

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

**“FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASE
IMOBILIZADA: NOVOS MODELOS DE TRIAGEM DE
LIGANTES”**

Bruno Sérgio do Amaral*

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS,
área de concentração: QUÍMICA.

Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

Coorientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

*** bolsista CAPES**

São Carlos - SP

2019

do Amaral, Bruno Sérgio

Fosfoenolpiruvato carboxiquinase imobilizada: novos modelos de triagem de ligantes / Bruno Sérgio do Amaral. -- 2019.
193 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos,
São Carlos

Orientador: Quezia Bezerra Cass

Banca examinadora: Mônica Tallarico Pupo, Bianca Ferreira da Silva,
Cíntia Duarte de Freitas Milagre, Carmen Lúcia Cardoso

Bibliografia

1. Imobilização de enzimas. 2. Cromatografia a líquido. 3. Triagem de ligantes. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Bruno Sergio do Amaral, realizada em 30/08/2019:

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass
UFSCar

Profa. Dra. Monica Tallarico Pupo
FCFRP/USP

Profa. Dra. Bianca Ferreira da Silva
UNESP

Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre
UNESP

Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso
FCCLRP/USP

“Liberdade
é poder escolher estar preso no que te faz feliz”
(Sanderson de Andrade Santana)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Quezia Cass pela orientação e liberdade a mim confiada para desenvolver o projeto, mas sempre contribuindo imensamente e compartilhando todo o seu conhecimento. Agradeço, também, pela amizade e ensinamentos no âmbito da docência que, certamente, tiveram papel fundamental para o meu posicionamento atual.

À Profa. Dra. Dulce H. Ferreira de Souza, que tive o prazer de ganhar como coorientadora mas que, na verdade, foi muito além do “co” durante a longa jornada de purificação. Também devo agradecer a todo o apoio dado após eu me ausentar para o trabalho, sempre com belas palavras e compartilhando experiências de vida.

Às minhas queridas, Bibs e Kenia, que me acolheram no lab, me ensinaram muitas coisas e se tornaram grandes amigas de todo meu coração. Vocês só deixaram saudade no lab e na minha vida.

Aos meus amigos do Separare (Adriana, Andrea, Amanda, Bia, Cleiton, Gui, Iza, João, Ju's, Larissa, Marry, Neiloca, Romário e Profa. Regina), que sempre tornaram a jornada tão mais leve e gostosa, pelos cafés, pelos momentos dentro e fora da federal e por terem se tornado minha família de São Carlos.

Aos amigos do LBFE (Arielle, Bruna, Dri, Kelli e Marys) por terem me recebido de braços abertos, me ajudado com as purificações e sempre me fazerem ficar com o coração dividido entre os dois labs.

Aos amigos que do PN (Marina, Lu's, Luize, João), que vieram para agregar ainda mais felicidade, e aos amigos feitos na pós-graduação durante as disciplinas e demais momentos.

À Alessandra que, como um presente do céu, apareceu em minha vida, se tornou mais do que amiga, me fez olhar as coisas por diferentes pontos de vista e me deu todo apoio nas horas mais importantes.

Aos meus amigos do IFSP Câmpus Pirituba (Thiago, Danilo, Arianne, Claudia, Davi, Ivan, Hânia, Julio, Kamili, Lu, Lucas, Maysa, Patrícia e Renatinho) e a Luise, que me aguentaram nesse vai e vem e me deram todo o apoio e forças para concluir o doutorado. Também, é claro, ao Rafa que dedicou todo apoio, compreensão e carinho a mim.

Agradeço incondicionalmente aos meus pais, Sérgio e Sandra, minha irmã, Natália, a minha amada vó Hilda (*in memoriam*) e ao Luck. Sem vocês eu nunca teria chegado nem perto de onde cheguei. Não existe agradecimento que seja suficiente. Dedico todo meu amor, carinho e gratidão a vocês. Obrigado por compreenderem minha ausência e sempre me receberem daquela forma que me faz querer ficar.

À Profa. Dra. Arlene Gonçalves Corrêa pela colaboração com a doação de hidantoínas e cumarinas para triagem de ligantes.

À Profa. Dra. Richele Priscila Severino e à Prof. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa, da UFG – Regional Catalão, pela colaboração com o fornecimento de extratos de plantas do cerrado para triagem.

Aos docentes e ao corpo técnico e administrativo do Departamento de Química da UFSCar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
APTES	3-Aminopropiltriétoxisilano
ATP	Adenosina trifosfato
DEAE	Dietilaminoetil, troca aniônica fraca
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EC	Número EC (do inglês, <i>Enzyme commission number</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FPLC	Cromatografia a líquido de proteína rápida (do inglês, <i>Fast protein liquid chromatography</i>)
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução (do inglês, <i>high resolution mass spectrometry</i>)
ICER	Reator capilar com enzima imobilizada (do inglês, <i>Immobilized Capillary Enzyme Reactors</i>)
IMER	Reator com enzima imobilizada (do inglês, <i>Immobilized Enzyme Reactors</i>)
IT	Armadilha de íons (do inglês, <i>Ion trap</i>)
kDa	Kilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Mentem
LC	Cromatografia a líquido (do inglês, <i>Liquid chromatography</i>)
LC-HRMS	Cromatografia a líquido hifenada à espectrometria de massas de alta resolução (do inglês, <i>Liquid chromatography – tandem High-resolution mass spectrometry</i>)

LC-MS/MS	Cromatografia a líquido hifenada à espectrometria de massas (do inglês, <i>Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry</i>)
LDH	Lactato desidrogenase
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MB	Partículas magnéticas (do inglês, <i>magnetic beads</i>)
MDH	Malato desidrogenase
MeOH	Metanol
min	Unidade de Tempo (minutos)
mm	Unidade de Distância (milímetro)
<i>m/v</i>	Massa/volume
MS	Espectrometria de massas (do inglês, <i>Mass spectrometry</i>)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
nm	Unidade de Distância (nanômetro)
OAA	Oxaloacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PK	Piruvato quinase
QFF	Amônio quaternário, troca aniônica forte
QqTOF	Espectrômetro de massas por quadrupolo-quadrupolo-tempo de voo (do inglês, <i>Quadrupole-quadrupole-time-of-flight</i>)
s	Unidade de Tempo (segundos)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SRM	Monitoramento de reação selecionada (do inglês, <i>Selected reaction monitoring</i>)
TBAHS	Hidrogenossulfato de tetrabutilamônio
UHPLC	Cromatografia a líquido de ultra eficiência (do inglês, <i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>)

UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
μm	Unidade de Distância (micrômetro)
λ	Comprimento de onda

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 – Influência no tempo de retenção, devido a proporção de MeOH (v/v) na fase móvel, composta por tampão fosfato de potássio 65 mmol L ⁻¹ pH 7,50 e TBAHS 5 mmol L ⁻¹ , em diferentes vazões.	60
TABELA 4.2 – Condições cromatográficas desenvolvidas no sistema 2D LC para separação de ADP e ATP.	67
TABELA 4.3 – Recuperação das atividades das frações após as etapas de purificação da <i>TcPEPCK</i>	101
TABELA 4.4 – Substâncias e dados LC-HRMS/MS dos ligantes capturados dos extratos de <i>Q. grandiflora</i> (<i>Qg</i>), <i>D. burchellii</i> (<i>Db</i>), <i>A. falcata</i> (<i>Af</i>) e <i>B. coccolobifolia</i> (<i>Bc</i>).	134

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 – Princípios empregados em cromatografia: (a) por filtração em gel, (b) de interações hidrofóbicas, (c) de troca iônica, (d) de afinidade e (e) em fase reversa, adaptado²⁸. 5
- FIGURA 1.2 – Esquema geral do princípio dos ensaios de *ligand fishing*. Inicialmente a enzima-MB é imersa em uma mistura (representada por ●, Δ e □) e apenas as substâncias com afinidade pela biomolécula (●) ficam retidas na mesma. Os demais compostos (Δ e □) permanecem em solução e podem ser facilmente removidos. 8
- FIGURA 1.3 – Etapas envolvidas nos ensaios de *ligand fishing*. Etapa 1: carregamento com a mistura de interesse e incubação por tempo estabelecido, seguido da remoção do sobrenadante 1 (S-1). Etapa 2: lavagem para retirada dos compostos não retidos utilizando-se a Solução 1, de 2 a 3 vezes, gerando os sobrenadantes 2 (S-2). Etapa 3: extração dos compostos (ligantes) que apresentaram afinidade, através da adição da Solução 2, seguido de incubação por tempo estabelecido e análise desta fração (S-3). Etapa 4: acondicionamento com a Solução 1 para reuso, caso a Solução 3 não tenha desnaturado a proteína. 8
- FIGURA 1.4 – Tipos de imobilizações enzimáticas, (a) ligação a um suporte, (b) aprisionamento e (c) ligação cruzada. 11
- FIGURA 1.5 – Imobilizações covalentes sendo, acima, ligação do grupo amina do suporte ao reagente bifuncional glutaraldeído, com formação de imina, seguido da imobilização da enzima por resíduos básicos, com formação de outra imina e, abaixo, funcionalização do suporte, com inserção de grupo epóxido, seguido da imobilização da enzima por resíduos básicos e formação de amina. 13
- FIGURA 1.6 – Representação esquemática da glicólise em *T. cruzi*. As enzimas participantes são: 1, hexoquinase/glucoquinase; 2, fosfoglicose isomerase; 3, fosfofrutoquinase; 4, aldolase; 5, triose fosfato isomerase; 6, gliceraldeído-3-

fosfato desidrogenase; 7, fosfoglicerato quinase (glicosomal); 8, fosfoglicerato-quinase (citosólica); 9, fosfoglicerato mutase; 10, enolase; 11, piruvato quinase; 12, **PEPCK**; 13, MDH (glicosomal); 14; fumarato hidratase (glicosomal); 15, fumarato redutase NAD-ligada; 16, piruvato-fosfato diquinase; 17, alanina desidrogenase; 18, fumarato hidratase (citosólica); 19, MDH NADP-ligada (citosólica); 20, alanina aminotransferase; 21, frutose-1,6-bifosfatase. Os produtos de fermentação aeróbica são apresentados em caixas. L-alanina pode ser produzido, tanto no glicosomo quanto no citosol. Succinato também pode ser produzido no citosol, com utilização de fumarato como receptor de elétrons⁸³. 16

- FIGURA 1.7 – Estrutura cristalográfica da PEPCK de *T. cruzi* (PDB 1II2)..... 21
- FIGURA 4.1 – Cromatograma da separação de OAA, PEP, ADP, ATP e interferentes do Tampão C, utilizando-se a coluna C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm, Waters), fase móvel (tampão fosfato de potássio 65 mmol L⁻¹ pH 7,5 contendo TBAHS 5 mmol L⁻¹)/MeOH (87,5:12,5, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹ e λ = 220 nm (vermelho) e 260 nm (preto). 61
- FIGURA 4.2 – Cromatograma da separação de OAA, PEP, ADP, ATP e interferentes do Tampão C, utilizando-se a coluna C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm, Waters), fase móvel Tampão V/MeOH (75:25, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹ e λ = 220 nm (vermelho) e 260 nm (preto). 62
- FIGURA 4.3 – Análise em SDS-PAGE do processo de expressão e purificação da *Tc*PEPCK, sendo: marcador de massa molecular (poços 1 e 10); cultura de *E.coli* antes (poço 2) a após indução com IPTG (poço 3); precipitação com 40 % de sulfato de amônio, precipitado (poço 4) e sobrenadante (poço 5); sobrenadante (NH₄)₂SO₄ 40% após diálise (poço 6); fração 2 da coluna DEAE (poço 7); frações 27 e 28 eluídas da coluna Superose 12 (poços 8 e 9, respectivamente)..... 63
- FIGURA 4.4 – Cromatogramas LC-UV das reações branco da *Tc*PEPCK obtida de (a) DEAE e (b) Superose 12, utilizando-se a coluna C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm, Waters), com fase móvel Tampão V/MeOH, vazão 0,4 mL/min e λ = 220 nm (vermelho) e 260 nm (preto). 64

- FIGURA 4.5 – Representação do sistema cromatográfico bidimensional com o ICER na primeira dimensão e uma coluna analítica na segunda dimensão..... 65
- FIGURA 4.6 – Cromatograma da injeção de 10 μL de um mix de OAA, PEP, ADP e ATP $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em um capilar de sílica fundida vazio (40 cm), utilizando Tampão C como fase móvel, vazão de $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 220 \text{ nm}$ (vermelho) e 260 nm (preto). 66
- FIGURA 4.7 – Cromatogramas 2D LC. 1ª dimensão: capilar vazio (40 cm), fase móvel Tampão C, vazão $0,05 \text{ mL min}^{-1}$. 2ª dimensão: coluna C_{18} XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, $3,5 \mu\text{m}$, Waters), com fase móvel Tampão V/MeOH (75:25, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = \lambda = 220 \text{ nm}$ (vermelho) e 260 nm (preto). (a) Injeção branco e (b) injeção da mistura de OAA, PEP, ADP e ATP. 67
- FIGURA 4.8 – Cromatogramas 2D LC da separação de OAA, PEP, ADP, ATP e interferentes do Tampão C. 1ª dimensão: capilar vazio (40 cm), fase móvel tampão fosfato 10 mmol L^{-1} e pH 7,00, vazão $0,05 \text{ mL min}^{-1}$. 2ª dimensão: coluna C_{18} XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, $3,5 \mu\text{m}$, Waters), com fase móvel Tampão V/MeOH, vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 220$ e 260 nm 68
- FIGURA 4.9 – Cromatogramas 2D LC, sendo a 1ª dimensão de (a) Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH 7,5 com adição dos metais, (b) apenas Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH 7,5 e (c) PIPES 50 mmol L^{-1} pH 7,4. 2ª dimensão: C_{18} XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, $3,5 \mu\text{m}$, Waters), com fase móvel Tampão V/MeOH (71,5:28,5, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 220 \text{ nm}$ (vermelho) e 260 nm (preto). 69
- FIGURA 4.10 – Cromatogramas LC-UV das separações analíticas com a coluna (a) C_{18} XTerra vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e (b) C_{18} XSelect CSH vazão $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. O acoplamento 2D LC foi realizado em (c) com a C_{18} XTerra e (d) C_{18} XSelect CSH. A separação analítica utilizou fase móvel composta por Tampão VI/MeOH (75:25) e as separações 2D utilizaram, na 1ª dimensão, tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} pH 5,65 contendo DTT 1 mmol L^{-1} , MnCl_2 $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e MgCl_2 3

mmol L ⁻¹ com vazão 0,05 mL min ⁻¹ e $\lambda = 220$ nm (vermelho) e 260 nm (preto).	71
FIGURA 4.11 – Cromatogramas LC-UV da reação em Tampão D de (a) descarboxilação da <i>Tc</i> PEPCK, (b) reação branco e (c) reação na ausência dos cofatores. Coluna C ₁₈ XSelect CSH (100 x 2,1 mm, 2,5 μ m, Waters), com fase móvel Tampão VI/MeOH 75:25, vazão 0,25 mL min ⁻¹ e $\lambda = 220$ nm (vermelho) e 260 nm (preto).	72
FIGURA 4.12 – Esquematização do processo de imobilização em capilar de sílica fundida.	73
FIGURA 4.13 – Cromatograma 2D LC de atividade o ICER. 1 ^a dimensão: ICER com fase móvel Tampão D, vazão 0,05 mL min ⁻¹ . 2 ^a dimensão: coluna C ₁₈ XSelect CSH (100 x 2,1 mm, 2,5 μ m, Waters), com fase móvel Tampão VI/MeOH 75:25, vazão 0,25 mL min ⁻¹ e $\lambda = 220$ nm (vermelho) e 260 nm (preto).	74
FIGURA 4.14 – Esquematização do processo de imobilização em partículas magnéticas amino-terminadas.	75
FIGURA 4.15 – Cromatograma LC-UV do ensaio de atividade da <i>Tc</i> PEPCK-D2-MB. Coluna C ₁₈ XSelect CSH (Waters®, 2,5 μ m, 100 x 2,1 mm), com fase móvel Tampão VI/MeOH 75:25, vazão 0,25 mL min ⁻¹ e $\lambda = 220$ nm (vermelho) e 260 nm (preto).	76
FIGURA 4.16 – Cromatograma de íons extraídos de uma mistura de ATP, ADP, OAA e PEP, utilizando uma coluna Luna C ₁₈ (2) (50 x 2,0 mm, 3 μ m, Phenomenex), com fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) 0,15 mL min ⁻¹ , com MS operando em modo negativo e SRM, monitorando os íons [M-H] ⁻ de cada composto.	78
FIGURA 4.17 – Cromatograma de íons extraídos da análise da atividade da <i>Tc</i> PEPCK em tampão acetato de amônio 50 mmol L ⁻¹ pH 9,0 contendo DTT 1 mmol L ⁻¹ , com adição de MgCl ₂ 1 mmol L ⁻¹ (azul), MnCl ₂ 1 mmol L ⁻¹ (vermelho) e 1 mmol L ⁻¹ de cada metal (preto), utilizando uma coluna Luna C ₁₈ (2) (50 x 2,0	

- mm, 3 μm), com fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) 0,15 mL min⁻¹, com MS operando em modo negativo e SRM, monitorando PEP. 80
- FIGURA 4.18 – Cromatograma de íons extraídos, da análise da atividade da *TcPEPCK* em tampão acetato de amônio 50 mmol L⁻¹ pH 9,0 contendo DTT 1 mmol L⁻¹, com variação da concentração de MnCl₂ em 2,0 mmol L⁻¹ (laranja), 1,5 mmol L⁻¹ (azul), 1,0 mmol L⁻¹ (preto) e 0,5 mmol L⁻¹ (vermelho), utilizando a coluna Luna C₁₈(2) (50 x 2,0 mm, 3 μm), com fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) 0,15 mL min⁻¹, com MS operando em modo negativo e SRM, monitorando PEP, com suas respectivas áreas relativas..... 80
- FIGURA 4.19 – Cromatograma de íons extraídos e espectro de massas referente a injeção de PEP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema LC-MS monitorando o íon precursor do PEP, m/z 167 ([M-H]⁻), com coluna Luna C₁₈(2) (50 x 2,0 mm, 3 μm) e fase móvel Tampão B/MeOH 1:1(v/v), 0,15 mL min⁻¹..... 82
- FIGURA 4.20 – Curva de Michaelis-Menten para produção de PEP pela *TcPEPCK*-D2-MB, variando-se a concentração de OAA entre 4-800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATP constante em 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 83
- FIGURA 4.21 – Análise em SDS-PAGE da purificação da *TcPEPCK* em coluna de afinidade ATP-agarose. Sobrenadante (NH₄)₂SO₄ 40% após diálise (poço 1); fração 2 da DEAE (poço 2), frações 3 a 5 que não se ligaram na coluna ATP-agarose (poços 3 a 5), frações 2 a 5 após aplicação de solução de ATP na coluna ATP-agarose (poços 6 a 9) e marcador de massa molecular (poço 10)..... 86
- FIGURA 4.22 – Análise em SDS-PAGE, da purificação da *TcPEPCK* em coluna de afinidade ATP-agarose e eluição com Tampão III, marcadores de massa molecular (poços 1 e 10); fração 6 a 8 da DEAE, sendo o *pool* de entrada na coluna de afinidade (poço 2); frações 4, 10 e 22 da afinidade que não se ligaram à coluna (poços 3, 4 e 5); frações 35 a 38 da afinidade que se ligaram à coluna (poços 6 a 9)..... 87

- FIGURA 4.23 – Análise em SDS-PAGE da purificação da *Tc*PEPCK em coluna de afinidade ATP-agarose e eluição com Tampão III, sendo (a) aplicação após precipitação com sulfato de amônio e (b) aplicação após lise celular. Os poços 1 e 2 são frações que se ligaram à coluna de afinidade e MM os marcadores de massa molecular. 88
- FIGURA 4.24 – Cromatogramas FPLC-UV da Superdex75 do padrão de BSA (acima) e das frações da coluna de afinidade (abaixo). As frações que apresentaram atividade estão marcadas com 1 e 2 no cromatograma e as respectivas análises em SDS-PAGE destas frações e de uma mistura de ambas estão ao lado. 89
- FIGURA 4.25 – a) Cromatograma FPLC-UV da eluição da coluna QFF, representando o gradiente (verde) e as frações coletadas (vermelho). As frações que apresentaram atividade foram de 3 a 8 (não se ligaram à coluna) e 24 (se ligou à coluna). b) A análise em SDS-PAGE da entrada da coluna e das frações com atividade, sendo destacada as PEPCKs. 90
- FIGURA 4.26 – Cromatograma FPLC-UV, com coluna de afinidade ATP-agarose, representando a eluição (verde) e as frações coletadas (vermelho). A análise em SDS-PAGE apresenta todas as etapas do processo de purificação: precipitado da lise celular (poço 1); sobrenadante da lise celular (poço 2); precipitado após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (poço 3); sobrenadante dialisado após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (poço 4); *Tc*PEPCK-I (poço 5); *Tc*PEPCK-II (poço 6); *Tc*PEPCK-III (poço 7) e MM marcadores de massa molecular. 91
- FIGURA 4.27 – Cromatograma de íons extraídos para m/z 506, da solução de ATP utilizada para imobilização (em preto) e da solução de ATP após 4 horas de imobilização (em vermelho), utilizando uma coluna Luna $\text{C}_{18}(2)$ (50 x 2,0 mm, 3 μm), com volume de injeção de 5 μL e fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) 0,15 mL min^{-1} , MS operando em modo negativo e SRM, monitorando os íons $[\text{M}-\text{H}]^-$ de ATP e ADP, 506 e 426 m/z , respectivamente. 93

- FIGURA 4.28 – À esquerda, a análise em SDS-PAGE apresenta as seguintes etapas do processo de purificação: precipitado após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (poço 1); sobrenadante dialisado após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (poço 2); *TcPEPCK*-I (poço 3); *TcPEPCK*-III (poço 4); *TcPEPCK* obtida a partir da extração do ATP-MB (poço 5), tentativa de eluição da *TcPEPCK* da coluna de ATP-agarose com tampão HEPES (poço 6) e MM marcador de massa molecular. Ao lado, está apresentado o cromatograma de íons extraídos do teste de atividade da *TcPEPCK* obtida a partir da extração do ATP-MB sendo a alíquota de 1 h (em preto), 4 h (em azul) e 10 h (em vermelho)..... 94
- FIGURA 4.29 – Curva de efeito do pH para *TcPEPCK*, utilizando tampão acetato de amônio pH 8,20 a 10,00 e analisado por LC-MS/MS..... 96
- FIGURA 4.30 – Curva de efeito da temperatura para *Tc*-PEPCK, utilizando Tampão A e analisado por LC-MS/MS. 97
- FIGURA 4.31 – Efeito do tempo na atividade relativa da *TcPEPCK*. 98
- FIGURA 4.32 – Cromatogramas de íons extraídos, de uma mistura de PEP em Tampão A/MeOH 1:1 em uma concentração de (a) $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo em vermelho apenas PEP e, em preto, adição de enzima seguida de centrifugação e análise do sobrenadante. Foi utilizada uma coluna Luna $\text{C}_{18}(2)$ (50 x 2,0 mm, 3 μm), com fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ 99
- FIGURA 4.33 – Cromatograma de íons extraídos e espectro de massas referente a injeção de PEP $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema LC-MS/MS monitorando o íon precursor do PEP, $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 167 (vermelho) e seus fragmentos de qualificação $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$ m/z 139 (azul) e quantificação $[\text{PO}_3]^-$ m/z 79 (preto) e cromatograma de íons totais (verde), com coluna Luna $\text{C}_{18}(2)$ (50 x 2,0 mm, 3 μm) e fase móvel Tampão B/MeOH 1:1, vazão $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ 100
- FIGURA 4.34 – Curva de Michaelis-Menten para produção de PEP, variando-se a concentração de OAA e de ATP. 102

FIGURA 4.35 – Curva de Michaelis-Menten para produção de PEP, variando-se a concentração de OAA para (a) <i>TcPEPCK-II-MB</i> e (b) <i>TcPEPCK-III-MB</i> ...	106
FIGURA 4.36 – Inibidores de PEPCK reportados: (a) ácido 3-mercaptopicolínico para PEPCK nativa de <i>T. cruzi</i> , (b) e (c) docagem para <i>TcPEPCK</i> nos sítios de ATP e OAA/PEP, respectivamente, (d) oxalato para <i>C. glutamicum</i> e <i>E. coli</i> (ambas ATP-dependente), (e) quinolinato para <i>T. brucei</i> (ATP-dependente) e <i>R. norvegicus</i> (GTP-dependente), (f) iodoacetamida para <i>S. costicola</i> (ATP-dependente), <i>R. catesbeiana</i> (GTP-dependente) e <i>G. gallus</i> (GTP-dependente), (g) reagente de Ellman para <i>T. cruzi</i> e <i>A. suum</i> (GTP-dependente), (h) NADH para <i>E. coli</i> e (i) xantina para <i>H. sapiens</i> (GTP-dependente).	108
FIGURA 4.37 – Estrutura de 20 compostos triados como ligantes da <i>TcPEPCK</i>	110
FIGURA 4.38 – Estrutura das 14 hidantoínas triadas como ligantes da <i>TcPEPCK</i>	111
FIGURA 4.39 – Valores de inibição ($n = 2$) das 20 moléculas triadas a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de inibidores.	112
FIGURA 4.40 – Valores de ativação ($n = 2$) das 14 hidantoínas triadas a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ativadores.	113
FIGURA 4.41 – Comparação das inibições de sete ligantes triados a 50 e $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ com a concentração de OAA em $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ambos os casos. ...	114
FIGURA 4.42 – Valores de inibição ($n = 2$) das sete moléculas triadas a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de inibidores.	116
FIGURA 4.43 – Comparação dos níveis de inibição ($n = 2$) de sete compostos triados a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de inibidor em solução e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de inibidores para a <i>TcPEPCK-II-MB</i>	117
FIGURA 4.44 – Cromatograma de íons extraídos da mistura dos inibidores 1 , 3 , 5 , 7 e 9 a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando-se a coluna Poroshell C ₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 μm , Agilent) e fase móvel composta por ACN/água com 0,1% de ácido fórmico 1:4 (v/v), vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, com <i>split</i> onde $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ foi enviado para o	

MS, que operou em modo positivo e SRM, monitorando os íons $[M+H]^+$ de cada inibidor.	118
FIGURA 4.45 – Cromatogramas de íons extraídos da mistura dos ativadores H1 , H3 , H6 , H8 e H10 a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando-se a coluna Poroshell C_{18} (100 x 2,1 mm, 2,7 μm , Agilent), fase móvel composta por ACN/água com 0,1% de ácido fórmico 35:65 (v/v), vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, com <i>split</i> onde $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ foi enviado para o MS, que operou em modo positivo e SRM, monitorando os íons $[M+H]^+$ de cada ativador.	119
FIGURA 4.46 – Cromatograma de íons extraídos, LC-MS/MS, da reação da <i>TcPEPCK-II</i> na ausência de MeOH (preto) e na presença de MeOH em concentração de 5% (vermelho), 10% (azul), 20% (verde) e 30% (laranja), com suas respectivas atividades relativas.	120
FIGURA 4.47 – Fluxograma do processo da prova de conceito do <i>ligand fishing</i> , em que o procedimento de carregamento foi realizado por três vezes para otimização da etapa de extração, tendo sido testado três soluções extratoras, representadas em <i>i</i> , <i>ii</i> e <i>iii</i>	122
FIGURA 4.48 – Cromatograma de íons extraídos para a extração dos ligantes da mistura de inibidores da <i>TcPEPCK-III-MB</i> , utilizando-se a coluna Poroshell C_{18} (100 x 2,1 mm, 2,7 μm , Agilent) e fase móvel composta por ACN/água com 0,1% de ácido fórmico 1:4 (v/v), com vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, com <i>split</i> onde $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ foi enviado para o MS.	123
FIGURA 4.49 – Cromatograma de íons extraídos, LC-MS, para a extração dos ligantes (S3) da mistura de ativadores da <i>TcPEPCK-III-MB</i> , utilizando-se a coluna Poroshell C_{18} (100 x 2,1 mm, 2,7 μm , Agilent) e fase móvel composta por ACN/água com 0,1% de ácido fórmico 35:65 (v/v), com vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, com <i>split</i> onde $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ foi enviado para o MS.	124
FIGURA 4.50 – Razão de afinidade para os compostos utilizado como prova de conceito para a <i>TcPEPCK-III-MB</i>	124

FIGURA 4.51 – Cromatogramas de pico base, LC-HRMS, para os extratos (verde) e frações S3 da *TcPEPCK-III-MB* inativa (preto) e ativas (vermelho e azul), utilizando-se a coluna Ascentis Express C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 μm, Agilent), com fase móvel composta por água contendo 0,1% de ácido fórmico e ACN, em modo gradiente, de 5% a 100% de ACN com vazão de 0,4 mL min⁻¹ e modo positivo de ionização, sendo (a) *Q. grandiflora*, (b) *D. burchellii*, (c) *A. falcata* e (d) *B. coccolobifolia*. 127

FIGURA 4.52 – Estruturas moleculares inferidas para os ligantes isolados nos ensaios de *ligand fishing* com os extratos de *Q. grandiflora* (*Qg*), *D. burchellii* (*Db*), *A. falcata* (*Af*) e *B. coccolobifolia* (*Bc*), sendo 1-*Qg* e 2-*Qg* propostos a partir dos dados de MS e os demais confirmados pela literatura como metabólitos de plantas. 129

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1 – Reação reversível de descarboxilação e fosforilação catalisada pelas PEPCKs.....	14
ESQUEMA 1.2 – Abordagens clássicas para medir a atividade catalítica da PEPCK.....	19

RESUMO

FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASE IMOBILIZADA: NOVOS MODELOS DE TRIAGEM DE LIGANTES.

A enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) é amplamente distribuída nos organismos e atua na conversão reversível do fosfoenolpiruvato (PEP) para oxaloacetato (OAA), na presença de CO₂ e um cátion divalente, dependente de ATP ou GTP. A sua atividade catalítica é normalmente monitorada por ensaios acoplados com malato desidrogenase ou piruvato quinase/lactato desidrogenase. Assim, o produto da reação da PEPCK é convertido em outro pela ação de uma enzima NADH-dependente, com o monitoramento do NADH consumido através da diminuição da absorbância a 340 nm. A principal desvantagem dos ensaios acoplados é que qualquer interferência na atividade da segunda enzima afeta a atividade da primeira enzima. Também, o NADH foi reportado como inibidor da PEPCK de alguns organismos. Para superar estes problemas, relatamos aqui um ensaio direto para quantificar o PEP por cromatografia a líquido hifenada à espectrometria de massas (LC-MS). A dificuldade relacionada aos substratos e produtos da PEPCK é sua elevada hidrofobicidade e baixa retenção no modo reverso de eluição, o que leva a coeluição ou baixa resolução de picos. Apesar disso, o PEP foi quantificado em coeluição com OAA através da diferenciação obtida pelos íons no espectro de massas. O método desenvolvido foi qualificado e todos os valores estiveram de acordo com os critérios adotados. Assim, a PEPCK de *T. cruzi* foi expressa como uma enzima ativa em *E. coli* e purificada por cromatografia aniônica e de afinidade. O método LC-MS foi utilizado, então, para monitorar a purificação da PEPCK de *T. cruzi*, bem como para determinar todos os parâmetros cinéticos da enzima purificada. O método direto aqui reportado pode ser usado para outras PEPCKs. Além disso, um ensaio de captura de ligantes, através da imobilização da PEPCK em partículas magnéticas, foi modulado com base em uma série de compostos sintéticos que foram selecionados para PEPCK usando o ensaio de atividade em solução aqui desenvolvido. Na busca por ligantes seletivos, foram realizados ensaios de *ligand fishing*, baseados em afinidade, para a triagem em quatro extratos etanólicos de plantas brasileiras do cerrado: *Qualea grandiflora*, *Diospyros burchellii*, *Anadenanthera falcata* e *Byrsonima coccolobifolia*. A caracterização química dos ligantes identificados foi realizada através de análise por LC-HRMS. Esses resultados são totalmente discutidos. Os esforços para produzir um reator capilar de enzima imobilizada com a PEPCK para ser usado como uma coluna de bioafinidade em um ensaio de fluxo também são apresentados.

ABSTRACT

IMMOBILIZED PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE: NEW MODELS OF LIGANDS SCREENING.

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) is a ubiquitous enzyme found in all known groups of organisms, acting in the reversible conversion of oxaloacetate (OAA) to phosphoenolpyruvate (PEP) and CO₂, in the presence of divalent metal ion, and dependent of ATP or GTP. Their catalytic activity is usually measured by coupled assays with malate or pyruvate kinase/lactate dehydrogenases as preferred second enzyme. Thus, the PEPCK reaction product is converted by the action of a NADH-dependent enzyme, wherein the catalytic reaction is followed by the decrease in the absorbance at 340 nm due to the consumption of NADH. The main drawback in coupled assays is that any interference in the activity of the second enzyme will affect the result of the first enzyme. In addition, in the case of PEPCK, NADH has been reported as inhibitor of some of these enzymes. To overcome these problems, herein we report a direct assay to quantify PEP by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS). The difficulty related to PEPCK's substrates and products are their higher hydrophilicity and poor retention in reverse-phase elution mode, which leads to coelution or low peak resolution. In spite of this, PEP was quantified in coelution with OAA by the differentiation obtained by the mass spectra data. The developed method was validated, and all the significant figures were in accordance with the adopted criteria. For that, PEPCK of *T. cruzi* was expressed as an active enzyme in *Escherichia coli* and purified by anionic exchanged and affinity chromatography. The method was used, then, to monitor the purification of *T. cruzi* PEPCK as well as to determine all the kinetics parameters of the purified enzyme. The direct method herein disclosed can be used for others PEPCKs. Moreover, a ligand fishing assay based on the immobilization of PEPCKs to magnetic particles was modulated based on a series of synthetic compounds that were screened towards PEPCKs using the solution activity assay here developed. In searching for selective binders, the affinity-based assay was used to screen four ethanolic extracts of Brazilian Cerrado plants: *Qualea grandiflora*, *Diospyros burchellii*, *Anadenanthera falcata* and *Byrsonima coccolobifolia*. The chemical characterization of the identified ligands was carried out by means of LC-HRMS analysis. These results are fully discussed. The efforts to produce a PEPCK immobilized capillary enzyme reactor to be used as a bioaffinity column in a flow assay is also presented.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxi
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
1 Introdução.....	1
1.1 Enzimas e ensaios de triagem de alta eficiência	1
1.2 A cromatografia de bioafinidade na identificação de ligantes.....	4
1.3 Ensaios de <i>ligand fishing</i>	7
1.4 Imobilização de enzimas	10
1.5 A enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase.....	14
2 Objetivos.....	22
3 Procedimento Experimental.....	23
3.1 Materiais.....	23
3.2 Tampões utilizados.....	26
3.2.1 Tampões utilizados em etapas cromatográficas.....	26
3.2.2 Ensaios de atividade, imobilização e <i>ligand fishing</i>	26
3.3 Expressão da <i>TcPEPCK</i> em <i>E. coli</i>	27
3.4 Purificação da <i>TcPEPCK</i>	28
3.4.1 Procedimento de purificação A.....	28
3.4.2 Procedimento de purificação B	29
3.4.3 Procedimento de purificação C	30
3.5 Teste de atividade da <i>TcPEPCK</i>	31

3.5.1	Reação de descarboxilação e fosforilação	31
3.5.2	Reação de carboxilação e desfosforilação	32
3.5.3	Avaliação da influência dos metais na reação de descarboxilação e fosforilação.....	32
3.5.4	Testes de tampões e aditivos para a reação de carboxilação e desfosforilação.....	33
3.6	O sistema LC-MS/MS.....	33
3.7	O sistema LC-UV.....	34
3.7.1	Métodos para análise da atividade no sentido da carboxilação	34
3.7.2	Tempo de acoplamento	35
3.7.3	Método 2D LC-UV	35
3.8	Imobilização da <i>Tc</i> PEPCK em capilar.....	36
3.8.1	Preparo dos ICERS.....	36
3.8.2	Análise da atividade dos ICERS.....	37
3.9	Imobilização da <i>Tc</i> PEPCK em partículas magnéticas	38
3.10	Qualificação de método LC-MS para <i>Tc</i> PEPCK-D2-MB	39
3.11	Caracterização cinética da <i>Tc</i> PEPCK-D2-MB	40
3.12	Imobilização de ATP em partículas magnéticas e aplicação na purificação da <i>Tc</i> PEPCK.....	41
3.13	Efeito do pH, da temperatura e do tempo de reação para <i>Tc</i> PEPCK em solução.....	42
3.14	Qualificação do método analítico para a <i>Tc</i> PEPCK em solução	43
3.15	Caracterização cinética da <i>Tc</i> PEPCK em solução	44
3.16	Qualificação do método analítico para a <i>Tc</i> PEPCK-II-MB e <i>Tc</i> PEPCK-III-MB	45

3.17	Caracterização cinética da <i>Tc</i> PEPCK-II-MB e <i>Tc</i> PEPCK-III-MB	46
3.18	Triagem de ligantes da <i>Tc</i> PEPCK em solução.....	47
3.19	Ensaio de atividade para a <i>Tc</i> PEPCK-MB.....	49
3.20	Teste de inibição com a <i>Tc</i> PEPCK-II-MB.....	50
3.21	Teste de tolerância da <i>Tc</i> PEPCK ao MeOH	51
3.22	Prova de conceito para ensaio de <i>ligand fishing</i> com a <i>Tc</i> PEPCK-II-MB e <i>Tc</i> PEPCK-III-MB.....	52
3.23	Ensaio de <i>ligand fishing</i> para a <i>Tc</i> PEPCK-MB com extrato de plantas do cerrado	55
4	Resultados e discussão	59
4.1	Desenvolvimento de método LC-UV para a reação de carboxilação	59
4.2	Expressão e purificação da <i>Tc</i> PEPCK	62
4.3	Cromatografia 2D LC.....	65
4.4	Reação de descarboxilação e fosforilação da <i>Tc</i> PEPCK	72
4.5	Imobilização da <i>Tc</i> PEPCK e preparo do ICER	73
4.6	Imobilização da <i>Tc</i> PEPCK em partículas magnéticas	75
4.7	Desenvolvimento de método LC-MS/MS.....	76
4.7.1	Detecção de PEP no MS	76
4.7.2	Acoplamento LC-MS	78
4.8	Influência do DTT, Mn ²⁺ e Mg ²⁺ na atividade da <i>Tc</i> PEPCK.....	79
4.9	Qualificação do método analítico por LC-MS para a <i>Tc</i> PEPCK-D2-MB	81
4.10	Estudo cinético do <i>Tc</i> PEPCK-MB	82
4.11	Teste de atividade dos ICERs	84
4.12	Purificação em coluna de afinidade	85
4.12.1	Síntese de ATP-MB para purificação da <i>Tc</i> PEPCK.....	92

4.13 Caracterização da <i>Tc</i> PEPCK em solução.....	95
4.13.1 Efeito do pH	95
4.13.2 Efeito da temperatura	96
4.13.3 Tempo de reação	97
4.13.4 Qualificação de método LC-MS/MS para enzima em solução.....	98
4.13.5 Avaliação das etapas de purificação	101
4.13.6 Caracterização cinética da <i>Tc</i> PEPCK em solução	102
4.14 Imobilização da <i>Tc</i> PEPCK-III em capilar	103
4.15 Imobilização da <i>Tc</i> PEPCK-II e <i>Tc</i> PEPCK-III em partículas magnéticas	104
4.16 Qualificação do método LC-MS/MS para enzima imobilizada em partículas magnéticas	105
4.17 Caracterização cinética do <i>Tc</i> PEPCK-II-MB e <i>Tc</i> PEPCK-III-MB	106
4.18 Busca de ligantes	107
4.19 Teste de inibição com <i>Tc</i> PEPCK-II-MB	115
4.20 Prova de conceito com <i>Tc</i> PEPCK-II-MB e <i>Tc</i> PEPCK-III-MB.....	117
4.20.1 Desenvolvimento de método LC-MS para inibidores e ativadores	118
4.20.2 Teste de tolerância da <i>Tc</i> PEPCK à MeOH para extração em ensaios de <i>ligand fishing</i>	120
4.20.3 Ensaio de <i>ligand fishing</i> para inibidores e ativadores.....	121
4.21 Ensaio de <i>ligand fishing</i> com extratos de plantas do cerrado	125
5 Conclusão	137
6 Referências Bibliográficas	139
Apêndice	155

1 Introdução

1.1 Enzimas e ensaios de triagem de alta eficiência

Enzimas são macromoléculas que atuam como biocatalisadores destinados a acelerar, em ordens de magnitude, reações químicas essenciais à vida¹, sendo conhecidas mais de 5.000 reações catalisadas pelas mesmas². Ainda, mediam uma variedade de processos *in vivo*, incluindo transformações oxidativas e conjugativas, bem como as vias de sinalização intracelular³. Para controlar o metabolismo, muitas enzimas interagem naturalmente com compostos, denominados inibidores, que diminuem ou impedem sua função catalítica⁴.

Devido à sua vasta gama de atividades biológicas, as enzimas são muitas vezes o alvo para a triagem de pequenas moléculas moduladoras de sua atividade, que possam atuar como fármacos⁵. Por exemplo, os inibidores da enzima conversora de angiotensina são importantes medicamentos para o tratamento de hipertensão, enquanto os inibidores de protease são agentes chave no tratamento do HIV, que controlam a AIDS³.

O esforço para desenvolver medicamentos inovadores mais rapidamente, sem afetar a qualidade e segurança, tem impulsionado a procura de novas estratégias e metodologias. Os aspectos principais do processo de descoberta de um *hit* ou candidato a fármaco incluem o desenvolvimento de metodologias de triagem de alta eficiência (HTS, do inglês *high throughput screening*) em larga escala, para a avaliação da atividade biológica, análise de interações medicamentosas e a determinação das propriedades físico-químicas⁶.

Existem três considerações importantes para a escolha de um alvo terapêutico destinado a HTS. A primeira está baseada na relevância do alvo, ou seja, refere-se a importância da doença na qual o mesmo se relaciona. A relação entre a relevância do alvo e seu ineditismo é inversa. A segunda consideração está

relacionada à probabilidade de que ligantes que produzam efeitos terapêuticamente relevantes contra um alvo estejam presentes na triagem. O desafio para o estudo com enzimas é encontrar compostos que contenham propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. O terceiro fator a ser considerado é a capacidade de desenvolver um ensaio de triagem robusto e de alta qualidade. Todos os fatores devem ser considerados, sendo que ensaios caros e tecnicamente difíceis devem ser comparados com o grau de validação e relevância biológica do alvo. Tal validade pode ser avaliada com abordagens genéticas - através de nocaute de gene ou RNA de interferência - e/ou experimentos baseados em ligantes^{7,8}.

Dentre as diversas formas de se buscar um *hit*, destaca-se o uso de ensaios bioquímicos ou com células. Os ensaios bioquímicos buscam por compostos que interagem com um alvo isolado em um ambiente artificial. Os ensaios com células, embora mais vantajosos; dado que os compostos testados interagem com uma mistura mais realista do alvo em seu ambiente fisiológico, são mais difíceis de executar em alta produtividade. Assim, desde o início da década de 90, quando HTS se tornou uma área central na busca de novos fármacos, os ensaios bioquímicos já predominavam⁸.

Os ensaios bioquímicos de HTS referem-se à utilização de uma proteína alvo purificada ou parcialmente purificada para triagem em bibliotecas de compostos. Este sistema experimental, em princípio, é o mais simples, permitindo a avaliação direta da interação entre um alvo e uma molécula de teste. Em contrapartida, a complexidade das células, como a permeabilidade da membrana, interações no plasma e o metabolismo do composto, pode mascarar ou impedir a identificação de ligantes com baixa afinidade na descoberta de um *hit*. Com os dados bioquímicos iniciais, pode-se estender para ensaio secundário baseado em células e outros mais complexos⁹.

Durante a década de 90, o aumento do tamanho das coleções de compostos químicos e a necessidade crescente de redução no volume de trabalho,

tempo e custo, impulsionaram a ampliação na capacidade das placas de 96 poços de HTS, para 384 poços (10-20 μL) com uma média de 10 mil ensaios por dia e, posteriormente, para os microensaios com 1586 poços ($\sim 2 \mu\text{L}$) e média de 100 mil ensaios por dia. Os microensaios apresentam longo tempo de projeto para implementação e operação robótica, o que os torna muito caros¹⁰⁻¹². O termo *ultra high throughput screening* refere-se a capacidades superiores a 100 mil ensaios por dia ($< 2 \mu\text{L}$), totalmente automatizados e, muitas vezes, é designado por μHTS ^{13,14}.

Os ensaios de HTS para inibidores enzimáticos normalmente envolvem testes espectrofotométricos ou fluorimétricos utilizando placas multi-poços em bibliotecas de compostos sintéticos ou isolados de produtos naturais. Tais ensaios apresentam características como: necessidade de reagentes colorimétricos ou fluorimétricos adequados para gerar um sinal, interferências causadas por compostos que absorvem ou fluorescem em comprimentos similares ao reagente e ineficiência para triagem em misturas¹⁵.

Alternativamente às coleções de compostos sintéticos, os metabólitos secundários, devido suas estruturas e grupos multifuncionais, são coleções atrativas para triagem¹⁶. No entanto, os extratos de produtos naturais são misturas complexas que contém um grande número de compostos, necessitando de isolamento, sendo que os compostos ativos estão normalmente presentes em baixa quantidade. No caso de plantas, por exemplo, o conteúdo é geralmente inferior a 0,01% do seu peso seco, com poucas exceções^{17,18}.

De forma clássica, os metabólitos são isolados e realizados testes de atividade biológica. Para evitar os isolamentos de metabólitos que não apresentam atividade, surgiram abordagens de fracionamento de extratos naturais guiado por bioensaios. Desta forma, apenas as frações bioativas são selecionadas para o isolamento dos compostos, seguido dos testes de atividade biológica individuais. No entanto, os fracionamentos bioguiados envolvem etapas repetitivas de testes de fracionamento e atividade biológica sendo, geralmente, trabalhoso, caro, pouco

eficiente e demorado¹⁸⁻²⁰. Alternativamente às placas multi-poços dos HTS e, valendo-se da seletividade e alta produtividade, abordagens baseadas em afinidade têm se tornado atrativas para triagem de produtos naturais¹⁸.

1.2 A cromatografia de bioafinidade na identificação de ligantes

A cromatografia de bioafinidade pode ser definida como uma cromatografia a líquido que utiliza uma enzima ou outra biomolécula alvo como fase estacionária. Esta fase estacionária pode ser produzida ligando-se covalentemente, aprisionando, adsorvendo ou, de alguma outra forma, imobilizando a biomolécula em um suporte cromatográfico. Este suporte pode ser colocado dentro de uma coluna ou capilar para utilização²¹ ou, ainda, pode ser a própria superfície interna do capilar²². A biomolécula imobilizada se liga seletivamente ao ligante ou grupo de ligantes de uma amostra, com alta especificidade e seletividade, tal como observado nas interações dos sistemas biológicos como a interação enzima-substrato ou a antígeno-anticorpo²³⁻²⁵.

Desta maneira, a cromatografia de bioafinidade é empregada com sucesso em projetos de química medicinal para a caracterização detalhada das interações entre os fármacos e as proteínas alvo. A exploração dos princípios de separação por afinidade foi desenvolvida por Emil Starckensten em 1910, que reportou a ligação de α -amilase em amido insolúvel²⁶. O termo cromatografia de afinidade foi introduzido em 1968, por CUATRECASAS et al.²⁷, ao descrever a técnica de purificação de enzimas através de fases estacionárias contendo substratos ou inibidores imobilizados, diferenciando-se das outras técnicas cromatográficas, como apresentado na FIGURA 1.1.

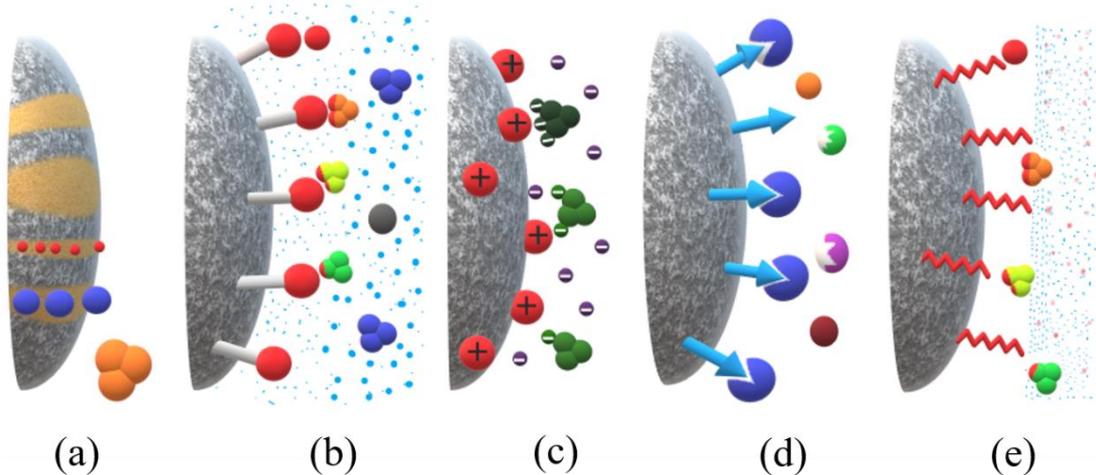


FIGURA 1.1 – Princípios empregados em cromatografia: (a) por filtração em gel, (b) de interações hidrofóbicas, (c) de troca iônica, (d) de afinidade e (e) em fase reversa, adaptado²⁸.

Nesse contexto, o que diferencia a cromatografia de afinidade clássica da cromatografia de bioafinidade é que, no primeiro caso, um ligante seletivo de alta afinidade é imobilizado usualmente para purificar uma proteína, enquanto no segundo, a biomolécula é imobilizada para triar ligantes de baixa a alta afinidade²⁹.

Três etapas são essenciais ao desenvolvimento da cromatografia de bioafinidade, quando a biomolécula alvo é uma enzima: a imobilização da enzima, a avaliação da preservação da atividade e determinação dos parâmetros cinéticos após a imobilização³⁰.

A cromatografia de bioafinidade permite a fácil caracterização termodinâmica, cinética e química, além do mecanismo de interação biológica em um sistema hifenado *online*³¹. Uma abordagem para este tipo de estudo é a eluição zonal. Nesse modo de eluição, injeta-se um ligante em baixa concentração na coluna de bioafinidade para determinações de, por exemplo, afinidade relativa, intensidade das interações, efeitos da mudança de condições reacionais (pH, solvente, temperatura, etc.), triagens e mecanismos de inibição^{32,33}.

Na cromatografia zonal, o fator de retenção de um composto é comparável com sua afinidade pelo alvo. Mas, dada a baixa eficiência

cromatográfica da coluna, não é possível, quase sempre, separar os compostos de uma mistura com base em suas afinidades relativas. Portanto, muitas vezes são utilizados sistemas cromatográficos multidimensionais³¹.

Em métodos multidimensionais, a primeira dimensão está ligada em uma bomba de um cromatógrafo a líquido (LC); que é utilizada para a entrega de fase móvel, a um amostrador automático e à uma coluna que contém uma biomolécula imobilizada. A segunda dimensão também utiliza uma bomba de LC, mas está acoplada à uma coluna analítica e à um detector conveniente³⁴, gerando um sistema cromatográfico bidimensional (2D LC). Alternativamente aos métodos multidimensionais, é possível acoplar a coluna de bioafinidade diretamente ao espectrômetro de massas^{35,36}. Mesmo sem eficiência cromatográfica da coluna, o MS é capaz de monitorar seletivamente o íon de interesse, desde que a fase móvel usada para eluição com a biomolécula seja compatível com tampões de baixa força iônica, necessários ao *electrospray* (ESI)³⁷.

Uma outra abordagem para a cromatografia de bioafinidade é a eluição frontal, na qual a solução em triagem de concentração conhecida é continuamente injetada. Os diferentes ligantes migram pela coluna em taxas diferentes e permanecem retidos, baseado em suas afinidades, até a saturação dos sítios de interação, quando a eluição se inicia^{32,33}. O cromatograma resultante deste modo de análise é frequentemente denominado curva de ruptura, sendo esta técnica empregada para avaliar a retenção relativa com base na afinidade^{31,38}. A eluição frontal pode ser empregada para análises individuais de ligantes ou em misturas. Em análises individuais, pode ser utilizada a detecção por UV/Vis ou fluorescência³¹, enquanto em mistura exige a utilização de MS.

Uma vantagem da eluição frontal sobre a zonal reside na possibilidade de informação simultânea das constantes de equilíbrio para a interação do alvo com o ligante e a capacidade de ligação da coluna. No entanto, a análise frontal necessita de maiores concentrações do ligante a ser estudado. Por

outro lado, experimentos com eluição zonal são mais convenientes para identificar os locais de interação e mensurar tais interações nesses locais²¹.

A cromatografia de bioafinidade apresenta diversas conveniências na busca de ligantes, como a identificação direta de um composto bioativo. Entretanto, a triagem em extratos naturais ainda é um desafio. Além disso, a fase móvel deve ser predominantemente aquosa (tipicamente > 95%) para assegurar adequadas interações ligante-proteína, o que pode resultar em um aumento de interações não específicas com o suporte, sobretudo em colunas empacotadas³⁹.

1.3 Ensaios de *ligand fishing*

O *ligand fishing* é uma técnica baseada em afinidade, na qual, devido a interação de um ligante com uma biomolécula alvo, é possível separá-lo dos demais componentes de uma mistura⁴⁰. Estes ensaios têm sido aplicados de diferentes formas, tais como ultrafiltração⁴¹⁻⁴³, microdiálise^{44,45}, nanotubos^{46,47}, partículas magnéticas^{40,48}, zeólitas⁴⁹, fibras ocas^{50,51}, etc. Quando se trata de enzimas, dada a excelente preservação da atividade enzimática e a praticidade no manuseio, as partículas magnéticas (MB, do inglês *magnetic beads*) têm sido, até o momento, o suporte sólido mais amplamente utilizado para a captura de ligantes^{40,52}.

Desta forma, as MBs contendo a enzima imobilizada (enzima-MB) podem ser imersas diretamente em misturas de coleções sintéticas ou em extratos naturais brutos, onde os compostos com afinidade pela biomolécula são retidos e facilmente retirados da mistura, com auxílio de um ímã, enquanto os não ligantes permanecem no sobrenadante e, em seguida, são removidos. A FIGURA 1.2. ilustra o processo geral dos ensaios de *ligand fishing*, na qual apenas os compostos que apresentam afinidade são capturados seletivamente ou “pescados” pela biomolécula^{39,53}.

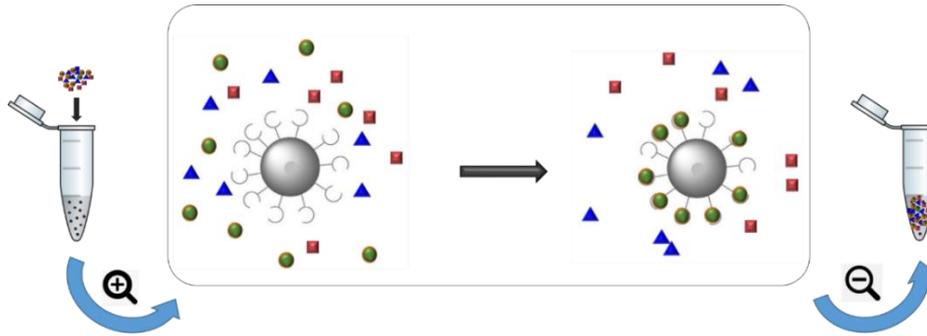


FIGURA 1.2 – Esquema geral do princípio dos ensaios de *ligand fishing*. Inicialmente a enzima-MB é imersa em uma mistura (representada por ●, Δ e □) e apenas as substâncias com afinidade pela biomolécula (●) ficam retidas na mesma. Os demais compostos (Δ e □) permanecem em solução e podem ser facilmente removidos.

Os ensaios de *ligand fishing* são realizados de maneira *off-line*, na qual a captura seletiva de ligantes e a análise são dois passos independentes⁵⁴. A FIGURA 1.3 sumariza as etapas do processo onde, em princípio, seleciona-se a mistura ou extrato de interesse em que a enzima-MB será imersa (carregamento) e incubada (etapa 1), seguido de lavagem para remoção dos compostos que não apresentaram afinidade (etapa 2), extração dos ligantes retidos (etapa 3) e análise para identificação dos mesmos^{39,55}.

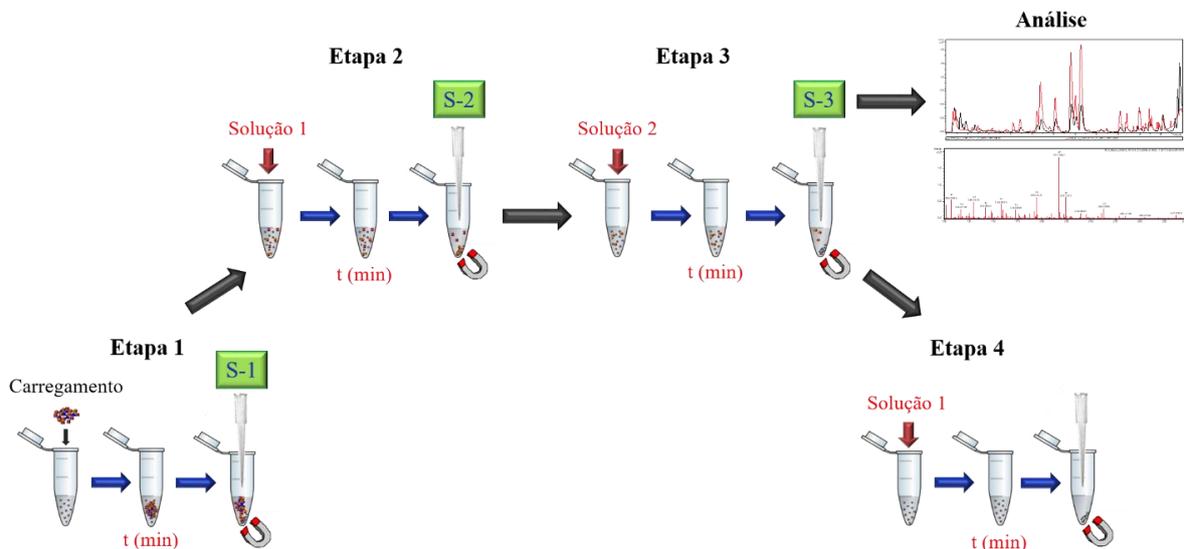


FIGURA 1.3 – Etapas envolvidas nos ensaios de *ligand fishing*. Etapa 1: carregamento com a mistura de interesse e incubação por tempo estabelecido, seguido da remoção do sobrenadante 1 (S-1). Etapa 2: lavagem para retirada dos compostos não retidos utilizando-se a Solução 1, de 2 a 3 vezes, gerando os sobrenadantes 2 (S-2). Etapa 3: extração dos compostos (ligantes) que apresentaram afinidade, através da adição da Solução 2, seguido de incubação por tempo estabelecido e análise desta fração (S-3). Etapa 4: recondicionamento com a Solução 1 para reuso, caso a Solução 3 não tenha desnaturado a proteína.

O tempo de incubação com a mistura de interesse, de lavagem e extração, bem como a solução extratora dos compostos retidos, são variáveis que devem ser avaliadas caso a caso. A solução extratora deve ser capaz de romper a interação entre o ligante e a biomolécula, através da redução da afinidade de ligação entre ambos, fazendo com que os ligantes voltem para o sobrenadante. A solução extratora (Solução 2, FIGURA 1.3) pode ser a mesma solução de incubação, mas com aplicação de temperatura, variação de pH e/ou força iônica, com adição do substrato ou solvente orgânico e, caso ainda não seja possível extrair os ligantes retidos, a solução extratora pode ser diferente da solução de incubação⁵⁶. As variações na solução para a extração dos ligantes podem afetar a atividade da enzima e, desta forma, é necessária uma etapa de condicionamento e avaliação da atividade, antes de reiniciar o processo.

