

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência multidimensional para validação do uso do biorreator gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* para triagem de inibidores

Marcela Cristina de Moraes*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

*** Bolsista FAPESP**

São Carlos – SP

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M825dm

Moraes, Marcela Cristina de.

Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência multidimensional para validação do uso do biorreator gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* para triagem de inibidores / Marcela Cristina de Moraes. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
106 f.

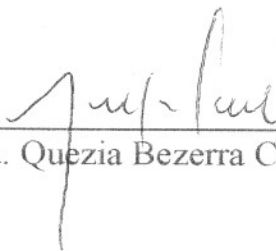
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Imobilização de enzimas. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Chagas, Doença de. 5. GAPDH. I. Título.

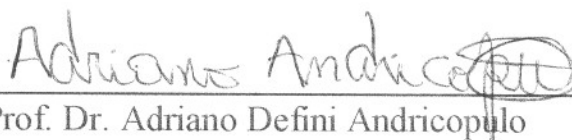
CDD: 543.0894 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

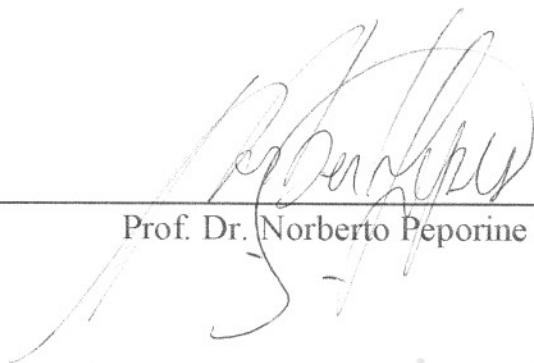
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Marcela Cristina de Moraes**, realizada em 27 de agosto de 2008:*



Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass



Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo



Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Quezia Cass pela orientação, incentivo e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, além do excelente exemplo de profissionalismo.

Aos professores Dr. Adriano D. Andricopulo, Dr. Glaucius Oliva, Dr. Irwin Wainer, Dr. Ivan Pitta, Dra. Arlene G. Côrrea, Dr. Alzir A. Batista e Dra. Dulce H. F. de Souza pela colaboração, empréstimo de equipamentos e doação de amostras para a execução dos estudos aqui apresentados.

À Profa. Dra. Carmen Lucia Cardoso pela paciência, co-orientação e apoio durante a iniciação científica e mestrado, mas principalmente pela preciosa amizade durante todos esses anos. E, claro, pelas célebres pérolas que nos proporcionaram tantos momentos de descontração.

Às professoras Dra. Regina V. Oliveira e Dra. Neila M. Cassiano pelas produtivas discussões, amizade e incentivo.

Aos alunos Aderson Zottis, Matheus P. Postigo, Rafael V. C. Guido e Tatiane L. Balliano, do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo pela colaboração nos estudos realizados e pelo fornecimento da enzima GAPDH de *T. cruzi*, bem como empréstimo de reagentes e materiais.

Aos alunos Bruna R. Amaral, Joel Alvim Jr., Junia M. Pereira e Richele Severino pela doação de amostras estudadas neste trabalho e principalmente pela amizade ao longo desses anos.

Ao Alexandre A. Cruz pela amizade e disponibilidade no reparo de equipamentos.

Aos meus amigos do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE: Aline A. Becaro, Ângela C. De Pietro, Ariele F. Fogolin, Bianca R. Lopes, Bruna N. O. C. Moreira, Fernando C. C. R. de Paula, Fernando G. Almeida, Graziani F. Côrrea, Juliana C. Barreiro, Kátia Roberta A. Belaz, Lúcia R. R. Martins, Mariana Coimbra, Marina Denadai, Patrícia Polachini, Rejane Carla de Souza, Tiago de C. Lourenço, Túlio F. Galatti e Vanessa M. Urban. Agradeço a todos pela

amizade construída nestes anos, pelo clima de apoio mútuo, incentivo, colaboração e momentos de descontração.

À Kenia Lourenço Vanzolini pela amizade irrestrita, conselhos, apoio e companhia em noites e madrugadas de imobilização.

Às minhas amigas Josiane Tioffi e Priscila Chiaradia, por todo carinho, todas as conversas, risadas e atenção aos meus níveis de “loucura”.

Aos meus amigos da turma de bacharel em Química 2003, por estarem sempre presentes, me apoiando e incentivando.

Aos meus amigos do Departamento de Química, por todas as risadas, companhia e amizade.

Àqueles que, incondicionalmente, sempre fizeram todo o possível para que eu chegasse até aqui e alcançasse esta conquista. Aos meus pais, Paulo e Aparecida, todo o meu carinho, amor e gratidão.

À minha querida irmã Claudia pelo apoio, dedicação e amizade verdadeira por todos esses anos.

Ao meu docinho Matheus, pelo carinho, incentivo, apoio incondicional, cumplicidade, alegria e auxílio na revisão desta dissertação.

A toda família Postigo pelo carinho, amizade e preocupação.

Ao Igor pela companhia nas noites de redação de relatórios e desta dissertação.

Ao corpo técnico e administrativo do Departamento de Química de Universidade Federal de São Carlos.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida.

“Se pude ver mais longe é porque estava apoiado nos ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1. Introdução.....	1
1.1. A cromatografia seletiva de afinidade na identificação de ligantes	1
1.2. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos.....	5
1.3. Doenças parasitárias tropicais	10
1.3.1. A doença de Chagas.....	11
1.3.2. A enzima GAPDH como alvo na busca de novos agentes tripanocidas...	14
1.4. Cinética enzimática.....	17
1.5. Inibidores enzimáticos	21
1.5.1. Inibição irreversível	21
1.5.2. Inibição reversível	22
1.5.2.1. Inibição reversível competitiva	22
1.5.2.2 Inibição reversível incompetitiva	24
1.5.2.3. Inibição reversível não-competitiva	25
2. Objetivos	27
3. Procedimento Experimental.....	28
3.1. Generalidades	28
3.2. Empacotamento das colunas analíticas	29
3.3. Preparo de fases móveis.....	29
3.4. Preparo do reagente de Bradford e quantificação de proteínas	30
3.5. Preparo das soluções de NADH utilizadas na curva de calibração	30
3.6. Curvas analíticas para a quantificação de NADH produzido pelo IMER-GAPDH-Tc	30

3.7. Preparo dos Biorreatores de GAPDH.....	32
3.7.1. Pré-tratamento do capilar de sílica fundida	32
3.7.2. Imobilização da GAPDH	33
3.7.2.1. Soluções utilizadas.....	33
3.7.2.2. Procedimento de imobilização	34
3.8. Preparo da solução DL-G3P (DL-Gliceraldeído-3-fosfato).....	34
3.9. Preparo das soluções de NAD^+	35
3.10. Preparo das soluções utilizadas no estudo cinético da atividade enzimática de GAPDH-Tc.....	35
3.10.1. Concentração de NAD^+ constante e concentrações variáveis de D-G3P	35
3.10.2. Concentração de D-G3P constante e concentrações variáveis de NAD^+	35
3.11. Obtenção dos parâmetros cinéticos enzimáticos.....	36
3.12. Ensaio da atividade enzimática de GAPDH em solução.....	36
3.13. Preparo das soluções para o estudo da atividade enzimática no IMER.....	37
3.14. Estudo da inibição da GAPDH-Tc em solução	37
3.15. Preparo das soluções dos compostos selecionados para avaliação da atividade inibitória.....	37
3.16. Estudo da inibição da GAPDH-Tc imobilizada.....	38
3.17. Estudo da inibição da GAPDH-Hu imobilizada.....	38
4. Resultados e Discussão	40
4.1. Modulagem do ensaio enzimático para as condições cromatográficas	42
4.2. Otimização das condições de separação de NAD^+ e NADH por CLAE multidimensional.....	44
4.3. Validação do método analítico para a quantificação de NADH formado pelo IMER-GAPDH-Tc	53
4.4. Otimização do processo de imobilização da enzima	55

4.5. Estabilidade do IMER-GAPDH-Tc preparado com o novo procedimento.....	63
4.6. Estudo cinético da atividade enzimática do IMER-GAPDH-Tc.....	65
4.7. Aplicação dos biorreatores com as enzimas GAPDH-Tc e Hu na triagem de ligantes.....	75
4.7.1. Avaliação da influência de solventes orgânicos empregados no preparo das soluções dos compostos avaliados.....	81
4.7.2. Avaliação da atividade inibitória dos compostos selecionados.....	82
4.8. Estudo comparativo da estabilidade dos IMERs em função do tempo decorrido após o processo de imobilização.....	90
4.9. Desenvolvimento de um ensaio para o estudo da reversibilidade dos inibidores identificados.....	92
5. Conclusões.....	94
6. Referências Bibliográficas.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de Onda
Å	Ângstrom
1,3-DPG	1,3-difosfoglicerato
ACN	Acetonitrila
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APTS	3-aminopropiltriétoxisilano
ATP	Adenosina Trifosfato
CBME	Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural
C ₁₈	Octadecil-Sílica
C ₈	Octil-Sílica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variação
D.I.	Diâmetro Interno
DHFR	Diidrofolato redutase
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EI	Complexo Enzima-Inibidor
ES	Complexo Enzima-Substrato
ESI	Complexo Enzima-Substrato-Inibidor
G3P	Gliceraldeído 3-fosfato
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GAPDH-Hu	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase Humana
GAPDH-Tc	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase

HTS	Ensaio Biológico Automatizado em Larga Escala (<i>High Throughput Screening</i>)
IAM	Membranas Artificiais Imobilizadas (<i>Immobilized Artificial Membrane</i>)
IC ₅₀	Concentração do inibidor em que a atividade da enzima é reduzida a 50%
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IMER	Reator com Enzima Imobilizada (<i>Immobilized Enzyme Reactor</i>)
kDa	Kilodalton
K _M	Constante de Michaelis-Menten
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LQ	Limite de Quantificação
LQMC	Laboratório de Química Medicinal e Computacional
MeOH	Metanol
NAD ⁺ /NADH	β-Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.A.	Pureza Analítica
PGA	Penicillin G acylase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
RNA	Ácido Ribonucléico
TEA	Trietilamina
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
V _{max}	Velocidade Máxima de Reação

LISTA DE TABELAS

1. Introdução

TABELA 1.1. Aplicações de LC-IMERs na pesquisa de novos fármacos.....	4
1.2. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos.....	5
TABELA 1.2. Comparação entre os métodos de imobilização mais utilizados.....	10

4. Resultados e Discussão

TABELA 4.1. Condições cromatográficas para a separação do NAD^+ e NADH previamente estabelecidas para o IMER-GAPDH-Hu acoplado a coluna diol. .	43
TABELA 4.2. Condições cromatográficas estabelecidas para a separação de NAD^+ e NADH pela coluna C_8 acoplada ao IMER-GAPDH-Tc.....	50
TABELA 4.3. Condições cromatográficas estabelecidas para a separação de NAD^+ e NADH pela coluna C_8 acoplada ao IMER-GAPDH-Tc na validação do método analítico.	53
TABELA 4.4. Precisão e exatidão intra e interdias do método de análise para quantificação do NADH formado pelo biorreator de GAPDH-Tc.....	55
TABELA 4.5. Concentração de NADH formado mantendo-se constante a concentração de D-G3P e variando-se as concentrações de NAD^+	68
TABELA 4.6. Concentração de NADH formado mantendo-se constante a concentração de NAD^+ e variando-se as concentrações de D-G3P.....	70
TABELA 4.7. Parâmetros cinéticos para as enzimas de GAPDH humana e de <i>T. cruzi</i> , imobilizadas e em solução.	72
TABELA 4.8. Série de compostos avaliados com as enzimas GAPDH de <i>T. cruzi</i> e humana.	77

LISTA DE FIGURAS

1. Introdução

FIGURA 1.1. Métodos de imobilização de enzimas baseados em interações químicas e físicas.....	6
FIGURA 1.2. Representação dos possíveis efeitos na acessibilidade do sítio ativo causados pela imobilização.....	9
FIGURA 1.3. Estruturas dos fármacos empregados no tratamento da doença de Chagas.....	13
FIGURA 1.4. Estrutura cristalográfica da GAPDH de <i>T. cruzi</i>	16
FIGURA 1.5. (A) Hipérbole de Michaelis-Menten e (B) Gráfico de Lineweaver-Burk.	20
FIGURA 1.6. Ilustração do equilíbrio enzimático com um inibidor competitivo.....	23
FIGURA 1.7. Ilustração do equilíbrio enzimático com um inibidor incompetitivo.....	24
FIGURA 1.8. Ilustração do equilíbrio enzimático com inibidores não-competitivos.....	25

4. Resultados e Discussão

FIGURA 4.1. Estrutura da β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e β -nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH).....	40
FIGURA 4.2. Representação do sistema cromatográfico multidimensional usado com o IMER na primeira dimensão e a coluna analítica na segunda dimensão.	41
FIGURA 4.3. Cromatograma de formação do NADH pelo IMER-GAPDH-Tc. IMER na primeira dimensão e coluna diol na segunda dimensão.....	43
FIGURA 4.4. Cromatogramas de separação de NAD^+ e NADH exemplificando os resultados obtidos com diferentes proporções do modificador orgânico.....	45

FIGURA 4.5. Cromatogramas de separação de NAD^+ e NADH exemplificando os resultados obtidos na substituição do modificador orgânico.....	46
FIGURA 4.6. Cromatogramas de separação de NAD^+ e NADH	48
FIGURA 4.7. Cromatograma de separação de NAD^+ e NADH sobreposto com o cromatograma do tampão B.....	49
FIGURA 4.8. Cromatogramas de separação de NAD^+ e NADH	49
FIGURA 4.9. Cromatograma do NADH ao final das análises para a construção da curva de calibração.	51
FIGURA 4.10. Cromatogramas de separação de NAD^+ e NADH empregando acetonitrila como modificador orgânico.....	52
FIGURA 4.11. Cromatograma de separação de NAD^+ e NADH	52
FIGURA 4.12. Cromatograma referente à concentração $80\mu\text{mol/L}$ de NADH ..	54
FIGURA 4.13. Curva de calibração do NADH . IMER-GAPDH-Tc acoplado a uma C_8 Luna-Phenomenex [®] ..	54
FIGURA 4.14. Representação dos grupos que podem estar presentes na superfície do capilar de sílica fundida.....	56
FIGURA 4.15. Atividade enzimática em função do tempo para dois biorreatores com diferentes procedimentos de tratamento do capilar, um deles com NaOH e outro com HCl	57
FIGURA 4.16. Cromatogramas obtidos para a produção inicial de NADH dos biorreatores que tiveram a limpeza e ativação do capilar realizada com A) HCl concentrado e B) HCl 2mol/L	59
FIGURA 4.17. Cromatogramas obtidos referente a produção inicial de NADH para os biorreatores com pré-tratamento realizado com: A) eluição uma vez da solução de APTS pelo capilar ; B) eluição duas vezes da solução APTS	61
FIGURA 4.18. Cromatogramas obtidos referentes à produção inicial de NADH pelo IMER-GAPDH-Hu para os biorreatores preparados empregando NaOH $0,5\text{mol/L}$ e HCl 2mol/L no pré-tratamento do capilar.	63

FIGURA 4.19. Porcentagem de perda de atividade da solução com a enzima GAPDH-Tc após eluir pelo capilar.....	64
FIGURA 4.20. Gráfico da reprodutibilidade na atividade enzimática obtida pelo processo de imobilização.....	65
FIGURA 4.21. Produção inicial de NADH pelo IMER-GAPDH-Tc (50cm x 0,10mm D.I.) na primeira dimensão.	67
FIGURA 4.22. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de NADH pelo IMER-GAPDH-Tc, variando-se a concentração de NAD^+ e mantendo-se constante a de D-G3P.	69
FIGURA 4.23. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de NADH pelo IMER-GAPDH-Tc, variando-se a concentração de D-G3P e mantendo-se constante a de NAD^+	71
FIGURA 4.24. Seqüência primária alinhada da GAPDH <i>T. cruzi</i> e humana.....	73
FIGURA 4.25. Superfície dos tetrâmeros A) GAPDH-Tc e B) GAPDH-Hu. ..	74
FIGURA 4.26. Cromatograma exemplificando os resultados obtidos referentes ao estudo da influência da percentagem de solvente orgânico, no preparo de amostras, na atividade enzimática.....	82
FIGURA 4.27. Porcentagem de inibição dos compostos avaliados com a enzima GAPDH-Hu em solução e imobilizada.	84
FIGURA 4.28. Porcentagem de inibição dos compostos avaliados com a enzima GAPDH-Tc em solução e imobilizada.....	85
FIGURA 4.29. Porcentagem de inibição dos compostos avaliados com os biorreatores com as enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu.	86
FIGURA 4.30. Porcentagem de inibição da atividade enzimática da GAPDH-Hu no biorreator para diferentes concentrações do composto 5.	87
FIGURA 4.31. Cromatogramas referente a produção de NADH pelo IMER-GAPDH-Tc no teste inicial e na presença do composto 45.....	89
FIGURA 4.32. Atividade inibitória do composto 45 para a enzima GAPDH-Tc imobilizada.....	89

FIGURA 4.33. Porcentagem de atividade enzimática retida pelo IMER-GAPDH-Hu recém-imobilizado e após um período de 8h a 4°C para estabilização enzimática.	91
FIGURA 4.34. Cromatogramas ilustrando a produção de NADH pelo IMER-GAPDH-Hu antes e após a incubação com o composto 46 (em A) e com o composto 5 (em B).	93

LISTA DE ESQUEMAS

1. Introdução

ESQUEMA 1.1. Catálise reversível da GAPDH na presença de fosfato inorgânico.....	15
ESQUEMA 1.2. Equilíbrio da catálise enzimática na presença de ausência de inibidores.....	24

4. Resultados e Discussão

ESQUEMA 4.1. Método de imobilização da enzima em capilares de sílica fundida.	60
ESQUEMA 4.2. Formação da ligação covalente entre o ácido iodoacético e a os resíduos de cisteína da enzima.	76

RESUMO

“Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência multidimensional para validação do uso do biorreator gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* para triagem de inibidores”.

Este trabalho descreve a quantificação do NADH formado pela reação do biorreator da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *T. cruzi* usando cromatografia líquida de alta eficiência multidimensional. Para isto, o biorreator foi usado na primeira dimensão e uma coluna analítica C₈ na segunda dimensão. As etapas de pré-tratamento dos capilares de sílica fundida e da imobilização covalente da enzima, neste suporte, foram otimizadas com sucesso, resultando no aumento da atividade e da estabilidade da enzima. Os estudos cinéticos para a enzima GAPDH-Tc imobilizada foram realizados para verificar se o método de imobilização empregado afetou a afinidade da enzima pelo substrato ou cofator. Os resultados obtidos com os biorreatores das enzimas GAPDH-Tc e humana foram comparados àqueles obtidos com as enzimas em solução, e evidenciaram que o método de imobilização covalente afetou principalmente a afinidade da enzima humana pelo substrato. Os biorreatores das enzimas do parasita e humana foram empregados para a triagem de ligantes. Os ligantes reconhecidos pelos biorreatores foram os mesmos identificados pelas enzimas em solução, evidenciando que a enzima imobilizada reteve a capacidade de reconhecer os compostos capazes de modular a atividade enzimática. Os biorreatores mostraram-se uma ferramenta útil na caracterização dos inibidores quanto à reversibilidade da ligação. Considerando os altos custos e as dificuldades envolvidas na purificação de enzimas, os procedimentos descritos neste trabalho representam um valioso método para preservar a atividade enzimática e para a realização de uma variedade de ensaios bioquímicos.

ABSTRACT

“Multidimensional high-performance liquid chromatography methods development for validating the employment of an immobilized enzyme reactor of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma cruzi* for inhibitors screening.”

This work reports the quantification of NADH formed by an immobilized enzyme reactor (IMER) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *T. cruzi* using multidimensional high-performance liquid chromatography. For this, The IMER was used in the first dimension while an analytical C₈ column was used in the second dimension. The conditions of the pre-treatment of the fused silica capillary tubes and the covalent immobilization of the enzyme into the capillary were successfully optimized, resulting in increased enzymatic activity and stability. Kinetic studies for the *T. cruzi* GAPDH-IMER were carried out to verify the influence of the immobilization over the enzyme affinity for the substrate and cofactor. The kinetic results for the IMERs of human and parasite GAPDH enzymes were compared to those obtained with the enzymes in solution, and showed that the covalent immobilization method used affected mainly the affinity of the human enzyme for the substrate. The human and parasite GAPDH-IMERs were employed for the ligand screening. The ligands recognized by the IMERs were the same identified by the enzymes in solution, showing that the immobilized enzymes kept the ability of recognizing the activity compounds modulators. The IMERs demonstrated to be a useful tool also for inhibitors binding reversibility characterization. In view of the high costs and difficulties involved on enzyme purification, the methods described in this work represents a valuable way of preserving enzyme activity and carrying out a variety of biochemical experiments.

1. Introdução

Enzimas são biocatalisadores com excelentes propriedades tais como elevadas seletividade e especificidade que lhes permite realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais.¹ Sua função metabólica exerce influência específica sobre certas interações bioquímicas, usualmente em ambientes muito complexos - como no interior de células - e incluem transformações oxidativas e conjugativas que ocorrem em altas velocidades catalíticas e com reações altamente regioseletivas e estereosseletivas.^{2,3}

O tratamento de diversas doenças através da inibição seletiva de enzimas, envolvidas em processos vitais nos organismos infecciosos, tem sido explorado com sucesso na medicina moderna e é bem representado pelo número de fármacos, por exemplo, os antivirais, antiparasitários e antibióticos, em uso clínico, que atuam como inibidores enzimáticos.⁴

Uma das estratégias empregadas no desenvolvimento de um novo fármaco contra uma enfermidade específica se inicia pela busca de substâncias que apresentem significativa atividade inibitória contra um alvo selecionado do agente patogênico causador da enfermidade em questão. A necessidade de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças tem estimulado a pesquisa pelo desenvolvimento de novas estratégias e associação de métodos capazes de reduzir o tempo necessário para a identificação de novos ligantes.

1.1. A cromatografia seletiva de afinidade na identificação de ligantes

Os ensaios biológicos automatizados em larga escala (HTS, do inglês *High Throughput Screening*) mais comumente empregados na identificação de ligantes envolvem ensaios espectrofotométricos, colorimétricos ou

fluorimétricos utilizando o formato de multi-poços. Entretanto tais ensaios apresentam desvantagens como: 1) necessidade de reagentes fluorimétricos ou com cromóforos adequados para gerar um sinal, 2) interferências causadas por compostos que absorvem ou fluorescem em comprimentos similares ao reagente, 3) ineficiência para triagem em misturas e 4) usualmente utilizam complexos sistemas robotizados.⁵

Uma alternativa promissora aos ensaios convencionais é o emprego da cromatografia seletiva de afinidade na identificação de ligantes em misturas complexas. A cromatografia de afinidade é considerada uma das técnicas cromatográficas mais versáteis e é definida como um método cromatográfico que utiliza um agente de ligação específica como uma fase estacionária para purificação ou análise de uma mistura de compostos. Como esta definição sugere, as interações que ocorrem na cromatografia de afinidade são as mesmas presentes em vários sistemas biológicos, como a interação enzima-substrato ou a interação de um antígeno com o anticorpo. A elevada especificidade destas interações fornece a esta técnica um elevado grau de seletividade.⁶

Inicialmente, a cromatografia de afinidade foi utilizada no isolamento e purificação de misturas biológicas complexas, mas, nos últimos tempos, tem se revelado uma poderosa ferramenta para monitorar as interações ligante-proteína, substrato-proteína, inibidor-proteína e ligante-receptor. O uso da cromatografia seletiva de afinidade, para mimetizar ações biológicas, tem sido explorado com eficiência e tem demonstrado grandes vantagens como uma das técnicas de HTS.^{7,8}

Os processos fundamentais de ação dos fármacos como a absorção, a excreção e a ativação do receptor são dinâmicas na natureza e, portanto, similares aos processos cromatográficos. As principais interações intermoleculares, como as eletrostáticas, hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio, são determinantes tanto nos processos biológicos quanto nos

cromatográficos. Portanto, as técnicas cromatográficas podem ser utilizadas para estudos de afinidade dos fármacos.^{9,10}

A cromatografia seletiva de afinidade envolve três passos: a imobilização de um alvo; a avaliação das modificações sofridas pelo biopolímero após a imobilização; e a determinação dos parâmetros de ligação após a inserção da proteína imobilizada no sistema de separação.¹¹

Dessa forma, a identificação de substâncias que possuem maior afinidade por uma biomolécula pode ser realizada eluindo-se uma mistura de compostos através de uma superfície na qual a biomolécula de interesse esteja imobilizada. De um modo geral, as substâncias que possuem maior afinidade pela biomolécula permanecem um maior tempo retidas, eluindo mais tardiamente sendo, portanto, os melhores ligantes.¹²

A inserção de um IMER (do inglês *Immobilized Enzyme Reactor*) a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência fornece seletividade, rapidez e possibilidade de reutilização da enzima. A reprodutibilidade deste sistema cromatográfico pode ser combinada com a especificidade e a sensibilidade de uma reação enzimática. Assim, a sensibilidade de detecção é aumentada e os IMERs podem ser usados para isolar e/ou identificar compostos biologicamente ativos em misturas complexas. Esse processo cromatográfico pode ser chamado de cromatografia seletiva de afinidade ou biocromatografia.^{13,14}

O emprego de enzimas imobilizadas como suportes cromatográficos apresenta diversas vantagens, sobre a utilização de enzimas livres em solução, entre as quais podem ser destacadas: 1) a utilização de pequenos volumes de amostra (pL-nL); 2) aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima em relação à temperatura, solventes orgânicos e variação de pH sem perda considerável da atividade catalítica; 3) reutilização; 4) pequeno manuseio da amostra, evitando contaminações; 5) fácil separação da enzima dos produtos da reação. Essas vantagens são úteis nos estudos enzimáticos *on-line*, onde os

produtos da reação enzimática e os inibidores são detectados diretamente por UV-Vis, fluorescência ou espectrometria de massas.^{12,15-19}

Além disso, os estudos envolvendo enzimas imobilizadas retratam com maior proximidade a conformação da enzima nos sistemas biológicos, considerando que um grande número de enzimas ocorre naturalmente na forma “imobilizada” por estarem em membranas celulares ou fazendo parte de complexos contendo várias enzimas.¹⁰

Os IMERs têm sido usados em várias áreas da química – desde a medicinal até a síntese orgânica enantiosseletiva e em estudos farmacológicos e de metabolismo. Entre estas aplicações destaca-se a identificação de substratos ou inibidores para a descoberta de potenciais fármacos, como exemplificado na Tabela 1.1.^{20,21}

TABELA 1.1. Aplicações de LC-IMERs na pesquisa de novos fármacos.¹¹

Enzima imobilizada	Doença alvo	Inibidor	Substrato
Feniletanolamina <i>N</i> -metiltransferase	Hipertensão	Benzilamina, <i>N</i> -etilmaleimida, Ácido <i>p</i> -cloromercúrio-fenil sulfônico <i>S</i> -Adenosil-L-homocisteína Metildopa	Nometanefrina, Norepinefrina
Dopamina β - hidroxilase	Hipertensão	Captopril, ácido fusárico	Tiramina, ácido ascórbico
Acetilcolinesterase	Mal de Alzheimer Miastenia grave Glaucoma	Tacrina, donepezil, rivastigmina	Acetiltiocolina, acetilcolina
Glutamina sintetase	Epilepsia, Intoxicação por fármacos	Fenitoína, carbamazepina, sulfoximina metionina, AMP	Glutamato
N- Acetilglicosaminil transferase-V	Tumores malignos mamários, hepatocelulares e pancreáticos	Trissacarídeos	UDP- <i>N</i> - acetilglicosamina

1.2. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos

Embora diversas tecnologias disponíveis em diferentes áreas da ciência, como a microbiologia, engenharia de proteínas e química de proteínas, possam ser utilizadas para melhorar as propriedades das enzimas, uma técnica relativamente antiga, a imobilização de enzimas, tem se mostrado uma poderosa ferramenta para aumentar a estabilidade da enzima, essencial para os diversos estudos cinéticos que demandam reprodutibilidade, característica que permite sua aplicabilidade em diferentes campos da pesquisa científica.²²

A imobilização de biomoléculas teve início nos anos 60 e o seu grande desenvolvimento deve-se principalmente ao extenso uso nos processos industriais. Enzimas imobilizadas são amplamente usadas em biocatálise, bioprocessos e detecção bioespecífica.³

Os biorreatores contendo enzimas imobilizadas podem ser empregados em biocatálise, onde se utilizam as reações enzimáticas na obtenção de um produto de interesse, ou ainda, na transformação de um analito em uma espécie mais facilmente detectável, e também podem ser utilizados como uma técnica valiosa na triagem de ligantes e em estudos cinéticos.²³

O processo de imobilização de enzimas pode ser realizado “*in situ*” ou “*in batch*”. No processo “*in batch*”, a enzima é primeiramente imobilizada sobre o suporte e em seguida empacotada na coluna. Já no processo “*in situ*”, a enzima é imobilizada diretamente na coluna previamente empacotada. Alguns estudos de comparação entre os dois modos na imobilização da Penicillin G acylase (PGA), utilizando vários suportes derivados de sílica, demonstraram que os melhores resultados foram obtidos, em termos de quantidade de PGA ligada, quando foi utilizada a técnica de imobilização “*in situ*”. Além disso, observou-se que durante o processo “*in batch*” pode ocorrer a inativação da enzima.²⁴

As técnicas freqüentemente empregadas na imobilização de enzimas em suportes sólidos baseiam-se em interações químicas ou físicas entre a proteína e o suporte. Os métodos de imobilização baseados em interações químicas

incluem principalmente a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte ou a formação de ligações cruzadas entre a enzima e a proteínas inativas ou entre as próprias enzimas. Os métodos baseados em interações físicas envolvem: i) a adsorção física ou iônica das moléculas de enzima em um suporte poroso ou carregado ou ii) o confinamento dentro de uma matriz de gel insolúvel. Esses métodos são sumarizados na Figura 1.1.^{24,25}

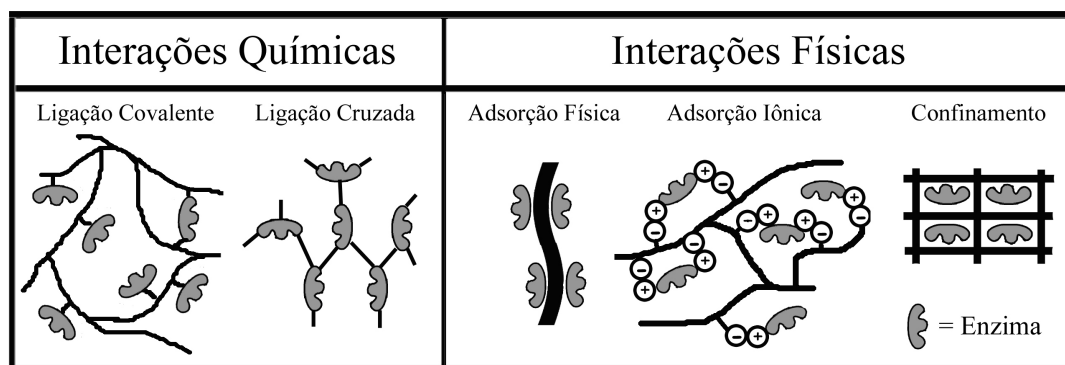


FIGURA 1.1. Métodos de imobilização de enzimas baseados em interações químicas e físicas.

