UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

SBI-IFUSP

305M810T1669

RADICAIS LIVRES INTRÍNSECOS E FOTO-
INDUZIDOS EM MELANO-PROTEÍNA

Pedro Geraldo Pascutti
Orientador: Prof.Dr.Amando Siuiti Ito

*Antônio
Pedro
Amando Siuiti Ito*

Dissertação apresentada ao
Instituto de Física da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
1990

De/isa 29.06.90

À Tais

Algumas pessoas às quais por muitos motivos gostaria de agradecer: Amando, Tereza, Regina, Cesar, Celina, Tião, Carlos, João, Zélia, Cláudio, Marta, Floriano, Whilk, Antonio Cesar, Hohara, Tais, mãe, pai, mana, cunhado, sobrinhas. Em especial agradeço ao Amando pela orientação e apoio. Agradeço especialmente também à Celina pelos melanossomos e à Zélia pelo AJU. Agradeço aos profs.: Shirley e Otaciro pelo empréstimo de equipamentos e laboratórios. Finalmente, meus agradecimentos ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Foi realizado um estudo por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica de soluções de complexos formados por melanina sintética, obtida por auto-oxidação de L-DOPA (dihidroxi-L-fenilalanina), e albumina de soro bovino (BSA). Investigaram-se os efeitos devidos a alterações de pH, de concentração e conformação da BSA, e presença de O_2 , tomando como base as variações das formas e intensidades das linhas espectrais dos radicais livres intrínsecos da melanina e dos induzidos por radiação visível-UV. Verificou-se uma dependência da intensidade do sinal com o estado de protonação do pigmento. Na presença da albumina a indução de radicais livres por luz foi maior, o que não observou-se quando esta foi denaturada. A indução e decaimento dos radicais fotoinduzidos foi monitorada por espectro de varredura temporal, observando-se uma cinética que envolveu processos mais lentos com o aumento da concentração da proteína. A partir de medidas de saturação progressiva, verificou-se um comportamento de saturação homogêneo para a melanina pura e não homogêneo quando BSA e O_2 estavam presentes, acompanhados de variações nos tempos de relaxação. Os resultados foram interpretados com base em um modelo que supõe a existência de processos de transferência de elétrons da melanina excitada para o O_2 e transferência de carga entre o pigmento e a proteína.

ABSTRACT

Synthetic melanin (obtained by L-DOPA auto-oxidation) and melanin-bovine serum albumin complexes were studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR). The melanin intrinsic and light-induced free radicals by visible-UV were studied. The dependence of the EPR line shapes on the pH value, albumin conformation and concentration, and O₂ presence was analyzed. It was found that the EPR signal intensity depended on the pigment protonation state. The light free radical induction in the melanin-albumin solutions was higher than in pure melanin solution. This effect was only observed when the protein was in its natural form. The induction and decay of the light-induced radicals were monitored by time-resolved experiments. A slower kinetic was observed with increasing of the albumin concentration. Progressive saturation measurements showed a homogeneous saturation behavior for pure melanin and inhomogeneous in the protein or O₂ presence, showing also changes in time relaxations. The results were interpreted assuming the existence of electron transfer processes from excited melanin to O₂ and charge exchange between the pigment and the protein.

ÍNDICE

CAPÍTULO-I - INTRODUÇÃO	1
I.1 - Característica de Semicondutor Amorfo Com Localização de Spin	4
I.2 - Propriedades Óxido-Redutoras da Melanina	7
I.3 - Efeitos da Presença de O ₂ e Iluminação - Radicais Livres Foto-Induzidos	9
I.4 - Estudo do Complexo Melanina-Proteína	11
I.5 - Objetivos	13
CAPÍTULO-II - MATERIAIS E MÉTODOS	15
II.1 - Amostras	15
II.2 - Iluminação	18
II.3 - Espectrômetros e Condições de Utilização	18
CAPÍTULO-III - RESUMO DA TEORIA DE RPE ENVOLVIDA	22
III.1 - Ressonância Paramagnética Eletrônica	22
III.2 - Intensidade do Sinal RPE e Saturação	24
III.3 - Relaxação Spin-Rede	25
III.4 - Alargamento de Linha	27
CAPÍTULO-IV - VARIAÇÕES NO FATOR-g, INTENSIDADE E LARGURA DELINHA DO SINAL RPE	30
IV.1 - Procedimento	30
IV.2 - Resultados	31
IV.3 - Discussão	41

CAPÍTULO-V - SATURAÇÃO PROGRESSIVA 50

V.1 - Procedimento 53

V.2 - Resultados 54

V.3 - Discussão 69

**CAPÍTULO-VI - CINÉTICAS DE INDUÇÃO E DECAIMENTO DE RADICAIS
LIVRES E DEPENDÊNCIA COM A ILUMINAÇÃO VISÍVEL E VIS-UV
..... 75**

VI.1 - Procedimento 75

VI.2 - Resultados 75

VI.3 - Discussão 90

CAPÍTULO-VII - CONCLUSÕES 94

VII.1 - Resumo dos Resultados 94

VII.2 - Sinal Intrínseco 98

VII.3 - Interação Com a Luz 99

BIBLIOGRAFIA 104

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Melaninas são biopolímeros pigmentares heterogêneos abundantes nos seres vivos, aparecendo em quase todas as espécies animais e vegetais. São encontradas em organismos de diferentes complexidades, desde fungos até o ser humano. Sua estrutura é pouco conhecida. O próprio termo melanina (derivado do grego "melas" - negro) denota somente um pigmento negro-marrom de origem biológica, não contendo nenhuma informação sobre sua estrutura química, referindo-se a uma classe de substâncias.

Em plantas e animais o papel das melaninas em processos como mimetismo, identificação sexual e camuflagem já é bem conhecido. Nos vertebrados superiores sua presença em quantidades substanciais na epiderme, pelos, íris e epitélio, aliada à sua capacidade de absorver intensamente no visível e ultra-violeta sugere à melanina uma função fotoprotetora (Blois et al, 1964). As melaninas podem absorver radiações que causariam danos como indução de aberrações cromossômicas, erros na síntese de RNA, DNA e proteínas e alterações no processo de divisão celular (Paitner, 1970). Pouco se sabe a respeito de sua função quando presente em regiões não iluminadas como a "substância nigra" do cérebro, medula e ouvido interno.

Uma classificação segundo a cor e os precursores químicos do biopolímero, estabelecida por R.A.Nicolaus (1968), considera eumelaninas todo pigmento negro-marrom encontrado na pele, cabelo, coróide, epitélio e inclusive na "substantia nigra" (neuromelaninas). Essas melaninas têm sido mais estudadas por aparecerem em maior quantidade no ser humano. Seus possíveis precursores são a tirosina e dihidroxifenilalanina (DOPA), tendo como análogo sintético a DOPA-melanina. Outra classe é constituída pelas feomelaninas, pigmentos animais amarelo-avermelhados encontrados em pelos, penas e também no ser humano,

podendo ser obtidos a partir de DOPA na presença de cisteína. Finalmente as alomelaninas, pigmentos negro-marrons encontrados nas sementes, esporos e ácidos-húmicos, constituem mais uma classe, que pode ser sintetizada a partir de catecol e outros compostos polihidroxiaromáticos.

Melaninas sintéticas, preparadas "in vitro" por oxidação de hidróxidos aromáticos, têm as vantagens de serem prontamente obtidas dos precursores das melaninas naturais e possuem comportamento qualitativa e às vezes quantitativamente semelhante ao das naturais (Sealy et al, 1980).

As melaninas apresentam radicais livres estáveis sob variadas condições (característica singular nos seres vivos), o que torna possível seu estudo por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). De um modo geral, as melaninas, independentemente da origem, apresentam sinal RPE característico de radicais livres, com valores de fator-g entre 2,003 e 2,005 e largura de linha predominantemente entre 4 e 6 Gauss (Sealy et al, 1980). A técnica de RPE fornece informações tanto dos radicais livres intrínsecos do polímero como daqueles transientes, que podem ser induzidos por luz e outros tratamentos (Sealy et al, 1980).

Nos vertebrados superiores, a melanina geralmente é polimerizada no melanossomo, uma organela de dimensões da ordem de 1 micron, formada numa célula especializada, o melanócito (Blois, 1969). O esquema abaixo mostra uma sequência possível para a formação de melanina no melanossomo:

Segundo M.S.Blois (1969), nos primeiros estágios um pré-melanossomo consiste de uma matriz de proteínas e membranas (a) sobre a qual os precursores da melanina são difundidos e incorporados no polímero (b e c). O melanossomo maduro é formado com a cobertura completa da matriz pelo pigmento (d). Um esquema para a síntese de eumelanina, proposto originalmente por Raper-Marson (Marson et al, 1960) e modificado por Sealy et al (1980), é apresentado na Figura-I.1.

Figura-I.1 Síntese de melanina a partir da tirosina (Sealy et al, 1980)

Nos passos iniciais, considera-se que a síntese da melanina se dê via ação enzimática. A tirosinase, que é uma enzima encontrada nas membranas dos melanossomos (Jimbow et al, 1982 e Crippa e Ito, 1985), é responsável pela oxidação da tirosina em dopaquinona. A partir da dopaquinona, os passos subsequentes não requerem ação enzimática, podendo ocorrer espontaneamente. O esquema indica que a polimerização é aleatória, sendo que todos os produtos intermediários entre dopa e indolquinona podem estar incorporados no polímero final.

I.1 - CARACTERÍSTICA DE SEMICONDUTOR AMORFO COM LOCALIZAÇÃO DE SPIN ELETRÔNICO.

A existência nos organismos vivos de estruturas moleculares planares conjugadas (séries alternadas de ligações duplas e simples) é importante do ponto de vista de interação com a luz. Exemplos clássicos são a molécula de clorofila na fotossíntese e a do retineno na visão. Nessas estruturas os elétrons- π são deslocalizados, não estando associados a átomos ou ligações individuais, mas com o sistema conjugado planar como um todo (Wald, 1959). Seu comportamento pode ser aproximado ao do gás de elétrons livres numa caixa de dimensões correspondentes às da cadeia ressonante (Setlow e Pollard, 1962). Tais elétrons seriam os responsáveis pela cor dos pigmentos naturais ou sintéticos, absorvendo em frequências compatíveis com as transições permitidas pela extensão da deslocalização eletrônica. Quanto maior a deslocalização, mais baixos e próximos entre si são os níveis de energia.

A polimerização a partir de precursores aromáticos pode formar estruturas planares conjugadas nas macromoléculas de melanina. De fato, estudos por difração de raios-X (Tathachari, 1976) revelaram que as melaninas possuem

porções planares com um espaçamento inter-camadas de 3.4 angstroms (equivalente ao da grafite), provavelmente devido ao empilhamento de unidades aromáticas. Supõe-se, portanto, que a cor preta do pigmento melanina provavelmente resulte da grande extensão molecular de seu sistema de elétrons π , onde um grande número de transições devem ocorrer com pequena diferença em energia (Horak e Gillette, 1971).

As propriedades eletrônicas das melaninas foram explicadas por J.E.McGinness (1972) através de um modelo de bandas de semicondutor amorfo, em que os estados eletrônicos são eficientemente acoplados aos modos vibracionais do polímero. Uma contribuição para este modelo foi dada por Crippa et al (1978), com base na observação de que amostras de melaninas naturais e sintéticas apresentam absorção óptica e fotocondutividade crescentes na direção do ultravioleta. A partir de um modelo estabelecido por Mott e Davis (1970), que relaciona a absorbância de semicondutores amorfos com a energia dos fótons incidentes, M.R.Kawamura (1986) obteve uma mesma energia de gap de 1.3 eV para diferentes concentrações de melanina em solução.

No entanto, o modelo de semicondutor amorfo para as melaninas baseado na extensa deslocalização dos elétrons- π , fica comprometido quando se considera os dados de RPE. Esses dados indicam que os elétrons desemparelhados do pigmento são localizados. O sinal de RPE das melaninas caracteriza-se por um singleto, sem estrutura hiperfina, correspondente a elétrons- π localizados (Sealy et al, 1980). Uma solução para este paradoxo foi proposta por Galvão e Caldas (1988) e Galvão (1989), a partir de cálculos sobre os orbitais- π de polímeros de melanina de 5,6-indolquinona. Nesses cálculos foram considerados monômeros isolados, cadeias finitas e polímeros unidimensionais infinitos, nos quais as unidades monoméricas apresentaram-se em diferentes estados de hidrogenação:

hidrogenadas (hidroquinonas: H_2Q), semi-hidrogenadas (semiquinonas: HQ) e desidrogenadas (quinonas: Q), respectivamente:

Os resultados de Galvão (1989) mostraram que cadeias semi-hidrogenadas finitas apresentam o LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) ligante, enquanto que polímeros infinitos constituídos das mesmas unidades semi-hidrogenadas não apresentam bandas de condução ligantes. Um outro resultado foi a forte tendência a concentrar cargas nas extremidades dos polímeros semi-hidrogenados finitos. Como os estados desocupados ligantes só apareceram para polímeros finitos, atribuiu-se isto a um "efeito de ponta". Algumas estruturas desidrogenadas apresentaram o mesmo efeito, porém com o LUMO (ligante) mais próximo de zero. Estruturas hidrogenadas não apresentaram tendência a concentrar cargas na extremidade do polímero nem estados desocupados ligantes.

Estes cálculos sugerem que, nas melaninas, os elétrons desemparelhados estão localizados preferencialmente na extremidade das formas semi-hidrogenadas, aprisionados em um LUMO ligante. Estes "estados de ponta" são equivalentes a estados de defeitos profundos em um semicondutor, que devido ao seu valor negativo baixo são situados na região central do gap (Galvão, 1989). Devido à sua localização em energia no meio do gap, um estado de defeito deste tipo é capaz de estabilizar somente um elétron, pois um segundo elétron aumentaria a energia do nível devido à repulsão eletrônica, desfazendo seu caráter ligante

(Galvão, 1989). Elétrons aprisionados nestes estados de defeito, portanto, dariam origem ao paramagnetismo intrínseco observado nas melaninas.

Em amostras hidratadas ou em solução a interação entre cadeias é menor, sendo que o polímero pode se comportar mais como moléculas isoladas. Se neste caso, apesar da repulsão eletrônica devido à presença de um segundo elétron o nível de energia continuar ligante, a ausência de um meio semiconductor fará com que o par de elétrons permaneça capturado (Galvão, 1989). O potencial de ligação para um segundo elétron seria menor, facilitando sua ejeção térmica, dando origem ao magnetismo dependente da temperatura, como é observado experimentalmente (Galvão, 1989).

1.2 - PROPRIEDADES ÓXIDO-REDUTORAS DA MELANINA

Os cálculos sobre orbitais moleculares podem ser interpretados como indicativos de que alterações no grau de hidrogenação de unidades quinona, hidroquinona e semiquinona trazem mudanças na estrutura eletrônica, de modo a alterar o caráter de aceitador ou doador de elétrons da melanina. Isto significa que o polímero como um todo pode oscilar entre os estados de oxidação reduzido (hidroquinona) e oxidado (quinona), sendo possível supor um caráter óxido-redutor para o polímero.

O processo de óxido-redução em grupos quinonas-hidroquinonas da melanina deve obedecer aos mesmos princípios propostos para quinonas monoméricas (Horak e Gillette, 1971):

Sealy et al (1980), em uma extensa revisão da bibliografia sobre melaninas, considerou que grupos quinonas e hidroquinonas (as estruturas Q e H₂Q

apresentadas anteriormente) estejam presentes no polímero em equilíbrio com radicais livres semiquinonas (HQ $\cdot$):

Este equilíbrio seria modificado por fatores como variações no grau de hidratação da amostra, no pH e temperatura (para soluções) (Chio et al, 1980 e 1982). Considera-se ainda (Felix et al, 1978) a possibilidade da associação quinona-hidroquinona para formar quinohidrona (Q...H₂Q), um complexo doador-aceitador de elétrons.

Estudos sobre a oxidação de DOPA-melanina com Fe³⁺ e redução com Ti³⁺ (Horak e Gillette, 1971) demonstraram que a produção de Fe²⁺ é mais lenta quando comparada com a de Ti⁴⁺, atribuindo-se isto ao fato de que a remoção de elétrons de uma unidade H₂Q para a formação de Fe²⁺ deve passar por um processo de desidrogenação.

Através de experimentos eletroquímicos e de RPE simultâneos (Lukieiewicz et al, 1980), verificou-se que a eletro-redução e eletro-oxidação de polímeros naturais e sintéticos de melanina afeta fortemente a intensidade do sinal de RPE dos mesmos. Quatro fases distintas com relação à intensidade (I) do sinal de RPE apareceram no decorrer de um ciclo eletroquímico fechado (que corresponde a um aumento seguido da diminuição da voltagem aplicada):

A propriedade de transferência de cargas das melaninas é importante do ponto de vista de sua interação com outras moléculas. Observou-se "in vitro" que melanina oxida NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida) e NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida), e reduz as formas oxidadas de citocromo-C e DCPIP (Diclorofenolindofenol). Além disso, a oxidação de NADH com a redução simultânea de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ é acelerada na presença de melanina, sendo atribuído a ela um papel de agente transferidor de elétrons (Gan et al, 1976).