A análise dos ligantes extraídos nos ensaios de *ligand fishing* em combinação com técnicas cromatográficas hífenadas a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) e/ou ressonância magnética nuclear (LC-PDA-SPE-NMR)⁵⁷, fornecem identificação rápida e/ou caracterização estrutural completa dos ligantes da mistura com identificação de novos *hits*. Os ensaios de captura seletiva de ligantes podem ser usados para orientar o isolamento de compostos em extratos brutos, permitindo a posterior caracterização da interação dos ligantes puros com a enzima⁵⁸.

Previamente aos ensaios, deve-se selecionar as partículas magnéticas que serão utilizadas como suporte para imobilização. As partículas variam em tamanho, de nanômetros a micrômetros, e são constituídas de um material magnético (óxido de ferro, cobalto ou níquel)⁵⁹. A magnetita (Fe_3O_4) é o mais magnético de todos os minerais que ocorrem naturalmente na Terra e é, portanto, amplamente usada para a imobilização, estando disponível comercialmente em diversos tamanhos e com diferentes grupos funcionalizados³⁴. Em circunstâncias normais, quanto menor o tamanho de uma partícula, menor a temperatura necessária para a transição do ferromagnético para o superparamagnético. Devido

ao menor tamanho das nanopartículas magnéticas, elas geralmente exibem um comportamento superparamagnético que leva a uma estrutura superficial mais favorável para a modificação⁵⁵.

As nanopartículas tendem a se agregar devido à sua alta energia superficial causada pela elevada área superficial. Além disso, as nanopartículas de óxido de ferro podem ser facilmente oxidadas pelo ar, resultando em perda de magnetismo e dispersibilidade. Portanto, a utilização de micropartículas funcionalizadas tem sido amplamente aplicada na imobilização de enzimas. Estas possuem elevadas superfícies específicas e podem ser separadas rapidamente através da aplicação de forças magnéticas externas. Desta forma, o processo de separação é brando para a enzima, evitando as forças de cisalhamento causadas pela centrifugação, como quando o ensaio de *ligand fishing* é realizado com ultrafiltração, nanotubos, zeólitas ou fibras ocas^{55,59}.

Uma das maiores vantagens do uso de *ligand fishing* é a possibilidade de identificação de ligantes de baixa afinidade, que geralmente são negligenciados quando se utilizam outras técnicas de triagem, bem como metabólitos secundários de baixa concentração que possuem alta afinidade pelo alvo biológico³⁹.

1.4 Imobilização de enzimas

Os biocatalisadores, em geral, apresentam seletividade e especificidade (regio-, quimio- e estereosseletividade)⁶⁰. Tais propriedades têm sido exploradas pela química sintética, pois dispensa etapas de ativação ou proteção de grupos funcionais, além dos biocatalisadores serem biodegradáveis e não deixam resíduos de metais pesados. As reações biocatalíticas são ambientalmente amigáveis, pois usualmente ocorrem em condições brandas (temperatura menor que 100 °C, pressão ambiente e pH próximo à neutralidade) requerendo baixas quantidades de energia⁶¹. As enzimas podem ser imobilizadas e reutilizadas por muitos ciclos, superexpressadas para tornar os processos

economicamente mais eficientes ou, ainda, modificadas para o aperfeiçoamento de sua atividade⁶².

O processo de imobilização vem sendo estudado há anos. A motivação inicial foi devido à substituição dos processos industriais, catalisados por enzimas em solução, por seus homólogos imobilizados sobre um suporte. Desta maneira, a enzima pode ser utilizada em reatores de processo contínuo devido ao aumento de estabilidade, é facilmente removida da mistura reacional e mantém sua atividade preservada por diversos ciclos. Estas implementações reduziram o custo com o biocatalisador, representando uma economia significativa em operações que requerem enzimas caras⁶³. Além destas vantagens, a imobilização geralmente permite operações em meio não aquoso e a utilização em processos multienzimáticos⁶⁴.

A imobilização pode ocorrer por três métodos tradicionais: ligação a um suporte, aprisionamento (encapsulamento) e ligação cruzada (FIGURA 1.4). A ligação a um suporte pode ser de natureza física, iônica ou covalente. O aprisionamento ocorre através de inclusão da enzima em uma rede polimérica (estrutura de gel) ou um dispositivo de membrana. A ligação cruzada, de agregados ou cristais de enzimas, utiliza um reagente bifuncional para preparar as macropartículas⁶⁴.

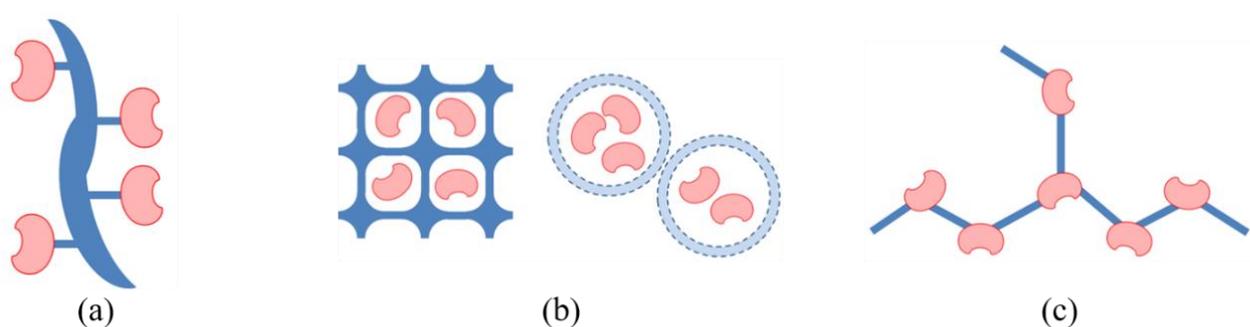


FIGURA 1.4 – Tipos de imobilizações enzimáticas, (a) ligação a um suporte, (b) aprisionamento e (c) ligação cruzada.

Não existe um método ou suporte ideal para imobilização. A escolha deve ser baseada no conhecimento da constituição do sítio ativo, propriedades bioquímicas da enzima, grupos funcionais, estabilidade química, tamanho do poro e diâmetro de partícula do suporte³. A dispersão das moléculas de enzima no suporte deve proporcionar uma melhor acessibilidade e/ou uma estabilização adicional em relação à desnaturação pelo meio reacional, quando comparada com a enzima livre⁶⁴.

Os processos biocatalíticos que empregam enzimas imobilizadas podem ocorrer em batelada alimentada ou por sistema contínuo, utilizando reatores de enzimas imobilizadas (IMERs, do inglês *Immobilized Enzyme Reactor*)⁶⁵. Ainda, a enzima pode ser imobilizada na superfície interna funcionalizada de capilares de sílica fundida (~ 100 µm de diâmetro interno) e, por vezes, chamado de ICER (do inglês *Immobilized Capillary Enzyme Reactor*). A utilização de um ICER ou IMER como fase estacionária em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) fornece acurácia, automação, rapidez e possibilidade de reutilização da enzima a cada análise, onde a reprodutibilidade do sistema cromatográfico é combinada com a especificidade e sensibilidade de uma reação enzimática^{6,22,65-67}. Os ICERs, além de utilizarem pequeno volume em baixas concentrações de amostra e fase móvel, apresentam baixas interações inespecíficas²¹.

A imobilização de enzimas pode ser feita “*in batch*” ou “*in situ*”. Quando se emprega o processo “*in batch*” a enzima é imobilizada e, em seguida, empacotada na coluna, enquanto que “*in situ*”, a enzima é diretamente imobilizada na coluna previamente preparada (IMER) ou na sua superfície interna funcionalizada (ICER) do capilar. Estudos comparativos dos métodos de imobilização com penicilina G acilase, em vários suportes de sílica, apontaram o processo “*in situ*” como mais satisfatório na quantidade de enzima ligada, bem como na retenção de atividade^{22,65}. Em cromatografia de bioafinidade o processo *in situ* tem sido o mais utilizado³⁷.

A imobilização covalente; através dos grupos funcionais amina, epóxido (FIGURA 1.5) e carboxila, e os suportes de sílica são os mais empregados em cromatografia de bioafinidade. Para este tipo de imobilização, a primeira etapa necessária é a ativação da biomolécula e/ou suporte. A ativação da biomolécula é feita quando se deseja que a mesma seja imobilizada em uma região específica. O uso de um suporte ativado é mais comum para imobilização, que pode ser realizado por meio de reações químicas tais como: base de Schiff (aminação redutiva), epóxido, formação de ligação amida, *N*-hidroxissuccinimida, carbonildiimidazol, brometo de cianogênio, etc. Após o preparo, e antes dos ensaios com ligantes, as enzimas imobilizadas são caracterizadas por parâmetros cinéticos ou de afinidade através de cromatografia a líquido^{25,31}.

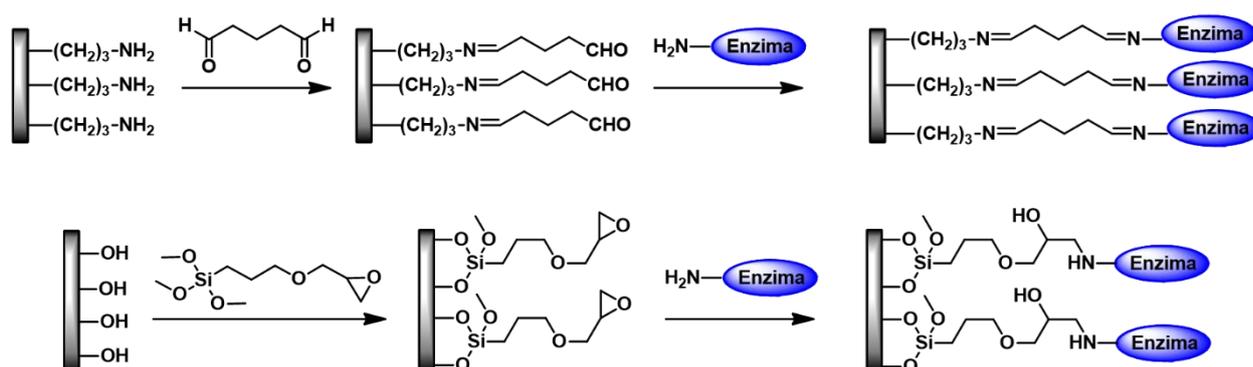


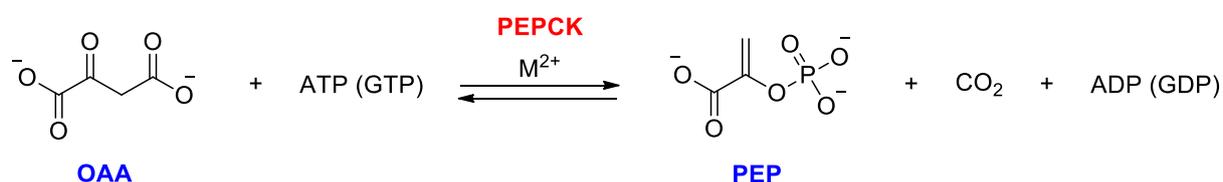
FIGURA 1.5 – Imobilizações covalentes sendo, acima, ligação do grupo amina do suporte ao reagente bifuncional glutaraldeído, com formação de imina, seguido da imobilização da enzima por resíduos básicos, com formação de outra imina e, abaixo, funcionalização do suporte, com inserção de grupo epóxido, seguido da imobilização da enzima por resíduos básicos e formação de amina.

Para seleção do suporte deve-se levar em consideração características como resistência mecânica, estabilidade química e microbiológica, tamanho de poros e partículas, além da capacidade de fixação ao suporte⁶⁸. Diversos suportes são disponíveis comercialmente como polissacarídeos, celulose, dextrana, agarose e os suportes de sílica²². O capilar de sílica fundida se destaca pela alta área superficial para imobilização, associada a baixa capacidade de interações inespecíficas com os analitos⁶⁹.

1.5 A enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase

A fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) foi primeiro reportada por WOOD & WERKMAN^{70,71}, relacionada à fixação de CO₂ na fermentação por *Propionibacterium* com produção de ácido succínico, sendo sugerido que a formação do ácido tinha como precursor algum composto com 3 carbonos em sua estrutura. Em 1940, os mesmos autores publicaram⁷² a fixação de CO₂ por *Propionibacterium pentosaceum*, e apontaram que o possível composto com 3 carbonos em sua estrutura era o ácido fosfopirúvico. Passados 30 anos, a enzima foi isolada de fígado de galinha, parcialmente purificada, descrita por sua reação química como conhecida até hoje e nomeada como oxaloacético carboxilase⁷³. Por um curto período, a enzima recebeu diferentes nomes na literatura⁷⁴ e, subsequentemente, mudado para fosfoenolpiruvato carboxiquinase⁷⁵.

A PEPCK é uma enzima amplamente distribuída em todos os grupos de organismos conhecidos⁷⁶. Sua atividade catalítica está relacionada com a descarboxilação e a fosforilação reversível de oxaloacetato (OAA), para se obter o fosfoenolpiruvato (PEP) e dióxido de carbono, dependente de um nucleotídeo (ATP ou GTP) para a transferência de fosfato, na presença de íons metálicos divalentes como cofator⁷⁷, como mostrado no ESQUEMA 1.1.



ESQUEMA 1.1 – Reação reversível de descarboxilação e fosforilação catalisada pelas PEPCKs.

Baseado na especificidade de nucleotídeo, as PEPCKs podem ser divididas em duas famílias, na qual as ATP-dependentes (EC 4.1.1.49) são encontradas em bactérias, leveduras, plantas superiores e tripanosomatídeos, e as

GTP-dependentes (EC 4.1.1.32); em moluscos, insetos, fungos e animais vertebrados⁷⁶⁻⁷⁸. Diferentes níveis de identidade na sequência primária são encontradas entre PEPCKs da mesma família, mas uma baixa identidade (18-20%) é verificada entre PEPCKs de famílias diferentes^{77,79}. Alguns resíduos de aminoácidos são conservados no sítio ativo de ambas as famílias, no entanto, nenhuma similaridade é observada nos sítios de ligação com o nucleotídeo entre as famílias, justificando a dependência específica de um nucleotídeo ao outro⁷⁷.

Trypanosoma cruzi, o agente causador da doença de Chagas, tripanosomatídeos relacionados e várias espécies de *Leishmania* utilizam glicose e aminoácidos como fonte de energia. A glicose é preferida sobre aminoácidos e, então, primeiramente consumida quando ambos estão presentes. A utilização de carboidratos como fonte de energia e carbono em todos os ciclos de vida do *T. cruzi* apresenta características incomuns. A glicose é degradada apenas parcialmente para CO₂ e catabólitos, apesar dessas células conterem um conjunto completo de enzimas glicolíticas, apresentarem atividade no ciclo de Krebs, de fosforilação e na cadeia de transporte de elétrons no citocromo. A via glicolítica não é regulada nos seus pontos de controle clássicos (hexoquinase e fosfofrutoquinase) e está contida, até a etapa da fosfoglicerato quinase, na organela denominada glicossomo⁸⁰⁻⁸³.

A PEPCK desempenha um papel fundamental no metabolismo desses parasitas⁸¹. A fermentação da glicose leva a produção de catabólitos reduzidos, majoritariamente succinato e L-alanina, ligados a reoxidação de NADH. A produção de succinato depende da fixação de CO₂ que, por sua vez, é mediado pela PEPCK através da produção de PEP no glicossomo (FIGURA 1.6). Subsequentemente, OAA pode ser reduzido para malato, através da malato desidrogenase (MDH), o qual entra no ciclo de Krebs, na mitocôndria, com produção de succinato como produto final do catabolismo. Ao mesmo tempo, o malato formado no glicossomo pode participar, após entrar no citossol, do ciclo da glutamato desidrogenase, levando a produção de L-alanina^{80,84}.

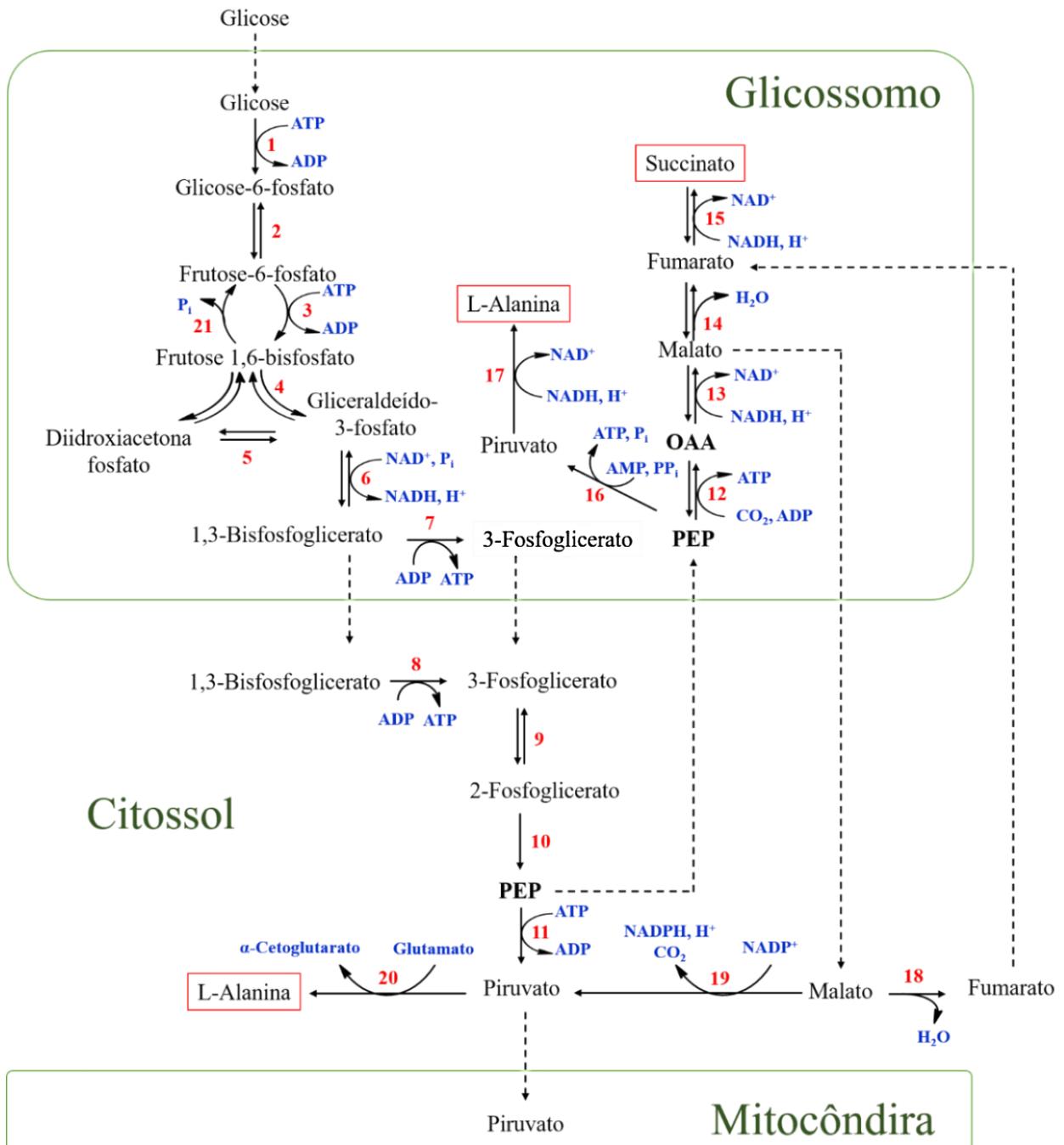


FIGURA 1.6 – Representação esquemática da glicólise em *T. cruzi*. As enzimas participantes são: 1, hexoquinase/glucoquinase; 2, fosfoglicose isomerase; 3, fosfofrutoquinase; 4, aldolase; 5, triose fosfato isomerase; 6, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 7, fosfoglicerato quinase (glicosomal); 8, fosfoglicerato-quinase (citosólica); 9, fosfoglicerato mutase; 10, enolase; 11, piruvato quinase; 12, **PEPCK**; 13, MDH (glicosomal); 14, fumarato hidratase (glicosomal); 15, fumarato redutase NAD-ligada; 16, piruvato-fosfato diquinase; 17, alanina desidrogenase; 18, fumarato hidratase (citosólica); 19, MDH NADP-ligada (citosólica); 20, alanina aminotransferase; 21, frutose-1,6-bifosfatase. Os produtos de fermentação aeróbica são apresentados em caixas. L-alanina pode ser produzido, tanto no glicossomo quanto no citosol. Succinato também pode ser produzido no citosol, com utilização de fumarato como receptor de elétrons⁸³.

Experimentos *in vivo*, com análises por RMN, em células de *T. cruzi* com adição de ácido 3-mercaptopicolínico (3MP), um inibidor da PEPCK, resultou em uma significativa diminuição no consumo de glicose e produção de succinato, com um concomitante aumento na produção de L-alanina, demonstrando o papel fundamental da enzima no catabolismo do parasita⁸⁵.

T. cruzi é capaz de catabolizar L-prolina, bem como outros aminoácidos⁸⁴. Na ausência de carboidratos, a acetil-CoA, o OAA ou o malato se acumulariam a menos que entrassem novamente no ciclo, respectivamente como PEP ou piruvato. O PEP, produzido pela PEPCK através da descarboxilação do OAA, também pode ser usado na gliconeogênese. As propriedades cinéticas da enzima purificada indicam, *in vitro*, sob condições fisiológicas, que esta é a reação favorecida pela PEPCK⁸⁰. Além disso, foi reportado⁸⁵ que o catabolismo da prolina com conversão para piruvato, alanina, citrato e isocitrato é bloqueado na presença de 3MP.

Desta forma, a PEPCK de *T. cruzi* é uma enzima-chave, descrita em todas as formas evolutivas do parasita, na flexibilidade do uso de carboidratos e aminoácidos como fonte de energia. Em contraste com o seu papel em *T. cruzi*, a função central da PEPCK em bactérias, leveduras e vertebrados é iniciar a via gliconeogênica⁷⁷. Em seres humanos e outros mamíferos a PEPCK é citossólica e fundamental no metabolismo de carboidratos, que auxilia na regulação do nível de glicose no sangue. Presente em tecidos gliconeogênicos, tais como fígado e rim, a enzima está associada com a conversão de lactato e outras moléculas (de não-carboidratos) à glicose que, por sua vez, é liberada para o sangue^{77,78}. Devido a importância da PEPCK no metabolismo de carboidratos em seres humanos, esta enzima tem sido avaliada como um potencial alvo de novos fármacos para o tratamento de diabetes mellitus não dependente de insulina^{78,86}.

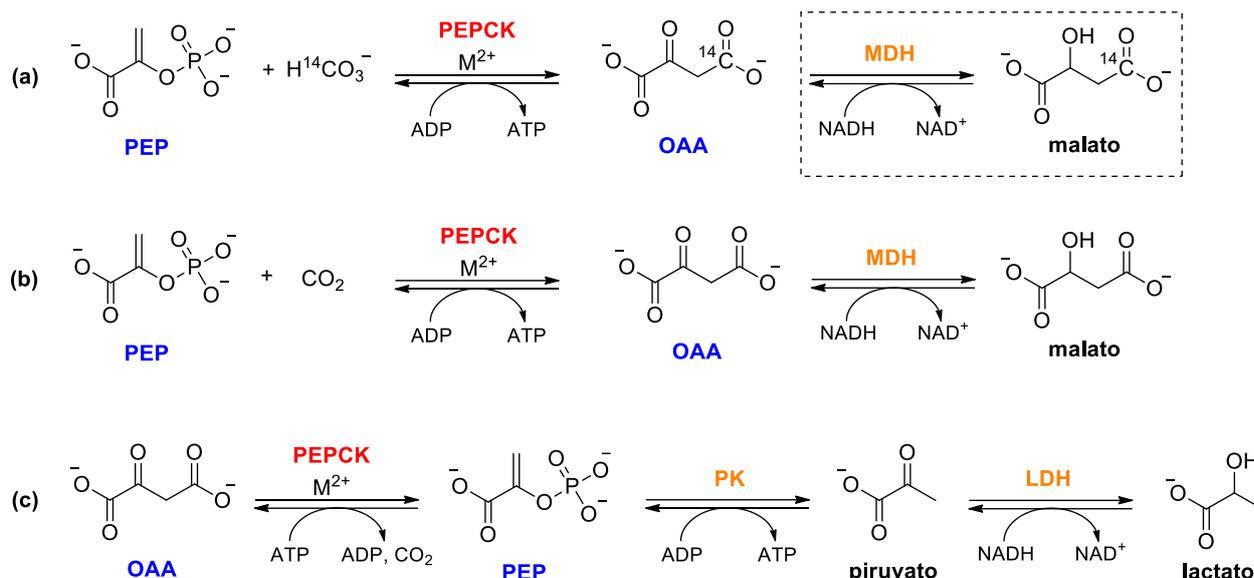
As diferenças significativas na estrutura terciária entre a PEPCK do parasita e a humana prevê afinidades distintas por substratos, possibilitando um inibidor específico para a enzima do parasita⁷⁷. Desta forma, a PEPCK do parasita

tem sido considerada um alvo potencial na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para a doença de Chagas^{77,87,88}.

A doença de Chagas atinge cerca de 10 milhões de infectadas nas Américas e 120 milhões estão em risco de contração⁸⁹, onde seu impacto pode atingir proporções globais devido às populações migratórias. A compreensão completa da patogênese, bem como os alvos terapêuticos e identificação de fatores genéticos prognósticos, não estão completamente esclarecidos. A doença de Chagas permanece, assim, uma doença negligenciada, sem vacinas ou medicamentos antiparasitários comprovadamente eficientes em pacientes cronicamente infectados^{89,90}.

A atividade catalítica da PEPCK é sempre mensurada por ensaios laborosos, a maioria das vezes envolvendo a oxidação de NADH a NAD⁺ (ESQUEMA 1.2). Inicialmente, a atividade catalítica do PEPCK foi medida pela incorporação de ¹⁴CO₂ no OAA (ESQUEMA 1.2a)⁷³. Em 1954⁹¹, um ensaio enzimático acoplado foi desenvolvido, na qual o OAA produzido pela ação da PEPCK é convertido em malato pela MDH, com consequente oxidação de NADH a NAD⁺ (ESQUEMA 1.2b). Este ensaio foi, frequentemente, empregado em conjunto com substratos isotopicamente marcados com ¹⁴C (ESQUEMA 1.2a, no quadro), como forma complementar de mensurar a atividade enzimática.

A reação catalítica no sentido da formação de PEP, a princípio, foi monitorada pela medição de fosfato inorgânico por hidrólise⁹². Em seguida, um ensaio acoplado foi relatado, desta vez usando piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) com oxidação de NADH (ESQUEMA 1.2c)^{93,94}.



ESQUEMA 1.2 – Abordagens clássicas para medir a atividade catalítica da PEPCK.

Os métodos presentes no ESQUEMA 1.2 foram desenvolvidos entre a década de 50 e 60, mas ainda são utilizados para mensurar a atividade da PEPCK de diferentes organismos^{95–102} com pouca ou nenhuma modificação. Os dois métodos mais empregados (ESQUEMA 1.2b e 1.2c) são ensaios acoplados que valem-se de enzimas NADH-dependentes, nas quais a atividade de PEPCK é indiretamente monitorada pela diminuição da absorbância a 340 nm como resultado da depleção de NADH. Estranhamente, o NADH foi relatado como um inibidor da PEPCK de *E. coli*^{103,104}.

Em ensaios acoplados, a reação enzimática principal ocorre no mesmo meio reacional da reação indicadora. O acoplamento de reações exige a compatibilidade nas condições do meio, além de nenhum substrato ou produto de uma reação deve ter ação moduladora sobre a outra. Também, os ensaios enzimáticos devem ser realizados sob condições ótimas ou o mais próximo possível destas condições, em que a enzima é menos sensível a pequenas variações na concentração dos componentes do ensaio, o que garante reprodutibilidade. Condições ótimas são conseguidas alterando-se individualmente o pH, a concentração de cada componente e a temperatura. As misturas reacionais de ensaios acoplados são complexas, em que a variação de

cada condição do ensaio pode exigir um grande número de medições¹⁰⁵. Porém, condições ótimas dificilmente são conseguidas simultaneamente para duas ou mais enzimas¹⁰⁶.

DUFF e SNELL¹⁰⁷ realizaram um trabalho comparativo com quatro diferentes ensaios acoplados para a PEPCK usando três diferentes músculos de rato. Uma grande incongruência foi obtida quando comparado o método de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ com a reação da MDH para medidas de atividade, cujos valores encontrados para a PEPCK do mesmo músculo diferiram em uma ordem de magnitude em todos os músculos analisados. Os autores mostraram, ainda, que os ensaios com PK podem levar a resultados não confiáveis, visto que Na^+ estimula a atividade da enzima, enquanto K^+ , Mg^{2+} e NH_4^+ diminuem sua atividade. Estes íons são adicionados nos ensaios a partir de tampões e cofatores. Assim, as limitações dos ensaios acoplados ficam claras, uma vez que qualquer interferência na atividade da segunda enzima pode gerar resultados não confiáveis.

Medidas diretas do produto da reação, como se realiza para inúmeras enzimas, são impraticáveis para a PEPCK. Embora seja possível monitorar OAA e PEP no UV, ambos absorvem na mesma região. Ao mesmo tempo, o OAA apresenta equilíbrio ceto-enólico em solução, que forma quelatos cíclicos ressonantes com os cofatores metálicos Mn^{2+} e Mg^{2+} . Ademais, a descarboxilação espontânea de OAA para piruvato é acelerada na presença desses íons¹⁰⁸.

Os trabalhos publicados com a PEPCK nativa de *T. cruzi*, isolada diretamente de sua forma epimastigota, utilizaram os ensaios acoplados para medir a atividade e os parâmetros cinéticos^{85,109–112}. Em 2001, a estrutura cristalina da PEPCK recombinante de *T. cruzi* (*TcPEPCK*) foi determinada por TRAPANI et al.⁷⁷, apresentada na FIGURA 1.7. A enzima é composta por um homodímero, sendo que cada monômero se dobra em dois complexos α/β mistos, com os dois sítios ativos localizados afastados uns dos outros, em um arranjo que parece permitir um acesso independente dos substratos para os dois sítios ativos. Para a

obtenção do cristal, a *Tc*PEPCK foi expressa em *E. coli* e purificada, mas o protocolo ainda não foi publicado.

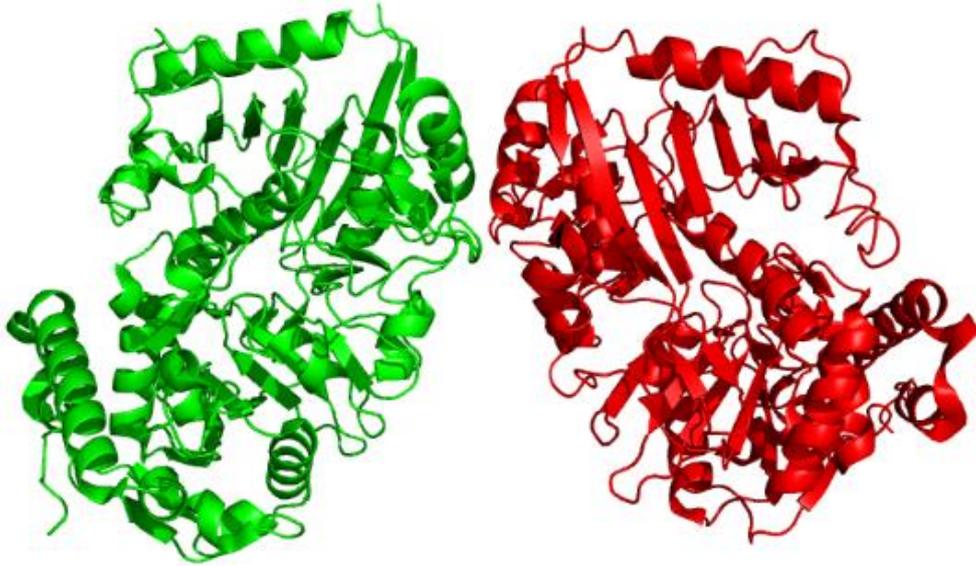


FIGURA 1.7 – Estrutura cristalográfica da PEPCK de *T. cruzi* (PDB 1II2).

2 Objetivos

Desenvolver biorreatores com a enzima heteróloga PEPCCK de *T. cruzi* covalentemente imobilizada para serem empregados na triagem de ligantes da enzima.

3 Procedimento Experimental

3.1 Materiais

Todos os procedimentos cromatográficos analíticos aqui descritos, referentes ao monitoramento de atividade e caracterização da TcPEPCK em solução e imobilizada, foram realizados em um cromatógrafo a líquido com duas bombas SHIMADZU LC-20AD, sendo uma quaternária e outra unitária, um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-20A, um auto-injetor SHIMADZU SIL-20A, um degaseificador modelo DGU-20A5 e uma interface modelo CBM-20A conecta o sistema. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas modelo Esquire 6000 (Bruker Daltonics) equipado com uma fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI), operando no modo negativo, e analisador do tipo *ion-trap* (IT), formando o sistema LC-MS(/MS). Os cromatogramas são registrados através do *software* Compass DataAnalysis® 4.0 e, para qualificações de método e quantificações, foi utilizado o *software* Compass QuantAnalysis® 2.0, ambos Bruker Daltonics.

Todos os procedimentos de purificação enzimática foram realizados em um cromatógrafo a líquido de baixa pressão para separação de proteínas ÄKTA-FPLC™ (GE Healthcare), composto por um detector de UV UPC-900, uma bomba binária P-920, um coletor de fração FRAC-920, sendo os cromatogramas registrados através do *software* UNICORN na versão 3.2.

Para a análise dos ensaios de *ligand fishing* com os extratos de plantas do cerrado, foi utilizado o sistema UHPLC Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies) composto por uma bomba binária (G7120A – *High speed Pump*), auto-injetor 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 – Impact HD, Rheinstetten, Alemanha) equipado com fonte ESI (LC-HRMS). A aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o software Data Analysis® (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

Para os ensaios enzimáticos foi utilizado um banho seco com agitação, modelo B1-AQR (VHD) e centrífuga 5415R (Eppendorf).

Nos experimentos com as células de *E. coli*, foi utilizado o sonicador Model 500 Sonic dismembrator (Fisher Scientific), incubadora Innova 4430 (New Brunswick) e centrífuga D-37520 Osterode (Thermo).

A homogeneização das amostras foi efetuada em vórtex modelo Lab Dancer (IKA).

A pesagem de padrões foi realizada em balança analítica modelo AL204 (Mettler Toledo), com precisão de 0,0001 g.

As medidas e ajustes de pH foram efetuadas em pHmetro PG1800 (Gehaka), com precisão de 0,01 unidade.

Para os testes de efeito da temperatura foi utilizado o termociclador modelo Mastercycler gradient 2231 (Microtubos).

Para o preparo dos capilares e imobilização da enzima, foi utilizada uma bomba-seringa modelo 11 Plus (Harvard Apparatus).

Para a imobilização em partículas magnéticas, foi utilizado o agitador rotatório, modelo Revolver (Labnet), com velocidade fixa de 20 rpm, com capacidade para microtubos de 1,5 e 2 mL e tubos Falcon de 15 e 50 mL.

Para as separações das partículas do sobrenadante, foi utilizado o separador magnético manual para seis microtubos de 1,5 mL, modelo WM206 (Wang Yuan Biotech).

Os tampões fosfato utilizados como fase móvel foram filtrados a vácuo em sistema Durapore®, utilizando membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), com 47 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm.

As fases móveis preparadas foram degaseificadas em ultrassom modelo 1510 (BRANSON).

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema Milli-Q (MILLIPORE). Os solventes orgânicos foram grau HPLC (J.T. Baker e Honeywell).

Os reagentes acetato de amônio, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico (HEPES), fosfoenolpiruvato monopotássio (PEP), ácido oxaloacético (OAA), adenosina 5'-trifosfato (ATP), adenosina 5'-difosfato (ADP), cloreto de manganês monoidratado, ditioneitol (DTT), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido bis(2-aminoetil)etilenoglicol-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) foram grau HPLC, adquiridos da Sigma-Aldrich.

As partículas magnéticas amino-terminadas suportadas em óxido de ferro supermagnético foram adquiridas da Sigma Aldrich (PN I7643) com diâmetro de 1 μm .

Hipoxantina $\geq 99\%$, xantina $\geq 99,5\%$, ofloxacina $\geq 99\%$, albendazol $\geq 98\%$, iodoacetamida $\geq 99\%$, ácido quinolínico 99% e NADH $\geq 97\%$ foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Aciclovir (Lote: M24136-1) foi doado pela EMS (Hortolândia, Brasil). 2-mercaptobenzimidazol 98%, 2-mercaptobenzoxazol 99%, 6-mercaptopurina $\geq 99,5\%$, 2-mercapto-5-metilbenzimidazol 99% e sulfeto de resorcinol 98% foram adquiridos da Acros Organics (Geel, Bélgica). As cumarinas¹¹³ (LSPN214, LSPN234, LSPN223, LSPN224 e LSPN272) e hidantoínas¹¹⁴ (LSPN551, LSPN552, LSPN553, LSPN54, LSPN557, LSPN558, LSPN59, LSPN561, LSPN562, LSPN563, LSPN564, LSPN565, LSPN566 e LSPN568) foram sintetizadas no Laboratório de Síntese de Produtos Naturais “Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira” e gentilmente doadas pela Profa. Dra. Arlene Gonçalves Corrêa. Gemifloxacina (Lote: QUB10006) foi doada pela Aché (São Paulo, Brasil). Moxifloxacina (Lote: M201400) foi doada pelo Instituto Vita Nova (Hortolândia, Brasil).

Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.2 Tampões utilizados

3.2.1 Tampões utilizados em etapas cromatográficas

- Tampão I: HEPES 50 mmol L⁻¹ pH 7,4; contendo EDTA 2 mmol L⁻¹ e DTT 1 mmol L⁻¹;
- Tampão II: HEPES 20 mmol L⁻¹ pH 7,5; contendo EDTA 0,1 mmol L⁻¹, DTT 0,5 mmol L⁻¹, MnCl₂ 2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol L⁻¹ e KCl 100 mmol L⁻¹;
- Tampão III: fosfato de potássio 200 mmol L⁻¹ pH 6,8; contendo EDTA 4 mmol L⁻¹;
- Tampão IV: HEPES 50 mmol L⁻¹ pH 6,8; contendo EDTA 2 mmol L⁻¹ e DTT 1 mmol L⁻¹.
- Tampão V: fosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ pH 7,50; contendo hidrogenossulfato de tetrabutilamônio (TBAHS) 5 mmol L⁻¹.
- Tampão VI: acetato de amônio 20 mmol L⁻¹ pH 9,50; contendo TBAHS 5 mmol L⁻¹.

3.2.2 Ensaios de atividade, imobilização e *ligand fishing*

- Tampão A: acetato de amônio 50 mmol L⁻¹ pH 9,00; contendo DTT 1 mmol L⁻¹ e MnCl₂ 1 mmol L⁻¹;
- Tampão B: acetato de amônio 15 mmol L⁻¹ pH 8,50;
- Tampão C: PIPES 50 mmol L⁻¹ pH 7,4; contendo KCl 90 mmol L⁻¹, EGTA 0,6 mmol L⁻¹, DTT 1 mmol L⁻¹, MnCl₂ 0,7 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 3 mmol L⁻¹;

- Tampão D: acetato de amônio 50 mmol L⁻¹ pH 9,00 contendo DTT 1 mmol L⁻¹, MnCl₂ 0,7 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 3 mmol L⁻¹.
- Tampão E: piridina 10 mmol L⁻¹ pH 6,0 com HCl.
- Tampão F: acetato de amônio 50 mmol L⁻¹ pH 5,50; contendo 20% de MeOH.

3.3 Expressão da *TcPEPCK* em *E. coli*

A obtenção da enzima recombinante *TcPEPCK* foi feita através da colaboração com o grupo do Prof. Dr. Glaucius Oliva do IFSC/USP, que gentilmente forneceu o plasmídeo pANEX-*TcPEPCK*. Este plasmídeo é uma construção em que o gene *TcPEPCK* foi inserido no vetor pANEX entre os sítios de restrição *BamHI* e *EcoRI*. O vetor pANEX é uma construção não comercial obtida do vetor pGEXB, retirando o gene que codifica a síntese da glutionina S-transferase, de forma a clonar o gene *TcPEPCK* sob o controle direto do promotor *tac*. O grupo do Prof. Glaucius purificou a enzima *TcPEPCK* e determinou sua estrutura tridimensional⁷⁷, porém a metodologia de purificação não foi publicada e não pode mais ser repetida devido à descontinuidade de colunas cromatográficas utilizadas.

O plasmídeo pANEX-*TcPEPCK* foi transformado em linhagem competente BL21(DE3)pT-GroE de *E. coli* por choque térmico na presença de CaCl₂ (30 min a 0 °C, 2 min a 42 °C e 2 min a 0 °C). Após o choque térmico, a cultura foi plaqueada em meio LB-ágar (Luria Bertani, m/v: triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5 e ágar 1,5%), *overnight* a 37 °C.

Quatro colônias isoladas foram cultivadas separadamente em 20 mL de meio líquido LB, contendo ampicilina (0,1 mg mL⁻¹) e cloranfenicol (34 µg mL⁻¹), *overnight* a 37 °C e 250 rpm. Em seguida, 1 mL do cultivo foi transferido para 500 mL de meio LB, contendo ampicilina e cloranfenicol nas mesmas concentrações citadas, que ficou incubado a 37 °C e 250 rpm até atingir densidade ótica a 600 nm entre 0,6-0,8.

Em seguida, foi realizada a indução, pela adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1 mmol L^{-1} , incubação em *shaker* por 5 horas, a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 250 rpm . Cada 125 mL de meio foi centrifugado em tubo Falcon de 50 mL , a 9000 g por 10 min . O pellet obtido foi estocado em freezer $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até utilização.

3.4 Purificação da *TcPEPCK*

Foram empregados três procedimentos diferentes para a purificação da *TcPEPCK*, descritas nas subseções a seguir. Todas as etapas de purificação foram acompanhadas por análise em SDS-PAGE¹¹⁵, utilizando dois marcadores de massas moleculares diferentes: marcador de proteína não-corado ($116,0$; $66,2$; $45,0$; $35,0$; $25,0$; $18,4$ e $14,4 \text{ kDa}$, Thermo Scientific) e marcador de proteínas de amplo espectro corado (260 ; 140 ; 95 ; 72 ; 52 ; 42 ; 34 ; 26 ; 17 e 10 kDa , Thermo Scientific). A concentração de proteínas das frações foram determinadas pelo método de Bradford¹¹⁶ através do kit da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), utilizando Coomassie Brilliant Blue G250.

3.4.1 Procedimento de purificação A

Lise: as células obtidas e armazenadas em tubo Falcon foram ressuspendidas em 10 mL de Tampão I contendo leupeptina $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, pepstatina $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 1 mmol L^{-1} e lisado por sonicação (23% de amplitude, 15 s on , 30 s off , por 4 min) em banho de gelo. Em seguida, o lisado foi centrifugado (14.100 g , 30 min e $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Salting out: ao sobrenadante da lise, foi adicionado lentamente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ previamente macerado, até 40% de saturação ($2,26 \text{ g}$ para cada 10 mL). O sal ficou em contato com o extrato enzimático a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 min sob agitação e 1 h estático. O conteúdo insolúvel foi removido por centrifugação

(1.300 g, 20 min e 4 °C) e o sobrenadante foi dialisado *overnight* contra o Tampão I (1 mL de extrato para 25 mL de tampão) a 4 °C.

Cromatografia de troca aniônica fraca: 2 mL do sobrenadante dialisado foram aplicados em uma coluna de troca aniônica fraca (DEAE-Sepharose™, 1 mL de volume interno, GE Healthcare) pré-equilibrada com Tampão I no sistema ÄKTA-FPLC™, com vazão de 0,5 mL min⁻¹ e foram coletadas frações de 1 mL. A TcPEPCK foi eluída nas frações 2 a 10. Para limpeza da coluna, foi aplicado 5 mL de NaCl 1 mol L⁻¹ em Tampão I, onde ocorreu a eluição de proteínas com alta retenção. Para armazenamento, as frações foram mantidas em Tampão IV a -20 °C. A fração 2 foi utilizada para dar continuidade à purificação e foi denominada TcPEPCK-D2.

Exclusão molecular: 1 mL de TcPEPCK-D2 foi aplicada na coluna Superose12 (100 mL de volume interno, GE Healthcare), pré-equilibrada com HEPES 20 mmol L⁻¹ pH 7,4 contendo NaCl 150 mmol L⁻¹ no sistema ÄKTA-FPLC™, com vazão de 0,5 mL min⁻¹ e foram coletadas frações de 0,5 mL. A TcPEPCK foi eluída em modo isocrático, com volume de eluição entre 13,5-14,0 mL, nas frações 27 e 28. Estas duas frações foram combinadas e denominadas TcPEPCK-Sup12. Para armazenamento, as frações foram mantidas no mesmo tampão a -20 °C.

3.4.2 Procedimento de purificação B

Lise: mesmo protocolo do Procedimento A.

Salting out: mesmo protocolo do Procedimento A.

Cromatografia de troca aniônica fraca: mesmo protocolo do Procedimento A.

Cromatografia de afinidade: 1 mL da TcPEPCK-D2 foi aplicado em uma coluna de afinidade ATP-agarose (adenosina 5'-trifosfato-agarose, 1 mL de volume interno, Sigma-Aldrich), pré-equilibrada com Tampão II no sistema

ÄKTA-FPLC™, com vazão de 0,5 mL min⁻¹ e foram coletadas frações de 0,5 mL. A eluição das proteínas que não apresentaram afinidade pela coluna se deu com 10 mL de Tampão II. A TcPEPCK se ligou à coluna e foi eluída de duas formas diferentes: *i*) com 1 mL de uma solução de ATP 5 mmol L⁻¹ em Tampão I, a partir de aplicação manual da solução de ATP, fora do sistema FPLC e *ii*) com 2 mL de Tampão III no sistema ÄKTA-FPLC™, com vazão de 0,3 mL min⁻¹ e frações de 1 mL, sendo esta fração utilizada para a etapa seguinte.

Exclusão molecular: 2 mL da fração da eluição *ii* da etapa de afinidade acima foi aplicada na coluna Superdex®75 (200 mL de volume interno, GE Healthcare), pré-equilibrada com Tampão III no sistema ÄKTA-FPLC™, com vazão de 0,5 mL min⁻¹ e foram coletadas frações de 1 mL. A TcPEPCK foi eluída em modo isocrático, com volume de eluição entre 22,5-23 mL, nas frações 45 e 46. Para armazenamento, as frações foram mantidas no mesmo tampão a -20 °C.

Para melhor acompanhar o perfil de eluição por massa molecular, foi aplicado 1 mL de BSA 1 mg mL⁻¹ na Superose12 (100 mL de volume interno, GE Healthcare), pré-equilibrada com Tampão III no sistema ÄKTA-FPLC™, com vazão de 0,5 mL min⁻¹. A BSA foi eluída em modo isocrático, com volume de eluição de 20 mL, na frações 40 (dímero), e 26,5 mL na fração 53 (monômero).

3.4.3 Procedimento de purificação C

Lise: foi seguido o mesmo protocolo do Procedimento A, porém com 24% de amplitude na etapa de lise celular e utilizando-se Tampão IV.

Salting out: foi seguido o mesmo protocolo do Procedimento A, porém utilizando-se Tampão IV.

Cromatografia de troca aniônica forte: 5 mL da solução dialisada após a precipitação com sulfato de amônio foram aplicados em uma coluna de troca aniônica forte (QFF-Sepharose™, 1 mL de volume interno, GE Healthcare)

pré-equilibrada com Tampão IV no sistema ÄKTA-FPLC™, com vazão de 0,5 mL min⁻¹ e foram coletadas frações de 1 mL. A *Tc*PEPCK foi eluída nas dez primeiras frações, porém foram coletadas as frações 2 a 8, sendo que as frações 2 a 7 (denominada *Tc*PEPCK-I) foram combinadas e a fração 8 (denominada *Tc*PEPCK-II) mantida sozinha. Para limpeza da coluna, foram aplicados 5 mL de NaCl 1 mol L⁻¹ em Tampão IV, onde ocorreu a eluição de proteínas com alta retenção. Para armazenamento, as frações de *Tc*PEPCK-I e *Tc*PEPCK-II foram mantidas em Tampão IV a -20 °C.

Cromatografia de afinidade: 3 mL da fração da troca aniônica *Tc*PEPCK-I foram diluídas em 7 mL de Tampão II e aplicada em uma coluna de afinidade ATP-agarose (adenosina 5'-trifosfato-agarose, 1 mL de volume interno, Sigma-Aldrich), pré-equilibrada com Tampão II no sistema ÄKTA-FPLC™, com vazão de 0,3 mL min⁻¹ e foram coletadas frações de 1 mL. A eluição das proteínas que não apresentaram afinidade pela coluna se deu com 10 mL de Tampão II. A *Tc*PEPCK se ligou à coluna e foi eluída com 3 mL de Tampão III (denominada *Tc*PEPCK-III). A *Tc*PEPCK-III foi armazenada em Tampão III a -20 °C e, para os testes de atividade, a fração foi diluída 1:4 em Tampão II.

Os ensaios de atividade foram monitorados por LC-MS/MS.

3.5 Teste de atividade da *Tc*PEPCK

3.5.1 Reação de descarboxilação e fosforilação

As reações foram realizadas em microtubos de 1,5 mL contendo OAA 200 μmol L⁻¹ (2 μL de OAA 10 mmol L⁻¹), ATP 240 μmol L⁻¹ (2 μL de ATP 12 mmol L⁻¹), 10 μL da fração de enzima purificada e volume final ajustado com 86 μL de Tampão A, com um volume final de 100 μL. A reação foi incubada a 36 °C por 10 min e 200 rpm, seguido da adição de 100 μL de metanol (MeOH)

e centrifugação a 9.300 g, 10 min e 4 °C. O sobrenadante (10 µL) foi injetado em LC-MS/MS. As soluções de OAA e ATP foram preparadas em Tampão B.

3.5.2 Reação de carboxilação e desfosforilação

As reações foram realizadas em microtubos de 1,5 mL contendo KHCO_3 20 mmol L^{-1} , PEP 2 mmol L^{-1} , 25 µL do extrato de enzima purificado, ADP 1 mmol L^{-1} e volume final ajustado para 250 µL com Tampão C. A reação foi incubada a 25 °C por 10 min e 200 rpm, seguido de choque térmico (2 min a 100 °C e 2 min a 0 °C), adição de 250 µL de acetonitrila (ACN) e centrifugação a 9.300 g, 10 min e 4 °C. O sobrenadante (15 µL) foi injetado em LC-UV. As soluções de PEP e ADP foram preparadas em Tampão C e a solução de KHCO_3 foi preparada em água.

3.5.3 Avaliação da influência dos metais na reação de descarboxilação e fosforilação

A presença dos metais na reação de descarboxilação e fosforilação foi avaliada em triplicata, onde o Tampão A foi substituído, como descrito:

- I. Efeito do magnésio: foram realizadas reações como descrito na Seção 3.5.1, porém utilizando-se tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} pH 9,0; contendo DTT 1 mmol L^{-1} e MgCl_2 1 mmol L^{-1} ;
- II. Efeito do manganês: foram realizadas reações como descrito na Seção 3.5.1, porém utilizando-se tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} pH 9,0; contendo DTT 1 mmol L^{-1} e MnCl_2 1 mmol L^{-1} ;
- III. Efeito do magnésio e manganês juntos: foram realizadas reações como descrito na Seção 3.5.1, porém utilizando-se tampão acetato de amônio

50 mmol L⁻¹ pH 9,0; contendo DTT 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol L⁻¹ e MnCl₂ 1 mmol L⁻¹.

3.5.4 Testes de tampões e aditivos para a reação de carboxilação e desfosforilação

A presença dos aditivos da reação de carboxilação e desfosforilação, bem como tampões, foi avaliada em triplicata e descritas:

- I. Efeito do KCl e EGTA: foram realizadas reações como descrito na Seção 3.5.2, em Tampão C, porém sem a adição de KCl e EGTA ao tampão;
- II. Efeito do Mg²⁺ e Mn²⁺: foram realizadas reações como descrito na Seção 3.5.2, em Tampão C, porém sem a adição de KCl, EGTA, Mg²⁺ e Mn²⁺ ao tampão;
- III. Efeito de tampões: foram realizadas reações como descrito na Seção 3.5.2, porém substituindo-se o Tampão C por tampão acetato de amônio pH 5,65; bicarbonato de amônio pH 6,50, fosfato de potássio pH 7,00 e Tris-HCl pH 7,50, todos na concentração de 50 mmol L⁻¹ e contendo DTT 1 mmol L⁻¹, MnCl₂ 0,7 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 3 mmol L⁻¹.

3.6 O sistema LC-MS/MS

Para monitorar a atividade da *TcPEPCK* no sentido da descarboxilação (Seção 3.5.1), através da formação de PEP, foi utilizada uma coluna Luna C₁₈(2) (50 x 2,0 mm, 3 μm, Phenomenex) em modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por Tampão B/MeOH 1:1, vazão 0,15 mL min⁻¹ e tempo de corrida de 3 min. Os parâmetros do IT otimizados para o íon PEP *m/z* 167 [M-H]⁻ foram: voltagem no capilar: 2877 V; voltagem no *skimmer*:

-15,0 V; pressão do gás de nebulização (N₂): 30,0 psi; vazão do gás de secagem (N₂): 8,0 L min⁻¹ e temperatura da fonte: 325 °C. No modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*) foi monitorado o íon precursor do PEP, m/z 167 [M-H]⁻ e os seus fragmentos [M-H-CO]⁻ m/z 139 e [PO₃]⁻ m/z 79 com uma janela de isolamento igual a m/z 1. O íon fragmento mais intenso m/z 79 foi utilizado para a quantificação e o m/z 139 para a confirmação da proposta.

3.7 O sistema LC-UV

3.7.1 Métodos para análise da atividade no sentido da carboxilação

Para monitorar a atividade da TcPEPCK no sentido da carboxilação (Seção 3.5.2), através da formação de ADP, foram desenvolvidos três métodos por LC-UV, todos monitorados em $\lambda = 220$ e 260 nm, descritos a seguir:

Método I: coluna C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 μ m, Waters), fase móvel composta por Tampão V [tampão fosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ pH 7,5; contendo TBAHS 5 mmol L⁻¹]/MeOH (75:25, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹ e forno de coluna em 30 °C.

Método II: coluna C₁₈ XSelect CSH (100 x 2,1 mm, 2,5 μ m, Waters), com fase móvel composta por Tampão VI [acetato de amônio 20 mmol L⁻¹ pH 9,50; contendo TBAHS 5 mmol L⁻¹]/MeOH 75:25, vazão 0,25 mL min⁻¹ e forno de coluna em 45 °C.

Método III: coluna C₁₈ XTerra (150 x 4,6 mm, 5 μ m, Waters) com fase móvel composta por Tampão VI/MeOH 75:25, vazão 0,40 mL min⁻¹ e forno de coluna em 30 °C.

3.7.2 Tempo de acoplamento

No sistema LC-UV, foi conectado um capilar de sílica fundida (100,0 μm D.I. x 0,375 mm x 40,0 cm) e injetado, em quintuplicata, 10 μL uma solução-padrão contendo uma mistura 0,5 mg mL^{-1} de OAA, PEP, ADP e ATP, monitorados em $\lambda = 220$ e 260 nm. Foram utilizadas duas fases móveis, sendo Tampão C e tampão fosfato de potássio 10 mmol L^{-1} pH 7,00, ambos em vazão de 0,05 mL min^{-1} . Não houve variação no tempo de acoplamento devido à fase móvel e o mesmo foi estabelecido entre 1,4 e 6,0 min.

3.7.3 Método 2D LC-UV

Para a detecção da atividade nos ICERs, foi desenvolvido um método 2D, descrito como segue:

(1) Bomba B (vazão 0,05 mL min^{-1} com o tampão de interesse)

0 - 1,39 min: eluição dos analitos.

1,40 - 6,00 min: transferência dos analitos para a coluna analítica.

6,01 - 15,00 min: condicionamento do ICER.

(2) Bomba A (vazão e fase móvel de acordo com a coluna utilizada, descrito nos métodos da Seção 3.7.1, $\lambda = 220$ e 260 nm)

0 - 1,39 min: condicionamento da coluna C_{18} .

1,40 - 6,00 min: descarte.

6,01 - 15,00 min: fase móvel da coluna analítica para separação e análise na coluna analítica.

Quando foi utilizada a coluna C_{18} XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 μm , Waters) na 2ª dimensão para separação analítica, a força da fase móvel foi aumentada para 28,5% de MeOH.

3.8 Imobilização da *Tc*PEPCK em capilar

3.8.1 Preparo dos ICERS

Para imobilização, foi utilizado um método previamente estabelecido pelo grupo de pesquisa^{117,118}. Utilizando-se uma bomba de seringa com uma vazão de 130 $\mu\text{L min}^{-1}$, o capilar de sílica fundida (100,0 $\mu\text{m D.I.} \times 0,375 \text{ mm} \times 40,0 \text{ cm}$) foi limpo com 2,0 mL de uma solução de HCl 2 mol L^{-1} , seguido por 1,0 mL de água Milli-Q. Após lavagem, o capilar foi seco em estufa a 95 °C durante 1 h e, em seguida, passou-se 1,0 mL de uma solução aquosa de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) 10% (v/v) e, subsequentemente, levado para estufa a 95 °C durante 30 min, sendo a passagem de APTES 10% repetida por mais uma vez. O capilar foi armazenado *overnight* em temperatura ambiente.

No dia seguinte, 2 mL de uma solução de glutaraldeído 1% (v/v) em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 7,00 foi passada através do capilar aminopropilado, para ativação do mesmo. O excesso de glutaraldeído foi removido por 1,0 mL de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 7,00.

Em seguida ocorre a etapa de imobilização da enzima, que foi variada de acordo com a fração de enzima utilizada.

Fração *Tc*PEPCK-D2: passou-se 1 mL de *Tc*PEPCK obtida na fração 2 da purificação com a coluna DEAE (Seção 3.4.1), com uma vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$. A enzima foi recolhida em banho de gelo e eluída novamente, seguido de 1 mL de Tampão C.

Com a fração *Tc*PEPCK-III, além da imobilização como descrito para fração *Tc*PEPCK-D2, foram feitas outras três modificações:

1. Passagem da 2 mL da fração *Tc*PEPCK-III, em vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, onde a enzima foi recolhida em banho de gelo e reaplicada por diversas vezes, em um tempo total de 8 horas;

2. Passagem de aproximadamente 1 mL da fração *TcPEPCK-III*, em vazão de 1 $\mu\text{L min}^{-1}$, em um tempo total de 16 horas e o procedimento realizado a 4 °C;
3. Passagem da 100 μL da fração *TcPEPCK-III*, em vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$, para preenchimento de todo o volume interno do capilar com a enzima e, em seguida, o capilar foi deixado 16 horas com suas duas extremidades em contato com 1 mL de *TcPEPCK-III* em um microtubo de 1,5 mL a 4 °C.

Todos os procedimentos com a fração *TcPEPCK-III* foram finalizados pela passagem de 1 mL de Tampão A em vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$.

3.8.2 Análise da atividade dos ICERs

Para a análise de atividade dos ICERs preparados com a fração *TcPEPCK-D2* foi utilizado o método 2D LC (Seção 3.7.3). Assim, foi injetado 10 μL de uma mistura de OAA 0,5 mmol L^{-1} e ATP 1 mmol L^{-1} preparados em Tampão B e injetados no ICER com fase móvel composta por Tampão D em vazão de 0,05 mL min^{-1} . A separação analítica foi realizada com coluna C_{18} XSelect CSH (100 x 2,1 mm, 2,5 μm , Waters), fase móvel composta por Tampão VI/MeOH 75:25, vazão 0,25 mL min^{-1} e forno de coluna em 45 °C.

Ainda para a análise de atividade dos ICERs preparados com a fração *TcPEPCK-D2*, mas também com a fração *TcPEPCK-III*, os capilares foram levados ao LC-MS/MS, operando com os parâmetros descritos na Seção 3.6, sendo injetados 10 μL de OAA 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparados em Tampão B, com fase móvel composta por Tampão B em vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, e mistura de MeOH pós-capilar em mesma vazão.

