



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



MARIA CLARA QUEIROZ DE ARAÚJO

Nanopartículas de carbono como inibidores da tirosinase:
síntese, caracterização, interação proteica e estudo de permeação

Recife

2025

MARIA CLARA QUEIROZ DE ARAÚJO

Nanopartículas de carbono como inibidores da tirosinase:
síntese, caracterização, interação proteica e estudo de permeação

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

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Neves

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Araújo, Maria Clara Queiroz de.

Nanopartículas de carbono como inibidores da tirosinase: síntese, caracterização, interação proteica e estudo de permeação / Maria Clara Queiroz de Araújo. - Recife, 2025.
51f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

Orientação: Jorge Luiz Neves.

Inclui referências.

1. Nanopartículas de carbono; 2. Tirosinase; 3. Melasma; 4. Permeação cutânea; 5. Hiperpigmentação; 6. Interação proteica. I. Neves, Jorge Luiz. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

Dedico esta dissertação à minha amada avó,
que foi a minha primeira professora na vida,
que me introduziu ao mundo da educação,
que pacientemente me ensinou a fazer minhas tarefas e a ler,
e que com amor e sabedoria guiou os meus primeiros passos na busca pelo
conhecimento.

Este trabalho é uma pequena homenagem a toda a dedicação, amor e carinho que
sempre me ofereceu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades que sempre me deu, por me ajudar a superar as dificuldades e por não permitir que eu fraquejasse, mesmo nos momentos em que quis desistir; e à Nossa Senhora, por seu amor de mãe, que nunca faltou e me deu forças para seguir adiante.

Aos meus pais, pelo apoio constante e por acreditarem em minhas escolhas, incentivando-me sempre.

Aos meus avós, que contribuíram com minha educação da melhor forma que puderam, deixando um legado de amor e ensinamentos.

Às minhas tias, que são como segundas mães e sempre torceram por mim com carinho e dedicação.

À minha família, de modo geral, pelo amor, apoio e presença que foram fundamentais em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus amigos, por serem meu porto seguro e minha válvula de escape, salvando-me de mim mesma em muitas ocasiões.

À minha companheira de vida, por todo amor, suporte, compreensão, apoio e companheirismo incondicional.

Aos colegas do LQB, pelo apoio, paciência e ajuda para superar os desafios ao longo desta jornada.

Ao Departamento de Química Fundamental e ao órgão de fomento CAPES, pelo suporte institucional e financeiro.

Aos laboratórios que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, disponibilizando recursos e infraestrutura essenciais.

E, por fim, ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz Neves, pelo valioso apoio, ensinamentos, paciência e orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

“Deus não poderia me inspirar desejos irrealizáveis...”

Santa Teresinha do Menino Jesus

RESUMO

O melasma é uma desordem hiperpigmentar crônica associada à superprodução de melanina pela enzima tirosinase, cuja inibição representa uma estratégia terapêutica promissora no manejo dessa condição. Neste estudo, foram sintetizadas e caracterizadas três diferentes nanopartículas de carbono (*carbon dots* – CDs), dopadas com diferentes metais, manganês e ferro, com o objetivo de avaliar seu potencial como inibidores da tirosinase. As nanopartículas foram obtidas a partir de albumina de soro bovino e caracterizadas por espectroscopias UV-Vis e FTIR, confirmando a presença de grupos funcionais oxigenados e nitrogenados relevantes para interações biomoleculares. Resultados prévios demonstraram que os MnCdots exibiram os menores valores de IC_{50} e K_i na avaliação da atividade inibitória enzimática, evidenciando desempenho superior ao de clareadores tradicionais, como o ácido kójico. Neste estudo, a análise por supressão de fluorescência revelou interação do tipo supressão estática entre tirosinase e MnCdots, com formação de complexo estável e perfil termodinâmico compatível com interações eletrostáticas e ligações direcionais. Estudos de permeação cutânea in vitro em pele de porco demonstraram que os CDs alcançaram a camada basal da epiderme, local de atuação dos melanócitos, sem transposição para a derme, sugerindo perfil de ação tópica localizada e segura. Os dados obtidos evidenciam que os MnCdots são candidatos promissores para aplicação em formulações dermatológicas no tratamento de desordens pigmentares como o melasma.

Palavras-chave: Nanopartículas de carbono; Tirosinase; Melasma; Interação proteica; Permeação cutânea.

ABSTRACT

Melasma is a chronic hyperpigmentation disorder associated with the overproduction of melanin by the enzyme tyrosinase, whose inhibition represents a promising therapeutic strategy for its management. In this study, three different carbon nanoparticles (carbon dots – CDs), doped with distinct metals, were synthesized and characterized to assess their potential as tyrosinase inhibitors. The nanoparticles were derived from bovine serum albumin and characterized using UV-Vis and FTIR spectroscopy, confirming the presence of oxygenated and nitrogenated functional groups relevant to biomolecular interactions. Previous results demonstrated that MnCdots exhibited the lowest IC_{50} and K_i values in enzymatic inhibition assays, indicating superior performance compared to traditional skin-lightening agents such as kojic acid. In this work, fluorescence quenching analysis revealed a static quenching mechanism between tyrosinase and MnCdots, with stable complex formation and a thermodynamic profile consistent with electrostatic interactions and directional bonding. In vitro skin permeation studies using pig skin showed that the CDs reached the basal layer of the epidermis—where melanocytes are located—without crossing into the dermis, suggesting a localized and safe topical action. The results indicate that MnCdots are promising candidates for incorporation into dermatological formulations aimed at treating pigmentary disorders such as melasma.

Keywords: Carbon dots; Tyrosinase, Melasma; Protein interaction; Skin permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da epiderme e suas camadas: estratos basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo. Melanócitos e células de Merkel também podem ser observados	14
Figura 2	Esquema de biossíntese da eumelanina e feomelanina.	16
Figura 3	Estruturas dos inibidores da tirosinase mais utilizados atualmente no mercado.	19
Figura 4	Figura 4 - Pele de orelha suína fresca prontas para dessecação (a), durante a dessecação (b) e após a dessecação (c), utilizada para os estudos de permeação cutânea in vitro.	26
Figura 5	Suspensões de nanopartículas sob luz visível. a) CDots, b) MnCdots, c) FeCdots.	28
Figura 6	Figura 5 – Espectros de absorção no UV-Vis. a) Cdots, b) FeCdots, c) MnCdots.	29
Figura 7	Figura 6 – Espectro FTIR das nanopartículas. a) Cdots, b) FeCdots, c) MnCdots.	30
Figura 8	Espectros de supressão de fluorescência da enzima tirosinase em diferentes temperaturas. a) 30°C (303 K), b) 35°C (308 K), c) 40°C (313 K).	32
Figura 9	Figura 8 - Gráfico de Stern–Volmer para o complexo tirosinase–MnCdots nas temperaturas de 303, 308 e 313 K, apresentando comportamento linear compatível com mecanismo de supressão estática.	34
Figura 10	Figura 9 – Gráfico para obtenção das constantes de afinidade (Ka).	35
Figura 11	Figura 10 – Gráfico de Van't Hoff para obtenção dos parâmetros termodinâmicos.	36
Figura 12	Fotomicrografias de pele de porco submetidas aos tratamentos experimentais, obtidas por microscopia de fluorescência e óptica. a) MnCdots, b) FeCdots, c) Cdots	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise comparativa das constantes de inibição da enzima tirosinase e dos mecanismos inibitórios associados aos diferentes tipos de carbon dots (CDs).	32
Tabela 2	Parâmetros de interação das nanopartículas e MnCdots com enzima tirosinase.	37
Tabela 3	Tamanho e Potencial Zeta das nanopartículas de carbono.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDs	Carbon Dots (Nanopartículas de Carbono)
BSA	Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
UV-Vis	Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento de Luz Dinâmico)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
CC	Camada córnea
L-tirosina	L-4-hidroxifenilalanina
L-dopa	L-3,4-di-hidroxifenilalanina
UV	Ultravioleta
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pi\text{-}\pi^*$	Transição eletrônica entre orbitais π e π^*
$n\text{-}\pi^*$	Transição eletrônica entre orbital não ligante e π^*
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\rightarrow$	Indica reação ou transformação química
μm	Micrômetro
mg/mL	Miligrama por mililitro
O_2	Oxigênio molecular
V_{max}	Velocidade máxima da reação enzimática
K_m	Constante de Michaelis-Menten
IC_{50}	Concentração de inibidor que reduz 50% da atividade
K_a	Constante de afinidade
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
K_i	Constante de inibição
K_{is}	Constante de dissociação em inibição competitiva pelo substrato
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação de entropia
R	Constante universal dos gases ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)
F_0	Intensidade de fluorescência na ausência do supressor
F	Intensidade de fluorescência na presença do supressor
$[Q]$	Concentração do <i>quencher</i> (supressor)
n	Número de sítios de ligação
log	Logaritmo decimal (base 10)
ln	Logaritmo natural (base e)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Pele.....	14
1.1.2 Epiderme e melanogênese	15
1.2 Nanopartículas carbonáceas	18
1.3 Modelo enzimático	20
1.4 Inibidores da Tirosinase	20
2 MOTIVAÇÃO	22
2.1 Hipótese	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Reagentes	24
4.2 Síntese das nanopartículas.....	24
4.3 Caracterização das nanopartículas	24
4.3.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis	25
4.3.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	25
4.4 Estudo de interação por supressão de fluorescência	25
4.5 Estudo de permeação	27
4.5.1 Estudo <i>in vitro</i> de permeação cutânea (IVPT)	27
4.5.2 Análise por Microscopia de fluorescência	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1 Síntese das nanopartículas.....	29
5.2 Caracterização das nanopartículas	29
5.2.1 Espectroscopia de Absorção no UV-Vis.....	29
5.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	31
5.3 Ensaio enzimáticos	34
5.4 Estudo de interação por supressão de fluorescência	35
5.5 Estudo de permeação	41
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

As doenças de pele representam um desafio significativo para a saúde pública no Brasil, um país de dimensões continentais e clima predominantemente tropical. No país, cerca de 30% dos diagnósticos de câncer são correspondentes ao câncer de pele, sendo registrados mais de 185 mil casos todos os anos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA). Entre essas condições, o melasma se destaca como uma das principais desordens hiperpigmentares, ocasionada pelo aumento da produção de melanina, afetando milhões de brasileiros, especialmente mulheres em idade fértil. O impacto do melasma vai além da esfera dermatológica, influenciando diretamente a qualidade de vida dos pacientes devido às alterações estéticas e ao seu impacto psicossocial (GAN; RODRIGUES, 2024).

1.1 Pele

A pele corresponde a aproximadamente 15% do peso corporal total em adultos e possui uma área superficial em torno de 2m² (BENSON, 2011). Este órgão é formado por duas camadas principais: epiderme e derme (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009).

A derme é a camada mais espessa, com espessura variando de 1 a 4 mm (BETTS *et al.*, 2022), sendo composta por uma rica variedade de células, terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, todos imersos em um tecido conjuntivo denso (PROW *et al.*, 2011). Suas estruturas principais incluem fibras de colágeno e fibras elásticas (BETTS *et al.*, 2022).

Acima da derme localiza-se a epiderme, que é constituída predominantemente por queratinócitos, os quais representam cerca de 95% das células dessa camada (CANDI *et al.*, 2005). Estes passam por um processo de diferenciação denominado queratinização, no qual migram da camada basal até a superfície da pele, atravessando as camadas espinhosa e granulosa até alcançarem a camada córnea (CC). Nessa fase final, tornam-se células achatadas e sem núcleo, chamadas corneócitos, que são eventualmente eliminadas por descamação natural da pele. A camada córnea, portanto, representa a porção não viável da epiderme, e atua como a principal barreira contra a penetração de substâncias químicas na pele (PROKSCH *et al.*, 2008).

