

JÚLIO CÉSAR PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE MELANINAS SINTETIZADAS POR OXIDAÇÃO
QUÍMICA E ELETROQUÍMICA DA
[3-(3,4-dihidroxifenil)-l-alanina]**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química, Curso de Pós-graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salvio Mangrich

Co-orientadora: Dra. Cláudia E. B. Marino

CURITIBA
2005

À minha esposa Meire, aos meus pais Jailson e Brandina aos meus irmãos Marcos, Márcio e Francine, a todos meus familiares e verdadeiros amigos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus que me deu vida e proveu força para concluir este trabalho.

À minha esposa por ter me apoiado e exortado a nunca desistir dos meus objetivos e alvos, além de proporcionar meus melhores momentos na vida.

Aos meus pais que, desde meu nascimento, orientaram-me a ser digno e confiável, garantiram boa instrução, ensinaram-me a ter perseverança e me deram o maior tesouro na vida: o amor.

Aos meus três irmãos que, mesmo vivendo distante (saudades!!!) sempre me deram orgulho de seus feitos.

Ao Prof. Mangrich pela orientação acadêmica, pela paciência e pelo exemplo de vida.

À Dra. Cláudia pelo auxílio com as análises eletroquímicas, impedância e sugestões.

Ao Prof. Ney Matoso e equipe pelo auxílio nas análises microscópicas e interpretações.

Aos meus familiares: avós, tios, primos, sogros e cunhados por depositarem total confiança em mim.

Aos meus amigos de pesquisa: Rodrigão, Katita, Betânia, Fábio, Marcão (Careca), Zé Luiz, Tati, Ademar, Cris, Elisete, Jennifer e Araí que sempre estiveram dando apoio técnico científico, bem como os bons momentos de descontração.

Aos Profs. Fábio Nunes, Iara Messerschmidt, Jaísa Fernandes e Ana Mercê pela orientação e sugestões durante a iniciação científica e mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Química e da biblioteca.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
ABREVIACÕES.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES	4
1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS MELANINAS.....	7
1.3 PROPRIEDADES DA 3-(3,4-dihidroxifenil)-l-alanina – L-DOPA.....	8
1.4 OBJETIVOS	12
1.5 TECNICAS ANALÍTICAS	13
1.5.1 ELETROQUÍMICA.....	13
1.5.1.2. VOLTAMETRIA CÍCLICA	13
1.5.1.2 CRONOAMPEROMETRIA (CA)	14
1.5.2 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (EPR)	14
1.5.3 ESPECTROELETROQUÍMICA DE EPR	23
1.5.4 ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS).....	23
1.5.5 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)	25
1.5.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS –X (DRX)	26
1.5.7 MÉTODOS MICROSCÓPICOS	27
1.5.8 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETRÔNICA (EIE).....	29
1.5.9 O ESPAÇO DOS NÚMEROS COMPLEXOS E SUAS UTILIZAÇÕES... 30	
CAPÍTULO 2	36
2.1 MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.2 SÍNTESE DAS MELANINAS	38
PARTE I – SÍNTESE QUÍMICA E ELETROQUÍMICA DE MELANINAS	39

2.3 METODOLOGIA DE SÍNTESE.....	39
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – Parte I	40
2.4.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA (VC).....	40
2.4.2 ESPECTROELETROQUÍMICA DE EPR	43
2.4.3 ULTRAVIOLETA VISÍVEL DAS AMOSTRAS EM ESTADO SÓLIDO	45
2.4.3 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)	46
CAPÍTULO 3	49
PARTE II – SÍNTESE ELETROQUÍMICA COM VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE L-DOPA	49
3.1 METODOLOGIA DE SÍNTESE.....	49
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – Parte II	50
3.2.1 A INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE L-DOPA NO SISTEMA ELETROQUÍMICO.....	50
3.2.2 ESPECTROELETROQUÍMICA DE EPR	52
3.2.3 ULTRAVIOLETA VISÍVEL DAS AMOSTRAS EM ESTADO SÓLIDO	56
3.2.4 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	58
3.2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	61
3.2.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	69
3.2.7 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE)	71
CAPÍTULO 4	78
4. CONCLUSÕES.....	78
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (a) Estrutura tridimensional da 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina (L-dpa) e (b) fórmula estrutural da Dopa, composto modelo utilizado na síntese oxidativa de melaninas. 2
- Figura 2. – Mecanismo de oxidação da tirosina à melanina – Melanogênese..... 3
- Figura 3. Dímeros encontrados por CLAE com substituições nas posições 4- e 7- confirmadas por RMN H^1 e C-13, que permitem a formação de melaninas com estruturas morfológicas distintas..... 10
- Figura 4. Equilíbrio químico entre os intermediários quinônicos e seus respectivos radicais livres formados durante o processo de melanogênese..... 11
- Figura 5. Espectros típicos de EPR na forma integrada(I) ou de derivada primeira (dI/dH) – obtidos por simulação a partir do software SIMFONIA®..... 17
- Figura 6. Equilíbrio de oxi-redução entre quinona e bi-fenol, tendo como intermediário estável o radical livre orgânico (RLO) semiquinona. 19
- Figura 7. Espectro de EPR simulado de radical livre orgânico (RLO)..... 19
- Figura 8. Perfil potenciodinâmico da L-dopa (10 mg) em tampão $KH_2PO_4/NaOH$ em pH = 6,8. Intervalo de potencial $-0,6$ a $+1$ V e velocidade de varredura igual a 100 $mV s^{-1}$ 42
- Figura 9. Perfil potenciodinâmico da L-dopa em tampão fosfato, pH = 7,0. Velocidade de varredura 100 $mv s^{-1}$. Registrado por Stern e colaboradores, 1988..... 42
- Figura 10. Espectroetetroquímica de EPR em 1ª Derivada da Absorbância da L-dopa em faixa de campo magnético de 5000 G, centrada em 2550 G. Potencial elétrico fixado em $+617$ mV pela cronoamperometria. 43
- Figura 11. Espectroscopia de EPR em faixa de campo magnético de 50 G, campo central de 3405 G, das ms's. Sinal de RLO típico de radical o-benzesemiquinona em $g \approx 2,0035$ 44
- Figura 12. Espectroscopia eletrônica em estado sólido em reflectância das melaninas sintetizadas ao ar (msar) e por via eletroquímica (ms1)..... 46
- Figura 13. Espectroscopia de infravermelho em Transmitância das melaninas sintetizadas ao ar (msar) e eletroquimicamente (mse)..... 47
- Figura 14. Perfil potenciodinâmico de obtenção de melaninas em tampão $KH_2PO_4/NaOH$ em pH = 6,8 num intervalo de potencial de $-0,6$ V a $+1,0$ V (vs Ag/AgCl) e velocidade de varredura igual a 100 $mV s^{-1}$. As concentrações de L-dopa foram: a – 5 mg, b – 10 mg, c – 30 mg e d – 50 mg por 10 mL da solução do eletrólito..... 51
- Figura 15. Correlação da concentração de L-dopa e as quantidades de carga em solução e o n° spins g^{-1} 54

Figura 16. a) Espectroeletróquímica de EPR em banda X (9,5 GHz) das melaninas durante a oxidação eletroquímica em célula <i>flat</i> , em campo magnético de 5000 G, a 300 K.....	55
Figura 17. Espectroscopia de EPR das amostras sólidas de melaninas em campo magnético de 50 G, a 300 K.....	55
Figura 18. Espectro de UV das melaninas em estado sólido. Modo de Reflectância. Intervalo de 300 a 800 nm.....	56
Figura 19. Espectroscopia de infravermelho do composto de partida (L-Dopa) em comparação com as melaninas química (msar) e eletroquímica (ms1) geradas a partir de sua oxidação.	58
Figura 20. das melaninas eletroquimicamente sintetizadas- Processo de melanização. Aumento dos sinais típicos de grupamentos -COO^- e C-O nas amostras com maior teor de L-dopa no sistema oxidativo.....	59
Figura 21. Visualização dos produtos obtidos a partir dos processos oxidativos da L-dopa à melanina; a) msar e mse respectivamente;	60
Figura 22. msar, ms05, ms10 (em cima), ms30 e ms50 mg (em baixo), da esquerda para a direita. Formação de produtos com conformações distintas entre si oriundas do processo oxidativo e da variação de concentração.....	61
Figura 23 a) MET da melanina sintetizada ao ar (msar) aumentada 6.000 vezes; b) msar aumentada 150.000 vezes.....	64
Figura 24. b) MET da melanina sintetizada ao ar (msar) aumentada 150.000 vezes..	64
Figura 25. a) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms05 aumentada 6.000 vezes	65
Figura 26. b) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms05 aumentada 150.000 vezes.....	65
Figura 27. a) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms10 aumentada 6.000 vezes.....	66
Figura 28. b) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms10 aumentada 150.000 vezes.....	66
Figura 29. a) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms30 aumentada 6.000 vezes.....	67
Figura 30. b) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms30 aumentada 150.000 vezes.....	67
Figura 31. a) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms50 aumentada 150.000 vezes.....	68
Figura 32. b) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms50 aumentada 6.000 vezes.....	68

- Figura 33. c) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms50 aumentada 30.000 vezes.....69
- Figura 34. Difractogramas de Raios-X das melaninas sintéticas obtidos utilizando-se com radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), com tensão e corrente de fonte de 40 KV e 40mA, varrendo 2θ de 10° a 60° 70
- Figura 35. Impedância eletroquímica para o sistema Pt/melanina/tampão KH₂PO₄/NaOH em pH = 6,8. Potencial de polarização igual a 617 mV e amplitude igual a 25 mV. (A) Diagrama de Bode: $\log |Z|$ vs \log frequência; (B) Diagrama de Bode: ângulo de fase (θ) vs \log da f..... 72
- Figura 36. Espectros de impedância eletroquímica para o sistema Pt/melanina/tampão KH₂PO₄/NaOH em pH = 6,8. Potencial de polarização igual a 617 mV, sob amplitude igual a 25 mV. Diagrama de Nyquist ou no plano complexo para diferentes concentrações de L-dopa no sistema..... 74
- Figura 37. Espectros de impedância eletroquímica para o sistema Pt/melanina/tampão KH₂PO₄/NaOH em pH = 6,8 medidas no potencial de polarização igual a 617 mV, sob amplitude igual a 25 mV. Diagrama de Nyquist ou no plano complexo comparando-se os processos oxidativos..... 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação das cargas anódicas geradas em cada síntese eletroquímica, a partir da variação da concentração de L-dopa no sistema.....	52
Tabela 2. Teor de spins g-1 presentes nas melaninas sintetizadas eletroquimicamente.....	53
Tabela 3. Razão E4/E6 das melaninas sintetizadas eletroquimicamente.....	57
Tabela 4. Correlação entre informações da MET vs EIE.....	76

ABREVIACÕES

L-dopa - 3-(3,4-dihidroxifenil-*l*-alanina)

msar – melanina sintetizada quimicamente ao ar – 10 mg de L-dopa /10 mL de solução eletrolítica

ms1 – melanina sintetizada eletroquimicamente com 10 mg de L-dopa / 10 mL de solução eletrolítica

ms05– melanina sintetizada eletroquimicamente com 5 mg de L-dopa / 10 mL de solução eletrolítica

ms10– melanina sintetizada eletroquimicamente com 10 mg de L-dopa / 10 mL de solução eletrolítica

ms30– melanina sintetizada eletroquimicamente com 30 mg de L-dopa / 10 mL de solução eletrolítica

ms50– melanina sintetizada eletroquimicamente com 50 mg de L-dopa / 10 de solução eletrolítica

DHI – 5,6-di-hidroxi-indol

DHICA – ácido-5,6-di-hidroxi-indol-2-carboxílico

SH – substâncias húmicas

VC – voltametria cíclica

CA – cronoamperometria

UV-VIS – Ultravioleta visível

IVTF – Infravermelho com transformada de Fourier

EPR – Ressonância paramagnética eletrônica

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

DRX – Difração de raios-X

EIE – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

RLO – Radical livre orgânico

MO – Matéria orgânica

Log (1/R) – logaritmo do inverso da reflectância

Log f – logaritmo da frequência de onda

E_4/E_6 – razão entre as absorvâncias dos comprimentos de onda em 465 e 665 nm

Z – Impedância

τ – tempo de relaxação

θ - ângulo de fase

RESUMO

Melanina compõe uma classe de pigmentos na natureza que pode ser encontrada na pele, nos pêlos, olhos e atuam também nos mecanismos de fotoproteção celular dos seres vivos. Nos solos, este pigmento é considerado um importante precursor para a formação das substâncias húmicas por serem macromoléculas altamente recalcitrantes. As melaninas podem ser obtidas a partir da oxidação química ou eletroquímica de compostos que tenham as funções catecol e amina, tais como a dopamina ou a L-dopa. Estudos recentes têm buscado esclarecer o mecanismo envolvido no processo de polimerização oxidativa dos intermediários indólicos gerados durante a síntese, pois esta é a chave da melanogênese. O objetivo do trabalho foi determinar qual processo mais eficiente na oxidação da 3-(3,4-dihidroxifenil-*l*-alanina) - L-dopa - à melanina durante a síntese e avaliar como a variação do teor deste composto no sistema influencia a formação do produto final. Na primeira etapa, foram obtidas melaninas a partir da oxidação da L-dopa por via química e via eletroquímica. Os resultados das análises evidenciaram que oxidação por via eletroquímica foi mais eficiente. Em seqüência, sintetizou-se novas melaninas por oxidação eletroquímica variando-se as concentrações de L-dopa no sistema. Foram caracterizadas por voltametria cíclica, espectroscopias de UV-VIS, IVTF e EPR, por MET, DRX e de impedância eletroquímica (EIE). O mecanismo de formação dos intermediários indólicos foi estudado por espectroeletroquímica de EPR (eletroquímica simultânea a espectroscopia de EPR). A síntese mostrou-se eficiente resultando num produto que exhibe propriedades de um sistema heterogêneo contendo uma mistura de espécies quinônicas e espécies intermediárias, com alta massa molecular, boa absorção de radiação ultravioleta e de microondas e morfologias distintas entre si, que variam de formatos de redes condensadas a bastonetes.

ABSTRACT

Melanins constitute a common class of pigment in nature. They are found in skin, hair, eyes and act in cell-photoprotection mechanisms on living beings. In soils, these pigments are thought to be an important forerunner for humic substances formation due its less degradation by microorganisms. Melanins can be obtained from catecholamine derived substances, such as dopamine and L-dopa. Recent studies have tried to explain the mechanism involved in oxidative polymerization process of the indolic intermediates formed during that synthesis, because it can be the melanogenesis key. The subjects of this work were to determine which these two oxidative process would be more efficient on 3-(3,4-di-hydroxyphenyl)-*l*-alanine oxidation to melanin and to evaluate how the variation's grade of L-dopa into the systems could affect the final product formation. On the first step, melanins were obtained by chemical and electrochemical oxidation pathways. The analytical results have shown the electrochemical pathway was the more efficient oxidation process. Secondly, we synthetized fresh melanins by electrochemical pathway increasing the grade of L-dopa in the systems. These samples were characterized by cyclic voltammetry, UV-visible spectroscopy, FT-IR and EPR, as well as TEM, XRD and EIS. The intermediate-indolic formation process was studied by EPR spectroelectrochemistry. Electrochemical synthesis showed to be an efficient oxidative process to obtain melanins that exhibited properties of a heterogeneous system containing a mixture of quinones and other intermediates species, with high molecular mass, high absorption of ultraviolet radiation and microwaves, as well as morphology distinguished, whose variate from condensed-nets to sticks.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Melanina é uma importante classe de pigmentos presente em animais e vegetais que desempenha uma gama de atividades biológicas. Este composto, considerado um polímero heterogêneo, designa a tonalidade da cor da pele, pêlos e membrana conjuntiva do olho [CANTAROW, 1968, p. 644], protege os tecidos vivos contra lesões fotoquímicas, permite ligação a medicamentos e íons de metais pesados, incluindo radionuclídeos [GOLOUNIN; SELYUTIN, 1996]. Age como radioprotetor de organismos vivos contra longas exposições à radiação [CLANCY; SIMON, 2001], são de interesse às indústrias de cosméticos como antioxidantes [KALKA, et al, 2000; SICHEL, et al, 1991] e atua nos mecanismos de fotoproteção celular e em áreas de intensa atividade nervosa, como por exemplo, no cérebro [STAINSACK, 1998]. *In vivo* as melaninas estão geralmente associadas a proteínas e lípidios [HEGEDUS, 2000]. A melanina se forma em célula especializada, o melanócito, encontrado nas camadas mais profundas da epiderme. É substância de elevado peso molecular, relativamente insolúvel, produzida em forma de bastões (escuro) e esferas (claras). A intensidade da cor depende do grau de oxidação, da quantidade de melanina, de sua dispersão e forma de agregação, como grânulos ou bastonetes.

Naturalmente, pela enzima tirosinase, pertencente à família da *o*-difenoil-oxidase, que contém cobre, pode-se oxidar a tirosina a dopaquinona, e esta à melanina. As melaninas também podem ser obtidas por oxidação química da

dopamina ou da L-dopa, resultando num produto de cor escura com propriedades similares às das melaninas naturais [CANTAROW, 1968 p. 833].

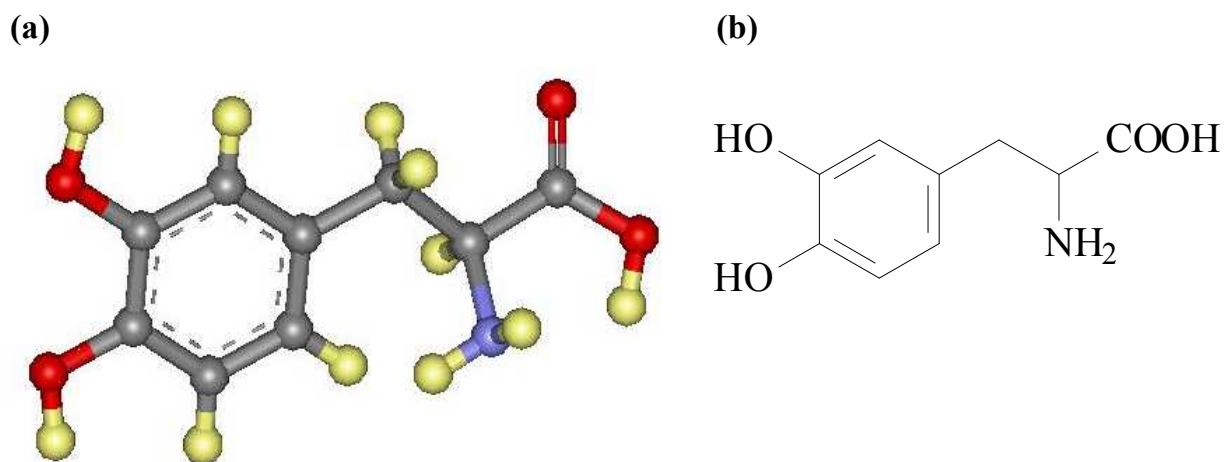


Figura 1. (a) Estrutura tridimensional da 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina (L-dopa) e (b) fórmula estrutural da Dopa, composto modelo utilizado na síntese oxidativa de melaninas.

Devido à presença dos grupos quinônicos as melaninas podem apresentar-se nas formas oxidadas ou reduzidas, passando pelas estruturas de semiquinonas responsáveis pelo espectro de EPR característico [WILCZOK, et al., 1984]. Este pigmento, que varia de pardo (reduzido) a preto escuro (oxidado), é resultante da polimerização de produtos de oxidação de moléculas que tenham função catecolamina, como a dopamina e a L-dopa [STAINSACK, et al., 2003].

A melanogênese nos organismos vivos dá-se da seguinte forma: hidroxilação da tirosina, na presença da enzima tirosinase, com formação da L-dopa [3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina], que é por sua vez oxidada pelo oxigênio do ar a um radical livre orgânico, em seguida há um rearranjo formando a dopaquinona, que é ciclizada e posteriormente, novamente oxidada, transformando-se em um pigmento vermelho, o dopacromo [ROBINSON; IWUOHA, SMYTH, 1998]. Este é espontaneamente descarboxilado formando dois intermediários indólicos: o 5,6- di-hidroxi-indol ou o ácido-5,6-di-hidroxi-indol-2-carboxílico, que se oxidam a quinona correspondente e,

por fim, a polimerização desta última produz a melanina [PEZELLA; NAPOLITANO; d'ISCHIA; PROTA, 1996; ROSEI, 1996; NICOLAUS, 1968].

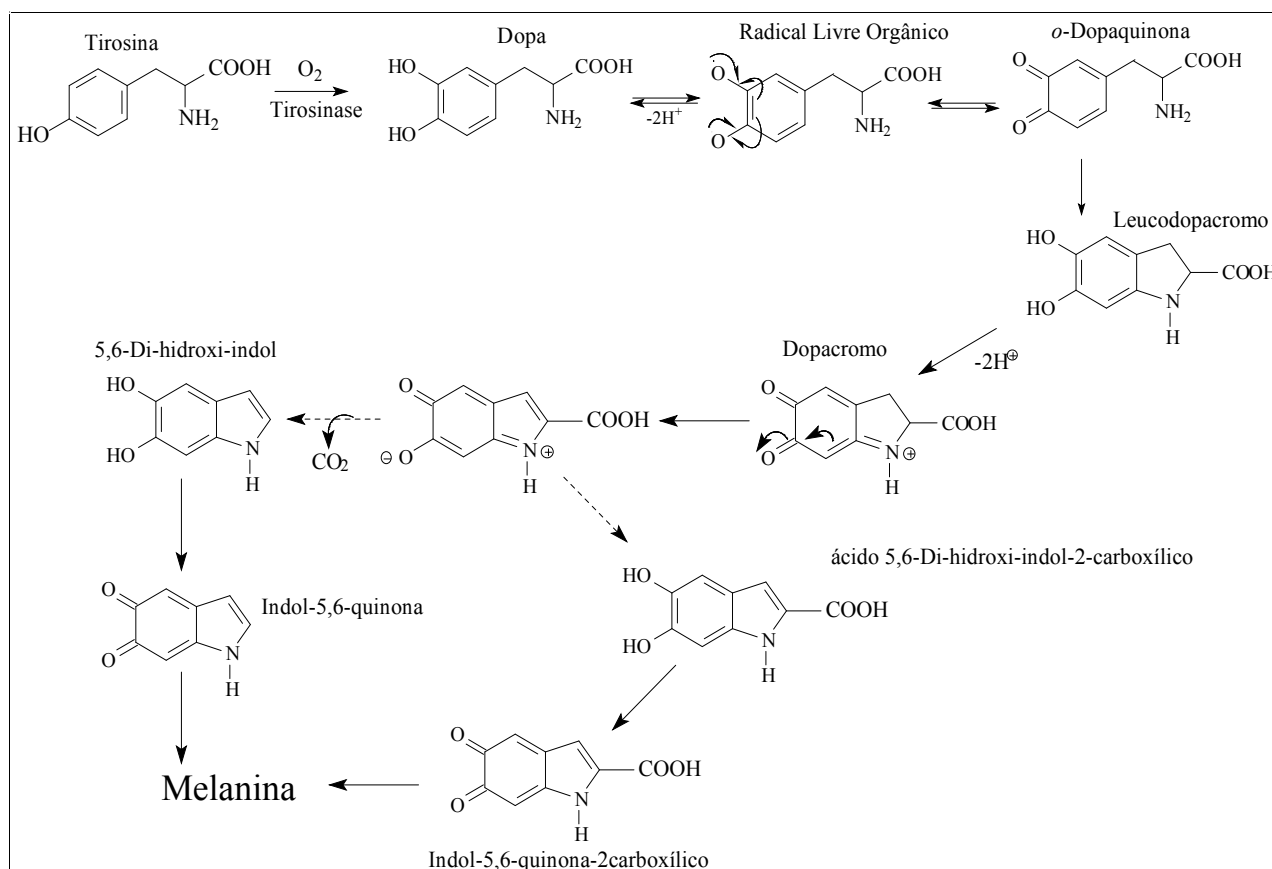


Figura 2. – Mecanismo de oxidação da tirosina à melanina – Melanogênese.

Nos solos, apresentam-se como estruturas supramoleculares resistentes à degradação por microorganismos, podendo ser consideradas precursoras das substâncias húmicas [PICCOLO, 1996; PAIM, et al., 1990; GOMES, et al., 1996; MANGRICH, et al, 1998; STAINSACK, et al., 2003].

As propriedades químicas das melaninas são: alto peso molecular, descoloração por agentes oxidantes, insolubilidade em solventes orgânicos, que as tornam difíceis de analisar físico-quimicamente. Contudo, o paramagnetismo estável dos biopolímeros de melaninas associados aos radicais livres do tipo semiquinonas permite a investigação destes polímeros por EPR [WILCZOCK, et al. 1984; CORRADINI, et al., 1986; VUGMAN, et al, 1988; MANGRICH, et al, 1998].

Anteriormente, as melaninas eram consideradas compostos quimicamente estáveis por não serem alteradas durante hidrólise ácida ou básica. Sua baixa reatividade deve-se à baixa solubilidade e, conseqüentemente, baixa velocidade de reação heterogênea. Atualmente, as melaninas são consideradas como estruturas supramoleculares contendo uma mistura de unidades de 5,6-dihidroxi-indol e ácido-5,6-di-hidroxi-indol-2-carboxílico em diferentes níveis de oxidação e para um menor grau de unidades pirrol unidas aleatoriamente por ligações C-C. Em outras palavras, melaninas contém polímero a base de polihidroxi-indol em vários graus de oxidação, formando uma estrutura supramolecular complexa [CARBANES, et al., 1987].

1.1 ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES

As interações intermoleculares entre várias unidades monoméricas heterogêneas presentes num sistema permitem a formação de uma estrutura maior e mais complexa. Este tipo de arranjo molecular, nos solos, favorece a formação de macromoléculas altamente recalcitrantes. Melaninas são constituídas por várias destas unidades monoméricas em diferentes estados de oxidação, por isso, são consideradas precursoras das substâncias húmicas (SH). O produto final deste rearranjo molecular é denominado estrutura supramolecular. Dentre as muitas novas teorias que surgiram na literatura nos últimos anos, sobre substâncias húmicas está a teoria das estruturas supramoleculares [MAIA, 2003].

A “química supramolecular” é definida como a “química dos arranjos moleculares e das ligações intermoleculares” e envolve entidades de grande complexidade que resultam da associação de espécies químicas unidas por forças intermoleculares. Forças essas que levam a formação de estruturas supramoleculares que podem ser ligações secundárias, ligações por pontes de hidrogênio, interações

doador-aceptor fracas [SUPRA.html, 2003]. Tal estruturação pode ser estudada pela criação de modelos matemáticos, que são capazes de representar o agrupamento entre estes monômeros. A partir dos vários monômeros que são gerados durante a melanosíntese, o estudo por modelagem conformacional mostra que estas espécies unidas por ligações fracas têm maior liberdade de aglutinação, permitindo formarem estruturas maiores e estáveis, que podem ser classificadas como supramoleculares [SEIN Jr, et al., 1999]. Desta forma, são classificadas como supramoléculas aquelas espécies em que as propriedades eletrônicas das subunidades são perturbadas apenas devido à formação das ligações entre elas. As interações intermoleculares podem ser muito pronunciadas, como no caso das espécies formadas pelo empilhamento de moléculas de porfirinas e ftalocianinas, que apresentam condutividade elétrica similar à dos polímeros dopados com metais, sugerindo a presença de um sistema deslocalizado por toda a extensão da pilha. A química supramolecular usa uma abordagem centrada na associação de moléculas, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade [ARAKI; TOMA, 2002]. A formação de estruturas supramoleculares é um processo espontâneo, não ocorre em etapas e envolve o processo conhecido como “reconhecimento molecular”. Automontagem ou “self-assembly” é o principal processo espontâneo que confere ordem aos materiais moleculares. O processo de automontagem molecular envolve interações não covalentes e a construção de supramoléculas é controlada termodinamicamente, levando a estruturas finitas (tais como dímeros unidos por ligações de hidrogênio) ou a supermoléculas extendidas (cadeias lineares, planos bidimensionais ou redes tridimensionais) [MOORE, 1996].

Em compostos supramoleculares podemos distinguir três níveis de organização estrutural: a estrutura primária (no nível molecular); a estrutura secundária, que consiste da associação de moléculas (ou seja, entidades supramoleculares que

resultam das interações intermoleculares); e a estrutura terciária, isto é, o empacotamento cristalino tridimensional das entidades supramoleculares [LEHN, 2001]. A química supramolecular vem se desenvolvendo a partir dos avanços de conhecimento sobre a química da funcionalidade de espécies bioquímicas e os novos materiais produzidos por meio deste conhecimento são à base do desenvolvimento da engenharia molecular e da nanotecnologia.

As melaninas, assim como as substâncias húmicas (SH) são constituídas de moléculas pequenas e heterogêneas (~600 Da), de várias origens e auto-organizadas em conformações supramoleculares (~100.000 Da). Estas superestruturas não estariam associadas por ligações covalentes, mas seriam estabilizadas somente por forças fracas tais como interações hidrofóbicas (van der Waals, π - π e ligações CH- π) e ligações por pontes de hidrogênio, estas últimas sendo progressivamente mais importantes em valores crescentes de pH. Nas organizações húmicas supramoleculares, as forças intermoleculares determinariam a estrutura conformacional das SH e a complexidade das interações múltiplas não covalentes controlariam sua reatividades ambientais [PICCOLO, 2001].

A definição dada por Lehn pode então ser bem aplicada às melaninas: “conjunto supramolecular formado por entidades que resultam da associação espontânea de um grande número indefinido de componentes em uma fase específica, tendo organização microscópica mais ou menos bem-definida e características macroscópicas dependendo de sua natureza (tais como filmes, membranas, vesículas, micelas, fases mesomórficas e estruturas em estado sólido)” [LEHN, 2001].

