que as demais amostras.

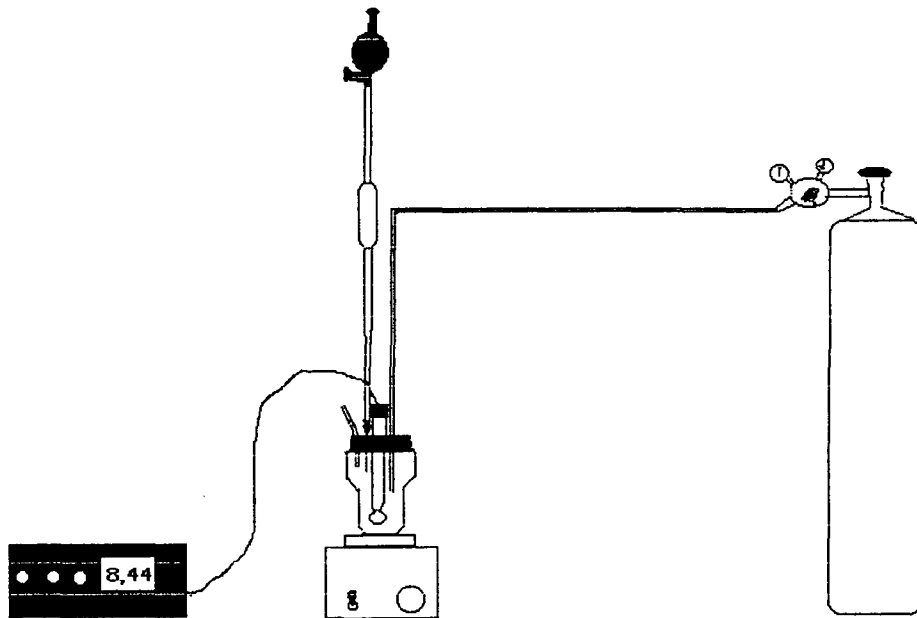


FIGURA 14 – Sistema utilizado na transferência da alíquota da solução contendo excesso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ para a célula eletroquímica.

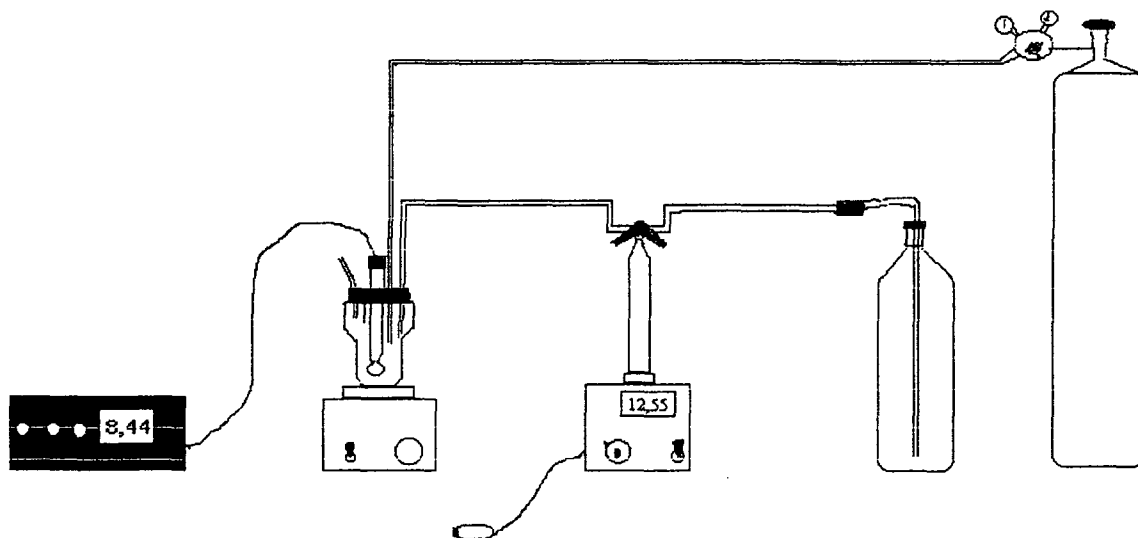


FIGURA 15 – Sistema utilizado na titulação da alíquota retirada da solução contendo excesso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, com HCl 0,1076 mol/L.

De posse do número de milimols de base não consumidos e com o auxílio da equação (7), determinou-se o valor da acidez total para as amostras.

3.7.2.2.2 Acidez parcial (carboxílica)

Transferiu-se 20 mg de amostra para um frasco de 30 mL de capacidade. Fechou-se o frasco com o septo conforme descrito na seção anterior. Submeteu-se o conteúdo do mesmo a um fluxo de argônio, conforme citado para a acidez total. Adicionou-se, com o auxílio de uma bureta semi-automática, 20,00 mL de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Carlo Erba) 0,25 mol/L, previamente degasado, procedendo-se de acordo com o efetuado na adição de hidróxido de bário, na determinação da acidez total. Manteve-se a mistura sob agitação por 24 horas. Centrifugou-se o frasco a 4000 rpm. Retirou-se uma alíquota de 10,00 mL da solução existente em seu interior, que agora continha ácido acético, transferindo-se a mesma para uma célula eletroquímica. O processo de retirada e transferência foi exatamente o mesmo utilizado na acidez total. Titulou-se essa alíquota com NaOH (Merck) 0,1103 mol/L, previamente degasado. Como o volume titulado era a metade do volume de acetato de cálcio adicionado, multiplicou-se o resultado da titulação por 2, obtendo-se assim o total de ácido acético formado. Aqui também manteve-se o sistema da amostra em branco, submetendo-a às mesmas condições das demais amostras.

Com o valor obtido pela titulação e com o auxílio da equação (8), determinou-se o número de milimols de H^+ carboxílicos presentes na amostra.

A acidez fenólica continuou sendo determinada subtraindo-se o número de milimols de H^+ carboxílicos do número de milimols de H^+ total.

3.8 DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DO PODER REDUTOR

O experimento foi realizado com base na literatura⁶². Utilizou-se uma célula eletroquímica de 20 mL de capacidade, com tampa de teflon. Os eletrodos utilizados foram: Ag/AgCl como referência e epoxigrafite como eletrodo indicador (eletrodo construído por A. R. S. Oliveira e A. L. Juliato do grupo de pesquisa do laboratório de Humus)⁶³. As medidas de potencial foram feitas com o auxílio do pHmetro, trabalhando-se na escala de mV.

Adicionou-se 2,0 mg de amostra em 10,00 mL de tampão borato 0,1 mol/L, pH 9,0 , previamente degasado. Manteve-se o sistema sob agitação e fluxo de argônio por 30 minutos, para dissolução total da amostra. Titulou-se a amostra com $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,101 mol/L, fazendo-se adições de 0,010 mL (10 μ L). O tempo entre uma e outra adição foi estabelecido como o intervalo necessário para que o potencial retornasse à "linha base", caso não houvesse um "salto" abrupto do mesmo, indicando que o ponto de equivalência fora alcançado.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DE GRUPOS ÁCIDOS

4.1.1 MÉTODO DA FUNÇÃO DE FORMAÇÃO ÁCIDA

Esta metodologia é aplicada na determinação da acidez de ácidos fúlvicos⁶¹, os quais constituem a fração solúvel (em qualquer faixa de pH) das substâncias húmicas do solo. Consiste em elevar-se o pH (em geral, até 11) da solução da amostra em estudo, com KOH e então, realizar uma retrotitulação, com HCl, até pH 2. Sabendo-se o número de mols de base adicionados para elevar-se o pH e, para cada ponto da titulação, o número de mols de ácido adicionados, o volume da total da solução, a concentração de H⁺ e OH⁻ (determinadas pela medida direta do pH e pelas expressões: $[H]^+ \cong 10^{-pH}$ e $[OH^-] = Kw/[H^+]$), e a massa da amostra em solução, é possível traçar-se uma curva que relaciona o número de mols de H⁺ ligados (n_H) a uma determinada massa de amostra, em função do pH⁶¹. Esta curva é regida pela expressão:

$$\delta_{nH} = \{(n_A - [H^+] V) - (n_B - [OH^-] V)\} / m \quad (9)$$

onde δ_{nH} é uma função de formação relativa, n_A é o número de mols de ácido adicionados em cada ponto da titulação, n_B é o número de mols de base adicionados inicialmente para elevar-se o pH até 11, $[H^+]$ é a concentração de hidrogênios ácidos presentes na solução após cada adição de HCl, $[OH^-]$ é a concentração de íons hidroxila presentes na solução após cada adição de HCl, V é o volume total da solução após cada adição de HCl e m é a massa de amostra (expressa em gramas ou quilogramas) contida na solução. A função n_H , que

representa o número de mols de H^+ ligados por grama (ou Kg) de amostra em um determinado pH pode ser obtida subtraindo-se da função relativa de cada ponto, o valor da função relativa a pH 11 ($n_H = \delta_{nH} - \delta_{nH(pH11)}$)⁶¹. Para construir uma curva de boa resolução, são necessários de 90 a 120 adições de ácido, obtendo-se desta forma, o número correspondente de pontos. O volume de ácido por adição é de 20 a 30 μ L.

Traçando-se a curva com os pontos obtidos, é possível determinar-se o valor da acidez fenólica (altura da inclinação mais pronunciada da curva, geralmente entre pH 11 e 8) e o da acidez carboxílica (altura da inclinação mais pronunciada da curva, geralmente entre pH 5,5 e 3).

Como a primeira melanina sintetizada (MS01) solubilizava-se em soluções com pHs ≥ 8 , vindo a precipitar novamente somente a pHs < 3 , tentou-se adequar a metodologia da função de formação ácida para esta melanina sintética. Como almejava-se obter resultado precisos na determinação da acidez, primeiramente, aplicou-se a metodologia a alguns compostos modelos simples (ácido para-hidroxibenzóico, ácido orto-hidroxibenzóico [salicílico], ortodi-hidroxibenzeno [catecol] e L-3,4-di-hidroxifenilalanina [L-DOPA]), cujos valores teóricos da acidez são conhecidos, para avaliar-se a metodologia.

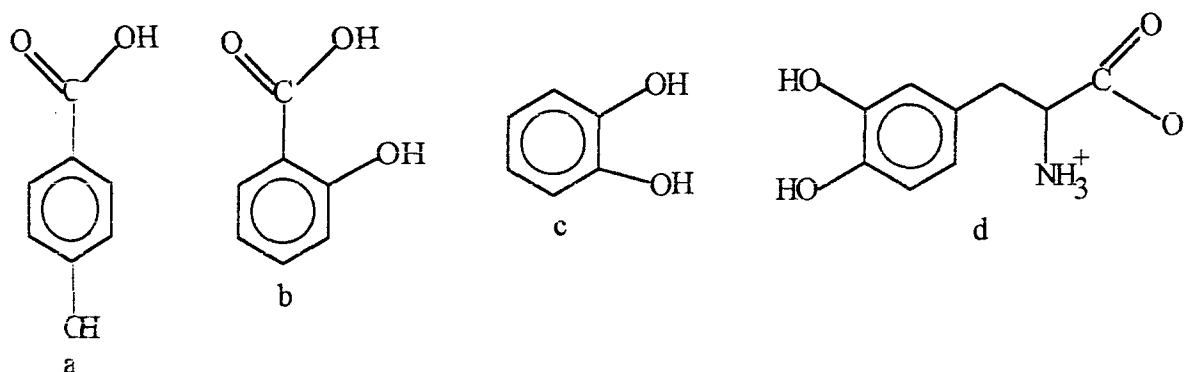


FIGURA 16 – Compostos modelos utilizados na determinação da acidez pelo método da função de formação ácida: ácido para-hidroxibenzóico (a) , ácido salicílico (b), catecol (c) e L-DOPA (d).

Como o objetivo era verificar a aplicabilidade do método a tais compostos, não foi realizado um controle rigoroso da força iônica⁶⁴ durante as titulações e nem as conseqüentes correções necessárias nos cálculos, uma vez que as diferenças não eram tão significativas. As Figs. 17, 18, 19 e 20 mostram as curvas das funções de formação ácida para os compostos modelos e a Tab. 01 apresenta os valores teóricos e experimentais para a acidez.

Para o composto ácido para-hidroxibenzóico, o resultado foi satisfatório. A função apresentou duas regiões ascendentes, entre pHs 10 – 7 e entre pHs 6 – 3, correspondentes à acidez fenólica e carboxílica respectivamente. Os valores experimentais diferem um pouco, em relação aos teóricos, principalmente para a acidez carboxílica, provavelmente devido à falta de controle na força iônica. Para os compostos: ácido salicílico, catecol e L-DOPA, os resultados dos experimentos sugerem que a técnica não é adequada para tais sistemas.

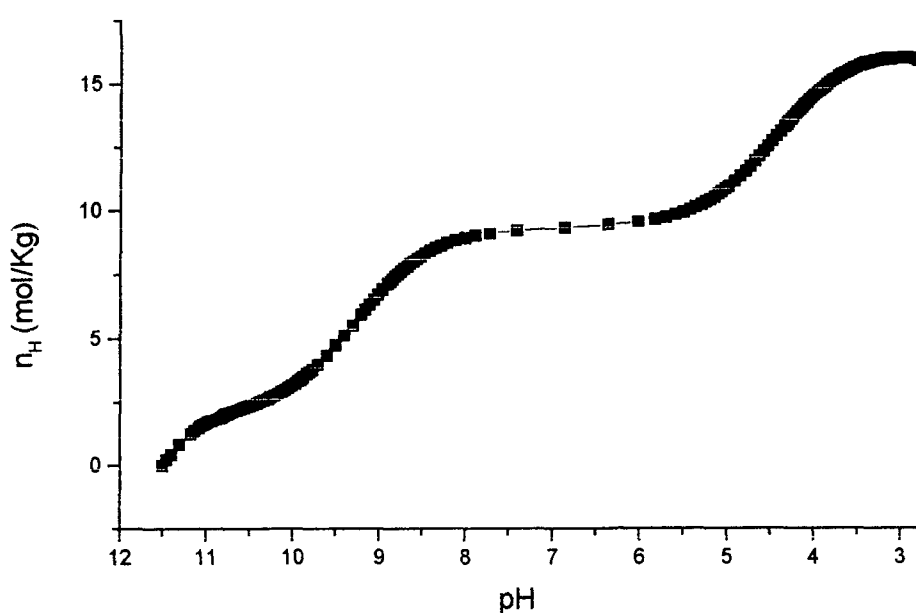


FIGURA 17 – Função de formação ácida para o ácido para-hidroxibenzóico.

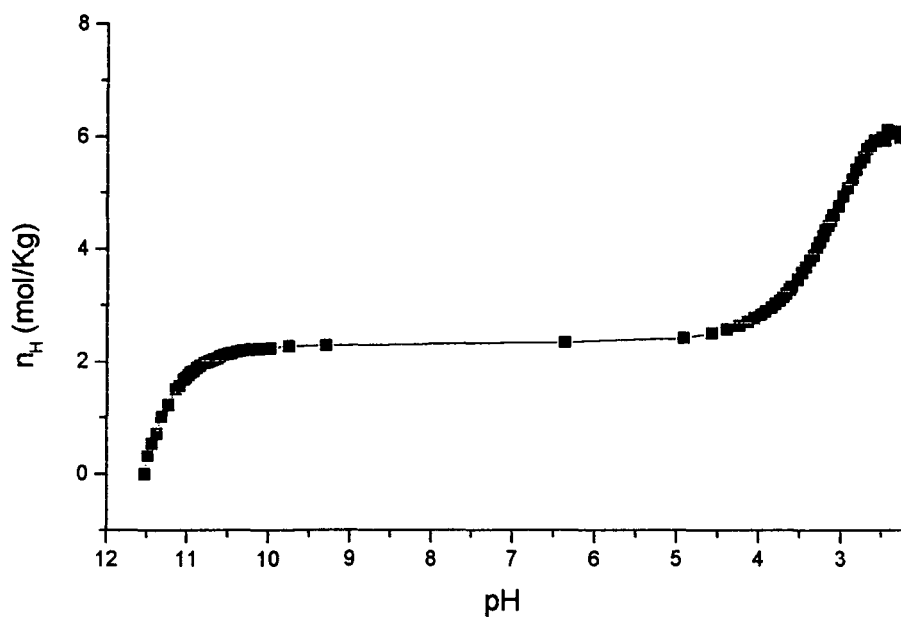


FIGURA 18 – Função de formação ácida para o ácido salicílico.

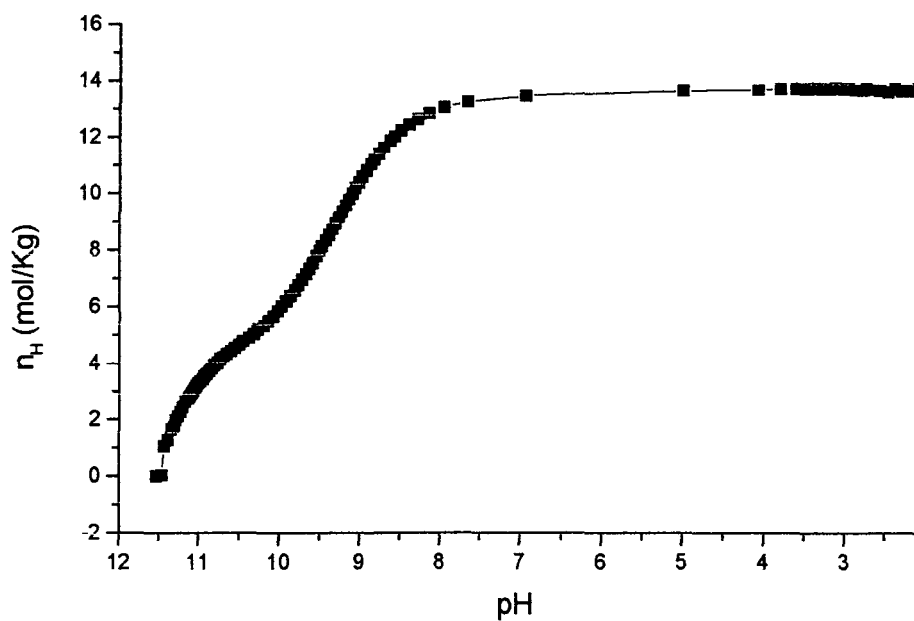


FIGURA 19 – Função de formação ácida para o catecol.

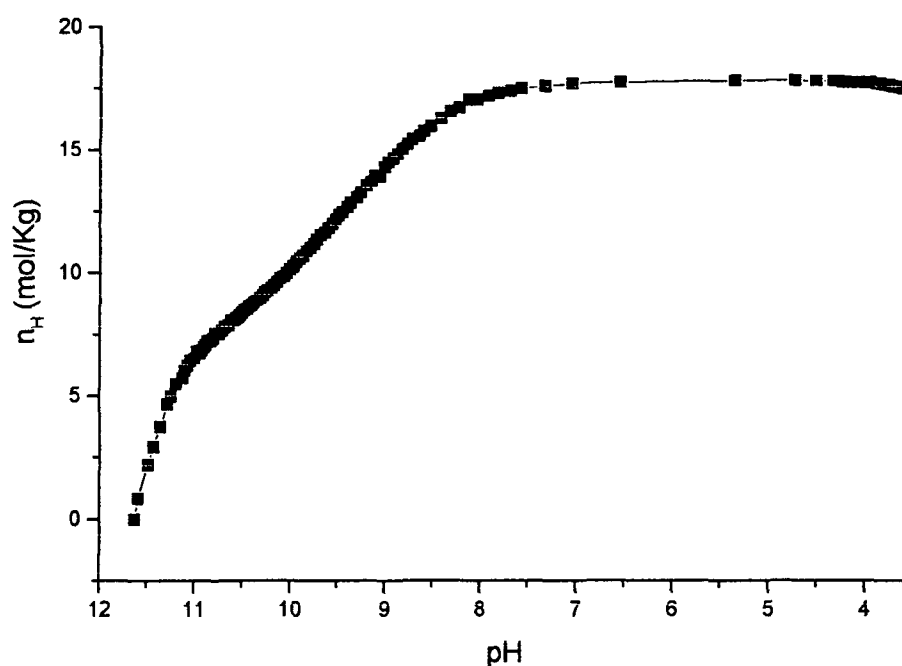


FIGURA 20 – Função de formação ácida para a L-DOPA.

