



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

LUCAS PEREIRA SOUZA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DERIVADAS DE PROTEÍNA NA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TIROSINASE**

Recife

2021

LUCAS PEREIRA SOUZA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DERIVADAS DE PROTEÍNA NA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TIROSINASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientador (a): Jorge Luiz Neves

Recife

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecário Cristiano Cosme S. dos Anjos, CRB4-2290

S586a Silva, Lucas Pereira Souza da
Avaliação de nanopartículas derivadas de proteína na atividade enzimática da tirosinase/ Lucas Pereira Souza da Silva. – 2021.
76 f.: il., fig.

Orientador: Jorge Luiz Neves.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.CCEN, Química, Recife, 2021.
Inclui referências.

1. Química inorgânica. 2. Nanopartículas. 3. Cinética enzimática. 4. Inibidores enzimáticos. I. Neves Jorge Luiz (orientador). II. Título.

546

CDD (23. ed.)

UFPE- CCEN 2021 - 99

LUCAS PEREIRA SOUZA DA SILVA

AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DERIVADAS DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TIROSINASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Aprovada em: 15/01/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Jorge Luiz Neves (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Gustavo de Miranda Seabra

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Jefferson Luiz Princival

Universidade Federal de São João del-Rey
Campus CCO-Divinópolis

Prof. Luana Oliveira dos Santos

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Caio Rodrigo Dias de Assis

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Bioquímica

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho e me confortar nos momentos de dificuldade passados. Agradeço também a minha família pelo incentivo e apoio ao longo dessa jornada, principalmente a minha esposa, **Denise**, e filhos, **Diego**, **Guilherme** e **Rodrigo**, pela compreensão, pois diversas vezes dei a eles pouca atenção em virtude da pesquisa. Aos meus pais, **Pedro** e **Sônia**, pela minha formação educacional desde cedo, investindo tempo e dinheiro nesse processo. Ao meu irmão **Gabriel**, aos meus sogros **Julio** e **Divane**

Ao meu orientador, **Jorge Luiz Neves**, sou muito grato pela oportunidade de me integrar ao seu grupo de pesquisa, pela atenção e por todos os seus conhecimentos e experiências compartilhados, que me acrescentaram tanto no lado pessoal como no âmbito profissional.

E por fim, agradeço aos meus colegas de laboratório, **Marcela**, **Larissa**, **Yarima**, e **Thaís** pelos conhecimentos passados, me ajudando no processo de adaptação a um novo departamento e área de conhecimento, além de agradecer também ao DQF - Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal do Rio de Janeiro e o CNPq pela utilização da infraestrutura disponível e investimento financeiro da pesquisa. Aos professores e funcionários das pós-graduação e, do departamento como um todo, pela contribuição e serviços prestados.

RESUMO

Os nanomateriais, estruturas da ordem de nanômetros, possuem propriedades físico-químicas que diferem bastante dos materiais de maior escala. Dentre eles, os que são a base de carbono, como os carbon dots, possuem boa biocompatibilidade e baixa toxicidade para sistemas biológicos, e por isso, tem sido objeto de estudo em diversas pesquisas, para aplicações biológicas como biomarcadores, biosensores, carreamento de drogas, entre outras. Dessa forma, esta pesquisa propõe o uso de carbon dots sintetizados a partir de proteínas como inibidor enzimático da tirosinase, uma enzima de grande importância e envolvida na produção melanina. Aumento de sua expressão altera de maneira anormal a concentração desse pigmento, causando diversas patologias como por exemplo, doenças de pele como o melasma e seu envolvimento com o desenvolvimento do melanoma é foco de intensas pesquisas na literatura. Neste trabalho foram sintetizadas duas nanopartículas Cdots-Conc A e Cdots-BSA, a partir das proteínas Concanavalina A e Albumina do soro bovino (BSA), respectivamente. Através de estudos cinéticos, ambas as nanopartículas testadas demonstraram uma inibição reversível da atividade catalítica da tirosinase. O Cdots-Conc A, por exemplo, demonstrou uma potente inibição (média de inibição = 0,691 μM), quando comparado com inibidores comerciais como a quercetina (média de inibição = 30,8 μM) e o ácido kójico (média de inibição = 40,69 μM). Os experimentos espectroscópicos mostram que as nanopartículas possuem interação com a tirosinase (Cdots-Conc A, $K_i = 0,462 \mu\text{M}$, Cdots-BSA $K_i = 1,687 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) superior aos inibidores comerciais (ácido kójico, $K_i = 64,1 \mu\text{M}$, quercetina $K_i = 53,0 \mu\text{M}$), com pequenas modificações na estrutura secundária enzima. Células de melanoma da linhagem B16F10 ATCC tiveram sua quantidade reduzida em até 42%, em testes *in vitro*, na presença das nanopartículas, demonstrando serem sensíveis a pequenas concentrações dos carbon dots, da ordem de microgramas por litro. Esses resultados demonstram o potencial desses nanomateriais, como possíveis candidatos no desenvolvimento de cosméticos e agentes farmacológicos no tratamento de melanoma, clareamento de pele e outras doenças relacionadas a melanina.

Palavras-chave: Nanopartículas; Cinética enzimática; Inibidores enzimáticos.

ABSTRACT

Nanomaterials, structures of the order of nanometers, have physico-chemical properties that differ greatly from larger scale materials. Among them, those that are carbon-based, such as carbon dots, have good biocompatibility and low toxicity for biological systems, and for this reason, it has been the object of study in several studies, for biological applications such as biomarkers, biosensors, drug carrying , among others. Thus, this research proposes the use of carbon dots synthesized from proteins as an enzyme inhibitor of tyrosinase, an enzyme of great importance and involved in melanin production. Increasing its expression abnormally alters the concentration of this pigment, causing various pathologies such as skin diseases such as melasma and its involvement with the development of melanoma is the focus of intense research in the literature. In this work, two nanoparticles Cdots-Conc A and Cdots-BSA were synthesized, starting from the proteins Concanavalin A and bovine serum albumin (BSA), respectively. Through kinetic studies, both nanoparticles tested demonstrated a reversible inhibition of tyrosinase catalytic activity. Cdots-Conc A, for example, demonstrated a potent inhibition (inhibition mean = 0.691 μM), when compared with commercial inhibitors such as quercetin (inhibition mean = 30.8 μM) and kojic acid (inhibition mean = 40.69 μM). Spectroscopic experiments show that nanoparticles have an interaction with tyrosinase (Cdots-Conc A, K_i = 0.462 μM , Cdots-BSA K_i = 1.687 μM) superior to commercial inhibitors (kojic acid, K_i = 64.1 μM , quercetin K_i = 53.0 μM), with minor changes in the secondary enzyme structure. Melanoma cells of the B16F10 ATCC strain had their amount reduced by up to 42%, in in vitro tests, in the presence of nanoproteins, demonstrating that they are sensitive to small concentrations of carbon dots, on the order of micrograms per liter. These results demonstrate the potential of these nanomaterials, as possible candidates in the development of cosmetics and pharmacological agents in the treatment of melanoma, skin whitening and other melanin-related diseases.

Keywords: Nanoparticles; Enzyme Kinetics; Enzyme Inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Exemplos de nanopartículas de carbono	13
Gráfico 1 -	Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática.	17
Gráfico 2 -	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk	18
Figura 2 -	Mecanismos de inibição enzimática através do gráfico duplo recíproco	18
Figura 3 -	Inibição competitiva a uma enzima	19
Figura 4 -	Ação da tirosinase sobre monofenóis e catecóis	20
Figura 5 -	Representação do sítio ativo da tirosinase na forma met	21
Figura 6 -	Representação do ciclo catalítico da enzima tirosinase	21
Figura 7 -	Biossíntese da melanina	23
Figura 8 -	Estrutura química de inibidores da tirosinase	24
Figura 9 -	Centrifugação através dos dispositivos filtrantes Amicon Ultra 4.0 10K e obtenção das nanopartículas concentradas	27
Figura 10 -	Soluções contendo as os Cdots-Conc A e Cdots-BSA sob a iluminação de luz ultravioleta no comprimento de 365 nm	32
Gráfico 3 -	Espectro de absorção no UV/Vis das nanopartículas Cdots-Conc A e Cdots-BSA	33
Gráfico 4 -	Espectro de emissão de fluorescência da nanopartícula Cdots-BSA.	34
Figura 11 -	Curva de potencial zeta dos a) Cdots-Conc A e b) Cdots-BSA	35
Figura 12 -	Espectro de infravermelho de a) Cdots-Conc A e b) Cdots-BSA	37
Figura 13 -	Espectro de dicroísmo circular da Tirosinase na ausência e na presença das nanopartículas a) Cdots-Conc A e b) Cdots-BSA (1,37 μ M e 2,5 μ M). Concentração de tirosinase 5 μ M, em tampão fosfato de sódio com pH = 7,4	38
Figura 14 -	Supressão da fluorescência da enzima tirosinase (200 nM) na presença do Cdots1 (0 até 726 nM) em diferentes temperaturas a) 30 °C, b) 35 °C e c) 40 °C	41

Gráfico 5 -	Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da intensidade de fluorescência da tirosinase pela titulação por Cdots-Conc A em diferentes temperaturas	42
Gráfico 6	Gráfico de $\log [(F_0 - F)/F]$ em função da concentração de Cdots-Conc A	43
Gráfico 7 -	Gráfico de $\ln K$ em função do inverso da temperatura, obtido a partir da equação de Van't Hoff, baseado nas diferentes temperaturas.	45
Quadro 1 -	Parâmetros termodinâmicos de interação entre a enzima e o Cdots1	45
Figura 15 -	Gráfico da velocidade da reação enzimática catalisada pela tirosinase na ausência e na presença de várias concentrações de a) Cdots-Conca A e b) Cdots-BSA (0,0 até 640 nM).	47
Figura 16 -	Gráfico de Lineweaver-Burk para a reação da tirosinase com a L-dopa com aumento gradativo da concentração de a) Cdots-Conc A e b) Cdots-BSA	48
Figura 17 -	Gráfico do efeito dos Cdots-Conc A e Cdots-BSA sobre a atividade enzimática da tirosinase.	50
Gráfico 8 -	Gráfico obtido por suavização dos pontos, referente ao efeito do Cdots-BSA sob a atividade enzimática da tirosinase.	52
Gráfico 9 -	Gráfico da velocidade da reação em função da concentração de enzima na presença do Cdots-Conc A	54
Gráfico 10 -	Gráfico da velocidade da reação em função da concentração de enzima na presença do Cdots-BSA	54
Gráfico 11-	Viabilidade celular de células B16F10 ATCC (Melanoma murino metastático) após a incubação de 48 horas com as nanopartículas.	56
Figura 18 -	Pellet das células B16F10 ATCC após o tratamento com o hormônio α MSH e incubação de 48 horas com o Cdots-Conc A (NP1) e Cdots-BSA (NP2).	57

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A459	Carcinoma do pulmão humano
B16F10 ATCC	Células de melanoma murino metastático
BSA	Albumina do soro bovino
Cdots-BSA	Carbon dots derivado da BSA
Cdots-Conc A	Carbon dots derivado da Concanavalina A
CDs	Carbon dots
CNTs	Nanotubos de carbono
Cu	Cobre
DMEM	modificação do Eagle's Basal Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Enzima
EI	Complexo enzima-inibidor
ES	Complexo enzima-substrato
HBMEC	Células endoteliais microvasculares do cérebro humano
HTC116	Carcinoma do colón humano
IC ₅₀	Concentração que causa cinquenta por cento da inibição
K _a	Constante de associação
K _i	Constante de inibição
K _m	Constante de Michaelis
K _{sv}	Constante de Stern-Volmer
L-Dopa	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MTT	brometo de 3- [4,5- dimetiltiazol-2- il] -2,5 difeniltetrazólio
n	Sítios de ligação
Na ₂ HPO	Fosfato de sódio dibásico
NaH ₂ PO	Fosfato de sódio monobásico
P	Produto
Q	Concentração do agente supressor
S	Substrato
Tyr	Enzima Tirosinase
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
V ₀	Velocidade inicial

$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
α	Alfa
αMSH	Hormônio alfa melanócitos estimulante
β	Beta
ΔG	Variação da energia livre
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação de entropia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Carbon dots	13
1.2	Inibição enzimática	15
1.3	Inibição da enzima tirosinase	20
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivos gerais	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Obtenção da nanopartícula de BSA	26
3.2	Caracterização das nanopartículas	27
3.2.1	Absorção no ultravioleta/visível	27
3.2.2	Espectroscopia de fluorescência	27
3.2.3	Potencial Zeta	28
3.2.4	Espectroscopia no infravermelho	28
3.3	Espectroscopia de dicroísmo circular	28
3.4	Experimento de supressão da fluorescência da tirosinase	29
3.5	Cinética enzimática de inibição da tirosinase	29
3.5.1	Ensaio da atividade catalítica da tirosinase	29
3.5.2	Reversibilidade da inibição da tirosinase	30
3.6	Ensaio de citotoxicidade	30
3.7	Quantificação de melanina	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Obtenção das nanopartículas	32
4.2	Caracterização das nanopartículas	32
4.2.1	Absorção no ultravioleta/visível	33
4.2.2	Espectroscopia de fluorescência	34
4.2.3	Potencial Zeta	35
4.2.4	Espectroscopia no infravermelho	36
4.3	Espectroscopia de dicroísmo circular	38
4.4	Experimento de supressão da fluorescência da tirosinase	40
4.5	Cinética enzimática de inibição da tirosinase	46

4.5.1	Ensaio da atividade catalítica da tirosinase	46
4.5.2	Reversibilidade da inibição da tirosinase	53
4.6	Ensaio de citotoxicidade	55
4.7	Quantificação de melanina	56
5	CONCLUSÃO	58
6	PERSPECTIVAS	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

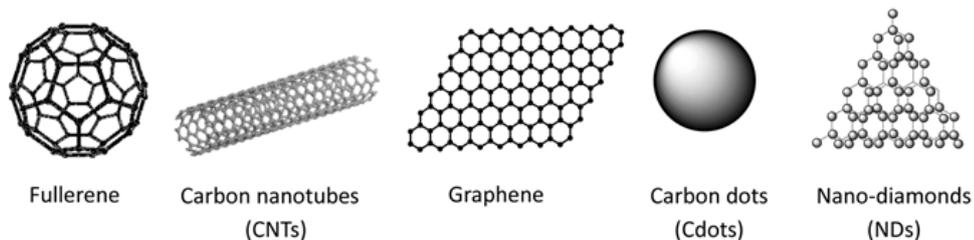
Em 1959, Feynman propôs pela primeira vez o conceito de nanomateriais, que se caracterizam como materiais que possuem graus estruturais na ordem de 10^{-9} metros, tendo como princípio básico a construção de estruturas a partir de átomos, e formando sistemas em escala nanométricas. O estudo dessas estruturas, demonstrou que a matéria em nanoescala apresenta propriedades que diferem bastante dos materiais na forma condensada, tais como uma grande área superficial e uma grande proporção de partículas por unidade massa (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; WHITSIDES, 2005.)

O conhecimento dessas diferentes propriedades, permitiram a manipulação da matéria em escala atômica, molecular e supramolecular, dando origem a nanotecnologia. Os recentes avanços nessa área permitiram o desenvolvimento de diferentes nanomateriais para uma variedade de aplicações na área da indústria de alimentos, de eletrônicos, na área da óptica, da biotecnologia, da medicina, entre outras (MULVANEY, 2015; SOHAL et al., 2018).

1.1 Carbon dots

Dentre os muitos tipos de nanomateriais existentes, os que são a base de carbono tem despertado bastante interesse na área da medicina e biotecnologia. Dentre elas pode-se destacar o grafeno, os nanotubos de carbono (CNTs) e os carbon dots (CDs), por exemplo (figura 1) (LIU; LIANG, 2012).

