



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

BEATRIZ ALVES BENTES

**Estudo Computacional de arilpiperidina e arilpiperazina como Inibidores de
Tirosinase: Aplicações Cosméticas e Terapêuticas**

Belém – PA
2025

BEATRIZ ALVES BENTES

**Estudo Computacional de arilpiperidina e arilpiperazina como Inibidores de
Tirosinase: Aplicações Cosméticas e Terapêuticas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química, como requisito para obtenção do
título de Doutora em Química.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva.

Coorientador: Prof^o.Dr^o. José Rogério de Araújo
e Silva

**Belém - PA
2025**

**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)**

A474e Alves Bentes, Beatriz.
 Estudo Computacional de arilpiperidina e arilpiperazina como
 Inibidores de Tirosinase: Aplicações Cosméticas e Terapêuticas / Beatriz
 Alves Bentes. — 2025.
 79 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva Coorientador(a):
 Prof. Dr. José Rogério de Araújo E Silva Tese (Doutorado) -
 Universidade Federal do Pará, Instituto de
 Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química,
 Belém, 2025.

 1. Química Computacional. 2. Inibição Enzimática. 3. Modelagem
 Molecular. I. Título.

CDD 541

BEATRIZ ALVES BENTES

**Estudo Computacional de arilpiperidina e arilpiperazina como Inibidores de Tirosinase:
Aplicações Cosméticas e Terapêuticas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química, como requisito para obtenção do
título de Doutora em Química.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva.

Coorientador: Profº.Drº. José Rogério de Araújo
e Silva

Aprovada em 08 de abril de 2025

Conceito: Aprovado

NOME/INSTITUIÇÃO	PARECER	ASSINATURA
Dr. Jerônimo Lameira Silva – Presidente da Sessão e Orientador (UFPA)	APROVADO	 Documento assinado digitalmente JERONIMO LAMEIRA SILVA Data: 18/04/2025 19:33:30 -0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
Dr. José Rogério de Araújo Silva – Coorientador (UFPA)	APROVADO	 Documento assinado digitalmente JOSE ROGERIO DE ARAUJO SILVA Data: 16/04/2025 12:26:00 -0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
Dr. Anderson Henrique Lima e Lima – Examinador (UFPA)	APROVADO	 Documento assinado digitalmente ANDERSON HENRIQUE LIMA E LIMA Data: 15/04/2025 14:02:34 -0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
Dr. Jaime Antônio Urban – Examinador (UFPA)	APROVADO	 Documento assinado digitalmente JAIME ANTONIO URBAN Data: 09/04/2025 13:34:11 -0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
Dr. Nelson Alberto Nascimento de Alencar – Examinador (UNAMA)	APROVADO	 Documento assinado digitalmente NELSON ALBERTO NASCIMENTO DE ALENCAR Data: 10/04/2025 10:33:45 -0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
Dr. Paulo Robson Monteiro de Sousa – Examinador (UFPA)	APROVADO	 Documento assinado digitalmente PAULO ROBSON MONTEIRO DE SOUSA Data: 14/04/2025 21:17:00 -0300 Verifique em https://validar.it.gov.br

RESUMO

As tirosinases (TYR) catalisam a oxidação de fenóis e catecóis, desempenhando um papel essencial na melanogênese, que regula a produção de melanina e protege contra a radiação UV. No entanto, distúrbios relacionados à pigmentação impulsionam a busca por inibidores eficazes da TYR. Compostos como hidroquinona, arbutina e ácido kójico possuem limitações, tornando necessária a investigação de novos inibidores. Neste estudo, compostos baseados em arilpiperidina e arilpiperazina demonstraram potente atividade inibitória contra a TYR. A análise computacional incluiu *docking* molecular, simulações de dinâmica molecular (DM) e cálculos de energia livre de ligação pelo método *Linear Interaction Energy* (LIE), revelando forte correlação com dados experimentais. Para aprimorar o entendimento das relações estrutura-atividade (SAR), transformações de Perturbação da Energia Livre (FEP) foram realizadas para pares de ligantes selecionados. Além disso, cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) foram aplicados aos inibidores L04 e L19, permitindo a determinação de descritores eletrônicos e orbitais moleculares de fronteira. Os inibidores interagem com a TYR principalmente por meio de interações eletrostáticas com o íon cobre e forças de van der Waals com resíduos críticos como Phe197, Pro201, Val218, Asn205 e Arg209. Esses achados são promissores para aplicações cosméticas e terapêuticas, possibilitando o desenvolvimento de clareadores de pele para tratar melasma e manchas solares, além de potenciais tratamentos para doenças associadas à hiperpigmentação e melanomas. O desenvolvimento de inibidores mais seletivos e com menor toxicidade pode ampliar o uso clínico e cosmético desses compostos, oferecendo alternativas mais seguras e eficazes para a modulação da produção de melanina.

Palavras-chave: Química Computacional, Inibição Enzimática, Modelagem Molecular.

ABSTRACT

Tyrosinases (TYR) catalyze the oxidation of phenols and catechols, playing a crucial role in melanogenesis, which regulates melanin production and provides protection against UV radiation. However, pigmentation-related disorders drive the search for effective TYR inhibitors. Compounds such as hydroquinone, arbutin, and kojic acid have limitations, highlighting the need for new inhibitors. In this study, arylpiperidine- and arylpiperazine-based compounds demonstrated potent inhibitory activity against TYR. Computational analysis included molecular docking, molecular dynamics (MD) simulations, and binding free energy calculations using the Linear Interaction Energy (LIE) method, revealing a strong correlation with experimental affinity data. To enhance the understanding of structure-activity relationships (SAR), Free Energy Perturbation (FEP) transformations were performed for selected ligand pairs. Additionally, Density Functional Theory (DFT) calculations were applied to inhibitors L04 and L19, enabling the determination of electronic descriptors and frontier molecular orbitals. The inhibitors interact with TYR mainly through electrostatic interactions with the copper ion and van der Waals forces with critical residues such as Phe197, Pro201, Val218, Asn205, and Arg209. These findings are promising for both cosmetic and therapeutic applications, enabling the development of skin-lightening agents to treat melasma and sunspots, as well as potential treatments for hyperpigmentation-related diseases and melanomas. The development of more selective inhibitors with lower toxicity may expand the clinical and cosmetic use of these compounds, offering safer and more effective alternatives for melanin production modulation.

Keywords: Computational Chemistry, Enzymatic Inhibition, Molecular Modeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema geral do mecanismo catalítico do TYR.....	11
Figura 2 - Os três diferentes estados de oxidação de um centro de cobre tipo III podem ser adequados durante a catálise e distâncias usuais de cobre-cobre.	14
Figura 3 - Atividades enzimáticas de tirosinases e enzimas de cobre relacionadas.	15
Figura 4 - Atividade difenolase da tirosinase. D é o-difenol, QH é o-dopaquinona protonada e DC é dopacromo.	16
Figura 5 - Atividades monofenolase e difenolase da tirosinase. M é monofenol, D é o-difenol, QH é o-dopaquinona protonada e DC é dopacromo. As formas enzimáticas são: metatirosinase (<i>Em</i>), desoxitirosinase (<i>Ed</i>) e oxitirosinase (<i>Eox</i>).	16
Figura 6 - Resumo das duas formas de melanina e descrição das funções das principais enzimas associadas	20
Figura 7 - Via biossintética da melanina. TYR: tirosinase; TYRP-1: proteína 1 relacionada à tirosinase; DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina; DHI: 5,6-dihidroxiindol; DHICA: ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico.....	21
Figura 8 - Gráfico RMSD médio para os sistemas TYR.....	45
Figura 9 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L03.....	46
Figura 10 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L04.....	46
Figura 11- Gráfico das energias que envolvem o ligante L05.....	47
Figura 12 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L07.....	47
Figura 13 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L08.....	48
Figura 14 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L09.....	48
Figura 15 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L10.....	49
Figura 16 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L11.....	49
Figura 17 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L12.....	50
Figura 18 - Estruturas DM representativas dos inibidores à base de arilpiperidina L04 (A) e L12 (B) ligados ao sítio ativo da TYRBm.	51
Figura 19 - Estruturas DM representativas dos inibidores à base de arilpiperazina L14 (A) e L19 (B) ligados ao sítio ativo da TYRBm.....	52
Figura 20 - Modelo de regressão linear entre a energia livre de ligação calculada (ΔG_{LIE}) e experimental (ΔG_{EXP}) (em kcal/mol) para inibidores à base de arilpiperidina e arilpiperazina ligados a TYR.....	55
Figura 21 - (A) contribuições energéticas eletrostáticas e (B) van der Waals (vdW) (em kcal/mol) sobre os inibidores L04 (azul) e L19 (vermelho) usados nos cálculos LIE.	57
Figura 22 - Diagramas de HOMO (esquerda) e LUMO (direita) para os inibidores (A) L04, (B) L08 e (C) L19, calculados no nível wB97XD/6-311++G (d,p) no modelo PCM, as cores vermelho e verde representam sinais positivos e negativos para a função de onda, respectivamente.	61
Figura 23 - Diagramas de MEP para os inibidores (A) L04 e (B) L19, calculados no nível wB97XD/6-311++G (d,p) no modelo PCM.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Inibidores de TYR baseados em arilpiperidina (L02–L07) e arilpiperazina (L08–L12) avaliados por Ferro et al. (2018) e suas respectivas energias livres de ligação experimentais (ΔG_{exp}), calculadas a partir dos valores de IC_{50} , conforme a equação $\Delta G_{exp} = RT \ln IC_{50}$, onde T equilibra a 310 K.....	35
Tabela 2 - Inibidores de TYR à base de arilpiperazina avaliados por Ferro et al., (2018) e suas respectivas energias livres de ligação experimental (ΔG_{exp}), calculadas a partir dos valores de IC_{50} , conforme a equação $\Delta G_{exp} = RT \ln IC_{50}$, onde T equilibra a 310 K.....	36
Tabela 3 - Função de pontuação MOLDOCK e valores experimentais de energia livre de ligação (ΔG_{exp}) para inibidores de TYR à base de arilpiperidina (L02–L07) e arilpiperazina (L08–L24). Esses valores são expressos em quilocalorias por mol (kcal/mol).	43
Tabela 4 - Valores de Root Mean Square Deviation (RMSD), medidos em angstroms (Å), referentes aos átomos pesados dos inibidores dentro do complexo enzimático TYR.....	44
Tabela 5 - Energia livre de ligação calculada (ΔG_{LIE}) e experimental (ΔG_{EXP}) para inibidores de TYR à base de arilpiperidina e arilpiperazina. Esses valores são expressos em quilocalorias por mol (kcal/mol).	53
Tabela 6 - Variações calculadas e experimentais nas energias livres de ligação dos derivados de arilpiperidina e arilpiperazina como inibidores de TYR. Todos os valores estão expressos em quilocalorias por mol (kcal/mol).	58
Tabela 7 - Descritores QM obtidos a partir de cálculos de DFT. Os valores estão expressos em eV.	60

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SBOLOS

AM1	<i>Austin Model 1</i>
AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
AUS	Aurona Sintase
CO	Catecol Oxidases
DHI	5,6-dihidroxiindol
DHICA	5,6-dihidroxiindol carboxílico
DM	Dinâmica Molecular
DQ	Dopaquinona
FEL	<i>Free Energy Landscape</i>
AK	cido Kjico
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
LIE	<i>Linear Interaction Energy</i>
MEP	Potencial Eletrosttico Molecular
MINDO	Negligncia Intermediria Modificada da Sobreposio Diferencial
MM	Mecnica Molecular
MQ	Mecnica Quntica
MVD	<i>Molegro Virtual Docker</i>
NDDO	<i>Neglect of Diatomic Differential</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM3	<i>Parametric Method 3</i>
PPOs	Polifenoloxidasas
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
TGN	Rede trans-Golgi
TYR	Tirosinase
TYRBm	<i>Bacillus megaterium</i>
TYRP-1	proteína 1 relacionada à tirosinase
TYRP-2	proteína 2 relacionada à tirosinase
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1. Tyrosinase.....	13
3.1.1. Inibidores da tirosinase.....	17
3.2. Melanogênese	18
3.3. Planejamento de novos fármacos.....	22
3.3.1. Modelagem molecular.....	22
3.3.2. Mecânica molecular	23
3.3.3. Mecânica quântica.....	24
3.3.4. <i>Docking</i> Molecular	24
3.3.5. Dinâmica Molecular	25
3.3.6. <i>Linear Interaction Energy</i>	28
3.3.7. <i>Free energy perturbation</i>	30
3.3.8. Cálculos de DFT.....	32
4. MATÉRIAS E MÉTODOS.....	34
4.1. Métodos Computacionais	34
4.1.1. Simulações de <i>Docking</i> Molecular.....	34
4.1.2. Dinâmica Molecular	38
4.1.3. Ligação de energias livres pelo método <i>Linear Interaction Energy</i>	40
4.1.4 Cálculos de FEP	40
4.1.5 Cálculos de DFT.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Cálculo <i>Linear Interaction Energy</i>	52
5.2. Análise de decomposição residual	55
5.3 Cálculos de FEP.....	57
5.4. Descritores QM, Análise de FMO e MEP	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

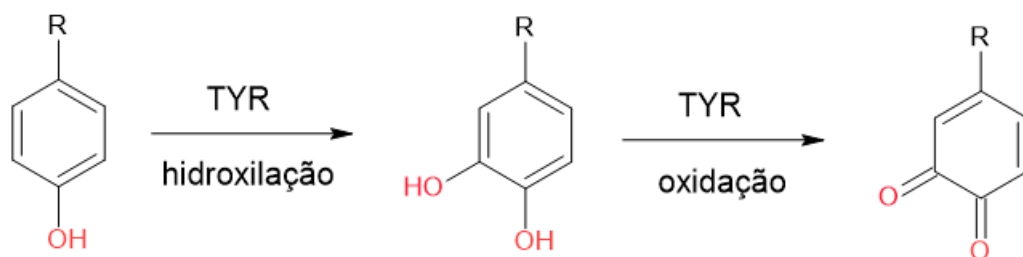
1. INTRODUÇÃO

A melanina desempenha uma função crucial em diversos organismos, exercendo papéis significativos como fotoproteção, termorregulação e cicatrização de feridas. Em seres humanos, esse pigmento é responsável pela determinação da cor da pele, dos olhos e do cabelo (Saghaie; Pourfarzam; Fassihi, 2013). Dentro deste contexto biológico, os pigmentos de melanina desempenham um papel essencial, atuando como um eficaz mecanismo de defesa contra os danos causados pela radiação UV e contra os perigosos ataques dos radicais livres, assim protegendo o sistema tegumentar de potenciais danos (D'mello *et al.*, 2016).

A despigmentação pode acarretar consequências visíveis e preocupantes na saúde da pele, enquanto o excesso de produção e acúmulo de melanina estão associados a várias doenças cutâneas, como a neurodegeneração relacionada à doença de Parkinson (Carballo-Carbajal *et al.*, 2019) e um maior risco de câncer de pele (Kamo *et al.*, 2022). De fato, é amplamente reconhecido que as condições relacionadas à melanina podem originar uma variedade de doenças cutâneas, incluindo hiperpigmentação, formação de lesões e o desenvolvimento de melasma (Brenner; Hearing, 2007; Bino; Duval; Bernerd, 2018).

A Tirosinase desempenha um papel crucial no processo de melanogênese em mamíferos (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995). Portanto, a inibição da TYR emerge como uma estratégia chave para regular a produção de melanina (Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017), despertando um grande interesse no desenvolvimento de tratamentos para condições dermatológicas e avanços em intervenções dermocosméticas. Tirosinases (TYR, EC 1.14.18.1) são metaloenzimas amplamente encontradas em várias formas de vida, incluindo mamíferos, fungos, bactérias e plantas. Essas TYRs possuem sítios ativos binucleares proeminentes, caracterizados pela coordenação meticulosa de dois íons de cobre por seis resíduos de histidina (Solano, 2018). Sua principal função catalítica é oxidar fenóis e catecóis, resultando na formação de catecóis e ortoquinonas, respectivamente (FIGURA 1) (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995).

Figura 1- Esquema geral do mecanismo catalítico do TYR.



Fonte: Adaptado de Fan *et al.*, 2021

O ácido kójico (AK) tem sido utilizado como um padrão de referência para avaliar a inibição da Tirosinase (Cabanés; Chazarra; García-Carmona, 1994; Burdock; Soni; Carabin, 2001). No entanto, demonstrou efeitos adversos devido ao seu potencial sensibilizante e toxicidade pronunciada (Chen *et al.*, 2015; Hashemi; Emami, 2015). Essas limitações questionam sua adequação para aplicação em cosméticos e produtos farmacêuticos. Assim, há uma urgência destacada na pesquisa para desenvolver novos inibidores de TYR. Nesse contexto, Ferro *et al.* (2018) sintetizaram com sucesso uma nova classe de inibidores de TYR contendo componentes de arilpiperidina e arilpiperazina, demonstrando sua eficácia em concentrações micromolares.

Significativamente, esses inibidores demonstraram uma potência superior em comparação com o composto de referência, o ácido kójico. Uma variedade desses inibidores, como a hidroquinona, arbutina e KA, atualmente são utilizados como agentes de despigmentação (Zolghadri *et al.*, 2019; Chang, 2009). Essas características destacam a importância de investigar compostos que suprimam a síntese de melanina, contribuindo para o desenvolvimento de agentes clareadores e despigmentantes da pele, uma área de interesse considerável na indústria cosmética (Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017).

Neste estudo, apresentamos uma análise computacional abrangente dos inibidores de TYR que foram sintetizados e avaliados por Ferro *et al.* (2018). Esta análise envolveu a aplicação de técnicas de docking molecular, simulações de dinâmica molecular (MD) e cálculos de energia livre de ligação (SABE *et al.*, 2021). Nosso trabalho investigativo esclarece o mecanismo de inibição da TYR, fornecendo insights estruturais e energéticos que corroboram com as descobertas experimentais. É relevante destacar que todas as metodologias computacionais utilizadas neste estudo foram submetidas a uma validação rigorosa por parte de nosso grupo de pesquisa (BRASIL *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2022).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar, por meio de métodos computacionais, o potencial dos inibidores derivados de arilpiperidina e arilpiperazina na inibição da tirosinase, visando compreender seus mecanismos de ação e explorar suas aplicações em modulação da produção de melanina para uso cosmético e terapêutico.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a estabilidade dos inibidores de arilpiperidina e arilpiperazina no sítio ativo da tirosinase utilizando simulações de dinâmica molecular.
- Identificar e caracterizar as principais interações moleculares, como ligações de van der Waals e outras forças intermoleculares, entre os inibidores e a tirosinase.
- Estimar as energias livres de ligação dos inibidores ao sítio ativo da tirosinase por meio do método *Linear Interaction Energy* (LIE), bem como transformações de Perturbação da Energia Livre (FEP) e correlacioná-las com dados experimentais.
- Determinar descritores eletrônicos e orbitais moleculares de fronteira dos inibidores mais promissores utilizando cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT), auxiliando na compreensão de suas propriedades eletrônicas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Tyrosinase

As tirosinases foram isoladas e purificadas de diversas fontes, como plantas, animais e microrganismos (Zolghadri *et al.*, 2019). Embora muitas tenham sido sequenciadas, apenas algumas foram completamente caracterizadas, conforme destacado por Zaidi *et al.*, (2014). Em 2011, Ismaya *et al.*, ilustrou a estrutura cristalina da enzima tirosinase do cogumelo *Agaricus bisporus* (mTYR) com base em métodos moleculares e bioquímicos.

A tirosinase proveniente do cogumelo *Agaricus bisporus* destaca-se como uma enzima relevante e economicamente viável, além de apresentar considerável similaridade e homologia em relação à tirosinase humana (Strzępek-Gomółka *et al.*, 2021). Sua alta identidade com as tirosinases de mamíferos a torna um modelo apropriado para estudos de melanogênese. Notavelmente, a maioria dos estudos de inibição da tirosinase até o momento tem empregado a tirosinase do cogumelo, dada a disponibilidade comercial desta enzima (Chang, 2009).

A expressão anormal da tirosinase pode resultar no acúmulo excessivo de melanina, associado a vários distúrbios de pigmentação da pele, como sardas, manchas senis, melasma e até tumores malignos de melanoma (Chung *et al.*, 2018). Portanto, a regulação da síntese de melanina por meio da inibição da enzima tirosinase é uma área de grande interesse para pesquisadores, especialmente no contexto da prevenção da hiperpigmentação (Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017).

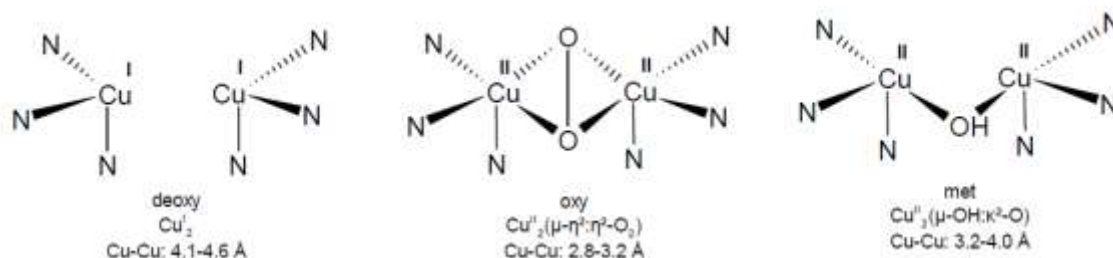
A enzima tirosinase, essencial na formação da melanina, é transferida do aparelho de Golgi para o citosol por meio do transporte vesicular. Isso ativa o processo de síntese de melanina (Skoczyńska *et al.*, 2017). Na etapa inicial, os melanossomas ou pré-melanossomas assumem uma matriz proteica, na qual a melanina (principalmente eumelanina) é depositada, a formação desses melanossomas resulta das interações entre estruturas do retículo endoplasmático rugoso (RER), vesículas e canais da Rede trans-Golgi (TGN) (Slominski *et al.*, 2004). As enzimas cruciais para a melanogênese são transportadas por vesículas aos melanossomas, originando-se do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi (Cichorek *et al.*, 2013).

A tirosinase, também conhecida como L-DOPA oxidoreductase, catecolase, difenoloxidase ou polifenoloxidase (EC 1.14.18.1), é uma glicoproteína multifuncional vinculada à membrana melanossomal (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995). Esta enzima faz parte do grupo de enzimas cobre tipo III, o qual inclui catecol oxidases (CO) e aurona sintase (AUS),

todas resumidas sob o termo genérico polifenoloxidasas (PPOs) (Mayer, 2006). Os resíduos de histidina na porção catalítica interna da tirosinase formam complexos com íons de cobre, essenciais para a sua atividade (Hearing; Jiménez, 1987).

O sítio ativo da tirosinase apresenta três estados distintos: metatirosinase (cobre II – OH – cobre II) desoxitirosinase (cobre I – cobre I) e oxitirosinase (cobre II – O₂ – cobre II). Esses estados diferem entre si pelo grau de oxidação do cobre, conforme descrito por Solomon *et al.*, (2014). A forma desoxi é constituída por dois íons Cobre (I) com uma configuração eletrônica 3d¹⁰, apresentando uma coordenação do cobre I tão independente quanto a do cobre metálico, sem ligante em ponte (Beltramini *et al.*, 1990). Por outro lado, a forma oxi inclui dois íons cobre II com uma configuração eletrônica 3d⁹, cada um acompanhado por dois resíduos de histidina equatoriais fortes e um axial mais fraco (Cramer *et al.*, 2006). Já a forma met contém também dois íons Cobre (II), sendo que o ligante em ponte é um ligante aqua (hidroxo) diferente do peróxido (Espín; Wichers, 1999).

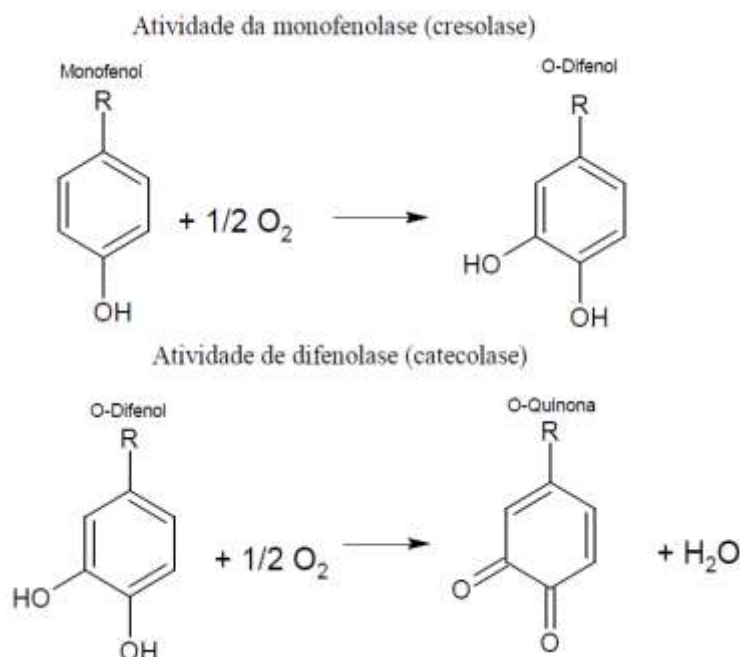
Figura 2 - Os três diferentes estados de oxidação de um centro de cobre tipo III podem ser adequados durante a catálise e distâncias usuais de cobre-cobre.