3.9 Imobilização da *Tc*PEPCK em partículas magnéticas

De acordo com protocolo já estabelecido no grupo de pesquisa³⁵, realizou-se a imobilização em partículas magnéticas (*magnetic beads*, MB). As proporções variaram de acordo com a fração de enzima imobilizada, descritas abaixo. No entanto, o procedimento geral utilizado iniciou-se com a pesagem das partículas magnéticas amino-terminadas em um microtubo de 1,5 mL e lavagem com 1,5 mL de Tampão E por 3 vezes. Em seguida, foi adicionado uma solução de glutaraldeído 5% em Tampão E e foi deixado sob agitação a temperatura ambiente, por 3 h, em agitador rotatório. Após, as partículas são lavadas com 1 mL de Tampão E por 1 vez, seguido de 2 lavagens com 1 mL do tampão em que a *Tc*PEPCK será imobilizada (dependendo da fração de purificação utilizada), adição da fração de interesse da *Tc*PEPCK obtida em uma das etapas cromatográficas de purificação, descritas na Seção 3.4, e deixado em agitador rotatório por 16 h a 4 °C. Após, o sobrenadante foi removido e adicionado 1 mL de uma solução de glicina 1 mol L⁻¹ em pH 8,0 com NaOH, que ficou sob agitação rotatória a 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o biorreator contendo a *Tc*PEPCK imobilizada, doravante denominado *Tc*PEPCK-MB, lavado com Tampão A.

As variações no processo de imobilização, dependendo da fração de enzima utilizada, foram:

- *Tc*PEPCK-D2-MB: foram utilizados 25 mg de partículas magnéticas, 1 mL de glutaraldeído 5% em Tampão E, lavagem com Tampão I e imobilização com 2 mL de *Tc*PEPCK-D2;
- *Tc*PEPCK-II-MB: foram utilizados 4,3 mg de partícula magnética, 172 µL de glutaraldeído 5% em Tampão E, lavagem com Tampão IV e imobilização com 16,8 U de *Tc*PEPCK-II (150 µL da fração de enzima em 985 µL de Tampão IV);

- *TcPEPCK-III-MB*: foram utilizados 25 mg de partículas magnéticas, 1 mL de glutaraldeído 5% em Tampão E, lavagem com Tampão III e imobilização com 150 U de *TcPEPCK-III* (6 mL da fração).

As *TcPEPCK-MB* foram armazenadas em Tampão B a 4 °C. Previamente à sua utilização, foi removido o Tampão B da *TcPEPCK-MB*, adicionado 1 mL de Tampão A e deixado em repouso por 1 h em temperatura ambiente.

3.10 Qualificação de método LC-MS para *TcPEPCK-D2-MB*

O estudo de linearidade do método foi realizado através da construção de curvas analíticas com padrão externo. Para isso, uma solução padrão de PEP 5 mmol L⁻¹ foi preparada em Tampão B. A partir da solução padrão, foram preparadas soluções estoque, em Tampão B, nas seguintes concentrações: 15; 25; 50; 75; 150; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 µmol L⁻¹ para a curva e 40; 550 e 950 µmol L⁻¹ para os controles de qualidade (CQs).

A partir das soluções estoque, foram preparadas as soluções de trabalho para as curvas analíticas e CQs, nas seguintes concentrações: 1,5; 2,5; 5,0; 7,5; 15; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100 µmol L⁻¹ e, os CQs: 4,0; 55 e 95 µmol L⁻¹. Para tanto, os padrões para a curva e as amostras CQ foram preparadas a partir de 10 µL da solução estoque apropriada, acrescido de 90 µL de Tampão B e 100 µL de MeOH. As soluções foram homogeneizadas e transferidas para *vials* do auto-injetor, sendo injetados 10 µL no LC-MS, utilizando a coluna Luna C₁₈(2) (50 x 2,0 mm, 3 µm) e fase móvel composta por Tampão B/MeOH 1:1, vazão 0,15 mL min⁻¹.

Os padrões foram preparados em triplicata e a curva analítica construída através de regressão linear, a partir da área do íon precursor do PEP [M-H]⁻ m/z 167 em função de sua concentração.

Os critérios para a concentração dos CQs do método foram: *i*) CQ de menor concentração em até 3 vezes a concentração do menor ponto da curva; *ii*) CQ de concentração intermediária entre 40-60% da concentração do maior ponto da curva e *iii*) CQ de maior concentração entre 75-95% da concentração do maior ponto da curva.

A seletividade foi avaliada através da injeção da matriz isenta do padrão, cujo íon de mesma razão m/z não foi observado.

A precisão e exatidão intra- e inter-lotes foram mensuradas analisando-se três replicatas dos três níveis de CQs em quintuplicata. A precisão do método foi expressa através do coeficiente de variação (CV%) dos CQs. A exatidão foi determinada pelo cálculo de volta e expressa em porcentagem de desvio entre o valor médio encontrado e o valor de nominal das concentrações preparadas.

3.11 Caracterização cinética da *Tc*PEPCK-D2-MB

Para a caracterização da *Tc*PEPCK-D2-MB foram utilizadas concentrações de OAA entre 4 e 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATP constante em 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As áreas das bandas de PEP produzido foram correlacionadas com a concentração através da curva analítica (Seção 3.10).

Para as reações, foram preparados padrões de OAA 1 mmol L^{-1} e ATP 10 mmol L^{-1} , ambos em Tampão B. O estudo foi realizado com o lote imobilizado na Seção 3.9, com cada nível de concentração em triplicata. Porém, para tanto, o lote todo foi lavado 1x 1 mL com Tampão A, seguido de 2x 1 mL com Tampão B e, então, feita a reação através da adição de volumes crescentes

da solução de OAA, 100 μL de ATP 10 mmol L^{-1} e volume final ajustado para 1 mL com Tampão B. As reações foram realizados por 10 min, 30 °C e 250 rpm. Em separador magnético, foi retirada uma alíquota de 100 μL da reação, acrescido o mesmo volume de MeOH e injetado em LC-MS (Seção 3.6). Para a próxima reação, o *TcPEPCK*-D2-MB foi lavado 1x 1 mL com Tampão A, seguido de 2x 1 mL com Tampão B e, então, feita a reação em 1 mL de Tampão B. A constante de Michaelis-Menten aparente (K_{Mapp}) para o substrato OAA foi estimada usando o *software* GraphPad Prism 5.0 através de análise de regressão não-linear.

3.12 Imobilização de ATP em partículas magnéticas e aplicação na purificação da *TcPEPCK*

Para a imobilização de ATP, pesou-se 25 mg de partículas magnéticas amino-terminadas em um microtubo de 1,5 mL e lavou-se com 1,5 mL de Tampão E por 3 vezes. Em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução de glutaraldeído 5% em Tampão E e foi deixado sob agitação a temperatura ambiente, por 3 h, em agitador rotatório. Após, as partículas foram lavadas por 3 vezes com 1 mL de Tampão E e adicionado 1 mL de uma solução de ATP 7,5 mmol L^{-1} em Tampão E, que foi deixado sob agitação a temperatura ambiente, por 4 h, em agitador rotatório.

Em seguida, com auxílio de um ímã, a solução de ATP foi removida e as partículas magnéticas com ATP imobilizado, denominada ATP-MB, foram armazenadas em 1 mL de Tampão B, a 4 °C.

Para purificação da *TcPEPCK* com ATP-MB, através de uma captura seletiva da enzima, foram diluídos 3 mL da fração *TcPEPCK*-II em 7 mL de Tampão II e incubados com o ATP-MB, em um tubo Falcon de 15 mL com agitação rotatória por 1 h e em temperatura ambiente.

Em seguida, com o auxílio de um ímã, a solução foi removida das ATP-MB e a extração da enzima foi feita através da adição de 3 mL de Tampão III. Novamente, a mistura foi levada para agitação rotatória em temperatura ambiente. Para avaliar a extração da *TcPEPCK*, foram retiradas alíquotas com 1; 4 e 10 h e realizados testes de atividade de cada alíquota.

Após as 10 h de extração, o Tampão III contendo a *TcPEPCK* foi totalmente removido, as ATP-MB foram lavadas com por 2 vezes com 1 mL de Tampão B e armazenadas.

3.13 Efeito do pH, da temperatura e do tempo de reação para *TcPEPCK* em solução

Os efeitos de pH e temperatura na atividade da *TcPEPCK* foram avaliados para a reação de descarboxilação e fosforilação.

Para o efeito do pH, foi utilizado o tampão acetato de amônio no intervalo de 8,2 a 10,0 (faixa tamponante do $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). As reações foram realizadas em triplicata, em microtubos de 1,5 mL, contendo OAA $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de OAA 10 mmol L^{-1}), ATP $240 \mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de ATP 12 mmol L^{-1}), 1,12 U da *TcPEPCK*-II (10 μL) e 86 μL de Tampão A, onde foi variado o pH do Tampão A com os valores de: 8,2; 8,4; 8,6; 8,8; 9,0; 9,2; 9,4; 9,6; 9,8 e 10,0. As reações foram incubadas a 36°C por 10 min e 200 rpm, seguido da adição de 100 μL de MeOH e centrifugação a 9.300 g, 10 min e 4°C . O sobrenadante (10 μL) foi injetado em LC-MS/MS. As soluções de OAA e ATP foram preparadas em Tampão B.

Para avaliação do efeito da temperatura, as reações foram realizadas de acordo com a Seção 3.5.1, porém foram utilizados microtubos de 200 μL e as reações foram incubadas em termociclador com as temperaturas de 19,9; 20,1; 21,1; 22,8; 25,1; 27,8; 30,6; 33,4; 36,0; 38,2; 39,9 e $40,9^\circ\text{C}$ por 10 min de maneira

estática. Os testes foram feitos em triplicata e as reações finalizadas e analisadas como já descrito.

O tempo de reação foi avaliado com reações realizadas de acordo com a Seção 3.5.1, porém interrompidas pela adição de MeOH frio em 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 30 e 60 minutos. Os testes foram feitos em triplicata e as reações finalizadas e analisadas como já descrito.

3.14 Qualificação do método analítico para a *Tc*PEPCK em solução

O estudo de linearidade do método foi realizado através da construção de curvas analíticas com padrão externo. Para isso, uma solução padrão de PEP 5 mmol L⁻¹ foi preparada em Tampão B. A partir da solução padrão, foram preparadas soluções estoque, em Tampão B, nas seguintes concentrações: 0,10; 0,20; 0,30; 0,50; 0,90; 1,3; 1,7; 2,0; 3,0 e 4,0 mmol L⁻¹ para a curva e 0,25; 2,4 e 3,6 mmol L⁻¹ para os controles de qualidade (CQs).

A partir das soluções estoque, foram preparadas as soluções de trabalho para as curvas analíticas e CQs, nas seguintes concentrações: 5; 10; 15; 25; 45; 65; 85; 100; 150 e 200 μmol L⁻¹ para a curva e 12,5; 120 e 180 μmol L⁻¹ para os CQs. Para tanto, em microtubos de 0,6 mL, foram transferidos 5 μL da solução estoque de PEP, 10 μL da *Tc*PEPCK-II (1,12 U) e 85 μL de Tampão A contendo OAA 118 μmol L⁻¹, a fim de manter uma concentração constante de OAA em 100 μmol L⁻¹. Ao final, foi adicionado 100 μL de MeOH e a mistura foi centrifugada a 10.000 g, 10 min e 4 °C. O sobrenadante foi transferido para *vials* do auto-injetor e injetados 10 μL no LC-MS/MS, como descrito na Seção 3.6.

Os padrões de PEP foram preparados em triplicata e a curva analítica construída através de regressão linear, a partir da área da banda cromatográfica

do íon fragmento $[\text{PO}_4]^-$ m/z 79 em função de sua concentração e o fragmento $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$ m/z 139 foi utilizado para confirmar a proposta.

Os critérios para a concentração dos CQs, seletividade, precisão e exatidão intra e inter-lotes foram os mesmos explicitados na Seção 3.10.

3.15 Caracterização cinética da *Tc*PEPCK em solução

A caracterização cinética foi feita no sentido da descarboxilação, para ambos os substratos da PEPCK, OAA e ATP, em separado.

Desta forma, foram utilizadas concentrações de um dos substratos na faixa de 6 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto o outro substrato foi mantido constante em 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inicialmente, foi preparado uma solução padrão de cada substrato em separado, na concentração de 5 mmol L^{-1} em Tampão B. A partir das soluções padrão de cada substrato, foram preparadas soluções estoque, em separado, com as seguintes concentrações: 0,12; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,80; 100; 120; 140; 160; 180 e 200 mmol L^{-1} em Tampão B.

A partir das soluções estoque de OAA, foram preparadas as triplicatas das reações de trabalho para o estudo cinético, nas seguintes concentrações: 6; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 140; 160; 180; 200 e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para tanto, em microtubos de 1,5 mL, foram transferidos 5 μL da solução estoque de OAA, 10 μL da *Tc*PEPCK-II (1,12 U) e 85 μL de Tampão A contendo ATP 589 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A reação foi incubada a 36 °C por 10 min e 200 rpm, seguido da adição de 100 μL de MeOH e centrifugação a 10.000 g, 10 min e 4 °C. O sobrenadante (10 μL) foi injetado em LC-MS/MS, como descrito na Seção 3.6.

Em seguida, o mesmo foi feito variando-se a concentração de ATP, a partir das soluções estoque de ATP, e mantendo-se a concentração fixa de OAA a partir de uma solução de OAA 589 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em Tampão A.

Os experimentos foram realizados em triplicata e as constantes de Michaelis-Menten aparente (K_{Mapp}), para ambos os substratos, foram estimadas usando o *software* GraphPad Prism 5.0 através de análise de regressão não-linear.

3.16 Qualificação do método analítico para a TcPEPCK-II-MB e TcPEPCK-III-MB

Novamente, o estudo de linearidade do método foi realizado através da construção de curvas analíticas com padrão externo. Para isso, uma solução padrão de PEP 5 mmol L⁻¹ foi preparada em Tampão B. A partir da solução padrão, foram preparadas soluções estoque, em Tampão B, nas seguintes concentrações: 0,20; 0,30; 0,50; 0,90; 1,3; 1,7; 2,0 e 3,0 mmol L⁻¹ para a curva e 0,25; 1,4 e 2,4 mmol L⁻¹ para os controles de qualidade (CQs).

A partir das soluções estoque, foram preparadas as soluções de trabalho para as curvas analíticas e CQs, nas seguintes concentrações: 10; 15; 25; 45; 65; 85; 100 e 150 µmol L⁻¹ para a curva e 12,5; 70,0 e 120 µmol L⁻¹ para os CQs. Para tanto, em tubos microtubos de 0,6 mL, foram transferidos 5 µL da solução estoque de PEP e 95 µL de Tampão A contendo OAA 106 µmol L⁻¹, a fim de manter uma concentração constante de OAA em 100 µmol L⁻¹. A mistura foi homogeneizada, transferida para *vials* do auto-injetor e injetados 10 µL no LC-MS/MS, como descrito na Seção 3.6.

Os padrões foram preparados em triplicata e a curva analítica construída através de regressão linear, a partir da área da banda cromatográfica do íon fragmento [PO₄]⁻ *m/z* 79 do PEP em função de sua concentração.

Os critérios para a concentração dos CQs, seletividade, precisão e exatidão intra e inter-lotes foram os mesmos explicitados na Seção 3.10.

3.17 Caracterização cinética da *TcPEPCK-II-MB* e *TcPEPCK-III-MB*

A caracterização cinética foi feita no sentido da descarboxilação, para o OAA como substrato, mantendo-se o ATP constante.

O lote de *TcPEPCK-II-MB* foi dividido em três partes iguais e as reações foram realizadas através da adição crescente de OAA, entre 10 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto o outro substrato ATP foi mantido constante em 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Inicialmente, foi preparada uma solução padrão de OAA a 50 mmol L^{-1} em Tampão B e, a partir desta, outra solução padrão de OAA 10 mmol L^{-1} . A partir das soluções padrão apropriadas, foram preparadas soluções estoque com as seguintes concentrações: 0,500; 0,750; 1,00; 1,25; 1,50; 2,50; 3,50; 4,50; 5,00; 10,0; 15,0 e 20,0 mmol L^{-1} em Tampão B.

A partir das soluções estoque de OAA, foram preparadas as triplicatas das reações de trabalho para o estudo cinético, nas seguintes concentrações: 10; 15; 20; 25; 30; 50; 70; 90; 100; 200 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para tanto, em 3 microtubos de 1,5 mL contendo a *TcPEPCK-II-MB*, foram transferidos 10 μL da solução estoque de OAA 0,500 mmol L^{-1} , 10 μL de ATP 25 mmol L^{-1} em Tampão B, 5 μL de Tampão B e 475 μL de Tampão A. As reações foram incubadas a 36 °C por 10 min e 250 rpm, e levada para separador magnético por 30 s. Ao final, alíquotas de 100 μL da reação foram transferidos para *vials*, acrescidas de 100 μL de metanol e analisado (10 μL) através de LC-MS/MS como descrito na Seção 3.6.

Em seguida, o volume restante de reação em cada biorreator foi descartado. As *TcPEPCK-II-MB* foram lavadas com 3x 500 μL de Tampão A, sendo agitadas por 10 s em vórtex, levadas para o separador magnético por 30 s e, então, o tampão foi descartado. Desta forma, a *TcPEPCK-II-MB* estava pronta

para a próxima reação, que foi realizada da mesma maneira, porém com a solução estoque de OAA com concentração imediatamente superior.

O mesmo procedimento foi realizado com as *TcPEPCK*-III-MB, porém com o substrato OAA variando entre 10 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e ATP mantido constante em 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os experimentos foram realizados em triplicata e a constante de Michaelis-Menten aparente (K_{Mapp}), para o OAA, foi estimada usando o *software* GraphPad Prism 5.0 através de análise de regressão não-linear, para *TcPEPCK*-II-MB e *TcPEPCK*-III-MB.

3.18 Triagem de ligantes da *TcPEPCK* em solução

A atividade da *TcPEPCK* na presença de diferentes compostos foi monitorada através da reação de descarboxilação. Os compostos triados foram hipoxantina, xantina, albendazol, iodoacetamida, quinolinato, NADH, aciclovir, 2-mercaptobenzimidazol, 2-mercaptobenzoxazol, 6-mercaptopurina, 2-mercapto-5-metilbenzimidazol, sulfeto de resorcinol, gemifloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, 5 cumarinas (LSPN214, LSPN234, LSPN223, LSPN224 e LSPN272) e 14 hidantoínas (LSPN551, LSPN552, LSPN553, LSPN54, LSPN557, LSPN558, LSPN59, LSPN561, LSPN562, LSPN563, LSPN564, LSPN565, LSPN566 e LSPN568). Assim, as reações foram realizadas em microtubos de 1,5 mL, contendo:

Triagem com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ligante: OAA 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de OAA 7,5 mmol L^{-1}), ATP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de ATP 25 mmol L^{-1}), 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ligante (1 μL de ligante 5 mmol L^{-1}), 10 μL de *TcPEPCK*-II (1,12 U) e 85 μL de Tampão A.

Triagem com 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ligante: OAA 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de OAA 7,5 mmol L^{-1}), ATP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de ATP 25 mmol L^{-1}),

450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ligante (2 μL de ligante 22,5 mmol L^{-1}), 10 μL de *TcPEPCK-II* (1,12 U) e 84 μL de Tampão A.

Em todos os casos, as soluções de OAA e ATP foram preparadas em Tampão B e os ligantes preparados em uma mistura DMSO/acetona 1:1 (v/v). As reações foram incubadas a 36 °C por 10 min e 200 rpm, seguido da adição de 100 μL de MeOH e centrifugação a 9.300 g, 10 min e 4 °C. O sobrenadante (10 μL) foi injetado em LC-MS/MS, como descrito na Seção 3.6, e forneceram áreas de PEP denominadas A_{triagem} .

Os controles foram preparados como segue:

Controle negativo (sem ATP): OAA 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de OAA 7,5 mmol L^{-1}), 2 μL de Tampão B, 50 ou 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ligante (1 μL do ligante 5 mmol L^{-1} ou 2 μL do ligante 22,5 mmol L^{-1}), 10 μL de *TcPEPCK-II* (1,12 U) e 85 ou 84 μL de Tampão A.

Controle positivo (sem ligante): OAA 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de OAA 7,5 mmol L^{-1}), ATP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de ATP 25 mmol L^{-1}), 1 ou 2 μL de DMSO/acetona 1:1, 10 μL de *TcPEPCK-II* (1,12 U) e 85 ou 84 μL de Tampão A.

A seletividade foi avaliada para cada ligante sob triagem, como controle negativo, cujo íon m/z 167 \rightarrow 79 não foi observado em nenhum caso.

A coeluição dos ligantes com o PEP pode interferir no processo de ionização¹¹⁹, afetando a intensidade. Este efeito foi avaliado, baseado no proposto por KRUVE et al.¹²⁰, onde dois lotes de amostras foram preparados:

Amostras do lote 1: OAA 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de OAA 7,5 mmol L^{-1}), PEP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de PEP 5 mmol L^{-1}), 1 μL ou 2 μL de DMSO/acetona 1:1, 10 μL de *TcPEPCK-II* (1,12 U) e 85 ou 84 μL de Tampão A. As análises de LC-MS/MS das amostras do lote 1 forneceram áreas de PEP denominadas $A_{\text{PEP-padrão}}$.

Amostras do lote 2: OAA 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de OAA 7,5 mmol L^{-1}), PEP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de PEP 5 mmol L^{-1}), 50 ou 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ligante

(1 μL ou 2 μL de ligante 5 ou 22,5 mmol L^{-1}), 10 μL de *Tc*PEPCK-II (1,12 U) e 85 ou 84 μL de Tampão A. As análises de LC-MS/MS das amostras do lote 2 forneceram áreas de PEP denominadas $A_{\text{PEP-ligante}}$.

Todas as amostras de ambos os lotes, previamente às análises por LC-MS/MS, foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos, seguidos da adição de 100 μL de MeOH, agitação em vortex por mais 10 segundos, seguido de centrifugação a 9.300 g, 10 min e 4 °C. O sobrenadante (10 μL) foi injetado em LC-MS/MS como descrito na Seção 3.6.

A razão $A_{\text{PEP-ligante}}/A_{\text{PEP-padrão}}$ foi calculada com a área do íon fragmento m/z 79 e foi definida como o efeito matriz. O valor de 1 indica que não há efeito do ligante sobre a ionização do PEP. Uma intensificação no sinal fornece valores >1 e supressão de sinal valores <1 .

Para corrigir o efeito matriz na ionização do PEP ($A_{\text{corrigida}}$) foi utilizado a seguinte equação:

$$A_{\text{corrigida}} = A_{\text{triagem}} + \left\{ A_{\text{triagem}} \times \left[1 - \left(\frac{A_{\text{PEP-ligante}}}{A_{\text{PEP-padrão}}} \right) \right] \right\}$$

A porcentagem de inibição/ativação causada pelos ligantes [L(%)] foi estimada comparando-se a área corrigida com a área do controle positivo (A_{CP}):

$$L (\%) = \left(\frac{A_{\text{corrigida}}}{A_{\text{CP}}} \right) \times 100$$

onde valores acima de 100% representam ativação e, inferiores, inibição.

3.19 Ensaio de atividade para a *Tc*PEPCK-MB

Para testar a atividade da *Tc*PEPCK-MB quando a mesma estava armazenada (1 mL de Tampão B e 4 °C) ou após os ensaios de *ligand fishing*, o biorreator foi levado para separador magnético, para que o tampão de

armazenamento ou de ensaio fosse substituído por 1 mL de Tampão A, seguido de agitação em vórtex e deixado em repouso por 1 h, em temperatura ambiente.

Em seguida, o biorreator foi levado para separador magnético, o Tampão A foi removido e adicionou-se OAA $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (10 μL de OAA 5 mmol L^{-1} em Tampão B), ATP $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ (10 μL de ATP 25 mmol L^{-1} em Tampão B), 5 μL de Tampão B e 475 μL de Tampão A. As reações foram incubadas a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min e 250 rpm, e levadas para separador magnético por 30 s. Ao final, alíquotas de 100 μL da reação foram transferidas para *vials*, acrescidas de 100 μL de metanol e analisado (10 μL) através de LC-MS/MS, como descrito na Seção 3.6.

Para reutilização da *TcPEPCK-MB*, foram realizadas 3 lavagens com Tampão A, como descrito na Seção 3.17.

3.20 Teste de inibição com a *TcPEPCK-II-MB*

A atividade da *TcPEPCK-II-MB* na presença de ligantes foi monitorada através da reação de descarboxilação. Assim, foram escolhidos sete ligantes triados em solução (Seção 3.18), a saber: hipoxantina, aciclovir, 2-mercaptobenzoxazol, 2-mercapto-5-metilbenzimidazol, LSPN214, quinolinato e NADH.

Os testes de inibição foram realizados em duplicatas, em microtubos de 1,5 mL contendo a *TcPEPCK-II-MB*, OAA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (10 μL de OAA $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$), ATP $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ (10 μL de ATP 25 mmol L^{-1}), $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ do ligante (5 μL de ligante 1 mmol L^{-1}) e 475 μL de Tampão A.

Os controles positivos foram realizados em duplicatas, em microtubos de 1,5 mL contendo a *TcPEPCK-II-MB*, OAA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (10 μL de OAA $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$), ATP $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ (10 μL de ATP 25 mmol L^{-1}), 5 μL de DMSO/acetona 1:1 e 475 μL de Tampão A.

Em todos os casos, as soluções de OAA e ATP foram preparadas em Tampão B e os ligantes em uma mistura DMSO/acetona 1:1 (v/v). As reações foram incubadas a 36 °C por 10 min e 250 rpm, e levada para separador magnético por 30 s. Ao final, alíquotas de 100 µL da reação foram transferidos para *vials*, acrescidas de 100 µL de metanol e analisado (10 µL) através de LC-MS/MS como descrito na Seção 3.6.

Em seguida, o restante da reação em cada biorreator foi descartado. As *TcPEPCK-II-MB* foram lavadas com 3x 500 µL de Tampão A, sendo agitados por 10 segundos em vórtex, levados para o separador magnético por 30 s, então, o tampão foi descartado. Desta forma, as *TcPEPCK-II-MB* estavam prontas para a próxima reação. Cada teste de inibição foi intercalado com um controle positivo e a os resultados da inibição foram sempre comparados com o controle positivo imediatamente anterior.

A coeluição foi avaliada, através de dois lotes de amostras preparadas:

Amostras do lote 1: OAA 30 µmol L⁻¹ (10 µL de OAA 1,5 mmol L⁻¹), PEP 25 µmol L⁻¹ (10 µL de PEP 1,25 mmol L⁻¹), 5 µL de DMSO/acetona 1:1 e 475 µL de Tampão A.

Amostras do lote 2: OAA 30 µmol L⁻¹ (10 µL de OAA 1,5 mmol L⁻¹), PEP 25 µmol L⁻¹ (10 µL de PEP 1,25 mmol L⁻¹), 10 µmol L⁻¹ do ligante (5 µL de ligante 1 mmol L⁻¹) e 475 µL de Tampão A.

Todos os cálculos foram realizados utilizando-se as fórmulas descritas na Seção 3.18.

3.21 Teste de tolerância da *TcPEPCK* ao MeOH

Os testes de tolerância ao MeOH foram realizados com as concentrações de 0; 5; 10; 20 e 30% do mesmo, para a reação de descarboxilação.

As reações foram realizadas em duplicata, em microtubos de 1,5 mL contendo OAA $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de OAA 10 mmol L^{-1}), ATP $240 \mu\text{mol L}^{-1}$ (2 μL de ATP 12 mmol L^{-1}) e 10 μL da fração *TcPEPCK-II* (1,12 U). Então foi adicionado MeOH nos volumes correspondentes às concentrações desejadas, ou seja, 0; 5; 10; 20 e 30 μL , e o volume ajustado com 86; 81; 76; 66 e 56 μL com Tampão A, respectivamente, sendo o volume final de 100 μL . As reações foram incubadas a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min e 200 rpm.

Ao final, para manter todas as concentrações de MeOH constantes em todas as análises por LC-MS/MS, as reações foram interrompidas pela de adição de 100; 95; 90; 80 e 70 μL de MeOH e 0; 5; 10; 20 e 30 μL de Tampão A, respectivamente, seguido de centrifugação a 9.300 g, 10 min e $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante (10 μL) foi injetado em LC-MS/MS. As soluções de OAA e ATP foram preparadas em Tampão B.

3.22 Prova de conceito para ensaio de *ligand fishing* com a *TcPEPCK-II-MB* e *TcPEPCK-III-MB*

Um lote de *TcPEPCK-II-MB* e *TcPEPCK-III-MB* foi fracionado em 3 partes iguais e, em uma das partes, a enzima foi desnaturada pela adição de solvente orgânico (ACN e MeOH) a quente, seguido de choque térmico. A *TcPEPCK-MB* desnaturada foi utilizada como controle do ensaio de *ligand fishing*.

Os 3 biorreatores de *TcPEPCK-II-MB* (sendo 1 desnaturado e 2 com atividade para *TcPEPCK*) foram levados para o separador magnético e adicionado 10 μL de uma mistura contendo hipoxantina, aciclovir, 2-mercapto-5-meilbenzimidazol, 2-mercaptobenzoxazol e a cumarina LSPN214, cada um a 1 mmol L^{-1} em DMSO/acetona 1:1, seguidos pela adição de 490 μL de Tampão A, sendo que a mistura final apresentou $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada ligante. As *TcPEPCK-*

II-MB foram agitadas em vortex por 10 s e deixadas sob agitação por 10 min, 36 °C e 250 rpm. Após, as *Tc*PEPCK-II-MB foram levadas para o separador magnético, deixadas por 30 s e, então, todo o sobrenadante foi removido. As *Tc*PEPCK-II-MB foram lavadas (2x 500 µL) com Tampão A, sempre em ciclos de 10 segundos de agitação em vortex e 30 s no separador magnético.

Em seguida, foram testadas três formas de extração. O primeiro teste foi realizado com o próprio substrato, utilizando-se 500 µL de OAA 500 µmol L⁻¹ em Tampão A. Após a adição de substrato como solução extratora, os biorreatores foram agitados em vortex por 10 s e deixados sob agitação por 10 min, 36 °C e 250 rpm. Após, as *Tc*PEPCK-II-MB foram levadas para o separador magnético, deixadas por 30 s e, então, todo o sobrenadante foi recolhido, transferidos para *vials* e analisado (10 µL) através de LC-MS.

O processo foi reiniciado por mais duas vezes, seguindo o mesmo procedimento de carregamento e incubação, a fim de testar mais dois métodos de extração dos ligantes. O segundo teste de extração foi realizado com mudança de pH, através da adição de 500 µL de tampão acetato de amônio 50 mmol L⁻¹ pH 5,5 e o terceiro com mudança de pH e adição de solvente orgânico, a partir de 500 µL de tampão acetato de amônio 50 mmol L⁻¹ pH 5,5 contendo 20% de MeOH (Tampão F). Após a adição da solução extratora, os biorreatores foram incubados como descrito acima.

Para a análise das extrações, foi utilizada uma coluna Poroshell C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 µm, Agilent), com forno de coluna a 40 °C, fase móvel ACN/água contendo 0,1% de ácido fórmico 1:4 (v/v), em modo isocrático, vazão de 0,4 mL min⁻¹ com *split*, onde 0,1 mL min⁻¹ foi levado para o IT, que operou em modo SRM monitorando os íons [M+H]⁺ de cada um dos cinco compostos. O tempo de corrida foi de 10 min.

O mesmo procedimento foi realizado com as *TcPEPCK-III-MB*, porém com tempo de incubação da mistura dos 5 inibidores de 30 min e extração apenas com 500 μL de Tampão F, seguido de análise por LC-MS.

O tratamento dos dados foi realizado através das áreas das bandas cromatográficas obtidas para cada ligante, nas duas *TcPEPCK-MB* ativas, relacionada com a área obtida na *TcPEPCK-MB* inativa (controle), através da razão:

$$\text{Razão de afinidade} = \frac{\text{Área do ligante}_{\text{MB-ativa}}}{\text{Área do ligante}_{\text{MB-inativa}}}$$

Para reiniciar os ensaios de *ligand fishing*, as *TcPEPCK-III-MB* foram deixadas em contato com Tampão A por 1 h e, em seguida, avaliadas suas atividades (Seção 3.19). Então, novamente o procedimento foi repetido com as *TcPEPCK-III-MB*, porém com uma mistura de cinco hidantoínas (LSPN551, LSPN553, LSPN558, LSPN561 e LSPN563) preparadas cada uma a 1 mmol L^{-1} em DMSO/acetona 1:1, com adição de 10 μL da mistura e 490 μL de Tampão A, sendo que a mistura final apresentou 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada hidantoína. As *TcPEPCK-III-MB* foram agitadas em vortex por 10 s e deixadas sob agitação por 30 min, 36 °C e 250 rpm. Após, as *TcPEPCK-III-MB* foram levadas para o separador magnético, deixadas por 30 s e, então, todo o sobrenadante foi removido. As *TcPEPCK-III-MB* foram lavadas (2x 500 μL) com Tampão A, sempre em ciclos de 10 segundos de agitação em vortex e 30 s no separador magnético. Então, foram adicionados 500 μL de Tampão F, seguido de agitação em vortex por 10 s e deixados sob agitação por 10 min, 36 °C e 250 rpm. Após, as *TcPEPCK-III-MB* foram levadas para o separador magnético, deixadas por 30 s e, então, todo o sobrenadante foi recolhido, transferidos para *vials* e analisados (10 μL) através de LC-MS.

Para análise do ensaio com as hidantoínas, foi utilizada a coluna Poroshell C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 µm, Agilent), com forno de coluna a 40 °C, fase móvel ACN/água contendo 0,1% de ácido fórmico 35:65 (v/v), em modo isocrático, vazão de 0,4 mL min⁻¹ com *split*, onde 0,1 mL min⁻¹ foi levado para o IT, que operou em modo SRM monitorando os íons [M+H]⁺ de cada um dos cinco compostos. O tempo de corrida foi de 8 min.

Os parâmetros do IT para ambas as análises foram: voltagem no capilar: 4500 V; voltagem no *skimmer*: +40,0 V; pressão do gás de nebulização (N₂): 30,0 psi; vazão do gás de secagem (N₂): 7,0 L min⁻¹ e temperatura da fonte: 300 °C. No modo SRM, foi monitorado o íon [M+H]⁺ de cada composto.

3.23 Ensaio de *ligand fishing* para a TcPEPCK-MB com extrato de plantas do cerrado

O extrato etanólico seco das cascas de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae), pré-purificado para retirada da clorofila, foi solubilizado em Tampão A, de tal forma a ser preparada uma solução 2 mg mL⁻¹ que foi agitada em vortex e permaneceu 5 min em sonicação. A solução foi centrifugada por 1 min e 5.000 g, e 500 µL do sobrenadante do extrato foi adicionado às três TcPEPCK-III-MB (sendo 1 desnaturada e 2 com atividade para TcPEPCK), que foram agitadas em vortex por 10 s e deixadas sob agitação por 30 min, 36 °C e 250 rpm. Após, as TcPEPCK-III-MB foram levadas para o separador magnético, deixadas por 30 s e, então, todo o sobrenadante foi removido. As TcPEPCK-III-MB foram lavadas (2x 500 µL) com Tampão A, sempre em ciclos de 10 s de agitação em vortex e 30 s no separador magnético.

Em seguida, aos biorreatores adicionou-se 500 µL de Tampão F, que foram agitados em vortex por 10 segundos e deixados sob agitação por 10 min, 36 °C e 250 rpm. Após, as TcPEPCK-III-MB foram levadas para o separador

magnético, deixadas por 1 min e, então, todo o sobrenadante foi recolhido, transferido para *vials* e analisado (10 μ L) através de LC-HRMS(/MS).

As *TcPEPCK-III-MB* foram lavadas (3x 500 μ L) com Tampão A e o procedimento se repetiu com os extratos etanólicos secos das folhas de *Diospyros burchellii* (Ebenaceae) e *Byrsonima coccolobifolia* (Malpighiaceae), e com o extrato etanólico seco das cascas de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg (Fabaceae).

No sistema LC-HRMS, foi utilizada a coluna Ascentis Express C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 μ m, Agilent), com fase móvel composta por água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e ACN (B), em modo gradiente, iniciando-se com 5% de B, 5-20% de B em 15 min, 20-60% de B em 5 min, 60-100% de B em 1 min e mantido em 100% de B por mais 1 min. Para o reequilíbrio, a coluna permaneceu com 5% de B por 3 min, com um tempo total de corrida de 25 min. A vazão foi de 0,4 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 μ L. As análises de cada ensaio de *fishing* foram realizadas em duplicata, sendo uma no modo positivo e outra no modo negativo de ionização. O QqTOF operou com janela espectral de m/z 100-1000, voltagem do capilar em 4500 V, pressão do nebulizador (N₂) 4,0 bar, gás de secagem (N₂) 10 L min⁻¹ e 180 °C, tempo de transferência de 70 μ s, pré-pulso de 5,0 μ s e energia da cela de colisão em 8 eV.

Para as análises de LC-HRMS/MS, o QqTOF operou nas mesmas condições descritas acima, e foi programado para aquisições no modo auto MS/MS (íons precursores por ciclo de tempo de 3 s), em experimentos com diferentes energias de colisão de 18, 27, 32 e 45 eV para toda a janela de m/z analisada.

Os extratos foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Richele Priscila Severino e pela Prof. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa. As informações a respeito da coleta das espécies e o preparo dos extratos estão apresentados a seguir:

- *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae), VOUCHER: 8854, extrato etanólico das cascas: as cascas do caule da planta *Q. grandiflora* foram coletadas em outubro de 2015 na dependência do cerrado da UFSCar, no município de São Carlos/SP, rodovia Washington Luís Km 235, sendo a exsicata depositada no herbário desta instituição. O material vegetal foi seco a 40 °C em estufa e moído em moinho de facas, logo após foram submetidos a maceração utilizando etanol, sendo feito quatro vezes a cada 7 dias em triplicata. Após a maceração, o material foi filtrado e o solvente evaporado a 50 °C utilizando um evaporador rotativo, obtendo assim o extrato etanólico.
- *Anadenanthera falcata* (Fabaceae), VOUCHER: 8370, extrato etanólico das cascas: as cascas do caule foram coletadas no cerrado paulista no primeiro semestre de 2011, no município de São Carlos/SP, rodovia Washington Luís Km 235, e identificadas pela Profa. Dra. Maria Inês Salgueiro Lima. As amostras foram secas em uma estufa a 40 °C durante três dias e depois o material seco foi moído e colocado em erlenmeyers com etanol 99,5% para a extração. O extrato bruto concentrado foi obtido com a evaporação do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida, a temperatura de 40 °C.
- *Diospyros burchellii* DC. (Ebenaceae), VOUCHER: BW 3457, *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (Malpighiaceae) VOUCHER: BW 6029, extratos etanólicos das folhas: ambas as espécies foram coletadas em 15 de dezembro de 2010 na Rodovia DF 480, Lote 01, Setor de Múltiplas Atividades do Gama - SMA - Gama/DF, sob as autorizações ambientais nº 021/2010 - SUGAP/IBRAM (supressão vegetal) e nº 043/2010 – IBRAM, sendo os espécimes testemunhos depositados no Herbário da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), Brasília/DF. Os estudos dessas espécies possuem Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético nº 010698/2013-2 (CNPq). As folhas

foram secas em estufa de circulação a 40 °C por 4 dias, posteriormente trituradas em moinho de facas e submetidas à maceração com etanol, a temperatura ambiente, durante três dias. Após os primeiros três dias de extração o material foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato etanólico das folhas. Este procedimento de extração e evaporação do solvente foi repetido por três vezes.

4 Resultados e discussão

4.1 Desenvolvimento de método LC-UV para a reação de carboxilação

Os métodos desenvolvidos para o monitoramento da atividade da PEPCK datam da década de 60-70^{108,121-123}, e são utilizados até os dias atuais^{95,96,126,97-102,124,125} com pouca ou nenhuma modificação, apesar dos vários problemas relacionados a eles. Visando eliminar tais problemas, foi proposto o desenvolvimento de um método por cromatografia a líquido para monitorar diretamente os produtos da catálise enzimática com detecção por ultravioleta (LC-UV).

Inicialmente, foi escolhido monitorar a reação de carboxilação e desfosforilação do PEP, com consumo de ADP e formação de OAA e ATP, a partir da separação cromatográfica de ADP e ATP. Assim, a utilização de outras reações enzimáticas acopladas não é necessária e os problemas com o monitoramento direto do OAA é superado.

Ao tampão de trabalho para a reação com a PEPCK (Tampão C) são adicionados os cofatores metálicos Mn^{2+} e Mg^{2+} , DTT e $NaHCO_3$ como fonte de CO_2 . Todos esses componentes são necessários para a atividade enzimática e, portanto, devem ser considerados no desenvolvimento do método analítico de separação, além dos substratos e produtos, PEP, OAA, ADP e ATP.

Para as condições de separações cromatográficas foi selecionado o modo isocrático de eluição com pareamento iônico. A fase estacionária selecionada foi a coluna C_{18} XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 μm , Waters) devido a sua alta capacidade de retenção para compostos polares.

Uma vez que o detector usado seria o UV e, assim, não havia a restrição para tampões não-voláteis, o tampão fosfato de potássio (65 mmol L^{-1} ,

pH 6,00) foi selecionado. Para o pareamento, foi utilizado hidrogenossulfato de tetrabutílamônio (TBAHS) 4 mmol L⁻¹. Metanol foi usado como modificador orgânico na proporção de 1% v/v. Nestas condições o ATP apresentou retenção elevada (em torno de 45 minutos) enquanto OAA e PEP eluíram no volume morto da coluna.

Baseados em trabalhos da literatura¹²⁷⁻¹²⁹, optou-se por alterar a fase móvel, de tal forma a utilizar o tampão fosfato em pH maior que o pK_a mais elevado de 6,5 do ATP, porém mantendo-se constante a concentração de fosfato, e uma maior concentração do pareador iônico TBAHS. Assim, testou-se a utilização de tampão fosfato de potássio 65 mmol L⁻¹ pH 7,50 e TBAHS 5 mmol L⁻¹ com diferentes proporções de MeOH em diferentes vazões. Os tempos de retenção obtidos para ATP e ADP estão apresentados na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – Influência no tempo de retenção, devido a proporção de MeOH (v/v) na fase móvel, composta por tampão fosfato de potássio 65 mmol L⁻¹ pH 7,50 e TBAHS 5 mmol L⁻¹, em diferentes vazões.

Vazão (mL min ⁻¹)	ADP, tempo de retenção (min)				ATP, tempo de retenção (min)			
	%MeOH (v/v)							
	5%	10%	12,5%	15%	5%	10%	12,5%	15%
0,2	19,3	-	-	3,9	42,5	-	-	5,5
0,3	13,2	6,7	5,3	-	29,0	11,8	8,5	-
0,4	-	5,0	4,1	-	-	8,9	6,6	-

Embora com 15% de MeOH os tempos de retenção tenham sido menores, o que levaria a corridas mais curtas, a resolução dos picos foi prejudicada. Assim, optou-se por utilizar 12,5% de MeOH e vazão 0,4 mL min⁻¹. O cromatograma obtido está apresentado na FIGURA 4.1.

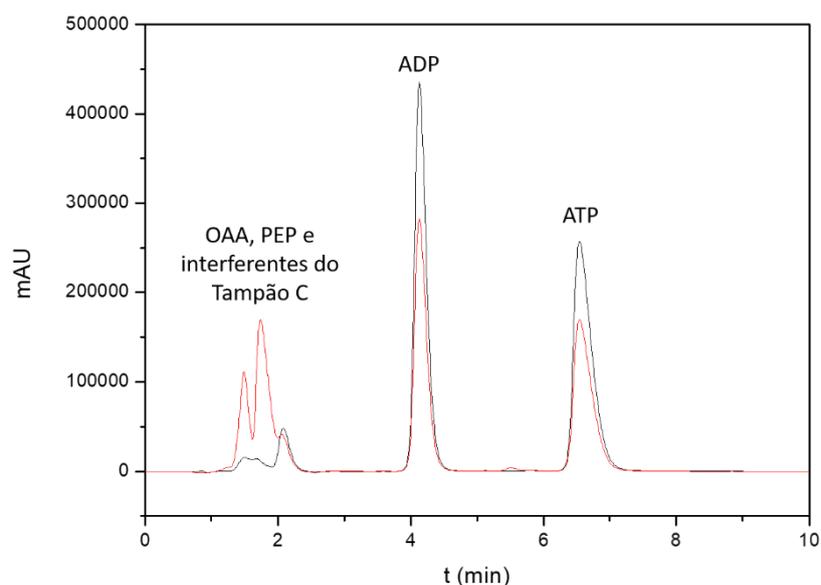


FIGURA 4.1 – Cromatograma da separação de OAA, PEP, ADP, ATP e interferentes do Tampão C, utilizando-se a coluna C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 μm, Waters), fase móvel (tampão fosfato de potássio 65 mmol L⁻¹ pH 7,5 contendo TBAHS 5 mmol L⁻¹)/MeOH (87,5:12,5, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹ e λ = 220 nm (vermelho) e 260 nm (preto).

Na perspectiva de se trabalhar em menores concentrações de tampão fosfato, optou-se por diminuir a concentração de 65 mmol L⁻¹ para 10 mmol L⁻¹. Porém, ao utilizar as mesmas condições cromatográficas, mas com concentração do tampão a 10 mmol L⁻¹ contendo TBAHS 5 mmol L⁻¹ (Tampão V), o tempo de retenção de ADP e ATP aumentou em 17 minutos. Desta maneira, a proporção de MeOH foi aumentada para 25%, proporcionando eficiência cromatográfica com alta resolução (FIGURA 4.2).

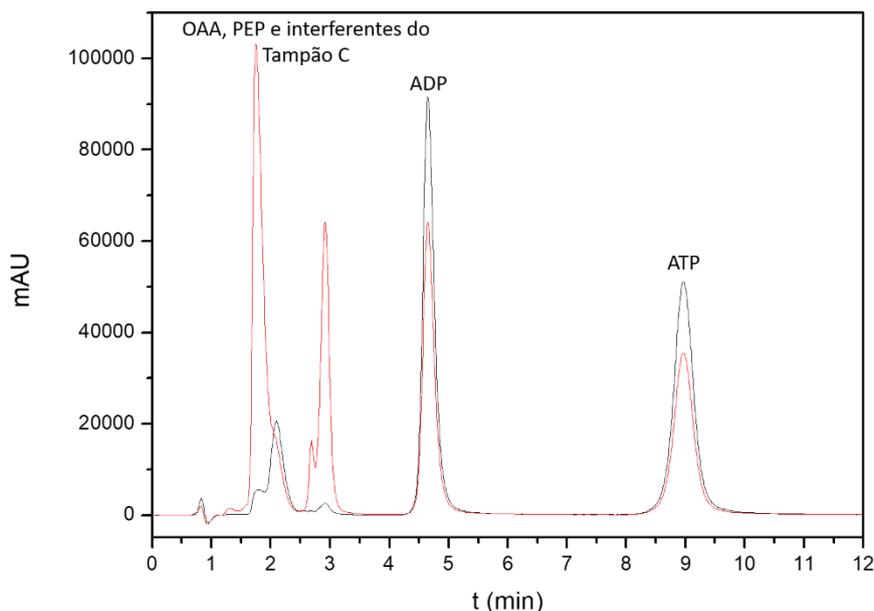


FIGURA 4.2 – Cromatograma da separação de OAA, PEP, ADP, ATP e interferentes do Tampão C, utilizando-se a coluna C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 μ m, Waters), fase móvel Tampão V/MeOH (75:25, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹ e λ = 220 nm (vermelho) e 260 nm (preto).

Com o método analítico da separação dos compostos da reação da PEPCK devidamente desenvolvido, iniciou-se os experimentos de expressão e purificação da enzima.

4.2 Expressão e purificação da *Tc*PEPCK

Para a expressão, foi utilizado um protocolo previamente desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE), da Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, empregando-se células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pT-GroE para transformação do plasmídeo pANEX-*Tc*PEPCK⁷⁷, conforme Seção 3.3. Análise por eletroforese em gel desnaturante da cultura, antes e após a indução da expressão com IPTG (FIGURA 4.3), mostrou uma banda em aproximadamente 60 kDa após a indução, próximo de 58,7 kDa esperado para a *Tc*PEPCK.

A lise celular seguida de precipitação com sulfato de amônio 40%, como descrito na Seção 3.4, foi realizada desde o princípio. Porém, nas etapas

cromatográficas subsequentes à precipitação, inicialmente, utilizou-se uma coluna de troca aniônica fraca (DEAE-SepharoseTM, 1 mL de volume interno, GE Healthcare), seguida por uma de exclusão molecular em Superose®12 (100 mL de volume interno, GE Healthcare), descritas na Seção 3.4.1.

Para a troca aniônica em DEAE, as frações com atividade para a *TcPEPCK* foram aquelas de baixa retenção (fração 2 a 10), eluídas com tampão de baixa força iônica (Tampão I). A baixa retenção era esperada, uma vez que o pH do Tampão I estava abaixo do pI da *TcPEPCK*, estando a mesma positivamente carregada. Um volume de 1 mL da fração 2 obtida da DEAE (denominada *TcPEPCK*-D2) foi aplicado na coluna de exclusão molecular e eluída em modo isocrático. Os níveis de purificação obtidos para cada etapa podem ser apreciados através de análise em SDS-PAGE, apresentado na FIGURA 4.3.

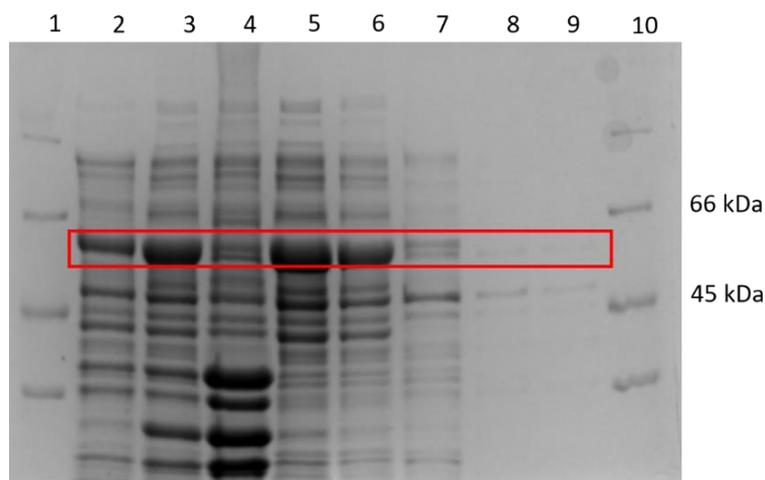


FIGURA 4.3 – Análise em SDS-PAGE do processo de expressão e purificação da *TcPEPCK*, sendo: marcador de massa molecular (poços 1 e 10); cultura de *E.coli* antes (poço 2) a após indução com IPTG (poço 3); precipitação com 40 % de sulfato de amônio, precipitado (poço 4) e sobrenadante (poço 5); sobrenadante (NH₄)₂SO₄ 40% após diálise (poço 6); fração 2 da coluna DEAE (poço 7); frações 27 e 28 eluídas da coluna Superose 12 (poços 8 e 9, respectivamente).

As purificações foram acompanhadas através do ensaio de atividade, monitorando-se a reação de carboxilação (Seção 3.5.2) com análises por LC-UV (Seção 3.7.1, método I). A purificação foi eficiente após a etapa de exclusão molecular (FIGURA 4.3, poços 8 e 9), mas com baixo rendimento. A realização

de purificações sucessivas na Superose 12, a fim de se obter maiores quantidades de enzima, mostrou-se dificultosa. A completa eluição das proteínas, de tal forma que a coluna estivesse pronta para a próxima purificação, foi um processo de várias horas e, embora esta etapa tenha apresentado reprodutibilidade, em cada purificação foram obtidas duas frações de 0,5 mL cada, com baixa atividade e baixíssima produtividade.

A purificação pela DEAE (FIGURA 4.3, poços 7), embora não tão eficiente como a Superose 12, mostrou-se satisfatória comparado ao perfil de proteínas após indução. Assim, para dar continuidade aos demais testes, seguiu-se com a fração *Tc*PEPCK-D2. É importante ressaltar que as reações branco para as duas frações se diferenciaram, com a presença de ATP para a fração obtida da DEAE. O pico do ATP foi provavelmente devido a ação de ATPases presentes nas frações mais impuras, o que não ocorreu com a fração da Superose 12, como mostrado na FIGURA 4.4.

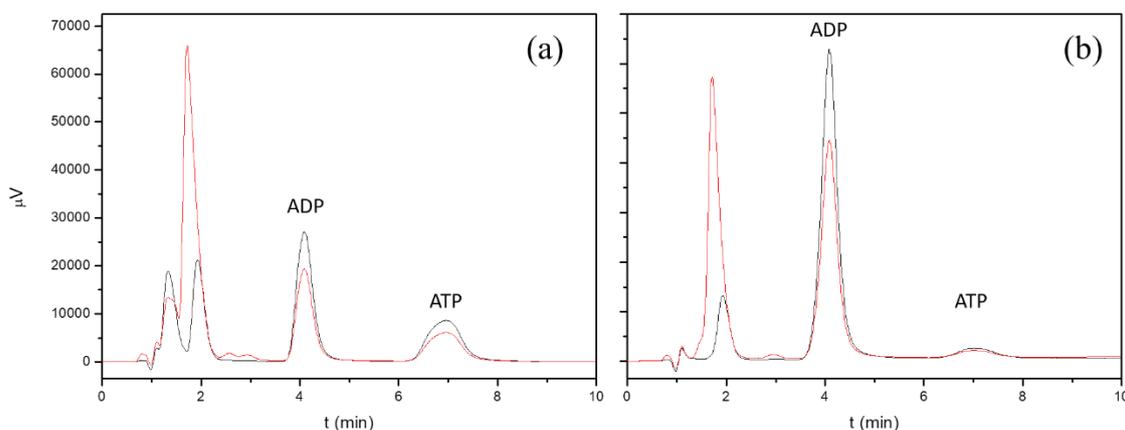


FIGURA 4.4 – Cromatogramas LC-UV das reações branco da *Tc*PEPCK obtida de (a) DEAE e (b) Superose 12, utilizando-se a coluna C_{18} XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 μ m, Waters), com fase móvel Tampão V/MeOH, vazão 0,4 mL/min e $\lambda = 220$ nm (vermelho) e 260 nm (preto).

Um pico de ATP de baixa intensidade na reação branco da Superose 12 (FIGURA 4.4b) ocorre naturalmente, dada a presença de ATP no próprio padrão comercial de ADP. Contudo, é importante observar a necessidade de reações branco da DEAE para desconsiderar a área do branco das reações

enzimáticas a fim de não superestimar as atividades encontradas, levando a resultados não confiáveis.

4.3 Cromatografia 2D LC

Visando novos modelos de triagem de ligantes, com a enzima imobilizada em capilares de sílica fundida (ICER) e dada a baixa resolução cromatográfica dos biorreatores capilares, é necessária a utilização de 2D LC para separação de ADP e ATP.

O sistema cromatográfico bidimensional foi configurado como ilustrado na FIGURA 4.5. Na primeira dimensão, a enzima imobilizada converte o substrato PEP, na presença dos cofatores e ADP, em OAA e ATP (posição 1 da válvula de seis pórticos). Em seguida, o OAA e o ATP produzido pela ação da PEPCCK, além do excesso de PEP e ADP que não foram convertidos, são transferidos para a coluna analítica através da mudança da válvula para posição 2. A separação é obtida na segunda dimensão (válvula na posição 1) e a atividade da enzima é monitorada através da quantificação de ATP.

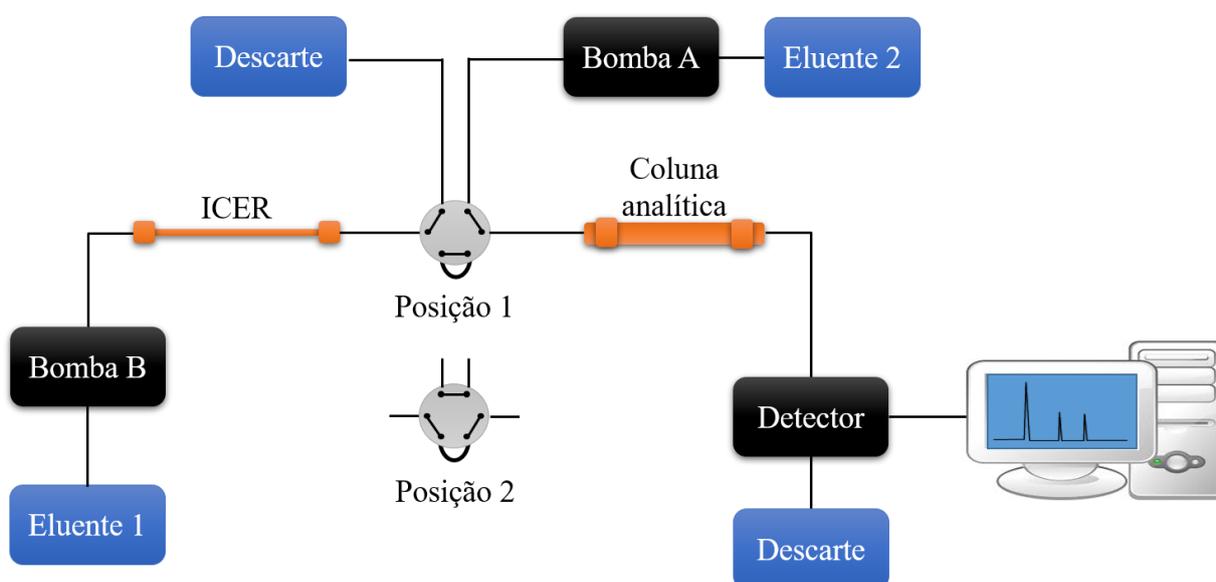


FIGURA 4.5 – Representação do sistema cromatográfico bidimensional com o ICER na primeira dimensão e uma coluna analítica na segunda dimensão.

Para utilização desse sistema, é preciso estabelecer o tempo em que os analitos da primeira dimensão são transferidos para a segunda dimensão (posição 2) até que a válvula retorne para a posição 1 e inicie a separação analítica na segunda dimensão.

Como a atividade da enzima já era conhecida em Tampão C, o tempo de acoplamento do ICER com a coluna analítica para transferência dos compostos (OAA, PEP, ADP e ATP) foi estabelecido neste tampão, avaliando-se o tempo de transferência de todos os compostos em um capilar de sílica fundida vazio de 40 cm (Seção 3.7.2) até o detector de UV. As solução-padrão contendo a mistura de cada um dos compostos foram injetadas no capilar, em quintuplicata, e o tempo de acoplamento estabelecido entre 1,4 e 6,0 min (FIGURA 4.6.)

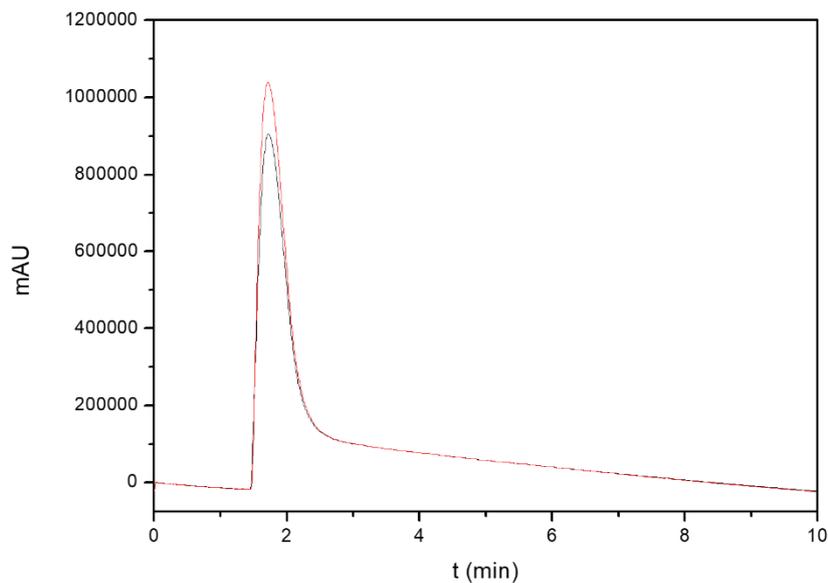


FIGURA 4.6 – Cromatograma da injeção de 10 μL de um mix de OAA, PEP, ADP e ATP 0,5 mg mL^{-1} em um capilar de sílica fundida vazio (40 cm), utilizando Tampão C como fase móvel, vazão de 0,05 mL min^{-1} e $\lambda = 220 \text{ nm}$ (vermelho) e 260 nm (preto).

