

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências/Campus de Bauru

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

ESTUDO DETALHADO DA SÍNTESE DE MELANINA EM DMSO

Pedro Henrique Petri Xavier

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais do Programa de Pós – Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Bauru – SP

2011

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências/Campus de Bauru

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

ESTUDO DETALHADO DA SÍNTESE DE MELANINA EM DMSO

Pedro Henrique Petri Xavier

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais do Programa de Pós – Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Orientador: Carlos Frederico de Oliveira Graeff

Bauru – SP

2011

Xavier, Pedro Henrique Petri.

Estudo detalhado da síntese de melanina em DMSO/
Pedro Henrique Petri Xavier, 2011

Total de folhas: 84

Orientador: Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2011

1. Melanina. 2.Síntese. 3.DMSO. I. Universidade
Estadual Paulista. Faculdade de Ciências.

ATA DO EXAME GERAL DE QUALIFICAÇÃO DE PEDRO HENRIQUE PETRI XAVIER, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, CURSO DE MESTRADO, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 18 dias do mês de agosto do ano de 2011, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-graduação/FC, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Profa. Dra. MONICA ALONSO COTTA do(a) Departamento de Física Aplicada / Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. FENELON MARTINHO LIMA PONTES do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru, sob a presidência do primeiro, para o Exame Geral de Qualificação de PEDRO HENRIQUE PETRI XAVIER, nos termos do Regulamento do Programa, tendo o candidato 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



Profa. Dra. MONICA ALONSO COTTA



Prof. Dr. FENELON MARTINHO LIMA PONTES

Dedicatória

Dedico essa dissertação a todos da minha família, pela minha educação, formação e por estarem sempre ao meu lado em todos os desafios que me foram proporcionados até hoje.
Obrigado a todos vocês!

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador o Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff, primeiramente por me dar a oportunidade de trabalhar em seu grupo de estudos e pela orientação dada durante toda a pesquisa.

Agradeço especialmente a Dra. Érika Soares Bronze Uhle e Augusto Batagin Neto, pela grande e importante ajuda na pesquisa. Muito obrigado a vocês dois por tudo e também por serem grandes amigos, espero levar essa amizade por muitos e muitos anos.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Ricardo Zanatta do Laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física da USP de São Carlos pela realização das medidas de RAMAN. Agradeço também ao Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo do Grupo de Ressonância Magnética Nuclear também do Instituto de Física da USP de São Carlos pelas medidas de ressonância magnética de carbono em estado sólido.

Agradeço também ao Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho do Laboratório de Materiais Supercondutores da Unesp de Bauru e também agradeço a aluna de doutorado Larisa Baldo pela realização das medidas de FTIR.

Agradeço ao Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira do Departamento de Química da USP de São Carlos pela realização das medidas de ressonância magnética nuclear de próton em solução.

Agradeço aos meus amigos que estudaram e tornaram o ambiente de estudo o melhor possível: Andrei, Marcus, Bruna, Juliana, Janaine, Oswaldo, Alejandra, Douglas e David. Além dos alunos da Pós-graduação em Ciência dos Materiais (POSMAT), amigos que quero, sem dúvida nenhuma, levar para a vida toda.

Agradeço aos meus amigos de república: Luciano, Fábio, Raul, Michel, Diego, Gustavo e Anne. Abraço a todos vocês e obrigado.

E finalmente agradeço a Fapesp e ao CNPq pela suporte financeiro e pela minha bolsa de mestrado.

Conteúdo

Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	11
Lista de esquemas para as reações químicas	12
Lista de abreviaturas e siglas	13
Resumo	15
Abstract	17
Capítulo 1: Introdução	18
1.1: Melanina	20
1.2: Síntese de melanina em DMSO	30
1.3: Objetivos	31
Capítulo 2: Metodologia	32
2.1: Técnicas de Caracterização	32
2.1.1: Espectroscopia na região do Ultravioleta – Visível (UV-Vis)	32
2.1.2: Espectroscopia RAMAN	33
2.1.3 : Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	33
2.1.4: Ressonância Magnética Nuclear	34
2.1.4.1: Ressonância Magnética Nuclear de carbono (^{13}C RMN)	34
2.1.4.2: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (^1H RMN)	35
2.1.5: Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	35
2.1.5.1: Cálculo do fator g e da densidade de spins	36
Capítulo 3: Materiais Utilizados e Procedimento Experimental	39
3.1: Reagentes Utilizados	39
3.2: Procedimento Experimental	40
3.2.1: Síntese aquosa	40
3.2.2: Síntese em DMSO	41
3.2.3: Síntese de melanina em DMSO com diferentes concentrações de peróxido de benzoíla	42
3.2.4: Síntese em DMSO com adição de água	44
Capítulo 4: Resultados	45
4.1: Teste de solubilidade	45

4.2: Diferenças entre H ₂ O-melanina e DMSO-melanina	46
4.3: Efeito do peróxido de benzoíla na síntese de melanina em DMSO	54
4.4: Efeito da água adicionada na síntese de melanina em DMSO	56
4.5: DMSO-melanina envelhecida	60
Capítulo 5: ``Proposta de modelo estrutural para a DMSO-melanina``	63
5.1: Reação de oxidação do DMSO com o peróxido de benzoíla	63
5.2: Reação de oxidação da L-Dopa com o peróxido de benzoíla	66
Capítulo 6: Conclusão	77
Referências	78

Lista de Figuras

<u>Figura 1: Espectro de absorção UV-Vis da melanina. Figura retirada do trabalho de Meredith et al.</u> ⁴⁰	<u>21</u>
<u>Figura 2: Espectro de emissão para a melanina</u> ⁴¹ .	<u>22</u>
<u>Figura 3: Medidas de condutividade em função da humidade relativa</u> ²⁶ .	<u>23</u>
<u>Figura 4: Estrutura da melanina sugerida pelo modelo do homopolímero, proposto por Raper-Mason. As flechas indicam as posições de crescimento do polímero composto somente por IQ Figura retirada do trabalho de Mason.</u> ³²	<u>26</u>
<u>Figura 5: (a) Nova proposta da Melanogênese ainda por Raper-Mason, porém a formação da melanina ocorre com a polimerização de todos os monômeros presentes na reação, inclusive os reagentes. (b): Estrutura da melanina, pelo modelo do heteropolímero estendida.Figurada retirada do trabalho de Blois</u> ⁴ .	<u>27</u>
<u>Figura 6: Monômeros formadores da melanina após vários estudos e presentes no modelo do oligômero empilhado.</u>	<u>29</u>
<u>Figura 7: Modelo dos oligômeros empilhados. Melanina composta por monômeros heterogêneos empilhados e ligados através das ligações π-π stackin</u> ¹ .Figura retirada do trabalho de Meredith e Sarna ²⁴ .	<u>30</u>
<u>Figura 8: Campos magnéticos ressonantes experimentais para os marcadores.</u>	<u>36</u>
<u>Figura 9: Campo magnético ressonante experimental sem correção da amostra.</u>	<u>37</u>
<u>Figura 10: Intensidade y_1 do sinal de EPR e ΔH_{pp1} da amostra de melanina.</u>	<u>38</u>
<u>Figura 11: Reagentes utilizados na síntese de melanina em DMSO. Respectivamente L-Dopa, DMSO e peróxido de benzoíla.</u>	<u>39</u>

Figura 12: Espectro de Absorção da H₂O-melanina e da DMSO-melanina. 46

Figura 13: Espectro simulado da eumelanina. O espectro é composto por onze cromóforos diferentes presentes na estrutura da eumelanina, sendo que cada banda de absorção tracejada abaixo da curva de absorção corresponde à um cromóforo. Figura retirada do trabalho de Meredith⁴⁰. 47

Figura 14: Comparação no processo de formação de melanina nas sínteses de água e na síntese de DMSO, fixando o comprimento de onda em 320 nm. 48

Figura 15: Espectro RAMAN para o grafeno e movimento de vibração ``Breathing Mode`` dos anéis aromáticos presentes na melanina e no grafeno⁰². 49

Figura 16: Espectro RAMAN para a H₂O-melanina e DMSO-melanina. 50

Figura 17: Espectro de Infravermelho para as amostras de melanina em água e em DMSO. 50

Figura 18: Espectro de infravermelho no intervalo de 1800 cm⁻¹ – 400 cm⁻¹ 51

Figura 19: ¹³C RMN das melaninas em água e em DMSO. 52

Figura 20: Comparação entre os espectros de EPR obtidos para as amostras de H₂O-melanina e DMSO-melanina. 53

Figura 21: Espectros de IR para o DMSO, peróxido de benzoíla e da solução DMSO+peróxido de benzoíla. 54

Figura 22: Concentração de peróxido de benzoíla versus a absorbância, no comprimento de onda de 320 nm, após 27 dias de síntese. 55

Figura 23: Comparação dos espectros de UV-Vis para as melaninas sintetizadas em água, DMSO e DMSO+água. 56

<u>Figura 24 : Espectroscopia RAMAN para as melaninas em água, DMSO, DMSO com 5% de água e DMSO com 10% de água no volume total da solução.</u>	<u>57</u>
<u>Figura 25: Espectros de ^{13}C RMN para as amostras de melanina.</u>	<u>58</u>
<u>Figura 26: Espectros comparativos de EPR entre as amostras de DMSO-melanina, DMSO-melanina+10% de água e H_2O-melanina.</u>	<u>59</u>
<u>Figura 27: Espectro de FTIR para as amostras de DMSO-melanina e DMSO-melanina envelhecida.</u>	<u>60</u>
<u>Figura 28: Espectros de ^{13}C RMN para as amostras de melanina.</u>	<u>61</u>
<u>Figura 29: Espectro comparativo de EPR para as amostras de DMSO-melanina e DMSO-melanina envelhecida.</u>	<u>62</u>
<u>Figura 30: Espectro de FTIR para o DMSO e para a solução DMSO + Peróxido de Benzoíla.</u>	<u>65</u>
<u>Figura 31: Possíveis estruturas químicas para os monômeros formadores da DMSO-Melanina.</u>	<u>67</u>
<u>Figura 32: Exclusão da N-sulfonação pelo espectro de IR.</u>	<u>68</u>
<u>Figura 33: monômeros formadores da DMSO-melanina após a exclusão das estruturas que apresentaram N-sulfonação.</u>	<u>70</u>
<u>Figura 34: Espectro de ^{13}C RMN experimental e estruturas simuladas para as amostras de DMSO-melanina e H_2O-melanina respectivamente.</u>	<u>71</u>
<u>Figura 35: Espectro de ^1H RMN para a amostra de DMSO-melanina.</u>	<u>72</u>
<u>Figura 36: Prováveis estruturas monoméricas.</u>	<u>73</u>

Figura 37: Espectros de IR para as amostras de DMSO-melanina, DMSO-melanina degradada e DMSO-melanina envelhecida respectivamente. 74

Figura 38: Espectros de EPR para as amostras de melanina. 75

Figura 39: Possível estrutura para a DMSO-melanina. 76

Lista de Tabelas

<u>Tabela 1: Composições em mol dos reagentes utilizados nas sínteses em DMSO.</u>	<u>43</u>
<u>Tabela 2: Quantidade de reagentes utilizados nas sínteses em DMSO.</u>	<u>44</u>
<u>Tabela 3: Composições dos reagentes utilizados nas sínteses em DMSO com água deionizada.</u>	<u>44</u>
<u>Tabela 4: Teste de solubilidade.</u>	<u>45</u>
<u>Tabela 5: Bandas presentes no espectro de infravermelho na DMSO-melanina.</u>	<u>51</u>

Lista de esquemas para as reações químicas

Esquema 1: Melanogênese proposta por Raper. De acordo com Raper, somente o DHI participava da síntese de melanina. 24

Esquema 2: Melanogênese proposta por Raper-Mason. Adição da IQ na melanogênese. 25

Esquema 3: Oxidação do DMSO com peróxido de benzoíla. 64

Esquema 4: Formação do benzeno eliminado durante a evaporação do solvente no processo de síntese. 65

Esquema 5: Mecanismo de reação para a oxidação da L-Dopa e o peróxido de benzoíla. 66

Esquema 6: Oxidação da L-Dopa pelo peróxido de benzoíla e ação da dimetilsulfona. 67

Esquema 7: Decomposição da dimetilsulfona durante o processo de evaporação do DMSO no processo de obtenção da síntese de melanina. 69

Esquema 8: Reação de degradação da DMSO-melanina. 73

Lista de abreviaturas e siglas

DMSO: Dimetilsulfóxido

L-Dopa: Levógero-Dopaquinona

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

DHI: 5,6-dihidroindol

DHICA: 5,6-dihidroindol 2-ácido carboxílico

¹³C RMN: Ressonância Magnética Nuclear de carbono

DMF: Dimetilformamida

THF: Tetrahydrofurano

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

NaOH: Hidróxido de sódio

EPR: Ressonância Paramagnética Eletrônica

DHF: Dihidroxifumarato

UV-Vis: Espectroscopia ultravioleta-vísivel

DOPA: Dopaquinona

IQ: indolquinona

SQ: semiquinona

TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão

AFM: Microscopia de Força Atômica

SAXS: Espalhamento de raio-X em baixos ângulos

STM: Microscopia de Tunelamento

^1H RMN: Ressonância Magnética Nuclear de próton.

HMPA: Hexametilfosforamida

CPMAS: Cross Polarization Magic Angle Spinning

TOSS: Total Supression of Spinning Sidebands

RPM: Rotação por minuto

Resumo

A síntese em DMSO foi proposta a cerca de seis anos e o resultado mais importante foi o fato da melanina obtida ser solúvel em DMSO o que permitiu a produção de filmes finos de alta qualidade. Para tal fim, a L-Dopa foi utilizada como reagente principal, em sínteses onde se variou: a concentração de peróxido de benzoíla e a concentração de água no DMSO. A síntese em água foi realizada para fins de comparação.

A síntese em DMSO apresentou-se mais lenta em comparação a síntese de melanina em água através dos resultados obtidos pela técnica UV-Vis.

O peróxido de benzoíla tem influência significativa na síntese, agindo diretamente na oxidação do DMSO e na oxidação da L-Dopa.

Teste de solubilidade com diferentes solventes foi realizado nas amostras de H₂O-melanina, DMSO-melanina recém sintetizada e DMSO-melanina envelhecida com tempo de estocagem de quatro anos. Os solventes utilizados foram; água, DMSO, DMF, THF, acetonitrila e acetato de etila. Os resultados mostraram a insolubilidade da H₂O-melanina e da DMSO-melanina envelhecida em todos os solventes e somente a solubilidade da DMSO-melanina recém sintetizada no solvente DMSO foi observada. Indicando novamente que as amostras possuem estruturas diferentes e que a DMSO-melanina sofre alterações estruturais quando exposta ao ar.

Nos espectros de FTIR, grupos sulfonados só foram observados na DMSO-melanina recém sintetizada, que desapareceram nas amostras envelhecidas, e que não estão presentes na H₂O-melanina. Ou seja, os grupos sulfonados responsáveis pela solubilidade da DMSO-melanina com o passar do tempo sofrem degradação e saem da estrutura da DMSO-melanina, explicando assim a insolubilidade da amostra de DMSO-melanina envelhecida. O mesmo foi observado para os espectros de ¹³C RMN.

Para entender esse processo de degradação utilizamos o NaOH, cuja ação é a retirada dos grupos sulfonados. Observamos que a DMSO-melanina tornou-se insolúvel após a exposição ao NaOH. Confirmando com o auxílio do FTIR, a saída dos grupos sulfonados presentes anteriormente na DMSO-melanina recém sintetizada.

Um modelo químico foi proposto para a DMSO-melanina. Nessa estrutura os grupos sulfonados estão substituindo as hidroxilas presentes nos monômeros DHI e DHICA, ocorrendo assim a O-sulfonação. Além da O-sulfonação, duas hipóteses surgiram, a primeira foi a N-sulfonação, ou seja, a ligação da dimetilsulfona no nitrogênio presente no DHI e no DHICA e também a N-metilação, que seria somente a entrada do radical metil no nitrogênio dos monômeros formadores da DMSO-melanina.

A N-sulfonação foi descartada através da técnica de FTIR, pois no espectro não há evidências da banda relacionada à ligação N-S.

Abstract

Synthesis in DMSO was proposed about six years and the most important result was the fact that it is soluble in DMSO which allowed the production of thin films of high quality. To this end, the L-Dopa was used as primary reagent in syntheses where varied: the concentration of benzoyl peroxide and water concentration in DMSO. The synthesis was carried out in water for comparison purposes.

The synthesis presented in DMSO is slower than the synthesis of melanin in water for analysis of the results obtained with the technique of UV-vis.

When we analyzed the effect of the concentration of benzoyl peroxide in the synthesis, we found that the concentration of 0.5 moles of benzoyl peroxide gave a summary more efficient to melanin in DMSO.

Benzoyl peroxide has significant influence on the synthesis, acting directly on the oxidation of DMSO and the oxidation of L-Dopa.

Solubility test was carried out with different solvents in the samples of H₂O-melanin, DMSO-melanin newly synthesized and old DMSO-melanin with storage time of four years. The solvents used were: water, DMSO, DMF, THF, acetonitrile and ethyl acetate. The results showed the insolubility of H₂O-melanin and old DMSO-melanin in all solvents and only the solubility of newly synthesized DMSO-melanin in the solvent DMSO was observed. Indicating again that the samples have different structures and that the DMSO-melanin undergoes structural changes when exposed to air.

In FTIR, sulphonated groups were only observed in DMSO-melanin newly synthesized, which disappeared in the old samples, which are not present in the H₂O-melanin. That is, the sulfonated groups responsible for the solubility in DMSO-melanin suffer degradation over the time and leave the structure of DMSO-melanin, thus explaining the insolubility of old DMSO-melanin.

A chemical model was proposed, using tools, in addition to the previously mentioned computer simulation of EPR spectra. In this structure sulphonated groups replacing the hydroxyl groups are present in these monomers DHI and DHICA, thus leading to O-sulfonation. In addition to O-sulfonation, two hypotheses emerged, the first was the N-sulfonation, binding of the dimethyl sulfone in nitrogen present in DHI

and DHICA and the N-metilation which would be only the input of methyl radical in the nitrogen in the forming monomers of the DMSO-melanins through the process of degradation to obtaining the DMSO-melanin. The N-sulfonation was ruled out by FTIR technique.

Capítulo 1: Introdução

Em 1862, Henry Letheby, químico analítico nascido em Plymouth no ano de 1816 e falecido em 1876, obteve um material condutor em parte por oxidação anódica da anilina em ácido sulfúrico. O material era provavelmente a polianilina.

No ano de 1950, foi descoberto que os compostos aromáticos policíclicos formavam complexos de sais semi-condutores de transferência de carga com halogênios³⁸. Este achado indica que os compostos orgânicos poderiam transportar carga e gerar corrente. Alta condutividade de 1 S / cm em polímeros lineares foi relatado em 1963⁶⁻⁵.

No entanto, somente após a descoberta de Alan J. Heeger (professor da Universidade da Califórnia-USA), Alan G. MacDiarmid (professor da Universidade da Pensilvânia-USA) e Hideki Shirakawa (professor da Universidade de Tsukuba-Japão) em 1977²¹ é que cresce fortemente o interesse nos chamados polímeros condutores. Os três pesquisadores receberam conjuntamente o Prêmio Nobel de Química em 2000 por seu artigo publicado no ano de 1977 referente a oxidação do poliacetileno dopado com iodo²¹.

O mecanismo de condução nos polímeros condutores envolve a estabilização ressonante e delocalização de elétrons π ao longo de todo polímero³⁵.

Polímeros condutores são mais leves, mais flexíveis e menos caros em comparação aos condutores inorgânicos. Isso os torna uma alternativa desejável em muitas aplicações.

A Eletrônica Orgânica não inclui apenas os semicondutores orgânicos, mas também dielétricos orgânicos, condutores e emissores de luz.

Dentre os materiais orgânicos utilizados para a produção e desenvolvimento desses materiais, a melanina é um material que vem intrigando a comunidade científica por apresentar propriedades físicas e químicas interessantes, como pôr exemplo absorção em todo o espectro UV-Vis e também excelente condutor elétrico e iônico, que podem vir a auxiliar na produção desses novos dispositivos eletrônicos orgânicos, como por exemplo a produção de células solares.

1.1- Melanina

A melanina, palavra de origem grega que significa escuro, é um termo que descreve uma grande família de pigmentos quinonóidicos-fenólicos de origem natural ou sintéticos. Esses compostos podem ser vistos como ligações estruturais entre os alcalóides indólicos e a mais importante família de alcalóides poliméricos, os pigmentos de melanina derivados do 5,6-Dihidroindole (DHI), um dos monômeros precursores responsável pela formação da melanina¹⁵.

Com relação às melaninas naturais, elas se diferenciam pela suas origens, por exemplo, olho bovino, melanoma e sépia melanina. Geralmente encontram-se na forma de partículas granulares, conhecidas como melanossomas e são produtos liberados de células produtoras de pigmentos conhecidas como melanócitos.

A melanina exibe uma impressionante gama de propriedades químicas atuando como um efetivo polímero redutor (troca de elétrons), troca de íons e varredores de radicais e por mostrar uma forte tendência para se ligar com compostos aromáticos e lipofílicos¹⁵.

Ao contrário da maioria dos alcalóides, as reações de melaninas, são heterogêneas e envolvem tanto a superfície quanto o interior das partículas¹⁵.

Devido a essas reações químicas heterogêneas, as melaninas são classificadas de acordo com suas estruturas químicas. São elas: eumelaninas, feomelaninas, neuromelaninas e alomelaninas.

As eumelaninas (poli 5-6 indolquinonas), a forma mais comum das melaninas de coloração marrom ou preta e insolúvel em água, são encontradas em cabelos, peles e olhos, devido a sua propriedade de fotoproteção²⁸⁻⁴⁸⁻⁴³⁻²⁹. Em outros vertebrados, a eumelanina auxilia no processo metabólico através da conversão da luz em calor, por exemplo em répteis e anfíbios²⁰.

As feomelaninas (poli-dihidrobenzothiazina), a forma menos comum das melaninas de coloração vermelha ou laranja, estão mais presentes em seres humanos ruivos. Sua diferença em comparação as eumelaninas está na adição da molécula de cisteína durante o processo de melanogênese²⁵.

A neuromelanina é um terceiro tipo de melanina presente nos mamíferos, encontrada no cérebro, é uma melanina híbrida de feomelanina e eumelanina, com a

feomelanina no núcleo e a eumelanina na superfície⁹. Sua função está no transporte de impulsos elétricos entre os neurônios⁴⁴. A falta de produção desse pigmento está relacionada ao Mal de Parkinson⁵⁵.

Finalizando a classificação dos tipos de melaninas, temos a melanina encontrada nos fungos conhecida como alomelaninas. Elas se referem às DHF-melaninas, ou seja melaninas derivados do dihidroxifumarato, as outras melaninas citadas são melaninas derivadas da DOPA, ou DOPA-melaninas.

No corpo humano, tanto a eumelanina quanto a feomelanina apresentam propriedades químicas e físicas semelhantes. Com relação a doenças como Parkinson, esquizofrenia, câncer e surdez, a mudança da estrutura da melanina pode ser importante para evitar ou auxiliar no desenvolvimento de doenças como: o caso do câncer de pele e da doença do mal de Parkinson³⁶.

Estudos com o espectro de Uv-Vis da eumelanina, Figura 1, mostra uma forte absorção na região do UV-vis, explicando o efeito foto protetor da eumelanina²⁷⁻²²⁻³⁹.