A *imobilização por ligação covalente* é uma dos métodos mais utilizados e envolve a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte. As ligações são normalmente formadas entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos [(NH₂) de lisina e arginina, o (CO₂H) de ácido aspártico ou glutâmico, o (OH) de serina ou tionina e o grupo (SH) de cisteína]. As principais vantagens deste método são: 1) a diminuição da velocidade de inativação espontânea, como ocorre na autodigestão de proteases, 2) evitar o fenômeno de dessorção, e 3) aumentar o tempo de vida útil do biorreator. Envolve, ainda, o aumento da estabilidade térmica, uma vez que a forte interação da enzima ao suporte promove a rigidez da estrutura da enzima, limitando seu movimento, quando submetida a altas temperaturas.^{25,26}

A *imobilização por ligação cruzada* é livre de suporte e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), através de reagentes bi- ou multifuncionais (glutaraldeído, diisocianato, etc), formando uma estrutura complexa tridimensional. No entanto, esse método possui algumas desvantagens, como baixa retenção de atividade, pouca reprodutibilidade e baixa estabilidade mecânica. A pouca estabilidade mecânica, que geralmente dificulta sua aplicação industrial, pode ser aumentada pela ligação cruzada das enzimas em matriz de gel ou sobre suportes.^{25,27}

A *imobilização por adsorção física* constitui-se no método mais simples, onde a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. O procedimento é simples e consiste na mistura da enzima com o suporte sob condições de pH, força iônica e períodos de incubação adequados. Promove pequena perturbação na estrutura nativa da enzima, mas, no entanto, e como desvantagem, permite a dessorção da enzima durante o uso.²⁵

Na *imobilização por adsorção iônica*, a enzima se une ao suporte através de atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas presentes, tanto na superfície do suporte, quanto da enzima. Essa união é mais efetiva que a adsorção física, mas é inferior quando comparada com outros métodos. Para evitar que ocorra a dessorção da enzima é de suma importância o controle do pH e da força iônica do meio.^{25,28}

Na *imobilização por confinamento* da enzima em uma matriz insolúvel, a proteína é misturada aos componentes que formarão o gel e, quando esse é formado, a enzima fica presa à matriz.^{24,25,29}

A estrutura do suporte onde a biomolécula será imobilizada é um fator determinante na preparação dos reatores bioativos, pois define o fácil acesso do substrato aos sítios ativos da biomolécula. Além disso, a superfície do suporte tem um papel fundamental na preservação da estrutura terciária da enzima, que

exerce grande influência sobre a estabilidade térmica e atividade catalítica da enzima imobilizada. O suporte ideal deve ser inerte, estável e resistente à força mecânica. Outras propriedades também devem ser consideradas: a forma, a distribuição e tamanho de poro, a capacidade de expansão, além das cargas, as quais influenciam o processo cinético.

Vários suportes estão disponíveis comercialmente, para serem utilizados nos processos de imobilização de enzimas e outras biomoléculas. Exemplos de suportes amplamente usados são: os monolitos (de sílica ou de polímeros orgânicos); as membranas artificiais imobilizadas (IAM, do inglês *Immobilized Artificial Membranes*); os capilares de sílica fundida; os polissacarídeos, como a celulose, a dextrana e a agarose; e suportes de sílica, como a sílica comum, a aminopropil, octil ou octadecilsílicas; etc.^{3,30}

Alguns aspectos devem ser considerados quando da escolha do método a ser empregado no desenvolvimento de um novo biorreator. Os sítios ativos da biomolécula devem ser conhecidos, a fim de evitar a perda da atividade enzimática pela ligação destes sítios ao suporte, além das suas propriedades bioquímicas como massa molecular, pureza e estabilidade. Deve-se ainda levar em consideração os grupos funcionais, tamanho de poro e diâmetro da partícula do suporte.²⁴

Nos casos em que os sítios ativos da enzima não são bem conhecidos ou em que se possuem poucas informações acerca de sua estrutura, pode-se realizar a imobilização da enzima na presença do substrato ou de um inibidor competitivo em concentrações de saturação. Tal condição assegura que o sítio ativo não reaja durante o processo de imobilização e reduz a porcentagem de enzima imobilizada em conformação não catalítica (Figura 1.2), proporcionando que a enzima retenha a atividade após o processo de imobilização. A atividade da enzima imobilizada pode então ser restaurada pela simples lavagem do IMER, removendo o substrato ou o inibidor.³¹

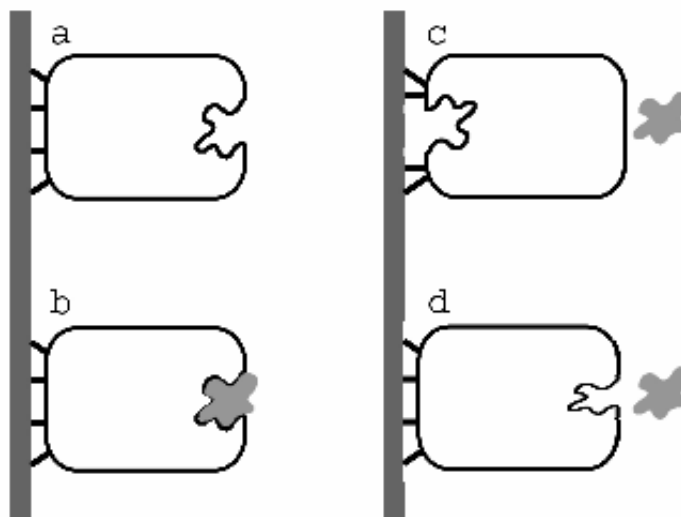


FIGURA 1.2. Representação dos possíveis efeitos na acessibilidade do sítio ativo causados pela imobilização.

Em (a) na Figura 1.2, a enzima foi imobilizada com o sítio ativo inalterado e disponível para catalisar a reação do substrato, como mostrado em (b). Em (c) a enzima está imobilizada, de modo que o sítio ativo permaneceu inacessível, portanto, ela não catalisa a reação. Em (d) o sítio ativo da enzima ficou distorcido, após o processo de imobilização, o que resulta na inatividade da enzima.³¹

A escolha do suporte, bem como da técnica a ser utilizada, depende da natureza da enzima, da natureza do substrato e de sua aplicação final. Assim, não é possível sugerir uma maneira universal de imobilização. Muitas vezes, o aumento da estabilidade, da seletividade e da atividade catalítica da enzima é obtido através da combinação de diferentes técnicas de imobilização e da seleção apropriada do suporte.³² Na Tabela 1.2, apresenta-se um resumo das dificuldades de cada método de imobilização, que serve como orientação para seleção do método adequado.³³

TABELA 1.2. Comparação entre os métodos de imobilização mais utilizados.³¹

Características	Adsorção	Ligação covalente	Ligação cruzada	Em microcápsula
Preparo	Simples	Difícil	Difícil	Simples
Custo	Baixo	Alto	Moderado	Alto
Força de ligação	Variável	Forte	Fraca	Forte
Intercruzamento	Sim	Não	Sim	Não
Aplicabilidade	Freqüente	Seletiva	Freqüente	Muito freqüente
Problemas experimentais	Muitos	Poucos	Muitos	Muitos
Efeitos da matriz	Sim	Sim	Sim	Não
Grande barreira difusional	Não	Não	Sim	Sim
Proteção microbiana	Não	Não	Sim	Sim

1.3. Doenças parasitárias tropicais

As doenças parasitárias tropicais, como a doença de Chagas, a esquistossomose, a malária e a leishmaniose, têm recebido grande atenção do Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (*Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases*) da Organização Mundial de Saúde (OMS).³⁴ Estas doenças afetam aproximadamente 1 bilhão de pessoas, principalmente as populações pobres que vivem em regiões tropicais ou sub-tropicais. Frequentemente essas doenças sobrepõem-se geograficamente, sendo comum que um mesmo indivíduo esteja contaminado com mais de uma infecção.³⁵

Para algumas dessas doenças infecto-parasitárias consideradas prioritárias não há vacinas disponíveis e os fármacos permanecem como alternativa ao

controle destas doenças. Contudo, o repertório de fármacos disponível é limitado e/ou inadequado, e o quadro é bastante agravado pela emergência de cepas de parasitas resistentes.^{36,37} Esse quadro torna o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de tais doenças uma clara necessidade de saúde pública.³⁸

1.3.1. A doença de Chagas

Alguns parasitas protozoários da família Trypanosomatidae causam uma grande variedade de doenças graves como a tripanossomíase, conhecida como doença de Chagas. Aproximadamente 120 milhões de pessoas correm o risco de contrair a infecção na América Latina, onde a doença é endêmica em quinze países, e estima-se que entre 16-18 milhões de pessoas, a maioria crianças, estejam infectadas. Entretanto, devido a migração em grande escala de latino-americanos para diversas partes do mundo, a doença de Chagas se tornou um problema de saúde global. Nos últimos anos têm sido relatado o aumento dos casos desta doença nas áreas urbanas da América do Norte.³⁹ Cerca de 3 milhões das pessoas infectadas têm desenvolvido complicações severas, caracterizadas por cardiopatia crônica, lesões digestivas e distúrbios neurológicos, levando a morte cerca de 45 mil pessoas ao ano.^{40,41}

A doença de Chagas assim nomeada, após ser descoberta pelo sanitarista brasileiro Carlos Chagas, em 1909, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e constitui-se, em termos de impacto social e econômico, em um dos mais graves problemas de saúde pública na América Latina. Ela é transmitida aos humanos pelo vetor *Triatoma infestans*, inseto conhecido popularmente como “vinchuca”, “barbeiro”, “chipo”, etc. A infecção também pode ocorrer através de transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgãos, incidentes laboratoriais ou através da ingestão de comida ou bebida contaminada.⁴²

A doença de Chagas apresenta duas fases bastante distintas: a fase aguda e a crônica. Na manifestação aguda da doença, que varia entre 6-8 semanas, ocorre

inflamação no local de entrada do *T. cruzi* no corpo humano e quando a transmissão se dá através da mucosa do olho, pode-se observar o *senal de Romaña*: edema unilateral que acomete a conjuntiva e ambas as pálpebras de um dos olhos, assumindo coloração rósea-violácea, com secreção e congestão, ocorrendo também adenopatia satélite pré-auricular. As manifestações das infecções generalizadas ocorrem concomitantemente com febre, linfadenopatia, esplenomegalia branda, edema e taquicardia com freqüente comprometimento cardíaco caracterizado por miocardite aguda. Nesta fase, os parasitas estão amplamente disseminados e podem ser detectados por exame direto de sangue. No entanto, em grande parte dos pacientes esta fase passa despercebida devido à ausência total ou parcial das manifestações clínicas.

Quando não tratada, a maioria das pessoas infectadas passa para um período clinicamente silencioso e sem manifestações detectáveis, chamado de forma crônica indeterminada, de longa duração (10-30 anos) podendo permanecer neste estado por toda a vida. Nesse estágio da doença, o parasita é raramente detectado no sangue periférico do paciente chagásico e, após esse período, muitos apresentam comprometimento de certos órgãos vitais como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso. Entretanto, é estimado que 30% das pessoas infectadas iniciarão o estágio crônico sintomático da doença, usualmente uma década após a infecção, com manifestações cardíacas, como arritmia, cardiomiopatia e morte súbita.

Desde sua descoberta em 1909, vários tipos de tratamentos foram testados para a doença de Chagas, porém nenhum fármaco seguro e eficaz foi, até o momento, descoberto. Os fármacos nifurtimox (Lampit[®], Bayer) e o benznidazol (Rochagan[®], Roche), disponíveis há mais de 30 anos, são efetivos apenas na fase aguda da infecção. O nifurtimox não é mais comercializado no Brasil e em outros países como a Argentina, Uruguai e Chile. Estes fármacos apresentam baixa eficácia e severos efeitos colaterais, como anorexia, perda de peso,

alterações psíquicas, vômito, dermatite alérgica e neuropatia periférica. As estruturas destes fármacos são mostradas na Figura 1.3.⁴³⁻⁴⁵

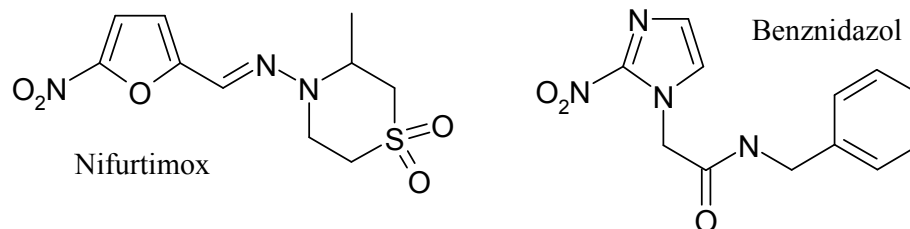


FIGURA 1.3. Estruturas dos fármacos empregados no tratamento da doença de Chagas.

Os compostos alopurinol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol tiveram sua eficácia avaliada no tratamento da doença de Chagas.

O alupurinol é um análogo da hipoxantina e atua como um substrato alternativo da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT) e é incorporado ao DNA. Esta incorporação leva à formação de nucleotídeos não fisiológicos que bloqueiam a síntese *de novo* de purinas no parasita. O emprego deste fármaco na fase aguda da doença mostrou-se ineficaz, por outro lado apresentou elevado índice de cura em pacientes na fase crônica com menos efeitos colaterais que o nifurtimox e benznidazol.⁴⁵

O cetoconazol foi um dos primeiros imidazóis que mostraram atividade *in vitro* contra a forma epimastigota do *T. cruzi*, provavelmente devido ao acúmulo dos metabólitos do esterol. Nos ensaios *in vivo*, levou à cura parasitológica em experimentos animais na fase aguda da doença, mas não é efetivo na fase crônica.⁴⁵

O fluconazol e o itraconazol são derivados de azóis que interferem na síntese de ergosterol. O itraconazol apresentou 36,5% de cura em estudos com pacientes na fase crônica, enquanto que o isômero D(+) do fluconazol apresentou 60-70% de cura na fase crônica e na aguda em experimentos com ratos.^{45,46}

Considerando este quadro, tem sido estimulada a busca por uma quimioterapia anti-parasitária eficiente e segura. Um novo composto ativo pode emergir da triagem em coleções de compostos naturais ou sintéticas, de compostos com similaridades estruturais com um fármaco com atividade conhecida, de ensaios com agentes já aprovados para outras enfermidades ou através da determinação de um alvo específico, identificado em um processo metabólico chave.⁴⁵

Recentes desenvolvimentos no estudo da biologia básica de *T. cruzi* tem permitido a identificação de novos alvos para o tratamento quimioterapêutico, que incluem o metabolismo de esteróis, enzimas como tripanotona redutase, cisteína protease, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), DNA topoisomerasas, diidrofolato redutase (DHFR) e farnesilpirofosfato sintetase (FPPS).⁴⁵

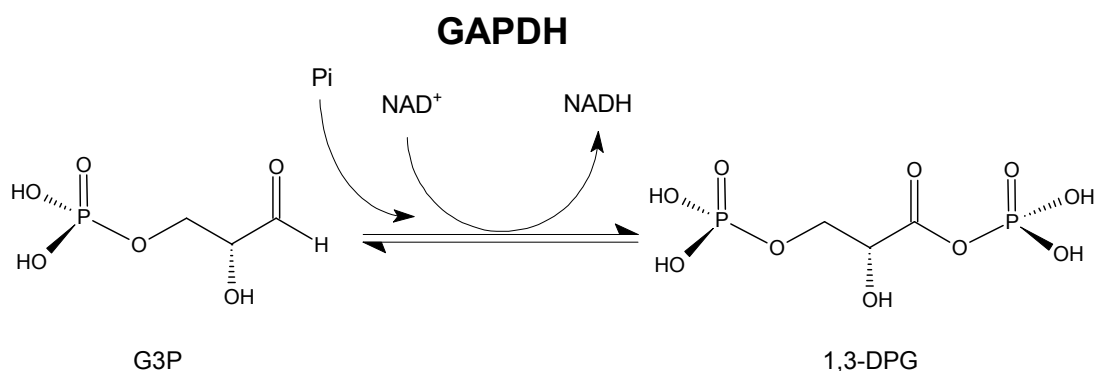
1.3.2. A enzima GAPDH como alvo na busca de novos agentes tripanocidas

Em 1977, Opperdoes e Borst descobriram que parasitas da família Trypanosomatidae possuem uma organela especializada, chamada glicossoma, que contém nove enzimas envolvidas nas reações da via glicolítica. O estudo foi realizado com o *Trypanosoma brucei*, agente causador da doença do sono e evidenciou que o parasita é altamente dependente da glicólise para a produção de ATP. Estudos mostraram que a forma amastigota intracelular e tripamastigota de *T. cruzi* também é altamente dependente desta via metabólica.^{45,47} Isto se deve ao fato do parasita possuir mitocôndrias inativas durante determinadas fases de seu ciclo celular, o que impossibilita a obtenção de energia por rotas metabólicas alternativas mais eficientes. Assim, a inibição seletiva de enzimas essenciais a este processo metabólico, fisiologicamente importante, impediria o parasita de obter a energia necessária para sua sobrevivência. Portanto, as

enzimas glicolíticas tornaram-se alvos atrativos para o desenvolvimento de fármacos tripanocidas.^{40,45,48,49}

Um estudo sobre o controle do fluxo glicolítico em tripanosomatídeos realizado por Bakker e colaboradores⁴⁷ evidenciou as principais enzimas cuja inibição levaria a uma redução da glicólise no parasita. Este estudo mostrou que a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é um alvo atrativo para a intervenção na glicólise, sua inibição em 84% levaria a redução de 50% do fluxo glicolítico. Dessa forma, a enzima foi escolhida como alvo para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas por diversos grupos de pesquisa.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), sexta enzima do processo de glicólise é um homotetrâmero de massa molecular de aproximadamente 156 kDa, que catalisa a fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (D-G3P) em 1,3-disfosfoglicerato (1,3-DPG) na presença de NAD^+ e fosfato inorgânico. (Esquema 1.1)



ESQUEMA 1.1. Catálise reversível da GAPDH na presença de fosfato inorgânico. Adaptado de Lehninger.⁵⁰

Estudos estruturais mostraram que as estruturas da GAPDH de diferentes espécies são muito similares como, por exemplo, as GAPDH do *T. cruzi* e *T. brucei* que apresentam cerca de 90% da seqüência idêntica. No entanto, possuem diferenças significantes em relação à atividade catalítica e sensibilidade interespecies. A determinação da estrutura tridimensional da enzima GAPDH de *T. cruzi* (Figura 1.4) evidenciou importantes diferenças

estruturais com relação à sua homóloga humana. O sítio ativo na GAPDH de *T. cruzi* e GAPDH humana difere pela substituição da Asp²¹⁰ (*T. cruzi*) pelo Leu¹⁹⁴ (humanos). Esta substituição sugere que substâncias que ocupem parcialmente o sítio ativo e ao mesmo tempo façam interações polares com a Asp²¹⁰ na cadeia lateral poderia aumentar especificamente para a enzima do parasita. Com base nesta diferença, inibidores enzimáticos seletivos para o tratamento da doença de Chagas podem ser desenvolvidos.⁴⁰ Outra importante razão para selecionar a enzima GAPDH como alvo é que a deficiência de GAPDH nos eritrócitos humanos não causa nenhum sintoma clínico.⁵¹

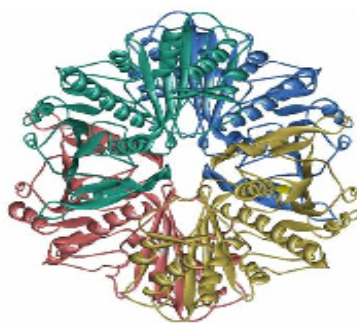


FIGURA 1.4. Estrutura cristalográfica da GAPDH de *T. cruzi*.⁴¹

As diferenças específicas apresentadas entre GAPDH de *T. cruzi* e a GAPDH humana justificam o desenvolvimento de IMERs utilizando ambas enzimas para serem utilizados na triagem de ligantes específicos para *T. cruzi*

Evidências recentes sugerem uma variedade de funções para a GAPDH humana que inclui o envolvimento direto na produção de energia na via glicolítica, a participação dos processos enzimáticos no reparo a danos ao DNA e na replicação durante o ciclo celular e no processo de endocitose. Além disso, a GAPDH é super-expressada e se acumula no núcleo durante os processos de apoptose, em tumores de mucosa oral, mama, cólon e próstata.⁵² Atribui-se ainda a GAPDH humana envolvimento na fusão de membrana, empacotamento de microtubulos e na exportação do RNA nuclear.^{53,54} Em adição, problemas

com a atividade da GAPDH tem sido recentemente associada às disfunções celulares em algumas doenças neurodegenerativas e diabetes.⁵⁵

1.4. Cinética enzimática

As reações químicas envolvidas em processos biológicos são geralmente mediadas por enzimas, que desempenham a função de catalisadores. A catálise das reações se processa através da formação do complexo enzima-substrato, o qual diminui a cinética e as barreiras de energia associada com a transformação química. Esses processos são freqüentemente descritos em termos da cinética de Michaelis-Menten. As enzimas são catalisadores específicos para certas reações e através de medidas da cinética enzimática é possível determinar a afinidade de ligação entre enzima e substrato e a taxa catalítica máxima de uma enzima. Assim, a observação da variação da taxa de reação, em diferentes condições, combinada com informações químicas e estruturais, pode levar à determinação do mecanismo catalítico da enzima.⁵⁶

Para explicar a especificidade enzimática, em 1894 Emil Fischer propôs o modelo chave-fechadura, um modelo em que a estrutura da enzima e do substrato são rígidas. A enzima se encaixaria com o substrato específico no sítio ativo, como uma chave e fechadura. Entretanto, esta hipótese não parece adequada quando se considera a catálise enzimática, pois uma enzima totalmente complementar a seu substrato seria uma enzima pouco eficiente. Um modelo mais flexível da interação enzima-substrato é o encaixe induzido, proposto por Koshland em 1958. Neste modelo, se considera que o sítio ativo da enzima não está completamente pré-formado, e a enzima e o substrato passam por mudanças conformacionais para propiciar o encaixe efetivo.^{57,58}

Todas as reações enzimáticas são iniciadas pela formação de um complexo binário (ES) entre a enzima (E) e seu substrato (S). A formação deste complexo é freqüentemente dirigida por interações não-covalentes entre o sítio ativo da enzima e o substrato, e ocorre através de um processo rápido e reversível, antes

da formação do produto. Rapidamente o complexo se dissocia liberando o produto (P) e a enzima:⁴



Esse modelo foi proposto por Adrian Brown em 1902, quando em seus estudos observou que, se a concentração do substrato é alta o suficiente para converter completamente a enzima em sua forma ES, a segunda etapa da reação irá tornar-se a etapa limitante da velocidade. Ou seja, nestas condições, a velocidade da reação torna-se independente da concentração do substrato.⁵⁹

Em um esquema cinético complexo, a velocidade de formação dos produtos pode ser expressa como o resultado da multiplicação da constante de velocidade da reação a formar os produtos e a concentração do seu intermediário imediatamente anterior. Dessa forma, a expressão geral para a velocidade da reação é dada pela Equação 1.2:

$$V_0 = k_2 [ES] \quad \text{Equação 1.2}$$

Como [ES] na Equação 1.2 não é facilmente mensurável, o termo $[E]_T$ deve ser introduzido, representando a concentração total da enzima ($[E]_T = [E] + [ES]$).

A relação quantitativa entre a velocidade da reação enzimática e a concentração do substrato é definida pela equação de Michaelis-Menten. No desenvolvimento desta equação supõe-se que: **i)** k_2 é muito pequena quando comparada a k_{-1} e **ii)** a velocidade de formação do complexo (ES) é igual a velocidade de sua degradação (postulado do estado estacionário). Dessa forma, a

velocidade da formação do complexo ES deve igualar a sua velocidade de consumo durante a reação:

$$k_1 ([E]_T - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad \text{Equação 1.3}$$

Resolvendo a Equação 1.3 em função da [ES] obtém-se:

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 1.4}$$

Onde $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ é conhecida como a constante de Michaelis-Menten.

Substituindo-se a [ES] (Equação 1.4) na Equação 1.2 obtém-se a expressão para a velocidade inicial (V_0) da reação:

$$V_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 1.5}$$

Tanto $[E]_T$ como $[S]$ são mensuráveis experimentalmente.

A velocidade máxima é obtida quando os centros catalíticos na enzima estão saturados com o substrato, ou seja, $[S]$ é muito maior que K_M , de tal forma que $[S]/([S] + K_M)$ na Equação 1.5 se aproxima de 1. Portanto, $V_{\text{máx}} = k_2 [E]_T$ e obtém-se a equação chamada de Michaelis-Menten, equação básica no estudo de cinética enzimática.

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação de Michaelis-Menten (Equação 1.6)}$$

A constante de Michaelis-Menten, K_M , corresponde à concentração de substrato para qual a velocidade de reação corresponde à metade da velocidade

máxima e depende do substrato e das condições do meio, tais como pH, temperatura e força iônica. Considerando a suposição: **i**) ($k_2 \ll k_{-1}$), discutida anteriormente, pode-se considerar que K_M é uma medida da afinidade da enzima pelo substrato, sendo que um baixo valor de K_M indica uma ligação ES forte.

As medidas das velocidades iniciais da reação, em várias concentrações de substrato, permitem a construção da curva de Michaelis-Menten e a determinação dos valores de V_{\max} e K_M .

Um método gráfico simples para se obter um valor aproximado de K_M é ilustrado na Figura 1.5. A Equação 1.7, obtida invertendo-se a equação de Michaelis-Menten, é chamada de equação de Lineweaver-Burk. A grande vantagem desta equação é a determinação mais exata de V_{\max} , que pode ser obtida apenas aproximadamente pelo gráfico de V_0 versus $[S]$ (hipérbole de Michaelis-Menten).⁶⁰

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}[S]} \quad \text{Equação de Lineweaver-Burk} \quad (\text{Equação 1.7})$$

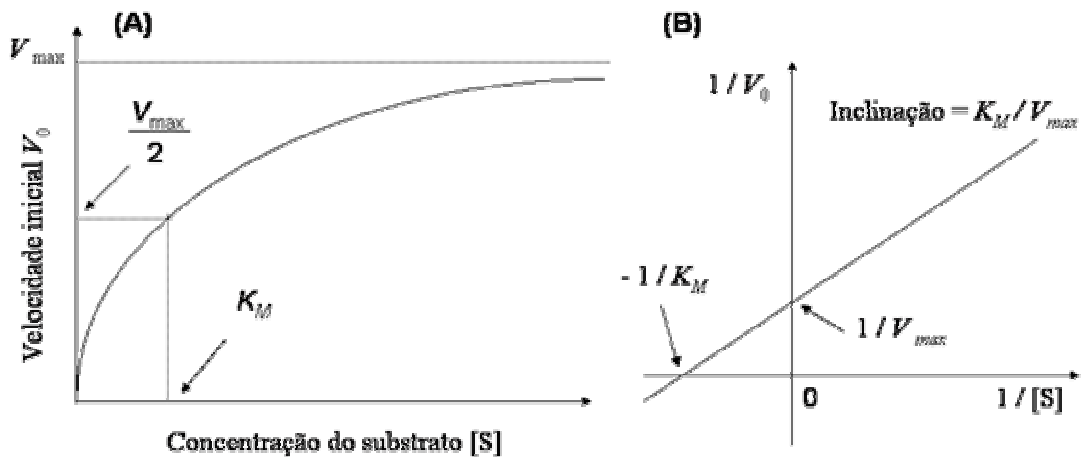


FIGURA 1.5. (A) Hipérbole de Michaelis-Menten e (B) Gráfico de Lineweaver-Burk.

1.5. Inibidores enzimáticos

Inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem na catálise enzimática, diminuindo ou bloqueando as reações, quando adicionados ao meio reacional. As enzimas catalisam todas as reações envolvidas nos processos celulares, então, não é surpreendente que inibidores enzimáticos estejam entre os produtos farmacêuticos mais conhecidos, como discutido anteriormente. Dentre os 97 fármacos introduzidos no mercado no período de 1998 a 2000, 31 deles são inibidores enzimáticos. A inibição seletiva de enzimas cruciais aos organismos infecciosos (vírus, bactérias e parasitas) é um meio atrativo para o tratamento diversas patologias. As enzimas humanas também são alvos terapêuticos quando o produto da reação é o causador de uma desordem ou quando é necessário provocar o acúmulo de um substrato cuja deficiência esteja relacionada a uma doença ou disfunção no organismo.⁶¹

Como exemplo da aplicação terapêutica de inibidores enzimáticos pode ser citado a vigabatrina, um composto com estrutura similar ao ácido γ -aminobutírico (GABA), que atua como inibidor irreversível da GABA-transferase, permitindo o acúmulo de GABA no sistema nervoso central. A diminuição dos níveis de neurotransmissores inibidores do sistema nervoso central, como o GABA, provoca convulsões.⁶¹

1.5.1. Inibição irreversível

Na inibição irreversível, o inibidor se liga covalentemente ou destrói um grupo funcional da enzima que é essencial à atividade enzimática. Uma enzima inativada através de inibição irreversível não pode ser reativada por meio de diálise ou procedimentos similares. Existem também algumas moléculas que não são reativas, mas ao reagirem com a enzima como pseudo-substratos dão origem a espécies reativas que se ligam covalentemente à enzima tornando-a inativa. Neste tipo de inibição a perda de atividade enzimática é tempo-dependente.^{31,62}

Um exemplo de inibidor irreversível empregado clinicamente é a aspirina, que acetila irreversivelmente a prostaglandina sintetase, ou ciclooxigenase, e é utilizada como antiinflamatório, antipirético e analgésico.⁶¹

1.5.2. Inibição reversível

Os inibidores reversíveis constituem a mais importante classe de inibidores para estudos enzimáticos. Estes inibidores geralmente formam complexos não-covalentes com as enzimas e, portanto, diminuem a quantidade de enzima disponível para participar da seqüência normal da reação. Na inibição reversível a enzima retoma a sua atividade após a dissociação do inibidor.