Fonte: Adaptado de Pretzler e Rompel (2018)

Na formação da pigmentação, especificamente no sítio ativo, dois íons de cobre interagem com o dioxigênio, gerando um intermediário químico altamente reativo (Wakamatsu; Zippin; Ito, 2021). Esse intermediário participa diretamente da hidroxilação de monofenóis, como a L-tirosina, transformando-os em difenóis, como a L-dopa, por meio da atividade de monofenolase ou cresolase. Adicionalmente, está envolvido na oxidação de o-difenóis para o-quinonas, através da atividade de difenolase ou catecolase, marcando o início da melanogênese (FIGURA 3) (Decker; Tuczek, 2000; Chang, 2009).

Figura 3 - Atividades enzimáticas de tirosinases e enzimas de cobre relacionadas.



Fonte: Adaptado de Claus e Decker (2006)

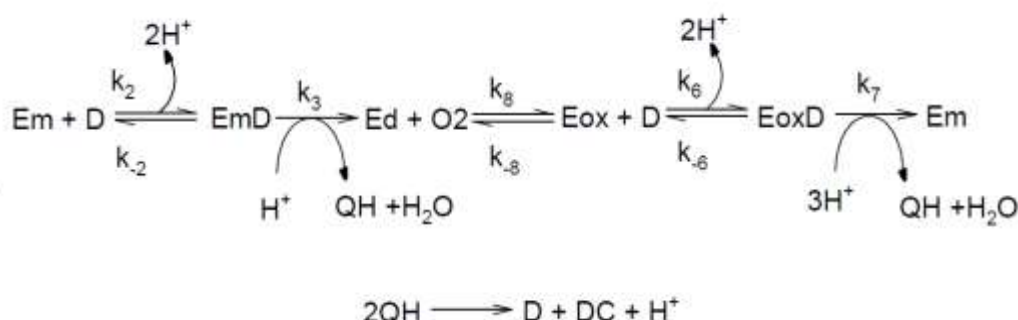
As o-quinonas, altamente reativas, passam por diversas reações espontâneas e não enzimáticas, incluindo a formação de melanina, conforme observado por Mason e Wright em 1949. A enzima tirosinase apresenta a atividade da monofenolase com um período de latência, representando o tempo necessário para acumular o-difenol no meio reacional, proporcional à quantidade de monofenol utilizada (Zolghadri *et al.*, 2019).

Olivares e Solano (2009) sugeriram que o estado de oxidação (E oxy) e substratos apropriados em mamíferos desencadeiam tanto a atividade da monofenolase quanto a atividade da difenolase. Durante a atividade da monofenolase, os monofenóis (L-Tirosina) são oxidados para formar o-quinonas (o-dopaquinona), um precursor crucial da melanina, e o estado de desoxigenação (E desoxi). Na atividade da difenolase, o E oxy e o estado de redução (E met) também podem oxidar o-difenóis (L-DOPA) para produzir o-dopaquinona.

Conforme Zolghadri *et al.* (2019), a atividade da difenolase pode ser analisada de forma independente quando a tirosinase interage com um o-difenol. A forma met-tirosinase (*Em*) se combina com o o-difenol (*D*), formando o complexo (*EmD*). Esse complexo oxida os o-difenóis, convertendo-os em o-quinona, e a enzima assume a forma desoxitirosinase (*Ed*). *Ed* possui uma afinidade significativa pelo oxigênio molecular, gerando a forma oxi-tirosinase (*Eox*), que se associa a outra molécula de o-difenol, formando o complexo (*EoxD*). Posteriormente, o o-difenol é novamente oxidado a o-quinona, e a forma met-tirosinase (*Em*) é reconstituída, completando o ciclo catalítico. Contudo, após essas reações enzimáticas, duas

moléculas de o-quinona (como a o-dopaquinona) reagem, gerando dopacromo e regenerando uma molécula de o-difenol.

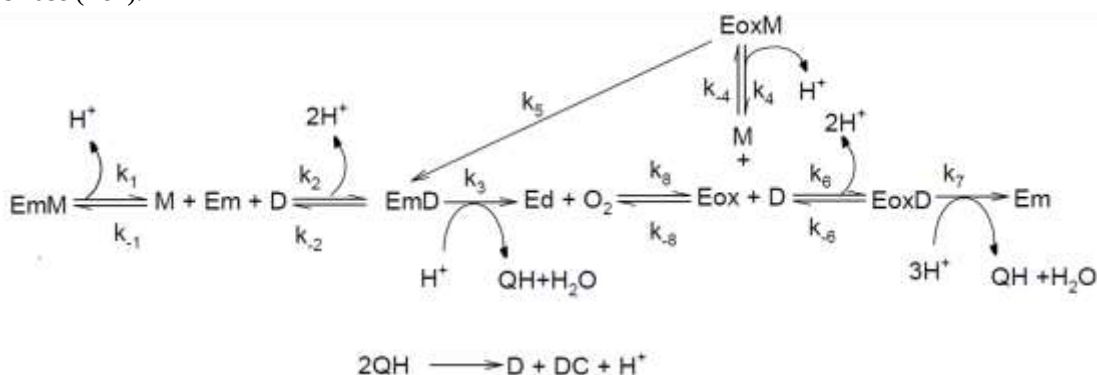
Figura 4 - Atividade difenolase da tirosinase. D é o-difenol, QH é o-dopaquinona protonada e DC é dopacromo.



Fonte: Adaptado de García-Molina *et al.*, (2021)

As reações químicas associadas à atividade da difenolase devem ocorrer simultaneamente com a atividade da monofenolase (Zhang *et al.*, 2021). A tirosinase apresenta a atividade da monofenolase com um período de latência. Esse período refere-se ao tempo necessário para a enzima acumular uma quantidade de o-difenol no meio reacional, sendo proporcional à quantidade de monofenol utilizada. A Figura 5 ilustra os novos complexos formados durante a atividade da monofenolase: oxi-tirosinase ligada ao monofenol (*EoxM*) e met-tirosinase ligada aos monofenóis (*EmM*). O *EoxM* é ativo e se converte em *EmD*, que é um intermediário no ciclo catalítico (García-Molina *et al.*, 2021).

Figura 5 - Atividades monofenolase e difenolase da tirosinase. M é monofenol, D é o-difenol, QH é o-dopaquinona protonada e DC é dopacromo. As formas enzimáticas são: metatirosinase (*Em*), desoxitirosinase (*Ed*) e oxi-tirosinase (*Eox*).



Fonte: Adaptado de García-Molina *et al.*, 2021

A tirosinase desempenha um papel crucial na produção de neuromelanina, catalisando o processo de oxidação da dopamina (Nagatsu *et al.*, 2023). Isso implica que a tirosinase pode ter uma influência significativa na formação de dopaquinonas pela neuromelanina (Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017). No entanto, a produção excessiva de dopaquinonas está

associada à ocorrência de danos neuronais no cérebro humano, sendo responsável pela neurodegeneração relacionada ao Parkinson e à morte celular (Greggio *et al.*, 2011). Adicionalmente, é importante destacar que a tirosinase é a principal causa do escurecimento indesejado de frutas e vegetais (Zolghadri *et al.*, 2019).

O domínio citoplasmático da tirosinase, especificamente o motivo EXXQPLL (ácido glutâmico-X-X-glutamina-prolina-leucina-leucina, onde X representa qualquer aminoácido), direciona o tráfego da tirosinase para os melanossomas (Park *et al.*, 2009). Além disso, a proteína quinase C-b (PKC-b) ativa a tirosinase diretamente pela fosforilação dos resíduos de serina nas posições 505 e 509 no domínio citoplasmático desta proteína associada ao melanossoma (Park *et al.*, 1999).

Segundo Marles *et al.*, (2003), a enzima tirosina hidroxilase isoenzima 1 (TH1) presente no melanócito é responsável por catalisar a conversão de L-tirosina em L-dopa. Essa enzima, por sua vez, pode fornecer o substrato e ativador preferidos para a tirosinase, que desempenha um papel fundamental na biossíntese de melanina. Além disso, é observado que a concentração de L-tirosina para a melanogênese está vinculada à conversão do aminoácido essencial L-fenilalanina em L-tirosina pela atividade intracelular da fenilalanina hidroxilase (PAH, EC 1.14.16.1) (Schallreuter *et al.*, 2008).

Os inibidores da tirosinase têm uma relevância significativa em diversos setores, sendo utilizados como conservantes de alimentos na indústria alimentícia e como agentes clareadores da pele no âmbito da medicina e dos cosméticos (Li *et al.*, 2021). Entretanto, o uso de inibidores da tirosinase, como a hidroquinona, o ácido kójico e a-arbutina, oriundos de fontes naturais ou sintéticas, enfrenta desafios consideráveis devido à sua atividade inibitória fraca e aos potenciais riscos à segurança (Fujimoto, 1999; McGregor, 2007). Portanto, a busca por inibidores de tirosinase eficientes e seletivos é de extrema importância.

3.1.1. Inibidores da tirosinase

Entre os diferentes tipos de compostos capazes de inibir a melanogênese, como inativadores e inibidores específicos da tirosinase, eliminadores de dopaquinona, substratos enzimáticos alternativos, inativadores e desnaturantes enzimáticos inespecíficos, apenas os inativadores e inibidores reversíveis específicos da tirosinase realmente se ligam à enzima e realmente inibem sua atividade (Zolghadri *et al.*, 2019)

Os inibidores são geralmente divididos em inibidores reversíveis e inibidores irreversíveis com base no fato de os inibidores que interagem com as enzimas causarem

inativação permanente da enzima. A inibição característica da tirosinase é a inibição reversível. Para a inibição caracterizada por inibição reversível, a combinação de inibidor e enzima é um processo de equilíbrio dinâmico reversível (Honisch *et al.*, 2020).

De acordo com Qu *et al.*, (2020) o aumento da concentração do inibidor fará com que a atividade enzimática diminua, mas o inibidor apenas inibe a atividade enzimática em vez de inativar permanentemente a enzima, quando a concentração do inibidor diminuir, a atividade da tirosinase aumentará, enquanto isso, a inibição irreversível será a inativação permanente da tirosinase. De acordo com os diferentes locais e métodos de interação dos inibidores da tirosinase com a enzima, eles podem ser divididos em quatro formas: competitivo, não competitivo, misto e de ligação lenta (Masum; Yamauchi; Mitsunaga, 2019).

A tirosinase é amplamente encontrada em plantas, animais e microorganismos. Dado o envolvimento da tirosinase na patogênese do melanoma, o monitoramento e a regulação farmacológica de sua atividade auxiliarão no diagnóstico e tratamento da doença (Chang, 2009). Para descobrir inibidores de tirosinase altamente eficientes e seletivos, vários pesquisadores usam principalmente os dois métodos a seguir. Uma maneira é extrair e separar os recursos naturais: Hidroquinona (Kang *et al.*, 2003), a-arbutina (Jin *et al.*, 1999), ácido kójico (Curto *et al.*, 1999), retinóides (Sarkar; Arora; Garg, 2013), ácido azelaico (Berlitz *et al.*, 2019), resveratrol (Na *et al.*, 2019), ácido caftárico (Honisch *et al.*, 2020), tanino de valonea (Liu *et al.*, 2021) e crisosplenetina (Arroo *et al.*, 2020) são identificados como inibidores naturais da tirosinase. A síntese orgânica e a otimização estrutural são outras formas de obtenção de novos inibidores. De acordo com as características estruturais, podemos dividir os inibidores sintéticos da tirosinase existentes em polifenóis, flavonóides, fenilpropanóides, tioureias e heterocíclicos de enxofre.

3.2. Melanogênese

A melanina desempenha um papel importante na proteção da pele da luz ultravioleta (UV). Também determina a cor da pele e influencia a aparência fenotípica. No entanto, níveis aumentados de melanina podem levar a problemas estéticos (Na *et al.*, 2019). A pigmentação irregular da pele é causada pela desregulação do processo de melanogênese pela radiação UV, inflamação, desequilíbrio hormonal ou vários compostos químicos, incluindo medicamentos, esses estímulos afetam as diferentes vias da melanogênese (D'mello *et al.*, 2016). A melanogênese, por definição, é a produção dos pigmentos de melanina; estes são mais

frequentemente produzidos por células chamadas melanócitos (Bonaventure; Domingues; Larue, 2013).

A melanina nos queratinócitos atua como fotoprotetor através da pigmentação da pele, cabelos e olhos humanos e da eliminação de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete e ânions superóxidos (Tada; Kohno; Niwano, 2014). A pele possui unidades epidérmicas responsáveis pela produção e distribuição de melanina, processo denominado melanogênese, estas unidades são compostas por um melanócito rodeado por queratinócitos e regulado por um sistema parácrino fechado (Videira; Moura; Magina, 2013).

A melanogênese e a pigmentação da pele são o fator fotoprotetor mais importante em resposta aos danos da radiação ultravioleta do sol e à fotocarcinogênese da pele (Brenner; Hearing, 2007). O efeito protetor da melanina, especialmente da eumelanina, é alcançado pela sua capacidade de servir como uma barreira física que dispersa a radiação UV e como um filtro absorvente que reduz a penetração da radiação UV através da epiderme (Kaidbey *et al.*, 1979).

Supõe-se que a maioria dos efeitos UVA seja o resultado de danos oxidativos mediados pela absorção de UVA por cromóforos celulares, como precursores de melanina, que atuam como fotossensibilizadores, levando à geração de espécies reativas de oxigênio e radicais livres que podem induzir danos ao DNA (Park *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado que os lipídios da membrana plasmática também são afetados pela irradiação UV para liberar diacilglicerol associado à membrana (DAG), que por sua vez pode ativar a proteína quinase C-b (PKC-b), resultando na estimulação da melanogênese (Punnonen; Yuspa, 1992).

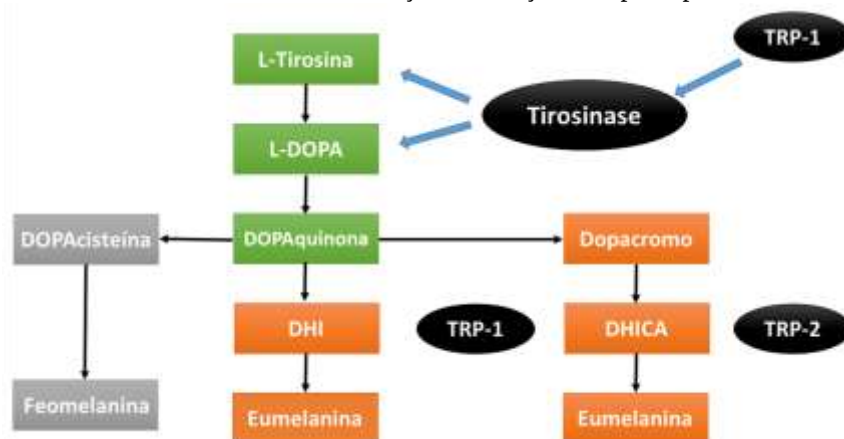
A melanina inclui principalmente eumelanina e feomelanina, que estão presentes principalmente na pele, no cabelo, nos olhos (íris e coróides) e no ouvido interno (Cichorek *et al.*, 2013). A eumelanina é um polímero insolúvel marrom/preto, enquanto a feomelanina é um polímero solúvel vermelho/amarelo (Videira; Moura; Magina, 2013). A biossíntese da melanina envolve diferentes tipos de reações enzimáticas complexas, como tirosinase, proteína 1 relacionada à tirosinase (TYRP-1) e proteína 2 relacionada à tirosinase (TYRP-2) (Li *et al.*, 2021).

A feomelanina e a eumelanina diferem não apenas na cor, mas também no tamanho, formato e embalagem de seus grânulos. Ambas as melaninas derivam de uma via comum dependente da tirosinase com o mesmo precursor, a tirosina. A etapa obrigatória é a hidroxilação da tirosina em dopaquinona, da qual também pode ser derivada a l-DOPA (Land; Riley, 2000).

Duas proteínas semelhantes à tirosinase (40% de aminoácidos homólogos), a proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP-1) e a proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP-2), também estão

presentes na membrana dos melanossomas (Videira; Moura; Magina, 2013). Embora seu papel preciso ainda não esteja esclarecido, é possível que o TRP-1 tenha um papel na ativação e estabilização da tirosinase, na síntese de melanossomas, no aumento da relação eumelanina/feomelanina e um papel contra o estresse oxidativo devido ao seu efeito peroxidase (Park *et al.*, 2009).

Figura 6 - Resumo das duas formas de melanina e descrição das funções das principais enzimas associadas



Fonte: Adaptado Videira; Moura; Magina, 2013

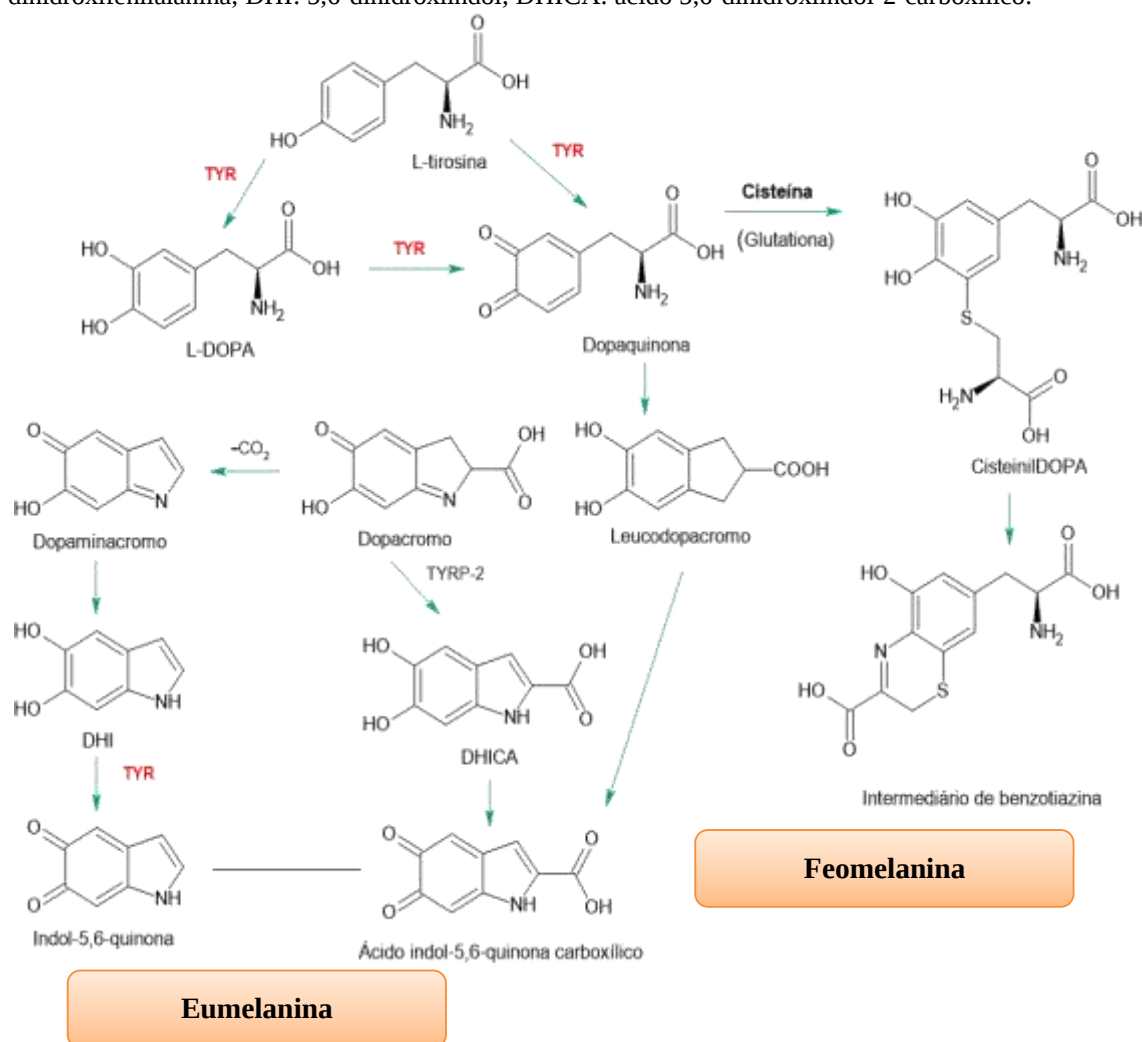
O processo de melanogênese é iniciado com a oxidação da L-tirosina em dopaquinona (DQ) pela tirosinase através do ciclo da monofenolase (Logesh *et al.*, 2023). A L-tirosina também pode ser hidroxilada em L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), e então a L-DOPA também pode ser oxidada em dopaquinona através do ciclo da difenolase. Acredita-se frequentemente que a formação de dopaquinona seja uma etapa limitante da taxa na biossíntese da melanina porque as seguintes etapas de reação podem ocorrer espontaneamente em um valor de pH fisiológico (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995).

Além disso, devido ao excesso de tirosinase, a dopaquinona pode autociclar-se para gerar leucodopacromo que pode posteriormente se transformar em dopacromo. Após a descarboxilação, o dopacromo se converte em 5,6-dihidroxiindol (DHI), que é posteriormente oxidado para produzir indol-5,6-quinona pela oxidação da tirosinase (Fan *et al.*, 2021). O dopacromo pode ser convertido em ácido 5,6-dihidroxiindol carboxílico (DHICA) com a ajuda do TYRP-2. O ácido indol-5,6-quinona carboxílico é oxidado tanto do DHICA quanto do leucodopacromo. A eumelanina é formada através da polimerização do ácido indol-5,6-quinona e do ácido indol-5,6-quinona carboxílico (Carradori *et al.*, 2024).

Estudos demonstraram que a tirosinase é uma oxidoredutase e o TYRP-2 é uma isomerase. No entanto, a função do TYRP-1 continua a ser mais explorada. As evidências confirmaram que o TYRP-1 de camundongos é uma oxidoredutase que pode catalisar a

oxidação do DHICA (Carradori *et al.*, 2024). Em 2017, Lai *et al.* obteve a estrutura cristalina do TYRP-1 humano (PDB ID: 5M8L) pela primeira vez, fornecendo novas evidências e insights para explicar que o TYRP-1 não mostrou nenhuma atividade redox da tirosinase. Em suma, a tirosinase desempenha um papel importante na biossíntese da melanina.

Figura 7 - Via biossintética da melanina. TYR: tirosinase; TYRP-1: proteína 1 relacionada à tirosinase; DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina; DHI: 5,6-dihidroxiindol; DHICA: ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico.



Fonte: Adaptado de (Chang, 2009)

3.3. Planejamento de novos fármacos

De maneira geral, leva-se mais de 10 anos para lançar um medicamento no mercado, com um custo médio de aproximadamente US\$ 2,6 bilhões (Sharma *et al.*, 2021). Devido a isso, o planejamento de fármacos tem se tornado progressivamente mais racional, buscando estabelecer propostas e objetivos claramente definidos.

O planejamento racional de fármacos envolve a aplicação dos conhecimentos sobre fisiopatologia, atividade biológica, seletividade, biodisponibilidade, e outras características de moléculas bioativas (ou ligantes, do inglês "hits"), para a identificação de compostos-protótipos (ou "lead compounds", em inglês) com potencial farmacológico, visando à posterior otimização molecular (Guido; Andricopulo; Oliva, 2010). Nesta abordagem, o planejamento estrutural de uma nova molécula com potencial atividade biológica baseia-se no alvo terapêutico escolhido. Portanto, a seleção do alvo terapêutico representa uma etapa crucial no processo de descoberta de novos fármacos.

Os ensaios de triagem virtual (VS, do inglês, Virtual Screening) podem ser conduzidos com o propósito de identificar estruturas de potenciais inibidores disponíveis em bancos de dados, permitindo a visualização gráfica de diversos complexos ligante-receptor, a identificação de interações, bem como a compreensão da relação estrutura-afinidade (Kitchen *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2021). Informações sobre a estrutura de alvos macromoleculares ou de complexos ligante-receptor possibilitam o desenvolvimento de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês, Structure-Based Drug Design) (Guido; Andricopulo; Oliva, 2010).

Em situações em que a estrutura do alvo escolhido não é conhecida, pode-se recorrer a métodos de planejamento de fármacos baseados na estrutura do ligante (LBDD, do inglês ligand-based drug design), como destacado por Sharma *et al.*, (2021). Esses métodos exploram propriedades e características de séries de ligantes bioativos. É crucial um gerenciamento adequado da informação relacionada ao planejamento racional de fármacos para lidar com o vasto volume de dados disponíveis, garantindo organização e análise eficazes.

3.3.1. Modelagem molecular

A modelagem molecular é composta por um conjunto de técnicas computacionais que visam a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos (Barreiro *et al.*, 1997). De acordo com Montanari (2000) a utilização de métodos computacionais tem se tornado indispensável no estudo, planejamento e descoberta de novos

fármacos, bem como, a descrição de processos químicos e biológicos por meio da estrutura tridimensional de micro e macromoléculas.

Sobre as técnicas de modelagem molecular, duas estratégias podem ser utilizadas na: o desenho direto, onde as propriedades tridimensionais do receptor estudado são diretamente consideradas e o desenho indireto, baseado na análise comparativa das propriedades estruturais de moléculas ativas e inativas previamente conhecidas que são interpretadas em termos de complementaridade com um modelo hipotético de um receptor (Cohen *et al.*, 1990).