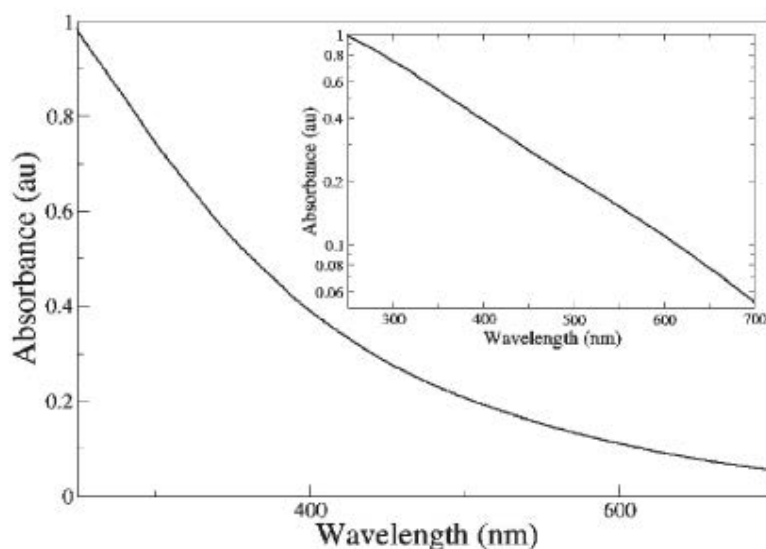


Figura 1: espectro de absorção UV-Vis da melanina. Figura retirada do trabalho de Meredith *et al.*⁴⁰

Outra função biológica está na quelação de íons metálicos relacionado diretamente a doença do mal de Parkinson e também a propriedade de ligação da melanina com remédios, fazendo com que ocorra um maior tempo de permanência do medicamento dentro do corpo do indivíduo³¹.

Como mostrada na figura 1, a melanina apresenta uma larga banda de absorção no espectro UV-vis. Como observado por Wolbarsht et al, o amplo espectro é atípico de cromóforos orgânicos, que normalmente contêm picos correspondentes às transições entre estados eletrônicos individuais e distintos⁵⁷. A absorção da melanina mais se parece com um material inorgânico que um material orgânico. Colocando esse material na classe dos semicondutores amorfos⁴².

Muitos pesquisadores acreditavam que o espectro de absorção da melanina se dava ao espalhamento de luz ao invés de absorção eletrônica. Porém estudos realizados por Riesz mostraram que a dispersão contribui somente 6% para o espectro de absorção. Portanto a forma do espectro de absorção se dá devido as excitações eletrônicas na melanina⁵⁰.

A fotoluminescência é apresentada na Figura 2, através do espectro de emissão da melanina.

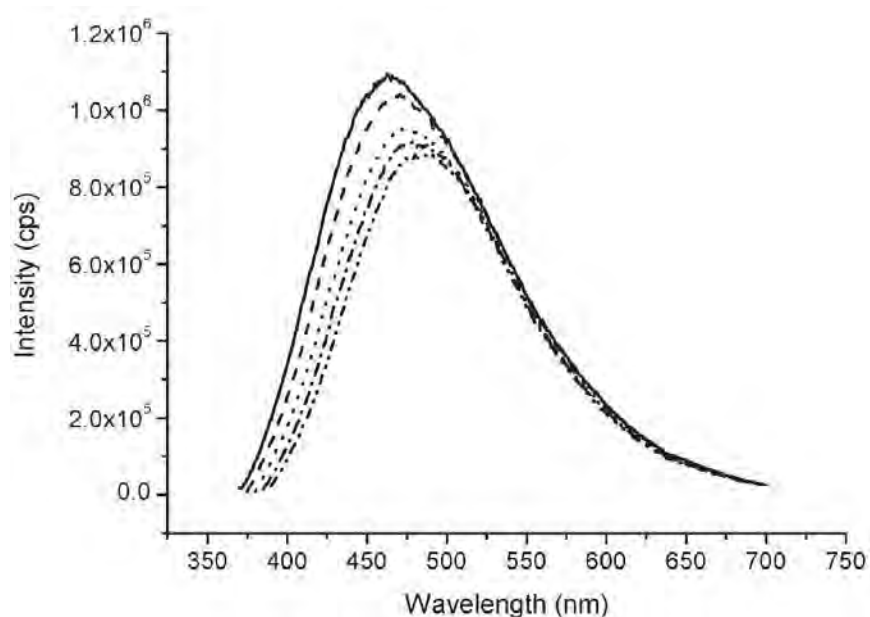


Figura 2: Espectro de emissão para a melanina⁴¹.

A forma de linha do espectro de emissão da melanina é diferente do espectro de absorção, violando a *mirror-image rule*. Essa regra diz que o espectro de absorção e o espectro de emissão devem apresentar algumas semelhanças qualitativas entre si, ou seja, compostos orgânicos deveriam apresentar espectros de absorção e de emissão semelhantes. Para a melanina os espectros de absorção e de emissão não são comparáveis⁴⁵.

Mostrando assim o porque da melanina ser um material que intriga tanto a comunidade científica.

Além das propriedades ópticas, a melanina também possui propriedades eletrônicas. Entre elas a condutividade eletrônica da melanina se destaca como uma das propriedades mais interessantes. O efeito da hidratação na condutividade é um dos resultados mais interessantes obtidos para a melanina e está apresentado na figura 3²⁶.

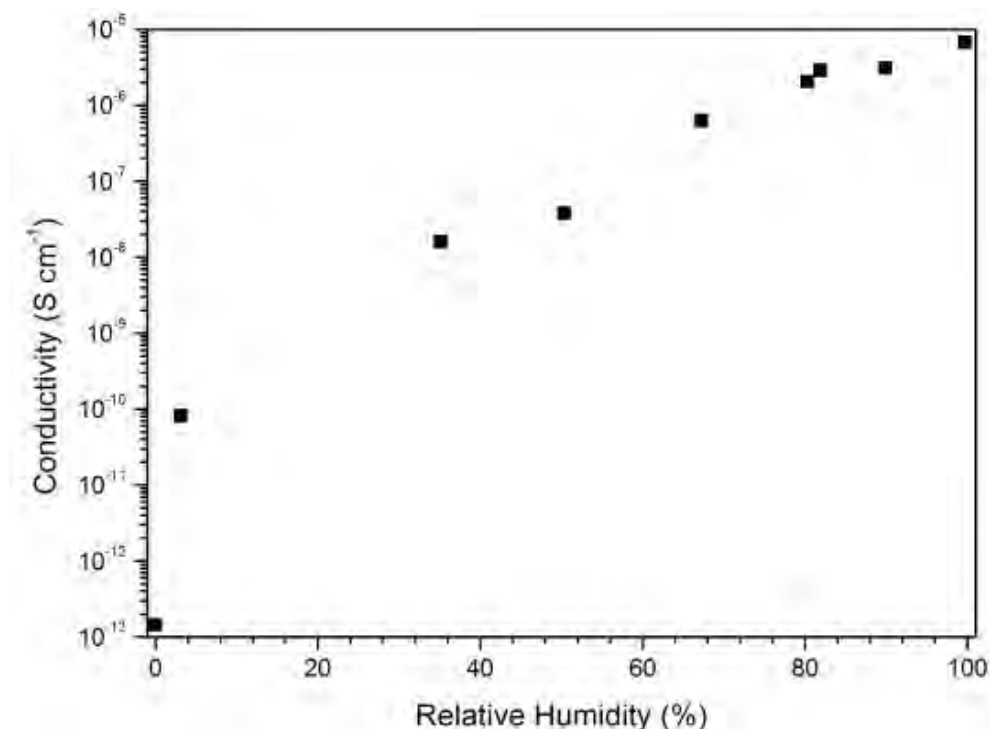


Figura 3: Medidas de condutividade em função da umidade relativa²⁶.

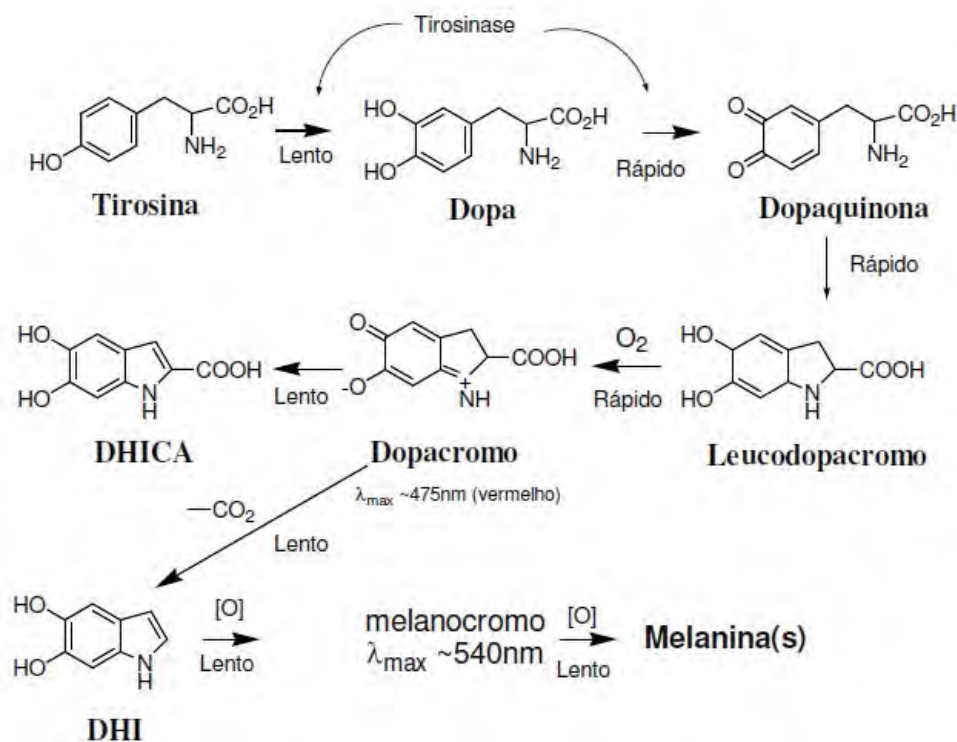
De acordo com a Figura 3, a condutividade aumenta significativamente conforme a umidade relativa aumenta partindo de 10^{-10} S cm⁻¹ para 10^{-5} S cm⁻¹ com 100% de umidade relativa. Esse resultado indica que a água apresenta uma forte influência na melanina. Sendo motivo de estudos e de vários trabalhos publicados⁴⁷⁻³⁷⁻³. A síntese utilizada na Figura 3 foi a síntese de melanina em água.

Através de estudos com análise coulométrica, medidas que utilizam a primeira Lei de Faraday, a melanina absorve 65% de prótons e 35% de elétrons⁴⁷. Devido a esses estudos a melanina pode ser utilizada como material base para sensores de umidade¹⁹.

Portanto para tentar entender melhor essas propriedades biológicas, ópticas e elétricas, vários cientistas com o passar dos anos começaram a desenvolver modelos científicos para determinar a estrutura da melanina.

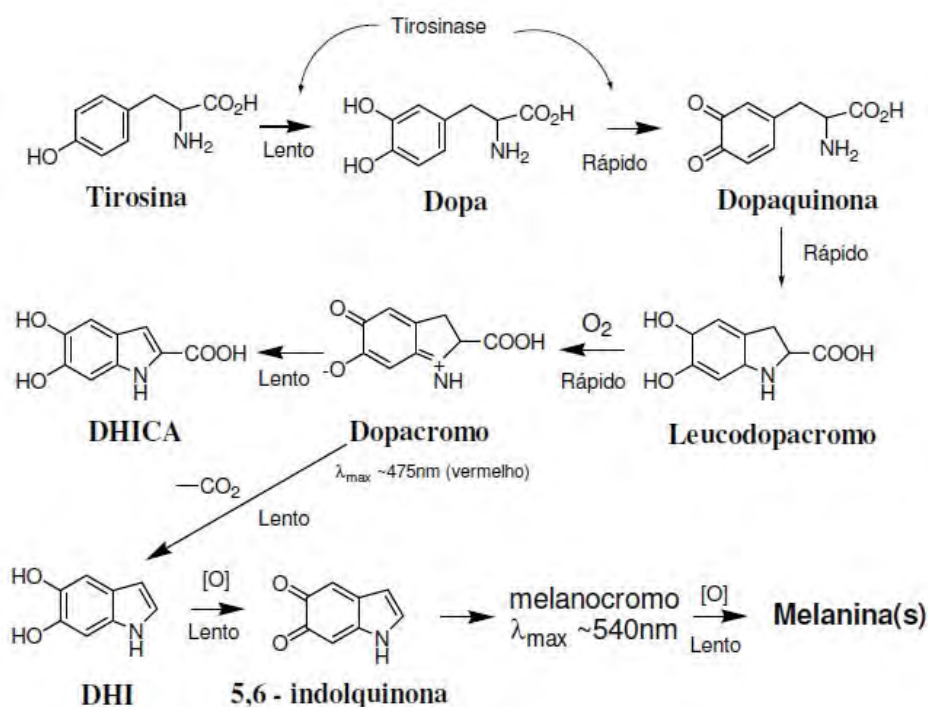
O primeiro modelo estrutural foi apresentado por Raper no ano de 1920, através de um experimento com preparo de enzimas com a espécie *Tenebrio molitor*, popularmente conhecido como o bicho da farinha, descobriu que em presença de oxigênio a tirosina é oxidada para dopa e dopaquinona e que após sucessivos processos de oxidação passa para dopacromo. Outros dois experimentos foram realizados com o dopacromo. O experimento baseou-se em simplesmente isolar em vácuo ou na presença de ácido sulfúrico o dopacromo possibilitando assim identificar o DHICA, concluindo que a melanina é um produto obtido principalmente pela oxidação da DOPA (dopaquinona), DHI (5,6-dihidroxi indole) e DHICA (5,6-dihidroxi indole 2- ácido carboxílico)⁴⁹.

A melanina através de seus intermediários DOPA, DHI e DHICA seria um polímero homogêneo. Porém para esse modelo, somente o DHI seria responsável pela formação da melanina, esquema 1. Mason em 1936, com a realização de novos experimentos detectaram a existência de mais um monômero formador, a 5-6 indolquinona (IQ) e esse novo monômero se formaria através da oxidação do DHI. Com essa descoberta surge então o segundo modelo estrutural da melanina: O Modelo do Homopolímero.



Esquema 1: Melanogênese proposta por Raper. De acordo com Raper, somente o DHI participava da síntese de melanina.

Mason descobriu um novo monômero formador da melanina, derivado da oxidação do DHI, a IQ, com isso surge o modelo Raper-Mason da melanogênese, mostrado no esquema 2.



Esquema 2: Melanogênese proposta por Raper-Mason

No modelo do homopolímero, esquema 2, somente o DHI participaria na síntese da melanina e a mesma seria formada por um único monômero, a IQ, e com isso três hipóteses foram propostas:

- 1) Se os reagentes de partida são tirosina, DOPA e DHI, então o produto obtido deveria ser um derivado desses reagentes.
- 2) Se a melanina é um derivado de IQ, então em um experimento de difração de raio-X deveria ser observados espaçamentos da rede estrutural correspondente a IQ.
- 3) Através de análise elementar o polímero melanina deveria ter a fórmula química $(C_8H_3O_2)_n$.

A Figura 4 abaixo apresenta a estrutura dos monômeros formadores da melanina, de acordo com o modelo proposto por Raper-Mason.

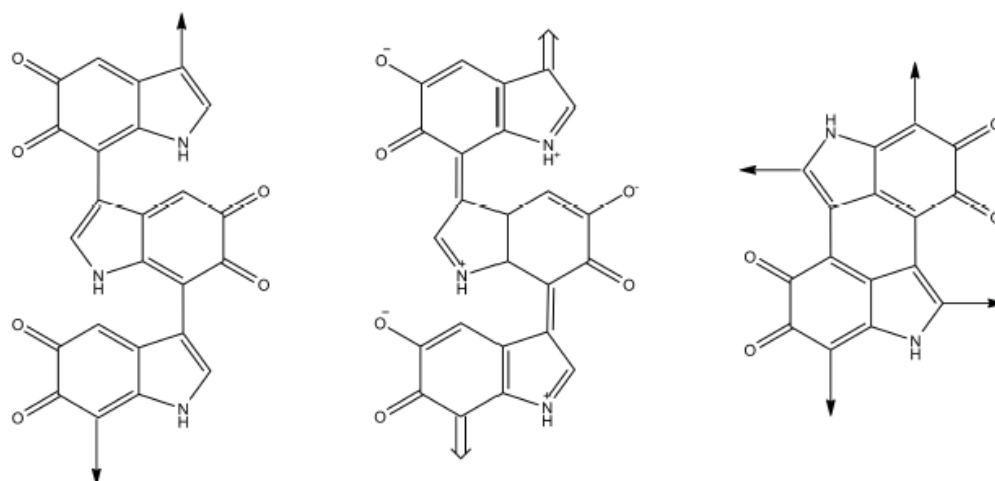


Figura 4: Estrutura da melanina sugerida pelo modelo do homopolímero, proposto por Raper-Mason. As flechas indicam as posições de crescimento do polímero composto somente por IQ
 Figura retirada do trabalho de Mason.³²

A idéia principal do modelo do homopolímero está diretamente associada ao grafite, apresentando semelhanças estruturais. Porém resultados experimentais para o modelo do homopolímero não comprovaram as hipóteses anteriormente propostas.

Entre as hipóteses propostas para o modelo do homopolímero estendido, o item 2 é inconsistente com os dados experimentais obtidos na época, ou seja, a melanina não apresenta, no experimento de difração de raios-X, um espaçamento estrutural semelhante a IQ.

Com relação as hipóteses 1 e 3, testes de degradação realizados nas décadas de 50 e 60 mostraram que a fórmula molecular proposta pelo modelo estava incorreta. Em um dos experimentos foi encontrado uma maior presença de hidrogênio, ao invés da quantidade proposta na fórmula molecular $(C_8H_3O_2)_n$.

E finalmente, estudos com DOPA mostraram a presença de dióxido de carbono proveniente de ácido carboxílico. Como a IQ não possui o grupo funcional referente a ácidos carboxílicos em sua estrutura, derruba de vez o modelo proposto por Raper-Mason sobre a homogeneidade dos monômeros formadores da melanina. Fazendo com que um segundo modelo entre em cena: o Modelo do Heteropolímero Estendido.

O Modelo do Heteropolímero foi também um modelo proposto por Raper e Mason, sendo uma extensão do modelo do homopolímero. A diferença principal está na formação dos monômeros que constituem a melanina. Antes os monômeros eram homogêneos, ou seja, todos iguais (IQ) e de cadeia estendida como apresentado na

Figura 4, porém para esse modelo a melanina é formada por monômeros heterogêneos também com cadeia estendida, de acordo com a Figura 5.

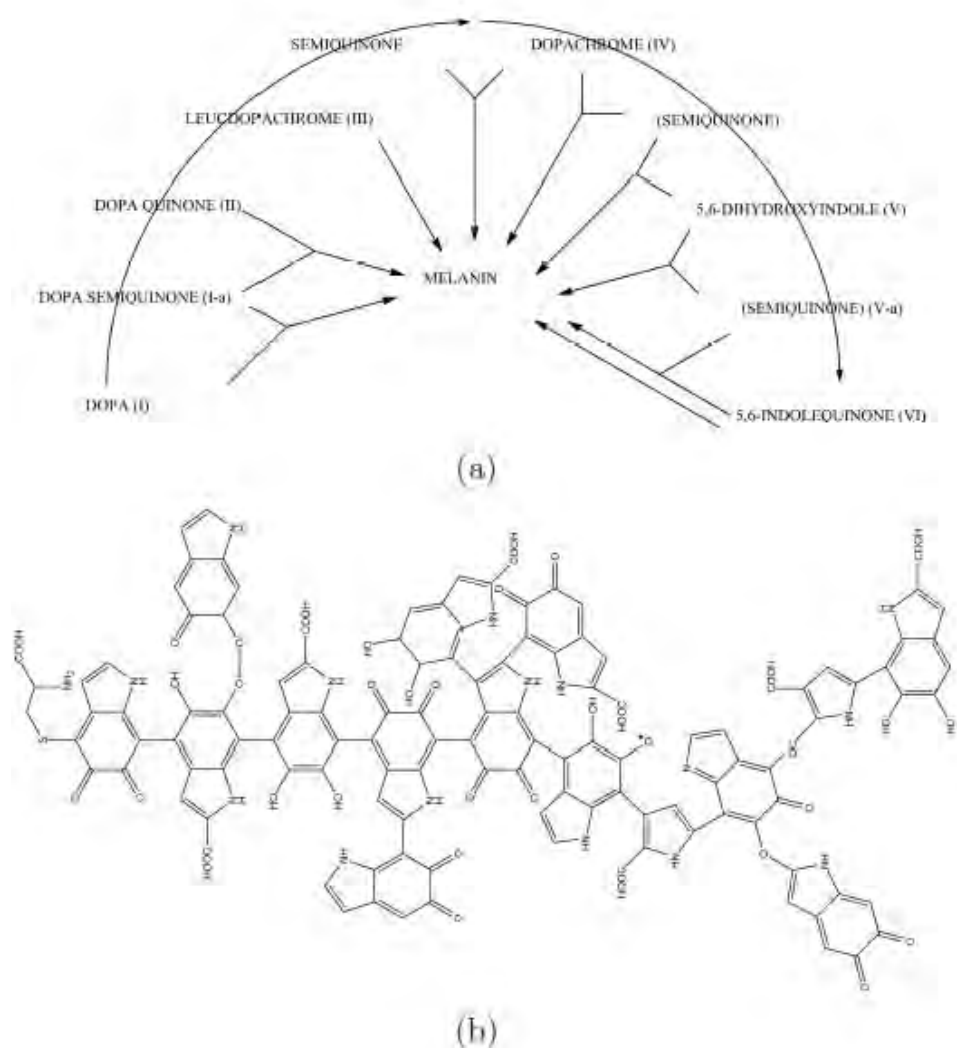


Figura 5:

(a) Nova proposta da Melanogênese ainda por Raper-Mason, porém a formação da melanina ocorre com a polimerização de todos os monômeros presentes na reação, inclusive os reagentes.

(b): Estrutura da melanina, pelo modelo do heteropolímero estendida. Figurada retirada do trabalho de Blois⁴.

De acordo com a Figura 5, o novo modelo de Raper-Mason para a melanogênese é apresentado. A melanina é formada por vários monômeros, inclusive monômeros de DOPA podem ser encontrados na estrutura da melanina. Além da DOPA novos monômeros surgem nesse modelo, entre eles estão: semiquinona (SQ), hidroquinona

(DHI), indolquinona (IQ) e também a adição do 5,6-dihidroxi indole 2-ácido carboxílico (DHICA) como participante da reação, diferença que não acontecia no modelo anterior.

O modelo do heteropolímero estendido foi o modelo que na época conseguiu explicar as propriedades óptico-eletrônicas da melanina.

Esse modelo prevê as seguintes propriedades da melanina:

- 1) A melanina deverá ser constituída de vários monômeros;
- 2) Os monômeros devem ser ligados por diferentes tipos de ligações covalentes, formando um polímero altamente reticulado;
- 3) A melanina deve apresentar uma estrutura irregular;
- 4) A melanina deve aprisionar os radicais livres envolvidos na polimerização dos monômeros.
- 5) A eumelanina deve ter uma absorção óptica correspondente a soma dos diferentes cromóforos presentes em sua estrutura, dando-lhe uma aparência negra.