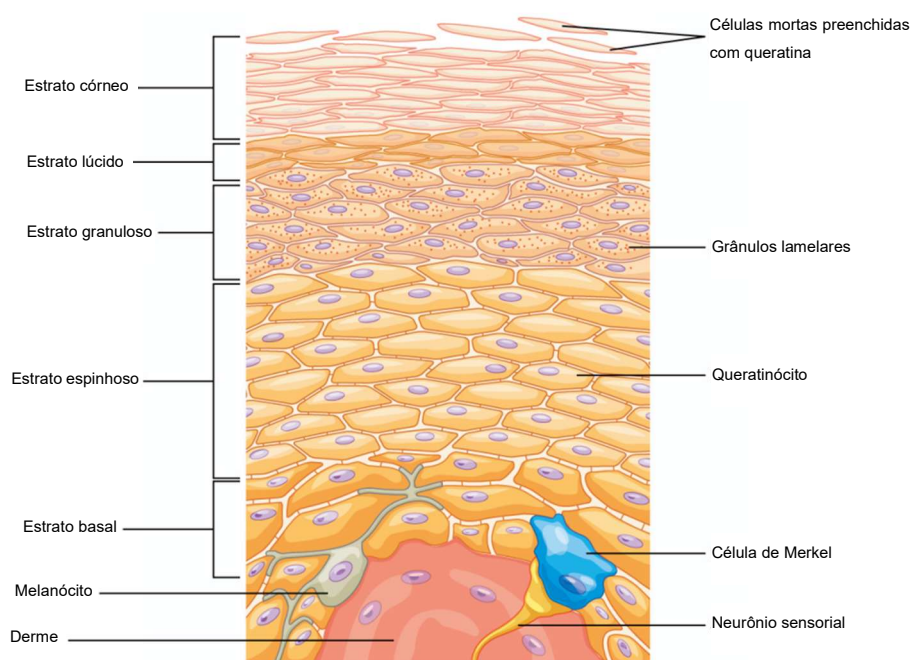
Entre os queratinócitos da epiderme viável, encontram-se células com funções específicas: os melanócitos, que sintetizam melanina; as células de Merkel, envolvidas na percepção sensorial; e as células de Langerhans, com papel

imunológico (PROW *et al.*, 2011). Também fazem parte da estrutura cutânea os anexos da pele, como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (WICKETT; VISSCHER, 2006).

1.1.2 Epiderme e melanogênese

Dentre os tipos celulares presente no estrato basal da epiderme, destacam-se os melanócitos, responsáveis pela síntese de melanina (Figura 1). A melanina é um pigmento biológico amplamente distribuído na natureza, desempenhando funções essenciais em organismos que vão desde microrganismos até seres humanos. Esse biopolímero multifuncional apresenta propriedades físico-químicas únicas, sendo responsável por diversas funções fisiológicas, como fotoproteção, neutralização de radicais livres e quelação de metais (D'ISCHIA *et al.*, 2015).

Figura 1 – Estrutura da epiderme e suas camadas: estratos basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo. Melanócitos e células de Merkel também podem ser observados.



Fonte: Adaptada de Betts *et al.*, 2022.

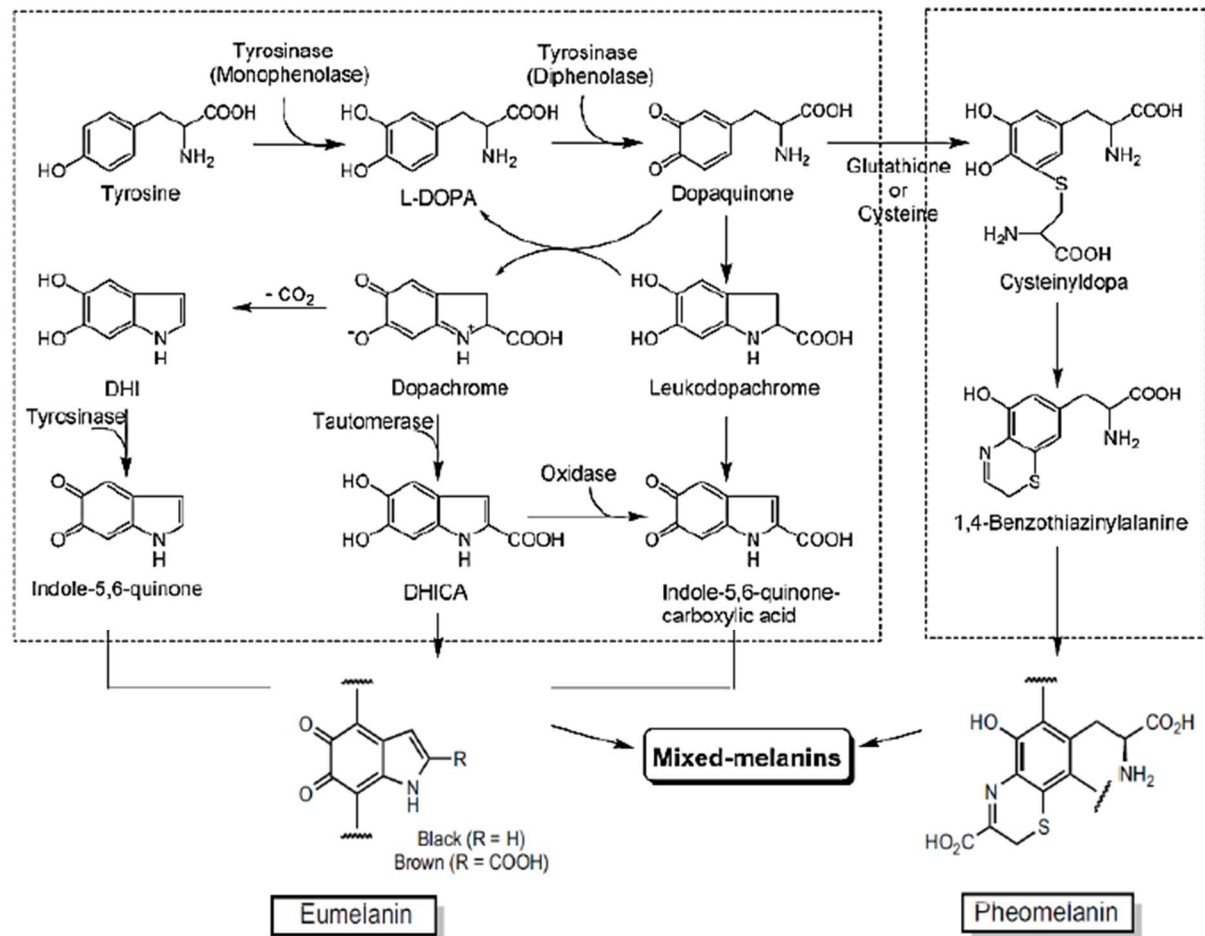
Quimicamente, a melanina é um biopolímero heterogêneo de elevado peso molecular, cuja estrutura complexa é constituída de porções de polifenóis. A oxidação e subsequente autopolimerização de catecóis e fenóis resultam na formação dos dois principais tipos de melanina: eumelanina e feomelanina. Além de sua função pigmentante, a melanina desempenha um papel crucial na proteção contra a radiação

ultravioleta e na neutralização de radicais livres oxidativos, contribuindo para a defesa celular (BUITRAGO *et al.*, 2016; ISMAYA *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2014).

A biossíntese da melanina ocorre nos melanócitos por meio da melanogênese, e é transferida para os queratinócitos por meio de vesículas chamadas melanossomos (Betts *et al.*, 2022). A melanogênese é catalisada pela enzima tirosinase, uma metaloenzima da classe oxirredutase, também denominada polifenol oxidases (PPO), amplamente distribuídas em plantas, animais, fungos e bactérias. Estas enzimas catalisam duas reações principais: a o-hidroxilação de monofenóis e a subsequente oxidação de o-difenóis (catecóis), sendo fundamentais na biossíntese da melanina. Em vegetais, a tirosinase está associada ao processo de escurecimento enzimático, enquanto em mamíferos participa da conversão da L-tirosina em L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), etapa inicial da melanogênese (BUITRAGO *et al.*, 2016). Essa conversão, ocorrida através de uma o-hidroxilação, utiliza o O₂ como oxidante, sendo esta a etapa limitante da biossíntese do pigmento. Posteriormente, a tirosinase oxida a L-DOPA produzindo L-dopaquinona, um intermediário essencial na formação dos oligômeros constituintes da melanina (MUNÓZ-MUNÓZ *et al.*, 2009); este último, após auto-oxidação, resultará no L-dopacromo. (BUITRAGO *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2014).

Além da tirosinase, outras duas enzimas desempenham um papel regulador secundário na determinação do tipo de melanina sintetizado (CHEN *et al.*, 2015a; KOBAYASHI *et al.*, 1994). Durante o ciclo catalítico, sucessivas etapas de oxidação e rearranjos levam à formação das duas principais variantes de melanina: a eumelanina, responsável por pigmentos de tonalidade preta a marrom, e a feomelanina, associada a cores que variam entre o amarelo e o avermelhado (Figura 2) (BUITRAGO *et al.*, 2016).

Figura 2 – Esquema de biossíntese da eumelanina e feomelanina.



Fonte: Adaptado de (BUIRAGO *et al.*, 2016; KIM; UYAMA, 2005).

Indivíduos de pele clara, que possuem maior proporção de feomelanina, apresentam maior sensibilidade à radiação ultravioleta, uma vez que esse pigmento tem maior propensão à geração de radicais livres, podendo causar danos ao DNA (MIOT *et al.*, 2009; WAGNER *et al.*, 2002). Esse fator pode contribuir para um aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias. Em contraste, a eumelanina atua como um filtro protetor, dispersando a luz UV e minimizando seus efeitos prejudiciais, reduzindo a penetração da radiação na pele (WAGNER *et al.*, 2002). As tirosinases são enzimas-chave nesse processo, sendo um alvo viável para o desenvolvimento de inibidores que modulam a produção de melanina, reduzindo sua formação e podendo ser utilizada em tratamentos dermatológicos (MEREDITH e SARNA, 2006; ZAREBA, 2006).

Os melanócitos, quando passam por uma transformação maligna, originam o melanoma, uma das formas mais agressivas de câncer de pele. Apesar de representar apenas 1% dos tumores cutâneos, é responsável por até 60% das mortes relacionadas ao câncer de pele, com incidência crescente em todo o mundo, especialmente entre indivíduos jovens e de meia-idade (KHAZAEI *et al.*, 2019; LOGESH *et al.*, 2023; MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020). A melanogênese desempenha papel ambíguo nesse contexto: enquanto a melanina oferece fotoproteção, seus intermediários podem ter efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, favorecendo a progressão do melanoma (SLOMINSKI *et al.*, 2014; SLOMINSKI *et al.*, 2022). A eumelanina atua como antioxidante e barreira contra radiação, enquanto a feomelanina, em contrapartida, está associada à geração de espécies reativas após exposição UV, podendo contribuir para um ambiente mutagênico (SLOMINSKI *et al.*, 2022).

Nesse sentido, a tirosinase destaca-se não apenas como alvo terapêutico em distúrbios hiperpigmentares como o melasma, mas também em estratégias antitumorais voltadas ao melanoma (D'MELLO *et al.*, 2016). Pró-fármacos ativados pela tirosinase vêm sendo estudados como alternativa no tratamento do melanoma, embora a formação de metabólitos tóxicos ainda represente um desafio (GASOWSKA-BAJGER; WOJTASEK, 2008; (JAWAID *et al.*, 2009). Paralelamente, produtos naturais com atividade antitumoral, como flavonoides, alcaloides e terpenoides, têm demonstrado potencial promissor na modulação da tirosinase (SHANMUGAM *et al.*, 2016; LOGESH *et al.*, 2023).

Diferentes compostos atuam como inibidores da tirosinase, agindo por mecanismos distintos. Alguns competem com a tirosina ou L-DOPA pelo sítio ativo da enzima, impedindo a ligação do substrato. Outros alteram a estrutura da enzima ao formar complexos com os íons de cobre do seu sítio ativo, inativando-a. Há ainda compostos que destroem melanócitos, levando à perda irreversível da capacidade de produção de melanina (BARROS, 2021). Cada abordagem tem vantagens e limitações, e novas alternativas terapêuticas estão constantemente sendo investigadas.

1.2 Nanopartículas carbonáceas

As nanopartículas de carbono (CDs - *Carbon Dots*) surgem como uma promissora alternativa no tratamento do melasma. Essas nanopartículas são materiais

nanométricos (10^{-9} m) altamente fluorescentes, hidrofílicos e biocompatíveis, tornando-os candidatos ideais para aplicações biomédicas (YANG *et al.*, 2016). Além disso, podem ser funcionalizadas com diferentes grupos químicos para melhorar sua interação com biomoléculas, o que permite seu uso direcionado para inibição enzimática. Sua estrutura interna é identificada como nanocristalina ou amorfa, com carbonos predominantemente com hibridização sp^2 (LIU; LIANG, 2012). Os CDs podem ser obtidos por métodos como pirólise térmica, hidrólise controlada e síntese eletroquímica. Dependendo da rota sintética e dos precursores utilizados, as propriedades dos CDs podem ser ajustadas para otimizar sua eficiência como inibidores da tirosinase (BARROS, 2021).

