

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química

**Desenvolvimento e aplicação de biorreatores
capilares para a triagem de ligantes de Purina
Nucleosídeo Fosforilases**

Marcela Cristina de Moraes*

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

Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

*** Bolsista FAPESP**

São Carlos – SP

2012

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

M827da

Moraes, Marcela Cristina de.

Desenvolvimento e aplicação de biorreatores capilares para a triagem de ligantes de Purina Nucleosídeo Fosforilases / Marcela Cristina de Moraes. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
129 f.

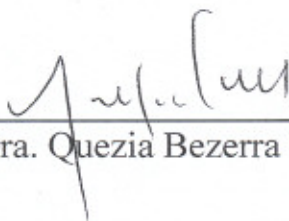
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Química. 2. Imobilização de enzimas. 3. Ensaio enzimáticos. I. Título.

CDD: 540 (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 Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Marcela Cristina de Moraes**, realizada em 28 de fevereiro de 2012:*



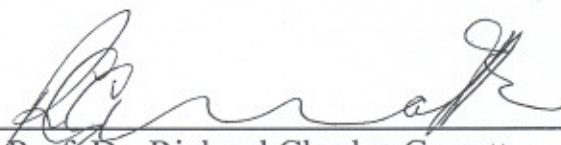
Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass



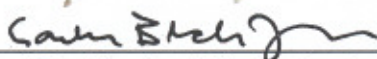
Prof. Dr. Emanuel Carrilho



Prof. Dr. Jerson Lima da Silva



Prof. Dr. Richard Charles Garratt



Dr. Carlos Bloch Junior

“Nossos pensamentos e imaginação são os
únicos limites reais para nossas possibilidades.”
(Orison Swett Marden)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Quezia B. Cass pela orientação, incentivo e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, além da liberdade a mim concedida para desenvolver este projeto, compartilhando sempre seu conhecimento e contribuindo imensamente para meu crescimento profissional.

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

Ao professor Dr. Diógenes Santiago Santose ao Dr. Rodrigo G. Ducati, que confiaram em nosso trabalho e contribuíram com a doação de enzimas e discussão de resultados.

À professora Dra. Carmen Lucia Cardoso pela paciência, co-orientação e apoio durante a iniciação científica, mestrado e doutorado, mas principalmente pela preciosa amizade durante todos esses anos.

Às professoras Dra. Gabriella Massolini, Dra. Enrica Calleri e Dra. Caterina Temporini, por me receberem em seus grupos de pesquisa para a realização de estágio na Itália. Agradeço a confiança, aos ensinamentos, contribuições e amizade.

À professora Dra. Regina V. Oliveira e Dra. Neila M. Cassiano pelas produtivas discussões, amizade e incentivo.

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

Aos colegas do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE pela amizade construída nestes anos, pelo clima de apoio mútuo, incentivo, colaboração e momentos de descontração.

Aos meus amigos Franciane Moura, Vinícius Carvalho e Josiane Tiossi, pelo apoio, amizade irrestrita, entusiasmo e momentos de descontração.

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 Luiz Claudio, pelo companheirismo, carinho, dedicação e apoio em todos os momentos.

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

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 (2008/04051-0) e Capes (6595/10-3) pelas bolsas concedidas.

Lista de abreviaturas e símbolos

λ	Comprimento de onda
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
APTS	3-aminopropiltriétoxissilano
B_t	Quantidade de biomolécula imobilizada
C_8	Octil-sílica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos (<i>Diode array detector</i>)
D.I.	Diâmetro interno
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EI	Complexo enzima-inibidor
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Complexo enzima-substrato-inibidor
ESI	Ionização por electrospray (<i>Electrospray ionization</i>)
FAC	Cromatografia de afinidade frontal (<i>Frontal affinity chromatography</i>)
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HTS	Ensaio biológico automatizado em larga escala (<i>High Throughput Screening</i>)
HsPNP	Purina nucleosídeo fosforilase humana
IAM	Membranas artificiais imobilizadas (<i>Immobilized Artificial Membrane</i>)
IC ₅₀	Concentração do inibidor em que a atividade da enzima é reduzida a 50%
IMER	Reator com enzima imobilizada (<i>Immobilized Enzyme Reactor</i>)

IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
K_d	Constante de dissociação
K_i	Constante de inibição
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MBP	Proteína de ligação de maltose (<i>Maltose binding protein</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass spectrometry</i>)
PGA	Penicillin G acylase
pH	Potencial hidrogeniônico
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
RNA	Ácido Ribonucléico
<i>Sm</i> PNP	Purina nucleosídeo fosforilase de <i>Schistosoma mansoni</i>
TEA	Trietilamina
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
V_{max}	Velocidade máxima de reação
X.O.	Xantina oxidase

Lista de Tabelas

Tabela 4.1. Condições cromatográficas no sistema multidimensional para a separação de inosina e hipoxantina.....	62
Tabela 4.2. Precisão e exatidão intra e interdias do método de análise para quantificação da hipoxantina formada pelo biorreator de PNP.	63
Tabela 4.3. Valores obtidos de K_M para o substrato inosina nas diversas condições avaliadas.....	74
Tabela 4.4. Compostos derivados de 9-deazaguaninas ^{105,115}	79
Tabela 4.5. Porcentagem de inibição do <i>Sm</i> PNP-IMER para os compostos da série de derivados da 9-deazaguanina nas condições otimizadas.....	82
Tabela 4.6. Valores médios de porcentagem de inibição, a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos compostos avaliados, obtidos no ensaio em solução da enzima xantina oxidase	84
Tabela 4.7. Porcentagem de inibição dos compostos da série de derivados da 9-deazaguanina e DI4G.....	92
Tabela 4.8. Resultados da triagem realizada com os derivados de 7-deazaguanina contra o <i>Hs</i> PNP-IMER e <i>Sm</i> PNP-IMER.	97
Tabela 4.9. Valores de K_M para a <i>Hs</i> PNP livre e imobilizada nos suportes selecionados e capacidade máxima de produção de hipoxantina dos biorreatores preparados.....	111

Lista de figuras

Figura 1.1. Métodos de imobilização de enzimas baseados em interações químicas e físicas ²⁰	4
Figura 1.2. Exemplo de um perfil obtido por cromatografia de afinidade frontal (FAC).	8
Figura 1.3. Perfis de eluição de um mesmo ligante utilizado como sonda em experimentos de FAC. Figura adaptada de Wainer et al ⁶¹	9
Figura 1.4. Exemplo de perfil de eluição zonal no estudo de afinidade de uma mistura racêmica. Adaptado de H.S.Kim, I.W. Wainer ⁵³	9
Figura 1.5. Resultados esperados em um experimento de deslocamento na avaliação da afinidade de um composto. Adaptada de Sharma <i>et al</i> ⁶³	10
Figura 1.6. Cromatograma exemplificando a separação analítica realizada <i>on line</i> do substrato e produto da reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Adaptado de Cardoso et al. ²⁴	12
Figura 1.7. Método para a avaliação de inibidores através do monitoramento da atividade enzimática por cromatografia frontal. Figura adaptada de Hodgson <i>et al</i> ¹¹ ..	13
Figura 1.8. (A) Hipérbole de Michaelis-Menten e (B) Gráfico de Lineweaver-Burk. .	19
Figura 1.9. Representação do equilíbrio enzimático com um inibidor competitivo. Adaptado de Copeland ¹⁷	21
Figura 1.10. Representação do equilíbrio enzimático com um inibidor incompetitivo. Adaptado de Copeland ¹⁷	22
Figura 1.11. Representação do equilíbrio enzimático com um inibidor não-competitivo. Adaptado de Copeland ¹⁷	23
Figura 1.12. Gráficos típicos de Lineaweaver-Burk obtidos na caracterização de: (I) inibidores competitivos; (II) não competitivos e (III) incompetitivos. Figuras adaptadas de Leskovac ⁹³	26
Figura 1.13. Vias de conversão da adenosina.	28
Figura 1.14. Estrutura cristalográfica da PNP de <i>S. mansoni</i> complexada com o substrato inosina ¹⁰⁰	29

Figura 1.15. Estrutura da PNP humana complexada com o substrato inosina ¹⁰⁸	30
Figura 1.16. Estruturas de alguns potentes inibidores da <i>HsPNP</i> e do substrato inosina.	31
Figura 1.17. Estrutura do inibidor BCX-1777.	31
Figura 4.1. Representação do sistema cromatográfico multidimensional usado com o IMER na primeira dimensão e a coluna analítica na segunda dimensão.	59
Figura 4.2. Cromatograma referente a injeção de solução padrão com inosina e hipoxantina diretamente no IMER.	60
Figura 4.3. Cromatograma de separação de inosina e hipoxantina.	61
Figura 4.4. Curva analítica da hipoxantina. PNP-IMER acoplado a uma coluna C8 Luna-Phenomenex [®] . Condições cromatográficas vide Tabela 4.1.	63
Figura 4.5. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo <i>SmPNP</i> -IMER, variando-se a concentração de inosina, mantendo-se as condições do ensaio padrão realizado em solução ¹⁰⁰	65
Figura 4.6. Proposta do mecanismo catalítico para <i>HsPNP</i> adaptada de Canduri et al. ¹³¹	67
Figura 4.7. Curva obtida para a produção de hipoxantina pelo IMER- <i>SmPNP</i> variando-se a concentração de fosfato.	69
Figura 4.8. Gráfico de Lineweaver-Burk (ou duplo-recíproco) para o fosfato com o <i>SmPNP</i> -IMER.	70
Figura 4.9. Cromatogramas evidenciando a produção de hipoxantina na ausência de fosfato.	71
Figura 4.10. Gráfico de Lineweaver-Burk (ou duplo-recíproco) para o substrato inosina com o IMER- <i>SmPNP</i>	73
Figura 4.11. Superfície do trímero <i>SmPNP</i> . Os sítios ativos são mostrados em vermelho e os resíduos de lisina em azul.	77
Figura 4.13. Porcentagem de inibição da atividade enzimática da <i>SmPNP</i> no biorreator para diferentes concentrações do composto 1 nas condições otimizadas.	82
Figura 4.14. Estrutura da hipoxantina e do composto 1.	85
Figura 4.15. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de ácido úrico para a enzima xantina oxidase em solução.	86

Figura 4.16. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo <i>HsPNP</i> -IMER, variando-se a concentração de inosina, com 5 mmol.L ⁻¹ de fosfato na amostra.	88
Figura 4.17. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo <i>HsPNP</i> -IMER, variando-se a concentração de inosina, com 400 μmol.L ⁻¹ de fosfato na amostra.	88
Figura 4.18. Estrutura do derivado de Imucilina de 4 ^a geração, composto 10, identificado como potente inibidor da <i>HsPNP</i> através dos ensaios em solução.....	91
Figura 4.19. Curva dose-resposta para o composto 8 no <i>HsPNP</i> -IMER.....	93
Figura 4.20. Curva dose-resposta para o composto 10 no <i>HsPNP</i> -IMER.....	93
Figura 4.21. Gráfico de duplo recíproco para o composto 8 no <i>HsPNP</i> -IMER.....	94
Figura 4.22. Gráfico de duplo recíproco para o composto 10 no <i>HsPNP</i> -IMER.....	95
Figura 4.23. Determinação de K_i para os inibidores 8 e 10 da <i>HsPNP</i> imobilizada.	96
Figura 4.24. Estruturas dos compostos selecionados para os experimentos de <i>ranking</i> por cromatografia de afinidade frontal.....	103
Figura 4.25. Perfil obtido por FAC-ESI-MS/MS no experimento de classificação com os compostos 15 (sem atividade inibitória), 8 (IC ₅₀ 1,83 μM) e 10 (IC ₅₀ 0,12 μM), a concentração de 100 nM de cada composto, utilizando a coluna capilar aberta como suporte.	104
Figura 4.26. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo IMER- <i>HsPNP</i> preparado com o capilar monolítico baseado em polímero orgânico epóxi, variando-se a concentração de inosina, com 5 mmol.L ⁻¹ de fosfato na amostra.	110
Figura 4.27. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo IMER- <i>HsPNP</i> preparado com o capilar monolítico baseado em sílica epoxi, variando-se a concentração de inosina, com 5 mmol.L ⁻¹ de fosfato na amostra.....	110
Figura 4.28. Perfil obtido por FAC-ESI-MS/MS no experimento de classificação com os compostos 15 (sem atividade inibitória), composto 8 (IC ₅₀ 1,83 μM) e composto 10	

(IC ₅₀ 0,12 μM, a concentração de 100 nM de cada composto, utilizando a coluna capilar com monólito polimérico orgânico epóxi como suporte.....	112
Figura 4.29. Perfil obtido por FAC-ESI-MS/MS no experimento de ranking com os compostos 15 (sem atividade inibitória), composto 8 (IC ₅₀ 1,83 μM) e composto 10 (IC ₅₀ 0,12 μM, a concentração de 100 nM de cada composto, utilizando a coluna capilar com monólito baseado em sílica como suporte.....	113
Figura 4.30. Gráfico traçado para a obtenção de K_d para o composto 10, e cálculo de B_t para o <i>Hs</i> PNP-IMER.....	115

Lista de esquemas

Esquema 1.1. Equilíbrio da catálise enzimática na presença e ausência de inibidores.	22
Esquema 1.2. Reação catalisada pela PNP.....	27
Esquema 4.1. Método de imobilização da enzima em capilares de sílica fundida.	57
Esquema 4.1. Reações envolvidas no ensaio enzimático acoplado PNP-X.O.....	58
Esquema 4.2. Sistema FAC-ESI-MS/MS utilizado.	104
Esquema 4.3. Representação esquemática da imobilização de enzimas em suportes derivados com grupo epóxi.	109

RESUMO

“Desenvolvimento e aplicação de biorreatores capilares para a triagem de ligantes de Purina Nucleosídeo Fosforilases”

Purina Nucleosídeo Fosforilases (PNPs) são enzimas chave na via de salvação de purinas, e por isso são consideradas alvos atrativos para a busca por novos fármacos. Nesse contexto, o desenvolvimento de bioensaios seletivos e eficazes para a triagem de novos ligantes das PNPs é de importância crucial. Este trabalho descreve a imobilização covalente das PNPs humana e de *Schistosoma mansoni* em capilares de sílica fundida. A atividade das enzimas imobilizadas (IMERs) foi monitorada *on line*, por cromatografia zonal multidimensional, através da quantificação do produto formado na reação enzimática. Este método possibilitou a determinação das constantes cinéticas, a triagem, identificação e caracterização de inibidores enzimáticos. Dois inibidores potentes da PNP humana foram reconhecidos e caracterizados. Através do uso destes inibidores de diferentes potências, previamente caracterizados por cromatografia zonal, a triagem de ligantes por afinidade empregando a cromatografia frontal foi validada para o IMER baseado na PNP humana. As análises por cromatografia de afinidade frontal demonstraram ser uma estratégia valiosa na identificação rápida de novos ligantes, enquanto o método multidimensional desenvolvido apresenta como principal vantagem a capacidade de avaliar diretamente o efeito dos ligantes na função biológica destas enzimas. Os métodos descritos neste trabalho representam um avanço aos métodos consolidados de triagem de inibidores das PNPs, pois quantifica diretamente o produto formado da reação enzimática ou os classifica por afinidade, resultando em análises rápidas, automatizadas e sem falsos positivos.

ABSTRACT

“Development and application of capillary bioreactors for screening of Purine Nucleoside Phosphorylases ligands”

Purine Nucleoside Phosphorylases (PNPs) are key enzymes of the purine salvage pathway, and therefore are considered attractive targets for new drugs search. In this context, the development of effective and selective bioassays for PNP ligands screening is an important task. This work describes the covalent immobilization of human and *Schistosoma mansoni* PNP on fused silica capillaries. The activity of the immobilized enzyme reactors (IMERs) was monitored on line, employing multidimensional zonal chromatography, by the quantification of the product formed throughout the enzymatic reaction. This method enabled the determination of kinetic constants, screening, identification and characterization of enzymatic inhibitors. Two potent human PNP inhibitors were recognized and characterized. Through the use of inhibitors with different potencies, previously characterized by zonal chromatography, the affinity-based ligands screening employing frontal chromatography was validated. Frontal affinity chromatography analysis demonstrated to be a valuable method for the rapid identification of new ligands, while the main advantage of the multidimensional zonal chromatography method herein described consists on the ability to directly evaluate the effect of the ligands in the biological function of these enzymes. The methods described in this work represent an improvement to the PNPs inhibitors consolidated screening assays, since they directly quantify the enzymatic reaction product or are able to rank the inhibitors according to their affinities, resulting in a rapid automated analysis and false positives free.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos	V
Lista de Tabelas.....	VII
Lista de figuras	VIII
Lista de esquemas.....	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
SUMÁRIO	XV
Introdução.....	1
1. Conceitos teóricos	3
1.1. Métodos de imobilização enzimática.....	3
1.2. Métodos biocromatográficos aplicados a triagem e caracterização de ligantes	6
1.2.1. Ensaio biocromatográfico baseado em afinidade.....	7
1.2.2. Ensaio biocromatográfico baseado na atividade	11
1.3. A cromatografia de afinidade frontal como método de triagem rápida	13
1.4. Cinética enzimática	15
1.5. Inibidores enzimáticos como candidatos a fármacos.....	19
1.5.1. Inibidores enzimáticos reversíveis	20
1.5.1.1. Inibidores competitivos.....	20
1.5.1.2. Inibidores incompetitivos.....	21
1.5.1.3. Inibidores não-competitivos.....	23
1.5.2. Inibidores irreversíveis.....	24
1.6. Métodos de caracterização de inibidores	24
1.7. Os alvos biológicos selecionados.....	27
1.7.1. Purina Nucleosídeo Fosforilases.....	27

1.7.2. Purina Nucleosídeo Fosforilase de <i>Schistosoma mansoni</i>	27
1.7.3. Purina Nucleosídeo Fosforilase Humana.....	29
2. Objetivos	36
3. Procedimento Experimental	34
3.1. Generalidades	34
3.1.1. Grupo de Síntese Orgânica e CLAE – Universidade Federal de São Carlos.....	34
3.1.2. Centro de Biologia Molecular e Estrutural – Instituto de Física de São Carlos, USP.....	35
3.1.3. Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli studi di Pavia	36
3.2. Expressão e purificação da enzima <i>Sm</i> PNP	36
3.2.1. Tampões Utilizados.....	36
3.2.2. Expressão e purificação da proteína de fusão MBP-PNP	37
3.2.3. Eluição da proteína de fusão na coluna de amilose	38
3.2.4. Clivagem da proteína de fusão com o fator Xa.....	38
3.2.5. Purificação da <i>Sm</i> PNP.....	38
3.3. Ensaio enzimático com a <i>Sm</i> PNP em solução	39
3.3.1. Tampões utilizados.....	39
3.3.2. Ensaio de atividade com a <i>Sm</i> PNP em solução	39
3.3.3. Ensaio de inibição com a <i>Sm</i> PNP em solução	39
3.4. Imobilização das enzimas <i>Sm</i> e <i>Hs</i> PNP em capilares de sílica fundida	40
3.4.1. Pré-tratamento do capilar de sílica fundida.....	40
3.4.2. Imobilização das PNPs.....	40
3.5. Preparo da coluna analítica	41
3.6. Preparo das fases móveis	41
3.7. Preparo das soluções de hipoxantina e inosina utilizadas no desenvolvimento do método analítico	41

3.8. Preparo das soluções de hipoxantina utilizadas na curva de calibração	42
3.9. Curva analítica para a quantificação de hipoxantina produzida pelos IMERs	42
3.10. Estudo cinético da inosina com a enzima <i>Sm</i> PNP imobilizada mantendo-se as condições do ensaio em solução	43
3.11. Estudo cinético do fosfato com a <i>Sm</i> PNP imobilizada	44
3.12. Preparo das soluções utilizadas nos estudos cinéticos de inosina com diferentes concentrações de fosfato para a enzima <i>Sm</i> PNP imobilizada.....	44
3.13. Desenvolvimento e validação do método cromatográfico para monitorar a atividade da enzima <i>Sm</i> PNP em solução	45
3.13.1. Meio reacional.....	45
3.13.2. Pré-tratamento da amostra.....	45
3.13.3. Desenvolvimento do método cromatográfico	45
3.13.4. Preparo das soluções de hipoxantina utilizadas na validação do método analítico	46
3.13.5. Validação do método cromatográfico para o monitoramento da atividade da <i>Sm</i> PNP em solução	46
3.13.6. Estudo cinético para a enzima <i>Sm</i> PNP em solução através da quantificação da hipoxantina formada por HPLC	46
3.14. Preparo das soluções dos compostos selecionados para avaliação da atividade inibitória no <i>Sm</i> PNP-IMER.....	47
3.15. Estudo da inibição da <i>Sm</i> PNP imobilizada	47
3.16. Ensaio enzimáticos com a enzima xantina oxidase em solução.....	48
3.16.1. Ensaio da atividade enzimática para a enzima xantina oxidase.....	48
3.16.2. Ensaio de inibição da enzima xantina oxidase em solução nos estudos de seletividade dos inibidores	48
3.16.3. Estudo cinético com a enzima X.O. em solução.....	48
3.17. Estudo cinético da enzima <i>Hs</i> PNP imobilizada.....	49

3.18. Preparo das soluções dos compostos selecionados para avaliação da atividade inibitória do <i>Hs</i> PNP-IMER.....	49
3.19. Estudo da inibição da <i>Hs</i> PNP imobilizada	50
3.20. Caracterização dos ligantes identificados da <i>Hs</i> PNP.....	50
3.21. Estudo da estabilidade da <i>Hs</i> PNP em tampões voláteis	51
3.22. Experimentos de classificação de ligantes por cromatografia de afinidade frontal.....	51
3.23. Estudo da recuperação da atividade do <i>Hs</i> PNP-IMER após os ensaios de FAC-MS	52
3.24. Imobilização da <i>Hs</i> PNP em capilares monolíticos com grupos epóxido	52
3.25. Estudos cinéticos com os bioreatores preparados com a <i>Hs</i> PNP utilizando os capilares monolíticos como suporte.....	53
3.26. Determinação da constante de dissociação (K_d)	54
4. Resultados e discussão	55
4.1. Imobilização das PNPs em capilares tubulares abertos	55
4.1.1. Obtenção das enzimas.....	55
4.1.2. Imobilização enzimática.....	55
4.2. Ensaio de atividade por cromatografia zonal	57
4.2.1. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação da hipoxantina produzida PNPs imobilizadas	58
4.2.2. Validação do método analítico para a quantificação de hipoxantina formada pelos PNP-IMERs	62
4.2.3. Estudo cinético da atividade enzimática do IMER- <i>Sm</i> PNP	64
4.2.3.1. Estudo cinético para o substrato inosina com a <i>Sm</i> PNP mantendo-se as condições utilizadas nos ensaios em solução	64
4.2.3.2. Estudo cinético para o substrato fosfato com a <i>Sm</i> PNP imobilizada.....	68
4.2.3.3. Estudo do efeito da concentração de fosfato na afinidade da enzima pelo substrato inosina.....	71

4.2.4. Estudo cinético com a enzima <i>Sm</i> PNP em solução através da quantificação da hipoxantina formada por HPLC	75
4.2.5. Estabilidade e reprodutibilidade do <i>Sm</i> PNP-IMER	78
4.2.6. Triagem de inibidores do <i>Sm</i> PNP-IMER.....	78
4.2.6.1. Avaliação da atividade inibitória dos compostos selecionados contra a enzima xantina oxidase	84
4.2.7. Estudo cinético com a enzima <i>Hs</i> PNP imobilizada	87
4.2.8. Estudo da estabilidade e reprodutibilidade do <i>Hs</i> PNP-IMER	90
4.2.9. Validação do emprego do <i>Hs</i> PNP-IMER na triagem de ligantes	90
4.2.10. Determinação da potência inibitória (IC_{50}) para inibidores da <i>Hs</i> PNP	92
4.2.11. Determinação do mecanismo de inibição e do K_i para inibidores da <i>Hs</i> PNP... 94	
4.2.12. Emprego dos <i>Sm</i> PNP e <i>Hs</i> PNP-IMERS na triagem de novos ligantes	96
4.3. Ensaio de afinidade por cromatografia frontal	102
4.3.1. Experimentos de classificação de ligantes por cromatografia de afinidade frontal utilizando o <i>Hs</i> PNP-IMER.....	102
4.3.2. Estudo da recuperação da atividade de <i>Hs</i> PNP-IMERS após o uso nos ensaios FAC-MS	107
4.3.3. Estudo da aplicação de novos suportes capilares para os ensaios por cromatografia de afinidade frontal.....	108
4.3.4. Determinação da constante de dissociação (K_d) para o composto 10	114
5. Conclusões	117
6. Referências Bibliográficas	118

Introdução

O desenvolvimento científico da biologia molecular, aliado aos avanços em química sintética e técnicas de triagem, tem difundido a busca por substâncias que apresentem atividade significativa contra o alvo biológico de uma dada patologia como principal estratégia na pesquisa por novos fármacos ¹. A necessidade constante da descoberta de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças tem estimulado a pesquisa pelo desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a triagem rápida e automatizada de novos *hits* como candidatos a fármacos ^{1,2}.

