UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

André José Cardoso de Miranda

Estudo da Cinética da Tirosinase Imobilizada em Nanopartícula de Sílica com Obtenção de Revestimento de Eumelanina

Versão Corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

11/11/2015

André José Cardoso de Miranda

Estudo da Cinética da Tirosinase Imobilizada em Nanopartícula de Sílica com obtenção de Revestimento de Eumelanina

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

São Paulo

2015

André José Cardoso Miranda

Estudo da Cinética da Tirosinase Imobilizada em Nanopartícula de Sílica com obtenção de Revestimento de Eumelanina

Dissertação Apresentada ao Instituto de Química

da Universidade de São Paulo para obtenção do

Título de Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

A minha família por todo amor e apoio.

Sem ela esse trabalho não seria possível.

Obrigado por toda confiança e segurança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Ao Prof. Maurício pela oportunidade, orientação e auxilio.

A Prof. Liane pela ajuda com as nanopartículas.

A todos dos Laboratórios em que visitei por esses anos de estudo onde conheci pessoas admiráveis e divertidas.

Ao meu próprio lab. de Processos Fotoinduzidos e Interfases, em especial: Alan, Alessandra Sousa, Aline Abrantes, Décio Briotto Filho, Helena Junqueira, Isabel Bacellar (obrigado por tantas dicas), Mariana Lima, Nayra Fernandes, Orlando Chiarelli Neto, Paulo Tonolli, Tatiana Pereira e Tiago Rodrigues (obrigado por tantas dicas).

Lab. de Nanomateriais e Catálise, em especial: Fernanda Parra e Marco Aurélio, sem eles ainda estaria centrifugando litros de dispersão de nanopartículas.

Lab. de Bioquímica de Insetos, em especial meu chara André, desculpe por tantas perguntas aleatórias.

Lab. de Química Analítica Instrumental, em especial o Mauro (“Bahia”) que sem ele não teria conseguido adaptar o agitador magnético no espectro.

Ao pessoal do Departamento de Analítica, em especial ao Alfredo Duarte, sem ele as marcações não teriam ocorrido com tanta rapidez, e a todos da secretaria de pós-graduação.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo finalciamento e suporte.

Onde está escrito a lei de DEUS?

Na Consciência.

Questão 621

O livro dos Espíritos

O tempo, é o papel.

Nossas ações, a caneta.

Deus, o Professor.

PREÂMBULO

A ideia que deu origem ao trabalho foi de proteger a pele de forma análoga a biológica: com melanina. Essa ideia evoluiu para a construção de nanopartículas (NPs) revestidas com melanina para atuarem como novo principio ativo de protetor solar. Pensou-se que a obtenção das moléculas formadoras da melanina por tirosinase imobilizada a nanopartícula favoreceria a absorção de melanina com a formação de um filme fino sobre a NP. Este trabalho teve dois princípios motivadores: o tecnológico, que almejou o desenvolvimento de NPs de sílica revestidas com melanina, sendo este um material hibrido orgânico/inorgânico inédito; o de bioquímica básica, que almejou entender o efeito do ambiente molecular da NP de sílica na atividade enzimática da tirosinase (enzima usada na síntese de melanina) imobilizada. Ou seja, almejou-se um trabalho multidisciplinar nas fronteiras da cinética enzimática e da nanociência. Não trataremos neste trabalho das aplicações do material, e sim de sua obtenção e caracterização, focando alterações das cinéticas de catálise da tirosinase e na obtenção e caracterização da NP revestida com melanina.

RESUMO

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, Universiade 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-dihidroxindol (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 oxido 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 Km 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 glutaraldeido dispersa em solução de DHI e IQ. O revestimento de melanina foi na forma de um filme fino com espessura ~1,9nm, 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 glutaraldeido e a superfície da sílica passa a funcionar como ambiente de polimerização da melanina.

Palavras-chave: tirosinase, nanopartícula de sílica, melanina, atividade enzimática, imobilização de enzimas, revestimento de nanomaterial.

ABSTRACT

Miranda, A.J.C. **Study of the kinetics of Tyrosinase Immobilized in nanoparticle silica wiht obtention of eumelanin coating.** 2015 (74 pag). Masters Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universiade de São Paulo, São Paulo.

Melanin is a polymer consisting of a large heterogeneity of monomers having as a common feature the presence of indole groups. Contrarily, eumelanin produced by enzymatic oxidation of tyrosine is a simpler polymer consisting mainly of 5,6-dihidroxindol (DHI) and indole-5,6-quinone (IQ) monomers. Tyrosinase is the key enzyme in melanin production, and its kinetic activity is measured by the formation of the intermediate dopacroma. Nanoparticles (NPs) are made of silica nanoparticles of silicon oxide and are obtained by sol-gel method developed by Stöber of hydrolysis and condensation of tetraethylorthosilicate (TEOS), using ethanol as solvent in an alkaline medium. NPs were functionalized with 3-Aminopropyltriethoxysilane (ATPES) and then with glutaraldehyde. The latter allows the immobilization of tyrosinase on the silica surface. We characterized NPs before and after the reaction of the enzyme, the catalytic activity of the enzyme bound to the NP and melanin-forming mechanisms on the silica surface. NPs were characterized by absorption spectrophotometry and reflectance, electron microscopy and thermogravimetric analysis. The synthesis of silica NP returned spherical particles of 55nm diameter and particle functionalization showed efficiently modify its surface. The immobilization of tyrosinase by covalent bond was 99.5% versus 0.5% by physical adsorption. The activity of tyrosinase was characterized by the formation of dopacroma. The Km of the immobilized enzyme did not change compared to the free tyrosinase, but the catalytic efficiency - considering the recovered efficiently - was only 1/3 for the enzyme covalently bound, meaning that 2/3 of the enzymes are not connected active. We obtained melanin coated NPs from tyrosine oxidation in two preparations: NP with covalently bound tyrosinase in the NP surface and NP functionalized with glutaraldehyde dispersed in DHI and IQ solution. The melanin coating was in the form of a thin film with the thickness of ~ 1,9 nm, giving light absorption profile equivalent to that of melanin itself. We showed that the polymerization mechanism involves the oxidation of tyrosine by tyrosinase, which generates oxidized intermediates (especially DHI and IQ) that go into solution (even when tyrosinase is covalently bound to the silica). These intermediates bind the glutaraldehyde and the surface of the silica begins to function as an environment for melanin polymerization.

Keywords: Tyrosinase, silica nanoparticle, melanin, enzyme activity, enzyme immobilization, coating nanomaterial

Lista de Abreviaturas

NP(s): nanopartícula(s).

Tyr: L-tirosina.

Tyrs: tirosinase.

DHI: 5,6-dihidroxindol.

IQ: Indol-5,6-quinona.

TEOS: tetraetilortosilicato.

ATPES: 3-Aminopropiltrietoxissilano

Conteúdo

1 Introdução 18
1.1 Melanina 18
1.2 Tirosinase 20
1.3 O processo sol-gel 28
1.4 Imobilização da tirosinase em NP de sílica 30
2 Objetivos 33
2.1 Objetivo geral 33
2.2 Objetivos específicos 33
3 Materiais e Métodos 34
3.1 Reagentes 34
3.2 Equipamentos 34
3.3 Métodos 34
3.3.1 Síntese de NP de sílica pelo método sol-Gel 34
3.3.2 Curva padrão da dopacroma 35
3.3.3 Obtenção da solução de DHI e IQ 35
3.3.4 Imobilização da tirosinase em NP de sílica por adsorção física 35
3.3.5 Imobilização da tirosinase em NP de sílica por ligação covalente 36
3.3.6 Quantificação de proteína não imobilizada em NP de sílica 37
3.3.7 Caracterização da formação de dopacroma por tirosinase livre e imobilizada 37
3.3.8 Atividade enzimática da tirosinase livre e imobilizada 37
3.3.9 Análise termogravimétrica 39
3.3.10 Obtenção da NP de sílica revestida com eumelanina 39
3.3.11 Microscopia eletrônica de transmissão 40
4 Resultados e Discussão 42
4.1 Obtenção e caracterização da NP de sílica nua e da NP de sílica funcionalizada 42

4.2 Formação da dopacroma e de DHI e IQ 44
4.2.1 Curva padrão da dopacroma..... 44
4.2.2 Evolução de dopacromo para DHI e IQ 46
4.3 Imobilização da tirosinase na NP de sílica..... 46
4.4 Atividade da enzima livre e ligada na NP de sílica 49
4.5 Obtenção e caracterização da NP de sílica revestida com eumelanina 56
4.5.1 Mecanismos de polimerização da eumelanina na superfície da sílica ... 64
5 Conclusões e Perspectivas 68
6 Bibliografia 69

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema proposto para a melanina mostrando indóis ligados pelos carbonos 4´-7 formando um alta grau de conjugação. Ácidos carboxílicos estão ligados no carbono 2 e carbonilas nos carbonos 5 e 6 das ortoquinonas, grupos hidroxílicos apresentados desprotonados na forma de catecol. Existe a formação de três regiões com funções diferentes: aceptora, doadora e com as duas funções. A. Extraído de [7] 19

Figura 2: : Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de eumelanina sintética (A: x 3000; B: x 48000). Cada porção preta e branca da linha pontilhada tem 8,3µm para (a) e 830nm para (b). Extraído de [8]. 19

Figura 3: A direita um modelo molecular tridimensional da melanina com três folhas empilhadas do tipo mostrado em C. As dimensões totais são ~20 Å em extensão lateral e ~ 7,6 Å em altura. (A) Um modelo molecular de uma única folha mostrado uma ligação aleatória de unidades indol-5,6-quinona (IQ), que fornece uma abertura no centro da folha.. (B) A ligação aleatória de monómeros indol-5,6-quinona. (C) Uma variante do modelo mostrado em B. Oxigênio como círculos abertos, posição do nitrogênio não mostrada. Adaptado de [9]. 20

Figura 4: Esquema mostrando as duas atividades catalíticas da tirosinase: atividade monofenolase e atividade difenolase. Tyrs: tirosinase. 21

Figura 5: Sítio ativo da tirosinase mostrando os dois átomos de cobre nos seus diferentes estados de oxidação: *Oxi, Met e Deoxi*, adptado de [18]. 22

Figura 6: Esquema mostrando os ciclos catalíticos da atividade monofenolase (TH), da atividade difenolase (DO) *e da inativação temperaria da tirosinase por ligação da tirosina ao estado met* "*Dead-end complex",* extraído de [15]. Os demais símbolos foram definidos na figura 5. 23

Figura 7: Fase proximal da síntese de eumelanina (Tyrs: tirosinase), adaptado de [23][20]. 25

Figura 8: Atividade enzimática da tirosinase de *grape berry* (a) atividade difenofenolase com 25mm 4-metil catecol (tirosinase 1µg); (b) atividade monofenolase com 2.1 mm p-cresol (tirosinase 100µg); extraído de [27]. 26

Figura 9: Fase distal da síntese de eumelanina (Tyrs: tirosinase; e TyrsP1 e TyrsP2 enzimas relacionadas com a tirosinase, sendo respectivamente a Dopacroma Tautomerase e a DHICA Oxidase), adaptado de [32] [37] 27

Figura 10: Síntese de feomelanina (mostrado apenas cisteina) adaptado de [39]. 28

Figura 11: Hidrólise e condensação de tetraetilortosílicato (TEOS), adaptado de [42].30

Figura 12: Tipos de imobilização de uma enzima (E) que podem ocorrer na superfície de uma partícula.(a) adsorção por forças de Van Der Waals; (b) adsorção iônica; (c) ligação covalente. 31
Figura 13: Esquema mostrando a modificação da superfície de uma estrutura de sílica obtida com o processo sol-gel e a imobilização de uma enzima: (a) Ativação da superfície de NP de sílica com ATPES; (b) Funcionalização da NP de sílica com glutaraldeído; (c) Imobilização da enzima a superfície funcionalizada; (d) enzima imobilizada por ligação covalente. 32
Figura 14: Marcação em microscopia eletrônica de transmissão, (a) marcação negativa, (b) marcação positiva, adaptado de [64] e [67]. 41
Figura 15: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da NP de sílica nua. .. 42
Figura 16: Histograma de dispersão do diâmetro da NP de sílica nua obtido com a análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão sob uma centena de partículas com a utilização do *freeware ImaJ*..... 43
Figura 17: Espectro da dispersão e foto da NP de sílica (a) nua e (b) funcionalizada. Condição da dispersão: 0,25mg/mL de NPs de sílica dispersas em tampão fosfato pH6,5; temperatura ambiente. 44
Figura 18: Espectros de absorção da dopacroma em diferentes concentrações para obtenção do coeficiente de extinção molar. (Tampão fosfato 50 mM, pH 6,5; concentrações de dopacroma em mM) 45
Figura 19: Curva de calibração de dopacroma utilizando o máximo de absorção em 475nm. Dados foram extraídos dos espectros apresentados na figura 18. 45
Figura 20: Espectros de absorção da dopacroma com máximo em 475nm (a); e para a solução de DHI/IQ (b). Condições: tirosina 250mM, tirosinase 13µg/mL, tampão fosfato 50mM, 30ºC. 46
Figura 21: Quantificação de proteína total no sobrenadante após centrifugação (tirosinase não imobilizada) pelo método de Bradford. (a) absorção física da tirosinase na NP de sílica nua; (b) ligação covalente na NP de sílica funcionalizada. 47
Figura 22: Atividade da tirosinase em solução/dispersão de: (a) tirosinase livre; e dos sobrenadantes da (b) tirosinase imobilizada por adsorção física; e (c) tirosinase imobilizada por ligação Covalente. Condições: 13µg/mL de tirosinase para cada 0,25mg de suporte; 250µM de tirosina; tampão fosfato 50mM pH6,5; 30ºC; a atividade foi medida no sobrenadante. 48
Figura 23: Caracterização da formação de dopacroma por (a) tirosinase livre; (b) por tirosinase em dispersão de NP de sílica nua (gráfico do sobrenadante obtido após centrifugação); (c) tirosinase imobilizada por ligação covalente (gráfico do sobrenadante obtido após centrifugação); (*)solução de dopacroma obtida com

tirosinase livre. Condições: Tampão fosfato 50mM (pH 6,5), tirosinase 13µg/mL; 30ºC; tirosina 250mM). Espectros foram obtidos 15minutos após a preparação da dispersão/solução. (Tyrs:tirosinase) 49
Figura 24: Controle negativo da formação de produtos por NP de sílica nua e NP de sílica funcionalizada (preparada para a imobilização da tirosinase). Condições: Tampão fosfato 50mM (pH 6,5), tirosinase 13µg/mL; 30ºC; tirosina 250mM). Espectros foram obtidos 30minutos após a preparação da dispersão/solução. 50
Figura 25: Formação de dopacroma por tirosinase em solução tampão fosfato 50mM, pH6,5; 30ºC; tirosina como substrato. [tirosinase]=13µg/mL e [tirosina] =50;75;100;250;500;750;1000µM. Tampão fosfato de sódio 50mm pH6,5. A 2,450mL de uma solução de tirosina, foi adicionado 50µL de uma solução de tirosinase 650mg/mL, resultando numa concentração de 13µg/mL de enzima. Procedeu-se a regressão linear na parte linear da curva, que é mostrado como tracejado na figura. O *lag* foi calculado como a distância entre o ponto de intercessão na abscissa da reta tracejada até a ordenada no plano cartesiano, neste caso sendo de 0,7min. O estado estacionário prevaleceu entre 2-5 minutos e foi precedido pelo *lag* característico da conversão de tirosina por tirosinase (ver item “tirosinase” na introdução”) 51
Figura 26: Formação de dopacroma por tirosinase em dispersão de NP de sílica nua. Condições: Tampão fosfato 50mM, pH6,5; 30ºC; tirosina como substrato. Tampão fosfato de sódio 50mm pH6,5. O experimento com a atividade da tirosinase em dispersão de NP de sílica nua, foi realizado da mesma forma que para tirosinase livre, com a diferença do substrato ter sido preparado numa dispersão de NP de sílica nua 0,25mg/mL. A dispersão sem substrato foi usada como linha de base. Os procedimentos para cálculo de regressão linear, *lag* e estado estacionários são os mesmos dos descritos na figura 25. 52
Figura 27: Formação de dopacroma por tirosinase ligada covalentemente a NP de sílica. Condições: Tampão fosfato 50mM, pH6,5; 30ºC; tirosina como substrato. Adicionou-se a cada amostra de 2,4mL com solução de tirosina, 100µmL de uma dispersão com 32,5 µg/mL de tirosinase imobilizada em 650mg/mL, resultando numa dispersão final de 13µg/mL de tirosinase e 0,25mg/mL de NP de sílica. Os procedimentos para calculo de regressão linear, *lag* e estado estacionários são os mesmos dos descritos na figura 25. 52
Figura 28: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade cinética da tirosinase para (a) tirosinase livre; (b) tirosinase em dispersão de NP de sílica; e (c) tirosinase ligada covalentemente a NP de sílica. 54

Figura 29: Gráfico de Linewear-Burk da atividade cinética da tirosinase para (a) tirosinase livre; (b) tirosinase em dispersão de NP de sílica; e (c) tirosinase ligada covalentemente a NP de sílica. 54
Figura 30: Estratégias de preparação da NP de sílica revestida. Na estratégia tipo I utilizou-se a NP de sílica funcionalizada com a tirosinase ligada e na estratégia tipo II primeiro obteve-se uma solução com os precursores da eumelanina (Etapa 1) e depois misturou-se a solução obtida na etapa 1 com NP de sílica funcionalizada (Etapa 2), segundo o procedimento 3.3.10 descrito em Materiais e Métodos. 57
Figura 31: Espectro da dispersão e foto da: (a) NP de sílica Tipo I (via DHI/IQ obtido com tirosinase ligada); (b) NP de sílica tipo II (via DHI/IQ obtido com tirosinase livre); e (c) melanina sigma padrão. Condição da dispersão: 0,25mg/mL. 58
Figura 32: Espectro de Reflectância da (a) NP de sílica funcionalizada; (b) NP de sílica Tipo I (via tirosinase imobilizada por ligação covalente); (c) NP de sílica Tipo II (via DHI/IQ obtido com tirosinase livre); e (d) melanina sigma padrão. NP de sílica nua constituiu a linha de base. 58
Figura 33: Análise termogravimétrica da NP nua. Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2. 59
Figura 34: Análise termogravimétrica da NP funcionalizada. Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2. 60
Figura 35: Análise termogravimétrica da melanina sigma de referência. Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2. 60
Figura 36: Análise termogravimétrica da NP revestida tipo I (via DHI/IQ obtido com tirosinase ligada). Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2. 61
Figura 37: Análise termogravimétrica da NP tipo II (via DHI/IQ obtido com tirosinase livre). Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2. 61
Figura 38:Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de NP de sílica (a) funcionalizada e (b) tipo II; e marcas com acetato de uranila 1% (c) funcionalizada e (d) tipo II. Amostras foram dispersas em água destilada e gotejadas sobre um grid de transmissão de cobre com filme de Formvar revestido de carbono. 63
Figura 39: Escala de cinza da (a) NP funcionalizada e da (b) NP de sílica revestida com eumelanina. Os perfis são referentes aos diâmetros marcados na figura 38..... 64
Figura 40:Esquema reacional de indol-5,6-quinona (IQ) e 5,6-dihidroxindol (DHI) para formação de dímeros e início da reação de polimerização na reação de polimerização. O carbono 2 do 5,6-dihidroindol é um forte nucleófilo e ataca os carbonos 4 e 7 do IQ, que são excelentes eletrófilos permitindo o acoplamento eficiente destas moléculas. Extraído de [68] 65

Figura 41: Esquema mostrando a ligação de IQ (obtido por tirosinase imobilizada ou previamente com tirosinase livre) ao glutaraldeído ancorado na NP funcionalizada com a posterior polimerização de eumelanina favorecida pela maior concentração de íons H^+ na superfície da partícula. 66
Figura 42: Espectros de absorbância de (a) NP nua e (b) solução de DHI e IQ. Obtenção da solução de DHI/IQ: tirosina 250mM; tirosinase 13µg/mL; tampão fosfato 50mM, 30ºC e 4h de reação. Depois da síntese foi misturada um dispersão 0,25mg/mL de NP de sílica nua. 67

1 Introdução

1.1 Melanina

A pele e os pelos dos mamíferos adquirem uma enorme variedade de padrões de cores de acordo com a distribuição e concentração de um tipo principal de pigmento chamado melanina [1] [2]. Existem dois tipos principais de melanina em mamíferos, a eumelanina e a feomelanina. A eumelanina possui cor que varia do marrom ao preto, e a feomelanina possui cor que varia do amarelo ao vermelho. [3][4]

A melanina é formada em célula especializada localizada na camada basal da pele chamada melanócito. A biossíntese ocorre em organelas especializadas denominadas melanossomas, que quando maduros localizam-se nos dendritos dos melanócitos. Estes são internalizados pelos queratinócitos presentes nas proximidades, e levam as melaninas para a superfície da pele na sua diferenciação de célula viva em camada córnea[5].

