



Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular

LUCAS DE SOUSA MARTINS

**MODELAGEM MOLECULAR DE INIBIDORES DA ENZIMA TIROSINASE**

Belém - PA  
2018

LUCAS DE SOUSA MARTINS

**MODELAGEM MOLECULAR DE INIBIDORES DA ENZIMA TIROSINASE**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará.  
Orientador: Prof. Dr. José Rogério de Araújo Silva.

Belém - PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

M379m Martins, Lucas de Sousa.  
MODELAGEM MOLECULAR DE INIBIDORES DA  
ENZIMA TIROSINASE / Lucas de Sousa Martins. — 2018.  
74 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. José Rogério de Araújo Silva  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação  
em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Belém,  
2018.

1. Tirosinase. 2. Modelagem Molecular. 3. LIE. I.  
Título.

CDD 541.2

---

LUCAS DE SOUSA MARTINS

**MODELAGEM MOLECULAR DE INIBIDORES DA ENZIMA TIROSINASE**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará.  
Orientador: Prof. Dr. José Rogério de Araújo Silva.

Data da Defesa: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Conceito:

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. José Rogério de Araújo Silva  
Faculdade de Química / ICEN / UFPA – Orientador

---

Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima  
Faculdade de Química / ICEN / UFPA – Membro

---

Prof. Dr. Ricardo Morais de Miranda  
IFPA – Membro

Aos meus pais, José Lúcio e  
Lucilena Martins.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que me guia na luz em momentos de dificuldades. Ao Nosso Senhor Jesus Cristo e a Nossa Senhora, quem me apego em oração para sempre ter forças para seguir firme e alcançar meus objetivos.

Ao meu pai, José Lúcio Dias Martins, que mesmo com dificuldades me deu o apoio necessário para que eu chegasse até aqui. A minha mãe, Lucilena de Sousa Martins, que sempre fez o possível e o impossível para me ver feliz, e nunca mediu esforços para me proporcionar tudo que precisei para a minha caminhada acadêmica, assim como, me transmitiu valores os quais eu levarei para minha vida toda. A minha irmã Layna Martins com quem passei vários momentos de alegria, apesar de tudo, mas sempre estive do meu lado. Por esses motivos sou muito grato aos três e sempre amarei a todos.

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, pela oportunidade de cursar o mestrado.

A todos meus colegas e professores do LPDF (Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos), com quem tive a oportunidade de conviver durante toda minha trajetória no mestrado e compartilhar conhecimentos, criando grandes laços de amizade que levarei pra vida toda.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Rogério de Araújo Silva, que foi essencial para o desenvolvimento e finalização desse trabalho, sempre me ajudando e me transmitindo os conhecimentos necessários, agradeço ao mesmo pelo grande auxílio, amizade e pela convivência durante esses anos.

A FAPESPA pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudo.

## RESUMO

A enzima Tirosinase (TYR), responsável pela catálise das etapas iniciais da melanogênese em vários organismos, está relacionada a diversos problemas de saúde de ordem cutânea em seres humanos. Dentre os quais destacam-se: a hiperpigmentação, melasma e o câncer de pele, nas formas não melanômica e melanoma maligno. Em geral, estas disfunções são tratadas com substâncias despigmentantes cutâneas, baseadas na inibição da enzima TYR. Porém, muitas destas substâncias onde destaca-se o ácido kójico (AK), apresentam efeitos colaterais acentuados. Tais fatores tornam a TYR um interessante alvo biológico no planejamento e desenvolvimento de protótipos à fármacos. Neste estudo, investigou-se alguns potenciais inibidores da enzima TYR, em particular o AK e moléculas análogas, assim como, a Tropolona e alguns derivados de benzaldeído, relacionados estruturalmente aos substratos naturais da TYR (L-Tirosina e L-Dopa), utilizando as técnicas de Docagem Molecular, Dinâmica Molecular (DM) e o método LIE (*Linear Interaction Energy*), usado para calcular a energia livre de ligação dos sistemas. Especificamente aplicação da Docagem Molecular definiu o modo de ligação dos inibidores no sítio da TYR, sendo possível quantificar as interações ocorrentes nos sistemas. As simulações por DM, exibiram o comportamento da enzima com diferentes inibidores e a forma como esses agem quando complexados com a enzima TYR, utilizando-se na simulação um modelo *dummy atom* de cobre. Sendo assim, os resultados do LIE mostraram concordância com os resultados experimentais, obtendo um  $R^2$  de 0,91 em uma regressão linear LIE vs Experimental, e isso possibilitou analisar as estimativas energéticas por resíduo da enzima em relação aos inibidores, onde percebeu-se que a Tropolona, AK, MOL2 e MOL3 fazem interações diretas com resíduos importantes para o sítio ativo da TYR. Assim sendo, os resultados alcançados neste trabalho contribuem de maneira significativa para a ciência a cerca a inibição da enzima TYR, ajudando no combate aos males provenientes de irregularidades no ciclo de produção de melanina nos organismos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tirosinase. Modelagem Molecular. LIE.

## ABSTRACT

The enzyme Tyrosinase (TYR), responsible for the catalysis of the early stages of melanogenesis in various organisms, is described in some groups. Among those that stand out: hyperpigmentation, melasma and skin cancer, in not melanoma forms and malignant melanoma. In general, dysfunctions are treated with depigmenting agents, TYR enzyme alerts. However, among them is the kojic acid (KA), marked side effects. Such phenomena make a TYR a model of biological development of drug prototypes. In the meantime, I investigated some TYR enzyme inhibitory genes, in particular AK and analogous plants, as well as a Tropolone and some benzaldehyde derivatives, structurally related to the natural substrates of TYR (L-Tyrosine and L-Dopa), as the Molecular Docking, Molecular Dynamics (MD), and the Linear Interaction Energy (LIE) method, used to calculate the free binding energy of the systems. Specifically application of Molecular Docking defined the mode of binding of the inhibitors in the TYR site, being possible to quantify how interactions occur in the systems. As the MD simulations, they exhibited the effect of the enzyme with different inhibitors and how they act when complexed with a TYR enzyme, using a copper dummy atom model. Thus, the results obtained by LIE were concordant with the experimental results, obtaining an  $R^2$  of 0.91 in a linear regression of LIE vs Experimental, and this allowed to analyze how Tropolona, KA, MOL2 and MOL3 interactions with the important to the active site of TYR. Thus, the results achieved at work contributed significantly to the achievement of inhibition of the TYR enzyme, helping to combat the evils caused by a cycle of melanin production in organisms.

KEY WORDS: Tyrosinase. Molecular Modeling. LIE.



## LISTA DE ILLUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração das camadas da pele, em destaque a localização dos melanócitos na camada basal da epiderme.	18
Figura 2 -	Caminho biossintético da síntese da melanina, em destaque as duas etapas iniciais catalisadas pela enzima Tirosinase.	20
Figura 3 -	Ilustração do melanoma na pele	22
Figura 4 -	Sítio de ligação da enzima TYR (PDB: 5I38) (DERI et al., 2016). Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.	23
Figura 5 -	Estrutura terciária da enzima TYR, substrato L-Dopa e os íons cobre como cofator.	25
Figura 6 -	(A) Estrutura da Hidroquinona (B) Estrutura da Arbutina.	27
Figura 7 -	Estrutura do Ácido Kójico	28
Figura 8 -	Estrutura da Tropolona.	28
Figura 9 -	Conexão entre experimento, simulação e teoria.	30
Figura 10 -	Subáreas da modelagem molecular.	31
Figura 11 -	Ilustração representando a docagem molecular predizendo o modo de ligação de uma molécula ligante e seu possível receptor.	32
Figura 12 -	Ilustração do modelo <i>dummy atoms</i> octaédrico de Aqvist e Warshel (1989).	40
Figura 13 -	Sequência de etapas realizadas para o cálculo de docagem molecular.	46
Figura 14 -	Modo representativo dos sistemas construídos para as simulações de DM. (A) Ligante solvatado, mostrando a esfera de simulação (18 Å) e a esfera de solvente (20 Å). (B) Complexo solvatado, com esfera de simulação (18 Å) e esfera de solvente (20 Å).	47
Figura 15 -	(A) Modo de ligação da L-Tirosina no sítio ativo da TYR. (B) Modo de ligação L-Dopa no sítio ativo da TYR. Ambos obtidos por docagem molecular. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.	51
Figura 16 -	Modo de ligação de AK no sitio ativo, obtidos por docagem molecular. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.	52

Figura 17 -	(A) Sobreposição entre AK e L-tirosina. (B) Sobreposição entre AK e L-Dopa. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.	52
Figura 18 -	(A) Modo de ligação da Tropolona. (B) Modo de ligação de MOL4. Obtidos por docagem molecular. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.	53
Figura 19 -	Gráfico de RMSD para a estrutura dos ligantes complexadas no sítio ativo da TYR.	55
Figura 20 -	Gráfico de RMSD para a estrutura da TYR ao receber os ligantes em seu sítio ativo.	55
Figura 21 -	Afastamento da His69 em relação ao $\text{Cu}^{2+}$ A durante a simulação de DM. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.	57
Figura 22 -	Gráfico de regressão linear entre valores de $\Delta G_{\text{EXP}}$ vs $\Delta G_{\text{LIE}}$ . Para os valores $\alpha$ e $\beta$ coletados da literatura (HANSSON; MARELIUS; ÅQVIST, 1998).	59
Figura 23 -	Gráfico de regressão linear entre valores de $\Delta G_{\text{EXP}}$ vs $\Delta G_{\text{LIE}}$ . Para os valores $\alpha$ e $\beta$ gerados através de uma correlação linear.	59
Figura 24 -	Estimativas de energia de Van der Waals e eletrostática por resíduo da enzima TYR, para o sistema com Tropolona.	60
Figura 25 -	Estimativas de energia de Van der Waals e eletrostática por resíduo da enzima TYR, para o sistema com AK.	60
Figura 26 -	Estimativas de energia de Van der Waals e eletrostática por resíduo da enzima TYR, para o sistema com MOL2.	60
Figura 27 -	Estimativas de energia de Van der Waals e eletrostática por resíduo da enzima TYR, para o sistema MOL3.	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Moléculas ligantes estudadas nesse trabalho e suas respectivas informações	43
Tabela 2 -	Estruturas 3D da TYR extraídas do <i>Protein Data Bank</i> para as simulações	45
Tabela 3 -	Valor da pontuação dos ligantes e RMSD obtidas pela redocagem	50
Tabela 4 -	Pontuação <i>MolDock Score</i> obtidas por docagem molecular	53
Tabela 5 -	Valores de ELL para LIE e seus valores experimentais de energia, valores em Kcal.mol <sup>-1</sup>	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

AK	-	Ácido Kójico
Arg	-	Arginina
Cu	-	Cobre
DHI	-	<i>Dihidroxiindole</i>
DHICA	-	<i>Dihydroxyindole-2-carboxylic acid</i>
DM	-	Dinâmica Molecular
DOPA	-	<i>3,4-dihidroxifenilalanina</i>
ELL	-	Energia Livre de Ligação
EVB	-	<i>Empirical valence bond</i>
Fe	-	Ferro
FEP	-	<i>Free energy perturbation</i>
His	-	Histidina
INCA	-	Instituto Nacional de Câncer
IUPAC	-	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K	-	Potássio
Kcal	-	Quilocaloria
Kd	-	Constante de dissociação
Ki	-	Constante de inibição
LIE	-	<i>Linear Interaction Energy</i>
MOL1	-	Molécula 1
MOL2	-	Molécula 2
MOL3	-	Molécula 3
MOL4	-	Molécula 4
MSH	-	Hormônio Estimulante de Alfa-Melanócitos
MVD	-	Molegro Virtual Docker

ns	-	Nanosegundos
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PDB	-	<i>Protein Data Bank</i>
PHE	-	Fenilalanina
PM6	-	Parametric Method 6
R <sup>2</sup>	-	Coeficiente de determinação
RMSD	-	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SA	-	Sítio Ativo
TRO	-	Tropolona
TYR	-	Tirosinase
UV	-	Ultra Violeta
WHO	-	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral .....	18
2.2. Objetivos Específicos .....	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	19
3.1. Melanogênese.....	19
3.1.1. Distúrbios na Melanogênese.....	22
3.1.2. Melanoma .....	23
3.2. Enzima Tirosinase: Estrutura e Função .....	24
3.3. Enzimas e Inibição Enzimática.....	25
3.4. Inibidores de Tirosinase .....	27
3.4.1. Ácido Kójico .....	28
3.4.2. Tropolona.....	29
3.5. Modelagem Molecular Aplicada ao Planejamento de Fármacos.....	30
3.5.1. Docagem Molecular .....	33
3.5.1.1. Função de Pontuação <i>MolDock</i> .....	34
3.5.2. Desvio Médio Quadrático.....	35
3.5.3. Dinâmica Molecular .....	36
3.5.4. Mecânica Molecular .....	37
3.5.5. Modelo <i>Dummy Atom</i> .....	39
3.5.6. Energia livre de ligação (ELL): Método <i>linear interaction energy</i> (LIE) .....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
4.1. Construção dos Modelos.....	44
4.2. Cálculos de Docagem Molecular.....	45
4.3. Simulação por Dinâmica Molecular.....	47
4.4. Energia Livre de Ligação: Método LIE .....	49

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1. Docagem Molecular .....	51
5.2. Análise das Simulações por Dinâmica Molecular .....	55
5.3. Cálculo de Energia Livre de Ligação: método LIE .....	58
6. CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

A melanina é um conjunto de compostos poliméricos, que está presente em vários organismos, tendo como principais funções a fotoproteção, termorregulação, supressão de radicais livres, cicatrização de feridas, assim como, delimitação da coloração da pele, olhos e cabelos (CHANG, 2009; KIM; UYAMA, 2005; SAGHAIE et al., 2013). Apesar de suas funções benéficas, irregularidades na síntese da melanina influenciadas pela ação de enzimas, como a Tirosinase (TYR), é a causa de vários problemas de ordem cutânea em seres humanos (CHANG, 2009; PARVEZ et al., 2006; SAGHAIE et al., 2013). Do mesmo modo, o escurecimento enzimático em frutos e vegetais também está ligado a ação dessa enzima (CHANG, 2009; MATSUI et al., 2010; RAO et al., 2013; SAGHAIE et al., 2013).

Entre os males consequentes dessas irregularidades em humanos, está o vitiligo, albinismo, hiperpigmentação, lentigo, melasma, bem como o câncer de pele na forma não melanômica e melanoma maligno (AZULAY; AZULAY, 2011; GOYDOS; SHOEN, 2016; RAO et al., 2013). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o melanoma é a principal causa de morte por câncer de ordem cutânea em todo o mundo (OMS, 2017). Particularmente, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se cerca de 6.260 novos casos nacionais para o ano de 2018 (INCA, 2017). De acordo com Souza e seus colaboradores (2011), estimou-se que a média dos custos diretos unitários do tratamento do melanoma seja R\$13.062,40 para o SUS e R\$ 26.668,30 para convênios. Considerando-se que, na ocorrência de metástase o melanoma é geralmente incurável, a estratégia de tratamento para a doença avançada deve ter então como objetivo aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2018).

Especificamente, o tratamento para o câncer de pele do tipo não melanômico, que raramente é letal, é doloroso e geralmente leva a deformação localizada (OMS, 2017). Este tipo de câncer ocorre majoritariamente em partes do corpo rotineiramente expostas a radiação solar, como orelhas, rosto, pescoço e antebraços (OMS, 2017). Além disso, outros fatores podem agravar a sua incidência, tais como, o envelhecimento, gravidez, distúrbios endócrinos e entre outros (HERNANDEZ; MERCIER-FRESNEL, 1999; INCA, 2018; MOREIRA et al., 2010). Em geral, essas discromias são tratadas com substâncias despigmentantes cutâneas, entretanto,



apresentam efeitos colaterais, como toxicidade aos melanócitos, irritação e a sensibilidade na pele (DRAELOS, 2007; NICOLETTI et al., 2002). Ficando assim evidente a importância de buscar novos agentes terapêuticos.

Dentre as peças chaves no processo da melanogênese destaca-se a enzima TYR (CHANG, 2009; COATES; NAIRN, 2014; OLIANAS et al., 2005), que é responsável pelas duas etapas iniciais nessa síntese (CHANG, 2009; HERRAIZ et al., 2009). Inicialmente, o substrato L-Tirosina é hidroxilado, produzindo L-Dopa, sendo este por sua vez oxidado à DOPAquinona (CHANG, 2009; HALABAN et al., 2002). Por fim, a melanina é formada pela polimerização espontânea das DOPAquinonas (CLAUS; DECKER, 2006; DECKER et al., 2007; KANTEEV; GOLDFEDER; FISHMAN, 2015; ROSATTO et al., 2001).

Considerando a importância biológica da enzima TYR, estudos a utilizam como alvo no planejamento de medicamentos anticâncer de pele e contra outras discromias (BRASIL et al., 2017; CHANG, 2009; KIM; UYAMA, 2005; LIMA et al., 2014). Um dos inibidores mais estudados para a TYR é o ácido kójico (AK) (CABANES; CHAZARRA; GARCIA-CARMONA, 1994; RODRIGUES et al., 2011), um metabólito fúngico que possui propriedade de quelação de íons de metais de transição, como o  $\text{Cu}^{2+}$  que está presente na TYR (KIM; UYAMA, 2005; SAGHAIE et al., 2013). Entretanto, o AK mostrou baixo rendimento em alguns ensaios (HERMANNNS; PIÉRARD-FRANCHIMONT; PIÉRARD, 2000). Sendo necessário novos estudos a fim de propor novos inibidores, tal como, maximizar a eficiência daqueles já existentes e minimizar seus efeitos colaterais.

Em vista disso, neste estudo usou-se metodologias de modelagem molecular para investigar inibidores de TYR, em particular o AK e moléculas análogas, assim como, a Tropolona e alguns derivados de benzaldeído, relacionados estruturalmente aos substratos naturais da TYR (L-Tirosina e L-Dopa), os inibidores investigados aqui têm se mostrado promissores na inibição da TYR em diversas literaturas (KUBO et al., 2003; MAGHSOUDI et al., 2013). Através das metodologias usadas, obteve-se o modo de ligação inibidor/TYR, bem como, propriedades termodinâmicas desses sistemas, como a energia livre de ligação (ELL). Essas técnicas, têm sido cada vez mais empregadas no planejamento de novos fármacos ou aprimoramento de fármacos já conhecidos, sendo aplicadas a vários estudos nesta área (BRASIL et al., 2017; CARVALHO et al., 2003; LIMA et al., 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Aplicar métodos de modelagem molecular na investigação de inibidores da enzima Tirosinase.