Ensaio de triagem de alta eficiência (*high throughput screening*, HTS) têm sido empregado na avaliação de compostos promissores originários de extratos de produtos naturais ou coleções combinatórias sintetizadas com base na relação estrutura-atividade ou de triagem *in silico* de bibliotecas virtuais ^{3,4}. Apesar deste tipo de ensaio permitir a avaliação rápida (50-1000 moléculas por dia) de uma grande variedade de compostos, existem diversas desvantagens associadas aos métodos empregados. A maioria destes ensaios envolve métodos de detecção por fluorescência, absorvância ou radioquímico, e que, portanto, fornecem apenas uma evidência de interação entre o alvo biológico e a molécula avaliada. Além disso, frequentemente os compostos avaliados interferem na análise ⁵⁻⁸. Deve ainda ser salientado que, em geral, estes ensaios requerem grandes quantidades de enzimas purificadas, que usualmente são obtidas pela tecnologia do DNA recombinante e, portanto, envolvem um elevado custo em sua expressão e purificação. Estes métodos requerem também o emprego de biomoléculas solubilizadas e tendem a serem afetados pela baixa reprodutibilidade e variabilidade da atividade devido ao uso de diferentes lotes ⁹.

Dessa forma, o desenvolvimento de métodos de triagem capazes de identificar novos ligantes e que amenizem os problemas observados nos métodos convencionais torna-se uma etapa de crucial importância. Como o processo de ação de fármacos é dinâmico na natureza e tem muito em comum com os mecanismos básicos envolvidos em cromatografia líquida, métodos cromatográficos podem ser utilizados em estudos de afinidade dos fármacos adicionando agentes biológicos em sistemas cromatográficos ¹⁰⁻¹².

Muitas informações importantes sobre a afinidade das ligações, o equilíbrio e as constantes cinéticas podem ser obtidas utilizando os princípios da cromatografia por afinidade. As interações intermoleculares básicas, como a hidrofobia, as interações eletrostáticas e as ligações de hidrogênio são determinantes tanto nos processos biológicos quanto cromatográficos. Além disso, 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 cromatográficos¹³.

O termo biocromatografia é utilizado quando o alvo biológico imobilizado é empregado como fase estacionária em análises cromatográficas. Esta técnica se baseia nas interações reversíveis e específicas entre o ligante e a biomolécula imobilizada e é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos métodos de triagem¹⁴.

Este trabalho versa sobre estudos biocromatográficos envolvendo enzimas Purina Nucleosídeo Fosforilases imobilizadas para o desenvolvimento e aplicação de ensaios de triagem rápida empregando-se os modos de eluição zonal e frontal.

1. Conceitos teóricos

1.1. Métodos de imobilização enzimática

O desenvolvimento de métodos biocromatográficos para a triagem de ligantes envolve essencialmente três passos: a imobilização do alvo; a avaliação das modificações sofridas pela biomolécula após a imobilização; e a determinação das constantes cinéticas e/ou de afinidade após a inserção da proteína imobilizada no sistema de análise ¹⁵.

As enzimas representam uma das principais classes de alvos biológicos: 47% das pequenas moléculas comercializadas como fármacos em 2002 atuavam como inibidores enzimáticos ¹⁶; e em 2000, as enzimas representavam 20% de todos os alvos biológicos ^{6,15,17}. Esta elevada importância das enzimas no tratamento de diversas patologias está associada ao seu papel fundamental em diversos processos bioquímicos vitais e torna evidente a importância dos métodos de imobilização de enzimas no desenvolvimento de ensaios de HTS.

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 antes do preparo da coluna. Já no processo “*in situ*”, a enzima é imobilizada diretamente na coluna previamente preparada. 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 ⁸.

De acordo com as propriedades da proteína alvo, diversas técnicas têm sido utilizadas para a imobilização de enzimas, que se baseiam nas ligações físicas ou químicas entre o biopolímero e o suporte. As técnicas mais utilizadas são: adsorção, ligação covalente, imobilização em gel ou polímero, encapsulação e o intercruzamento ^{8,18,19}. Esses métodos são sumarizados na Figura 1.1.

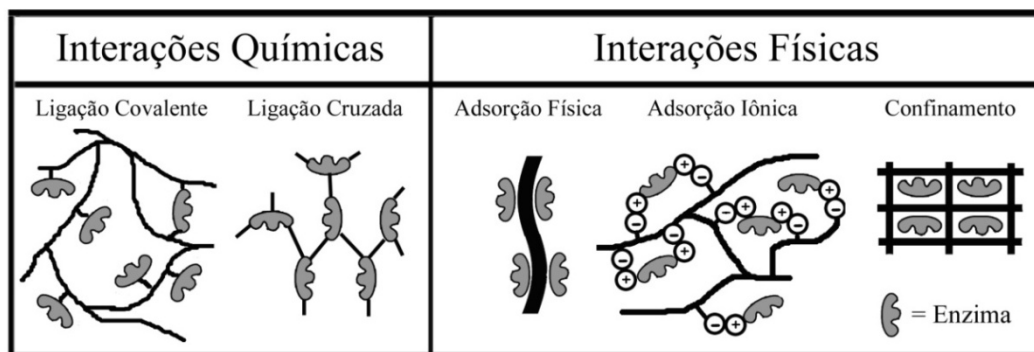


Figura 1.1. Métodos de imobilização de enzimas baseados em interações químicas e físicas²⁰.

A imobilização por ligação covalente é uma dos métodos mais utilizados e empregados em biocromatografia, 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 temperaturas²⁰⁻²².

Uma discussão detalhada sobre os demais métodos de imobilização de enzimas pode ser encontrada em diversos trabalhos na literatura^{8,20,21}.

A estrutura do suporte é um fator determinante no preparo dos biorreatores, 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 imobilizada⁸.

Os capilares tubulares abertos confeccionados com sílica fundida representam um formato promissor para a imobilização de proteínas, com um baixo tempo de análise, baixa pressão de volta e minimização de interações não-específicas^{14,20,23-25}.

A imobilização de proteínas na superfície de partículas magnéticas também tem sido explorada com sucesso na análise de interações proteína-proteína ou fármaco-proteína. Esta abordagem possui como principal vantagem a facilidade de isolar uma substância ativa de uma mistura de compostos, sem nenhuma etapa adicional^{14,26-28}.

Suportes baseados em material monolítico (baseado em sílica ou polímero orgânico) têm sido empregados na imobilização de diversas proteínas, e possuem como principais vantagens a possibilidade de utilizar elevadas vazões com baixa pressão de volta²⁹⁻³¹. Discos monolíticos baseados em um novo material polimérico macroporoso (com o nome comercial CIM, *convective interaction media*) também se mostrou um suporte promissor^{32,33}.

Matrizes baseadas em HILIC (*hydrophilic interaction chromatography*), material preparado através da derivação de sílica gel ultrapura com grupos hidrofílicos neutros, tem sido utilizadas no processo de imobilização dinâmica de enzimas³⁴.

Os suportes baseados em IAM (*immobilized artificial membrane*), preparados pela ligação covalente de uma monocamada de lipídeos a partículas de sílica, são uma alternativa valiosa para a imobilização por confinamento, pois mimetizam o ambiente lipídico de uma membrana celular^{15,35,36}.

Vários outros suportes estão disponíveis comercialmente, entre os quais podem ser citados: os polissacarídeos, como a celulose, a dextrana e a agarose; e suportes de sílica, como a sílica comum, a aminopropil, octil ou octadecilsílicas; etc^{20,24,37}.

A escolha do suporte, bem como da técnica a ser utilizada, depende da natureza da enzima, 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 apropriada seleção do suporte³⁸.

Exemplos da utilização dessas técnicas de imobilização de biomoléculas são encontrados na literatura recente. Segundo esses estudos, todas as proteínas imobilizadas mantiveram suas funções biológicas^{8,10,12,15,29,32,37,39,40}.

As fases estacionárias contendo proteínas imobilizadas, também chamadas IMERs (do inglês: *Immobilized Enzyme Reactor*), usualmente retêm a atividade catalítica, com superior estabilidade em relação à temperatura, à presença de solventes orgânicos e ao pH. Para a imobilização não há necessidade da utilização de proteínas com alto teor de pureza. Além disso, as biomoléculas imobilizadas podem ser reutilizadas várias vezes e também podem operar em fluxo^{8,10,19,20,41-44}. Em geral, os IMERs podem ser usados em eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência, e outros métodos analíticos para a caracterização das interações ligantes-biomolécula e realização de ensaios de triagem *on line*^{14,19}. Na próxima seção são exploradas as diversas abordagens que podem ser empregadas quando estas fases estacionárias são utilizadas em biocromatografia para a realização de ensaios biológicos.

1.2. Métodos biocromatográficos aplicados a triagem e caracterização de ligantes

De uma maneira geral, podem ser utilizadas duas diferentes estratégias convencionais para a triagem e identificação de novos *hits*⁴⁵. Uma delas se baseia no monitoramento da capacidade do composto avaliado modular a atividade biológica do alvo, por exemplo, a atividade catalítica de uma enzima^{11,23,29,46-48}. A segunda estratégia avalia a afinidade dos compostos pela biomolécula alvo⁴⁹⁻⁵². Para os métodos biocromatográficos essas duas estratégias podem também ser empregadas.

Os métodos de triagem que empregam técnicas cromatográficas podem utilizar o modo frontal ou zonal de eluição. A principal diferença entre estes dois modos de eluição é o modo de introdução da amostra na coluna.

Na cromatografia frontal a amostra é continuamente injetada na coluna, podendo ser adicionada, portanto, na fase móvel. A amostra permanece retida na coluna até a saturação de seus sítios de interação, quando então se inicia a eluição. Este método cromatográfico não permite a separação total dos compostos presentes em uma mistura.

Na cromatografia zonal, a amostra é aplicada em pequenos volumes, de uma só vez, numa determinada zona, e permite a separação total dos seus componentes.

1.2.1. Ensaios biocromatográficos baseados em afinidade

A biocromatografia de afinidade é empregada na determinação das constantes de afinidade entre ligantes e biomoléculas que possui como vantagens sobre os métodos tradicionais a elevada precisão, automação e velocidade de análise. Esta abordagem se fundamenta na avaliação da retenção dos analitos no biorreator e/ou competição com ligantes conhecidos⁵³.

No que concerne aos ensaios baseados na afinidade, a análise frontal utiliza a aplicação contínua de um soluto puro, a uma concentração conhecida, na coluna contendo a biomolécula alvo imobilizada. A afinidade do soluto pela biomolécula alvo causa a saturação dos sítios de interação da biocoluna e gradativamente a quantidade de soluto que elui aumenta, formando uma curva de saturação (*breakthrough curve*) característica (Figura 1.2). O ponto médio desta curva, chamado de ponto de inflexão, está diretamente relacionado a concentração e afinidade do soluto e a quantidade de biomolécula imobilizada. O tempo de eluição de cada composto e, portanto, o volume de saturação da coluna para cada analito depende da afinidade do ligante pela biomolécula⁵³⁻⁵⁶.

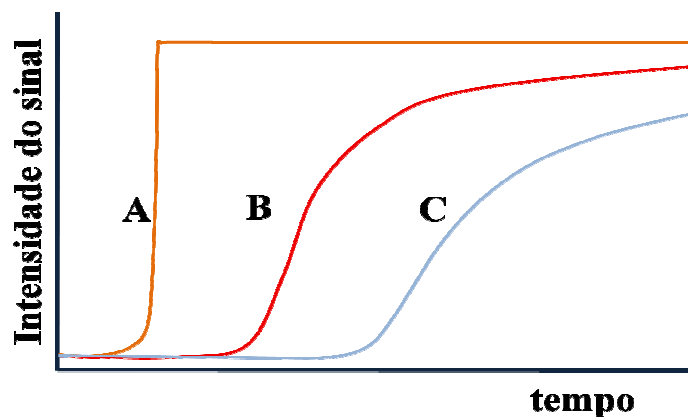


Figura 1.2. Exemplo de um perfil obtido por cromatografia de afinidade frontal (FAC). O composto A não possui afinidade pela biomolécula imobilizada, eluindo primeiro (curva de saturação alaranjada). O composto B possui afinidade moderada pela biomolécula, permanecendo retido por mais tempo (curva de saturação vermelha) que o composto A. O composto C é o que possui a maior afinidade, eluindo mais tardiamente (curva de saturação azul).

Outra abordagem que pode ser utilizada na avaliação da afinidade de compostos por cromatografia de afinidade frontal é o monitoramento do perfil de eluição de um composto com conhecida afinidade, utilizado como sonda nos ensaios. A afinidade de compostos, isolados ou em misturas, por uma biomolécula alvo pode ser avaliada rapidamente utilizando-se este tipo de ensaio. Quando a sonda é infundida na presença de outro ligante que se ligue ao mesmo sítio da biomolécula, a sonda é deslocada e elui em tempos menores^{52,57-60}, como exemplificado na Figura 1.3.

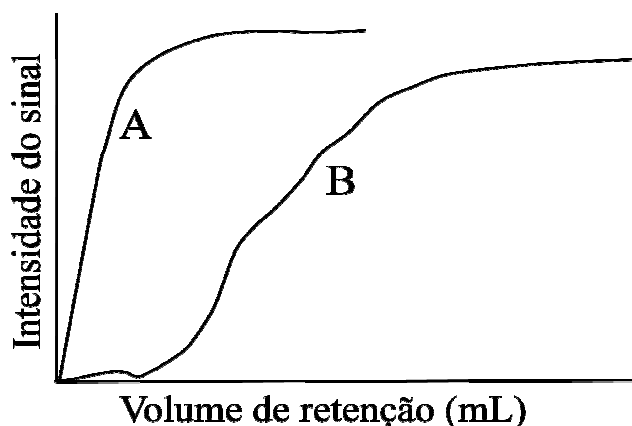


Figura 1.3. Perfis de eluição de um mesmo ligante utilizado como sonda em experimentos de FAC. A curva de saturação A representa a eluição do ligante utilizado como sonda ($[^3\text{H}]\text{EB}$ – epibatidina) na presença de nicotina, que possui elevada afinidade pela biomolécula alvo imobilizada (receptor nicotínico da acetilcolinesterase). A curva de saturação B representa a eluição da sonda infundida isoladamente. Figura adaptada de Wainer et al ⁶¹.

Na eluição zonal, uma pequena quantidade do analito é injetada no biorreator com a molécula alvo e a eluição deste é monitorada por um detector *on line* ^{53,54}. Quando esta estratégia foi empregada para avaliar a afinidade dos constituintes de uma mistura racêmica, foi obtida a separação de seus enantiômeros com base nas diferentes afinidades, como ilustrado na Figura 1.4 ⁵³.

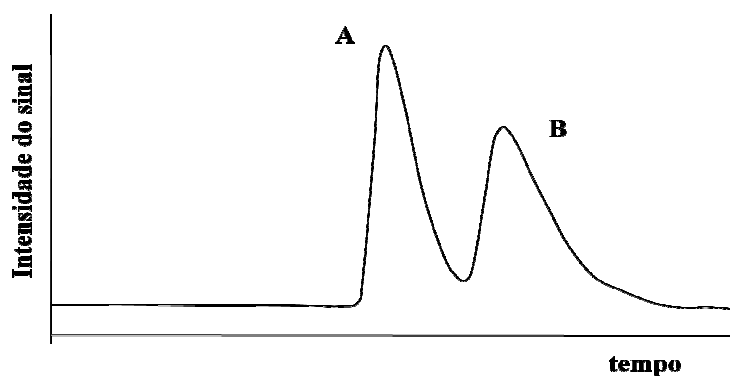


Figura 1.4. Exemplo de perfil de eluição zonal no estudo de afinidade de uma mistura racêmica. O enantiômero B possui maior afinidade pela biomolécula imobilizada do que o enantiômero A. Adaptado de H.S.Kim, I.W. Wainer ⁵³.

Outra abordagem envolve a infusão contínua de um composto utilizado como sonda, com conhecida afinidade e a uma concentração fixa, na fase móvel, enquanto o analito é injetado em pequenos volumes. Se o analito interagir com a

biomolécula imobilizada, no mesmo sítio, será observado um efeito “roll-up” na eluição da sonda, que corresponde a um deslocamento deste pela presença de ligante que compete pelo mesmo sítio. Outro resultado relevante é o deslocamento da banda do analito com a variação da concentração da sonda na fase móvel^{55,62,63}. A Figura 1.5 ilustra os perfis obtidos nesta análise.

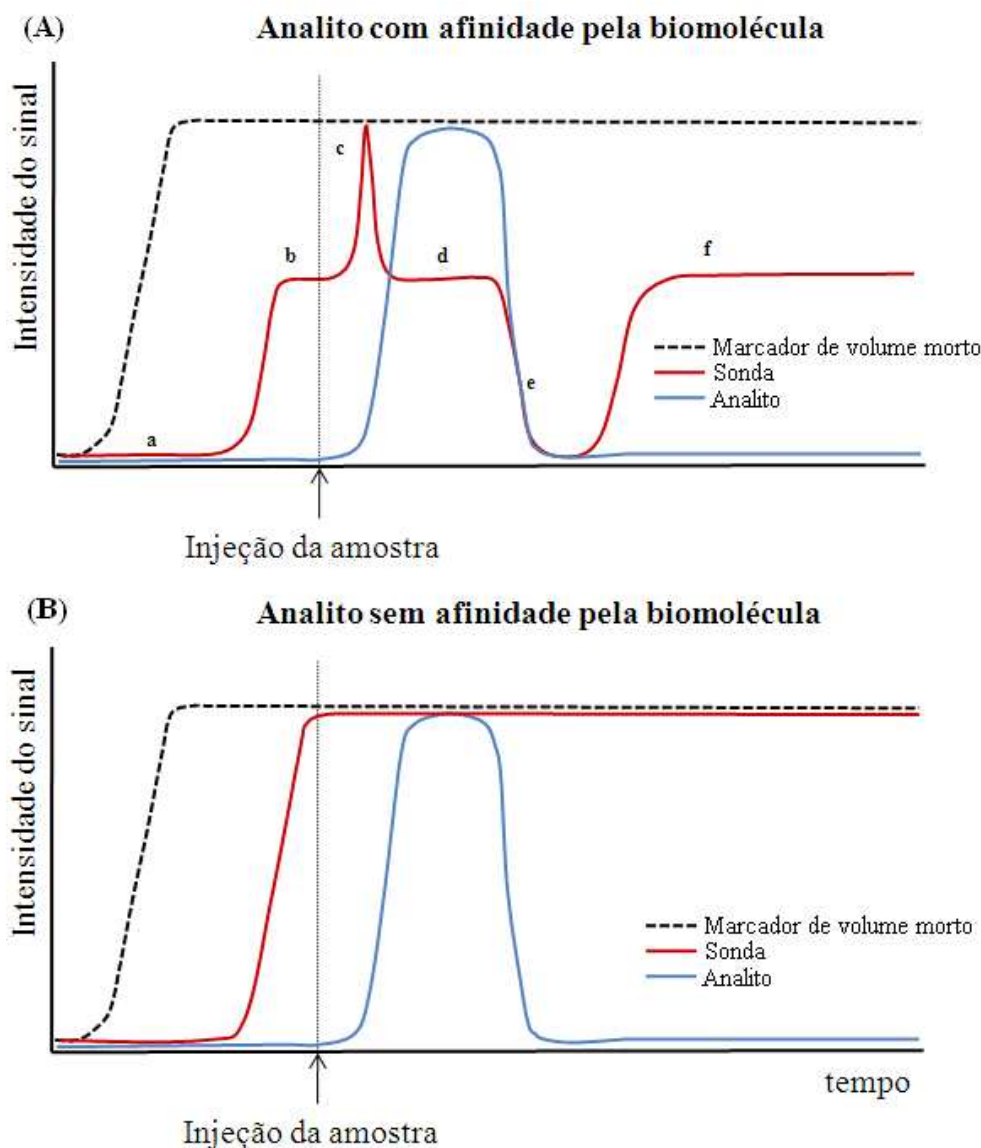


Figura 1.5. Resultados esperados em um experimento de deslocamento na avaliação da afinidade de um composto. Em (A) é mostrado o efeito da injeção de um composto que possui afinidade pela biomolécula imobilizada no perfil de eluição da sonda. Em (B) observa-se os perfis de eluição na análise composto que não possui afinidade pela biomolécula. Adaptada de Sharma *et al*⁶³.

No ensaio de deslocamento esquematizado na Figura 1.5, um marcador de volume morto e um composto com conhecida afinidade pela biomolécula alvo

(sonda), são continuamente infundidos na coluna. No início da análise, ocorre o equilíbrio das interações, e a sonda permanecerá retida na coluna por um tempo maior do que o marcador de volume morto (a). Após o equilíbrio (b), se injeta um composto que interage com o mesmo sítio da biomolécula que a sonda, ocorre inicialmente um “*roll-up*” no perfil de eluição da sonda (c). Esse excesso temporário na concentração da sonda que elui, se deve ao deslocamento do equilíbrio ligante-biomolécula devido a presença de um segundo ligante no sistema. O composto sonda reestabelece um novo equilíbrio (d) até que o composto avaliado atravesse toda a coluna. Então ocorre uma queda no sinal da sonda (e), pois com a ausência do segundo ligante (analito), mais sítios de interação na biomolécula estão disponíveis, o que resulta na diminuição na concentração da sonda que elui. Em seguida, a sonda reestabelece o equilíbrio na ausência do analito (f). Quando o analito não possui afinidade pela biomolécula alvo (Figura 5B), o perfil de eluição da sonda não sofre nenhuma modificação⁶³.

Os estudos de afinidade por cromatografia zonal e frontal possuem como vantagem o uso de um equipamento padrão de cromatografia líquida (LC) e a possibilidade da avaliação simultânea de diversos compostos. A análise por eluição frontal requer uma quantidade maior de amostra, no entanto fornece uma maior quantidade de informação^{53,54}.