I.3 - EFEITOS DA PRESENÇA DE O_2 E ILUMINAÇÃO - RADICAIS LIVRES FOTO-INDUZIDOS.

Os processos de transferência de cargas dos quais participa a melanina ficam alterados em presença de O_2 e sob irradiação com luz visível e/ou ultra-violeta. Assim, a formação de superóxido observada na oxidação de NADH pela melanina em atmosfera de O_2 (Van Woert, 1968), sofre aumento quando a amostra é irradiada com UV (Ito e Crippa, 1985). A produção de superóxido, seguida da formação de peróxido de hidrogênio, também é verificada quando soluções de melaninas são expostas à luz vis-UV (Felix et al, 1978a).

Foi observado por Sarna et al (1985) que melaninas de diferentes fontes podem reduzir radicais livres nitróxidos do tipo TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), TTPO (4-tri-metilamonio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil,iodada) e TEMPO-colina (4,4-[N-(2-hidroxi-etil)-N,N-dimetil]amônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil,clorada), produzindo hidroxilaminas:

Na ausência de oxigênio atmosférico, a irradiação do sistema com luz visível-UV levou a uma maior redução do nitróxido, a qual foi inibida quando O_2 estava presente. Isto sugeriu uma competição entre o oxigênio e o nitróxido pelos equivalentes redutores foto-induzidos.

Através da espectroscopia de RPE observa-se um aumento na concentração de radicais livres da melanina sob iluminação. Cope et al (1963) observou que para melanina natural irradiada com luz visível este aumento é maior na presença de O_2 . Sealy et al (1980) relacionou aumentos de 1.1 a 4 vezes na intensidade do sinal RPE de melaninas, naturais e sintéticas de diversas fontes, em suspensão sob luz visível e vis-UV. Na mesma relação, as melaninas em estado sólido não registraram aumentos na intensidade do sinal RPE quando iluminadas.

Quanto à interação com a luz, pode-se destacar a importância dos estudos relacionados ao papel foto-protetor. A absorção de luz pela melanina leva à dissipação de energia como calor e a alguma oxidação, estando esta última relacionada ao escurecimento imediato do pigmento (Sealy et al, 1980). A produção de radicais livres pela luz e o decaimento destes, formando um ciclo capaz de repetir-se indefinidamente, foi atribuído por Sealy et al (1980) como um mecanismo fundamental na foto-proteção. Por outro lado, sob altas doses de radiação UV, a melanina, de foto-protetora passa a cito-tóxica, levando à morte células pigmentadas (Procor et al, 1974).

Algumas propriedades das melaninas ficam modificadas em presença de proteína. A oxidação de NADH por melaninas naturais, que contêm proteínas agregadas, mostrou-se bem menor, aumentando quando as proteínas eram hidrolisadas (Gan et al, 1974). Melaninas sintéticas na presença de albumina de soro bovino (BSA) também demonstraram diminuição na capacidade da melanina em oxidar NADH (Gan et al, 1974 e Ito e Crippa, 1985), sendo atribuído à proteína um papel de bloqueador dos centros de reações de transferência de elétrons (Ito e

Crippa, 1985). Reações em que oxigênio é consumido também ficam prejudicadas quando proteínas estão agregadas ao polímero (Sarna et al, 1980).

Interações com outras moléculas, em que não se tem estabelecida a transferência de cargas, têm sido verificadas. Neuromelaninas ligam-se com alta afinidade a metilfenilpiridina (MPP^+), agente citotóxico para os neurônios da "substantia nigra" (D'Amato et al, 1986). Observou-se ainda a supressão da fluorescência de porfirinas catiônicas (Bielec et al, 1986) e de proteínas séricas (Kawamura, 1986), quando complexadas com melanina. Na presença de fotossensibilizadores, o número de radicais livres gerados por luz na melanina é muito maior, não implicando necessariamente na transferência de cargas da molécula foto-sensível para o pigmento (Sealy et al, 1984).

Cabe ressaltar que um ponto controverso é a extensão de resultados obtidos com sistemas modelo (como melanina sintética) à explicação de fenômenos relacionados à melanina na célula, onde o pigmento aparece em organelas subcelulares, os melanossomos, associado a proteínas. Desta forma, passaremos a discutir sistemas compostos de melaninas e proteínas.

1.4 - ESTUDO DO COMPLEXO MELANINA-PROTEÍNA

Estudos da composição de melanossomos realizados por W.O.Stein (1955) indicaram que de 35% a 40% de sua constituição seria de melanina e de 25% a 35% seria de proteína. Mais recentemente, observou-se que melanossomos de diferentes regiões de um organismo apresentam diferentes concentrações de melanina e proteína. Por exemplo, melanossomos do fígado de uma determinada espécie de rã apresentaram 27% de proteína em peso, enquanto que as da pele, 56%, além disso, os aminoácidos dessas proteínas também diferiram, segundo a origem, em composição e quantidade. O teor de melanina foi observado ser maior

para os melanossomos da pele do mesmo animal (Sciuto et al, 1988). Um estudo da composição protéica da matriz do melanossomo proveniente do pigmento epitelial de galinha (Zimmerman, 1982) encontrou 26 tipos diferentes de proteínas, com diferentes pesos moleculares e também com natureza predominantemente básica.

Apesar de a identificação da melanina como um polímero quimicamente ativo ter sido estabelecida já há algum tempo, muito pouco se sabe a respeito do papel das proteínas a ela associada além do estrutural. Foi realizado por M.R.Kawamura (1986) um estudo sobre um sistema modelo constituído de melanina de L-DOPA e albuminas de soro bovino e humana acompanhado de um estudo de melanossomos. Naquele trabalho ficou bem estabelecida a capacidade da melanina sintética de formar complexos com essas proteínas. Observou-se uma pequena diminuição (inferior a 20%) na intensidade da absorção óptica da BSA quando complexada com melanina. Experimentos de RPE em amostras sólidas demonstraram, que na presença de proteínas, um número maior de radicais livres é estabilizado nas melaninas, sendo observadas mudanças nos tempos de relaxação e na distribuição local de cargas nos sítios radicalares do pigmento. O bloqueio das pontes de enxofre da BSA com N-etil-maleimida, fez reduzir em cerca de 20% o número de radicais estabilizados na melanina quando na presença da proteína. Alterações conformacionais na proteína foram observadas por meio de dicroísmo circular. Os resultados permitiram sugerir que a interação com a BSA não se dá por um sítio ligante específico da proteína, podendo haver mais de um mecanismo estrutural de interação e inclusive interações com acesso à cadeia polipeptídica.

M.R.Kawamura também observou uma forte supressão da emissão fluorescente das proteínas pela melanina. Este fato sugeriu que o caráter protetor da melanina não se limita a absorver diretamente a radiação proveniente do exterior do organismo, dissipando-a em seguida, um mecanismo de proteção indireta pôde ser proposto com a transferência da energia de moléculas excitadas

para a melanina. Nesse aspecto, a transferência de energia da proteína para a melanina foi considerada como sendo um processo não somente do interior dos melanossomos, mas também externo a eles. Moléculas excitadas no meio em que os melanossomos se encontram poderiam desexcitarem-se transferindo-lhes sua energia. Desse modo, foi proposto que o caráter protetor das melaninas estende-se às regiões não iluminadas dos organismos.

1.5 - OBJETIVOS

É apresentado neste trabalho um estudo sobre radicais livres de sistemas compostos por melanina e proteína em solução. Dado que na célula a melanina encontra-se associada a proteínas, são analisadas as possíveis alterações que uma proteína pode produzir nas propriedades da melanina medidas pelo seu sinal de RPE.

Considerando que dados por vezes conflitantes em trabalhos anteriores sobre melanina resultaram da não especificação de parâmetros relativos a alteração na forma de linha do sinal, foi realizado um estudo sobre os processos de saturação e relaxação do sinal de RPE do radical livre da melanina.

Foram também estudadas as modificações induzidas por irradiação com luz visível e UV nos espectros de RPE de complexos melano-protéicos, em presença e ausência de O_2 . São ainda apresentados alguns resultados obtidos com melanossomos extraídos de coróide bovina.

Nos capítulos II e III, que se seguem, são estabelecidos os materiais e métodos utilizados e apresentado um resumo da teoria envolvida. No Capítulo-IV são apresentados os resultados de RPE para soluções de melanina e melanina com diversas concentrações de proteína. Foram observadas variações na intensidade do sinal de RPE, fator-g e largura de linha, induzidas por variações do pH e da

concentração de BSA, e pela incidência de luz vis-UV. São discutidas as possíveis alterações havidas no equilíbrio redox do sistema. No Capítulo-V são apresentados os resultados de saturação progressiva com a potência da microonda, discutindo-se as variações ocorridas na homogeneidade e nos tempos de relaxação dos sistemas de spin, inclusive a participação do O_2 nesses processos. As cinéticas envolvidas na indução e decaimento dos radicais livres induzidos por luz são apresentadas e discutidas no Capítulo-VI, uma dependência com a região do espectro vis-UV na foto-indução foi observada. Finalmente, um resumo dos resultados e as conclusões são apresentados no Capítulo-VII.

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

Para o sistema melanoproteína modelo foram escolhidas melanina sintetizada a partir de L-DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina) e albumina de soro bovino (BSA). Esta escolha se justifica pela suficiente solubilidade destes produtos, condição necessária para o trabalho em solução, o que se espera possa reproduzir melhor as condições "in vivo". Além disso, melanina de L-DOPA tem síntese bem controlável, seu precursor (L-DOPA) é de fácil obtenção comercial e é o modelo que mais se aproxima da eumelanina humana. A BSA, que também é de fácil obtenção comercial, é resistente a variações de pH e temperatura, sendo freqüente sua utilização em sistemas-modelo, sendo ainda bastante estudada e tendo seqüência de aminoácidos definida (Figura II.1). A BSA foi escolhida por estes motivos e pela sua capacidade em estabelecer ligações com afinidades variadas com diversos ligantes, tendo inclusive sítios que ligam-se a precursores da melanina, como tirosina (Kragh-Hansen, 1981).

II.1 - AMOSTRAS

Albumina de soro bovino (BSA) - adquirida junto à Sigma Chemical Co. (n^o A.4503; PM 66.000) e utilizada sem purificações adicionais.

L-Dopa ($C_9H_{11}NO_4$; PM 197,19) - adquirida junto aos Laboratórios Merck (Art.4196):

SÍNTESE DE MELANINA

A síntese de melanina é obtida dissolvendo-se um grama de L-DOPA em 200 ml de água bidestilada aquecida a 50°C, acrescentando-se a seguir 2 ml de NaOH 2,0 M. A solução adquire coloração castanha escura e o pH se estabiliza entre 9 e 10. A oxidação e polimerização leva cerca de três dias, borbulhando-se oxigênio atmosférico na solução durante este período. O pH da solução decresce estabilizando-se em valores próximo ao neutro, indicando o final da polimerização. A seguir tem lugar a diálise, que pode levar até dez dias. São utilizados tubos de celulose específicos com porosidade de 5.000 Daltons. A água da diálise é trocada a cada dia e seu monitoramento por espectroscopia de absorção óptica indica a eliminação de subprodutos e pequenos polímeros (com PM abaixo de 5.000), a qual diminui na medida em que a diálise prossegue. A melanina obtida desta forma foi secada em placas de Petri em estufa a 40°C e armazenada na forma de pó. A partir dessa melanina em estado sólido são preparadas soluções em concentrações que podem alcançar até 30 mg/ml.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MELANINA-BSA

Como a melanina tem peso molecular indefinido, as concentrações das soluções foram estabelecidas em mg/ml, sendo o mesmo adotado para a albumina.

As amostras foram preparadas a partir de soluções-mãe de 30 mg/ml de melanina e de 300 mg/ml de BSA em água. As concentrações de melanina permaneceram em 15 mg/ml, enquanto a proporção melanina:BSA variou de 1:1 a 1:10 em peso. Quando o controle do pH foi requerido, as amostras foram preparadas em solução tampão. Para valores de pH entre 6 e 8 utilizou-se tampão fosfato 50 mM. Para a faixa de pH entre 4 e 11, utilizada em experimentos com melanina pura, foi empregado tampão Universal citrato-fosfato-borato 50mM. A

dependência com a integridade estrutural da proteína foi observada a partir de soluções em uréia 6M, condição em que a BSA apresenta-se denaturada.

Alguns espectros de absorção óptica foram obtidos de amostras de 1 e 0,1 mg/ml de BSA e 0,01 mg/ml de melanina, na forma de complexo e separadas. As amostras em estado sólido foram obtidas masserando-se juntas melanina e BSA, sendo levadas ao espectrômetro de RPE 1 mg de melanina e proporções em peso de melanina:BSA de 1:4 e 1:10.

OBTENÇÃO DE MELANOSSOMOS

Melanossomos foram obtidos de coróide bovina segundo o procedimento descrito por Crippa et al (1985a). Olhos bovinos foram gentilmente cedidos pelo Frigorífico de Cotia S/A e pelo Matadouro Municipal de Itapira-SP. Este material foi colhido minutos após o abate dos animais, sendo colocado imediatamente em gelo à temperatura próxima a 0°C. Obedecendo ao procedimento referido, os olhos foram abertos e a retina e o pigmento epitelial foram separados da coróide. A coróide foi cuidadosamente removida e colocada em tampão Hepes 5 mM a pH 6,9, sobre gelo. A seguir, o material obtido sofreu homogeneização em "Potter" e foi submetido a sucessivas centrifugações. Da primeira centrifugação, que aconteceu durante 10 minutos a 700 g, foi colhido o sobrenadante que foi novamente centrifugado, desta vez em 11.000 g por 10 minutos. Colheu-se então o sedimento, o qual foi ressuspenso em Hepes e centrifugado a 15.000 g por 10 minutos sobre sacarose 0,5 M. O sedimento foi resuspenso e sonificado, sendo submetido a uma última centrifugação, que ocorreu durante uma hora a 100.000 g, sobre sacarose 2,0 M.

Uma microfotografia típica dos melanossomos assim obtidos é apresentada na Figura-II.2. Microfotos deste material foram obtidas junto ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da USP.

II.2 - ILUMINAÇÃO

Como fonte de iluminação foi utilizada uma lâmpada de vapor de mercúrio de iluminação pública comum marca Philips, de 500 W de potência. O bulbo da lâmpada, que filtra o ultra-violeta foi removido. Uma caixa metálica confeccionada na oficina do Departamento de Física Experimental envolveu a lâmpada, proporcionando proteção contra o UV. Por uma fenda na parede da caixa as amostras foram irradiadas diretamente na cavidade ressonante do espectrômetro a 40 cm de distância.

O efeito da iluminação somente visível foi estudado utilizando-se um projetor de slides Kodak, equipado com uma lâmpada de tungstênio de 150 W. Foi também utilizada a fonte visível-UV referida acima, acoplada ao filtro de UV deste projetor de slides.

II.3 - ESPECTRÔMETROS E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Os espectros de RPE foram geralmente obtidos nas seguintes condições: varredura de campo de 50 G; tempo de varredura de 4 minutos; constante de tempo de 0.1 s; amplitude de modulação de 1 G e 100 Khz de frequência de modulação. No sentido de evitar efeitos de saturação, trabalhou-se com potência de microonda de 1mW. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente, sendo registradas por termopar variações que não excederam 2°C quando as amostras foram iluminadas. Em cada capítulo de resultados a seguir, são indicados os modelos de espectrômetros utilizados, bem como as variações das condições acima descritas.

Foram utilizados três espectrômetros de RPE diferentes: Varian E9 do Departamento de Biofísica do Instituto de Física e Química da USP - São Carlos;

Varian E4 e BRUKER 2000 do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP - São Paulo.

Os espectros de absorção óptica foram obtidos por um espectrofotômetro ZEISS DMR 21 do Laboratório de Dosimetria do Departamento de Física Nuclear do IFUSP.

Figura-II.1 - Sequência de aminoácidos da albumina de soro bovino (Kragh-Hansen, 1981).

Figura-II.2 - Melanosomos (Aumento 20.000 vezes).