Quimicamente, a melanina é um polímero heterogêneo constituído principalmente por grupos indóis e seus derivados, que são ligados covalentemente (figura 1). Por possuir muitas ligações carbono-carbono, o espectro de absorção da melanina estende-se do ultravioleta ao visível, atuando como principal fotoprotetor natural da pele [7]. A grande capacidade de absorção da radiação ultravioleta B (comprimento de onda na faixa de 320–280 nm), impede que estes raios atinjam e sejam absorvidos por DNA nuclear das células da pele, sendo esta a principal função biológica das melaninas [7]. A eumelanina obtida *in vitro* é bem caracterizada na literatura, sendo um sólido amorfo com diâmetro médio de 400nm[8] (figura 2). Estudos por espalhamento de raio-X revela a formação randômica de estruturas, que pode ser explicada simplesmente como heteropolímeros de indol-5,6-quinona (IQ) e 5,6-dihidroxindol (DHI), bem como, traços de derivados carboxilados destes (figura 3) [9].

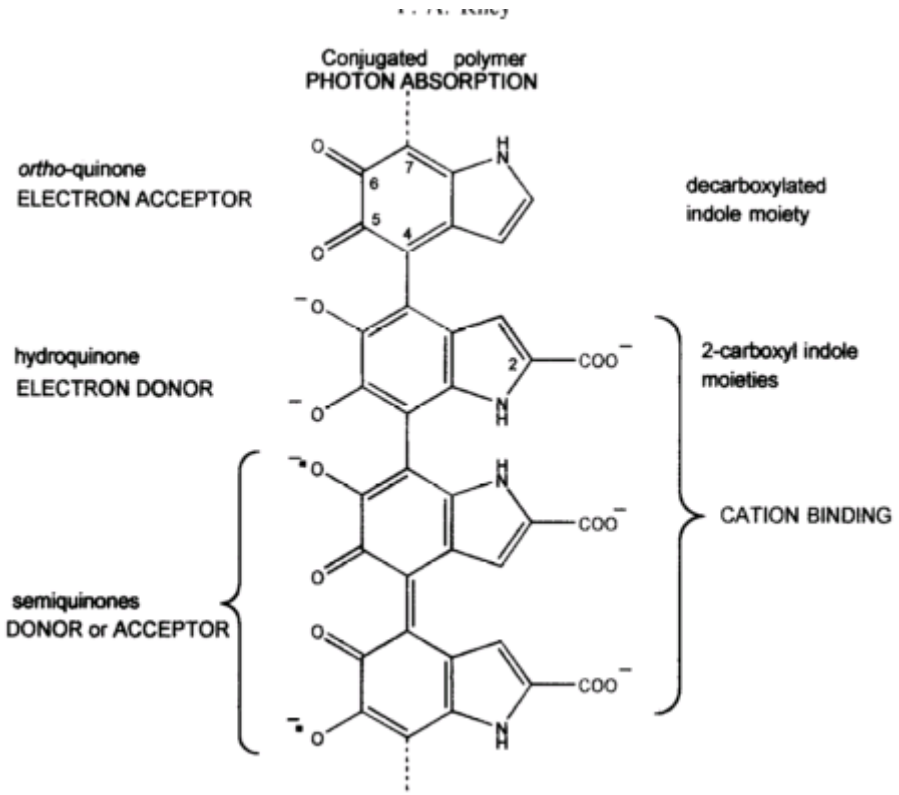


Figura 1: Esquema proposto para a melanina mostrando indóis ligados pelos carbonos 4-7 formando um alta grau de conjugação. Ácidos carboxílicos estão ligados no carbono 2 e carbonilas nos carbonos 5 e 6 das ortoquinonas, grupos hidroxílicos apresentados desprotonados na forma de catecol. Existe a formação de três regiões com funções diferentes: aceptora, doadora e com as duas funções. A. Extraído de [7]

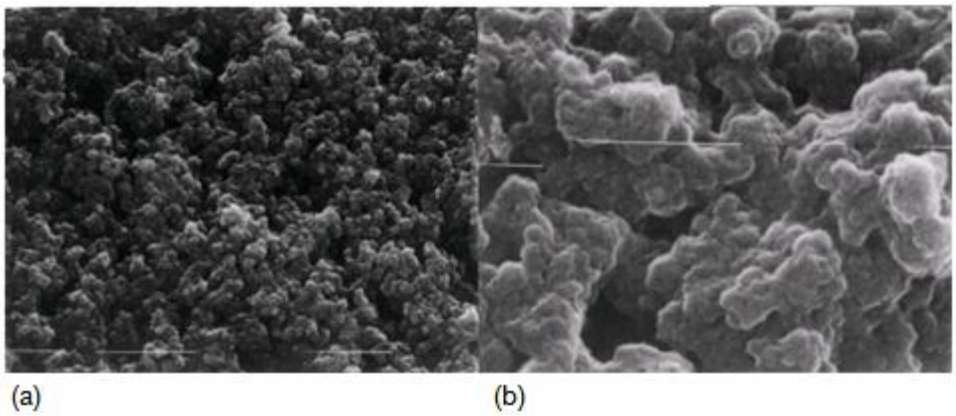


Figura 2: : Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de eumelanina sintética (A: x 3000; B: x 48000). Cada porção preta e branca da linha pontilhada tem 8,3µm para (a) e 830nm para (b). Extraído de [8].

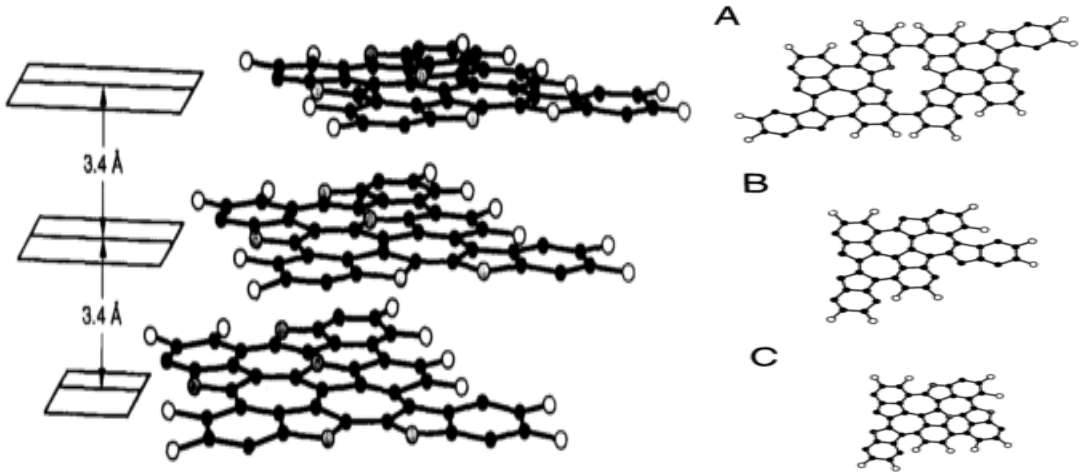


Figura 3: A direita um modelo molecular tridimensional da melanina com três folhas empilhadas do tipo mostrado em C. As dimensões totais são ~20 Å em extensão lateral e ~ 7,6 Å em altura. (A) Um modelo molecular de uma única folha mostrado uma ligação aleatória de unidades indol-5,6-quinona (IQ), que fornece uma abertura no centro da folha. (B) A ligação aleatória de monômeros indol-5,6-quinona. (C) Uma variante do modelo mostrado em B. Oxigênio como círculos abertos, posição do nitrogênio não mostrada. Adaptado de [9].

Diversos intermediários da síntese da melanina são espécies muito reativas. Por exemplo, as ortoquinonas, que são intermediários eletrofílicos produzidos na biossíntese de melanina, podem reagir com nucleófilos diversos presentes em proteínas e nas bases nitrogenadas. De fato essas reações são responsáveis por diversos processos biológicos, como o escurecimento das frutas danificadas [10]. Em decorrência da grande reatividade das ortoquinonas, a síntese da melanina deve ser realizada em ambientes específicos e distinto do resto da célula, explicando assim porque a biossíntese de melanina ocorre no interior dos melanossomas, onde existe uma matriz proteica para a polimerização do pigmento [11]. Esta reatividade também será importante para o entendimento da interação de NPs de sílica com melanina, seus derivados e precursores, conforme resultados que serão apresentados e discutidos nesta Dissertação.

1.2 Tirosinase

A tirosinase é uma metaloproteína com dois átomos de cobre em seu sitio ativo, sendo a enzima chave na produção de melanina [12]. Catalisa a oxidação de L-dopa e de

tirosina para os intermediários formadores da melanina. A feomelanina, além desses, tem também a L-cisteína como percursor. Os tipos de melanina produzidas em animais não depende somente da disponibilidade de seus percursores, mas também da regulação da tirosinase e da tautomerase (outra enzima também envolvida na biossíntese de melanina) de onde decorre o controle refinado na biossíntese desse pigmento [13].

A tirosinase possui duas atividades catalíticas distintas no mesmo sitio ativo: a oxidação de monofénois para o-quinonas (atividade monofenolase), e a oxidação de difenóis para o-quinonas (atividade difenolase) (Figura 4) [14].

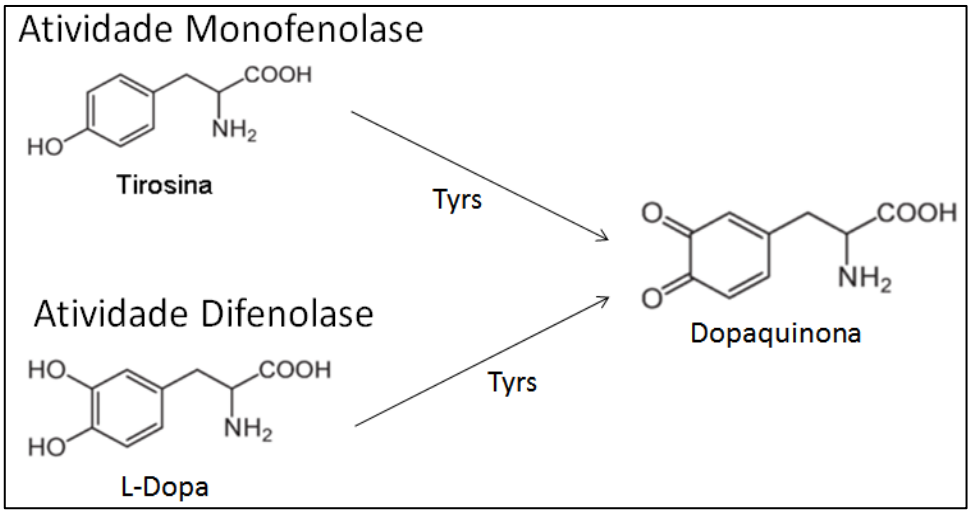


Figura 4: Esquema mostrando as duas atividades catalíticas da tirosinase: atividade monofenolase e atividade difenolase. Tyrs: tirosinase.

O sítio ativo da tirosinase consiste de uma bolsa hidrofóbica, que é formado principalmente por quatro α-hélices compactas. No seu interior estão dois átomos de cobre (Cu “A”, Cu “B”), ligados a três resíduos de histidina cada, formando duas regiões ricas em histidina. O segundo resíduo de histidina está ligado a um *loop* da estrutura proteíca da região do CuA e é o único flexível. Os outros cinco resíduos de histidina estão ligados a fragmentos de α-hélices circundantes [15].

Estudos químicos e espectroscópicos mostram que o sítio ativo da tirosinase é similar ao das hemocianinas [16]. Possui três estados de oxidação diferentes: o estado *oxi*, *met* e *deoxi* (figura 5). No estado *oxi* o cobre está na valência “II” com a presença de uma molécula exógena de oxigênio ligada aos dois átomos de cobre numa ponte de

peróxido [17]. Os átomos de cobre estão ligados ainda por duas fortes ligações equatoriais e uma fraca axial aos nitrogênios ligantes dos resíduos de histidina formando uma pirâmide quadrada. No estado *met* o cobre está na valência “II” na forma tetraédrica com apenas um átomo de oxigênio numa ligação entre os átomos de cobre [18] [12].

No estado *deoxi* o cobre está na valência “I” sem oxigênio formando uma pirâmide trigonal. Este estado de valência possui afinidade por uma molécula de oxigênio e sua ligação ao sítio ativo da tirosinase causa a oxidação dos átomos de cobre e a enzima volta ao estado *oxi* [19]

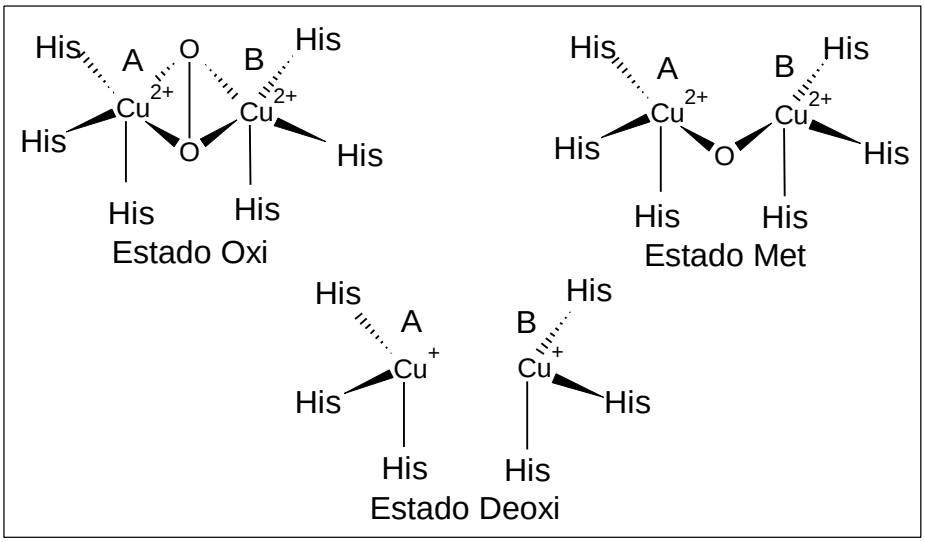


Figura 5: Sítio ativo da tirosinase mostrando os dois átomos de cobre nos seus diferentes estados de oxidação: *Oxi, Met e Deoxi*, adaptado de [18].

O tipo de atividade catalítica da tirosinase depende do estado de oxidação do seu sítio ativo. A atividade monofenolase ocorre no estado *oxi*, e a atividade difenolase ocorre no estado *oxi* e no estado *met*. A figura 6, apresenta um esquema explicando como ocorre a oxidação de tirosina no estado *oxi*, e como ocorre a oxidação de L-dopa tanto pelo estado *oxi* como pelo *met.*

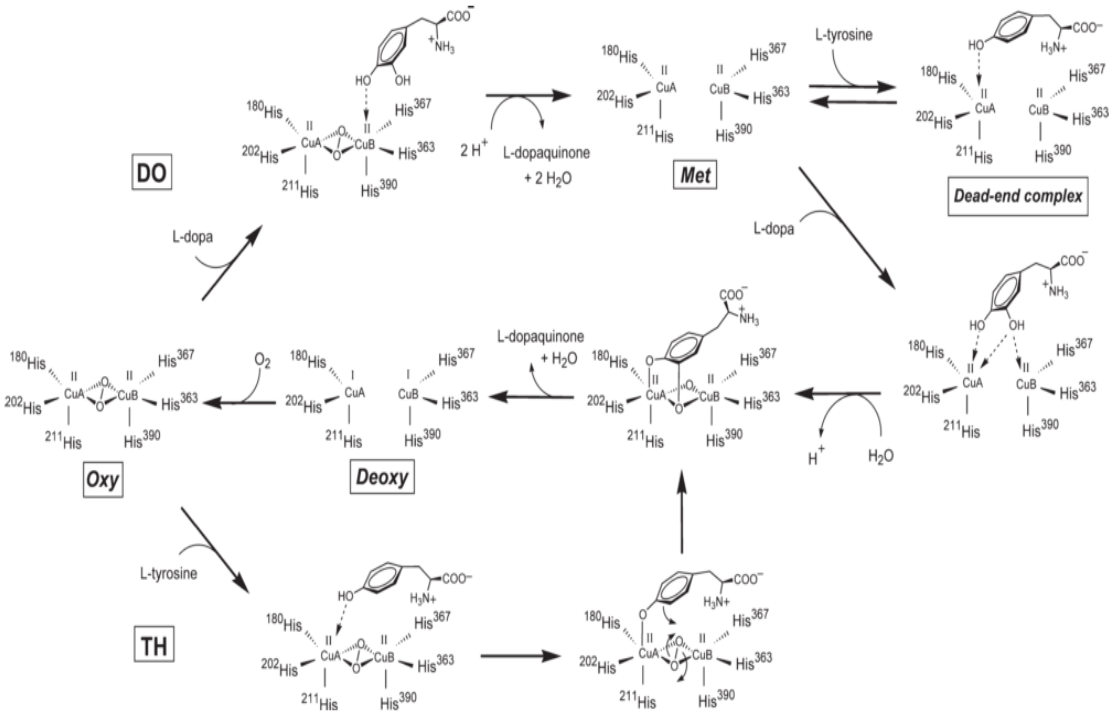


Figura 6: Esquema mostrando os ciclos catalíticos da atividade monofenolase (TH), da atividade difenolase (DO) e da inativação temporaria da tirosinase por ligação da tirosina ao estado *met* "*Dead-end complex",* extraído de [15]. Os demais símbolos foram definidos na figura 5.

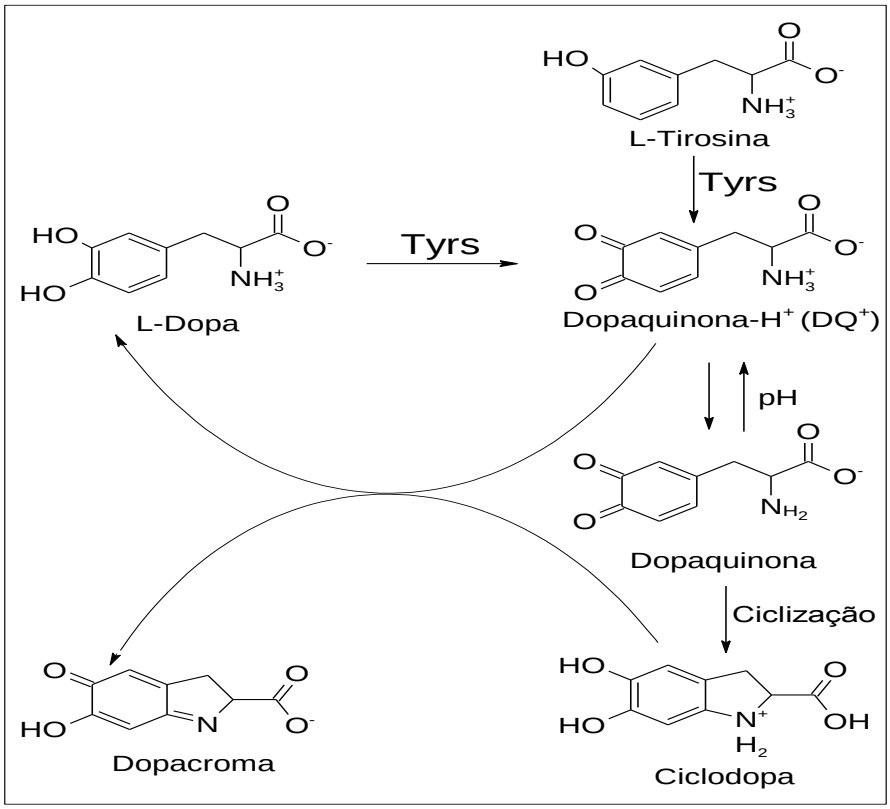
Na atividade monofenolase (ciclo monofenolase - TH), uma molécula de tirosina se liga ao átomo de cobre do sítio ativo pelo oxigênio de sua hidroxila. Um rearranjo das ligações leva a ligação equatorial Cu-O-Cu para uma axial Cu-O-fenol [15]. Então ocorre uma hidroxilação na posição orto do monofenol, sendo liberadas uma molécula de difenol e uma de água. O estado de valência passa então para o estado Deoxi (figura 6).

Na atividade difenolase (ciclo difenolase - DO), ocorre a oxidação de duas moléculas de L-dopa, sendo uma oxidada pelo estado *oxi* e a outra pelo estado *met* (figura 6). As oxidações podem ser sequenciais, uma vez que a primeira oxidação pelo estado *oxi* leva o estado de oxidação do sitio ativo da enzima para o estado *met* [20]. Uma molécula de difenol liga-se aos átomos de cobre do sítio ativo pelos átomos de oxigênio de suas hidroxilas, ocorre então a liberação de uma molécula de o-quinona e uma de água [15]. A oxidação de o-difenóis ocorre num processo de $2e^-$, uma vez que nenhuma semiquinona é formada, após a segunda oxidação pelo estado *met* o sítio

ativo da enzima passa para o estado *deoxi* [21]. A ligação de tirosina ao estado *met* inativa temporariamente parte da população de enzima (*Dead-end Complex)*, que só é restaurada conforme a atividade difenolase drena o estado *met* de volta a atividade catalítica [22](figura 6).

A síntese de eumelanina é atualmente explicada pelo modelo enzimático-químico (figura 7) descrito por Cabanes [23], que foi baseado nos estudos iniciais de Raper [24] e Mason [25]. Esta síntese é dividida em duas fases, a proximal (figura 7) e a distal (figura 8). A fase proximal ocorre rapidamente e nos primeiros momentos da reação e a fase distal ocorre mais lentamente e na sequencia da fase proximal. A atividade monofenolase é considerada a etapa lenta da fase proximal e por isso é usada na literatura para medir a atividade enzimática da tirosinase[26][6].