O tempo de acoplamento foi reavaliado após a obtenção do ICER. Contudo, as condições de análise desenvolvidas estão sumarizadas na TABELA 4.2.

TABELA 4.2 – Condições cromatográficas desenvolvidas no sistema 2D LC para separação de ADP e ATP.

Bomba (eluyente)	Tempo (min)	Evento	Posição da válvula
B (1)	0 - 1,39	Eluição dos analitos	1
A (2)	0 - 1,39	Condicionamento da coluna analítica	1
B (1)	1,40 - 6,00	Transferência dos analitos para a coluna analítica	2
A (2)	6,01 - 15,00	Análise dos compostos pela coluna analítica	1
B (1)	6,01 - 15,00	Condicionamento do ICER	1

Bomba B (1ª dimensão): ICER (40 cm x 100 µm d.i.), vazão 0,05 mL min⁻¹, eluyente 1 = Tampão C. Bomba A (2ª dimensão): coluna C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm, Waters), vazão 0,4 mL min⁻¹, eluyente 2 = Tampão V/MeOH (75:25, v/v) e λ = 220 e 260 nm.

Após estabelecido o tempo de acoplamento e encontradas as condições de separação dos compostos na coluna analítica, as duas dimensões foram acopladas, a fim de verificar o efeito das condições de reação enzimática (primeira dimensão) na separação analítica.

As condições cromatográficas utilizadas na primeira dimensão foram as mesmas para a determinação do tempo de acoplamento e necessárias para atividade do ICER. As condições da primeira dimensão, no entanto, prejudicaram as condições de eluição da segunda dimensão. A retenção foi afetada para todos os compostos (FIGURA 4.7).

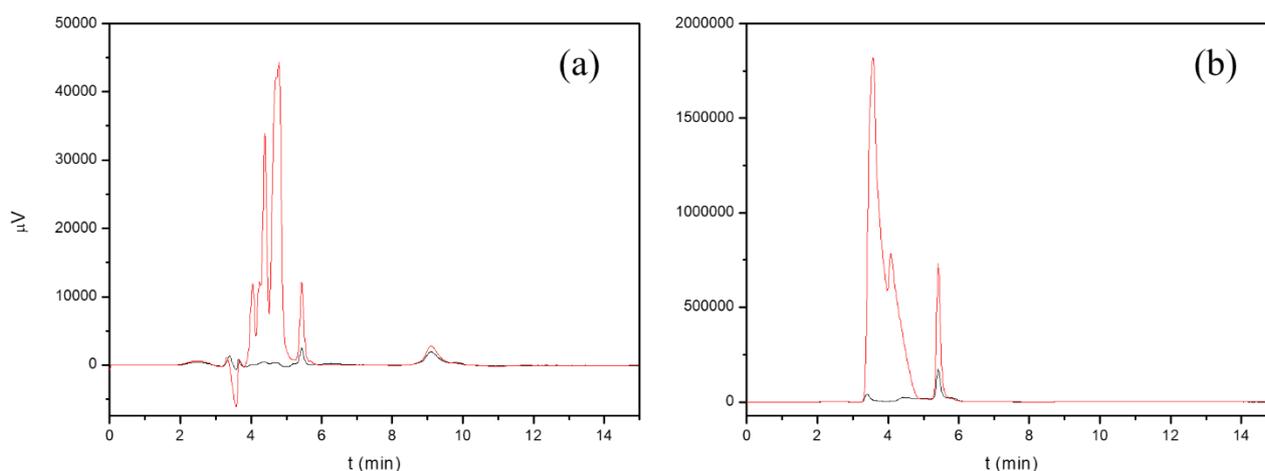


FIGURA 4.7 – Cromatogramas 2D LC. 1ª dimensão: capilar vazio (40 cm), fase móvel Tampão C, vazão 0,05 mL min⁻¹. 2ª dimensão: coluna C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm, Waters), com fase móvel Tampão V/MeOH (75:25, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹ e λ = λ = 220 nm (vermelho) e 260 nm (preto). (a) Injeção branco e (b) injeção da mistura de OAA, PEP, ADP e ATP.

Duas hipóteses foram levantadas: *i*) o tampão PIPES compete com o pareamento iônico, visto que possui um ácido sulfônico em sua estrutura e, *ii*) ADP e ATP complexam com os metais Mn^{2+} e Mg^{2+} presentes no Tampão C, perdendo retenção. Para verificar a interferência do Tampão C, foi realizado um teste com tampão fosfato no capilar vazio, visto que a separação analítica ocorre neste tampão. Assim, foi novamente avaliado o tempo de transferência dos analitos em tampão fosfato de potássio 10 mmol L^{-1} pH 7,00, que não sofreu alteração.

A utilização de tampão fosfato na 1ª dimensão não prejudicou à separação analítica na 2ª dimensão, como apresentado na FIGURA 4.8. No entanto, a transferência dos analitos em um tampão aquoso acarretou em aumento na retenção de ADP e ATP e, assim, a proporção de 25% de MeOH utilizada inicialmente foi aumentada para 28,5% de MeOH.

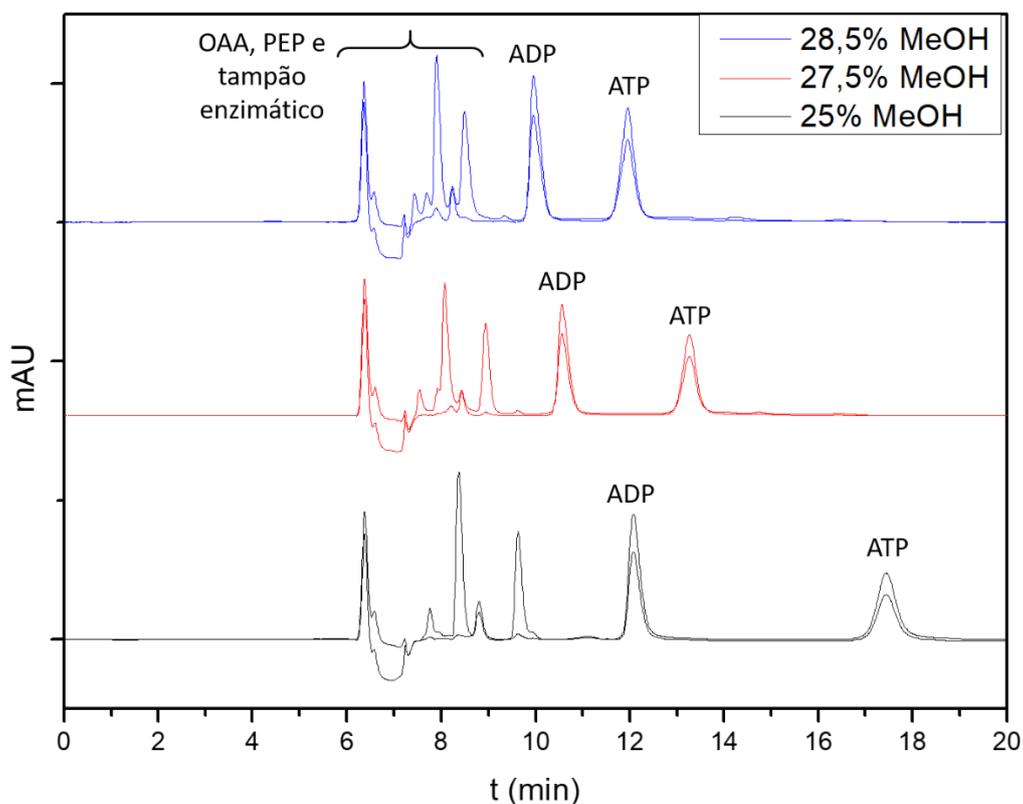


FIGURA 4.8 – Cromatogramas 2D LC da separação de OAA, PEP, ADP, ATP e interferentes do Tampão C. 1ª dimensão: capilar vazio (40 cm), fase móvel tampão fosfato 10 mmol L^{-1} e pH 7,00, vazão $0,05\text{ mL min}^{-1}$. 2ª dimensão: coluna C_{18} XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 μm , Waters), com fase móvel Tampão V/MeOH, vazão $0,4\text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 220$ e 260 nm .

Nos métodos 2D LC, ambas as dimensões necessitam ser compatíveis e, neste trabalho, as condições da primeira dimensão (ICER) devem possibilitar a biocatálise da *Tc*PEPCK mas, ao mesmo tempo, não podem interferir na separação analítica da 2ª dimensão. Como a utilização de tampão fosfato não interferiu na separação analítica, então foi avaliado o efeito individual dos compostos do Tampão C, ou seja, a decorrência dos metais na retenção, bem como a competição de PIPES pelo pareamento iônico. Para tanto, foram realizados dois testes na primeira dimensão: *i*) utilização de PIPES 50 mmol L⁻¹ pH 7,4, sem adição dos metais, EGTA e KCl e *ii*) utilização de Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 com adição de MnCl₂ 0,7 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 3 mmol L⁻¹. O tampão Tris-HCl foi escolhido pois também é reportado na literatura¹¹² para ensaios de atividade com a PEPCK.

Os resultados obtidos evidenciaram que os metais levam a perda de retenção, provavelmente devido à formação de complexos mais polares com ADP e ATP, bem como a utilização de PIPES compete com o pareamento e leva à assimetria de picos (FIGURA 4.9).

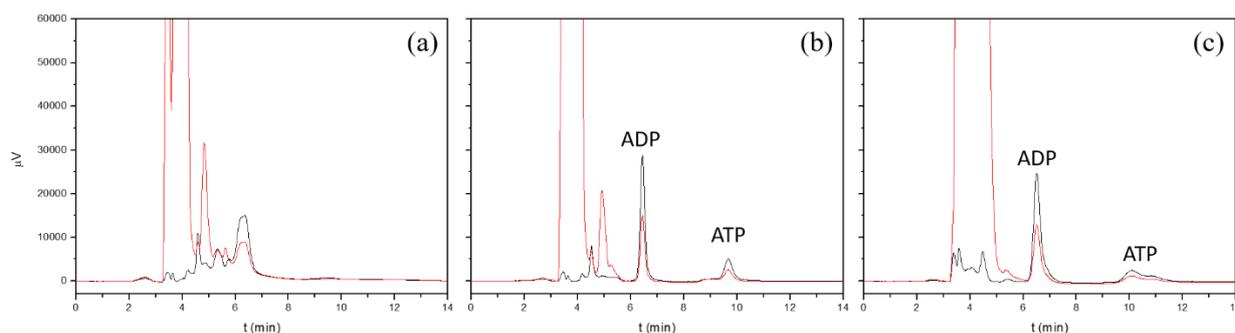


FIGURA 4.9 – Cromatogramas 2D LC, sendo a 1ª dimensão de (a) Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 com adição dos metais, (b) apenas Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 e (c) PIPES 50 mmol L⁻¹ pH 7,4. 2ª dimensão: C₁₈ XSelect HSS T3 (100 x 2,1 mm, 3,5 μm, Waters), com fase móvel Tampão V/MeOH (71,5:28,5, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹ e λ = 220 nm (vermelho) e 260 nm (preto).

Desta forma, foi preciso buscar tampões compatíveis com as condições cromatográficas na qual a enzima apresentasse atividade. Como o Tampão C apresenta diversos compostos (PIPES 50 mmol L⁻¹ pH 7,4; contendo

KCl 90 mmol L⁻¹, EGTA 0,6 mmol L⁻¹, DTT 1 mmol L⁻¹, MnCl₂ 0,7 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 3 mmol L⁻¹), foi preciso verificar a influência destes compostos na atividade da enzima através da área da banda de ATP produzido. Primeiramente foi avaliada a atividade da *TcPEPCK* em Tampão C (Seção 3.5.2), porém sem adição de KCl e EGTA, na qual a atividade não foi afetada e, assim, a adição desses dois compostos foi descontinuada. Em seguida, avaliou-se a atividade da enzima em Tampão C sem KCl, EGTA, MnCl₂ e MgCl₂ (Seção 3.5.4). Neste caso, a *TcPEPCK* não apresentou nenhuma atividade, comprovando a necessidade dos metais divalentes como cofatores.

A utilização de outros tampões também foi avaliada (Seção 3.5.4), através de reações de carboxilação, em que o PIPES foi substituído por acetato de amônio pH 5,65; bicarbonato de amônio pH 6,50, fosfato de potássio pH 7,00 e Tris-HCl pH 7,50, todos na concentração de 50 mmol L⁻¹ e contendo DTT 1 mmol L⁻¹, MnCl₂ 0,7 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 3 mmol L⁻¹. A enzima apresentou atividade em todos tampões, sendo as atividades semelhantes ao Tampão C quando foi utilizado acetato de amônio e Tris-HCl, porém uma atividade cerca de 60% menor em bicarbonato e fosfato. Entretanto, a utilização de tampões na 1ª dimensão com pHs mais distantes de 7,5 (pH da fase móvel na 2ª dimensão); como o acetato e o bicarbonato, poderiam levar a problemas na separação analítica, visto que o último pK_a do ADP e ATP está em cerca de 6,5 e a retenção é diretamente afetada pelo pH.

Para não ocorrer efeitos na retenção devido ao pH, é preciso utilizar pH da fase móvel com, no mínimo, 1,5 unidade acima do pK_a, ou seja, pH acima de 8, o que é incompatível com a coluna analítica utilizada, bem como com as colunas C₁₈ clássicas. Então, testou-se a separação dos componentes da reação enzimática em duas diferentes colunas C₁₈ híbridas, que apresentam estabilidade até pH 12, a C₁₈ XTerra (150 x 4,6 mm, 5 µm, Waters) e C₁₈ XSelect CSH (100 x 2,1 mm, 2,5 µm, Waters) ambas com fase móvel composta por Tampão VI [acetato de amônio 20 mmol L⁻¹ e pH 9,50 contendo TBAHS 5 mmol L⁻¹] e MeOH

(Seção 3.7.1, métodos II e III). Os cromatogramas obtidos estão apresentados na FIGURA 4.10.

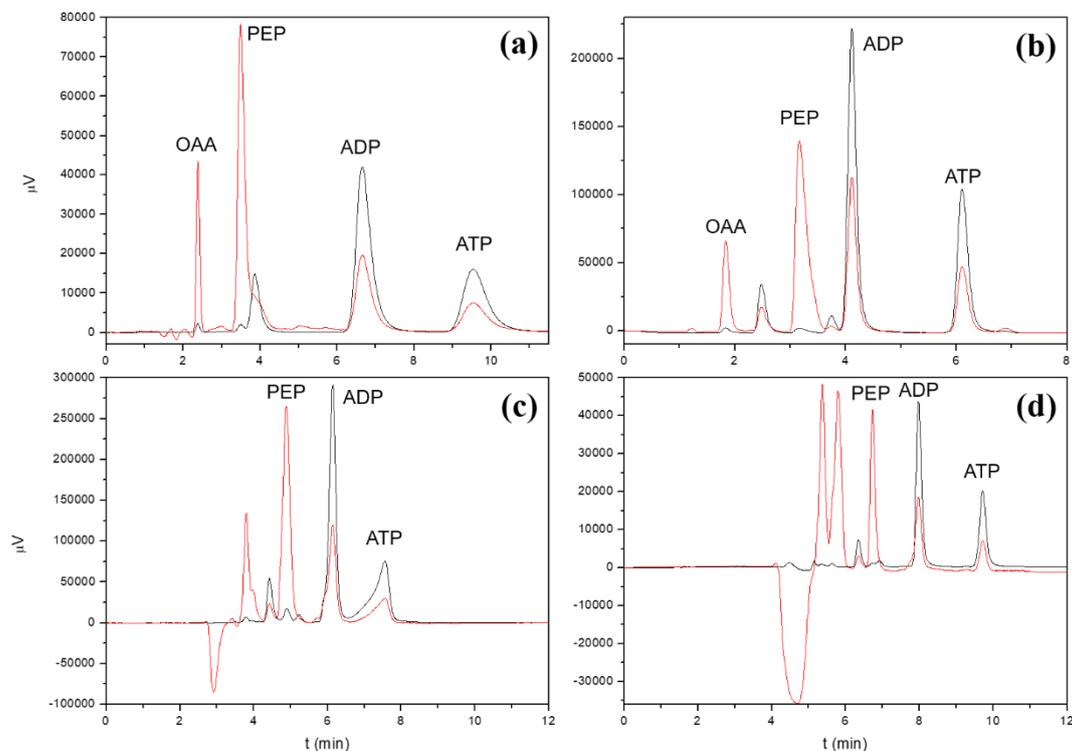


FIGURA 4.10 – Cromatogramas LC-UV das separações analíticas com a coluna (a) C_{18} XTerra vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e (b) C_{18} XSelect CSH vazão $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. O acoplamento 2D LC foi realizado em (c) com a C_{18} XTerra e (d) C_{18} XSelect CSH. A separação analítica utilizou fase móvel composta por Tampão VI/MeOH (75:25) e as separações 2D utilizaram, na 1ª dimensão, tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} pH 5,65 contendo DTT 1 mmol L^{-1} , MnCl_2 $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e MgCl_2 3 mmol L^{-1} com vazão $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 220 \text{ nm}$ (vermelho) e 260 nm (preto).

A utilização de ambas colunas levou a ótimas separações analíticas de ADP e ATP, sendo que na coluna C_{18} CSH a corrida é mais curta (7 min) e com vazão menor. Quanto aos métodos 2D, ilustrados na FIGURA 4.10c e 4.10d, os metais do tampão na 1ª dimensão afetaram a separação analítica na 2ª dimensão, sobretudo para a coluna C_{18} XTerra.

Os novos métodos analíticos levaram à separação de PEP – o substrato da PEPCCK na reação de carboxilação – sendo que com a coluna C_{18} HSS T3 o mesmo coeluiu com OAA e os demais compostos do Tampão C. A proposta inicial de monitoramento da reação através do ATP formado se deu em função da difícil retenção do OAA e sua alta instabilidade em solução. A grande importância

da retenção de PEP deve-se à reação de descarboxilação da PEPCK, na qual o mesmo é o produto da catálise enzimática, uma vez que esta é a reação favorecida *in vivo* devido à baixa afinidade da enzima por CO_2 ⁸⁰. Desta forma, testou-se a reação de descarboxilação, sendo OAA substrato e PEP produto, com monitoramento direto do pico do produto.

4.4 Reação de descarboxilação e fosforilação da *Tc*PEPCK

A atividade da enzima, em sua reação de descarboxilação, foi testada em solução, utilizando-se a fração *Tc*PEPCK-D2 através do método cromatográfico desenvolvido (Seção 3.7.1, método II).

Para a biocatálise, foram testados os tampões Tris-HCl pH 7,5, HEPES pH 8,0 e acetato de amônio pH 9,0; todos a 50 mmol L^{-1} e contendo DTT 1 mmol L^{-1} , MnCl_2 $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e MgCl_2 3 mmol L^{-1} . A enzima apresentou atividade em todos os tampões testados (FIGURA 4.11a). A amostra branco da reação, na ausência de OAA, não produziu PEP (FIGURA 4.11b), embora tenha formado ADP, evidenciando, outra vez, a presença de ATPases. Novamente, na ausência dos cofatores metálicos não houve formação de produto e nem mesmo ADP (FIGURA 4.11c), visto que a maioria das ATPases são dependentes de magnésio.

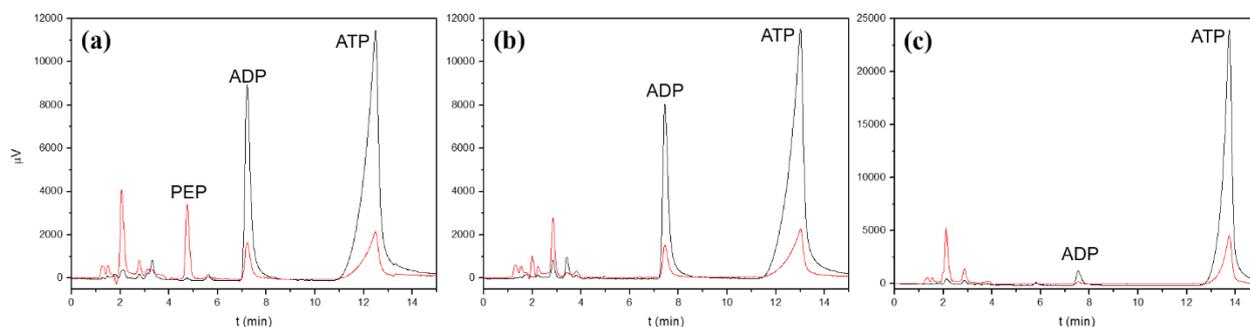


FIGURA 4.11 – Cromatogramas LC-UV da reação em Tampão D de (a) descarboxilação da *Tc*PEPCK, (b) reação branco e (c) reação na ausência dos cofatores. Coluna C_{18} XSelect CSH ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $2,5 \mu\text{m}$, Waters), com fase móvel Tampão VI/MeOH 75:25, vazão $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 220 \text{ nm}$ (vermelho) e 260 nm (preto).

Desta forma, a proposta inicial de monitorar a atividade da *TcPEPCK* através da produção de ATP, por meio da reação de carboxilação, foi alterada para o monitoramento direto do produto da reação de descarboxilação, o PEP. Ademais, a ausência de produto no branco garante maior confiabilidade no monitoramento da atividade. Assim, com a enzima ativa e o método desenvolvido, iniciaram-se os testes de imobilização da *TcPEPCK*.

4.5 Imobilização da *TcPEPCK* e preparo do ICER

Dentre os vários métodos de imobilização, a imobilização covalente nas paredes do capilar de sílica fundida usando glutaraldeído, através de formação de grupos iminas, oferece vantagens pela praticidade e reprodutibilidade. Embora as condições devam ser encontradas para cada nova enzima, é um método bem estabelecido em nosso grupo de pesquisa^{117,118,130-132}. O esquema ilustrado na FIGURA 4.12 apresenta as reações envolvidas.

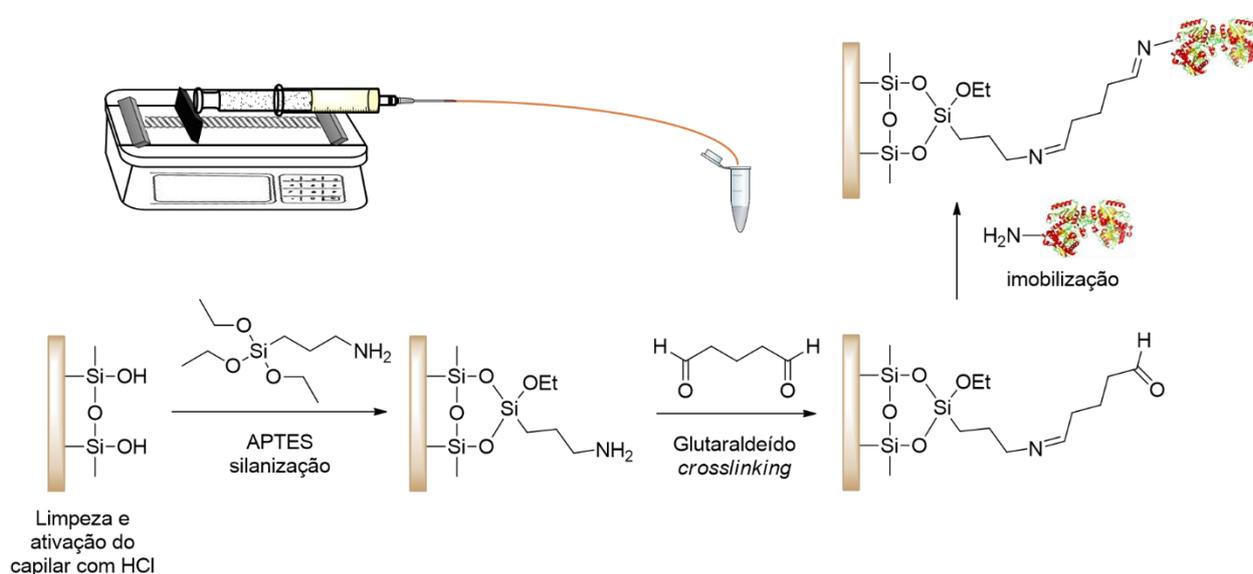


FIGURA 4.12 – Esquematisação do processo de imobilização em capilar de sílica fundida.

A imobilização da fração *TcPEPCK*-D2 (Seção 3.8.1) não resultou em capilares ativos, dada a ausência de pico de PEP e ADP que confirmam a reação, como é possível observar na FIGURA 4.13. Diversas tentativas de

variações no LC-UV foram realizadas, como variação da concentração dos substratos, diminuição da vazão na 1ª dimensão para $0,01 \text{ mL min}^{-1}$, aumento do tempo de acoplamento e *stop flow* (parada da bomba após injeção dos substratos a fim de fornecer maior tempo para que a biocatálise ocorra). Porém, em nenhuma tentativa foi observada atividade.

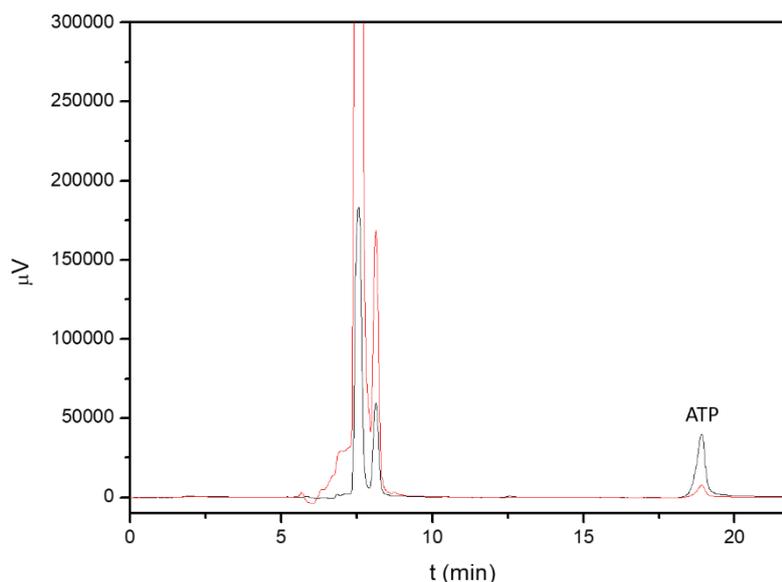


FIGURA 4.13 – Cromatograma 2D LC de atividade o ICER. 1ª dimensão: ICER com fase móvel Tampão D, vazão $0,05 \text{ mL min}^{-1}$. 2ª dimensão: coluna C_{18} XSelect CSH (100 x 2,1 mm, $2,5 \mu\text{m}$, Waters), com fase móvel Tampão VI/MeOH 75:25, vazão $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 220 \text{ nm}$ (vermelho) e 260 nm (preto).

Outras tentativas de imobilização foram realizadas, com enzimas purificadas de diferentes expressões, passagem de maior volume de enzima no capilar durante a imobilização, diminuição da vazão na passagem da enzima pelo capilar e também diminuindo a concentração de glutaraldeído de 1% para 0,25%. A concentração de glutaraldeído é uma variável que depende da estrutura da enzima e, se esta possuir muitos resíduos de aminoácidos básicos disponíveis para ligação, a enzima pode se ligar de maneira muito rígida^{133,134} e perder sua estrutura ativa. Porém, nenhuma das variações na imobilização resultou em um ICER ativo.

4.6 Imobilização da *Tc*PEPCK em partículas magnéticas

A química envolvida na imobilização de enzimas em partículas magnéticas com resíduos de amina é a mesma que ocorre no ICER, ou seja, o reagente bifuncional glutaraldeído se liga aos grupamentos amino da partícula, formando uma imina, e a ligação com a enzima ocorre da mesma maneira, via resíduos de aminoácidos básicos, formando-se o biorreator ou IMER (FIGURA 4.14). O diferencial da partícula está em sua maior área de imobilização, comparado ao capilar, o que leva a uma maior quantidade de enzima ligada.

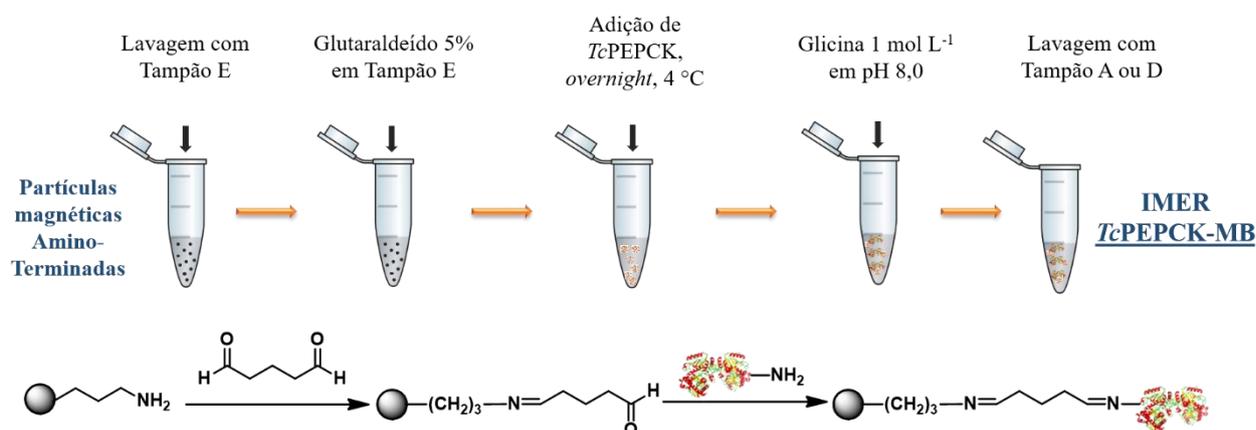


FIGURA 4.14 – Esquemática do processo de imobilização em partículas magnéticas amino-terminadas.

Testou-se a imobilização da *Tc*PEPCK em partículas magnéticas comerciais amino-terminadas (Seção 3.9), utilizando-se 2 mL da fração *Tc*PEPCK-D2. Após a finalização, foi testada a atividade da *Tc*PEPCK-D2-MB e analisado por LC-UV. A *Tc*PEPCK-D2-MB consumiu quase todo substrato OAA e ATP em 10 min de reação, apresentado no cromatograma da FIGURA 4.15. A enzima imobilizada apresentou atividade cerca de 6 vezes maior que em solução, mensurado através de comparação entre áreas das bandas cromatográficas de PEP.

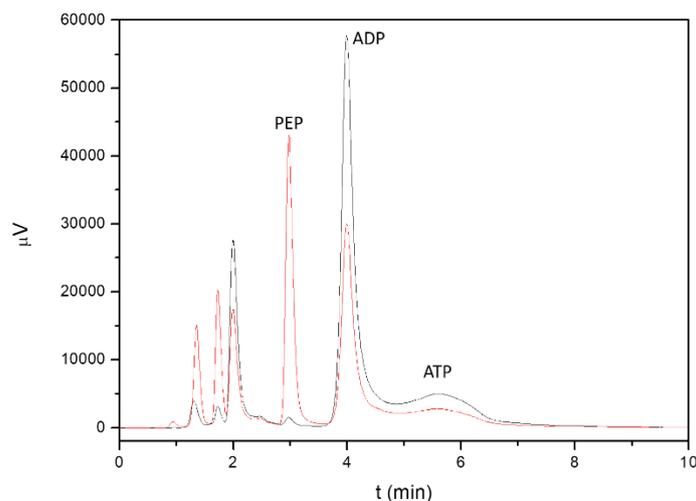


FIGURA 4.15 – Cromatograma LC-UV do ensaio de atividade da *Tc*PEPCK-D2-MB. Coluna C₁₈ XSelect CSH (Waters®, 2,5 µm, 100 x 2,1 mm), com fase móvel Tampão VI/MeOH 75:25, vazão 0,25 mL min⁻¹ e $\lambda = 220$ nm (vermelho) e 260 nm (preto).

A atividade do IMER indicou que a química envolvida na imobilização foi efetiva, ou seja, é possível imobilizar a *Tc*PEPCK por resíduos de aminoácidos básicos, utilizando o glutaraldeído para formação de iminas. Isso pode indicar que a ausência de atividade no ICER seja devido ao capilar e sua menor área para imobilização. Como a *Tc*PEPCK utilizada para imobilização não apresenta elevada pureza (FIGURA 4.3, poço 7) e a imobilização por resíduos básicos não é específica, uma baixa quantidade de enzima pode ter sido imobilizada e a atividade não detectada. Uma possível alternativa para tal problema é refinar a purificação e/ou melhorar a sensibilidade do método. Ambas as alternativas foram realizadas e descritas a seguir.

4.7 Desenvolvimento de método LC-MS/MS

4.7.1 Detecção de PEP no MS

Uma outra forma de trabalhar com o ICER, alternativamente à utilização de 2D LC, é acoplá-lo diretamente ao MS no qual, embora o biorreator não apresente resolução cromatográfica para separar substrato e produto, esses

podem ser identificados pelos seus íons no MS. Além disso, o MS apresenta, em geral, maior sensibilidade quando comparado ao UV.

O PEP ioniza no modo negativo em pH básico¹³⁵ e, então, foi proposta a detecção direta do produto no MS. Na reação de descarboxilação, a *TcPEPCK* foi ativa em Tampão D. Todavia, metais e concentrações elevadas de tampão interferem na ionização e, então, alguns testes prévios ao acoplamento direto do capilar ao MS foram realizados, a fim de verificar a influência de cada componente na detectabilidade.

A diluição dos componentes do Tampão D para infusão de PEP e otimização de suas condições de ionização foram realizadas e, para que a ionização não fosse grandemente prejudicada, as concentrações de DTT e dos metais foram da ordem de 1 nmol L⁻¹ cada. Mas, em tais concentrações, a enzima não apresentou atividade em solução, em ensaios realizados e analisados por LC-UV.

Novamente os aditivos do tampão interferiram na detectabilidade. Como o comportamento da enzima imobilizada pode ser diferente da enzima em solução e, com a *TcPEPCK-D2-MB* ativa, esta foi utilizada para avaliar as diferenças entre a enzima imobilizada e em solução, no que diz respeito a necessidade dos componentes do Tampão D na reação. Como o ensaio de atividade da *TcPEPCK-D2-MB* é *off-line*, optou-se por otimizar as condições de ionização do PEP em Tampão B.

Para o desenvolvimento do método analítico, foram avaliadas as condições de ionização e fragmentação do PEP. Assim, foi preparada uma solução de PEP 10 µg mL⁻¹ em Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) e, através de uma bomba-seringa em vazão de 1 µL min⁻¹, foi realizada a infusão no IT. A otimização dos parâmetros de ionização e fragmentação no modo negativo foi realizada com auxílio do software Esquire 6000 no modo Expert. No modo SRM foi monitorado o íon precursor do PEP [M-H]⁻ *m/z* 167 e dois fragmentos; [PO₃]⁻ *m/z* 79 para quantificação e [M-H-CO]⁻ *m/z* 139 para confirmação.

4.7.2 Acoplamento LC-MS

Embora as condições de ionização do PEP para detecção no MS foram desenvolvidas, o método cromatográfico de separação dos quatro compostos da reação, por LC-UV, é incompatível com o MS pois, ainda que se utilize acetato de amônio como fase móvel, o TBAHS não é volátil. Assim, foi pensado em um método por cromatografia em modo reverso na qual, dada a elevada hidrofobicidade dos quatro compostos, não ocorre retenção, porém os mesmos são diferenciados por suas razões m/z .

Para tanto, foi utilizada a coluna Luna C₁₈(2) (50 x 2,0 mm, 3 μm, Phenomenex), fase móvel composta por Tampão B/MeOH 1:1 (v/v), vazão de 0,15 mL min⁻¹ e 3 min de tempo de corrida, como representados na FIGURA 4.16.

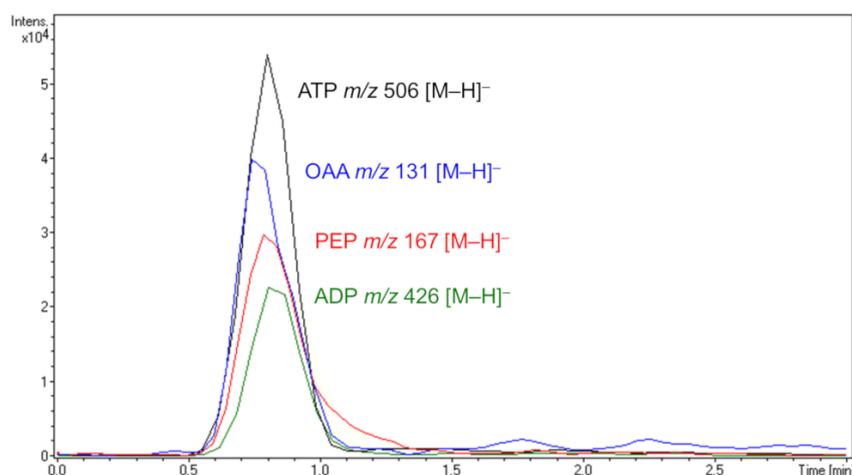


FIGURA 4.16 – Cromatograma de íons extraídos de uma mistura de ATP, ADP, OAA e PEP, utilizando uma coluna Luna C₁₈(2) (50 x 2,0 mm, 3 μm, Phenomenex), com fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) 0,15 mL min⁻¹, com MS operando em modo negativo e SRM, monitorando os íons [M-H]⁻ de cada composto.

Desta forma, o produto PEP foi detectado em coeluição com os outros componentes da reação. Em análises de rotina não foram monitorados OAA, ADP e ATP.

4.8 Influência do DTT, Mn^{2+} e Mg^{2+} na atividade da *TcPEPCK*

Com um método LC-MS/MS desenvolvido e, devido a influência dos aditivos do tampão da enzima na ionização do PEP, os efeitos dos mesmos foram avaliados frente à atividade da *TcPEPCK* para a reação de descarboxilação. Os testes foram realizados visando-se um equilíbrio entre a atividade da enzima e a preservação do MS frente aos reagentes utilizados.

O Tampão D apresenta concentração total de metais de 3,7 mmol L⁻¹, sendo 3 mmol L⁻¹ de MgCl₂ e 0,7 mmol L⁻¹ de MnCl₂. Para tentar reduzir essas concentrações, foram realizados três testes de atividade, em tampão acetato de amônio 50 mmol L⁻¹ pH 9,0 contendo DTT 1 mmol L⁻¹, a saber: *i*) adição de apenas MgCl₂ 1 mmol L⁻¹; *ii*) adição de apenas MnCl₂ 1 mmol L⁻¹; e *iii*) adição de 1 mmol L⁻¹ de cada metal. As reações foram realizadas como descrito na Seção 3.5.1.

O efeito do Mg^{2+} na atividade da *TcPEPCK* foi muito baixo quando comparado ao Mn^{2+} e, mesmo a mistura de ambos os metais, resulta em pequena diferença de atividade sendo, quase sua totalidade, devido ao Mn^{2+} . A FIGURA 4.17 representa os cromatogramas obtidos nesses ensaios de atividade. O efeito dos metais é descrito na literatura para PEPCK nativa de *T. cruzi*, onde URBINA¹¹⁰ não identificou atividade na presença apenas de Mg^{2+} , mesmo em concentrações elevadas, já CYMERYNG et al.¹¹² reportou K_{Mapp} de $1,37 \pm 0,33$ mmol L⁻¹ para Mn^{2+} e $24,17 \pm 7,9$ mmol L⁻¹ para Mg^{2+} ; empregando OAA como substrato, o que indicou maior afinidade da enzima por manganês.

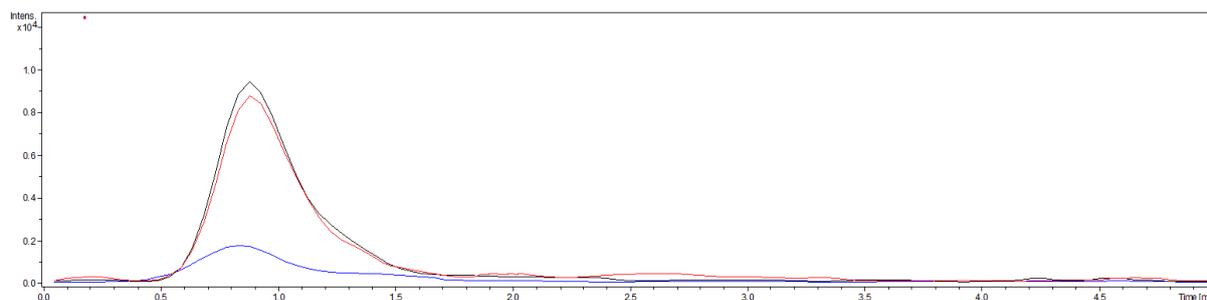


FIGURA 4.17 – Cromatograma de íons extraídos da análise da atividade da *TcPEPCK* em tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 contendo DTT 1 mmol L^{-1} , com adição de MgCl_2 1 mmol L^{-1} (azul), MnCl_2 1 mmol L^{-1} (vermelho) e 1 mmol L^{-1} de cada metal (preto), utilizando uma coluna Luna $\text{C}_{18}(2)$ ($50 \times 2,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$), com fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) $0,15 \text{ mL min}^{-1}$, com MS operando em modo negativo e SRM, monitorando PEP.

Outro teste realizado foi a atividade da *TcPEPCK* em Tampão D, sem a adição de DTT, na qual a enzima não apresentou atividade, revelando uma estrita necessidade do agente redutor. Um último teste avaliou a atividade da enzima em tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 contendo DTT 1 mmol L^{-1} , porém com concentrações decrescentes de Mn^{2+} ($2,0$; $1,5$; $1,0$ e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), em que foi verificada uma diminuição progressiva da atividade, como ilustrado no cromatograma da FIGURA 4.18.

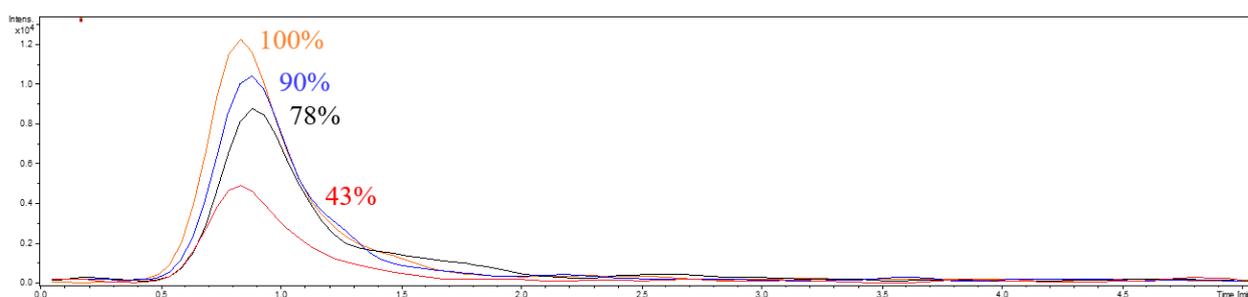


FIGURA 4.18 – Cromatograma de íons extraídos, da análise da atividade da *TcPEPCK* em tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 contendo DTT 1 mmol L^{-1} , com variação da concentração de MnCl_2 em $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (laranja), $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (azul), $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (preto) e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (vermelho), utilizando a coluna Luna $\text{C}_{18}(2)$ ($50 \times 2,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$), com fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) $0,15 \text{ mL min}^{-1}$, com MS operando em modo negativo e SRM, monitorando PEP, com suas respectivas áreas relativas.

Os íons Mn^{2+} são necessários para ativação de cada subunidade do homodímero da enzima. URBINA¹¹⁰ demonstrou que a ativação não pode ser atribuída à formação de complexo Mn-ATP, visto que enquanto foi obtida elevada

atividade para PEPCK nativa de *T. cruzi*, a concentração medida do complexo Mn-ATP foi menor que 0,01% da concentração total de metal. Em contraste, a formação do complexo entre metal divalente-nucleotídeo, *in vivo*, é a função mais provável do íon magnésio¹¹⁰.

A atividade da *Tc*PEPCK com 1,0 mmol L⁻¹ de Mn²⁺ foi aproximadamente 20% menor, comparada ao dobro da concentração, enquanto 0,5 mmol L⁻¹ levou a uma diminuição de quase 60% de atividade. Para continuidade do trabalho, optou-se pela utilização de 1,0 mmol L⁻¹ de Mn²⁺, uma vez que a concentração não inviabiliza a atividade e, ainda, o produto é suficientemente detectado no MS. Desta forma, foi fixado o Tampão A para atividade da *Tc*PEPCK, que contém DTT 1 mmol L⁻¹ e MnCl₂ 1 mmol L⁻¹.

4.9 Qualificação do método analítico por LC-MS para a *Tc*PEPCK-D2-MB

Para efeitos de avaliar o comportamento da *Tc*PEPCK-D2-MB frente as componentes do tampão, realizou-se a qualificação do método para o PEP, sendo monitorado apenas o seu íon [M-H]⁻, neste momento (Seção 3.10).

As curvas analíticas foram lineares no intervalo estudado, com coeficiente de determinação (R²) superiores a 0,99 para uma amostragem igual a 3, com equação obtida $y = 162009,913x - 429143,442$.

O coeficiente de variação (CV%) para as replicatas foi inferior a 15%. A exatidão para as curvas, entre 86 e 114%, apresentou um desvio menor que 15% do valor nominal (exceto para o limite de quantificação), e indicou que estão dentro dos critérios adotados para a qualificação do método¹³⁶.

A precisão e exatidão intra- e inter-lotes foram mensuradas analisando-se cinco replicatas dos três níveis de CQs. Os resultados foram valores de precisão entre 1,81 e 12,8%. A exatidão variou entre 87 e 115%, estando dentro

dos critérios adotados¹³⁶. O cromatograma de íon extraído e seu espectro de massa se encontram na FIGURA 4.19.

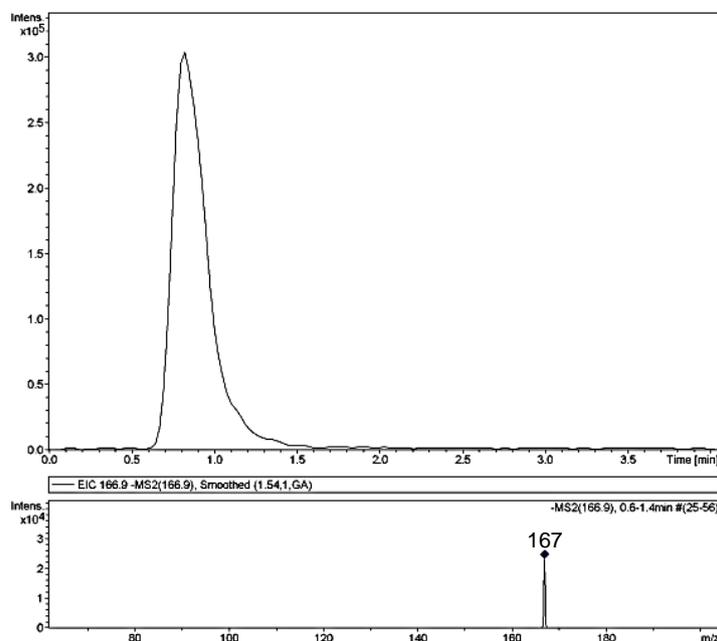


FIGURA 4.19 – Cromatograma de íons extraídos e espectro de massas referente a injeção de PEP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema LC-MS monitorando o íon precursor do PEP, m/z 167 ($[\text{M}-\text{H}]^{-}$), com coluna Luna $\text{C}_{18}(2)$ ($50 \times 2,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$) e fase móvel Tampão B/MeOH 1:1(v/v), $0,15 \text{ mL min}^{-1}$.

4.10 Estudo cinético do *Tc*PEPCK-MB

O processo de imobilização pode levar a alterações nas propriedades cinéticas da enzima, visto que a formação de ligação covalente entre esta e o suporte resultam em modificações de estrutura terciária^{133,134,137}. Desta forma, o conhecimento do comportamento cinético da enzima imobilizada é útil para avaliar as possíveis modificações ocorridas, pois permite verificar a afinidade de ligação enzima/substrato, bem como a eficiência catalítica do biorreator^{138,139}.

A constante de Michaelis-Menten, K_M , é a concentração de substrato em que se obtém uma velocidade reacional igual a metade da velocidade máxima da reação catalítica. Para enzimas multi-substratos, uma forma simples de determinação dos parâmetros cinéticos baseia-se na utilização de um substrato

com concentração constante, enquanto a concentração do outro substrato é variada. Sob essas condições, a enzima se comporta de maneira semelhante às enzimas de substrato único e, desta forma, se obtém a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{Mapp}) para o substrato na qual a concentração foi variada. Aqui, esta constante foi determinada para o substrato OAA (Seção 3.11), monitorando-se a atividade enzimática através do método desenvolvido e qualificado. Para tanto, foram realizadas reações com concentrações crescentes de substrato até que fosse atingido um platô de saturação, onde a taxa de reação não se altera frente ao aumento na concentração de substrato.

Um método de regressão não-linear de melhor ajuste foi utilizado para se obter a curva de Michaelis-Menten, determinando-se, assim, o valor de K_{Mapp} como $88 \pm 9 \mu\text{mol L}^{-1}$ para OAA, como ilustrado na FIGURA 4.20. A curva está de acordo com a equação de Michaelis-Menten sendo que, em baixas concentrações de substrato ($[S] \ll K_{Mapp}$) a velocidade da reação V_0 é diretamente proporcional à concentração do substrato. Já em elevadas concentrações do substrato ($[S] \gg K_{Mapp}$), V_0 se aproxima de seu valor máximo e a velocidade da reação independe da concentração do substrato.

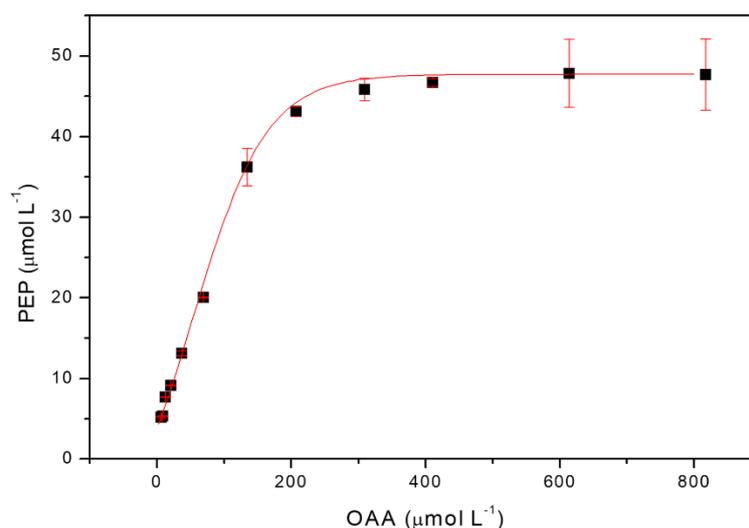


FIGURA 4.20 – Curva de Michaelis-Menten para produção de PEP pela *Tc*PEPCK-D2-MB, variando-se a concentração de OAA entre 4-800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATP constante em 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Para a caracterização cinética da *TcPEPCK-D2-MB* foram realizadas reações em série, em Tampão B. Com isso, constatou-se que a enzima apresenta atividade imobilizada em tampão sem DTT e Mn^{2+} , necessitando apenas ser sistematicamente lavada com Tampão A, antes da realização de reação.

Um teste de reações em série com a *TcPEPCK-D2-MB* utilizando apenas Tampão B, sem lavagem com Tampão A e concentração constante de substrato, mostrou que a atividade começa a diminuir após nove reações consecutivas, mas ainda foi observada cerca de 30% da atividade residual após 168 h. Porém, a atividade inicial foi recuperada após lavagem da *TcPEPCK-D2-MB* com Tampão A.

Outro teste foi feito, comparando-se reações com diferentes concentrações de substrato na *TcPEPCK-D2-MB* em Tampão A e B. As atividades foram equivalentes em baixa concentração de substrato e cerca de um terço menor em concentrações elevadas (condições de saturação) em Tampão B.

Tais resultados demonstram que, quando imobilizada, a enzima abstrai o cofator Mn^{2+} presente no tampão e não o lixivia pois, após troca do tampão sem os aditivos, a mesma mantém sua atividade. A perda do cofator para o meio ocorre de forma gradual. Assim, constatou-se que é possível desenvolver as condições analíticas para o ICER utilizando apenas Tampão B, sem prejudicar a ionização do PEP no MS.

4.11 Teste de atividade dos ICERs

Com os resultados supracitados, obtidos a partir da *TcPEPCK-D2-MB*, dois novos capilares foram preparados (Seção 3.8.1). A diferença neste preparo foi que após os procedimentos de imobilização os capilares foram eluídos com 2 mL de Tampão A (análogo ao procedimento de lavagem da *TcPEPCK-D2-MB* com este tampão).

Em seguida, os capilares foram levados ao LC-MS/MS, onde foram injetados 10 μL de OAA 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B. Contudo, não foi observada a produção de PEP, evidenciando a não atividade dos capilares.

Dado o baixo grau de pureza das frações da DEAE e os capilares não ativos, foi realizada uma nova tentativa de purificação.

4.12 Purificação em coluna de afinidade

Colunas de afinidade são, normalmente, utilizadas para aprimoramento de purificação, em etapas finais na qual a proteína já foi previamente purificada. Como a fração da DEAE estava parcialmente purificada e a PEPCK possui sítio de ligação para o ATP, testou-se a purificação com coluna de afinidade de ATP-agarose¹¹² (Seção 3.4.2).

A fração *Tc*PEPCK-D2 foi aplicada em uma coluna de afinidade ATP-agarose, equilibrada com Tampão II, e a etapa de eluição das proteínas que não se ligaram à coluna foi feita em modo isocrático com o mesmo tampão de equilíbrio. A eluição da *Tc*PEPCK foi feita a partir de uma solução de ATP 5 mmol L^{-1} . As frações que apresentaram atividade foram tanto aquelas que se ligaram à coluna quanto as que não se ligaram, provavelmente devido à saturação dos sítios de ATP da coluna. No entanto, as frações que não se ligaram à coluna apresentaram nível de pureza baixo, semelhante ao perfil da amostra de entrada. As frações que se ligaram à coluna apresentaram elevado grau de pureza. Os níveis de purificação podem ser apreciados através de análise em SDS-PAGE, apresentado na FIGURA 4.21.

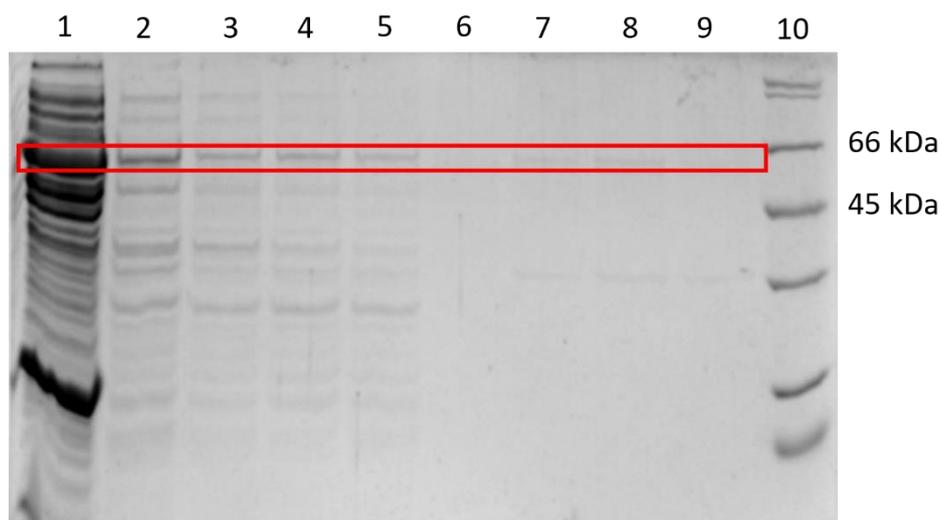


FIGURA 4.21 – Análise em SDS-PAGE da purificação da *TcPEPCK* em coluna de afinidade ATP-agarose. Sobrenadante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% após diálise (poço 1); fração 2 da DEAE (poço 2), frações 3 a 5 que não se ligaram na coluna ATP-agarose (poços 3 a 5), frações 2 a 5 após aplicação de solução de ATP na coluna ATP-agarose (poços 6 a 9) e marcador de massa molecular (poço 10).

A coluna de afinidade resultou em uma grande melhora no grau de pureza da PEPCK. Como a enzima eluiu em quatro frações (FIGURA 4.21, poços 6 a 9), essas foram combinadas, concentradas e dialisadas para remover o ATP.

Apesar do elevado grau de pureza, a *TcPEPCK* foi eluída da coluna de afinidade com uma solução de ATP, que possui elevado custo e necessidade de diálise para utilização da enzima. Então, uma outra purificação na coluna de afinidade foi feita, porém a eluição foi realizada com Tampão III (fosfato de potássio 200 mmol L^{-1} pH 6,8; contendo EDTA 4 mmol L^{-1}), baseado em um trabalho da literatura na qual foi realizada a purificação da PEPCK nativa de *T. cruzi*¹¹², sendo que a eluição ocorre devido a alteração de pH da fase móvel e aumento da força iônica. Os níveis de purificação podem ser apreciados através de análise em SDS-PAGE, apresentado na FIGURA 4.22.

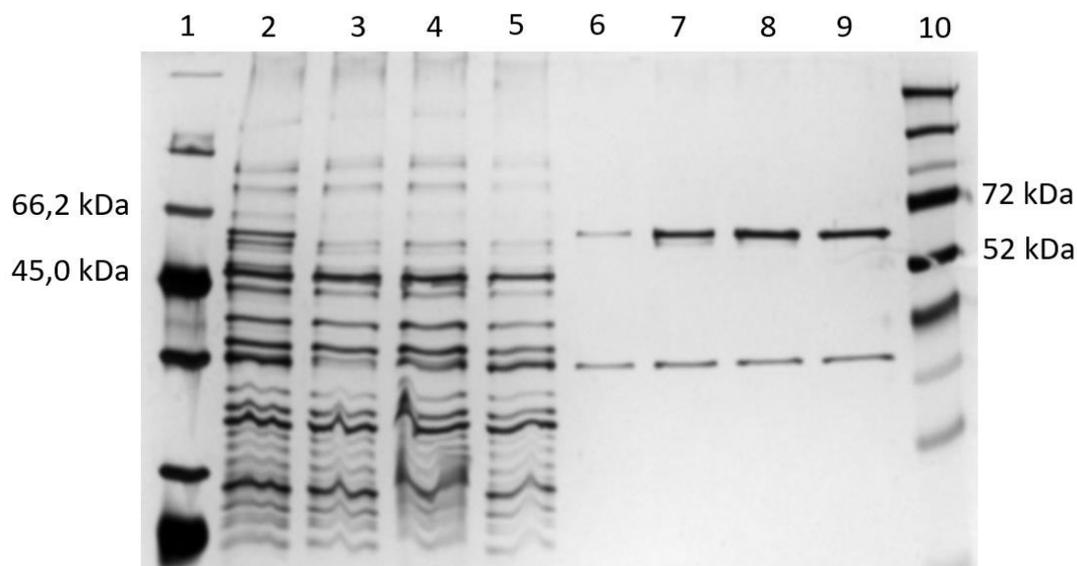


FIGURA 4.22 – Análise em SDS-PAGE, da purificação da *TcPEPCK* em coluna de afinidade ATP-agarose e eluição com Tampão III, marcadores de massa molecular (poços 1 e 10); fração 6 a 8 da DEAE, sendo o *pool* de entrada na coluna de afinidade (poço 2); frações 4, 10 e 22 da afinidade que não se ligaram à coluna (poços 3, 4 e 5); frações 35 a 38 da afinidade que se ligaram à coluna (poços 6 a 9).