CAPITULO III - RESUMO DA TEORIA DE RPE ENVOLVIDA

A radiação eletromagnética é considerada como constituída de um acoplamento entre um campo elétrico e um campo magnético oscilando perpendicularmente um ao outro e na direção de propagação. A componente elétrica é a principal responsável pela interação com a matéria, sendo capaz de estimular dipólos elétricos oscilantes em átomos e moléculas. Quando uma radiação eletromagnética interage por exemplo com moléculas que têm momento de dipólo elétrico permanente, transições podem ocorrer quando a energia do quantum da radiação incidente corresponder à separação entre níveis de energia nas moléculas. Do mesmo modo, moléculas contendo dipólos magnéticos deveriam interagir com a componente magnética da radiação. Porém, os níveis de energia devidos à presença de dipólos magnéticos coincidem e nenhuma transição ocorre. Para que sejam observadas transições, é necessário que haja separação entre os níveis de energia. A componente magnética da radiação pode induzir transições somente quando a amostra de interesse é submetida a um campo magnético estático externo, onde ocorre a separação entre os níveis de energia de dipólo magnético. Este é o princípio básico da ressonância paramagnética de elétrons (Wertz e Bolton, 1972).

III.1 - RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Dipólos magnéticos permanentes estão associados ou com elétrons ou com núcleos. Em espécies com elétrons desemparelhados, dipólos magnéticos correspondem à taxa líquida de momento angular orbital e de spin, sendo que frequentemente o momento de spin eletrônico contribui com 99 % ao dipólo. Por este motivo é empregada uma hamiltoniana de spin (na descrição dos estados de

spin do sistema) onde é utilizado um "spin efetivo" que combina as contribuições devidas aos dois momentos angulares (Wertz e Bolton, 1972).

A

interação de um dipólo magnético com um campo magnético estático H_0 define um momento de dipólo magnético μ , que tende a ser orientado pelo campo H_0 . Para um elétron livre submetido a H_0 corresponderão duas possíveis orientações, uma antiparalela e outra paralela ao campo, com energias respectivas $\pm \mu H_0$. O momento angular de spin eletrônico é um efeito puramente quântico (Bolton, 1972), sendo representado por:

$$\mu_e = -g\beta M_s \quad (3.1)$$

onde g (denominado fator- g) é a constante giromagnética de spin; β é o magnéton de Bohr ($= eh/4\pi mc$) e M_s é o número quântico de spin ($M_s = \pm 1/2$).

Sob a influência de um campo estático H_0 , portanto, os níveis de spin para elétrons livres desdobrar-se-ão em dois, com energias:

$$E = \pm (1/2)g\beta H_0 \quad (3.2)$$

Para que seja satisfeita a condição de ressonância, a energia da radiação incidente deverá corresponder à diferença de energia ΔE entre esses dois níveis, de forma que:

$$h\nu_0 = g\beta H_0 \quad (3.3)$$

A ressonância paramagnética de elétrons ocorre na região de frequência de microondas. Espectrômetros de RPE operando em banda-X na frequência de 9.5 GHz, medem transições para elétrons livres para valores de campo estático correspondentes a 3.400 Gauss (Bolton, 1972).

A interação entre um spin efetivo S e o campo magnético aplicado é descrita pelo termo H_h da hamiltoniana de spin H_s de forma que :

$$H_h = H.g.S \quad (3.4)$$

Geralmente H_s contém ainda diversos termos devidos a efeitos de campo cristalino e interações com núcleos. Para radicais livres em meio aquoso, quando não há interações com núcleos, H_s reduz-se a H_h .

III.2 - INTENSIDADE DO SINAL RPE E SATURAÇÃO

Quando um sistema de spins é perturbado por um campo de radiação com frequência de ressonância, a priori as probabilidades de absorção e de emissão estimulada serão exatamente iguais (lei da radiação de Einstein). A taxa líquida de transição dependerá da diferença populacional entre os níveis energéticos, havendo maior número de transições dos níveis de maior para os de menor população.

A dependência com r^{-3} da interação spin-spin (Orton, 1968) possibilita que a população dos estados de spin eletrônicos obedeça melhor a uma distribuição de Boltzman. Em um sistema de dois níveis ($S = 1/2$), o nível de maior energia E^+ ($M_s = +1/2$) será populado com N^+ elétrons, enquanto que o nível de menor energia E^- ($M_s = -1/2$) será populado com N^- elétrons, de forma que:

$$N^+/N^- = \exp\{-\Delta E/KT\} \quad (3.5)$$

onde K é a constante de Boltzman e T é a temperatura absoluta.

A intensidade do sinal de RPE dependerá portanto, da diferença populacional " n " ($n = N^+ - N^-$) entre os estados de spin. Se $N^- > N^+$, resulta em maior taxa de transição do estado E^- para o estado E^+ e conseqüente absorção líquida de energia do campo de radiação. Na ausência de processos dissipativos N^+ crescerá até igualar-se a N^- e a taxa de absorção de energia tenderia a zero. A ressonância não mais seria observada e o sistema estaria saturado.

Na prática, o acoplamento entre o sistema de spins e a rede proporciona um caminho alternativo para o decaimento dos estados excitados, que sendo um processo não radiativo, não está sujeito à lei da radiação.

Do ponto de vista termodinâmico, o sistema de spins está em contato térmico com o meio. Uma temperatura de spin T_S pode ser definida como a temperatura em que a distribuição de Boltzman produz a diferença populacional observada. Sob equilíbrio térmico, T_S é idêntica à temperatura da rede T_L . Quando energia é absorvida do campo da microonda, o equilíbrio térmico tende a ser quebrado e T_S tende a tornar-se maior que T_L . O equilíbrio térmico só será mantido enquanto a relaxação spin-rede atuar eficientemente.

III.3 - RELAXAÇÃO SPIN-REDE

A taxa em que a energia flui para o sistema de spins é proporcional à potência da microonda aplicada, enquanto que a taxa em que ela flui deste para a rede é inversamente proporcional a T_1 , o tempo de relaxação spin-rede.

Uma definição para T_1 em termos de probabilidade de transição foi apresentada por J.W.Orton (1968). De acordo com esta referência, considerando W_{12} a probabilidade de transição do nível 1 para o nível 2 sob a influência do campo de radiação, e w_{21} a probabilidade de um processo de relaxação no sentido inverso, a taxa de variação da diferença populacional "n" será descrita por:

$$dn/dt = N(w_{21} - w_{12}) - n(2W_{12} + w_{21} + w_{12}) \quad (3.6)$$

onde $W_{12} = W_{21}$

e $N = N_2 + N_1$ (ou $N^+ + N^-$) é o número total de spins.

Supondo que o sistema de spins foi saturado por um pulso de microonda de maneira que, em $t = 0$, $n = 0$ e $W = 0$, a volta de "n" para seu valor de equilíbrio " n_0 " será governada pela solução da equação (3.6):

$$n = n_0[1 - \exp(-t/T_1)] \quad (3.7)$$

onde $T_1 = 1/(w_{21} + w_{12})$ é então definido para um sistema de dois níveis.

Sob a influência do campo de radiação e na ausência de saturação a diferença populacional "n" permanece estável, ou seja, $dn/dt = 0$, de maneira que:

$$n/n_0 = 1/(1 + 2W_{12}T_1) \quad (3.8)$$

Uma perturbação oscilante pode causar uma probabilidade de transição por unidade de tempo entre dois estados de energia n e m ($E_m > E_n$) na forma:

$$W_{nm} = (\pi^2/h^2)g(\nu) | \langle m | H_1 | n \rangle |^2 \quad (3.9)$$

onde $g(\nu)$ é uma função forma de linha normalizada, usualmente uma lorentziana (Orton, 1968):

$$g(\nu) = 2T_2/[1 + T_2(2\pi)^2(\nu - \nu_0)^2] \quad (3.10)$$

sendo T_2 aqui introduzido como o inverso da meia-largura de um pacote de spins em unidades de frequência $T_2 = 1/\Delta\nu_{1/2}$. O efeito perturbativo do campo da microonda incidente é descrito por H' , que é um termo dependente do tempo, o qual soma-se à Hamiltoneana de spin, logo:

$$H' = H_1 \sin(\omega t) = \mathbf{H}_1 \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} \sin(\omega t) \quad (3.11)$$

de maneira que:

$$\langle m | H_1 | n \rangle = \langle m | \mathbf{H}_1 \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} | n \rangle \quad (3.12)$$

onde $\mathbf{H}_1$ corresponde à amplitude da microonda (assumindo polarização linear), e $\mathbf{S}$ o operador de spin.

Supondo uma espécie paramagnética com $S = 1/2$ em um campo cristalino axial "z". Se o campo estático H_0 for aplicado paralelamente à direção z e o campo da microonda for aplicado paralelamente a x, o elemento de matriz da equação acima torna-se (Orton, 1968):

$$\langle 1/2 | H_1 g_{\perp} S_x | 1/2 \rangle = H_1 g_{\perp} / 2 \quad (3.13)$$

onde $g_{\perp}$ (g perpendicular) = $g_{xx} = g_{yy}$ e $g_{zz} = g_{\parallel}$ (g paralelo).

Para uma solução de baixa viscosidade contendo moléculas paramagnéticas, o fator g poderá ser isotrópico, ou seja, $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$

Introduzindo os resultados acima na equação (3.9) e considerando $\nu = \nu_0$ no centro da linha em (3.10), a probabilidade de transição W_{12} da equação (3.8) é então obtida, de modo que:

$$n/n_0 = 1/[1 + (1/4)\pi^2 H_1^2 T_1 T_2] \quad (3.14)$$

III.4 - ALARGAMENTO DE LINHA

Quando $(1/4)\pi^2 H_1^2 T_1 T_2 \ll 1$, na equação (3.14) "n" será constante e as populações N^+ e N^- permanecerão próximas ao seu valor de equilíbrio térmico. À medida que a amplitude do campo da radiação incidente H_1 aumenta, a diferença populacional diminui, resultando em saturação do sistema.

Quando $(1/4)\pi^2 H_1^2 T_1 T_2 = 1$; H_1 é denominado $H_{1/2}$ por corresponder à amplitude de campo em que a diferença populacional "n" cairá para a metade do que seria na ausência de saturação, nesse caso:

$$H_{1/2}^2 = 1/[(1/4)\pi^2 T_1 T_2] \quad (3.15)$$

A potência absorvida (P_a) por uma amostra paramagnética num campo oscilante $H_1 \sin(\omega t)$ é freqüentemente expressa em termos da susceptibilidade complexa (Orton, 1968):

$$P_a = \pi \nu_0 \chi'' H_1^2 \quad (3.16)$$

onde $\chi = \chi' - i\chi''$

Em termos de probabilidade de transição, P_a pode ser escrita:

$$P_a = W_{nm} n h \nu_0 \quad (3.17)$$

Substituindo os valores de n e W_{nm} nesta última e igualando à eq.(3.14), obtém-se:

$$\chi''(\nu_0) = \pi \chi_0 \nu_0 T_2 / [1 + (1/4)\pi^2 H_1^2 T_1 T_2] \quad (3.18)$$

onde $\chi_0 = \pi^2 h n_0 / 4 \pi \nu_0$ é a susceptibilidade estática de spin.

O espectrômetro de banda-X mede um sinal proporcional a $\chi''H_1$ (Castner, 1959). Assim, de acordo com a expressão (3.18), abaixo da saturação a intensidade do sinal cresce à medida que H_1 aumenta. Sob intensa saturação ele diminui com o aumento de H_1 . Este é o comportamento típico de saturação para uma amostra que sofre ALARGAMENTO HOMOGÊNEO das linhas espectrais.

Uma teoria para o ALARGAMENTO INOMOGÊNEO, proposta por Portis (1953), inclui uma função normalizada $h(\nu - \nu_0)$ de distribuição não homogênea de campos locais, modificando o termo de absorção, tal que:

$$\chi''(\nu) = \pi\chi_0\nu_0 h(\nu - \nu_0)/[1 + (1/4)\pi^2 H_1^2 T_1 T_2]^{1/2} \quad (3.19)$$

De acordo com esta expressão, a intensidade do sinal, para alargamento não homogêneo de linha, permanecerá constante com o aumento de H_1 na região de intensa saturação.

Geralmente, as curvas experimentais de saturação do sinal com a potência da microonda situam-se entre esses dois casos (homogêneo e inhomogêneo). Castner (1959) introduziu um parâmetro que mede o grau de inhomogeneidade:

$$a = \Delta w_L / \Delta w_G$$

onde Δw_L é a largura do pacote de spin homogêneo lorentziano e Δw_G a largura do envelope não homogêneo gaussiano. A nova susceptibilidade imaginária toma a forma:

$$\chi''(w_0) = (1/2t)\chi_0\pi^{1/2}(w_0/\Delta w_G)[1 - \Phi(at)]\exp(a^2 t^2) \quad (3.20)$$

onde $\Phi(at)$ é uma função erro e $t = (1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2)^{1/2}$, γ é a razão giromagnética de spin.

Quando os pacotes individuais de spin tiverem largura muito menor do que o envelope não homogêneo observado, a tenderá a zero e a absorção χ'' aproximar-se-á da expressão para o alargamento completamente não homogêneo, proposta por Portis (Eq.-3.19).

Uma expressão que apresenta maior praticidade, derivada da teoria acima, relaciona a intensidade do sinal (I) com a potência da microonda aplicada (Rupp et al, 1978):

$$I \propto (P)^{1/2} / (1 + P/P_{1/2})^{b/2} \quad (3.21)$$

onde $P \propto H_1^2$ e $P_{1/2} \propto H_{1/2}^2$ é a potência em que a intensidade do sinal reduz-se para a metade da que teria na ausência de saturação, sendo inversamente proporcional a $T_1 T_2$. "b" é o parâmetro de inomogeneidade, podendo variar de 1 até 2, do caso completamente não homogêneo para o caso completamente homogêneo.

No presente trabalho, é utilizada potência de microonda de 1mW no sentido de evitar efeitos de saturação. No estudo de saturação progressiva apresentado no Capítulo-V, a teoria acima é aplicada. É quando torna-se oportuna uma consideração inicial sobre os fatores que levam ao alargamento homogêneo ou inomogêneo.

CAPÍTULO IV - VARIAÇÕES NO FATOR g , INTENSIDADE E LARGURA DE LINHA DO SINAL DE RPE

IV.1 - PROCEDIMENTO

Foram estudadas as variações induzidas por pH e radiação vis-UV no fator espectroscópico g , na intensidade e na largura do sinal de RPE em soluções de melanina de L-DOPA e em soluções de melanina contendo quantidades crescentes de BSA.

Em uma primeira etapa foram estudadas as alterações no fator g e na intensidade do sinal ocorridas somente em amostras de melanina pura em tampão Universal, induzidas por uma variação de 4 a 11 no valor do pH e pela incidência de luz vis-UV. Em seguida estudou-se o mesmo, incluindo as alterações na largura de linha, em amostras contendo também BSA, desta vez em tampão fosfato com pHs entre 6 e 8. Uma variação extrema de pH para a proteína implicaria na destruição de sua integridade estrutural. O efeito da desnaturação da proteína foi estudado a partir de soluções contendo uréia 6M.

As medidas de variações na intensidade do sinal e na largura de linha foram realizadas a partir de dados obtidos no espectrômetro de RPE Varian E4, efetuando-se varreduras de campo de 20 Gauss. As amostras foram colocadas em um tubo capilar de quartzo de 1mm de diâmetro interno, em volumes de 30 microlitros. A fonte de luz vis-UV foi instalada a uma distância de 40 cm da cavidade do aparelho.

As medidas do fator g foram efetuadas a partir de dados colhidos no espectrômetro Varian E9. Desta vez varreu-se 80 G de campo, sendo registrados ao mesmo tempo o sinal da amostra e o de um cristal de MgO dopado com Cr^{3+} , com valor de g conhecido (1.9797).

Uma amostra de melanina natural ou sintética, tem em média uma concentração de spins de 10^{17} spins/grama (Sealy et al, 1980). Uma dificuldade enfrentada neste trabalho foi obter uma concentração de spins alta o suficiente para proporcionar um sinal detectável com o mínimo de "ruído" e, ao mesmo tempo, uma amostra transparente o suficiente para que a luz pudesse causar um efeito passível de análise. Uma outra dificuldade foi encontrar o porta-amostra adequado. Uma sela chata de RPE tem maior superfície de iluminação mas, dada a baixa concentração de spins da melanina, o sinal fica prejudicado pelo afastamento de parte dos spins do centro da cavidade e pela interação da água com o campo elétrico da microonda. A escolha recaiu em uma concentração de 15 mg/ml de melanina, e concentrações mais elevadas de proteína. O porta-amostra escolhido foi o tubo de quartzo já mencionado.

Neste capítulo foram introduzidas algumas medidas de absorção Óptica, com o objetivo de incrementar a discussão sobre a interação melanina-BSA.

IV.2 - RESULTADOS

Um exemplo típico do espectro de RPE de melanina pura e melanina com BSA em solução, é apresentado na Figura-IV.1. A intensidade do sinal (I) é obtida medindo-se a altura pico a pico, ou seja, a distância entre os pontos de máximo e mínimo no eixo vertical. A largura de linha (ΔH) é a distância entre esses pontos, no eixo horizontal.