TABELA 01 – Valores teóricos e experimentais, obtidos pelo método da função de formação ácida, para os compostos modelos.

Composto	Valor teórico (mmol/g)		Valor experimental (mmol/g)	
	Φ -OH	COOH	Φ -OH	COOH
Ácido p-hidroxibenzóico	7,24	7,24	7,0	6,8
Ácido salicílico	7,24	7,24	indeterminado	3,7
Catecol	18,16	-	8,5	-
L-DOPA	10,19	5,04	10,1	0,0

Para o ácido salicílico, a função apresentou apenas uma região ascendente correspondente à acidez carboxílica, porém com um erro (à menor) de quase 50 por cento em relação ao valor experimental. Não aparece a região correspondente à acidez fenólica, a qual deve estar muito além da faixa de pH na qual se trabalha neste sistema. Como nesse composto a hidroxila se encontra em posição orto à carboxila, quando o experimento se processa, durante a adição de base, há a retirada do próton da carboxila e a concomitante formação de ligação de hidrogênio entre o carboxilato e o hidrogênio do grupo fenólico, dificultando sua saída, a qual

não ocorre dentro da faixa de pH em que se trabalha. Como esse hidrogênio não é retirado, conseqüentemente durante a retrotitulação, não aparece na curva a região correspondente à protonação do grupo fenolato. Outro fato importante, é que esta ligação de hidrogênio também dificulta a protonação do carboxilato, fazendo com que, mesmo a pHs baixos, somente uma parte das moléculas tenham esse grupo protonado. Para o catecol, não há a região da curva correspondente à carboxilas (por não haver carboxilas) e a região correspondente aos fenóis é equivalente a apenas um hidrogênio fenólico por molécula. A situação é semelhante ao caso do ácido salicílico. Um dos hidrogênios fenólicos é retirado durante a adição de base, com formação de ligação de hidrogênio entre o fenolato formado e o outro hidrogênio fenólico. Como este segundo hidrogênio não é retirado, durante a retrotitulação somente um fenolato é protonado, fazendo com que a função de formação ácida apresente uma região correspondente a um hidrogênio fenólico. Para a L-DOPA, não aparece a região da curva que corresponde às carboxilas e, a região fenólica é equivalente a dois prótons por molécula. Porém, ao consultar-se na literatura⁶⁵ os valores dos pK_{as} para a L-DOPA (carboxila = 2,22 ; grupo amino $[NH_3^+]$ = 8,8 ; fenol₁ = 9,83 ; e fenol₂ = 13,4), conclui-se que a região atribuída aos fenóis, está na verdade englobando um dos prótons fenólicos e o próton do grupo amino, visto que os pK_{as} são próximos, não havendo resolução na curva para diferenciá-los. O segundo hidrogênio fenólico não aparece na curva semelhantemente ao catecol (pK_a extremamente alto). Como o pK_a da carboxila é bastante baixo, sua protonação se dá fora da região operacional de pHs "varrida" nesta metodologia, não sendo portanto visualizada na curva da função de formação ácida.

Apenas para observar-se o aspecto da curva, uma amostra da MS01 foi submetida à análise por esse método. A curva da função de formação resultante

apresentou baixa resolução, quase não se podendo perceber onde inicia ou termina as regiões que correspondem a diferentes grupos ácidos (Fig. 21).

Com base nos experimentos realizados, conclui-se que esta metodologia não é adequada para a quantificação de grupos ácidos de sistemas que apresentem grupos funcionais semelhantes ao ácido salicílico, ao catecol ou à L-DOPA, sendo portanto inviável sua aplicação à melaninas também. Questiona-se ainda sua aplicação em ácidos fúlvicos, já que os mesmos podem ter grupos funcionais semelhantes aos citados. Para fins comparativos, quando se trabalha com duas amostras semelhantes de ácidos fúlvicos, o método pode ter validade, porém não é um método indicado para quantificação.

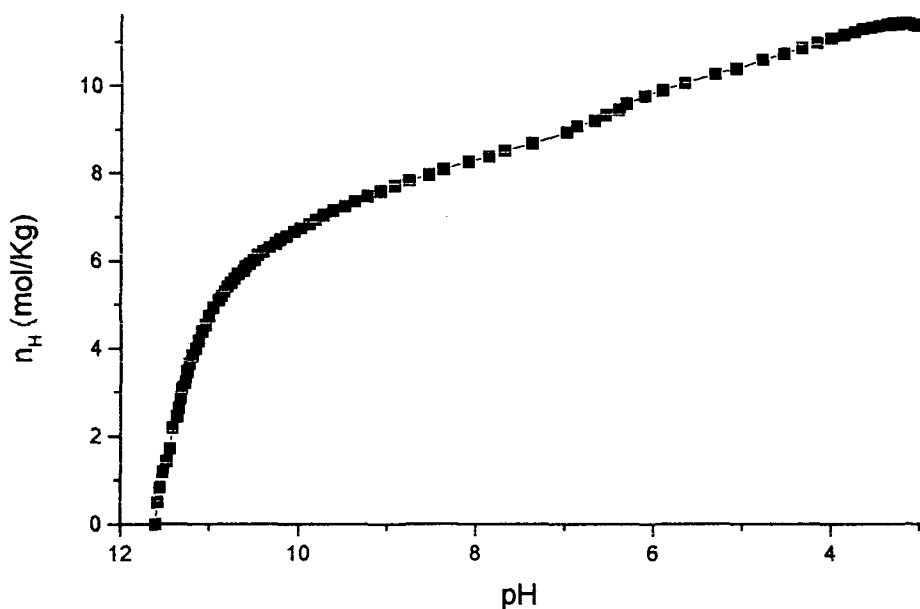


FIGURA 21 – Função de formação ácida para a MS01.

4.1.2 MÉTODO DA ACIDEZ TOTAL E PARCIAL

Ao observar-se o procedimento empregado nessas determinações, trabalhando-se com ácidos húmicos, constatou-se que na ausência de um sistema fechado com atmosfera inerte, algumas das etapas do método, falando-se em termos de procedimento científico, deixavam a desejar. Trabalhando-se com o composto modelo - ácido salicílico, o erro encontrado entre o valor teórico e o valor experimental para a acidez total (acidez carboxílica + acidez fenólica), foi de 10 por cento. Portanto, procurou-se alternativas para minimizar o erro nas determinações. Uma delas, foi tentar adaptar o método da função de formação ácida. A outra, uma vez que a primeira mostrou-se inadequada para os compostos em estudo, foi modificar o procedimento empregado nas determinações da acidez de ácidos húmicos pelo método Schnitzer and Gupta⁶⁰.

Resumidamente, este método compreende duas etapas: 1º - determina-se a acidez total da amostra (carboxílica + fenólica): Reage-se esta com $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Parte da base é consumida pelos grupos ácidos da amostra e outra parte não. Titulando-se o excesso de base, com HCl, descobre-se o quanto foi gasto para neutralizar os grupos ácidos (carboxílicos e fenólicos) da amostra. 2º - determina-se a acidez carboxílica: Reage-se a amostra com uma solução de acetato de cálcio. Por ser uma base de Brönsted mais forte que as carboxilas da amostra, o acetato retira da mesma os hidrogênios próticos carboxílicos formando ácido acético. Esse ácido formado é titulado com NaOH, descobrindo-se então a acidez carboxílica da amostra.

Para achar-se a acidez fenólica, subtrai-se do valor da acidez total o valor encontrado para a acidez carboxílica.

4.1.2.1 Metodologia modificada

Os objetivos desta parte do trabalho foram: diminuir as etapas de transferência de reagentes, manter os sistemas sob atmosfera inerte, reduzir a quantidade de amostra a ser analisada bem como aumentar a precisão do resultado, conforme citado na seção 3.7.2.2.1. Como a técnica desenvolvida por Schnitzer e Gupta⁶⁰ já é consagrada, para testar a metodologia modificada, realizaram-se experimentos somente com o composto modelo ácido salicílico. As análises foram feitas utilizando-se 20 e 25 mg de amostra. Os resultados foram satisfatórios. O erro entre o valor teórico e o experimental, que era da ordem de 10 por cento para a acidez total, pela metodologia sem modificações (trabalhando-se entre 50 e 100 mg de amostra), ficou ao redor de 1 a 1,5 por cento, sendo que o valor médio encontrado para a acidez total (Φ -OH + COOH) foi 2,02 mols H^+ /mol (valor teórico = 2,00 mols H^+ /mol) e para a acidez parcial (COOH), 1,01 mols H^+ /mol (valor teórico = 1,00 mol H^+ /mol), pela metodologia modificada.

O fato de se usar o hidróxido de bário na determinação da acidez total, e não um hidróxido alcalino, que a princípio é mais forte, é justificado a seguir: Como foi discutido na seção anterior, mesmo em pHs ao redor de 12, determinados prótons fenólicos não são ionizados na presença de hidróxido de potássio, devido à formação de ligações de hidrogênio. Os íons de metais alcalinos são ácidos de Lewis extremamente “moles”, que não se ligam às estruturas aniônicas. Já o íon Ba^{2+} , como é um ácido de Lewis mais “duro” que os prótons, liga-se às estruturas aniônicas, deslocando os prótons seguros pelas ligações de hidrogênio, tomando então o lugar destes, formando quelatos. No caso da melaninas, este fato é notado pois, a MS01 que era solúvel em soluções de hidróxidos alcalinos e a MS03 e MS04 que eram parcialmente solúveis, são insolúveis em solução de hidróxido de

bário, devido à diminuição das cargas das estruturas, pela ligação com os íons bário(II) e à formação de agregados, onde o Ba^{2+} funciona como mordente.

Os resultados encontrados para a determinação de grupos ácidos das melaninas sintéticas são apresentados na seção seguinte, juntamente com os resultados da análise elementar.

4.2 ANÁLISE ELEMENTAR

A Tab. 02 apresenta os resultados da análise química elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio das melaninas sintéticas bem como os valores encontrados nas determinações de grupos ácidos, além dos valores teóricos para a L-DOPA e alguns modelos de melaninas.

TABELA 02 – Dados da análise elementar e da determinação do teor de grupos ácidos (valores experimentais para as melaninas sintéticas; valores teóricos para a L-DOPA e para os modelos propostos por: Swan G. A.², Blois M. S.³⁸ e Zajac G. W. et al.⁴⁰ para estruturas de melaninas).

	%				Razões atômicas				Acidez (mmol/g)		
	C	H	N	O	H/C	H _(na) /C	N/C	O/C	Total	COOH	Φ-OH
L-DOPA	54,8	5,6	7,1	32,5	1,22	0,89	0,11	0,44	15,21	5,07	10,14
#											
Swan	70,1	2,7	10,3	27,2	---	0,32	0,13	0,29	---	---	---
#											
Blois	62,2	2,4	8,4	27,1	---	0,46	0,11	0,33	---	---	---
#											
Zajac	66,8	1,1	9,7	22,3	---	0,20	0,13	0,25	---	---	---
#											
MS01	49,5	3,0	8,2	39,3	0,73	0,40	0,14	0,60	12,34	3,29	9,05
MS02	50,9	2,6	7,5	39,0	0,61	0,35	0,13	0,58	11,08	3,06	8,02
MS03	46,0	3,1	6,8	44,1	0,80	0,43	0,13	0,72	13,26	3,84	9,42
MS04	40,4	2,2	11,2	46,2	0,64	0,31	0,24	0,86	11,32	4,14	7,18

H_(na) Hidrogênios não-ácidos.

Valores calculados com base na estrutura molecular.

— Valores não determinados pelo fato dos autores não terem especificado a quantidade de hidrogênios ácidos.

Comparando-se os percentuais de C, H, N e O, entre as melaninas sintéticas e a L-DOPA, observa-se que há um decréscimo dos percentuais de

carbono e hidrogênio e um aumento do percentual de o oxigênio, durante o processo de formação das melaninas. O decréscimo no percentual de carbono se dá, em parte, devido à descarboxilação parcial sofrida pelos derivados da L-DOPA durante a melanização (ver Fig. 01)^{1,26,29}, e em maior escala, pela fissão de anéis benzênicos das unidades indólicas, principalmente aquelas que não estão ligadas através da posição 4, a outras unidades do polímero (Fig. 22)²⁹. O decréscimo no percentual de hidrogênio se deve principalmente à perda de parte dos hidrogênios que se encontram nas posições 2 (se não houver carboxila nessa posição), 3, 4 e/ou 7 das unidades indólicas, durante o acoplamento das mesmas.

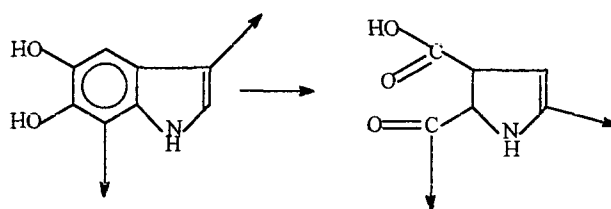


FIGURA 22 – Quebra oxidativa do anél benzênico de uma unidade indólica presente na estrutura de uma melanina sintética.

Comparando-se os valores da acidez carboxílica entre as melaninas sintéticas e a L-DOPA, observa-se que as melaninas apresentam menores teores de carboxila. É importante salientar, que segundo a literatura^{1,29}, menos de 1/6 das carboxilas presentes nas estruturas de melaninas são oriundas daquelas existentes nas unidades de L-DOPA. O restante das carboxilas são formadas pela “quebra” oxidativa dos anéis benzênicos, durante o processo de síntese²⁹. Dessa forma, as melaninas sintéticas com maior teor de acidez carboxílica são, em hipótese, aquelas que sofreram maior degradação das unidades indólicas na melanização. Durante o processo degradativo, além da perda de carbonos e formação de carboxilas, há um aumento do percentual de oxigênio, que é em parte aparente

(porque o número de carbonos está diminuindo) e em parte real (há a entrada de novos oxigênios na estrutura). Comparando-se as melaninas sintéticas com a L-DOPA, nota-se que todas as quatro melaninas possuem um percentual de oxigênio mais elevado. Levando em consideração o percentual de carbono, o percentual de oxigênio e a acidez carboxílica, parece que a MS04 foi a que sofreu maior degradação das unidades indólicas, vindo em segundo lugar a MS03, em terceiro a MS01 e por último a MS02. Isto sugere que os processos de síntese da MS01 e principalmente da MS02, são menos agressivos que aqueles empregados para as demais melaninas.

Os valores determinados para a acidez fenólica das melaninas sintéticas, são mais baixos que o da L-DOPA. Se houvesse somente descarboxilação ou outro processo de perda de massa onde todos os grupos fenólicos provenientes da L-DOPA fossem conservados após a formação das melaninas, o valor da acidez fenólica deveria aumentar, por unidade de massa. Mas, provavelmente alguns dos oxigênios fenólicos devem estar envolvidos em ligações entre as unidades indólicas^{1,2} ou então, estarem na forma de ortoquinonas²⁹, o que é suportado pela espectroscopia de RPE (seção 4.5). Todas as melaninas apresentaram uma linha característica de radicais semiquinonas indicando que deve haver um equilíbrio catecol \leftrightarrow semiquinona \leftrightarrow quinona⁶⁶. Além disso, a “quebra” oxidativa dos anéis benzênicos também contribuem para diminuir o teor de grupos fenólicos. A MS04, que é aparentemente a mais degradada, apresenta o menor valor para a acidez fenólica. Com os dados da análise elementar e os resultados da acidez total, calculou-se o percentual de hidrogênios não ácidos existentes nas melaninas sintéticas bem como as razões $H_{(na)}/C$. Comparando-se os valores de $H_{(na)}/C$ das melaninas sintéticas com os valores de $H_{(na)}/C$ dos modelos propostos, observa-se que os valores são mais coerentes com os modelos que apresentam menor

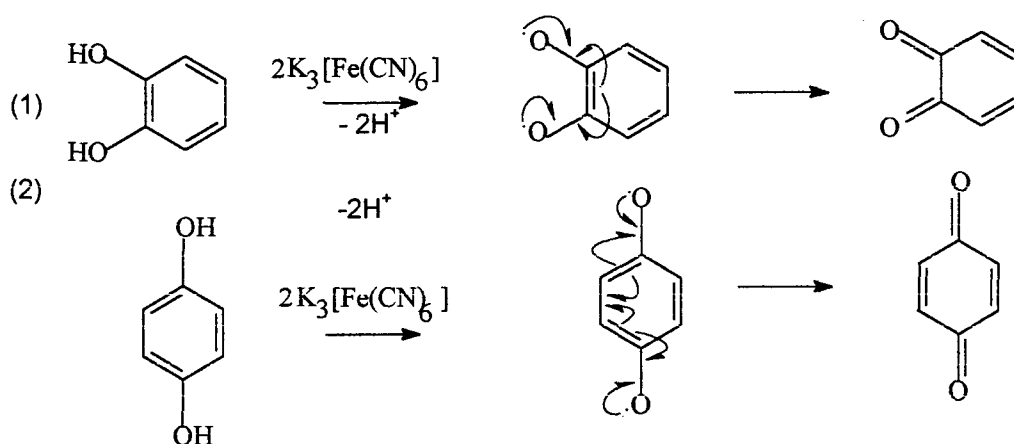
número de ligações entre as unidades fundamentais, não devendo possuir cadeias muito condensadas como é o caso do modelo de Zajac et al. (Fig. 05)⁴⁰. A razão N/C é praticamente a mesma para as melaninas sintéticas e para os modelos, com exceção de MS04 que é praticamente o dobro. Isto provavelmente se deve a dois fatos: primeiramente, nos processos de degradação, a quantidade de nitrogênio se mantém enquanto que a do carbono diminui e, como essa melanina foi aparentemente a que sofreu maior degradação das unidade indólicas, conseqüentemente teria a maior razão N/C. Mas somado a isso, existe um outro ponto. A espectroscopia de infravermelho indicou a presença de cianetos na estrutura dessa melanina (conforme discutido na seção 4.4). Estes cianetos também estão colaborando para o aumento da razão N/C. Comparando-se ainda as razões O/C das melaninas sintéticas com as dos modelos propostos para estruturas de melaninas, nota-se que para as melaninas sintéticas essas razões são cerca de duas vezes maiores, sugerindo estruturas mais oxigenadas, contendo provavelmente, um número relativamente elevado de unidades indólicas degradadas pela "quebra" oxidativa dos anéis benzênicos.