A associação das melaninas com a fração inorgânica mineral do solo, especialmente com as argilas, poderia desempenhar um papel fundamental no

desenvolvimento desta funcionalidade e as argilas poderiam funcionar como verdadeiras matrizes de organização molecular do solo.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS MELANINAS

Numerosos estudos têm confirmado que estes pigmentos desempenham uma importante função na incorporação de drogas ao cabelo [POTSCH, et al, 1997; JOSEPH, et al, 1996; SLAWSON, et al, 1996; GYGI, et al, 1997; UEMATSU, et al, 1992], determinam a coloração da pele e atuam em regiões de alta atividade nervosa como, na retina ocular e no cérebro [ZEISE, et al, 1995; HILL, 1992; SARNA, 1992)]. Existem três tipos de melaninas: (i) as eumelaninas, (ii) as feomelaninas e (iii) as alomelaninas.

As melaninas, *in vivo* geralmente não são homopolímeros, ou seja, são unidades heteropoliméricas estruturadas em vários blocos de eumelaninas e feomelaninas. As eumelaninas (i) são as mais comuns encontradas nos animais e solos. São compostos formados a partir da oxidação da tirosina, dopa, dopamina ou outras catecolaminas, via reação entre os derivados indólicos de unidades 5,6-dihidroxi-indol (DHI) e ácido 5,6-di-hidróxi-indol-2-carboxílico (DHICA) [CLANCY, SIMON, 2001; NICOLAUS, 1968]. Apresentam-se geralmente como pigmentos de tonalidade negra a marrom, insolúveis, responsáveis pela coloração escura dos cabelos e pele [BORGES, et al, 2001; ITO, WAKAMATSU, 1998; STAINSACK, 1998; HUNT, et al, 1995; THODY, et al, 1991].

Feomelaninas (ii) constituem os pigmentos mais claros, de tonalidades que variam de amarelo a vermelho e apresentam maior solubilidade. São obtidas a partir de reações envolvendo cisteína e glutatona, geralmente estruturadas em monômeros benzotiazonas [BORGES et al, 2001; ITO, 1993; SEALY, et al, 1980].

Mais comuns no reino vegetal estão as alomelaninas (iii), que são formadas durante a “polimerização” oxidativa de substratos fenólicos, como catecol e outros polihidroxiaromáticos na presença da enzima poli-feniloxidas [MAYER, HAREL, 1979; STAINSACK, 1998].

1.3 PROPRIEDADES DA 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina – L-DOPA

A 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina, mais conhecida como L-DOPA é um composto branco, sem odor, pó microcristalino que é rapidamente oxidado pelo oxigênio atmosférico [MARCOLINO-JUNIOR, et al, 2001; GILMAN, et al, 1991]. É o precursor do neurotransmissor dopamina na melanogênese [KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988] de importância bioquímica e de grande valor farmacológico, visto que é extensivamente aplicado no tratamento do Mal de Parkinson [LINERT, W.; JAMESON, G.N.L., 2000; LINERT, W. et al, 1996; LYYTINEN, et al, 2001; WERNER, et al, 2001; OBESO, et al, 2000]. Ligantes catecolamínicos, como a L-dopa e dopamina são de interesse particular, pois contém dois sítios bidentados quelantes que não podem complexar simultaneamente com um mesmo íon metálico [EMANUEL; BHATTACHARYA, 1987].

Alguns estudos têm fornecido os potenciais de oxidação e redução da L-dopa, composto modelo oxidado durante a síntese de melaninas por oxidação eletroquímica [ZHANG; WANG; ZHOU, 1992; KUMARASWAMY, et al, 2000; RUBIANES, RIVAS, 2001; HEFTI; MELAMED, 1981; GARCÍA, et al., 2001]. Cantarow e colaboradores citam também que a maior parte dos intermediários quinonóides pode reagir de maneira não enzimática com os intermediários polifenólicos, reduzindo os primeiros e oxidando os segundos, permitindo autocatálise complexa em toda a cadeia de reações [CANTAROW, 1968].

Métodos químicos, eletroquímicos e espectrocópicos são utilizados para caracterizar estruturas supramoleculares como as melaninas. O estudo das propriedades dos materiais por meio de espectroscopia é fundamental, pois a interação da radiação eletromagnética com a matéria fornece informações quanto à natureza microscópica da matéria e da qual especula-se e formula-se modelos [SEIN Jr, et al, 1999; JEZIERSKI, et al, 2000).

Durante o processo de síntese, a L-dopa sofre várias transformações e os metabólitos intermediários formados possuem vários e distintos estados de oxidação. De acordo com Pezella e colaboradores a melanina é resultado da junção de monômeros dos intermediários 5,6-dihidróxi-indol, consistindo principalmente do processo de acoplamento seqüencial através de ligações 2,4'- e 2,7'-. Contudo, sabe-se da formação do intermediário ácido-5,6-dihidróxi-indol-2-carboxílico. Este tem a tendência de “polimerizar” pelas posições 4- e 7-. Estudos cromatográficos (CLAE), confirmaram tais argumentos a partir do isolamento de vários dímeros ligados nas posições 4,4-, 4,7- e 7,7-. As substituições nos anéis aromáticos foram correlacionadas a análises espectrais de RMN do H^1 , que revelaram singletos sobrepostos em δ 6,80 e 6,81 e RMN de C-13, que apresentaram picos em δ 95,53 e 96,84, indicando substituições no C-7, como apresentados na Figura 3 [PEZELLA, 1996]. Alguns outros dímeros possíveis seriam ligados pelas posições 3,4- e 3,7-, 3,3' e 7,7', que ocupariam uma camada acima do anel aromático. Estas variações de ligações entre as espécies possibilitam a formação de melaninas com diversificadas conformações estruturais e morfológicas.

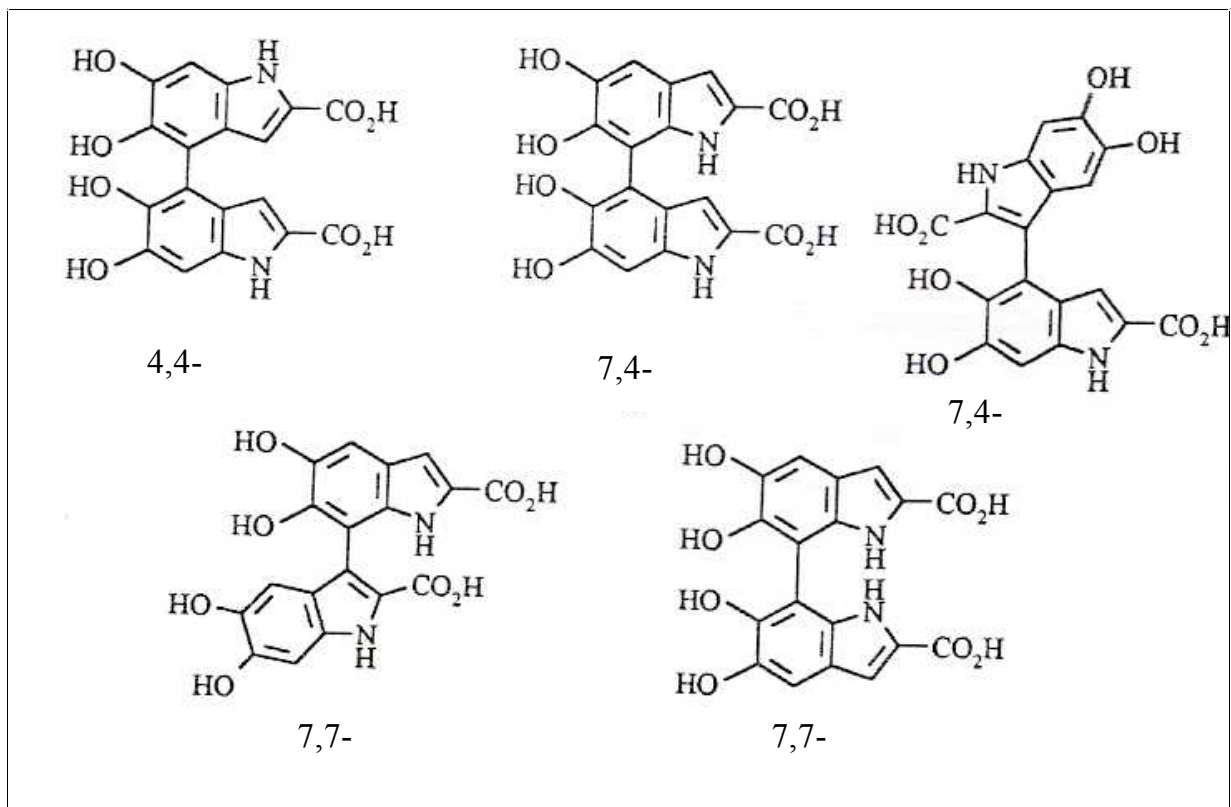


Figura 3. Dímeros encontrados por CLAE com substituições nas posições 4- e 7- confirmadas por RMN H^1 e C-13, que permitem a formação de melaninas com estruturas morfológicas distintas.

As substâncias húmicas são de grande importância na agricultura devido a sua utilização na fertilização natural do solo. Sabe-se que a melanina é um dos constituintes do solo, precursora das substâncias húmicas. Tendo-se modelos da estruturas possíveis para tais compostos supramoleculares haverá informações mais contundentes com respeito à produção de novos materiais com habilidades de absorção de radiação eficientes [BATY, et al., 1997], bem como o estudo de fertilizantes potencialmente nutritivos que favoreçam o crescimento das plantas [RESZKA, K.J., CHIGNELL, 1993; NEWMAN; KOLTER, 2000], e assim, esclarecer o mecanismo de melanização, principalmente, o comportamento dos radicais livres (RLO) formados durante a biossíntese [TALBI, et al, 2001; Cl, et al, 1989; PORTELA; STOPPANI, 1996].

Existem evidências de que há um aumento do número de radicais livres formados em *p*-quinonas em compostos do tipo catecol (dopamina, L-dopa, etc)

quando submetidas à redução e/ou oxidação destes, ocasionando a polimerização oxidativa dos intermediários formados. As substâncias húmicas (SH) estabilizam os radicais orgânicos (principalmente semiquinonas) na sua matriz macromolecular. Portanto, o fator-g e a concentração dos radicais estabilizados podem ser utilizados com fonte de informação no que tange a processos físico-químicos no meio ambiente [JEZIERSKI, et al, 1993; GOLAB, et al, 1995; VUGMAN, et al, 1988]. Estudados por espectroeletróquímica de EPR mostram que melaninas possuem intermediários quinônicos e hidroquinônicos de L-dopa e 5,6-dihidroxi-indol em equilíbrio com seus respectivos RLO's gerados durante a formação desta estrutura (Figura 4).

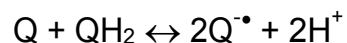


Figura 4. Equilíbrio químico entre os intermediários quinônicos e seus respectivos radicais livres formados durante o processo de melanogênese.

Outras técnicas analíticas como: eletroquímica para estudos farmacocinéticos [LUNTE; OSHEA, 1994; NAKAZATO; AKIYAMA, 1999], cromatografia [PEZELLA, et al 1996; RIZZO, et al, 1996], eletroquímicos [MERCÊ, et al, 1998; FERRAZ, et al, 2001] e espectroeletróquímicos [TANG; WU; WANG, 2001], eletroforese capilar [O'SHEA, et al, 1992], injeção em fluxo [FATIBELLO-FILHO, et al, 2001], RMN de C-13 [ADHYARU, et al, 2003] e ESCA [STERN, et al, 1988] têm sido empregadas com o fim de determinar a estrutura e o mecanismo envolvido na formação de melaninas, e estudos morfológicos têm sido empregados a fim de avaliar o modo de agregação destas estruturas complexas [CLANCY, et al, 2000; CLANCY; SIMON, 2001].

1.4 OBJETIVOS

Neste trabalho foram obtidas melaninas por meio de sínteses química e eletroquímica a partir da oxidação da 3-(3,4-dihidroxifenil)-*l*-alanina, com o objetivo de se estudar a formação e estruturação orgânica dos solos a partir de modelos sintéticos, bem como, avaliar qual destes processos oxidativos é mais eficiente na formação de estruturas supramoleculares e entender como a cinética das unidades indólicas *in bulk* alteram a morfologia do produto final. Buscou-se a compreensão do mecanismo de formação dos radicais livre *o*-semiquinona durante a melanização como importante também para possíveis aplicações destas melaninas nas indústrias de cosméticos, aeronáutica e outros. A síntese foi feita em pH fisiológico devido ser a condição em que estes compostos são formados na natureza.

Com o objetivo de avaliar as propriedades químicas e físico-químicas das amostras de melanina, planejou-se utilizar técnicas eletroquímicas de análises, métodos espectroscópicos e microscópicos anteriormente descritos.

1.5 TECNICAS ANALÍTICAS

1.5.1 ELETROQUÍMICA

O termo 'eletroquímica' engloba fenômenos de dois tipos: elétricos e químicos. O processo químico está relacionado a um reagrupamento de partículas carregadas, núcleos atômicos e elétrons. Assim, pode-se estudar o que acontece quando são imersos na solução de eletrólito, eletrodos carregados positiva e negativamente.

1.5.1.2. VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica ou voltametria de varredura linear de potenciais (VVLV) constitui-se em um dos métodos mais adequados para a obtenção de informações sobre a reversibilidade de processos redox, seus potenciais formais, ocorrência ou não de reações acopladas aos processos de transferência de elétrons, bem como sobre a carga envolvida no processo e a reprodutibilidade da superfície. Estas características, e a facilidade nas medidas fazem da voltametria cíclica uma técnica muito útil em diferentes áreas como a eletroquímica, química inorgânica, bioquímica dentre outras [BARD, FAULKNER, 1980]. Esta técnica é caracterizada pela variação linear de potenciais entre o eletrodo de trabalho e o de referência, obtendo-se como resposta uma corrente que flui entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, em função do potencial.

Na voltametria cíclica, é usual partir-se de um potencial inicial (E_i), varrer-se até um potencial final (E_f) mais anódico que E_i e, então, inverter-se o sentido da varredura retornando-se ao potencial inicial. As correntes resultantes dos processos de eletrodo, isto é, de variações na superfície e de reações presentes na interface, são registradas

nos voltamogramas e analisadas por modelos cinéticos e termodinâmicos [BARD, FAULKNER, 1980; EWING, 1969].

Estudos voltamétricos têm sido largamente empregados no estudo de melaninas, pois esta técnica é sensível o suficiente para visualizar as fases durante a transformação, quer por oxidação quer por redução do composto inicial [REIN, et al, 2001; YAVICH, AIRAKSINEN, RIEKKINEN, 1992; RUBIANES, RIVAS, 2001; STERN, et al, 1988].

1.5.1.2 CRONOAMPEROMETRIA (CA)

A cronoamperometria consiste na aplicação de corrente elétrica a um sistema, mantendo-se um potencial fixo controlado, e a resposta da corrente e sua variação durante um intervalo de tempo suficiente para que haja completa redução ou oxidação do composto estudado, pode ser registrada [BRETT, 1993].

1.5.2 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (EPR)

Também conhecida como ressonância do spin eletrônico (ESR), a ressonância paramagnética eletrônica (RPE), em inglês EPR, é o nome dado ao processo de absorção ressonante de microondas por átomos, íons ou moléculas paramagnéticas, com no mínimo um elétron desemparelhado, em presença de um campo magnético estático. A EPR tem uma ampla variedade de aplicações em química, física, biologia, e medicina. Foi descoberta por Zavoiski em 1945. Esta técnica tem por objetivo mapear a distribuição de elétrons desemparelhados em uma molécula, fornecendo várias informações sobre os níveis de energia de sistemas químicos. Informa e comprova a estrutura estática de sistemas sólidos e líquidos, podendo também ser

utilizada no estudo de processos dinâmicos. Os espectrômetros mais comuns trabalham na faixa de 9-10 GHz (banda X). No entanto, o desenvolvimento da eletrônica tem facilitado o aparecimento de espectrômetros trabalhando em faixas de frequências de centenas de MHz até centenas de GHz [LABRSEPR, 1998]. Esta técnica também permite acompanhar o processo de humificação através da determinação da concentração de radicais livres orgânicos (número de spins/ g MO) [SILVA, 2001, GUIMARÃES, 1997].

A EPR é extremamente sensível e sob condições favoráveis o limite de detecção para centros paramagnéticos em SH encontra-se no intervalo de 10^{17} a 10^{18} spins g^{-1} [CHESHIRE, McPHAIL, 1996; GOODMAN; HALL, 1994]. Considerando-se a massa molecular média de 600 g/ 6×10^{23} moléculas, a sensibilidade da espectroscopia de EPR para as SH será da ordem de 10 ppb.

A energia devido à interação do momento magnético do elétron desemparelhado com o campo magnético externo é quantizada e os níveis energéticos são descritos pela relação [MANGRICH, 1998; NOVOTNY, 2002]

$$E = g\mu_B B.m_s \quad \text{Equação 0.1}$$

Onde: E é a energia; g é uma constante de proporcionalidade conhecida como fator g, cujo o valor para o elétron livre g_e é igual a 2,0023; μ_B é o magneton de Bohr para o elétron ($9,2740154 \times 10^{-24}$ J T⁻¹); B é a densidade de fluxo magnético; m_s é o número quântico de spin. Substituindo os números quânticos de spin na equação acima, são obtidos os valores de energia para cada estado ($\pm \frac{1}{2} g\mu_B B$). A separação de energia entre os dois estados será:

$$E = g \mu_B B \quad \text{Equação 0.2}$$

Para um campo magnético de 0,3 T (3000 Gauss) a energia $\Delta E \cong 2 \times 10^{-23}$ J T⁻¹ multiplicada por 0,3 T é igual a 6×10^{-24} J. Como $1,6 \times 10^{-19}$ J é aproximadamente 8000 cm^{-1} , então $E \cong 0,3 \text{ cm}^{-1}$.

Transições de dipolo magnético entre os dois estados de spins ocorrem quando se incide, perpendicularmente ao campo magnético H ($=\mu_B B$), radiação eletromagnética de energia $h\nu$ igual a E , onde h é a constante de Planck ($6,6260755 \times 10^{-34}$ J s) e ν é a frequência da radiação incidente. A condição de ressonância é representada pela equação:

$$H\nu = \Delta E = g\mu_B B_r \quad \text{Equação 0.3}$$

Na qual B_r é igual ao fluxo do campo magnético no qual ocorre a ressonância. Ao se variar a frequência de radiação incidente ou o campo magnético externo pode ser atingida a condição de ressonância para uma determinada amostra.

A frequência para transição de spin eletrônico de um radical livre orgânico (RLO), com $g \cong 2$, seria: 6×10^{-24} J dividido por $6,6 \times 10^{-34}$ J s, que resultaria cerca de 9×10^9 s⁻¹, ou seja, 9 GHz.

Para a aquisição de um espectro de EPR a amostra é colocada dentro de uma cavidade cujas dimensões são ajustadas à frequência de microondas utilizada e, para variar esta frequência a fim de atingir a condição de ressonância, as dimensões da cavidade deveriam variar também. Em seguida, submete-se a amostra à radiação de microondas com frequência fixa e conhecida e varia-se o fluxo do campo magnético aplicado $H_o (= \mu_B B_o)$, onde H_o é o campo magnético aplicado [PARISH, 1990]. Isto provoca a variação de E até ocorrer ressonância e também a transição de spin com a absorção de energia, que é detectada pelo equipamento. Geralmente os espectros de EPR são adquiridos na forma de primeira derivada do espectro de absorção [MANGRICH, 1998; NOVOTNY, 2002].

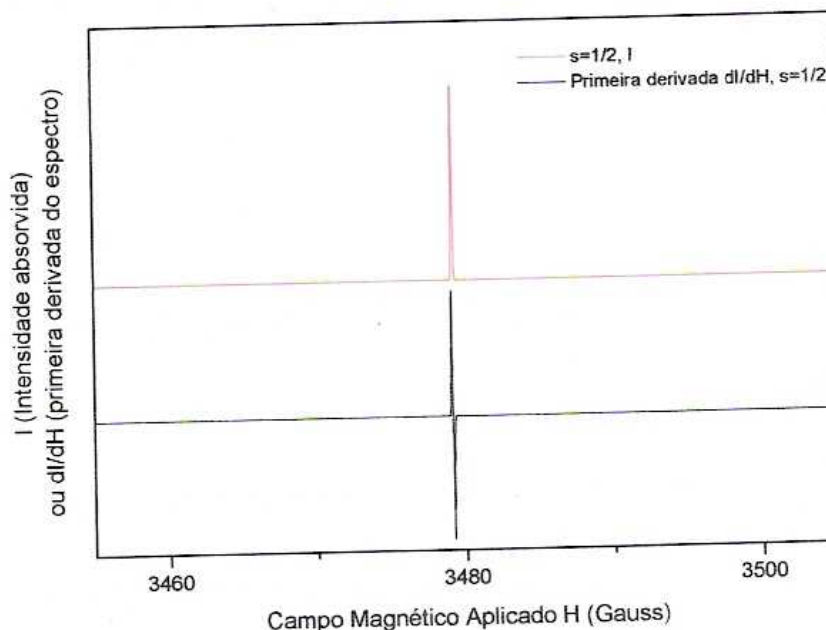


Figura 5. Espectros típicos de EPR na forma integrada(I) ou de derivada primeira (dI/dH) – obtidos por simulação a partir do software SIMFONIA®

Em uma substância com elétrons desemparelhados várias interações entre campos magnéticos vizinhos podem ocorrer, tais como spin-spin, spin do núcleo-spin do elétron, spin-órbita, entre outras. Essas interações alterarão o valor do campo magnético efetivo experimentado pelos elétrons desemparelhados. No entanto, algumas interações podem ser desconsideradas dependendo do equipamento, pois a energia ou frequência necessária para que ocorra determinada transição e absorção de energia não é atingida. No equipamento utilizado neste trabalho a frequência é a da banda X (9,5 GHz) e as transições entre os campos magnéticos de spin-spin e spin do elétron-spin do núcleo são possíveis. Então, o operador hamiltoniano (H) do sistema (através do qual se pode determinar os autovalores de energia quantizada) tornam-se [MANGRICH, 1998]:

$$H = g\beta_e H \cdot S + A \cdot S \cdot I \quad \text{Equação 0.4}$$

Onde: H = hamiltoniano de spin; β_e = momento magnético do spin do elétron; H é o campo magnético externo; A = constante de interação hiperfina; S = operando do

momento magnético do spin eletrônico; I = operando do momento magnético do spin nuclear.

O fator g é o tensor que corresponde à interação entre spin-spin. Ele relaciona-se tanto à população de elétrons desemparelhados quanto à proximidade da condição de elétron livre. A constante de acoplamento hiperfino “ A ” depende da interação elétron-núcleo e no espectro é medida através da distância entre as linhas de ressonância. Ela permite, juntamente com o valor de g , identificar se uma amostra tem ligações mais covalentes que iônicas.

O fator- g reflete a natureza dos orbitais inclusive sua simetria. Caso o radical em questão possua uma simetria esférica ou cúbica apenas um valor de g será obtido (isotropia). Para radicais de menor simetria o fator- g pode variar de acordo com a orientação do orbital contendo o elétron desemparelhado em relação ao campo magnético externo (anisotropia). O valor de g medido para um mono-cristal (com anisotropia em g) será dependente da orientação dos eixos deste mono-cristal em relação ao campo magnético externo, portanto, são obtidos três valores característicos do tensor g : g_x , g_y e g_z . Estes valores fornecem informações a respeito dos eixos principais de simetria do orbital contendo elétron desemparelhado.

Os processos de transformação da matéria orgânica no ambiente envolve reações com radicais livres e estes podem ser estabilizados em estruturas de melaninas, melanoidinas e polifenóis [JEZIERSKI et al., 1998].

Os radicais livres gerados durante estas transformações podem ser detectados pela espectroscopia de EPR como um sinal fino e intenso com g entre 2,0030 e 2,0043. Esse sinal é atribuído a semiquinonas possivelmente conjugadas a anéis aromáticos ($g = 2,041$ para o radical 9,1 *orto*-antraquinona), embora possa haver contribuições de radicais metoxibenzênicos, cujo valor g varia de 2,0035 a 2,0040

[BLOIS, et al., 1961; NOVOTNY, 2002] e radicais associados a nitrogênio, também não podem ser excluídos [SENESI; STEELINK, 1989].

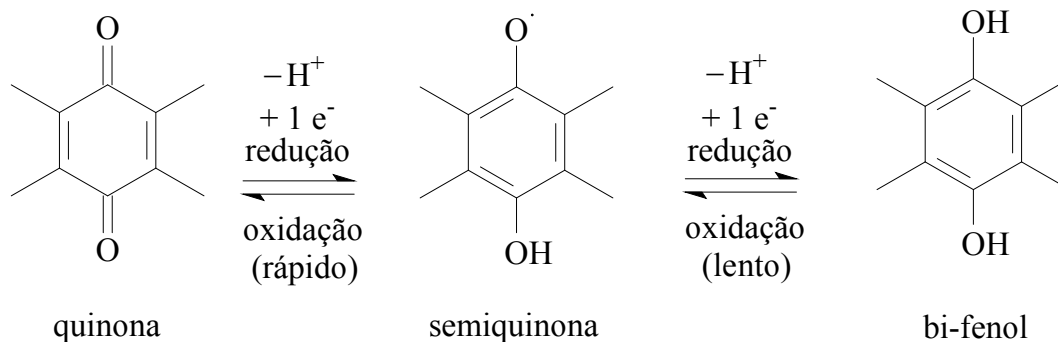


Figura 6. Equilíbrio de oxi-redução entre quinona e bi-fenol, tendo como intermediário estável o radical livre orgânico (RLO) semiquinona.

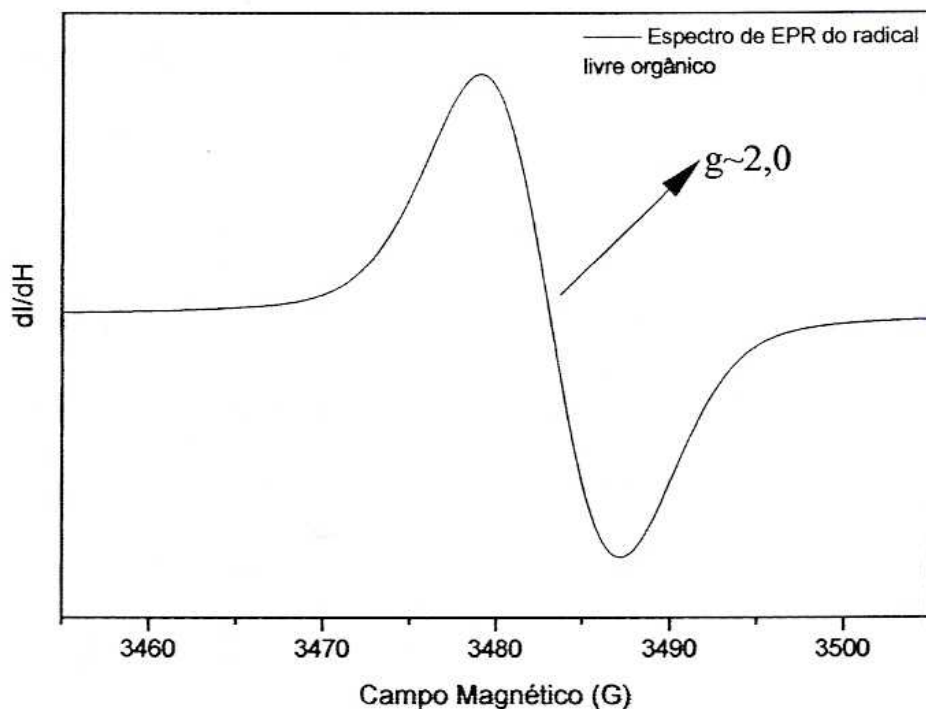


Figura 7. Espectro de EPR simulado de radical livre orgânico (RLO)

Estruturas aromáticas conjugadas a semiquinonas (Figura 6) causam parcial deslocalização do elétron livre do oxigênio da semiquinona para os átomos de carbono reduzindo com isto o valor de g [SCHNITZER; SKINNER, 1969; RIFFALDI;

SCHNITZER, 1972]. Provavelmente o sinal, dos radicais livres orgânicos, observado em substâncias húmicas seja devido a mais de uma espécie paramagnética, sendo uma delas mais transiente e envolvida em reações de oxi-redução [STEELINK; TOLIN, 1962; ALBERTS et al.; 1974; SENESI; SCHNITZER, 1977].

A largura da linha dos espectros de EPR em primeira derivada (medida pico a pico) – Figura 7 – para radicais livres orgânicos das SH geralmente é de 0,2 a 1 mT. Esta largura de linha, avaliada em relação às de compostos orgânicos puros, pode ser devida à estrutura hiperfina e super-hiperfina não resolvida e à sua grande complexidade, onde um vasto conjunto de radicais livres orgânicos ligeiramente diferentes coexistiria apresentando sinais de ressonância próximos, dando como resultado um envelope de linhas de EPR sobrepostas [NOVOTNY, 2002].

A área sob a curva de absorção de um sinal de EPR é diretamente proporcional ao número de centros paramagnéticos que contribuem para a ressonância. Para que seja obtida a concentração de spins de uma amostra, compara-se a área do seu espectro com a de um padrão de estrutura química similar, cuja concentração de spins seja conhecida. Esse parâmetro pode ser usado na estimativa da reatividade das substâncias húmicas no ambiente [SENESE, 1990; SPOSITO et al., 1996]; assim como no monitoramento ambiental [JEZIERSKI et al., 1998].

A concentração de radicais livres em SH, depende de numerosos fatores, alguns deles relacionados ao processo de extração das SH, tais como: pH, hidrólise ácida, metilação, temperatura, entre outros [SENESE, 1990].

