

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Papaína Imobilizada em Partículas Magnéticas: Novos Modelos de
Triagem de Ligantes**

Cleiton Silva Leandro*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

Orientador(a): Quezia Bezerra Cass

***Bolsista CNPq**

São Carlos - SP
2019



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Cleiton Silva Leandro, realizada em 29/03/2019:

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass
UFSCar

Profa. Dra. Marcela Cristina de Moraes
UFF

Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira
UFSCar

Por isso cuidado meu bem
Há perigo na esquina
Eles venceram
E o sinal está fechado prá nós
Que somos jovens

(...)

Mas é você que ama o passado
E que não vê
É você que ama o passado
E que não vê
Que o novo sempre vem

(...)

Minha dor é perceber
Que apesar de termos feito tudo, tudo
Tudo o que fizemos
Nós ainda somos os mesmos
E vivemos
Ainda somos os mesmos
E vivemos
Ainda somos os mesmos
E vivemos como os nossos pais

Antonio Belchior

AGRADECIMENTOS

Apesar de altos e baixos, risos e choros, reclamações e muito trabalho, caminho para o destino pretendido, e espero que o Cleiton que cá gastou dias e horas escrevendo tal texto seja melhor, como pessoa, cidadão e profissional, que o Cleiton que começou essa jornada em março de 2017.

De acordo com uma frase intitulada a Sir Issac Newton, “Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”, logo, agradeço à **Professora e Doutora Quezia Bezerra Cass** pela orientação, pela oportunidade de compor seu grupo de pesquisa, pela paciência (em todos os momentos), pela confiança depositada em minha pessoa (eu era totalmente inexperiente no início não só na química como na vida), entre tantos outros pontos fortes e positivos, e claro, pelos ensinamentos e direcionamentos em cromatografia. Agora fazemos parte da história um do outro!

À **Professora e Doutora Regina Vincenzi Oliveira**, pelas contribuições dentro e fora do laboratório, pelas diretrizes em espectrometria de massas... e pela amizade.

À **Bianca Rebelo**, uma espécie de co-orientadora de coração. Agradeço a paciência em ouvir as balelas ditas, pela amizade, por sua IMENSA vontade e zelo em sempre ajudar o próximo, tentando diminuir aquilo que pode estar nos afligindo.

À **Bruno Amaral**, pelos primeiros apertos de botão nos equipamentos e pela paciência em ouvir e responder as dúvidas pertinentes. Pela amizade, pelos risos e pelas lágrimas que juntos vivemos.

Agradeço ao grande grupo CLAE/SEPARARE: **Adriana Bonatti, Alessandra Valverde, Amanda Jordana, Andrea Batista, Fernando Martins, Gabriel Mazzi, Gabriel Scatena, Izadora Furlani, João Marcos Batista, Juliana Lima, Juliana Magalhães, Juliana Rodrigues, Larissa Ramos, Neila Maria, Romário Pereira e Welma Beatriz**. A todos que contribuíram para meu crescimento intelectual e pessoal. Vocês são demais!

Espero ter feito o meu melhor, claro, sempre há o que melhorar, mas só é possível observar que poderia ter sido melhor, quando se aprendeu e se desenvolveu com aquilo que passamos.

Agradeço aos Professores **Paulo Cezar Vieira, Arlene Gonçalves Correa, Maria Fátima G. F. da Silva e Carlos Alberto Montanari** pelas contribuições ao trabalho.

Aos amigos que viram, ouviram e vivenciaram essa fase da minha vida: **Maria Luiza Fernandes, Aline Barrios, Suzane Fidelis, Luciano Pereira, Marina Zequin, Bruna Soares, Bruna Ribeiro, Tainara Lopes, Luciano Silva, Jéssica Zaroni, Carolina Furlan, Marilia Carnielo, Claudete Santana e Janaina Bagatini.** E a todos os amigos que fiz durante essa jornada.

Aos meus pais, meu pai, **João Antônio Leandro** e minha mãe, **Cleonice Silva de Araújo**, minha irmã, **Melina Leandro** e meu cunhado **William Correa**, pela força e amor, apesar das dificuldades emocionais e financeiras.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, CNPQ**, pela bolsa de Mestrado concedida, à **CAPES, FAPESP e Cersuschem** pelos auxílios financeiros.

Aos **docentes e ao corpo técnico e administrativo** do Departamento de Química da UFSCar e ao **Programa de Pós-Graduação** em Química da UFSCar e às suas **secretárias**.

Muito Obrigado!!!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1. Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de um fármaco (ADME: Absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Adaptado da Referência 3.	2
FIGURA 1. 2. Estrutura da papaína. Adaptada da Referência 18.	8
FIGURA 1. 3. Mecanismo da catálise enzimática da papaína com o substrato Z-Phe-Arg-AMC.....	9
FIGURA 1. 4. Estrutura do substrato Z-Phe-Arg-AMC, sendo Z: carbobenzoxi, Phe: fenilalanina, Arg: arginina e AMC: 7-amino-4-metil-cumarina.....	10
FIGURA 1. 5. Estrutura molecular do E-64 (MM: 357,20 g/mol).....	12
FIGURA 1. 6. Formas de Imobilização. Retirada da referência 58.....	14
FIGURA 1. 7. Representação de ensaio de <i>Ligand Fishing</i> com proteína imobilizada em partículas magnéticas. Proteína (estrutura da papaína da <i>Carica papaya</i>) disponível em: < https://www.iycr2014.org/learn/crystallography365/articles/20140620 > Acessado em: 26. Jun. 2019.....	17
FIGURA 4. 1. Reação enzimática da papaína e o substrato Z-Phe-Arg-AMC e os produtos reacionais.....	40
FIGURA 4. 2. Cromatograma de íons extraídos dos produtos da reação enzimática da papaína com o substrato Z-Phe-Arg-AMC.....	42
FIGURA 4. 3. Mecanismo de redução das pontes dissulfeto em cisteíno proteases com agente redutor ditioneitol (DTT).....	45
FIGURA 4. 4. Soluções de compostos voláteis para o ensaio enzimático.	47
FIGURA 4.5. Variação de pH do meio reacional enzimático.	48
FIGURA 4. 6. Métodos experimentais para finalização da atividade enzimática.	50
FIGURA 4. 7. Procedimento experimental do ensaio em solução da papaína. Proteína (estrutura da papaína da <i>Carica papaya</i>) disponível em:	

< https://www.iycr2014.org/learn/crystallography365/articles/20140620 >	
Acessado em: 26. Jun. 2019.....	51
FIGURA 4. 8. Curva analítica, sua equação matemática e os três controles de qualidade.	52
FIGURA 4. 9. Cinética de michaelis-menten para papaína em solução.....	54
FIGURA 4. 10. Mecanismo reacional da imobilização de enzimas em suportes magnéticos amino-propilados para imobilização covalente utilizando o glutaraldeído como espaçador.....	56
FIGURA 4. 11. Procedimento experimental do ensaio de verificação de atividade da P-MB. Proteína (estrutura da papaína da <i>Carica papaya</i>) disponível em: < https://www.iycr2014.org/learn/crystallography365/articles/20140620 > Acessado em: 26. Jun. 2019.....	57
FIGURA 4. 12. Cromatograma de íon extraído da separação do substrato (m/z 613) e produto (m/z 176) da reação da papaína imobilizada em partículas magnéticas.....	57
FIGURA 4. 13. A) Espectro de Massas do Cromatograma de íon extraído [M-H] ⁺ 176 m/z; B) espectro de massas do cromatograma de íon extraído [M-H] ⁺ 613 m/z.	58
FIGURA 4. 14. Cinética de michaelis-menten para a papaína imobilizada em partículas magnéticas	59
FIGURA 4. 15. Estruturas das moléculas selecionadas para o ensaio de inibição da papaína.....	60
FIGURA 4. 16. Procedimento Experimental do Ensaio de Inibição em Solução. Proteína (estrutura da papaína da <i>Carica papaya</i>) disponível em: < https://www.iycr2014.org/learn/crystallography365/articles/20140620 > Acessado em: 26. Jun. 2019.....	63
FIGURA 4. 17. Valores de inibição da papaína em solução com inibidores conhecidos de cisteíno proteases e a maltose, controle negativo. Sendo a concentração de papaína 2,5 mg/ml e dos inibidores 237 µM.....	63

FIGURA 4. 18. Procedimento Experimental do Ensaio de Inibição da P-MB ..	65
FIGURA 4. 19. Valores de inibição da P-MB com inibidores conhecidos de cisteíno proteases e a maltose um não inibidor da papaína, sendo a concentração da P-MB 30,0 mg/mL e dos inibidores 157,5 µM.	66
FIGURA 4. 20. Valores de inibição da papaína livre em solução e da papaína imobilizada em partículas magnéticas (P-MB).....	67
FIGURA 4. 21. Procedimento Experimental das Quatro Etapas do Ensaio de <i>Ligand Fishing</i>	70
FIGURA 4. 22. Cromatograma de íon extraído correspondentes a: 1. <i>m/z</i> 291: catequina; 2. <i>m/z</i> 291: epicatequina; 3. <i>m/z</i> 303: quercetina; 4. <i>m/z</i> 308: Neq409; 5. <i>m/z</i> 334: Neq570; 6. <i>m/z</i> 241: LSPN 167; 7. <i>m/z</i> 347: LSPN 172; 8. <i>m/z</i> 259: LSPN 159; 9. <i>m/z</i> 338: LSPN 169 e 10. <i>m/z</i> 300: LSPN 182.....	72
FIGURA 4. 23. Compostos ensaiados e suas razões de afinidade.	73
FIGURA 4. 24. A) Cromatograma de íons totais dos ligantes presentes na solução de extração da P-MB controle; B) Cromatograma de íons totais dos ligantes presentes na solução de extração da P-MB ativa.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1 Classes de Catepsinas, Tipos de Protease, Patologia Associada, Valor em Reais das Catepsinas Purificadas e Empresa Distribuidora. Adaptada da referência	5
TABELA 3. 1. Volumes Utilizados do Padrão AMC e de Solução de Acetato de Amônio no Preparo de Curva Analítica	27
TABELA 3. 2. Volumes Utilizados de Substrato e de Solução de Acetato de Amônio para Determinação das Constantes Cinéticas da Papaína em Solução .	29
TABELA 3. 3. Volumes Utilizados de Substrato e de Solução de Acetato de Amônio para Determinação das Constantes Cinéticas da Papaína Imobilizada em Partículas Magnéticas.....	33
TABELA 4. 1. Relação m/z do substrato e produtos da reação enzimática	43
TABELA 4. 2. Principais aditivos e tampões voláteis utilizados em análises por LC-MS. Baseado na referência 100.	46
TABELA 4. 3. Valores de IC ₅₀ ou K _i dos Inibidores de Catepsinas B, L, V e Cruzaína. Em acordo com as Referências 13, 93, 108.....	61
TABELA 4. 4. Íons dos Ligantes Identificados, seus Tempos de Retenção e suas Razões de Afinidade do Ensaio de Ligand Fishing da Papaína Imobilizada em Partículas Magnéticas com o Extrato Etanólico do caule de Melia azedarach...	76

RESUMO

Papaína Imobilizada em Partículas Magnéticas: Novos Modelos de Triagem de Ligantes. As catepsinas, enzimas lisossomais humanas, estão associadas ao desenvolvimento de várias doenças, e a cruzaína é uma enzima importante no desenvolvimento do protozoário *Trypanosoma Cruzi*, causador da doença de Chagas. As catepsinas e a cruzaína são cisteíno proteases, conhecidas como *papain-like*, devido suas similaridades estruturais e mecanismo catalítico com a papaína. A papaína é uma enzima comercial, de baixo custo, estável, e foi utilizada como modelo no desenvolvimento de métodos de triagem para ligantes de cisteíno proteases. Uma vez que os métodos clássicos de triagem são espectrofotométricos, o ensaio aqui descrito mede diretamente o produto da reação enzimática por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS). Neste contexto, novas condições reacionais foram determinadas. A papaína em solução apresentou um K_M de $52,9 \pm 3,12 \mu\text{M}$. A fim de desenvolver um novo modelo de triagem, um biorreator de papaína, P-MB (K_M de $34,9 \pm 3,59 \mu\text{M}$), foi produzido pela imobilização covalente da enzima em partículas magnéticas. Para qualificação do ensaio de prospecção de ligantes usando a P-MB, 10 inibidores conhecidos de cisteíno proteases (acridonas, quinolinonas, flavonoides e dipeptidil nitrilas) foram ensaiados com a papaína. Com exceção da maltose, com valor de inibição em torno de 3%, a porcentagem de inibição da papaína em solução ($2,1 \times 10^{-3}$ U), variou de 13 a 100%, enquanto com as P-MBs ($1,4 \times 10^{-3}$ U) a inibição variou entre 34 e 85%. No ensaio de *Ligand Fishing*, os biorreatores de papaína apresentaram afinidade por todos os ligantes conhecidos de cisteíno proteases, e não-afinidade com a maltose. Seis deles apresentaram expressivos valores de afinidade pela P-MB ativa, sem nenhuma retenção com a P-MB controle. Os outros quatro ligantes mostraram razão de afinidade entre 2,0 a 3,5. Com o extrato etanólico do caule de *Melia azedarach* foram bioconjugados 11 compostos entre eles a catequina e a epicatequina. Os resultados descritos nesse trabalho inferem que biorreatores de

papaína podem ser usados em ensaios de triagem para ligantes de cisteíno proteases.

ABSTRACT

Immobilized Papain on Magnetic Particles: New Models of Ligand Screening.

Cathepsins, human lysosomal enzymes, are associated with the development of various diseases, and cruzain is an important enzyme in the development of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, causes Chagas' disease. Cysteine proteases, cathepsins and cruzain, are known as papain-like, due to their structural similarities and catalytic mechanism. Papain is a commercial enzyme, inexpensive and stable, and thus, it has been used as a model for screening assays for cysteine-proteases' ligands. As the classical assays for these enzymes are spectrophotometrically-based, herein a direct method for measuring the enzymatic product of the reaction using liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry is described. For that, new reaction conditions were employed. Under this condition, in solution papain showed a K_M of 52.9 ± 3.12 μM . For developing new assay conditions and considering the advantages of use of immobilized enzymes, papain was covalently immobilized on to magnetic particles (P-MB), producing a bioreactor with a K_M of 34.9 ± 3.59 μM . For qualifying P-PB screening assay, 10 known cysteine protease inhibitors including acridones, quinolinones, flavonoids, and dipeptidyl nitriles were screened. Maltose was used as a non-binder of papain. With the exception of maltose that showed no inhibitory capacity, in the solution assay ($2,1 \times 10^{-3}$ U) the percentage of inhibition ranged from 13 to 100%, while with P-MBs ($1,4 \times 10^{-3}$ U) the inhibition range was from 34 to 85%. Ligand Fishing assay, papain bioreactors showed affinity for all known binders of cysteine proteases, and no affinity for maltose. Six of them presented expressive affinity only ratio for the active P-MB, with no retention to inactive P-MB control. The other four binders varied their affinity ratio in the range of 2.0 to 3.5. With the ethanolic extract from the stem of *Melia azedarach*, 11 compounds were fished, among them catechin and epicatechin. The results herein described demonstrates that papain bioreactors can be used for screening cysteine-proteases' ligands.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. Introdução e Fundamentos teóricos	1
1.1. Enzimas como alvos biológicos.....	1
1.1.1. Cruzaina	3
1.1.2. Catepsinas	4
1.2. Papaína	6
1.3. Substrato Fluorogênico	9
1.4. Triagem de Ligantes.....	10
1.5. Inibidores Enzimáticos.....	11
1.6. Imobilização Enzimática.....	12
1.6.1. Partículas Magnéticas.....	14
1.7. <i>Ligand Fishing</i>	15
1.8. Papaína Imobilizada.....	17
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Metas Alcançadas	20
3. Materiais e Procedimento Experimental	21
3.1. Generalidades.....	21
3.2. Preparo das Soluções de Trabalho.....	22
3.2.1. Fase Móvel.....	22

3.2.2. Soluções de Reação.....	23
3.2.4. Soluções de Papaína	24
3.2.5. Soluções do substrato	24
3.2.7. Solução de Fosfato de Potássio 100 mM pH 7,0.	25
3.2.9. Soluções dos Inibidores de Catepsinas e Cruzaina	25
3.2.10. Extrato Do Caule de <i>Melia azedarach</i>	25
3.3. Condições cromatográficas e de otimização do espectrômetro de massas para detecção e quantificação do produto da reação enzimática.	26
3.4. Curva Analítica para quantificação do produto da reação enzimática	26
3.5. Ensaio em solução - Verificação da atividade.....	28
3.6. Determinação dos parâmetros cinéticos da papaína em solução.....	28
3.8. Ensaio com a P-MB - Verificação da atividade	30
3.9. Determinação dos parâmetros cinéticos da P-MB	31
3.10. Condições cromatográficas e de otimização do espectrômetro de massas para detecção dos ligantes.....	33
3.11. Ensaio de Inibição	34
3.11.1. Ensaio de Inibição em solução	34
3.11.2. Ensaio de Inibição na P-MB.....	35
3.12. Avaliação dos Tempos de Carregamento e Extração das P-MBs.	36
3.13. Prova de Conceito do Ensaio de <i>Ligand Fishing</i>	37
3.14. Ensaio de <i>Ligand Fishing</i> com Extrato de Produtos Naturais.....	38
4. Resultados e Discussão.....	40
4.2. Determinação das Condições de Reação	44
4.2.1. Determinação da concentração de papaína	44

4.2.2. Determinação da concentração de DTT.....	44
4.2.3. Determinação da Solução de reação.....	46
4.2.4. Determinação do pH de ensaio.....	47
4.2.5. Determinação do tempo de reação enzimática.....	48
4.2.7. Súmula das Condições Determinadas de Reação.....	50
4.3. Curva Analítica.....	51
4.4. Parâmetros cinéticos em solução.....	53
4.5. Imobilização da Papaína em Partículas Magnéticas.....	54
4.6. Verificação da atividade da papaína imobilizada em partículas magnéticas (P-MB).....	56
4.7. Parâmetros cinéticos da P-MB.....	59
4.8. Ensaio de Inibição.....	60
4.8.1. Ligantes para o Ensaio de Inibição.....	60
4.8.2. LC-MS: Separação Produto e Ligantes.....	61
4.8.3. Ensaio de inibição da papaína em solução.....	62
4.8.4. Ensaio de Inibição da Papaína Imobilizada em Partículas Magnéticas.....	64
4.9. <i>Ligand Fishing</i>	69
4.9.1. Determinação do Tempo de Carregamento e Extração.....	69
4.9.2. Prova de Conceito do Ensaio de <i>Ligand Fishing</i>	71
4.9.3. Ensaio de <i>Ligand Fishing</i> com Extratos do caule de <i>Melia azedarach</i>	74
5. Conclusão.....	78
Referências.....	80

1. Introdução e Fundamentos teóricos

1.1. Enzimas como alvos biológicos

A descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco na indústria farmacêutica envolvem processos complexos, com longos anos de pesquisa atrelados à inovação, conhecimento científico, tecnologia e altos custos financeiros¹ (Figura 1.1). Modernos avanços tecnológicos e a melhor compreensão dos ciclos bioquímicos dos sistemas vivos, das estruturas dos alvos moleculares e dos mecanismos que ocasionam o surgimento e desenvolvimento de patologias, têm propiciado desenvolvimentos terapêuticos importantes e de grande sucesso, resultando em melhorias na qualidade de vida da população mundial².

Anteriormente à fase pré-clínica, busca-se a identificação e otimização de moléculas que possam ser caracterizadas como novas entidades químicas com potencial clínico promissor, triagem de ligantes. Neste processo está envolvido a validação do alvo molecular selecionado, afirmando-se sua relevância no processo fisiopatológico estudado e sua caracterização no tratamento e/ou cura de doenças².

A identificação bem-sucedida de um novo alvo é seguida por avaliações moleculares detalhadas consistindo em estudos experimentais sobre suas propriedades farmacodinâmicas de acordo com a hipótese da doença e avaliações teóricas de sua especificidade e seletividade.

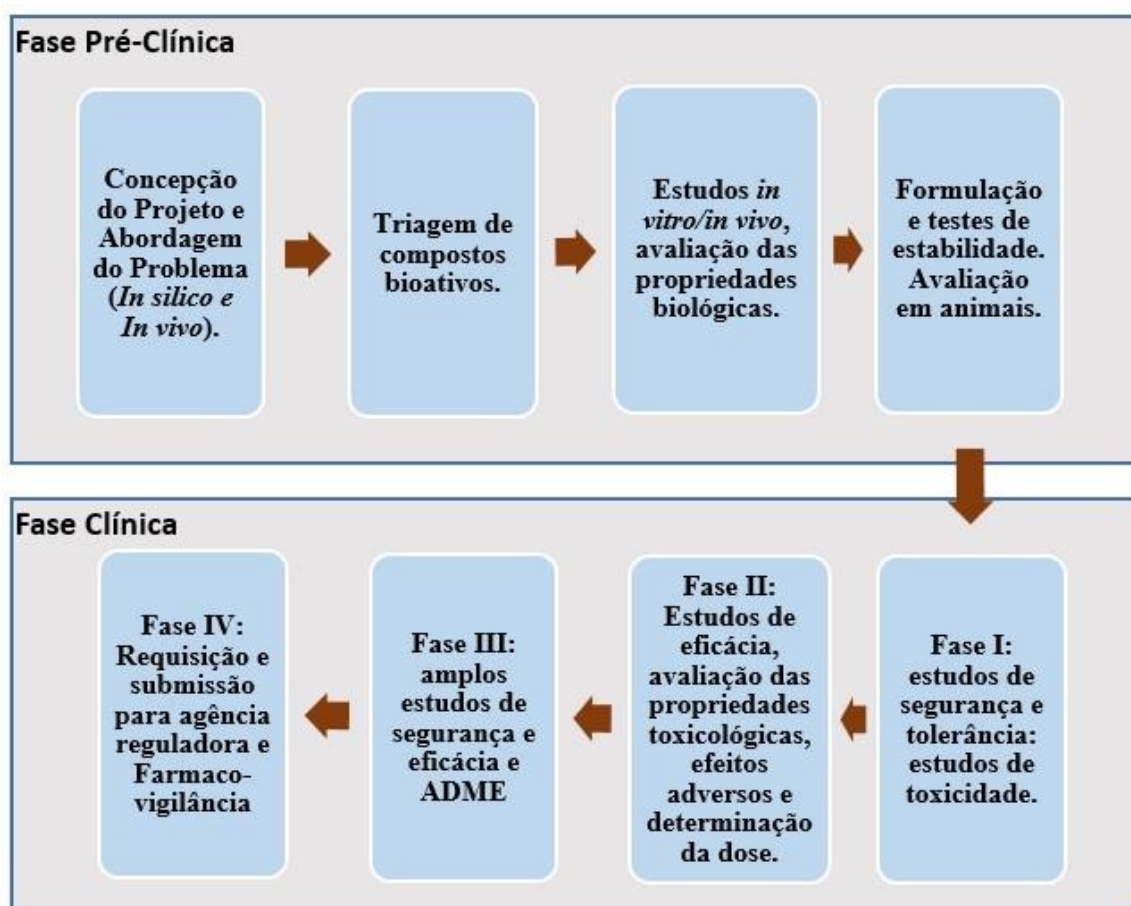


FIGURA 1. 1. Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de um fármaco (ADME: Absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Adaptado da Referência 3.

A maioria das enzimas são proteínas, com exceção das ribozimas, com função catalítica e estão envolvidas em diversos processos bioquímicos em sistemas vivos. No organismo humano as enzimas fazem parte de diversos processos que garantem o seu funcionamento, como por exemplo, a quebra do álcool pela ingestão de bebidas alcoólicas, a transferência de CO₂ dos tecidos para o sangue e a quebra da lactose do leite.

Contudo, enzimas também estão envolvidas em processos bioquímicos celulares responsáveis por acarretar o aparecimento e desenvolvimento de doenças. Por isso e por sua relevância nos ciclos bioquímicos, as enzimas se tornam alvos biológicos importantes na investigação de novos fármacos ⁴.

De acordo com a *American Association for the Advancement of Science*, em 2000, as enzimas correspondiam a 28% do total de alvos terapêuticos ⁵. Já em 2016, as enzimas passaram a apresentar 47% dos alvos de interesse das indústrias farmacêuticas ⁶, o que representa um aumento considerável no período de 16 anos.

1.1.1. Cruzaína

A cruzaína apresenta uma homologia típica das enzimas da família da papaína. Formada por 205 aminoácidos, com massa molecular estimada entre 40 e 60 kDa e pH ótimo de atividade de 5,5 ⁷. É uma enzima não comercial, obtida através de protocolos de expressão e purificação para sua obtenção ^{8,9}.

A cruzaína é a maior protease lisossomal do *Trypanosoma Cruzi*, sendo uma das enzimas mais abundantes e essenciais para a sobrevivência do protozoário ¹⁰. Está atrelada à remodelação da célula hospedeira e a evasão do mecanismos de defesa do hospedeiro ^{7,8}.

O protozoário parasita *T. Cruzi* é o agente causador da Doença de Chagas, uma doença negligenciada, que se caracteriza como um grave problema de saúde pública em países subdesenvolvidos e pobres. A forma de transmissão da doença para os seres humanos acontece indiretamente, através da picada do inseto da subfamília *Triatominae*, conhecido como barbeiro ¹¹.