Figura 1 - Exemplos de nanomateriais de carbono



Fonte: Liu; Liang (2012)

Os carbon dots ou pontos de carbono, constituem uma classe mais recente de nanopartículas esféricas de carbono, de dimensão zero e com diâmetro médio inferior a 10 nm (WEN et al., 2015). 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, carreadores de fármacos, agentes de contraste, no teranóstico de câncer, entre outros (LIM; SHEM; GAO, 2015).

Os carbon dots podem ser amorfos ou cristalinos, tendo em sua estrutura principal um núcleo oco ou denso, contendo átomos de carbono com hibridização predominantemente em sp^2 . Já a sua superfície, contém vários B que variam quimicamente de acordo com o método de síntese e das substâncias precursoras utilizadas nesse processo (PENG et al., 2017).

Esses nanomateriais podem ser obtidos a partir de uma grande variedade de materiais diferentes, o que influencia diretamente na superfície do material. Por isso, biomoléculas como carboidratos e, principalmente, proteínas são considerados excelente “blocos de construção” na fabricação de nanomateriais desse tipo. Dessa maneira, a síntese dos carbon dots utilizando proteínas como material de partida, fazem com que alguns resíduos de aminoácidos se orientem em direção a superfície, funcionalizado estas nanopartículas e influenciando na sua possível atividade terapêutica (ESTRADA; CHAMPION, 2015).

Além disso o uso dessas biomoléculas na construção das nanopartículas confere aos carbon dots características biologicamente interessantes, como uma boa biocompatibilidade e biofuncionalidade, que facilita o reconhecimento molecular, além de proporcionar uma baixa toxicidade desses compostos, já que tem como precursor substâncias compatíveis com o organismo humano (ESTRADA; CHAMPION, 2015).

Apesar da recente descoberta dos carbon dots, estas nanopartículas vem se estabelecendo como um dos principais exemplos de aplicação na área da saúde, dentro dos nanomateriais da família do carbono. Diversas propriedades, tais como solubilidade em água, baixa toxicidade, propriedades fotoluminescentes têm determinado sua aplicação nas áreas de bio-imagem, drug delivery, teranóstico de câncer, biosensores, entre outros (JALEEL; PRAMOD, 2018).

Em 2014, Nandi *et al*/ sintetizaram carbon dots funcionalizados na sua superfície com cadeia longas de hidrocarbonetos cm capacidade de fornecer imagens em células vivas. Através da microscopia de fluorescência foi comprovado que essas

nanopartículas entraram na célula, tendo se distribuído de maneira homogênea no citosol e no núcleo (NANDI et al., 2014).

Em um outro estudo realizado em 2015, Zhang *et al.* desenvolveram nanopartículas de carbono e de sílica com capacidade específica para marcar mitocôndria dentro de seis diferentes tipos de linhagem celular (ZHANG et al., 2015).

Os CDs também podem atuar no carreamento fármacos, várias pesquisas nesse aspecto já foram realizadas, principalmente com drogas antitumorais de elevada toxicidade. Em 2013, Wang *et al.* sintetizaram CDs ociosos a partir da BSA (albumina do soro bovino) através de uma reação solvotermal. Essa nanopartícula foi conjugada com a doxorubicina formando um sistema *drug delivery* de liberação controlada pelo pH. Os resultados foram satisfatórios e demonstraram o potencial uso desse sistema na obtenção de imagens celulares e no seu uso terapêutico (WANG et al., 2013).

Muitas dessas aplicações biológicas das nanopartículas envolvem a participação de proteínas e enzimas, dessa forma é se torna importante estudar os mecanismos dessa relação entre os nanomateriais e as biomoléculas. As interações com os carbon dots, podem alterar a estrutura das enzimas, levando a diferentes rearranjos estruturais desses peptídeos. Esse aspecto estrutural é determinante no caso das enzimas, pois sua atividade catalítica é estritamente dependente das interações e dos dobramentos adequados dos aminoácidos, podendo acarretar um aumento ou diminuição da atividade enzimática (SHEMETOV; NABIEV; SUKHANOVA, 2012). Estudos tem demonstrado diferentes efeitos estruturais e catalíticos provenientes da interação entre os vários tipos de nanopartículas de carbono e as proteínas e enzimas (CHEN et al., 2017).

1.2 Inibição enzimática

Diversas enzimas que atuam no organismo humano, como a tirosinase e a tripsina por exemplo, seguem um comportamento cinético de acordo com o modelo de Michaelis Menten, descrito pela equação 1, que mostra a relação quantitativa entre a concentração do substrato e a velocidade da reação (CORNISH-BOWDEN, 2013; NELSON; COX, 2014).

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

Onde V_0 é a velocidade inicial da catálise enzimática, $V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima que a reação atinge, $[S]$ é a concentração do substrato que vai sofrer a ação da enzima e o termo K_m é a $[S]$ no qual a reação atinge a metade da velocidade máxima (NELSON; COX, 2014).

A origem dessa equação é explicada pela formação do complexo ES (enzima-substrato) (equação 2) que acontece durante a catálise enzimática. Assim que a enzima $[E]$ é misturada com o substrato $[S]$, a $[ES]$ vai aumentando de acordo com a constante k_1 , no entanto, essa etapa acontece em um tempo muito curto. Dessa forma, a etapa determinante para a formação do produto $[P]$ é o rompimento do complexo $[ES]$, governada pela constante k_2 , que é a etapa mais lenta (NELSON; COX, 2014).

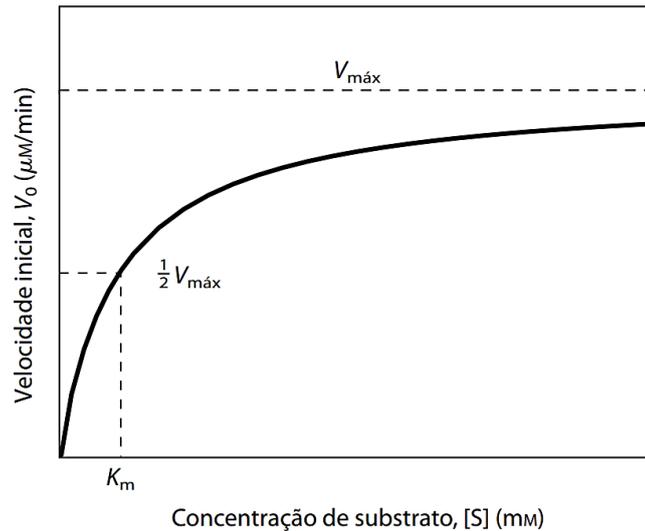


Portanto, nos estágios iniciais da reação, quando acontece a formação do complexo $[ES]$, se diz que a reação atingiu o estado estacionário, no qual a concentração de $[ES]$ é constante, pois a velocidade de formação é igual a velocidade de quebra do $[ES]$. Por isso, a velocidade inicial (V_0) reflete o estado estacionário, em que o $[ES]$ é constante (NELSON; COX, 2014).

De acordo com a equação 1, quando o substrato (S) está em pequenas concentrações, o K_m é muito maior do que $[S]$ e a maior parte da enzima está na sua forma livre (E). Com isso, um aumento de $[S]$ acarreta um aumento na velocidade da reação (NELSON; COX, 2014).

No entanto, se a concentração do substrato for muito alta, $[S]$ é muito maior do que o K_m , a maior parte da enzima está na forma do complexo ES, dessa forma a reação atinge a velocidade máxima, que pode ser observada no gráfico como um platô, que é uma das características do modelo de Michaelis Menten (gráfico 1) (NELSON; COX, 2014).

Gráfico 1 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática



Fonte: Nelson; Cox (2014, p. 201)

O efeito dos inibidores sob a cinética enzimática pode ser estudado a partir do modelo de Michaelis-Menten (equação 3), onde diversas concentrações de inibidores, são testadas frente a diferentes concentrações de substratos, mantendo a concentração de enzima constante.

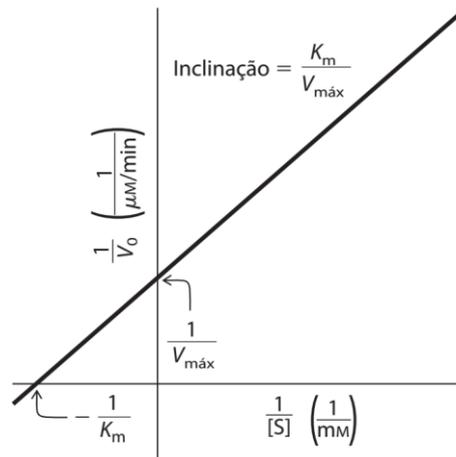
$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad (3)$$

No entanto, uma maneira mais eficiente de analisar os parâmetros cinéticos envolvidos em uma inibição enzimática, é realizando uma transformação algébrica da equação de Michaelis-Menten (equação 1). Uma das transformações mais comuns é a que dá origem a equação de Lineweaver-Burk (equação 4), que pode ser obtida calculando o inverso dos dois lados da equação 1 (NELSON; COX, 2014).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (4)$$

Essa transformação produz um gráfico linear (gráfico 2), com $1/V_0$ em função de $1/[S]$, com linha reta, também chamado de “duplo recíproco”, que permite a determinação mais precisa da velocidade máxima e do K_m , a partir de dados experimentais (NELSON; COX, 2014).

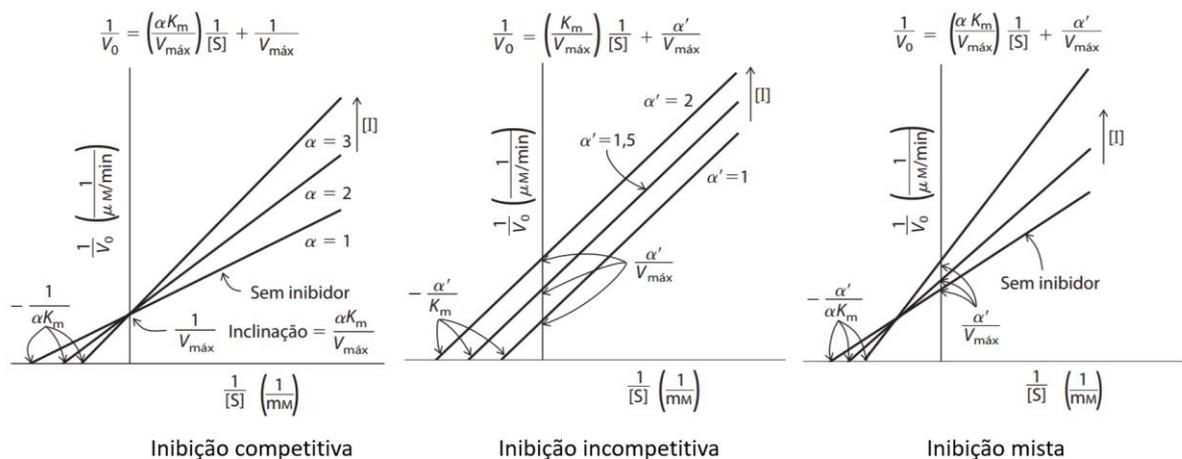
Gráfico 2. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk



Fonte: Nelson; Cox (2014, p. 204)

Ao realizar a análise dos dados do efeito inibitório de substâncias sob a cinética de enzimas, o gráfico duplo recíproco gerado, figura 2, é formado por várias linhas, que correspondem as diferentes concentrações de inibidor utilizadas.

Figura 2 - Mecanismos de inibição enzimática através do gráfico duplo recíproco



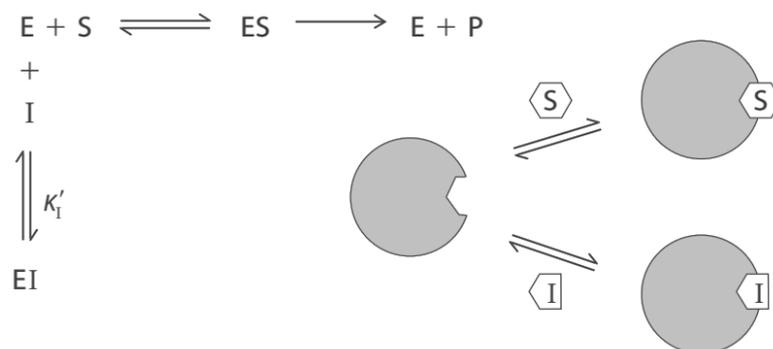
Fonte: Nelson; Cox (2014, p. 209)

No gráfico duplo recíproco, a inclinação das retas representa a relação $K_m/V_{máx}$, a interceptação no eixo Y corresponde a $1/V_{máx}$ e no eixo X, a $-1/K_m$. Essa abordagem possibilita uma maneira mais fácil de determinar o tipo de inibição enzimática, pois cada tipo de inibição, competitiva, incompetitiva e mista, gera gráficos de aspectos diferentes (figura 2).

Nos gráficos da figura 4, um termo comum, presente na equação que descreve os três tipos de inibição citados, é o termo alfa (α). Um dos parâmetros que determina o tipo de inibição, pois seu valor reflete o grau que a ligação do inibidor altera a afinidade da enzima pelo substrato.

Se $\alpha = 1$, o inibidor não altera a ligação do substrato com a enzima, que corresponde a uma inibição de modelo misto. Se $\alpha \gg 1$, o inibidor impede a ligação da enzima com o substrato, o que satisfaz o modelo competitivo e quando $0 > \alpha < 1$, se considera um modelo de inibição não competitiva (NELSON; COX, 2014).

Figura 3 - Inibição competitiva a uma enzima

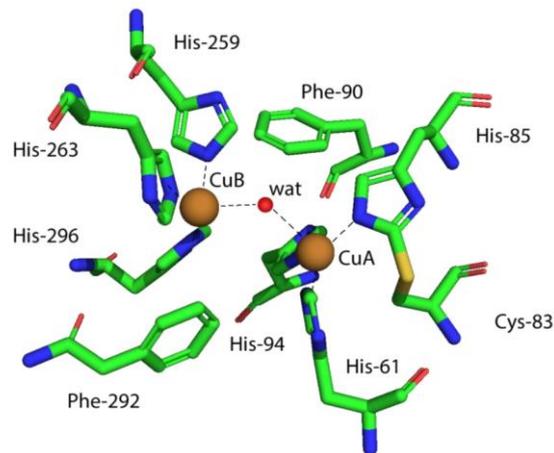


Fonte: Nelson; Cox (2014, p. 208)

Como mostrado na figura 3, no modelo de inibição competitiva, o substrato e o inibidor competem pelo sítio ativo da enzima, com isso, tanto a afinidade quanto a concentração do inibidor e do substrato interferem no deslocamento do equilíbrio para a formação do complexo [ES] ou [EI] (NELSON; COX, 2014).

Para determinar o tipo de inibição, o valor de alfa, como mostrado na equação 5, pode ser calculado a partir da concentração do inibidor [I] e da constante de inibição, o K_i . Que é calculado de acordo com o tipo de inibição, a partir do equilíbrio descrito abaixo (NELSON; COX, 2014).

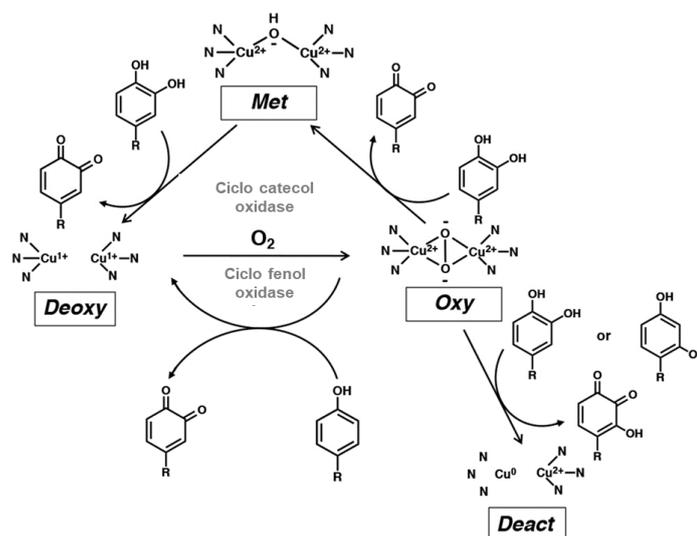
Figura 5 - Representação do sítio ativo da tirosinase na forma met



Fonte: Pretzler; Rompel (2018)

Durante o processo catalítico, esses íons são convertidos e podem assumir quatro estados de oxidação diferentes: *deoxy* (Cu^{+1} - Cu^{+1}), *oxy* (Cu^{+2} - O_2 - Cu^{+2}), *met* (Cu^{+2} - OH - Cu^{+2}) e *deact* (Cu^0 Cu^{+2}). A forma *met*- é considerada a forma nativa, onde os íons cobre estão unidos por um grupo hidroxila ou por uma molécula de água, tendo afinidade para se ligar a monofenóis, mas não para realizar catálise. Esta forma tem a capacidade de oxidar apenas catecóis, o que leva a enzima à forma *deoxy*, sendo posteriormente convertida à forma *oxy*- na presença de oxigênio molecular. (Figura 6) (ITO; SUGUMARAN; WAKAMATSU, 2020).