DEPENDÊNCIA COM pH E ILUMINAÇÃO

A dependência da intensidade do sinal com o pH para soluções de melanina na ausência de albumina é apresentada na Figura-IV.2, onde incluiu-se também o efeito da radiação vis-UV. Observa-se um crescimento na intensidade do

sinal na direção dos valores de pH mais básicos, a qual atinge o dobro em relação ao pH mais ácido. Quando a amostra é iluminada são induzidos radicais livres, o que é observado pelo aumento na intensidade do sinal. O comportamento do sinal sob irradiação, relativo à variação de pH, é semelhante ao do sinal na ausência de luz. Pode-se considerar, dentro do erro experimental, que a mesma quantidade de radicais livres foi induzida pela luz nas soluções de melanina em diferentes valores de pH.

Não foram observadas diferenças significativas no fator g quando a amostra foi iluminada. As variações mensuráveis apareceram somente com as mudanças no pH. Na Tabela-IV.1 são apresentados os valores obtidos para o fator g de soluções de melanina para os valores de pH entre 4 e 11, nas situações com iluminação e sem iluminação. Observa-se um crescimento do valor de g na direção dos pHs básicos.

DEPENDÊNCIA COM BSA E ILUMINAÇÃO

A concentração de spins da melanina não se modificou com o acréscimo de BSA. Porém, a irradiação com luz vis-UV induziu um maior número de radicais livres na melanina quando na presença da proteína, sendo que o número desses radicais livres foto-induzidos cresceu à medida em que era aumentada a concentração da proteína. Observou-se que a BSA não apresenta sinal de RPE, mesmo sob irradiação. Na Figura-IV.3a é apresentado o aumento percentual na intensidade do sinal para concentrações crescentes de BSA em pHs 6, 7 e 8. Nenhuma diferença considerável com relação ao pH é observada para este intervalo. A concentração de melanina foi mantida em 15 mg/ml, enquanto que a de BSA variou de 15 a 75 mg/ml. O efeito da fotoindução maior na presença da albumina mostrou-se dependente da integridade desta última. A desnaturação da

albumina com uréia 6M fez com que este efeito desaparecesse. Este resultado pode ser visto na Figura-IV-3b.

As soluções de melanina-proteína em água apresentam valor de pH próximo do neutro. Os valores do fator g para soluções aquosas de melanina-proteína, na ausência e presença de luz, são apresentados na Tabela-IV.2. As concentrações variaram de 1:0 (melanina pura) a 1:10 em peso. Observa-se novamente que os valores de fator g sofrem um crescimento como para os valores de melanina pura em pH básico, sendo ligeiramente maiores os valores de g para amostras irradiadas.

O espectro de absorção óptica de uma solução de melanina (0.01 mg/ml) e o de melanina-BSA na proporção 1:10 (0.01:0.1 mg/ml) contra água na cubeta de referência é apresentado na Figura-IV.4a e IV.4b, respectivamente. A Figura-IV.4c mostra o espectro de absorção da BSA (0.1 mg/ml) contra água na referência e a IV.4d, o espectro do complexo melanina-BSA contra melanina na referência, nas mesmas concentrações anteriores. A diminuição na absorbância da proteína quando complexada com melanina, em relação à proteína livre, é um resultado que, embora esteja dentro do erro experimental para a medida, está reproduzindo o observado de maneira sistemática por Kawamura (1986). O emprego da técnica de ultravioleta diferencial por Kawamura, possibilitou verificar que a absorção óptica do complexo melanina-BSA não corresponde à soma das absorções das mesmas concentrações de melanina e BSA separadas, sendo observadas diminuições na região de absorção do triptofano e mais próximo ao esqueleto da cadeia polipeptídica.

Finalmente, as variações ocorridas nas larguras de linha do sinal de RPE são apresentadas na Tabela-IV.3. Observa-se um efeito de alargamento nas linhas provocado pela irradiação com luz vis-UV. Comparando os dados da tabela verticalmente, observa-se um efeito mais pronunciado de alargamento das linhas

provocado pelo acréscimo de BSA. Soluções de melanina-proteína em uréia 6M sofreram o mesmo efeito, apesar de não apresentarem maior fotoindução de radicais livres.

Figura-IV.2 - Variação da intensidade do sinal RPE com o pH para soluções de melanina (15mg/ml) em tampão citrato-fosfato-borato 50mM.

Figura-IV.1 - Espectro de RPE: a) melanina de L-DOPA; b) melanina de L-DOPA na presença de BSA (1:2). Sob irradiação vis-UV é observado aumento na intensidade, o qual é maior na presença da proteína.

Tabela IV.1 - Variação no valor do fator-g com o pH para soluções de melanina.

pH	g ($\pm 0,0002$)
4	2,0037
5	2,0038
6	2,0038
7	2,0038
8	2,0039
9	2,0039
10	2,0041
11	2,0042

Tabela-IV.2 - Variação no valor do fator-g com o acréscimo de BSA e com a incidência de luz Vis-UV (pH 6.5).

[mel]:[BSA]	g - s/luz	g - sob vis-UV ($\pm 0,0002$)
1:0	2,0039	2,0040
1:2	2,0039	2,0041
1:4	2,0040	2,0041
1:8	2,0040	2,0041
1:10	2,0040	2,0042

Figura-IV.3 - Variação percentual na intensidade do sinal RPE de melanina (15 mg/ml), sob irradiação vis-UV, com o acréscimo de BSA, a) em tampão fosfato e b) em uréia 6M.

Figura-IV.4 - Espectros de absorção óptica: a) melanina (0,01 mg/ml) contra água na referência; b) melanina-BSA (1:10) contra água; c) BSA contra água; d) melanina-BSA contra melanina.

Tabela-IV.3 - Variações nas larguras de linha (DH) com o acréscimo de proteína e com iluminação vis-UV ($\pm 5\%$).

[mel]:[BSA]

em tampão fosfato 50mM

	pH 6		pH 7		pH 8	
	s/luz	vis-UV	s/luz	vis-UV	s/luz	vis-UV
1:0	3,6	3,7	3,8	3,9	3,7	3,7
1:1	3,9	4,0	3,8	3,8	3,9	4,0
1:2	4,0	4,0	4,0	4,1	4,0	4,1
1:3	4,0	4,2	4,2	4,4	4,1	4,3
1:4	4,3	4,3	4,3	4,4	4,2	4,4
1:5	4,2	4,4	4,3	4,4	4,3	4,4

em uréia 6M

	s/luz	vis-UV
1:0	3,7	3,9
1:1	3,8	4,0
1:2	4,0	4,1
1:3	4,1	4,2
1:4	4,1	4,3
1:5	4,1	4,3

IV.3 - DISCUSSÃO

DEPENDÊNCIA COM pH

A primeira evidência do aumento na concentração de radicais livres em melaninas naturais com o aumento do pH possivelmente surgiu com o trabalho de F.W.Cope et al em 1963. Num estudo mais detalhado realizado por S-S.Chio et al (1982) sobre melaninas naturais e sintéticas foi observado um aumento de até cinco vezes na concentração de spins em pH 12, em relação àquela observada em pH 7. Este comportamento havia sido atribuído por Sealy et al (1980) a deslocamentos no equilíbrio entre espécies quinonas (Q), hidroquinonas (H₂Q) e radicais livres semiquinonas (Q^{•-}), presentes no polímero:

Um aumento no pH leva este equilíbrio a deslocar-se para a direita, aumentando a concentração dos radicais livres semiquinonas. A Figura-IV.2 mostra um crescimento na intensidade do sinal de RPE de melanina na direção dos valores de pH básicos, em concordância com os resultados da literatura.

Os valores de fator-g apresentados na Tabela-IV.1 concordam com os encontrados por Chio et al (1982), que observou uma variação no fator-g para soluções de dopa-melanina de 2,0034 para 2,0042, conforme o pH variou de 2 para 12.

O valor do fator espectroscópico g para elétrons livres é uma constante física bem estabelecida, sendo igual a 2,002319. Valores como os encontrados na Tabela-IV.1 distanciam-se do valor de g para elétrons livres por

corresponderem a spins eletrônicos mais localizados (Pasenkiewicz-Gierula e Sealy, 1986). A localização de spin eletrônico para melanina é prevista teoricamente (Galvão e Caldas, 1988) como um "efeito de pontas" em polímeros de melanina constituídos de unidades semiquinonas.

Valores de fator g como 2,0042, encontrados para soluções de melanina em pH alcalino (Tab.-IV.1), correspondem a spins mais localizados do que os encontrados para melaninas em pH ácido, por exemplo 2,0037. Segundo P-Gierula e Sealy (1986), no extremo alcalino de pH predominam formas desprotonadas aniônicas do polímero ($Q^{\cdot-}$ no equilíbrio anterior), onde a repulsão eletrônica entre a carga negativa e o elétron desemparelhado, situados em átomos de oxigênio vizinhos, causa a maior localização de spin sobre o átomo de oxigênio. Nos valores de pH próximos do neutro, formas semiquinonas neutras do polímero ($HQ^{\cdot}$) predominam, não apresentando a mesma repulsão eletrônica interna e levando à deslocalização da densidade de spins sobre o oxigênio e o carbono vizinho.

Têm sido registrados dois valores de pK_a para amostras de melanina. Um situado entre 3,7 e 4,8 (Sealy et al, 1980) e outro em torno de 8,5 (Sarna et al, 1985) ou 10,7 (P-Gierula e Sealy, 1986). O equilíbrio entre os grupos quinonas presentes no polímero pode ser então representado como segue:

Na medida em que o pH aumenta, o equilíbrio desloca-se para a direita, aumentando a concentração de spins. Ao mesmo tempo, a segunda desprotonação leva a uma maior localização desses spins.

O aumento na concentração de spins com o pH, também pode ser interpretado segundo os resultados de cálculos sobre orbitais moleculares de melanina, realizados por Galvão e Caldas (1988). Esses cálculos sugerem que o

paramagnetismo da melanina é devido ao LUMO ligante que aparece no polímero quando ele é constituído predominantemente por grupos semiquinonas, com capacidade de receber e estabilizar um elétron. À medida que o pH aumenta o polímero perde prótons, e grupos hidroquinonas vão sendo convertidos em grupos semiquinonas.

DEPENDÊNCIA COM ILUMINAÇÃO

Foram observados por espectroscopia de RPE de varredura no tempo, por C.C.Felix et al (1979), dois componentes de radicais livres de melaninas naturais e sintéticas, induzidos por luz na região visível do espectro. Um deles, observado na escala de tempo de milissegundos, apresentou decaimento rápido, em torno de 50ms, enquanto que o observado na escala de segundos apresentou decaimento mais lento, em torno de 30s. Um mecanismo proposto para o componente rápido (Felix et al, 1979) considera a participação de um estado tripleto precursor com base em observações que indicaram a ocorrência de polarização de spins em melaninas sintéticas irradiadas. Neste fenômeno, a absorção de luz por um aceitador A promove-o a um estado singleto excitado A^S , que sofre "intersystem crossing" para um correspondente tripleto A^T com privilégio de população do subnível tripleto mais alto (polarização de spins) (Felix et al, 1979). Se uma reação entre A^T e um doador de hidrogênio DH ocorrer de maneira rápida o suficiente para competir com a perda da polarização via relaxação spin-rede, a polarização é transferida para os radicais livres produtos da reação, como indica o esquema abaixo (Felix et al, 1979):

Nas melaninas esse mecanismo teria lugar nas foto-reações entre quinonas e hidroquinonas, onde a absorção de luz por grupos quinonas ou complexos quinohidronas levaria à formação de radicais livres semiquinônicos como indica o esquema abaixo (Felix et al, 1979 e Sealy et al, 1980):

Na ausência de oxigênio atmosférico (rota A), o par formado de radicais semiquinonas sofre recombinação, trazendo o polímero à forma inicial. Na presença de O₂ (rota B), o radical deve ser suprimido com a formação de superóxido, a qual tem sido observada experimentalmente na irradiação de melaninas (Felix et al, 1978a, Ito e Crippa, 1985 e Korytowski et al, 1987).

Registros do decaimento do sinal fotoinduzido na região de segundos e minutos são mais freqüentes na literatura sobre melaninas (Cope et al, 1963 e Sarna e Sealy, 1984), sendo observada uma dependência com o grau de hidratação das amostras (Jahan et al, 1987). O componente de decaimento mais lento, observado por Felix et al (1979) na escala de tempo de segundos, apresentou dependência com a temperatura enquanto o componente de decaimento rápido

não. Além disso, o componente lento obedeceu a uma cinética de decaimento de segunda ordem. Estas observações sugerem que pelo menos parte da recombinação radicalar deve depender da difusibilidade das moléculas no meio (Sealy et al, 1980). Deste modo, a indução e decaimento de radicais livres por luz em melaninas em solução não fica restrita a trocas de carga intramoleculares entre grupos quinonas e hidroquinonas (ou complexos quinohidronas) vizinhos, sendo estendida a processos intermoleculares.

Alguns fatores que caracterizam os radicais fotoinduzidos, que os diferenciam dos existentes na ausência de luz a pH neutro (comumente denominados intrínsecos), são valores mais altos para o fator-g, maior largura de linha e saturação com a potência para valores mais altos de potência de microonda (Felix et al, 1979 e Sealy et al, 1980). Um aumento no valor de g para elétrons desemparelhados em melaninas é compatível com um aumento no grau de localização de spin (conforme seção anterior), tornando possível supor que, além dos radicais livres semiquinonas do tipo $HQ^\bullet$, podem estar sendo gerados por luz também os do tipo $Q^\bullet$, devido à possível fotodesprotonação do pigmento (caracterizada por um aumento no fator-g). Um argumento a favor disso são os valores de fator-g encontrados para os radicais livres induzidos por luz UV nos precursores da melanina, que devem obedecer a equação abaixo (Felix e Sealy, 1981):

onde $R = \text{CO}_2^-$; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2^-$; CH_2NH_3^+ ; CH_2NH_2 ; etc.

Os valores de g encontrados nesses experimentos, 2,0043 a 2,0047, são maiores do que os comumente encontrados para melaninas sintéticas a pH neutro. Uma justificativa para isto pode ser a maior localização de spin quando uma carga negativa está presente no oxigênio vizinho, como é o esperado com a desprotonação do polímero a pHs básicos (P-Gierula e Sealy, 1986 e discussão anterior).

Possivelmente, mais de um mecanismo deve ser responsável pela produção de radicais livres por luz em melaninas. Trocas de cargas entre grupos quinonas e hidroquinonas vizinhos podem levar à produção de radicais livres semiquinonas do tipo $HQ^{\cdot-}$, conforme propõe o esquema envolvendo estados precursores tripleto mencionado. Outros mecanismos porém, como a desprotonação e ejeção de elétrons sob influência da luz podem gerar radicais do tipo $Q^{\cdot-}$. B.Kalyanaraman et.al (1984) demonstrou, por experimentos de RPE, a produção de elétron aquoso e átomo de hidrogênio durante a irradiação UV de melaninas na presença de "spin trap".

Observou-se no presente trabalho o mesmo efeito de foto-indução de radicais livres em solução de melanina. Note-se que o número de radicais induzidos, para uma mesma condição experimental, não dependeu do pH da solução (Figura-IV.2). Contudo, para que fosse verificada essa independência com o estado de protonação do pigmento seria necessária uma maior taxa de foto-indução do que a obtida. O mesmo seria necessário para que fossem observadas alterações significativas no fator-g em relação ao sinal intrínseco (Tabela-IV.2).

DEPENDÊNCIA COM BSA

No estudo realizado por Kawamura (1986) foram observadas alterações nos espectros de RPE de amostras sólidas de complexos de Dopa-melanina com BSA. Essas amostras foram misturadas previamente em solução e depois secadas. Nessas condições, a concentração de proteína em relação à

melanina pôde ser entre 20 e 200 vezes maior. Observou-se um aumento de até 3 vezes na intensidade do sinal do complexo, em relação à melanina pura. O valor do fator-g cresceu de 2,0030 para melanina pura, até 2,0037 para melanina com proteína (1:200). A largura de linha variou respectivamente de 4,5 para 5,0 Gauss. O efeito da luz não foi estudado, sendo que as variações observadas aconteceram somente com o acréscimo da proteína.

No estudo de soluções de complexos melanina-proteína, realizado no presente trabalho, não se verificaram alterações significativas na concentração de spins somente com o acréscimo de BSA. Este fato pode ser atribuído em parte às limitações experimentais já mencionadas, e à relativamente baixa proporção melanina:proteína, que teve variação máxima de 1:10. Foi verificado um pequeno aumento no valor do fator-g (na ausência de luz) com o acréscimo da albumina (Tabela-IV.2). Aumentos na largura de linha foram observados com o acréscimo de BSA (Tab.-IV.3) independente de seu estado de integridade (em Uréia 6M o alargamento também aconteceu). Esses resultados serão discutidos em conjunto nos capítulos que se seguem. As maiores alterações na intensidade do sinal e fator-g foram observadas quando as amostras foram submetidas à irradiação com visível-UV, que discutiremos a seguir.