Todos os inibidores reversíveis formam complexos dinâmicos com as enzimas que possuem propriedades catalíticas diferentes da enzima livre. Inibidores reversíveis são divididos de acordo com o modo de ligação com a enzima em três tipos: competitivos, incompetitivos e não-competitivos.⁶²

1.5.2.1. Inibição reversível competitiva

Na inibição reversível competitiva, um *inibidor competitivo* compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Grande parte dos inibidores competitivos se assemelha ao substrato e se ligam ao sítio ativo da enzima formando o complexo enzima-inibidor (EI) sem que a catálise enzimática ocorra.(Figura 1.6) Nessas condições, o substrato não se liga ao sítio ativo e, portanto, a reação enzimática não ocorre. Assim, a formação dos complexos EI diminui a eficiência da catálise enzimática, mas quando ocorre a dissociação do complexo a enzima fica livre e pode catalisar a reação com o substrato.

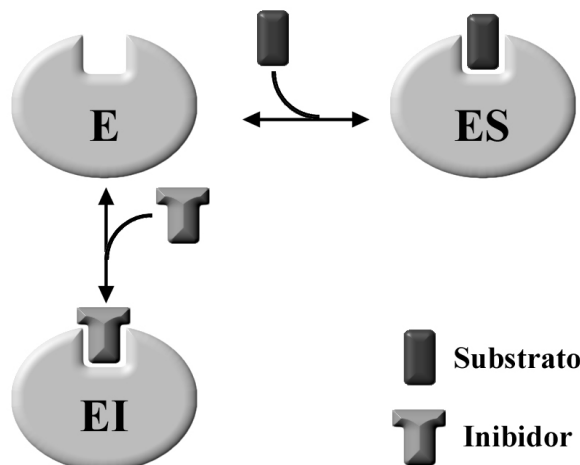


FIGURA 1.6. Ilustração do equilíbrio enzimático com um inibidor competitivo.

Um aumento na concentração do substrato em relação à concentração do inibidor resulta numa maior atividade enzimática, pois a probabilidade da enzima se chocar com o substrato aumenta, e na presença de excesso de substrato, este desloca totalmente o inibidor, já que competem pelo mesmo sítio da enzima. Assim, os valores de V_{\max} permanecem inalterados. Entretanto, o valor de K_M aparente aumenta na presença do inibidor, pois será necessária uma concentração maior do substrato para atingir a metade de V_{\max} . Este efeito no K_M aparente, associado com a ausência de alterações no V_{\max} , é empregado na identificação de inibidores competitivos.⁴

Um exemplo de fármaco que age como inibidor competitivo é o sildenafil, empregado no tratamento de disfunção erétil, que atua como inibidor competitivo da enzima fosfodiesterase tipo 5. O sildenafil possui estrutura similar a do substrato, GMPc (guanosina monofosfato cíclico), e compete com este pelo sítio ativo da enzima.⁴

1.5.2.2 Inibição reversível incompetitiva

Na inibição reversível incompetitiva, um *inibidor incompetitivo* se liga exclusivamente ao complexo enzima-substrato (ES), ou espécies subsequentes, e possui pouca ou nenhuma afinidade pela enzima livre (Figura 1.7).

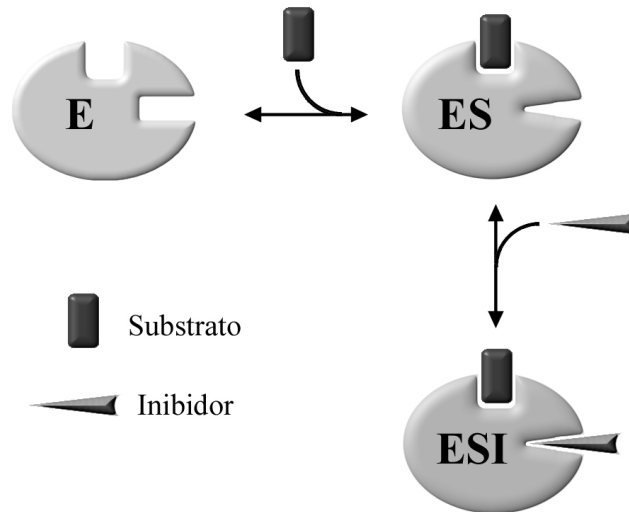
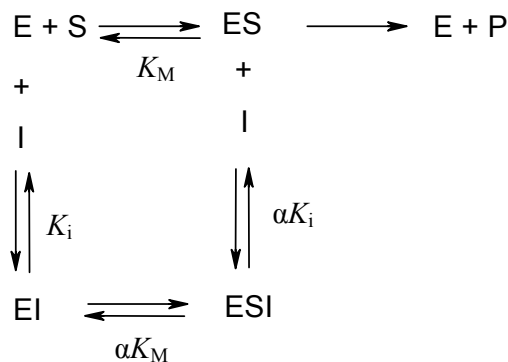


FIGURA 1.7. Ilustração do equilíbrio enzimático com um inibidor incompetitivo.

Inibidores pertencentes a esta classe requerem a ligação prévia do substrato à enzima, para posteriormente se ligar ao complexo e efetivar a inibição propriamente dita através da formação do complexo (ESI) que é inativo.



ESQUEMA 1.2. Equilíbrio da catálise enzimática na presença de ausência de inibidores.

De acordo com o esquema 1.2, a formação do complexo ternário ESI representa um ciclo termodinâmico entre as espécies ES, EI e ESI. Portanto, o acréscimo da afinidade de um inibidor incompetitivo que acompanha a formação do complexo ES precisa ser balanceado por um acréscimo idêntico da afinidade do substrato pelo complexo EI. Como resultado, o efeito observado experimentalmente de um inibidor incompetitivo é a diminuição nos valores de V_{\max} e K_M .

O ácido valpróico pode ser citado como exemplo de fármaco que atua como inibidor incompetitivo da enzima glucuronosiltransferase no metabolismo xenobiótico.⁴

1.5.2.3. Inibição reversível não-competitiva

Na inibição reversível não-competitiva, um *inibidor não-competitivo* é aquele que possui afinidade de ligação tanto pela enzima livre como pelo complexo enzima-substrato (ES), ou seja, ele se liga a uma região da enzima diferente do sítio ativo, denominada sítio alostérico. (Figura 1.8)

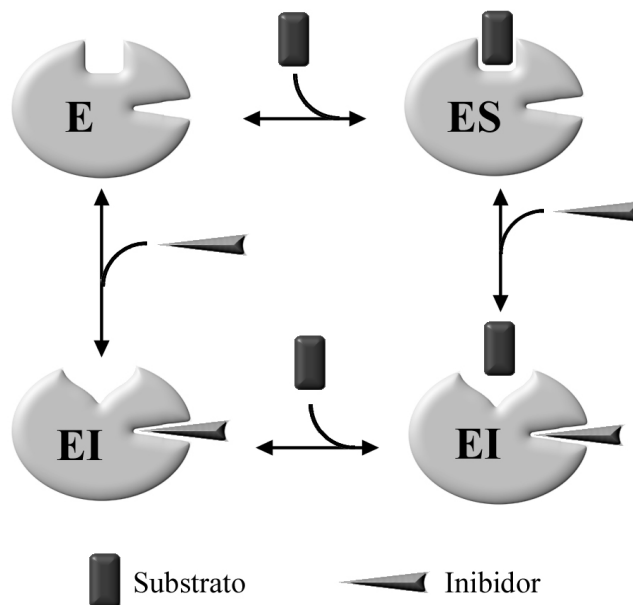


FIGURA 1.8. Ilustração do equilíbrio enzimático com inibidores não-competitivos.

A ligação com o inibidor não bloqueia a reação do substrato, mas provoca uma alteração conformacional na enzima que evita a formação do produto. Então a inibição não é revertida pelo aumento na concentração do substrato mas provoca a diminuição do valor de V_{\max} por reduzir a concentração de enzima ativa.

Existem poucos exemplos de inibidores não-competitivos no uso clínico. Isto reflete a tendência da busca por novos fármacos que atuem como inibidores diretamente no sítio ativo. Um exemplo de fármaco que atua como inibidor não-competitivo é o efavirenz, utilizado no tratamento da AIDS, que atua como inibidor da transcriptase reversa não-nucleosídeo.⁴

Com base no exposto, este trabalho versa sobre o desenvolvimento/validação de método biocromatográfico para triagem de inibidores da GAPDH.

2. Objetivos

Os objetivos fundamentais desta dissertação são:

- Modular o ensaio enzimático com a GAPDH-Tc para as condições cromatográficas.
- Estudar as condições de imobilização para a GAPDH-Tc.
- Realizar os estudos cinéticos para a enzima imobilizada e avaliar a estabilidade nas condições cromatográficas de análise.
- Padronizar os ensaios para a triagem bioquímica de inibidores com as enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu imobilizadas.
- Validar o uso dos biorreatores com as enzimas GAPDH-Hu e GAPDH-Tc na triagem de inibidores, através da realização de estudos da atividade inibitória de uma série de compostos com a enzima imobilizada e em solução.
- Utilizar os biorreatores enzimáticos na triagem de ligantes.

3. Procedimento Experimental

3.1. Generalidades

Cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 10 AD VP, onde uma delas está acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-10AL para gradiente de baixa pressão; um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-10AV; um auto-injetor SHIMADZU SIL 10 AD VP e uma válvula de seis caminhos VALCO NITRONIC 7000 que foi utilizada para o sequenciamento de colunas. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU SCL 10 AVP e os cromatogramas são registrados através de um software LC Solutions.

As colunas foram empacotadas em uma empacotadora Shandon utilizando tubos de aço inox (10,0 x 0,46cm D.I.).

As colunas analíticas foram preparadas utilizando sílica C₈ Luna-Phenomenex[®] (10μ, 100Å) e diol-sílica Spherex[®] OH (10μm, 100Å).

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema de deionização MILLI-Q[®] (MILLIPORE).

Os solventes orgânicos grau CLAE foram filtrados a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando membranas de nylon Phenomenex[®] de 0,45μm e posteriormente degaseificados em ultra-som COLE-PALMER 8852.

A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex PHOENX AP56.

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

As medidas de pH foram realizadas em pH-metro Qualxtron 8010 com precisão de 0,01.

Para o preparo do capilar e imobilização da enzima foi utilizada uma Syringe Pump 11 plus Harvard Apparatus.

Os reagentes e demais produtos químicos utilizados foram obtidos de diversas fontes: Sigma-Aldrich, Merck, Synth.

3.2. Empacotamento das colunas analíticas

Para o preparo da coluna Diol utilizou-se 1,5g de sílica diol (diol-sílica Spherex[®] OH, 10 μ m, 100Å) e para a coluna C₈ foi utilizado 1,5g de sílica octil (C₈ – Luna-Phenomenex[®], 10 μ m, 100Å).

No empacotamento das colunas analíticas, a fase estacionária foi suspensa em 50mL de metanol, homogeneizada em ultra-som por 3 minutos e empacotada em uma coluna de aço inoxidável (10 x 0,46 D.I.) sob pressão de 7000psi utilizando-se metanol como solvente. As colunas foram condicionadas por 12 horas com metanol 100% a uma vazão de 0,8mL.min⁻¹.

3.3. Preparo de fases móveis

TAMPÃO A: A solução Trietilamina (TEA) 1% foi preparada diluindo-se 10mL de TEA 99% em um volume total de 1L, ajustando-se a pH 6,0 com ácido acético glacial.

TAMPÃO B: A solução Trietanolamina 0,5mol/L foi preparada diluindo-se 3,32mL trietanolamina a um volume final de 250mL. Diluindo-se 20mL desta solução e acrescentando-se 1,86g de KCl (0,25mol/L), 936mg de arseniato de sódio (Na₂HAsO₄) (1mol/L), 1mL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (100mmol/L), 29,24mg de EDTA(1mmol/L) e 7 μ L de β -mercaptoetanol (1mmol/L), com pH ajustado a 7,5 com a adição de solução de HCl 10% em volume, a volume final de 100mL do tampão.

TAMPÃO C: A solução tampão TRIS 50mmol/L foi preparada pesando-se 1,52g de TRIS, 73,0mg de EDTA (1mmol/L), 17,0 μ L de β -mercaptoetanol (1mmol/L) e 2,34g de arseniato de sódio (1mol/L) para um volume final de 250mL em água. A solução foi ajustada a pH 8,6 com a adição de HCl a 10% em volume.

As fases móveis utilizadas nas colunas analíticas foram preparadas na proporção tampão A:MeOH (90:10) e tampão A:ACN (96,5:3,5) para coluna diol e C₈ respectivamente.

3.4. Preparo do reagente de Bradford e quantificação de proteínas

A solução de corante azul de Comassie foi preparada segundo o procedimento descrito por Bradford⁶³: em um béquer dissolveu-se 10mg de Comassie-blue G-250, em 5,0mL de etanol e a seguir acrescentou-se lentamente 10mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 85% P.A. sob agitação. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100mL e completou-se o volume com água. A solução do corante foi estocada em um frasco de vidro âmbar. Para a dosagem de enzima foram preparadas duas amostras de referência, com 900 μ L da solução de Bradford e 100 μ L de água (branco), e quatro amostras testes com soluções com 900 μ L da solução de Bradford, 95 μ L de água e 5 μ L da solução de enzima.

3.5. Preparo das soluções de NADH utilizadas na curva de calibração

A solução estoque 5mmol/L de NADH (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida) foi preparada solubilizando-se 36,6mg de NADH em um volume final de 10,0mL de água. As soluções utilizadas na obtenção da curva de calibração foram preparadas a partir da solução estoque nas seguintes concentrações: 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 100,0; 160,0; 320,0 μ mol/L diluindo-se respectivamente 10, 20, 40, 80, 200, 320, 640 μ L da solução estoque de 5mmol/L a um volume final de 10mL em água.

3.6. Curvas analíticas para a quantificação de NADH produzido pelo IMER-GAPDH-Tc

A curva de calibração foi obtida através de regressão linear, a partir da razão entre a área da banda cromatográfica e uma dada concentração de NADH. Para a quantificação do NADH para o IMER-GAPDH-Tc foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas:

(1) Bomba 1 (tampão B, vazão 0,05mL/min);

0,00-2,00min: reação enzimática no IMER

2,01-8,50min: transferência dos analitos para a coluna analítica

8,51-20,00min: condicionamento do IMER

(2) Bomba 2 (vazão 0,8mL/min, detecção UV 340nm)

0,00-2,00min: fase móvel da coluna analítica C₈ (seção 3.3, página 29)

2,01-8,50min: tampão B para transferência de analitos da coluna enzimática para a coluna analítica

8,51-20,00min: fase móvel da coluna analítica C₈ para separação e análise dos compostos na coluna analítica.

A partir das soluções de 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 100,0; 160,0; 320,0µmol/L foram preparadas amostras em triplicata com 60µL da solução de NADH e 40µL do tampão B. As amostras foram preparadas em pequenos tubos de ensaio e homogeneizadas em vórtex por 10 segundos. Uma alíquota de 90µL desta amostra foi transferida para o *vial* do auto-injetor. 15µL de cada *vial* foram injetados no cromatógrafo.

Para a validação da do método analítico, foram analisados os seguintes parâmetros:

(1) Precisão e exatidão intradia e inter-dias: prepararam-se amostras, em quintuplicata, com as soluções de controle de qualidade 12, 120 e 240µmol/L preparadas através da adição de 60µL da solução estoque de NADH a 40µL do tampão B. A precisão do método foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) e foram aceitos valores de CV menores ou iguais a 20%. A exatidão foi determinada pelo cálculo de volta e expressa, em porcentagem, como a razão entre o valor médio encontrado pelo método e o valor de referência das concentrações adicionadas. Para a exatidão, foram aceitos desvios menores ou iguais a 15% do valor nominal da concentração, conforme recomendado pela ANVISA para a validação de métodos bioanalíticos.^{64,65}

(2) Seletividade: cada seqüência de análises continha três amostras denominadas brancos para assegurar a seletividade do método, preparadas acrescentando-se 60 μ L de água a 40 μ L de solução de enzima.^{64,65}

(3) Limite de Quantificação (LQ): O limite de quantificação encontrado para o método foi de 5 μ mol/L de NADH e foi estabelecido como a menor concentração onde a precisão e a exatidão de três amostras não excediam o valor de 20%.^{64,65}

3.7. Preparo dos Biorreatores de GAPDH

3.7.1. Pré-tratamento do capilar de sílica fundida

Pré-tratamento 1: Passou-se por esse capilar 2,0 mL de NaOH (0,5mol/L) utilizando uma bomba seringa. O capilar foi colocado em estufa a 95°C por 1 hora. Preparou-se uma solução de 3-aminopropiltriétoxisilano (APTS) diluindo-se 250 μ L de solução APTS 99% em 2,5mL de água. Um volume de 1mL dessa solução foi eluído através do capilar que novamente foi colocado em estufa por meia hora a 95 °C. Mais 1mL dessa solução de APTS em água (10:90 v/v) foi eluído através do capilar e este foi novamente colocado em estufa por meia hora a 95°C. A coluna foi então deixada à temperatura ambiente por 12 horas.

Pré-tratamento 2: Passou-se por esse capilar 2,0mL de HCl (2,0mol/L) utilizando uma bomba seringa. O capilar foi colocado em estufa a 95°C por 1 hora. Preparou-se uma solução de APTS diluindo-se 250 μ L de solução APTS 99% em 2,5mL de água. Um volume de 1mL dessa solução foi eluído através do capilar que novamente foi colocado em estufa por meia hora a 95 °C. Mais 1mL dessa solução de APTS em água (10:90 v/v) foi eluído através do capilar e este foi novamente colocado em estufa por meia hora a 95°C. A coluna foi então deixada à temperatura ambiente por 12 horas.

Pré-tratamento 3: Passou-se por esse capilar 2,0mL de HCl (2,0mol/L) utilizando-se uma bomba seringa. O capilar foi colocado em estufa a 95°C por 1

hora. Preparou-se uma solução de APTS diluindo-se 250 μ L de solução APTS 99% em 2,5mL de água. Um volume de 1mL dessa solução foi eluído através do capilar que novamente foi colocado em estufa por meia hora a 95°C. A coluna foi então deixada à temperatura ambiente por 12 horas.

Pré-tratamento 4: Passou-se por esse capilar 2,0mL de HCl (concentrado) utilizando-se uma bomba seringa. O capilar foi colocado em estufa a 95°C por 1 hora. Preparou-se uma solução de APTS diluindo-se 250 μ L de solução APTS 99% em 2,5mL de água. Um volume de 1mL dessa solução foi eluído através do capilar que novamente foi colocado em estufa por meia hora a 95 °C. Mais 1mL dessa solução de APTS em água (10:90 v/v) foi eluído através do capilar e este foi novamente colocado em estufa por meia hora a 95°C. A coluna foi então deixada à temperatura ambiente por 12 horas.

3.7.2. Imobilização da GAPDH

3.7.2.1. Soluções utilizadas

Solução enzimática de GAPDH humana: 1,2mg de GAPDH-Hu foi solubilizada em 0,6mL de solução tampão pirofosfato de sódio decahidratado (50mmol/L). Este tampão foi preparado diluindo-se 0,0684g do sal a um volume final de 10mL. A solução foi ajustada a pH 8,5 com H₃PO₄ concentrado.

Solução enzimática de GAPDH de *Trypanosoma cruzi*: A GAPDH de *T. cruzi*, foi armazenada congelada em uma solução de trietanolamina 100mmol/L, ditioneitol (DTT) 1mmol/L; PMSF 1mmol/L, leupeptina 1mmol/L, e KCl 500mmol/L, pH 7,6 ajustado com HCl e 10% de glicerol. Essa solução foi dialisada contra solução tampão HEPES 20mmol/L, preparada diluindo-se 0,47g do sal em um volume final de 100mL de água. A solução foi ajustada a pH 8,2, com adição de NaOH 1mol/L.

3.7.2.2. Procedimento de imobilização

Para GAPDH-Tc: O capilar foi preparado segundo o pré-tratamento 3 descrito na seção 3.7.1, página 32. No capilar pré-tratado, utilizando-se a bomba seringa, passou-se: 1,5mL de solução de glutaraldeído 1% em KH_2PO_4 (50mmol/L, pH 7,0); em seguida 0,5mL de solução KH_2PO_4 (50mmol/L, pH 7,0); 0,5mL de solução tampão HEPES (20mmol/L, pH 8,2) a temperatura ambiente. A 4°C passou-se 0,5mL de solução de enzima por duas vezes e em seguida 0,5mL de tampão B. A solução enzimática foi preparada pela diálise da enzima de seu tampão de estoque contra solução de tampão HEPES (20mmol/L, pH 8,2) até concentração final de 0,8mg/mL em volume de 500 μL . O capilar foi mantido a 4°C e suas extremidades imersas em 0,5mL do tampão B.

Para GAPDH-Hu: O capilar foi preparado segundo o pré-tratamento 3 descrito na seção 3.7.1, página 32. No capilar pré-tratado, utilizando-se a bomba seringa, passou-se: 1,5mL de solução de glutaraldeído 1% em KH_2PO_4 (50mmol/L, pH 7,0); em seguida 0,5mL de solução KH_2PO_4 (50mmol/L, pH 7,0). Passou-se 0,5mL de solução enzimática por duas vezes e em seguida 0,5mL de tampão C. A solução enzimática foi preparada pela solubilização de 0,5mg a enzima em 1mL da solução tampão C. O capilar foi mantido a 4°C e suas extremidades imersas em 0,5mL do tampão C.

3.8. Preparo da solução DL-G3P (DL-Gliceraldeído-3-fosfato)

As soluções foram armazenadas em pequenos volumes a -20°C e degeladas apenas no momento do uso. A solução estoque 60mmol/L foi preparada diluindo-se 408 μL de G3P (Sigma, 52mg/mL) para um volume final de 1mL de água. As soluções 1,5 e 15mmol/L utilizadas nos ensaios cinéticos foram preparadas diluindo-se respectivamente 25 e 250 μL da solução estoque 60mmol/L para 1,0mL de volume final em água.

3.9. Preparo das soluções de NAD⁺

Soluções com concentrações definidas foram preparadas e armazenadas em pequenos volumes a -20°C e descongeladas no momento de uso. A solução estoque a 60mmol/L foi preparada dissolvendo-se 39,8mg de NAD⁺ em 1mL de água. As soluções padrões utilizadas nos ensaios cinéticos nas concentrações 1,2 e 12,0mmol/L foram preparadas diluindo-se 100 e 200µL da solução estoque 60mmol/L respectivamente para um volume final de 1mL em água.

3.10. Preparo das soluções utilizadas no estudo cinético da atividade enzimática de GAPDH-Tc

3.10.1. Concentração de NAD⁺ constante e concentrações variáveis de D-G3P

As concentrações desejadas foram obtidas a partir da adição de 40µL de NAD⁺ 60mmol/L, 40µL da solução enzimática, alíquotas apropriadas das soluções padrão de D-G3P (1,50; 15,0 e 60,0mmol/L) e completando-se o volume para 120µL com água. As amostras utilizadas como branco foram preparadas pela adição de 40µL da solução enzimática e 80µL de água. Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos, em seguida, alíquotas de 110µL de cada amostra foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. Foram injetados 15µL das amostras em duplicata no cromatógrafo.

3.10.2. Concentração de D-G3P constante e concentrações variáveis de NAD⁺

As concentrações desejadas foram obtidas a partir da adição de 40µL de D-G3P 15mmol/L, 40µL da solução enzimática, alíquotas apropriadas das soluções padrão de NAD⁺ (1,2; 12,0 e 60mmol/L), completando-se o volume para 120µL com água. As amostras utilizadas como branco foram preparadas pela adição de

40 μ L da solução enzimática e 80 μ L de água. Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos. Alíquotas de 110 μ L de cada amostra foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. Foram injetados 15 μ L das amostras em duplicata no cromatógrafo.

3.11. Obtenção dos parâmetros cinéticos enzimáticos

A determinação do valor de K_M para o substrato (D-G3P) envolveu a medida de velocidade da reação frente a diferentes concentrações deste, como descrito no item 3.10.1, mantendo-se a concentração do cofator (NAD^+) constante, até que se atingisse a saturação da enzima, onde um aumento da concentração do substrato não afetaria notavelmente a velocidade da reação. No caso do cofator (NAD^+), a determinação do K_M envolveu a medida da velocidade da reação frente a diferentes concentrações deste, como descrito no item 3.10.2, mantendo-se a concentração do substrato (D-G3P) constante, até que se atingisse a saturação da enzima, onde um aumento da concentração do cofator não afetaria notavelmente a velocidade da reação.

Os dados experimentais coletados foram analisados utilizando o programa Sigma Plot versão 7.0 e os parâmetros cinéticos calculados através de análise de regressão não-linear de melhor ajuste.

3.12. Ensaio da atividade enzimática de GAPDH em solução

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados de acordo com o método previamente descrito e modificado.⁶⁶ Neste ensaio o NADH formado pela enzima em intervalos de 30 segundos é medido espectrofotometricamente em 340nm. Em uma cubeta são adicionados 445 μ L da solução trietanolamina 0,5mol/L (item 3.3), 15 μ L de arseniato de sódio (1mmol/L); 30 μ L de D-G3P (60mmol/L), 5 μ L de NAD^+ (40mmol/L) e 5 μ L de GAPDH (20nmol/L). O volume total corresponde a 500 μ L e a reação é iniciada pela adição do substrato. Os experimentos foram realizados a 25°C.

3.13. Preparo das soluções para o estudo da atividade enzimática no IMER

Para o IMER-GAPDH-Tc: as amostras utilizadas para determinar a atividade dos biorreatores foram preparadas com 15 μ L de G3P (0,8mmol/L), 30 μ L de NAD⁺ (1,1mmol/L), 20 μ L de tampão B e 65 μ L de água.

Para o IMER-GAPDH-Hu: as amostras utilizadas para determinar a atividade dos biorreatores foram preparadas com 15 μ L de G3P (6mmol/L), 30 μ L de NAD⁺ (1,2mmol/L), 20 μ L de tampão C e 65 μ L de água.

Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos, e em seguida, alíquotas de 100 μ L de cada amostra foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. Foram injetados 15 μ L das amostras em duplicata no cromatógrafo.

3.14. Estudo da inibição da GAPDH-Tc em solução

Neste ensaio o NADH formado pela enzima em intervalos de 30 segundos é medido espectrofotometricamente em 340nm. Em uma cubeta foram adicionados 245 μ L de uma solução tampão B, 15 μ L de arseniato de sódio (1mol/L), 200 μ L da solução 500 μ mol/L do composto candidato a inibidor, 30 μ L de D-G3P (10mmol/L), 5 μ L de NAD⁺ (40mmol/L) e 5 μ L de GAPDH (5nmol/L). As medidas são realizadas em duplicata. O volume total corresponde a 0,5mL e a reação é iniciada pela adição do substrato. Os experimentos foram realizados a 25°C.

3.15. Preparo das soluções dos compostos selecionados para avaliação da atividade inibitória

Preparou-se 2mL de uma solução estoque 5mmol/L de cada um dos compostos em solvente apropriado. Diluindo-se 120 μ L desta solução em um volume final de 1mL foram obtidas as soluções 600 μ mol/L de cada composto.

O efeito do solvente em que tais soluções foram preparadas foi avaliado substituindo-se a maior alíquota da solução do composto a ser avaliado (65 μ L

para a concentração 300 μ mol/L) por soluções 0, 50 e 100% de etanol ou acetonitrila, e 50% de DMSO, em água. A atividade da enzima na presença destas proporções de solventes orgânicos foi então comparada à atividade inicial. Dessa forma, estudou-se o emprego de três diferentes solventes no preparo das soluções dos inibidores, tornando possível a avaliação de uma grande variedade de compostos.

3.16. Estudo da inibição da GAPDH-Tc imobilizada

As concentrações desejadas para os compostos avaliados foram obtidas a partir da adição de 15 μ L de G3P (0,8mmol/L), 30 μ L de NAD⁺ 5mmol/L (1,1mmol/L), 20 μ L de tampão B e alíquotas apropriadas da solução 600 μ mol/L dos compostos avaliados e completando-se o volume para 130 μ L com água. Dessa forma foram preparadas soluções com concentrações 100, 200 e 300 μ mol/L. A atividade inicial da enzima, medida antes da injeção do composto candidato a inibidor, foi avaliada em duplicata, injetando-se a solução descrita no item 3.13. Todas as amostras foram preparadas em duplicata, homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e em seguida alíquotas de 100 μ L de cada amostra foram transferidas para o *vial* do auto-injetor. Foram injetados 15 μ L de cada amostra no cromatógrafo.