1.2.2. Ensaios biocromatográficos baseados na atividade

Quando se avalia a capacidade do analito em modular a função de uma proteína alvo, a atividade da biomolécula deve ser monitorada. Através das técnicas cromatográficas, esta estratégia pode ser realizada também utilizando-se o modo de eluição frontal ou zonal.

Empregando-se a cromatografia zonal, a separação cromatográfica do substrato e produto da reação pode ser utilizada na determinação da atividade da biomolécula alvo. O excesso do substrato e o produto formado pela biocatálise são separados em uma segunda dimensão acoplando-se o biorreator a uma coluna analítica através de uma válvula de seis caminhos. Os biorreatores podem também ser inseridos *in line* com o detector para a quantificação direta do produto formado, pelo uso de um

detector seletivo como o espectrômetro de massas ^{62,64}, ou através da derivatização do produto da reação enzimática, produzindo um composto que gere um sinal espectrofotométrico em uma região distinta ^{32,39,65}. A área da banda cromatográfica é relacionada a concentração de produto formado, permitindo o monitoramento da atividade do IMER. Esta estratégia tem sido empregada na determinação da atividade de biorreatores baseados em diversas enzimas como GAPDH ^{47,66}, β -glucuronidase ⁶⁷ e β -secretase ⁶⁸. Nesta abordagem, a triagem de inibidores é realizada individualmente, monitorando a área da banda correspondente a formação produto da reação. Um exemplo de cromatograma obtido utilizando o acoplamento do biorreator a uma coluna analítica para quantificar o produto formado é apresentado na Figura 1.6.

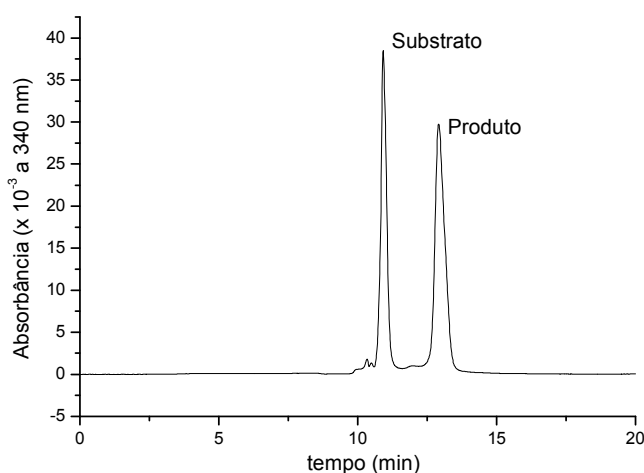


Figura 1.6. Cromatograma exemplificando a separação analítica realizada *on line* do substrato e produto da reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Adaptado de Cardoso et al.²⁴

No modo de eluição frontal, a triagem de ligantes através de ensaios baseados na função pode ser realizada infundindo-se continuamente uma solução contendo o substrato específico. A eluição do produto formado pela catálise da enzima imobilizada pode ser monitorada utilizando-se um método de identificação como espectrometria de massas ou espectrofotometria. Quando uma pequena quantidade de analito é injetada, sua capacidade de modular a função da biomolécula é avaliada pelo efeito no *front* de eluição do produto ^{11,34}. A Figura 1.7 ilustra o uso desta técnica, avaliando-se o efeito da injeção de inibidores enzimáticos na formação do produto da catálise.

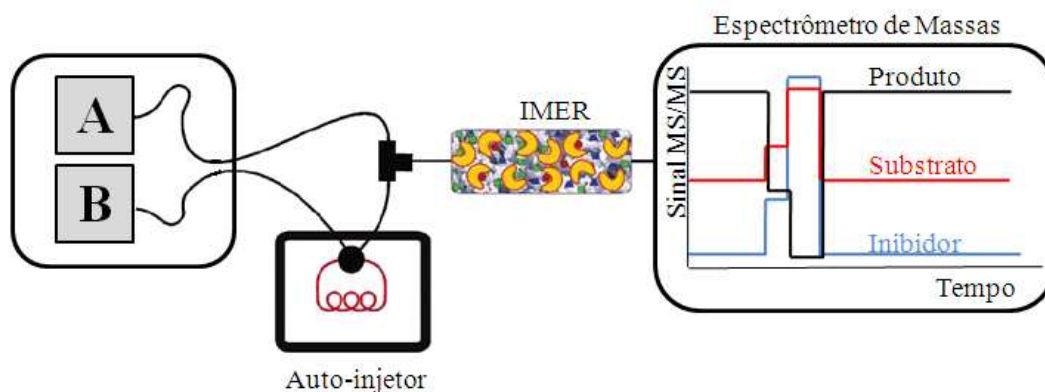


Figura 1.7. Método para a avaliação de inibidores através do monitoramento da atividade enzimática por cromatografia frontal. O substrato é continuamente infundido através da bomba A. O analito é injetado através de um auto-injetor, tratando-se, portanto, de um ensaio automatizado. Com a injeção do inibidor, atividade da enzima diminui e o sinal referente a formação do produto, monitorado por espectrometria de massas, cai, enquanto o sinal referente ao substrato aumenta. Figura adaptada de Hodgson *et al*¹¹.

Estas duas estratégias que podem ser empregadas no monitoramento da atividade da proteína proporcionam a obtenção das constantes cinéticas K_M e V_{max} , triagem de inibidores, determinação da IC_{50} e de K_i , e estudo do mecanismo de inibição de compostos identificados como ativos contra a biomolécula alvo imobilizada^{62,65,69}.

Além do uso de cromatografia zonal para o monitoramento da atividade, determinação de constantes cinéticas, método de triagem e determinação mecanismos de inibição, a cromatografia de afinidade frontal foi empregada para a classificação de inibidores de diferentes potências quanto a sua afinidade pela biomolécula, e também na caracterização individual dos inibidores. Assim, os aspectos teóricos desta técnica são apresentados na próxima seção.

1.3. A cromatografia de afinidade frontal como método de triagem rápida

A cromatografia de afinidade frontal acoplada a espectrometria de massas (FAC-MS) foi introduzida por Schriemer em 1998^{5,70}, e se baseia na contínua infusão de ligantes em uma proteína alvo imobilizada em um suporte sólido, com a eluição dos compostos detectada por MS. FAC-MS tem se mostrado um método valioso para a triagem de ligantes em misturas, pois fornece rapidamente a

caracterização da espécie, a ordem de afinidade dos compostos avaliados e a determinação da constante de dissociação (K_d).

Nas análises por FAC-MS, a mistura dos compostos em triagem é aplicada continuamente no biorreator e a eluição é acompanhada por MS, monitorando-se a relação m/z de cada composto analisado. Quando os compostos percorrem o biorreator, eles podem se ligar a proteína com diferentes afinidades. Assim, os compostos com maior afinidade são mais retidos, causando um aumento no volume de ruptura (ou volume do *front*), que corresponde ao volume de eluente que passa pela coluna até que a concentração do referido composto no eluato seja igual a concentração injetada^{5,71-74}. Empregando esta estratégia, cerca de 10.000 compostos podem ser avaliados em um dia de análise, considerando uma corrida analítica de 30 minutos⁵.

Um composto detectável por MS, que se liga a um sítio específico da biomolécula imobilizada com alta afinidade, chamado de sonda, pode ser utilizado para monitorar em tempo real a competição com outros compostos presentes numa mistura em triagem. Quando se usa uma única sonda, são monitorados apenas o volume de ruptura da sonda e o do marcador de volume morto. O marcador de volume morto corresponde a um composto que não possui afinidade pela biomolécula imobilizada, obtendo-se o mesmo *front* de eluição quando este composto atravessa uma coluna com ou sem a biomolécula alvo. Um deslocamento no *front* de eluição da sonda com relação ao *front* do marcador de volume morto indica uma interação específica entre pelo menos um dos compostos da mistura e o sítio específico. Através da detecção por MS, o composto identificado pode ser apropriadamente caracterizado.

A constante de dissociação, K_d , pode ser relacionada aos parâmetros experimentais envolvidos em FAC-MS através da seguinte equação:

$$K_d = \frac{[A][P]}{[AP]} = \frac{[A]_0\{[P]_0 - [A]_0\}(V - V_0)/v}{[A]_0(V - V_0)/v} = \frac{Bt}{V - V_0} - [A]_0 \quad \text{Equação 1.1}$$

Onde $[A]_0$ é a concentração do composto A injetado, $[P]_0$ é a quantidade de biomolécula imobilizada por unidade de volume da coluna, v é o volume total da

coluna, B_t é a quantidade total de biomolécula imobilizada, V é o volume de eluição do composto A. V_0 é o volume de eluição do composto A na ausência da biomolécula imobilizada. Esta equação pode ser rearranjada se tornando mais prática:

$$V - V_0 = \frac{B_t}{[A]_0 + K_d}$$

Assim, traçando-se o inverso da diferença entre os volumes de eluição do composto A avaliado em diferentes concentrações $(V - V_0)^{-1}$ em função da concentração do composto A injetado $[A]_0$, obtém-se a quantidade de biomolécula imobilizada B_t (inverso da inclinação da reta) e a constante de dissociação K_d (intercepção com o eixo x) ^{52,75}.

A FAC-MS pode ser empregada com uma grande variedade de sistemas biológicos, operando sem marcadores radioativos, e com a habilidade de classificar compostos quando a sua afinidade (*ranking*) e determinar facilmente sua constante de dissociação. Esta importante vantagem implica que produtos oriundos de síntese combinatória ou extratos de produtos naturais podem ser avaliados quando a sua afinidade pela biomolécula alvo sem nenhuma purificação prévia. Essas considerações tornam a FAC-MS uma ferramenta universal na triagem de novos *hits* ^{5,60,71}.

Como em qualquer ensaio de afinidade, há uma grande preocupação no que concerne as correlações entre os ensaios de afinidade e a atividade funcional. No entanto, diversos estudos indicam uma boa correlação entre as constantes de inibição (IC_{50} ou K_i) e a constante de dissociação (K_d) ^{5,58,69,76}. Dessa forma, a técnica de FAC-MS pode ser seguramente aplicada a triagem de novos inibidores com uma grande variedade de alvos biológicos.

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. 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 ⁷⁷.

Para explicar a especificidade enzimática, em 1894 Emil Fischer propôs o modelo chave-fechadura, um modelo em que as estruturas 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 ^{78,79}.

Considera-se que 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 ¹⁷:



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 ⁸⁰.

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 1.4:

$$V_0 = k_2 [ES] \quad \text{Equação 1.4}$$

Como [ES] na Equação 1.4 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^{17,80,81}. 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:

$$k_1 ([E]_T - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad \text{Equação 1.5}$$

Resolvendo a Equação 1.5 em função da [ES] obtém-se:

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 1.6}$$

Onde $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ é conhecida como a constante de Michaelis-Menten^{17,80,81}.

Substituindo-se a [ES] (Equação 1.6) na Equação 1.4 obtém-se a expressão para a velocidade inicial (V_0) da reação:

$$V_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 1.7}$$

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 1.7 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.

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação de Michaelis-Menten (Equação 1.8)}$$

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 $V_{\text{máx}}$ e K_M .

Um método gráfico simples para se obter um valor aproximado de K_M é ilustrado na Figura 1.8. A Equação 1.9, obtida invertendo-se a equação de Michaelis-Menten, é chamada de equação de Lineweaver-Burk⁸².

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_M}{V_{\text{máx}}[S]} \quad \text{Equação de Lineweaver-Burk}^{17,80,81} \quad \text{(Equação 1.9)}$$

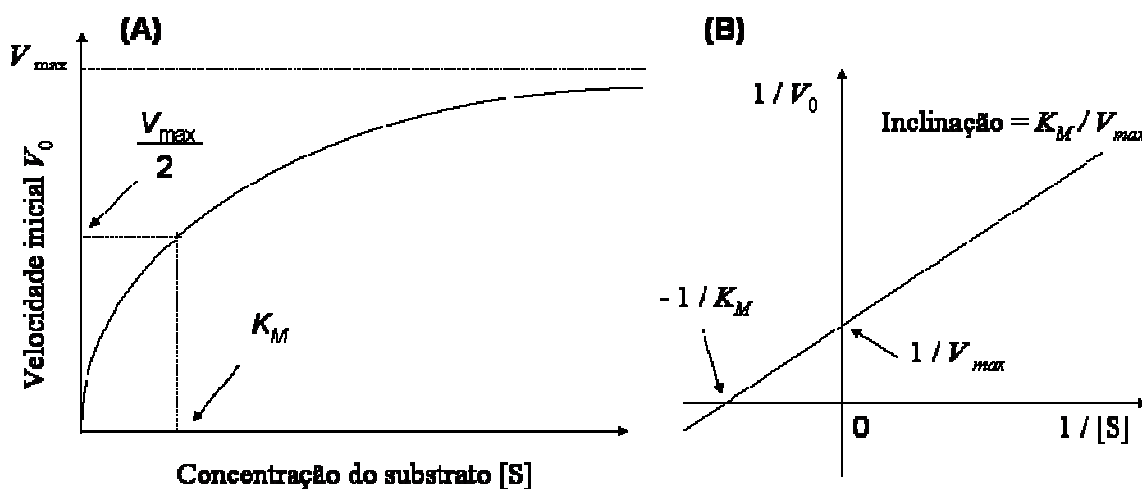


Figura 1.8. (A) Hipérbole de Michaelis-Menten e (B) Gráfico de Lineweaver-Burk.

1.5. Inibidores enzimáticos como candidatos a fármacos

O processo de descoberta de novos fármacos se inicia pela seleção de uma macromolécula, cuja atividade é patogênica ou associada a uma desordem ou doença, como alvo para a busca de novos ligantes candidatos a fármacos. Enzimas representam uma das mais importantes classes de alvos para o desenvolvimento de novos fármacos: em 2000, 28% de todos os alvos de fármacos eram enzimas e 48% de todas as pequenas moléculas empregadas como fármacos atuavam como inibidores enzimáticos. Este elevado percentual se deve principalmente aos papéis essenciais que as enzimas possuem nos processos vitais e patológicos. Muitas doenças são causadas pela disfunção ou expressão desregulada de enzimas^{17,83,84}. Em outros casos, 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^{71,85-87}. As enzimas são as biomoléculas alvo para o tratamento de diversas doenças, como AIDS, hipertensão, diabetes, câncer e mal de Alzheimer^{20,84}.

As enzimas catalisam quase todas as reações envolvidas em processos celulares, assim, não é surpreendente que os inibidores enzimáticos sejam

notavelmente empregados como fármacos. Dos 54 novos fármacos aprovados pelo FDA em 2006-2007, quase um terço (16) atuam como inibidores de enzimas^{88,89}.

1.5.1. Inibidores enzimáticos reversíveis

A maioria dos inibidores enzimáticos empregados clinicamente interage com o alvo através de interações simples e reversíveis. O termo inibidor reversível implica que há um equilíbrio reversível estabelecido entre a enzima e o ligante, baseado em interações não covalentes como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças hidrofóbicas e de Van der Waals. A formação do complexo binário enzima-inibidor diminui a quantidade de enzima disponível para catalisar a reação, mas a enzima recupera sua atividade catalítica quando ocorre a dissociação do complexo.

Todos os inibidores reversíveis formam complexos dinâmicos com as enzimas, e estes complexos possuem propriedades catalíticas diferentes da enzima livre. Os inibidores enzimáticos reversíveis podem ser classificados em três categorias, de acordo com o modo de inibição: competitivo, não-competitivo e incompetitivo^{88,90}.

1.5.1.1. Inibidores competitivos

Um inibidor competitivo se liga exclusivamente à enzima livre, no sítio ativo da enzima, bloqueando estericamente a ligação do substrato, como ilustrado na Figura 1.9. Grande parte dos inibidores competitivos se assemelha estruturalmente ao substrato e se liga ao sítio ativo da enzima formando o complexo enzima-inibidor (EI), sem que a catálise enzimática ocorra. 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.

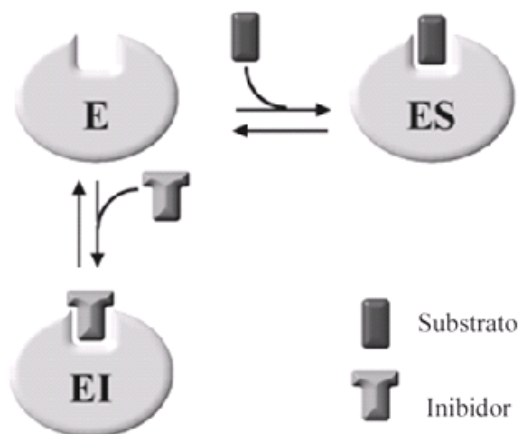


Figura 1.9. Representação do equilíbrio enzimático com um inibidor competitivo. Adaptado de Copeland ¹⁷.

Este modo de inibição resulta da competição direta de dois ligantes (substrato e inibidor) por um sítio comum da enzima. 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 ¹⁷.

Um exemplo de fármaco que age como inibidor competitivo é o metotrexato, empregado como antineoplásico, que atua como inibidor competitivo da enzima diidrofolato redutase.

1.5.1.2. Inibidores incompetivos

Quando um inibidor demonstra pouca ou nenhuma afinidade pela enzima livre, ele pode se ligar exclusivamente ao complexo enzima-substrato ou espécies subsequentes. Este tipo de inibidor é chamado incompetivo. O sítio de ligação do inibidor atinge a conformação necessária para a ligação deste composto apenas após a ligação prévia do substrato à enzima, como ilustrado na Figura 1.10.

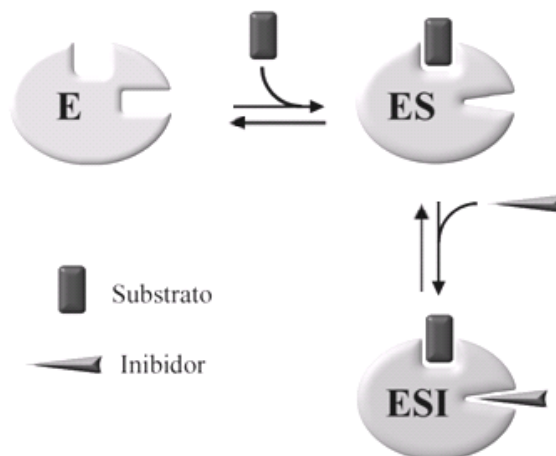
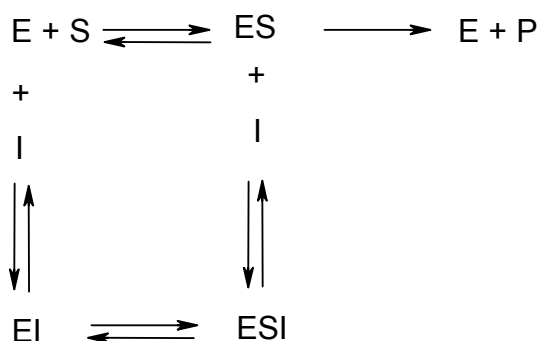


Figura 1.10. Representação do equilíbrio enzimático com um inibidor incompetitivo. Adaptado de Copeland¹⁷.

Após a ligação do inibidor incompetitivo ao complexo enzima-substrato a reação não prossegue, pois o complexo ternário ESI é inativo, como ilustrado no Esquema 1.1.



Esquema 1.1. Equilíbrio da catálise enzimática na presença e ausência de inibidores.

De acordo com o esquema 1.1, 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 xenobiótico¹⁷.

1.5.1.3. Inibidores não-competitivos

Um inibidor reversível 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 1.11)

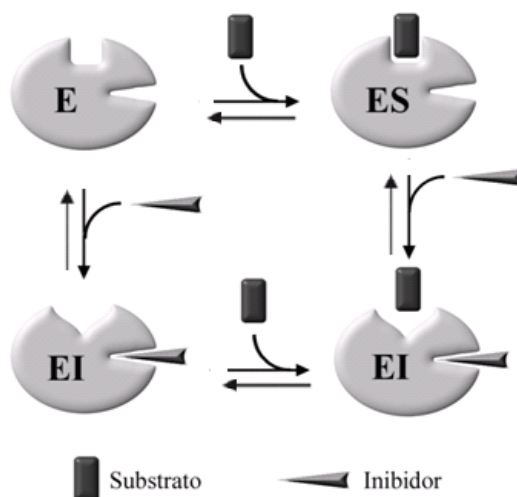


Figura 1.11. Representação do equilíbrio enzimático com um inibidor não-competitivo. Adaptado de Copeland¹⁷.

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. A constante de Michaelis-Menten, K_M , pode ou não ser afetada, dependendo se o inibidor possui afinidade distinta ou igual pela enzima livre e pelo complexo ES.

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-nucleosídeo¹⁷.

1.5.2. Inibidores irreversíveis

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^{85,91}.

1.6. Métodos de caracterização de inibidores

Inibição enzimática é definida como uma redução da atividade da enzima causada pela interação específica de um ligante (inibidor) a um sítio definido da enzima. No entanto, outros fatores como variações na temperatura, pH, força iônica e polaridade de solventes, podem resultar na redução da atividade enzimática. Assim, as condições do ensaio biológico devem ser criteriosamente controladas para que sejam obtidos resultados confiáveis nos estudos de triagem⁹².

A primeira etapa na caracterização de um novo inibidor, consiste em verificar a reversibilidade da interação com a enzima. Através de ensaios em solução, isso pode ser avaliado por um método de separação como diálise, ultracentrifugação ou filtração em gel. No caso de inibidores reversíveis, empregando-se tais métodos de separação, a enzima recupera sua atividade após a remoção do inibidor do meio reacional. Caso se trate de um inibidor irreversível, a enzima permanecerá inativa após tais procedimentos. Um teste rápido que pode também ser realizado é a diluição da enzima. No caso de um inibidor reversível, este é deslocado com a diluição e a atividade da enzima aumenta. Por outro lado, um inibidor irreversível continuará ligado a enzima; e a atividade enzimática irá diminuir de acordo com o fator de diluição⁹².

Nos ensaios de triagem envolvendo enzimas imobilizadas, a caracterização de inibidores quanto a sua reversibilidade é ainda mais simples. Como o IMER permanece em fluxo, o inibidor reversível é removido do biorreator pela fase móvel, resultando na recuperação da atividade enzimática. No caso de um inibidor irreversível, este estará ligado covalentemente a enzima e a vazão não será suficiente para extraí-lo do IMER ^{23,32,39}.

Os inibidores reversíveis, como discutido no tópico 1.5, podem ser classificados quanto ao mecanismo de inibição: competitivos, não-competitivos e incompetitivos. Esta caracterização é feita com base na influência destes inibidores nas constantes cinéticas de velocidade. Diversas representações gráficas, derivadas das equações de velocidade, podem ser utilizadas para a classificação dos inibidores reversíveis quanto ao modo de inibição. Entre elas, podem ser destacados os gráficos de Dixon, de Eadie-Hofstee, de Hanees e de Lineaweaver-Burk ^{92,93}.

Neste trabalho, nos ensaios de caracterização de inibidores foram traçados os gráficos de Lineaweaver-Burk. Para este tipo de análise, são realizados estudos cinéticos em diferentes concentrações do composto em estudo. Cada cinética é traçada como uma reta através do método de duplo recíproco, utilizando-se a equação de Lineaweaver-Burk (Equação 1.9), obtendo-se assim um conjunto de retas como ilustrado na Figura 1.12 abaixo.