4.3 DETERMINAÇÃO DA PODER REDUTOR

Antes de se obter as melaninas MS02, MS03 e MS04, tentou-se aplicar a técnica da determinação do poder redutor à MS01. Esta técnica consiste em titular-se potenciométricamente a amostra, dissolvida em tampão borato pH 9,0, com solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,1 mol/L⁶². Como o $K_3[Fe(CN)_6]$ reage com sistemas orto ou paradifenóis, formando quinonas (Fig. 23), e as melaninas possuem muito grupos ortodifenóis (catecóis), derivados de seu precursor (L-DOPA), o objetivo foi quantificar esses grupo para que através da comparação com os valores da acidez

fenólica, se pudesse ter uma idéia do teor de grupos fenólicos isolados (que não formam quinonas)⁶⁷. Se há um grupo fenólico isolado, é bem provável que houvesse outro, em posição orto a este, e que deixou de existir, por estar envolvido em ligações entre as unidades básicas da melanina. Dessa forma, sabendo-se o número de fenóis que não são oxidados, sabe-se quantos fenóis estão envolvidos nas ligações entre as unidades básicas das melaninas. Apesar dos esforços, não foi possível atingir o objetivo. Ao realizar-se o experimento com a melanina MS01, surgiram problemas.

FIGURA 23 – Oxidação do catecol(1) e da hidroquinona(2) a orto e paraquinona respectivamente.



Logo após a adição do titulante, o potencial "saltava" para um determinado valor, e ia caindo rapidamente em direção à linha base, indicando o consumo do titulante, que era a princípio, o comportamento esperado. Porém, após alguns minutos, a velocidade de queda do potencial diminuía, continuando a variar por horas, vindo a cair bem abaixo do potencial ao qual o sistema estava submetido antes da adição do titulante, sem se estabilizar. Procurou-se então, fazer as adições sucessivas do titulante sempre após o potencial ter caído a valores próximos da linha base inicial, admitindo-se que o ponto de equivalência não fora alcançado. Esperava-se que num momento, houvesse então um "salto" e enfim, o

potencial não caísse mais, indicando que o ponto de equivalência fora atingido. Porém, após diversas adições do titulante, quantidade mais que suficiente para oxidar todos os grupos catecóis que poderiam estar presentes na amostra, conforme dados da acidez fenólica determinada, não se chegou à equivalência. Pensou-se que talvez alguns dos grupos catecóis reagissem mais rapidamente, enquanto que outros, devido à localização demorassem mais para serem oxidados. Colocou-se então uma quantidade alta do titulante e deixou-se a amostra sob fluxo de argônio e agitação por 24 horas. Após esse período, observou-se que o potencial voltou a cair. Este fato levou a descartar-se esta primeira hipótese. Pensou-se também em possíveis falhas no equipamento (o qual foi checado), ou então, problemas de adsorção nos eletrodos (não havia indícios de adsorção que viesse a comprometer o experimento). Dessa forma, sugeriu-se que deveria estar havendo alguma reação paralela, a qual estaria consumindo também $K_3[Fe(CN)_6]$.

Como estava no projeto realizar a síntese de uma melanina utilizando sais de ferro(III) como oxidante, optou-se pelo $K_3[Fe(CN)_6]$ devido à sua estabilidade, tentando-se dessa forma evitar a contaminação com o ferro(III). Depois de sintetizar-se a MS04 e submetê-la à análise de IVTF e RPE (seções 4.4 e 4.5), constatou-se que parte do $K_3[Fe(CN)_6]$ sofrera decomposição, sendo que o ferro(III) ligou-se à melanina. Na determinação do poder redutor de substâncias húmicas, a literatura⁶² cita que o $K_3[Fe(CN)_6]$ não sofre decomposição pois, se assim fosse, seria impossível realizar o experimento, devido à variação de potencial causada pelos diferentes íons formados. Se durante a síntese da MS04 houve decomposição do $K_3[Fe(CN)_6]$, provavelmente, na determinação do poder redutor para a MS01, também deve ter havido o mesmo, causando dessa forma variações no potencial.

Outro fato importante, é que a maior fração da melanina MS04 é insolúvel, ou seja, o $K_3[Fe(CN)_6]$ é capaz de produzir melaninas com massas moleculares relativamente altas. Portanto, como a reação de formação das melaninas é um ciclo que envolve a oxidação dos grupos catecóis a quinonas, e acoplamento entre as unidades indólicas com regeneração dos catecóis, é provável que as moléculas da MS01, que são solúveis, ao serem oxidadas, sofram acoplamento, gerando estruturas de maior massa molecular, regenerando os grupos catecóis que podem ser novamente oxidados (Fig. 24).

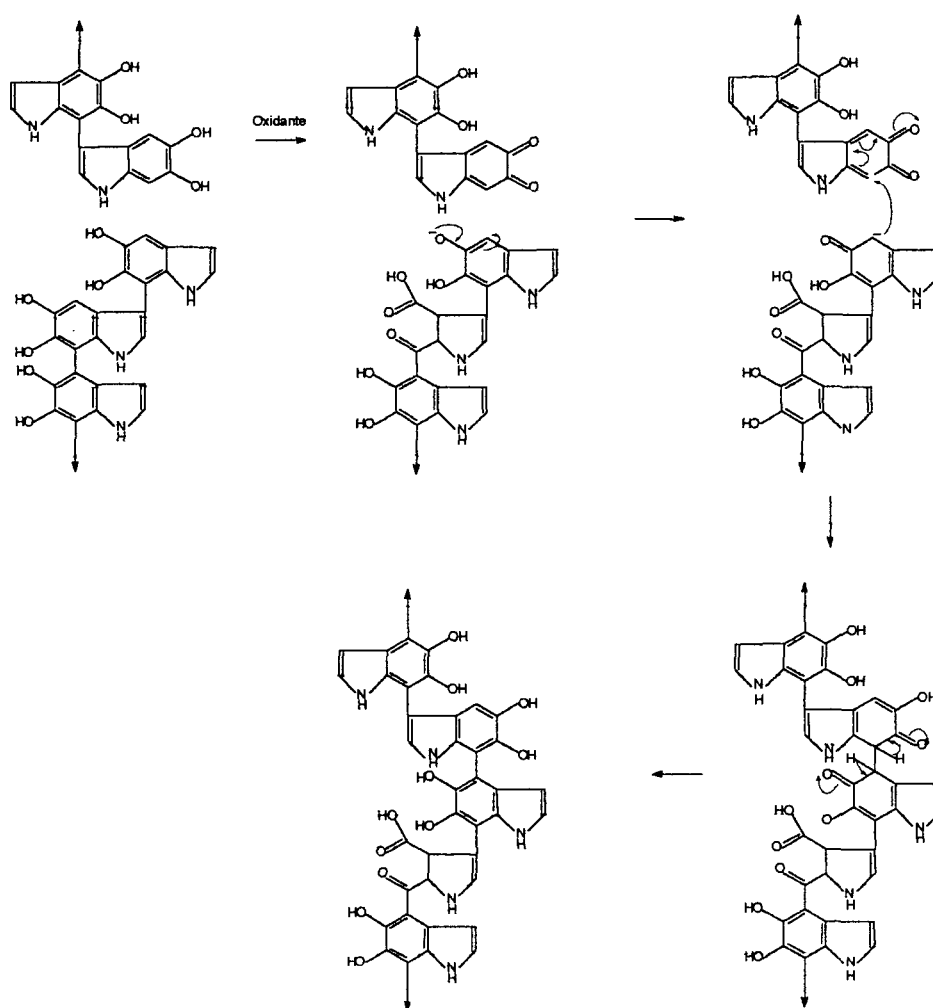


FIGURA 24 – Esquema representativo da regeneração de um grupo catecol, a partir do acoplamento de 2 estruturas de melaninas de baixas massas moleculares.

Esse ciclo poderia repetir-se até que houvesse formação de estruturas com massas moleculares elevadas, as quais se tornariam insolúveis, interrompendo então a reação.

Levando em consideração todos os fatos discutidos, conclui-se que a quantificação de grupos ortodifenóis pela titulação com o hexacianoferrato(III) de potássio não é uma técnica adequada para ser aplicada às melaninas.

4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IVTF)

A Fig. 25 apresenta os espectros de IVTF das quatro melaninas sintetizadas. Embora existam algumas diferenças, de uma forma geral, os espectros são semelhantes.

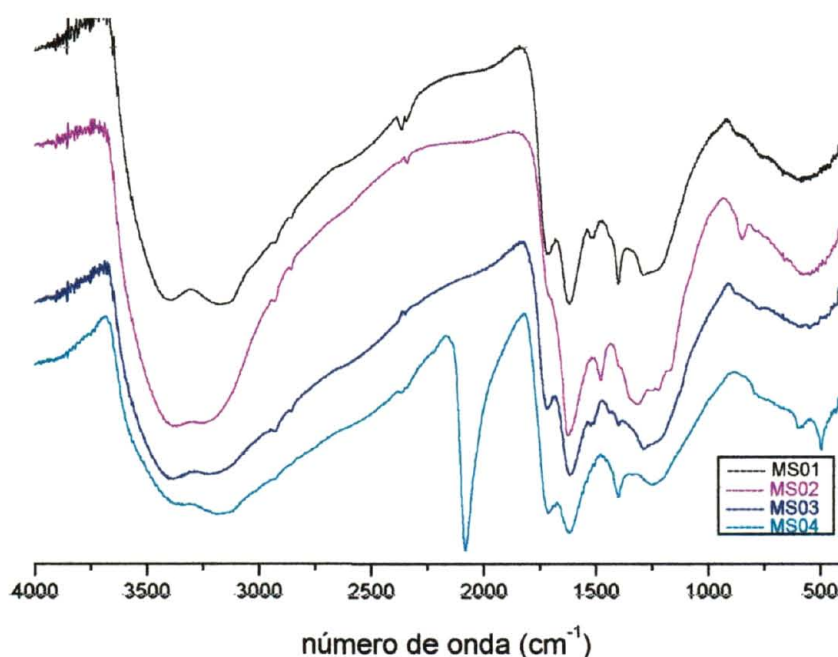


FIGURA 25 – Espectros de infravermelho das melaninas sintéticas: MS01, MS02, MS03 E MS04.

Ao preparar-se amostras para espectroscopia de IVTF, é muito difícil conseguir-se melaninas isentas de água, visto que esta se adsorve na superfície das estruturas, localizando-se nos espaços entre as camadas de macromoléculas (as melaninas compactam-se semelhantemente ao grafite)⁶⁸. Além disso, melaninas dispersas em KBr, apresentam um comportamento higroscópico considerável⁶⁸. O problema de hidratação causa perda de resolução nos espectros, devido às interações entre moléculas de água e os grupos funcionais da melanina (como ligações de hidrogênio, por exemplo), podendo haver deslocamento ou alargamento das bandas e modificação na intensidade das mesmas, dependendo do maior ou menor grau de hidratação⁶⁸. Apesar desses problemas, foi possível obter-se informações relevantes dos espectros obtidos.

Na região entre 3400 e 3100 cm^{-1} , podem ser observadas bandas provenientes, respectivamente, de estiramentos N-H e O-H (de fenóis e ácidos carboxílicos) para as quatro melaninas sintéticas. Em 2920 e 2850 cm^{-1} , aparecem bandas discretas, quase superpostas pelas bandas na região entre 3400 e 3100 cm^{-1} , indicando a presença de grupamentos C-H alifáticos na estruturas das melaninas. A absorção em 1712 cm^{-1} é proveniente do estiramento C=O de carboxilas⁶⁹, cuja intensidade decresce na seguinte ordem: MS04 > MS03 > MS01 > MS02. Essa ordem está coerente com os resultados obtidos para a determinação da acidez carboxílica, conforme apresentado na seção 4.1. Entre 1640 e 1515 cm^{-1} encontram-se superpostas as bandas provenientes de estiramento C=C de anéis aromáticos, estiramento assimétrico COO^- e deformação NH_2 ⁶⁹. Para a MS01 e MS03, pode-se observar uma outra banda de fraca intensidade em 1515 cm^{-1} , também proveniente de anéis aromáticos⁷⁰. Para a MS02, essa banda encontra-se um pouco deslocada para 1475 cm^{-1} . Entre 1400 e 1390 cm^{-1} , encontram-se superpostas as bandas provenientes da deformação C-O-H de fenóis⁶⁹ (mais

estreita) e estiramento simétrico de carboxilatos⁶⁹ (mais larga). Ao comparar-se essa região entre MS01 e MS04, cujas intensidades destacam-se em relação a MS02 e MS03, observa-se que para MS04 predomina a banda mais larga, proveniente dos carboxilatos. Isto se deve ao fato de que esta melanina, ao ser sintetizada, coordenou uma quantidade razoável de ferro, proveniente do agente oxidante utilizado (hexacianoferrato(III)). Outras bandas que aparecem no espectro da MS04, em 2080, 585 e 490 cm^{-1} , provenientes do estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$, estiramento $\text{Fe}-\text{CN}$ e deformação $\text{NC}-\text{Fe}-\text{CN}$ respectivamente⁷¹, bem como os dados obtidos pela espectroscopia de RPE, conforme discutido na seção 4.5, confirmam a formação de complexos de campo fraco do íon Fe^{3+} . Optou-se pelo hexacianoferrato(III) de potássio como oxidante no lugar de íons $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, devido à sua estabilidade, para tentar evitar-se a complexação com íons ferro(III) durante o processo de síntese. Porém, devido à alta afinidade que as melaninas apresentam por esses íons^{72,73}, parte dos cianetos, dos íons complexos deve ter sido substituída pelos sítios ligantes das melaninas. Na região entre 1230 e 1220 cm^{-1} , também são observadas bandas provenientes do estiramento $\text{C}-\text{O}$ e da deformação $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ de carboxilas^{70,74}. Para a MS02, destaca-se ainda uma pequena banda em 840 cm^{-1} , proveniente de anéis aromáticos⁷⁰. Essa absorção também é observada para as outras melaninas porém, com intensidade reduzida. Todas as absorções relativas a anéis aromáticos apresentam maior intensidade para a MS02, sugerindo que essa melanina sofreu menos degradação dos anéis aromáticos durante o processo de síntese, fato esse que está em acordo com os resultados da análise elementar (seção 4.1).

As Figs. 26, 27, 28 e 29 apresentam os espectros de infravermelho de cada uma das melaninas sintéticas, e de seus complexos com Mn^{2+} , Cu^{2+} , VO^{2+} e Fe^{3+} .

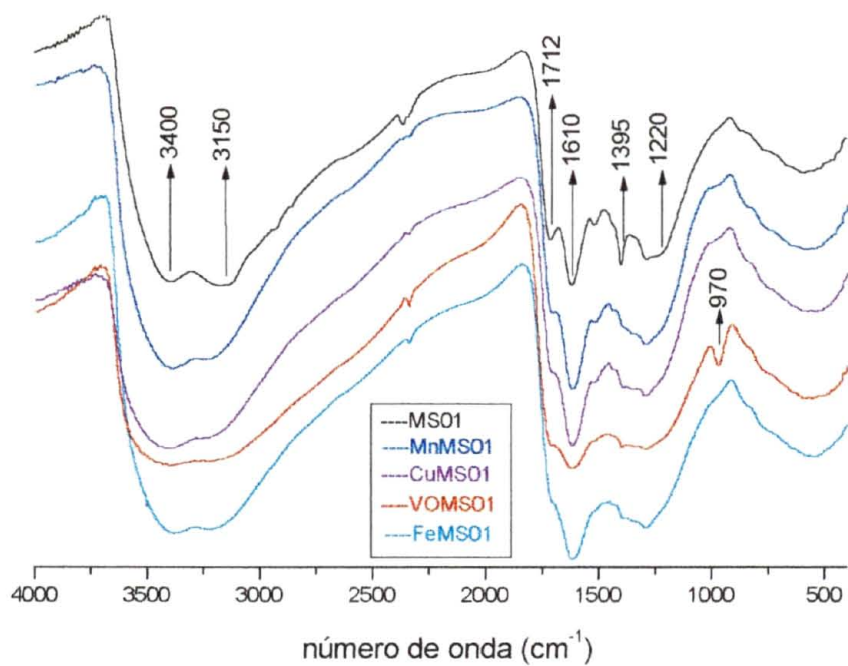


FIGURA 26 – Espectros de IVTF da MS01 e seus compostos de coordenação: MnMS01, CuMS01, VOMS01 e FeMS01.

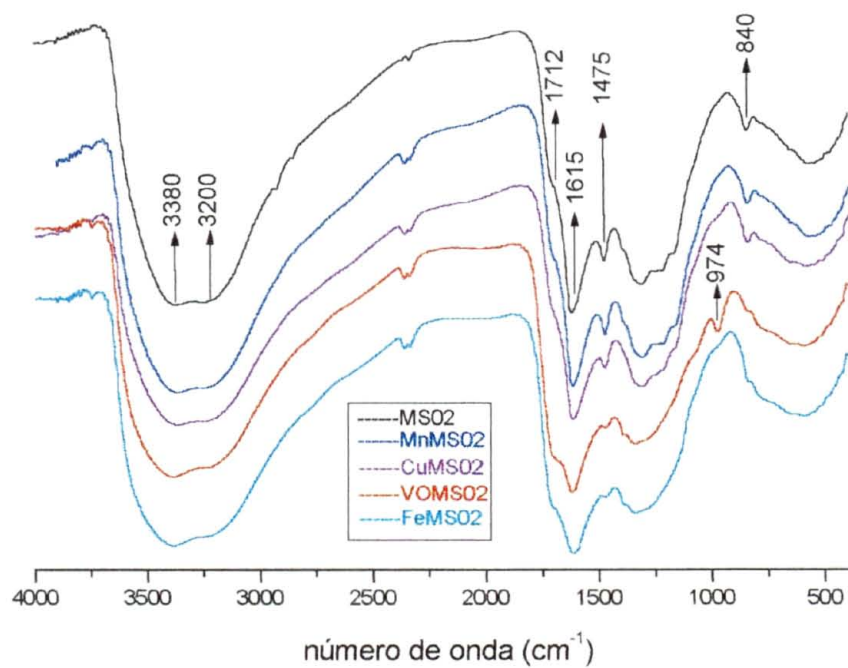


FIGURA 27 – Espectros de IVTF da MS02 e seus compostos de coordenação: MnMS02, CuMS02, VOMS02 e FeMS02.

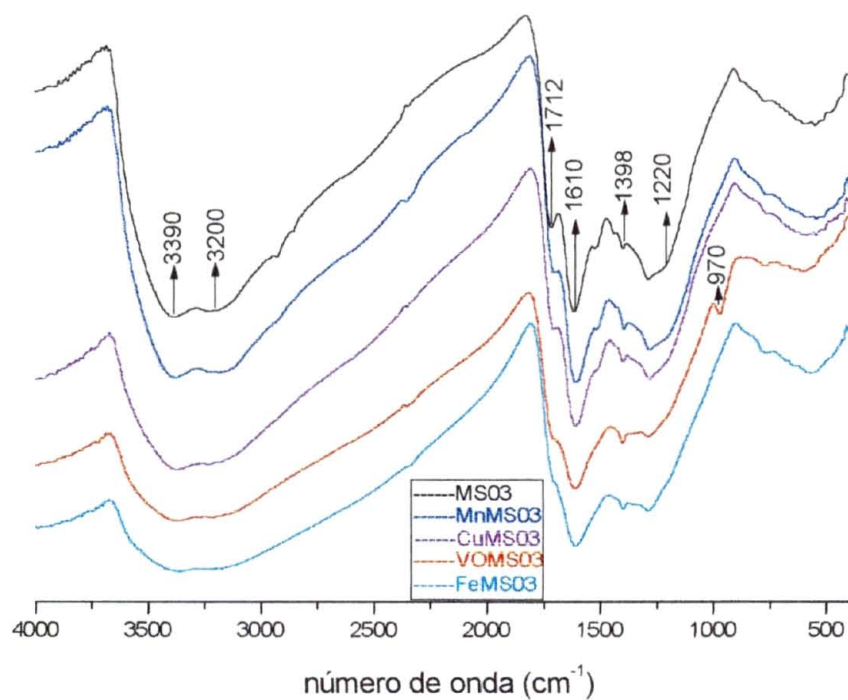


FIGURA 28 – Espectros de IVTF da MS03 e seus compostos de coordenação: MnMS03, CuMS03, VOMS03 e FeMS03.