O percentual de inibição foi obtido comparando-se a atividade da enzima na presença do inibidor (V_i) com a atividade inicial da enzima (V_0), de acordo com a Equação 3.8:

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \frac{V_i}{V_0} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3.8}$$

3.17. Estudo da inibição da GAPDH-Hu imobilizada

As concentrações desejadas para os compostos avaliados foram obtidas a partir da adição de 15 μ L de G3P (6mmol/L), 30 μ L de NAD⁺ (1,2mmol/L),

20 μ L de tampão C e alíquotas apropriadas das soluções 100 μ mol/L, 500 μ mol/L e 1mmol/L dos compostos avaliados, completando-se o volume para 130 μ L com água. Dessa forma foram preparadas soluções com concentrações 100, 200 e 300 μ mol/L. A atividade inicial da enzima, medida antes da injeção de cada composto candidato a inibidor, foi avaliada através da injeção da amostra descrita no item 3.13. Todas as amostras foram preparadas em duplicata, homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e em seguida alíquotas de 100 μ L de cada amostra foram transferidas para o *vial* do auto-injetor. Foram injetados 15 μ L de cada amostra no cromatógrafo.

O percentual de inibição foi obtido comparando-se a atividade da enzima na presença do inibidor (V_i) com a atividade inicial da enzima (V_0), de acordo com a Equação 3.8.

4. Resultados e Discussão

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi desenvolvido baseando-se nos resultados obtidos anteriormente no Grupo de Síntese Orgânica e CLAE em estudos realizados com a enzima GAPDH-Hu.⁶⁷ A linha de pesquisa no Grupo iniciou-se com esta enzima devido à sua maior estabilidade, facilidade na obtenção e sua semelhança estrutural com a enzima GAPDH-Tc.

Os estudos enzimáticos com desidrogenases NAD^+ dependentes são realizados através da oxidação do substrato para a produção estequiométrica de NADH. Nos ensaios bioquímicos com a GAPDH em solução, a atividade da enzima é monitorada através de um ensaio espectrofotométrico na região do ultravioleta (UV), com base na reação bioquímica catalisada pela enzima (Esquema 1.1).⁶⁸ Como o substrato (D-G3P) e o produto (1,3-disfosfoglicerato) da reação catalisada pela GAPDH não absorvem na região do UV, a atividade da enzima é monitorada pela formação de NADH a partir da redução do cofator NAD^+ (Figura 4.1), no comprimento de onda de 340nm.

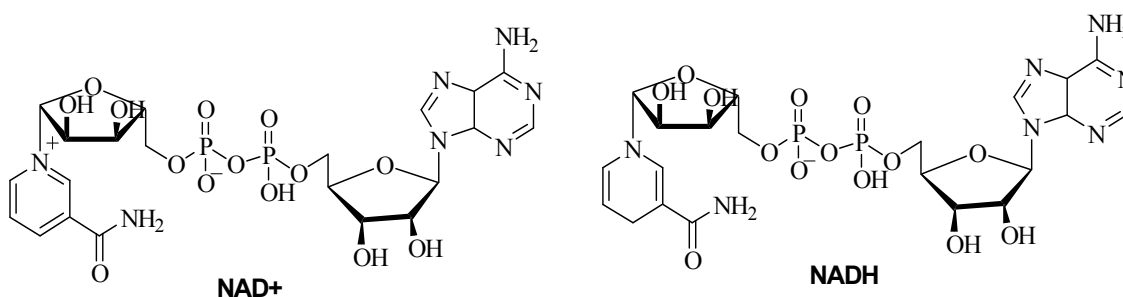


FIGURA 4.1. Estrutura da β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e β -nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH).

Quando o IMER com a enzima GAPDH é empregado como coluna cromatográfica, a atividade da enzima pode ser monitorada também pela formação de NADH, no entanto, a resolução cromatográfica do cofator NAD^+ e de sua forma reduzida NADH torna-se indispensável.

Devido à baixa capacidade de resolução cromatográfica do IMER, a separação do co-fator e de sua forma reduzida não pode ser realizada em uma única dimensão. Assim, nos IMERs com a GAPDH-Hu a atividade enzimática foi avaliada pela inserção do IMER a um sistema de CLAE multidimensional. A formação do NADH foi monitorada através de detecção direta por absorbância UV-Vis.^{30,67}

A cromatografia multidimensional é utilizada quando a resolução cromatográfica necessária para o desenvolvimento e a validação do método analítico não pode ser alcançada em uma única dimensão, como na análise de amostras complexas e/ou com muitos constituintes.^{69,70}

O sistema cromatográfico multidimensional empregado está ilustrado na Figura 4.2. Na primeira dimensão, a enzima imobilizada converte o substrato em produto (posição 1, Figura 4.2). Em seguida, o NADH, formado pela oxidação do cofator (NAD^+) na reação bioquímica catalisada pela GAPDH, é transferido para a coluna analítica através de uma válvula de desvio de seis caminhos (posição 2, Figura 4.2). Então, na segunda dimensão, o NADH pode ser separado e quantificado.

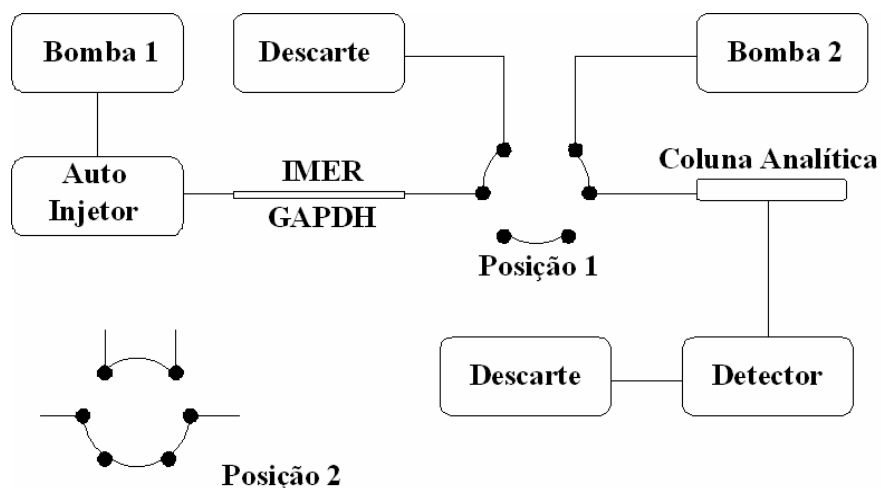


FIGURA 4.2. Representação do sistema cromatográfico multidimensional usado com o IMER na primeira dimensão e a coluna analítica na segunda dimensão.

4.1. Modulagem do ensaio enzimático para as condições cromatográficas

Baseando-se no trabalho desenvolvido com a enzima GAPDH-Hu^{67,71}, a enzima GAPDH-Tc foi imobilizada covalentemente em capilares de sílica fundida utilizando-se as mesmas condições descritas para a sua homóloga humana. No entanto, o biorreator apresentou baixa atividade e estabilidade, que tornou fundamental a avaliação de uma série de tampões, em um trabalho anteriormente desenvolvido no grupo. Foram estudados, através de ensaios em solução, fatores que influenciam a atividade e a estabilidade da enzima (como pH, temperatura e composição do tampão) a fim de se otimizar o tampão de trabalho e de imobilização.³⁰ A enzima demonstrou maior estabilidade e atividade no tampão B (tampão de trabalho, página 29), que passou a ser utilizado como fase móvel. A substituição do tampão de trabalho no método cromatográfico desenvolvido para a enzima humana, descrito na Tabela 4.1, afetou drasticamente a resolução cromatográfica do NAD⁺ e NADH na coluna analítica, como ilustrado na Figura 4.3.

TABELA 4.1. Condições cromatográficas para a separação do NAD^+ e NADH previamente estabelecidas para o IMER-GAPDH-Hu acoplado a coluna diol.

Bomba (Eluente)	Tempo (min)	Evento	Posição da Válvula
1 (A)	0,00-2,00	Reação Enzimática no IMER-GAPDH-Hu	1
2 (B)	0,00-2,00	Condicionamento da coluna analítica.	1
1 (A)	2,01-8,50	Transferência dos analitos para a coluna analítica.	2
1 (A)	8,51-20,00	Condicionamento da IMER-GAPDH-Hu	1
2 (B)	8,51-20,00	Análise dos compostos pela coluna analítica	1

Bomba 1: eluente A: tampão C, $0,05\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: eluente B: tampão A:MeOH (90:10 v/v), $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Representação das posições da válvula na Figura 4.2.

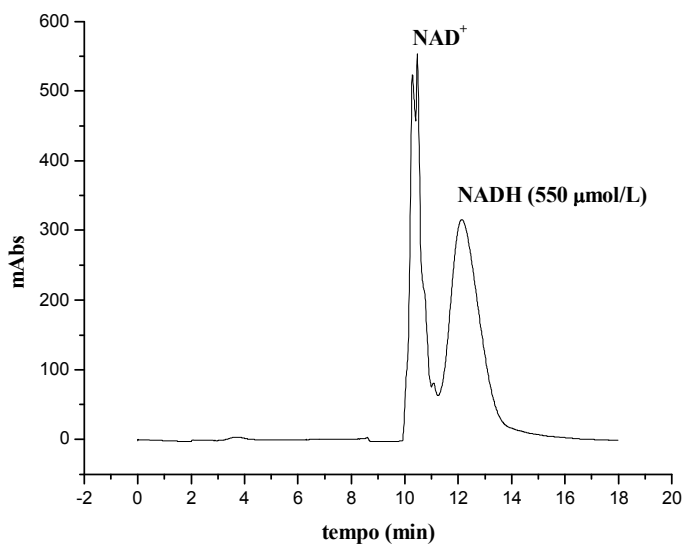


FIGURA 4.3. Cromatograma de formação do NADH pelo IMER-GAPDH-Tc. IMER na primeira dimensão e coluna diol na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, $0,05\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: tampão A:MeOH (90:10 v/v), $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 340nm. (D-G3P 7,5mmol/L e NAD^+ 20mmol/L, volume de injeção: 15 μL).

Desse modo, tornou-se necessário que novas condições de separação fossem estabelecidas para avaliação do novo biorreator preparado. O presente trabalho de desenvolvimento do IMER-GAPDH-Tc teve início com a otimização das condições separação do NAD^+ e NADH.

4.2. Otimização das condições de separação de NAD^+ e NADH por CLAE multidimensional

Para otimizar as condições cromatográficas de separação de NAD^+ e NADH, a coluna analítica diol (seção 3.2, página 29) foi avaliada em diversas condições de eluente e vazão testados no modo multidimensional de análise, descrito na Tabela 4.1.

Inicialmente avaliou-se o tampão A com diferentes proporções do modificador orgânico: tampão A:MeOH (95:5), (85:15), (80:20), (75:25), (70:30), (63:37), (65:35) (60:40) (50:50 v/v) com vazões de $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $0,6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Considerando que os analitos são muito hidrofílicos tentou-se com o aumento do modificador orgânico aumentar sua retenção, uma vez que o NAD^+ estava eluindo no volume morto da coluna sobre a deflexão do detector e o NADH também mostrou pouca retenção. No entanto, observou-se que com o aumento da porcentagem do modificador orgânico foram obtidas alterações significativas na seletividade, mas em nenhuma das condições alcançou-se a resolução cromatográfica necessária para a validação do método cromatográfico, como exemplificado na Figura 4.4.

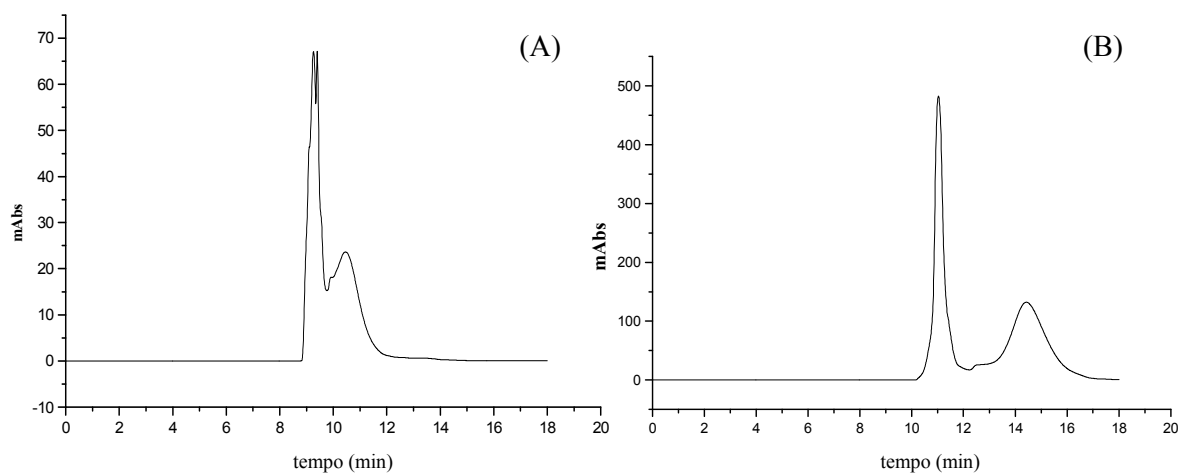


FIGURA 4.4. Cromatogramas de separação de NAD⁺ e NADH exemplificando os resultados obtidos com diferentes proporções do modificador orgânico. IMER na primeira dimensão e coluna diol na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, 0,05mL. min⁻¹. Bomba 2: tampão A:MeOH (80:20)(A) e (65:35 v/v)(B), 0,8mL.min⁻¹, 340nm.

Embora na última condição testada (65:35 v/v), Figura 4.4-B, tenha havido uma pequena melhora na resolução cromatográfica, o NAD⁺ continuava eluindo no volume morto da coluna e a banda referente ao analito, NADH, estava muito alargada. Tendo em vista esse comportamento, avaliou-se a troca do modificador orgânico. Foi então testado ACN como modificador orgânico. Os cromatogramas mostrados na Figura 4.5 ilustram os resultados obtidos.

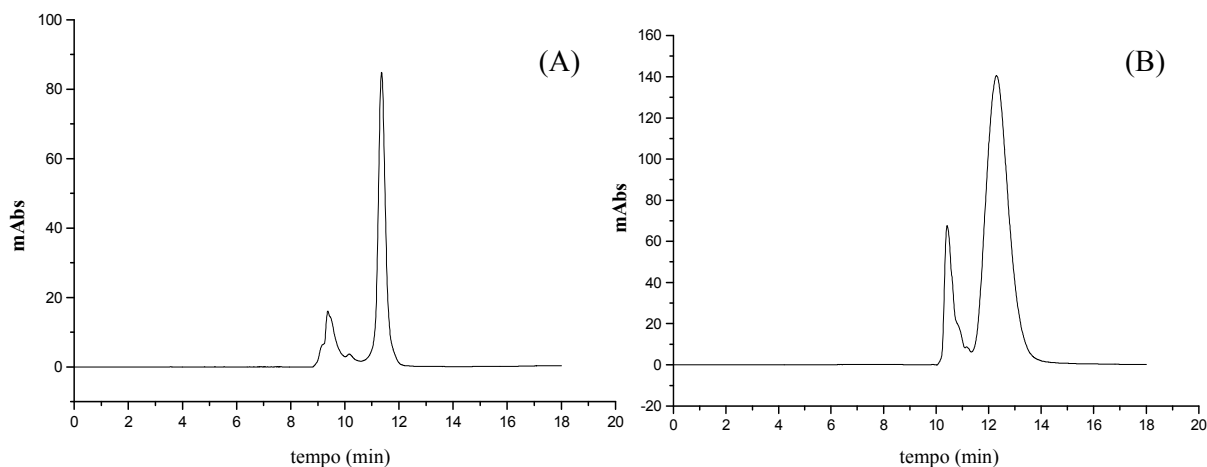


FIGURA 4.5. Cromatogramas de separação de NAD⁺ e NADH exemplificando os resultados obtidos na substituição do modificador orgânico. IMER na primeira dimensão e coluna diol na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, 0,05mL.min⁻¹. Bomba 2: tampão A:ACN (98:2)(A), (97:3)(B) e (90:10 v/v)(C), 0,8mL.min⁻¹, 340nm.

Como ilustrado pelos cromatogramas apresentados, não houve uma mudança significativa na resolução cromatográfica com a substituição do modificador orgânico na coluna analítica diol, evidenciando a pouca influência exercida pelo modificador sobre a separação dos analitos NAD⁺ e NADH nestas condições.

Após os diversos testes realizados, observou-se perda da eficiência da coluna analítica, sendo necessário preparar uma nova coluna. Em alguns testes utilizando a nova coluna analítica foi observado que ao se utilizar o tampão B recém-preparado, e as mesmas condições estabelecidas para a o IMER-GAPDH-Hu, ou seja, tampão A:MeOH (90:10 v/v), as análises apresentaram melhor resolução cromatográfica, embora o NAD⁺ continuasse a eluir no tempo morto da coluna. Entretanto, a finalidade do método analítico em desenvolvimento é monitorar a atividade da enzima GAPDH imobilizada, o que, com base na reação bioquímica catalisada pela enzima, pode ser realizado pela quantificação do NADH formado, não sendo necessário quantificar o NAD⁺. Baseado nesse

dado, e considerando-se que na realidade o problema era a diminuição da eficiência da coluna analítica, optou-se por trabalhar nessas condições, e uma curva de calibração foi obtida. No entanto, ao final da série de análises para cálculo da faixa de linearidade houve perda de resolução das bandas.

Considerou-se também a possibilidade de retirar alguns dos constituintes do tampão de trabalho utilizado (tampão B). Alguns componentes desse tampão como o β -mercaptoetanol e o PMSF se justificariam apenas para o uso da enzima em solução, uma vez que o β -mercaptoetanol atua como protetor das ligações de enxofre evitando a redução de cisteínas, impedindo alterações prejudiciais na estrutura terciária da proteína, sendo ainda muito tóxico. Já o emprego do PMSF, um inibidor de proteases, não se justificaria pela ausência de contato da enzima imobilizada com proteases. Por tais razões, optou-se em avaliar o tampão de trabalho sem a presença desses dois reagentes. No entanto, nenhuma melhora na resolução cromatográfica foi observada e assim continuou-se a utilizar o tampão B com todos os reagentes como tampão de trabalho, para que todas as condições reacionais dos ensaios biológicos com a enzima em solução fossem mantidas, possibilitando posteriores estudos comparativos.

Esgotadas as possibilidades de se melhorar a resolução da separação do NAD^+ e NADH usando a coluna diol como coluna analítica, outra fase estacionária foi selecionada. Em trabalhos recentes foram avaliadas diferentes colunas quanto a capacidade de separação de NAD^+ e NADH , como a coluna monolítica C_{18} (Chromolith[®] Speed-ROD), a octadecil-sílica (C_{18} , Nucleosil[®]), a aminopropil-sílica (Hypersil[®]-APS) bem como diferentes tampões.^{71,72} Com base nas informações obtidas a fase estacionária C_8 (Luna-Phenomenex[®]) foi escolhida.

A coluna C_8 (sílica Luna-Phenomenex[®], 10 μm , 100 Å) foi empacotada (seção 3.2, página 29) e avaliada quanto à sua eficiência cromatográfica. Uma solução padrão de NAD^+ (20mmol/L) e NADH (2mmol/L) em tampão B foi injetada no modo multidimensional utilizando-se um biorreator inativo. A fase

móvel solução tampão A:MeOH (85:15 v/v) foi utilizada a uma vazão de $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 340nm. O cromatograma obtido está ilustrado na Figura 4.6.

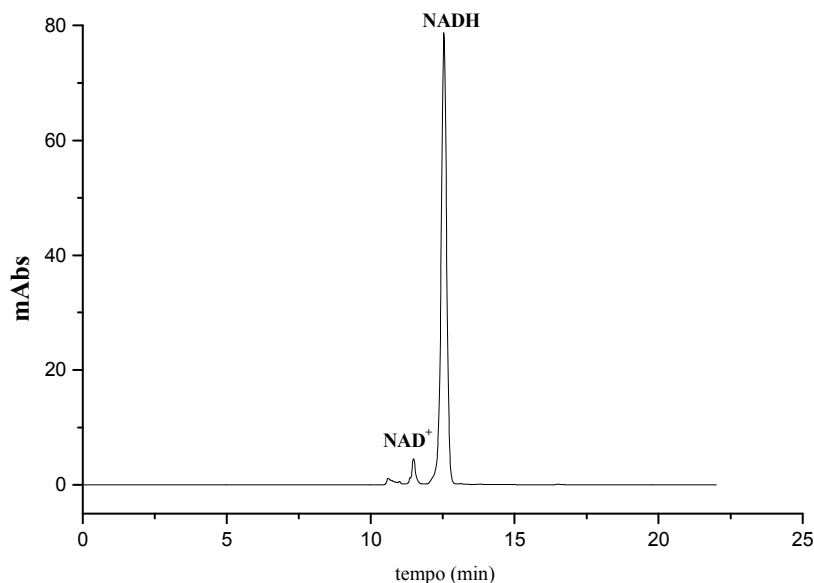


FIGURA 4.6. Cromatogramas de separação de NAD^+ e NADH . IMER na primeira dimensão e coluna C_8 na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, $0,05\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: tampão A:MeOH (85:15 v/v), $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 340nm.

Nas condições utilizadas obteve-se a separação do NAD^+ e NADH , entretanto o NAD^+ apresentou fator de retenção muito baixo e a resolução com o NADH não era adequada para a quantificação. Com o intuito de se melhorar a separação foi avaliada a solução tampão A:MeOH (90:10 v/v) como fase móvel. Embora tenha sido observada uma melhora na resolução cromatográfica, não foi obtida seletividade satisfatória, evidenciada pela sobreposição dos cromatogramas dos analitos e do tampão da enzima (tampão B), que mostrou a coeluição de algumas bandas presentes no tampão com o NADH , como ilustrado na Figura 4.7. Esse fator poderia comprometer a quantificação do NADH e, portanto, prosseguiu-se com o processo de otimização.

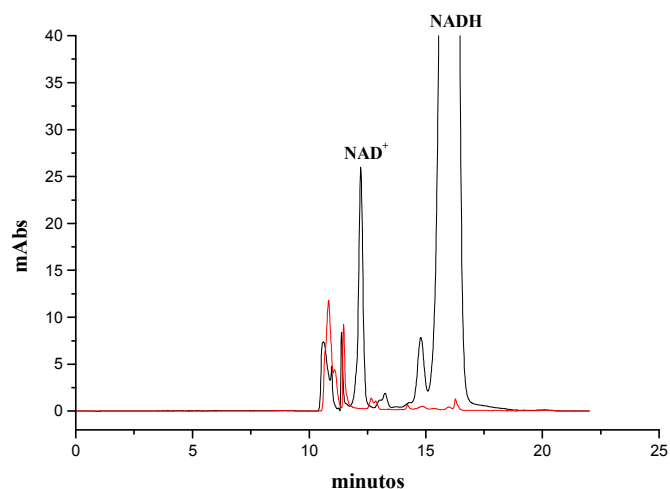


FIGURA 4.7. Cromatograma de separação de NAD^+ e NADH (—) sobreposto com o cromatograma do tampão B (—). IMER na primeira dimensão e coluna C_8 na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, $0,05\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: tampão A:MeOH (90:10 v/v), $0,8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 340nm.

O uso de diferentes fases móveis foi então avaliado: tampão A:MeOH (90:10); (92:8), (91:9) e (93:7 v/v). Os resultados estão ilustrados nos cromatogramas da Figura 4.8 a seguir.

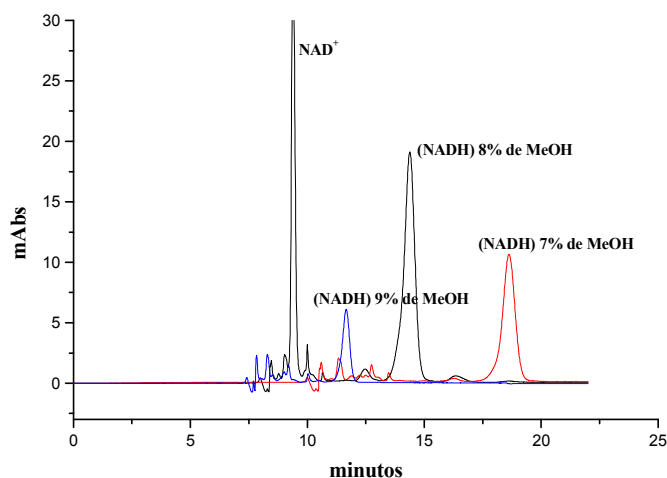


FIGURA 4.8. Cromatogramas de separação de NAD^+ e NADH . IMER na primeira dimensão e coluna C_8 na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, $0,05\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: tampão A:MeOH (90:10); (92:8), (91:9), (93:7 v/v), $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 340nm.

Nas condições avaliadas a resolução de NAD^+ e NADH melhorou consideravelmente principalmente utilizando-se fase móvel contendo tampão A:MeOH (92:8 v/v), que também apresentou seletividade satisfatória. Observou-se, no entanto, que a banda correspondente ao NAD^+ coeluiu com bandas de compostos presentes no tampão B. Contudo, considerando que a atividade da enzima é monitorada através da quantificação do NADH , a baixa seletividade observada para o NAD^+ não interferiu na utilização dessas condições.

Com melhores condições estabelecidas e sumarizadas na Tabela 4.2, uma nova curva de calibração foi construída.

TABELA 4.2. Condições cromatográficas estabelecidas para a separação de NAD^+ e NADH pela coluna C_8 acoplada ao IMER-GAPDH-Tc.

Bomba (Eluente)	Tempo (min)	Evento	Posição da Válvula
1 (A)	0,00-2,00	Reação Enzimática no IMER-GAPDH-Tc	1
2 (B)	0,00-2,00	Condicionamento da coluna analítica.	1
1 (A)	2,01-8,50	Transferência dos analitos para a coluna analítica.	2
1 (A)	8,51-22,00	Condicionamento da IMER-GAPDH-Tc	1
2 (B)	8,51-22,00	Análise dos compostos pela coluna analítica	1

Bomba 1: 0,05 mL.min⁻¹, eluente A: tampão B. Bomba 2: 0,8mL.min⁻¹, eluente B: tampão A:MeOH (98:2 v/v); 340nm.

No entanto, no decorrer das análises, uma variação no tempo de retenção do NADH ocasionou uma aproximação das bandas cromatográficas e houve sobreposição da banda do NADH e de bandas de compostos do tampão B. Esta perda de seletividade é ilustrada na Figura 4.9.

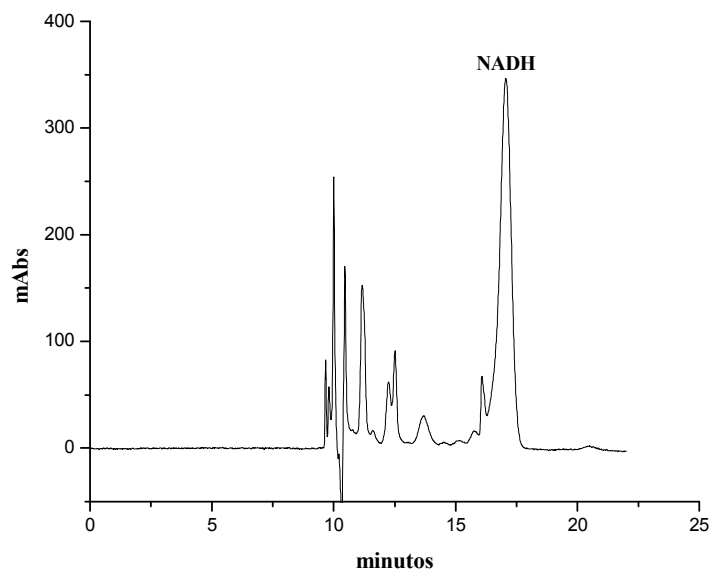


FIGURA 4.9. Cromatograma do NADH ao final das análises para a construção da curva de calibração. IMER na primeira dimensão e coluna C_8 na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, $0,05\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: tampão A:MeOH (92:8 v/v), $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 340nm.

Buscando solucionar esse problema substituiu-se o modificador orgânico metanol por acetonitrila. As seguintes fases móveis foram usadas: tampão A:ACN (97:3), (96:4) e (96,5:3,5 v/v). Os resultados estão ilustrados na Figura 4.10.

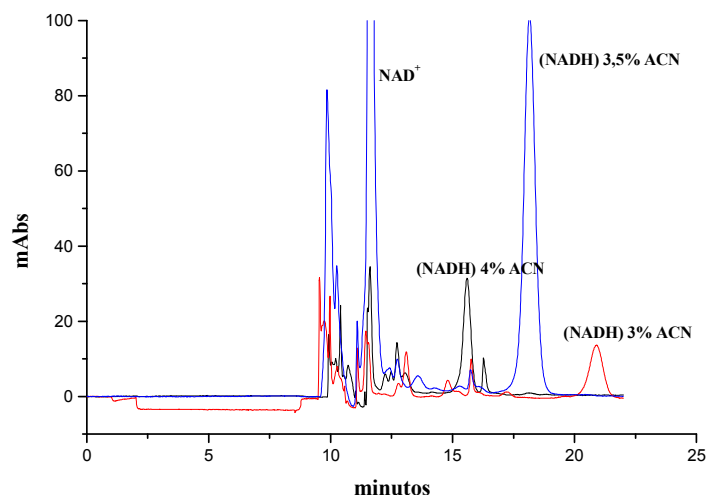


FIGURA 4.10. Cromatogramas de separação de NAD^+ e NADH empregando acetonitrila como modificador orgânico. IMER na primeira dimensão e coluna C_8 na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, $0,05\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: tampão A:ACN (96:4); (97:3), (96,5:3,5 v/v), $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 340nm.

Das condições avaliadas e ilustradas na Figura 4.10 a melhor foi selecionada: tampão A:ACN (96,5:3,5 v/v), cromatograma na Figura 4.11 e condições na Tabela 4.3.

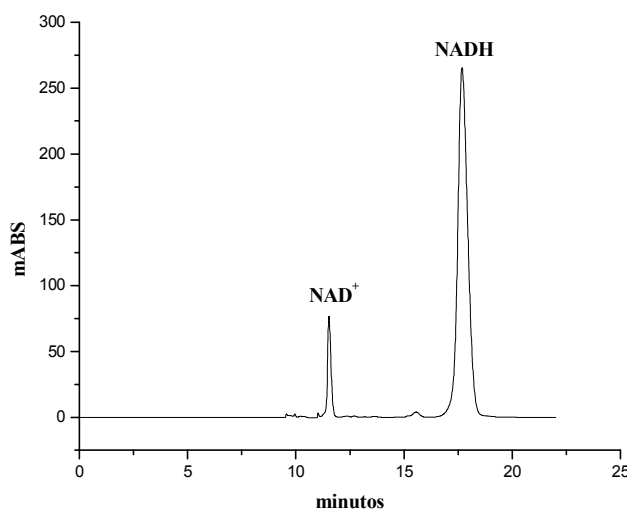


FIGURA 4.11. Cromatograma de separação de NAD^+ e NADH . IMER na primeira dimensão e coluna C_8 na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, $0,05\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: tampão A:ACN (96,5:3,5 v/v), $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 340nm.