Na fase proximal ocorre a oxidação enzimática de tirosina (atividade monofenolase) e a oxidação enzimática de L-dopa (atividade difenolase) para dopaquinona$^+$ (DQ^+). O grupo amino da DQ desprotonada, sofre espontaneamente uma reação intramolecular de adição ao anel benzênico produzindo ciclodopa. Este último é quimicamente oxidado pela reciclagem de uma outra molécula de DQ^+ para L-dopa produzindo dopacroma. [23] (figura 7).



2 DopaquionaH$^+$ ⟶ L-Dopa + Dopacroma + H$^+$

Figura 7: Fase proximal da síntese de eumelanina (Tyrs: tirosinase), adaptado de [23][20].

A atividade monofenolase apresenta um intervalo *(lag)* na atividade enzimática antes de atingir o estado estacionário (figura 8). O motivo do *lag* é estequiométrico, cada molécula de dopacroma requer a formação de duas moléculas de dopaquinona, uma para atender a reciclagem química da redução de dopaquinonaH$^+$ para L-dopa na oxidação de ciclodopa a dopacroma, e outra justamente para ser transformada para dopacroma (figura 7). A atividade monofenolase só produz uma dopaquinona por ciclo monofenolase (figura 6), por isso nunca satisfaz a necessidade da formação de duas dopaquinonaH$^+$ para uma dopacroma, neste período a formação de dopacroma não é linear, ocorrendo o *lag*. Na atividade difenolase, duas moléculas de dopaquinona são formadas por ciclo catalítico (figura 6), satisfazendo a estequiometria da reação, assim a formação de dopacroma é linear. O *lag* na atividade monofenolase tem fim quando dopa é produzida quimicamente na reação de oxidação de ciclodopa a dopacroma por dopaquinonaH$^+$ (fig.7). A L-dopa produzida nesta etapa química inicia a atividade

difenolase da tirosina pondo fim ao *lag*. Ou seja, mesmo na atividade monofenolase (usando tirosina como substrato), durante o estado estacionário da formação de dopacroma também ocorre a atividade difenolase [23].

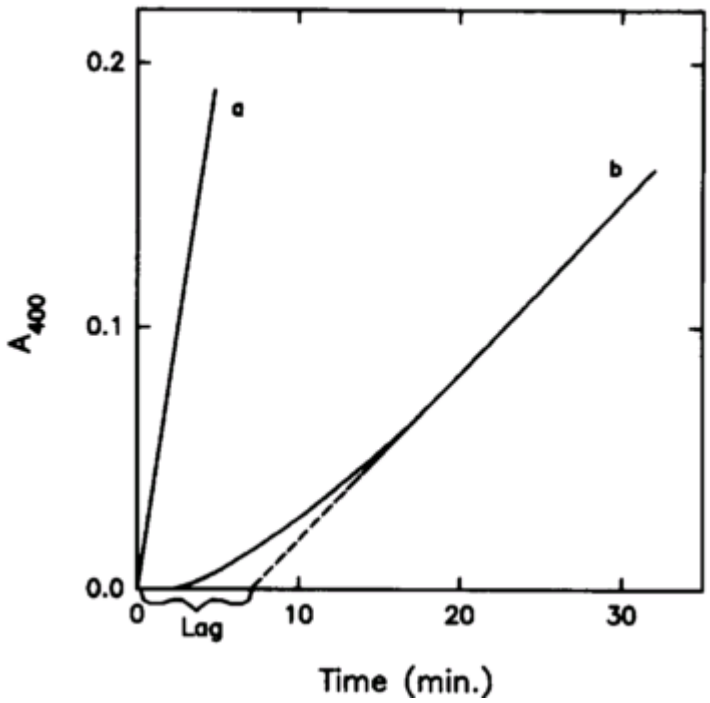


Figura 8: Atividade enzimática da tirosinase de *grape berry* (a) atividade difenofenolase com 25mm 4-metil catecol (tirosinase 1µg); (b) atividade monofenolase com 2.1 mm p-cresol (tirosinase 100µg); extraído de [27].

A explicação deste período *lag* surtiu muitas discussões na literatura científica. O modelo enzimático-químico (fig.4), que é o mais aceito, está de acordo com a estrutura do sitio ativo da tirosinase [28] e explica diversas observações experimentais: a ausência de atividade monofenolase na forma *met* da tirosinase [29]; a existência da reação química de transformação de dopaquinona em L-dopa [20]; o *lag* deixa de ocorrer quando a tirosina é oxidada na presença de L-dopa [20]; a existência de um único sitio ativo para a atividade monofenolase e difenolase [18]; a existência de um *lag* na atividade difenolase em pH<6, uma fez que a protonação de dopaquinona dificulta a formação de ciclodopa [30].

Na fase distal, uma molécula de 5,6-dihidroxindol (DHI) é formada com a lenta descarboxilação de dopacroma. DHI é rapidamente oxidada a indol-5,6-quinona (IQ).

Essa oxidação pode ocorrer quimicamente com a redução de outra molécula de DQ^+ para L-dopa [31] [32], ou enzimaticamente por tirosinase [13]. Um caminho alternativo é a oxidação enzimática de dopacroma para 5,6-dihidroxindol-2-ácido carboxílico (DHICA) pela dopacroma tautomerase, uma enzima relacionada com a tirosinase que contém zinco em seu sítio ativo[33] [34]. DHICA é então oxidada por DQ^+ ou por DHICA oxidase (outra enzima relacionada com a tirosinase) para Indol-2-ácido carboxilico-5,6-quinona (ICAQ) (figura 9). Devido a ausência de cisteína e da dopacroma tautomerase, a eumelanina obtida *in vitro* é principalmente um heteropolímero de DHI, IQ e suas semiquinonas além de traços de derivados carboxilados[35]. Para obter feomelanina *in vitro* utiliza-se L-dopa ou tirosina e cisteína [36].

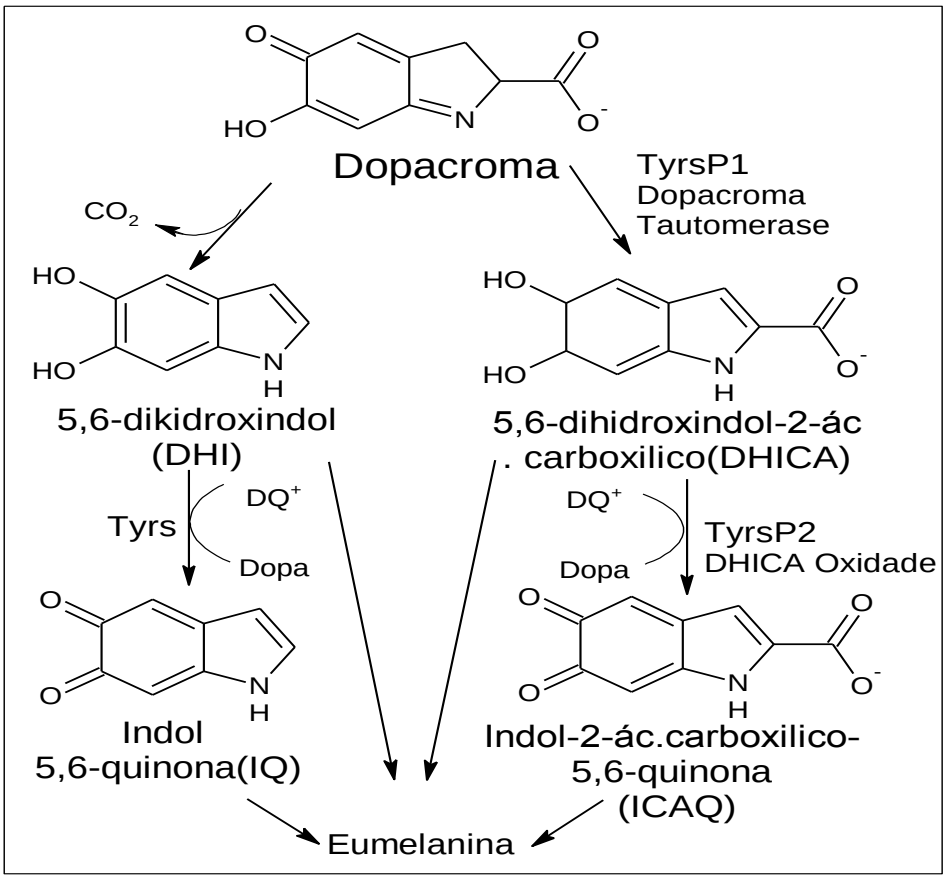


Figura 9: Fase distal da síntese de eumelanina (Tyrs: tirosinase; e TyrsP1 e TyrsP2 enzimas relacionadas com a tirosinase, sendo respectivamente a Dopacroma Tautomerase e a DHICA Oxidase), adaptado de [32] [37] .

A disponibilidade de cisteína ou glutationa leva a formação de feomelanina (fig.9). O grupo tiol presente nestes compostos reage com DQ num ataque nucleofílico, preferencialmente gerando 5-cisteinildopa ou 5-glutationildopa. 5-cisteinildopa é então oxidado para 5-cisteinildopaquinona por tirosinase, apesar de este último ser um substrato ruim, fazendo a reciclagem por redução de uma molécula de DQ^+ para L-dopa o caminho principal. 5-cisteinildopaquinona sofre uma reação de ciclização intramolecular produzindo 1,4-Benzotiazina alanina, subsequentes reações de polimerização levam a formação da feomelanina [38] [39]. As interação entre os diferentes percursores da eumelanina e feomelanina são responsáveis pela heterogeneidade de melaninas [1].

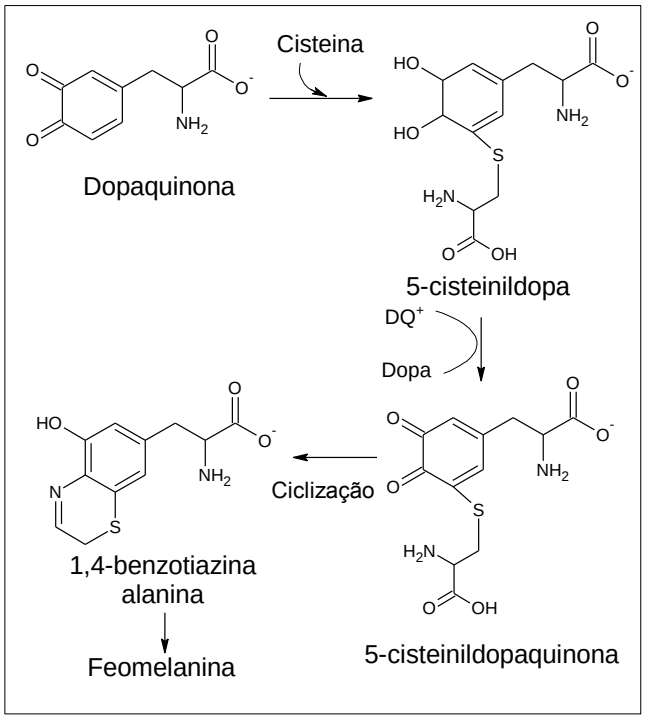


Figura 10: Síntese de feomelanina (mostrado apenas cisteina) adaptado de [39].

1.3 O processo sol-gel

O processo sol-gel é uma tecnologia usada para obtenção de materiais inorgânicos ou orgânicos, incluindo dispersões coloidais, fibras, monólitos e géis. Basicamente o processo sol-gel ocorre com a cristalização do percursor, num processo chamado de nucleação [40][41], que envolve reações simultâneas de hidrólise e condensação do percursor, geralmente óxidos de metais e semimetais [42]. É possível controlar a

estrutura a nível molecular desde os primeiros estágios da formação do coloide com o controle das variáveis físico-químicas, de concentração, do tipo de solventes e de percursores. Culmina numa estrutura homogenia e de escala ultrafina entre 1nm e 1µm, dimensões estas que caracterizam um coloide [43]. O material obtido possui características físico-químicas diferentes de outros materiais de mesma constituição química, justamente pela sua estrutura de criação controlada aliada a seu tamanho nanométrico [44].

Elbelman [45] e Graham´s [46] são exemplos de autores que realizaram os estudos iniciais do processo sol-gel, visando obtenção de cerâmicas e vidros por processos químicos. Obtiveram a partir da hidrólise e condensação de organosilicatos em meio ácido diversos tipos de materiais vítreos, monólitos, géis viscosos e fibras. Para evitar a transformação da estrutura a um pó fino durante a secagem era necessário um processo lento de cura, que durava mais de um ano e por isso não houve interesse comercial. Stöber [47] foi capaz de obter partículas de óxidos de silício de tamanho nanométrico, o então chamado “pó de sílica esférica de Stöber”, com destaque para a possibilidade de obtenção de partículas rígidas e de distribuição de tamanho uniforme, que causou uma revolução nesta área de investigação e tecnologia.

Esta síntese consiste da hidrólise do grupo alcóxido do organosilano, que leva a formação de grupos reativos do sílanóis e do álcool correspondente. A condensação ocorre entre duas moléculas de silanol provenientes da hidrólise com a eliminação de uma molécula de água. Na sequência ocorre a poli-condensação das moléculas de silanol. O resultado é uma estrutura microcristalina (figura 11) [42].

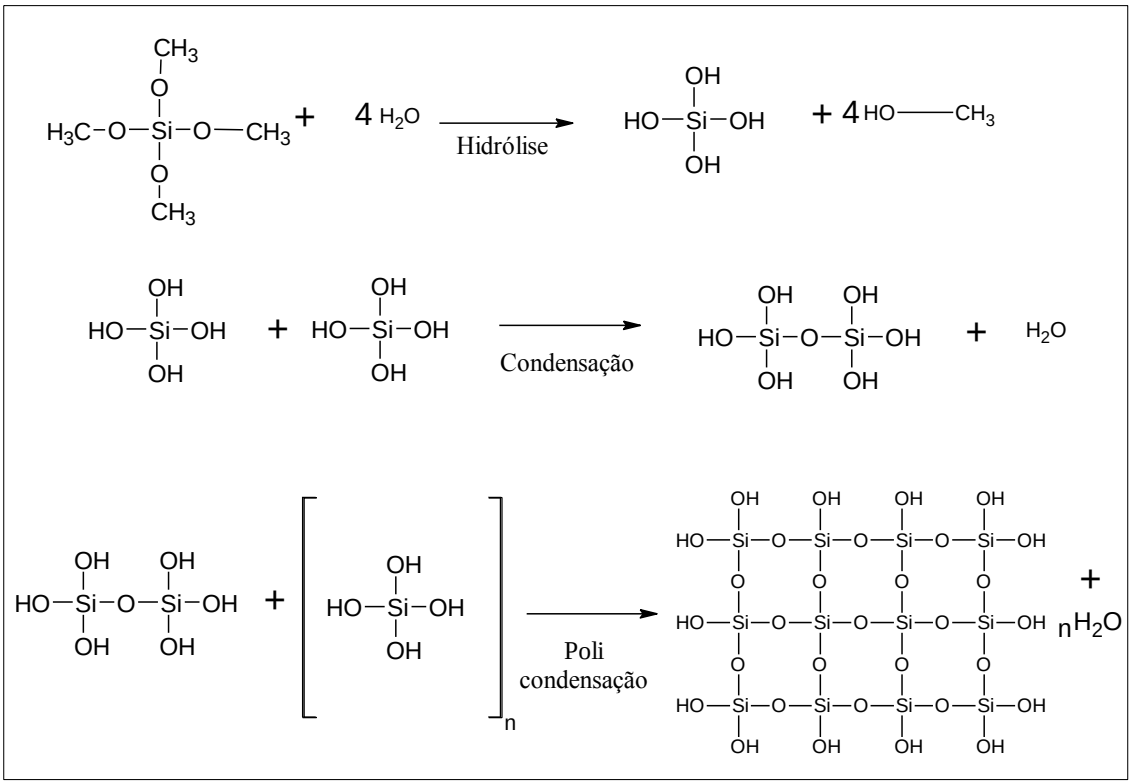


Figura 11: Hidrólise e condensação de tetraetilortosílicato (TEOS), adaptado de [42].

Usando-se a síntese de Stöber, que ocorre em pH alcalino e utilizando álcool como solvente, é possível controlar o tamanho da partícula em função da concentração de água, álcool e hidróxido de amônia. O tipo de álcool e de percursor também influencia no tamanho final da partícula. O pH alcalino é obtido com amônia, que segundo Stöber, também atua como agente estabilizante das partículas esféricas [47]. As NPs pode ser usadas em adsorção, troca iônica, aplicações óticas, sensores, catálise, para incorporar outras moléculas e biomoléculas, etc.[48][49][50].

1.4 Imobilização da tirosinase em NP de sílica

A imobilização de enzimas em suportes sólidos objetiva a melhora na performance catalítica da enzima em condições adversas à biológica. Os custos adicionais com o suporte, com a imobilização e com a perda parcial da atividade catalítica (devido a imobilização) acabam sendo vantajosos sobre o uso tradicional de enzimas não imobilizadas em processos que necessitam dessa melhora frente a condições adversas a biológicas [51]. As vantagens são: (i) a imobilização das enzimas as torna mais resistentes a condições industriais de síntese, que geralmente usam extremos de

pH e de temperatura e muitas vezes solventes orgânicos; (ii) as enzimas imobilizadas podem ser reaproveitadas, podendo ser separadas do meio de síntese por filtração [52]; (iii) a imobilização de enzimas pode até mesmo aumentar a atividade catalítica, como por exemplo na lacase. Essas enzimas são imobilizadas na sua conformação aberta, permitindo que o substrato tenha mais acesso a enzima [53].

A imobilização de enzimas pode ocorrer por adsorção física dirigida por forças de Van Der Waals, forças iônicas ou ainda por ligação covalente. Geralmente as adsorções físicas são muito fracas e a enzima tende a sofrer dessorção, principalmente em meios com alta força iônica [54]. No caso da ligação covalente a enzima fica definitivamente imobilizada (Figura 12). Modificações estruturais que resultam da ligação covalente geralmente causam a diminuição da afinidade entre enzima e substrato (>Km) ou o impedimento de ajustes conformacionais durante o estado de transição decorrentes de um “enrijecimento” da enzima imobilizada [55]. As desvantagens do processo de imobilização por ligação covalente estão relacionados com o possível impedimento das modificações conformacionais alostéricas das enzimas e a própria desnaturação [53]. Uma vantagem de destaque na imobilização de enzimas em suportes nanométricos por ligação covalente em relação a incorporação em matrizes é que no primeiro método as limitações difusionais da enzima são significativamente atenuadas enquanto no segundo elas são acentuadas.

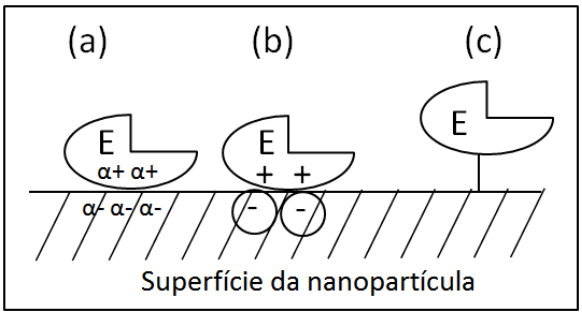


Figura 12: Tipos de imobilização de uma enzima (E) que podem ocorrer na superfície de uma partícula.(a) adsorção por forças de Van Der Waals; (b) adsorção iônica; (c) ligação covalente.

Para a imobilização por ligação covalente de uma enzima a NP de sílica, é necessário que inicialmente a superfície seja ativada, com um grupo reativo (ponte), que receberá outro grupo reativo que finalmente reagirá e imobilizará a enzima. Por exemplo: o glutaraldeído é muito usado como intermediário de ligação, pois possui dois grupos reativos polares (carbonilas), que reagem eficientemente com grupos amino da cadeia

peptídica [51]. No entanto, Nps de sílica possuem grupos hidroxilas não reativos ao glutaraldeído, e a superfície destas precisa ser ativada pela introdução de um grupo amino [56]. Usualmente o 3-Aminopropiltrietoxissilano (ATPES) é usado com esse propósito. Sua capacidade de se ligar as hidroxilas da NP de sílica e ao mesmo tempo deixar um grupo reativo (amino) exposto para o solvente torna essa molécula ideal para esse procedimento (figura13). Essa ligação ocorre entre resíduos de aminoácidos com cadeias laterais que possuam grupos amino expostas a superfície da enzima, como lisina e arginina e a carbonila presente no glutaraldeído. É importante enfatizar que a enzima será inativada se a imobilização ocorrer no sitio ativo.

O método de imobilização por ligação covalente, em substratos sólidos, geralmente é o escolhido para processos industriais por oferecer a maior resistência a condições adversas as biológicas. Geralmente a funcionalização das NPs ocorre em duas etapas: primeiro com a ativação da superfície com 3-Aminopropiltrietoxissilano (ATPES) e depois com a ligação do glutaraldeído. Posteriormente ocorre a ligação da enzima [56].