DEPENDÊNCIA COM BSA SOB ILUMINAÇÃO

A Figura-IV.3a mostra que a indução de radicais livres por luz é maior com o acréscimo de BSA. Ao mesmo tempo, a Tabela-IV.2 mostra que o valor do fator-g é maior para as amostras irradiadas. Com base no que foi discutido até agora, esses resultados sugerem que a fotoindução de radicais livres na presença da proteína é acompanhada da desprotonação e estabilização de elétron desemparelhado do polímero de melanina. A desprotonação deve conduzir à estabilização de mais radicais livres como a provocada pela elevação do pH

(Figura-IV.2), os quais são caracterizados por um maior valor de fator-g (Tabela-IV.1). Um possível papel da proteína, portanto, poderia ser o de trocar cargas com a melanina, criando condições para a desprotonação do pigmento e maior estabilização de radicais livres sob iluminação. A Figura-IV.3b sugere que este fenômeno dependeria da interação da melanina com sítios específicos da proteína, pois a destruição da estrutura terciária da BSA em Uréia 6M pode ser o motivo do corte observado na fotoindução de radicais dependentes do acréscimo de proteína.

O fato de a absorção de luz do complexo melanina-BSA não corresponder à soma das absorções da melanina e da proteína separadas (Kawamura, 1986) sugere a transferência de cargas entre as duas macromoléculas. As reações de óxido-redução envolvendo melanina e outras moléculas, como NADH (Ito e Crippa, 1985) e citocromo-C (Gan et al, 1975), são estudadas monitorando-se as alterações nas bandas de absorção dessas últimas. Foi observado que a absorbância da melanina sofre alterações menores quando complexada com a BSA, enquanto que nesta última, houve uma diminuição que não excedeu a 20% (Kawamura, 1986 e Figura-IV-4). Devido à sua intensa absorbância, a quantidade de elétrons envolvidos na absorção de luz pela melanina deve ser muito alta, de maneira que a transferência de elétrons para outros agentes não afeta em muito o seu espectro de absorção óptica. Isto pode ser observado no trabalho de Korytowski et al (1987), que mostra os efeitos da redução de Fe^{3+} pela melanina na absorbância desta última. Mudanças mais drásticas no espectro da albumina não são observadas pelo fato de que os sítios que trocariam cargas com a melanina não são necessariamente os mesmos responsáveis pela absorção óptica das proteínas na região observável experimentalmente.

No esquema proposto por Sealy et al (1980) a produção de radicais livres considera a melanina excitada passando por um estado tripleto, que tem tempo de vida suficientemente longo para que reações de transferência de carga

entre hidroquinonas e quinonas ocorram, gerando radicais livres semiquinonas. Pode-se supor que na presença de BSA este estado tripleto seja precursor no processo de transferência de cargas entre melanina e BSA.

O alargamento de linha do sinal RPE com a iluminação, aconteceu também com a presença de proteína e ainda, com a proteína desnaturada (Tabela-IV.3). O alargamento com a proteína desnaturada indica uma não dependência com interações específicas com sítios da proteína. Para uma melhor interpretação dos alargamentos observados é necessário uma análise dos resultados de Saturação Progressiva, o que é apresentado no capítulo seguinte.

CAPITULO V - SATURAÇÃO PROGRESSIVA

Em um experimento de Ressonância Paramagnética Eletrônica, a largura de linha dos espectros observados depende fortemente de fatores que influenciam nos tempos de vida dos estados excitados de spin e de fatores que geram variações locais de campo magnético.

Em virtude do tempo de vida (Δt) de um estado excitado ser finito, a energia deste estado (ΔE) terá largura finita, sendo determinada pelo princípio da incerteza de Heisenberg:

$$\Delta E \Delta t = h/2\pi \quad (5.1)$$

Considerando a condição de ressonância de spin eletrônico:

$$h\nu = g\beta H$$

a largura do sinal de RPE será (Bolton, 1972):

$$\Delta H = 1/\gamma \Delta t \quad (5.2)$$

onde $\gamma = g\beta/h$ é a razão giromagnética eletrônica.

Um processo que aumenta a probabilidade de transição entre dois estados de spin eletrônico deverá diminuir Δt , aumentando conseqüentemente ΔH e vice-versa. Esta forma de alargamento das linhas espectrais é denominada alargamento por tempo de vida (Bolton, 1972) e, desde que se aplique igualmente para todo o sistema de spins, será considerada uma forma homogênea de alargamento.

Um ALARGAMENTO HOMOGÊNEO acontece quando a energia absorvida do campo de radiação é prontamente distribuída para todo o sistema de spins, preservando seu equilíbrio térmico durante o fenômeno de ressonância. Nessas condições, a teoria prediz uma forma Lorentziana de linha (Portis, 1953).

Decaimentos por emissão espontânea são desprezíveis na região de frequência de microondas, onde tem lugar a ressonância eletrônica de spin.

Processos não radiativos no decaimento dos estados excitados são até 10^{15} vezes mais efetivos do que a emissão de fótons (Bowman, 1979). Neste sentido, o alargamento por tempo de vida depende em grande parte da interação do sistema de spins com sua vizinhança. Duas fontes comuns de alargamento homogêneo são: a relaxação spin-rede (com tempo de vida caracterizado por T_1), onde a energia é transferida dos estados excitados de spin para os modos vibracionais da estrutura, apresentando forte dependência com a temperatura; e a interação spin-spin entre centros paramagnéticos idênticos (caracterizada por T_2), onde a energia pode ser transferida durante a troca de estados de spins entre centros próximos, dependendo portanto da concentração de spins.

Outros mecanismos que levam ao alargamento homogêneo catalogados por Portis (1953) incluem: rápidas flutuações no campo local dos centros de spin, difusão da excitação através da amostra, movimento de portadores no campo da microonda, interações com o campo da radiação e interação dipolar entre spins semelhantes.

Quando a energia do campo de radiação é absorvida somente por aqueles spins cujo campo local satisfaz a condição de ressonância e a interação spin-spin é lenta quando comparada com a interação spin-rede, o equilíbrio térmico do sistema de spins não é mantido durante o fenômeno de ressonância. Nesse caso as linhas espectrais sofrem **ALARGAMENTO INOMOGÊNEO** (Portis, 1953). A este tipo de alargamento está associada uma forma gaussiana de linha, a qual corresponde a um pacote de lorentzianas estreitas, não resolvidas, devido a ressonâncias para valores de campo muito próximos.

Alargamento inomogêneo acontece por exemplo quando não há uniformidade no campo magnético aplicado, onde diferentes regiões da amostra estarão sujeitas a diferentes valores de campo. Cada centro paramagnético pode

apresentar linhas estreitas, mas a largura observada é determinada pela não homogeneidade de H.

Estando presente uma espécie paramagnética diferente, esta contribuirá com um campo magnético efetivo no sítio da espécie absorvente, tal que o campo de ressonância será a soma dessa componente dipolar e o campo magnético externamente aplicado (Orton, 1968). Considerando uma distribuição aleatória dessa espécie diferente, o campo dipolar não será o mesmo para cada sítio em ressonância, resultando em um alargamento não homogêneo de linha.

Outro exemplo para o caso inomogêneo são irregularidades na estrutura onde os centros de spin estão inseridos, as quais podem levar a variações locais do campo cristalino (Orton, 1968). Outros fatores que levam a alargamentos anisotrópicos, estruturas hiperfinas e estruturas finas não resolvidas são fontes de alargamento inomogêneo (Portis, 1953).

A maneira como se comportam as curvas espectrais para uma determinada amostra paramagnética, à medida que os estados excitados de spin vão sendo saturados com o aumento da intensidade do campo de radiação aplicado, é uma forma de identificar a categoria de alargamento (homogêneo ou inomogêneo) para esta amostra. Um resumo da teoria envolvida na saturação de estados de spins, para sistemas de spins homogêneos e inomogêneos, é apresentado no Capítulo III. Uma expressão de bastante praticidade utilizada neste trabalho relaciona a intensidade do sinal (I) com a potência da microonda (P) aplicada (Rupp et al, 1978):

$$I \propto (P)^{1/2}/(1 + P/P_{1/2})^{b/2} \quad (5.3)$$

Nesta expressão, $P_{1/2}$ é a potência em que a intensidade do sinal reduz-se para a metade da que teria na ausência de saturação (potência de meia saturação), sendo

inversamente proporcional ao produto T_1T_2 . "b" é o parâmetro de inomogeneidade, o qual assume valores que variam de 1 a 2, do caso completamente inomogêneo para o caso completamente homogêneo respectivamente. Desta forma, quando o alargamento é do tipo inomogêneo ($b = 1$), a intensidade do sinal na região de intensa saturação deve permanecer constante com o aumento da potência ($I \propto (P/P_1)^{1/2}$ para $P \gg P_{1/2}$). Já no caso homogêneo ($b = 2$), a intensidade do sinal deve sofrer diminuição com o aumento da potência da microonda quando o sistema está saturado ($I \propto (P/P_1)^{1/2}/P$ para $P \gg P_{1/2}$).

V.1 - PROCEDIMENTO

As amostras utilizadas foram preparadas de acordo com a descrição do capítulo II. As iluminações vis-UV e visível foram efetuadas pelas fontes descritas no mesmo capítulo. Nos experimentos deste capítulo foi empregado o espectrômetro de RPE BRUKER 2000, com potência de microonda variando de 0.1 a 80 mW.

Para permitir a desoxigenação as amostras foram inseridas em uma membrana plástica tubular permeável a gases, de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Em seguida foram colocadas no interior de um tubo de quartzo atravessando a cavidade do espectrômetro de RPE. Em uma extremidade desse tubo de quartzo foi acoplada uma mangueira que, ligada a um balão de nitrogênio comum, proporcionou o fluxo de N_2 .

Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente, sendo tirados após 30 minutos sob fluxo de N_2 , quando era o caso, tempo necessário para que o sinal fosse estabilizado.

V.2 - RESULTADOS

RADICAIS LIVRES INTRÍNSECOS

A molécula de oxigênio apresenta estado eletrônico fundamental tripleto, contendo dois elétrons desemparelhados, o que caracteriza o seu paramagnetismo. Em experimentos de RPE a presença de oxigênio atmosférico tem um papel importante, muitas vezes indesejável. Ele pode reagir facilmente com outras moléculas com elétrons desemparelhados, pode reduzir os tempos de relaxação resultando em um crescimento aparente na intensidade do espectro e, além disso, a suficiente aproximação do O_2 de outros centros paramagnéticos causa uma perturbação magnética local que leva ao alargamento inhomogêneo (Bolton, 1972).

Algumas informações podem ser obtidas sobre a interação do O_2 com a amostra em estudo a partir de experimentos de saturação progressiva. A figura-V.1 apresenta a variação da intensidade do sinal com a raiz quadrada da potência da microonda aplicada para uma solução de 15mg/ml de melanina. Quando oxigênio atmosférico está presente, a intensidade do sinal é maior para potências acima de 0.5 mW, indicando um processo de relaxação mais eficiente. Sob fluxo de N_2 , a intensidade do sinal é menor, tendendo a uma diminuição na região de alta saturação, o que caracteriza um comportamento mais homogêneo quando O_2 é removido. Na presença de BSA (Fig.-V.2), o fenômeno se repete, porém o comportamento da curva de saturação já não é o mesmo. A intensidade do sinal sob O_2 não cresce tanto quanto para melanina pura, o que indica uma diminuição da interação entre o oxigênio molecular e os centros paramagnéticos da melanina quando a BSA está presente. A Figura-V.3 mostra os espectros obtidos na região de saturação (em 80mW) sob fluxo de N_2 e em O_2 atmosférico, para melanina pura e para o complexo melanina-BSA. Nesta figura, a queda na intensidade do sinal

saturado com o acréscimo de albumina, sob O_2 (Fig.-V.3b), pode ser melhor observada.

A diminuição na interação oxigênio-melanina parece não ser afetada mesmo com a mudança no estado de conformação da proteína, como pode ser observado na Figura-V.4, onde a BSA apresenta-se desnaturada.

A Figura-V.5 mostra os resultados de saturação progressiva para melanossomos. Pouca diferença é notada quando o oxigênio atmosférico é retirado. O sistema de spins apresentou-se bastante inhomogêneo. Já as amostras em estado sólido (Fig.-V.6) apresentaram um comportamento de saturação homogêneo, apesar de terem sido estudadas somente na presença de O_2 .

RADICAIS LIVRES FOTO-INDUZIDOS

O comportamento da curva de saturação para os radicais livres intrínsecos é semelhante ao da curva de saturação para os induzidos por luz visível e UV em melanina pura (Fig.-V.7). Esta observação pode ser estendida para melanina com BSA (Fig.-V.8), onde a maior separação entre as curvas reflete a maior fotoindução de radicais livres na presença da proteína. Quando a BSA é desnaturada, as curvas de saturação caminham mais próximas (Fig.-V.9).

De maneira geral, não foi observada variação significativa no grau de homogeneidade dos sistemas de spins quando espécies radicalares induzidas por luz estão presentes, comparando com os mesmos sistemas na ausência de luz. Nas Figuras V.8 e V.10, uma pequena diminuição na intensidade do sinal na região de saturação, indica um caráter mais homogêneo para os radicais fotoinduzidos.

A separação entre as curvas de saturação para radicais livres intrínsecos e foto-induzidos em melanossomos (Fig.-V.10), é maior do que para a melanina pura ou com BSA desnaturada. A maior foto-indução de radicais nesta melanina natural pode ser atribuída a diferenças químicas ou de concentração,

quando comparada à melanina sintética. Porém, a presença de proteínas agregadas à melanina no melanossomo pode ter algum papel na maior indução de radicais livres por luz.

Figura-V.1 - Curvas de Saturação (variação da intensidade do sinal RPE com a raiz quadrada da potência) para melanina em solução aquosa (15 mg/ml) na presença e ausência de O_2 .

Figura-V.2 - Curvas de Saturação para melanina(15 mg/ml)-BSA em solução aquosa, a) 1:4 e b) 1:8, na presença e ausência de O_2 .

Figura-V.3 - Espectros obtidos em potência de saturação (80mW) para melanina e melanina-BSA (1:4 e 1:8), a) na ausência e b) presença de O_2 .

Figura-V.4 - Curvas de Saturação para melanina-BSA (7,5 e 75 mg/ml respectivamente) em Uréia 6M, na presença e ausência de O_2 .

Figura-V.5 - Curvas de Saturação para melanossomos em suspensão de sacarose 0,25M na ausência e presença de O_2 .

Figura-V.6 - Curvas de Saturação para amostras em estado sólido, melanina (1mg) e melanina-BSA (1:10 em peso).

Figura-V.7 - Curvas de Saturação para melanina em solução aquosa (15 mg/ml), irradiada com vis-UV e visível, a) na ausência e b) presença de O_2 .

Figura-V.8 - Curvas de Saturação para melanina-BSA (15 e 90 mg/ml respectivamente) irradiada com Vis-UV e visível, a) na ausência e b) presença de O_2 .

Figura-V.9 - Curvas de Saturação para melanina-BSA (7,5 e 75 mg/ml respectivamente) irradiada por vis-UV, em Uréia 6M, a) na ausência e b) presença de O_2 .

Figura-V.10 - Curvas de Saturação para melanossomos em suspensão de sacarose 0,25 M irradiados por vis-UV, a) na ausência e b) presença de O_2 .

Figura-V.11 - $\text{Log}(I/P^{1/2})$ X $\text{Log}(P)$ para obtenção dos parâmetros de saturação $P_{1/2}$ e b das curvas da Figura-V.1.

Tabela-V.1 - Parâmetros de Saturação: Potência de meia saturação ($P_{1/2}$) e parâmetro de inhomogeneidade (b) ($\pm 10\%$).

b = 1 inhomogêneo
b = 2 homogêneo

[mel]:[BSA]	$P_{1/2}$ (mW)			b		
	s/luz vis-UV visível			s/luz vis-UV visível		
1:0 em O ₂	10	12	13	1,0	1,1	1,0
desoxig.	4,3	4,7	4,2	1,7	1,8	1,6
1:4 em O ₂	7,2	9,0	6,8	1,3	1,3	1,4
desoxig.	3,0	4,0	3,5	1,4	1,5	1,4
1:8 em O ₂	7,6	8,1	8,9	1,1	1,1	1,2
desoxig.	3,5	4,6	4,9	1,4	1,4	1,4
EM URÉIA 6M						
1:10 em O ₂	6,5	9,4		1,0	1,2	
desoxig.	3,9	4,3		1,3	1,4	
EM ESTADO SÓLIDO						
1:0 em O ₂	3,9	3,7		1,8	1,8	
1:4 em O ₂	3,2	3,5		1,6	1,7	
1:10 em O ₂	3,7	3,5		1,9	1,9	
MELANOSSOMOS						
em O ₂	5,0	6,8		1,1	1,3	
desoxig.	4,3	6,6		1,2	1,3	

V.3 - DISCUSSÃO

Os valores das potências em que a intensidade do sinal cai pela metade da que teria na ausência de saturação ($P_{1/2}$), e do parâmetro de inhomogeneidade (b) podem ser obtidos tomando a equação 5.3 e "plotando" $\log(I/P^{1/2})$ contra $\log(P)$. O valor de b é obtido a partir da inclinação da reta que passa pelos pontos correspondentes à saturação mais intensa (Fig.V.11). $P_{1/2}$ é obtido da intersecção desta reta com a que passa pelos pontos iniciais, correspondentes à região onde a saturação é desprezível, e que é paralela ao eixo das abscissas. Na tabela V.I estão relacionados os valores encontrados para $P_{1/2}$ e b , para soluções de melanina pura e melanina com BSA, íntegra e denaturada, amostras em estado sólido e melanossomos, em condições diferentes de iluminação e oxigenação.