TABELA 4.3. Condições cromatográficas estabelecidas para a separação de NAD⁺ e NADH pela coluna C₈ acoplada ao IMER-GAPDH-Tc na validação do método analítico.

Bomba (Eluente)	Tempo (min)	Evento	Posição da Válvula
1 (A)	0,00-2,00	Reação Enzimática no IMER-GAPDH-Tc	1
2 (B)	0,00-2,00	Condicionamento da coluna analítica.	1
1 (A)	2,01-8,50	Transferência dos analitos para a coluna analítica.	2
1 (A)	8,51-22,00	Condicionamento da IMER-GAPDH-Tc	1
2 (B)	8,51-22,00	Análise dos compostos pela coluna analítica	1

Bomba 1(IMER): 0,05 mL.min⁻¹, eluente A: tampão B. Bomba 2(C₈): 0,8mL.min⁻¹, eluente B: tampão A:ACN (96,5:3,5 v/v); 340nm. Representação das posições da válvula na Figura 4.2.

4.3. Validação do método analítico para a quantificação de NADH formado pelo IMER-GAPDH-Tc

O método foi validado avaliando-se a linearidade através da curva de calibração e da precisão intermediária. As análises foram feitas utilizando-se biorreatores inativos para evitar o estresse do biorreator, como observado por Lima.^{65,71,73}

A curva de calibração foi obtida nas seguintes concentrações: 5, 10, 20, 40, 80, 100, 160 e 320µmol/L de NADH. O coeficiente de correlação (r) obtido da curva de calibração foi de 0,99978. O cromatograma mostrado na Figura 4.12

corresponde à concentração 80 $\mu\text{mol/L}$ de NADH. A curva de calibração está mostrada na Figura 4.13.

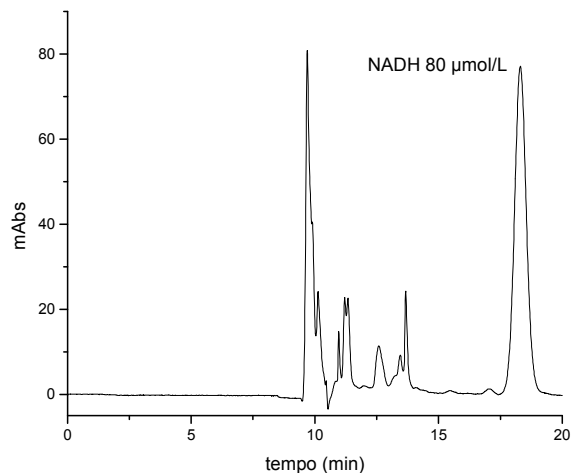


FIGURA 4.12. Cromatograma referente à concentração 80 $\mu\text{mol/L}$ de NADH. IMER na primeira dimensão e coluna C_8 na segunda dimensão. Bomba 1: tampão B, 0,05 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bomba 2: tampão A:ACN (96,5:3,5 v/v), 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 340nm.

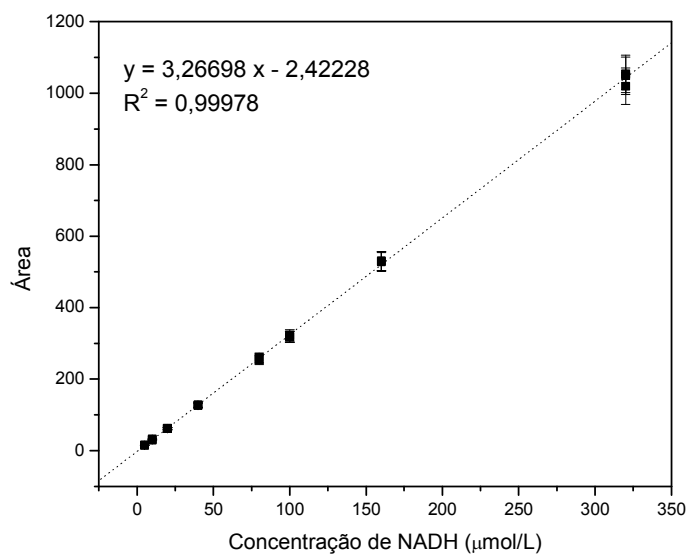


FIGURA 4.13. Curva de calibração do NADH. IMER-GAPDH-Tc acoplado a uma C_8 Luna-Phenomenex[®]. Condições cromatográficas vide Tabela 4.3.

A precisão e exatidão intra e interdias do método foram determinadas analisando-se cinco replicatas do três controles de qualidade selecionados (12, 120 e 240 $\mu\text{mol/L}$) em dias não consecutivos. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta da curva de calibração construída e expressa como porcentagem do desvio entre as quantidades adicionadas e quantificadas, nas três concentrações examinadas.^{30,65,67} Os valores de precisão e exatidão obtidos estão dentro dos critérios de aceitação do método^{64,65}, e são apresentados na Tabela 4.4.

TABELA 4.4. Precisão e exatidão intra e interdias do método de análise para quantificação do NADH formado pelo biorreator de GAPDH-Tc.

Concentração NADH ($\mu\text{mol/L}$) teórica	1º dia (n = 5)		2º dia (n = 5)		3º dia (n = 5)		Média dos três dias (n = 15)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
12	102,3	3,22	99,6	2,34	96,6	2,41	99,5	2,66
120	99,7	1,03	98,8	0,97	93,6	1,15	97,2	1,47
240	97,7	0,84	99,7	1,75	89,8	0,65	95,2	1,08

O método desenvolvido apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão e pode, então, ser usado para avaliação dos parâmetros cinéticos e para a realização de ensaios bioquímicos com a GAPDH-Tc imobilizada.

4.4. Otimização do processo de imobilização da enzima

O procedimento de imobilização selecionado para a enzima GAPDH-Tc consiste em três etapas e foi realizado com base no trabalho desenvolvido anteriormente no grupo com a imobilização da enzima GAPDH-Hu⁶⁷. As etapas

envolvidas são: 1) limpeza e ativação do capilar, 2) silanização e 3) ligação do reagente bifuncional glutaraldeído e imobilização da enzima.

Limpeza e ativação do capilar

A enzima foi imobilizada em capilares de sílica fundida com dimensões de 50cm x 0,1mm D.I. O emprego dos capilares de sílica fundida como suporte no processo de imobilização da enzima apresenta diversas vantagens como a minimização de interações secundárias entre os compostos analisados e o suporte, uma grande área de superfície por volume, permitindo interações adequadas entre o substrato e a enzima imobilizada, e, também, baixa pressão de gota através do capilar. Deve-se considerar, ainda que, por ter a fase móvel eluindo através de uma coluna tubular aberta, a velocidade da reação enzimática total é maior, quando comparada com colunas de suportes micro particulados, já que estas últimas oferecem resistência à transferência de massa.^{74,75}

A superfície interna do capilar de sílica pode ser constituída por grupos siloxanos, silanóis livres, vicinais (com ligações de hidrogênio), geminais e dissociados, como ilustrado na Figura 4.14.^{67,76-78}

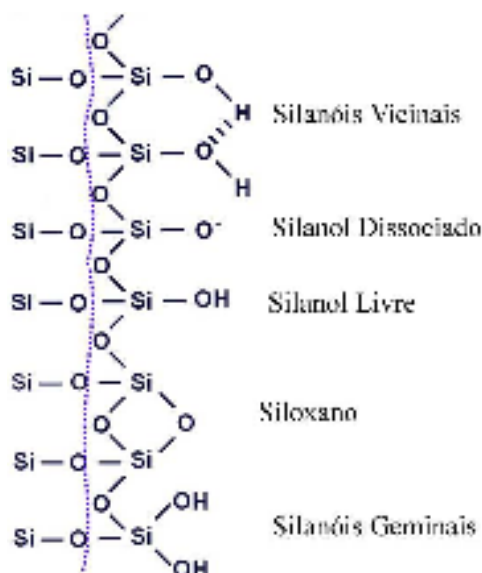


FIGURA 4.14. Representação dos grupos que podem estar presentes na superfície do capilar de sílica fundida.

A primeira etapa do procedimento de imobilização da enzima envolve a ativação do capilar, que consiste na liberação dos grupos silanóis, e a corrosão da parede interna do suporte, que é realizada a fim de se aumentar a área superficial e garantir a reprodutibilidade do processo. Tal etapa pode ser realizada empregando-se soluções de NaOH ou HCl.^{30,67,77,79}

Este procedimento foi realizado inicialmente com uma solução NaOH 0,5mol/L, como descrito por Cardoso e colaboradores³⁰ para o preparo do IMER-GAPDH-Hu. Baseado no trabalho de Shi e colaboradores⁷⁷, que utilizou ácido nítrico concentrado para limpeza e ácido clorídrico concentrado para ativação do capilar, avaliou-se a substituição da solução de NaOH por HCl 2mol/L na etapa do pré-tratamento da coluna capilar. A atividade dos biorreatores foi monitorada através da quantificação do NADH formado. O gráfico mostrado na Figura 4.15 apresenta os resultados obtidos, onde se pode observar a maior atividade e estabilidade do biorreator que teve a limpeza e ativação do capilar realizada com a solução de HCl 2mol/L.³⁰

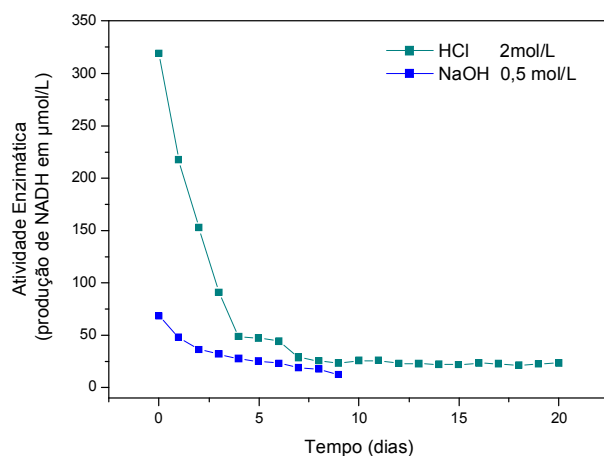


FIGURA 4.15. Atividade enzimática em função do tempo para dois biorreatores com diferentes procedimentos de tratamento do capilar, um deles com NaOH e outro com HCl.

A corrosão da parede interna do capilar com ácido clorídrico deve ter sido mais eficiente, resultando numa maior área superficial para a imobilização da

enzima. Além disso, o emprego da solução de ácido clorídrico para a ativação do capilar deve ter sido mais efetiva na ativação dos grupos silanóis, pois o ácido pode catalisar a reação de abertura do siloxano, que deve ser mais lenta em meio básico. Assim, os resultados sugerem que com a utilização da solução de HCl obteve-se uma imobilização mais efetiva e/ou uma imobilização com menor efeito sobre a estrutura terciária e menor impedimento para o acesso do substrato e do co-fator aos sítios ativos.

Considerando a maior eficiência do uso da solução de HCl 2mol/L para a limpeza e ativação do capilar, foi avaliado também o emprego do HCl concentrado. No entanto, o emprego do ácido concentrado mostrou-se mais laborioso, tendo em vista que por inúmeras vezes os capilares de sílica fundida entupiram ou mesmo se romperam com muita facilidade, além de ser um reagente que necessita de um cuidado muito maior em seu manuseio. Comparando-se as atividades iniciais dos biorreatores preparados (cromatogramas na Figura 4.16), observa-se que o biorreator que teve a limpeza e ativação do capilar realizada com HCl concentrado apresentou uma menor atividade inicial, quando comparado ao biorreator cujo capilar foi tratado com HCl 2mol/L.

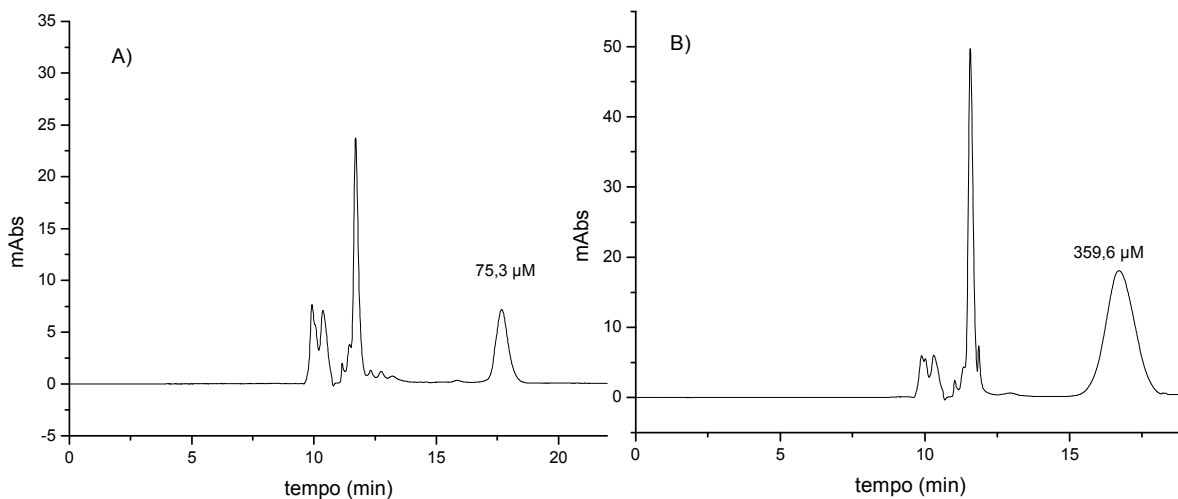
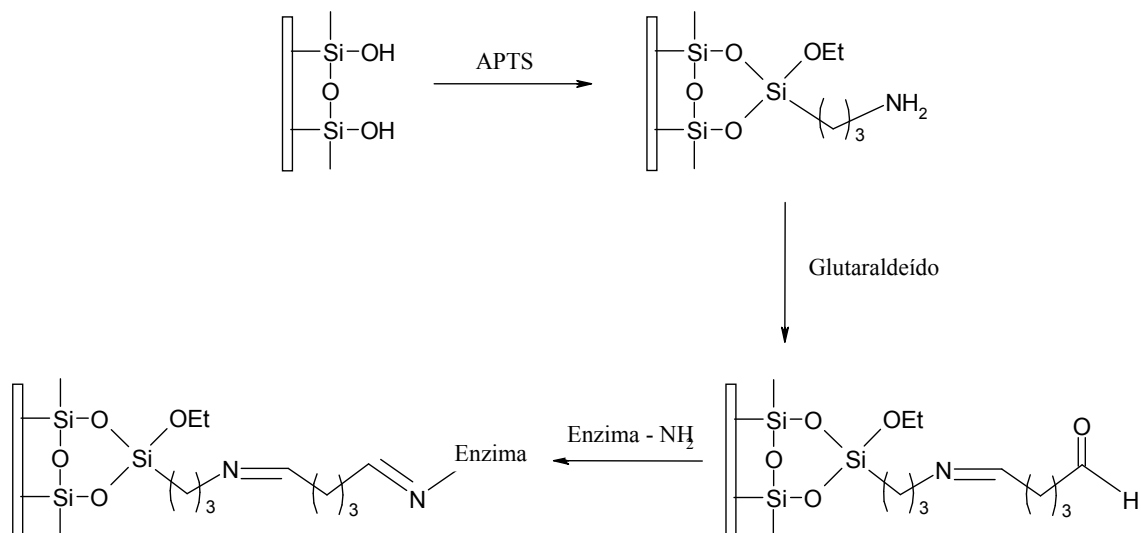


FIGURA 4.16. Cromatogramas obtidos para a produção inicial de NADH dos biorreatores que tiveram a limpeza e ativação do capilar realizada com A) HCl concentrado e B) HCl 2mol/L.

Silanização

O processo de silanização consiste na reação de substituição nucleofílica entre os grupos silanóis livres presente na parede do capilar e o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS). O grupo amina presente no APTS permite a posterior ligação do agente bifuncional glutaraldeído, através da formação de uma base de Schiff. Então, a enzima irá se ligar ao capilar através da reação entre os grupos amina presentes nos resíduos de lisina da enzima e o espaçador glutaraldeído fixado a parede do suporte, através da formação também de uma base de Schiff. O esquema 4.1 ilustra a reação.



ESQUEMA 4.1. Método de imobilização da enzima em capilares de sílica fundida.

Portanto, a etapa de silanização é crucial para que a imobilização da enzima seja eficiente. Assim, prosseguindo com a otimização das condições de imobilização, foi estudado o efeito da passagem da solução de APTS uma ou duas vezes através do capilar no processo de silanização. Comparando-se os biorreatores preparados, nenhuma alteração na atividade enzimática inicial do biorreator foi observada. A Figura 4.17 ilustra os cromatogramas obtidos.

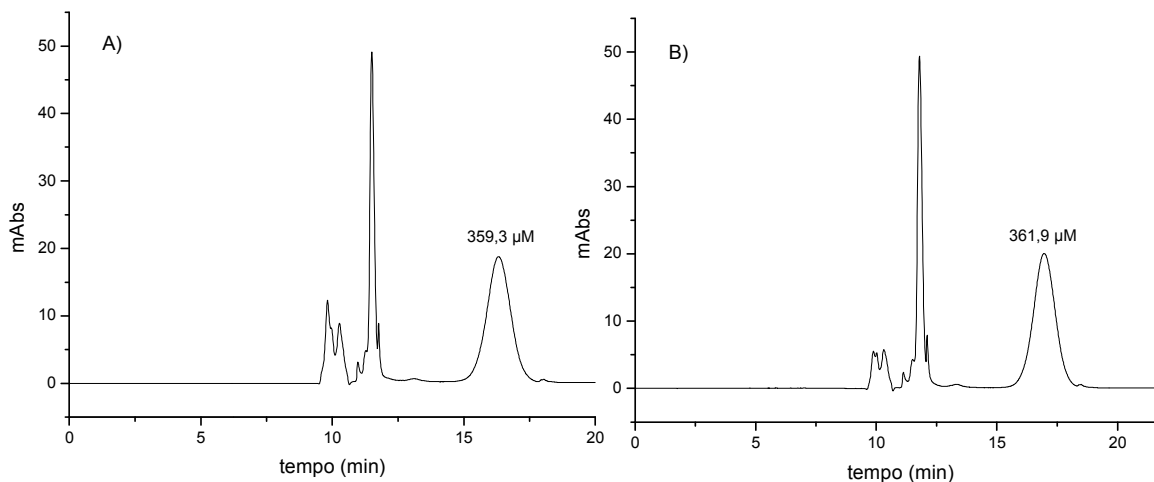


FIGURA 4.17. Cromatogramas obtidos referente a produção inicial de NADH para os biorreatores com pré-tratamento realizado com: A) eluição uma vez da solução de APTS pelo capilar ; B) eluição duas vezes da solução APTS.

Esse resultado sugere que os grupos silanóis foram completamente saturados com os grupos aminopropila com a passagem da solução de APTS apenas uma vez pelo capilar.

Ligação do reagente bifuncional glutaraldeído e imobilização da enzima

A imobilização da enzima se dá neste processo através da formação de uma base de Schiff entre os grupos amina dos resíduos de lisina e o glutaraldeído ancorado no capilar, como mostrado no Esquema 4.1. Portanto, um aspecto fundamental nesta etapa de imobilização é que os reagentes presentes no tampão de imobilização, em que a enzima está solubilizada quando eluída através do capilar, não reajam com o glutaraldeído ligado à parede do capilar.

A enzima GAPDH-Tc é expressa e purificada pelo Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-CBME-USP), e congelada a -80°C no tampão descrito no item 3.7.2.1 para armazenagem. No entanto, este tampão de armazenagem não poderia ser utilizado como tampão de imobilização, pois

reagentes presentes neste, como a leupeptina e a trietanolamina, poderiam competir com a enzima pela reação com o suporte, diminuindo a eficiência da imobilização. Assim, em um trabalho realizado por Cardoso e colaboradores, um novo tampão de imobilização foi estabelecido.³⁰ Baseado nas condições de imobilização para a GAPDH-Hu previamente desenvolvidas, o tampão pirofosfato de sódio decahidratado 50mmol/L pH 8,5 foi inicialmente avaliado como tampão de imobilização. No entanto, nos ensaios em solução realizados, foi observado que a enzima retém apenas 50% da atividade após 24h neste tampão, e os melhores resultados foram obtidos com o tampão HEPES 50mmol/L pH 8,2, que foi então selecionado como tampão de imobilização para a GAPDH-Tc.³⁰ Assim, para a imobilização da enzima GAPDH-Tc, foi feita a diálise da enzima de seu tampão de armazenagem contra a solução de tampão HEPES até concentração final média de 0,8mg/mL.

O protocolo de preparo do biorreator com a enzima GAPDH-Tc foi então estabelecido como descrito na seção 3.7.1, página 32, onde a limpeza e ativação do capilar são realizadas utilizando-se uma solução HCl 2mol/L, seguido da eluição da solução de APTS uma única vez através do capilar na etapa de silanização, em seguida a solução de glutaraldeído é eluída pelo capilar e o glutaraldeído se liga ao suporte através da formação de uma base de Schiff, e finalmente a enzima, em um tampão que não reage com o suporte, é imobilizada no capilar através da formação de outra base de Schiff entre os grupos amina do resíduo de lisina e o glutaraldeído ancorado no capilar.

A partir dos resultados satisfatórios obtidos após a otimização do preparo do IMER-GAPDH-Tc, o mesmo procedimento estabelecido para o pré-tratamento do capilar (seção 3.7.1, pré-tratamento 3) foi avaliado no preparo do IMER-GAPDH-Hu. Os cromatogramas obtidos na análise da atividade inicial do IMER preparado com o procedimento otimizado e com o procedimento inicialmente empregado³⁰ são ilustrados na Figura 4.18.

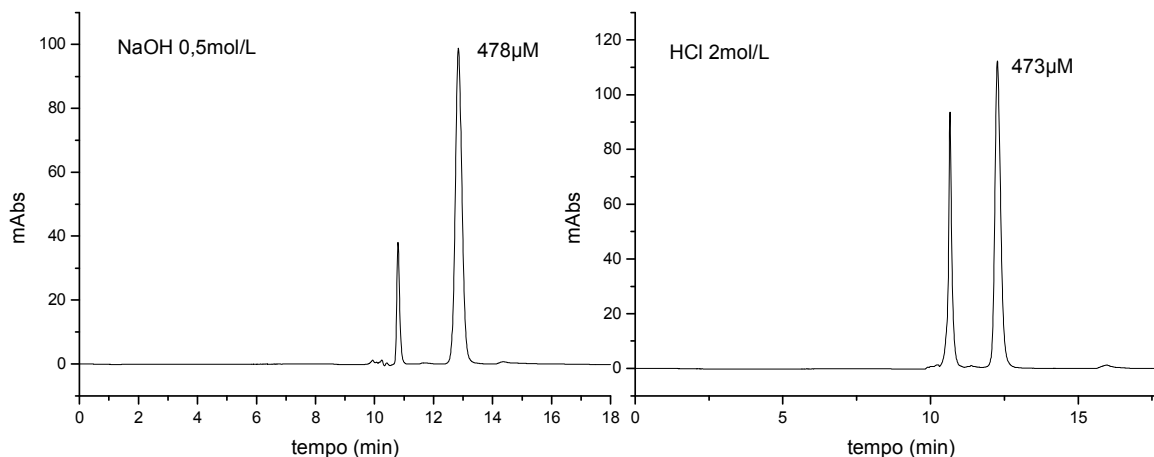


FIGURA 4.18. Cromatogramas obtidos referentes à produção inicial de NADH pelo IMER-GAPDH-Hu para os biorreatores preparados empregando NaOH 0,5mol/L e HCl 2mol/L no pré-tratamento do capilar.

Os resultados obtidos mostraram que a substituição da solução de NaOH 0,5mol/L pela solução de HCl 2mol/L no processo de limpeza e ativação do capilar não afetaram significativamente a atividade da enzima imobilizada. Entretanto, novamente foi observado que a eluição da solução de APTS apenas uma vez pelo capilar é o suficiente para saturar os grupos silanóis com os grupos aminopropila. Dessa forma, esse novo procedimento de preparo do biorreator foi estabelecido também para o IMER-GAPDH-Hu.

4.5. Estabilidade do IMER-GAPDH-Tc preparado com o novo procedimento

A reprodutibilidade da imobilização é de fundamental importância para o desenvolvimento deste projeto e por esta razão foi avaliada. Este estudo pode ser realizado através da análise da reprodutibilidade da quantidade de enzima imobilizada nas paredes do capilar. Para isso, mediu-se a atividade da enzima no tampão de imobilização, antes e depois da solução eluir através do capilar. A diferença de atividade observada pode ser relacionada à quantidade de enzima

imobilizada, o que não necessariamente corresponde às unidades ativas de enzima imobilizada. Isto se deve ao fato de que a enzima pode ser imobilizada numa conformação inativa, devido à inacessibilidade de um dos sítios ativos ou à distorção em sua conformação, como discutido na seção 1.2, páginas 8 e 9. Para este estudo, utilizaram-se duas soluções com a mesma concentração da enzima GAPDH-Tc, e cada solução foi empregada no preparo de um biorreator. A atividade da enzima em cada solução foi medida em triplicata antes e depois da imobilização. Os dados apresentados na Figura 4.19 ilustram a porcentagem de perda de atividade da solução com a enzima após a eluição em cada capilar.

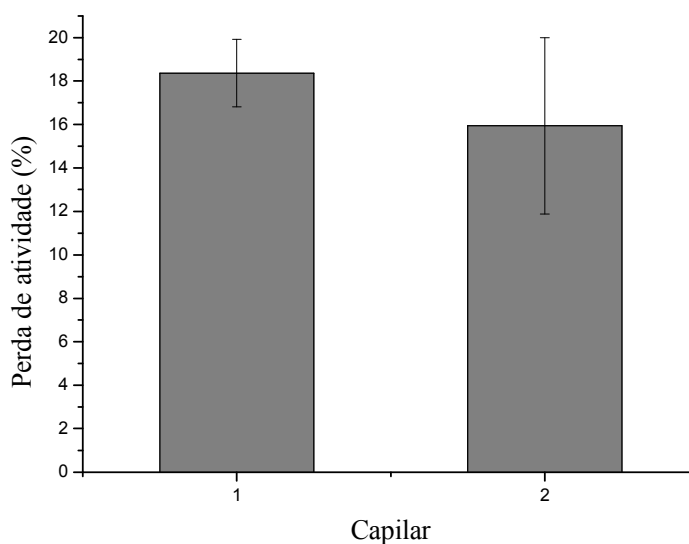


FIGURA 4.19. Porcentagem de perda de atividade da solução com a enzima GAPDH-Tc após eluir pelo capilar.

Os resultados obtidos mostraram valores próximos de perda de atividade das soluções usadas para o preparo dos dois IMERs, evidenciando perdas semelhantes de proteínas das soluções no preparo destes biorreatores. Esses dados demonstram a reprodutibilidade do protocolo estabelecido para o preparo do IMER-GAPDH-Tc.

A reprodutibilidade do método de imobilização também foi avaliada pela comparação da produção inicial de NADH dos dois biorreatores preparados

simultaneamente, sendo que as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.20.

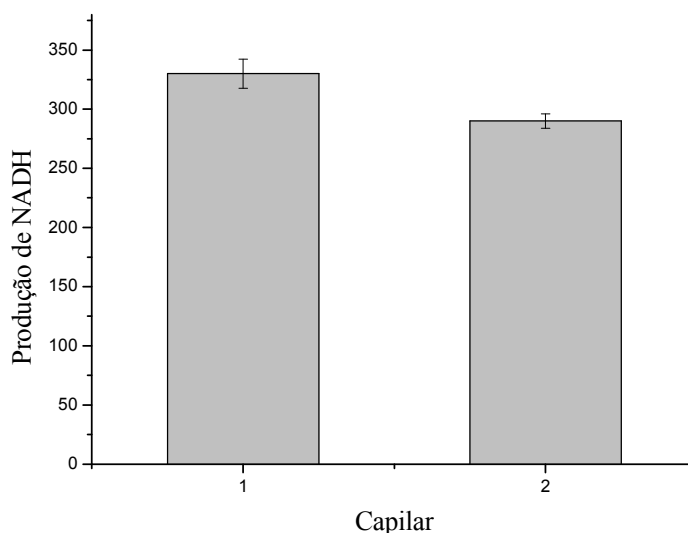


FIGURA 4.20. Gráfico da reprodutibilidade na atividade enzimática obtida pelo processo de imobilização.

Os biorreatores apresentaram atividades próximas, com produção de NADH na faixa de 280-340 μ M. Esses resultados demonstram a reprodutibilidade alcançada pelo processo de imobilização utilizado para GAPDH-Tc.

4.6. Estudo cinético da atividade enzimática do IMER-GAPDH-Tc

A enzima GAPDH-Tc se liga ao suporte através da formação de bases de Schiff entre os grupos amino dos resíduos de lisina e o glutaraldeído ligado à parede do capilar. Apesar de nenhum resíduo de lisina estar envolvido diretamente na reação bioquímica catalisada pela enzima, a formação de tais ligações pode resultar na inacessibilidade ou na distorção de um do sítio ativo do substrato ou do cofator, o que impossibilitaria a enzima de catalisar a reação. Um método útil para se avaliar tais fatores é a realização de estudos cinéticos com a enzima imobilizada. A determinação da constante de Michaelis-Menten,

K_M , permite avaliar a afinidade da enzima pelo substrato e pelo cofator, e assim pode evidenciar, através da comparação com os estudos cinéticos realizados em solução, como o método de imobilização afetou as propriedades da enzima.

Dessa forma, a fim de se determinar a eficiência catalítica do biorreator e a afinidade de ligação entre a enzima e o substrato e a enzima e o cofator, foram realizadas medidas cinéticas para o IMER-GAPDH-Tc. A atividade enzimática foi medida através do método cromatográfico multidimensional desenvolvido e validado.