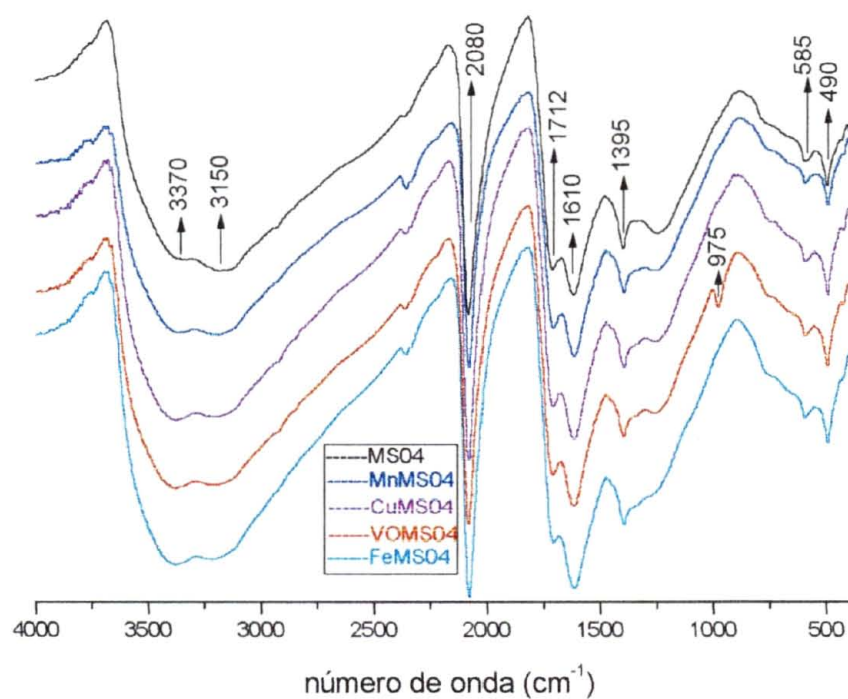


FIGURA 29 – Espectros de IVTF da MS04 e seus compostos de coordenação: MnMS04, CuMS04, VOMS04 e FeMS04.

Para a MS01 (Fig.26), nota-se que após a formação dos compostos de coordenação, a banda em 1395 cm^{-1} (deformação C-O-H de fenóis), também reduz-se significativamente. Isto sugere que parte dos íons metálicos está coordenada por grupos fenolatos, o que era de se esperar, uma vez que grande parte do grupos catecóis (ortodifenóis) provenientes da L-DOPA continuam a existir após a melanização. Talvez, esses sejam os principais grupos ligantes das melaninas, uma vez que se encontram em posição favorável para quelar os íons metálicos enquanto que as carboxilas e os grupos nitrogenados (aminas ou indóis) apresentam menor chance de estarem em posição adequada para fazê-lo (vide modelos nas Figs. 02, 03, 04 e 05). Modificações das bandas provenientes de anéis aromáticos, principalmente para os compostos com Fe^{3+} e VO^{2+} , tais como: diminuição da intensidade para a banda em 1615 cm^{-1} , deslocamento da banda em 1515 cm^{-1} (1475 cm^{-1} para MS02) para maiores números de onda, e o deslocamento da banda em 840 cm^{-1} (mais evidente para a MS02) para números de onda menores, indicam que a presença dos íons metálicos está causando modificação na densidade eletrônica dos anéis, sugerindo proximidade aos mesmos, evidenciando também a coordenação com os ortodifenóis⁶⁹. Observa-se também que as bandas provenientes de carboxilas em 1712 e 1220 cm^{-1} sofrem perda de intensidade para todos os compostos de coordenação das quatro melaninas (a diminuição da banda em 1712 cm^{-1} é menos evidente para o MnMS04, o CuMS04 e o VOMS04), enquanto que as bandas de carboxilatos em 1610 e $1400\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$ sofrem deslocamento para maiores números de onda e aumento da intensidade respectivamente⁶⁹, principalmente para os complexos entre melaninas e os íons: Fe^{3+} e VO^{2+} . Mesmo a MS04, a qual já possuía um teor considerável de íons férricos provenientes da síntese, ao ser submetida a um novo contato com esses íons, sofreu um aumento do teor de Fe^{3+} coordenado, o que é

evidenciado pelo espectro de IVTF do FEMS04, o qual apresenta um padrão semelhante aos dos demais compostos, sofrendo redução das bandas em 1712 e 1220 cm^{-1} , e um aumento da banda entre 1400-1390 cm^{-1} . Para os compostos: VOMS01, VOMS02, VOMS03 e VOMS04 observam-se bandas centradas em 970, 974, 970 e 975 cm^{-1} respectivamente, as quais são provenientes do estiramento V=O apical⁷⁵. Em complexos envolvendo o íon vanadilo, esta banda é observada na faixa entre 950-1050 cm^{-1} , dependendo do campo ligante equatorial e do efeito trans se houver um sexto ligante também em posição axial oposta ao oxigênio⁷⁵. Para compostos mais octaédricos, esta banda encontra-se deslocada para números de onda mais baixos, próximos a 950 cm^{-1} , indicando o enfraquecimento da ligação V=O devido ao efeito trans. Para complexos piramidais de base quadrada, esta banda encontra-se deslocada para números de onda mais altos⁷⁵. As absorções entre 970 e 975 cm^{-1} são mais coerentes com complexos piramidais. Porém, não há como fazer avaliações precisas sobre a geometria desses complexos baseado unicamente nessas bandas de absorção. Somente com o auxílio de outras técnicas é possível sugerir se existe ou não um sexto ligante nesses complexos, conforme é discutido na seção 4.5.1.4.1.

4.5 ESPECTROSCOPIA DE RPE

Comparando-se os espectros de RPE (obtidos de amostras em pó) das melaninas sintéticas: MS01, MS02, MS03 e MS04 (Fig. 30), observa-se similaridade entre os mesmos. Excetuando-se a linha que aparece em $g \approx 4,3$ característica de íons ferro (III) em ambiente rômico⁷⁶, para a MS02 e MS04 e a linha larga centrada em $g \approx 2$, proveniente de interação ferro(III)-ferro(III), para a MS04, todos os espectros apresentam uma linha estreita em $g = 2,003$,

característica de radical livre de matéria orgânica, no caso, provavelmente semiquinonas⁶⁶. A presença de ferro(III) ($g=4,3$) na MS02 e MS04 se deve à contaminação durante o processo de síntese. Embora as soluções de fosfato e pirofosfato de sódio, utilizadas na síntese da MS02, tenham sido tratadas para eliminar-se os íons ferro existentes como impureza, o $MnCl_2$ e o MnO_2 utilizados na preparação do pirofosfato de manganês(III), não eram reagentes de alto grau de pureza. Os mesmos continham um teor de ferro ao redor de 0,0003%, o qual incorporou-se à solução de pirofosfato de manganês(III), vindo a ser complexado pela melanina durante a síntese. O teor de ferro(III) presente na MS04 foi discutido na seção 4.4.

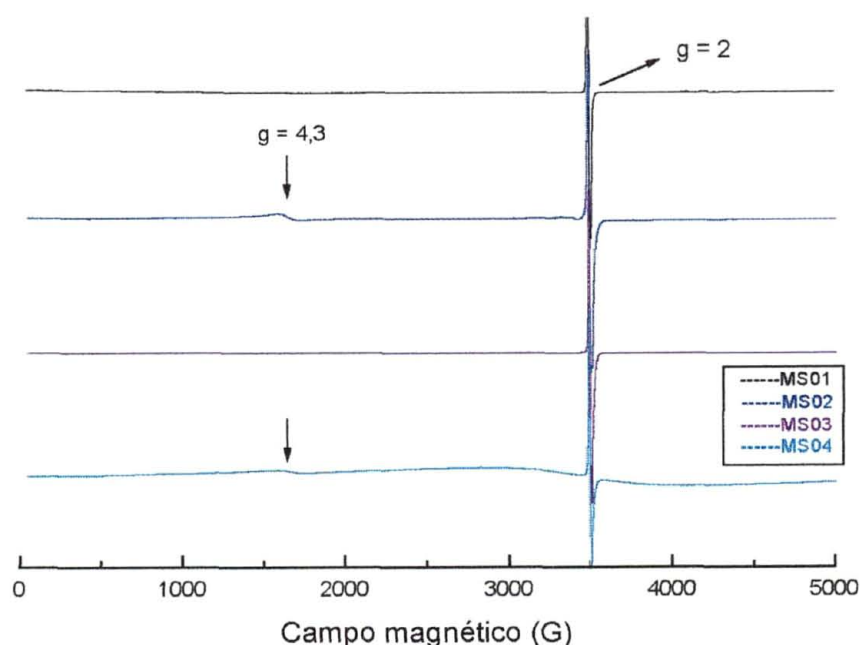


FIGURA 30 – Espectros de RPE das melaninas MS01, MS02, MS03, e MS04 (amostras em pó) em 1ª derivada.

Para a MS01, também foram realizados experimentos de RPE em modo de 2ª derivada, de amostras em pó e em solução (10 mg / mL KOH 0,1 mol/L),

varrendo-se uma faixa estreita de campo magnético (3450 – 3510 G). O objetivo desse experimento foi averiguar a possível existência de interações (super-hiperfinas) do elétron desemparelhado do radical livre com núcleos de hidrogênios próximos, bem como a existência de diferentes tipos de radicais livres, cujas linhas poderiam estar superpostas. O espectro em 2ª derivada, obtido da amostra em pó, apresentou somente uma única linha ($g = 2,0037$), sem sinais de resolução (Fig. 31). De acordo com a literatura⁷⁷, alguns espectros obtidos de amostras no estado sólido que apresentam uma só linha, podem ser resolvidos quando se obtém o espectro dessa mesma amostra em solução, sob condições adequadas. A resolução das estruturas hiperfinas e super-hiperfinas dependem dos parâmetros de operação (settings) aos quais o equipamento está submetido⁷⁷. Portanto, durante a obtenção de espectros da amostra em solução, procurou-se ajustar tais parâmetros, trabalhando-se a baixas potências de microondas e baixas amplitudes de modulação, de tal forma a aumentar a resolução e evitar possíveis saturações de sinais⁷⁷. Para encontrar o melhor conjunto de parâmetros, que fosse o mais brando possível, variava-se a amplitude de modulação, enquanto que a potência de microondas era mantida constante, até se chegar à melhor resolução possível; em seguida, mantinha-se a amplitude de modulação constante e variava-se a potência de microondas. Apesar das diversas combinações de parâmetros realizadas, mesmo acumulando-se diversas varreduras, não foi possível observar o desdobramento da linha do radical livre ($g = 2,0045$), mesmo para a amostra em solução (Fig. 31). Estes resultados indicam que deve haver apenas uma única espécie de radical livre nas estruturas das melaninas (semiquinonas)⁷⁸. Também sugerem a ausência de átomos de hidrogênio próximos aos grupos responsáveis pela formação do radical (grupos catecóis que podem formar ortosemiquinonas), que no caso, seriam os hidrogênios das posições 4 e 7 das unidades indólicas (ver

Fig. 01), sugerindo que grande parte dessas posições estão envolvidas nas ligações entre as unidades básicas das melaninas^{26,29}.

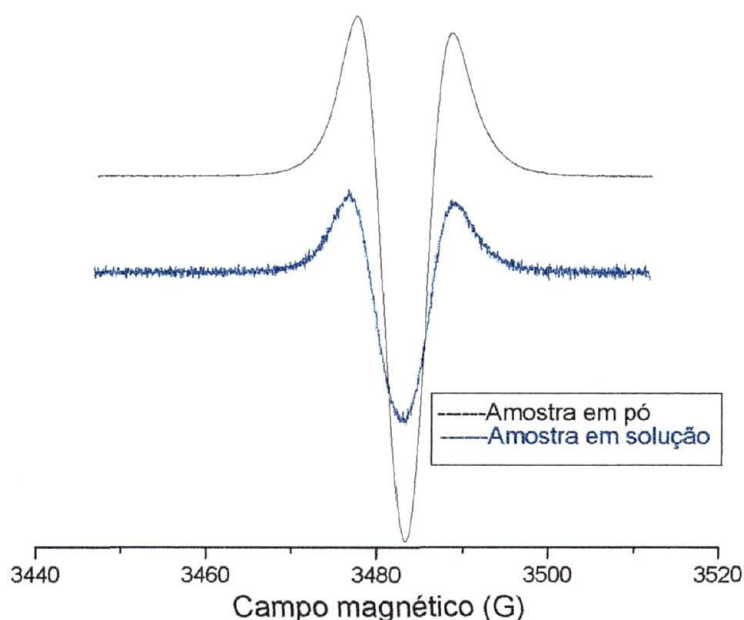


FIGURA 31 – Espectros de RPE da MS01 em 2ª derivada: amostra em pó – amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 1,0 mW (10 varreduras somadas); amostra em solução – amplitude de modulação 1,0 G e potência de microondas 0,91 mW (100 varreduras somadas).

4.5.1 COMPLEXOS MELANINA-ÍON PARAMAGNÉTICO

Além dos parâmetros de RPE mostrados na Tabela 03, as Figs. 32 – 43 e 45 – 48 apresentam os espectros dos complexos melanina-íon paramagnético, para as quatro melaninas sintéticas. Em todos os espectros, além das linhas provenientes dos íons metálicos e suas interações com as melaninas, pode ser visto ainda a linha fina correspondente ao radical livre, a qual em alguns desses espectros sofreu redução da intensidade, devido às interações dipolares com os referidos íons^{65,79}.

TABELA 03 – Parâmetros de RPE para os compostos de coordenação entre melaninas sintéticas e íons metálicos paramagnéticos:

Complexo	$A_{\parallel}(G)$	$A_{\perp}(G)$	$A_N(G)$	$A_{iso}(G)$	g_{\parallel}	g_{\perp}	g_{iso}
MnMS1	-	-	-	96 (a)	-	-	2,0 (a)
MnMS2	-	-	-	96 (a)	-	-	2,0 (a)
MnMS3	-	-	-	96 (a)	-	-	2,0 (a)
MnMS4	-	-	-	96 (a)	-	-	2,0 (a)
FeMS1	-	-	-	-	-	-	4,27 (e)
FeMS2	-	-	-	-	-	-	4,27 (e)
FeMS3	-	-	-	-	-	-	4,27 (e)
FeMS4	-	-	-	-	-	-	4,27 (e)
CuMS1	175 (s)	-	16 (s)	-	2,264 (s)	2,071 (s)	-
CuMS2	170 (s)	-	16 (s)	-	2,270 (s)	2,070 (s)	-
CuMS3	165 (s)	-	16 (s)	-	2,275 (s)	2,067 (s)	-
CuMS4	160 (s)	-	16 (s)	-	2,285 (s)	2,076 (s)	-
VOMS1	190 (s)	69,5 (s)	-	109,6 (c)	1,941 (s)	1,981 (s)	1,968 (c)
VOMS2	191 (s)	70 (s)	-	110,3 (c)	1,939 (s)	1,979 (s)	1,966 (c)
VOMS3	188,5 (s)	70 (s)	-	109,5 (c)	1,941 (s)	1,979 (s)	1,967 (c)
VOMS4	193 (s)	72 (s)	-	112,3 (c)	1,937 (s)	1,979 (s)	1,965 (c)

(a) valor aproximado.

(c) valor calculado ($X_{iso} = [2X_{\perp} + X_{\parallel}]/3$).

(e) valor experimental.

(s) valor obtido através da simulação do espectro.

4.5.1.1 Complexos melanina-Mn²⁺

Comparando-se os espectros dos complexos melanina-Mn²⁺ (MnMS01, MnMS02, MnMS03 e MnMS04) observa-se que praticamente não há diferenças entre eles (Figs. 32 – 35). Os parâmetros de RPE para esses complexos indicam que o manganês não está coordenado diretamente aos sítios ligantes das melaninas. Trabalhos realizados por Maturama O. J.⁸⁰ e Title R. S.⁸¹ com diversos compostos de manganês(II), demonstraram que há uma correlação linear entre a constante de acoplamento hiperfina (A) e o caráter iônico desses compostos. Quanto maior o valor de A , maior o caráter iônico do composto. Comparando-se os valores de A dos complexos melanina-Mn²⁺ com os valores da literatura^{80,81}, encontrou-se que esses complexos apresentam um caráter iônico de 92 por cento. Esse valor sugere a formação de complexos de esfera externa, onde o íon $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ está ligado eletrostaticamente aos sítios ligantes das melaninas^{82,83}.

Uma evidência disso, é a facilidade com a qual esses complexos são hidrolisados pelo uso de soluções diluídas de HCl (0,01 e 0,05 mol/L). Os demais complexos são muito mais estáveis frente à hidrólise ácida.

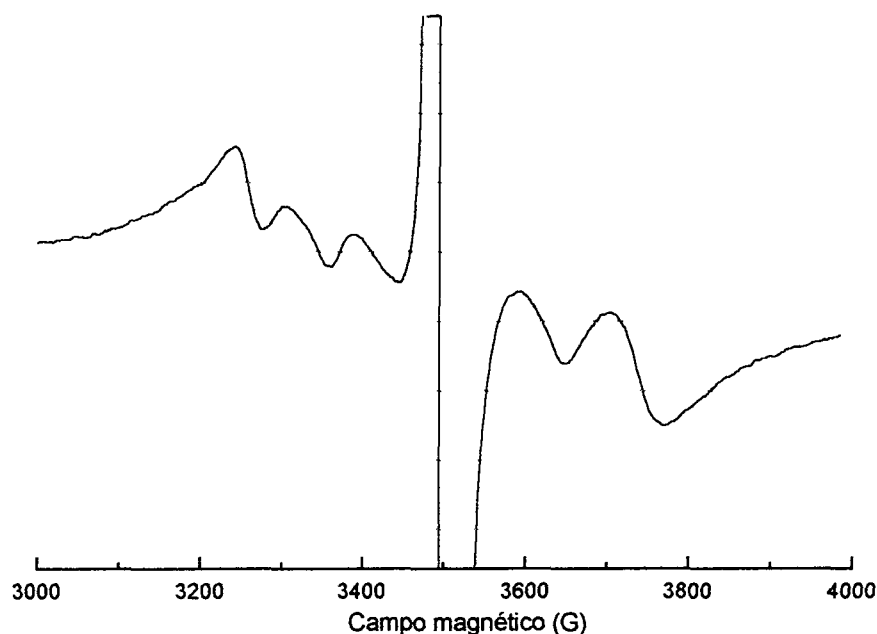


FIGURA 32 – Espectro de RPE em 1ª derivada do complexo MnMS01, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.