### 2.2. Objetivos Específicos

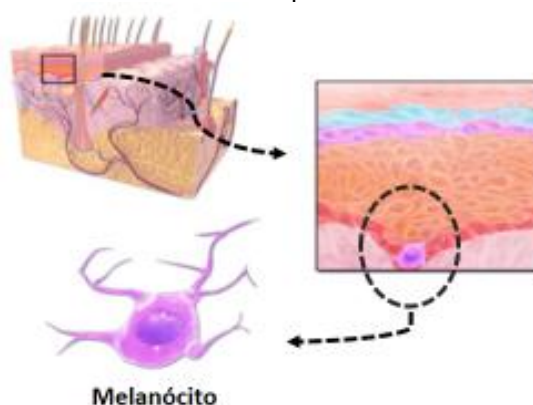
- Definir o modo de ligação das moléculas ligantes no sítio ativo da enzima TYR, através do método de docagem molecular;
- Quantificar as interações ocorrentes entre os ligantes e os resíduos do sítio ativo da enzima TYR;
- Executar simulações por dinâmica molecular nos sistemas em estudo;
- Calcular a energia livre de ligação dos sistemas em estudo, através do método *Linear Interaction Energy* (LIE);
- Contribuir para o planejamento e desenvolvimento de novos inibidores de TYR;

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Melanogênese

A melanogênese é o processo bioquímico encarregado pela síntese da melanina, essa síntese ocorre nos melanócitos, que são encontrados na camada de células basais da epiderme (Figura 1), os melanócitos possuem organelas complexas, nomeadas de melanossomos, os quais contêm diversas enzimas importantes nesse processo, dentre essas enzimas está a TYR, responsável direta pela catálise enzimática para a formação da melanina (CHANG, 2009; HERRAIZ et al., 2009; ROBINS, 1991). A TYR é a enzima que controla as primeiras etapas da melanogênese, ela é inicialmente formada na superfície do retículo endoplasmático rugoso (HERRAIZ et al., 2009).

**Figura 1.** Ilustração das camadas da pele, em destaque a localização dos melanócitos na camada basal da epiderme.



Fonte: Blausen Medical (2014).

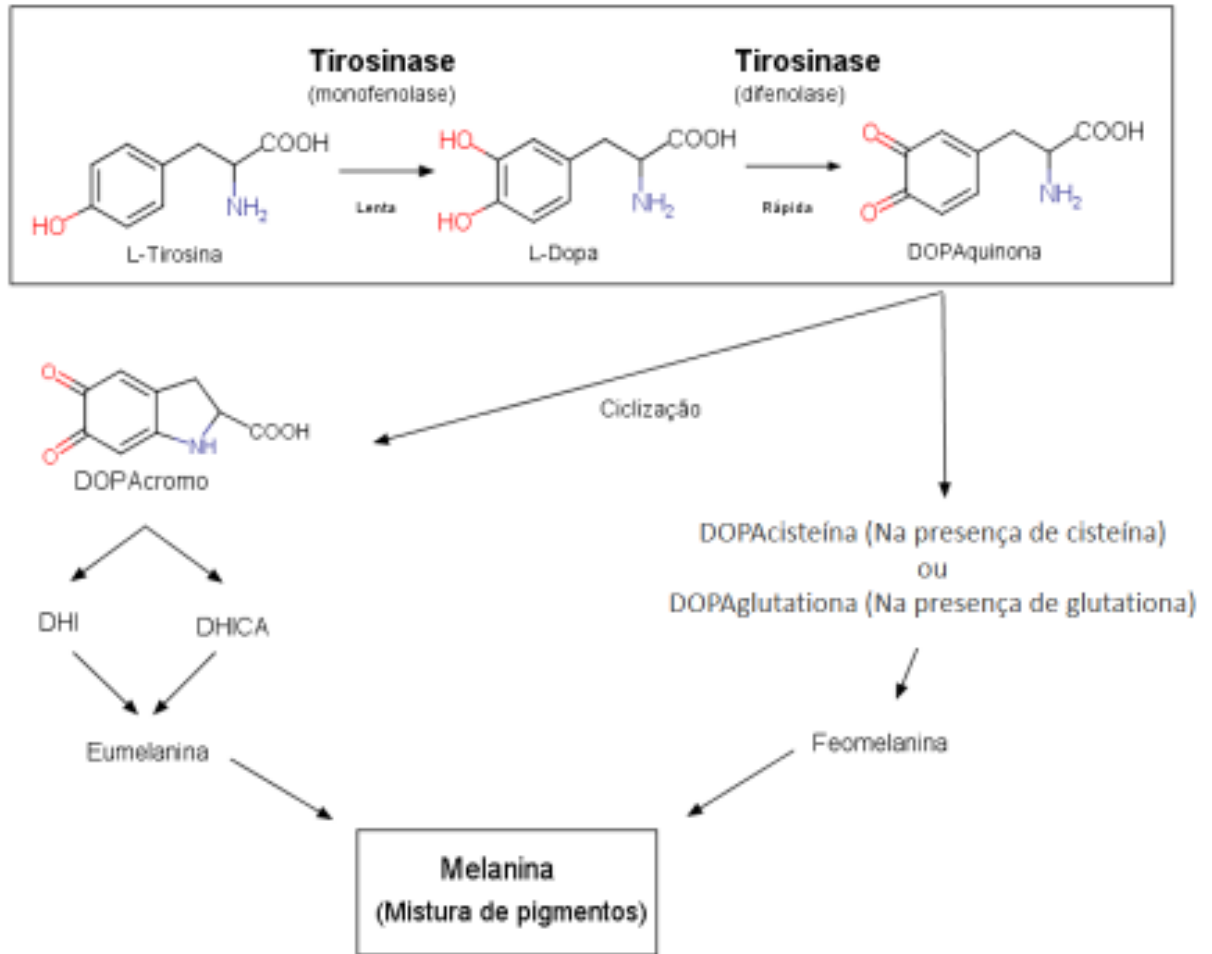
Nos seres humanos a melanina é espalhada na pele pelas unidades epidérmicas, que são constituídas por melanócitos e rodeadas por queratinócitos (CICHOREK et al., 2013; LIN; FISHER, 2007). A coloração da pele é estabelecida então por um agregado de fatores, entre eles a vascularização, quantidade de carotenos, porém principalmente pelo nível de melanina contida no tecido, sob as influências de aspectos genéticos, raciais, hormonais e fatores externos, como a incidência da radiação ultravioleta (UV) (STEINER, 1996a, 1996b; SU, 1999).

Existem alguns fatores que influenciam no processo da melanogênese. O fator genético, pois todas as etapas da melanogênese estão ligadas ao controle genético e as características dos melanossomos são codificadas pelos genes de pigmentação. O fator hormonal, já que o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (MSH) e o hormônio hipofisário estimulam a melanogênese, assim como, os estrogênios e a

progesterona provocam a hiperpigmentação do rosto e da epiderme genital. A ação das radiações UV, pois os raios UV-B elevam o nível dos melanócitos ativados e estimula a enzima TYR, ou seja, a produção acelerada de melanina é uma reação defensiva da pele, porém em excesso apresenta efeitos colaterais consideráveis, promovendo a formação do eritema actínico (pigmentação indireta). Os raios UV-A oxidam e escurecem os precursores incolores da melanina, favorecendo uma pigmentação sem eritema (pigmentação direta) (CHARLET, 1996; HERNANDEZ; MERCIER-FRESNEL, 1999; MOREIRA et al., 2010). Nesses processos a quantidade de melanócitos não se eleva, mas eles aumentam de tamanho, por consequência, aumentando a ação das enzimas envolvidas na melanogênese (STEINER, 1996b).

O caminho da biossíntese para a produção de melanina em diversas formas de vida foi inicialmente elucidada por Raper (1928) e Mason (1948) e depois foi modificada por Schallreuter e seus colaboradores (2008). A melanogênese começa com a hidroxilação da L-Tirosina em L-Dopa, processo que é catalisado pela TYR, mostrado na sequência da Figura 2. Este passo inicial é o passo limitante da velocidade na melanogênese, porque a sequência das reações posteriores podem ter seguimento espontâneo em um valor de pH fisiológico (CHANG, 2009; HALABAN et al., 2002). Em seguida, a L-Dopa formada é convertida em DOPAquinona, via oxidação, sendo esta a segunda etapa da síntese catalisada pela enzima TYR (CHANG, 2009; HALABAN et al., 2002).

**Figura 2.** Caminho biossintético da síntese da melanina, em destaque as duas etapas iniciais catalisadas pela enzima Tirosinase.



Fonte: Adaptado de Chang (2009) e Rocha & Moreira (2007).

Em uma série de reações espontâneas sob controle biológico, a DOPAquinona formada pode ser convertida em DOPAcisteína ou DOPAglutationa, na presença de cisteína ou glutatona, respectivamente, posteriormente por uma oxidação a Feomelanina (pigmentação mais clara) é formada. A DOPAquinona também pode ser convertida em DOPAcromo (por meio de uma ciclização) e finalmente a Eumelanina (pigmentação mais escura) é formada pela sequência de reações de 5,6-dihidroindol (DHI) e também de 5,6-diidroindol-2-carboxílico (DHICA), esses dois são os produtos de reação do DOPAcromo. Portanto, com a Eumelanina e Feomelanina formadas se obtém a sequência de mistura de pigmentações, que é chamado de melanina (CHANG, 2009; HALABAN et al., 2002).

### 3.1.1. Distúrbios na Melanogênese

Embora a melanina apresente principalmente ação fotoprotetora na pele humana, o acúmulo anormal da mesma por consequência de distúrbios na melanogênese, ocasiona uma variedade de complicações que podem se tornar um problema de saúde significativo, influenciando a qualidade de vida das pessoas (CHANG, 2009; MATSUI et al., 2010; SAGHAIE et al., 2013). Esses distúrbios na melanogênese podem afetar do mesmo modo outros organismos, como de vegetais, causando o escurecimento enzimático nos mesmos, um fator indesejável, uma vez que isso diminui o valor comercial desses produtos, afetando a indústria em geral (CHANG, 2009; MATSUI et al., 2010; RAO et al., 2013).

Esses problemas de saúde relacionados à pigmentação do tecido cutâneo são chamados de discromias, geralmente relacionadas com a quantidade de melanina presente na região afetada, as discromias são tipificadas como acromias (ausência de melanina), hipocromias (diminuição da melanina), hiperacromias (aumento da melanina) leucomelanodermias (junção de hipocromias e hiperacromias) (AZULAY; AZULAY, 2011). Entre os vários males consequentes das irregularidades no ciclo da síntese da melanina estão o vitiligo, sardas, albinismo, envelhecimento precoce, hiperpigmentação, lentigo, melasma, bem como o câncer de pele na forma não melanômica e melanoma maligno (AZULAY; AZULAY, 2011; GOYDOS; SHOEN, 2016; MATSUI et al., 2010; RAO et al., 2013).

O melasma é uma das discromias que apresenta condições devastadoras para muitos pacientes, gerando um impacto nocivo na qualidade de vida dessas pessoas (GRIMES, 2009). O melasma é distinguido por manchas com coloração entre marrom claro a acinzentado, na região da face principalmente, mas também podem aparecer lesões em regiões expostas aos raios UV, como costas, peito e braços (GRIMES, 2009; MIOT et al., 2009).

É evidente a influência dos raios UV sobre a incidência de discromias e nas irregularidades da melanogênese, as peles geneticamente negras oferecem uma proteção de dez a quinze vezes maiores contra a radiação UV do que as peles geneticamente brancas (GARCIA, 2001). Entre as discromias citadas, a mais letal é o câncer de pele na sua forma maligna (melanoma), pois é a principal causa de morte por câncer de ordem cutânea no mundo (INCA, 2018; OMS, 2017).

### 3.1.2. Melanoma

Segundo Carvalho e seus colaboradores (2004), acredita-se que a maioria dos casos dessa neoplasia seja multifatorial, ou seja, são resultados da interação de fatores de risco não só ambientais como também genéticos. Nesse mesmo sentido, a Organização Mundial de Saúde relata que o risco de melanoma maligno se correlaciona com características genéticas, pessoais e com o comportamento de exposição de uma pessoa aos raios UV (OMS, 2017). Segundo Toledo (2012), especialistas durante o 14º Congresso Mundial de Câncer de Pele, realizado em São Paulo em agosto de 2012, alertaram sobre o risco de pessoas que possuem histórico de melanoma na família. Essas pessoas possuem risco pelo menos 30 vezes maior de desenvolver a doença. Ainda nesse contexto, de acordo com INCA, foi estimado cerca de 6.260 novos casos nacionais para o ano de 2018 (INCA, 2017).

O melanoma origina-se a partir dos melanócitos na epiderme (Figura 3), quando não tratado com antecedência a cirurgia se torna o tratamento mais indicado (CARVALHO et al., 2004). Porém, quando há metástase, o melanoma é incurável na maioria dos casos, a estratégia de tratamento para a doença avançada deve ter então como objetivo, aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2018). A incidência do melanoma maligno tem maiores chances em populações brancas devido à menor proteção à radiação solar oferecida pela cor e pelos fatores genéticos. Assim como, o melasma e outras discromias também são mais frequente nas populações geneticamente brancas (INCA, 2018; STEINER, 1996b; OMS, 2017). Essas anomalias também tendem se agravar com a latitude decrescente no espaço geográfico (INCA, 2018; OMS, 2017).

**Figura 3.** Ilustração do melanoma na pele.



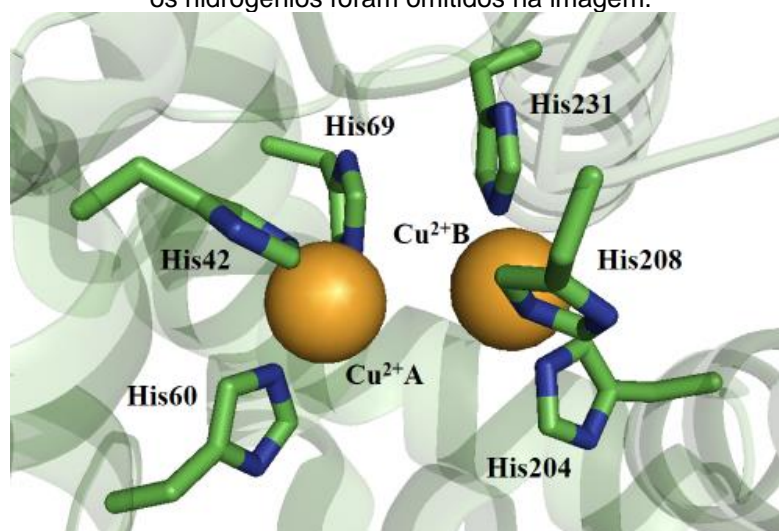
Fonte: Leonel (2018).

Dessa forma, conhecer os mecanismos de atuação das enzimas envolvidas na melanogênese, como a enzima TYR, bem como, as substâncias que podem modificar esses mecanismos e as informações termodinâmicas desses processos, constitui um objetivo científico muito relevante que pode favorecer o desenvolvimento de novos fármacos para combater esses males, como o melanoma (VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013).

### 3.2. Enzima Tirosinase: Estrutura e Função

As tirosinases, também conhecidas como polifenoloxidase, são encontradas em tecidos animais, cogumelos e entre outros, elas fazem parte do grupo de proteínas que possuem íons cobre em sua estrutura (COATES; NAIRN, 2014; KHANOM; KAYAHARA; TADASA, 2000; OLIANAS et al., 2005). Os dois íons cobre presentes no sítio ativo da TYR ( $\text{Cu}^{2+}\text{A}$  e  $\text{Cu}^{2+}\text{B}$ ), são coordenados por seis resíduos de histidina (His) (Figura 4) (CLAUS; DECKER, 2006; DECKER et al., 2007; KANTEEV; GOLDFEDER; FISHMAN, 2015). Uma característica notável que se pode observar em TYR's, é que seu sítio ativo com íons cobre é preservado, contendo resíduos de aminoácidos estritamente conservados, mesmo em TYR's de diferentes segmentos como bactérias, mamíferos e entre outros (CHANG, 2009).

**Figura 4.** Sítio de ligação da enzima TYR (PDB: 5I38) (DERI et al., 2016). Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.



A TYR é uma enzima que tem a função de catalisar a hidroxilação de monofenóis para formar difenóis (atividade de monofenolase) e posteriormente catalisar a oxidação dos difenóis resultando em DOPAquinonas reativas (atividade de difenolase) (CLAUS; DECKER, 2006; DECKER et al., 2007; HALAOULI et al., 2006; KANTEEV; GOLDFEDER; FISHMAN, 2015; MAYER, 1987). A partir disso, a melanina



é então formada rapidamente pela polimerização espontânea das DOPAquinonas produzidas na etapa da difenolase (CLAUS; DECKER, 2006; DECKER et al., 2007; HALAOULI et al., 2006; KANTEEV; GOLDFEDER; FISHMAN, 2015).

Nos últimos anos, os inibidores da enzima TYR têm sido um grande objeto de estudo para pesquisadores no mundo todo, por conta do papel fundamental dessa enzima tanto na melanogênese, quanto no escurecimento enzimático de frutos e vegetais, que tormenta a indústria alimentícia (CHANG, 2009; RAO et al., 2013; SAGHAIE et al., 2013).

### **3.3. Enzimas e Inibição Enzimática**

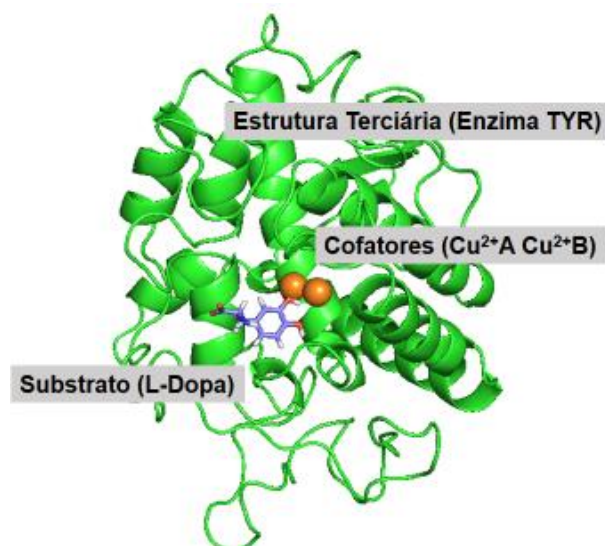
O interesse farmacêutico e industrial por tecnologias enzimáticas cresce de forma exponencial, pois as enzimas estão diretamente ligadas a catálise e ao controle da grande maioria dos processos bioquímicos, com eficiência bem maior do que catalisadores sintéticos (NELSON; COX, 2011; WARSHEL, 2003). As enzimas denotam estereoespecificidade, regio e quimiosseletividade (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; WARSHEL, 2003).

A especificidade de uma enzima é decretada pela sua capacidade de harmonizar-se com um substrato natural formando o complexo (enzima/substrato), onde posteriormente a enzima catalisa o processo de conversão deste substrato a um produto (DE OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). Uma alta especificidade depende diretamente da região do sítio ativo da enzima, a qual é afinada em tamanho, forma e natureza química para o substrato, algumas enzimas necessitam de cofatores ( $K^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  e entre outros) ou também coenzimas, para a formação do complexo (DE OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). Como exemplo a enzima TYR, que apresenta como cofatores dois íons cobre em seu sítio de ligação (DECKER et al., 2007; KANTEEV; GOLDFEDER; FISHMAN, 2015).

No geral, as enzimas são estruturalmente compostas pela condensação de aminoácidos, por meio de ligações peptídicas (VERLI, 2014). Através das interações das cadeias laterais presentes na estrutura desses aminoácidos, a enzima adota uma forma estrutural (estrutura terciária) (Figura 5), que está ligada estritamente com a atividade química exercida pelo sítio catalítico da enzima (VERLI, 2014). A catálise enzimática ocorre de diversas formas, porém em todos os processos é necessário alguns grupos reativos para a interação da enzima com o substrato (NELSON; COX, 2011). Nas enzimas, os grupos  $\alpha$ -carboxilas e os  $\alpha$ -aminos dos aminoácidos não estão

livres, pois eles estão efetuando as ligações peptídicas, ou seja, os grupamentos envolvidos na catálise enzimática são os grupos reativos das cadeias laterais (NELSON; COX, 2011).

