



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020020146-8 A2



(22) Data do Depósito: 30/09/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 12/04/2022

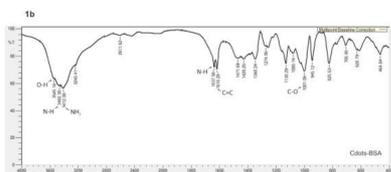
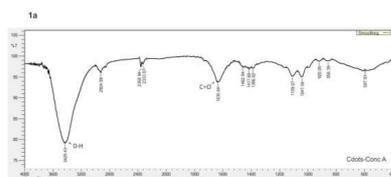
(54) **Título:** NANOPARTÍCULAS DE CARBONO BIOCOMPATÍVEIS PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA COMO MODULADORES ENZIMÁTICOS.

(51) **Int. Cl.:** C12N 9/00; C01B 32/05; C12Q 1/25.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** LUCAS PEREIRA SOUZA DA SILVA; JORGE LUIZ NEVES; MARCELA JACINTA RODRIGUES DE BARROS.

(57) **Resumo:** NANOPARTÍCULAS DE CARBONO BIOCOMPATÍVEIS PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA COMO MODULADORES ENZIMÁTICOS. A presente patente de invenção caracteriza-se pela obtenção de sistemas de nanopartículas de carbono biocompatíveis para atuação como moduladores enzimáticos direcionados para o tratamento e prevenção de doenças, conservação de alimentos e aspectos ambientais. As nanopartículas de carbono do tipo pontos de carbono exibem um forte efeito reversível sobre a atividade catalítica das enzimas. Onde, através dos ensaios e parâmetros cinéticos, uma das nanopartículas possui efeito inibitório podendo ser utilizada no tratamento de doenças e outra possui efeito modulador, podendo ser aplicada, por exemplo, no tratamento de efluentes. Os experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência molecular, demonstram uma interação de moderada a forte entre as nanopartículas e a enzima, sendo responsável pelos efeitos exercidos sobre a atividade catalítica.



Nanopartículas de carbono biocompatíveis para aplicação biológica como moduladores enzimáticos.

Campo da Invenção

[001] A presente patente de invenção caracteriza-se pela obtenção de sistemas de nanopartículas de carbono biocompatíveis para atuação como inibidores e/ou moduladores enzimáticos direcionados para o tratamento e prevenção de doenças, conservação de alimentos e aspectos ambientais.

Fundamentos da Invenção

[002] As macromoléculas presentes nos organismos vivos, como lipídeos, ácido nucléicos e proteínas, desempenham funções biológicas importantes. Dentre as moléculas proteicas, podemos destacar as enzimas, que modulam diversas respostas fisiológicas, pois estão envolvidas em diversas reações biológicas, tanto em processos naturais dentro de um organismo vivo, quanto em processos sintéticos, em aplicações industriais.

[003] Muitos estudos estão direcionados a desenvolver substâncias que aumentam a atividade catalítica das enzimas, no entanto, em outras situações é necessário uma diminuição ou inibição da atividade enzimática. Essa estratégia vem sendo utilizada em diversas situações tais como, a conservação de alimentos in natura ou industrializados, agentes terapêuticos no combate a microorganismos, principalmente vírus e bactérias, além de sua aplicação no tratamento de diversas doenças humanas, que possuem enzimas como principal alvo terapêutico.

[004] A patente KR20160072174 descreve uma composição com atividade herbicida, constituída por derivados do Ariloxifenoxipropionato, cujo mecanismo de ação está baseado na inibição da enzima acetil-CoA carboxilase. No pedido de patente CN100579582C é descrito o uso de inibidores das enzimas dipeptidil peptidase IV e alanil aminopeptidase para o tratamento e profilaxia da arteriosclerose e alergias. Já na patente

KR101912850B1 apresenta uma série de compostos que tem a capacidade de modular a atividade enzimática de metaloenzimas.

[005] Apesar de já ter sido sintetizado e estudado inúmeras substâncias que modulam a atividade catalítica de diversas enzimas, ainda se faz necessário o estudo de novos compostos com a mesma finalidade. Pois, a maioria dessas substâncias são moléculas tradicionais, de natureza orgânica, que apresentam diversas limitações de uso, como baixa solubilidade, alta toxicidade, acentuados efeitos colaterais, e além disso, muitas delas são fotossensíveis ou susceptíveis a degradação quando inserida nos meios biológicos, até mesmo pelas próprias enzimas.

[006] Com o intuito de contornar esses problemas, ao longo dos últimos anos surgiram vários estudos sobre como as nanopartículas e os nanomateriais interagem com proteínas e enzimas, e como eles interferem na atividade catalítica dessas biomoléculas. A patente US20180243336 demonstra o uso de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO – Np) que atuam como inibidor enzimático, causando um efeito antimicrobiano. Outro estudo, descrito na patente US20080103459, demonstra que nanopartículas de argila contendo alumínio e magnésio em sua composição, são capazes de inibir enzimas como lipases e proteases, com a finalidade de tratar dermatites causadas por enzimas fecais.

[007] Dos vários tipos de nanomateriais que foram desenvolvidos, as nanopartículas de carbono, como o grafeno, os nanotubos (CNTs) e quantum dots (QDs), que tem despertado bastante interesse na área da medicina e biotecnologia. Recentemente, na patente WO2014175635, foi descrito o uso de um complexo estável, enzima com oxido de grafeno, como células de biocombustível. Em outra patente, KR20190015685, foram desenvolvidos complexos com nanoestruturas de carbono que aumentam a acessibilidade do substrato ao sítio ativo de enzimas.

