



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



MARCELA JACINTA RODRIGUES DE BARROS

Desenvolvimento de Nanoinibidores Enzimáticos para a Enzima Tirosinase:
Interação Molecular, Mecanismo e Cinética Inibitória

Recife
2021

MARCELA JACINTA RODRIGUES DE BARROS

Desenvolvimento de Nanoinibidores Enzimáticos para a Enzima Tirosinase: Interação Molecular, Mecanismo e Cinética Inibitória

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Neves

Recife

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

B277d Barros, Marcela Jacinta Rodrigues de
Desenvolvimento de nanoinibidores enzimáticos para a enzima tirosinase:
interação molecular, mecanismo e cinética inibitória/ Marcela Jacinta Rodrigues de
Barros – 2021.
68f., il., fig., tab.

Orientador: Jorge Luiz Neves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN,
Química, Recife, 2021.
Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Química Inorgânica. 2. Tirosinase. 3. Carbono dots. 4. Inibição. I. Neves,
Jorge Luiz. (orientador) II. Título.

546

CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2021-44

MARCELA JACINTA RODRIGUES DE BARROS

Desenvolvimento de Nano-inibidores Enzimáticos para a Enzima Tirosinase: Interação Molecular, Mecanismo e Cinética Inibitória.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 25/02/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Jorge Luiz Neves (Orientador)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Priscila Gubert
Departamento de Bioquímica e Biofísica
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Ricardo Olímpio de Moura
Departamento de Farmácia
Universidade Estadual da Paraíba

**Dedico este trabalho à Deus, minha família, ao Lucas e aos que me
acompanharam nessa jornada.**

AGRADECIMENTOS

Foram muitas pessoas que contribuíram para que eu chegasse até aqui, e agradecer a todas elas seria impossível num espaço tão limitado quanto este.

Aos meus pais por todo apoio e compreensão, e por sempre acreditarem na minha capacidade e nos meus sonhos. À minha tia Conceição pelo incentivo e à Luciana por ser um exemplo para mim desde muito nova.

Ao Lucas Maggi, por todo incentivo e amor, pelos momentos de estresse compartilhado e pela paciência em me acompanhar nesta caminhada. Ele fez parte de cada passo, não só incentivando, mas também desenvolvendo ferramentas que facilitaram o tratamento dos dados desse trabalho.

À todos os docentes que de alguma forma instigaram meu interesse científico, incluindo os professores com quem tive contato durante a graduação, e os que passaram conhecimentos a mim durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Jorge Neves, por toda dedicação em me orientar e repassar conhecimentos desde a graduação, pela amizade e paciência, principalmente nesta última etapa.

Ao grupo LQB, pela contribuição fundamental na realização deste trabalho, e aos colegas de laboratório Yarima, Lucas, Nathália e Thaís.

A Dayane e Caio pela ajuda com os experimentos de fluorescência e cinética.

Aos amigos que fiz durante a graduação e mestrado: Amanda, Max, Dayane, Ilária, Joalen, Jéssika, Igor, Bárbara, Hélder e Lia. Obrigada por tornar esses anos mais leves. Também as amigas que me acompanham desde sempre: Ammanda e Wendy, obrigada por aguentarem as ausências e serem exatamente como são.

Aos laboratórios que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho: Laboratório de Eletrossíntese Orgânica, Departamento de Química Fundamental, Laboratório de Enzimologia (LABENZ), DBioq – UFPE.

Ao Departamento de Química Fundamental e aos órgãos de fomento FACEPE e PROPESQ da UFPE.

"E as conquistas reais da biologia são explicações em termos de mecanismos fundados na física e na química, o que não é a mesma coisa que explicações em termos de física e química." (POLANYI, 1970, p. 970).

RESUMO

A tirosinase é uma enzima que atua catalisando a *o*-hidroxilação e a consecutiva oxidação de compostos fenólicos, tendo papel chave na produção de melanina. Logo, desordens de pigmentação estão diretamente ligadas a ação desta enzima, como hiperpigmentação, melasmas e câncer, o que a torna um marcador sensível, uma vez que ela é super-expressa durante tais desordens. Por isso, muitos inibidores de fontes naturais e sintéticas têm sido estudados para inibir a tirosinase, porém possuem desvantagens quanto a toxicidade, baixa estabilidade e solubilidade, e biocompatibilidade. Nesse cenário, nanopartículas de carbono (CDs) surgem como candidatos promissores para inibição enzimática, sendo a proposta desse trabalho sintetizar e caracterizar quatro CDs utilizando técnicas espectroscópicas (FTIR, UV-vis) e investigar suas propriedades de interação e inibição usando experimentos espectroscópicos (UV-vis, Espectroscopia de Fluorescência) e cinéticos. Os resultados expõem que os CDs hidrofóbicos contendo grupos superficiais amínicos e carboxil aumentaram a capacidade de inibição da tirosinase (IC50) para a faixa nanomolar para todas as quatro nanopartículas. Além disso, todos os CDs apresentam interações moderadas com a enzima com constantes de associação $K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$, interagindo de forma espontânea ($\Delta G < 0$) e foram inibidores da tirosinase até três ordens de grandeza mais potentes que o inibidor comercial ácido kójico e aproximadamente duas a três ordens de grandeza mais efetivos que as nanopartículas de amido relatadas anteriormente. Dentre as quatro nanopartículas, as que mostraram a presença de grupos NH em sua superfície foram as que mostraram maior afinidade e capacidade de inibição, sendo estes os melhores inibidores desse trabalho: MnCdots ($K_i = 44,28 \pm 8,83 \text{ nM}$) e EuCdots ($K_i = 234,8 \pm 31,75 \text{ nM}$), evidenciando que a presença desses grupos pode ser um diferencial na inibição. Cada um dos quatro CDs inibiu a tirosinase de formas diferentes (Cdots competitivo, FeCdots acompetitivo, MnCdots misto e EuCdots não-competitivo), realizando interações hidrofóbicas, exceto EuCdots com interações hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio, provavelmente por possuir mais grupos amina.

Palavras-chave: Tirosinase. *Carbono dots*. Inibição. CDs. EuCdots. MnCdots. FeCdots. Cdots.

ABSTRACT

Tyrosinase is an enzyme that acts by catalyzing *o*-hydroxylation and the consecutive oxidation of phenolic compounds and has a key role in the production of melanin, therefore pigmentation disorders are directly linked to the action of this enzyme, such as hyperpigmentation, melasmas and cancer, which it makes it a sensitive marker, since it is overexpressed during such disorders. For this reason, many inhibitors from natural and synthetic sources have been studied to inhibit tyrosinase, however they have disadvantages in terms of toxicity, low stability and solubility, and biocompatibility. In this scenario, carbon nanoparticles (CDs) appear as promising candidates for enzymatic inhibition, the purpose of this work being to synthesize, characterize four CDs using spectroscopic techniques (FTIR, UV-vis) and investigate their interaction and inhibition properties using spectroscopic experiments (UV-vis, Fluorescence Spectroscopy) and kinetic. The results show that hydrophobic CDs containing amine and carboxyl surface groups increased the tyrosinase inhibition capacity (IC₅₀) for the nanomolar range for all four nanoparticles. In addition, all CDs have moderate interactions with the enzyme with $K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$ association constants, interacting spontaneously ($\Delta G < 0$) and inhibited tyrosinase activity up to three orders of magnitude more potently than the commercial kojic acid inhibitor and approximately two to three orders of magnitude more effective than the starch nanoparticles previously reported. Among the four nanoparticles, the ones that showed the presence of NH groups on their surface were the ones that showed greater affinity and inhibition capacity, these being the best inhibitors of this work: MnCdots ($K_i = 44.28 \pm 8.83 \text{ nM}$) and EuCdots ($K_i = 234.8 \pm 31.75 \text{ nM}$), showing that the presence of these groups can be a differential in inhibition. Each of the four CDs inhibited tyrosinase in different ways (competitive Cdots, uncompetitive FeCdots, mixed MnCdots and non-competitive EuCdots), performing hydrophobic interactions, except EuCdots with hydrophobic and hydrogen bonding interactions, probably because it has more amine groups.

Keywords: Tyrosinase. Carbon dots. Inhibition. CDs. EuCdots. MnCdots. FeCdots. Cdots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ação da tirosinase sobre monofenóis e catecóis (benzenodióis)	17
Figura 2 –	Representação do sítio ativo da tirosinase na forma <i>met-</i> . Os átomos estão identificados de acordo com a coloração: verde, azul, vermelho e amarelo para os átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre, respectivamente, existindo uma ligação covalente entre a Cys-83 e His85. As esferas laranjas ao centro representam os íons cobre, unidos por uma molécula de água ou íon hidroxila.	18
Figura 3 –	Esquema representativo do ciclo catalítico da tirosinase mostrando os estados de oxidação dos íons cobre no sítio ativo da enzima, durante o processo de hidroxilação de monofenóis e oxidação de <i>o</i> -difenois.	19
Figura 4 –	Superposição do sítio ativo de diferentes tirosinases tipo 3 (<i>Ipomoea batatas</i> , <i>Limulus polyphemus subunit II</i> , <i>Octopus dofleini</i> , <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> e <i>Bacillus megaterium</i>).	19
Figura 5 –	Esquema da biossíntese da eumelanina e feomelanina.	22
Figura 6 –	Estrutura química de inibidores conhecidos da tirosinase, utilizados no clareamento da pele.	23
Figura 7 –	Modelo cinético proposto para a atuação da enzima (E) sobre um substrato (S), levando à formação de um complexo (ES) e a posterior liberação do produto (P) e da enzima livre (E) (SITTAMPALAM et al., 2016).	26
Figura 8 –	a) Gráfico de Michaelis-Menten, evidenciando as constantes K_m , e $V_{máx}$, assim como suas relações com a velocidade inicial e a concentração do substrato. b) A linearização do Gráfico de Lineweaver-Burk, facilitando a melhor visualização das constantes de interesse.	26
Figura 9 –	Representação dos tipos de inibição reversível. a) Inibição competitiva, onde K_I é a constante de equilíbrio do complexo EI. b) Inibição mista c) Inibição incompetitiva, onde K_I' é a constante de equilíbrio para a ligação ES.	27
Figura 10 –	A linearização do Gráfico de Lineweaver-Burk que facilita a identificação do tipo de inibição envolvida em cada caso. a) Inibidor competitivo, b) Inibidor misto/não-competitivo e c) Inibidor incompetitivo.	28
Figura 11 –	Foto da síntese dos CDs. a) Suspensão dos CDs sendo secadas para pesagem, b) Material obtido após a secagem para pesagem, c) Luminescência das nanopartículas sob luz ultravioleta.	35
Figura 12 –	a) Espectro de absorção UV-Vis dos FeCdots (laranja), MnCdots (azul), Cdots (preto) e EuCdots (vermelho), a 5 mg/mL cada. b) Espectro FTIR dos Cdots, FeCdots; e c) Espectro FTIR dos EuCdots e MnCdots.	36
Figura 13 –	Espectros de supressão de fluorescência da enzima tirosinase a 30°C (303 K - $\lambda_{exc.} = 280$ nm), em tampão fosfato (pH 6,9), na presença dos CDs. A enzima foi mantida a uma concentração de 201 nM onde os CDs foram titulados. Supressão da fluorescência da tirosinase pelo CDs e Stern-Volmer para as três temperaturas. a) Cdots, gráfico interno: Stern-Volmer, usando a equação (1); b) FeCdots, gráfico interno: Stern-Volmer, usando a equação (3); c) EuCdots, gráfico interno: Stern-Volmer usando a equação (2); d) MnCdots, gráfico interno: Stern-Volmer usando a equação (1); e) e f) Stern-Volmer do MnCdots usando as equações (2) e (3), respectivamente.	40

- Figura 14 – Gráficos representando o fitting realizado a partir dos dados de fluorescência e das equações citadas para a interação Tirosinase-CDs nas temperaturas de 303, 308 e 313 K: Cdots (a – equação (4)), FeCdots (b – equação (5)), MnCdots (c – equação (4)), e EuCdots (d – (5)). 41
- Figura 15 – Gráfico resultante da aplicação da equação de van't Hoff para a determinação dos parâmetros termodinâmicos para a interação Tirosinase-CDs. 42
- Figura 16 – Superfície Hidrofóbica da enzima tirosinase de cogumelo *Agaricus bisporus*, (PDBID: 2y9x). As áreas avermelhadas representam as porções hidrofóbicas da enzima. 43
- Figura 17 – Gráficos referentes à cinética enzimática da tirosinase na presença dos CDs, com a tirosinase na concentração de 25 nM e o substrato L-DOPA. a) é referente ao gráfico de IC50 dos quatro CDs. Linearização da equação de Michaelis-Menten, o gráfico Lineweaver-burk determinando o mecanismo de inibição enzimática: Cdots b), MnCdots c), FeCdots d), e EuCdots e) para a inibição da tirosinase de cogumelo na catálise do L-DOPA. 45
- Figura 18 – Espectro de absorção UV-Vis da tirosinase (0.36 μ M) na presença dos FeCdots a), MnCdots b) e EuCdots c), em 298 K. As concentrações dos CDs foram adicionadas em intervalos de 33, 27 e 55 nM, respectivamente. 47

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 –	Comparação das constantes de inibição da tirosinase na presença de CDs, e seus tipos de inibição.	46
Tabela 2 –	Tamanho e potencial zeta dos CDs.	48
Tabela 3 –	Parâmetros espectroscópicos da tirosinase na presença de CDs, constantes de ligação (K_a) e parâmetros termodinâmicos em várias temperaturas.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAS	Número de registro único no banco de dados do <i>Chemical Abstracts Service</i>
EC	Classificação Enzimológica
FTIR	<i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i> – Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L-DOPA	L-3,4-di-hidroxifenilalanina
L-Tirosina	L-4-hidroxifenilalanina
<i>o</i> -dopaquinona	4-(2-carboxi-2-aminoetil)-1,2-benzoquinona
PDB	Protein Data Bank
PDBID	Protein Data Bank Identification
PPO	Polifenol oxidase
Trp	Aminoácido Triptofano
Tyr	Aminoácido Tirosina

LISTA DE SÍMBOLOS

AK ou KA	Ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona)
°C	Graus Celsius
C	Carbono
Cdots	Nanopartícula de Carbono
CDs	<i>Carbon dots</i>
CuA e CuB	Íons cobre no sítio ativo da tirosinase
E	Enzima livre
EI	Complexo Enzima-Inibidor
ES	Complexo Enzima-Substrato
ESI	Complexo Enzima-Substrato-Inibidor
Eu	Európio
EuCdots	Nanopartícula de Carbono com Európio
Fe	Ferro
FeCdots	Nanopartícula de Carbono com Ferro
I	Inibidor
K_a	Constantes de associação
K_d	Constante de dissociação
K_I	Constante de equilíbrio de dissociação para a ligação do Inibidor com a enzima livre
$K_{IS} = \alpha K_I$	Constante de ligação do inibidor com o complexo enzima-substrato
$K_{m App}$	Constante de Michalis-Menten aparente
K_m	Constante de Michalis-Menten
K_{SV}	Constante Stern-Volmer de <i>quenching</i> ,
Mn	Manganês
MnCdots	Nanopartícula de Carbono com Manganês
P	Produto
Phe	Aminoácido fenilalanina
Q	Concentração do supressor (<i>quencher</i>)
RNA _m	RNA mensageiro
S	Substrato
UV	Raios Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta Visível
v	velocidade de reação

V_0	Velocidade inicial
$V_{\text{máxApp}}$	velocidade máxima aparente
α	Grau de afinidade
αK_m	Constante de Michalis-Menten na presença do inibidor
μM	Micromolar
Da	Unidade de massa atômica
K	Kelvin
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	CONTEXTO ENZIMÁTICO E A TIROSINASE.....	17
1.2	TIROSINASE E MELANOGÊNESE.....	20
1.3	INIBINDO A TIROSINASE	22
1.3.1	Nanopartículas de Carbono.....	23
1.4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DO MODELO ENZIMÁTICO	25
1.4.1	Modelo de Cinética Enzimática.....	25
2	MOTIVAÇÃO	29
2.1	HIPÓTESE.....	29
2.2	OBJETIVO	29
2.2.1	Objetivos Específicos.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	REAGENTES	30
3.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	30
3.2.1	Espectroscopia de Absorção UV-Vis.....	30
3.2.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	30
3.3	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE	30
3.4	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	31
3.5	ENSAIOS ENZIMÁTICOS	32
3.5.1	Modelo Cinético.....	32
3.5.2	Metodologia dos Ensaio Enzimáticos.....	33
3.6	SUPERFÍCIE HIDROFÓBICA DA TIROSINASE.....	33
3.7	ESPECTROSCOPIA UV-VIS: ESTUDO DE INTERAÇÃO	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CARBONO..	35

4.1.1	Caracterização por Espectroscopia de Absorção no UV-Vis e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	35
4.2	ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE CDS E TIROSINASE: ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	37
4.2.1	Mecanismo de Supressão.....	38
4.2.2	Constante de Ligação.....	40
4.2.3	Parâmetros Termodinâmicos.....	42
4.3	ENSAIOS ENZIMÁTICOS	44
4.4	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS: MUDANÇAS CONFORMACIONAIS NA TIROSINASE	46
4.5	<i>INSIGHTS</i> NA CORRELAÇÃO ENTRE RESULTADOS ENZIMÁTICOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS INTERAÇÕES: COMPARANDO OS CDS	48
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICE A – ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DOS CDS EM 298 K.	62
	APÊNDICE B – ESPECTROS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA ENZIMA TIROSINASE A 35°C E 40°C (308 K E 313K - $\lambda_{exc.}$= 280 NM), EM TAMPÃO FOSFATO (pH 6,9), NA PRESENÇA DOS CDS.	63
	APÊNDICE C – PARÂMETROS ESPECTROSCÓPICOS DA INTERAÇÃO DA TIROSINASE COM OS CDS.	65
	APÊNDICE D – GRÁFICOS DE MICHAELIS-MENTEN DA ENZIMA TIROSINASE COM OS CDS E SUAS RESPECTIVAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO.	66
	ANEXO A – DEDUÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN.....	67

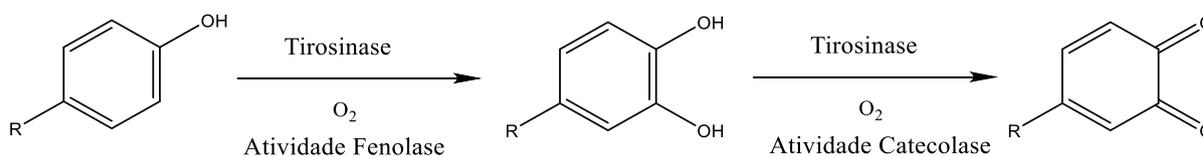
1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO ENZIMÁTICO E A TIROSINASE

As enzimas estão presentes no nosso cotidiano desempenhando papéis que envolvem desde a indústria de alimentos, com a produção de xarope de milho rico em frutose usado na produção da Coca-Cola[®], à produção de agentes terapêuticos, como na produção de penicilinas semissintéticas, e até na indústria de produtos de limpeza, aumentando a capacidade de branqueamento (ROBINSON, 2015; SINGH et al., 2016b). Essas macromoléculas biológicas são compostas de aminoácidos conectados por ligações amida que catalisam reações bioquímicas em organismos vivos. Esse processo de catálise reduz consideravelmente o tempo reacional, sendo de grande valor para reações importantes na indústria. O sítio ativo é a região da enzima em que ocorre a catálise. Essa região, geralmente hidrofóbica, está interna a sua estrutura e é onde acontece a interação entre a enzima e o substrato, molécula que é convertida em produto (GARRETT, REGINALD H.; GRISHAM, 2008; SINGH et al., 2016a). Essas proteínas têm a capacidade de serem específicas e diferenciar substratos muito semelhantes. Tal eficiência e seletividade podem ser explicadas pelas interações inter e intramoleculares que ocorrem nessas macromoléculas durante o processo de catálise enzimática. O substrato se liga a enzima levando a rearranjos que reduzem a energia de ativação da reação, e conseqüentemente tornando-a mais rápida, sem interferir no equilíbrio reacional (NELSON; COX, 2014, cap. 6; GARRETT; GRISHAM, 2008, cap. 5).