**Figura 5.** Estrutura terciária da enzima TYR, substrato L-Dopa e os íons cobre como cofator.



As interações não covalentes que podem vir a ocorrer entre o substrato e a enzima receptora, são geralmente as interações eletrostáticas, as ligações de hidrogênio e as interações de Van der Waals (VERLI, 2014). O traço de estabilidade das ligações de hidrogênio entre a enzima e o substrato retifica um alto grau de especificidade ocorrente de um complexo (VERLI, 2014; VOET; VOET; PRATT, 2008). Já o mecanismo de catálise é único para cada enzima, o que não é inesperado, visto a grande especificidade das enzimas, contudo, o mecanismo completo para uma catálise pode ser certamente complexo, porém as partes individuais de um mecanismo global podem ser de certa forma simplificados (CAMPBELL, 1999; NELSON; COX, 2011).

Mesmo que várias etapas desse processo tenham sido elucidadas por estudos estruturais e bioquímicos ao longo dos anos, o campo do poder catalítico das enzimas ainda apresenta muitos pontos a serem explorados e são densamente estudados (SILVA, 2015; WARSHEL, 2003). Existem algumas substâncias capazes de interferir no processo da catalise enzimática, são os chamados inibidores enzimáticos, eles conseguem alterar a ação de uma enzima, reduzindo ou interrompendo a catálise, deste modo, as moléculas com um potencial de inibição enzimática estão entre os compostos mais estudados (NELSON; COX, 2011; SILVA, 2015; VOET; VOET; PRATT, 2008; WARSHEL, 2003).

A inibição enzimática é tipificada em reversível e irreversível. Sendo que, quando reversível pode ser principalmente competitiva e não competitiva. O inibidor reversível competitivo exibe, na maioria das vezes, características estruturais e afinidades análogas às do substrato natural da enzima, competindo assim pelo sítio ativo da enzima e impedindo a formação do produto (NELSON; COX, 2011). Porém, como a reação é do tipo reversível, quando se eleva a concentração de substrato, por consequência o equilíbrio é deslocado no sentido de formação do complexo (enzima/substrato), ou seja, os produtos serão formados (MARQUES; YAMANAKA, 2008; NELSON; COX, 2011; VOET; VOET; PRATT, 2008). O inibidor que funciona de forma não competitiva interage com um sítio diferente do sítio de ligação em que o substrato atua, um chamado sítio periférico (MARQUES; YAMANAKA, 2008). No sítio periférico o inibidor provoca a alteração do sítio ativo da enzima que receberia o substrato (NELSON; COX, 2011; VOET; VOET; PRATT, 2008).

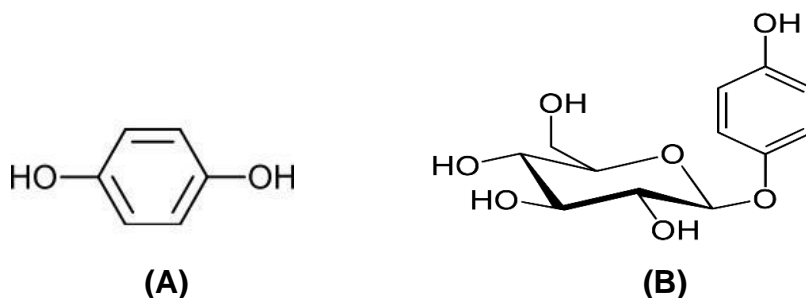
Por fim, no caso onde um inibidor interage de forma irreversível, ele se ligará no sítio ativo da enzima irreversivelmente, geralmente por meio de interações mais intensas, ou seja, pode formar ligações covalentes e eventualmente pode até destruir grupos importantes para a estrutura e função da enzima. Por progressão pode alcançar máxima inibição com uma determinada concentração de inibidor (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

### **3.4. Inibidores de Tirosinase**

Algumas discromias são tratadas com substâncias despigmentantes cutâneas, porém apresentam efeitos colaterais pronunciados, como toxicidade aos melanócitos, irritação e sensibilidade a pele, assim como, um potencial carcinogênico (DRAELOS, 2007; NICOLETTI et al., 2002; PARK et al., 2012). Essas substâncias despigmentantes podem ser decorrentes de diversos mecanismos de ação, como toxicidade seletiva aos melanócitos, adsorção de melanina pré-formada e principalmente a inibição da atividade da enzima TYR (MAEDA; FUKUDA, 1991; ZUIDHOFF; RIJSBERGEN, 2001).

Diversas substâncias de origem natural já foram retratadas como inibidoras da enzima TYR (BRASIL et al., 2017; LIMA et al., 2014), muitas das quais são compostos fenólicos como, por exemplo, a hidroquinona e também a arbutina (Figura 6) que é um glicosídeo da hidroquinona, presente em diversas formulações para clareamento de pele (MUNOZ et al., 2006).

**Figura 6.** (A) Estrutura da Hidroquinona (B) Estrutura da Arbutina.



Outros estudos também apresentam vários agentes (de origem natural ou sintética) com possível atividade de inibição para a ação da TYR, como os polifenóis (kaempferol, galangina e a quercetina) (KUBO et al., 2000), antraquinonas como 1,8-di-hidroxi-2-metoxi-3-metil-antraquinona (LEU et al., 2008), lipídios de cadeias longas (como triacilglicerol e trilinoleína) (JEON et al., 2006), assim como, o ácido kójico (SAGHAIE et al., 2013; SCHURINK et al., 2007).

Visto que, as irregularidades na síntese da melanina estão ligadas diretamente ao poder de catálise exercido pela enzima TYR (CHANG, 2009; SAGHAIE et al., 2013), a busca por inibidores dessa enzima é a principal estratégia para o combate as discromias em geral. Em vários estudos que objetivam investigar os possíveis inibidores da enzima TYR utilizam-se o ácido kójico como inibidor padrão (CHANG, 2009; SAGHAIE et al., 2013).

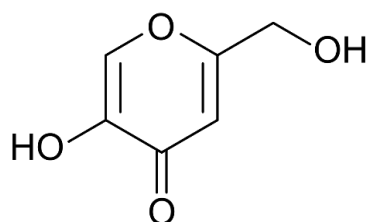
Levando em conta que, as terapias usadas atualmente não têm tido total eficiência, ou apresentam efeitos citotóxicos, como é o caso da hidroquinona, que ainda apresenta baixa estabilidade (DERI et al., 2016). Neste sentido, fica evidente a importância de buscar novos agentes terapêuticos, assim como, aperfeiçoar os já existentes baseados na inibição da enzima TYR.

#### 3.4.1. Ácido Kójico

O ácido kójico (AK) é utilizado como agente clareador de pele (CICHOREK et al., 2013; HA et al., 2007; NOHYNEK et al., 2004). O AK também denominado 5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona (Figura 7) é um metabólito produzido por vários fungos e bactérias, como as espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*. Esse potencial agente terapêutico apresenta propriedade de quelação de íons de metais de transição (como o  $\text{Cu}^{2+}$  presente na TYR), possuindo também a capacidade de eliminar radicais livres (KIM; UYAMA, 2005; SAGHAIE et al., 2013). O AK também é

usado na indústria alimentícia por conta de sua capacidade de evitar o escurecimento enzimático de alimentos (BLUMENTHAL, 2004; BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001; CHANG, 2009), assim como apresenta propriedades anti-tumoral (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001; GOMES et al., 2001; MOTO et al., 2006; TAMURA et al., 2006) e radioprotetora (EMAMI et al., 2007).

**Figura 7.** Estrutura do Ácido Kójico

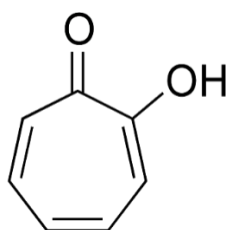


O AK inibe de forma competitiva a etapa da monofenolase catalisada pela enzima TYR, porém na etapa de difenolase o AK funciona como inibidor misto (CHANG, 2009; SAGHAIE et al., 2013; SCHURINK et al., 2007). Assim sendo, o mecanismo de atuação deste metabólito compreende a afinidade pelo sítio ativo da enzima, onde ocorrem a quelação dos íons ( $\text{Cu}^{2+}$ ) presentes nessa cavidade (SENDOVSKI et al., 2011). Embora contendo essas propriedades significativas, o AK tem seu uso limitado pela indústria de fármacos, por conta de alguns efeitos indesejados devido a sua citotoxicidade (PARK et al., 2012; SAGHAIE et al., 2013).

#### 3.4.2. Tropolona

A Tropolona (Figura 8) é outra estrutura com potencial de inibição de TYR, se trata de um composto orgânico com estrutura aromática constantemente isolados de fungos e eventualmente isoladas de plantas (REN et al., 2001). Essa classe de compostos constitui um estratégico ramo de interesse biológico, pois algumas substâncias que contêm um núcleo Tropolona em sua estrutura exibem atividade relevante para área farmacêutica (ISMAYA et al., 2011; YAMATO et al., 1986, 1987) e agrícola (VALERO et al., 1991).

**Figura 8.** Estrutura da Tropolona.



Yamato e colaboradores em uma série de estudos mostrou que alguns compostos derivados de Tropolona podem apresentar atividade antitumoral e ainda destaca que provavelmente essa característica está relacionada com a quelação de ferro no local ativo do ribonucleótido redutase (YAMATO et al., 1985, 1986, 1987).

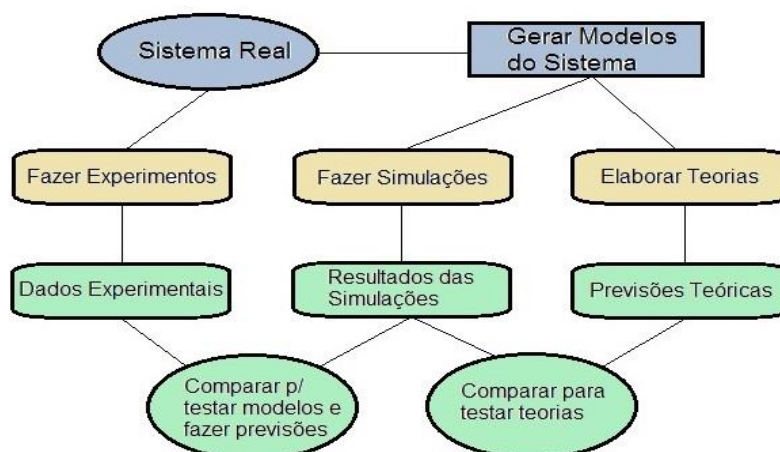
Estudos em Tropolonas e derivados, também relatam atividade antimalárica (REN et al., 2001), atividade de inibição de polifenol oxidase das uvas (VALERO et al., 1991) e atividade de inibição da enzima TYR em cogumelos (ISMAYA et al., 2011; KAHN; ANDRAWIS, 1985). Diversos compostos naturais possuem a estrutura base da Tropolona, entre esses compostos estão o ácido puberúlico, ácido stipitatonico, ácido puberulónico, sepedonina, teaflavinas e entre outros (PIETRA, 1973).

### **3.5. Modelagem Molecular Aplicada ao Planejamento de Fármacos**

Ultimamente, a procura por maior desenvolvimento e eficiência no mercado farmacêutico, influenciou avanços científicos e tecnológicos no setor de planejamento de fármacos (MARINHO; SEIDL; LONGO, W. P., 2008). Junto ao surgimento dos primeiros computadores, se arquitetaram técnicas virtuais na química teórica. Com isso, surgiram diversos bancos de dados, por exemplo, o *Protein Data Bank* (PDB), usado para arquivar estruturas proteicas já descobertas, o PDB possibilitou o acesso de informações para embasar o desenvolvimento de vários fármacos (VERLI, 2014).

Desde esse momento, as indústrias farmacêuticas vêm acompanhando uma tendência tecnológica, usando metodologias como as de modelagem molecular para descobrir novos candidatos a fármacos e também aperfeiçoar outros já existentes na indústria (MILLER, 2012; VERLI, 2014). A modelagem molecular se expressa através da construção e manuseio de sistemas biomoleculares e busca realizar simulações similares aos sistemas reais, relacionando experimento, simulação e teoria (Figura 9), essas metodologias usam de um conjunto de cálculos, química teórica, modelos matemáticos e a computação gráfica para fazer o manuseio dos modelos obtidos (BIELSKA et al., 2011; MILLER, 2012). Assim, facilita a interpretação da relação entre a estrutura estudada e sua atividade biológica (BIELSKA et al., 2011). Essa área de estudo tem uma importância crucial no planejamento de fármacos, pois proporciona a análise da conformação de sistemas complexos, por exemplo, conformação e interação entre fármaco e um receptor alvo (MILLER, 2012).

**Figura 9.** Conexão entre experimento, simulação e teoria.



Fonte: Adaptado de Diehl (2017)

As metodologias usadas na modelagem molecular para estudar os sistemas biológicos, são divididas em dois grupos, Métodos Quânticos e Métodos Clássicos. No geral os Métodos Quânticos são empregados para adquirir a energia do sistema em estudo por meio da resolução da equação de Schrödinger (Equação 1) (CRAMER, 2004; SANT'ANNA, 2009; VERLI, 2014).

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

Essa equação define a função de onda ( $\Psi$ ) dependente das coordenadas de todas as partículas, a equação também define o termo ( $E$ ) que julga a energia total do sistema sendo a soma das energias cinéticas e potenciais. Sendo que, o operador Hamiltoniano da equação é representado por ( $\hat{H}$ ).

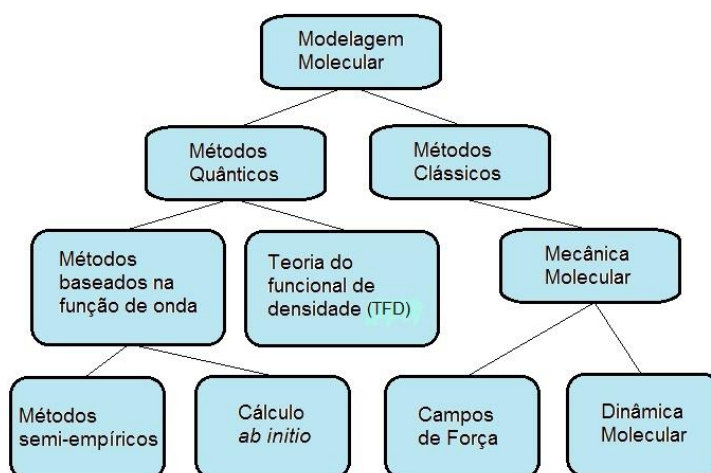
Vários níveis de aproximação são efetuados nos cálculos, dependendo das variáveis ou dados experimentais adicionados nos algoritmos é possível se dividir essas áreas em outros níveis. Alguns métodos consideram todos os elétrons do sistema, nesse caso o método *ab initio*, porém outros só levam em conta os elétrons de valência, como é o caso dos métodos semi-empíricos (CRAMER, 2004; VERLI, 2014). De fato, os métodos quânticos *ab initio* descrevem melhor sistemas com poucos átomos por conta da grande quantidade de equações que são utilizadas em suas construções. Dessa maneira, os métodos semi-empíricos funcionam como uma estratégia interessante e refinada para a investigação de sistemas biológicos por causa de suas parametrizações específicas e a inclusão de menos equações a serem

resolvidas, tornando o método de certa forma computacionalmente mais barato (CRAMER, 2004; SANT'ANNA, 2009; VERLI, 2014).

Já os Métodos Clássicos são tratados baseados nas Leis da Física Clássica de Isaac Newton, isto é, desconsiderando a quantização da energia. Por meio das equações dessa lei é possível obter uma trajetória do sistema em função do tempo. De maneira que, essa trajetória possui diversas propriedades, como as propriedades termodinâmicas, calculadas através das ferramentas da Mecânica Estatística (CRAMER, 2004; VERLI, 2014).

Uma das estratégias mais utilizadas e classificada como método de simulação Clássica, é a Dinâmica Molecular (DM). Na DM o sistema é descrito por meio de um campo de força e as equações são integradas em função de um intervalo tempo, podendo assim ser obtido o movimento das partículas em função desse mesmo tempo, além da obtenção das propriedades termodinâmicas (CRAMER, 2004; VERLI, 2014). A Figura 10 demonstra como se distribuem as áreas e algumas subáreas dentro da modelagem molecular.

**Figura 10.** Subáreas da modelagem molecular.



Fonte: Adaptado de Campos (2013).

Ao estudar a interação de um fármaco e o receptor percebe-se uma energia de interação que provém da estrutura química dos grupos funcionais da molécula bioativa, bem como, da conformação tridimensional destes grupos (ANDREI et al., 2012). Dessa forma, decidir entre o método clássico ou quântico depende do sistema biológico que se está estudando, assim como, dos resultados que se pretende obter. Outro fator relevante na Química Teórica é o custo computacional, o maquinário deve satisfazer o método a ser trabalhado (SANT'ANNA, 2009).

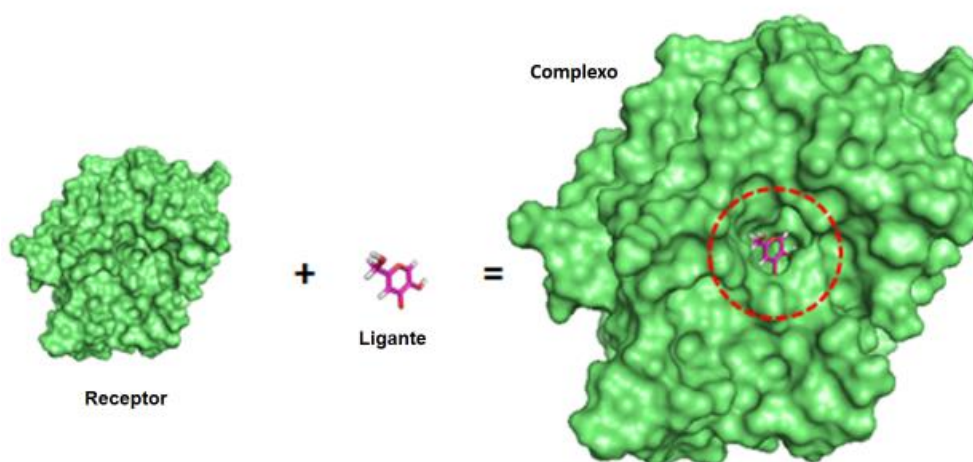


### 3.5.1. Docagem Molecular

O método de docagem molecular ou ancoragem molecular (do inglês, *molecular docking*) está baseado no modelo chave-fechadura, proposto por Emil Fischer em 1894 (VERLI, 2014). Essa técnica objetiva prever o modo de ligação e propriedades do reconhecimento molecular receptor-ligante (Figura 11), isso permite obter estimativas de interações entre o receptor e o ligante, antes mesmo que esses sejam sintetizados. A grande vantagem é que, os custos computacionais da docagem molecular são bem inferiores, em comparação aos custos laboratoriais usados para sintetizar e testar farmacologicamente várias substâncias (TAYLOR; JEWsbury; ESSEX, 2002; VERLI, 2014; YURIEV; RAMSLAND, 2013). Esses resultados auxiliam estudos de novas moléculas e direcionam a síntese de compostos e derivados (TAYLOR; JEWsbury; ESSEX, 2002; YURIEV; RAMSLAND, 2013).