As etapas em coluna de afinidade, então, foram sempre eluídas com Tampão III. As purificações foram monitoradas através da reação de descarboxilação do OAA e analisadas em LC-MS/MS.

A purificação se mostrou muito eficiente após a etapa de afinidade por ATP. Dado que a afinidade ocorre devido às interações específicas de biomoléculas com o ligante, realizou-se dois novos testes, a saber, *i*) eliminar a etapa de troca aniônica; aplicando o dialisado da precipitação com sulfato de amônio diretamente na coluna de afinidade e, *ii*) eliminar a precipitação com sulfato de amônio e a troca aniônica, ou seja, após a lise celular já realizar a etapa de afinidade, o que dispensaria a diálise e uma etapa cromatográfica. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 4.23.

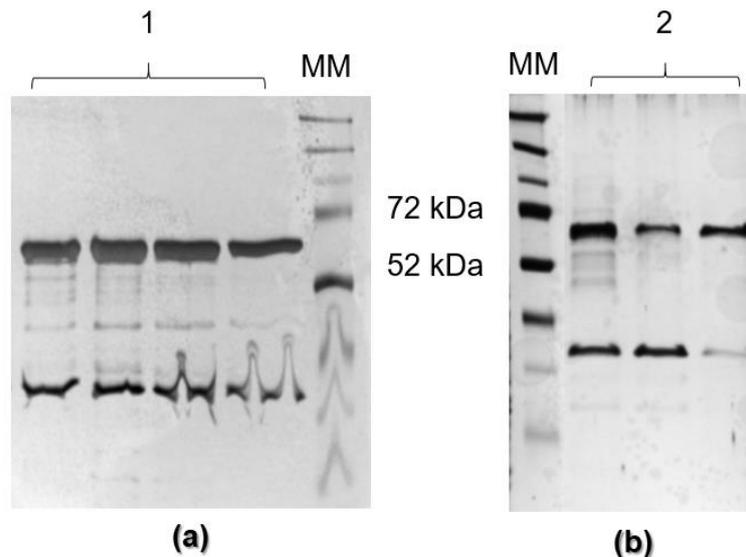


FIGURA 4.23 – Análise em SDS-PAGE da purificação da *Tc*PEPCK em coluna de afinidade ATP-agarose e eluição com Tampão III, sendo (a) aplicação após precipitação com sulfato de amônio e (b) aplicação após lise celular. Os poços 1 e 2 são frações que se ligaram à coluna de afinidade e MM os marcadores de massa molecular.

Desta forma, viu-se que a etapa de precipitação com sulfato de amônio não contribui para o grau de pureza e que a etapa de troca aniônica também se mostrou desnecessária. As frações da saída da coluna de afinidade apresentaram grau de pureza muito superior às frações da saída da DEAE que, até então, se utilizava neste trabalho. Então, combinou-se todas as frações ativas para a continuidade dos estudos.

Com esta fração mais pura, iniciou-se a caracterização cinética em solução. Porém, ao se realizar reações com concentrações crescentes de substrato OAA, foi encontrada dificuldade em saturar a enzima e observar a formação de produto constante e independente do acréscimo da concentração de substrato (platô na curva de Michaelis-Menten). Como visto pela análise em SDS-PAGE da FIGURA 4.23b, há majoritariamente 2 proteínas na fração e, desta forma, foi feita mais uma etapa de purificação, dessa vez por exclusão molecular.

A coluna de exclusão escolhida foi a Superdex® 75 (200 mL de volume interno, GE Healthcare) para separar estas duas proteínas de massa molecular tão distintas. A eluição ocorreu em modo isocrático, em Tampão III (Seção 3.4.2). A PEPCK de *T. cruzi* é um homodímero em que os monômeros

possuem massa molecular de aproximadamente 60 kDa, como visto nos géis por serem desnaturantes. Para facilitar o acompanhamento da eluição, foi corrido um padrão de BSA 1 mg mL⁻¹, que possui massa de aproximadamente 66 kDa e, em solução, dimeriza em pequena quantidade com dímero de massa 132 kDa.

Como esperado, a *Tc*PEPCK eluiu com tempo de retenção próximo ao dímero da BSA e, surpreendentemente, em um tempo de retenção equivalente ao monômero da BSA, ocorreu a eluição de uma proteína que também apresentou atividade para PEPCK. Esses resultados estão apresentados na FIGURA 4.24.

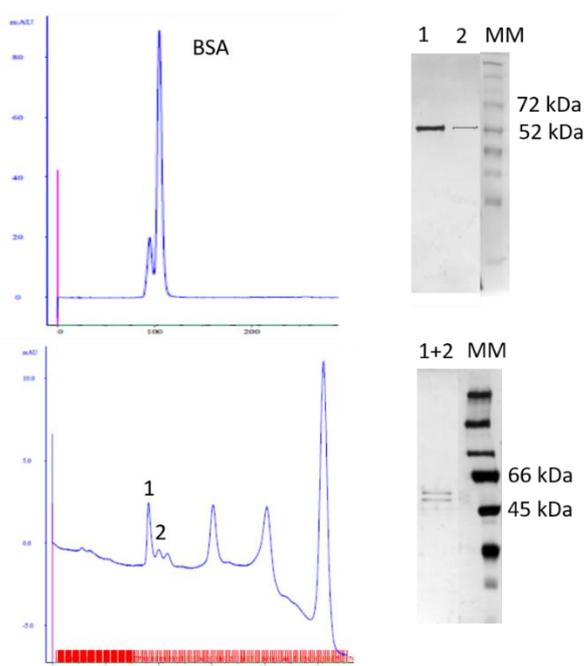


FIGURA 4.24 – Cromatogramas FPLC-UV da Superdex75 do padrão de BSA (acima) e das frações da coluna de afinidade (abaixo). As frações que apresentaram atividade estão marcadas com 1 e 2 no cromatograma e as respectivas análises em SDS-PAGE destas frações e de uma mistura de ambas estão ao lado.

Quando foi feita uma análise em SDS-PAGE da mistura dessas duas proteínas que apresentaram atividade e deixado correr por mais tempo, para tentar obter melhor resolução, foi observada uma pequena separação. Como a PEPCK de *T. cruzi* é homodimérica, sabia-se que não se tratava de seus dois monômeros, por serem idênticos. Uma vez que quase todos os seres vivos possuem PEPCK, sugeriu-se uma possível contaminação com a PEPCK de *E. coli* (*Ec*PEPCK) pois,

segundo a literatura, esta possui estrutura monomérica com massa de 59,6 kDa¹⁴⁰, muito próxima a massa do monômero da PEPCK de *T. cruzi*.

Ambas as PEPCKs são ATP-dependentes e apresentam afinidade pela coluna. Então, a fim de separá-las, foi proposto voltar ao procedimento inicial e explorar as propriedades físico-químicas das proteínas (Seção 3.4.3). As alterações realizadas foram na etapa de lise, precipitação e purificação em coluna de troca aniônica em que o pH foi diminuído de 7,40 (Tampão I) para 6,80 (Tampão IV) e a coluna DEAE (troca aniônica fraca) foi substituída pela QFF (troca aniônica forte).

A *Ec*PEPCK possui pI de 5,46, enquanto a *Tc*PEPCK apresenta pI teórico de 8,63 e 7,30 obtido experimentalmente para a PEPCK nativa de *T. cruzi*¹¹². A diminuição do pH foi escolhida de tal forma que a enzima *Ec*PEPCK estivesse negativamente carregada e a *Tc*PEPCK positivamente carregada; independente da consideração do pI teórico ou experimental. A coluna de troca aniônica fraca foi substituída por uma forte, a fim de garantir que a *Ec*PEPCK se ligasse a mesma. Os resultados obtidos estão demonstrados na FIGURA 4.25.

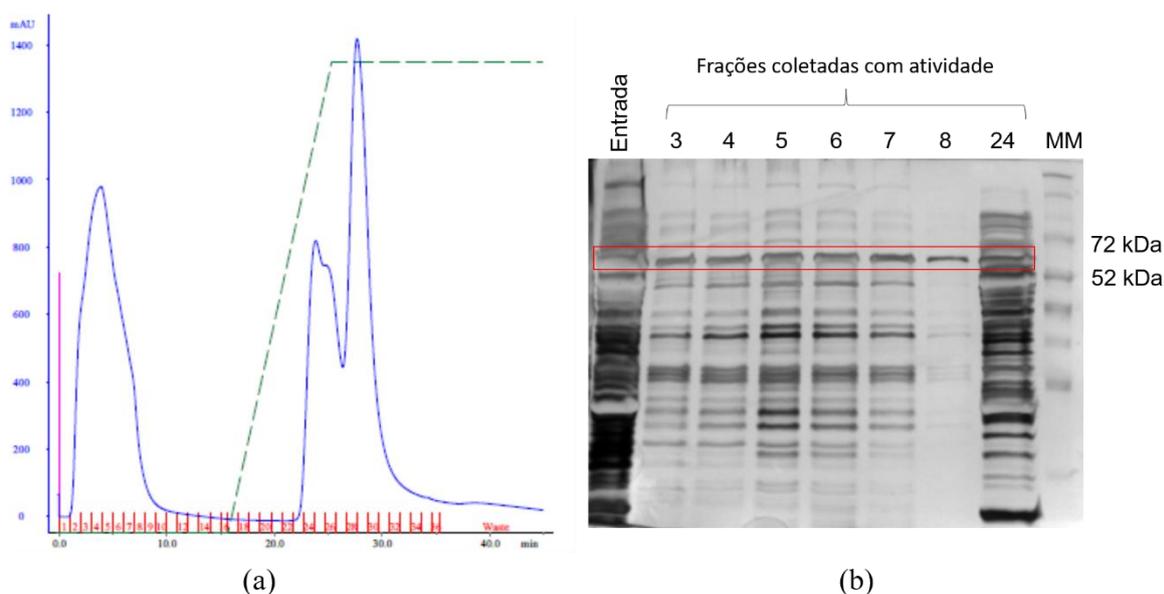


FIGURA 4.25 – a) Cromatograma FPLC-UV da eluição da coluna QFF, representando o gradiente (verde) e as frações coletadas (vermelho). As frações que apresentaram atividade foram de 3 a 8 (não se ligaram à coluna) e 24 (se ligou à coluna). b) A análise em SDS-PAGE da entrada da coluna e das frações com atividade, sendo destacada as PEPCKs.

Pelo esperado, através da relação entre pH e pI, a *Tc*PEPCK não se ligou à coluna e estas frações (2 a 7) foram combinadas, denominadas *Tc*PEPCK-I. A fração 8 foi mantida em separado por apresentar maior grau de pureza, denominada *Tc*PEPCK-II. Então, 3 mL de *Tc*PEPCK-I foram diluídos com 7 mL de Tampão II e aplicados na coluna de afinidade. A eluição ocorreu nas mesmas condições anteriores, obtendo-se a fração denominada *Tc*PEPCK-III. A diluição prévia à aplicação na coluna de afinidade foi realizada a fim de que a enzima seja aplicada em condições favoráveis de ligação ao ATP, fornecendo um meio com DTT e os cofatores metálicos. Os resultados estão apresentados na FIGURA 4.26.

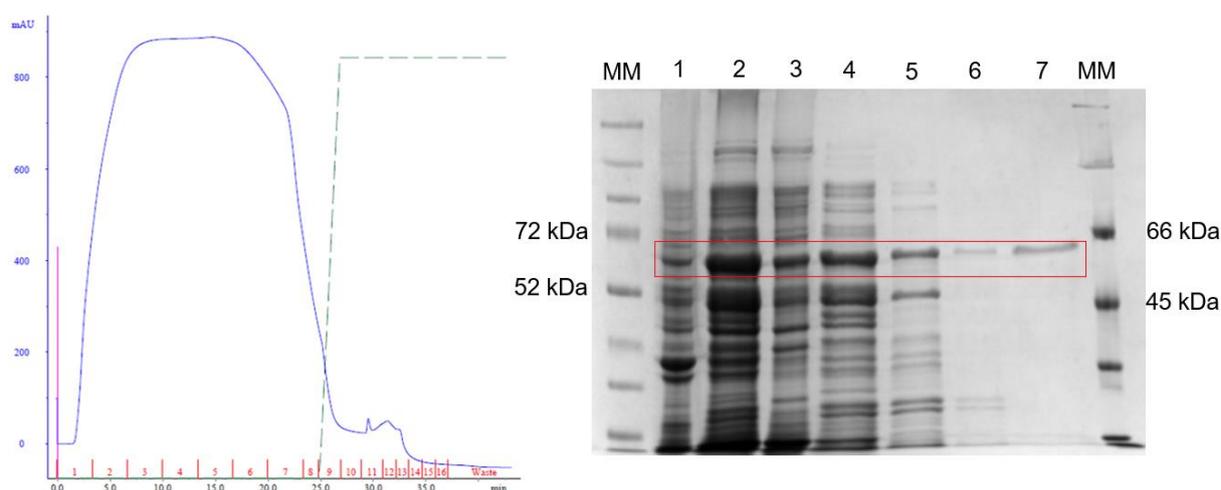


FIGURA 4.26 – Cromatograma FPLC-UV, com coluna de afinidade ATP-agarose, representando a eluição (verde) e as frações coletadas (vermelho). A análise em SDS-PAGE apresenta todas as etapas do processo de purificação: precipitado da lise celular (poço 1); sobrenadante da lise celular (poço 2); precipitado após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (poço 3); sobrenadante dialisado após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (poço 4); *Tc*PEPCK-I (poço 5); *Tc*PEPCK-II (poço 6); *Tc*PEPCK-III (poço 7) e MM marcadores de massa molecular.

Pelo exposto, a purificação da *Tc*PEPCK foi concluída com elevado grau de pureza. A FIGURA 4.26 sumariza todas as etapas de purificação e seus níveis de pureza, apreciados por análise em SDS-PAGE.

Para realizar as caracterizações da enzima em solução é necessário dialisar a fração contendo a *Tc*PEPCK-III. Isso se deve pela eluição ocorrer em tampão fosfato e, para que a reação enzimática ocorra, é necessário a adição do

cofator Mn^{2+} , que precipita na presença de fosfato. Diversas tentativas de diálise foram realizadas utilizando diferentes membranas e concentradores de troca, porém em todas as tentativas a *TcPEPCK*-III perdeu parcial ou total atividade.

4.12.1 Síntese de ATP-MB para purificação da *TcPEPCK*

A *TcPEPCK*-III eluiu da coluna de afinidade em 3 mL de Tampão III e diluída. Mesmo a aplicação de maior quantidade de *TcPEPCK*-II na coluna não resultou em uma fração *TcPEPCK*-III mais concentrada, devido a saturação da coluna de afinidade, relacionada a sua baixa capacidade de carga, o que levou a várias etapas sucessivas de purificação.

Para tentar aumentar a produtividade dessa etapa, a fim de explorar a troca do Tampão III, um teste de imobilização de ATP em partículas magnéticas foi realizado. Isso foi pensando devido à alta capacidade de carga na imobilização em partículas magnéticas, além da praticidade operacional. Então, a imobilização de ATP foi realizada, como descrito na Seção 3.12, e a etapa de ligação do ATP ao glutaraldeído foi feita com uma solução de ATP $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em Tampão E, com reação de 4 horas. A taxa de imobilização foi monitorada por LC-MS (FIGURA 4.27), na qual a concentração de ATP diminuiu com o tempo, até que permaneceu constante após 3 h. Também foi monitorado o íon correspondente ao ADP, de modo a observar se a diminuição da concentração de ATP em solução foi devido à imobilização ou hidrólise.

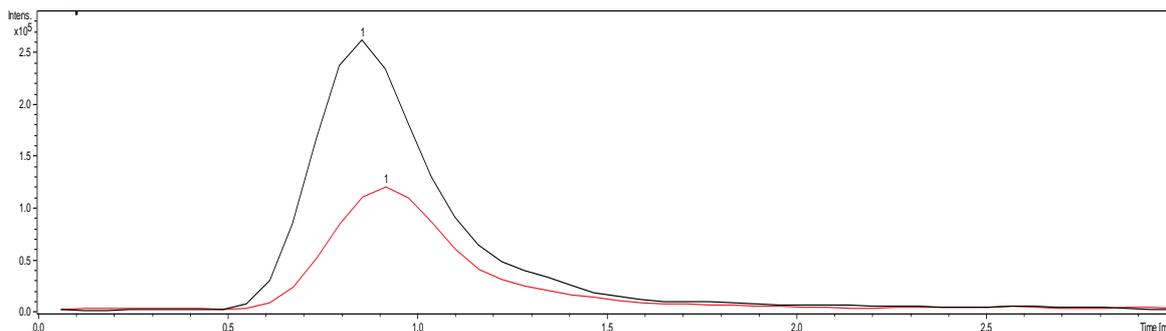


FIGURA 4.27 – Cromatograma de íons extraídos para m/z 506, da solução de ATP utilizada para imobilização (em preto) e da solução de ATP após 4 horas de imobilização (em vermelho), utilizando uma coluna Luna C₁₈(2) (50 x 2,0 mm, 3 μ m), com volume de injeção de 5 μ L e fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) 0,15 mL min⁻¹, MS operando em modo negativo e SRM, monitorando os íons [M-H]⁻ de ATP e ADP, 506 e 426 m/z , respectivamente.

Não foi verificado íon de ADP durante à imobilização e, então, toda a diminuição na concentração de ATP em solução foi devido à imobilização. Assim, obteve-se as partículas magnéticas com ATP imobilizado (ATP-MB). Para sua utilização, visando uma captura seletiva da enzima, foi utilizado o mesmo procedimento desenvolvido para coluna de afinidade, onde a *TcPEPCK-II* foi incubada com o ATP-MB.

Em seguida, com o auxílio de um ímã, foi removida a solução e, ao ATP-MB, foi adicionado Tampão III para extração da enzima. A extração foi monitorada através da medida de atividade de alíquotas retiradas com 1; 4 e 10 h. A última alíquota apresentou atividade equiparável às frações da coluna de afinidade, *TcPEPCK-III*.

Os níveis de purificação, por análise em SDS-PAGE, bem como os cromatogramas com análise da atividade enzimática, estão apresentados na FIGURA 4.28. É possível observar que o nível de pureza obtido a partir do ATP-MB é semelhante à coluna ATP-agarose. No entanto, o tempo despendido para a captura seletiva da enzima por ATP-MB foi muito superior ao tempo para purificação no sistema FPLC.

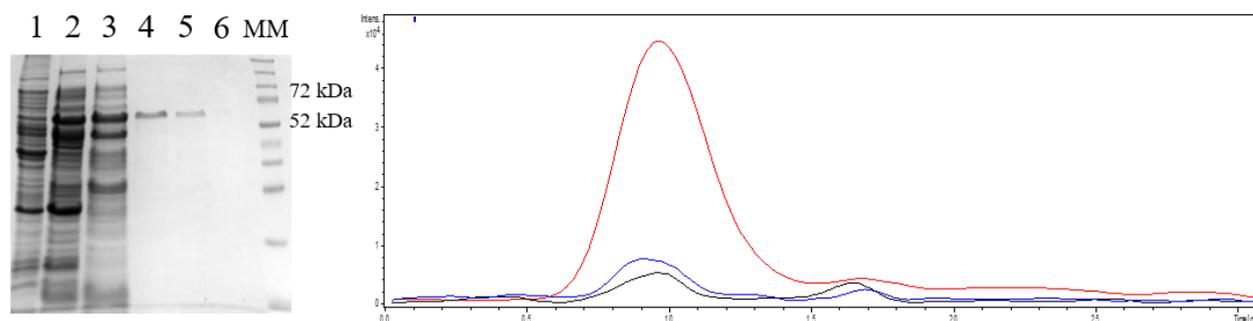


FIGURA 4.28 – À esquerda, a análise em SDS-PAGE apresenta as seguintes etapas do processo de purificação: precipitado após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (poço 1); sobrenadante dialisado após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (poço 2); *TcPEPCK*-I (poço 3); *TcPEPCK*-III (poço 4); *TcPEPCK* obtida a partir da extração do ATP-MB (poço 5), tentativa de eluição da *TcPEPCK* da coluna de ATP-agarose com tampão HEPES (poço 6) e MM marcador de massa molecular. Ao lado, está apresentado o cromatograma de íons extraídos do teste de atividade da *TcPEPCK* obtida a partir da extração do ATP-MB sendo a alíquota de 1 h (em preto), 4 h (em azul) e 10 h (em vermelho).

Após a utilização do ATP-MB, o mesmo foi armazenado em Tampão B e 4 °C. Porém, uma tentativa de utilização após 2 meses de preparo mostrou-se incapaz de capturar a enzima. Acredita-se que, durante o armazenamento, o ATP tenha sofrido hidrólise. Assim, embora o ATP-MB seja aplicável para a purificação da *TcPEPCK*, dada sua captura seletiva, o mesmo se mostrou impraticável devido ao tempo de extração e instabilidade.

Desta forma, uma última tentativa com a coluna de ATP-agarose foi realizada, sendo que o fosfato do Tampão III de eluição foi substituído por HEPES. Essa mudança evitaria a necessidade de diálise com utilização direta da fração eluída da coluna. Entretanto, HEPES 200 mmol L⁻¹ contendo EDTA 4 mmol L⁻¹ (mimetizando o Tampão III) não foi capaz de eluir a *TcPEPCK* da coluna (FIGURA 4.28, poço 6), tendo sido necessária a aplicação do Tampão III para ocorrer a eluição. Isso indica que a eluição não se dá apenas pela variação de pH entre o Tampão II e III, mas também pela força iônica do último.

4.13 Caracterização da *TcPEPCK* em solução

Como exposto, não foi possível obter a *TcPEPCK*-III livre de fosfato e, então, as caracterizações em solução foram realizadas somente com a *TcPEPCK*-II. Esta fração apresentou uma concentração de proteínas totais de 130 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mensurada através do método de Bradford¹¹⁶.

4.13.1 Efeito do pH

Para a avaliação do efeito do pH, foi utilizado o tampão acetato de amônio no intervalo de 8,2 a 10,0 (faixa tamponante de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). Não foi testado pH em outros intervalos devido as limitações de tampões voláteis em pHs próximo a neutralidade e, desta forma, o efeito do pH não foi considerado como teste de pH ótimo. Embora houvesse a possibilidade do tampão bicarbonato de amônio que tampona em uma ampla faixa de pH 6 a 10, o cofator Mn^{2+} precipita na presença de bicarbonato.

As reações foram realizadas como descrito na Seção 3.13, em triplicata, e analisadas por LC-MS/MS. As atividades relativas, com seus respectivos desvios, estão mostradas na FIGURA 4.29, onde se nota que a enzima apresentou elevada atividade em toda a faixa de pH estudada, com maior atividade em torno de pH 9,0. Uma análise estatística através do teste t, com 95% de significância, mostrou que não houve diferença entre as atividades médias obtidas em pH 9,0, quando comparado aos pHs de 9,8 e 10,0, com valores de $t_{\text{calculado}}$ 2,47 e 1,69, respectivamente, e $t_{95\% (4)} = 2,77$.

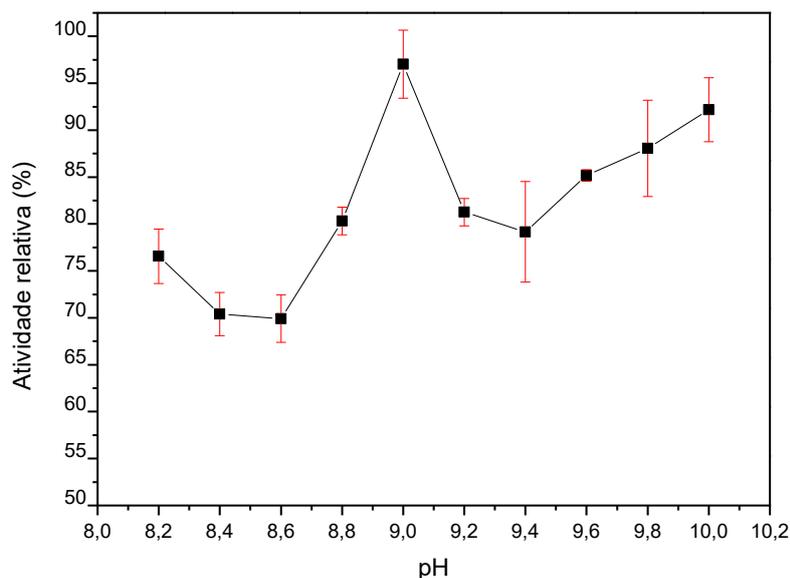


FIGURA 4.29 – Curva de efeito do pH para *TcPEPCK*, utilizando tampão acetato de amônio pH 8,20 a 10,00 e analisado por LC-MS/MS.

Como houve uma atividade relativa estatisticamente semelhante em pH 9,0; 9,8 e 10,0, optou-se por utilizar o pH 9,0 para o teste de efeito de temperatura, em proteção à coluna cromatográfica utilizada. Ainda, foi verificado que o PEP apresenta melhor ionização a medida em que o mesmo é preparado em soluções mais alcalinas. Isso pode, também, ter levado a um artefato de acréscimo de atividade em função do pH.

4.13.2 Efeito da temperatura

Os testes de temperatura foram realizados em termociclador com gradiente de temperatura, em triplicata, e analisados por LC-MS/MS, como descrito na Seção 3.13. As atividades relativas, com seus respectivos desvios, estão apresentadas na FIGURA 4.30.

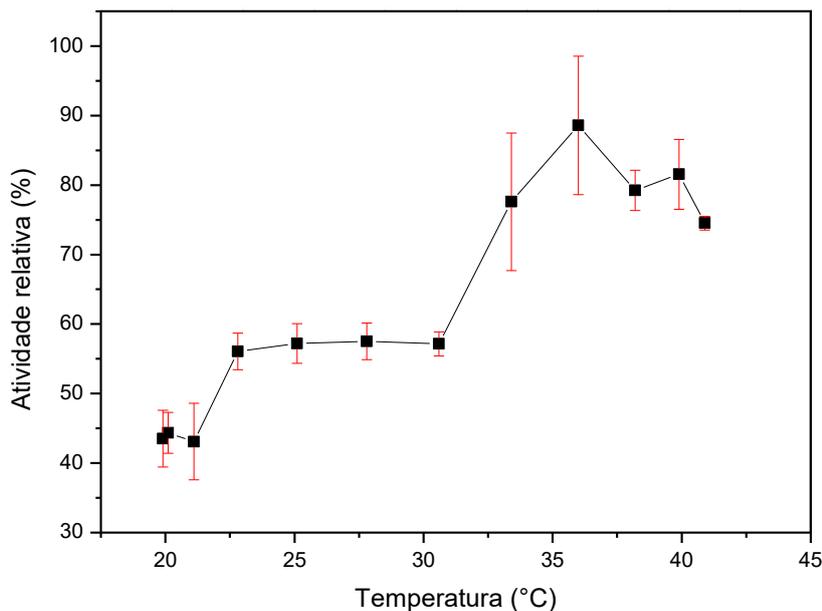


FIGURA 4.30 – Curva de efeito da temperatura para *Tc*-PEPCK, utilizando Tampão A e analisado por LC-MS/MS.

A atividade relativa máxima ocorreu em temperatura ao redor de 36 °C em que, novamente, com uma análise estatística através do teste t e 95% de significância, mostrou que não há diferença entre as atividades médias obtidas em 36 °C, quando comparado a 33,4; 38,2; 39,9 e 40,9 °C, com valores de $t_{\text{calculado}}$ 1,35; 1,56; 1,09 e 2,43, respectivamente, e $t_{95\% (4)} = 2,77$. No entanto, entre 22 e 30 °C, houve uma diminuição em quase metade da atividade relativa, caindo para mais da metade abaixo de 22 °C. Optou-se, então, por seguir as caracterizações com a temperatura de 36 °C.

4.13.3 Tempo de reação

Após verificação do efeito do pH e temperatura, o tempo de reação foi avaliado. Para tanto, as reações em triplicata foram realizadas como descrito na Seção 3.13, com Tampão A, onde o tempo foi variado de 2,5 a 60 minutos, em que a formação do PEP foi linear com o tempo, como apresentado na FIGURA 4.31.

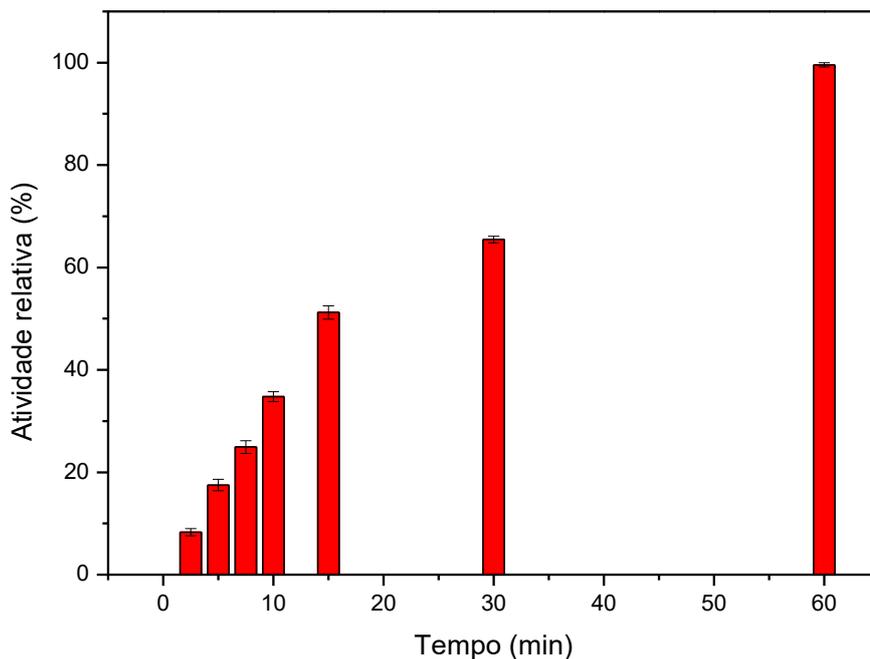


FIGURA 4.31 – Efeito do tempo na atividade relativa da *TcPEPCK*.

Desta forma, foi selecionado um tempo de reação de 10 min, uma vez que a concentração do produto foi suficiente para quantificação e, ainda, estar na faixa linear da taxa de formação de produto da enzima.

4.13.4 Qualificação de método LC-MS/MS para enzima em solução

Antes de iniciar a qualificação do método, como já explicitado na Seção 4.7.2 e apresentado na FIGURA 4.16, os quatro componentes da reação coeluem e, então, o efeito da coeluição foi avaliado. Verificou-se que a injeção de soluções padrão de PEP na presença e ausência de OAA tem efeito na ionização do PEP. Outra observação feita foi que a presença da *TcPEPCK* causa efeito matriz, mesmo com adição de MeOH para precipitação, seguido de centrifugação (FIGURA 4.32).

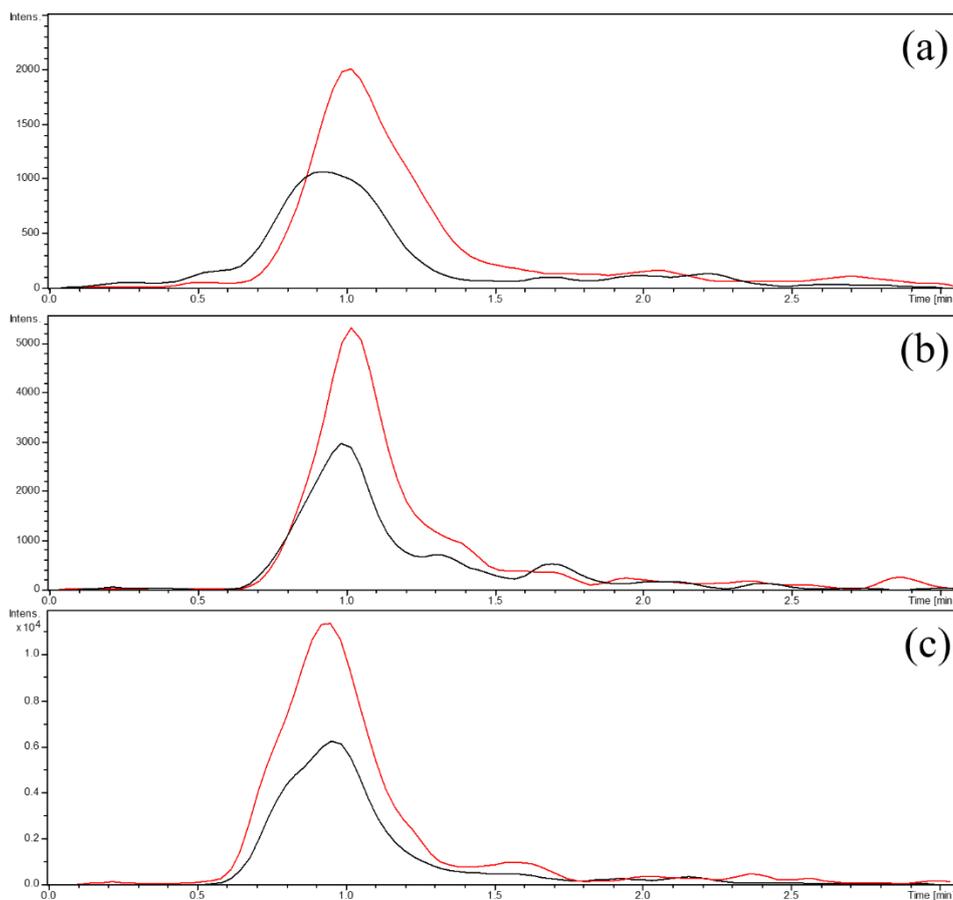


FIGURA 4.32 – Cromatogramas de íons extraídos, de uma mistura de PEP em Tampão A/MeOH 1:1 em uma concentração de (a) $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo em vermelho apenas PEP e, em preto, adição de enzima seguida de centrifugação e análise do sobrenadante. Foi utilizada uma coluna Luna C₁₈(2) (50 x 2,0 mm, 3 μm), com fase móvel Tampão B/MeOH 1:1 (v/v) $0,15 \text{ mL min}^{-1}$.

Desta forma, o método foi qualificado em condições idênticas as de reação da enzima, onde manteve-se constante a concentração de OAA em $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e adicionou-se a enzima na mesma concentração usada para monitoramento de atividade (1,12 U); a fim de eliminar os efeitos de matriz. É importante destacar que o ATP não foi adicionado na qualificação, para que não ocorresse reação. De todo modo, a influência do ATP na coeluição foi examinada e este não afetou a ionização do PEP.

O estudo de linearidade do método foi realizado através da construção de curvas analíticas com padrão externo, como descritos na Seção 3.14. A curva analítica foi construída através de regressão linear, a partir da área do íon fragmento do PEP, o $[\text{PO}_4]^- m/z 79$, em função de sua concentração e o

fragmento $[M-H-CO]^-$ m/z 139 foi utilizado para confirmar a proposta, conforme apresentado no espectro de massas obtido através do cromatograma de íons extraídos do PEP, na FIGURA 4.33.

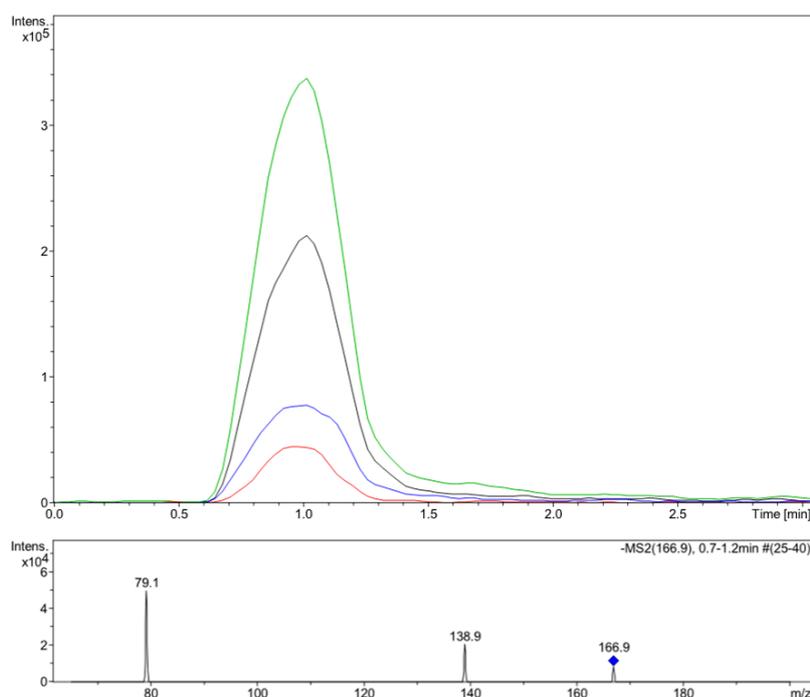


FIGURA 4.33 – Cromatograma de íons extraídos e espectro de massas referente a injeção de PEP $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema LC-MS/MS monitorando o íon precursor do PEP, $[M-H]^-$ m/z 167 (vermelho) e seus fragmentos de qualificação $[M-H-CO]^-$ m/z 139 (azul) e quantificação $[PO_3]^-$ m/z 79 (preto) e cromatograma de íons totais (verde), com coluna Luna $C_{18}(2)$ (50 x 2,0 mm, 3 μm) e fase móvel Tampão B/MeOH 1:1, vazão $0,15 \text{ mL min}^{-1}$.

Foram avaliadas a seletividade, linearidade, precisão e exatidão intra- e inter-lotes. A seletividade foi avaliada através da injeção da matriz isenta do padrão, onde não foi observado a presença de nenhum íon de mesma razão m/z .

As curvas analíticas foram lineares no intervalo estudado, com coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,99 para uma amostragem igual a 3, com equação obtida $y = 741,1054x - 5065,100$.

A precisão do método foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) e foram aceitos valores menores ou iguais a 15%. A exatidão foi determinada pelo cálculo de volta e expressa em porcentagem, como a razão do valor médio encontrado e o valor de referência das concentrações preparadas. Para

exatidão, foram aceitos valores menores ou iguais a 15% do valor nominal da concentração.

A precisão e exatidão intra- e inter-lotes foram mensuradas analisando-se três replicatas dos três níveis de CQs. Os resultados foram valores de precisão entre 5,33 a 9,01%. A exatidão variou entre 87 e 115%, estando dentro dos critérios para validação de método adotado¹³⁶.

4.13.5 Avaliação das etapas de purificação

Após determinado o pH e temperatura em que a enzima apresentou as maiores atividades, o tempo de reação e o método analítico por LC-MS/MS devidamente qualificado, todas as etapas de purificação foram avaliadas nestas condições. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.3

TABELA 4.3 – Recuperação das atividades das frações após as etapas de purificação da *TcPEPCK*.

Fração	Atividade (U mL ⁻¹)	Concentração de proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Purification fold
(NH ₄) ₂ SO ₄	167,9	2,20	76,3	1,0
<i>TcPEPCK</i> -I	289,7	0,490	591,3	7,7
<i>TcPEPCK</i> -II	112,0	0,130	860,7	11,3
<i>TcPEPCK</i> -III	25,0	0,0198	1265,5	16,6

As atividades específicas aqui apresentadas para a PEPCK de *T. cruzi* expressa em *E. coli* são elevadas (76,3 a 1265,5 U mg⁻¹) quando comparadas com a PEPCK nativa de *T. cruzi*, relatadas na faixa de 5,3¹¹⁰ a 6,25¹¹² U mg⁻¹. A expressão de enzimas leva a produção de maiores quantidades e, neste trabalho, as caracterizações foram realizadas por um método direto de detecção de atividade, o que pode justificar os resultados tão elevados.

4.13.6 Caracterização cinética da *Tc*PEPCK em solução

A caracterização cinética em solução é importante, particularmente neste trabalho, para o conhecimento da enzima livre e para avaliar a enzima imobilizada. Como a atividade é dependente de ATP e OAA, a constante cinética foi determinada para ambos os substratos da PEPCK, em separados, a fim de se obter as constantes aparentes para cada substrato. Assim, um substrato foi mantido com concentração constante em $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ e concentrações crescentes do outro foi utilizado até que se atingiu um patamar de saturação (6 a $400 \mu\text{mol L}^{-1}$), onde o aumento da concentração não alterasse a taxa de formação de produto.

As reações foram realizadas utilizando-se $1,12 \text{ U}$ da *Tc*PEPCK-II, como apresentado na Seção 3.15. As curvas obtidas para ambos os substratos estão apresentadas na FIGURA 4.34.

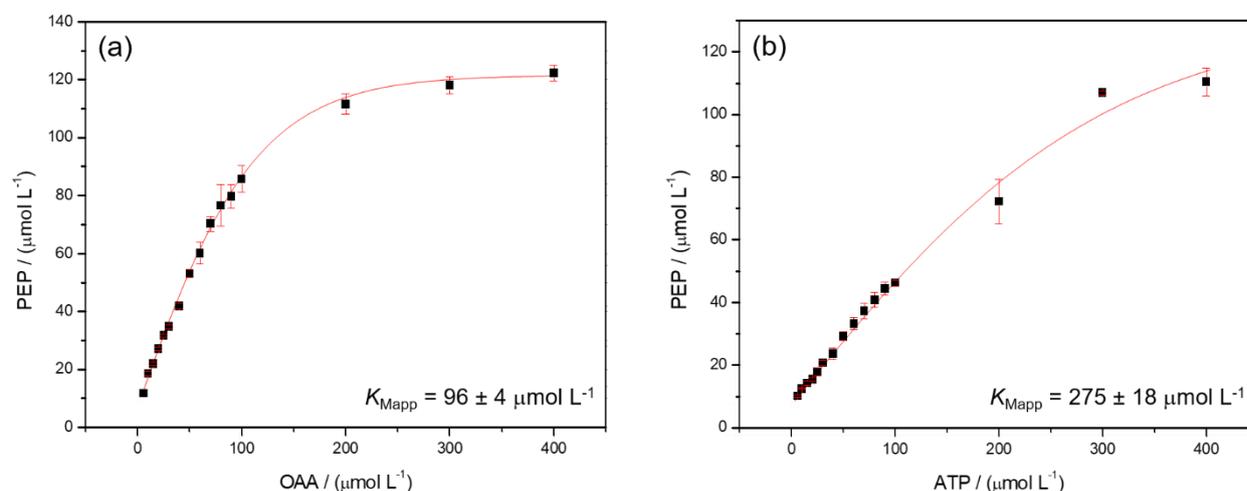


FIGURA 4.34 – Curva de Michaelis-Menten para produção de PEP, variando-se a concentração de OAA e de ATP.

A curva para o OAA (FIGURA 4.34a) está de acordo com a equação de Michaelis-Menten, onde a *Tc*PEPCK mostrou-se Michaeliana para este substrato, com $K_{Mapp} 96 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já para ATP (FIGURA 4.34b), não foi atingido um platô. Na literatura foi reportado por URBINA¹¹⁰ para a PEPCK

nativa de *T. cruzi* uma cinética bifásica para ATP como substrato, com comportamento Michaeliano em concentrações abaixo de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$. Então, a constante foi estimada com $K_{\text{Mapp}} 275 \pm 18 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Os valores de K_{Mapp} aqui obtidos são maiores, quando comparado com a literatura para a enzima nativa^{110,112}. O método descrito neste trabalho utilizou baixa concentração de cofator Mn^{2+} (1 mmol L^{-1}) enquanto, em geral, concentrações $\geq 3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Mn^{2+} ; chegando até 6 mmol L^{-1} de Mn^{2+} , ou combinações de $\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ são utilizadas^{95-98,101,108,110-112}. Como já discutido na Seção 4.8, Mg^{2+} não afetou significativamente a atividade, comparado ao Mn^{2+} e, então, Mg^{2+} não foi aqui utilizado. A baixa concentração de Mn^{2+} empregada foi justificada pela menor interferência na ionização do PEP no MS.

4.14 Imobilização da *Tc*PEPCK-III em capilar

Os ICERs preparados com a fração *Tc*PEPCK-D2, de baixa pureza, não apresentaram atividade, uma vez que não foi detectado PEP nos biorreatores capilares avaliadas por LC-MS/MS.

Agora, com uma fração de elevada pureza, a *Tc*PEPCK-III, novos capilares foram preparados, como descrito na Seção 3.8.1. Além do procedimento já utilizado, foram realizadas três variações na etapa de passagem da enzima pelo capilar, buscando-se favorecer a imobilização covalente da enzima. Assim, as três variações foram:

1. Passagem de 2 mL da fração *Tc*PEPCK-III em um tempo total de 8 horas e vazão de $50 \mu\text{L min}^{-1}$;
2. Passagem de aproximadamente 1 mL da fração *Tc*PEPCK-III em um tempo total de 16 horas e vazão de $1 \mu\text{L min}^{-1}$;
3. Preenchimento de todo o volume interno do capilar com a enzima e deixado 16 horas em contato com a mesma.

Todos os procedimentos foram finalizados com a eluição de Tampão A, a fim de proporcionar DTT e Mn^{2+} para a PEPCK. A atividade dos ICERs preparados foi avaliada em sistema LC-MS/MS, como descrito na Seção 3.8.2. Contudo, não foi observada a formação de PEP, evidenciando a não atividade dos capilares.

Também, foi realizada uma outra tentativa de avaliação da atividade dos capilares no qual, com o auxílio de uma bomba de seringa, foram eluídos 100 μL de OAA 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em Tampão A, com vazão de 1 e 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, a fim de se realizar uma reação em fluxo *off-line* com relação ao MS, que permite a utilização do Tampão A (que contém os compostos necessários para a atividade da enzima). A mistura foi coletada em um microtubo, acrescida de 100 μL de MeOH e analisados no LC-MS/MS, tal como uma reação com a *Tc*PEPCK em solução. Porém, não foi observada a formação de PEP.

4.15 Imobilização da *Tc*PEPCK-II e *Tc*PEPCK-III em partículas magnéticas

A *Tc*PEPCK-III apresentou elevado grau de pureza e esta fração imobilizada em partículas magnéticas permite a realização de ensaios de *ligand fishing*. As caracterizações da *Tc*PEPCK em solução foram realizadas com a *Tc*PEPCK-II e, a imobilização em partículas magnéticas desta fração, permite avaliar o efeito da imobilização sobre a enzima.

Assim, realizou-se a imobilização em partículas magnéticas de ambas as frações, como descrito na Seção 3.9. Para a *Tc*PEPCK-III-MB, foi utilizada uma maior quantidade de *Tc*PEPCK-III, uma vez que esta fração apresentou uma concentração de proteínas de 19,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a *Tc*PEPCK-II-MB, a quantidade de enzima utilizada na imobilização foi escalonada a fim de mimetizar as condições da reação em solução, em termos de unidades de enzima

por mililitro de reação, bem como a diminuição da quantidade de partículas e glutaraldeído se deu para manter a proporção de reagentes entre as imobilizações.

Após as imobilizações, cada lote foi dividido em três partes iguais e as atividades dos biorreatores foram avaliadas. As *TcPEPCK-II-MB* e *TcPEPCK-III-MB* apresentaram atividade e, assim, prosseguiu-se para a qualificação do método analítico, a fim de caracterizar os biorreatores.

4.16 Qualificação do método LC-MS/MS para enzima imobilizada em partículas magnéticas

Embora a Seção 4.11 discutiu a qualificação de um método para o monitoramento da atividade da *TcPEPCK-D2-MB*, naquele momento o método foi qualificado por LC-MS, ou seja, sem fragmentação do PEP e foi utilizado Tampão B para avaliar o efeito deste sobre a atividade da enzima. Aqui, um método LC-MS/MS foi qualificado, como descrito na Seção 3.16. Para os biorreatores não há efeito matriz causado pela enzima, como ocorre em solução, pois a mesma está imobilizada. Porém, novamente ocorre a coeluição de PEP com OAA e, então, este foi considerado na qualificação.

O estudo de linearidade do método foi realizado através da construção de curvas analíticas com padrão externo. As curvas analíticas foram lineares no intervalo estudado, com coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,99 para uma amostragem igual a 3, com equação obtida $y = 862,2148x - 7476,7052$.

Para as curvas foram utilizados os mesmos critérios de exatidão e precisão descritos na Seção 4.13.4.

A precisão e exatidão intra- e inter-lotes foram mensuradas analisando-se três replicatas dos três níveis de CQs. Os resultados foram valores de precisão entre 2,27 a 14,1%. A exatidão variou entre 85 e 115%, estando dentro dos critérios adotados para o método¹³⁶.

4.17 Caracterização cinética do *TcPEPCK-II-MB* e *TcPEPCK-III-MB*

Em solução, a enzima mostrou-se Michaeliana para OAA. Então, as caracterizações das *TcPEPCK-MB* foram realizadas em função de OAA, mantendo-se ATP constante.

Em princípio, o lote das *TcPEPCK-MB* foi dividido em três partes iguais e as reações foram realizadas através da adição crescente de OAA, entre 10 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para *TcPEPCK-II-MB* e entre 10 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para *TcPEPCK-III-MB*, enquanto o ATP foi mantido constante em 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ambos os casos. As reações se procederam conforme descrito na Seção 3.17. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 4.35.

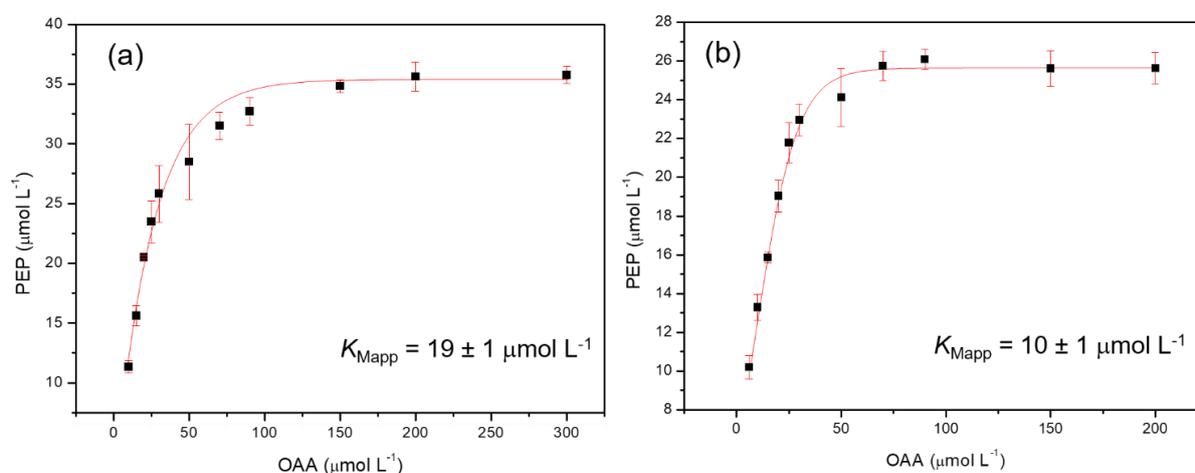


FIGURA 4.35 – Curva de Michaelis-Menten para produção de PEP, variando-se a concentração de OAA para (a) *TcPEPCK-II-MB* e (b) *TcPEPCK-III-MB*.

A curva está de acordo com a equação de Michaelis-Menten. A caracterização cinética do biorreator é importante para o conhecimento da enzima imobilizada, visto que o processo de imobilização pode resultar em alterações na estrutura terciária da enzima e afetar sua atividade.

Ambos os K_{Mapp} dos *TcPEPCK-MBs* foram menores, comparados à enzima livre. A *TcPEPCK-II-MB* foi imobilizada de tal forma a apresentar 11,2

U mL⁻¹, tal como a reação da *TcPEPCK-II* em solução. O menor valor de K_{Mapp} indica uma maior afinidade da enzima imobilizada por OAA. Uma possível explicação para que a concentração de substrato necessária para saturar a enzima imobilizada seja inferior que a enzima livre, baseia-se no aumento da partição do substrato entre o meio reacional e o sítio ativo, devido a rigidez que a imobilização causa na estrutura da enzima¹³⁹. Entre os biorreatores, a *TcPEPCK-III-MB* apresentou menor K_{Mapp} , isso pode ser explicado pela maior quantidade de enzima neste, comparado ao *TcPEPCK-II*.

É importante observar que os K_{Mapp} para as *TcPEPCK-MB* foram determinados nas condições de pH, temperatura e tempo de reação estabelecidos para a enzima em solução, o que pode explicar as diferenças de K_{Mapp} encontrados. Também, a utilização das *TcPEPCK-MB* visa novos modelos de triagem de ligantes e, para tanto, não é necessário que sejam feitas as triagens em condições ótimas da enzima imobilizada. A verificação de atividade após imobilização seguida da caracterização cinética valida os biorreatores como ferramenta potencial para a triagem de ligantes.

4.18 Busca de ligantes

Com a *TcPEPCK-III-MB* devidamente caracterizada, é possível aplicá-la em ensaios de *ligand fishing*. No entanto, em geral, nestes ensaios se utiliza um ligante conhecido como sonda a fim de mensurar a afinidade de novos ligantes¹⁴¹.

Para a PEPCK de *T. cruzi* é apenas descrito e caracterizado o ácido 3-mercaptocolínico⁸⁵ (FIGURA 4.36a), como um inibidor não competitivo, em que 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ inibiu em 95% a formação de OAA. Desta forma, buscou-se informações adicionais na literatura de inibidores de PEPCK.

A tese de TRAPANI¹⁴², que deu origem ao cristal da *TcPEPCK*⁷⁷, apresentou um estudo preliminar de docagem de maneira rígida, com compostos

do banco *NCIopen3D*, baseado na complementaridade de forma entre a cavidade do sítio ativo e os possíveis ligantes. Foram selecionadas duas cavidades: a cavidade para ligação da adenina do ATP; dada a diferença de especificidade com a enzima humana, e a cavidade de ligação do OAA e PEP. Os melhores escores para a cavidade do ATP foram com moléculas contendo anéis do tipo adenina (FIGURA 4.36b) e, para o sítio do OAA, o melhor escore revelou uma molécula que levaria dois oxigênios para coordenar o cofator Mn^{2+} (FIGURA 4.36c).

Ainda, foram buscados inibidores relatados no banco de dados “BRENDA - *The Comprehensive Enzyme Information System*” para PEPCCK ATP- e GTP-dependentes¹⁴³ (FIGURA 4.36d-h) e buscas na literatura para inibidores de PEPCCK GTP-dependentes^{144,145}, uma vez que o sítio de ligação OAA/PEP é conservado entre as duas famílias (FIGURA 4.36i).

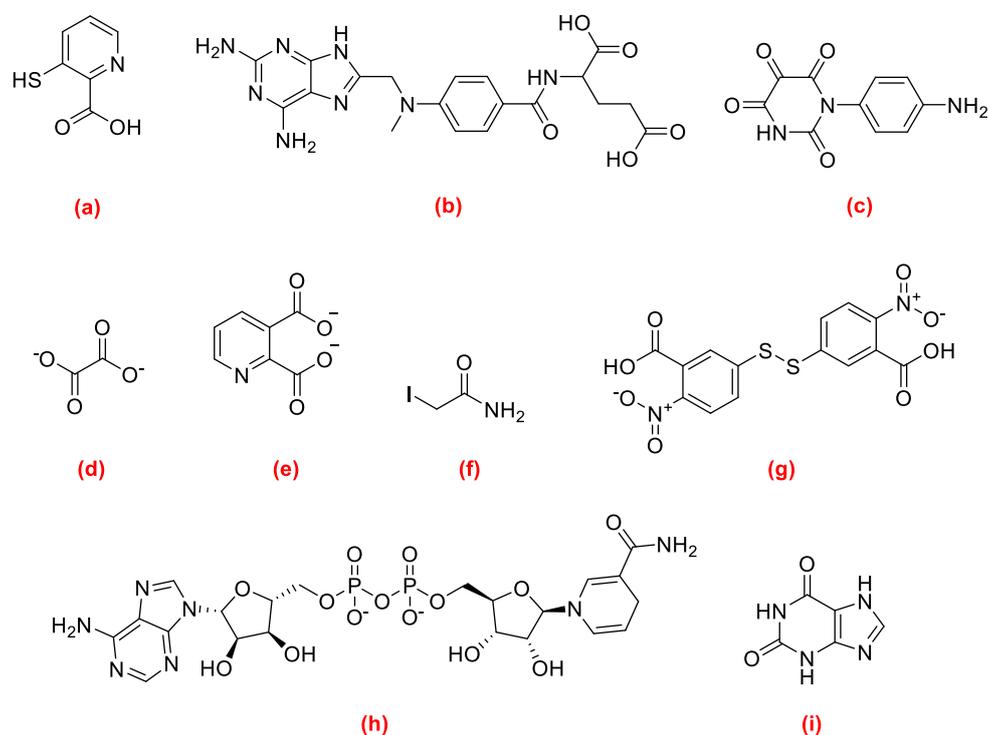


FIGURA 4.36 – Inibidores de PEPCCK reportados: (a) ácido 3-mercaptopicolínico para PEPCCK nativa de *T. cruzi*, (b) e (c) docagem para *TcPEPCCK* nos sítios de ATP e OAA/PEP, respectivamente, (d) oxalato para *C. glutamicum* e *E. coli* (ambas ATP-dependente), (e) quinolinato para *T. brucei* (ATP-dependente) e *R. norvegicus* (GTP-dependente), (f) iodoacetamida para *S. costicola* (ATP-dependente), *R. catesbeiana* (GTP-dependente) e *G. gallus* (GTP-dependente), (g) reagente de Ellman para *T. cruzi* e *A. suum* (GTP-dependente), (h) NADH para *E. coli* e (i) xantina para *H. sapiens* (GTP-dependente).

Assim, baseado nas estruturas moleculares das substâncias apresentadas na FIGURA 4.36, foram selecionados 34 compostos por semelhança estrutural para triagem de ligantes da *Tc*PEPCK em solução. Destes, 15 foram compostos comerciais e 19 compostos sintéticos, sendo 5 cumarinas e 14 hidantoínas. As 15 substâncias comerciais e as 5 cumarinas estão apresentadas na FIGURA 4.37 e as 14 hidantoínas na FIGURA 4.38.

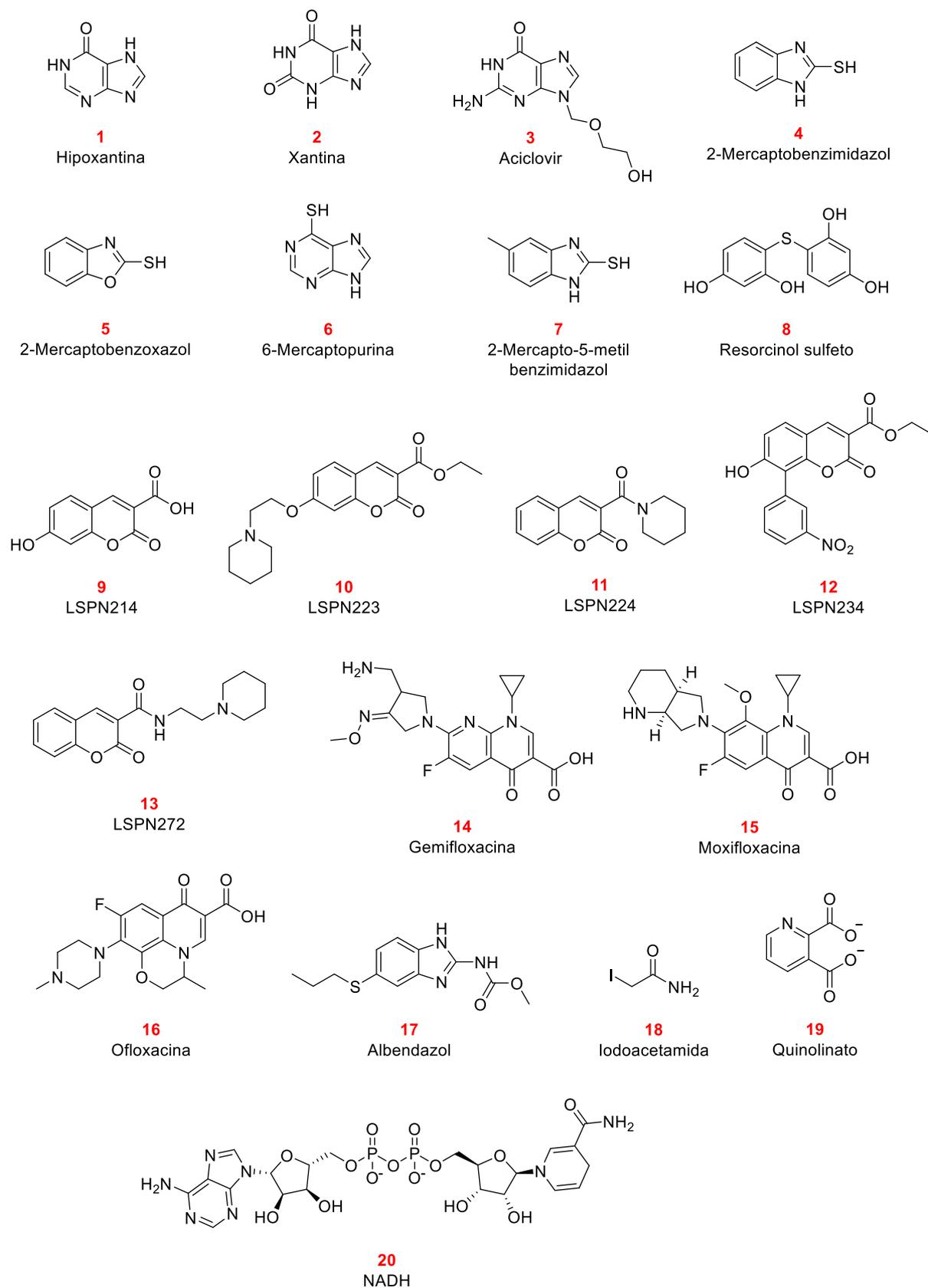


FIGURA 4.37 – Estrutura de 20 compostos triados como ligantes da *TcPEPCK*.

