

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

JOÃO VITOR PAULIN

Abordagem alternativa para síntese de melanina

Bauru

2016

JOÃO VITOR PAULIN

Abordagem alternativa para síntese de melanina

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Ciência dos Materiais, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff.

Bauru
2016

Paulin, João Vitor.

Abordagem alternativa para síntese da melanina /
João Vitor Paulin, 2016

111 f. : il

Orientador: Carlos Frederico de Oliveira Graeff

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2016

1. Melanina. 2. Síntese. 3. Pressão de oxigênio.
I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de JOÃO VITOR PAULIN, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

Aos 26 dias do mês de fevereiro do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Sala 5 da Pós-graduação da Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA do(a) Faculdade de Odonotologia de Bauru / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Prof. Dr. LUIZ CARLOS DA SILVA FILHO do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de JOÃO VITOR PAULIN, intitulada **Abordagem alternativa para síntese de melanina**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF
Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA
Prof. Dr. LUIZ CARLOS DA SILVA FILHO

A minha mãe, Claudia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me incentivaram e não mediram esforços para que pudesse alcançar mais esta etapa,

ao Prof. Carlos Frederico de Oliveira Graeff, orientador deste trabalho, pela inestimável orientação, pelas várias discussões científicas, pelas sugestões e ideias, pela confiança em mim depositada, pela amizade e pelo apoio pessoal e profissional prestado durante o mestrado e IC,

à Dra. Erika S. Bronze-Uhle, orientadora da IC, pelas várias discussões e instruções, pelos momentos de risos e por toda ajuda com as análises dos resultados e modelo sintético proposto,

aos amigos do LNMD, Bruna, Gustavo, Mirko, Silvia e Oswaldo, pelo excelente ambiente de trabalho, pelas discussões científicas oportunas, pelos momentos de descontração, pelo apoio pessoal e amizade,

à Prof. Dra. Marina P. Silva (UNESP) pelas instruções e ajuda com as primeiras sínteses,

à Prof. Dra. Maria L. M. Rocco (UFRJ) e à Prof. Dra. Chiara Battocchio (University “Roma Tre”) pelas caracterizações de XPS,

à Dra. Lucinéia Vizzotto Marconci e Dr. Nivaldo Boralle pelas medidas de ^1H e ^{13}C RMN em solução,

ao Prof. Dr. Alvielér Magalhães (UNICAMP) pelas análises de ^{13}C CP/MAS-RMN em estado sólido,

ao Dr. Daniel Rentsch (EMPA) pelas medidas de ^1H - ^{15}N RMN,

ao Prof. Dr. Marcos Donate (USP) pelo sistema do reator,

a todos familiares e amigos, que de alguma maneira me apoiaram durante este tempo,

à CAPES, ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro,

enfim, a todos que direta e indiretamente me ajudaram na execução deste trabalho,

meu MUITO OBRIGADO!

*The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not
"EUREKA" (I have found it) but "That's funny...?"*
Isaac Asimov

PAULIN, J. V. **Abordagem alternativa para síntese de melanina**. 2016. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2016.

RESUMO

Por mais de 40 anos, a melanina tem despertado cada vez mais atenção como um material funcional para dispositivos orgânicos como células solares, transistores, sensores, engenharia de tecidos, baterias, dispositivos de memória e *drug delivery*. As melaninas apresentam uma combinação de propriedades físico-químicas únicas com sua biocompatibilidade intrínseca que inspira seu uso em aplicações bioeletrônicas. Contudo, sua aplicação em dispositivos orgânicos é limitada devido a sua baixa solubilidade na maioria dos solventes. Assim, neste trabalho, buscamos obter derivados solúveis de melanina a partir de uma abordagem sintética alternativa utilizando diferentes pressões (4 a 8 atm) oxigênio molecular como agente oxidante em água ou DMSO. Espectroscopia UV-Vis, FTIR, RMN e XPS foram utilizados para caracterização, tendo como referência os materiais obtidos a partir das rotas sintéticas tradicionais. A utilização de pressão de oxigênio acelerou o processo sintético em ambos os casos e foi possível obter uma alta proporção DHICA/DHI. A principal diferença é a obtenção em meio aquoso de um material solúvel em água sem nenhuma funcionalização exótica, enquanto que em solvente orgânico o derivado da melanina, funcionalizado com grupos sulfonatos, apresenta solubilidade em DMSO, DMF e N-metil-2-pirrolidona. Um mecanismo reacional baseado na elevada natureza oxidante do meio sintético, incluindo na decomposição do H₂O₂ pelo oxigênio é proposto para explicar as alterações estruturais observadas.

Palavra chaves: Melanina, síntese, pressão de oxigênio, solubilidade.

PAULIN, J. V. **Alternative synthetic approach for melanin**. 2016. 111f. Dissertation (Master in Materials Science and Tecnlogy) - UNESP, School of Sciences, Bauru, 2016.

ABSTRACT

For over 40 years, melanin has been focus of increasing attention as a promising functional material for organic devices like solar cells, transistors, sensors, tissue engineering, charge storage, memory devices and drug delivery. Melanins present a combination of unique physical-chemical properties with its intrinsic biocompatibility inspire its use in bioelectronics applications. However, their applicability in organic devices is limited due to its low solubility in most solvents. Thus, in this work, we aim to achieve soluble derivatives of melanin from an alternative synthetic approach using different oxygen pressures (4 to 8 atm) as an oxidizing agent in water or DMSO. UV-Vis spectroscopy, FTIR, RMN and XPS was used to characterize the material using conventional synthesized melanin as a reference. The use of oxygen pressure accelerated the synthetic process and in both cases it was possible to obtain a high DHICA/DHI ratio. The main difference is obtained in aqueous medium a water soluble material without any exotic functionalization, while in organic solvent we have a functionalization with sulfonate group with solubility in DMSO, DMF and N-methyl-2-pyrrolidone. A reaction mechanism based on the higher oxidative nature of the reaction medium including oxygen-induced decomposition of H_2O_2 is proposed to explain the structural changes observed.

Keywords: Melanin, synthesis, oxygen pressure, solubility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais monômeros formadores da melanina: (a) eumelanina, (b) feomelanina e (c) alomelainas.....	21
Figura 2 - Estrutura molecular proposta para DMSO-Melanina.	28
Figura 3 - Monômeros formadores da melanina em diferentes estados de oxidação. R = H (DHI e derivados) ou R = COOH (DHICA e derivados).	28
Figura 4 - Representação estrutural da melanina rica em DHI (DHI-Melanina) e DHICA (DHICA-Melanina).	29
Figura 5 - Espectro de absorvância no UV-Vis característico da melanina sintética.....	31
Figura 6 - Estrutura molecular dos reagentes utilizados para realização das sínteses das melaninas em solvente orgânico: (a) L-DOPA, (b) DMSO e (c) peróxido de benzoíla.....	32
Figura 7 - Absorvância em função do tempo para DMSO-Melanina sintetizadas em diferentes temperaturas.....	36
Figura 8 - Absorvância em função da concentração para HMel(4) em $\lambda = 250$ nm e um caminho óptico de 1 cm.....	37
Figura 9 - Espectro de UV-Vis obtido para o monitoramento sintético da HMel-8P(4). Conforme pode ser observado, absorvância aumenta conforme a reação procede.	45
Figura 10 - Coeficiente de absorvância molar obtido para H ₂ O-Melanina com 8 atm de pressão de O ₂ e diferentes quantidades de NH ₄ OH.....	46
Figura 11 - ¹ H RMN para melanina sintetizados em meio aquoso com 8 atm de O ₂ e diferentes volumes de NH ₄ OH.	48
Figura 12 - Espectro de FTIR para melanina sintetizados com 8 atm de O ₂ e diferentes volumes de NH ₄ OH em água.....	49
Figura 13 - Deconvolução do espectro de FTIR da HMel-8P(4).	50
Figura 14 - Coeficiente de absorvância molar da H ₂ O-Melanina em diferentes pressões de O ₂	52
Figura 15 - ¹ H RMN (a) e FTIR (b) para as melaninas sintetizadas em água em diferentes pressões de O ₂	53
Figura 16 - ¹³ C CP/MAS-RMN da HMel-4P e HMel.	56
Figura 17 - Sinal de XPS da HMel-4P e HMel a partir dos núcleos de C _{1s}	57
Figura 18 - Coeficiente de absorção molar para a melanina sintetizada em DMSO.	59
Figura 19 - ¹ H RMN para melanina sintetizada em DMSO.	61

Figura 20 - Espectro de FTIR para melaninas sintetizadas em DMSO	62
Figura 21 - Deconvolução do espectro absorbância da DMel.....	63
Figura 22 - ¹³ C RMN para melanina sintetizada em DMSO.....	64
Figura 23 - Solução de L-DOPA evoluindo com o tempo para (a) DMel-S e (b) DMel-O.	66
Figura 24 - Absorbância em 445 nm para DMel-S e DMel-O em função do tempo de síntese.	67
Figura 25 - Espectro de FTIR para a DMel-S e DMel-O.	68
Figura 26 - ¹³ C RMN para DMel-O.....	69

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Processo sintético da melanogênese.....	23
Esquema 2 - Espécies derivadas da tirosinase durante a reação de oxidação.	24
Esquema 3 - Mecanismo proposto para o processo da síntese da melanina em DMSO.	27
Esquema 4 - Descarboxilação do derivado da DHICA devido à variação de pressão de O ₂ . Se R ₁ = R ₂ = H temos H ₂ O-Melanina, se não, DMSO-Melanina.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teste de solubilidade para as Melanina sintetizadas em água.....	42
Tabela 2 - Teste de solubilidade para as Melanina sintetizadas em DMSO.....	43
Tabela 3 - Tempo reacional da melanina sintetizada em água com 8 atm de O ₂ variando a quantidade de NH ₄ OH em $\lambda_{Abs} = 450$ nm.	45
Tabela 4 - Bandas vibracionais do espectro de FTIR do grupos carboxílicos das H ₂ O-Melaninas em diferentes quantidades de NH ₄ OH normalizados pela intensidade da vibração C-C=C (1585 cm ⁻¹).	50
Tabela 5 - Tempo reacional da melanina sintetizada em água variando a pressão de O ₂ e mantendo a quantidade de NH ₄ OH constante em $\lambda_{Abs} = 450$ nm.....	51
Tabela 6 - Bandas vibracionais do espectro de FTIR do grupo carboxílico das H ₂ O-Melaninas em diferentes pressões de O ₂ normalizados pela banda de vibração C-C=C (1585 cm ⁻¹).	54
Tabela 7 - Valores (normalizados) da intensidade de fotoemissão de C _{1s} calculados para HMeI-4P e HMeI a partir dos fittings da Figura 17.....	58
Tabela 8 - Tempo reacional da melanina sintetizada em DMSO em $\lambda_{Abs} = 425$ nm.	59
Tabela 9 - Bandas vibracionais do espectro de FTIR do grupo carboxílico das melaninas sintetizadas em DMSO normalizadas pela intensidade da vibração C-C=C (1594 cm ⁻¹).	63
Tabela 10 - Intesidade dos sinais de ¹³ C RMN normalizada pela região dos carbonos aromáticos.....	65

LISTA DE ABREVIACOES

CP/MAS	Polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico
D ₂ O	gua deuterada
Deoxi	Forma di-cobre(I) da enzima tirosinase
DHI	5,6-di-hidroindole
DHICA	cido 5,6-di-hidroindole-2-carboxílico
DMel	DMSO-Melanina sintetizada tradicionalmente
DMel-4P	Síntese da DMSO-Melanina com 4 atm de pressão de O ₂
DMel-8P	Síntese da DMSO-Melanina com 8 atm de pressão de O ₂
DMel-O	Síntese da DMSO-Melanina sem peróxido de benzoíla e borbulhando ar atmosférico
DMel-S	Síntese da DMSO-Melanina sem peróxido de benzoíla
DMel-T	Síntese da DMSO-Melanina aquecida a 100 °C
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	DMSO deuterado
DMSO-Melanina	Melanina sintetizada com dimetilsulfóxido como solvente
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier
H ₂ O-Melanina	Melanina sintetizada com água como solvente
HMel	H ₂ O-Melanina sintetizada tradicionalmente sem controle da quantidade de hidróxido de amônio (insolúvel)
HMel(4)	H ₂ O-Melanina sintetizada tradicionalmente com 1,33 mL de hidróxido de amônio
HMel-4P	Síntese da H ₂ O-Melanina com 4 atm de pressão de O ₂ sem controle da quantidade de Hidróxido de amônio
HMel-4P(4)	Síntese da H ₂ O-Melanina com 4 atm de pressão de O ₂ e 400 µL de Hidróxido de amônio

HMel-6P(4)	Síntese da H ₂ O-Melanina com 6 atm de pressão de O ₂ e 400 µL de Hidróxido de amônio
HMel-8P(1)	Síntese da H ₂ O-Melanina com 8 atm de pressão de O ₂ e 100 µL de Hidróxido de amônio
HMel-8P(4)	Síntese da H ₂ O-Melanina com 8 atm de pressão de O ₂ e 400 µL de Hidróxido de amônio
HMel-8P(7)	Síntese da H ₂ O-Melanina com 8 atm de pressão de O ₂ e 700 µL de Hidróxido de amônio
HMel-8P(10)	Síntese da H ₂ O-Melanina com 8 atm de pressão de O ₂ e 1000 µL de Hidróxido de amônio
IQ	Indolquinona
L-DOPA	L-3,4-di-hidroxifenil-alanina
Met	Forma di-cobre(II) da enzima tirosinase
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
NMP	N-metil-2-pirrolidona
Oxy	Forma peroxo-di-cobre(II) da enzima tirosinase
QI	Quinona imina
RMN	Ressonância magnética nuclear
SO	Semicondutor orgânico
SQ	Semiquinona
Tyrp1	DHICA oxidase (proteína-1 relacionada à tirosinase)
Tyrp2	Dopacromo tautomerase (proteína-2 relacionada à tirosinase)
UV-vis	Ultravioleta-visível
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ESQUEMAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES	xii
1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA: MELANINA.....	20
2.1. Melanogênese: mecanismo sintético <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	22
2.2. Características estruturais	28
2.3. Propriedades ópticas	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Sínteses da H ₂ O-Melanina	32
3.2. Sínteses da DMSO-Melanina.....	33
4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	35
4.1. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível	35
4.1.1. Coeficiente de absorção molar	36
4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	38
4.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	38
4.4. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-X (XPS)	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1. Testes de solubilidade	41
5.2. Caracterização estrutural.....	44
5.2.1. Efeito do hidróxido de amônio no meio aquoso.....	44
5.2.2. Efeito da pressão de O ₂ em meio aquoso.....	51
5.2.3. Efeito da pressão de O ₂ em meio orgânico.....	58
5.2.4. Modificações na síntese tradicional da melanina em DMSO.....	66
5.3. Mecanismo reacional	69
6. CONCLUSÕES.....	74

7. PERSPECTIVAS FUTURAS	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	85
APÊNDICE A - Tripla emissão da melanina sintetizada em DMSO com pressão de O ₂	85
APÊNDICE B - Síntese eletroquímica da melanina em TiO ₂	95

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de polímeros com alta condutividade no final da década de 1970 proporcionou o avanço de uma nova classe de materiais e o surgimento da eletrônica orgânica. Os dispositivos eletrônicos orgânicos são conceitualmente diferentes dos dispositivos inorgânicos convencionais, pois os semicondutores orgânicos (SO) apresentam versatilidade estrutural que permite alterar suas características por design molecular (DEY et al., 2015). Além disso, eles aliam as propriedades optoeletrônicas de semicondutores inorgânicos com as propriedades mecânicas e vantagens de processamento dos materiais orgânicos, possibilitando a produção de dispositivos eletrônicos a partir de soluções e sem tratamento a altas temperaturas assegurando um procedimento de baixo custo (DEY et al., 2015). No entanto, os SO apresentam algumas limitações como baixa estabilidade e baixa mobilidade dos portadores de carga. Mesmo assim, já é possível verificar algumas aplicações de SO em dispositivos tais como diodos emissores de luz (KAMTEKAR; MONKMAN; BRYCE, 2010; BUI; HAUSER, 2015), célula eletroquímica emissora de luz (ZHANG et al., 2015), células fotovoltaicas (BURKE; LIPOMI, 2013; BELLA et al., 2015; MAZZIO; LUSCOMBE, 2015), transistores de efeito de campo (MUCCINI; NAZIONALE, 2006), transistores de efeito de campo flexíveis, de filmes finos estendíveis (HOROWITZ, 2004), transistor de efeito de campo utilizando eletrólitos como *gate* (BUTH et al., 2012), transistores flexíveis, biodegradáveis e alto-reparo (O'CONNOR et al., 2015), transistores eletroquímicos (STRAKOSAS; BONGO, 2015) e sensores (LOI et al., 2013).

Outra área que tem atraído bastante atenção em dispositivos orgânicos é a chamada bioeletrônica, um dos recentes grandes temas da fronteira que engloba a interface entre dispositivos eletrônicos com o meio biológico. A motivação da bioeletrônica consiste no controle ou monitoramento de impulsos elétricos, reparo ou substituição de tecidos, *drug*

delivery e detecção de baixas concentrações de analitos biológicos e agentes patogênicos (OWENS; MALLIARAS, 2010; MEREDITH; TANDY; MOSTERT, 2013; O'CONNOR et al., 2015). Contudo, para tais tipos de aplicações, necessita-se que os materiais apresentem biocompatibilidade ao tecido hospedeiro e que sirvam como uma ponte de comunicação entre os fluxos iônicos do meio biológico com os elétrons e buracos dos dispositivos (OWENS; MALLIARAS, 2010; MEREDITH; TANDY; MOSTERT, 2013).

Neste contexto, um biopolímero que vem ganhando cada vez mais destaque é a melanina, uma classe de pigmentos encontrada pela natureza com importantes implicações na biologia e na medicina. Elas fazem parte de uma classe de materiais bio-orgânicos funcionais com intrigantes propriedades físicas e químicas que possibilitam uma vasta gama de aplicações como, por exemplo, corantes na terceira geração de células solares (MEREDITH et al., 2005), sensores (HUANG et al., 2007; BORGHETTI et al., 2010; PIACENTI-SILVA et al., 2014b; WU; HONG, 2016), engenharia de tecidos (BETTINGER et al., 2009), dispositivo de memória (AMBRICO et al., 2010, 2012), dispositivos de armazenamento de íons (KIN et al., 2013), interfaces biomiméticas (WÜNSCHE et al., 2013a; AMBRICO et al., 2014) e dispositivo de *drug release* (ARAÚJO et al., 2014).

Mesmo que seu potencial tecnológico tenha sido reconhecido por volta dos anos 1970 (MCGINNESS, 1972), a busca por seu uso na eletrônica orgânica apresenta uma grande barreira: produção de filmes finos de boa qualidade. Atualmente, muitos grupos de pesquisa estão encontrando soluções diferentes para este problema. Por exemplo, o trabalho de Guin e colaboradores (GUIN et al., 2015) mostrou que filmes finos com boa aderência e espessura controlável podem ser obtidos utilizando usando a técnica *layer-by-layer*. Também foi relatado que é possível obter filmes de melanina a partir de métodos eletroquímicos (DÍAZ et al., 2005), eletrospray (ABBAS et al., 2009), evaporação de laser pulsado assistido por matriz (MAPLE, em inglês) (BLOISI et al., 2011), polimerização direta da L-DOPA (SUBIANTO;

WILL; MEREDITH, 2005), 5,6-di-hidroxi-indole (KIM et al., 2011) e dopamina (KLOSTERMAN; RILEY; BETTINGER, 2015) em substrato, polimerização em estado sólido (PEZZELLA et al., 2015) e autodeposição por processo enzimático (STRUBE; BÜNGELER; BREMSER, 2015).

Talvez o método mais simples consista em solubilizar a melanina em solução aquosa com amônia (BOTHMA et al., 2008), o que permite a produção de filmes finos a partir de técnicas simples como *spin-coating* e *drop-casting*. No entanto, é possível que tal tratamento alcalino modifique a estrutura química (*i.e.* propriedades físico-químicas) da melanina (D'ISCHIA et al., 2013; WÜNSCHE et al., 2013b). Nesta perspectiva, uma alternativa prática seria a obtenção de um derivado da melanina que apresente as propriedades físico-químicas do pigmento e maior solubilidade. Vale ressaltar que desde 2004 derivados solúveis já podem ser obtidos utilizando diferentes grupos funcionais como sulfona (DEZIDÉRIO et al., 2004; BRONZE-UHLE et al., 2013), éster octil e benzil (LAWRIE; MEREDITH; MCGEARY, 2008), *S-galactosyl* (PEZZELLA et al., 2009) e trietilenoglicol (CICCO et al., 2015).

Portanto, o trabalho apresentado nesta dissertação é motivado pela possibilidade do uso de filmes finos de melanina em dispositivos eletrônicos orgânicos. Assim, visando facilitar seu processo de deposição, temos como objetivo propor uma abordagem sintética alternativa para obtenção de derivados solúveis de melanina utilizando oxigênio molecular como agente oxidante. É importante lembrar que o oxigênio molecular é considerado um oxidante ideal e cumpre os requisitos sociais para uma química verde (baixo custo, abundância e não tóxico), possuindo bastante interesse industrial e acadêmico.

Dentre objetivos mais específicos, buscamos:

- apresentar, pela primeira vez, um estudo sintético da melanina em solventes como água e DMSO com pressão de oxigênio molecular;
- apresentar um estudo estrutural para os materiais formados, e;

- propor o mecanismo reacional envolvido nas diferentes sínteses.

Para isto, no *capítulo 2* é apresentada uma fundamentação teórica a respeito da melanina, sua forma de obtenção, estrutura e propriedades físico-químicas. No *capítulo 3*, descrevem-se os materiais e as diferentes rotas sintéticas utilizadas e no *capítulo 4* o preparo das amostras, bem como as técnicas utilizadas para suas caracterizações. No *capítulo 5* são apresentados e discutidos os resultados para as diferentes melaninas formadas, apresentando um mecanismo e possível estrutura em cada solvente estudado e no *capítulo 6* e *capítulo 7* apresentam-se, respectivamente, as conclusões gerais do estudo e perspectivas futuras para dar continuidade ao estudo apresentado.

Por fim, um estudo a respeito do procedimento de extração para a síntese com 4 atm de pressão de O₂ em DMSO foi realizado visando verificar a eficácia no processo de purificação. Além disso, também buscamos uma alternativa para síntese da melanina a partir de métodos eletroquímicos diretamente em dióxido de titânio. Os resultados preliminares e mais informações a respeito destes estudos podem ser encontrados, respectivamente, nos Apêndices A e B.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA: MELANINA

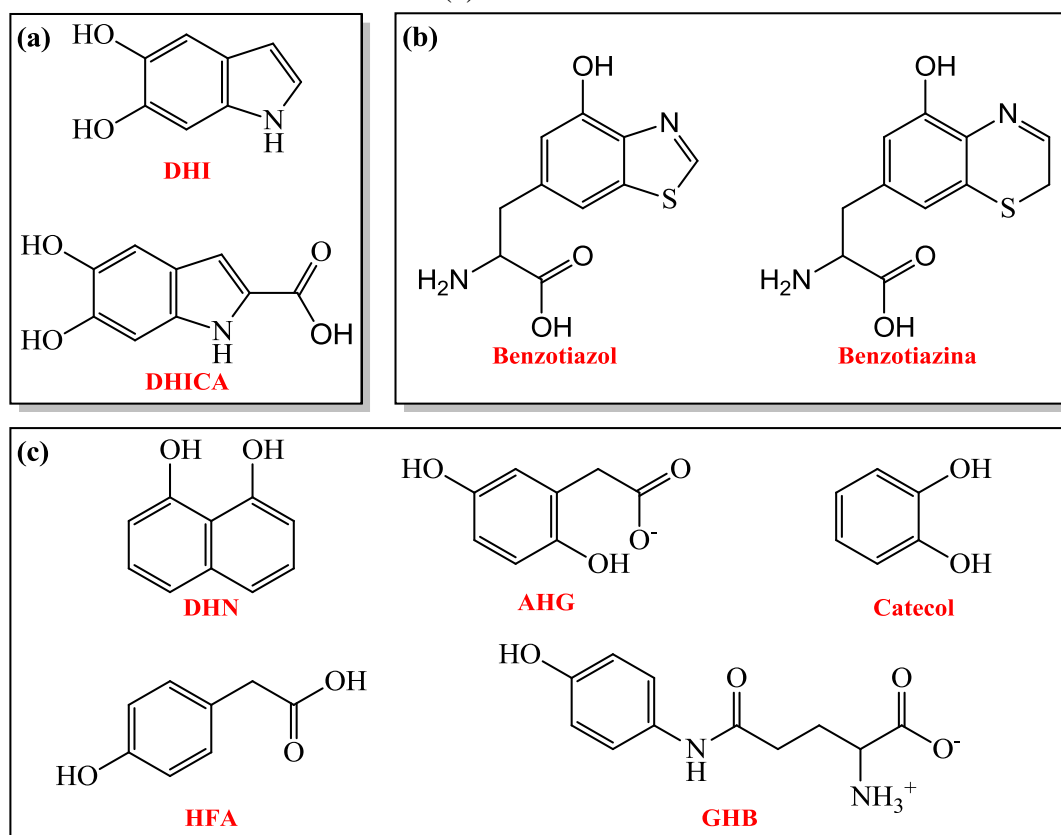
Melanina, do grego *melanos* que significa *escuro*, refere-se a um termo genérico utilizado para descrever um dos mais enigmáticos pigmentos/biopolímeros ao longo de toda escala filogenética, sendo também o grupo mais resistente, heterogêneo e antigo da natureza (D'ISCHIA et al., 2013; SOLANO, 2014). Dentro do corpo humano, as melaninas estão presentes em diferentes regiões como pele, cabelo, olhos, orelha interna e cérebro, devido a sua função de pigmentação e fotoproteção, fotossensibilidade e até mesmo quelatação de íons metálicos e termorregulação (KROL; LIEBLER, 1998; D'ISCHIA et al., 2013).

Estruturalmente, as melaninas divergem da maioria dos outros pigmentos naturais, pois não podem ser descritas como uma estrutura única e bem definida. Diante disto, ao final da década de 1960, foi sugerida uma classificação dividindo as melaninas em três grupos principais que podem ser diferenciados de acordo com suas estruturas químicas.

O primeiro grupo, chamado *eumelanina*, é formado a partir da oxidação da tirosina e apresenta coloração marrom-preta, sendo formada estruturalmente por 5,6-di-hidroxi-indole (DHI) e ácido 5,6-di-hidroxi-indole-2-carboxílico (DHICA) (D'ISCHIA et al., 2013; SOLANO, 2014), Figura 1(a). O segundo grupo também é formado a partir da oxidação da tirosina, porém na presença do aminoácido cisteína. Neste caso, temos a *feomelanina* que apresenta coloração amarela-vermelha, formada por monômeros de benzotiazina e benzotiazol, unidades que, além do nitrogênio, contém enxofre em sua estrutura (ITO, 2003; SOLANO, 2014), Figura 1(b). O último grupo pertencente às *alomelaninas* e pode ser encontrado em fungos, micróbios e plantas. Apresentam coloração escura (semelhante à eumelanina), porém diferentemente dos grupos anteriores, suas estrutura são formadas, na maioria dos casos, por carbono, hidrogênio e oxigênio (PLONKA; GRABACKA, 2006). É formada durante a oxidação/polimerização de substratos fenólicos, como ácido

4-hidroxifenilacético (HFA), γ -glutaminil-4-hidroxibenzeno (GHB), ácido homogentísico (AHG), 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN) e o-benzenodiol (catecol), Figura 1(c), na presença da enzima fenol oxidase (PLONKA; GRABACKA, 2006; SOLANO, 2014). É o grupo mais diversificado e o menos estudado.

Figura 1 - Principais monômeros formadores da melanina: (a) eumelanina, (b) feomelanina e (c) alomelainas.



Nesta dissertação, o interesse científico está voltado exclusivamente para as eumelaninas, portanto, a partir deste momento, por simplicidade, as descreveremos como o termo comumente adotado na área de materiais: melanina.

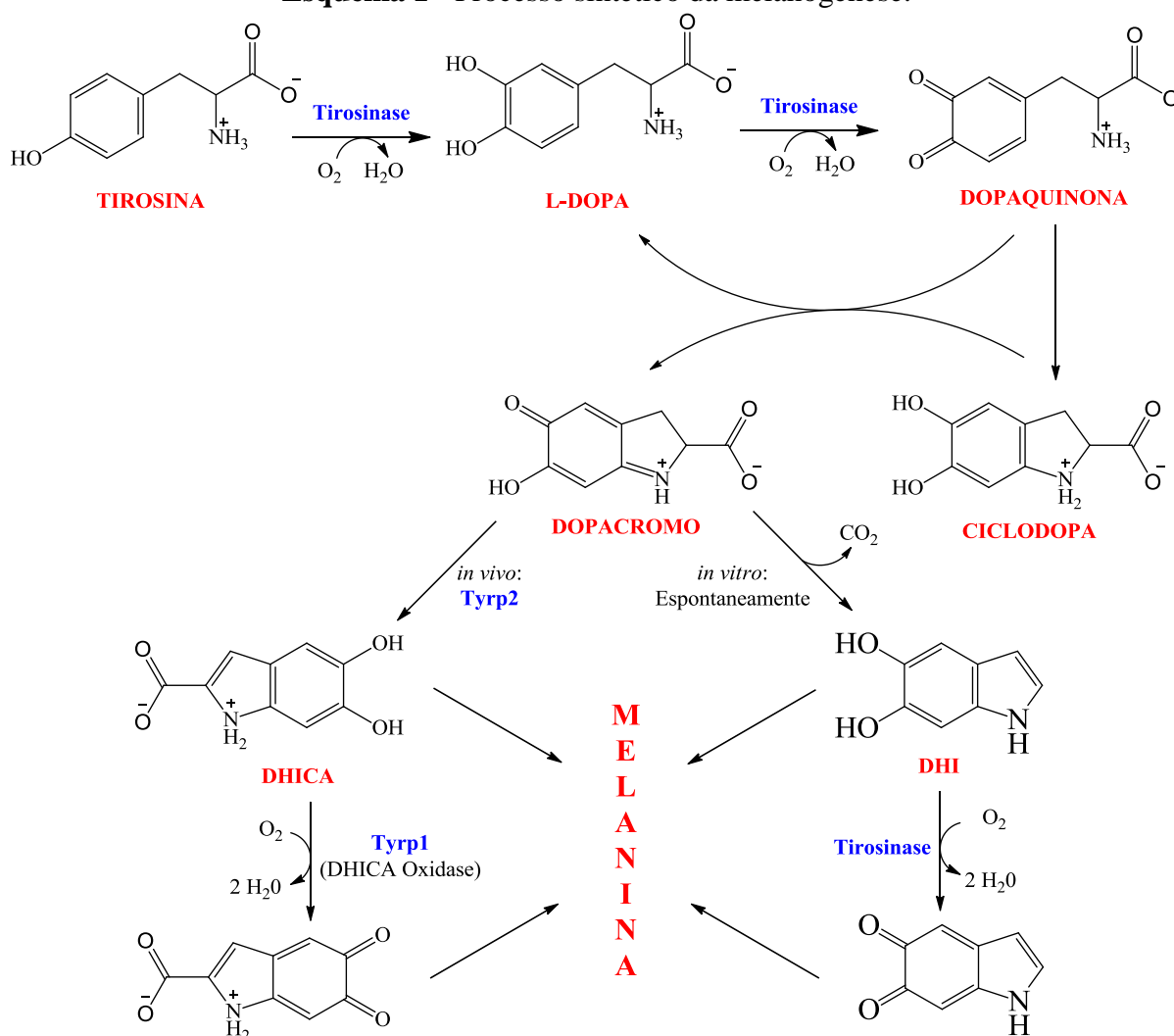
2.1. Melanogênese: mecanismo sintético *in vivo* e *in vitro*

Entende-se por melanogênese como sendo a biossíntese da melanina a partir de precursores fenólicos. Esse fenômeno ocorre de maneira generalizada em todos os tipos de organismos e foi só a partir do final da década de 1920, com os trabalhos de Raper (RAPER, 1928) e Mason (MASON, 1948), que seu mecanismo começou a ser compreendido.