A Docagem molecular tem sido amplamente utilizada para selecionar compostos que servem para serem designados como possíveis fármacos e eliminar os candidatos não promissores, ainda se pode presumir possíveis moléculas que possuiriam uma afinidade maior com o sítio de ligação do receptor (TAYLOR; JEWsbury; ESSEX, 2002; VERLI, 2014; YURIEV; RAMSLAND, 2013).

**Figura 11.** Ilustração representando a docagem molecular predizendo o modo de ligação de uma molécula ligante e seu possível receptor.



Os principais tipos de interações entre o ligante e o receptor acontecem através de forças intermoleculares do tipo dipolo-dipolo induzido e permanente (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; VERLI, 2014). Dentre as forças dipolo-dipolo permanente as mais comuns nesses sistemas são as ligações de hidrogênio, as dipolo-dipolo induzidos

são geralmente forças de Van Der Waals ou London. (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; VERLI, 2014; YURIEV; RAMSLAND, 2013). Além disso, o procedimento para o reconhecimento receptor-ligante é guiado por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos (VERLI, 2014).

As cristalografias ainda podem ser analisadas por meio da redocagem, que é um procedimento para se obter a posição da cristalografia do ligante em estudo, é um método fundamental de validação para estruturas cristalográficas submetidas à docagem, que determina se o algoritmo usado na simulação é capaz de recuperar a posição cristalográfica através simulação computacional (FRIESNER et al., 2004). Entre os softwares disponíveis para cálculos de docagem molecular estão várias alternativas, comerciais e gratuitos, como AutoDock 4 (MORRIS et al., 1998), AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009), DockThor (ALMEIDA, 2011), Molegro Virtual Docker (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) e entre outros.

#### 3.5.1.1. Função de Pontuação *MolDock*

Os cálculos para uma docagem molecular são baseados em funções de pontuação, como exemplo, a função de pontuação *MolDock* implementada no programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O *MolDock* é baseado em uma aproximação da energia de interação entre o ligante e o seu receptor. Por meio das coordenadas atômicas do ligante, da proteína e em alguns casos também coordenadas de co-fatores e águas importantes para o sistema, é possível calcular a pontuação para os sistemas. Na docagem molecular, o valor da função de pontuação *MolDock* é obtida para cada conformação possível da molécula ligante no sítio do seu receptor. E esse valor da função de pontuação é usada como um dos preceitos para selecionar as melhores conformações. A função citada aqui pode ser definida de acordo com a (Equação 2). Na qual,  $E_{score}$  representa a própria função de pontuação *MolDock*,  $E_{inter}$  representa a energia de interação intermolecular (receptor e ligante) e  $E_{intra}$  é a energia intramolecular presente no ligante.

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (2)$$

Na Equação 3 observa-se a descrição da equação que define a pontuação das interações intermoleculares entre receptor e a molécula ligante.

$$E_{inter} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \left( E_{PLP}(r_{ij}) + 332 \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \quad (3)$$

Nas somatórias são considerados todos os átomos diferentes de hidrogênio, isso inclui cofatores. N e M são os números de átomos do ligante e do receptor, respectivamente. A expressão,  $E_{PLP}$  representa o termo de energia *piecewise linear potential*. 332 é usado para fixar as unidades de energias eletrostáticas em Kcal/mol. Os termos,  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas dos átomos  $i$  e  $j$ , respectivamente. Por fim, a distância interatômica entre os átomos  $i$  e  $j$  é representada por  $r_{ij}$ .

A equação 4, representa a descrição da equação que define a pontuação das interações intramoleculares.

$$E_{intra} = \sum_{i \in lig} \sum_{j \in lig} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{lig \text{ flexíveis}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad (4)$$

Onde, a somatória dupla indica que a soma é realizada para todos pares de átomos do ligante, que estejam a mais de duas ligações de distância. O segundo termo da equação é um termo de energia torcional, parametrizados de acordo com os tipos de hibridação dos átomos ligados.  $\theta$  é o ângulo de torção da ligação.  $E_{clash}$  atribui uma penalidade de 1000 se a distância entre os dois átomos for menor que 2Å, assim ele pune conformações quimicamente inviáveis.

Já que para esta metodologia, um dos critérios principais de avaliação para eleger o melhor complexo, é a conformação mais próxima da estrutura cristalográfica em estudo, tomada como referência (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Torna-se necessário estabelecer um método que avalie a distância entre as estruturas elegida pela função de pontuação e a estrutura cristalográfica.

### 3.5.2. Desvio Médio Quadrático

Na Modelagem Molecular, o Desvio Médio Quadrático, do inglês, *Root Mean Square Deviation* (RMSD) é a medida dos desvios entre os átomos de uma estrutura, geralmente da cristalografia em relação as estruturas sobrepostas, no entanto, o cálculo do RMSD pode ser aplicado a outras moléculas não proteicas, como pequenas moléculas orgânicas, tendo como exemplo, moléculas inibidoras e substratos naturais

(RASCHKA, 2014). Sendo assim, esse método é amplamente utilizado para a análise de metodologias de Modelagem Molecular, como os cálculos de docagem molecular.

Em outras palavras, o RMSD consegue estimativas dos desvios da estrutura obtida nos cálculos em relação a sua estrutura de referência. Para uma redocagem considerada satisfatória, as conformações geradas como resultado devem apresentar um valor nos desvios (RMSD) inferior a 2,0 Å, sendo que, quanto mais próximo de zero o valor do RMSD for, melhor se torna o resultado (FRIESNER et al., 2004). Por outra forma, quanto mais próximo de zero for esse valor de RMSD, mais próximo à conformação obtida nos cálculos conseguiu chegar da sua referência. Nesse caso, considera-se que o método utilizado foi validado, pois os resultados corresponderam aos resultados experimentais.

### 3.5.3. Dinâmica Molecular

Simulação por Dinâmica Molecular (DM) é uma das metodologias da Química teórica mais flexíveis para o estudo de sistemas biológicos (ALONSO; BLIZNYUK; GREARY, 2006; HANSSON; OOSTENBRINK; GUNSTEREN, 2002; KARPLUS, 2002). De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a dinâmica molecular é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula, de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton, ou seja, a DM faz a descrição da variação do comportamento de uma estrutura em função de um intervalo de tempo (VERLI, 2014).

O detalhamento proposto pela DM, para algumas moléculas estudadas ou grupo de moléculas, fundamenta-se na solução da 2ª Lei de Newton (Equação 5).

$$F_{xi} = \frac{d^2x_i}{dt^2} m_i = \frac{\Delta v_i}{\Delta t} m_i = a_i m_i \quad (5)$$

Onde  $F_{xi}$  é a força aplicada ao átomo  $i$  na posição  $x$ ,  $t$  representa o tempo,  $v$  é a velocidade e  $a_i$  a aceleração do átomo  $i$ . Por ser baseada na física desenvolvida por Newton, a DM está no grupo dos métodos denominados Clássicos (métodos de mecânica molecular) (VERLI, 2014).

Dessa forma, a DM proporciona obter modelos de moléculas bastante similares a realidade biológica, visto que, pode descrever características como a flexibilidade molecular e a temperatura. Grande parte da atividade dos sistemas biológicos está associada à flexibilidade de biomoléculas, como a catálise enzimática, que vêm sendo descrita com sucesso por simulações de DM (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008; VERLI, 2014).

#### 3.5.4. Mecânica Molecular

Baseada na Mecânica Molecular, os sistemas em estudo na DM, são tratados como um grupamento de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas é conhecido como campo de força (BROOKS III; KARPLUS; PETTITT, 1988; VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990). Cada campo de força designa um conjunto de equações matemáticas direcionadas a reproduzir características do comportamento molecular, como o estiramento de ligações químicas, a deformação de um ângulo de ligação ou a torção de um diedro. Essas estratégias, por sua vez, são parametrizadas para reproduzir o comportamento dos sistemas estudados deixando-os mais próximos do sistema real (VERLI, 2014).

Matematicamente o campo de força empírico, é uma função de energia potencial, que proporciona que a energia potencial total do sistema  $V(r)$  seja calculada a partir da estrutura tridimensional (3D) do sistema. Usualmente, o  $V(r)$  é descrito como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados, como comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros e entre outros, também os termos para átomos não ligados, como interações de van der Waals e de Coulomb (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008; VERLI, 2014). Um representativo geral de um campo de força é mostrado pela Equação 6.

$$V(r) = \sum V_l + \sum V_\theta + \sum V_{vdW} + \sum V_{elet} \quad (6)$$

Onde,  $V_l$  representa energia de estiramento da ligação relacionado ao seu valor de equilíbrio (ou valor ideal),  $V_\theta$  é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor de equilíbrio,  $V_{vdW}$  representa a energia das interações de Van der

Waals e  $V_{elet}$  representa as energias de atração ou repulsão eletrostática entre duas cargas (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

A Lei de Hooke mostrada na Equação 7 e na Equação 8 é a forma padrão de representar os potenciais harmônicos, por conta das oscilações dos comprimentos e ângulos de ligação com relação aos valores de equilíbrio.

$$V_l = K_l(l - l_0)^2 \quad (7)$$

$$V_\theta = K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (8)$$

Onde,  $l$  e  $\theta$  são os comprimentos e ângulos de ligação, respectivamente,  $l_0$  e  $\theta_0$  são os correspondentes aos valores no estado de equilíbrio e  $K_l$  e  $K_\theta$  correspondem as constantes de força para a restituição aos respectivos valores de equilíbrio. A aproximação harmônica é válida só para casos que possuem pequenas distorções com relação aos valores de equilíbrio (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Os pares de átomos não ligados covalentemente ( $i, j$ ), tem sua interação descrita por potenciais compostos pelos termos de Van der Waals e eletrostáticos, representados respectivamente pelos potenciais de Lennard-Jones (potencial 6-12) (Equação 9) e de Coulomb (Equação 10).

$$V_{vdW} = 4 \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (9)$$

$$V_{elet} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (10)$$

Na Equação 9, que representa os potenciais de Lennard-Jones,  $\epsilon_{ij}$  é a profundidade do potencial entre a barreira atrativa e a repulsiva e  $\sigma_{ij}$  é a distância finita na qual o potencial interparticular é zero. Esses parâmetros são ajustados experimentalmente ou por cálculos teóricos. Já a Equação 10, que descreve as interações eletrostáticas,  $q_i$  e  $q_j$  representa a magnitude das cargas pontuais de cada

átomo,  $r_{ij}$  é a distância entre essas cargas,  $\epsilon_0$  corresponde à permissividade do espaço livre e  $\epsilon_r$  representa a constante dielétrica relativa do meio (LENNARD-JONES, 1924; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Os conjuntos de parâmetros dos diversos campos de força existentes são bem específicos e todos foram criados de maneira independente. Alguns campos de força adicionam termos diversificados para descrever especificamente as ligações de hidrogênio ou para acoplar oscilações entre ângulos e comprimentos de ligação, para tentar obter uma melhor concordância com espectros vibracionais (BROOKS III; KARPLUS; PETTITT, 1988; VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

A credibilidade dos resultados de uma DM é dependente da elaboração de um campo de força com parâmetros bem definidos. Portanto, escolher um campo de força é um passo crucial, porém, o tipo de campo de força depende do sistema a ser estudado e das propriedades que serão investigadas (MORGON; COUTINHO, 2007). Para sistemas biomoleculares, por exemplo, os campos de força mais utilizados são CHARMM (III; KARPLUS; AUSTIN, 1990), GROMOS (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987), AMBER (WEINER et al., 1986), OPLS (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996), OPLS-AA (ROBERTSON; TIRADO-RIVES; JORGENSEN, 2015), CVFF (HAGLER; HULER; LIFSON, 1974) (HAGLER; HULER; LIFSON, 1974) e entre outros.

### 3.5.5. Modelo *Dummy Atom*

As simulações de DM são normalmente usadas para investigar informação estrutural, interações e outras propriedades de sistemas bioquímicos, isso inclui sistemas com metal-proteínas, como a enzima TYR. Entretanto, os campos de força mais utilizados não possuem parâmetros apropriados para íons metálicos, apresentando um obstáculo relevante para estudos de DM envolvendo metal-proteínas. Já foram desenvolvidos vários métodos para descrever as interações entre íons metálicos e os resíduos circundantes em simulações clássicas de DM. Entre esses métodos estão a representação de íons metálicos como esferas simples de Van der Waals (TORRAS; ALEMÁN, 2013), modelos *dummy atoms* (AQVIST; WARSHEL, 1989; LIAO; KAMERLIN; STRODEL, 2015; OELSCHLAEGER et al., 2007; PANG, 1999; SAXENA; SEPT, 2013) e os chamados modelos ligados, onde ligações artificiais entre íons metálicos e as moléculas circundantes são introduzidas

(HANCOCK, 1990; LIN; WANG, 2010). Cada um desses métodos citados tem seus próprios méritos e também suas limitações.

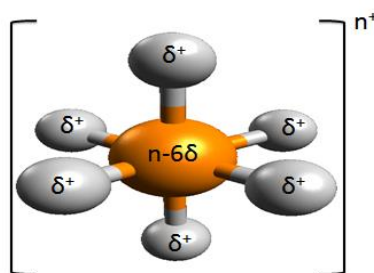
A DM realizada usando modelos de íons metálicos como esferas simples de Van der Waals é muitas vezes bem sucedida para a descrição de íons alcalinos e alcalino terrosos, porém esse modelo parece ser inadequado quando se trata de situações mais complexas, como sistemas que possuem centros de metais multinucleares, ou para o tratamento de metais de transição. Os modelos ligados, por outro lado, sofrem com o fato de incluírem “ligações covalentes artificiais” predefinidas entre o metal e as moléculas circundantes com que o metal interage, o que não permite a troca de interação que o íon pode vim a realizar ou a conversão entre diferentes geometrias de coordenação do metal (LIAO; KAMERLIN; STRODEL, 2015).

A abordagem do modelo *dummy atoms* busca solucionar os problemas acima mencionados, fornecendo uma descrição que compreende efeitos estruturais e eletrostáticos, o modelo inclui átomos “falsos” cercando o íon metálico (LIAO; KAMERLIN; STRODEL, 2015). Existem diversos estudos que demonstram *dummy atoms* para as geometrias bipiramidais, tetradrédicas, octaédricas ou pentagonais para  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  (AQVIST; WARSHEL, 1989; LIAO; KAMERLIN; STRODEL, 2015; OELSCHLAEGER et al., 2007; PANG, 1999; SAXENA; SEPT, 2013).

Analisando o modelo *dummy atoms* octaédrico (Figura 12) proposto por Åqvist e Warshel, em 1989. Trata-se de um *dummy atom* que contém seis átomos “falsos” com parâmetros de Van der Waals negligenciáveis e carga positiva ( $\delta^+$ ), que são colocados em torno de um íon metálico central (n) com uma carga de  $(n-6\delta)$ . Essa distribuição de carga é particularmente favorável em sistemas multinucleares (OELSCHLAEGER et al., 2007), pois a redistribuição de cargas reduz a repulsão excessiva entre os centros metálicos. Vale ressaltar que, os átomos “falsos” estão ligados e angulados ao átomo metálico central, mas não existem ligações com moléculas circundantes ao modelo *dummy atom*.



**Figura 12.** Ilustração do modelo *dummy atoms* octaédrico de Aqvist e Warshel (1989).



Fonte: Kamerlin et al (2015).

Nenhum modelo de *dummy atoms* tinha sido desenvolvido para o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , provavelmente devido à distorção Jahn-Teller do  $\text{Cu}^{2+}$  na água. No entanto, Kamerlin e colaboradores, em 2015, propuseram um modelo *dummy* para o íon  $\text{Cu}^{2+}$  que inclui o efeito Jahn-Teller, facilitando estudos de simulações de proteínas que contém íons cobre em sua composição. A principal vantagem desse modelo é que ele permite reproduzir as propriedades de coordenação corretas do metal, sem precisar de cálculos quânticos (ALÍ-TORRES et al., 2015). Isso permite o uso desse modelo *dummy atom* de cobre em simulações baseadas em mecânica molecular, como a DM.

### 3.5.6. Energia livre de ligação (ELL): Método *linear interaction energy* (LIE)

Obter estimativas de forma precisa para a ELL de um sistema inclui um custo computacional elevado na maioria das vezes, no entanto, várias abordagens para este problema foram desenvolvidas, que vão desde estimativas rápidas usando funções de pontuação empírica até alternativas baseadas em cálculos de campo de força (GOODFORD, 1985; KRYSTEK; STOUCHE; NOVOTNY, 1993; MENG; SHOICHET; KUNTZ, 1992). Nesse segmento, estudos provaram que estimativas de ELL podem ser obtidas por meio de médias de energia de simulação de DM, mediante a resposta linear para interações eletrostáticas, juntamente com uma expressão empírica para efeitos não polares (AQVIST; MOWBRAY, 1995; HANSSON; ÅQVIST, 1995; HULTÉN et al., 1997). Esse método para calcular a ELL é denominado pela sigla LIE do inglês *linear interaction energy* (AQVIST; MEDINA; SAMUELSSON, 1994). O LIE além de sua simplicidade apresenta algumas vantagens em comparações a outros métodos, para esse tipo de cálculo se tem uma redução considerável do sistema simulado comparado a outros métodos, como *free energy perturbation* (FEP) (BEVERIDGE;

DICAPUA, 1989; KOLLMAN, 1993) e *empirical valence bond* (EVB) (AQVIST; MEDINA; SAMUELSSON, 1994; ÅQVIST; WARSHEL, 1993). No LIE o sistema é solvatado por meio de modelo de água explícita e ainda possibilita calcular valores absolutos da energia de ligação em um curto tempo de simulação, na ordem de uma dezena de nanosegundos (ns) (AQVIST; MEDINA; SAMUELSSON, 1994; AQVIST; MOWBRAY, 1995; HANSSON; ÅQVIST, 1995).

Em conceitos gerais, o LIE é caracterizado por obter a média térmica das conformações do sistema simulado, ao contrário do FEP não são necessários processos de transformações envolvendo estados não físicos, também o LIE não se limita aos cálculos de energia livre relativa, porém é baseado na estimativa das energias de ligação absoluta (MARELIUS et al., 1998). No geral, o LIE é mais lento do que a pontuação de conformações únicas, porém bem mais rápido do que os cálculos de FEP rigorosos e alguns métodos baseados na simplificações de FEP (MARELIUS et al., 1998).

Como já citado, o LIE julga que a ELL pode ser separada em dois tipos de contribuições, polares e não polares (AQVIST; MEDINA; SAMUELSSON, 1994; MARELIUS et al., 1998). Essas contribuições variam linearmente em conformidade com as médias termodinâmicas, adquiridas pelas simulações de DM, através das interações eletrostáticas e de interações de Van der Waals. Para a obtenção das médias termodinâmicas, o método julga a DM do receptor complexado ao seu respectivo ligante e a simulação de DM do ligante livre em solvente (MARELIUS et al., 1998). Dessa forma, por meio da variação nos potenciais médios das interações eletrostáticas e de Van Der Waals do ligante, no estado complexado e no estado livre em solução, a ELL ( $\Delta G_{lig}$ ) pode ser estimada por meio da Equação 11.

$$\Delta G_{lig} = \alpha(\langle V_{vdW} \rangle_{complexo} - \langle V_{vdW} \rangle_{livre}) + \beta(\langle V_{elet} \rangle_{complexo} - \langle V_{elet} \rangle_{livre}) \quad (11)$$

Na qual,  $\langle V_{vdW} \rangle$  e  $\langle V_{elet} \rangle$  representam as médias termodinâmicas dos potenciais de interações de Van Der Waals e eletrostáticas do ligante, respectivamente, tanto no estado complexado como também no estado livre (quando o ligante está sozinho em solução). Os potenciais das interações não ligadas são calculados diretamente das configurações microscópicas dos sistemas gerados através das simulações de DM.