[008] Dentro das nanoestruturas de carbono, pode-se destacar o carbons dots (CDs), ou pontos de carbono, que constituem uma recente classe de nanopartículas esféricas de carbono de dimensão zero, pois são extremamente pequenas, com diâmetro inferior a 10 nm. Devido as suas propriedades de baixa toxicidade, alta biocompatibilidade e características fotoluminescentes, estudos vem demonstrando o uso dos carbon dots em diversas aplicações na área da saúde como biosensores, imagens biológicas, como

contrastes (BR 10 2018 005838 0), carreadores de fármacos, no teranóstico de câncer, entre outros.

[009] Na patente CN110882216A é explicado o uso de uma nanoenzima, composta por carbono dots dopado por ferro, com seletividade células tumorais. Já na patente CN111066792A foi desenvolvida uma nanoenzima de carbono dots, que pode ser utilizada na detecção de várias biomoléculas como glicose, ácido úrico e colesterol por exemplo. Outros estudos, como Ren et al 2015, Li et al 2015 e Li et al 2019, demonstram a interação e/ou o efeito de carbon dots na atividade catalítica de algumas enzimas.

[011] Atualmente, algumas nanopartículas modularam a atividade enzimática, através da diminuição ou aumento da atividade, no entanto os dados sobre os efeitos dos carbon dots sobre a atividade enzimática na literatura são poucos, limitados ou estão em fases de estudos embrionárias. Além disso, é necessário desenvolver novos inibidores e/ou moduladores enzimáticos estáveis a degradação e reversíveis sobre a atividade enzimática.

[012] Portanto a presente invenção tem como principal objetivo demonstrar o uso de nanopartículas de carbono, do tipo carbon dots, sem modificações pós-sintéticas e/ou presença de aditivos, desenvolvidos a partir de biomoléculas, como inibidores e/ou moduladores enzimáticos, com propriedades almejadas para serem aplicados comercialmente.

[013] Por conta da sua estrutura e arranjo molecular, os Cdots têm diversas vantagens para o uso com essa finalidade, quando comparado com moléculas orgânicas e outros tipos de nanomaterias que já foram testados. Os CDs possuem maior estabilidade química, o que torna esses compostos mais resistentes em ambientes biológicos; grande área superficial; alta biocompatibilidade, alta solubilidade em água, baixo custo de produção e boa reprodutibilidade. Além disso, a superfície dos CDs possui uma grande área e muitos grupos funcionais como carboxilas, amidos e hidroxilas (figura 1a-b), que ao interagir com as enzimas promovem diferentes interações químicas e novos padrões de inibição e modulação.

[014] Essa variedade de grupos funcionais na superfície dos CDs, proporciona outras vantagens, como a possibilidade de conjugação com outras substâncias, outros

inibidores e moduladores, fármacos, o que pode promover um sinergismo na modulação enzimática e/ou um direcionamento do efeito dessas nanoestruturas e substâncias para células ou bioestruturas específicas, de acordo com a necessidade da aplicação.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 apresenta os espectros de infravermelho das nanopartículas Cdots-Conc A (Fig. 1a) e Cdots-BSA (Fig. 1b)

A Figura 2a-b apresenta os resultados do potencial zera das nanopartículas Cdots-Conc A (Fig. 2a) e Cdots-BSA (Fig. 2b). A figura 2c-d apresenta o resultado da espectroscopia de dicroísmo circular da enzima tirosinase na ausência e presença das nanopartículas Cdots-Conc A (Fig. 2c) e Cdots-BSA (Fig. 2d).

A Figura 3a-b mostra os gráficos de Lineweaver-Burk da tirosinase com várias concentrações das nanopartículas Cdots-Conc A (Fig. 3a) e Cdots-BSA (Fig. 3b). A figura mostra a atividade enzimática da tirosinase incubada com diferentes concentrações das nanopartículas Cdots-Conc A (Fig. 3c) e Cdots-BSA (Fig. 3d).

Descrição da invenção

[015] As substâncias, materiais de partida, composições, métodos e enzimas citadas no texto são informações e modelos fornecidos como exemplos para que se tenha um total entendimento da invenção. É evidente, que esses modelos descritos neste documento podem ser exemplificados de diferentes formas, não devendo ser interpretados como uma limitação do escopo dessa divulgação.

[016] Além disso, os valores de substâncias, materiais e tempos citados nessa invenção, são exemplos de valores escolhidos na demonstração do estado da arte, e estão dentro de um intervalo de valores largamente testados. Não estando o desfecho do produto e sua aplicação, condicionada especificamente aos valores que aqui são apresentados.

[017] A presente patente demonstra nanopartículas de carbono, do tipo carbono dots, capaz de ser utilizada como inibidor e/ou modulador enzimático. O termo nanopartícula se refere a uma estrutura em que todas as três dimensões são menores do que 1 micrômetro, ou seja, menores que 1000 nm. A nanopartícula descrita nessa divulgação

foi sintetizada de acordo com esses aspectos citados, tendo um tamanho médio de partícula de 5 nm e forma quase esféricas.

[018] As nanopartículas carbon dots descritas nessa divulgação foram sintetizadas a partir de biomoléculas, nesse caso proteínas, através de um método simples por pirólise, escolhidas de maneira genérica como molécula fonte de carbono para o procedimento, pois essa natureza biomolecular do material de partida, aumenta a sua compatibilidade com diversos organismos. No entanto, o uso dessas macromoléculas citadas, deve ser visto como um exemplo de um material de partida que pode ser utilizado no desenvolvimento dos Carbon dots aqui citados, não estando os produtos descritos nessa invenção limitado a escolha apenas dessa substância como material de partida.