Os CDs têm despertado grande interesse devido às suas propriedades únicas, que os tornam altamente promissores para diversas aplicações, especialmente nas áreas de bioimagem, liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), nanomedicina e nanoteranóstico (GHOSAL; GHOSH, 2019). Dentre essas aplicações, destaca-se seu uso na detecção e tratamento de neoplasias como o melanoma. Por exemplo, Nasrin *et al.* (2020) desenvolveram CDs a partir de um derivado da vitamina B1 conjugados ao ácido fólico, os quais demonstraram potencial para bioimagem de células de melanoma. Já Beack *et al.* (2015) propuseram o uso de CDs funcionalizados com sal de ácido hialurônico e um fotossensibilizador para aplicação em terapia fotodinâmica contra melanomas. Outros estudos também têm explorado o uso dos CDs como ferramentas versáteis para bioimagem, modulação celular, sistemas carreadores de fármacos e imunoterapia no contexto do melanoma (BAJPAI *et al.*, 2020; HORST *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2014).

A utilização de aminoácidos, carboidratos e proteínas como precursores na síntese de *carbon dots* (CDs) tem se expandido significativamente, com o objetivo de conferir características de superfície favoráveis para aplicações em sistemas biológicos (GARCIA *et al.*, 2019; PICHARDO-MOLINA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2012). Além disso, os CDs podem ser funcionalizados por dopagem com elementos como boro (B), fósforo (P), enxofre (S) e até mesmo metais, o que permite otimizar suas propriedades fotoluminescentes, carga superficial e solubilidade em meio aquoso (PENG *et al.*, 2017b).

As interações entre biomoléculas e ligantes ocorrem principalmente por forças não covalentes, incluindo ligações de hidrogênio, interações de van der Waals,

eletrostáticas e hidrofóbicas. A espectroscopia de fluorescência é amplamente utilizada para investigar esses processos, pois possibilita a determinação de constantes de associação e parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG). A partir do sinal e da magnitude desses parâmetros, é possível identificar o tipo de força intermolecular predominante na interação (BHATTACHARYA et al., 2016; GARCIA et al., 2019; GUO et al., 2015; YANG et al., 2016).

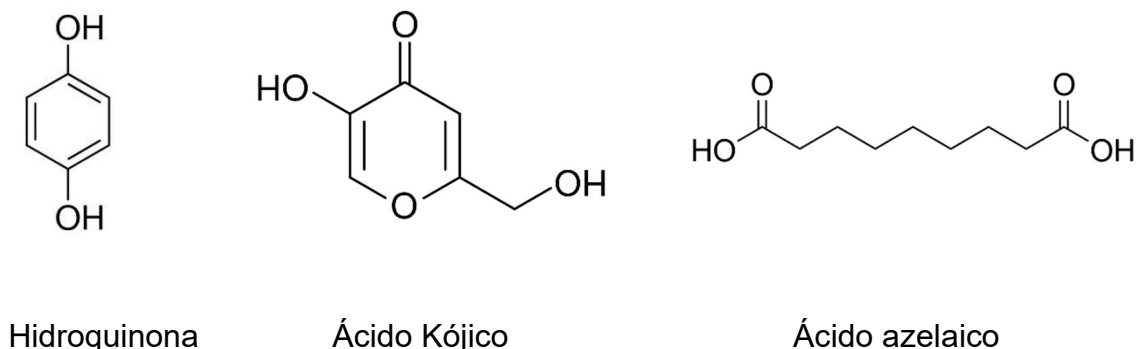
1.3 Modelo enzimático

A cinética enzimática desempenha um papel fundamental na análise da interação entre a tirosinase e seus inibidores. O modelo de Michaelis-Menten descreve a taxa de reação enzimática em função da concentração do substrato, permitindo determinar parâmetros como a constante de Michaelis-Menten (K_m), que indica a afinidade da enzima pelo substrato, e a velocidade máxima da reação (V_{max}), que reflete a capacidade catalítica máxima da enzima. A inibição pode ocorrer de forma competitiva, quando o inibidor compete diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima; não competitiva, quando o inibidor se liga a um local diferente do sítio ativo, reduzindo a atividade enzimática sem competir diretamente com o substrato; ou acompetitiva, quando o inibidor se liga apenas ao complexo enzima-substrato, reduzindo a velocidade máxima da reação (BARROS, 2021). A análise da inibição da tirosinase por CDs é essencial para determinar sua eficácia no controle da hiperpigmentação cutânea.

1.4 Inibidores da Tirosinase

Diante desse cenário, diversas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas para o tratamento do melasma. Entre os agentes clareadores mais utilizados atualmente no mercado, destacam-se a hidroquinona, o ácido azelaico e o ácido kójico, sendo este último muito utilizado como controle positivo em estudos que buscam novos inibidores, todos atuando na inibição da tirosinase (GAN; RODRIGUES, 2024).

Figura 3 – Estruturas dos inibidores da tirosinase mais utilizados atualmente no mercado.



Fonte: A autora, 2025.

Diversas pesquisas sobre inibidores mostram que certas porções estruturais são frequentemente encontradas nesses compostos, como grupos COOH, OH, OMe e NH (CASELLI *et al.*, 2018; CLEMENT; WEIDE; ZIEGLER, 1996). Isso inclui tanto inibidores de metaloenzimas (HINCHLIFFE *et al.*, 2018) quanto de tirosinase (CABEZUDO *et al.*, 2021; HA *et al.*, 2012; HAŁDYS; LATAJKA, 2019; LANGAT *et al.*, 2021; SHAO *et al.*, 2018). Além desses grupos funcionais, diversos estudos indicam que a introdução de porções hidrofóbicas pode potencializar a atividade inibitória contra a tirosinase (BARROS *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2012; KHATIB *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2010; THANIGAIMALAI *et al.*, 2010).

No entanto, esses agentes apresentam desvantagens, como potencial toxicidade, instabilidade química e irritação cutânea. A busca por novas alternativas terapêuticas continua sendo um tema relevante na dermatologia. Estudos demonstram que nanopartículas de carbono podem inibir a atividade da tirosinase de maneira eficaz, além de apresentar maior estabilidade e menor potencial de irritação cutânea em comparação aos clareadores tradicionais (YANG *et al.*, 2016). Além disso, abordagens nanotecnológicas oferecem novas perspectivas para o desenvolvimento de formulações com melhor permeabilidade cutânea e liberação controlada dos ativos, ampliando a eficácia do tratamento (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016).

2 MOTIVAÇÃO

A crescente necessidade de tratamentos mais seguros e eficazes para o melasma e demais doenças hiperpigmentares motiva a investigação de novas abordagens terapêuticas. Os clareadores convencionais, embora amplamente utilizados, apresentam efeitos adversos, como irritação cutânea e potencial toxicidade a longo prazo. Assim, a aplicação de nanotecnologia no tratamento da hiperpigmentação pode representar um avanço significativo na dermatologia, proporcionando opções terapêuticas inovadoras e eficientes.

2.1 Hipótese

Com base em evidências experimentais previamente relatadas em nosso grupo de pesquisa (BARROS, 2021), postula-se que as nanopartículas de carbono atuam como inibidores eficazes da enzima tirosinase, apresentando valores de IC_{50} e K_i superiores aos observados para agentes clareadores tradicionais. Supõe-se, portanto, que essas nanopartículas possam promover a redução da hiperpigmentação cutânea de forma mais segura e eficiente em comparação aos clareadores convencionais. Adicionalmente, espera-se que apresentem elevada capacidade de penetração cutânea, favorecendo a biodisponibilidade e potencializando a eficácia terapêutica das formulações dermatológicas em que forem incorporadas, sem comprometer a segurança do uso tópico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas de carbono com potencial atividade inibitória da tirosinase, avaliando suas propriedades físico-químicas, mecanismos de interação enzimática e perfil de permeação cutânea, com o propósito de identificar sistemas promissores para aplicação tópica no tratamento de desordens hiperpigmentares.

3.2 Objetivos específicos

- a. Sinterizar três diferentes nanopartículas do tipo *carbon dots* (CDs), variando dopantes, cargas superficiais e tamanhos;
- b. Caracterizar as CDs obtidas quanto às suas propriedades físico-químicas e grupos funcionais de superfície, por meio de técnicas como FTIR e espectroscopia UV-visível;
- c. Investigar o mecanismo de interação entre a nanopartícula mais promissora e a enzima tirosinase, utilizando espectroscopia de fluorescência por supressão;
- d. Realizar o estudo de permeação cutânea para todas as CDs em modelo de barreira cutânea apropriado;
- e. Correlacionar os dados físico-químicos, enzimáticos e de permeação cutânea, visando compreender os fatores determinantes para o desempenho das CDs como potenciais agentes multifuncionais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os sais $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e o NaOH e HCl foram fornecidos pela Química Moderna. A albumina de soro bovino (BSA) foi adquirida da Sigma-Aldrich. Todos os reagentes utilizados possuem grau analítico. Para o preparo das soluções e experimentos, foi utilizada água destilada e deionizada.

4.2 Síntese das nanopartículas

As nanopartículas de carbono foram obtidas a partir da albumina de soro bovino (BSA) e dos sais metálicos previamente mencionados, utilizando-se a metodologia previamente estabelecida pelo Laboratório de Química Biológica e conforme descrita na literatura (GARCÍA; TODESCHINI; NEVES, 2018).

Inicialmente, uma mistura contendo 0,4 g de albumina de soro bovino (BSA) e 25 mL de solução de NaOH (2 mol/L) foi submetida a agitação vigorosa a 80°C por 60 horas. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 5,0 mediante adição de HCl (aq) 2 mol/L, resultando na formação de um precipitado abundante. A mistura foi então centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, os precipitados foram descartados e o sobrenadante foi submetido à diálise em água deionizada, utilizando uma membrana de 3500 Da, por um período de 12 horas, obtendo-se o produto final.

Dado que o protocolo de síntese desses dots de carbono (CDs) encontra-se amplamente consolidado na literatura científica, as etapas de caracterização neste estudo concentraram-se na identificação dos grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas, uma vez que tais grupos desempenham papel essencial nas interações moleculares, especialmente na potencial inibição da atividade da enzima tirosinase.

4.3 Caracterização das nanopartículas

A albumina sérica bovina (BSA), em particular, é amplamente empregada como modelo experimental devido à sua elevada similaridade estrutural com a albumina sérica humana (HSA) (ADAMCZYK *et al.*, 2023). Sua estrutura é composta por 583 resíduos de aminoácidos organizados em três domínios (I, II e III), cada um subdividido em dois subdomínios (A e B), contendo 17 pontes dissulfeto responsáveis por sua estabilidade estrutural (TWOREK *et al.*, 2023). Destacam-se ainda dois

resíduos de triptofano: o Trp-213, localizado no sítio hidrofóbico Sudlow I, e o Trp-134, exposto na superfície da proteína.

A composição da BSA inclui grupos funcionais como aminas primárias ($-\text{NH}_2$), carboxilas ($-\text{COOH}$), hidroxilas ($-\text{OH}$) e tióis ($-\text{SH}$), estes últimos presentes em resíduos de cisteína. Embora os grupos tiol possam ser menos evidentes nas análises espectroscópicas, como no FTIR, sua presença estrutural é significativa. Durante processos de carbonização – como na síntese bottom-up de carbon dots (CDs) –, especialmente em meio alcalino com NaOH, ocorre a desnaturação da estrutura secundária da proteína, levando à formação de fragmentos peptídicos e à exposição ou modificação de tais grupos funcionais. Assim, é esperado que traços ou fragmentos oxidativos desses grupos permaneçam incorporados à estrutura dos CDs obtidos a partir de BSA (TWOREK *et al.*, 2023).

4.3.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis

O espectro de absorção na região do UV-Vis dos CDs foi obtido por meio do espectrofotômetro Shimadzu UV-2600i, localizado na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As análises foram realizadas utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, em um intervalo espectral de 200 a 500 nm, à temperatura controlada de 25 °C. Como branco, foi empregada uma solução alcalina compatível com o meio de dispersão das amostras.

4.3.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi empregada com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas de carbono sintetizadas. As análises foram realizadas utilizando o espectrofotômetro SHIMADZU IRSpirit, localizado na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As medidas foram obtidas por meio da técnica de reflectância total atenuada (ATR), em um intervalo de frequência compreendido entre 500 e 4000 cm^{-1} .

4.4 Estudo de interação por supressão de fluorescência

A interação entre a nanopartícula selecionada e a enzima tirosinase foi avaliada por supressão de fluorescência. As amostras foram preparadas a partir da titulação da nanopartícula nos volumes de 0, 10, 20, 30, 50, 60, 80, 100 e 110 μL em uma

solução contendo 201 nM de tirosinase. Para a determinação dos parâmetros termodinâmicos, os experimentos foram conduzidos em três temperaturas distintas: 303, 308 e 313 K. As leituras espectrais foram realizadas em espectrofluorímetro Jasco FP-6300, com comprimento de excitação fixado em 280 nm e emissão monitorada na faixa de 300 a 400 nm.

A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi calculada com base na equação 1:

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

em que F_0 é a intensidade de fluorescência da tirosinase na ausência do supressor, F é a intensidade na presença do supressor, e $[Q]$ representa a concentração do quencher.