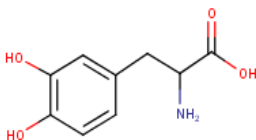
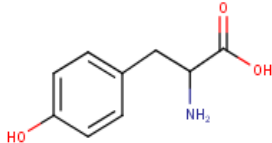
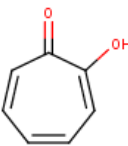
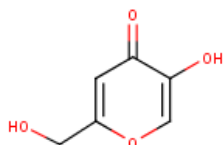
Os parâmetros empíricos  $\alpha$  e  $\beta$  simbolizam as contribuições não polares e polares respectivamente, frequentemente utilizado para ajustar a equação de acordo com resultados de ELL de moléculas similares obtidos de dados experimentais, esses parâmetros variam de acordo com a estrutura química do ligante em estudo (MARELIUS et al., 1998).

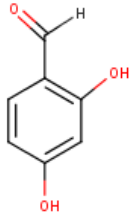
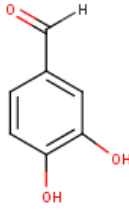
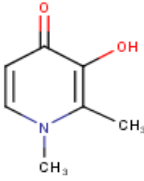
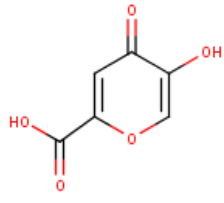
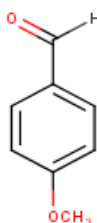
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Construção dos Modelos

Inicialmente, as estruturas cristalográficas da TYR foram extraídas do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), com os códigos 4P6R, 4P6S e 5I38. Posteriormente, para se realizar a docagem molecular, as estruturas cristalográficas foram preparadas usando o Software UCSF Chimera 2.0 (PETTERSEN et al., 2004). As moléculas ligantes L-Tirosina, L-Dopa, AK e o restante dos inibidores, a princípio foram, construídas no software MarvinSketch (CHEMAXON, [s.d.]) e otimizados no programa Gaussian09 (FRISCH et al., 2009), através do método semi-empírico *Parametric Method 6* (PM6) (STEWART, 2007). A Tabela 1 mostra informações gerais sobre as moléculas ligantes investigadas neste trabalho. O valor da constante de inibição ( $K_i$ ) para os inibidores e constante de dissociação ( $K_d$ ) para o substrato L-Tirosina, foram obtidos através das literaturas (DERI et al., 2016; KUBO et al., 2003; LIMA et al., 2014; MAGHSOUDI et al., 2013).

**Tabela 1.** Moléculas ligantes estudadas nesse trabalho e suas respectivas informações

Moléculas ligantes	Nomenclatura IUPAC	Estrutura 2D	-
L-Dopa	Ácido (S)-2-amino-3-(3,4-dihidróxifenil) propanóico		-
L-Tirosina	Ácido (S)-2-amino-3-(4-hidroxifenil) -propanóico		$K_d = 0,1 \mu\text{M}$
Tropolona	2-Hidroxi-2,4,6-cicloheptatrieno-1-ona		$K_i = 0,8 \mu\text{M}$
Ácido Kójico	5-Hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona		$K_i = 3,5 \mu\text{M}$

MOL1	2,4-di-hidroxibenzaldeído		Ki= 41,55 $\mu$ M
MOL2	3,4-di-hidroxibenzaldeído		Ki= 52,96 $\mu$ M
MOL3	3-hidroxi-1,2-dimetil-4 (1H)-piridona		Ki= 64 $\mu$ M
MOL4	Ácido 5-hidroxi-4-oxo-4H-pirano-2-carboxílico		Ki= 145 $\mu$ M
MOL5	4-metoxibenzaldeído		Ki= 376 $\mu$ M

## 4.2. Cálculos de Docagem Molecular

Entre os softwares disponíveis para cálculos de docagem molecular estão várias alternativas, comerciais e gratuitas, como AutoDock 4 (MORRIS et al., 1998), AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009), DockThor (ALMEIDA, 2011), Molegro Virtual Docker (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) e entre outros. Para as simulações desse trabalho usou-se o software MVD 5.0, pelo fato de o MVD em estudos anteriores já demonstrar bons resultados para sistemas com a enzima TYR (BRASIL et al., 2017; LIMA et al., 2014). As informações das estruturas cristalográficas da TYR complexadas as moléculas ligantes (L-tirosina, L-Dopa, AK) estão expostas na Tabela 2.

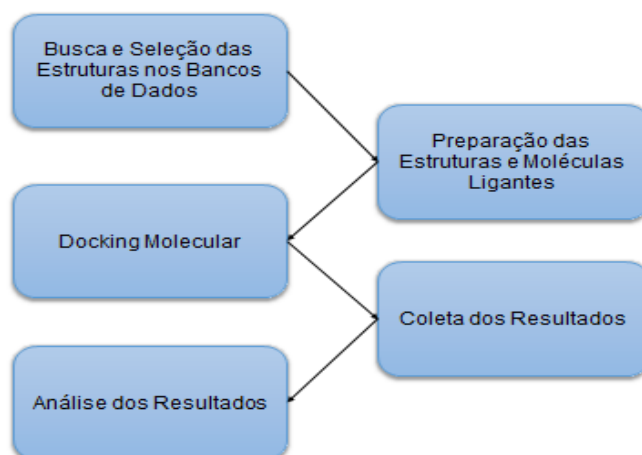
**Tabela 2.** Estruturas 3D da TYR extraídas do *Protein Data Bank* para as simulações

<b>Códigos PDB</b>	<b>Resolução</b>	<b>Organismo</b>	<b>Molécula Ligante</b>	<b>Referências</b>
4P6R	2,2 Å	<i>Bacillus megaterium</i>	L-Tirosina	(GOLDFEDER et al., 2014)
4P6S	2,2 Å	<i>Bacillus megaterium</i>	L-Dopa	(GOLDFEDER et al., 2014)
5I38	2,6 Å	<i>Bacillus megaterium</i>	Ácido Kójico	(DERI et al., 2016)

Como essas estruturas da enzima TYR fazem parte do mesmo organismo (*Bacillus megaterium*), puderam ser comparadas de forma coerente e válidas nas análises. As estruturas então foram usadas como ponto de partida para o cálculo de redocagem, o qual toma como referência a molécula ligante contida na estrutura obtida por difração de raios X, a fim de validar a estrutura, investigar o comportamento do complexo, fazer análises das interações e do modo de ligação da molécula no sítio ativo. As simulações para a redocagem molecular foram realizados por meio da função *MolDock Score*, implementada no programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Já a docagem realizada com o restante das moléculas (Tabela 1), propostas como inibidores, foi feita na estrutura com o código de PDB:5I38, pois a estrutura cristalográfica já contém um inibidor (AK) em seu sítio ativo que foi usado como referência para esse cálculo, ou seja, ancoragem desses ligantes foi realizada de forma a sobrepor o AK presente no sítio ativo da TYR, podendo se obter uma melhor comparação entre as moléculas. Uma sequência das etapas gerais seguidas para a realização da docagem molecular está ilustrada na Figura 13. Para todas as docagens realizadas neste trabalho, os átomos de cobre foram descritos como esferas com raio de Van der Waals, sendo suas contribuições mais estéricas do que eletrostáticas.

**Figura 13.** Sequência de etapas realizadas para o cálculo de docagem molecular.



### 4.3. Simulação por Dinâmica Molecular

A princípio para as simulações de DM desse trabalho, usou-se o modelo *dummy atoms* de cobre proposto por Kamerlin e seus colaboradores em 2015, para representar os íons desse metal presentes na enzima TYR. A substituição foi realizada através do Software UCSF Chimera 2.0 (PETTERSEN et al., 2004), removendo os íons cobre que estavam descritos como esferas com raio de Van der Waals e adicionando nas mesmas coordenadas os modelos de *dummy atoms*. Dessa forma, pretende-se descrever os íons  $\text{Cu}^{2+}$  presentes no sítio de ligação da enzima TYR de maneira satisfatória e coerente durante a simulação.

Os complexos obtidos após a docagem foram submetidos a simulação por DM, utilizando-se o pacote de dinâmica molecular Q (MARELIUS et al., 1998). O pacote Q é um conjunto de ferramentas para tais cálculos, adaptados para alguns tipos específicos de cálculos de energia livre, como, simulações de perturbação de energia livre (FEP) (BEVERIDGE; DICAPUA, 1989; KOLLMAN, 1993), cálculos de métodos empíricos de ligação de valência (EVB) (AQVIST; WARSHEL, 1989; ÅQVIST; WARSHEL, 1993) e cálculos de energia de interação linear, do inglês, *linear interaction energy* (LIE) (AQVIST; MEDINA; SAMUELSSON, 1994; HULTÉN et al., 1997; JONES-HERTZOG; JORGENSEN, 1997).

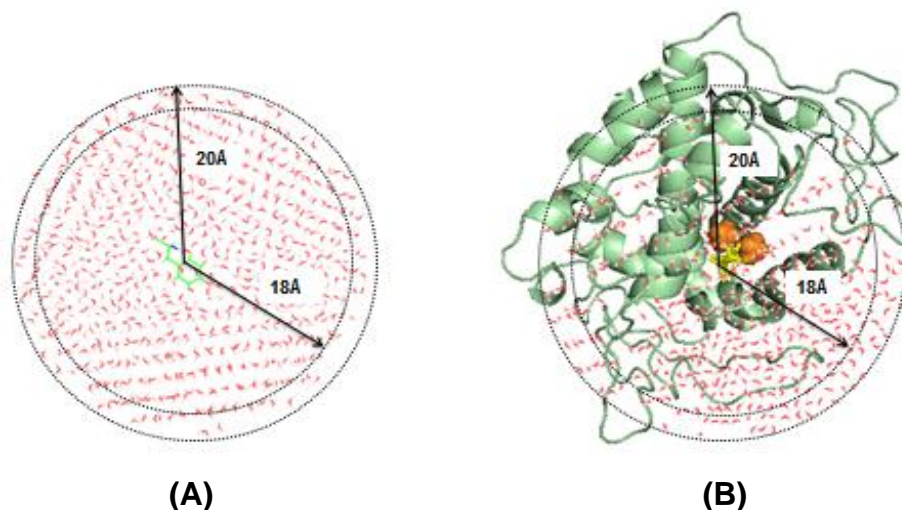
O pacote de Dinâmica Molecular Q foi planejado para funcionar com uma grande variedade na seleção de campos de força. As bibliotecas de fragmentos e os parâmetros do campo de força para AMBER95 (KOLLMAN, 1993), AMBER/OPLS (JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988), OPLS-AA (ROBERTSON; TIRADO-RIVES;

JORGENSEN, 2015), CHARMM (BROOKS et al., 2009), GROMOS87 (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987) e GROMOS96 (VAN GUNSTEREN, 1996), já estão adaptados junto ao programa Q, para serem legíveis pelo mesmo. Os parâmetros selecionados para as simulações de DM aqui realizadas, foram do campo de força OPLS-AA (ROBERTSON; TIRADO-RIVES; JORGENSEN, 2015).

O pacote computacional Q realiza os cálculos de energia livres em sistemas biomoleculares solvatados em uma área esférica finita de moléculas de água explícita, a utilização de um limite esférico (BERKOWITZ; MCCAMMON, 1982; WARSHEL, 1978) possibilita limitar a região do sistema simulado, sendo assim, pode-se focar a simulação em uma região menor, como um sítio de ligação, podendo fazer um tratamento preciso de longo alcance eletrostático computacionalmente mais barato.

Usou-se então as coordenadas dos complexos obtidas por meio da docagem molecular e também coordenadas dos respectivos ligantes livres. Para assim, poder obter dois estados (ligante + solvente e complexo + solvente), necessários para o método de cálculo de ELL, selecionado nesse trabalho, ou seja, cada ligante aqui estudado foi submetido a duas simulações distintas que estão ilustradas na Figura 14.

**Figura 14.** Modo representativo dos sistemas construídos para as simulações de DM. (A) Ligante solvatado, mostrando a esfera de simulação (18 Å) e a esfera de solvente (20 Å). (B) Complexo solvatado, com esfera de simulação (18 Å) e esfera de solvente (20 Å).



Por meio do *Qprep* selecionou-se uma esfera de simulação com raio de 18 Å, com seu centro de massa na região central do ligante complexado, dessa forma o sítio de ligação, os íons cobre presentes na enzima e a molécula ligante, ficaram dentro da esfera de simulação, ou seja, da região de interesse. O mesmo centro de massa e o



mesmo raio da esfera de simulação foram usados para a simulação no segundo estado, em que é simulado somente o ligante livre no solvente.

O próximo passo foi à inserção do solvente no sistema, as moléculas de solvente foram adicionadas de forma explícita em uma região esférica com raio de 20 Å a partir do mesmo centro de massa usado para a esfera de simulação. Dessa forma, as moléculas de solvente são adicionadas 2 Å além da esfera de simulação, a fim de manter a segmentação do sistema durante a etapa de equilíbrio e também na fase de produção da DM. O parâmetro *solvent\_pack*, foi fixado em 2,3 Å, que representa a distância mínima entre as moléculas do soluto e as moléculas de água que o cercam, durante a solvatação do sistema.

Outra etapa essencial da DM é a minimização de energia. Trata-se de uma técnica que objetiva alcançar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema, chegando a um mínimo de energia local, dessa forma, diminuindo as possibilidades de colisões entre os átomos e equilibrando o sistema (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). Na sequência, o sistema pode ser aquecido de forma gradual, até se alcançar a temperatura desejada, atribuindo a velocidade inicial de todas as partículas (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). Os sistemas aqui estudados foram minimizados inicialmente com uma restrição  $100 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$  nos átomos do soluto, dessa forma, o solvente do sistema ficou mais livre para se adequar ao redor do soluto chegando a um mínimo de energia local. Simultaneamente, os sistemas foram gradualmente sendo aquecidos até alcançarem a temperatura de 310 K, à medida que os sistemas eram equilibrados diminuía-se a força das restrições deixando o sistema o mais livre possível para a etapa de produções da DM.

Essa etapa inicial de uma simulação de DM é denominada de etapa de equilibração, ela pode variar dependendo do sistema em estudo, e termina quando se chega a um equilíbrio termodinâmico do sistema. Então se pode iniciar a produção das trajetórias, que ajudam a calcular diversas propriedades do sistema. As produções das trajetórias dos sistemas desse trabalho foram calculadas durante 10 ns contendo 20 000 *frames* no total.

#### **4.4. Energia Livre de Ligação: Método LIE**

Os valores de ELL experimentais para os inibidores, foram calculados a partir do seu  $K_i$ , já para o substrato L-Tirosina foi calculada a partir do seu  $K_d$ , para o substrato L-Dopa não se conseguiu dados experimentais até o momento. Por fim, as

estimativas de ELL experimental foram relacionadas ao  $K_i$  e calculadas através da Equação 12.

$$\Delta G_{exp} = -RT \ln \left( \frac{1}{K_i} \right) \quad (12)$$

Para se obter estimativa de ELL teóricas, aplicou-se o método LIE. A escolha dos intervalos das simulações da DM utilizadas para o cálculo teórico, foi baseada nos gráficos de RMSD gerados na DM e a partir das análises feitas sobre cada estimativa de valor médio gerado nos pontos da simulação, médias essas de Van Der Waals e eletrostáticas. Os parâmetros empíricos  $\alpha$  e  $\beta$ , foram determinados por meio de uma regressão múltipla calculada através do software GNUPLOT 5.0, essa regressão múltipla relacionou os valores obtidos das estimativas médias de energias de Van Der Waals, eletrostáticas na DM e os valores de energias experimentais calculados, a ponto de comparação também usou-se valores de parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$  extraídos diretamente da literatura (HANSSON; MARELIUS; ÅQVIST, 1998).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No planejamento teórico de fármacos e na Química medicinal, o conhecimento completo da estrutura molecular é essencial, estas áreas de estudo buscam investigar os comportamentos moleculares e atividade biológica dos fármacos, determinando os parâmetros que relacionam estrutura e atividade, aplicando estes fundamentos no planejamento dos fármacos (COHEN et al., 1990). Parâmetros como modo de ligação, tipos de interações e energia livre de ligação de uma molécula em seu alvo e entre outros, são essenciais para o planejamento de compostos bioativos.

### 5.1. Docagem Molecular

Através da metodologia de redocagem aplicada nos sistemas cristalográficos em estudo nesse trabalho (5I38, 4P6R, 4P6S) foi possível obter a sobreposição das estruturas, assim como, informações sobre as principais interações que ocorrem entre as moléculas ligantes e os resíduos que influenciam na atividade ou inibição da enzima TYR. Como critério de avaliação para eleger as melhores conformações dos ligantes no sítio da enzima, foram usados os valores de pontuação *MolDock Score* e os valores de RMSD, ambos extraídos após o cálculo de redocagem realizado no programa MVD.

Os valores de pontuação *MolDock Score* para a melhor conformação obtida na redocagem de cada sistema estão ilustradas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valor da pontuação dos ligantes e RMSD obtidas pela redocagem

<b>Molécula Ligante</b>	<b>MolDock Score (Kcal/mol)</b>	<b>RMSD (Å)</b>
L-Tirosina	-89,77	0,22
L-Dopa	-90,25	0,29
Ácido Kójico	-69,26	0,31

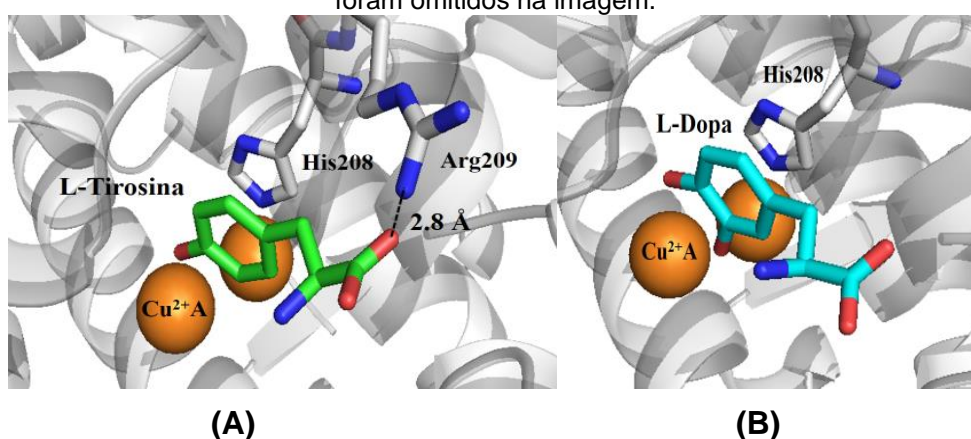
O *MolDock Score* é uma função de aproximação da energia de interação entre a molécula ligante e o seu receptor, ou seja, o valor mais negativo teoricamente é o que satisfaz o melhor modo de ligação, por isso, selecionou-se as conformações de menor valor *MolDock Score* para cada sistema. A pontuação das moléculas se mostra

coerente no sentido de que os substratos apresentaram um valor menor do que o inibidor AK, ou seja, possuem uma afinidade maior pelo sítio ativo da TYR.