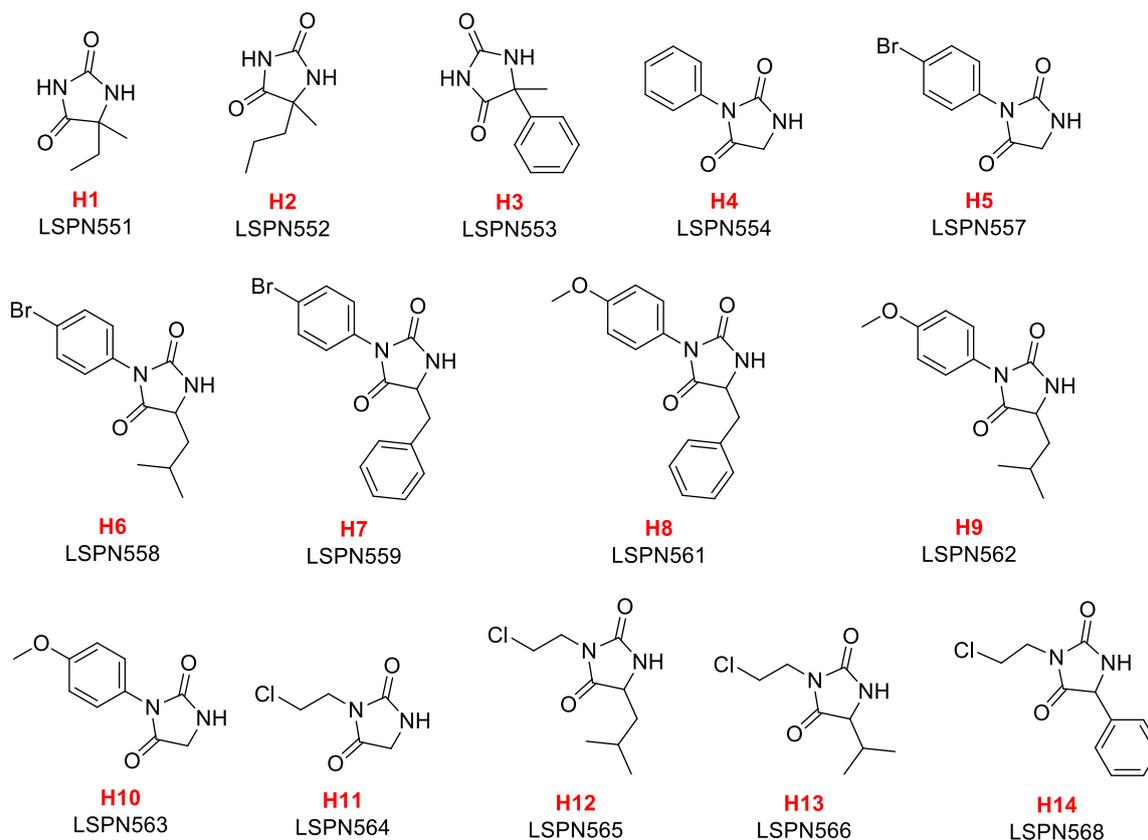


FIGURA 4.38 – Estrutura das 14 hidantoínas triadas como ligantes da *TcPEPCK*.

A triagem foi realizada como descrito na Seção 3.18. Todos os ligantes foram solubilizados em uma mistura de DMSO/acetona 1:1. Os controles negativos de todos os ligantes foram preparados na ausência de ATP, a fim de verificar a seletividade. Controles positivos foram preparados a fim de se obter a atividade da enzima na ausência do composto em triagem, porém com a presença de 1 ou 2% da mistura do solvente orgânico; embora o solvente nesta proporção em nada afetou a atividade.

O efeito da coeluição também foi verificado, através do preparo de dois lotes de PEP nas condições de ensaio: 1) ausência de ligante e 2) presença de ligante. O efeito matriz causou supressão ou melhoramento na ionização, dependendo do ligante. Contudo, a área obtida na triagem de ligantes foi corrigida baseada no efeito que o respectivo ligante causou na ionização do PEP.

Os resultados obtidos foram tratados com as fórmulas descritas na Seção 3.18. Todas as triagens foram realizadas com $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e 50

$\mu\text{mol L}^{-1}$ de ligante. Estas concentrações foram baseadas no K_{Mapp} da *Tc*PEPCK em solução, sendo 1,5 vezes a concentração de substrato, em relação ao K_{Mapp} , e 1/3 dessa concentração em relação aos compostos em triagem. As baixas concentrações favorecem inibidores não competitivos¹⁴⁶, adequados em casos como os da PEPCK, visto que um possível candidato a fármaco sendo um inibidor competitivo também poderia inibir a enzima humana, se a competição se der pelo sítio de ligação de PEP/OAA.

Todas as 20 moléculas apresentadas na FIGURA 4.37 causaram inibição da *Tc*PEPCK¹⁴⁷, com valores de inibição desde 1 até 60%, apresentados no gráfico da FIGURA 4.39. Já as hidantoínas causaram ativação da enzima em um intervalo de 30-80%, apresentado no gráfico da FIGURA 4.40.

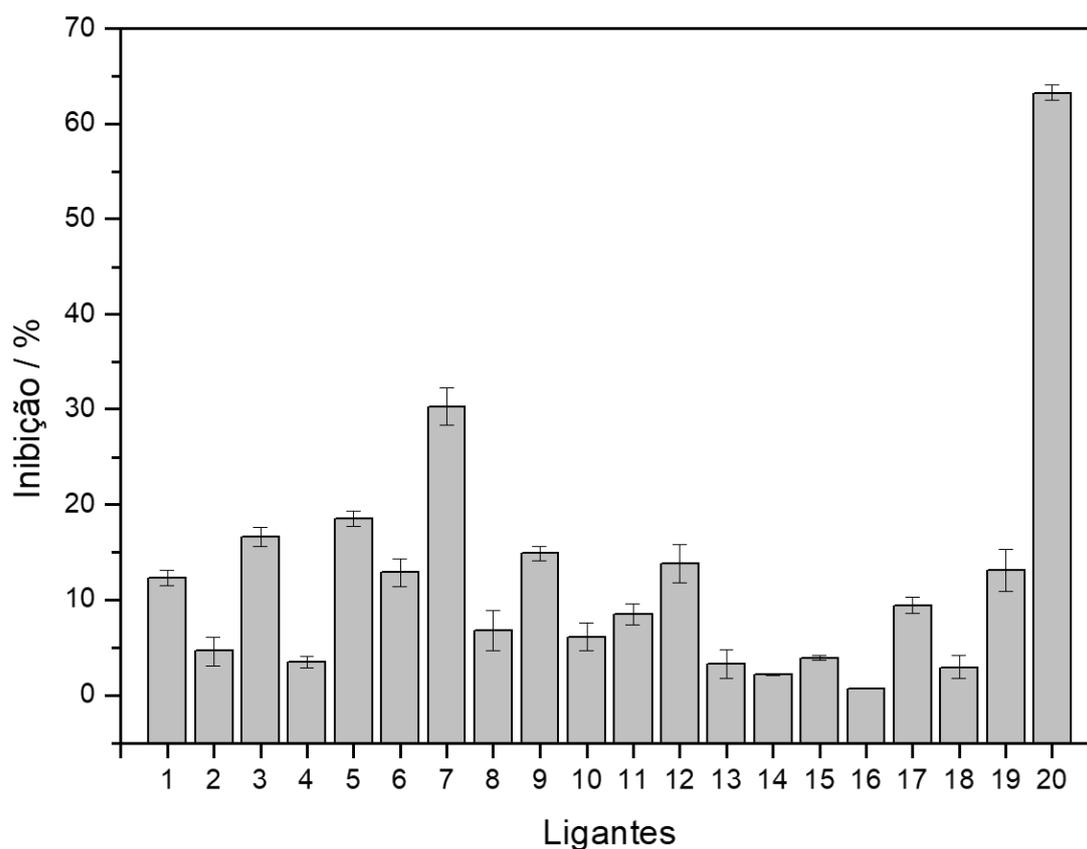


FIGURA 4.39 – Valores de inibição ($n = 2$) das 20 moléculas triadas a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de inibidores.

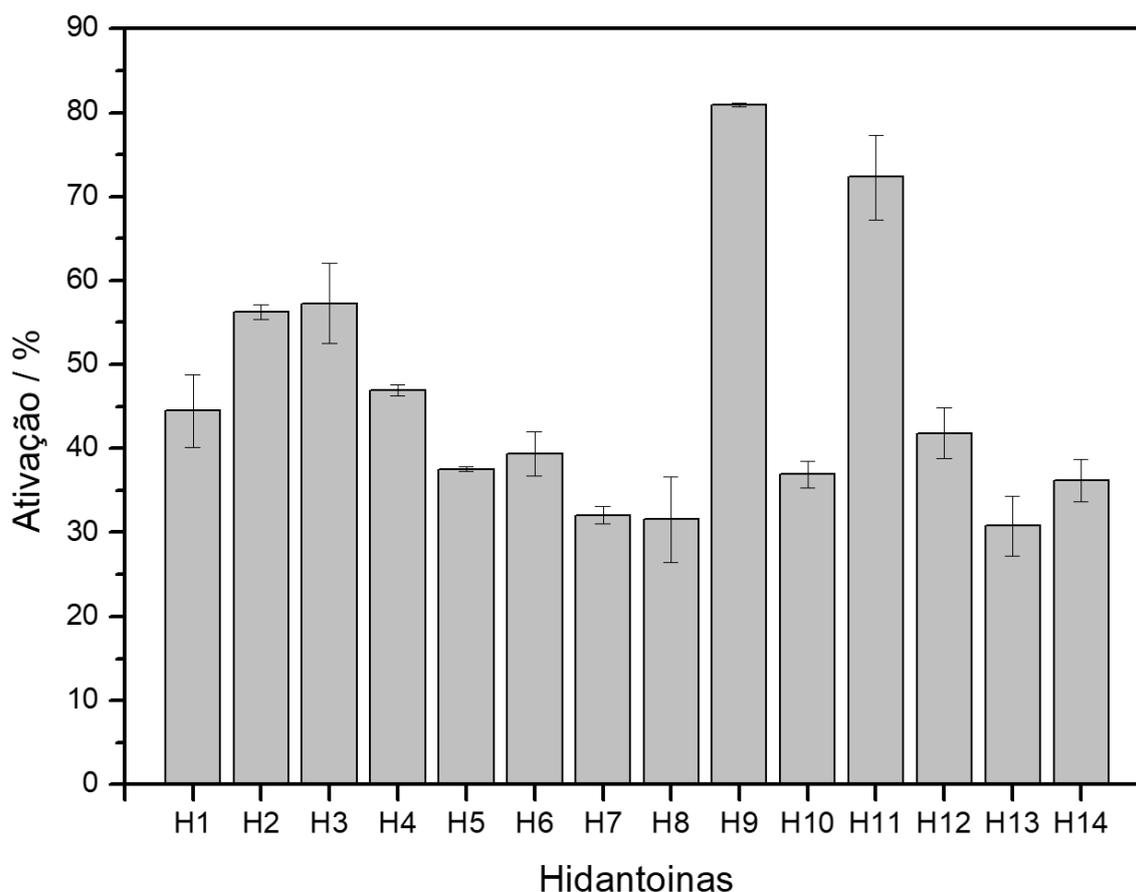


FIGURA 4.40 – Valores de ativação ($n = 2$) das 14 hidantoínas triadas a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ativadores.

Alguns resultados chamam especial atenção, como o elevado valor de inibição causado pelo NADH. Nos ensaios acoplados se utiliza enzimas NADH-dependentes para mensurar a atividade da PEPCK. As concentrações de NADH utilizadas nesses ensaios variam, mas, em geral, estão na ordem de $200\text{--}500 \mu\text{mol L}^{-1}$, mais elevado do que a concentração aqui utilizada de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH. Isso pode implicar que os valores de atividade atribuídos a PEPCK de *T. cruzi* utilizando esses métodos sejam numericamente superiores aos obtidos. Tal fato aumenta a importância do método direto aqui desenvolvido.

Outro fato importante foi a ativação da enzima por ação das hidantoínas. Essas moléculas foram selecionadas devido a semelhança estrutural com a substância da FIGURA 4.36c, proposta por docagem, sendo que as carbonilas poderiam complexar com o metal divalente do sítio ativo e inibir a ação

da enzima. Contudo, isso não deve ter ocorrido pois, senão, as hidantoínas teriam inibido a enzima.

Comparado aos elevados valores de ativação, as inibições obtidas a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram baixas ($< 30\%$), exceto para o NADH. Então, os sete compostos com maior porcentagem de inibição (**1**, **3**, **5**, **7**, **9**, **19** e **20**, FIGURA 4.37) foram novamente triados a $450 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, 3 vezes mais concentrados em relação ao substrato. Os resultados estão apresentados no gráfico da FIGURA 4.41.

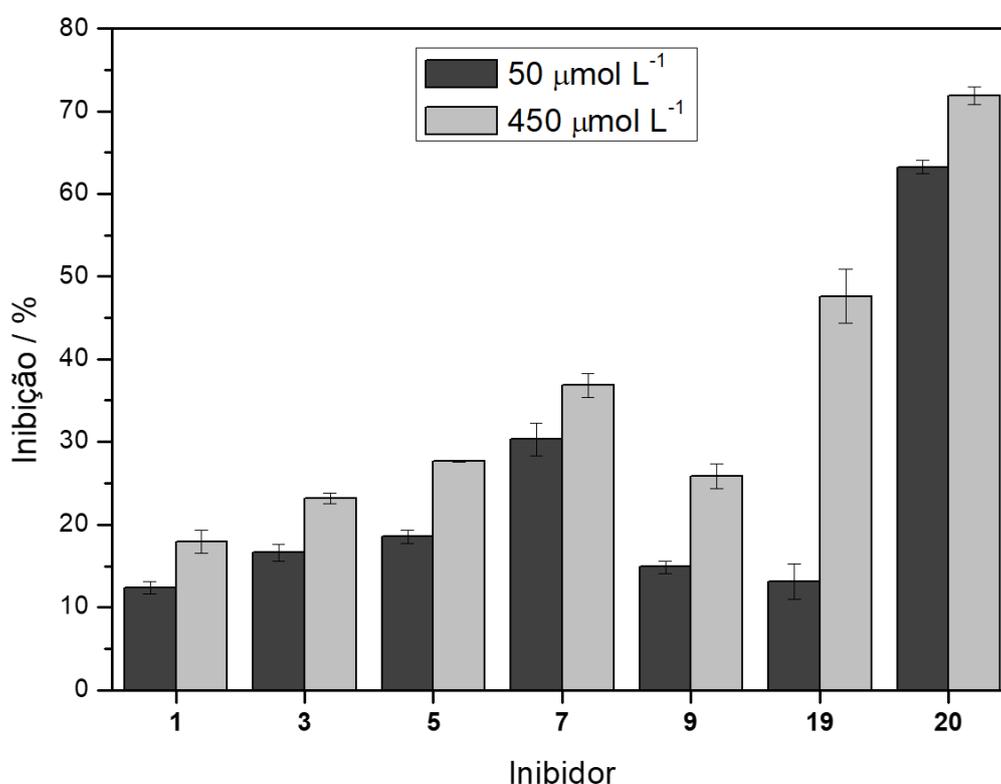


FIGURA 4.41 – Comparação das inibições de sete ligantes triados a 50 e $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ com a concentração de OAA em $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ambos os casos.

Todos os ligantes causaram maior inibição acompanhados pela elevação da concentração, com aumentos de até 10%, com exceção do composto **19** que aumentou em quase 4 vezes. Este aumento elevado da inibição do quinolinato foi, provavelmente, devido à quelação do Mn^{2+} em alta concentração, indo de encontro com o proposto para a substância da FIGURA 4.36c.

A grande vantagem de utilizar o método LC-MS/MS para a triagem de ligantes é o monitoramento direto pela quantificação de PEP, que elimina falsos positivo ou negativo. Além disso, o uso de MS inclui excelente relação sinal/ruído, precisão e redução dos custos dos reagentes, quando comparado aos métodos acoplados. O método permitiu detectar inibições em uma ampla faixa, desde inibições tão pequena quanto 1% (composto **16**) e até mesmo ativações, demonstrando a importância do método direto aqui reportado não somente para monitoramento de atividade em purificação, mas para a caracterização cinética e também para triagens de ligantes.

De maneira geral, os baixos valores de inibição aqui reportados estão de acordo com fragmentos moleculares (< 300 Da), conforme descrito na literatura¹⁴⁸. A série de substâncias triadas que apresentaram inibição foi composta por NADH e 19 pequenas moléculas, com cinco delas abaixo de 400 Da e quatorze abaixo de 300 Da.

As baixas afinidades de ligação ($0,1-10$ mmol L⁻¹) de uma pequena molécula com uma enzima alvo estão fora da faixa de detecção da maioria dos ensaios de rotina e justifica o porquê da utilização de altas concentrações (> 100 μ mol L⁻¹) destas em ensaios rotineiros¹⁴⁹. Além disso, uma quantidade muito pequena de enzima foi usada para cada amostra, em contraste com ensaios tradicionais que requerem quantidades significativas de proteína pura e solúvel¹⁴⁸.

4.19 Teste de inibição com *Tc*PEPCK-II-MB

Para verificar se as inibições obtidas nos ensaios em solução com a *Tc*PEPCK-II se confirmam com a enzima imobilizada, selecionou-se os ligantes **1, 3, 5, 7, 9, 19** e **20** para um teste de inibição com a *Tc*PEPCK-II-MB. Os testes foram realizados como descrito na Seção 3.20 e os mesmos critérios da triagem em solução foram adotados.

Assim, todas as triagens foram realizadas com $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ligante. Estas concentrações foram baseadas no K_{Mapp} da *TcPEPCK-II-MB*, sendo 1,5 vezes a concentração de substrato, em relação ao K_{Mapp} e 1/3 dessa concentração em relação aos compostos em triagem, mantendo-se a mesma proporção da triagem realizada em solução. Os valores de inibição obtidos estão mostrados no gráfico da FIGURA 4.42.

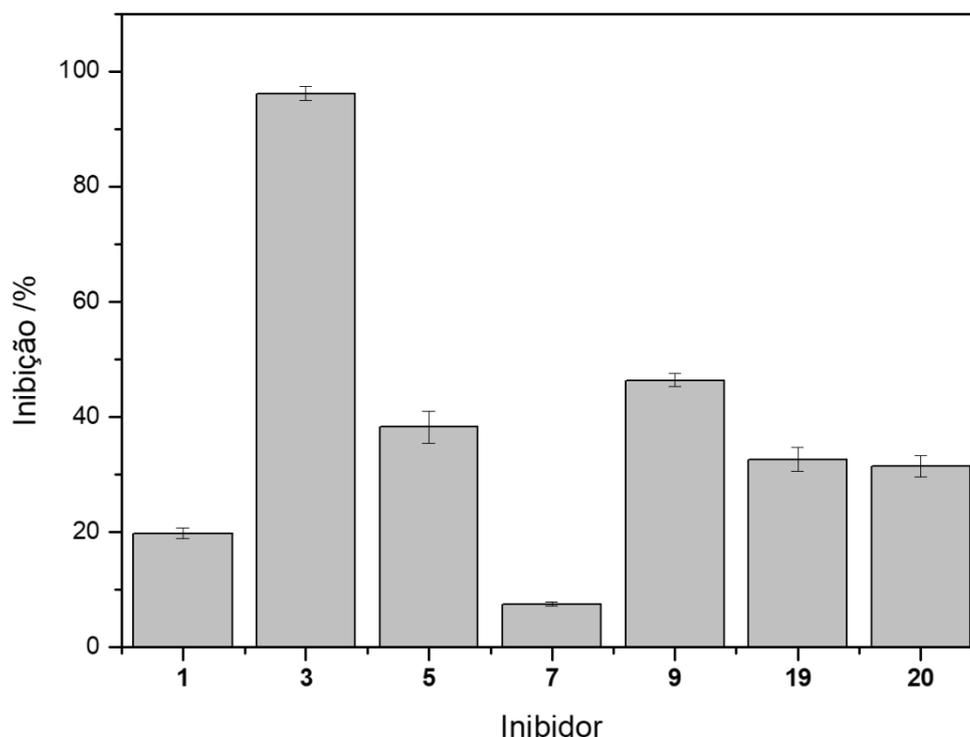


FIGURA 4.42 – Valores de inibição ($n = 2$) das sete moléculas triadas a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de inibidores.

Todos os compostos inibiram a enzima imobilizada, mas em diferentes proporções quando comparado com a enzima em solução (FIGURA 4.43). O composto **3** levou a uma inibição 96% para a *TcPEPCK-II-MB*, enquanto em solução inibiu apenas 16%, e o **19** inibiu 31% a *TcPEPCK-II-MB* e 63% em solução. Outra importante observação é que cada reação controle, realizada com a *TcPEPCK-II-MB* após cada teste de inibição, produziu quantidades equivalentes de PEP. Isso sugere que nenhum dos ligantes é um inibidor irreversível.

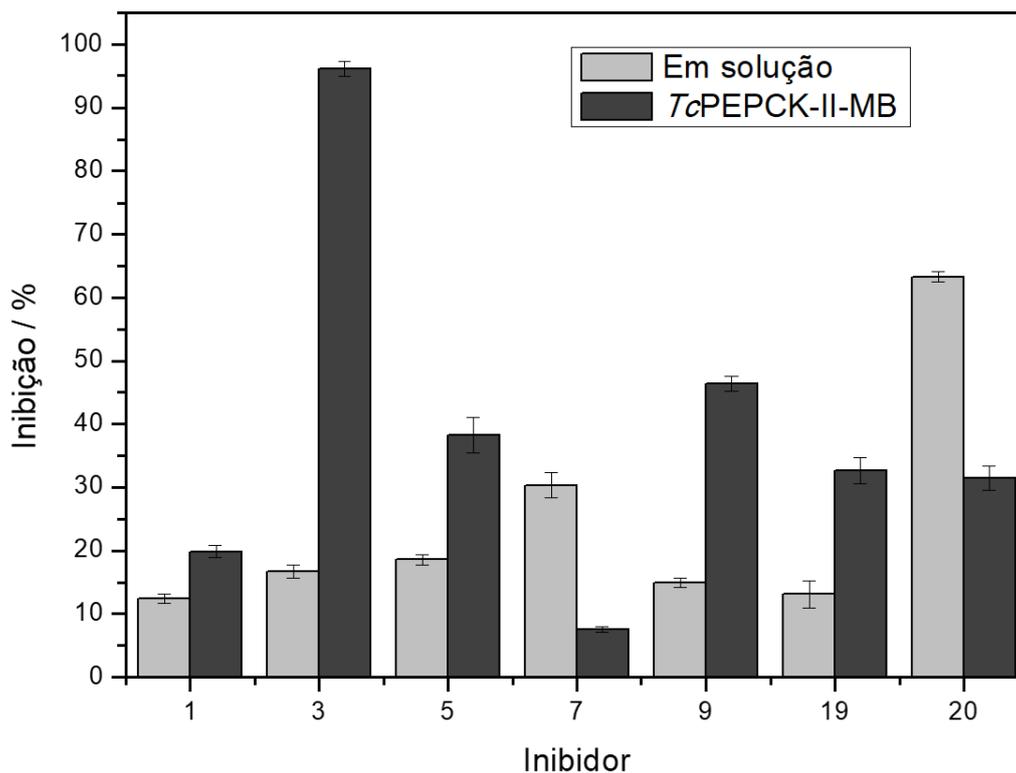


FIGURA 4.43 – Comparação dos níveis de inibição ($n = 2$) de sete compostos triadas a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de inibidor em solução e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OAA e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de inibidores para a *TcPEPCK-II-MB*.

4.20 Prova de conceito com *TcPEPCK-II-MB* e *TcPEPCK-III-MB*

A ausência de inibidores conhecidos da *TcPEPCK* levou a realização de triagens que revelaram inibidores e ativadores. Ademais, a inibição foi confirmada para alguns dos compostos selecionados através do ensaio com a *TcPEPCK-II-MB*. Assim, ensaios de *ligand fishing* foram modulados com alguns dos ligantes identificados.

Baseado nos resultados obtidos na triagem, foram preparadas duas misturas de compostos, sendo uma contendo os inibidores **1**, **3**, **5**, **7** e **9** e a outra contendo os ativadores **H1**, **H3**, **H6**, **H8** e **H10** para uma prova de conceito com os biorreatores. A escolha foi feita em função da porcentagem de inibição/ativação, bem como na qualidade da ionização observada dos respectivos

íons $[M+H]^+$ de cada composto no MS. O NADH não foi selecionado devido sua rápida oxidação para NAD^+ .

4.20.1 Desenvolvimento de método LC-MS para inibidores e ativadores

Para analisar os ensaios de *fishing*, foi necessário desenvolver um método que tenha sensibilidade para detectar as substâncias da mistura. Desta forma, optou-se por desenvolver dois métodos por LC-MS, um para a mistura de inibidores e a outra para a mistura de ativadores, em que cada uma foi composta pelas cinco substâncias a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em Tampão A com 2% de DMSO/acetona 1:1 (v/v).

Como as misturas continham substâncias de polaridade semelhantes, foram desenvolvidos métodos isocráticos, utilizando a coluna Poroshell C_{18} (100 x 2,1 mm, 2,7 μm , Agilent), descritos na Seção 3.22, e os cromatogramas da separação apresentados na FIGURA 4.44 e FIGURA 4.45.

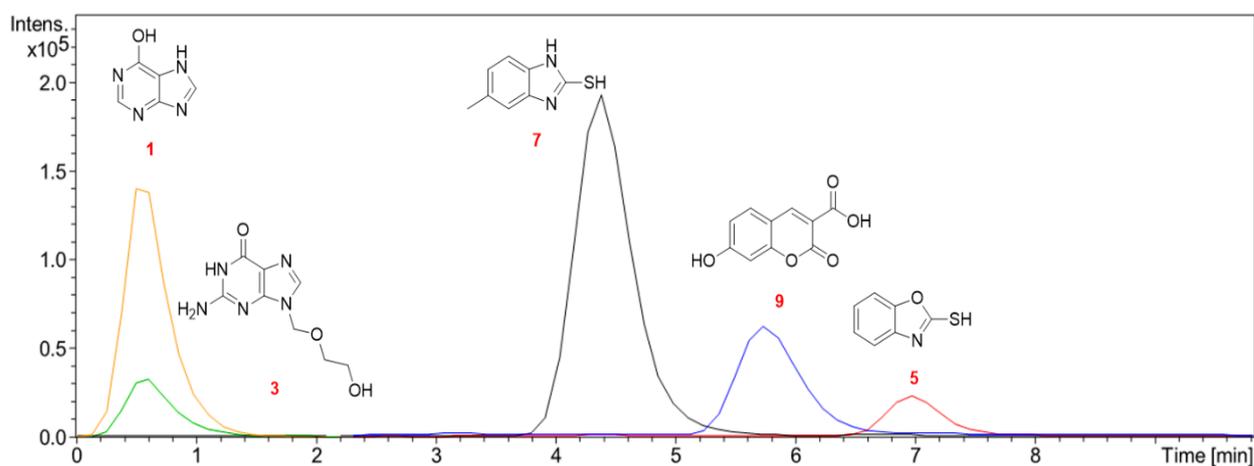


FIGURA 4.44 – Cromatograma de íons extraídos da mistura dos inibidores **1**, **3**, **5**, **7** e **9** a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando-se a coluna Poroshell C_{18} (100 x 2,1 mm, 2,7 μm , Agilent) e fase móvel composta por ACN/água com 0,1% de ácido fórmico 1:4 (v/v), vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, com *split* onde $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ foi enviado para o MS, que operou em modo positivo e SRM, monitorando os íons $[M+H]^+$ de cada inibidor.

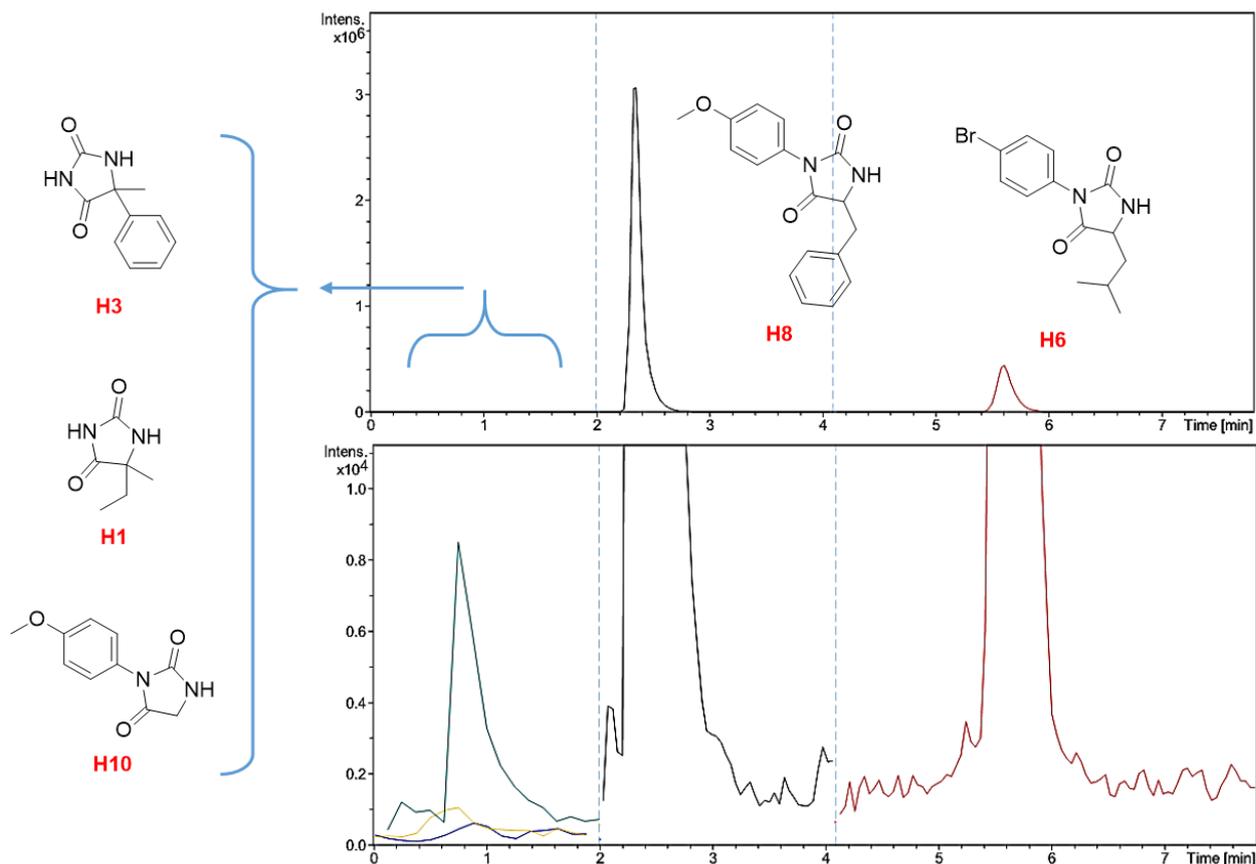


FIGURA 4.45 – Cromatogramas de íons extraídos da mistura dos ativadores **H1**, **H3**, **H6**, **H8** e **H10** a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando-se a coluna Poroshell C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 μm , Agilent), fase móvel composta por ACN/água com 0,1% de ácido fórmico 35:65 (v/v), vazão de 0,4 mL min^{-1} , com *split* onde 0,1 mL min^{-1} foi enviado para o MS, que operou em modo positivo e SRM, monitorando os íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ de cada ativador.

Na separação dos inibidores, os compostos **1** e **3**, bem como os ativadores **H1**, **H3** e **H10**, sofreram coeluição. Porém, eles foram identificados por suas razões m/z . Os compostos **H1**, **H3** e **H10** ionizam muito menos que **H6** e **H8** nas mesmas concentrações, na ordem de 10^4 , mas isso não interferiu em suas detecções individuais.

4.20.2 Teste de tolerância da *TcPEPCK* à MeOH para extração em ensaios de *ligand fishing*

Dentre as otimizações necessárias aos ensaios de *ligand fishing*, está a solução extratora. Como explicitado na Seção 1.3, pode-se utilizar uma solução do próprio substrato, mudança de pH ou adição de uma porcentagem de solvente orgânico. Caso a utilização de solvente seja necessária, é preciso saber a concentração que não afete a enzima, ao menos que o biorreator não seja mais reutilizado após o contato com o solvente orgânico.

Para tanto, um teste em solução com a *TcPEPCK*-II foi realizado como descrito na Seção 3.21, com volume final de reação ajustado com mistura de Tampão A/MeOH, de tal forma que houvesse 5, 10, 20 e 30% de MeOH. As reações foram interrompidas pela adição de misturas complementares de Tampão A/MeOH, sendo que todas as reações apresentaram, ao final, uma proporção de Tampão A/MeOH 1:1 (v/v), seguida de centrifugação e análise por LC-MS/MS. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na FIGURA 4.46.

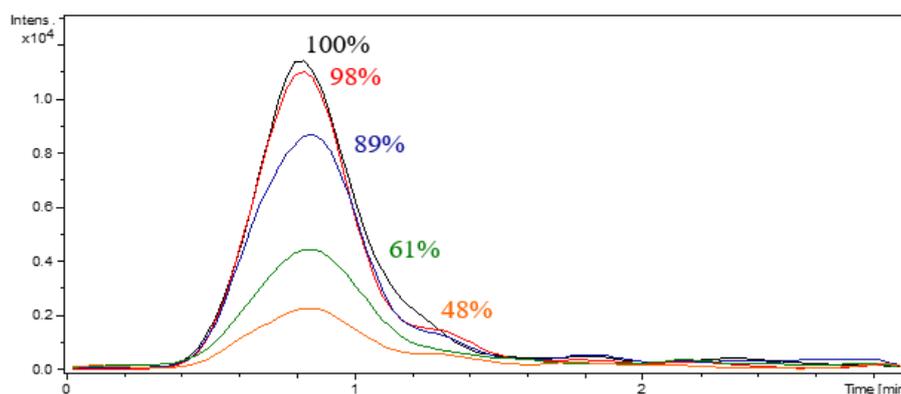


FIGURA 4.46 – Cromatograma de íons extraídos, LC-MS/MS, da reação da *TcPEPCK*-II na ausência de MeOH (preto) e na presença de MeOH em concentração de 5% (vermelho), 10% (azul), 20% (verde) e 30% (laranja), com suas respectivas atividades relativas.

A presença de 5% de MeOH praticamente não afetou a atividade da *TcPEPCK*, enquanto com 30% de MeOH a atividade foi reduzida em mais da metade. Embora 10% de MeOH tenha afetado consideravelmente menos a

atividade, quando comparado à 20% de MeOH, o último ainda se mostrou satisfatório, pois manteve quase dois terços da atividade. Além disso, uma maior concentração de solvente aumenta a extractabilidade da solução e, com a enzima imobilizada, espera-se uma maior tolerabilidade ao mesmo.

4.20.3 Ensaio de *ligand fishing* para inibidores e ativadores

Os ensaios foram iniciados com a *TcPEPCK-II-MB*, onde três biorreatores (1 contendo a enzima desnaturada e 2 contendo a enzima ativa) foram carregados, inicialmente, com a mistura dos inibidores a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em Tampão A, incubados a $36 \text{ }^\circ\text{C}$, 250 rpm e 10 min (Seção 3.22). Em seguida, a *TcPEPCK-II-MB* foi lavada por duas vezes com Tampão A, a fim de remover os compostos adsorvidos e/ou com baixa afinidade (sobrenadantes S1 e S2). A terceira lavagem se trata da extração dos compostos que apresentem afinidade e, como se sabe que são ligantes, esperou-se extraí-los (sobrenadante S3).

A primeira tentativa de extração (FIGURA 4.47*i*) foi realizada com o próprio substrato, utilizando-se $500 \mu\text{L}$ de OAA $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ em Tampão A, o qual ficou 10 min em contato com o *TcPEPCK-II-MB*, em $36 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 rpm, e analisado por LC-MS. No entanto, o cromatograma de íons extraídos obtido apresentou apenas OAA, com elevada intensidade, o qual levou 5 minutos para terminar de eluir. Assim, constatou-se que o OAA não é um bom extrator por prejudicar a análise.

Como não foi possível constatar se os inibidores foram extraídos, o procedimento de carregamento dos biorreatores com a mistura de inibidores foi reiniciado, como já descrito. A segunda tentativa de extração (FIGURA 4.47*ii*) se deu com tampão ácido, uma vez que pH ácido altera a afinidade da enzima pelos seus substratos e, então, adicionou-se $500 \mu\text{L}$ de tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} em pH 5,5, o qual ficou 10 min em contato com o *TcPEPCK-II-MB*, em $36 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 rpm e analisado o sobrenadante. O cromatograma não apresentou

nenhum dos cinco inibidores e, então, outra extração (FIGURA 4.47iii) foi realizada da mesma maneira, porém adicionado-se 20% de MeOH ao tampão (Tampão F). Novamente não foi observado pico de nenhum inibidor.

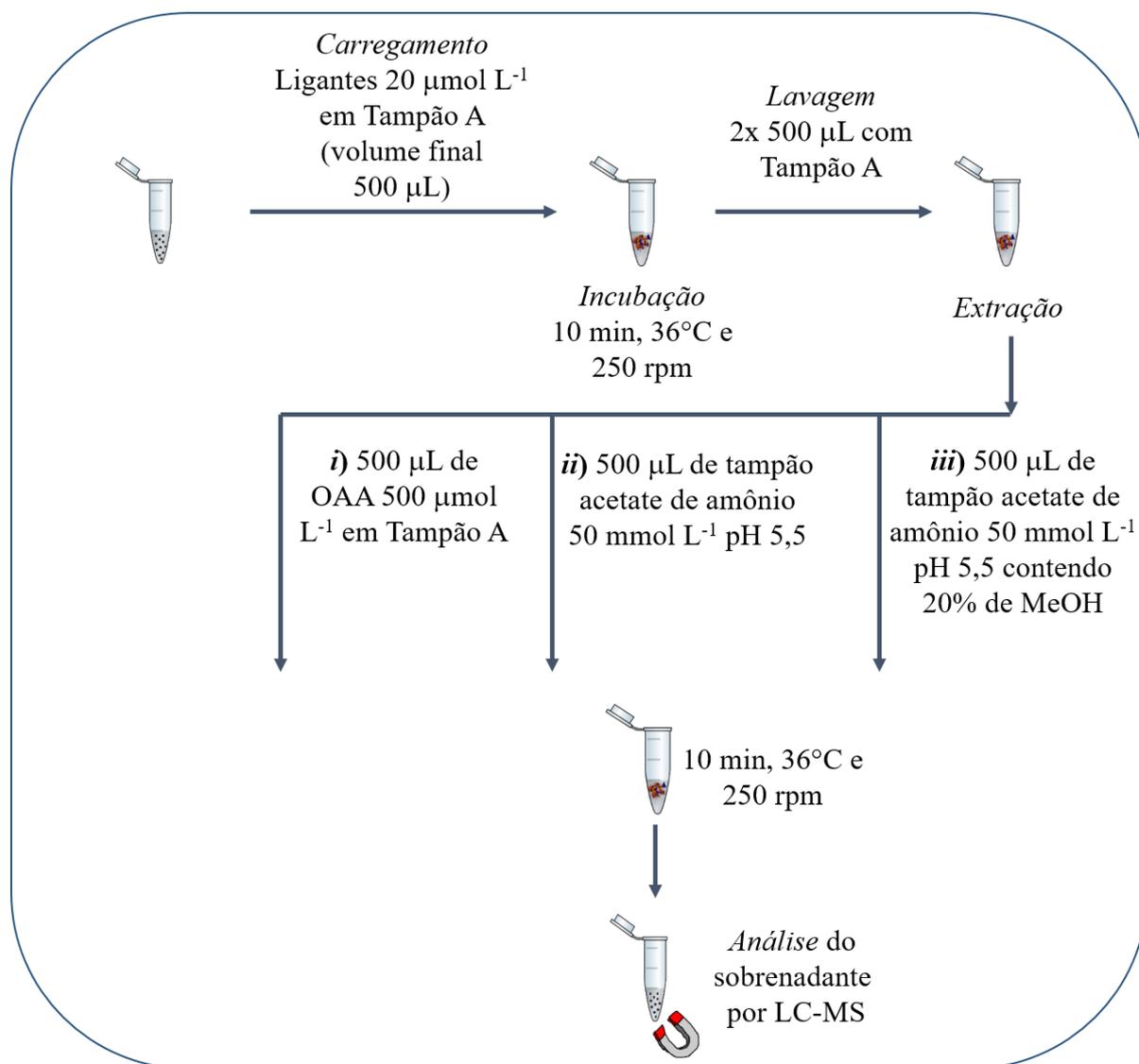


FIGURA 4.47 – Fluxograma do processo da prova de conceito do *ligand fishing*, em que o procedimento de carregamento foi realizado por três vezes para otimização da etapa de extração, tendo sido testado três soluções extratoras, representadas em *i*, *ii* e *iii*.

O procedimento de carregamento foi testado com tempo de incubação de 30 min e extração por 10 min com Tampão F, no qual não foi observado os inibidores. Os testes de atividade dos biorreatores após as incubações com ligantes e extração com tampão contendo MeOH revelou que a

*Tc*PEPCK-II-MB continuava ativa, com atividade equivalente ao início dos experimentos.

Para dar continuidade, optou-se por testar a *Tc*PEPCK-III-MB, uma vez que foram imobilizadas 150 U, enquanto para *Tc*PEPCK-II-MB foram apenas 17 U da enzima. Uma carga maior de enzima deve apresentar afinidade por maior quantidade de ligante. Então, a *Tc*PEPCK-III-MB foi incubada com a mistura dos inibidores por 30 min, seguida de duas lavagens com Tampão A e extração por 10 min com Tampão F e analisado. A extração revelou os ligantes, como ilustrado no cromatograma da FIGURA 4.48, em que os compostos **5** e **7** não foram identificados pois, possivelmente, apresentam as menores afinidades dentre todos os compostos.

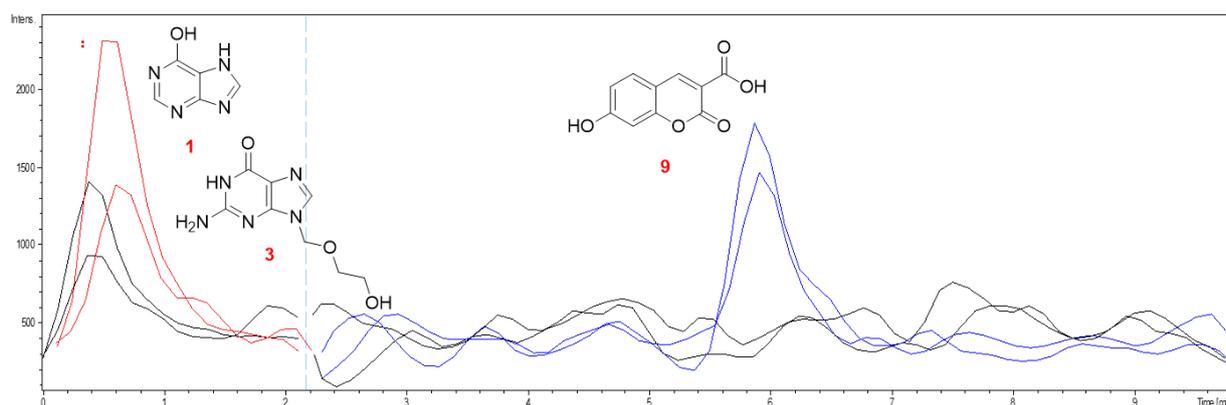


FIGURA 4.48 – Cromatograma de íons extraídos para a extração dos ligantes da mistura de inibidores da *Tc*PEPCK-III-MB, utilizando-se a coluna Poroshell C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 μm, Agilent) e fase móvel composta por ACN/água com 0,1% de ácido fórmico 1:4 (v/v), com vazão de 0,4 mL min⁻¹, com *split* onde 0,1 mL min⁻¹ foi enviado para o MS.

Tendo modulado o ensaio para os inibidores, o mesmo procedimento foi empregado para a mistura dos ativadores **H1**, **H3**, **H6**, **H8** e **H10**. A amostra foi carregada no biorreator da *Tc*PEPCK-III-MB, incubado por 30 min, seguido de 2 lavagens com Tampão A e extração por 10 min com Tampão F. A análise da extração está representada na FIGURA 4.49, sendo que as hidantoínas **H1**, **H3** e **H10** não foram identificadas na solução extratora.

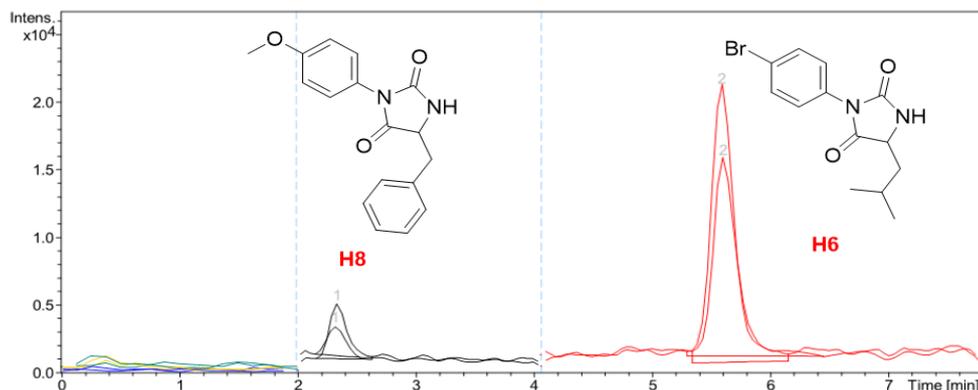


FIGURA 4.49 – Cromatograma de íons extraídos, LC-MS, para a extração dos ligantes (S3) da mistura de ativadores da *TcPEPCK-III-MB*, utilizando-se a coluna Poroshell C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 μ m, Agilent) e fase móvel composta por ACN/água com 0,1% de ácido fórmico 35:65 (v/v), com vazão de 0,4 mL min⁻¹, com *split* onde 0,1 mL min⁻¹ foi enviado para o MS.

A razão de afinidade, definida na Seção 3.18, foi calculada para os compostos que foram extraídos e estão apresentados na FIGURA 4.50.

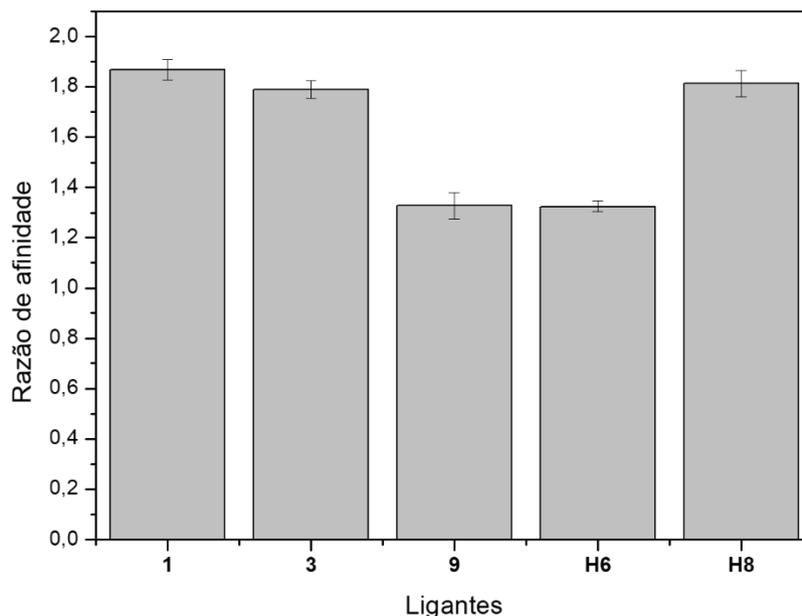


FIGURA 4.50 – Razão de afinidade para os compostos utilizado como prova de conceito para a *TcPEPCK-III-MB*.

Os compostos **9** e **H6** apresentaram razões de 1,3, estando próximas de 1,2, o que indica a predominância de adsorção ao biorreator controle. Os compostos **1**, **3** e **H8** apresentaram razões de afinidade de, aproximadamente, 1,8. O composto **3** foi o que apresentou a maior inibição para a enzima imobilizada.

O composto **1** não acompanhou uma elevada inibição da enzima imobilizada, mas, em solução, inibiu em proporções semelhantes ao **3**.

Estes resultados evidenciam que a razão de afinidade não está diretamente relacionada com o potencial de inibição ou ativação. Contudo, os ensaios de *ligand fishing* revelam potenciais ligantes.

4.21 Ensaio de *ligand fishing* com extratos de plantas do cerrado

Os ensaios feitos como prova de conceito demonstraram que os ligantes apresentam afinidade seletiva pelas *TcPEPCK*-III-MB e podem ser, então, identificados em misturas. Assim, na procura de ligante e dada a ausência de inibidores conhecidos para *TcPEPCK*, o biorreator foi aplicado para triagem em quatro extratos de plantas oriundas do Cerrado, sendo o extrato da casca para *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) e *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg (Fabaceae), e o extrato das folhas para *Diospyros burchellii* DC (Ebenaceae) e *Byrsonima coccolobifolia* (Malpighiaceae).

A procura de substâncias biologicamente ativas em plantas destaca-se pelo fato de os vegetais possuírem alta capacidade de produzir estruturas moleculares extremamente funcionalizadas, complexas e incomuns, fazendo da flora um atraente foco químico e biológico. O Brasil é um país com grande biodiversidade e viabiliza oportunidade para a identificação de plantas com potencial terapêutico, sendo o Cerrado o segundo maior bioma da América do Sul e com a flora mais rica de todas as savanas do mundo, e está sendo considerado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade¹⁵⁰.

Dentre as espécies selecionadas, a *B. coccolobifolia*, conhecida como murici, apresenta o maior número de estudos de caracterização estrutural e foi reportada atividade leishmanicida¹⁵¹. Para *Q. grandiflora*, conhecida como pau-terra, foi reportada¹⁵⁰ recentemente atividade tripanocida, *in vitro*, para a fração acetato de etila das folhas. Para as espécies *A. falcata* e *D. burchellii*,

popularmente chamadas de angico-do-cerrado e olho-de-boi, respectivamente, há pouquíssimos estudos reportados.

Os extratos etanólicos secos de cada espécie foram ressuspensos em Tampão A, seguido de centrifugação para utilização da fração hidrossolúvel (sobrenadante) nos ensaios de *ligand fishing*. Previamente aos ensaios, foi feito o perfil cromatográfico (*fingerprint*) para as quatro frações hidrossolúveis dos extratos em LC-HRMS, operando em modo gradiente segmentado, utilizando-se ACN como modificador orgânico de 5-100%, o HRMS em modo positivo *full scan* e a mesma análise foi repetida com o HRMS em modo negativo (Seção 3.23).

Para os ensaios de *ligand fishing* com as frações dos extratos, foi utilizado o procedimento modulado para as pequenas moléculas na prova de conceito, com lavagens utilizando-se o Tampão A e extração com Tampão F. As frações S3 do ensaio foram analisadas e comparadas com o perfil cromatográfico obtido para cada extrato. Para os cálculos das razões de afinidade, as frações S3 das *TcPEPCK-MB-III* ativas foram comparadas com as frações S3 das *TcPEPCK-MB-III* inativas.

Todos os ensaios foram inicialmente analisados no modo positivo e negativo de ionização em *full scan*. Em ambos os modos não houve diferença no número de picos, apenas em suas intensidades, porém com maior quantidade de íons no modo positivo. Desta forma, o cálculo da razão de afinidade foi feito em função do modo positivo, dada a maior intensidade.

Os cromatogramas de pico base apresentados na FIGURA 4.51 ilustram todo o processo para os quatro extratos utilizados. Os ensaios de *fishing* com extratos revelaram a capacidade de interação seletiva da *TcPEPCK* com ligantes. Estas interações podem ocorrer no sítio ativo ou em outras regiões da estrutura da enzima. Diversas substâncias foram capturadas, porém, a fim de evitar a caracterização de compostos extraídos por interações adsorptivas, apenas aquelas que apresentaram razão de afinidade maior que 1,2 foram consideradas como ligantes. Assim, 11 ligantes foram identificados nos 4 extratos. Todos os

ligantes isolados estavam presentes na fração hidrossolúvel do extrato bruto, ou seja, não são artefatos da análise.

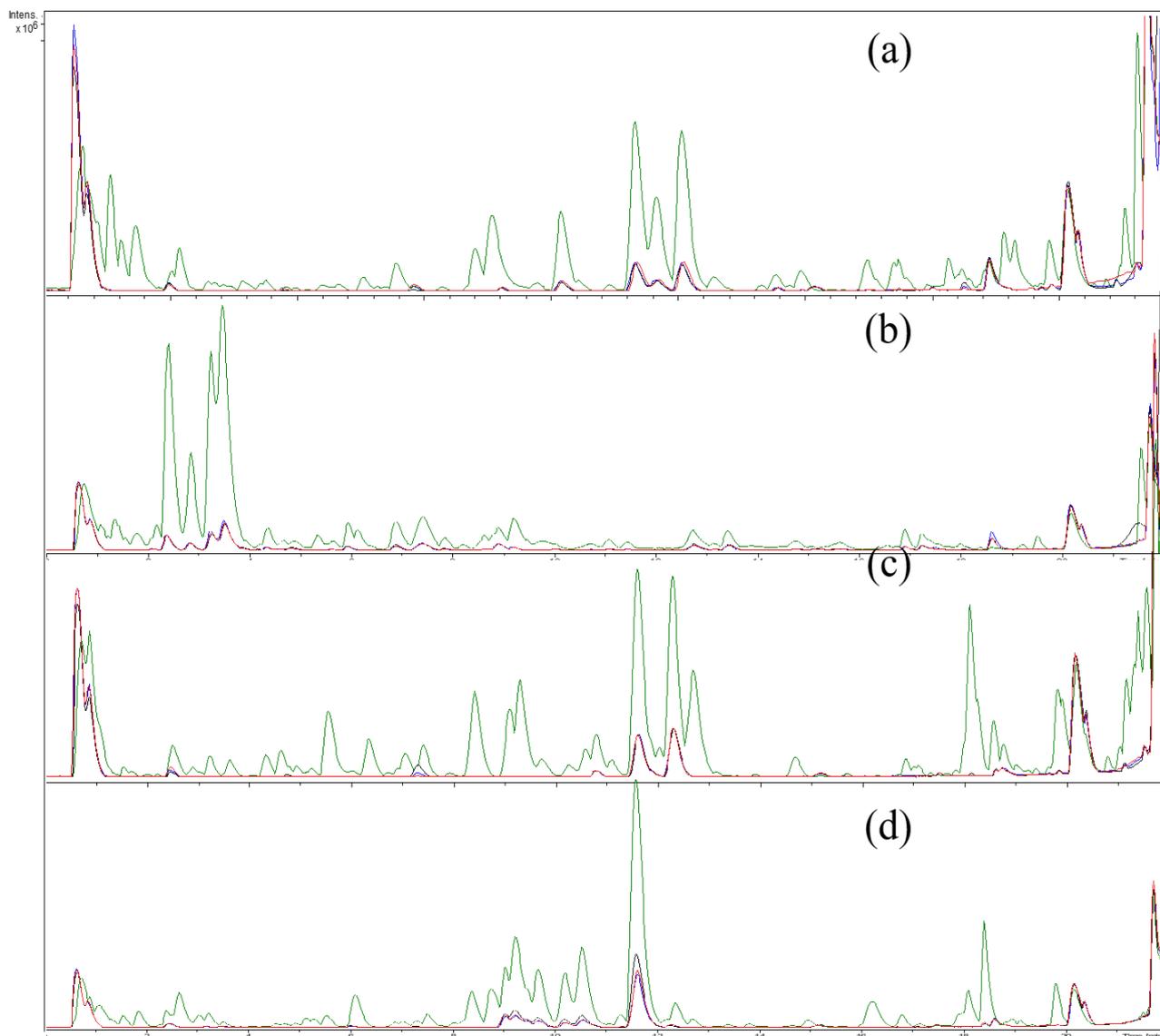


FIGURA 4.51 – Cromatogramas de pico base, LC-HRMS, para os extratos (verde) e frações S3 da *TcPEPCK-III-MB* inativa (preto) e ativas (vermelho e azul), utilizando-se a coluna Ascentis Express C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 μ m, Agilent), com fase móvel composta por água contendo 0,1% de ácido fórmico e ACN, em modo gradiente, de 5% a 100% de ACN com vazão de 0,4 mL min⁻¹ e modo positivo de ionização, sendo (a) *Q. grandiflora*, (b) *D. burchellii*, (c) *A. falcata* e (d) *B. coccolobifolia*.

Para a proposição das estruturas dos ligantes, somente os espectros obtidos no modo positivo de ionização foram considerados devido a maior quantidade de íons. Assim, inicialmente foram obtidas as fórmulas moleculares

teóricas através da massa exata dos íons $[M+H]^+$ precursores nas análises de *full scan*. Em seguida, para obtenção dos íons fragmentos, as frações S3 foram novamente analisadas por LC-HRMS/MS, com o QqTOF operando em modo auto MS/MS. Desta forma, com as fórmulas moleculares, os íons fragmentos e auxílio da base de dados SciFinder® as estruturas para os ligantes identificados foram sugeridas e estão apresentados na FIGURA 4.52. As estruturas estão numeradas sequencialmente e seguidas das iniciais dos respectivos extratos dos quais os ligantes foram isolados.