As tirosinases (EC 1.14.18.1) são metaloenzimas da classe oxirredutase, também conhecidas como polifenol oxidase (PPO), que atuam catalisando a *o*-hidroxilação e a consecutiva oxidação de compostos fenólicos (Figura 1) (BUITRAGO et al., 2016; MESSERSCHMIDT, 2010).

Figura 1 – Ação da tirosinase sobre monofenóis e catecóis (benzenodióis).



Fonte: A autora, 2021.

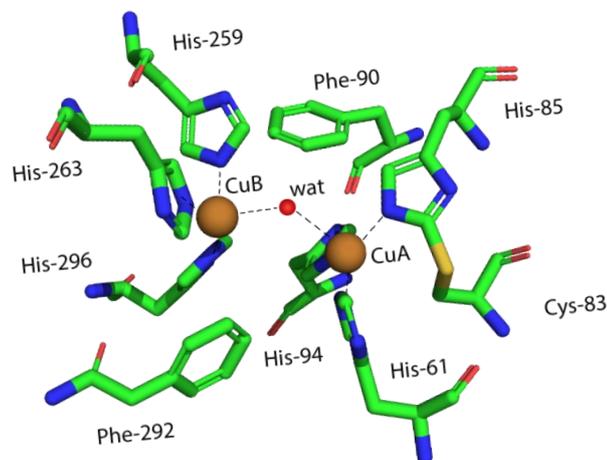
Essa enzima pode ser encontrada em plantas, animais, bactérias e fungos (SHAO et al., 2018), tendo papel de catalisar as reações responsáveis pela síntese de melanina. Em frutas e vegetais essa enzima tem um papel significativo no processo de escurecimento, quando esses

são armazenados por longos períodos ou sofrem danos durante o transporte (KIM et al., 2014). Em mamíferos, a classe das tirosinases está envolvida principalmente no processo de conversão de L-tirosinase em L-DOPA (BUITRAGO et al., 2016)

As metaloenzimas no geral são classificadas de acordo com a geometria de seus centros contendo cobre e da esfera de coordenação, e por essas características pode-se classificá-las em tipo 1, tipo 2 e tipo 3 (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013). Nas metaloenzimas do tipo 1, ou “proteínas azuis de cobre”, há apenas um átomo de cobre (II), com geometria descrita como piramidal trigonal ou bipiramidal, possuindo a função de transporte de elétrons. Metaloenzimas do tipo 2 têm estruturas do tipo planar e a funcionalidade de ativar O_2 tornando-o mais reativo. As metaloenzimas de cobre do tipo 3, são dímeras, ou seja, possuem dois átomos de cobre interligados, tendo a função de transportar oxigênio (FENNER, 2001; KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).

A tirosinase pertence à família de metaloenzimas do tipo 3, com seu sítio ativo possuindo dois íons cobre (CuA e CuB), como ilustrado na Figura 2. Além disso, cada íon metálico está coordenado a três histidinas através do nitrogênio dos grupos imidazóis. (PRETZLER; ROMPEL, 2018; XIE et al., 2016) A ligação covalente com a Cys-83 atua fixando a His-85, mantendo a orientação da cadeia lateral desse resíduo. Adicionalmente, os resíduos Phe-90 e Phe-292 restringem as conformações da cadeia lateral dos resíduos de histidina, conservando a integridade do sítio ativo, sendo inclusive uma característica comum em tirosinases. (ISMAYA et al., 2011).

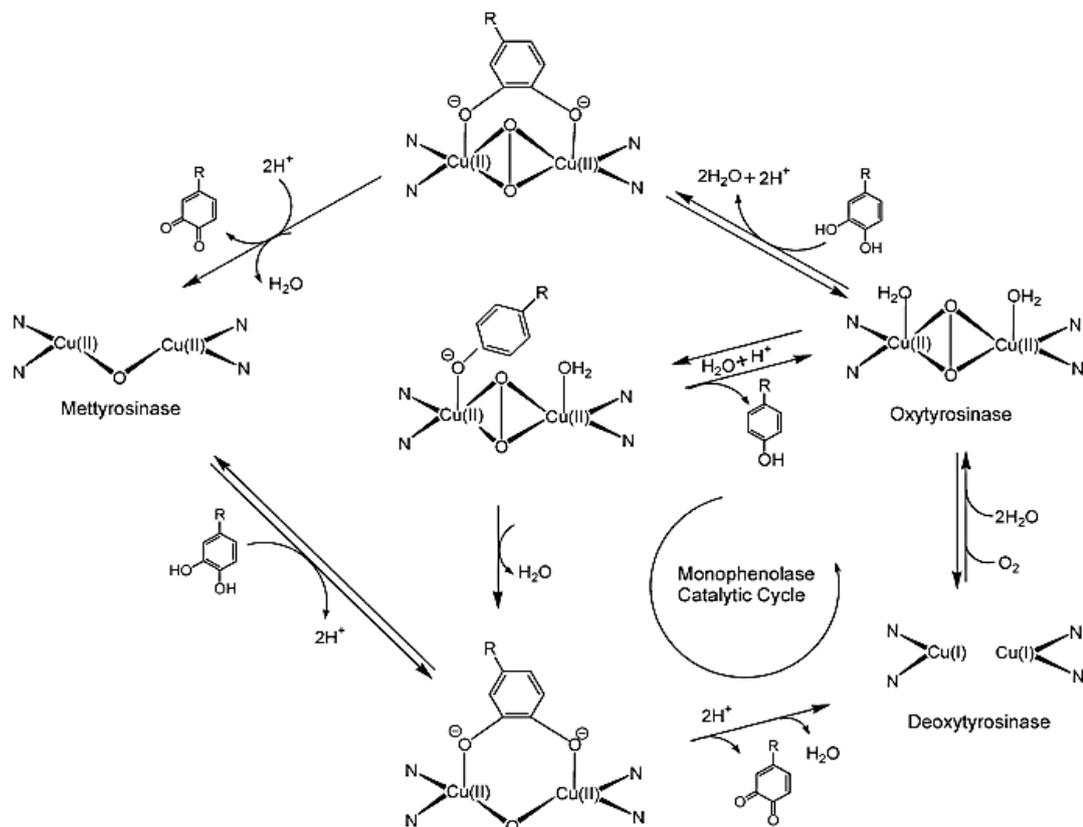
Figura 2 – Representação do sítio ativo da tirosinase na forma *met-*. Os átomos estão identificados de acordo com a coloração: verde, azul, vermelho e amarelo para os átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre, respectivamente, existindo uma ligação covalente entre a Cys-83 e His85. As esferas laranjas ao centro representam os íons cobre, unidos por uma molécula de água ou íon hidroxila.



Fonte: A autora, 2021. Encontrado também em (ISMAYA et al., 2011).

Os íons cobre presentes no sítio ativo podem assumir quatro estados de oxidação distintos: *deoxy-* ($\text{Cu}^{+1}\text{-Cu}^{+1}$), *oxy-* ($\text{Cu}^{+2}\text{-O}_2\text{-Cu}^{+2}$), *met-* ($\text{Cu}^{+2}\text{-OH-Cu}^{+2}$) e *deact-Ty* ($\text{Cu}^0\text{Cu}^{+2}$), que se interconvertem durante os processos oxidativos (PRETZLER; ROMPEL, 2018). A forma nativa (*met-*) tem os íons cobre unidos por um grupo hidroxila ou por uma molécula de água e pode se ligar a monofenóis e catecóis, porém realizando a oxidação apenas dos catecóis. A ação da enzima sobre catecóis muda o estado de oxidação da enzima para a forma *deoxy-* que na presença de O_2 se transforma na forma *oxy-*. Esta última forma é capaz de atuar sobre fenóis e catecóis (Figura 3) (PRETZLER; ROMPEL, 2018; RAMSDEN; RILEY, 2014). Os catecóis podem participar do mecanismo mono-oxigenase quando são tratados como fenóis pela forma *oxy-* da enzima, o que leva a forma *deact-Tirosinase* (HASSANI; HAGHBEEN; FAZLI, 2016; RAMSDEN; RILEY, 2014).

Figura 3 – Esquema representativo do ciclo catalítico da tirosinase mostrando os estados de oxidação dos íons cobre no sítio ativo da enzima, durante o processo de hidroxilação de monofenóis e oxidação de o-difenóis.

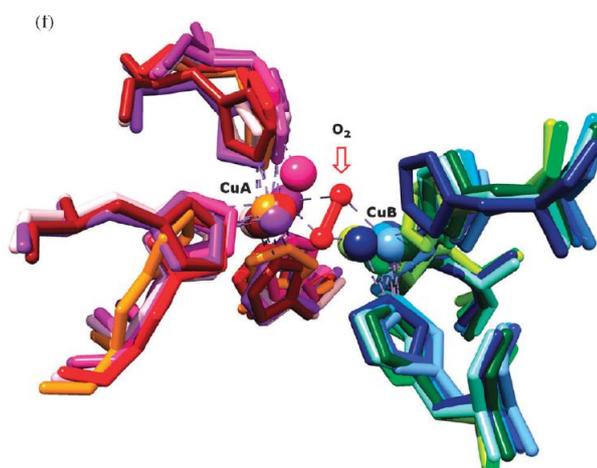


Fonte: Obtido de (KIM; UYAMA, 2005).

Apesar das enzimas da família de tirosinases não possuírem homologia de sequência primária entre si (e.g. apenas 23% entre a humana e a encontrada em cogumelos *Agaricus*

bisporus) (PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017; PRETZLER; ROMPEL, 2018), a conservação do sítio ativo se mostra como um ponto em comum (Figura 4), incluindo todo o bolsão hidrofóbico, possibilitando o uso *in vitro* de tirosinases de diferentes fontes (BUIRAGO et al., 2016; PRETZLER; ROMPEL, 2018; RAMSDEN; RILEY, 2014).

Figura 4 – Superposição do sítio ativo de diferentes tirosinases tipo 3 (*Ipomoea batatas*, *Limulus polyphemus* subunit II, *Octopus dofleini*, *Streptomyces castaneoglobisporus* e *Bacillus megaterium*).



Fonte: Adaptado de (ROLFF et al., 2011).

1.2 TIROSINASE E MELANOGÊNESE

A melanina é o principal pigmento presente na pele e é produzida por meio de um processo chamado melanogênese. Esse pigmento é um biopolímero de elevado peso molecular e sua estrutura complexa é constituída de porções de polifenóis. A autopolimerização de catecóis e fenóis oxidados leva a produção de dois tipos de melanina, eumelanina e feomelanina. Além disso, esse pigmento atua substancialmente na proteção contra a radiação ultravioleta, assim como eliminando radicais livres oxidativos (BUIRAGO et al., 2016; ISMAYA et al., 2011; ZHU et al., 2014).

A produção de melanina tem como elemento fundamental a tirosinase, iniciando com a gradual *o*-hidroxilação do aminoácido L-tirosina a L-DOPA, utilizando O₂ como oxidante, sendo a etapa limitante da biossíntese do pigmento. A tirosinase oxida a L-DOPA produzindo L-dopaquinona, que após auto-oxidação resulta no L-dopacromo (BUIRAGO et al., 2016; ZHU et al., 2014). Existem outras duas enzimas que atuam de forma secundária, regulando o tipo de pigmento produzido (CHEN et al., 2015a; KOBAYASHI et al., 1994), e após várias etapas de oxidação e rearranjos no ciclo catalítico envolvendo a tirosinase e os seus substratos,

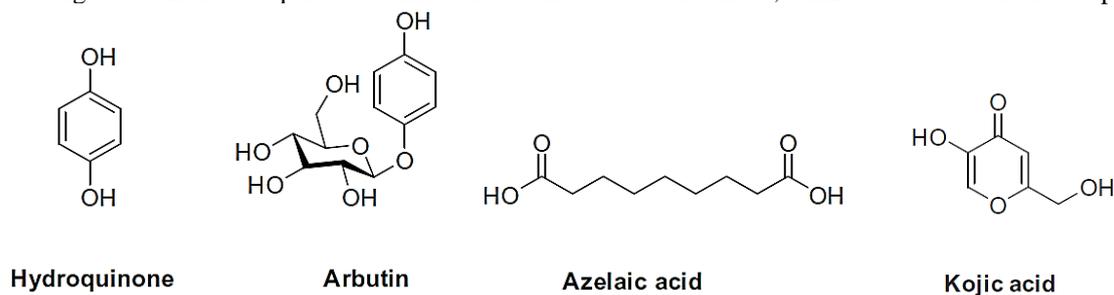
há a formação destas duas formas de melanina: Eumelanina – que caracteriza os pigmentos de preto a marrom; e Feomelanina – responsável pelos pigmentos amarelo e avermelhado (Figura 5) (BUITRAGO et al., 2016). Pessoas com pele clara, ou seja, com maior concentração de feomelanina na pele, são mais sensíveis aos efeitos da radiação ultravioleta pois este pigmento tem maior potencial para geração de radicais livres, causando danos no DNA (MIOT et al., 2009; WAGNER et al., 2002). Isso pode contribuir para os efeitos nocivos da radiação, aumentando o risco de neoplasias. A eumelanina, em contrapartida, dispersa a luz UV e reduz os efeitos nocivos por diminuir a penetração deles na pele (WAGNER et al., 2002).

Além de ser significativa em processos epiteliais, a tirosinase também está presente na produção de neuromelanina a partir da oxidação de dopamina a dopaquinona (PILLAIYAR, 2017).

Apesar da melanina atuar substancialmente na proteção da pele, a exposição exagerada a radiação ultravioleta é o principal fator que leva ao aparecimento de câncer de pele (HAYWARD et al., 2017). A radiação UV acaba estimulando a produção do pigmento e ativa também a proteína supressora de tumor p53. Com essa proteína ativa, há a elevação dos níveis de RNAm e da tirosinase, que leva a superprodução e posterior acúmulo desse pigmento (CHANG, 2012; VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013). Desta forma, a tirosinase se mostra como um marcador sensível para melanomas, pelo fato de ser super-expressa durante a tumorigênese (BANDARCHI et al., 2010; BOYLE et al., 2002). A hiperpigmentação é um dos fatores responsáveis pelo surgimento de melasmas e melanoma, uma forma grave de câncer de pele (XIE et al., 2016; ZHU et al., 2014). Os melanomas também aparecem devido a mutações genéticas nos melanócitos, células que produzem a melanina, e encontrados em diversas partes do corpo, como pele, olhos e leptomeninges (DOMINGUES et al., 2018).

No Brasil, cerca de 30% de todos os diagnósticos de câncer são correspondentes ao câncer de pele, onde são registrados mais de 185 mil casos todos os anos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) sendo considerado o mais frequente em nosso país (“Câncer de Pele”, 2017; “Câncer de pele melanoma”, 2020). Apesar dos melanomas representarem entre 1 – 3% de ocorrência entre os tipos de malignidades cutâneas, sendo considerado o mais raro, é também o mais agressivo e letal, inclusive podendo provocar metástase (“Câncer de pele melanoma”, 2020; DOMINGUES et al., 2018) correspondendo a cerca de 73% de mortes por câncer de pele (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Isso pode ocorrer devido ao fato de as células de melanoma não secretarem a melanina produzida como ocorreria em um melanócito saudável. Isso torna estas células mais resistentes a tratamentos, pois a melanina absorve a radiação utilizada nos tratamentos convencionais (BUITRAGO et al., 2016).

Figura 6 – Estrutura química de inibidores conhecidos da tirosinase, utilizados no clareamento da pele.



Fonte: Adaptado de (PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017).

Analisando as pesquisas envolvendo os inibidores, nota-se que existem porções que são de certa forma comuns aos inibidores (*e.g.* COOH, OH, OMe, e NH) (CASELLI et al., 2018; CLEMENT; WEIDE; ZIEGLER, 1996), incluindo inibidores de metaloenzimas (HINCHLIFFE et al., 2018) e da tirosinase (CABEZUDO et al., 2021; HA et al., 2012; HALDYS; LATAJKA, 2019; KRUEGER, 1955; LANGAT et al., 2021; SHAO et al., 2018). Além desses grupos, muitos trabalhos mostram que a presença de grupos hidrofóbicos pode elevar a atividade inibitória sobre a tirosinase (BARROS et al., 2019; FAN et al., 2012; KHATIB et al., 2007; LEE et al., 2010; RHO et al., 2007, 2010; THANIGAIMALAI et al., 2010).

O uso dessas moléculas como inibidores pode apresentar pontos indesejados, como a necessidade de altas doses e problemas com estabilidade (SHAO et al., 2018; ZHENG et al., 2016). Por exemplo, altas doses de arbutin podem causar hiperpigmentação, o ácido kójico pode desencadear alergias e o uso contínuo de hidroquinona causa despigmentação permanente (OISO et al., 2017; YANG et al., 2016). Para contornar esses problemas surge a necessidade do desenvolvimento e utilização de materiais biocompatíveis e com grande estabilidade química.

1.3.1 Nanopartículas de Carbono

Uma das alternativas que pode ser exploradas é o uso de nanomateriais baseados em carbono. Esses materiais vem ganhando destaque em aplicações nos campos da biologia, medicina, *drug delivery*, fotocatalise e eletrônica, emergindo como candidatos promissores em bioimagem e teranóstico, dentre muitas outras aplicações (BHATTACHARYA et al., 2016; BOAKYE-YIADOM et al., 2019).

Essas partículas carbonáceas de tamanhos nanométricos (10^{-9} m), como os nanotubos de carbono, fulereno, folhas de grafeno e *carbon dots*, são basicamente formadas por carbono e podem conter nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em sua composição (BOAKYE-YIADOM et

al., 2019; LIU; LIANG, 2012). Os *carbon dots* (CDs) são formados por cluster de carbono e são partículas classificadas como quase esféricas de dimensão zero com tamanhos que podem chegar até os 20 nm (SAGBAS; SAHINER, 2019). Sua estrutura interna é identificada como amorfa ou nanocristalina, com carbono predominantemente com hibridização sp^2 (LIU; LIANG, 2012).

Os CDs vêm ganhando destaque em aplicações biomédica principalmente pelas suas propriedades únicas e adaptáveis: Alta foto e químico-estabilidade, tamanho pequeno, síntese simples e de baixo custo, solubilidade em água, excelente biocompatibilidade e propriedades fotoluminescentes; adequadas para aplicações médicas e biológicas. Na verdade, existem estudo que mostram baixa ou nenhuma citotoxicidade *in vitro* e até em modelos *in vivo*, como em *zebrafish* e camundongos (GARCIA et al., 2019; JIANG et al., 2015; LI et al., 2015b, 2016; PENG et al., 2017a; YANG et al., 2009).