Figura 6 - Representação do ciclo catalítico da enzima tirosinase



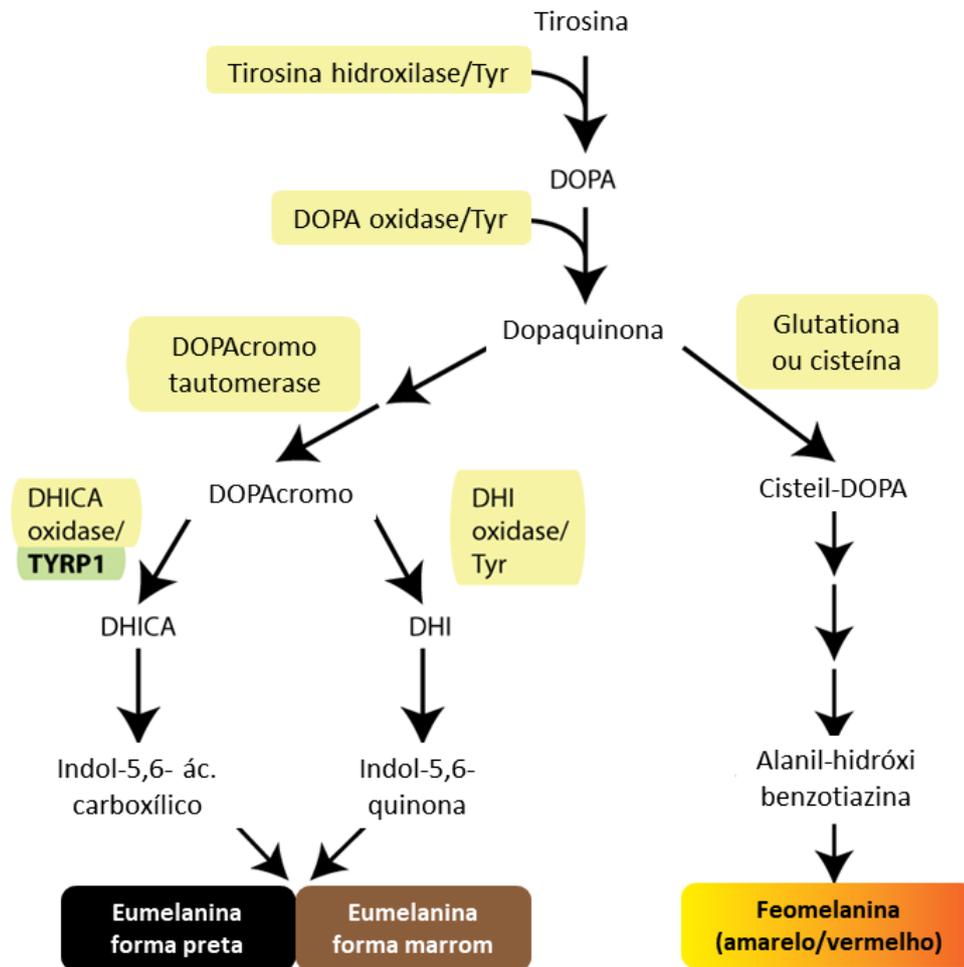
Fonte: Ito; Sugumaran; Wakamatsu (2020)

Já a forma a forma oxy- oxida tanto fenóis, quanto catecóis, através de mecanismos diferentes, mono-oxigenase/fenolase para o primeiro e oxidase/catecolase para o segundo. Além disso, os catecóis podem participar do mecanismo mono-oxigenase quando são tratados como fenóis pela forma oxy da enzima, o que leva a forma *deact* da tirosinase (ITO; SUGUMARAN; WAKAMATSU, 2020).

As enzimas da família tirosinase tem grande variedade entre si, quando comparada a sequência de aminoácidos. A estrutura primária da tirosinase humana, por exemplo, possui cerca de 30% de compatibilidade com a que é produzida por bactérias e apenas 10% com a maioria que vem de origem fúngica. Apesar da baixa porcentagem de semelhança em suas estruturas primárias, a conservação da estrutura do sítio ativo é algo comum entre todas elas, incluindo todo o bolsão hidrofóbico, apresentando algumas diferenciações apenas em um dos íons cobre (CuA) encontrados no sítio ativo (BUIRAGO, 2016; PRETZLER; ROMPEL, 2018). Esta característica possibilita a utilização de tirosinase provenientes de diferentes fontes na realização de ensaios in vitro.

No organismo humano, a enzima tirosinase tem como principal função a catálise de reações na biossíntese de melanina (figura 7) (MIOT et al., 2009). Dentre essas reações estão a hidroxilação da tirosina para L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) e a oxidação de L-dopa em dopaquinona, que são etapas cruciais na produção desse pigmento, responsável pela cor e proteção da pele contra os raios ultravioletas e a o estresse oxidativo (YANG et al., 2016; LEE et al., 2018).

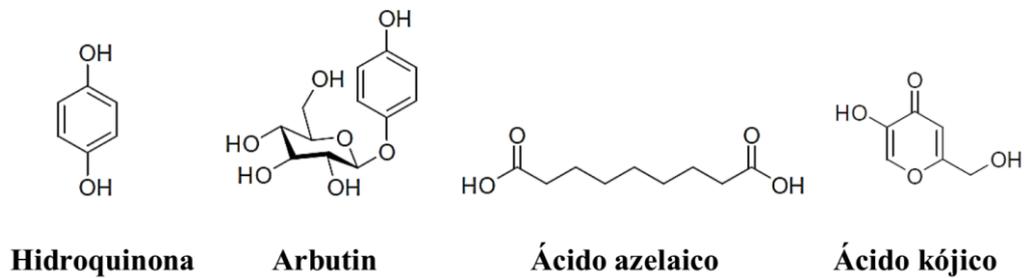
Figura 7 - Biossíntese da melanina



Fonte: Miot et al. (2009)

Por isso, um aumento da expressão dessa enzima, pode aumentar a síntese desse pigmento pelos melanócitos, causando sérios problemas patológicos como melasma e outras formas de hiperpigmentação (CHEN et al., 2015). Diversos inibidores da tirosinase têm sido testados por indústrias farmacêuticas na prevenção da superprodução de melanina, tais como o ácido kójico, hidroquinona, arbutina, ácido azelaico, entre outros (figura 8) (PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017).

Figura 8 - Estrutura química de inibidores da tirosinase



Fonte: Pillaiyar; Manickam; Namasivayam (2017)

Assim como demonstrado na figura, a maioria dos inibidores da tirosinase possuem diversos grupos oxigenados, como hidroxilas, carboxilas, éteres, que possibilitam a interação dessas substâncias com os íons cobre do sítio ativo da enzima (PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017).

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 (CHEN et al., 2015).

Por isso, se faz necessário o estudo e o desenvolvimento de novas substâncias capazes de inibir a tirosinase, de maneira eficiente e segura, e que possam ser aplicadas em produtos cosméticos no controle desses distúrbios relacionados a hiperpigmentação da melanina.

A partir disso, este trabalho propôs a utilização exclusivamente de carbon dots, sintetizados a partir de proteínas e sem a conjugação com nenhuma outra substância, como inibidor enzimático da tirosinase. Além de compreender o mecanismo de inibição e interação entre essas nanopartículas e as enzima utilizada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a aplicação de nanopartículas de carbono, preparados por pirólise a partir da Concanavalina A e da Albumina de soro bovino (BSA), como inibidor enzimático da tirosinase, avaliando sua cinética enzimática, interação e toxicidade *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de carbono a partir da proteína albumina sérica bovina;
- Estudar o efeito das nanopartículas sobre a atividade da enzima tirosinase, através da determinação do mecanismo de inibição, bem como o IC₅₀ e sua reversibilidade.
- Investigar a afinidade e os efeitos da interação das nanopartículas com a enzima tirosinase, por meio de fluorescência e dicróismo circular.
- Avaliar a viabilidade celular das nanopartículas em células da linhagem de melanoma murino metastático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das nanopartículas

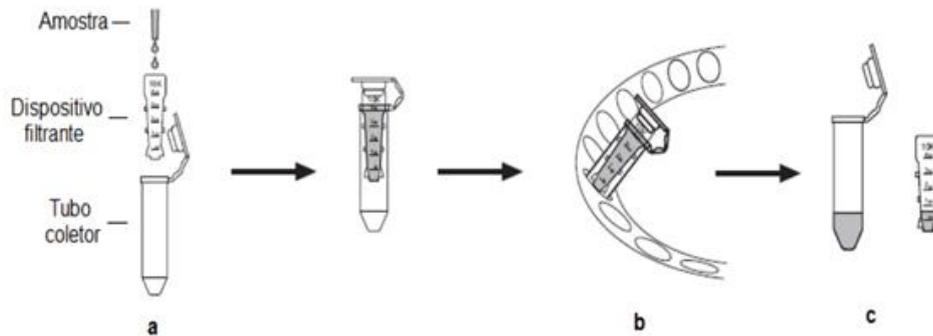
As nanopartículas de carbono utilizadas nesse estudo foram sintetizadas a partir de duas proteínas: a Concanavalina A, referente a Cdots-Conc A, e a Albumina do Soro Bovino (BSA), referente ao Cdots-BSA. As nanopartículas Cdots-Conc A foram obtidas anteriormente em outro estudo, dessa forma, nesse trabalho foi utilizado o mesmo método para a síntese das novas nanopartículas, as Cdots-BSA (GARCIA et al., 2019).

Nesse método, as Cdots-BSA foram sintetizadas a partir de 3,0 mL de uma solução de BSA (Sigma) na concentração 13,33 mg/ml, em tampão fosfato composto por fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), adquiridos na Insofar, resultando num pH 7,5.

Esse sistema foi mantido em repouso durante 4 horas, à temperatura ambiente, em seguida foi colocada numa estufa a 100 °C, para evaporação de todo o líquido. Em seguida, a amostra foi colocada na mufla a 300 °C durante 3 horas para o término do processo de síntese por pirólise. Após resfriamento a temperatura ambiente, foi adicionado 6 mL de água e a mistura foi sonicada por 3 horas para homogeneização e extração da nanopartícula.

A solução resultante foi centrifugada duas vezes a 5000 rpm durante 30 min, para precipitação das impurezas derivadas do processo de síntese. O sobrenadante aquoso contendo a nanopartícula foi colocado em dispositivos de ultrafiltração Amicon Ultra 4.0 10K (millipore) para que fosse filtrado o tamanho de nanopartícula desejado, esse sistema foi colocado dentro de tubos para a coleta do material e centrifugados a 5000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. Esse processo de filtração (figura 9) foi repetido por várias vezes até obtenção de praticamente todo o volume de sobrenadante filtrado.

Figura 9 - Centrifugação através dos dispositivos filtrantes Amicon Ultra 4.0 10K e obtenção das nanopartículas concentradas



Fonte: Millipore Corporation (2011)

Após esse processo de purificação, a solução obtida pela filtração foi transferida para um recipiente, e foi aquecida a uma temperatura de 110 °C durante 2h, para que todo o solvente fosse evaporado. Depois disso, a partir do conhecimento do peso do recipiente, foi possível obter a massa de nanopartícula obtida a partir dessa síntese.

3.2 Caracterização das nanopartículas

A nanopartícula Cdots-Conc A foi caracterizada anteriormente em outros trabalhos, através de alguns métodos como, fluorescência, espectroscopia no ultravioleta, entre outros (GARCIA et al., 2019). No entanto, nesse trabalho foram realizados experimentos para elucidar características da nova nanopartícula Cdots-BSA e para fornecer informações adicionais sobre a Cdots-Conc A.

3.2.1 Absorção no ultravioleta/visível

Amostras de Cdots-Conc A e Cdots-BSA foram submetidas a radiação na região do ultravioleta e do visível, utilizando o espectrofotômetro Varian Cary, localizado na Central Analítica do departamento de Química Fundamental da UFPE. A partir dos dados gerados pelo experimento, foi possível obter o espectro de absorção das nanopartículas para essa região do espectro eletromagnético.

3.2.2 Espectroscopia de fluorescência

A partir desse experimento foi possível entender como a nanopartículas emitem radiação espontânea, quando estão num estado excitado. Para isso, a nanopartícula

Cdots-BSA foi excitada em diversos comprimentos de onda, variando de 360 a 480 nm, e teve seus espectros de emissão coletados entre os comprimentos de onda 360 a 650 nm. O experimento de fluorescência foi realizado no equipamento Cary Eclipse (Varian, Sydney, Austrália) na temperatura ambiente, com as fendas de excitação e emissão fixadas em 10 nm.

3.2.3 Potencial Zeta

Nesse experimento foi possível indicar a carga superficial das nanopartículas, através de uma dispersão aquosa de carbon dots, na concentração de 0,01 mg/mL. As medidas do potencial zeta do Cdots-Conc A e Cdots-BSA foram realizadas coletadas a 25 °C, no equipamento Zetasizer nano ZS90, do Laboratório de nanotecnologia Farmacêutica, localizado no Departamento de Farmácia da UFPE.

3.2.4 Espectroscopia no infravermelho

Para a realização desse experimento, foi transferido para o suporte uma alíquota das nanopartículas previamente secas. Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer, Spectrum 400, situado na central analítica do departamento de química da UFRPE, no modo de transmitância, na faixa de 4000 a 550 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 16 acumulações (scans) por espectro.

3.3 Espectroscopia de dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular foi aplicada com o objetivo de identificar quantitativamente possíveis alterações na estrutura secundária da enzima Tirosinase, devido a sua interação com a nanopartícula Cdots-Conc A. Foram obtidos espectros da enzima (5 μM) dissolvidas numa solução tampão de $\text{pH}=7,4$, e, depois, espectros da tirosinase com a adição de Cdots nas concentrações de 1,37 μM e 2,5 μM respectivamente.

Os espectros foram obtidos em um espectropolarímetro de Chirascan (Appfried Photophysics, London, UK), a 25 °C, sob um fluxo constante de nitrogênio, utilizando uma cuvete de quartzo com 0,1 mm de comprimento. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas, entre os comprimentos de onda de 200 nm a 250 nm. Para a obtenção dos gráficos, as médias das três leituras foram inseridas no programa

Graphpad Prism 7.0, onde foi ajustado a linha base tendo como referência o espectro contendo apenas a solução tampão.

3.4 Experimento de supressão da fluorescência da tirosinase

Os experimentos de fluorescência foram realizados no equipamento Jascon FP 6300, localizado no Labenz, Departamento de Bioquímica da UFPE, em três diferentes temperaturas (30, 35 e 40 °C). Em cada temperatura foi colocado em uma cubeta cerca de 1,0 mL de uma solução de tirosinase (200 nM) em tampão fosfato (pH = 6,2), que foi titulada em série com uma quantidade crescente de Cdots-Conc A, obtendo diferentes concentrações da nanopartícula que variaram de 0 até 726 nM. O comprimento de onda de excitação da enzima foi estabelecido em 280 nm e os espectros de emissão da tirosinase foram coletados de 300 nm a 400 nm.