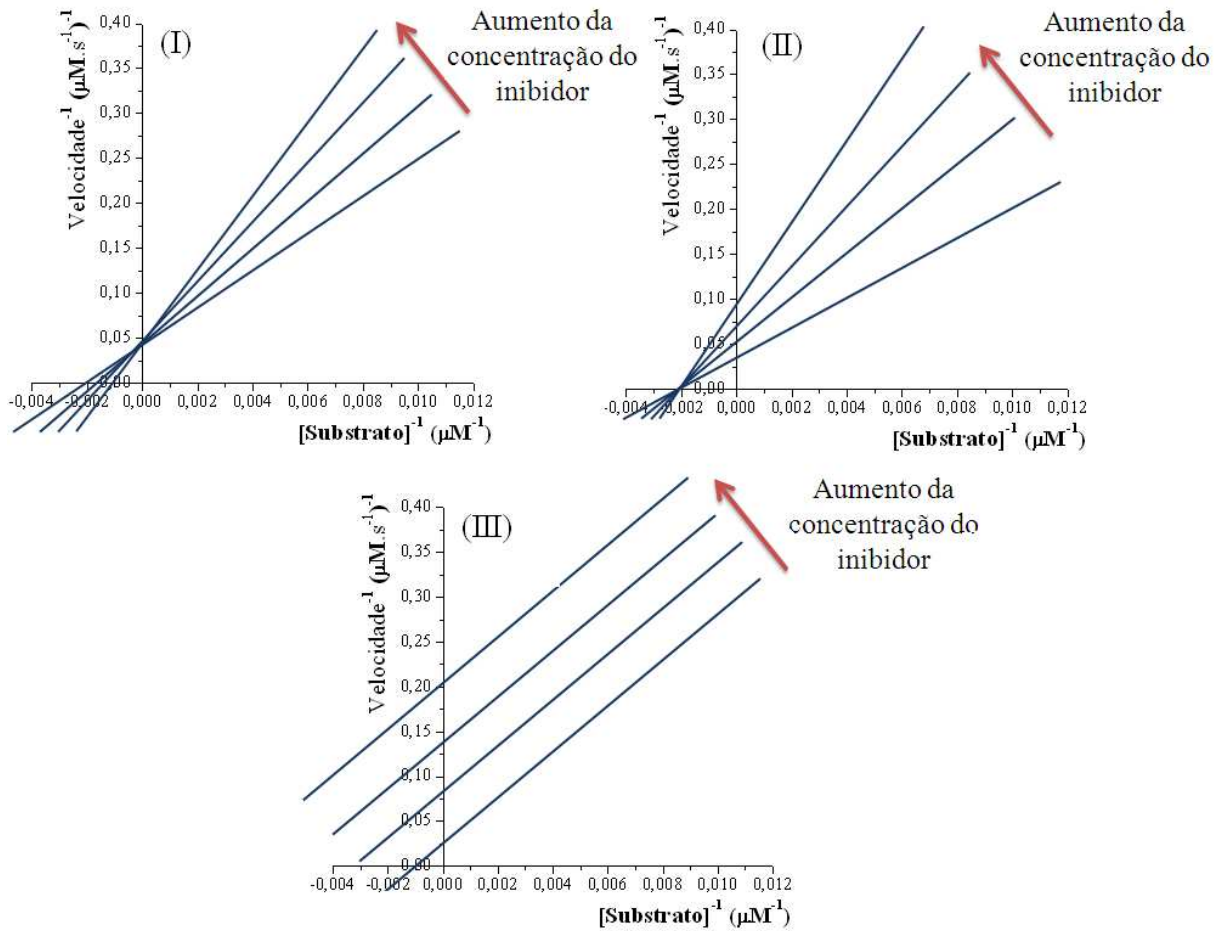


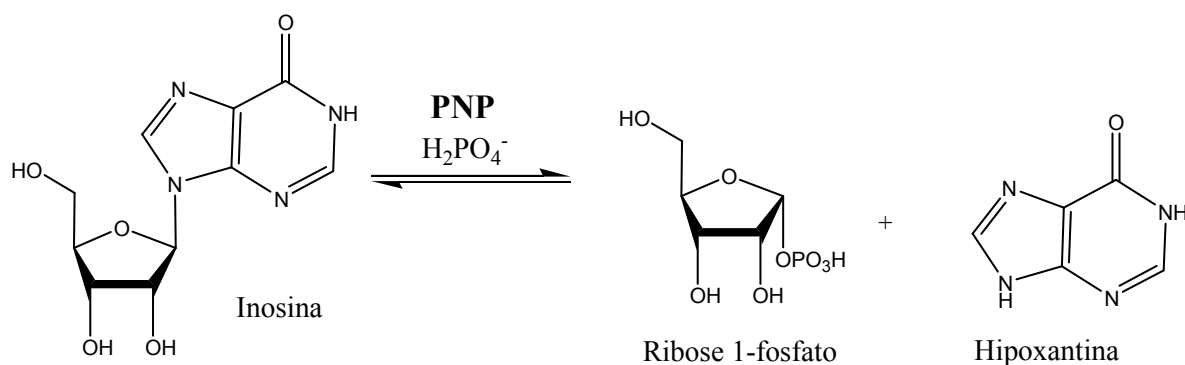
Figura 1.12. Gráficos típicos de Lineaweaver-Burk obtidos na caracterização de: (I) inibidores competitivos; (II) não competitivos e (III) incompetitivos. Na avaliação de inibidores não competitivos e incompetitivos, em geral, trata-se de uma reação com dois ou mais substratos (A e B). Figuras adaptadas de Leskovac⁹³.

De acordo com o perfil dos gráficos obtidos pode-se classificar os inibidores quanto ao modo de ação. Considerando que um inibidor competitivo não afeta o valor de V_{\max} da catálise enzimática, mas altera o valor de K_M , o conjunto de linhas se intercepta no eixo das ordenadas. No caso de um inibidor não-competitivo, que afeta o valor de V_{\max} , as linhas se interceptam na abscissa. Enquanto que para um inibidor incompetitivo, que altera o valor de ambas as constantes cinéticas, obtém-se um conjunto de retas paralelas, como ilustrado na Figura 1.12.

1.7. Os alvos biológicos selecionados

1.7.1. Purina Nucleosídeo Fosforilases

Enzimas purina nucleosídeo fosforilases (PNP, EC 2.4.2.1) de duas diferentes espécies foram selecionadas como alvos biológicos neste estudo. Estas enzimas catalisam a clivagem da ligação glicosídica de ribo e deoxiribonucleosídeos, na presença de fosfato inorgânico como um segundo substrato, levando a formação da base purínica correspondente e ribose-1-fosfato, como ilustrado no esquema 1.2⁹⁴⁻⁹⁶.



Esquema 1.2. Reação catalisada pela PNP.

A PNP desempenha um papel central no metabolismo de purinas, geralmente operando na via de recuperação de DNA das células. Estudos caracterizando a reação por cinética enzimática indicaram que a catálise requer a formação de um complexo ternário da enzima, do nucleosídeo e do fosfato, e que a reação procede sem o envolvimento de intermediários fosforilados ou ribosilados da enzima⁹⁶⁻⁹⁸.

1.7.2. Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*

Nucleosídeos de purinas são necessários em qualquer organismo vivo para a síntese de DNA e RNA, bem como para a obtenção de energia. Existem dois modos para a sua obtenção. Um deles é a via de síntese, chamada de via “*de novo*”. Tal via utiliza-se de precursores simples para a síntese de vários nucleosídeos. Outro modo é a via “de salvação”, onde purinas já utilizadas são “recicladas” através do metabolismo⁹⁹.

Estudos envolvendo o *S. mansoni*, parasita causador da esquistossomose, mostraram a ausência da via biossintética “*de novo*”. Portanto, são exclusivamente

dependentes da via “de salvação” para a manutenção de seu DNA e RNA, bem como para a obtenção de energia, sugerindo que as enzimas cruciais desta via, tais como as quinases, as fosforribosiltransferases, as difosfoquinases, as desaminases e uma fosforilase, são alvos potenciais para o desenvolvimento de novos tratamentos para a esquistossomose⁹⁸⁻¹⁰⁰.

No metabolismo da adenosina observou-se que o parasita dispõe de duas vias: uma direta, pela conversão de adenosina em AMP (adenosina monofosfato) através da ação da adenosina quinase, e outra indireta, pela seqüência adenosina-inosina-hipoxantina-IMP (inosina monofosfato)-AMP, sendo a via indireta consideravelmente mais ativa que a via direta¹⁰¹. Na Figura 1.13 são mostradas as vias de conversão de adenosina.

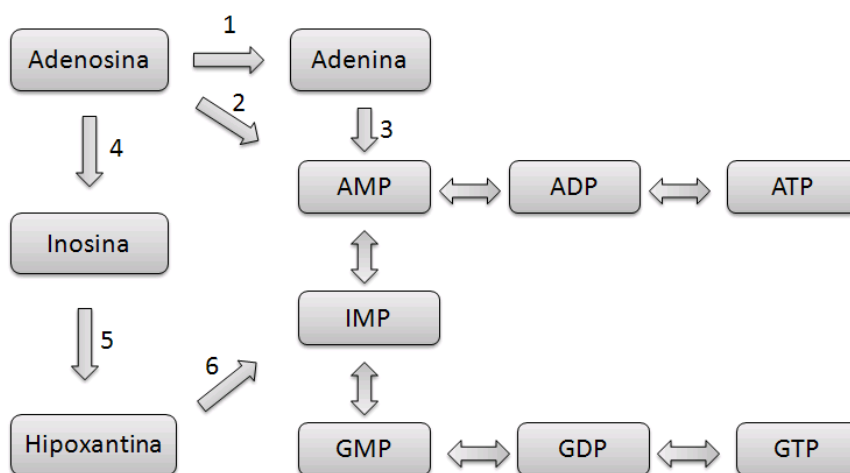


Figura 1.13. Vias de conversão da adenosina. Os números representam as enzimas Adenosina Fosforilase (AP) (1), Adenosina Quinase (AK) (2), Adenina Fosforribosil Transferase (APRT) (3), Adenosina Desaminase (AD) (4), Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) (5) e Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferase (HGPRT) (6).

Recentemente, a via de salvação de purinas voltou a ser explorada e estudos têm sugerido que inibidores seletivos da enzima purina nucleosídeo fosforilase de *S. mansoni* (*SmPNP*, Figura 1.14) podem causar deficiência de purinas e levar o parasita a morte^{99,102}.

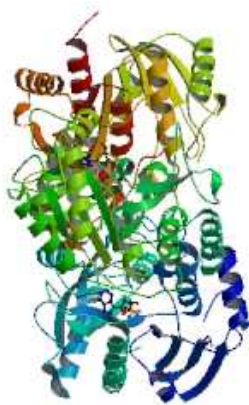


Figura 1.14. Estrutura cristalográfica da PNP de *S. mansoni* complexada com o substrato inosina ¹⁰².

1.7.3. Purina Nucleosídeo Fosforilase Humana

A importância da PNP na integridade do sistema imune tornou-se relevante a partir da descrição de uma imunodeficiência encontrada em crianças que não possuíam a enzima. Essas crianças exibiam uma depleção seletiva de células T, sugerindo que a atividade da PNP é necessária para a proliferação normal de células T humanas ¹⁰³.

A PNP utiliza basicamente inosina e guanosina como substratos, que são derivados da hidrólise de ribonucleotídeos e 2-deoxiguanosina (dGuo). Através desta biotransformação, purinas são resgatadas pela via de salvação gerando nucleotídeos para síntese de DNA e RNA em células cuja atividade proliferativa esteja aumentada. Duas enzimas utilizam dGuo como substrato: a PNP e a deoxicitidina quinase (dCyK). A PNP catalisa a fosforólise de dGuo em guanina e ribose-1-fosfato, enquanto que a dCyK catalisa a conversão de dGuo em deoxiguanosina monofosfato (dGMP). O substrato dGuo apresenta maior afinidade pela PNP em relação à dCyK. No entanto, na presença de inibidores da PNP, a dCyK catalisa a conversão da dGuo acumulada a dGMP, que é então convertida a deoxiguanosina trifosfato (dGTP). O excesso de dGTP acumulado inibe a ribonucleotídeo redutase, bloqueando a conversão de ribonucleosídeos difosfatos aos correspondentes deoxiribonucleosídeos difosfatos, resultando na inibição da síntese de DNA e replicação celular, que induz a supressão da proliferação de células T imaturas ^{94,104,105}.

Assim, a enzima PNP humana (*HsPNP*, Figura 1.15) tem sido investigada como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos, objetivando a inibição desta enzima para o tratamento de desordens imunológicas, incluindo doenças autoimunes do tipo IV como a artrite reumatóide, psoríase, doenças intestinais inflamatórias e esclerose múltipla. E também para o tratamento de desordens de proliferação de células T como rejeição de órgãos transplantados, linfoma e leucemia de células T. Além disso, inibidores de PNP podem ser usados para evitar a clivagem de fármacos antivirais e anti-cancêr, promovendo o aumento do tempo de meia-vida desses compostos, visto que vários fármacos mimetizam nucleosídeos de purina naturais e podem, por isso, ser clivados pela *HsPNP* antes de completar sua função terapêutica^{94,106-109}.

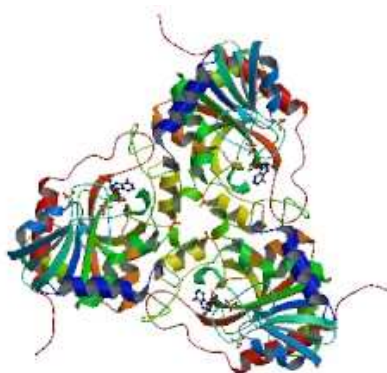


Figura 1.15. Estrutura da PNP humana complexada com o substrato inosina¹¹⁰.

Os primeiros estudos envolvendo inibidores da PNP foram realizados na década de 70, aonde a atividade da formicina B, análogo estrutural da inosina, foi descrita¹¹¹. Na década de 90, Schramm e coautores investigaram o efeito isotópico na cinética desta enzima para predizer a estrutura do estado de transição^{112,113}. Este estudo levou ao desenvolvimento de uma nova classe de inibidores, análogos do estado de transição da inosina, que são extremamente potentes contra a PNP. Dentre estes compostos, podem ser citados o BCX-4208, que está na fase II dos ensaios clínicos para tratamento da psoríase¹¹⁴ e o BCX-34 que apresentou IC_{50} de 30 nm, mas não alcançou níveis de dGuo necessários para a inibição da proliferação de células T¹⁰⁵. As estruturas dos inibidores citados são mostradas na Figura 1.16.

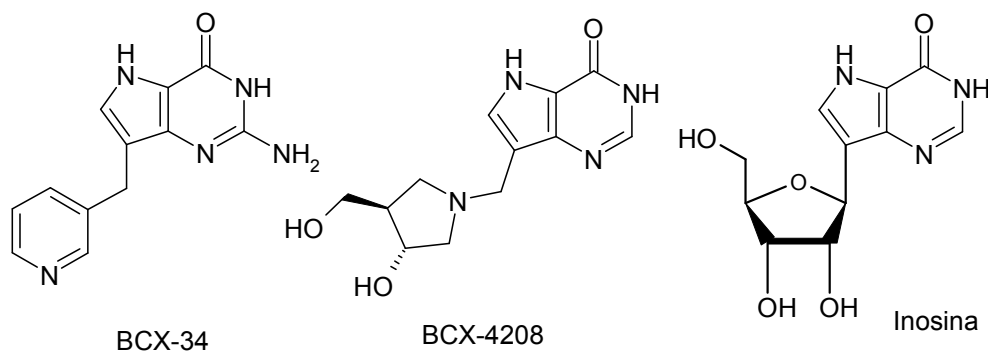


Figura 1.16. Estruturas de alguns potentes inibidores da *HsPNP* e do substrato inosina.

Um dos maiores desafios na questão do desenvolvimento de inibidores clinicamente efetivos para a PNP tem sido alcançar o nível suficiente de inibição da enzima. Para se obter uma resposta clínica, inibidores de PNP têm que reduzir sua atividade até um valor limiar muito baixo. Como exemplo de um inibidor bem sucedido, em fase de testes clínicos com humanos para o tratamento de câncer e várias doenças autoimunes, pode ser citada a Immucillina-H (BCX-1777), também análogo do estado de transição da PNP. Este composto tem se mostrado eficaz no controle de leucemias em estudos clínicos de fase I, e também inibiu a proliferação de linhagens de células T humanas malignas e células T ativadas na presença de dGuo^{103,115,116}. A estrutura deste inibidor promissor é ilustrada na Figura 1.17.

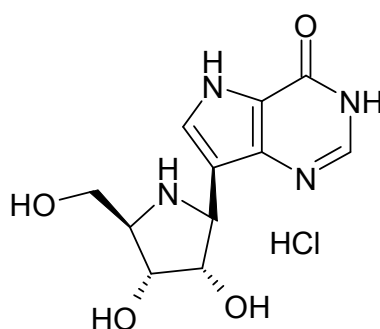


Figura 1.17. Estrutura do inibidor BCX-1777.

O sucesso obtido com este inibidor incentiva a busca por novos inibidores da PNP, bem como o desenvolvimento de novos métodos capazes de identificar e caracterizar ligantes potentes em misturas complexas.

Devido a sua importância na via de salvação de purinas, as enzimas PNP humana (*HsPNP*) e de *S. mansoni* (*SmPNP*)⁹⁴ foram selecionadas como alvos biológicos para a produção de IMERs no desenvolvimento de novos métodos de triagem de ligantes seletivos.

2. Objetivos

Desenvolver biorreatores capilares com a enzima PNP de *S. mansoni* (*SmPNP*) e humana (*HsPNP*) para serem empregados na identificação e caracterização de novos inibidores seletivos através de métodos biocromatográficos.

3. Procedimento Experimental

3.1. Generalidades

3.1.1. Grupo de Síntese Orgânica e CLAE – Universidade Federal de São Carlos

Cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 10 AD VP, uma delas 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.

Empacotadora Shandon para o empacotamento de colunas analíticas.

As colunas analíticas foram preparadas utilizando sílica C8 Luna-Phenomenex (10 μm , 100 Å).

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

Os solventes orgânicos grau HPLC foram filtrados a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45 μm 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 0,0001 g.

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

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

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

A enzima *SmPNP* foi expressa e purificada no Instituto de Física de São Carlos (USP) de acordo com os protocolos previamente desenvolvidos e otimizados^{97,117}.

A enzima PNP humana (*HsPNP*) foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Diógenes Santos, do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (PUC-RS), e expressa e purificada através de protocolo previamente desenvolvido¹¹⁸.

3.1.2. Centro de Biologia Molecular e Estrutural – Instituto de Física de São Carlos, USP.

A água utilizada foi obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE).

Para a pesagem analítica dos reagentes foi utilizada uma balança analítica Ohaus, modelo Explorer Pro, com precisão 0,0001 g.

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

Para a lise das células no processo de expressão da enzima foi utilizado um sonicador Sonic Dismembrator 550 da Fisher Scientific

Nas medidas de densidade óptica durante a expressão da enzima foi utilizado um UV Ultrospec 2000 da Pharmacia Biotech. Para as medidas cinéticas foi empregado um UV 1650PC da Shimadzu.

Para a inoculação das bactérias e para o posterior crescimento da colônia foram utilizados os Shakers Innova modelos 4430 e C24, da New Brunswick Scientific, Edison, NJ – USA.

Para a purificação da proteína foi utilizado um cromatógrafo Akta Amersham Biosciences série 900.

Um Freezer Forma -86 °C da Thermo Scientific foi utilizado para a estocagem da proteína.

Em diversas etapas da purificação da enzima foi utilizada uma centrífuga refrigerada Sorvall RC 5C Plus. Um centrífuga refrigerada BR4i da Jouan foi utilizada na diálise de tampões.

3.1.3. Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli studi di Pavia

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema Direct-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Cromatógrafo líquido Agilent 1100 series modular (Palo Alto, CA, USA), consistindo de duas bombas quaternárias (quatpump G1311A), dois degaseificadores G1322A e G1379A, um compartimento para colunas termostaticado com uma válvula de acoplamento G1316A, um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável G1314A, um injetor manual G1328A. O sistema é controlado por um software HP ChemStations (revision A.06.03 509).

As análises por cromatografia de afinidade frontal foram realizadas em um sistema de microcromatografia líquida Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA), consistindo de um auto-injetor Surveyor com forno termostaticado, uma bomba quaternária Surveyor MS e equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e um espectrômetro de massa íon trap linear LQT com ionização por electrospray (ESI) controlado por um software Xcalibur (version 1.4, Thermo Finnigan).

3.2. Expressão e purificação da enzima *SmPNP*

O procedimento utilizado para expressão e purificação da enzima *SmPNP*, desenvolvido em estudos anteriores^{97,117}, é descrito a seguir.

3.2.1. Tampões Utilizados

Tampão A: 1 mmol.L⁻¹ NaN₃, 1 mmol.L⁻¹ EDTA, 10 mmol.L⁻¹ β-mercaptoetanol, 200 mmol.L⁻¹ NaCl e 20 mmol.L⁻¹ Tris-HCl com pH ajustado em 7,4 com NaOH ou HCl.

Tampão B: 1 mmol.L⁻¹ NaN₃, 1 mmol.L⁻¹ EDTA, 10 mmol.L⁻¹ β-mercaptoetanol, 200 mmol.L⁻¹ NaCl, 20 mmol.L⁻¹ Tris-HCl e 10 mmol.L⁻¹ de maltose com pH ajustado em 7,4 com NaOH ou HCl.

Tampão C: 20 mmol.L⁻¹ MES e 10 mmol.L⁻¹ β-mercaptoetanol com pH 6,0 ajustado com HCl ou NaOH

Tampão de estocagem: tampão C com 10% de glicerol.

3.2.2. Expressão e purificação da proteína de fusão MBP-PNP

A expressão da enzima PNP de *S. mansoni* foi realizada através de uma cepa de bactérias *Escherichia coli* geneticamente modificadas, contendo o inserto gênico correspondente à expressão da *SmPNP*. Esse inserto foi obtido através do vetor de clonagem pMALc, que faz com que a proteína derivada do gene alvo seja expressa em fusão com a proteína de ligação de maltose (MBP). As bactérias foram cultivadas em meio 2XYT preparado através da diluição de 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl em um volume final de 1 L de água. O pH da solução final foi ajustado em 7,0 com HCl ou NaOH.

Em dois tubos de ensaio de 15 mL adicionou-se 5 mL do meio 2XYT previamente autoclavado acrescido de 2% de glicose e 2,5 μL de ampicilina (200 ng/mL) em cada tubo. Uma pequena alíquota das bactérias contendo os insertos correspondentes à purificação da *SmPNP* congelada a -80°C foi inoculada, e o meio permaneceu sob agitação a 250 rpm por 16 h a 37°C . Um pré-inóculo foi então transferido para um erlenmeyer de 2 L contendo 1 L do meio 2XYT esterilizado, 2% de glicose e 500 μL de ampicilina (200 ng/mL). O crescimento foi realizado mantendo-se o meio sob agitação a 250 rpm e 37°C até que a densidade óptica do meio atingisse aproximadamente 0,6 u.a. através da leitura espectrofotométrica a 600 nm.

A expressão da proteína foi então induzida através da adição de 300 μL da solução estoque $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de IPTG. Os frascos foram colocados novamente sob agitação a 250 rpm e 37°C por 1,5 horas. Então, o inoculo foi centrifugado a 4000 g por 20 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 40 mL do tampão utilizado na coluna de amilose (tampão A, seção 3.2.1). As soluções foram armazenadas em tubos Falcon a -20°C por 16 horas.