A constante de ligação (K_a) e o número de sítios de ligação (n) foram determinados por meio da equação 2:

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

A energia de Gibbs livre (ΔG) das interações entre as nanopartículas e a enzima tirosinase foi calculada através da equação de Van't Hoff (3):

$$\Delta G = RT \ln K_a \quad (3)$$

em que R é a constante universal dos gases ($8,3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) e T a temperatura em Kelvin.

A partir do ΔG calculado, as variações de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) foram calculadas através da equação 4:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

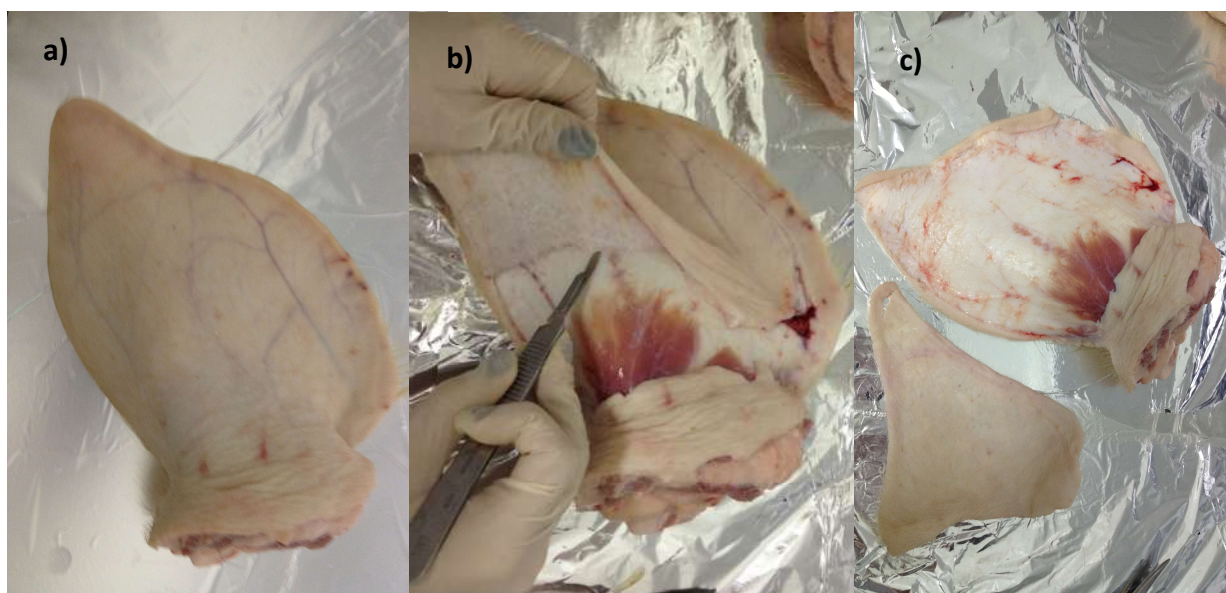
Os cálculos e o tratamento dos dados experimentais foram realizados no software GraphPad Prism, que permitiu ajustes estatísticos apropriados e conferiu maior robustez e confiabilidade aos valores obtidos.

4.5 Estudo de permeação

4.5.1 Estudo *in vitro* de permeação cutânea (IVPT)

Para os estudos de permeação cutânea, foram utilizadas peles de orelha suína, adquiridas de um matadouro local (Paulista, Pernambuco, Brasil). As amostras foram inicialmente lavadas com água corrente, e os pelos visíveis foram cuidadosamente aparados com tesoura (Figura 4). Posteriormente, a pele foi separada da cartilagem e seccionada em fragmentos menores, adequados ao diâmetro das células de difusão tipo Franz. Regiões que apresentavam alterações macroscópicas, como hematomas, coloração heterogênea, manchas, cicatrizes, feridas ou qualquer outro sinal de comprometimento tecidual, foram descartadas após inspeção visual criteriosa.

Figura 4 - Pele de orelha suína fresca prontas para dessecação (a), durante a dessecação (b) e após a dessecação (c), utilizada para os estudos de permeação cutânea *in vitro*.



Fonte: Acervo do NUDFAC (Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético), 2025.

As peles selecionadas foram submetidas à dermatomização utilizando um dermatômetro (Zimmer®, EUA), com espessura padronizada de aproximadamente 400 μm . Em seguida, foi realizada a avaliação da integridade da barreira cutânea por meio da mensuração da perda de água transepidérmica (TEWL) utilizando o equipamento Acqua Flux®.

Os estudos de absorção cutânea *in vitro* foram conduzidos em sistema automatizado de células de difusão (Vision® Microette™), com volume do compartimento receptor de 6,0 mL e área efetiva de difusão de 1,77 cm^2 . Como meio

receptor, utilizou-se tampão fosfato salino (PBS) ajustado para pH 6,0, mantido a 32 ± 1 °C ao longo de 24 horas. Ao término do experimento, as peles foram cuidadosamente removidas das células, higienizadas com *swab* embebido em álcool isopropílico 70% (Biosoma®) e posteriormente encaminhadas para análise por imagem. Todos os procedimentos deste estudo foram conduzidos no laboratório parceiro NUDFAC – Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, vinculado à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob condições controladas e seguindo protocolos padronizados.

4.5.2 Análise por Microscopia de fluorescência

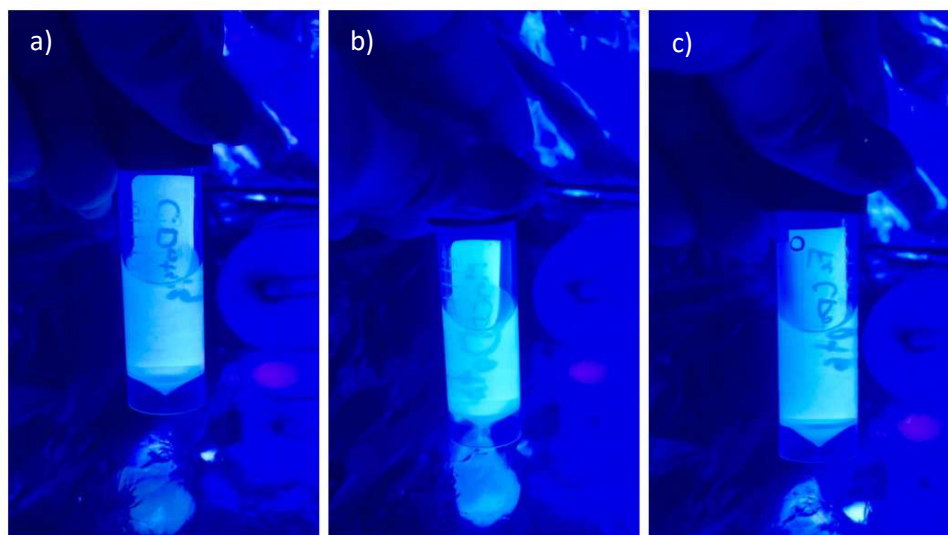
Os cortes histológicos foram realizados em criostato (Leica, modelo Ag Protect), com a câmara mantida a -25 °C e espessura de corte ajustada para 6,0 µm. As amostras foram seccionadas e as lâminas obtidas foram destinadas à análise por microscopia de fluorescência. O fluoróforo natural utilizado corresponde as próprias nanopartículas testadas, que apresentam fluorescência intrínseca. A excitação foi realizada em 365 nm, com emissão detectada em 450 nm, em luz violeta correspondente as nanopartículas, que emitem luz nessa faixa de comprimento de onda curto, próximo a 390–455 nm. As informações foram obtidas a partir da observação por microscopia óptica através do microscópio de fluorescência invertido (Nikon, TS2-FL). As lâminas foram observadas em aumentos de 20x a 400x, com registro em fotomicrografias por meio do Software PrimeCam, de áreas representativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Síntese das nanopartículas

A síntese das quatro nanopartículas carbonáceas utilizadas neste estudo foi realizada com base em metodologias previamente estabelecidas no Laboratório de Química Biológica e protegidas por patente (GARCÍA; TODESCHINI; NEVES, 2018). Após a etapa de síntese, o material foi purificado com o objetivo de isolar os *carbon dots* (CDs) dentro da faixa de tamanho desejada, variando entre 5 e 12 nm, com rendimentos que oscilaram entre 22% e 50%. As suspensões obtidas após solubilização apresentaram coloração marrom-amarelada sob luz visível e exibiram emissão azulada quando expostas à luz ultravioleta (Figura 5).

Figura 5 – Suspensões de nanopartículas sob luz visível. **a)** CDots, **b)** MnCdots, **c)** FeCdots.



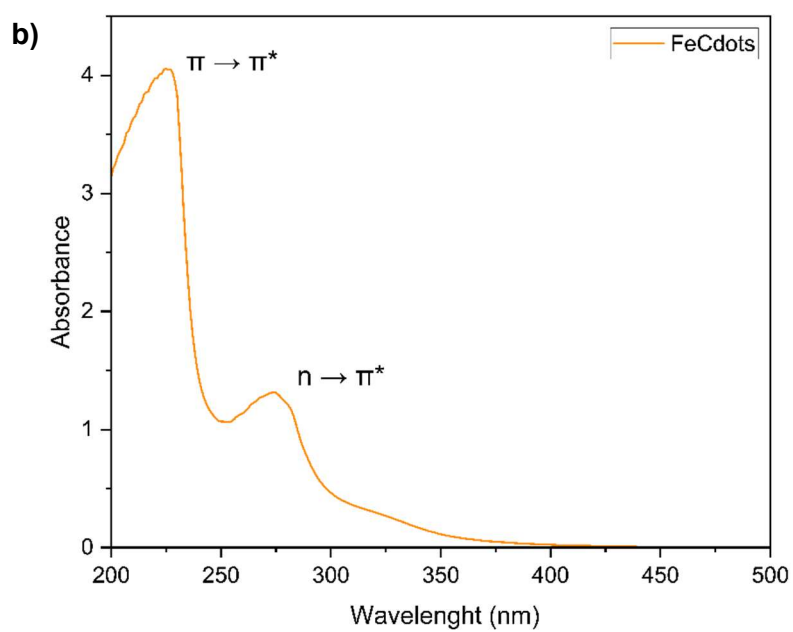
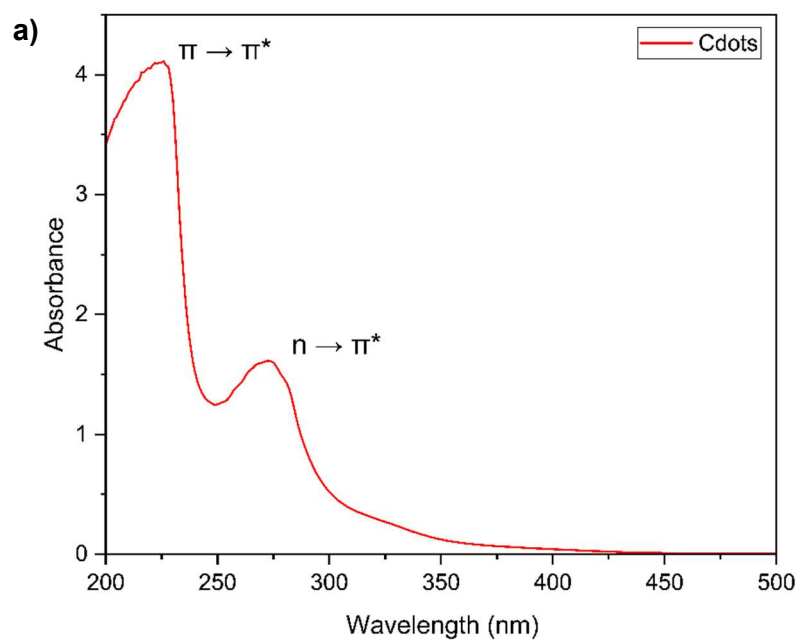
Fonte: A autora, 2025.