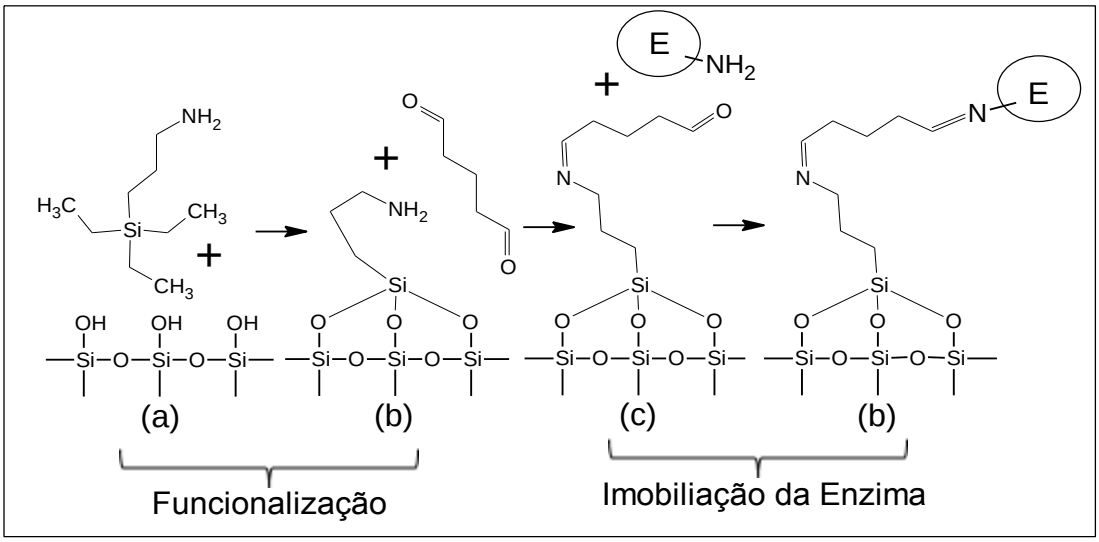


Figura 13: Esquema mostrando a modificação da superfície de uma estrutura de sílica obtida com o processo sol-gel e a imobilização de uma enzima: (a) Ativação da superfície de NP de sílica com ATPES; (b) Funcionalização da NP de sílica com glutaraldeído; (c) Imobilização da enzima a superfície funcionalizada; (d) enzima imobilizada por ligação covalente.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Obtenção de NP de sílica revestida com eumelanina através de tirosinase imobilizada no microambiente da NP e avaliação das alterações cinéticas decorrentes da imobilização.

2.2 Objetivos específicos

1. Obtenção e caracterização das NPs de sílica;
2. Caracterização da formação da dopacroma e DHI e IQ;
3. Imobilização da tirosinase em NP de sílica;
4. Atividade da enzima livre e ligada na NP de sílica;
5. Obtenção e caracterização da NP de sílica revestida com eumelanina;

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

A água destilada, deionizada e filtrada antes da utilização usando o sistema Milli-Q (resistividade 18 mohms.cm; Millipore, Barueri, Brasil). Tetraetilortosílicato (TEOS), tirosina, L-dopa, tirosinase (E.C.1.14.18.1) de Agaricus bisporus**,** melanina, 3-Aminopropiltrietoxissilano (ATPES), glutaraldeído, fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico, etanol p.a., e hidróxido de amônia foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados como recebidos.

3.2 Equipamentos

O espectrofotômetro modelo U-V 2401PC SHIMADZU (Japan), com controlador térmico e agitador magnético adaptado, foi usado para todas as leituras de absorbância. Os espectros de emissão foram adquiridos com um Ocean Optics USB 2000 (USA). Microscopia eletrônica de transmissão foi usada para medir o tamanho das NP de sílica modelo Jeol Neoscope JCM-5000 (USA). Os dados de termogravimetria foram obtidos na central analítica do Instituto de Química com termobalança modelo STA i 1500 Scinco (South Korea).

3.3 Métodos

3.3.1 Síntese de NP de sílica pelo método sol-Gel

As NPs de sílica foram preparadas pelo método de Stober, o qual já foi comentado na Introdução desta Dissertação. O procedimento experimental utilizado neste trabalho foi: em um erlenmeyer foi adicionado 12ml de hidróxido de amônia, 240mL de álcool e a essa solução foi adicionado 8mL de TEOS. A mistura foi mantida sob agitação branda por 24h. As partículas foram centrifugadas por 30min a 20000rpm e dispersas em água destilada com a ajuda de um sonicador por 15 min. O procedimento foi repetido por três vezes. O material foi seco em dessecador e o pó obtido guardado em um frasco em temperatura ambiente**.**

3.3.2 Curva padrão da dopacroma

Foi realizada com base no artigo de Mason [25] e seguindo o protocolo encontrado no site da *Winona State University* http://homepages.gac.edu/~cellab/chpts/chpt5/ex5-2.html. A uma solução de 10 mL de 8mM L-dopa (tampão citrato 0,1M pH4,8), foi adicionado 0,5mL que contém 250µg de tirosinase. A solução foi deixada em repouso por 15 min em temperatura ambiente (frasco foi coberto com papel alumínio). Durante esse período, toda a L-dopa foi convertida em dopacroma, com a solução então contendo 8mM de dopacroma. Diluições foram realizadas para a obtenção da absorbância em diferentes concentrações de dopacroma (0,125-0,15-0,175-0,2-0,225mM). Com o uso dos dados obtidos foi preparada a curva padrão de calibração para dopacroma.

3.3.3 Obtenção da solução de DHI e IQ

Foi utilizado método adaptado de Itu [57]. A obtenção da solução de DHI e IQ foi feita com a conversão de tirosina, com o uso da tirosinase a, principalmente DHI e IQ, que são antecessores da eumelanina [22]. Importante ressaltar que a melanina (*eu* ou *feu*) é um material de difícil diluição em água, ocorrendo em pH alcalino (pH10) ou em baixíssima concentração por sonicação por 30 min e posterior filtração[58]. Uma solução 250mM de L-tirosina e tirosinase 500µg/L em tampão fosfato 50mM (pH6,5) foi deixada sob agitação a 30ºC por 4h, período em que a L-tirosina é convertida em DHI e IQ. Além de conter monômeros de DHI, IQ, comtém oligômeros diversos da reação entre esses antecessores[59], como também tautomeros e traços de derivados carboxilados [35]. Sua polimerização em eumelanina foi feita por Itu em pH ácido, quando então obteve um precipitado preto e insolúvel em água [57]. Essa solução tem um pico de absorção em 300 e um com grande amplitude em 540nm como observado por Mason[25],Raper [32] e Lock[59].

3.3.4 Imobilização da tirosinase em NP de sílica por adsorção física

Em 25mL de uma dispersão em tampão fosfato pH 6,5 de NP de sílica 0,25mg/mL, foi adicionado 0,5mL de uma solução em tampão fosfato pH 6,5 contendo 0,328mg de tirosinase (razão massa:enzima de 19:1). Após duas horas sob agitação, a amostra foi lavada 3x por centrifugação (10000rpm) com tampão fosfato pH 6,5 por 15min,

obtendo-se no precipitado a NP de sílica com a tirosinase imobilizada por adsorção física.

3.3.5 Imobilização da tirosinase em NP de sílica por ligação covalente

3.3.5.1 Ativação da NP de sílica com 3-Aminopropil- trietoxissilano (ATPES)

Em 25mL de uma dispersão em tampão fosfato pH 6,5 de NP de sílica 2,5mg/mL, foi adicionado 1,2mL de 3-Aminopropiltrietoxissilano (ATPES) (concentração final de 5%). Após duas horas sob agitação, a amostra foi lavada 3x por centrifugação (10000rpm) com tampão fosfato pH6,5 por 15min. O material foi usado imediatamente

3.3.5.2 Funcionalização da NP de sílica com glutaraldeído. NP de sílica funcionalizada.

Em 25mL de uma dispersão em tampão fosfato pH 6,5 de NP de sílica 2,5mg/mL ativada com ATPES, foi adicionado 1,2mL Glutaraldeído (concentração final de 5%). Após duas horas sob agitação, a amostra foi lavada por 15min com tampão fosfato pH 6,5 e separada 3x por centrifugação (10000rpm). O material foi seco em dessecador por 24h, e o pó obtido, foi mantido em congelador a -20ºC**.** Estas NPs foram chamadas de NP de sílica funcionalizada.

3.3.5.3 Imobilização da tirosinase na NP de sílica funcionalizada

Em 25mL de uma dispersão de NP de sílica 0,25mg/mL em tampão fosfato pH 6,5, foi adicionado 0,5mL de uma solução 0,328mg de tirosinase (razão massa:enzima de 19:1) em tampão fosfato pH 6,5. Após duas horas sob agitação, a amostra foi lavada por 15min com tampão fosfato pH 6,5 e separada 3x por centrifugação (10000rpm), obtendo-se no precipitado a NP de sílica com a tirosinase imobilizada por ligação covalente.

3.3.6 Quantificação de proteína não imobilizada em NP de sílica

Para avaliação da quantidade de tirosinase imobilizada na NP de sílica foi usado o método de Bradford[60] adaptado por [61]. Foi quantificada a concentração de tirosinase antes e depois (sobrenadante) do procedimento de imobilização.

3.3.7 Caracterização da formação de dopacroma por tirosinase livre e imobilizada

A 2,450mL de uma solução de tirosina 250mM, foi adicionado 50µL de uma solução de tirosinase 650mg/mL, resultando numa concentração de 13µg/mL de enzima. Para o caso da tirosinase imobilizada, foi usada a tirosinase imobilizada conforme descrito no item "Atividade Enzimática da tirosinase Livre e Imobilizada". Após 30 minutos sob agitação magnética, foram medidos os espectros de absorbância entre 800nm e 200nm. A formação de dopacroma é caracterizada pelos seus máximos de absorção em 475nm e 305nm. Todas as soluções e dispersões em tampão fosfato de sódio 50mM pH6,5.

3.3.8 Atividade enzimática da tirosinase livre e imobilizada

As equações para obtenção de K_m e de $V_{máx}$ foram obtidas com o uso do programa *OrigenPro8*.

A cinética enzimática geralmente é descrita pelo modelo de Michaelis-Menten, que é baseado na formação de um estado estacionário da concentração do complexo enzima-substrato. Para o tratamento matemático do estado estacionário considera-se:

$$E + S \underset{k-1}{\overset{k+1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k+2} E + P \qquad \text{(Eq.1)}$$

Onde a associação do complexo [ES] é [E]+[S] →[ES] e a dissociação do complexo [ES] é [ES]→[E]+[S] e [ES] →[E]+[P], a concentração do complexo [ES] será constante quando as velocidades de associação e de dissociação forem constantes, o que caracteriza o estado estacionário que ocorre nos momentos iniciais da reação, sendo que V_0=k2[ES], será máxima quando $[E]_{total}$=[ES]. O modelo prevê que a velocidade da catalise depende da concentração de substrato. A concentração de substrato que resulta em uma velocidade de reação igual à metade da $V_{máx}$ é a constante de

Michaelis, K_m (eq.2), que é característica para cada enzima agindo sobre determinado substrato. Geralmente K_m é considerada como inversamente proporcional a afinidade do substrato pela enzima, mas isso considerando desprezível a constante de velocidade da formação de produto (k_2). Quando K_2 não é considerado desprezível, K_m torna-se uma relação complexa das três variáveis envolvidas, k_1, k_{-1} e k_2. A equação de Michaelis-Menten (eq.3) relacionada a velocidade inicial com [S] e $V_{máx}$ por meio da constante K_m. A cinética de Michaelis-menten também é denominada cinética do estado estacionário.

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \qquad \text{(Eq.2)}$$

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{(K_M + [S])} \qquad \text{(Eq.3)}$$

A eq. 3 é uma hipérbole retangular, o que torna difícil a determinação experimental da $V_{máx}$ pois seria necessário uma alta concentração de substrato para obtê-la. A inversão da formula de Michaelis-Menten proporcionada por Lineweaver e Burk possibilita a linearização da hipérbole (Eq.4). Dessa forma, variando a concentração de substrato e medindo-se a velocidade da catálise e possível chegar a $V_{máx}$ e a K_M.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \qquad \text{(Eq. 4)}$$

Para a mensuração da atividade da tirosinase livre, foi usado tirosinase 13µg/mL e tirosina (50;75;100;250;500;750;1000µM) ambas dissolvidas em tampão fosfato de sódio 50mm pH 6,5. A 2,450mL de uma solução de tirosina, foi adicionado 50µL de uma solução de tirosinase 650mg/mL, resultando numa concentração de 13µg/mL de enzima. As medidas de absorbância foram realizadas em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1cm com 2,5mL de volume total de amostra, que foi mantida sob agitação a 30°C. A atividade enzimática foi mensurada através da formação da dopacroma, que foi mensurada por absorção a 475nm.

Para a atividade da tirosinase imobilizada em NP de sílica, também foi usado a mesma concentração de tirosina para enzima livre, no entanto, a tirosinase usada foi imobilizada de modo que a razão inicial de imobilização sílica:enzima (19:1) fosse

coincidente com a concentração usado nos outros ensaios com tirosinase de 13µg/mL de tirosinase por 0,25mg/mL de sílica, conforme descrito no item “Imobilização por Ligação Covalente”. Dessa forma, foi adicionado a cada amostra de 2,4mL com solução de tirosina, 100µmL de uma dispersão com 32,5 µg/mL de tirosinase ligada a NP em 650mg/mL, resultando numa dispersão final de 13µg/mL de tirosinase e 0,25mg/mL de NP de sílica. Todas as soluções e dispersões em tampão fosfato de sódio pH 6,5. A eficiência de imobilização está descrita no Item “Imobilização da tirosinase” em “Resultados e Discussão”.

Como controle, foi mensurada também a atividade da tirosinase livre colocada em dispersões contendo NP de sílica. Foi usado a mesma concentração de tirosinase e tirosina mencionadas acima, sendo que o substrato foi solubilizado em dispersão de NP de sílica 0,25 mg/mL em tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5.

3.3.9 Análise termogravimétrica

Análise termogravimétrica (TGA) consiste na medida da perda de massa da amostra frente a um gradiente de aumento de temperatura, quantificando a saída de material volátil total. O equipamento consiste de uma balança que comporta poucas miligramas de amostra, que uma vez fechada dentro do compartimento, passa a contar a perda de massa volátil do material em função da temperatura [62]. Esta técnica permite não somente avaliar a composição geral, mas quantificar o nível de hidratação e oxidação do material [63]. A análise termogravimétrica da NP de sílica funcionalizada foi realizada nas seguintes condições: entre 25-900ºC; rampa de aquecimento de 20°C/min; atmosfera de nitrogênio; 1g de amostra.

3.3.10 Obtenção da NP de sílica revestida com eumelanina

O revestimento obtido com tirosinase imobilizada por ligação covalente ocorreu como segue (Tipo I): em 40mL de uma solução 250µg de Tirosina em tampão fosfato (pH6,5), foi adicionado 10mL de uma dispersão em tampão fosfato (pH6,5) com 250µg de tirosinase imobilizada por ligação covalente em 12,5g de NP de sílica funcionalizada, a mistura foi mantida sob agitação a 30ºC por 4h, quando Tirosina é convertida a DHI e IQ. O material foi centrifugado, o sobrenadante incolor foi descartado e o precipitado de cor negra foi seco em dessecador por 24h.

O revestimento obtido com NP de sílica funcionalizada (sem a presença da enzima ancorada) ocorreu como segue (Tipo II): em 40mL de uma solução 250µg de Tirosina em tampão fosfato (pH6,5), foi adicionado 1mL de uma solução em tampão fosfato (pH6,5) com 250µg de tirosinase, a mistura foi mantida sob agitação a 30ºC por 4h, quando tirosina é convertida a DHI e IQ. Foi adicionado a mistura 9mL de uma dispersão em tampão fosfato (pH6,5) com 12,5g de NP de sílica funcionalizada. A mistura foi mantida por 4h sob agitação a 30ºC. O material foi centrifugado, o sobrenadante incolor foi descartado e o precipitado de cor negra foi seco em dessecador por 24h.

3.3.11 Microscopia eletrônica de transmissão

A marcação em microscopia eletrônica de transmissão consiste em marcar a amostra com um composto com alta densidade eletrônica, que permite a observação mais bem definida dos contrastes de densidade eletrônica. Entre os compostos geralmente usados podemos citar: acetato de uranila, oxalato de ósmio, molibdato de amónio, etc [64], [65]. O tipo de contraste observado dependerá se a marcação for positiva ou negativa. Na marcação positiva, o marcador liga-se covalentemente a amostra e a imagem obtida no microscópio revela uma amostra com maior contraste. Na marcação negativa, o marcador se acumula nas arestas da amostra e o resultado é uma imagem com uma aureola que contrasta com a amostra [66] (figura14).

As amostras para microscopia eletrônica de transmissão foram preparadas sobre um grid de cobre para transmissão com 300-mesh com filme de Formvar revestido de carbono adquirido da KOCH (SP, Brasil). Uma gota de amostra dispersa em água destilada foi gotejada sobre o grid e deixada secar em temperatura ambiente. Algumas amostras foram marcadas para melhor contraste do revestimento de eumelanina. Neste caso uma gota de solução de acetato de uranila foi gotejada sobre a amostra já seca no gride e deixada secar sem temperatura ambiente.

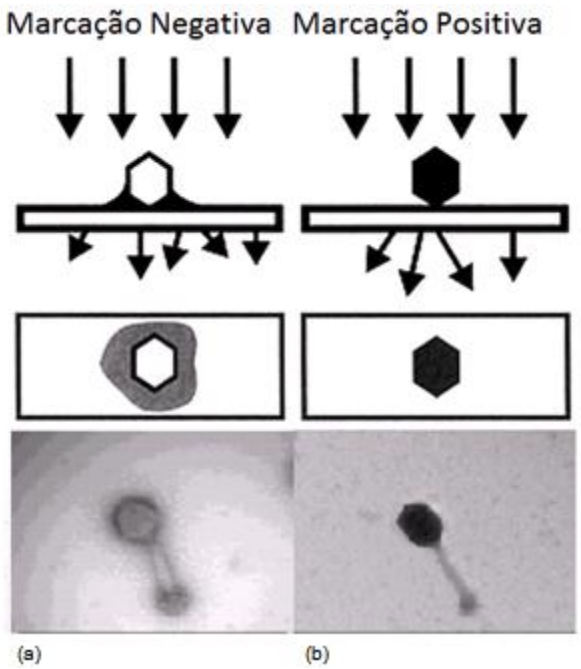


Figura 14: Marcação em microscopia eletrônica de transmissão, (a) marcação negativa, (b) marcação positiva, adaptado de [64] e [67].

4 Resultados e Discussão

4.1 Obtenção e caracterização da NP de sílica nua e da NP de sílica funcionalizada

A NP de sílica nua é aquela sem nenhum grupo externo adicionado a sua superfície, contendo somente grupos silanol próprios da partícula. Estas NPs foram sintetizadas com um protocolo próprio, que foi adaptado do método original proposto por Stöber (veja materiais e métodos). As partículas obtidas foram lavadas por centrifugação e secas em dessecador e o material obtido foi levado para análise por microscopia eletrônica de transmissão. A figura 15 apresenta algumas das imagens obtidas**.** É possível verificar que as partículas obtidas possuem tamanho uniforme e morfologia esférica. [47] O diâmetro obtido com o histograma de dispersão foi de 55±6nm, demonstrando distribuição granulométrica homogenia, característica esperada de NPs de sílica preparadas pelo método de Stöber [47].

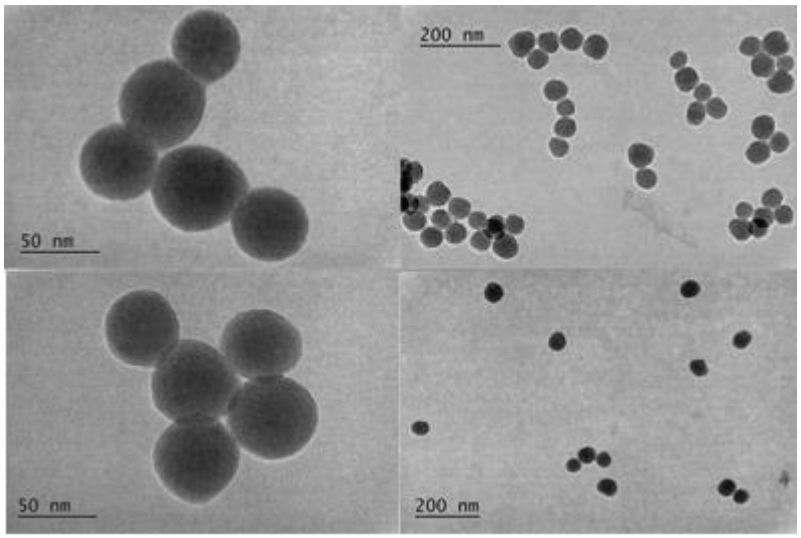


Figura 15: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da NP de sílica nua.

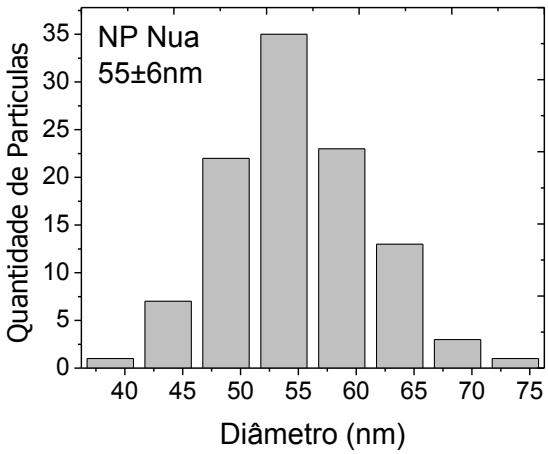


Figura 16: Histograma de dispersão do diâmetro da NP de sílica nua obtido com a análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão sob uma centena de partículas com a utilização do *freeware ImaJ*

Como descrito na Introdução e nos Materiais e Métodos desta Dissertação, a NP de sílica funcionalizada consistiu da introdução de um grupo reativo (glutaraldeído) na superfície da partícula. O glutaraldeído é reativo a aminoácidos com cadeia lateral contendo um grupos aminos que ficam expostos na superfície da tirosinase, como a lisina e a arginina. Note que esta pequena modificação química já causa alterações perceptíveis nas NPs de sílica (Figura 17). A NP de sílica nua é branca e a funcionalizada é rósea (Fotos a e b, respectivamente, na Figura 17). O espectro de absorção das dispersões de NPs nua e funcionalizada também apresentam um perfil de espalhamento distinto.