A redocagem realizada nos sistemas com os substratos da enzima TYR (L-Tirosina e L-Dopa) e AK, alcançaram a sobreposição das estruturas do cristal como mostrado nos valores de RMSD próximos de zero na Tabela 3. No sistema possuindo o substrato L-tirosina o grupo carbonila desse ligante interage por ligação de hidrogênio com o resíduo Arg209 com uma distância de 2,8 Å, o grupamento hidroxila presente no anel da L-tirosina é direcionado para o  $\text{Cu}^{2+}$ A e o anel da L-tirosina é orientado por interações hidrofóbicas  $\pi$ - $\pi$  com o anel do resíduo His208 (Figura 15), essas interações obtidas estão coerentes com a literatura (CLAUS; DECKER, 2006; DEETH; DIEDRICH, 2010; GOLDFEDER et al., 2014).

Para os cálculos com L-Dopa, estudos anteriores propuseram que esse difenol, é orientado em direção ao  $\text{Cu}^{2+}$ B (MUÑOZ-MUÑOZ et al., 2012; RAMSDEN; RILEY, 2014), dessa forma, correlacionando cada atividade da enzima com um íon diferente. No entanto, a redocagem aqui realizada obteve concordância com a cristalografia de (GOLDFEDER et al., 2014), contradizendo os estudos anteriores (MUÑOZ-MUÑOZ et al., 2012; RAMSDEN; RILEY, 2014). Observou-se nos resultados obtidos, que o difenol está direcionado para o íon  $\text{Cu}^{2+}$ A auxiliado pela interação com o resíduo His208 em uma orientação parecida com o substrato L-tirosina (Figura 15).

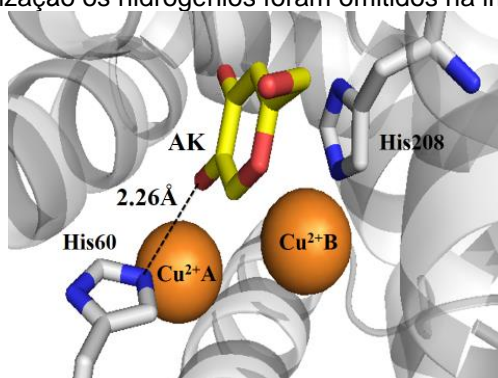
**Figura 15.** (A) Modo de ligação da L-Tirosina no sítio ativo da TYR. (B) Modo de ligação L-Dopa no sítio ativo da TYR. Ambos obtidos por redocagem molecular. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.



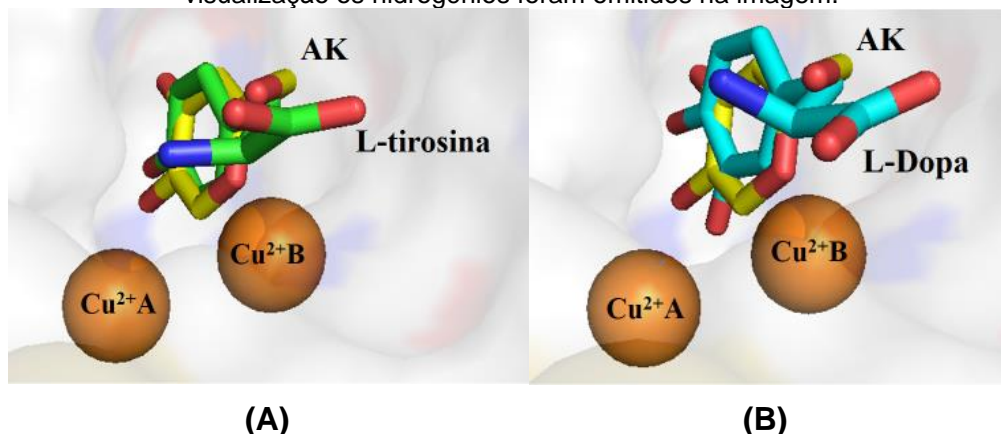
O sistema com AK no sítio ativo da TYR, se mostrou estabilizado por interações  $\pi$ - $\pi$  com o anel do resíduo His208 similarmente como visto nos substratos aqui apresentados, concordando com os estudos (DERI et al., 2016; GOLDFEDER et al., 2014). O grupamento hidroxila do anel de AK ficou orientado em direção ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ A

com uma distância de 3,58 Å, enquanto o grupo carbonila do anel do AK ficou a uma distância de 5,8 Å do mesmo íon, essas distâncias concordam com estudos antecedentes (LIMA et al., 2014), porém contrariam outros trabalhos (NOH et al., 2009; SENDOVSKI et al., 2011). Ainda se observou uma ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila do AK e o resíduo His60 com uma distância de 2,26 Å. O modo de ligação do AK no sítio ativo da TYR pode ser visto na Figura 16.

**Figura 16.** Modo de ligação de AK no sítio ativo, obtidos por redocagem molecular. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.



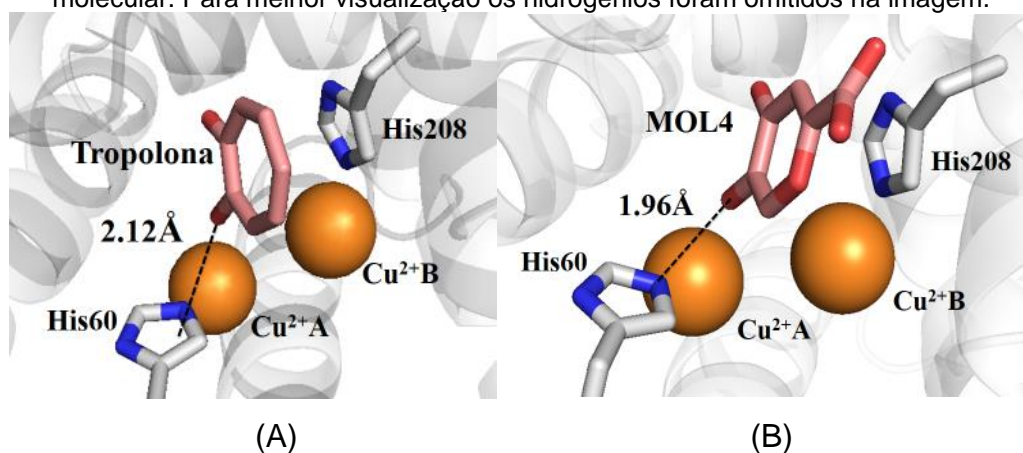
**Figura 17.** (A) Sobreposição entre AK e L-tirosina. (B) Sobreposição entre AK e L-Dopa. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.



Além disso, ainda é possível visualizar as sobreposições entre as moléculas ligantes, dessa forma, se pode comparar a orientação e o modo de ligação de cada uma delas dentro do sítio ativo da enzima TYR, como mostrado na Figura 17. A L-Tirosina, L-Dopa e AK apresentam um modo de ligação parecido quando estão orientados dentro do sítio ativo da enzima TYR. Como os resultados obtidos na redocagem realizada aqui validaram o modo de ligação das estruturas cristalográficas e se mostram coerentes com resultados experimentais, usou-se a estrutura de código do PDB: 5I38, a qual apresenta em seu sítio ativo a molécula de AK ancorada, para a realização da docagem molecular das outras moléculas ligantes propostas como inibidoras de TYR nesse trabalho.

A docagem para o restante das moléculas apresentaram modo de ligação e pontuação mais aproximados ao inibidor AK do que para os substratos, os valores de pontuação estão mostrados na Tabela 4. Percebeu-se que a interação  $\pi$ - $\pi$  com o anel do resíduo His208 (presente no sítio ativo da TYR), que ocorre com AK (e também nos substratos), é conservada no modo de ligação de todos os inibidores aqui estudados, de acordo com os resultados obtidos na docagem dos mesmos. Percebeu-se também ligações de hidrogênio das moléculas ligantes com resíduos importantes do sítio ativo da TYR, como entre a hidroxila da Tropolona e o nitrogênio do anel do resíduo His60 (Figura 18) e também a hidroxila do MOL4 com o mesmo resíduo (His60) (Figura 18). Essas interações também são percebidas quando o AK está ancorado no sítio ativo.

**Figura 18.** (A) Modo de ligação da Tropolona. (B) Modo de ligação de MOL4. Obtidos por docagem molecular. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.



**Tabela 4.** Pontuação *MolDock Score* obtidas por docagem molecular

<b>Moléculas Ligantes</b>	<b>MolDock Score (Kcal/mol)</b>
Tropolona	-70,43
MOL1	-71,69
MOL2	-68,43
MOL3	-58,60
MOL4	-72,49
MOL5	-67,37

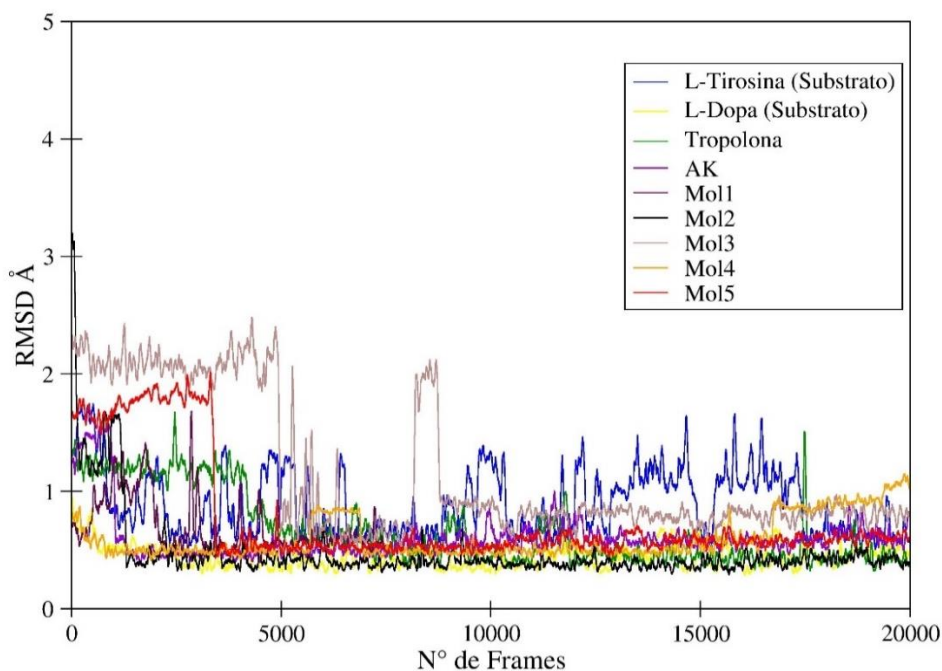
Em vista disso, com a análise destes cálculos se declarou que o recurso de docagem molecular utilizado aqui se mostrou válido, permitindo estender o estudo desses sistemas para outras análises e metodologias da Química teórica. Posteriormente ao estudo de docagem, foram realizadas simulações de DM, a fim de analisar o comportamento desses sistemas e observar a nível molecular as contribuições de cada interação com o sítio ativo e a sua relação com as atividades enzimáticas da TYR.

## **5.2. Análise das Simulações por Dinâmica Molecular**

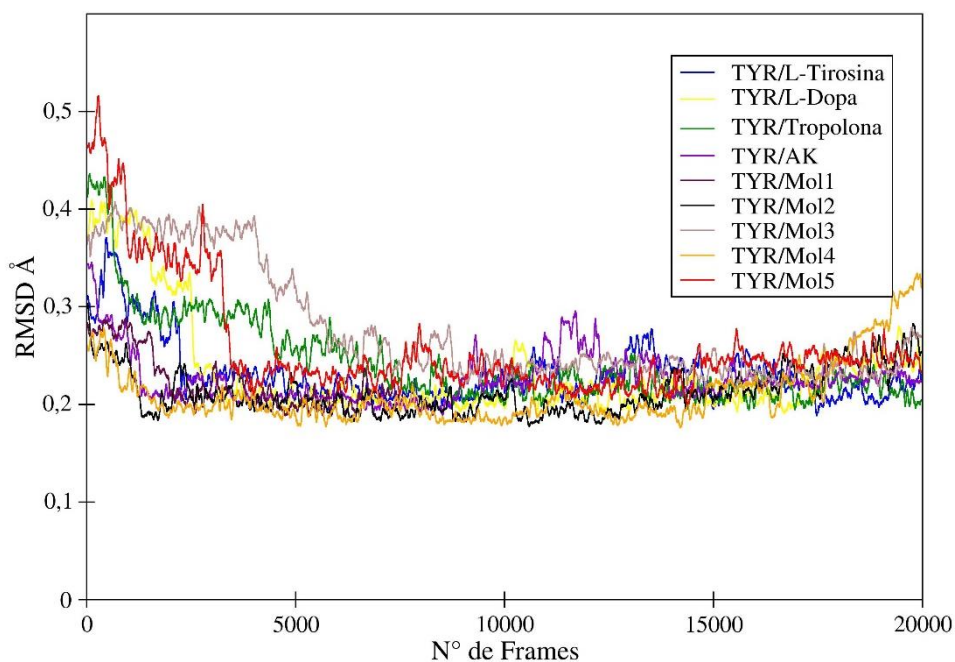
As simulações de DM, que são fundamentadas na mecânica molecular possibilitaram gerar várias conformações ao longo do tempo de 10 ns (20 mil frames), para cada sistema estudado até aqui neste trabalho. Para analisar essas conformações durante esse intervalo de tempo, gerou-se o gráfico de RMSD, fazendo comparações entre os desvios dos ligantes quando estão presentes no sítio da enzima TYR e os desvios dos resíduos da enzima TYR quando recebe os ligantes em seu sítio ativo. O gráfico de RMSD ilustra as movimentações das estruturas ao longo da trajetória, delineando desvios na conformação do sistema e fazendo a média dos mesmos.

A Figura 19 mostra o gráfico RMSD para as estruturas dos ligantes quando estão complexados ao sítio da enzima TYR, já a Figura 20 expõe os desvios na conformação da enzima TYR ao receber os ligantes no seu sítio ativo.

**Figura 19.** Gráfico de RMSD para a estrutura dos ligantes complexadas no sítio ativo da TYR.



**Figura 20.** Gráfico de RMSD para a estrutura da TYR ao receber os ligantes em seu sítio ativo.



Na Figura 19, observa-se no gráfico que as estruturas dos ligantes tendem a ser estabilizadas a partir da segunda metade da simulação, mantendo a escala do valor de RMSD abaixo de 2 Å, depois dos primeiros 10000 frames. Da mesma forma, o gráfico de RMSD da Figura 20 referente a estrutura da TYR, se apresenta mais estável a contar do frame de número 5000. Assim sendo, se deu preferência aos



intervalos de estabilidade de cada sistema analisado, para se extrair as médias a fim de calcular a ELL.

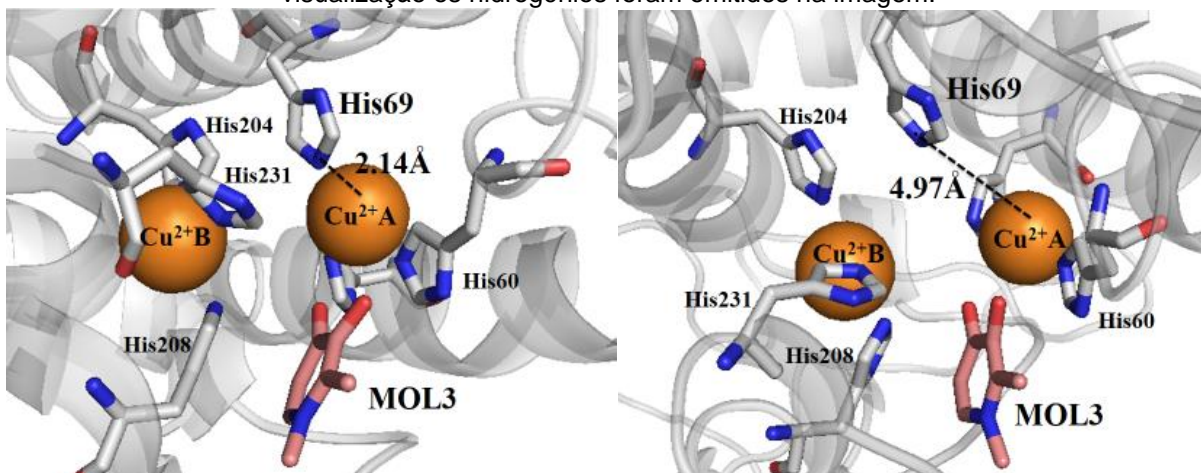
Em outra análise, percebeu-se que durante a simulação de DM o inibidor AK, Tropolona, MOL1 e MOL4 tendem a conservar algumas interações em comum com os substratos (L-Tirosina e L-Dopa), por exemplo, a interação  $\pi$ - $\pi$  com o anel do resíduo His208 e o grupamento polar desses inibidores orientados em direção ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ , o que reforça ainda mais a afinidade dessas moléculas pelo sítio ativo da enzima TYR e as suas potenciais ações inibitórias.

Particularmente, a trajetória de simulação do MOL4 comparado aos outros ligantes, apresenta desvios mais consideráveis no início da simulação, com RMSD um pouco a cima de 2 Å, porém segundo análise do gráfico a estrutura tende a se estabilizar no decorrer da trajetória, essa movimentação inicial do MOL4 relatada no gráfico de RMSD se dá pela aproximação da carbonila do ligante em direção ao íon cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) presente no sítio de ligação.

Um fenômeno que também foi observado durante as simulações de DM é o afastamento do resíduo de His69 em relação ao  $\text{Cu}^{2+}$ , ocorrendo na simulação com alguns inibidores, como AK, MOL2 e MOL3, onde o afastamento acontece durante a fase de produção, já para os inibidores MOL4 e MOL5 esse afastamento da histidina ocorre desde a fase de equilíbrio do sistema, para os demais inibidores não se observou esse fenômeno. Essas observações estão em concordância com a literatura, onde um estudo publicado relata sobre a possível variação da distância que pode ocorrer entre as histidinas e os íons de cobre, quando um inibidor presente no sítio de ligação da enzima faz quelação com esses íons (LIMA et al., 2014).

Na Figura 21 é possível observar o primeiro e o último frame de simulação para o sistema com MOL3, no qual se observou que a distância inicial entre His69 e o  $\text{Cu}^{2+}$  é de 2,14 Å e no final da simulação a distância é de 4,97 Å. No entanto, esse afastamento parece não influenciar quebras de interações entre a enzima e os inibidores presentes no sítio ativo da mesma. No geral para os outros inibidores onde esse afastamento é observado, a distância entre a His69 e o  $\text{Cu}^{2+}$  varia em média entre 2,28 Å e 5,26 Å.

**Figura 21.** Afastamento da His69 em relação ao  $\text{Cu}^{2+}\text{A}$  durante a simulação de DM. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos na imagem.