Na melanogênese, o passo inicial envolve a hidroxialquilação da tirosina, na presença de oxigênio para formação da 3,4-di-hidroxifenil-L-alanina (L-DOPA) e/ou oxidação da L-DOPA em dopaquinona sendo ambos os processos catalisados pela enzima tirosinase. Como a dopaquinona é um intermediário bastante reativo, esta espontaneamente se rearranja e cicliza para gerar o dopacromo (PROTA, 1992a; PANZELLA et al., 2013).

Até os anos 1980, acreditava-se que as reações subsequentes seguiam o mecanismo proposto por Raper-Mason, no qual o dopacromo espontaneamente sofre descarboxilação formando os monômeros DHI que rapidamente são submetidos a uma polimerização oxidativa para formação da melanina e outros compostos instáveis (MASTORE; KOHLER; NAPPI, 2005). Contudo, este mecanismo não explicava a presença da grande quantidade de compostos carboxílicos, como as DHICA, na melanina natural.

Para explicar essa divergência, atualmente considera-se que existem, durante a formação da melanina, duas enzimas derivadas da tirosinase ativas no processo de oxidação: proteína-1 relacionada à tirosinase (Tyrp1) e proteína-2 relacionada à tirosinase (Tyrp2), também chamada de dopacromo tautomerase. Assim, foi proposto que, *in vivo*, a enzima Tyrp2 catalisa a tautomerização do dopacromo em DHICA e Tyrp1 catalisa a oxidação da DHICA de tal forma a promover sua polimerização (MUNOZ-MUNOZ et al., 2009). Portanto, a presença da Tyrp2 poderia explicar a proporção de DHICA/DHI maior que 50% na melanina natural (PANZELLA et al., 2013). Um resumo do processo de melanogênese apresentado no Esquema 1.

Esquema 1 - Processo sintético da melanogênese.

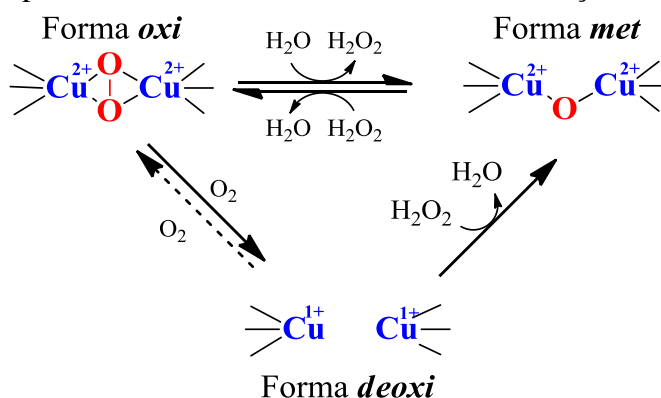
Fonte: Adaptado de MUNOZ-MUNOZ et al., 2009.

Durante a síntese da melanina, o processo de oxidação da o-quinona (catalisada, ou não, enzimaticamente) produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é acumulado no meio reacional (JOLLEY et al., 1974; NOFSINGER; LIU; SIMON, 2002; YAMAZAKI; MORIOKA; ITOH, 2004; MASTORE; KOHLER; NAPPI, 2005; MUNOZ-MUNOZ et al., 2009; GUO et al., 2014). O mecanismo de formação do H_2O_2 e sua função durante a melanogênese não é completamente compreendido, mas estudos indicam que sofre ação direta da tirosinase através de dois diferentes processos: *catalase* (conversão de H_2O_2 em $\frac{1}{2}O_2$ e H_2O) e *peroxigenase* (dependência de H_2O_2 para oxigenação de substratos).

Tirosinase é uma enzima de cobre mono-oxigenada que pode ser encontrada em plantas, fungos, bactérias e animais, atuando como catalisador para a oxigenação do substrato pela ação do oxigênio. A enzima pode existir em três diferentes formas chamadas: *oxi* [di-cobre(II)], *met* [peroxo-di-cobre(II)] e *deoxi* [di-cobre(I)] dependendo da presença/ausência de oxigênio e do estado de oxidação dos íons de cobre.

Os processos da catalase e da peroxigenase podem ser explicados pela existência da forma *oxi*, que atua como um intermediário reativo comum. Durante a oxidação, a forma *oxi* é responsável pelas reações de oxigenação fenólica e desidrogenação do catecol produzindo no meio reacional a forma *met*. Esta espécie reage com catecol originando o-quinona e a forma *deoxi*. Por fim, esta estrutura reage com O_2 , regenerando no meio reacional a forma *oxi* (veja Esquema 2). Os produtos o-quinonas são espontaneamente convertidos em pigmentos de melanina e H_2O_2 (ITOH et al., 2001; YAMAZAKI; ITOH, 2003; YAMAZAKI; MORIOKA; ITOH, 2004).

Esquema 2 - Espécies derivadas da tirosinase durante a reação de oxidação.



Fonte: Adaptado de YAMAZAKI; MORIOKA; ITOH, 2004.

Durante o processo da catalase, essas espécies são formadas pela reação da forma *met* com o H_2O_2 que foi formado no meio reacional. O complexo *oxi* reage com O_2 originando *deoxi* que, em seguida, reage com outra molécula de H_2O_2 gerando novamente *met* e H_2O . Quando o substrato fenólico é adicionado, a espécie *oxi* ataca o substrato para induzir a

formação da ligação C-O fenólica pela transferência de átomos de oxigênio através do mecanismo de substituição eletrofílica aromática (ITOH et al., 2001; YAMAZAKI; ITOH, 2003; YAMAZAKI; MORIOKA; ITOH, 2004). Na atividade peroxigenease a enzima pode catalisar a oxigenação dos fenóis p-substituídos por H₂O₂ (WOOD; SHALLREUTER, 1991; MUNOZ-MUNOZ et al., 2009).

Estudos realizados por Wood et al. (WOOD; SHALLREUTER, 1991) mostram que baixas concentrações de H₂O₂ ativam a atividade da enzima. Logo todo o processo pode ser responsável pela alteração de quantidades monoméricas de DHI e DHICA do pigmento. Diante disto, as condições na qual a síntese ocorre é de extrema importância, visto que pequenas modificações na reação podem afetar a estrutura polimérica e consequentemente as propriedades do material formado.

Devido à insolubilidade e dificuldade de extração da melanina de fontes naturais, surge a necessidade de se obter a melanina *in vitro*. Atualmente, é possível obter a melanina a partir de diversas rotas sintéticas e também a partir de diversos precursores como L-DOPA, DHI, DHICA, tirosina e dopamina (DEZIDÉRIO et al., 2004; SUBIANTO; WILL; MEREDITH, 2005; LAWRIE; MEREDITH; MCGEARY, 2008; PEZZELLA et al., 2010; KIM et al., 2011; D'ISCHIA et al., 2013; VECCHIA et al., 2014). Embora dopamina venha ganhando bastante atenção devido à facilidade de processamento e disponibilidade comercial (BERNSMANN et al., 2011; JU et al., 2011; MICHEL, 2013; KLOSTERMAN; RILEY; BETTINGER, 2015; WU; HONG, 2015, 2016), a melanina é tradicionalmente obtida a partir da oxidação da L-DOPA por meio de reação enzimática ou pela auto-oxidação em solução aquosa alcalina com o borbulhamento de oxigênio atmosférico (D'ISCHIA et al., 2013). Ambos os processos sintéticos não são controlados, ocasionando um material polimérico com grande heterogeneidade química e diferentes proporções DHICA/DHI. Além disso, a melanina obtida

também é insolúvel em água ou outros tipos de solventes, o que inviabiliza a produção de bons filmes finos (PROTA, 1992b; BOTHMA et al., 2008).

Uma das primeiras tentativas para desenvolver um derivado de melanina solúvel foi obtida pelo grupo de pesquisa do Professor Carlos Graeff em 2004 (DA SILVA et al., 2004; DEZIDÉRIO et al., 2004). Neste procedimento, a síntese é controlada o que propicia a obtenção de um material homogêneo, com maior estabilidade térmica e solubilidade em solventes orgânicos como dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF), possibilitando a produção de filmes finos com melhor aderência nos substratos (DA SILVA et al., 2004; DEZIDÉRIO et al., 2004; LORITE et al., 2006; WÜNSCHE et al., 2011, 2013b).

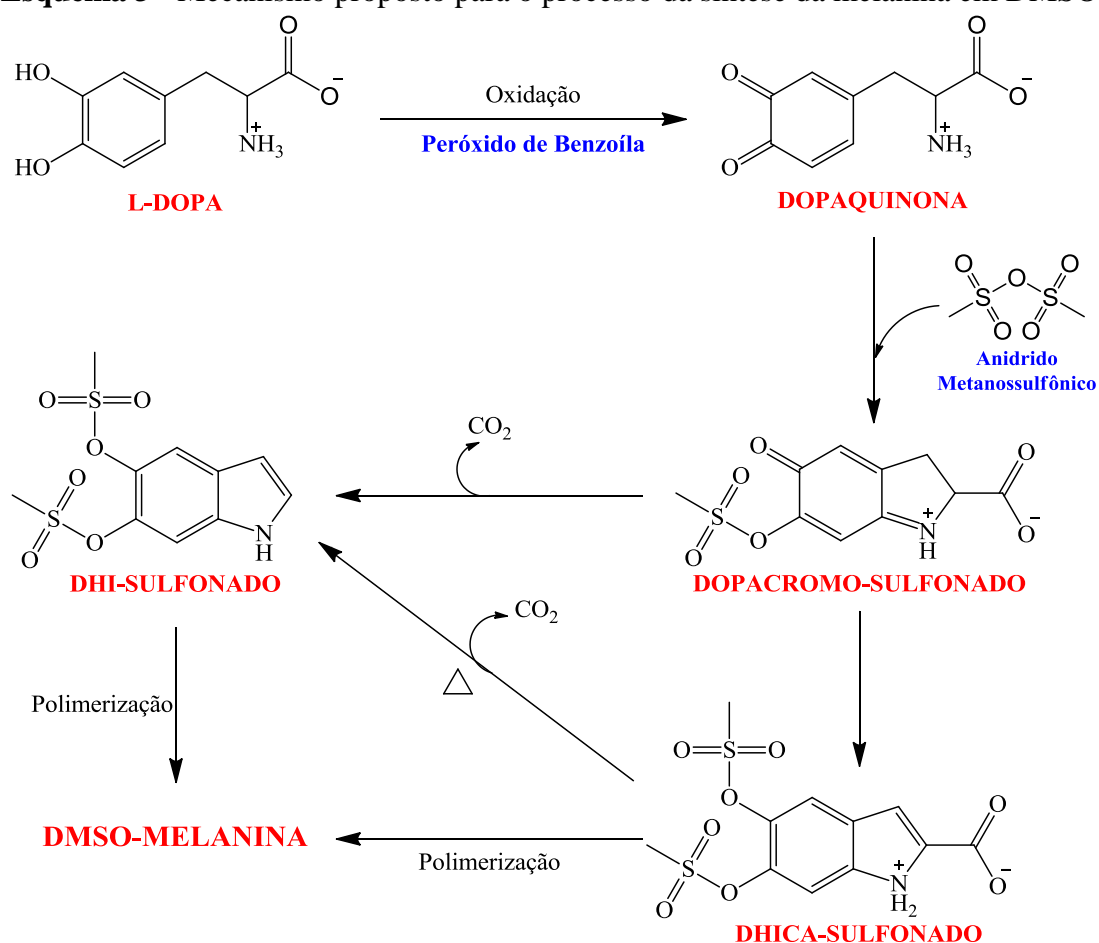
De maneira semelhante às sínteses em meio aquoso, este procedimento reacional também é baseado na oxidação da L-DOPA, porém utiliza-se peróxido de benzoíla como agente oxidante e DMSO como solvente. Neste ambiente químico, o peróxido de benzoíla apresenta duas importantes funções (BRONZE-UHLE et al., 2013): i) oxidação da L-DOPA para formação dos monômeros derivados de DHI e DHICA, conforme o modelo de Raper-Mason; ii) oxidação do DMSO para formação do anidrido metanossulfônico. Este subproduto é responsável pela proteção das hidroxilas fenólicas dos monômeros da DHI e DHICA com grupos sulfonados ($-SO_2CH_3$).

Observações experimentais sugerem que o material formado possa ser N-sulfonado, ou seja, que exista a presença de grupos sulfonados ligados ao nitrogênio e também sugerem a presença do grupo metil ligado ao nitrogênio da estrutural indol, que pode ser proveniente de subprodutos da oxidação do DMSO ou decomposição térmica dos mesmos durante o processo de extração (BRONZE-UHLE et al., 2013).

Vale ressaltar que, embora este material apresente bom potencial tecnológico, o tempo sintético é lento (mais de 50 dias). Diante disto, a primeira alteração sintética baseada neste mecanismo foi realizada a partir do aquecimento do meio reacional. Observou-se durante o

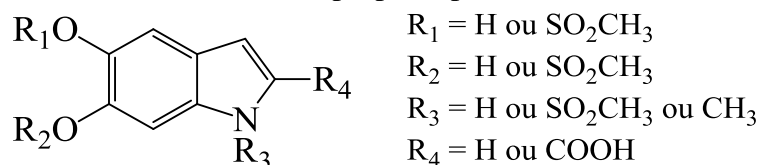
aquecimento da solução à 100 °C que a síntese é ainda mais controlada e o tempo reacional diminui para 8 dias. Além disto, este aquecimento ocasiona uma diminuição dos grupos carboxílicos nos produtos intermediários e, conseqüentemente, no polímero final (PIACENTI-SILVA et al., 2014a). Um resumo do mecanismo proposto para a síntese da melanina em DMSO (DMSO-Melanina) é apresentado no Esquema 3.

Esquema 3 - Mecanismo proposto para o processo da síntese da melanina em DMSO.



Fonte: Adaptado BRONZE-UHLE et al., 2013 e PIACENTI-SILVA et al., 2014a.

Portanto, a partir deste mecanismo sintético, foi proposto que a estrutura da DMSO-Melanina é um conjunto de oligômeros com diferentes grupos protetores ligados às hidroxilas fenólicas e ao nitrogênio do anel pirrol, conforme Figura 2.

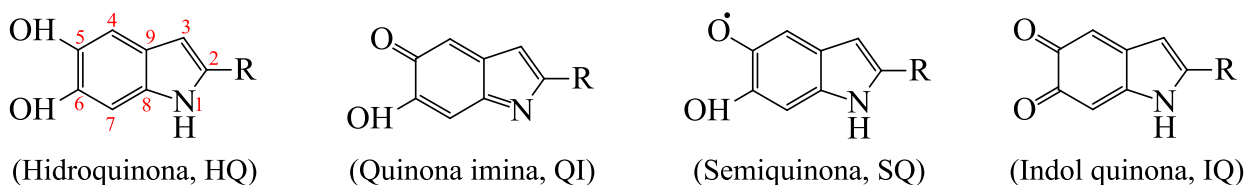
Figura 2 - Estrutura molecular proposta para DMSO-Melanina.

Fonte: BRONZE-UHLE et al., 2013.

2.2. Características estruturais

A estrutura macromolecular da melanina ainda não é conhecida detalhadamente e diversos modelos foram propostos. A principal, se não única, semelhança entre os diversos modelos é a presença de unidades de 5,6-di-hidroxi-indoles ligadas por ligações covalentes. Estas unidades são formadas pelas estruturas primárias de DHI e DHICA em diferentes estados de oxidação, Figura 3. Neste sentido, pode-se dizer que a melanina é uma mistura heterogênea de pequenos oligômeros similares formados por ligações aleatórias de suas estruturas primárias.

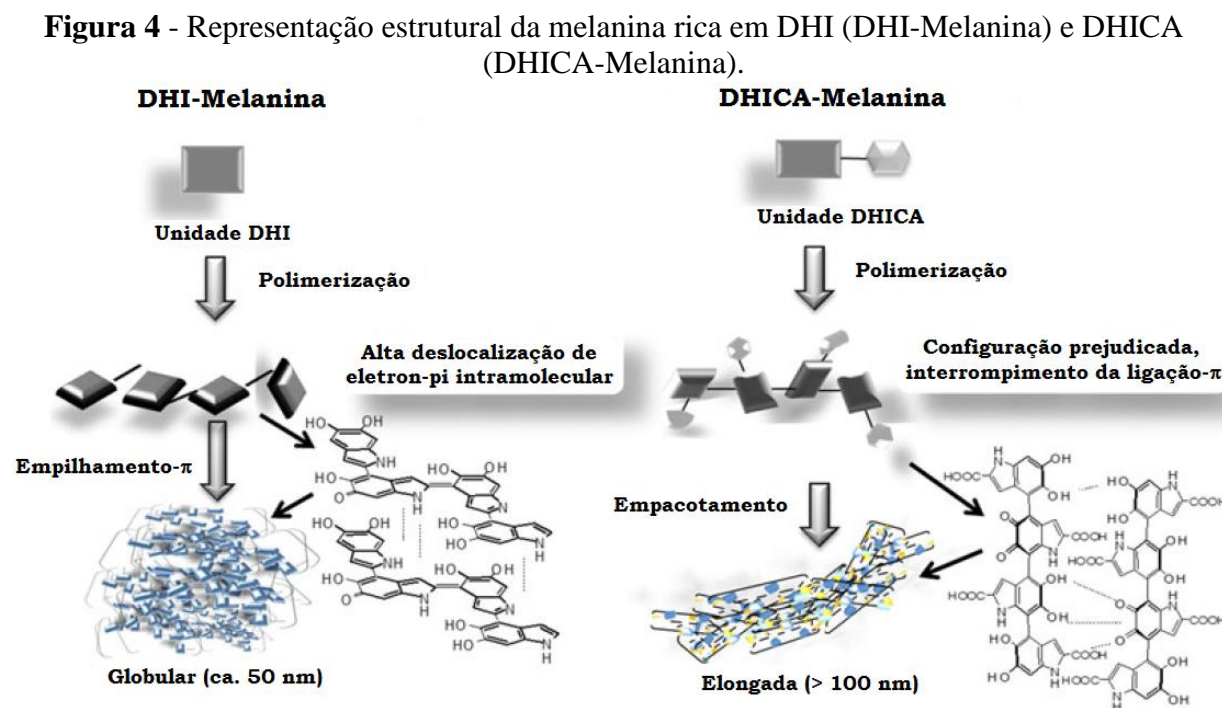
Figura 3 - Monômeros formadores da melanina em diferentes estados de oxidação. R = H (DHI e derivados) ou R = COOH (DHICA e derivados).



O modelo mais aceito atualmente para explicar a estrutura macromolecular da melanina considera que seja composta de 3 a 4 subestruturas planas empilhadas de forma similar ao grafeno. Além disto, estas subestruturas apresentariam um espaçamento de 3,4 Å intercadas e dimensões aproximadas de 10 e 20 Å para altura e comprimento, respectivamente (ZAJAC et al., 1994; D'ISCHIA et al., 2009; WATT; BOTHMA; MEREDITH, 2009). Contudo, duas observações se fazem necessárias: i) detalhes de como as unidades primárias são ligadas ainda é questão de debate na literatura; ii) não é possível

desconsiderar a possibilidade da formação de uma estrutura polimérica durante a síntese das melaninas.

Diferentes proporções dos monômeros DHI e DHICA podem influenciar em sua macromolécula. Sabe-se que quando a melanina é rica em DHI, a estrutura é mais heterogênea decorrente das várias posições disponíveis (2, 3, 4 e 7) para polimerização, enquanto que a DHICA polimeriza apenas nas posições 4 e 7, resultando em polímeros menores e com maior linearidade (PANZELLA et al., 2013; D'ISCHIA et al., 2015), Figura 4.



Fonte: Adaptado de D'ISCHIA et al., 2015.

Além disso, a razão entre os monômeros DHI e DHICA apresenta uma profunda capacidade de afetar as propriedades físico-químicas e biológicas das melaninas (PELES; SIMON, 2011; PANZELLA et al., 2013; PIACENTI-SILVA et al., 2014a). Também, é possível que a proporção DHICA/DHI varie de acordo com a biossíntese, conforme já mencionado. De fato, a sépia-melanina (obtida a partir de moluscos marinhos da classe

Cephalopoda) apresenta uma razão DHICA/DHI maior que 50%, enquanto que em melaninas sintéticas é mais comum se obter monômeros de DHI, com cerca de 10% de DHICA (PANZELLA et al., 2013).

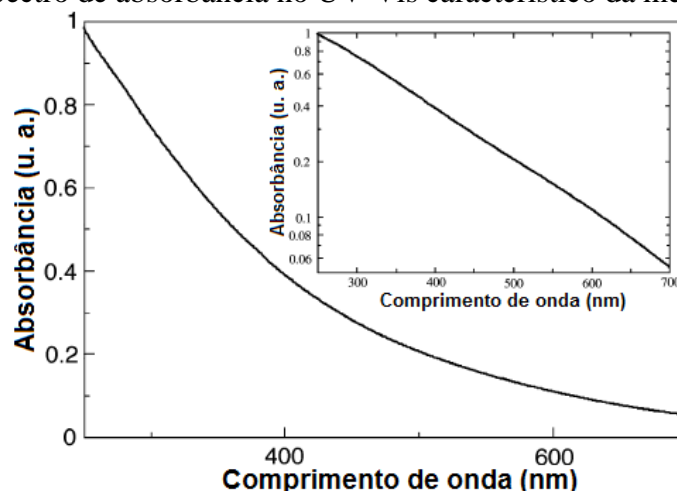
2.3. Propriedades ópticas

Diferentemente da maioria das moléculas orgânicas que apresentam picos de absorção devido às transições entre estados eletrônicos, o espectro de absorbância da melanina possui um comportamento monoatômico que em função do comprimento de onda resulta numa linha exponencial que aumenta em direção a região do ultravioleta (STARK et al., 2003; MEREDITH et al., 2006; MEREDITH; SARNA, 2006; TRAN; POWELL; MEREDITH, 2006), Figura 5. Esta curva de absorção suave é considerada característica da melanina e sua origem é atribuída ao chamado *Modelo de desordem química* (MEREDITH et al., 2006; TRAN; POWELL; MEREDITH, 2006). Conforme apresentado anteriormente, a melanina é formada por diferentes monômeros em diferentes estados de oxidação que podem se ligar por diversas posições formando um grande número de espécies quimicamente distintas. Com isso, a larga banda de absorbância pode ser uma consequência da sobreposição dos picos dos espectros destas espécies.

Em 2014, foi sugerido que esta característica espectral também poderia ser explicada levando em consideração um distúrbio físico chamado *desordem geométrica* (CHEN et al., 2014). Utilizando análises computacionais e microscópicas, este trabalho mostrou que a maior contribuição para a banda de absorção da melanina vem do arranjo físico de seus constituintes e não das características químicas. Segundo os autores, a melanina é constituída de pequenas estruturas quimicamente ordenados a partir de uma aleatoriedade intrínseca, de tal modo que a orientação das moléculas empilhadas pode ser arbitrária e seus tamanhos possam ser diferentes, formando agregados altamente desordenados. Diante disto, ambos os tipos de

desordem podem desempenhar um papel complementar na característica do espectro de absorção.

Figura 5 - Espectro de absorbância no UV-Vis característico da melanina sintética.



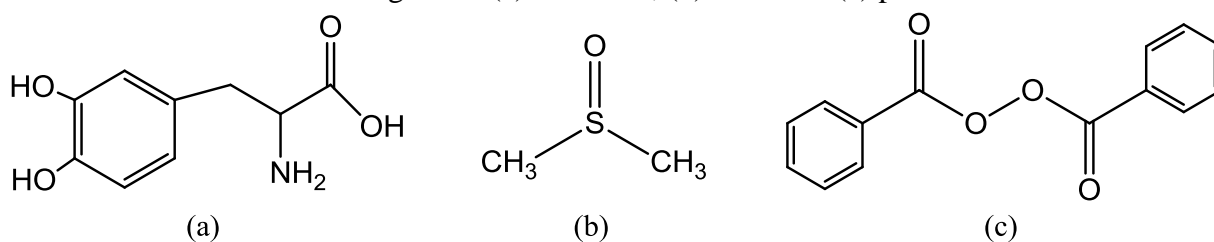
Fonte: Adaptado de MEREDITH et al., 2006.

O espectro de absorbância da melanina é interessante por duas principais razões. A primeira delas é a possibilidade de poder utilizar esta classe de pigmentos como um material ativo para aplicações tecnológicas em dispositivos fotovoltaicos e na eletrônica orgânica (MEREDITH et al., 2005). A segunda razão é que a ampla banda de absorção no UV-Vis funciona como uma primeira barreira de fotoproteção do corpo humano. A absorção aumenta monotonicamente para as energias mais elevadas aumentando a proteção contra os fótons de grande energia que poderiam causar maior dano ao DNA (MEREDITH et al., 2006). Outra característica bastante útil para a fotoproteção é a capacidade de conseguir dissipar de maneira não radiativa mais de 99,9% dos fótons absorvidos (MEREDITH; SARNA, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para realizar os procedimentos sintéticos, foram utilizados os seguintes reagentes: dimetilsulfóxido (DMSO) P. A., Vetec (99,9%), peróxido de benzoíla, Vetec (75,0 - 80,0 %) e 3,4-di-hidroxifenil-L-alanina (L-DOPA), Sigma ($\geq 98\%$), cujas estruturas moleculares são apresentadas na Figura 6. Também foi utilizado acetonitrila, Synth (99,5%), hidróxido de amônia, Synth (28,0 - 30,0%), e água MiliQ.

Figura 6 - Estrutura molecular dos reagentes utilizados para realização das sínteses das melaninas em solvente orgânico: (a) L-DOPA, (b) DMSO e (c) peróxido de benzoíla.



Com esses reagentes, diferentes procedimentos foram realizados (seções 3.1 e 3.2, a seguir). Vale ressaltar que as sínteses foram realizadas pelo menos com cinco repetições e características óptico-estruturais semelhantes foram obtidas indicando a alta reprodutibilidade. Além disso, o processo de polimerização da melanina em todos os procedimentos sintéticos realizados foi acompanhado pela técnica de espectroscopia de UV-Vis (PIACENTI-SILVA et al., 2014a).

3.1. Sínteses da H₂O-Melanina

Procedimento 1: Síntese tradicional

Inicialmente foi dissolvido 300 mg de L-DOPA em 60 mL de água MiliQ e adicionou-se 400 μ L de hidróxido de amônio (pH da mistura entre 8 e 10). Sob agitação magnética, a síntese foi mantida a temperatura ambiente e oxigenada com o auxílio de uma bomba de ar

atmosférico. Após a reação ter sido considerada concluída, a solução foi inserida numa membrana de diálise de 3500 MWCO. Utilizou-se a água MiliQ como meio dialisante, a fim de separar o material com baixo peso molecular. Esta água foi rotineiramente trocada até não sofrer mais alteração de cor. Por fim, a melanina foi seca na estufa a 90 °C. O material obtido será chamado a partir de agora *HMel(4)*.

Procedimento 2: Pressão de oxigênio molecular

As sínteses realizadas foram baseadas no procedimento 1, porém ao invés de manter a síntese sob oxigenação atmosférica, utilizando-se um reator de aço inoxidável e diferentes pressões de O₂. 60 mL de água MiliQ, 300 mg de L-DOPA e diferentes volumes entre 0,0 e 1,0 mL de hidróxido de amônio (pH entre 8 e 10). O processo de extração utilizado foi semelhante ao descrito no procedimento 1. O material obtido nesta nova rota será referido de maneira geral como sendo *HMel-pP(b')*, onde *p* representa o valor da pressão utilizada (4, 6 e 8 atm) e *b'* (sendo, respectivamente, 0, 1, 4, 7 e 10 para 0, 100, 400, 700, 1000 µL) o volume de hidróxido de amônio utilizado durante a síntese.

3.2. Sínteses da DMSO-Melanina

Procedimento 3: Síntese Tradicional

A síntese foi realizada em um balão de fundo chato com uma mistura de 1,5 g de L-DOPA e 0,93 g de peróxido de benzoíla dissolvidos em 200 mL DMSO, mantidos em agitação magnética. Após a síntese ter sido considerada concluída, a solução foi concentrada em ¼ de seu volume. Após a concentração, a solução foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente, sendo, posteriormente, adicionado acetonitrila até a solução completar 200 mL novamente. Essa nova mistura ficou em repouso por três dias visando separar a melanina formada de subprodutos da síntese. Após o terceiro dia, a solução foi centrifugada

por 15 minutos com velocidade de 2500 rpm. O precipitado foi levado até a estufa a 90°C para secar e obter a melanina em pó. O material obtido será chamado *DMel*.

Procedimento 4: Síntese aquecida

Este procedimento é semelhante ao procedimento 3, porém a reação foi mantida em um banho de silicone com temperatura controlada de 100 °C num balão com condensador de refluxo a fim de evitar a evaporação do solvente. O material obtido será chamado de *DMel-T*.

Procedimento 5: Pressão de oxigênio molecular

A síntese foi realizada no reator de aço inox com uma mistura de 0,45 g de L-DOPA em 60 mL DMSO e diferentes pressões de O₂. A síntese foi mantida em agitação magnética. O material obtido neste procedimento será referido a partir de agora como *DMel-p'P*, onde *p'* representa o valor da pressão (4 ou 8 atm) utilizada durante a síntese.

Devido à natureza explosiva dos peróxidos orgânicos, optou-se por não utilizar o peróxido de benzoíla no processo envolvendo pressão de oxigênio molecular.

Procedimento 6: Ausência do peróxido de benzoíla

Este procedimento é semelhante ao da síntese tradicional em DMSO (procedimento 3), porém não foi utilizado o peróxido de benzoíla. O nome desta amostra será *DMel-S*.

Procedimento 7: Presença de ar atmosférico

Este processo segue o descrito no procedimento 6. A diferença está no borbulhamento do ar atmosférico na solução. A amostra será chamada *DMel-O*.

4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.1. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível

O espectro de absorção na região UV-Vis nos compostos orgânicos está relacionado às transições entre níveis de energia eletrônica. Estes espectros comumente apresentam a absorvância em função comprimento de onda e servem para ajudar na elucidação de estruturas de compostos orgânicos com base em espectros de referência (BRUICE, 2005; CONSTANTINO, 2006; SKOOG et al., 2006).