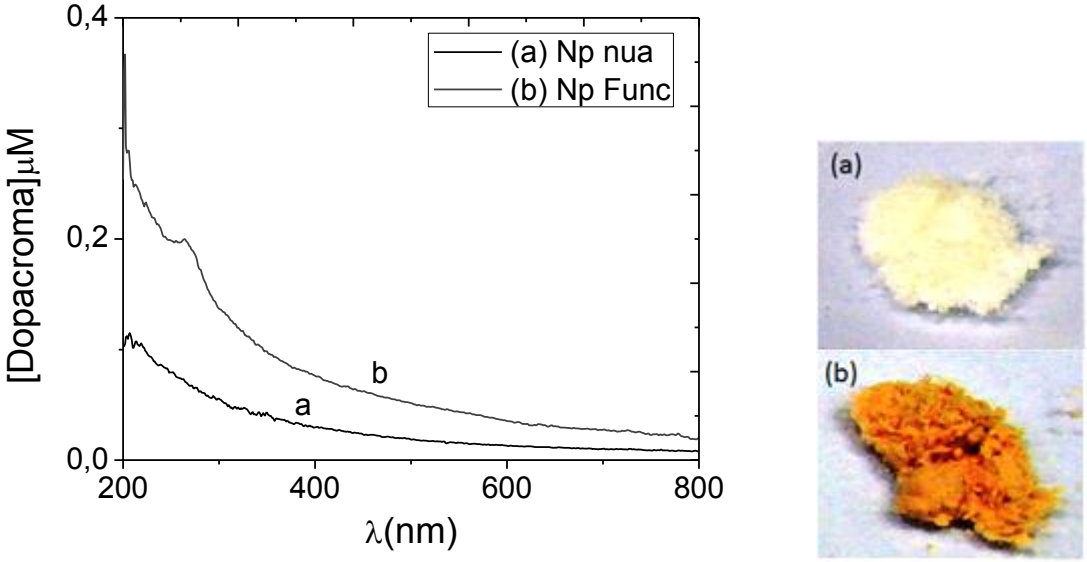


Figura 17: Espectro da dispersão e foto da NP de sílica (a) nua e (b) funcionalizada. Condição da dispersão: 0,25mg/mL de NPs de sílica dispersas em tampão fosfato pH6,5; temperatura ambiente.

4.2 Formação da dopacroma e de DHI e IQ

A caracterização da atividade enzimática da enzima ligada a NP e do revestimento com eumelanina, passou inicialmente pela padronização de um método de quantificar a formação da dopacroma e da solução de DHI/IQ, que seguem abaixo.

4.2.1 Curva padrão da dopacroma

Dopacroma é a molécula usada para monitorar a atividade enzimática da tirosinase [20], [25]. Esse intermediário na formação de melanina, é estável o suficiente e solúvel para que a sua concentração possa ser usada na avaliação e quantificação da atividade da tirosinase. A padronização da formação da dopacroma é obtido a partir da conversão total de L-dopa pela tirosinase (métodos 3.3.2). A solução é deixada em repouso por 15 min em tampão citrato, e a curva padrão é obtida por espectrofotometria a partir de diluições sequencial desta solução estoque.

Note que a Dopacroma tem dois máximos de absorção, sendo um em 305nm e outro em 475nm (figura 16). Seguindo procedimento bem aceito na literatura científica [25], valores de absorção em 475nm são utilizados para construir uma curva de calibração e obter o coeficiente de extinção molar (Figura 16). Obtivemos o valor de 3,64 mM

para o coeficiente de extinção molar, valor este que é coerente com o encontrado na literatura de 3,6 mM [25].

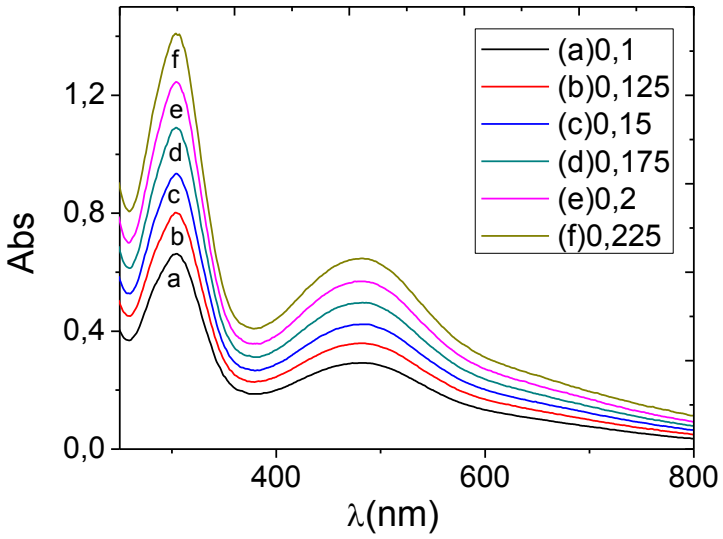


Figura 18: Espectros de absorção da dopacroma em diferentes concentrações para obtenção do coeficiente de extinção molar. (Tampão fosfato 50 mM, pH 6,5; concentrações de dopacroma em mM)

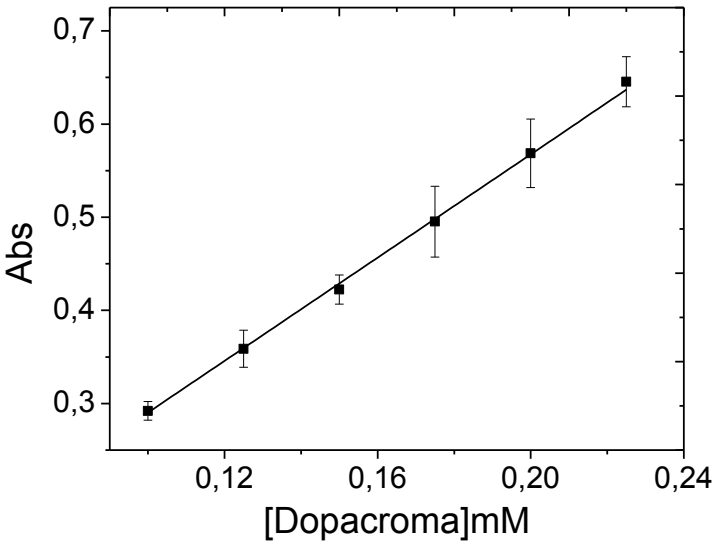


Figura 19: Curva de calibração de dopacroma utilizando o máximo de absorção em 475nm. Dados foram extraídos dos espectros apresentados na figura 18.

4.2.2 Evolução de dopacroma para DHI e IQ

A evolução de dopacroma para DHI e IQ acontece com mais passos de oxidação da dopacroma para formação de indol-5,6-quinona (IQ) e 5,6-dihidroxindol (DHI). Como já mencionado anteriormente a eumelanina sintética é principalmente um polímero de DHI e IQ. Como a eumelanina precipitada é um sólido amorfo de diâmetro médio de 400nm (fig.2), não imaginamos ser possível obter um revestimento da NP que tem ~55nm por uma outra partícula (de eumelanina) que tem quase dez vezes o tamanho da NP (fig.13). Por isso, imaginamos que o revestimento da NP poderia seguir pela polimerização de eumelanina na superfície da sílica, surgindo então a necessidade de se estudar os intermediários. Note na Figura 20 a transição de dopacroma (máximo em 475nm) para intermediários finais de polimerização (IQ e DHI). Esta solução foi obtida com a oxidação de tirosina por tirosinase após 4h de reação (seção 3.3.3).

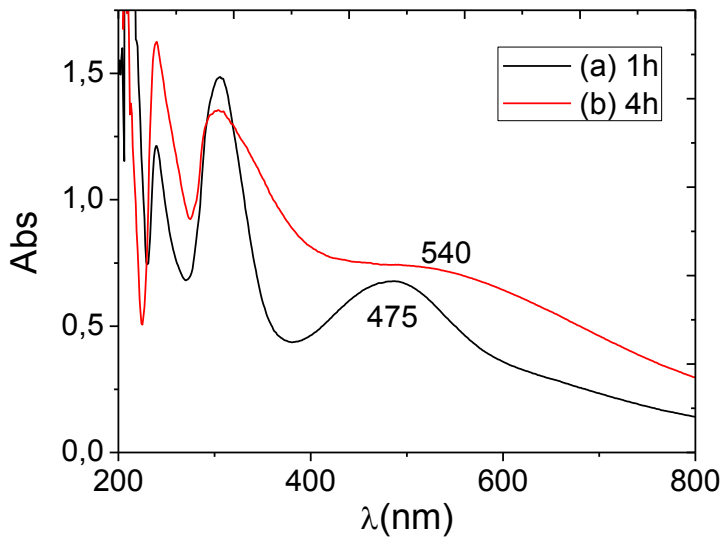


Figura 20: Espectros de absorção da dopacroma com máximo em 475nm (a); e para a solução de DHI/IQ (b). Condições: tirosina 250mM, tirosinase 13µg/mL, tampão fosfato 50mM, 30ºC.

4.3 Imobilização da tirosinase na NP de sílica

Nos testamos dois métodos de imobilização da enzima na superfície da sílica: adsorção física (com a NP de sílica nua) e ligação covalente (com a NP de sílica funcionalizada). Imaginamos testar a atividade catalítica da tirosinase em dispersões destas NPs de sílica em comparação com a atividade da tirosinase livre. No entanto, como ficará claro abaixo, a adsorção física não foi eficiente, liberando a enzima na

solução. Desta forma, somente as NPs ligadas covalentemente à tirosinase foram usadas na comparação de atividade catalítica com a enzima livre. Os métodos de preparação de tirosinase imobilizada em NP de sílica por adsorção física e por ligação covalente foram descritos respectivamente nas seções 3.3.3 e 3.3.4 desta Dissertação.

Após o procedimento de preparação da NP de sílica com tirosinase imobilizada, a quantidade de enzima remanescente no sobrenadante do meio de imobilização foi quantificada com o método de Bradford, que quantifica proteínas totais [60], [61]. Utilizou-se a mesma quantidade de tirosinase em todos os protocolos. Note que após o protocolo de adsorção física a maior parte da tirosinase fica na solução do sobrenadante, indicando que a 99,5% da enzima não se liga na NP de sílica nua (Figura 21). O baixo percentual de imobilização por adsorção física é possivelmente o resultado da repulsão entre a carga residual negativa da tirosinase (pI:5,7; tampão pH6,5) e os grupos silanol da superfície da partícula também com carga residual negativa. Note também que no caso da ligação covalente, somente 0,5% da proteína é encontrada no sobrenadante, indicando a efetiva ligação na superfície da partícula. A funcionalização da partícula com a introdução do glutaraldeído reativo a grupos amino (lisina, arginina) dos aminoácidos favorece a imobilização, sendo por isso altamente eficiente.

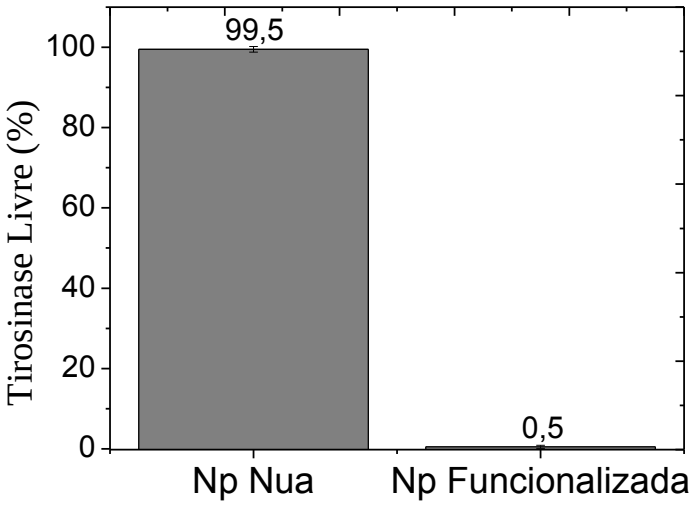


Figura 21: Quantificação de proteína total no sobrenadante após centrifugação (tirosinase não imobilizada) pelo método de Bradford. (a) absorção física da tirosinase na NP de sílica nua; (b) ligação covalente na NP de sílica funcionalizada.

A atividade da tirosinase foi quantificada nas NPs que foram obtidas pelos dois processos de imobilização (física e por ligação covalente). A atividade da tirosinase livre foi considerada como padrão. A uma solução de tirosina 250µM, foi adicionado uma solução de tirosinase não imobilizada, e para o caso da imobilizada foi adicionado uma dispersão de NP, que supostamente tinha a mesma quantidade de tirosinase. A concentração molar da tirosinase resultante da diluição (para cada amostra) foi 13ug/mL. Para a tirosinase imobilizada por adsorção física a concentração também foi (para cada amostra) de 13ug/mL refere-se ao total teórico e não ao total de fato imobilizado, uma vez que a NP nua perde a maior parte da tirosinase durante a lavagem (figura 22). Foram medidos os espectros de absorbância entre 800nm e 200nm e a formação de dopacroma foi caracterizada por seus máximos de absorção em 305 e 475nm.

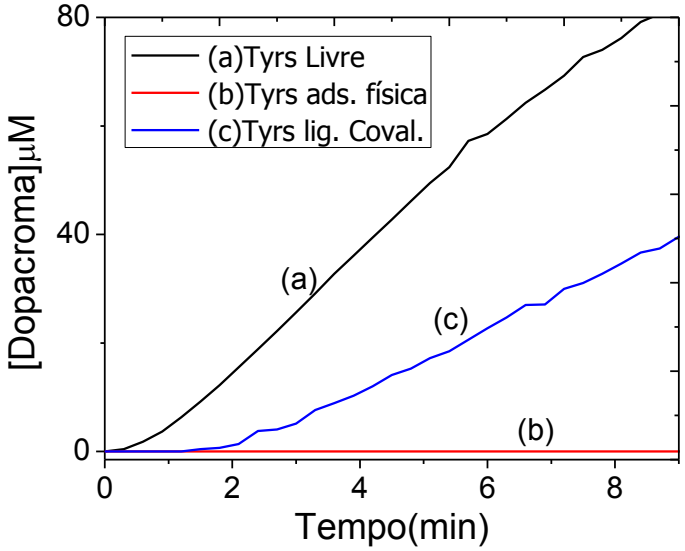


Figura 22: Atividade da tirosinase em solução/dispersão de: (a) tirosinase livre; e dos sobrenadantes da (b) tirosinase imobilizada por adsorção física; e (c) tirosinase imobilizada por ligação Covalente. Condições: 13µg/mL de tirosinase para cada 0,25mg de suporte; 250µM de tirosina; tampão fosfato 50mM pH6,5; 30ºC; a atividade foi medida no sobrenadante.

A forma mais aceita de avaliar a atividade da tirosinase, consiste no monitoramento da formação de dopacroma em 475nm (pg.7 da Introdução). Note que não houve formação de dopacroma na dispersão de NP de sílica preparada por adsorção física, o

que é condizente com a não imobilização da enzima (apenas 0,5% de proteína fica adsorvida após centrifugação). No caso da dispersão contendo a enzima covalentemente ligada na NP de sílica houve formação de produto, no entanto, verificou-se perda de velocidade frente ao total imobilizado, assunto abordado a seguir.

4.4 Atividade da enzima livre e ligada na NP de sílica

Uma vez que o processo físico de adsorção se mostrou inadequado na obtenção de tirosinase ligada na NP, a continuidade do uso deste material nos estudos que seguem nos pareceu inadequado, pois estaríamos, na verdade, usando uma dispersão de NP de sílica sem enzima. Sendo assim, decidimos usar um outro controle que foi uma dispersão de NP de sílica nua misturada com tirosinase livre e as medições foram realizadas nesta dispersão. As medições também foram realizadas com a tirosinase livre e na dispersão de NP de sílica funcionalizada covalentemente com a enzima. Novamente a quantificação da atividade enzimática foi realizada com a tomada de espectros de absorção destas dispersões na presença de tirosina em função do tempo. Os máximos de absorção (305nm e 475nm) apresentados no gráfico da Figura 17, são característicos da dopacroma (veja também figura 23). Como controle negativo foram tomados também espectros de dispersões de NP de sílica sem tirosinase (Figura 24).

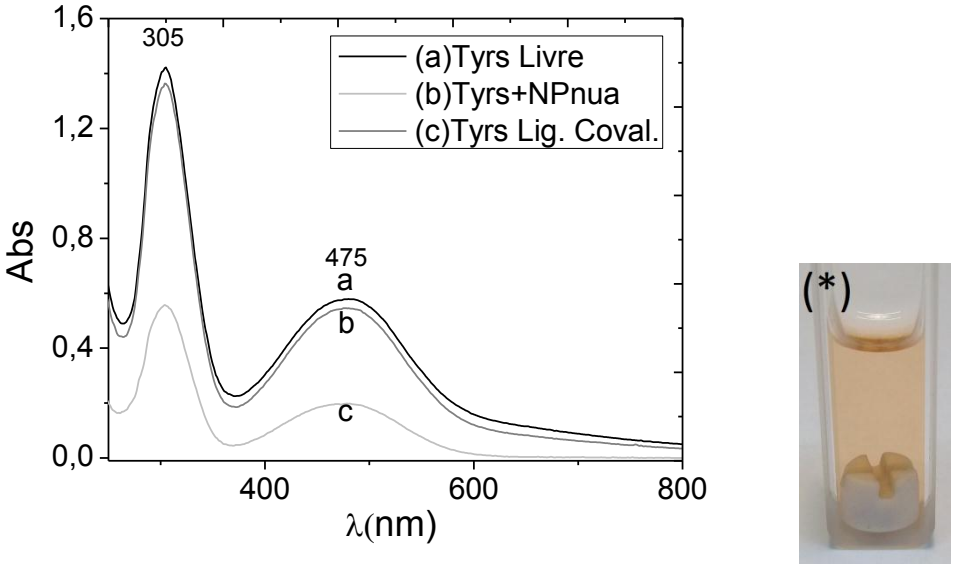


Figura 23: Caracterização da formação de dopacroma por (a) tirosinase livre; (b) por tirosinase em dispersão de NP de sílica nua (gráfico do sobrenadante obtido após

centrifugação); (c) tirosinase imobilizada por ligação covalente (gráfico do sobrenadante obtido após centrifugação); (*)solução de dopacroma obtida com tirosinase livre. Condições: Tampão fosfato 50mM (pH 6,5), tirosinase 13µg/mL; 30ºC; tirosina 250mM). Espectros foram obtidos 30minutos. (Tyrs:tirosinase)

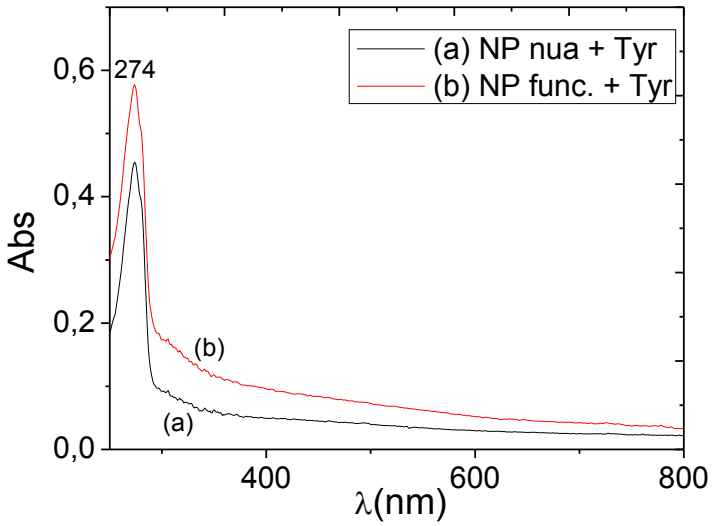


Figura 24: Controle negativo da formação de produtos por NP de sílica nua e NP de sílica funcionalizada (preparada para a imobilização da tirosinase). Condições: Tampão fosfato 50mM (pH 6,5), tirosinase 13µg/mL; 30ºC; tirosina 250mM). Espectros foram obtidos 30minutos após a preparação da dispersão/solução.

Note que os controles negativos mostraram a ausência de formação de dopacroma na ausência de enzima (Figura 24). No entanto, na observação da formação de produto por tirosinase livre, por livre em dispersção de NP nua e na dispersão de NP com tirosinase ligada covalentemente, (figura 23) observa-se praticamente espectros de mesma intensidade. Contudo, para a NP de sílica com tirosinase ligada, observa-se uma menor quantidade de produto formado . Não podemos atribuir a menor atividade da tirosinase ligada na NP de sílica a uma menor quantidade de enzima ligada a NP, pois a eficiência de imobilização para a ligação covalente foi de 99,5%. A presença física das NPs também não afetou significativamente a atividade enzimática, como comprovam a comparação dos espectros a e b da Figura 23. Desta forma, a imobilização deve ter causado uma perda significativa da atividade catalítica da tirosinase. Pode ter ocorrido uma perda de uma parcela das enzimas durante a imobilização por desnaturação ou impedimento de substrato à enzima. Vale ressaltar,

no entanto, que embora a atividade da tirosinase ligada seja menor do que a livre, ela está ativa e permitirá o seguimento dos estudos de obtenção da NP de sílica revestida com eumelanina.