3.5 Cinética enzimática de inibição da tirosinase

3.5.1 Ensaio da atividade catalítica da tirosinase

O efeito inibitório na atividade catalítica da enzima tirosinase pelas nanopartículas Cdots-Conc A e Cdots-BSA foi avaliado utilizando uma adaptação de um método anterior.[21] Nessa reação, a L-dopa é utilizada como substrato, dessa forma a ação da enzima tirosinase pode ser avaliada espectroscopicamente através da medição da absorção do produto *o*-dopaquinona, em 475 nm.

Inicialmente, 10 uL de uma solução de tirosinase (dissolvida em tampão fosfato), com concentração fixada em 1,3 µM, e diferentes concentrações das nanopartículas (0 nM a 640nm) foram adicionados em cada poço de uma placa de Elisa 96 poços. Posteriormente, junto a esse sistema, foi adicionado água e incubado a 5 °C por um período de uma hora.

Por ser sensível a luz visível, momentos antes da realização da leitura, foi adicionado em cada poço uma solução de L-dopa (dissolvido em tampão fosfato) suficiente para completar o volume final de 300 µL, obtendo-se quatro diferentes concentrações de substrato (0,25 mM, 0,5mM, 1,0 mM e 2,0 mM) nos poços da placa. Os valores de concentração do substrato foram escolhidos de modo que contemplassem valores abaixo e acima do K_m da enzima.

Os valores de absorbância foram medidos em um espectrofotômetro de microplacas (xMark, Bio Rad), no comprimento de 475 nm a cada 30s, dentro de um

intervalo de três minutos. As análises foram realizadas em triplicata tendo a substância ácido kójico como controle positivo e o sistema contendo somente enzima, substrato e água sendo utilizado como branco.

A inibição dos Cdots na tirosinase foi analisada no programa GraphPad Prism 7.0, utilizando gráficos de Lineweaver- Burk e a regressão não linear da equação de Michaelis-Mentan para determinar o IC_{50} e as constantes relacionadas obtidas.

3.5.2 Reversibilidade da inibição da tirosinase

Além do efeito inibitório das nanopartículas, também foi avaliado a reversibilidade desse efeito. Para isso, foi utilizado o mesmo método utilizado no ensaio da atividade catalítica da tirosinase (item 3.3.1), diferindo em alguns aspectos.

No experimento com o Cdots-Conc A, a concentração de L-dopa permaneceu fixa (1,0 mM) em todos os poços e três diferentes concentrações de Cdots-Conc A (80 nM, 160 nM e 320 nM) foram avaliadas frente a quatro diferentes concentrações da enzima tirosinase, variando de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Já com o Cdots-BSA, a concentração de L-dopa permaneceu em 0,5 mM e três diferentes concentrações de Cdots-BSA (80 nM, 160 nM e 320 nM) foram avaliadas em três diferentes concentrações da mesma enzima (0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 0,4 $\mu\text{g/mL}$).

3.6 Ensaio de citotoxicidade

O uso terapêutico de nanopartículas deve ser cuidadosamente estudado, com o intuito de se evitar toxicidade e efeitos adversos causado pelo uso desses materiais. Dessa forma, foi realizado um experimento *in vitro* que avaliou viabilidade celular na presença das nanopartículas, através de um ensaio colorimétrico que mediu a atividade mitocondrial em células viáveis, utilizando a substância brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2- il] -2,5 difeniltetrazólio (MTT) (RADHAKRISHNAN et al., 2016; ABE; MATSUKI, 2008).

As células da linhagem B16F10 ATCC (melanoma murino metastático), previamente cultivadas foram plaqueadas em 150 μL de um meio contendo DMEM high glucose (Sigma) e 10% Soro Fetal Bovino (Cultilab), obtendo uma concentração aproximada de 2000 células por poço. Após 24 h, as células foram incubadas e houve troca do meio biológico por um novo contendo os Cdots-Conc A e Cdots-BSA diluídos em água, nas concentrações de 0, 0,1, 1,0, 10,0 e 100,0 $\mu\text{g/ml}$. A incubação foi

realizada em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por um período de 48 horas.

Após esse período de contato entre as nanopartículas e as células, foi adicionado em cada poço 22 µL de MTT (5 mg/ml de PBS) e a placa foi incubada por mais 4 horas para a redução do composto. Em seguida, o meio biológico foi descartado e adicionado 150 µL de DMSO para a solubilização dos cristais formados. A leitura da absorbância foi realizada no equipamento (SpectraMAX M5e - Molecular Devices) em um comprimento de onda de 540 nm. O cálculo da toxicidade das nanopartículas foi calculado em função do sistema controle, em que foram as células expostas somente ao meio de cultura, sendo consideradas como 100% de viabilidade celular.

3.7 Quantificação de melanina

Foram plaqueadas $2 \cdot 10^5$ células B16F10 em placas de 12 poços e aguardado um período de 4 horas para que as células aderissem a placa. Em seguida, o meio de cultura foi trocado pelo DMEM com 10% de soro bovino fetal no grupo controle, em outro grupo foi acrescentado o hormônio α MSH 0,1 µM junto ao meio de cultura e no terceiro grupo além do meio biológico e do hormônio, foi adicionado o Cdots-Conc A e Cdots-BSA em diferentes concentrações (0,4 e 4,0 µM).

Após a incubação de 48 horas com as nanopartículas, as células foram tripsinizadas, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 800 rpm por 5 minutos e a cor do pellet foi verificada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das nanopartículas

A partir do método descrito no item 3.1 foi possível obter as nanopartículas Cdots-Conc A e a Cdots-BSA purificadas. Foram realizados alguns experimentos que comprovam a formação das nanopartículas e que serão abordados nos tópicos seguintes.

No entanto, a formação dos Carbon dots pode ser rapidamente verificada através da excitação da solução resultante sob a luz ultravioleta no comprimento de 365 nm (Figura 10), onde esse sistema apresentou uma intensa luminescência com coloração entre o verde e o azul.

Figura 10 - Soluções contendo as os Cdots-Conc A e Cdots-BSA sob a iluminação de luz ultravioleta no comprimento de 365 nm.



Fonte: O autor (2020)

4.2 Caracterização das nanopartículas

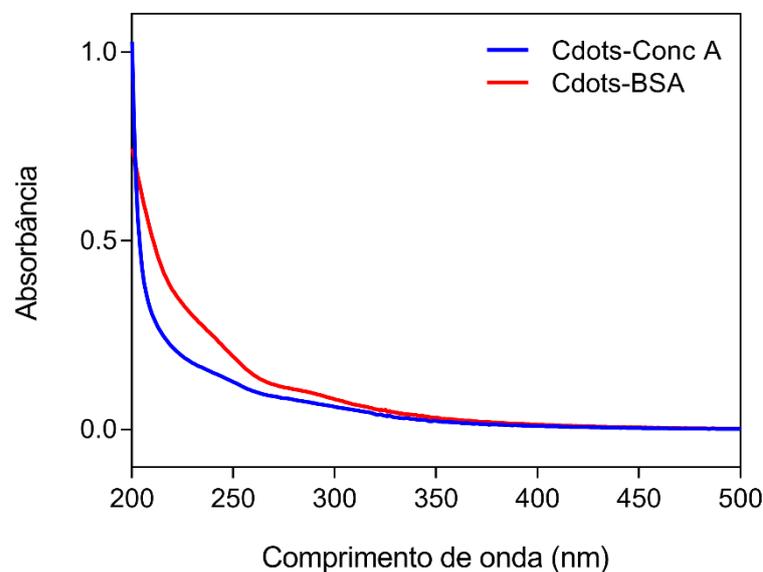
Diversos experimentos de caracterização das nanopartículas foram realizados anteriormente durante a pesquisa de Garcia *et al*, 2019 (GARCIA et al., 2019). Dessa forma, nesse estudo além de explorar novas aplicações desses nanomateriais, foram realizados experimentos que forneceram informações adicionais sobre as características das nanopartículas.

4.2.1 Absorção no ultravioleta/visível

Além da observação do aspecto visual das soluções de nanopartículas sob a incidência de luz ultravioleta de comprimento 365 nm, como mostrado na figura 12. Foi obtido, também, os espectros de absorção no UV/Vis das nanopartículas, gráfico 3, que demonstram o perfil de absorção desses nanomateriais.

Ambas nanopartículas de carbono, Cdots-Conc A e Cdots-BSA, absorvem luz ultravioleta, e a medida que o comprimento de onda aumenta, essa absorção diminui, o que revela um comportamento característico para esse tipo de nanopartícula (ZHANG et al., 2015).

Gráfico 3 - Espectro de absorção no UV/Vis das nanopartículas Cdots-Conc A e Cdots-BSA



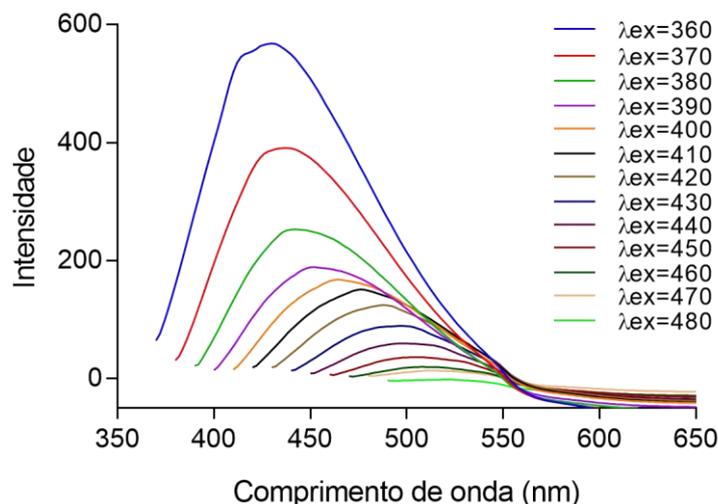
Fonte: O autor (2020)

Além disso, os espectros de absorção das nanopartículas apresentam uma banda discreta em torno de 225 nm, que possivelmente está associado as transições eletrônicas do tipo $\pi-\pi^*$ das ligações C=C presente nas estruturas dos Cdots (ZHU et al., 2015). O que justifica uma maior intensidade de absorção nesse comprimento de onda pelo Cdots-BSA, visto que, essa nanopartícula apresentou maior quantidade de ligações duplas C=C no espectro de absorção de infravermelho, que será discutido no tópico.

4.2.2 Espectroscopia de fluorescência

No gráfico 4 é apresentado o espectro de emissão da nanopartícula Cdots-BSA, quando excitada nos comprimentos de onda entre 360 nm a 480 nm. A nanopartícula apresentou emissão na região de 360 nm a 650 nm, dependente do comprimento de onda de excitação. Pois, um aumento no comprimento de onda de excitação, levou a uma diminuição da intensidade da fotoluminescência. Além disso, a maior intensidade de luminescência aconteceu em 430 nm, quando a nanopartícula foi excitada num comprimento de 360 nm.

Gráfico 4 - Espectro de emissão de fluorescência da nanopartícula Cdots-BSA



Fonte: O autor (2020)

Resultados semelhantes foram obtidos por Garcia et al, 2019, em experimentos realizados com a nanopartícula Cdots-Conc A, que demonstrou ter a sua emissão da fotoluminescência dependente do comprimento de excitação e obteve uma intensidade máxima de emissão em 500 nm, quando excitada em 430 nm.

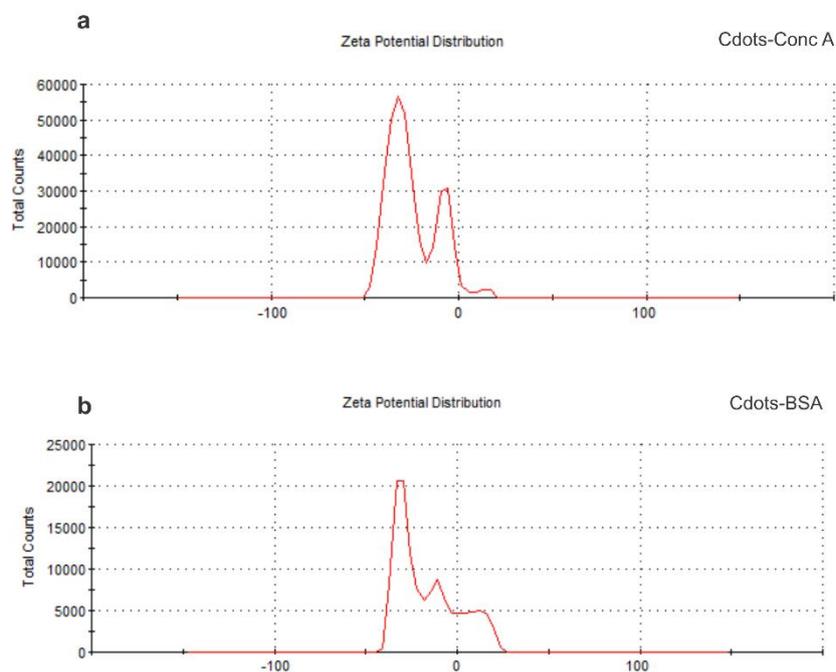
Apesar da origem da fluorescência carbon dots ainda não ser totalmente compreendida, estudos confirmaram alguns mecanismos que explicam essa propriedade desses nanomateriais por: confinamento quântico, onde portadores de carga estariam presos em “poços” de acordo com a dimensão da partícula; estado da superfície, que são determinados pela conjugação dos carbonos sp^2 e pelos grupos

químicos da superfície; estado da superfície, que são moléculas fluorescentes conectadas na superfície ou no interior da estrutura, e podem emitir diretamente a radiação (ZHU et al., 2015).

4.2.3 Potencial Zeta

A figura 11 apresenta as curvas de potencial zeta das nanopartículas Cdots-Conc A e Cdots-BSA, onde ambas as nanopartículas apresentaram carga negativa em torno de -31,8 mV e -16,7 mV, respectivamente.

Figura 11- Curva de potencial zeta dos a) Cdots-Conc A e b) Cdots-BSA.



Fonte: O autor (2020)

A técnica utilizada nesse experimento fornece o potencial de superfície das partículas, nesse caso das nanopartículas, que é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante. Essas interações acontecem em função da presença de grupos funcionais na superfície das nanopartículas.