O sucesso na interpretação dos dados requer conhecimento preciso da magnitude das condições experimentais aplicadas. Por exemplo, é essencial conhecer-se exatamente o valor da grandeza do campo magnético das microondas aplicadas e da amplitude de modulação do campo magnético de modo a se obter simulações quantitativas da saturação do espectro ou da medida do tempo de

relaxação spin-rede. Para se obter com precisão esses dados procede-se a calibração do espectrômetro de EPR lançando-se mão de padrões. As amostras padrões são úteis para se testar a “performance” do sistema, a calibração do espectrômetro e medidas quantitativas de concentrações. Idealmente a amostra padrão deverá ser estável, possuir a espécie paramagnética por longo período de tempo, ser facilmente preparada sob métodos controlados e consistentes, e deveriam ser plenamente caracterizadas com respeito a todos os parâmetros espectroscópicos tais como tempos de relaxação, e estruturas finas e hiperfinas. Além disso, a linha de ressonância deveria ser fina e preferivelmente homogênea. Infelizmente, a amostra padrão universal ainda não foi encontrada. Muitos padrões têm sido sugeridos e cada um tem o seu mérito particular. Dentre os mais comuns estão os de amostras de “pitch” (asfalto) de baixa e de alta concentração, em solvente sólido de KCl. O “pitch” em KCl emergiu como um padrão por causa do seu sinal de radical livre de longa vida e baixa perda dielétrica. Devido a sua longa vida ele é perfeito para se testar, de tempos em tempos, a sensibilidade do espectrômetro e é ideal para avaliar RLO das SH. É preparado pela companhia Bruker, por adição do pitch a KCl em pó, e o material é cuidadosamente misturado, mecanicamente até se obter uma amostra homogênea. Depois de misturada, a amostra é aquecida e bombeada para dentro de um tubo de quartzo, sob vácuo. O “pitch” é preparado em duas concentrações: o “strong pitch” é 0,11 % de “pitch” em KCl, e o “weak pitch” que é 0,0003% de “pitch” em KCl. Para corrigir a concentração, cada amostra de weak pitch é comparada com um padrão e recebe um fator de correção.

A largura de linha de pico a pico, ΔH_{pp} , é tipicamente de 1,7 G (0,17 mT), com um fator g de 2,0028. Esta pequena largura de linha torna o “pitch” adequado para calibração da amplitude de modulação. As amostras de “weak pitch” da Bruker têm concentração nominal de 10^{13} spins cm^{-1} de tubo de quartzo de 3 mm de diâmetro

interno. As amostras são calibras e a correção do fator é escrita no tubo através de um rótulo. No caso do espectrômetro do DQ/UFPR este fator para a amostra “weak pitch” é de $1,22 \pm 5\%$. Assim, o valor real é de $1,22 \pm 5\% \times 10^{13}$ spins cm^{-1} .

A quantificação do número de spins por grama de AH (n° spins g^{-1}) foi feita com o auxílio da amostra padrão de “weak pitch”, fornecida pela Companhia Bruker, que possui a concentração dada acima. Procura-se centrar na mesma posição dentro da cavidade do espectrômetro, um de cada vez, tanto o tubo da amostra, quanto do padrão, que devem possuir o mesmo diâmetro interno. A amostra é pesada dentro do tubo e sua altura é medida. A quantidade de spins por centímetro de tubo (S) foi obtida com o auxílio da equação, que relaciona os sinais levando em consideração a intensidade do sinal (I), a amplitude de modulação (A), a largura de linha (ΔH_{pp}) e o ganho do equipamento (G), e que é representada abaixo:

$$S_S = S_R \left[\frac{I_S A_R (H_{pp_S})^2 G_R}{I_R A_S (H_{pp_R})^2 G_S} \right] \quad \text{Equação 0.5}$$

onde o sub-índice S refere-se a amostra e R refere-se ao padrão. Tendo sido determinado S_S da amostra de AH por centímetro de tubo, e sabendo-se a massa de AH em gramas por centímetro de tubo faz-se a transformação:

$$n^\circ \text{ spins } \text{g}^{-1} = S_{R\text{padrão}} \text{ cm}^{-1} / S_S \text{ gcm}^{-1} \quad \text{Equação 0.6}$$

Desta maneira é possível determinar exatamente o n° de spins g^{-1} desemparelhados que estão presentes nas amostras de melaninas ou outros materiais estudados.

1.5.3 ESPECTROELETROQUÍMICA DE EPR

Atualmente, pode-se contar com diversos métodos de criar saldos de spin eletrônico artificialmente. Um deles consiste em provocar reação redox (eletroquímica) dentro da cavidade do espectrômetro e registrar o espectro de EPR simultaneamente. Este estudo mais abrangente é a espectroeletroquímica de EPR, que une ambas as técnicas acima citadas. Consiste basicamente na oxidação, ou redução, eletroquímica de um composto, concomitantemente com a sua análise por espectroscopia de EPR, possibilitando identificar os radicais livres formados, ou espécies químicas paramagnéticas [NAPPI, VASS, 2001]. Segundo estudos, as melaninas obtidas a partir de oxidação eletroquímica, bem como seus intermediários indólicos podem ser caracterizadas pelo seu perfil potenciodinâmico e por espectroeletroquímica de EPR [ROBINSON, et al, 1998].

Estudos espectroeletroquímicos em melaninas são importantes, pois provêm uma gama de informações com respeito ao efeito da aplicação de potencial elétrico sobre as transformações tanto da dopa quanto ao produto final, bem como transporte de carga e reações redox do sistema.

1.5.4 ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)

A espectroscopia de UV-Vis constitui-se em uma técnica útil para a caracterização das mais variadas substâncias e moléculas em misturas complexas. A espectroscopia na região do UV-Vis permite a identificação de transições de elétrons entre grupos adjacentes (transições eletrônicas). Os elétrons de ligações químicas absorvem energia na faixa do ultravioleta – visível (190 – 800 nm), e os grupos que os contém são chamados cromóforos, grupos insaturados covalentes, responsáveis pela

absorção eletrônica, como por exemplo, C=C, C=O ou NO₂. Ligados aos cromóforos estão os auxócromos, grupos saturados, ou átomos, que alteram tanto o comprimento de onda como a intensidade da absorção como, por exemplo, -OH, -NH₂ e Cl⁻ [SANTOS, CAMARGO, 1999; MARTIN-NETO, et al, 1998].

A razão E_4/E_6 (razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm) determinada, então, por absorção no visível, tem sido também um bom método para avaliar o grau de humificação da matéria orgânica (MO) do ambiente. A baixa razão E_4/E_6 está diretamente relacionada com o aumento da massa molecular e condensação de grupos aromáticos e inversamente relacionados com a quantidade de grupos alifáticos [FOKEN, et al, 2000; BAES, et al, 1990]. Estudos mostraram que este dado independe da concentração de material húmico, mas varia para materiais obtidos de diferentes tipos de solos e sedimentos [MANGRICH, 2000].

A absorção de luz em toda a faixa do espectro visível pelas substâncias húmicas, que incluem as melaninas, é o fenômeno responsável pela cor escura que apresentam. Estas estruturas possuem grupamentos alifáticos (cadeias hidrocarbônicas abertas, ramificadas, cíclicas não-aromáticas, insaturadas ou saturadas) e aromáticos (anel benzênico conjugado e seus derivados substituídos). A estrutura eletrônica determina os orbitais moleculares em que os elétrons irão ocupar. Os níveis de energia em ordem crescente mais comuns para este tipo de amostra são: orbital sigma ligante (σ) < orbital pi ligante (π) < orbital não ligante (n) < orbital pi anti-ligante (π^*) < orbital sigma antiligante (σ^*). Os elétrons recebem fótons de energia e são transferidos dos orbitais ligantes para os anti-ligantes. Assim, uma transição $n \rightarrow \pi^*$ requer luz de menor energia – comprimento de onda maior – que uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, por exemplo.

A energia E de um orbital numa molécula é dada pela expressão:

$$E = \frac{n^2 h^2}{8ml^2} \quad \text{Equação 0.7}$$

onde E é a energia do nível considerado, n é o nível de energia que pode ter valores, $1, 2, 3, \dots, n$, h é a constante de Planck, igual a $6,62607 \times 10^{-34}$ J.s, $m = 9,109389 \times 10^{-31}$ kg, é a massa do elétron, e l , é o comprimento da molécula com ligações conjugadas, simples e duplas, sobre as quais o elétron pode se deslocar.

A energia necessária para o elétron se deslocar de um nível n para um outro nível $n + 1$ será:

$$\Delta E = \frac{(n+1)^2 h^2}{8ml^2} - \frac{n^2 h^2}{8ml^2} = \frac{(2n+1)h^2}{8ml^2} = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 0.8}$$

e

$$l = \sqrt{\frac{(2n+1)h\lambda}{8mc}} \quad \text{Equação 0.9}$$

Assim, tendo-se o comprimento de onda de absorção e sabendo-se os níveis dentro dos quais houve a transição, pode-se calcular o tamanho da molécula que apresenta conjugações de ligações químicas, simples e duplas. Por outro lado, pode-se concluir que estruturas orgânicas, com ligações conjugadas, duplas e simples, absorverão tanto mais luz visível em diferentes energias - parecerão mais escuras - quanto maior for o tamanho da cadeia conjugada. Como as estruturas alifáticas conjugadas não são estáveis no ambiente, conclui-se que a cor escura das SH mais estáveis é dada por conjugação de estruturas aromáticas [MANGRICH, 2000].

1.5.5 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

A espectroscopia no infravermelho foi extensivamente usada no passado para caracterizar substâncias húmicas, embora alguns duvidem que exista utilidade no espectro no infravermelho dessas substâncias. As análises de IVTF têm sido usadas nos estudos de macromoléculas orgânicas complexas como as SH [GOMES, et al., 1996; PAIM, et al., 1990; STEVENSON, et al., 1971] para identificar grupos funcionais, como ácidos carboxílicos, aminas, amidas, grupos alifáticos e grupos hidroxilas [SILVERSTEIN, et al, 1979], bem como identificar grupos funcionais em melaninas, precursoras dos ácidos húmicos do solo [STAINSACK, et al., 2003]. Desta forma, permite-se obter valiosas informações sobre a natureza e posição dos grupos funcionais nos ácidos húmicos (AH) das mais diversas origens. Tem sido usada também para avaliações dos efeitos dos extratores químicos utilizados e o grau de pureza alcançado através dos processos de purificação [BUDZIAK, et al, 2003].

1.5.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS -X (DRX)

Os raios X foram descobertos por Roentgen em 1885. Dezessete anos depois, Max Laue sugeriu que esses raios poderiam ser difratados por um cristal, pois percebeu que os respectivos comprimentos de onda eram comparáveis às separações entre planos da rede do cristal. Os raios-X, radiação eletromagnética com comprimento de onda da ordem de 10^{-10} m são gerados pelo bombardeio de um metal por elétrons de alta energia. Os elétrons são desacelerados ao penetrar no metal e geram uma radiação num intervalo contínuo de onda, a radiação de frenamento (“bremsstrahlung”) [RIBEIRO, et al, 2000].

Os máximos de difração de raios X (devido à interferência construtiva em uma família de planos de uma rede cristalina) ocorrem quando a direção de uma onda

incidente, medida em relação à superfície de um plano de átomos, e o comprimento de onda da radiação obedecem a lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad \text{Equação 0.10}$$

onde d é a distância entre os planos, θ é o ângulo de incidência, n as ordens das reflexões e λ é o comprimento de onda do raio X. A lei de Bragg é usada primordialmente na determinação do espaçamento entre os planos da rede do cristal, pois a distância d pode ser calculada quando θ for determinado experimentalmente.

A técnica de difração de pó foi usada para identificar presença ou ausência de planos definidos na estruturas das melaninas sintéticas [ATKINS, 1999; PAIXÃO, 2003].

1.5.7 MÉTODOS MICROSCÓPICOS

A potência amplificadora de um microscópio óptico é limitada pelo comprimento da onda de luz visível. O microscópio eletrônico utiliza elétrons para iluminar um objeto. Como os elétrons têm um comprimento de onda muito menor do que o da luz, podem mostrar objetos muito menores. O comprimento de onda dos elétrons utilizado nos microscópios eletrônicos é de cerca de 0,5 Å. Há dois tipos básicos de microscópios eletrônicos: o microscópio eletrônico de transmissão – MET (no inglês “Transmission Electron Microscope”, TEM) e o microscópio eletrônico de varredura - MEV (no inglês “Scanning Electron Microscope”, SEM). O MET dirige o feixe de elétrons para o objeto que se deseja aumentar. Uma parte dos elétrons atravessa o objeto, formando uma imagem aumentada. Para utilizar um MET, é preciso cortar a amostra em camadas finas. Os microscópios eletrônicos de transmissão podem aumentar um objeto em até um milhão de vezes. Um microscópio eletrônico de varredura cria uma imagem ampliada da superfície do objeto. Não é necessário cortar

um objeto para observá-lo com um MEV. A amostra pode ser colocada no microscópio sem grandes preparativos. O MEV explora a superfície da amostra ponto por ponto, ao contrário do MET, que examina uma grande parte da amostra de cada vez. Seu funcionamento se baseia em percorrer a amostra com um feixe muito concentrado de elétrons, de forma parecida com a varredura de um feixe de elétrons na tela de um aparelho de televisão. Os microscópios eletrônicos de varredura podem ampliar os objetos 100 mil vezes ou mais. Esse tipo de microscópio é muito útil porque, ao contrário dos MET ou dos microscópios ópticos, produz imagens tridimensionais realistas da superfície do objeto [WOODRUFF, et al, 1986; WILLIANS, et al, 1996, RIBEIRO, et al, 2000].

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite ao usuário determinar a estrutura interna de materiais, sejam eles de origem biológica ou não-biológica.

Os materiais para a MET devem ser especificamente preparados a fim de obterem espessuras que permitam que os elétrons transmitam através da amostra, tal como a luz é transmitida em microscopia óptica convencional. Conforme já dito, devido ao comprimento de onda dos elétrons ser muito menor que o da luz, a resolução alcançada pelas imagens da MET são muitas ordens de magnitude maior que a microscopia óptica. Esta pode revelar detalhes peculiares da estrutura interna – em alguns casos tão pequenos quanto átomos individuais. A MET tem capacidade de ampliar a imagem até 350.000 vezes, mas em circunstâncias especiais as imagens podem ser ampliadas em até 15 milhões de vezes [RIBEIRO, et al, 2001; ROCKMOUNTAIN, 2002].

Técnicas microscópicas têm sido empregadas no estudo da morfologia de melaninas devido apresentarem importantes informações ao efeito dos procedimentos de preparação, bem como na interação entre as unidades menores para a

estruturação da supramolécula [LYU, SIMON, 2003; NOFSINGER, et al, 2000; CLANCY, SIMON, 2001].

1.5.8 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETRÔNICA (EIE)

Quando se estudam sistemas eletroquímicos, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) (no inglês “Electrochemical Impedance Spectroscopy” – EIS) é uma técnica analítica que dá mais exatidão, fornece informações mecanísticas e cinéticas livre-de-erros usando uma variedade de técnicas e formatos de saída. Por esta razão, a EIE tem se tornado uma ferramenta poderosa no estudo de corrosão de semicondutores e sínteses eletro-orgânicas [TSCHOPE, *et al*, 2004; MARINO, MASCARO, 2004]. Esta técnica é uma resposta, em termos da resultante de voltagem ac (do inglês, “Alternating current”), de um circuito elementar pela aplicação de um corrente ac. É análoga à resistência de um sistema DC (do inglês, “Direct Current”). Após a aplicação de uma excitação potencial senoidal, a resposta a este potencial é um sinal de corrente ac, contendo a freqüência de excitação e seus harmônicos. Esta resposta pode ser analisada como uma soma das funções senoidais. Como qualquer freqüência pode ser aplicada, a impedância seria função da freqüência, e um espectro de impedância é uma representação de um circuito em função da freqüência. Desta forma, a espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica utilizada na análise de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução eletrolítica. Trata-se de um método de identificação e determinação de parâmetros de um modelo elaborado com base na resposta de freqüência do sistema eletroquímico em estudo [PREIS, *et al*, 2004; PRINCETON, 1999; GAMRY, 2004].

Para se avaliar a viabilidade da aplicação desta técnica a um determinado sistema eletroquímico, deve-se testar três fatores: causalidade, linearidade e estabilidade. É necessário que o sistema contemple estes três parâmetros a fim de que a técnica apresente resultados confiáveis e válidos. Estes critérios foram testados nas amostras de melaninas e a técnica mostrou-se viável para este tipo de amostra.

1.5.9 O ESPAÇO DOS NÚMEROS COMPLEXOS E SUAS UTILIZAÇÕES

O aparecimento dos números complexos se deu no século XVI ao longo das descobertas de procedimentos gerais para resolução de equações algébricas de terceiro e quarto grau. Nos séculos XVII e XVIII os números complexos são usados apenas para facilitar os cálculos que permitem a conexão de vários resultados dispersos da Matemática no conjunto dos números reais. Apenas no século XIX, aparece a representação geométrica dos números complexos, motivada pela necessidade em Geometria, Topografia e Física, de se trabalhar com o conceito de vetor no plano e, assim passam a ser aplicados em várias áreas do conhecimento humano, dentro e fora da Matemática.

As equações de segundo grau com discriminante (Δ) negativo não motivaram o aparecimento dos números complexos [GREEN, 1976].

Durante o período Renascentista (1400-1600), o estudo dos números complexos foi estimulado pelo desenvolvimento comercial e pelo crescimento das cidades européias. Paccioli (1494), Tartaglia e Cardano (1545) apresentaram trabalhos envolvendo os números complexos. Porém, estes não foram aceitos naturalmente como números, pois não havia significado geométrico em uma raiz quadrada de um número negativo [MILIES, 1994; WITMER, 1968].

Equações cúbicas estudadas por Cardano (1545) e Bombelli (1572) motivaram a utilização dos números complexos. Era necessário trabalhar com os números complexos, "como se fossem números", para achar a solução real (positiva) $x = 4$ do problema: "Seja x^3 o volume de um cubo de aresta x e $15x$ o volume de um paralelepípedo retângulo cuja área da base é 15 e cuja altura é igual à aresta do cubo. Determine x de modo que $x^3 = 15x + 4$ ". Ao se aplicar a fórmula de Cardano nesta equação de terceiro grau apareceu na solução uma raiz quadrada de número negativo [BOYER, 1974; MILIES, 1994; WITMER, 1968].

O símbolo $\sqrt{-1}$, para a raiz quadrada de -1, introduzido por Girard (1629), passou a ser representado pela letra i a partir de Euler (1777). Em 1637, Descartes introduziu os termos real e imaginário, mas a expressão números complexos só usada em 1831 pela primeira vez por Gauss [RICIERI, 1993].

A partir da conjectura levantada por Cardano (1545), Bombelli (1572) e Leibniz (1676) de que a soma de dois complexos conjugados daria um número real, Cauchy (1829), Hermite (1865), entre outros, constataram estas propriedades seriam possíveis. Então, Girard (1629), Descartes (1673) e D'Alembert (1746) elaboraram o Teorema Fundamental da Álgebra (TFA), que foi provado por Gauss (1798) [EVES, 1996, BOYER, 1974].

Motivados pela geometria e pela topografia, Girard (1628), Wallis (1685), Argand (1790) e Wessel (1797), representaram geometricamente, de maneira intuitiva e prática, os complexos como vetores num plano cartesiano. Gauss (1831) e Hamilton (1833) redescobriram a representação geométrica e definiram os complexos. Gauss os definiu como números da forma, $a+bi$, onde a e b são números reais, e $i^2 = -1$.

Hamilton os definiu como o conjunto dos pares ordenados (vetores) (a,b) , onde a e b são números reais, identificando $(0,1)$ com $0+i$ e $(1,0)$ com $1+0i$. Hamilton associou a multiplicação

$$(a,b) \times (x,y) = (ax-by, ay+bx) \quad \text{Equação 0.11}$$

a uma operação envolvendo a rotação de vetores em torno da origem. Multiplicar por i envolve uma rotação de 90° , multiplicar por $i^2 = -1$ envolve uma rotação de 180° , multiplicar por $i^3 = -i$ envolve uma rotação de 270° e assim por diante.

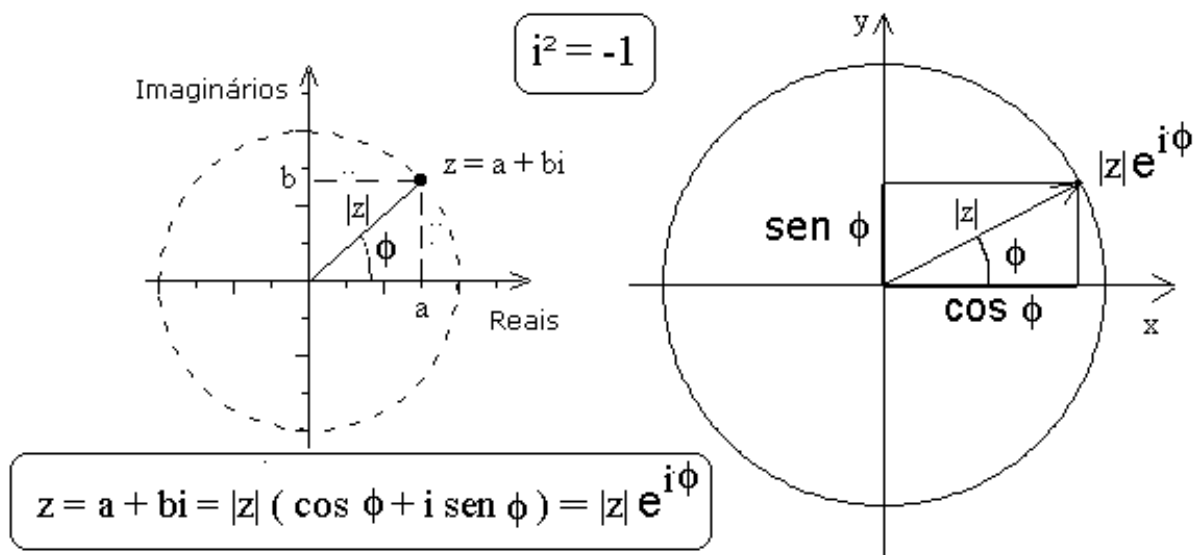


Figura 8. Representação dos números complexos a partir da rotação dos vetores no plano cartesiano em torno da origem.

A representação geométrica permitiu que os complexos fossem visualizados, por conseguinte, aceitos como números. A possibilidade de extrair a raiz enésima de um complexo dada por Cotes (1714), Moivre (1730), D'Alembert (1746), Euler (1748) e Picard (1871), sinalizando que o sistema dos números complexos é algebricamente fechado, também contribuiu para isso [CARAÇA, 1984].

O significado geométrico dos números negativos surgiu com a representação geométrica dos complexos. Em 1867, Hankel trabalhando com a álgebra dos números complexos e as leis fundamentais da aritmética, estabeleceu a regra ("regra dos sinais") da multiplicação $(-1) \times (-1) = 1$ (o produto de dois números inteiros negativos é sempre positivo) para a permanência da propriedade distributiva $a(b+c) = ab + ac$. Por exemplo:

$$-1 + 1 = (-1) \times 1 + (-1) \times (-1) = -1 \times (1 - 1) = -1 \times 0 = 0$$

$$\text{Equação 0.12}$$

Assim, terminava a polêmica entre os que ainda não aceitavam e os que aceitavam os números negativos como números [MEDEIROS, 1992].

A álgebra dos números complexos permite representar e operar vetores no plano. Possibilita que grandezas que variam senoidalmente (ou cossenoidalmente) em função do tempo, ou seja, do tipo

$$A \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \phi) \quad \text{Equação 0.13}$$

sejam representados por vetores bidimensionais (fasores)

$$A(\cos\phi + i \cdot \text{sen}\phi) \quad \text{Equação 0.14}$$

que sofre rotação em sentido anti-horário com velocidade angular ω . É mais fácil operar (somar, multiplicar, etc.) com números complexos de diferentes módulos e argumentos do que operar com funções trigonométricas (senos e cossenos) de diferentes amplitudes e fases [BOLTON, 1994, TIPLER, 1995].

Existe nos complexos um subconjunto (eixo x) em que os números reais e os complexos da forma $(a,0)$ são identificados por meio de uma função injetora (injetiva) e sobrejetora (sobrejetiva), que preserva as operações de adição e multiplicação de complexos (isomorfismo). Então, pode-se dizer, "por abuso de linguagem", que os complexos contém os reais [NETO, 1993].

Fasor (quantidade complexa) é uma grandeza que pode ser representada e operada vetorialmente, pela álgebra dos números complexos, no plano. Pode significar uma variação de amplitude A (ou Módulo) e fase ϕ (ou argumento) num movimento periódico (como acontece nos circuitos elétricos de corrente alternada). Grandeza vetorial (ou vetor) é aquela que possui direção, sentido e módulo (velocidade, deslocamento, etc). É representada e operada vetorialmente no plano e no espaço por uma álgebra (cálculo vetorial) diferente da álgebra dos complexos [VALLADARES, 1990].

Foi através do uso e da compreensão dos números complexos que, certos "defeitos" existentes no conjunto dos números reais foram "consertados". Euler (1748) usou as séries de Maclaurin (1742),

$$e^x = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} x^n \qquad e^x = 1 + \left(\frac{x}{1}\right) + \left(\frac{x^2}{2!}\right) + \left(\frac{x^3}{3!}\right) + \left(\frac{x^4}{4!}\right) + \dots$$

$$\cos x = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{(2n)!} x^{2n} \qquad \cos x = 1 - \left(\frac{x^2}{2!}\right) + \left(\frac{x^4}{4!}\right) - \left(\frac{x^6}{6!}\right) + \dots$$

$$\operatorname{sen} x = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{(2n+1)!} x^{2n+1} \qquad \operatorname{sen} x = x - \left(\frac{x^3}{3!}\right) + \left(\frac{x^5}{5!}\right) - \left(\frac{x^7}{7!}\right) + \dots$$

Equação 0.15 – Equações resolvidas por Euler a partir das séries de MacLaurin

com $x = ix$, para chegar a relação

$$e^{ix} = \cos x + i \operatorname{sen} x \qquad \text{Equação 0.16}$$

onde $i^2 = -1$, $e = 2,7182 \dots$, conhecida como identidade de Euler. Esta equação fez a tão necessária conexão entre logaritmos, funções trigonométricas e fatoriais (os complexos conseguem ter forma exponencial, trigonométrica ou polar). Além dessas conquistas, a identidade de Euler deu significado aos logaritmos de números negativos. Fazendo $x = \pi$, Euler obteve:

$$e^{\pi i} + 1 = 0 \qquad \text{Equação 0.17}$$

onde o número $\pi = 3,14159\dots$, implicando no logaritmo neperiano

$$\operatorname{Ln}(-1) = \pi i \qquad \text{Equação 0.18}$$

ou seja, os logaritmos de números negativos são números imaginários puros.

Na eletrônica e na eletricidade, a análise de circuitos de corrente alternada (AC) é feita com a ajuda de números complexos. Grandezas como a impedância (em ohms) e a potência aparente (em volt-ampére) são exemplos de quantidades complexas [ÁVILA, 1990].

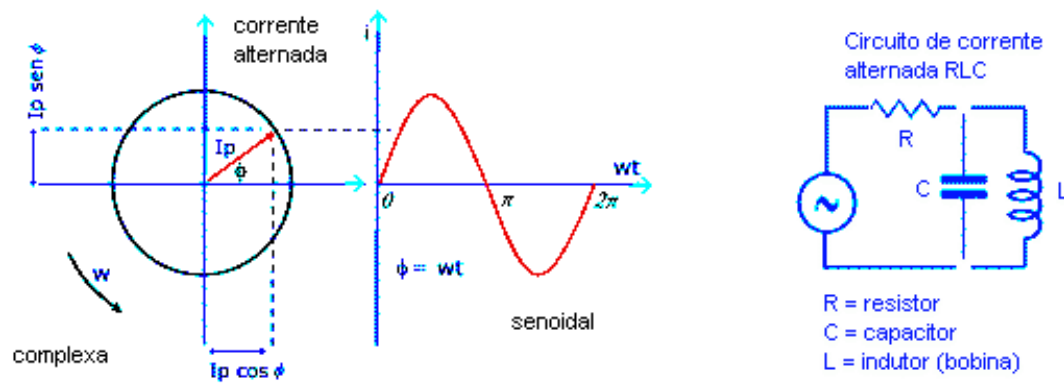


Figura 9. Representação de um circuito AC como quantidades complexas.

A impedância (Z) é o número complexo $Z = R + jX$, ou na forma polar

$$Z = |Z|(\cos\phi + i.\text{sen}\phi) \quad \text{Equação 0.19}$$

onde $i^2 = -1$, ϕ é o ângulo (argumento) de defasagem entre a tensão aplicada e a corrente no circuito, $|Z|$ é o módulo, R é a resistência elétrica (em ohm) e X é a resultante (em ohm) das reatâncias indutivas e capacitivas do circuito.

A potência aparente (em volt-ampère) é o número complexo $P = P_r + iP_x$, ou,

$$P = |P|(\cos\phi + i.\text{sen}\phi) \quad \text{Equação 0.20}$$

onde $i^2 = -1$, $|P|$ é o módulo, ϕ é o ângulo de defasagem entre a tensão e a corrente, P_r é a potência real ou ativa (em watt), P_x é a potência reativa (em volt-ampère reativo). O valor do $\cos\phi$ (fator de potência) é importante na determinação do aproveitamento da energia que está sendo gasta [BOLTON, 1994, TIPPLER, 1995].

Desta forma, desde o século XIX os números complexos passaram a ser grandemente utilizados no estudo da Mecânica de Flúidos, da Eletricidade e outros fenômenos em meios contínuos de forma que, hoje são absolutamente necessários em inúmeros campos da Ciência e Tecnologia.

CAPÍTULO 2

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Das técnicas utilizadas durante a execução do trabalho, a cronoamperometria foi utilizada somente na oxidação do composto de partida (modo preparativo), enquanto que a voltametria cíclica foi utilizada na avaliação do comportamento eletroquímico da L-dopa, bem como na caracterização do produto final pela espectroeletroquímica de EPR.