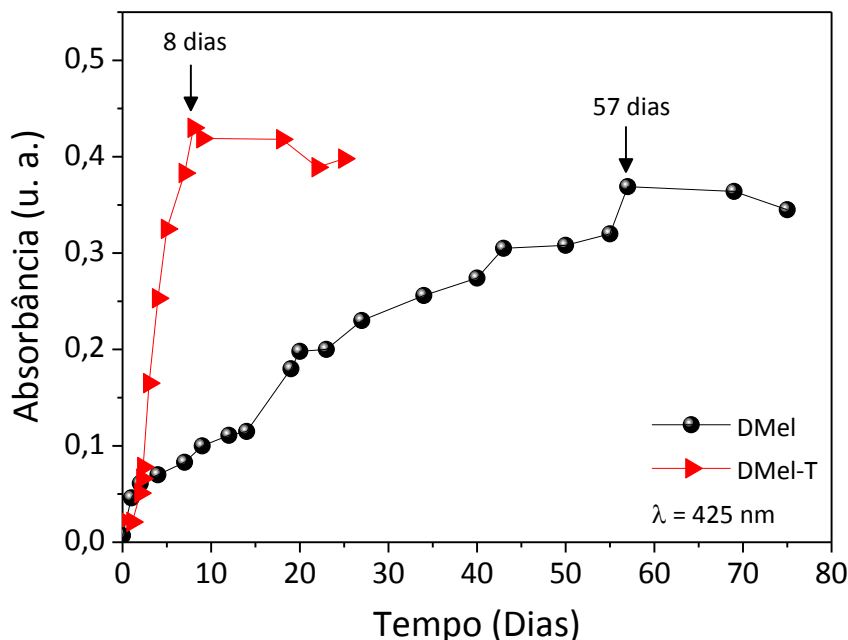
Na espectroscopia UV-Vis, quando um feixe de luz de intensidade I_0 incide sobre uma amostra, parte da luz é absorvida de forma que a intensidade I que emerge da amostra é menor que a intensidade incidente (BRUICE, 2005; CONSTANTINO, 2006; SKOOG et al., 2006). Estas grandezas são relacionadas empiricamente através da Lei de Beer-Lambert, equação (1):

$$A = -\ln \frac{I}{I_0} = \varepsilon c L \quad (1)$$

onde A é a absorvância, c é a concentração da solução, L o tamanho do caminho óptico e ε o coeficiente de absorção molar.

Neste estudo, esta técnica foi bastante utilizada para acompanhar o processo de polimerização das melaninas. Durante o processo sintético a absorção da amostra aumenta com o tempo até que absorvância se estabiliza de maneira similar ao apresentado na Figura 7. Considera-se que estabilização da absorvância acontece devido ao fim da reação de polimerização da melanina (PIACENTI-SILVA et al., 2014a).

Figura 7 - Absorbância em função do tempo para DMSO-Melanina sintetizadas em diferentes temperaturas.



Fonte: Adaptado de PIACENTI-SILVA et al., 2014a.

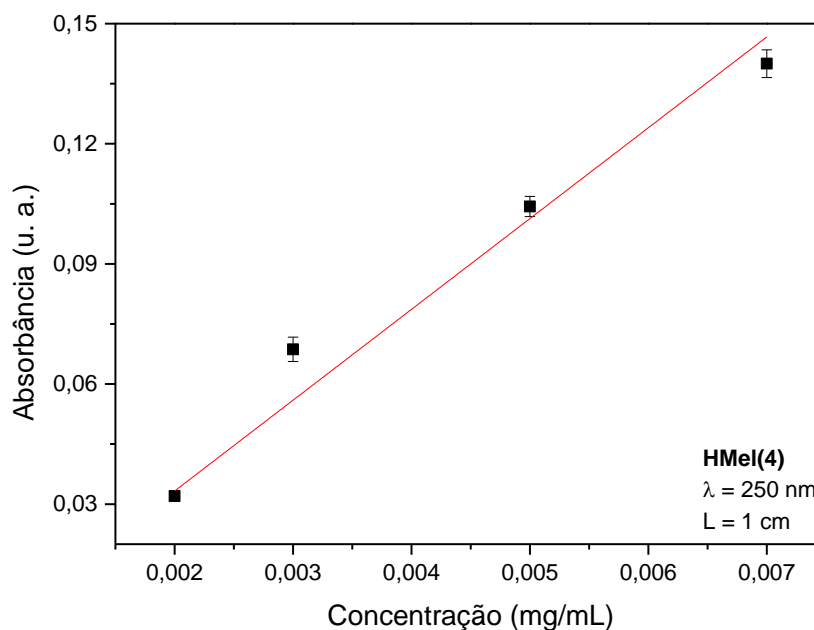
Para as medidas de absorbância diluiu-se em 1,0 mL do solvente do meio reacional alíquotas de 7,0 μL das amostras retiradas em intervalos de tempos regulares até o fim da reação. Como branco, foi utilizado água MiliQ ou DMSO dependendo do solvente utilizado na síntese. Para estas medidas, utilizou-se o aparelho “UV-Vis-Spectrophotometers (UVmini-1240)” da Shimadzu, com varredura de 200-800 nm.

4.1.1. Coeficiente de absorção molar

O coeficiente de absorção molar, também conhecido como absorvidade molar, é uma constante característica do material e do comprimento de onda da radiação incidente (CUSTODIO; KUBOTA; ANDRADE, 2000; CONSTANTINO, 2006; SKOOG et al., 2006). Para concentrações muito baixas, a lei de Lambert-Beer (eq. (1)), pode ser utilizada para o cálculo deste coeficiente (CONSTANTINO, 2006). Como o caminho óptico utilizado durante

a medida era 1 cm, o coeficiente angular da reta fornece o coeficiente de absorção molar da amostra.

Figura 8 - Absorbância em função da concentração para HMel(4) em $\lambda = 250$ nm e um caminho óptico de 1 cm.



Para realizar o estudo do coeficiente de absorção molar dos derivados solúveis obtidos, inicialmente foram preparadas soluções estoque com concentração de 5 mg/mL, sendo utilizado água miliQ ou DMSO como solvente para as melaninas sintetizadas em água e DMSO, respectivamente. Estas soluções foram deixadas em agitação magnética por uma hora visando uma melhor diluição/dispersão.

A partir dessas soluções pré-preparadas, alíquotas de 1 μ L foram diluídas em 3 mL do mesmo solvente e a concentração variou entre 0,002 mg/mL e 0,007 mg/mL. As medidas foram realizadas em triplicata e utilizou-se o aparelho “UV-Vis-Spectrophotometers (UVmini-1240)” da Shimadzu, com varredura de 250-800 nm.

4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho é o resultado da absorção/transmissão da radiação infravermelha que passou pela amostra. É uma técnica bastante utilizada para identificação/caracterização da estrutura de um composto devido às informações vibracionais características de um conjunto de átomos e suas respectivas ligações (BRUICE, 2005; CONSTANTINO, 2006; SKOOG et al., 2006). Esta técnica espectroscópica foi bastante utilizada para comparar os diferentes materiais obtidos a partir dos diferentes procedimentos sintéticos.

As medidas foram obtidas no Laboratório de Materiais Supercondutores coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho na UNESP de Bauru em um espectrofotômetro modelo VERTEX 70 da marca BRUKER na forma de pó. A região utilizada para a obtenção das medidas foi de 4000 cm^{-1} até 500 cm^{-1} no modo ATR (Refletância Total Atenuada) em temperatura ambiente.

Para avaliar as modificações relativas nas bandas de absorção, deconvoluções espectrais foram realizadas. A análise de deconvolução foi baseada no procedimento proposto por Paudel e colaboradores na qual funções gaussianas são utilizadas para ajustar os espectros de FTIR através do método dos mínimos quadrados (PAUDEL; NIES; VAN DEN MOOTER, 2012). Utilizou-se o software OriginPro versão 9.0 (OriginLab Corp., MA, USA) para tal estudo.

4.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta utilizada para estudar as estruturas químicas dos materiais. Seu funcionamento explora as propriedades magnéticas de um determinado núcleo atômico e é baseada na modificação que um campo magnético externo produz sobre o número quântico de spin (BRUICE, 2005). É uma técnica bastante

utilizada na identificação de uma substância, podendo diferenciar sinais de diferentes grupos funcionais ou mesmo de grupos iguais em diferentes vizinhanças químicas (BRUICE, 2005; CONSTANTINO, 2006; SKOOG et al., 2006).

Neste trabalho foram utilizados os núcleos de ^1H e ^{13}C em estado sólido e líquido. As análises de ^1H e ^{13}C em estado líquido (D_2O ou DMSO-d_6) foram realizadas em solução de 67 mg/mL no Instituto de Química de Araraquara da UNESP no espectrômetro Bruker Avance III HD 600 MHz (temperatura ambiente). Já as análises de ^{13}C RMN em estado sólido foram utilizadas um espectrômetro VARIAN INOVA de 9.4 T, operando nas frequências de 100,5MHz. Utilizou-se uma sonda com rotação em torno do ângulo mágico (*magic angle spinning* – MAS) de 5 mm modelo Jackobsen e frequência de rotação de 5 kHz. Os espectros de ^{13}C de sólidos foram obtidos utilizando a técnica de polarização cruzada (*Cross Polarization Magic Angle Spinning* – CP/MAS). Os espectros de ^{13}C CP/MAS foram feitas no Grupo de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UNICAMP pelo Prof. Dr. Alviclér Magalhães em 2013.

É importante frisar que uma interpretação precisa dos espectros de RMN da melanina é um desafio uma vez que o mesmo contém um número grande de sinais que, devido a heterogeneidade química do pigmento, são difíceis de serem atribuídos. No entanto, as medidas de RMN ainda podem ser utilizadas na busca por informações estruturais, pois, mesmo que não seja possível fazer uma análise quantitativa, trabalhos mostram que é possível utilizar a área dos sinais do espectro do núcleo de ^{13}C para obter dados qualitativos comparando diferentes amostras.

4.4. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-X (XPS)

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS, do inglês *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) é baseada no efeito fotoelétrico, onde a absorção de Raio-X na

camada superficial da amostra, ocasiona uma ejeção de elétrons de níveis de energia fortemente ligados ao núcleo (RIBEIRO et al., 2003). A partir da análise da energia cinética do elétron emitido, é possível obter dados sobre identificação elementar, estado químico, composição atômica e coordenação de átomos próximos à superfície da amostra (RIBEIRO et al., 2003).

As medidas de XPS para HMe1 e HMe1-4P foram realizadas em pó num instrumento construído em laboratório que consiste numa câmara UHV de preparação e análise equipado com analisador hemisférico de elétrons de 150 mm de raio médio, com um sistema de lentes de quatro elementos com um detector de 16 canis dando uma resolução instrumental total de 1,0 eV, conforme medido com núcleo de Ag 3d_{5/2}. Radiação de Raio-X não monocromatizada de MgK α ($h\nu = 1253.6$ eV) foi utilizada para aquisição dos espectros de nível C_{1s}. Os espectros foram referenciados ao sinal de C_{1s} do carbono alifático possuindo uma energia de ligação de 285,00 eV. As proporções atômicas foram calculadas a partir das intensidades de pico, utilizando valores da seção transversal de Scofield e fatores de λ foram calculados. Os ajustes de curva da C_{1s} foram realizados utilizando funções gaussianas para os *fittings*, após a subtração de um fundo tipo Shirley. Essas medidas foram obtidas pela prof. Dra. Chiara Battocchio, do departamento de Ciências da Universidade “Roma Tre”.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Testes de solubilidade

Visando verificar a solubilidade dos materiais formados, dois testes foram realizados. O primeiro consiste num teste visual, no qual 1 mL do solvente é adicionado a 5 mg do material sólido após o processo de extração. Nas Tabela 1 e Tabela 2 são apresentados os diferentes solventes utilizados, junto com suas respectivas polaridades e os resultados obtidos durante o teste para as amostras sintetizadas, respectivamente, em água (H₂O-Melanina) e em DMSO (DMSO-Melanina).

De acordo com o observado, podemos verificar que os materiais obtidos a partir desta nova abordagem sintética são solúveis em alguns solventes. Percebemos primeiramente que das sete amostras obtidas de H₂O-Melanina (Tabela 1), com exceção da HMel-8P(1), todas são solúveis apenas em água MiliQ, o que sugere que existe alguma alteração estrutural entre as amostras. Este teste de solubilidade não foi realizado para HMel-8P(0) devido à baixa massa do produto formado (< 5 mg). No caso da DMSO-Melanina (Tabela 2), todas são solúveis em diferentes solventes orgânicos polares apróticos com alta polaridade (> 6) como DMF, DMSO e N-metil-2-pirrolidona (NMP), provavelmente devido a funcionalização dos monômeros DHI e DHICA com grupos sulfonados de maneira similar ao proposto por Bronze-Uhle para a amostra DMel (BRONZE-UHLE et al., 2013).

Tabela 1 - Teste de solubilidade para as Melanina sintetizadas em água.

Solventes	Polaridade	HMel (4)	HMel-4P (4)	HMel-6P (4)	HMel-8P (1)	HMel-8P (4)	HMel-8P (7)	HMel-8P (10)
Acetato de etila	4,4	I	I	I	I	I	I	I
Acetona	5,1	I	I	I	I	I	I	I
Acetonitrila	5,8	I	I	I	I	I	I	I
Água MiliQ (pH = 7,4)	9	S	S	S	I	S	S	S
Clorofórmio	4,1	I	I	I	I	I	I	I
DMF	6,4	I	I	I	I	I	I	I
DMSO	7,2	I	I	I	I	I	I	I
Etanol	5,2	I	I	I	I	I	I	I
Isopropanol	3,9	I	I	I	I	I	I	I
Metanol	5,1	I	I	I	I	I	I	I
NMP	6,7	I	I	I	I	I	I	I
Tetrahydrofurano	4	I	I	I	I	I	I	I
Tolueno	2,4	I	I	I	I	I	I	I

I – Insolúvel
S – Solúvel

Tabela 2 - Teste de solubilidade para as Melanina sintetizadas em DMSO.

Solventes	Polaridade	DMel	DMel-T	DMel-4P	DMel-8P	DMel-S	DMel-O
Acetato de etila	4,4	I	I	I	I	I	I
Acetona	5,1	I	I	I	I	I	I
Acetonitrila	5,8	I	I	I	I	I	I
Água MiliQ (pH = 7,4)	9	I	I	I	I	I	I
Clorofórmio	4,1	I	I	I	I	I	I
DMF	6,4	S	S	S	S	S	S
DMSO	7,2	S	S	S	S	S	S
Etanol	5,2	I	I	I	I	I	I
Isopropanol	3,9	I	I	I	I	I	I
Metanol	5,1	I	I	I	I	I	I
NMP	6,7	S	S	S	S	S	S
Tetrahidrofurano	4	I	I	I	I	I	I
Tolueno	2,4	I	I	I	I	I	I

I – Insolúvel
S – Solúvel

Outro teste de solubilidade foi realizado seguindo o procedimento utilizado CICCIO et al. (2015), no qual testaram a solubilidade de um derivado de melanina funcionalizado por filtração em membrana de nylon (0,45 μm). A amostra é considerada solúvel quando o filtro não retém a passagem de partículas. Em nosso caso, utilizamos um filtro com membrana de celulose regenerada com 0,2 μm de poro e uma solução com concentração de 5 mg/mL em água MiliQ ou DMSO, dependendo da amostra. A solução das amostras solúveis no teste 1 foi posta em agitação por 15 minutos para melhor dispersão. Todas as amostras testadas também mostraram-se solúveis a partir deste teste o que sugere que os aglomerados formados durante as sínteses são menores que 200 nm.

5.2. Caracterização estrutural

5.2.1. Efeito do hidróxido de amônio no meio aquoso

Como visto no tópico 3.1, as sínteses em meio aquoso faz-se uso de dois agentes oxidantes durante o processo sintético: hidróxido de amônio (NH_4OH) e oxigênio molecular. Além disso, a Tabela 1 mostra que a quantidade de hidróxido influencia na solubilidade das amostras, visto que esta relacionada à proteção e desproteção da função ácida ou dos grupos fenólicos presentes na estrutura (MEREDITH et al., 2006; MEREDITH; SARNA, 2006; BOTHMA et al., 2008; MOSTERT et al., 2010). Diante disto, surge a necessidade de verificar sua influência na estrutura dos derivados de melanina. Esta influência foi estudada utilizando 8 atm de pressão de O_2 para volume variando de 0 a 1 mL.

Visando acompanhar o processo de polimerização da melanina, a espectroscopia de UV-Vis foi utilizada. O espectro de absorvância da síntese da melanina caracterizado com um aumento gradual até atingir um patamar constante, conforme Figura 9 para HMeI-8P(4). Comportamento semelhante é observado durante as sínteses das demais amostras em ambos solventes.

O tempo reacional de cada uma destas sínteses (observado na Tabela 3) foi obtido seguindo o procedimento proposto por PIACENTI-SILVA et al. (2014a) descrito na seção 4.1 para $\lambda_{\text{Abs}} = 450 \text{ nm}$. Nota-se que a quantidade de hidróxido de amônio não influencia no tempo reacional das sínteses, ou seja, variando entre 100 e 1000 μL a quantidade de NH_4OH utilizado, o tempo de síntese continua sendo 3 horas. Na ausência do hidróxido, a reação é bastante lenta e mesmo após 5 dias nenhuma quantidade significativa do material foi obtida. Esta característica demonstra a importância do hidróxido no processo de oxidação da L-DOPA em meio aquoso. Note ainda na Tabela 3 que a quantidade de massa formada após o

processo de extração da melanina formada em cada uma das sínteses não segue um resultado linear.

Figura 9 - Espectro de UV-Vis obtido para o monitoramento sintético da HMel-8P(4). Conforme pode ser observado, absorvância aumenta conforme a reação procede.

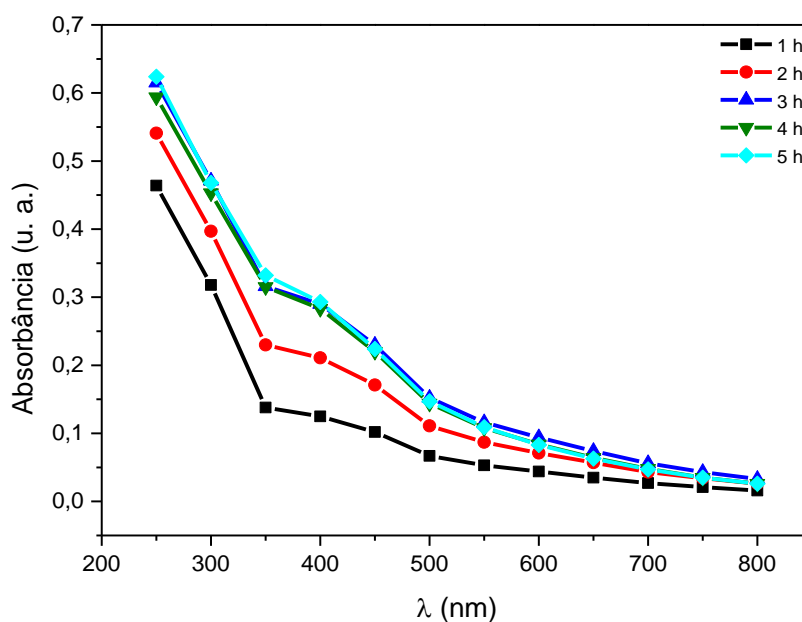


Tabela 3 - Tempo reacional da melanina sintetizada em água com 8 atm de O₂ variando a quantidade de NH₄OH em $\lambda_{Abs} = 450$ nm.

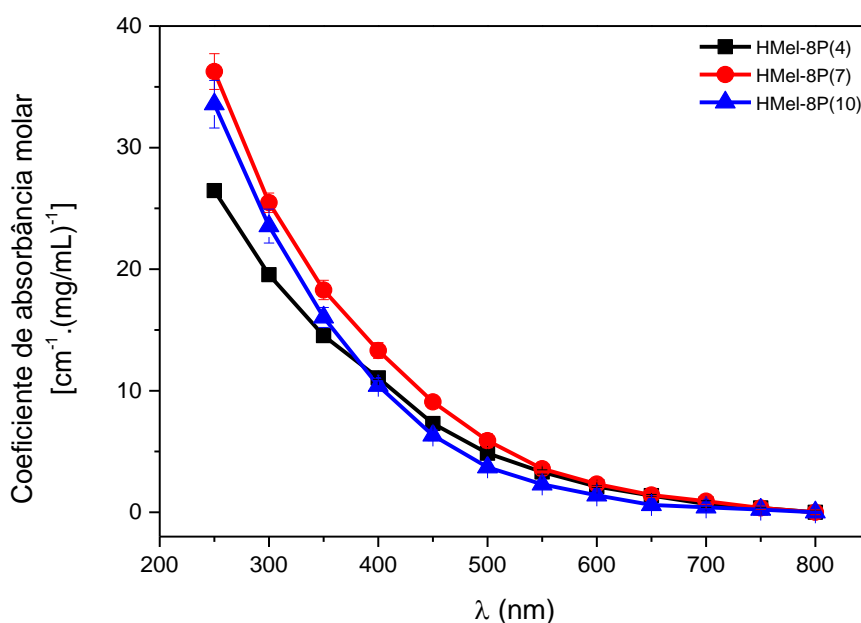
Amostra	HMel-8P(0)	HMel-8P(1)	HMel-8P(4)	HMel-8P(7)	HMel-8P(10)
Tempo (h)	> 140	3	3	3	3
Massa (mg)	3	86	160	120	90

Considerando que a variação da quantidade de hidróxido de amônio modifica a solubilidade, as caracterizações em solução de coeficiente de absorção e de RMN foram realizadas apenas para quantidades maiores que 400 μ L (Tabela 1).

Na Figura 10 é apresentado o coeficiente de absorção molar das melaninas sintetizadas em meio aquoso com 8 atm de pressão de O₂ e diferentes volumes de NH₄OH para alguns comprimentos de onda. Como pode se observar, o aumento no comprimento de onda ocasiona

uma diminuição da absorção da amostra, de maneira semelhante ao que se encontra na literatura (SARNA; SWARTZ, 2006; PELES et al., 2010; PELES; SIMON, 2010; PIACENTI-SILVA et al., 2014a). Além disso, esse comportamento do espectro de banda larga que aumenta exponencialmente para o ultravioleta sugere que o produto sintético formado apresenta grande desordem estrutural (MEREDITH et al., 2006). Note que o valor absoluto do coeficiente de absorção molar é da mesma ordem de grandeza ao mencionado para a melanina natural (SARNA; SWARTZ, 2006).

Figura 10 - Coeficiente de absorbância molar obtido para H₂O-Melanina com 8 atm de pressão de O₂ e diferentes quantidades de NH₄OH.



Conforme discutido anteriormente, oligômeros heterogêneos são formados durante a complexa reação da melanina e estes irão afetar o coeficiente de absorção em cada uma das amostras. Além disso, foi demonstrado para melanina natural (PELES et al., 2010) e para derivados sulfonados sintéticos (PIACENTI-SILVA et al., 2014a) que o aumento na proporção de monômeros descarboxilados na estrutura polimérica acarretará numa diminuição do coeficiente de absorção molar.

Ao observar a Figura 10 podemos observar que HMel-8P(4) e HMel-8P(7) apresentam um comportamento semelhante para λ_{Abs} maiores que 550 nm, enquanto que para λ_{Abs} menores que 550 nm HMel-8P(4) apresenta uma intensidade menor em comparação com HMel-8P(7). Diante disto, podemos sugerir que esta última amostra apresenta uma maior razão DHICA/DHI do que o primeiro. Contudo, o comportamento óptico da HMel-8P(10) é ligeiramente diferente das demais amostras, sugerindo que o excesso de NH_4OH no meio reacional pode interferir na estrutura química dos compostos e/ou em sua organização da macromolécula.

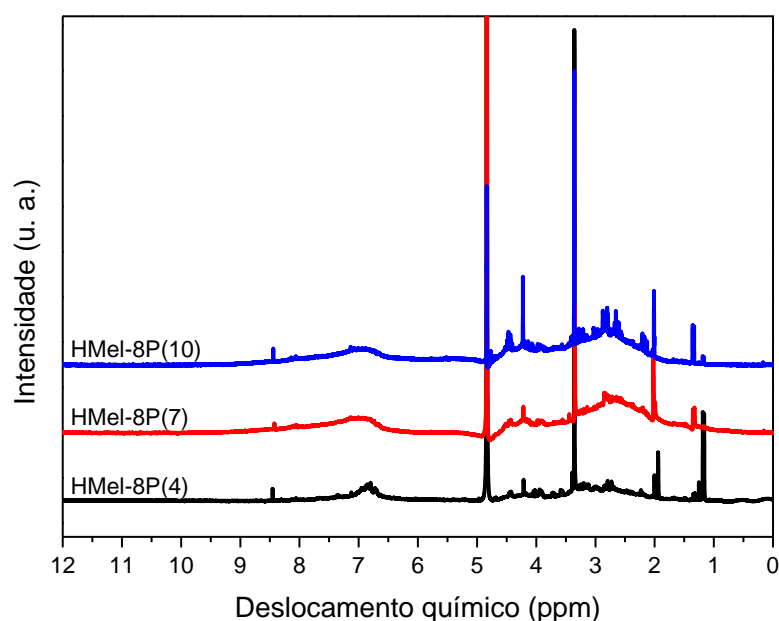
Para verificar as possíveis modificações estruturais causadas pela variação do NH_4OH no meio reacional com 8 atm de pressão de O_2 , medidas de RMN e FTIR foram realizadas. A Figura 11 mostra os espectros de ^1H RMN das melaninas sintetizadas em água em D_2O . Para auxiliar na identificação das bandas dos espectros, foi utilizada a simulação do software ChemDraw Ultra 12.0. Desta forma são atribuídos aos sinais observados entre:

- i) 0,8 e 1,6 ppm às cadeias alifáticas não ciclizadas;
- ii) 1,6 e 2,4 ppm à presença de grupos metilos;
- iii) 2,4 e 4,7 ppm aos prótons de carbono ligados ao oxigênio e/ou nitrogênio, e;
- iv) 6,0 e 9,0 ppm aos prótons dos anéis aromáticos ou heteroaromáticos.

Ao analisar as estruturas básicas da melanina (Figura 3), duas observações são necessárias: i) os sinais referentes aos prótons das ligações NH, OH e COOH não são observados; ii) a presença dos grupos metilas e cadeias alifáticas podem ser consequência da degradação das estruturas monoméricas durante o processo de oxidação do reagente e seus intermediárias. Estas características estão em boa concordância com a literatura (KATRITZKY et al., 2002). O sinal do solvente D_2O pode ser observado em 4,84 ppm (GOTTBLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997).

A avaliação dos acoplamentos de *spins* ou mesmo uma análise quantitativa dos sinais observados não foi possível de ser realizado devido à natureza desordenada das melaninas. Contudo, como pode ser observado, o espectro de ^1H RMN sugere que diferentes quantidades de NH_4OH não afetam de maneira drástica a estrutura das melaninas. As diferenças obtidas podem ser consequência do processo de polimerização e oxidação/degradação dos monômeros durante o processo sintético. Análises de ^{13}C RMN em solução dessas amostras também foram realizadas, porém nenhuma informação foi obtida, visto que o tempo de relaxação da região aromática é muito lento (AIME et al., 1991).

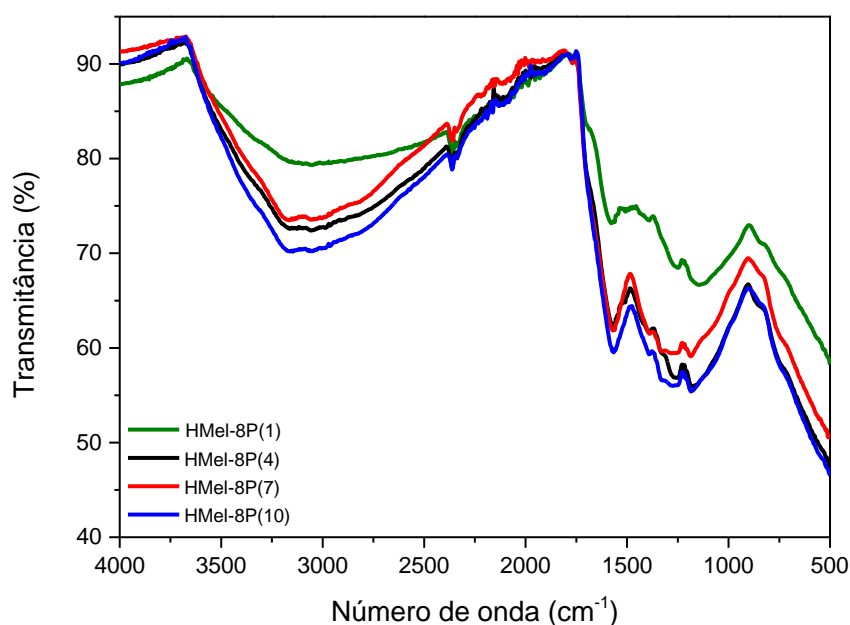
Figura 11 - ^1H RMN para melanina sintetizados em meio aquoso com 8 atm de O_2 e diferentes volumes de NH_4OH .



Medidas de FTIR foram realizadas após a síntese ter sido considerada concluída. Como esta caracterização foi feita em estado sólido, HMel-8P(1) também foi caracterizada por esta técnica. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 12. Conforme pode ser observado, os espectros de FTIR são semelhantes e, independente do procedimento experimental

utilizado, exibem grupos funcionais equivalentes. Como reportado na literatura (CENTENO; SHAMIR, 2008), a larga banda entre 2500 e 3500 cm^{-1} é associada ao estiramento da ligação -OH dos derivados de DHI e DHICA. As bandas em 1600 e 1430 cm^{-1} são relacionadas a ligação C=C da estrutura fenólica e ao estiramento da ligação C-O do ácido carboxílico ionizado, já em 1180-1280 cm^{-1} as bandas de C-OH dos fenóis ou carboxilas. A carboxila relativa à DHICA (-COOH) e seus derivados é evidente a partir da banda em aproximadamente 1724-1486 cm^{-1} .

Figura 12 - Espectro de FTIR para melanina sintetizados com 8 atm de O_2 e diferentes volumes de NH_4OH em água.



Os espectros de FTIR (Figura 12) são condizentes com a literatura (CENTENO; SHAMIR, 2008; BETTINGER et al., 2009). Embora a melanina seja de grande complexidade estrutural, foram observadas pequenas diferenças nos compostos sintetizados que podem ser decorrentes do grau de conjugação de C-C=C, C=N e C=O ou também do tamanho do polímero que consegue afetar o tamanho das ligações e, por consequência, a posição das bandas.

A deconvolução do espectro de absorvância da HMeI-8P(4) na região entre 900 e 1750 cm^{-1} foi realizada e pode ser vista na Figura 13. Resultados semelhantes foram observados para as demais amostras sintetizadas em água, utilizando o mesmo número e posição dos picos de absorção durante o processo. Na Tabela 4, as intensidades individuais das bandas de vibrações do grupo carboxílico/carboxilato para cada uma das amostras é apresentada. A intensidade do sinal foi normalizada utilizando a banda correspondente ao estiramento da vibração C-C=C (1585 cm^{-1}).

Figura 13 - Deconvolução do espectro de FTIR da HMeI-8P(4).