Existem diversos métodos de cálculo que podem ser aplicados em uma determinada estratégia de modelagem molecular, diferenciando-se quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados (Barreiro *et al.*, 1997). Os campos podem ser totalmente empíricos, como os utilizados em mecânica molecular, ou, no outro extremo, puramente teóricos (métodos *ab initio*), passando pelos chamados métodos semi-empíricos (Venâncio; Rocha, 2015). A aplicação de um ou outro método dependem da complexidade do sistema a ser analisado.

3.3.2. Mecânica molecular

A metodologia da mecânica molecular é baseada na aproximação de Born-Oppenheimer, onde os movimentos dos núcleos e dos elétrons podem ser tratados separadamente, logo, este método é caracterizado por considerar os movimentos nucleares e por tratar os elétrons indiretamente, assumindo que os núcleos possuem movimentos livres e que todas as interações nucleares são aditivas (Coelho *et al.*, 1999).

Neste contexto, o campo de forças é constituído pelo somatório de termos de energia relacionados às posições de equilíbrio do sistema (distâncias de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros, distâncias de van der Waals, ligações hidrogênio, interações eletrostáticas, etc.) as quais podem ser associadas penalidades energéticas para seu afastamento (Barreiro *et al.*, 1997).

Os pacotes de programas de mecânica molecular (AMBER, CHARM, DISCOVER, MM2/MMP2, PCMODEL-MMX, SYBIL, etc.) utilizam diferentes funções de energia potencial para representar a energia interna de uma molécula (Brooks *et al.*, 1983; Case *et al.*, 2005). O campo de força AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), por exemplo, é expresso pela equação (1) (Barreiro *et al.*, 1997):

$$E_{total} = \sum_{ligação} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{ângulo} k_\theta \left(\theta - \theta_0 \right)^2 + \sum_{diedro} \frac{k_\phi}{2(1 + s \cdot \cos \phi)} - \frac{b_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{D \cdot r_{ij}} + \sum_{ligação-H} \left(\frac{c_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{d_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \quad (1)$$

3.3.3. Mecânica quântica

A mecânica quântica permite maior precisão nos resultados, fornecendo dados sobre a estrutura eletrônica (Gupta; Sharma, 2009). Os pacotes de programas de métodos quânticos *ab initio* (CADPAC, GAMESS, GAUSSIAN, HONDO, etc.) e semi-empíricos (AMPAC, MOPAC, etc.) são baseados no formalismo de orbitais moleculares com diferentes abordagens (Spoel *et al.*, 2005). Nos métodos *ab initio*, um modelo para uma função de onda particular é determinado e os cálculos são realizados sem simplificação, nesta abordagem o erro está relacionado ao conjunto de bases selecionado e ao nível de tratamento da correlação eletrônica (Venâncio; Rocha, 2015).

Os métodos semi-empíricos baseiam-se no mesmo formalismo do método Hartree-Fock, tendo parte de seus parâmetros ajustados a dados experimentais (Segantine; Gonçalves, 2020). A parametrização dos métodos semi-empíricos com dados experimentais aumentou significativamente a acuracidade química e a velocidade dos métodos de orbitais moleculares (Barreiro *et al.*, 1997). Os métodos semiempíricos de maior sucesso, MINDO, ou Negligência Intermediária Modificada da Sobreposição Diferencial, AM1 (*Austin Model 1*) e PM3 (*Parametric Method 3*), são todos baseados em NDDO (*Neglect of Diatomic Differential*), mas diferem no tratamento da repulsão núcleo-núcleo e como os parâmetros estão atribuídos (Hofmann; Schaefer, 2003)

Nos métodos quânticos os núcleos são assumidos em sucessivas posições estacionárias, sobre as quais a distribuição espacial ótima dos elétrons é calculada pela resolução da equação de Schrödinger (Gupta; Sharma, 2009). O processo é repetido até que a energia permaneça constante dentro de um limite escolhido, ou seja, até se alcançar um ponto estacionário da superfície de energia (Barreiro *et al.*, 1997).

3.3.4. Docking Molecular

A técnica de *docking* molecular fornece informações sobre o melhor encaixe de uma molécula (denominada ligante) no sítio ativo do receptor, considerando características

químicas, eletrostáticas e espaciais, além de calcular sua energia de interação e classificar os ligantes de acordo com sua afinidade com o alvo macromolecular (Morris; Lim-Wilby, 2008). Os dados obtidos a partir da docagem facilitam as pesquisas de novos compostos de partida e auxiliam na direção da síntese de compostos derivados (Li *et al.*, 2003).

A docagem molecular é dividida em três partes: i) os sítios de interação ligante-receptor são definidos, ii) estudo do espaço conformacional do ligante-receptor, e iii) as coordenadas do modelo são otimizadas para aumentar a precisão dos cálculos de energia de ligação em estudos de validação. Os sistemas, normalmente, são constituídos por um receptor macromolecular (muitas vezes, uma proteína) e um potencial ligante, essa estrutura é descrita por meio de modelos atômicos tridimensionais, isto é, um conjunto de coordenadas atômicas (Seddon *et al* 2012). A estrutura do receptor pode ser determinada por técnicas como a cristalografia de raios-X, a ressonância magnética nuclear (RMN) ou a microscopia eletrônica (Barreiro *et al.*, 1997).

A maioria dos alvos de drogas ainda está em uma das cinco famílias de proteínas: receptores acoplados à proteína G (GPCRs), canais iônicos, quinases, receptores de hormônios nucleares e proteases que estejam associados a doenças ou processos fisiológicos para os quais busca-se desenvolver um tratamento quimioterápico (Rask-Andersen; Masuram; Schiöth, 2014). Existem diversos programas de *docking* comerciais e gratuitos sendo amplamente empregados, como *GOLD* (Cole; Nissink; Taylor, 2005), *AutoDockTools4* (Morris *et al.*, 2009), *AutoDock Vina* (Trott; Olson, 2009), *Glide* (Friesner *et al.*, 2006), *Molegro Virtual Docker* (Thomsen; Christensen, 2006), etc.

Os conformeros pré-selecionados são frequentemente avaliados usando esquemas de score mais complexos com inclusão de pelo menos algum efeito de solvatação ou entrópicos e tratamento mais minucioso das interações eletrostáticas e de van der Waals (Gohlke; Klebe, 2002). A ligação entre dois parceiros em interação tem componentes entálpicos (ΔH) e entrópicos ($-T\Delta S$), o que significa que o evento de reconhecimento está associado a mudanças na estrutura e na dinâmica de cada contraparte (K, 2011).

3.3.5. Dinâmica Molecular

Fundamentada nos princípios básicos da mecânica clássica, a metodologia DM possibilita a observação do comportamento dinâmico microscópico dos átomos que compõem o sistema. A partir disso, é possível analisar os mecanismos microscópicos de transferência de energia e massa em processos químicos, bem como calcular propriedades dinâmicas, como espectros de absorção, constantes de taxa e propriedades de transporte. Além de oferecer uma

visão dinâmica em escala microscópica, a DM também pode ser utilizada para amostragem de conjuntos mecânicos estatísticos e para a determinação de propriedades de equilíbrio, incluindo médias termodinâmicas (como pressão, temperatura e volume), estrutura e energias livres ao longo de caminhos de reação (Tuckerman; Martyna, 1999)

A ideia central por trás das simulações de DM é estudar a dependência do tempo comportamento de sistemas microscópicos, conforme demonstrado na equação (2). Isto é obtido resolvendo as equações diferenciais de segunda ordem representadas pela segunda lei de Newton (Vivo *et al.*, 2016):

$$f_i(t) = m_i a_i(t) = - \frac{\partial V(x(t))}{\partial x_i(t)} \quad (2)$$

Onde $f_i(t)$ é a força resultante que atua no átomo do sistema em um dado ponto no tempo t , $a_i(t)$ é a aceleração correspondente e m_i é a massa. Na equação (1), a configuração instantânea do sistema é representada pelo vetor $x(t)$, que descreve a posição dos N átomos que interagem no espaço cartesiano ($x = \{x_1, y_1, z_1, x_2, y_2, z_2, \dots, x_N, y_N, z_N\}$). Normalmente, na descoberta computacional de drogas, adotamos uma descrição mecânica clássica das forças. Notavelmente, essa aproximação vale para partículas massivas, como núcleos, enquanto os movimentos dos elétrons devem ser calculados em média. Para conseguir isso, uma função de energia potencial empírica é introduzida ($V(x)$ na equação (2)), e o modelo decorrente dessa representação simplificada é chamado de campo de força, ou mecânica molecular (MM), descrito na equação (3):

$$V = \sum_i^{\text{ligação}} \frac{k_{l,i}}{2} (l_i - l_{0,i})^2 + \sum_i^{\text{ângulo}} \frac{k_{\alpha,i}}{2} (\alpha_i - \alpha_{0,i})^2 \quad (3)$$

$$+ \sum_i^{\text{torção}} \left\{ \sum_k^M \frac{V_{ik}}{2} [1 + \cos(n_{ik}\theta_{ik} - \theta_{0,ik})] \right\}$$

$$+ \sum_{i,j}^{\text{pares}} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i,j}^{\text{pares}} \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r r_{ij}}$$

Na equação (3), os três primeiros termos representam interações intramoleculares dos átomos. Eles descrevem variações na energia potencial em função do alongamento, flexão e torção da ligação entre os átomos diretamente envolvidos nas relações de ligação. Eles são representados por somas sobre comprimentos de ligação (l), ângulos (α) e ângulos diedros (θ), respectivamente. As contribuições de alongamento e flexão de ligação compartilham a mesma forma funcional, pois ambas são descritas por potenciais harmônicos com valores de referência

l_0 e α_0 e constantes de força k_l e k_α , respectivamente. No entanto, devido à sua periodicidade intrínseca, os termos de torção são naturalmente definidos por uma série de cossenos de M termos para cada ângulo diedro. Assim, n_{ik} é um parâmetro que descreve a multiplicidade para o k -ésimo termo da série, $\theta_{0,ik}$ é o ângulo de fase correspondente e V_{ik} é a barreira de energia. Tomado como um todo, este grupo de contribuições é geralmente referido como os termos “bonded” do campo de força.

As forças em uma simulação de DM são calculadas usando um modelo conhecido como campo de força de mecânica molecular, que se ajusta aos resultados de cálculos de mecânica quântica e, normalmente, a certas medidas experimentais. Por exemplo, um campo de força típico incorpora termos que capturam interações eletrostáticas (coulombianas) entre átomos, termos semelhantes a molas que modelam o comprimento preferido de cada ligação covalente e termos que capturam vários outros tipos de interações interatômicas (Hollingsworth; Dror, 2018). A principal vantagem dos campos de força é que eles aceleram consideravelmente os cálculos, especialmente em comparação com a mecânica quântica (MQ) (Vivo *et al.*, 2016).

As escolhas mais comuns de campo de força são versões de AMBER, CHARMM e OPLS (Harder *et al.*, 2015; Huang; Mackerell, 2018; Robustelli; Piana; Shaw, 2018). Todos esses campos de força dependem de formas funcionais, mas cada uma tem certos pontos fortes e fracos (Hollingsworth; Dror, 2018). Por exemplo, O CHARMM36m e o complementar CHARMM General Force Field (CGenFF) têm parâmetros amplamente otimizados e validados para proteínas, lipídios e ligantes semelhantes a drogas (Huang; Mackerell, 2018; KLAUDA *et al.*, 2010); os modelos de campo de força A99SB-disp recentemente introduzidos desordenaram particularmente bem as proteínas (Robustelli; Piana; Shaw, 2018); e OPLS3 pode ter os parâmetros de ligante mais amplamente otimizados, embora sua natureza proprietária geralmente tenha impedido a avaliação de terceiros (Harder *et al.*, 2015).

Os softwares mais utilizados incluem GROMACS, NAMD, AMBER, CHARMM, Desmond e OpenMM (Abraham *et al.*, 2015; Eastman *et al.*, 2017). O software AMBER e CHARMM não deve ser confundido com os campos de força AMBER e CHARMM; mais modernos pacotes de software de simulação suportam vários campos de força. Todos esses pacotes de software executam cálculos semelhantes, mas diferem na eficiência com que são mapeados para vários hardwares e nos recursos suportados (por exemplo, amostragem aprimorada métodos, esquemas de controle de temperatura e pressão, suporte para simulações de granulação grossa) (Hollingsworth; Dror, 2018).

3.3.6. Linear Interaction Energy

O método *Linear Interaction Energy* é amplamente utilizado em biologia computacional e química para estimar a energia livre de ligação de um ligante a uma proteína. Baseado na teoria de resposta linear, o LIE tem aplicações significativas no design de fármacos baseado em estrutura e em estudos de reconhecimento molecular. Seu cálculo é realizado a partir de uma combinação linear das energias de interação eletrostática e de van der Waals entre o ligante e a proteína.

O método LIE foi introduzido por Åqvist e colaboradores em 1994 (Åqvist *et al.*, 1994) como um modelo de ponto final derivado da Aproximação de Resposta Linear (LRA) (Lee *et al.*, 1992). Esse método permite calcular as contribuições eletrostáticas para a afinidade de ligação e tem sua formulação baseada na equação de Zwanzig para perturbação de energia livre (Leach, 2001). Além da contribuição eletrostática, o LIE também considera a componente não polar da energia livre de ligação (ΔG_{bind}), representada pela diferença entre as energias médias de interação não ligadas, como as forças de van der Waals, do ligante em seus estados ligado e não ligado à proteína (Åqvist *et al.*, 1994). Para calcular ΔG_{bind} , as energias médias de interação van der Waals (vdW) e eletrostáticas (ele) do ligante com seu ambiente são escaladas pelos parâmetros LIE α e β . A equação (4) pode ser usada para prever afinidades de ligação de ligantes com dados experimentais desconhecidos (Rifai *et al.*, 2020).

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha (\langle V_{\text{lig-surr}}^{\text{vdw}} \rangle_{\text{bound}} - \langle V_{\text{lig-surr}}^{\text{vdw}} \rangle_{\text{unbound}}) + \beta (\langle V_{\text{lig-surr}}^{\text{ele}} \rangle_{\text{bound}} - \langle V_{\text{lig-surr}}^{\text{ele}} \rangle_{\text{unbound}}) \quad (4)$$

Os modelos LIE podem ser descritos como Relações Quantitativas Estrutura-Atividade (QSAR) empíricas, que utilizam estimadores energéticos fundamentados fisicamente. Diferentemente de métodos que estimam a energia livre de ligação apenas com base na estrutura do ligante, o LIE também leva em conta as propriedades do complexo ligante-receptor. Isso sugere que os modelos LIE podem apresentar um desempenho superior a métodos que consideram apenas a estrutura do ligante, pois estão mais diretamente relacionados à conformação do complexo molecular. Uma das formulações mais utilizadas do LIE emprega a seguinte expressão de regressão para a energia livre de ligação ΔF_{bind} , representa da equação (5) (Su *et al.*, 2006):

$$\Delta F_{bind} = \alpha \overline{\Delta V_{vdw}} + \beta \overline{\Delta V_{ele}} + \gamma \overline{\Delta A} + \delta \quad (5)$$

Onde:

- $\overline{\Delta V_{vdw}}$, $\overline{\Delta V_{ele}}$ e $\overline{\Delta A}$ representam as diferenças entre as energias médias de interação van der Waals e eletrostática, respectivamente, medidas para o ligante no complexo e livre em solução.
- V_{vdw} é a energia média de interação van der Waals do ligante com seu ambiente (o solvente ou o receptor e seu meio circundante).
- $\overline{V_{ele}}$ é a energia média de interação eletrostática do ligante com seu ambiente.
- $\overline{A}$ é a área média de superfície acessível ao solvente do ligante.
- Os parâmetros α , β , γ e δ são ajustáveis empiricamente, sendo calibrados com base em conjuntos de treinamento de ligantes de afinidade de ligação conhecida.

Os valores dessas quantidades são normalmente obtidos por simulações de Dinâmica Molecular ou Monte Carlo (MC), partindo de conformações conhecidas ou modeladas do ligante e do complexo ligante-receptor. Essas abordagens permitem a obtenção de propriedades energéticas médias, essenciais para a estimativa precisa da energia livre de ligação (Jorgensen *et al.*, 2008). Os modelos LIE têm sua fundamentação teórica em princípios físicos de solvatação, baseando-se na aproximação de resposta linear para a energia livre (Lee *et al.*, 1992; Åqvist *et al.*, 1994; Leach, 2001).

A introdução de um ligante em um ambiente, seja ele uma solução ou um receptor, pode ser interpretada como uma perturbação no sistema. Caso o sistema responda de maneira perfeitamente linear a essa perturbação, a energia livre de introdução do ligante será proporcional à energia de interação entre ele e seu ambiente. Entretanto, devido ao impacto significativo da presença do ligante, a hipótese de resposta linear exata nem sempre se aplica a todos os processos. A equação de regressão do LIE assume, em vez disso, que a resposta linear se aplica individualmente às interações hidrofóbicas, de van der Waals e eletrostáticas, cada uma com um coeficiente de proporcionalidade distinto. Assim, as relações LIE são mais adequadas para estimar energias livres de ligação relativas entre ligantes semelhantes, e a precisão do modelo depende da magnitude da perturbação causada pela substituição de um ligante por outro. O efeito das energias livres de ligação absolutas é absorvido pelo parâmetro de interceptação δ , refletindo a faixa limitada de aplicabilidade do modelo (Su *et al.*, 2006).

3.3.7. Free energy perturbation

A simulação de perturbação de energia livre é um método rigoroso, fundamentado em princípios físicos, utilizado para calcular a diferença de energia livre entre sistemas químicos distintos. Com os avanços tecnológicos recentes, o FEP tornou-se uma ferramenta poderosa para prever com precisão afinidades de ligação relativas, sendo cada vez mais aplicado no desenvolvimento de fármacos (Zhu *et al.*, 2022).

O cálculo de mudanças na energia livre desempenha um papel essencial na caracterização termodinâmica de equilíbrios químicos e vias de reação. As abordagens convencionais para essa estimativa incluem a FEP e a integração termodinâmica (TI), ambas baseadas no conceito de acoplamento contínuo, proposto por Kirkwood em seus estudos sobre equações integrais de sistemas de fluidos (Kirkwood *et al.*, 1935). Posteriormente, Zwanzig aprimorou o formalismo matemático da teoria de perturbação de energia livre, estabelecendo a expressão fundamental para o cálculo da diferença de energia livre entre estados (Zwanzig *et al.*, 1954). A combinação dessa teoria com simulações de dinâmica molecular e técnicas de amostragem de Monte Carlo estabeleceu a FEP como um método amplamente utilizado no cálculo de diferenças de energia livre (Jorgensen *et al.*, 1985).

Diversas aplicações foram desenvolvidas a partir desse método, incluindo a computação de energias livres relativas de solvatação, a determinação de valores relativos de pKa, a avaliação dos efeitos do meio em equilíbrios conformacionais, o estudo de afinidades de ligação hospedeiro-hóspede e a construção de superfícies de energia livre para reações orgânicas e bioquímicas. A teoria de perturbação de energia livre, conforme formulada por Zwanzig em seu artigo de 1954, estabelece uma relação entre a diferença de energia livre de um sistema em seu estado inicial (referência) e seu estado final (alvo). Essa relação é expressa na equação (6) como a média de uma função da diferença de energia, avaliada por meio da amostragem do estado inicial (Jorgensen *et al.*, 2008).

$$\Delta F = F_1 - F_0 = -kT \ln \left\langle \exp \left[\frac{-(E_1 - E_0)}{kT} \right] \right\rangle_0 \quad (6)$$

Zwanzig continuou a derivar uma expressão para a mudança de energia livre como uma série de potências. Definindo a energia do estado alvo, E_1 , como a soma da energia de um estado de referência, E_0 , e um pequeno potencial perturbador, V (equação (2)), a equação (3) foi obtida expandindo a equação (7) para a segunda ordem apresentada abaixo:

$$E_1 = E_0 + V \quad (7)$$

A diferença de energia livre pode ser aproximada pela equação (8) a seguir:

$$\Delta F = F_1 - F_0 = \langle V \rangle - \frac{1}{2kT} (\langle V^2 \rangle - \langle V \rangle^2) \quad (8)$$

Aqui, a diferença de energia livre entre os estados de referência e alvo é estimada para a primeira ordem pela média do conjunto de referência do potencial perturbador, e para a segunda ordem incluindo o desvio quadrático médio do potencial perturbador de sua média, ou a variância. Esta aproximação para calcular diferenças de energia livre foi reconhecida como especialmente relevante para sistemas com flutuações governadas por uma distribuição de probabilidade gaussiana, e, por exemplo, protocolos relacionados foram aplicados à carga de íons em solução (Levy *et al.*, 1991) a estimativa de pKa intrínsecos e mudanças de pKa em proteínas (Jorgensen *et al.*, 2008).

A abordagem FEP se destaca por permitir a realização de simulações apenas nos estados termodinâmicos finais para obter diferenças de energia livre, sem a necessidade de atravessar um caminho intermediário. Esse aspecto tornou a FEP atrativa para a realização de correções de ponto final (*book-ending*), especialmente na transição entre modelos mecânico-moleculares (MM) e mecânico-quânticos (QM). Essas correções ajudam a reduzir ou eliminar a necessidade de simulações com modelos QM computacionalmente intensivos. Além disso, a FEP tem servido como base para métodos aproximados de ponto final, como a abordagem de LIE (Cournia *et al.*, 2021). Os cálculos de FEP têm sido amplamente utilizados para: Estudo da energética de ligação hospedeiro-convidado; Previsões de pKa; Avaliação dos efeitos do solvente em reações; Análise de reações enzimáticas; Triagem virtual de ligantes na descoberta de fármacos; Estudos de mutagênese *in silico* (Sampson *et al.*, 2024).

Para estudar reações químicas, muitas vezes é necessário empregar uma representação quântico-mecânica (QM) do centro reativo, pois os campos de força da mecânica molecular (MM) utilizados na FEP não conseguem lidar com a quebra de ligações químicas. Nesses casos, um método híbrido que combina as vantagens das abordagens QM e MM, denominado QM/MM, é amplamente empregado para obter maior precisão nos cálculos de energia livre. A abordagem de perturbação da energia livre tem se consolidado como uma ferramenta essencial na modelagem computacional, permitindo o estudo de diferenças de energia livre com alta precisão. Seu desenvolvimento histórico, desde as formulações de Kirkwood (Kirkwood *et al.*, 1935) e Zwanzig (Zwanzig *et al.*, 1954) até as aplicações modernas em descoberta de fármacos

e ciência dos materiais, destaca a relevância desse método. A integração com abordagens híbridas como QM/MM amplia ainda mais seu potencial, possibilitando estudos complexos com alto grau de confiabilidade.

3.3.8. Cálculos de DFT

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT) é uma das abordagens "ab initio" mais populares e bem-sucedidas para descrever a estrutura de sistemas quânticos de muitos corpos (átomos, moléculas, sólidos). Provavelmente, nenhum outro método alcança precisão comparável com o mesmo custo computacional. O conceito fundamental é que as propriedades do estado fundamental de um sistema estacionário de muitos corpos podem ser representadas exclusivamente em termos da densidade do estado fundamental. Como a densidade $\rho(r)$ é uma função de apenas três coordenadas espaciais, em vez das $3N$ coordenadas da função de onda de um sistema com N partículas, a DFT é computacionalmente viável mesmo para sistemas grandes (Niklić *et al.*, 2011).