[019] Dessa maneira, a presente invenção demonstra um modelo que pode ser utilizado para a aplicação e o desenvolvimento de outros tipos e exemplos de carbon dots inibidores e/ou moduladores enzimáticos, provenientes de outras moléculas e materiais de partida como fonte de carbono.

[020] Em certos aspectos, a presente invenção compreende o uso de nanopartículas de carbono, do tipo carbon dots, como inibidores e/ou moduladores enzimáticos. Dentro desse universo dos carbon dots, a maioria dos estudos desenvolvidos tem como finalidade, a aplicação desse tipo de nanopartícula de carbono como carreadores de outras substâncias, sensores ou até mesmo como uma nanoenzima. Por se tratar de um tema relativamente novo, foram encontrados poucos estudos e nenhuma patente demonstrando o uso de carbon dots, com as características descritas nessa invenção, na inibição e/ou modulação enzimática.

[021] As poucas nanopartículas carbon dots utilizadas anteriormente com a finalidade descrita nessa divulgação, consistiram no resultado de desnaturação, ligações irreversíveis com a enzima e/ou imobilização das enzimas. Ou muitas vezes, foi necessária uma modificação na estrutura original desses Cdots, como um enriquecimento das partículas, através de dopagem com outros átomos, encapsulamento de outras substâncias, ou mudanças na quiralidade dessas nanoestruturas para que pudessem desempenhar sua ação inibitória e/ou moduladora sob as enzimas.

[022] No entanto o tipo de aplicação descrito nessa divulgação, já fornece carbon dots em sua estrutura original, sem grandes modificações químicas, com uma inibição e/ou modulação enzimática única, proporcionando uma interação reversível, sem mudanças conformacionais prejudiciais a enzima e uso biologicamente seguro, como já demonstrado em outros estudos. Essas características fazem com as nanopartículas descritas nessa divulgação, desempenhem um efeito semelhante a um processo natural, tal como uma modulação enzimática biomimética, além de possuir várias propriedades almejadas que permitem sua aplicação comercial.

[023] Sobre o termo inibição enzimática entende-se como redução a atividade da enzima em qualquer porcentagem, quando comparado a atividade enzimática na ausência das nanopartículas descritas nessa divulgação. Já o termo modulação, refere-se tanto a um efeito de diminuição e/ou um efeito de aumento da atividade catalítica da enzima. Sendo ambos, inibição e/ou modulação, proporcionada pelo contato entre as nanopartículas descritas com a enzima, sem a necessidade de imobilização dessa enzima.

[024] Em relação a reversibilidade, significa que o efeito na atividade enzimática provocado pela presença das nanopartículas é revertido com a diminuição da oferta dessas nanoestruturas no meio. O que acontece com a remoção das nanopartículas do mesmo meio que a enzima está presente e/ou quando ocorre o aumento da concentração do substrato nesse mesmo ambiente.

[025] Na presente descrição é utilizado a enzima tirosinase como modelo de enzima para demonstrar a modulação enzimática das nanopartículas carbon dots. A escolha foi feita como fator de comparação, para uma melhor exemplificação a aplicação, pois outros estudos já utilizaram a mesma enzima. Um exemplo desses estudos é o de Yang et al 2016, em que demonstrou a inibição enzimática por nanopartículas de amido, sob a enzima tirosinase. Contudo essa escolha não tem o objetivo de limitar os resultados descritos nessa patente, podendo ser utilizado diversos outros exemplos de enzimas para a aplicação proposta nessa divulgação, tais como amilases, hidrolases, catalases, acilase, lipases, celulasas, uréases, pectinases, oxidases, lacases, proteases, entre outras enzimas presentes em seres vivos.

[026] Além disso, para avaliar e demonstrar o efeito de modulação dos carbon dots sobre a enzima tirosinase, foi selecionado a L-dopa, conhecida como 3- (3,4-Di-hidroxifenil-2,5,6-d3) -L-alanina, como substrato para enzima citada. Não sendo limitado o efeito inibitório e/ou modulador dos carbon dots sobre a enzima, a condição do uso desse substrato citado. Podendo ser utilizado outros substratos para a enzima tirosinase ou para outras enzimas, se for utilizado modelos com outras enzimas, como já foi citado, para demonstrar o efeito e a aplicação da nanoestrutura descrita nessa patente.

[027] A presente invenção fornece a aplicação de carbon dots com forte atividade inibitória e/ou modulatória sobre enzimas. A análise da cinética de inibição enzimática dessas nanopartículas, utilizando o modelo de Michales Menten, demonstra que a inibição pelas nanopartículas descritas nessa invenção ocorre de maneira competitiva, reversível, com forte interação entre as nanoestruturas e a enzima. Além disso, demonstra excelentes valores de IC_{50} (parâmetro que se refere a metade da concentração inibitória máxima), quando comparado a outras substâncias já utilizadas comercialmente.

[028] Outra característica importante das nanopartículas apresentadas nessa divulgação que produzem é uma alta interação com a enzima, e conseqüentemente uma forte inibição e/ou modulação enzimática, é a sua superfície hidrofóbica e carregada negativamente (figura 2a-b). Mahmoudi et al 2011, demonstram que a presença de cargas negativas na superfície das nanopartículas, fazem com que essas nanoestruturas interajam com moléculas proteicas, como enzimas por exemplo.

[029] A partir da síntese no desenvolvimento dos carbon dots descritos nessa patente, obtém-se a diversos grupos hidrofóbicos em sua superfície, remanescentes da biomolécula utilizada como material de partida, como os grupos $-CH_3$. Essas interações hidrofóbicas demonstradas pela fluorescência entre o carbon dots e a enzima descritos nessa divulgação, aumentam a interação química entre a nanopartícula e estruturas proteicas. Pois, de acordo com relatos da literatura, Mahmoudi et al 2011, apesar de existir interações químicas de outros tipos, as hidrofóbicas dominam o balanço energético em diversos exemplos estudados.