### 5.3. Cálculo de Energia Livre de Ligação: método LIE

A ELL é uma característica primordial para elucidar novos candidatos com potencial de se tornarem fármacos, ou seja, da molécula se ligar ao receptor alvo e inibir sua atividade (MOBLEY; DILL, 2010), a ELL é capaz de descrever se a reação, ligação, e/ou interações entre a molécula ligante e seu receptor alvo, serão favoráveis de acontecer no sistema real. Dessa forma, através do método LIE a estimativa de ELL dos sistemas foi calculada e são mostradas na Tabela 5, comparando-as com as devidas ELL experimentais.

Os parâmetros empíricos  $\alpha$  e  $\beta$ , usados diretamente no cálculo do LIE, foram obtidos de duas formas para servirem como ponto de comparação e assim perceber quais parâmetros representam melhor o sistema com a metal-proteína TYR. Primeiramente, os parâmetros foram coletados diretamente da literatura ( $\alpha= 0.181$  e  $\beta= 0.5, 0.43, 0.37$  e  $0.33$ ) (HANSSON; MARELIUS; ÅQVIST, 1998) e também foram gerados valores ( $\alpha= 0.117$  e  $\beta = 0.378$ ) através de uma regressão múltipla calculada através do software GNU PLOT 5.0, essa regressão relaciona as médias de Van der Waals, eletrostáticas e energias experimentais.

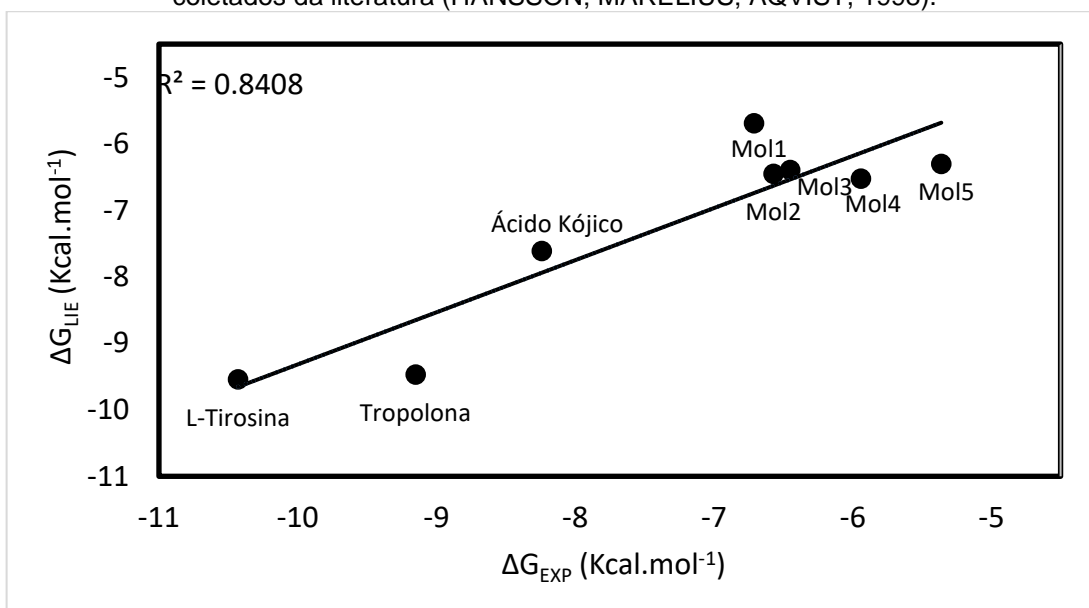
**Tabela 5.** Valores de ELL para LIE e seus valores experimentais de energia, valores em Kcal.mol<sup>-1</sup>

Ligantes	E (vdW)	E (velet)	$\Delta G_{LIE}$ $\alpha = 0,181$ $\beta = 0.5, 0.43,$ $0.37 \text{ e } 0.33$	$\Delta G_{LIE}$ $\alpha = 0.117$ $\beta = 0.378$	$\Delta G_{EXP}$
L-Dopa	-21,77	-26,97	-12,84	---	---
L-Tirosina	-14,62	-19,38	-9,04	-9,03	-9,93
Tropolona	-12,43	-18,17	-8,97	-8,32	-8,65
Ácido Kójico	-10,88	-15,58	-7,11	-7,16	-7,74
MOL1	-10,75	-9,85	-5,19	-4,99	-6,21
MOL2	-8,40	-13,44	-5,95	-6,06	-6,07
MOL3	-9,81	-11,2	-5,89	-5,35	-5,95
MOL4	-11,03	-12,21	-6,02	-5,90	-5,44
MOL5	-12,9	-8,01	-5,80	-4,55	-4,86

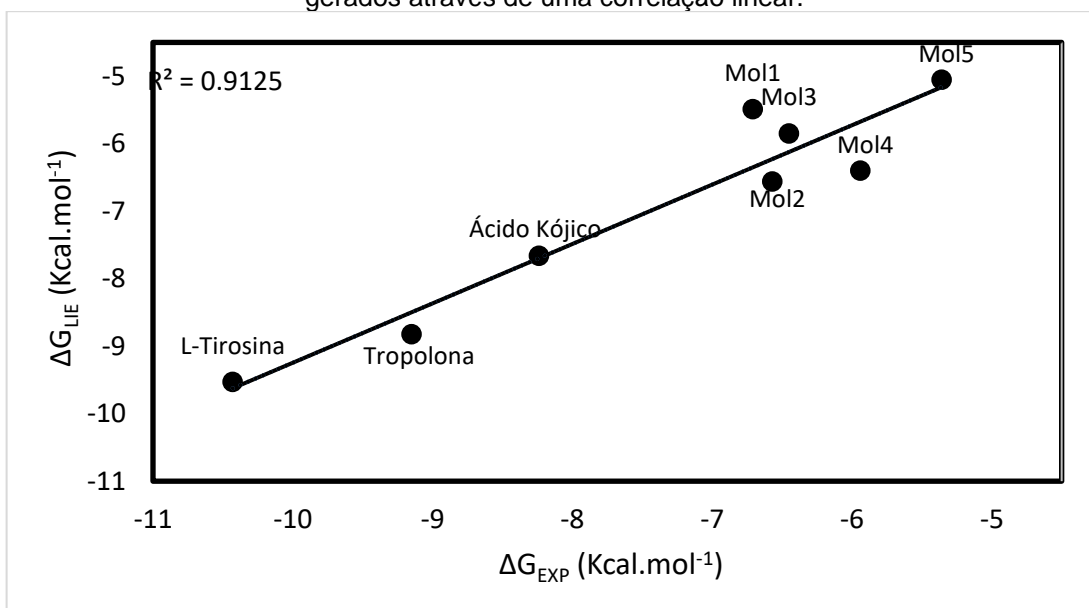
Segundo os resultados obtidos pelos cálculos no método LIE, observa-se que o complexo TYR-MOL2 teve uma ELL teórica calculada pelo LIE de -5,95 e -6,06 Kcal.mol<sup>-1</sup>, usando  $\alpha$  e  $\beta$  obtidos pela literatura e também obtidos pela regressão múltipla, respectivamente, na melhor comparação conseguindo uma diferença de apenas 0,01 Kcal.mol<sup>-1</sup> do seu respectivo valor calculado experimentalmente que foi de -6,07 Kcal.mol<sup>-1</sup>. Além do mais, o substrato natural L-Tirosina apresentou uma diferença entre o valor teórico do LIE e o valor experimental de 0,89 Kcal.mol<sup>-1</sup>, na sua melhor comparação.

Vale ressaltar também que os resultados obtidos para os dois inibidores já conhecidos da TYR, Tropolona e AK, estão de acordo com os resultados experimentais, com diferenças entre LIE e experimental de 0,32 e 0,58 Kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente, para os melhores resultados de cada inibidor.

**Figura 22.** Gráfico de regressão linear entre valores de  $\Delta G_{\text{EXP}}$  vs  $\Delta G_{\text{LIE}}$ . Para os valores  $\alpha$  e  $\beta$  coletados da literatura (HANSSON; MARELIUS; ÅQVIST, 1998).



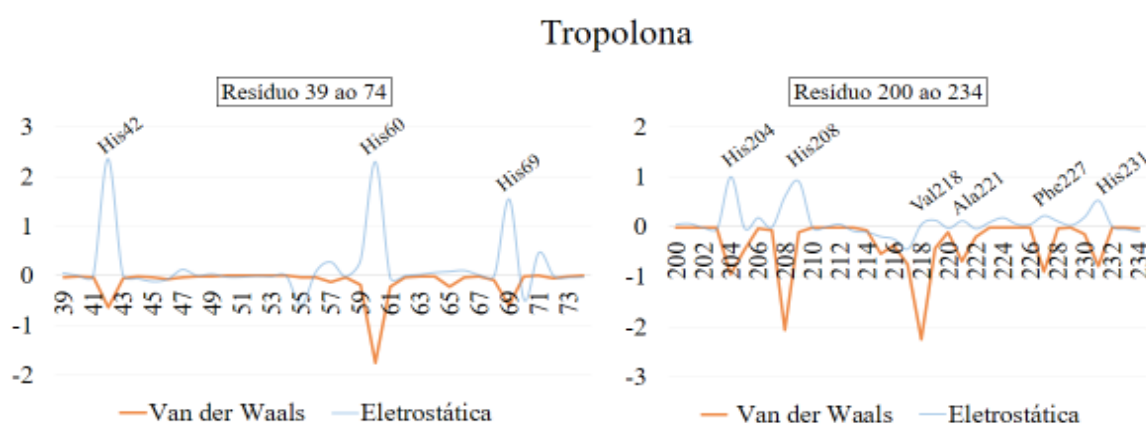
**Figura 23.** Gráfico de regressão linear entre valores de  $\Delta G_{\text{EXP}}$  vs  $\Delta G_{\text{LIE}}$ . Para os valores  $\alpha$  e  $\beta$  gerados através de uma correlação linear.



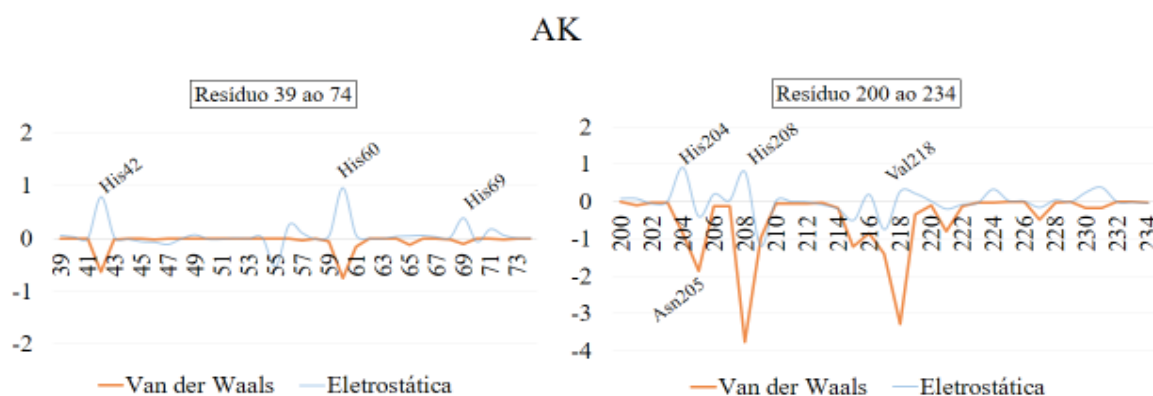
Em uma regressão linear entre ELL Experimentais vs. ELL Teóricas, calculadas aqui neste trabalho (Figura 22 e 23), obteve-se um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,8408 e 0,9125, respectivamente, onde pode-se declarar que os valores de LIE apresentados aqui representam aproximadamente em 85% os valores experimentais, na primeira regressão linear analisada, já para a segunda regressão linear, o LIE conseguiu representar em 91% os valores experimentais, mostrando que os respectivos valores de  $\alpha = 0,117$  e  $\beta = 0,378$  descrevem melhor os sistemas com a metal-proteína TYR.

Para uma análise mais detalhada dos inibidores que melhor performaram nos resultados teóricos, Tropolona, AK, MOL2 e MOL3, se analisou as estimativas médias de energias de Van der Waals e eletrostáticas para cada resíduo da enzima TYR em relação a molécula ligante. Essas estimativas podem ser observadas na Figura 24, Figura 25, Figura 26 e Figura 27, destacando as regiões de resíduos que fazem parte do sítio ativo da enzima TYR.

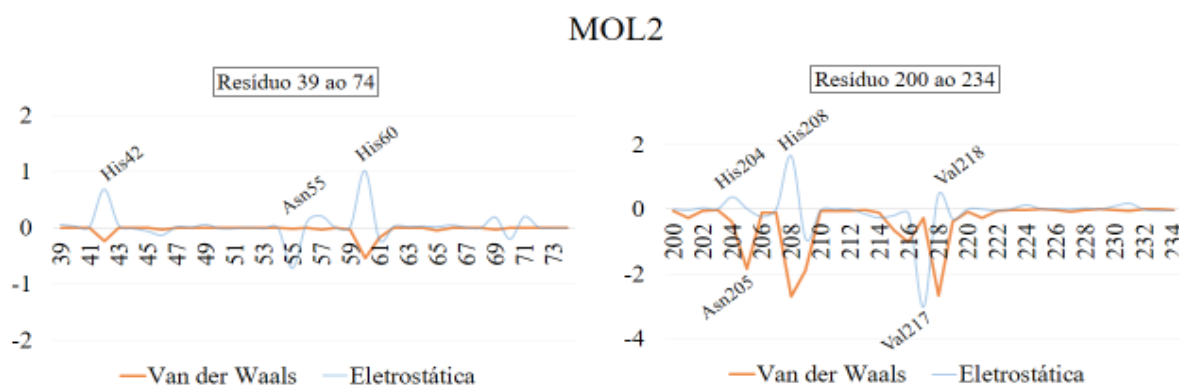
**Figura 24.** Estimativas de energia de Van der Waals e eletrostática por resíduo da enzima TYR, para o sistema com Tropolona.



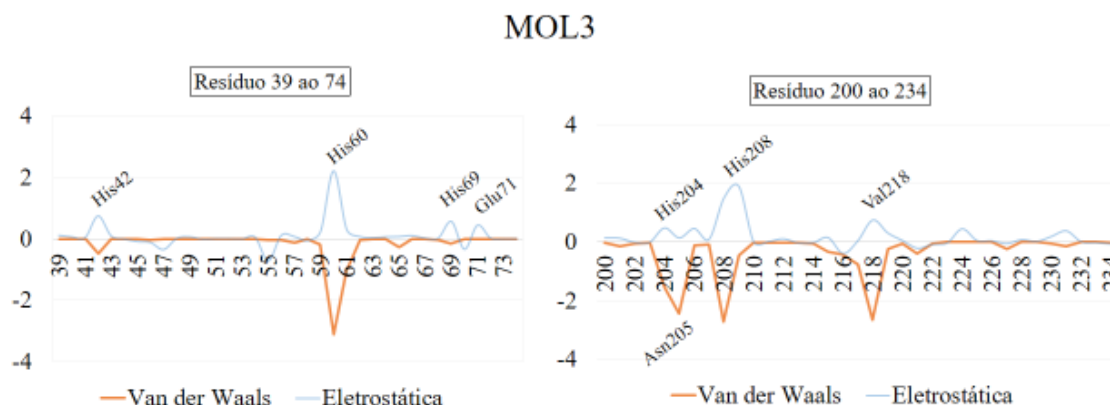
**Figura 25.** Estimativas de energia de Van der Waals e eletrostática por resíduo da enzima TYR, para o sistema com AK.



**Figura 26.** Estimativas de energia de Van der Waals e eletrostática por resíduo da enzima TYR, para o sistema com MOL2.



**Figura 27.** Estimativas de energia de Van der Waals e eletrostática por resíduo da enzima TYR, para o sistema com MOL3.



Segundo a análise exposta nos gráficos da Figura 24, Figura 25, Figura 26 e Figura 27, a média das energias de Van der Waals e eletrostática de todos os quatro inibidores com os resíduos da enzima individualmente, mostraram que as contribuições energéticas mais expressivas ocorrem nas regiões com resíduos importantes para o sítio de ligação da TYR, por exemplo observa-se interações diretas com a His42, His60 e His69, para os sistemas com Tropolona, AK e MOL3, destaca-se que esses resíduos fazem quelação com o  $(\text{Cu}^{2+\text{A}})$  no sítio ativo da TYR. Do mesmo modo, observa-se interações diretas com os resíduos His204 e His208, nos sistemas com os quatro inibidores, vale ressaltar que os resíduos His 204 e His208 fazem a quelação do íon  $(\text{Cu}^{2+\text{B}})$  no sítio ativo, juntamente com o resíduo His 231.

Particularmente para o sistema com a Tropolona, é possível observar que as contribuições energéticas ocorrem para os seis resíduos de His responsáveis pela quelação dos íons cobre no sítio de ligação da TYR, além de alguns resíduos próximos ao sítio de ligação, como a Val218. Ressalta-se que a Tropolona é o inibidor que apresenta a maior atividade dentre os inibidores destacados aqui.

Portanto, essas interações diretas das moléculas ligantes com os resíduos presentes no sítio de ligação da enzima TYR, reforçam a afinidade desses inibidores pelo sítio desta enzima, assim como o seu potencial poder de inibição.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho se fundamentou nas metodologias da modelagem molecular, estudos de parâmetros Físico-Químicos e na Química Teórica, para investigar a ação de inibidores da enzima TYR. Enzima chave no processo de melanogênese em diversos organismos vivos, que também está relacionada a problemas de saúde de ordem cutânea (SAGHAIE et al., 2013).

Primeiramente, as metodologias que foram aplicadas aqui, Docagem Molecular, simulação por DM e LIE, se mostraram competentes no sentido de atingirem os objetivos do trabalho e também possibilitando a análise molecular dos sistemas aqui investigados. Especificamente a aplicação da Docagem Molecular conseguiu mostrar consonância com os resultados experimentais, apresentando valores de RMSD (0.22, 0.29 e 0.31 Å) próximos a zero para a redocagem nos três PDB's. A Docagem também mostrou interações dos ligantes em estudo com os resíduos do sitio de ligação da TYR, com distâncias próximas as cristalográficas.

As simulações de DM com os complexos resultantes da docagem, mostraram o comportamento da enzima com diferentes moléculas ligantes, dessa forma, foi exposto a nível molecular as interações e a forma como esses inibidores agem quando complexados com a enzima TYR. Além disso, foi possível analisar a estabilidade desses complexos através de análise de gráficos de RMSD, que permitiu observar os desvios dos complexos ao longo do tempo de DM. Ainda, percebeu-se que o modelo *dummy atom* usado nesse trabalho para a simulações de DM, conseguiu descrever as propriedades dos íons cobre presente na estrutura da TYR.

Da mesma maneira, os resultados obtidos pelo método LIE se mostraram bastante expressivos e estão de acordo com a área experimental. Dessa forma, os resultados alcançados nesse trabalho contribuem de maneira significativa para a ciência a cerca a inibição da enzima TYR, assim como, também colaboram no estudo de novas moléculas com provável potencial de inibição da mesma. Sendo assim, ajudando no combate aos males provenientes de irregularidades no ciclo de produção de melanina nos organismos.