RADICAIS LIVRES INTRÍNSECOS

O termo radical livre intrínseco pode não ser apropriado devido ao fato de os radicais livres da melanina não serem estáveis, mas dependentes de diversos fatores que alteram o equilíbrio redox do qual participam. Neste trabalho, seu emprego tem um caráter principalmente ilustrativo, no sentido de diferenciar os radicais livres induzidos por luz daqueles existentes na ausência de iluminação no polímero.

A potência de meia saturação ($P_{1/2}$) é inversamente proporcional a T_1T_2 (ver teoria - Cap.III). Desta forma, aumentos no valor de $P_{1/2}$ geralmente estão associados a mecanismos que cooperam na relaxação de estados de spin, levando à diminuição do produto T_1T_2 . Os resultados sugerem que a interação melanina- O_2 se dá neste sentido. Como pode ser observado na Tabela V.I, os

valores de $P_{1/2}$ são sempre maiores quando as amostras estão na presença de oxigênio atmosférico.

O papel do O_2 na relaxação dos spins da melanina pode se dar a nível de dissipação de calor, pela excitação térmica dos estados de spin do O_2 a partir da rede da melanina. É possível ainda que o oxigênio atmosférico interaja diretamente com os spins do polímero, roubando-lhes a excitação via interação de troca. Os valores do parâmetro de inhomogeneidade "b" apresentados na Tabela-V.I demonstram a existência de interação entre O_2 e os centros paramagnéticos do polímero. Valores de b mais próximos de 1 são encontrados para amostras oxigenadas, onde a interação magnética entre O_2 e os spins da melanina aumenta o grau de inhomogeneidade do sistema de spins do polímero, chegando ao extremo inhomogêneo para melanina pura ($b = 1$).

A acessibilidade da molécula de oxigênio aos centros radicalares da melanina é compatível com um modelo de estrutura planar para o polímero, a qual não deve sofrer empacotamento em solução. A localização de spins na extremidade do polímero melanina, prevista teoricamente por Galvão e Caldas (1988), também encontra concordância nesses resultados.

A relaxação de spins induzida por O_2 sofre diminuição quando a albumina está presente (Figuras V.2 e V.3), em relação à melanina na ausência de proteína (Figura-V.1). Esta observação é demonstrada pela diminuição dos valores de $P_{1/2}$, para amostras em oxigênio, com o acréscimo de BSA. Sob fluxo de N_2 os valores de $P_{1/2}$ não se alteram, quando BSA é acrescentada (Tab.-V.I). A menor interação entre o O_2 e os spins da melanina, quando na presença de BSA, é verificada também pelo aumento na homogeneidade do sistema de spin do polímero, como indica a elevação dos valores de b para essas amostras (Tab.V.I).

Um fato a se considerar é a possível diminuição na difusibilidade do oxigênio, à medida que a concentração das amostras aumentam com o acréscimo de

proteína. Outro fato a se levar em conta é que a interação melanina-proteína pode envolver os sítios radicalares do pigmento, pois ocorrem alterações na largura de linha do sinal de RPE e no fator-g (Capítulo-IV). A homogeneidade do sistema de spins da melanina também é afetada com a presença de BSA. Conforme mostra a Tabela-V.I, na ausência de O_2 , o acréscimo de albumina leva à diminuição da homogeneidade do sistema (b diminui). Esses resultados sugerem um bloqueio da interação entre moléculas de oxigênio e os centros de spin da melanina, provocado pela proteína.

A diminuição na homogeneidade do sistema de spins da melanina induzida pela proteína manteve-se para amostras em uréia 6M (Tab.-V.I), sugerindo uma não especificidade na interação magnética entre as duas macromoléculas. Esta diminuição na homogeneidade pode refletir apenas variações locais de cargas nos sítios radicalares do pigmento provocadas pela presença da BSA, mesmo denaturada. Quanto aos valores de $P_{1/2}$, pode-se dizer que estes reproduziram o padrão observado para a proteína em estado natural, onde é dificultado o acesso do O_2 aos spins da melanina.

Os resultados de $P_{1/2}$ obtidos para amostras em estado sólido aproximam-se dos obtidos para soluções na ausência de O_2 . As amostras sólidas não foram desoxigenadas, porém a interação do oxigênio com os centros de spin da melanina deve ser desprezível, como pode-se notar pelo maior grau de homogeneidade de spin verificado para essas amostras (Tab.-V.I). A presença de BSA não alterou os parâmetros de saturação, sugerindo que a proteína e melanina não interagem em estado sólido. Nesses experimentos, porções sólidas de melanina e BSA foram maceradas juntas, o que não é o mesmo se BSA e melanina tivessem sido misturadas primeiramente em solução e secadas em seguida.

A interação O_2 -melanossomo foi pequena como o mostram a Figura-V.5 e os valores de $P_{1/2}$ da Tabela-V.I. Isto pode ser atribuído a um caráter mais

sólido para a organela, onde o O_2 teria pouca penetração. É possível também que a melanina natural seja estruturada de tal forma a "esconder" seus spins do oxigênio atmosférico. Uma outra possibilidade seria um bloqueio efetuado pelas proteínas agregadas. O elevado grau de inomogeneidade que os valores de b indicam pode advir do fato de que melaninas naturais apresentam íons metálicos paramagnéticos (Blois et al, 1964). É possível que elas contenham O_2 intersticiais que não possam ser expulsos pelo nitrogênio. É necessário ainda considerar que o movimento de cargas ou dipólos presentes em outras moléculas que circundam ou estão agregadas ao biopolímero natural também podem afetar a homogeneidade dos seus centros de spins.

RADICAIS LIVRES FOTO-INDUZIDOS

A amostra de melanina pura oxigenada apresentou um valor de $P_{1/2}$ maior quando foi irradiada com luz vis-UV e visível, o mesmo não sendo observado sob fluxo de N_2 (Tab.-V.I). Se uma maior quantidade de spin está presente em ressonância, espera-se que mais energia deva ser transferida para a rede e, em consequência, que a saturação ocorra para valores de potência de microonda mais baixos. O aumento de $P_{1/2}$ quando espécies induzidas pela luz também estão presentes é, deste modo, um efeito oposto ao esperado. A observação de que este fenômeno acontece predominantemente na presença de O_2 para melanina sem proteína sugere a participação deste no processo. Um mecanismo que daria conta da relaxação mais rápida do radical foto-induzido na presença de oxigênio poderia ser o da formação de superóxido, onde O_2 seria reduzido a $O_2^{\cdot-}$ pela melanina. Nesse caso a reação com o oxigênio seria rápida o suficiente para competir com a relaxação spin-rede. O mecanismo de foto-indução de radicais livres na região de tempo de milisegundos proposto por Sealy et al (1980), discutido no capítulo

anterior, considera a formação de superóxido como uma rota alternativa à recombinação radicalar (rota B naquele esquema).

A produção de superóxido, porém, não justifica totalmente a relaxação de spin mais rápida do radical foto-induzido. Para o complexo melanina-BSA e melanossomos, os radicais fotoinduzidos tiveram maiores valores de $P_{1/2}$ tanto na presença como na ausência de oxigênio atmosférico (Tab.-V.I). Outros processos envolvendo trocas rápidas de cargas entre regiões do polímero, entre macromoléculas de melanina ou entre melanina e outras moléculas, poderiam então causar o aumento verificado nos valores de $P_{1/2}$. Uma outra hipótese pode ser levantada considerando a baixa concentração de spins em amostras do pigmento. É estimada a existência de um spin para cada 400 unidades monoméricas de melanina (Sealy et al, 1980). Deste modo, a probabilidade de que a foto-indução radicalar ocorra em macromoléculas onde previamente não existam spins em ressonância pode ser elevada e a relaxação spin-rede dos radicais recém-induzidos não seria afetada pela relaxação dos radicais livres intrínsecos. Nessas condições, $P_{1/2}$ na Tabela V.I deveria ser um valor médio entre a potência de saturação dos spins intrínsecos e foto-induzidos na amostra.

Uma comparação entre os valores de $P_{1/2}$ relacionados na Tabela-V.I e os valores para as larguras de linha relacionados na Tabela-IV.I do capítulo precedente pode ajudar a interpretar as variações ocorridas nessas últimas. Uma vez que $P_{1/2}$ é inversamente proporcional a T_1T_2 e que a largura de linha (ΔH) é inversamente proporcional ao tempo de vida do estado de spin (Δt), $P_{1/2}$ será proporcional a ΔH para as situações em que o alargamento das linhas é governado pelo tempo de vida, que é um alargamento homogêneo. Assim, os alargamentos verificados na Tabela-IV.I quando as amostras foram iluminadas devem estar vinculados aos aumentos dos valores de $P_{1/2}$ devido à relaxação mais rápida do radical fotoinduzido. Já os alargamentos devidos ao aumento da concentração de

BSA não encontram correspondência nas variações de $P_{1/2}$, caracterizando um alargamento não homogêneo.

Os valores para a potência de saturação, portanto, encontram uma correspondência com o parâmetro de inomogeneidade, quando o alargamento do sinal de RPE vem dado pelo tempo de vida (alargamento homogêneo). Quando é esse o caso, o aumento de $P_{1/2}$ é acompanhado de um aumento de b , refletindo um aumento na homogeneidade. De um modo geral, isto foi observado quando as amostras foram irradiadas (Tab.-V.I). Fatores como a presença de O_2 , que caracterizam o alargamento inomogêneo, podem algumas vezes terem mascarado a componente homogênea do radical fotoinduzido, como os valores de b para a melanina pura indicam. Um fator satisfatório para a correspondência entre $P_{1/2}$ e b no alargamento homogêneo, pode ser o crescimento no valor desses parâmetros para o complexo melanina-BSA em uréia e melanossomos.

CAPITULO VI - CINÉTICAS DE INDUÇÃO E DECAIMENTO DE RADICAIS LIVRES E DEPENDÊNCIA COM A ILUMINAÇÃO VISÍVEL E VIS-UV

VI.1 - PROCEDIMENTO

As cinéticas de indução e decaimento de radicais livres por luz são obtidas a partir de experimentos de RPE de varredura no tempo, onde é monitorada a variação da intensidade do sinal com o tempo, após a incidência de luz ou após a suspensão desta.

A desoxigenação das amostras foi efetuada da maneira descrita no capítulo anterior. No capítulo II estão descritas a preparação das amostras e as fontes de iluminação visível e vis-UV utilizadas neste capítulo. O monitoramento da temperatura por termopar na cavidade do aparelho registrou variações que não excederam 2°C durante a irradiação.

Foram utilizados os espectrômetros de RPE BRUKER 2000 e Varian E9 e o espectrofotômetro ZEISS DMR 21.

VI-2 - RESULTADOS

CINÉTICAS DE FOTO-INDUÇÃO POR VIS-UV

Foram obtidas cinéticas de foto-indução e decaimento de radicais livres no complexo melanina-proteína na escala de tempo de minutos. Os resultados apresentados na Figura-VI.1 referem-se a soluções de melanina pura (15mg/ml) e melanina com proteína nas concentrações relativas 1:2, 1:4 e 1:8. A incidência de luz provoca aumento imediato na concentração de spins em amostras de melanina pura, a qual se estabiliza alguns minutos após. Quando a iluminação é suspensa, a concentração de spins retorna a um valor próximo ao anterior à incidência de luz,

denotando um processo reversível. A presença de BSA leva a uma maior foto-indução, caracterizada por uma cinética mais lenta, chegando à escala de horas. A Figura-VI.2 mostra que o processo de indução e decaimento é ainda mais vagaroso na ausência de oxigênio atmosférico. Nesta figura a queda na intensidade do sinal após o início do fluxo de N_2 é atribuída à saturação de spin, uma vez que esses espectros foram obtidos a 2mW de potência.

Uma dependência com a hidratação da amostra é apresentada na Figura-VI.3, onde pode ser observado que em amostra sólida a presença da proteína em nada modifica a intensidade do espectro sob irradiação (Fig.- VI.3b e c). Por outro lado, quando a amostra contendo BSA na razão 1:4 em peso é umidecida, surge o efeito da maior foto-indução (Fig.-VI.3d).

Experimentos com melanina em solução de glicerina (Fig.-VI.4) demonstraram que a viscosidade do meio, não influencia a quantidade de radicais livres foto-induzidos. O aumento na viscosidade do meio, porém, torna as cinéticas mais lentas. A Figura-VI.4c mostra o efeito da viscosidade de uma solução de glicerina equivalente à de uma solução de 300 mg/ml de BSA, medidas em um viscosímetro de Ostwald. Uma comparação com a Figura-VI.1 mostra que o aumento da concentração da albumina pode diminuir a velocidade das cinéticas, devido ao aumento na viscosidade. É provável que haja influência deste fator nas cinéticas, mas sua importância é relativa, pois o sinal de RPE da melanina em glicerina (com viscosidade equivalente a 300 mg/ml de BSA) volta à intensidade original em pouco mais de 10 minutos (Fig.-VI.4c), enquanto que na presença de BSA a volta à intensidade original pode levar horas (Fig.-VI.1). Além disso, a máxima concentração de proteína utilizada no complexo com melanina foi de apenas 120 mg/ml no experimento da Figura-VI.1.

DEPENDÊNCIA DA FOTO-INDUÇÃO COM LUZ VISÍVEL E UV

A Figura-VI.5 mostra que as cinéticas sob luz visível e vis-UV são semelhantes para sistemas melanina-BSA. Isto sugere que a radiação UV tem pouca importância no fenômeno de fotoindução estudado, apesar do Mercúrio apresentar emissão mais intensa em 254 nm. É necessário considerar que houve diferenças na intensidade de irradiação da amostra. A lâmpada do projetor tem menor potência, mas é acoplada a lentes e espelhos, tendo sua irradiação mais focalizada.

A confirmação de que a luz UV tem um papel diminuto na indução de radicais livres em sistemas melanina-proteína é dada na Figura VI.6, onde utilizou-se a mesma fonte vis-UV acoplada ao filtro de UV do projetor de slides. Nestes experimentos a irradiação se iniciou com o filtro, que foi retirado quando o sinal alcançou estabilização, sendo recolocado em seguida. Nessas condições foram obtidos espectros de varredura temporal de soluções melanina-BSA na concentração relativa de 1:5 (Fig.-VI.6a), melanina pura (Fig.-VI.6b) e melanossomos (Fig.-VI.6c). A Figura VI.7 mostra o espectro de absorção óptica do filtro, o de uma solução de BSA (1mg/ml) e o de uma solução de melanina (0,03 mg/ml). Pode-se observar que a luz absorvida pelas amostras nos experimentos onde o filtro estava atuando (Figs.-V.7 e V.8 do capítulo anterior e Fig.-VI.5b e VI.6) provém da região do espectro compreendida entre os limites 300 e 800 nm. Esta região é, portanto, a principal responsável pela indução de radicais livres nos complexos melanina-proteína.

Figura-VI.1 - Espectros de varredura no tempo, monitorando a indução e o decaimento de radicais livres produzidos por luz vis-UV, em soluções aquosas de melanina (15 mg/ml) e melanina-BSA (1:2, 1:4 e 1:8), na presença de O_2 . As setas indicam o início e o final da irradiação.

Figura-VI.2 - Foto-indução e decaimento de radicais livres, nas mesmas condições anteriores (Figura-VI.1), desta vez na ausência de O_2 . As setas nos extremos indicam o início e o final do fluxo de N_2 .

Figura-VI.3 - Espectros de varredura no tempo para amostras de (a) melanina e melanina-BSA (b) 1:4 e (c) 1:10, em estado sólido; e (d) melanina-BSA hidratada (1:4). As setas indicam o início e o final da iluminação com Vis-UV.

Figura-VI-4 - Foto-indução e decaimento de radicais livres em (a) melanina em solução aquosa e melanina em solução de glicerina com viscosidade equivalente a BSA em (b) 75 mg/ml e (c) 300 mg/ml.