[030] Além disso, a presença de diversos grupos funcionais oxigenados e nitrogenados na superfície das nanopartículas descritas, tais como carboxilas, hidroxilas e aminas, permitem a interação e/ou conjugação com outras moléculas, como fármacos, o que as torna potencialmente úteis em diversas aplicações farmacêuticas para serem utilizadas em tratamento e diagnóstico.

Exemplos de concretização da invenção

[031] São apresentados alguns exemplos de possíveis composições e aplicações contendo em sua composição nanoestrutura, descritos na presente invenção, capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas.

[032] Exemplo 1

[033] Nessa seção é proposto um exemplo de aplicação do carbon dots descrito nessa invenção, quanto a sua capacidade de inibir a atividade enzimática. Nesse intuito, é relatado a seguir carbon dots (Cdots-Conc A) que tem como material de partida a proteína Convanavalina A, que é capaz de inibir a enzima tirosinase, que foi utilizada como modelo.

[034] Materiais

[035] A enzima tirosinase derivada do cogumelo e o substrato 3-(3,4-Di-hidroxifenil-2,5,6-d3) -L-alanina (L-Dopa) são adquiridos na Sigma-Aldrich e utilizados sem nenhuma purificação adicional. Na composição do tampão fosfato são utilizados os reagentes fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO) adquiridos na Insofar, além disso, é utilizado água destilada e deionizada.

[036] Ensaio da atividade catalítica da tirosinase

[037] A atividade catalítica da enzima tirosinase é medida pelo aumento da intensidade da fluorescência, comprimento de 475 nm, em função do tempo, causado pelo acúmulo da o-dopaquinona, que é formado pela reação do substrato 3-(3,4-Di-hidroxifenil-2,5,6-d3) -L-alanina (L-dopa) com a tirosinase.

[038] A concentração da tirosinase é mantida constante, enquanto são aplicadas quatro concentrações diferentes do substrato L-dopa na faixa de 0,25-2,0 mM. Antes de realizar a medição da atividade enzimática, o sistema composto pela enzima tirosinase com várias concentrações de Cdots-Conc A, que variam dentro de uma faixa de 0-640nM, em tampão fosfato (pH 6,2) incubado por uma hora em uma temperatura de 5 °C. Por ser sensível a luz, o substrato é adicionado a mistura contendo Cdots e tirosinase momentos antes da realização da leitura, que é quando se inicia as reações catalíticas no meio.

[039] As intensidades da fluorescência são medidas através de um leitor microplacas da Bio Rad, no comprimento de 475 nm a cada 30s, dentro de um intervalo de três minutos, tendo como branco uma mistura contendo somente a enzima, o substrato e a solução tampão fosfato. A inibição dos Cdots na tirosinase é analisada utilizando o gráfico de Lineweaver- Burk e a regressão não linear da equação de Michaelis-Mentan para determinar o IC50 e as constantes relacionadas obtidas.

[040] A atividade catalítica da enzima tirosinase é inibida na presença do Cdots-Conc A no meio. Em um gráfico de Lineweaver- Burk (figura 3a) o eixo y corresponde ao inverso da velocidade da reação entre a enzima e o substrato, portanto, pode-se observar que o valor dessa velocidade diminui gradualmente, quando comparado a velocidade da reação na ausência da nanopartícula, ocasionando uma inibição diretamente proporcional, pois a medida que ocorre o aumento da concentração do Cdots no meio, o efeito inibitório dos mesmos sobre a enzima também aumenta.

[041] Outro aspecto importante, é que o aumento da concentração das nanopartículas produziu várias curvas com inclinações diferentes, no entanto com uma interceptação comum no eixo x ($1/V$) entre todas elas, pois o aumento da concentração do inibidor, nessa caso a nanopartícula, não acarreta uma diminuição na velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da reação. Demonstrando que a inibição por essas nanoestruturas acontece de maneira competitiva e reversível, pois um aumento da concentração do substrato deslocará o inibidor do sítio ativo da tirosinase.

[042] Efeito inibitório das nanopartículas

[043] Para calcular os parâmetros cinéticos e avaliar as características da inibição causada pelos Cdots na enzima tirosinase, é necessário ajustar os dados experimentais

a equação de Lineweaver- Burk, descrita abaixo, que consiste de uma adaptação da equação de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha \cdot K_m}{V_{m\acute{a}x}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (1)$$

[044] Onde V_0 é a velocidade inicial da reação enzimática e V_{max} consiste na velocidade máxima aparente da enzima. A partir dessa equação é obtido o valor de alfa determina o quanto a ligação do inibidor (nanopartícula) modifica a afinidade da enzima pelo substrato. Nesse exemplo o valor de alfa medido foi 168,9, um valor alto, indicando que a ligação da nanopartícula impede a interação do substrato com a tirosinase.

[045] Além disso, foi obtido a constante de equilíbrio para a ligação entre o inibidor e a enzima ($K_i = 4,62 \times 10^{-5}$ M) ou constante de inibição, esse valor da ordem de 10^{-5} indica que há uma forte interação entre a nanopartícula (inibidor) e a enzima tirosinase, principalmente quando comparado as constantes da quercetina, $K_i = 6,41 \cdot 10^{-5}$ M, e do ácido kójico, $K_i = 5,3 \cdot 10^{-5}$ M, substâncias já utilizadas em formulações com o mesmo propósito desse exemplo descrito.