Atualmente existem no mercado dois medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas, ambos heterocíclis nitroaromáticos: o Nifurtimox, (4-(5-nitrofurfurilindenamino)-3-metiltiomorfolina 1,1-dióxido), um nitrofurano, produzido pela empresa Bayer, em El Salvador; e o Benzonidazol, (*N*-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamida), um derivado da classe dos nitroimidazóis, produzido pela Roche, contudo não comercializado no Brasil. Adicionalmente uma alta taxa de desistência no tratamento é observada, principalmente na fase crônica ^{12,13}, onde efeitos colaterais como anorexia,

vômitos, perda de peso, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgica¹⁴ são observados. Assim perante à baixa eficácia terapêutica, genotoxicidade^{15,16}, entre outras razões, encontrar novas entidades químicas com potencial farmacológico para o tratamento da doença de Chagas tem sido estratégia de pesquisa, tendo a cruzaina como alvo.

1.1.2. Catepsinas

O nome “catepsina” foi dado por Willstaetter e Bamann em 1929 para uma protease cuja atividade ocorre em pH levemente ácido, mas pode ser diferenciada da pepsina¹⁷.

As cisteíno catepsinas são membros da família C1 das enzimas *papain-like*, sendo elas: catepsinas B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W. São enzimas comerciais, contudo alguns microgramas são de alto valor comercial (TABELA 1.1).

Seus perfis de expressão indicam que estas enzimas estão envolvidas nas degradações de proteínas celulares. Porém, as catepsinas K, W e S mostram uma distribuição restrita ou tecido-específica, indicando que suas rotas são mais específicas^{18,19}.

As catepsinas B, H, K, L, S e V apresentam massas moleculares de 25 a 40 kDa, e compartilham 60% da mesma homologia, porém cada uma delas apresenta propriedade e funções homeostáticas diferentes. A catepsina S é a única das catepsinas cisteíno proteases que apresenta atividade ótima em pH neutro^{20,21,22,23}.

As catepsinas humanas são enzimas lisossomais que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos vitais do corpo humano tais como coagulação do sangue, reabsorção óssea, autofagia, entre outros. Porém suas desregulações acarretam em diversas disfunções celulares, estando associadas ao surgimento de diversas doenças, tais como, câncer, doença de Alzheimer,

diabetes, obesidade, entre outras ²⁴. (Tabela 1.1). Por essas razões, as catepsinas também são vistas como importantes alvos na busca de novos inibidores.

TABELA 1. 1 Classes de catepsinas, tipos de protease, patologia associada, valor em reais das catepsinas purificadas e empresa distribuidora. Adaptada da Referência 24.

Classe de Catepsinas Humanas	Tipo de Protease	Patologia	R\$ por 5 µg*	Empesa
Catepsina A	Serino	Distrofia Muscular, Galactosialidolise	377,4	BioLegend
Catepsina B	Cisteíno	Doença de Alzheimer, Câncer	504,2	Sigma-Aldrich
Catepsina C	Cisteíno	Doença de Papillon-Lefevre, Queratose Periodontite	344,5	Sino Biological
Catepsina D	Aspartil	Câncer de Mama, Doença de Alzheimer, Lipofuscinose Ceróide Neuronal	398,8	Sigma-Aldrich
Catepsina E	Aspartil	Dermatite Atópica	114,2	BioVision
Catepsina F	Cisteíno	Doença de Kufs tipo B	199,3	Sigma-Aldrich
Catepsina G	Serino	Tuberculose, Artrite reumatoide, Doença arterial coronariana, Periodontite	133,2	Sigma-Aldrich
Catepsina H	Cisteíno	Tumor de próstata, Miopia grave, Diabetes tipo 1	108,4	Athens Rserach & Technology
Catepsina K	Cisteíno	Osteoporose, Artrite, Aterosclerose, Obesidade, Esquisofrenia, Metástase de Câncer	2.102,0	Sigma-Aldrich
Catepsina L	Cisteíno	Câncer, Supercrescimento Gengival	830,0	Sigma-Aldrich
Catepsina O	Cisteíno	Doenças Cardiovasculares	474,2	Signalway Antibody
Catepsina S	Cisteíno	Glioblastoma Multiforme, Aterosclerose	903,5	Sigma-Aldrich
Catepsina V	Cisteíno	Ceratocone	996,5	Sigma-Aldrich
Catepsina W	Cisteíno	Doença Inflamatória intestinal, Gastrite autoimune	542,0	MyBioSource
Catepsina X ou Z	Cisteíno	Inflamação, Câncer Maligno	578,7	OriGene

*** Somente os valores da empresa Sigma-Aldrich foram adquiridos em Reais, os outros valores foram convertidos da moeda americana dólar. Data da Pesquisa 07/03/2019.

Vários inibidores de catepsinas estão em etapas de ensaios clínicos, em particular os inibidores da catepsina K para o tratamento da osteoporose, tendo alguns agentes em desenvolvimento, tal como, o *balicatib* (AAE581) e o *odanacatib* (MK-0822). Embora a catepsina S tenha sido inicialmente explorada intensamente como alvo em muitas doenças inflamatórias e autoimunes, o número de patentes no desenvolvimento de seus inibidores diminuíram nos últimos 10 anos. No entanto, ainda é a segunda catepsina mais investigada ²⁵.

1.2. Papaína

As catepsinas cisteíno proteases e a cruzaína são conhecidas como enzimas do tipo *papain-like*, devidos suas similaridades químicas estruturais e seus mecanismos enzimáticos semelhantes à da papaína ^{18,7}. As cisteíno proteases são enzimas que estão envolvidas na proteólise/hidrólise de uma ligação peptídica, tendo em seus sítios ativos um resíduo de cisteína.^{17, 26}

Uma das mais famosas cisteíno proteases é a papaína da *Carica Papaya*. Uma enzima comercial (sendo, 5 µg menos do que R\$ 0,01, Sigma Aldrich[®]) de uso industrial e de alto interesse de pesquisa. Há várias aplicações de seu uso na indústria de alimentos para clareamento de sucos e cerveja, na indústria de carnes ²⁷, na produção de queijo, na hidrólise de proteínas, na extração de flavorizantes e corantes de plantas, na indústria de couro, cosméticos, têxtil, e outros ^{28,29}.

A papaína também apresenta propriedades anti-inflamatórias, antibacteriana, e antioxidante sendo bastante utilizada para o tratamento de lesões da pele ²⁹.

A papaína é proveniente do látex da fruta tropical *Carica Papaya* (mamão). O látex do mamão apresenta uma aparência leitosa sendo composto por 15% de matéria seca. Desta matéria seca, cerca de 40% é constituído de enzimas. A maioria destas enzimas apresentam um grande perigo ao mamoeiro,

devido sua capacidade proteolítica. Entretanto, o látex armazena as enzimas em suas formas inativas, e somente quando danos são causados às folhas da planta, há a ruptura dos veios de látex e as enzimas rapidamente são convertidas em enzimas ativas³⁰.

A papaína foi cristalizada pela primeira vez em 1937 por Balls, Lineweaver e Thompson ³¹. Entretanto somente em 1971, Drenth *et al.* determinou a estrutura da papaína por cristalografia de Raio-X, sendo a primeiro cisteíno-protease que teve sua estrutura identificada ³². E, em 1880, foi denominada “papaína” por Wutz ³⁰.

A papaína é um monômero, formado por uma cadeia polipeptídica de 212 resíduos de aminoácidos, uma tiol proteinase, com massa molecular de 23.400 Dalton. Sua estrutura cristalina tridimensional apresenta uma dobra entre os dois domínios, formando uma abertura sobre a superfície da enzima, localizando-se o seu sítio ativo. O domínio N-terminal, também chamado de domínio L, é composto em sua maioria de α -hélices, enquanto o domínio C-terminal, domínio R, apresenta uma estrutura em folha- β . Na interface entre esses dois domínios existe uma fissura na parte superior, onde encontra-se a fenda do sítio ativo, com os resíduos de aminoácidos cisteína na posição 25 (Cis-25), Histidina 159 (His-159) e Asparagina 175 (Asn-175). A superfície do sítio ativo é composta pelos resíduos provenientes de quatro alças localizadas em ambos os domínios. As duas alças do domínio L são curtas e interconectadas com uma ligação dissulfeto. As duas alças do domínio R são muito maiores e formam a superfície hidrofóbico da folha- β . O substrato da reação enzimática liga-se ao longo da fenda do sítio ativo em uma conformação estendida. A papaína possui um total de 7 resíduos de cisteína, três pares envolvidos em três ligações dissulfeto, e sendo o Cis-25 presente no sítio catalítico ^{32,33,34,35,18} (FIGURA 1.2)

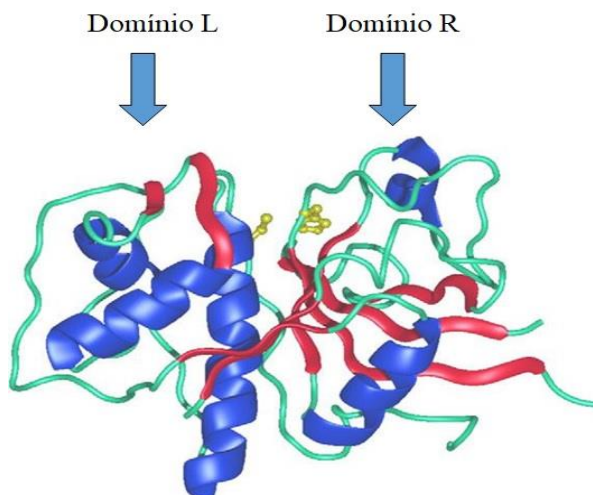


FIGURA 1. 2. Estrutura da papaína. Adaptada da Referência 18.

As cisteíno-proteases possuem um mecanismo catalítico com a formação de um intermediário tetraédrico covalente, a acil-enzima, devido ao ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína do sítio ativo (Cis-25) sobre a carbonila da ligação peptídica que será hidrolisada do substrato. O grupo imidazol presente na histidina (His-159) atua como um acceptor de próton na catálise, e o resíduo de asparagina (Asn-175) orienta o anel imidazólico da histidina. O ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína sobre o carbono da carbonila da ligação peptídica a ser hidrolisada gera um intermediário tetraédrico covalente entre a enzima e o substrato. Através de uma reação de acilação, a parte C-terminal do substrato é liberada, deixando a enzima acilada. Em seguida, em uma reação de deacilação, a acil-enzima reage com uma molécula de água liberando a parte N-terminal do substrato e a enzima se regenera ^{36,37,38}. Na FIGURA 1.3 é proposto o esquema da reação enzimática da papaína com o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC.

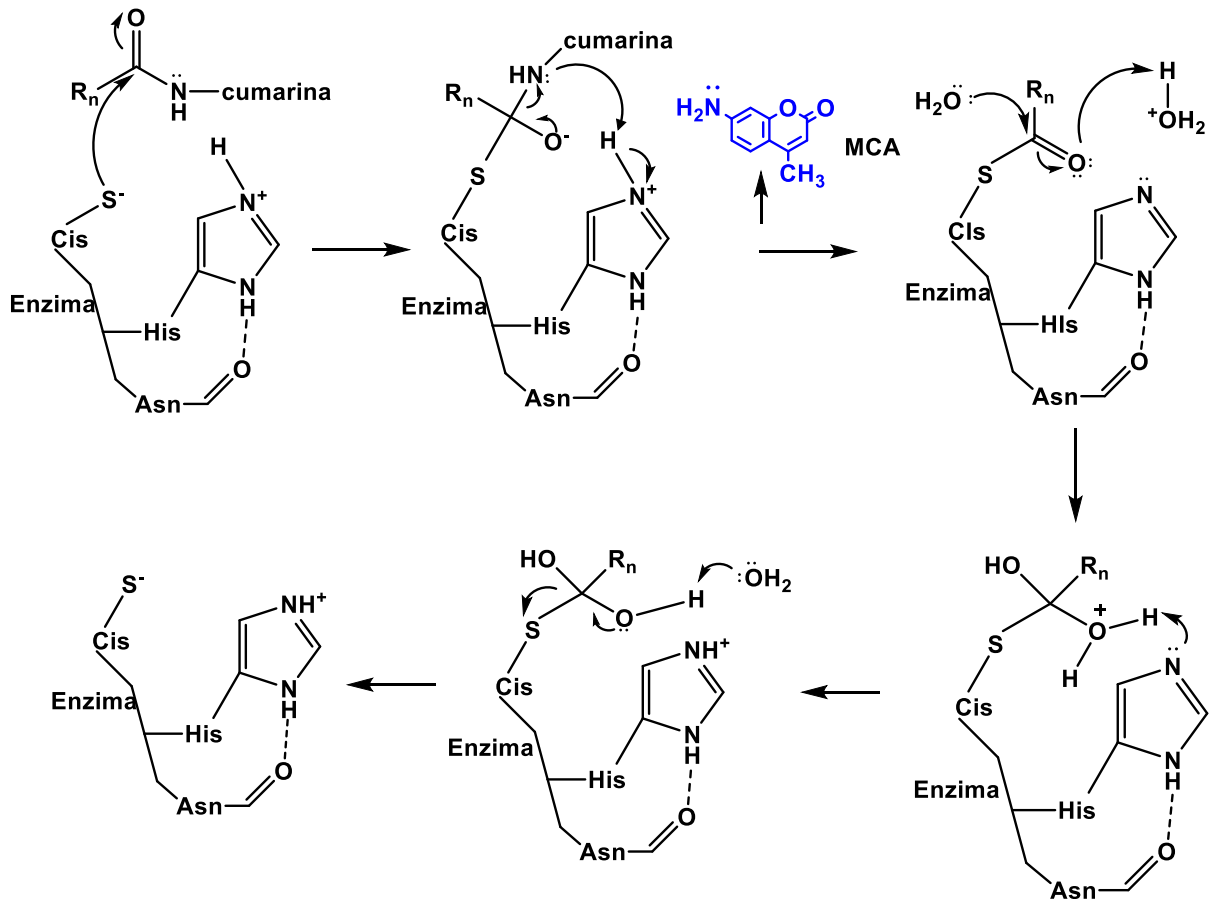


FIGURA 1. 3. Mecanismo da catálise enzimática da papaína com o substrato Z-Phe-Arg-AMC.

1.3. Substrato Fluorogênico

O substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC (FIGURA 1.4) é bastante utilizado nos estudos clássicos em solução para cisteíno proteases ²³, devido à alta sensibilidade do método de detecção para o produto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) ³⁹.

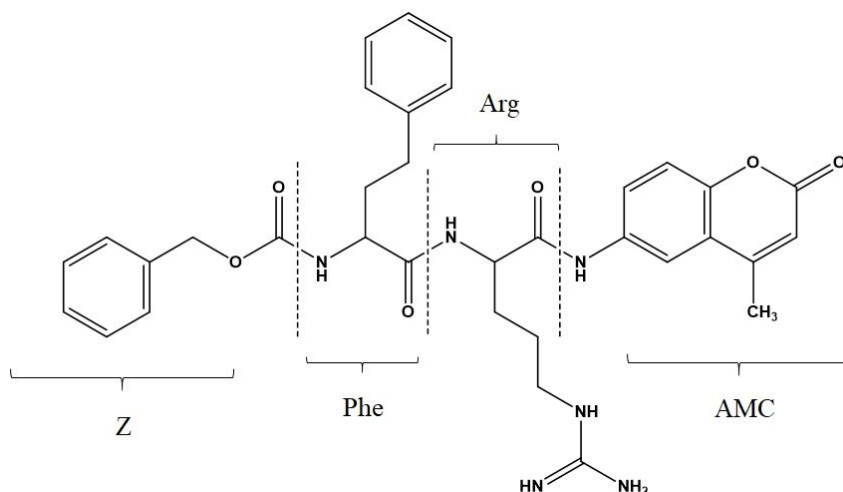


FIGURA 1. 4. Estrutura do substrato Z-Phe-Arg-AMC, sendo Z: carbobenzoxi, Phe: fenilalanina, Arg: arginina e AMC: 7-amino-4-metil-cumarina.

1.4. Triagem de Ligantes

O entendimento dos processos químicos e as interações entre as moléculas em sistemas biológicos vivos, é de grande importância na busca de ligantes. Por exemplo, anticorpos com antígenos, hormônios com receptores, enzimas com substratos, etc. Esses processos são altamente seletivos e as interações são frequentemente reversíveis e as forças de ligação variam de fracas a fortes.

No processo de desenvolvimento de novos fármacos ocorre a busca de ligantes que tenham interação/ação com o alvo selecionado. No ensaio de triagem busca-se eliminar falsos positivos e negativos ^{40, 41, 42, 43, 44}.

Uma forma eficiente para a seleção de ligantes em um elevado número de substâncias, com métodos computadorizados de testes em série e sistemas robóticos, bastante utilizada na indústria farmacêutica, é o *High Throughput Screening* (HTS), ou seja, triagem de alta produtividade, ensaios de um grande número de potenciais moduladores biológicos contra um conjunto escolhido de alvos definidos ^{45,46,47,48,49}.

As vantagens desse tipo de ensaio são: a redução de custos, tempo de análise, menores concentrações e volumes (< 1 microlitro), no entanto, o número de dados a serem processados é uma das desvantagens desses ensaios. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos eficazes que sejam capazes de triarem e identificar novos ligantes/inibidores diminuindo ou excluindo os resultados de falsos positivos e negativos tornam-se de grande interesse ^{50,51,52}.

1.5. Inibidores Enzimáticos

Moléculas que interferem no mecanismo catalítico das enzimas, diminuindo ou interrompendo as reações são chamadas de inibidores enzimáticos ⁵³. Existe duas grandes classes de inibidores de enzimas: os reversíveis e os irreversíveis.

Os inibidores reversíveis são caracterizados pelas interações não covalentes com a enzima (ligações iônicas, ligações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas). Havendo três modos potenciais de inibição reversíveis: a) competitivo - modo de interação entre enzima e inibidor em que o inibidor disputa com o substrato pelo sítio ativo da enzima livre; b) incompetitivo - a inibição pode ocorrer com a ligação do inibidor ao complexo enzima-substrato; e c) não competitivo - inibidores que se ligam a enzima livre ou ao complexo enzima-substrato. Já para a inibição irreversível, enzima e inibidor são ligados covalentemente ⁵⁴.

As cisteíno proteases contém um grupo tiol, com isso ligantes que bloqueiem os grupos tiols destas enzimas são considerados potenciais inibidores. Um bom exemplo, são as substâncias da classe diazometanos que reagem irreversivelmente com cisteíno proteases ⁵⁵.

Um outro inibidor conhecido de cisteíno-proteases é o *L-trans*-epoxisuccinil-leucilamido(4-guanidino) butano, conhecido como E-64 (FIGURA 5). Isolado de cultura fúngica de *Aspergillus japonicus*, é um inibidor

irreversível específico de cisteíno proteases, e usualmente aplicado na titulação do sítio ativo de várias enzimas desta classe ⁵⁵.

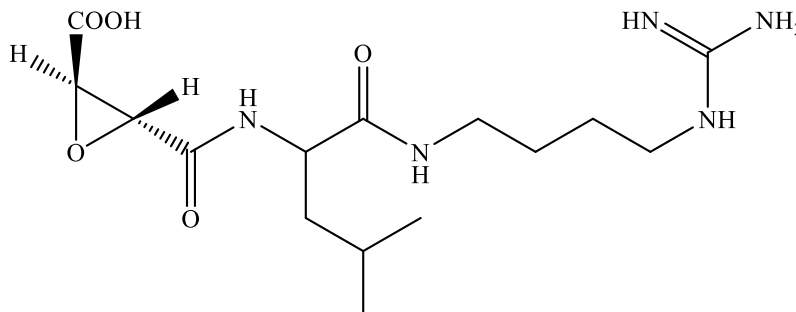


FIGURA 1. 5. Estrutura molecular do E-64 (MM: 357,20 g/mol)

1.6. Imobilização Enzimática

O termo enzimas imobilizadas refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma definida região do espaço com manutenção das suas propriedades catalíticas e que podem assim ser utilizadas repetidamente e continuamente. Wiley e Sons, citado por Comerlato (1995) ⁵⁶.

O primeiro uso industrial de enzimas imobilizadas foi reportado em 1967 por Chibata e colaboradores ⁵⁷, que desenvolveram a imobilização da aminoacilase *Aspergillus oryzae* para a determinação de aminoácidos D-L racêmicos. Atualmente alguns processos industriais como a produção de açúcar, aminoácidos, e até mesmo de alguns fármacos utilizam enzimas imobilizadas. Em alguns deles as células microbianas inteiras contendo a enzima desejada são imobilizadas e utilizadas como catalisadores ⁵⁸.

Existem várias vantagens associadas à imobilização de enzimas frente aos ensaios convencionais em solução, isto se deve a capacidade de reutilização, grande estabilidade de armazenamento e térmica (aumento do tempo de vida da enzima), baixo custo e reprodutibilidade dos dados obtidos ⁵⁹.

As enzimas imobilizadas têm sido utilizadas para identificar compostos biologicamente ativos em misturas complexas, como por exemplo,

em extratos de produtos naturais ^{60,61}, ou misturas complexas de proteínas, tal como, venenos de animais peçonhentos ⁶².

Na imobilização, a definição do suporte mais apropriado é tido como um dos grandes desafios. É necessário encontrar um suporte que favoreça a imobilização da enzima na melhor conformação possível, a fim de que suas características sejam inalteradas, ou seja, deve-se evitar a perda da atividade enzimática pela ligação dos sítios ativos ao suporte ou perda de mobilidade conformacional.

Parâmetros como estrutura química do suporte e tamanho dos poros determinam a área superficial total do suporte. Assim, suportes porosos geralmente são melhores porque a sua área superficial é maior e permite uma carga de enzima mais elevada, havendo uma melhor eficiência na imobilização e proteção da enzima. Contudo, é necessário ressaltar que quanto maior a porosidade do suporte, maior a capacidade de adsorção de moléculas.

Existe uma variedade de suportes utilizados para imobilização: membranas e polímeros ⁵⁸, partículas ^{63,64,65,66} e nanopartículas magnéticas ^{67,68}, capilares de sílica fundida ⁶⁹, materiais monolíticos ⁷⁰, entre outros.

Os vários métodos de imobilização empregados baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte.

Os três métodos tradicionais de imobilização enzimática são ⁵⁸:

1. As enzimas podem ser imobilizadas aos suportes por diferentes formas de interação: adsorção física, ligações iônicas ou ligações covalentes;
2. Há inclusão da enzima em uma rede polimérica (estrutura de gel ou membrana), havendo assim o aprisionamento (encapsulamento) da enzima;
3. Ligação Cruzada.

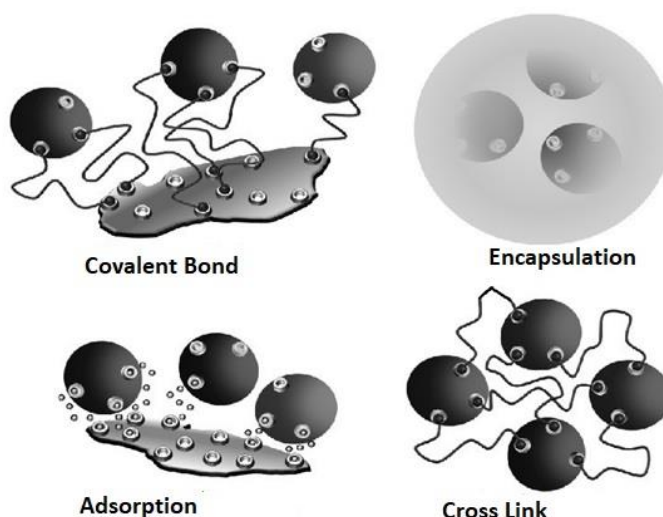


FIGURA 1. 6. Formas de Imobilização. Retirada da referência 58.

A imobilização de enzimas baseado através da formação de ligações covalentes é o método mais utilizado ⁵⁸. A vantagem desse método está na estabilidade da ligação formada entre suporte e enzima, com isso a enzima não é perdida para a solução.

É importante ressaltar que na produção do biorreator deve-se considerar o uso para o qual ele será aplicado: por exemplo, biocatalise, ensaios de triagem de ligantes através do uso de cromatografia zonal ou frontal de bioafinidade e os ensaios de bioafinidade (*Ligand Fishing*).

1.6.1. Partículas Magnéticas

Dentre os suportes disponíveis para a imobilização as partículas magnéticas destacam-se pela vantagem de poderem ser separadas do meio reacional através da separação magnética, interrompendo-se rapidamente as reações enzimáticas e recuperando as enzimas para reutilização. Também deve-se destacar como vantagens, sua grande área superficial; a capacidade da funcionalização, inserção de grupos funcionais diversos sobre a partícula; baixa porosidade e estabilidade mecânica, características importantes para o

desenvolvimento de um sistema catalítico matriz-enzima, biocompatibilidade. Por esta razão sua aplicabilidade vem se tornando cada vez mais intensa ^{71,72,73}.

Com diferentes tamanhos, variando do micro ao nanômetro, o núcleo das partículas contém átomos de elementos que apresentam capacidade magnética como o ferro, níquel ou nióbio tendo suas superfícies funcionalizadas com derivados tosila, amino, carboxila ou grupos epóxidos, possibilitando a imobilização de peptídeos, proteínas, DNA, anticorpos, etc ⁷⁴.

A primeira tentativa de usar enzimas imobilizadas em suportes magnéticos ocorreu em 1973. Robson e colaboradores, 1973 ⁷⁵, imobilizaram a α -quimotripsina e a β -galactosidase em partículas de celulose-óxido de ferro a fim de verificar o efeito magnético na atividade dessas enzimas.

Em 2018, Henriques e colaboradores ⁷⁶, coimobilizaram a lipase e a β -D-galactosidase em nanopartículas magnéticas, preservando a atividade catalítica das enzimas utilizadas, com o intuito de originar sistemas de reação em dominó em que o(s) produto(s) ou subprodutos da primeira reação atuam como substrato para a segunda reação, proporcionando um processo contínuo.