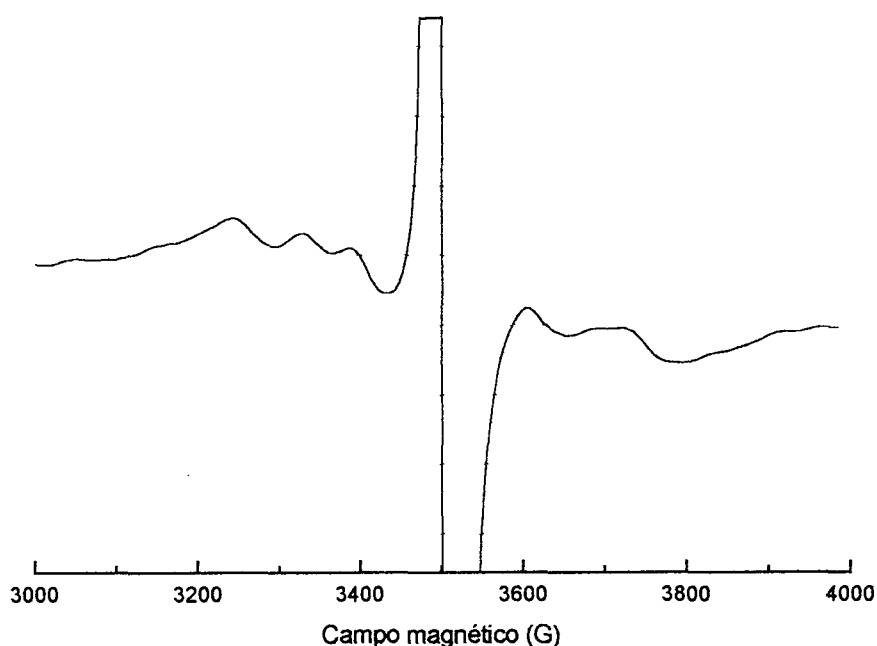


FIGURA 33 – Espectro de RPE em 1ª derivada do complexo MnMS02, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.

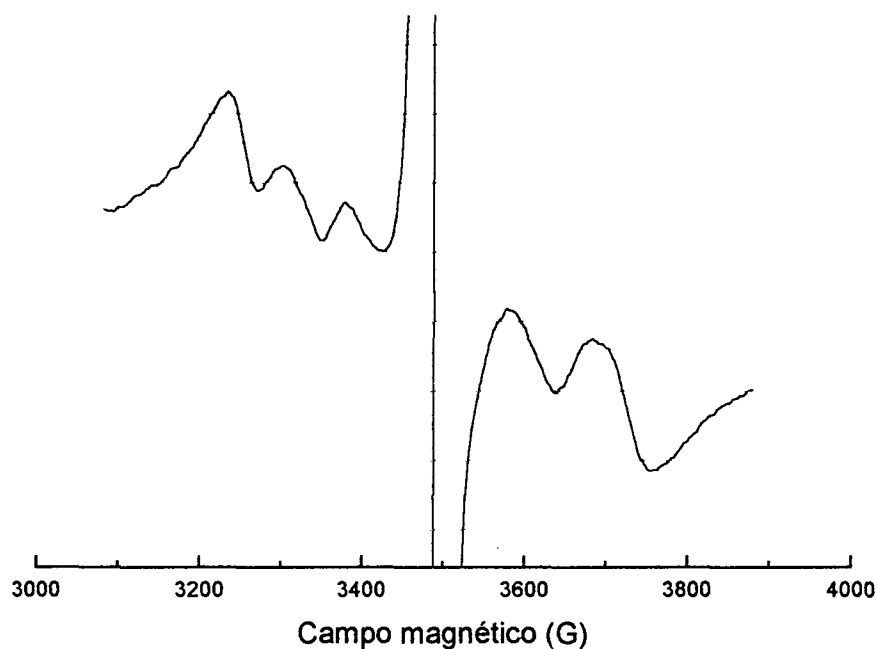


FIGURA 34 – espectro de RPE em 1ª derivada do complexo MnMS03, amplitude de modulação 28,5 G e potência de microondas 20 mW.

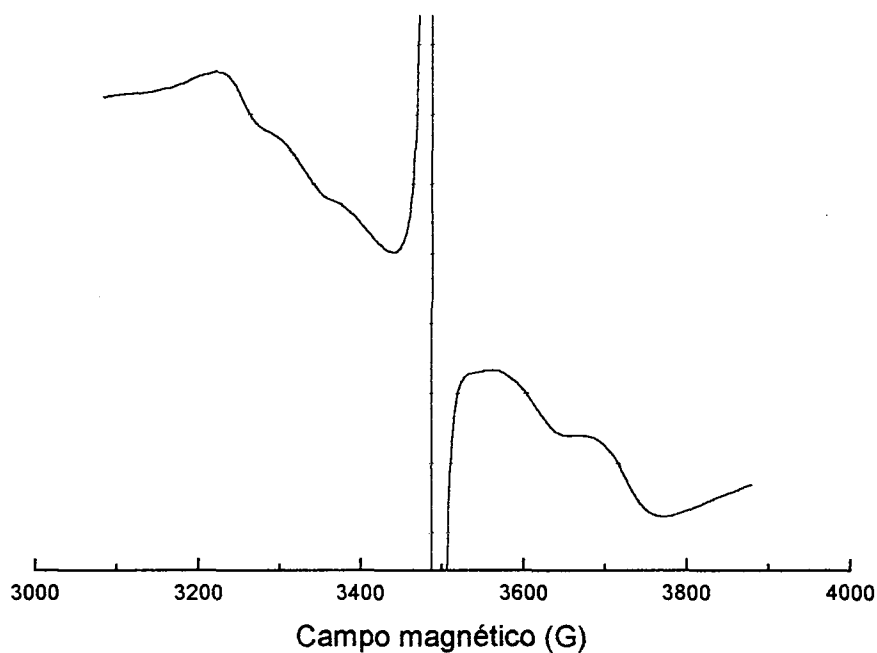


FIGURA 35 – Espectro de RPE em 1ª derivada do complexo MnMS04, amplitude de modulação 14,3 G e potência de microondas 20 mW.

4.5.1.2 Complexos melanina-Fe³⁺

Para os complexos melanina-Fe³⁺, além da linha do radical livre, observa-se uma linha em $g = 4,27$, e outra, mais discreta com $g \approx 9$ (Figs. 36–39). A linha em $g = 4,27$ é consistente com a existência de complexos de esfera interna onde o Fe³⁺ se encontra em sítios tetraédricos ou octaédricos com alta distorção rômbrica^{84,85,86,87}. Essa forma de complexo de ferro(III) é muito estável e exibe uma resistência considerável a trocas iônicas (frente a prótons ou outros íons metálicos) e a processos de redução^{73,88}. A linha em $g \approx 9$ é atribuída a íons Fe³⁺ em sítios com simetria rômbrica, tendendo para ortorrômbrica⁸⁷. A linha larga, centrada em $g = 2$, cuja intensidade decresce na seguinte ordem: FeMS04 > FeMS03 > FeMS01 > FeMS02, se deve ao acoplamento de spins de íons Fe³⁺ spin alto próximos, que se encontram em sítios octaédricos, com baixa distorção axial^{87,89}, provavelmente provenientes de íons Fe³⁺ hidratados, que se adsorveram à superfície das melaninas durante a preparação dos complexos (e também durante a síntese, no caso das MS02 e MS04), não sendo eliminados satisfatoriamente nas lavagens com HCl 0,01 e 0,05 mol/L. Um fato que se observa é que a intensidade dessa linha está, de certa forma, relacionada com o teor de grupos carboxílicos e com o percentual de carbono da melanina (ver análise elementar na seção 4.2). As melaninas com maior teor de carboxilas e menor percentual de carbono apresentam linhas mais intensas. Isto sugere que as melaninas que apresentam maior índice de degradação oxidativa dos anéis aromáticos (menor percentual de carbono e maior teor de carboxilas), estão mais pré-dispostas a assimilar ferro(III) na forma que resulta a linha larga centrada em $g = 2$.

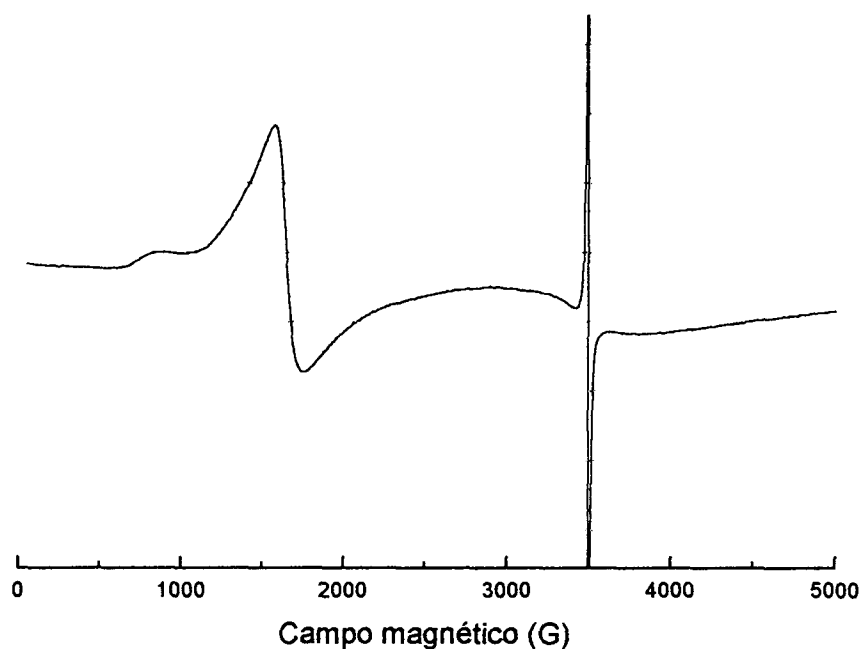


FIGURA 36 – Espectro de RPE em 1ª derivada do complexo FeMS01, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.

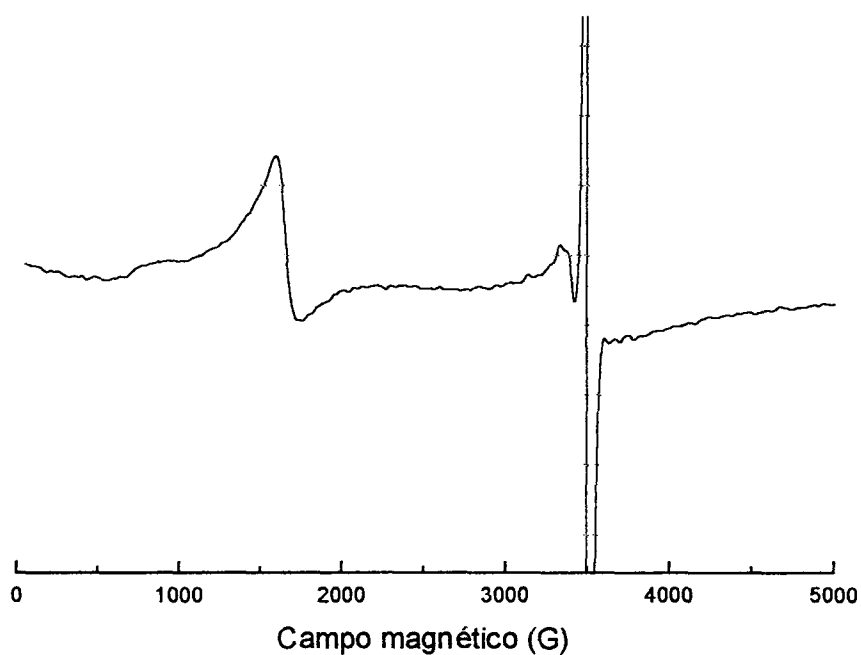


FIGURA 37 – Espectro de RPE em 1ª derivada do complexo FeMS02, amplitude de modulação 14,3 G e potência de microondas 20 mW.

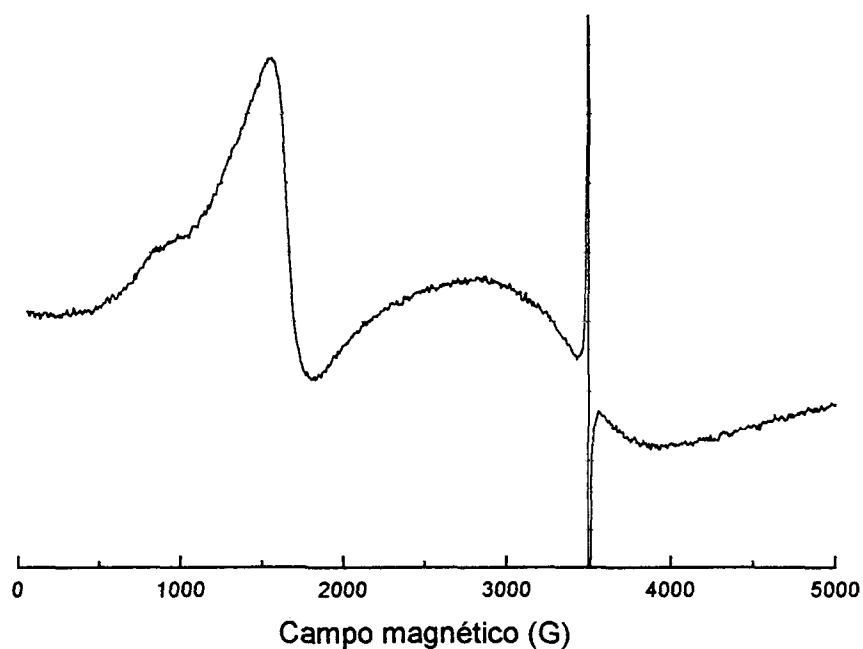


FIGURA 38 – Espectro de RPE em 1ª derivada do complexo FeMS03, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.

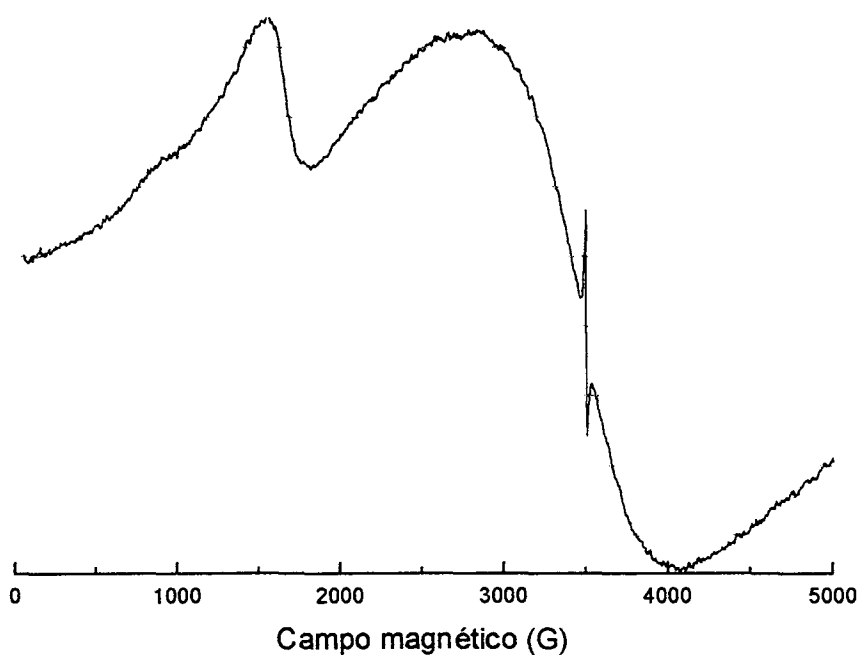


FIGURA 39 – Espectro de RPE em 1ª derivada do complexo FeMS04, amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW.

A MS04, que já possuía um teor considerável de ferro(III), adquirido durante a síntese, sofreu uma redução significativa do sinal do radical livre, e um aumento de intensidade para a linha em $g = 4,27$ e para a linha centrada em $g = 2$. Isto sugere que parte dos íons Fe^{3+} devem estar se ligando aos grupos catecóis (os quais são responsáveis pela formação de semiquinonas), gerando interação dipolar, reduzindo dessa forma a intensidade da linha do radical livre.

Não há em nenhum dos espectros indícios de íons Fe^{3+} spin alto com simetria axial (ausência de sinal na região de $g = 6$), característica de complexos com 4 átomos de nitrogênio numa configuração planar, indicando a ausência de sítios semelhantes a porfirinas ou porfírenos na estrutura das melaninas estudadas^{89,90,91}.

4.5.1.3 Complexos melanina- Cu^{2+}

Os parâmetros de RPE para os complexos melanina- Cu^{2+} (Tab. 03, Figs. 40 – 43) indicam que o cobre(II) se encontra em ambiente com simetria axial com oxigênios e/ou nitrogênios como átomos ligantes. Para o complexo CuMS01, os parâmetros de RPE obtidos através da simulação do espectro experimental sugerem que o cobre está coordenado por 2 nitrogênios e 2 oxigênios⁸⁵. O espectro em 1ª derivada (Fig. 40) não apresenta resolução da região do g_{\perp} , o que indica que a maior parte dos complexos existentes deve possuir somente oxigênios como átomos doadores de pares eletrônicos, o que é coerente, considerando-se que há uma grande quantidade de grupos oxigenados na estrutura da melanina (carboxilas e fenóis)⁸⁹.

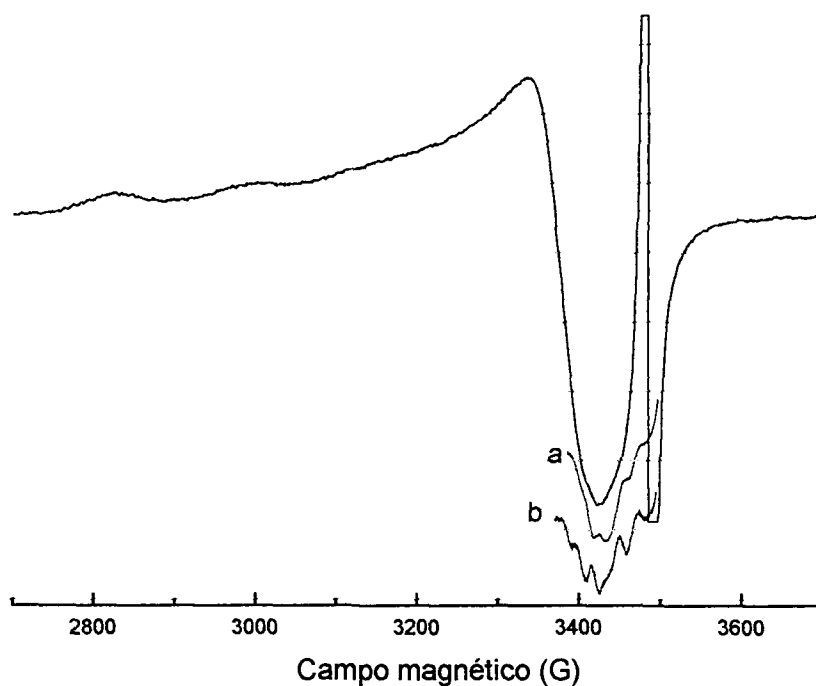


FIGURA 40 – Espectro de RPE do complexo CuMS01 em 1ª derivada e detalhe da região de g_{\perp} em 2ª derivada: a – sem tratamento com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; b – tratado com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; (amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).