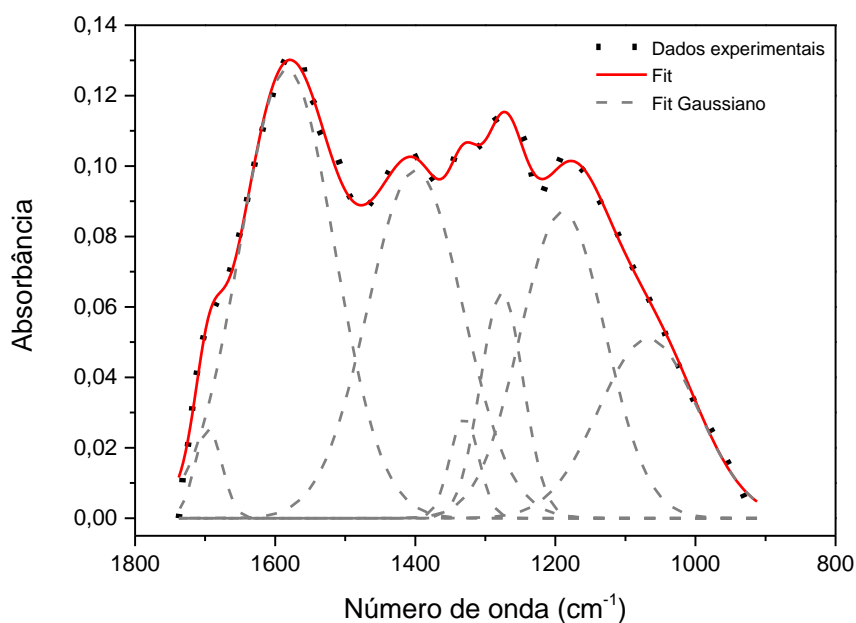


Tabela 4 - Bandas vibracionais do espectro de FTIR do grupos carboxílicos das H₂O-Melaninas em diferentes quantidades de NH₄OH normalizados pela intensidade da vibração C-C=C (1585 cm^{-1}).

Amostras	COOH	COO ⁻
HMeI-8P(1)	0,110 ± 0,010	0,162 ± 0,027
HMeI-8P(4)	0,064 ± 0,017	0,421 ± 0,604
HMeI-8P(7)	0,136 ± 0,046	0,298 ± 0,167
HMeI-8P(10)	0,122 ± 0,033	0,108 ± 0,031

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4, podemos observar que o grupo carboxílico apresenta um pico máximo para HMel-8P(7), enquanto que para o grupo carboxilato este pico é referente a amostra HMel-8P(4). Nota-se ainda que o aumento da quantidade utilizada de hidróxido de amônio diminui a intensidade deste grupo nas amostras solúveis, enquanto COOH não apresenta nenhum padrão observável.

5.2.2. Efeito da pressão de O₂ em meio aquoso

Seguindo o procedimento proposto por PIACENTI-SILVA et al. (2014a), Figura 7, observou-se que a pressão de oxigênio influencia o tempo de duração da síntese mantendo a quantidade de NH₄OH constante. Conforme pode ser visto na Tabela 5, o tempo reacional para 8 atm pressão de oxigênio [HMel-8P(4)] é de 3 horas, enquanto que no processo tradicional [HMel(4)] demora 72 horas. Note na Tabela 5 que a massa da melanina obtida também não segue um resultado linear.

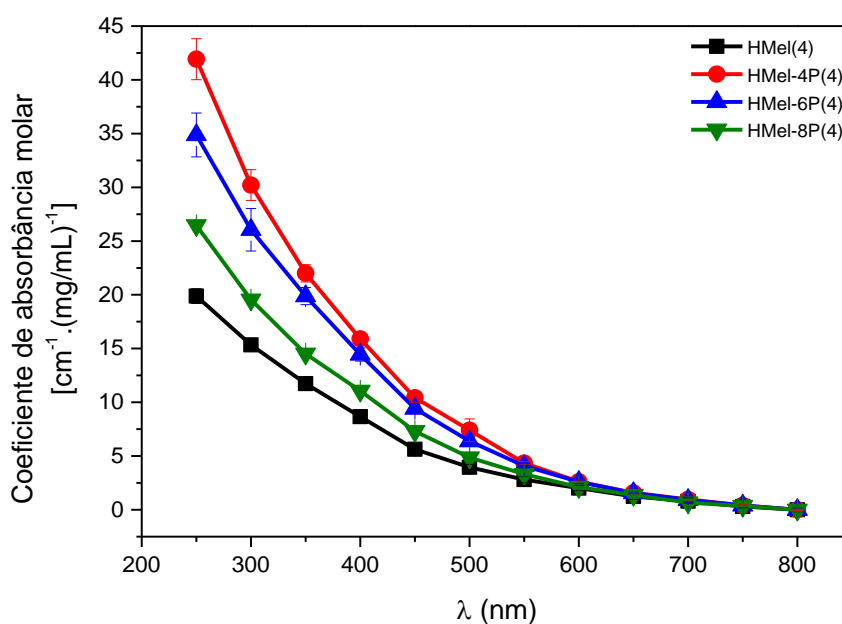
Tabela 5 - Tempo reacional da melanina sintetizada em água variando a pressão de O₂ e mantendo a quantidade de NH₄OH constante em $\lambda_{Abs} = 450$ nm.

Amostra	HMel(4)	HMel-4P(4)	HMel-6P(4)	HMel-8P(4)
Tempo (h)	72	15	6	3
Massa (mg)	114	154	85	160

Na Figura 14 é apresentado o coeficiente de absorção molar das H₂O-Melaninas sintetizadas com o mesmo volume de hidróxido de amônio e diferentes pressões de O₂ para alguns comprimentos de onda. Como pode se observar, o aumento no comprimento de onda diminui a absorção da amostra de maneira semelhante ao observado anteriormente (Figura 10), sugerindo que o material obtido em ambos os processos apresentam características ópticas semelhantes. Considerando o que foi discutido anteriormente para as melaninas sintetizadas em água com diferentes quantidades de NH₄OH, podemos aferir que a maior

absorção, para comprimentos de ondas menores que 550 nm, em HMel-4P(4) sugere um maior razão DHICA/DHI, enquanto que para HMel(4) uma maior proporção DHI/DHICA.

Figura 14 - Coeficiente de absorvância molar da H₂O-Melanina em diferentes pressões de O₂.

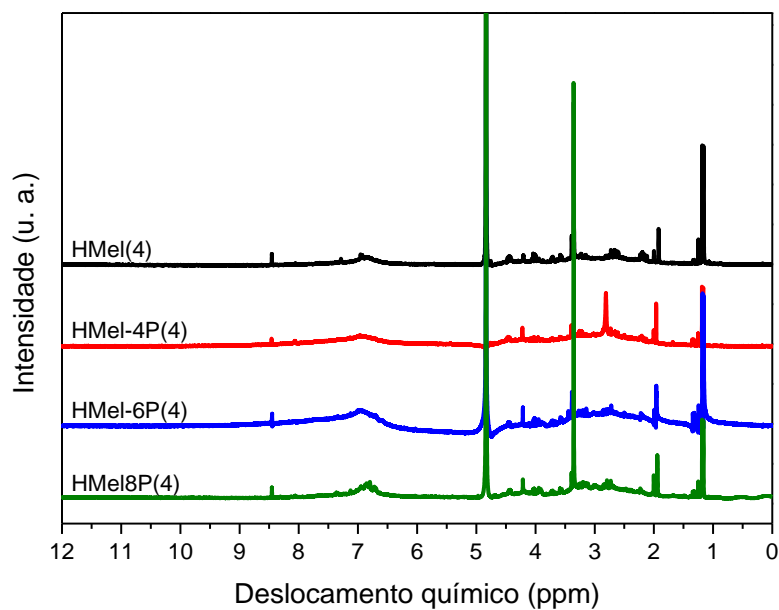


Os espectros de ¹H RMN e FTIR apresentados na Figura 15(a) e Figura 15(b) para as melaninas sintetizadas em água em diferentes pressões de O₂, com volume de NH₄OH constante. Como podem ser observados, os espectros obtidos apresentam regiões semelhantes às discutidas anteriormente (Figura 11 e Figura 12), sugerindo estrutura básica da melanina não é modificada de maneira drástica, independente do procedimento sintético utilizado.

A deconvolução dos espectros de FTIR entre 900 e 1750 cm⁻¹ para as amostras sintetizadas em água e diferentes pressões de O₂ foi realizada de maneira semelhante ao observado na Figura 13. O *fitting* foi obtido utilizando a mesma posição e mesma quantidade de picos de absorção durante o processo anterior. Na Tabela 6, as intensidades individuais das bandas de vibrações para cada uma das amostras é apresentada e foram normalizados utilizando a banda da região aromática correspondente ao estiramento da vibração C-C=C em 1585 cm⁻¹.

Figura 15 - ^1H RMN (a) e FTIR (b) para as melaninas sintetizadas em água em diferentes pressões de O_2 .

(a)



(b)

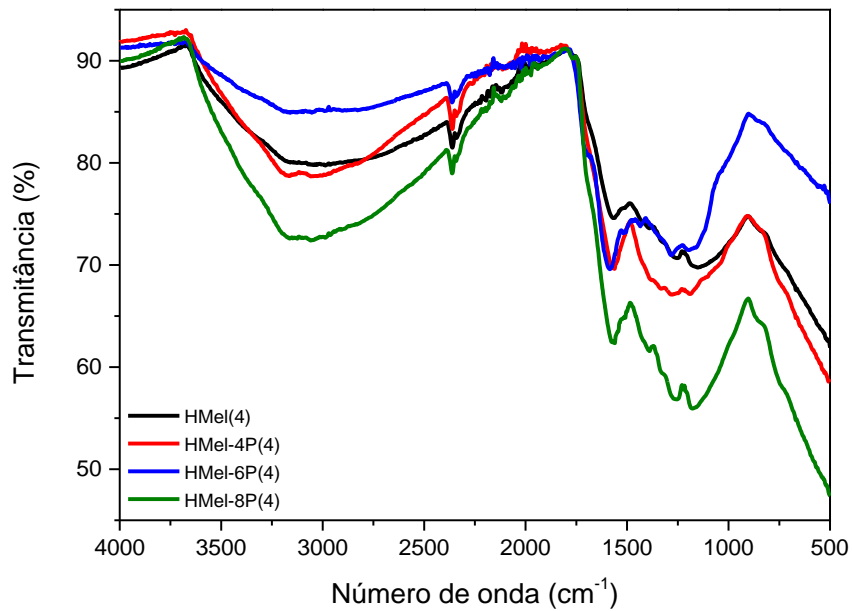


Tabela 6 - Bandas vibracionais do espectro de FTIR do grupo carboxílico das H₂O-Melaninas em diferentes pressões de O₂ normalizados pela banda de vibração C-C=C (1585 cm⁻¹).

Amostras	COOH	COO ⁻
HMel(4)	0,056 ± 0,002	0,407 ± 0,386
HMel-4P(4)	0,094 ± 0,006	1,041 ± 0,360
HMel-6P(4)	0,077 ± 0,034	1,544 ± 0,231
HMel-8P(4)	0,064 ± 0,017	0,421 ± 0,604

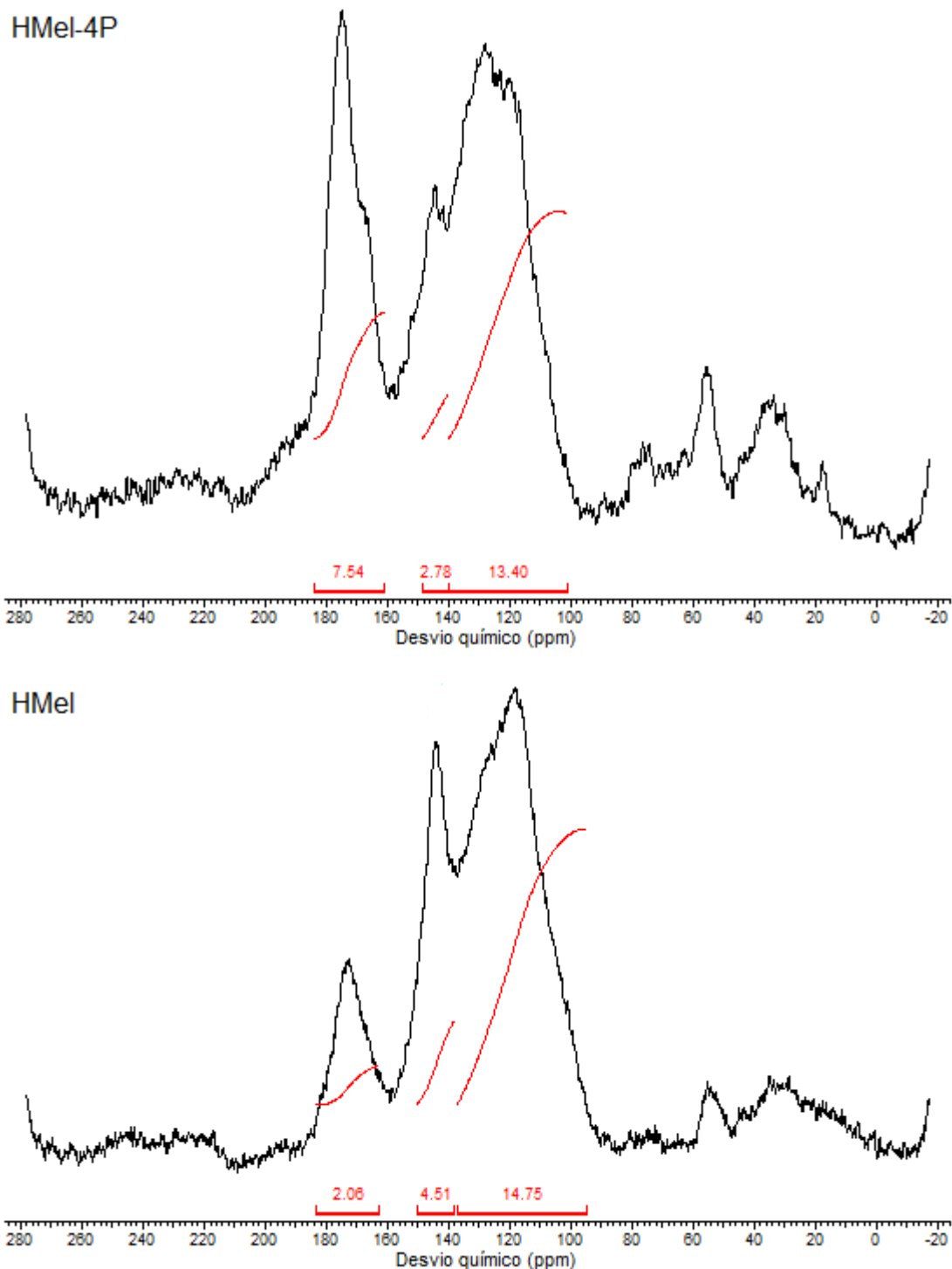
Ao analisar os valores obtidos na Tabela 6, algumas características estruturais podem ser observadas. Comparando HMel(4) com HMel-4P(4) notamos que existe um aumento de 68 % e 156 % em relação ao grupo COOH e COO⁻, nesta ordem. Esse resultado sugere que ao utilizar 4 atm de pressão de oxigênio na síntese tradicional favorece a formação de monômeros derivados da DHICA na estrutura final do polímero. Por outro lado, aumentando a pressão de O₂ de 4 para 8 atm uma diminuição de 17 % e 73 % para os grupos carboxílicos e carboxilatos, respectivamente, indicando que o aumento na pressão de O₂ pode diminuir a quantidade de monômeros derivados da DHI na estrutura do polímero. Esse resultado está de acordo com sugerido pelo coeficiente de absorção (Figura 14).

Tendo em vista o baixo tempo de relaxação da região aromática já discutida anteriormente, medidas ¹³C RMN em estado sólido se fazem necessárias. Os resultados apresentados a seguir de ¹³C CP/MAS RMN para HMel e HMel-4P (Figura 16) foram obtidos no início deste estudo antes de verificarmos que, não apenas o pH sintético era importante, mas também a quantidade utilizada hidróxido de amônio (veja Tabela 1). Podemos apenas afirmar que a caracterização foi feita em uma amostra HMel insolúvel e HMel-4P solúvel. Assim, vale destacar que tais resultados podem ser imprecisos, porém, de acordo com o que foi visto anteriormente, acredita-se que se assemelhariam aos resultados reais para as sínteses. Mesmo comentário é válido para as medidas de XPS (Figura 17 e Tabela 7).

Na Figura 16 é apresentado os espectros de ^{13}C CP/MAS RMN para as amostras de HMeI e HMeI-4P. Os espectros apresentam largos sinais de ressonância devido à heterogeneidade do polímero o que cria uma dispersão do desvio químico (GHIANI et al., 2008; GLASS et al., 2012). O grande número de ressonância sobrepostas não permite uma resolução dos sinais individuais do carbono nas melaninas. Contudo, por convenção, o sinal de ^{13}C CP/MAS RMN pode ser dividido em três regiões distintas decorrentes dos diferentes carbonos da estrutura (ADHYARU et al., 2003; GHIANI et al., 2008; GLASS et al., 2012; THUREAU et al., 2012):

- 0-90 ppm, grupos alifáticos decorrentes da L-DOPA que não reagiu;
- 95-155 ppm, carbonos aromáticos, incluindo carbonos pirrol e indol (CH_x , C-O, C_2NH), sendo observado carbonos protonados (95-144 ppm) e desprotonados (110-147 ppm);
- 160-200 ppm, grupos das carbonilas dos ácidos carboxílicos e carboxilas da indolquinonas (COO^- e $\text{C}=\text{O}$).

Os espectros de ^{13}C CP/MAS RMN mostrado na Figura 16 são semelhantes, porém as áreas dos sinais de carbono apresentam algumas diferenças dependendo da síntese, o que indica mudança estrutural no material polimérico, especialmente na região dos grupos das carbonilas. Quando se compara estes espectros, verifica-se uma diminuição da área dos carbonos aromáticos (90-160 ppm) de 14,6 para 13,4 e a área de carbonos aromáticos C-O (144 ppm) de 4,5 para 2,8, sugerindo uma maior formação de $\text{C}=\text{O}$. Contudo, a principal modificação é o aumento na área dos carbonos relacionados com $\text{C}=\text{O}$ e COO^- de 2,6 em HMeI para 7,54 em HMeI-4P.

Figura 16 - ^{13}C CP/MAS RMN da HMeI-4P e HMeI.

Foi sugerido por Yan Liu (LIU et al., 2005) que o aumento relativo da quantidade de carbonila e grupos carboxílicos em função dos carbonos aromáticos está relacionado ao aumento da proporção de DHICA ou oxidação de carbonos fenólicos. Podemos entender a partir deste resultado, que o aumento nos grupos carbonílicos na HMeI-4P está relacionado

com um aumento no número de unidades de DHICA no polímero final, reforçando os resultados anteriores.

Os sinais de XPS da HMeI e HMeI-4P são apresentados na Figura 17. Um *fitting* do espectro do núcleo de C_{1s} foi realizado. Os resultados estão em concordância com os da literatura (CLARK et al., 1990; TRAN; POWELL; MEREDITH, 2006; ABBAS et al., 2009; BERNSMANN et al., 2009). Cinco contribuições do C_{1s} associadas às ligações C-C, C-N, C-O, COOH e COO^- são observadas em ambas as amostras, porém com diferentes intensidades relativas. A intensidade das diferentes contribuições de fotoemissão do C_{1s} foi calculada conforme descrito por Abbas (ABBAS et al., 2009) e os resultados são apresentados na Tabela 7.

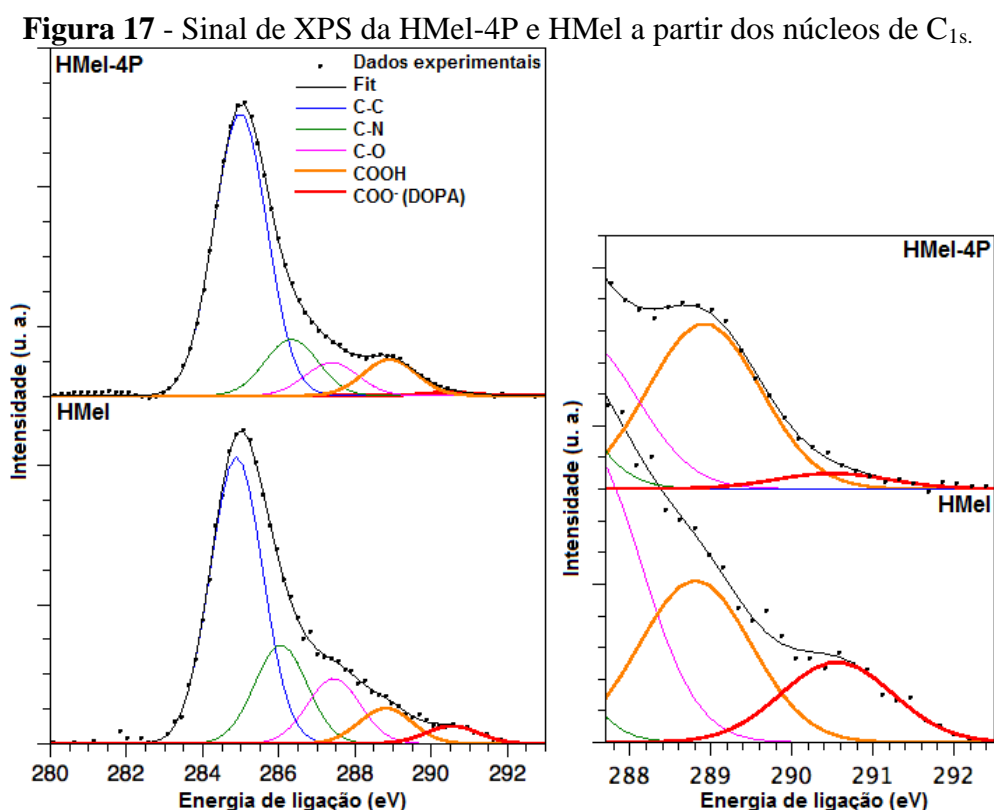


Tabela 7 - Valores (normalizados) da intensidade de fotoemissão de C_{1s} calculados para HMeI-4P e HMeI a partir dos fittings da Figura 17.

Amostra	Energia de ligação (eV)	Intensidade (normalizada) da fotoemissão de C _{1s}	Atribuição
HMeI-4P	285,00	6,0	C-C
	286,34	1,1	C-N
	287,39	0,9	C-O
	288,92	0,78	COOH
	290,50	0,07	COO ⁻
HMeI	285,00	5,0	C-C
	286,17	1,6	C-N
	287,56	1,4	C-O
	288,92	0,53	COOH
	290,67	0,27	COO ⁻

A partir dos resultados de XPS (Figura 17 e Tabela 7), podemos estimar um aumento de 47% em relação aos grupos carboxílicos e uma diminuição de 74% em relação aos grupos carboxilatos comparando HMeI e HMeI-4P. O aumento em relação aos grupos carboxílicos está de acordo com o que já foi discutido anteriormente pelas técnicas de absorvância, FTIR e ¹³C CP/MAS RMN. A diminuição dos grupos carboxilatos difere do resultado obtido pela deconvolução do espectro de FTIR, provavelmente devido incerteza da quantidade de NH₄OH utilizada para tal amostra.

5.2.3. Efeito da pressão de O₂ em meio orgânico

De maneira semelhante ao observado em água, a pressão de oxigênio também influencia no tempo de duração da síntese em DMSO. Seguindo o procedimento proposto (PIACENTISILVA et al., 2014a), observou-se que, ao utilizar 8 atm de pressão (DMel-8P), o tempo de síntese diminui 54 dias em comparação com o processo tradicional (DMel). Na Tabela 8 é apresentado o tempo reacional das sínteses utilizando DMSO como solvente e a quantidade de

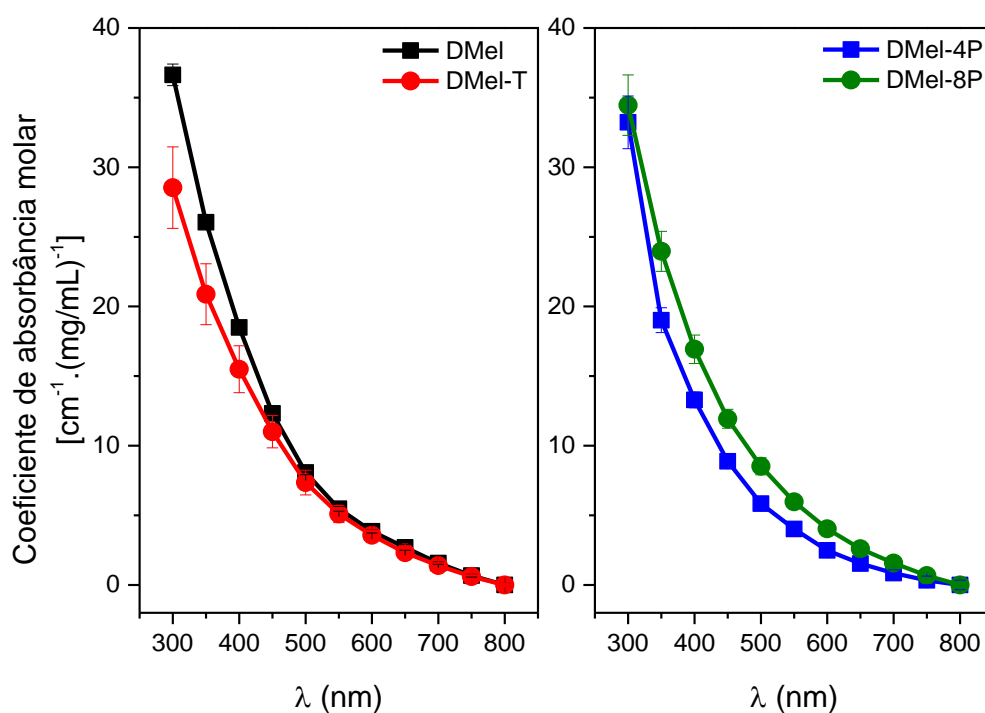
massa obtida após o processo de extração. Novamente, o resultado da quantidade de material formado em cada síntese não segue um resultado linear.

Tabela 8 - Tempo reacional da melanina sintetizada em DMSO em $\lambda_{Abs} = 425$ nm.

Amostra	DMel	DMel-T	DMel-4P	DMel-8P
Tempo (dias)	57	8	6	3
Massa (mg)	545	758	380	85

Na Figura 18 é apresentado o espectro de absorção das melaninas sintetizadas em DMSO após a síntese ter sido considerada concluída. A absorbância é semelhante ao que se encontra na literatura (TRAN; POWELL; MEREDITH, 2006; LAWRIE; MEREDITH; MCGEARY, 2008; PIACENTI-SILVA et al., 2014a). Esse espectro sugere que o solvente utilizado no procedimento não interfere na desordem estrutural característica da melanina.

Figura 18 - Coeficiente de absorção molar para a melanina sintetizada em DMSO.



Tendo em vista que o coeficiente de absorvância molar é sensível a diferentes origens (PELES; SIMON, 2011), uma comparação direta entre as amostras obtidas com diferentes agentes oxidantes pode não ser válida. Comparando DMel e DMel-T, nota-se que o comportamento é semelhante ao obtido para a síntese de água em diferentes pressões (Figura 14), o que sugere que DMel-T apresenta uma concentração maior de derivados de DHI (PIACENTI-SILVA et al., 2014a). Por outro lado, observe que para DMel-4P e DMel-8P o comportamento óptico é distinto de DMel e DMel-T, indicando que existe alguma modificação na estrutura eletrônica das amostras, provavelmente devido a uma mudança no processo de polimerização dos oligômeros. Considerando que a presença do oxigênio afeta os oligômeros de alto e baixo peso molecular, uma relação direta entre absorção e estrutura não é simples.

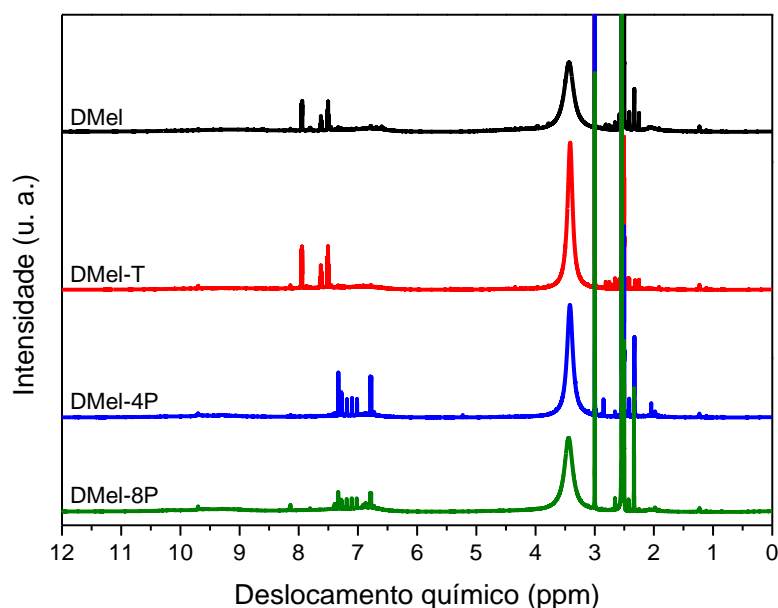
Após a síntese em meio orgânico ter sido considerada concluída, análises de ^1H RMN foram realizadas para analisar a estrutura dos materiais formados nas diferentes condições sintéticas em DMSO. A Figura 19 mostra o espectro de ^1H RMN das DMSO-Melaninas em DMSO deuterado (DMSO-d_6). O espectro obtido para as DMSO-Melaninas, estão de acordo com a literatura (KATRITZKY et al., 2002; BRONZE-UHLE et al., 2013). Atribuímos aos sinais observados:

- na região de 2,5 ppm aos prótons do DMSO (deuterado e solvente residual da síntese), ao grupo sulfonado ligado ao nitrogênio da estrutura indol (N-sulfonação) e também à ligação do tipo H-S;
- em 3,5 ppm aos prótons do grupo sulfonado ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$) e a possibilidade da N-metilação, e;
- entre 6,5 e 8,2 ppm aos prótons da estrutura indólica.

Novamente, os sinais referentes às ligações N-H, OH e COOH não são observados. Além disso, o largo singlete em 3,5 ppm é consequência da relaxação dos hidrogênios

vizinhos ao átomo de enxofre, indicando a ocorrência da O-sulfonação (BRONZE-UHLE et al., 2013). Parte do sinal em 3,5 ppm também pode ser atribuído a presença de água adsorvida na estrutura da melanina.

Figura 19 - ^1H RMN para melanina sintetizada em DMSO.

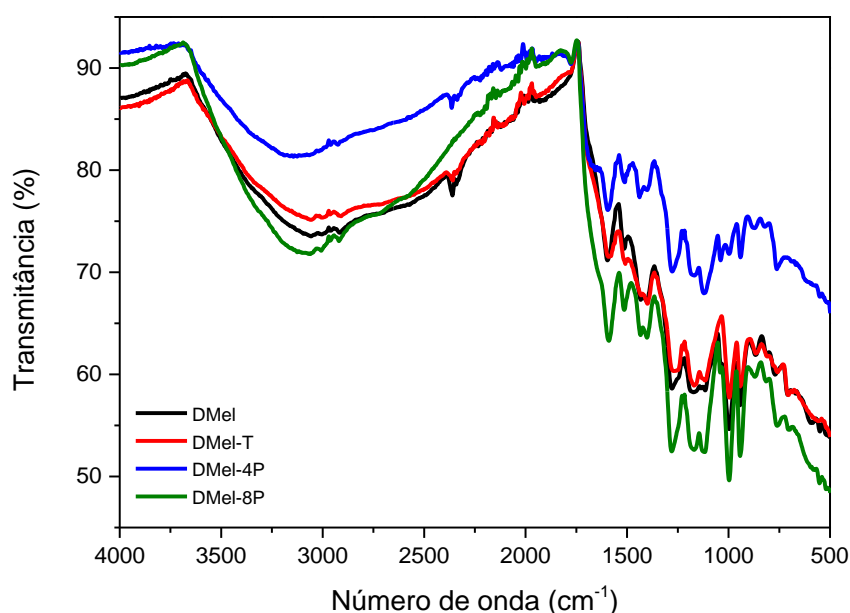


Por consequência da natureza desordenada também presente nas melaninas sintetizadas em DMSO, não foi possível avaliar o acoplamento dos *spins* ou analisar de maneira quantitativa dos sinais observados. Contudo, é interessante observar que a presença do oxigênio no meio reacional pode ocasionar uma mudança no processo de polimerização dos compostos. Isto é sugerido a partir do deslocamento dos sinais da região aromática do espectro. A mudança no processo de polimerização da melanina poderia explicar a diferença observada com o coeficiente de absorção molar visto na Figura 18.