- **Eletroquímica** – Voltametria Cíclica e Cronoamperometria foram realizadas no Laboratório de Eletroquímica Aplicada e Polímeros (LEAP) do Departamento de Química / UFPR. O estudo do comportamento eletroquímico da L-dopa, bem como a síntese de melaninas por oxidação eletroquímica, foram feitas usando-se um Potenciostato-Galvanostato Microquímica – modelo MQPG-01 em célula eletroquímica com 15 mL de capacidade. A espectroeletroquímica de EPR foi feita no Laboratório Regional Sul de EPR (LABEPR) do DQ/UFPR utilizando célula *flat* dotada de eletrodos. Tanto o eletrodo de trabalho quanto o contra-eletrodo foram fios de Pt e o eletrodo de referência Ag/AgCl de concentração 0,1 mol L⁻¹. O eletrólito de suporte utilizado durante as sínteses e caracterizações foi o tampão fosfato (KH₂PO₄/NaOH 0,1 mol L⁻¹) em pH = 6,8, a temperatura ambiente.

- **EPR** – A Ressonância Paramagnética Eletrônica em banda X (~9,5 GHz) foi realizada no LABEPR do Departamento de Química / UFPR. O equipamento utilizado foi um Espectrômetro BRUKER – modelo ESP300E, com as amostras em tubos de quartzo de 0,3 mm de diâmetro ou células *flat* de quartzo, registrados em temperatura ambiente e a 77 K. A espectroeletroquímica de EPR foi realizada usando-se célula *flat*

de quartzo, sob atmosfera inerte de N_2 e registrada em faixa de campo magnético de 50 e 5000 Gauss (G) centradas em 2550 G. Os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo foram fios de Pt e o eletrodo de referência de Ag/AgCl 1 mol L^{-1} .

- **UV-VIS** – A espectroscopia eletrônica foi realizada no Laboratório de Projetos e Processos Ambientais (LABPAM) também do Departamento de Química/UFPR. O espectrômetro da Shimadzu modelo UV-2401 PC registrou os espectros das amostras em estado sólido. Os espectros foram registrados no modo espectroscopia de reflectância difusa (ERD) (no inglês, “Diffuse Reflectance Spectroscopy”, DRS) como $(1/\log R)$, onde R é a Reflectância das amostras.

- **IVTF** – A espectroscopia na região do infravermelho médio das amostras foi efetuada no Laboratório de Infravermelho do DQ/UFPR. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro FTIR BIO-RAD modelo Excalibur Series (FTS-3500GX). As pastilhas foram de KBr (99 mg da amostra), grau espectroscópico e o empastilhamento em 9×10^3 psi de pressão.

- **MET** – a microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Física da UFPR. O microscópio utilizado foi um Jeol JEM – 1200EX II Electronic Microscopy. Foram utilizadas telas de parlódio como suporte para o material em suspensão. Uma pequena parcela do material sólido seco resultante da síntese foi triturado, a uma fina camada de pó. Este material foi dissolvido suspenso em água desionizada e colocado em ultra-som por 2 minutos. Uma fina película em suspensão resultante foi coletada sobre a tela de parlódio. Depois de seco o material foi analisado sob pressão interna do microscópio de 5×10^{-4} Pa, ângulo de incidência perpendicular, 60 kV de tensão e $40 \mu\text{A}$ de corrente (2,4 W de potencia).

- **DRX** – a difração de raios-X de pó foi realizada no Laboratório de DRX e Raman do Departamento de Química da UFPR. Os difratogramas de Raios-X foram

obtidos utilizando-se difratômetro Shimadzu XRD-6000 com radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), com tensão e corrente de fonte de 40 KV e 40mA, varrendo 2θ de 10° a 60° .

- **EIE** – a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica foi realizada no laboratório de Eletroquímica de superfícies e corrosão (LESC) do Departamento de Engenharia Química – UFPR. As análises de impedância eletroquímica foram realizadas em um potenciostato-galvanostato Voltalab 40 (PG7300). Para a aquisição dos dados de impedância foi empregado um sinal senoidal de 25 mV e intervalo de frequência de 100 kHz a 100 MHz. Os espectros de impedância foram obtidos no potencial de 617 mV em solução contendo melanina.

2.2 SÍNTESE DAS MELANINAS

As melaninas foram sintetizadas por dois métodos oxidativos distintos: oxidação química pelo oxigênio do ar (msar) e por oxidação eletroquímica (ms1). Escolheu-se a 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina (L-dopa) – Aldrich – como composto modelo devido sua estrutura ser semelhante à várias unidades estruturais encontrados nas estruturas das melaninas naturais, além de ser um dos metabólitos gerados durante o processo de melanização.

Primeiro, necessitou-se conhecer o perfil do comportamento eletroquímico da L-dopa. Segundo a literatura (ROBINSON, et al., 2001), um bom eletrólito de suporte para a síntese é o tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em $\text{pH} = 6.8$, sob agitação contínua. A síntese por oxidação eletroquímica foi feita sob atmosfera inerte de N_2 e/ou Ar. Depois de determinado o potencial elétrico de oxidação, a L-dopa foi oxidada em potencial controlado.

Na segunda etapa do trabalho foi estudado o comportamento das melaninas sob a variação da concentração de L-dopa no sistema eletroquímico e analisadas as características espectroscópicas dos produtos.

❖ PARTE I – SÍNTESE QUÍMICA E ELETROQUÍMICA DE MELANINAS

2.3 METODOLOGIA DE SÍNTESE

Foram preparados 300 mL de solução tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em pH 6,8. Foram retiradas duas alíquotas de 10 mL: uma para oxidação química (msar) e outra para eletroquímica (ms1). A cada uma foram adicionadas 10 mg de L-dopa. A msar foi obtida depois de 8 horas após deixar a solução ao ar para oxidação. A ms1 foi sintetizada eletroquimicamente tendo-se desaerado o solvente com N_2 antes da adição da L-dopa, fazendo-se primeiramente a voltametria pH = 6,8, intervalo de potencial $-0,6$ a $+1$ V e velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} e depois cronoamperometria durante 5 minutos em potencial controlado de $+617 \text{ mV}$. O produto foi obtido 2 horas depois da eletrossíntese.

O material resultante foi lavado e centrifugado em 3500 rpm por 5 vezes, e seco em estufa a $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dos produtos finais foram feitos os respectivos espectros de IVTF, UV-VIS e EPR. A espectroeletroquímica de EPR foi realizada usando-se célula *flat* de quartzo, sob atmosfera inerte de N_2 e registrada em faixa de campo magnético de 50 e 5000 Gauss (G), centradas em 2550 G, utilizando um potenciostato Microquímica – modelo MQPG – 01 em célula "flat" de quartzo. Os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo foram fios de Pt e o eletrodo de referência de Ag/AgCl 1 mol L^{-1} . Esta técnica foi

utilizada com vistas ao estudo do equilíbrio: $Q + QH_2 \rightarrow 2Q^{\cdot-} + 2H^+$, cujo mecanismo responde à estruturação da macromolécula das melaninas.

A voltametria cíclica (VC) e a cronoamperometria (CA) foram realizadas utilizando o Potenciostato Microquímica – modelo MQPG – 01 em célula eletroquímica de 15 mL de volume. Na síntese da ms1 foi observado que, logo no início da CA, a solução ficou alaranjada na superfície do eletrodo de platina sugerindo a oxidação total da L-dopa.

Os espectros de EPR foram registrados em espectrômetro BRUKER modelo ESP300E utilizando tubo de quartzo de 0,3 mm de diâmetro acoplada ao potenciostato.

Os espectros de UV-VIS foram adquiridos em espectrômetro Shimadzu UV-2401 PC (amostra sólida) e registrados em modo log (1/Reflectância) em comprimento de onda na faixa de 190 a 900 nm.

Para a espectroscopia de IVTF foi usado espectrofotômetro Bomem FTIR MB 100 e pastilhas de KBr grau espectrométrico (1 mg de amostra : 99 mg KBr) do DQ/UFPR.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – Parte I

2.4.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA (VC)

Um estudo preliminar por voltametria cíclica foi feito para determinar o potencial de oxidação e o perfil potenciodinâmico da L-dopa¹ de acordo com GARCÍA e colaboradores (2001). Lembramos que a L-dopa é apenas parcialmente solúvel. Assim, a fim de maximizar esta solubilidade utilizou-se o tampão fosfato em pH fisiológico (pH = 6,8). No voltamograma foi observada a oxidação da L-dopa

correspondente à quinona (Figura 3) que ocorria em potencial de +617 mV vs Ag/AgCl. Este, com varredura de potencial na faixa entre -600 e +1000 mV, apresentou sinais de par redox em +217 mV e +345 mV, um ombro em +617 mV e um sinal de redução em -78 mV. Este intervalo de potencial entre os picos redox (>30 mV) sugere que o processo de oxidação é irreversível e, segundo a equação de Nernst, trata-se de um sistema de transferência monoelétrônica. Porém, o pico anódico que ocorre em +217 mV pode ser atribuído à formação da semiquinona. O pico em +617 mV não pode ser totalmente atribuído à oxidação da L-dopa, pois durante a oxidação desta ocorre a formação de dopaquinonas que podem ser parcialmente reduzidas a L-dopa novamente. Este produto é mais reativo em meio ácido e sugere um ataque nucleofílico ao grupo amino desprotonado, que resulta no produto indólico. Durante a cronoamperometria (5 minutos), em potencial controlado e constante de +617 mV, a solução ficou alaranjada na superfície do eletrodo de platina sugerindo a oxidação da L-dopa; obteve-se assim uma melanina estável e altamente higroscópica de cor preta.

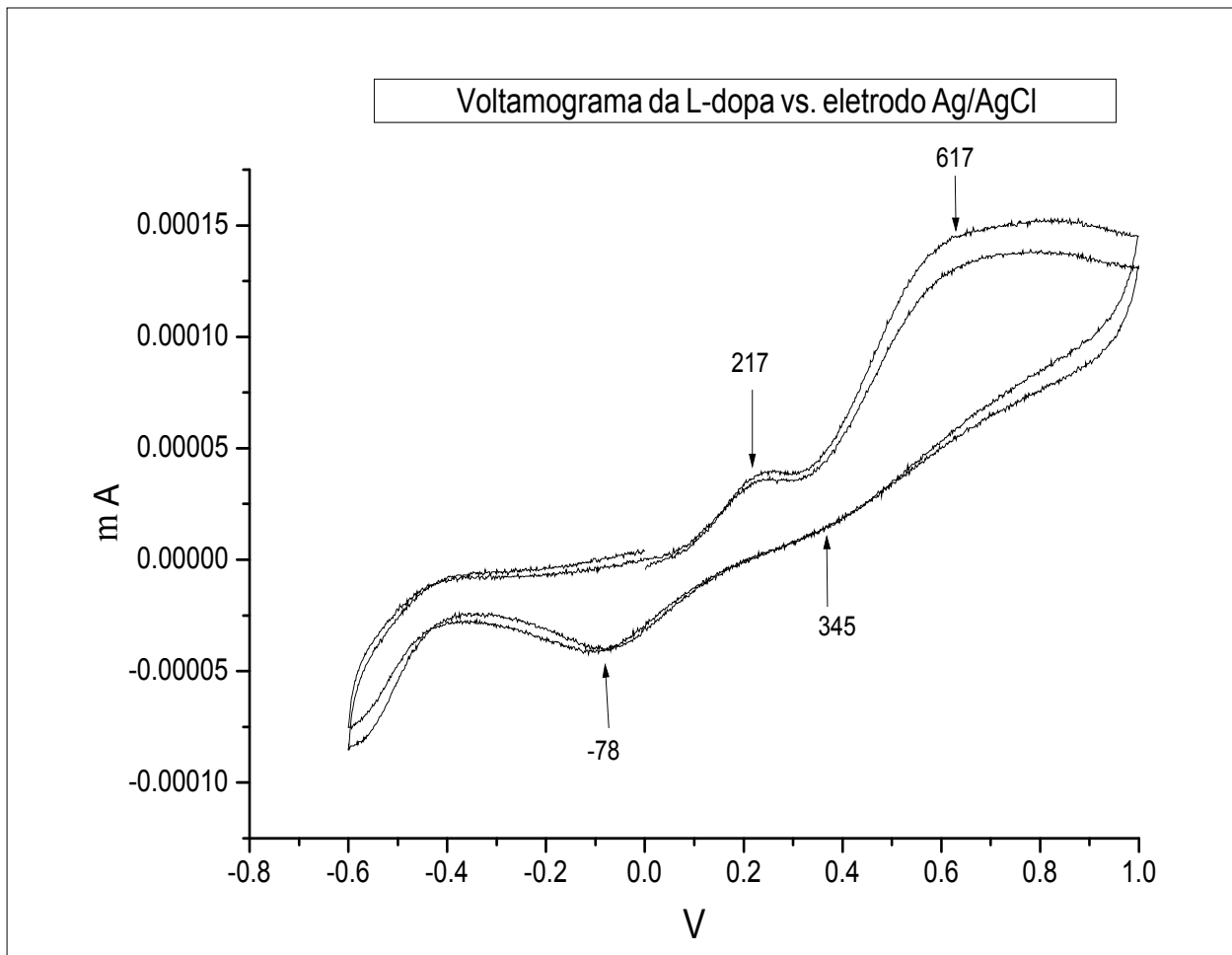


Figura 10. Perfil potenciodinâmico da L-dopa (10 mg) em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em $\text{pH} = 6,8$. Intervalo de potencial $-0,6$ a $+1$ V e velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} .

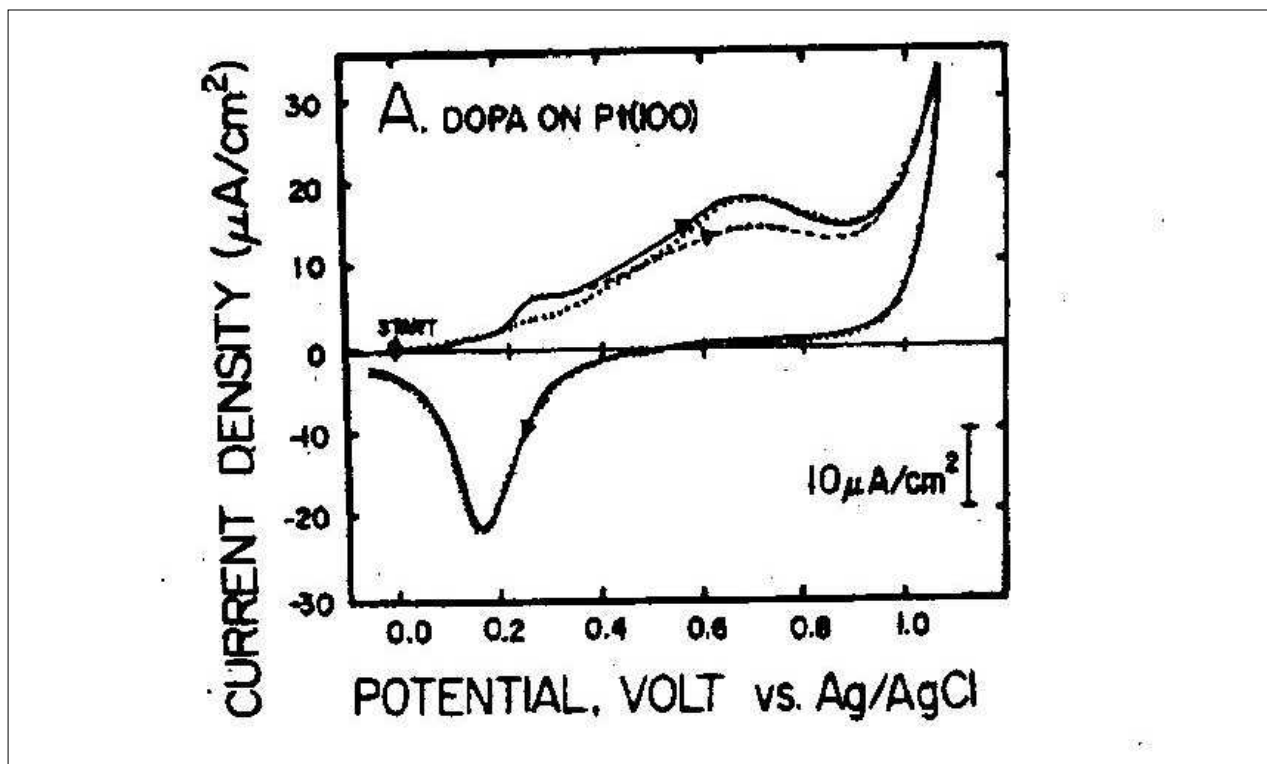


Figura 11. Perfil potenciodinâmico da L-dopa em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Registrado por Stern e colaboradores (1988).

2.4.2 ESPECTROELETROQUÍMICA DE EPR

A espectroeletróquímica de EPR, tanto em faixa de campo magnético de 5000 G quanto de 50 G, foi realizada em temperatura ambiente. Esta técnica foi utilizada com vistas ao estudo do equilíbrio: $Q + QH_2 \rightarrow 2Q^{\cdot-} + 2H^+$, cujo mecanismo responde à formação do radical livre e a estruturação da macromolécula das melaninas (Figura 10) – Q corresponde às espécies quinônicas no sistema.

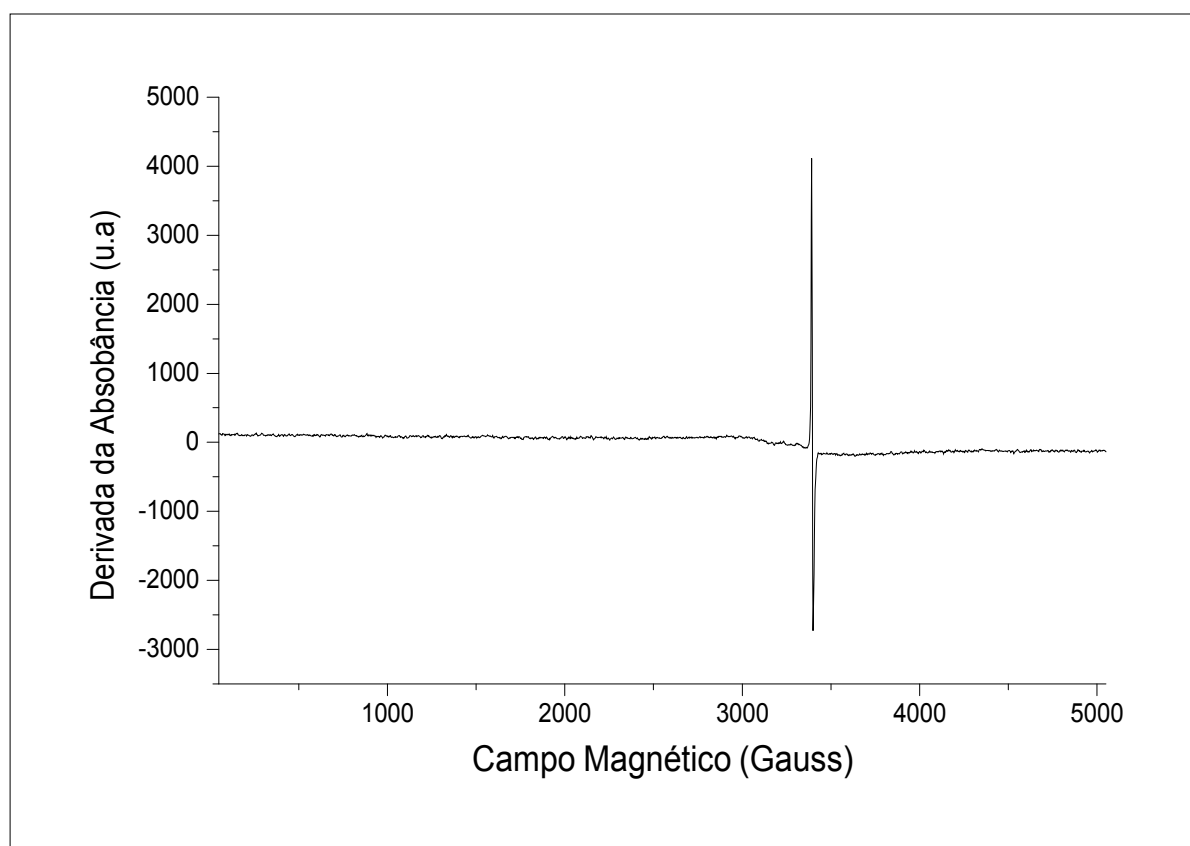


Figura 12. Espectroeletróquímica de EPR em 1ª Derivada da Absorbância da L-dopa em faixa de campo magnético de 5000 G, centrada em 2550 G. Potencial elétrico fixado em +617 mV pela cronoamperometria.

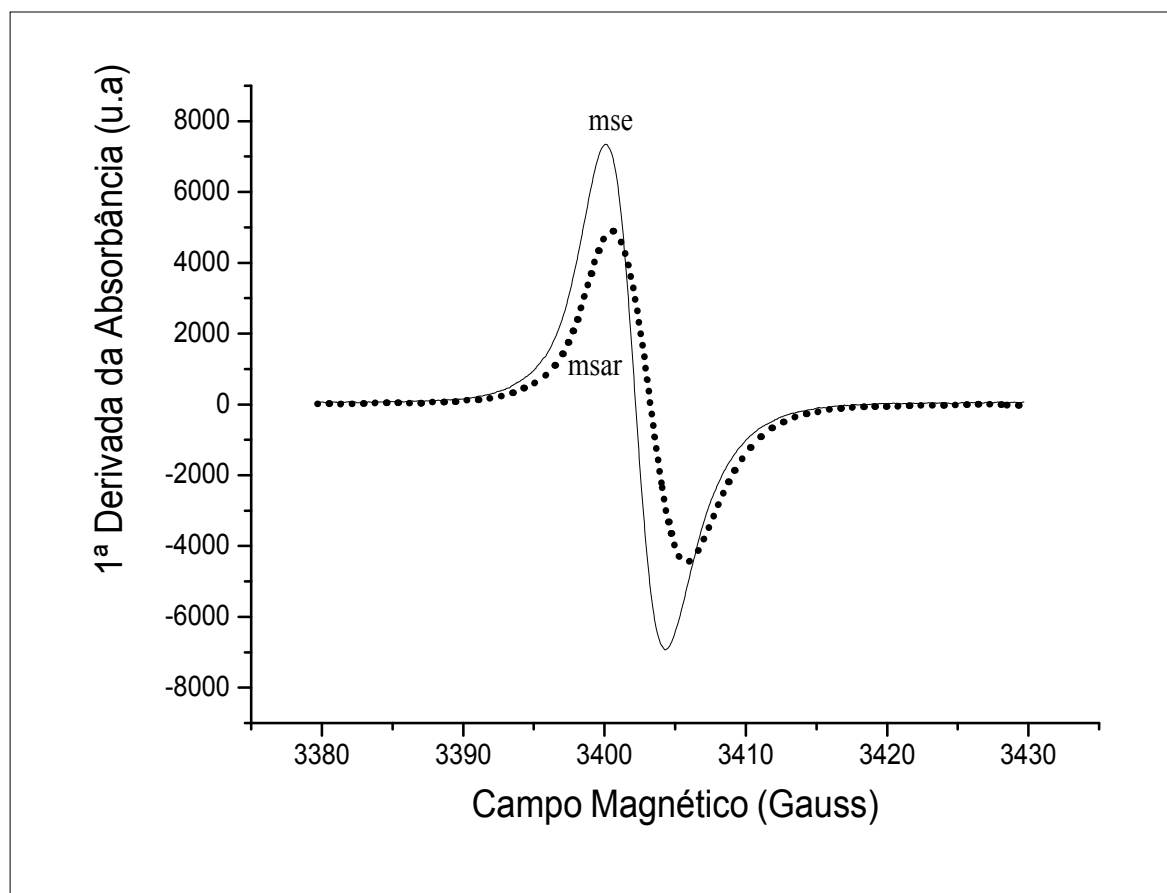


Figura 13. Espectroscopia de EPR em faixa de campo magnético de 50 G, campo central de 3405 G, das ms's. Sinal de RLO típico de radical o-benzo-semiquinona em $g \approx 2,0035$.

O espectro de EPR em campo magnético de 5000 G apresentou uma linha intensa de radical livre orgânico (RLO), indicando a formação do radical esperado durante a oxidação da L-dopa à melanina e a ausência de outras espécies paramagnéticas (Figura 10). O espectro em campo magnético de 50 G, obtido para a mse apresentou linha intensa em $g = 2,0036$, enquanto que a melanina msar apresentou linha com $g = 2,0035$ (Figura 11). Esses valores de g indicam presença de estruturas de σ -semiquinona, $Q\cdot$, nas duas amostras. As concentrações desses grupos, em número de spins g^{-1} de melanina, foram: $msar = 7,47 \times 10^{16}$ e $mse = 9,39 \times 10^{16}$ spin g^{-1} .

2.4.3 ULTRAVIOLETA VISÍVEL DAS AMOSTRAS EM ESTADO SÓLIDO

Os dados de espectroscopia eletrônica – UV-vis – fornecem informações importantes a partir da razão E_4/E_6 , que é a razão entre as absorbâncias dos comprimentos de onda em 465 e 665 nm, neste caso, $\log(1/R)$ nestes comprimentos de onda. Esta razão é válida tanto para amostras no estado sólido quanto líquido. A razão E_4/E_6 indica o grau de condensação aromática da estrutura. A condensação de anéis aromáticos desloca o λ para comprimentos de onda cada vez maiores, até chegar a região do visível, onde são feitas as leituras para o cálculo da razão E_4/E_6 . São necessários pelo menos 4 anéis condensados para se obter λ máximo na região de 465 nm (E_4) e, pelo menos 5 anéis condensados para se ter λ máximo em 665 nm. Assim, quanto menor for a razão entre as absorbâncias citadas, maior massa molecular e mais conjugada é a estrutura, pois a condensação de grupos aromáticos apresenta uma razão inversa a quantidade de grupos alifáticos. Isto pode ser explicado comparando-se com estrutura química da grafite, cuja razão E_4/E_6 é igual a 1 devido às conjugações dos anéis aromáticos ao longo de toda sua estrutura.

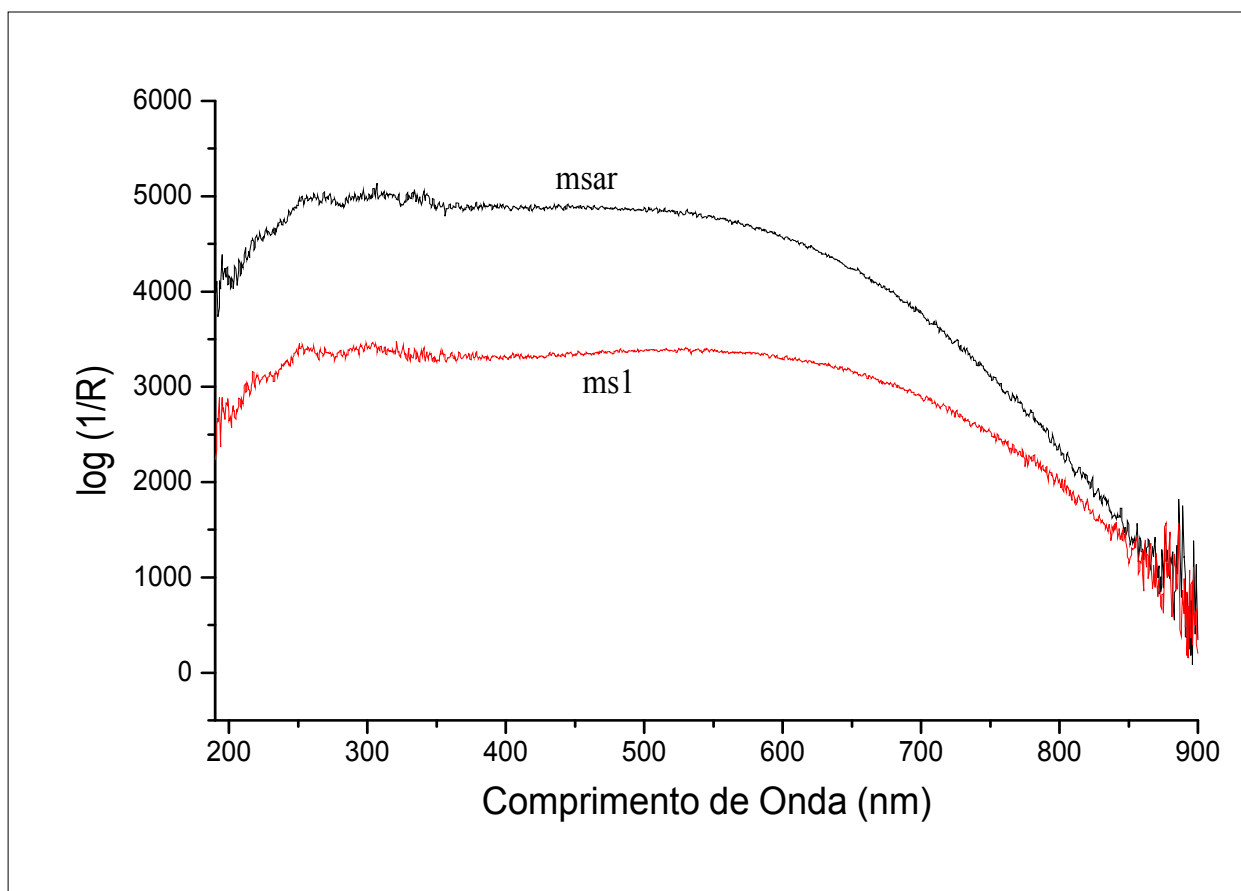


Figura 14. Espectroscopia eletrônica em estado sólido em reflectância das melaninas sintetizadas ao ar (msar) e por via eletroquímica (ms1).

Os espectros de UV-VIS das ms's (Figura12) foram tirados das amostras no estado sólido e registrados em reflectância ($\log 1/R$). Os espectros mostraram razão E_4/E_6 de 1,35 para a msar e 1,21 para a mse. Assim, os resultados sugerem que a mse pode apresentar estrutura molecular maior, mais condensada e/ou com maior número de conjugações em relação a msar.