A constante de Michaelis-Menten, K_M , definida como a concentração do substrato onde se obtém uma velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de catálise, foi determinada para o substrato (D-G3P) e para o co-fator (NAD^+).

Nos ensaios para a determinação de K_M para o co-fator, a concentração do substrato G3P foi mantida constante (7,5mmol/L) e foram empregadas concentrações crescentes de NAD^+ (0,1-12,5mmol/L) até que fosse atingido um patamar de saturação, onde o aumento da concentração do co-fator não produzia mais alterações na velocidade da reação. Para a determinação do K_M do substrato, a concentração do co-fator NAD^+ foi mantida constante (10mmol/L) e foram utilizadas concentrações crescentes de G3P (0,1-12,5mmol/L), até que fosse atingido um patamar de saturação. As áreas das bandas de NADH formado durante o estudo cinético foram correlacionadas às concentrações através da curva de calibração do método previamente validado. Os valores de concentração de NADH foram relacionados às concentrações do cofator ou do substrato para se obter as hipérbolas de Michaelis-Menten. Para a mensuração on-line do NADH formado pelo IMER-GAPDH-Tc, utilizaram-se as curvas analíticas obtidas nas faixas de concentração de 5-320 $\mu\text{mol/L}$. As amostras empregadas nos estudos cinéticos foram preparadas em duplicata tendo um volume de injeção de 15 μL . Durante as análises foram injetadas também as soluções controle de qualidade do método com as concentrações 12, 120 e

240 μ mol/L. As soluções D-G3P (7,5mmol/L) e NAD⁺ (10mmol/L) foram injetadas em intervalos de aproximadamente três horas para avaliar a estabilidade do biorreator.

O biorreator de GAPDH-Tc preparado segundo o procedimento otimizado apresentou uma atividade inicial de 273,6 μ mol/L de NADH, como ilustrado na Figura 4.21.

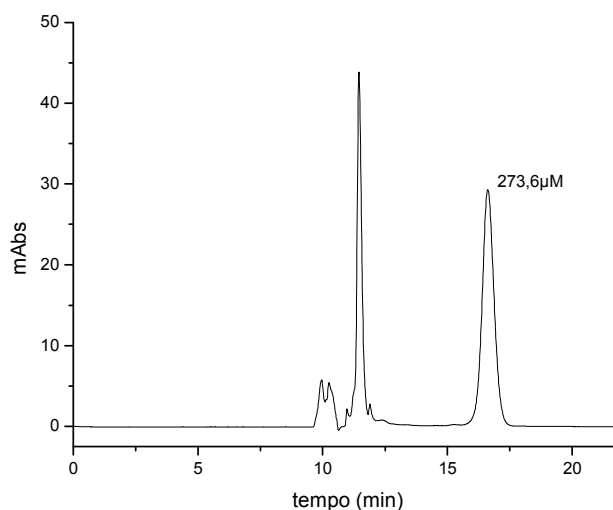


FIGURA 4.21. Produção inicial de NADH pelo IMER-GAPDH-Tc (50cm x 0,10mm D.I.) na primeira dimensão. Coluna analítica C₈ (10 μ m, 100Å, 10 x 0,46cm D.I) na segunda dimensão. Volume de injeção 15 μ L. Condições de análise na Tabela 4.2.

O estudo da cinética enzimática foi iniciado com a concentração do substrato D-G3P constante em 7,5mmol/L, e variando-se a concentração do cofator NAD⁺. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 4.5.

TABELA 4.5. Concentração de NADH formado mantendo-se constante a concentração de D-G3P e variando-se as concentrações de NAD^+ .

NAD^+ (mmol)	NADH (μmol)	NADH (μmol)	Média [NADH (μmol)]
0	0	0	0
0,1	21,62	21,86	21,74
0,2	27,42	31,69	29,55
0,4	35,88	39,51	37,69
0,8	54,65	55,97	55,31
1,0	63,36	63,20	63,28
1,25	72,60	73,60	73,10
2,5	74,88	72,20	73,54
3,75	75,80	76,10	75,95
5,0	77,50	76,80	77,15
6,5	78,43	77,82	78,12
7,5	94,96	99,82	97,39
8,5	101,75	100,54	101,14
10,0	102,30	103,50	102,90
11,5	107,77	101,90	104,83
12,5	103,34	107,66	105,50

O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados coletados, mostrados na Tabela 4.5, gerando a curva de Michaelis-Menten em função da concentração do co-fator NAD^+ e o valor K_M foi então determinado, como ilustrado na Figura 4.22.

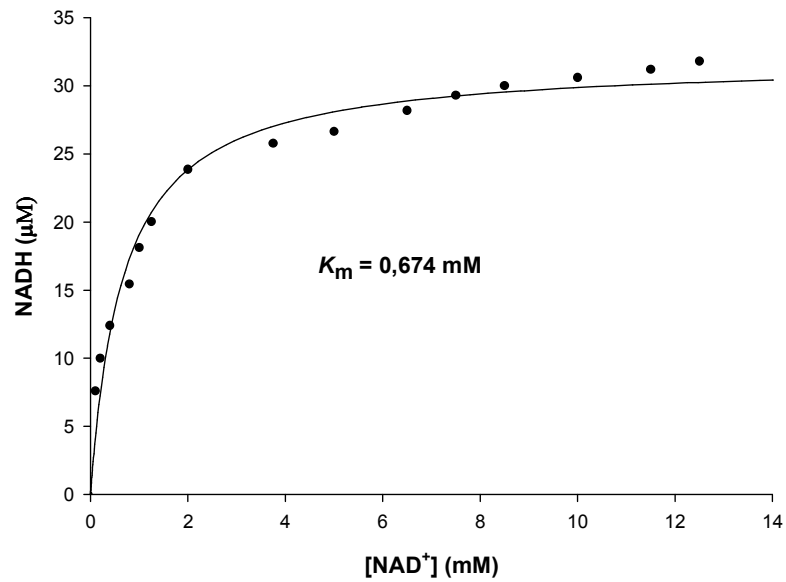


FIGURA 4.22. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de NADH pelo IMER-GAPDH-Tc, variando-se a concentração de NAD⁺ e mantendo-se constante a de D-G3P (7,5mmol/L).

Esse mesmo IMER, após 17 horas de análise, foi avaliado para concentrações variáveis de G3P mantendo-se a concentração de NAD⁺ constante (10mmol/L). Os valores obtidos estão descritos na Tabela 4.6.

TABELA 4.6. Concentração de NADH formado mantendo-se constante a concentração de NAD^+ e variando-se as concentrações de D-G3P.

D-G3P (mmol)	NADH (μmol)	NADH (μmol)	Média [NADH (μmol)]
0	0	0	0
0,1	8,05	6,25	7,15
0,2	7,64	9,28	8,46
0,3	8,74	8,36	8,55
0,5	13,10	12,27	12,68
0,75	15,38	14,20	14,79
1,0	29,57	30,10	29,83
1,25	27,63	32,69	30,16
2,5	46,02	47,55	46,78
3,75	49,14	50,26	49,70
5,0	48,68	47,93	48,30
6,5	48,75	48,72	48,73
7,5	46,45	46,39	44,20
8,5	47,40	46,83	47,11
10,0	45,90	51,12	48,51
11,5	48,16	47,76	47,96
12,5	49,25	45,96	47,60

O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi também aplicado aos dados coletados, mostrados na Tabela 4.6, gerando a curva de Michaelis-Menten em função da concentração do substrato D-G3P e o valor K_M foi então determinado, como ilustrado na Figura 4.23.

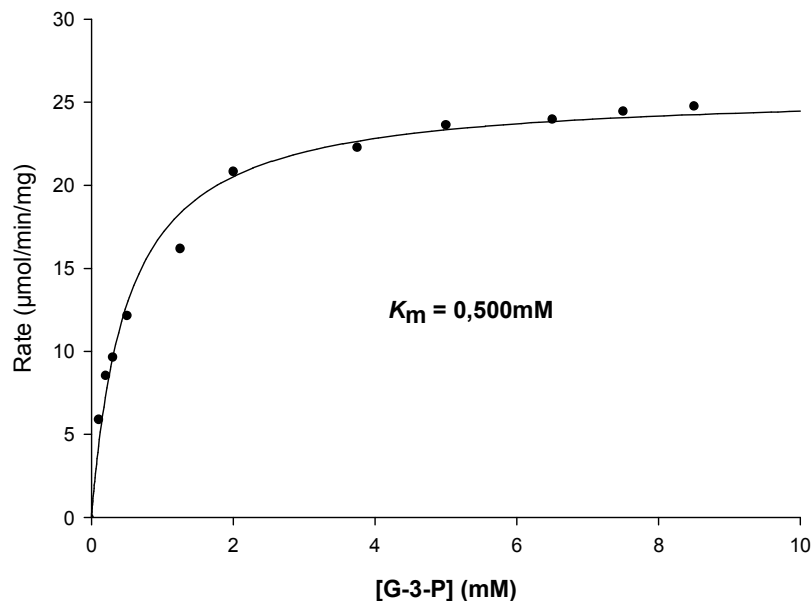


FIGURA 4.23. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de NADH pelo IMER-GAPDH-Tc, variando-se a concentração de D-G3P e mantendo-se constante a de NAD^+ (10,0mmol/L).

Como demonstrado pela Equação 1.6, que representa a equação de Michaelis-Menten, em concentrações baixas de substrato ($[\text{S}] \ll K_M$), a velocidade da reação V_0 é diretamente proporcional à concentração do substrato. Já em elevadas concentrações do substrato ($[\text{S}] \gg K_M$), V_0 se aproxima do seu máximo e a velocidade da reação se torna independente da concentração do substrato, o que pode ser observado nas hipérbolas mostradas nas Figuras 4.22 e 4.23.

Os valores de K_M obtidos para o D-G3P (0,500mmol/L) e para o NAD^+ (0,634mmol/L) evidenciam que após a imobilização a enzima GAPDH-Tc apresenta maior afinidade pelo substrato.

A comparação dos estudos cinéticos com a enzima imobilizada e livre em solução permite avaliar possíveis efeitos do método de imobilização empregado sobre a conformação da enzima e a acessibilidade dos sítios ativos. Assim, os valores de K_M determinados para as enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu, livres e imobilizadas, são apresentados na Tabela 4.7.

TABELA 4.7. Parâmetros cinéticos para as enzimas de GAPDH humana e de *T. cruzi*, imobilizadas e em solução.

<i>GAPDH-Tc</i>				<i>GAPDH-Hu</i>		
$K_M(\mu\text{M})$	IMER	Solução	Razão*	IMER	Solução	Razão*
D-G3P	500± 50	425± 17	1,2	3.500 ± 220	160± 17	21,9
NAD⁺	674 ± 80	258± 19	2,6	750 ± 40	180± 10	4,2

* Razão entre os valores de K_M para a enzima imobilizada e em solução. (±)-Erros associados às medidas expressos através do desvio padrão.

Os valores de K_M determinados para a enzima GAPDH-Tc imobilizada, tanto do substrato como do cofator, estão de acordo com aqueles obtidos para a enzima livre em solução. Os dados apresentados na Tabela 4.7 evidenciam que o processo de imobilização não afetou significativamente a afinidade da enzima pelo substrato e pelo cofator. No caso do NAD⁺, o valor de K_M para a enzima no formato de IMER é 2,6 vezes maior do que o valor da constante determinado para a enzima livre em solução, enquanto que os valores de K_M para o substrato G3P com a enzima imobilizada e em solução são praticamente idênticos. Os valores observados para o K_M da GAPDH-Tc evidenciaram efeitos insignificantes da imobilização sobre a estrutura quaternária, sobre a flexibilidade dos domínios dinâmicos e na acessibilidade aos sítios de ligação do substrato e do cofator.

Por outro lado, no que concerne à sua homóloga humana, os valores de K_M do cofator e do substrato, para a GAPDH-Hu no formato de IMER, foram respectivamente 4 e 22 vezes maior que os determinados para a enzima livre em solução, o que indica que a enzima imobilizada possui menor afinidade pelo substrato e pelo cofator.

As diferenças observadas nos estudos cinéticos entre as enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu podem ser explicadas considerando alguns aspectos estruturais chave, que podem afetar a estrutura quaternária das enzimas de maneira

diferente devido ao método de imobilização empregado, bem como possíveis alterações conformacionais e impedimento estérico do sítio ativo. No método de imobilização por ligação covalente empregado ocorre a formação de base de Schiff entre o glutaraldeído presente no suporte e os grupamentos amina livres presentes na estrutura da molécula. Nesta etapa, os resíduos de lisina presentes em cada enzima têm um papel fundamental. Assim, para entender as diferenças de afinidade observadas pelos IMERs com as enzimas do parasita e humana, foi feita, pelo Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (CBME-IFSC-USP), uma análise do alinhamento da seqüência primária das enzimas do parasita e humana (Figura 4.24).

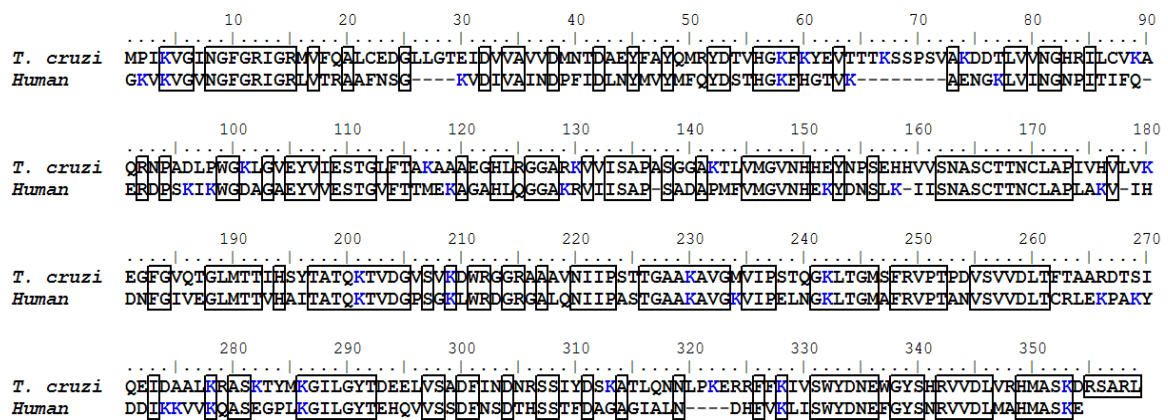


FIGURA 4.24. Seqüência primária alinhada da GAPDH *T. cruzi* e humana. Os números se referem a seqüência da enzima do parasita. Os resíduos conservados estão marcados e os resíduos de lisina estão marcados em azul.

Esta análise evidenciou que as enzimas humana e do parasita possuem 51% de identidade seqüencial, sendo que a enzima do *T. cruzi* possui 88 resíduos de Lys por tetrâmero, enquanto a sua homóloga humana apresenta 104 resíduos.

Os resíduos de Lys da enzima do parasita encontram-se na superfície acessível ao solvente e distante do sítio ativo do substrato e do cofator (Figura 4.25). Além disso, é importante salientar que nenhum resíduo de Lys está

envolvido na reação catalisada pela enzima.⁸⁰ Assim, mesmo após a formação da base de Schiff no processo de imobilização, os sítios ativos do G3P e do NAD⁺ continuam disponíveis para o processo catalítico. No entanto, três resíduos de Lys não-conservados da homóloga humana estão próximos do sítio ativo (Figura 4.25-D), sugerindo que a formação da base de Schiff entre a enzima e o suporte pode introduzir elementos estéricos, limitando a acessibilidade do substrato ao sítio ativo.

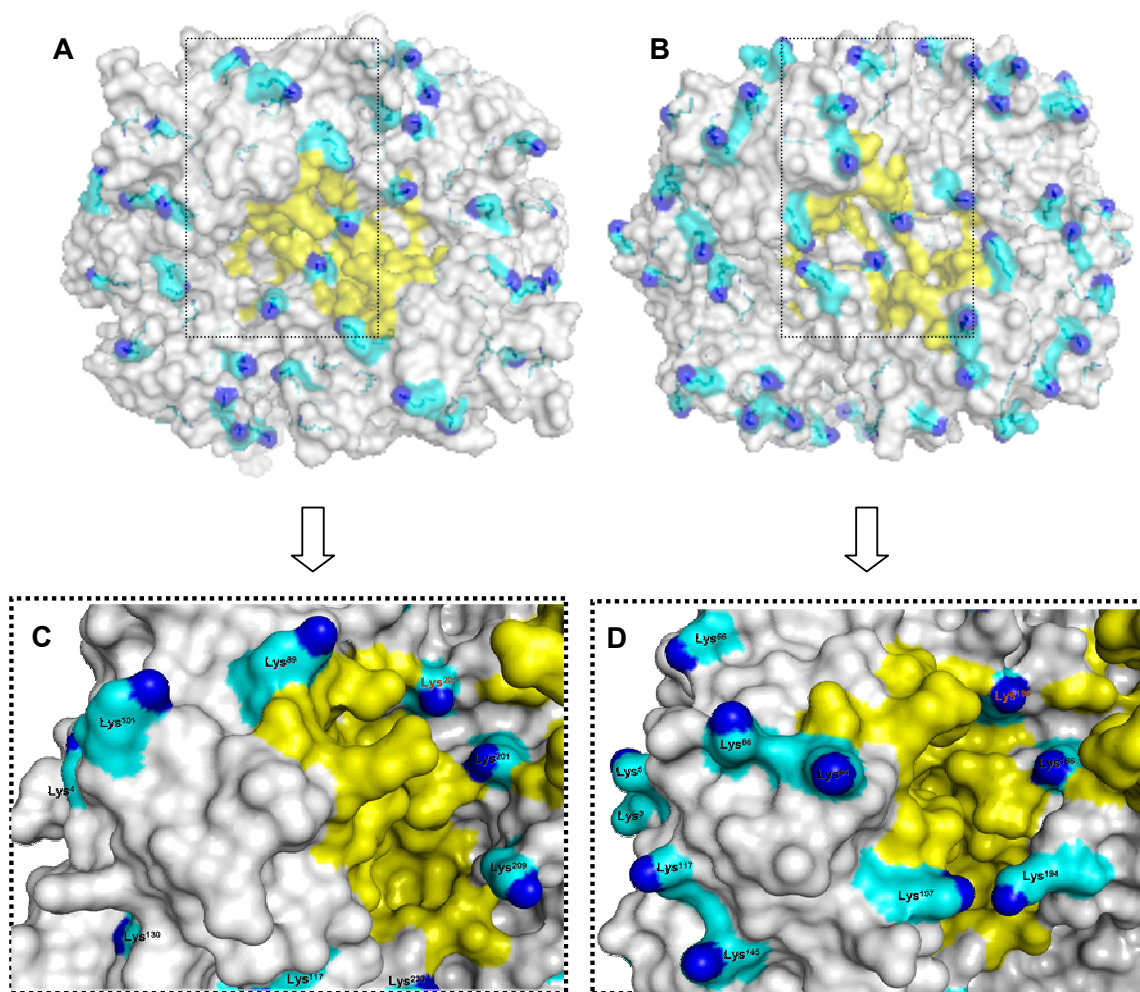


FIGURA 4.25. Superfície dos tetrâmeros A) GAPDH-Tc e B) GAPDH-Hu. Em C) e D) são focalizados os resíduos de lisina próximos ao sítio ativo do substrato. Os resíduos de lisina são mostrados em azul (carbono em azul claro e nitrogênio em azul escuro) e os sítios ativos do co-fator e do substrato são mostrados em amarelo.

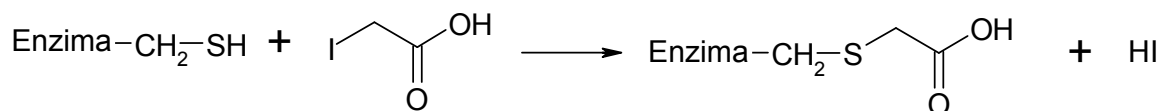
Deve-se ainda considerar que os resíduos de Lys envolvidos na formação da base de Schiff com o suporte podem restringir a flexibilidade da enzima, dificultando o movimento necessário para atingir o estado de transição no processo catalítico.⁸¹ Estas pequenas variações observadas entre as estruturas e as seqüências das enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu sugerem possíveis razões para as diferenças observadas entre as constantes cinéticas principalmente para a enzima humana nos ensaios em solução e após o processo de imobilização.

4.7. Aplicação dos biorreatores com as enzimas GAPDH-Tc e Hu na triagem de ligantes

Na ausência de compostos com conhecida atividade biológica para ambas as enzimas, a realização de uma triagem randômica de compostos é um caminho valioso. Na triagem de ligantes para a enzima GAPDH-Tc realizada através dos ensaios em solução, rotineiramente se observa que alguns dos compostos avaliados interferem nos ensaios. Muitas vezes o composto absorve no mesmo comprimento de onda do NADH (340nm) ou turva a solução, impedindo que o ensaio seja realizado. No presente trabalho, a atividade da enzima é também monitorada pela formação de NADH que neste modelo é quantificado após a separação cromatográfica numa coluna analítica. Dessa forma, se o composto em triagem absorver em 340nm ou turvar a solução, devido a seletividade do método, a atividade da enzima imobilizada ainda pode ser mensurada.

Uma coleção de 46 compostos foi ensaiada com as enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu, imobilizadas e em solução, para a triagem de inibidores. Nesta etapa, a comparação dos resultados obtidos com as enzimas em ambos os formatos permitiu a validação do uso dos biorreatores no processo de *screening* de ligantes. Em seguida, os IMERs com as enzimas do parasita e humana foram aplicados na triagem bioquímica de uma série de 17 compostos (47-63) (Tabela 4.8).

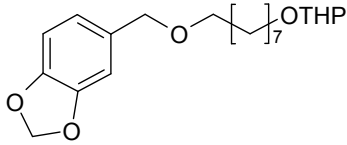
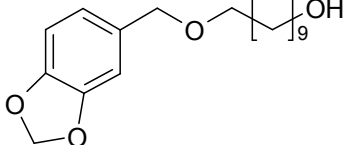
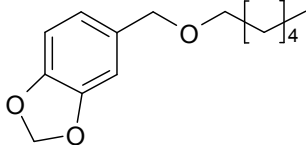
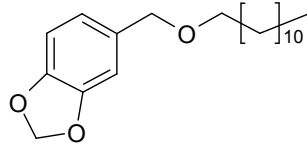
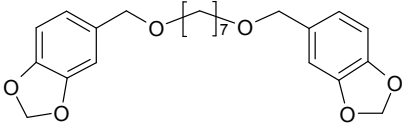
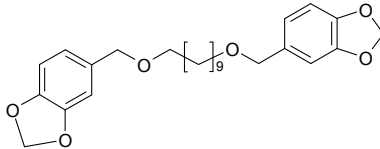
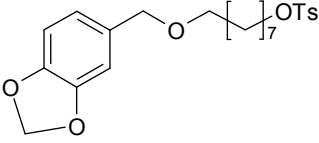
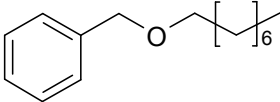
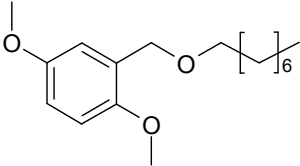
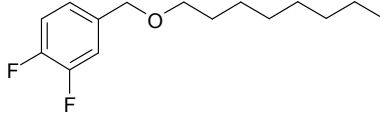
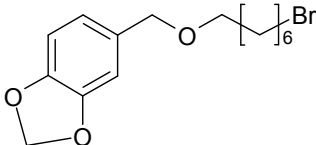
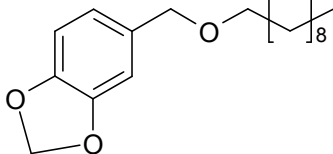
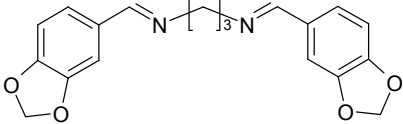
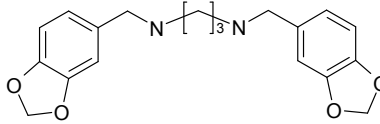
Os compostos 1 a 14 estudados são análogos à sesamina e foram selecionados aleatoriamente. Os compostos 15 a 43 avaliados foram planejados pelo CBME-IFSC-USP com base na atividade inibitória previamente conhecida, para a enzima GAPDH-Tc, de um análogo do ácido anacárdico com a cadeia lateral saturada (44), e sintetizados pelo grupo da Profa. Côrrea, do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais da UFSCar. O composto 45 foi incluído na série por ter sido identificado anteriormente, através de ensaios em solução, como um inibidor da enzima do parasita. O ácido iodoacético (46) é um conhecido inibidor irreversível destas enzimas. Este composto se liga covalentemente aos grupos tióis dos resíduos de cisteína presentes no sítio ativo da enzima, como mostrado no esquema 4.2 abaixo, impedindo-a de realizar a fosforilação oxidativa do D-G3P.⁸²



ESQUEMA 4.2. Formação da ligação covalente entre o ácido iodoacético e a os resíduos de cisteína da enzima.

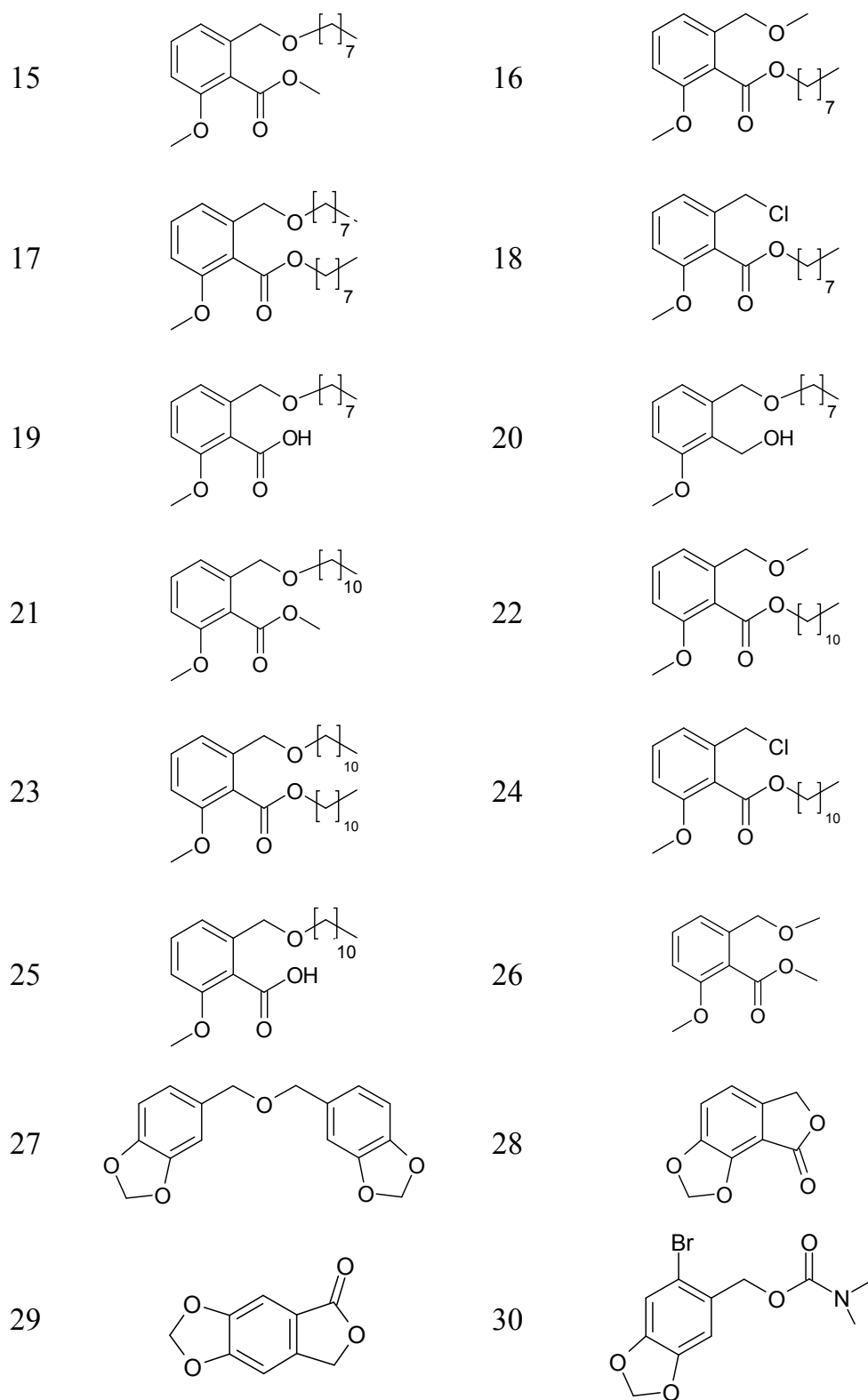
Os compostos 47 a 63 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Ivan da Rocha Pitta do Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos da UFPE e foram selecionados para os ensaios por apresentarem atividade tripanocida em estudos *in vitro*.

TABELA 4.8. Série de compostos avaliados com as enzimas GAPDH de *T. cruzi* e humana.