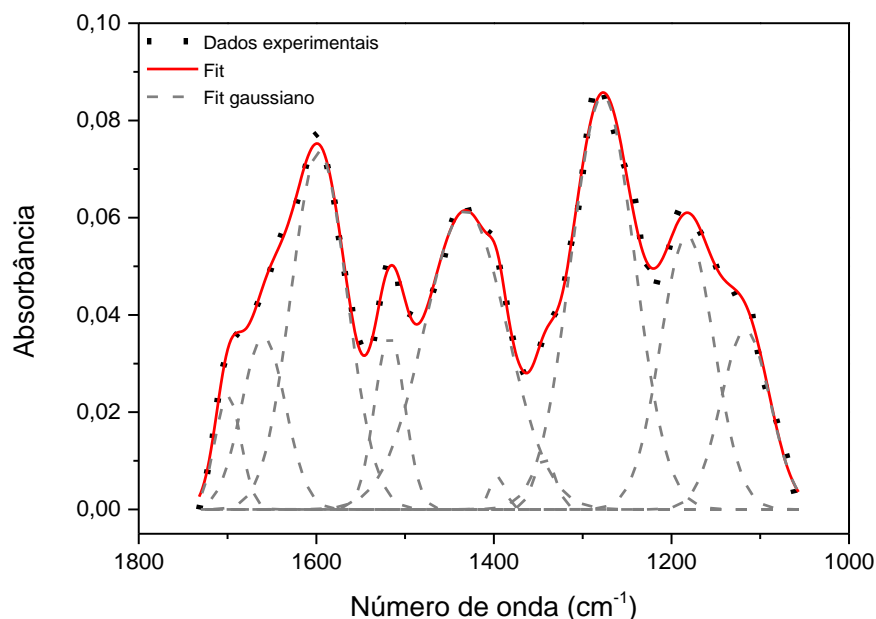
Os espectros de FTIR obtidos são apresentados na Figura 20. Conforme pode ser observado, os espectros de FTIR das melaninas sintetizadas em DMSO são semelhantes aos sintetizados em água [Figura 12 e Figura 15(b)] o que sugere que em ambos os processos formem um material com características estruturais parecidas. A diferença encontra-se no

aparecimento de algumas bandas entre $1800-500\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento dos grupos sulfonados presentes na estrutura (C-S em $700-600\text{ cm}^{-1}$, S-O em $830-690\text{ cm}^{-1}$ e SO_2 em $1420-1330\text{ cm}^{-1}$) (BRONZE-UHLE et al., 2013). Estes espectros de FTIR (Figura 20) são condizentes com a literatura (CENTENO; SHAMIR, 2008; BRONZE-UHLE et al., 2013; PIACENTI-SILVA et al., 2014a), confirmando que a melanina sulfonada foi obtida.

Figura 20 - Espectro de FTIR para melaninas sintetizadas em DMSO.



A deconvolução do espectro de FTIR entre 1050 e 1750 cm^{-1} é apresentado na Figura 21 para DMel. Ajuste de curva semelhante foi realizado para as demais amostras, utilizando o mesmo número e posição dos picos de absorção. Vale lembrar que o número de picos obtidos para as melaninas sintetizadas em DMSO é maior em comparação com as sintetizadas em água, devido à presença das bandas dos grupos sulfonados na cadeia carbônica. As intensidades individuais das bandas de vibrações para cada uma das amostras são apresentadas na Tabela 9 e as intensidades dos sinais dos grupos carboxílicos/carboxilatos foram normalizadas utilizando a banda correspondente ao estiramento da vibração C-C=C (1594 cm^{-1}) da região aromática.

Figura 21 - Deconvolução do espectro absorvância da DMel.**Tabela 9** - Bandas vibracionais do espectro de FTIR do grupo carboxílico das melaninas sintetizadas em DMSO normalizadas pela intensidade da vibração C-C=C (1594 cm^{-1}).

Amostras	COOH	COO ⁻
DMel	$0,364 \pm 0,021$	$0,054 \pm 0,001$
DMel-T	$0,339 \pm 0,009$	$0,045 \pm 0,009$
DMel-4P	$0,760 \pm 0,093$	$0,051 \pm 0,021$
DMel-8P	$0,575 \pm 0,014$	$0,145 \pm 0,011$

Os dados referentes aos grupos carboxílicos são compatíveis com os obtidos para a variação da pressão de O₂ em água, no qual aumentando a pressão de O₂ para 4 atm, ocorre um aumento de 109 % e uma diminuição de 6 % em relação aos grupos COOH e COO⁻, respectivamente. De maneira semelhante à variação de pressão para a síntese em meio aquoso, o aumento da pressão para 8 atm em meio orgânico ocasiona uma diminuição de 24 % e um aumento de quase 190 % desses mesmos grupos comparando com DMel-4P. Conforme foi apresentado na seção 2.1, o aquecimento da síntese da melanina em DMSO provoca uma diminuição de monômeros DHICA (PIACENTI-SILVA et al., 2014a). Assim, a

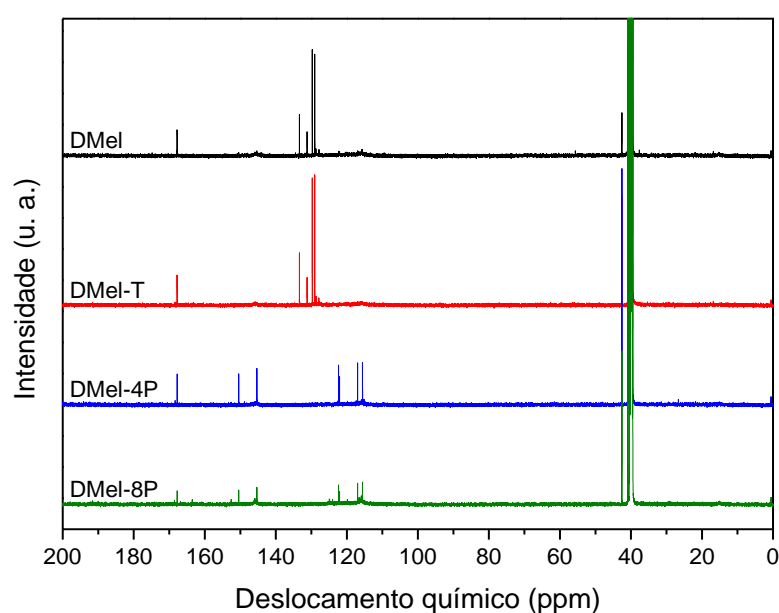
diminuição de 7 % e 17 % dos grupos COOH e COO⁻, nesta ordem, observadas comparando DMel e DMel-T esta dentro do esperado.

A análise para o núcleo de ¹³C da DMSO-Melanina é apresentado na Figura 22. Para auxiliar na identificação das bandas dos espectros, foi utilizada a simulação do software ChemDraw Ultra 12.0. Diante disto, são atribuídos aos sinais observados:

- em 40,8 ppm e 42,6 ppm ao carbono do grupo sulfonado. A diferença na posição deste sinal provavelmente se deve às regiões químicas vizinhas que são distintas para cada hidroxila sulfonada (Figura 2);
- entre 112 e 152 ppm aos carbonos aromáticos da estrutura indólica, e;
- em 167 ppm ao carbono do grupo ácido;

Por fim, o intenso sinal na região de 40 ppm corresponde ao sinal de DMSO residual da síntese e ao solvente DMSO-d₆ utilizando durante o experimento (GOTTBLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997).

Figura 22 - ¹³C RMN para melanina sintetizada em DMSO.



Na Tabela 10 são apresentadas as áreas dos sinais referentes à sulfonação da hidroxila fenólica e do grupo ácido, ambos normalizados pela somatória das áreas dos sinais do espectro referente aos carbonos aromáticos (90-160 ppm) de cada amostra.

Tabela 10 - Intesidade dos sinais de ^{13}C RMN normalizada pela região dos carbonos aromáticos.

Amostra	O-S (Fenol)	COOH	
Sinal (ppm)	$40,84 \pm 0,00$	$42,56 \pm 0,00$	$167,78 \pm 0,02$
DMel	2,480	0,150	0,081
DMel-T	2,160	0,280	0,079
DMel-4P	1,480	0,900	0,110
DMel-8P	7,950	1,070	0,102

Ao analisar os dados da Tabela 10, é possível verificar algumas relações. Em primeiro, percebe-se que pelo sinal em 42,56 ppm, que a sulfonação da oxigênio da hidroxila fenólica aumenta independente da modificação sintética efetuada, contudo nenhuma relação é observada para o sinal em 40,84 ppm. O sinal referente ao grupo carboxílico (167,78 ppm) diminui 2 % comparando DMel e DMel-T. Além disso, comparando DMel e DMel-4P é observado que o sinal da carboxila aumenta 36 %, enquanto que aumento a pressão de 4 atm para 8 atm, o mesmo sinal diminui 7 %. Note que os resultados obtidos de ^{13}C RMN das melaninas sintetizadas em DMSO com relação a proporção DHICA/DHI estão de acordo com o discutido anteriormente com o espectro de FTIR e para as melaninas sintetizadas em água.

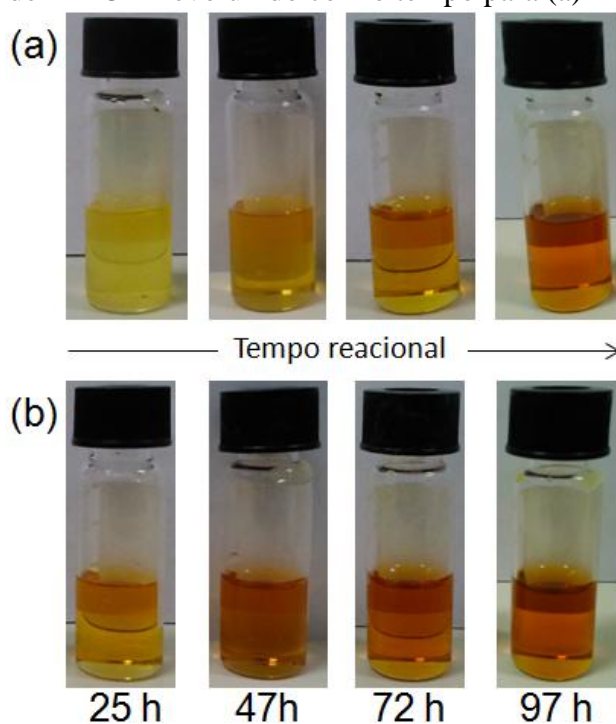
Note que a região aromática do espectro de ^{13}C RMN também é modificada quando se utiliza O_2 como agente oxidante no lugar do peróxido de benzoíla do processo tradicional. Essa diferença obtida poderia ser ocasionada levando em consideração que o oxigênio é um consumido em todo o processo de melanogênese, tornando-o um reagente da síntese, enquanto que o peróxido é um iniciador radicalar no procedimento da síntese da melanina.

5.2.4. Modificações na síntese tradicional da melanina em DMSO

A fim de verificar o mecanismo sintético da síntese de melanina em DMSO com a pressão de oxigênio, duas modificações sintéticas foram efetuadas na síntese tradicional (DMel). De acordo com o que foi visto na seção 3.2 a primeira modificação sintética realizada foi analisar o efeito da ausência do peróxido de benzoíla na síntese (DMel-S). A segunda alteração proposta, visa entender o que aconteceria com a síntese borbulhando ar atmosférico na reação da DMel sem o peróxido (DMel-O).

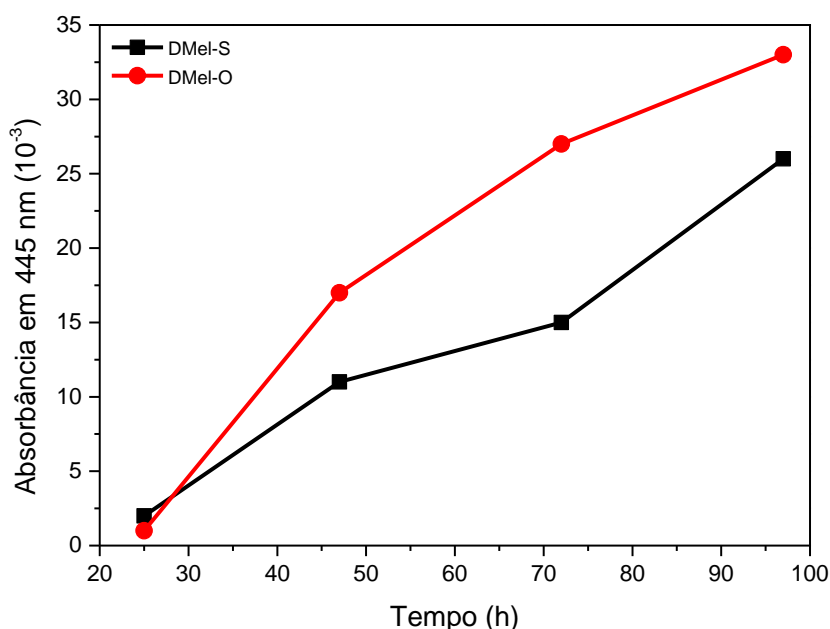
O processo de oxidação da L-DOPA resulta em um processo que varia de claro/transparente até marrom/preto em um pequeno intervalo de tempo e permanece com a coloração escura até o final da reação. Conforme pode ser observado na Figura 23(a) e Figura 23(b) ambas as modificações sintéticas mesmo após quatro dias não apresentam uma coloração escura o que indica que na ausência do peróxido de benzoíla o processo de oxidação é bastante lento.

Figura 23 - Solução de L-DOPA evoluindo com o tempo para (a) DMel-S e (b) DMel-O.



O processo sintético também foi acompanhado por absorvância em intervalos de tempo regulares por 4 dias. Conforme pode ser observado na Figura 24, seguindo o procedimento de (PIACENTI-SILVA et al., 2014a) para $\lambda_{\text{Abs}} = 445 \text{ nm}$. A absorvância aumenta com o passar do tempo de maneira similar ao obtido nas outras sínteses. Contudo, a intensidade de absorção é inferior comparada ao processo tradicional, sugerindo que neste caso o processo sintético será mais lento.

Figura 24 - Absorvância em 445 nm para DMel-S e DMel-O em função do tempo de síntese.

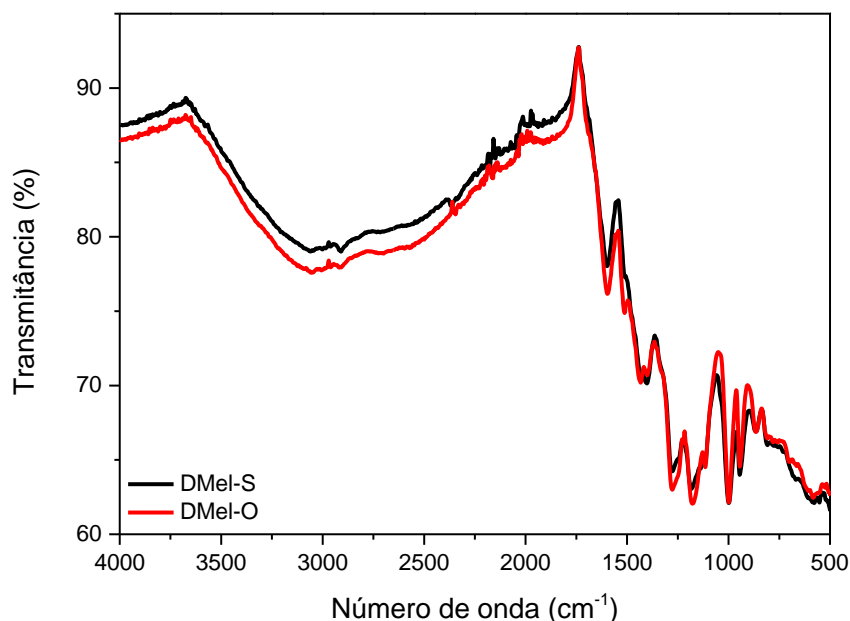


Em decorrência da pouca variação da absorvância das amostras neste período de tempo da reação, a síntese foi interrompida antes de sua finalização e o material extraído foi caracterizado por FTIR e ^{13}C RMN. Devido à interrupção prematura do processo sintético, apenas análises qualitativas serão realizadas para estas duas amostras.

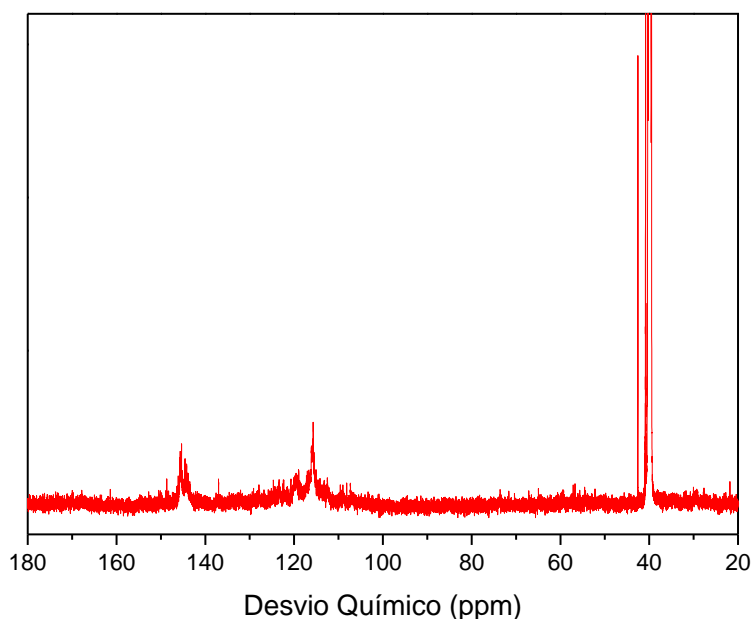
Conforme pode ser observado na Figura 25, o espectro de FTIR é similar ao obtido para as demais amostras (Figura 20), o que sugere que um material com estruturas semelhantes, ou

seja, estruturas indólicas sulfonadas possam ter sido formadas nos diferentes procedimentos realizados.

Figura 25 - Espectro de FTIR para a DMel-S e DMel-O.



Na Figura 26 observa-se o espectro de ¹³C RMN para DMel-O. Nesta figura, verifica-se um sinal em 40,53 ppm e em 42,56 ppm referentes aos carbonos do grupo sulfonado. Além disso, também é observado dois largos sinais centrados em 115,71 ppm e 145,52 ppm referentes aos prótons dos anéis aromáticos. Nenhum sinal, contudo, referente ao grupo do ácido carboxílico é visto. O interessante dos dois sinais da região aromática é que ambos são equivalentes ao observado em DMel-4P e DMel-8P, Figura 22, indicando que o excesso de oxigênio no meio sintético é o responsável pela mudança no processo de polimerização observado na seção 5.2.3. A mesma caracterização foi realizada para DMel-S, porém de maneira semelhante às H₂O-Melanina em D₂O, nenhum sinal na região aromática foi obtido, o que inviabiliza a análise do espectro.

Figura 26 - ^{13}C RMN para DMel-O.

5.3. Mecanismo reacional

As diferenças estruturais observadas entre a síntese tradicional e a síntese utilizando 4 atm de pressão de O_2 são decorrentes da maior disponibilidade do oxigênio no último. Assim, supõe-se que o oxigênio em excesso e a pressão favorecem a produção de um polímero com maior quantidade do monômero de DHICA, de maneira semelhante ao observado no meio biológico.

No processo sintético descrito aqui, a oxidação da L-DOPA na fase aquosa necessita de um meio alcalino (fornecido por NH_4OH) somado a inerente capacidade de auto-oxidação da L-DOPA. De fato, conforme descrito anteriormente, a reação acontece bastante lentamente na ausência do NH_4OH , pois o meio alcalino é necessário para desprotonar os alcoóis primários, levando a ciclização e formação do dopacromo que, após uma série de etapas oxidativas, forma os monômeros DHI e DHICA.

In vitro, o dopacromo sofre espontânea descarboxilação para formar uma melanina rica em estruturas DHI e seus derivados (PANZELLA et al., 2013). Conseqüentemente, CO₂ é liberado aumentando a pressão do sistema. Assim, com o aumento da pressão de oxigênio, uma maior atividade oxidativa é esperada a partir da transferência de massa da fase de vapor do O₂ para a fase aquosa, liberando ainda mais CO₂.

Pelo princípio de Le Chatelier, uma alteração no equilíbrio químico faz com que a reação seja deslocada no sentido de minimizar os efeitos causados pela perturbação (BRUICE, 2005; SKOOG et al., 2006). Portanto, se a pressão total do sistema for aumentada, o sistema tenderá a reduzir esse efeito e o equilíbrio será deslocado no sentido a diminuir a pressão. Deste modo, ao utilizarmos pressão de O₂, a reação de descarboxilação do dopacromo será impedida visando diminuir a pressão do sistema e como consequência aumentará a quantidade de monômeros carboxilados como a DHICA.

Considerando que o peróxido de hidrogênio pode ser obtido durante a síntese *in vivo* e *in vitro* da melanina (JOLLEY et al., 1974; NOFSINGER; LIU; SIMON, 2002; YAMAZAKI; MORIOKA; ITOH, 2004; MASTORE; KOHLER; NAPPI, 2005; MUNOZ-MUNOZ et al., 2009), sua formação é esperada neste processo sintético. No meio biológico, o peróxido é decomposto, através da catalase, pela enzima tirosinase em resposta ao stress oxidativo gerado (JOLLEY et al., 1974). Por outro lado, na ausência da enzima, são obtidos maiores proporções de DHI no meio reacional sugerindo que a presença de H₂O₂ pode ser responsável pela clivagem da ligação C-C gerando CO₂ (WOOD et al., 2004; KETCHIE et al., 2007; KETCHIE; MURAYAMA; DAVIS, 2007; MUNOZ-MUNOZ et al., 2009). Assim propomos que durante a síntese tradicional a presença do peróxido de hidrogênio irá ocasionar uma maior clivagem C-C do grupo carboxílico para formação de CO₂, gerando uma maior razão DHI/DHICA.

Assumindo que a síntese da HMel-4P(4) é similar a HMel(4), ao utilizar 4 atm de pressão de oxigênio a taxa de oxidação da L-DOPA será maior, aumentando a decomposição do H_2O_2 para formação de O_2 e H_2O no meio reacional o que favorecerá ainda mais o processo de oxidação devido a maior concentração de oxigênio dissolvido no meio reacional (KETCHIE; MURAYAMA; DAVIS, 2007). Além disso, o aumento da taxa de decomposição do peróxido numa solução rica em oxigênio, os produtos da reação de auto-oxidação são alterados, o que proporciona uma menor clivagem do grupo carboxílico, diminuindo a produção de CO_2 e aumentando a razão DHICA/DHI.

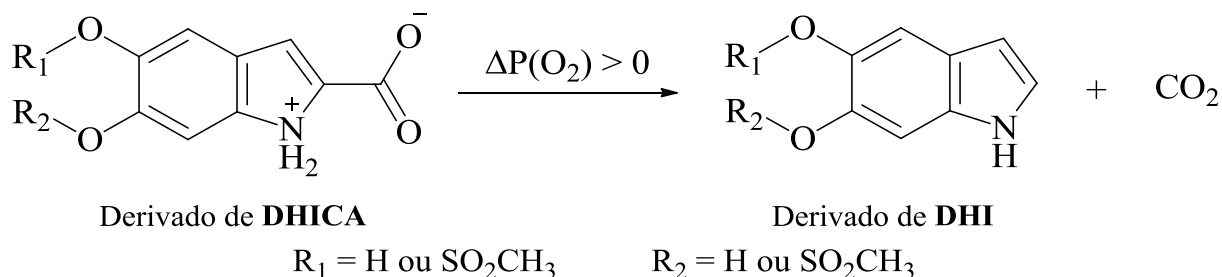
O derivado da melanina obtido em solvente orgânico apresenta o comportamento semelhante ao obtido em água em relação a proporção DHICA/DHI e ao favorecimento da velocidade de reação. Diante disto, podemos considerar que o processo de oxidação da L-DOPA em DMSO seja semelhante ao em água. A principal diferença é a funcionalização com grupo sulfonado no material sintetizado com o solvente orgânico.

Sabe-se que durante a oxidação da L-DOPA, neste caso favorecida pelo ambiente altamente oxidativo decorrente do oxigênio molecular e meio alcalino ocasionado pelo DMSO, (GRAHAM et al., 1978; KRUK et al., 1999; QU; KIRSCHENBAUM; BORISH, 2000) e durante o processo de decomposição do peróxido de hidrogênio (WU; MURUGANANDHAM; CHEN, 2007; POYATOS et al., 2010) existirá a formação de radicais hidroxilas. Além disso, diversos estudos têm mostrado que o DMSO na presença destes radicais sofre oxidação para formação do ácido metanosulfônico (SØRENSEN et al., 1996; BARDOUKI et al., 2002; KUKUI et al., 2003; LEE; LEE; YOON, 2004, 2006; CHOBAN; YURCHUK; LYAVINETS, 2008). Assim, este subproduto pode participar do processo sintético da melanina com pressão de O_2 e ser o responsável pela presença das estruturas sulfonadas que foram observadas através das técnicas FTIR e 1H e ^{13}C RMN, seção 5.2.3. O ácido metanosulfônico pode proteger os átomos de oxigênios fenólicos (TEASDALE

et al., 2010) e/ou nitrogênio (LUCA et al., 2008) dos monômeros DHI e DHICA de tal forma que seria obtido um produto semelhante ao que é observado durante o processo tradicional com o peróxido de benzoíla (Figura 2).

Os resultados apresentados também indicam que o aumento da pressão de O_2 induz a um aumento da velocidade de reação, obtendo um polímero com baixa intensidade de grupos carboxílicos. Essa característica é semelhante ao obtido com o aquecimento da síntese de DMel (PIACENTI-SILVA et al., 2014a) e os resultados aqui apresentados (seção 5.2.3). Diante disto, podemos assumir que o aumento da pressão de O_2 também induz a descarboxilação da DHICA (sulfonada ou não) para formação da DHI (sulfonada ou não), seguindo o Esquema 4. É pertinente dizer que DHI é um monômero mais reativo que DHICA devido a posição 2 ser uma posição favorável para dimerização e polimerização via reação radicalar (TRAN; POWELL; MEREDITH, 2006; ARZILLO et al., 2012), o que conseguiria explicar a diminuição no tempo de síntese.

Esquema 4 - Descarboxilação do derivado da DHICA devido à variação de pressão de O_2 . Se $R_1 = R_2 = H$ temos H_2O -Melanina, se não, DMSO-Melanina.



O processo de descarboxilação está associado a possíveis mudanças no processo cinético e termodinâmico da reação que ainda não são totalmente compreendidos. Contudo, uma possível explicação poderia ser decorrente da presença de H_2O_2 no meio reacional. Anteriormente, nós supomos que o aumento da pressão aumenta a taxa de decomposição do peróxido o que favorece a formação de uma maior proporção de DHICA/DHI. Entretanto,

pelo princípio de Le Chatelier, este processo de decomposição seria impedido, visto que a formação de H_2O e O_2 iria aumentar a pressão do sistema. Diante disso é possível que dois processos distintos baseados no princípio de Le Chatelier irão ocorrer durante a síntese da melanina com pressão de O_2 em duas etapas diferentes: descarboxilação do dopacromo e decomposição do H_2O_2 . Quando utilizamos 4 atm de pressão de O_2 , podemos propor que existe um equilíbrio entre estes dois processos de tal forma que é obtido uma maior razão DHICA/DHI. Por outro lado, ao aumentar a pressão do sistema este equilíbrio é perturbado aumentando quantidade de peróxido no meio reacional. Por consequência, maior clivagem da ligação C-C do grupo ácido irá ocorrer aumentando a formação de monômeros DHI e diminuindo a proporção DHICA/DHI.

É interessante destacar que apesar da diminuição de compostos carboxilados com o aumento da pressão de O_2 de 4 atm para 6 ou 8 atm, tais amostras ainda apresentam uma razão DHICA/DHI maior que o material obtido através da síntese tradicional, o que pode ocasionar propriedades notáveis no material. Enquanto melaninas ricas em DHICA apresentam maior capacidade quelante e oxidante, a presença do ácido carboxílico em maior concentração na estrutura polimérica pode melhorar a ancoragem do pigmento em diferentes substratos para aplicações em eletrônica orgânica, além de poder melhorar sua condutividade protônica (ORDINARIO et al., 2014). Por fim, a maior solubilidade dos derivados solúveis da melanina é um pré-requisito para a formação de filmes finos de melanina com boa qualidade, como já observado nas melaninas sintetizadas tradicionalmente em DMSO (DA SILVA et al., 2004; DEZIDÉRIO et al., 2004; LORITE et al., 2006; WÜNSCHE et al., 2013a, 2013b).

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, uma nova rota sintética foi proposta buscando obter derivados solúveis de melanina a partir da oxidação da L-DOPA usando oxigênio molecular. Diferentes técnicas de caracterizações opto-estruturais foram utilizadas visando elucidar a estrutura química dos materiais formados.

Ao utilizar alta pressão de oxigênio molecular algumas características são observadas:

- i) o tempo reacional diminui 45 horas em água e 54 dias em DMSO comparando o material obtido pela rota tradicional e com 8 atm de pressão de O₂;
- ii) ambos procedimentos proporcionam uma razão DHICA/DHI maior comparando a tradicional e 4 atm, porém o aumento da pressão de 4 para 8 atm favorece a descarboxilação do material;
- iii) o material obtido em ambiente aquoso é solúvel em água, enquanto que em solvente orgânico em DMSO, DMF e NMP.

O aumento da quantidade de funções carboxilas no polímero é interessante, pois, além de ser uma característica do pigmento natural, estes grupos estão ligados às propriedades quelantes, oxidantes e também da condução iônica na melanina. Um mecanismo reacional foi proposto baseado decomposição do H₂O₂ induzido pela presença do oxigênio.

A solubilidade dos derivados obtidos através desta abordagem é bastante atrativa do ponto de vista tecnológico uma vez que esta característica facilita a aplicação de filmes finos para (bio)eletrônica orgânica.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Visando complementar o estudo estrutural das amostras sintetizadas, medidas de XPS, espectroscopia de massa, espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta, cromatografia por exclusão por tamanho e análise térmica já estão sendo realizadas, porém até a finalização deste texto, nenhum resultado havia sido recebido.

Tendo em vista os resultados apresentados, algumas questões podem ser levantadas de modo a sugerir trabalhos futuros. Em um primeiro momento, o peróxido de hidrogênio formado/consumido durante a síntese varia conforme o mecanismo propõe? Além disso, considerando as diferenças obtidas na região aromática dos espectros de RMN para as DMSO-Melaninas, qual seria a influência dessas variações na seletividade oligomérica e na organização final da macromolécula? Conforme discutido anteriormente, a melanina pode ser obtida a partir de diversos precursores. Assim, o procedimento sintético aqui proposto poderia ser aplicado para os demais precursores como dopamina ou catecol?