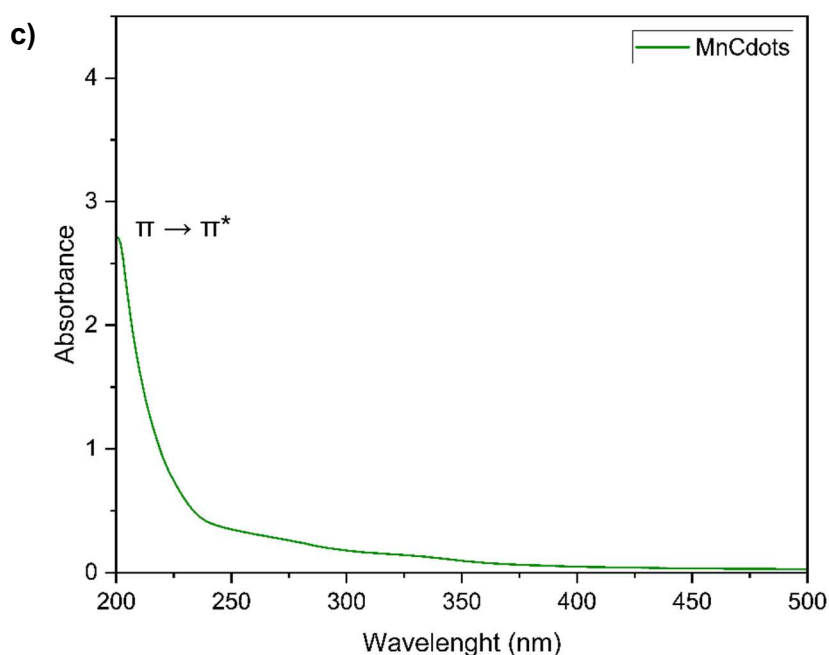
5.2 Caracterização das nanopartículas

5.2.1 Espectroscopia de Absorção no UV-Vis

A fim de caracterizar as CDs e os grupos de superfícies, foram utilizadas técnicas espectroscópicas prontamente disponíveis no Departamento de Química Fundamental. As propriedades ópticas de absorção foram avaliadas por meio da Espectroscopia de absorção no UV-Vis, observadas na figura 6. Os resultados obtidos apresentam comportamentos similares entre Cdots, FeCdots e MnCdots.

Figura 6 – Espectros de absorção no UV-Vis. **a)** Cdots, **b)** FeCdots, **c)** MnCdots.





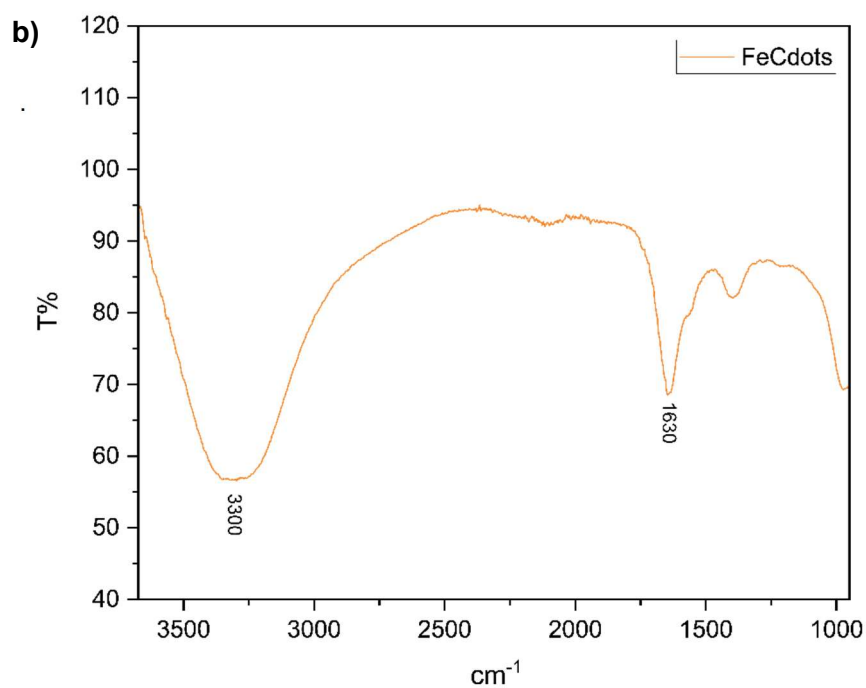
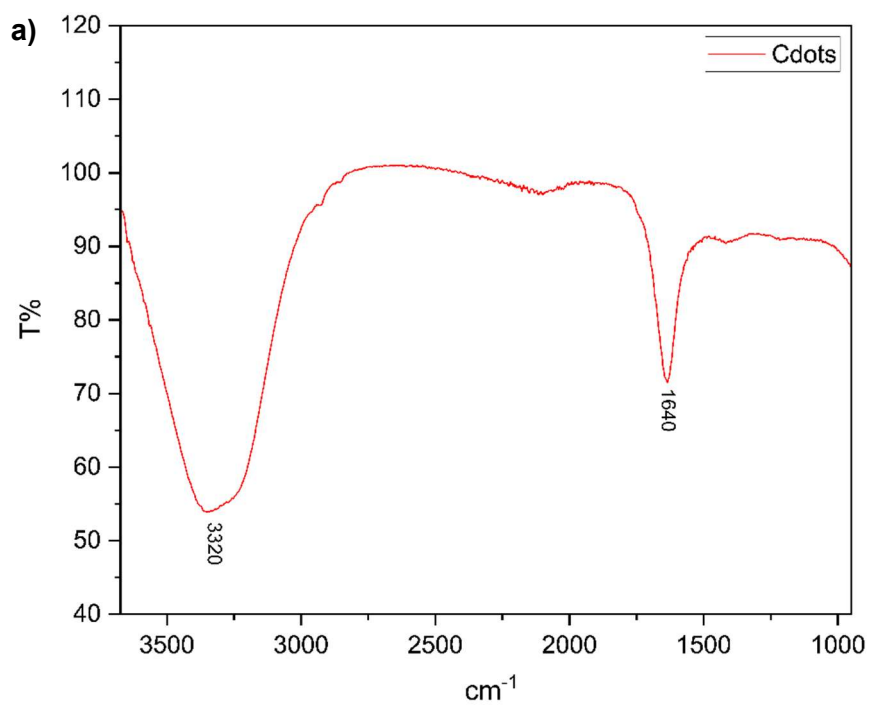
Fonte: A autora, 2025

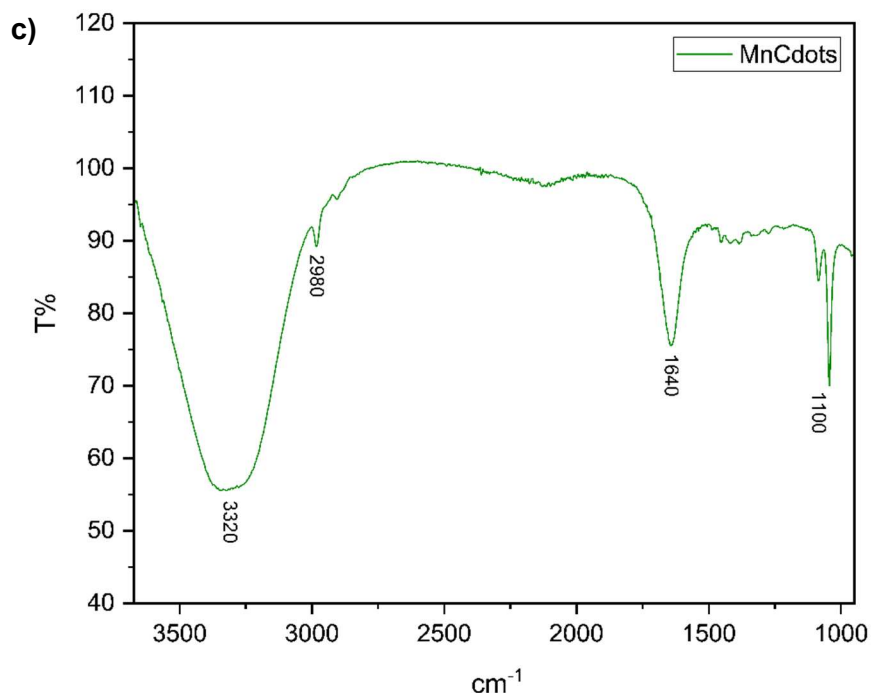
Observa-se nos espectros de absorção uma banda com máximo em 230 nm, atribuída à transição eletrônica $\pi\text{-}\pi^*$, característica das ligações de carbono sp^2 presentes nos *carbon dots* (CDs) (PAULA *et al.*, 2019; SWAPNA; SANKARARAMAN, 2019; VAZ *et al.*, 2017). Além disso, uma banda mais intensa, localizada entre 250 e 290 nm, é particularmente evidente nos espectros dos Cdots e FeCdots, sendo associada às transições $\pi\text{-}\pi^*$ de sistemas aromáticos e $n\text{-}\pi^*$ provenientes de grupos carbonílicos (LIANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2012; ZHU; ZHAI; DONG, 2012). Esses resultados estão em conformidade com os dados descritos na literatura para o perfil espectral típico dos CDs, reforçando a similaridade entre as nanopartículas obtidas neste estudo e aquelas descritas em trabalhos anteriores (BHATTACHARYA *et al.*, 2016; GARCÍA, 2018; GARCIA *et al.*, 2019; LIANG *et al.*, 2013; PAULA *et al.*, 2019; VAZ *et al.*, 2017).

5.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A análise espectroscópica por FTIR dos CDs forneceu informações relevantes sobre os grupos funcionais presentes em sua superfície, permitindo inferências importantes acerca de sua potencial interação com a enzima tirosinase. Considerando o método de síntese utilizado, observaram-se bandas comuns a todas as amostras analisadas (Figura 7).

Figura 7 – Espectro FTIR das nanopartículas. **a)** Cdots, **b)** FeCdots, **c)** MnCdots.





Fonte: A autora, 2025.

Dentre elas, destaca-se a banda em torno de 3300-3320 cm^{-1} , atribuída ao estiramento vibracional do grupo hidroxila ($-\text{OH}$); a banda em aproximadamente 1630-1640 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$), possivelmente associada também ao dobramento da ligação $\text{N}-\text{H}$; e a banda ao redor de 1100 cm^{-1} , referente ao estiramento $\text{C}-\text{O}$, todas indicativas da presença de grupos oxigenados, como hidroxilas e carboxilas, em todas as amostras de CDs (HU *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2013; SAILAJA PRASANNAKUMARAN NAIR; KOTTAM; S G, 2020; ZHU; ZHAI; DONG, 2012).

Nos MnCdots, a absorção em torno de 1230 cm^{-1} foi associada ao estiramento $\text{C}-\text{N}$, sugerindo a possível presença de grupos amina na superfície das nanopartículas. Contudo, deve-se considerar que essa região também pode apresentar contribuições de vibrações $\text{C}-\text{O}$, sendo a atribuição feita com base em dados de literatura. Além disso, a banda larga observada entre 3300-3200 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento $\text{O}-\text{H}$ de grupos hidroxila e/ou carboxila superficiais; entretanto, a presença de grupos amina não pode ser descartada, uma vez que o estiramento $\text{N}-\text{H}$ ocorre na mesma faixa espectral, podendo estar sobreposto ao sinal de $\text{O}-\text{H}$. (SAILAJA PRASANNAKUMARAN NAIR; KOTTAM; S G, 2020; VAZ *et al.*, 2017).

Em materiais contendo grupos amina, pequenas contribuições de estiramento N–H ligado a C também podem ocorrer, sobrepondo-se levemente à absorção na região, em torno de 1470 cm^{-1} . Tais sinais são compatíveis com os grupos funcionais presentes na matéria-prima utilizada na síntese — a albumina sérica bovina — e corroboram os dados descritos na literatura para CDs obtidos por rotas semelhantes (LIANG *et al.*, 2013; VAZ *et al.*, 2017; ZHU; ZHAI; DONG, 2012; GARCÍA, 2018).

A presença desses grupos funcionais oxigenados confere aos CDs elevada solubilidade em meio aquoso, o que é essencial para sua interação com biomoléculas em solução. No contexto deste trabalho, tal característica é especialmente relevante para viabilizar a interação com a enzima tirosinase, contribuindo para sua inibição.

5.3 Ensaios enzimáticos

Resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa investigaram a atividade inibitória da tirosinase frente a quatro diferentes tipos de nanopartículas de carbono (BARROS, 2021). Os valores mais baixos de K_i (constante de inibição) e IC_{50} (concentração inibitória média) indicam maior eficácia inibitória, pois representam a menor quantidade de inibidor necessária para reduzir significativamente a atividade da enzima-alvo. O valor de K_i está diretamente relacionado à afinidade do inibidor pela enzima: quanto menor, maior a afinidade de ligação ao sítio ativo ou a regiões alostéricas (COPLAND, 2018). De maneira semelhante, baixos valores de IC_{50} indicam maior potência inibitória, uma vez que menores concentrações do composto são suficientes para inibir 50% da atividade enzimática (COPLAND, 2018; BERTRAM, 2019). Dentre as nanopartículas avaliadas, os MnCdots apresentaram o melhor desempenho inibitório, conforme evidenciado na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise comparativa das constantes de inibição da enzima tirosinase e dos mecanismos inibitórios associados aos diferentes tipos de carbon dots (CDs).