O objetivo da Teoria do Funcional da Densidade, conforme introduzida por Hohenberg e Kohn (Hohenberg; Kohn, 1964), é determinar a densidade exata do estado fundamental e a energia total de um sistema composto por N elétrons interagentes em um potencial externo V_{ext} . Assume-se que os elétrons interagem entre si de forma par a par por meio da interação de Coulomb. O Hamiltoniano $\hat{H}$ para esse sistema é definido na equação (9) (Aulbur *et al.*, 2000):

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N -\frac{1}{2} \bar{V}_i^2 + \sum_{i<j}^N \frac{1}{|r_i - r_j|} + \sum_{i=1}^N V_{\text{ext}}(r_i), \quad (9)$$

Onde r_i é a coordenada do i -ésimo elétron. A maioria das aplicações práticas da Teoria do Funcional da Densidade utiliza as equações efetivas de uma única partícula de Kohn-Sham (KS) (Kohn *et al.*, 1965; Kohn *et al.*, 1999), introduzidas para um sistema auxiliar de N partículas não interagentes. De acordo com o teorema de Hohenberg-Kohn (Hohenberg; Kohn, 1964), existe um funcional de energia único determinado na equação (10) abaixo:

$$E_s[\rho] = T_s[\rho] + \int d^3r v_s(r) \rho(r) \quad (10)$$

Para o qual a equação (11) variacional fornece a densidade exata do estado fundamental $\rho_s(r)$. $T_s[\rho]$ é o funcional universal da energia cinética do sistema não interagente. O esquema de Kohn-Sham (KS) baseia-se na seguinte afirmação: para qualquer sistema interagente, existe

um potencial local único de partícula única $v_s(r)$, tal que a densidade exata do estado fundamental do sistema interagente é igual à densidade do estado fundamental do sistema auxiliar não interagente (Niklić *et al.*, 2011).

$$\rho(r) = \rho_s(r) = \sum_i^N |\phi_i(r)|^2 \quad (11)$$

Expresso em termos das N orbitais de partícula única mais baixas ocupadas — soluções da equação (12) de Kohn-Sham:

$$\left[\frac{-\bar{\nabla}^2}{2m} + v_s(r) \right] \phi_s(r) = \varepsilon_i \phi_i(r) \quad (12)$$

A unicidade de $v_s(r)$ decorre do teorema de Hohenberg–Kohn, e os orbitais de uma única partícula são funcionais únicos da densidade: $\phi_i(r) = \phi_i([\rho]:r)$. Para um sistema autoligado, como o núcleo atômico, o funcional da energia pode ser decomposto em três termos distintos explicitados na equação (13) (Niklić *et al.*, 2011):

$$F[\rho] = T_s[\rho] + E_H[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (13)$$

Onde T_s é a energia cinética do sistema de A -núcleons não interagentes, E_H é a energia de Hartree, e E_{xc} denota a energia de troca-correlação, que, por definição, contém todo o restante—todos os efeitos de muitos corpos. O potencial local correspondente de troca-correlação é definido pela equação (14) (Niklić *et al.*, 2011):

$$v_{xc}[\rho](r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (14)$$

Assim, o potencial total do sistema de Kohn-Sham é dado pela equação (15) representada abaixo:

$$v_s[\rho](r) = v_H[\rho](r) + v_{xc}[\rho](r) \quad (15)$$

Kohn e Sham mostraram como um método computacional prático pode ser construído a partir dos funcionais de densidade de Hohenberg e Kohn. A ideia é associar o sistema físico de elétrons interagentes a um sistema fictício de elétrons não interagentes, conhecido como "sistema de Kohn-Sham". Os elétrons desse sistema fictício são chamados de "elétrons de Kohn-Sham". A conexão entre os dois sistemas é que ambos são definidos para possuir exatamente a mesma densidade do estado fundamental e o mesmo potencial químico. No

entanto, os potenciais externos nos dois sistemas não são os mesmos. No sistema de Kohn-Sham, o potencial externo — conhecido como potencial de Kohn-Sham — deve ser precisamente aquele potencial efetivo de partícula única que gera uma densidade do estado fundamental igual à densidade do estado fundamental do sistema interagente (Aulbur *et al.*, 2000).

4. MATÉRIAS E MÉTODOS

Todos os resultados gerados nesta tese foram executados utilizando a estrutura do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de fármacos (LPDF) da Universidade Federal do Pará – UFPA, os cálculos computacionais de maiores desempenho foram calculados utilizando o supercomputador CABANO (<https://sites.google.com/view/cabanolpdf>) do LPDF, composto de um único *head-node/compute-node* interligado por uma rede Gigabit Ethernet (1 Gbps). O nó computacional (*compute-nodes*), é um servidor que possui 32 núcleos reais e 32 virtuais, composto também por 64 GB de memória RAM, 4 HDD's de 3 TB e 1 SSD de 160 GB. No total estão disponíveis: 64 núcleos, 64 GB de memória RAM, 4 TB de espaço em disco para os diretórios de usuários (2TB /home 4TB /data), 250 GB de espaço para os cálculos rápidos (1 SSD). O CABANO ainda conta com 4x GGPU's N-Vidia GTX 4000 de alto rendimento.

4.1. Métodos Computacionais

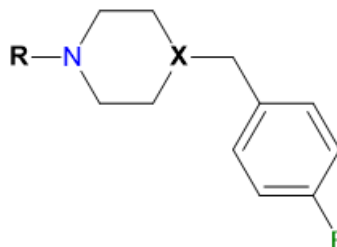
4.1.1. Simulações de *Docking* Molecular

As estruturas cristalinas da tirosinase de *Bacillus megaterium* (TYRBm) foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) com os códigos 5OAE e 6EI4, juntamente com os compostos à base de arilpiperidina e arilpiperazina, conforme indicado nas Tabelas 1 e 2 (Ferro *et al.*, 2018). Os cálculos de *docking* molecular foram realizados utilizando o *Molegro Virtual Docker* (MVD) versão 5.5 (Thomsen; Christensen, 2006), uma ferramenta reconhecida por sua eficácia em sistemas TYR (Brasil *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2022).

Este estudo utilizou o algoritmo de busca MOLDOCK, implementado no software MVD que combina uma abordagem heurística que combina evolução diferencial com um algoritmo de predição de cavidades (Thomsen; Christensen, 2006). Como uma extensão do potencial linear por partes (PLP), o MOLDOCK integra contribuições adicionais provenientes de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, o que aprimora sua precisão dos

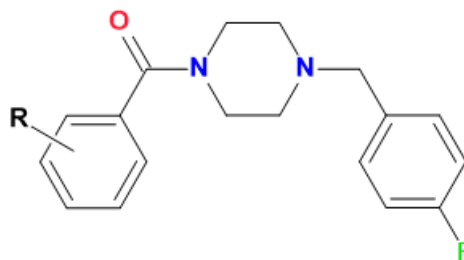
resultados. Para selecionar as soluções de *docking* mais promissoras, uma função de pontuação de reclassificação é aplicada aos resultados gerados pelo algoritmo (Bitencourt-Ferreira; Azevedo, 2019). Para os procedimentos de *docking*, os íons Cobre (II) foram representados como esferas de van der Waals no sítio catalítico do TYR.

Tabela 1 - Inibidores de TYR baseados em arilpiperidina (L02–L07) e arilpiperazina (L08–L12) avaliados por Ferro et al. (2018) e suas respectivas energias livres de ligação experimentais (ΔG_{exp}), calculadas a partir dos valores de IC_{50} , conforme a equação $\Delta G_{exp} = RT \ln IC_{50}$, onde T equivale a 310 K.



Inibidor	R	X	IC_{50} (μM)	ΔG_{EXP} (kcal/mol)
L02	CH ₃ CH ₂	CH	116,0 $\pm$ 1,88	-5,58
L03	CH ₃ CO	CH	25,11 $\pm$ 0,98	-6,53
L04	H	CH	286,83 $\pm$ 1,05	-5,02
L05	CH ₃ CH ₂ CO	CH	24,10 $\pm$ 0,62	-6,55
L06	CH ₃ CH(CH ₃)CO	CH	35,26 $\pm$ 0,97	-6,32
L07	C ₆ H ₅ CO	CH	19,50 $\pm$ 0,44	-6,68
L08	H	N	85,50 $\pm$ 0,67	-5,77
L09	CH ₃ CO	N	45,85 $\pm$ 1,31	-6,15
L10	CH ₃ CH ₂ CO	N	51,08 $\pm$ 4,88	-6,09
L11	CH ₃ CH(CH ₃)CO	N	30,90 $\pm$ 1,90	-6,40
L12	C ₆ H ₅ CO	N	13,34 $\pm$ 0,73	-6,91

Tabela 2 - Inibidores de TYR à base de arilpiperazina avaliados por Ferro et al., (2018) e suas respectivas energias livres de ligação experimental (ΔG_{exp}), calculadas a partir dos valores de IC_{50} , conforme a equação $\Delta G_{exp} = RT \ln IC_{50}$, onde T equivale a 310 K.



Inibidor	R	IC_{50} (μM)	ΔG_{EXP} (kcal/mol)
L13	2-F	$3,75 \pm 0,37$	-7,70
L14	3-F	$54,68 \pm 6,03$	-6,05
L15	4-F	$7,77 \pm 2,89$	-7,25
L16	2-CH ₃	$5,25 \pm 1,60$	-7,49
L17	3-CH ₃	$173,82 \pm 1,50$	-5,33
L18	4-CH ₃	$33,13 \pm 4,50$	-6,35
L19	2-OCH ₃	$2,03 \pm 0,89$	-8,07
L20	3-OCH ₃	$27,04 \pm 0,05$	-6,48
L21	4-OCH ₃	$9,14 \pm 2,16$	-7,15
L22	2-OH	$7,06 \pm 0,62$	-7,31
L23	3-OH	$12,64 \pm 1,41$	-6,95
L24	4-OH	$27,41 \pm 0,16$	-6,47

Para as simulações de Dinâmica Molecular, foram selecionadas as conformações de *docking* mais favoráveis dos inibidores de TYR como configurações iniciais. Os campos de força OPLS-AA (Jorgensen *et al.*, 1996) e TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983) foram utilizados para parametrizar os subsistemas de soluto (compostos pelos aminoácidos da TYR e seus inibidores) e de solvente, respectivamente. Os parâmetros dos inibidores de TYR foram calculados por meio do pacote MACROMODEL (Mohamadi *et al.*, 1990; Schrödinger, 2020). Especificamente, foi empregado o conjunto de parâmetros clássicos proposto por Liao *et al.* 2015, utilizando o modelo fictício Cobre (II) (CuDum) para caracterizar o centro metálico da TYRBm. A abordagem PROPKA (Olsson *et al.*, 2011) foi aplicada para determinar os valores de pKa de todos os resíduos de aminoácidos ionizáveis em pH neutro.

O uso desse modelo permite capturar as propriedades químicas e estruturais do cobre dentro da proteína sem a necessidade de uma parametrização excessivamente complexa. O tratamento do íon Cobre (II) no estudo de Liao *et al.* (2015) é realizado por meio de um modelo fictício não ligado (CuDum), que utiliza átomos fictícios (*dummy atoms*) para distribuir cargas ao redor do metal, permitindo uma representação precisa da sua geometria de coordenação.

Esse modelo é essencial para capturar o efeito Jahn-Teller, uma distorção estrutural característica do Cobre (II) que afeta suas interações com ligantes.

Diferentemente de abordagens tradicionais que representam metais como esferas de van der Waals ou utilizam modelos ligados que restringem a flexibilidade da coordenação, o CuDum permite uma descrição mais realista e dinâmica da interação do cobre com biomoléculas. Ele foi validado em simulações de dinâmica molecular utilizando o software GROMACS, onde demonstrou estabilidade e precisão na reprodução de estruturas biológicas, como o peptídeo amiloide- β e a superóxido dismutase Cobre-Zinco. Esse modelo melhora significativamente a capacidade de estudar sistemas biológicos contendo cobre sem necessidade de cálculos quânticos complexos, tornando-se uma ferramenta valiosa para a bioquímica computacional (Liao *et al.*, 2015).

A abordagem PROPKA (desenvolvida por Olsson *et al.*, 2011) foi utilizada para calcular os valores de pKa dos resíduos de aminoácidos ionizáveis da proteína em pH neutro. O PROPKA é um método computacional amplamente empregado para estimar a tendência de protonação/desprotonação de grupos funcionais em biomoléculas, o que é essencial para entender a estabilidade estrutural e a reatividade química da proteína. O modelo busca um equilíbrio entre precisão e eficiência computacional, evitando tratamentos excessivamente rigorosos, mas mantendo a coerência física dos fenômenos envolvidos (Olsson *et al.*, 2011). O modelo desenvolvido por Olsson *et al.*, 2011 aprimorou as versões anteriores ao eliminar a classificação discreta de resíduos como "superficiais" ou "enterrados". Em vez disso, foi implementada uma transição contínua entre esses estados, reduzindo a sensibilidade do modelo a pequenas variações estruturais e proporcionando maior estabilidade nas predições, considerando diversos fatores para o cálculo dos valores de pKa, incluindo a contribuição Coulombiana, ajustada para refletir corretamente as interações eletrostáticas, diferenciando os coeficientes dielétricos para resíduos superficiais e enterrados.

Além disso, a penalidade de dessolvatação foi refinada para evitar superestimações, considerando a influência diferencial da água em resíduos em diferentes profundidades dentro da estrutura proteica. A eletrostática intrínseca inclui interações dipolares permanentes e efeitos de van der Waals, priorizando as interações de curto alcance. Já as interações de ligação de hidrogênio são modeladas por uma função linearizada que depende da distância e do ângulo da ligação, permitindo um tratamento mais realista desses efeitos (Olsson *et al.*, 2011). O PROPKA3 foi reparametrizado com base em um conjunto de dados reduzido e mais confiável de resíduos Asp e Glu, cujos valores experimentais de pKa são bem caracterizados. O modelo foi validado em diferentes conjuntos de dados experimentais, apresentando melhorias na

precisão das predições, redução do número de outliers e eliminação de artefatos numéricos indesejados (Olsson *et al.*, 2011). A combinação dessas duas metodologias — a parametrização de Liao *et al.* (2015) e a análise de protonação com PROPKA — permitiu caracterizar adequadamente o centro metálico da proteína TYRBm e avaliar seu comportamento químico em condições fisiológicas.

Cada sistema de TYR foi inserido em uma esfera de simulação com raio de 20 Å, composta por moléculas de TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983), centralizada no centro de massa do inibidor. O método SCAAS (*Solvent with Constrained All-Atom Surface*) (King; Warshel, 1989) foi adotado para tratar restrições de polarização e limitações radiais na superfície da esfera de simulação. Para considerar o efeito de triagem dielétrica (Marelius *et al.*, 1998), todos os resíduos de aminoácidos ionizáveis próximos ao limite da esfera foram neutralizados. Um corte de 10 Å foi aplicado no cálculo das energias de interação não ligadas, excetuando-se apenas os átomos dos inibidores. As interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas pelo método de expansão múltipla do campo de reação local (LRF) (Díaz *et al.*, 2011).

Para otimizar o custo computacional, todos os átomos fora da esfera de 20 Å foram fixados (Marelius *et al.*, 1998), e o algoritmo SHAKE (Ryckaert *et al.*, 1977) foi utilizado para manter as ligações de hidrogênio do solvente. Detalhes sobre os procedimentos de equilíbrio e produção das simulações de DM para os estados ligados à enzima e expostos ao solvente estão disponíveis em estudos anteriores (Martins *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2020) realizados com o programa Q6 (Bauer *et al.*, 2018). Cada sistema equilibrado passou por 10 ns de simulações de DM, conduzidas em cinco réplicas aleatórias de 2 ns cada.

Considerando que simulações longas podem não explorar adequadamente o espaço de fase devido à proximidade com a estrutura inicial, uma alternativa mais econômica seria realizar múltiplas simulações curtas a partir de diferentes pontos do espaço de fase (Genheden *et al.*, 2009). O protocolo empregado é adequado para amostrar o espaço conformacional do sistema e representar sua dinâmica, conforme validado por estudos anteriores (Vanga *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2020). Um passo de tempo de 1 fs foi utilizado, sem a aplicação de restrições posicionais. Para o estado livre, uma restrição harmônica fraca foi aplicada para manter os inibidores de TYR centralizados nas respectivas esferas de simulação aquosa.

4.1.2. Dinâmica Molecular

As estruturas inicialmente selecionadas para as simulações de Dinâmica Molecular foram as mais bem classificadas a partir dos resultados de *docking* molecular. Durante este

processo, os íons Cobre II presentes no sítio ativo do TYRBm foram tratados utilizando o modelo fictício de Cobre II (CuDum), conforme proposto por Liao e colaboradores (2015). As simulações de DM foram então conduzidas utilizando o programa Q (Marelius *et al.*, 1998), empregando o campo de força OPLS-AA (Jorgensen *et al.*, 1996) para representar o soluto (enzima e ligantes) e o modelo de água TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983) para descrever o solvente (água).

Os parâmetros clássicos para os ligantes, incluindo substratos naturais e inibidores, foram determinados por meio de uma parametrização automática realizada pelo MACROMODEL (Schrödinger, 2020). Para começar, os valores de pKa de todos os resíduos tituláveis foram computados utilizando o método PROPKA (Li; Robertson; Jensen, 2005), tal como implementado no servidor PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004), sob condições de pH neutro.

Posteriormente, todos os sistemas foram solvatados por meio da inserção de uma esfera de simulação, com um raio de 20 Å, composta pelo modelo de água TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983), localizada no centro de massa de cada ligante correspondente. A esfera de simulação foi submetida a restrições de polarização e radiais, utilizando o modelo de solvente SCAAS (King; Warshel, 1989) para todos os átomos, com restrição de superfície na interface da esfera, com o intuito de representar de forma precisa as propriedades da água em massa. Resíduos tituláveis localizados próximos ao limite da esfera foram tratados em sua forma neutra, levando em consideração a triagem dielétrica (Marelius *et al.*, 1998).

Em seguida, cada sistema passou por três fases distintas de simulação de dinâmica molecular: (a) aquecimento, (b) equilíbrio e (c) produção. Durante o cálculo das energias de interação não ligadas, foi aplicado um corte de 10 Å, excluindo apenas os átomos do ligante. As interações eletrostáticas de longo alcance foram determinadas utilizando a abordagem de expansão múltipla do campo de reação local (LRF) (Díaz *et al.*, 2011). As listas de pares não ligados e os valores de energia de interação entre o ligante e o ambiente foram registrados a cada 25 etapas. Com o intuito de otimizar os recursos computacionais, todos os átomos fora da esfera de simulação, com um raio de 20 Å, foram mantidos em suas posições iniciais (Marelius *et al.*, 1998).

Inicialmente, foram realizadas simulações DM com 5000 passos, utilizando um passo de tempo muito curto (0,1 fs) e uma temperatura de 1K. Estas simulações foram acopladas a um banho forte (com um acoplamento de banho de 0,1 fs), enquanto átomos pesados foram restritos por uma constante de força de 50 kcal/mol·Å². Posteriormente, cada sistema foi gradualmente aquecido até 300K ao longo de 50 ps, com intervalos de tempo e acoplamentos

de banho de 1 fs e 100 fs, respectivamente. A constante de força de restrição aplicada a todos os átomos pesados do soluto foi então gradualmente removida. Em seguida, para cada sistema, foram realizadas simulações DM de 10 nanossegundos (ns) a 300K para a coleta de dados, utilizando um intervalo de tempo de 2 fs. Todas as ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restritas utilizando o algoritmo SHAKE (Ryckaert *et al.*, 1977). Para simulações de água (estado livre), os ligantes foram mantidos no centro de sua esfera de simulação de água, empregando uma restrição harmônica fraca ao centro de massa dos ligantes.

4.1.3. Ligação de energias livres pelo método *Linear Interaction Energy*

Foram realizados cálculos detalhados da energia livre de ligação por meio de simulações de dinâmica molecular com uma duração de 10 ns durante a fase de produção. O método empregado foi o *Linear Interaction Energy* (Bauer *et al.*, 2018), que utiliza conjuntos representativos dos estados ligado e livre de um ligante específico para determinar a discrepância na energia livre (Gutiérrez-de-Terán; Åqvist, 2011; Hansson; Marelus; Åqvist, 1998). A energia livre de ligação (ΔG_{lie}) para cada sistema de TYR foi avaliada usando a equação (16) de LIE:

$$\Delta E_{LIE} = \alpha \Delta U_{vdW} + \beta \Delta U_{ele} + \gamma \quad (16)$$

Na equação, os parâmetros α e β atuam como fatores de escala empíricos para os componentes apolares e polares, respectivamente, em função das propriedades químicas do ligante (Hansson; Marelus; Åqvist, 1998). Esses parâmetros podem ser obtidos a partir de estudos anteriores ($\alpha = 0,181$ e $\beta = 0,33-0,50$) (Hansson; Marelus; Åqvist, 1998) ou, alternativamente, por meio de regressão linear utilizando energias livres de ligação experimentais (ΔG_{exp}), conforma a equação (17) (ZHENG *et al.*, 2017). As médias das interações de van der Waals (vdW) e eletrostáticas (ELE) entre os estados "ligado" e "livre" foram calculadas utilizando conjuntos gerados durante a produção do DM.

$$\Delta G_{EXP} = RT \ln IC_{50} \quad (17)$$

4.1.4 Cálculos de FEP

A energia livre de ligação relativa entre dois ligantes, A e B ($\Delta \Delta G_{bind}$), foi calculada utilizando o método de Perturbação da Energia Livre e o pacote QligFEP (Jespers *et al.*, 2019). Esse cálculo é baseado no ciclo termodinâmico com base na equação (18) a seguir:

$$\Delta\Delta G_{bind}^B - \Delta\Delta G_{bind}^A = \Delta\Delta G_{bind} = \Delta G_{A\rightarrow B}^{complex} - \Delta G_{A\rightarrow B}^{free} \quad (18)$$

A diferença de energia livre para cada transformação de ligante ($\Delta G_{A\rightarrow B}$) foi calculada utilizando a equação (19) exponencial de Zwanzig (Zwanzig *et al.*, 1954):

$$\Delta G_{A\rightarrow B} = \Delta G_B - \Delta G_A = -\beta^{-1} \cdot \ln\langle e^{-\beta\Delta U} \rangle \quad (19)$$

Onde $\beta = (kBT)^{-1}$ é a energia térmica inversa, $\Delta U = U_{m+1} - U_m$ representa a diferença na energia potencial efetiva entre janelas consecutivas de FEP, e os colchetes angulares denotam a média de conjunto. A transformação é realizada por meio de uma série de estados intermediários, com o potencial efetivo U_m definido como na equação (20):

$$U_m = (1 - \lambda m)UA + \lambda mUB \quad (20)$$

Aqui, λm é o parâmetro de acoplamento que interpola entre o estado inicial (A) e o estado final (B). O parâmetro λm é incrementado gradualmente de 0 a 1, dividindo a transformação em 101 janelas de λ igualmente espaçadas. Cada janela foi amostrada por 10 ps, utilizando um passo de tempo de 1 fs, em 10 simulações de DM replicadas em paralelo. Essas réplicas diferem apenas em suas velocidades aleatórias iniciais, que foram geradas conforme a distribuição de Maxwell-Boltzmann.

4.1.5 Cálculos de DFT

Após a realização das simulações de Dinâmica Molecular, submetemos estruturas representativas dos inibidores L04 e L19 para cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Utilizamos o nível wB97XD/6-311++G (d,p) e o modelo PCM para o ambiente de solvatação em água (Mennucci *et al.*, 2012). Todos os cálculos foram realizados utilizando o pacote Gaussian09 (Frisch *et al.*, 2009). Após a otimização e os cálculos de frequência, determinamos alguns descritores, como eletronegatividade (χ), dureza (η), índice de eletrofilicidade (ω) e a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO (Bursch *et al.*, 2022; Grillo *et al.*, 2023), conforme implementado por Contreras *et al.* (1999). Subsequentemente, obtivemos os orbitais moleculares de fronteira (HOMO e LUMO), bem como os mapas do potencial eletrostático molecular (MEP), a fim de analisar a reatividade química dos inibidores selecionados (Politzer *et al.*, 2021; Suresh *et al.*, 2022)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *docking* molecular e as simulações de dinâmica molecular são técnicas essenciais no processo de design computacional de fármacos, proporcionando uma compreensão abrangente das interações entre fármacos e seus alvos. O *docking* molecular facilita a identificação de compostos líderes promissores, prevendo os modos de ligação e as afinidades dos candidatos a fármacos com proteínas-alvo. Em contraste, as simulações de DM são utilizadas para explorar o comportamento dinâmico dessas interações, fornecendo insights sobre a estabilidade e as mudanças conformacionais dos complexos fármaco-proteína ao longo do tempo. Essas abordagens combinadas não apenas auxiliam na otimização dos candidatos a fármacos para um melhor encaixe, mas também aceleram o processo de descoberta de novos medicamentos, reduzindo o número de experimentações dispendiosas (Honarparvar *et al.*, 2013; Batool; Ahmad; Choi, 2019; Sabe *et al.*, 2021).

Os compostos arilpiperidínicos e arilpiperazínicos possuem estruturas heterocíclicas com funcionalidades químicas diversificadas, tornando-os alvos promissores para modificações moleculares direcionadas à inibição da tirosinase. Segundo Ferro *et al.* (2018), a incorporação de anéis arila nesses esqueletos heterocíclicos aumenta a afinidade de ligação com o sítio ativo da enzima. Estudos estruturais e computacionais permitiram aprimorar a potência inibitória e a seletividade desses derivados, resultando no desenvolvimento de compostos líderes com maior bioatividade e menores efeitos colaterais indesejados.

Estudos cristalográficos e de *docking* realizados com tirosinases de diferentes origens, como *Bacillus megaterium* (TyBm) e cogumelos (TyM), auxiliaram na identificação dos principais determinantes moleculares responsáveis pela interação entre esses inibidores e a enzima. Notavelmente, derivados como 1-(4-fluorobenzil) piperazina e 1-(4-fluorobenzil) piperidina demonstraram atividade inibitória significativa sobre a TyM, com valores de IC₅₀ na faixa micromolar, superando a eficácia do ácido kójico, um inibidor de referência (Ferro *et al.*, 2018). Além da inibição da tirosinase, os compostos arilpiperidínicos e arilpiperazínicos apresentam diversas atividades farmacológicas, tornando-os candidatos promissores para agentes terapêuticos multifuncionais (Hu *et al.*, 2021; Yi *et al.*, 2023).

Mais recentemente, uma investigação experimental e computacional envolvendo compostos contendo o grupo 3-cloro-4-fluorofenil destacou a importância dessa estrutura na inibição da tirosinase de *Agaricus bisporus* (Mirabile *et al.*, 2023). Observou-se que a introdução desse grupo funcional em diferentes compostos resultou em um aumento significativo da atividade inibitória, possivelmente devido à interação desse fragmento com resíduos-chave na cavidade

catalítica da enzima. Estudos de *docking* molecular corroboraram essas descobertas, sugerindo que esse grupo participa de interações vantajosas, como empilhamento π - π e ligações halogênio-metal, contribuindo para um maior potencial inibitório (Mirabile *et al.*, 2023).