Figura-VI.5 - Dependência com a fonte de iluminação, (a) visível-UV e (b) visível, na foto-indução e decaimento de radicais livres em solução de melanina-BSA (1:4).

Figura-VI.6 - Efeito da filtragem da radiação UV na foto-indução de radicais livres em (a) melanina-BSA (1:5) em tampão fosfato pH 7, (b) melanina pura no mesmo tampão e (c) melanossomos em sacarose 0.25 M. As setas indicam a colocação e a retirada do filtro.

Figura-VI.7 - Espectros de absorção óptica (a) do filtro utilizado no experimento da Figura-VI.6, (b) de uma solução de 0.03 mg/ml de melanina e (c) 1 mg/ml de BSA.

Figura-VI.8 - Ajuste a cinéticas de pseudo-primeira ordem, para o decaimento radicalar em melanina pura (a) na ausência de O_2 (dado da Figura-VI.2) e (b) na presença de O_2 (dado da Figura-VI.1). As curvas ajustam-se às equações:

a) $Y = 17e^{-0.27t} + 17e^{-0.04t}$ e b) $Y = 25e^{-0.35t} + 19e^{-0.05t}$

Figura-VI.9 - Ajuste a cinéticas de pseudo-primeira ordem, para o decaimento radicalar em melanina-BSA (1:8), na ausência de O_2 (dado da Figura-VI.2).

- a) ajuste à equação: $Y = 38e^{-0.04t} + 78e^{-0.04t}$
 b) ajuste à equação: $Y = 37e^{-0.01t} + 23e^{-0.06t} + 56e^{-0.01t}$

Figura-VI.10 - Ajuste a cinéticas de pseudo-primeira ordem para o decaimento radicalar em melanina-BSA (1:8), na presença de O₂ (dado da Figura-VI.1).

- a) ajuste à equação: $Y = 77e^{-0.04t} + 98e^{-0.01t}$
 b) ajuste à equação: $Y = 27e^{-0.10t} + 69e^{-0.02t} + 82e^{-0.02t}$

Figura-VI.11 - Ajuste a cinéticas de decaimento de segunda ordem, para soluções de melanina (15 mg/ml) e melanina-BSA (1:8), na presença e ausência de O_2 (dados das figuras VI.1 e VI.2).

VI.3 - DISCUSSÃO

CINÉTICAS DE FOTO-INDUÇÃO POR VIS-UV

A indução de radicais livres por luz em melaninas pode se dar por diferentes vias. Processos rápidos envolvendo tunelamento eletrônico em complexos quinohidronas concorrem com processos difusivos mais lentos (Felix et al, 1979 e Sealy et al, 1980). A presença de moléculas aceptoras de elétrons aumenta a complexidade das cinéticas desses radicais. Comparações com cinéticas de adsorção de oxigênio em superfícies semicondutoras foram realizadas por F.F.Cope (1964) para grânulos de melanina natural, sendo proposto um modelo que considera a transferência de elétrons para o O_2 . Foi observado que decaimentos de radicais nitróxidos na presença de melanina obedecem cinéticas de pseudo-primeira ordem para altas concentrações do pigmento e cinéticas de segunda ordem para baixas concentrações (Kalyanaraman et al, 1984). Cinéticas de decaimento de segunda ordem foram observadas em amostras desoxigenadas de melanina pura (Felix et al, 1979) e na presença de foto-sensibilizadores (Sealy et al, 1984).

Neste trabalho tentou-se ajustar as cinéticas de decaimento a diversos modelos. As tentativas de ajustes às variações da equação de Elovich, que governam a transferência de elétrons entre superfícies sólidas semicondutoras e destas para o meio líquido, propostas por F.F.Cope (1964) para melaninas naturais, não foram bem sucedidas. Ajustes a cinéticas de primeira ordem para o decaimento radicalar em melanina pura, tanto na ausência como na presença de O_2 , foram alcançados para duas exponenciais de decaimento (Fig.-VI.8). Para os complexos com albumina, na proporção 1:8, um melhor ajuste foi alcançado para duas e três exponenciais (Figs.-VI.9 e VI.10). Também foram conseguidos ajustes para cinéticas de segunda ordem para a foto-indução em soluções de melanina pura desoxigenada e saturada de ar. Para os complexos com a albumina o processo de segunda ordem

ajustou-se somente para os primeiros minutos do decaimento radicalar (Figura-VI.11). As inclinações das retas correspondentes a essas cinéticas de segunda ordem (plotadas na Figura VI.11) fornecem as constantes de velocidade para cada amostra, que encontram-se relacionadas na Tabela-VI.I em unidades arbitrárias de radicais livres decaíntes por minuto.

Em uma cinética de decaimento de primeira ordem, a concentração de uma determinada espécie X varia com o tempo segundo a equação:

$$-d[X]/dt = K[X]$$

que tem solução:

$$[X] = e^{-Kt}$$

Neste modelo, o decaimento de radicais em melanina ($M\cdot$) seria de pseudo-primeira ordem, de forma que:

onde A^- seria a molécula elétron-aceptora que durante a indução do radical livre na melanina recebeu elétron.

Para uma cinética de decaimento de segunda ordem, a concentração de uma determinada espécie Y obedeceria a:

$$-d[Y]/dt = k[Y]^2$$

de solução:

$$1/[Y] = kt$$

Neste caso, teríamos um processo birradicalar:

As cinéticas de decaimento de radicais fotoinduzidos em melanina pura, registradas na bibliografia, geralmente obedecem este segundo processo, estando envolvida a foto-reação entre grupos quinonas e hidroquinonas produzindo radicais livres semiquinonas:

que decaem com a conversão da energia absorvida em calor, voltando o polímero à configuração inicial (Sealy et al, 1980).

Quando outras moléculas que podem receber elétrons estão presentes, estas poderiam competir com a troca de cargas entre os grupos quinonas do polímero, alterando as velocidades e a natureza das cinéticas. Neste contexto, os ajustes das Figuras VI.9 a VI.11 não implicariam que somente um ou outro processo de decaimento estaria envolvido. Uma combinação de processos de primeira e segunda ordem pode estar ocorrendo quando a melanina é complexada com a proteína. Isto seria compatível com a transferência de cargas entre melanina e BSA, conforme proposto no Capítulo IV.

Os dados da Tabela VI.I são úteis na comparação entre as velocidades dos decaimentos. Uma análise das Figuras VI.1 e VI.2, comparada com os valores desta tabela, mostra que o aumento na concentração da albumina, além de aumentar a concentração de radicais foto-induzidos, diminui as velocidades de decaimento destes. A presença de O_2 tem um papel oposto, isto é, aumenta as velocidades de decaimento. Se a foto-indução de radicais livres nos complexos melanoprotéicos depende de sítios de interação específicos, como a desnaturação da proteína o demonstra, a aproximação entre estes sítios específicos da proteína e os cromóforos onde o radical é gerado na melanina depende da difusibilidade das duas macromoléculas ou da probabilidade destes sítios específicos se encontrarem. A velocidade das cinéticas na presença da proteína pode ser governada por estes fatores. Mais dados, porém, como a dependência dessas cinéticas com a temperatura, seriam necessários para uma afirmação mais segura.

A maior rapidez das cinéticas quando oxigênio atmosférico está presente poderia ser consequência da participação de superóxido (formado na irradiação) no processo de recombinação radicalar. A propriedade de "scavenger" eficiente de superóxido da melanina foi demonstrada (Korytowski et al, 1987). Uma

analogia com sistemas melaninas-nitróxidos irradiados na presença de O_2 pode ser feita. Em experimentos deste tipo, T.Sarna et al (1985) sugeriu que a redução de nitróxidos a partir da irradiação de melaninas concorre com a produção de $O^{\cdot-}$. Os resultados do presente trabalho (Fig.- VI.1, VI.2, VI.11 e Tabela VI.I) argumentam a favor da ocorrência deste fenômeno no sistema melanina-BSA.

DEPENDÊNCIA DA FOTO-INDUÇÃO COM LUZ VISÍVEL E UV

A produção de radicais livres por luz em melaninas tem sido observada ser maior na presença de foto-sensibilizadores como "Rose Bengal", alcançando aumentos de 2 a 20 vezes para melaninas naturais e aumentos maiores para as sintéticas (Sealy et al, 1984 e Sarna et al, 1985a). Nesses experimentos a irradiação acontece com luz do mesmo comprimento de onda do máximo de absorção da molécula sensibilizadora (544 nm para "Rose Bengal"). A elevada produção de radicais livres é atribuída à transferência de energia do foto-sensibilizador para a melanina (Sealy et al, 1984). A supressão da fluorescência da BSA pela melanina, observada por Kawamura (1986), faria supor um mecanismo semelhante para a elevação da quantidade de radicais livres produzidos por luz, observada no presente trabalho, para o sistema melanina-BSA. Os resultados das Figuras VI.6 e VI.7 descartam esta possibilidade. A foto-indução de radicais livres no complexo melanina-proteína é produzida principalmente pela irradiação de comprimento maior que 300 nm (Figura-VI.6), que está fora da região de absorção da proteína (Figura-VI.7). A Figura-VI.6 indica também que o mesmo é válido para melanossomos.

CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES

VII.1 - RESUMO DOS RESULTADOS

1) VARIAÇÕES NO SINAL DE RPE DA MELANINA COM O pH

SINAL INTRÍNSECO

- aumento na concentração de radicais livres (r.l.) na direção dos valores de pH básicos.

- aumento nos valores do fator espectroscópico g na mesma direção, sugerindo que a desprotonação do polímero leva à formação de r.l. do tipo $Q^{\cdot-}$, caracterizado por spins mais localizados.

SOB ILUMINAÇÃO (R.L. INTRÍNSECOS + TRANSIENTES)

- invariância na quantidade de r.l. gerados por luz nos diversos valores de pH.

- invariância no fator- g com relação ao sinal intrínseco.

2) DEPENDÊNCIA COM BSA

SINAL INTRÍNSECO

- invariância na concentração de r.l. com o acréscimo de proteína.

- aumento moderado no fator- g .

- alargamento de linha caracterizado como inomogêneo, atribuído a alterações locais de distribuição de cargas. O parâmetro de inomogeneidade " b " acusa diminuição na homogeneidade de spin quando a BSA está presente.

- alargamento de linha inomogêneo em solução de uréia 6M onde a BSA apresenta-se desnaturada.

SOB ILUMINAÇÃO

- aumento na concentração de r.l. gerados por luz, em relação à amostra sem proteína.

- o resultado anterior não é alcançado quando a BSA é desnaturada, sugerindo que o fenômeno dependa da interação entre o pigmento e sítios específicos da proteína.

- maior aumento do fator-g, igualando-se ao valor encontrado para o extremo básico de pH, sugerindo que na presença da albumina o r.l. foto-induzido seja do tipo $Q^{\cdot-}$.

- alargamento de linha caracterizado como homogêneo devido à diminuição nos tempos de relaxação dos estados de spin ($P_{1/2}$ aumenta sob irradiação).

- as cinéticas de indução e decaimento dos r.l. foto-induzidos são mais lentas na presença da BSA, sugerindo um processo difusivo. Os dados de decaimento ajustam-se a cinéticas de primeira e segunda ordem, podendo esses dois processos estarem envolvidos na recombinação radicalar ao mesmo tempo.

- a cinética mais lenta na presença da proteína não é atribuída ao aumento na viscosidade.

3) DEPENDÊNCIA COM A PRESENÇA DE O_2 ATMOSFÉRICO

SINAL INTRÍNSECO

- O_2 induz relaxação de spin mais rápida (maior valor de $P_{1/2}$).

- a interação spin-spin O_2 -melanina leva a processos inomogêneos de saturação ($b \cong 1$).

- a presença de proteína diminui a interação entre melanina e oxigênio atmosférico, bloqueando os efeitos de relaxação mais rápida e inomogeneidade de spins induzidos pelo O_2 .

SOB ILUMINAÇÃO

- a relaxação de spin é mais rápida ($P_{1/2}$ é maior), atribuída a possíveis transferências rápidas de elétrons para o O_2 e/ou entre regiões (ou unidades) do polímero.

- as cinéticas de indução e decaimento dos r.l. foto-induzidos são mais rápidas na presença de O_2 , sugerindo sua participação cooperativa, coerente com a possível formação e "trap" de superóxido proposta na literatura.

- na região de saturação desprezível a presença de O_2 não altera a intensidade do sinal.

4) AMOSTRAS EM ESTADO SÓLIDO

SINAL INTRÍNSECO

- homogeneidade de spin elevada, mesmo na presença de O_2 .
- $P_{1/2}$ é da mesma ordem de grandeza das amostras em solução na ausência de O_2 .
- a presença de BSA não afeta os parâmetros de saturação ($P_{1/2}$ e b).

SOB ILUMINAÇÃO

- a quantidade de r.l. foto-induzidos em melanina é baixa quando comparada com os induzidos em solução.

- a presença de BSA não leva a maior foto-indução de r.l., a qual surge somente quando a amostra é hidratada.

5) DEPENDÊNCIA COM A REGIÃO DO ESPECTRO DE IRRADIAÇÃO

- tanto a luz visível como a vis-UV geram r.l. na melanina.
- a região do espectro vis-UV responsável pela maior foto-indução de r.l. em melano-proteínas pertence ao intervalo entre 300 e 800 nm. Este intervalo é fora da

região de absorção das proteínas, ficando excluída a possibilidade da foto-sensibilização como principal geradora de r.l.

6) ABSORÇÃO ÓPTICA

- a absorbância da BSA, na região dos resíduos aromáticos, é menor quando complexada com melanina em relação à proteína livre. Este resultado, juntamente com a diminuição da absorbância da melanina complexada com BSA, já registrados anteriormente por trabalhos deste laboratório, pode sugerir a formação de complexos de transferência de cargas entre essas duas macromoléculas.

7) MELANOSSOMOS

SINAL INTRÍNSECO

- a interação entre o oxigênio atmosférico e a melanina natural é pequena, havendo pouca influência do O_2 na relaxação de spin do melanossomo.

- a inomogeneidade de spin é elevada, sendo causada por outros fatores que a não interação com O_2 .

SOB ILUMINAÇÃO

- A relaxação dos estados de spin é mais rápida sob irradiação ($P_{1/2}$ e b são maiores).

- a foto-indução de r.l. é maior do que para melanina sintética pura em solução ou amostras em estado sólido.

- a região do espectro luminoso responsável pela maior foto-indução de r.l. está acima de 300nm, como para o complexo melanina-BSA.

VII.2 - SINAL INTRÍNSECO

Os resultados de cálculos sobre orbitais moleculares em melanina previram que o paramagnetismo desse pigmento seria devido à captura de um elétron pelo orbital molecular desocupado mais baixo (LUMO) e ligante, presente nas formas semi-hidrogenadas do polímero como um efeito de pontas (Galvão e Caldas, 1988). Assim, o elétron desemparelhado se estabiliza preferencialmente nas extremidades dos polímeros constituídos de unidades semiquinonas. Combinando essas informações com os resultados do presente trabalho, pode-se dizer que a desprotonação do polímero devido ao aumento do pH converte grupos hidroquinonas em semiquinonas, o que aumenta a probabilidade de estabilizar elétron desemparelhado em LUMO ligante. O aumento no fator-g pode ser explicado pelo fato de que em valores de pH básicos mais extremos, uma segunda desprotonação do polímero leva à formação de grupos aniônicos caracterizados por uma maior localização de spin (Pasenkiewicz-Gierula e Sealy, 1986).

Em solução aquosa a melanina pode ser tratada como um sistema de macromoléculas em interação com o meio. Os centros de spin da melanina em solução são expostos o suficiente para serem afetados pela presença da proteína ou espécies paramagnéticas como o oxigênio atmosférico. A presença de BSA causou um ligeiro aumento no grau de localização de spin do polímero e, ainda, indução de alargamento inomogêneo de linha. Alargamento inomogêneo também foi provocado pela presença de O_2 , o que se explica pelo paramagnetismo deste último. Um outro efeito devido à presença de O_2 foi a relaxação de spin mais rápida para a melanina pura. A formação do complexo melanina-proteína diminui a interação do oxigênio molecular com os spins do pigmento. A presença de BSA bloqueou os efeitos de inomogeneidade e relaxação de spin induzidos pelo O_2 .

Como já foi comentado na introdução deste trabalho, registrou-se na literatura alterações em algumas propriedades da melanina quando agregada a proteínas. Por exemplo, o consumo de O_2 na presença de melanina fica prejudicado quando proteínas estão agregadas à melanina natural ou quando albumina está presente em solução de melanina de L-DOPA (Sarna et al, 1980). Os resultados aqui apresentados confirmam a menor interação entre O_2 e o pigmento quando complexado à proteína e acrescentam que pode estar havendo um bloqueio a nível de spin.