O modelo do heteropolímero estendido realmente conseguiu explicar algumas propriedades da melanina, como a larga banda de absorção correspondendo a grande quantidade de cromóforos presentes na melanina. Conseguiu explicar também o sinal de EPR encontrado em experimentos de ressonância paramagnética eletrônica, ou seja, a melanina possui em sua estrutura, radicais livres, no caso a SQ, sendo ela uma das responsáveis pelo processo de polimerização através dos radicais livres na melanina.

Porém imagens geradas por microscopia eletrônica de transmissão mostram que a melanina está na forma de oligômeros empilhados e não na forma de cadeia planar estendida, como anteriormente proposto pelo modelo⁴².

Com isso um novo modelo surge para explicar a estrutura da melanina, o modelo do oligômero empilhado e seus monômeros formadores estão apresentados na Figura 6 a seguir.

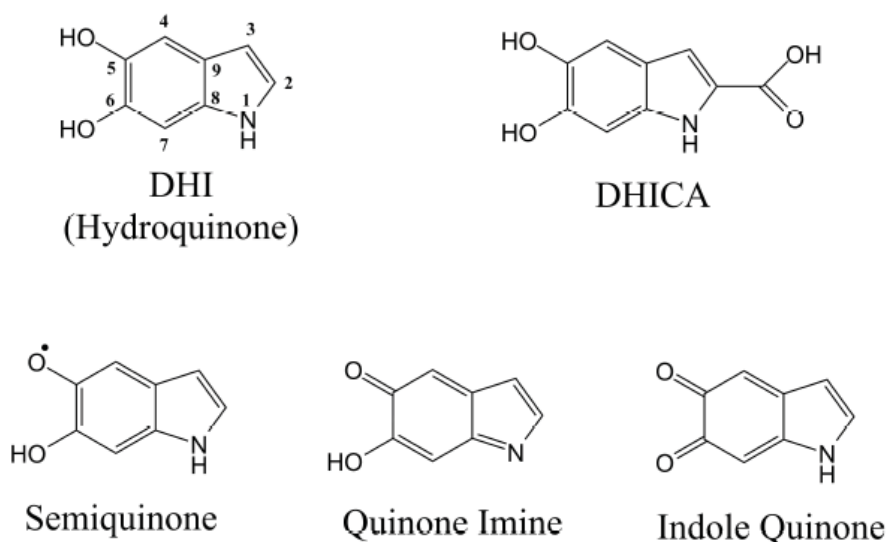


Figura 6: Monômeros formadores da melanina após vários estudos e presentes no modelo do oligômero empilhado.

Esse modelo surge no ano de 1994, através do uso de técnicas como microscopia eletrônica de transmissão (TEM)¹², microscopia de força atômica (AFM)¹³, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)¹⁷ e microscopia de tunelamento (STM)¹⁴. Todas essas técnicas foram utilizadas com o objetivo de analisar e verificar se realmente a melanina possui sua estrutura na forma de oligômeros empilhados.

Nesse modelo, a melanina possui monômeros heterogêneos, de acordo com o modelo anterior (heteropolímero estendido), porém dessa vez empilhados com espaçamento de 34 nm entre eles, resultados obtidos em experimentos de difração de raio-X. Os empilhamentos ocorrem nas ligações π - π de empilhamento ou π - π stacking de acordo com a Figura 7²⁴.

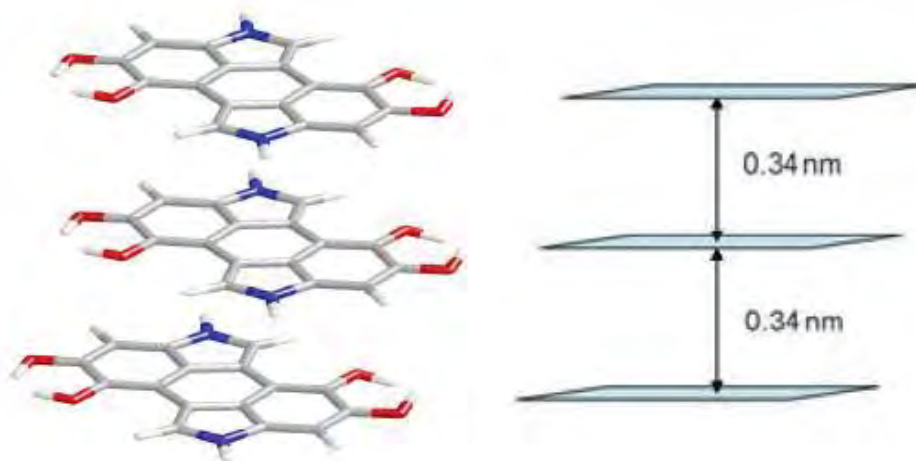


Figura 7: Modelo dos oligômeros empilhados. Melanina composta por monômeros heterogêneos empilhados e ligados através das ligações π - π stackin¹. Figura retirada do trabalho de Meredith e Sarna²⁴.

Portanto atualmente o modelo de oligômeros empilhados é o modelo mais utilizado para explicar a estrutura e as propriedades químicas e físicas da melanina.

1.2- Síntese de melanina em DMSO

A maioria das sínteses de melanina realizadas ocorre em água com adição de hidróxido de sódio (NaOH). Porém a melanina obtida nessa síntese é uma melanina que apresenta insolubilidade e baixa estabilidade térmica¹⁶, impossibilitando assim a produção de filmes finos de melanina para a produção de dispositivos eletrônicos orgânicos.

Devido a isso, novas rotas de síntese estão sendo desenvolvidas e entre elas a síntese de melanina em solventes orgânicos, principalmente DMSO e DMF. As melaninas com a síntese em solventes orgânicos são quase indistinguíveis da melanina feitas em água, porém experimentos com análises termogravimétricas DTA/TGA mostram uma melanina mais estável termicamente, com 46% de sua massa inicial mantida à temperatura de 1000°C¹⁶.

Além disso, resultados de AFM (microscopia de força atômica) mostram unidades poliméricas mais largas para as melaninas obtidas em síntese com solventes orgânicos. Possibilitando assim uma maior fixação nos substratos e aumentando, como

dito anteriormente, a estabilidade térmica para a produção dos dispositivos eletrônicos orgânicos¹⁶.

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto químico orgânico de fórmula C_2H_6SO ⁵¹, peso molecular 78¹¹ e temperatura de congelamento 18,5°C⁷. A elevada capacidade higroscópica decorre da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que às formadas entre moléculas de água. Isso faz com que o DMSO puro passe rapidamente para a concentração entre 66-67% se for deixado exposto ao ar ambiente⁷, razão porque deve ser mantido em frasco hermeticamente fechado¹.

As sínteses realizadas nesse estudo foram com o DMSO.

1.3- Objetivo

O objetivo dessa dissertação é:

- Apresentar um estudo detalhado da síntese de melanina em DMSO;
- Mostrar o mecanismo de reação envolvido na síntese de melanina em DMSO;
- Propor uma possível estrutura química para a DMSO-melanina.

Capítulo 2: Metodologia

2.1- Técnicas de Caracterização

2.1.1 - Espectroscopia na região do Ultravioleta – Visível (UV-Vis)

O espectro de absorção na região do ultravioleta e visível de compostos orgânicos está associado com as transições entre níveis de energia eletrônica. As transições são geralmente entre orbitais ligantes e antiligantes. O comprimento de onda da absorção é uma medida da separação energética entre os níveis dos orbitais.

A independência entre absorção e intensidade da fonte e a proporcionalidade entre a absorção e o número de moléculas absorvedoras deram origem a equação de Lambert – Beer:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_t} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot L$$

onde I_0 e I são as intensidades do feixe incidente e transmitido, respectivamente, L é o comprimento do caminho óptico em cm, c é a concentração da solução e ε é o coeficiente de extinção molar.

O espectro de absorção apresenta a intensidade relativa de absorção versus o comprimento de onda e pode ser correlacionado a espectros de referência para elucidar estruturas de compostos.

Para a realização da espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível utilizou-se o aparelho UV-Vis-Spectrophotometers (UVmini-1240) da Shimadzu, com varredura de 900-200 nm, na velocidade baixa.

Retirou-se alíquotas durante o processo de síntese, e diluiu-se na proporção de 1 mL de solução de melanina para 100 mL de solvente (DMSO ou água deionizada). Para a síntese aquosa utilizou-se a água deionizada como linha de base, e para a síntese em DMSO utilizou-se o DMSO como linha de base.

2.1.2 – Espectroscopia RAMAN.

Raman é uma técnica espectroscópica usada para estudar modos vibracionais, rotacionais e outros modos de baixa frequência em sistemas orgânicos e inorgânicos. A técnica se baseia em espalhamento inelástico ou espalhamento Raman de uma luz monocromática proveniente de um laser no visível, próximo ao infravermelho ou próximo do ultravioleta. A luz do laser interage com as vibrações moleculares, fônons ou outras excitações no sistema, resultando no deslocamento para cima ou para baixo da energia dos fótons do laser. A mudança de energia fornece informações sobre os modos vibracionais do sistema¹⁸.

Os espectros de Raman foram obtidos usando um equipamento Renishaw RM2000 (Raman microprobe), com varreduras no intervalo de 200 a 4000 cm^{-1} , em temperatura e atmosfera ambiente. Para a excitação utilizou-se um laser HeNe (632.8 nm) com potência de aproximadamente 50 mW. A resolução espacial foi de aproximadamente 1 μm (lente objetiva de 50x). A resolução espectral foi de aproximadamente de 3 cm^{-1} (rede de difração de 1200 l/mm). O modo de medida foi *backscattering*. As análises foram feitas no Instituto de Física da USP de São Carlos, pelo Prof. Dr. Antônio Ricardo Zanatta do Laboratório de Filmes Finos.

2.1.3- Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

O espectro de infravermelho em geral, é bastante distinto de um composto a outro, em especial para os compostos orgânicos, portanto é muito útil na identificação/caracterização de um determinado material. A região entre 0,75 μm até 200 μm (entre a região do visível e a região das microondas) é a região do infravermelho, porém, normalmente o espectro cobre somente a faixa de 0,25 μm a 50 μm e fornece informações sobre os modos de vibrações característicos de um determinado conjunto de átomos e sua ligação. O comprimento de onda é mais comumente expresso em termos do número de onda.

Os espectros de FTIR foram utilizados para analisar as bandas presentes na estrutura química da DMSO-melanina e posteriormente realizar comparações com os espectros de FTIR de outras amostras de melanina, como por exemplo melanina em

água, DMSO-melanina envelhecida e DMSO-melanina degradada por hidróxido de sódio.

As medidas de FTIR foram obtidas em um espectrofotômetro modelo VERTEX 70 da marca BRUKER. A região utilizada para a obtenção das medidas foi de 4000 cm^{-1} até 400 cm^{-1} no método ATR (Reflectância Total Atenuada) em janelas de KBr. As medidas foram realizadas no Laboratório de Materiais Supercondutores com o auxílio da aluna Larisa Baldo orientada de doutorado do Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho na Unesp de Bauru.

2.1.4- Ressonância Magnética Nuclear

2.1.4.1- Ressonância Magnética Nuclear de carbono (^{13}C RMN) em estado sólido.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica amplamente utilizada para estudar a estrutura molecular dos compostos. Baseia-se na alteração do número quântico de spin em função de um campo magnético externo. A excitação do núcleo, ou sua oscilação de uma orientação para outra, é detectada como uma voltagem induzida, resultado da absorção de energia do campo de radiofrequência incidente na amostra. A área sob um determinado pico depende da quantidade de núcleos que estão oscilando. De acordo com o ambiente químico dos núcleos excitados a intensidade do campo magnético para a excitação sofre um deslocamento. Pode também acontecer um desdobramento do pico de oscilação, o que é devido ao acoplamento do spin de vários núcleos. Dentre os núcleos paramagnéticos com número quântico de spin igual a $n/2$ os mais utilizados para estudo de estruturas são os de ^1H e ^{13}C .

Realizaram-se as análises de ^{13}C RMN em um espectrômetro VARIAN INOVA de 9.4 T, operando nas frequências de 100.5 MHz para ^{13}C . 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* - CPMAS) com tempo de contato de 1 ms e tempo de repetição de 5 s. Para remoção de bandas laterais utilizou-se a técnica *Total Supression of spinning sidebands*

(TOSS). As análises foram feitas no Instituto de Física da USP de São Carlos, pelo Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo do Grupo de Ressonância Magnética Nuclear.

2.1.4.2- Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H RMN).

Os aparelhos de ^1H RMN em geral utilizam imãs supercondutores com campos magnéticos muito intensos e pulsos curtos de radiação de radiofrequência, que provocam a absorção de energia pelos núcleos de ^1H , todos ao mesmo tempo, ocorrendo assim a ressonância. A excitação dos núcleos provoca um fluxo de pequena corrente elétrica numa bobina receptora que envolve a amostra. O instrumento então amplifica a corrente e exibe o sinal, na forma de pico ou uma série de picos, no computador. Após isso é feita pré medição dos sinais e depois de um cálculo matemático, no caso a transformada de Fourier, exibindo assim um espectro legível.

O espectro de ^1H RMN foi obtido somente para a amostra de DMSO-melanina recém sintetizada, pois somente essa amostra apresenta solubilidade.

Os espectros foram obtidos no aparelho BRUKER DRX 400 MHz no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

2.1.5- Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).

A ressonância paramagnética é uma forma de espectroscopia na qual um campo magnético oscilatório induz transições de dipolos magnéticos entre os possíveis níveis de energia de um sistema que apresente entidades paramagnéticas.

Os níveis de energia de um elétron são separados em $2S + 1$. O elétron livre tem $S = \frac{1}{2}$, o que resulta em dois níveis possíveis de ocupação (níveis de Zeeman). O experimento consiste em irradiar a amostra com fótons de energia capaz de promover transições entre os níveis de Zeeman que foram separados pela presença do campo magnético estático. Na prática, por ser experimentalmente mais simples, a frequência que excita o sistema é mantida constante enquanto o campo H varia.

A ressonância acontece com uma varredura deste campo, num intervalo adequado para proporcionar o ajuste energético que obedece a relação:

$$h\nu = \mu_B g H \quad (2)$$

Onde h corresponde a constante de Planck, ν é a frequência de ressonância, μ é o magnéton de Bohr, g é uma constante adimensional que determina o momento de dipolo magnético e finalmente H é o campo central ressonante.

As medidas de EPR foram obtidas no aparelho MS 300 da Magnettech no Laboratório de Novos Materiais e Dispositivos (LNMD) na Unesp de Bauru, com o objetivo de estudar as propriedades paramagnéticas da melanina, devido a presença de radicais livres presentes na estrutura da melanina.

2.1.5.1- Cálculo do fator g e da densidade de spins

As medidas para a obtenção dos espectros de EPR foram feitas utilizando marcadores de Mn^{+2} , para facilitar o cálculo do fator g das amostras de H_2O -melanina e DMSO-melanina. O método utilizado para determinar o fator g e a densidade de spins foi:

- 1) Com a frequência obtida no medidor de frequência e com os respectivos valores de fator g para o marcador de Mn^{+2} , calculou-se os campos magnéticos ressonantes teóricos, usando a equação 2;
- 2) Com o espectro de EPR obtido, coletou-se os valores dos campos ressonantes experimentais para os dois marcadores de acordo com a Figura 8;

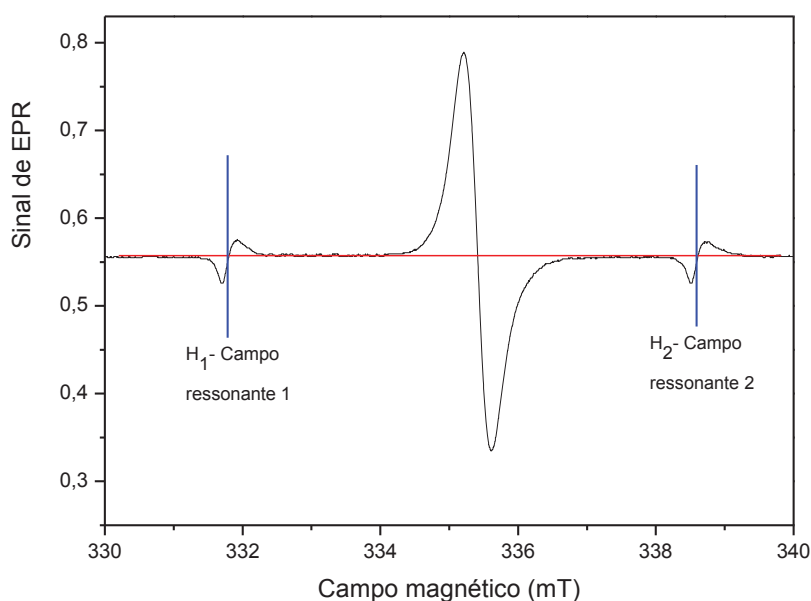


Figura 8: Campos magnéticos ressonantes experimentais para os marcadores

- 3) A diferença entre os dois campos teóricos e experimentais é determinada e após isso uma média simples é feita, determinando assim o ΔH , variação média entre os campos teóricos e experimentais.
- 4) Retornando ao espectro de EPR obtido anteriormente, determina-se o campo magnético ressonante não corrigido da amostra de acordo com a Figura 9;

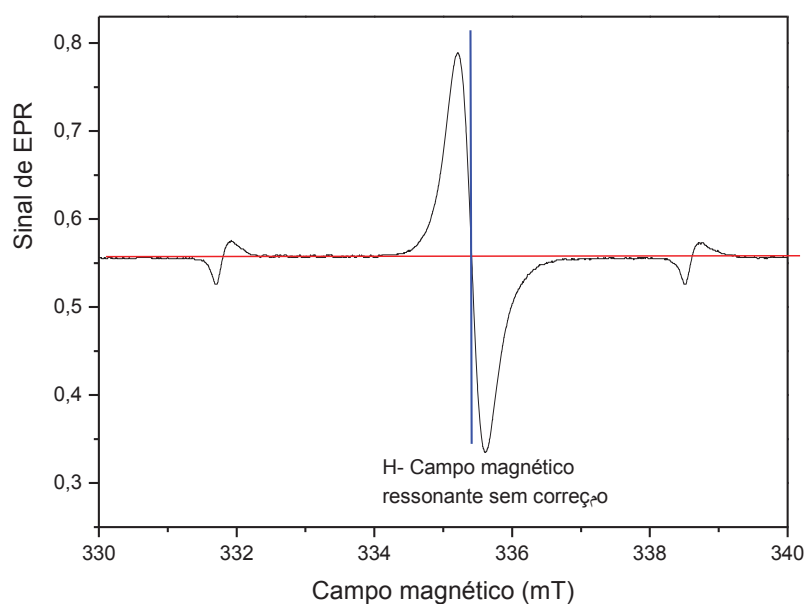


Figura 9: Campo magnético ressonante experimental sem correção da amostra

- 5) Após isso, soma-se ao campo magnético ressonante com a variação média obtida (ΔH), para obter assim o campo magnético ressonante corrigido do sinal de EPR.;
- 6) Finalmente determina-se o fator g da amostra, utilizando o campo magnético corrigido e a frequência inicialmente medida no medidor de frequências usando a equação 2.

O método para o cálculo da densidade de spins utiliza uma amostra com densidade de spins conhecidas. No caso a amostra utilizada foi o silício amorfo. Determina-se a densidade de spins para as amostras de melanina sintetizadas em água e em DMSO¹⁰.

O método consta de:

- 1) Medir inicialmente a quantidade de massa utilizada em cada amostra;
- 2) Com o espectro corrigido da amostra obtêm-se a intensidade y_1 do sinal e também o ΔH_{pp1} de acordo com a Figura 10;

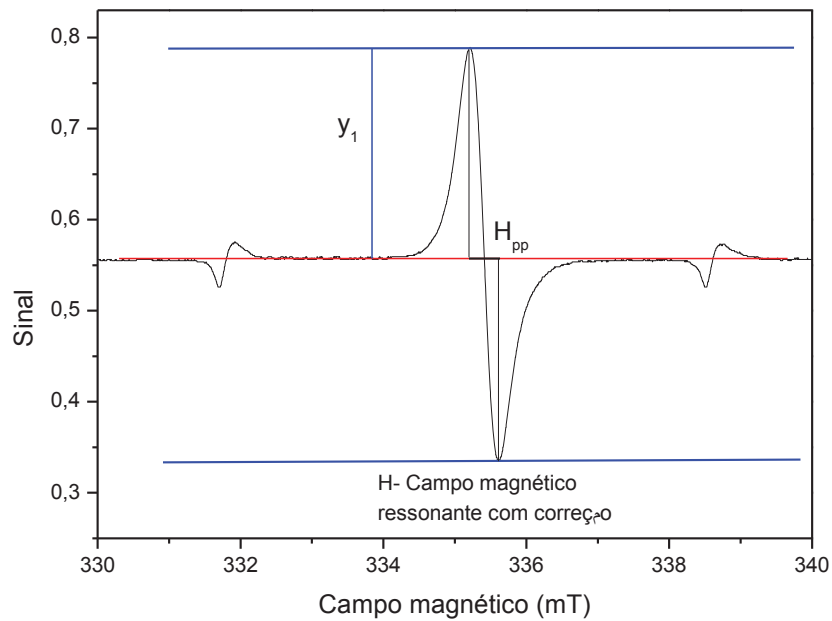


Figura 10: Intensidade y_1 do sinal de EPR e ΔH_{pp1} da amostra de melanina

- 3) Com o espectro de EPR do silício obtêm-se a intensidade y_2 do sinal, além também do ΔH_{pp2} , seguindo o passo 2 para o espectro de EPR do silício. O número de spins (A_2) para o silício é conhecido e será utilizado;
- 4) Utilizando a equação abaixo, que determina o número de spins na amostra de melanina (A_1);

$$A_1 = A_2 \frac{y_1 (\Delta H_{pp1})^2}{y_2 (\Delta H_{pp2})^2}$$

- 5) Para a determinação da densidade de spins, dividiu-se o número de spins da melanina (A_1) pela massa inicialmente pesada.

As medidas de EPR foram realizadas junto com o aluno de mestrado Andrei Paulo de Assis do Laboratório de Novos Materiais e Dispositivos (LNMD) na Unesp de Bauru.

Capítulo 3: Materiais Utilizados e Procedimento Experimental

3.1- Reagentes Utilizados

Para a obtenção da melanina os reagentes utilizados foram: o 3,4-dihidroxifenil-L-alanina (L-Dopa) da marca Acros Organics (99%), Peróxido de benzoíla da marca Vetec (75%). Continuando a Acetonitrila da marca Tedia, e Dimetilsulfóxido P.A. (DMSO) da marca Vetec (99,9%).

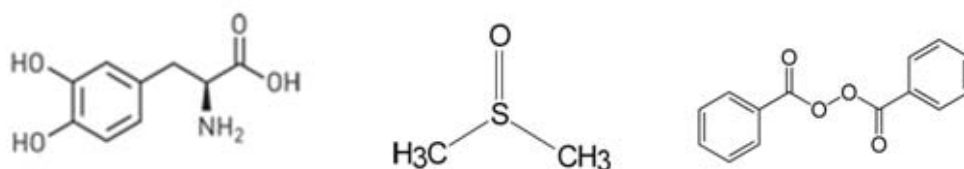


Figura 11: Reagentes utilizados na síntese de melanina em DMSO. Respectivamente da esquerda para a direita: L-Dopa, DMSO e peróxido de benzoíla.