1.7. Ligand Fishing

Os ensaios de *Ligand Fishing*, no português Pesca de Ligantes, foram desenvolvidos inicialmente para extração de proteínas em matrizes complexas por imobilização em micro ou nano partículas ⁷⁴. O processo de fishing envolve três etapas bem definidas: a) incubação/*loading*: o biorreator produzido pela imobilização da proteína na partícula é adicionado à matriz para bioconjugação com os possíveis ligantes; b) lavagem: exclusão das substâncias não conjugadas; c) extração dos ligantes: os ligantes que apresentaram afinidade pelo alvo imobilizados são extraídos e caracterizados ^{77,78}.

A técnica de *Ligand Fishing* é empregada na triagem ou no isolamento de compostos ativos em misturas complexas, tais como extratos celulares ⁷⁹ e extratos de produtos naturais ^{80,81,82}.

Como visto, há vários tipos de suporte podem ser utilizados para a imobilização, contudo o uso de partículas magnéticas para ensaios de *Ligand Fishing* é visto com bastante interesse para ensaios com matrizes complexas devido a facilidade de isolar os ligantes (capacidade magnética) sem procedimentos de purificação prévios (filtração ou centrifugação), evitando interferências e contaminações no processo de extração ⁸³. Este ensaio apresenta benefícios como aumento do tempo de vida da biomolécula imobilizada e redução da sua inativação ⁸⁴.

Moaddel e colaboradores, 2007 ⁷⁷, foram os primeiros a utilizar partículas magnéticas para ensaios de *Ligand Fishing*. Albumina Sérica Humana foi imobilizada em partículas magnética, fazendo o ensaio de pesca com ligantes conhecidos e desconhecidos, e correlacionando os resultados com dados obtidos em ensaios de cromatografia de bioafinidade.

Devido à grande variedade dos tipos de partículas disponíveis, as modificações superfícies diversas com espaçadores de diferentes características e propriedades, isto, associado às técnicas modernas de detecção, tais como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, etc., o ensaio de *Ligand Fishing* torna-se uma importante ferramenta potencial para estudos de afinidade e triagem de ligantes ^{74, 83}.

A FIGURA 1.7 mostra a representação de um ensaio de *Ligand Fishing* com proteína imobilizada em partícula magnética.

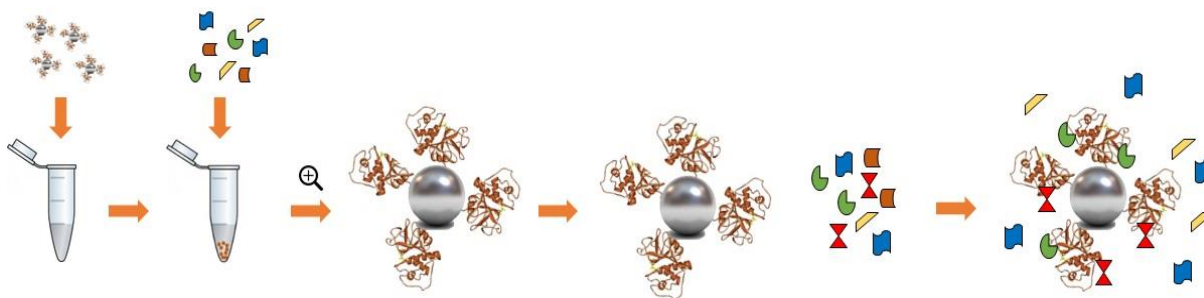


FIGURA 1. 7. Representação de ensaio de *Ligand Fishing* com proteína imobilizada em partículas magnéticas. Proteína (estrutura da papaína da *Carica papaya*) disponível em: <<https://www.iycr2014.org/learn/crystallography365/articles/20140620>> Acessado em: 26. Jun. 2019.

Por exemplo, Marszall e colaboradores, 2008 ⁸⁵, imobilizaram a proteína Hsp90 em partículas magnética, que foram utilizadas para isolar ligantes da Hsp90a conhecidos de uma mistura contendo ligantes e não ligantes. As partículas com proteína imobilizada, também foram usadas para isolar proteínas de uma mistura de proteínas, bem como em extrato celular.

A enzima neuraminidase é um alvo biológico para influenza, Zhao e colaboradores, 2018 ⁸⁶, executaram o ensaio de *Ligand Fishing* com a neurominidase imobilizada e para validação do método de triagem foram utilizados ligantes sintéticos e de produtos naturais conhecidos.

Xu *et al*, 2019 ⁸⁷, adsorveram membranas celulares sobre filtro de papel de celulose na triagem de compostos potencialmente ativos de produtos naturais (*Angelica dahurica*).

1.8. Papaína Imobilizada

Devido a sua grande capacidade proteolítica e alta estabilidade, a papaína tem sido imobilizada em diferentes tipos de partículas e para diversos fins:

- Lya e colaboradores, 2013 ⁸⁸, encapsularam papaína em matriz de biosslica a fim de verificarem o aumento de sua estabilidade e capacidade catalítica.
- Mosafa e colaboradores, 2013 ⁶⁷, imobilizaram papaína em nanopartículas magnéticas, investigando as condições ótimas de imobilização e a estabilidade da enzima imobilizada. Também, compararam a atividade da papaína livre e imobilizada no processo de clareamento de suco de romã.
- A papaína foi imobilizada por Sahoo *et al*, 2013 ⁸⁹, em nanopartículas de ouro modificadas com 3-(mercaptopropil) trimetoxissilano, demonstrando maior estabilidade térmica e capacidade catalítica do que a papaína em solução .
- He e colaboradores, 2014 ⁶³, estudaram os mecanismos do método de imobilização da papaína em superfícies de sílica.
- Alpay e Uygun, 2014 ²⁸, utilizaram o corante Cibracon 3G azul como espaçador para imobilização da papaína em nanopartículas magnéticas (200 nm), comparando o potencial catalítico da papaína livre e imobilizada.
- Atacan, 2017 ⁹⁰, verificaram o aumento da capacidade antibacteriana de nanopartículas magnéticas de Ag/CuFe₂O₄ com papaína imobilizada diante da *S. aureus* e *E. coli*. Ressaltando a aplicabilidade das partículas de papaína.
- Nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄, quitosana, e Cu²⁺ foram suportes utilizados para imobilização da papaína. Comparada com a papaína livre, a papaína imobilizada apresentou atividade e propriedade enzimáticas superiores, boa estabilidade operacional e de reutilização ⁹¹.

- Executou-se a imobilização da papaína em nanopartículas porosas de fibras de seda com Fe_3O_4 de modo aumentar sua eficiência catalítica. Sheg e colaboradores, 2019 ⁹², verificaram vantagens como maior atividade catalítica, boa capacidade de reutilização e maior estabilidade nas faixas de pH e variações de temperatura estudadas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Modular ensaios de triagem de ligantes para papaína usando-a como cisteíno protease modelo.

2.2. Metas Alcançadas

- Desenvolvimento das condições cromatográficas para monitorar a reação catalítica da papaína;
- Desenvolvimento das condições de reação da papaína e determinação dos parâmetros cinéticos em solução;
- Imobilização da papaína em partículas magnéticas e determinação dos parâmetros cinéticos;
- Avaliação de inibidores previamente identificados através dos ensaios com a papaína em solução e imobilizada;
- Modulação do ensaio de *Ligand Fishing* com os ligantes selecionados;
- Execução do ensaio de *Ligand Fishing* em extratos de produtos naturais.

3. Materiais e Procedimento Experimental

3.1. Generalidades

O sistema de cromatografia líquida utilizado (SHIMADZU, Quioto, Japão) consiste de duas bombas modelo LC-20 AD, um auto injetor modelo SIL-20A com loop de volume igual a 50 μ L, um degaseificador modelo DGU-20A5 e, uma interface modelo CBM-20A conecta o sistema. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas (Bruker Daltonics) modelo Esquire 6000 equipado com uma fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI), operando no modo positivo e, analisador do tipo *ion-trap* (IT). A aquisição dos dados foi realizada através do software Bruker Daltonics.

A coluna analítica utilizada nos ensaios foi uma coluna Poroshell HPH-C18 (50 X 2.1 mm, 2.7 μ m).

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema Milli-Q[®] Direct 8.

Os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC (PANREAC[®], J. T. BAKER[®], HONEYWELL[®]), e degaseificados em ultrassom BRANSON[®] 1510.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica AND, modelo HR200, com precisão $\pm 0,0001$ g.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, GEHAKA[®], modelo PG1800, com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampão pH 7,00 e 10,0 (GEHAKA[®]).

Nos processos de agitação de solução foi utilizado um Agitador Magnético IKA[®] RH B 1 S26.

O banho-maria utilizado foi um Banho Dubnoff, Nova Ética[®].

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON[®] e EPPENDORF[®].

As amostras foram centrifugadas utilizando uma centrífuga da marca Eppendorf[®] 5415R.

A enzima papaína, o substrato cloridrato Z-Phe-Arg-AMC e o produto 7-amino-4-metilcumarina foram comprados da Sigma- Aldrich[®].

Os ligantes utilizados nos experimentos de inibição e ensaios de *Ligand Fishing*: os flavonóides são de origem da Sigma- Aldrich[®]; as acridonas e quinolinonas ⁹³ são de origem do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP; e as dipeptidil nitrilas ⁹⁴ foram concedidas pelo Grupo de Pesquisa em Química Medicinal do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, São Carlos-SP.

O extrato etanólico empregado no ensaio de *Ligand Fishing* do caule de *Melia azedarach* foi disponibilizado pelo laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

As partículas magnéticas utilizadas eram de 1µm Bemag Amine-Terminated Magnetic Beads (30mg/mL) Bioclone Inc[®].

Os reagentes e demais produtos químicos utilizados foram obtidos da Sigma- Aldrich[®] e Synth[®].

3.2. Preparo das Soluções de Trabalho

3.2.1. Fase Móvel

- Solução Aquosa: água com adição de 0,1 % ácido fórmico
- Modificadores Orgânicos: Acetonitrila (ACN) com adição de 0,1% ácido fórmico; e Metanol com adição de 0,1% ácido fórmico.

Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume.

3.2.2. Soluções de Reação

- Soluções de Acetato de Amônio (MM: 77,08 g/mol): Foram pesadas três quantidades diferentes de acetato de amônio: 19,3; 38,5 e 77,08 mg. Essas massas foram diluídas em 100 mL de água, originando soluções com concentração de 2,5 mM, 5,0 mM e 10,0 mM, respectivamente. Agitou-se as soluções em agitador magnético para homogeneização.
- Soluções de Acetato de Amônio de diferentes pH: Soluções de acetato de amônio de 2,5mM de diferentes pH, variando-se de 4,0 a 8,5, foram preparadas. As soluções ácidas foram ajustadas com ácido acético 0,1M e as soluções básicas foram ajustadas com hidróxido de amônio 0,1M. Adicionou-se gotas das soluções de ajuste até se atingir o pH desejado. Para homogeneização fez-se uso de um agitador magnético.
- Soluções de Formiato de Amônio (MM: 63,06 g/mol): Foram pesadas três quantidades diferentes de formiato de amônio: 15,77; 31,53 e 63,06 mg. Essas massas foram diluídas em 100 mL de água, originando soluções com concentração de 2,5 mM, 5,0 mM e 10,0 mM, respectivamente. Agitou-se as soluções em agitador magnético para homogeneização.
- Soluções de Bicarbonato de Amônio (MM: 77,06 g/mol): Foram pesadas três quantidades diferentes de bicarbonato de amônio: 19,8; 39,50 e 79,06 mg. Essas massas foram diluídas em 100 mL de água, originando soluções com concentração de 2,5 mM, 5,0 mM e 10,0 mM, respectivamente. Agitou-se as soluções em agitador magnético para homogeneização.

3.2.3. Soluções de Ditioneitol (DTT) (MM: 154, 25g/mol)

Pesou-se 2 mg de DTT diluindo numa solução com 1,9 mL de acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8, e 100 μ L de DMSO, volume de final de 2 mL. A solução permaneceu no ultrassom por 20 minutos.

Para as soluções mais diluídas partiu-se desta solução mãe, diluindo as alíquotas em solução de acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8, para volume final de 2 mL.

3.2.4. Soluções de Papaína

Pesou-se 2 mg de papaína diluindo-a em solução de acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8, para 2mL. Para as soluções mais diluídas partiu-se desta solução mãe, diluindo-a em solução de acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8.

3.2.5. Soluções do substrato

Pesou-se 2 mg do substrato, Z-Phe-Arg-AMC, diluindo-o em solução de acetato de amônio 2,5 M, pH 6,8. A solução permaneceu no ultrassom por 20 minutos. Para as soluções mais diluídas partiu-se desta solução mãe, diluindo em solução de acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8.

3.2.6. Soluções do padrão 7-amino-4-metilcumarina

Pesou-se 2 mg do produto de reação padrão, AMC, diluindo numa solução com 1,9 mL de acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8, e 100 μ L de DMSO, volume de final de 2 mL. A solução permaneceu no ultrassom por 20 minutos.

Para as soluções mais diluídas partiu-se desta solução mãe, diluindo em solução de acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8.

3.2.7. Solução de Fosfato de Potássio 100 mM pH 7,0.

Pesou-se 340,2 mg de fosfato de potássio monobásico, diluindo-se em 25 mL de água. Agitou-se a solução em agitador magnético para homogeneização

3.2.8. Solução de 5% de glutaraldeído

Partindo-se de uma solução estoque de 75% proveniente da Synth[®], retirou-se 333 μ L e completando o volume para 5 mL, com solução de fosfato de potássio 100mM, pH 7,0.

3.2.9. Soluções dos Inibidores de Catepsinas e Cruzaína

As massas dos seguintes compostos: Neq409 com 1,12 mg, Neq 570 com 1,25 mg, LSPN 159 com 0,93 mg, LSPN 167 com 0,78 mg, LSPN 169 com 0,8 mg, LSPN 172 com 0,95 mg, LSPN 182 com 0,90 mg, foram diluídas numa solução com 1,9 mL de acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8, e 100 μ L de DMSO, volume final de 2 mL. Também, pesou-se 2 mg de catequina, epicatequina e quercetina, sendo diluídas na mesma solução que os compostos anteriores. As soluções permaneceram no ultrassom por 20 minutos.

Para soluções mais diluídas, partiu-se da solução-mãe diluindo-as em acetato de amônio 2,5M, pH 6,8.

3.2.10. Extrato Do Caule de *Melia azedarach*

Uma alíquota de 500 μL do extrato etanólico do caule de *Melia azedarach* (2,2 mg/mL) foi diluída em 500 μL de solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 6,8, originando uma solução de 1,1 mg/mL. partir desta solução foi executado o ensaio de *Ligand Fishing*.

3.3. Condições cromatográficas e de otimização do espectrômetro de massas para detecção e quantificação do produto da reação enzimática.

Para os ensaios o substrato utilizado foi o cloridrato de Z-Phe-Arg 7-amido-4-metilcumarina, e o produto AMC, 7-amino-4-metilcumarina. A separação do Z-Phe-Arg e AMC ocorreu por modo reverso de eluição em condições isocráticas com uma coluna Poroshell HPH-C18 (50 X 2.1 mm, 2.7- μm), e ACN:H₂O com 0,1% ácido fórmico (32,5:67,5 v/v) como fase móvel a uma vazão de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Com 6 minutos de corrida cromatográfica.

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados por infusão direta do AMC no espectrômetro de massas, via uma bomba seringa acoplado com o sistema LC nas devidas condições de separação. A união entre LC e bomba seringa se deu via um adaptador em forma de T. Os parâmetros usados para detecção do AMC, $[\text{M-H}]^+$ 176 m/z , foram voltagem do capilar 4500 V; voltagem do skimmer 63.8 V; gás nebulizador (N₂) 20 psi; gás de secagem (N₂) 6 L/min e temperatura da fonte de ionização 325 °C.

A aquisição de dados no espectrômetro de massas ocorreu no modo de varredura total de íons na faixa de m/z 80 a 800, e analisados e quantificados através do íon extraído $[\text{M-H}]^+$ 176 m/z .

3.4. Curva Analítica para quantificação do produto da reação enzimática

A curva foi planejada com oito níveis de concentrações (5, 10, 25, 30, 60, 70, 90 e 100 μM). Além disso, definiu-se 3 controles de qualidade: de baixa, média e alta concentração, com concentrações de: 15 μM (CQB), 45 μM (CQM) e 80 μM (CQA).

Pesou 2 mg do padrão AMC conforme Preparo de Solução 3.2.4, obtendo uma solução de 5708,0 μM . A partir desta solução retirou-se duas alíquotas de 35,0 e 87,6 μL , diluindo-as em soluções de acetato de amônio, pH 6,8, originando duas soluções com concentrações de 100 e 250 μM , respectivamente.

Os volumes de AMC pipetados para execução dos diferentes níveis de concentração e controles variaram conforme a concentração de cada nível e controle planejado, mantendo-se constante somente os volumes de DTT 15 μM (30 μL de uma solução 150 μM), substrato 1 μM (15 μL de uma solução de 20 μM) e ACN (100 μl). Para completar o volume final de 300 μL , adicionou-se a solução acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8. (TABELA 3.1.)

TABELA 3. 1. Volumes utilizados do padrão AMC e de solução de acetato de amônio no preparo da curva analítica.

Concentrações dos Níveis e Controles da Curva (μM)	Concentração da Solução-mãe (μM)	Volumes de AMC (μL)	Volumes de Acetato de Amônio 2,5mM pH 6,8 (μL)
5	100	15	145
10	100	30	130
25	100	75	85
30	10	90	70
60	250	72	88
70	250	84	76
90	250	108	52
100	250	120	40
15 (CQB)	100	45	115
45 (CQM)	250	54	106
80 (CQA)	250	96	64

3.5. Ensaio em solução - Verificação da atividade

Pré-ativação da enzima: Pipetou-se 15 μL de papaína de uma solução de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 30 μL de DTT de uma solução de 150 μM , agitando-se a solução por 30 segundos e deixando-a em repouso por 4,5 minutos. (solução A)

Reação enzimática: Adicionou-se à solução A 140 μL de solução acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8 e 15 μL de Z-Phe-Arg-AMC de uma solução de 20 μM . Agitou-se a solução por 30 segundos, deixando-a em repouso por 4,5 minutos. (solução B)

Para finalizar, aqueceu-se a solução B em banho a 95 °C por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 μL de ACN, obtendo-se um volume final de 300 μL . Centrifugou-se a solução por 3 minutos em 12000 rpm, recolhendo o sobrenadante para análise.

As concentrações finais dos reagentes em um volume de 300 μL foram: 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de papaína, 15 μM de DTT e 1 μM de Z-Phe-Arg.

O tempo de 5 minutos de pré-ativação da enzima, seguiu-se o tempo definido por Ramalho, 2015 ⁹⁵.

3.6. Determinação dos parâmetros cinéticos da papaína em solução

Planejou-se 18 níveis de concentração (TABELA 1.3) para determinação das constantes cinéticas da papaína em solução. E os ensaios de cada nível foram executados em triplicata.

Pré-ativação da enzima: Seguiu-se o mesmo procedimento em 3.5, originando Soluções A.

Reação Enzimática: Às soluções A adicionou-se volumes diferentes da solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 6,8, e da solução de 500 μM de Z-Phe-Arg-AMC, a fim de se obter as concentrações previamente planejadas.

Agitou-se as soluções por 30 segundos, deixando-as em repouso por 4,5 minutos. (Soluções B)

Para finalizar, aqueceu-se as soluções B em banho a 95 °C por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de ACN, obtendo-se um volume final de 300 µL. Centrifugou-se as soluções por 3 minutos em 12000 rpm, recolhendo o sobrenadante para análise.

Os volumes e concentrações de papaína e DTT foram os mesmos para cada nível, sendo a concentração de papaína 2,5 µg/mL e de DTT 15 µM em 300 µL.

A partir dos valores de concentração obtidos, utilizou-se para determinação dos parâmetros cinéticos o software GraphPad Prism.

TABELA 3. 2. Volumes utilizados de substrato e de solução de acetato de amônio para determinação das constantes cinéticas da papaína em solução.

Nível	Concentração Planejada de Z-Phe-Arg-AMC (µM)	Volumes de Z-Phe-Arg-AMC (µL)	Volumes de Acetato de Amônio 2,5mM pH 6,8 (µL)
1	8,33	5	150
2	11,67	7	148
3	15,00	9	146
4	18,33	11	144
5	21,67	13	142
6	25,00	15	140
7	33,33	20	135
8	41,67	25	130
9	50,00	30	125
10	58,33	35	120
11	66,67	40	115
12	75,00	45	110
13	91,67	55	100
14	108,33	65	90
15	125,00	75	80
16	141,67	85	70
17	158,33	95	60
18	175,00	105	50

3.7. Imobilização da papaína em partículas magnéticas (P-MB)

O método de imobilização foi feito em acordo com o descrito em trabalho de Vanzolini *et al* 96.

Dia 1: Adicionou-se 500 μ L da solução de partículas magnéticas (30 mg/mL) em um tubo eppendorf, colocando-o no separador magnético por 2 minutos, e descartando o sobrenadante. Lavou-se as partículas com 1 mL com uma solução de fosfato de potássio 100 mM, pH 7, por três vezes. A cada lavagem agitou-se a solução por 30 segundos e pôs-se em descanso no separador magnético por 2 minutos.

Após lavagem, adicionou-se 1 mL da solução de glutaraldeído 5% nas partículas, fechando o tubo, vedando-o com ParaFilm.

Em seguida, com um agitador rotacional, agitou-se a solução por 3 horas a temperatura ambiente. Após isto, colocou-se o eppendorf no separador magnético por 2 minutos, descartando o sobrenadante, e repetindo o procedimento de lavagem.

Ao final, adicionou-se 500 μ L da solução de papaína 0,5 mg/mL às partículas, vedando com ParaFilm. Agitou-se a solução por 16 horas.

Dia 2 – Colocou-se as P-MBs no separador magnético, descartando o sobrenadante. Em seguida, foi executado o procedimento de lavagem das P-MBs por três vezes usando uma solução de acetato de amônio, pH 4,5.

Foi adicionado 500 μ L da solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 4,5, às P-MBs, armazenando-as na geladeira a 4 °C.

3.8. Ensaio com a P-MB - Verificação da atividade

Condicionamento da P-MB: Agitou-se a P-MB armazenada em 500 μ L de solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 4,5, por 1 minuto. Em seguida

colocou-a no separador magnético por 2 minutos. Recolheu-se o sobrenadante, descartando-o.

Adicionou-se à P-MB 500 μ L de solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 6,8, agitando-se por 1 minuto. Em seguida, colocou-a no separador magnético por 2 minutos. Recolhendo-se o sobrenadante e descartando-o. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Pré-ativação da P-MB: À P-MB condicionada adicionou-se 30 μ L de DTT de uma solução 150 μ M. Agitou-se o sistema por 30 segundos e deixou-o em repouso por 4,5 minutos. A concentração de DTT nesta etapa foi de 100 μ M. (Sistema A)

Reação Enzimática: Adicionou-se ao Sistema A 155 μ L de solução acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8 e 15 μ L de Z-Phe-Arg-AMC de uma solução de 20 μ M. Agitou-se o Sistema A por 30 segundos, deixando-o 2,5 minutos em repouso no suporte de eppendorf e mais 2,5 minutos no separador magnético.

Recolheu-se o sobrenadante, e adicionou-se 100 μ L de ACN, obtendo-se um volume final de 300 μ L. Em seguida, centrifugou-se a solução por 3 minutos em 12000 rpm, recolhendo o sobrenadante para análise.

Lavagem e Estocagem da P-MB: Adicionou-se à P-MB 500 μ L de solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 4,5. Agitou-se o sistema por 1 minuto colocando-o no separador magnético por 2 minutos. Em seguida, recolheu-se o sobrenadante, descartando-o. Este procedimento foi efetuado mais duas vezes.

Adicionou-se à P-MB 500 μ L de acetato de amônio 2,5mM, pH 4,5, estocando-a na geladeira com temperatura de 4 °C.

3.9. Determinação dos parâmetros cinéticos da P-MB

O mesmo planejamento dos níveis de concentração do Procedimento 3.6 foram utilizados para a determinação dos parâmetros cinéticos da papaína imobilizada em partículas magnéticas.

Aliquotas de 100 μ L de 30 mg/mL de P-MB foram utilizados para determinação dos parâmetros cinéticos. Cada nível, em triplicata, foi ensaiado individualmente variando os volumes de reagentes utilizados conforme planejamento prévio.

Os mesmos procedimentos experimentais executados em 3.8 foram efetuados para o Condicionamento e para Pré-Ativação da P-MB.

Reação enzimática: Adicionou-se volumes diferentes da solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 6,8, e da solução de 500 μ M de Z-Phe-Arg-AMC, a fim de se obter as concentrações planejadas previamente. (TABELA 1.4) Agitou-se o biorreator por 30 segundos, deixando-o em repouso no suporte para eppendorf por 2,5 minutos e 2 minutos no separador magnético (Sistemas B).

Para finalizar, recolheu-se os sobrenadantes, adicionando-se 100 μ L de ACN, obtendo-se um volume final de 300 μ L. Centrifugou-se as soluções por 3 minutos em 12000 rpm, recolhendo-se os sobrenadantes para análise.

A lavagem e estocagem da P-MB após o ensaio também seguiram os procedimentos em 3.8.

A partir dos valores de concentração obtidos, utilizou-se para determinação dos parâmetros cinéticos o software GraphPad Prism.

TABELA 3. 3. Volumes utilizados de substrato e de solução de acetato de amônio para determinação das constantes cinéticas da papaína imobilizada em partículas magnéticas.