Os resultados de *docking* molecular, utilizando o pacote MVD e o método MOLDOCK (Thomsen; Christensen, 2006), demonstraram sua eficácia nos sistemas de TYR (Brasil *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2020). A função de pontuação MOLDOCK para cada inibidor de TYR baseado em arilpiperidina e arilpiperazina foi extraída e posteriormente comparada com os dados experimentais de ligação (Tabela 3). No caso do primeiro grupo de compostos (sem anel benzamida), L02–L12, foi observada uma correlação positiva significativa ($r^2 = 0,73$) entre a pontuação MOLDOCK e os valores experimentais. No entanto, a correlação foi consideravelmente mais fraca e negativa para os compostos arilpiperazínicos (com anel benzamida), L13–L24 ($r^2 = -0,39$). Esses achados estão alinhados com as expectativas no campo dos cálculos de *docking* molecular. Em muitos casos, os algoritmos de *docking* podem prever corretamente os modos de ligação, mas nem sempre classificam os diversos ligantes de acordo com suas afinidades de ligação de forma consistente (Warren *et al.*, 2005).

Tabela 3 - Função de pontuação MOLDOCK e valores experimentais de energia livre de ligação (ΔG_{exp}) para inibidores de TYR à base de arilpiperidina (L02–L07) e arilpiperazina (L08–L24). Esses valores são expressos em quilocalorias por mol (kcal/mol).

Inibidor	MOLDOCK (kcal/mol)	ΔG_{EXP} (kcal/mol)	Inibidor	MOLDOCK (kcal/mol)	ΔG_{EXP} (kcal/mol)
L02	-79,32	-5,58	L13	-95,49	-7,70
L03	-81,16	-6,53	L14	-101,05	-6,05
L04	-69,54	-5,02	L15	-102,65	-7,25
L05	-87,73	-6,55	L16	-96,04	-7,49
L06	-82,71	-6,32	L17	-100,97	-5,33
L07	-82,28	-6,68	L18	-102,06	-6,35
L08	-74,18	-5,77	L19	-97,34	-8,07
L09	-80,50	-6,15	L20	-102,81	-6,48
L10	-87,09	-6,09	L21	-106,33	-7,15
L11	-82,05	-6,40	L22	-99,78	-7,31
L12	-81,51	-6,91	L23	-100,74	-6,95
			L24	-97,81	-6,47

Realizar simulações de Dinâmica Molecular após o *docking* molecular é de suma importância na descoberta de medicamentos e na biologia estrutural. Embora o *docking* molecular forneça informações cruciais sobre os modos de ligação potenciais e as afinidades de ligação iniciais, as simulações de DM vão além, oferecendo uma visão dinâmica das interações entre os ligantes e as proteínas alvo ao longo do tempo. Isso permite a exploração de mudanças estruturais, dinâmica conformacional e estabilidade do complexo ligante-proteína, fatores frequentemente críticos na compreensão do verdadeiro mecanismo de ligação e na previsão precisa das afinidades de ligação (Liu *et al.*, 2017; Vivo; Cavalli, 2017).

Conforme descrito na seção Métodos Computacionais, realizamos um total de cinco réplicas aleatórias, cada uma com duração de 2 ns, utilizando o programa Q6 (Bauer *et al.*, 2018). Essa estratégia foi adotada para gerar conjuntos de dados que aprimorariam a compreensão da dinâmica de ligação de compostos à base de arilpiperidina e arilpiperazina com a TYR. Os resultados de Dinâmica Molecular revelam a robusta estabilidade de todos os compostos simulados dentro do sítio catalítico da TYR. Além disso, as características estruturais da TYR se assemelham muito às observadas em investigações computacionais anteriores (Martins *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2022).

Conforme demonstrado na Tabela 4, é evidente que, para o grupo arilpiperidina, os valores de *Root Mean Square Deviation* (RMSD) variam de $0,41 \pm 0,10$ Å (L05) a $1,19 \pm 0,24$ Å (L04). Já para o grupo arilpiperazina, os valores de RMSD variam de $0,39 \pm 0,10$ Å (L20) a $0,97 \pm 0,30$ Å (L24). Esses resultados indicam claramente a eficaz estabilização de todos os compostos simulados dentro do sítio catalítico TYR em seus respectivos complexos. Curiosamente, todos os inibidores mantiveram a interação entre o átomo de flúor do grupo fluorobenzil e o íon Cobre II (B) presente no sítio catalítico TYR, uma característica semelhante ao observado com substratos naturais (L-Tyr e L-DOPA), assim como o inibidor AK (DERI *et al.*, 2016). Esse comportamento pode ser melhor visualizado no Gráfico RMSD médio (em Å) para todos os sistemas TYR (Figura 8), que ilustra a estabilidade estrutural dos complexos analisados.

Tabela 4 - Valores de Root Mean Square Deviation (RMSD), medidos em angstroms (Å), referentes aos átomos pesados dos inibidores dentro do complexo enzimático TYR.

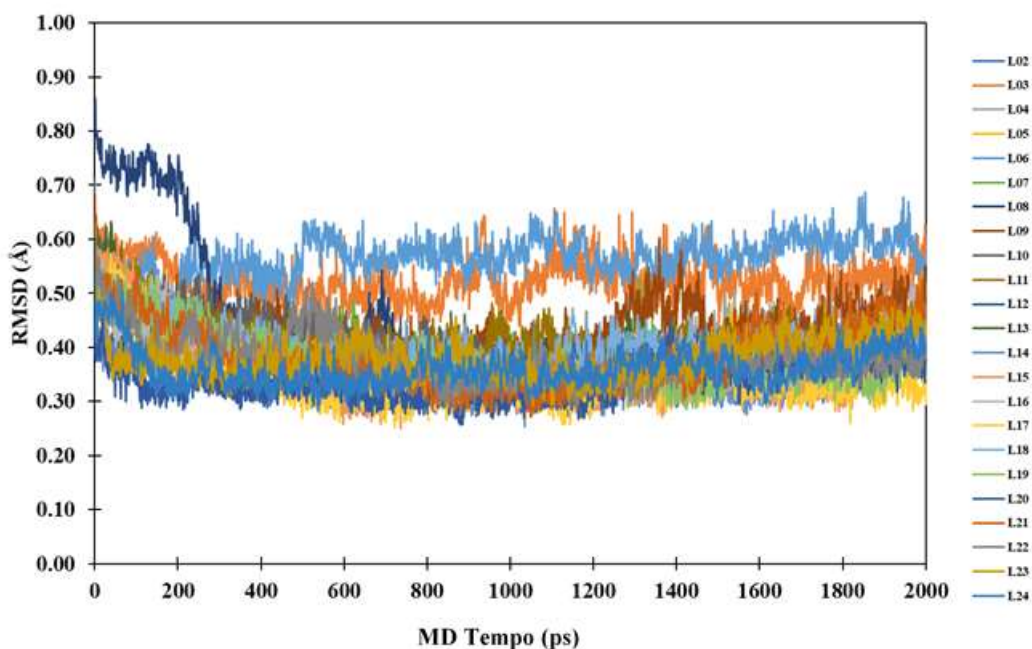
(continua)			
Inibidor	RMSD (Å)	Inibidor	RMSD (Å)
L02	$0,32 \pm 0,10$	L13	$0,71 \pm 0,33$
L03	$0,47 \pm 0,14$	L14	$0,95 \pm 0,52$

Tabela 4 - Valores de Root Mean Square Deviation (RMSD), medidos em angstroms (Å), referentes aos átomos pesados dos inibidores dentro do complexo enzimático TYR.

(continuação)

Inibidor	RMSD (Å)	Inibidor	RMSD (Å)
L04	1,19 ± 0,24	L15	0,70 ± 0,27
L05	0,41 ± 0,10	L16	0,82 ± 0,28
L06	0,45 ± 0,10	L17	0,55 ± 0,15
L07	0,40 ± 0,11	L18	0,79 ± 0,21
L08	0,46 ± 0,14	L19	0,79 ± 0,28
L09	0,45 ± 0,15	L20	0,39 ± 0,10
L10	0,44 ± 0,21	L21	0,67 ± 0,17
L11	0,39 ± 0,09	L22	0,52 ± 0,11
L12	0,58 ± 0,30	L23	0,52 ± 0,11
		L24	0,97 ± 0,30

Figura 8- Gráfico RMSD médio para os sistemas TYR.



A análise das interações energéticas dos diferentes ligantes foi realizada com base em simulações de dinâmica molecular de 10 ns, considerando tanto o estado livre em solvente quanto o estado complexado com a proteína TYR. As Figuras 9 a Figura 17 apresentam os gráficos das energias eletrostáticas (ele) e de Van der Waals (vdW) para cada ligante avaliado.

Na Figura 9, observa-se o comportamento energético do ligante L03. As energias eletrostáticas para o estado livre (em azul) e para o complexo solvatado (em vermelho) indicam variações na interação com o ambiente. Da mesma forma, as energias de Van der Waals são representadas em verde para o estado livre e em roxo para o estado complexado, evidenciando mudanças nas interações intermoleculares.

Figura 8 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L03

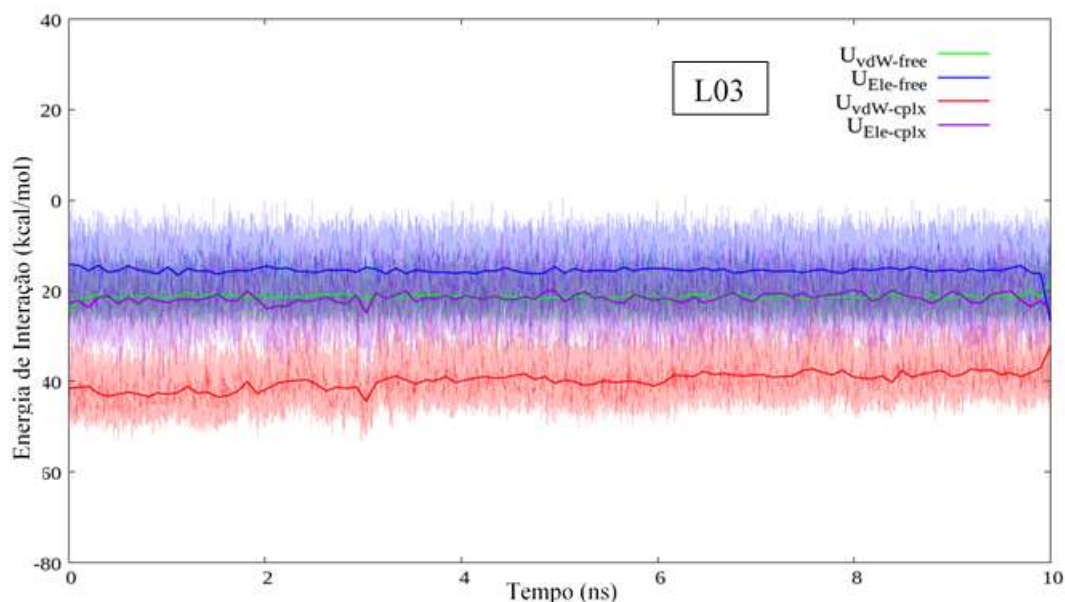
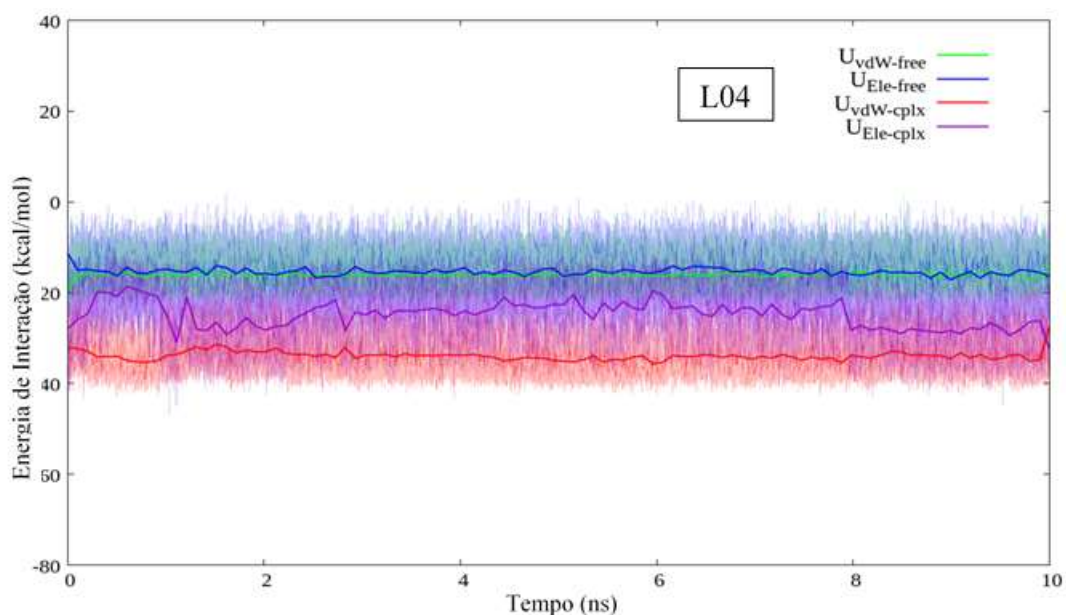


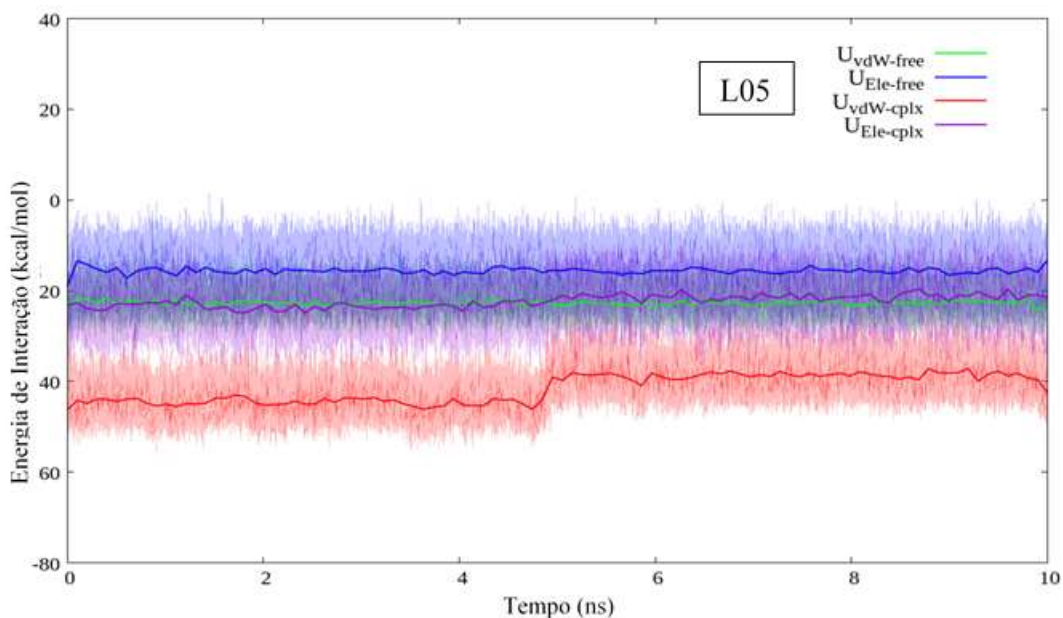
Figura 9 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L04



A Figura 10 exibe os mesmos parâmetros para o ligante L04, onde se verifica um padrão semelhante ao observado para L03, com diferenças nas intensidades das interações eletrostáticas e de Van der Waals, sugerindo diferentes graus de estabilização ao longo da trajetória de DM.

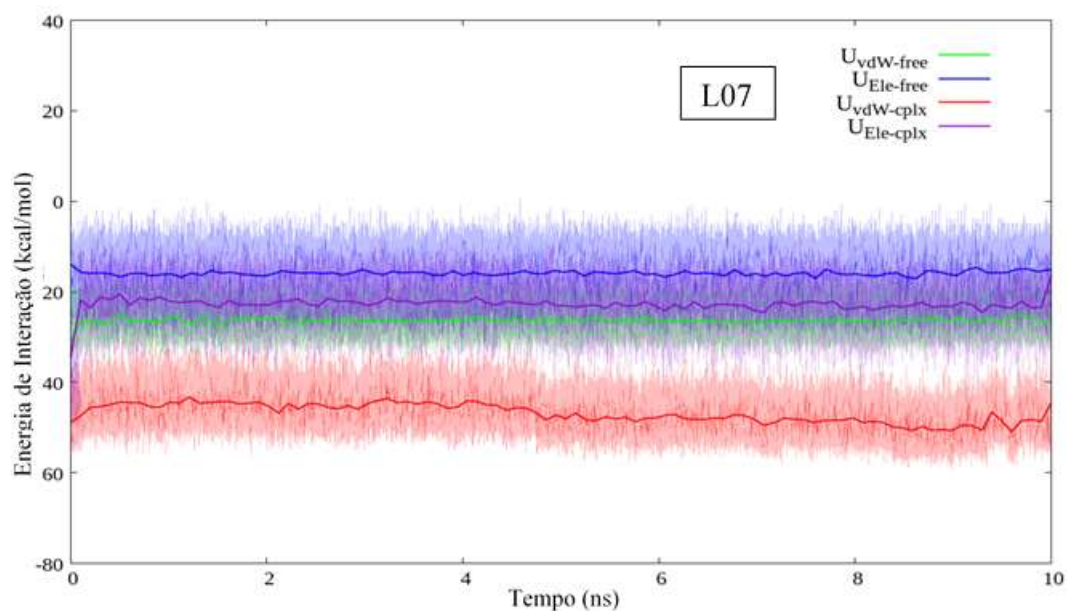
Seguindo a mesma abordagem, a Figura 11 apresenta os dados para o ligante L05, destacando as variações nas energias eletrostáticas e de Van der Waals. Esses resultados reforçam a importância da solvatação no comportamento do ligante dentro do complexo.

Figura 10- Gráfico das energias que envolvem o ligante L05



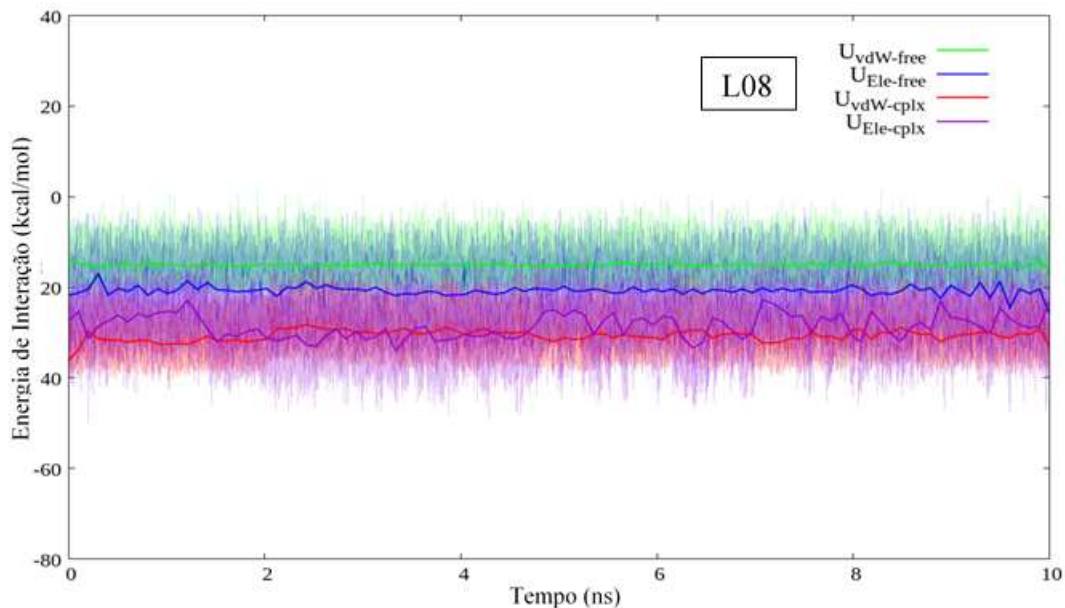
A Figura 12 corresponde ao ligante L07, cuja análise revela uma dinâmica energética que pode indicar ajustes conformacionais relevantes para a estabilidade do sistema.

Figura 11 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L07



A Figura 13, referente ao ligante L08, mostra um perfil energético compatível com interações específicas que podem influenciar a afinidade do ligante pela proteína TYR.

Figura 12 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L08



Os gráficos das Figuras 14 e 15 detalham as energias dos ligantes L09 e L10, respectivamente, permitindo a comparação entre seus comportamentos no estado livre e no estado complexado. Tais dados são fundamentais para compreender os efeitos estruturais e energéticos desses ligantes na interação com a proteína alvo.

Figura 13 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L09

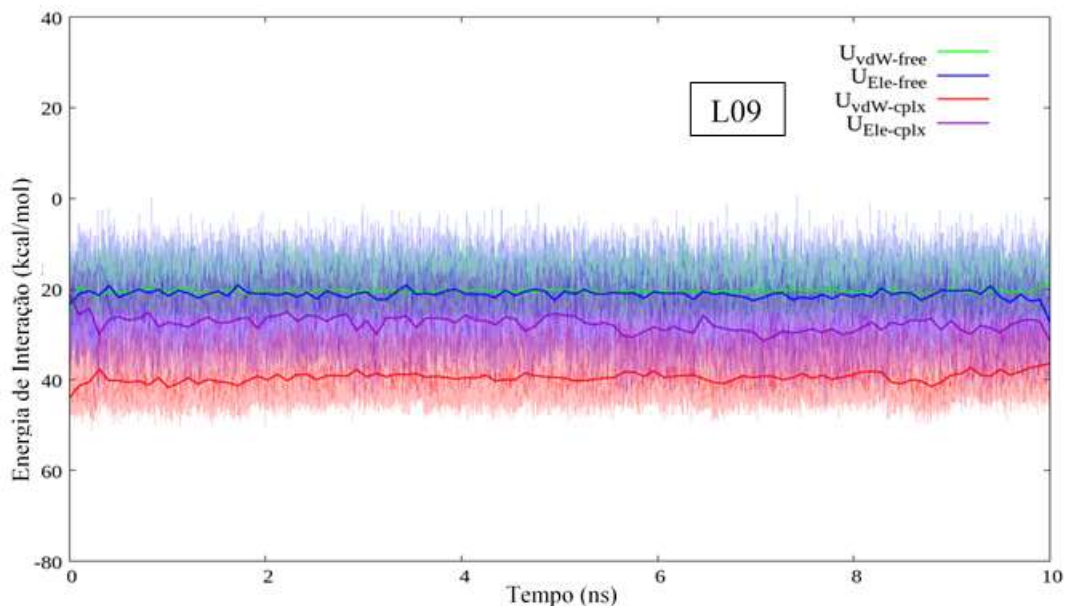
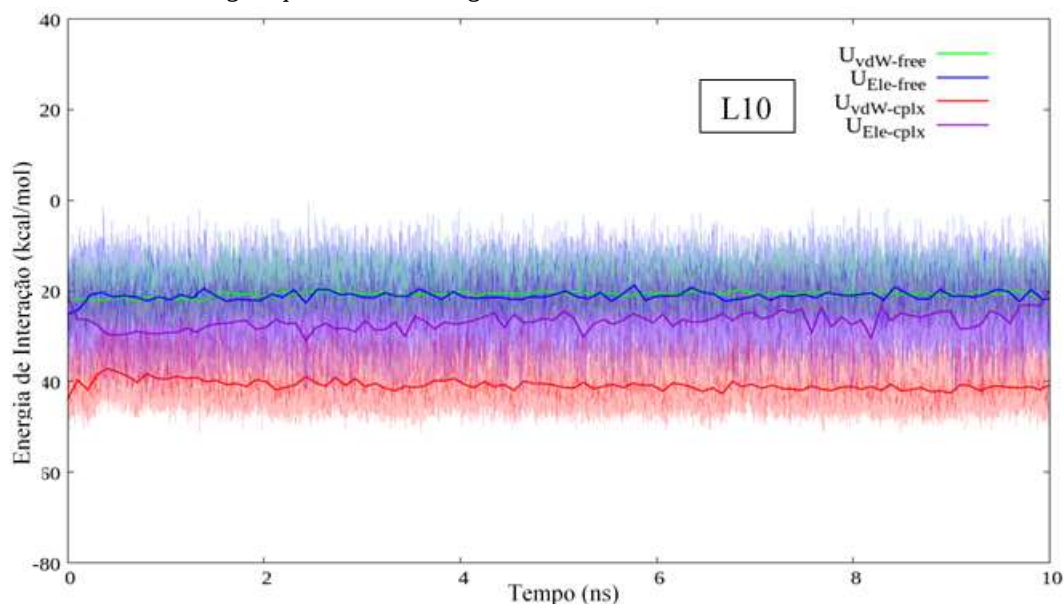


Figura 14 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L10



Por fim, as Figuras 16 e 17 ilustram as interações dos ligantes L11 e L12, onde a análise das componentes eletrostáticas e de Van der Waals pode fornecer insights sobre a estabilidade e a dinâmica desses compostos no contexto do complexo TYR-ligante.