Inibidor	IC ₅₀ (nM)	Tipo de inibição	K _i (nM)
Cdots	691,30	Competitiva	517,7 +- 170,4
MnCdots	80,81	Mista	44,28 +- 8,83
FeCdots	163,00	Acompetitiva	-
Ácido Kójico (LIU <i>et al.</i> , 2017; XIE <i>et al.</i> , 2016)	17940 +- 3750	-	36640

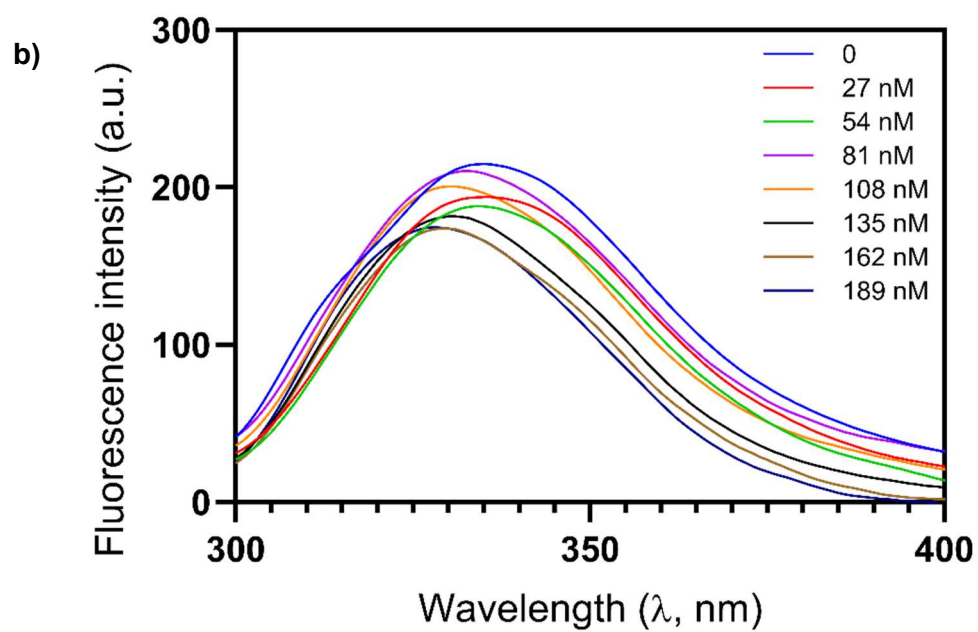
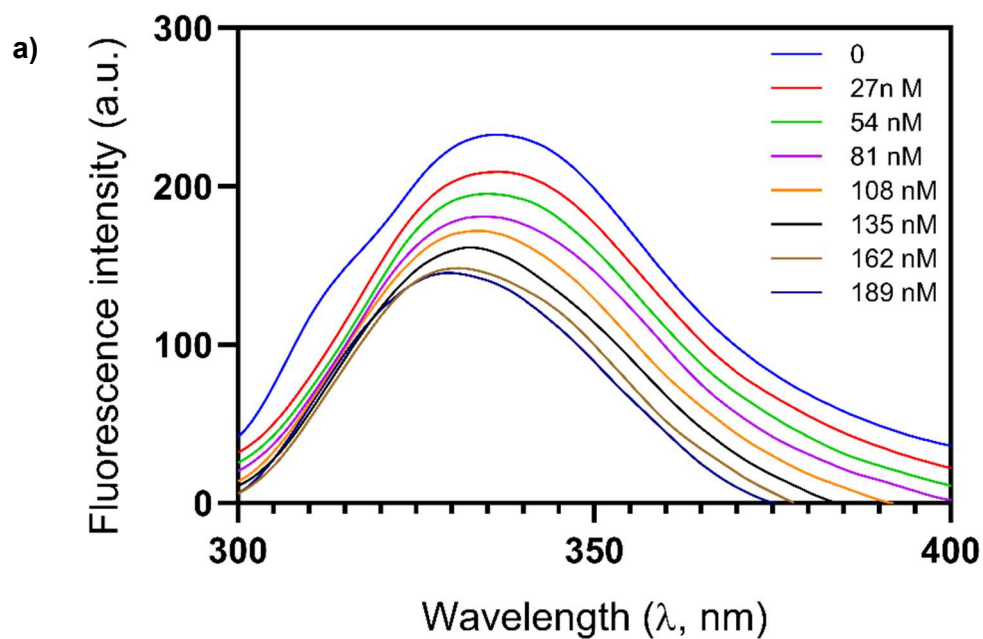
Fonte: Adaptado de (BARROS, 2021).

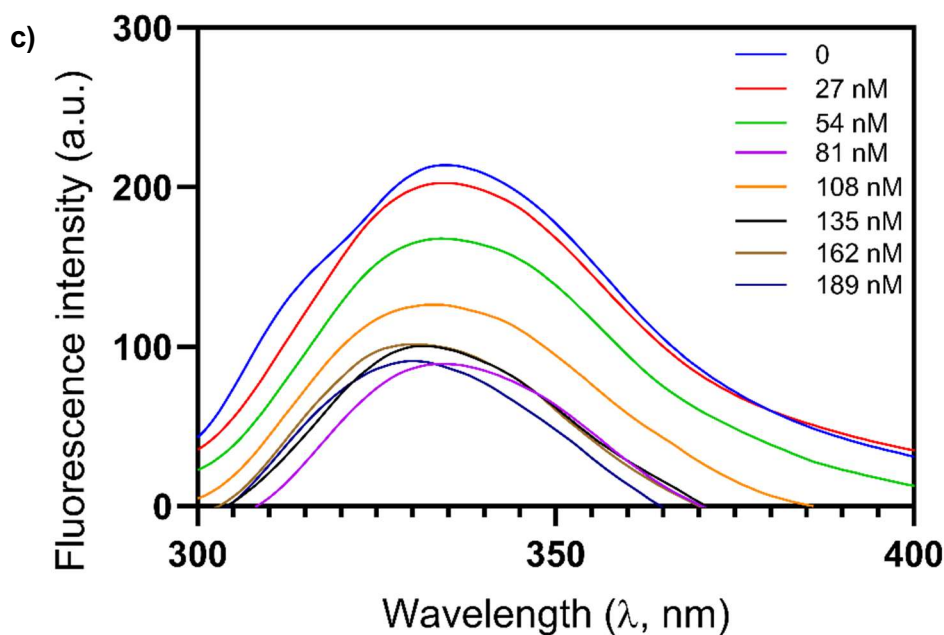
5.4 Estudo de interação por supressão de fluorescência

Com base nos resultados dos ensaios enzimáticos, os MnCdots foram selecionados para o estudo de interação com a enzima tirosinase por meio da técnica de supressão de fluorescência. A fluorescência intrínseca da tirosinase a 303 K foi gradualmente suprimida durante a titulação com MnCdots, sugerindo a ocorrência de interação entre a proteína e as nanopartículas (Figura 8). Essa supressão também foi observada em diferentes extensões nas temperaturas de 308 e 313 K. Além disso, foi identificado um leve deslocamento para o azul no espectro de emissão durante a titulação, o que pode estar associado a alterações na polaridade do ambiente do triptofano ou ao enrijecimento da mobilidade do resíduo, indicando mudanças na microestrutura da proteína (LAKOWICZ, 2013).

Figura 8 – Espectros de supressão de fluorescência da enzima tirosinase em diferentes temperaturas.

a) 30°C (303 K), b) 35°C (308 K), c) 40°C (313 K).

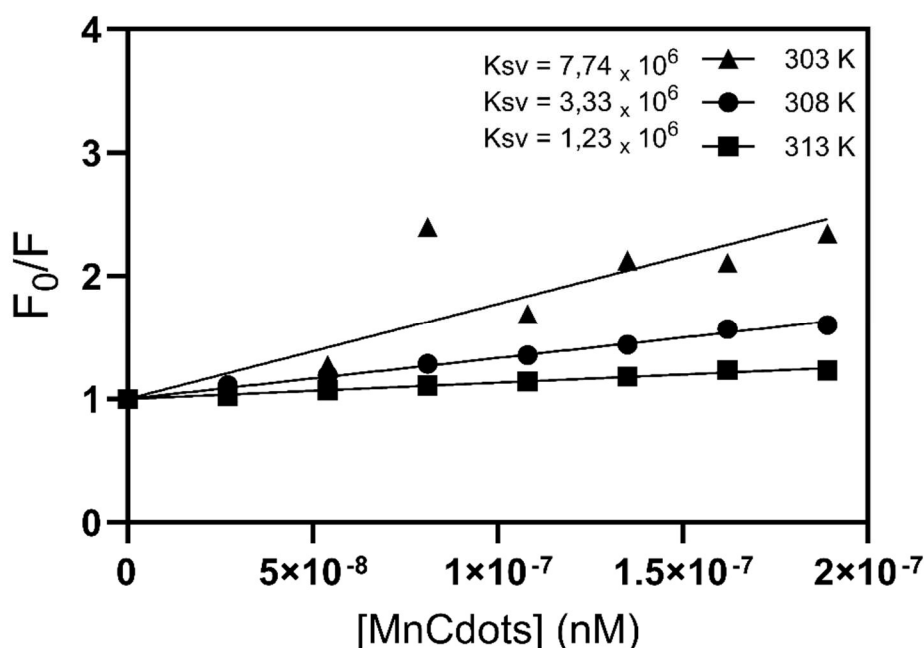




Fonte: A Autora, 2025.

A distinção entre os mecanismos de supressão de fluorescência pode ser feita com base no comportamento da constante de Stern–Volmer (K_{sv}) em diferentes temperaturas. Em geral, a supressão dinâmica apresenta aumento de K_{sv} com a elevação da temperatura, enquanto na supressão estática ocorre a tendência oposta, com redução de K_{sv} (MOHAMMADZADEH-AGHDASH *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2016). Neste estudo, os gráficos de Stern–Volmer (F_0/F vs. $[MnCdots]$) exibiram comportamento linear nas três temperaturas avaliadas (303, 308 e 313 K), indicando ausência de curvatura associada à presença de mecanismos mistos (Figura 9).

Figura 9 - Gráfico de Stern–Volmer para o complexo tirosinase–MnCdots nas temperaturas de 303, 308 e 313 K, apresentando comportamento linear compatível com mecanismo de supressão estática.

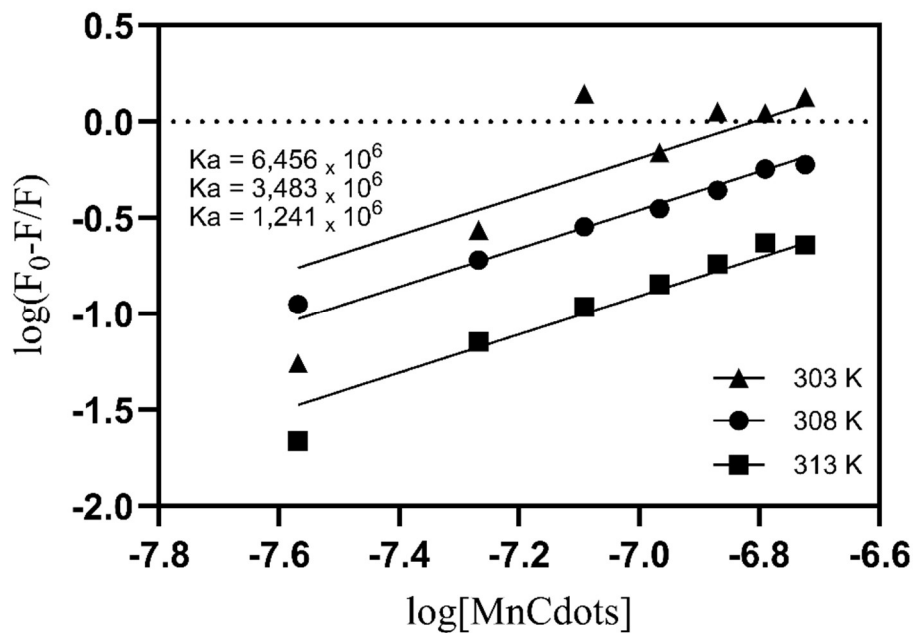


Fonte: A Autora, 2025.

Além disso, observou-se uma diminuição progressiva dos valores de K_{sv} com o aumento da temperatura, o que é indicativo de um mecanismo de supressão estática. Esses resultados sugerem que a interação entre a tirosinase e os MnCdots envolve a formação de um complexo no estado fundamental, reforçando a hipótese de uma associação estável entre a nanopartícula e a proteína.

Os valores da constante de associação (K_a) foram determinados a partir da construção do gráfico de $\log(F_0/F)$ em função de $\log[Q]$, onde F_0 representa a intensidade de fluorescência na ausência do *quencher* (os MnCdots) e F , na presença. Esse modelo permite a análise quantitativa da interação entre a tirosinase e as MnCdots, possibilitando a extração dos valores de K_a em diferentes temperaturas. (Figura 10).