Nível	Concentração Planejada de Z-Phe-Arg-AMC (μM)	Volumes de Z-Phe-Arg-AMC (μL)	Volumes de Acetato de Amônio 2,5mM pH6,8 (μL)
1	8,33	5	195
2	11,67	7	193
3	15,00	9	191
4	18,33	11	189
5	21,67	13	187
6	25,00	15	185
7	33,33	20	180
8	41,67	25	175
9	50,00	30	170
10	58,33	35	165
11	66,67	40	160
12	75,00	45	155
13	91,67	55	145
14	108,33	65	135
15	125,00	75	125
16	141,67	85	115
17	158,33	95	105
18	175,00	105	95

3.10. Condições cromatográficas e de otimização do espectrômetro de massas para detecção dos ligantes.

Ensaio de inibição: A separação do AMC dos ligantes ocorreu por modo reverso de eluição em condições isocráticas com uma coluna Poroshell HPH-C18 (50 X 2,1 mm, 2,7 μm), e usando ACN:H₂O 0,1% ácido fórmico (32,5:67,5 v/v) como fase móvel a uma vazão de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Ensaio de prova de conceito de *Ligand Fishing*: As condições de ionização do massas mantiveram-se as mesmas para todos os ensaios realizados neste trabalho, sendo possível identificar cada um dos analitos de interesse.

A separação dos ligantes ocorreu por modo reverso de eluição em condições gradiente com uma coluna Poroshell HPH-C18 (50 X 2,1 mm, 2,7 μm), com vazão de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, e fase móvel composta por uma solução aquosa com (A) e MeOH (B), ambas com 0,1% ácido fórmico. O percentual de B variou de 15 – 60% nos primeiros 5 minutos, de 60 a 100% por 22 minutos e 3 minutos a 100%. A corrida cromatográfica teve um tempo total de 25 minutos e volume de injeção igual a 10 μL . O tempo de condicionamento da coluna foi de 7 minutos.

3.11. Ensaio de Inibição

3.11.1. Ensaio de Inibição em solução

Com cada inibidor executou-se o ensaio de inibição em triplicata.

A etapa de Pré-ativação da enzima seguiu-se o mesmo Procedimento em 3.5, obtendo-se as soluções A.

Reação de Inibição: Adicionou-se às soluções A 36,6 μL de solução acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8; 47,4 μL , 79 μM , de Z-Phe-Arg-AMC e 71 μL , 237,0 μM , de inibidor. Agitou-se as soluções por 30 segundos e deixando-as em repouso por 4,5 minutos. (soluções B)

Para finalizar, aqueceu-se as soluções B em banho a 95 °C por 2 minutos. Adicionou-se 100 μL de ACN, obtendo um volume final de 300 μL . Centrifugou-se a solução por 3 minutos em 12 rpm, recolhendo o sobrenadante para análise.

As concentrações finais dos reagentes utilizados foram: 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de papaína, 15 μM de DTT, 79 μM de Z-Phe-Arg-AMC e 237 μM dos inibidores.

3.11.2. Ensaio de Inibição na P-MB

Duas alíquotas de P-MB de 150 μL , 30mg/mL, foram utilizadas para os ensaios de inibição. Cada inibidor, em triplicata, foi ensaiado seguidamente da seguinte forma:

Biorreator 1 (B-1): 1° maltose; 2° Neq570; 3° quercetina; 4° epicatequina; 5° catequina e 6° LSPN 159.

Biorreator 2 (B-2): 1° Neq409; 2° LSPN 167; 3° LSPN 169; 4° LSPN 172 e 5° LSPN 182.

A etapa de condicionamento e Pré-ativação das P-MBs seguiu-se os mesmos procedimentos em 3.8, originando as soluções A.

Reação de Inibição: Adicionou-se às soluções A 91,5 μL de solução acetato de amônio 2,5 mM, pH 6,8; 31,5 μL , numa concentração de 52,5 μM , de substrato e 47,0 μL , 157,4 μM de inibidor. Agitando as P-MBs por 30 segundos, deixou-as em repouso no suporte para eppendorf por 2,5 minutos e mais 2 minutos no separador magnético. Recolheu-se os sobrenadantes, e adicionou-se 100 μL de ACN, obtendo um volume final de 300 μL . Centrifugou-se as soluções por 3 minutos em 12 rpm, recolhendo o sobrenadante para análise.

Lavagem dos biorreatores no ensaio de inibição: A cada ensaio de inibição as P-MBs foram lavadas com 500 μL de solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 6,8, agitando as P-MBs por 1 minuto e deixando-as no separador magnético por 2 minutos. Sendo este procedimento executado por mais duas vezes.

Ao fim do ensaio de inibição os mesmos procedimentos de lavagem e estocagem das P-MBs foram os mesmos do procedimento 3.8.

As concentrações finais dos reagentes utilizados foram: 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de papaína, 15 μM de DTT, 52,5 μM de Z-Phe-Arg-AMC e 157,5 μM dos inibidores.

3.12. Avaliação dos Tempos de Carregamento e Extração das P-MBs

Foram avaliados tanto para o carregamento como para a extração os tempos de 5, 10 e 30 minutos. O mesmo biorreator que foi executado os testes de carregamento de 5 minutos, também foi o mesmo que foi utilizado para testar o tempo de extração de 5 minutos, e assim sucessivamente.

Selecionou-se os compostos Neq 409 e Neq570 para os ensaios.

Para este ensaio usou-se seis alíquotas de 150 μL de P-MB, 30 mg/mL: três controles e três ativas. Sendo uma P-MB controle e uma ativa para o ensaio de cada um dos tempos.

Preparação das P-MBs controles: Adicionou-se às P-MBs controles 500 μL de solvente (200 μL de DMSO, 150 μL ACN e 150 μL MeOH). Agitou-se as P-MBs por 30 minutos. Em seguida, aqueceu-as em banho a 95 °C por 10 minutos. Centrifugou-se as P-MBs a 12000 rpm, descartando o sobrenadante. Para finalizar, verificou-se a atividade das P-MBs controles conforme procedimento 3.8,

Às P-MBs controles e ativas, também foram submetidas aos ensaios de condicionamento e pré-ativação conforme procedimento 3.8.

Ensaio de Carregamento: Adicionou-se às P-MBs pré-ativadas 18 μL de cada ligante (concentração final de 6 μM) e 164 μL de solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 6,8. Agitou-se os biorreatores por 30 segundos, e os tempos em repouso no suporte de eppendorf e separador magnético variaram da seguinte forma:

- Ensaio 1: 2,5 minutos no suporte de eppendorf e 2 minutos no separador magnéticos;
- Ensaio 2: 5 minutos no suporte de eppendorf e 4,5 minutos no separador magnético;

- Ensaio 3: 15 minutos no suporte de eppendorf e 14,5 minutos para cada ensaio.

Em seguida, recolhe-se os sobrenadantes (S-1), centrifugando-os por 3 minutos em 12000 rpm. Retirou-se os sobrenadantes, analisando-os.

Lavagem dos biorreatores: Adicionou-se 500 μ L de solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 6,8, às P-MBs agitando-as por 1 minuto e deixando-as no separador magnético por 2 minutos. Descartando-as em seguida. Sendo este procedimento executado por mais duas vezes.

Ensaio de Extração: Adicionou-se às P-MBs lavadas 500 μ L de MeOH. E em seguida:

- Ensaio 1: Agitou-se as P-MBs por 3 minutos e depois colocou-se em repouso no separador magnético por 2 minutos;
- Ensaio 2: Agitou-se as P-MBs por 8 minutos e depois colocou-se em repouso no separador magnético por 2 minutos;
- Ensaio 3: Agitou-se as P-MBs por 25 minutos e depois colocou-se em repouso no separador magnético por 2 minutos;

Em seguida, recolhe-se os sobrenadantes (S-2), centrifugando-os por 3 minutos em 12000 rpm. Retirou-se novamente os sobrenadantes, analisando-os.

As etapas de lavagem e estocagem das P-MBs seguiram procedimento 3.8.

3.13. Prova de Conceito do Ensaio de *Ligand Fishing*

O ensaio de *Ligand Fishing* foi feito em acordo com o descrito na referência ⁷⁸ com modificações.

Para este ensaio usou-se duas alíquotas de 150 μ L de P-MB (retiradas da P-MB estoque de 500 μ L): uma ativa e uma controle.

A P-MB controle foi preparada conforme procedimento 3.12.

As etapas seguintes foram executadas para as P-MB ativa e controle:

Às P-MBs controles e ativas, também foram submetidas aos ensaios de condicionamento e pré-ativação conforme procedimento 3.8.

Carregamento (*Loading*): Adicionou-se uma solução contendo 18 μL dos 11 ligantes, 6 μM , ensaiados a atividade de inibição previamente, e 2 μL de solução de acetato de amônio 2,5mM, pH 6,8. Agitou-se a P-MBs por 30 segundos, deixando-as em repouso no suporte de eppendorf por 2,5 minutos e 2 minutos no separador magnético. Recolheu-se os sobrenadantes (S-1), adicionou-se 102 μL de ACN, e centrifugando-os por 3 minutos em 12 rpm. Retirou-se os sobrenadantes, analisando-os.

A etapa de lavagem entre o condicionamento e a extração ocorreu conforme procedimento 3.12.

Extração: Adicionou-se 160 μL de solução de acetato de amônio 2,5 mM, pH 4,0 e 40 μL de MeOH. Agitou-se os biorreatores por 3 minutos, colocando-os em repouso no separador magnético por 3 minutos. Os sobrenadantes (S-2) foram recolhidos, e adicionou-se 100 μL de ACN. Centrifugou-os por 3 minutos em 12000 rpm, retirando o sobrenadante, analisando-os.

As etapas de lavagem e estocagem das P-MBs seguiram procedimento 3.8.

3.14. Ensaio de *Ligand Fishing* com Extrato de Produtos Naturais

O mesmo procedimento 3.13 foi executado para o ensaio de *Ligand Fishing* com extrato etanólico do caule de *Melia azedarach*:

A separação dos ligantes ocorreu no modo reverso de eluição em condições gradiente com uma coluna Poroshell HPH-C18 (50 X 2,1 mm, 2,7 μm), com vazão de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, e fase móvel composta por uma solução aquosa

com (A) e MeOH (B), ambas com 0,1% ácido fórmico. O percentual de B variou de 5 – 100% nos primeiros 22 minutos, mantendo 100% nos últimos 3 minutos da corrida cromatográfica.

As condições de otimização do espectrômetro de massas são descritas no procedimento 3.3. A aquisição de dados no espectrômetro de massas ocorreu no modo de varredura total de íons, na faixa de análise de $[M-H]^+$ 80 a 1000 m/z .

Foram empregados 300 μL do extrato, 1,1 mg/mL em uma alíquota de 150 μL da P-MB.

Determinação da massa exata da catequina e epicatequina:

Foi utilizado o sistema UHPLC Agilent[®] 1290 *Infinity* II (Agilent Technologies) composto por uma bomba binária (G7120A – *High speed Pump*), autoinjeter e compartimento de colunas (G7129B – 1290 *Vialsampler*) e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G7114B – modelo 1260 *Infinity* II – VWD, acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo QqTOF (Bruker Daltonics[®]) equipado com fonte ESI (LC-HRMS). A aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o software Data Analysis[®] (Bruker Daltonics[®]).

A solução de extração do ensaio de P-MB foi injetada no LC-HRMS em eluição gradiente de 5-100% em 20 minutos, com uma vazão de 0,4 mL/min. A coluna analítica utilizada foi Ascentis[®] Express F5 (2,7 μm , 2,1x100mm).

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram: modo negativo de ionização; nebulizador 3 bar, energia do quadrupolo 5 eV, vazão do gás de secagem 8mL/min (N_2), temperatura do gás de secagem 180 °C, tensão do End Plate e capilar de 500V e 4500V, respectivamente.

4. Resultados e Discussão

4.1. LC-MS: Separação substrato e produtos

Na reação enzimática entre papaína e o substrato Z-Phe-Arg-AMC são gerados dois produtos: a parte C-terminal do substrato, AMC, e a partir N-terminal, Z-Phe-Arg. A reação enzimática é apresentada na FIGURA 4.1.

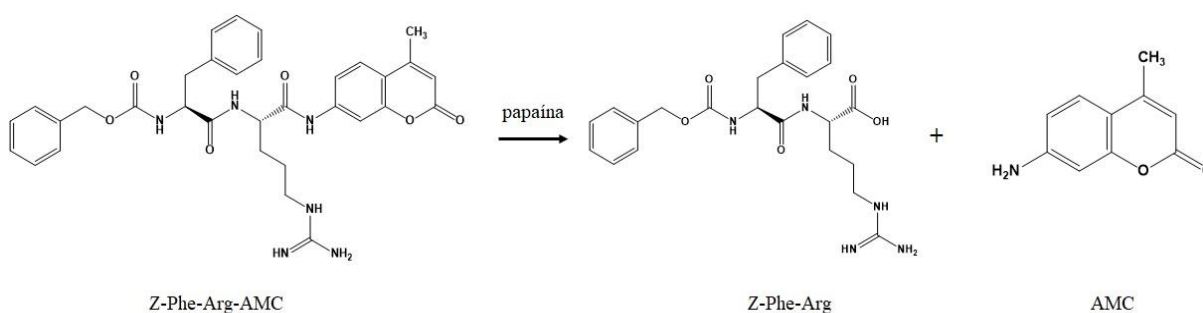


FIGURA 4. 1. Reação enzimática da papaína e o substrato Z-Phe-Arg-AMC e os produtos reacionais.

Nos ensaios clássicos em cubeta e placa de ELISA com o fluorímetro como detector, os produtos da reação enzimática e os compostos ensaiados (compostos sintéticos ou de extratos de produtos naturais, tais como, alcaloides, quininas, flavonoides, entre outros) ⁹⁷, apresentam muitas vezes, fluorescência nos mesmos comprimentos de onda que o produto da reação monitorado, AMC, ocasionando interpretações errôneas diante dos dados obtidos. Por isso, a fim de evitar falsos positivos ou negativos nos ensaios enzimáticos optou-se pelo emprego de um sistema LC-MS/MS para o monitoramento da atividade enzimática e testes de triagem. A técnica de LC-MS/MS possibilita o uso de amostras de baixas concentrações, separação das bandas cromatográficas características de cada analito, obtenção dos íons moleculares e seus fragmentos, isto é, o método apresenta alta sensibilidade e seletividade quando comparada com a técnica fluorimétrica.

No modo reverso de eluição, a fase estacionária é apolar, em geral alquil sílica, e a fase móvel é composta por um solvente orgânico, componente forte da mistura, e uma solução aquosa. Este modo de eluição é preferível para analitos com polaridade intermediária. O mecanismo de separação envolvido é a hidrofobicidade, ou seja, os compostos que são hidrofóbicos são mais fortemente atraídos/retidos para a fase estacionária que tem maior interação química com os analitos. Assim sendo, quanto maior a hidrofobicidade da fase estacionária e menor a concentração de solvente orgânico na fase móvel, maior será o tempo de retenção do soluto ⁹⁸.

Em condições isocráticas, a composição da fase móvel mantém-se constante durante a eluição, não alterando os valores de fator de retenção, k . A eluição isocrática é preferível quando k das bandas cromatográficas forem de $0,5 < k < 20$. Nestas condições, as bandas cromatográficas apresentam bastante diferença de valores de k entre si ⁹⁹.

Portanto, o modo reverso em condições isocráticas de eluição foi escolhido para este ensaio devido: à necessidade de se separar somente três analitos, com polaridade intermediárias e com valores do fator de retenção diferentes, conseqüentemente, diferenças nos valores de tempos de retenção nas condições de separação estudadas. Assim sendo, a separação do substrato e seus respectivos produtos ocorreu numa coluna Poroshell HPH -C18[®] (50 X 2.1 mm, 2.7- μ m), com tempo de corrida de 6 minutos. O cromatograma de íons extraídos dos produtos da reação enzimática é apresentado na FIGURA 4.2.

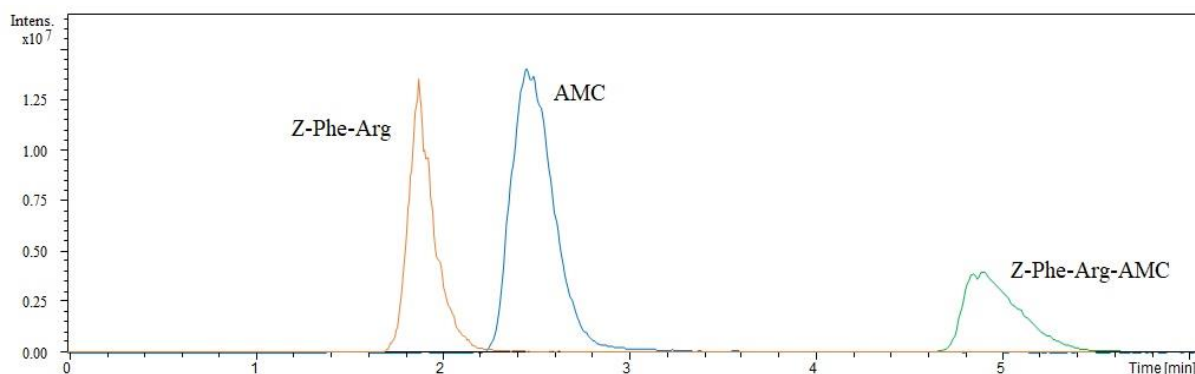


FIGURA 4. 2. Cromatograma de íons extraídos dos produtos da reação enzimática da papaína com o substrato Z-Phe-Arg-AMC.

Foi utilizado como analisador um espectrômetro de massas de baixa resolução, *Ion Trap*, com fonte de ionização do tipo *eletrospray*.

As fontes de ionização à pressão atmosférica, por exemplo *eletrospray*, possibilitam uma ionização branda, havendo pouca fragmentação da molécula durante o processo. Como resultado da ionização, à pressão atmosférica, há a protonação ($[M+H]^+$) ou desprotonação ($[M+H]^-$). A fonte de ionização por *eletrospray* é a técnica de ionização mais utilizada em análises químicas e biológicas. No processo de ionização, a amostra em solução, eluente do sistema cromatográfico, é introduzida em um capilar metálico de pequeno diâmetro interno, o qual obtém uma diferença de potencial de poucos quilovolts (kV). Esta voltagem causa a separação das cargas, neutralizando os contra-íons negativos, no caso de uma ionização em modo positivo, ou contra-íons positivos, no caso da ionização em modo negativo. As vantagens dessa técnica de ionização é que os analitos podem apresentar média e alta polaridade, baixa ou elevada massa molecular, e as vazões variam de nano a mililitros ¹⁰⁰.

O analisador de massas é a parte fundamental do espectrômetro de massas, sendo responsável por separar os íons gerados na fonte de ionização de acordo com a razão massa-carga (m/z) e direcioná-los ao detector. O analisador de massa utiliza o movimento de íons em campos elétricos e magnéticos, acarretando na separação dos íons de diferentes m/z no espaço ou no tempo. O

analisador de massa por armadilha de íons, do inglês *Ion Trap*, é constituído de um eletrodo circular e dois eletrodos terminais, formando uma cavidade onde é possível armazenar os íons gerados na fonte de ionização. O *Ion trap* fornece alta sensibilidade nos experimentos conduzidos no modo de varredura total de íons devido à possibilidade do acúmulo de íons por um tempo determinado, o que torna de grande utilidade na obtenção de informações qualitativas ¹⁰⁰.

Os parâmetros de detecção foram otimizados automaticamente utilizando o software Squire Control Brucker[®] para o analito AMC, padrão de quantificação, de massa molecular 175,06 g/mol. A otimização foi feita no modo positivo, ou seja, com adição de um próton à molécula, fornecendo um íon 176 *m/z*. As relações *m/z* do substrato e produtos da reação enzimática são apresentados na TABELA 4.1.

TABELA 4. 1. Relação *m/z* do substrato e produtos da reação enzimática.

Analito	Massa Molecular	<i>m/z</i> [M+H]⁺
Z-Phe-Arg	455,22	456
AMC	175,06	176
Z-Phe-Arg-AMC	612,27	613

A aquisição de dados no espectrômetro de massas ocorreu no modo de varredura total de íons, no modo positivo, na faixa de análise de 80 a 800 *m/z*.

Foi utilizado o ácido fórmico, ácido volátil, a fim de melhorar o processo de ionização do analito. A adição de aditivos em baixas concentrações à fase móvel favorece a ionização de compostos polares neutros ¹⁰⁰.

4.2. Determinação das Condições de Reação

A técnica LC-MS/MS apresenta alta sensibilidade e seletividade. Dessa maneira, as condições das reações enzimáticas foram adaptadas, buscando a diminuição das concentrações dos reagentes utilizados e os menores tempos reacionais possíveis, a fim de se obter as melhores respostas e/ou melhores sinais qualitativos e quantitativos.

Os parâmetros selecionados a seguir foram classificados considerando aqueles resultados que apresentassem maior área para a formação do produto.

Os ensaios de determinação das condições de reação em solução foram realizados uma única vez e os procedimentos experimentais efetuados são descritos em 3.5.

4.2.1. Determinação da concentração de papaína

A fim de se determinar a menor concentração de enzima possível para os ensaios em solução, em contrapartida aos ensaios clássicos que utilizam concentrações na faixa de miligramas^{101,102,103}, concentrações de papaína de 0,1; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0 µg/mL foram ensaiadas.

Para as concentrações abaixo de 2,5µg/mL não se verificou a presença/formação de produto. Dessa forma, selecionou-se a concentração de 2,5µg/mL de papaína, como a menor concentração de enzima capaz de produzir o AMC em concentrações detectáveis nas condições de ensaio e análise.

4.2.2. Determinação da concentração de DTT

O uso do reagente ditioneitol (DTT), um agente redutor, faz-se necessário no ensaio de cisteína proteases, pois os resíduos de cisteína presentes

na enzima formam pontes dissulfeto, impossibilitando o acesso do substrato ou de ligantes ao sítio ativo. Portanto, o DTT é utilizado para redução das pontes dissulfeto presentes na enzima, aqui denominado ensaio de pré-ativação da enzima. Na FIGURA 4.3 é proposto o mecanismo de redução das pontes dissulfeto de cisteína proteases.

As seguintes concentrações de DTT foram avaliadas: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 10,0; 50,0; 100,0; 250,0; 500,0; 1000,0 μM . Estas soluções continham valores abaixo de 5% de DMSO (solvente de solubilidade do DTT), a fim de se evitar que a papaína diminuísse ou perdesse sua atividade catalítica. Pois, porcentagens acima de 10% de DMSO no meio reacional afetam a atividade enzimática através de processos redox ³⁹.

A partir dos dados obtidos, verificou-se que a concentração de DTT que apresentou maior sinal/área na formação de produto da reação foi a de 100 μM .

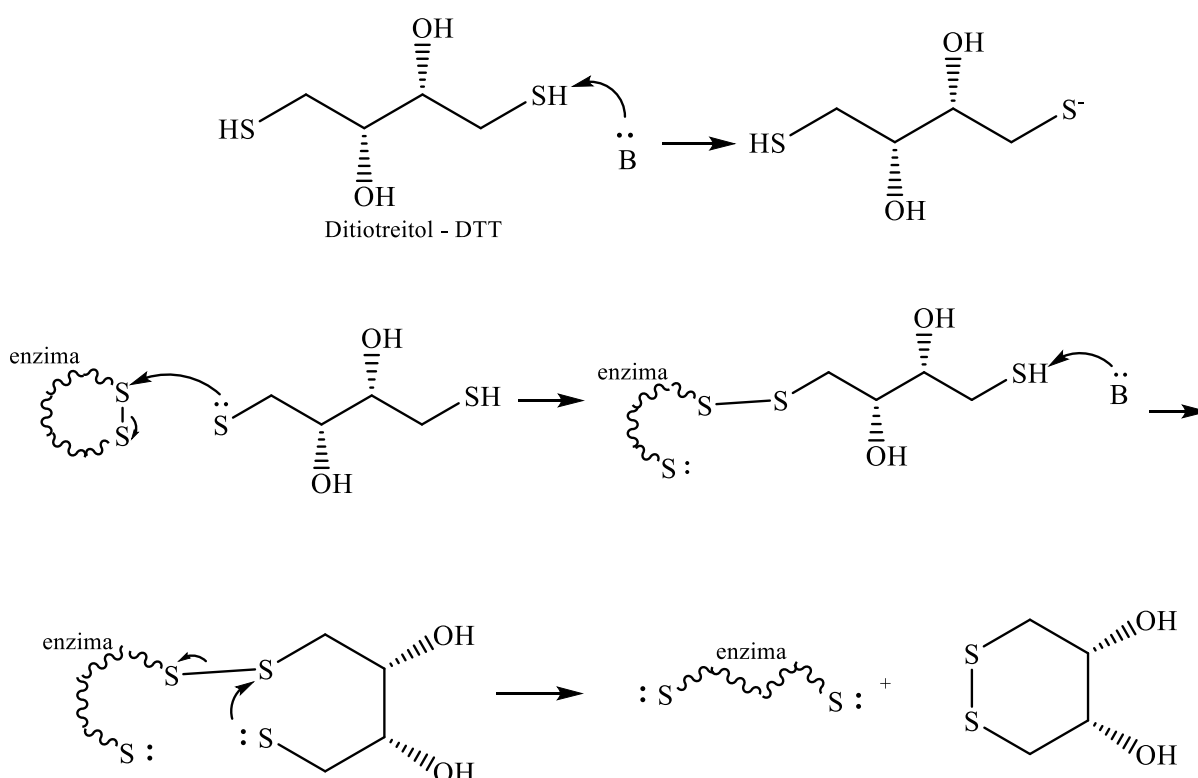


FIGURA 4. 3. Mecanismo de redução das pontes dissulfeto em cisteína proteases com agente redutor ditioneitol (DTT).