2.4.3 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

A espectroscopia de IVTF ou espectroscopia vibracional foi registrada em transmitância (Figura 13). O espectro da msar apresentou uma banda larga entre $3600-3100\text{ cm}^{-1}$, típica de deformação axial de grupos $-\text{OH}$ em pontes de hidrogênio; absorção de energia em 1715 cm^{-1} atribuída a carbonilas ($\nu\text{C=O}$) de grupos

carboxílicos ($-\text{COOH}$) e em 1636 cm^{-1} de absorção assimétrica de $\text{C}=\text{O}$ de grupos carboxilatos (COO^-). Pode-se atribuir a absorção em 1093 cm^{-1} ao estiramento simétrico (ligação σ) do grupo $\text{C}-\text{O}$ de álcoois.

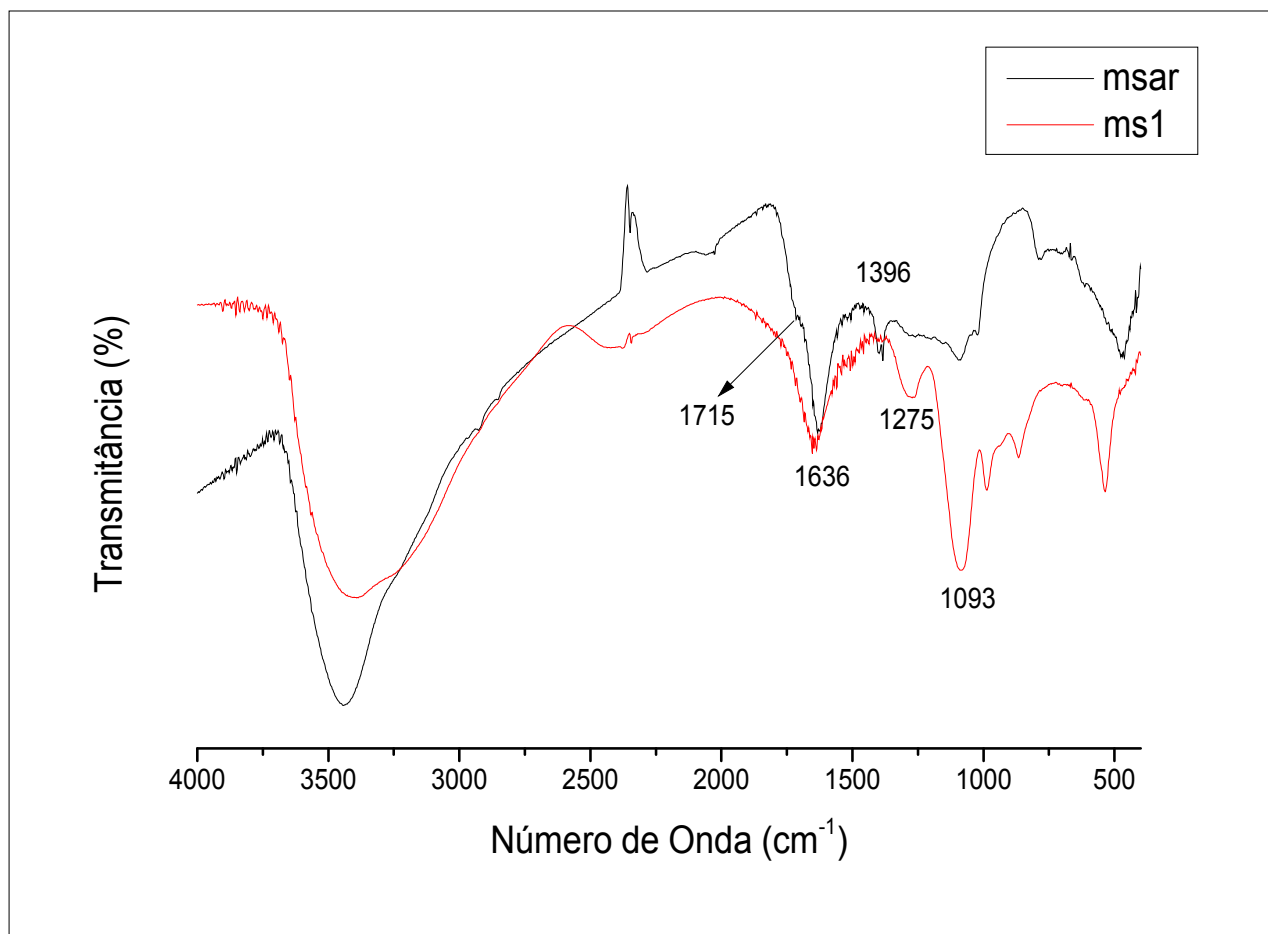


Figura 15. Espectroscopia de infravermelho em Transmitância das melaninas sintetizadas ao ar (msar) e eletroquimicamente (mse).

Comportamento semelhante foi observado para a mse, cujo espectro apresentou também bandas típicas em: 3600 cm^{-1} , atribuídas a deformação axial de grupos $-\text{OH}$, em 1715 cm^{-1} , absorção referente ao estiramento assimétrico de $-\text{COOH}$, em 1636 cm^{-1} , absorção típica de grupos $-\text{COO}^-$ em estiramento assimétrico e absorção de energia em 1086 cm^{-1} , atribuída a grupos $\text{C}-\text{O}^-$ de álcoois e ésteres. Entretanto, a absorção em 1093 cm^{-1} é mais intensa para a amostra ms1, atribuindo este fato a uma “polimerização” diferenciada e mais específica.

A partir destes resultados pode-se sugerir que o processo de oxidação eletroquímica foi mais eficiente em relação à oxidação química. Ambas amostras apresentaram propriedades semelhantes às melaninas naturais [CLANCY, et al, 2000], sendo que a melanina sintetizada eletroquimicamente apresentou estrutura supramolecular, capacidade de absorção de radiação e geração de radicais livres superior a msar.

A segunda parte do trabalho enfocou a síntese eletroquímica de melaninas pela variação da concentração de L-dopa no sistema. Foram avaliados também os comportamentos eletroquímicos e espectroscópicos destes produtos.

CAPÍTULO 3

❖ PARTE II – SÍNTESE ELETROQUÍMICA COM VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE L-DOPA

A segunda etapa de trabalho envolveu o estudo do comportamento das melaninas sintetizadas eletroquimicamente em função da variação da concentração da 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina na célula eletroquímica.

3.1 METODOLOGIA DE SÍNTESE

Foram preparados 300 mL de solução tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em pH 6,8. Foram retiradas 12 alíquotas de 10 mL a fim de realizar síntese em triplicata. A concentração de L-dopa no sistema eletroquímico foi de 5, 10, 30 e 50 mg de L-dopa por 10 mL da solução de eletrólito de suporte, respectivamente. As amostras foram denominadas: ms05, ms10, ms30 e ms50 em alíquotas distintas e em triplicata para obter também material suficiente para as demais análises. Para todas as sínteses, o tempo de oxidação pela cronoamperometria foi de 5 minutos, em potencial controlado de +617 mV.

As melaninas obtidas foram lavadas, centrifugadas a 3500 rpm e secadas em estufa a 45 °C.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – Parte II

3.2.1 A INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE L-DOPA NO SISTEMA ELETROQUÍMICO

A variação da concentração de L-dopa no processo de oxidação pode causar variações nos perfis potenciodinâmicos no processo de oxidação da L-dopa. Este fato pode ser estudado por meio da análise da magnitude dos picos anódicos e catódicos. A Figura 14 mostra o perfil potenciodinâmico, na faixa de -0.6 V a $+1.0$ V vs. Ag/AgCl a 100 mV s^{-1} , que corresponde à oxidação da molécula de L-dopa à melanina sobre o eletrodo Pt, usando concentração de 5, 10, 30 e 50 mg de L-dopa por 10 mL do eletrólito. Como pode ser observado, o voltamograma de I vs E apresenta perfil típico de processo de oxidação e redução desta molécula orgânica, isto é, pico de redução por volta de $-0,18$ V e pico de oxidação próximo de $+0.27$ V (vs. Ag/AgCl). O fato de o pico catódico ser menos intenso que o anódico evidencia a irreversibilidade do processo. Quando se variou a concentração de L-dopa foi possível observar que há um aumento do pico anódico com o aumento da concentração do composto em solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ de $+0.061$ mA a 0.33 mA.

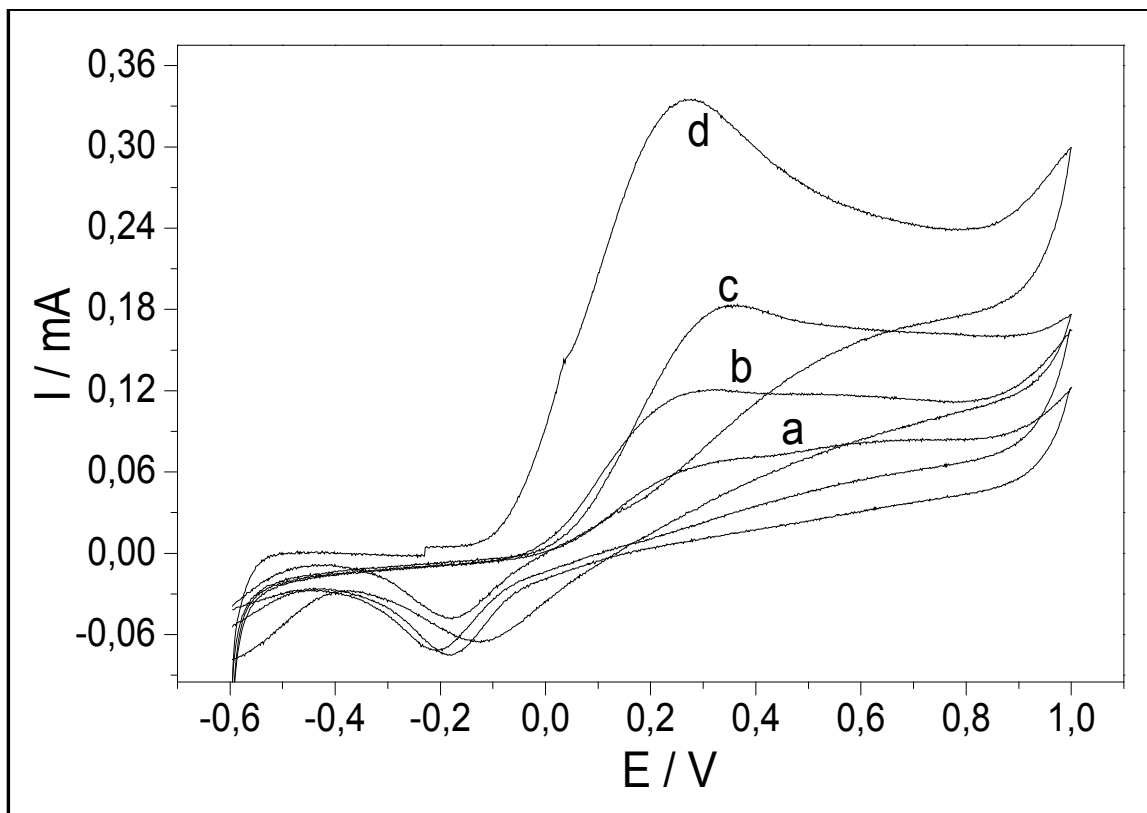


Figura 16. Perfil potenciodinâmico de obtenção de melaninas em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em $\text{pH} = 6,8$ num intervalo de potencial de $-0,6 \text{ V}$ a $+1,0 \text{ V}$ (vs Ag/AgCl) e velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} . As concentrações de L-dopa foram: a – 5 mg, b – 10 mg, c – 30 mg e d – 50 mg por 10 mL da solução do eletrólito.

Este comportamento pode indicar que as cargas anódicas envolvidas neste processo de oxidação aumentam e, conseqüentemente, o produto oxidado. As cargas foram obtidas por integração das curvas I vs E correspondentes, isto é, são calculadas pelas áreas sob as curvas potenciodinâmicas. Os resultados apresentados na Tabela 1 foram feitos em triplicata.

Tabela 1. Determinação das cargas anódicas geradas em cada síntese eletroquímica, a partir da variação da concentração de L-dopa no sistema.

Amostras	Cargas (Coulomb)
ms05	4,5
ms10	6,1
ms30	10,2
ms50	16,4

Os picos que aparecem próximos a +200 mV podem ser atribuídos a formação da dopaquinona derivada da dopa. A ausência de um pico de redução correspondente indica que a formação da dopaquinona está acoplada ao processo químico que levará a formação do leucodopacromo, que é mais facilmente oxidado em relação a L-dopa. O rearranjo do dopacromo para os intermediários indólicos de 5,6-di-hidroxi-indol, que é oxidado a uma mistura de indol-5,6-quinona e ácido indol-5,6-quinona-2-carboxílico, por sua vez, interagem formando uma melanina específica. Os picos de redução que aparecem próximos a -200 mV podem ser atribuídos à redução de quinonas e semiquinonas, segundo pesquisas recentes [ROBINSON, et al., 2001; PEZELLA, et al., 1996].

3.2.2 ESPECTROELETROQUÍMICA DE EPR

A espectroeletroquímica de EPR da L-dopa, em campo magnético de 5000 G, a temperatura ambiente (300 K) – (Figura 15), permitiu acompanhar o processo de oxidação da L-dopa. O espectro mostra nitidamente o sinal intenso do radical livre orgânico (RLO). No instante em que o potencial elétrico dentro do sistema alcança +617 mV (potencial de oxidação da L-dopa), o sinal é registrado pela espectroscopia de EPR, referente à reação: $Q + QH_2 \rightarrow 2Q^{\cdot-} + 2H^+$.

Os espectros de EPR das melaninas, em campo magnético 50 G e temperatura de 300 K (Figura 17), exibem apenas um sinal intenso em $g \cong 2,0035$, típico do RLO de *o*-benzosemiquinona. Esta espécie radicalar intermediária é formada em função da oxidação de uma das hidroxilas do grupo catecol que, por ação de agentes químicos ou energia eletroquímica, desencadeia o processo de melanização.

O nº de spins g^{-1} foi calculado a partir da massa bem compactada de amostra dentro do tubo de quartzo e sua altura. Correlacionado-se estes dados aos do padrão “weak pitch” da análise do mesmo dia, pôde-se determinar a concentração de spins em cada amostra sólida.

A partir da integração dos espectros de EPR no programa WinEPR[®] foi possível calcular o teor de spins g^{-1} presente em cada uma das amostras sólida de melanina – Tabela 2.

Tabela 2. Teor de spins g^{-1} presentes nas melaninas sintetizadas eletroquimicamente.

Melanina sintética	n.º spins g^{-1}
ms05	$0,38 \cdot 10^{17}$
ms10	$3,89 \cdot 10^{17}$
ms30	$6,06 \cdot 10^{17}$
ms50	$9,14 \cdot 10^{17}$

Pela correlação dos valores da Tabela 2 com os valores de carga da Tabela 1 e as concentrações de L-dopa no sistema pôde-se notar que o aumento da concentração do composto na eletro-síntese é diretamente proporcional ao aumento do nº de spins, bem como o aumento de cargas em solução (Figura 17).

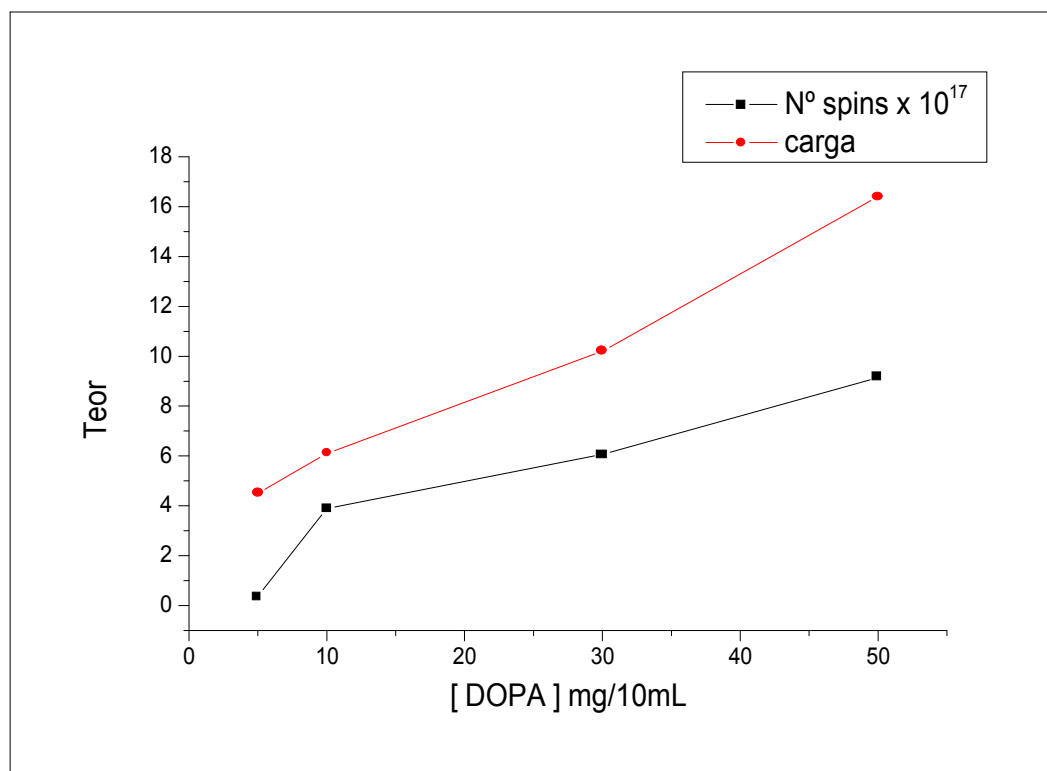


Figura 17. Correlação da concentração de L-dopa e as quantidades de carga em solução e o nº spins g⁻¹.

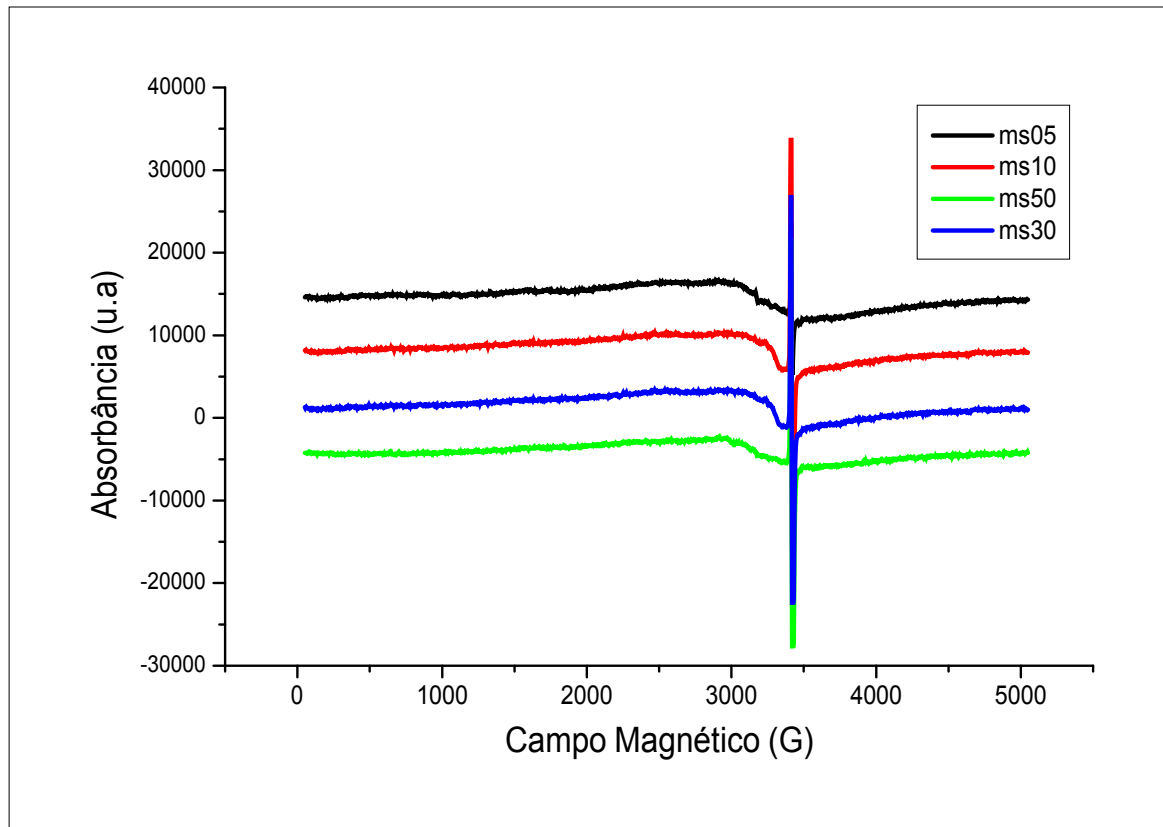


Figura 18. a) Espectroeletróquímica de EPR em banda X (9,5 GHz) das melaninas durante a oxidação eletroquímica em célula *flat*, em campo magnético de 5000 G, a 300 K.

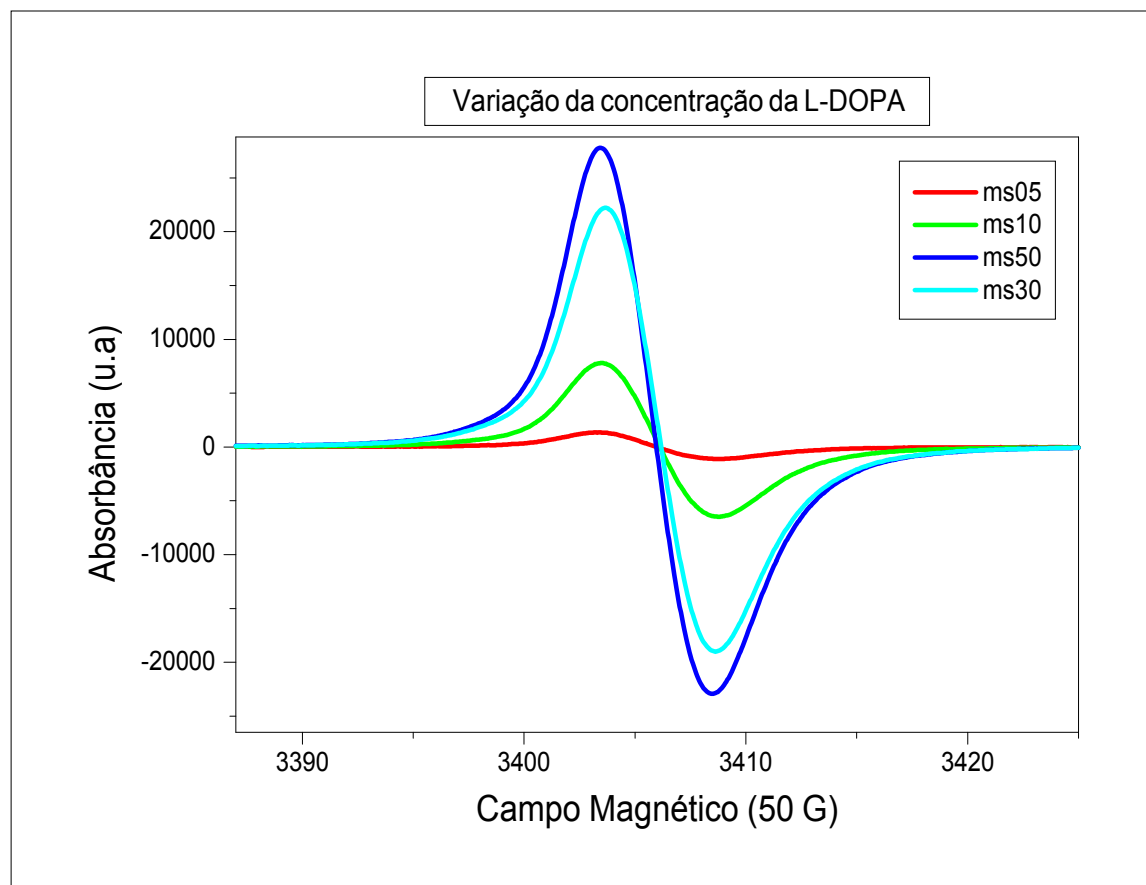


Figura 19. Espectroscopia de EPR das amostras sólidas de melaninas em campo magnético de 50 G, a 300 K.

Estes dados também corroboram com a voltametria, ou seja, são formadas mais espécies intermediárias durante o processo de oxidação eletroquímica com o aumento da concentração de L-dopa no sistema.

3.2.3 ULTRAVIOLETA VISÍVEL DAS AMOSTRAS EM ESTADO SÓLIDO

Os dados da espectroscopia UV-vis (Figura 20) em estado sólido mostraram que a melanina sintetizada com 30 mg de L-dopa no sistema eletroquímico apresentou menor razão E_4/E_6 . Este dado sugere que esta melanina tem maior estrutura molecular, mais aromatizada, com maior número de ligações simples e duplas alternadas entre si e com uma maior capacidade de absorção da radiação. Quanto menor a razão entre as absorções em 465 e 665 nm (E_4/E_6), maior massa molecular, mais homogênea e maior capacidade de absorção de radiação possui a estrutura.

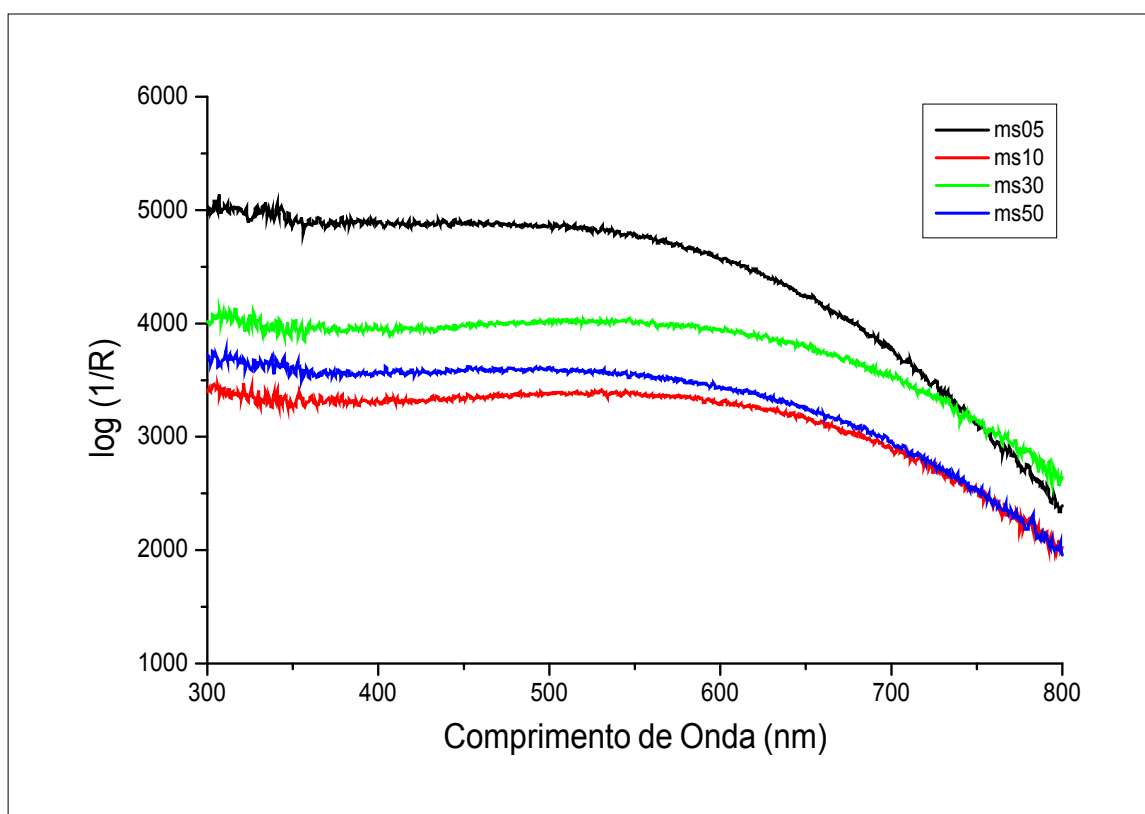


Figura 20. Espectro de UV das melaninas em estado sólido. Modo de Reflectância. Intervalo de 300 a 800 nm.

Este requisito leva-nos a observar que, pelos dados da Tabela 3, a ms30 apresentou esta característica mais fortemente em relação às demais.

Tabela 3. Razão E_4/E_6 das melaninas sintetizadas eletroquimicamente.

Melanina sintética	E_4/E_6
ms05	1,32
ms10	1,21
ms30	1,10
ms50	1,25

Estes dados sugerem que, possivelmente nesta concentração a L-dopa tenha sofrido uma oxidação eletroquímica mais efetiva.

3.2.4 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia no infravermelho mostra que, em virtude de sua oxidação, a L-dopa sofre uma mudança muito brusca na estrutura e, como consequência, o espectro do produto final resultante do processo de melanização é muito diferente quando comparado ao do composto inicial (Figura 21). Contudo, o produto final possui características espectroscópicas típicas das melaninas, com a intensificação de sinais de absorção em 1656 e 1093 cm^{-1} , típicos de grupos $-\text{COO}^-$ e C–O, respectivamente. O aumento destes grupamentos funcionais na estrutura supramolecular da melanina pode aumentar a possibilidade de quelação desta estrutura a espécies metálicas na forma iônica no solo.