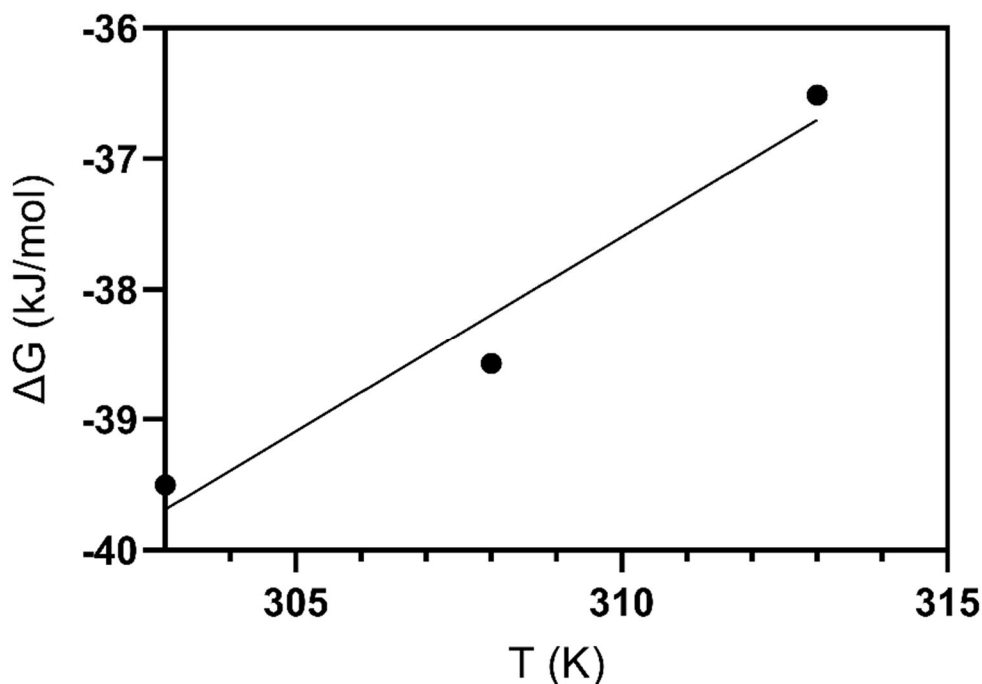
Figura 10 – Gráfico para obtenção das constantes de afinidade (K_a).



Fonte: A Autora, 2025.

A fim de determinar os parâmetros termodinâmicos da interação entre tirosinase e MnCdots, os valores de K_a obtidos nas diferentes temperaturas foram utilizados para a construção do gráfico de Van't Hoff, conforme descrito na equação 3. Esse gráfico permitiu a extração dos valores de variação de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS), associados ao processo de complexação entre a enzima e as nanopartículas. Os resultados da análise termodinâmica indicam que a formação do complexo entre tirosinase e MnCdots é espontânea nas três temperaturas, uma vez que os valores de energia livre de Gibbs (ΔG) calculados foram negativos em todas as condições (Figura 11).

Figura 11 – Gráfico de Van't Hoff para obtenção dos parâmetros termodinâmicos.



Fonte: A Autora, 2025.

A partir da regressão linear dos dados experimentais, foram obtidos valores negativos tanto para a entalpia (ΔH) quanto para a entropia (ΔS). Essa combinação indica que a interação entre a enzima e as nanopartículas é exotérmica e ocorre com redução da desordem no sistema, o que pode estar relacionado à formação de um complexo mais organizado e à presença de interações eletrostáticas específicas. Esse perfil termodinâmico é frequentemente associado à formação de ligações de hidrogênio direcionais, pontes salinas e rearranjos estruturais que restringem a flexibilidade molecular (MAHAMMAD *et al.*, 2019).

O potencial zeta positivo dos MnCdots (+8,16 mV) previamente relatado (GARCÍA, 2018) reforça essa hipótese, indicando que as nanopartículas apresentam carga superficial catiônica. Considerando que a tirosinase possui carga líquida negativa no pH experimental (pH 6,2), é plausível que interações eletrostáticas atrativas contribuam significativamente para a estabilização do complexo.

Esses resultados, aliados ao comportamento linear dos gráficos de Stern–Volmer e à diminuição da constante K_{sv} com o aumento da temperatura, confirmam que a interação tirosinase–MnCdots ocorre predominantemente por mecanismo de supressão estática, com formação de um complexo estável no estado fundamental

(MOHAMMADZADEH-AGHDASH *et al.*, 2017). A Tabela 2 resume as constantes e os parâmetros termodinâmicos obtidos.

Tabela 2 – Parâmetros de interação das nanopartículas e MnCdots com enzima tirosinase.

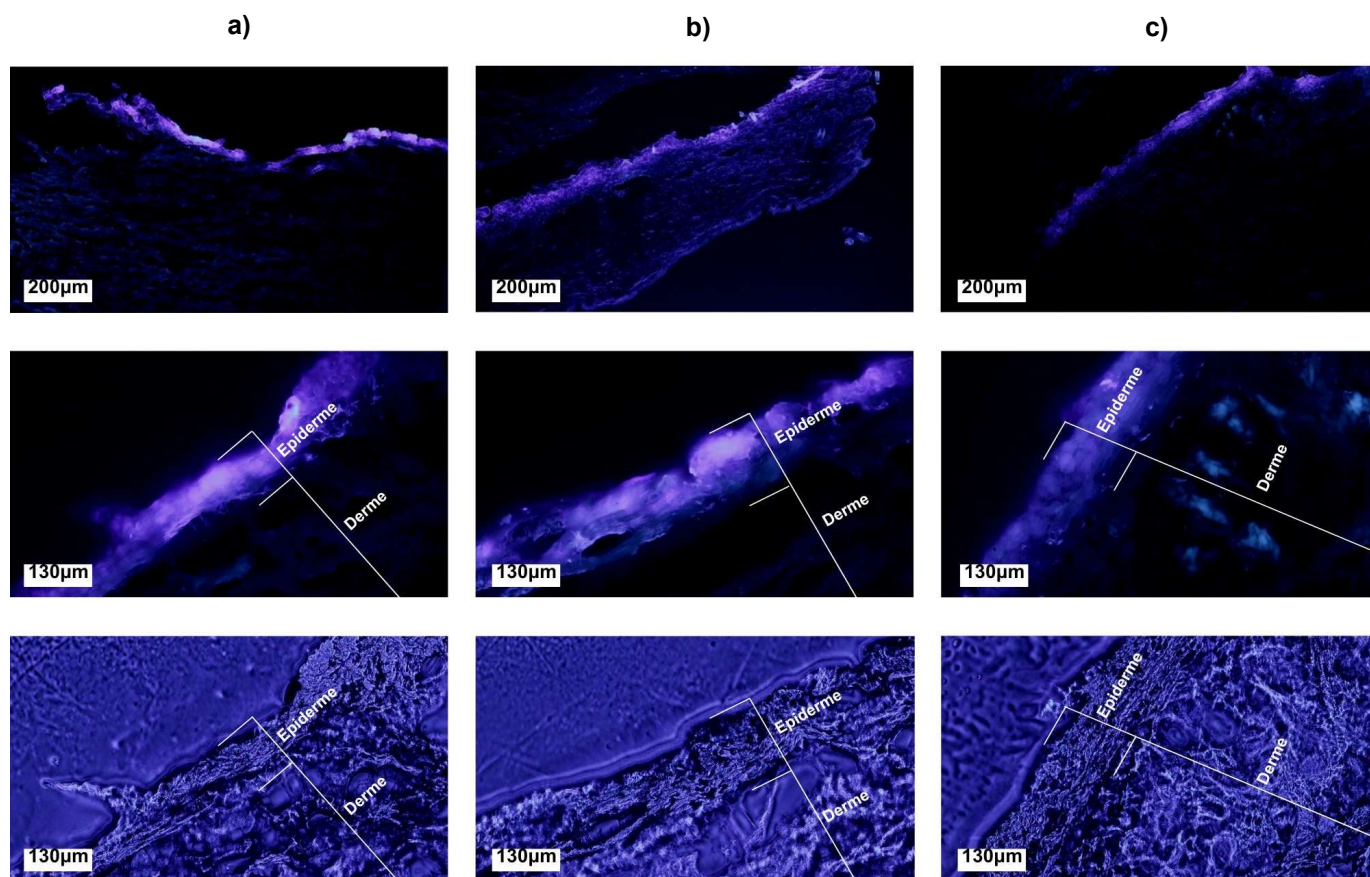
T (K)	K _{sv} (10 ⁻⁶ M ⁻¹)	K _a (10 ⁻⁶ M ⁻¹)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol)
303 K	7,74	6,456	-39,501		
308 K	3,33	3,483	-38,573	-130,2	-298,8
313 K	1,23	1,241	-36,513		

Fonte: A Autora, 2025.

5.5 Estudo de permeação

Os resultados obtidos por meio da análise de fluorescência na pele de porco evidenciaram que o composto testado apresentou penetração restrita à epiderme, sem detecção de permeação para a derme. Essa distribuição cutânea era esperada, considerando-se as características físico-químicas das nanopartículas, como potencial zeta e DLS, previamente analisados (GARCÍA, 2018). A retenção das nanopartículas nas camadas viáveis da epiderme, especialmente até a camada basal — onde localizam-se os melanócitos, células-chave na síntese de melanina — indica que essas estruturas foram eficazes em atingir o sítio-alvo desejado, sem ultrapassar a barreira epidérmica, sendo, portanto, potencialmente capazes de exercer sua ação sobre os melanócitos (Figura 12).

Figura 12 - Fotomicrografias de pele de porco submetidas aos tratamentos experimentais, obtidas por microscopia de fluorescência e óptica. **a)** MnCdots, **b)** FeCdots, **c)** Cdots.



Fonte: A autora, 2025.

Na figura 13, a linha superior apresenta imagens fluorescentes obtidas com objetiva 4x, mostrando a distribuição geral do fluoróforo nas amostras. A linha intermediária exibe imagens fluorescentes com objetiva 20x (escala aproximada: 130 µm), detalhando a penetração dos compostos nas camadas epidérmicas. A linha inferior mostra imagens em campo claro (ópticas) obtidas com objetiva 20x (escala aproximada: 130 µm), evidenciando a morfologia das camadas cutâneas correspondentes. As colunas correspondem aos diferentes grupos experimentais, sendo a coluna “a)” as nanopartículas de carbono dopadas com Manganês (MnCdots), a coluna “b)” as nanopartículas de carbono dopadas com Ferro (FeCdots), e a coluna “c)” as nanopartículas de carbono sem metal dopante (Cdots).

Atravessando com sucesso o estrato córneo, principal barreira da pele, o composto alcançou as camadas granulosa, espinhosa e basal, sem evidência de permeação para a derme ou para o compartimento receptor. A ausência de detecção

nas camadas mais profundas reforça o perfil de ação localizada do sistema, com baixa probabilidade de efeitos sistêmicos. Dessa forma, a não quantificação do fluxo de permeação e do tempo de latência (lag time) justifica-se pela ausência de concentrações detectáveis do ativo além da epiderme, corroborando a adequação do sistema para aplicações tópicas seguras e eficazes em desordens pigmentares.

A ausência de permeação das nanopartículas até a derme, observada por meio das análises de fluorescência, pode ser atribuída às suas características físico-químicas, em especial à presença de cargas superficiais, como indicado pelos valores de potencial zeta apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Tamanho e Potencial Zeta das nanopartículas de carbono.

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

Fonte: Adaptado de GARCÍA, 2018.

Essas características podem gerar interações eletrostáticas desfavoráveis com os componentes estruturais da pele, restringindo a difusão das nanopartículas para camadas mais profundas. Além disso, cargas superficiais muito acentuadas, sejam positivas ou negativas, podem intensificar a interação com a epiderme e, consequentemente, reduzir sua mobilidade vertical.

No presente contexto, tal comportamento é considerado vantajoso, uma vez que a atividade esperada das nanopartículas é localizada na epiderme, particularmente na camada basal, onde se encontram os melanócitos — principais células envolvidas na síntese de melanina. A retenção nas camadas epidérmicas viáveis, sem transposição para a derme, favorece uma ação clareadora tópica localizada, reduzindo o risco de efeitos sistêmicos. Contudo, para aplicações que demandem entrega dérmica ou transdérmica, podem ser adotadas estratégias tecnológicas para otimizar a permeação cutânea, como o uso de promotores químicos, sistemas eutéticos, vesículas lipossomais, dentre outros sistemas de liberação modificada (FERREIRA, 2018).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foram sintetizadas e caracterizadas três diferentes nanopartículas de carbono (carbon dots – CDs), variando-se dopantes metálicos, cargas superficiais e tamanhos. A caracterização físico-química por espectroscopias UV-Vis e FTIR confirmou a presença de grupos funcionais oxigenados e nitrogenados na superfície dos CDs, os quais são determinantes para suas interações com biomoléculas, como a enzima tirosinase. Dentre os sistemas testados, os MnCdots demonstraram desempenho superior em termos de inibição enzimática, com valores de IC_{50} e K_i significativamente inferiores aos de clareadores convencionais, como o ácido kójico.