Figura 15 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L11

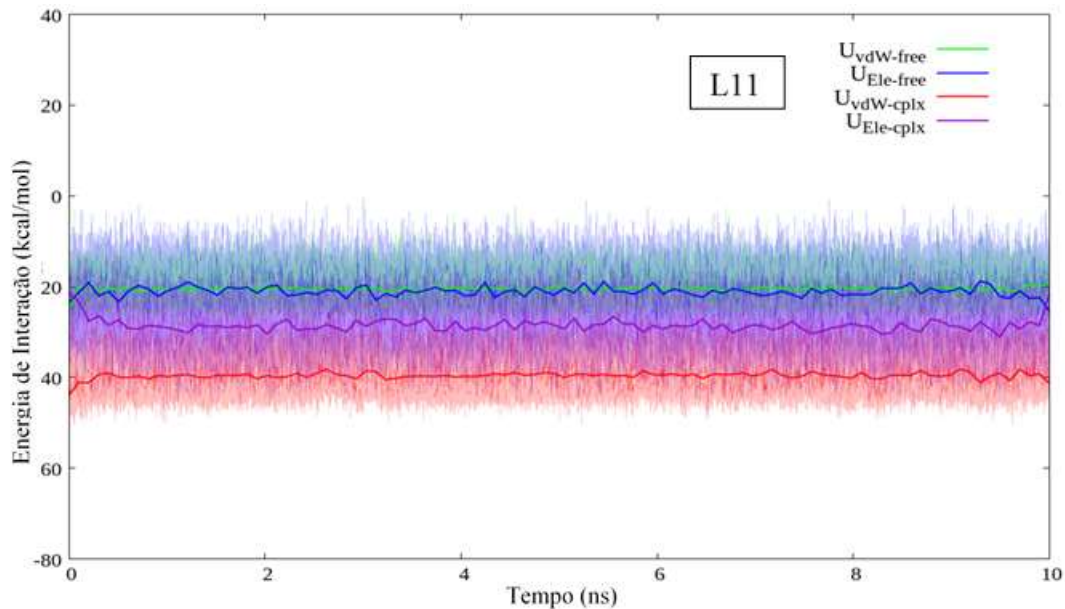
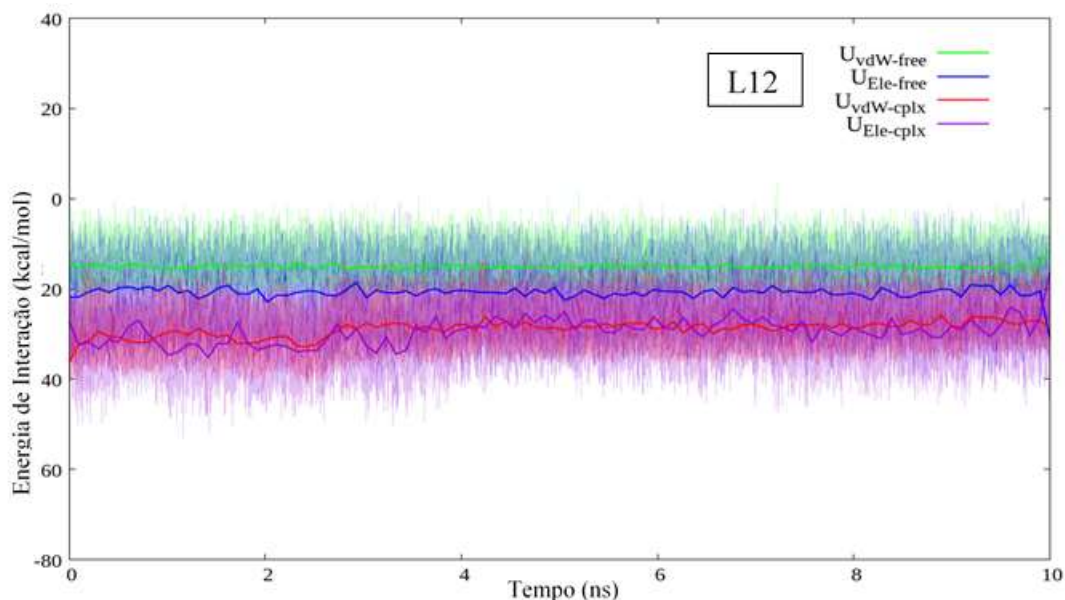


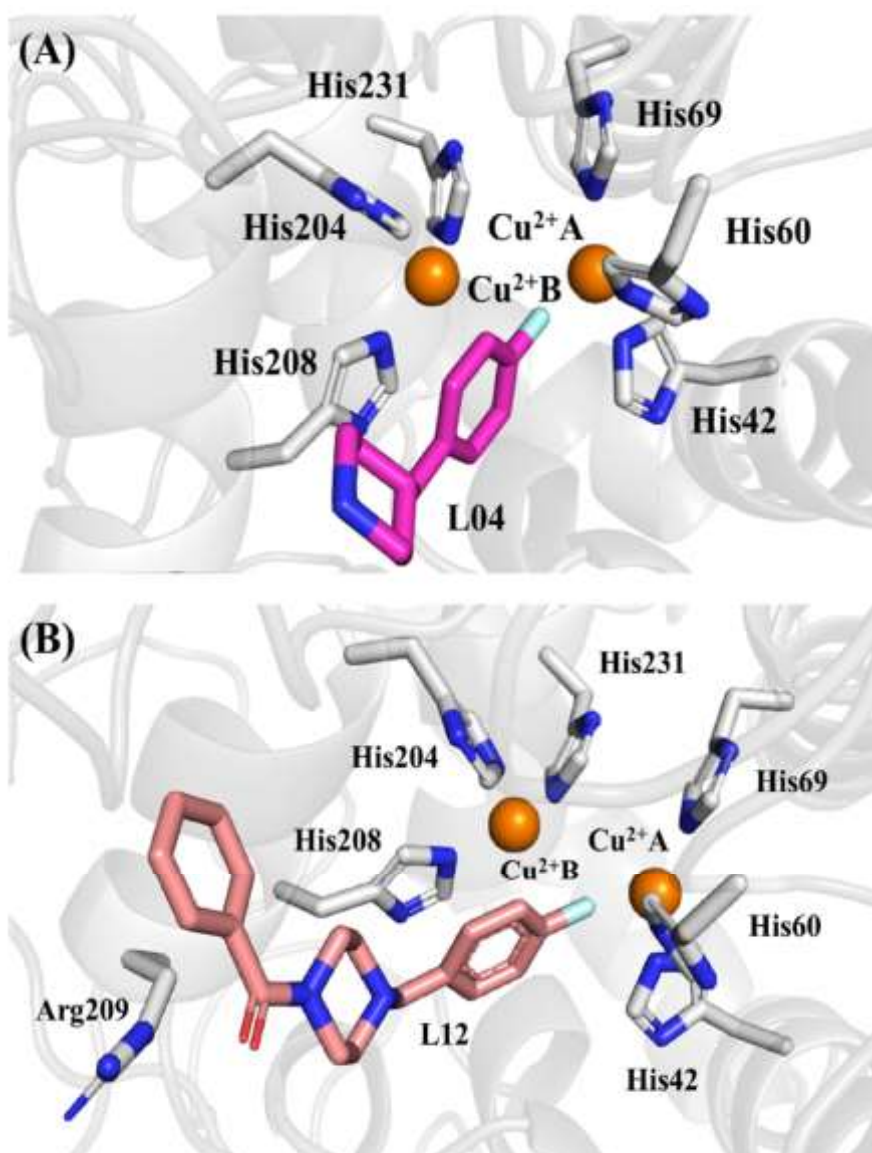
Figura 16 - Gráfico das energias que envolvem o ligante L12



Os dados apresentados nas figuras fornecem uma visão detalhada da contribuição das interações intermoleculares na estabilidade dos complexos, sendo essenciais para a compreensão da afinidade e do comportamento desses ligantes em sistemas biológicos.

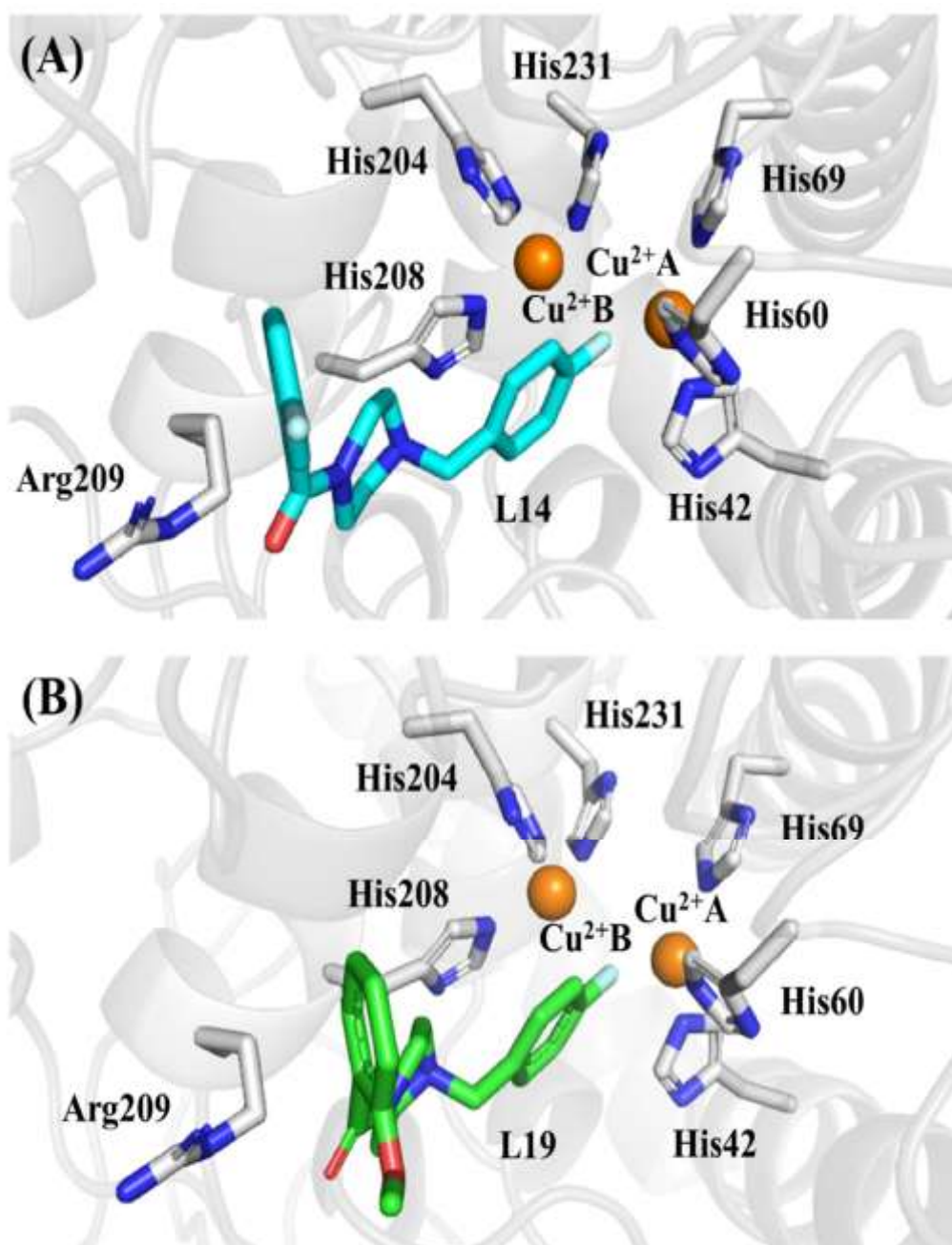
Essas interações estão em conformidade com os resultados encontrados por Ferro *et al.* (2018), cujo estudo demonstrou que a densidade eletrônica no sítio ativo TYR sustenta a colocação da porção 4'-fluorobenzil entre os dois íons de cobre. Além disso, o anel aromático foi estabilizado por meio de interações de empilhamento com o resíduo His208, conforme mostrado na Figura 18. O composto mais potente à base de arilpiperidina, L12, forma uma interação de hidrogênio com Arg209 de TYR (Figura 18B), interação essa que não foi observada no caso de L04 (Figura 18A). Ademais, como já avaliado anteriormente (Martins *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2022), o modelo CuDum (Liao *et al.*, 2015), utilizado para descrever os íons cobre (II), capturou de maneira adequada todas as características estruturais críticas.

Figura 17 - Estruturas DM representativas dos inibidores à base de arilpiperidina L04 (A) e L12 (B) ligados ao sítio ativo da TYRBm.



Considerando as premissas do grupo arilpiperidina, pode-se inferir que os compostos que interagem com o resíduo Arg209 possuem potencial inibitório aumentado contra a enzima TYR. Essa interação é evidente tanto no inibidor mais potente quanto no segundo menos potente entre os compostos de arilpiperazina (ver Figura 19). As evidências computacionais apresentadas aqui corroboram as observações feitas por Ferro *et al.* (2018) em relação à mobilidade do Arg209, que facilita a estabilização de compostos volumosos dentro do sítio ativo do TYR.

Figura 18 - Estruturas DM representativas dos inibidores à base de arilpiperazina L14 (A) e L19 (B) ligados ao sítio ativo da TYRBm.



5.1. Cálculo *Linear Interaction Energy*

O método LIE é uma abordagem computacional eficiente utilizada no design de fármacos para estimar as energias livres de ligação entre um ligante e sua proteína-alvo (Hansson; Marelus; Åqvist, 1998; Almlöf; Carlsson; Åqvist, 2007; Gutiérrez-de-Terán; Åqvist, 2011). Esse método oferece uma maneira simplificada, porém precisa, de prever as variações nas afinidades de ligação, considerando as contribuições energéticas das interações

não covalentes, como interações de van der Waals, eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Uma das principais vantagens desse método reside em sua eficiência computacional, ao contrário de métodos mais complexos que exigem uma extensa amostragem do espaço conformacional (Limongelli *et al.*, 2020). A abordagem LIE é adequada para estudos de alto rendimento, triagem virtual e otimização de compostos líderes, equilibrando precisão e custo computacional, tornando-se uma ferramenta valiosa nas fases iniciais da descoberta de fármacos (Murcko *et al.*, 1995).

Na Tabela 5, são apresentadas as energias computadas ao redor do ligante para os análogos à base de arilpiperidina e arilpiperazina, respectivamente. Esses valores derivam de uma análise abrangente de todas as simulações de DM realizadas para cada inibidor. Especificamente, para o cálculo dos valores de energia livre, optamos por um total de 10 ns de simulações de Dinâmica Molecular para cada sistema TYR. Os parâmetros empíricos α e β foram obtidos diretamente da literatura (Hansson; Marelius; Åqvist, 1998).

Destacadamente, o valor otimizado de γ , definido em -2,75 na equação LIE para a arilpiperazina, foi determinado por meio de ajuste linear em relação a ΔG_{EXP} . Especificamente, percebeu-se que ao omitir os inibidores L02, L06 e L17, houve uma correlação significativamente aprimorada com ΔG_{EXP} . Portanto, em todas as discussões subsequentes sobre LIE apresentadas aqui, esses inibidores específicos foram deliberadamente excluídos da análise de regressão. Essa abordagem reflete a estratégia empregada por Carlsson, Boukharta e Åqvist (2008) e Vanga *et al.*, (2018), bem como anteriormente em sistemas TYR (Martins *et al.*, 2022).

Tabela 5 - Energia livre de ligação calculada (ΔG_{LIE}) e experimental (ΔG_{EXP}) para inibidores de TYR à base de arilpiperidina e arilpiperazina. Esses valores são expressos em quilocalorias por mol (kcal/mol).

(continua)				
Inibidor	ΔU_{vdW}	ΔU_{ele}	ΔG_{LIE}	ΔG_{EXP}
L03	-20,31±0,90	-6,72 ± 0,51	-6,55 ± 0,16	-6,53
L04	-11,86±0,90	-7,35 ± 0,88	-5,00 ± 0,52	-5,02
L05	-20,90±1,01	-6,82 ± 0,19	-6,69 ± 0,20	-6,55
L07	-20,93±0,74	-6,23 ± 0,71	-6,44 ± 0,02	-6,68
L08	-14,70±1,10	-8,92 ± 0,85	-6,12 ± 0,18	-5,77
L09	-20,09 ± 0,26	-6,02 ± 0,51	-6,20 ± 0,10	-6,15
L10	-21,26 ± 0,66	-5,54 ± 0,48	-6,21 ± 0,02	-6,09
L11	-22,37 ± 0,58	-5,96 ± 0,89	-6,59 ± 0,22	-6,40

Tabela 5 - Energia livre de ligação calculada (ΔG_{LIE}) e experimental (ΔG_{EXP}) para inibidores de TYR à base de arilpiperidina e arilpiperazina. Esses valores são expressos em quilocalorias por mol (kcal/mol).

Inibidor	ΔU_{vdW}	ΔU_{ele}	ΔG_{LIE}	(continuação)
				ΔG_{EXP}
L12	$-19,61 \pm 0,89$	$-7,55 \pm 0,71$	$-6,77 \pm 0,18$	-6,91
L13	$-23,53 \pm 0,59$	$-0,88 \pm 0,10$	$-7,36 \pm 0,38$	-7,70
L14	$-21,43 \pm 0,57$	$+1,13 \pm 0,26$	$-6,12 \pm 0,01$	-6,05
L15	$-24,26 \pm 0,28$	$-0,40 \pm 0,98$	$-7,28 \pm 0,21$	-7,25
L16	$-18,41 \pm 0,45$	$-2,52 \pm 0,64$	$-7,15 \pm 0,02$	-7,49
L18	$-25,38 \pm 0,36$	$+2,58 \pm 0,91$	$-6,20 \pm 0,32$	-6,35
L19	$-22,32 \pm 1,01$	$-2,17 \pm 0,41$	$-7,70 \pm 0,23$	-8,07
L20	$-18,21 \pm 0,53$	$-0,14 \pm 0,44$	$-6,09 \pm 0,04$	-6,48
L21	$-24,16 \pm 0,78$	$+0,48 \pm 0,89$	$-6,88 \pm 0,05$	-7,15
L22	$-21,87 \pm 0,92$	$-0,68 \pm 0,57$	$-6,94 \pm 0,20$	-7,31
L23	$-21,23 \pm 0,67$	$-0,28 \pm 0,63$	$-6,67 \pm 0,10$	-6,95
L24	$-23,65 \pm 0,52$	$+1,79 \pm 0,88$	$-6,34 \pm 0,01$	-6,47

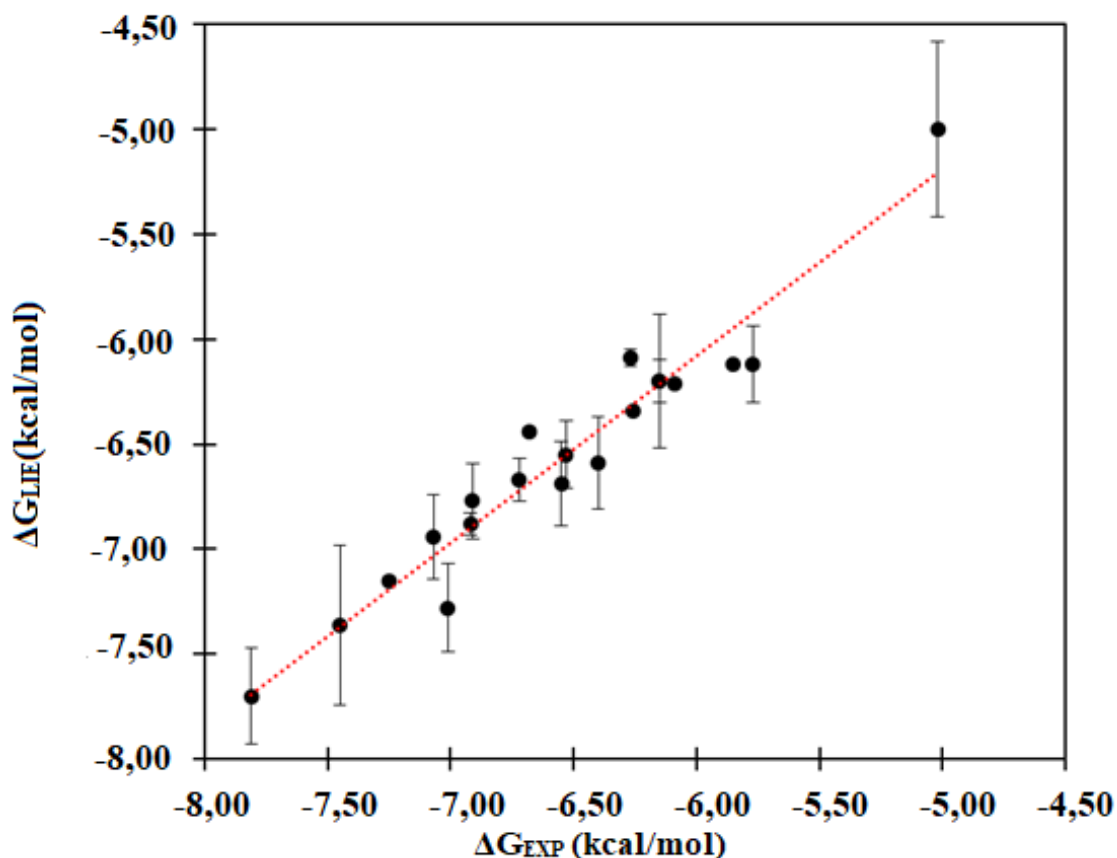
A abordagem LIE demonstrou ser capaz de reproduzir os valores absolutos de energia livre de ligação dos inibidores à base de arilpiperidina e arilpiperazina presentes no conjunto de dados experimentais ($r^2 = 0,963$) (Figura 20). Na discussão a seguir, analisaremos o inibidor mais fraco (L04) e o mais potente (L19) em relação à TYR, visando identificar as características-chave que explicam suas diferenças de ligação.

Notavelmente, o valor de ΔG_{LIE} para L04 excede seu valor experimental em aproximadamente 0,02 kcal/mol (-5,02 kcal/mol), enquanto para L19, o valor de ΔG_{LIE} ultrapassa seu valor experimental em cerca de 0,37 kcal/mol (-8,07 kcal/mol). Conforme proposto anteriormente por Ferro *et al.* (2018), a atividade inibitória significativa da TYR exibida por esses inibidores à base de arilpiperazina pode ser atribuída à presença do anel benzamida. Consequentemente, a exploração de novas interações nessa região dos inibidores de TYR pode fornecer informações valiosas sobre seus mecanismos de inibição.

Realizamos uma análise de decomposição residual para decifrar as contribuições energéticas dos resíduos de aminoácidos ao redor do sítio catalítico da TYR, abrangendo tanto os componentes de van der Waals quanto os eletrostáticos, conforme a equação LIE. Um resultado interessante em relação ao componente eletrostático pode ser observado nos inibidores L16 e L24, onde aqueles que possuem grupos substituintes na posição para do anel

benzamida (L18, L21 e L24) apresentam valores eletrostáticos positivos: +2,58, +0,48 e +1,79 kcal/mol, respectivamente.

Figura 19 - Modelo de regressão linear entre a energia livre de ligação calculada (ΔG_{LIE}) e experimental (ΔG_{EXP}) (em kcal/mol) para inibidores à base de arilpiperidina e arilpiperazina ligados a TYR.



5.2. Análise de decomposição residual

A análise de decomposição residual é uma técnica computacional poderosa utilizada nos cálculos de energia livre de ligação para dissecar e compreender as contribuições dos componentes moleculares individuais para a afinidade de ligação geral entre um ligante e sua proteína alvo. Esta abordagem proporciona insights sobre as interações específicas que impulsionam a ligação do ligante, elucidando os mecanismos moleculares subjacentes. Essa técnica serve como uma ferramenta valiosa para validar hipóteses de ligação, explicar a seletividade da ligação e sugerir maneiras de aprimorar a ligação do ligante.