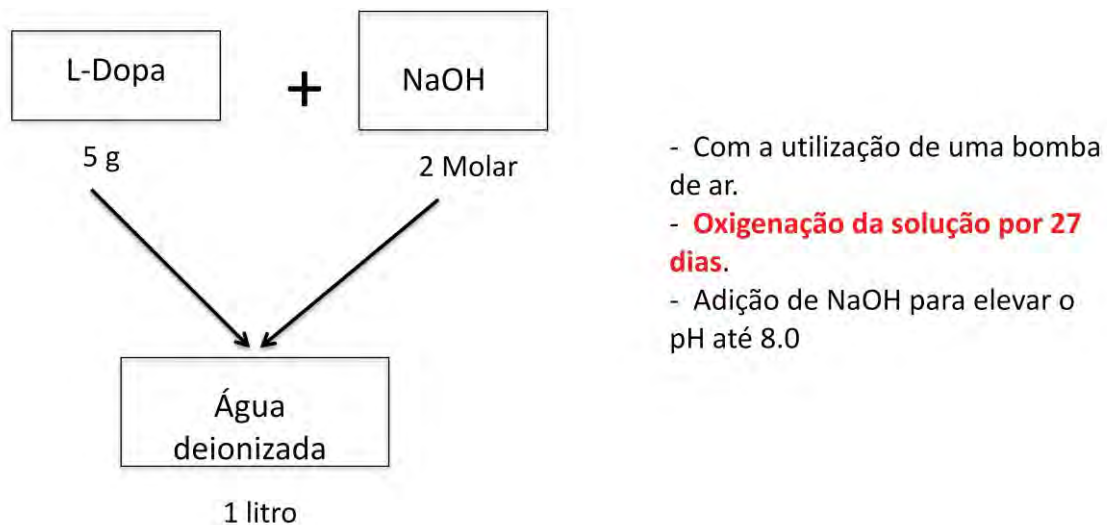
Com esses reagentes, quatro procedimentos foram realizados, para a obtenção da melanina. A síntese de melanina em água, síntese de melanina em DMSO, e a síntese em DMSO com adição de 5% e 10% de água no volume final da solução.

3.2- Procedimento Experimental

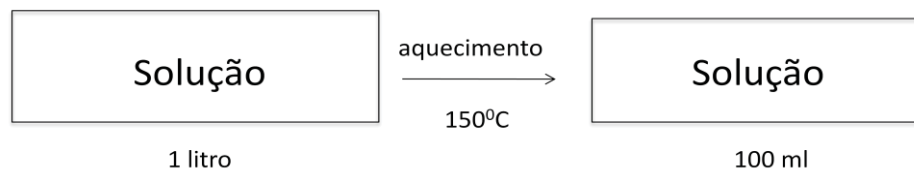
3.2.1- Síntese aquosa

Para a obtenção da melanina em água, o procedimento experimental utilizado segue o fluxograma, dividido em três partes, abaixo:

Parte 1: Síntese. Proporção 1:1:1 (mol)

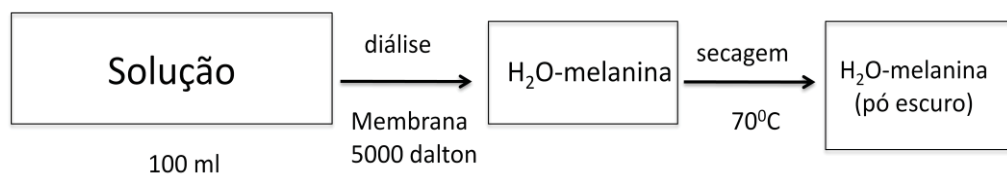


Parte 2: Evaporação da solução



- O aquecimento foi realizado em uma chapa térmica acima de 100°C.

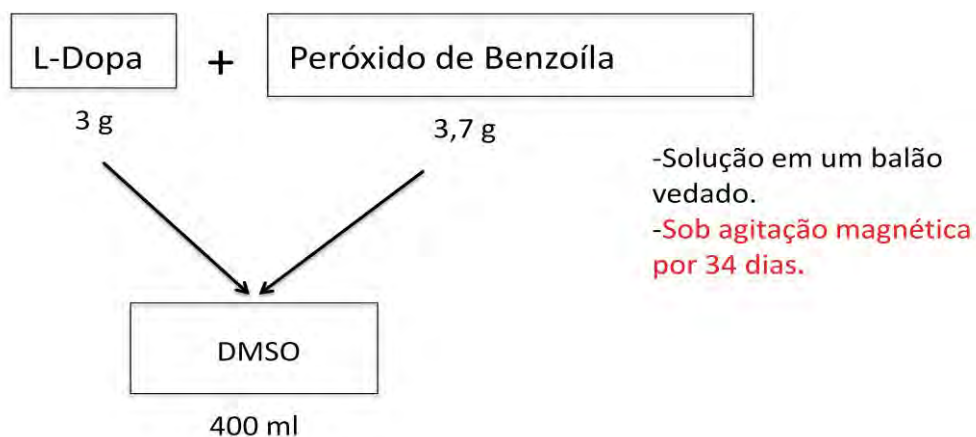
Parte 3: Extração, secagem e obtenção do pó



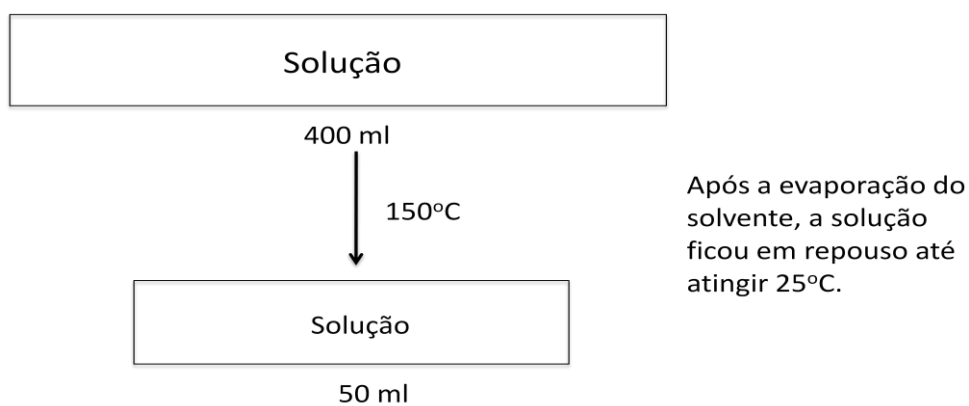
3.2.2- Síntese em DMSO

A síntese de melanina em DMSO foi obtida também em três partes, de acordo com o fluxograma abaixo:

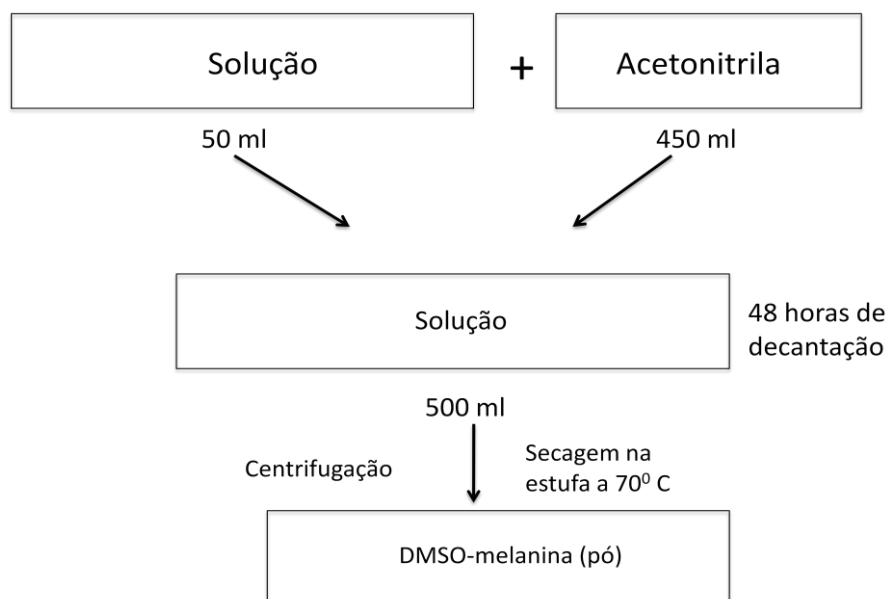
Parte 1: Síntese. Proporção 1:1:1 (mol)



Parte 2: Evaporação do Solvente



Parte 3: Purificação e Decantação da solução



3.2.3- Síntese de melanina em DMSO com diferentes concentrações de peróxido de benzoíla:

Para a obtenção da DMSO-melanina com diferentes concentrações de peróxido, o procedimento experimental utilizado foi o mesmo apresentado na seção 3.2.2. Onze sínteses com diferentes concentrações de peróxido de benzoíla foram realizadas para determinar a sua quantidade ideal para uma síntese de alto rendimento, mostrado na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Composições em mol dos reagentes utilizados nas sínteses em DMSO.

	Peróxido de Benzoíla	L-Dopa	DMSO
1:1:1	1 mol	1 mol	1 mol
0,9:1:1	0,9 mol	1 mol	1 mol
0,8:1:1	0,8 mol	1 mol	1 mol
0,7:1:1	0,7 mol	1 mol	1 mol
0,6:1:1	0,6 mol	1 mol	1 mol
0,5:1:1	0,5 mol	1 mol	1 mol
0,4:1:1	0,4 mol	1 mol	1 mol
0,3:1:1	0,3 mol	1 mol	1 mol
0,2:1:1	0,2 mol	1 mol	1 mol
0,1:1:1	0,1 mol	1 mol	1 mol
0,01:1:1	0,01 mol	1 mol	1 mol

As quantidades em volume de DMSO e gramas de L-Dopa e peróxido de benzoíla, são apresentados na Tabela 2. Em seguida, vedou-se o béquer com parafilm e colocou-se a reação para agitar em um agitador magnético durante 24 horas, observando-se a mudança de coloração das reações. Devido a demora na mudança de coloração das sínteses com proporções estimadas em 0,1:1:1 e 0,01:1:1, as mesmas foram descartadas. As outras reações foram mantidas sob agitação a temperatura ambiente, por 34 dias. As sínteses foram realizadas com o auxílio da aluna de iniciação científica Nicole Ieno Fernandes.

Tabela 2: Quantidade de reagentes utilizados nas sínteses em DMSO.

	Peróxido de Benzoíla (g)	L-Dopa (g)	DMSO (mL)
1:1:1	0,0925	0,075	10
0,9:1:1	0,0832	0,075	10
0,8:1:1	0,0740	0,075	10
0,7:1:1	0,0647	0,075	10
0,6:1:1	0,0555	0,075	10
0,5:1:1	0,0462	0,075	10
0,4:1:1	0,0370	0,075	10
0,3:1:1	0,0277	0,075	10
0,2:1:1	0,0185	0,075	10
0,1:1:1	0,0370	0,3	40
0,01:1:1	0,0037	0,3	40

3.2.4- Síntese em DMSO com adição de água.

Para as sínteses em DMSO com água deionizada, utilizou-se o mesmo método utilizado na síntese de melanina em DMSO. As quantidades de reagentes utilizadas para cada síntese podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3: Composições dos reagentes utilizados nas sínteses em DMSO com água deionizada.

	5% de Água Deionizada	10% de Água Deionizada
DMSO (mL)	380	360
Água deionizada (mL)	20	40
L-Dopa (g)	3,0	3,0
Peróxido de Benzoíla (g)	3,7	3,7

Capítulo 4: Resultados

4.1-Teste de solubilidade

Experimentos realizados com a H₂O-melanina mostraram que a mesma é insolúvel em água. Devido a esse resultado outros testes de solubilidade foram feitos em amostras de melanina sintetizadas em água e em DMSO.

O teste de solubilidade consistia simplesmente em adicionar diferentes solventes como pör exemplo: metanol, tetrahidrofurano, acetona, acetato de etila, etanol, clorofórmio, água e o próprio DMSO, ao composto sólido final, obtido após o processo de síntese em água e DMSO.

O resultado do teste de solubilidade está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Teste de solubilidade

Solventes	H ₂ O-melanina	DMSO-melanina recém sintetizada	DMSO-melanina envelhecida
Metanol	I	I	I
Tetrahidrofurano	I	I	I
Acetona	I	I	I
Acetato de etila	I	I	I
Etanol	I	I	I
Clorofórmio	I	I	I
Água	I	I	I
DMSO	I	S	I

* (S) - Solúvel

(I)- Insolúvel

De acordo com a tabela, somente a melanina recém sintetizada apresentou solubilidade e em seu próprio solvente, no DMSO. Porém um resultado que nos chamou a atenção é a DMSO-melanina envelhecida não apresentar solubilidade nem mesmo em seu próprio solvente. Evidenciando pela primeira vez que as amostras de melanina obtidas pelo processo de síntese em água e em DMSO apresentam diferenças em sua estrutura molecular.

Com esse primeiro resultado, as medidas de caracterização foram iniciadas, no intuito de se determinar a estrutura química obtida pelos diferentes procedimentos analisados durante esse trabalho.

4.2- Diferenças entre H₂O-melanina e DMSO-melanina

Antes de iniciar a análise propriamente dita dos espectros de UV-Vis, vale ressaltar que os mesmos foram obtidos por métodos diferentes, em função da insolubilidade da melanina em diferentes solventes. O espectro da H₂O-melanina foi obtido logo após o término da síntese ainda em solução aquosa, porque o pó de H₂O-melanina obtido após o processo de extração é totalmente insolúvel, mesmo em água. Porém para a DMSO-melanina, primeiramente o pó foi extraído e após isso uma solução de DMSO-melanina foi obtida e medida. A diferença entre as duas medidas é que, além dos solventes utilizados na medida do espectro serem diferentes, para a melanina em água, não há garantia do produto obtido estar totalmente livre de impurezas provenientes da síntese.

Os espectros obtidos para as amostras estão apresentados na Figura 12 a seguir.

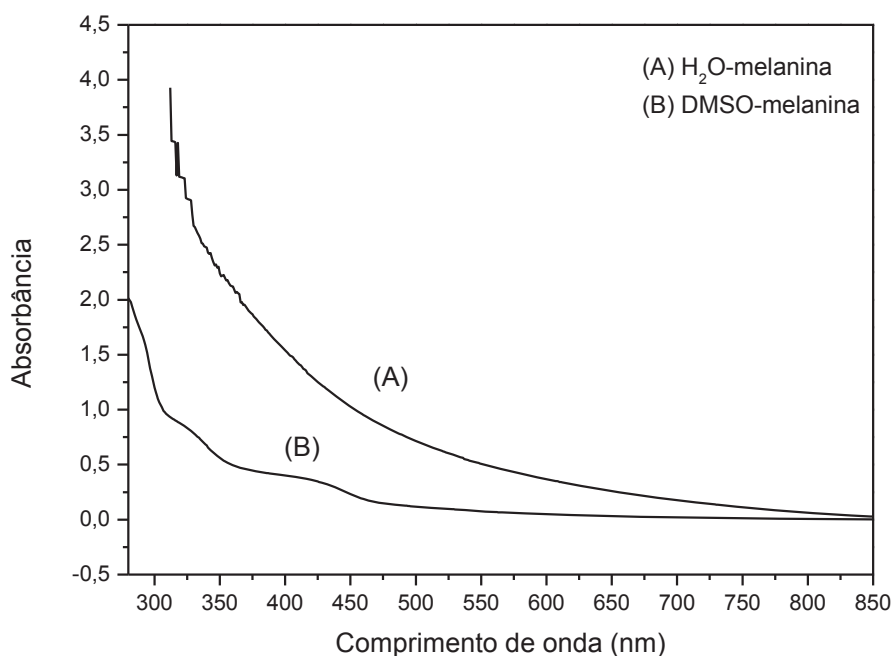


Figura 12: Espectro de Absorção da H₂O-melanina e da DMSO-melanina

De acordo com a Figura 12, a H₂O-melanina apresenta uma maior intensidade de absorção em comparação a DMSO-melanina, além também de apresentar uma curva de absorção mais homogênea, sugerindo inicialmente que as amostras de melanina apresentam diferenças em sua estrutura química. A diferença de homogeneidade na curva de absorção é explicada pela diferença de monômeros presentes na estrutura das amostras. Os monômeros que formam a H₂O-melanina são mais homogêneos em comparação a DMSO-melanina.

Os cromóforos, que são partes ou conjuntos de átomos de uma molécula responsável por sua cor, são os responsáveis pelo espectro de absorção de qualquer material. Estudos de simulação para a melanina, no caso a eumelanina, mostraram que a eumelanina apresenta em sua estrutura onze cromóforos. Por isso a explicação da eumelanina ser escura e possuir a curva de absorção característica, a Figura 13 mostra o espectro simulado da eumelanina.

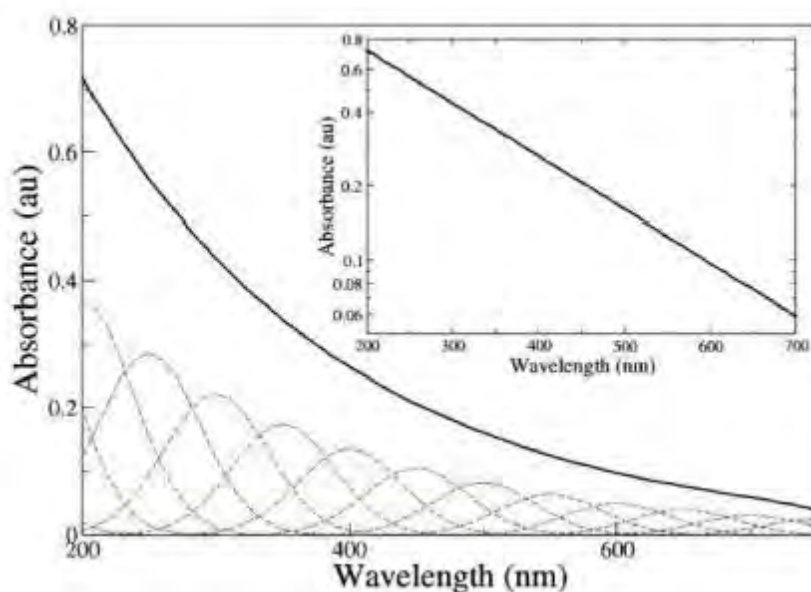


Figura 13: Espectro simulado da eumelanina. O espectro é composto por onze cromóforos diferentes presentes na estrutura da eumelanina, sendo que cada banda de absorção tracejada abaixo da curva de absorção corresponde à um cromóforo. Figura retirada do trabalho de Meredith⁴⁰.

Com a utilização da espectroscopia UV-Vis, um segundo estudo foi realizado, fixando um comprimento de onda, no caso o comprimento de onda que apresente valores de absorção altos (320 nm), sobre o processo de formação da melanina, em qual das duas sínteses: a síntese em água ou a síntese em DMSO produziria uma quantidade maior de melanina?

A Figura 14 mostra o resultado obtido.

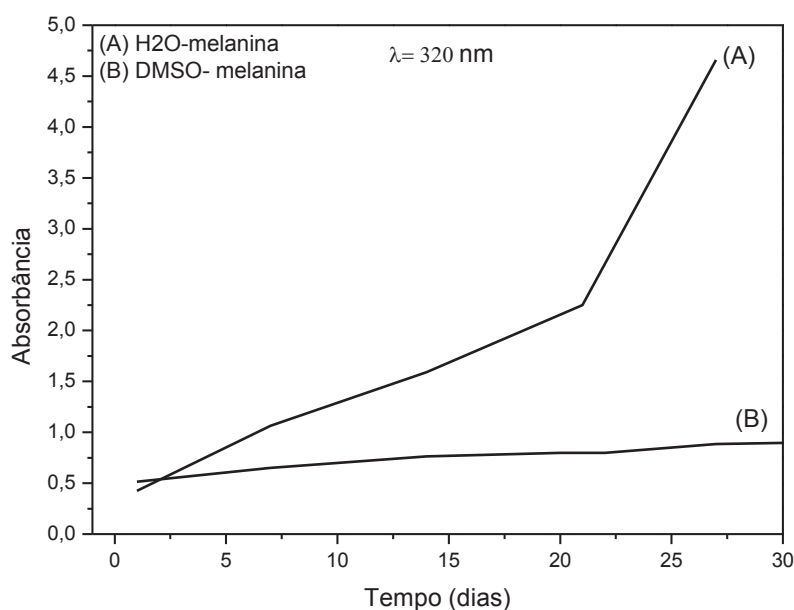


Figura 14: Comparação no processo de formação de melanina nas sínteses de água e na síntese de DMSO, fixando o comprimento de onda em 320 nm.

De acordo com a Figura 14, o processo de formação da melanina é maior na síntese em água em comparação a síntese em DMSO. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, a absorbância é diretamente proporcional a concentração, a figura 14 mostra a absorbância maior para a H₂O-melanina, como o caminho óptico (L) é constante e o coeficiente molar (ε) também, a absorbância irá variar com a concentração, no caso a H₂O-melanina apresenta uma concentração de melanina maior em comparação a DMSO-melanina.

Outro resultado que chama a atenção é o aumento da absorção da H₂O-melanina principalmente no final do processo de síntese em aproximadamente 23 dias. Uma possível explicação para isso é além da oxidação da L-Dopa, um outro processo químico pode estar ocorrendo. Com isso novos estudos deverá ser feito na síntese de melanina em água.

A espectroscopia RAMAN foi utilizada para estudar as diferenças na estrutura química da H₂O-melanina e da DMSO-melanina.

O espectro de RAMAN obtido corresponde ao chamado ``breathing mode`` de vibração dos anéis aromáticos presentes na estrutura química do grafeno e da melanina, de acordo com a Figura 15.

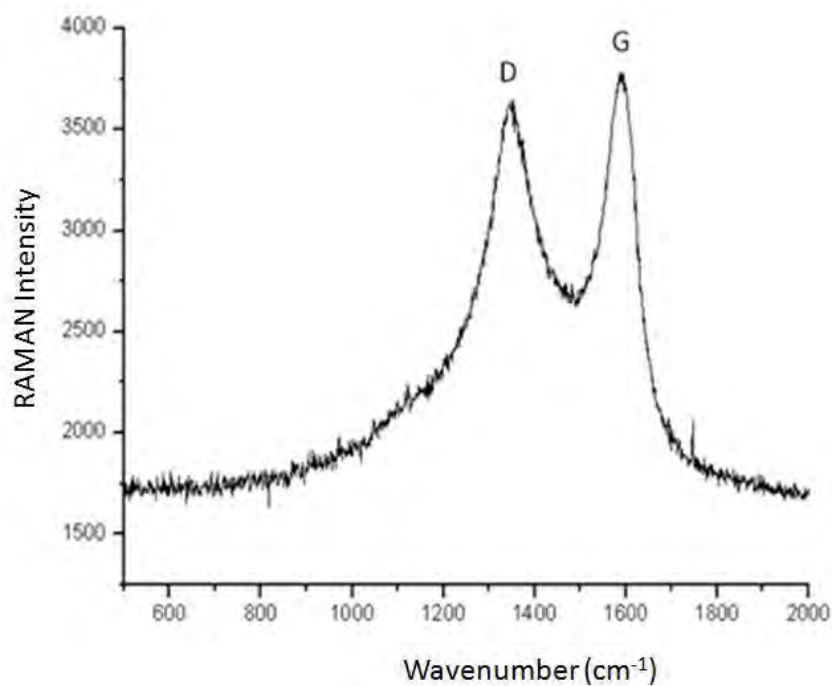


Figura 15: Espectro RAMAN para o grafeno e movimento de vibração "Breathing Mode" dos anéis aromáticos presentes na melanina e no grafeno².

A Figura 16 mostra o espectro de RAMAN obtido para as amostras de melaninas. Os picos em destaque são denominados picos D e G. O pico D representa os estiramentos lineares das ligações C-C nos anéis aromáticos e o pico G representa os estiramentos no plano dos anéis aromáticos presentes na estrutura da melanina²³.