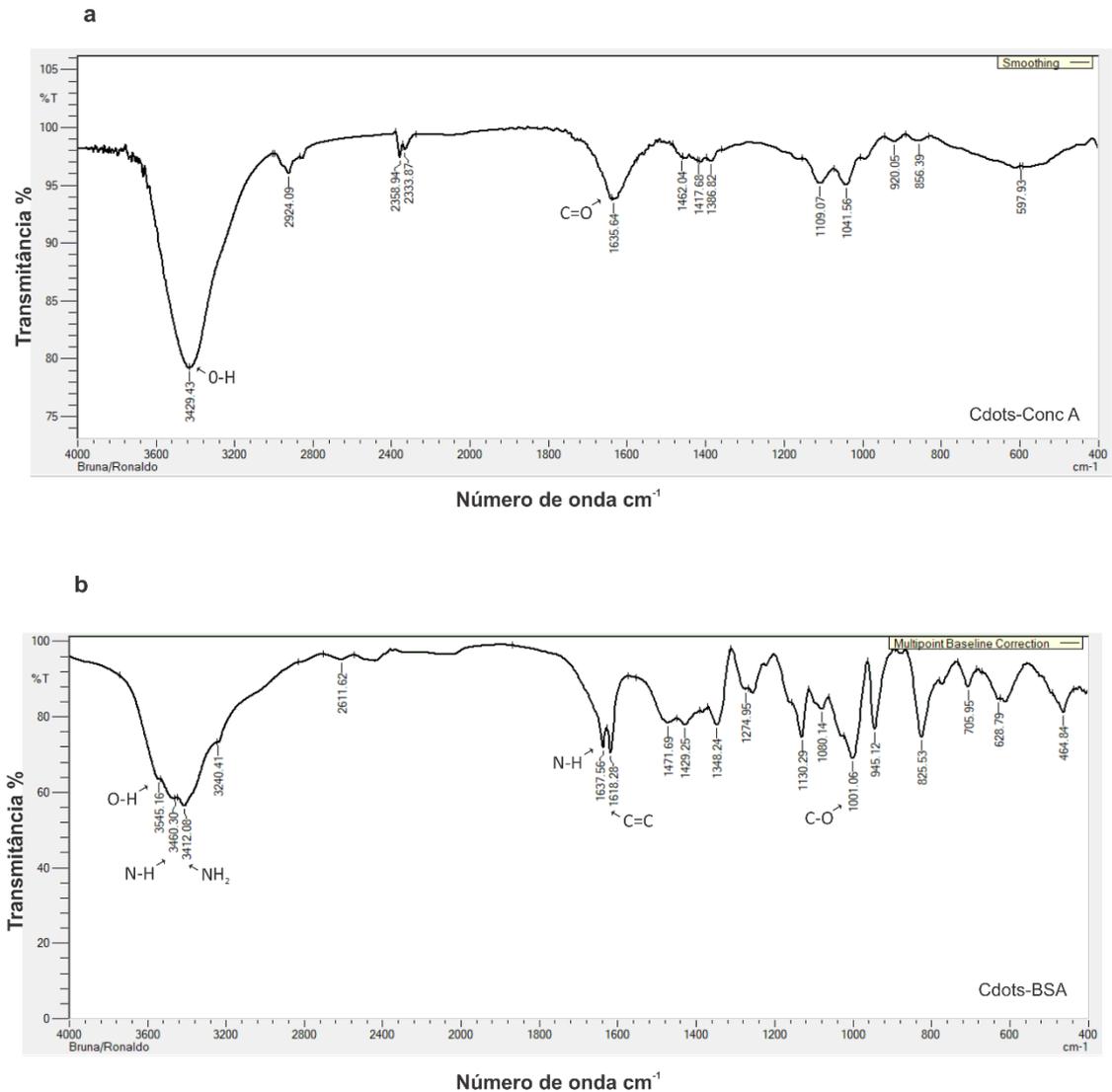
A presença de carga negativa na superfície das nanopartículas apresentadas é uma característica importante para o objetivo desse estudo. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a presença desse tipo de carga na superfície das nanopartículas, aumenta a interação dessas nanoestruturas com moléculas proteicas, como por exemplo, as enzimas (MAHMOUDI et al., 2011).

Dessa forma, uma maior interação dessas nanopartículas com enzimas, ajudam no efeito inibitório dos carbon dots apresentados sob tirosinase.

4.2.4 Espectroscopia no infravermelho

A figura 12 mostra os espectros de infravermelho das nanopartículas Cdots-Conc A (Figura 12a) e Cdots-BSA (Figura 12b), onde indica a presença de vários grupos funcionais, possivelmente na superfície das nanopartículas. Esse resultado está de acordo com o método de síntese utilizado, pois como relatado anteriormente na introdução, a obtenção de Carbon dots pelo método de pirólise, produz nanopartículas contendo um núcleo de átomos de carbono com hibridização sp^2 e grupos funcionais em sua superfície, que dependem do material de partida utilizado, nesse caso, as proteínas Concanavalina A e BSA.

Figura 12 - Espectro de infravermelho de a) Cdots-Conc A e b) Cdots-BSA.



Fonte: O autor (2020)

Pesquisas anteriores onde foram realizados estudos de *docking*, mostram a relação da estrutura das moléculas com sua atividade inibitória sob a enzima tirosinase. Como descrito na introdução, a região do sítio ativo dessa enzima possui carga positiva devido aos resíduos de aminoácidos presentes e, principalmente, a presença do cobre.

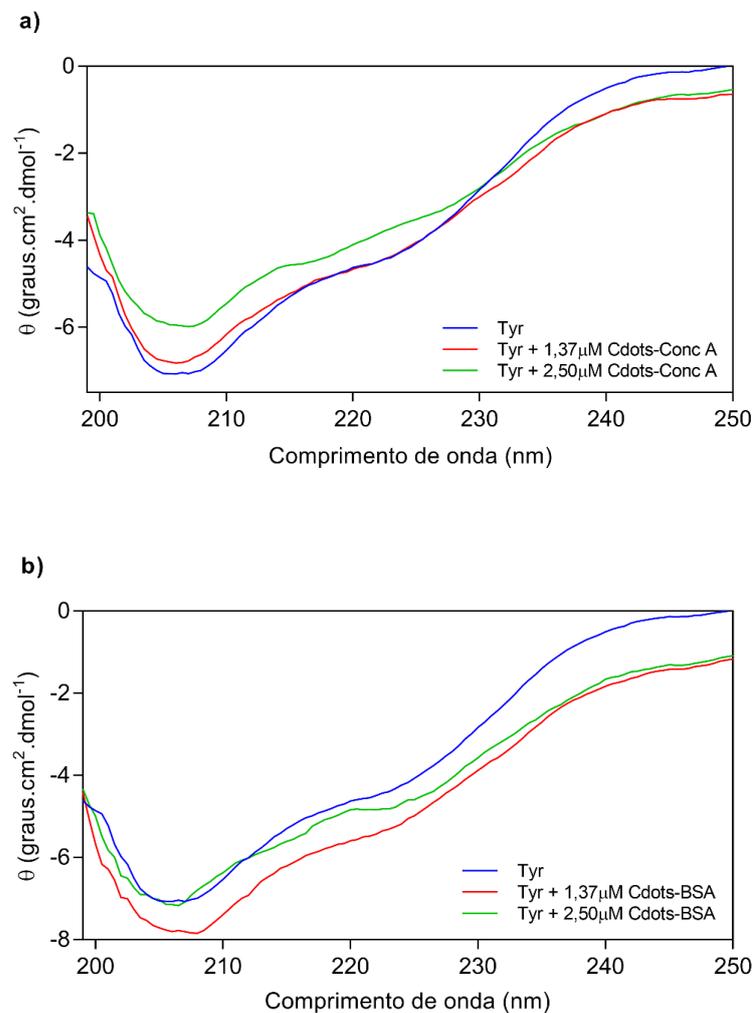
Dessa forma, moléculas contendo grupos funcionais que possuem nucleófilos, como os que estão presentes nos Cdots-Conc A e Cdots-BSA (C=O, O-H, N-H, C-O), demonstraram uma maior interação com o sítio ativo da enzima e, conseqüentemente,

um maior efeito inibitório na atividade catalítica da tirosinase. (CHEN et al., 2015; BAROOS et al., 2019).

4.3 Espectroscopia de dicroísmo circular

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica utilizada na investigação de mudanças estruturais e conformacionais da estrutura secundária da proteína. Fornecendo informações sobre as interações entre as nanopartículas e a enzima tirosinase (figura 13).

Figura 13 - Espectro de dicroísmo circular da Tirosinase na ausência e na presença das nanopartículas a) Cdots-Conc A e b) Cdots-BSA (1,37 μM e 2,5 μM). Concentração de tirosinase 5 μM , em tampão fosfato de sódio com pH = 7,4.



Fonte: O autor (2020)

A figura 13a mostra os espectros de dicroísmo circular da tirosinase na ausência e na presença do Cdots1, exibindo duas bandas largas em 204 nm e 208 nm, o que corresponde estrutura α -hélice da enzima, e uma banda em 212 nm, pela contribuição do domínio folha- β . O aumento da concentração de Cdots-Conc A aumentou a intensidade das bandas de absorção da tirosinase, enquanto que na presença do Cdots-BSA há uma diminuição dessa intensidade.

Na ausência de Cdots-Conc A, a tirosinase possui 30,24% de α -hélice e 18,31% de folha β , com a adição progressiva de Cdots-Conc A houve um acréscimo da porção α -hélice da enzima para 31,18% e 32,64%. Por outro lado, a porção folha β sofreu um decréscimo para 16,61% e, posteriormente, para 15,35%.

Com a adição do Cdots-BSA houve uma mudança significativa na proporção da estrutura secundária da enzima (figura 13b), a porção α -hélice aumentou de 30,24% para 40,21% e a porção folha β diminuiu de 18,31% para 8,09%. No entanto, com o aumento da concentração do Cdots-BSA para 2,50 μ M no meio, houve uma nova mudança, deixando os valores em termos de percentual, mais próximos da estrutura original da enzima, α -hélice com uma proporção de 31,39% e a folha β com valor de 12,4%.

Uma das principais consequências e riscos da interação de proteínas com nanopartículas, é a drástica alteração permanente da estrutura da biomolécula. Como as proteínas tem suas atividades estritamente relacionadas a sua estrutura, essas mudanças conformacionais podem causar modificações no sítio ativo, desnaturação da proteína e até mesmo perda irreversível da atividade enzimática, o que pode ser crucial no sistema biológico. No entanto, a interação da tirosinase com o Cdots-Conc A, por exemplo, causou pequenas alterações na estrutura secundária da enzima.

A interação do Cdots-BSA com a tirosinase também demonstrou ser satisfatória, apesar de ter ocorrido uma mudança significativa na porcentagem da estrutura secundária da tirosinase, com a presença da nanopartícula na concentração de 1,37 μ M. Pois, com a adição de mais Cdots-BSA ao sistema, ocorreram novas mudanças conformacionais, fazendo com que a estrutura secundária da enzima se aproximasse da proporção original.

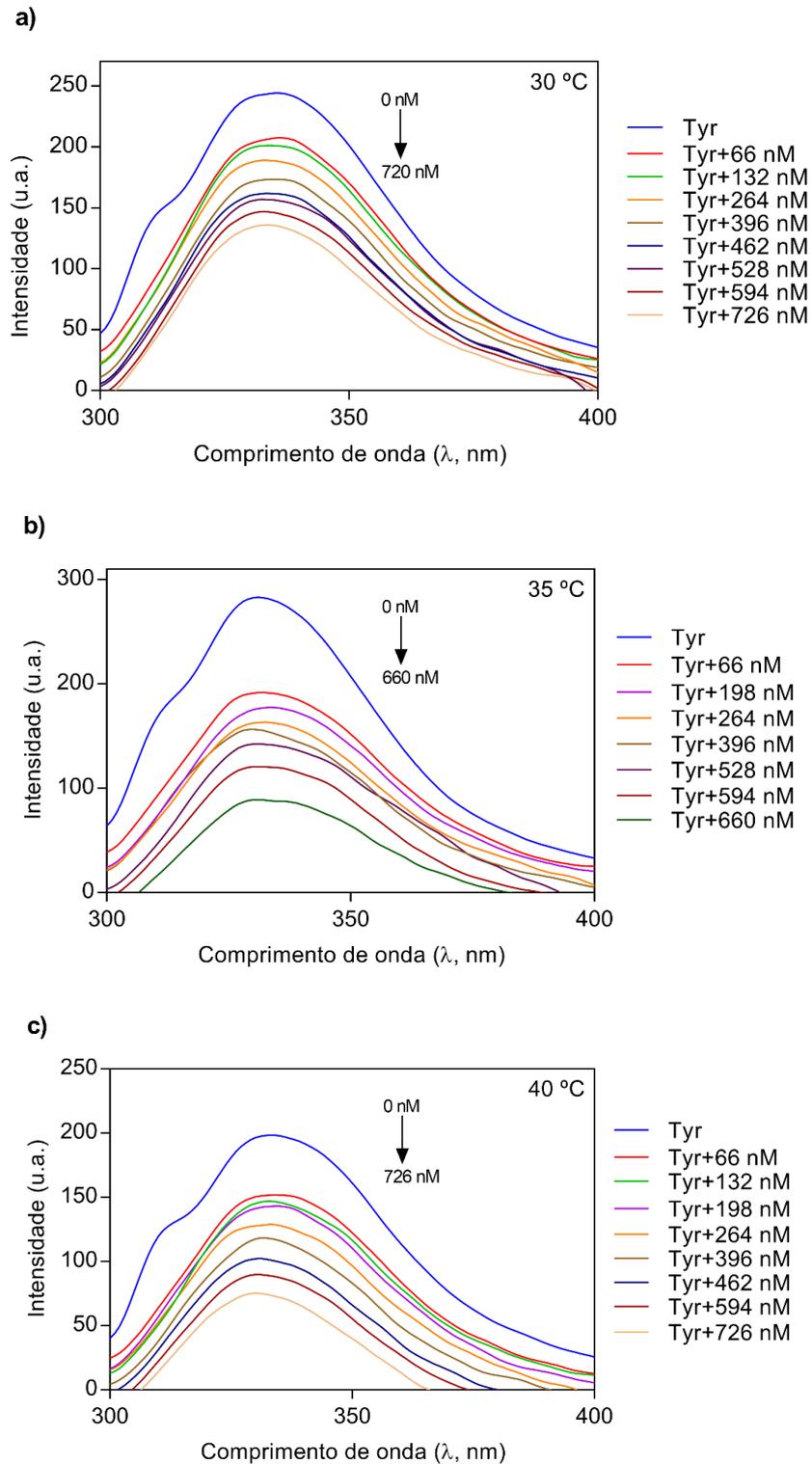
Esses resultados são bastante positivos para o uso terapêutico dessas carbon dots, pois as pequenas modificações na tirosinase causadas pelas nanopartículas, aparentam ser momentâneas e condicionadas a concentração das substâncias, com a tendência de não serem irreversíveis.

4.4 Experimento de supressão da fluorescência da tirosinase

A tirosinase, assim como várias proteínas, possui fluorescência intrínseca, decorrentes de grupos fluoróforos presentes em sua estrutura, tais como os resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina. Pequenas modificações na polaridade em torno do microambiente próximo a esses grupos podem modificar a emissão da fluorescência dessas proteínas (SURYAWANSHI et al., 2016). Dessa maneira, a espectroscopia de fluorescência foi utilizada para detectar essas modificações e fornecer informações mais detalhadas sobre as interações bioquímicas entre a proteína e a nanopartícula Cdots-Conc A.

Os dados espectrais da tirosinase após a adição de diferentes concentrações de Cdots-Conc A, coletados nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C e com o comprimento de excitação em 280 nm, estão ilustrados na figura 14.

Figura 14 - Supressão da fluorescência da enzima tirosinase (200 nM) na presença do Cdots1 (0 até 726 nM) em diferentes temperaturas a) 30 °C, b) 35 °C e c) 40 °C.



Fonte: O autor (2020)

Foi observado que, na ausência do Cdots-Conc A, a tirosinase exibiu uma forte banda de emissão de fluorescência a 333 nm, no entanto essa intensidade foi

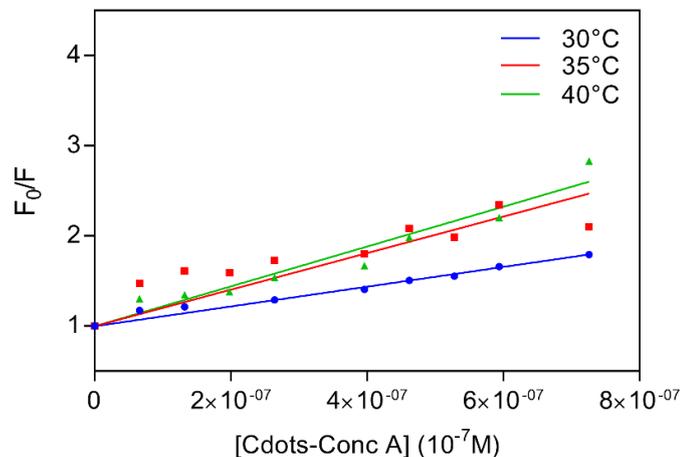
diminuindo gradualmente, sem mudanças na posição dos picos no espectro, com o aumento da concentração da nanopartícula no meio.

A redução da intensidade de fluorescência pode ser descrita pela equação de Stern-Volmer (equação 5), que utiliza a proporção entre as intensidades máximas de emissão da enzima, em um determinado comprimento de onda, na ausência (F_0) e na presença (F) do agente supressor (Q) (LAKOWICZ, 2006).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (5)$$

A partir das regressões lineares dessa equação foi obtido o gráfico 5 e os valores de Ksv do sistema Cdots-Conc A – Tirosinase em diferentes temperaturas.