Já a superfície dos CDs depende do tipo de síntese e dos materiais de partida utilizados. Existem vários métodos de síntese capazes de produzir CDs a partir de materiais contendo carbono, podendo ser classificados em “*top-down*” e “*bottom-up*”. O primeiro visa sintetizar CDs a partir de materiais macroscópicos, e o segundo a partir de pequenas moléculas contendo carbono, realizando a polimerização destes (BOAKYE-YIADOM et al., 2019). Os métodos mais recorrentes são a carbonização de hidrocarbonetos, síntese hidrotermal, tratamento oxidativo e até ablação a laser (PENG et al., 2017b). Dentre os precursores mais encontrados, podemos citar o grafite, nanotubos de carbono e citratos (BOAKYE-YIADOM et al., 2019). Também é possível encontrar trabalhos que buscam por sínteses mais ambientalmente amigáveis empregando materiais bioinorgânicos, como suco de laranja (SAHU et al., 2012), casca de laranja (DU et al., 2015), leite de soja (ZHU; ZHAI; DONG, 2012) e leite de vaca (WANG; ZHOU, 2014), de forma a evitar métodos complicados e compostos perigosos. O uso de aminoácidos, carboidratos e proteínas também têm ganhado espaço como precursores sintéticos de CDs, buscando obter propriedades de superfície interessantes para aplicações biológicas (GARCIA et al., 2019; PICHARDO-MOLINA et al., 2020; ZHANG et al., 2012). Os CDs podem ainda ser dopados com outros elementos, como B, P, S, e também com elementos metálicos, visando melhorar suas propriedades fotoluminescentes, carga e solubilidade (PENG et al., 2017b).

Como destacado acima, os *carbon dots* têm chamado atenção por todas as suas propriedades únicas que os tornam bastante atrativos para aplicações em bioimagem, *drug delivery*, além de suas aplicações em nanomedicina e nanoteranóstico (GHOSAL; GHOSH, 2019). Essas aplicações também envolvem a detecção e tratamento de cânceres, como o

melanoma: Nasrin e colaboradores utilizaram *carbon dots* produzidos a partir de um derivado da vitamina B1 conjugados a ácido fólico para bioimagem de melanomas (NASRIN et al., 2020); Já Beack e colaboradores propõem mostram o potencial de utilização de CDs conjugados ao sal de ácido hialurônico e a um fotossensibilizador para terapia fotodinâmica em melanomas (BEACK et al., 2015), além de outros trabalhos propondo a utilização de CDs para bioimagem, regulação, carreador de drogas e imunoterapia de melanomas (BAJPAI et al., 2020; HORST et al., 2021; WANG et al., 2014).

As aplicações empregadas nos CDs relacionadas a biomedicina levam a preocupação de se estudar a interação com biomoléculas essencial para organismos vivos. É importante estudar a interação entre CDs e proteínas, por exemplo, pois sabendo que a função dessas macromoléculas estão fortemente ligadas a suas estruturas, qualquer mudança estrutural gerada por conta de interações com essas nanopartículas pode ocasionar alterações em suas funções (PENG et al., 2017b). Inúmeros nanomateriais baseados em carbono já foram estudados quando em contato com enzimas e sabe-se que os efeitos são dependentes do tamanho, da forma das nanopartículas e de outras características físico-químicas, sendo aplicados na modulação da atividade enzimática (CHEN et al., 2017; HU et al., 2018; LI et al., 2015a; QIAN et al., 2016; ZHAO; ZHOU, 2017).

A interação entre biomoléculas e ligantes se dá por meio de ligações de interações fracas: ligações de hidrogênio, interações de van de Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Para determinar que tipo de forças governam as interações pode-se fazer uso da espectroscopia de fluorescência, que fornece constantes de associação e parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), e a partir da magnitude e sinal desses parâmetros é definido o tipo de força intermolecular envolvida na interação (BHATTACHARYA et al., 2016; GARCIA et al., 2019; GUO et al., 2015; YANG et al., 2016).

1.4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DO MODELO ENZIMÁTICO

1.4.1 Modelo de Cinética Enzimática

Leonor Michaelis e Maud Menten postularam que durante a sua ação, as enzimas formam um complexo intermediário com o substrato de forma reversível em uma etapa rápida, e posteriormente se dissociam em produto e enzima, em uma segunda etapa mais lenta (Figura 7) (NELSON; COX, 2012; SITTAMPALAM et al., 2016). A dedução completa a equação que descreve o comportamento enzimático pode ser encontrada em qualquer livro de físico-química ou bioquímica, e se encontra reproduzida de (BARROS, 2018) no (ANEXO A).

Figura 7 – Modelo cinético proposto para a atuação da enzima (E) sobre um substrato (S), levando à formação de um complexo (ES) e a posterior liberação do produto (P) e da enzima livre (E) (SITTAMPALAM et al., 2016).



Fonte: Obtido de (SITTAMPALAM et al., 2016).

A equação provinda do modelo de Michalis-Menten descreve a velocidade de uma reação que sofre atuação catalítica de alguma enzima atuando sobre um único substrato (NELSON; COX, 2012; SITTAMPALAM et al., 2016; STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008):

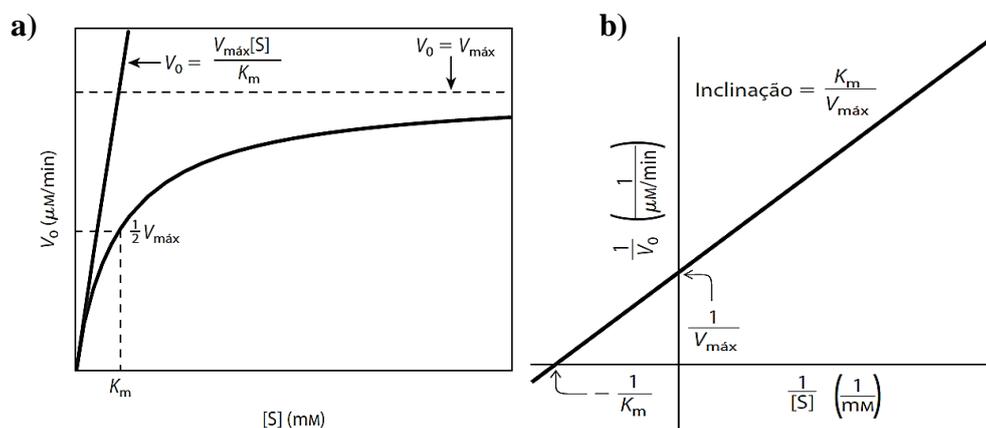
$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (10)$$

Essa equação nos fornece relações importantes entre K_m e a concentração do substrato. Quando $K_m = [S]$, então $V_0 = V_{m\acute{a}x}/2$, ou seja, K_m é uma constante que diz a concentração do substrato na qual a velocidade da reação cai à metade (NELSON; COX, 2012; STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008).

Para melhor visualização gráfica das constantes desse modelo pode-se lineariza-la, facilitando interpretação dos tipos de inibição, transformando o gráfico da Figura 8 – a no gráfico da Figura 8 – b, chamado de gráfico Lineweaver-Burk representado pela equação (NELSON; COX, 2012):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Figura 8 – a) Gráfico de Michaelis-Menten, evidenciando as constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$, assim como suas relações com a velocidade inicial e a concentração do substrato. b) A linearização do Gráfico de Lineweaver-Burk, facilitando a melhor visualização das constantes de interesse.



Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2014).

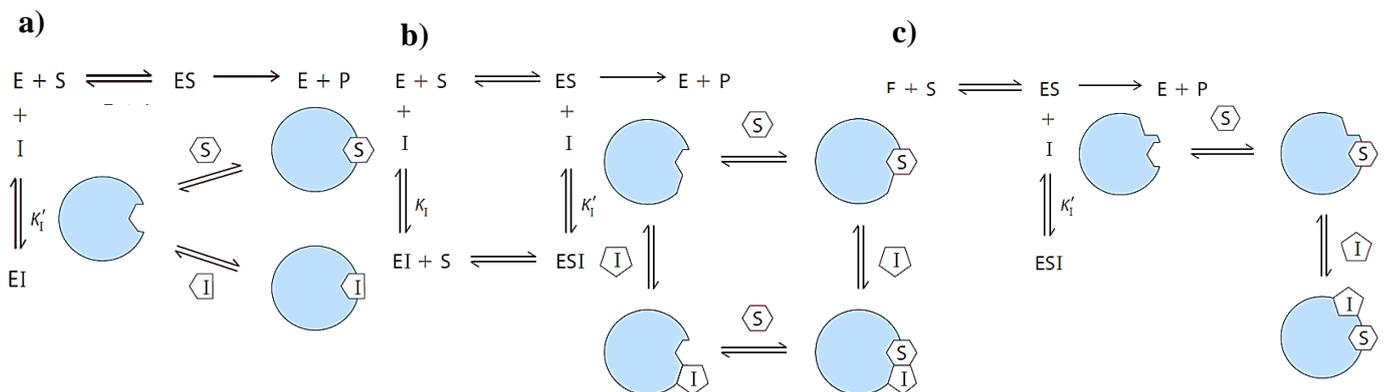
Como já mencionado, a ação de enzimas pode ser inibida por moléculas chamadas inibidores. A classe de inibidores reversíveis se divide de acordo com a maneira que ocorre a interação entre a enzima (E), o inibidor (I) e o substrato (S), sendo esta divisão composta por inibições competitivas, acompetitivas e mista (PURICH, 2010).

A inibição competitiva é quando o inibidor e o substrato competem para se ligar no sítio ativo, podendo formar os complexos EI e ES, mas não ESI (Figura 9 – a) (STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008). Assim, o inibidor reduz a velocidade da catálise por meio da redução do número de enzimas ligadas ao substrato, de forma que o aumento da concentração do substrato induz o aumento da velocidade da reação, a uma dada concentração de I. Ou seja, o inibidor não modifica a $V_{m\acute{a}x}$ da ação enzimática (NELSON; COX, 2012).

Um inibidor classificado como misto se liga a um sítio que é topologicamente diferente do sítio ativo (PURICH, 2010). Assim, esta molécula não compete com o substrato, mas de alguma forma interfere no sítio ativo e consequentemente na catálise, sendo capaz de formar tanto o complexo ES quanto ESI (Figura 9 – b) (NELSON; COX, 2012). Neste caso, a ligação IS independe da ligação ES. Logo, o aumento da concentração de S não interfere na $V_{m\acute{a}x}$ (PURICH, 2010).

No caso de um inibidor acompetitivo, a molécula inibidora só é capaz de se ligar ao complexo ES, formando o complexo ESI (Figura 9 – c) (PURICH, 2010).

Figura 9 – Representação dos tipos de inibição reversível. a) Inibição competitiva, onde K_I é a constante de equilíbrio do complexo EI. b) Inibição mista c) Inibição acompetitiva, onde K_I' é a constante de equilíbrio para a ligação ES.

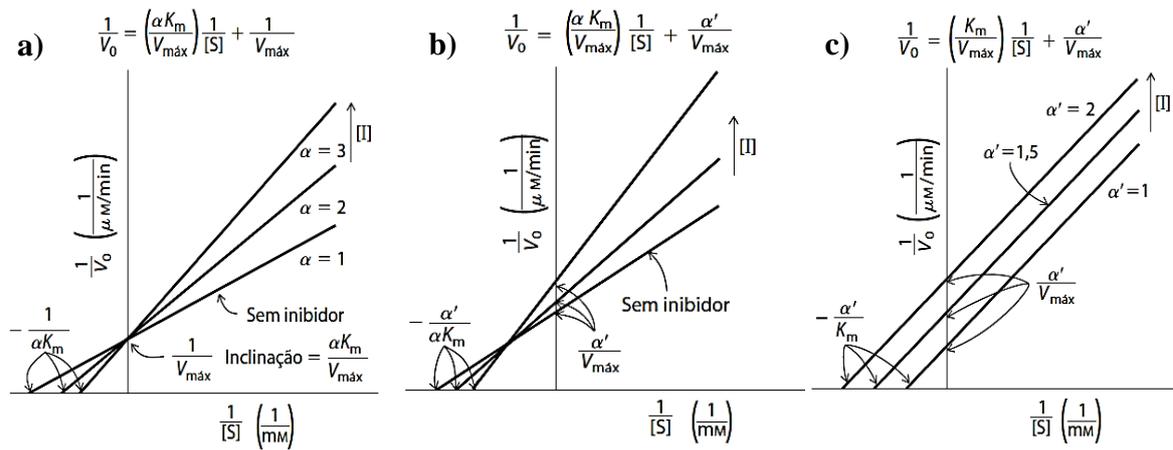


Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2014).

Observando a Figura 10 é possível distinguir de que tipo de inibição se trata de forma bem prática, uma vez que cada inibição apresenta um gráfico característico. Os parâmetros

envolvidos na inibição que estão representados graficamente serão esclarecidos na metodologia.

Figura 10 – A linearização do Gráfico de Lineweaver-Burk que facilita a identificação do tipo de inibição envolvida em cada caso. a) Inibidor competitivo, b) Inibidor misto/não-competitivo e c) Inibidor acompetitivo.



Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2014).

2 MOTIVAÇÃO

A tirosinase, enzima da classe oxirredutase, tem papel fundamental no processo de escurecimento de frutas e no processo de pigmentação em animais através da produção de melanina. Mas quando há a desregulação da atividade desta enzima ocorre a produção excessiva de melanina, causando hiperpigmentação, além de ser super-expressa em melanomas, sendo um marcador sensível para esta doença. As opções existentes de moléculas inibidoras da tirosinase possuem desvantagens em relação a estabilidade e eficácia. Desta forma, mostram-se relevantes o entendimento e a pesquisa de novos inibidores que possam regular tais processos e que possam ser utilizados no tratamento de melanomas.

2.1 HIPÓTESE

Muitos inibidores da tirosinase já estudados possuem grupos específicos comuns a maioria dos inibidores. Também se sabe que porções hidrofóbicas participam significativamente no melhoramento da inibição, sendo uma parte importante dessas moléculas. Unindo estas suas características em estruturas nanométricas (*carbon dots*), é possível supor que tais nanopartículas podem ser potenciais inibidores da atividade enzimática da tirosinase.

2.2 OBJETIVO

É proposto neste trabalho a avaliação do potencial inibitório de quatro nanopartículas de carbono frente a enzima tirosinase, assim como estudar as características das interações entre a enzima e essas nanopartículas através de técnicas espectroscópicas visando mapear modificações estruturais durante o processo inibitório e definir as forças intermoleculares que governam as interações.

2.2.1 Objetivos Específicos

- a. Sintetizar quatro diferentes *carbon dots* (CDs) contendo cargas e tamanhos diferentes;
- b. Caracterizar os grupos de superfícies desses CDs utilizando espectroscopia FTIR e UV-visível;
- c. Avaliar a interação entre a enzima e os CDs utilizando espectroscopia de fluorescência, determinando parâmetros termodinâmicos;
- d. Verificar a inibição da enzima tirosinase utilizando os CDs e estudar os mecanismos de inibição;
- e. Avaliar modificações estruturais na tirosinase devido a interação utilizando UV-Vis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

A enzima tirosinase do cogumelo *Agaricus bisporus* 1000 U/mg, e os reagentes L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA), ácido kójico e a proteína concanavalina A (*Canavalia ensiformis*) (Jack bean) foram obtidos da Sigma-Aldrich, bem como os sais $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, e $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Os reagentes $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram adquiridos da Isofar, o solvente álcool etílico adquirido da Química Moderna, todos possuem padrão analítico. Foi utilizada água destilada e deionizada.

3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de carbono foram sintetizadas usando a concanavalina A e sais dos metais citados acima, com base na metodologia já utilizada pelo Laboratório de Química Biológica e descrita na literatura (GARCÍA; TODESCHINI; NEVES, 2018). Levando em conta que a síntese desses CDs está bem estabelecida, as caracterizações foram limitadas à identificação dos grupos superficiais considerados chave para interações importantes com a enzima tirosinase.

3.2.1 Espectroscopia de Absorção UV-Vis

Para a obtenção do espectro de absorção na região do UV-Vis dos CDs foi utilizado o espectrofotômetro Agilent 8453 UV-Visível localizado no Laboratório de Eletrossíntese Orgânica, Departamento de Química Fundamental - UFPE. Foi utilizada uma cubeta de 1 cm de caminho ótico, em um intervalo de 200–500 nm a 25 °C, usando tampão como branco.

3.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Outra técnica de grande valia na identificação de grupos superficiais dos CDs é a espectroscopia FTIR. Desta forma, utilizamos esta técnica para definir o padrão espectral e identificar grupos de superfície presentes nas nanopartículas sintetizadas. Utilizamos um espectrofotômetro de infravermelho IR tracer-100 Schimaszu, usando pastilhas de KBR como matriz, em um intervalo de frequência entre 500–4000 cm^{-1} .

3.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

A solução estoque da enzima tirosinase foi preparada na concentração de 1,5 μM em tampão fosfato 20 mM, pH 6,2, previamente preparado em água destilada, assim como a

solução de L-DOPA 6 mM. As soluções estoque das nanopartículas foram preparadas em água destilada na concentração de 5 mg/mL, e o ácido kójico em tampão fosfato na concentração de 0,5 mM. Todas as soluções estoque foram mantidas a mesma temperatura de 5 °C.

3.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos em um espectrofluorímetro Jasco FP-6300, situado no Laboratório de Enzimologia (LABENZ), DBioq – UFPE. Foi utilizado um banho termostático para realização dos experimentos a 303, 308 e 313 K. O espectrofluorímetro foi configurado para excitar resíduos aromáticos da proteína em 280 nm, como por exemplo os resíduos de triptofano. A emissão foi monitorada entre os comprimentos de onda de 310 nm e 400 nm. Os CDs foram titulados nos volumes 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 e 110 µL, em uma solução de tirosinase 201 nM. O *inner filter effect* (efeito de filtro interno) pôde ser desconsiderado neste trabalho devido à baixa intensidade na absorbância dos CDs nos comprimentos de onda de excitação da tirosinase e concentrações utilizadas (APÊNDICE A). A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi definida usando as seguintes equações (CARVALHO et al., 2017; LAKOWICZ, 2006), dependendo dos resultados obtidos para cada CDs:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_{sv}[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2)$$

$$\frac{F_0}{F} = A e^{K_{sv}v} \quad (3)$$

F_0 é a intensidade inicial, F é a intensidade final, $[Q]$ é a concentração do *quencher*, k_q é uma constante de *quenching*, τ_0 é o tempo de vida, $\Delta F = F_0 - F$ e f_a é a fração da fluorescência inicial acessível ao supressor (*quencher*) e A é um parâmetro do *fitting*.

As constantes de associação (K_a), foram calculadas usando as (4) ou (5) dependendo do comportamento dos resultados experimentais (BARROS et al., 2019; LAKOWICZ, 2006; XU et al., 2016).

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log[K_a] + n \log[Q] \quad (4)$$

$$\frac{F_0 - F}{F} = \frac{B_{max}[Q]}{K_d + [Q]} + NS[Q] \quad (5)$$

n é o número de sítios de ligação, $B_{máx}$ representa a ligação máxima; $K_d=K_a^{-1}$ é a constante de equilíbrio de dissociação e NS é o coeficiente angular da regressão não-linear.