Para entender a causa para a perda da atividade da enzima ligada covalentemente, procedemos a medição da velocidade de catálise em função da concentração de tirosina em solução da enzima livre (Figura 25) e em dispersões de NP de sílica e tirosinase (Figura 26), bem como, em dispersões contendo a enzima ligada covalentemente (Figura 27). Novamente medimos a atividade através da formação de dopacroma em 475nm usando tirosina como substrato.

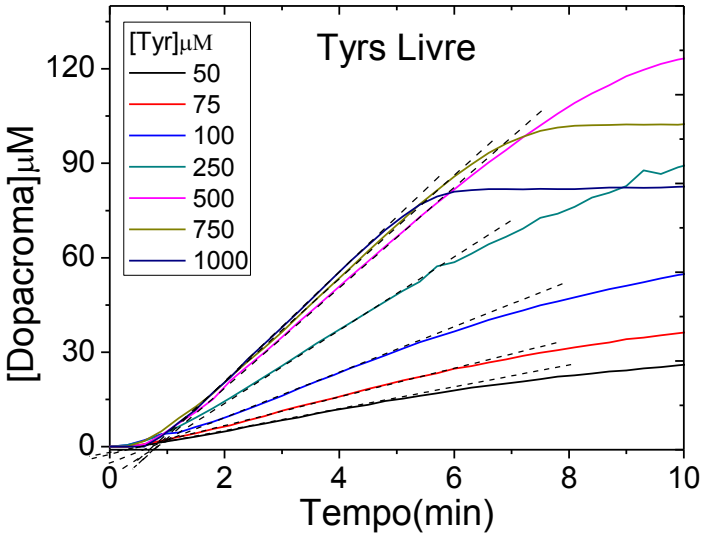


Figura 25: Formação de dopacroma por tirosinase em solução tampão fosfato 50mM, pH6,5; 30ºC; tirosina como substrato. [tirosinase]=13µg/mL e [tirosina] =50;75;100;250;500;750;1000µM. Tampão fosfato de sódio 50mm pH6,5. A 2,450mL de uma solução de tirosina, foi adicionado 50µL de uma solução de tirosinase 650mg/mL, resultando numa concentração de 13µg/mL de enzima. Procedeu-se a regressão linear na parte linear da curva, que é mostrado como tracejado na figura. O *lag* foi calculado como a distância entre o ponto de intercessão na abscissa da reta tracejada até a ordenada no plano cartesiano, neste caso variou entre 0,39 e 0,78min. O estado estacionário prevaleceu entre 2-5 minutos e foi precedido pelo *lag* característico da conversão de tirosina por tirosinase (ver item “tirosinase” na introdução”)

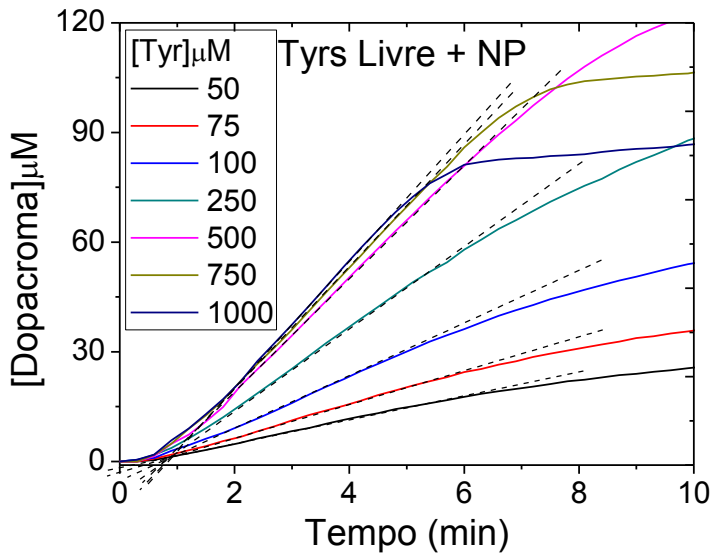


Figura 26: Formação de dopacroma por tirosinase em dispersão de NP de sílica nua. Condições: Tampão fosfato 50mM, pH6,5; 30ºC; tirosina como substrato. Tampão fosfato de sódio 50mm pH6,5. O experimento com a atividade da tirosinase em dispersão de NP de sílica nua, foi realizado da mesma forma que para tirosinase livre, com a diferença do substrato ter sido preparado numa dispersão de NP de sílica nua 0,25mg/mL. A dispersão sem substrato foi usada como linha de base. Os procedimentos para cálculo de regressão linear, *lag* (0,36-0,81min) e estado estacionários (2-5min) são os mesmos dos descritos na figura 25.

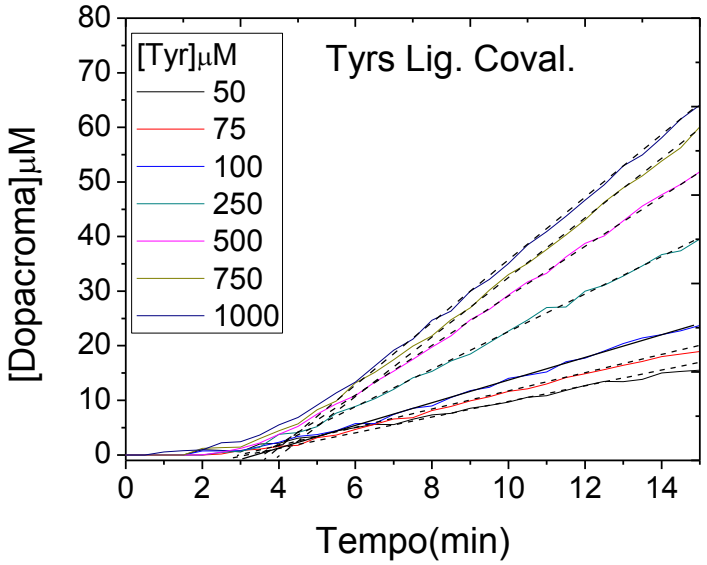


Figura 27: Formação de dopacroma por tirosinase ligada covalentemente a NP de sílica. Condições: Tampão fosfato 50mM, pH6,5; 30ºC; tirosina como substrato.

Adicionou-se a cada amostra de 2,4mL com solução de tirosina, 100µmL de uma dispersão com 32,5 µg/mL de tirosinase (ligada a NP) em 650mg/mL, resultando numa dispersão final de 13µg/mL de tirosinase e 0,25mg/mL de NP de sílica. Os procedimentos para calculo de regressão linear, *lag* (3-3,8min) e estado estacionários (4-14min) são os mesmos dos descritos na figura 25.

Note que as cinéticas enzimáticas da tirosinase livre na presença e ausência de NP de sílica são muito semelhantes. Como esperado elas não seguem um perfil catalítico simples uma vez que ocorre o período *lag.* O estado estacionário é observado em todas as concentrações de substrato. O lag é maior quanto maior for a concentração de substrato. Note também que no caso da tirosinase ligada há diferenças significativas. A tirosinase ligada apresentou um tempo de *lag* superior (3-3,8min), duração do estado estacionário maior (4min-14min) e menor formação de produto. Por exemplo, para 250µM de tirosina, ao final de dez minutos, foi formado 22,5µM de produto em comparação com 88µM de produto para enzima livre. O *lag* maior com a mesma concentração de substrato e o aumento do tempo do estado estacionário é descrito por Cabanes[23] como resultado da utilização de uma quantidade menor de enzima. Neste caso, como a eficiência de imobilização foi de 99,5%, o *lag* e o estado estacionário maior, juntamente com a menor formação de produto, pode ser explicado por uma menor concentração de enzimas ativas, devido a uma desnaturaçãos na ligação covalente com a NP.

Os valores de velocidade de catálise foram plotados em função da concentração de substrato na forma hiperbólica de Michaelis-Menten, bem como, na forma de duplos recíprocos de Linewearver-Burk (figuras 28 e 29, respectivamente). Os dados foram tratados usando ferramentas de obtenção de formulas do programa *OrigenPro8*. É possível verificar que as velocidades máximas alcançadas por tirosinase livre e por tirosinase em dispersão de NP de sílica estão dentro da margem de erro não sendo, portanto diferentes entre si. Já a velocidade máxima para a tirosinase ligada covalentemente é significativamente menor, sendo equivalente a apenas um terço do máximo obtido com tirosinase livre. Note também que não há diferenças significativas nas constantes de Michaelis (Km) nas três condições testadas. O gráfico de Lineweaver-burk (figura 29) reitera a diferença dentro da margem de erro entre a velocidade máxima e a constante de Michaelis para a tirosinase livre e para a tirosinase em dispersão de NP de sílica nua.

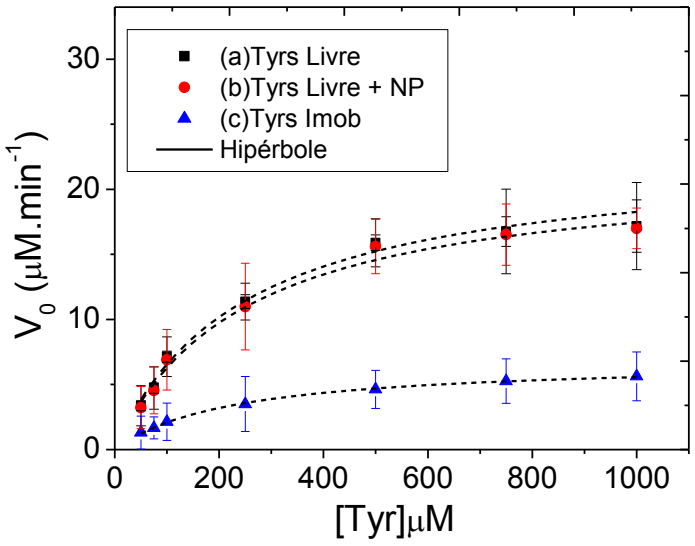


Figura 28: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade cinética da tirosinase para (a) tirosinase livre; (b) tirosinase em dispersão de NP de sílica; e (c) tirosinase ligada covalentemente a NP de sílica.

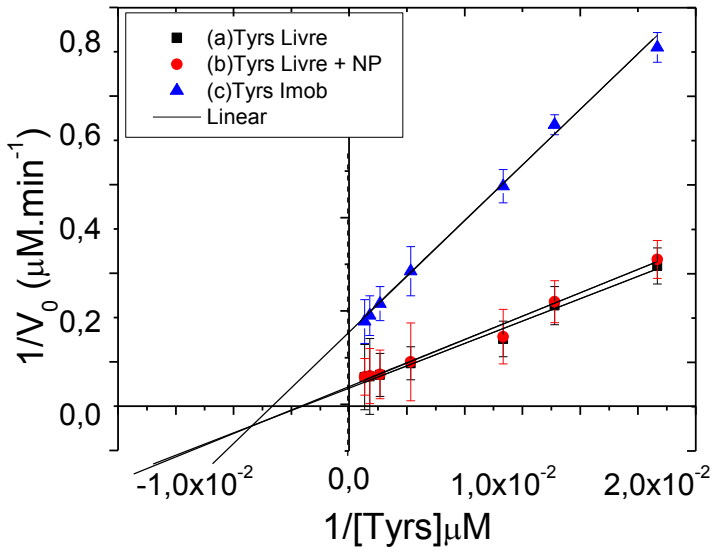


Figura 29: Gráfico de Linewear-Burk da atividade cinética da tirosinase para (a) tirosinase livre; (b) tirosinase em dispersão de NP de sílica; e (c) tirosinase ligada covalentemente a NP de sílica.

A tabela1 mostra os dados obtidos de velocidade máxima ($V_{máx}$) e da constante de Michaelis (K_m) tanto para o gráfico de Michaelis-Menten como para o gráfico de

Lineweaver-Burk. Note que a análise comparativa das três amostras utilizando um mesmo método de cálculo é equivalente. Ou seja, Km é relativamente constante e ocorre perda de velocidade máxima de mais ou menos 2/3. A atividade preservada da enzima ligada em relação a enzima livre é em torno de 29%. Ou seja, é como se somente 29% das enzimas ligadas estivessem funcionando [54]. Entretanto, os valores *per-si* calculados pelos métodos do ajuste não linear (gráfico hiperbólico, Michaelis-Menten) e linear (gráfico duplo-recíproco, Lineweaver-Burk) fornecem valores medianos distintos mas dentro da margem de erro, sendo maior para o duplo-reciproco. Essa diferença deve-se principalmente ao acúmulo dos pontos de velocidade próximos ao eixo x no gráfico de Lineweaver-Burk. Esse acúmulo deve-se a inversão dos dados para obtenção da reta e tem como consequência uma imprecisão maior na extrapolação da reta, já que menos pontos estão presentes da região mais distante do eixo x para orientação da reta.

Tabela 1
Parâmetros Cineticos ($V_{máx}$ e K_m) para Tyrs livre, Tyrs + NP e Tyrs lig.Coval. a NP.

	Michaelis-Menten		**Lineweaver-Burk**	
	$V_{máx}$	K_m	$V_{máx}$	K_m
Tyrs livre	23±2	248±32	29±1	374±120
Tyrs + NP de sílica	22±1	246±33	25±2	335±152
Tyrs lig.Coval.	6,8±0,1	228±8	6±1,4	202±74

As equações para obtenção de K_m e de $V_{máx}$ foram obtidas com o uso do programa *OrigenPro8*

Note que não foi observado mudanças no valor da constante de Michaelis (Km) quando comparamos as enzimas livres e ligadas covalentemente. Como comentado nos Materiais e Métodos, o Km é uma razão de velocidades. De fato a razão entre as velocidades de dissociação do complexo enzima-substrato com a velocidade de formação não havendo por isso, mudança conformacional significativa do sitio ativo. A observação de que não há alteração de Km indica que as enzimas que continuam realizando catálise após a ligação a NP, o fazem de forma semelhante a enzima livre. Entretanto, uma parcela importante das enzimas adsorvidas, simplesmente não realiza catálise o que causa uma alteração no valor de Vmax.

Na literatura, Cardoso e Sheldon [51], [54] abordam os motivos para a perda de velocidade catalítica observada por tirosinase ligada covalentemente. Para o caso de dímeros (como a tirosinase usada neste trabalho) a imobilização pode causar a separação dos monômeros constituintes da enzima e por consequência inativando-a. A imobilização também pode trazer dificuldades difusionais para a enzima, apesar de que elas serem relatadas como significativamente inferiores em relação a enzimas

imobilizadas em suportes que não estejam na escala nano ou micro. Outo ainda é o impedimento estérico do substrato para o sítio ativo da enzima se a orientação da imobilização ocorrer de forma desfavorável, ou seja, com o sitio ativo bloqueado pela superfície da partícula. A enzima também pode ser imobilizada pelo seu sitio ativo, causando sua inativação. A tirosinase possui seis resíduos de histidina com grupos aminos em suas cadeias laterais, esses grupos podem reagir com o glutaraldeído ancorado a superfície da partícula, assim a possibilidade de imobilização por meio da ligação covalente do sitio ativo com a NP de sílica é uma possibilidade plausível.

4.5 Obtenção e caracterização da NP de sílica revestida com eumelanina

Como a eumelanina precipitada é um sólido amorfo de diâmetro médio de 400nm (seção3.3.3), não se espera obter um revestimento fino e controlado de eumelanina nas NPs que possuem somente 55nm de diâmetro, simplesmente misturando-se a NP de sílica e eumelanina previamente polimerizada. De fato, este procedimento resulta na formação de um precipitado contendo NP de sílica e eumelanina, mas sem formação de NPs híbridas contendo o polímero na superfície da NP. Para se obter a NP de sílica revestida com eumelanina realizou-se então a reação de biossíntese da eumelanina in-situ na presença de NP de sílica, tirosinase e tirosina, em duas condições distintas. Na condição chamada de tipo I, utilizou-se a NP de sílica contendo tirosinase ligada covalentemente e na condição chamada de tipo II, primeiramente obteve-se a solução de DHI e IQ (Etapa I) e depois adicionou-se uma dispersão com NP de sílica funcionalizada (figura 30).

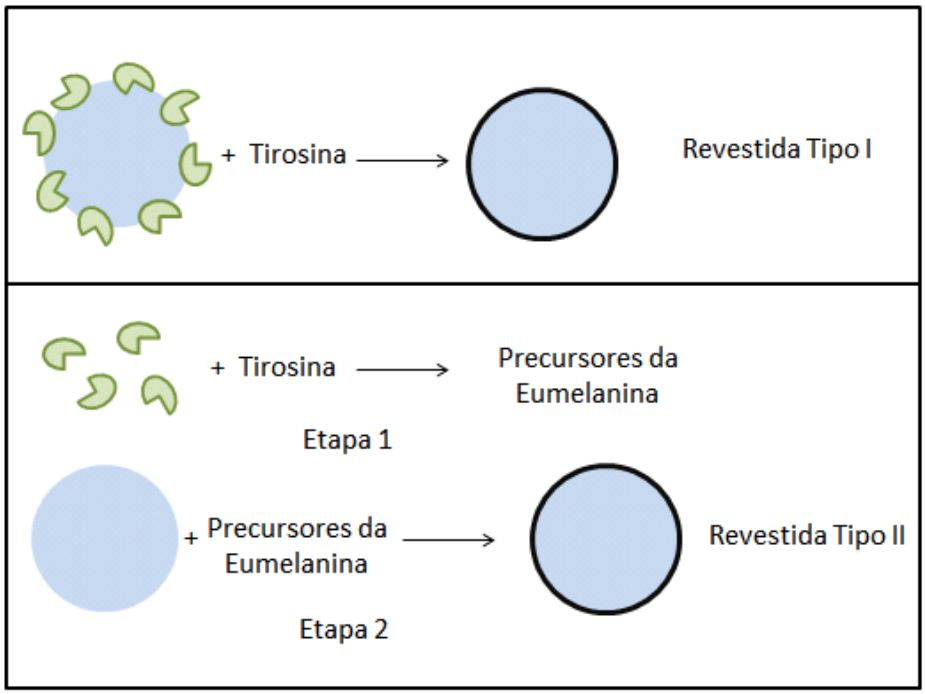


Figura 30: Estratégias de preparação da NP de sílica revestida. Na estratégia tipo I utilizou-se a NP de sílica funcionalizada com a tirosinase ligada e na estratégia tipo II primeiro obteve-se uma solução com os precursores da eumelanina (Etapa 1) e depois misturou-se a solução obtida na etapa 1 com NP de sílica funcionalizada (Etapa 2), segundo o procedimento 3.3.10 descrito em Materiais e Métodos.

Note que tanto o procedimento tipo I quanto o tipo II produz NPs de sílica com coloração preta escura semelhante à coloração da melanina (Figura 31). Para o tipo I a solução adquiriu primeiramente a cor laranja típica da dopacroma e depois houve a formação de um precipitado preto e dispersível em pH 6,5. A tipo II causou a descoloração da solução é houve, igualmente a tipo I, a formação de um precipitado preto dispersível em pH6,5. O precipitado, antes um sólido róseo, torna-se um sólido preto. Os espectros de absorção das dispersões destas partículas em tampão foram medidos e demonstraram um perfil de espalhamento característico e bastante semelhante entre as partículas obtidas pelos métodos I e II e parecidos com o espectro da própria melanina Sigma, esta por sua vez, obtida pela oxidação de L-dopa por peroxido de hidrogênio. (Figura 31).

Obteve-se também o espectro de refletância difusa. Neste caso, capta-se diretamente a luz refletida pelo pó do produto quando uma fonte de luz branca é incidente. Note que os dois tipos de NP de sílica revestida mostraram um padrão de refletância similar ao da melanina padrão, que foi bem diferente do padrão de refletância da NP de sílica apenas funcionalizada (Figura 32). Este resultado indica que tanto o revestimento tipo

I quanto tipo II permitem a formação de um filme de eumelanina ligado a superfície da NP de sílica.

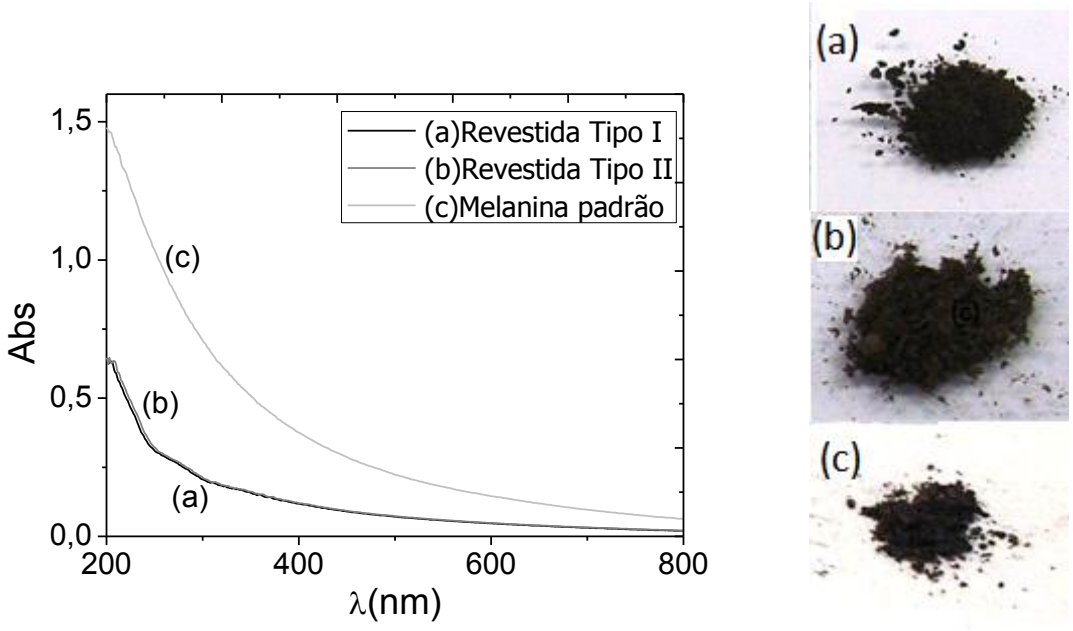


Figura 31: Espectro da dispersão e foto da: (a) NP de sílica Tipo I (via DHI/IQ obtido com tirosinase ligada); (b) NP de sílica tipo II (via DHI/IQ obtido com tirosinase livre); e (c) melanina sigma padrão. Condição da dispersão: 0,25mg/mL.