Um outro fato registrado na literatura e já comentado é a diminuição na reatividade de transferência de cargas da melanina quando proteínas estão agregadas, tanto ao pigmento natural (Gan et al, 1974) como em modelos sintéticos, sendo atribuído à proteína um papel de agente bloqueador dos centros de reações de transferência de elétrons (Ito e Crippa, 1985). Os cálculos sobre orbital molecular previram elétrons desemparelhados na melanina capturados em um LUMO ligante. Neste sentido, a interação proteína-melanina pode envolver os elétrons situados nos mais altos níveis ocupados do pigmento ou, segundo o modelo de semicondutor amorfo, os elétrons do topo da banda de valência e os capturados em estados de defeitos na região do gap.

VII.3 - INTERAÇÃO COM A LUZ

Existe na literatura uma quantidade considerável de resultados relacionados à fotoindução de radicais livres em sistemas contendo melaninas. São encontrados resultados diferentes dependendo do estado de hidratação da molécula e de sua origem: extraída de tecido natural ou sintetizada a partir de precursores conhecidos como L-DOPA ou tirosina (Sealy et al, 1980). Analisa-se neste trabalho a foto-indução em algumas situações: amostras de melanina sintetizada a partir de

L-DOPA dissolvidas em meio aquoso; melanina sintética em estado sólido; soluções de melanina contendo a proteína BSA; melanina e proteína no estado sólido; melanosomos extraídos de olho bovino e as amostras descritas anteriormente na presença ou ausência de oxigênio molecular.

Uma primeira observação que emerge dos resultados diz respeito às diferenças devidas ao estado de hidratação da amostra. Quando no estado sólido, não foi observada fotoindução significativa de radicais livres. Pode-se interpretar este resultado dentro da seguinte linha de raciocínio: Os orbitais moleculares calculados para o polímero estendem-se a bandas eletrônicas quando a molécula encontra-se no estado sólido, sendo então plausível falar em bandas de condução e de valência além de armadilhas na banda proibida para o aprisionamento de elétrons ou vacâncias. Desta forma, elétrons promovidos a bandas de condução por absorção de luz podem rapidamente recombinares-se com buracos criados na banda de valência, resultando em processos de desexcitação eletrônica através de interação direta com vibrações da estrutura, sem formação de elétrons desemparelhados.

Por sua vez, a foto-indução de radicais livres é mais significativa em soluções de melanina, caso em que a melanina apresenta-se na forma de macromoléculas isoladas. Para a macromolécula isolada, a interação com a luz resulta na excitação eletrônica de elétrons- π que ocupam os últimos orbitais moleculares. Considera-se então que, além de desexcitação não radiativa, pode ocorrer a passagem de elétrons excitados para um estado tripleto, conforme verificado por Felix et al (1978). A produção de radicais livres quando soluções de melanina são iluminadas foi considerada por Sealy et al (1980) como tendo origem em reações com unidades aceptoras de elétrons do polímero, a partir deste estado tripleto. A indução e decaimento desses radicais depende de fotorreações rápidas em complexos quinohidronas e de processos intermoleculares mais lentos e

difusivos. Nesta situação, tornam-se importantes os processos através dos quais a macromolécula no estado excitado pode interagir com o meio, processos esses que, em última análise, determinarão o destino da energia absorvida.

Verificou-se neste trabalho que a indução de radicais livres por luz e o seu desaparecimento quando a iluminação é suspensa é um processo cíclico. O efeito do oxigênio neste processo é o de abreviar os tempos de indução e decaimento. Embora não tenha sido aqui investigada a formação de superóxido, é conhecida a sua formação quando soluções de melanina são iluminadas tanto na região visível como no UV (Felix et al, 1978a, Ito e Crippa, 1985 e Korytowski et al, 1987). É possível então supor que a transferência de elétrons para o O_2 (e do $O_2^{\cdot-}$ para o pigmento) seja o fator que aumente a taxa de formação e recombinação radicalar. O efeito de "trap" de radicais superóxido pela melanina também foi observado (Korytowski et al, 1987).

Na presença da proteína BSA é observada uma maior quantidade de radicais livres foto-induzidos. Ao mesmo tempo as cinéticas de decaimento desses radicais prolongam-se por tempos mais longos. Considerando que os radicais foto-induzidos desaparecem quando a iluminação é suspensa, é possível que a proteína exerça um efeito de bloqueio, de maneira que os radicais livres formados recombinem-se com maior dificuldade. Assim, as cinéticas de recombinação mais lentas na presença de BSA implicariam em um aumento na concentração estacionária de radicais livres foto-induzidos. Poder-se-ia pensar que o efeito da BSA fosse simplesmente o de alterar a viscosidade do meio de modo a limitar processos difusivos envolvendo moléculas de melanina e oxigênio. Todavia, verificamos que o simples aumento de viscosidade introduzido pela adição de glicerina ao meio não produziu o mesmo efeito que a proteína no que se refere à foto-indução de radicais livres. Dessa forma, a limitação imposta pela BSA aos

processos de recombinação origina-se de fato da existência de interação específica da proteína com o pigmento.

Um outro resultado encontrado na irradiação de melanina em presença de BSA foi o aumento no valor do fator-g sob iluminação, caracterizando uma maior localização de spins. Como observado no início da seção anterior, um aumento na concentração e na localização de spins é compatível com a desprotonação do pigmento. Desta forma, a irradiação da melanina na presença da proteína pode estar levando à desprotonação da melanina e conseqüente estabilização de spins mais localizados. Este resultado pode ser tomado como um indicativo de que a interação melanina-proteína inclua transferência de cargas entre essas duas macromoléculas. A participação da melanina em reações deste tipo e as alterações nos espectros de Absorção Óptica quando melanina e BSA formam complexo (Kawamura, 1986) são argumentos a favor desta possibilidade.

A desprotonação do pigmento poderia ser consequência direta ou indireta da troca de cargas entre melanina e BSA, uma vez que a retirada de elétrons da melanina é acompanhada de desprotonação (Horak e Gilletti, 1971 e Kalyanaraman et al, 1984). Este fenômeno dependeria da interação entre a melanina e sítios específicos da proteína, dependentes da integridade desta última, pois com a desnaturação da proteína o efeito da maior foto-indução não é mais observado. A desprotonação da melanina conduziria ao aumento na heterogeneidade radicalar, levando ao alargamento inomogêneo observado na presença de BSA (a componente homogênea do alargamento devido à iluminação foi atribuída ao menor tempo de relaxação dos radicais induzidos pela luz). Contudo, o alargamento inomogêneo não é um efeito específico da interação melanina-proteína como a maior foto-indução, pois amostras em Uréia 6M também o apresentam. Além disso, ele aparece na ausência de luz.

Uma via possível para a troca de cargas entre melanina e BSA sob iluminação poderia ser a partir do estado tripleto precursor dos radicais livres na melanina em solução. A troca de cargas induzida por luz entre quinonas e hidroquinonas, que gera radicais livres semiquinonas no modelo proposto por Sealy et al (1980), contaria com mais um agente transferidor de cargas, a proteína. O resultado poderia ser a maior foto-indução caracterizada por uma cinética difusiva e mais complexa, conforme o observado.

Resta analisar os resultados referentes ao melanossomo. Certamente os processos de fotoindução de radicais livres estudados em amostras no estado sólido não refletem o que ocorre a nível da organela, apesar do denso empacotamento de melanina nela existente. Tampouco as observações em amostras de melanina sintética pura em solução são semelhantes ao encontrado nos melanossomos, como se depreende dos resultados de saturação progressiva e dependência da fotoindução com a região espectral.

O conjunto de resultados deste trabalho indicam que, dentre essas situações extremas, melanina em estado sólido ou melanina sintética pura em solução, um sistema modelo composto da melanina sintética mais proteína BSA em solução aquosa produz resultados mais próximos ao observado no melanossomo. Com o cuidado de evitar extrapolações de um simples sistema modelo para o complexo sistema biológico, enfatiza-se a necessidade de se levar em conta a capacidade de interação do pigmento com o meio circundante ao se analisarem os processos biológicos nos quais ele participa.

BIBLIOGRAFIA

- . BIELEC,J., PILAS,B. e SARNA,T., J.Chem.Soc., Faraday Trans. **82**, 1 (1986).
- . BLOIS,M.S.,ZAHLAN,A.B., e MOLING,J.E., Biophys.J., **4**, 471 (1964).
- . BLOIS,M.S., in "Solid State Biophysics", S.J.Wyard ed., p.247, Wiley, N.Y.(1969).
- . BOLTON,J.R. in "Biological Applications of Electron Spin Resonance" ch.1 e 2, Jhon Wiley & Sons., N.Y. (1972).
- . BOWMAN,M.K. in "Time Domain E.S.R." p.69, Jhon Wiley & Sons, N.Y. (1979).
- . CASTNER Jr.,t.g., Phys.Rev. **115**, 1506 (1959).
- . CHIO,S-S., HYDE,J.S. e SEALY,R.C., Arch.Biochem.Biophys. **199**, 133 (1980).
- . CHIO,S-S.,HYDE,J.S. e SEALY,R.C., Arch.Bichem.Biophys. **215**(1), 100 (1982).
- . COPE,F.W., SEVER,R.J., e POLIS,B.D., Arch.Biochem.Biophys. **100**, 171 (1963).
- . COPE,F.W., J.Chem.Phys. **40**(3), 2653 (1964).
- . CRIPPA,P.R., CRISTOFOLETTI,V. e ROMEO,N., Bioch.Buiophys. Acta **538**, 164 (1978).
- . CRIPPA,P.R. e ITO,A.S., Pigm.Cell. **7**, 87 (1985).
- . CRIPPA,P.R., ITO,A.S., MASOTTI,C., PASQUALI-RONCHETTI,I., Exp.Eye Res. **41**, 661 (1985a).
- . D'AMATO,R.J., LIPMAN,Z.P. e SNYDER,S.H., Science, **231**, 987 (1986).
- . FELIX,C.C.,HYDE,J.S.,SARNA,T. e SEALY,R.C., J.Am.Chem.Soc. **100**, 3922 (1978).
- . FELIX,C.C., HYDE,J.S. ,SARNA,T. SEALY,R.C., Biochem.Biophys. Res.Com. **84**, 335 (1978a).
- . FELIX,C.C., HYDE,J.S. e SEALY,R.C., Biochem.Biophys.Res.Com. **88**, 456 (1979).
- . FELIX,C.C. e SEALY,R.C., Photochem.Photobiol. **34**, 423 (1981).
- . GALVÃO,D.S. e CALDAS,M.J., J.Chem.Phys. **88**(6), 4088 (1988).

- . GALVÃO,D.S., Tese de Doutorado, Inst.Fis. Unicamp, Campinas (1989).
- . GAN,E.V., HERBERT, H.F., MENON,A., Biochem.Biophys.Acta **370**, 62 (1974).
- . GAN,E.V., HERBERT,F.H. e MENON,A. Arch.Biochem.Biophys. **173**, 666 (1976).
- . HORAK,V. e GILLETTE,J.R., Mol.Pharmacol. **7**,429 (1971).
- . ITO,A.S., e CRIPPA,P.R., Physiol.Chem.Phys.Med. **17**, 205 (1985).
- . JAHAN,M.S., DROUIN,T.R. e SAYRE,R.M., Photochem.Photobiol. **45**, 543 (1987).
- . JIMBOW,M.,KANOCH,H. e JIMBOW,K., J.Invest.Derm. **79**, 97 (1982).
- . KALYANARAMAN,B., FELIX,C.C. E SELY,R.C., J.Am.Chem.Soc. **106**, 7327 (1984).
- . KAWAMURA,M.R., Tese de Doutorado, IFUSP São Paulo (1986).
- . KORYTOWSKI,W. PILAS,B., SARNA,T. e KALYANARAMAN,B., Photoc hem.Photobiol. **45**, 185 (1987).
- . KRAGH-HANSEN,U., Pharm.Rev. **33**, 17 (1981).
- . LUKIEWICZ,S., RESKA,K., MATUSZAK,Z., Bioeletrochem.Biophys. **7**, 153 (1980).
- . MARSON,H.S.,INGRAN,D.J.E. e ALLEM,B., Arch.Biochem.Biophys. **86**, 225 (1960).
- . MCGINNESS,J.E., Science **177**, 896 (1972).
- . MOTT,N.F. e DAVIS,E.A., Phil.Mag., **22**, 903 (1970).
- . NICOLAUS, R.A. in "Melanins", Herman, Paris (1968).
- . ORTON,J.W. in "Electron Paramagnetic Resonance", London ILIFFE Books, London (1968).
- . PAINTNER, R.B., in "Photophysiology", Academic Press, N.Y. (1970).

- . GALVÃO,D.S., Tese de Doutorado, Inst.Fis. Unicamp, Campinas (1989).
- . GAN,E.V., HERBERT, H.F., MENON,A., Biochem.Biophys.Acta **370**, 62
(1974).
- . GAN,E.V., HERBERT,F.H. e MENON,A. Arch.Biochem.Biophys. **173**, 666
(1976).
- . HORAK,V. e GILLETTE,J.R., Mol.Pharmacol. **7**,429 (1971).
- . ITO,A.S., e CRIPPA,P.R., Physiol.Chem.Phys.Med. **17**, 205 (1985).
- . JAHAN,M.S., DROUIN,T.R. e SAYRE,R.M., Photochem.Photobiol. **45**, 543
(1987).
- . JIMBOW,M.,KANOCH,H. e JIMBOW,K., J.Invest.Derm. **79**, 97 (1982).
- . KALYANARAMAN,B., FELIX,C.C. E SELY,R.C., J.Am.Chem.Soc. **106**, 7327
(1984).
- . KAWAMURA,M.R., Tese de Doutorado, IFUSP São Paulo (1986).
- . KORYTOWSKI,W. PILAS,B., SARNA,T. e KALYANARAMAN,B., Photoc
hem.Photobiol. **45**, 185 (1987).
- . KRAGH-HANSEN,U., Pharm.Rev. **33**, 17 (1981).
- . LUKIEWICZ,S., RESKA,K., MATUSZAK,Z., Bioeletrochem.Biophys. **7**, 153
(1980).
- . MARSON,H.S.,INGRAN,D.J.E. e ALLEM,B., Arch.Biochem.Biophys. **86**, 225
(1960).
- . MCGINNESS,J.E., Science **177**, 896 (1972).
- . MOTT,N.F. e DAVIS,E.A., Phil.Mag., **22**, 903 (1970).
- . NICOLAUS, R.A. in "Melanins", Herman, Paris (1968).
- . ORTON,J.W. in "Electron Paramagnetic Resonance", London ILIFFE Books,
London (1968).
- . PAINTNER, R.B., in "Photophysiology", Academic Press, N.Y. (1970).

- . PASENKIEWICZ-GIERULLA,M. e SEALY,R.C., Biochem.Biophys.Acta **884**, 510 (1986).
- . PORTIS,J., Phys.Rev. **91**, 1071 (1953).
- . PROCOR,P., MCGINNESS,J. e CORRY,P., J.Teor.Biol. **48**, 19 (1974).
- . RUPP,H., RAD,K.K., HALL,D.D. e CAMMACK,P., Biochem.Biophys.Acta **537**, 255 (1978).
- . SARNA,T., DULEBA,A., KORYTOWSKI,W. e SWARTZ,H. Arch.Biochem.Biophys. **200**, 140 (1980).
- . SARNA,T. e SEALY,R.C., Photochem.Photobiol. **39**, 69 (1984).
- . SARNA,T., KORYTOWSKI,W., SEAY,R.C., Arch.Biochem.Biophys. **239**, 226 (1985).
- . SARNA,T., MENON,A. e SEALY,R.C., Photochem.Photobiol. **42**, 529 (1985a).
- . SEALY,R.C.,FELIX,C.C.HYDE,J.C. e SWARTZ,H.M., in "Free Radicals in Biology", 4, ch.7,p.209, Pryor Ed.(1980).
- . SEALY,R.C., SARNA,T., WANNER,E.J. e REZKA,K., Photochem.Photobiol. **40**(4), 453 (1984).
- . SCIUTO,S., CHILLEMI,R., PATTI,A., SICHEL,G., Comp.Biochem. **90B**(2), 397 (1988).
- . SETLOW,R.B. e POLLAND,E.C. in "Molecular Biophysics",A.W.Publisch.Co., London (1962).
- . STEIN,W.O., Nature, **175**, 256 (1955).
- . THATHACHARI,Y.T., Pigment Cell **3**, 64 (1976).
- . VanWOERST,M.H., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. **129**, 165 (1968).
- . WALD,G. em "A Base Molecular da Vida - art.Sc.American", Ed.USP (1959).
- . WERTZ,J.E. E BOLTON,J.R. in "Electron Spiun Resonance -Elementary Teory and Practical Aplications" ch.1 e 2, McGraw-Hill Co., N.Y. (1972).
- . ZIMMERMAN,J., J.Exp.Zool. **219**, 1 (1982).