4.2.3. Determinação da Solução de reação

Foram selecionados três sais voláteis comumente utilizados como soluções-tampão em análises por LC-MS/MS para os ensaios enzimáticos: Acetato de Amônio, Bicarbonato de Amônio e Formiato de Amônio. Com diferentes concentrações: 2,5; 5,0 e 10,0 mM.

No acoplamento LC-MS, a exigência é que os aditivos e soluções tampão sejam voláteis ¹⁰⁰. Ou seja, ensaios enzimáticos clássicos com soluções tampão de fosfato, borato, citrato, ou outras de sais não voláteis não devem ser usados nos sistemas de LC-MS/MS. A TABELA 4.2 são apresentados os principais aditivos e tampões voláteis utilizados em análises por LC-MS.

TABELA 4. 2. Principais aditivos e tampões voláteis utilizados em análises por LC-MS. Baseado na referência 100.

Tampão ou Aditivo	pKa	Faixa Tamponante
Ácido acético	4,8	-
Ácido fórmico	3,8	-
Amônia	9,2	-
Acetato de amônio/ácido acético	4,8	3,8-5,8
Formiato de amônio/ácido fórmico	3,8	2,8-4,8
Formiato de amônio/hidróxido de amônio	9,2	8,2-10,2
Acetato de amônio/hidróxido de amônio	9,2	8,2-10,2
Bicarbonato de amônio	6,3/10,3/9,2	6,8-11,3

Por esta razão, uma nova configuração do meio reacional para a papaína foi determinada. Das soluções dos três sais eleitos, a solução de acetato de amônio 2,5 mM demonstrou o melhor resultado (Figura 4.4) Sendo esta condição definida para os ensaios posteriores.

O ensaio enzimático também foi executado em 100% água, contudo não houve formação de produto.

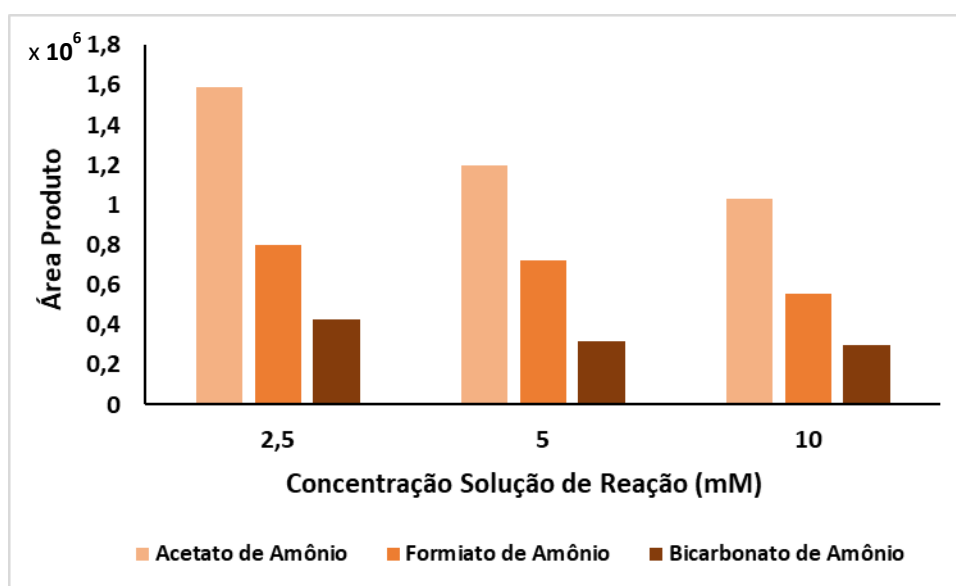


FIGURA 4. 4. Soluções de compostos voláteis para o ensaio enzimático.

4.2.4. Determinação do pH de ensaio

Com a solução de reação determinada (acetato de amônio 2,5 mM), avaliou-se a influência do pH na atividade enzimática.

O pH de ótima atividade da papaína, de acordo com o fornecedor (Sigma-Adrich), varia entre 6,0 – 7,0. Tendo inatividade reversível de 4,0 – 4,5 e inatividade irreversível abaixo de 3,0.

Considerando estas informações variou-se o pH do meio reacional em: 4,0; 5,0; 6,0; 6,8; 7,5; 8,0; 8,5.

Constatou-se com os ensaios (FIGURA 4.5) que em faixas de pH neutras a atividade enzimática é maior, ou seja, convertendo uma maior concentração de substrato em produto. Adotou-se o pH 6,8, em contrapartida com o valor de pH 7,5, que apresentou melhor atividade. O valor de pH 7,5 impossibilitou o manuseio experimental e a determinação dos parâmetros cinéticos da papaína, pois, com poucos segundos de reação o substrato era totalmente consumido.

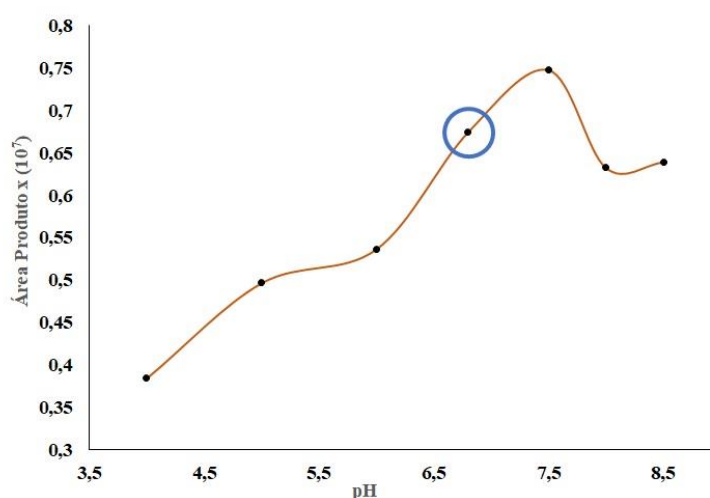


FIGURA 4.5. Variação de pH do meio reacional enzimático.

4.2.5. Determinação do tempo de reação enzimática

Avaliou-se o tempo de reação enzimático considerando as condições de reação e análise definidos nos experimentos anteriores. Os tempos ensaiados foram de: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 minutos, verificando que somente após 5 minutos de reação houve formação de produto. Sendo este, o menor tempo reacional para formação de AMC determinado para os ensaios.

4.2.6. Verificação da Atividade Residual

Para os ensaios em solução foi feito um estudo para determinar as condições de finalização da reação enzimática. Para isso, executou-se após os 5 minutos de reação (tempo zero), experimentos a fim de finalizar a reação enzimática:

1. adição de 100 μ L de ACN;
2. adição de 100 μ l MeOH;
3. adição de 100 μ L de ACN e resfriamento do meio reacional a -18 °C por 10 minutos;
4. adição de 100 μ L de ACN e resfriamento do meio reacional a -18 °C por 10 minutos;
5. aquecimento em banho do meio reacional em 80 °C por 2, 5 e 7 minutos;
6. aquecimento em banho do meio reacional em 95 °C por 2, 5 e 7 minutos;

Após os tempos de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos dos experimentos de finalização enzimática, foram verificadas as atividades residuais das alíquotas reacionais.

Nos experimentos de aquecimento não foi adicionado solventes orgânicos, pois os mesmos evaporariam diante das temperaturas avaliadas (ponto ebulição MeOH: 64,7 °C; temperatura de ebulição ACN: 82 °C) sendo insignificantes seus usos.

De acordo com os dados obtidos (FIGURA 4.6) as adições de solventes orgânicos ao meio reacional foram as tentativas menos eficazes para o fim da reação. Por exemplo, na alíquota reacional com adição de MeOH houve um aumento de quase 31% da área do produto após 2 horas da adição do solvente.

No experimento de adição de solventes e resfriamento do meio reacional $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, o ensaio com a adição de ACN e resfriamento em seguida foi o menos eficaz ACN, tendo aumento de 18% da área do produto.

Entre as formas de aquecimento a mais ineficiente foi o aquecimento a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mesmo aquecendo-se o meio reacional por 5, 7 e até 10 minutos a atividade enzimática não foi finalizada.

E por fim, a forma mais eficaz de interrupção da reação foi o aquecimento a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, capaz de finalizar a atividade da papaína.

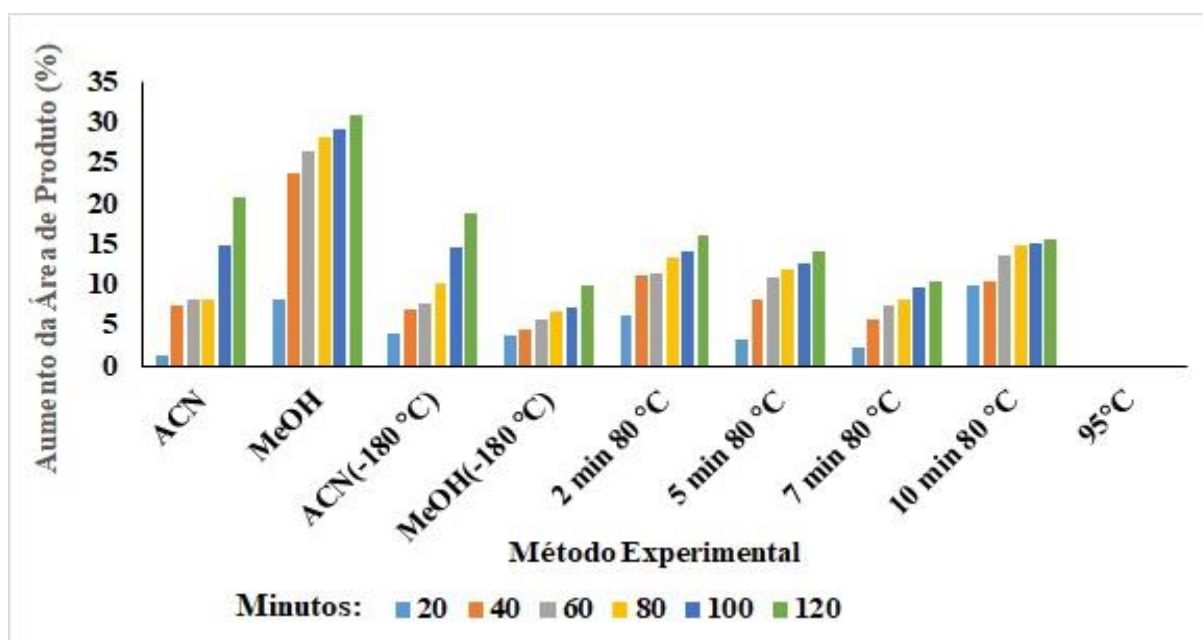


FIGURA 4. 6. Métodos experimentais para finalização da atividade enzimática.

4.2.7. Súmula das Condições Determinadas de Reação

Para o ensaio reacional em solução foi definido o uso de $2,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ de papaína; solução acetato de amônio $2,5\text{ mM}$, pH 6,8, e a concentração de DTT sendo $100\mu\text{M}$. Para pré-ativação da enzima definiu-se o tempo de 5 minutos de reação entre a papaína e o agente redutor de pontes de dissulfeto.

O tempo de reação entre enzima e substrato determinado foi de 5 minutos, sendo essencial o aquecimento em banho do meio reacional por 2 minutos a uma temperatura de 95 °C a fim de cessar a atividade enzimática da papaína. Após finalização da reação foi adicionado 100 µL de ACN (o uso do solvente acetonitrila ocorreu a fim de auxiliar no processo de ionização da amostra no espectrômetro de massas), centrifugou-se por 3 minutos a 12000 rpm e seguida, análise por LC-MS/MS. A FIGURA 4.7 apresenta um esquema do procedimento experimental do ensaio em solução.



FIGURA 4. 7. Procedimento experimental do ensaio em solução da papaína. Proteína (estrutura da papaína da *Carica papaya*) disponível em: <<https://www.iycr2014.org/learn/crystallography365/articles/20140620>> Acessado em: 26. Jun. 2019.

4.3. Curva Analítica

O padrão selecionado para construção da curva analítica foi o 7-amino-4-metilcumarina, AMC, um dos produtos da reação entre enzima e substrato.

Para construção da curva analítica foram levados em consideração os parâmetros do Guia para Validação Bioanalítica da Agência de Medicina Europeia (EMA) ¹⁰⁴ e a revisão de Cassiano, et al, 2009 ¹⁰⁵.

A curva foi planejada com oitos níveis de concentração, de acordo com o mínimo de seis níveis de calibração exigidos na qualificação do método. E três níveis de controles de qualidade para avaliação da precisão e recuperação do método (controle de qualidade de baixa concentração (CQB), 3 vezes o menor valor da curva; controle de qualidade de média concentração (CQM) sendo 45% do valor do ponto mais alto; e, controle de qualidade de alta concentração (CQA), correspondendo 85% do valor do P8 da curva analítica.

Os valores calculados devem estar em torno de até 15% dos valores estimados, e no mínimo 75% dos padrões de calibração devem preencher este critério. Sendo os mesmos requisitos aplicados aos controles de qualidade ¹⁰⁴.

A equação da curva analítica foi calculada pelo programa QuantAnalysis, Bruker®. A FIGURA 4.8 ilustra a curva analítica, sua equação matemática e os três controles de qualidade do método.

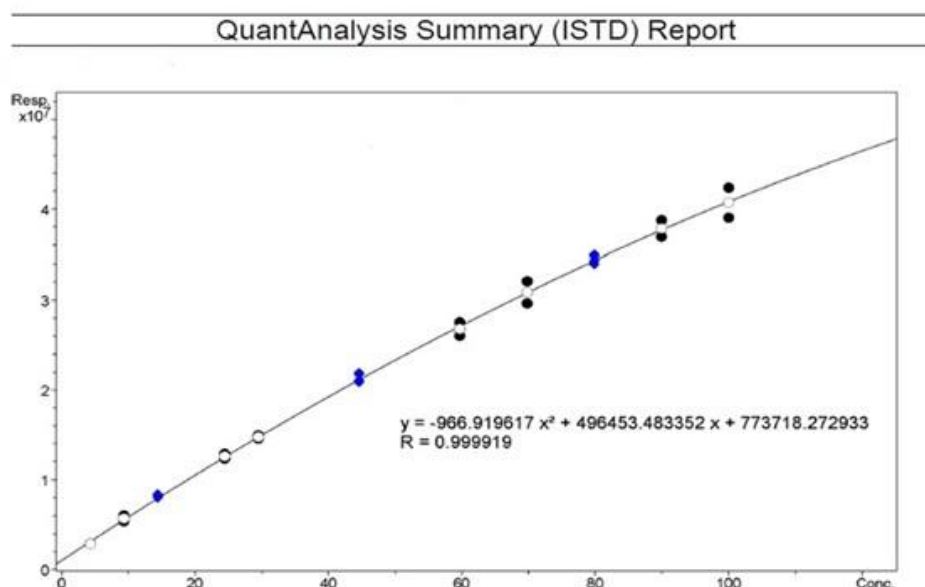


FIGURA 4. 8. Curva analítica, sua equação matemática e os três controles de qualidade.

A curva foi do tipo quadrática e a regressão linear descreve 99,9% de todos os valores.

O Limite de detecção do método analítico, ou seja, a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente

do ruído de fundo, porém não podendo ser quantificado com precisão e exatidão¹⁰⁵ foi de 0,5 μM .

Somente duas concentrações não foram consideradas para cálculo da curva analítica, P1 e um P2, enquanto todas as outras concentrações obtiveram exatidão menores que 15%, e coeficiente de variação, precisão, de no máximo 9,25 %.

O limite de quantificação 5,0 μM apresentou exatidão de 90% e coeficiente de variação inferior a 0,78%.

4.4. Parâmetros cinéticos em solução

A fim de se entender o comportamento da enzima nas condições de reação e no método de análise determinados, ou seja, se diante de todas novas condições estabelecidas o método é capaz de identificar a atividade enzimática da papaína, executou-se um planejamento para determinação do K_M da papaína em solução a partir da Curva Analítica obtida em 4.3.

A constante de Michaelis-Mentem para o ensaio da papaína em solução foi de $52,87 \pm 1,658 \mu\text{M}$, com V_{max} $70,18 \pm 1,658 \mu\text{M}/\text{min}$ e R^2 de 0,976, demonstrando seu comportamento Micaelino. (FIGURA 4.9)

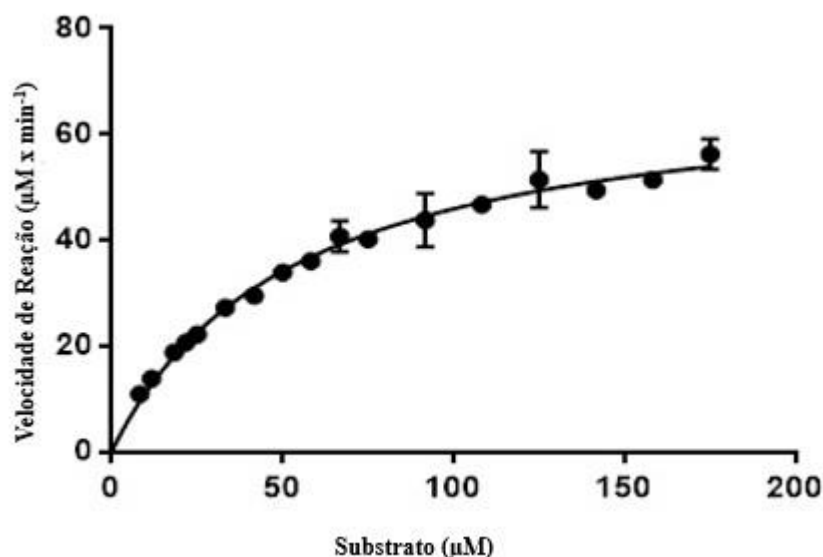


FIGURA 4. 9. Cinética de michaelis-menten para papaína em solução.

O K_M determinado é chamado de K_M aparente (K_{Map}), pois, este resultado da constante de Michaelis-Menten é derivado das condições reacionais definidas exclusivamente para este ensaio.

A partir do valor de K_{Map} foi determinada a unidade de enzima ativa em solução. Uma unidade (U) de uma enzima é a quantidade que catalisará a transformação de um micromolar de substrato por minuto, nas condições padrão de reação determinadas. Logo, a unidade de enzima ativa em uma solução de 300µL de papaína com 2,5 µg/mL foi de $2,1 \times 10^{-3}$ U.

4.5. Imobilização da Papaína em Partículas Magnéticas

A imobilização de enzimas em partículas apresenta várias vantagens quando comparado aos ensaios clássicos em solução: estabilidade térmica e estabilidade diante solventes orgânicos, resultando no aumento do “tempo de vida” da enzima, reutilização, baixo custo e reprodutibilidade dos dados obtidos. E ao considerarmos as partículas magnéticas como suporte, mais uma vantagem é acrescida, a facilidade de separação da biomolécula imobilizada do meio reacional.

Levando em consideração estes entre outros pontos positivos da imobilização de enzimas, em especial, a imobilização em partículas magnéticas, a papaína foi imobilizada em partículas magnéticas para ensaios de triagem de ligantes sintéticos e em extratos de produtos naturais.

No processo de imobilização da papaína em partículas magnéticas, fez-se uso do glutaraldeído, aldeído glutárico, um reagente bifuncional e que permite o acoplamento com a enzima e partícula pelos seus grupos amino com a carbonila do aldeído. Por esta razão, o glutaraldeído é utilizado como espaçador entre enzima e partícula. O uso de um espaçador faz-se necessário pois, a imobilização da enzima diretamente sobre a partícula limita seus movimentos, podendo ocasionar o impedimento ou aprisionamento dos seus sítios de ligação. Logo, o espaçador aumenta a liberdade da enzima do que quando imobilizada diretamente no suporte ^{58,106,107}.

O método de imobilização envolveu a formação de ligações covalentes entre o grupo amino-propila das partículas com as carbonilas do glutaraldeído, e os resíduos de lisina e arginina da enzima, com a outra parte carbonilada do espaçador.

A reação ocorreu através de uma adição nucleofílica das aminas, bases de Lewis, aos grupos carbonilas do glutaraldeído, havendo a formação de um intermediário tetraédrico. Em seguida, ocorreu a perda de água, bom grupo de saída, e formação de um grupo imina, conforme mecanismo reacional proposto na FIGURA 4.10.

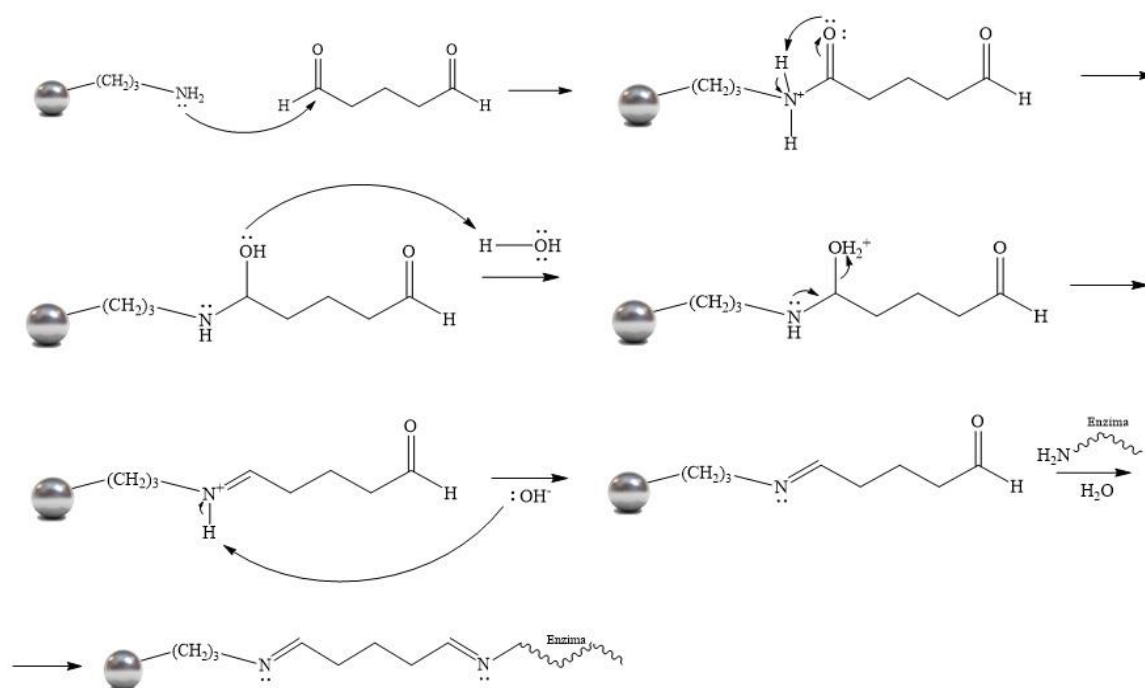


FIGURA 4. 10. Mecanismo reacional da imobilização de enzimas em suportes magnéticos amino-propilados para imobilização covalente utilizando o glutaraldeído como espaçador.

A fim de evitar a auto proteólise da enzima utilizou-se a solução de acetato de amônio, pH 4,5, para armazenamento da papaína imobilizada nesta faixa de pH encontra-se na sua forma inativa reversível.

4.6. Verificação da atividade da papaína imobilizada em partículas magnéticas (P-MB)

Após o procedimento de imobilização da papaína em partículas magnéticas, a fim de averiguar que a papaína manteve sua capacidade proteolítica fez-se a verificação da atividade enzimática da P-MB.

As mesmas condições reacionais de atividade e de análise LC-MS/MS da papaína em solução foram aplicadas ao ensaio de atividade da P-MB, diferenciando-se apenas no momento de interrupção da reação enzimática, que

para a P-MB o fim da reação ocorreu via separação magnética. A FIGURA 4.11 ilustra o procedimento experimental do ensaio com a P-MB.

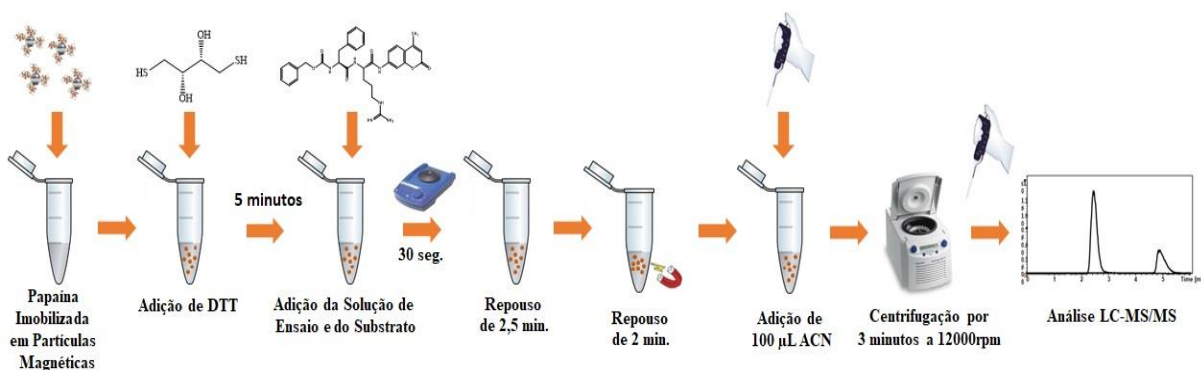


FIGURA 4. 11. Procedimento experimental do ensaio de verificação de atividade da P-MB. Proteína (estrutura da papaína da *Carica papaya*) disponível em: <<https://www.iycr2014.org/learn/crystallography365/articles/20140620>> Acessado em: 26. Jun. 2019.

Uma alíquota reacional da P-MB de 10µL foi analisada via LC-MS/MS, constatando-se a conversão do substrato para produto pela P-MB, conforme cromatograma da separação (FIGURA 4.12) e os espectros de massas (FIGURA 4.13) dos analitos Z-Phe-Arg-AMC e AMC.