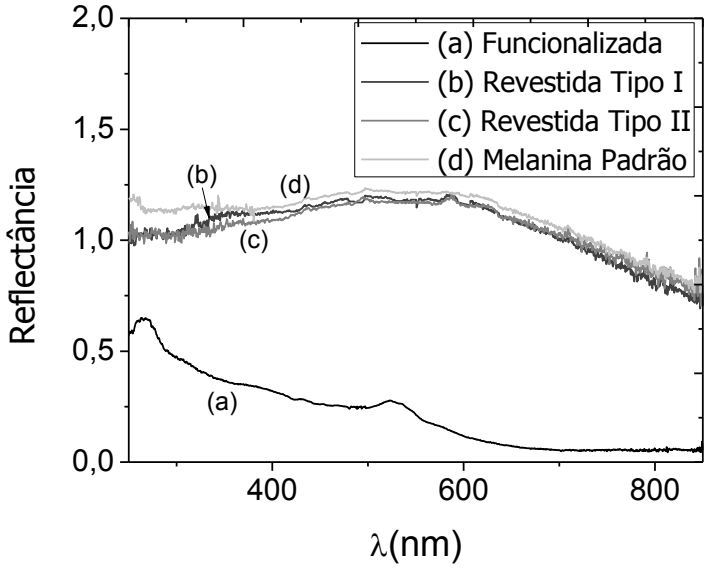


Figura 32: Espectro de Reflectância da (a) NP de sílica funcionalizada; (b) NP de sílica Tipo I (via tirosinase imobilizada por ligação covalente); (c) NP de sílica Tipo II (via DHI/IQ obtido com tirosinase livre); e (d) melanina sigma padrão. NP de sílica nua constituiu a linha de base.

A porcentagem de material adsorvido pelas NPs e o teor de sólido contido em cada amostra, foi mensurada por termogravimetria. Note que a NP nua teve 84% de resíduo, sendo a perda de 16% referente a água contida no interior na estrutura cristalina de sílica. A maior perda de massa ocorreu justamente no início do processo, sendo a água aprisionada a maior responsável. Além desta, moléculas do percursor TEOS não condensados também podem estar sendo volatizados, com 168ºC de ponto de evaporação (Figura 33).

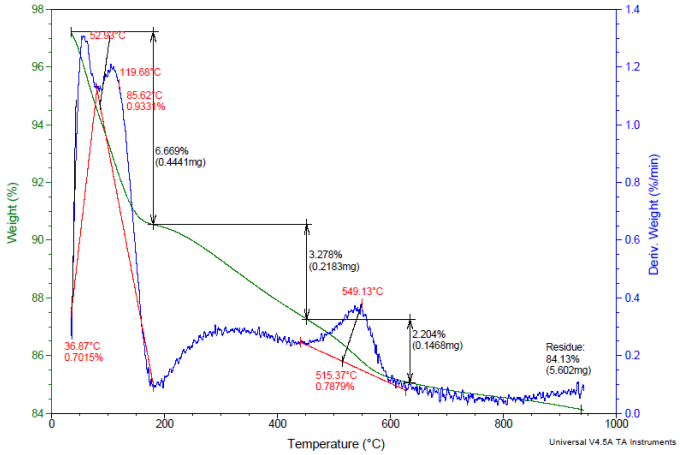


Figura 33: Análise termogravimétrica da NP nua. Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2.

A segunda referência na quantificação de eumelanina nas amostras é a NP funcionalizada. Esta apresentou 83% de resíduo que, em relação a NP nua, é apenas 1% menor devido à perda das moléculas ancoradas de glutaraldeído e de ATPES. Apesar da baixa diferença relativa de 1% entre a NP nua e a funcionalizada, o perfil da perda de material da funcionalizada mostra, além da perda similar na região dos 100ºC referente a água, uma rampa de perda mais suave que se estende pelo gráfico, muito compatível com a perda de glutaraldeído e ATPES com ponto de ebulição de 187ºC e 217ºC respectivamente (figura 34).

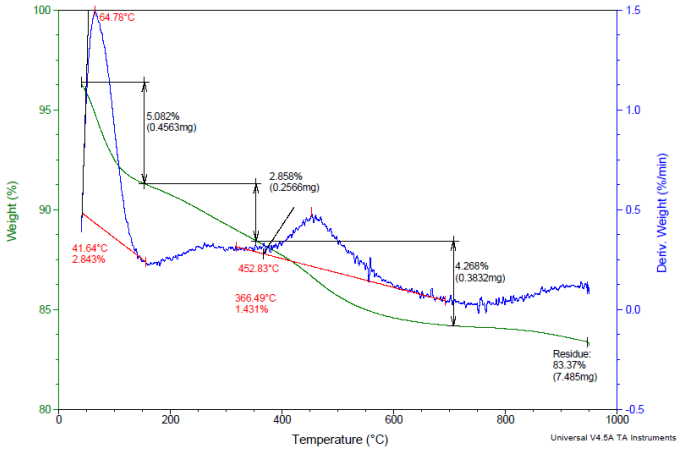


Figura 34: Análise termogravimétrica da NP funcionalizada. Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2.

Como referência para as NPs revestidas com eumelanina, uma análise termogravimétrica foi realizada com a melanina padrão da sigma. Com apenas 36% de resíduo, este resultado mostra principalmente em que temperatura esperar a perda de eumelanina para as revestidas. Somente no perfil de perda de massa da revestida tipo I (figura 33), já é possível verificar que a perda de matéria seguiu um padrão bem diferente da NP nua e da funcionalizada. Além disso, a maior perda de matéria ocorreu nas proximidades de 400ºC (figura 35).

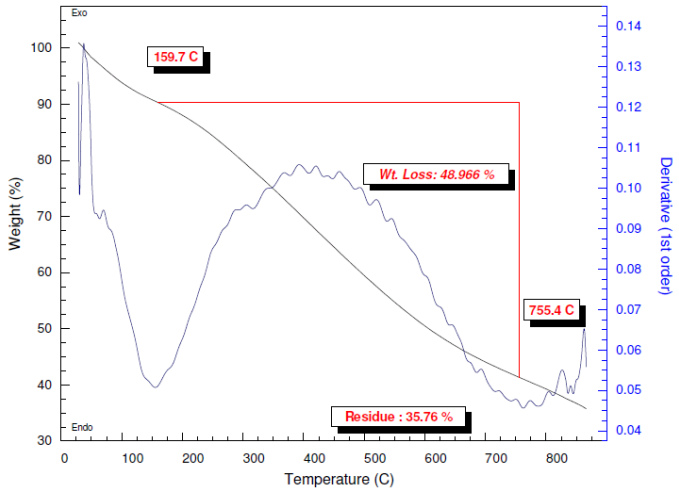


Figura 35: Análise termogravimétrica da melanina sigma de referência. Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2.

A amostra com NP revestida com eumelanina tipo I, resultou em 74% de resíduo e além disso, o perfil apresentado pelo gráfico de perda de matéria foi algo entre o da

NP funcionalizada e da eumelanina padrão. Neste gráfico, existem dois grandes pontos de perda de massa. O primeiro na região dos 100ºC, referente a perda de água aprisionada, e o segundo, iniciando próximo do ponto de ebulição do indol em 253ºC e se estendendo para pouco além dos 400ºC. A maior perda de massa aliado ao perfil do gráfico indica a presença de melanina (figura 36).

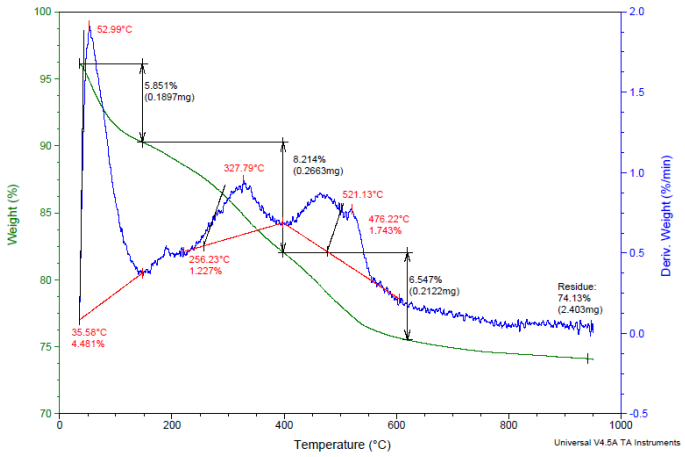


Figura 36: Análise termogravimétrica da NP revestida tipo I (via DHI/IQ obtido com tirosinase ligada). Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2.

A amostra com NP revestida com melanina tipo II, resultou em 79% de resíduo e além disso, o perfil apresentado pelo gráfico de perda de matéria também foi algo entre o da NP funcionalizada e da melanina padrão (figura 37).

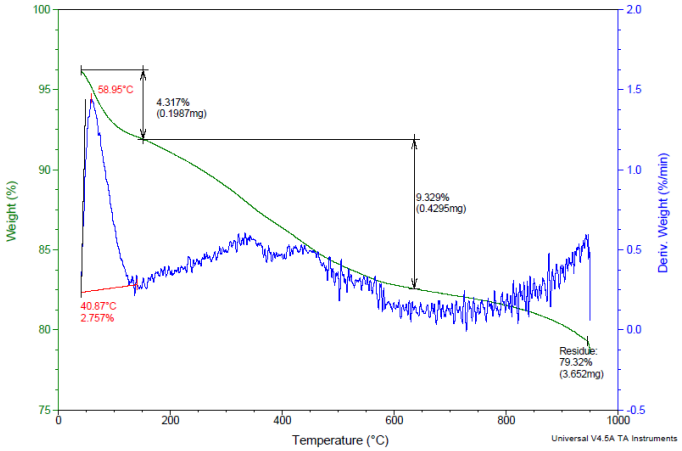


Figura 37: Análise termogravimétrica da NP tipo II (via DHI/IQ obtido com tirosinase livre). Condições: 25-900ºC; 20°C/min; atmosfera-N_2.

Análise termogravimétrica das NPs de sílica nua, tipo I e II e da melanina padrão permitiu a quantificação do teor de sólido contido em cada amostra, permitindo o cálculo de quanto de material foi adsorvido por cada sílica. A comparação com a massa de resíduo da NP de sílica nua indica que ambas as sílicas tipo I e tipo II tiveram aproximadamente 10% a mais de matéria orgânica adsorvida (tabela 3).

Tabela 3: resíduo de material após aquecimento do material até 900 ºC

Material	**Resíduo (%)**	**Relativo (nanosílicanua/amostra)**
NP de sílica Nua	84	1
NP de sílica Funcionalizada	83	0,99
Melanina Sigma	36	0,42
Revestida Tipo I	74	0,88
Revestida Tipo II	79	0,94

Análise termogravimétrica das NPs de sílica foi realizada nas seguintes condições: entre 25-900ºC; rampa de aquecimento de 20°C/min; atmosfera de nitrogênio; 1g cada amostra.

Com o intuito de determinar detalhes estruturais da NP de sílica recoberta com filme de eumelanina, e comprovar se efetivamente houve a formação de uma camada de material revestindo a partícula, obteve-se imagens de microscopia eletrônica da NP de sílica funcionalizada e comparou-se com a partícula revestida com eumelanina tipo II. Comparamos as imagens por contraste direto, bem como com marcação com acetato de uranila (composto geralmente usado para marcar estruturas biológicas para posterior análise por microscopia eletrônica). O átomo de uranio possui alta densidade eletrônica e retorna uma imagem com maior contraste em relação a imagem não marcada. Se o acetato de uranila reagir com a amostra, a marcação será positiva e a amostra aparecerá com uma densidade ótica muito maior. Se o acetato de uranila não reagir com uma determinada região da amostra, um acúmulo do composto poderá ser observado nas regiões adjacentes da amostra, permitindo também a visualização da região de interesse por contraste negativo (seção3.3.11). As imagens a e b na Figura 38 trazem o contraste por visualização direta, amostras de NP funcionalizada e revestida com eumelanina (tipo II). Note que é possível distinguir uma superfície mais rugosa e com padrão de contraste distinto na superfície das NPs de sílica revestidas com eumelanina (b). Note também que este contraste fica mais evidente nas amostras de NPs de sílica marcadas com acetato de uranila. A marcação mais intensa na

superfície permite definir a região de maior densidade eletrônica, que tem uma espessura média de ~1,9nm.

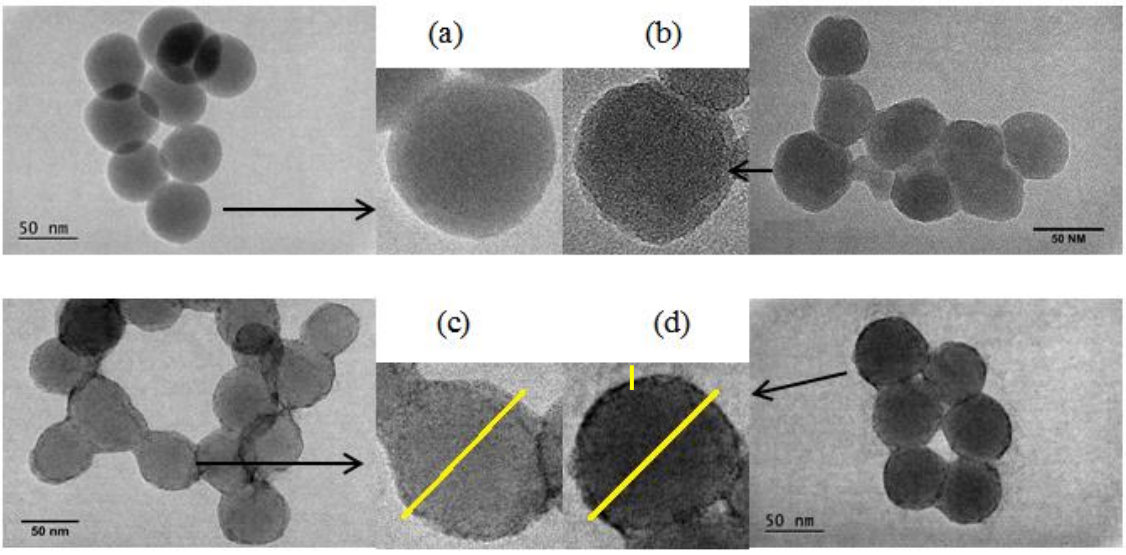


Figura 38:Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de NP de sílica (a) funcionalizada e (b) tipo II; e marcas com acetato de uranila 1% (c) funcionalizada e (d) tipo II. Amostras foram dispersas em água destilada e gotejadas sobre um grid de transmissão de cobre com filme de Formvar revestido de carbono.

Para caracterizar em maior detalhe a superfície das NPs, perfis de densidade foram calculados e os gráficos estão apresentados na Figura 39. Os perfis de densidade são os níveis de cinza da imagem original, sendo que quanto maior o valor de cinza mais claro é o trecho da amostra. O perfil de cinza para a NP funcionalizada e marcada com acetato de uranila, mostrou uma média de 104 no trecho referente a partícula (separado por linhas pontilhadas). Já na amostra com NP de sílica revestida apresentou uma média de 65, mostrando que o tom observado na imagem é muito mais escuro que na amostra, mostrando também que a marcação foi positiva. Note também que nas partículas revestidas com eumelanina, a superfície das partículas tem uma marcação mais intensa com valores de cinza menos intenso (mais coradas) do que a média (círculos na figura), o que não acontece com as partículas apenas funcionalizadas.

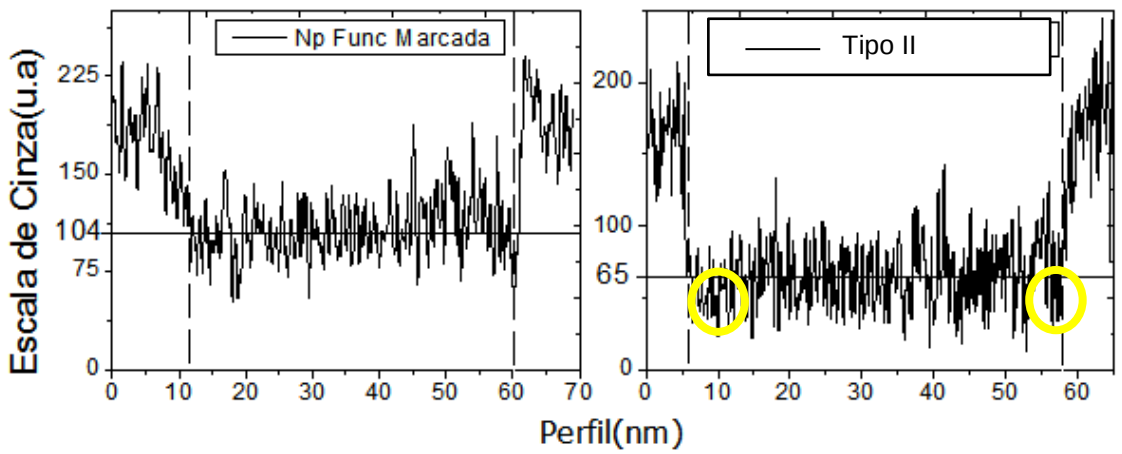


Figura 39: Escala de cinza da (a) NP funcionalizada e da (b) NP de sílica revestida com eumelanina. Os perfis são referentes aos diâmetros marcados na figura 38.

4.5.1 Mecanismos de polimerização da eumelanina na superfície da sílica

Os resultados apresentados nesta seção demonstraram que é possível obter NP revestida com eumelanina de duas formas distintas: (i) ligação covalente da enzima na NP de sílica e síntese da eumelanina in-situ e (ii) preparação da solução de DHI e IQ pela tirosinase livre e posteriormente realizar o revestimento com eumelanina das NPs de sílica funcionalizadas com glutaraldeído. Como a eumelanina é um sólido amorfo de diâmetro médio de 400nm (seção3.3.3), não se esperou obter um revestimento fino e controlado de eumelanina (com cerca de 1,9nm) nas NPs que possuem somente 55nm de diâmetro. Hipotetizamos, consequentemente, que o revestimento com eumelanina da NP de sílica funcionalizada ocorre através da interação dos monômeros da síntese de eumelanina, principalmente, moléculas de indol-5,6-quinona (IQ) e 5,6-dihidroxindol (DHI) com as moléculas de glutaraldeído presentes na superfície da NP de sílica e com elas próprias para formar a camada de polímero na superfície da sílica. O esquema da figura 40 ilustra que diversos grupos destes compostos tem características de elétrófilos e nucleófilos permitindo o acoplamento destes compostos. A figura descreve os carbonos mais reativos somente, sendo estes o carbono 2 do DHI, bastante nucleófilo e os carbonos 4 e 7 do IQ bastante eletrófilos. No entanto, o carbono 2 do IQ, bem como, o nitrogênio do anel indol são também nucleófilos, explicando o porquê do polímero de eumelanina se formar com diferentes formas de acoplamento, sendo assim bastante heterogêneo. Note também que há os derivados carboxílicos do IQ e DHI, que também podem participar desta reação. Estes

grupos podem interagir com o glutaraldeído presente na superfície da sílica. A Figura 40 ilustra essa reação para o IQ agindo como nucleófilo, mas é claro que tanto DHI quanto IQ podem reagir com glutaraldeído nos seus diversos grupos nucleófilos. Uma vez presentes na superfície estes compostos podem interagir entre si finalizando a polimerização e revestindo a NP de sílica com eumelanina.