[046] As nanopartículas apresentam uma grande atividade inibitória quando comparado com outros inibidores da tirosinase, em relação ao IC_{50} por exemplo, referente a inibição sobre a enzima tirosinase, a nanopartícula Cdots-Conc A, $IC_{50} = 0,691 \mu M$ (figura 3c) apresenta um valor quase sessenta vezes menor do que o ácido kójico, $IC_{50} = 40,69 \mu M$, composto utilizado amplamente em produtos de clareamento de pele.

[047] Estudo da interação entre os carbon dots e a enzima

[048] A intensidade da capacidade de inibição enzimática dos carbon dots descritos nessa patente, pode ser explicada também, pelas características e magnitude da interação dessas nanoestruturas com a enzima. Para a elucidação das interações bioquímicas envolvendo a nanoestrutura e a enzima, é utilizado a espectroscopia de fluorescência molecular, uma técnica bastante utilizada para estudar mudanças estruturais e interações entre macromoléculas.

[049] A tirosinase, assim como várias proteínas, possui fluorescência intrínseca, decorrentes de grupos fluoróforos presentes em sua estrutura, por isso pequenas

modificações na polaridade, causadas pela nanopartícula, em torno do microambiente próximo a esses grupos modificam a emissão da fluorescência da enzima.

[050] Cerca de 600 μL de uma solução de tirosinase (5 μM) é titulada em série com uma quantidade crescente de Cdots-Conc A, faixa entre 0 até 1,2 μM , nas temperaturas de 303K, 308K e 313K. O comprimento de onda de excitação é estabelecido em 280 nm e os espectros de emissão são coletados de 300 nm a 500 nm, através de um fluorímetro Varian, com as fendas de excitação e emissão mantidas em 10 nm.

[051] No quadro a seguir são apresentados os valores das constantes e parâmetros referentes a interação do Cdots-Conc A e a enzima tirosinase.

$^{\circ}\text{C}$	Ksv ($\times 10^6$ mol L^{-1})	Ka ($\times 10^5$ mol L^{-1})	n	H (KJmol^{-1} K^{-1})	S (Jmol^{-1} K^{-1})	G(KJmo $\text{l}^{-1} \text{K}^{-1}$)
30	1,10	1,25	0,85	56,45	302,46	-35,19
35	2,03	2,61	0,85			-36,70
40	2,21	13,27	0,96			-38,21

[052] As constantes de supressão (Ksv), que representa nas diferentes temperaturas, é calculada a partir da equação de Stern-volmer, descrita abaixo, que fornece como acontece o processo de *quenching* da fluorescência da enzima pela ação das nanopartículas. Pode-se observar na tabela, que o aumento da temperatura provoca um aumento do Ksv, o que indica um *quenching* dinâmico, pois esse ganho de energia favorece a formação do complexo nanopartícula-enzima.

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

[053] Através dos valores da constante de associação (K_a) e n é obtido a afinidade entre as nanopartículas descritas e a enzima tirosinase, e a proporção como a interação acontece, calculando a equação modificada de Stern-volmer, descrita abaixo. Os valores de K_a da ordem de 10^5 e n próximo a 1,0 (0,85; 0,85 e 0,98) indicam uma afinidade de moderada a forte entre as substâncias, que acontece aproximadamente numa proporção de uma molécula de enzima com uma nanoestrutura.

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log\log K_a + n \log[[Q]] \quad (3)$$

[054] Com uma abordagem termodinâmica, através da equação de Van't Hoff e da energia livre de Gibbs, descritas abaixo, é possível identificar os tipos de interação não covalentes que governam a interação da nanopartícula com a enzima. Valores termodinâmicos, $\Delta G < 0$, $\Delta S < 0$ e $\Delta H < 0$, indicam que a interação dos Cdots com a enzima tirosinase é espontânea, e que é governada em sua maior parte por interações hidrofóbicas.

$$\ln K = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{R T} \quad (4)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (5)$$

[055] Além disso a reversibilidade, estabilidade química e a capacidade de inibir a enzima tirosinase é um grande atrativo tecnológico, para as nanopartículas descritas nessa divulgação serem utilizadas em formulações e produtos de uso tópico, que tenham a finalidade de clareamento da pele em distúrbios relacionados a produção de melanina.

[056] A tirosinase é uma enzima multifuncional e um dos principais alvos no desenvolvimento de inibidores em diversas pesquisas relacionadas a cosméticos, pois tem papel fundamental na cascata de síntese do pigmento melanina. Que é responsável pela cor e proteção da pele contra os raios ultravioletas e a o estresse oxidativo.

[057] No entanto, um aumento da expressão da enzima tirosinase, pode aumentar a síntese desse pigmento pelos melanócitos, causando sérios problemas patológicos como melasma e outras formas de hiperpigmentação. Diversos inibidores da tirosinase têm sido testados por indústrias farmacêuticas na prevenção da superprodução de

melanina, tais como o ácido kójico, hidroquinona, arbutina, entre outros. Apesar dessas substâncias serem eficientes na diminuição da produção do pigmento, ainda apresentam algumas desvantagens e efeitos colaterais, como irritação da pele, toxicidade para as células sadias de melanócitos, pouca eficácia nos testes in vivo, além de baixa estabilidade na sua formulação, que podem ser superadas pelos CDs descritos nessa patente.

[058] Exemplo 2

[059] Nessa seção é proposto um exemplo de aplicação do carbon dots descrito nessa invenção, como agentes removedores de rejeitos industriais utilizado no tratamento de efluentes, devido a sua capacidade de modular a atividade de enzimas utilizadas nesse processo. Nesse intuito, é relatado a seguir carbon dots (Cdots-BSA) que tem como material de partida a proteína Albumina do soro bovino, que é capaz de modular a atividade catalítica da enzima tirosinase, que foi utilizada como protótipo.