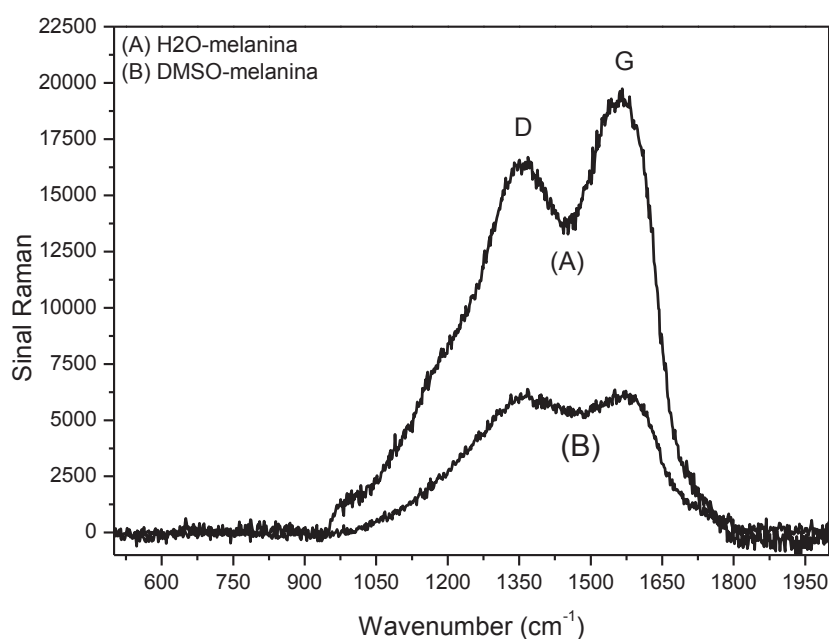


Figura 16: Espectro RAMAN para a H₂O-melanina e DMSO-melanina.

Pela Figura 16, a H₂O-melanina apresenta um espectro de RAMAN com picos (D e G) bem definidos em comparação à DMSO-melanina. Esse resultado indica que a H₂O-melanina apresenta uma estrutura e um arranjo químico mais organizado em comparação a DMSO-melanina.

A Figura 17 apresenta os espectros de FTIR para as duas amostras: a H₂O-melanina e a DMSO-melanina.

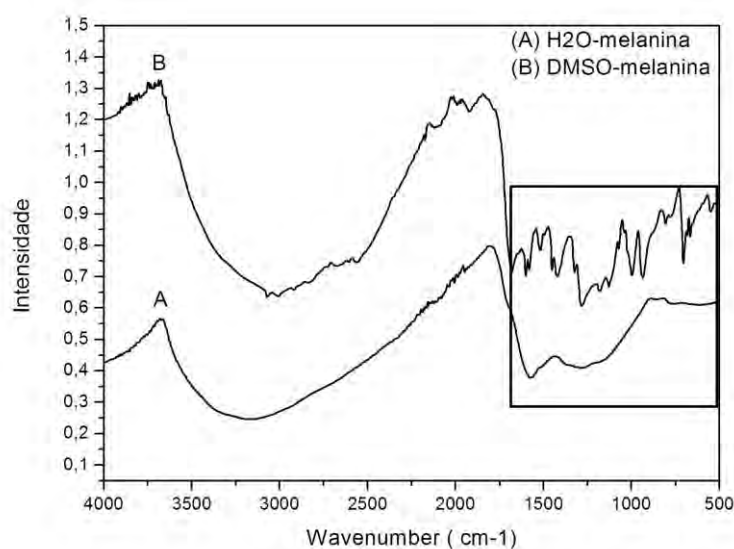


Figura 17: Espectro de Infravermelho para as amostras de melanina em água e em DMSO.

O espectro de infravermelho comprova que ambas as amostras apresentam diferenças significativas em suas estruturas químicas, principalmente no intervalo de $1800\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$.

A larga banda presente entre 3500 cm^{-1} e 2500 cm^{-1} representa o estiramento OH. O intervalo entre 1800 cm^{-1} e 400 cm^{-1} é apresentado na Figura 18.

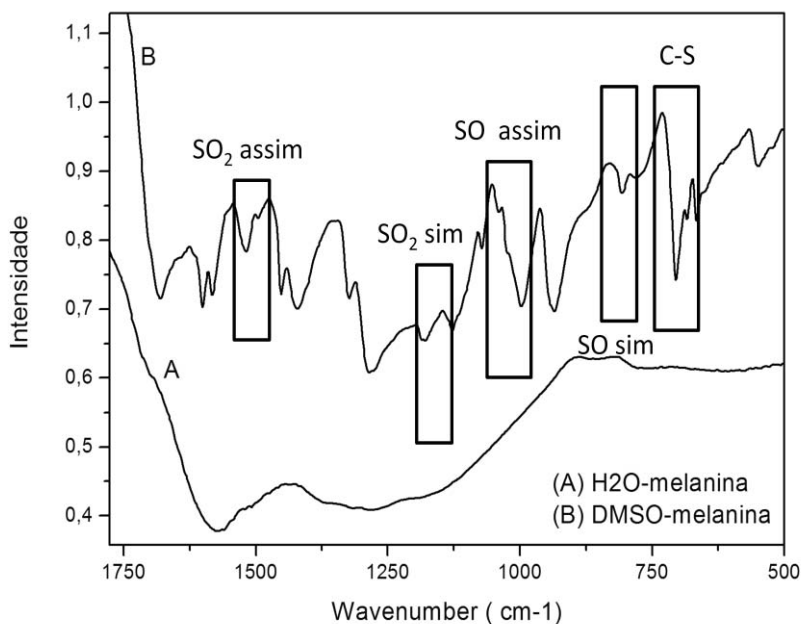


Figura 18: Espectro de infravermelho no intervalo de $1800\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$

A Tabela 5 mostra as bandas presentes na DMSO-melanina e ausentes no espectro da H₂O-melanina.

Tabela 5: Bandas presentes no espectro de infravermelho na DMSO-melanina

Número de onda (cm^{-1})	Tipo de ligação	Tipo de modo vibracional
1420-1330	-SO ₂	Asym Stretching
1235-1145	-SO ₂	Sym stretching
1020-850	-SO	Asym stretching
830-690	-SO	Sym stretching
700-600	-C-S	Stretching

De acordo com a análise das bandas presentes na melanina em DMSO, vemos a presença de grupos sulfonados na estrutura química que possivelmente alteram a solubilidade do composto.

A ressonância magnética eletrônica também foi usada para apontar diferenças na estrutura da melanina sintetizada em água e da melanina sintetizada em DMSO. A Figura 19, apresenta os espectros obtidos para as respectivas amostras.

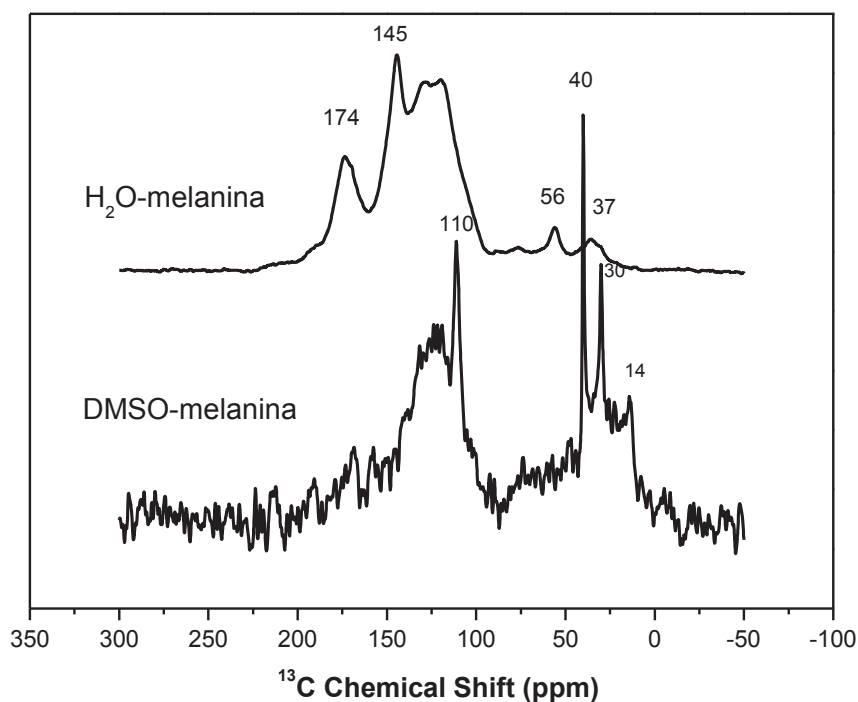


Figura 19: ^{13}C RMN das melaninas em água e em DMSO.

Com relação a H₂O-melanina, os sinais apresentados correspondem respectivamente a:

- 37 ppm e 56 ppm são respectivos a L-dopa ainda presentes na solução;
- 145 ppm carbono ligado a hidroxila (C-OH);
- 174 ppm são carbonos relativos a carbonila da quinona ou DHICA;

Para a DMSO-melanina, os picos apresentados correspondem respectivamente a:

- 40 ppm – grupos sulfonados, provenientes de DMSO restante no meio reacional ou grupos sulfonados realmente presentes na estrutura química da melanina obtida.
- 30 ppm- possível proteção do nitrogênio do grupo indólico.
- 110 até 140 ppm- anéis aromáticos;
- 174 ppm- são carbonos relativos a carbonila da quinona ou DHICA;

Na comparação entre os espectros, a ausência dos sinais em 145 ppm, referente a grupos C-OH indica a proteção dos grupos hidroxilas presentes na estrutura da DMSO-melanina.

A alta concentração de centros paramagnéticos na melanina possibilita o uso da espectroscopia de EPR. Os elétrons desemparelhados localizados nos átomos de oxigênio nos grupos indols-5,6-quinonas são os centros paramagnéticos na melanina³³.

A Figura 20 mostra a comparação entre os dois espectros de EPR obtidos.

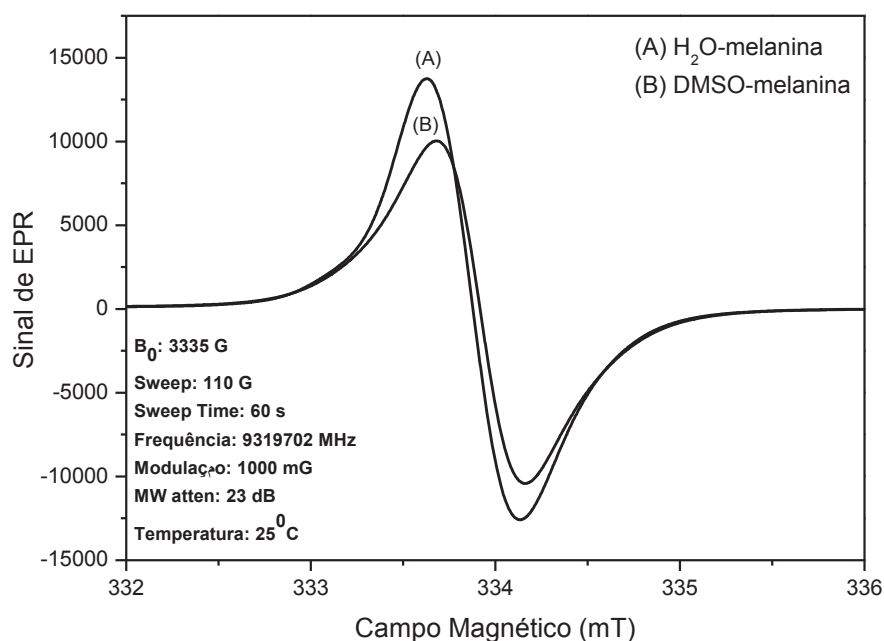


Figura 20: Comparação entre os espectros de EPR obtidos para as amostras de H₂O-melanina e DMSO-melanina

A semelhança dos fatores g obtidos para as amostras de melanina em água ($2,0045 \pm 0,0001$) e em DMSO ($2,0042 \pm 0,0001$) mostra que os centros paramagnéticos das amostras localizam-se nas mesmas posições tanto da DMSO-melanina quanto na H₂O-melanina, no caso nos oxigênios da semiquinona⁴². Além disso, a largura de linha (ΔH_{pp}) para a H₂O-melanina é maior em comparação a amostra de DMSO-melanina, sendo $0,52 \pm 0,01$ mT e $0,49 \pm 0,01$ mT respectivamente. A densidade de spins também é diferente para a amostra de DMSO-melanina e H₂O-melanina, a DMSO-melanina apresenta uma quantidade menor de spins presentes em sua estrutura química ($1,2 \pm 0,1 \times 10^{17}$ spins/grama), já a amostra de H₂O-melanina possui em sua estrutura ($1,4 \pm 0,1 \times 10^{17}$ spins/grama).

4.3- Efeito do peróxido de benzoíla na síntese de melanina em DMSO.

Com o início do projeto, uma dúvida surgiu: Qual seria o papel do peróxido de benzoíla na síntese de melanina em DMSO? Seria somente de agir como um catalisador? Ou o peróxido de benzoíla agiria como um reagente, assim como a L-Dopa, participando diretamente na síntese e na obtenção da melanina?

Com essa pergunta em mente, o estudo do efeito do peróxido de benzoíla se iniciou, junto com a aluna de iniciação Nicole Ieno Fernandes. Inicialmente acreditava-se que o peróxido atuaria na síntese como um catalisador, acelerando o processo de oxidação da L-Dopa no DMSO.

Utilizando a técnica de espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), mediu-se o espectro de IR do peróxido de benzoíla e do DMSO separadamente e também o espectro de IR da solução peróxido de benzoíla mais DMSO. O resultado obtido está na Figura 21.

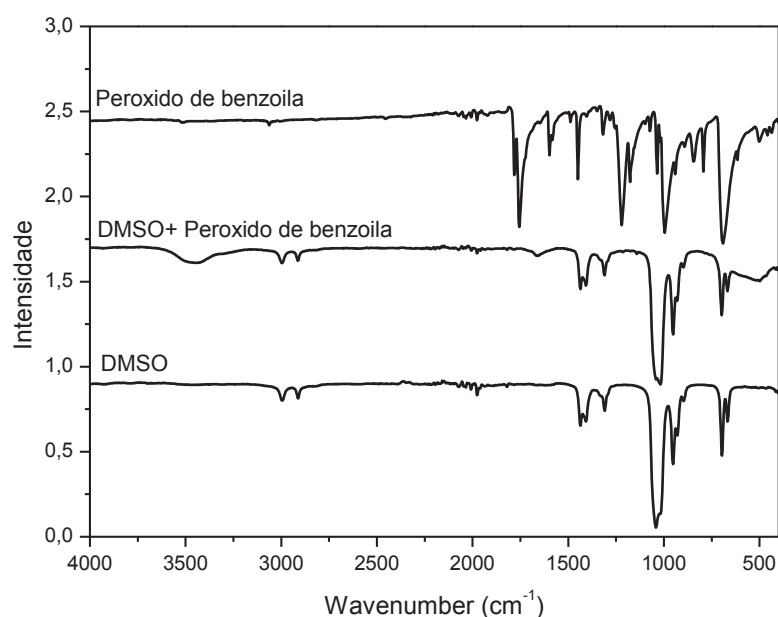


Figura 21 : Espectros de IR para o DMSO, peróxido de benzoíla e da solução DMSO+peróxido de benzoíla

De acordo com a Figura 21, o peróxido de benzoíla é consumido e reage com o DMSO, respondendo a dúvida inicial, se o peróxido de benzoíla atuaria como o catalisador na reação. Para ser um catalisador, as bandas que caracterizam o peróxido de

benzoíla deveriam estar presentes no espectro da solução DMSO + peróxido de benzoíla. E isso não é observado, inclusive outras bandas surgem no espectro da solução DMSO + peróxido de benzoíla.

Com a primeira dúvida respondida, sobre o efeito catalisador do peróxido de benzoíla na síntese, a segunda pergunta também foi respondida, o peróxido de benzoíla participa e tem papel importante na síntese de melanina em DMSO assim como a L-dopa e o próprio DMSO.

Através desses resultados partiu-se para um segundo estudo: ``A quantidade de peróxido de benzoíla ideal para a obtenção da DMSO-melanina``. Para a realização desse estudo utilizou-se a técnica UV-vis, novamente fixando o comprimento de onda em 320 nm e analisando a absorção em função da concentração de peróxido de benzoíla em uma síntese de 27 dias de acordo com a Figura 22.

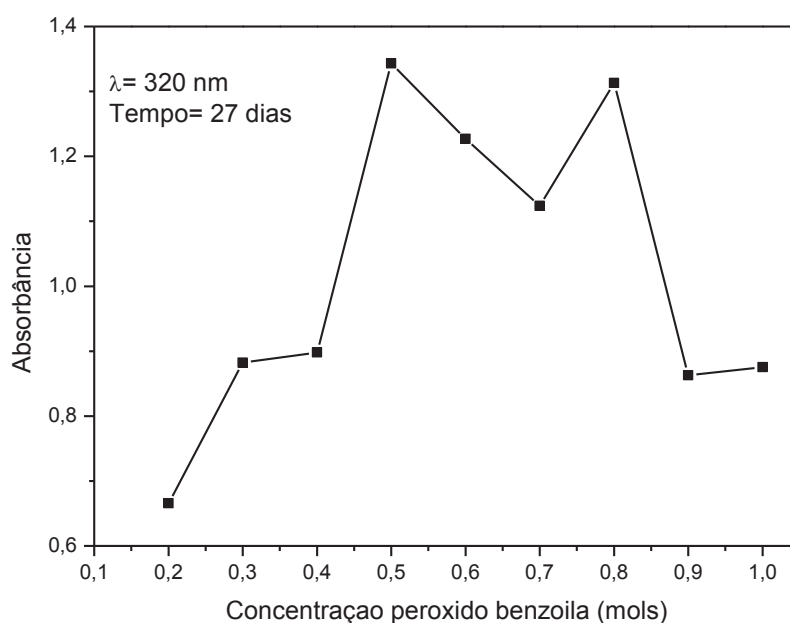


Figura 22 : Concentração de peróxido de benzoíla versus a absorbância, no comprimento de onda de 320 nm, após 27 dias de síntese.

De acordo com a Figura 22, a concentração ideal foi a de 0,5 mols de peróxido de benzoíla seguindo de 0,8 mols de peróxido de benzoíla. A partir desse resultado a síntese para a obtenção da melanina em DMSO passa a ser de 1: 0,5: 1 ou, 3 g de L-Dopa, 1,85 g de peróxido de benzoíla e 400 ml de DMSO.

4.4- Efeito da água adicionada na síntese de melanina em DMSO.

O dimetilsulfóxido é um solvente orgânico higroscópico, ou seja, o DMSO tem a tendência natural de absorver a umidade do ar, devido a essa propriedade, um estudo sobre o efeito da água adicionada na síntese de melanina em DMSO foi realizado. O estudo foi realizado com duas sínteses: a primeira com 5% de água no volume total da solução, ou seja, 20 ml de água deionizada em 380 ml de DMSO resultando em 400 ml de solução total e a segunda síntese com 10% de água no volume total da síntese, sendo 40 ml de água deionizada em 360 ml de DMSO. As técnicas de caracterização utilizadas foram: UV-Vis, RAMAN, EPR, e ^{13}C RMN em estado sólido.

Com relação às medidas de UV-Vis, o espectro de absorção da melanina em DMSO com a adição de água não sofre mudanças significativas, como pode ser observado na Figura 23.

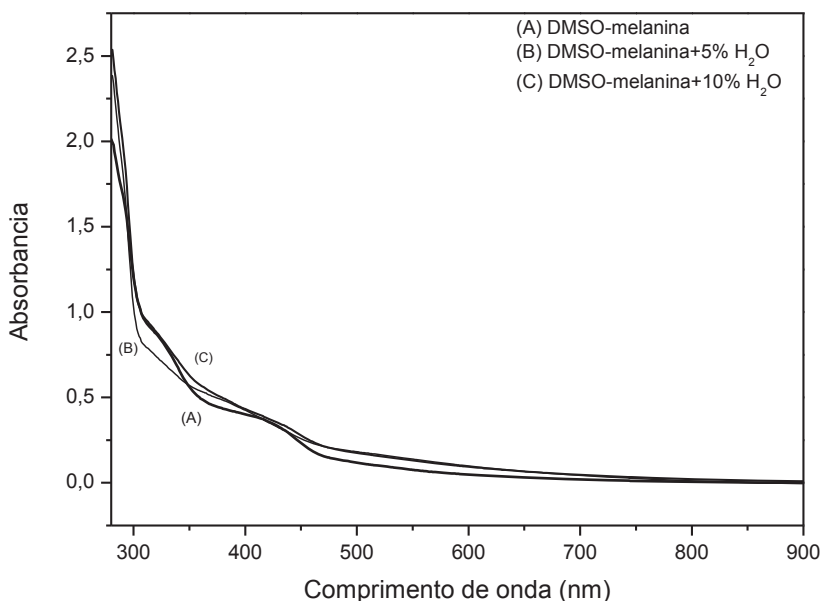


Figura 23 : Comparação dos espectros de UV-Vis para as melaninas sintetizadas em água, DMSO e DMSO+água.

A adição de água na síntese de melanina em DMSO, de acordo com as medidas de UV-Vis não altera significativamente o meio reacional, ou seja, os monômeros formadores da DMSO-melanina continuam sendo heterogêneos.

A espectroscopia RAMAN também foi utilizada para analisar possíveis diferenças na estrutura e no arranjo dos clusters. A Figura 24, mostra os resultados obtidos.

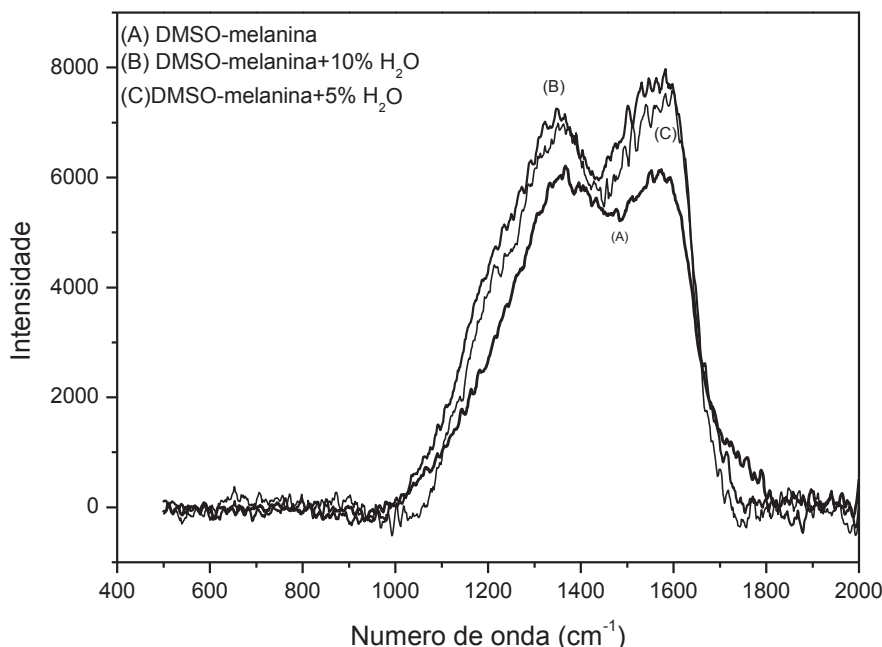


Figura 24 : Espectroscopia RAMAN para as melaninas em água, DMSO, DMSO com 5% de água e DMSO com 10% de água no volume total da solução.