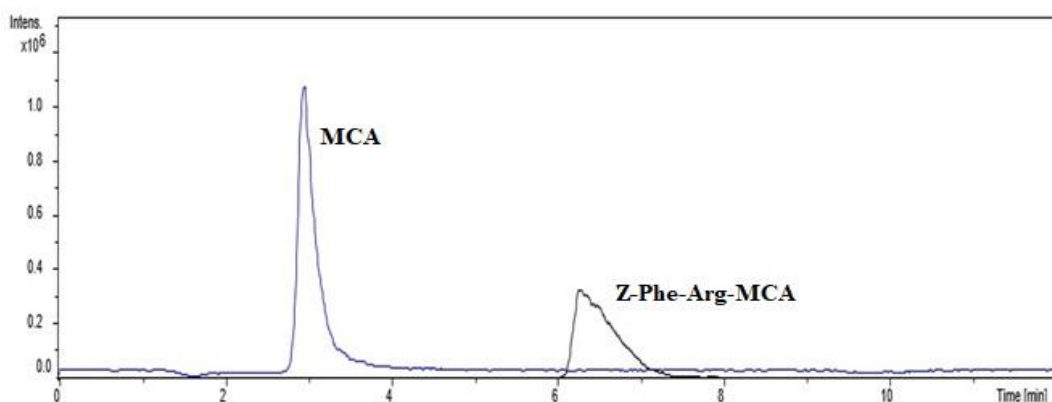


FIGURA 4. 12. Cromatograma de íon extraído da separação do substrato (m/z 613) e produto (m/z 176) da reação da papaína imobilizada em partículas magnéticas.

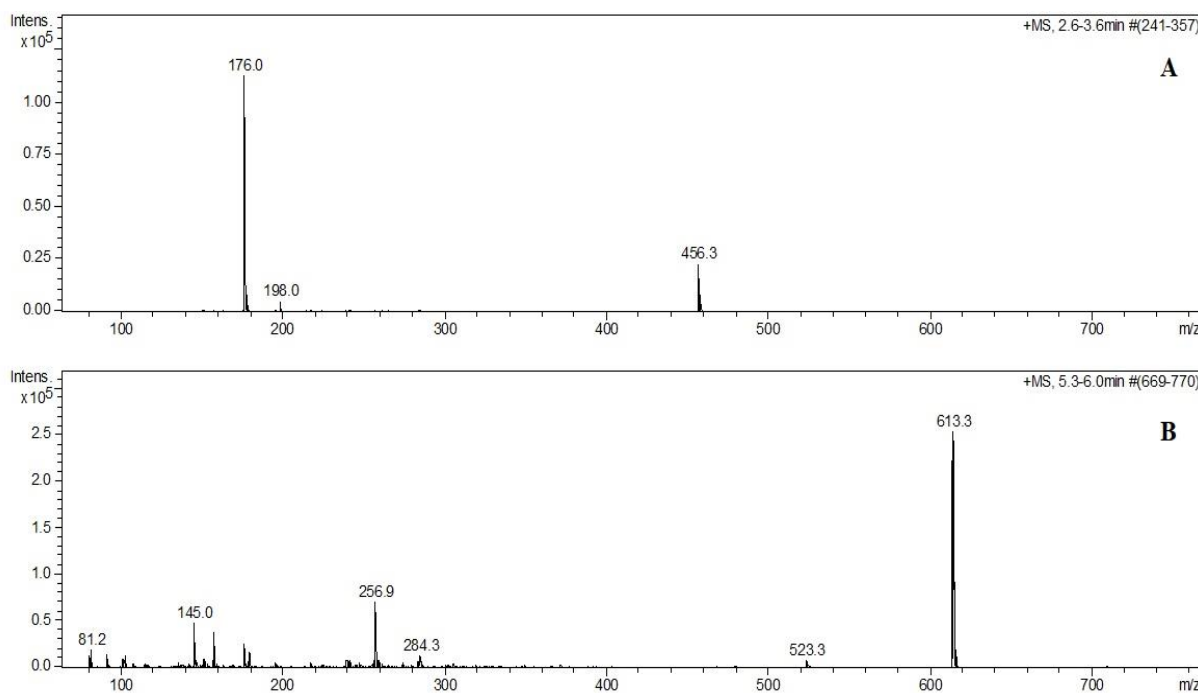


FIGURA 4. 13. A) Espectro de Massas do Cromatograma de íon extraído [M-H]⁺ 176 m/z; B) espectro de massas do cromatograma de íon extraído [M-H]⁺ 613 m/z.

A imobilização da papaína apresentou-se ser bem-sucedida por este método de imobilização.

O potencial catalítico da P-MB não apresentou diminuição diante variações de temperatura (P-MB foi armazenado na geladeira, em torno de 4 °C, enquanto a reação enzimática ocorreu a temperatura ambiente).

A adição de solventes orgânicos (por exemplo, MeOH e ACN) diminuiram a atividade da P-MB em torno de 10%; seu uso sucessivo nos ensaios de verificação de atividade apresentou perda da capacidade proteolítica em torno de 10% após 10 meses de imobilização; e diante os ensaios de ligante (após 15 ensaios seguidos de ligantes com diferentes afinidades), o biorreator exibiu perda de somente 20%.

4.7. Parâmetros cinéticos da P-MB

A fim de caracterizar o biorreator de papaína efetuou-se a determinação dos parâmetros cinéticos da P-MB. O ensaio foi executado conforme procedimento experimental 3.9.

O valor da constante de Michaelis-Menten para o ensaio da P-MB foi $34,99 \pm 4,404 \mu\text{M}$, com V_{max} de $88,55 \pm 4,404 \mu\text{M}/\text{min}$ e R^2 de 0,956 (FIGURA 4.14) Sendo a unidade de enzima ativa para $500\mu\text{L}$ de P-MB de $1,4 \times 10^{-3}$ U.

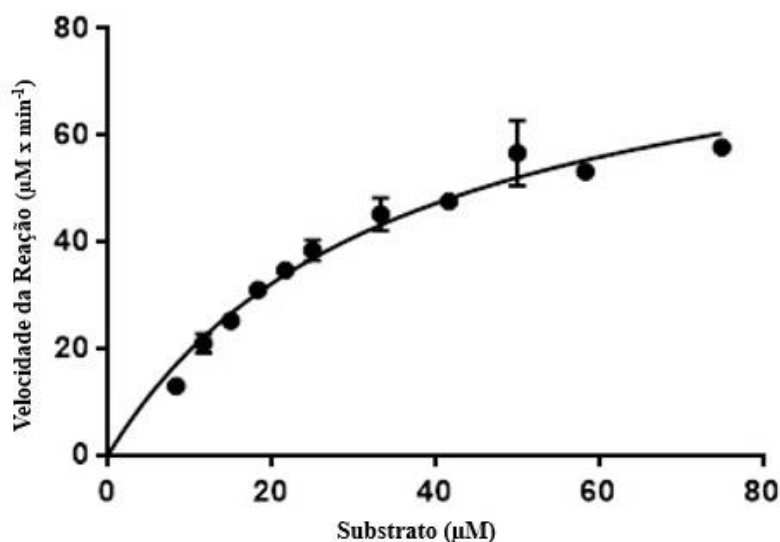


FIGURA 4. 14. Cinética de michaelis-mentem para a papaína imobilizada em partículas magnéticas

Ao comparar-se os valores de K_M da papaína livre em solução ($52,87 \pm 1,658 \mu\text{M}$) com a papaína imobilizada ($34,99 \pm 4,404 \mu\text{M}$), é possível afirmar que a interação do substrato com a P-MB foi mais efetiva do que com a papaína livre.

4.8. Ensaios de Inibição

4.8.1. Ligantes para o Ensaio de Inibição

Selecionou-se os ligantes (FIGURA 4.15) com valores de inibição (IC_{50} ou K_i) conhecidos de quatro cisteíno-proteases: Catepsinas B, L, V e a cruzaina (TABELA 4.3) para verificar suas inibições com a papaína.

Para validação do ensaio de *Ligand Fishing* também considerou-se ensaiar as atividades de inibição de mais outros dois compostos: a maltose (MM: 342,3 g/mol) como controle negativo; e o E-64, inibidor conhecido de cisteíno protease, como controle positivo.

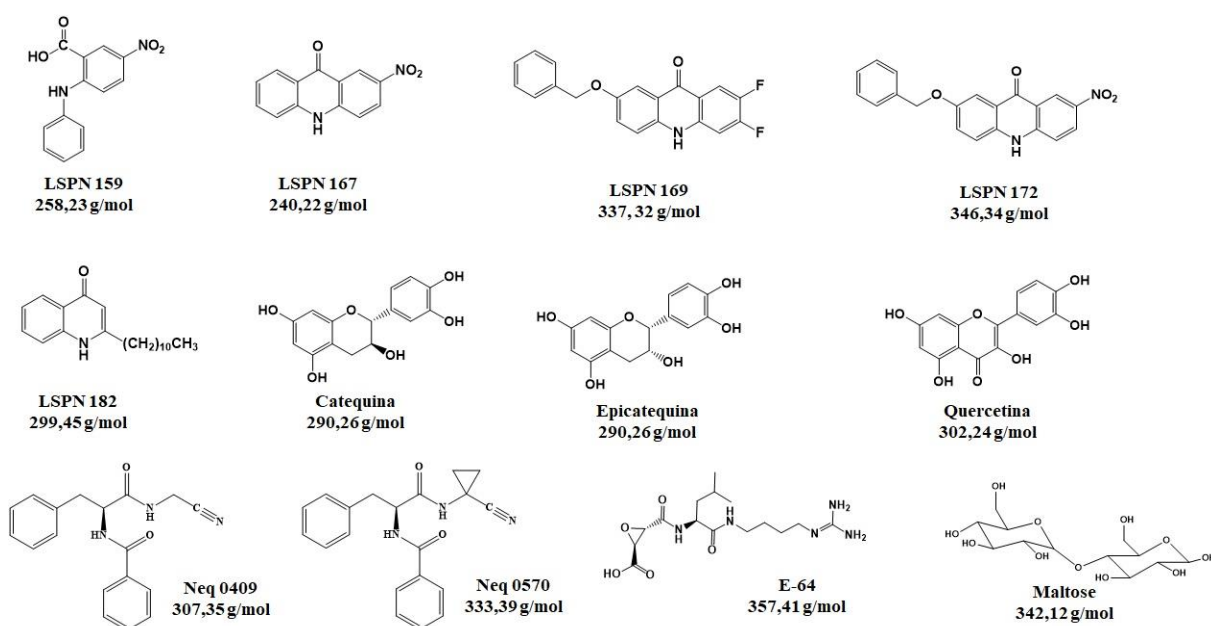


FIGURA 4. 15. Estruturas das moléculas selecionadas para o ensaio de inibição da papaína

TABELA 4. 3. Valores de IC₅₀ ou K_i dos inibidores de catepsinas B, L, V e cruzaina. Em acordo com as Referências 12, 93, 108.

Molécula Inibidora	Classe Química	Enzima Alvo	Valores de Inibição	
			IC 50 (µM)	Ki (µM)
LSPN 159	Ácido N-Arilantranílico	Catepsina L	4,3±0,2	-
		Catepsina V	10,0±0,8	-
LSPN 167	Acridona	Catepsina L	6,8±0,08	-
		Catepsina V	7,2±0,08	-
LSPN 169	Acridona	Catepsina L	1,5±0,1	-
		Catepsina V	4,9±0,3	-
LSPN 172	Acridona	Catepsina L	0,5±0,1	-
		Catepsina V	1,7±0,08	-
LSPN 182	Quinolinona	Catepsina L	2,9±0,3	-
		Catepsina V	9,9±0,2	-
Catequina	Flavonóide	Catepsina L	2,9±0,3	-
		Catepsina V	9,9±0,2	-
Epicatequina	Flavonóide	Catepsina L	2,9±0,3	-
		Catepsina V	9,9±0,2	-
Quercetina	Flavonóide	Catepsina B	33,8±3,0	-
		Catepsina L	180±16,4	-
Neq0409	Dipeptidil Nitrila	Cruzaína	1,89±0,11	0,453±0,032
Neq0570	Dipeptidil Nitrila	Cruzaína	-	0,252±0,019

Verificada a inibição da papaína por estes inibidores, eles foram utilizados para prova de conceito do ensaio de *Ligand Fishing* com a P-MB. E com o ensaio validado, executou-se a triagem de ligantes em extratos de produtos naturais conforme os objetivos desta dissertação.

4.8.2. LC-MS: Separação Produto e Ligantes

As mesmas condições cromatográficas e os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas para os ensaios de atividade foram adotadas para os ensaios de inibição em solução. Garantindo que as bandas cromatográficas formadas pelo produto da reação monitorado e os compostos em triagem de

inibição não coeluissem, e assim causassem interferências na ionização do AMC, originando falsos-positivos ou negativos.

4.8.3. Ensaio de inibição da papaína em solução

Os ensaios de inibição da papaína em solução foram feitos com os compostos apresentados na Tabela 4.3, e estruturas mostradas na Figura 4.15.

O intuito destes ensaios foi para verificar se estes compostos apresentavam atividade de inibição frente a papaína, e que os métodos de reação e análise por LC-MS/MS determinados eram capazes de reconhecer/demonstrar os resultados de inibição.

Para os ensaios considerou-se todas as condições de reação de atividade em solução definidas previamente.

A concentração de substrato foi 1,5 vezes o valor de K_M , aproximadamente, 79,0 μM , e a concentração dos compostos em triagem foi 3 vezes a concentração de substrato utilizada, sendo aproximadamente, 237 μM . Os experimentos foram executados em triplicata.

Na escolha da concentração do substrato considerou-se o efeito da concentração na identificação de inibidores com diferentes mecanismos de inibição. Inibidores competitivos são favorecidos a baixas concentrações de substrato uma vez que competem pelo mesmo sítio ativo, enquanto inibidores não competitivos são favorecidos por maiores concentrações de substrato uma vez que interagem tanto com a proteína quanto com o complexo enzima-substrato. Baseado nisto, a concentração de substrato igual a 1,5 vezes o valor de K_M foi selecionado a fim de que o ensaio pudesse reconhecer inibidores de diferentes mecanismos ⁵⁴.

A FIGURA 4.16 ilustra o procedimento experimental executado no ensaio de inibição em solução.

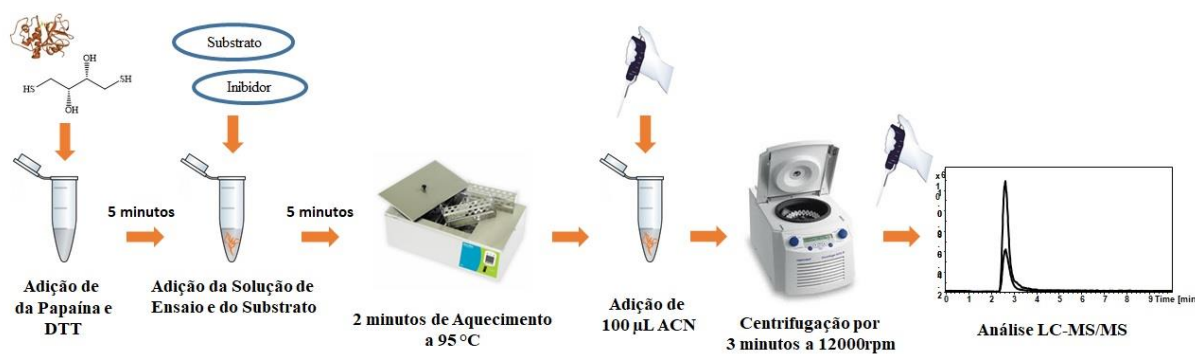


FIGURA 4. 16. Procedimento Experimental do Ensaio de Inibição em Solução. Proteína (estrutura da papaina da *Carica papaya*) disponível em: <<https://www.iycr2014.org/learn/crystallography365/articles/20140620>> Acessado em: 26. Jun. 2019.

O gráfico da figura 4.17 demonstra os resultados obtidos do ensaio de inibição da papaina em solução com os inibidores conhecidos de cisteíno proteases selecionadas.

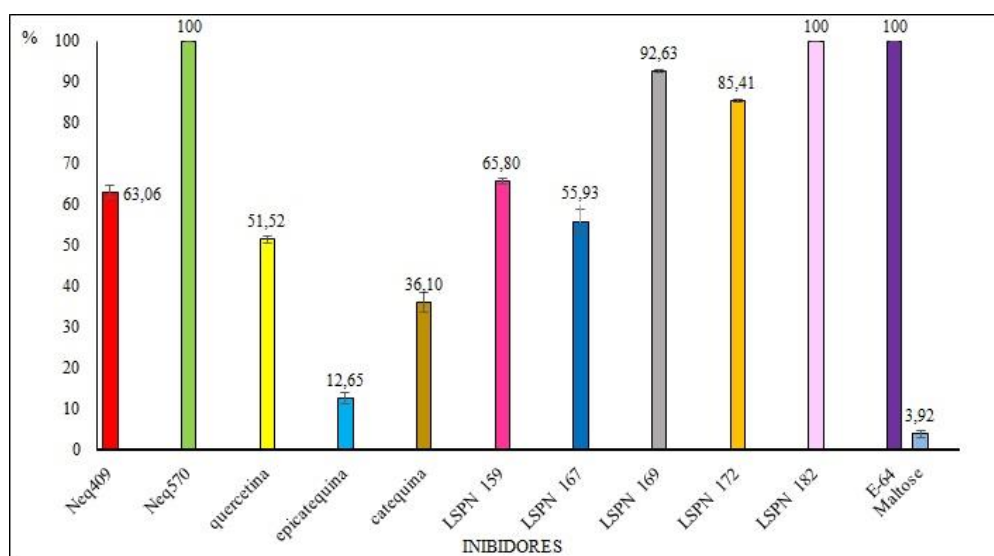


FIGURA 4. 17. Valores de inibição da papaina em solução com inibidores conhecidos de cisteíno proteases e a maltose, controle negativo. Sendo a concentração de papaina 2,5 mg/ml e dos inibidores 237 µM.

Os valores de inibição foram calculados da seguinte forma:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(\text{Concentração}_{\text{Ensaio de Atividade}} - \text{Concentração}_{\text{Ensaio de Inibição}}) \times 100}{\text{Concentração}_{\text{Ensaio de Atividade}}}$$

Sendo:

- Concentração do ensaio de atividade: concentração do produto formado na reação da enzima com 79 μM de substrato.
- Concentração do ensaio de Inibição: concentração do produto formado da reação de inibição

Os dados obtidos apresentam que os compostos Neq570, dipeptidil nitrila, e LSPN 182, quinolinona, ocasionaram 100% de inibição da papaína. As moléculas, LSPN 169 e 172 mostraram valores de 92,6 e 85,4 %, respectivamente. Neq409, quercetina, LSPN 159 e 167, inibiram com valores percentuais entre 50 a 65%. Somente a catequina e epicatequina tiveram valores de inibição abaixo dos 50%.

O composto E-64, inibidor irreversível, causou inibição de 100% na atividade enzimática da papaína, como esperado. E a inibição na presença da maltose foi de $3,92 \pm 0,78$ %, demonstrando a maltose ser um não-inibidor.

Além disso, os métodos de reação e análise mostraram-se satisfatórios reconhecendo a inibição da papaína com os compostos selecionados.

4.8.4. Ensaio de Inibição da Papaína Imobilizada em Partículas Magnéticas

Tendo determinado o percentual de inibição da papaína pela série de compostos da Tabela 4.3, o ensaio de inibição da P-MB foi também examinado.

A justificativa é que essa série de compostos seria usada para prova de conceito do ensaio de bioafinidade (*Ligand fishing*).

Para o ensaio, a concentração de substrato foi 1,5 vezes o K_M da P-MB, no valor de 52,5 μM , e a concentração dos inibidores foi 3 vezes este valor, 157,4 μM . Duas alíquotas individuais de 150 μL de P-MB foram utilizadas para o ensaio de inibição, sendo que cada uma foi usada em triplicata para o ensaio de cinco ligantes conforme descrito no procedimento 3.11.2. A FIGURA 4. 18 ilustra o procedimento experimental do ensaio de inibição da P-MB.

Previamente analisou-se a atividade da P-MB e em seguida executou-se os ensaios de inibição um seguido do outro, com etapas de lavagem entre eles. E ao final dos ensaios, novamente verificou-se a atividade da P-MB.

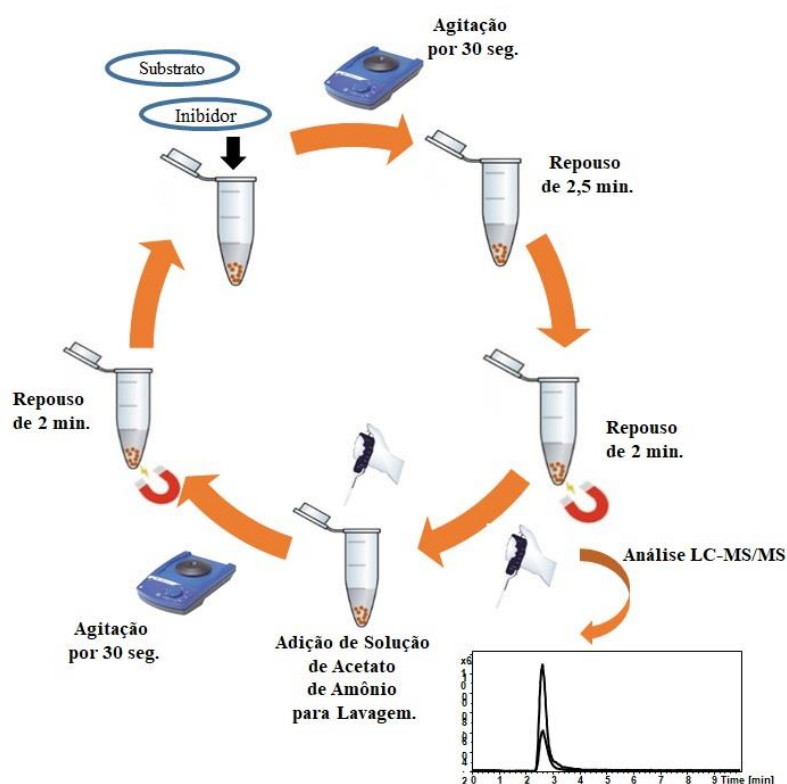


FIGURA 4. 18. Procedimento Experimental do Ensaio de Inibição da P-MB

Para esse estudo o E-64 foi desconsiderado, pois, sendo o E-64 um inibidor irreversível, este ocasionaria a inutilização do biorreator.

A FIGURA 4.19 apresenta um gráfico de barras com os valores obtidos do ensaio de inibição dos ligantes com a P-MB. Estes valores foram calculados conforme a fórmula apresentada em 4.8.3.

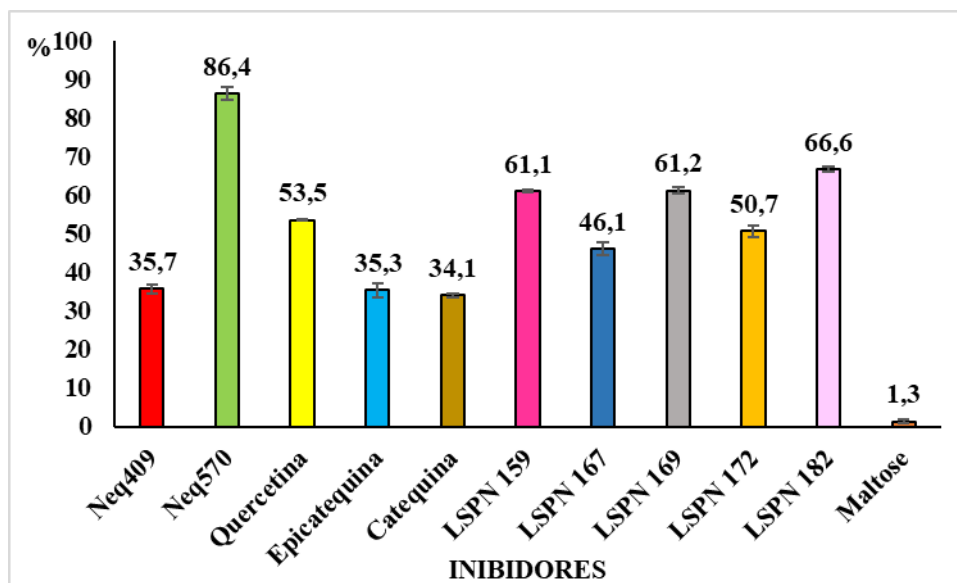


FIGURA 4. 19. Valores de inibição da P-MB com inibidores conhecidos de cisteína proteases e a maltose um não inibidor da papaína, sendo a concentração da P-MB 30,0 mg/mL e dos inibidores 157,5 μ M.

De acordo com os dados, os compostos Neq570 e LSPN 182 tiveram as maiores porcentagens de inibição. Neq409, epicatequina, catequina e o LSPN 167 apresentaram inibição abaixo de 50%. Quercetina, LSPN 159, 169 e 172 demonstraram valores percentuais que variaram de 50 a 61 %. Já a maltose não passou dos 1,5% de inibição.

As atividades de ambas as alíquotas utilizadas no ensaio foram verificadas após os ensaios de inibição, apresentando uma perda de 20% de suas capacidades catalíticas. Esta diminuição da atividade dos biorreatores pode ser explicada de duas formas: devido à perda de massa da P-MB, pois, no processo experimental do ensaio é possível observar P-MB depositada sobre as ponteiros

das pipetas utilizadas, e a presença de pequenas quantidades de partícula depositadas nas alíquotas reacionais após centrifugação. E também, há possibilidade que exista ligantes ligados no biorreator que não foram lixiviados.