Gráfico 5 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da intensidade de fluorescência da tirosinase pela titulação por Cdots-Conc A em diferentes temperaturas.



Fonte: O autor (2020)

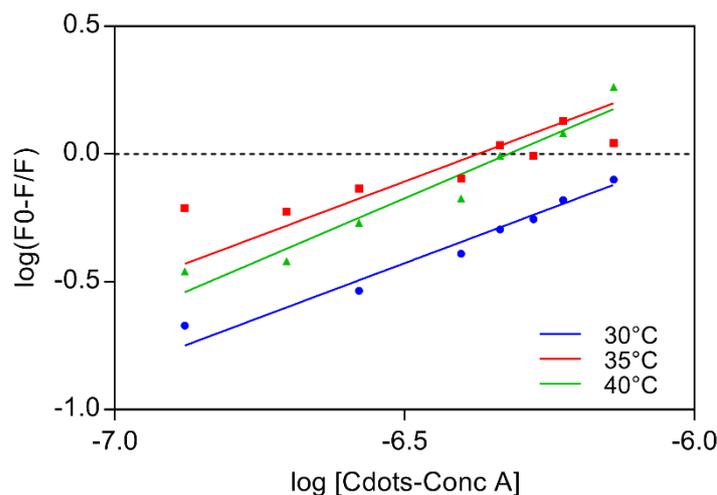
A constante de supressão (K_{sv}) indica como acontece o processo de *quenching*, ou seja, supressão da fluorescência, da enzima pela ação do Cdots-Conc A. De acordo com os valores obtidos nas diferentes temperaturas, $K_{sv30\text{ °C}} = 1,1 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$, $K_{sv35\text{ °C}} = 2,03 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$, $K_{sv40\text{ °C}} = 2,21 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$, pode-se observar que o aumento da temperatura provoca um aumento do K_{sv} , o que indica um processo de *quenching* dinâmico, pois esse ganho de energia favorece a formação do complexo nanopartícula-enzima (LAKOWICZ, 2006).

Além disso, através da equação 6 foi possível obter informações mais quantitativas sobre a interação da ligação nanopartícula-proteína. Onde K_a é a constante de associação, n é o número de sítios ocupados pela nanopartícula na estrutura proteica, $[Q]$ é a concentração do agente supressor (Cdots-Conc A) e F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência na ausência e na presença da nanopartícula (ZHAO et al., 2009).

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (6)$$

A partir dessa equação foi obtido um gráfico de $\log [(F_0 - F)/F]$ em função do logaritmo da concentração de Cdots-Conc A que está representado no gráfico 6. A partir da regressão linear, foi obtido, para cada temperatura, o valor de n , correspondente a inclinação da reta, e o valor da constante de associação (K_a) referente a interceptação no eixo Y do gráfico 6 (ZHAO et al., 2009).

Gráfico 6 - Gráfico de $\log [(F_0 - F)/F]$ em função da concentração de Cdots-Conc A.



Fonte: O autor (2020)

A constante de associação constitui um importante parâmetro no estudo da interação entre moléculas, pois revela o grau de interação entre as substâncias estudadas. Nesse estudo, os valores de K_a encontrados para 30, 35 e 40 °C ($1,25 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$, $2,61 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ e $1,32 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente), foram da ordem

entre 10^{5-6} , o que indica uma afinidade de moderada a alta entre o Cdots-Conc A e a enzima tirosinase (FAN et al., 2017).

Além disso, o aumento do K_a , com o aumento da temperatura, sugere que a estabilidade do complexo tirosinase - Cdots-Conc A é incrementada com temperaturas mais altas.

Essa alta afinidade é um fator importante para a atividade inibitória das nanopartículas, pois como discutido posteriormente, o Cdots-Conc A inibi a enzima tirosinase de maneira competitiva, indicando que a nanopartícula se liga no mesmo sítio de ligação que o substrato. Dessa forma, a natureza e a intensidade da interação entre a nanopartícula e a enzima, é um fator determinante na inibição enzimática.

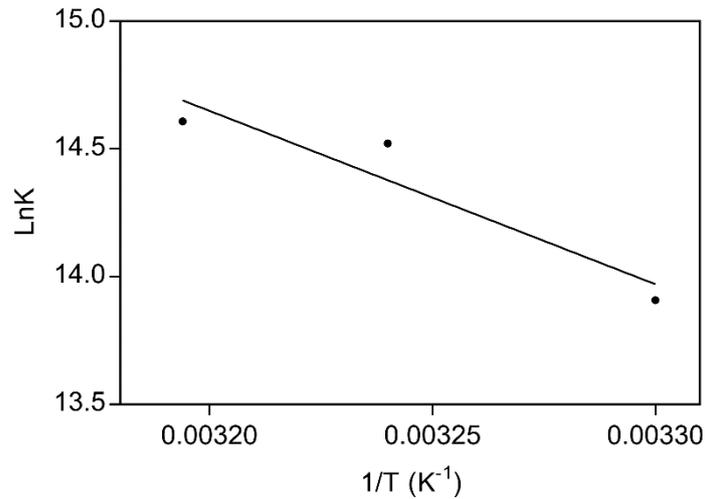
A partir da inclinação da reta, também foi obtido o valor de n para as temperaturas de 30, 35 e 40 °C, respectivamente ($n=0,85$; $n=0,85$ e $0,96$). Os valores obtidos foram bem próximos a 1, o que indica que a interação entre as substâncias acontece na proporção de 1:1. Provavelmente, apenas 1 molécula do Cdots-Conc A interage no sítio de ligação de uma molécula da enzima tirosinase, diminuindo sua atividade enzimática.

Com esses dados, a partir equação de Van't Hoff (equação 7), é possível calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre a nanopartícula e a enzima.

$$\ln K = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{R T} \quad (7)$$

Onde K é a constante de equilíbrio em cada temperatura, R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J/Mol.K}^{-1}$), T são as diferentes temperaturas utilizadas, ΔH é a variação de entalpia e ΔS é a de variação de entropia do sistema. A partir dessa equação. Foi obtido o gráfico de $\ln K$ em função de $1/T$ (gráfico 7), que tem como o coeficiente angular ($-\Delta H/T$) e o coeficiente linear ($\Delta S/T$).

Gráfico 7 - Gráfico de LnK em função do inverso da temperatura, obtido a partir da equação de Van't Hoff, baseado nas diferentes temperaturas.



Fonte: O autor (2020)

A partir dos dados experimentais obtidos nas três diferentes temperaturas e sua aplicação na equação de energia livre de Gibbs (equação 8), é possível calcular os parâmetros termodinâmicos (Quadro 1) e identificar os tipos de interação não covalentes que governam a interação da nanopartícula com a enzima.

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (8)$$

Quadro 1 – Parâmetros termodinâmicos de interação entre a enzima e o Cdots1

°C	K _{sv} (x10 ⁶ mol L ⁻¹)	K _a (x10 ⁵ mol L ⁻¹)	n	ΔH (KJmol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS (Jmol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJmol ⁻¹ 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

Fonte: O autor (2020)

Valores termodinâmicos seguindo o padrão $\Delta G < 0$, $\Delta S < 0$ e $\Delta H < 0$, indicam que a interação do Cdots-Conc A com a enzima tirosinase é espontânea, e que é governada em sua maior parte por interações hidrofóbicas.

Essas informações sobre interação são relevantes para a pesquisa, visto que a utilização das mais variadas substâncias como agentes terapêuticos é basicamente dependente da sua capacidade de ligação com as biomoléculas, e nesse contexto, esse complexo nanopartícula-proteína é um bom modelo miniatura para se obter informações sobre estas interações (SURYAWANSHI et al., 2016).

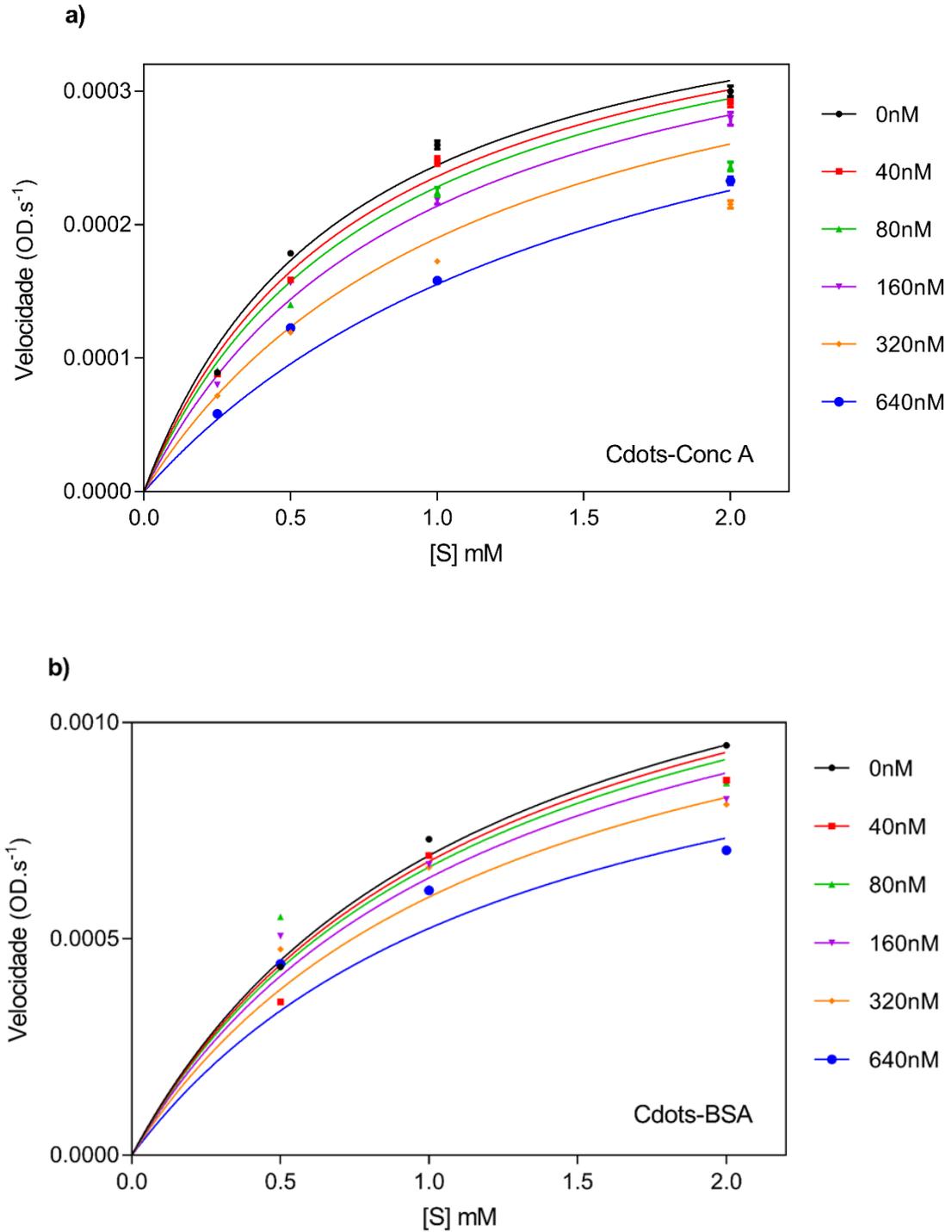
4.5 Cinética enzimática de inibição da tirosinase

4.5.1 Ensaio da atividade catalítica da tirosinase

O efeito das nanopartículas de carbono sobre a atividade da enzima tirosinase foi avaliado através da quantidade formada de o-dopaquinona, que é um produto da reação que tem essa enzima como catalizador e a L-dopa como substrato. Através desse experimento, foi constatado que as duas nanopartículas testadas possuem atividade inibitória dose dependente contra a tirosinase, com ótimos valores de IC_{50} e outros parâmetros de inibição.

Como mostrado na figura 15, a inibição enzimática das nanopartículas utilizadas apresentaram cinética semelhante ao modelo de Michaelis Menten, onde a taxa de conversão do substrato em produto pela enzima é máxima, quando se utiliza pequenas quantidades de [S], e depois vai diminuindo com o aumento de [S], até atingir um platô, que indica a saturação da enzima no processo catalítico (NELSON; COX, 2014).

Figura 15- Gráfico da velocidade da reação enzimática catalisada pela tirosinase na ausência e na presença de várias concentrações de a) Cdots-Conca A e b) Cdots-BSA (0,0 até 640 nM).



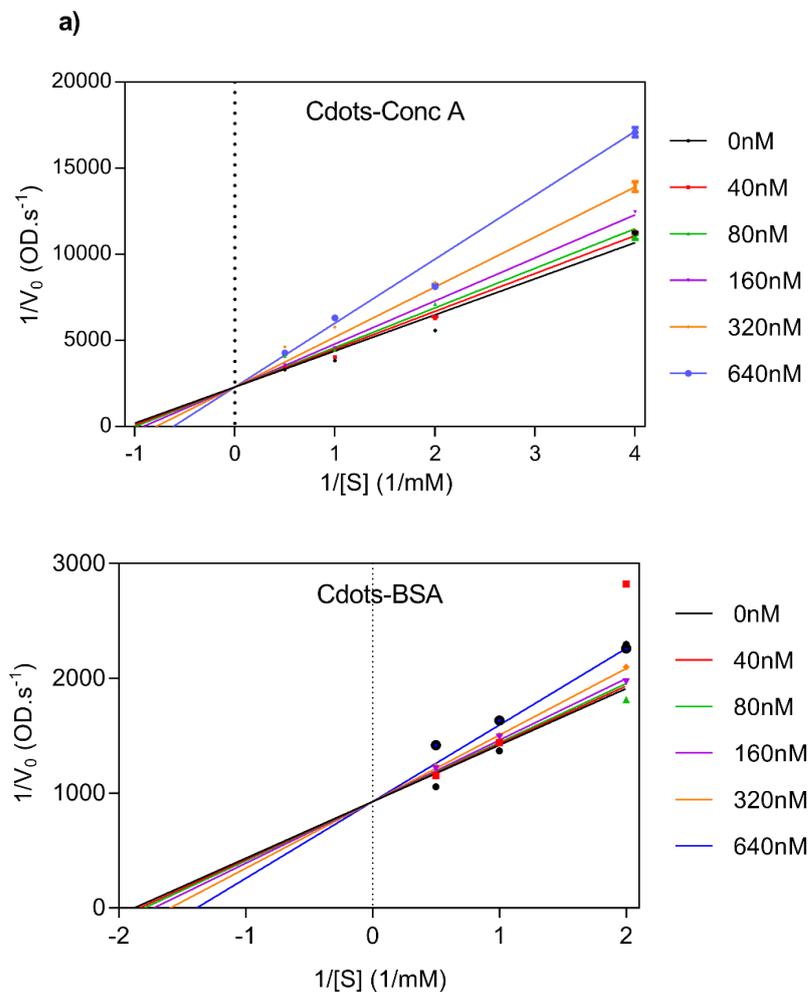
Fonte: O autor (2020)

Além disso, os gráficos demonstram que, baseados na velocidade inicial da enzima, a taxa de conversão da realizada pela tirosinase vai diminuindo, com o aumento da concentração dos inibidores, carbon dots, no meio.

Para uma melhor análise dos parâmetros cinéticos de inibição enzimática, a equação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em equações mais práticas, como é o caso da equação de Lineweaver-Burk, explicado na introdução, o que fornece gráficos com informações mais claras sobre os dados experimentais.

Na figura 16 está representado os gráficos duplo recíproco dos Cdots-Conc A e Cdots-BSA, obtidos a partir da equação de Lineweaver-Burk, onde é possível extrair informações sobre o tipo de mecanismo de inibição e a constante de inibição (K_i).

Figura 16 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a reação da tirosinase com a L-dopa com aumento gradativo da concentração de a) Cdots-Conc A e b) Cdots-BSA.