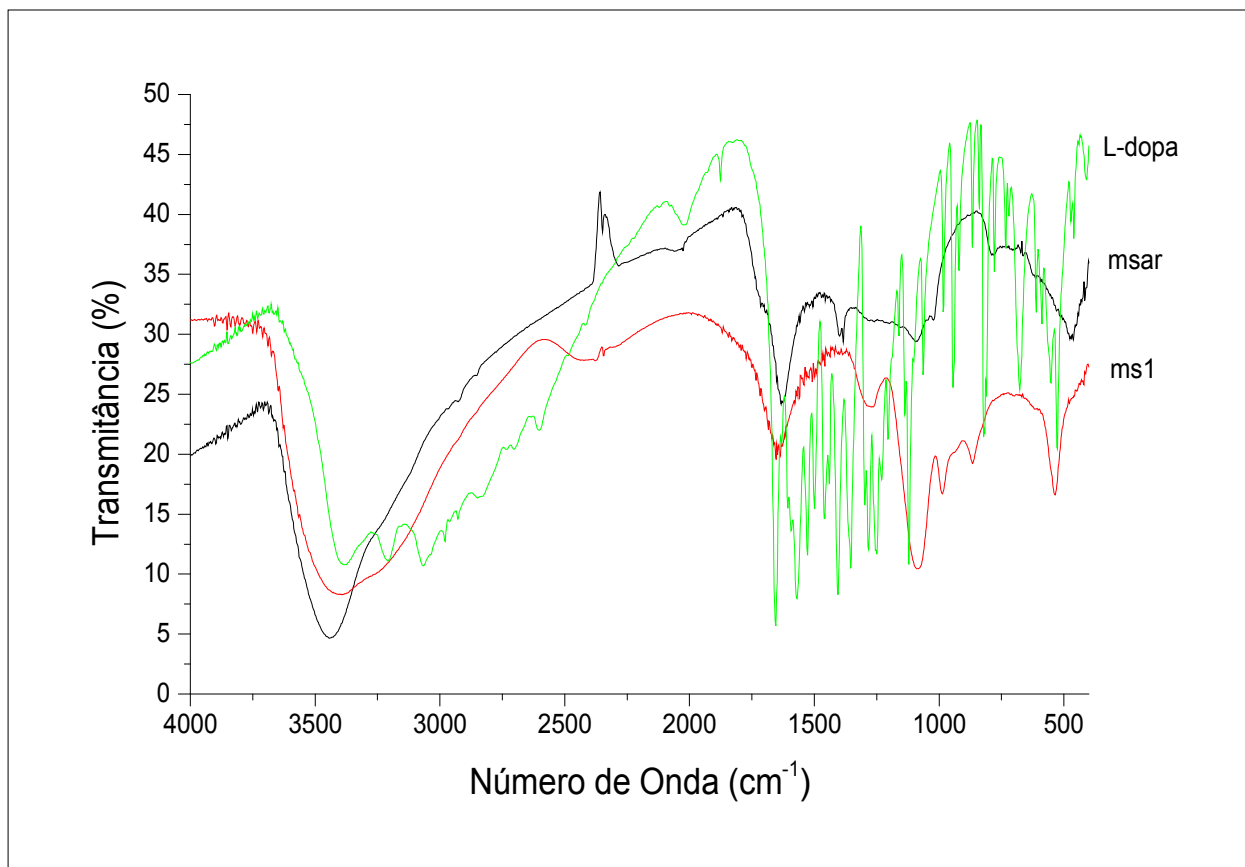


Figura 21. Espectroscopia de infravermelho do composto de partida (L-Dopa) em comparação com as melaninas química (msar) e eletroquímica (ms1) geradas a partir de sua oxidação.

A oxidação por via eletroquímica gera um produto mais higroscópico que a oxidação química. Pela espectroscopia no infravermelho esta característica pode ser observada (Figura 22). Mesmo que ambos os processos sejam de oxidação, as melaninas obtidas apresentam espectros distintos que possivelmente interfere na conformação final dos mesmos.

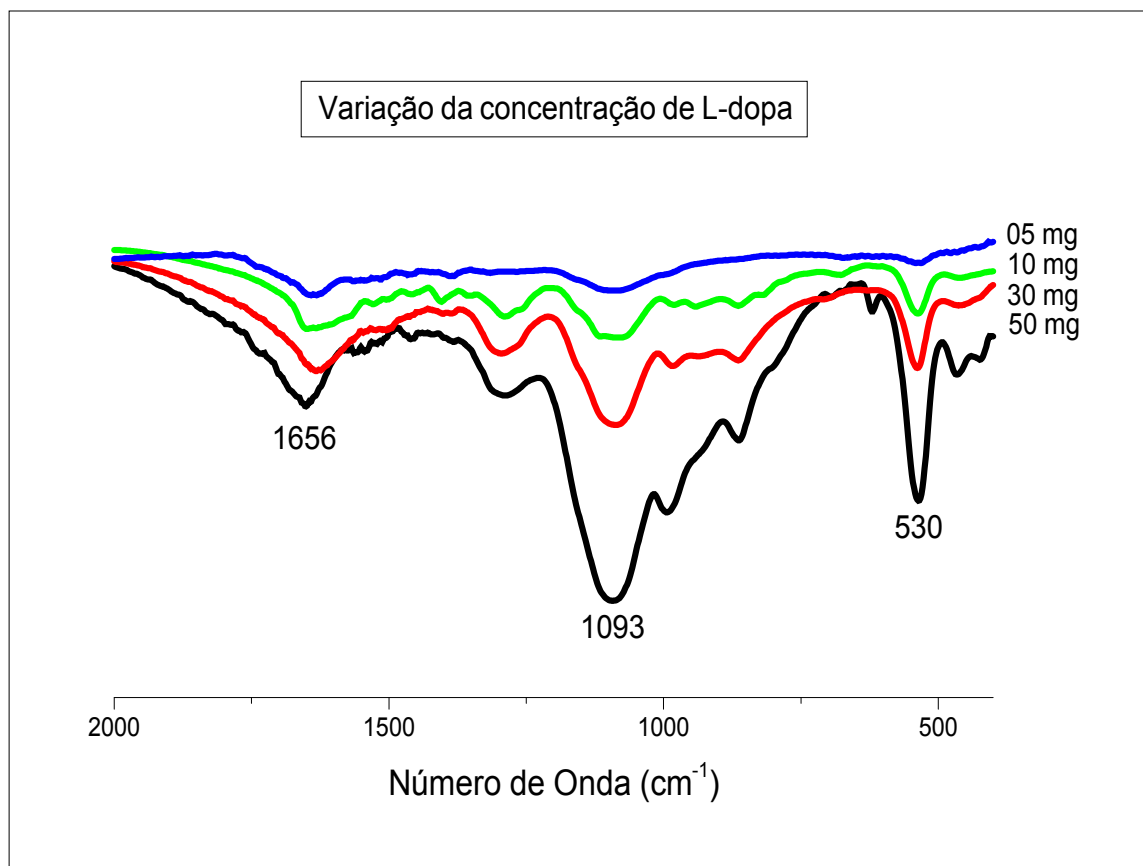


Figura 22. das melaninas eletroquimicamente sintetizadas - Processo de melanização. Aumento dos sinais típicos de grupamentos -COO^- e C-O nas amostras com maior teor de L-dopa no sistema oxidativo.

Tanto o produto final sólido obtido quanto o material em suspensão resultante desta oxidação variavam de acordo com a concentração de L-dopa no sistema. A oxidação química ao ar (msar) formou um produto em forma de pó depositado no fundo do recipiente. Nenhuma das melaninas sintetizadas eletroquimicamente demonstrou comportamento semelhante. Ao contrário, as de concentração de 5 e 10 mg de L-dopa ficaram suspensas na forma de grumos, enquanto que as de 30 e 50 mg apresentavam suspensão homogênea em todo o recipiente como mostra a Figura

23 e 24. Este aspecto distinto entre as amostras pode ser proveniente de reestruturação mais rápida e menos organizada, ocasionado possivelmente pelo excesso de cargas em solução. As características morfológicas de todas elas a olho nu apresentaram-se bem distintas. Análises microscópicas foram implementadas para confirmar este fato.



Figura 23. Visualização dos produtos obtidos a partir dos processos oxidativos da L-dopa à melanina; a) msar e mse respectivamente;



Figura 24. msar, ms05, ms10 (em cima), ms30 e ms50 mg (em baixo), da esquerda para a direita. Formação de produtos com conformações distintas entre si oriundas do processo oxidativo e da variação de concentração.

3.2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) das melaninas sintéticas forneceu informações importantes quanto à sua morfologia.

Com relação à morfologia, as melaninas eletroquimicamente sintetizadas se apresentaram distintas a sintetizada quimicamente. A msar apresentou-se em forma de um pó fino que, em suspensão aquosa, se depositava mais facilmente. Pela microscopia desta amostra (Figura 25) fica evidente sua característica morfológica: material bem disperso, pouco agregado e com unidades menores. Também a msar

apresentou a menor cristalinidade e a menor estabilidade termodinâmica entre todas as melaninas sintetizadas neste trabalho.

As melaninas sintetizadas eletroquimicamente se apresentaram mais agrupadas. A melanina sintetizada com menor concentração de DOPA (ms05) no sistema eletroquímico se apresentou em forma de redes (Figura 27), enquanto que as com maiores concentrações (10, 30 e 50 mg) apresentaram-se em grupamentos maiores. O maior teor de L-dopa no sistema fez com que a agregação entre as “unidades” fosse maior, como se pode notar nas Figuras 29, 31 e 34. A melanina com maior teor de L-dopa (ms50) gerou um produto em forma de “filamentos” ou “bastonetes” (Figuras 34 e 35) que possuía grande estabilidade termodinâmica diante do feixe de energia. Assim, para as melaninas oxidadas eletroquimicamente, quanto maior a concentração do L-DOPA no sistema maior a agregação das unidades e maior a estabilidade térmica do produto.

A formação de filamentos ou bastonetes na amostra com maior concentração de L-dopa (ms50) no sistema eletro-sintético pode ser explicada. A unidade molecular fundamental é considerada um pequeno oligômero planar consistindo de ~5 unidades indólicas de DHI/DHCA. Estes oligômeros planares podem se unir através de interações por empilhamento- π e interações laterais, que resultam no formato filamentososo do produto final. Esta forma de agregação é possibilitada principalmente pelos vários estados de oxidação existentes nas unidades quinonas, semiquinonas e hidroquinonas em solução. Esta estrutura formada é denominada de “agregado fundamental” por muitos pesquisadores [CLANCY, SIMON, 2001].

Nas primeiras varreduras sobre a placa de parlódio, constatou-se que o feixe eletrônico sofria difração quando incidia sobre o material. Com a precisão do equipamento pôde-se verificar que havia cristais de formato hexagonal na placa para a melanina ms05 (Figura 28). Entretanto, após alguns segundos de incidência do feixe

eletrônico sobre a amostra (cristal) o mesmo passava a se deteriorar. Notou-se que com esta intensidade de energia (2,4 W de potencia – $\frac{1}{4}$ da potencia máxima do equipamento) o cristal que se desintegrava só poderia ser de origem orgânica, pois a energia suficiente para desintegrar cristais inorgânicos deveria ser bem maior.

Das amostras estudadas aquela em que o cristal apresentou maior estabilidade termodinâmica sob o feixe de elétrons foi à melanina oxidada eletroquimicamente com 5 mg de DOPA no sistema eletroquímico. Aparentemente, todas as melaninas apresentaram “cristais”, todavia, não foi possível fotografá-los adequadamente devido à rápida desintegração que sofriam durante a exposição ao feixe eletrônico, como se pode observar nas Figuras 29, 30, 32 e 33. O produto resultante da oxidação ao oxigênio do ar (msar) apresentou-se com unidades de tamanho inferior em relação aos da oxidação eletroquímica.

A existência de cristais no produto final gerou discussão quanto a sua constituição, visto que, segundo a literatura, até hoje não foi possível a síntese de um cristal de melanina. Para validar a estrutura do produto obtido utilizou-se a análise por difração de raios-X.

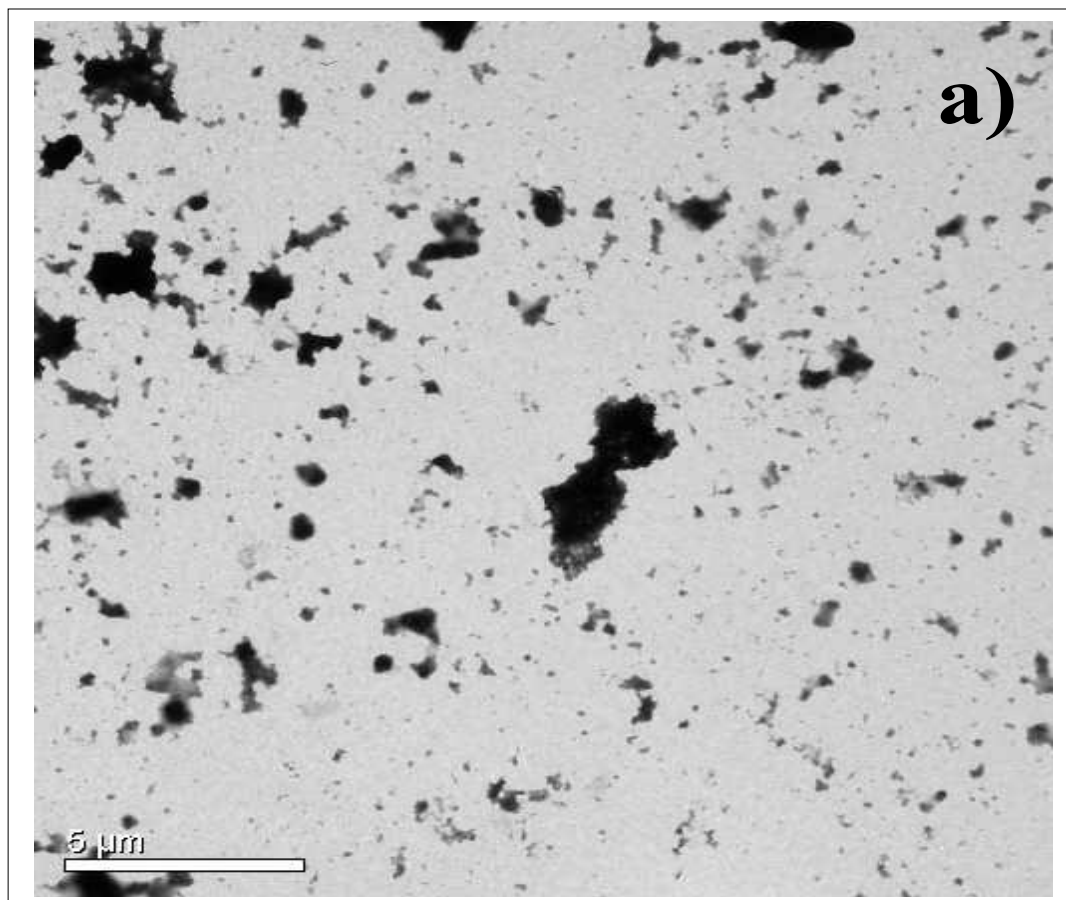


Figura 25 a) MET da melanina sintetizada ao ar (msar) aumentada 6.000 vezes; b) msar aumentada 150.000 vezes.

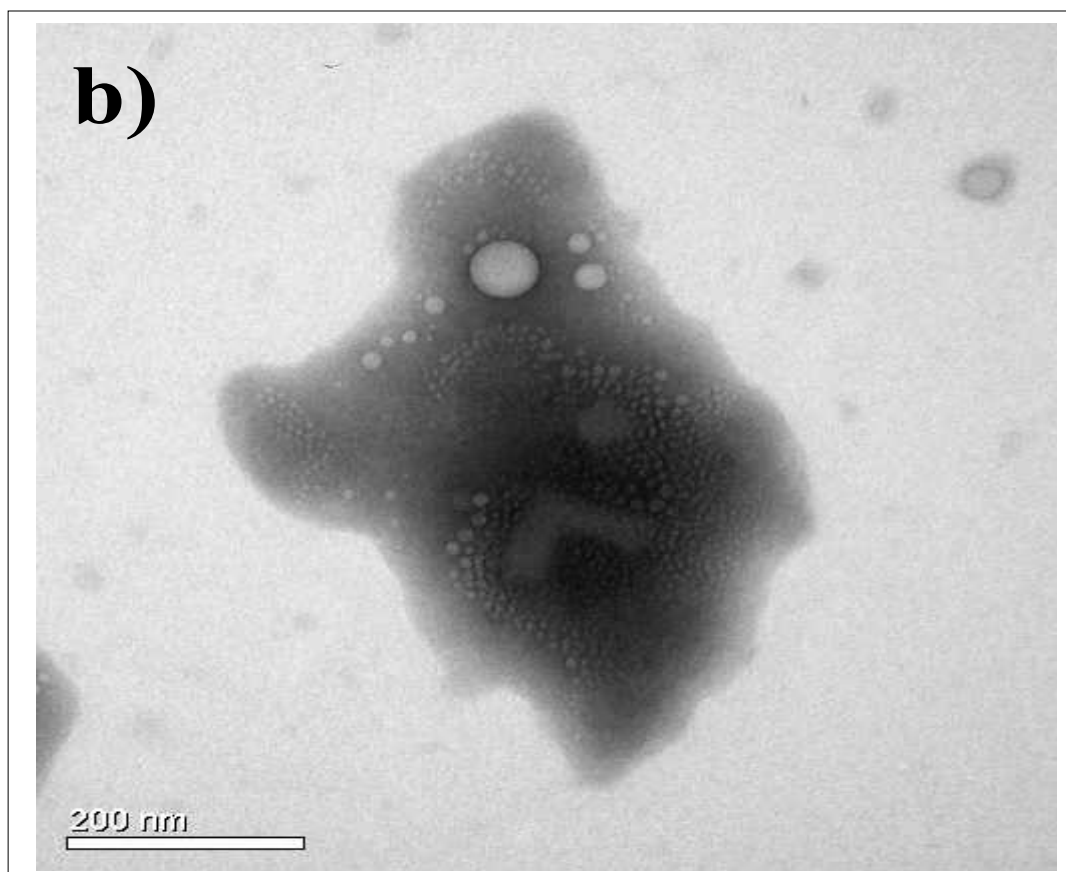


Figura 26. b) MET da melanina sintetizada ao ar (msar) aumentada 150.000 vezes.

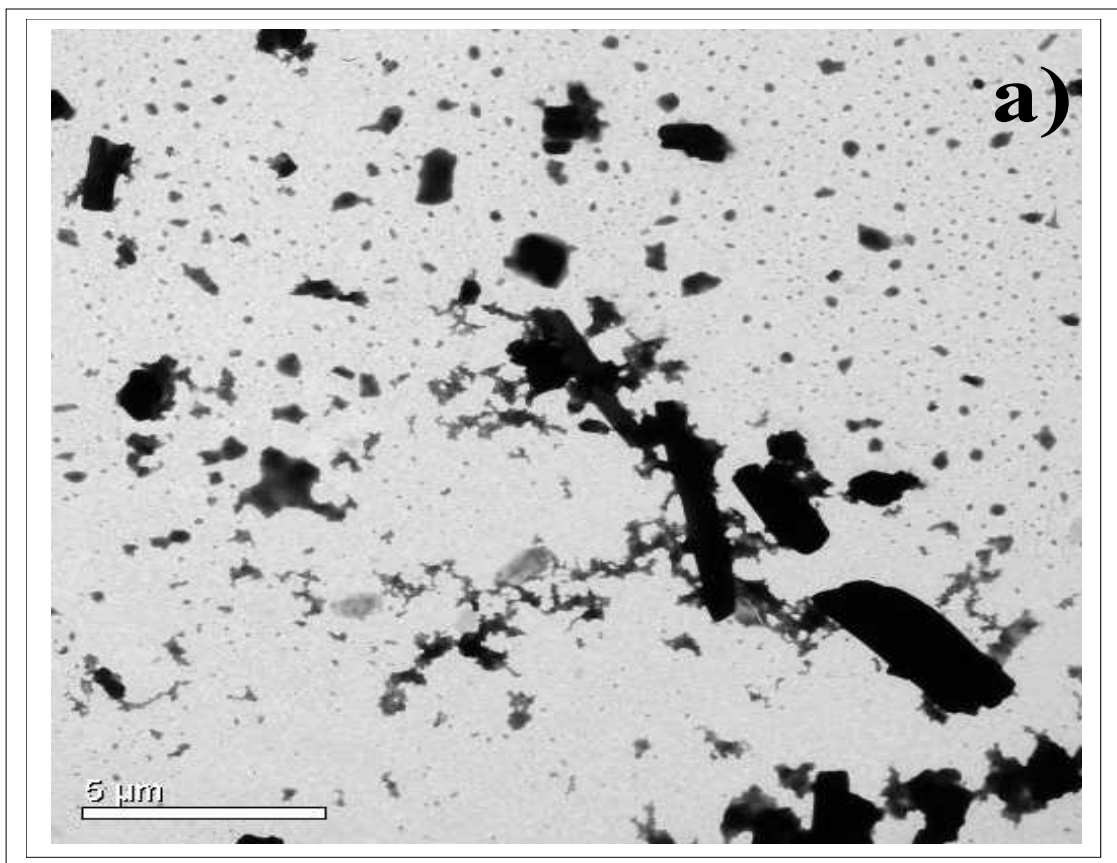


Figura 27. a) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms05 aumentada 6.000 vezes

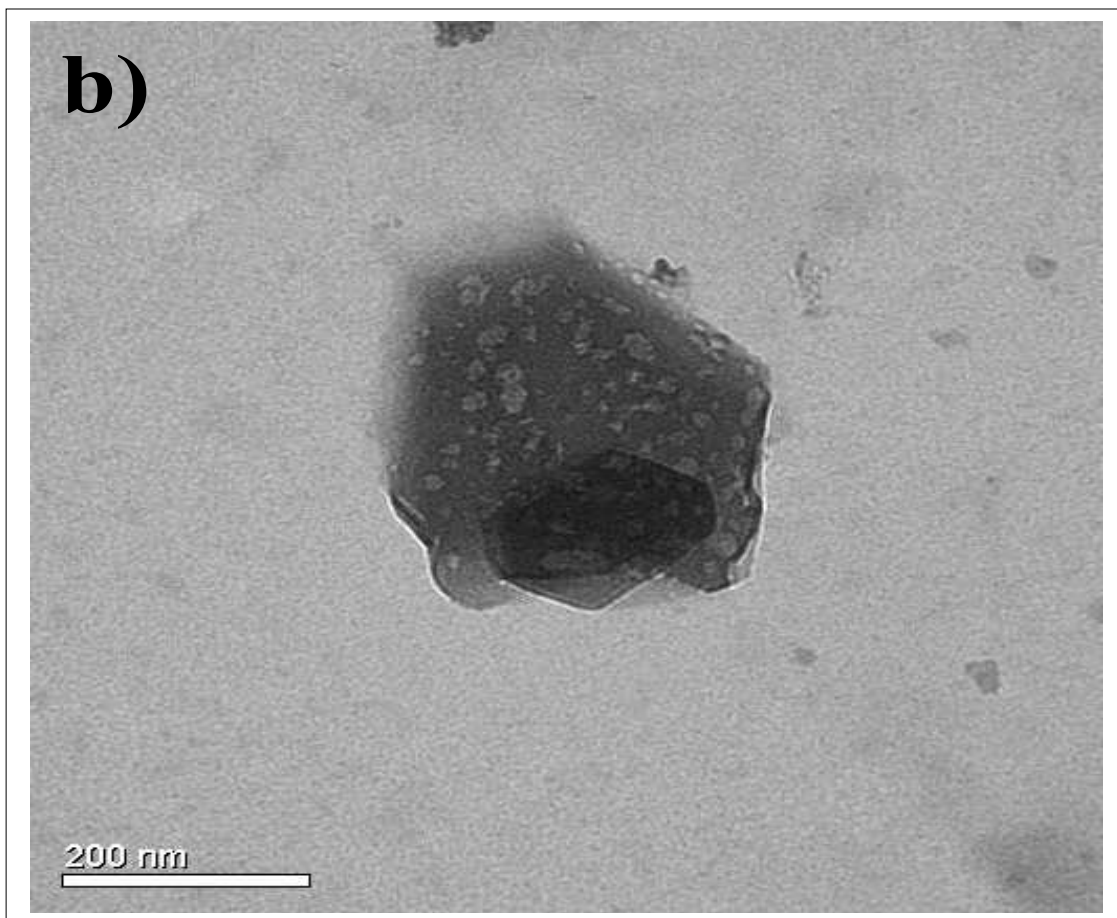


Figura 28. b) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms05 aumentada 150.000 vezes.

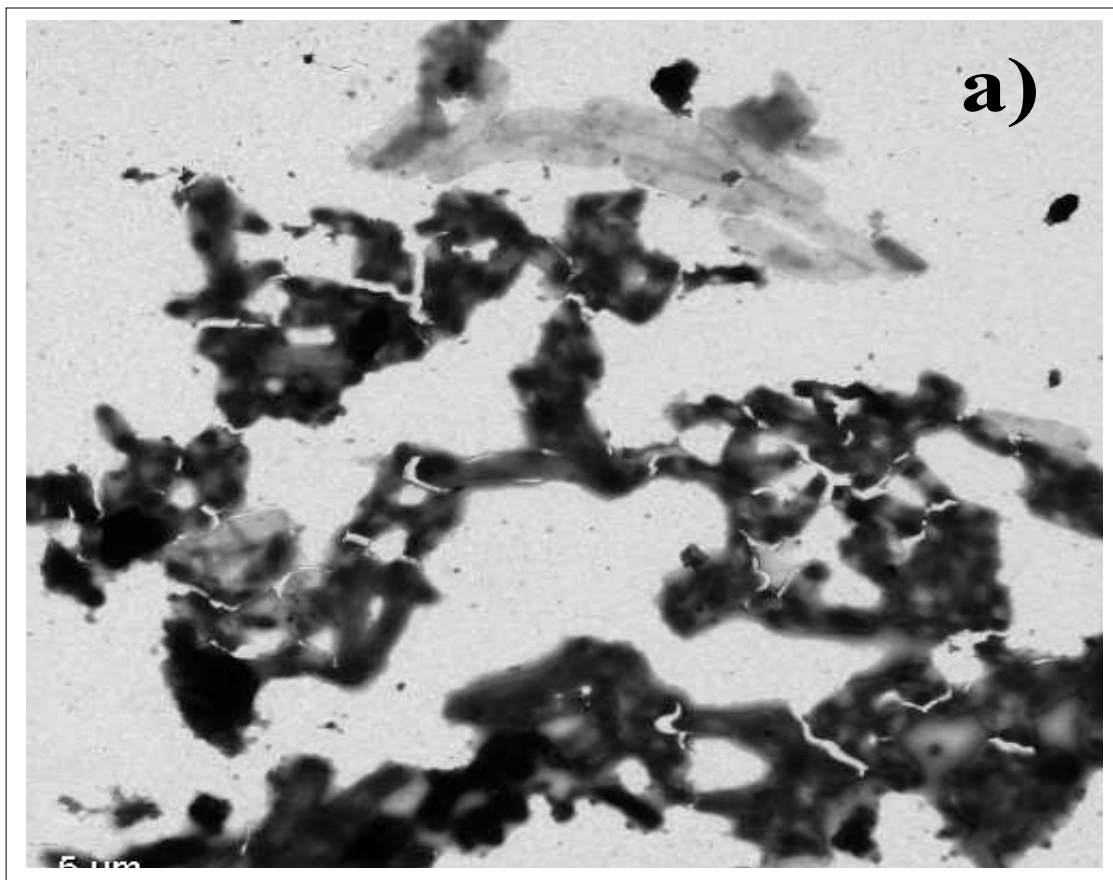


Figura 29. a) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms10 aumentada 6.000 vezes.

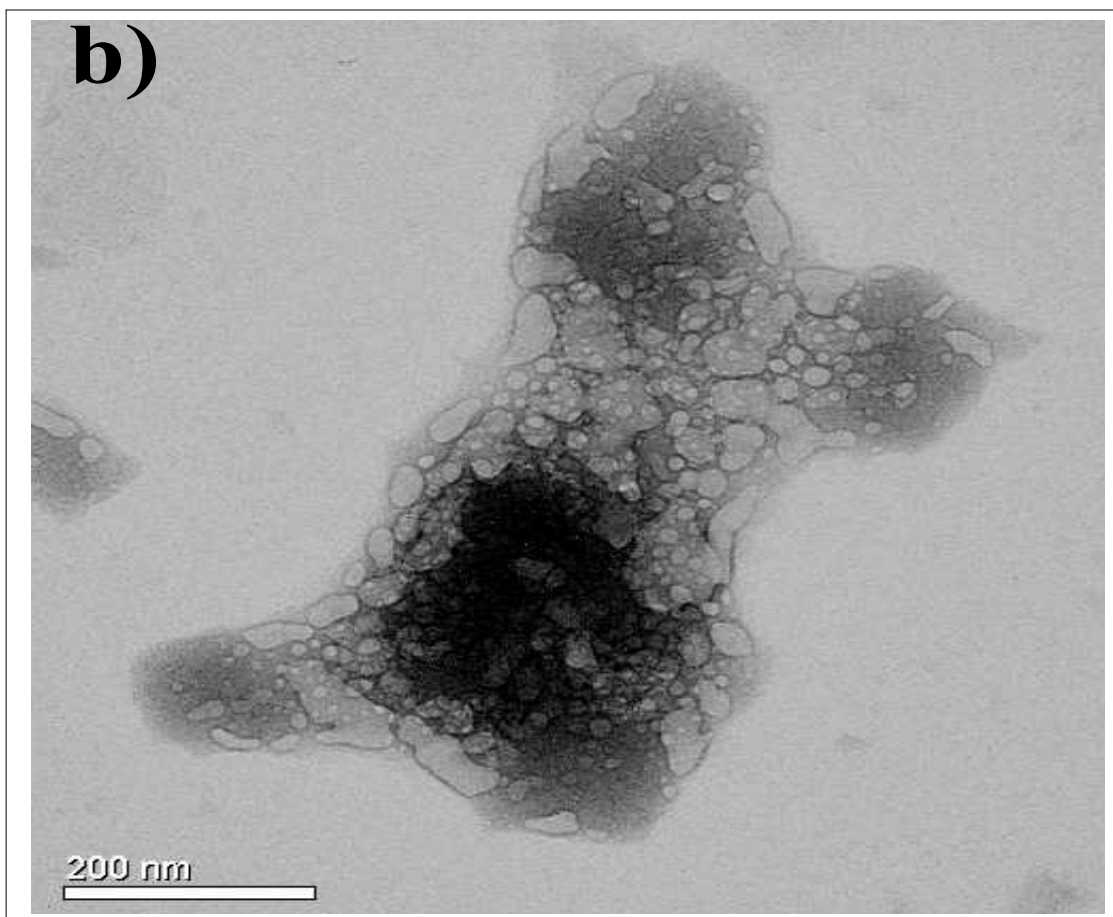


Figura 30. b) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms10 aumentada 150.000 vezes.