A partir das constantes de ligação obtidas pela espectroscopia de fluorescência, determinamos parâmetros termodinâmicos das interações entre os CDs e a tirosinase para cada temperatura, como a energia livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS), utilizando a equação Van't Hoff (6) e a equação (7), onde R é a constante dos gases ideais e T a temperatura em Kelvin (MOHAMMADZADEH-AGHDASH et al., 2017).

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (6)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.5.1 Modelo Cinético

Com base no modelo de Michaelis-Menten podemos destacar as equações (8) e (9) demonstradas que descrevem o modelo de ação de enzimas e auxiliam na determinação de constantes experimentais importantes.

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad (9)$$

Quando uma enzima é submetida a ação de um inibidor, a equação (9) assume a seguinte forma (BURLINGHAM; WIDLANSKI, 2003):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{mApp}}{V_{máxApp}[S]} + \frac{1}{V_{máxApp}} \quad (10)$$

Onde:

v é a velocidade de reação; $K_{mApp} = K_m \left[\frac{1 + \frac{I}{K_I}}{1 + \frac{I}{\alpha K_I}} \right]$ é a constante de Michaelis-Menten

aparente; $V_{máxApp} = \frac{V_{máx}}{1 + \frac{I}{\alpha K_I}}$ é a velocidade máxima aparente; $[I]$ é a concentração do

inibidor; $[S]$ é a concentração de substrato; K_I é a constante de equilíbrio de dissociação para a ligação do inibidor com a enzima livre e α é a constante que determina o mecanismo da inibição: se $\alpha = 1$ o mecanismo é não-competitivo, se α for muito grande é competitivo e se α for pequeno, porém maior que zero, o mecanismo é incompetitivo. O fator $K_{IS} = \alpha K_I$ é a constante de

dissociação do inibidor no complexo enzima-substrato. A partir do perfil do gráfico também é possível determinar o tipo e de mecanismo de ação do inibidor.

3.5.2 Metodologia dos Ensaio Enzimáticos

Os ensaios enzimáticos foram realizados a partir da adaptação na literatura (XIE et al., 2003). Em uma microplaca de 96 poços uma porção da solução de tirosinase foi adicionada com concentração final de 25 nM, juntamente com a solução de cada nanopartícula separadamente, nos volumes de 2,5, 5, 10, 20, 30 e 40 μ L, tendo cada poço capacidade máxima de 300 μ L. Após uma hora, adicionou-se 4 concentrações diferentes de L-DOPA: 2, 1, 0,5 e 0,25 mM. Essas concentrações foram definidas com base no K_m da tirosinase para o L-DOPA (1,5 mM), onde K_m é a concentração de substrato em que a enzima atinge metade de sua velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$). A inibição foi monitorada tendo como base a conversão da L-DOPA à dopaquinona pela ação da tirosinase, a 475 nm, durante 3,6 minutos, usando um leitor de microplacas ELISA (Bio-rad), situado no Laboratório de Enzimologia (LABENZ), DBioq - UFPE. Após as análises os dados foram tratados com o programa Graphpad Prism, onde foram obtidos os gráficos Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A Atividade enzimática relativa foi calculada a partir da equação (11):

$$\text{Atividade enzimática (\%)} = \frac{OD_1}{OD_2} \times 100 \quad (11)$$

Onde:

OD_1 é a inclinação da equação da cinética de reação com inibidor; OD_2 é a inclinação da equação da cinética da reação do branco. O ácido kójico foi usado como inibidor padrão de referência para comparação (XIE et al., 2016).

O mecanismo de inibição foi elucidado pelo gráfico de Lineweaver-Burk baseado nos resultados do efeito inibitório dos CDs sobre a atividade da tirosinase na oxidação da L-DOPA, e a constante de inibição K_I foi determinada graficamente pelo programa citado acima.

O IC50, concentração do inibidor para que a atividade enzimática diminuía em 50%, foi medido a partir da atividade enzimática versus concentração do inibidor em uma dada concentração do substrato, aproximadamente o K_m .

3.6 SUPERFÍCIE HIDROFÓBICA DA TIROSINASE

As superfícies de potencial hidrofóbico são úteis para entender as interações eletrostáticas entre a proteína e o ligante. A estrutura cristalina de raios-X da tirosinase de

Agaricus bisporus (PDB ID: 2Y9X) cadeia A foi baixada do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) (ISMAYA et al., 2011). A superfície hidrofóbica foi feita executando o script disponível em https://pymolwiki.org/index.php/Color_h, no software PyMOL versão 2.4.0 (“The PyMOL Molecular Graphics System”, [s.d.]).

3.7 ESPECTROSCOPIA UV-VIS: ESTUDO DE INTERAÇÃO

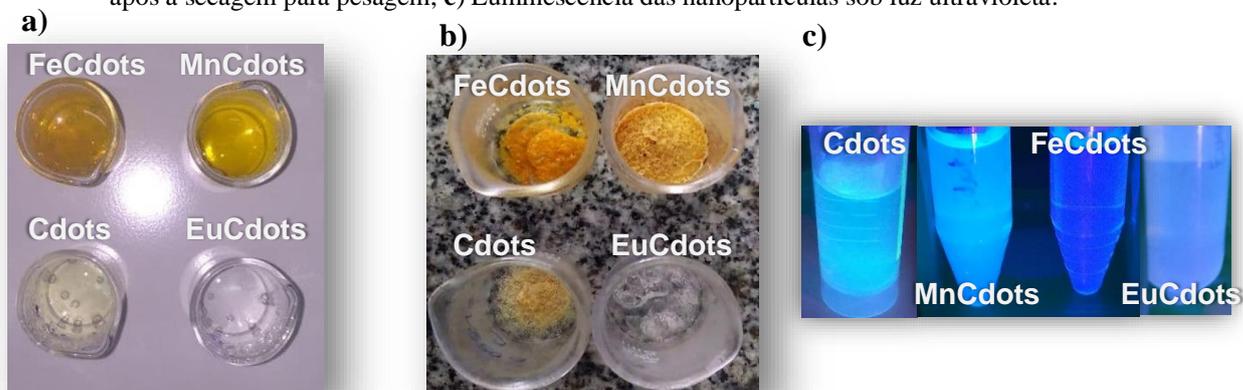
Para a obtenção do espectro de absorção da interação entre tirosina e os CDs na região do UV-Vis foi utilizado o espectrofotômetro Agilent 8453 UV-Visível localizado no Laboratório de Eletrossíntese Orgânica, Departamento de Química Fundamental - UFPE. Foi utilizada uma cubeta de 1 cm de caminho ótico, em um intervalo de 190 – 400 nm a 298 K, usando tampão como branco. Os CDs foram titulados em intervalos de 27 nM para o MnCdots, 33 nM para FeCdots e 55 nM para EuCdots, em uma solução de tirosinase 0,36 µM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CARBONO

A síntese das quatro diferentes nanopartículas carbonáceas utilizadas neste trabalho foi reproduzida de acordo com metodologias pré-estabelecidas no Laboratório de Química Biológica e previamente patenteada (GARCÍA; TODESCHINI; NEVES, 2018). Após a síntese realizamos a purificação do material obtido para obtenção dos CDs nos tamanhos desejados (entre 5 – 12 nm) com rendimentos entre 22% - 50%. Após a solubilização do material foram obtidas suspensões com coloração marrom-amarelada sob luz visível (Figura 11), e sob luz ultravioleta emitiu coloração próxima ao azul.

Figura 11 – Foto da síntese dos CDs. **a)** Suspensão dos CDs sendo secadas para pesagem, **b)** Material obtido após a secagem para pesagem, **c)** Luminescência das nanopartículas sob luz ultravioleta.



Fonte: A autora, 2021.

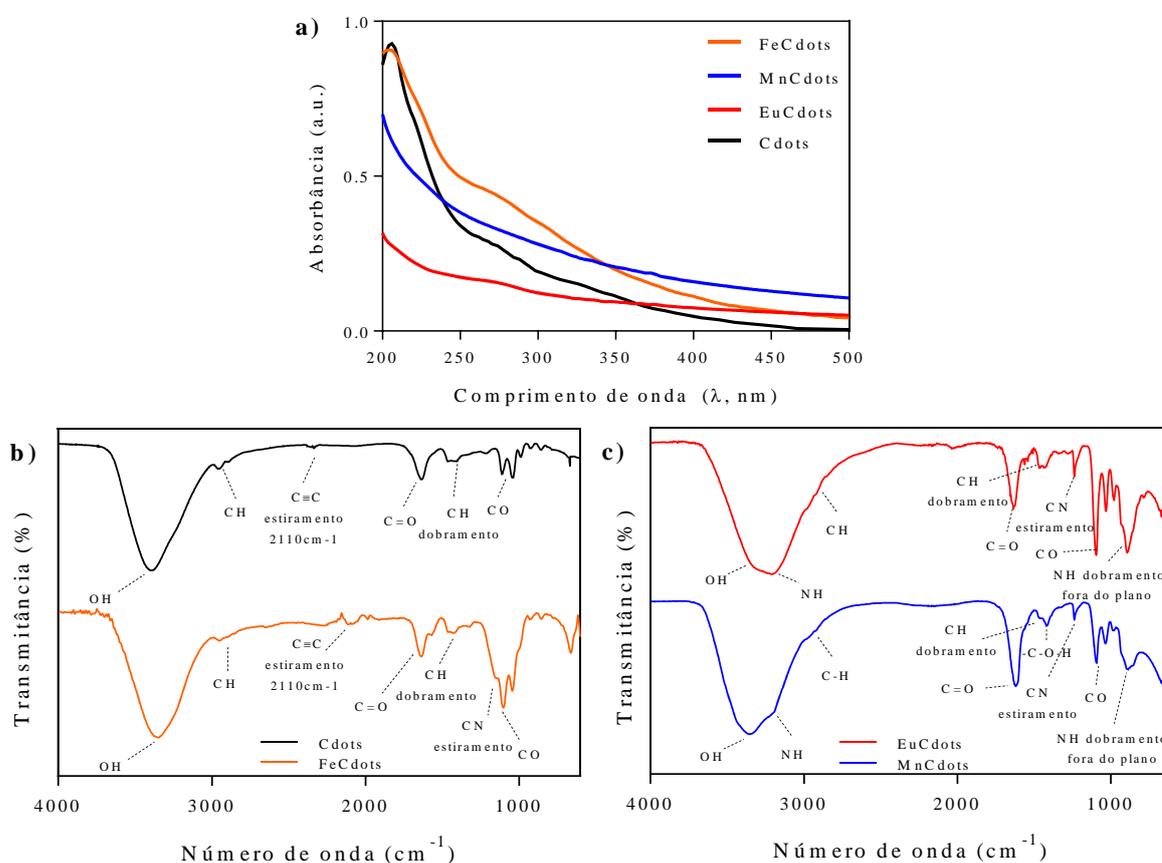
4.1.1 Caracterização por Espectroscopia de Absorção no UV-Vis e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A fim de determinar características dos CDs sintetizados, utilizamos técnicas espectroscópicas prontamente disponíveis no Departamento de Química Fundamental. Assim, obtivemos informações relevantes quanto à compatibilidade das nanopartículas sintetizadas com as obtidas previamente e quanto aos grupos superficiais que poderiam participar da interação entre a superfície e qualquer agente externo, que no caso deste trabalho é a enzima tirosinase. As propriedades óticas de absorção foram avaliadas por meio da espectroscopia de absorção no UV-Vis. Os espectros de absorção para Cdots, FeCdots, MnCdots e EuCdots (Figura 12 – a) mostram comportamentos similares entre si. Pode-se notar uma banda centrada em 230 nm, atribuída à transição $\pi-\pi^*$ correspondente a ligações de carbono sp^2 presente nos CDs (PAULA et al., 2019; SWAPNA; SANKARARAMAN, 2019; VAZ et al., 2017). Uma banda por volta de 250-290 nm se mostra mais proeminente nos espectros de absorção do Cdots e FeCdots, atribuída a transições $\pi-\pi^*$ de sistemas aromáticos e $n-\pi^*$ de grupos carbonílicos

(LIANG et al., 2013; ZHANG et al., 2012; ZHU; ZHAI; DONG, 2012). Tais resultados são compatíveis tanto com dados encontrados na literatura para o perfil de absorção de CDs, bem como com os resultados obtidos pelo trabalho de referência, confirmando a similaridade entre as nanopartículas de ambos os trabalhos (BHATTACHARYA et al., 2016; GARCÍA, 2018; GARCIA et al., 2019; LIANG et al., 2013; PAULA et al., 2019; VAZ et al., 2017).

O espectro FTIR dos CDs permitiu que obtivéssemos informações relevante sobre a superfície destas nanopartículas, contribuindo para alguns *insights* quanto a interação entre elas e a proteína tirosinase. Devido ao método de síntese notamos que o espectro FTIR possui bandas que são comuns a todos os CDs (Figura 12 – b e c). As bandas de absorção em torno de 3350 cm^{-1} , referentes ao estiramento vibracionais do grupo OH; a banda de estiramento do C=O por volta de 1630 cm^{-1} (podendo ser atribuída ao dobramento NH), e as bandas presentes em 1100 cm^{-1} referente ao estiramento CO nos dão evidência da presença de grupos oxigenados, como grupos carboxílicos e hidroxila, para todos os quatro CDs (HU et al., 2017; LIANG et al., 2013; SAILAJA PRASANNAKUMARAN NAIR; KOTTAM; S G, 2020; ZHU; ZHAI; DONG, 2012).

Figura 12 – a) Espectro de absorção UV-Vis dos FeCdots (laranja), MnCdots (azul), Cdots (preto) e EuCdots (vermelho), a 5 mg/mL cada. b) Espectro FTIR dos Cdots, FeCdots; e c) Espectro FTIR dos EuCdots e MnCdots.



Fonte: A autora, 2021.

As bandas de absorção do estiramento C-N podem ser observadas em torno de 1230 cm^{-1} , o dobramento vibracional N-H perto de 860 cm^{-1} e estiramento vibracional do N-H em 3200 cm^{-1} indicam a presença de grupos amina na superfície do MnCdots e EuCdots (SAILAJA PRASANNAKUMARAN NAIR; KOTTAM; S G, 2020; VAZ et al., 2017). O dobramento vibração do C-O-H é visto apenas no MnCdots, em 14790 cm^{-1} , e o estiramento vibracional do $\text{C}\equiv\text{C}$ em 1110 cm^{-1} nos Cdots e FeCdots. Além disso, FeCdots mostra uma banda de estiramento C-N em 1154 cm^{-1} . Também vemos bandas de absorção em torno de 2930 cm^{-1} referentes ao estiramento C-H, e dobramento C-H em 1470 cm^{-1} , presentes em todos os CDs deste trabalho. Esses resultados estão de acordo com os grupos encontrados na matéria-prima da síntese, a proteína concanavalina A (LIANG et al., 2013; VAZ et al., 2017; ZHU; ZHAI; DONG, 2012), e estão em concordância com os dados encontrados para estas nanopartículas, confirmando a similaridade entre estes CDs e os previamente sintetizados (GARCÍA, 2018).

Estes resultados nos mostram que estas nanopartículas, por possuírem grupos oxigenados, possuem grande solubilidade em água, o que possibilita o potencial de interação com biomoléculas em solução, que no caso deste trabalho se faz necessário para que ocorra a inibição da tirosinase.

4.2 ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE CDS E TIROSINASE: ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica sensível a mudanças na estrutura e no ambiente de proteínas (FERREIRA, 2009). Por isso é uma ferramenta que permite evidenciar interações entre a enzima tirosinase e os CDs estudados. Durante o processo fotoluminescente os átomos têm seus elétrons de valência excitados por absorção de radiação eletromagnética, em um comprimento de onda específico, chamado de comprimento de onda de excitação. Quando estas espécies voltam ao seu estado fundamental, liberam energia na forma de fótons, geralmente de comprimentos de onda maiores que o de excitação, chamado de comprimento de onda de fluorescência. Para as proteínas, este método faz uso da fluorescência natural, provinda essencialmente dos aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina (LAKOWICZ, 2006).

Uma das ferramentas que a espectroscopia de fluorescência fornece é o *quenching* (supressão) de fluorescência, que se define como qualquer processo que leva ao decréscimo da intensidade de fluorescência, onde a espécie que causa a supressão é chamada de *quencher* (supressor). Este supressor pode ser qualquer espécie que interaja com o fluoróforo (espécie luminescente), como O_2 , compostos halogenados, íons metálicos ou moléculas neutras. Esta é uma ferramenta utilizada principalmente por dar informação sobre as interações

intermoleculares entre o supressor e biomoléculas, por exemplo, que podem levar a supressão da fluorescência.

4.2.1 Mecanismo de Supressão

A supressão pode ocorrer por um mecanismo de supressão dinâmica (colisional) ou supressão estática, dentre outros vários mecanismos. É possível identificar o mecanismo de atuação do supressor na biomolécula pela análise da dependência da constante de supressão em função da temperatura (CHEN et al., 2020; LAKOWICZ, 2006).

No mecanismo dinâmico, o fluoróforo, que é a espécie que apresenta a fluorescência (tirosinase), quando no estado excitado, é desativado após interagir com o supressor (CDs). Quando há um aumento na temperatura reacional ocorre o favorecimento da difusão do supressor em direção ao fluoróforo no estado excitado, aumentando o número de colisões, e consequentemente a constante de supressão (K_{sv}). Já no mecanismo estático, o fluoróforo interage com o supressor formando um complexo que não tem atividade fluorescente. Assim, não há emissão de fóton quando o complexo absorve luz, voltando imediatamente ao estado fundamental. Desta forma, quando há um aumento da temperatura ocorre a diminuição da estabilidade do complexo formado, e assim diminuindo a constante K_{sv} (LAKOWICZ, 2006).

Utilizando o método que mede a quantidade de *quenching* (supressão) de fluorescência foi estudada a interação da tirosinase com os Cdots, FeCdots, MnCdots e EuCdots, em três diferentes temperaturas. O comprimento de onda de excitação de 280 nm foi utilizado devido à absorção do grupo indol do triptofano, uma vez que este é o fluoróforo dominante em relação aos outros aminoácidos fluorescentes presentes na tirosinase (LAKOWICZ, 2006), e esta técnica é também interessante por ser sensível a dinâmica da proteína (MAHMOUDI et al., 2011).