Após o descongelamento das soluções, foi realizada a lise das células através de pulsos de ultrassom em 12 ciclos (30 s de cada vez, com intervalos de 1 min, com pulsos de potência variando entre 25 e 30 %). Em seguida, a solução foi centrifugada a 9000 g por 30 min a 4°C a fim de sedimentar as partículas indesejadas, como membranas celulares e organelas citoplasmáticas. O sobrenadante contendo a MBP-PNP foi armazenado a 4°C .

3.2.3. Eluição da proteína de fusão na coluna de amilose

O extrato bruto armazenado a 4 °C foi diluído com o tampão A para um volume final de 60 mL. Em seguida a amostra foi aplicada em uma coluna com 15 mL de resina de amilose (New England Biolabs). Devido a afinidade da MBP pela amilose a MBP-PNP permanece retida na coluna. Após a aplicação lenta da amostra, a resina foi lavada com tampão A por 16 horas a uma vazão de aproximadamente 0,5 mL/min para garantir a pureza da proteína após a eluição. A proteína de fusão foi eluída com o tampão da coluna de amilose com 10 mmol.L⁻¹ de maltose (tampão B, seção 3.2.1) que se liga a amilose, eluindo a MBP-PNP da coluna.

3.2.4. Clivagem da proteína de fusão com o fator Xa

Para a clivagem da proteína de fusão foi utilizado 1 µg da protease Fator Xa (1 mg/mL New England Biolabs) para 200 µg de proteína de fusão (1 mg/mL). A quantificação da proteína de fusão purificada foi realizada pelo coeficiente de extinção molar a 280 nm de acordo com o protocolo de Gill & Von Hippel¹¹⁹. Incubou-se a 4 °C por 96 horas. O produto da reação de clivagem foi então dialisado, a fim de efetuar a troca do tampão B pelo tampão C (seção 3.2.1) empregado como fase móvel na próxima etapa de purificação, mantendo-se a temperatura de 4 °C.

3.2.5. Purificação da *Sm*PNP

A proteína foi injetada em uma coluna de troca catiônica POROS 20 HS previamente condicionada com o tampão C. A eluição foi monitorada a 280 nm. Para a eluição da PNP da coluna foi realizado com gradiente salino utilizando como segunda fase móvel o tampão C acrescido de 1 mol.L⁻¹ de NaCl. O gradiente salino de 0 a 100% do tampão C contendo NaCl foi realizado entre 35 e 45 minutos. Os eluatos correspondentes as bandas de MBP e *Sm*PNP foram coletados e seu conteúdo foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida, a fim de verificar a pureza da enzima de interesse. A *Sm*PNP foi então armazenada a -80 °C com 10 % de glicerol.

3.3. Ensaio enzimático com a *SmPNP* em solução

3.3.1. Tampões utilizados

Tampão D: TRIS-HCl 1 mol.L⁻¹ pH 7,4, preparada a partir de 1,2112g de TRIS para 10 mL de solução e ajustando-se o pH com uma solução 10% de HCl;

Tampão E: tampão fosfato 500 mmol.L⁻¹ pH 7,4, preparado a partir de 0,5339 g de fosfato de potássio dibásico e 0,2632 g de fosfato de potássio monobásico para 10 mL do tampão.

3.3.2. Ensaio de atividade com a *SmPNP* em solução

Os ensaios de atividade com a *SmPNP* livre em solução foram realizados de acordo com os métodos descritos na literatura^{97,117}. Para este ensaio, foi preparada uma solução F contendo 1 mL da solução estoque TRIS-HCl (1 mol.L⁻¹, pH 7,4 – tampão D), 1 mL tampão fosfato (500 mmol.L⁻¹, pH 7,4 – tampão E), 0,8 U de xantina oxidase (28 µL da solução comercial) e 10 µL da solução estoque de inosina (10 mmol.L⁻¹), completando-se a um volume final de 10 mL com água. A atividade enzimática foi medida adicionando-se 1 µL da solução contendo a enzima (350 µg.mL⁻¹) em 500 µL da solução F previamente preparada. A produção de ácido úrico (produto da reação) foi acompanhada a 293 nm por 120 segundos.

3.3.3. Ensaio de inibição com a *SmPNP* em solução

Nos ensaios de inibição realizados na UFSCar com a enzima *SmPNP* livre em solução, adicionou-se 5 µL de uma solução MeOH:H₂O (1:1, v/v, solvente utilizado no preparo das soluções dos inibidores) a 500 µL da solução F em uma cubeta de quartzo de 700 µL, e zerou-se o UV. Em seguida, acrescentou-se 1 µL da *SmPNP* (350 µg.mL⁻¹ em tampão MES) e iniciou-se a leitura da formação de ácido úrico a 293 nm por 120 segundos. Dessa forma, obteve-se o máximo de atividade da enzima nestas condições, excluindo-se possíveis interferências do solvente empregado no preparo das soluções dos inibidores na atividade enzimática.

Para se obter a porcentagem de inibição dos compostos avaliados na concentração de 10 µM, adicionou-se 500 µL da solução F e 5 µL da solução do inibidor (1mM) em uma cubeta de quartzo de 700 µL, e zerou-se o UV. Em seguida,

acrescentou-se 1 μL da *Sm*PNP (350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão MES) e iniciou-se a leitura da formação de ácido úrico a 293 nm por 120 segundos. Comparando-se a diferença entre a absorbância final e inicial de cada medida realizada, e considerando-se o “branco” como 100% de atividade, foi obtida a porcentagem de inibição para cada ligante.

3.4. Imobilização das enzimas *Sm* e *Hs*PNP em capilares de sílica fundida

3.4.1. Pré-tratamento do capilar de sílica fundida

Utilizando-se uma bomba seringa com uma vazão de 130 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, o capilar de sílica fundida (100 μm d.i. \times 0,375 mm \times 40 cm) foi limpo eluindo-se 2,0 mL de HCl (2,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). O capilar foi colocado em estufa a 95 °C por 1 hora. Preparou-se uma solução de APTS diluindo-se 250 μL de solução APTS 99% em 2,5 mL de água. Um volume de 1 mL 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.

3.4.2. Imobilização das PNPs

A enzima PNP de *S. mansoni*, após a expressão e purificação, foi armazenada congelada a -80 °C em um tampão 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES contendo 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -mercaptoetanol e 10% de glicerol (tampão de estocagem). Para a imobilização, a solução contendo a enzima foi dialisada contra uma solução tampão fosfato de potássio 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4 até concentração final de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A enzima PNP humana é eluída através do capilar para a imobilização em seu próprio tampão de estocagem (85% de sulfato de amônio)¹¹⁸.

No capilar pré-tratado, utilizando-se a bomba seringa, passou-se: 1,5 mL de solução de glutaraldeído 1% em KH_2PO_4 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0); em seguida 0,5 mL de tampão fosfato (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4) a temperatura ambiente. A 4°C passou-se 0,5 mL da solução da enzima por duas vezes e em seguida 0,5 mL do tampão de trabalho (tampão G) contendo fosfato 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e TRIS-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4. O capilar foi mantido a 4°C e suas extremidades imersas em 1 mL do tampão G.

3.5. Preparo da coluna analítica

Para o preparo da coluna C8 foi utilizado 1,5 g de sílica octil (C8 – Luna-Phenomenex[®], 10 μm , 100 Å). No preenchimento das colunas analíticas, a fase estacionária foi suspensa em 50 mL de metanol, homogeneizada em ultra-som por 3 minutos e empacotada em uma coluna de aço inoxidável (10 \times 0,46 d.i.) sob pressão de 7000 psi utilizando-se metanol como solvente. As colunas foram condicionadas por 12 horas com metanol 100% a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹.

3.6. Preparo das fases móveis

Para o preparo do tampão de trabalho (tampão G: TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ e fosfato 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4), utilizado como fase móvel no biorreator, foram utilizados os tampões D e E preparados como descrito no item 3.3.1.

O tampão de trabalho (G) foi preparado acrescentando-se 10 mL de cada uma dessas soluções para um volume final de 100 mL de tampão.

Os tampões avaliados como fase móvel para a separação de hipoxantina e xantina na coluna analítica foram preparados utilizando-se diferentes proporções de MeOH: TEA 1% pH 6,0. A solução de trietilamina 1% foi preparada diluindo-se 10 mL de TEA 99% em um volume total de 1 L, ajustando-se a pH 6,0 com ácido acético glacial.

3.7. Preparo das soluções de hipoxantina e inosina utilizadas no desenvolvimento do método analítico

No desenvolvimento do método analítico foram avaliadas as condições cromatográficas para a separação de hipoxantina e inosina utilizando-se soluções na concentração de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A solução de inosina 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi preparada solubilizando-se 1,34 mg de inosina em um volume final de 25 mL de água. A solução de hipoxantina 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi preparada solubilizando-se 0,68 mg de inosina em um volume final de 25 mL de água.

3.8. Preparo das soluções de hipoxantina utilizadas na curva de calibração

A solução estoque 5 mmol.L^{-1} de hipoxantina foi preparada solubilizando-se 6,8 mg de hipoxantina em um volume final de 10,0 mL de água. As soluções utilizadas na obtenção da curva de calibração foram preparadas a partir da solução estoque nas seguintes concentrações: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 100,0; 200 e $400 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ diluindo-se respectivamente 5, 10, 20, 40, 80, 160, 200, 400 e 800 μL da solução estoque de 5 mmol.L^{-1} a um volume final de 10 mL em água.

3.9. Curva analítica para a quantificação de hipoxantina produzida pelos IMERs

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 hipoxantina. Para a quantificação da hipoxantina para o *Sm*PNP-IMER foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas:

(1) Bomba 1 (tampão G – seção 3.6, vazão 0,05 mL/min);

0,00-1,20 min: reação enzimática no IMER

1,20-8,50 min: transferência dos analitos para a coluna analítica

8,51-25,0 min: condicionamento do IMER

(2) Bomba 2 (solução TEA 1%, pH 6,0 : MeOH – 95:5, vazão 0,5 mL/min, detecção UV 260nm)

0,00-1,20 min: condicionamento da coluna analítica C8

1,21-8,50 min: descarte

8,51-25,0 min: fase móvel da coluna analítica C8 para separação e análise dos compostos na coluna analítica.

A partir das soluções de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 100,0; 200 e $400 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram preparadas amostras em triplicata com 50 μL da solução de hipoxantina e 50 μL do tampão G. As amostras foram preparadas em pequenos tubos de ensaio e homogeneizadas em vórtex por 10 segundos. Uma alíquota de 90 μL desta

amostra foi transferida para o vial do auto-injetor. 15 μL de cada amostra 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 3, 160 e 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ preparadas através da adição de 50 μL da solução estoque de hipoxantina a 50 μL do tampão G. 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^{66,120}.

(2) Seletividade: cada seqüência de análises continha três amostras denominadas brancos para assegurar a seletividade do método, preparadas acrescentando-se 50 μL de água a 50 μL do tampão G^{66,120}.

(3) Limite de Quantificação (LQ): O limite de quantificação encontrado para o método foi de 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de hipoxantina e foi estabelecido como a menor concentração onde a precisão e a exatidão de três amostras não excediam o valor de 20%^{66,120}.

3.10. Estudo cinético da inosina com a enzima *SmPNP* imobilizada mantendo-se as condições do ensaio em solução

As concentrações desejadas foram obtidas a partir da adição de 50 μL do tampão G, alíquotas apropriadas das soluções padrão de inosina (20, 400 e 8000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e completando-se o volume para 100 μL com água. As amostras utilizadas como branco foram preparadas pela adição de 50 μL do tampão G e 50 μL de água. Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos, em seguida,

alíquotas de 90 µL de cada amostra foram transferidas para os vials do auto-injetor. Foram injetados 15 µL das amostras em duplicata no cromatógrafo.

3.11. Estudo cinético do fosfato com a *SmPNP* imobilizada

As concentrações desejadas de fosfato foram obtidas a partir da adição de 30 µL de TRIS 100 mmol.L⁻¹ pH 7,4; 20 µL de inosina 8 mmol.L⁻¹ e alíquotas apropriadas das soluções padrão de tampão fosfato (1, 20 ou 400 µmol.L⁻¹), completando-se o volume para 100 µL com água. As amostras, utilizadas como branco, foram preparadas substituindo-se o volume corresponde às soluções de tampão fosfato por água. Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos, em seguida, alíquotas de 90 µL de cada amostra foram transferidas para os vials do auto-injetor. Foram injetados 15 µL das amostras em duplicata no cromatógrafo.

3.12. Preparo das soluções utilizadas nos estudos cinéticos de inosina com diferentes concentrações de fosfato para a enzima *SmPNP* imobilizada

Foram realizados diversos ensaios cinéticos com a enzima *SmPNP* imobilizada para avaliar o efeito da concentração de fosfato na afinidade da enzima pelo substrato inosina. Diferentes condições foram avaliadas para a construção da curva cinética para a inosina:

Fosfato 50 mmol.L⁻¹ e TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 7,4 como fase móvel do biorreator.

Fosfato 5 mmol.L⁻¹ e TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 7,4 como fase móvel do biorreator.

TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 7,4 na fase móvel e 400 µmol.L⁻¹ de fosfato na amostra

Água como fase móvel.

As concentrações desejadas para cada curva cinética foram obtidas a partir da adição de 50 µL da fase móvel empregada no biorreator, alíquotas apropriadas das soluções padrão de inosina (20, 400 e 8000 µmol.L⁻¹) e completando-

se o volume para 100 μL com água. As amostras utilizadas como branco foram preparadas pela adição de 50 μL da fase móvel empregada e 50 μL de água. Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos, em seguida, alíquotas de 90 μL de cada amostra foram transferidas para os vials do auto-injetor. Foram injetados 15 μL das amostras em duplicata no cromatógrafo.

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.

3.13. Desenvolvimento e validação do método cromatográfico para monitorar a atividade da enzima *Sm*PNP em solução

3.13.1. Meio reacional

O meio reacional é constituído por: 50 μL tampão fosfato 500 mmol.L^{-1} pH 7,4, 50 μL tampão TRIS-HCl 1 mol.L^{-1} pH 7,4, 5 μL da solução de inosina (concentrações variáveis), 395 μL de água e 1 μL da solução de *Sm*PNP 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (50 ng). A reação prosseguiu por 120 s e foi cessada pela adição de 50 μL de MeOH grau HPLC.

3.13.2. Pré-tratamento da amostra

Para a precipitação da proteína presente na amostra a ser analisada por HPLC, após a adição de MeOH a solução foi centrifugada a 10.000 rpm e 20°C por 5 minutos. Em seguida, 300 μL do sobrenadante foram transferidos para os vials do auto-injetor. Foram injetados 100 μL das amostras em duplicata no cromatógrafo.

3.13.3. Desenvolvimento do método cromatográfico

A mesma condição de separação empregada para monitorar a atividade do *Sm*PNP-IMER através da quantificação da hipoxantina formada foi empregada para quantificar a hipoxantina formada na reação catalisada pela *Sm*PNP em solução. A separação do substrato (inosina) e produto da reação (hipoxantina) foi realizada em

uma coluna C8 Luna-Phenomenex (100Å, 10µm, 10 x 0.46 cm), empregando uma coluna guarda C18 Phenomenex (4,0 x 3,0 mm) para proteger a coluna analítica caso algum resíduo da proteína ainda estivesse na amostra, utilizando como fase móvel uma mistura de metanol e solução trietilamina descrito na seção 3.9 (MeOH: TEA 1% pH 6,0 (5:95, v/v)), $\lambda = 260$ nm.

3.13.4. Preparo das soluções de hipoxantina utilizadas na validação do método analítico

A solução estoque 400 mmol.L^{-1} de hipoxantina foi preparada solubilizando-se 1,36 mg de hipoxantina em um volume final de 25,0 mL de água. As soluções utilizadas na obtenção da curva de calibração foram preparadas a partir da solução estoque nas seguintes concentrações: 0,4, 1,0, 2,0, 4,0, 10, 20 e $40 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ diluindo-se respectivamente 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µL da solução estoque de $400 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ a um volume final de 10 mL em água.

3.13.5. Validação do método cromatográfico para o monitoramento da atividade da *Sm*PNP em solução

Para a validação do método analítico foram preparadas amostras como descrito na seção 3.13.1 contendo as soluções de hipoxantina preparadas de acordo com a seção 3.13.4, com volume de injeção de 100 µL. As mesmas figuras de mérito avaliadas para a validação do método cromatográfico multidimensional descritas na seção 3.9 foram avaliadas para o método cromatográfico para o monitoramento da atividade *Sm*PNP em solução. A linearidade foi avaliada para a faixa de concentração de 0,4 a $40 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os controles de qualidade utilizados na obtenção da exatidão e precisão foram preparados com as concentrações de 0,3; 0,8 e $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.13.6. Estudo cinético para a enzima *Sm*PNP em solução através da quantificação da hipoxantina formada por HPLC

As concentrações desejadas de inosina para a construção da curva de Michaelis-Menten foram obtidas a partir da adição de 50 µL tampão fosfato 500

mmol.L⁻¹ pH 7,4, 50 µL tampão TRIS-HCl 1 mol.L⁻¹ pH 7,4, 5 µL da solução de inosina (concentrações variáveis), 395 µL de água e 1 µL da solução de *Sm*PNP 50 µg.mL⁻¹ (50 ng). A reação prosseguiu por 120 s e foi cessada pela adição de 50 µL de MeOH grau HPLC. A proteína presente no meio foi precipitada como descrito no item 4.11.1. Aliquotas de 300 µL de cada amostra foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. Foram injetados 100 µL das amostras em duplicata no cromatógrafo.

3.14. Preparo das soluções dos compostos selecionados para avaliação da atividade inibitória no *Sm*PNP-IMER

Preparou-se 1 mL de uma solução estoque 1 mmol.L⁻¹ de cada um dos compostos avaliados em MeOH:H₂O (1:1, v/v).

3.15. Estudo da inibição da *Sm*PNP imobilizada

As concentrações desejadas de cada composto avaliado foram obtidas a partir da adição de 20 µL da solução estoque de inosina 2,5 mmol.L⁻¹, 30 µL do tampão G e alíquotas apropriadas das soluções estoque dos compostos avaliados, completando-se o volume final para 100 µL com água. Dessa forma, amostras dos compostos estudados foram preparadas contendo 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400 e 500 µmol.L⁻¹. A atividade inicial do biorreator foi avaliada em duplicata antes de cada triagem realizada. Todas as amostras foram preparadas em duplicata, homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e em seguida alíquotas de 90 µL de cada amostra foram transferidas para o vial do auto-injetor. Foram injetados 15 µL 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 3.1:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{V_i}{V_0} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

3.16. Ensaio enzimáticos com a enzima xantina oxidase em solução

3.16.1. Ensaio da atividade enzimática para a enzima xantina oxidase

No ensaio para verificar a atividade da enzima xantina oxidase em solução foi utilizada a solução G contendo 50 mM tampão fosfato, 100 mM tampão TRIS-HCl (pH 7,4) e 50 μ M de hipoxantina (50 μ L de uma solução estoque 10 mM). Em uma cubeta de quartzo de 700 μ L, adicionou-se 500 μ L do tampão G e zerou-se o UV. Em seguida, acrescentou-se 5 μ L da solução estoque de xantina oxidase (28 μ L da solução comercial de X.O. em 100 μ L), mantendo-se a concentração utilizada no ensaio acoplado com a PNP – 0,04 U^{102,107,117}. A leitura da formação de ácido úrico foi realizada a 293 nm por 15 segundos.

3.16.2. Ensaio de inibição da enzima xantina oxidase em solução nos estudos de seletividade dos inibidores

A fim de verificar a atividade dessa enzima, acrescentou-se 500 μ L do tampão G e 5 μ L de uma solução MeOH:H₂O (1:1, v/v) e zerou-se o UV. Em seguida, acrescentou-se 5 μ L da solução estoque de xantina oxidase e iniciou-se a leitura da formação de ácido úrico a 293 nm por 15 segundos.

Nos ensaios de inibição dos compostos avaliados a 10 μ M, acrescentou-se 500 μ L do tampão G e 5 μ L da solução 1 mM do inibidor e zerou-se o UV. Em seguida, acrescentou-se 5 μ L da solução estoque de xantina oxidase e iniciou-se a leitura da formação de ácido úrico a 293 nm por 15 segundos. Comparando-se a diferença entre a absorbância final e inicial de cada medida realizada, e considerando-se o ensaio inicial com a ausência de inibidores como 100% de atividade, obteve-se a porcentagem de inibição para cada ligante.

3.16.3. Estudo cinético com a enzima X.O. em solução

Para verificar a atividade da enzima nas condições analisadas, a constante de Michaelis-Menten para a hipoxantina com a enzima X.O. em solução foi

determinada. Esse estudo envolveu a medida da velocidade da reação frente a diferentes concentrações de hipoxantina ($0,2 - 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$), até que se atingisse a saturação da enzima, onde um aumento da concentração do substrato não afetaria notavelmente a velocidade da reação.

Para isso, a formação de ácido úrico com as diferentes concentrações de hipoxantina foi monitorada espectrofotometricamente a 293 nm por 120 segundos. As diferentes concentrações de hipoxantina no meio reacional foram obtidas a partir da adição de alíquotas adequadas das soluções estoque 20 e $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e completando-se o volume final para $500 \mu\text{L}$ com o tampão G. A reação era iniciada pela adição de $2 \mu\text{L}$ de uma solução $1,9 \text{ U.mL}^{-1}$ de X.O., obtendo-se $0,04\text{U}$ de enzima no meio reacional.

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.

3.17. Estudo cinético da enzima *HsPNP* imobilizada

As concentrações desejadas foram obtidas a partir da adição de $50 \mu\text{L}$ do tampão H, alíquotas apropriadas das soluções padrão de inosina ($20, 400$ e $8000 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e completando-se o volume para $100 \mu\text{L}$ com água. As amostras utilizadas como branco foram preparadas pela adição de $50 \mu\text{L}$ do tampão H e $50 \mu\text{L}$ de água. Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos, em seguida, alíquotas de $90 \mu\text{L}$ de cada amostra foram transferidas para os vials do auto-injetor. Foram injetados $15 \mu\text{L}$ das amostras em duplicata no cromatógrafo.

3.18. Preparo das soluções dos compostos selecionados para avaliação da atividade inibitória do *HsPNP-IMER*

Preparou-se 1 mL de uma solução estoque 1 mmol.L^{-1} de cada um dos compostos em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ ($1:1, \text{ v/v}$). As demais soluções necessárias foram realizadas a partir desta solução estoque, completando-se o volume com $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ ($1:1, \text{ v/v}$).

