Miranda, A.J.C. **Estudo da Cinética da Tirosinase Imobilizada em Nanopartícula de Sílica com obtenção de Revestimento de Eumelanina**. 2015 (74 pag.). Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Melanina é um polímero constituído por uma grande heterogeneidade de monômeros tendo como característica comum a presença de grupos indóis. Por outro lado, a eumelanina produzida pela oxidação enzimática da tirosina é um polímero mais simples constituído principalmente de monômeros 5,6-dihidroindol (DHI) e de indol-5,6-quinona (IQ). Tirosinase é a enzima chave na produção de melanina, sendo que a sua atividade cinética é medida em função da formação do intermediário dopacroma. Nanopartículas (NPs) de sílica são partículas nanométricas compostas de óxido de silício e são obtidas pelo processo sol-gel desenvolvido por Stöber de hidrólise e condensação de tetraetilortosilicato (TEOS), usando etanol como solvente em meio alcalino. As NPs foram funcionalizadas com 3-Aminopropiltrietoxissilano (ATPES) e depois com glutaraldeído. Este último permitiu a imobilização da tirosinase na superfície da sílica. Caracterizamos as NPs antes e após a reação da enzima, a atividade catalítica da enzima ligada à NP e o mecanismos de formação de melanina na superfície da sílica. As NPs foram caracterizadas por espectrofotometria de absorção e de reflectância, termogravimetria e microscopia eletrônica. A síntese da NP de sílica retornou partículas esféricas com 55nm de diâmetro e a funcionalização da partícula mostrou modificar eficientemente a sua superfície. A imobilização da tirosinase por ligação covalente foi de 99,5% contra 0,5% da adsorção física. A atividade da tirosinase foi caracterizada pela formação de dopacroma. O K_m da enzima imobilizada não sofreu alteração em comparação com a tirosinase livre, mas a eficiência catalítica – que considera a eficiência recuperada – foi de apenas 1/3 para a enzima ligada covalentemente, significando que 2/3 das enzimas ligadas não estão ativas. Obtivemos NPs revestidas com melanina a partir de oxidação de tirosina solubilizada em duas preparações: NP com tirosinase ligada covalentemente na superfície e NP funcionalizada com glutaraldeído dispersa em solução de DHI e IQ. O revestimento de melanina foi na forma de um filme fino com espessura $\sim 1,9\text{nm}$, conferindo perfil de absorção luminosa equivalente ao da própria melanina. Mostramos que o mecanismo de polimerização passa pela oxidação da tirosina pela tirosinase, que gera intermediários oxidados (principalmente DHI e IQ) que vão para solução (mesmo quando a tirosinase está ligada covalentemente na sílica). Estes intermediários ligam-se ao glutaraldeído e a superfície da sílica passa a funcionar como ambiente de polimerização da melanina.