Código	Estrutura	Código	Estrutura
1		2	
3		4	
5		6	
7		8	
9		10	
11		12	
13		14	

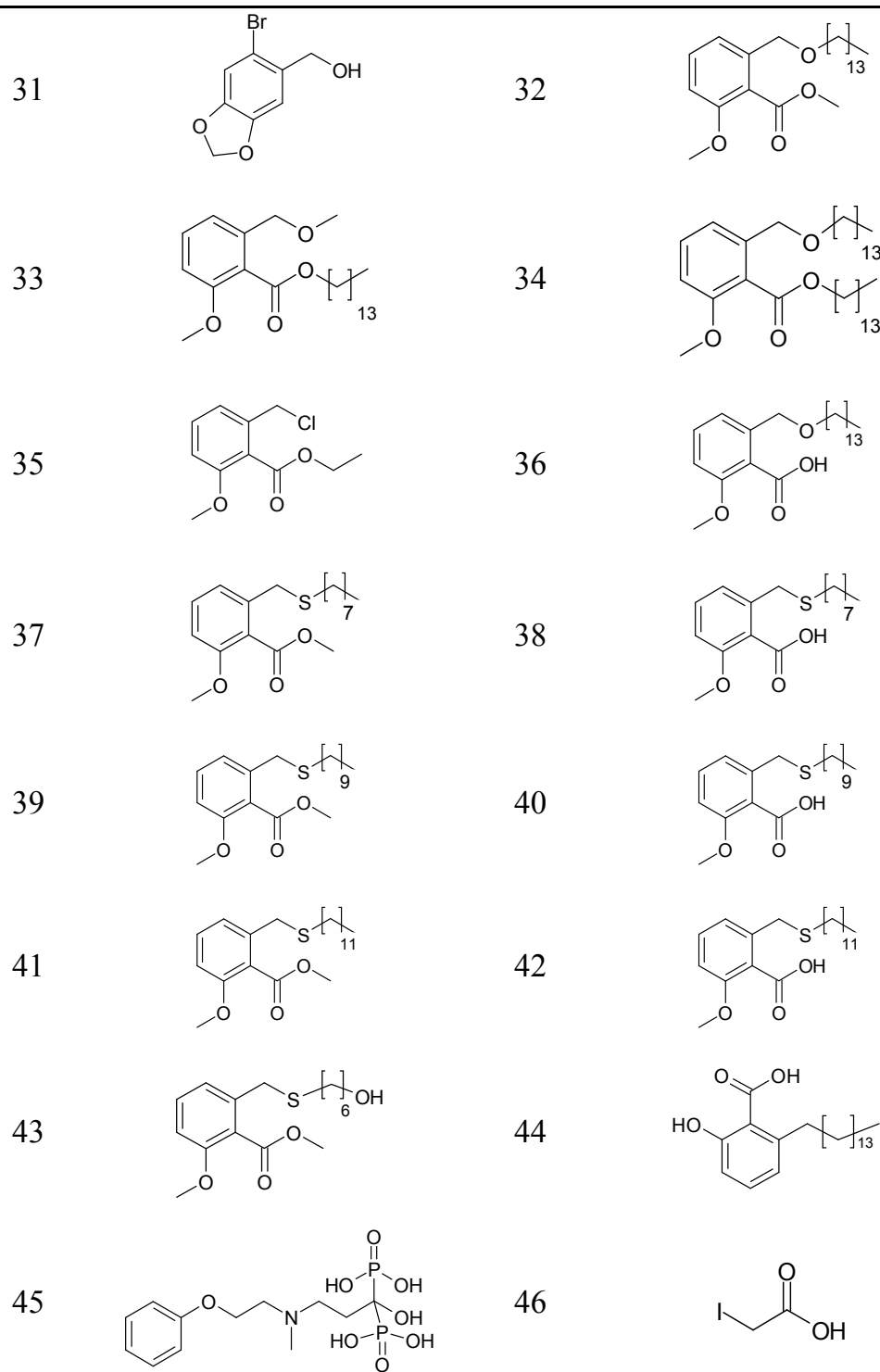
Continua

Continuação da Tabela 4.8



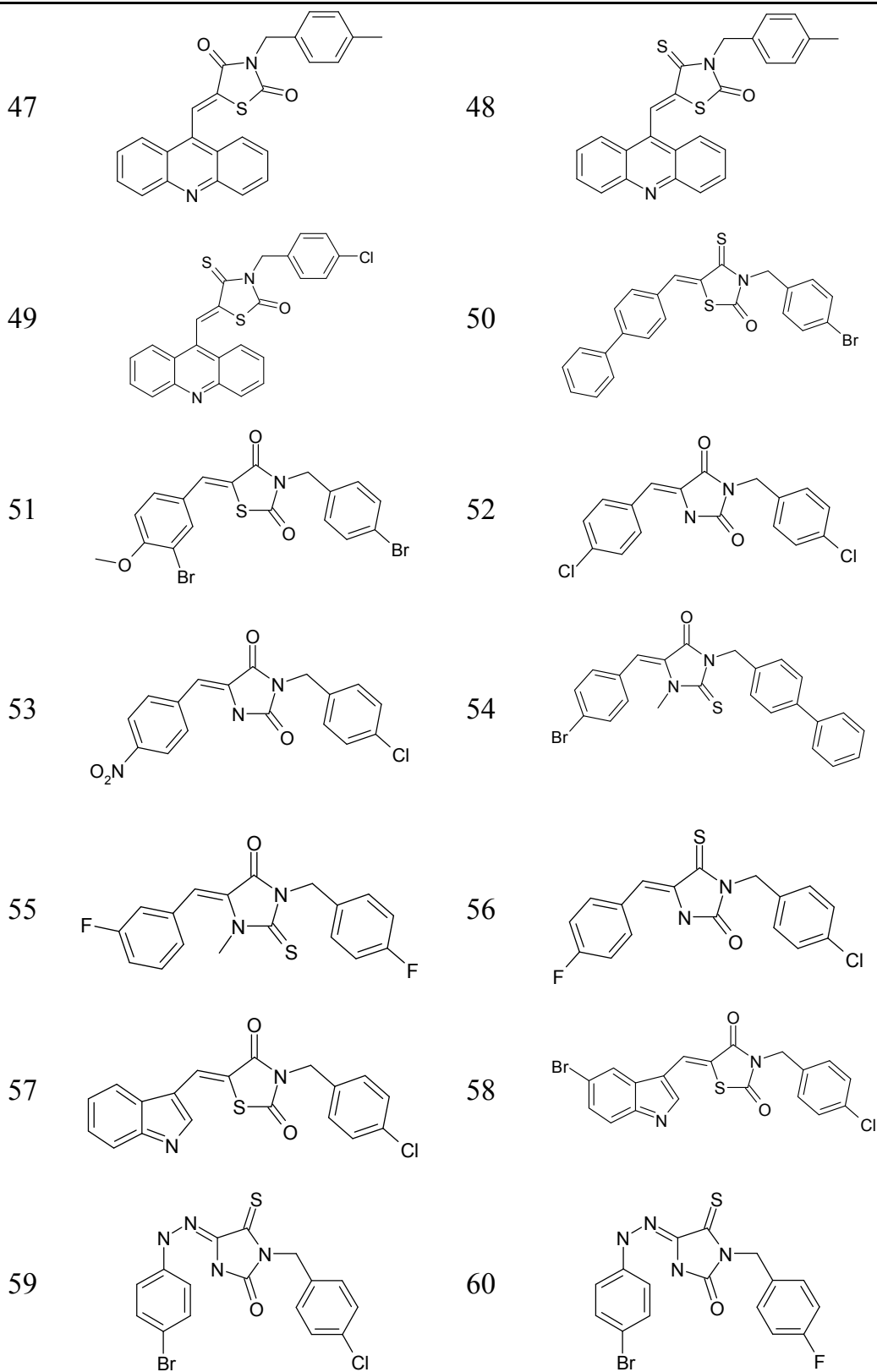
Continua

Continuação da Tabela 4.8



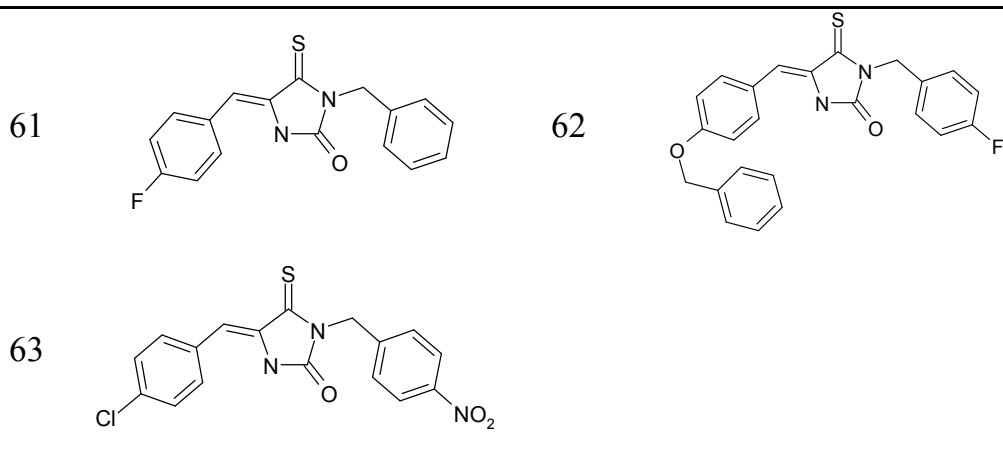
Continua

Continuação da Tabela 4.8



Continua

Continuação da Tabela 4.8



4.7.1. Avaliação da influência de solventes orgânicos empregados no preparo das soluções dos compostos avaliados

A baixa solubilidade em água apresentada por alguns compostos da série estudada exigiu a realização de um estudo preliminar sobre a influência na atividade enzimática do percentual de solvente orgânico necessário para o preparo da amostra. Foi considerada, inicialmente, a possibilidade de baixas porcentagens de solventes orgânicos desnaturarem a enzima ou interferirem no método analítico. Como descrito na seção 3.15, página 37, a atividade da enzima foi avaliada na ausência de possíveis ligantes, substituindo-se seu volume pelas soluções com diferentes porcentagens de solvente orgânicos, a fim de se estabelecer a influência das mesmas no método. Os cromatogramas apresentados na Figura 4.26 exemplificam os resultados obtidos na análise com etanol.

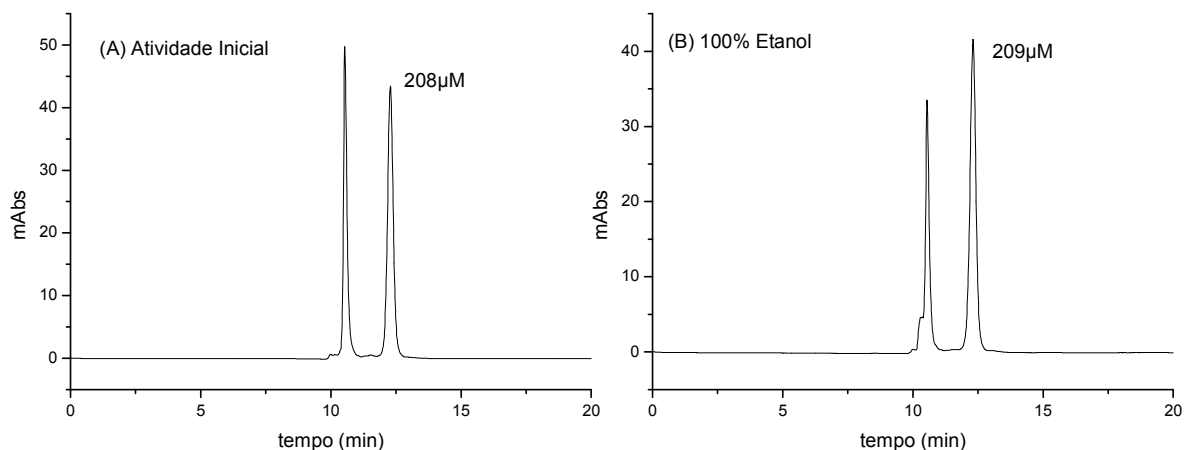


FIGURA 4.26. Cromatograma exemplificando os resultados obtidos referentes ao estudo da influência da percentagem de solvente orgânico, no preparo de amostras, na atividade enzimática.

Os resultados obtidos demonstraram que a presença destes solventes orgânicos não exerce influência sobre a atividade de ambas as enzimas e também não interferiram nos métodos cromatográficos. A razão que deve ser considerada é a pequena porcentagem de solvente orgânico na amostra analisada e ainda a diluição na fase móvel após a injeção da amostra, sendo insuficiente para desnaturar a enzima, através da alteração de sua estrutura tridimensional pelo do rompimento de interações hidrofóbicas estabilizantes, levando a perda da atividade.⁵⁰ Com esse estudo, foi demonstrado que as soluções dos compostos, para triagem, podem ser preparadas em acetonitrila/água, etanol/água ou DMSO/água, assim, qualquer perda da atividade enzimática está relacionada apenas com a presença do composto avaliado.

4.7.2. Avaliação da atividade inibitória dos compostos selecionados

A atividade inibitória dos compostos apresentados na Tabela 4.8 foi avaliada em duas etapas. Na primeira delas, os compostos 1 a 46 foram avaliados frente

às enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu, livres em solução e imobilizadas, como descrito nas seções 3.14, 3.16 e 3.17, para a validação do uso dos biorreatores na triagem bioquímica através da comparação dos dados obtidos. Na segunda etapa, os compostos 47 a 63 foram avaliados empregando apenas as enzimas do parasita e humana imobilizadas.

As análises com a enzima imobilizada foram realizadas em três diferentes concentrações (100, 200 e 300 μ mol/L) e em duplicata durante o processo de validação. Como os ensaios em solução são realizados em concentração única (200 μ mol/L), esta concentração foi utilizada para a validação do emprego no IMER na triagem de ligantes, através da comparação dos resultados obtidos com a enzima em solução e imobilizada. A Figura 4.27 mostra uma comparação entre percentual de inibição frente à enzima GAPDH-Hu em solução e imobilizada. Na Figura 4.28, é apresentada a mesma comparação para a enzima do parasita. Posteriormente, a concentração de 200 μ mol/L foi estabelecida como padrão nos ensaios bioquímicos envolvendo os compostos 47 a 63, onde os biorreatores foram empregados na triagem de ligantes. O ácido iodoacético foi empregado como padrão por ser um conhecido inibidor irreversível tempo-dependente da enzima GAPDH.⁸² Na Figura 4.29 são apresentados os resultados da triagem bioquímica realizada com os biorreatores com a enzima do parasita e humana.

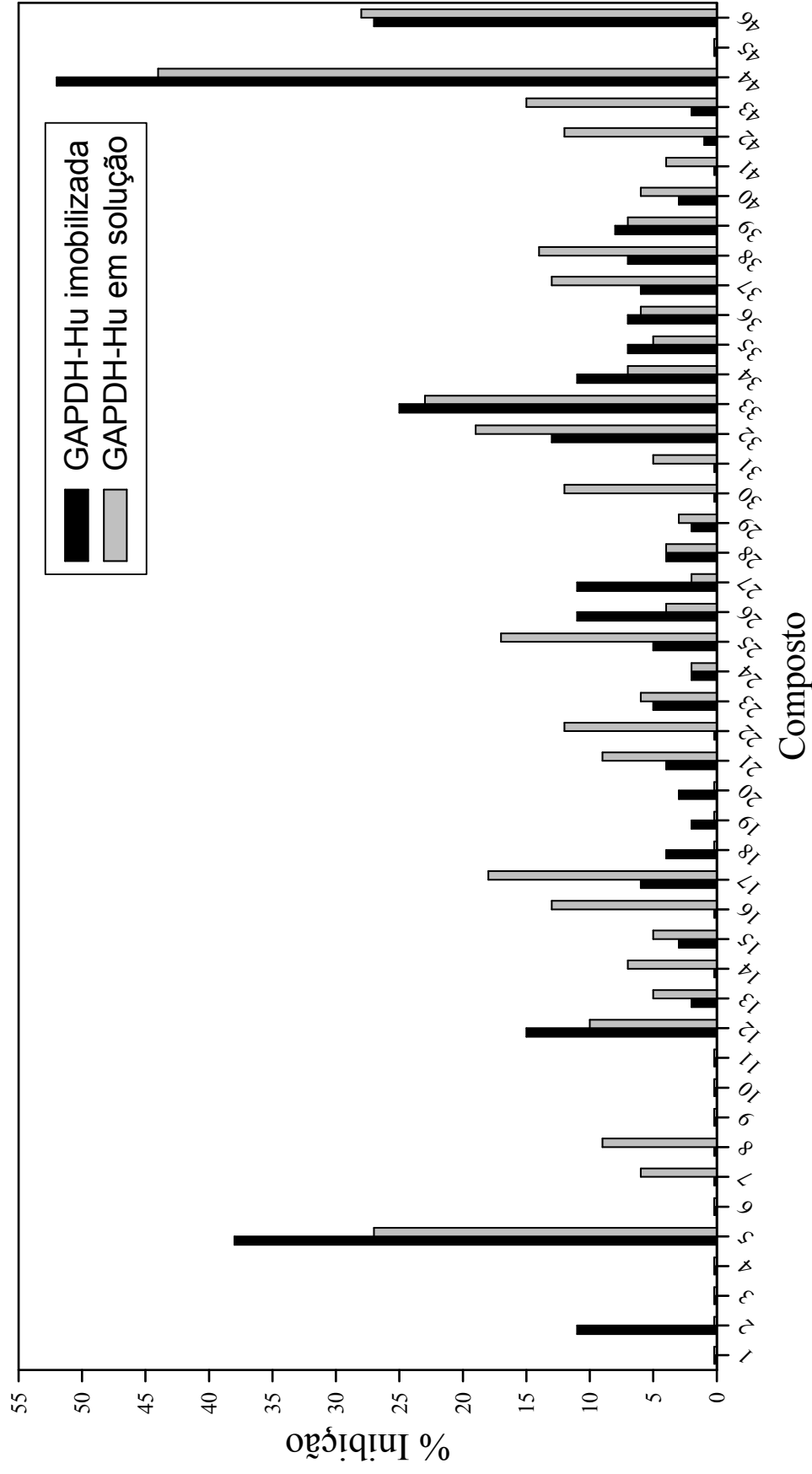


FIGURA 4.27. Porcentagem de inibição dos compostos avaliados com a enzima GAPDH-Hu em solução e imobilizada.

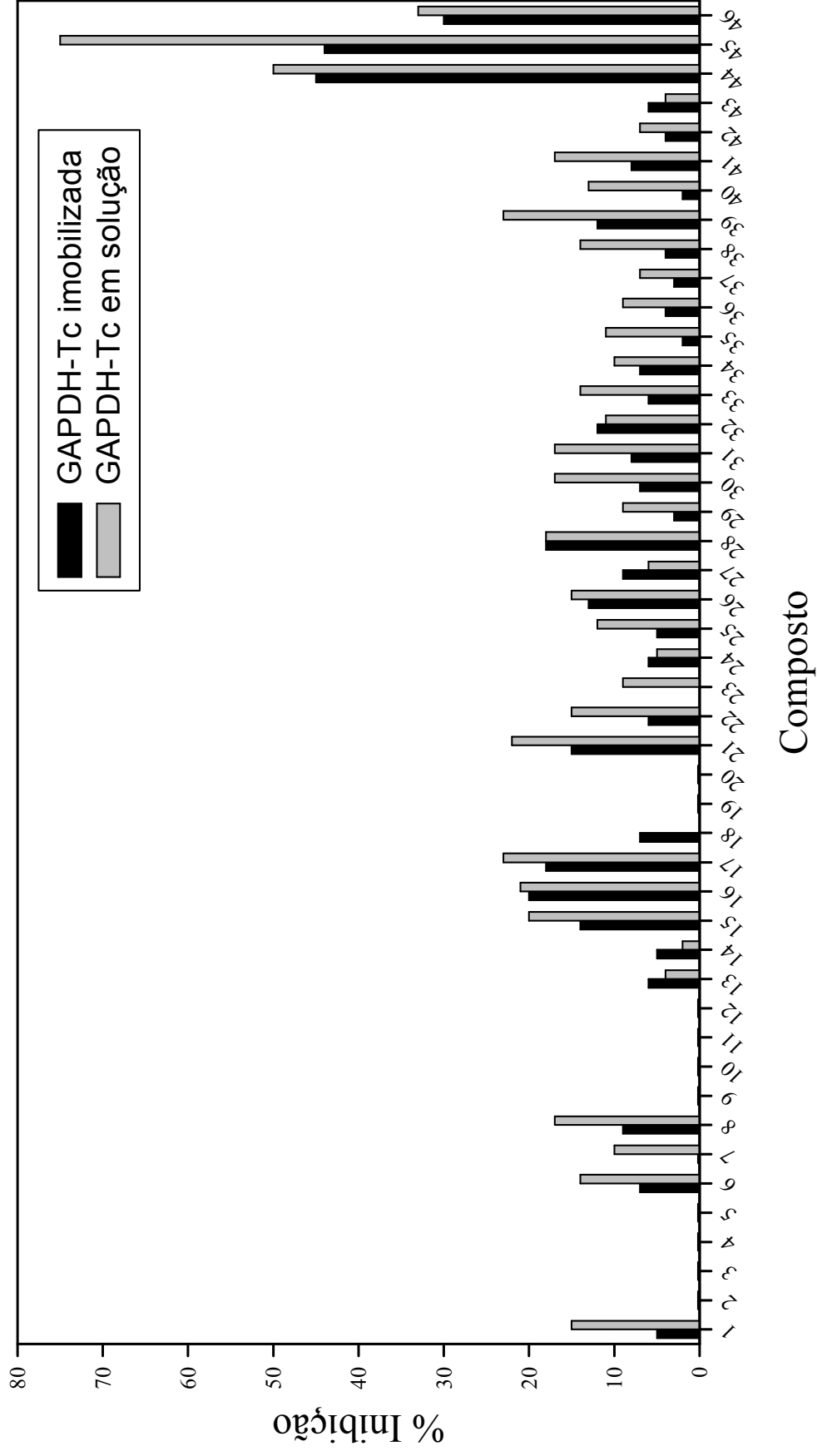


FIGURA 4.28. Porcentagem de inibição dos compostos avaliados com a enzima GAPDH-Tc em solução e imobilizada.

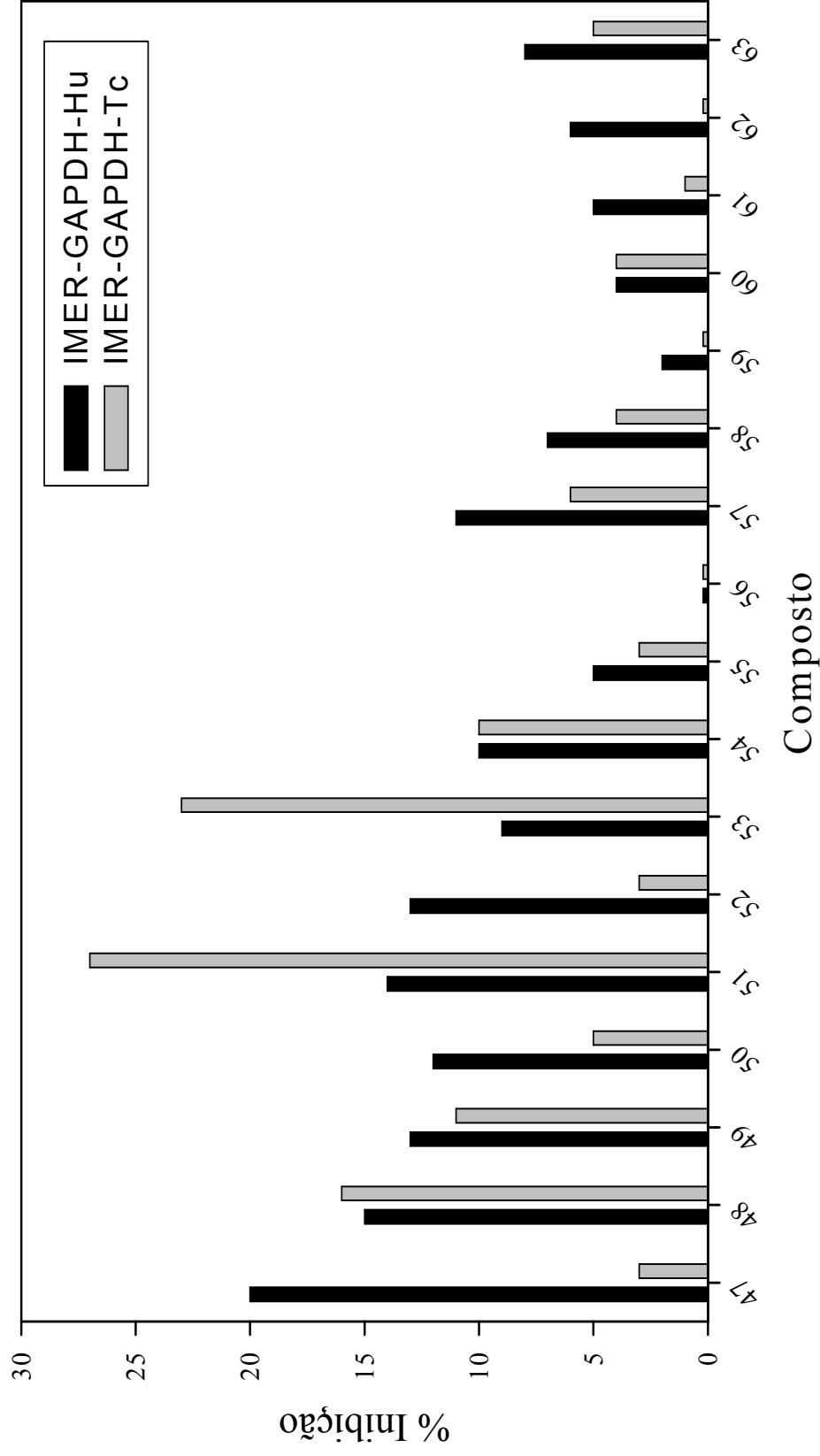


FIGURA 4.29. Porcentagem de inibição dos compostos avaliados com os biorreatores com as enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu.

Os compostos que apresentaram uma porcentagem de inibição representativa (>35%) foram selecionados para a determinação da potência através dos valores de IC_{50} , concentração do composto que reduz a atividade da enzima em 50%. Para isso, foram determinadas as porcentagens de inibição nas concentrações 10, 40, 70, 100, 150, 200, 250, 300 e 400 $\mu\text{mol/L}$, com o intuito de reduzir a atividade enzimática entre 15-85%, realizando-se todas as análises em duplicata.

Dentre os éteres avaliados (compostos 1 a 14) o composto 5 demonstrou 35% de inibição a 200 $\mu\text{mol/L}$ para a GAPDH-Hu imobilizada. Os demais compostos apresentaram pouca ou nenhuma atividade para as enzimas do parasita e humana, em ambos os ensaios. O composto 5 foi então selecionado para se determinar da potência inibitória com a GAPDH-Hu imobilizada. A Figura 4.30 ilustra a porcentagem de inibição do composto 5 em diferentes concentrações.

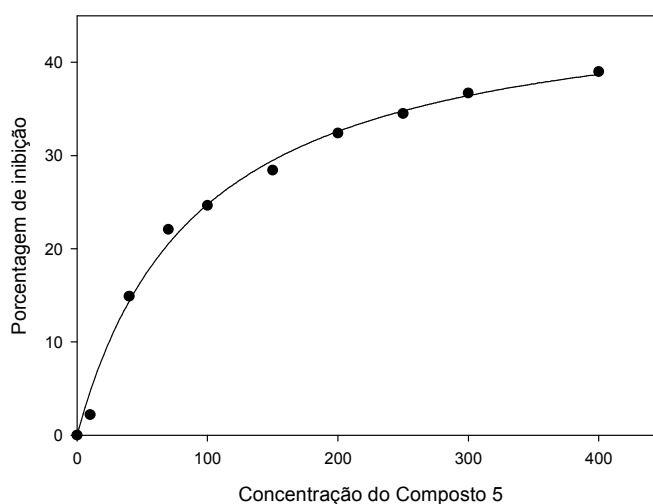


FIGURA 4.30. Porcentagem de inibição da atividade enzimática da GAPDH-Hu no biorreator para diferentes concentrações do composto 5.

Com os resultados obtidos não foi possível calcular a IC_{50} para o composto 5, uma vez que este mostrou atividade pouco expressiva, apresentando porcentagens de inibição inferiores a 50% mesmo em concentrações elevadas, como 400 $\mu\text{mol/L}$. Este ensaio demonstrou que o biorreator identifica inibidores

concentração-dependente, como pode ser observado na curva ilustrada na Figura 4.30, onde nota-se o aumento da porcentagem de inibição com o aumento da concentração do composto 5. Os ensaios com as enzimas humana e do parasita demonstraram que este composto é um inibidor seletivo para a enzima humana, que têm sido associada à diversas doenças.⁵³

Os compostos análogos ao ácido anacárdico (15 a 43) demonstraram pouca ou nenhuma atividade inibitória para as enzimas do parasita e humana, nos ensaios com a enzima imobilizada e em solução.

O ácido anacárdico (44) demonstrou atividade inibitória significativa em todos os ensaios realizados, o que elucida sua não seletividade. Os resultados obtidos para este composto com as enzimas imobilizadas demonstraram que a inibição não é concentração-dependente. Entretanto, nos ensaios realizados com as enzimas em solução pelo CBME, o ácido anacárdico foi caracterizado como um inibidor não-competitivo da enzima GAPDH-Tc.⁸³ Inibidores não competitivos se ligam ao sítio alostérico da enzima, provocando alterações conformacionais que a impede de catalisar a reação. Nos ensaios feitos com os biorreatores não foi possível caracterizar o ácido anacárdico (44) quanto ao tipo de interação com a enzima.

O composto 45 apresentou atividade inibitória relevante e seletividade para a enzima GAPDH-Tc nos ensaios em solução e com a enzima imobilizada. Este composto apresentou IC_{50} de $40\mu\text{mol/L}$, determinado através dos ensaios em solução. Nos ensaios com o IMER foi observada a diminuição na produção de NADH na presença deste composto (Figura 4.31), porém não foi possível calcular a IC_{50} deste para a enzima imobilizada, uma vez que o mesmo apresentou porcentagens de inibição inferiores a 50% em todas as concentrações analisadas. (Figura 4.32)

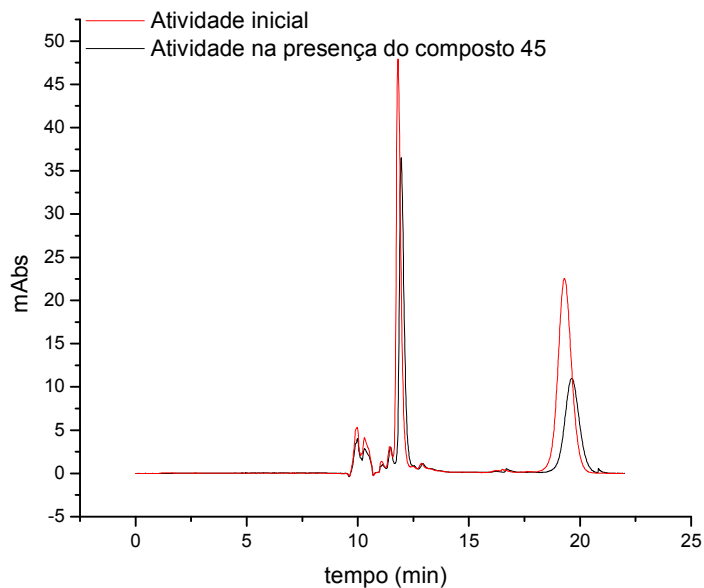


FIGURA 4.31. Cromatogramas referente a produção de NADH pelo IMER-GAPDH-Tc no teste inicial e na presença do composto 45.