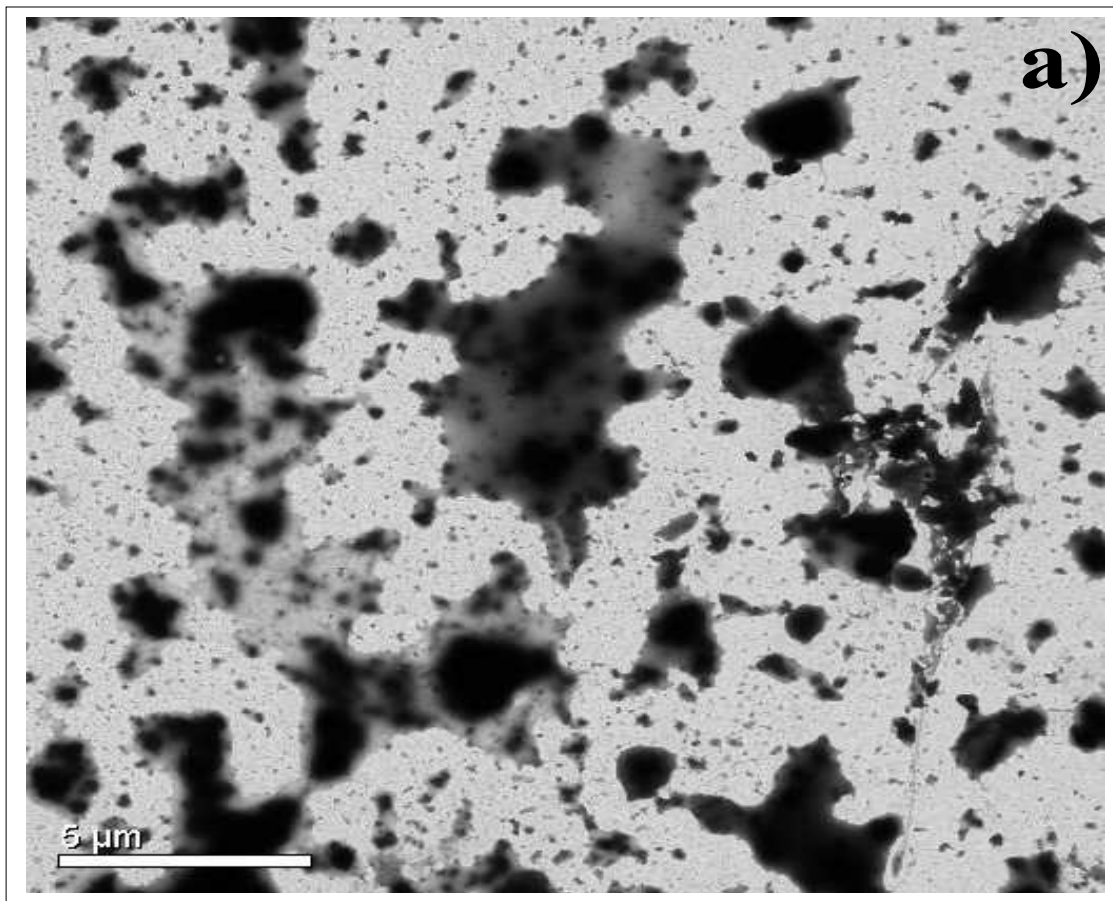


Figura 31. a) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms30 aumentada 6.000 vezes.

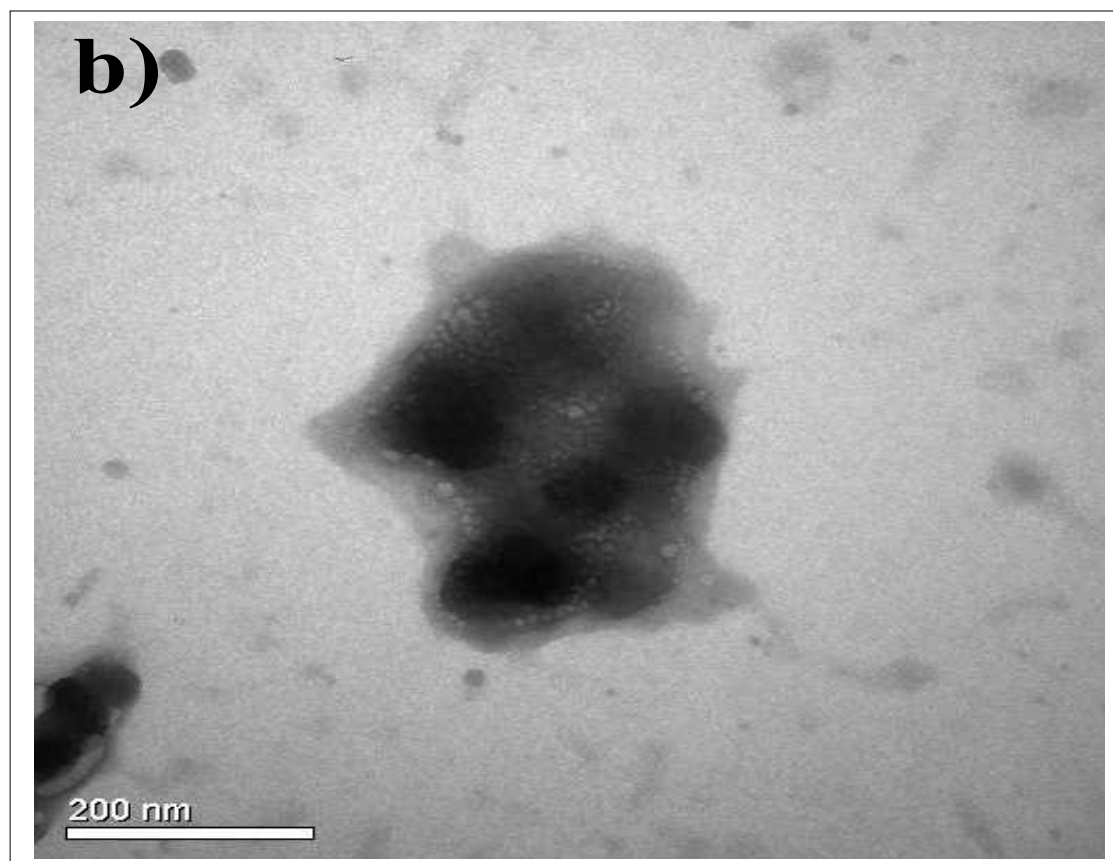


Figura 32. b) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms30 aumentada 150.000 vezes.

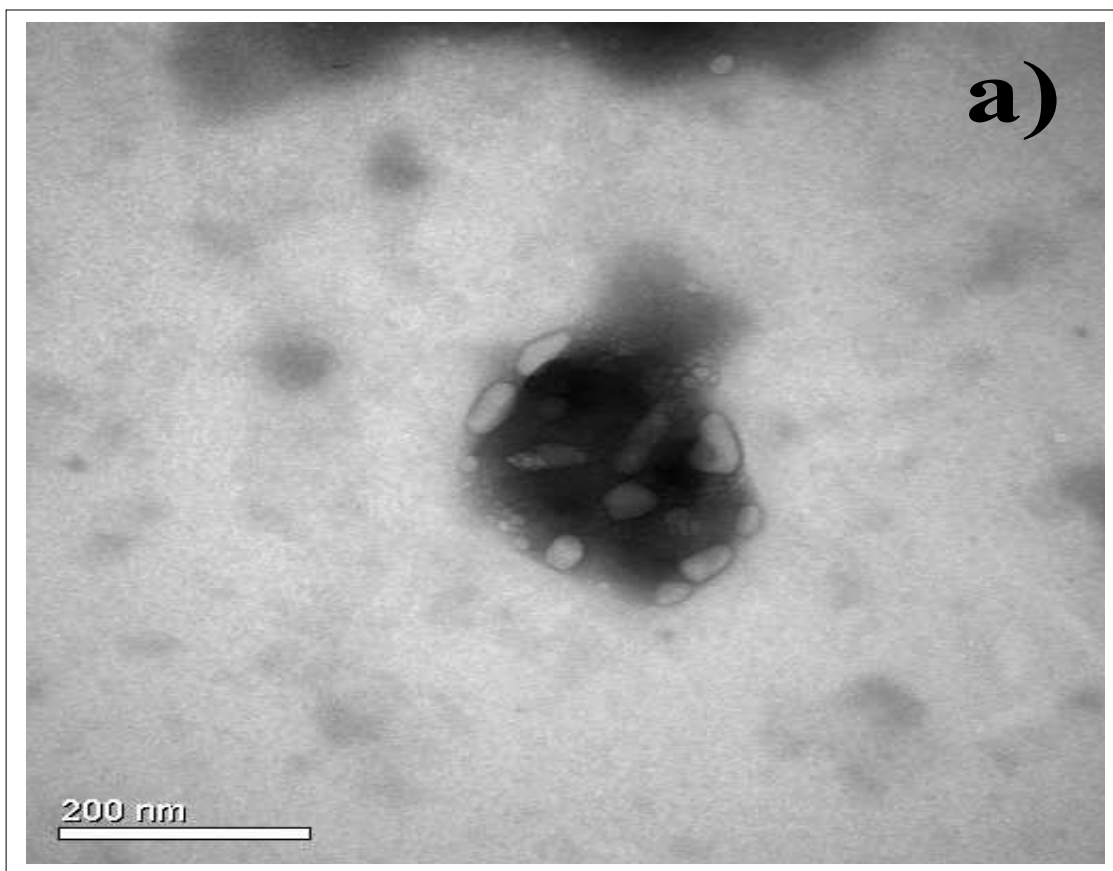


Figura 33. a) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms50 aumentada 150.000 vezes.

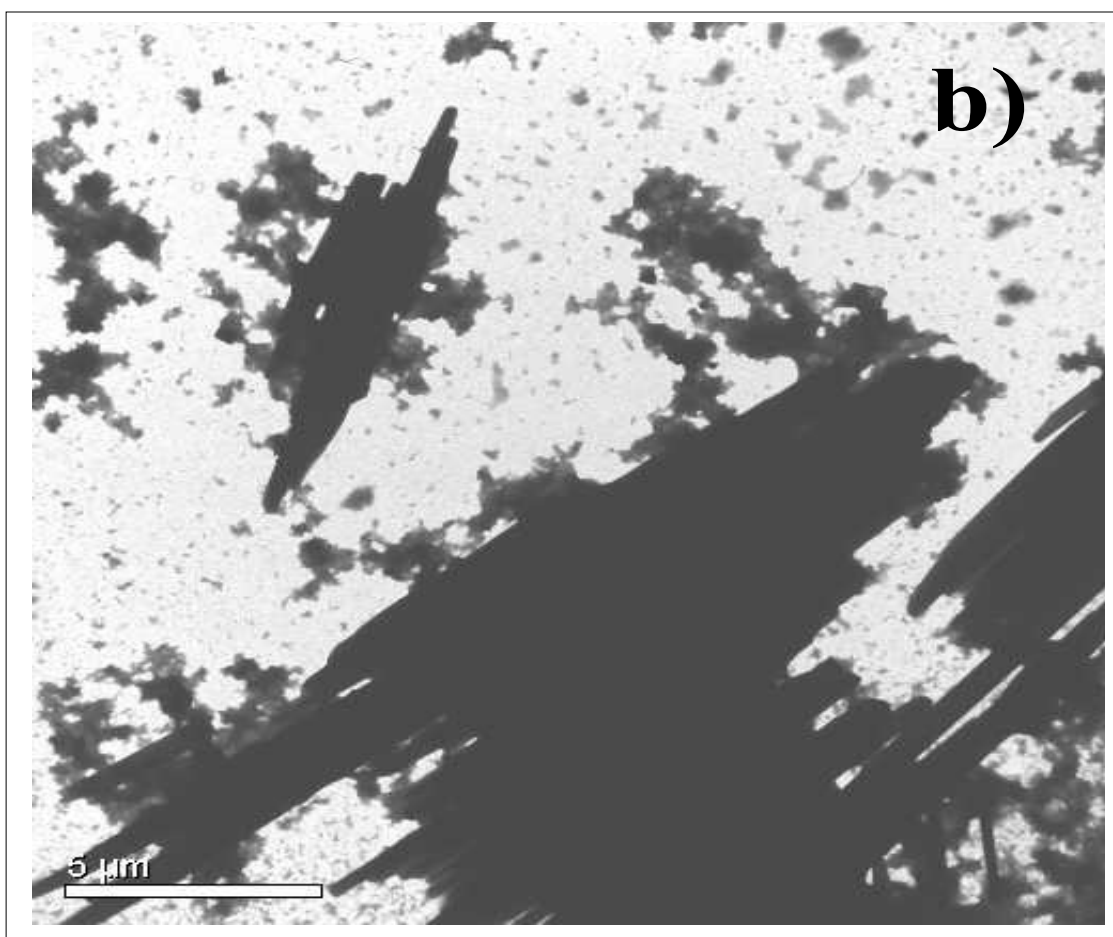


Figura 34. b) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms50 aumentada 6.000 vezes.

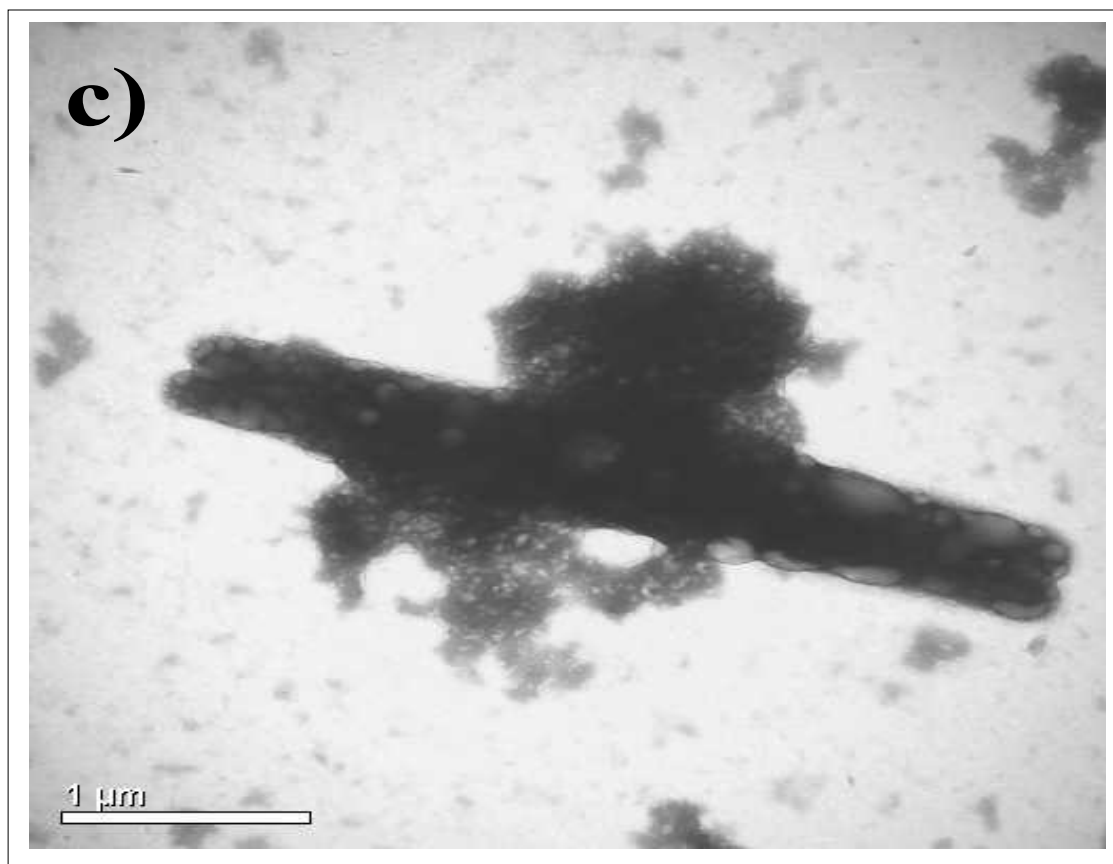


Figura 35. c) MET da melanina sintetizada eletroquimicamente ms50 aumentada 30.000 vezes.

3.2.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A difração de raios-X de pó fornece informações importantes sobre a constituição estrutural do material resultante dos processos oxidativos.

Os difratogramas (Figura 36) apresentam picos largos típicos de material amorfo, bem como picos intensos e finos típicos de material cristalino para todas as amostras de melaninas sintéticas estudadas. O pico largo, que se estende de 16 a 38°, é típico de matéria orgânica de alta massa molecular, como as melaninas. Os picos intensos e finos em 17,4, 23,8, 30,7, 34,4, 38,5, 46,55, 55,14 e 58,5° são típicos de materiais de alta cristalinidade estrutural. Assim, pode-se concluir que o produto final obtido trata-se de um material heterogêneo, contendo unidades amorfas e cristalinas em sua composição.

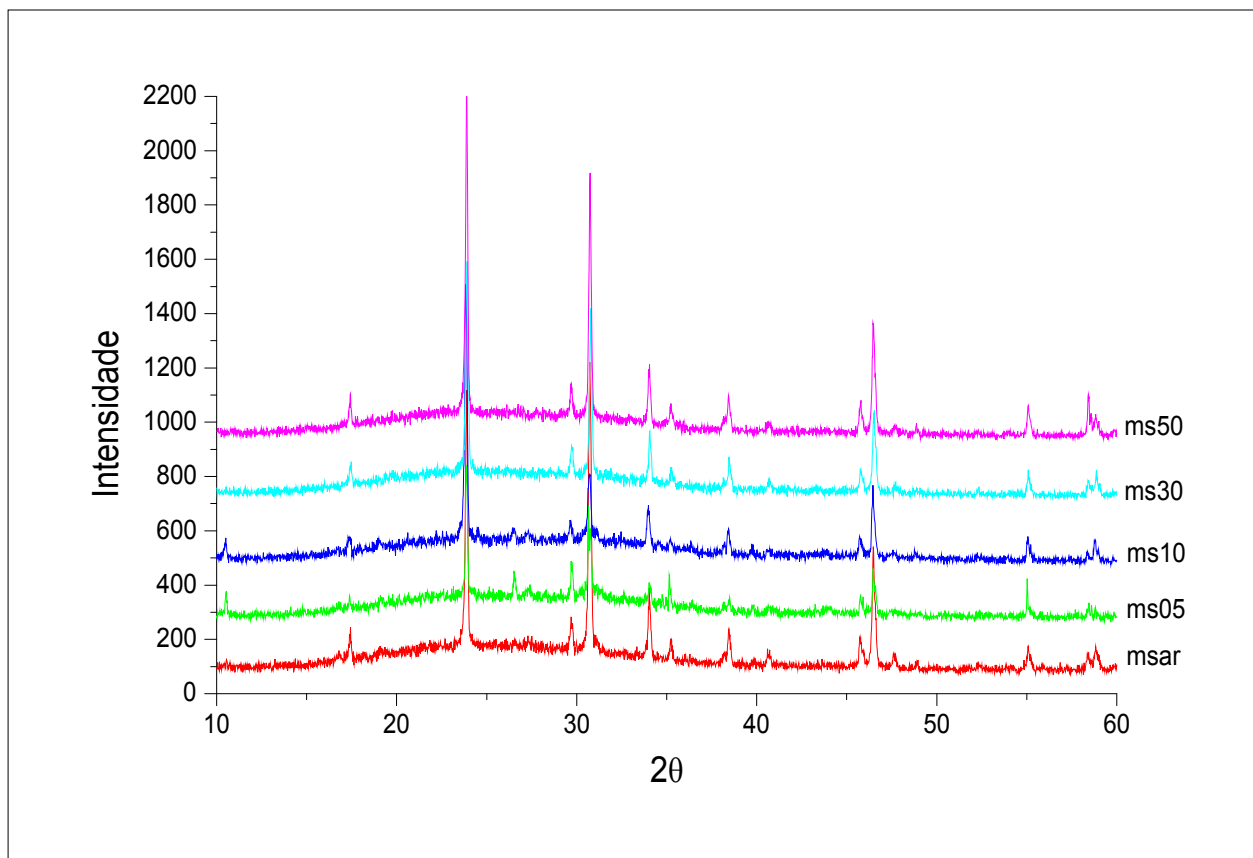


Figura 36. Difratogramas de Raios-X das melaninas sintéticas obtidos utilizando-se com radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), com tensão e corrente de fonte de 40 KV e 40mA, varrendo 2θ de 10° a 60° .

Foram feitas simulações e previsões estruturais a partir de informações registradas na biblioteca de difratogramas do equipamento comparando-se aos dados empíricos. Caso houvesse alguma cristalinidade do material orgânico sintetizado e os picos resultantes nos difratogramas fossem suficientemente intensos, haveria possibilidade de os cristais serem orgânicos. Porém, as simulações mostraram que os picos descritos acima são idênticos ao de cristais inorgânicos como, por exemplo, resíduos de fosfato de potássio, eletrólito de suporte utilizado no sistema de síntese eletroquímica destas melaninas. Desta forma, a hipótese de os cristais encontrados nas amostras serem orgânicos pode ser descartada.

Todavia, percebe-se pela microscopia que alguns cristais estão intercalados, o que permite a inserção da melanina entre os cristais ou a superposição da mesma sobre estes, conseqüentemente, a melanina passaria a fazer parte da estrutura do compósito, diminuindo a interação entre os cristais. Isso explicaria a rápida e fácil

desintegração do cristal sob a incidência do feixe energético. Quando um material é inserido entre dois ou mais cristais há um deslocamento dos picos no difratograma, pois ocorre uma distorção na estrutura cristalina. Isso não ocorre no caso destas melaninas sintéticas. Deste modo, os dados de DRX são claros e nos levam a concluir que as melaninas estão superpostas aos cristais de fosfato de potássio residuais do processo oxidativo, quer estejam elas na forma amorfa quer como cristais menores.

3.2.7 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE)

A espectroscopia de impedância eletroquímica fornece informações sobre processos cinéticos e difusionais de espécies carregadas em solução entre outros. Os experimentos de impedância foram obtidos empregando-se o potencial contínuo igual a 617 mV, assegurando-se assim, que praticamente toda L-dopa foi oxidada a melanina.

Um sinal alternado de potencial, de pequena amplitude, aplicado a um sistema constituído de uma interface eletrodo/solução origina um sinal alternado de corrente como resposta. A razão entre a perturbação e a resposta corresponde à impedância do sistema. Fisicamente, a impedância pode ser interpretada como a obstrução à passagem de corrente elétrica, através de um sistema. Esta obstrução é proveniente da estrutura originada pelas moléculas, pelos íons e pela carga do eletrodo.

O ângulo de fase (θ) é um dos parâmetros resultantes da perturbação gerada pela onda senoidal no sistema. Quando o valor de θ se aproxima a 90° indica que o material acumula cargas, não permitindo sua difusão em solução. Os diagramas de Bode representam o logaritmo da impedância (Figura 37a) e o ângulo de fase, θ , (Figura 35b) em função do logaritmo da frequência. No perfil $\log |Z|$ em função de $\log f$, pode-se observar a inclinação de aproximadamente -1 e no perfil $-\theta$ em função do

log f, algumas amostras apresentam ângulo de fase próximos de 90° ($\cong 80^\circ$). Este fato caracteriza um sistema capacitivo, ou seja, há armazenamento de cargas. Tal comportamento é apresentado pelas melaninas obtidas por síntese com baixas concentrações de L-dopa no sistema, isto é, sintetizadas eletroquimicamente com 5 e 10 mg de L-dopa e sintetizada ao ar (10 mg), onde $\theta \cong 80^\circ$.

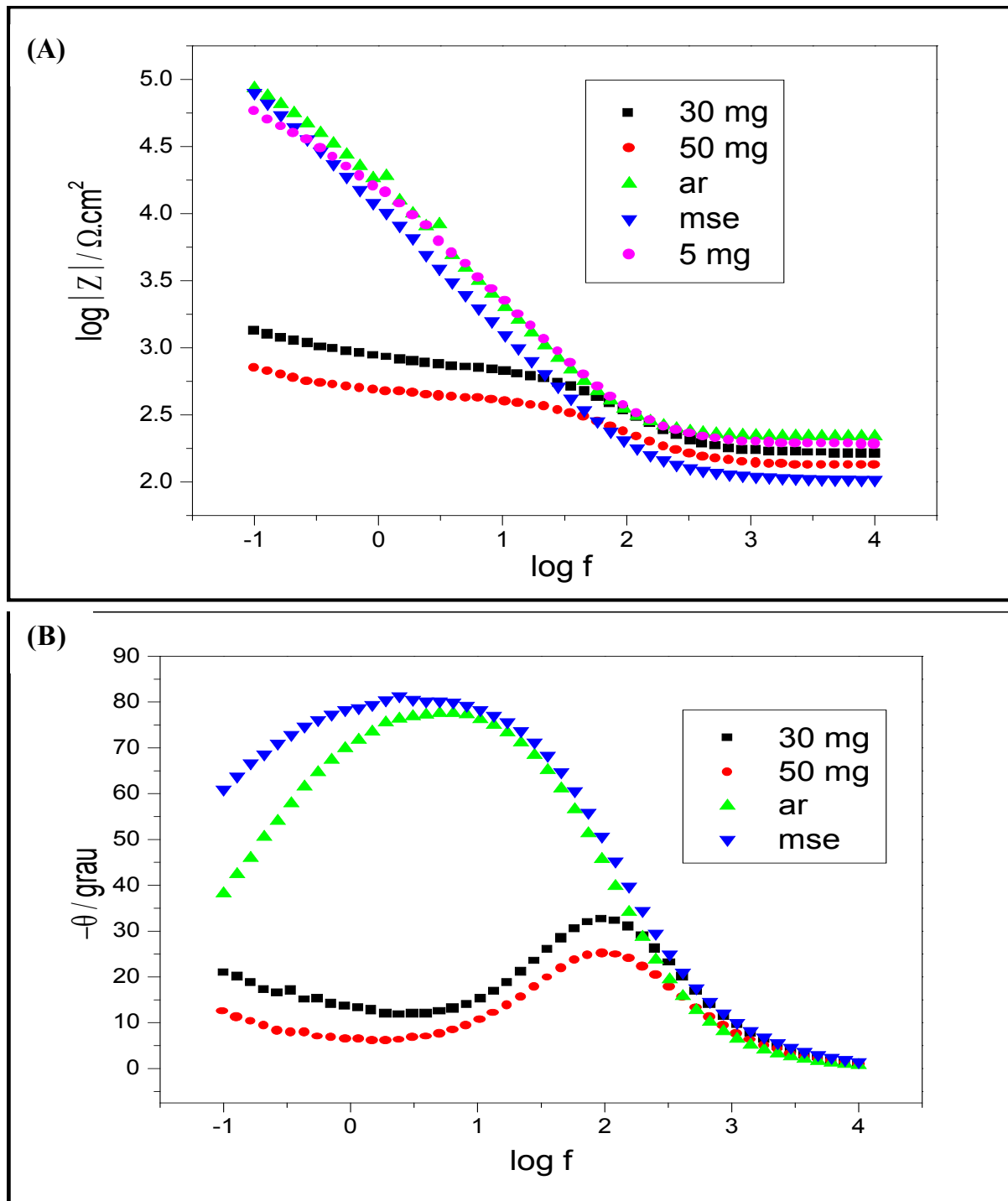


Figura 37. Impedância eletroquímica para o sistema Pt/melanina/tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em pH = 6,8. Potencial de polarização igual a 617 mV e amplitude igual a 25 mV. (A) Diagrama de Bode: $\log |Z|$ vs log frequência; (B) Diagrama de Bode: ângulo de fase (θ) vs log da f.

Diferentemente, um sistema resistivo não acumula cargas, mas impede o fluxo destas em solução. Este comportamento é evidenciado no perfil ângulo de fase em função do $\log f$ quando θ aproxima-se de 45° (Figura 37b). A serem empregadas maiores concentrações de L-dopa para a obtenção das melaninas, o sistema apresentou comportamento mais resistivo, que está diretamente relacionado a presença de processos difusionais. Como existe um excesso de cargas em solução durante a síntese das amostras ms30 (30 mg) e ms50 (50 mg), o sistema fica saturado, o que impede o fluxo das cargas na solução.

Analisando-se os diagramas no plano complexo (Figura 38) foi possível obter o valor da resistência da solução (R_s). A magnitude deste parâmetro deve ser em torno de 50Ω para não interferir no meio de oxidação estudado. Este parâmetro é obtido por extrapolação do semicírculo sobre o eixo das abscissas em altas frequências. Apesar da solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em pH 6,8 apresentar alta resistência, ou seja, $\cong 90 \Omega$, o emprego deste meio não interferiu nos processos. Isto porque, os três critérios de confiabilidade (linearidade, causalidade e estabilidade) foram previamente estabelecidos.

A resistência de polarização (R_p) ou resistência de transferência de carga na interface eletrodo/solução foi estimada pela extrapolação do semicírculo em baixas frequências nos diagramas no plano complexo. As amostras ms30 (30 mg de L-dopa) e ms50 (50 mg de L-dopa) apresentaram valores de R_p próximas a 810Ω e 450Ω , respectivamente. As demais amostras (5 mg, 10 mg e msar) têm valores de polarização maiores, como podem ser observados na Figura 38. A diminuição de R_p entre as amostras com maiores concentrações de L-dopa no sistema permite supor que, aumentando a concentração L-dopa o sistema passa a ser mais resistivo, para este tipo de material. A partir dos resultados apresentados nos diagramas de Bode e

no plano complexo, pode-se sugerir que as melaninas sintetizadas com maiores concentrações de L-dopa têm comportamento mais resistivo, enquanto que os menores teores, apresentam comportamento mais capacitivo.