De acordo com a Figura 24, percebe-se que a adição de água na síntese em DMSO auxília, porém de forma discreta, o arranjo estrutural da melanina. Isso se torna evidente devido a uma melhor definição dos picos D e G em comparação a DMSO-melanina. Ou seja, a adição de água na síntese faz com que os monômeros formadores da melanina estejam mais organizados, tornando-se mais homogêneos em comparação aos clusters da DMSO-melanina, dando início a suposição de que a adição de água na síntese de melanina faz com que a estrutura comece a ser semelhante a estrutura da melanina em água.

As medidas de RMN de carbono em estado sólido foram utilizadas para auxiliar na identificação da estrutura química da melanina, por isso ela é considerada também uma técnica de caracterização estrutural. A Figura 25 apresenta as medidas obtidas de ¹³C RMN.

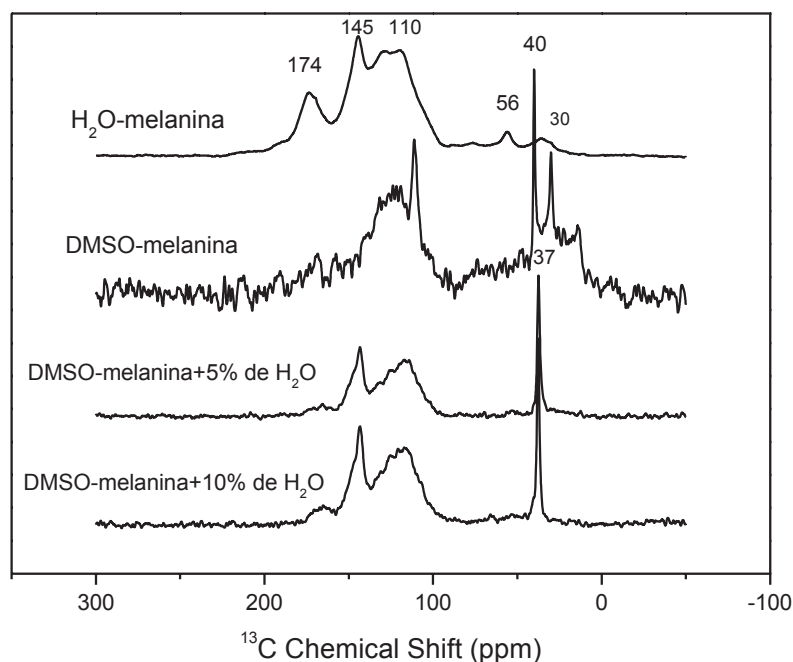


Figura 25: Espectros de ^{13}C RMN para as amostras de melanina.

Com relação à Figura 25, as moléculas de água presentes na DMSO-melanina, mostram significativas alterações na estrutura da molécula. O pico em 145 ppm mostra a semelhança na estrutura da H_2O -melanina, correspondendo a presença de carbonos ligados a hidroxilas (C-OH). Em 40 ppm, observa-se a presença dos grupos sulfonados.

Portanto a adição de água na síntese de melanina em DMSO, faz com que o produto final seja um híbrido de H_2O -melanina e DMSO-melanina. A DMSO-melanina com porcentagens de água, mesmo possuindo grupos sulfonados em sua estrutura, é um material insolúvel.

As medidas de EPR foram obtidas somente para as amostras de melanina em água, DMSO e DMSO com 10% de H_2O .

O experimento realizado seguiu o mesmo padrão utilizado nas amostras de H_2O -melanina e DMSO-melanina, calculou-se o fator g, a largura de pico a pico (ΔH_{pp}) e a densidade de spins.

A Figura 26 mostra o gráfico comparativo dos espectros de EPR das amostras de melaninas utilizadas nesse estudo, com o campo central corrigido e normalizado.

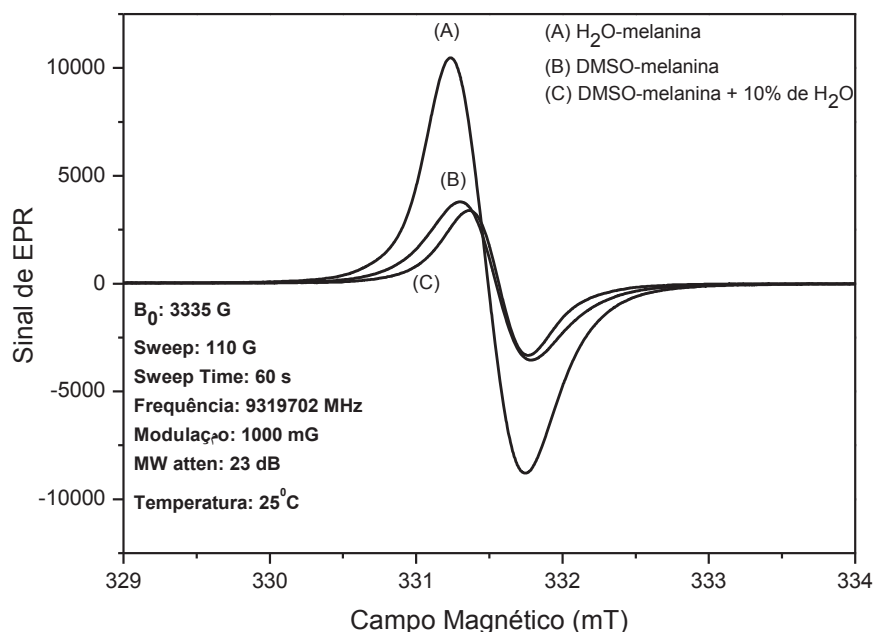


Figura 26: Espectros comparativos de EPR entre as amostras de DMSO-melanina, DMSO-melanina+10% de água e H₂O-melanina

Os resultados obtidos para as medidas de EPR mostram que a adição de água na síntese de melanina em DMSO não altera significativamente o fator g, o valor do fator g encontrado para a amostra de DMSO-melanina+10% de água foi de $2,0041 \pm 0,0001$ tendendo a um valor próximo ao da DMSO-melanina de $2,0042 \pm 0,0001$. Com relação aos valores obtidos para as larguras de linha (ΔH_{pp}), a DMSO-melanina+10% de água apresentou uma largura de linha menor ($0,41 \pm 0,01$ mT) em comparação as amostras de DMSO-melanina ($0,49 \pm 0,01$ mT) e H₂O-melanina ($0,52 \pm 0,01$ mT). Finalmente a densidade de spins também sofreu alteração, a DMSO-melanina com adição de água apresentou diminuição na densidade de spins ($2,9 \pm 0,1 \times 10^{16}$ spins/grama) em comparação as amostras de DMSO-melanina ($1,2 \pm 0,1 \times 10^{17}$ spins/grama) e H₂O-melanina ($1,4 \pm 0,1 \times 10^{17}$ spins/grama).

Além disso, sua solubilidade também é alterada, a DMSO-melanina com adição de água torna-se insolúvel ao ser colocada em DMSO.

Em resumo a DMSO-melanina sintetizada com 10% de água apresenta pequenas diferenças em sua estrutura apresentando características da DMSO-melanina e da H₂O-melanina, como pôr exemplo o mesmo valor de fator g em comparação a DMSO-melanina e a insolubilidade da H₂O-melanina.

4.5- DMSO-melanina envelhecida

Antes de iniciar a exposição dos resultados, deve-se deixar bem claro que as amostras utilizadas nesse subcapítulo são amostras de melanina envelhecida, ou seja, amostra de DMSO-melanina que foram sintetizadas em um grande período de tempo, no caso dessa amostra, sintetizada no ano de 2007 pelo procedimento utilizado para as amostras de DMSO-melanina recém sintetizadas. Lembrando que a DMSO-melanina recém sintetizada é solúvel em DMSO e a DMSO-melanina envelhecida é insolúvel no mesmo solvente portanto existe diferença na estrutura de ambas as amostras.

As técnicas de caracterização, FTIR e EPR, foram utilizadas para tentar determinar a diferença estrutural entre as duas amostras.

A primeira técnica utilizada para analisar e determinar diferenças na estrutura da DMSO-melanina envelhecida e DMSO-melanina foi a técnica de FTIR. A Figura 27 mostra o espectro comparativo entre as duas amostras.

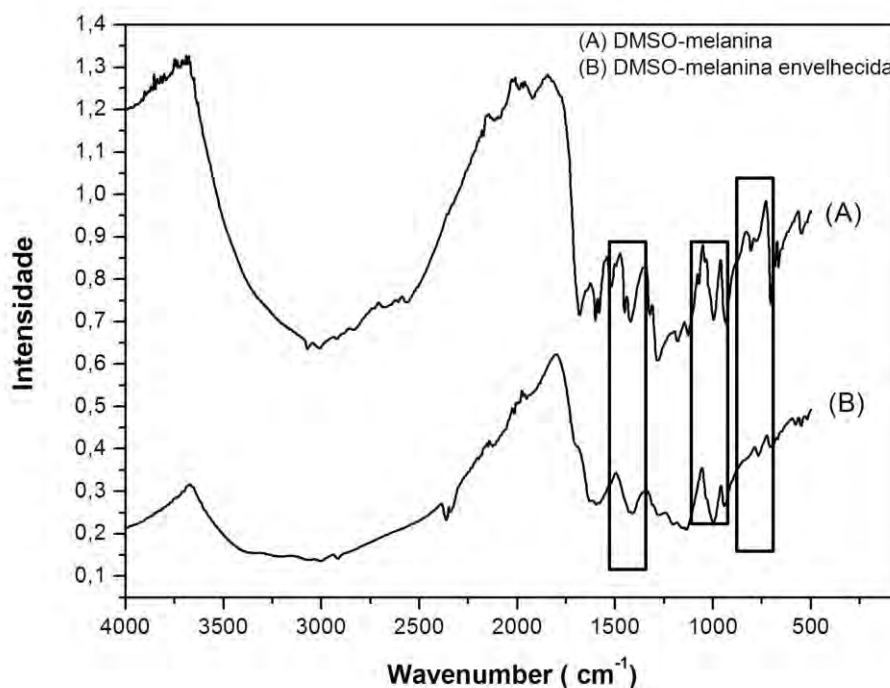


Figura 27: Espectro de FTIR para as amostras de DMSO-melanina e DMSO-melanina envelhecida.

De acordo com a Figura 27, percebemos diferenças significativas com relação à ausência de bandas na melanina envelhecida, principalmente com as bandas referentes

aos grupos sulfonados, por exemplo $700\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ referente à ligação C-S, no intervalo de $830\text{-}690\text{ cm}^{-1}$ ocorre diminuição de intensidade do pico referente ao estiramento SO e finalmente no intervalo de $1420\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ ocorre novamente à diminuição do pico referente também ao estiramento assimétrico do grupo SO_2 , que garante a solubilidade da DMSO-melanina recém sintetizada.

A Figura 28 mostra a comparação para os espectros de RMN de carbono entre as amostras de DMSO-melanina, H_2O -melanina e DMSO-melanina envelhecida.

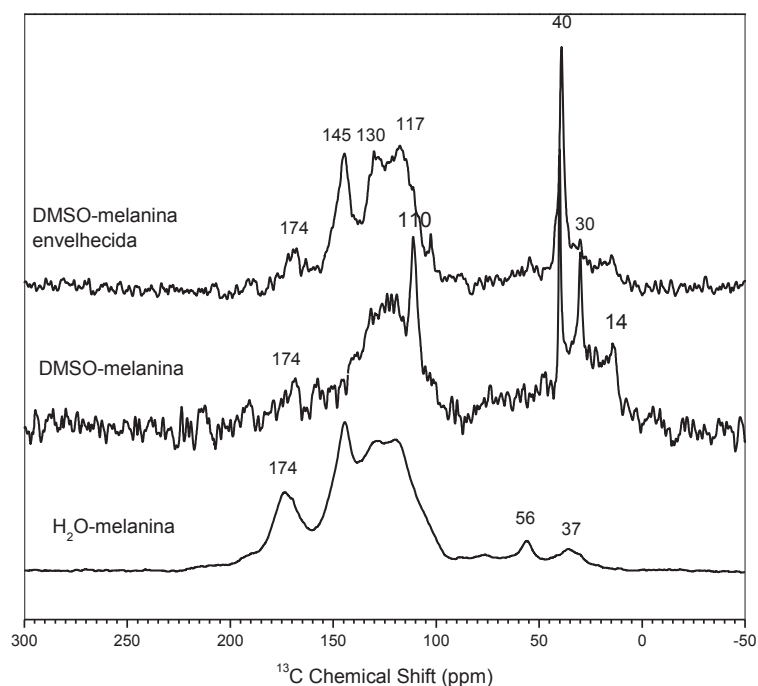


Figura 28: Espectros de ^{13}C RMN para as amostras de melanina

De acordo com a Figura 28, o espectro obtido para a amostra de DMSO-melanina envelhecida é semelhante ao espectro da H_2O -melanina, com o destaque ao aparecimento do pico em 145 ppm referente ao carbono ligado a hidroxila (C-OH), confirmando assim a degradação com o tempo dos grupos sulfonados presentes na DMSO-melanina recém sintetizada. Esse resultado corrobora com os resultados obtidos com a técnica de FTIR, a solubilidade da amostra de DMSO-melanina recém sintetizada se dá devido à presença dos grupos sulfonados presentes em sua estrutura.

O EPR também foi utilizado para diferenciar a estrutura entre a DMSO-melanina envelhecida e a DMSO-melanina recém sintetizada, principalmente utilizando o fator g para evidenciar essa mudança na estrutura da DMSO-melanina envelhecida.

Os espectros comparativos de EPR das amostras estão na Figura 29.

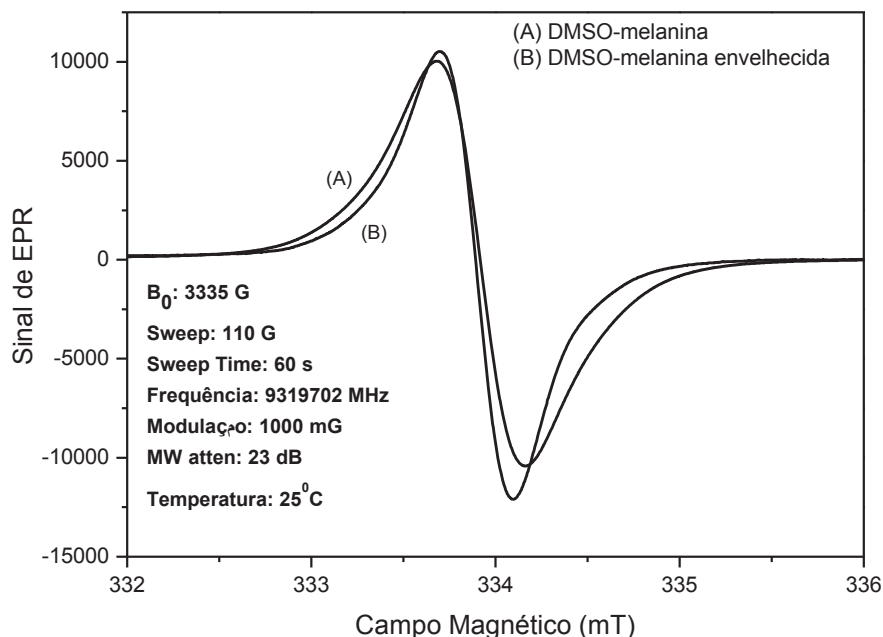


Figura 29: Espectro comparativo de EPR para as amostras de DMSO-melanina e DMSO-melanina envelhecida.

De acordo com os resultados obtidos, o fator g das amostras de DMSO-melanina envelhecida ($2,0044 \pm 0,0001$) e DMSO-melanina são semelhantes ($2,0042 \pm 0,0001$). A DMSO-melanina envelhecida apresentou respectivamente os valores de largura de linha e densidade de spins de $0,40 \pm 0,01$ mT e densidade de spins de $1,9 \pm 0,1 \times 10^{16}$ spins/grama, em comparação a amostra de DMSO-melanina que apresentou respectivamente a largura de linha de $0,49 \pm 0,01$ mT e densidade de spins de $1,2 \pm 0,1 \times 10^{17}$ spins/grama.

A Figura 29 e os resultados obtidos mostram que a DMSO-melanina envelhecida não possui alterações nos centros paramagnéticos presentes em sua estrutura química, o fator g da amostra não se altera em comparação a DMSO-melanina, porém a densidade de spins sofre diminuição.

Os resultados de EPR obtidos para as amostras de melanina corroboram com a literatura, na qual o valor de fator g para a melanina na literatura⁴⁸ é de 2,004, a largura de linha está no intervalo de 0,4 mT- 0,6 mT e a densidade de spins no intervalo de $4-10 \times 10^{17}$ spins/grama.

Capítulo 5: “Proposta de modelo estrutural para a DMSO-melanina”

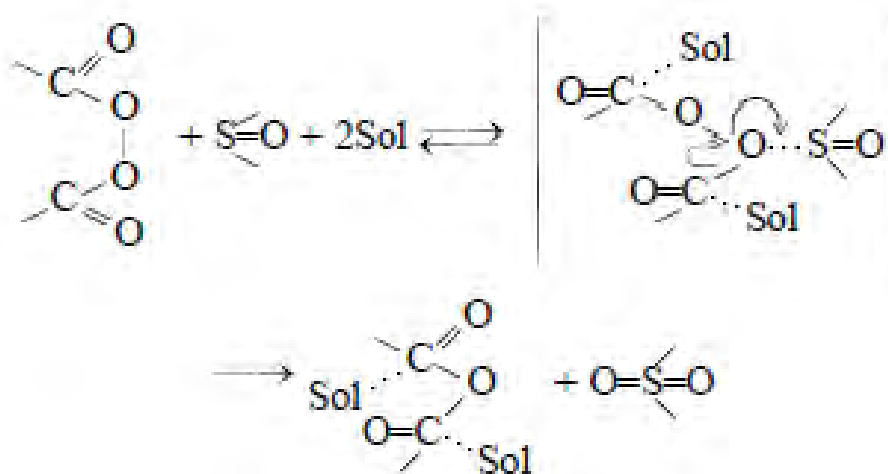
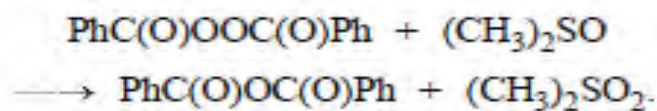
Neste capítulo será apresentado o mecanismo de reação para a síntese de melanina em DMSO de acordo com os resultados obtidos experimentalmente e de simulação computacional. Finalizando com os possíveis modelos estruturais propostos para a DMSO-melanina.

A explicação para o mecanismo reacional foi desenvolvida pela Dra. Érika Soares Bronze Uhle e a simulação computacional pelo aluno de doutorado Augusto Neto Batagin ambos do Laboratório de Novos Materiais e Dispositivos (LNMD) da Unesp de Bauru.

5.1- Reação de oxidação do DMSO com o peróxido de benzoíla.

A primeira reação química estudada é a reação química da oxidação do DMSO com o peróxido de benzoíla, mostrada anteriormente na Figura 23 e cujo mecanismo reacional está exposto no esquema 3 abaixo. O esquema 3 apresenta o mecanismo reacional dessa síntese.

Nesse esquema o DMSO tem o papel de solvatar o átomo de carbono da carbonila do peróxido enfraquecendo a ligação O-O e aumentando a reatividade. Lyavinets et al sugerem o seguinte mecanismo de oxidação do DMSO com peróxido de benzoíla conforme mostrado no esquema 3 abaixo³⁰.



Esquema 3: Oxidação do DMSO com peróxido de benzoíla³⁰.

Nesse mecanismo, ocorre a quebra do peróxido de benzoíla com incorporação do oxigênio proveniente do peróxido na molécula de DMSO, formando o composto químico dimetilsulfona $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$ e o anidrido benzóico. O papel dos solventes nas reações consiste, aparentemente, na solvatação do peróxido de benzoíla no átomo de carbono da carbonila, enfraquecendo assim a ligação O-O e reforçando a sua reatividade³⁰.

Medidas de FTIR comprovam o surgimento da dimetilsulfona após a adição de peróxido de benzoíla no DMSO, Figura 30.

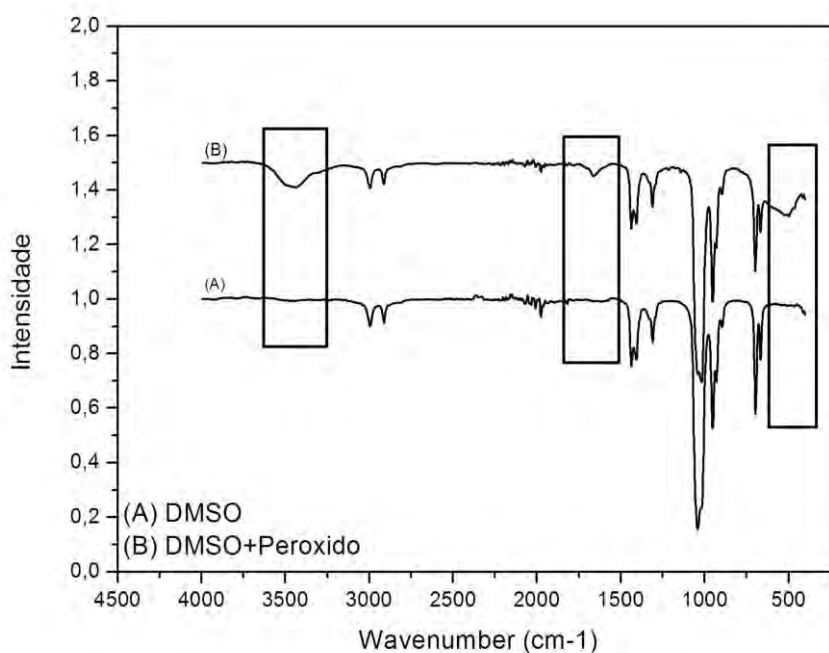
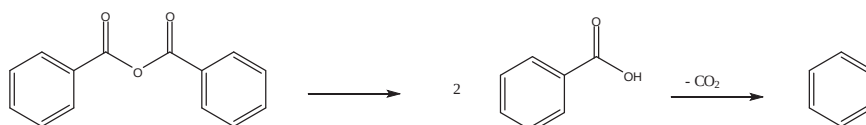


Figura 30: Espectro de FTIR para o DMSO e para a solução DMSO + Peróxido de Benzoíla.

A Figura 30 comprova a presença do grupo funcional SO_2 em 500 cm^{-1} , indicando assim a formação da dimetilsulfona. Com relação ao anidrido benzóico não há evidência da presença do mesmo no meio reacional, porém na região de 1700 cm^{-1} encontra-se uma banda referente ao benzeno, o que leva a crer que o anidrido benzóico sofreu degradação. Observa-se também a presença de ácido sulfônico na região de 3500 cm^{-1} .