O espectro de fluorescência da tirosinase exibe uma modificação da intensidade de fluorescência devido à adição dos CDs, sendo atenuada com o aumento da concentração dos inibidores (Figura 13 – a, b, c e d; APÊNDICE B). Este resultado indica que a tirosinase e os CDs interagem e estas nanopartículas estão suprimindo a fluorescência intrínseca da proteína (LAKOWICZ, 2006; XU et al., 2016). Há também um leve deslocamento para o azul durante o *quenching* para todos os CDs utilizados que pode estar relacionado à diminuição da polaridade no microambiente de resíduos triptofano da proteína tornando-o menos acessível ao solvente, ou mesmo mudanças na mobilidade do ambiente para um de maior rigidez devido a interação com os CDs, também indicando que os fluoróforos que emitem em comprimentos de onda maiores são extintos mais facilmente do que os de comprimento de onda mais curto

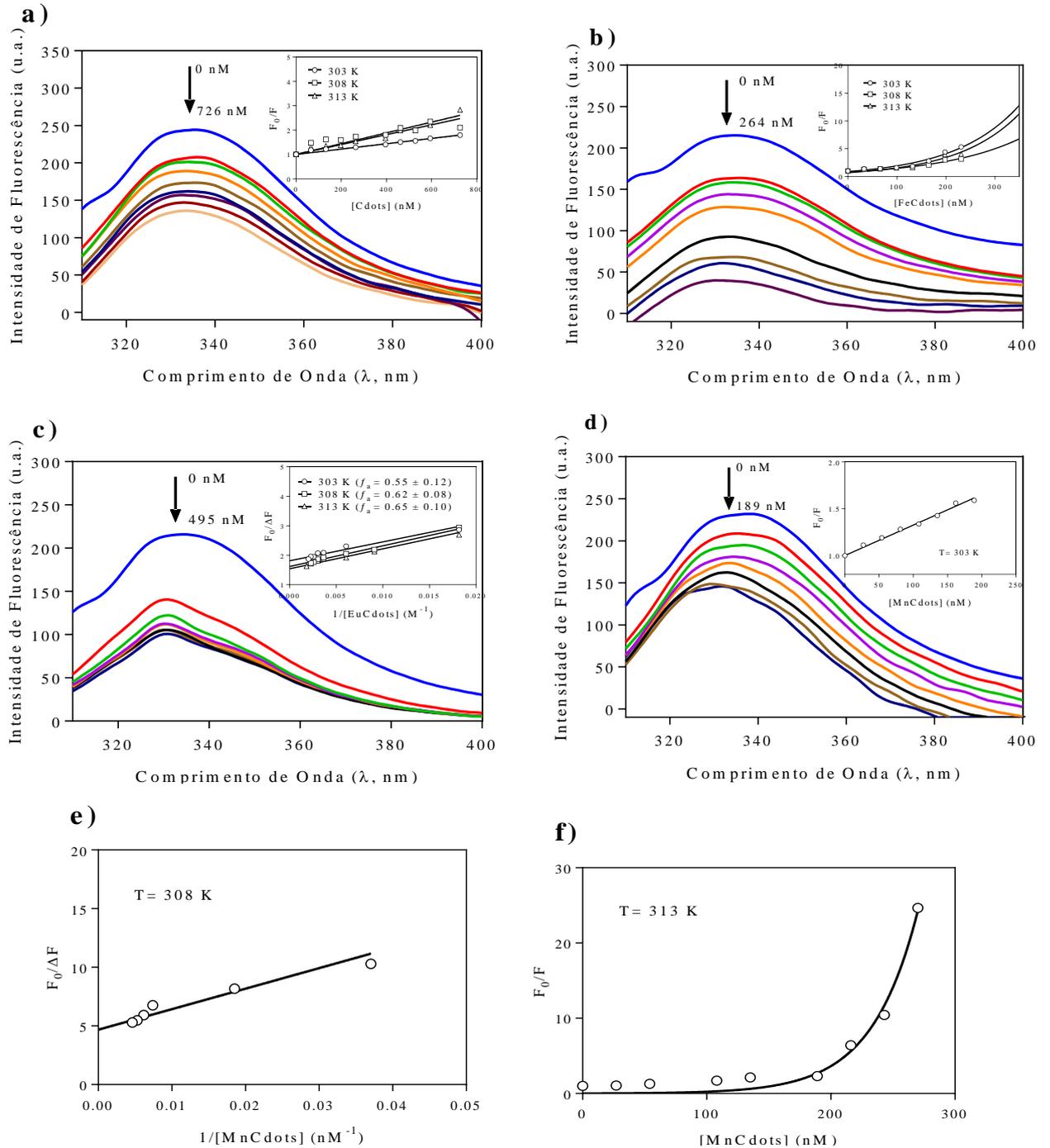
(LAKOWICZ, 2006; MOLLER; DENICOLA, 2002). A redução da intensidade de fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer, onde é utilizada a proporção entre as intensidades máximas de emissão da proteína sem e com o supressor, para cada concentração dos CDs (equação (1)).

O *quenching* pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos, generalizados como *quenching* dinâmico, estático e uma combinação desses dois mecanismos. Uma abordagem para diferenciar esses mecanismos é explorar suas diferentes dependências com a temperatura. Para o mecanismo estático, o K_{sv} diminui com o aumento da temperatura, enquanto para o dinâmico ocorre o oposto (MOHAMMADZADEH-AGHDASH et al., 2017; XU et al., 2016). A partir de regressões lineares foram obtidos os valores de K_{sv} para o sistema Tirosinase-Cdots (Figura 13 – a, interno), nas três temperaturas estudadas. Existem situações em que esta equação não descreve bem o comportamento de supressão obtido experimentalmente por conta de desvios na linearidade. Nesses casos o desvio é atribuído a uma combinação de ambos os mecanismos, além da forma em que as superfícies dos CDs e da enzima interagem (LAKOWICZ, 2006). Nesses casos é possível utilizar equações modificadas que descrevem e nos fornecem constantes que são relevantes para o entendimento dos fenômenos experimentais.

Esse foi o caso do sistema Tirosinase-FeCdots (Figura 13 – b) onde o uso da equação (3) foi necessária devido a curvatura para cima em direção ao eixo y, quando usada a equação de Stern-Volmer. Esse comportamento está relacionado com a mistura de ambos os mecanismos de supressão de fluorescência sendo ativos simultaneamente (CAMPBELL et al., 2012; KEIZER, 1983; LAKOWICZ, 2006). No caso do sistema Tirosinase-EuCdots, o gráfico de Stern-Volmer teve uma curvatura para baixo devido a existência de duas populações de fluoróforos (resíduos da proteína), uma acessível ao supressor e outra inacessível (LAKOWICZ, 2006). Ao linearizar os dados, usando a equação (2), foi possível então obter as constantes de Stern-Volmer (Figura 13- c, interno). O MnCdots teve um comportamento diferente para cada temperatura. A Figura 13 – d, interno; mostra a dependência linear do gráfico de Stern-Volmer a 303 K, enquanto nas temperaturas de 308 K e 313 K (Figura 13 – e, f) tivemos desvios da linearidade para baixo e para cima, respectivamente. Assim, a utilização das equações (2) e (3).

Desta forma foi possível a obtenção das constantes de Stern-Volmer e consequentemente obtivemos o mecanismo de supressão para cada interação Tirosinase-CDs (APÊNDICE C). Os valores de K_{sv} aumentam com a temperatura para todos os CDs, indicando o mecanismo dinâmico de supressão, exceto para os EuCdots, que apresenta um mecanismo estático de supressão, formando um complexo não fluorescente com a tirosinase.

Figura 13 – Espectros de supressão de fluorescência da enzima tirosinase a 30°C (303 K - $\lambda_{exc.} = 280$ nm), em tampão fosfato (pH 6,9), na presença dos CDs. A enzima foi mantida a uma concentração de 201 nM onde os CDs foram titulados. Supressão da fluorescência da tirosinase pelo CDs e Stern-Volmer para as três temperaturas. **a)** Cdots, gráfico interno: Stern-Volmer, usando a equação (1); **b)** FeCdots, gráfico interno: Stern-Volmer, usando a equação (3); **c)** EuCdots, gráfico interno: Stern-Volmer usando a equação (2); **d)** MnCdots, gráfico interno: Stern-Volmer usando a equação (1); **e)** e **f)** Stern-Volmer do MnCdots usando as equações (2) e (3), respectivamente.



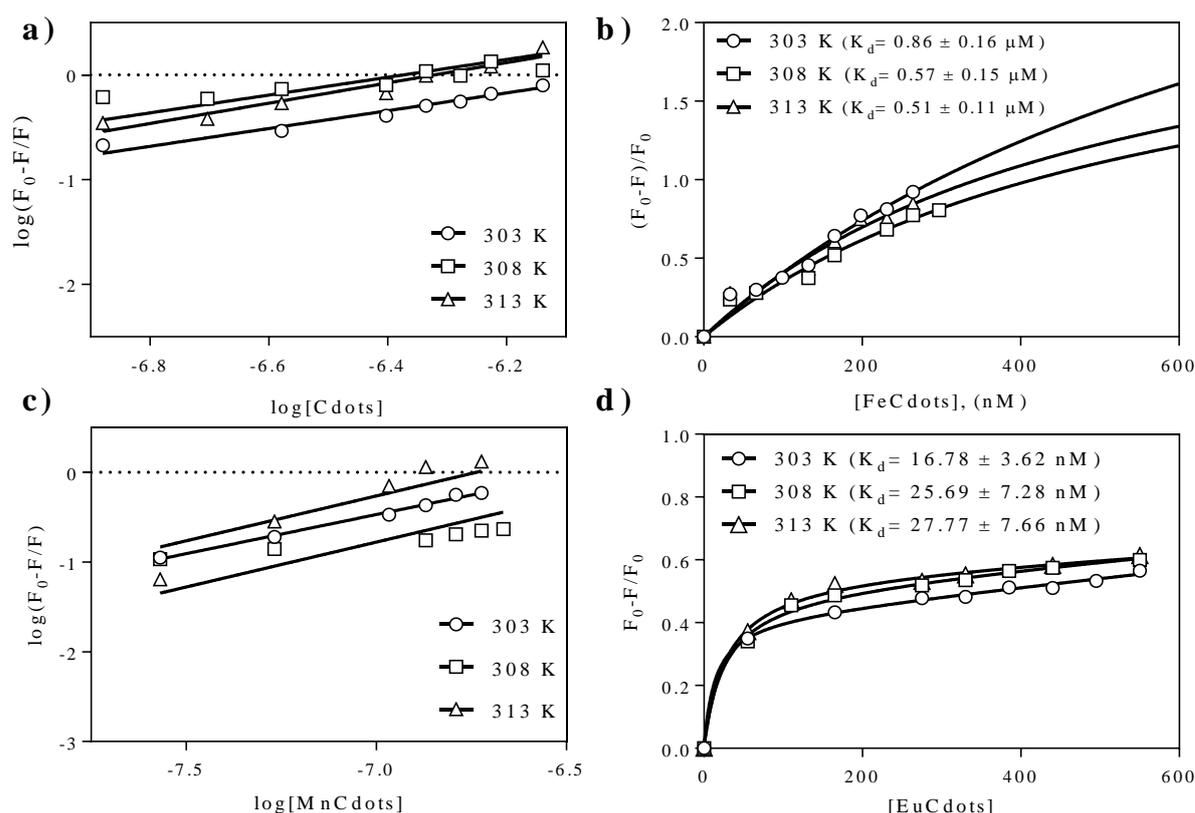
Fonte: A autora, 2021.

4.2.2 Constante de Ligação

Com o gráfico $\log x \log$ foi possível obter constantes importantes sobre as interações. Para os sistemas Tirosinase-Cdots e Tirosinase-MnCdots estudados (Figura 14 – **a**, **c**), observou-se linearidade e foram calculadas as constantes de ligação (K_a) e o número de sítios ligantes (n) por meio da equação (4), a partir dos valores de coeficiente angular e linear (APÊNDICE C).

Devido ao comportamento do sistema Tirosinase-FeCdots e Tirosinase-EuCdots, citado anteriormente, a constante de ligação K_a foi obtida de forma diferente, usando a equação (5), sendo determinado primeiramente o K_d e a partir dele o K_a , uma vez que $K_d^{-1} = K_a$ (Figura 14 – **b**, **d**).

Figura 14 – Gráficos representando o *fitting* realizado a partir dos dados de fluorescência e das equações citadas para a interação Tirosinase-CDs nas temperaturas de 303, 308 e 313 K: Cdots (a – equação (4)), FeCdots (b – equação (5)), MnCdots (c – equação (4)), e EuCdots (d – (5)).



Fonte: A autora, 2021.

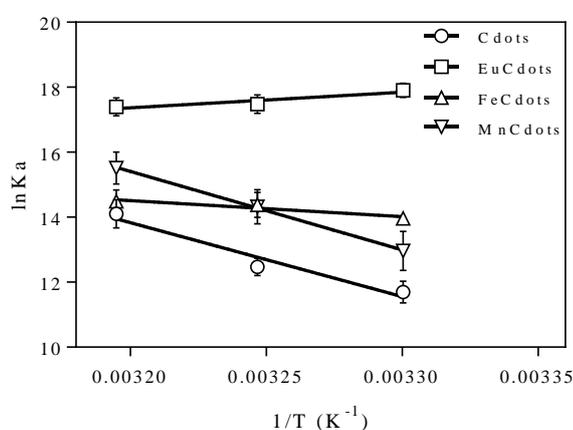
É notado que a proporção entre Tirosinase-CDs no complexo formado foi de aproximadamente 1:1 para o Cdots e MnCdots. Com relação as constantes de ligação, observa-se um aumento dessas com o aumento da temperatura, assim como o K_{sv} , validando o

mecanismo de supressão dinâmico para Cdots, FeCdots e MnCdots. Para o EuCdots o mecanismo estático foi confirmado pelo decréscimo de K_a com o aumento da temperatura. Além disso, os valores de $K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$ para todos os CDs concordam com os valores encontrados na literatura para a interação entre Tirosinase-Nanopartículas (GUO et al., 2015; PATIL et al., 2018; YANG et al., 2016). Também se observa o aumento progressivo de K_a a 313 K: Cdots < FeCdots < MnCdots < EuCdots, indicando que existe maior afinidade da enzima pelos CDs MnCdots e EuCdots.

4.2.3 Parâmetros Termodinâmicos

Para avaliar a espontaneidade e a natureza da interação Tirosinase-CDs usamos a equação (6) e (7), (Figura 15). Essas interações podem ocorrer através de interações eletrostáticas, forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e por interações de van der Waals, podendo ser estimadas de acordo com os valores de ΔH e ΔS (MOHAMMADZADEH-AGHDASH et al., 2017).

Figura 15 – Gráfico resultante da aplicação da equação de van't Hoff para a determinação dos parâmetros termodinâmicos para a interação Tirosinase-CDs.



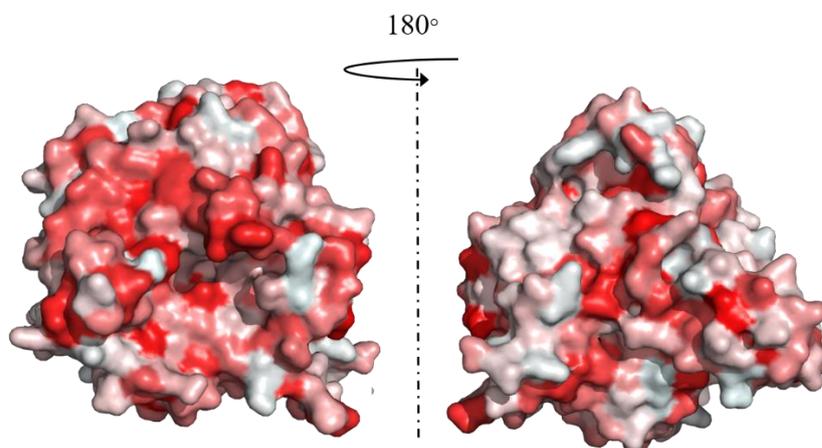
Fonte: A autora, 2021.

Como mostrado no (APÊNDICE C), todos os CDs apresentaram valores de $\Delta G < 0$, caracterizando as interações como sendo espontâneas. Nota-se que Cdots, FeCdots e MnCdots têm parâmetros termodinâmicos positivos e um processo de interação endotérmica. Enquanto isso, o EuCdots mostrou processo de interação exotérmico.

Os valores positivos de ΔH e ΔS sugerem que interações hidrofóbicas governam a formação do complexo Tirosinase-CDs para os Cdots, FeCdots e MnCdots

(MOHAMMADZADEH-AGHDASH et al., 2017; REHMAN et al., 2015). Já os valores de ΔH negativos e o ΔS positivo podem evidenciar que forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio têm um papel importante na interação entre EuCdots e a tirosinase (REHMAN et al., 2015; SHI et al., 2019; WANG et al., 2020). Devido à evidência de grupos carboxílicos e amínicos na superfície dos CDs, a ligação de hidrogênio pode ser formada entre esses grupos e os grupos de superfície da tirosinase, como os grupos amino. A superfície hidrofóbica da tirosinase mostra várias áreas com grupos altamente hidrofóbicos onde essa interação pode ocorrer, como os arredores do sítio ativo (Figura 16).

Figura 16 – Superfície Hidrofóbica da enzima tirosinase de cogumelo *Agaricus bisporus*, (PDBID: 2y9x). As áreas avermelhadas representam as porções hidrofóbicas da enzima.



Fonte: A autora, 2021.

Estudos de interação entre nanopartículas e proteínas mostram que as interações podem ser de vários tipos: van der Waals (GUO et al., 2015; YANG et al., 2016), eletrostática (BHATTACHARYA et al., 2016; GARCIA et al., 2019; YANG et al., 2016), e as mais comuns, ligação de hidrogênio e do tipo hidrofóbica (GARCIA et al., 2019; GUO et al., 2015; YANG et al., 2016), como neste trabalho. Sabendo que as nanopartículas de carbono (CDs) são majoritariamente compostas de carbono, é esperado que esses CDs interajam com a tirosinase por meio de forças hidrofóbicas, pois esse tipo de interação tende a estar presente, balanceando a energia na maioria das interações proteína-nanopartículas. Entretanto, como os quatro CDs possuem carga, as interações eletrostáticas não devem ser completamente negligenciadas (GARCIA et al., 2019).

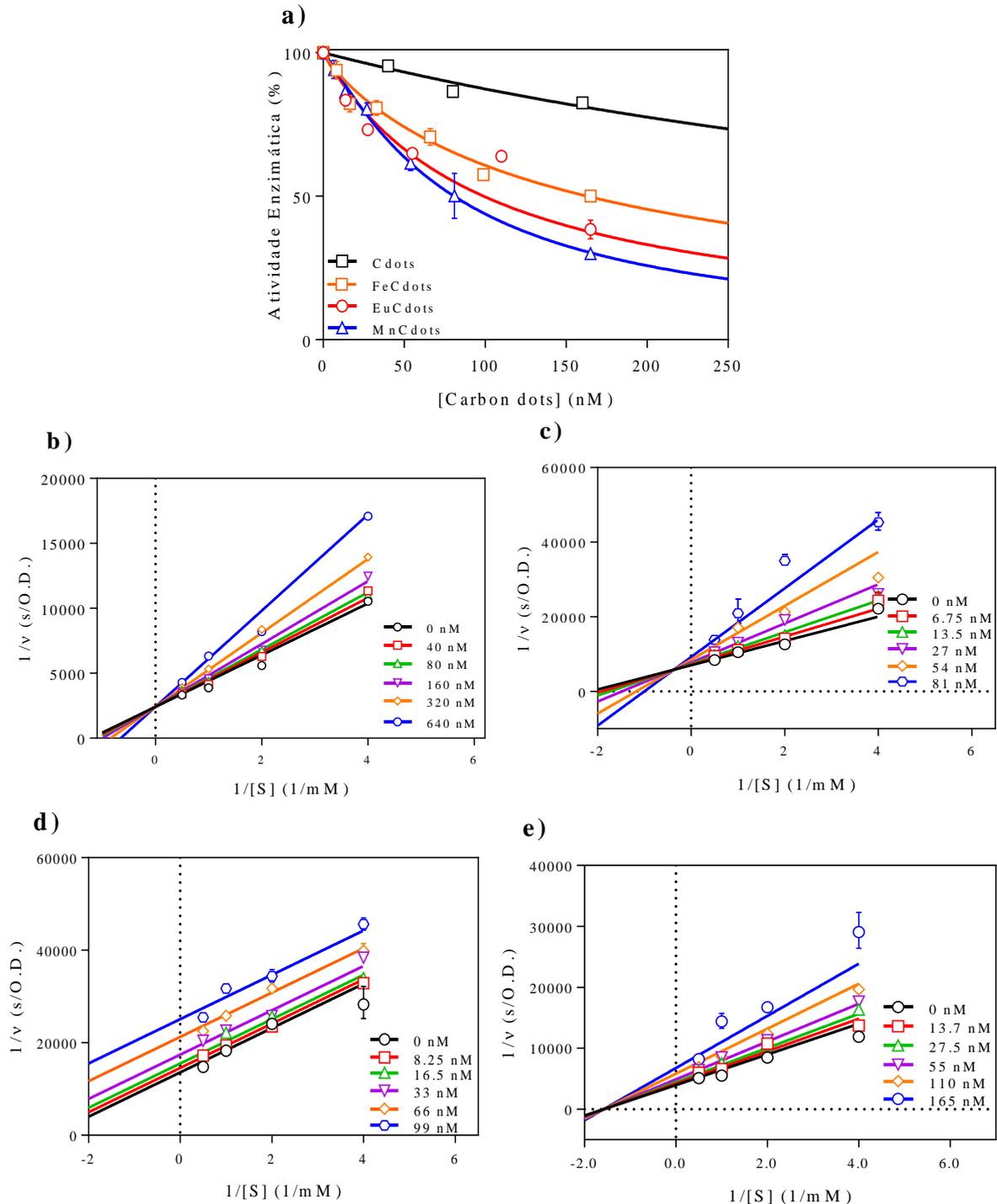
4.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os CDs foram testados quanto aos seus potenciais inibitórios frente à enzima tirosinase por meio de ensaios enzimáticos, utilizando o inibidor comercial ácido kójico como um inibidor de referência por ser o mais utilizado para esta finalidade tratando-se da tirosinase. A enzima tirosinase mais usada em testes desse tipo é a do cogumelo *Agaricus bisporus*, encontrada comercialmente já pronta para realização de ensaios.