A solução do derivado de Imucilina de 4ª geração, também obtido através da colaboração com o Prof. Dr. Santiago previamente caracterizado como um

potente inibidor da *HsPNP*, foi preparada a 5mmol.L^{-1} em 100% de DMSO. Todas as diluições sucessivas foram feitas mantendo-se 10% de DMSO na solução final, para se obter soluções 500, 10 e $0,05\ \mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.19. Estudo da inibição da *HsPNP* imobilizada

A triagem inicial dos compostos foi realizada avaliando-se o percentual de inibição a $200\ \mu\text{mol.L}^{-1}$. As soluções analisadas foram preparadas a partir da adição de $50\ \mu\text{L}$ da solução estoque dos substratos ($50\ \text{mmol.L}^{-1}$ fosfato e $765\ \mu\text{mol.L}^{-1}$), $30\ \mu\text{L}$ da solução empregada como fase móvel (tampão H, seção 3.17) e $20\ \mu\text{L}$ das soluções estoque ($1\ \text{mmol.L}^{-1}$) dos compostos avaliados. A atividade inicial do biorreator foi avaliada em duplicata antes de cada triagem realizada. Todas as amostras foram preparadas em duplicata, homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e em seguida alíquotas de $90\ \mu\text{L}$ de cada amostra foram transferidas para o vial do auto-injetor. Foram injetados $15\ \mu\text{L}$ 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 3.1 apresentada na seção 3.14.

Os compostos que apresentaram $\%I \geq 80\%$ a $200\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram selecionados para a construção de curvas dose-resposta a fim de se determinar a capacidade inibitória (IC_{50}).

3.20. Caracterização dos ligantes identificados da *HsPNP*

Para o estudo da potência dos ligantes identificados pelo *HsPNP*-IMER, foram construídas curvas dose resposta, avaliando-se a porcentagem de inibição em diferentes concentrações do ligante, em duplicata. Na avaliação de cada composto utilizou-se a faixa de concentração adequada a fim de se obter 5 – 95% de inibição. Os dados cinéticos foram tratados através do método de regressão não-linear de melhor ajuste, empregando-se o software SigmaPlot 9.0.

3.21. Estudo da estabilidade da *HsPNP* em tampões voláteis

Nos estudos por FAC-MS, faz-se necessário o uso de tampões compatíveis com a detecção por MS. O tampão empregado deve ser orgânico volátil e utilizado idealmente em baixas concentrações. Nos ensaios de atividade, por cromatografia líquida multidimensional, o tampão utilizado é o TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0, incompatível com o acoplamento com MS. Assim, foi avaliada a estabilidade da *HsPNP* em tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0, e o tampão TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0 foi empregado como controle. As medidas de atividade foram realizadas, em duplicata, a cada 48 h, como descrito na seção 3.3.2 para os ensaios em solução com a *SmPNP*.

3.22. Experimentos de classificação de ligantes por cromatografia de afinidade frontal

Para a realização dos experimentos de FAC-ESI-MS/MS, e validação do emprego do *HsPNP*-IMER em ensaios de bioafinidade, foi selecionada uma coleção com três compostos com diferentes capacidades inibitórias contra a *HsPNP*: composto 15 (sem atividade inibitória), composto 8 (IC₅₀ 1,83 μM) e composto 10 (IC₅₀ 0,12 μM). Uma mistura contendo 100 nM de cada composto foi continuamente infundida no *HsPNP*-IMER com 5 cm de comprimento. Antes de cada análise o biorreator foi equilibrado com tampão acetato de amônio 5 mM pH 7,0, a uma vazão de 5 μL.min⁻¹, por 5 minutos. Em seguida, a solução contendo os três compostos selecionados foi infundida a 5 μL.min⁻¹ utilizando uma bomba-seringa. Uma solução contendo metanol/água (1:1) é adicionada a fase que elue do biorreator, a uma vazão de 10 μL.min⁻¹, para auxiliar na ionização dos compostos. A vazão total de 15 μL.min⁻¹ foi introduzida na fonte de ionização. O espectrômetro de massa operou em modo positivo, com a detecção simultânea das transições: m/z 253,3→106 (composto 15); m/z 257,3→163 (composto 8); e m/z 287,3→191 (composto 10). Os volumes de ruptura foram determinados através da análise dos perfis de eluição como uma equação polinomial de grau 3 ($y = a + b x + c x^2 + d x^3$), e o ponto de inflexão foi obtido através da segunda derivada. Todos os dados foram processados utilizando os softwares Microsoft Excel e Origin 11.0.

3.23. Estudo da recuperação da atividade do *HsPNP*-IMER após os ensaios de FAC-MS

Diversos ensaios foram realizados a fim de se estudar a recuperação da atividade do *HsPNP*-IMER após a infusão dos ligantes por FAC-MS. A perda de atividade dos biorreatores em cerca de 90% após uma única infusão, resultava numa falta de reprodutibilidade das análises quando o mesmo IMER era utilizado em múltiplos ensaios. Os testes realizados foram: I) Lavagem, por 1 hora, a 50 uL.min⁻¹, com o tampão TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ pHs 4,0; 7,0 e 8,5; II) Lavagem por 72 horas, a 50 uL.min⁻¹, com o tampão TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0; III) Lavagem por 1 hora, a 50 e 5 uL.min⁻¹, com o tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0; IV) Lavagem por 1 hora, a 5 e 50 uL.min⁻¹, com o tampão fosfato 5 e 50 mmol.L⁻¹; V) Lavagem por 2 horas, a 5 uL.min⁻¹, com inosina 1 mmol.L⁻¹; VI) Lavagem por 1 hora, a 5 uL.min⁻¹, com uma solução contendo inosina 100 nmol.L⁻¹ e fosfato 1 μmol.L⁻¹; VII) Lavagem por 1 e 3 horas, a 50 e 5 uL.min⁻¹, com tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0:MeOH (75:25).

A atividade do biorreator avaliado, anteriormente utilizado na infusão da mistura de ligantes por FAC-MS, foi avaliada em duplicata entre cada etapa de lavagem, injetando-se 20 μL de uma amostra contendo inosina 500 μmol.L⁻¹ e fosfato 5 mmol.L⁻¹. Antes de cada análise, o *HsPNP*-IMER foi re-equilibrado por 20 minutos com TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0.

3.24. Imobilização da *HsPNP* em capilares monolíticos com grupos epóxido

Dois novos suportes foram utilizados para a imobilização da *HsPNP*: i) capilar monolítico polimérico baseado em sílica-epóxi, e ii) capilar monolítico polimérico orgânico-epóxi. O capilar monolítico baseado em sílica-epóxi foi desenvolvido pela Merck[®], enquanto o capilar monolítico polimérico foi desenvolvido pelo grupo do Prof. Gasparrini, da Universidade de Roma, e ambos foram gentilmente cedidos para a realização do presente estudo.

O método de imobilização empregado se baseia em estudos anteriormente descritos^{29,121} com algumas modificações. Em todas as etapas do preparo dos biorreatores foram utilizadas as vazões $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para o capilar monolítico baseado em sílica-epóxi, e $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para o capilar monolítico polimérico orgânico-epóxi.

Antes da imobilização, o capilar foi equilibrado com água e tampão fosfato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,0 por 30 minutos. Em seguida, a solução chamada *grafting*, que consiste em KH_2PO_4 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,19 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0, foi eluída pelo capilar por 30 minutos. Posteriormente, a enzima na concentração $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ na solução *grafting* foi eluída através do capilar *overnight*. Em seguida, o capilar foi lavado com tampão fosfato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,0 por 30 minutos, e então eluiu-se uma solução de glicina $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ através do biorreator por 2 horas.

3.25. Estudos cinéticos com os bioreatores preparados com a HsPNP utilizando os capilares monolíticos como suporte

A determinação do valor de K_M para o substrato inosina envolveu a medida de velocidade da reação frente a diferentes concentrações deste (1 - $4000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato, até que se atingisse a saturação da enzima, onde um aumento da concentração do substrato não afetaria notavelmente a velocidade da reação.

Para o capilar monolítico baseado em sílica epoxi ($0,1 \text{ mm O.D.} \times 5 \text{ cm}$), devido a elevada pressão de volta, a quantificação da hipoxantina formada, para o monitoramento da atividade enzimática, não pode ser realizada *on line*. A vazão máxima utilizada neste biorreator foi de $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, o que resultaria em um tempo de acoplamento inviável caso fosse empregado o método cromatográfico multidimensional. Assim, para o biorreator preparado utilizando o capilar monolítico baseado em sílica-epóxi, uma solução contendo as concentrações citadas de inosina e fosfato foi infundida no IMER e o eluato coletado por 30 minutos. Posteriormente, $20 \mu\text{L}$ da solução coletada, contendo a inosina que não reagiu e a hipoxantina formada, foram quantificadas utilizando o método cromatográfico anteriormente desenvolvido e validado.

Os estudos cinéticos com o bioreator preparado com capilar monolítico polimérico orgânico-epóxi (0,5 mm O.D. × 5 cm) foram realizados através da quantificação da hipoxantina formada empregando o método cromatográfico multidimensional previamente desenvolvido e validado.

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.

3.26. Determinação da constante de dissociação (K_d)

A constante de dissociação (K_d) para o inibidor 8 foi calculada utilizando a equação 1.2 anteriormente descrita^{5,52}, na qual K_d e a quantidade de biomolécula imobilizada (B_i) pode ser calculada infundindo-se diversas concentrações do ligante e obtendo-se os diferentes volumes de ruptura, como descrito no item 1.3.

4. Resultados e discussão

4.1. Imobilização das PNPs em capilares tubulares abertos

4.1.1. Obtenção das enzimas

A enzima *Sm*PNP foi expressa na forma de uma proteína de fusão utilizando-se o vetor pMAL. Após a purificação da proteína de fusão, como descrito na seção 3.2, empregou-se o fator Xa na clivagem proteolítica das duas proteínas. A *Sm*PNP foi então purificada em uma coluna de troca catiônica e armazenada a uma concentração de 1 mg/mL em tampão 20 mmol.L⁻¹ MES e 10 mmol.L⁻¹ β-mercaptoetanol, pH 6, contendo 10% de glicerol. Considerando que a imobilização da enzima ocorre através da formação de ligações covalente entre as amins presentes em seus resíduos de lisina e grupamentos aldeído do capilar, o tampão de estocagem desta enzima poderia interferir no processo de imobilização, e, portanto, antes do preparo dos IMERs, solução contendo a enzima *Sm*PNP foi dialisada contra o tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4.

A enzima *Hs*PNP é recebida a uma concentração de 1,5 mg/mL e armazenada em uma solução sulfato de amônio 85%¹¹⁸, que não afeta o processo de imobilização, e, portanto, foi imobilizada no capilar em seu próprio tampão de estocagem.

4.1.2. Imobilização enzimática

A enzima foi imobilizada em capilares de sílica fundida com dimensões de 50 cm × 0,1 mm 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 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^{122,123}.

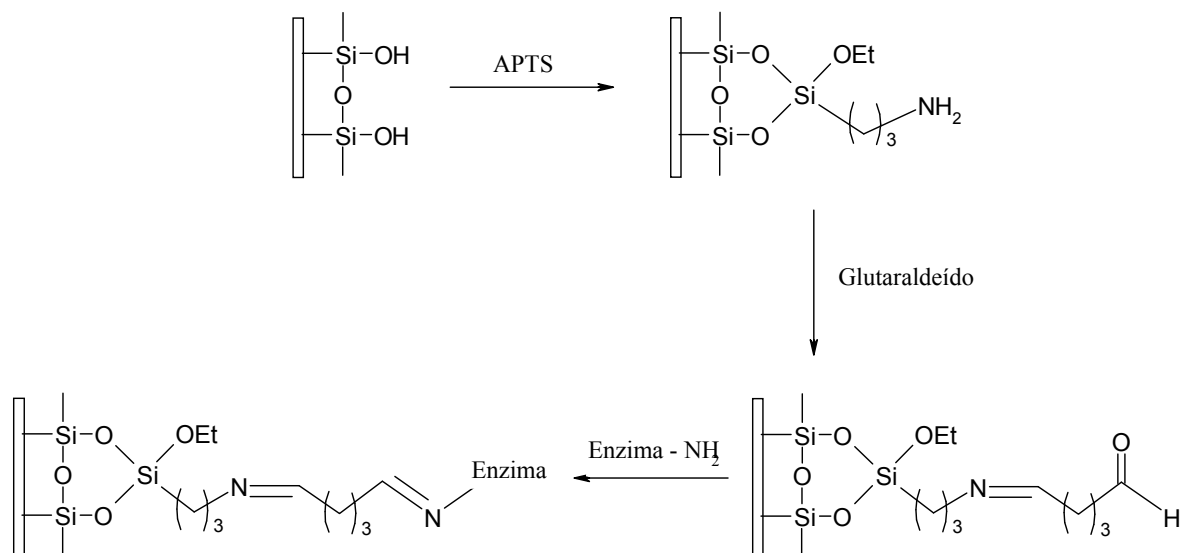
O procedimento de imobilização selecionado para as enzimas *Sm* e *HsPNP* consiste em três etapas e foi realizado com base no trabalho desenvolvido anteriormente no grupo com a imobilização das enzimas GAPDH humana e de *T. cruzi*^{24,47}. As etapas envolvidas são: 1) limpeza e ativação do capilar, 2) silanização e 3) ligação do reagente bifuncional glutaraldeído e imobilização da enzima.

Limpeza e ativação do capilar

A 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^{24,47,124,125}. Estudos anteriores realizados no grupo com a imobilização da enzima GAPDH-Tc demonstraram uma maior eficiência na imobilização quando uma solução de HCl 2 mol.L⁻¹ foi utilizada na limpeza e ativação do capilar.

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 se liga ao agente bifuncional glutaraldeído, através da formação de uma base de Schiff. A enzima se liga 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 as etapas envolvidas nesta reação.



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

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.

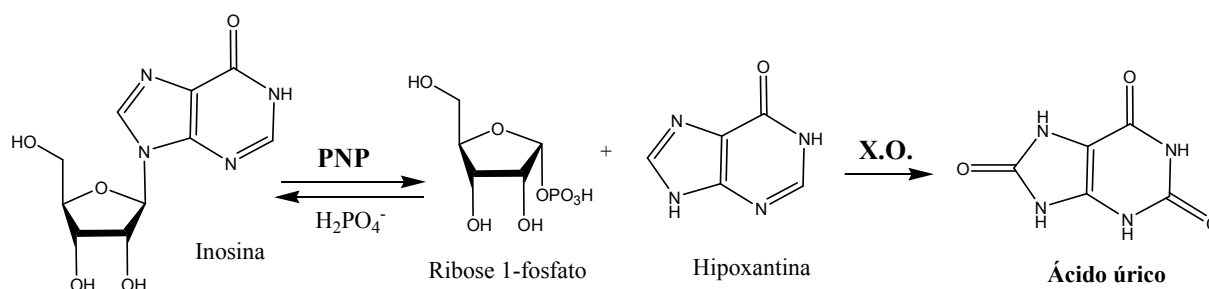
As bases de Schiff são reativas em meio ácido, podendo ser facilmente hidrolisada, causando a liberação da enzima. Por isso, alguns trabalhos relatam a redução das bases de Schiff formada com cianoborohidreto de sódio^{8,66,126}. No entanto, como os pHs ótimos de catálise das PNPs selecionadas são 7,0 e 7,4; esta etapa não foi empregada neste trabalho.

4.2. Ensaios de atividade por cromatografia zonal

A cromatografia zonal foi a estratégia selecionada para monitorar a atividade das PNPs imobilizadas. Nesta abordagem, o substrato é injetado em pequenos volumes, ou zonas, e o produto da catálise enzimática é quantificado⁴⁷. Para este propósito, é necessário desenvolver um método cromatográfico que possibilite a quantificação da hipoxantina formada pela ação das PNPs selecionadas.

4.2.1. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação da hipoxantina produzida PNP's imobilizadas

Em 1947 Kalckar e colaboradores publicaram o ensaio enzimático mais citado e empregado para monitorar a atividade da PNP em solução^{94,127}. O substrato (inosina) e o produto (hipoxantina) da reação catalisada pela PNP possuem máximos de absorção muito próximos na região do ultravioleta 249 e 252 nm, respectivamente. Dessa forma, no ensaio proposto por Kalckar, a enzima xantina oxidase é adicionada ao meio reacional, e converte rápida e quantitativamente a hipoxantina formada no meio pela catálise da PNP em ácido úrico, como ilustrado no esquema 4.1. A formação de ácido úrico é então detectada pelo aumento da absorção em 293 nm, comprimento de onda de absorção máxima bem definido e distinto da inosina e hipoxantina^{94,97,102,117,128}.



Esquema 4.1. Reações envolvidas no ensaio enzimático acoplado PNP-X.O..

Em 1995, Parkin et al¹²⁹ relataram o emprego de um ensaio enzimático onde a formação de hipoxantina a partir da inosina é monitorada diretamente a 280 nm.

Nos ensaios com os biorreatores é possível monitorar a atividade da enzima imobilizada diretamente através da quantificação da hipoxantina formada, pela separação cromatográfica de inosina e hipoxantina. Assim sendo, o emprego do ensaio combinado se torna dispensável e a interferência de compostos avaliados, durante ensaios de triagem, praticamente extinta. No entanto, o biorreator possui baixa capacidade de resolução cromatográfica e a separação do substrato e do produto da reação não pode ser realizada em uma única dimensão. Portanto, foi planejado o uso

da cromatografia líquida multidimensional, com detecção no UV para monitorar a atividade da enzima imobilizada.

A cromatografia multidimensional é utilizada através do acoplamento de duas ou mais colunas 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^{130,131}.

O sistema cromatográfico multidimensional foi configurado de acordo com a ilustração da Figura 4.1. Na primeira dimensão, a enzima imobilizada converte o substrato em produto (posição 1, Figura 4.1). Em seguida, a hipoxantina formada na reação bioquímica catalisada pela PNP e o excesso de inosina, que não foi convertido pelo IMER, são transferidos para uma coluna analítica através de uma válvula de desvio de seis caminhos (posição 2, Figura 4.1). Então, na segunda dimensão, a inosina e a hipoxantina podem ser separadas (posição 1, Figura 4.1) e a atividade da enzima é monitorada através da quantificação da hipoxantina formada.

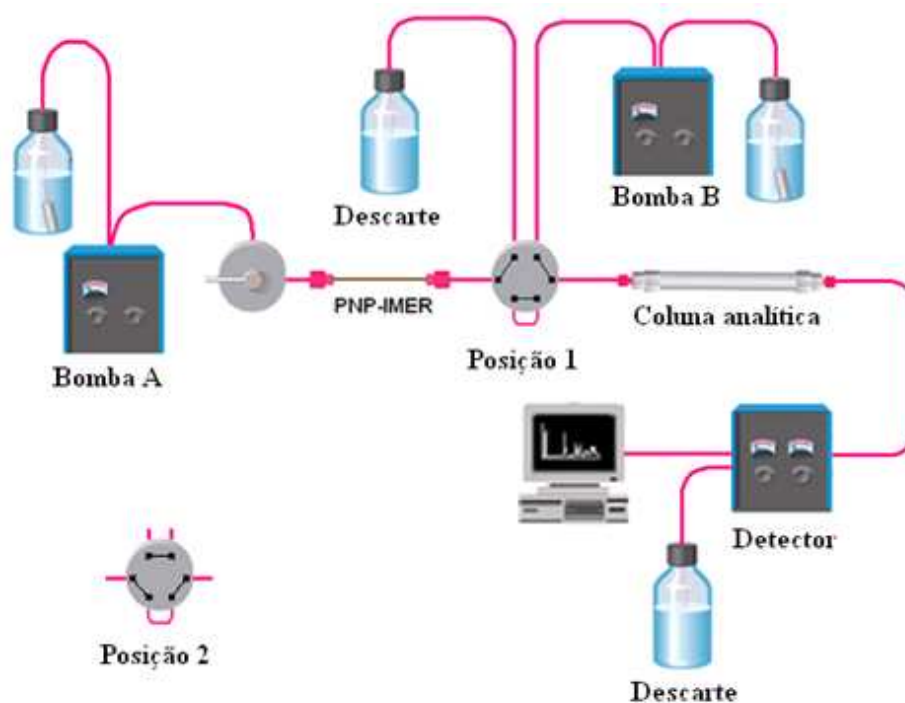


Figura 4.1. Representação do sistema cromatográfico multidimensional usado com o IMER na primeira dimensão e a coluna analítica na segunda dimensão.

O tempo de transferência da inosina e da hipoxantina do IMER para a coluna analítica foi estabelecido avaliando-se o volume de retenção da hipoxantina e da inosina em um capilar vazio e também em um capilar com a enzima inativa, como ilustrado na Figura 4.2. Para isso, uma solução padrão de inosina ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e hipoxantina ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi injetada diretamente no sistema utilizando como fase móvel o tampão de trabalho contendo fosfato 50 mmol.L^{-1} e TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} (tampão G, seção 3.6).

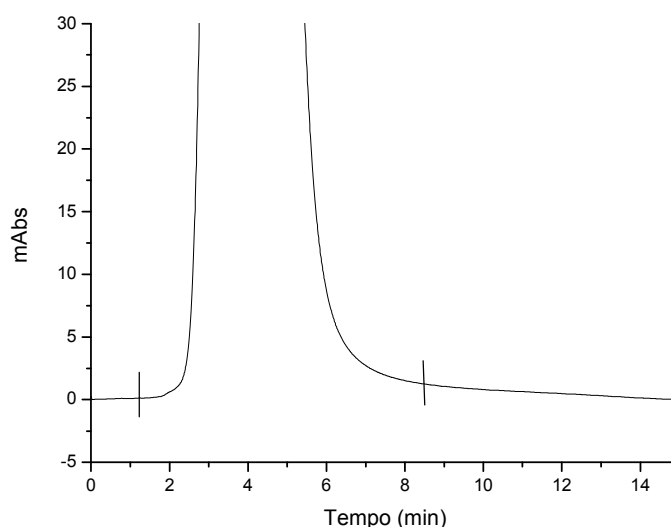


Figura 4.2. Cromatograma referente a injeção de solução padrão com inosina e hipoxantina diretamente no IMER. Tempo de acoplamento estabelecido: 1,2 – 8,5 minutos. Eluente: tampão G, vazão $0,05 \text{ mL.min}^{-1}$ e detecção a 260 nm .

A baixa vazão utilizada no biorreator é essencial para que o tempo de contato entre o substrato inosina e a enzima imobilizada permita a formação do produto hipoxantina. No entanto, essa baixa vazão resulta em um tempo maior para a eluição do substrato e produto da reação, o que implica em um tempo de acoplamento entre o biorreator e a coluna analítica de 7,3 minutos.

A próxima etapa no desenvolvimento no método analítico corresponde à obtenção da separação cromatográfica dos analitos (inosina e hipoxantina) na segunda dimensão. A escolha das condições cromatográficas avaliadas para a separação de inosina e hipoxantina foi baseada em métodos cromatográficos anteriormente desenvolvidos e validados no grupo ^{24,47} para a separação de substâncias muito hidrofílicas, como os analitos em questão. Uma coluna C8 (Luna-Phenomenex[®], 10

μm , 100 \AA) com dimensões $10 \times 0,46 \text{ cm d.i.}$ foi preparada e avaliada quanto à sua eficiência cromatográfica. Uma alíquota de $15 \mu\text{L}$ de uma solução padrão de inosina ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e hipoxantina ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no tampão G (seção 3.6) foi injetada diretamente na coluna analítica C8, utilizando diversas composições de fase móvel e vazões.

O cromatograma apresentado na Figura 4.3 ilustra a separação cromatográfica obtida na condição de análise descrita na Tabela 4.1.