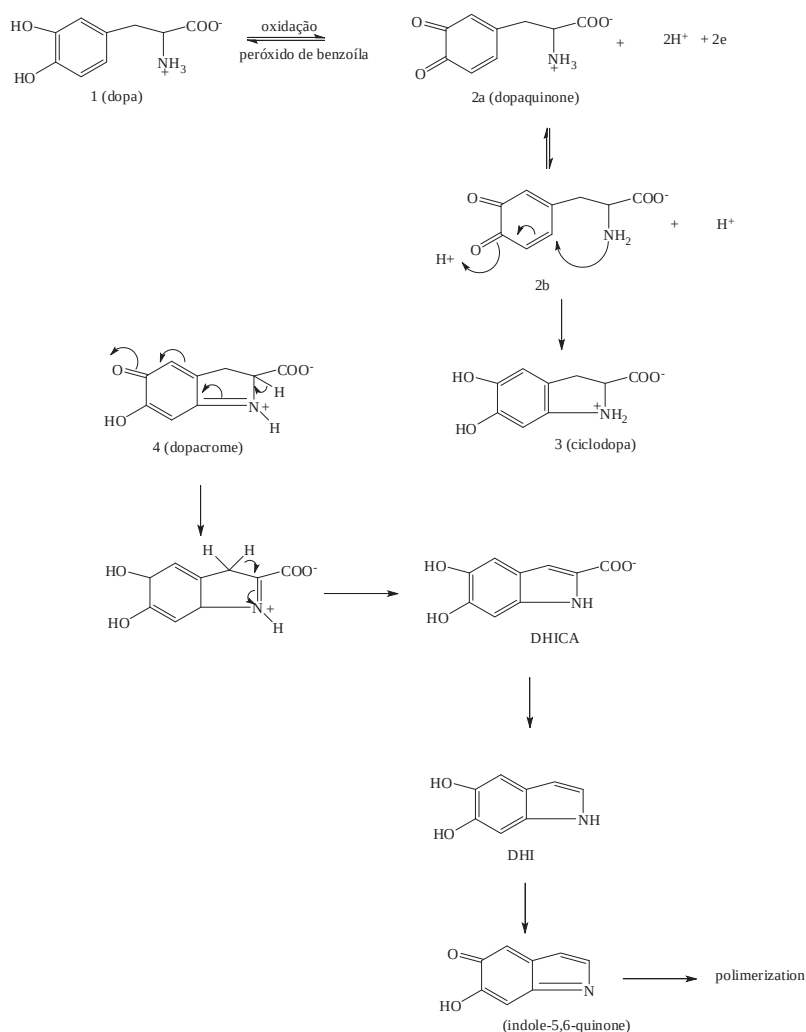
O esquema 4 a seguir demonstra o possível mecanismo de degradação do anidrido benzóico obtendo o benzeno formado no meio reacional com a oxidação do DMSO em dimetilsulfona.



Esquema 4: Formação do benzeno eliminado durante a evaporação do solvente no processo de síntese.

5.2- Reação de oxidação da L-Dopa com o peróxido de benzoíla

Ao mesmo tempo em que ocorre a oxidação do DMSO com o peróxido de benzoíla, outra reação ocorre no meio reacional. O peróxido de benzoíla é também responsável pela oxidação da L-Dopa formando os derivados de DHI e DHICA no meio reacional conforme mostrado no esquema 5 a seguir.



Esquema 5: Mecanismo de reação para a oxidação da L-Dopa e o peróxido de benzoíla.

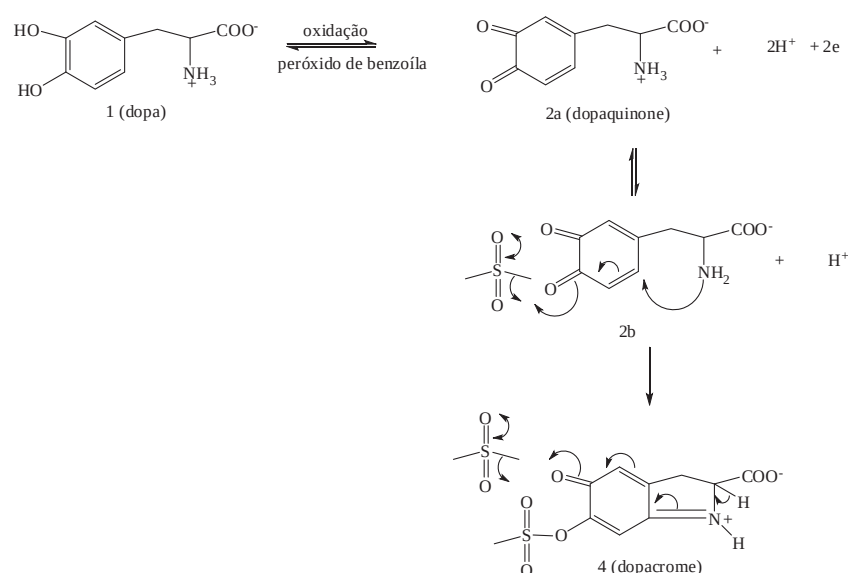
O passo inicial na oxidação e da polimerização da melanina é a formação de uma quinona com um radical livre intermediário, no caso dopaquinona. Sendo que a proteção dos grupos hidroxilas devem diminuir a taxa de polimerização⁵².

Em meio básico obtido, a dopaquinona cicliza formando ciclodopa que é então oxidada para dopacroma produzindo uma conversão envolvendo quatro elétrons por moléculas. Esse sistema compreende um mecanismo ECC (sequência de passos

eletroquímica-química-química), similar ao fechamento dos anéis na oxidação da adrenalina⁵⁶. Finalmente, uma sequência de oxidações ocorrem na dopacromo, passando para DHI e DHICA até a formação das quinonas e iniciando assim o processo de polimerização da melanina.

Esse mecanismo ocorreria sem a influência de DMSO ou dimetilsulfona, entretanto, considerando a presença da dimetilsulfona esta então participa do processo reacional protegendo os grupos hidroxilas das quinonas e o nitrogênio do monômero de DHI ou DHICA. Essa proteção diminui o processo de polimerização do composto refletindo na queda de intensidade de absorção com relação a H₂O-melanina.

O esquema 6 a seguir demonstra o possível mecanismo reacional e os possíveis derivados estruturais obtidos pelo processo de síntese em DMSO, inclusive com a ciclização da dopaquinona tornando-se dopacromo.



Esquema 6: Oxidação da L-Dopa pelo peróxido de benzoíla e ação da dimetilsulfona

A Figura 31 abaixo mostra as possíveis estruturas dos monômeros formadores da DMSO-melanina.

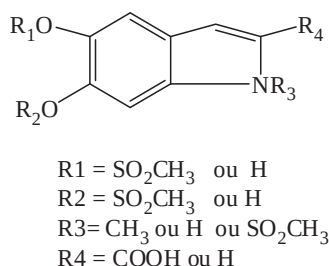


Figura 31: Possíveis estruturas químicas para os monômeros formadores da DMSO-Melanina

O mecanismo reacional apresentado é semelhante ao mecanismo reacional para a H₂O-melanina. Inicialmente ocorre a oxidação da L-dopa tornando-se dopaquinona em seguida a ciclização da dopaquinona ocorre, formando assim a dopacromo. A diferença entre os mecanismos está na ação da dimetilsulfona no momento da formação da dopacromo, os ataques químicos ocorrem nos oxigênios das hidroxilas ou nos nitrogênios que acabaram de sofrer a ciclização. Esses dois ataques químicos recebem o nome de O-sulfonação e N-sulfonação.

De acordo com March⁵³, as sulfonações seguem uma ordem de nucleofilicidade para um determinado ataque químico, sendo o ataque em hidroxilas o ataque químico que possui a maior facilidade para que a sulfonação ocorra. Isso acontece porque álcoois primários reagem mais rapidamente e muitas vezes é possível o grupo sulfona selecionar uma hidroxila primária, mesmo em outras moléculas que estão localizadas em carbonos secundários ou terciários. Para a DMSO-melanina, dois tipos de sulfonações foram apresentadas, a O-sulfonação e a N-sulfonação.

Experimentos com FTIR foram realizados com o objetivo de localizar alguma banda presente no espectro de IR referente a N-sulfonação em DMSO-melanina recém sintetizada, ou seja, se há evidências de que o grupo sulfonado está ligada ao nitrogênio. Porém após a análise das bandas no espectro de IR, nenhuma evidência do estiramento N-S em 1360-1315cm⁻¹ foi encontrada de acordo com a Figura 32.

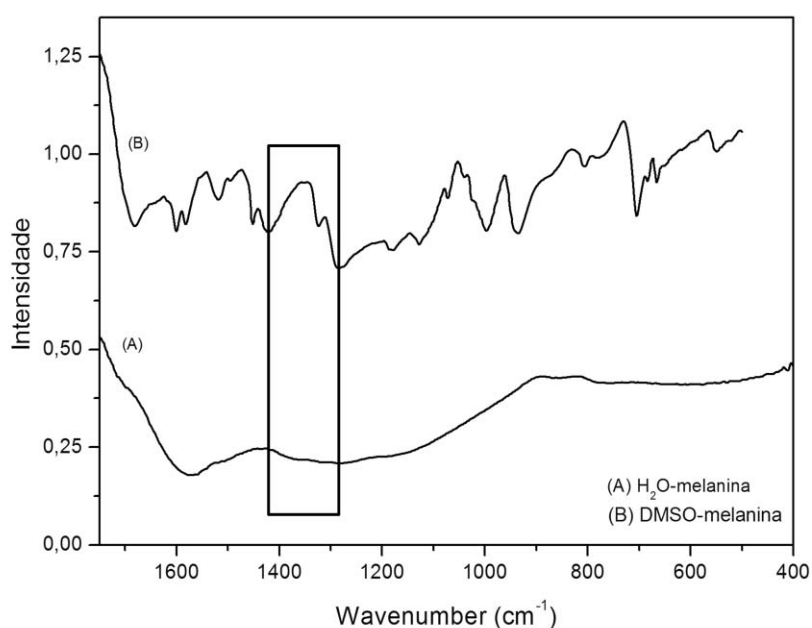


Figura 32: Exclusão da N-sulfonação pelo espectro de IR

Concluindo portanto que a N-sulfonação não ocorre para os monômeros formadores da DMSO-melanina, restando somente a O-sulfonação. Em função da decomposição térmica da dimetilsulfona, formando $-\text{CH}_3$ no meio reacional, há fortes indícios na Ressonância Magnética de carbono (30ppm) de tenha ocorrido concomitantemente com a O-sulfonação, a metilação do nitrogênio, pelo aparecimento do sinal em 30 ppm referente à N-CH₃. A metilação do nitrogênio pode ser explicada pelo decomposição da dimetilsulfona⁸ em altas temperaturas. O esquema 7 abaixo explica a decomposição.



Esquema 7: Decomposição da dimetilsulfona durante o processo de evaporação do DMSO no processo de obtenção da síntese de melanina.

No momento da evaporação do DMSO no processo de obtenção da melanina a dimetilsulfona presente no meio reacional sofre decomposição e libera uma metila e passa a ser metilsulfona. Entretanto, podemos descartar a metilação do nitrogênio considerando os resultados obtidos na técnica de EPR, na qual apresentou resultados no fator g das amostras todas semelhantes, excluindo assim a idéia que a presença do radical metil no nitrogênio era um dos responsáveis pela variação do fator g nas amostras de DMSO-melanina e H₂O-melanina. Ainda com relação aos valores semelhantes obtidos pelo fator g, os centros paramagnéticos não sofrem alterações, ou seja, o sinal de EPR encontrado na melanina corresponde as semiquinonas presentes nas melaninas.

A O-sulfonação pode ser confirmada pelas bandas 1020-850 cm⁻¹ referentes aos estiramentos simétricos dos grupos SO e as bandas no intervalo de 830-690 cm⁻¹ referentes aos grupos SO dos espectros de FTIR na figura 18 e pelos sinais em 40 ppm observados nos espectros de ¹³C RMN. Excluindo portanto duas possíveis estruturas anteriormente apresentadas na Figura 31, as análises serão realizadas com as estruturas apresentadas na Figura 33 abaixo.

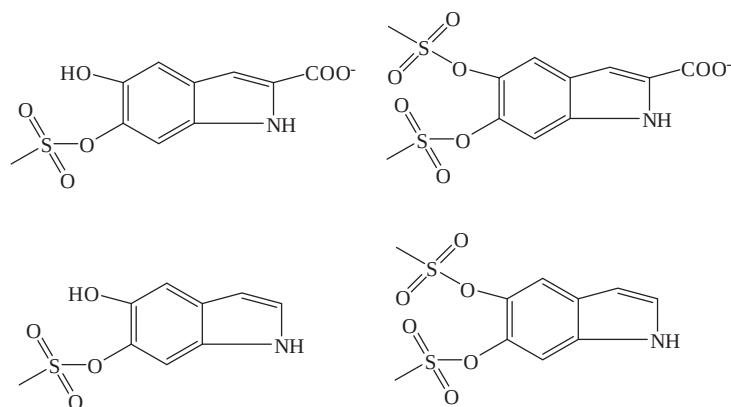


Figura 33: monômeros formadores da DMSO-melanina após a exclusão das estruturas que apresentaram N-sulfonação.

Observando a Figura 31 vemos a presença de estruturas que apresentam radicais CH_3 (metilas) ligados ao nitrogênio, ocorrendo assim a metilação no átomo de nitrogênio.

Para essa análise, ou seja, verificar a presença de metila na estrutura do monômero de DMSO-melanina, as técnicas de caracterização FTIR e ^{13}C RMN, além da simulação com o software ChemDraw e espectro de EPR foram utilizadas. Com a técnica de FTIR não foi possível determinar a presença de CH_3 devido a grande intensidade de bandas presentes no espectro de IR, fazendo com que algumas bandas estivessem mascaradas no espectro. No entanto a simulação do espectro de ^{13}C RMN com o ChemDraw e os espectros experimentais não comprovam a presença desses radicais metilas ligados ao átomo de nitrogênio. A Figura 34, apresenta as estruturas simuladas e o espectro experimental obtido para a DMSO-melanina e para a H_2O -melanina.

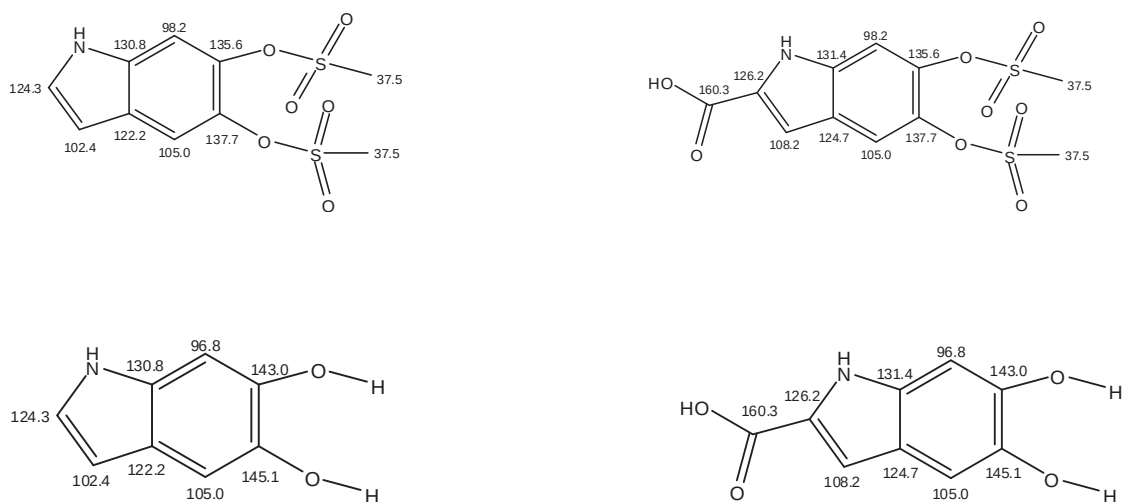
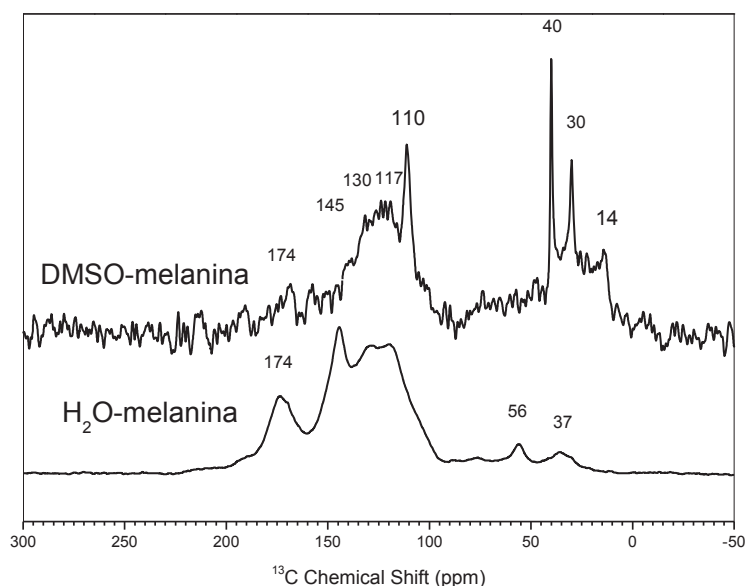


Figura 34: Espectro de ^{13}C RMN experimental e estruturas simuladas para as amostras de DMSO-melanina e H_2O -melanina respectivamente.

Os espectros de RMN apontam diferenças na estrutura da DMSO-melanina e H_2O -melanina, a presença de DMSO ou dos grupos sulfonados está clara com o pico em 40 ppm. Os picos no intervalo de 100 ppm até 175 ppm correspondem aos carbonos relacionados a diferentes monômeros formadores da H_2O -melanina quanto da DMSO-melanina, são eles os picos em 110 ppm corresponde ao monômero DHI e em 145 ppm corresponde a IQ e finalmente em 174 ppm corresponde a HQ. Comprovando assim que a melanina é realmente um polímero heterogêneo⁵⁴. Para a H_2O -melanina o espectro de RMN se apresenta mais visível, com os picos mais claros, evidenciando novamente que os monômeros formadores da H_2O -melanina são mais homogêneos em comparação a

DMSO-melanina, que pode apresentar em sua estrutura variações no DHI, DHICA, IQ, SQ e HQ, sendo que a maioria dos monômeros apresentam a adição da dimetilsulfona em suas estruturas básicas.

Em função da solubilidade dos compostos sintetizados, apenas foi possível realizar a análise de ^1H RMN da DMSO-melanina recém sintetizada, em DMSO deuterado. O espectro obtido está mostrado na figura 35 abaixo .

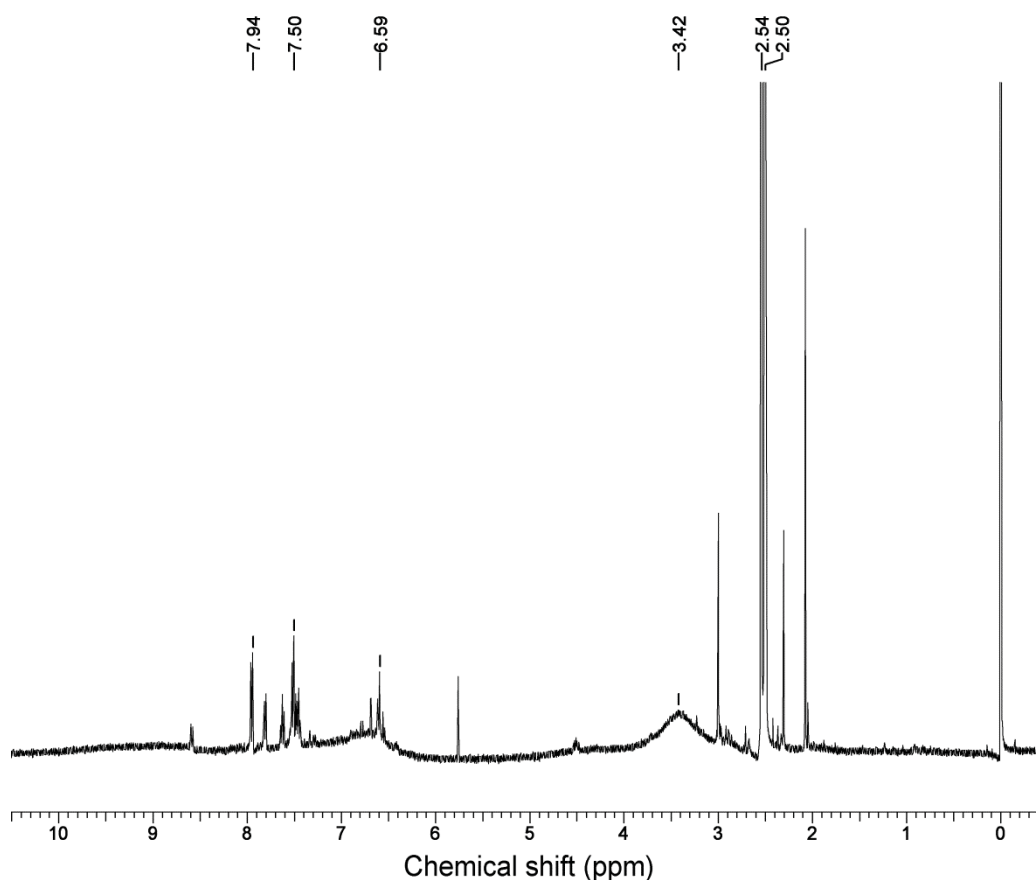


Figura 35: Espectro de ^1H RMN para a amostra de DMSO-melanina

A presença do grupo sulfonado é confirmada pelo sinal em 3.67 ppm referente aos prótons do grupo $-\text{SO}_2\text{CH}_3$. O sinal apresenta-se como singleto largo em função dos processos de relaxação desses hidrogênios vizinhos ao átomo de enxofre. Os sinais referentes ao DMSO e DMSO deuterado, são distintos do grupo substituinte e aparecem em 2,5 ppm. Na região de 6.5-7.2 estão os prótons referentes a dupla ligação do anel indol e os sinais em 7.0-8.2 são referentes aos dois prótons do anel aromático. O próton ligado ao nitrogênio deveria aparecer como uma sinal largo em 10 ppm, mas em função da resolução espectral obtida, não foi detectado. A presença da função ácida deve

aparecer em aproximadamente 12.0 ppm mas também não foi possível observá-la. A integração dos sinais poderia trazer maiores informações, mas como o composto apresenta-se como uma mistura de diferentes estruturas oligoméricas, não foi possível analisar a mesma.

A análise de próton confirma a presença da sulfonação nos grupos hidroxilas da DMSO-melanina. Outras técnicas estão sendo utilizadas no intuito de melhorar a confirmação estrutural obtida.

As medidas de EPR junto com a simulação computacional e os resultados obtidos para o fator g das amostras de melanina também auxiliaram para a determinação da estrutura química da DMSO-melanina através dos resultados obtidos pelas análises de FTIR e ^{13}C RMN.

De acordo com as análises espectroscópicas e espectrométricas os possíveis monômeros obtidos durante a síntese em DMSO estão ilustrados na Figura 36 abaixo.

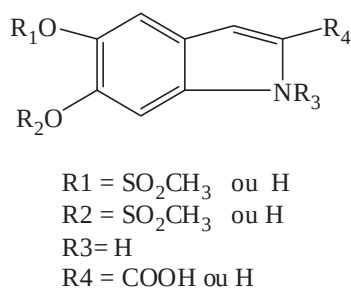
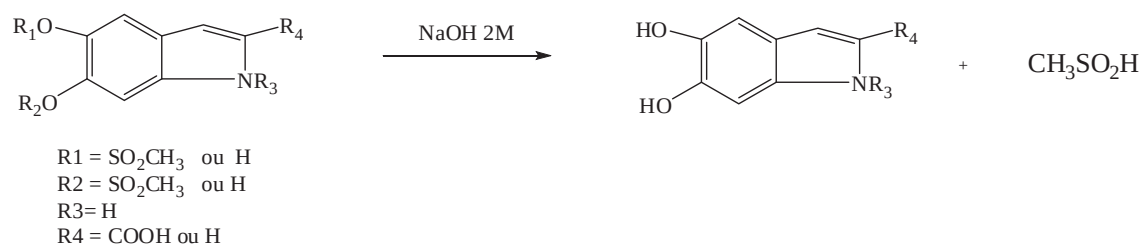


Figura 36: Prováveis estruturas monoméricas

No intuito de confirmar a estrutura monomérica proposta e compará-la com a DMSO-melanina envelhecida, realizou-se a reação da DMSO-melanina com solução aquosa de NaOH à temperatura ambiente de 25°C. A adição de NaOH deve promover a clivagem da ligação -S-O formando o álcool correspondente, conforme o esquema 8 a seguir.