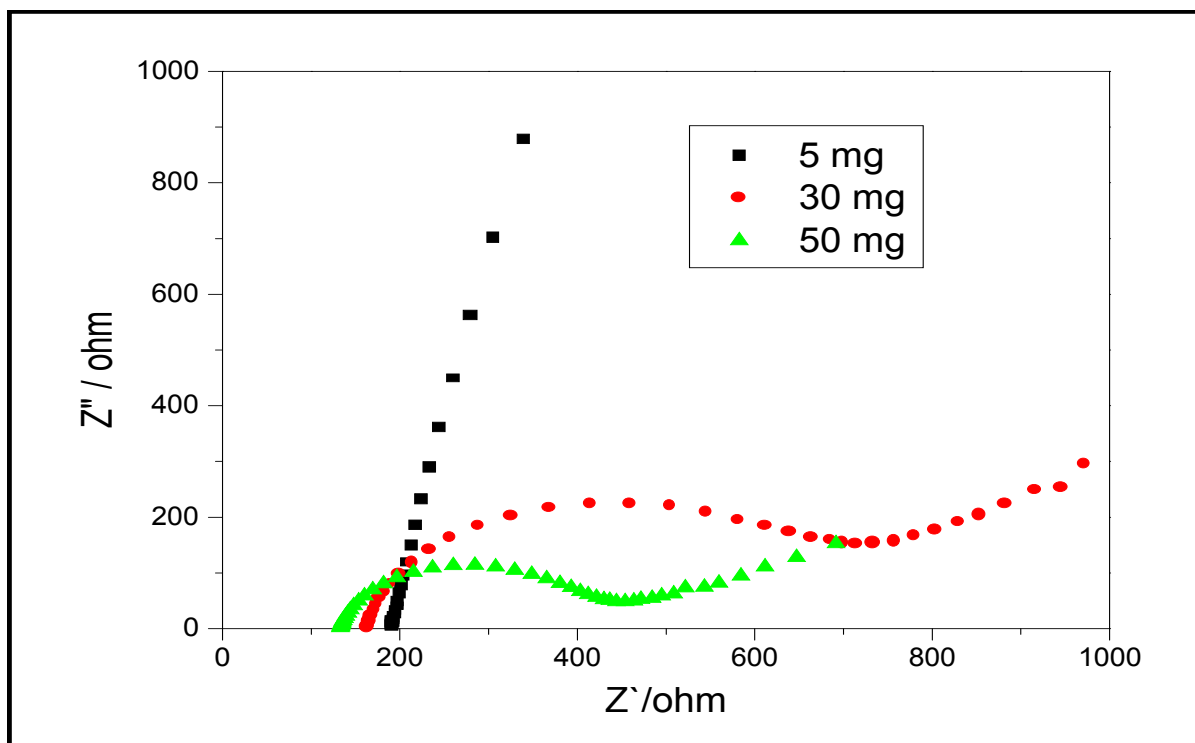


Figura 38. Espectros de impedância eletroquímica para o sistema Pt/melanina/tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em $\text{pH} = 6,8$. Potencial de polarização igual a 617 mV, sob amplitude igual a 25 mV. Diagrama de Nyquist ou no plano complexo para diferentes concentrações de L-dopa no sistema.

Em geral, existem três formas pelas quais os íons são transportados em solução: migração, difusão e convecção. Segundo os experimentos realizados durante a síntese das melaninas pode-se dizer que não houve transporte iônico por convecção, pois não havia agitação no sistema eletroquímico. Fixando-se a concentração do sistema em 10 mg de L-dopa, o diagrama da Figura 39, pode-se notar que, independentemente o processo de oxidação aplicado, quer seja químico ou eletroquímico, menores concentrações de L-dopa no sistema favorecem o transporte de íons por migração, obtendo-se melaninas com comportamento mais resistivo.

Uma das vantagens em se utilizar a espectroscopia de impedância eletroquímica é poder visualizar processos químicos ocorrendo separadamente, ou seja, distingue cada etapa em seus respectivos tempos de relaxação.

Os tempos de relaxação ($\tau = 1/f$) na espectroscopia de impedância eletroquímica estão relacionados à cinética do processo. Fixando-se agora o método de oxidação, observa-se que, pelos diagramas das Figuras 37b, o valor de θ máximo aproxima-se de 45° no espectro das melaninas com maiores concentrações de L-dopa, ou seja, valores de $\log f$ mais altos ($\log f \cong 2$), enquanto que os valores de θ das melaninas com menores concentrações de L-dopa têm valor de $\log f \cong 0,7$. Isto sugere que a cinética de reação para as melaninas mais concentradas é mais rápida.

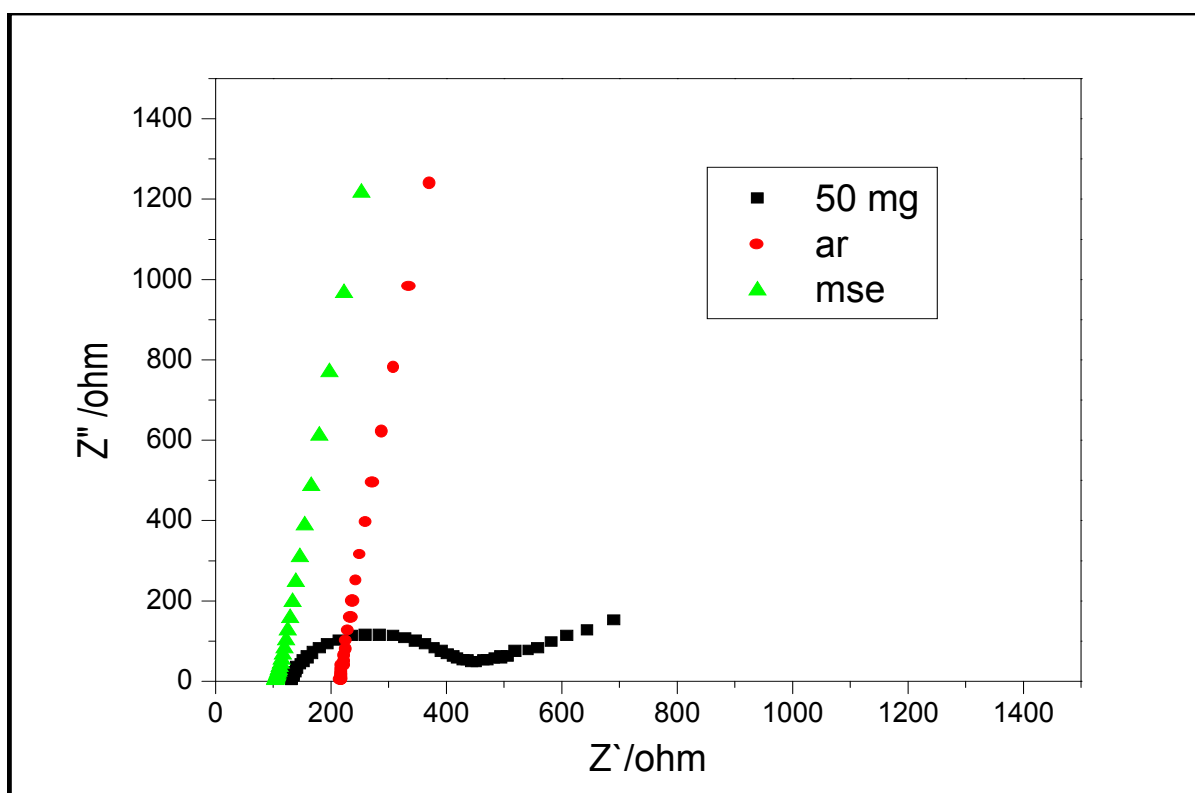


Figura 39. Espectros de impedância eletroquímica para o sistema Pt/melanina/tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ em $\text{pH} = 6,8$ medidas no potencial de polarização igual a 617 mV, sob amplitude igual a 25 mV. Diagrama de Nyquist ou no plano complexo comparando-se os processos oxidativos.

Comparando-se estes resultados às micrografias de transmissão, pode-se sugerir que a oxidação da L-dopa favorece a formação de unidades carregadas “in

bulk” que passam a interagir e se aglomerarem entre si acumulando cargas e impedindo o fluxo ou difusão destas em solução. As melaninas, por sua vez, se associam de forma espontânea, resultando em estruturas supramoleculares, seja na forma de grumos ou pó. Esta conformação microscópica para as msar, ms05 e ms10 pode ter sido favorecida em virtude da cinética de formação ser mais lenta em relação às ms30 e ms50, em solução, bem como em estado sólido. O processo de transporte de íons por migração, para este sistema, pode ser mais lento (Tabela 4), permitindo a formação de um produto mais bem estruturado, pois a interação entre as espécies químicas presentes no sistema pode ser mais seletiva e organizada, o que resulta nas estruturas supramoleculares em forma de grumos.

Tabela 4. Correlação entre informações da MET vs EIE.

Amostra	morfologia	Sistema	processo	Cinética
Ms05	Grumo	Capacitivo	Migração	Lenta
Ms10	Grumo	Capacitivo	Migração	Lenta
Ms30	Suspensão	Resistivo	Difusional	Rápida
Ms50	Suspensão	Resistivo	Difusional	Rápida
Msar	Pó	Capacitivo	Migração	Lenta
Mse	Grumo	Capacitivo	Migração	Lenta

A formação da estrutura supramolecular das melaninas ocorre pela interação entre várias espécies diferentes em vários estados de oxidação. Desta maneira, a estrutura resultante deste rearranjo pode ter muitos poros (espaços) entre as espécies, possivelmente permitindo o acúmulo de cargas e a passagem de corrente. A capacitância das amostras era da ordem de $20 \mu\text{F cm}^{-2}$, indicando um sistema que acumula cargas.

A formação de unidades supramoleculares menores e mais dispersas nas amostras ms05, ms10 e msar, podem ter sido favorecidas pelo comportamento resistivo do sistema. Já num sistema de comportamento capacitivo há o favorecimento para aglutinação das unidades carregadas em estruturas maiores e mais condensadas. Portanto, a estruturação supramolecular destas melaninas depende diretamente da cinética das reações no meio e dos processos difusionais “*in bulk*”.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSÕES

É possível sintetizar melaninas vias oxidação química e eletroquímica. A oxidação eletroquímica (mse) mostrou-se mais eficiente e permitiu maior controle do processo de síntese.

Os produtos obtidos ao final de ambos processos apresentaram-se bem distintos, sendo que o produto da oxidação eletroquímica, no geral, apresentou melhor absorção de radiação UV e maior massa molecular. Maior quantidade de grupamentos -COO^- na estrutura supramolecular pode favorecer mecanismos de quelação entre estes intermediários indólicos e espécies químicas vitais na agricultura. O aumento do número de spins g^{-1} devido ao mecanismo $Q + QH_2 \rightarrow 2Q^{\cdot-} + 2H^+$ confirma esta afirmação.

A morfologia distinta entre depende diretamente dos processos de transporte de carga no sistema, da cinética de cada processo de oxidação e da concentração do produto de partida de síntese.

Os espectros obtidos por EIE permitiram diferenciar os métodos de oxidação por via química e eletroquímica, através dos parâmetros de resistência e capacitância do sistema. Por meio deste método foi possível sugerir que o processo eletroquímico mais efetivo na oxidação. Quanto à cinética dos sistemas, mesmo entre os produtos de oxidação eletroquímica, a variação do teor de L-dopa no sistema fez com que as velocidades das reações fossem distintas. Os comportamentos mais resistivos foram apresentados para as melaninas sintetizadas com maiores concentrações de L-dopa no sistema eletroquímico, enquanto que a síntese com menores concentrações

favorece um comportamento mais capacitivo com acúmulo de cargas na estrutura, proporcionando um rearranjo estrutural mais bem organizado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, J.J., SCHINDLER, J.E., MILLER, R.W., NUTTER, D.E. *Science*, **1974**, 184: 895-897.

ADHYARU, B.B., AKHMEDOV, N.G., KATRIZKY, A.R., BOWERS, C.R. *Magn. Res. In Chem.* **2003**, 41 (6): 466-474.

ARAKI, K., TOMA, H.E. *Química Nova*, **2002**, 25 (6): 962-975.

ATKINS, P. W. *Físico-Química*. 6ª ed., vol. 2. LTC, Rio de Janeiro. **1999**, 225-293.

ÁVILA, Geraldo. *Variáveis complexas e aplicações*. Rio de Janeiro, Ltc, **1990**.

BAES, A.U., BLOOM, P.R. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1990**, 54: 1248-1253.

BATY, A.M., LEAVITT, P.A., SIEDLECKI, C.A., TYLER, B.J., SUCI, P.A., MARCHANT, R.E., GEESEY, G.G. *Langmuir*, **1997**, 13:5702-5710.

BILINSKA, B., PILAWA, B., ZAWADA, WYLEGAA, E., T. WILCZOK, DONTSOV, A.E., SAKINA, N.L., OSTROVSKY, M.A., ILYASOVA, V.B. *Spectrochimica Acta Part A*, **2002** (58): 2257–2264.

BOLTON, W. *Análise de Circuitos Elétricos*. São Paulo, Makron Books, **1994**.

BORGES, C.R., ROBERTS, J.C., WILKINS, D.G., ROLLINS, D.E. *Anal. Biochem.* **2001** (290): 116-125.

BOYER, C. *História da Matemática*. São Paulo, Edgar Blücher, **1974**.

BRETT, A.M.O., BRETT, C.M.A. *Electroquímica: princípios métodos e aplicações*. Portugal: Almedina, **1993**, 191-205.

BUDZIAK, C.R, MAIA, C.M.B.F, MANGRICH, A.S. *Química Nova*, 2003. Aceito para publicação.

CANTAROW, A., SCHEPARTZ, B. *Bioquímica*. Livraria Ateneu: **1968**, p. 640-5, 833,834.

CAPELA J. M. V.; CAPELA, M. V.; MAGNANI, R. *Eclética química*. **2003** (28): 63-67

CARAÇA, B. J. *Conceitos fundamentais da Matemática*. Lisboa, Livraria Sá da Costa Editora, **1984**.

CARBANES, J, GARCIA-CANOVAS, F. LOZANO, J.A., GARCIA-CARMONA, F. *Biochimical and Biophysical Acta*, **1987** (923): 187-195.

CHESHIRE, M.V., McPHAIL, D.B. *European J. Soil Science*. **1996** (47): 205-213.

CI, X., SILVA, R.S., NICODEM, D., WHITTEN, D.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111: 1337-1343.

CLANCY, C.M.R., NOFSINGER, J.B., HANKS, R.K., SIMON, J.D. *J. Phys. Chem. B*. **2000** (104): 7871-7873.

CLANCY, C.M.R., SIMON, J.D. *Biochemistry* , **2001**(4): 13353-13360.

CORRADINI, M. G., NAPOLITANO, A., PROTA, G. *Tetrahedron*, **1986**, 42: 2083-2088.

EMANUEL, N.A., BHATTACHARYA, P.K. *Polyhedron*, **1987**, 6: 845-848.

EVES, Howard. *História da Matemática*. São Paulo, Editora da UNICAMP, **1996**.

EWING, W. G. *Instrumental methods of chemical analysis*. 3.^a ed., McGraw-Hill, **1969**, 302-306.

FERRAZ, P.A.L., deABREU, F.C., PINTO, A.V., GLEZER, V., TONHOLO, J., GOULART, M.O.F. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 507:275-286.

FOKEN, U., LIEBEZEIT, G. *Marine Geology*. **2000**, 164: 173-181.

GARCIA, C. D., De PAULI, C.P, ORTIZ, P.I. *Journ. Electroanal. Chem.* **2001** (510): 115-119

GARCÍA, C.D., DE PAULI, C.P., ORTIZ, P.I. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 510:115-119.

GAMRY, Instruments: http://www.gamry.com/App_Notes/EIS_Primer/EIS_Primer.htm, **2004**.

GILMAN, G.A., RALL, R.T., NIES, A.S., TAYLOR, P. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, McGraw-Hill, Singapore, **1991**.

GOLAB, Z., BREITENBACH, M., JEZIERSKI, A., *Water, Air, Soil, Pollut.* **1995**, 82:713.

GOLOUNIN, A. V., SELIUTIN, G.E. *Russian J. Appl. Chem.*, **1996**, 69 (4): 645-648.

GREEN, D. R. *The Historical development of Complex Numbers*. *The Math. Gaz.* 60, 412 (1976), 99-107.

GUIMARÃES, E. *Tese de Mestrado - DQ/UFPR*, **1997**.

GYGI, S.P., JOSEPH, T.E. Jr, CONE, E.J., WILKINS, D.G., ROLLINS, D.E. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, 24: 495-501.

HEFTI, F., MELAMED, E. *Brain Research.* **1981**, 225 (2): 333-346.

HEGEDUS, Z.L. *Toxicology.* **2000**, 145 (2-3): 85-101.

HILL, H.Z. *BioEssays*, **1992**, 14: 49-56.

HUNT, G., KYNE, S., ITO, S., WAKAMATSU, K., TODD, C., THODY, A.J. *Pigment Cells Res.* **1995**, 8: 202-208.

INBAR, Y.; CHEN, Y.; HADAR, Y. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **1989** (53): 1695- 1701.

ITO, S. *J. Invest Dermatol.* **1993**, 100: 116S-171S.

ITO, S., WAKAMATSU, K. *Pigment Cell Res.* **1998**, 11: 120-126.

JEZIERSKI, A. CZECHOWSKI, F., JERZIKIEWSCZ, M., CHEN, Y., DROZD, J. *Spectrochim. Acta Part A.* **2000**, 56: 379-385.

JEZIERSKI, A., LISOWSKI, J., BILINSKA, E. *Appl. Magn. Reson.* **1993**, 5:15.

JOSEPH, R.E. Jr, SU, T.P., CONE, E.J. *J. Anal. Toxicol.* **1996**, 20: 338-344.

KALKA K., MUKHTAR, H., TUROWSKI-WNAKE, A. MERK, H. *Skin Pharm. Appl. Skin Physiol.* **2000**, 13 (3-4): 143-149.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. *Química farmacêutica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1988**: 260-261.

KUMARASWAMY, B.E., SHERIGARA, B.S., SUBRAHMANYAM, E.V.S., VENKATESWARAN, G. *Bulletin of electrochemistry*, **2000**, 16 (12): 533-536.

Laboratório de Cristalografia Estereodinâmica e Modelagem Molecular. **Linhas de pesquisa**. Universidade de São Carlos, São Carlos. Disponível em: <http://www.dq.ufscar.br/Labs/LACREMM/supra.html>

LABRSEPR, 1998: <http://www.quimica.ufpr.br/%7Elabepr/>

LEHN, J.-M. *Supramolecular Chemistry*, VCR, Weinheim, **1995**: 7.

LINERT, W., HERLINGER, E., JAMESON, R.F., KIENZL, E., JELLINGER, K., YODIM, M.B.H., *Biochim. Biophys. Acta*. **1996**, 1316: 160-168.

LINERT, W., JAMESON, E. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, 79: 319-326.

LINGLER, S., RUBINSTEIN, I, KNOLL, W., OFFENHAUSSER, A. *Langmuir*, **1997** (13): 7085-7091

LORENZ, M. *EG&G Princeton Applied research*. Application notes AC-1., 1-13.

LUNTE, S.M., OSHEA, T.J. *Electrophoresis*. **1994**, 15 (1): 79-86.

LYU, Y., SIMON, J.D. *Pigment cell Res*. **2003**, 16 (1): 72-80.

LYYTINEN, J. SOVIJARVI, A., KAAKKOLA, S. GORDIN, A., TERAVALINEN, H. *Clinic. Neuropharm.* **2001**, 24 (1): 50-57.

MANGRICH, A. S.; LERMEN, A. W.; SANTOS, E.J.; GOMES, R.C.; COELHO, R.R.R.; LINHARES, L.F.; SENESI, N. *Biol. Fert. Soil*, **1998** (26): 341-345.

MANGRICH, A.S. Apostila de EPR, DQ-UFPR, **1998**.

MANGRICH, A.S. *Química dos Solos* - DQ-UFPR, Curitiba, PR, **2000**.

MARCOLINO-JUNIOR, L.H., TEIXEIRA, M.F.S., PEREIRA, A.V. FATIBELLO-FILHO, O. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. **2001** (25): 393-398.

- MARINO, C. E. B, MASCARO, L. H. *J. Electronal. Chem.* **2004** (568): 115-120.
- MARTIN-NETO, L., ROSSEL, R, SPOSITO, G. *Geoderma*, **1998**, 81: 305-311.
- MAYER, A.M., HAREL, E. *Phytochemistry*, **1979**, 18: 193-199.
- MEDEIROS, A. & MEDEIROS, C. *Números negativos: uma história de incertezas*. Bolema, **1992** , ano 7 (8): 49-59.
- MILIES, Cezar Polcino. *A solução de Tartáglia para a equação do terceiro grau*. Revista do Professor de Matemática **1994** (25): 15-22.
- MOORE, J.S. *Solid State & Materiais Science*, **1996**: 777-788.
- NAKAZATO, T., AKIYAMA, A. *J. Neurosci. Methods*. **1999**, 89:105-110.
- NAPPI, A.J., VASS, E. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (14): 11214-11222.
- NAUMANN, R, BAUMGART, T, GRÄBER, P, JONCZYK, A., OFFENHÄUSSER, A., KNOLL, W. *Biosensors & bioelectronics*, **2002** (17): 25-34
- NETO, Alcides Lins. *Funções de uma Variável complexa*. Rio de Janeiro, Projeto Euclides, IMPA - CNPQ, **1993**.
- NEWMAN, D.K., KOLTER, R. *Nature*, **2000**, 405 (6782): 94-97.
- NICOLAUS, R. A, *Melanins*, Lederer E. (Ed.), Paris: Hermann, **1968**, 5.
- NOFSINGER, J.B., FOREST, S.E., EIBEST, L.M., GOLD, K.A., SIMON, J.D. *Pigment Cell Res.* **2000**, 13 (3): 179-184.
- NOVOTNY, E.H. *Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo*. Tese de Doutorado - São Carlos/USP, **2002**.
- O'SHEA, T.J., TELTIN-DIAZ, M.W., LUNTE, S.M., LUNTE, C.E., SMYTH, M.R. *Eletroanalysis*, **1992**(4): 463-468.
- OBESO, J.A., RODRIGUES-OROZ, M.C., CHANA, P., LERA, G., RODRIGUEZ, M., OLANOW, C.W. *Neurology*. **2000**, 55: s13-s20.

PAIM, S. *Biol. Fert Soil.* **1990** (10): 72-76.

PAIXÃO, R. E. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, **2003**.

PARISH, R.V. *NMR, NQR, EPR and Mossbauer spectroscopy in inorganic chemistry.* London: Elis Horwood, **1990**.

PEZZELLA, A., NAPOLITANO, A., D'ISCHIA, M. PROTA, G. *Tetradron*, **1996**, 52 (23): 7913-7920.

PICCOLO, A. *Humic substances in terrestrial systems*, Italia, **1996**.

PICCOLO, A. *Soil Science*, **2001**, 810-832.

PINHEDO, L., MOTHEO, A.J. *J. Sci. Total Envir.* **2000**, 256 (1): 67-76,.

PORTELA, M.P.M., STOPPANI, A.O.M. *Biochem. Pharm.* **1996**, 51: 275-283.

POTSCH, L., SKOPP, G., MOELLER, M.R. *J. Forensic Sci.* **1997**, 42: 1095-1098.

PREIS, W., BÜRGERMEISTER, A., SITTE, W., SUPANCIC, P. *Solid state ionic*, **2004** (173): 69-75

PRINCETON APLIED RESEARCH. *Basic of electrochemical Impedance spectroscopy*, **1999**.

PROTA, G. *Melanins e melanogenesis*, Academic Press, San Diego, **1992**.

REIN, F.N., ROCHA, R.C., TOMA, H.E. *J. Inorg. Chem.*, **2001** (85): 155-166.

RESZKA, K.J., CHIGNELL, C.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1993** (115): 7752-7760.

REZENDE, M. O. O. **A importância ambiental das substâncias húmicas.** São Carlos – Livre Docência: **1999**.

RIBEIRO, E.S., FRANCISCO, M.S.P, GUSHIKEM, Y., GONÇALVES, J.E. *Princípios básicos*: www.chemkeys.com, **2000**.

RIBEIRO, E.S., FRANCISCO, M.S.P., GUSHIKEM, Y., GONÇALVES, J.E.: http://www.chemkeys.com/bra/md/ede_5/edrxex_1/edrxex_1.htm, **2001**.

RICIERI, A. P. *Assim nasceu o imaginário: Origem dos números complexos*. São Paulo, Edições Prandiano, **1993**.

RIFFALDI, SCHNITZER, M. *Soil Sci.of Soc. Am. Journ.* **1972**, 36: 301-305.

RIZZO, V., PASTORE, R., PANKOPF, S., DERIL, G.V.M., MORATTI, R. *Biogenic Amines*. **1996**, 12 (1): 1-7.

ROBINSON, G.M., IWUOHA, E.I., SMYTH, M.R. *Electrochimica Acta*, **1998**, 43 (23): 3489-3496.

Rockymountain: http://www.rockymountainlabs.com/tech_spm.html, **2002**.

ROSEI, M.A. *Pigment Cell Research*. **1996**, 9 (6): 273-280.

RUBIANES, M.D., RIVAS, G.A. *Anal. Chim. Acta*, **2001** (440): 99-108.

SANTOS, G.A., CAMARGO, F.A. *Fundamentos da matéria orgânica do solo.Ecossistemas tropicais e subtropicais*. Gêneseis. Porto Alegre, **1999**.

SARNA, T. *Photochem. Photobiol. B*. **1992**, 12: 215-258.

SCHNITZER, M., McLAREN, D.; SKUJINS, J. *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker, **1971** (2): 60-95.

SCHNITZER, M., SKINNER, S.I.M. *Soil Science*, **1969**, 108: 383-390.

SEALY, R.C., FELIX, C.C., HYDE, J.S., SWARTZ, J.M. *Free radicals in biology*. American Press, New York, **1980**: 205-259.

SEIN Jr, L.T., VARNUM, J.M., JANSEN, S. A. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33: 546-552.

SENESI, N., STEELINK, C. *Applications of ESR spectroscopy to the study of humic substances II*. In: HAYES, M.H.B., MACCARTHHTHY, P., MALCOLM, R.L., SWIFT, R.S. *Humic substances – In seach of structure*. Chinchester:Wiley, **1989**, 373-407.

SERPENTINI, Charles-Louis, GAUCHET, C. M., D. COMTAT, M. GINESTAR,J., PAILLOUS, N. *Electrochimica Acta*, **2000** (45):1663-1668.

SICHEL, G., CORSARO, C., SCALIA, M., DIBLIO, A.J., BONOMO, R.P. *Free Radical Biol. And Medic.* **1991**, 11 (1): 1-8.

SILVA, L da. *Estruturas químicas dos ácidos húmicos de sedimento de mangue e o nível de poluição ambiental* – Tese de Mestrado, **2001**.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. *Identificação espectroscópica de compostos orgânicos*. Ed. Guanabara Koogan S.A., **1979**.

SLAWSON, M.H., WILKINS, D.G., FOLTZ, R.L., ROLLINS, D.E. *J. Anal. Toxicol.* **1996**, 20: 350-354.

SPOSITO, G., MARTIN-NETO, L., YANG, A. *Joun. Environ. Quality*, **1996**, 25: 1203-1209.

STAINSACK, J, MANGRICH, A.S., MAIA, C.M.B.F., MACHADO, V.G., dos SANTOS, J. C. P., NAKAGAKI, S. *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, (x)1-6.

STAINSACK, J. *Dissertação de Mestrado*, DQ/UFPR, **1998**.

STEELINK, C., TOLLIN. *Biochim. Biophys. Acta.* **1962**, 59: 25-34.

STERN, D.A., SALAITA, G. N., LU, F., McCARGAR, J.M., BATINA, N., FRANK, D.G., LAGUREN-DAVIDSON, L., LIN, Cihui-Hsun, WALTON, N., GUI, J.Y., HUBBARD, A.T. *Langmuir*, **1988** (4): 711-722.

STEVENSON, F.J., GOH, K.M. *Geochim. et Cosmochim. Acta.* **1971**, 35: 417.

TALBI, H., BILLAUD, D., LOUARN, G., PRON, A. *Spectrochim. Acta Part A – Molec. and Biomolec. Spectroscopy.* **2001**, 57 (3): 423-433.

TANG, Y.H., WU, Y.R., WANG, Z.H. *J. Electrochem. Soc.* **2001**, 148: 133-138.

THODY, A.J., HIGGINS, E.M., WAKAMATSU, K., ITO, S., BURCHILL, S.A., MARKS, J.M. *J. Invest Dermatol.* **1991**, 97: 340-344.

TIPLER, P. A. *Física Volume 3*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., **1995**.

TSCHÖPE, A., KILASSONIA, S., BIRRINGER, R. *Solid State Ionics.* **2004** (173): 57-61.

UEMATSU, T., SATO, R., FUJIMORI, O., NAKASHIMA, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, 81: 45-48.

UFMG: <http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/interface.htm>, **2002**.

VALLADARES, Renato. *Geometria Analítica do plano e do espaço*. Rio de Janeiro, LTC Ltda, **1990**.

VUGMAN, N. V., COELHO NETO, J.A., MANGRICH, A.S. *First Latin American Congress on Organic Geochemistry*, Abstract, **1988**, 69.

WERNER, P., ROCCO, A. Di, PRIKHOJAN, A., REMPEL, N, BOTTIGLIERI, T., BRESSMAN, S., YAHR, M.D. *Brain Reseach*, **2001**, 893: 278-281.

WILCKSOK, T., BILINSKA, B.,BUSMAN, E., KOPERA, M. *Archins. Biochem. Biophys.* **1984** (231), 257-262.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C.B. *Transmission Electron Microscopy: a Textbook for Materials Science*, Plenum Press; New York and London, **1996**, vol.1.

WITMER, T. R. *The great art*. M. I. T. Press, **1968**.

WOODRUFF, D.P., DELCHAR, T.A. *Modern Techniques of surface science*. Cambridge University Press, **1986**.

ZEISE, L., CHEDEKEL, M.R., FITZPATRICK, T.B. *Melanin: it's role in human protection*, Valdmar, Overland Park, **1995**.

ZHANG, X.J, WANG, C.F., ZHOU, X. *Anal. Chim. Acta*, **1992**(265): 27-34.