## REFERÊNCIAS

- ALÍ-TORRES, J. et al. Modeling Cu 2+ - $\beta$  complexes from computational approaches. **AIP Advances**, v. 5, n. 9, 2015.
- ALMEIDA, D. M. **Dockthor: Implementação, Aprimoramento e Validação de um Programa de Docking Receptor-Ligante. Dissertação de Mestrado.** [s.l: s.n.].
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531–568, 2006.
- ANDREI, C. C. et al. **Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular: Um Curso Prático.** São Paulo: Manole, 2012.
- AQVIST, J.; MEDINA, C.; SAMUELSSON, J. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug Design. **Protein Engineering**, v. 7, n. 3, p. 385–391, 1994.
- AQVIST, J.; MOWBRAY, S. L. Sugar recognition by a glucose/galactose receptor. Evaluation of binding energetics from molecular dynamics simulations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 17, p. 9978–9981, 1995.
- AQVIST, J.; WARSHEL, A. Calculations of free energy profiles for the staphylococcal nuclease catalyzed reaction. **Biochemistry**, v. 28, n. 11, 1989.
- ÅQVIST, J.; WARSHEL, A. Simulation of Enzyme Reactions Using Valence Bond Force Fields and Other Hybrid Quantum/Classical Approaches. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 7, p. 2523–2544, 1993.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, L. A. **Dermatologia.** 5ª ed. [s.l.] Editora Guanabara Koogon, 2011.
- BERKOWITZ, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics with stochastic boundary conditions. **Chemical Physics Letters**, v. 90, n. 3, p. 215–217, 1982.
- BEVERIDGE, D. L.; DICAPUA, F. M. Free Energy Via Molecular Simulation: Applications to Chemical and Biomolecular Systems. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 431–492, 1989.
- BIELSKA, E. et al. Virtual screening strategies in drug design - methods and applications. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 3, p. 249–264, 2011.
- BLAUSEN MEDICAL. Medical gallery of Blausen Medical. **WikiJournal of Medicine**, v. 1, n. 2, p. 50, 2014.



- BLUMENTHAL, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: Justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 214–228, 2004.
- BRASIL, E. M. et al. Inhibition of tyrosinase by 4H- chromene analogs: Synthesis, kinetic studies, and computational analysis. **Chem Biological Drug Desing**, v. 90, p. 804–810, 2017.
- BROOKS III, C. L.; KARPLUS, M.; PETTITT, B. M. Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics. **Advances in Chemical Physics**, v. 71, p. 259, 1988.
- BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 10, 2009.
- BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; CARABIN, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 80–101, 2001.
- CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 12, p. 982–985, 1994.
- CAMPBELL, M. K. **Biochemistry**. Saunders College: Philadelphia, 1999.
- CAMPOS, A. F. C. Introdução à Modelagem Molecular. 2013.
- CARVALHO, C. A. et al. Melanoma hereditário : prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **An Bras Dermatol.**, v. 79, n. 1, p. 53–60, 2004.
- CARVALHO, I. et al. Introdução a Modelagem Molecular De Fármacos No Curso Experimental De Química Farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.
- CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440–2475, 2009.
- CHARLET, E. **Cosmética para farmacêuticos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1996.
- CHEMAXON. **MarvinSketch**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.chemaxon.com/>>
- CICHOREK, M. et al. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.
- CLAUS, H.; DECKER, H. Bacterial tyrosinases. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 3–14, 2006.
- COATES, C. J.; NAIRN, J. Diverse immune functions of hemocyanins. **Developmental**

- and Comparative Immunology**, v. 45, n. 1, p. 43–55, 2014.
- COHEN, N. C. et al. Molecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry. **Journal of medicinal chemistry**, v. 33, n. 3, p. 883–894, 1990.
- CRAMER, C. J. **Essentials of computational chemistry : theories and models**. 2<sup>a</sup> ed. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltda, 2004.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.
- DE OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações Biológicas: Contribuições E Perspectivas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 742–756, 2009.
- DECKER, H. et al. Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. **Gene**, v. 398, p. 183–191, 2007.
- DEETH, R. J.; DIEDRICH, C. Structural and mechanistic insights into the oxy form of tyrosinase from molecular dynamics simulations. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 117–129, 2010.
- DERI, B. et al. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.
- DIEHL, A. Fundamentos da modelagem Molecular. 2017.
- DRAELOS, Z. D. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 5, p. 308–313, 2007.
- EMAMI, S. et al. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 45–48, 2007.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Livro - Princípios Físico Químicos em Farmácia**. 2<sup>a</sup> ed. [s.l.] Pharmabooks, 2011.
- FRIESNER, R. A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, 2004.
- FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09 (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009)**., 2009.
- GARCIA, C. R. O farmacêutico e a proteção solar. **Infarma – Informativo Profissional do Conselho Federal de Farmácia**, v. 13, n. 11/12, p. 81–86, 2001.
- GOLDFEDER, M. et al. Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–5, 2014.

- GOMES, A. J. et al. The antioxidant action of Polypodium leucotomos extract and kojic acid: Reactions with reactive oxygen species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1487–1494, 2001.
- GOODFORD, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 849–857, 1985.
- GOYDOS, J. S.; SHOEN, S. L. Acral Lentiginous Melanoma. **Cancer Treat Res**, v. 167, p. 321–9, 2016.
- GRIMES, P. E. Management of Hyperpigmentation in Darker Racial Ethnic Groups. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 28, n. 2, p. 77–85, 2009.
- HA, Y. M. M. et al. 4-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1,3-benzendiol: a potent, new tyrosinase inhibitor. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 9, p. 1711–5, 2007.
- HAGLER, A. T.; HULER, E.; LIFSON, S. Energy Functions for Peptides and Proteins. I. Derivation of a Consistent Force Field Including the Hydrogen Bond from Amide Crystals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 17, p. 5327–5335, 1974.
- HALABAN, R. et al. Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14821–14828, 2002.
- HALAOULI, S. et al. Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 219–232, 2006.
- HANCOCK, D. Molecular Mechanics Calculations and Metal Ion Recognition. **Accounts of chemical research**, v. 23, n. 13, p. 253–257, 1990.
- HANSSON, T.; ÅQVIST, J. Estimation of binding free energies for HIV proteinase inhibitors by molecular dynamics simulations. **Protein Engineering**, v. 8, n. 11, 1995.
- HANSSON, T.; MARELIUS, J.; ÅQVIST, J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. n. 2, p. 27–35, 1998.
- HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; GUNSTEREN, W. F. VAN. Molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, p. 190–196, 2002.
- HERMANNNS, J. F.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; PIÉRARD, G. E. **Skin colour assessment in safety testing of cosmetics. An overview** **International Journal of Cosmetic Science**, 2000.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M. M. **Manual de cosmetologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

HERRAIZ, C. et al. Melanocortin 1 receptor mutations impact differentially on signalling to the cAMP and the ERK mitogen-activated protein kinase pathways. **FEBS Letters**, v. 583, n. 19, p. 3269–3274, 2009.

HULTÉN, J. et al. Cyclic HIV-1 protease inhibitors derived from mannitol: Synthesis, inhibitory potencies, and computational predictions of binding affinities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 885–897, 1997.

III, C. L. B.; KARPLUS, M.; AUSTIN, B. M. P. H. Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 43, n. 2, 1990.

INCA. **Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

INCA. **Instituto Nacional De Câncer: Tipos de Câncer, Melanoma**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/tratamento+](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/tratamento+)>. Acesso em: 12 dez. 2017.

ISMAYA, W. T. et al. Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. **American Chemical Society**, v. 50, p. 5477–5486, 2011.

JEON, H. J. et al. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9827–9833, 2006.

JONES-HERTZOG, D. K.; JORGENSEN, W. L. Binding affinities for sulfonamide inhibitors with human thrombin using Monte Carlo simulations with a linear response method. **Journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 10, p. 1539–1549, 1997.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS all-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **American Chemical Society**, 1996.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. **Journal of the american chemical society**, v. 110, n. 6, p. 1657–1666, 1988.

KAHN, V.; ANDRAWIS, A. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone.

**Phytochemistry**, v. 24, n. 5, p. 905–908, 1985.

KANTEEV, M.; GOLDFEDER, M.; FISHMAN, A. Structure-function correlations in tyrosinases. **The Protein Science**, v. 24, n. 9, p. 1360–1369, 2015.

KARPLUS, M. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Chemical Research**, v. 35, n. 6, 2002.

KHANOM, F.; KAYAHARA, H.; TADASA, K. Tyrosinase Inhibitory Activity of Bangladeshi Indigenous Medicinal Plants. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 9, p. 1967–1969, 2000.

KIM, Y. J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 15, p. 1707–1723, 2005.

KOLLMAN, P. Free-Energy Calculations - Applications to Chemical and Biochemical Phenomena. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 7, p. 2395–2417, 1993.

KRYSTEK, S.; STOUCHE, T.; NOVOTNY, J. Affinity and specificity of serine endopeptidase-protein inhibitor interactions: Empirical free energy calculations based on X-ray crystallographic structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 661–679, 1993.

KUBO, I. et al. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 1749–1755, 2000.

KUBO, I. et al. Tyrosinase Inhibition Kinetics of Anisic Acid. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 58, n. 9–10, p. 713–718, 2003.

LENNARD-JONES, J. E. On the Determination of Molecular Fields. **Proc. R. Soc. Lond. A**, v. 106, p. 463–477, 1924.

LEONEL, C. **Identifique o Melanoma**. Disponível em: <<https://www.medicinamitoseverdades.com.br/blog/identifique-o-melanoma>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

LEU, Y.-L. et al. Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* as Tyrosinase Inhibitors for Dermal Use. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 22, p. 552–556, 2008.

LIAO, Q.; KAMERLIN, S. C. L.; STRODEL, B. Development and Application of a Nonbonded Cu<sup>2+</sup> Model That Includes the Jahn–Teller Effect. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 6, n. 13, p. 2657–2662, 2015.

- LIMA, C. et al. Combined Kinetic Studies and Computational Analysis on Kojic Acid Analogous as Tyrosinase Inhibitors. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9591–9605, 2014.
- LIN, F.; WANG, R. Systematic derivation of AMBER force field parameters applicable to zinc-containing systems. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 6, p. 1852–1870, 2010.
- LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, p. 843–850, 2007.
- MAEDA, K.; FUKUDA, M. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 42, n. 6, p. 361–368, 1991.
- MAGHSOUDI, S. et al. Kinetic of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Benzaldehyde Derivatives. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences Medical Sciences JRPS**, v. 2, n. 22, p. 156–164, 2013.
- MARELIUS, J. et al. Q: An MD Program for Free Energy Calculations and Empirical Valence Bond Simulations in Biomolecular Systems. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 16, n. 4, p. 213–225, 1998.
- MARINHO, V. M. C.; SEIDL, P. R.; LONGO, W. P., A. Diversidade biológica: uma potencial fonte de vantagem competitiva para a indústria farmacêutica brasileira. **Revista Arbitrada de Gestión Tecnológica**, v. 29, n. 1, p. 49–67, 2008.
- MARQUES, P. R. B. DE O.; YAMANAKA, H. BIOSSENSORES BASEADOS NO PROCESSO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.
- MASON, H. S. The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of trihydroxyphenylalanine by tyrosinase. **J. Biol. Chem.**, v. 172, p. 83–99, 1948.
- MATSUI, Y. et al. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 11112–11118, 2010.
- MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. **Phytochemistry**, v. 26, n. 1, p. 11–20, 1987.
- MENG, E. C.; SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 505–524, 1992.
- MILLER, W. H. Perspective: Quantum or classical coherence. **Journal of Chemical**

**Physics**, v. 136, n. 21, 2012.

MIOT, L. D. B. et al. Physiopathology of melasma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623–635, 2009.

MOREIRA, A. M. et al. Estudo duplo cego comparativo entre hidroquinona e extrato de uva-ursina no tratamento do melasma. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 2, p. 99–104, 2010.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

MOTO, M. et al. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 5, p. 299–304, 2006.

MUÑOZ-MUÑOZ, J. L. et al. Unravelling the suicide inactivation of tyrosinase: A discrimination between mechanisms. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 11–19, 2012.

MUNOZ, K. et al. SCREENING BIOACTIVES FROM VEGETAL SOURCES AS POTENTIAL SKIN LIGHTENING AGENTS USING AN ENZYMATIC MODEL OF TYROSINASE INHIBITION, CORRELATIONS AMONGST ACTIVITY, PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT AND CYTOTOXICITY. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 802–807, 2006.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Quimica**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NICOLETTI, M. A. et al. Hiperpigmentação: Aspectos Gerais e Uso de Despigmmentantes Cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 14, p. 46–51, 2002.

NOH, J. et al. Kojic acid – amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 19, p. 5586–5589, 2009.

NOHYNEK, G. J. et al. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 93–105, 2004.

OELSCHLAEGER, P. et al. Magnesium-cationic Dummy Atom Molecules Enhance Representation of DNA Polymerase  $\beta$  in Molecular Dynamics Simulations: Improved Accuracy in Studies of Structural Features and Mutational Effects. **Journal of Molecular Biology**, v. 366, n. 2, p. 687–701, 2007.

OLIANAS, A. et al. Tyrosinase activity and hemocyanin in the hemolymph of the slipper lobster *Scyllarides latus*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 175, n. 6, p. 405–411, 2005.

PANG, Y.-P. Novel Zinc Protein Molecular Dynamics Simulations: Steps Toward Antiangiogenesis for Cancer Treatment. **Journal of Molecular Modeling**, v. 5, n. 10, p. 196–202, 1999.

PARK, S. H. et al. Molecular analysis of Korean patients with oculocutaneous albinism. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 56, n. 1, p. 98–103, 2012.

PARVEZ, S. et al. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 20, p. 921–934, 2006.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PIETRA, F. Seven-Membered Conjugated Carbo- and Heterocyclic Compounds and Their Homoconjugated Analogs and Metal Complexes. Synthesis, Biosynthesis, Structure, and Reactivity. **Chemical Reviews**, v. 73, n. 4, p. 293–364, 1973.

RAMSDEN, C. A.; RILEY, P. A. Bioorganic & Medicinal Chemistry Tyrosinase : The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation , oxidation and inactivation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 2388–2395, 2014.

RAO, A. R. et al. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *haematococcus pluvialis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 16, p. 3842–3851, 2013.

RAPER, H. S. THE AEROBIC OXIDASES. **Physiol. Rev.**, v. 8, n. 2, p. 245–282, 1928.

RASCHKA, S. **Molecular docking, estimating free energies of binding, and AutoDock's semi-empirical force field.** Disponível em: <[http://sebastianraschka.com/Articles/2014\\_autodock\\_energycomps.html](http://sebastianraschka.com/Articles/2014_autodock_energycomps.html)>. Acesso em: 20 jun. 2018.



- REN, H. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a series of simple and novel potential antimalarial compounds. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 11, n. 14, p. 1851–1854, 2001.
- ROBERTSON, M. J.; TIRADO-RIVES, J.; JORGENSEN, W. L. Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 7, p. 3499–3509, 2015.
- ROBINS, A. H. **Biological perspectives on human pigmentation**. 1<sup>a</sup> ed. New York: Cambridge University Press, 1991.
- ROCHA, L. D. M.; MOREIRA, L. M. D. A. Diagnóstico laboratorial do albinismo oculocutâneo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 25–30, 2007.
- RODRIGUES, A. P. D. et al. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. **Cell Biology International**, v. 35, n. 4, p. 335–343, 2011.
- ROSATTO, S. S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77–86, 2001.
- SAGHAIE, L. et al. Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. **Res Pharm Sci**, v. 8, n. 4, p. 233–242, 2013.
- SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49–57, 2009.
- SAXENA, A.; SEPT, D. Multisite ion models that improve coordination and free energy calculations in molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 8, p. 3538–3542, 2013.
- SCHALLREUTER, K. U. et al. Regulation of melanogenesis-controversies and new concepts. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 395–404, 2008.
- SCHURINK, M. et al. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 485–495, 2007.
- SENDOVSKI, M. et al. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. **Journal of Molecular Biology**, v. 405, n. 1, p. 227–237, 2011.
- SILVA, J. R. **Estudo computacional da enzima l,d-transpeptidase 2 de mycobacterium tuberculosis: perspectivas para o desenvolvimento de**

- antibióticos.** [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2015.
- SOUZA, R. J. S. P. et al. An estimate of the cost of treating non-melanoma skin cancer in the state of São Paulo, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 657–662, 2011.
- STEINER, D. Discromias – Parte I: Generalidades. **Cosmetics & Toiletries**, v. 8, n. 1, p. 31–32, 1996a.
- STEINER, D. As influências raciais e a pele. **Cosmetics & Toiletries**, v. 8, n. 3, p. 28–31, 1996b.
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173–1213, 2007.
- SU, E. G. Formulando com Branqueadores da Pele. **Cosmetics & Toiletries (Edição em Português)**, v. 11, p. 57–63, 1999.
- TAMURA, T. et al. Absence of in vivo genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. **Toxicology**, v. 222, n. 3, p. 213–224, 2006.
- TAYLOR, R. D.; JEWsbury, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002.
- THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 3315–3321, 2006.
- TOLEDO, K. **Especialistas alertam para a síndrome do melanoma familiar.** Disponível em: <[http://agencia.fapesp.br/especialistas\\_alertam\\_para\\_a\\_sindrome\\_do\\_melanoma\\_familiar/16134/#.UEXidXEXRNo.email](http://agencia.fapesp.br/especialistas_alertam_para_a_sindrome_do_melanoma_familiar/16134/#.UEXidXEXRNo.email)>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- TORRAS, J.; ALEMÁN, C. Determination of new Cu<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> Lennard-Jones ion parameters in acetonitrile. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 36, p. 10513–10522, 2013.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, 2009.
- VALERO, E. et al. Time-Dependent Inhibition of Grape Polyphenol Oxidase by Tropolone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1043–1046, 1991.

- VAN GUNSTEREN, W. F. ET AL. Biomolecular Simulation: The GROMOS 96 Manual and User Guide. **VDF Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich**, 1996.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual, Biomos, Groningen. **The Netherlands**, 1987.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 29, n. 9, p. 992–1023, 1990.
- VERLI, H. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. 1ª ed. São Paulo: [s.n.].
- VIDEIRA, I. F. D. S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 1, p. 76–83, 2013.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- WARSHEL, A. A microscopic model for calculations of chemical processes in aqueous solutions. **Chem. Phys. Lett.**, v. 55, n. 3, p. 454–458, 1978.
- WARSHEL, A. Computer Simulations of Enzyme Catalysis: Methods, Progress, and Insights. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 425–443, 2003.
- WEINER, S. J. et al. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. **Journal of Computational Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 230–252, 1986.
- WHO. **World Health Organization. Skin cancers**. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/>>. Acesso em: 11 dez. 2017.
- YAMATO, M. et al. Synthesis and Antitumor Activity of Tropolone Derivatives. 2. **j. med. chem**, v. 28, p. 1026–1031, 1985.
- YAMATO, M. et al. Synthesis and antitumor activity of tropolone derivatives. 3. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1026–1031, 1986.
- YAMATO, M. et al. Synthesis and Antitumor Activity of Tropolone Derivatives. 5. **j. med. chem**, v. 30, n. 3, p. 1245–1248, 1987.
- YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 5, p. 215–239, 2013.
- ZUIDHOFF, H. W.; RIJSBERGEN, J. M. VAN. Whitening Efficacy of frequently used whitening ingredients. **Cosm Toil**, v. 116, n. 1, p. 53–59, 2001.