O primeiro ensaio realizado testou o potencial dos CDs de inibir a ação da enzima tirosinase, impedindo a oxidação de L-DOPA a dopaquinona. O IC₅₀ é a concentração do inibidor para que a atividade enzimática diminuía em 50%, e nesse ensaio a atividade enzimática se mostrou dose-dependente, isto é, mantendo a concentração da enzima constante a atividade decresceu com o aumento da concentração dos CDs, que atuaram como inibidores (Figura 17 - **a**). Os valores de IC₅₀ alcançaram doses na ordem de nanomolar, seguindo uma ordem de efetividade similar aos valores de K_a .

O tipo de inibição também foi avaliado através de ensaios cinéticos com a enzima, o substrato e os CDs. O modelo da cinética enzimática seguido pela tirosinase foi estudado utilizando também o substrato L-DOPA, mostrando um comportamento típico descrito pelo modelo de Michaelis-Menten. Os gráficos desse modelo para a inibição da tirosinase pelos CDs e os valores das constantes de inibição estão detalhados no (APÊNDICE D). A linearização do gráfico de Michaelis-Mente, chamado de linearização de Lineweaver-Burk, nos permite visualizar e identificar de forma mais fácil o tipo de inibição que está ocorrendo, além da análise das constantes de inibição. Desta forma, obtivemos os gráficos linearizados mostrados na Figura 17 – **b**, **c** e **d**. O gráfico linearizado para a cinética com o Cdots (Figura 17 – **b**), mostra um comportamento típico de inibidor competitivo, onde $V_{m\acute{a}x}$ não muda e K_m aumenta. Para o MnCdots (Figura 17 – **c**), os resultados sugerem o tipo de inibidor misto (NELSON; COX, 2012), com linhas que se intersectam no segundo quadrante, mostrando o aumento de K_m e diminuição dos valores de $V_{m\acute{a}x}$ no gráfico. Assim, esses CDs podem se ligar com a enzima livre (E), e com o complexo enzima-substrato (ES). O FeCdots (Figura 17 – **d**) apresentou um conjunto de linhas paralelas, com valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ diminuindo, indicando uma inibição acompetitiva, na qual o inibidor se liga apenas à ES.

Figura 17 - Gráficos referentes à cinética enzimática da tirosinase na presença dos CDs, com a tirosinase na concentração de 25 nM e o substrato L-DOPA. a) é referente ao gráfico de IC50 dos quatro CDs. Linearização da equação de Michaelis-Menten, o gráfico Lineweaver-burk determinando o mecanismo de inibição enzimática: Cdots b), MnCdots c), FeCdots d), e EuCdots e) para a inibição da tirosinase de cogumelo na catálise do L-DOPA.



Fonte: A autora, 2021.

A Figura 17 – e mostra os resultados para o EuCdots, com linhas de diferentes coeficientes angulares que se encontram no eixo x. Os valores de K_m se mantêm os mesmos enquanto $V_{m\acute{a}x}$ diminui, indicando um inibidor não-competitivo. As constantes para os

inibidores se ligando a enzima livre (K_I) e ao complexo enzima-substrato (K_{IS}) estão apresentados na Tabela 1. Para fins de comparação, é possível utilizar valores de K_I e K_{IS} presentes na literatura para o ácido kójico, e para outros CDs já reportadas como inibidores, que estão também apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação das constantes de inibição da tirosinase na presença de CDs, e seus tipos de inibição.

Inibidor	IC50 (nM)	Tipo de Inibição	K_I (nM)	K_{IS} (nM)
Cdots	691,30	Competitiva	$517,7 \pm 170,4$	$698617,4 \pm 208726,20$
MnCdots	80,81	Mista	$44,28 \pm 8,83$	$256,47 \pm 92,86$
FeCdots	163,00	Acompetitiva	-	$117,00 \pm 10,34$
EuCdots	99,04	Não-competitiva	$234,8 \pm 31,75$	$234,8 \pm 31,75$
HNPs (YANG et al., 2016)	308	Mista	8944	30416
TSNPs (YANG et al., 2016)	4774	Mista	35548	149817
Kojic acid (LIU et al., 2017; XIE et al., 2016)	17940 ± 3750	-	36640	74350

HNPs = Nanopartículas ocas (hollow nanoparticles)

TSNPs = Nanopartículas de amido de tapioca (tapioca starch nanoparticles)

Fonte: A autora, 2021.

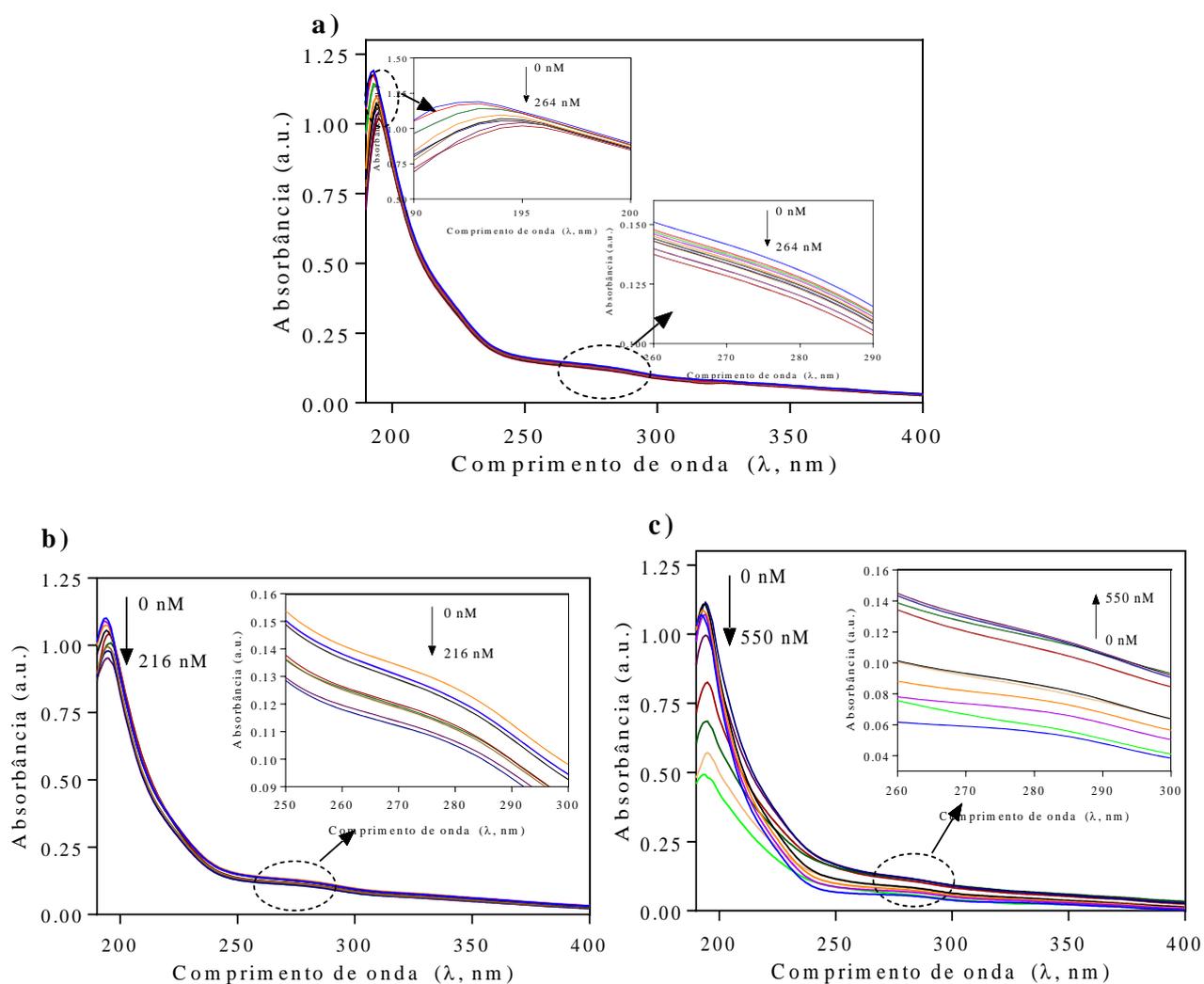
Considerando K_I a constante de dissociação para o complexo enzima-inibidor, quanto menor este valor mais eficaz é o inibidor. Comparando o valor K_I para os MnCdots e EuCdots com o valor do ácido kójico, a afinidade desses CDs para a enzima livre é até três ordens de grandeza maior do que o inibidor comercial. Além disso, de acordo com os valores de K_I , os CDs deste trabalho inibem a tirosinase aproximadamente duas a três ordens de grandeza mais efetivamente do que as nanopartículas de amido relatadas anteriormente. Em relação aos CDs deste trabalho, os valores de K_I indicam que as nanopartículas que têm maior afinidade pela tirosinase são MnCdots e EuCdots. Isso indica que a presença da função ácido e o potencial hidrofóbico por si só não garantem a eficiência na inibição, dando indícios que os grupos amina adicionais presentes nos MnCdots e EuCdots têm papel fundamental durante a inibição.

4.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS: MUDANÇAS CONFORMACIONAIS NA TIROSINASE

As proteínas possuem espectros de absorção no UV-Vis característicos, tornando essa uma ferramenta muito útil para identificar mudanças conformacionais e estimar o efeito da

interação de ligantes na estrutura da proteína (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016). O espectro UV-Vis da tirosinase apresenta duas bandas de absorção conhecidas por serem da absorção do *backbone* da proteína (~200 nm) e devido à absorção dos resíduos aromáticos, como Tyr, Trp e Phe (~280 nm); a presença de interação pode afetar o perfil de absorção, dando indícios das modificações estruturais (Figura 18) (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016; SHI et al., 2018a).

Figura 18 – Espectro de absorção UV-Vis da tirosinase (0.36 μM) na presença dos FeCdots **a**), MnCdots **b**) e EuCdots **c**), em 298 K. As concentrações dos CDs foram adicionadas em intervalos de 33, 27 e 55 nM, respectivamente.



Fonte: A autora, 2021.

Devido a performance de inibição dos CDs MnCdots, FeCdots e EuCdots, selecionamos tais nanopartículas para avaliar modificações estruturais na tirosinase causadas durante a interação. Esses CDs causaram diminuição na intensidade de absorção em ~200 nm, enquanto se observa uma pequena mudança na intensidade de absorção em ~280 nm devido a crescente adição de CDs na solução. Estas variações indicam que a conformação da tirosinase

muda devido a formação do complexo Tirosinase-CDs (CHEN et al., 2015b; SHI et al., 2018a). Adicionalmente, um pequeno deslocamento para o vermelho (~3 nm) sugere que a hidrofobicidade no microambiente dos resíduos aromáticos cresceu devido a interação (CHEN et al., 2015b; SHI et al., 2018b). Isso pode estar relacionado a carga positiva dessas nanopartículas, proporcionando um aumento de carga na superfície da enzima, conduzindo ao aumento das regiões hidrofóbicas da proteína (SANTOS, 2017).

4.5 *INSIGHTS* NA CORRELAÇÃO ENTRE RESULTADOS ENZIMÁTICOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS INTERAÇÕES: COMPARANDO OS CDS

Como regra geral, quando os nanomateriais interagem com enzimas provocam alterações estruturais, levando ao aumento ou inibição de sua atividade catalítica. Todas as características das nanopartículas (*e.g.*, tamanho, forma, cargas, grupos superficiais) são responsáveis em conjunto pelos diferentes efeitos na atividade enzimática (CHEN et al., 2017). Para comparar as características dos CDs, o potencial zeta e o tamanho dos Cdots, FeCdots, MnCdots, e EuCdots são apresentados na Tabela 2. Uma vez que todos os CDs possuem um núcleo de carbono, espera-se que haja interações hidrofóbicas entre eles e a tirosinase. A estratégia de agrupar frações hidrofóbicas fez com que esses *carbon dots* atingissem doses nanomolares de IC₅₀. A presença de metais e de grupos superficiais entre essas nanopartículas pode tornar a inibição mais efetiva, levando a tipos de inibições diferentes.

Tabela 2 – Tamanho e potencial zeta dos CDs.

Inibidor	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)
Cdots	5	-28,2
MnCdots	12	+8,16
FeCdots	10	+59,9
EuCdots	6	+58,9

Fonte: Adaptado de (GARCÍA, 2018).

O tamanho dos Cdots em torno de 5 nm pode levar esses CDs a se aproximarem do sítio ativo, uma área da enzima hidrofóbica e carregada positivamente (BARROS et al., 2019). Desta forma, interações eletrostáticas não devem ser descartadas devido a carga negativa do Cdots, e combinada às interações hidrofóbicas podem explicar o tipo de inibidor competitivo: Obstruindo a passagem para o sítio ativo e dificultando o acesso do substrato. No entanto, os Cdots ainda são muito grandes comparados com o tamanho da enzima e não podem acessar o sítio ativo de forma adequada, evitando a ligação forte à proteína. Além disso, a ressonância

dos grupos carbonila podem não favorecer as interações, dificultando a formação de interações eletrostática e a formação de ligações de hidrogênio entre os CDs e a tirosinase. Portanto, a característica hidrofóbica e os grupos oxigenados por si só não podem garantir um valor IC50 baixo para essa nanopartícula.

Comparando EuCdots e Cdots, ambos os CDs têm tamanhos semelhantes. Ainda assim, enquanto os Cdots têm uma carga superficial negativa, os EuCdots têm grupos superficiais diferentes (*e.g.*, NH₃), além dos grupos funcionais oxigenados, e uma carga superficial positiva. Os tipos de inibição geralmente estão associados à interação do inibidor com a enzima sozinha e o complexo enzima-substrato. O tipo não-competitivo de inibição apresentado pelos EuCdots pode indicar que ele interage com um sítio alostérico na tirosinase (HASSANI; HAGHBEEN; FAZLI, 2016). Sítios de ligação não específicos são relatados em outras metaloenzimas, e na tirosinase de cogumelo é um aspecto essencial que pode explicar a inibição não-competitiva (CERQUEIRA; FERNANDES; RAMOS, 2006; HASSANI; HAGHBEEN; FAZLI, 2016). As diferenças de carga e nos grupos de superfície podem permitir que EuCdots se liguem e penetrem não apenas no sítio ativo, mas também em um sítio alostérico, fazendo interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com a enzima (devido às frações NH₃ e CN, possuindo elétrons livres), como indicado pelos experimentos de fluorescência e UV-Vis, ajudando a diminuir o IC50 e aumentar o K_a.

Os MnCdots têm o dobro do tamanho dos EuCdots e sua carga parece ser quase uma combinação das cargas dos Cdots e dos EuCdots. Essas características podem explicar a inibição do tipo misto causada pelos MnCdots. Devido à distribuição dos grupos superficiais e ao grande tamanho, esses CDs podem atingir o sítio ativo e sítios não-específicos ao mesmo tempo e aumentar a inibição (diminuindo o IC50) por meio de um efeito sinérgico.

A inibição mista, e seu baixo K_I, podem também ser explicados pela possibilidade de deformar a estrutura da enzima afetando sua atividade (PENG et al., 2017b). Por exemplo, a estrutura secundária da α -quimiotripsina mudou devido à adsorção de nanotubos de carbono à superfície enzimática, levando à inibição (ZHAO; ZHOU, 2017). A deformação também pode facilitar a aproximação dos MnCdots às regiões hidrofóbicas nas áreas circundantes do sítio ativo e outras áreas hidrofóbicas.

Os EuCdots e FeCdots têm cargas superficiais semelhantes. No entanto, os EuCdots têm uma afinidade superior com a tirosinase do que os FeCdots. Uma explicação razoável pode ser a diferença de tamanho. Os EuCdots, por serem menores, têm algumas vantagens ao se aproximar das regiões hidrofóbicas próximas ao sítio ativo da enzima. Os EuCdots também podem interagir com a enzima por meio de uma ligação de hidrogênio, aumentando o valor de

Ka. Os FeCdots, por outro lado, são muito grandes e devido à identidade química superficial, apresentam poucas evidências de grupos NH, tendo um tipo distinto de inibição: não-competitivo, e um IC50 intermediário entre esses CDs. Este tipo de inibição indica que o inibidor só se liga ao complexo ES em uma região diferente do sítio ativo devido às mudanças conformacionais causadas pelo substrato (sítio de ligação não específico) (GHEIBI et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

A inibição enzimática é uma forma eficaz de controlar o comportamento indesejável da desregulação enzimática e suas consequências, podendo ser uma ferramenta útil no tratamento de melanomas. Para superar as desvantagens dos pequenos inibidores moleculares, propusemos a síntese de *carbon dots* hidrofóbicos, contendo porções amplamente encontradas nas moléculas usadas como inibidores. Os resultados confirmaram que a criação de conjuntos hidrofóbicos desempenhou um papel significativo na inibição da tirosinase, levando o IC50 das nanopartículas ao intervalo nM.

Resultados espectroscópicos mostraram que todos os CDs apresentam interações moderadas com a enzima com constantes de associação $K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$. Todos os CDs inibiram a tirosinase de forma satisfatória, sendo três ordens de grandeza mais potentes que o inibidor comercial ácido kójico, e aproximadamente duas a três ordens de grandeza mais efetivos que as nanopartículas de amido relatadas anteriormente. Dentre as quatro nanopartículas, as que mostraram a presença de grupos NH em sua superfície foram as que mostraram maior afinidade e capacidade de inibição, sendo estes os melhores inibidores desse trabalho: MnCdots ($K_i = 44,28 \pm 8,83 \text{ nM}$) e EuCdots ($K_i = 234,8 \pm 31,75 \text{ nM}$), evidenciando que a presença desses grupos pode ser um diferencial na inibição. Todos os CDs interagiram de forma espontânea com a tirosinase, com interações do tipo hidrofóbicas para os CDs, exceto EuCdots com interações hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio, provavelmente por possuir mais grupos amina. A natureza de cada interação terá um papel importante na afinidade com o alvo, nesse caso a tirosinase, e avaliar essa natureza por meio de estudos *in silico* pode nos dar melhor entendimento dos efeitos dos CDs na atividade da tirosinase.