A análise espectroscópica por supressão de fluorescência revelou um mecanismo de interação do tipo supressão estática entre a tirosinase e os MnCdots, com formação de complexo estável no estado fundamental. A termodinâmica da interação evidenciou um processo espontâneo, exotérmico e entropicamente desfavorável, com indícios de interações eletrostáticas específicas e ligações direcionais, o que reforça a afinidade seletiva entre a nanopartícula e a enzima. Os resultados obtidos permitem inferir que os MnCdots atuam como inibidores mistos, com ligação tanto ao sítio ativo quanto a regiões alostéricas da enzima.

Adicionalmente, o estudo de permeação em modelo de pele de porco demonstrou que as CDs apresentam penetração restrita à epiderme, alcançando a camada basal — local onde se concentram os melanócitos — sem ultrapassar para a derme. Dentre elas, os MnCdots também se destacaram nesse ensaio, reforçando seu desempenho globalmente superior. Este comportamento evidencia um perfil de ação tópica localizada, reduzindo o risco de efeitos sistêmicos e aumentando a segurança para uso dermatológico.

Portanto, os resultados obtidos confirmam a hipótese inicial desta pesquisa, evidenciando que as nanopartículas de carbono, especialmente os MnCdots, apresentam potencial significativo como inibidores da tirosinase, com propriedades desejáveis para formulações tópicos voltadas ao tratamento de desordens hiperpigmentares, como o melasma. A elevada atividade enzimática, a adequada permeação cutânea e a baixa toxicidade descrita na literatura para esses sistemas apontam para seu uso promissor como alternativa inovadora, segura e eficaz frente aos clareadores tradicionais disponíveis no mercado.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, O. *et al.* Bovine Serum Albumin as a Platform for Designing Biologically Active Nanocarriers—Experimental and Computational Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 37, 19 dez. 2023.
- ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 2, p. 163–177, jun. 2016.
- BAJPAI, V. K. *et al.* Multifunctional N-P-doped carbon dots for regulation of apoptosis and autophagy in B16F10 melanoma cancer cells and in vitro imaging applications. **Theranostics**, v. 10, n. 17, p. 7841–7856, 2020.
- BARROS, M.R. Desenvolvimento de nanoinibidores enzimáticos para a enzima tirosinase: interação molecular, mecanismo e cinética inibitória. 2021. Dissertação (Mestrado em Química) – **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2021.
- BARROS, M. R. *et al.* Furan inhibitory activity against tyrosinase and impact on B16F10 cell toxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 1034–1041, set. 2019.
- BEACK, S. *et al.* Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot – chlorin e6 – hyaluronate conjugate. **Acta Biomaterialia**, v. 26, p. 295–305, out. 2015.
- BENSON, A. A. *et al.* The role of vitamin D in the immunopathogenesis of allergic skin diseases. **Allergy**, v. 67, n. 3, p. 296–301, 2012.
- BERTRAM, C. M. Melasma: current treatment options and future perspectives. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, Auckland, v. 12, p. 1799–1805, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CCID.S228679>. Acesso em: 11 abr. 2025.
- BETTS, J. G. *et al.* *Layers of the Skin – Pathology*. Pressbooks, 2022. Disponível em: <https://pressbooks.bccampus.ca/pathology/chapter/layers-of-the-skin/>. Acesso em: 16 jun. 2025.
- BHATTACHARYA, M. *et al.* pH-induced Conformational Isomerization of Bovine Serum Albumin Studied by Extrinsic and Intrinsic Protein Fluorescence. **Journal of Fluorescence**, v. 21, n. 3, p. 1083–1090, maio 2011.

BITRAGO, E. *et al.* Are Human Tyrosinase and Related Proteins Suitable Targets for Melanoma Therapy? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 27, p. 3033–3047, 7 set. 2016.

CABEZUDO, I. *et al.* Effect directed synthesis of a new tyrosinase inhibitor with anti-browning activity. **Food Chemistry**, v. 341, p. 128232, mar. 2021.

CANDI, Eleonora; SCHMIDT, Rainer; MELINO, Gerry. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 4, p. 328-340, 2005.

CASELLI, E. *et al.* Inhibition of Acinetobacter -Derived Cephalosporinase: Exploring the Carboxylate Recognition Site Using Novel β -Lactamase Inhibitors. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 337–348, 9 mar. 2018.

CHEN, C.-Y. *et al.* An Updated Organic Classification of Tyrosinase Inhibitors on Melanin Biosynthesis. **Current Organic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 4–18, 2015a.

CLEMENT, B.; WEIDE, M.; ZIEGLER, D. M. Inhibition of Purified and Membrane-Bound Flavin-Containing Monooxygenase 1 by (N , N -Dimethylamino)stilbene Carboxylates †. 54 **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 599–604, jan. 1996.

COPLAND, L. Melasma: a review of clinical diagnosis, management, and emerging therapies. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, Auckland, v. 11, p. 533–542, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CCID.S144098>. Acesso em: 11 abr. 2025

D'ISCHIA, M. *et al.* Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 28, n. 5, p. 520–544, set. 2015.

D'MELLO, S. *et al.* Signaling Pathways in Melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1144, 15 jul. 2016.

FAN, Q. *et al.* Tyrosinase inhibitory effects and antioxidative activities of novel cinnamoyl amides with amino acid ester moiety. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1081–1087, set. 2012.

FERREIRA, N.; BRANDÃO, M.; POLONINI, H. **Guia Prático da Farmácia Magistral** – Volume 2. 5ª edição. Ed. Editar, 2018.

GAN, C.; RODRIGUES, M. An Update on New and Existing Treatments for the Management of Melasma. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 25, n. 5, p. 717–733, set. 2024.

GARCIA, Y. S. *et al.* Probing the interaction of carbonaceous dots with transferrin and albumin : Impact on the protein structure and non-synergetic metal release. **Journal of Molecular Liquids**, v. 292, p. 111460, 2019.

GARCÍA, Y. S.; TODESCHINI, A. R.; NEVES, J. L. Nanopartículas de carbono encapsuladas com íons metálicos Mn²⁺, Fe³⁺ e Eu³⁺, biocompatíveis para aplicação biológica como agente de contraste em MRI. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, 2018.

GAŚOWSKA-BAJGER, B.; WOJTASEK, H. Indirect oxidation of the antitumor agent procarbazine by tyrosinase—Possible application in designing anti-melanoma prodrugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 11, p. 3296–3300, jun. 2008.

GHEIBI, N. *et al.* Dual effects of aliphatic carboxylic acids on cresolase and catecholase reactions of mushroom tyrosinase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1076–1081, 19 out. 2009.

GHOSAL, K.; GHOSH, A. Carbon dots: The next generation platform for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 887–903, mar. 2019.

GUO, J. *et al.* Interaction study on bovine serum albumin physically binding to silver nanoparticles: Evolution from discrete conjugates to protein coronas. **Applied Surface Science**, v. 359, p. 82–88, 2015.

HA, Y. M. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 2-(substituted phenyl)thiazolidine-4-carboxylic acid derivatives as novel tyrosinase inhibitors. **Biochimie**, v. 94, n. 2, p. 533–540, fev. 2012.

HAŁDYS, K.; LATAJKA, R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 378–389, 2019.

HINCHLIFFE, P. *et al.* Structural and Kinetic Studies of the Potent Inhibition of Metallo- β -lactamases by 6-Phosphonomethylpyridine-2-carboxylates. **Biochemistry**, v. 57, n. 12, p. 1880–1892, 27 mar. 2018.

HORST, F. H. *et al.* From cow manure to bioactive carbon dots: a light-up probe for bioimaging investigations, glucose detection and potential immunotherapy agent for melanoma skin cancer. **RSC Advances**, v. 11, n. 11, p. 6346–6352, 2021.

HU, J.-J. *et al.* Functionalized carbon quantum dots with dopamine for tyrosinase activity analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 995, p. 99–105, dez. 2017.

ISMAYA, W. T. *et al.* Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. **Biochemistry**, v. 50, n. 24, p. 5477–5486, 21 jun. 2011.

JAWAID, S. *et al.* Tyrosinase Activated Melanoma Prodrugs. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 717–727, 1 set. 2009.

KHATIB, S. *et al.* Enhanced Substituted Resorcinol Hydrophobicity Augments Tyrosinase Inhibition Potency. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2676–2681, 1 maio 2007.

KHAZAEI, Z. *et al.* Global incidence and mortality of skin cancer by histological subtype and its relationship with the human development index (HDI); an ecology study in 2018. **World Cancer Research Journal**, v. 6, n. April 2019, abr. 2019.

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

LAI-CHEONG, Joey E.; MCGRATH, John A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 41, n. 6, p. 317-320, 2013.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. ed. New York: Springer Science & Business Media, 2013. Disponível em: <https://play.google.com/store/books/details?id=1bLVBwAAQBAJ>. Acesso em: 12 jul. 2025.

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

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

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

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

LIU, Z.; LIANG, X.-J. Nano-Carbons as Theranostics. **Theranostics**, v. 2, n. 3, p. 235–237, 2012.

LOGESH, R. *et al.* Natural tyrosinase enzyme inhibitors: A path from melanin to melanoma and its reported pharmacological activities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1878, n. 6, p. 188968, nov. 2023.

MAHAMMAD, S.; KHAN, M. B.; GHAFOR, N. *et al.* Thermodynamic and structural basis of protein–nanoparticle interactions: a review. **Nanoscale**, Cambridge, v. 11, n. 42, p. 20271–20285, 2019.

MEREDITH, P.; SARNA, T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment Cell Research**, v. 19, n. 6, p. 572–594, dez. 2006.

MIOT, L. D. B. *et al.* Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623–635, dez. 2009.

MITCHELL, T. C.; KARAKOUSIS, G.; SCHUCHTER, L. Melanoma. Em: **Abeloff's Clinical Oncology**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1034-1051.e2.

MOHAMMADZADEH-AGHDASH, H.; DOLATABADI, J. Ezzati Nazhad; DEGHAN, P.; PANAHI-AZAR, V.; BARZEGAR, A. Multispectroscopic and molecular modeling studies of bovine serum albumin interaction with sodium acetate food additive. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 221, p. 1961–1967, 2017.

MUNOZ-MUNOZ, J. L. *et al.* Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 7, p. 1017–1029, jul. 2009.

NASRIN, A. *et al.* Conjugated ternary doped carbon dots from vitamin B derivative: Multispectral nanoprobe for targeted melanoma bioimaging and photosensitization. **Journal of Luminescence**, v. 217, p. 116811, jan. 2020.

PAULA, N. T. G. DE *et al.* Use of Carbon Dots Synthesized from Citrate as a Fluorescent Probe for Quercetin Determination in Tea and Beer Samples. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2355–2366, 2019.

PENG, Z. *et al.* Carbon dots: promising biomaterials for bone-specific imaging and drug delivery. **Nanoscale**, v. 9, n. 44, p. 17533–17543, 2017a.

PICHARDO-MOLINA, J. L. *et al.* Fluorescent carbon nanoparticles synthesized from bovine serum albumin nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 724–731, jan. 2020.

PROKSCH, Ehrhardt; BRANDNER, Johanna M.; JENSEN, Jens-Michael. The skin: an indispensable barrier. **Experimental dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

PROW, Tarl W. *et al.* Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

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

SHANMUGAM, M. K. *et al.* Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40–41, p. 35–47, out. 2016.

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

SLOMINSKI, A. *et al.* The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: Melanogenesis leads to stimulation of HIF-1 α expression and HIF-dependent attendant pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 563, p. 79–93, dez. 2014.

SLOMINSKI, R. M. *et al.* Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 842496, 14 mar. 2022.

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

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

TWOREK, P. *et al.* Changes in Secondary Structure and Properties of Bovine Serum Albumin as a Result of Interactions with Gold Surface. **ChemPhysChem**, v. 25, n. 2, p. e202300505, 15 jan. 2024.

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

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

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

WICKETT, R. Randall; VISSCHER, Marty O. Structure and function of the epidermal barrier. **American journal of infection control**, v. 34, n. 10, p. S98-S110, 2006.

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

XU, Z.-Q. *et al.* Interactions between carbon nanodots with human serum albumin and γ-globulins: the effects on the transportation function. **Journal of Hazardous Materials**, [S.l.], v. 301, p. 242–251, 2016.

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

ZAREBA, M. *et al.* Effects of Photodegradation on the Physical and Antioxidant Properties of Melanosomes Isolated from Retinal Pigment Epithelium. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 4, p. 1024–1029, jul. 2006.

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

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

ZHU, Y. *et al.* Inhibitory Mechanism of Salidroside on Tyrosinase. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 10, p. 698–703, 23 set. 2014.

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