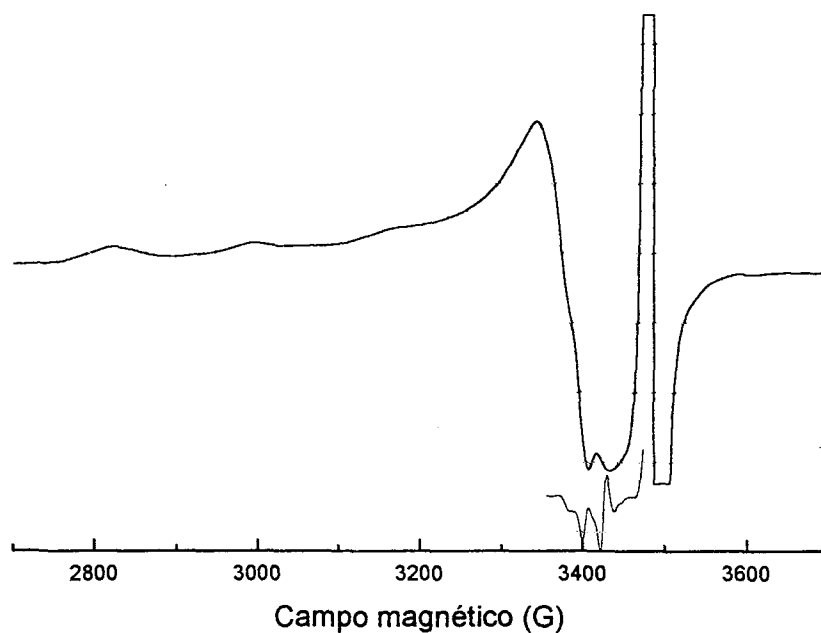


FIGURA 41 – Espectro de RPE do complexo CuMS02 em 1ª derivada e detalhe da região de g_{\perp} em 2ª derivada (amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).

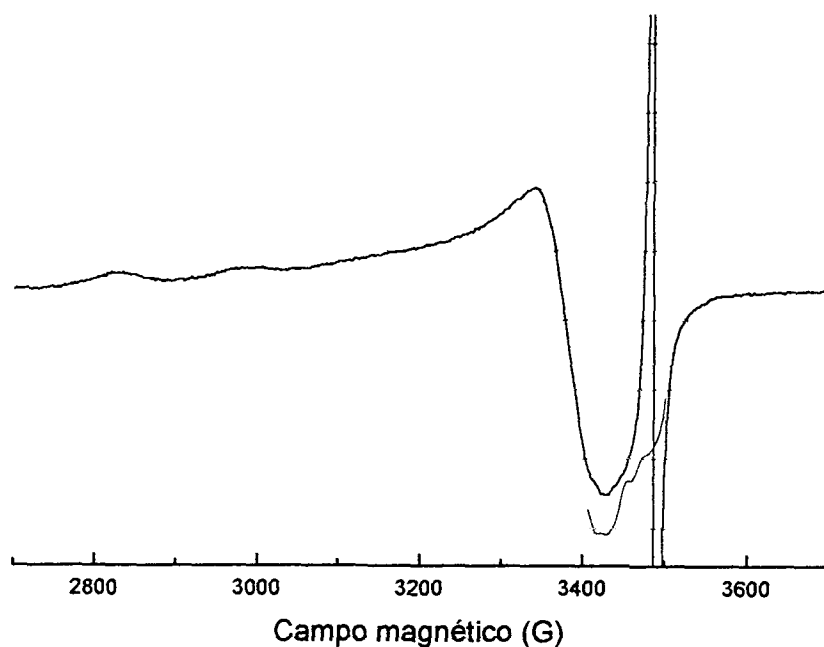


FIGURA 42 – Espectro de RPE do complexo CuMS03 em 1ª derivada e detalhe da região de g_{\perp} em 2ª derivada (amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).

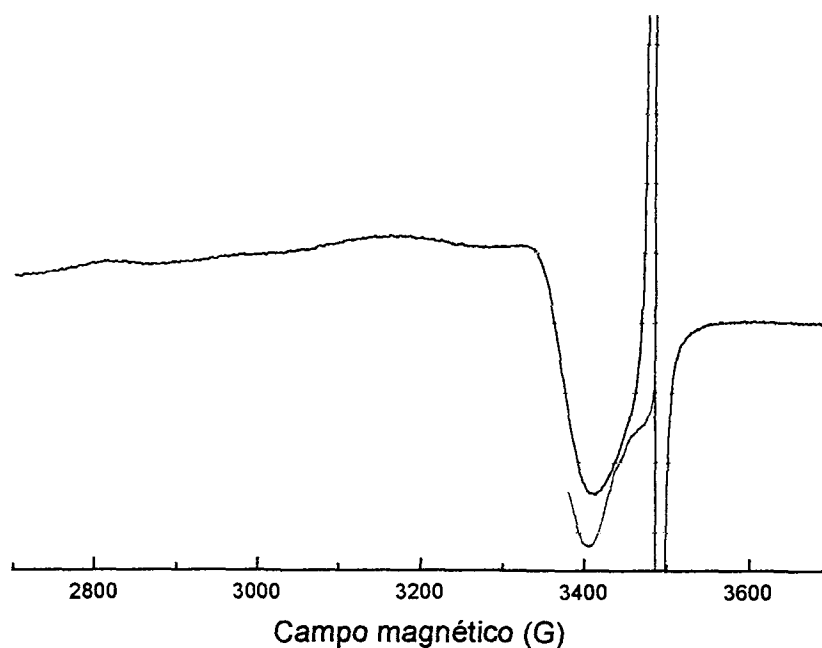


FIGURA 43 – Espectro de RPE do complexo CuMS04 1ª derivada e detalhe da região de g_{\perp} em 2ª derivada (amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).

O espectro de RPE em 2ª derivada da região de g_{\perp} para o CuMS01, (Fig. 40, detalhe a) apresentou uma resolução um tanto pobre, mas cujos parâmetros encontrados através da simulação do espectro, sugeriram novamente a coordenação com 2 oxigênios e 2 nitrogênios. Seguindo-se a literatura⁹³, fez-se um tratamento do complexo CuMS01 com solução 0,1 mol/L de ditonito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) para se tentar reduzir parte dos íons Cu^{2+} coordenados somente por oxigênios, de tal forma, que o sinal no espectro de RPE correspondente aos mesmos sofresse diminuição da intensidade, melhorando dessa forma a resolução do espectro da região de g_{\perp} (os complexos de cobre(II) envolvendo nitrogênios como doadores de pares de elétrons, nas melaninas, são mais difíceis de serem reduzidos⁹⁰). Embora o resultado não tenha sido excelente (ao secar-se o complexo, após o tratamento com ditonito, houve contato com o oxigênio do ar, fazendo com que parte do cobre reduzido fosse novamente oxidado), houve uma ligeira melhora na resolução, evidenciando as cinco linhas que caracterizam a interação do elétron desemparelhado do cobre(II) com os núcleos de dois átomos de nitrogênio equivalentes (Fig. 40, detalhe b). Este fato implica que algumas das unidades indólicas presentes na estrutura da melanina sintética estão ligadas entre si de uma maneira tal que possibilite a quelação do cobre(II) por dois nitrogênios. Isto é possível quando duas unidades indólicas estão ligadas entre si pela posição 2 de uma delas (sem carboxila) e pela posição 7 da outra (com ou sem carboxila em 2) (Fig. 44)²⁶. Outra possibilidade seria a ligação entre duas unidades indólicas (ambas sem carboxilas em 2) pelas posições 2 e 2' (Fig. 44)⁹³. Nas outras possibilidades de ligação entre as unidades indólicas, a quelação através de 2 nitrogênios torna-se difícil ou mesmo impossível devido ao posicionamento de um em relação ao outro.

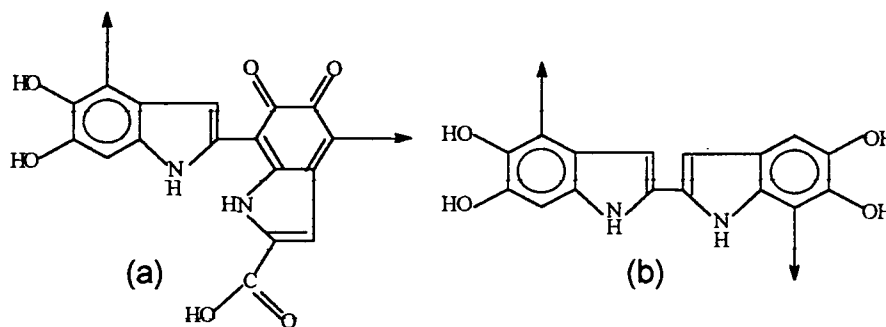


FIGURA 44 – Ligações entre as unidades indólicas pelas posições 2,7' (a) e 2,2' (b).

Poderia haver formação de complexos de cobre(II) onde os nitrogênios pertencem a diferentes estruturas ou então, de diferentes partes de uma estrutura longa, que poderia “dobrar-se” e coordenar o cobre(II). Essas possibilidades porém, são mais remotas pois, a chance de se encontrar 2 estruturas (no estado sólido) em posição adequada para que 2 nitrogênios estejam próximos o suficiente para coordenar o íon metálico é baixa. Outro ponto a considerar, seria a possível existência de impedimento estérico que também dificultaria o processo.

Os espectros de RPE (1ª derivada) dos demais complexos melanina-Cu²⁺ (Figs. 41, 42 e 43) também não dão indícios de interação do cobre(II) com nitrogênios. Mesmo o espectro da CuMS02, que apresenta um desdobramento na região de g_{\perp} , não permite concluir se o mesmo se deve a interações hiperfinas do elétron desemparelhado do cobre(II) com seu núcleo, ou então interações super-hiperfinas com núcleos de átomos de hidrogênio. Os parâmetros obtidos através da simulação dos espectros experimentais sugerem para os 3 complexos coordenação através de 3 oxigênios e 1 nitrogênio⁸⁵. Porém, as simulações dos espectros de RPE em 2ª derivada da região de g_{\perp} para complexos CuMS02, CuMS03 e CuMS04 (ver detalhes das Figs. 41, 42 e 43), indicam, como no caso do CuMS01, interação com 2 nitrogênios, mesmos para os espectros que apresentaram baixíssima resolução. Para o CuMS02 (cujo espectro apresenta

linhas mais estreitas em relação aos outros), a simulação indicou que há superposição de linhas provenientes da interação hiperfina do elétron desemparelhado do cobre(II) com seu núcleo, com as linhas provenientes da interação super-hiperfina com dois nitrogênios.

Relacionando todos os fatos citados, parece haver diversos tipos de complexos envolvendo os íons cobre(II): cobre(II) – 4 O; cobre(II) – 3 O, 1 N; e cobre(II) – 2 O, 2 N. Como todos os espectros apresentaram linhas razoavelmente largas, eles devem constituir uma resultante dos espectros de cada uma das espécies citadas, com suas relativas proporções. A julgar pelos parâmetros obtidos pela simulação dos espectros em 1ª derivada (Tab. 03), o composto CuMS01 deve ser o que apresenta o maior percentual relativo de complexos envolvendo 2 nitrogênios. Já o CuMS04, deve ser o que apresenta maior quantidade de complexos envolvendo oxigênios como átomos doadores. Esta suposição está de acordo com o fato que o CuMS04 foi o complexo que sofreu o maior número de lavagens com HCl 0,1 mol/L, para diminuir a concentração de íons metálicos, visto que os primeiros espectros deste complexo (espectros não mostrados) apresentavam apenas uma única linha larga não resolvida, devido à interação entre íons metálicos próximos (no caso, Cu^{2+}).

Outro ponto comum para os 4 complexos melanina- Cu^{2+} , foi que nem as formas dos espectros nem os parâmetros dos mesmos indicaram a presença de complexos contendo 3 ou 4 nitrogênios. Novamente, evidencia-se que nessas melaninas sintéticas não deve haver estruturas semelhantes a porfirinas ou porfírenos, com um sítio com 4 nitrogênios próximos e magneticamente equivalentes⁹⁴. Se o cobre(II) estivesse coordenado por quatro nitrogênios, numa simetria axial, deveria haver nove linhas na região de g_{\perp} do espectro (o número de linhas é dado através da regra de multiplicidade $2n+1$, onde n é o número de

núcleos num mesmo ambiente químico e I o spin nuclear, que para $N = 1$). É claro que deve ser levado em consideração, que no caso de estruturas semelhantes a porfíricos, pode ser que a cavidade onde se encontram os 4 nitrogênios não tenha um tamanho adequado para coordenar o cobre(II), impedindo a coordenação ou então, resultando numa pobre sobreposição dos orbitais p dos nitrogênios com o orbital $d_{x^2-y^2}$ do cobre(II). Nesse caso, poderia não ser possível a caracterização por RPE.

4.5.1.4 Complexos melanina- VO^{2+}

Os espectros (Figs. 45–48), bem como os parâmetros de RPE (ver Tab. 03) para os complexos VOMS01, VOMS02, VOMS03 e VOMS04 sugerem que o VO^{2+} se encontra em simetria axial. Na literatura^{95,96} são encontradas correlações entre os valores de A_{iso} e g_{iso} , com o sítio ligante no qual se encontra o VO^{2+} . A comparação dos valores de A_{iso} e g_{iso} dos complexos melanina- VO^{2+} com os da literatura⁹⁶, indica que o VO^{2+} se encontra coordenado a 4 oxigênios no plano equatorial (ver Fig. 49). A proporção de oxigênios provenientes de sítios ligantes da melanina (carboxilas e fenóis) pode variar de 1 a 4, sendo que uma boa parte dos íons VO^{2+} deve estar coordenada por 2 oxigênios provenientes de grupos ortodifenóis da estrutura das melaninas e por dois oxigênios de moléculas de água. Complexos onde todos os 4 oxigênios são provenientes das estruturas das melaninas, devem ter uma incidência bem menor pois, com base nas estruturas propostas (Figs. 02, 03, 04 e 05), somente íons ligados a grupos funcionais de duas macromoléculas (que estejam em posição adequada) teriam essa possibilidade.

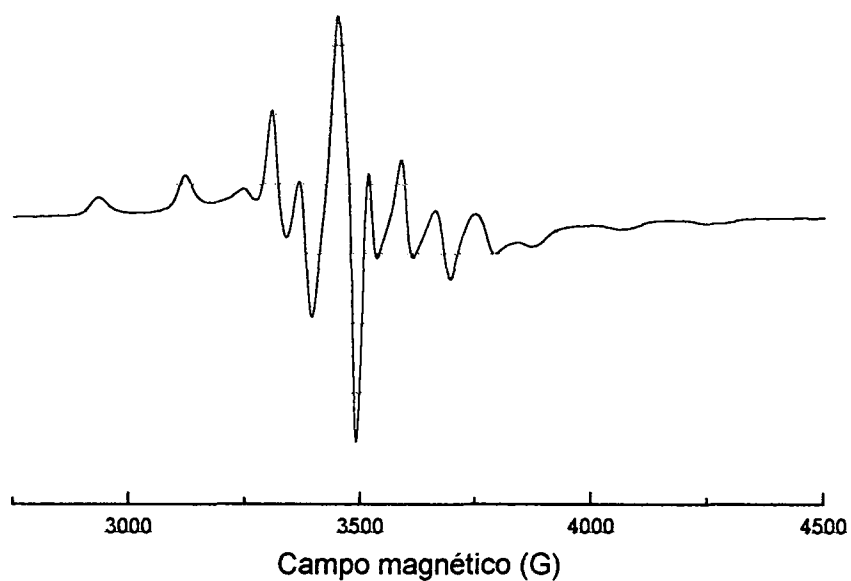


FIGURA 45 – Espectro de RPE do complexo VOMS01 em 1ª derivada com amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).

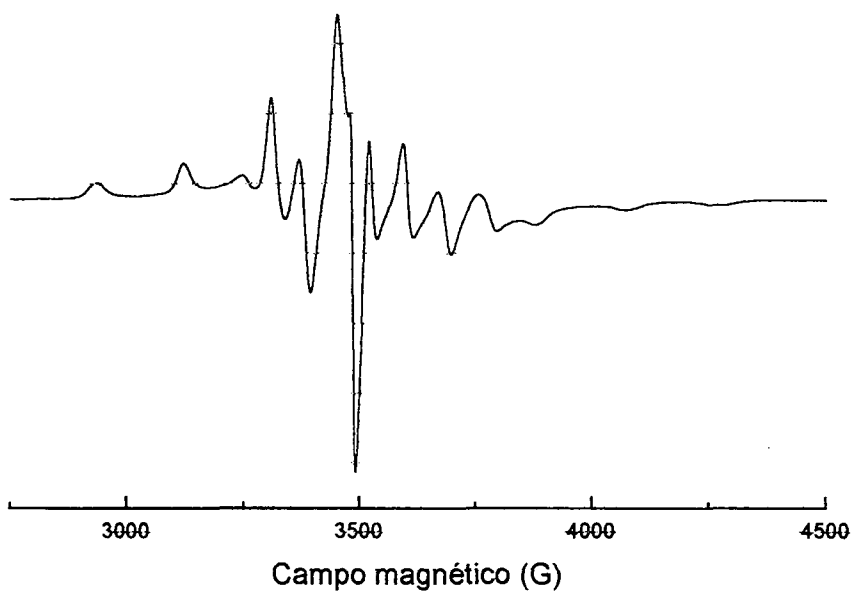


FIGURA 46 – Espectro de RPE do complexo VOMS02 em 1ª derivada com amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).

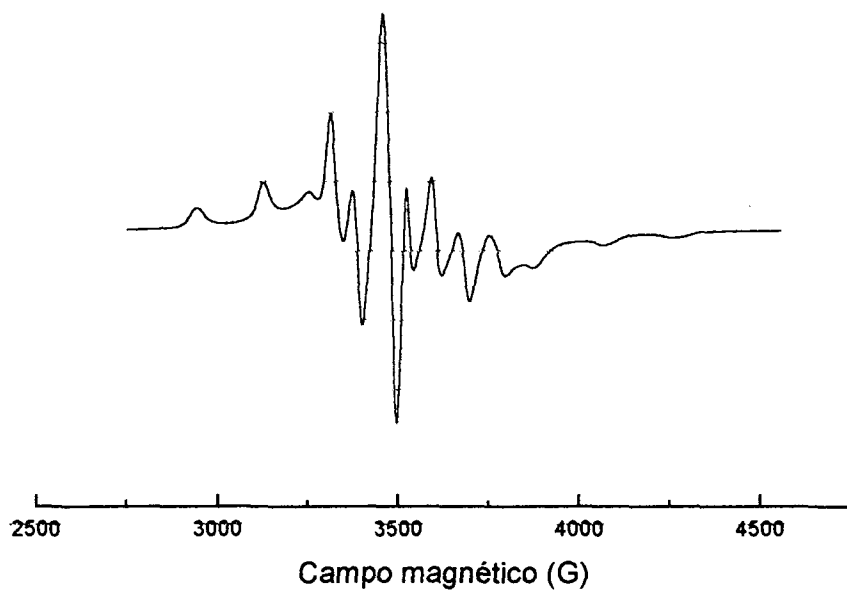


FIGURA 47 – Espectro de RPE do complexo VOMS03 em 1ª derivada com amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).