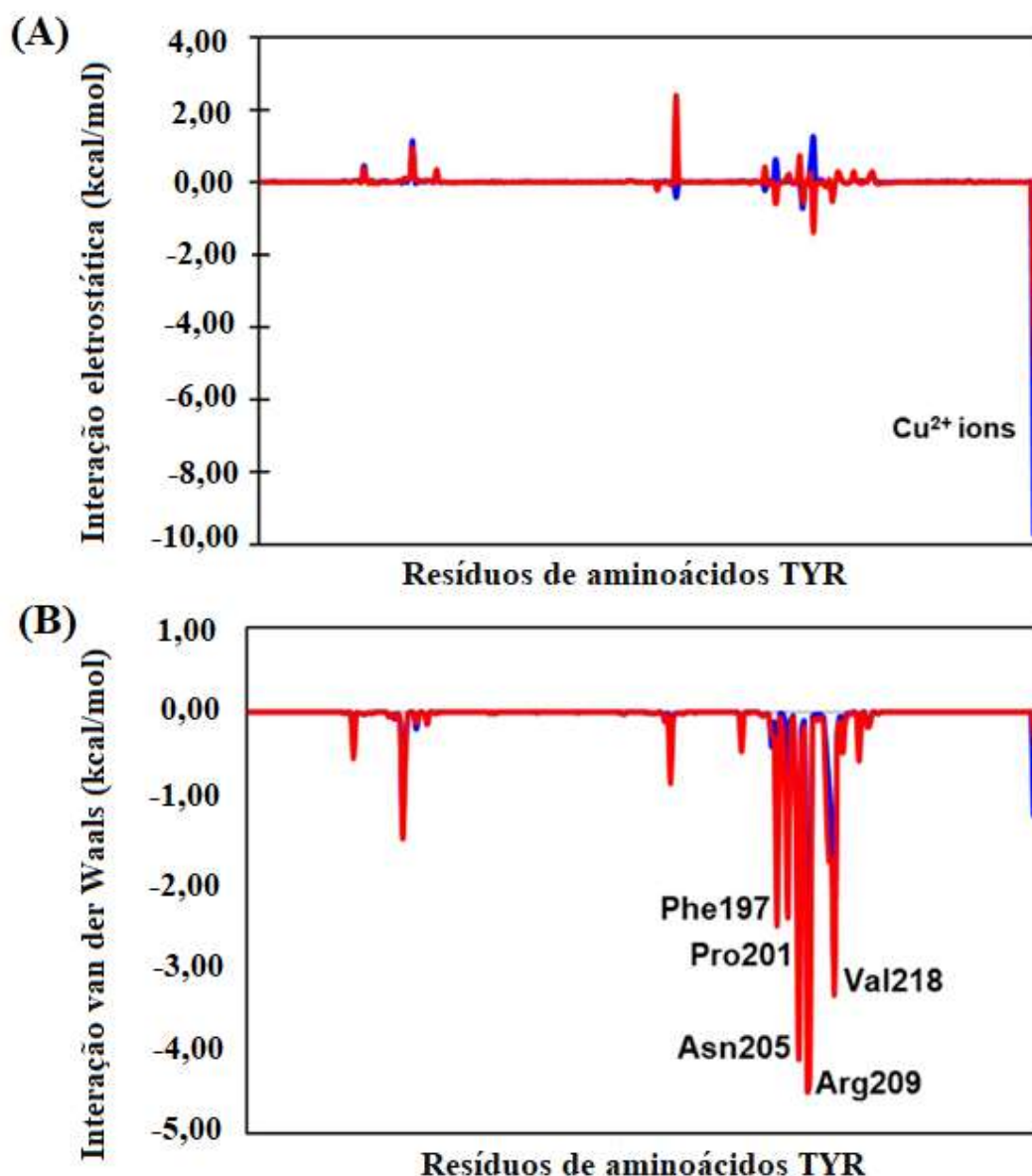
Os insights fornecidos podem simplificar a identificação de candidatos a medicamentos mais eficazes e seletivos, resultando, em última análise, em uma aceleração do processo de desenvolvimento de medicamentos (Sabe *et al.*, 2021). Na Figura 21, são apresentadas as energias médias de interação van der Waals (vdW) e eletrostática (ele) para os resíduos de aminoácidos TYR que contribuem significativamente para ΔG_{LIE} , considerando tanto os

inibidores de TYR mais potentes (L19, representados por linhas vermelhas) quanto os menos potentes (L04, representados por linhas azuis). De modo geral, as contribuições eletrostáticas dos resíduos TYR demonstram disparidades mínimas entre os sistemas L04 e L19 (Figura 21A).

Notavelmente, a interação eletrostática com íons Cobre II para L04 é de -12,64 kcal/mol, enquanto que para L19 é de -9,17 kcal/mol. Por outro lado, as contribuições do vdW sofrem alterações mais substanciais durante a transição dos inibidores de L04 para L19 (vide Figura 11B). As diferenças mais proeminentes são perceptíveis para Phe197, Pro201, Asn205, Arg209 e Val218, com valores variando aproximadamente em -0,94, -1,68, -0,91, -1,60 e -0,30 kcal/mol dos inibidores L04 para L19, respectivamente (conforme Figura 21B). De particular interesse é a interação estabelecida entre L19 e Arg209, caracterizada por um contato de empilhamento de cátions π entre a cadeia lateral do aminoácido e o anel benzamida do inibidor à base de arilpiperazina.

Além disso, confirma-se que as interações de van der Waals predominam sobre as outras, mesmo ao considerar todos os aminoácidos e íons Cobre II. As contribuições totais dos elementos para os sistemas L04 e L16 são de -9,45 e -5,54 kcal/mol, respectivamente, indicando uma diferença de aproximadamente 4,00 kcal/mol. Ao levar em conta as contribuições totais de van der Waals, os sistemas apresentam -25,10 e -39,12 kcal/mol, respectivamente, o que representa uma diferença de aproximadamente -14,00 kcal/mol. Esses resultados sugerem que a inibição da enzima TYR por esses inibidores é principalmente impulsionada pelas interações de van der Waals, destacando a importância do anel de benzamida nos inibidores estudados de arilpiperidina e nos inibidores baseados em arilpiperazina.

Figura 20 - (A) contribuições energéticas eletrostáticas e (B) van der Waals (vdW) (em kcal/mol) sobre os inibidores L04 (azul) e L19 (vermelho) usados nos cálculos LIE.



5.3 Cálculos de FEP

Para validar os achados sugeridos pelos resultados de LIE e aprimorar a compreensão dos modelos de relação estrutura-atividade (SAR), foi projetada uma série de transformações FEP para pares de ligantes selecionados, conforme aplicado em estudos anteriores (Vanga *et al.*, 2018; Barlow *et al.*, 2020). Essa abordagem permite estimar as energias livres de ligação relativas ($\Delta\Delta G_{\text{bind}}$) entre pares de compostos, possibilitando a comparação com variações experimentais observadas nas afinidades de ligação. No total, sete ligantes foram analisados

por meio de seis transformações FEP. O primeiro caminho de FEP foi projetado para calcular as afinidades de ligação relativas dos derivados de arilpiperidina (L02, L03 e L05) em relação ao composto de referência mais simples, L04. Em seguida, L04 foi transformado no derivado de arilpiperazina mais simples, L08, que serviu como ponto de partida para as transformações envolvendo L09 e L10 (outros derivados de arilpiperazina). A Tabela 6 resume os valores calculados de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ para cada transformação.

Tabela 6 - Variações calculadas e experimentais nas energias livres de ligação dos derivados de arilpiperidina e arilpiperazina como inibidores de TYR. Todos os valores estão expressos em quilocalorias por mol (kcal/mol).

Transformação do Ligante (A→B)	$\Delta\Delta G_{\text{bind},\text{exp}}^{\text{a}}$	$\Delta\Delta G_{\text{bind},\text{calc}}^{\text{b}}$
L04→L02	-0,557	-0,345 ± 0,170
L02→L03	-0,942	-0,670 ± 0,149
L03→L05	-0,025	-0,081 ± 0,041
L04→L08	-0,745	-0,514 ± 0,494
L08→L09	-0,383	-0,450 ± 0,201
L09→L10	0,066	0,792 ± 0,211

^aOs valores experimentais de ΔIC_{50} (Tabela 1) foram transformados em $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ utilizando a relação $\Delta\Delta G_{\text{bind},\text{exp}} = RT \ln (\text{IC}_{50}(\text{B})/\text{IC}_{50}(\text{A}))$.

^bOs valores de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ foram calculados usando o programa QligFEP. Os erros-padrão da média (SEM) foram estimados com base em simulações replicadas individualmente.

Conforme mostrado na Tabela 6, as afinidades relativas calculadas utilizando o QligFEP demonstram excelente concordância com os dados experimentais ($r^2 = 0,843$ e $\text{MAE} = 0,26$). Na primeira transformação da arilpiperidina (L04→L02), onde um átomo de hidrogênio é substituído por um grupo CH_3CH_2 na posição R (conforme Tabela 1), observa-se uma melhoria na atividade inibitória. Esse aumento pode ser atribuído à adição de interações adicionais de van der Waals com resíduos circundantes, conforme sugerido pelos resultados de LIE, contribuindo para uma ligação mais forte entre o ligante e a tirosina.

Na transformação subsequente (L02→L03), a substituição do grupo CH_3CH_2 pelo grupo CH_3CO resulta em um duplo efeito: o grupo metila hidrofóbico melhora as interações de van der Waals, enquanto o oxigênio carbonílico polar possibilita a formação de ligações de hidrogênio potenciais com Arg209, conforme sugerido por Ferro *et al.* (2018). Essa combinação equilibrada entre hidrofobicidade e polaridade permite que o ligante interaja eficazmente com as regiões hidrofóbicas e polares do sítio de ligação da TYR, aprimorando ainda mais a afinidade de ligação.

Por fim, na transformação L03→L05, é introduzido o grupo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$, que mantém esse equilíbrio favorável entre características hidrofóbicas e polares. O grupo etil contribui para interações hidrofóbicas aprimoradas, enquanto o oxigênio carbonílico mantém interações

polares, otimizando a ligação do ligante em um bolsão que acomoda tanto regiões hidrofóbicas quanto polares da TYR. No entanto, essa transformação apresenta o menor deslocamento de energia livre, conforme refletido nos valores experimentais e teóricos de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$, sugerindo uma melhora relativamente modesta na afinidade de ligação em comparação com as modificações anteriores.

Dentre todas as transformações de FEP, a mais significativa é a conversão do derivado de arilpiperidina mais simples (L04) para o derivado de arilpiperazina mais básico (L08), onde um átomo de carbono (CH) na posição X é substituído por um átomo de nitrogênio (N) (conforme Tabela 1). O valor experimental de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ para essa transformação é de $-0,745$ kcal/mol, indicando uma melhora na afinidade de ligação. Os cálculos de FEP resultaram em um valor teórico de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ de $-0,514 \pm 0,494$ kcal/mol, demonstrando excelente concordância com os dados experimentais. Essa correlação próxima ressalta a precisão da metodologia de FEP na captura dos efeitos energéticos das modificações estruturais, especialmente a introdução de um átomo de nitrogênio, que provavelmente melhora a ligação por meio de interações polares adicionais e alterações nas propriedades eletrônicas dentro do sítio de ligação.

Para as transformações de arilpiperazina, nossas simulações de FEP capturaram com precisão a transformação L08→L09, confirmando a robustez do procedimento QligFEP na descrição das variações relativas da energia livre de ligação. Curiosamente, a transformação L09→L10 resultou em um valor teórico de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ aproximadamente 12 vezes maior que o valor experimental, apesar de envolver a mesma modificação estrutural da transformação L03→L05. No entanto, tanto os valores experimentais quanto os teóricos de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ são positivos, indicando uma redução na afinidade de ligação consistente com a natureza da modificação.

5.4. Descritores QM, Análise de FMO e MEP

Um desafio crítico na caracterização precisa de sistemas enzimáticos que envolvem metais é compreender seu impacto definitivo nas interações entre a proteína e o ligante (Li *et al.*, 2017). Os métodos de mecânica quântica (QM) têm se mostrado inestimáveis na caracterização precisa desses sistemas (Siegbahn *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015). Principalmente, descritores QM, como eletronegatividade, dureza, índice de eletrofilicidade, energias de gap HOMO-LUMO, orbitais moleculares de fronteira (FMO) e potenciais eletrostáticos moleculares (MEP), são ferramentas essenciais para compreender a reatividade química das moléculas (Bursch *et al.*, 2022; Grillo *et al.*, 2023; Suresh *et al.*, 2022).

Inicialmente, as energias de HOMO e LUMO fornecem informações sobre a capacidade de doação ou aceitação de elétrons por uma molécula, influenciando diretamente sua reatividade e interação com o sítio ativo de uma enzima. Por outro lado, os diagramas de FMO e MEP representam visualmente os orbitais moleculares e a distribuição de carga, destacando regiões de atração ou repulsão eletrostática cruciais para prever como e onde uma molécula interagirá com outra. Coletivamente, esses descritores QM (Tabela 7) facilitam uma compreensão abrangente das propriedades moleculares subjacentes ao processo de inibição da TYR.

Tabela 7 - Descritores QM obtidos a partir de cálculos de DFT. Os valores estão expressos em eV.

Inibidor	Eletronegatividade (χ)	Dureza (η)	Índice de eletrofilicidade (ω)	energias de gap HOMO- LUMO
L04	-3,66	9,53	0,70	19,06
L08	-3,62	9,36	0,69	18,72
L19	-3,52	8,91	0,69	17,82

Os cálculos de DFT demonstram que L04, com sua dureza mais elevada (9,53 eV), exibe menor reatividade química. Essa limitação pode dificultar sua capacidade de ajustar sua densidade eletrônica durante interações com Cobre II, resultando em uma ligação mais fraca, apesar de sua maior eletronegatividade e índice de eletrofilicidade. Em contraste, a menor dureza de L19 (8,91 eV) melhora sua reatividade, permitindo uma interação mais robusta e eficiente com Cobre II, sugerindo que L19 pode ser a escolha mais prática em aplicações que exigem ligação forte ao íon metálico.

Outro valor a ser considerado é o gap HOMO-LUMO (ver Figura 22), um indicador crucial de estabilidade e reatividade molecular. L04, com um gap de 19,06 eV, demonstra estabilidade elevada, embora com reatividade reduzida, em comparação com L19, que possui um gap de 17,82 eV. Essa maior estabilidade de L04 implica uma menor propensão a transições eletrônicas, contribuindo para sua menor potência inibitória. Por outro lado, o menor gap HOMO-LUMO de L19 equivale a uma reatividade química superior. Tanto a dureza quanto o gap HOMO-LUMO demonstram a interação facilitada com os íons cobre II em TYR, resultando em um valor significativamente menor de IC₅₀ para o inibidor L19.

Figura 21 - Diagramas de HOMO (esquerda) e LUMO (direita) para os inibidores (A) L04, (B) L08 e (C) L19, calculados no nível wB97XD/6-311++G (d,p) no modelo PCM, as cores vermelho e verde representam sinais positivos e negativos para a função de onda, respectivamente.

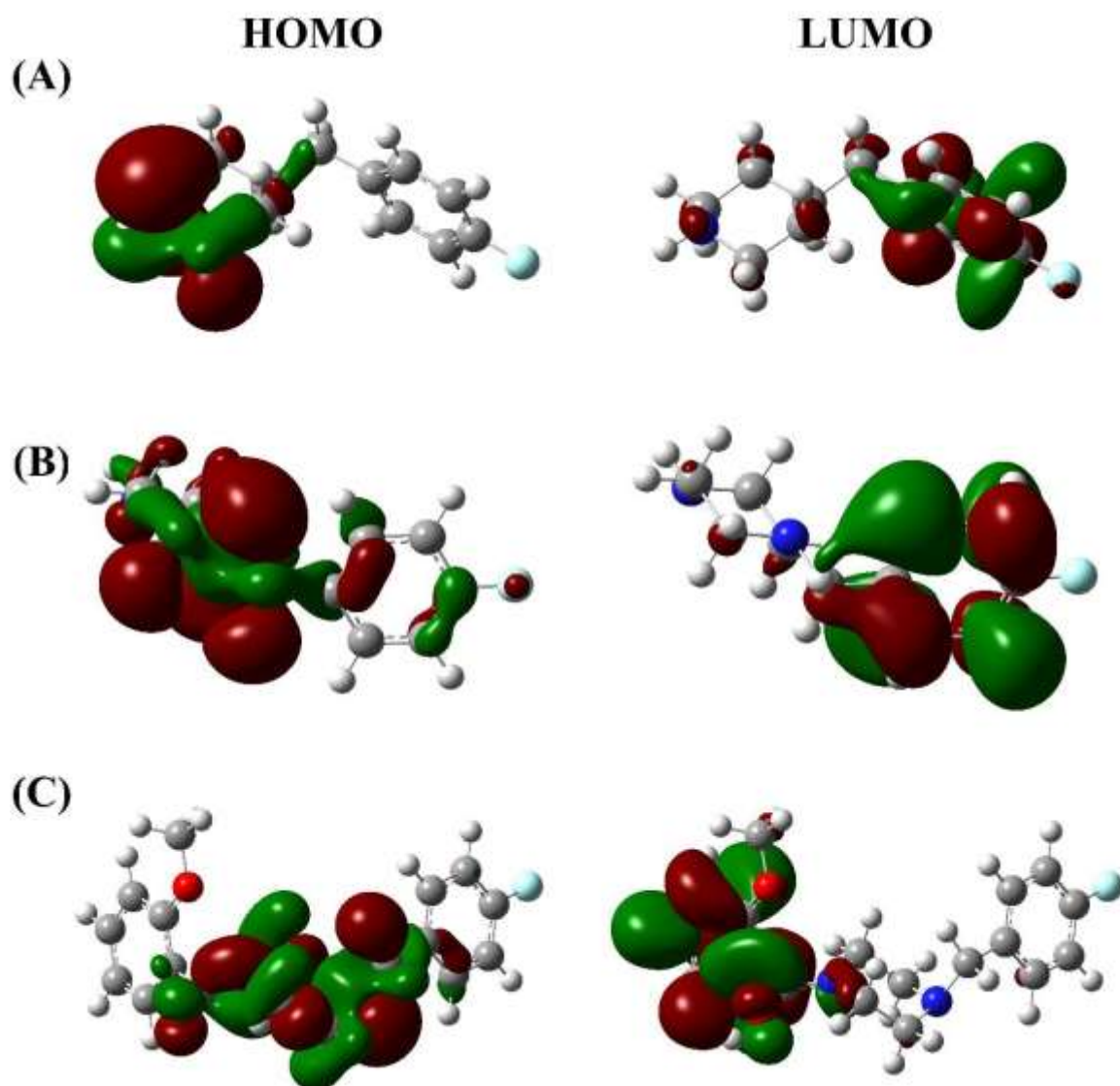
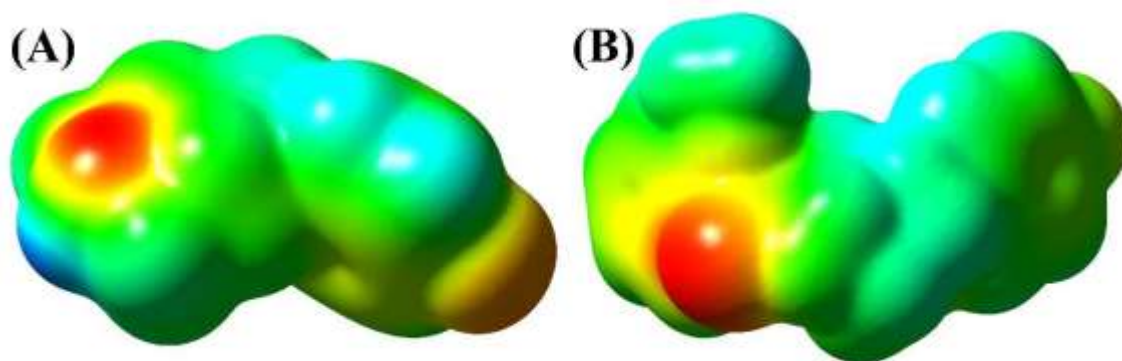


Figura 22 - Diagramas de MEP para os inibidores (A) L04 e (B) L19, calculados no nível wB97XD/6-311++G (d,p) no modelo PCM.



O potencial eletrostático molecular é um importante dado obtido a partir de um método quântico confiável e comumente utilizado para interpretar e prever diversos aspectos da reatividade química (Politzer *et al.*, 2021; Suresh *et al.*, 2022). A Figura 23 mostra que o MEP destaca diferenças na distribuição eletrônica entre os inibidores L04 e L19. Notavelmente, em L04, as densidades eletrônicas concentram-se ao redor do átomo N no anel de piperidina. Em contraste, em L19, o grupo carbonila ligado ao anel metoxifenil e ao anel de piperazina exibe a maior densidade eletrônica, favorecendo uma distribuição eletrônica mais ampla em todo o grupo metoxifenil.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, utilizou-se técnicas computacionais avançadas, incluindo *docking* molecular, simulações de dinâmica molecular e o método de Energia de Interação Linear, para investigar a inibição da tirosinase por inibidores à base de arilpiperidina e arilpiperazina. Os resultados obtidos demonstraram que todos os ligantes simulados apresentaram estabilidade consistente dentro do sítio catalítico da TYR, mantendo interações fundamentais com resíduos essenciais e íons Cobre (II).

A análise detalhada das interações revelou que as interações eletrostáticas com Cobre (II) e as interações de van der Waals (vdW) com os resíduos Phe197, Pro201, Val218, Asn205 e Arg209 desempenham um papel fundamental na ligação dos inibidores. Em particular, os inibidores baseados em arilpiperidina demonstraram maior potência devido à presença do anel benzamida, que contribui para interações estabilizadoras adicionais. Além disso, a energia livre de ligação calculada por meio da abordagem LIE apresentou uma excelente correlação com os dados experimentais de afinidade de ligação ($r^2 = 0,963$).

Esses achados foram reforçados pelos resultados da metodologia FEP utilizando o protocolo QligFEP, que também apresentou alta confiabilidade na previsão precisa das afinidades de ligação dos ligantes ($r^2 = 0,843$). Os resultados deste estudo possuem implicações significativas tanto na área cosmética quanto na terapêutica. No campo cosmético, a tirosinase é uma enzima essencial no processo de biossíntese da melanina e sua inibição é fundamental no desenvolvimento de agentes despigmentantes.

Os compostos estudados demonstraram eficácia como potenciais inibidores da TYR, podendo ser explorados como novos ingredientes ativos para produtos dermatológicos voltados ao clareamento da pele e ao tratamento de hiperpigmentação. Na área terapêutica, as técnicas de *docking* molecular e DM utilizadas são ferramentas essenciais para o design racional de fármacos. A identificação de compostos líderes promissores e a previsão da estabilidade dos complexos ligante-proteína podem contribuir para o tratamento de distúrbios relacionados à tirosinase, incluindo doenças neurodegenerativas e certos tipos de câncer de pele.

A metodologia aplicada neste estudo, baseada em cálculos de energia livre de ligação e análises computacionais detalhadas, a abordagem computacional permite acelerar o processo de desenvolvimento de novos compostos, reduzindo a necessidade de experimentação laboratorial dispendiosa e contribuindo para a inovação na biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos e cosméticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Mark James. *et al.* GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [S.L.], v. 1-2, p. 19-25, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.

ALMLÖF, Martin; CARLSSON, Jens; ÅQVIST, Johan. Improving the Accuracy of the Linear Interaction Energy Method for Solvation Free Energies. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 2162-2175, 28 set. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ct700106b>.

ÅQVIST, Johan. *et al.* A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. **Protein Eng. Des**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 385-391, 1994. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/protein/7.3.385>.

ARROO, Randolph R.J. *et al.* Flavones as tyrosinase inhibitors: kinetic studies in vitro and in silico. **Phytochemical Analysis**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 314-321, 29 jan. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2897>.

AULBUR, Wilfried G. *et al.* Quasiparticle Calculations in Solids. **Solid State Physics**, [S.L.], p. 1-218, 2000. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0081-1947\(08\)60248-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0081-1947(08)60248-9).

BARLOW, Nicholas *et al.* Macrocyclic peptidomimetics as inhibitors of insulin-regulated aminopeptidase (IRAP). **Rsc Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 234-244, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9md00485h>.

BARREIRO, Eliezer J. *et al.* Modelagem Molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 300-310, jun. 1997. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421997000300011>.

BATOOL, Maria; AHMAD, Bilal; CHOI, Sangdun. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 2783, 6 jun. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20112783>.

BAUER, Paul. *et al.* Q6: a comprehensive toolkit for empirical valence bond and related free energy calculations. **SoftwareX**, [S.L.], v. 7, p. 388-395, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.softx.2017.12.001>.

BELTRAMINI, M. *et al.* The reaction of CN⁻ With the binuclear copper site of Neurospora tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active sites. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [S.L.], v. 1040, n. 3, p. 365-372, set. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(90\)90134-2](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(90)90134-2).

BERLITZ, Simone Jacobus. *et al.* Azelaic acid-loaded nanoemulsion with hyaluronic acid – a new strategy to treat hyperpigmentary skin disorders. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 642-650, 28 jan. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2019.1569032>.

BINO, Sandra del; DUVAL, Christine; BERNERD, Françoise. Clinical and Biological Characterization of Skin Pigmentation Diversity and Its Consequences on UV Impact. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 2668, 8 set. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19092668>.

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; AZEVEDO, Walter Filgueira de. Molegro Virtual Docker for Docking. *Methods In Molecular Biology*, [S.L.], p. 149-167, 2019. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_10.

BONAVENTURE, Jacky; DOMINGUES, Melanie J.; LARUE, Lionel. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 316-325, 27 mar. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pcmr.12080>.

BRASIL, Edikarlos M. *et al.* Inhibition of tyrosinase by 4H-chromene analogs: synthesis, kinetic studies, and computational analysis. **Chemical Biology & Drug Design**, [S.L.], v. 90, n. 5, p. 804-810, 12 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13001>.

BRENNER, Michaela; HEARING, Vincent J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin†. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 84, n. 3, p. 539-549, 16 nov. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x>.

BROOKS, Bernard R. *et al.* CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 187-217, jun. 1983. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540040211>.

BURSCH, Markus *et al.* Best-Practice DFT Protocols for Basic Molecular Computational Chemistry**. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 61, n. 42, 14 set. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.202205735>.

BURDOCK, George A.; SONI, Madhusudan G.; CARABIN, Ioana G. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 80-101, fev. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/rtph.2000.1442>.

CABANES, Juana; CHAZARRA, Soledad; GARCIA-CARMONA, Francisco. Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 46, n. 12, p. 982-985, dez. 1994. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03253.x>.

CARBALLO-CARBAJAL, Iria. *et al.* Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 973-973, 7 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08858-y>.

CARLSSON, Jens; BOUKHARTA, Lars; ÅQVIST, Johan. Combining Docking, Molecular Dynamics and the Linear Interaction Energy Method to Predict Binding Modes and Affinities for Non-nucleoside Inhibitors to HIV-1 Reverse Transcriptase. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 51, n. 9, p. 2648-2656, 12 abr. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm7012198>.