Sabe-se também que as propriedades bioquímicas da melanina são dependentes da proporção DHICA/DHI. Com o aumento desta proporção nos derivados obtidos, espera-se que apresentem uma maior capacidade quelante e anti-oxidante. Contudo, no caso da DMSO-Melanina, qual seria a influência dos grupos sulfonados nestas propriedades?

Tendo em vista que este trabalho é motivado para uma possível aplicação dos derivados de melanina solúveis na eletrônica orgânica e, em especial, na bioeletrônica, o crescimento e morfologia dos filmes finos serão modificados pelas diferentes razões DHICA/DHI e funcionalização com os grupos sulfonados? Qual será o comportamento elétrico das amostras? Ou, a presença do grupo sulfonados na DMSO-Melaninas e a maior proporção de estruturas carboxiladas influenciarão a condutividade protônica? Os materiais obtidos são biocompatíveis e biodegradáveis?

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.; D'AMICO, F.; MORRESI, L.; PINTO, N.; FICCADENTI, M.; NATALI, R.; OTTAVIANO, L.; PASSACANTANDO, M.; CUCCIOLONI, M.; ANGELETTI, M.; GUNNELLA, R. Structural, electrical, electronic and optical properties of melanin films. **The European Physical Journal E**, v. 28, p. 285–291, 2009.
- ADHYARU, B. B.; AKHMEDOV, N. G.; KATRITZKY, A. R.; BOWERS, C. R. Solid-state cross-polarization magic angle spinning ^{13}C and ^{15}N NMR characterization of Sepia melanin, Sepia melanin free acid and Human hair melanin in comparison with several model compounds. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, p. 466–474, 2003.
- AIME, S.; FASANO, M.; TERRENO, E.; GROOMBRIDGE, C. J. NMR studies of melanins: Characterization of a soluble melanin free acid from Sepia ink. **Pigment cell research**, v. 4, p. 216–221, 1991.
- AMBRICO, M.; AMBRICO, P. F.; CARDONE, A.; CICCIO, S. R.; PALUMBO, F.; LIGONZO, T.; DI MUNDO, R.; PETTA, V.; AUGELLI, V.; FAVIA, P.; FARINOLA, G. M. Melanin-like polymer layered on a nanotextured silicon surface for a hybrid biomimetic interface. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, p. 573–582, 2014.
- AMBRICO, M.; AMBRICO, P. F.; LIGONZO, T.; CARDONE, A.; CICCIO, S. R.; LAVIZZERA, A.; AUGELLI, V.; FARINOLA, G. M. Memory-like behavior as a feature of electrical signal transmission in melanin-like bio-polymers. **Applied Physics Letters**, v. 100, p. 253702–1/253702–5, 2012.
- AMBRICO, M.; CARDONE, A.; LIGONZO, T.; AUGELLI, V.; AMBRICO, P. F.; CICCIO, S.; FARINOLA, G. M.; FILANNINO, M.; PERNA, G.; CAPOZZI, V. Hysteresis-type current-voltage characteristics in Au/eumelanin/ITO/glass structure: Towards melanin based memory devices. **Organic Electronics**, v. 11, p. 1809–1814, 2010.
- ARAÚJO, M.; VIVEIROS, R.; CORREIA, T. R.; CORREIA, I. J.; BONIFÁCIO, V. D. B.; CASIMIRO, T.; AGUIAR-RICARDO, A. Natural melanin: a potential pH-responsive drug release device. **International journal of pharmaceutics**, v. 469, p. 140–5, 2014.
- ARZILLO, M.; MANGIAPIA, G.; PEZZELLA, A.; HEENAN, R. K.; RADULESCU, A.; PADUANO, L.; D'ISCHIA, M. Eumelanin buildup on the nanoscale: Aggregate growth/assembly and visible absorption development in biomimetic 5,6-dihydroxyindole polymerization. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2379–2390, 2012.
- BARDOUKI, H.; DA ROSA, M. B.; MIHALOPOULOS, N.; PALM, W. U.; ZETZSCH, C. Kinetics and mechanism of the oxidation of dimethylsulfoxide (DMSO) and methanesulfinate (MSI-) by OH radicals in aqueous medium. **Atmospheric Environment**, v. 36, p. 4627–4634, 2002.
- BELLA, F.; GERBALDI, C.; BAROLO, C.; GRÄTZEL, M. Aqueous dye-sensitized solar cells. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 3431–3473, 2015.
- BERNSMANN, F.; BALL, V.; ADDIEGO, F.; PONCHE, A.; MICHEL, M.; GRACIO, J. J. D. A.; TONIAZZO, V.; RUCH, D. Dopamine-melanin film deposition depends on the used oxidant and buffer solution. **Langmuir**, v. 27, p. 2819–2825, 2011.
- BERNSMANN, F.; PONCHE, A.; RINGWALD, C.; HEMMERLE, J.; RAYA, J.; BECHINGER, B.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P.; BALL, V. Characterization of dopamine-

- melanin growth on silicon oxide. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 8234–8242, 2009.
- BETTINGER, C. J.; BRUGGEMAN, J. P.; MISRA, A.; BORENSTEIN, J. T.; LANGER, R. Biocompatibility of biodegradable semiconducting melanin films for nerve tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 3050–3057, 2009.
- BLOISI, F.; PEZZELLA, A.; BARRA, M.; CHIARELLA, F.; CASSINESE, A.; VICARI, L. Matrix assisted pulsed laser deposition of melanin thin films. **Journal of Applied Physics**, v. 110, p. 026105–1/026105–3, 2011.
- BORGHETTI, P.; GOLDONI, A.; CASTELLARIN-CUDIA, C.; CASALIS, L.; HERBERG, F.; FLOREANO, L.; COSSARO, A.; VERDINI, A.; GEBAUER, R.; GHOSH, P.; SANGALETTI, L. Effects of potassium on the supramolecular structure and electronic properties of eumelanin thin films. **Langmuir**, v. 26, p. 19007–13, 2010.
- BOTHMA, J. P.; DE BOOR, J.; DIVAKAR, U.; SCHWENN, P. E.; MEREDITH, P. Device-Quality Electrically Conducting Melanin Thin Films. **Advanced Materials**, v. 20, p. 3539–3542, 2008.
- BRONZE-UHLE, E. S.; BATAGIN-NETO, A.; XAVIER, P. H. P.; FERNANDES, N. I.; GRAEFF, C. F. O. Synthesis and characterization of melanin in DMSO. **Journal of Molecular Structure**, v. 1047, p. 102–108, 2013.
- BRUICE, P. Y. Spectroscopy. In: **Organic Chemistry**. 4. ed. [s.l.] Prentice Hall, 2005.
- BUI, D. A.; HAUSER, P. C. Analytical devices based on light-emitting diodes - a review of the state-of-the-art. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 46–58, 2015.
- BURKE, D. J.; LIPOMI, D. J. Green chemistry for organic solar cells. **Energy & Environmental Science**, v. 6, p. 2053–2066, 2013.
- BUTH, F.; DONNER, A.; SACHSENHAUSER, M.; STUTZMANN, M.; GARRIDO, J. A. Biofunctional electrolyte-gated organic field-effect transistors. **Advanced Materials**, v. 24, p. 4511–4517, 2012.
- CENTENO, S. A.; SHAMIR, J. Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art. **Journal of Molecular Structure**, v. 873, p. 149–159, 2008.
- CHEN, C.-T.; CHUANG, C.; CAO, J.; BALL, V.; RUCH, D.; BUEHLER, M. J. Excitonic effects from geometric order and disorder explain broadband optical absorption in eumelanin. **Nature communications**, v. 5, p. 3859–1/3859–10, 2014.
- CHOBAN, A. F.; YURCHUK, I. R.; LYAVINETS, A. S. Oxidation of dimethyl sulfoxide with hydrogen peroxide in the presence of potassium hydroxide. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 78, p. 2071–2074, 2008.
- CICCO, S. R.; AMBRICO, M.; AMBRICO, P. F.; TALAMO, M. M.; CARDONE, A.; LIGONZO, T.; DI MUNDO, R.; GIANNINI, C.; SIBILLANO, T.; FARINOLA, G. M.; MANINI, P.; NAPOLITANO, A.; CRISCUOLO, V.; D'ISCHIA, M. A water-soluble eumelanin polymer with typical polyelectrolyte behaviour by triethyleneglycol N-functionalization. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 3, p. 2810–2816, 2015.
- CLARK, M. B.; GARDELLA, J. A.; SCHULTZ, T. M.; PATIL, D. G.; SALVATI, L. Solid-state analysis of eumelanin biopolymers by electron spectroscopy for chemical analysis. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 949–956, 1990.

CONSTANTINO, M. G. **Química orgânica - curso básico universário (v. 3)**. [s.l.: s.n.]

CUSTODIO, R.; KUBOTA, L. T.; ANDRADE, J. C. De. **Lei dos Processos de Absorção da Radiação**. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2000/03/18/lei-dos-processos-de-absorcao-da-radiacao/>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

D'ISCHIA, M.; NAPOLITANO, A.; PEZZELLA, A.; MEREDITH, P.; SARNA, T. Chemical and structural diversity in eumelanins: unexplored bio-optoelectronic materials. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 48, p. 3914–21, 2009.

D'ISCHIA, M.; WAKAMATSU, K.; CICOIRA, F.; DI MAURO, E.; GARCIA-BORRON, J. C.; COMMO, S.; GALVÀN, I.; GHANEM, G.; KOIKE, K.; MEREDITH, P.; PEZZELLA, A.; SANTATO, C.; SARNA, T.; SIMON, J. D.; ZECCA, L.; ZUCCA, F. A.; NAPOLITANO, A.; ITO, S. Melanins and Melanogenesis: From Pigment Cells to Human Health and Technological Applications. **Pigment cell & melanoma research**, v. 28, p. 520–544, 2015.

D'ISCHIA, M.; WAKAMATSU, K.; NAPOLITANO, A.; BRIGANTI, S.; GARCIA-BORRON, J.-C.; KOVACS, D.; MEREDITH, P.; PEZZELLA, A.; PICARDO, M.; SARNA, T.; SIMON, J. D.; ITO, S. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. **Pigment cell & melanoma research**, v. 26, p. 616–633, 2013.

DA SILVA, M. I. N.; DEZIDÉRIO, S. N.; GONZALEZ, J. C.; GRAEFF, C. F. O.; COTTA, M. a. Synthetic melanin thin films: Structural and electrical properties. **Journal of Applied Physics**, v. 96, p. 5803–5807, 2004.

DEY, A.; SINGH, A.; DAS, D.; IYER, P. K. Organic Semiconductors: A New Future of Nanodevices and Applications. In: MOORTHY, S. B. K. (Ed.). **Thin Film Structures in Energy Applications**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 97–128.

DEZIDÉRIO, S. N.; BRUNELLO, C. A.; DA SILVA, M. I. N.; COTTA, M. A.; GRAEFF, C. F. O. Thin films of synthetic melanin. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 338-340, p. 634–638, 2004.

DÍAZ, P.; GIMENO, Y.; CARRO, P.; GONZÁLEZ, S.; SCHILARDI, P. L.; BENÍTEZ, G.; SALVAREZZA, R. C.; CREUS, A. H. Electrochemical self-assembly of melanin films on gold. **Langmuir**, v. 21, p. 5924–5930, 2005.

GHIANI, S.; BARONI, S.; BURGIO, D.; DIGILIO, G.; FUKUHARA, M.; MARTINO, P.; MONDA, K.; NERVI, C.; KIYOMINE, A.; AIME, S. Characterization of human hair melanin and its degradation products by means of magnetic resonance techniques. **Magnetic resonance in chemistry**, v. 46, p. 471–479, 2008.

GLASS, K.; ITO, S.; WILBY, P. R.; SOTA, T.; NAKAMURA, A.; BOWERS, C. R.; VINTHER, J.; DUTTA, S.; SUMMONS, R.; BRIGGS, D. E. G.; WAKAMATSU, K.; SIMON, J. D. Direct chemical evidence for eumelanin pigment from the Jurassic period. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 10218–10223, 2012.

GOTTBLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512–7515, 1997.

GRAHAM, D. G.; TIFFANY, S. M.; BELL, W. R.; GUTKNECHT, W. F. Autoxidation versus Covalent Binding of Quinones as the Mecanism of Toxicity of Dopaminhe, 6-Hydroxydopamine, and Related Compounds towarts C1 300 Neuroblastoma Cells in Vitro.

Molecular Pharmacology, v. 14, p. 644–653, 1978.

GUIN, T.; CHO, J. H.; XIANG, F.; ELLISON, C. J.; GRUNLAN, J. C. Water-Based Melanin Multilayer Thin Films with Broadband UV Absorption. **ACS Macro Letters**, v. 4, p. 335–338, 2015.

GUO, X.; CHEN, S.; HU, Y.; LI, G.; LIAO, N.; YE, X.; LIU, D.; XUE, C. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 3680–3690, 2014.

HOROWITZ, G. Organic thin film transistors: From theory to real devices. **Journal of Materials Research**, v. 19, p. 1946–1962, 2004.

HUANG, G. S.; WANG, M.-T.; SU, C.-W.; CHEN, Y.-S.; HONG, M.-Y. Picogram detection of metal ions by melanin-sensitized piezoelectric sensor. **Biosensors & bioelectronics**, v. 23, p. 319–25, 2007.

ITO, S. A Chemist's View of Melanogenesis. **Pigment Cell Res.**, v. 16, p. 230–236, 2003.

ITOH, S.; KUMEI, H.; TAKI, M.; NAGATOMO, S.; KITAGAWA, T.; FUKUZUMI, S. Oxygenation of phenols to catechols by a (μ - η^2 : η^2 -peroxo)dicopper(II) complex: Mechanistic insight into the phenolase activity of tyrosinase [1]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 6708–6709, 2001.

JOLLEY, R. L.; EVANS, L. H.; MAKINO, N.; MASON, H. S. Oxytyrosinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 335–345, 1974.

JU, K. Y.; LEE, Y.; LEE, S.; PARK, S. B.; LEE, J. K. Bioinspired polymerization of dopamine to generate melanin-like nanoparticles having an excellent free-radical-scavenging property. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 625–632, 2011.

KAMTEKAR, K. T.; MONKMAN, A. P.; BRYCE, M. R. Recent advances in white organic light-emitting materials and devices (WOLEDs). **Advanced Materials**, v. 22, p. 572–582, 2010.

KATRITZKY, A. R.; AKHMEDOV, N. G.; DENISENKO, S. N.; DENISKO, O. V. ¹H NMR spectroscopic characterization of solutions of Sepia melanin, Sepia melanin free acid and human hair melanin. **Pigment Cell Research**, v. 15, p. 93–97, 2002.

KETCHIE, W. C.; FANG, Y. L.; WONG, M. S.; MURAYAMA, M.; DAVIS, R. J. Influence of gold particle size on the aqueous-phase oxidation of carbon monoxide and glycerol. **Journal of Catalysis**, v. 250, p. 94–101, 2007.

KETCHIE, W. C.; MURAYAMA, M.; DAVIS, R. J. Promotional effect of hydroxyl on the aqueous phase oxidation of carbon monoxide and glycerol over supported Au catalysts. **Topics in Catalysis**, v. 44, p. 307–317, 2007.

KIM, I. G.; NAM, H. J.; AHN, H. J.; JUNG, D.-Y. Electrochemical growth of synthetic melanin thin films by constant potential methods. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 2954–2959, 2011.

KIN, Y. J.; WU, W.; CHUN, S.; WHITACRE, J. F.; BETTINGER, C. J. Biologically derived melanin electrodes in aqueous sodium-ion energy storage devices. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 52, p. 20912–17, 2013.

KLOSTERMAN, L.; RILEY, J. K.; BETTINGER, C. J. Control of Heterogeneous Nucleation and Growth Kinetics of Dopamine-Melanin by Altering Substrate Chemistry. **Langmuir**, v.

31, p. 3451–3458, 2015.

KROL, E. S.; LIEBLER, D. C. Photoprotective Actions of Natural and Synthetic Melanins. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 1434–1440, 1998.

KRUK, I.; LICHSZTELD, K.; BOUNIAS, M.; KLADNA, A.; KUBERA-NOWAKOWSKA, L. Formation of active oxygen species during autoxidation of DOPA. **Chemosphere**, v. 39, p. 443–453, 1999.

KUKUI, A.; BORISSENKO, D.; LAVERDET, G.; LE BRAS, G. Gas-phase reactions of OH radicals with dimethyl sulfoxide and methane sulfinic acid using turbulent flow reactor and chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 107, p. 5732–5742, 2003.

LAWRIE, K. J.; MEREDITH, P.; MCGEARY, R. P. Synthesis and Polymerization Studies of Organic-Soluble Eumelanins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 632–638, 2008.

LEE, C.; LEE, Y.; YOON, J. Oxidative degradation of dimethylsulfoxide by locally concentrated hydroxyl radicals in streamer corona discharge process. **Chemosphere**, v. 65, p. 1163–1170, 2006.

LEE, Y.; LEE, C.; YOON, J. Kinetics and mechanisms of DMSO (dimethylsulfoxide) degradation by UV/H₂O₂ process. **Water research**, v. 38, p. 2579–88, 2004.

LIU, Y.; HONG, L.; WAKAMATSU, K.; ADHYARU, B.; CHENG, C.; BOWERS, C. R.; SIMON, J. D. Comparisons of the Structural and Chemical Properties of Melanosomes Isolated from Retinal Pigment Epithelium, Iris and Choroid of Newborn and Mature Bovine Eyes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 510–516, 2005.

LOI, A.; BASIRICÒ, L.; COSSEDDU, P.; LAI, S.; BARBARO, M.; BONFIGLIO, A.; MAIOLINO, P.; BAGLINI, E.; DENEI, S.; MASTROGIOVANNI, F.; CANNATA, G. Organic bendable and stretchable field effect devices for sensing applications. **IEEE Sensors Journal**, v. 13, p. 4764–4772, 2013.

LORITE, G. S.; COLUCI, V. R.; DA SILVA, M. I. N.; DEZIDÉRIO, S. N.; GRAEFF, C. F. O.; GALVÃO, D. S.; COTTA, M. Synthetic melanin films: Assembling mechanisms, scaling behavior, and structural properties. **Journal of Applied Physics**, v. 99, p. 113511–1/113511–6, 2006.

LUCA, L. De; GIACOMELLI, G.; CHIMICA, D.; UNI, V. An Easy Microwave-Assisted Synthesis of Sulfonamides Directly from Sulfonic Acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 3967–3969, 2008.

MASON, H. S. The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172, p. 83–99, 1948.

MASTORE, M.; KOHLER, L.; NAPPI, A. J. Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine. **The FEBS journal**, v. 272, p. 2407–2415, 2005.

MAZZIO, K. A.; LUSCOMBE, C. K. The future of organic photovoltaics. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, p. 78–90, 2015.

MCGINNESS, J. E. Mobility Gaps: A Mechanism for Band Gaps in Melanins. **Science**, v. 177, p. 896–897, 1972.

MEREDITH, P.; POWELL, B. J.; RIESZ, J.; NIGHSWANDER-REMPEL, S. P.;

PEDERSON, M. R.; MOORE, E. G. Towards structure–property–function relationships for eumelanin. **Soft Matter**, v. 2, p. 37–44, 2006.

MEREDITH, P.; POWELL, B. J.; RIESZ, J.; VOGEL, R.; BLAKE, D.; KARTINI, I.; WILL, G.; SUBIANTO, S. Broadband Photon-harvesting Biomolecules for Photovoltaics. In: COLLINGS, A. F.; CRITCHLEY, C. (Ed.). **Artificial Photosynthesis: From Basic Biology to Industrial Application**. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. p. 37–65.

MEREDITH, P.; SARNA, T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment cell research**, v. 19, p. 572–94, 2006.

MEREDITH, P.; TANDY, K.; MOSTERT, A. A Hybrid Ionic–Electronic Conductor: Melanin, the First Organic Amorphous Semiconductor? In: **Organic Electronics: Emerging Concepts and Technologies**. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 91–111.

MICHEL, M. Comparison of Synthetic Dopamine – Eumelanin Formed in the Presence of Oxygen and Cu²⁺ Cations as Oxidants. **Langmuir**, v. 29, p. 12754–12761, 2013.

MOSTERT, A. B.; DAVY, K. J. P.; RUGGLES, J. L.; POWELL, B. J.; GENTLE, I. R.; MEREDITH, P. Gaseous adsorption in melanins: Hydrophilic biomacromolecules with high electrical conductivities. **Langmuir**, v. 26, p. 412–416, 2010.

MUCCINI, M.; NAZIONALE, C. A bright future for organic field-effect transistors. **Nature Materials**, v. 5, p. 605–613, 2006.

MUNOZ-MUNOZ, J. L.; GARCÍA-MOLINA, F.; VARÓN, R.; TUDELA, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1794, p. 1017–1029, 2009.

NOFSINGER, J. B.; LIU, Y.; SIMON, J. D. Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 720–730, 2002.

O’CONNOR, T. F.; RAJAN, K. M.; PRINTZ, A. D.; LIPOMI, D. J. Toward organic electronics with properties inspired by biological tissue. **J. Mater. Chem. B**, v. 3, p. 4947–4952, 2015.

ORDINARIO, D. D.; PHAN, L.; WALKUP IV, W. G.; JOCSON, J.-M.; KARSHALEV, E.; HÜSKEN, N.; GORODETSKY, A. A. Bulk protonic conductivity in a cephalopod structural protein. **Nature Chemistry**, v. 6, p. 596–602, 2014.

OWENS, R. M.; MALLIARAS, G. G. Organic Electronics at the Interface with Biology. **MRS Bulletin**, v. 35, p. 449–456, 2010.

PANZELLA, L.; GENTILE, G.; D’ERRICO, G.; DELLA VECCHIA, N. F.; ERRICO, M. E.; NAPOLITANO, A.; CARFAGNA, C.; D’ISCHIA, M. Atypical structural and π -electron features of a melanin polymer that lead to superior free-radical-scavenging properties. **Angewandte Chemie**, v. 52, p. 12684–12687, 2013.

PAUDEL, A.; NIES, E.; VAN DEN MOOTER, G. Relating hydrogen-bonding interactions with the phase behavior of Naproxen/PVP K 25 solid dispersions: Evaluation of solution-cast and quench-cooled films. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 3301–3317, 2012.

PELES, D. N.; LIN, E.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; SIMON, J. D. Ultraviolet Absorption Coefficients of Melanosomes Containing Eumelanin As Related to the Relative Content of

- DHI and DHICA. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 1, p. 2391–2395, 2010.
- PELES, D. N.; SIMON, J. D. The ultraviolet absorption coefficient of melanosomes decreases with increasing pheomelanin content. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 9677–83, 2010.
- PELES, D. N.; SIMON, J. D. UV-Absorption Spectra of Melanosomes Containing Varying 5,6-Dihydroxyindole and 5,6-Dihydroxyindole-2-Carboxylic acid Content. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 12624–12631, 2011.
- PEZZELLA, A.; AMBROGI, V.; ARZILLO, M.; NAPOLITANO, A.; CARFAGNA, C.; D'ISCHIA, M. 5,6-Dihydroxyindole Oxidation in Phosphate Buffer/Polyvinyl Alcohol: A New Model System for Studies of Visible Chromophore Development in Synthetic Eumelanin Polymers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 533–537, 2010.
- PEZZELLA, A.; BARRA, M.; MUSTO, A.; NAVARRA, A.; ALFÈ, M.; MANINI, P.; PARISI, S.; CASSINESE, A.; CRISCUOLO, V.; D'ISCHIA, M. Stem cell-compatible eumelanin biointerface fabricated by chemically controlled solid state polymerization. **Materials Horizons**, 2015.
- PEZZELLA, A.; IADONISI, A.; VALERIO, S.; PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A.; ADINOLFI, M.; D'ISCHIA, M. Disentangling eumelanin “black chromophore”: visible absorption changes as signatures of oxidation state- and aggregation-dependent dynamic interactions in a model water-soluble 5,6-dihydroxyindole polymer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 15270–5, 2009.
- PIACENTI-SILVA, M.; BRONZE-UHLE, E. S.; PAULIN, J. V.; GRAEFF, C. F. O. Temperature-enhanced synthesis of DMSO-Melanin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1056-1057, p. 135–140, 2014a.
- PIACENTI-SILVA, M.; FERNANDES, J. C.; DE FIGUEIREDO, N. B.; CONGIU, M.; MULATO, M.; GRAEFF, C. F. de O. Melanin as an active layer in biosensors. **AIP Advances**, v. 4, p. 037120–1/037120–8, 2014b.
- PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 429–443, 2006.
- POYATOS, J. M.; MUÑO, M. M.; ALMECIJA, M. C.; TORRES, J. C.; HONTORIA, E.; OSORIO, F. Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: State of the Art. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 205, p. 187–204, 2010.
- PROTA, G. An introduction to melanin research. In: **Melanins and Melanogenesis**. [s.l.] Elsevier, 1992a. p. 1–13.
- PROTA, G. **Melanins and melanogenesis**. [s.l.] Academic Press, 1992b.
- QU, X.; KIRSCHENBAUM, L. J.; BORISH, E. T. Hydroxyterephthalate as a fluorescent probe for hydroxyl radicals: application to hair melanin. **Photochemistry and photobiology**, v. 71, p. 307–313, 2000.
- RAPER, H. S. The aerobic oxidases. **Physiological Reviews**, v. 8, p. 245–282, 1928.
- RIBEIRO, E. S.; FRANCISCO, M. S. P.; GUSHIKEM, Y.; GONÇALVES, J. E. **Princípios Básicos de XAS e XPS**. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/02/24/principios-basicos-de-xas-e-xps/>>. Acesso em: 31 jan. 2016.
- SARNA, T.; SWARTZ, H. A. **The physical properties of melanins. in the pigmentary system**. 2nd. ed. Malden: Blackwell Publishing, 2006.

- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Análise Espectroquímica. In: **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [s.l.] Thomson, 2006.
- SOLANO, F. Melanins: Skin Pigments and Much More - Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1–28, 2014.
- SØRENSEN, S.; FALBE-HANSEN, H.; MANGONI, M.; HJORTH, J.; JENSEN, N. R. Observation of DMSO and CH₃S(O)OH from the gas phase reaction between DMS and OH. **J. Atmosph. Chem.**, v. 24, p. 299–315, 1996.
- STARK, K. B.; GALLAS, J. M.; ZAJAC, G. W.; EISNER, M.; GOLAB, J. T. Spectroscopic Study and Simulation from Recent Structural Models for Eumelanin: II. Oligomers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p. 11558–11562, 2003.
- STRAKOSAS, X.; BONGO, M. The organic electrochemical transistor for biological applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 41735, p. 41735/1–41735/14, 2015.
- STRUBE, O. I.; BÜNGELER, A.; BREMSER, W. Site-Specific In Situ Synthesis of Eumelanin Nanoparticles by an Enzymatic Autodeposition-Like Process. **Biomacromolecules**, v. 16, p. 1608–1613, 2015.
- SUBIANTO, S.; WILL, G.; MEREDITH, P. Electrochemical synthesis of melanin free-standing films. **Polymer**, v. 46, p. 11505–11509, 2005.
- TEASDALE, A.; DELANEY, E. J.; EYLEY, S. C.; JACQ, K.; TAYLOR-WORTH, K.; LIPCZYNSKI, A.; HOFFMANN, W.; REIF, V.; ELDER, D. P.; FACCHINE, K. L.; GOLEC, S.; SCHULTE OESTRICH, R.; SANDRA, P.; DAVID, F.; OESTRICH, R. S. A Detailed Study of Sulfonate Ester Formation and Solvolysis Reaction Rates and Application toward Establishing Sulfonate Ester Control in Pharmaceutical Manufacturing Processes. **Organic Process Research & Development**, v. 14, p. 999–1007, 2010.
- THUREAU, P.; ZIARELLI, F.; THÉVAND, A.; MARTIN, R. W.; FARMER, P. J.; VIEL, S.; MOLLICA, G. Probing the motional behavior of eumelanin and pheomelanin with solid-state NMR spectroscopy: New insights into the pigment properties. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, p. 10689–10700, 2012.
- TRAN, M. L.; POWELL, B. J.; MEREDITH, P. Chemical and structural disorder in eumelanins: a possible explanation for broadband absorbance. **Biophysical journal**, v. 90, p. 743–52, 2006.
- VECCHIA, N. F. della; CERRUTI, P.; GENTILE, G.; ERRICO, M. E.; AMBROGI, V.; D'ERRICO, G.; LONGOBARDI, S.; NAPOLITANO, A.; PADUANO, L.; CARFAGNA, C.; ISCHIA, M. Artificial Biomelanin: Highly Light-Absorbing Nano-Sized Eumelanin by Biomimetic Synthesis in Chicken Egg White. **Biomacromolecules**, v. 15, p. 3811–3816, 2014.
- WATT, A. A. R.; BOTHMA, J. P.; MEREDITH, P. The supramolecular structure of melanin. **Soft Matter**, v. 5, p. 3754–3760, 2009.
- WOOD, J. M.; CHAVAN, B.; HAFEEZ, I.; SCHALLREUTER, K. U. Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H₂O₂. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 325, p. 1412–1417, 2004.
- WOOD, J. M.; SHALLREUTER, K. U. Studies on the reactions between human tyrosinase, superoxide anion, hydrogen peroxide and thiols. **Biochemica et biophysica Acta**, v. 1074, p. 378–385, 1991.

- WU, J. J.; MURUGANANDHAM, M.; CHEN, S. H. Degradation of DMSO by ozone-based advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 218–225, 2007.
- WU, T.-F.; HONG, J.-D. Dopamine-Melanin Nanofilms for Biomimetic Structural Coloration. **Biomacromolecules**, v. 16, p. 660–666, 2015.
- WU, T.-F.; HONG, J.-D. Synthesis of water-soluble dopamine–melanin for ultrasensitive and ultrafast humidity sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 178–184, 2016.
- WÜNSCHE, J.; CARDENAS, L.; ROSEI, F.; CICOIRA, F.; GAUVIN, R.; GRAEFF, C. F. O.; POULIN, S.; PEZZELLA, A.; SANTATO, C. In Situ Formation of Dendrites in Eumelanin Thin Films between Gold Electrodes. **Advanced Functional Materials**, v. 23, p. 5591–5598, 2013a.
- WÜNSCHE, J.; CICOIRA, F.; GRAEFF, C. F. O.; SANTATO, C. Eumelanin thin films: solution-processing, growth, and charge transport properties. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, p. 3836–3842, 2013b.
- WÜNSCHE, J.; ROSEI, F.; GRAEFF, C. F. O.; SANTATO, C. Growth and Morphology of Eumelanin Thin Films - A Future Bioelectronic Material? In: 219th ECS Meeting, 2006, **Anais...**2011.
- YAMAZAKI, S. I.; ITOH, S. Kinetic Evaluation of Phenolase Activity of Tyrosinase Using Simplified Catalytic Reaction System. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 13034–13035, 2003.
- YAMAZAKI, S. I.; MORIOKA, C.; ITOH, S. Kinetic evaluation of catalase and peroxygenase activities of tyrosinase. **Biochemistry**, v. 43, p. 11546–11553, 2004.
- ZAJAC, G. W.; GALLAS, J. M.; CHENG, J.; EISNER, M.; MOSS, S. C.; ALVARADO-SWAISGOOD, A. E. The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1199, p. 271–278, 1994.
- ZHANG, Z.; GUO, K.; LI, Y.; LI, X.; GUAN, G.; LI, H.; LUO, Y.; ZHAO, F.; ZHANG, Q.; WEI, B.; PEI, Q.; PENG, H. A colour-tunable, weavable fibre-shaped polymer light-emitting electrochemical cell. **Nature Photonics**, v. 9, p. 233–238, 2015.