Ao comparar-se os valores de inibição da papaína em solução com a P-MB verifica-se que a inibição dos ligantes em solução foi mais efetiva, com valores percentuais maiores. O gráfico de barras da FIGURA 4.20 apresenta os valores percentuais de inibição da papaína livre e imobilizada.

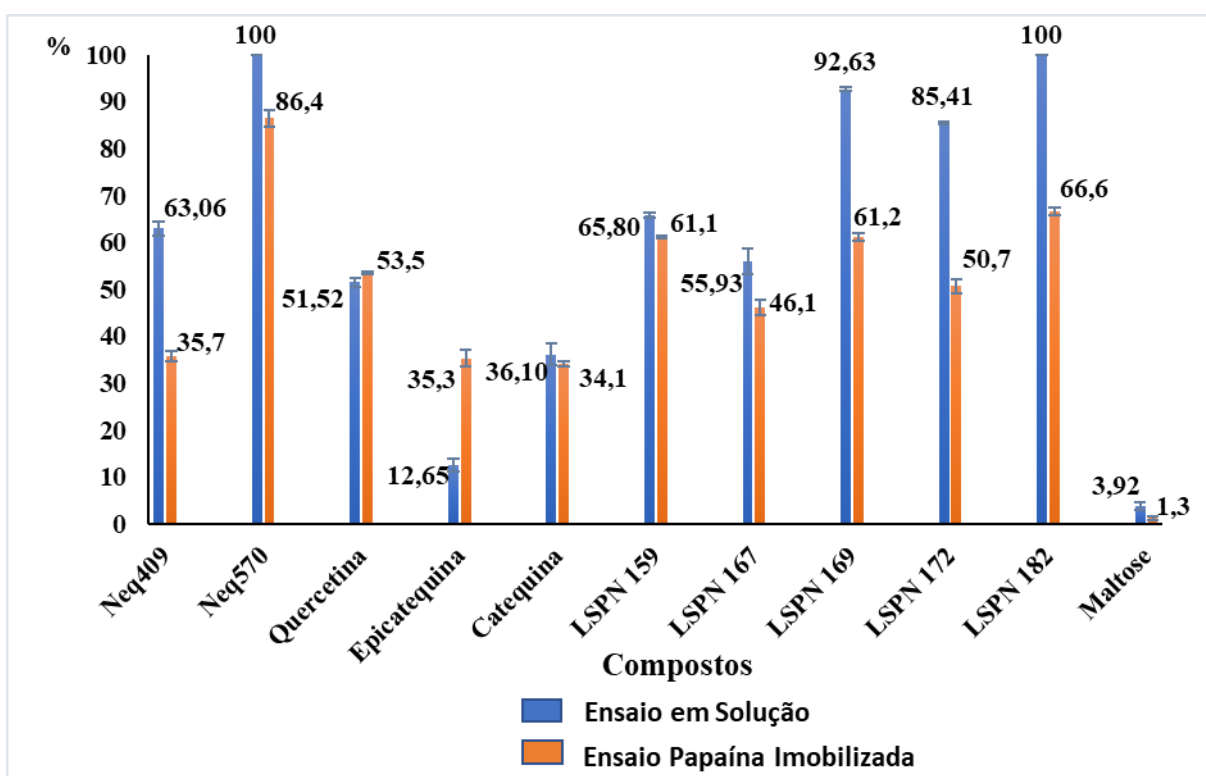


FIGURA 4. 20. Valores de inibição da papaína livre em solução e da papaína imobilizada em partículas magnéticas (P-MB).

A partir dos valores percentuais obtidos, é possível observar que a maioria dos compostos ensaiados apresentaram diminuição dos percentuais de inibição na P-MB comparando-se com a papaína em solução. Sendo uma diminuição percentual de 27,4% para o Neq409, 13,6% para o Neq570, 2% para catequina, 4,7% para o LSPN 159, 9,8 % para o LSPN 167, 31,4% para o LSPN 169, 34,7% para o LSPN 172, 33,4% para o LSPN 182.

Contudo, quercetina e epicatequina tiveram aumento nos valores de inibição em torno de 2% para quercetina e 22,6% para epicatequina. Este aumento nos valores dos ensaios de inibição da quercetina e epicatequina podem ser decorrentes de contaminação de outro inibidor. Pois, os experimentos de inibição de ambos flavonoides ocorreram após o ensaio do composto Neq570 (conforme Procedimento Experimental 3.11.2). O Neq570 foi o composto com maior inibição percentual, mostrando-se ser um inibidor mais efetivo do que a quercetina e epicatequina, sendo possível ainda estar presente no biorreator nos ensaios que foram sucedidos ao seu.

Por este motivo, os valores de inibição para quercetina e epicatequina tiveram aumento ao invés de diminuir conforme os valores de todos os outros ligantes.

A maltose manteve-se apresentando valores inexpressivos de inibição, com uma diminuição de 3,92% para 1,31%. Ou seja, sua característica de não-inibidor foi conservada.

As divergências nos valores de inibição da papaína livre em solução e da P-MB podem ser associadas a modulação do ensaio da P-MB. Enfatizam este argumento, as disparidades nos valores de diminuição de inibição entre os compostos com estruturas similares, por exemplo, as dipeptidil nitrilas, Neq409 e Neq570, respectivamente, com diferença percentual de inibição de 27,4 % e 13,6%. Em contrapartida, as acridonas LSPN 169 e 172, variaram em torno de 30% de diminuição. Ou seja, adversidades que podem estar associadas a modulação do ensaio.

Embora a IC_{50} tenha sido determinada para o lisinopril como inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA)¹⁰⁹ é preciso ressaltar que enzimas imobilizadas em partículas magnéticas não são comumente utilizadas para ensaios de inibição e, provavelmente o ensaio requeira otimização.

Contudo, interpretações mais precisas dos resultados obtidos só podem ser feitas a partir da caracterização do tipo de inibição de cada um dos compostos triados.

4.9. *Ligand Fishing*

4.9.1. Determinação do Tempo de Carregamento e Extração

No ensaio de *Ligand Fishing* há quatro etapas experimentais: a etapa de carregamento, seguida da etapa de lavagem, uma etapa de extração e novamente mais uma etapa de lavagem^{110, 109}.

Na etapa de carregamento ocorre a ligação, bioconjugação, entre ligantes e enzima imobilizada e adsorção de compostos não ligantes. E na etapa de extração, faz-se uso de uma solução com a capacidade de retirar os ligantes retidos no biorreator.

Estas etapas experimentais foram executadas em biorreatores com a enzima ativa e com a enzima desnaturada. Os biorreatores com enzima desnaturada, são chamados de controles, pois, são utilizados para verificar ligantes que se adsorvem ao biorreator, a fim de se evitar falsos-positivos no ensaio.

Com o intuito de se determinar o tempo mínimo necessário de interação e de extração dos ligantes do biorreator selecionou-se os compostos Neq409 e Neq570.

As condições do ensaio e os procedimentos experimentais são descritos no Procedimento Experimental 3.12. A FIGURA 4.21 ilustra as quatro etapas do procedimento experimental do ensaio de *Ligand Fishing*.

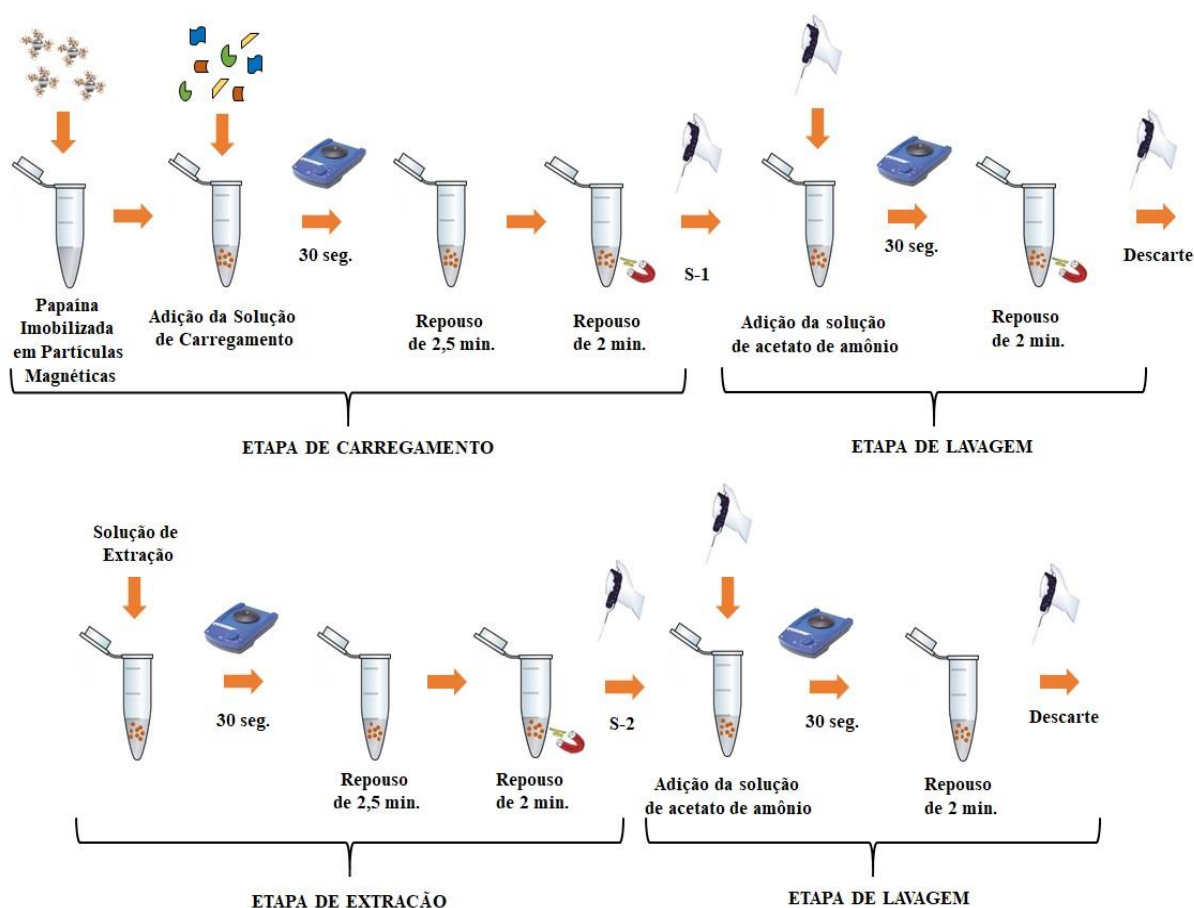


FIGURA 4. 21. Procedimento Experimental das Quatro Etapas do Ensaio de *Ligand Fishing*

Na etapa de carregamento os ligantes ficaram retidos na P-MB e os não ligantes permaneceram em solução. Nas etapas de lavagem foram removidos os ligantes com baixa afinidade pela P-MB, adsorvidos à papaína imobilizada ou que permaneceram retidos nos poros da partícula. E na etapa de Extração, com o auxílio de uma solução extratora, removeu-se os ligantes de elevada afinidade pela papaína, deslocando-os dos sítios de ligação para a solução.

Após o ensaio, foram feitas as análises das alíquotas S-1 e S-2 dos seis biorreatores, três controles e três ativos.

No ensaio com as P-MBs controles, identificou-se os analitos somente nas alíquotas S-1, não sendo verificados nas alíquotas S-2. Isto é, indicando que os analitos não se bioconjugam com a P-MBs desnaturadas.

Além disso, o processo de lavagem por três vezes entre a etapa de carregamento e extração pode ter retirado qualquer molécula que pudesse estar adsorvida ao biorreator e que poderia ser identificada na análise de S-2.

De maneira oposta, no ensaio com as P-MBs ativas não foi verificada a presença dos analitos nas alíquotas S-1, apenas em S-2. Ou seja, os analitos bioconjuram-se as P-MBs ativas.

A ausência dos analitos em S-2 das P-MBs controles e S-1 no ensaio das P-MBs ativas provavelmente foi devido à baixa concentração dos compostos utilizados, usou-se apenas 6 μM dos ligantes frente a concentração da P-MB de 30 mg/mL. Além disso, não foi verificado a sensibilidade do método de detecção.

Todos os tempos testados apresentaram as mesmas respostas para os ensaios.

Desta forma, diante dos resultados obtidos, é possível concluir que os tempos de 5, 10 e 30 minutos de carregamento e extração foram indiferentes. Pois, os valores das áreas dos analitos foram aproximadamente os mesmos para os tempos ensaiados, e assim optou-se pelo tempo de 5 minutos tanto para a etapa de carregamento quanto para a etapa de extração.

4.9.2. Prova de Conceito do Ensaio de *Ligand Fishing*

Para o ensaio de prova de conceito da P-MB os inibidores conhecidos de catepsinas e cruzaina aqui ensaiados como inibidores de papaína (Figura 4.15) foram utilizados em uma mistura como ligantes padrão e a maltose como um não ligante.

A partir dos resultados obtidos do ensaio de pesca dos biorreatores controle e ativo, é possível obter-se a razão de afinidade:

$$\text{Razão de Afinidade} = \frac{\text{Área}_{p-PM\text{ativa}}}{\text{Área}_{p-PM\text{controle}}}$$

Razão de afinidade igual a 1 é desconsiderado pois significa que o composto apresenta igual retenção nos biorreatores ativos e inativos.

Para os compostos que não adsorvem à partícula controle, não é possível calcular a razão de atividade, sendo considerada uma afinidade de 100% entre ligantes e enzima imobilizada.

As condições do ensaio e os procedimentos experimentais são descritos no Procedimento Experimental 3.3 e ilustrados na FIGURA 4.21.

Dois conjuntos de P-MB, uma controle e uma ativa, foram utilizados a fim de se analisar a capacidade de extração de duas soluções:

- Método de Extração 1: utilizou-se 300 μL de MeOH,
- Método de Extração 2: utilizou-se 240 μL de solução acetato de amônio 2,5 Mm pH 4,0 e 20% de MeOH.

A aquisição de dados no espectrômetro de massas ocorreu no modo de varredura total de íons, na faixa de $[\text{M}-\text{H}]^+$ 150 a 500 m/z . A figura 4.22 apresenta o cromatograma de íons extraídos dos ligantes presentes na S-2 da P-MB ativa.

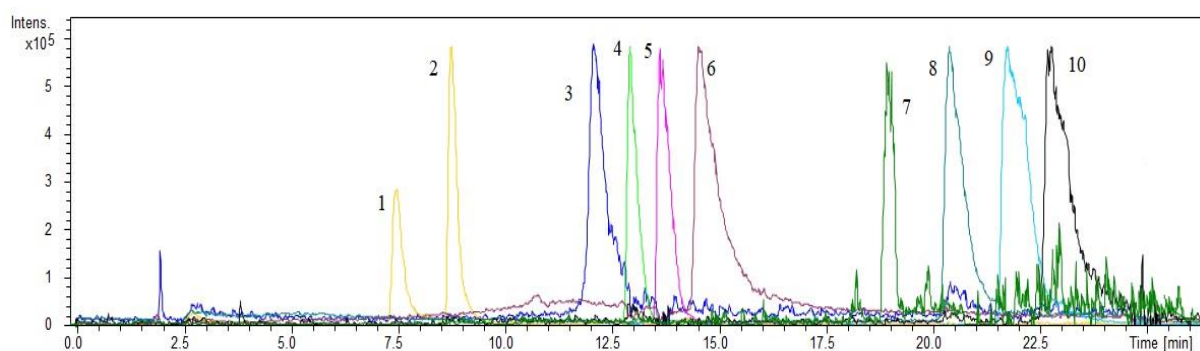


FIGURA 4. 22. Cromatograma de íon extraído correspondentes a: 1. m/z 291: catequina; 2. m/z 291: epicatequina; 3. m/z 303: quercetina; 4. m/z 308: Neq409; 5. m/z 334: Neq570; 6. m/z 241: LSPN 167; 7. m/z 347: LSPN 172; 8. m/z 259: LSPN 159; 9. m/z 338: LSPN 169 e 10. m/z 300: LSPN 182.

No método de extração com 100% MeOH não se obteve sucesso, pois, na solução de extração da P-MB ativa foi verificada apenas a presença dos ligantes Neq409 e Neq570. Ou, seja, a solução de extração não foi capaz de remover os outros ligantes do biorreator.

Todavia, o método de extração 2 apresentou resultados efetivos. Seis ligantes (Neq409, Neq570, epicatequina, catequina, LSPN 159 e LSPN 172) foram identificados apenas nas soluções de extração das P-MBs ativas, demonstrando grande afinidade pelo biorreator e baixa adsorção no biorreator controle, não identificadas pelo método de detecção. Já os compostos: quercetina, LSPN 167, LSPN 169 e LSPN 182 foram analisados nas soluções de extração das P-MBs controle e ativas, obtendo-se razões de afinidade de 2,2; 2,9; 3,1 e 3,5 respectivamente, conforme FIGURA 4.23.

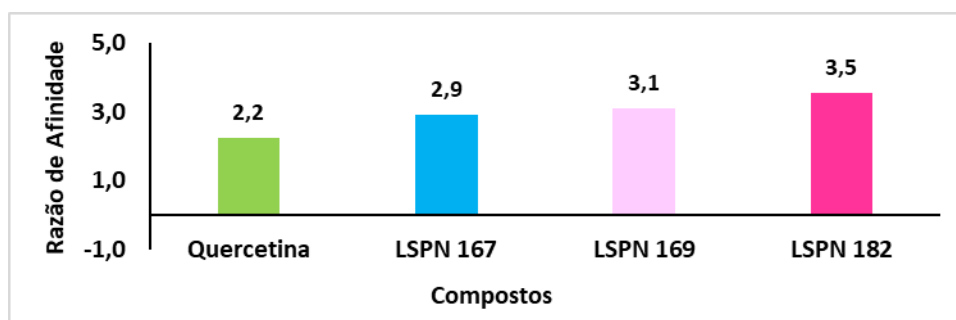


FIGURA 4. 23. Compostos ensaiados e suas razões de afinidade.

Todos os compostos referenciados como ligantes padrões apresentaram afinidade pela P-MB, bioconjugando-se. Contudo, as diferenças de afinidades exibidas evidenciam que a capacidade de “pesca” está relacionada com a afinidade do ligante pela biomolécula alvo.

A maltose não foi verificada nas alíquotas de S-2 da P-MB controle e ativa, isto é, não foi pescada pelos biorreatores. Sua presença foi constatada apenas em S-1, mostrando sua eficiência como um padrão não-ligante.

A ausência de alguns ligantes padrões em S-1 e da maltose em S-2 pode ser explicada como ocorreu em 4.9.1.

Os ligantes estando em baixas concentrações foram completamente bioconjugados devido suas significativas afinidades pela P-MB, sendo assim, verificados apenas em S-2 após a etapa de extração.

Já a maltose um não-ligante, apresentou um valor de área significativo em S-1 tanto da P-MB ativa quanto controle. E sendo o ensaio de lavagem executado por três vezes, possíveis moléculas adsorvidas foram retiradas do biorreator. Por isso, não se verificou a presença do não-ligante nas alíquotas S-2.

Portanto, levando em consideração os resultados obtidos para os inibidores de catepsinas e da cruzaina aqui avaliados, que, em geral, demonstraram capacidade de inibição em ensaios com a papaína e também efetivas afinidades no ensaio de *Ligand Fishing*, é possível afirmar que a papaína imobilizada pode ser utilizada como um modelo para prospecção de ligantes de cisteíno proteases.

4.9.3. Ensaio de *Ligand Fishing* com Extratos do caule de *Melia azedarach*

O Ensaio de *Ligand Fishing* é empregado na triagem ou no isolamento de compostos ativos em misturas complexas, tal como extratos de produtos naturais. Este ensaio elimina a etapa tradicional com colunas abertas sobre bancada, processo árduo e demorado, para o isolamento dos compostos ⁸⁷.

Produtos naturais tem um papel importante e de longa data no desenvolvimento de novos medicamentos. Segundo dados do FDA, 2014 ¹¹¹, nos últimos anos do total de novos agentes terapêuticos aprovados, 31 % foram decorrentes de origem de produtos naturais ou derivados de produtos naturais.

A planta *Melia azedarach* é conhecida popularmente como cinamomo, santa-bárbara, jasmim-de-soldado ou para-raios ¹¹². Nativa da Ásia tropical, mas introduzida e naturalizada nas Filipinas, Estados Unidos da América, Brasil, Argentina e muitos países africanos e árabes é uma planta de amplo uso medicinal ¹¹³.

Suas folhas, caule, cascas e raízes são destacados com potencial anti-inflamatório, anticancerígeno, antibactericida, entre outros ^{114,115,116,113}.

O extrato etanólico do caule de *Melia azedarach*, foi utilizado no ensaio de *Ligand Fishing* com a P-MB, a fim de verificar a habilidade de captura seletiva do alvo imobilizado por ligantes em uma mistura complexa.

Os procedimentos experimentais foram descritos em 3.13 e as condições LC-MS/MS foram executas conforme Procedimento Experimental 3.14.

Considerou-se um *threshold* de intensidade de 10^5 para classificação dos íons presentes na solução da etapa de extração. E diante deste parâmetro estabelecido, identificou-se 11 íons de maior intensidade. Seis ligantes tiveram razões de afinidade calculadas, considerando-se suas retenções na P-MB controle e ativa. E cinco deles não foram identificados na solução de S-2 da P-MB controle, extraídos apenas na solução S-2 do biorreator ativo. Os íons dos ligantes bioconjugados, seus tempos de retenção e suas razões de afinidade são apresentados na TABELA 4.4.

TABELA 4. 4. Íons dos ligantes identificados, seus tempos de retenção e suas razões de afinidade do ensaio de *Ligand Fishing* da papaína imobilizada em partículas magnéticas com o extrato etanólico do caule de *Melia azedarach*.

<i>Ligantes</i> (<i>m/z</i>)	Tempo de Retenção (Rt)	Razão de Afinidade
237	23,3	1,5
242	16,7	1,6
267	22,5	2,2
274	19,9	**
289	22,5	1,8
291	9,8	**
291	11,8	**
299	17,2	3,6
318	20,0	15,0
511	22,0	**
751	4,4	**

**Os ligantes que não apresentam valores de razão de afinidade não foram identificados na S-2 da P-MB controle.

Os cromatogramas de íons extraídos da análise das soluções de extração da P-MB controle e ativa são apresentados na FIGURA 4.24.

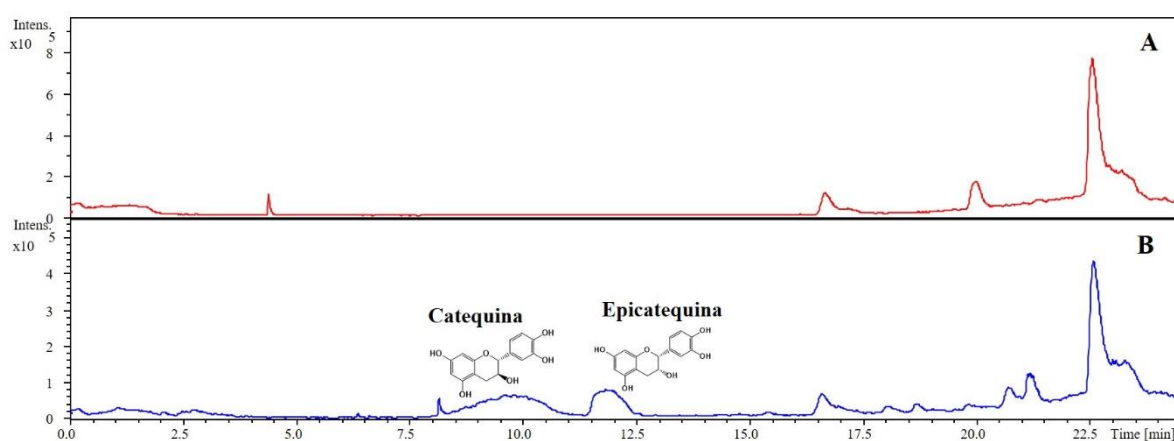


FIGURA 4. 24. A) Cromatograma de íons totais dos ligantes presentes na solução de extração da P-MB controle; B) Cromatograma de íons totais dos ligantes presentes na solução de extração da P-MB ativa.

Analisando os resultados obtidos, os íons m/z 274, 291, 511 e 751 foram identificados somente nas soluções de extração da P-MB ativa. Os íons m/z 237, 242, 267, 289 e 299 tiveram razões de afinidade de 1,5 a 3,6, e o íon 318 destaca-se com uma razão de afinidade em torno de 15.

O Ensaio realizado de prova de conceito em 4.9.2 fez uso de dois padrões de ligantes com massas de 290,0 g/mol, sendo eles, a catequina e a epicatequina, flavonoides comuns em extratos de produtos naturais^{117,118,119}.

Em modo positivo no espectrômetro de massas de baixa resolução, estes compostos apresentam íons 291 m/z , íons que foram verificados na análise do extrato ensaiado. A fim de confirmar se esses íons correspondiam a catequina e epicatequina, a solução de extrato da P-MB ativa, foi analisada em um espectrômetro de massas de alta resolução, Q-ToF (conforme procedimento 3.14), para determinação de suas massas exatas.

A análise apresentou duas bandas cromatográficas características para a catequina e para a epicatequina, íons $(M-H)^-$ 289,0728 m/z . Epímeros com massa exata de 290,0728.

Os outros ligantes pescados terão suas estruturas moleculares posteriormente determinadas.

Portanto, o ensaio de *Ligand Fishing* da P-MB com extratos de produtos naturais mostrou-se eficiente. A P-MB não só bioconjugou-se com novos ligantes, mas também pescou ligantes com afinidades conhecidas presentes em uma mistura complexa.