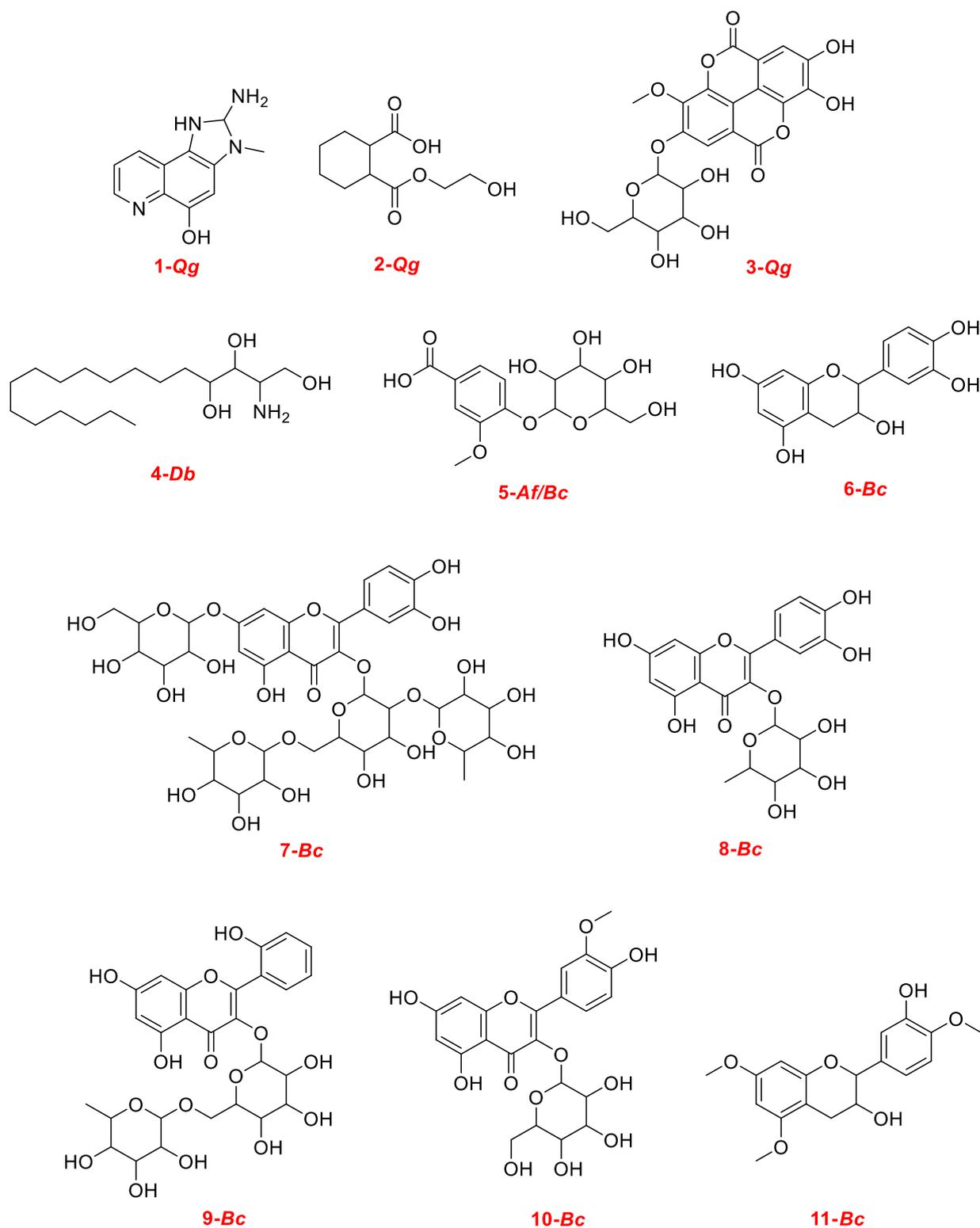


FIGURA 4.52 – Estruturas moleculares inferidas para os ligantes isolados nos ensaios de *ligand fishing* com os extratos de *Q. grandiflora* (*Qg*), *D. burchellii* (*Db*), *A. falcata* (*Af*) e *B. coccolobifolia* (*Bc*), sendo 1-*Qg* e 2-*Qg* propostos a partir dos dados de MS e os demais confirmados pela literatura como metabólitos de plantas.

Todos os espectros de massas (*full scan* e MS²), bem como as propostas de fragmentação que levaram a inferir as estruturas, estão mostrados no Apêndice (página 155). As razões de afinidade, íons precursores, teóricos e fragmentos estão apresentados na TABELA 4.4.

Para todos os compostos, foram realizadas correlação entre possíveis estruturas com os íons fragmentos. Porém, é importante frisar que as análises foram realizadas em uma faixa de m/z 100-1000 e alguns íons fragmentos, que auxiliariam na proposta da estrutura, ficaram fora da janela espectral. Em m/z abaixo de 100 ocorre um grande número de íons proveniente da fase móvel e impurezas do sistema, o que prejudica toda a análise uma vez que são os íons mais intensos do espectro.

Os dois ligantes de maior afinidade, **1-Qg** e **2-Qg**, são isóbaros e mesmo havendo publicações sobre o perfil químico de *Qualea sp.*^{150,152,153}, nenhuma reporta compostos com as fórmulas moleculares sugeridas pela massas exatas dos íons encontrados. Além disso, as bases de dados a partir de fórmulas moleculares, sugerem uma infinidade de estruturas para os íons encontrados. Assim, com base nas fragmentações, foi sugerido a estrutura 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolinol para **1-Qg** (página 155 e 156), e o ácido 2-((2-hidroxietoxi)carbonil)ciclohexano carboxílico para **2-Qg** (página 157). Este último, apresenta semelhança estrutural aos compostos reportados como inibidores de PEPCCK e apresentados na FIGURA 4.36, com estruturas cíclicas contendo carbonilas. A estrutura proposta para **1-Qg** trata-se de um metabólito derivado de um composto gerado normalmente no cozimento de alimentos com elevado teor proteico¹⁵⁴. Os estudos de fragmentação reportados na literatura para tal composto apresentam fragmentos que são coincidentes com os observados para o ligante **1-Qg**¹⁵⁵.

O ligante **3-Qg** é um derivado *O*-metilado-glicopiranosídeo do ácido elágico, caracterizado pelo m/z 317,0310 (perda da porção glicosídica, página

158). Na literatura, este composto já foi reportado para *Qualea sp.*¹⁵² como ácido 3-*O*-metil elágico 4-*O*-β-D-glicopiranosídeo.

O ligante correspondente ao íon *m/z* 318,3009 e identificado como **4-Db** foi atribuído a fitosfingosina. Também, foi identificado o íon *m/z* 274,2755, que foi atribuído a uma fragmentação na fonte de ionização, onde **4-Db** perdeu a porção C₂H₃O⁺ (página 159). A estrutura foi proposta através do fragmento *m/z* 256,2648, em que tanto o composto **4-Db** quanto o fragmento gerado na fonte levaram à formação de *m/z* 256,2648 devido à perda de água. Embora não tenha sido encontrado nenhum estudo que aponte a fitosfingosina em *D. burchellii*, a substância pertence ao grupo dos esfingolipídios, que compreendem uma das principais classes de materiais estruturais e moléculas de sinalização lipídica em todas as células eucarióticas existentes em plantas, leveduras e alguns tecidos de mamíferos¹⁵⁶. Mesmo com sua longa cadeia alquílica, a fitosfingosina já foi isolada em extrato etanólico de planta da espécie *P. nemorosa* (Orchidaceae)¹⁵⁷.

O ligante caracterizado como **5-Af/Bc** foi isolado dos extratos de *A. falcata* e *B. coccolobifolia*. Em ambos os casos, o **5-Af/Bc** apresentou no modo *full scan* um íon *m/z* 331,1066 com baixa intensidade, que foi caracterizado como ácido vanílico 4-glicopiranosídeo. Ainda no modo *full scan*, junto ao íon *m/z* 331,1066, foram encontrados os íons *m/z* 134,9958 e 169,0016 com as maiores intensidades do espectro de massas (página 160 a 162). Estes dois íons provêm do ácido vanílico 4-glicopiranosídeo, tendo sido produtos de fragmentação na fonte de ionização, cujo íon *m/z* 169,0016 corresponde à porção do ácido com perda da unidade glicosídica e *m/z* 134,9958 à unidade glicosídica com perda neutra de CO. As análises de LC-HRMS/MS não levaram a fragmentação do *m/z* 331,1066 devido sua baixa intensidade, o que confirmaria a proposta de fragmentação na fonte, mas levaram a fragmentação dos outros dois íons. Na literatura este metabólito foi reportado em plantas, como ácido vanílico 4-β-D-glicopiranosídeo, para *Alpinia zerumbe* (Zingiberaceae)¹⁵⁸ e sementes de *Passiflora molíssima* (Passifloraceae)¹⁵⁹ e avocado (*Persea americana* Miller, Lauraceae)¹⁶⁰.

Em relação aos demais ligantes isolados da *B. coccolobifolia*, a catequina (**6-Bc**, página 162 e 163) e quercetina-3-*O*-rhamnosídeo (**8-Bc**, página 164 e 165) já foram reportados para essa espécie^{151,161}. O kaempferol 3-*O*-rutinosídeo (**9-Bc**, página 165 e 166) foi reportado para *B. sericea* (Malpighiaceae)¹⁶². A isoramnetina 3-*O*-galactosídeo (**10-Bc**, página 166) foi relatada para *B. crassifolia* (Malpighiaceae)¹⁶³ e, inclusive, apresentou atividade tripanocida em uma fração do extrato etanólico que continha **10-Bc**. Ainda, a aglicona isoramnetina foi relatada para *B. duckeana* e *B. garcibarrigae* (Malpighiaceae)¹⁶⁴. O ligante **11-Bc** (página 167) foi justamente relatado pela primeira vez na literatura em uma espécie de *B. microphylla* (Malpighiaceae), como (2*S*,3*S*)-3-hidroxi-5,7,4'-trimetoxi-flavan-3-ol, sendo um flavonóide não comum¹⁶⁵. A estrutura para **7-Bc** (página 163 e 164) foi proposta a partir dos dados de MS, como uma quercetina semelhante à **8-Bc**, porém com três unidades de açúcar a mais.

Quanto as atividades biológicas dos ligantes identificados, o ácido elágico (derivado de **3-Qg**) já foi reportado como um potente inibidor competitivo com o substrato doador de fosfato da caseína quinase II¹⁶⁶ (K_i de 20 nmol L⁻¹), da proteína quinase A (IC_{50} = 2 μmol L⁻¹) e proteína quinase C¹⁶⁷ (IC_{50} = 8 μmol L⁻¹). Isso pode indicar uma afinidade no sítio de ligação de ATP na *TcPEPCK*. O ligante **4-Db** foi reportado como inibidor de fosfatase de *S. cerevisiae*¹⁶⁸, com K_i de 0,7 mol%. A inibição, em geral, é atribuída à capacidade de ligação ao fosfato de moléculas como o ATP.

O composto **6-Bc** foi reportado como inibidor da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC)¹⁶⁹ de *F. trinervia* e *F. pringlei*, com inibição nove vezes maior que seu inibidor natural, o malato. A PEPC é uma enzima citosólica presente em plantas superiores, bactérias, cianobactérias e algas verdes e catalisa a conversão irreversível de PEP para OAA e fosfato, na presença de bicarbonato, não dependente de moléculas como ADP/ATP¹⁷⁰. O composto **8-Bc** e o kaempferol

(aglicona no composto **9-Bc**) também já foram reportados como inibidores da PEPC de *A. viridis*¹⁷¹, com K_i de 8,5 e 7,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

O ensaio de *ligand fishing* demonstrou a importância da TcPEPCK-MB como ferramenta para busca de ligantes em misturas complexas, sem a necessidade de fracionamento de extrato, seguido de teste de atividade das frações. Ademais, a análise dos ligantes isolados por LC-HRMS/MS pode proporcionar a identificação de substâncias presentes em baixas concentrações no extrato que, muitas vezes, acabam sendo ignoradas durante fracionamentos clássicos. Neste contexto, surgem as substâncias **1-Qg**, **4-Db** e **5-Af/Bc** com massas exatas que propõe fórmulas moleculares para metabólitos ainda não reportados para tais espécies, bem como **2-Qg** que ainda não foi reportado como um metabólito secundário.

TABELA 4.4 – Substâncias e dados LC-HRMS/MS dos ligantes capturados dos extratos de *Q. grandiflora* (*Qg*), *D. burchellii* (*Db*), *A. falcata* (*Af*) e *B. coccolobifolia* (*Bc*).

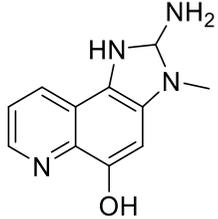
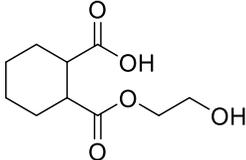
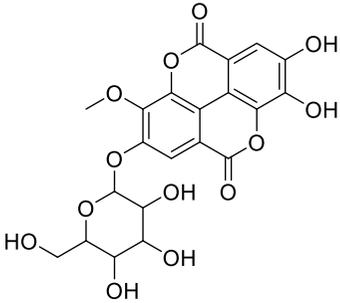
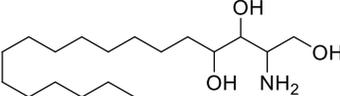
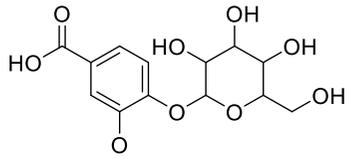
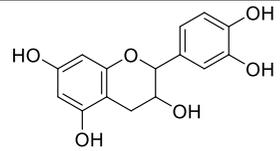
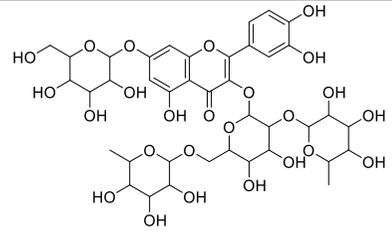
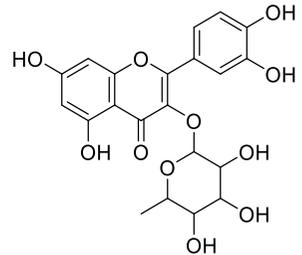
#	t _R (min)	Razão de afinidade	Substância	Íon precursor/ teórico [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Íons fragmento (m/z)
1-<i>Qg</i>	4,78	295,9	2-amino-3- metilimidazo [4,5- <i>f</i>]quinolin-5-ol	217,1075/ 217,1084	4,1	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O		103,0548, 115,0549, 130,0657, 144,0821, 158,0611, 174,0920, 188,1077, 200,1080
2-<i>Qg</i>	7,33	9,9	Ácido 2-((2-hidroxietoxi) carbonil)ciclohexa no carboxílico	217,1067/ 217,1071	1,7	C ₁₀ H ₁₆ O ₅		111,0446, 129,0548, 155,0710, 173,0818, 217,1082
3-<i>Qg</i>	9,07	1,2	Ácido 3- <i>O</i> -metil elágico 4- <i>O</i> - glicopiranosídeo	479,0808/ 479,0820	2,5	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃		145,0292, 173,0239, 201,0186, 229,0156, 257,0089, 285,0070, 317,0310
4-<i>Db</i>	18,60	1,5	Fitosfingosina	318,3009/ 318,3003	-1,9	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃		150,1122, 256,2648, 300,2912, 318,3015

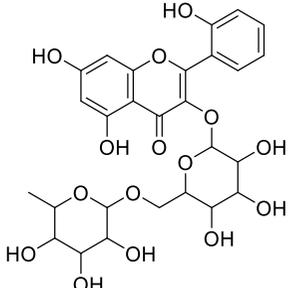
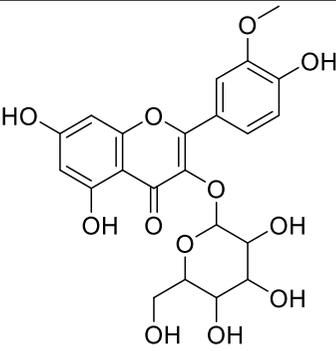
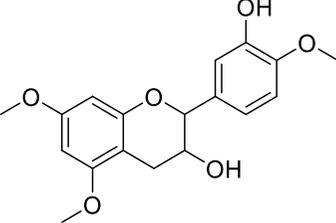
TABELA 4.4 - Continuação

#	t _R (min)	Razão de afinidade	Substância	Íon precursor [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Íons fragmento (m/z)
5-Af/Bc	2,49	1,8	Ácido vanílico 4-glicopiranosídeo	331,1066/ 331,1024	12,0	C ₁₄ H ₁₈ O ₉		104,9841, 114,9685, 120,9736, 148,0170, 150,9891, 169,0003*. 101,0058, 102,9662, 104,9833, 116,9831, 121,0893, 134,994**.
6-Bc	3,20	1,6	Catequina	291,0858/ 291,0863	1,8	C ₁₅ H ₁₄ O ₆		123,0448, 139,0399, 147,0446, 161,0596, 207,0673
7-Bc	3,48	1,7	Quercetina-3-(2G- rhamnosilrutinosil) -7-glicosídeo	919,2707/ 919,2714	0,8	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₅		303,0513, 465,1043, 627,1589
8-Bc	11,30	2,2	Quercetina-3-O- rhamnosídeo	449,1068/ 449,1078	2,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁		129,0557, 153,0192, 229,0509, 287,0559, 303,0515

*Fragmentos correspondentes ao íon m/z 169,0016 gerado na fonte de ionização a partir do composto **5-Af/Bc**.

** Fragmentos correspondentes ao íon m/z 134,9958 gerado na fonte de ionização a partir do composto **5-Af/Bc**.

TABELA 4.4 - Continuação

#	t _R (min)	Razão de afinidade	Substância	Íon precursor [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Íons fragmento (m/z)
9-Bc	11,30	2,2	Kaempferol-3- <i>O</i> - rutinosídeo	595,1645/ 595,1657	2,0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅		121,0298, 153,0193, 287,0565
10-Bc	12,29	2,1	Isoramnetina 3- <i>O</i> - galactosídeo	479,1169/ 479,1184	3,1	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂		127,0410, 153,0198, 229,0511, 274,0483, 317,0674
11-Bc	18,40	1,2	3-Hidroxi-5,7,4'- trimetoxi-flavan-3- ol	333,1323/ 333,1333	2,8	C ₁₈ H ₂₀ O ₆		109,0653, 122,0369, 137,0604, 147,0451, 167,0712

5 Conclusão

Para o monitoramento da atividade da *Tc*PEPCK, foi desenvolvido um método direto por LC-MS/MS para quantificação de PEP, que apresentou rapidez, sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade, além de minimizar os problemas dos ensaios acoplados. Este método foi imprescindível no acompanhamento de todas as etapas de purificação e, assim, após diversas propostas de purificação, a utilização de precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de troca aniônica e cromatografia de afinidade, levaram a um elevado nível de pureza da *Tc*PEPCK.

O método foi utilizado, ainda, para caracterização cinética da enzima; com valores de K_{Mapp} determinados para OAA e ATP, e aplicado para triagem de 34 pequenas moléculas, revelando 20 inibições e 14 ativações, com capacidade de identificar baixíssimos valores de inibição. Além disso, os ensaios acoplados com enzimas NADH-dependentes provaram ser impraticáveis para medidas de atividade com a *Tc*PEPCK, visto que uma baixa concentração de NADH levou à elevada inibição da mesma. Tal fato afirma, ainda mais, a importância do método direto aqui reportado. Igualmente, o método descrito pode ser de grande valia para PEPCKs de outras fontes.

A partir dos conhecimentos da enzima em solução, a mesma foi imobilizada em partículas magnéticas (*Tc*PEPCK-MB), que foram caracterizadas cineticamente a partir de um método direto por LC-MS/MS, na qual o K_{Mapp} foi determinado para o OAA a partir da quantificação de PEP. As inibições obtidas com a enzima em solução se confirmaram com às *Tc*PEPCK-MB para alguns ligantes testados e, então, foi possível modular ensaios de *ligand fishing* com estes ligantes, revelando o potencial dos biorreatores em realizar a captura seletiva dos mesmos.

Com os ensaios devidamente modulados, a *Tc*PEPCK-MB e o elevado nível de pureza obtido para a enzima, foram realizados ensaios de *ligand*

fishing, com extratos de quatro plantas do cerrado brasileiro e analisados por LC-HRMS(/MS), revelando 11 ligantes seletivos que tiveram suas estruturas inferidas a partir dos espectros de massa de alta resolução.

Contudo, a imobilização da *TcPEPCK* em partículas magnéticas permitiu a reutilização da enzima em diversos ensaios, além de necessitar de uma pequena quantidade de amostra dos analitos. O biorreator foi capaz de capturar ligantes seletivamente por afinidade sendo que, assim, a *TcPEPCK-MB* pode ser definida como uma ferramenta importante para a triagem de ligantes em coleções sintéticas combinatórias ou de extrato de produtos naturais, no processo de busca por novos ligantes.

6 Referências Bibliográficas

1. CALLENDER, R.; DYER, R. B. The Dynamical nature of enzymatic catalysis. *Acc. Chem. Res.* 48 (2): 407, 2015.
2. SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; PLACZEK, S.; SÖHNGEN, C.; ROTHER, M.; LANG, M.; MUNARETTO, C.; ULAS, S.; STELZER, M.; GROTE, A.; SCHEER, M.; SCHOMBURG, D. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Res.*, **41** : D764, 2013.
3. MARKOGLU, N.; WAINER, I. Chapter 7 Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: on-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery. In: *Handbook of Analytical Separations*, D. W. Ian (Ed.), **Volume 4** : 215, Elsevier Science B.V., 2003.
4. BEGLEY, T. P.; SILVERMAN, R. B. Enzyme inhibition. In: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, T. P. Begley (Ed.), 2008. doi:10.1002/9780470048672.wecb157.
5. HALL, M. D.; YASGAR, A.; PERYEA, T.; BRAISTED, J. C.; JADHAV, A.; SIMEONOV, A.; COUSSENS, N. P. Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review. *Methods Appl. Fluoresc.*, 4 (2): 22001, 2016.
6. BARTOLINI, M.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V. Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholine esterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery. *J. Chromatogr. A*, 1065 (1): 135, 2005.
7. MACARRÓN, R.; HERTZBERG, R. P. Design and implementation of high throughput screening assays. *Mol Biotechnol*, 47 (3): 270, 2011.
8. MACARRON, R.; HERTZBERG, R. P. Design and implementation of high throughput screening assays. In: *High Throughput Screening: Methods in Molecular Biology*, W.P. Janzen (Ed.), **vol 190**. Humana Press, 2009.
9. MALLENDER, W. D.; BEMBENEK, M.; DICK, L. R.; KURANDA, M.; LI, P.; MENON, S.; PARDO, E.; PARSONS, T. Biochemical assays for high-throughput screening. In: *High-throughput screening in drug discovery*, R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers & J. Hüser (Eds.), 2006. doi:10.1002/9783527609321.ch5.
10. INGLESE, J.; JOHNSON, R. L.; SIMEONOV, A.; XIA, M.; ZHENG, W.; AUSTIN, C. P.; AULD, D. S. High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat. Chem. Biol.*, 3 (8): 466, 2007.
11. SARKAR, J.; GUPTA, G.; KUMAR, G. Cryogels in high throughput processes. In: *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications*, A. Kumar (Ed.), CRC Press Inc., 2016.

12. CARAUS, I.; ALSUWAILEM, A. A.; NADON, R.; MAKARENKO, V. Detecting and overcoming systematic bias in high-throughput screening technologies: a comprehensive review of practical issues and methodological solutions. *Brief Bioinform.*, 16 (6): 974, 2015.
13. SUNDBERG, S. A. High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11 (1): 47, 2000.
14. YASMEEN, G.; IBRAHIM, M.; BALRAM, V. M.; PASHA, S. I.; RAHMAN, S.; ABID, M. Miniaturization in rational drug design of pharmaceuticals – a review. *Orient. J. Chem.*, 32 (2): 1265, 2016.
15. HOUSTON, J. G.; BANKS, M. The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8 (6): 734, 1997.
16. HANSON, J. R. The classes of natural product and their isolation. In: *Natural Products: The Secondary Metabolites*, E. W. Abel (Ed.), 2003. doi: 10.1039/9781847551535-00001.
17. WANG, J.; GAO, L.; LEE, Y. M.; KALESH, K. A.; ONG, Y. S.; LIM, J.; JEE, J. E.; SUN, H.; LEE, S. S.; HUA, Z. C.; LIN, Q. Target identification of natural and traditional medicines with quantitative chemical proteomics approaches. *Pharmacol. Ther.*, **162** : 10, 2016.
18. GUO, J.; LIN, H.; WANG, J.; LIN, Y.; ZHANG, T.; JIANG, Z. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **165** : 182, 2019.
19. LAU, E. C.; MASON, D. J.; EICHHORST, N.; ENGELDER, P.; MESA, C.; KITHSIRI WIJERATNE, E. M.; GUNATHERATH, G.; LESLIE GUNATILAKA, A. A.; LA CLAIR, J. J.; CHAPMAN, E. Functional chromatographic technique for natural product isolation. *Org. Biomol. Chem.*, 13 (8): 2255, 2015.
20. KANG, M. J.; WU, T.; WIJERATNE, E. M.; LAU, E. C.; MASON, D. J.; MESA, C.; TILLOTSON, J.; ZHANG, D. D.; GUNATILAKA, A. A.; LA CLAIR, J. J.; CHAPMAN, E. Functional chromatography reveals three natural products that target the same protein with distinct mechanisms of action. *ChemBioChem*, 15 (14): 2125, 2014.
21. ZHENG, X.; LI, Z.; BEERAM, S.; PODARIU, M.; MATSUDA, R.; PFAUNMILLER, E. L.; WHITE II, C. J.; CARTER, N.; HAGE, D. S. Analysis of biomolecular interactions using affinity microcolumns: a review. *J. Chromatogr. B*, **968** : 49, 2014.
22. 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, 2009.

23. HAGE, D. S.; ANGUIZOLA, J. A.; BI, C.; LI, R.; MATSUDA, R.; PAPASTAVROS, E.; PFAUNMILLER, E.; VARGAS, J.; ZHENG, X. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **69** : 93, 2012.
24. HAGE, D. S. High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 768 (1): 3, 2002.
25. ACIKARA, Ö. B.; ÇITOĞLU, G. S.; ÖZBILGIN, S.; ERGENE, B. Affinity chromatography and importance in drug discovery. In: *Column Chromatography*, D. Martin (Ed.), 2013. doi: 10.5772/55781.
26. LABROU, N. E. Design and selection of ligands for affinity chromatography. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 790 (1–2): 67, 2003.
27. CUATRECA, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 61 (2): 636, 1968.
28. AFFINITY CHROMATOGRAPHY. Principles and methods. *Handbooks from GE Healthcare*. 18-1022-29 AE 10/2007.
29. PFAUNMILLER, E. L.; PAULEMOND, M. L.; DUPPER, C. M.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (7): 2133, 2013.
30. BERTUCCI, C.; BARTOLINI, M.; GOTTI, R.; 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, 2003.
31. DE 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, 2014.
32. HAGE, D. S.; ANGUIZOLA, J. A.; LI, R.; MATSUDA, R.; PAPASTAVROS, E.; PFAUNMILLER, E.; SOBANSKY, M.; ZHENG, X. Chapter 1 - Affinity chromatography. In: *Liquid Chromatography: Applications*, S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. Schoenmakers & D. Lloyd (Eds.), 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-415806-1.00001-2.
33. DRACZKOWSKI, P.; MATOSIUK, D.; JOZWIAK, K. Affinity chromatography as a tool for quantification of interactions between drug molecules and their protein targets. In: *Affinity chromatography*, S. Magdeldin (Ed.), 2012. doi: 10.5772/36282.
34. FU, Y.; LUO, J.; QIN, J.; YANG, M. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **168** : 189, 2019.

35. VANZOLINI, K. L.; VIEIRA, L. C. C.; CORREA, A. G.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry: an on-flow tool for ligand screening. *J. Med. Chem.*, **56** (5): 2038, 2013.
36. 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, 2013.
37. DE SIMONE, A.; NALDI, M.; BARTOLINI, M.; DAVANI, L.; ANDRISANO, V. Immobilized enzyme reactors: an overview of applications in drug discovery from 2008 to 2018. *Chromatographia*, **82** (1): 425, 2019.
38. ZHANG, C.; RODRIGUEZ, E.; BI, C.; ZHENG, X.; SURESH, D.; SUH, K.; LI, Z.; ELSEBAEI, F.; HAGE, D. S. High performance affinity chromatography and related separation methods for the analysis of biological and pharmaceutical agents. *Analyst*, **143** (2): 374, 2018.
39. CIESLA, L.; MOADDEL, R. Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **33** (10): 1131, 2016.
40. ZHANG, Y.; WANG, Q.; LIU, R.; ZHOU, H.; CROMMEN, J.; MOADDEL, R.; JIANG, Z.; ZHANG, T. Rapid screening and identification of monoamine oxidase-A inhibitors from *Corydalis Rhizome* using enzyme-immobilized magnetic beads based method. *J. Chromatogr. A*, **1592** : 1, 2019.
41. ZHANG, G.; GUO, X.-H.; WANG, S.-S.; LI, Y.-Q.; LI, G.-Z.; ZHAO, W.-J. Screening and identification of natural ligands of tyrosinase from *Pueraria lobata* Ohwi by a combination of ultrafiltration and LC-MS. *Anal. Methods*, **9** : 4858, 2017.
42. CHEN, G.; WU, J.; GUO, M. Screening for anti-proliferative and anti-inflammatory components from *Rhamnus davurica* Pall. using bio-affinity ultrafiltration with multiple drug targets. *Anal. Bioanal. Chem.*, **410** (15): 3587, 2018.
43. ZHANG, H.; ZHANG, X.; JIANG, H.; XU, C.; TONG, S.; YAN, J. Screening and identification of α -glucosidase inhibitors from Shenqi Jiangtang Granule by ultrafiltration liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, **41** (3): 7975, 2018.
44. WANG, L.; LIU, S.; XING, J.; LIU, Z.; SONG, F. Characterization of interaction property of multi-components in *Gardenia jasminoides* with aldose reductase by microdialysis combined with liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **30** : 87, 2016.

45. LIU, Z.; LIU, M.; QI, Y.; ZHU, Z.; CHAI, Y.; YUAN; C.; LIN; Y. Plasma pharmacochemistry combined with microdialysis to screen potential bioactive components and their metabolites in *Anemarrhena asphodeloides* saponin extract using ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 36 (9–10):1659, 2013.
46. WANG, H.; ZHAO, X.; WANG, S.; TAO, S.; AI, N.; WANG, Y. Fabrication of enzyme-immobilized halloysite nanotubes for affinity enrichment of lipase inhibitors from complex mixtures. *J. Chromatogr. A*, **1392** : 20, 2015.
47. HU, Q.; BU, Y.; ZHEN, X.; XU, K.; KE, R.; XIE, X.; WANG, S. Magnetic carbon nanotubes camouflaged with cell membrane as a drug discovery platform for selective extraction of bioactive compounds from natural products. *Chem. Eng. J.*, **364** : 269, 2019.
48. 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, 2018.
49. TAO, Y.; JIANG, Y.; LI, W.; CAI, B. Zeolite based solid-phase extraction coupled with UPLC-Q-TOF-MS for rapid analysis of acetylcholinesterase binders from crude extract of *Corydalis yanhusuo*. *RSC Adv.*, 6 (100): 98476, 2016.
50. LIU, X.; HU, S.; CHEN, X.; BAI, X. Hollow fiber cell fishing with high-performance liquid chromatography for rapid screening and analysis of an antitumor-active protoberberine alkaloid group from *Coptis chinensis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **98** : 463, 2014.
51. ZHANG, L. S.; CHEN, X.; HU, S.; SHENG, X.; BAI, X. H. Rapid screening of different types of antitumor compound groups from traditional chinese medicine by hollow fiber cell fishing with high performance liquid chromatography. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 17 (10): 827, 2014.
52. WU, G. F.; JIANG, X. L.; GONG, Y. Z.; HU, Y. D.; BAI, X. L.; LIAO, X. Ligand fishing of anti-neurodegenerative components from *Lonicera japonica* using magnetic nanoparticles immobilised with monoamine oxidase B. *J. Sep. Sci.*, 42 (6): 1289, 2019.
53. MARSZALL, M. P.; SROKA, W. D.; SIKORA, A.; CHELMINIAK, D.; ZIEGLER-BOROWSKA, M.; SIODMIAK, T.; MOADDEL, R. Ligand fishing using new chitosan based functionalized Androgen Receptor magnetic particles. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **127** : 129, 2016.

54. 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.*, 411 (10): 1989, 2019.
55. 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): 1516, 2016.
56. FIRER, M. A. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49 (1–3): 433, 2001.
57. WUBSHET, S. G.; BRIGHENTE, I. M.; MOADDEL, R.; STAERK, D. Magnetic ligand fishing as a targeting tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -glucosidase inhibitory ligands and alkylresorcinol glycosides from *Eugenia catharinae*. *J. Nat. Prod.*, 78 (11): 2657, 2015.
58. WUBSHET, S. G.; LIU, B.; KONGSTAD, K. T.; BÖCKER, U.; PETERSEN, 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 complementary inhibition and affinity profiles. *Talanta*, 200 : 279, 2019.
59. GKANTZOU, E.; PATILA, M.; STAMATIS, H. Magnetic microreactors with immobilized enzymes – from assemblage to contemporary applications. *Catalysts*, 8 (7): 282, 2018.
60. FERNANDES, P. Miniaturization in biocatalysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 11 (3): 858, 2010.
61. CLOUTHIER, C. M.; PELLETIER, J. N. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.*, 41 (4): 1585, 2012.
62. PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Chiral Catal.*, 252 (5–7): 659, 2008.
63. SVEC, F. Less common applications of monoliths: I. Microscale protein mapping with proteolytic enzymes immobilized on monolithic supports. *Electrophoresis*, 27 (5–6): 947, 2006.
64. SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.*, 349 (8–9): 1289, 2007.
65. GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 819 (1): 3, 2005.
66. NICOLI, R.; BARTOLINI, M.; RUDAZ, S.; ANDRISANO, V.; VEUTHEY, J. L. Development of immobilized enzyme reactors based on human recombinant cytochrome P450 enzymes for phase I drug metabolism studies. *J. Chromatogr. A*, 1206 (1): 2, 2008.

67. YAO, C.; QI, L.; QIAO, J.; ZHANG, H.; WANG, F.; CHEN, Y.; YANG, G. High-performance affinity monolith chromatography for chiral separation and determination of enzyme kinetic constants. *Talanta*, 82 (4): 1332, 2010.
68. HAGE, D. S.; CAZES, J. *Handbook of Affinity Chromatography*. 2nd. ed., CRC Press, 2005.
69. DE MORAES, M. C.; TEMPORINI, C.; CALLERI, E.; BRUNI, G.; DUCATI, R. G.; SANTOS, D. S.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B.; MASSOLINI, G. Evaluation of capillary chromatographic supports for immobilized human purine nucleoside phosphorylase in frontal affinity chromatography studies. *J. Chromatogr. A*, **1338** : 77, 2014.
70. WOOD, H. G.; WERKMAN, C. H. The utilisation of CO₂ in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria. *Biochem. J.*, 30 (1): 48, 1936.
71. WOOD, H. G.; WERKMAN, C. H. The utilization of CO₂ by the propionic acid bacteria1. *Biochem. J.*, 32 (7): 1262, 1938.
72. WOOD, H. G.; WERKMAN, C. H. The fixation of CO₂ by cell suspensions of *Propionibacterium pentosaceum*1. *Biochem. J.*, 34 (1): 7, 1940.
73. UTTER, M. F.; KURAHASHI, K. Mechanism of action of oxalacetic carboxylase from liver. *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (3): 758, 1953.
74. SINGLA, S. K. Nomenclature of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem. J.*, 248 (2): 623, 1987.
75. KURAHASHI, K. The discovery of P-enolpyruvate carboxykinase. In: *Comprehensive Biochemistry: Selected Topics in the History of Biochemistry*, G. Semenza (Ed.), Elsevier Science, vol. 36 : 71, 1986.
76. VILLARREAL, J. M.; BUENO, C.; ARENAS, F.; JABALQUINTO, A. M.; GONZALEZ-NILO, F. D.; ENCINAS, M. V; CARDEMIL, E. Nucleotide specificity of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase - kinetics, fluorescence spectroscopy, and molecular simulation studies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38 (4): 576, 2006.
77. TRAPANI, S.; LINSS, J.; GOLDENBERG, S.; FISCHER, H.; CRAIEVICH, A. F.; OLIVA, G. Crystal structure of the dimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from *Trypanosoma cruzi* at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 313 (5): 1059, 2001.
78. MATTE, A.; TARI, L. W.; GOLDIE, H.; DELBAERE, L. T. J. Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.*, 272 (13): 8105, 1997.
79. CARLSON, G. M.; HOLYOAK, T. Structural insights into the mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis. *J. Biol. Chem.*, 284 (40): 27037, 2009.
80. URBINA, J. A. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, 10 (3): 107, 1994.

81. CAZZULO, J. J.; DECAZZULO, B. M. F.; ENGEL, J. C.; CANNATA, J. J. B. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16 (3): 329, 1985.
82. CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J.*, 6 (13): 3153, 1992.
83. MAUGERI, D. A.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Essays Biochem.*, **51** : 15, 2011.
84. CAZZULO, J. J. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26 (2): 157, 1994.
85. URBINA, J. A.; OSORNO, C. E.; ROJAS, A. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopycolinic acid – in vitro and in vivo studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 282 (1): 91, 1990.
86. AMALORPAVAM, J.; EBENEZER, G. A. I. Insilico docking analysis of kaempherol and luteolin against diabetic drug target PEPCK1. *Int. J. Pharma Bio Sci.*, 5 (4): 601, 2014.
87. LINSS, J.; GOLDENBERG, S.; URBINA, J. A.; AMZEL, L. M. Cloning and characterization of the gene encoding ATP-dependent phospho-enol-pyruvate carboxykinase in *Trypanosoma cruzi*: comparison of primary and predicted secondary structure with host GTP-dependent enzyme. *Gene*, 136 (1–2): 69, 1993.
88. ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARAES, A. C. R.; DA SILVA ZABALA CAPRILES, P. V.; DARDENNE, L. E.; DEGRAVE, W. M. A new approach for potential drug target discovery through in silico metabolic pathway analysis using *Trypanosoma cruzi* genome information. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104 (8): 1100, 2009.
89. CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.*, **2014** : 1, 2014.
90. CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J. Biomol. Screen.*, 20 (1): 22, 2015.
91. UTTER, M. F.; KURAHASHI, K. Mechanism of action of oxalacetic carboxylase. *J. Biol. Chem.*, 207 (2): 821, 1954.
92. BANDURSKI, R. S.; LIPMANN, F. Studies on an oxalacetic carboxylase from liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 219 (2): 741, 1956.
93. LANE, M. D.; CHANG, H. C.; MILLER, R. S. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from pig liver mitochondria. *Methods Enzymol.*, **13** : 270, 1969.
94. BERNDT, J.; ULBRICH, O. A simplified method for determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. *Anal. Biochem.*, **34** : 282, 1970.

95. LATORRE-MURO, P.; BAEZA, J.; ARMSTRONG, E. A.; HURTADO-GUERRERO, R.; CORZANA, F.; WU, L. E.; SINCLAIR, D. A.; LOPEZ-BUESA, P.; CARRODEGUAS, J. A.; DENU, J. M. Dynamic acetylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase toggles enzyme activity between gluconeogenic and anaplerotic reactions. *Mol. Cell*, 71 (5): 718, 2018.
96. REYES-RAMOS, C. A.; PEREGRINO-URIARTE, A. B.; COTA-RUIZ, K.; VALENZUELA-SOTO, E. M.; LEYVA-CARRILLO, L.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic and mitochondrial isoforms are expressed and active during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, **226** : 1, 2018.
97. FAMIANI, F.; PAOLETTI, A.; PROIETTI, P.; BATTISTELLI, A.; MOSCATELLO, S.; CRUZ-CASTILLO, J. G.; WALKER, R. P. The occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in the pericarp of different grapevine genotypes and in grape leaves and developing seeds. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 93 (5): 456, 2018.
98. FAMIANI, F.; BALDICCHI, A.; CASULLI, V.; DI VAIO, C.; CRUZ-CASTILLO, J. G.; WALKER, R. P. The occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and enzymes related to photosynthesis and organic acid/nitrogen metabolism in apricot flowers (*Prunus armeniaca* L.). *Acta Physiol. Plant.*, **39** : 260, 2017.
99. RAMNATH; DUTTA, A. K.; DKHAR, B.; TANDON, V.; DAS, B. Biological significance of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a cestode parasite, *Raillietina echinobothrida* and effect of phytoestrogens on the enzyme from the parasite and its host, *Gallus domesticus*. *Parasitology*, 144 (9): 1264, 2017.
100. LIU, R.; WANG, Y.; QIN, G.; TIAN, S. Molecular basis of 1-methylcyclopropene regulating organic acid metabolism in apple fruit during storage. *Postharvest Biol. Technol.*, **117** : 57, 2016.
101. DUTTA; A. K.; RAMNATH; TANDON; V.; DAS, B. Biocomputational analysis of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Raillietina echinobothrida* , a cestode parasite, and its interaction with possible modulators. *Parasitology*, **143** (3): 300, 2016.
102. KOTEYEVA, N. K.; VOZNESENSKAYA, E. V; EDWARDS, G. E. An assessment of the capacity for phosphoenolpyruvate carboxykinase to contribute to C-4 photosynthesis. *Plant Sci.*, **235** : 70, 2015.
103. KREBS, A.; BRIDGER, W. A. On the monomeric structure and proposed regulatory properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli*. *Can. J. Biochem.*, 54 (1): 22, 1976.
104. WRIGHT, J. A.; SANWAL, B. D. Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric effectors II. Control of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Bio. Chem.*, 244 (7): 1838, 1969.

105. KRUGER, N. J. Errors and artifacts in coupled spectrophotometric assays of enzyme activity. *Phytochemistry*, 38 (5): 1065, 1995.
106. BISSWANGER, H. Enzyme assays. *Report. Enzymol. Data – STRENDA Recomm. Beyond*, 1 (1–6): 41, 2014.
107. DUFF, D. A.; SNELL, K. Limitations of commonly used spectrophotometric assay methods for phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in crude extracts of muscle. *Biochem. J.*, 206 (1): 147, 1982.
108. HATCH, M. D. Assay for PEP carboxykinase in crude tissue extracts. *Anal. Biochem.*, 52 (1): 280, 1973.
109. AGUILAR, Z.; URBINA, J. A. The phosphofructokinase of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* - purification and kinetic mechanism. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 21 (2): 103, 1986.
110. URBINA, J. A. The phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes - molecular, kinetic, and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 258 (1): 186, 1987.
111. JURADO, L. A.; MACHIN, I.; URBINA, J. A. *Trypanosoma cruzi* phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP-dependent): transition metal ion requirement for activity and sulfhydryl group reactivity. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1292 (1): 188, 1996.
112. CYMERYNG, C.; CAZZULO, J. J.; CANNATA, J. J. B. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma cruzi* - purification and physicochemical and kinetic properties. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 73 (1–2): 91, 1995.
113. VIEIRA, L. C. C.; PAIXÃO, M. W.; CORRÊA, A. G. Green synthesis of novel chalcone and coumarin derivatives via Suzuki coupling reaction. *Tetrahedron Lett.*, 53 (22): 2715, 2012.
114. MONTEIRO, J. L.; MOREIRA, N. M.; DOS SANTOS, D. A.; PAIXAO, M. W.; CORREA, A. G. Step economy strategy for the synthesis of amphoteric aminoaldehydes, key intermediates for reduced hydantoins. *Pure Appl. Chem.*, 90 (1) :121–132, 2018.
115. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680, 1970.
116. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 (1–2): 248, 1976.
117. CARDOSO, C. L.; LIMA, V. V.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; WAINER, I. W.; MOADDEL, R.; CASS; Q. B. Development and characterization of an immobilized enzyme reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies. *J. Chromatogr. A*, 1120 (1–2): 151, 2006.

118. CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; WAINER, I. W.; CASS, Q. B. The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: the effect of species' specific differences on the immobilization. *Analyst*, 133 (1): 93, 2008.
119. PETROSINO, T.; PETROSINO, T. Matrix effect in F₂-isoprostanes quantification by HPLC-MS/MS: a validated method for analysis of iPF_{2 α} -III and iPF_{2 α} -VI in human urine. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **965** : 100, 2014.
120. KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part II. *Anal. Chim. Acta*, **870** : 8, 2015.
121. MARUYAMA, H.; EASTERDA, R. L.; CHANG, H. C.; LANE, M. D. Enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. I. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.*, 241 (10): 2405, 1966.
122. OPIE, L. H.; NEWSHOLM, E. Activities of fructose 1,6-diphosphatase phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem. J.*, 103 (2): 391, 1967.
123. BENTLE, L. A.; LARDY, H. A. Interaction of anions and divalent metal-ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.*, 251 (10): 2916, 1976.
124. CHEN, Z. H.; WALKER, R. P.; ACHESON, R. M.; LEEGOOD, R. C. Phosphoenolpyruvate carboxykinase assayed at physiological concentrations of metal ions has a high affinity for CO₂. *Plant Physiol.*, 128 (1): 160, 2002.
125. DAS, B.; RAMNATH; DUTTA, A. K.; TANDON, V. Differential kinetics at PK/PEPCK branch point in the cestode, *Raillietina echinobothrida*. *Exp. Parasitol.*, **153** : 151, 2015.
126. MACHOVA, I.; SNASEL, J.; DOSTAL, J.; BRYNDA, J.; FANFRLIK, J.; SINGH, M.; TARABEK, J.; VANEK, O.; BEDNAROVA, L.; PICOVA, I. Structural and functional studies of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 10 (3): 1, 2015.
127. LWIN, A.; PATEL, B. A. High performance liquid chromatography method for the detection of released purinergic and biogenic amine signaling molecules from in vitro ileum tissue. *J. Sep. Sci.*, 33 (11): 1538, 2010.
128. KAWAMOTO, Y.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M.; HAGINAKA, J. Determination of ATP and its metabolites released from rat caudal artery by isocratic ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 262 (1): 33, 1998.

129. ALLY, A.; PARK, G. Rapid-determination of creatine, phosphocreatine, purine-bases and nucleotides (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP) in heart biopsies by gradient ion-pair reversed-phase liquid-chromatography. *J. Chromatogr. Appl.*, 575 (1): 19, 1992.
130. DE MORAES, M. C.; DUCATI, R. G.; DONATO, A. J.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: a new approach for ligands identification and characterization. *J. Chromatogr. A*, **1232** : 110, 2012.
131. RODRIGUES, M. V. N.; CORRÊA, R. S.; VANZOLINI, K. L.; SANTOS, D. S.; BATISTA, A. A.; CASS, Q. B. Characterization and screening of tight binding inhibitors of xanthine oxidase: an on-flow assay. *RSC Adv.*, 5 (47): 37533, 2015.
132. DA SILVA, J. I.; DE MORAES, M. C.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; CASS, Q. B.; CARDOSO, C. L. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **73** : 44, 2013.
133. MODENEZ, I. A.; SASTRE, D. E.; MOARES, F. C.; MARQUES NETTO, C. G. C. Influence of glutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase B from *Candida antarctica* for transesterification of soy bean oil. *Molecules*, 23 (9): 2230, 2018.
134. MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37 (5): 790, 2004.
135. LUO, B.; GROENKE, K.; TAKORS, R.; WANDREY, C.; OLDIGES, M. Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1147 (2): 153, 2007.
136. 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, 2009.
137. CHUI, W. K.; WAN, L. S. C. Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *J. Microencapsul.*, 14 (1): 51, 1997.
138. RISSO, F. V. A.; MAZUTTI, M. A.; COSTA, F.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic solutions. *Brazilian J. Chem. Eng.*, 27 (4): 507, 2010.

139. RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, 42 (15): 6290, 2013.
140. MATTE, A.; GOLDIE, H.; SWEET, R. M.; DELBAERE, L. T. J. Crystal structure of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase: a new structural family with the P-loop nucleoside triphosphate hydrolase fold. *J. Mol. Biol.*, 256 (1): 126, 1996.
141. 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, 2015.
142. TRAPANI, S. Estudos estruturais da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) de *Trypanosoma cruzi*, um potencial alvo para o planejamento de drogas antichagásicas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - USP, 2001. Tese de doutorado, 186 p.
143. THE BRENDA ENZYME DATABASE. System Information on EC 4.1.1.49 - phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP). <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=4.1.1.49#INHIBITORS>. Acesso em: 23 Jun. de 2018.
144. FOLEY, L. H.; WANG, P.; DUNTEN, P.; RAMSEY, G.; GUBLER, M. L.; WERTHEIMER, S. J. X-ray structures of two xanthine inhibitors bound to PEPCK and N-3 modifications of substituted 1,8-dibenzylxanthines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (21): 3871, 2003.
145. PIETRANICO, S. L.; FOLEY, L. H.; HUBY, N.; YUN, W.; DUNTEN, P.; VERMEULEN, J.; WANG, P.; TOTH, K.; RAMSEY, G.; GUBLER, M. L.; WERTHEIMER, S. J. C-8 Modifications of 3-alkyl-1,8-dibenzylxanthines as inhibitors of human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17 (14): 3835, 2007.
146. COPELAND, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*, John Wiley & Sons, Inc., 2013. doi:10.1002/9781118540398.
147. DO AMARAL, B. S.; CORREA, K. C. S.; CORRÊA, A. G.; DE SOUZA, D. H. F.; CASS, Q. B. Direct assay to evaluate phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, 30 (10): 2105, 2019.
148. CIULLI, A.; ABELL, C. Fragment-based approaches to enzyme inhibition. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18 (6): 489, 2007.
149. SCOTT, D. E.; COYNE, A. G.; HUDSON, S. A.; ABELL, C. Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. *Biochemistry*, 51 (25): 4990, 2012.

150. CORDEIRO, T. M.; BORGHETTI, F.; CALDAS OLIVEIRA, S. C.; BASTOS, I. M. D.; DE SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; CHARNEAU, S. Brazilian Cerrado *Qualea grandiflora* Mart. leaves exhibit antiplasmodial and trypanocidal activities *In vitro*. *Pharmacogn. Mag.*, 13 (52): 668, 2017.
151. DE SOUSA, L. R. F.; RAMALHO, S. D.; BURGER, M. C. M.; NEBO, L.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; IEMMA, M. R. C.; CORRÊA, C. J.; DE SOUZA, D. H. F.; LIMA, M. I. S.; VIEIRA, P. C. Isolation of arginase inhibitors from the bioactivity-guided fractionation of *Byrsonima coccolobifolia* leaves and stems. *J. Nat. Prod.*, 77 (2): 392, 2014.
152. NASSER, A. L.; CARLI, C. B.; RODRIGUES, C. M.; MAIA, D. C.; CARLOS, I. Z.; EBERLIN, M. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Identification of ellagic acid derivatives in methanolic extracts from *Qualea* species. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.*, 63 (11–12): 794, 2008.
153. CARNEVALE NETO, F.; SIQUITELLI, C. D.; PILON, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I. Dereplication of phenolic derivatives of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae) using liquid chromatography coupled with ESI-QToF-MS/MS. *J. Braz. Chem. Soc.*, 24 : 758, 2013.
154. LAKSHMI, V. M.; HSU, F.-F.; ZENSER, T. V. Identification of new 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline urinary metabolites from β -naphthoflavone-treated mice. *Drug Metab. Dispos.*, 37 (8): 1690, 2009.
155. HSU, F.-F.; LAKSHMI, V. M.; ZENSER, T. V. Characterization of new metabolites from *in vivo* biotransformation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in mouse by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 44 (9): 1359, 2009.
156. KONDO, N.; OHNO, Y.; YAMAGATA, M.; OBARA, T.; SEKI, N.; KITAMURA, T.; NAGANUMA, T.; KIHARA, A. Identification of the phytosphingosine metabolic pathway leading to odd-numbered fatty acids. *Nat. Commun.*, 5 : 5338, 2014.
157. CALIXTO, N. O.; CORDEIRO, M. S.; GIORNO, T. B. S.; OLIVEIRA, G. G.; LOPES, N. P.; FERNANDES, P. D.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Chemical constituents of *Psychotria nemorosa* Gardner and antinociceptive activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, 28 : 707, 2017.
158. GHAREEB, M. A.; SOBEH, M.; REZQ, S.; EL-SHAZLY, A. M.; MAHMOUD, M. F.; WINK, M. HPLC-ESI-MS/MS profiling of polyphenolics of a leaf extract from *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) and its anti-inflammatory, anti-nociceptive, and antipyretic activities *in vivo*. *Molecules*, 23 (12): 3238, 2018.

159. BALLESTEROS-VIVAS, D.; ALVAREZ-RIVERA, G.; IBÁÑEZ, E.; PARADA-ALFONSO, F.; CIFUENTES, A. Integrated strategy for the extraction and profiling of bioactive metabolites from *Passiflora mollissima* seeds combining pressurized-liquid extraction and gas/liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1595** : 144, 2019.
160. ARAÚJO, R. G.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; RUIZ, H. A.; PINTADO, M. M. E.; AGUILAR, C. N. Avocado by-products: nutritional and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.*, **80** : 51, 2018.
161. FRAIGE, K.; DAMETTO, A. C.; ZERAIK, M. L.; DE FREITAS, L.; SARAIVA, A. C.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Phytochem. Anal.*, **29** (2): 196, 2018.
162. RODRIGUES, P. A.; MORAIS, S. M.; SOUZA, C. M.; MAGALHÃES, D. V.; VIEIRA, Í. G. P.; ANDRADE, G. M.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **84** : 113, 2012.
163. BERGER, I.; BARRIENTOS, A. C.; CACERES, A.; HERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C. M.; KUBELKA, W. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol.*, **62** (2): 107, 1998.
164. GUILHON-SIMPLICIO, F.; MACHADO, T. M.; DO NASCIMENTO, L. F.; SOUZA, R. D. S.; KOOLEN, H. H. F.; DA SILVA, F. M. A.; ACHO, L. D. R.; DOS SANTOS, A. R. S.; COS, P.; PEREIRA, M. M.; LIMA, E. S. Chemical composition and antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of four Amazonian *Byrsonima* species. *Phytother. Res.*, **31** (11): 1686, 2017.
165. AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. *Phytochemistry*, **66** (19): 2388, 2005.
166. COZZA, G.; BONVINI, P.; ZORZI, E.; POLETTO, G.; PAGANO, M. A.; SARNO, S.; DONELLA-DEANA, A.; ZAGOTTO, G.; ROSOLEN, A.; PINNA, L. A.; MEGGIO, F.; MORO, S. Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application. *J. Med. Chem.*, **49** (8): 2363, 2006.
167. WANG, B. H.; LU, Z. X.; POLYA, G. M. Inhibition of eukaryote serine/threonine-specific protein kinases by piceatannol. *Planta Med.*, **64** (3): 195, 1998.

168. WU, W. I.; CARMAN, G. M. Kinetic analysis of sphingoid base inhibition of yeast phosphatidate phosphatase. *Methods Enzym.*, **312** : 373, 2000.
169. PAULUS, J. K.; FORSTER, K.; GROTH, G. Direct and selective small-molecule inhibition of photosynthetic PEP carboxylase: new approach to combat C4 weeds in arable crops. *FEBS Lett.*, 588 (12): 2101, 2014.
170. CHOLLET, R.; VIDAL, J.; O'LEARY, M. H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **47** : 273, 1996.
171. PAIROBA, C. F.; COLOMBO, S. L.; ANDREO, C. S. Flavonoids as inhibitors of NADP-malic enzyme and PEP carboxylase from C4 plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60 (5): 779, 1996.

Apêndice

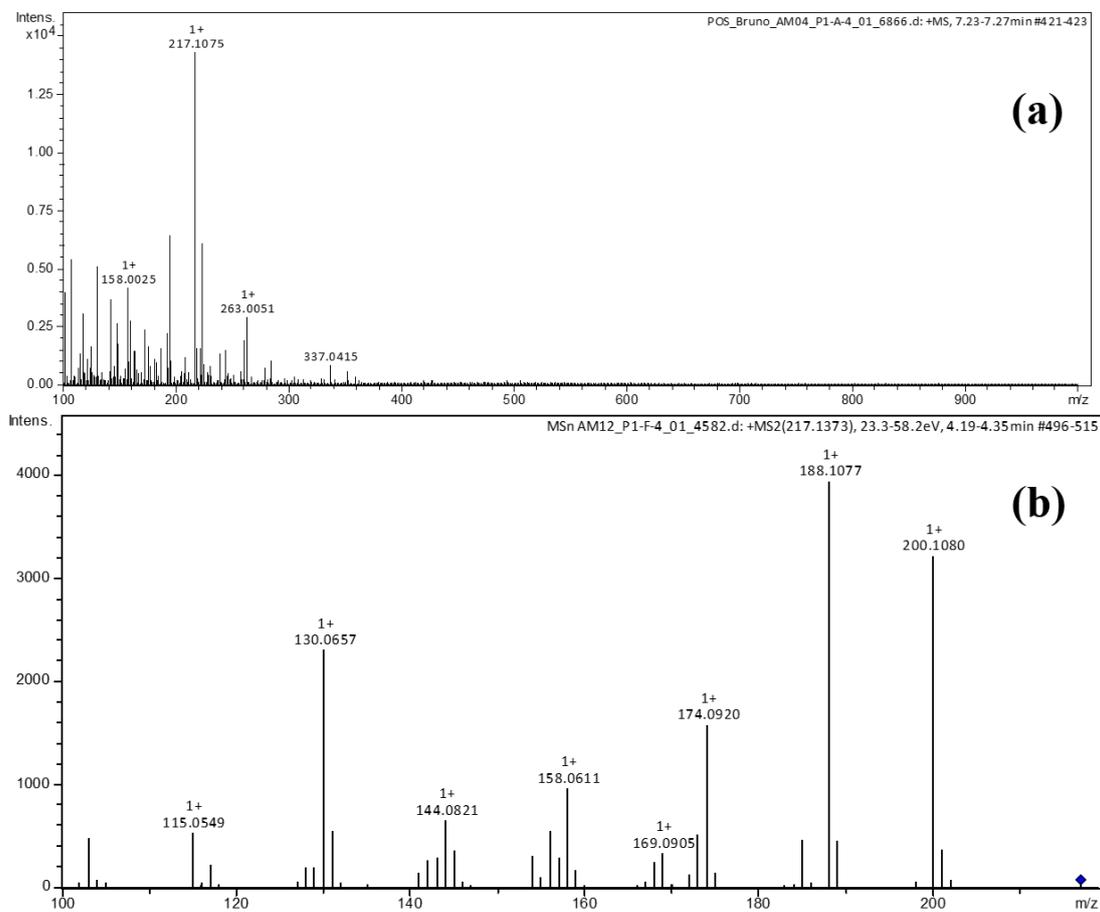


FIGURA A.1 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **1-Qg**, obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) MS^2 do íon m/z 217,1 através do modo auto MS/MS.

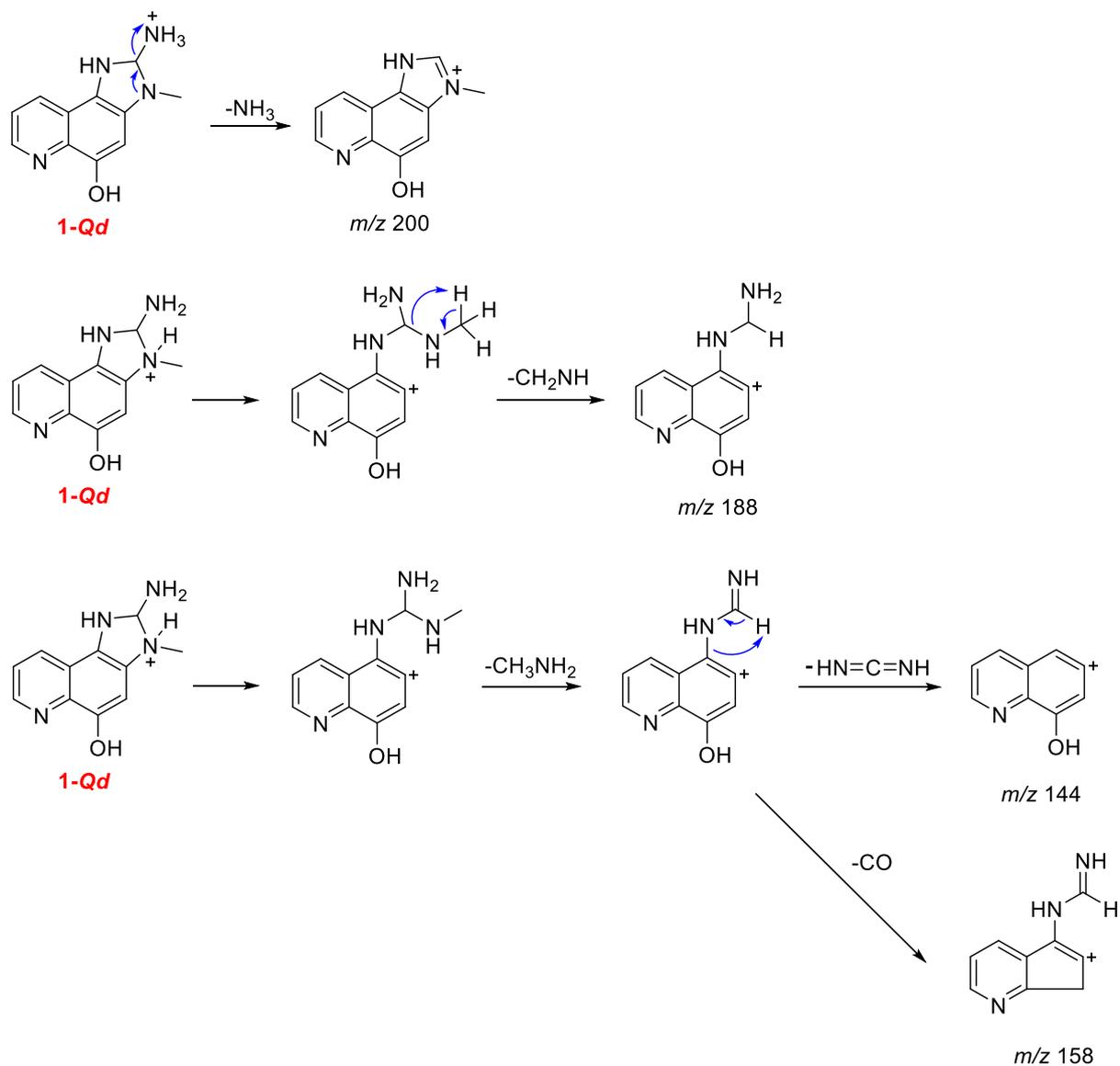


FIGURA A.2 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 217,1 correspondente ao composto **1-Qg**.