Fonte: O autor (2020)

Analisando o gráfico das nanopartículas, conclui-se que os Cdots-Conc A e da Cdots-BSA apresentam mecanismo de inibição competitivo. Pois, o aumento da concentração das nanopartículas [I] produziu várias retas com diferentes inclinações ($\alpha K_m/V_{m\acute{a}x}$), mas com interceptação comum no eixo x ($1/V_{m\acute{a}x}$). Isso significa que um aumento da concentração das nanopartículas não modificou o $V_{m\acute{a}x}$. As diferentes inclinações das retas são devido ao aumento do K_m pelo fator α , que é diretamente proporcional a [I], que nesse caso são as nanopartículas.

A partir desses gráficos, também pode ser obtido o valor de alfa para ambas as nanopartículas [I], esse parâmetro determina o quanto a ligação do inibidor modifica a afinidade da enzima pelo substrato. As duas nanopartículas apresentaram valor de alfa muito maior do que um ($\alpha \gg 1,0$), 168,9 para o Cdots-Conc A e 1687 para o Cdots-BSA, o que também indica um mecanismo de inibição do tipo competitivo.

Outro importante critério na avaliação de uma substância como inibidor enzimático é a constante de equilíbrio para a ligação entre o inibidor e a enzima, denominada K_i ou constante de inibição. Esse parâmetro avalia a força da interação entre o inibidor e a enzima, pois, como descrito anteriormente na equação, quanto menor o K_i , maior a [EI], portanto maior a afinidade da tirosinase pela nanopartícula.

Entre as duas nanopartículas, o Cdots-Conc A se liga de maneira mais forte com a enzima tirosinase, em razão de que o seu valor $K_i = 4,62 \cdot 10^{-5}$ M foi aproximadamente 3,6x menor do que o Cdots-BSA ($K_i = 16,87 \cdot 10^{-5}$ M). Esse resultado é bastante expressivo, pois a nanopartícula Cdots-Conc A apresentou uma maior força de ligação com a tirosinase, quando comparado com a quercetina, $K_i = 6,41 \cdot 10^{-5}$ M, e o ácido kójico, $K_i = 5,3 \cdot 10^{-5}$ M (FAN et al., 2017).

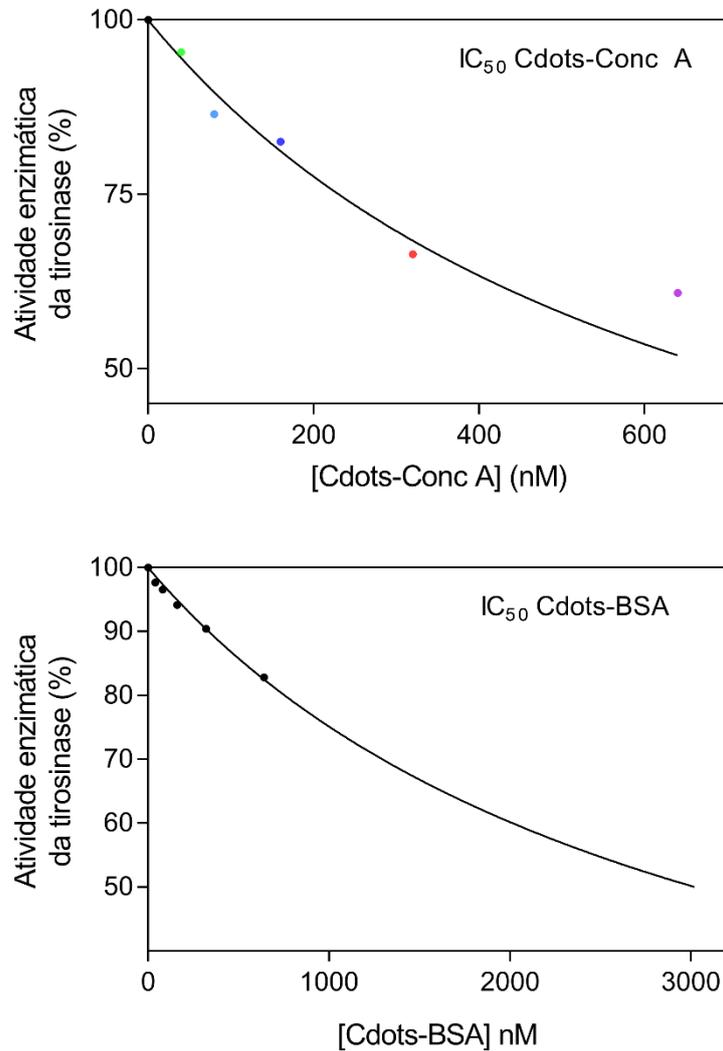
Comparando a atividade enzimática da tirosinase na ausência e na presença de várias concentrações de inibidor, através da equação 9, é possível avaliar a relação dose-resposta das nanopartículas.

$$\textit{Atividade enzimática} = \left(\frac{V_{\text{sem inibidor}}}{V_{\text{com inibidor}}} \right) \times 100 \quad (9)$$

Analisando os gráficos dose resposta das duas nanopartículas sob a enzima tirosinase (figura 17), pode-se concluir que a nanopartícula Cdots-Conc A teve uma maior eficácia inibitória do que a Cdots-BSA, pois apresentou um IC_{50} (0,691 μ M) quatro vezes menor que o valor obtido experimentalmente para o Cdots2 (3,02 μ M).

Essa diferença no efeito inibitório pode ser acarretada pelas mudanças estruturais relacionadas a composição das nanopartículas, detectadas pela espectroscopia de infravermelho. Como relatado anteriormente.

Figura 17 - Gráfico do efeito dos Cdots-Conc A e Cdots-BSA sobre a atividade enzimática da tirosinase.



Fonte: O autor (2020)

Apesar de ambas as nanopartículas terem sido sintetizadas pelo mesmo método, foram produzidas a partir de materiais de partida diferente, o Cdots-Conc A, derivado da proteína Concanavalina A, enquanto que o Cdots-BSA, da albumina do soro bovino. Essa diferença dos grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas e suas cargas superficiais, modificam a interação dessas nanoestruturas com a tirosinase, como demonstrado na análise de dicroísmo circular.

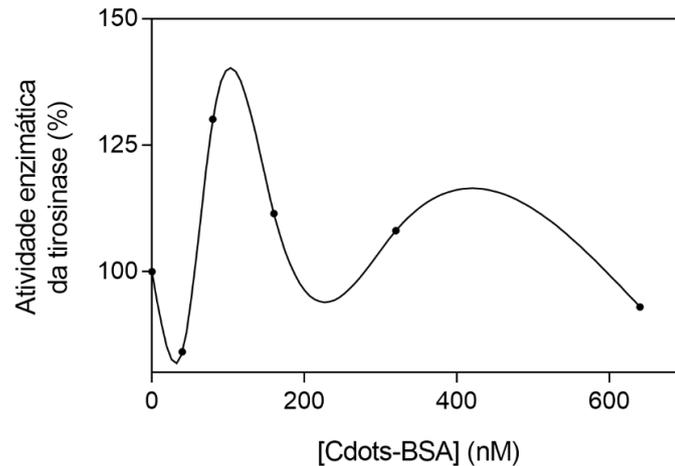
Tanto o Cdots-Conc, quanto o Cdots-BSA, apresentaram uma ótima atividade inibitória quando comparado com inibidores da tirosinase, comercialmente utilizados. O ácido kójico, por exemplo, possui um IC_{50} de 40,69 μM como inibidor da tirosinase, sendo uma das substâncias consideradas como padrão na inibição dessa enzima. Quando comparado com esses valores, a nanopartícula Cdots-BSA apresentou um IC_{50} cerca de treze vezes menor do que o ácido kójico (40,69 μM), enquanto que o Cdots-Conc A (0,691 μM) exibiu um valor quase 60x menor do que esse mesmo composto, demonstrando a capacidade de inibição sob a tirosinase dessas nanopartículas (FAN et al., 2017).

Valores semelhantes de IC_{50} foram obtidos com outras substâncias inibidoras da tirosinase, em trabalhos recentes. Em 2015, Chen *et al.* isolaram da planta chinesa *Gastrodia elata* um composto fenólico que apresentou uma potente inibição da tirosinase, com valor de IC_{50} 0,53 μM , e baixa toxicidade em células normais de melanócitos humanos (BUIRAGO, 2016).

Já em 2016, Yang e colaboradores avaliaram o efeito de nanopartículas de amido, derivadas de vários materiais como milho, mandioca e batata, sobre a atividade da tirosinase. Todas as nanopartículas sintetizadas inibiram a atividade enzimática reversivelmente, com valores de IC_{50} que variaram de 0,308 μM a 4,774 μM (YANG et al., 2016).

Apesar do seu efeito inibitório sobre a tirosinase, a nanopartícula Cdots2 apresentou um comportamento dose-resposta não linear quando avaliado a cinética enzimática da reação com o substrato L-dopa na concentração de 0,5 (gráfico 8), obtido através da suavização da curva por *spline*, um tratamento estatístico que ajusta a curva, através de uma suavização da reta, e que permite modelar um comportamento atípico dos dados.

Gráfico 8 - Gráfico obtido por suavização dos pontos, referente ao efeito do Cdots-BSA sob a atividade enzimática da tirosinase.



Fonte: O autor (2020)

Nesse gráfico acima mostra que uma pequena dose do Cdots-BSA, em torno de 80 nM, causa um incremento da atividade da enzima, enquanto que a partir desse ponto, um aumento subsequente da concentração dessa nanopartícula no meio, causou uma diminuição da atividade enzimática da tirosinase, ou seja, uma inibição.

Esse comportamento atípico para a maioria dos inibidores, pode ser explicado como uma resposta biológica adaptativa, caracterizada toxicologicamente pelo termo hormesis, que acontece quando uma substância apresenta uma dose resposta bifásica, ou seja, a utilização do agente em pequenas concentrações provoca uma estimulação, enquanto que o aumento da sua dose causa uma resposta terapêutica inibitória (MARKSON, 2008; CALABRESE, 2015).

Essa resposta não linear do Cdots-BSA na atividade catalítica da enzima, possivelmente deve-se ao fato de que o Cdots-BSA ao interagir com a tirosinase, provocou mudanças significativas na estrutura secundária da enzima, em determinados valores de concentração, ocorrência que foi indicada na análise de dicroísmo circular. Dessa maneira, essas modificações conformacionais podem estar mudando a disposição dos grupos presentes no sítio ativo da enzima, aumentando ou diminuindo o seu efeito catalítico sobre o substrato. Além disso, pode ocorrer a exposição de outro sítio ativos da enzima que tenha uma atividade enzimática inibitória, portanto a quantidade de nanopartícula do meio pode favorecer exposição de um sítio ativo em detrimento do outro.

Em 2008, Thangasamy *et al.* demonstraram que a quercetina exibiu efeito de hormesis em células de melanoma, induzindo a diferentes respostas celulares dependendo da dose de tratamento utilizada e do nível de expressão da enzima tirosinase na célula (THANGASAMY *et al.*, 2008).

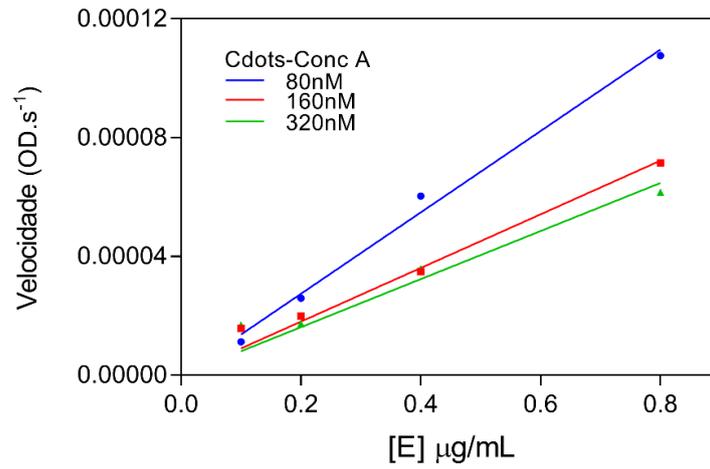
Calabrese, em março de 2018, através de uma revisão na literatura dos últimos sete anos, evidenciou que diferentes nanopartículas apresentaram uma dose repositiva hormética em diversas aplicações biológicas (LAVICOLI *et al.*, 2018). Tiwari e colaboradores, por exemplo, em 2014, demonstraram que pequenas concentrações de nanotubos de carbono incrementou o crescimento de plantas de milho, enquanto que maiores concentrações dessa nanopartícula de carbono induziram a significativas inibições (TIWARI *et al.*, 2014).

A partir desses resultados, devem ser planejados novos experimentos para um melhor estudo e avaliação das mudanças estruturais sofridas pela enzima tirosinase, decorrentes da sua interação com a nanopartícula Cdots-BSA.

4.5.2 Reversibilidade da inibição da tirosinase

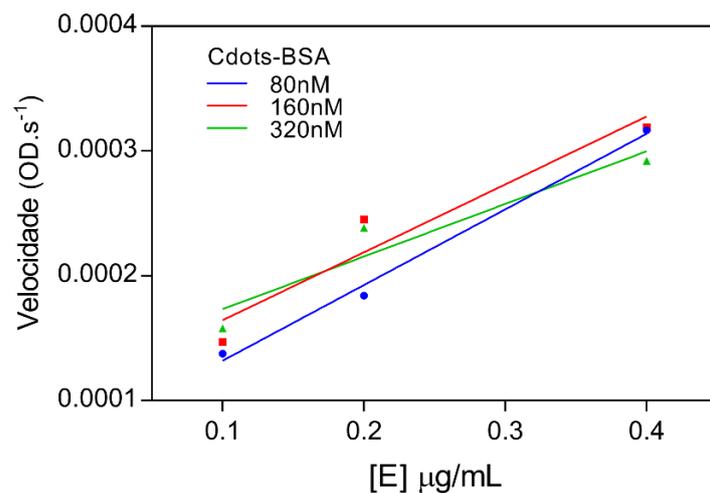
Nos gráficos 9 e 10, pode-se observar os gráficos que mostram o comportamento da atividade enzimática aumentando a concentração da enzima e mantendo a concentração das nanopartículas constantes. O aumento da concentração da enzima causou um aumento na velocidade da reação, mesmo na presença das diferentes concentrações de nanopartículas no meio, evidenciando que tanto o Cdots-Conc A, quanto a Cdots-BSA inibem a tirosinase de maneira reversível.

Gráfico 9 - Gráfico da velocidade da reação em função da concentração de enzima na presença do Cdots-Conc A



Fonte: O autor (2020)

Gráfico 10 - Gráfico da velocidade da reação em função da concentração de enzima na presença do Cdots-BSA



Fonte: O autor (2020)

Um resultado biologicamente importante para uma futura aplicação terapêutica desses nanomateriais. Pois, essa reversibilidade do efeito permite um maior controle terapêutico e representa um inibidor biologicamente mais seguro. Visto que, inibidores irreversíveis, normalmente interagem de maneira covalente com as enzimas,

modificando permanentemente a conformação das mesmas, fazendo com que percam definitivamente parte da sua atividade catalítica (NELSON; COX, 2014).

As nanopartículas Cdots-BSA e, principalmente, a Cdots-Conc A obtiveram bons resultados na cinética enzimática, demonstraram ter uma excelente eficácia *in vitro* na inibição da tirosinase, quando comparadas a outros inibidores da mesma enzima, além de ter uma característica reversível. Esses fatos são bastante importantes, pois podem proporcionar a aplicação dessas substâncias no tratamento de manchas na pele causado pelo aumento de melanina.