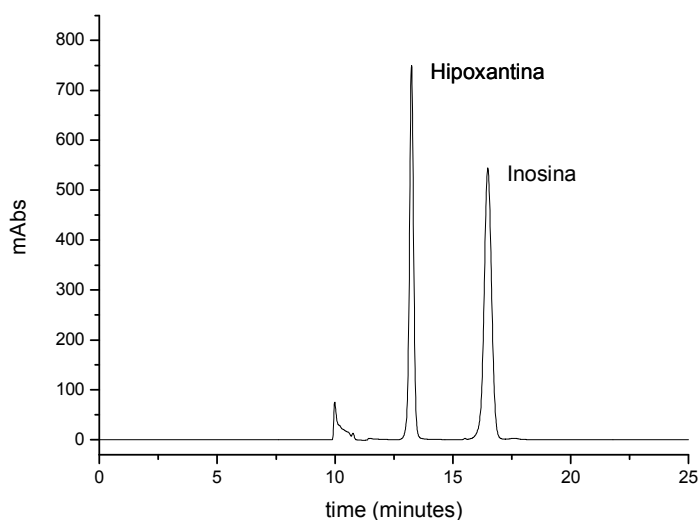


Figura 4.3. Cromatograma de separação de inosina e hipoxantina. Primeira dimensão: PNP-IMER ($40 \text{ cm} \times 100 \mu\text{m d.i.}$), vazão $0,05 \text{ mL.min}^{-1}$, eluente: tampão G. Segunda dimensão: coluna C8 Luna-Phenomenex[®] ($10 \text{ cm} \times 0,46 \text{ mm d.i.}$), vazão $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$, eluente: solução TEA 1% (pH 6,0 ajustado com ácido acético) 95:5 MeOH, detecção a 260 nm.

Tabela 4.1. Condições cromatográficas no sistema multidimensional para a separação de inosina e hipoxantina.

Bomba (Eluente)	Tempo (min)	Evento	Posição da Válvula
1 (A)	0,00-1,20	Eluição dos analitos	1
2 (B)	0,00-1,20	Condicionamento da coluna analítica.	1
1 (A)	1,21-8,50	Transferência dos analitos para a coluna analítica.	2
1 (A)	8,51-25,0	Condicionamento do PNP-IMER	1
2 (B)	8,51-25,0	Análise dos compostos pela coluna analítica	1

Bomba 1: 0,05 mL.min⁻¹, eluente A: tampão G. Bomba 2: 0,5 mL.min⁻¹, eluente B: tampão trietilamina 1% (pH 6,0):MeOH (95:5 v/v); 260 nm.

Na condição otimizada apresentada, o fator de retenção (k) para hipoxantina e inosina foram respectivamente 0,15 e 0,43; com um fator de separação (α) de 2,86 e resolução (R_s) de 2,67. Dessa forma, esta foi a condição selecionada para a validação do método analítico.

4.2.2. Validação do método analítico para a quantificação de hipoxantina formada pelos PNP-IMERS

O método foi validado avaliando-se a linearidade através da construção de uma curva de calibração e da precisão intermediária. As análises foram feitas utilizando-se biorreatores inativos para evitar o estresse do biorreator, injetando-se soluções padrão de hipoxantina.

A curva de calibração foi obtida nas seguintes concentrações: 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 100; 200 e 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de hipoxantina. O coeficiente de correlação (r) obtido da curva de calibração foi de 0,999, com coeficiente de variação entre 0,3 e 3,2% e exatidão entre 86,4 e 103%. A curva de calibração está mostrada na Figura 4.4.

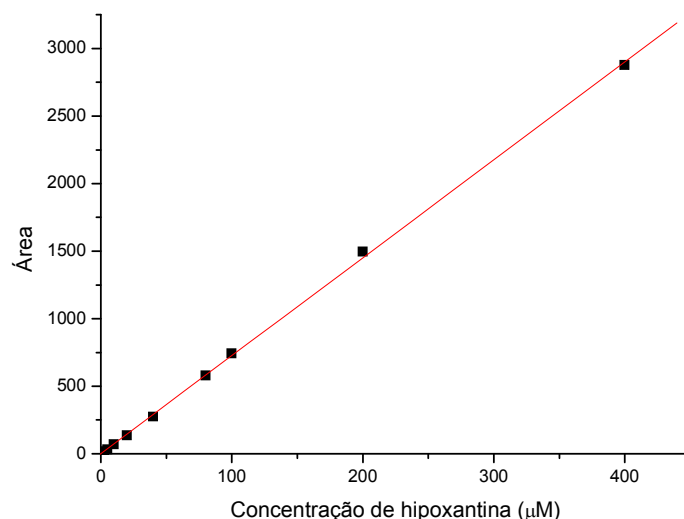


Figura 4.4. Curva analítica da hipoxantina. PNP-IMER acoplado a uma coluna C8 Luna-Phenomenex[®]. Condições cromatográficas vide Tabela 4.1.

As concentrações de 3, 160 e 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foram selecionadas como controles de qualidade do método, e foram empregadas para avaliar a precisão e exatidão intra e inter-dia do método. Os valores de precisão e exatidão intra e inter-dia são apresentados na Tabela 4.2. 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 de desvio entre as quantidades adicionadas e quantificadas, nas três concentrações analisadas. Os valores de precisão e exatidão do método estão dentro dos critérios de aceitação de validação de métodos bioanalíticos^{120,132}.

Tabela 4.2. Precisão e exatidão intra e interdias do método de análise para quantificação da hipoxantina formada pelo biorreator de PNP.

Concentração hipoxantina ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) 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
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
3	96,5	0,52	94,3	4,65	91,6	3,57	94,1	2,91
160	100	0,22	98,2	1,23	93,7	0,54	97,4	0,66
300	98,6	0,22	96,5	0,79	90,9	2,18	95,3	1,06

O método desenvolvido apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão, e, desta maneira pode ser empregado para monitorar a atividade da enzima PNP humana e de *S. mansoni* imobilizadas na avaliação dos parâmetros cinéticos e na realização de ensaios bioquímicos.

4.2.3. Estudo cinético da atividade enzimática do IMER-*Sm*PNP

A realização dos estudos cinéticos com a enzima imobilizada é uma ferramenta valiosa para avaliar possíveis modificações estruturais sofridas pela enzima devido ao método de imobilização empregado. A formação de ligações covalente entre a enzima e o suporte pode resultar na inacessibilidade ou na distorção do sítio ativo, o que impossibilitaria a enzima de catalisar a reação. Através da determinação da constante de Michaelis-Menten, K_M , é possível avaliar a afinidade de ligação entre a enzima e o substrato e a eficiência catalítica do biorreator, e comparando-se os valores obtidos com a enzima livre em solução pode-se analisar como o método de imobilização afetou as propriedades da enzima. No entanto, é preciso ter em mente as diferenças entre o ensaio enzimático acoplado geralmente empregado em solução e o método proposto neste trabalho. No ensaio enzimático acoplado, a hipoxantina formada pela catálise da PNP é removida do meio reacional pela ação da X.O., convertendo hipoxantina em ácido úrico. Dado que a reação catalisada pela PNP é um equilíbrio, a remoção do produto do meio pela ação da X.O. deve deslocar o equilíbrio no sentido de formação da hipoxantina, aumentando a velocidade de catálise da PNP. Empregando-se a enzima imobilizada, como a hipoxantina é quantificada diretamente *on line*, o equilíbrio não é perturbado.

4.2.3.1. Estudo cinético para o substrato inosina com a *Sm*PNP mantendo-se as condições utilizadas nos ensaios em solução

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 inosina, medindo-se a atividade enzimática através do método cromatográfico multidimensional desenvolvido e validado. Inicialmente, o valor de K_M foi determinado nas mesmas condições

empregadas nos ensaios em solução, mantendo-se os mesmos tampões, concentrações e pH. Esta estratégia permite a comparação dos valores obtidos e avaliar possíveis modificações estruturais causadas pelo método de imobilização empregado.

Para a determinação da K_M para o substrato inosina, foram empregadas concentrações crescentes do substrato (1 – 2800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), mantendo-se fixa a concentração de fosfato (segundo substrato da reação catalisada pela PNP) na fase móvel (50 mmol.L^{-1}), até que fosse atingido um patamar de saturação, onde o aumento da concentração de inosina não mais produzisse alterações na velocidade da reação. As áreas das bandas de hipoxantina formadas durante o estudo cinético foram correlacionadas às concentrações através da curva de calibração do método previamente validado. Os valores obtidos de concentrações de hipoxantina formada foram relacionados às concentrações do substrato para se obter a hipérbole de Michaelis-Menten. As amostras empregadas nos estudos cinéticos foram injetadas em duplicata com um volume de injeção de 15 μL .

O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados coletados no estudo cinético variando-se a concentração de inosina no *Sm*PNP-IMER, gerando a curva de Michaelis-Menten em função da concentração do substrato inosina, sendo assim determinado o valor de K_M como ilustrado na Figura 4.5.

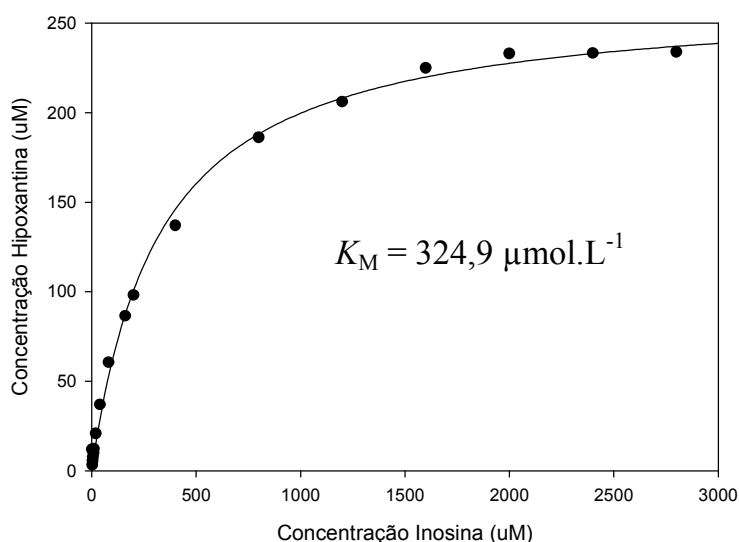


Figura 4.5. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo *Sm*PNP-IMER, variando-se a concentração de inosina, mantendo-se as condições do ensaio padrão realizado em solução¹⁰².

O perfil da hipérbole obtida está de acordo com a equação de Michaelis-Menten (Equação 1.8). Em concentrações baixas de substrato ($[S] \ll K_M$), a velocidade da reação V_0 é diretamente proporcional à concentração do substrato. Já em elevadas concentrações do substrato ($[S] \gg K_M$), V_0 se aproxima do seu máximo e a velocidade da reação se torna independente da concentração do substrato, o que pode ser observado na hipérbole mostrada na Figura 4.5.

O valor de K_M obtido para a enzima imobilizada ($325 \pm 19,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$) é cerca de 50 vezes maior do que o determinado para a enzima livre em solução ($6,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$)^{97,117} pelo método de Kalckar. Esta elevada diferença evidencia que o ensaio com a enzima imobilizada deve ser modulado e para isso é preciso explorar o mecanismo da reação.

Embora o mecanismo da reação catalisada pela PNP ainda não tenha sido completamente elucidado, pode-se considerar algumas propostas mecanísticas reportadas na literatura para avaliar quais fatores poderiam afetar os resultados obtidos nos estudos cinéticos. As propostas mecanísticas apresentadas, até o momento, se baseiam em dados cristalográficos de baixa resolução, e apresentam algumas discrepâncias entre as mesmas. Uma proposta mais recente e que corrige algumas das divergências dos modelos anteriores foi elaborada por Canduri et al.¹³³ para a PNP humana (*HsPNP*) e é ilustrada na Figura 4.6.

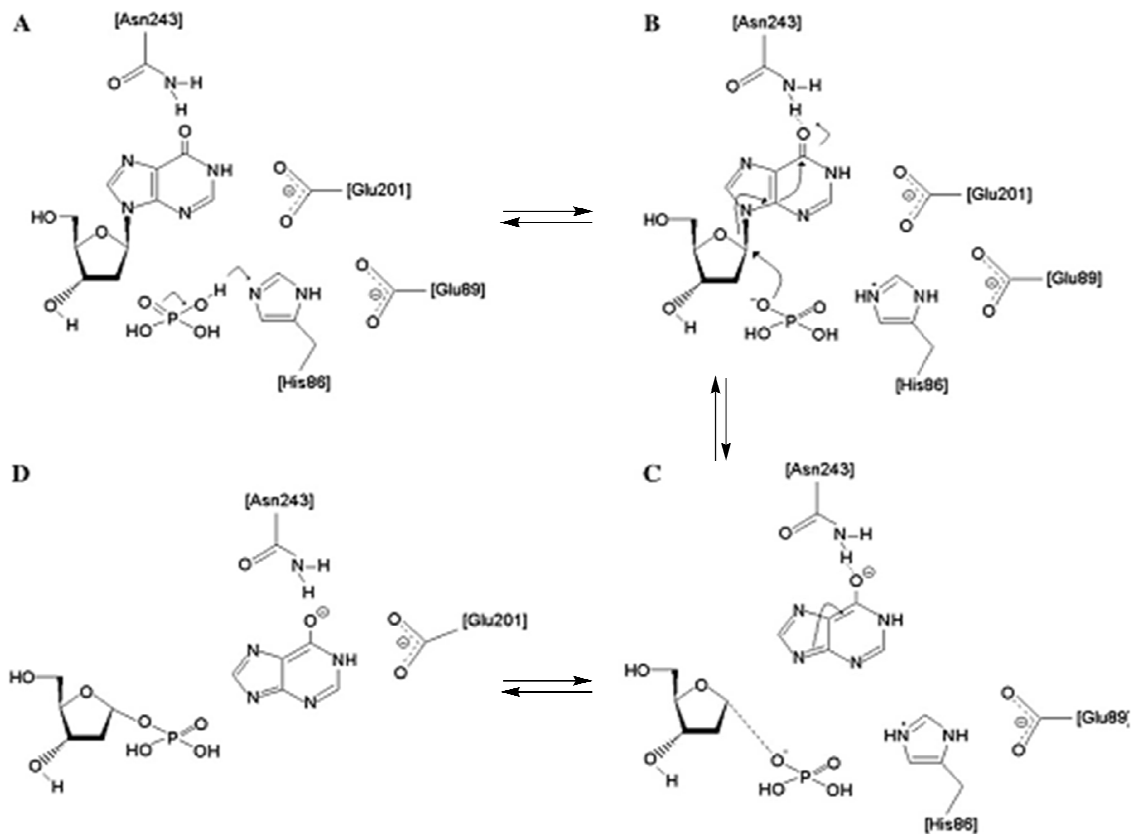


Figura 4.6. Proposta do mecanismo catalítico para *HsPNP* adaptada de Canduri et al.¹³³.

Neste modelo, His86 aceita um próton do fosfato, que então se torna um diânion. O fosfato diânion ataca o C(1') da pentose e enfraquece a ligação glicosídica, levando a um deslocamento de elétrons pelo anel purínico, resultando em um intermediário purínico carregado negativamente. Propõe-se que a carga negativa está localizada no O (6) purínico que faz uma forte interação eletrostática com Asn243. Esta ligação de hidrogênio intermolecular pode facilitar a redistribuição da carga negativa no anel purínico.

De acordo com o modelo proposto e com alguns experimentos realizados com PNP de outras espécies¹⁰⁸, a hidrólise do nucleosídeo β-purínico é acelerada pela presença de íons fosfato no meio reacional. O papel do segundo substrato, fosfato inorgânico (P_i), é mais complexo, pois facilita a saída da base purínica fortemente ligada a PNP. Assim, a concentração do fosfato no meio reacional é de fundamental importância na velocidade da catálise enzimática e também em ensaios de inibição,

onde observa-se que em concentrações elevadas de P_i tem-se uma diminuição na potência inibitória de compostos ativos¹⁰⁸.

Tendo em vista a importância do fosfato na reação catalisada pela PNP, os estudos cinéticos com o *Sm*PNP-IMER para o substrato inosina foram realizados na presença de diversas concentrações de fosfato. Além disso, a cinética do fosfato, mantendo-se a concentração de inosina fixa, foi também explorada.

4.2.3.2. Estudo cinético para o substrato fosfato com a *Sm*PNP imobilizada

A fim de se determinar a melhor concentração de fosfato para os bioensaios, os parâmetros cinéticos foram avaliados através da variação da concentração de fosfato na amostra e a uma concentração de inosina fixa em valor de saturação (1,6 mM, aproximadamente 5 vezes o K_M).

Para obter a hipérbole de Michaelis-Menten em função da concentração de P_i , a produção de hipoxantina foi quantificada, empregando o método multidimensional desenvolvido e validado. Neste estudo, a fase móvel empregada no biorreator, e, portanto, o eluente da bomba A, foi apenas TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,4. Assim, foram empregadas concentrações crescentes de P_i (0,05 – 4000 μ M) até que fosse atingido um patamar de saturação, onde um aumento na concentração de P_i não mais produzisse alterações na formação de hipoxantina. Os valores das concentrações de hipoxantina formada foram relacionados às concentrações do fosfato injetadas para se obter a hipérbole de Michaelis-Menten. As amostras empregadas nos estudos cinéticos foram injetadas em duplicata com um volume de injeção de 15 μ L, como descrito no item 3.14.

O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados obtidos, gerando a curva apresentada na Figura 4.7.

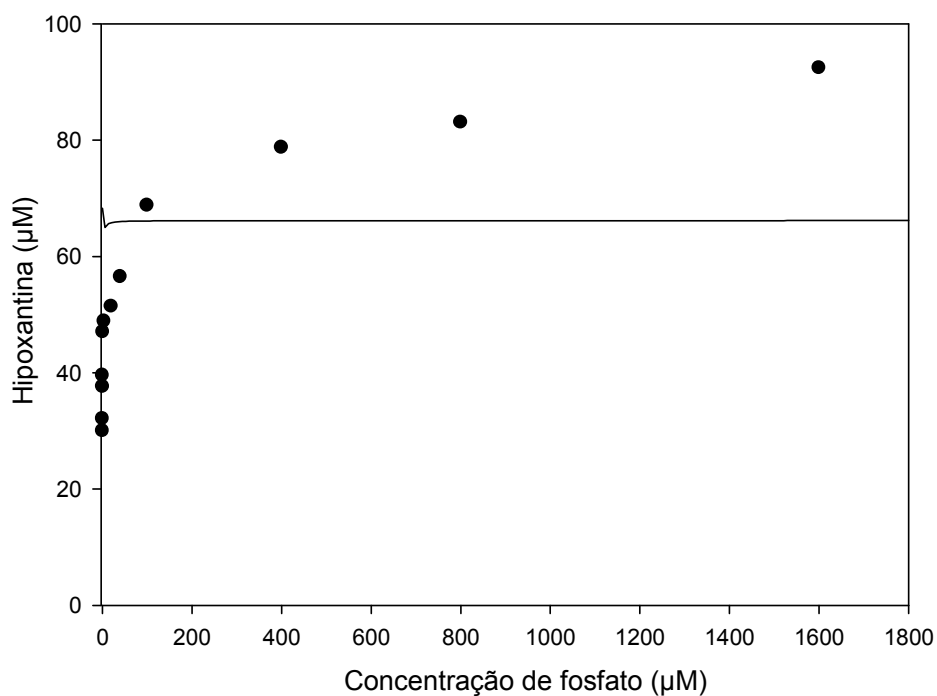


Figura 4.7. Curva obtida para a produção de hipoxantina pelo *Sm*PNP-IMER variando-se a concentração de fosfato.

Apesar dos dados apresentados na Figura 4.5 apresentarem o perfil de uma hipérbole, o coeficiente de correlação obtido através do método de regressão não-linear foi de 0,32. O que evidencia que a cinética para o fosfato não ocorre de acordo com a equação de Michaelis-Menten.

Uma característica frequente da reação catalisada pela PNP é a cinética não-Michaeliana observada para alguns substratos, refletida por uma curvatura no gráfico de Lineweaver-Burk. Este comportamento é observado para PNPs de todas as espécies quando o substrato variável é o P_i ⁹⁴. Utilizando os dados obtidos, construiu-se o gráfico de Lineweaver-Burk para a cinética do fosfato com o *Sm*PNP-IMER, ilustrado na Figura 4.8.

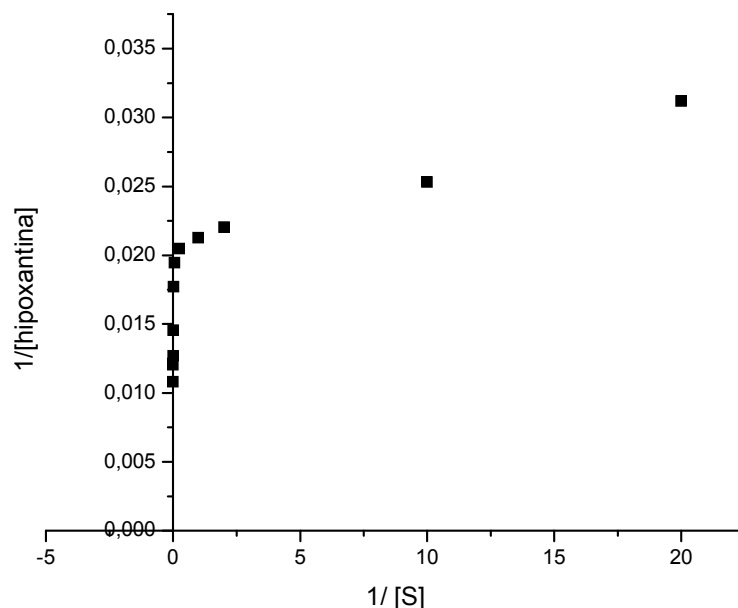


Figura 4.8. Gráfico de Lineweaver-Burk (ou duplo-recíproco) para o fosfato com o *SmPNP-IMER*.

Como pode ser observado, o gráfico mostrado na Figura 4.8 apresenta uma curvatura em elevadas concentrações de P_i ($1/[S]$ próximo a zero), evidenciando que a reação catalisada pelo *SmPNP-IMER* apresenta cinética não-Michaeliana para o fosfato e por isso o K_M não pode ser obtido.

No entanto, o estudo cinético evidenciou que com aproximadamente $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato ocorre a saturação da reação. Além disso, concentrações próximas a 1 mmol.L^{-1} de fosfato são indicadas para os ensaios de inibição por serem próximas a concentração intracelular de fosfato⁹⁴. Assim, dentre as concentrações estudadas, a de $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi selecionada para realizar os ensaios posteriores.

Estudos relatam que na ausência de fosfato a PNP bovina catalisa a hidrólise de guanosina, MESG (2-amino-6-mercaptopurina ribosenucleosídeo)¹³⁴ e inosina¹³⁵. Kline e Schramm¹³⁵ investigaram a atividade da PNP bovina para a fosforólise de inosina na ausência de fosfato. Para isso, inicialmente analisaram todos os reagentes para possíveis resíduos de fosfato e em nenhum deles foi encontrado o contaminante com sensibilidade de 5 pmol.mL^{-1} . Ainda assim, foi verificado que a reação catalisada pela PNP prossegue mesmo na ausência de fosfato. No mecanismo proposto por Canduri et al¹³³ (Figura 4.6), o fosfato atua na clivagem na ligação

glicosídica da inosina, o que na ausência de P_i poderia ser efetuado lentamente pela água.

Como pode ser observado nos cromatogramas apresentados Figura 4.9, o IMER com a enzima *SmPNP* também foi capaz de produzir hipoxantina ($30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) mesmo na ausência de fosfato.