APÊNDICES

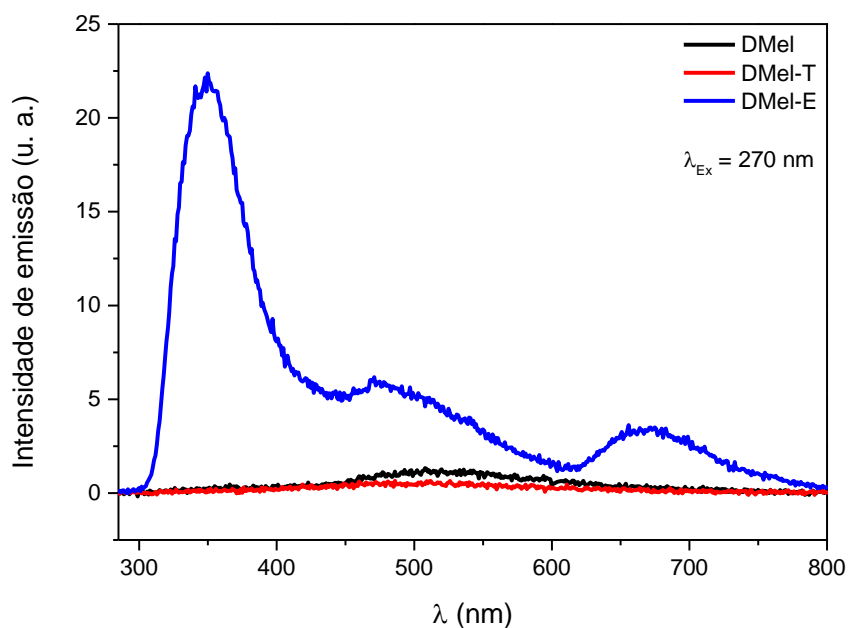
APÊNDICE A - Tripla emissão da melanina sintetizada em DMSO com pressão de O₂

Como apresentado durante o desenvolvimento deste estudo, a alta pressão no reator foi alcançada devido à injeção de gás oxigênio, que também atua como agente oxidante. No caso da síntese em DMSO, tanto a síntese tradicional quanto a aquecida utilizavam, como agente oxidante, o peróxido de benzoíla. Na síntese com 4 atm de pressão de O₂ o peróxido foi substituído pelo oxigênio molecular, o que torna a reação em DMSO mais limpa, devido à ausência de subprodutos derivados do peróxido de benzoíla. Assim, apenas a evaporação do solvente seria suficiente para extração da amostra. Durante as primeiras caracterizações estruturais realizadas, os resultados obtidos foram semelhantes ao que era observado para as outras amostras em DMSO, contudo, o espectro de emissão com excitação (λ_{Ex}) em 270 nm para tal amostra foi diferente aos demais. Por simplicidade, chamarei este derivado com 4 atm de pressão de O₂ com apenas evaporação do solvente no processo de extração de DMel-E.

Como se observa na Figura A1, DMel-E, além de apresentar uma emissão maior em uma ordem de grandeza, ainda apresenta 3 picos de emissão (em 346, 470 e 667 nm) diferentemente das outras amostras. O intrigante neste caso foi o fato da amostra apresentar uma emissão no ultravioleta próximo (346 nm) e também no vermelho (667 nm), ao contrário do esperado na emissão da melanina, geralmente na região entre azul e verde. Além disso, por mais que já houvesse alguns trabalhos que mostravam que a melanina pudesse apresentar um largo pico de emissão composto de duas (às vezes, três) emissões diferentes (GALLAS; EISNER, 1987; BOULTON et al., 1990; FOREST et al., 2000; PERNA et al., 2009; HUIJSER et al., 2010, 2012), seria a primeira vez que três picos separados e em regiões

distintas do espectro eram obtidos. Diante disso, grande esforço foi colocado para tentar entender qual região da estrutura química da DMel-E era responsável por tal característica.

Figura A1 – Espectro de emissão da DMel, DMel-T e DMel-E com $\lambda_{\text{Ex}} = 270 \text{ nm}$



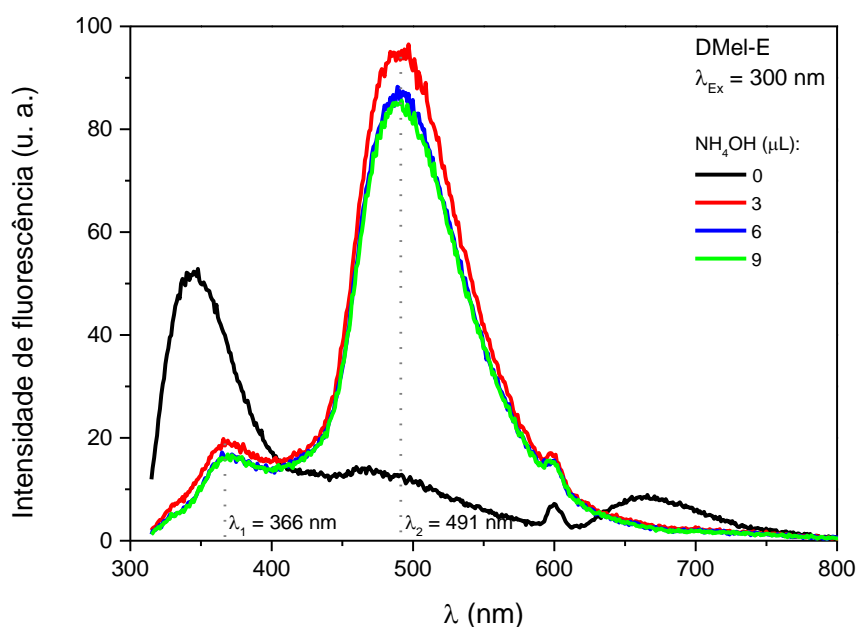
Uma emissão dupla em estruturas semelhantes à DHICA (ácido indol-2-carboxílico e ácido indol-5-carboxílico) foi atribuída ao equilíbrio entre os estados excitados de espécies *zwitterion* e neutras, na qual a formação da primeira, provavelmente, decorre da protonação do nitrogênio indólico (BANGAL; CHAKRAVORTI, 1999). Além disso, a partir de um análogo deuterado do monômero DHICA, foi observado um aumento na intensidade de emissão, sugerindo que a deuteração pudesse diminuir a frequência dos modos vibracionais do solvente e da estrutura DHICA (HUIJSER et al., 2010). Diante disso, Huijser e colaboradores propuseram que a emissão no UV fosse consequência do ânion carboxilato, enquanto que na região do visível pudesse referir aos estados neutros.

Como as caracterizações estruturas das amostras mostravam que DMel-E era similar a DMel e DMel-T e, considerando que o modelo estrutural propunha a existência de um

monômero N-sulfonado e N-metilado (Figura 2), a proposta inicial para explicar tal característica emissiva também era consequência da protonação deste nitrogênio. Além disso, a presença dos grupos sulfonados na estrutura talvez fosse suficiente para fornecer um decaimento não radiativo menos eficiente, de maneira similar a deuteração da DHICA.

Para testar a ideia de que a transferência de prótons pudesse estar acontecendo com a amostra, foi adicionado um pouco de NH_4OH na solução variando de 3 a 9 μL . Devido à afinidade maior do hidróxido com prótons, esperaríamos uma queda na emissão UV da amostra. Como podemos ver na Figura A2, a seguir, tal fato realmente acontece. Tanto a emissão no UV quanto no vermelho sofrem um *quenching*, enquanto que em 491 nm a emissão sofre um *enhancement*. Tal fato corrobora com a ideia de que uma transferência de prótons.

Figura A2 – Espectro de emissão da DMel-E com 0, 3, 6 e 9 μL de NH_4OH



Sabe-se que a DMel libera os grupos sulfonados das hidroxilas fenólicas (BRONZE-UHLE et al., 2013). Assim o aumento na emissão na região visível poderia ser consequência

de alguma modificação estrutural nesta parte da molécula. Tentando comprovar tal influência na molécula, foi estudada a variação da emissão durante um determinado período de tempo, Figura A3. Como pode ser observado na Figura A3(a), na ausência do hidróxido de amônio não ocorrem mudanças no espectro. Por outro lado, quando adiciona-se 3 μL , Figura A3(b), notamos que o sinal em 491 nm vai diminuindo com o tempo. Mesmo o NH_4OH sendo uma base fraca, acreditamos que quando concentrada, como no caso do estudo, pode liberar os grupos sulfonados da estrutura. Diante disso, foi assumido que a diminuição do sinal poderia ser consequência da diminuição de grupos sulfonados na estrutura com o passar do tempo.

Levando em consideração a importância do nitrogênio para a emissão no UV, uma análise estrutural mais profunda nesta região foi necessária. Para tal, duas caracterizações estruturais foram realizadas para as três amostras (DMel, DMel-T e DMel-E): ^{15}N RMN e XPS para o núcleo de N_{1s} .

A partir do espectro de NMR de ^1H - ^{15}N , pouca informação foi adquirida. Obtivemos, apenas para DMel-E, um sinal perto de 23 ppm o qual pode ser atribuído a presença de alguma estrutura do tipo N^+ . Já as medidas de XPS, como pode ser observado na Figura A4, estavam de acordo com o encontrado na literatura (CLARK et al., 1990; BERNSMANN et al., 2009). Conforme se percebe, duas contribuições atribuídas à $-\text{NH}-$ e $-\text{N}=\text{}$ estão presentes nas três amostras, enquanto a contribuição $-\text{NH}_2$ pode ser vista apenas para DMel-E. Segundo Clark *et al* (CLARK et al., 1990), o sinal centrado em 401 eV referente ao grupo amina (NH_2) também pode ser atribuído a presença de N^+ na amostra. Portanto, considerando que a L-DOPA pode existir numa estrutura neutra ou protonada, atribuímos que este sinal refere-se à presença do reagente como impureza na amostra após o processo de extração.

Figura A3 - Espectro de emissão com excitação em 300 nm para DMel-E variando no tempo com 0 μL (a) e 3 μL (b) de NH_4OH .

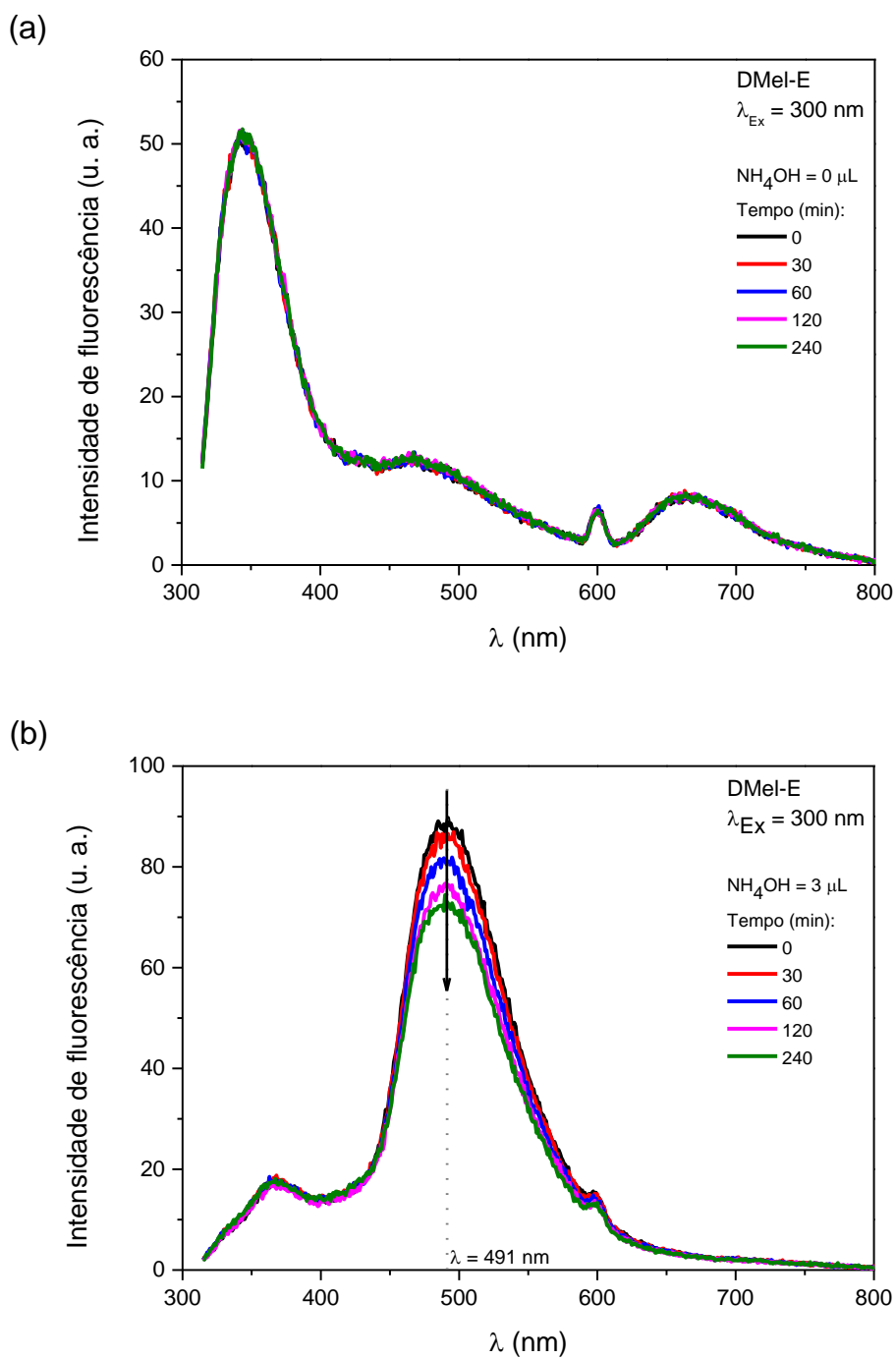
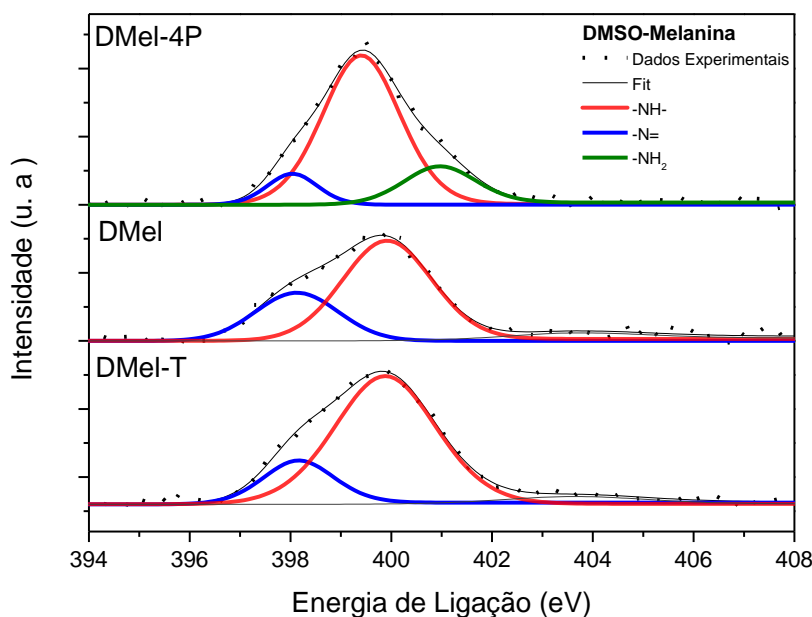
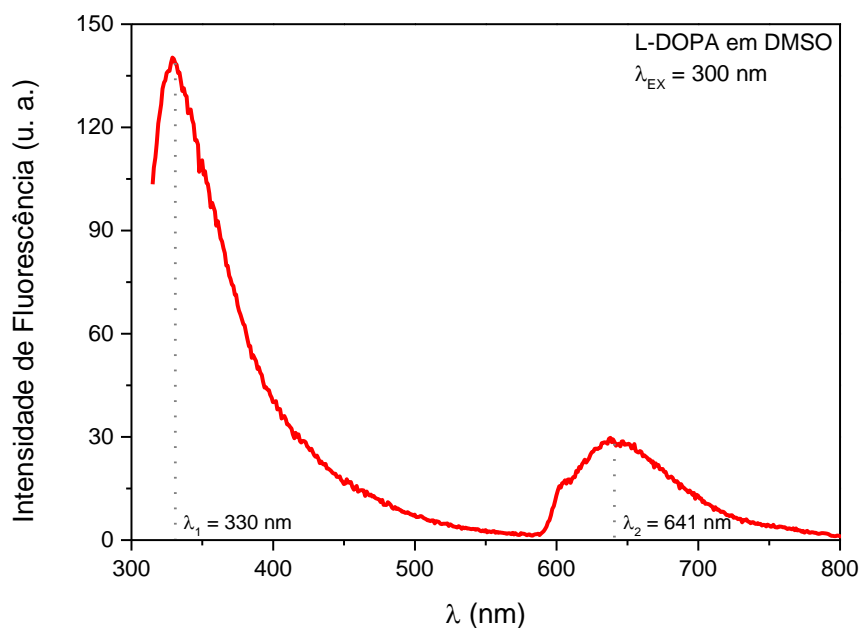


Figura A4 – Sinal de XPS do núcleo de N_{1s} da DMel-E em comparação com DMel e DMel-T.



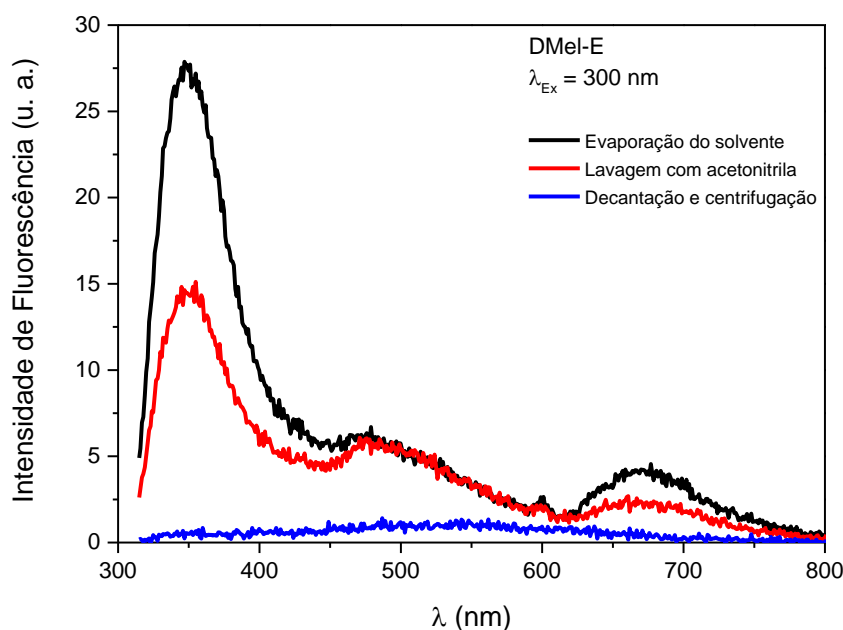
Diante da suposição anterior, obtivemos o espectro de emissão da L-DOPA em DMSO com excitação em 300 nm. Como observado na Figura A5, o espectro obtido apresenta os dois picos externos novos da DMel-E, o que leva a crer que o processo de evaporação não é suficiente para purificar a amostra.

Por fim, para verificar a presença da impureza de L-DOPA, foi adicionado 1 mL de acetonitrila em 5 mg da amostra DMel-E e foi deixado em vigorosa agitação por 2 horas. Após este tempo, considerando a insolubilidade da melanina no solvente, a solução ficou em repouso e após a decantação da amostra, o sobrenadante foi removido. Este procedimento foi repetido duas vezes. Após esta etapa, amostra foi novamente seca em estufa a 90°C e dissolvida em DMSO para que fosse medido seu espectro de emissão. Como a L-DOPA é solúvel em acetonitrila, esperava-se que parte dela estivesse dissolvida no sobrenadante que foi retirado e assim ocorresse um *quenching* na emissão. Essa diminuição da intensidade de emissão da DMel-E no UV e vermelho é observada, como pode visto na Figura A6, o que indica que realmente existe a presença de impurezas na amostra.

Figura A5 – Espectro de emissão da L-DOPA em DMSO em $\lambda_{\text{EX}} = 300 \text{ nm}$ 

Contudo, a partir de tal procedimento, ainda não poderia ser descartado que DMel-E apresentasse alguma modificação estrutural que fosse responsável pelo sinal de emissão remanescente ou se ele ainda era sinal de impurezas da L-DOPA. Diante disto, um segundo experimento foi realizado. Neste último experimento, uma nova síntese foi feita e, ao invés de apenas evaporar o solvente, todo o procedimento de extração utilizado para DMel e DMel-T (vide tópico 3.2) foi realizado. Como pode ser também observado na Figura A6, a emissão no UV e vermelho foram eliminados, confirmando que o sinal triplo obtido era, na verdade, apenas impurezas do reagente utilizado e que o sinal de emissão da melanina sintetizada em DMSO também é obtido na região entre azul e verde do espectro eletromagnético.

Figura A6 – Espectro de emissão da DMel-E com excitação em 300 nm após diferentes tipos de purificação



Procedimento experimental:

RMN de ^1H - ^{15}N :

A medida de NMR de ^1H - ^{15}N foram realizadas em solução de 75 mg/mL para as amostras de DMSO-Melanina no aparelho BRUKER AV III HD 400 MHz, pelo pesquisador Dr. Daniel Rentsch no Laboratório Federal de Ciência e Tecnologia de Materiais da Suíça (EMPA).

XPS:

As medidas de XPS das DMSO-Melaninas foram realizadas na forma de filmes finos. As amostras foram dissolvidas em DMSO para obter uma solução de 15 mg/mL que foi mantida em agitação por 30 minutos e filtrada para posteriormente ser spin-coated sobre o substrato de ITO a 4000 rpm durante 30 s. As medidas foram realizadas em um equipamento ESCALAB 250 Xi da Thermo Scientific, com fonte monocromática de $\text{AlK}\alpha$

($h\nu = 1486,7$ eV) e tamanho de feixe de 650 micrometros. As proporções atômicas e fittings foram calculadas de maneira semelhante ao descrito anteriormente para o núcleo de N_{1s} . Os espectros foram obtidos pela prof. Dra. Maria Luiza Rocco no Instituto de Química da Universidade de Federal do Rio de Janeiro.

Fotoluminescência:

Para realização das medidas de fotoluminescência, primeiramente foram feitas soluções estoque de 5 mg/mL para as diferentes amostras de DMSO-Melanina. Estas soluções foram postas em agitação por 1 hora visando melhor diluição e foi posteriormente filtrada com uma membrana de celulose não estéril de 0,2 μm de poro. Por fim, 50 μL da solução estoque foram diluídas em 3 mL de DMSO. As medias foram realizadas com uma cubeta de quartzo utilizando um espectrofotômetro de fluorescência modelo Cary Eclipse da marca Varian.

Referências

- BANGAL, P. R.; CHAKRAVORTI, S. Excited State Proton Transfer in Indole-2-carboxylic Acid and Indole-5-carboxylic Acid. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, p. 8585–8594, 1999.
- BERNSMANN, F.; PONCHE, A.; RINGWALD, C.; HEMMERLE, J.; RAYA, J.; BECHINGER, B.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P.; BALL, V. Characterization of dopamine-melanin growth on silicon oxide. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 8234–8242, 2009.
- BOULTON, M.; DOCCHIO, F.; DAYHAW-BARKER, P.; RAMPONI, R.; CUBEDDU, R. Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. **Vision research**, v. 30, p. 1291–1303, 1990.
- BRONZE-UHLE, E. S.; BATAGIN-NETO, A.; XAVIER, P. H. P.; FERNANDES, N. I.; GRAEFF, C. F. O. Synthesis and characterization of melanin in DMSO. **Journal of Molecular Structure**, v. 1047, p. 102–108, 2013.
- CLARK, M. B.; GARDELLA, J. A.; SCHULTZ, T. M.; PATIL, D. G.; SALVATI, L. Solid-state analysis of eumelanin biopolymers by electron spectroscopy for chemical analysis. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 949–956, 1990.
- FOREST, S. E.; LAM, W. C.; MILLAR, D. P.; NOFSINGER, J. B.; SIMON, J. D. A model for the activated energy transfer within eumelanin aggregates. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 811–814, 2000.

GALLAS, J. M.; EISNER, M. Fluorescence of melanin-dependence upon excitation wavelength and concentration. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, p. 595–600, 1987.

HUIJSER, A.; PEZZELLA, A.; HANNESTAD, J. K.; PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A.; D'ISCHIA, M.; SUNDSTRÖM, V. UV-Dissipation Mechanisms in the Eumelanin Building Block DHICA. **ChemPhysChem**, v. 11, p. 2424–2431, 2010.

HUIJSER, A.; RODE, M. F.; CORANI, A.; SOBOLEWSKI, A. L.; SUNDSTRÖM, V. Photophysics of indole-2-carboxylic acid in an aqueous environment studied by fluorescence spectroscopy in combination with ab initio calculations. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 14, p. 2078–86, 2012.

PERNA, G.; FRASSANITO, M. C.; PALAZZO, G.; GALLONE, A.; MALLARDI, A.; BIAGI, P. F.; CAPOZZI, V. Fluorescence spectroscopy of synthetic melanin in solution. **Journal of Luminescence**, v. 129, p. 44–49, 2009.

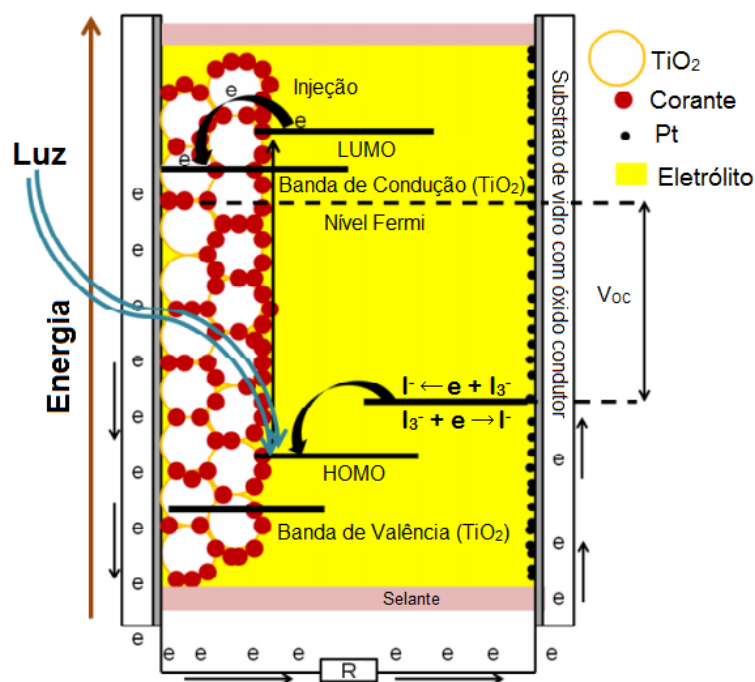
APÊNDICE B - Síntese eletroquímica da melanina em TiO₂

Devido ao aumento crescente na demanda por energia, existe um grande interesse por fontes alternativas de energia. Entre as mais variadas possíveis, o sol tem atraído bastante atenção por causa de seu potencial como uma fonte de energia limpa e abundante.

O campo de conversão de energia solar é bastante diverso e abundante, possuindo muitos materiais e dispositivos para converter a radiação solar em eletricidade. Dentre eles, as células solares sensibilizadas por corantes (*dye sensitized solar cell*, DSSC, no inglês) são uma alternativa técnica e economicamente viáveis para dispositivos fotovoltaicos, comparados às células solares de silício.

As DSSC são células solares híbridas, ou seja, combinam materiais orgânicos (corantes) com nanopartículas inorgânicas. Conforme apresentado na Figura B1, elas são compostas por duas superfícies condutoras (ITO ou FTO), na qual, em uma delas é depositado um filme poroso de óxido semiconductor nanocristalino (TiO₂, ZnO) que será recoberto por um corante e na outra superfície, um catalizador (platina ou carbono) é depositado. Entre estes dois eletrodos, adiciona-se um eletrólito líquido ou em gel (geralmente o par redox iodo/iodeto). Nestes dispositivos, o fóton de luz é absorvido pelo corante gerando um fotoelétron que é injetado na banda de condução do semiconductor. Por difusão, o elétron chega ao ânodo e passa por um circuito até o cátodo. Neste momento, o catalisador possibilita as reações de redução do eletrólito e a molécula oxidada do corante é reduzida ao estado original através de um par redox do eletrólito (CHAWALA; TRIPATHI, 2015; SHALINI et al., 2015; SUGATHAN; JOHN; SUDHAKAR, 2015; SUN; LIANG; CHEN, 2015; WU et al., 2015).

Figura B1 - Representação da estrutura básica de uma DSSC.



Fonte: Adaptado de (JENA et al., 2012).

Como o material orgânico é responsável por absorver o fóton e transformá-lo em energia elétrica, grande esforço tem sido realizado para conseguir um corante eficiente para as DSSCs. Entre as características necessárias para um bom corante, podemos citar (SUGATHAN; JOHN; SUDHAKAR, 2015):

- i. boa aderência na superfície do óxido visando garantir a injeção do elétron na banda de condução do mesmo;
- ii. LUMO maior que a banda de condução do óxido para garantir uma boa injeção de elétron.
- iii. HOMO menor que sua taxa de condução de buraco para obter uma maior eficiência no processo de regeneração, e;
- iv. alta absorção da luz do UV-Vis-NIR para conseguir ter uma melhor eficiência no processo de absorção da luz solar.

Entre a vasta gama de corantes já testados, materiais que apresentam metais de transição (como os complexos de ósmio, rênio e rutênio) geralmente apresentam as melhores eficiências nas DSSC (CHAWALA; TRIPATHI, 2015). Contudo, tais metais de transição são limitados em quantidade, são caros, poluentes e suas sínteses são complicadas, fazendo com que surja a necessidade de alternativas para substituí-los (CHAWALA; TRIPATHI, 2015). Devido ao baixo custo sintético, eficiência, viabilidade, toxicidade e biodegradabilidade, corantes naturais que pode ser encontrados por toda a flora estão sendo extensivamente investigados como uma forma de substituição dos corantes organo-metálicos nas DSSCs (LAI et al., 2008; FURUKAWA et al., 2009; BURKE; LIPOMI, 2013; SHALINI et al., 2015).

Diante disto, as melaninas surgem como um material bastante interessante para atuar como sensibilizante, devido à presença de grupos funcionais em suas estruturas que podem servir como grupos ancoradores aos óxidos, tais como as hidroxilas e carboxilas. Além disso, as melaninas possuem ampla faixa de absorção do espectro eletromagnético desde o UV até IF e por ser quimicamente estáveis em água ou atmosfera ambiente. Contudo, mesmo com as vantagens, as melaninas sintetizadas tradicionalmente podem formar agregados, o que limita seu contato com o óxido. Ainda, é possível que o fotoelétron formado não difunda completamente até os poros do óxido devido ao alto número de defeito em sua estrutura a tornando mais um filtro óptico do que um corante sensibilizador (MEREDITH et al., 2005). Assim, sintetizar a melanina diretamente sobre a superfície oxidada poderia ser uma alternativa para atingir uma melhor injeção eletrônica da melanina no óxido condutor.