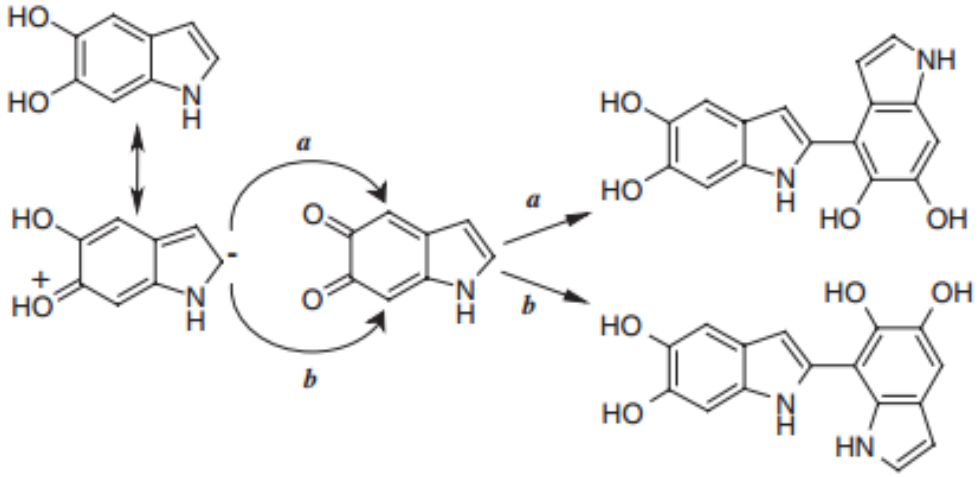


Figura 40:Esquema reacional de indol-5,6-quinona (IQ) e 5,6-dihidroxindol (DHI) para formação de dímeros e início da reação de polimerização na reação de polimerização. O carbono 2 do 5,6-dihidroindol é um forte nucleófilo e ataca os carbonos 4 e 7 do IQ, que são excelentes eletrófilos permitindo o acoplamento eficiente destas moléculas. Extraído de [68]

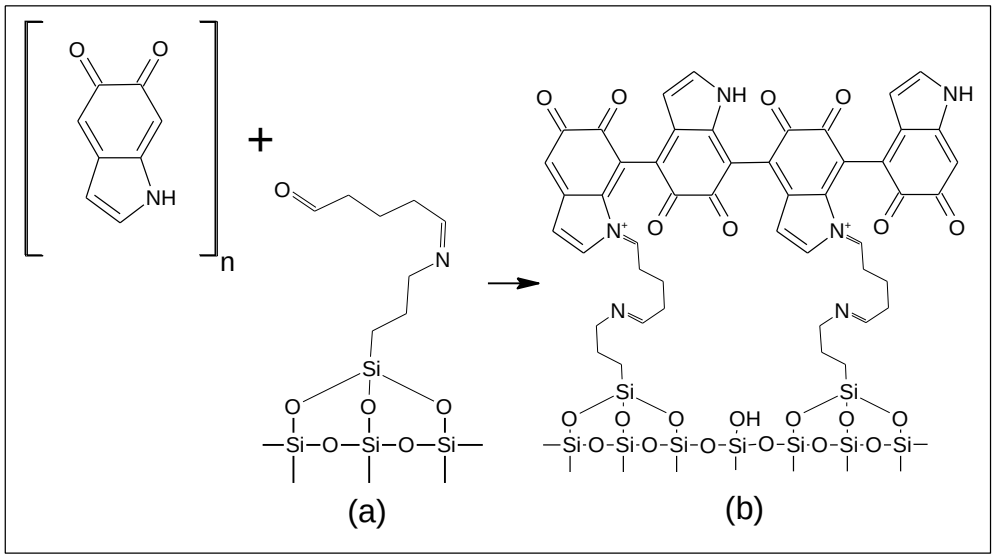


Figura 41: Esquema mostrando a ligação de IQ (obtido por tirosinase imobilizada ou previamente com tirosinase livre) ao glutaraldeído ancorado na NP funcionalizada com a posterior polimerização de eumelanina favorecida pela maior concentração de íons H^+ na superfície da partícula.

Apresentaremos três dados que suportam a hipótese do revestimento da NP de sílica com eumelanina nos tipos I e II.. Evidencia I: intermediários são gerados pela tirosinase ligada a NP e vão para solução, posteriormente sendo novamente oxidados pela enzima o que gera os intermediários reativos DHI e IQ que interagem com os grupos reativos da NP de sílica funcionalizada, formando então o polímero de eumelanina na superfície da NP de sílica (Tipo I). Note que em solução contendo NP de sílica com tirosinase ligada, há o acúmulo de dopacroma em solução após a centrifugação da solução (Figura 23). Evidencia II: a interação da NP funcionalizada com os intermediários da eumelanina (DHI e IQ) leva a formação de revestimento da NP com eumelanina. Evidencia III: uma dispersão de NP nua na presença de solução de DHI/IQ obtida enzimaticamente resultou em sílicas não revestidas, ou seja, DHI/IQ não reagiram com a superfície da sílica não ocorrendo a polimerização (Figura 42).

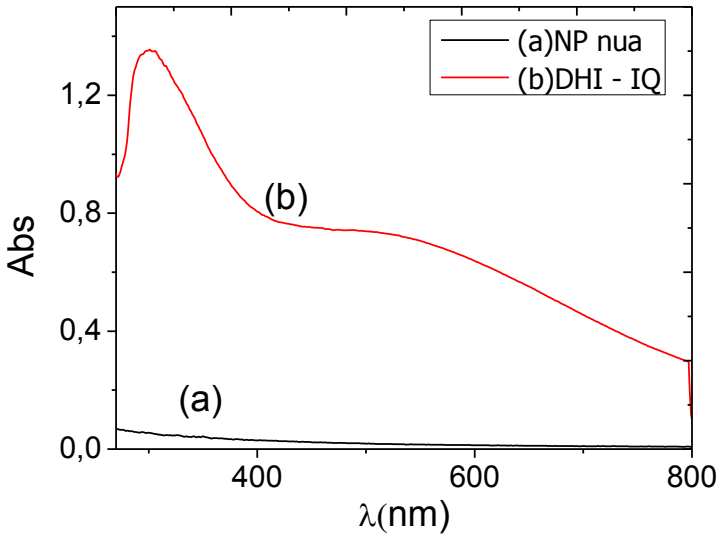


Figura 42: Espectros de absorbância de (a) NP nua e (b) solução de DHI e IQ. Obtenção da solução de DHI/IQ: tirosina 250mM; tirosinase 13µg/mL; tampão fosfato 50mM, 30ºC e 4h de reação. Depois da síntese foi misturada um dispersão 0,25mg/mL de NP de sílica nua.

Comparando a evidência II e III, é possível afirmar que a sílica funcionalizada com glutaraldeído na presença da solução de DHI/IQ resulta no revestimento da NP com eumelanina. Ou seja, é necessária a presença de sílica funcionalizada para permitir a ligação do DHI/IQ com a superfície funcionalizada da partícula e subsequente reação de polimerização. Assim propomos que ocorre a reação inicial entre o grupo carbonila do glutaraldeído com os grupos nucleófilos presentes nos monômeros da melanina catalisados pela tirosinase, que polimerizam e reticulam na superfície da NP. Hipotetizamos duas razões principais para que a polimerização seja favorecida na superfície da sílica: a concentração dos monômeros pela reação com o glutaraldeído; e as condições favoráveis de polimerização na superfície da sílica, uma vez que a polimerização de IQ e DHI ocorre em pH ácido[11], e a superfície da sílica tem carga residual negativa que atrai uma maior concentração de prótons.

5 Conclusões e Perspectivas

A imobilização por ligação covalente da tirosinase em NP de sílica ocorreu com alta eficiência, e a enzima permaneceu cataliticamente ativa. Não foi observada mudança significativa na constante de Michaelis-Menten (K_m) da tirosinase imobilizada em relação a tirosinase não imobilizada, não havendo por isso mudança conformacional significativa do sitio ativo. Houve diminuição da velocidade máxima ($V_{máx}$) de ~60% na tirosinase imobilizada em relação a tirosinase não imobilizada, indicando que a imobilização torna 2/3 das enzimas inativas. Não foi observado interferência na atividade da tirosinase em presença de NP de sílica. Com a enzima imobilizada a superfície da NP obtivemos o revestimento com eumelanina. Essa NP de sílica apresenta uma camada de eumelanina em torno de 1,9nm e tem características absortivas semelhantes da eumelanina. Foi possível também o revestimento com eumelanina usando NP de sílica funcionalizada e misturando com solução de DHI/IQ recém sintetizada. Os resultados mostraram que a tecnologia de recobrir a NP com eumelanina não depende da imobilização ou mesmo da presença da tirosinase, e sim que a superfície da NP seja funcionalizada de forma a estar apta a reagir com os precursores da melanina para que sua polimerização ocorra na sua superfície tendo, portanto, sido desenvolvido um método inédito de revestimento de uma partícula com melanina. Do ponto de vista tecnológico parece mais lógico preparar previamente a eumelanina e ligá-la covalentemente a suportes diversos. Devido ao perfil de absorbância, o material obtido possui potencial como novo principio ativo de protetor solar para proteger a pele com melanina, de modo análogo a natureza. Foi proposto um mecanismo de revestimento baseado na reatividade dos percursores eletrofilós da eumelanina reagindo com o glutaraldeído ancorado na NP, abrimos possibilidades da construção de novos matérias neutralizadores de fenóis com base no método desenvolvido.

6 Bibliografia

[1] L. D. P. Uyen, D. H. Nguyen, and E.-K. Kim, “Mechanism of skin pigmentation,” *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 13, no. 4, pp. 383–395, Sep. 2008.

[2] a Palumbo, M. d’Ischia, G. Misuraca, and G. Prota, “Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone.,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1073, no. 1. pp. 85–90, 1991.

[3] S. Ito and K. Fujita, “Microanalysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas by chemical degradation and liquid chromatography.,” *Anal. Biochem.*, vol. 144, no. 2, pp. 527–36, Feb. 1985.

[4] S. Ito, K. Fujita, H. Takahashi, and K. Jimbow, “Characterization of melanogenesis in mouse and guinea pig hair by chemical analysis of melanins and of free and bound dopa and 5-S-cysteinyldopa.,” *The Journal of investigative dermatology*, vol. 83, no. 1. pp. 12–14, 1984.

[5] M. Yaar and B. a Gilchrest, “Human melanocyte growth and differentiation: a decade of new data.,” *The Journal of investigative dermatology*, vol. 97, no. 4. pp. 611–617, 1991.

[6] Y.-J. Kim and H. Uyama, “Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future.,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 15, pp. 1707–23, Aug. 2005.

[7] P. A. Riley, “Melanin,” *Mol. Focus*, vol. 29, no. Ii, pp. 1235–1239, 1997.

[8] J. B. Nofsinger, S. E. Forest, L. M. Eibest, K. a Gold, and J. D. Simon, “Probing the building blocks of eumelanins using scanning electron microscopy.,” *Pigment Cell Res.*, vol. 13, pp. 179–184, 2000.

[9] G. W. Zajac, J. M. Gallas, J. Cheng, M. Eisner, S. C. Moss, and a E. Alvarado-Swaisgood, “The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1199, no. 3, pp. 271–278, 1994.

[10] J. L. Muñoz-Muñoz, M. D. M. García-Molina, F. Garcia-Molina, J. Berna, P. A. Garcia-Ruiz, M. García-Moreno, J. N. Rodriguez-Lopez, and F. Garcia-Canovas, “Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on o-diphenols, o-aminophenols and o-phenylendiamines: Potential use in industrial applications,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 91, pp. 17–24, Jul. 2013.

[11] I. Mani, V. Sharma, I. Tamboli, and G. Raman, “Interaction of melanin with

proteins--the importance of an acidic intramelanosomal pH.," *Pigment Cell Res.*, vol. 14, no. 3, pp. 170–9, Jun. 2001.

[12] K. Lerch, "Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure," in *Enzymatic Browning and Its Prevention*, vol. 600, American Chemical Society, 1995, pp. 5–64.

[13] J. M. Pawelek, A. M. Körner, and M. K. Ann, "Melanoma The Biosynthesis Melanin of Mammalian The regulation the key to of pigment formation ," 2015.

[14] a B. Lerner and T. B. Fitzpatrick, "Biochemistry of melanin formation.," *Physiol. Rev.*, vol. 30, no. 1, pp. 91–126, 1950.

[15] C. Olivares and F. Solano, "New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins.," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 750–60, Dec. 2009.

[16] N. C. Eickman, E. I. Solomon, J. a. Larrabee, T. G. Spiro, and K. Lerch, "Ultraviolet resonance Raman study of oxytyrosinase. Comparison with oxyhemocyanins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 100, no. 20, pp. 6529–6531, 1978.

[17] R. L. Jolley Jr., L. H. Evans, N. Makino, and H. S. Mason, "Oxytyrosinase "," *J. Biol. Chem.*, vol. 249, no. 2, pp. 335–345, 1974.

[18] R. Himmelwright and N. Eickman, "Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of Neurospora tyrosinase: comparison to hemocyanins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, no. c, pp. 7339–7344, 1980.

[19] H. J. Mason, W. B. Fowlks, and E. W. Peterson, "Oxygen Transfer and Electron Transport By the Phenolase Complex1," *J.Am.Chem.Soc.*, vol. 77, no. 3, pp. 2914–2915., 1955.

[20] F. Garcia-Carmona, F. Garcia-Cánovas, J. L. Iborra, and J. . Lozano, "KINETIC STUDY OF THE PATHWAY OF MELANIZATION BETWEEN L-DOPA AND DOPACHROME," *Biochim. Biophys. Acta 923,* no. 717, pp. 124–131, 1982.

[21] W. Korytowski, T. Sarna, B. Kalyanaraman, and R. C. Sealy, "Tyrosinase-catalyzed oxidation of dopa and related catechol(amine)s: a kinetic electron spin resonance investigation using spin-stabilization and spin label oximetry.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 924, no. 3, pp. 383–392, 1987.

[22] A. Sánchez-ferrer, J. N. Rodríguez-lopez, F. García-Cánovas, and F. García-Carmona, "Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1247, pp. 1–11, 1995.

[23] J. Cabanes, F. García-Cánovas, J. a Lozano, and F. García-Carmona, "A kinetic

study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 923, no. 2, pp. 187–195, 1987.

[24] H. S. Raper, "THE AEROBIC OXIDASES," *Physiol. Rev.*, vol. 8, no. 2, pp. 245–282, Apr. 1928.

[25] H. S. Mason, "THE CHEMISTRY OF MELANIN : III . MECHANISM OF THE OXIDATION OF DIHYDROXYPHENYLALANINE BY TYROSINASE," *J. Biol. Chem.*, vol. 172, pp. 83–99, 1948.

[26] S. S. Kim, C.-G. Hyun, Y. H. Choi, and N. H. Lee, "Tyrosinase inhibitory activities of the compounds isolated from Neolitsea aciculata (Blume) Koidz.," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 28, no. 4, pp. 685–9, Aug. 2013.

[27] a Sánchez-Ferrer, R. Bru, and F. Garcia-Carmona, "Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in triton x-114.," *Plant Physiol.*, vol. 91, no. 4, pp. 1481–1487, 1989.

[28] D. E. Wilcox, A. G. Porras, Y. T. Hwang, K. Lerch, M. E. Winkler, and E. I. Solomon, "Substrate Analogue Binding to the Coupled Binuclear Copper Active Site in Tyrosinase," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 107, no. 3, pp. 4015–4027, 1985.

[29] W. H. Vanneste and A. Zuberbuhler, *Copper-containing oxygenases*. 1974.

[30] C. Warner, "3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine as the Tyrosinase Cofactor," *J. Biol. Chem.*, vol. 242, no. 22, pp. 5308–5314, 1967.

[31] H. S. Mason, "Oxidases," *Annu. Rev. Biochem. 34, 595-634*, no. 34, pp. 595–634, 1965.

[32] H. S. Raper, "The Tyrosinase-tyrosine Reaction: Production from Tyrosine of 5: 6-Dihydroxyindole and 5: 6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid-the Precursors of Melanin.," *Biochem. J.*, vol. 21, no. 1, pp. 89–96, 1927.

[33] F. Solano, J. H. Martinez-Liarte, C. Jiménez-Cervantes, J. C. García-Borrón, and J. A. Lozano, "Dopachrome Tautomerase Is a Zinc-Containing Enzyme.pdf," vol. 204, no. 3, pp. 1243–1250, 1994.

[34] P. Aroca, J. C. Garcia-Borron, F. Solano, and J. A. Lozano, "Regulation of mammalian melanogenesis I partial purification and characterization of a dopachrome converting factor : dopachrome tautomerase," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1035, pp. 266–275, 1990.

[35] S. Ito, K. Wakamatsu, K. Glass, and J. D. Simon, "High-performance liquid chromatography estimation of cross-linking of dihydroxyindole moiety in eumelanin.," *Anal. Biochem.*, vol. 434, no. 2, pp. 221–5, Mar. 2013.

[36] S. ITO, “Optimization of Conditions for Preparing Synthetic Pheomelanin,” *Pigment Cell Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 53–56, 1989.

[37] H. Ozeki, K. Wakamatsu, S. Ito, and I. Ishiguro, “Chemical characterization of eumelanins with special emphasis on 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid content and molecular size.,” *Anal. Biochem.*, vol. 248, no. 1, pp. 149–57, 1997.

[38] G. Agrup, C. Hansson, H. Rorsman, and E. Rosengren, “The effect of cysteine on oxidation of tyrosine, dopa, and cysteinyldopas.,” *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 272, no. 1–2, pp. 103–115, 1982.

[39] J. R. Jara, P. A. r o c A, F. S. o l a n O, J. . H. . M. a r t i n e Z, and J. A. L. o z a n O, “The role of sulfhydryl compounds in mammalian melanogenesis: the effect of cysteine a n d glutathione upon tyrosinase and the intermediates of the path way,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 967, pp. 296–303, 1988.

[40] T. Sugimoto, “Preparation of monodispersed colloidal particles,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 28, pp. 65–108, 1987.

[41] J. Theodoor and G. Overbeek, “Strong and weak points in the interpretation of colloid stability,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 17–30, 1982.

[42] L. L. H. and J. K. West, “the Sol-Gel Process.pdf,” *Chem. Rev.*, vol. 90, pp. 33–72, 1990.

[43] J. T. G. Overbeek, “Monodisperse colloidal systems, fascinating and useful,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 15, no. 3–4, pp. 251–277, 1982.

[44] J. Livage and C. Sanchez, “Sol-gel chemistry,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 145, pp. 11–19, 1992.

[45] M. Ebelmen, “Sur l’hyalite artificielle et l'hydrphane." Comptes rendus de l'académie des Sciences,” *Comptes rendus l’académie des Sci.*, vol. 25, pp. 854–856, 1847.

[46] T. Graham, “On the Properties of Silicic Acid and other Analogous Colloidal Substances,” *T.J. Chem. Soc.*, vol. 17, pp. 318–327, 1864.

[47] W. Stöber and A. Fink, “Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1,” vol. 69, pp. 62–69, 1968.

[48] J. D. Brennan, “Biofriendly sol-gel processing for the entrapment of soluble and membrane-bound proteins: toward novel solid-phase assays for high-throughput screening.,” *Accounts of chemical research*, vol. 40, no. 9. pp. 827–35, Sep-

2007.

[49] L. T. Alfaya. A. A. S.; Kubota, “A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores,” *Quim. Nova*, vol. 25, no. 5, pp. 835–841, 2002.

[50] I. Gill and a Ballesteros, “Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals.,” *Trends in biotechnology*, vol. 18, no. 7. pp. 282–96, Jul-2000.

[51] E. P. Cipolatti, M. J. a. Silva, M. Klein, V. Feddern, M. M. C. Feltes, J. V. Oliveira, J. L. Ninow, and D. de Oliveira, “Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 99, pp. 56–67, Jan. 2014.

[52] R. a. Sheldon, “Enzyme immobilization: The quest for optimum performance,” *Adv. Synth. Catal.*, vol. 349, no. 8–9, pp. 1289–1307, 2007.

[53] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente, “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, no. 6, pp. 1451–1463, May 2007.

[54] C. L. Cardoso, “Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativa,” *Quím. Nov.*, vol. 32, no. 1, pp. 175–187, 2009.

[55] R. a Sheldon and S. van Pelt, “Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how.,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6223–35, 2013.

[56] L. Betancor, F. López-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. D.-O. C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, and J. M. Guisán, “Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 4, pp. 877–882, Aug. 2006.

[57] S. Ito, “Reexamination of the structure of eumelanin.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 883, pp. 155–161, 1986.

[58] G. Perna, M. C. Frassanito, G. Palazzo, a. Gallone, a. Mallardi, P. F. Biagi, and V. Capozzi, “Fluorescence spectroscopy of synthetic melanin in solution,” *J. Lumin.*, vol. 129, no. 1, pp. 44–49, 2009.

[59] J. D. B. Lock, “Intermediates in Melanin In the formation,” pp. 189–193, 1960.

[60] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.,” *Anal.*

Biochem., vol. 72, pp. 248–254, 1976.

[61] T. Zor and Z. Selinger, “Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.,” *Anal. Biochem.*, vol. 236, no. 2, pp. 302–308, 1996.

[62] A. W. COATS and J. P. REDFERN, “Thermogravimetric Analysis,” *Analyst*, vol. 88, no. 1053, pp. 906–924, 1963.

[63] T. Ozawa, “Thermal analysis — review and prospect,” *Thermochim. Acta*, vol. 355, no. 1–2, pp. 35–42, 2000.

[64] J. Brum and T. Marine, “Positive and Negative Staining of Viruses on TEM Grids,” *http://www.eebweb.arizona.edu/*, 2011.

[65] J. E. Mellema, E. F. J. Van Bruggen, and M. Gruber, “Uranyl oxalate as negative stain for electron microscopy of proteíns,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 140, pp. 180–182, 1967.

[66] M. Ohi, Y. Li, Y. Cheng, and T. Walz, “Negative Staining and Image Classification – Powerful Tools in Modern Electron Microscopy,” *Biol. Proced. Online*, vol. 6, no. 1, pp. 23–34, 2004.

[67] P. R. Hazelton and H. R. Gelderblom, “Electron Microscopy for Rapid Diagnosis of Infectious Agents in Emergent Situations 1,” vol. 9, no. 3, 2003.

[68] M. D’Ischia, A. Napolitano, A. Pezzella, E. J. Land, C. a. Ramsden, and P. a. Riley, “5,6-Dihydroxyindoles and Indole-5,6-diones,” vol. 89, no. 05, pp. 1–63, 2005.