Esquema 8: Reação de degradação da DMSO-melanina

Na solução de DMSO-melanina em solução de DMSO, adicionou-se 2 mL de solução aquosa de NaOH mantendo-se sob agitação por 10 minutos. Após o período observou-se a precipitação da melanina no solvente DMSO. O composto foi extraído, conforme o procedimento de síntese em DMSO e o sólido obtido analisado através de EPR e FTIR.

A Figura 37 mostra o espectro de IR para as amostras de DMSO-melanina, DMSO-melanina envelhecida e DMSO-melanina degradada.

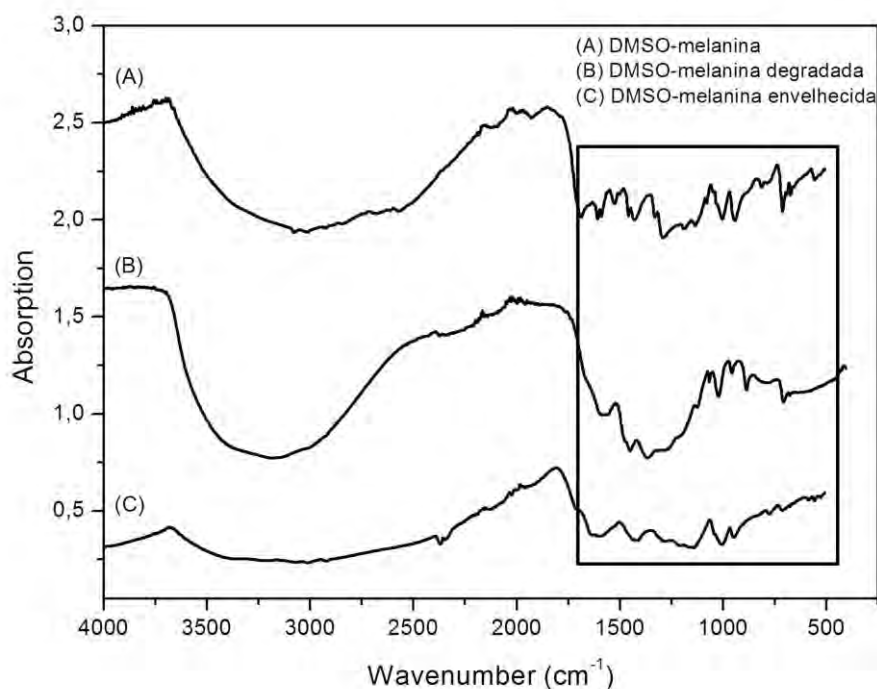


Figura 37: Espectros de IR para as amostras de DMSO-melanina, DMSO-melanina degradada e DMSO-melanina envelhecida respectivamente.

A clivagem dos grupos sulfonados pode ser confirmada através da análise de FTIR, com a presença da banda em 1350 cm^{-1} referente ao ácido sulfônico formado no meio. Os grupos sulfonados podem ser facilmente hidratados formando sulfonatos de hidrônio que absorvem na faixa de 1120 cm^{-1} a 1230 cm^{-1} . Comparando-se os resultados obtidos com a reação de clivagem com o espectro de FTIR da melanina envelhecida observou-se a formação desses sulfonatos de hidrônio, confirmando que a melanina envelhecida perde com o tempo de estocagem os grupos sulfonados presentes nas hidroxilas, responsáveis pela solubilidade da mesma.

A Figura 38 a seguir mostra os espectros comparativos de EPR para as amostras de DMSO-melanina, DMSO-melanina degradada e DMSO-melanina envelhecida.

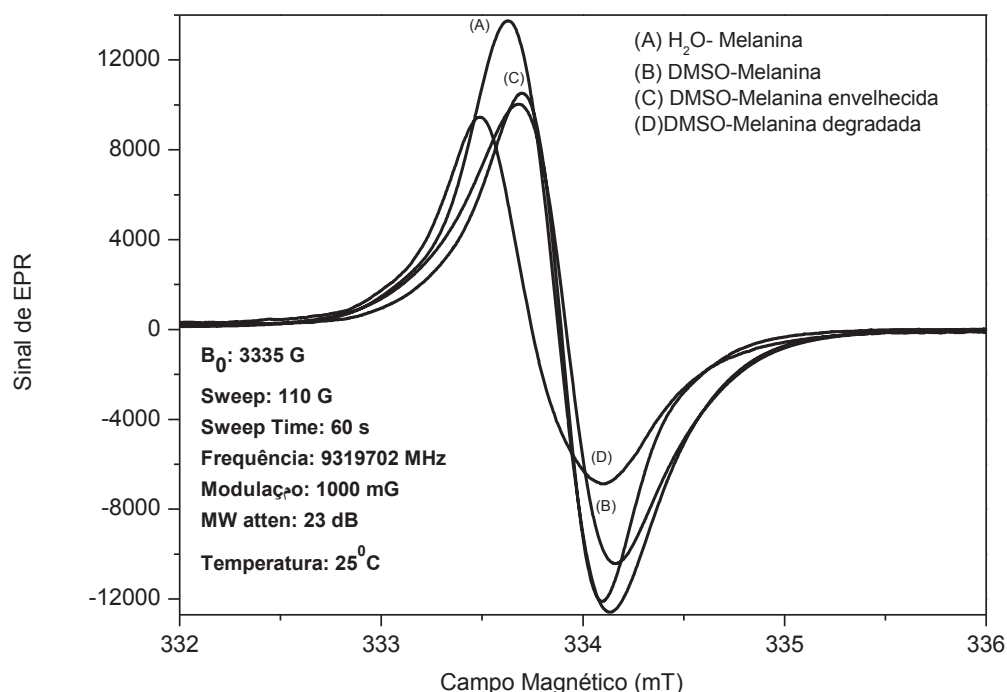


Figura 38: Espectros de EPR para as amostras de melanina

Os resultados demonstram que tanto a DMSO-melanina e a DMSO-melanina degradada com NaOH apresentam valores de fator g respectivamente $2,0042 \pm 0,0001$ e $2,0053 \pm 0,0001$, considerando os erros calculados. Ou seja, a estrutura e a solubilidade são alteradas, confirmando alterações na estrutura da amostra de DMSO-melanina. Para a DMSO-melanina envelhecida, o valor do fator g ($2,0044 \pm 0,0001$) também não sofre alteração comparando com as outras amostras, porém a DMSO-melanina envelhecida deixa de ser solúvel com o passar do tempo, possibilitando a explicação de que os grupos sulfonados, responsáveis pela solubilidade da amostra, presentes na DMSO-melanina recém sintetizada sofram degradação pelo oxigênio atmosférico.

Outra explicação na variação do fator g encontrado para a DMSO-melanina degradada pelo NaOH é o possível efeito causado pelo pH nas medidas de EPR⁴⁶. O aumento do pH faz com que ocorra um aumento do fator g , ou seja, para a DMSO-melanina degradada. Novos estudos de EPR estão sendo realizados para entender melhor o efeito do pH nas medidas de EPR.

Na tentativa de explicar os resultados obtidos experimentalmente, simulações computacionais de EPR foram realizadas pelo aluno Augusto Batagin Neto do Laboratório de Nanomateriais e Dispositivos (LNMD) da Unesp de Bauru.

As estruturas e os resultados analisados por simulação estão mostrados na Figura 39.

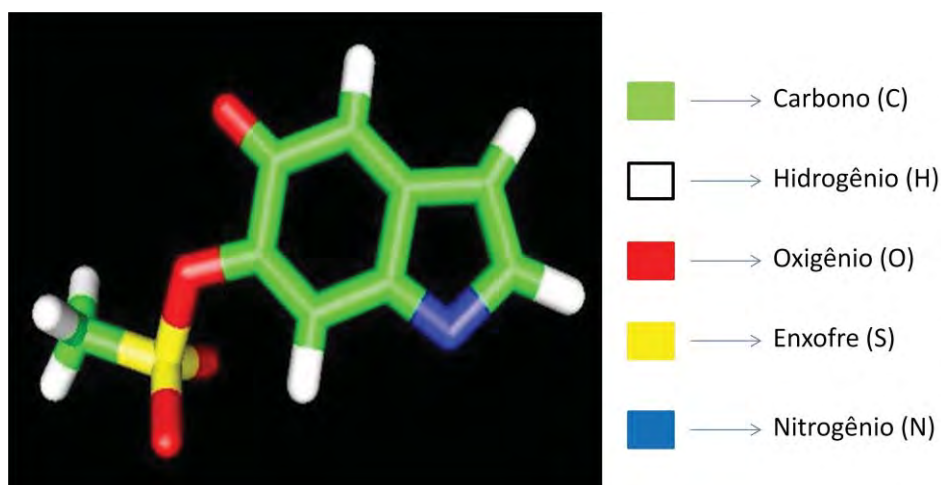


Figura 39: Possível estrutura para a DMSO-melanina.

Os resultados corroboram com a estrutura monomérica proposta na Figura 39 mostrada acima, o fator g simulado para a DMSO-melanina encontrado foi de 2,00419. O valor do fator g encontrado experimentalmente foi de $2,0042 \pm 0.0002$.

Novas simulações junto com outros experimentos, como pôr exemplo a ressonância magnética de nitrogênio em estado sólido (^{15}N RMN) podem auxiliar ou até mesmo garantir a presença de grupos químicos presentes ou não no nitrogênio.

Os resultados também indicam que os elétrons responsáveis pelas propriedades paramagnéticas podem não estar necessariamente associados aos grupos hidroxilas, abrindo caminhos para novos estudos. Além disso, a estrutura monomérica proposta, com grupos sulfonados protegendo as hidroxilas, abrem as portas para novos derivados sintéticos da melanina, pois esses grupos são ótimos grupos de saída podendo ser substituídos facilmente através de reações de substituição nucleofílica básicas da química orgânica.

Capítulo 6- Conclusão

Um estudo detalhado sobre a síntese de melanina em DMSO foi apresentado.

A síntese de melanina em DMSO é mais lenta em comparação a síntese de melanina em água. Com absorção UV-Vis menor e também com uma curva menos homogênea.

O peróxido de benzoíla age na oxidação do DMSO e da L-Dopa simultaneamente no meio reacional excluindo assim a idéia inicial do peróxido de benzoíla ser somente um catalisador. Além disso, uma quantidade ideal de peróxido de benzoíla na síntese em DMSO foi determinada.

Os espectros de RAMAN caracterizam os anéis aromáticos presentes na melanina em “breathing mode”. Além de confirmar a heterogeneidade dos monômeros formadores da DMSO-melanina.

Com relação ao estudo sobre a adição controlada de água na síntese de melanina em DMSO, a adição de água auxilia de forma pouco eficiente na síntese de melanina em DMSO, a melanina obtida nessa síntese apresenta grupos sulfonados presentes na DMSO-melanina e também é insolúvel em DMSO, característica da H₂O-melanina.

A DMSO-melanina apresenta grupos sulfonados responsáveis pela solubilidade da melanina. Porém com o passar do tempo esses grupos sulfonados sofrem degradação, conferindo assim a insolubilidade da DMSO-melanina envelhecida.

Finalmente um modelo proposto para o monômero formador da DMSO-melanina foi apresentado. O modelo apresenta um monômero com a presença da dimetilsulfona substituindo as ligações –OH (O-sulfonação), excluindo a N-sulfonação. Porém a N-metilação continua sendo dúvida.

Concluindo, a melanina é um material que a muito tempo vem sendo foco de estudos, principalmente pela evolução dos modelos estruturais que tentam explicar sua estrutura, iniciando com o Modelo do Homopolímero Estendido e atualmente com o Modelo do Oligômero Empilhado. A estrutura monomérica proposta nessa dissertação, com grupos sulfonados protegendo as hidroxilas, abrem as portas para novos derivados sintéticos da melanina, pois esses grupos são ótimos grupos de saída podendo ser substituídos facilmente através de reações de substituição nucleofílica básicas na química orgânica.

Referências

- 1- ALSUP E.M.; DeBOWES R.M.; “*Dimethyl sulfoxide.*” J. Am. Vet. Med. Assoc. **185**, 1011 (1984).
- 2- BALDAN M. R. ; ALMEIDA E. C. ; AZEVEDO A. F. ; GONÇALVES E. S. ; REZENDE M. C. ; FERREIRA N. G., “*Raman validity for crystallite size L_a determination on reticulated vitreous carbon with different graphitization index*” Applied Surface Science, 254, 2, 600 (2007).
- 3- BARALDI P.; CAPELLETTI R.; CRIPPA P.R.; ROMEO N.; “*Electrical charactersitics and electret behaviour of melanin.*” Journal of the Electrochemical Society, **126**,1207 (1979).
- 4- BLOIS M. S, The Origins of Prebiological Systems and of their Molecular Matrices,; chapter Random polymer as a matrix for chemical evolution, pages 19–33. Academic Press, (1965).
- 5- BOLTO B. A.; WEISS D. E., “*Electronic Conduction in Polymers. II. The Electrochemical Reduction of Polypyrrole at Controlled Potential*”, Australian Journal of Chemistry **16**, 6, 1076 (1963).
- 6- BOLTO B. A.; McNEILL R.; WEISS D. E., “*Electronic Conduction in Polymers. III. Electronic Properties of Polypyrrole*”, Australian Journal of Chemistry, **16**, 6, 1090 (1963).
- 7- BRAYTON C.F.; “*Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review.*” Cornell Vet. **76** 90, (1986).
- 8- BUSFIELD W.K.; IVIN K.J. “ *The kinects of decomposition of dimetyl sulphone, benzyl methyl sulphone and allyl methyl sulphone. The dissociation energies of the bonds $R-SO_2CH_3$.*” Trans. Faraday Soc., **57**, 1044 (1961).
- 9- BUSH W.D.; GARGUILO J.; ZUCCA F.A; ALBERTINI A.; ZECCA L.; G.S. EDWARDS G.S.; NEMANICH R.J.; SIMON J.D. “*The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface.*” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **103**, 14785, (2006).
- 10- CANO M.E.; CASTAÑEDA-PRIEGO R.; GIL-VILLEGAS A.; SOSA M.A.; SCHIO P.; DE OLIVEIRA J. A.; CHEN F.; BAFFA O.; GRAEFF C.F.O. “*Magnetic Properties of Synthetic Eumelanin—Preliminary Results*” Photochemistry and Photobiology, **84**, 627 (2008).
- 11- CARPENTER R.J.; ANGEL M.F.; MORGAN R.F.; “*Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps.*” Otolaring. Head Neck Surg. **110**, 228 (1994).

- 12- CHENG J.; MOSS S.C; EISNER M.; ZSCHACK P. "X-ray characterization of melanins" *Pigment Cell Research*, **7**, 255 (1994).
- 13- CHENG J.; MOSS S.C; EISNER M.; ZSCHACK P. "X-ray characterization of melanins" *Pigment Cell Research*, **7**, 263 (1994).
- 14- CLANCY C. M. R.; SIMON J. D., "Ultrastructural organization of eumelanin from *sepia officinalis* measured by atomic force microscopy." *Biochemistry*, **40**, 13353 (2001).
- 15- CRIPPA R; HORAK V; PROTA G; SVORONOS P; WOLFRAM L, *The Alkaloids*, vol 36 Cap. 6 Chemistry of Melanins p.254, Academic Press (1983).
- 16- 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*, **338–340**, 634 (2004).
- 17- GALLAS J. M.; LITTRELL K. C.; SEIFERT S.; ZAJAC G. W.; THIYAGARAJAN P. "Solution structure of copper ion-induced molecular aggregates of tyrosine melanin." *Biophysical Journal*, **77**, 1135 (1999)
- 18- GARDINER D.J., "Practical Raman spectroscopy." Springer-Verlag. ISBN 978-0387502540 (1989).
- 19- GIACOMANTONIO C.; "Charge transport in melanin, a disordered bio-organic conductor." Honours Thesis, University of Queensland (2005).
- 20- GOODMAN G.; BERCOVICH D. "Melanin directly converts light for vertebrate metabolic use: Heuristic thoughts on birds, icarus and dark human skin." *Medical Hypotheses*, **71**, 190 (2008).
- 21- HEEGER, A. J; MACDIARMID, A.G; SHIRAKAWA H "Conductive polymers" http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2000/chemadv.pdf. Acesso em 16 de junho de 2011.
- 22- HONG L.; SIMON J.D. "Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin." *Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 7938 (2007).
- 23- HUANG Z.; LUI H.; X. K. CHEN X. K.; ALAJLAN A.; McLEAN D. I.; ZENG H.; "Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin" *Journal of Biomedical Optics* **9(6)**, 1198 (2004).
- 24- HUNTER C. A.; SANDERS J. K. M "The nature of $\pi - \pi$ interactions." *Journal of the American Chemical Society*, **112**, 5525 (1990).
- 25- ITO S. "A chemist's view of melanogenesis." *Pigment Cell Research*, **16**, 230 (2003).

- 26-JASTRZEBSKA M.; ISOTALO H.; PALOHEIMO J.; STUBB H. "*Electrical conductivity and synthetic dopa-melanin polymer for different hydration states and temperatures.*" *Journal of Biomaterials Science Polymer Ed.*, **7**,577 (1995).
- 27-KOLLIAS N.; SAYRE R.M.; CHEDEKEL L.Z.; CHEDEKEL M.R. "*Photoprotection by melanin.*" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **9**, 135 (1991).
- 28-KOOLLIAS N.; SAYRE R. M.; CHEDEKEL L. Z.; CHEKEDEL M.R. "*Photoprotection by melanin.*" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **9**, 135 (1991).
- 29-KROL. E. S.; LIEBLER D.C.; "Photoprotective actions of natural and synthetic melanins." *Chemical Research in Toxicology*, **11**, 1434 (1998).
- 30-LYAVINETS A.S.; MARUSHCHAK N.T. "*Kinectis and Mechanism of Oxidation of DMSO with Benzoyl Peroxide in superbase media*" *Russian Journal of General Chemistry*, **74**, 885 (2004).
- 31-LYTTKENS L.; LARSSON B.; GOLLER H.; ENGLESON S.; J. STAHL. "*Melanin capacity to accumulate drugs in the internal ear.*" *Acta Otolaryngol*, **88**, 61 (1979).
- 32-MASON H.S.; *Pigment Cell Biology*, chapter Structure of melanins, pages 563–582. Academic Press, (1959).
- 33-MASON H. S.; D. J. E. Ingram; B. Allen, "*The free radical property of Melanins*" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **86**, 225 (1960).
- 34-McGINNESS J.E. "*Mobility gaps: a mechanism for band gaps in melanins*". *Science* **177**, 897 (1972).
- 35-McGINNESS J.E; "*Mobility gaps: A mechanism for band gaps in melanins.*" *Science*, **177**,896 (1972).
- 36-McGINNESS J.E; CORRY P.; PROCTOR P.; "*Amorphous semiconductor switching in melanins.*" *Science*, **183**, 853 (1974).
- 37-McGINNESS J.; CORRY P.; PROCTOR P.; "*Amorphous semiconductor switching in melanins.*" *Science*, **183**, 854 (1974).
- 38-McNEILL R; SIUDAK R; WARDLAW J. H.; WEISS D. E, "*Electronic Conduction in Polymers. I. The Chemical Structure of Polypyrrole*", *Australian Journal of Chemistry* **16**, 663,1056 (1963).
- 39-MEREDITH P.; POWELL B.J.; RIESZ J.;NIGHSWANDER S.P.; PEDERSON M.R.; MOORE E.G. "*Towards structure-property-function relationship for eumelanin.*" *Soft Matter*, **2**, 37 (2006).

- 40-MEREDITH P.; B.J. POWELL B. J.; RIESZ J.; NIGHSWANDER-REMPEL S. P.; PEDERSON M.R.; MOORE E. G., “Towards structure-property-function relationship for eumelanin.” *Soft Matter*, **2**, 37, (2006).
- 41-MEREDITH P.; RIESZ J.; “Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin.” *Photochemistry and Photobiology*, **79**, 211 (2004).
- 42-MEREDITH P.; SARNA T., “The physical and chemical properties of eumelanin.” *Pigment Cell Research*, **19**, 572 (2006).
- 43-MORISON W. L. “What is the function of melanin?” *Archives of Dermatology*, **121**, 1160 (1985).
- 44-NICOLAUS B.J.R. “A critical review of the function of neuromelanin and an attempt to provide a unified theory.” *Medical Hypotheses*, **65**, 791 (2005).
- 45-OLSEN S.; RIESZ J.; MAHADEVAN I.; COUTTS A.; BOTHMA J.; POWELL B.J.; MCKENZIE R.H.; SMITH S.C.; MEREDITH P.; “Convergent proton-transfer photocycles violate mirrorimage symmetry in a key melanin monomer.” *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 6672 (2007).
- 46-PASENKIEWICZ-GIERULA M.; SEARLY R.C.; “Analysis of the ESR spectrum of synthetic dopa melanin.” *Biochim Biophys Acta*. **884** 510-6 (1986).
- 47-POWELL M.R.; ROSENBERG B.; “The nature of the charge carriers in solvated biomacromolecules.” *Bioenergetics*, **1**, 493 (1970).
- 48-PROTA G. *Melanins and melanogenesis*. Academic Press (1992).
- 49-RAPER, H. “The aerobic oxidases” *Physiol. Rev.* **8**, 245 (1928).
- 50-RIESZ J.; GILMORE J.; MEREDITH P.; “Quantitative scattering of melanin solutions.” *Biophysical Journal*, **90**, 4137 (2006).
- 51-ROSENBAUM E.E.; HERSCHLER R.J.; JACOB S.W.; “Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders.” *J. Am. Med. Assoc.* **192**, 309 (1965).
- 52-SASSETTI R.J.; FUDENBERG H.H. “Alpha-methyldopa melanin: Synthesis and stabilization in vitro” *Biochemical Pharmacology*, **20**, 57 (1971).
- 53-SMITH M.; MARCH J.; *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. Chapter 10 575-576, 6ª Edição, Wiley, (2007).
- 54-ZHONG J.; FRASES S.; WANG H.; CASADEVALL A.; STARK R.E.; “Following Fungal Melanin Biosynthesis with solid-states NMR: Biopolymer Molecular Structures and Possible Connections to Cell-Wall Polysaccharides” *Biochemistry*, **47**, 4701 (2008).

- 55- ZUCCA F.A.; GIAVERI G.; GALLORINI M.; ALBERTINI A.; TOSCANI M.; PEZZOLI G.; LUCIUS R.; WILMS H.; SULZER D.; ITO S., WAKAMATSU K.; L. ZECCA. "*The neuromelanin of human substantia nigra: Physiological and pathogenic aspects*". *Pigment Cell Research*, **17**, 610 (2004).
- 56- YOUNG T.E.; GRISWOLD J.R.; HULBERT M.H. "*Melanin. I. Kinetics of the oxidative cyclization of dopa to dopachrome.*" *J. Org. Chem.*, **39**, 1980 (1974).
- 57- WOLBARSHT M. L; WASH A.W.; GEORGE G., "*Melanin, a unique biological absorber.*" *Appl. Opt.* **20**, 2184 (1981).