5. Conclusão

As condições reacionais determinadas e os parâmetros de análise por LC-MS foram eficazes para os ensaios de verificação da atividade da enzima, determinação dos seus parâmetros cinéticos e dos valores calculados de inibição e interação de ligantes; apresentando aumento da seletividade e sensibilidade se comparado com os ensaios clássicos em solução. Além disso, diante desses novos parâmetros determinados é importante destacar que manteve suas características proteolíticas correspondentes e identificadas.

A imobilização da papaína foi efetiva, obtendo um valor de K_M da partícula menor do que da enzima em solução, isto é, havendo uma maior interação entre enzima e substrato. Ademais, a imobilização da enzima apresentou vantagens quando comparada com a enzima livre, tais como: estabilidade da enzima diante variações de temperatura, solventes orgânicos e capacidade de reutilização.

Os inibidores das catepsinas B, L, V e da cruzaina selecionados demonstraram inibição com a papaína. Em solução somente os compostos catequina e epicatequina apresentaram valores de inibição abaixo de 50%, e na P-MB, os valores de inibição variaram de 30 a 80%. Devendo as divergências encontradas nesses ensaios decorrentes a modulação experimental.

No ensaio de prova de conceito a papaína imobilizada em partículas magnéticas reconheceu ligantes e não-ligante padrões. Além disso, o ensaio de *Ligand Fishing* da P-MB com extratos de produtos naturais mostrou-se eficiente, sendo capaz de identificar ligantes conhecidos e uma série de ligantes que precisam ser caracterizados quimicamente, presentes nessas misturas complexas. Evidenciando assim, a eficácia do modelo proposto.

Desta forma conclui-se que os biorreatores de papaína imobilizada em partículas magnéticas apresentam-se como uma excelente alternativa, com

alta estabilidade e baixo custo, como modelo para ensaios de triagem de ligantes de cisteína proteases.

Referências

1. GUIDO, R. V.C; ANDRICOPULO; A. D. Modelagem molecular de fármacos. *Rev. Process. Químicos* **2** (4) :24–36, 2008.
2. GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO; A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Curr. Med. Chem.* **15** (1) :37–46, 2008.
3. GUIDO, R. V.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA; G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. Avançados* **24** (70) :81–98, 2010.
4. GASHAW, I.; ELLINGHAUS, P.; SOMMER, A.; ASADULLAH; K. What makes a good drug target? *Drug Discov. Today* **16** (23–24) :1037–1043, 2011.
5. DREWS; J. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science (80-.)*. **287** (5460) :1960–1964, 2000.
6. SANTOS, R.; URSU, O.; GAULTON, A.; BENTO, A. P.; DONADI, R. S.; BOLOGA, C. G.; KARLSSON, A.; LAZIKANI, B. A.; HERSEY, A.; OPREA, T. I.; OVERINGTON; J. P. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16** (1) :19–34, 2017.
7. SAJID, M.; ROBERTSON, S. A.; BRINEN, L. S.; MCKERROW; J. H. Cruzain: the path from target validation to the clinic. in *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms* ed. ROBINSON, M.; DALTON, J. P.) :100–115, (Landes Bioscience e Springer Science, 2011).
8. EAKIN, A. E.; MILLS, A. A.; HARTH, G.; MCKERROW, J. H.; CRAIK; C. S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **267** (11) :7411–7420, 1992.
9. EAKIN, A. E.; MCGRATH, M. E.; MCKERROW, J. H.; FLETTERICK, R. J.; CRAIK; C. S. Production of crystallizable cruzain, the major

- cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **268** (9) :6115–6118, 1993.
10. MARTINEZ-MAYORGA, K.; BYLER, K. G.; RAMIREZ-HERNANDEZ, A. I.; TERRAZAS-ALVARES; D. E. Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. *Drug Discov. Today* **20** (7) :890–898, 2015.
 11. PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA; I. Chagas disease. *J. Am. Acad. Physician Assist.* **391** (10115) :82–94, 2018.
 12. OROSZCO; E. V. M. Síntese e Relações Estrutura-Atividade de Dipeptidil-nitrilas Inibidoras da Cruzaína. 2014. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biologia) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
 13. CIANNI, L.; SARTORI, G.; ROSINI, F.; VITA, D.; PIRES, G.; LOPES, B. R.; LEITÃO, A.; BURTOLOSO, A. C. B.; MONTANARI; C. A. Leveraging the cruzain S3 subsite to increase affinity for reversible covalent inhibitors. *Bioorg. Chem.* **79** :285–292, 2018.
 14. PORCAL, W.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, M.; AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CHIDICHIMO, A.; CAZZULO, J. J.; CAMPILLO, N. E.; PAEZ, J. A.; CASTRO, A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DAVIES, C.; BASOMBRÍO, M. A.; GINZÁLEZ, M.; CERECETTO; H. In vivo anti-chagas vinylthio-, vinylsulfinyl-, and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives. *J. Med. Chem.* **50** (24) :6004–6015, 2007.
 15. CASTRO, J. A.; MECCA, M. M.; BARTEL; L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.* **25** (8) :471–479, 2006.
 16. NAGEL; R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mutat. Res. Lett.* **191** (1) :17–20, 1987.
 17. OTTO, H.; SCHIRMEISTER; T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* **97** (1) :133–171, 1997.

18. TURK, V.; STOKA, V.; VASILJEVA, O.; RENKO, M.; SUN, T.; TURK, B.; TURK; D. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* **1824** (1) :68–88, 2012.
19. ROSSI, A.; DEVERAUX, Q.; TURK, B.; SALI; A. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol. Chem.* **385** (5) :363–372, 2004.
20. WILDER, C. L.; PARK, K.; KEEGAN, P. M.; PLATT; M. O. Manipulating substrate and pH in zymography protocols selectively distinguishes cathepsins K, L, S and V activity in cells and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **516** (1) :52–57, 2011.
21. RUAN, H.; HAO, S.; YOUNG, P.; ZHANG; H. Targeting Cathepsin B for Cancer Therapies. *Horiz. Cancer Res.* **2** (56) :23–40, 2015.
22. KIRSCHKE; H. Cathepsin H. in *Handbook of Proteolytic Enzymes* ed. RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G.) **2** :1795–1800, (ACADEMIC PRESS, 2013).
23. BARRET, A.J.; KIRSCHKE; H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol.* **80** :535–561, 1981.
24. PATEL, S.; HOMAEI, A.; EL-SEEDI, H. R.; AKHTAR; N. Cathepsins: proteases that are vital for survival but can also be fatal. *Biomed. Pharmacother.* **105** :526–532, 2018.
25. KRAMER, L.; TURK, D.; TURK; B. The future of cysteine cathepsins in disease management. *Trends Pharmacol. Sci.* **38** (10) :873–898, (2017).
26. BROMME; D. Papain-like Cysteine Proteases. in *Current Protocols in Protein Science* :21.2.1-14, 2001.
27. MONTI, R.; BASILIO, C. A.; TREVISAN, H. C.; CONTIERO; J. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **43** (5) :501–507, 2000.
28. ALPAY, P.; UYGUN; D. A. Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **111** :56–63, 2015.

29. SANGEETHA, K.; ABRAHAM; T. E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **38** (3–6) :171–177, 2006.
30. CAPUCHO; H. C. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
31. BALLS, A. K.; LINEWEAVER; H. Crystalline papain. *Science* (80):379, 1937.
32. DRENTH, L.; JANSONIUS, J. N.; KOEKOEK, R.; WOLTERS; B. G. The structure of papain. *Adv. Protein Chem.* **25** (C) :79–115, 1971.
33. MÉNARD, R.; CARMONA, E.; PLOUFFE, C.; BROMME, D.; KONISHI, Y.; LEFEBVRE, J.; STORER; A. C. The specificity of the S1' subsite of cysteine proteases. *FEBS Lett.* **328** (1–2) :107–110, 1993.
34. Schechter, I. and Berger; A. On the size of the active in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2** (2) :157–162, 1967.
35. SZABÓ, A.; KOTORMÁN, M.; LACZKÓ, I.; SIMON; L. M. Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **41** (1–2) :43–48, 2006.
36. STORER, A. C; MÉNARD; R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* **244** :486–500, 1994.
37. RAWLINGS, N. D.; BARRET; A. J. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* **244** :461–486, 1994.
38. AMRI, E.; MAMBOYA; F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **8** (2) :99–104, 2012.
39. SEVERINO; R. P. Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas. 2008. 248 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) . Centro de Ciências Exatas e de Tecnológica, Universidade Federal de São Carlos.
40. White; R. E. High-Throughput Screening in Drug Metabolism and

- Pharmacokinetic Support of Drug Discovery. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40** :133–57, 2015.
41. MORPHY, R.; RANKOVIC; Z. Designing multiple ligands – medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr. Pharm. Des.* **15** (6) :587–600, 2009.
 42. XIE, L.; LI, J.; XIE, L.; BOURNE; P. E. Drug discovery using chemical systems biology: Identification of the protein-ligand binding network to explain the side effects of CETP inhibitors. *PLoS Comput. Biol.* **5** (5) :1–13, 2009.
 43. MANOHARAN, G. B.; KOPRA, K.; ESKONEM, V.; HARMA, H.; ABANKWA; D. High-throughput amenable fluorescence-assays to screen for calmodulin-inhibitors. *Anal. Biochem.* **572** :25–32, 2019.
 44. LIM; S. P. Dengue drug discovery: Progress, challenges and outlook. *Antiviral Res.* **163** :156–178, 2019.
 45. HOUSTON, J. G.; BANKS; M. The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8** :734–740, 1997.
 46. ZHANG, J.; CHUNG; T. D. Y. . & OLDENBURG; K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **4** (2) :67–73, 1999.
 47. KATSUNO, K.; BURROWS, J. N.; DUNCAN, K.; HUIJSDUIJNEN, R. H. V.; KANEKO, T.; KITA, K.; MOWBRAY, C. E.; SCHMATZ, D.; WARNER, P.; SLINGSBY; B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14** (11) :751–758, 2015.
 48. KESERU, G. M.; MAKARA; G. M. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov. Today* **11** (15–16) :741–748, 2006.
 49. HEVENER, K. E.; PESAVENTO, R.; REN, J.; LEE, H.; RATIA, K.; JOHNSON; M. E. Hit-to-lead: hit validation and assessment. *Methods*

- Enzymol.* **610** :265–309, 2018.
50. BLEICHER, K. H.; BOHM, H.; MULLER, K.; ALANINE; A. I. Hit and lead generation: Beyond high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2** (5) :369–378, 2003.
 51. MACARRON, R.; BANKS, M. N.; BOJANIC, D.; BURNS, D. J.; CIROVIC, D. A.; GARYANTES, T.; GREEN, D. V. S.; HERTZBERG, R. P.; JANZEN, W. P.; PASLAY, J. W.; SCHOPFER, U.; SITTAMPALAM; S. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10** (3) :188–195, 2011.
 52. BURBAUM; J. J. Miniaturization technologies in HTS: How fast, how small, how soon? *Drug Discov. Today* **3** (7) :313–322, 1998.
 53. NELSON, D. L.; COX; M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* (Artmed, 214AD).
 54. COPELAND; R. A. *EVALUATION OF ENZYME INHIBITORS IN DRUG DISCOVERY A Guide for Medicinal Chemists Pharmacologists.* (JOHN WILEY & SONS, 2013).
 55. BARRET, A. J.; KEMHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAI, M.; HANADA; K. L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **201** (1) :189–98, 1982.
 56. MARIA HELENA COMERLATO. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS NO SUPORTE CRISOTILA. (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - SP, 1995).
 57. TOSA, T.; MORI, T.; FUSE, N.; CHIBATA; I. Studies on continuous enzyme reactions. *Agric. Biol. Chem.* **33** (7) :1052–1069, (1969).
 58. GUISAN; J. M. *Immobilization of Enzymes. Immobilization of Enzymes and Cells. Methods* **1**, 2006.
 59. BERTUCCI, C.; BARTOLINI, M.; GOTTI, V.; ANDRISANO; V. Drug

- affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **797** (1–2) :111–129, 2003.
60. WUBSHET, S. G.; LIU, B.; KONGSTAD, K. T.; BOCKER, U.; PETERSON, M. J.; LI, T.; WANG, J.; STAERK; D. Combined magnetic ligand fishing and high-resolution inhibition profiling for identification of α -glucosidase inhibitory ligands: A new screening approach based on complimentary inhibition and affinity profiles. *Talanta*, 2019.
61. ZHUO, R.; LIU, H.; LIU, N.; WANG; Y. Ligand fishing: a remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products. *Molecules* **21** (11) :1–16, 2016.
62. VANZOLINI, K. L.; AINSWORTH, S.; BRUYNEEL, B.; HERZIG, V.; SERAUS, M. G. L.; SOMSEN, G. W.; CASEWELL, N. R.; CASS, Q. B.; KOOL; J. Rapid ligand fishing for identification of acetylcholinesterase-binding peptides in snake venom reveals new properties of dendrotoxins. *Toxicon* **152** :1–8, 2018.
63. HE, J.; WU, M.; FENG, X.; SHAO, X.; CAI; W. Immobilization of papain on nanoporous silica. *R. Soc. Chem. Adv.* **4** (26) :13304–13312, 2014.
64. WANG; A. et al. Ag-induced efficient immobilization of papain on silica spheres. *Chinese J. Chem. Eng.* **16** (4) :612–619, 2008.
65. Zhou; L. et al. Immobilization of papain in biosilica matrix and its catalytic property. *Chinese J. Chem. Eng.* **21** (6) :670–675, 2013.
66. LI, L.; XU, H.; ZHAO, X.; HAN, J.; LI; T. Conformation and stability of three different enzymes adsorbed onto SiO₂ Nanoparticles nanoparticles. in *International Conference on New Technology of Agricultural* :925–930, 2011.
67. MOSAFA, L.; MOGHADAM, M.; SHAHEDI; M. Papain enzyme supported on magnetic nanoparticles: Preparation, characterization and application in the fruit juice clarification. *Chinese J. Catal.* **34** (10) :1897–

- 1904, 2013.
68. HU, T.; CHENG, J.; ZHNAG, B.; LOU, W.; ZONG; M. Immobilization of alkaline protease on amino-functionalized magnetic nanoparticles and its efficient use for preparation of oat polypeptides. *Ind. Eng. Chem. Res.* **54** (17) :4689–4698, 2015.
 69. VANZOLINI, K. L.; JIANG, Z.; ZHANG, X.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B.; MOADDEL; R. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: A new tool for plant extract ligand screening. *Talanta* **116** :647–652, 2013.
 70. MA, J.; ZHANG, L.; LIANG, Z.; ZHANG, W.; ZHANG; Y. Monolith-based immobilized enzyme reactors: Recent developments and applications for proteome analysis. *J. Sep. Sci.* **30** (17) :3050–3059, 2007.
 71. AL-QODAH, Z.; AL-SHANNAG, M.; AL-BUSOUL, M.; PENCHEV, I.; ORFALI; W. Immobilized enzymes bioreactors utilizing a magnetic field: A review. *Biochem. Eng. J.* **121** :94–106, 2017.
 72. BILAL, M.; ZHAO, Y.; RASHEED, T.; IQBAL; H. M. N. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **120** :2530–2544, 2018.
 73. NADAR, S. S.; RATHOD; V. K. Magnetic-metal organic framework (magnetic-MOF): A novel platform for enzyme immobilization and nanozyme applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **120** :2293–2302, 2018.
 74. MORAES, M. C.; CARDOSO, C. L.; SEIDL, C.; MOADDEL, R.; CASS; Q. B. Targeting Anti-Cancer Active Compounds: Affinity-Based Chromatographic Assays. *Curr. Pharm. Des.* **22** (39) :5976–5987, 2016.
 75. ROBINSON, P. J.; DUNNILL, P.; LILLY; M. D. The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **15** (3) :603–606, 1973.
 76. HENRIQUES, R. O.; BORK, J. A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.;

- GUIBAN, J. M.; FURIGO, A.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B. C. Co-immobilization of lipases and B-D-galactosidase onto magnetic nanoparticle supports: Biochemical characterization. *Mol. Catal.* **453** :12–21, 2018.
77. MOADDEL, R.; MARSZATT, P.; BIGHI, F.; YANG, Q.; DUAN, X.; WAINER, W. Automated ligand fishing using human serum albumin-coated magnetic beads. *Anal. Chem.* **79** (14) :5414–5417, 2007.
78. VANZOLINI, K. L.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; MOADDEL, R.; CASS, Q. B. Acetylcholinesterase immobilized on modified magnetic beads as a tool for screening a compound library. *Microchim. Acta* **182** (13–14) :2209–2213, 2015.
79. SANGHVI, M.; MOADDEL, R.; WAINER, I. W. The development and characterization of protein-based stationary phases for studying drug – protein and protein – protein interactions. *J. Chromatogr. A* **1218** (49) :8791–8798, 2011.
80. DENG, X.; SHI, S.; LI, S.; YANG, T. Magnetic ligand fishing combination with high-performance liquid chromatography – diode array detector – mass spectrometry to screen and characterize cyclooxygenase-2 inhibitors from green tea. *J. Chromatogr. B* **973** :55–60, 2014.
81. CHEN, L.; WANG, X.; LIU, Y.; DI, X. Dual-target screening of bioactive components from traditional Chinese medicines by hollow fiber-based ligand fishing combined with liquid chromatography – mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **143** :269–276, 2017.
82. QING, L.; XUE, Y.; ZHENG, Y.; XIONG, J.; LIAO, X.; DING, L.; LI, B.; LIU, Y. Ligand fishing from *Dioscorea nipponica* extract using human serum albumin functionalized magnetic nanoparticles. *J. Chromatogr. A* **1217** (28) :4663–4668, 2010.
83. MORAES, M. C.; VANZOLINI, K. L.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. New trends in LC protein ligand screening. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87**

- :155–166, 2014.
84. XUE, X.; LI, L.; CHEN, X.; HU, S.; BAI, X. Hollow fiber cell fishing with high performance liquid chromatography for screening bioactive compounds from traditional Chinese medicines. *J. Chromatogr. A* **1280** :75–83, 2013.
 85. MARSZALL, M. P.; MOADDEL, R.; KOLE, S.; GANDHARI, M.; BERNIER, M.; WAINER, I. W. Ligand and Protein Fishing with Heat Shock Protein 90 Coated Magnetic Beads. *Anal. Chem.* **80** (19) :7571–7575, 2008.
 86. ZHAO, Y.; WANG, L.; LUO, S.; WANG, Q.; MOADDEL, R.; ZHANG, T.; JIANG, Z. Magnetic beads-based neuraminidase enzyme microreactor as a drug discovery tool for screening inhibitors from compound libraries and fishing ligands from natural products. *J. Chromatogr. A* **1568** :123–130, 2018.
 87. XU, L.; TANG, C.; LI, X.; YANG, H.; MAO, R.; HE, J.; LI, W.; LIU, J.; LI, Y.; SHI, S.; XIAO, X.; WANG, X. Ligand fishing with cellular membrane-coated cellulose filter paper : a new method for screening of potential active compounds from natural products. *Anal. Bioanal. Chem.* :1–12, 2019.
 88. LIYA, Z.; CUI, W.; YANJUN, J.; JING, G. Immobilization of papain in biosilica matrix and its catalytic property. *Chinese J. Chem. Eng.* **21** (6) :670–675, 2013.
 89. SAHOO, B.; SAHU, S. K.; BHATTACHARYA, D.; DHARA, D.; PRAMANIK, P. A novel approach for efficient immobilization and stabilization of papain on magnetic gold nanocomposites. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **101** :280–289, 2013.
 90. Atacan, K.; Özacar, M. & Özacar, M. Investigation of antibacterial properties of novel papain immobilized on tannic acid modified Ag/CuFe₂O₄magnetic nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **109** :720–

- 731, 2018.
91. GU, Y.; ZHU, M.; LI, Y.; XIONG; C. Research of a new metal chelating carrier preparation and papain immobilization. *Biol. Macromol.* **112** :1175–1182, 2018.
 92. SHENG, W.; XI, Y.; ZHANG, L.; YE, T.; ZHAO; X. Enhanced activity and stability of papain by covalent immobilization on porous magnetic nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **114** :143–148, 2018.
 93. MARQUES, E. F.; BUENO, M. A.; DUARTE, P. D.; SILVA, L. R. S. P.; MARTINELLI, A. M.; SANTOS, C. Y.; SEVERINO, R. P.; BROMME, D.; VIEIRA, P. C.; CORRÊA; A. G. Evaluation of synthetic acridones and 4-quinolinones as potent inhibitors of cathepsins L and V. *Eur. J. Med. Chem.* **54** :10–21, 2012.
 94. SANTOS, A. M.; CIANNI, L.; VITA, D.; ROSINI, F.; LEITÃO, A.; LAUGHTON, C. A.; LAMEIRA, J.; MONTANARI; C. A. Experimental study and computational modelling of cruzain cysteine protease inhibition by dipeptidyl nitriles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20** (37) :24317–24328, 2018.
 95. RAMALHO; S. D. Busca por inibidores de catepsinas em plantas do cerrado paulista e avaliação da proteólise tumoral in vitro. 2015. 205 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos.
 96. VANZOLINI; K. L. Biorreatores De Acetilcolinesterase: Estudo De Condições Para a Triagem De Ligantes. 2013. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos.
 97. DUVAL, R.; DUPLAIS; C. Fluorescent natural products as probes and tracers in biology. *Nat. Prod. Rep.* **34** (2) :161–193, 2017.
 98. Jandera; P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Anal. Chim. Acta.* **692** (1–2) :1–25, 2011.

99. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *PRACTICAL HPLC METHOD DEVELOPMENT*. Wiley-Interscience, Second Edition. (JOHN WILEY & SONS, 1997).
100. CARDOSO, J. O.; OLIVEIRA, R. V. In: CASS, Q. B.; CASSIANO, N. *Cromatografia Líquida Novas Tendências e Aplicações*. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd., 2015. p. 55-91.
101. MUGITA, N.; NAMBU, T.; TAKAHASHI, K.; WANG, P.; KOMASA, Y. Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro. *Arch. Oral Biol.* **82** :233–240, 2017.
102. KAKIZAKI, E.; SONODA, A.; SHINKAWA, N.; YUKAWA, N. A new enzymatic method for extracting diatoms from organs of suspected drowning cases using papain: Optimal digestion and first practical application. *Forensic Sci. Int.* **297** :204–216, 2019.
103. PAN, A.; ZENG, H.; FOUA, G. B.; ALAIN, C.; LI, Y. Enzymolysis of chitosan by papain and its kinetics. *Carbohydr. Polym.* **135** :199–206, 2015.
104. Guideline on bioanalytical method validation Committee for Medicinal Products for Human Use. *Eur. Med. AGENCY Sci. Med. Heal.* :1–23, 2015.
105. Cassiano, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim. Nova* **32** (4) :1021–1030, 2009.
106. Barbosa, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORE, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *R. Soc. Chem. Adv.* **4** :1583–1600, 2014.
107. CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de

- Enzimas em Suportes Cromatográficos: Uma Ferramenta na Busca por Substâncias Bioativas. *Quim. Nova* **32** (1) :175–187, 2009.
108. Química; P. D. E. P. E. M. “ SEARCH FOR ENZYME INHIBITORS IN CERRADO. 2015.
109. ALMEIDA, F.G.; VANZOLINI, K. L.; CASS; Q. B. Angiotensin converting enzyme immobilized on magnetic beads as a tool for ligand fishing. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **132** :159–164, 2017.
110. Vanzolini, K. L.; SPRENGER, R. F.; LEME, G. M.; MORAES, V. R. S.; VILELA A. F. L.; CARDOSO, C. L.; CASS; Q. B. Acetylcholinesterase affinity-based screening assay on *Lippia gracilis* Schauer extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **153** :232–237, 2018.
111. NEWMAN, D. J.; CRAGG; G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79** (3) :629–661, 2016.
112. BRUNHEROTTO; R. & VENDRAMIM; J. D. Bioatividade de Extratos Aquosos de *Melia azedarach* L. Sobre o Desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro. *Neotrop. Entomol.* **30** (3) :455–460, 2005.
113. BONA, A. D.; NEDEL; F. Evaluation of *Melia azedarach* extracts against streptococcus mutans. *J. Med. Food* **18** (2) :259–263, 2014.
114. CHOI, W. H.; LEE; I. A. The anti-tubercular activity of *Melia azedarach* L. and *Lobelia chinensis* Lour. and their potential as effective anti-*Mycobacterium tuberculosis* candidate agents. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **6** (10) :830–835, 2016.
115. KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO; A. D. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwigii* and *Melia azedarach*. *Fitoterapia* **72** (4) :423–427, 2001.
116. Khalid; M.; Hassani; D.; Bilal; M.; Butt; Z. A.; Hamayun; M.; Ahmad; A.; Huang; D. & Hussain; A. Identification of oral cavity biofilm forming bacteria and determination of their growth inhibition by *Acacia arabica*,

- Tamarix aphylla L. and Melia azedarach L. medicinal plants. *Arch. Oral Biol.* **81** :175–185, 2017.
117. LÓPEZ-MIRANDA, S.; SERRANO-MARTÍNEZ, A.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, P.; GUARDIOLA, L.; PÉREZ-SÁNCHEZ, H.; FORTEA, I.; GABALDÓN, J. A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Use of cyclodextrins to recover catechin and epicatechin from red grape pomace. *Food Chem.* **203** :379–385, 2016.
118. CHANG, C.; WU, R. Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut water by LC-MS. *Food Chem.* **126** (2) :710–717, 2011.
119. TSANOVA-SAVOVA, S.; RIBAROVA, F.; GEROVA, M. (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. *J. Food Compos. Anal.* **18** (7) :691–698, 2005.