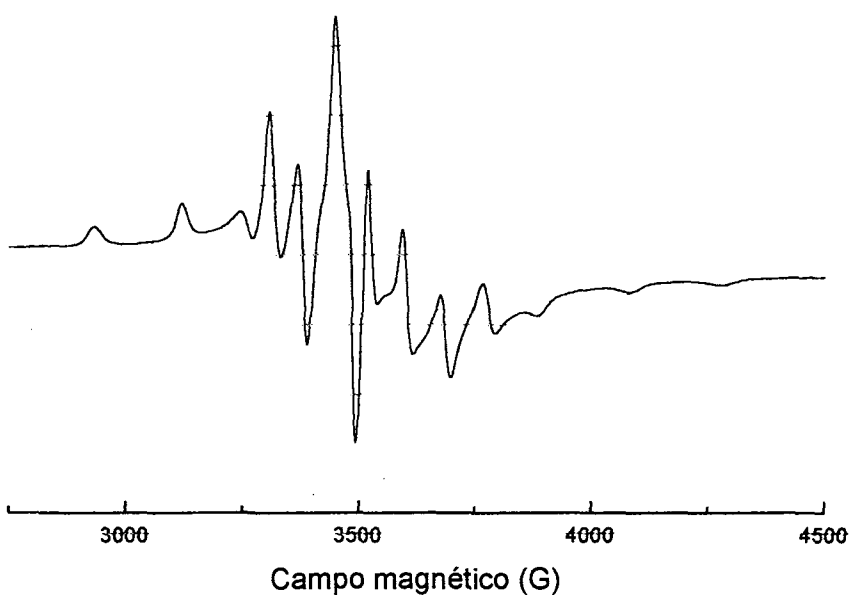


FIGURA 48 – Espectro de RPE do complexo VOMS04 em 1ª derivada com amplitude de modulação 10,1 G e potência de microondas 20 mW).

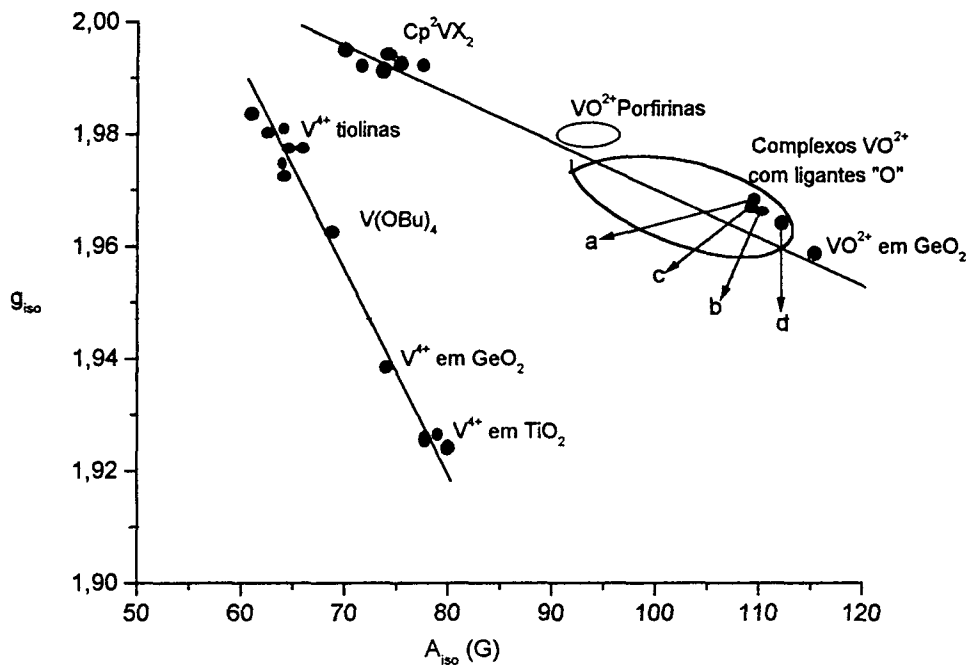


FIGURA 49 – Correlação entre os valores de A_{iso} e g_{iso} e o ambiente ligante do vanádio(IV)⁹⁴. VOMS01 (a), VOMS02 (b), VOMS03 (c) E VOMS04 (d).

4.5.1.4.1 Determinação dos parâmetros ligantes para os complexos melanina-VO²⁺

De acordo com a literatura⁹⁷, os parâmetros ligantes e o níveis eletrônicos de energia podem ser relacionados com os valores de g . Admitindo um estado fundamental 2B_2 , onde o elétron desemparelhado se encontra no orbital d_{xy} do átomo de vanádio, o tensor g pode ser relacionado com os coeficientes de orbitais moleculares (para uma simetria C_{4v}) através das relações⁹⁷:

$$g_{||} = g_e - [8\lambda(\beta_1^*)^2(\beta_2^*)^2] / \Delta E ({}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1) \text{ e}$$

$$g_{\perp} = g_e - [2\lambda(\beta_2^*)^2(\epsilon_{\pi^*})^2] / \Delta E ({}^2B_2 \rightarrow {}^2E)$$

onde $g_e = 2,0023$ (valor para o elétron livre), λ é a constante de acoplamento spin-órbita, e β_1^{*2} , β_2^{*2} e $\epsilon_{\pi^*}^2$ são, respectivamente, os coeficientes dos orbitais $d_{x^2-y^2}$, d_{xy} e d_{xz} / d_{yz} do vanádio.

As componentes do tensor hiperfino (A) podem ser escritas como:

$$A_{\parallel} = P[K + (4/7)(\beta_2^*)^2 + \Delta g_{\parallel} + (3/7) \Delta g_{\perp}]$$

$$A_{\perp} = P[K - (2/7)(\beta_2^*)^2 + (11/14) \Delta g_{\perp}]$$

$$A_{\parallel} - A_{\perp} = P[(6/7)(\beta_2^*)^2 + \Delta g_{\parallel} - (5/14) \Delta g_{\perp}]$$

onde $\Delta g_{\parallel} = g_e - g_{\parallel}$, $\Delta g_{\perp} = g_e - g_{\perp}$, K é a constante de interação de contato de Fermi e $P = g_e \beta_e g_N \beta_N \langle r^{-3} \rangle$ é o parâmetro de acoplamento dipolar. O valor de P normalmente aceito para o íon VO^{2+} é 0.0128 cm^{-1} ⁹⁸. O valor da constante de acoplamento spin-órbita adotado foi $\lambda = 248 \text{ cm}^{-1}$ ⁹⁹.

Como não foi possível se estabelecer os valores das energias de transição eletrônica através da espectroscopia eletrônica para os complexos melanina- VO^{2+} (ver seção 4.6), utilizou-se as energias de transição estabelecidas para um complexo que apresentava sítios ligantes semelhantes aos das melaninas sintéticas. Os valores eram provenientes de medidas realizadas através da espectroscopia foto-acústica, para um complexo vanadila-ácido húmico¹⁰⁰. Os valores para as transições d-d são: 15900 cm^{-1} para ${}^2B_2 \rightarrow {}^2E$ e 17400 cm^{-1} para ${}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1$ ¹⁰⁰. A validade deste procedimento está baseada em dois fatos: primeiramente, a literatura⁹⁷ apresenta um gráfico onde $1/\Delta E({}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1)$ está expresso em função de K (constantes de interação de contato de Fermi) para o íon vanadila em diferentes ambientes ligantes. Utilizando esse gráfico, foi possível estimar a energia de transição $\Delta E({}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1)$, para os complexos melanina- VO^{2+} . Os valores estimados ficaram ao redor de 17300 cm^{-1} , o que está bem próximo do valor adotado. Em segundo lugar, a literatura¹⁰¹ também cita que uma incerteza de 20 por cento nas energias de transição leva a um erro de somente 5 por cento nos valores dos parâmetros ligantes. Baseado na comparação entre o valor estimado e o valor utilizado para a energia de transição $\Delta E({}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1)$, acredita-se que o erro

seja bem menor que 20 por cento, resultando portanto num erro menor que 5 por cento na determinação dos valores dos parâmetros ligantes.

Como os valores das constantes e das energias de transição foram dados em cm^{-1} , os valores de A expressos em Gauss, foram convertidos para cm^{-1} , utilizando-se a expressão:

$$A_{(\text{cm}^{-1})} = A_{(\text{Gauss})} \times (g/2,1420) \times 10^{-4}$$

TABELA 04 – Valores calculados para os parâmetros ligantes dos complexos melanina- VO^{2+} .

Complexo	K	$(\beta_1^*)^2$	$(\beta_2^*)^2$	$(\epsilon_{\pi^*})^2$
VOMS01	0,75	0,58	0,92	0,78
VOMS02	0,75	0,60	0,92	0,81
VOMS03	0,75	0,59	0,91	0,82
VOMS04	0,76	0,62	0,92	0,81

Os valores de $(\beta_2^*)^2$ (menores que 1) indicam a existência de ligações π entre o vanádio e os sítios ligantes das melaninas. A literatura¹⁰² sugere que as ligações π são muito mais efetivas para grupos fenólicos do que para carboxilas, devido à possibilidade de ocorrer ressonância, o que não é possível no caso das carboxilas. Novamente, esta sugestão está de acordo com o fato de haver um grande número de grupos fenólicos (mais especificamente catecóis) nas estruturas das melaninas, os quais estão em posição favorável para quelar o íon VO^{2+} . Os valores de $(\beta_1^*)^2$ são consistentes com um grau relativamente alto de covalência nas ligações σ entre o VO^{2+} e os sítios ligantes equatoriais. Embora a diferença seja pequena, observa-se que para o VOMS01 E VOMS03, cujos $(\beta_1^*)^2$ são um pouco mais baixos (indicando maior covalência), a banda de infravermelho correspondente ao estiramento V=O está deslocada para números de onda mais baixos, indicando ligações mais fracas com o oxigênio apical, quando comparadas com o VOMS02 e VOMS04. Os valores de $(\epsilon_{\pi^*})^2$ são consistentes com as absorções relativas ao

estiramento V=O ($970 - 975 \text{ cm}^{-1}$). Embora o VOMS01 apresente o menor valor para $(\epsilon_{\pi^*})^2$ (indicando ligações π , do vanádio com o oxigênio apical, mais fortes que os demais complexos) é um dos que apresentam valores mais baixos para a banda de absorção V=O. Embora os coeficientes não forneçam informações a respeito da ligação σ entre o vanádio e o oxigênio apical, é provável que ela seja a responsável por tal fato, sendo um pouco mais fraca, quando comparada com as dos outros complexos.

A julgar pelas bandas de absorção no infravermelho e pelos valores de $(\epsilon_{\pi^*})^2$, não deve haver um sexto ligante nos complexos. Se houvesse, os valores de $(\epsilon_{\pi^*})^2$ deveriam estar bem mais próximos a 1, devido ao enfraquecimento das ligações V=O, causado pelo efeito trans⁷⁵.

4.6 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

O principal problema enfrentado na obtenção dos espectros de UV-Vis de melaninas foi a dificuldade de solubilização. Em geral, os espectros de substâncias húmicas são obtidos de amostras em solução 0,05 mol/L de NaHCO_3 . Porém, das quatro melaninas sintéticas, somente a MS01 era totalmente solúvel nessas condições (ou outras soluções alcalinas com pHs acima de 8,0). A MS03 e MS04 mostraram-se parcialmente solúveis, mesmo em soluções alcalinas com pHs ao redor de 13 (KOH 0,1 mol/L), sendo que das duas, a MS04 é a que apresentava a menor fração solúvel. A MS02 era insolúvel em qualquer pH. Esta dificuldade na solubilização acarretou alguns problemas na obtenção de espectros de UV-Vis: Os espectros obtidos para algumas das melaninas sintéticas não são representativos da amostra toda e sim, apenas da fração solúvel. Como há uma relação entre o tamanho da molécula e a solubilidade (moléculas menores são mais solúveis e

tamanho da molécula e a solubilidade (moléculas menores são mais solúveis e maiores menos), acredita-se que apenas as frações de menor massa molecular foram solubilizadas para a MS03 e MS04. Outro ponto, é o espalhamento de luz causado pelas partículas em suspensão, tornando os espectros ruidosos, o que não pôde ser evitado para a MS02 que era insolúvel, cujo espectro foi obtido a partir de uma suspensão extremamente fina de melanina sintética em KOH 0,1 mol/L, formada durante a tentativa de solubilização da mesma.

Tentou-se também obter espectros de melaninas em filme de nujol, para contornar-se o problema da solubilidade porém, os resultados foram desapontadores, com espectros extremamente ruidosos.

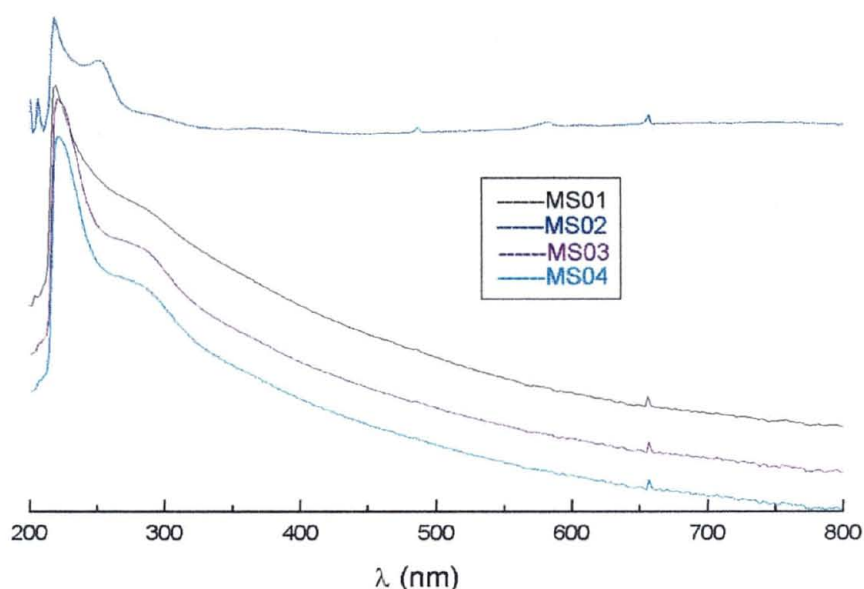


FIGURA 50 – Espectros de UV-Vis das melaninas sintéticas: MS01, MS02, MS03 e MS04, obtidos em solução 0,1 mol/L de KOH.

Comparando-se os espectros de UV-Vis das melaninas sintéticas (Fig. 50), observa-se como comportamento comum uma curva contínua, que decresce de 215 a 800 nm. Essas absorções, bastante intensas, principalmente na região do

ultravioleta, são atribuídas a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ nas unidades poliméricas das melaninas.¹⁰³

4.6.1 A RAZÃO E_4/E_6

No estudo de substâncias húmicas por UV-Vis, há um importante parâmetro denominado razão E_4/E_6 , que é a relação entre as absorvâncias em 465 e 665 nm^{104,105}. Este parâmetro é usado para obter informações a respeito do tamanho molecular¹⁰⁴, conjugação e condensação aromática dessas substâncias¹⁰⁵. De acordo com a literatura¹⁰⁴, há uma relação inversa entre a razão E_4/E_6 e o tamanho molecular. Entretanto, outros autores¹⁰⁴ citam, que não é só o tamanho molecular que controla a razão E_4/E_6 . Segundo a literatura¹⁰⁵, a razão E_4/E_6 também decresce com o aumento da conjugação e/ou condensação aromática. Dessa forma, o uso desse parâmetro para obter informações a respeito do tamanho molecular deve ser feito com cautela e estar apoiado em outras técnicas de análise.

Como existe similaridade entre as melaninas e as substâncias húmicas (além do fato de que actinomicetos e fungos do solo também produzem melaninas, as quais são consideradas precursores de ácidos húmicos)^{74,107}, foram realizadas neste trabalho, considerações baseadas na razão E_4/E_6 , para as melaninas sintéticas. Os valores desta razão para MS01, MS02, MS03 e MS04 são, respectivamente: 2,2; ≈ 1 ; 2,1; e 2,0. Os valores para MS01, MS03 e MS04 estão bem próximos. Porém como comentado acima devido à baixa solubilidade de MS03 e MS04, o valor determinado é representativo somente da fração que se solubilizou, valor esse que é quase igual ao da MS01, a qual é totalmente solúvel. Isto sugere que as frações solúveis da MS03 e MS04 devem ter estruturas

semelhantes à MS01, com tamanhos moleculares menores, quando comparadas com a fração insolúvel. Provavelmente, os valores da razão E_4/E_6 para essas duas melaninas sintéticas seriam menores se as frações insolúveis estivessem sendo representadas. Para a MS02, embora o espectro esteja bastante ruim, ele é representativo da amostra toda, com uma razão E_4/E_6 próxima de 1, indicando maior tamanho molecular (quando comparada com as demais melaninas sintéticas), o que é coerente com o fato dessa melanina ser insolúvel.

A julgar pela razão E_4/E_6 e pela solubilidade, o processo de síntese utilizando o oxigênio do ar é o menos efetivo, uma vez que as melaninas geradas possuem massas moleculares menores apresentando maior solubilidade. Já o processo utilizando pirofosfato de manganês(III), parece ser o mais efetivo, tendo capacidade para gerar estruturas com massas moleculares maiores. Os processos utilizando H_2O_2 e $K_3[Fe(CN)_6]$ são intermediários.

Comparando-se as razões E_4/E_6 das melaninas sintéticas com as de alguns ácidos húmicos do solo, cujos valores, em média, situam-se entre 4,5 e 6,0¹⁰⁸, nota-se que os valores para as melaninas são bem menores, mesmo para a mais solúvel (MS01), sugerindo que em suas estruturas moleculares deve haver um grau de conjugação e/ou aromaticidade muito mais elevado do que nos ácidos húmicos.

4.6.2 UV-Vis DE COMPLEXOS MELANINA-ÍON METÁLICO

Neste trabalho, também foram feitos espectros de UV-Vis dos complexos com íons metálicos da MS01. Comparando-se o espectro da melanina “pura” com os de seus complexos, não se observou diferenças significantes. As absorções relativas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ são tão intensas, que sobrepõe

(mesmo a MS04 que possuía um teor razoável de Fe^{3+} , também não apresentou nenhuma modificação em relação às outras melaninas [Fig. 50]). Notou-se apenas um decréscimo na intensidade geral das absorções para alguns dos complexos, devido à baixa solubilidade dos mesmos. Embora a MS01 fosse solúvel, seus complexos com o cobre(II), vanádio e principalmente com o ferro(III), são menos solúveis, provavelmente devido ao fato de que esses íons metálicos funcionam como mordentes, juntando estruturas de melaninas, fazendo com que ocorra um aumento da massa molecular, bem como uma diminuição da possibilidade de formação de cargas pela retirada de prótons, visto que muitos destes já deram lugar aos íons metálicos.

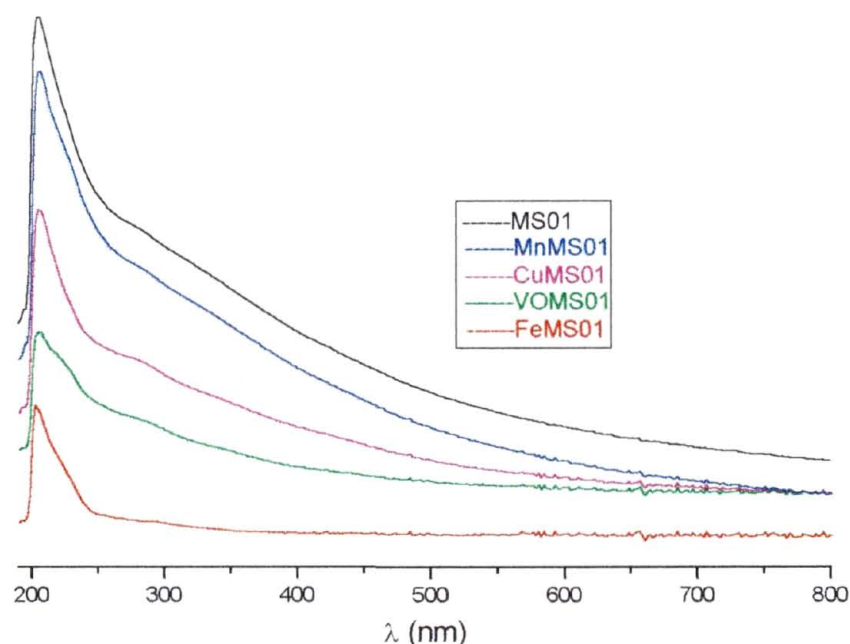


FIGURA 51 – Espectros de UV-Vis da MS01 e seus complexos com Mn^{2+} , Cu^{2+} , VO^{2+} e Fe^{3+} , obtidos em solução 0,05 mol/L de NaHCO_3 .