O uso de *carbon dots* se mostra como uma alternativa na inibição da tirosinase e abrem caminho para inibidores mais biocompatíveis e eficientes. Isso pode mitigar as desvantagens de inibidores baseado em pequenas moléculas, além dos CDs possuírem grande potencial para futuras aplicações em tratamentos envolvendo melanomas e outras doenças correlacionadas à enzima tirosinase.

REFERÊNCIAS

- ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 2, p. 163–177, 4 jun. 2016.
- ARNDT, K. A.; FITZPATRICK, T. B. Topical Use of Hydroquinone as a Depigmenting Agent. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 194, n. 9, p. 965–967, 1965.
- BAJPAI, V. K. et al. Multifunctional N-P-doped carbon dots for regulation of apoptosis and autophagy in B16F10 melanoma cancer cells and in vitro imaging applications. **Theranostics**, v. 10, n. 17, p. 7841–7856, 2020.
- BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatology Research and Practice**, v. 2010, n. 1, 2010.
- BARROS, M. J. R. DE. **Inibição da Enzima Tirosinase por Compostos Furanosídicos e seus Efeitos sobre a Toxicidade em Células de Melanomas**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- BARROS, M. R. et al. Furan inhibitory activity against tyrosinase and impact on B16F10 cell toxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 1034–1041, set. 2019.
- BEACK, S. et al. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot – chlorin e6 – hyaluronate conjugate. **Acta Biomaterialia**, v. 26, p. 295–305, out. 2015.
- BHATTACHARYA, A. et al. Luminescence turn-on/off sensing of biological iron by carbon dots in transferrin. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 7, p. 5148–5158, 2016.
- BOAKYE-YIADOM, K. O. et al. Carbon dots: Applications in bioimaging and theranostics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 564, n. March, p. 308–317, 2019.
- BOYLE, J. L. et al. Tyrosinase Expression in Malignant Melanoma , Desmoplastic Melanoma , and Peripheral Nerve Tumors. **Arch Pathol Lab Med**, v. 126, n. July, 2002.
- BREATHNACH, A. C. et al. Azelaic acid therapy in disorders of pigmentation. **Clinics in Dermatology**, v. 7, n. 2, p. 106–119, 1989.
- BUITRAGO, E. et al. Are Human Tyrosinase and Related Proteins Suitable Targets for Melanoma Therapy? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 27, p. 3033–3047, 2016.
- BURLINGHAM, B. T.; WIDLANSKI, T. S. An Intuitive Look at the Relationship of K_i and IC_{50} : A More General Use for the Dixon Plot. **Journal of Chemical Education**, v. 80, n. 2, p. 214, 2003.

- CABEZUDO, I. et al. Effect directed synthesis of a new tyrosinase inhibitor with anti-browning activity. **Food Chemistry**, v. 341, n. July 2020, p. 128232, mar. 2021.
- CAMPBELL, K. et al. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry Fluorescence quenching of a poly (para -phenylene ethynylenes) by C 60 fullerenes. “**Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**”, v. 249, p. 41–46, 2012.
- Câncer de Pele**. Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2017. Disponível em: <<https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>>. Acesso em: 4 mar. 2021.
- Câncer de pele melanoma**. Instituto Nacional do Câncer, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 4 mar. 2021.
- CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 1–12, fev. 2020.
- CARVALHO, J. et al. Study of the interaction between indole-based compounds and biologically relevant G-quadruplexes. **Biochimie**, v. 135, p. 186–195, 2017.
- CASELLI, E. et al. Inhibition of Acinetobacter -Derived Cephalosporinase: Exploring the Carboxylate Recognition Site Using Novel β -Lactamase Inhibitors. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 337–348, 9 mar. 2018.
- CERQUEIRA, N. M. F. S. A.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Enzyme Ribonucleotide Reductase: Unraveling an Enigmatic Paradigm of Enzyme Inhibition by Furanone Derivatives. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 42, p. 21272–21281, out. 2006.
- CHANG, T.-S. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. **Materials**, v. 5, n. 9, p. 1661–1685, 17 set. 2012.
- CHEN, C.-Y. et al. An Updated Organic Classification of Tyrosinase Inhibitors on Melanin Biosynthesis. **Current Organic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 4–18, 2015a.
- CHEN, J. et al. Phloretin as both a substrate and inhibitor of tyrosinase: Inhibitory activity and mechanism. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 226, p. 117642, fev. 2020.
- CHEN, M. et al. The secondary and aggregation structural changes of BSA induced by trivalent chromium: A biophysical study. **Journal of Luminescence**, v. 158, p. 116–124, fev. 2015b.
- CHEN, M. et al. How Do Enzymes ‘Meet’ Nanoparticles and Nanomaterials? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 11, p. 914–930, nov. 2017.
- CLEMENT, B.; WEIDE, M.; ZIEGLER, D. M. Inhibition of Purified and Membrane-Bound Flavin-Containing Monooxygenase 1 by (N , N -Dimethylamino)stilbene Carboxylates †.

- Chemical Research in Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 599–604, jan. 1996.
- DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 7, p. 35–49, jun. 2018.
- DU, W. et al. Green synthesis of fluorescent carbon quantum dots and carbon spheres from pericarp. **Science China Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 863–870, 2015.
- FAN, Q. et al. Tyrosinase inhibitory effects and antioxidative activities of novel cinnamoyl amides with amino acid ester moiety. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1081–1087, set. 2012.
- FENNER, H. **Novos modelos estruturais para o sítio ativo de metaloenzimas de vanádio e cobre**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- FERREIRA, E. S. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. [s.l.] Departamento de Física e Matemática - USP - Tese de Doutorado, 2009.
- FUNAYAMA, M. et al. Effects of α - and β -arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 143–144, 1995.
- GARCIA, Y. S. et al. Probing the interaction of carbonaceous dots with transferrin and albumin: Impact on the protein structure and non-synergetic metal release. **Journal of Molecular Liquids**, v. 292, p. 111460, 2019.
- GARCÍA, Y. S. **Nanopartículas de carbono encapsuladas com íons metálicos Mn²⁺, Fe³⁺ e Eu³⁺, biocompatíveis para aplicação biológica como agente de contraste em MRI**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- GARCÍA, Y. S.; TODESCHINI, A. R.; NEVES, J. L. **Nanopartículas de carbono encapsuladas com íons metálicos Mn²⁺, Fe³⁺ e Eu³⁺, biocompatíveis para aplicação biológica como agente de contraste em MRI** BrazilINPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, , 2018.
- GARRETT, REGINALD H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. 4^a ed. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole, 2008.
- GHEIBI, N. et al. Dual effects of aliphatic carboxylic acids on cresolase and catecholase reactions of mushroom tyrosinase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1076–1081, 19 out. 2009.
- GHOSAL, K.; GHOSH, A. Carbon dots: The next generation platform for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 887–903, mar. 2019.
- GONÇALEZ, M. L.; CORRÊA, M. A.; CHORILLI, M. Skin Delivery of Kojic Acid-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **Medical Journal of Australia**, v. 209, n. 6, p. 261–266, 2013.

- GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108–4116, out. 1969.
- GUO, J. et al. Interaction study on bovine serum albumin physically binding to silver nanoparticles: Evolution from discrete conjugates to protein coronas. **Applied Surface Science**, v. 359, p. 82–88, 2015.
- HA, Y. M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-(substituted phenyl)thiazolidine-4-carboxylic acid derivatives as novel tyrosinase inhibitors. **Biochimie**, v. 94, n. 2, p. 533–540, fev. 2012.
- HAŁDYS, K.; LATAJKA, R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 378–389, 2019.
- HASSANI, S.; HAGHBEEN, K.; FAZLI, M. Non-specific binding sites help to explain mixed inhibition in mushroom tyrosinase activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 138–148, 2016.
- HAYWARD, N. K. et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. **Nature**, v. 545, n. 7653, p. 175–180, 2017.
- HINCHLIFFE, P. et al. Structural and Kinetic Studies of the Potent Inhibition of Metallo- β -lactamases by 6-Phosphonomethylpyridine-2-carboxylates. **Biochemistry**, v. 57, n. 12, p. 1880–1892, 27 mar. 2018.
- HORST, F. H. et al. From cow manure to bioactive carbon dots: a light-up probe for bioimaging investigations, glucose detection and potential immunotherapy agent for melanoma skin cancer. **RSC Advances**, v. 11, n. 11, p. 6346–6352, 2021.
- HU, J.-J. et al. Functionalized carbon quantum dots with dopamine for tyrosinase activity analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 995, p. 99–105, dez. 2017.
- HU, L. et al. Chiral evolution of carbon dots and the tuning of laccase activity. **Nanoscale**, v. 10, n. 5, p. 2333–2340, 2018.
- ISMAYA, W. T. et al. Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. **Biochemistry**, v. 50, n. 24, p. 5477–5486, 21 jun. 2011.
- JIANG, K. et al. Red, Green, and Blue Luminescence by Carbon Dots: Full-Color Emission Tuning and Multicolor Cellular Imaging. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 18, p. 5360–5363, 27 abr. 2015.
- JUNG, H. J. et al. (E)-1-(Furan-2-yl)-(substituted phenyl)prop-2-en-1-one Derivatives as Tyrosinase Inhibitors and Melanogenesis Inhibition: An In Vitro and In Silico Study. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5460, nov. 2020.

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life**. 4th. ed. New York: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

KEIZER, J. Nonlinear Fluorescence Quenching and the Origin of Positive Curvature in Stern-Volmer Plots. **Journal of American Chemical Society**, v. 105, n. 6, p. 1494–1498, 1983.

KHATIB, S. et al. Enhanced Substituted Resorcinol Hydrophobicity Augments Tyrosinase Inhibition Potency. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2676–2681, maio 2007.

KIM, D. H. et al. Browning control of fresh-cut lettuce by phytoncide treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 188–192, 2014.

KIM, Y. J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 15, p. 1707–1723, 2005.

KOBAYASHI, T. et al. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. **EMBO J.**, v. 13, n. 24, p. 5818–5825, 1994.

KRUEGER, R. C. The inhibition of tyrosinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 57, n. 1, p. 52–60, jul. 1955.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3^a ed. New York: Springer, 2006.

LANGAT, M. K. et al. The effect of isolates from *Cassipourea flanaganii* (Schinz) alston, a plant used as a skin lightning agent, on melanin production and tyrosinase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, n. July 2020, p. 113272, jan. 2021.

LEE, K.-C. et al. Structural characteristics of thiosemicarbazones as inhibitors of melanogenesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 22, p. 6794–6796, nov. 2010.

LI, H. et al. Tuning Laccase Catalytic Activity with Phosphate Functionalized Carbon Dots by Visible Light. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 18, p. 10004–10012, 13 maio 2015a.

LI, S. et al. Nontoxic Carbon Dots Potently Inhibit Human Insulin Fibrillation. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 5, p. 1764–1771, 10 mar. 2015b.

LI, S. et al. “Dark” carbon dots specifically “light-up” calcified zebrafish bones. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 46, p. 7398–7405, 2016.

LIANG, Q. et al. Easy synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from gelatin and their luminescent properties and applications. **Carbon**, v. 60, p. 421–428, 2013.

LIU, D. M. et al. Kinetics and inhibition study of tyrosinase by pressure mediated microanalysis. **Analytical Biochemistry**, v. 525, p. 54–59, 2017.

- LIU, Z.; LIANG, X.-J. Nano-Carbons as Theranostics. **Theranostics**, v. 2, n. 3, p. 235–237, 2012.
- MAHMOUDI, M. et al. Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5610–5637, 14 set. 2011.
- MAHOMOODALLY, M. F. et al. In Vitro Enzyme Inhibitory Properties, Secondary Metabolite Profiles and Multivariate Analysis of Five Seaweeds. **Marine Drugs**, v. 18, n. 4, p. 198, abr. 2020.
- MESSERSCHMIDT, A. Copper Metalloenzymes. **Comprehensive Natural Products II**, v. 2, p. 489–545, 2010.
- MIOT, L. D. B. et al. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623–635, dez. 2009.
- MOHAMMADZADEH-AGHDASH, H. et al. Multi-spectroscopic and molecular modeling studies of bovine serum albumin interaction with sodium acetate food additive. **Food Chemistry**, v. 228, p. 265–269, 2017.
- MOLLER, M.; DENICOLA, A. Protein Tryptophan Accessibility Studied by Fluorescence Quenching. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 30, n. 3, p. 175–178, 2002.
- NASRIN, A. et al. Conjugated ternary doped carbon dots from vitamin B derivative: Multispectral nanoprobe for targeted melanoma bioimaging and photosensitization. **Journal of Luminescence**, v. 217, p. 116811, jan. 2020.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6^a ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2012.
- OISO, N. et al. Allergic contact dermatitis caused by arbutin and dipotassium glycyrrhizate in skin-lightening products. **Contact Dermatitis**, v. 77, n. 1, p. 51–53, jul. 2017.
- PATIL, S. et al. Melanin-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Affinity Towards Tyrosinase 1. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 163–172, 2018.
- PAULA, N. T. G. DE et al. Use of Carbon Dots Synthesized from Citrate as a Fluorescent Probe for Quercetin Determination in Tea and Beer Samples. **Jornal of Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2355–2366, 2019.
- PENG, Z. et al. Carbon dots: promising biomaterials for bone-specific imaging and drug delivery. **Nanoscale**, v. 9, n. 44, p. 17533–17543, 2017a.
- PENG, Z. et al. Carbon dots : Biomacromolecule interaction , bioimaging and nanomedicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 343, p. 256–277, 2017b.
- PICHARDO-MOLINA, J. L. et al. Fluorescent carbon nanoparticles synthesized from bovine

- serum albumin nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 724–731, jan. 2020.
- PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; NAMASIVAYAM, V. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 403–425, 2017.
- POLANYI, M. Science and Man. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 63, n. 9, p. 969–976, set. 1970.
- PRETZLER, M.; ROMPEL, A. What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. **Inorganica Chimica Acta**, v. 481, p. 25–31, 2018.
- PURICH, D. L. **Enzyme Kinetics: Catalysis & Control**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010.
- QIAN, M. et al. Structural Basis of Fullerene Derivatives as Novel Potent Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B: Insight into the Inhibitory Mechanism through Molecular Modeling Studies. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 10, p. 2024–2034, 24 out. 2016.
- RAMSDEN, C. A.; RILEY, P. A. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 2388–2395, 2014.
- REHMAN, S. U. et al. Deciphering the interactions between chlorambucil and calf thymus DNA: A multi-spectroscopic and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 566, n. December, p. 7–14, jan. 2015.
- RHO, H. S. et al. New 5-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one Derivative Has Both Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Properties. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 471–473, 20 mar. 2007.
- RHO, H. S. et al. Kojyl thioether derivatives having both tyrosinase inhibitory and anti-inflammatory properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 22, p. 6569–6571, nov. 2010.
- ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 15 nov. 2015.
- ROLFF, M. et al. Copper–O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 4077, 2011.
- SAGBAS, S.; SAHINER, N. Carbon dots: preparation, properties, and application. In: **Nanocarbon and its Composites**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 651–676.
- SAHU, S. et al. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice:

Application as excellent bio-imaging agents. **Chemical Communications**, v. 48, n. 70, p. 8835–8837, 2012.

SAILAJA PRASANNAKUMARAN NAIR, S.; KOTTAM, N.; S G, P. K. Green Synthesized Luminescent Carbon Nanodots for the Sensing Application of Fe³⁺ Ions. **Journal of Fluorescence**, v. 30, n. 2, p. 357–363, 19 mar. 2020.

SANTOS, J. C. N. **Estudos de Interação do Timerosal com Albumina de Soro Bovino (BSA) Simulando Condições Fisiológicas e Empregando Técnicas Espectroscópicas: Mecanismo e Perfil de Fibrilação Proteica**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2017.

SHAO, L. LE et al. Novel hydroxypyridinone derivatives containing an oxime ether moiety: Synthesis, inhibition on mushroom tyrosinase and application in anti-browning of fresh-cut apples. **Food Chemistry**, v. 242, n. September 2017, p. 174–181, 2018.

SHI, J.-H. et al. Multi-spectroscopic and molecular modeling approaches to elucidate the binding interaction between bovine serum albumin and darunavir, a HIV protease inhibitor. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 188, p. 362–371, jan. 2018a.

SHI, J.-H. et al. Elucidation of intermolecular interaction of bovine serum albumin with Fenhexamid: A biophysical prospect. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, n. December 2017, p. 125–133, mar. 2018b.

SHI, J.-H. et al. Exploring the binding interaction between herring sperm DNA and sunitinib: insights from spectroscopic and molecular docking approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 4, p. 837–845, 4 mar. 2019.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, dez. 2016a.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 19 dez. 2016b.

SITTAMPALAM, G. et al. Assay Guidance Manual. **Assay Guidance Manual**, n. Md, p. 305–336, 2016.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry**. 6^av ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2008.

SWAPNA, M. S.; SANKARARAMAN, S. Order fluctuation induced tunable light emission from carbon nanosystem. **International Nano Letters**, v. 9, n. 3, p. 221–229, 24 set. 2019.

THANIGAIMALAI, P. et al. Structural requirement(s) of N-phenylthioureas and benzaldehyde thiosemicarbazones as inhibitors of melanogenesis in melanoma B 16 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 9, p. 2991–2993, maio 2010.

The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, LLC, , [s.d.].

VAZ, R. et al. High luminescent carbon dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Cr(VI) determination in water and soil samples. **Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**, v. 346, n. Vi, p. 22, 2017.

VIDEIRA, I. F. DOS S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 1, p. 76–83, fev. 2013.

WAGNER, J. K. et al. Skin Responses to Ultraviolet Radiation: Effects of Constitutive Pigmentation, Sex, and Ancestry. **Pigment Cell Research**, v. 15, n. 5, p. 385–390, out. 2002.

WANG, B. L. et al. Investigation on the binding behavior between BSA and lenvatinib with the help of various spectroscopic and in silico methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 1204, p. 127521, 2020.

WANG, H. et al. Magnetic iron oxide–fluorescent carbon dots integrated nanoparticles for dual-modal imaging, near-infrared light-responsive drug carrier and photothermal therapy. **Biomater. Sci.**, v. 2, n. 6, p. 915–923, 2014.

WANG, L.; ZHOU, H. S. Green Synthesis of Luminescent Nitrogen-Doped Carbon Dots from Milk and Its Imaging Application. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 18, p. 8902–8905, 16 set. 2014.

XIE, J. et al. Inhibitory effect of synthetic aromatic heterocycle thiosemicarbazone derivatives on mushroom tyrosinase: Insights from fluorescence, ¹H NMR titration and molecular docking studies. **Food Chemistry**, v. 190, p. 709–716, jan. 2016.

XIE, L.-P. et al. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 68, n. 4, p. 487–91, 2003.