[060] Ensaio da atividade catalítica da tirosinase na presença da nanopartícula

[061] A atividade catalítica da enzima tirosinase é medida pelo aumento da intensidade da fluorescência, comprimento de 475 nm, em função do tempo, causado pelo acúmulo da o-dopaquinona, que é formado pela reação do substrato 3-(3,4-Di-hidroxifenil-2,5,6-d3) -L-alanina (L-dopa) com a tirosinase.

[062] A concentração da tirosinase é mantida constante, enquanto são aplicadas quatro concentrações diferentes do substrato L-dopa na faixa de 0,25-2,0 mM. Antes de realizar a medição da atividade enzimática, o sistema composto pela enzima tirosinase com várias concentrações de Cdots-BSA, que variam dentro de uma faixa de 0-640nM, em tampão fosfato (pH 6,2) incubado por uma hora em uma temperatura de 5 °C. Por ser sensível a luz, o substrato é adicionado a mistura contendo Cdots e tirosinase momentos antes da realização da leitura, que é quando se inicia as reações catalíticas no meio.

[063] As intensidades da fluorescência são medidas através de um leitor microplacas da Bio Rad, no comprimento de 475 nm a cada 30s, dentro de um intervalo de três minutos, tendo como branco uma mistura contendo somente a enzima, o substrato e a solução tampão fosfato. A inibição dos Cdots na tirosinase é analisada utilizando o gráfico de

Lineweaver- Burk e a regressão não linear da equação de Michaelis-Mentan para determinar o IC50 e as constantes relacionadas obtidas.

[064] A atividade catalítica da enzima tirosinase é modulada na presença do Cdots-BSA, de acordo com a concentração utilizada da nanopartícula. O gráfico da atividade enzimática da tirosinase (figura 3d), obtido através da suavização da curva por spline, mostra que na concentração 40 nM de Cdots-BSA inibi a atividade da enzimática, enquanto que na concentração de 80 nM, por exemplo, causa um incremento na atividade da enzima.

[065] Essa modulação da atividade enzimática causado pela presença da nanopartícula, possivelmente deve-se ao fato de que o Cdots-BSA ao interagir com a tirosinase, provoca mudanças na estrutura secundária da enzima. Em determinados valores de concentração há um aumento das porções alfa-hélice, enquanto que em outros, ocorre mudanças que aproximam a tirosinase a sua estrutura secundária original, como indicado na análise de dicroísmo circular (figura 2d). Dessa maneira, algumas mudanças conformacionais modificam a disposição dos grupos presentes no sítio ativo da enzima, aumentando o seu efeito catalítico sobre o substrato.

[066] A análise dos parâmetros cinéticos e as características da interação entre o Cdots-BSA e a enzima tirosinase, é obtido a partir do ajuste dos dados experimentais (figura 3b) a equação de Lineweaver- Burk, já descrita no exemplo 1 dessa divulgação. Demonstrando que a interação entre o carbon dots e a nanopartícula acontece de maneira reversível e com intensidade de moderada a forte ($K_i = 16,87 \times 10^{-5} \text{ M}$).

[067] O incremento na atividade enzimática com o uso dos carbon dots, é um atrativo para essas nanopartículas serem utilizadas no tratamento de diversos efluentes. Diversas atividades industriais e de outros segmentos, produzem rejeitos que são despejados na natureza. A maioria desses resíduos contém compostos fenólicos, que são extremamente tóxicos e corrosivos, causando graves impactos à saúde humana.

[068] Algumas soluções são empregadas para o tratamento de tais rejeitos, como tratamentos físico-químicos, vias eletroquímicas e técnicas utilizando nanotecnologia. Uma das principais alternativas para a degradação destes compostos fenólicos é a utilização de enzimas oxidativas, como a tirosinase por exemplo, que é da classe

oxirredutase, pois possuem alta seletividade, maior compatibilidade com o meio ambiente, além de serem mais rápidas e eficientes.

[069] Sendo assim, é de grande interesse potencializar a ação enzimática, a fim de melhorar o processo de degradação e tratamento de efluentes. O carbon dots descrito causa um incremento da atividade enzimática, possui alta solubilidade em água, biocompatibilidade, grande resistência a degradação química, além de ser um processo reversível, demonstrando assim uma nova solução nanotecnológica para alcançar a finalidade descrita nesse exemplo.

REIVINDICAÇÕES

1. Nanopartículas de carbono, compreendendo pontos de carbono ou carbon dots, caracterizadas por apresentar efeito de modulação enzimática reversível na presença de uma enzima.
2. Nanopartículas de carbono, compreendendo pontos de carbono ou carbon dots, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a modulação enzimática reversível na presença da enzima, reduz a atividade da enzima.
3. Nanopartículas de carbono, compreendendo pontos de carbono ou carbon dots, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a modulação enzimática reversível na presença da enzima, aumente a atividade da enzima.
4. Nanopartículas de carbono, compreendendo pontos de carbono ou carbon dots, de acordo com as reivindicações de 1 a 3, caracterizadas por serem obtidas a partir de biomoléculas.
5. Nanopartículas de carbono, compreendendo pontos de carbono ou carbon dots, de acordo com as reivindicações de 1 a 4, caracterizadas por exercer seu efeito sem modificações pós-sintéticas e/ou presença de aditivos nas nanopartículas.
6. Nanopartículas de carbono, compreendendo pontos de carbono ou carbono dots, de acordo com as reivindicações de 1 a 5, caracterizadas por possuírem boa solubilidade em água, biocompatibilidade e resistência a degradação química e biológica.
7. Nanopartículas de carbono, compreendendo pontos de carbono ou carbono dots, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizadas por serem utilizadas na forma livre, incluído, associado ou em combinação com outros agentes moduladores enzimáticos para fins que necessitem de modulação de enzima.