Portanto, a ideia inicial de sintetizar melanina diretamente no TiO_2 a partir de métodos eletroquímicos visava uma reação de polimerização controlada e com morfologia e espessura específicas de tal forma a obter valores de eficiência comparáveis aos corantes naturais. A utilização de procedimentos eletroquímicos tem atraído cada vez mais a atenção de químicos sintéticos uma vez que podem cumprir os requisitos necessários da Química Verde e serem de

interesse industrial (SPERRY; WRIGHT, 2006; FRONTANA-URIBE et al., 2010). Além disto, através de métodos eletroquímicos geralmente se obtém uma estrutura com maior regularidade e maior potencial redox (GIDANIAN; FARMER, 2002).

É importante mencionar que as sínteses eletroquímicas realizadas foram baseadas no trabalho de SUBIANTO, WILL e MEREDITH (2005). Assim, este estudo considerado encerrado prematuramente após encontrarmos uma patente dos mesmos com o procedimento eletroquímico (Número de publicação: WO 2005026216 A1). Por fim, destaco que este trabalho foi realizado em colaboração com Mirko Congiu, aluno de doutorado do prof. Carlos Graeff. A seguir descrevo os resultados preliminares obtidos.

Procedimento experimental:

Os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich e usados sem maiores purificações. A síntese eletroquímica foi realizada usando um potenciostato ECO CHEMIE PGSTAT 202, numa configuração de dois eletrodos, e foi baseada nos procedimentos de SUBIANTO et al., 2005.

0,05 M de L-DOPA e 0,1 M de KCl foram dissolvidos em 15,0 mL de uma solução tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,2. O ânodo na configuração de dois eletrodos era um filme de 0,25 cm² de TiO₂ depositado em FTO pelo método de *screen-printing* e o cátodo utilizado foi um fio de cobre, ambos separados por uma distância de 2,0 cm. Durante o processo de polimerização, foi utilizada uma ddp de 1,4 V.

Dois procedimentos foram realizados para polimerização: o primeiro utilizava corrente contínua por 1h e o segundo 100 pulsos de corrente de mesma intensidade, sendo 10 s com e 10 s sem corrente. Todas as reações de polimerização foram feitas em atmosfera ambiente e não houve a formação de gás na solução. O filme resultante foi lavado por imersão em água

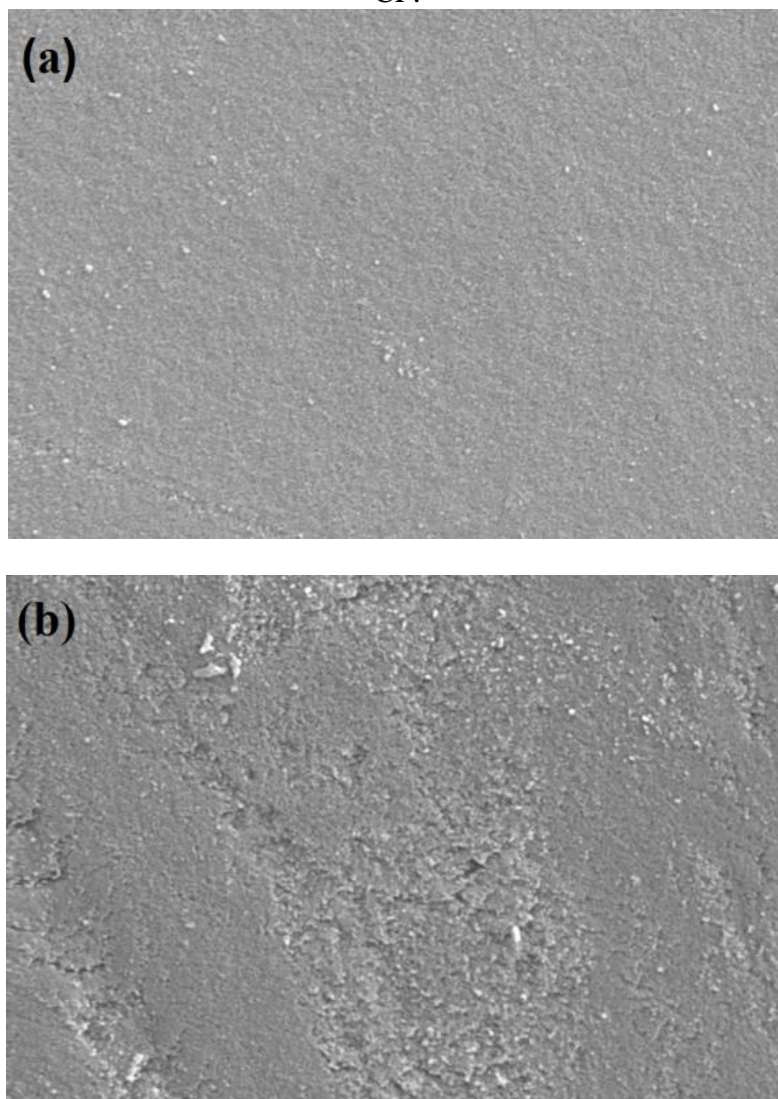
MiliQ e seco no ar atmosférico. A melanina formada através da síntese em corrente contínua será chamada de CC e com pulsos de corrente CP.

Resultados e Discussões

Conforme mencionado, dois tipos de procedimentos da síntese eletroquímica foram utilizados neste trabalho. A primeira consiste na aplicação da corrente elétrica de maneira contínua durante 1 hora, enquanto que no segundo a corrente era aplicada por 10 s seguido de um intervalo de mesma duração com corrente nula.

Para analisar a morfologia dos filmes a partir dos dois procedimentos, medidas de MEV foram realizadas. As imagens obtidas são apresentadas na Figura B2, a seguir. Conforme pode ser visto, CC possui uma superfície mais homogênea que CP, o que sugere que os pulsos elétricos durante o processo de polimerização ocasionam defeitos mecânicos durante o processo de crescimento do filme orgânico. Ademais, também nota-se que são obtidos filmes contínuos de melanina, sem a presença de grãos conforme visto para as melaninas naturais ou quimicamente sintetizada (ZAJAC et al., 1994).

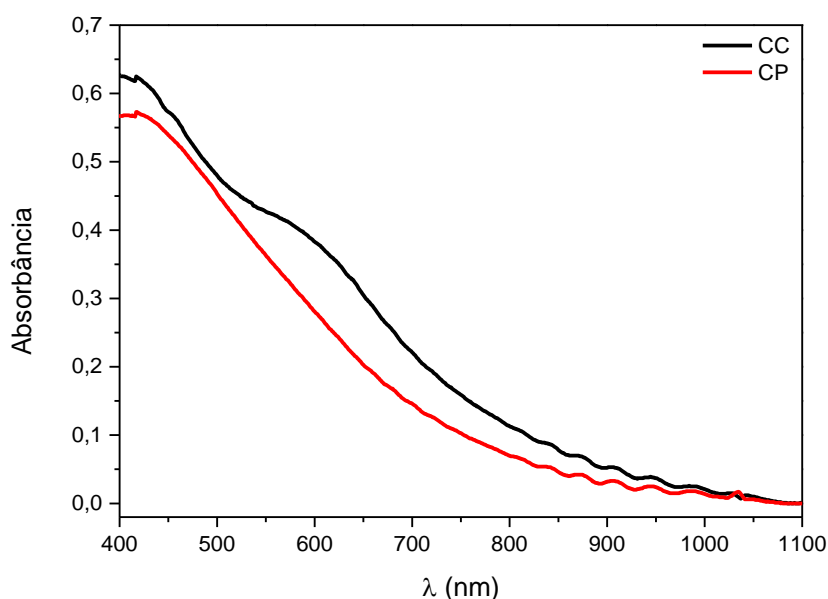
Figura B2 – Imagens de MEV para as amostras com ampliação de 10k vezes: (a) CC e (b) CP.



Na Figura B3 é mostrado o espectro de absorção das melaninas eletrossintetizadas. As medidas foram realizadas com o aparelho *UV-Vis-Spectrophotometers (UVmini-1240)* da Shimadzu, com varredura de 400-1100 nm. Como branco, utilizou-se filme de TiO_2 semelhante ao utilizado nas sínteses. Como pode se observar na Figura B3, a absorbância das amostras é caracterizada por um espectro de banda larga que aumenta exponencialmente para o ultravioleta, de maneira semelhante aos obtidos durante os processos sintéticos tradicionais e com pressão de O_2 . Esse espectro sugere que mesmo com o procedimento eletroquímico, o material obtido apresenta desordem estrutural. A intensa absorção obtida para a amostra CC

comparada com CP pode ser consequência de uma maior formação da melanina, decorrente do maior tempo de corrente entre os eletrodos durante o processo sintético.

Figura B3 – Espectro de Absorbância das melaninas eletrodepositadas.

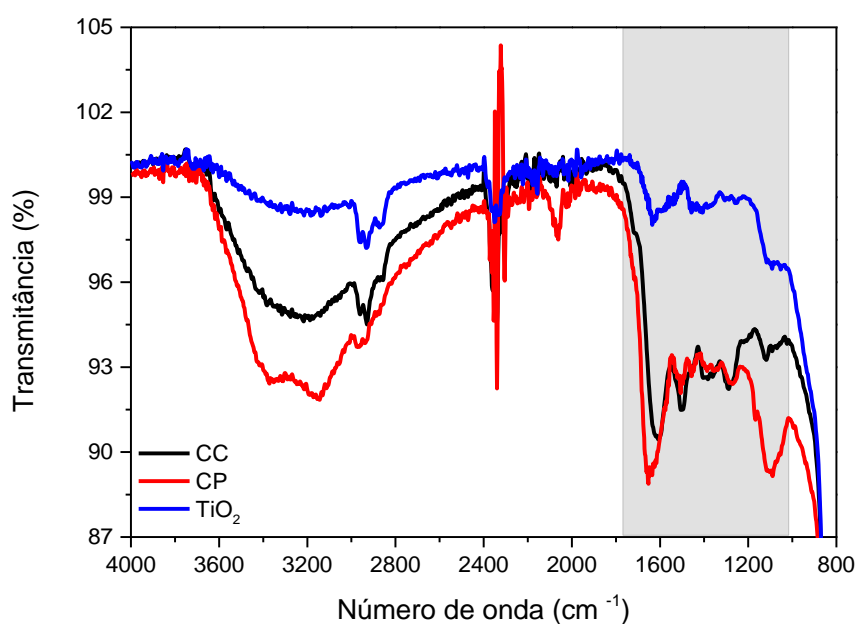


Para a verificação de possíveis alterações estruturais entre as amostras, os espectros de FTIR, Figura A4, foram obtidos utilizando espectrofotômetro modelo VERTEX 70 da marca BRUKER. A região utilizada para a obtenção das medidas foi de 4000 a 800 cm^{-1} no modo ATR (Refletância Total Atenuada) em temperatura ambiente. Como é possível ser observado, os espectros apresentam um comportamento semelhante, entretanto em CC e CP existe a presença de algumas novas bandas na região em destaque, provavelmente devido à polimerização da melanina no TiO_2 .

A ampla banda entre 2500 e 3650 cm^{-1} é associada ao alongamento de ligações OH. Em, 2970 cm^{-1} e 2350 cm^{-1} , temos a presença de água residual e CO_2 , respectivamente. Na região em destaque, podemos observar a presença de grupo carbonila ($-\text{C}=\text{O}$) é evidente devido à presença da banda entre 1728 e 1550 cm^{-1} . Além disso, também é possível observar a ligação C-N ou ligação NH curva (1500 cm^{-1}), uma vibração do anel indólico ou um

alongamento da ligação CNC (1381 cm^{-1}), o alongamento da ligação C-OH fenólica ou ao OH do grupo carboxílico (1280 cm^{-1}) e uma deformação no plano das ligações CH (1095 cm^{-1}) (CENTENO; SHAMIR, 2008). Observa-se que as bandas da região em destaque são praticamente constante, com exceção das bandas 1630 cm^{-1} e 1095 cm^{-1} que sofreram um aumento para CP com relação a CC. Diante disso, este resultado sugere que o processo pulsado de polimerização ocasiona uma maior proporção de monômeros formadores da melanina carboxilados ou, pelo menos, menor proporção de estruturas na forma reduzidas (veja Figura 3).

Figura B4 – Espectro de FTIR melaninas eletrodepositadas.



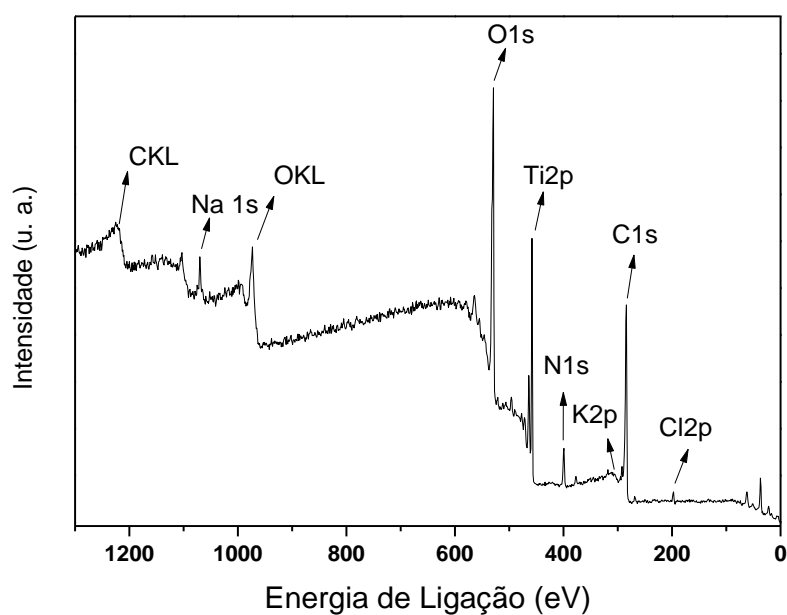
Os filmes das amostras CC e CP também foram caracterizados pela técnica de XPS de maneira semelhante ao descrito no Apêndice A. Os espectros foram obtidos pela prof. Dra. Maria Luiza Rocco no Instituto de Química da UFRJ.

Na Figura B5(a) e Figura B5(b) é possível observar os espectros de XPS dos filmes das amostras CC e CP, respectivamente, e na Tabela B1 a composição atômica da superfície dos

filmes em porcentagem. Como o espectro do TiO_2 não é modificado pelos métodos eletroquímicos utilizados (Figura B6), os valores apresentados estão normalizados pela quantidade de titânio (Ti_{2p}) presente em cada uma das amostras.

Figura B5– Avaliação do espectro de XPS para a) CC e b) CP

(a)



(b)

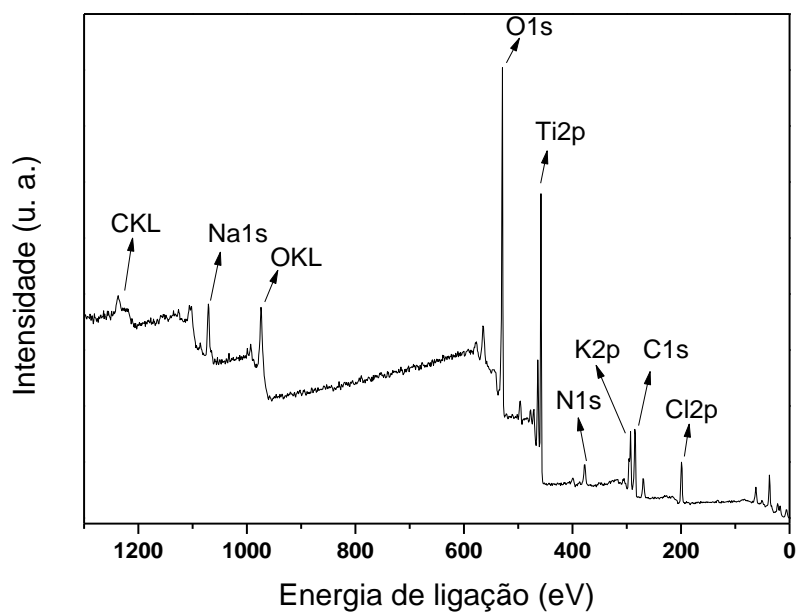


Tabela B1 – Composição atômica (em %) da superfície dos filmes CC e CP, normalizado pela proporção de Ti.

Amostra	Cl _{2p}	C _{1s}	K _{2p}	N _{1s}	O _{1s}	Na _{1s}
CC	0,18	7,98	0,02	0,86	4,98	0,34
CP	0,58	1,89	0,50	0,23	2,98	0,35

A partir da análise elementar superficial das amostras, podemos aferir um notável aumento da presença de C, N e O demonstrando o maior aumento da polimerização da L-DOPA na amostra CC em comparação com CP, de maneira semelhante ao observado pelo espectro de absorbância na Figura A3. Por outro lado, podemos notar que a quantidade de Cl e K sofre uma intensa queda enquanto que a concentração de Na é praticamente constante em ambas as amostras.

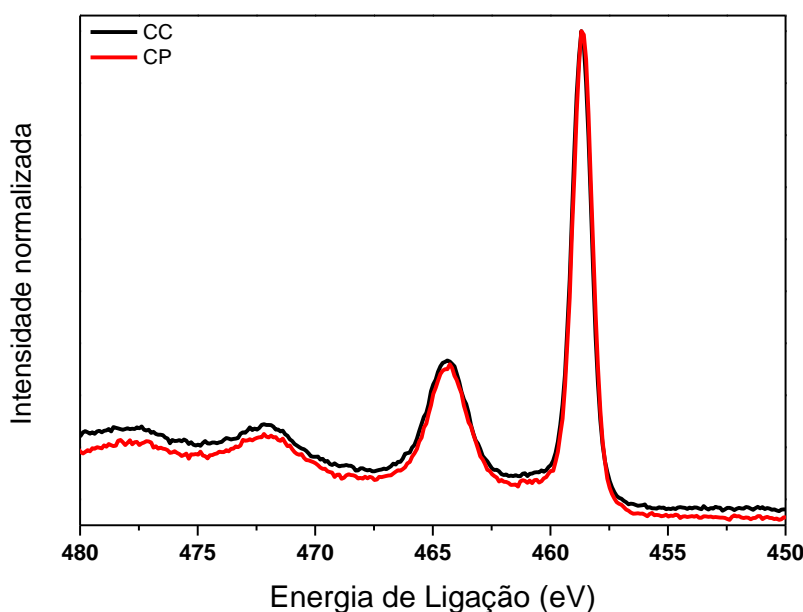
Sabe-se que a melanina apresenta grande potencial para se ligar a diversos metais, devido a sua estrutura possuir grupos como aminas, ácidos carboxílicos, semiquinonas e hidroxilas fenólicas (PEZZELLA; WÜNSCHE, 2013). Contudo, também já foi mostrado que metais como K e Na (e outros metais mais leves) não possuem grande afinidade de ligação com o pigmento (PEZZELLA; WÜNSCHE, 2013). Levando em consideração tais características, é possível que a presença dos íons de K, Na e Cl obtidos no espectro de XPS seja consequência, em grande parte, de seu aprisionamento no interior da estrutura polimérica.

Diante disto, podemos pressupor que durante a passagem de corrente no meio reacional, a polimerização aconteceria paralelamente ao eletrodo de maneira regular, dificultando a difusão de tais íons para o interior do filme. Por outro lado, na ausência de corrente, tal blindagem cessaria permitindo que os íons se difundam com mais facilidade por entre as estruturas formadas durante a polimerização. Portanto, durante o processo com corrente contínua, a blindagem atrapalharia a difusão dos íons pela estrutura limitando a quantidade no interior da estrutura. Já no processo com corrente pulsada, tais íons teriam possibilidade de penetrar na estrutura da melanina quando a corrente fosse nula, ou seja, quando não houvesse

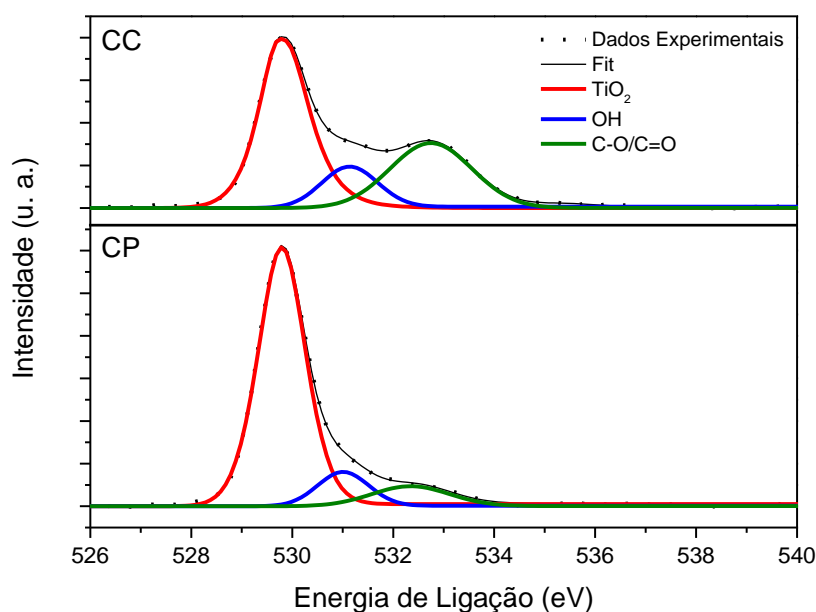
polimerização, isto é, sem blindagem. Neste caso, quando a corrente fosse novamente aplicada, o filme de melanina voltaria a crescer afastando os íons difundidos da superfície até o momento em que a corrente se anulasse mais uma vez, permitindo o fluxo de íons e formando um ciclo de polimerização e difusão.

Desta maneira, considerando que a taxa de difusão é dependente do tamanho da partícula difundida e considerando que o raio iônico (R) obedece a relação $R_{Na} < R_K < R_{Cl}$, é esperado que exista uma maior proporção de Cl e K na amostra CP, do que em CC, mesmo após lavagem com água MiliQ. Como o tamanho do raio iônico do Na é menor que dos outros dois íons, é possível que sua difusão não seja limitada pelo processo de blindagem, proporcionando quantidade semelhante em ambos os filmes.

Figura B6 – Espectro de alta resolução de XPS para Ti_{2P} das amostras CC e CP. Os espectros foram normalizados pelo pico de maior intensidade.



Para analisar a proporção de oxigênio nas amostras, o espectro de XPS para o núcleo de O_{1s} foi obtido. O espectro é apresentado na Figura B7, enquanto que a análise quantitativa é apresentada na Tabela B2.

Figura B7 – Espectro de XPS para o núcleo de O_{1s} .**Tabela B2** - Análise quantitativa obtida a partir do *fitting* da curva do espectro do núcleo O_{1s} normalizados pela porcentagem de TiO_2 (em 530,0 eV).

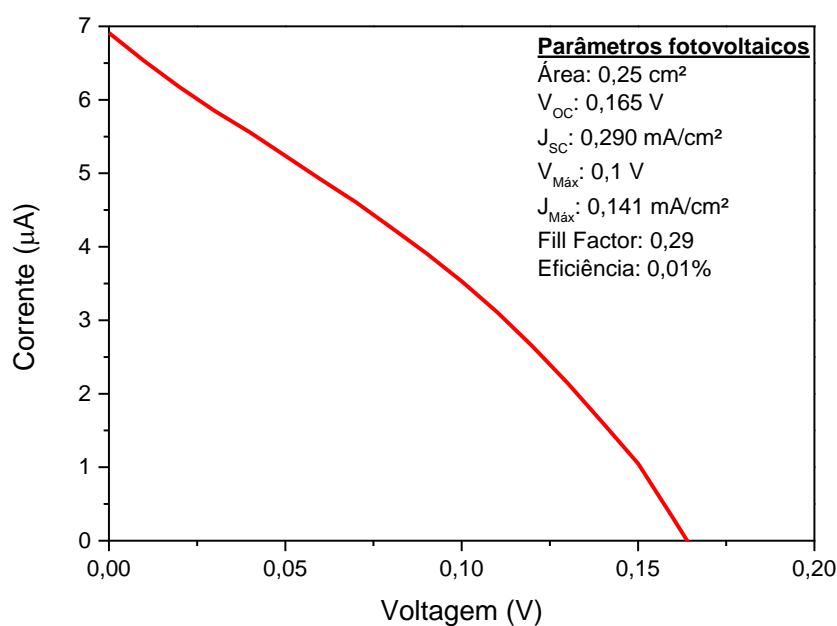
Amostra	OH	C-O/C=O
CC	0,37 (531.2 eV)	0,6 (532.7 eV)
CP	0,15 (531.1 eV)	0,12 (532.4eV)

A partir do *fitting* da curva do espectro de O_{1s} podemos observar um grande aumento em CC da intensidade das contribuições C-O/C=O por um fator de 5 e também um aumento na contribuição do grupo OH por um fator de 2,5 comparando com CP. Esse resultado descreve uma aumento na proporção de monômeros em estados oxidados em CP, de maneira semelhante ao obtido com o espectro de FTIR ou diminuição da cadeia carbônica devido à menor polimerização, conforme observado o espectro de absorvância.

Um teste preliminar do desempenho fotovoltaico da DSSC sensibilizada com a melanina eletrodepositada com corrente pulsada foi efetuado utilizando os materiais tradicionais como o par iodo-iodeto para o eletrólito e platina como contraeletrodo utilizando

uma lâmpada com intensidade padrão de 100 mW/cm^2 para simular a luz solar. O resultado obtido neste teste pode ser observado na Figura B8 juntamente com os parâmetros fotovoltaicos da DSSC.

Figura B8 – Curva IV de uma DSSC utilizando CP como corante.



A baixa eficiência da DSSC pode ser consequência do baixo potencial de circuito aberto da DSSC com 165 mV. Esse resultado é bastante semelhante aos valores encontrados na literatura para o corante comercial *crystal violet* que vale aproximadamente 0,188 V, no qual os autores acreditam que a razão para esse baixo V_{OC} seja a baixa intensidade de absorção e emissão do corante (LAI et al., 2008). Este resultado também é semelhante aos corantes de trifetilamina tipo p que apresenta um V_{OC} entre 0,123 e 0,144 V, devido à taxa de recombinação e injeção de buraco no fotoeletrodo (ZHU et al., 2014). Por fim, é possível que a célula montada seja bastante resistiva, o que também ocasionaria uma queda em sua eficiência.

Mesmo que não apresente uma eficiência satisfatória nas DSSCs, a melanina possui algumas vantagens sobre os corantes mais tradicionais: intensa absorção por toda a faixa UV-vis do espectro eletromagnético, quimicamente estável, não é tóxica e a síntese é simples e barata. Neste último aspecto, o uso da síntese eletroquímica pode ser bastante atraente do ponto de vista de processo industrial, uma vez que a síntese e a coloração do óxido acontecem ao mesmo tempo, reduzindo o tempo de manufatura das células. Diante disto, a célula solar sensibilizada com melanina pode ser um material interessante para ser utilizado onde apenas uma pequena quantidade de energia é necessária, porém ainda são necessários estudos complementares visando um aumento em sua eficiência. Acredita-se que isso possa ser alcançado compondo as células solares com diferentes combinações de materiais, seja óxido, eletrólito ou mesmo o contra eletrodo.

Referências:

BURKE, D. J.; LIPOMI, D. J. Green chemistry for organic solar cells. **Energy & Environmental Science**, v. 6, p. 2053–2066, 2013.

CENTENO, S. A.; SHAMIR, J. Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art. **Journal of Molecular Structure**, v. 873, p. 149–159, 2008.

CHAWALA, P.; TRIPATHI, M. Novel improvements in the sensitizers of dye-sensitized solar cells for enhancement in efficiency - a review. **International journal of energy research**, v. 39, p. 1579–1596, 2015.

FRONTANA-URIBE, B. a.; LITTLE, R. D.; IBANEZ, J. G.; PALMA, A. A.; VASQUEZ-MEDRANO, R. Organic electrosynthesis: a promising green methodology in organic chemistry. **Green Chemistry**, v. 12, p. 2099–2119, 2010.

FURUKAWA, S.; IINO, H.; IWAMOTO, T.; KUKITA, K.; YAMAUCHI, S. Characteristics of dye-sensitized solar cells using natural dye. **Thin Solid Films**, v. 518, p. 526–529, 2009.

GIDANIAN, S.; FARMER, P. J. Redox behavior of melanins: Direct electrochemistry of dihydroxyindole-melanin and its Cu and Zn adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 89, p. 54–60, 2002.

JENA, A.; MOHANTY, S. P.; KUMAR, P.; NADUVATH, J.; GONDANE, V.; LEKHA, P.; DAS, J.; NARULA, K. K.; MALLICK, S.; BHARGAVA, P. Dye Sensitized Solar Cells: A Review. **Transactions of the Indian Ceramic Society**, v. 71, p. 1–16, 2012.

LAI, W. H.; SU, Y. H.; TEOH, L. G.; HON, M. H. Commercial and natural dyes as photosensitizers for a water-based dye-sensitized solar cell loaded with gold nanoparticles.

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, v. 195, p. 307–313, 2008.

MEREDITH, P.; POWELL, B. J.; RIESZ, J.; VOGEL, R.; BLAKE, D.; KARTINI, I.; WILL, G.; SUBIANTO, S. Broadband Photon-harvesting Biomolecules for Photovoltaics. In: COLLINGS, A. F.; CRITCHLEY, C. (Ed.). **Artificial Photosynthesis: From Basic Biology to Industrial Application**. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. p. 37–65.

PEZZELLA, A.; WÜNSCHE, J. Eumelanin: An Old Natural Pigment and a New Material for Organic Electronics - Chemical, Physical, and Structural Properties in Relation to Potential Applications. In: CICOIRA, F.; SANTATO, C. (Ed.). **Organic Electronics: Emerging Concepts and Technologies**. 1. ed. [s.l.] Wiley-VCH, 2013. p. 113–137.

SHALINI, S.; BALASUNDARA PRABHU, R.; PRASANNA, S.; MALLICK, T. K.; SENTHILARASU, S. Review on natural dye sensitized solar cells: Operation, materials and methods. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 1306–1325, 2015.

SPERRY, J. B.; WRIGHT, D. L. The application of cathodic reductions and anodic oxidations in the synthesis of complex molecules. **Chemical Society reviews**, v. 35, p. 605–621, 2006.

SUBIANTO, S.; WILL, G.; MEREDITH, P. Electrochemical synthesis of melanin free-standing films. **Polymer**, v. 46, p. 11505–11509, 2005.

SUGATHAN, V.; JOHN, E.; SUDHAKAR, K. Recent improvements in dye sensitized solar cells: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 54–64, 2015.

SUN, Z.; LIANG, M.; CHEN, J. Kinetics of Iodine-Free Redox Shuttles in Dye-Sensitized Solar Cells: Interfacial Recombination and Dye Regeneration. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, p. 1541–1550, 2015.

WU, J.; LAN, Z.; LIN, J.; HUANG, M.; HUANG, Y.; FAN, L.; LUO, G. Electrolytes in Dye-Sensitized Solar Cells. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 2136–2173, 2015.

ZAJAC, G. W.; GALLAS, J. M.; CHENG, J.; EISNER, M.; MOSS, S. C.; ALVARADO-SWAISGOOD, A. E. The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1199, p. 271–278, 1994.

ZHU, L.; YANG, H. Bin; ZHONG, C.; LI, C. M. Rational design of triphenylamine dyes for highly efficient p-type dye sensitized solar cells. **Dyes and Pigments**, v. 105, p. 97–104, 2014.