XU, Z. Q. et al. Interactions between carbon nanodots with human serum albumin and γ -globulins: The effects on the transportation function. **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 242–249, 2016.

YANG, J. et al. The inhibition effect of starch nanoparticles on tyrosinase activity and its mechanism. **Food and Function**, v. 7, n. 12, p. 4804–4815, 2016.

YANG, S.-T. et al. Carbon Dots for Optical Imaging in Vivo. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 32, p. 11308–11309, 19 ago. 2009.

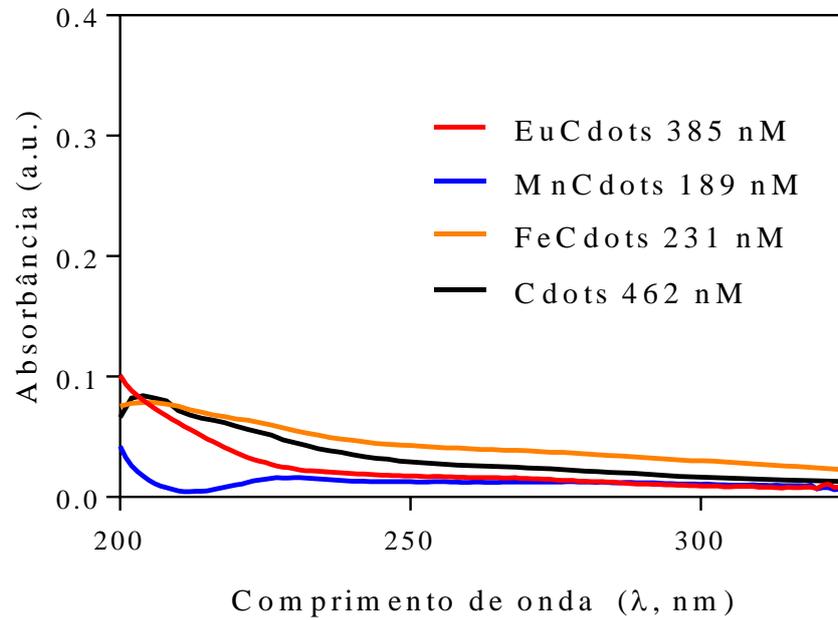
ZHANG, Z. et al. Protein as the source for synthesizing fluorescent carbon dots by a one-pot hydrothermal route. **RSC Advances**, v. 2, p. 8599–8601, 2012.

ZHAO, D.; ZHOU, J. Electrostatics-mediated α -chymotrypsin inhibition by functionalized single-walled carbon nanotubes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 2, p. 986–995, 2017.

ZHENG, Z.-P. et al. One-pot green synthesis of 1,3,5-triarylpentane-1,5-dione and triarylmethane derivatives as a new class of tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 3, p. 795–798, fev. 2016.

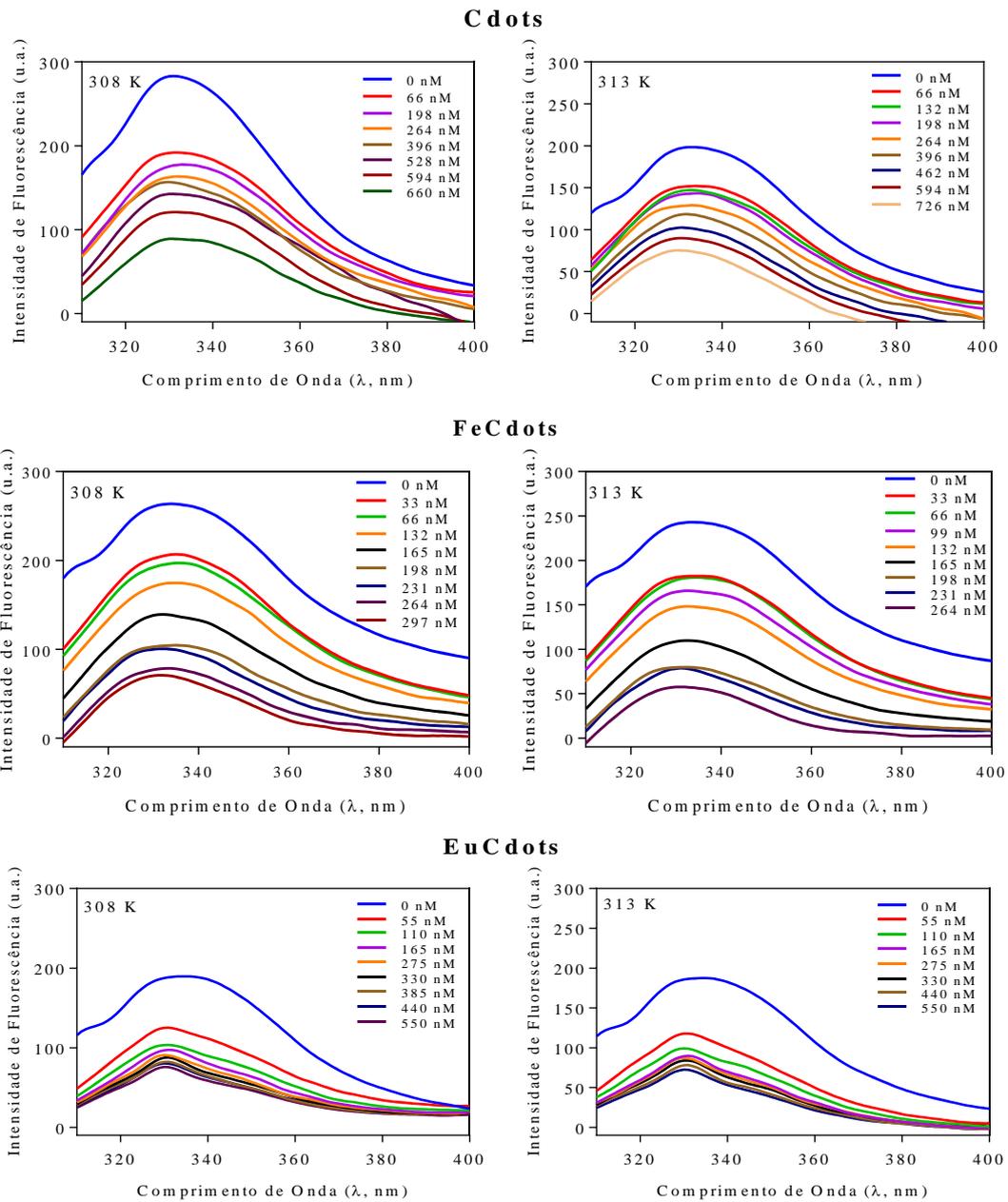
ZHU, C.; ZHAI, J.; DONG, S. Bifunctional fluorescent carbon nanodots : green synthesis via soy milk and application as metal-free electrocatalysts for oxygen reduction w. **Chemical Communications**, v. 48, n. C, p. 9367–9369, 2012.

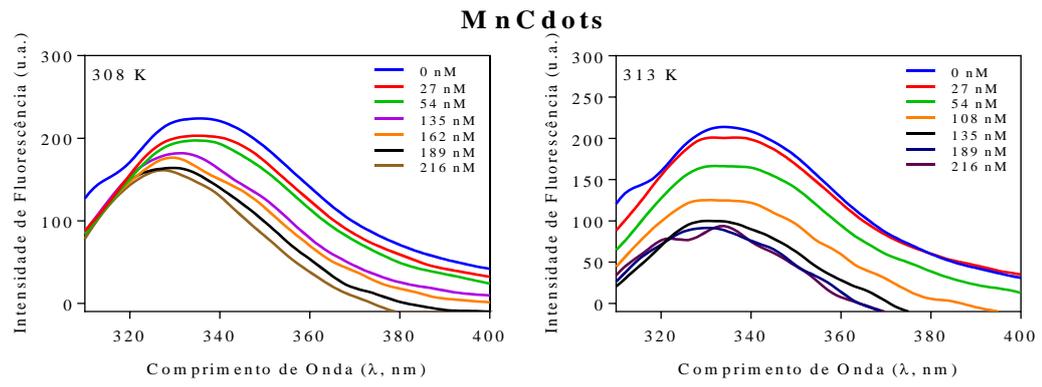
ZHU, Y. et al. Inhibitory Mechanism of Salidroside on Tyrosinase. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 10, p. 698–703, 2014.

APÊNDICE A – ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DOS CDS EM 298 K.

Fonte: A autora, 2021.

**APÊNDICE B – ESPECTROS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA ENZIMA
TIROSINASE A 35°C E 40°C (308 K E 313K - $\lambda_{exc.}$ = 280 NM), EM TAMPÃO
FOSFATO (pH 6,9), NA PRESENÇA DOS CDS.**





APÊNDICE C – PARÂMETROS ESPECTROSCÓPICOS DA INTERAÇÃO DA TIROSINASE COM OS CDS.

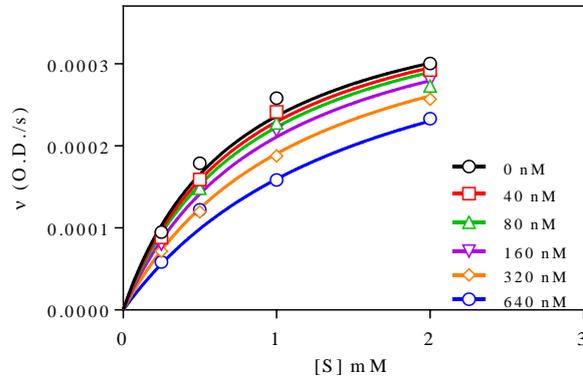
Tabela 3 – Parâmetros espectroscópicos da tirosinase na presença de CDs, constantes de ligação (K_a) e parâmetros termodinâmicos em várias temperaturas.

NP	T (K)	K_{sv} ($\times 10^6 M^{-1}$)	K_a ($\times 10^6 M^{-1}$)	n	ΔH ($kJ.mol^{-1}$)	ΔS ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)	ΔG ($kJ.mol^{-1}$)
Cdots	303	1.10 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.85 ± 0.14	189.28 ± 57.60	720.74 ± 144.00	-29.10 ± 10.59
	308	2.03 ± 0.58	0.26 ± 0.07	0.85 ± 0.16			-32.69 ± 11.90
	313	2.21 ± 0.11	1.33 ± 0.58	0.97 ± 0.29			-36.31 ± 13.23
MnCdots	303	3.26 ± 0.07	0.43 ± 0.26	0.87 ± 0.04	200.86 ± 10.54	770.87 ± 34.21	-32.72 ± 2.25
	308	26.73 ± 4.28	1.66 ± 0.88	1.01 ± 0.02			-36.57 ± 2.51
	313	27.11 ± 8.09	5.44 ± 2.69	1.04 ± 0.03			-40.43 ± 2.78
FeCdots	303	7.59 ± 2.32	1.16 ± 0.18	-	40.88 ± 14.40	251.41 ± 72.00	-35.30 ± 15.96
	308	6.29 ± 1.36	1.76 ± 0.38	-			-36.56 ± 16.53
	313	8.25 ± 2.40	1.95 ± 0.35	-			-37.81 ± 17.01
EuCdots	303	28.41 ± 6.25	59.59 ± 12.85	-	-39.87 ± 14.40	50.24 ± 14.40	-55.09 ± 25.40
	308	23.15 ± 3.07	38.93 ± 11.04	-			-55.34 ± 25.51
	313	22.90 ± 3.67	36.01 ± 9.94	-			-55.59 ± 25.63

Fonte: A autora, 2021.

**APÊNDICE D – GRÁFICOS DE MICHAELIS-MENTEN DA ENZIMA TIROSINASE
COM OS CDS E SUAS RESPECTIVAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO.**

C dots



Inibidor do tipo competitivo

$$K_m = 0.7517 \pm 0.0725 \text{ mM}$$

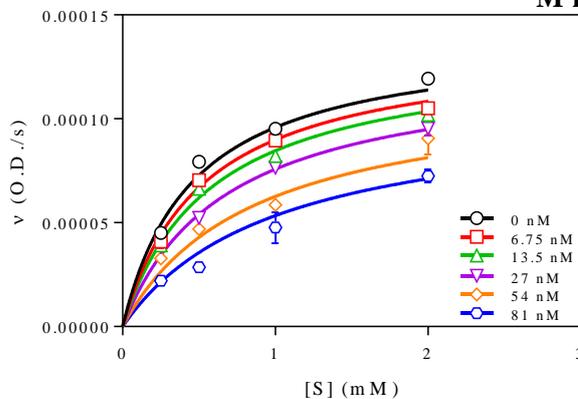
$$V_{\text{máx}} = 0.4135 \pm 0.0167 \text{ mO.D./s}$$

$$\alpha = 1222 \pm 25.19$$

$$K_I = 571.7 \pm 170.4 \text{ nM}$$

$$K_{IS} = (\alpha K_I) = 698617.4 \pm 208726.2 \text{ nM}$$

Mn C dots



Inibidor do tipo Misto

$$K_m = 0.464 \pm 0.059 \text{ mM}$$

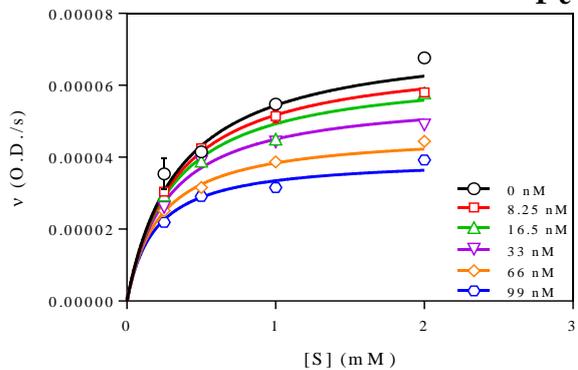
$$V_{\text{máx}} = 0.140 \pm 0.006 \text{ mO.D./s}$$

$$\alpha = 5.792 \pm 1.75$$

$$K_I = 44.29 \pm 8.83 \text{ nM}$$

$$K_{IS} = (\alpha K_I) = 256.47 \pm 92.86 \text{ nM}$$

Fe C dots



**Inibidor do tipo A competitivo
(uncompetitive)**

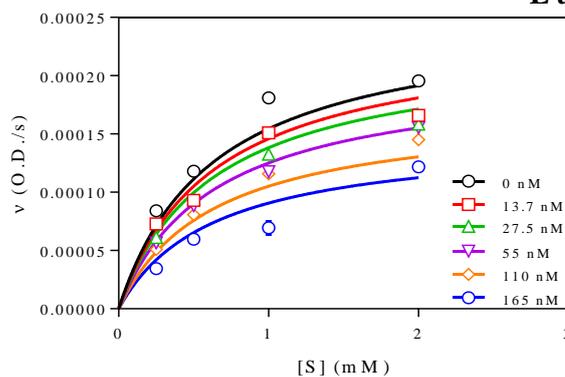
$$K_m = 0.352 \pm 0.02975 \text{ mM}$$

$$V_{\text{máx}} = 0.0736 \pm 0.0022 \text{ mO.D./s}$$

$$K_I = - \text{ (acompetitive)}$$

$$K_{IS} = (\alpha K_I) = 117.00 \pm 10.34 \text{ nM}$$

Eu C dots



**Inibidor do tipo não-competitivo
(noncompetitive)**

$$K_m = 0.633 \pm 0.0809 \text{ mM}$$

$$V_{\text{máx}} = 0.252 \pm 0.014 \text{ mO.D./s}$$

$$K_I = 234.8 \pm 31.75 \text{ nM}$$

ANEXO A – DEDUÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN

As constantes k_1 e k_{-1} que aparecem na equação do equilíbrio, representam as constantes de velocidade da formação do complexo enzima-substrato e da dissociação desse complexo, respectivamente. Nesse modelo, a segunda etapa da reação é representada pela constante de velocidade k_2 . Como no início da reação a quantidade de produto no meio reacional é considerada desprezível, é possível tornar mais simples as etapas posteriores ignorando a reação inversa da segunda etapa da reação ($E + P \xrightarrow{k_{-2}} ES$). (SITTAMPALAM et al., 2016)

Assim, é possível chegar à lei de velocidade que descreve o comportamento cinético da enzima na presença de um substrato. Analisando a Figura 7, há dois sentidos possíveis para a reação que envolve o complexo ES avançar. A primeira possibilidade é a formação do produto (P) e a liberação da enzima na forma livre (E), com constante de velocidade k_2 . A segunda é a dissociação do complexo em E e S, com constante de velocidade k_{-1} . É factível assumir que quase não há conversão de produto a substrato, uma vez que a concentração de produto ainda é pequena nos estágios iniciais de uma reação. (STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008)

Como já mencionado, a etapa lenta é a da quebra do complexo ES liberando o produto, logo esta é a etapa determinante da velocidade de reação, que é descrita como:

$$V_0 = k_2[ES] \quad (1)$$

Uma vez que ES é formado em um breve período da reação (estado pré-estacionário) sua determinação é dificultada. (NELSON; COX, 2012) Por isso é necessário descrever [ES] em termos de constantes mais facilmente identificadas na reação. Assim, a velocidade de formação e quebra do complexo ES é descrita pelas expressões: (STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008)

$$V_{fES} = k_1[E][S] \quad (2)$$

$$V_{qES} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

Utilizando o conceito de estado estacionário, onde a concentração de qualquer espécie intermediária é constante ao longo da reação, é possível igualar as expressões (2) e (3), supondo que as velocidades de formação e quebra de ES têm velocidades iguais. (NELSON; COX, 2012) Assim, temos a expressão (4) que quando resolvida em função das constantes de velocidade têm-se a expressão (5):

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

$$[E][S]/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1 \equiv [ES] = [E][S]/K_m \quad (5)$$

O conjunto destas constantes de velocidade é chamado de constante de Michaelis-Menten. (NELSON; COX, 2012; SITTAMPALAM et al., 2016; STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008)

Como a expressão acima ainda tem o intermediário [ES], temos que introduzir mais uma equação. Sabendo que a concentração total de enzima é a soma entre as concentrações de enzima livre e da enzima no complexo com o substrato, temos a expressão (6), (NELSON; COX, 2012; STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008) que quando é substituída na expressão (5), temos a expressão (7).

$$E_T = [E] + [ES] \quad (6)$$

$$[ES] = ([E_T] - [ES])[S]/K_m \quad (7)$$

Quando se resolve a expressão (7) para [ES], se obtém após alguns passos a expressão (8), que quando substituída na expressão (1), temos a expressão (9):

$$[ES] = [E_T][S]/(K_m + [S]) \quad (8)$$

$$V_0 = k_2[E_T][S]/(K_m + [S]) \quad (9)$$

A expressão (9) já descreve a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima, mas pode ainda ser mais simplificada. (NELSON; COX, 2012) Se levarmos em conta que $V_{m\acute{a}x}$ é alcançada quando a enzima se encontra saturada, podemos considerar a igualdade $[E_T] = [ES]$, logo $V_{m\acute{a}x} = k_2[E_T]$.

Assim, a equação de Michalis-Menten, que é a equação de velocidade de uma reação catalisada por uma enzima na presença de um único substrato, assume a sua forma mais típica: (NELSON; COX, 2012; SITTAMPALAM et al., 2016; STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008)

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (10)$$

Essa equação nos fornece relações importantes entre K_m e a concentração do substrato. Quando $K_m = [S]$, então $V_0 = V_{m\acute{a}x}/2$, ou seja, K_m é uma constante que diz a concentração do substrato na qual a velocidade da reação cai à metade. (NELSON; COX, 2012; STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008)