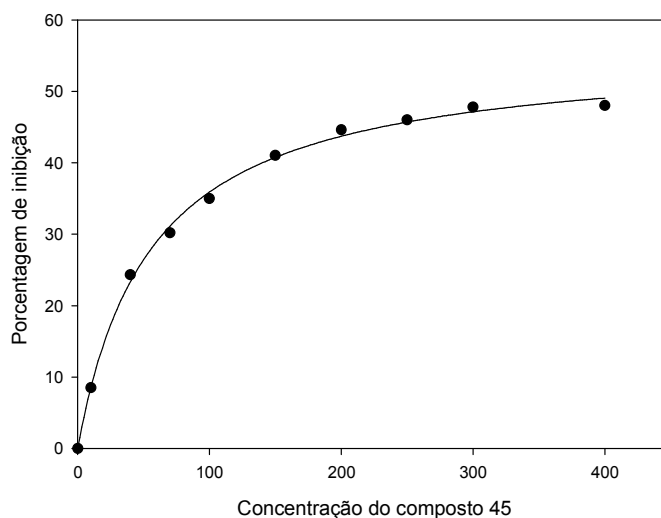


FIGURA 4.32. Atividade inibitória do composto 45 para a enzima GAPDH-Tc imobilizada.

Embora os relatos na literatura descrevam o ácido iodoacético (46) como um potente inibidor⁸², ele apresentou baixa porcentagem de inibição nos ensaios realizados. Como se trata de um inibidor tempo dependente, essa característica,

em um ensaio on-line, pode ser a responsável pela baixa porcentagem de inibição observada. No ensaio realizado, o contato entre inibidor e enzima ocorre em fluxo e em um curto período de tempo comparado ao ensaio descrito na literatura para esse composto.

Os compostos 47 a 63 foram analisados por apresentarem atividade tripanocida nos ensaios *in vitro*, segundo comunicação pessoal com o Prof. Ivan Pitta. Entretanto, nos ensaios com as enzimas GAPDH esta série de compostos não demonstrou atividade inibitória significativa, o que indica que estes podem atuar no parasita através da inibição de outras enzimas vitais ao parasita ou por outros mecanismos.

Através desta triagem de compostos e da comparação dos dados obtidos com as enzimas imobilizadas e em solução, pode-se inferir que as enzimas GAPDH-Tc e GAPDH-Hu retêm a capacidade de reconhecer inibidores enzimáticos após o processo de imobilização por ligação covalente empregado, e os respectivos IMERs podem, portanto, ser empregados na triagem bioquímica de ligantes. Os valores obtidos mostraram boa proximidade, e as pequenas divergências devem estar relacionadas a diferenças conformacionais das enzimas quando em solução ou imobilizadas. Considerando os altos custos e as dificuldades envolvidas na purificação de enzimas, esta técnica representa um método útil de preservar a atividade enzimática para a realização de um grande número de ensaios.

4.8. Estudo comparativo da estabilidade dos IMERs em função do tempo decorrido após o processo de imobilização

Alguns trabalhos envolvendo diferentes técnicas de imobilização de enzimas, onde o biorreator não é utilizado na triagem bioquímica logo após seu preparo, para que a estrutura interna se torne relativamente mais estável, podem ser encontrados na literatura recente.^{27,84} Assim, realizou-se um estudo com o IMER-GAPDH-Hu, empregando o composto 5 identificado como padrão, a fim de determinar se a diminuição da atividade enzimática observada durante os

ensaios estava relacionada apenas com a presença do composto analisado e se esta inibição é independente do tempo decorrido após o preparo do biorreator, considerando que nos ensaios preliminares o biorreator foi utilizado logo após seu preparo, sem aguardar um período para a estabilização da enzima no novo formato. Assim, foram preparados dois biorreatores: um deles foi utilizado para a análise do composto 5 imediatamente, enquanto o outro foi mantido a 4°C por 8 horas, antes de ser usado para análise. A Figura 4.33 mostra a relação entre porcentagem de atividade retida e concentração do composto 5 nas duas análises.

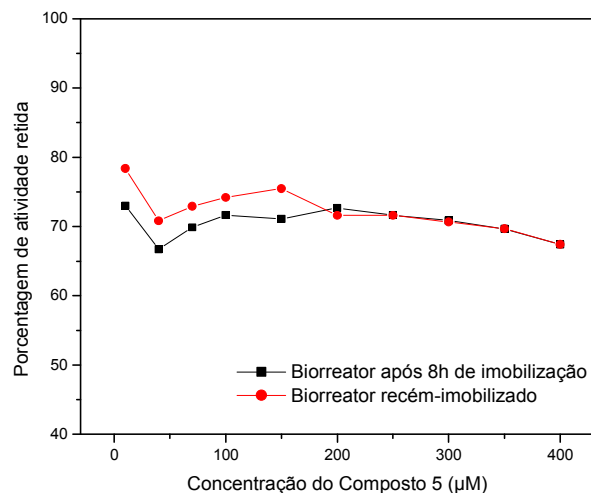


FIGURA 4.33. Porcentagem de atividade enzimática retida pelo IMER-GAPDH-Hu recém-imobilizado e após um período de 8h a 4°C para estabilização enzimática.

Para os ensaios realizados, pode-se notar que ambos os biorreatores apresentaram a mesma resposta, dentro dos erros experimentais. Portanto, não se faz necessário aguardar a estabilização da enzima após o processo de imobilização, pois as respostas obtidas independem do tempo decorrido após o preparo do IMER. Este resultado sugere que a necessidade do biorreator permanecer em repouso por um certo período antes de ser empregado nas análises será dependente da técnica de imobilização empregada bem como do

tipo de suporte empregado. Como, no presente trabalho, a imobilização covalente das enzimas é realizada *in situ* e em capilares de sílica fundida, ligando-se diretamente à parede do capilar, a enzima deve ser imobilizada já na sua conformação mais estável.

4.9. Desenvolvimento de um ensaio para o estudo da reversibilidade dos inibidores identificados

Na busca por um candidato a fármaco é desejável que o inibidor se ligue rápida e reversivelmente ao alvo biológico. A reversibilidade característica das interações intermoleculares é uma vantagem em termos de administração, controle de propriedades farmacocinéticas e redução de efeitos colaterais, uma vez que a enzima não é modificada quimicamente, e nem inativada irreversivelmente, como ocorre no caso dos inibidores enzimáticos irreversíveis.⁸⁵ Dessa forma, foi desenvolvido um método rápido para a caracterização dos inibidores identificados/selecionados quanto à reversibilidade da ligação.

Neste ensaio, utilizaram-se como padrões o ácido iodoacético (46) e o composto 5. A atividade da enzima imobilizada foi previamente avaliada em quadruplicata utilizando a amostra cujo preparo é descrito no item 3.10. Em seguida, eluiu-se através do capilar 1mL da solução 5mmol/L do inibidor a ser avaliado, utilizando-se a bomba seringa e incubou-se este na geladeira por 10 minutos. Posteriormente, o IMER foi inserido no sistema cromatográfico multidimensional e a atividade na enzima foi novamente avaliada. A Figura 4.34 ilustra os cromatogramas obtidos.

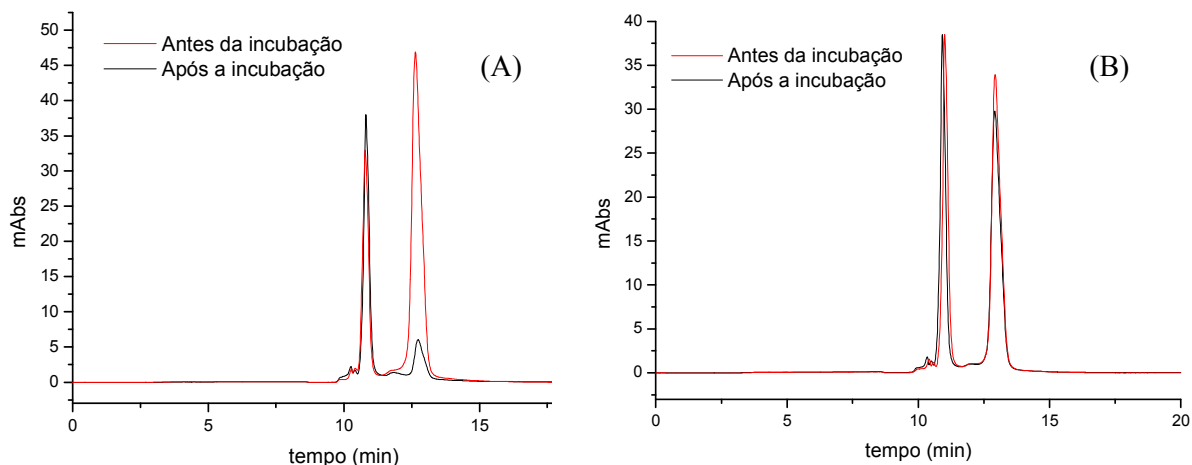


FIGURA 4.34. Cromatogramas ilustrando a produção de NADH pelo IMER-GAPDH-Hu antes e após a incubação com o composto 46 (em A) e com o composto 5 (em B).

Os resultados obtidos foram promissores, demonstrando que o tempo de incubação foi suficiente para praticamente inativar o biorreator que foi incubado com o ácido iodoacético, que se ligou covalentemente aos resíduos de Cys e impediu a catálise enzimática. Já no caso do composto 5, ao inserir-se o biorreator no sistema cromatográfico, apenas a vazão da fase móvel foi suficiente para remover o inibidor do interior do IMER e a enzima foi capaz de catalisar a reação. A principal vantagem deste ensaio aqui descrito é a caracterização rápida do inibidor quanto à sua reversibilidade, que em ensaios em solução pode levar 2 horas para que se observe a inativação de uma enzima pela ligação de um inibidor irreversível. Outros ensaios empregados na caracterização de inibidores irreversíveis envolvem a diálise da solução enzimática para tentar remover o inibidor, caso ele seja reversível, que também demandam tempos maiores de análise.^{86,87}

5. Conclusões

Os métodos cromatográficos multidimensionais desenvolvidos e validados foram empregados com sucesso no monitoramento das atividades das enzimas GAPDH humana e de *T. cruzi* imobilizadas em capilares de sílica fundida. Para quantificação do NADH produzido pelos biorreatores, usando o detector de ultravioleta, faz-se necessária a resolução cromatográfica entre o NAD⁺ e o NADH. O uso do biorreator na primeira dimensão e uma coluna analítica na segunda dimensão foi a estratégia usada para se alcançar a seletividade cromatográfica entre o cofator e o produto da reação enzimática. Os métodos cromatográficos multidimensionais desenvolvidos possibilitaram a realização de estudos cinéticos e triagem de inibidores.

As condições de imobilização para a enzima GAPDH de *T. cruzi* foram otimizadas a partir do procedimento empregado no grupo para a enzima humana. As novas condições resultaram em um aumento da atividade e da estabilidade da enzima, e reprodutibilidade entre os biorreatores preparados.

Foram realizados os estudos cinéticos a fim de se avaliar a eficiência catalítica dos biorreatores e a afinidade da enzima imobilizada pelo substrato e pelo cofator. A comparação destes dados com os obtidos com a enzima em solução evidenciou que a afinidade da enzima GAPDH *T. cruzi*, pelo substrato e pelo cofator, não foi afetada, sugerindo que a acessibilidade dos sítios ativos e a conformação da enzima não foram comprometidas pelo método de imobilização. Entretanto, para a GAPDH humana, os valores de K_M para o substrato e cofator foram, respectivamente, 4 e 22 vezes maiores que os determinados para a enzima em solução, indicando que a enzima imobilizada possui menor afinidade pelos mesmos. Para entender as diferenças de afinidade observadas pelos biorreatores, o Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (CBME-IFSC-USP) executou estudos computacionais que explicaram, de forma adequada, as

diferenças observadas em afinidade dos biorreatores das enzimas do parasita e humana.

Inicialmente, os biorreatores com ambas as enzimas foram empregados na triagem de 46 ligantes e os resultados comparados aos obtidos com as enzimas em solução. As porcentagens de inibição obtidas foram próximas para as enzimas em ambos os formatos. Assim, os biorreatores foram empregados na triagem de 17 outros compostos. Dos compostos avaliados, 2 foram selecionados para a determinação da IC_{50} . No entanto, não foi possível calcular a potência biológica, devido à baixa capacidade inibitória dos compostos. Os biorreatores mostraram-se, também, uma ferramenta valiosa para a caracterização de inibidores com relação à reversibilidade da ligação.

Na busca por novos fármacos para a doença de Chagas a enzima GAPDH é um importante alvo biológico. Os métodos desenvolvidos e descritos neste trabalho com os biorreatores das enzimas GAPDH-Tc e humana associam a especificidade da reação enzimática com a seletividade do método cromatográfico, e ainda, devido a elevada estabilidade da enzima imobilizada, possibilitam a reutilização da enzima na realização de estudos cinéticos e na triagem de ligantes em diferentes séries de compostos.

A falta de inibidores conhecidos com elevada afinidade, para as enzimas GAPDH do parasita e humana, que pudessem ser usados como sondas para validar o método de triagem fez com que não fossem desenvolvidos métodos para seleções de ligantes em bibliotecas combinatórias. No entanto, os resultados apresentados neste trabalho representam um valioso método para a realização de uma variedade de ensaios bioquímicos.

6. Referências Bibliográficas

1. DIXON, M. & WEBB, E.C., *Enzymes*. 3rd ed. 1979, New York: Academic Press. 1116.
2. KOELLER, K.M. & WONG, C.H., "Enzymes for chemical synthesis". *Nature*. **409**(6817): 232, 2001.
3. MARKOGLOU, N. & WAINER, I.W., *Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: On-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery.*, in *Handbook of Analytical Separations*, WILSON, I.D., Editor. 2003, Elsevier Science Ltd: Oxford, UK. p. 215.
4. COPELAND, R.A., *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. 2005, New York: Wiley. 265.
5. HOUSTON, J.G. & BANKS, M., "The chemical-biological interface: Developments in automated and miniaturised screening technology". *Current Opinion in Biotechnology*. **8**(6): 734, 1997.
6. SCHIEL, J.E.; MALLIK, R.; SOMAN, S.; JOSEPH, K.S. & HAGE, D.S., "Applications of silica supports in affinity chromatography". *Journal of Separation Science*. **29**: 719, 2006.
7. MOADDEL, R.; LU, L.; BAYNHAM, M. & WAINER, I.W., "Immobilized receptor- and transporter-based liquid chromatographic phases for on-line pharmacological and biochemical studies: a mini-review". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **768**(1): 41, 2002.
8. HODGSON, R.J.; BROOK, M.A. & BRENNAN, J.D., "Capillary-scale monolithic immunoaffinity columns for immunoextraction with in-line laser-induced fluorescence detection". *Analytical Chemistry*. **77**(14): 4404, 2005.

9. EMNÉUS, J. & MARKO-VARGÄ, G., "Biospecific detection in liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **703**(1-2): 191, 1995.
10. FREITAG, R., "Utilization of enzyme-substrate interactions in analytical chemistry". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **722**(1-2): 279, 1999.
11. BERTUCCI, C.; BARTOLINI, M.; GOTTI, R. & ANDRISANO, V., "Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **797**(1-2): 111, 2003.
12. WOODBURY, C.P. & VENTON, D.L., "Methods of screening combinatorial libraries using immobilized or restrained receptors". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **725**(1): 113, 1999.
13. WAINER, I.W.; KALISZAN, R. & NOCTOR, T.A.G., "Biochromatography using immobilized biopolymers - a new approach to the determination of pharmacological properties". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **45**: 367, 1993.
14. HAGE, D.S., "High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **768**(1): 3, 2002.
15. ZHANG, Y.X.; XIAO, Y.X.; KELLAR, K.J. & WAINER, I.W., "Immobilized nicotinic receptor stationary phase for on-line liquid chromatographic determination of drug-receptor affinities". *Analytical Biochemistry*. **264**(1): 22, 1998.
16. LIAO, P.C.; LI, C.M.; HUNG, C.W. & CHEN, S.H., "Quantitative detection of N-7-(2-hydroxyethyl)guanine adducts in DNA using high-performance

- liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry". *Journal of Mass Spectrometry*. **36**(3): 336, 2001.
17. LEE, M.S., *LC/MS applications in drug development*. Wiley-Interscience series on mass spectrometry. 2002, New York: J. Wiley & Sons.
 18. BOTHNER, B.; CHAVEZ, R.; WEI, J.; STRUPP, C.; PHUNG, Q.; SCHNEEMANN, A. & SIUZDAK, G., "Monitoring enzyme catalysis with mass spectrometry". *Journal of Biological Chemistry*. **275**(18): 13455, 2000.
 19. CAO, L., "Immobilised enzymes: science or art?" *Current Opinion in Chemical Biology*. **9**: 217, 2005.
 20. MARKOGLU, N.; HSUESH, R. & WAINER, I.W., "Immobilized enzyme reactors based upon the flavoenzymes monoamine oxidase A and B". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **804**(2): 295, 2004.
 21. BENETTON, S.; KAMEOKA, J.; TAN, A.M.; WACHS, T.; CRAIGHEAD, H. & HENION, J.D., "Chip-based P450 drug metabolism coupled to electrospray ionization-mass spectrometry detection". *Analytical Chemistry*. **75**(23): 6430, 2003.
 22. MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M. & FERNANDEZ-LAFUENTE, R., "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques". *Enzyme and Microbial Technology*. **40**(6): 1451, 2007.
 23. URBAN, P.L.; GOODALL, D.M. & BRUCE, N.C., "Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies". *Biotechnology Advances*. **24**(1): 42, 2006.
 24. GIRELLI, A.M. & MATTEI, E., "Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **819**(1): 3, 2005.

25. BICKERSTAFF, G.F., *Immobilization of enzymes and cells*. 1997, Totowa, N.J.: Humana Press. xiv.
26. LIM, L.W.; TOMATSU, M. & TAKEUCHI, T., "Development of an on-line immobilized-enzyme reversed-phase HPLC method for protein digestion and peptide separation". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **386**: 614, 2006.
27. BESANGER, T.R.; HODGSON, R.J.; GREEN, J.R.A. & BRENNAN, J.D., "Immobilized enzyme reactor chromatography: Optimization of protein retention and enzyme activity in monolithic silica stationary phases". *Analytica Chimica Acta*. **564**: 106, 2006.
28. KORECKÁ, L.; BÍLKOVÁ, Z.; HOLÈAPEK, M.; KRÁLOVSKÝ, J.; BENEŠ, M.; LENFELD, J.; MINC, N.; CECAL, R.; VIOVY, J.-L. & PRZYBYLSKI, M., "Utilization of newly developed immobilized enzyme reactors for preparation and study of immunoglobulin G fragments". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **808**: 15, 2004.
29. LUCKARIFT, H.R.; JOHNSON, G.R. & SPAIN, J.C., "Silica-immobilized enzyme reactors; application to cholinesterase-inhibition studies". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **843**: 310, 2006.
30. CARDOSO, C.L.; 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.
31. CHAPLIN, M.F. & BUCKE, C., *Enzyme technology*. 1990, Cambridge England ; New York: Cambridge University Press.

32. AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I. & PALLESCHI, G., "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring". *Biosensors & Bioelectronics*. **21**(8): 1405, 2006.
33. WISEMAN, A., *Handbook of enzyme biotechnology*. 2nd ed. 1985, Chichester West Sussex; New York: E. Horwood; Halsted Press. 457.
34. The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>. Acessado em 11/06/2008.
35. Neglected diseases: a human rights analysis, http://www.who.int/tdr/publications/publications/seb_topic6.htm. Acessado em 29/07/2008
36. FALLON, P.G. & DOENHOFF, M.J., "Drug-resistant Schistosomiasis - resistance to Praziquantel and Oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **51**(1): 83, 1994.
37. GRYSEELS, B.; MBAYE, A.; DE VLAS, S.J.; STELMA, F.F.; GUISSÉ, F.; VAN LIESHOUT, L.; FAYE, D.; DIOP, M.; LY, A.; TCHUEM-TCHUENTE, L.A.; ENGELS, D. & POLMAN, K., "Are poor responses to Praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence". *Tropical Medicine & International Health*. **6**(11): 864, 2001.
38. URBINA, J.A. & DOCAMPO, R., "Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances". *Trends in Parasitology*. **19**(11): 495, 2003.
39. ALVIM, J.; DIAS, R.L.A.; CASTILHO, M.S.; OLIVA, G. & CORREA, A.G., "Preparation and evaluation of a coumarin library towards the inhibitory activity of the enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*". *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **16**(4): 763, 2005.

40. SOUZA, D.H.F.; GARRATT, R.C.; ARAUJO, A.P.U.; GUIMARAES, B.G.; JESUS, W.D.P.; MICHELS, P.A.M.; HANNAERT, V. & OLIVA, G., "Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design". *Febs Letters*. **424**(3): 131, 1998.
41. PAVAO, F.; CASTILHO, M.S.; PUPO, M.T.; DIAS, R.L.A.; CORREA, A.G.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C. & OLIVA, G., "Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 angstrom resolution". *Febs Letters*. **520**(1-3): 13, 2002.
42. STRAMER, S.L.; DODD, R.Y.; LEIBY, D.A.; HERRON, R.M.; MASCOLA, L.; ROSENBERG, L.J.; CAGLIOTI, S.; LAWACZECK, E.; SUNENSHINE, R.H.; KUEHNERT, M.J.; MONTGOMERY, S.; BERN, C.; MOORE, A.; HERWALDT, B.; KUN, H. & VERANI, J.R., "Blood donor screening for Chagas disease - United States, 2006-2007 (Reprinted from MMWR, vol 56, pg 141-143, 2007)". *Jama-Journal of the American Medical Association*. **297**(13): 1424, 2007.
43. CROFT, S.L.; BARRETT, M.P. & URBINA, J.A., "Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis". *Trends in Parasitology*. **21**(11): 508, 2005.
44. SCHOFIELD, C.J. & MAUDLIN, I., "Trypanosomiasis control". *International Journal for Parasitology*. **31**(5-6): 615, 2001.
45. COURA, J.R. & DE CASTRO, S.L., "A critical review on Chagas disease chemotherapy". *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. **97**(1): 3, 2002.
46. LAZARDI, K.; URBINA, J.A. & SOUZA, W.D., "Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, Ketoconazole and Terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma*

- (*Schizotrypanum*) *cruzi*". *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **34**(11): 2097, 1990.
47. BAKKER, B.M.; MICHELS, P.A.M.; OPPERDOES, F.R. & WESTERHOFF, H.V., "What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*?" *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(21): 14551, 1999.
48. TYLER, K.M. & ENGMAN, D.M., "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited". *International Journal for Parasitology*. **31**(5-6): 472, 2001.
49. RENSLO, A.R. & MCKERROW, J.H., "Drug discovery and development for neglected parasitic diseases". *Nature Chemical Biology*. **2**(2): 701, 2006.
50. NELSON, D.L. & COX, M.M., *Lehninger. Princípios de Bioquímica*. 3ª ed ed. 2002, São Paulo: Sarvier.
51. DE MARCHI, A.A.; CASTILHO, M.S.; NASCIMENTO, P.G.B.; ARCHANJO, F.C.; DEL PONTE, G.; OLIVA, G. & PUPO, M.T., "New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **12**(18): 4823, 2004.
52. CHUANG, D.M.; HOUGH, C. & SENATOROV, V.V., "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis and neurodegenerative diseases". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **45**: 269, 2005.
53. SIROVER, M.A., "New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase". *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. **1432**(2): 159, 1999.
54. YAMAGUCHI, M.; TSUCHIYA, Y.; HISHINUMA, K.; CHIKUMA, T. & HOJO, H., "Conformational change of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by acetylleucine chloromethyl ketone is followed

- by unique enzymatic degradation". *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **26**(12): 1648, 2003.
55. BEISSWENGER, P.J.; HOWELL, S.K.; SMITH, K. & SZWERGOLD, B.S., "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes". *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. **1637**(1): 98, 2003.
56. VOET, D. & VOET, J.G., *Biochemistry*. 2nd ed. 1995, New York: J. Wiley & Sons.
57. MOADDEL, R. & WAINER, I.W., "Conformational mobility of immobilized proteins". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **43**(2): 399, 2007.
58. VERLI, H. & BARREIRO, E.J., "Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores." *Química Nova*. **28**(1): 95, 2005.
59. VOET, D.; VOET, J.G. & PRATT, C.W., *Fundamentos de Bioquímica*. 2000, Porto Alegre: Artmed Editora.
60. BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. & STRYER, L., *Biochemistry*. 5th ed. 2002, New York: W. H. Freeman and Co.
61. SILVERMAN, R.B., *The organic chemistry of drug design and drug action*. 2nd ed. 2004, Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
62. LESKOVAC, V., *Comprehensive Enzyme Kinetics*. 2004, New York: Kluwer Academic Publishers.
63. BRADFORD, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*. **72**(1-2): 248, 1976.
64. Esclarecimentos sobre a aplicação da re nº 899/2003 – Validação de métodos bioanalíticos,
http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE_899_consideracoes.pdf
Acessado em 28/07/2008

65. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. & MELO, L.F.C., "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos". *Química Nova*. **27**(5): 771, 2004.
66. BARBOSA, V.M. & NAKANO, M., "Muscle d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *anãs* sp. Purification and properties of the enzyme". *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology*. **88**(2): 563, 1987.
67. 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." *Journal of Chromatography A*. **1120**: 1715, 2005.
68. CHAN, P.C. & BIELSKI, B.H.J., "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase catalyzed chain oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by perhydroxyl radicals". *Journal of Biological Chemistry*. **255**(3): 874, 1980.
69. WAINER, I.W. & FRIED, K., "Methods of screening combinatorial libraries using immobilized or restrained receptors." *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **725**: 113, 1997.
70. DUGO, P.; CACCIOLA, F.; KUMM, T.; DUGO, G. & MONDELLO, L., "Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications". *Journal of Chromatography A*. **1184**(1-2): 353, 2008.
71. LIMA, V.V. *Colunas de Acesso restrito e Biorreatores de Enzima GAPDH: Desenvolvimento e Aplicação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. São Carlos, Departamento de Química, 2004. p 200.
72. BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V. & WAINER, I.W., "Development and characterization of an immobilized enzyme reactor based on

- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies". *Journal of Chromatography A*. **987**: 331, 2003.
73. RILEY, C.M. & ROSANSKE, T.W., *Development and validation of analytical methods*. 1^a ed. Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, ed. RILEY, C.M. & ROSANSKE, T.W. Vol. 3. 1996, New York: Elsevier Publishers. 364.
74. NAWROCKI, J., "The silanol group and its role in liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **779**: 29, 1997.
75. ZNALEZIONA, J.; PETR, J.; KNOB, R.; MAIER, V. & SEVCIK, J., "Dynamic coating agents in CE". *Chromatographia Supplement*. **67**: S5, 2008.
76. CIFUENTES, A.; CANALEJAS, P.; ORTEGA, A. & DIEZ-MAS, J.C., "Treatments of fused-silica capillaries and their influence on the electrophoretic characteristics of these columns before and after coating". *Journal of Chromatography A*. **823**: 561, 1998.
77. SHI, Y. & CROUCH, R., "Micro-scale determination of glucose by capillary flow injection with an immobilized enzyme reactor". *Analytica Chimica Acta*. **381**: 165, 1999.
78. BIDLINGMEYER, B.A. & HENDERSON, J., "Investigation of retention on bare silica using reversed-phase mobile phases at elevated temperatures". *Journal of Chromatography A*. **1060**: 187, 2004.
79. YANG, Q.; LUI, X.-Y. & MIYAKE, J., "Self-assembly and immobilization of liposomes in fused-silica capillary by avidin-biotin binding". *Supramolecular Science*. **5**(5-6): 769, 1998.
80. CASTILHO, M.S., PAVÃO, F., OLIVA, G., LADAME, S., WILLSON, M., PÉRIÉ, J., "Evidence for the two phosphate binding sites of an analogue of the thioacyl intermediate for the *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed reaction, from its crystal structure". *Biochemistry*. **42**(23): 71, 2003.

81. SKARZYNSKI, T., WONACOTT, A.J., "Coenzyme-induced conformational changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*". *J. Mol. Biol.* **203**(4): 1097, 1988.
82. FAHIM, F.A.; ESMAT, A.Y.; MADY, E.A. & IBRAHIM, E.K., "Antitumor activities of iodoacetate and dimethylsulphoxide against solid ehrlich carcinoma growth in mice." *Biological Research.* **36**(2): 253, 2003.
83. PEREIRA, J.M.; SEVERINO, R.P.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F.; ZOTTIS, A.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. & CORREA, A.G., "Anacardic acid derivatives as inhibitors of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.08.057, 2008.
84. HODGSON, R.J.; BESANGER, T.R.; BROOK, M.A. & BRENNAN, J.D., "Inhibitor screening using immobilized enzyme reactor chromatography/mass spectrometry". *Analytical Chemistry.* **77**(23): 7512, 2005.
85. POSTIGO, M.P. *Planejamento Racional de Inibidores da Purina Nucleosídeo Fosforilase de Schistosoma mansoni*. São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, 2007. p 106.
86. RODRIGUEZ, C.E.; FUKUTO, J.M.; TAGUCHI, K.; FROINES, J. & CHO, A.K., "The interactions of 9,10-phenanthrenequinone with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a potential site for toxic actions". *Chemico-Biological Interactions.* **155**(1-2): 95, 2005.
87. KALINOWSKI, S.S. & MOOKHTIAR, K.A., "Mechanism of inhibition of yeast squalene synthase by substrate analog inhibitors". *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **368**(2): 338, 1999.