DESENHOS

Figura 1

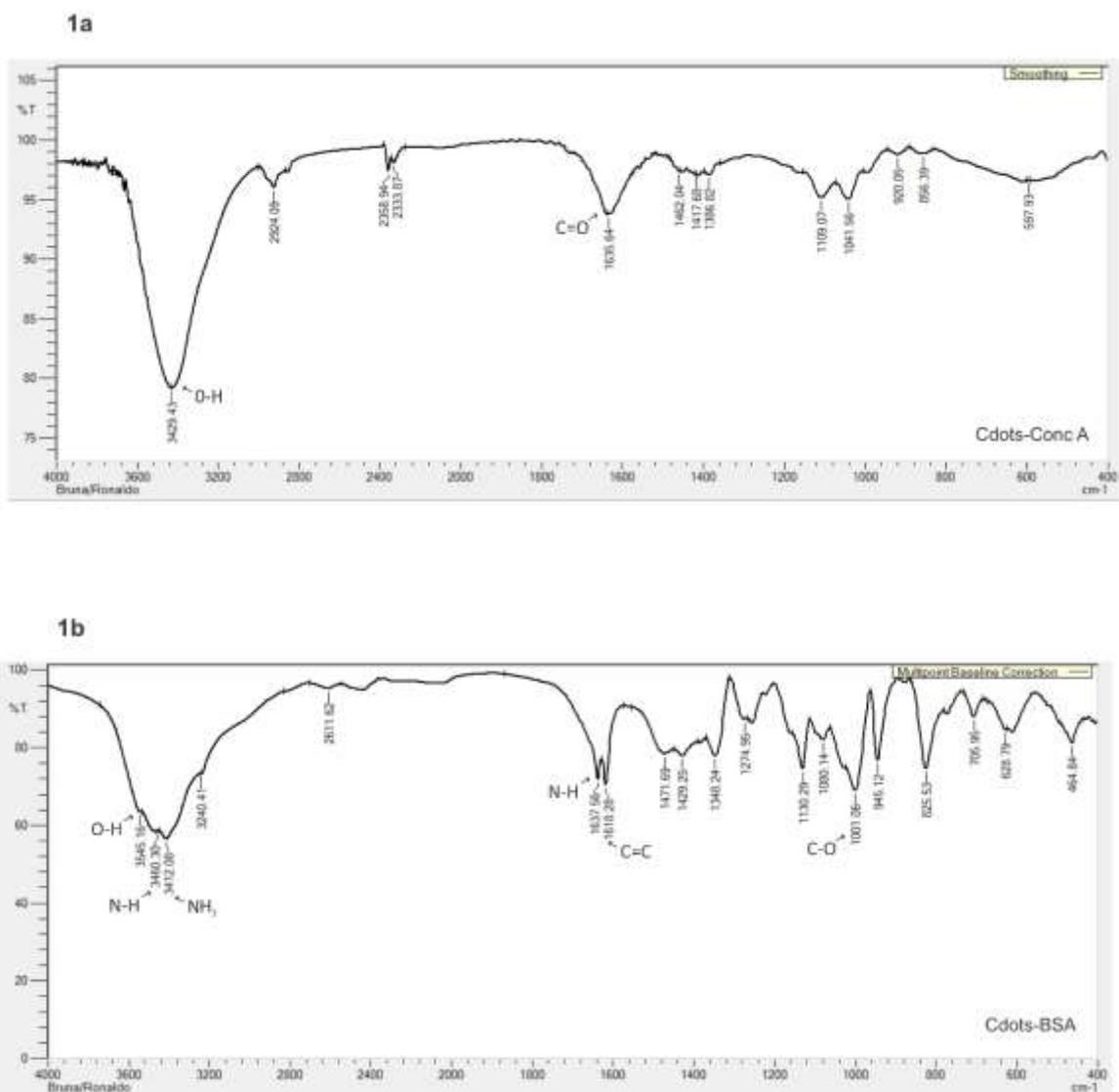


Figura 1

Figura 2

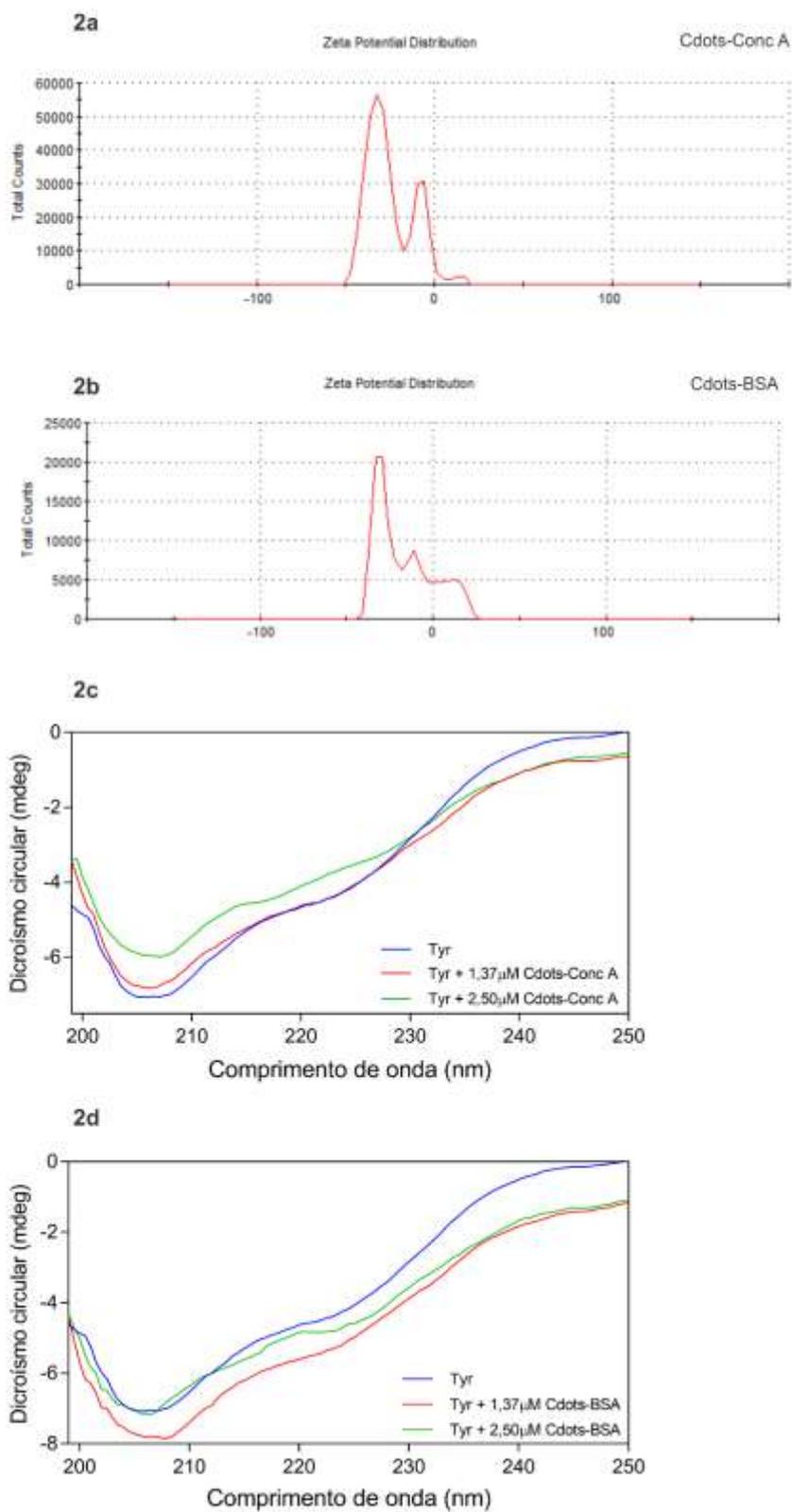


Figura 2

Figura 3

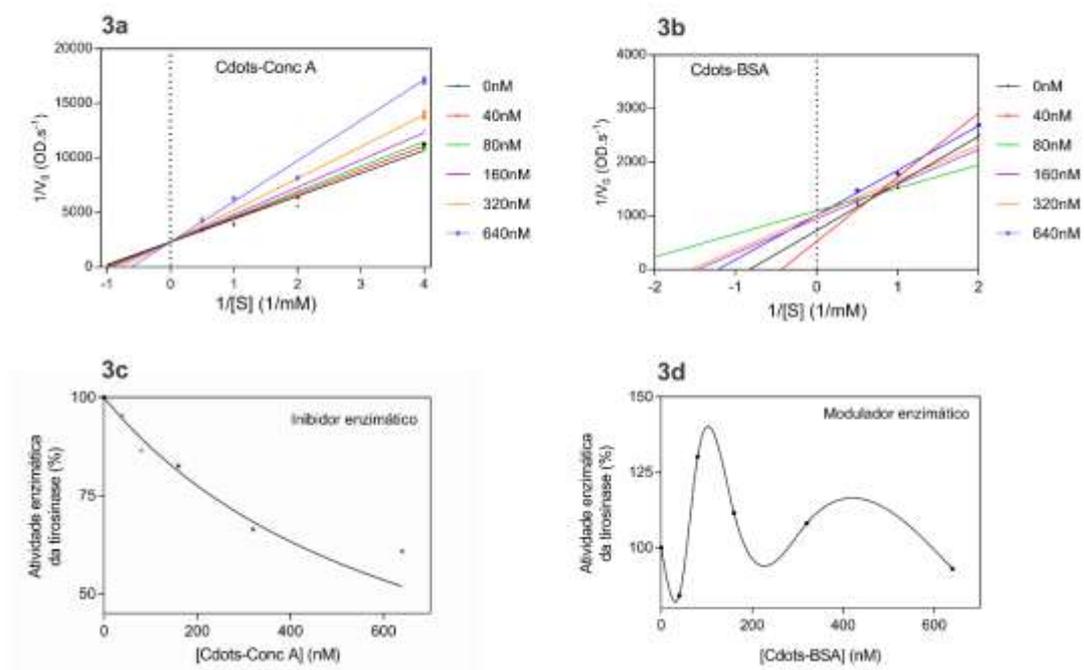


Figura 3

RESUMO**Nanopartículas de carbono biocompatíveis para aplicação biológica
como moduladores enzimáticos**

A presente patente de invenção caracteriza-se pela obtenção de sistemas de nanopartículas de carbono biocompatíveis para atuação como moduladores enzimáticos direcionados para o tratamento e prevenção de doenças, conservação de alimentos e aspectos ambientais. As nanopartículas de carbono do tipo pontos de carbono exibem um forte efeito reversível sobre a atividade catalítica das enzimas. Onde, através dos ensaios e parâmetros cinéticos, uma das nanopartículas possui efeito inibitório podendo ser utilizada no tratamento de doenças e outra possui efeito modulador, podendo ser aplicada, por exemplo, no tratamento de efluentes. Os experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência molecular, demonstram uma interação de moderada a forte entre as nanopartículas e a enzima, sendo responsável pelos efeitos exercidos sobre a atividade catalítica.