Como não se observou modificação nenhuma nos espectros dos complexos MnMS01, CuMS01, VOMS01 e FeMS01, quando comparados com o da MS01,

concluiu-se que fazer tal análise para os complexos das demais melaninas sintéticas não traria também informações relevantes.

5 - CONCLUSÕES

As análises químicas (CHN e determinação de acidez) e a espectroscópica de IVTF indicaram que, dos oxidantes utilizados nas sínteses das melaninas, o mais efetivo, foi o pirofosfato de manganês(III) e o oxidante menos efetivo, foi o oxigênio do ar. Também ficou evidenciado que o método utilizando o pirofosfato de manganês(III), degrada menos as unidades indólicas e que o hexacianoferrato(III) de potássio é o que provoca o maior índice de degradação, além do fato deste composto (que é em geral bastante estável) sofrer decomposição frente às melaninas, devido à alta afinidade destas pelo íon Fe^{3+} , conforme dados de RPE e IVTF.

A espectroscopia de RPE, juntamente com IVTF, indicaram que os principais sítios ligantes das melaninas contém átomos de oxigênio, provenientes de grupos catecóis e carboxilas, sendo que as melaninas com maiores teores de grupos carboxílicos, conforme determinação da acidez, foram as que apresentaram maior intensidade para a linha larga correspondente a interações entre íons metálicos próximos. Os parâmetros de RPE para os complexos entre melaninas sintéticas e Mn^{2+} sugeriram que esses complexos são de esfera externa, onde o $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ deve se encontrar ligado eletrostaticamente aos sítios das melaninas. Os espectros de IVTF bem como os de RPE, juntamente com os parâmetros ligantes calculados para os complexos entre melaninas sintéticas e o íon VO^{2+} , sugerem estrutura piramidal com 4 oxigênios como átomos ligantes no plano equatorial. Através dos espectros de RPE dos complexos entre melaninas sintéticas e o íon Cu^{2+} , ficou também evidente a existência de íon cobre(II) (em simetria axial) com diferentes ambientes ligantes, apresentando 4 oxigênios, 3

oxigênios e 1 nitrogênio, e também sítios com dois átomos de nitrogênio próximos e magneticamente equivalentes, sugerindo ligações entre as unidades indólicas pelas posições 2,7' e 2,2'. A ausência de sinais em g próximo a 6 para os complexos com o íon Fe^{3+} e o fato dos complexos com Cu^{2+} (simetria axial) não apresentarem nem parâmetros e nem o número de linhas correspondentes, evidenciam que nessas melaninas sintéticas não deve haver sítios semelhantes a porfirinas ou porfírenos, contendo quatro átomos de nitrogênio.

Os dados da espectroscopia eletrônica indicaram, através da razão E_4/E_6 , que as melaninas sintéticas devem apresentar alto grau de conjugação e/ou aromaticidade, bem superior aos ácidos húmicos do solo, sendo que a MS02 foi a que apresentou a menor razão, o que é coerente com fato de possuir estruturas menos degradadas conforme CHN e determinação da acidez, bem como maior tamanho molecular, conforme sugerido pela sua baixíssima solubilidade.

A análise elementar juntamente com a determinação de grupos ácidos, evidenciaram que as melaninas sintéticas possuem maior percentual de oxigênio, praticamente o dobro que os modelos propostos, sugerindo estruturas com um bom número de unidades indólicas degradadas. Levando em consideração os resultados de RPE, IVTF, determinação de acidez e CHN, o modelo mais se aproxima, ainda que com deficiências no percentual de oxigênios, índice de degradação da estrutura e tipo de ligações entre as unidades fundamentais, é o modelo proposto por Swan².

A modificação efetuada na metodologia aplicada na determinação de grupos ácidos (segundo Schnitzer e Gupta) apresentou resultados satisfatórios, melhorando significativamente o grau de precisão dos mesmos.

As técnicas de determinação de acidez pelo método da função de formação ácida, bem como a determinação do poder redutor mostraram-se inviáveis para serem aplicadas às melaninas sintéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NICOLAUS R. A., **Melanins**, Lederer E. (Ed.), Paris: Hermann, (1968) p. 5.
2. SWAN G. A., **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, Herz, W., Gricebach, H. and Kirly, G. W. (Eds.), Vienna: Springer-Verlag, vol. 31 (1974) p. 521-582.
3. PROTA G. *Invest. Dermatol*, **75** (1980) 122-127.
4. MAYER A. M. and HAREL E., *Phytochemistry*, **18** (1979) 193-199.
5. D'AMATO R. J., LIPMAN Z. P. and SNYDER S. J., *Science*, **231** (1986) 987-990.
6. PROTA G. and THOMSON R. H., *Endeavour*, **35** (1976) 32-38.
7. KAPLAN I. J. and HOLASEK E., *Ann. Ophthalmol.*, **15** (1983) 1132-1134.
8. LARSON B. and TJALVE H., *Acta Physiol. Scand.*, **104** (1978) 479-484.
9. LARSON B. and TJALVE H., *Biochem. Pharmacol.*, **28** (1979) 1181-1187.
10. PROCTOR P., *Phys. Chem. Phys.*, **4** (1972) 349-355.
11. COTZIAS G. C., PAPOVASILION, P. S., VAN WOART M. H. and SAKAMOTO A., *Fed. Proc.*, **23** (1964) 713-720.
12. LINDQUIST N. G., *Acta Radiol. Suppl.*, (1973) 325-329.
13. GALLAS J. M., **Optical lens system incorporation melanins as an absorbing pigments for protection against electromagnetic radiation**, US: patent 4, 698, 374 (1987).
14. GALLAS J. M., **Hydrophylic Contact Lens**, Australian Patent N° 603706 (1991).
15. CLARK M. B., GARDELLA J. A., SCHULTZ T. M., PATIL D. G. and SALVATI I., *Anal. Chem.*, **62** (1990) 949-956.

16. CULP C. H. **Threshold Switching in the Amorphous Semiconductor $As_{15}Te_{70}Ge_{15}$ and in the Organic semiconductor Melanin**, Dissertation Thesis, Iowa State University, (1976).
17. MCGINNESS J. E., CORRY P., PROCTOR P.M., *Science*, **183** (1974) 853-860.
18. KONO R., JIMBOW K., *Cancer Res.*, **44** (1984) 4337-4340.
19. KOLLIAS N. S., ZEISE L. and CHENDEKEL M. R., *J. Photochem. Photobiol.* **3-9** (1991) 135-140.
20. RAPER H. S., *Physiol. Rev.*, **8** (1928) 245-248.
21. MASON H. S., *J. Biol. Chem.*, **172** (1948) 83-99.
22. Bu'LOCK, *Arch. Biochem. Biophys.*, **91**(1960) 189-194.
23. d'ISCHIA M. NAPOLITANO A. and PROTA G., **1073** (1991) 423-430.
24. ITO S., *Biochim Biophys. Acta*, **883** (1986) 155-161.
25. PROTA G., **Advances in Pigment Cell Research**, Bagnara J. T. (Ed.), New York: Alan R. Liss Inc. (1988) p. 101.
26. d'ISCHIA, M., NAPOLITANO A. and PROTA G., *Gazz. Chim. Ital.*, **126** (1996) 783-789.
27. d'ISCHIA M., NAPOLITANO A., TSIKAKAS K. and PROTA G., *Tetrahedron*, **46** (1990) 5789-5796.
28. ZECCA L., MECACCI C., SERAGLIA R. and PARATI E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1138** (1992) 6-10.
29. SWAN G. A., WAGGOTT. A., *J. Chem. Soc., C* (1970) 1409-1418.
30. Bu'LOCK J. D., MASON H. S., *J. Chem. Soc.*, (1951) 703.
31. BEER R. J. S., BROADHURST T. and ROBERTSON A., *J. Chem. Soc.* (1954) 1947.

32. PALUMBO A., NARDI G., d'ISCHIA M., MISURACA G. and PROTA G., *Gen. Pharmacol.*, **14** (1983) 253.
33. NAPOLITANO A., CORRIDINI M. G. and PROTA G., *Tetrahedron Lett.*, **26** (1985) 2805.
34. STARVS-MOMBELLI L. and WYLER H., *Photochem. Photobiol.*, (1985) 69.
35. VACHTNHIEM J., DUCHON J., MATOUS B. and VULTERIN K., *J. Invest. Dermatol.*, **86** (1986) 573.
36. PROTA G., NAPOLITANO A. and CORRADINI A. G., *Tetrahedron Lett.*, **26** (1985) 2800-2804.
37. PALUMBO A., d'ISCHIA M., MISURACA G., PROTA G. and SCHULTZ T. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **964** (1988) 193.
38. BLOIS M. S., **Photochemical and Photobiological Reviews**, Smitch K. C. (Ed), New York: Plenum Press, vol. 3 (1978) p. 115-134.
39. ZAJAC G. W., GALLAS J. M., CHENG J., EISNER M., MOSS S. C. and ALVARADO-SWAISGOOD A. E., *Biochim. Biophys Acta* **1199** (1994) 271-278.
40. ZAJAC G. W., GALLAS J. M., CHENG J., EISNER M., MOSS S. C. and ALVARADO-SWAISGOOD A. E., *J. Vac. Sci. Technol. B.*, **12-3** (1994) 1247.
41. BERTAZZO A., COSTA C., ALLEGRI G., SERAGLIA R. and TRALDI P., *Rap. Com. Mass-Spectr.*, **9-8** (1995) 634-640.

42. NAPOLITANO A., PEZZELLA A., PROTA G., SERAGLIA R. and TRALDI P.,
Rap. Com. Mass-Spectr., **10-2** (1996) 204-208.
43. NAPOLITANO A., PEZZELLA A., PROTA G., SERAGLIA R. and TRALDI P.,
Rap. Com. Mass-Spectr., **10-4** (1996) 468-472.
44. ALLEGRI G., BERTAZZO A., COSTA C., SERAGLIA R. and TRALDI P., Rap.
Com. Mass-Spectr., **10-4** (1996) 419-423.
45. DRAGO R. S., **Physical methods for chemists**, 2^a ed., Orlando: Saunders,
(1992) p. 212, 392 e 572.
46. PARISH R. V., **NMR, NQR, EPR and Mössbauer spectroscopy in
inorganic chemistry**, London: Elis Horwood, (1990) 168-177.
47. NOVOTNY E. H., **Extração, fracionamento e caracterização
espectroscópica da matéria orgânica do solo**. Curitiba, Dissertação
(Mestrado em Agronomia – Ciências do solo), Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná, (1997) p. 5-16.
48. GOODMAN B. A. and HALL P. L., Electron paramagnetic resonance
spectroscopy, **Clay mineralogy: Spectroscopic and Chemical
Determinative Methods**, Wilson, M. J. (Ed.), London: Chapman & Hall,
(1994) 173-225.
49. STARSINIC M., OTAKE Y., WALKER Jr. P. L. And painter P. C., **Fuel**, **63**
(1984)1002-1007.

50. SENESI N., Application of Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy in Soil Chemistry, **Advances in soil science**, New York: Springer-Verlag, Vol. 14 (1990) 78-114.
51. COELHO NETO J. A., **Processamento de sinais de ressonância paramagnética eletrônica. Projeto de um sistema de varredura rápida para R P E**, Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado em Ciências – Física da matéria condensada), Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro, (1992) p. 119.
52. GIL V. M. S. e GERALDES C. F. G. C., **Ressonância Magnética Nuclear**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian (1987).
53. BINNS F., CHAPMAN R. F., ROBSON N. C., SWAN G. A. and WAGGOT A., J. Chem. Soc., **C** (1970) 1128-1134.
54. AZZELLINI G. C., **Síntese de porfirinas e metaloporfirinas N-alkilpiridil substituídas: Estudo da influência dos substituintes alquílicos em processos de fotossensibilização**, São Paulo, Tese (Doutoramento em Química), Universidade de São Paulo (1992) p. 194-214.
55. ARCHIBALD F. S. and TYREE C., Arch. Biochem. Biophys., **256-2**, August-1 (1987) 638-650.
56. WARING W. S. and WERKMAN C. H., Arch. Biochem., **1** (1942) 303-310.
57. KENTEN R. H., and MANN P. J. G., Biochem. J., **46** (1950) 67-73.
58. HERVÉ M., HIRSCHINGER J., GRANGER P., GILARD P., DEFLANDRE A. and GOETZ N., Biochim. Biophys. Acta, **1204** (1994) 19-27.
59. CHEN Y., SENESI N. and SCHNITZER M., Soil Sci. Soc. Am. J. **41**(1977) 352-358.

60. SCHNITZER M. and GUPTA U. C., Soil Sci. Soc. Proc., **29** (1965) 274-277.
61. SPOSITO G., HOLTZCLAW K. M. and KEECH D. A., Soil Sci. Soc. Am. J., **41** (1977) 1119-1125.
62. SELBIN J., HOLMES L. H. and MCGLYNN S. P., J. Inorg. Nucl. Chem. **25** (1963) 1359.
63. JULIATTO A. L. e OLIVEIRA A. R. S., **Otimização da construção de eletrodos de epoxi-grafite**, Anais do 4º Evento de Iniciação Científica-EVINCE , Curitiba, nº 284 (1996) 308.
64. SPOSITO G., HOLTZCLAW K. W. and KEECH D. A., Soil Sci. Sol. Am. J., **41** (1977) 1119-1125.
65. FRONCISZ W., SARNA T. and HYDE J. S., Arch. Biochem. Biophys. **202-1**, jun (1980)289-303.
66. FELIX C. C., HYDE J. S., SARNA T. and SEALY R. C., J. Am. Chem. Soc., **100-12**, june -7 (1978) 3922
67. PEZZELLA A., d'ISCHIA M., NAPOLITANO A., PALUMBO A. and PROTA G., Tetrahedron, **53-24** (1997) 8281-8286.
68. BILINSKA B., Spectrochim. Acta Part A, **52** (1996) 1157-1162.
69. BARDANI L., BRIDELLI M. G., CARBUCIDDHIO M. and CRIPPA P. R., Biochim. Biophys. Acta, **716** (1982) 8-15.
70. SENESI N., SPOSITO G. and BRADFORD G. R., Forest Sci., **35-4** (1989) 1040-1057.
71. .NAKAMOTO K., **Infrared and Raman Spectra of Inorgânico and Coordination Compounds**, Wiley J. & Sons (Ed.), New York: A Wiley-interscience publication, 4ª Edition, (1986) 227-272.
72. BOGACZ A., BUSZMAN E. and WILCZOK T., Stud. Biophys., **132-3** (1989) 189-195.

73. BUSZMAN E., KWASNIAK B. and BOGACZ A., *Stud. Biophys.*, **125-2** (1988) 143-152.
74. GOMES R. C., MANGRICH A. S., COELHO R.R.R. and LINHARES L. F., *Bio Fertil Soils*, **21** (1996) 84-88.
75. BONADIES J. A. and CARRANO C. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **108** (1986) 4088-4095.
76. SENESI N. and SPOSITO G., *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **48** (1994) 1247.
77. CHESHIRE M. V. and McPHAIL D. B., *European Journal of Soil Science*, **47**-jun (1996) 205-213.
78. PASENKIEWICZ-GIERULA M. and SEALY R. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **884** (1986) 510-516.
79. SARNA T., HYDE J. S. and WARTZ H. M., *Science*, **192** (1976) 1132-1134.
80. MUTURAMA O. J., *Phys. Soc. Japan.*, **5** (1959) 108.
81. TITLE R. S., *Phys. Rev.* **131-2** (1963) 623.
82. SENESI N. and SPOSITO G., *J. Soil Sci.*, **40** (1989) 461-472.
83. GAMBLE D. S., SCHNITZER M. and SKINNER D. S., *Can. J. Soil Sci.* **57** (1977) 47-53.
84. SENESI N. and SPOSITO G., *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **48** (1994) 1247.
85. SENESI N., SPOSITO G. and MARTIN J. P., *Sci. Total Env.*, **55** (1986) 351-362.
86. SENESI N. and SCHNITZER M., *Soil Sci*, **123** (1977) 224.
87. CHESHIRE M. V., BERROW M. L., GOODMAN B. A. and MUNDIE C. M., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **41** (1977) 1131-1138.
88. SENESI N., GRILFITH S. M., SCHNITZER M. and TOWNSEND M. G., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **41** (1977) 969-976.

89. SENESI N., SPOSITO G. and MARTIN J. P., Complexation of some transition metal ions in soil humic acids: An ESR study, Lekkas T. D. (Ed.), **Heavy Metals in the Environment**, Edinburgh: CEP Consultants Ltd. (1985) p. 478-480.
90. SENESI M., SPOSITO G. and MARTIN P., Naturally occurring cooper, iron and vanadyl complexes in humic acid-type polymers (melanins) from soil fungi: An ESR study, Grovannozzi-Sermanni G. and Nannipien P. (Eds.), **Current Perspectives in Environmental Biogeochemistry**, Rome: CNR-IPRA (1987) p. 295-308.
91. NAKAGAKI S., MANGRICH A. S. and WYPYCH F., *Inorg. Chim. Acta*, **254** (1997)213-217.
92. NETO L. M., NASCIMENTO O. R., TALAMONI J. and POPPI N. R. *Soil Science* **151-3**, May (1991) 369-376.
93. SARNA T., FRONCISZ W. and HYDE J. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **202-1**, Jun (1980) 304-313.
94. MANGRICH A. S., LERMEN A. W., SANTOS E. J., GOMES R. C., COELHO R. R. R., LINHARES L. F. and SENESI N., *Biol. Fertil Soils*, **26** (1998) 341-345.
95. MOORHEAD E. G. and SUTIN N., *Inorg. Chem.*, **5** (1966) 1866.
96. McPHAIL D.B. and GOODMAN B. A., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **83-12** (1987) 3627.
97. BOUCHER L. J., TYNAN E. C. And YEN T. F., **Electron spin Resonance of Metal Complexes**, New York: Plenum Press (1969)11-130.
98. CALLAHAN K. P. and DURAND P. J., *Inorg. Chem.*, **19** (1980) 3211-3217.
99. BRAMMAN P. F., LUND T. and RAYYNOR J. B., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1975) 45-50.

100. MANGRICH A. S. and VUGMAN N. V., *Sci. Tot. Environ.*, **75** (1988) 235-241.
101. MARTINI G., OTTAVIANI M. F. and SERAVALIL G. L., *J Phys. Chem.*, **79-16** (1975) 1716.
102. REEDER R. R. and RIEGER P. H. , *Inorg. Chem.*, **10** (1971) 1258-1264.
103. ROSEI M. A., MOSCA L. and GALLUZZI F., *Synthetic Metals* **76** (1996) 331-335.
104. CHEN Y., SENESI N. and SCHNITZER M., *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **41**(1977) 352-358.
105. KONONOVA M. M., *Soil organic matter*, Oxford: Pergamon Press (1966) 102.
106. BAES A. U. and BLOOM P. R., *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **54** (1990) 1248-1254.
107. PAIM S., LINHARES L. F., MANGRICH A. S. and MARTIN J. P., *Biol. Fertil. Soil.*, **10** (1990) 72-76.
108. BRAVARD S. and RIGHI D., *Geoderma*, **48** (1991) 151-162.