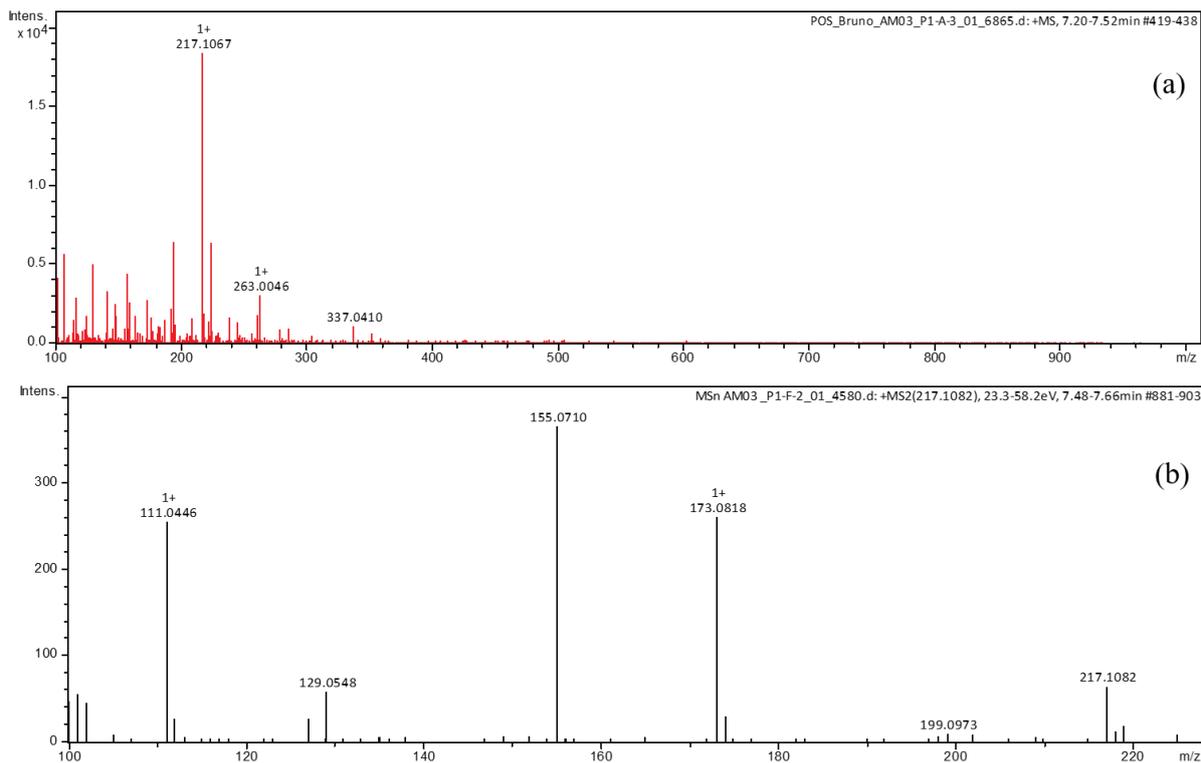


FIGURA A.3 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **2-Qg**, obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) MS^2 do íon m/z 217,1 através do modo auto MS/MS.

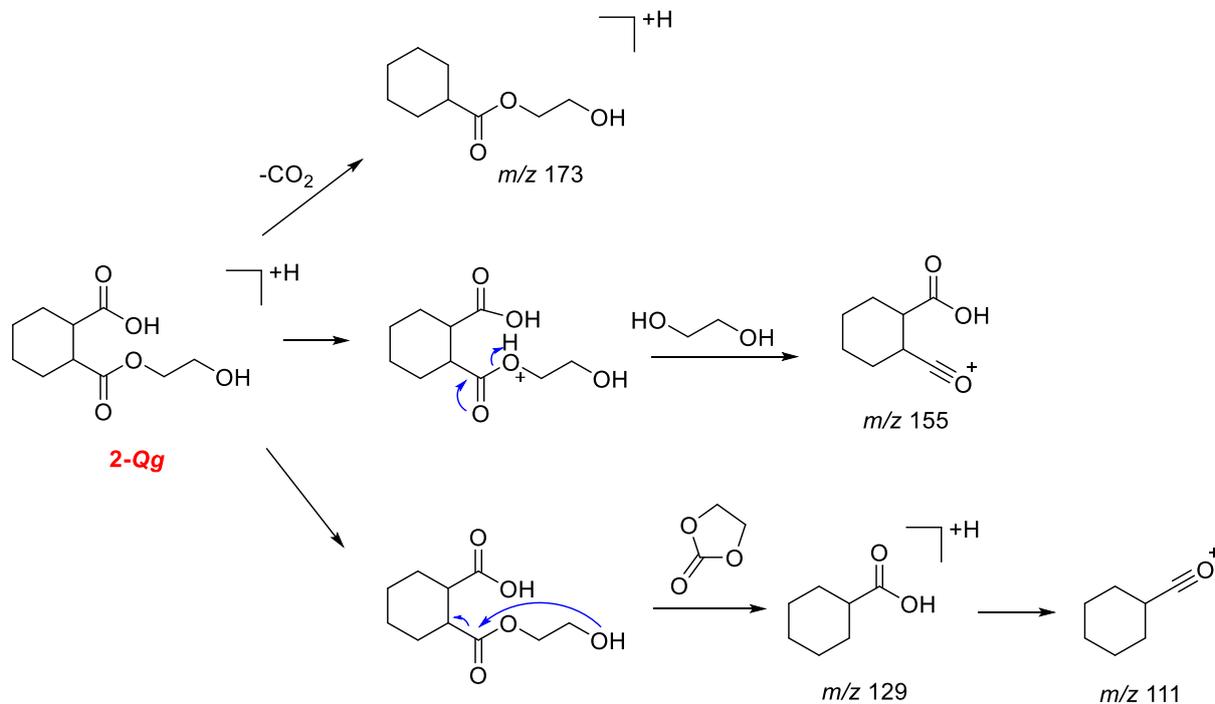


FIGURA A.4 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 217,1 correspondente ao composto **2-Qg**.

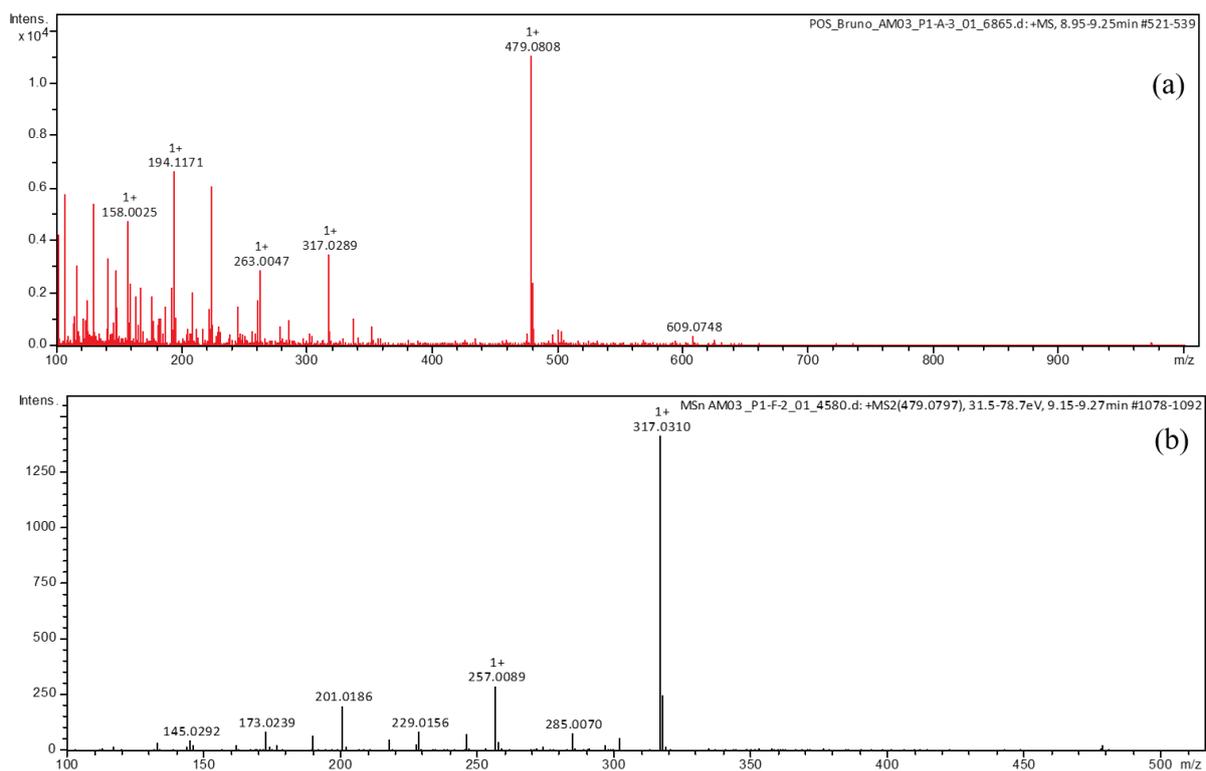


FIGURA A.5 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **3-Qg**, obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) MS^2 do íon m/z 479,1 através do modo auto MS/MS.

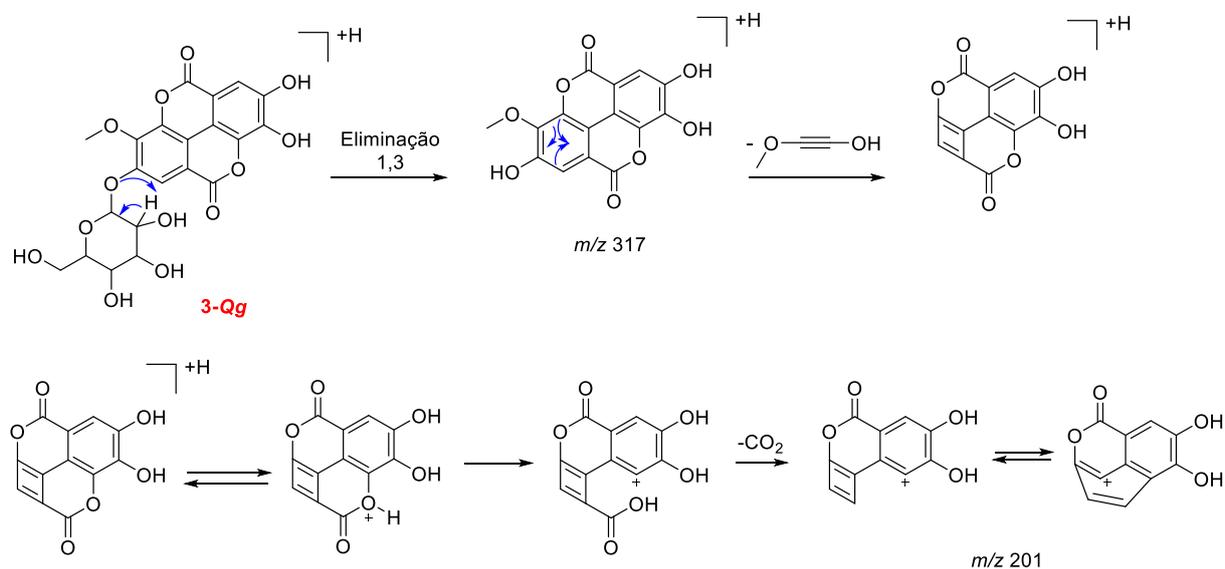


FIGURA A.6 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 479,1 correspondente ao composto **3-Qg**.

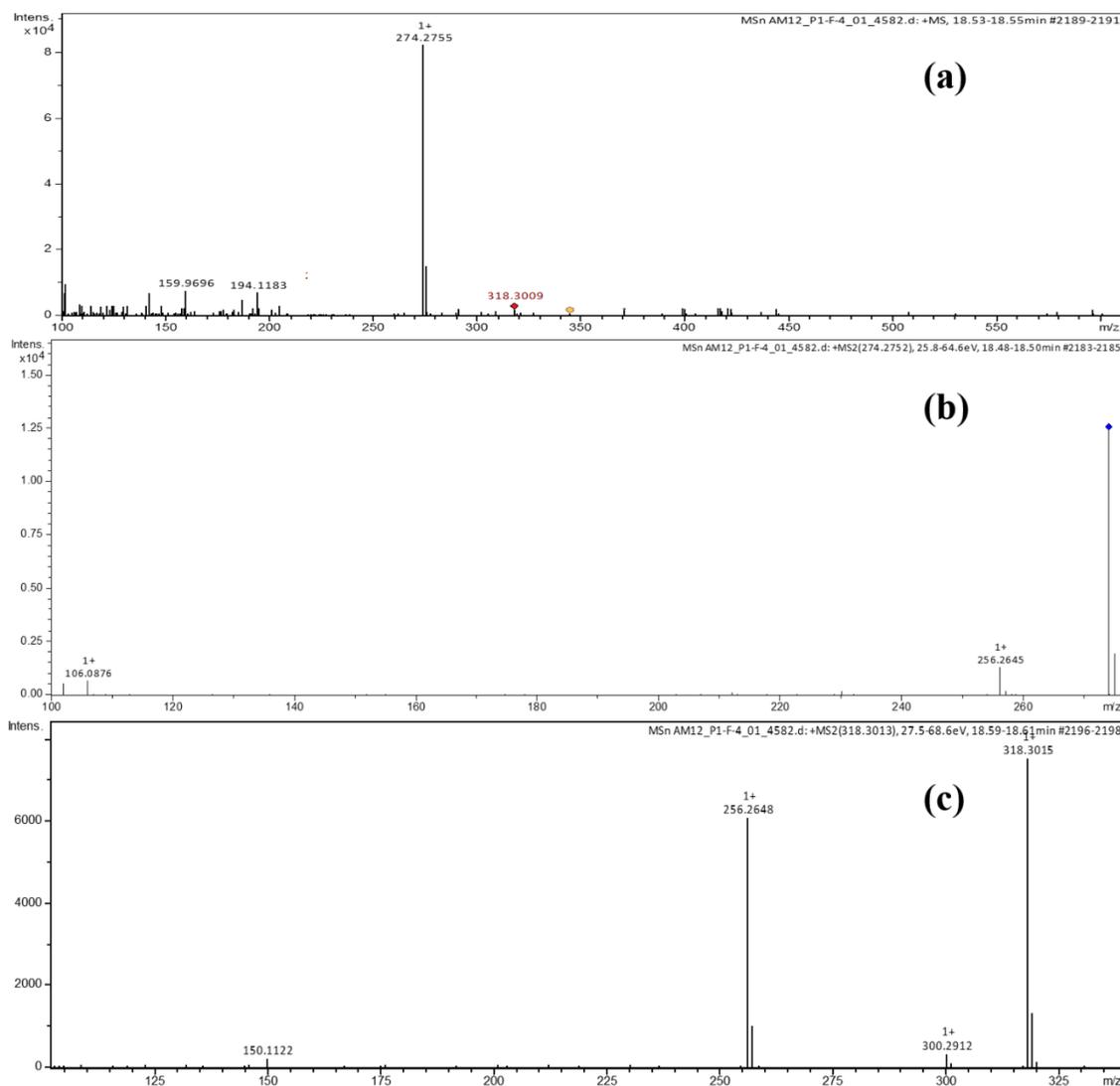


FIGURA A.7 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **4-Db** e seu íon fragmento gerado na fonte, com m/z 274,2799, obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan*, (b) MS² do íon m/z 274,3 e (c) MS² do íon m/z 318,3 através do modo auto MS/MS para os dois últimos.

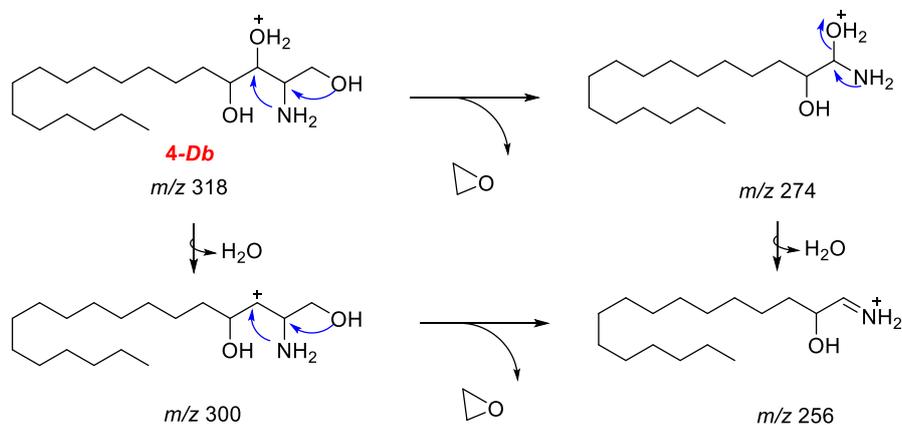


FIGURA A.8 – Proposta de fragmentação do íon m/z 318,3, correspondente ao composto **4-Db**, gerando o íon m/z 274,31 na fonte ESI, bem como um fragmento gerado a partir de cada íon.

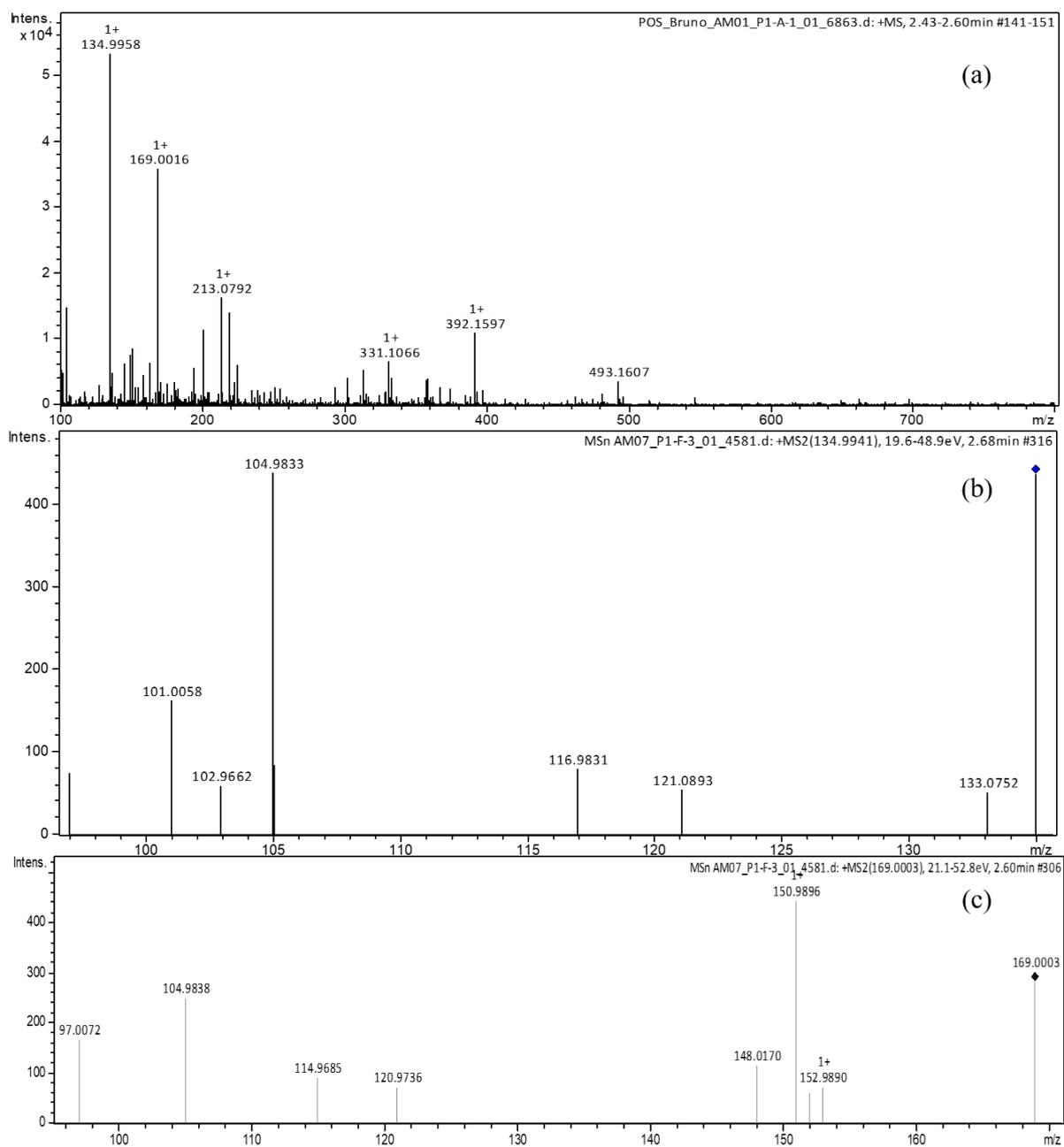


FIGURA A.9 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **5-Af/Bc** e seus dois íons fragmento, gerado na fonte ESI, com m/z 134,9958 e 169,0016, obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan*, (b) MS² do íon m/z 135,0 e (c) MS² do íon m/z 169,0 através do modo auto MS/MS para os dois últimos.

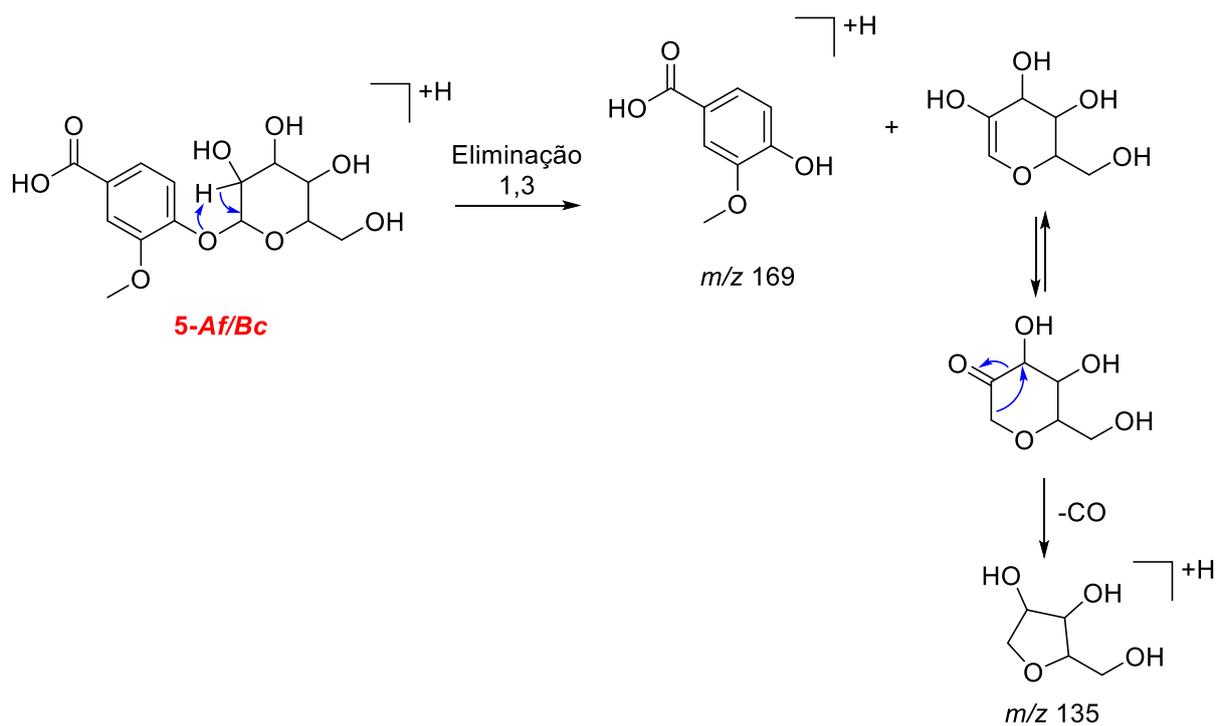


FIGURA A.10 – Proposta de fragmentação na fonte ESI para o composto **5-Af/Bc**, gerando os íons m/z 169,0 e 135,0.

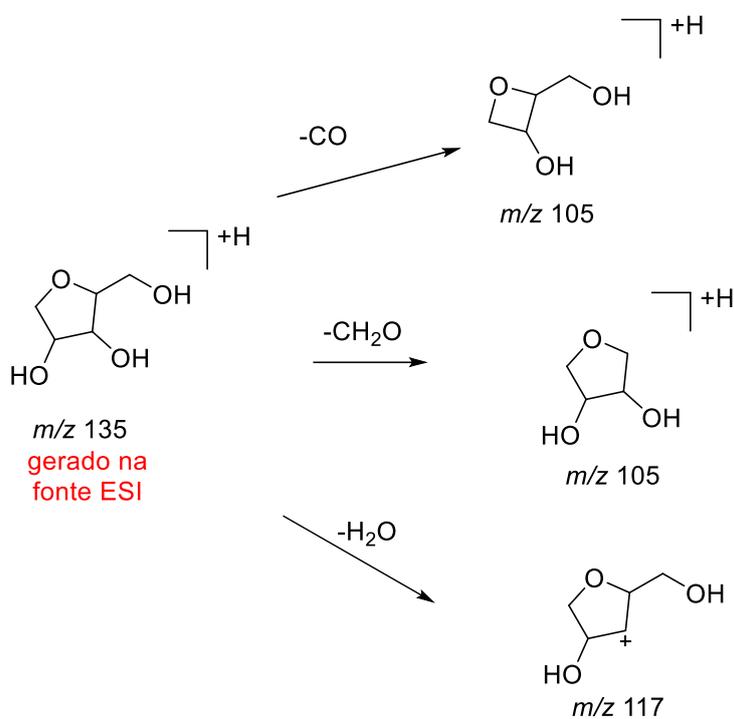


FIGURA A.11 – Proposta de fragmentação do íon m/z 135,0, gerado na fonte ESI a partir do composto **5-Af/Bc**.

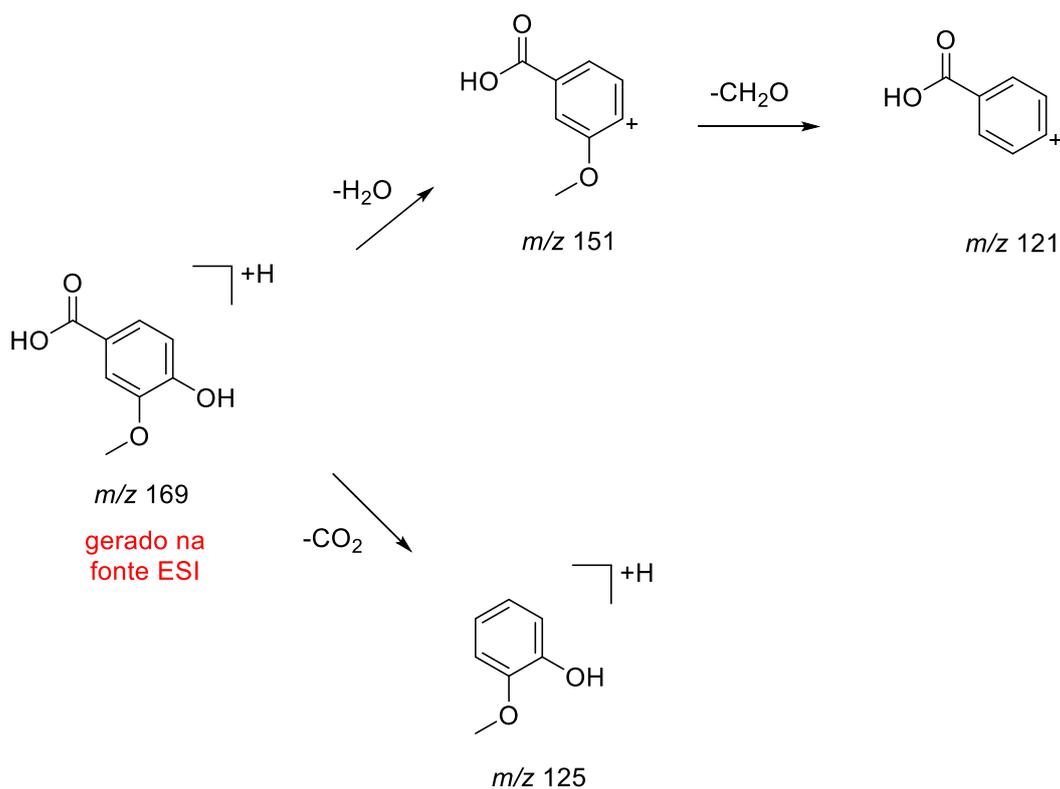


FIGURA A.12 - Proposta de fragmentação do íon m/z 169,0, gerado na fonte ESI a partir do composto **5-Af/Bc**.

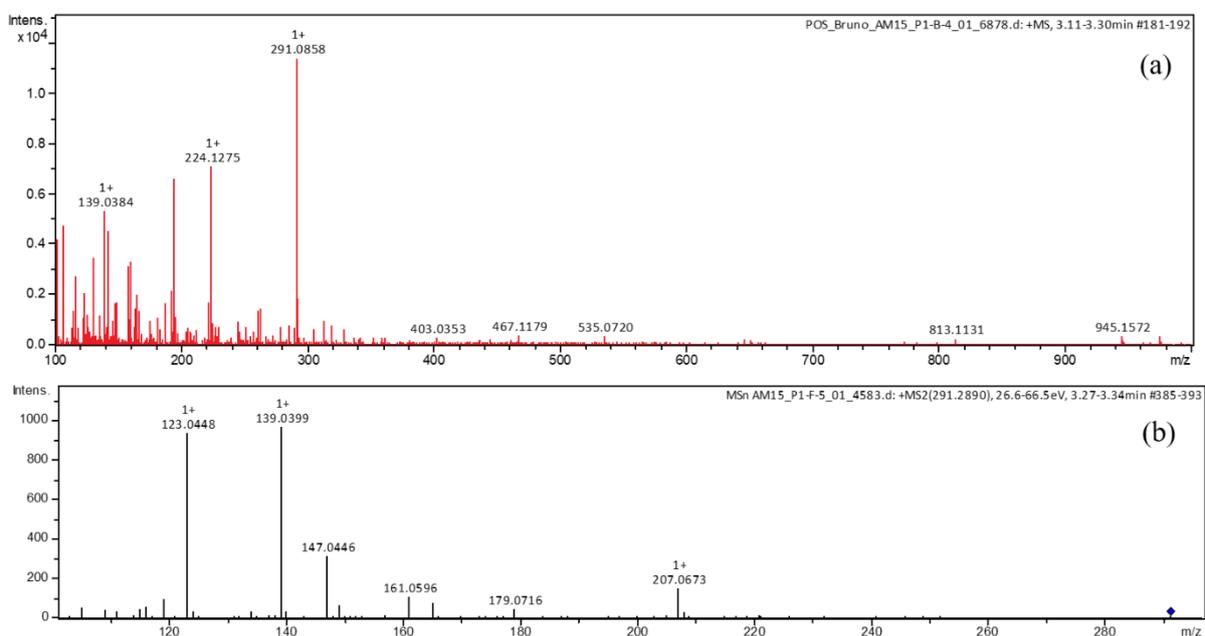


FIGURA A.13 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **6-Bc**, obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) MS^2 do íon m/z 291,3 através do modo auto MS/MS.

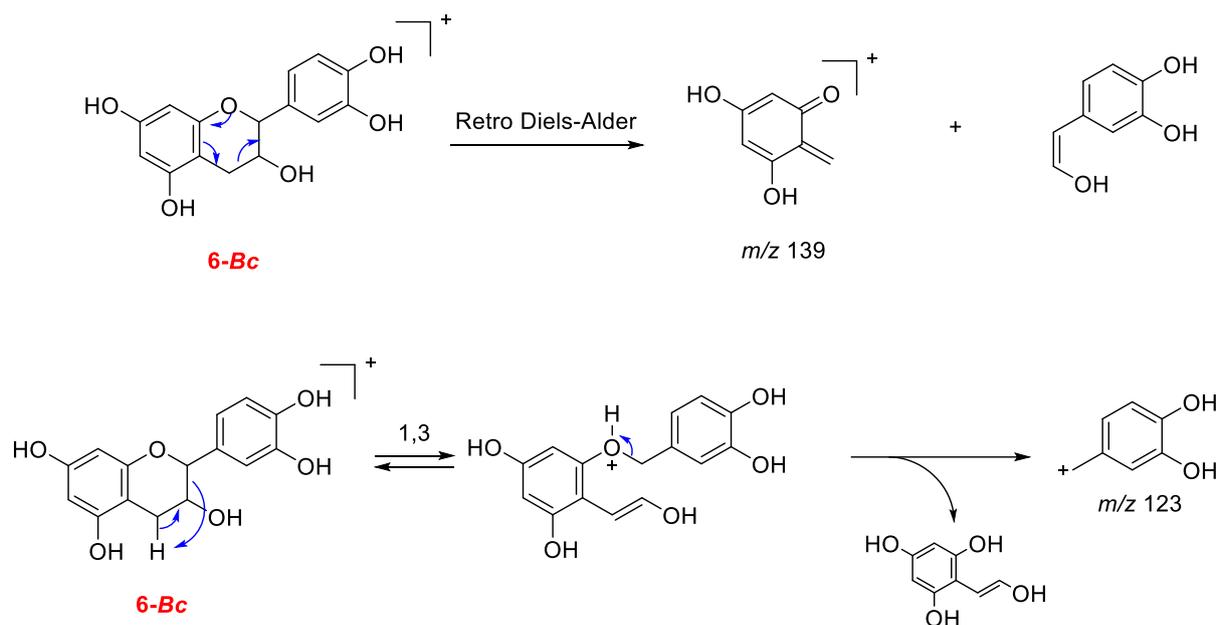


FIGURA A.14 – Propostas de fragmentação para o íon m/z 291,3 correspondente ao composto **6-Bc**.

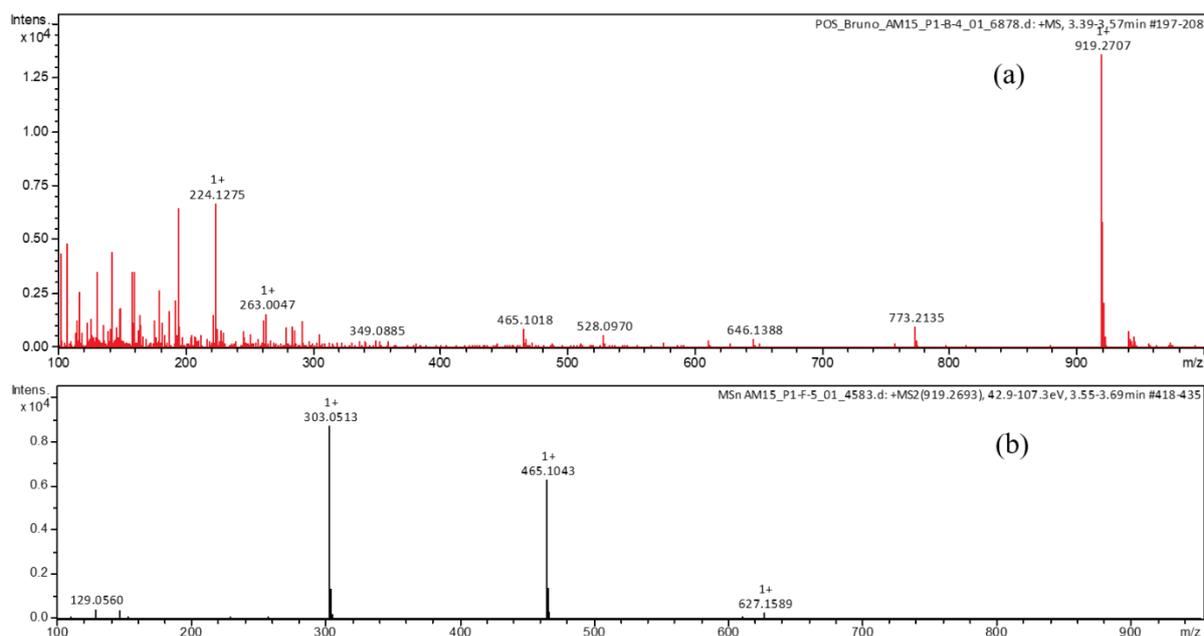


FIGURA A.15 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **7-Bc**, obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) MS^2 do íon m/z 919,3 através do modo auto MS/MS.

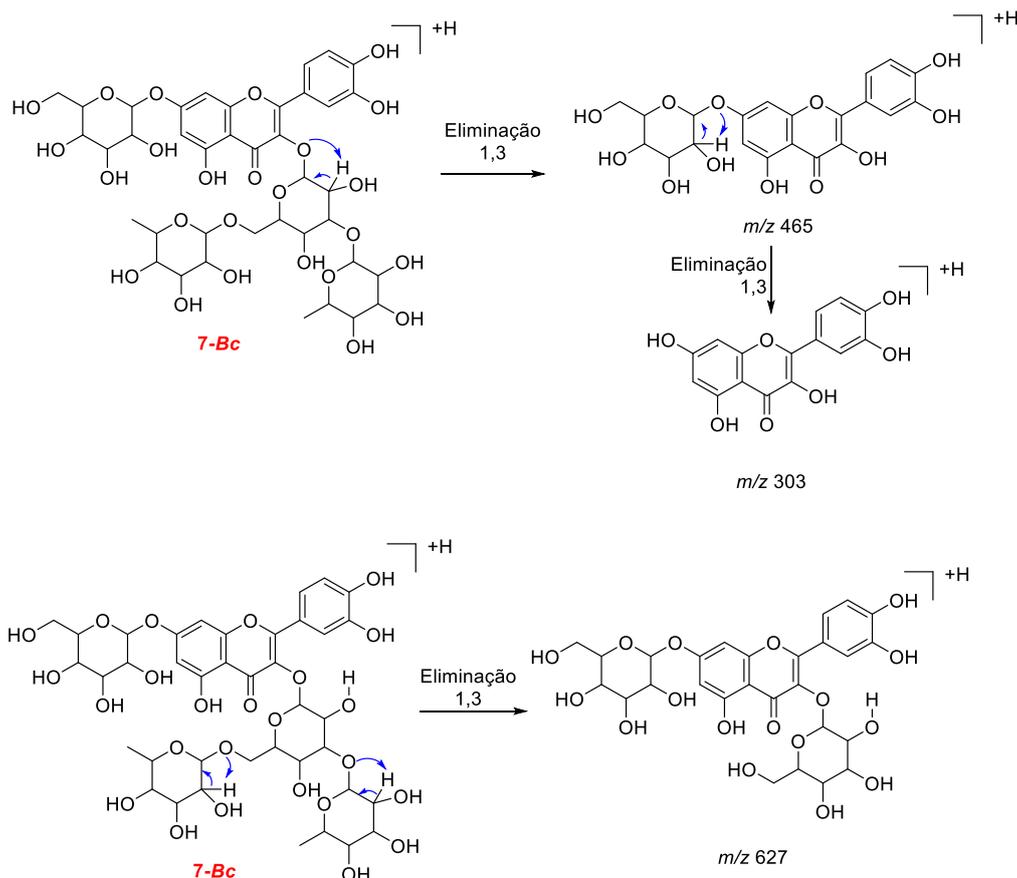


FIGURA A.16 – Propostas de fragmentação para o íon m/z 919,3 correspondente ao composto **7-Bc**.

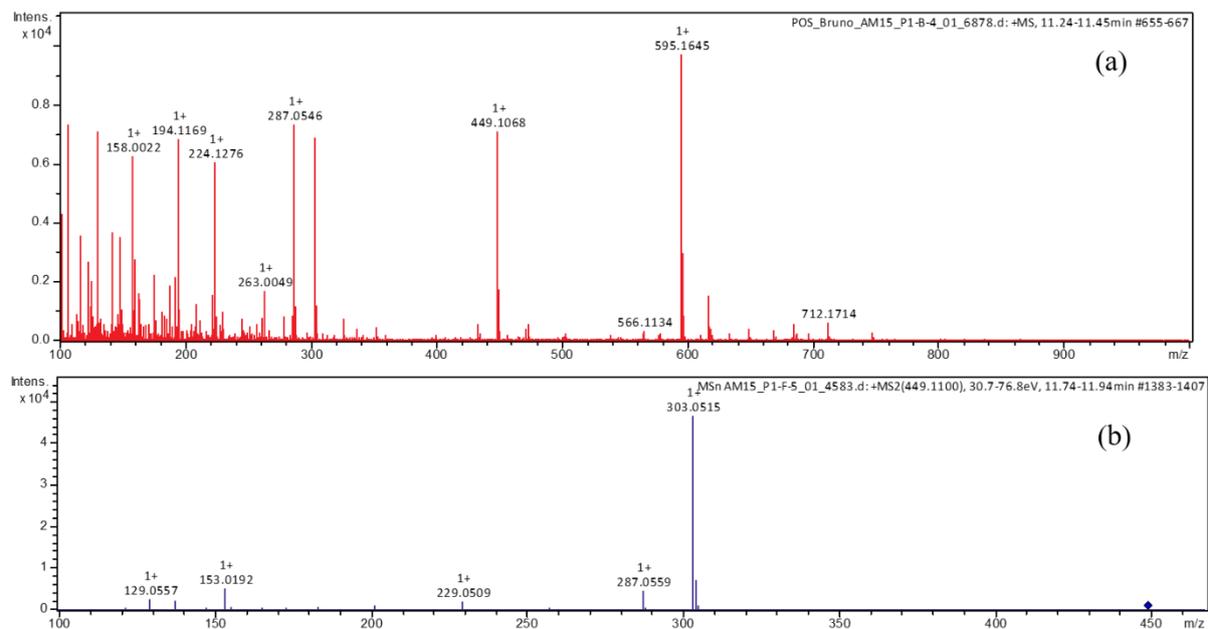


FIGURA A.17 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **8-Bc** e **9-Bc** (ambos coeluem), obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) MS^2 do íon m/z 449,1 (**8-Bc**) através do modo auto MS/MS .

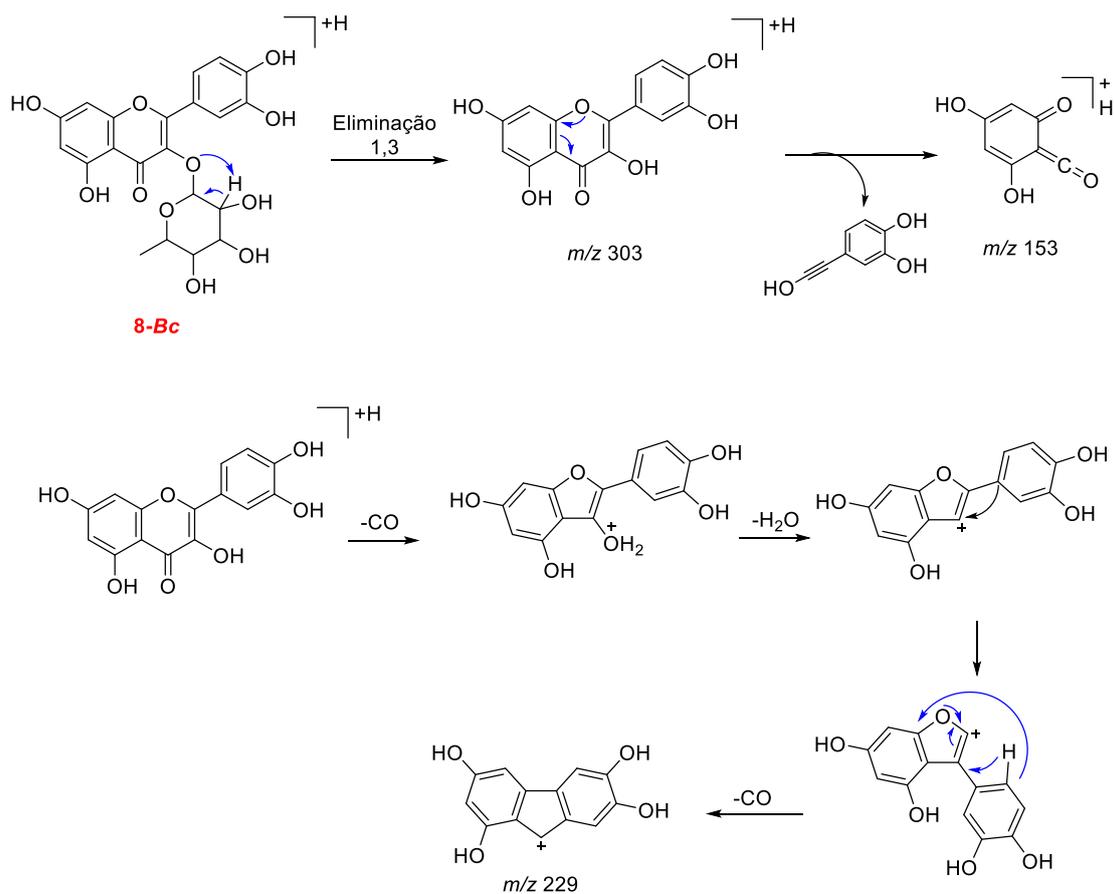


FIGURA A.18 – Propostas de fragmentação para o íon m/z 449,1 correspondente ao composto **8-Bc**.

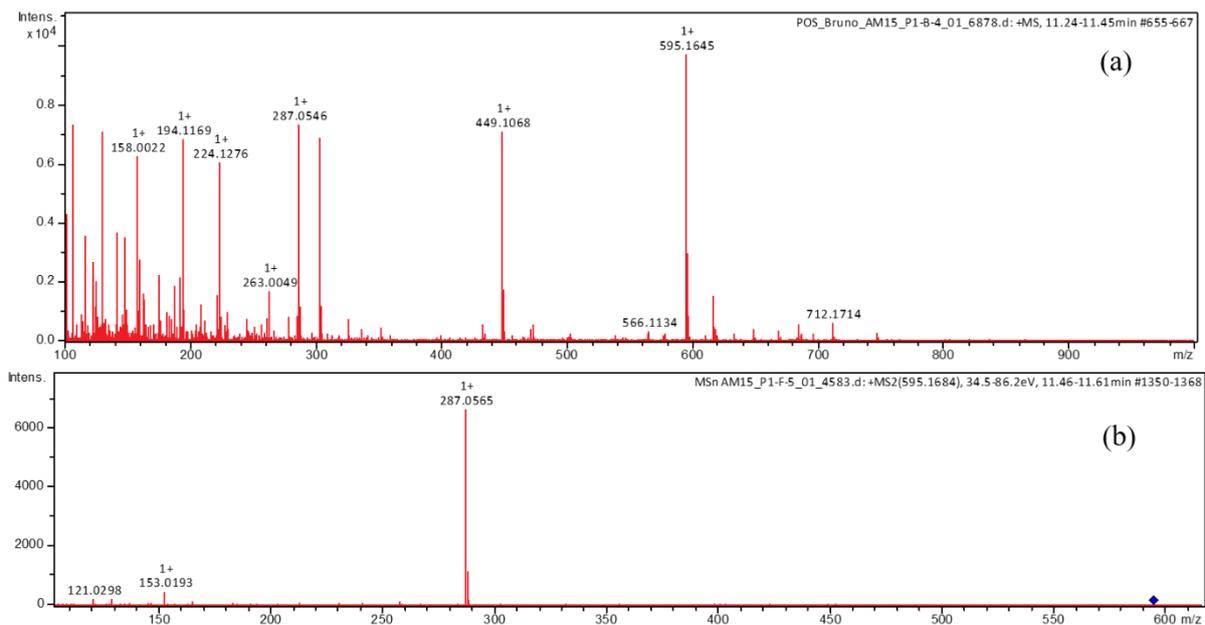


FIGURA A.19 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **8-Bc** e **9-Bc** (ambos coeluem), obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) *MS²* do íon m/z 595,2 (**9-Bc**) através do modo auto *MS/MS*.

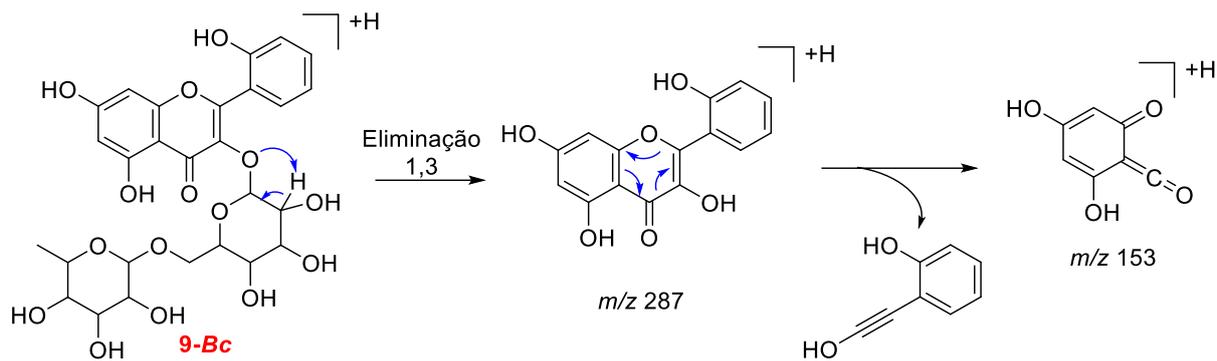


FIGURA A.20 – Propostas de fragmentação para o íon m/z 595,2 correspondente ao composto **9-Bc**.

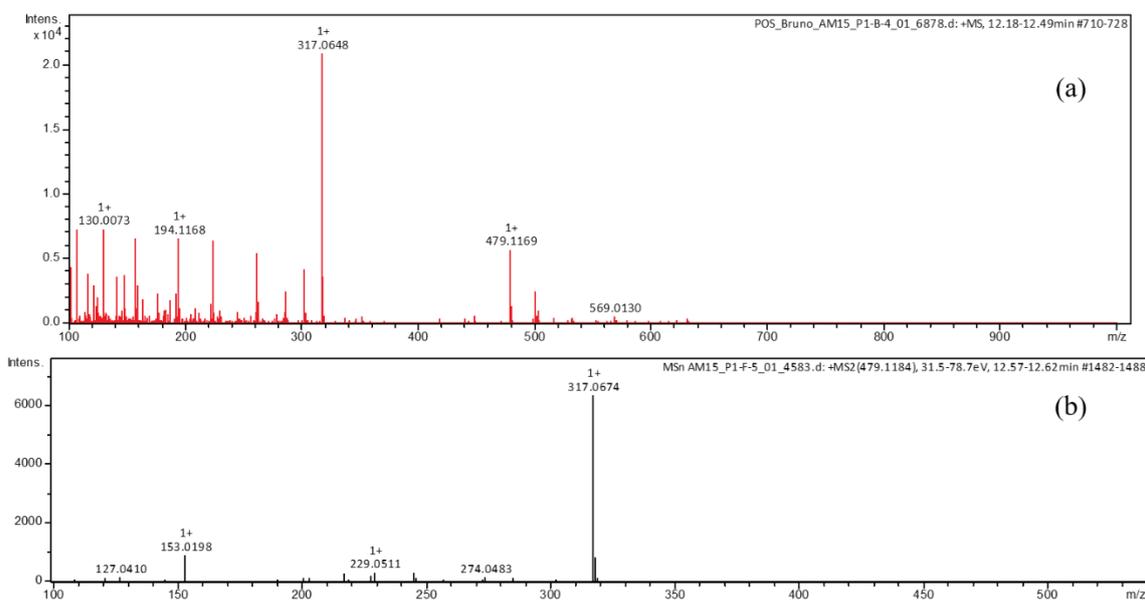


FIGURA A.21 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **10-Bc**, obtidos a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) MS^2 do íon m/z 479,1 através do modo auto MS/MS.

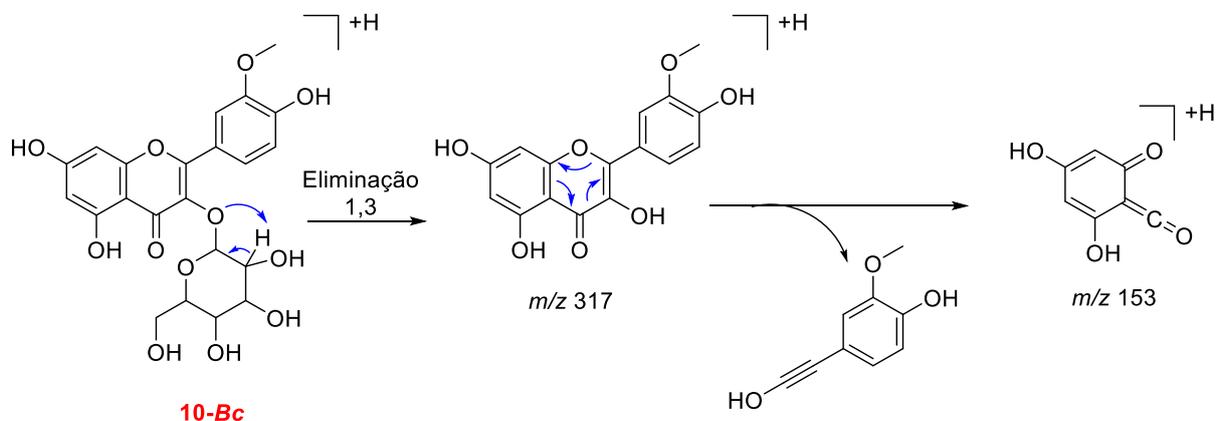


FIGURA A.22 – Propostas de fragmentação para o íon m/z 479,1 correspondente ao composto **10-Bc**.

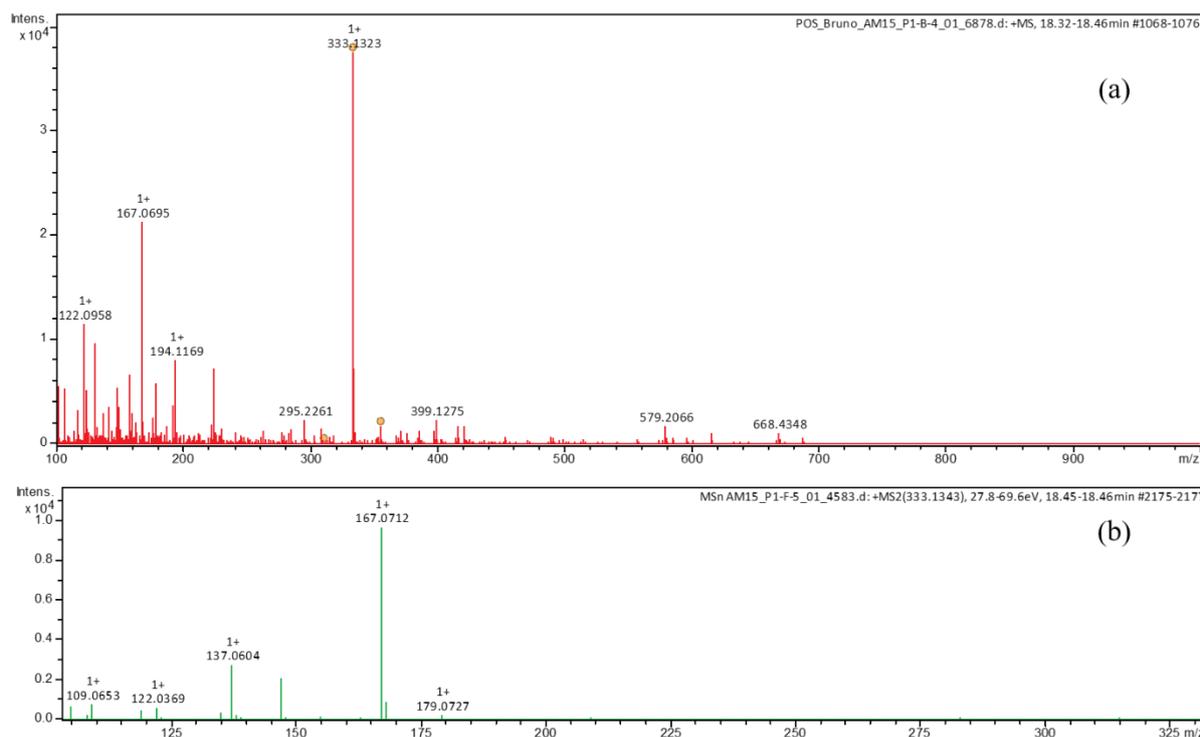


FIGURA A.23 – Espectros de massas de alta resolução para o composto **11-Bc**, obtido a partir de análises por LC-HRMS(/MS), sendo (a) modo *full scan* e (b) MS^2 do íon m/z 333,1 através do modo auto MS/MS.

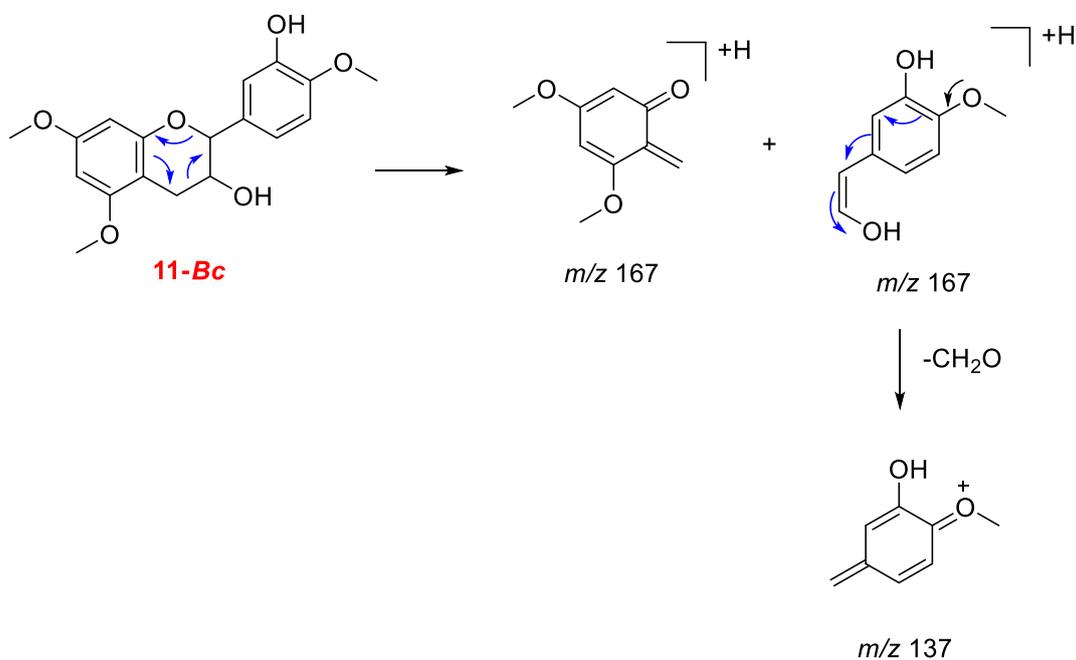


FIGURA A.24 – Propostas de fragmentação para o íon m/z 333,1 correspondente ao composto **11-Bc**.