4.6 Ensaio de citotoxicidade

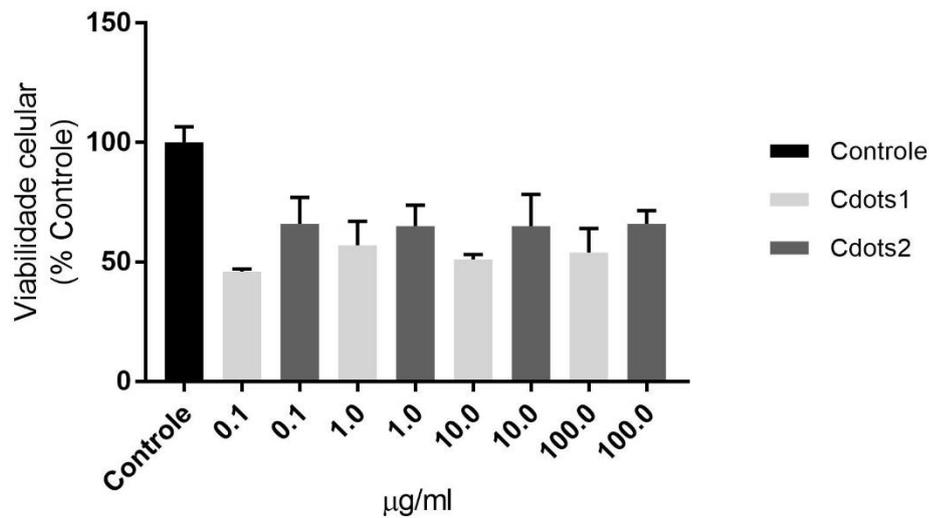
Através de testes biológicos realizados *in vitro*, tais como o modelo do MTT, é possível avaliar a segurança das substâncias num ambiente semelhante ao meio biológico, obtendo informações preliminares sobre a toxicidade das nanopartículas de carbono em células (JIA et al., 2005).

Em 2019, Garcia et al avaliaram a citotoxicidade da nanopartícula Cdots-Conc A em diferentes tipos de células do corpo humano, incluindo células sadias e patológicas. O resultados mostraram que o Cdots-Conc A apresentou toxicidade, apenas em altas concentrações, valores a partir de 2 mg/ml para as células HBMEC (Células endoteliais microvasculares do cérebro humano) e HTC116 (Carcinoma do colón humano) e na concentração de 0,5 mg/ml para a linhagem de células A459 (Carcinoma do pulmão humano) (GARCIA et al., 2019).

Nesse trabalho atual, essa mesma nanopartícula derivada da Concanavalina A (Cdots-Conc A) e a nanopartícula derivada da BSA (Cdots-BSA) foram submetidas a avaliação da toxicidade em células da linhagem B16F10 ATCC (Melanoma murino metastático), através de 48 horas de contato das células com essas substâncias.

Como representado no gráfico 11, foi observado que ambas as nanopartículas, mesmo quando administradas em pequenas concentrações, causaram uma diminuição significativa da viabilidade celular para linhagem de células B16F10 ATCC, alcançando o valor médio de 58% de viabilidade quando comparadas ao grupo de células utilizado como controle.

Gráfico 11 - Viabilidade celular de células B16F10 ATCC (Melanoma murino metastático) após a incubação de 48 horas com as nanopartículas.



Fonte: O autor (2020)

Esses resultados sugerem que pode haver uma toxicidade seletiva dessas nanopartículas para células de melanoma da linhagem utilizada. Pois, em estudos realizados anteriormente com a Cdots-Conc A, a nanopartícula só alterou a viabilidade celular a partir de concentrações em miligramas [26]. No entanto, no presente estudo, concentrações de Cdots-Conc A e Cdots-BSA da ordem de micrograma, causaram a morte de células melanoma.

A partir da toxicidade para esse tipo de células, pode concluir que as nanopartículas Cdots-Conc A e Cdots-BSA tem a possibilidade de serem utilizadas no tratamento de melanoma, com baixa toxicidade para outros tipos de células. Tendo como objetivo a confirmação desses efeitos, ambas as nanopartículas serão submetidas a novos testes de viabilidade celular com essas e outras diferentes células, além de utilizar diferentes concentrações para uma melhor avaliação dessas características.

4.7 Quantificação da melanina

A quantificação de melanina em células do tipo B16F10 ATCC caracteriza-se como um importante experimento *in vitro*, pois permite avaliar o efeito inibitório das nanopartículas sobre a enzima tirosinase.

Como mostrado na figura 18, os Cdots-Conc A e Cdots-BSA não modificaram, visualmente, a produção de melanina nessas células quando comparado com o grupo de células tratadas somente com o hormônio α MSH. Esse resultado pode ter ocorrido pelo uso do hormônio nos experimentos e/ou pelas pequenas concentrações das doses de nanopartículas administradas no meio celular.

Figura 18 - Pellet das células B16F10 ATCC após o tratamento com o hormônio α MSH e incubação de 48 horas com o Cdots-Conc A (NP1) e Cdots-BSA (NP2).



Fonte: O autor (2020)

Acredita-se que os Cdots-Conc A e Cdots-BSA tenham um efeito inibitório da tirosinase como foi comprovado nos testes de cinética enzimática *in vitro* sem a presença de células. Além de que as nanopartículas apresentaram toxicidade seletiva para as células de melanócitos e este fato pode estar diretamente relacionado a sua inibição sobre a enzima.

Dessa forma, serão realizados novos experimentos semelhante a metodologia de outros trabalhos, com e sem o uso do hormônio α MSH e, também, com maiores concentrações de nanopartículas no meio para que seja confirmado sua atividade inibitória no meio celular. (LEE et al., 2018)

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse trabalho, ficou evidente que, os nanomateriais de carbono, do tipo carbon dots, de acordo com suas propriedades, possuem forte tendência a modular a função de proteínas, como a atividade catalítica de enzimas.

Ambas as nanopartículas apresentaram uma atividade inibitória competitiva e reversível, sendo o Cdots-Conc A mais potente do que o Cdots-BSA, quercetina e ácido kójic, pois exibiu valores de K_i (constante de inibição) e IC_{50} menores do que essas substâncias utilizadas como referência na inibição da tirosinase.

Os diferentes padrões do efeito na inibição enzimática da tirosinase pelos Cdots desenvolvidos, foram explicados a partir de experimentos que avaliaram a interação das nanopartículas com a enzima.

Por conta da sua forte inibição a tirosinase, reversível e com baixa toxicidade para células saudáveis, essas nanopartículas qualificam-se como potenciais candidatos no desenvolvimento de cosméticos e agentes farmacológicos no tratamento de melanoma, clareamento de pele e outras doenças relacionadas a melanina.

6. PERSPECTIVAS

A fim de que essas nanopartículas tenham uma aplicação como inibidores enzimáticos ou outra aplicação biológica, se faz necessário a realização de novos experimentos sobre esses Cdots como:

- Estudar a influência do tamanho, forma e superfície desses carbon dots na inibição enzimática.
- Realizar estudos que forneçam maiores informações sobre a interação molecular entre os carbon dots e a tirosinase.
- Novos experimentos de cinética enzimática com a tirosinase, para um melhor entendimento do mecanismo de inibição e do efeito hormesis. Além do uso de outras enzimas como a tripsina, lipase pancreática, entre outras, com o objetivo de explorar a capacidade inibitória dos carbon dots.
- Realização de novos modelos de testes *in vitro* e *in vivo* para a quantificação da melanina, avaliação da atividade sobre a tirosinase e efeito sobre os melanócitos e outros tipos de células.
- Conjugação e inserção de substâncias inibidoras dentro da nanopartícula ou na superfície, além da avaliação dos possíveis efeitos biológicos e tóxicos *in vitro* e *in vivo* desses sistemas conjugados.

REFERÊNCIAS

- Abe, K., Matsuki, N., **Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT**. *Neuroscience Research*, v.38, p. 325–329, 2008.
- Barros, M. R., Menezes, T. M., da Silva, L. P. S., Pires, D. S., Princival, J. S., Seabra, G. e Neves, J. L. **Furan inhibitory activity against tyrosinase and impact on B16F10 cell toxicity**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.136, p. 1034-1041, 2019.
- Buitrago, E., Hardré, R., Haudcoeur, R., Jamet, H., Belle, C., Boumendjel, A., Bubacco, L e Reglier, M. **Are Human Tyrosinase and Related Proteins Suitable Targets for Melanoma Therapy?**, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 27, p. 3033–3047, 2016.
- Buzea, C.; Pacheco, I. I.; Robbie, K., **Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity**. *Biointerphases*, v.2, n.4, p.17-71, 2007.
- Calabrese, E. J., **Hormesis within a mechanistic context**. *Homeopathy*, v.104, p. 90-96, 2015.
- Chen, M., Zeng, G., Xu, P., Lai, C., Tang, L., **How do enzymes ‘meet’ nanoparticles and nanomaterials**. *Trends in Biochemical Sciences*, v.42, n.11, p. 914-930, 2017.
- Chen, WC., Tseng, TS., Hsiao, NW., Lin, YL., Wen, ZH., Tsai, CC., Lee, YC., Lin, HH., Tsai, KC., **Discovery of Highly Potent Tyrosinase Inhibitor, T1, with Significant Anti-Melanogenesis Ability by zebrafish in vivo Assay and Computational Molecular Modeling**. *Scientific Reports*, v.5, n.1, p. 7995-8003, 2015.
- Cornish-Bowden, A., **The origins of enzyme kinetics**. *Federation of European Biochemical Societies*, v.587, p. 2725–2730, 2013.
- Estrada, L. P. H. e Champion, J. A., **Protein nanoparticles for therapeutic protein delivery**. *Biomater. Sci.*, v.3, n.6, p. 787–799, 2015.
- Fan, M., Zhang, G., Hu, X., Xu, X., Gong, D., **Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism**. *Food Research International*, v.100, p. 226–233, 2017.
- Garcia, Y. S., Barros, M. R., Ventura, G. T., de Queiroz, R. M., Todeschini, A. R. e Neves, J. L. **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. 111460-111467, 2019.
- Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., Calabrese, E. J., **Nanoparticle Exposure and Hormetic Dose–Responses: An Update**. *International Journal of Molecular Sciences*, v.19, 805-828, 2018.

Ito, S., Sugumaran, M. e Wakamatsu, K. **Chemical Reactivities of ortho-Quinones Produced in Living Organisms: Fate of Quinonoid Products Formed by Tyrosinase and Phenoloxidase Action on Phenols and Catechols**. International Journal of Molecular Sciences, v.21, n.17, p. 6080-6116, 2020.

Jaleel, J. A., Pramod, K., **Artful and multifaceted applications of carbon dot in biomedicine**. Journal of Controlled Release, v.269, p. 302–321, 2018.

Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., Guo, X., **Cytotoxicity of Carbon nanomaterials: Single-Wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene**. Environmental, Science and Technology, v.39, p. 1378-1383, 2005.

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

Lee, G. Y., Cho, B. O., Shin, J. Y., Jang, S., Cho, I. S., Kim, H. Y., Park, J. S., Cho, C. W., Kang, J. S., Kim, J. H., Kim, Y. H., **Tyrosinase inhibitory components from the seeds of Cassia tora**. Archives Pharmacal Research, v.41, n.5, p. 490-496, 2018.

Lim, S.Y., Shem, W. e Gao, Z. **Carbon quantum dots and their applications**. Chemical Society Reviews, v.44, n.1, 362-381, 2015.

Liu, Z., Liang, XJ., **Nano-carbons as theranostic**. Theranostics, v.2, n.3, p. 235-237, 2012.

Mahmoudi, M., Shokrgozar, M. A., Sardari, S., Moghadam, M. K., Vali, H, Laurent, S. e Stroeve, P. **Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles**. ACS Nano, v.3, p. 1127-1138, 2011.

Markson, M. P., **Hormesis defined**. Ageing Research Reviews, v.7, p. 1–7, 2008.

Millipore Corporation. **User guide Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices**. Irlanda, 2011. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Amicon-Ultra-0.5-Centrifugal-Filter-Unit,MM_NF-UFC501008#anchor_UG

Miot, L. D. B., Miot, H. A.; Silva, M. G., Marques, M. E. A., **Fisiopatologia do melasma**. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.84, n.6,p. 623-635, 2009.

Mulvaney, P. **Nanoscience vs Nanotechnology - Defining the Field**. ACSA Nano, v.9, n.3, p. 2215-2217, 2015.

Nandi, S., Malishev, r., Kootery, K. P., Mirsky, Y., Kolusheva, S., Jelinek, R., **Membrane analysis with amphiphilic carbon dots**. Chemical Communications, v.50, p. 10299-10302, 2014.

Nelson, D. L., Cox, M. M., **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed, Editora Artmed, 2014.

Peng, Z., Han, X., Li, S., Al-Youbi, A. O., Bashammakh, A. S., El-Shahawi, M. S., Leblanc, R. M., **Carbon dots Biomacromolecule interaction, bioimaging and nanomedicine**. *Coordination Chemistry Reviews*, v.343, p. 256–277, 2017.

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.

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.

Radhakrishnan, S. K., Shimmon, R.G., Conn, C., Baker, A. T., **Evaluation of Chalcone Oximes as Inhibitors of Tyrosinase and Melanin Formation in B16 Cells**. *Arch. Pharm. Chemistry in Life Science*, v.349, p. 20–29, 2016.

Shemetov, A. A., Nabiev, I., Sukhanova, A., **Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles**. *ACS Nano*, v.6, n.6, p. 4585-4602, 2012.

Sohal, I. S.; O'Fallon, K. S.; Gaines, P.; Demokritou, P.; Bello, D., **Ingested engineered nanomaterials state of science in nanotoxicity testing and future research needs**. *Particle and Fibre Toxicology*, v.15, n.29, p. 1-31, 2018.

Suryawanshi, V. D, Walekar, L. S., Gore, A. H., Anbhule, P. V. e Kolekar, G. B. **Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin**. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v.6, p. 56-63, 2016.

Thangasamy, T., Sittadjody, S., Limesand, K. H., Burd, R., **Tyrosinase overexpression promotes ATM-dependent p53 phosphorylation by quercetin and sensitizes melanoma cells to dacarbazine**. *Cellular Oncology*, v.30, p. 371–387, 2008.

Tiwari, D. K., Dasgupta-Schubert, N., Cendejas, L. M. V., Villegas, J., Montoya, L. C., García, S. E. B., **Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (Zea mays) and implications for nanoagriculture**. *Applied Nanoscience*, v.4, p. 577–591, 2014.

Wang, Q., Huang, X., Long, Y., Wang, X., Zhang, H., Zhu, R., Liang, L., Teng, P., Zheng, H., **Hollow luminescent carbon dots for drug delivery**. *Carbon*, v.59, p. 192-199, 2013.

Wen, J., Xu, Y., Li, H., Lu, A., Sun, S., **Recent applications of carbon nanomaterials in fluorescence biosensing and bioimaging**. *Chemical Communications*, v.57, n.51, p. 11346-11358, 2015

Whitesides, G. M. **Nanoscience, Nanotechnology, and Chemistry**. *Small*, v.1, n2, p.172-179, 2005.

Yang, J., Chang, R., Ge, S., Zhao, M., Liang, C., Xiong, X., Sun, Q., **The inhibition effect of starch nanoparticles on tyrosinase activity and its mechanism.** Food and Function, 2016, v. 7, n.12, p. 4804–4815, 2016.

Zhang, M., JU, H., Zhang, L., Sun, M., Zhou, Z., Dai, Z., Zhang, L., Gong, A, Wu, C. e Du, F. **Engineering iodine-doped carbon dots as dual-modal probes for fluorescence and X-ray CT imaging.** International Journal of Nanomedicine, v.10, p. 6943-6953, 2015.

Zhang, Y., Shen, Y., Teng, X., Yan, M., Bi, H., Morais, P. C. **Mitochondria-Targeting Nanoplatform with Fluorescent Carbon Dots for Long Time Imaging and Magnetic Field-Enhanced Cellular Uptake.** ACS Applied Materials and Interfaces, v.7, n.19, p.10201–10212, 2015.

Zhao, L., Liu, R., Zhao, X., Yang, B., Gao, C., Hao, X., Wu, Y., **New strategy for the evaluation of CdTe quantum dot toxicity targeted to bovine serum albumin.** Science of the Total Environment, v.407, p+ 5019–5023, 2009.

Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J e Yang, B. **The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots).** Nano Research, v.8, n.2, p. 355-381, 2015.