CARRADORI, Simone. *et al.* Tyrosinase enzyme and its inhibitors: an update of the literature. **Metalloenzymes**, [S.L.], p. 533-546, 2024. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-823974-2.00003-6>.

CASE, David A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 26, n. 16, p. 1668-1688, 30 set. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20290>.

CHANG, Te-Sheng. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 2440-2475, 26 maio 2009. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms10062440>.

CHEN, Wang-Chuan. *et al.* Discovery of Highly Potent Tyrosinase Inhibitor, T1, with Significant Anti-Melanogenesis Ability by zebrafish in vivo Assay and Computational Molecular Modeling. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 7995-7995, 23 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep07995>.

CHUNG, Ki Wung. *et al.* Evaluation of Antimelanogenic Activity and Mechanism of Galangin in Silico and in Vivo. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 73-79, 2018. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b17-00597>.

CICHOREK, Mirosława. *et al.* Skin melanocytes: biology and development. **Advances In Dermatology And Allergology**, [S.L.], v. 1, p. 30-41, 2013. Termedia Sp. z.o.o. <http://dx.doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>.

CLAUS, Harald; DECKER, Heinz. Bacterial tyrosinases. **Systematic And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 3-14, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.012>.

COELHO, Lilian Weitzel. *et al.* Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 396-404, jun. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421999000300018>.

COHEN, N. Claude. *et al.* Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 883-894, mar. 1990. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm00165a001>.

COLE, Jason; NISSINK, J Willem M.; TAYLOR, Robin. Protein-Ligand Docking Virtual Screening with GOLD. **Virtual Screening In Drug Discovery**, [S.L.], p. 379-415, 24 mar. 2005. CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420028775.ch15>.

CONTRERAS, Renato R. *et al.* A direct evaluation of regional Fukui functions in molecules. **Chemical Physics Letters**, [S.L.], v. 304, n. 5-6, p. 405-413, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2614\(99\)00325-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2614(99)00325-5).

COURNIA, Zoe. *et al.* Free Energy Methods in Drug Discovery—Introduction. **Acs Symposium Series**, [S.L.], p. 1-38, 19 nov. 2021. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2021-1397.ch001>.

CRAMER, Christopher J. *et al.* Theoretical Models on the Cu₂O₂ Torture Track: mechanistic implications for oxytyrosinase and small-molecule analogues. **The Journal Of Physical Chemistry A**, [S.L.], v. 110, n. 5, p. 1991-2004, 6 jan. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp056791e>.

CURTO, Ernest V. *et al.* Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 663-672, mar. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00340-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00340-2).

DECKER, Heinz; TUCZEK, Felix. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. **Trends In Biochemical Sciences**, [S.L.], v. 25, n. 8, p. 392-397, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01602-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01602-9).

DERI, Batel *et al.* The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, 11 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep34993>.

DÍAZ, Lucía. *et al.* Computational Prediction of Structure-Activity Relationships for the Binding of Aminocyclitols to β -Glucocerebrosidase. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [S.L.], v. 51, n. 3, p. 601-611, 8 mar. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci100453a>.

DOLINSKY, T. J. *et al.* PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of poisson-boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 32, n., p. 665-667, 1 jul. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh381>.

D'MELLO, Stacey. *et al.* Signaling Pathways in Melanogenesis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 1144, 15 jul. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17071144>.

EASTMAN, Peter. *et al.* OpenMM 7: rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. **Plos Computational Biology**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 1005659, 26 jul. 2017. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005659>.

ESPÍN, Juan Carlos; WICHES, Harry J. Slow-Binding Inhibition of Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase Isoforms by Tropolone. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 47, n. 7, p. 2638-2644, 2 jul. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf981055b>.

FAN, Yu-Fan. *et al.* Spectrophotometric Assays for Sensing Tyrosinase Activity and Their Applications. **Biosensors**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 290, 23 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/bios11080290>.

FERRO, Stefania. *et al.* Targeting Tyrosinase: development and structural insights of novel inhibitors bearing arylpiperidine and arylpiperazine fragments. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 61, n. 9, p. 3908-3917, 10 abr. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01745>.

FRIESNER, Richard A. *et al.* Extra Precision Glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 49, n. 21, p. 6177-6196, 23 set. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm051256o>.

FRISCH, M.J. *et al.* Gaussian 09, **Revision E. 01**; Gaussian, 2009.

FUJIMOTO, N. Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by kojic acid in F344 rats. **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 1567-1572, 1 ago. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/20.8.1567>.

GARCÍA-MOLINA, Pablo. *et al.* Considerations about the Continuous Assay Methods, Spectrophotometric and Spectrofluorometric, of the Monophenolase Activity of Tyrosinase. **Biomolecules**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1269, 25 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom11091269>.

GENHEDEN, Samuel *et al.* How to obtain statistically converged MM/GBSA results. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 837-846, 13 jul. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21366>.

GOHLKE, Holger; KLEBE, Gerhard. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 41, n. 15, p. 2644-2676, 2 ago. 2002. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773\(20020802\)41:153.0.co;2-o](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773(20020802)41:153.0.co;2-o).

GREGGIO, Elisa. *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of parkinson's disease? **Molecular Neurodegeneration**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 6-6, 18 jan. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1326>.

GRILLO, Igor B. *et al.* Quantum chemical descriptors based on semiempirical methods for large biomolecules. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 158, n. 20, 24 maio 2023. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/5.0132687>.

GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, [S.L.], v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142010000300006>.

GUPTA, Himanshu; SHARMA, Aarti. Molecular modeling. **Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 16, 2009. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.62681>.

GURUNG, Arun Bahadur. *et al.* An Updated Review of Computer-Aided Drug Design and Its Application to COVID-19. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2021, p. 1-18, 24 jun. 2021. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/8853056>.

GUTIÉRREZ-DE-TERÁN, Hugo; ÅQVIST, Johan. Linear Interaction Energy: method and applications in drug design. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 305-323, 24 nov. 2011. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-465-0_20.

HANSSON, Tomas; MARELIUS, John; ÅQVIST, Johan. Ligand Binding Affinity Prediction by Linear Interaction Energy Methods. **Journal Of Computer-Aided Molecular Design**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 27-35, 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007930623000>.

HARDER, Edward. *et al.* OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 281-296, 1 dez. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00864>.

HASHEMI, Seyedeh Mahdiah; EMAMI, Saeed. Kojic acid-derived tyrosinase inhibitors: synthesis and bioactivity. **Pharmaceutical And Biomedical Research**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-17, 1 jan. 2015. CASRP: Center of Advanced Scientific Research and Publications. <http://dx.doi.org/10.18869/acadpub.pbr.1.1.1>.

HEARING, Vincent J.; JIMÉNEZ, Mercedes. Mammalian tyrosinase—The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. **International Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1141-1147, jan. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-711x\(87\)90095-4](http://dx.doi.org/10.1016/0020-711x(87)90095-4).

HOFMANN, Matthias; SCHAEFER, Henry F. Computational Chemistry. **Encyclopedia Of Physical Science And Technology**, [S.L.], p. 487-506, 2003. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b0-12-227410-5/00129-0>.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, [S.L.], v. 136, n. 3, p. 864-871, 9 nov. 1964. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrev.136.b864>.

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, [S.L.], v. 99, n. 6, p. 1129-1143, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.

HONARPARVAR, Bahareh. *et al.* Integrated Approach to Structure-Based Enzymatic Drug Design: molecular modeling, spectroscopy, and experimental bioactivity. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 114, n. 1, p. 493-537, 11 set. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr300314q>.

HONISCH, Claudia. *et al.* Isolation of a tyrosinase inhibitor from unripe grapes juice: a spectrophotometric study. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 305, p. 125506, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125506>.

HU, Jing. *et al.* Novel piperazine urea derivatives as highly potent transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 115, p. 105229, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105229>.

HUANG, Jing; MACKERELL, Alexander D. Force field development and simulations of intrinsically disordered proteins. **Current Opinion In Structural Biology**, [S.L.], v. 48, p. 40-48, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.008>.

ISMAYA, Wangsa T. *et al.* Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. **Biochemistry**, [S.L.], v. 50, n. 24, p. 5477-5486, 27 maio 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi200395t>.

JESPERSEN, Willem *et al.* QligFEP: an automated workflow for small molecule free energy calculations in q. **Journal Of Cheminformatics**, [S.L.], v. 11, n. 1, 2 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13321-019-0348-5>.

JIN, Ying Hua. *et al.* Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. **Archives Of Pharmacal Research**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 232-236, jun. 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02976355>.

JORGENSEN, William L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 79, n. 2, p. 926-935, 15 jul. 1983. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.445869>.

JORGENSEN, William L. *et al.* Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 118, n. 45, p. 11225-11236, 13 nov. 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja9621760>.

JORGENSEN, William L. *et al.* Monte Carlo simulation of differences in free energies of hydration. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 83, n. 6, p. 3050-3054, 15 set. 1985. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.449208>.

JORGENSEN, William L. *et al.* Perspective on Free-Energy Perturbation Calculations for Chemical Equilibria. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 869-876, 9 maio 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ct800011m>.

K., Agnieszka. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: implications for molecular design. **Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids And Gases**, [S.L.], p. 2-49, 2 nov. 2011. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/19447>.

KAIDBEY, Kays H. *et al.* Photoprotection by melanin—a comparison of black and Caucasian skin. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 249-260, set. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0190-9622\(79\)70018-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0190-9622(79)70018-1).

KAMO, Hiroki. *et al.* Tyrosinase suppresses vasculogenic mimicry in human melanoma cells. **Oncology Letters**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 169-169, 6 abr. 2022. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2022.13289>.

KANG, Hak Hee. *et al.* Depigmenting Activity and Low Cytotoxicity of Alkoxy Benzoates or Alkoxy Cinnamate in Cultured Melanocytes. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 51, n. 9, p. 1085-1088, 2003. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.51.1085>.

KING, Gregory; WARSHEL, Arieh. A surface constrained all-atom solvent model for effective simulations of polar solutions. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 91, n. 6, p. 3647-3661, 15 set. 1989. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.456845>.

KIRKWOOD, John G. *et al.* Statistical Mechanics of Fluid Mixtures. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 3, n. 5, p. 300-313, 1 maio 1935. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.1749657>.

KITCHEN, Douglas B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 3, n. 11, p. 935-949, 1 nov. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1549>.

KLAUDA, Jeffery B. *et al.* Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: validation on six lipid types. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [S.L.], v. 114, n. 23, p. 7830-7843, 24 maio 2010. **American Chemical Society (ACS)**. <http://dx.doi.org/10.1021/jp101759q>.

KOHN, W. *et al.* Nobel Lecture: electronic structure of matter.: wave functions and density functionals. **Reviews Of Modern Physics**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 1253-1266, 1 out. 1999. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/revmodphys.71.1253>.

KOHN, W. *et al.* Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, [S.L.], v. 140, n. 4, p. 1133-1138, 15 nov. 1965. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrev.140.a1133>.

LAI, X. *et al.* Crystal structure of human tyrosinase related protein 1. **Angew Chem Int Ed Engl**, [S.L.], p. 9812-9815, 12 jul. 2017. Worldwide Protein Data Bank. <http://dx.doi.org/10.2210/pdb5m8l/pdb>.

LAND, E.J.; RILEY, P.A. Spontaneous Redox Reactions of Dopaquinone and the balance between the Eumelanin and Pheomelanin Pathways. **Pigment Cell Research**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 273-277, ago. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0749.2000.130409.x>.

LEACH, A. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 2nd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

LEE, Frederick S. *et al.* Calculations of antibody-antigen interactions: microscopic and semi-microscopic evaluation of the free energies of binding of phosphorylcholine analogs to mcpc603. **Protein Eng. Des.**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 215-228, 1992. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/protein/5.3.215>.

LEVY, Ronald M. *et al.* Gaussian fluctuation formula for electrostatic free-energy changes in solution. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 95, n. 5, p. 3627-3633, 1 set. 1991. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.460813>.

LI, Hui; ROBERTSON, Andrew D.; JENSEN, Jan H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 704-721, 17 nov. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.20660>.

LI, Jin. *et al.* Recent advances in the design and discovery of synthetic tyrosinase inhibitors. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 224, p. 113744, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113744>.

LI, Pengfei *et al.* Metal Ion Modeling Using Classical Mechanics. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 117, n. 3, p. 1564-1686, 3 jan. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00440>.

LI, Wenhui. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, [S.L.], v. 426, n. 6965, p. 450-454, nov. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02145>.

LIAO, Qinghua. *et al.* Development and Application of a Nonbonded Cu^{2+} Model That Includes the Jahn–Teller Effect. **The Journal Of Physical Chemistry Letters**, [S.L.], v. 6, n. 13, p. 2657-2662, 24 jun. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b01122>.

LIMONGELLI, Vittorio. Ligand binding free energy and kinetics calculation in 2020. **Wires Computational Molecular Science**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1-32, 9 jan. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wcms.1455>.

LIU, Jiaman. *et al.* Valonea Tannin: tyrosinase inhibition activity, structural elucidation and insights into the inhibition mechanism. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 2747, 7 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26092747>.

LIU, Xuewei. *et al.* Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 23-37, 15 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2018.1403419>.

LOGESH, Rajan. *et al.* Natural tyrosinase enzyme inhibitors: a path from melanin to melanoma and its reported pharmacological activities. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Cancer**, [S.L.], v. 1878, n. 6, p. 188968, nov. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188968>.

MARELIUS, John. *et al.* Q: a molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular system. **Journal Of Molecular Graphics And Modelling**, [S.L.], v. 16, n. 4-6, p. 213-225, ago. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1093-3263\(98\)80006-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1093-3263(98)80006-5).

MARLES, Lee K. *et al.* Tyrosine hydroxylase isoenzyme I is present in human melanosomes: a possible novel function in pigmentation. **Experimental Dermatology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 61-70, fev. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0625.2003.120108.x>.

MARTINS, Lucas Sousa. *et al.* Computational Analysis of Triazole-Based Kojic Acid Analogs as Tyrosinase Inhibitors by Molecular Dynamics and Free Energy Calculations. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 23, p. 8141, 23 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27238141>.

MARTINS, Lucas Sousa. *et al.* Evaluating the Performance of a Non-Bonded Cu^{2+} Model Including Jahn-Teller Effect into the Binding of Tyrosinase Inhibitors. **International Journal**

Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 21, n. 13, p. 4783, 6 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21134783>.

MASON, Howard s; WRIGHT, Charles I. The chemistry of melanin; oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. **The Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 1, n. 180, p. 235-247, jan. 1949.

MASUM, Mohammad N.; YAMAUCHI, Kosei; MITSUNAGA, Tohru. Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources as Skin-lightening Agents. **Reviews In Agricultural Science**, [S.L.], v. 7, p. 41-58, 2019. United Graduate School of Agricultural Science. <http://dx.doi.org/10.7831/ras.7.41>.

MAYER, Alfred M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? a review. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 67, n. 21, p. 2318-2331, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>.

MCGREGOR, Douglas. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. **Critical Reviews In Toxicology**, [S.L.], v. 37, n. 10, p. 887-914, jan. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408440701638970>.

MENNUCCI, Benedetta *et al.* Polarizable continuum model. **Wires Computational Molecular Science**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 386-404, 17 jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wcms.1086>.

MIRABILE, Salvatore. *et al.* Leveraging the 3-Chloro-4-fluorophenyl Motif to Identify Inhibitors of Tyrosinase from *Agaricus bisporus*. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 9, p. 7944, 27 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24097944>.

MOHAMADI, Fariborz. *et al.* Macromodel—an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 440-467, maio 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540110405>.

MONTANARI, Carlos A. A química medicinal na próxima década. **Química Nova**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 134-137, fev. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422000000100024>.

MORRIS, Garrett M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 27 abr. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256>.

MORRIS, Garrett M.; LIM-WILBY, Marguerita. Molecular Docking. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 365-382, 2008. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19

MURCKO, Mark A. Computational Methods to Predict Binding Free Energy in Ligand-Receptor Complexes. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 38, n. 26, p. 4953-4967, dez. 1995. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm00026a001>.

NA, Jung-Im. *et al.* Resveratrol as a Multifunctional Topical Hypopigmenting Agent. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 956, 22 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20040956>.

NAGATSU, Toshiharu. *et al.* The role of tyrosine hydroxylase as a key player in neuromelanin synthesis and the association of neuromelanin with Parkinson's disease. **Journal Of Neural Transmission**, [S.L.], v. 130, n. 5, p. 611-625, 20 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-023-02617-6>.

NIKŁIĆ, T. *et al.* Relativistic nuclear energy density functionals: mean-field and beyond. **Progress In Particle And Nuclear Physics**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 519-548, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ppnp.2011.01.055>.

OLIVARES, Concepcion; SOLANO, Francisco. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 750-760, 14 out. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148x.2009.00636.x>.

OLSSON, Mats H. M. *et al.* PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pka predictions. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 525-537, 6 jan. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ct100578z>.

PARK, Hee-Young. *et al.* Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 66, n. 9, p. 1493-1506, 21 jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-8703-8>.

PARK, Hee-Young. *et al.* Protein Kinase C-beta Activates Tyrosinase by Phosphorylating Serine Residues in Its Cytoplasmic Domain. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 274, n. 23, p. 16470-16478, jun. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.23.16470>.

PILLAIYAR, Thanigaimalai; MANICKAM, Manoj; NAMASIVAYAM, Vigneshwaran. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 403-425, 1 jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2016.1256882>.

POLITZER, Peter. *et al.* Molecular Electrostatic Potentials: significance and applications. **Chemical Reactivity In Confined Systems**, [S.L.], p. 113-134, 13 ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119683353.ch7>.

PRETZLER, Matthias; ROMPEL, Annette. What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. **Inorganica Chimica Acta**, [S.L.], v. 481, p. 25-31, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.04.041>.

PUNNONEN, Kari; YUSPA, Stuart H. Ultraviolet Light Irradiation Increases Cellular Diacylglycerol and Induces Translocation of Diacylglycerol Kinase in Murine Keratinocytes. **Journal Of Investigative Dermatology**, [S.L.], v. 99, n. 2, p. 221-226, ago. 1992. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12650445>.

QU, Yunwei. *et al.* Catalysis-based specific detection and inhibition of tyrosinase and their application. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 414-425, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2020.07.004>.

RASK-ANDERSEN, Mathias; MASURAM, Surendar; SCHIÖTH, Helgi B. The Druggable Genome: evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 9-26, 6 jan. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135943>.

RIFAI, Eko Aditya. *et al.* Recent Developments in Linear Interaction Energy Based Binding Free Energy Calculations. **Frontiers In Molecular Biosciences**, [S.L.], v. 7, p. 1-7, 17 jun. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2020.00114>.

ROBUSTELLI, Paul; PIANA, Stefano; SHAW, David E. Developing a molecular dynamics force field for both folded and disordered protein states. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 115, n. 21, p. 4758-4766, 7, maio, 2018. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1800690115>.

RYCKAERT, Jean-Paul. *et al.* Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal Of Computational Physics**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 327-341, mar. 1977. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).

SABE, Victor T. *et al.* Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: a review. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 224, p. 113705, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113705>.

SAGHAIE, Lotfollah; POURFARZAM, Mr; FASSIHI, Afshin. Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. **Res Pharm Sci**, Isfahan, v. 4, n. 8, p. 233-242, fev. 2013.

SAMPSON, Jared M. *et al.* Robust prediction of relative binding energies for protein-protein complex mutations using free energy perturbation calculations. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], p. 1-54, 24 abr. 2024. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2024.04.22.590325>.

SÁNCHEZ-FERRER, Álvaro. *et al.* Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [S.L.], v. 1247, n. 1, p. 1-11, fev. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00204-t](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(94)00204-t).

SARKAR, Rashmi; ARORA, Pooja; GARG, Kvjay. Cosmeceuticals for hyperpigmentation: what is available? **Journal Of Cutaneous And Aesthetic Surgery**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 4, 2013. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-2077.110089>.

SCHALLREUTER, Karin U. *et al.* Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. **Experimental Dermatology**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 395-404, 7 abr. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00675.x>.

SCHRÖDINGER. Schrödinger Release 2020-1: **MacroModel**. Schrödinger. New York, Ny, Usa: Llc, 2020.

SEDDON, G. *et al.* Drug design for ever, from hype to hope. **Journal Of Computer-Aided Molecular Design**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 137-150, jan. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-011-9519-9>.

SEGANTINE, Arieli Santos de Andrade; GONÇALVES, Arlan da Silva. Estudo Por Métodos Semi-Empíricos E Dinâmica Molecular De Polímeros Carreadores De Antibióticos. **Revista Ifes Ciência**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 262-278, 28 ago. 2020. IFES – Instituto Federal do Espírito Santo. <http://dx.doi.org/10.36524/ric.v6i2.747>.

SHARMA, Vidushi. *et al.* Structure- and ligand-based drug design. **Chemoinformatics And Bioinformatics In The Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], p. 27-53, 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-821748-1.00004-x>.

SIEGBAHN, Per E. M. *et al.* Comparison of QM-only and QM/MM models for the mechanism of tyrosinase. **Faraday Discuss.**, [S.L.], v. 148, p. 109-117, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c004378h>.

SKOCZYŃSKA, Anna. *et al.* Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging. **Advances In Dermatology And Allergology**, [S.L.], v. 2, p. 97-103, 2017. Termedia Sp. z.o.o. <http://dx.doi.org/10.5114/ada.2017.67070>.

SLOMINSKI, Andrzej. *et al.* Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 1155-1228, out. 2004. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00044.2003>.

SOLANO, Francisco. On the Metal Cofactor in the Tyrosinase Family. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 633, 23 fev. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19020633>.

SOLOMON, Edward I. *et al.* Copper Active Sites in Biology. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 114, n. 7, p. 3659-3853, 3 mar. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr400327t>.

SPOEL, David van der. *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 6 out. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20291>.

STRZEPEK-GOMÓŁKA, Marcelina. *et al.* Identification of Mushroom and Murine Tyrosinase Inhibitors from *Achillea biebersteinii* Afan. Extract. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 964, 11 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26040964>.

SURESH, Cherumuttathu H. *et al.* Molecular electrostatic potential analysis: a powerful tool to interpret and predict chemical reactivity. **Wires Computational Molecular Science**, [S.L.], v. 12, n. 5, 6 fev. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wcms.1601>.

SU, Yang *et al.* Linear Interaction Energy (LIE) Models for Ligand Binding in Implicit Solvent: ∞ theory and application to the binding of nrtis to hiv-1 reverse transcriptase. **Journal Of**

Chemical Theory And Computation, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 256-277, 10 nov. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ct600258e>.

TADA, Mika; KOHNO, Masahiro; NIWANO, Yoshimi. Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with l-tyrosine and l-DOPA. **Bmc Biochemistry**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-7, 9 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2091-15-23>.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 29 abr. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm051197e>.

TUCKERMAN, Mark E.; MARTYNA, Glenn J. Understanding Modern Molecular Dynamics: Techniques and applications. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [S.L.], v. 104, n. 2, p. 159-178, 16 dez. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp992433y>.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 455-461, 4 jun. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334>.

VANGA, Sudarsana Reddy. *et al.* Structural Basis of Inhibition of Human Insulin-Regulated Aminopeptidase (IRAP) by Aryl Sulfonamides. **Acs Omega**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 4509-4521, 25 abr. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.8b00595>.

VENÂNCIO, Mateus F.; ROCHA, Willian R.. Ab initio molecular dynamics simulation of aqueous solution of nitric oxide in different formal oxidation states. **Chemical Physics Letters**, [S.L.], v. 638, p. 9-14, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2015.08.020>.

VIDEIRA, Inês Ferreira dos Santos; MOURA, Daniel Filipe Lima; MAGINA, Sofia. Mechanisms regulating melanogenesis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 76-83, fev. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962013000100009>.

VIVO, Marco de; CAVALLI, Andrea. Recent advances in dynamic docking for drug discovery. **Wires Computational Molecular Science**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 1-10, 13 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wcms.1320>.

VIVO, Marco de. *et al.* Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 4035-4061, 8 fev. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>.

WAKAMATSU, Kazumasa; ZIPPIN, Jonathan H.; ITO, Shosuke. Chemical and biochemical control of skin pigmentation with special emphasis on mixed melanogenesis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 730-747, 22 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pcmr.12970>.

WARREN, Gregory L. *et al.* A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 49, n. 20, p. 5912-5931, 13 ago. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm050362n>.

YI, Yunpeng. *et al.* Antibiotic resistance and drug modification: synthesis, characterization and bioactivity of newly modified potent pleuromutilin derivatives with a substituted piperazine moiety. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 132, p. 106353, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106353>.

ZAIDI, Kamal Uddin. *et al.* Tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. **Biochemistry Research International**, [S.L.], v. 2014, p. 1-16, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/854687>.

ZHANG, Ling. *et al.* First derivative synchronous fluorometric method to continuously measure monophenolase activity. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 150, p. 109884, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109884>.

ZHENG, Guoxun *et al.* Revealing vilazodone's binding mechanism underlying its partial agonism to the 5-HT1A receptor in the treatment of major depressive disorder. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S.L.], v. 19, n. 42, p. 28885-28896, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7cp05688e>.

ZHU, Fangqiang. *et al.* Large-scale application of free energy perturbation calculations for antibody design. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-14, 21 jul. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-14443-z>.

ZOLGHADRI, Samaneh. *et al.* A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 279-309, 1 jan. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>.

ZWANZIG, Robert W. *et al.* High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 1420-1426, 1 ago. 1954. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.1740409>.