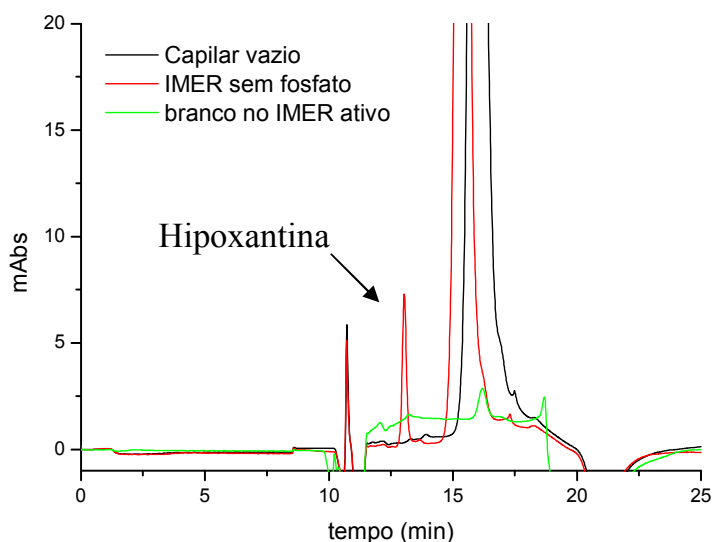


Figura 4.9. Cromatogramas evidenciando a produção de hipoxantina na ausência de fosfato: (—) injeção do tampão usado como fase móvel (TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} pH 7,4) no biorreator ativo; (—) $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ de inosina no capilar vazio; (—) $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ de inosina no biorreator ativo.

Este estudo demonstrou a formação da hipoxantina pelo *SmPNP*-IMER na ausência de fosfato, evidenciada pela presença da banda correspondente a hipoxantina, ausente nos outros dois cromatogramas (Figura 4.9) correspondentes a injeção do tampão usado como fase móvel e quando do uso de um capilar vazio.

4.2.3.3. Estudo do efeito da concentração de fosfato na afinidade da enzima pelo substrato inosina

Os estudos realizados demonstraram que a concentração de fosfato afeta sobremaneira a atividade da enzima *SmPNP* imobilizada. Para avaliar o efeito da concentração de fosfato na afinidade do *SmPNP*-IMER pelo substrato inosina, foram realizados quatro estudos cinéticos para a inosina:

1. Água como fase móvel e concentrações variáveis de inosina na amostra.
2. Água como fase móvel, e $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato e concentrações variáveis de inosina na amostra.
3. TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} e tampão fosfato 5 mmol.L^{-1} pH 7,4 como fase móvel, e concentrações variáveis de inosina na amostra.
4. TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} pH 7,4 como fase móvel, e concentrações variáveis de inosina com fosfato $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na amostra.

Para a determinação da K_M para o substrato em todos os estudos cinéticos realizados foram empregadas concentrações crescentes de inosina ($2 - 4000 \mu\text{mol.L}^{-1}$) até que fosse atingido um patamar de saturação. A hipoxantina formada durante o estudo cinético foi quantificada através da curva de calibração do método previamente validado e foi relacionada às concentrações do substrato inosina para se obter a hipérbole de Michaelis-Menten. As amostras empregadas nos estudos cinéticos foram injetadas ($15 \mu\text{L}$) em duplicata.

O perfil de todas as hipérbolas obtidas indica que a cinética do *SmPNP-IMER* para o substrato inosina obedece a equação de Michaelis-Menten em todas as condições avaliadas. O gráfico de Lineweaver-Burk apresentado na Figura 4.10 foi construído para os dados coletados no estudo cinético com concentrações variáveis de inosina e $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato na amostra, e TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} pH 7,4 como fase móvel no biorreator.

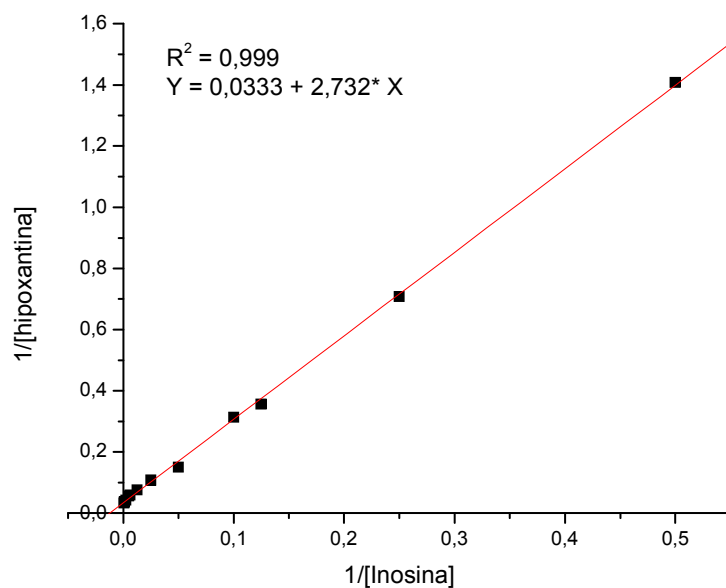


Figura 4.10. Gráfico de Lineweaver-Burk (ou duplo-recíproco) para o substrato inosina com o *SmPNP-IMER*.

O gráfico obtido possui elevado coeficiente de correlação linear ($R^2 = 0,999$) e assim pode-se afirmar que a cinética para o substrato inosina no *SmPNP-IMER* obedece a equação de Michaelis-Menten.

Para selecionar a condição mais adequada no que concerne a concentração de fosfato nos experimentos com o *SmPNP-IMER* todos os valores obtidos para a constante de Michaelis-Menten (K_M) nas diferentes condições estudadas foram comparados e estão resumidos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Valores obtidos de K_M para o substrato inosina nas diversas condições avaliadas.

Ensaio	Fase Móvel	Amostra Injetada	K_M ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
1	Água	Inosina	$763 \pm 97,7$
2	Água	Inosina e fosfato $400\mu\text{mol.L}^{-1}$	$282 \pm 37,9$
3	TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} pH 7,4	Inosina e fosfato $400\mu\text{mol.L}^{-1}$	$164 \pm 13,4$
4	TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} e tampão fosfato 5 mmol.L^{-1} pH 7,4	Inosina	$214 \pm 16,4$
5*	TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} e tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} pH 7,4	Inosina	$325 \pm 19,4$

*Dados apresentados na seção 4.2.3.1.

Analisando os valores de K_M obtidos nos diferentes experimentos observa-se que uma elevada concentração de fosfato na fase móvel, experimentos 4 e 5, afeta a afinidade da enzima *SmPNP* imobilizada pelo substrato inosina. No entanto, observa-se que a presença de fosfato em concentrações adequadas permite que o seu papel catalítico influencie positivamente na atividade da enzima (experimentos 1 e 2). Outro fator importante que foi evidenciado nestes experimentos corresponde ao controle do pH e força iônica do meio reacional. Quando apenas água é empregada como fase móvel para o biorreator, experimentos 1 e 2, não há controle de pH (o pH verificado para água foi de 6,2, no entanto, nestas condições não há tamponamento) e a afinidade do biorreator pelo substrato inosina decresce significativamente quando comparado aos demais experimentos. A manutenção do pH e da força iônica ótimos da *SmPNP* é um fator indispensável pois afeta diretamente a atividade, e possíveis modificações nestas condições podem causar alterações na estrutura terciária da proteína e até mesmo causar a sua desnaturação. Tendo em vista todo o exposto, as condições utilizadas no experimento 3 foram selecionadas para os demais estudos.

4.2.4. Estudo cinético com a enzima *Sm*PNP em solução através da quantificação da hipoxantina formada por HPLC

O método cromatográfico desenvolvido para quantificar a hipoxantina formada pela catálise da *Sm*PNP em solução apresentou linearidade para as áreas da banda obtidas em função da concentração injetada ($y = 3,45 \times 10^4 + 1,01 \times 10^5 \times x$, $r = 0,999$) utilizando soluções com concentrações de hipoxantina na faixa de 0,2 a 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A variabilidade intra- e inter-dia para os controles de qualidade do método foram determinadas pelo coeficiente de variação (ou desvio padrão relativo) entre 0,99 e 3,63 %, com valores de exatidão na faixa de 97,9 a 119 %. O limite de quantificação do método foi 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (CV = 1,94 % e exatidão de 119 %).

Os valores para as figuras de mérito consideradas na validação do método cromatográfico demonstraram a confiabilidade do método desenvolvido dentro da faixa de concentração considerada. Quando foi utilizada uma faixa de concentração mais ampla (0,2 – 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) os valores obtidos estavam fora dos valores para aceitação do método. No entanto, a maior concentração da curva de calibração (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foi considerada possivelmente baixa para monitorar a atividade da enzima *Sm*PNP em solução. Assim, foi realizada a validação da diluição de amostras mais concentradas de hipoxantina no meio reacional. Neste estudo, uma amostra com 2 mmol.L^{-1} de hipoxantina em meio reacional foi diluída a 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (fator de diluição: 100 vezes) e avaliada em triplicata. Uma segunda amostra, com 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi diluída a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (fator de diluição: 20 vezes) em meio reacional e injetada em triplicata. Para estas amostras, obteve-se CV = 1,43 e 3,45%, e exatidão 108,4 e 109,2 %, respectivamente.

O método desenvolvido apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão, e pode então, desta maneira pode ser empregado para monitorar a atividade da enzima PNP de *S. mansoni* livre em solução nos estudos cinéticos.

Para a determinação da K_M para o substrato inosina com a enzima livre em solução, através da quantificação direta de hipoxantina formada, foram empregadas concentrações crescentes de inosina (0,2 – 2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) até que fosse atingido um patamar de saturação, onde o aumento da concentração do substrato não mais

produzisse alterações na velocidade da reação. As áreas das bandas de hipoxantina formadas durante o estudo cinético foram correlacionadas às concentrações através da curva de calibração do método previamente validado. Quando necessário, as amostras foram diluídas no próprio meio reacional para que a concentração de hipoxantina analisada estivesse dentro do intervalo da curva de calibração. Os valores obtidos de concentrações de hipoxantina formada foram relacionados às concentrações do substrato para se obter a hipérbole de Michaelis-Menten.

O valor de K_M obtido para o substrato inosina com a enzima *SmPNP* livre em solução, quantificando-se a hipoxantina formada por HPLC, foi $120 \pm 6,92 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Tal valor é aproximadamente 17 vezes maior do que o determinado para a enzima livre em solução através do ensaio acoplado PNP/X.O. ($6,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$)^{97,117}. É importante salientar que no método enzimático acoplado, devido ao excesso de xantina oxidase empregado no meio reacional, o equilíbrio da reação catalisada pela *SmPNP* pode ser deslocado no sentido de formação de hipoxantina, e, portanto, o modelo de quantificação direta da hipoxantina formada por HPLC é mais adequado para a comparação com o valor de K_M obtido para o *SmPNP*-IMER ($164 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Comparando-se estes valores pode-se inferir que o método de imobilização empregado não afetou significativamente a afinidade da *SmPNP* imobilizada pelo substrato inosina, mostrando-se portanto uma alternativa promissora e valiosa para a triagem de inibidores específicos.

A diferença observada entre os modelos com a enzima livre em solução ($K_M = 120 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com o ensaio de quantificação da hipoxantina formada por HPLC) e com a enzima imobilizada ($K_M = 164 \pm 13,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$) pode ser explicada considerando diversos fatores. No entanto, é importante destacar que os ensaios em solução são estáticos, enquanto com o IMER a reação é dinâmica. A formação das ligações covalentes envolvidas no método de imobilização empregado pode afetar a estrutura quaternária da enzima ou resultar em alterações conformacionais ou impedimento estérico do sítio ativo, o que também afetaria a afinidade da enzima pelo substrato. Os resíduos de lisina presentes na estrutura da proteína têm um papel fundamental no método de imobilização empregado, pois a enzima se liga covalentemente através da formação de base de Schiff entre o glutaraldeído, presente

no suporte, e os grupamentos amina livres presentes na estrutura da molécula. A Figura 4.11 mostra a superfície do trímero *SmPNP* com o sítio ativo e os resíduos de lisina destacados.

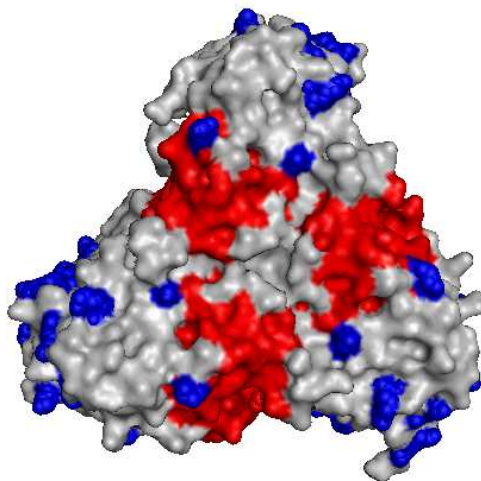


Figura 4.11. Superfície do trímero *SmPNP*. Os sítios ativos são mostrados em vermelho e os resíduos de lisina em azul.

Grande parte dos resíduos de Lys da enzima *SmPNP* encontram-se na superfície acessível ao solvente e distante do sítio ativo. No entanto, existem dois resíduos de Lys bem próximos aos sítios ativos, sugerindo que a formação da base de Schiff entre a enzima e o suporte pode introduzir efeitos estéricos, limitando a acessibilidade do substrato ao sítio ativo. É importante ainda salientar que a formação das ligações covalentes entre a enzima e o suporte pode restringir a flexibilidade da enzima, dificultando o movimento necessário para atingir o estado de transição no processo catalítico ⁷⁸.

A afinidade de uma enzima pelo substrato tem influência marcante sobre a velocidade da reação catalítica. Assim, o tempo de contato e a acessibilidade do substrato aos sítios ativos da enzima influenciam sobremaneira na atividade enzimática. Os resultados observados para o IMER evidenciam que o tempo de contato em função da vazão utilizada no método desenvolvido foi suficiente para se obter uma atividade enzimática mensurável por LC, corroborando a possibilidade de sua utilização para os objetivos propostos neste trabalho.

4.2.5. Estabilidade e reprodutibilidade do *Sm*PNP-IMER

Com o intuito de estudar o comportamento dos IMERs preparados e comparar sua estabilidade com a da *Sm*PNP livre em solução, foi realizado um teste de estabilidade em função do tempo.

Inicialmente a estabilidade do IMER foi investigada avaliando-se a atividade da enzima com a injeção de soluções controle com 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de inosina e 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato em duplicata. O biorreator permaneceu ativo por um período superior a 4 meses com perda de 75% da atividade inicial. Esse resultado evidenciou que o processo de imobilização desenvolvido para a *Sm*PNP foi um grande sucesso, pois preservou a atividade enzimática e possibilitou a reutilização da proteína por meses, enquanto que em solução a enzima é utilizada em um único experimento e descartada.

A reprodutibilidade do preparo dos *Sm*PNP-IMERS também foi investigada medindo-se, em duplicata, a atividade inicial de seis *Sm*PNP-IMERS diferentes recém-preparados, injetando-se 15 μL de soluções controle com 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de inosina e 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato. O desvio padrão relativo para a atividade inicial dos seis *Sm*PNP-IMERS (atividade inicial média $87,5 \pm 13,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com CV = 18,7%, n=6) demonstra a robustez do método de imobilização empregado.

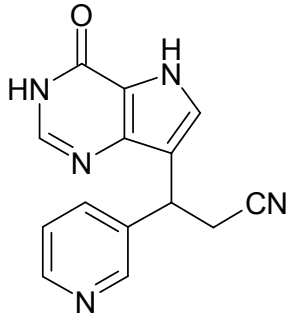
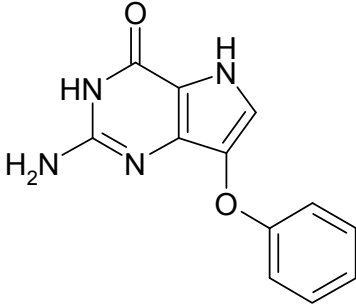
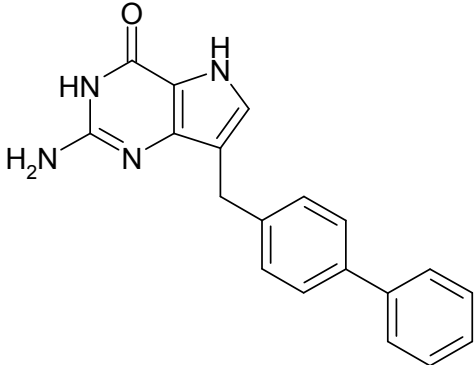
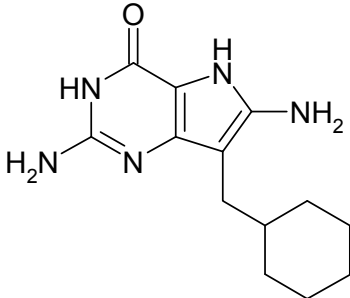
Esses resultados demonstraram que o *Sm*PNP-IMER preservou a atividade catalítica da enzima com elevada estabilidade. A reprodutibilidade no preparo dos IMERS é um fator importante, pois evidencia que podem ser empregado nos estudos de triagem de inibidores.

4.2.6. Triagem de inibidores do *Sm*PNP-IMER

Para os estudos de triagem inicial com o *Sm*PNP-IMER avaliou-se a atividade inibitória de uma série com nove compostos derivados de 9-deazaguanina, identificados através do ensaio em solução pelo método de Kalckar como inibidores contra a *Sm*PNP^{107,117,127,136,137}.

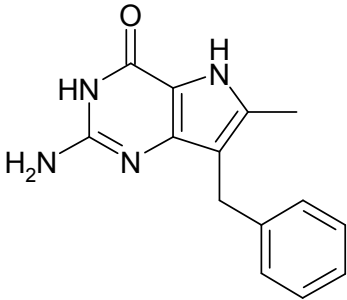
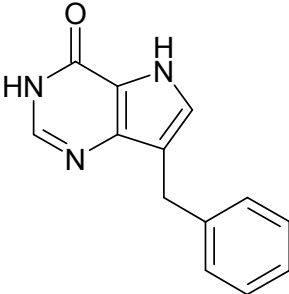
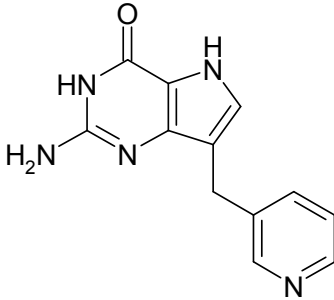
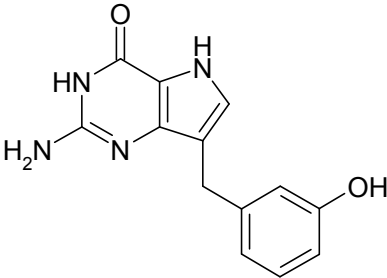
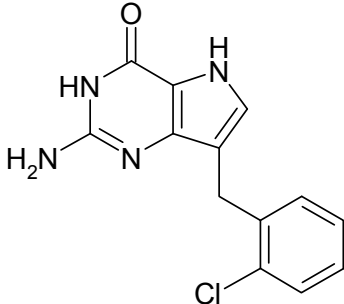
A Tabela 4.4 mostra as estruturas dos compostos da série de derivados de 9-deazaguanina selecionada e as IC₅₀ (concentração do inibidor que reduz a atividade enzimática em 50%) determinadas por Postigo^{117,138}.

Tabela 4.4. Compostos derivados de 9-deazaguaninas^{107,117,138}.

Composto	Estrutura	IC ₅₀ (μM) contra <i>Sm</i> PNP em solução*
1		4,2 ± 0,3
2		4,5 ± 0,4
3		0,10 ± 0,01
4		6,4 ± 0,7

Continua

Continuação da Tabela 4.4

5		200 ± 22
6		$16 \pm 1,2$
7		$0,80 \pm 0,05$
8		$0,79 \pm 0,06$
9		$0,87 \pm 0,06$

*Dados obtidos através do ensaio enzimático acoplado em solução, utilizando-se 50 mmol.L⁻¹ fosfato e 100 mmol.L⁻¹ de TRIS-HCl pH 7,4.

Os compostos selecionados apresentam, de acordo com os resultados da Tabela 4.4, uma ampla faixa de potência inibitória (0,1 – 200 μM). O propósito inicial desta escolha foi verificar se o biorreator seria capaz de distinguir entre os inibidores de diferentes potências.

Esta série de inibidores derivados da 9-deazaguanina possui grande similaridade estrutural com o substrato inosina, e diferem pelo C e grupo substituinte presentes na posição 9 do anel purínico (esquema 4.1) e alguns deles são conhecidos inibidores da PNP humana^{103,114,115}.

Utilizando as condições otimizadas para o ensaio de atividade com a enzima imobilizada (seção 4.2.3.3), os compostos 1-9, foram avaliados com o *Sm*PNP-IMER. A fase móvel utilizada foi TRIS-HCl 100 mmol.L^{-1} pH 7,4, e as amostras foram preparadas com 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de inosina (1,5 K_M nestas condições), 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto avaliado. É importante manter a concentração de substrato próxima ao valor de K_M na triagem de inibidores, pois o emprego de concentrações elevadas do substrato pode causar erros experimentais na identificação de inibidores competitivos, pois estes competem diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima, sendo, portanto, deslocados pelo excesso de substrato. As análises foram realizadas em duplicata, como descrito no item 3.14, e os percentuais de inibição obtidos a 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto avaliado estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Porcentagem de inibição do *Sm*PNP-IMER para os compostos da série de derivados da 9-deazaguanina nas condições otimizadas.

Composto	Inibição (em %) a 200 μ M
1	72,7
2	0
3	1,52
4	0,56
5	0
6	11,0
7	35,2
8	1,82
9	0

O composto 1 que demonstrou maior atividade inibitória foi selecionado para a determinação da IC_{50} com o *Sm*PNP-IMER. A Figura 4.13 ilustra a porcentagem de inibição do composto 1 em diferentes concentrações.

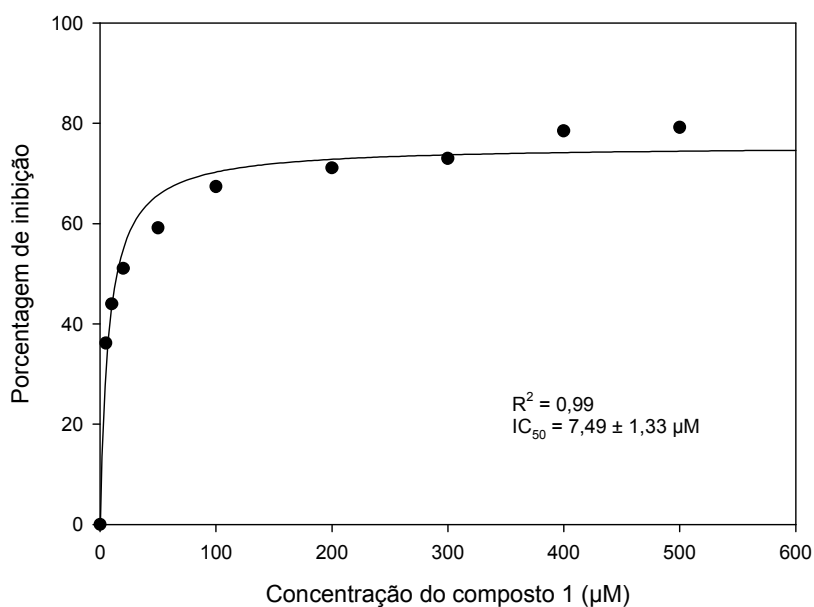


Figura 4.13. Porcentagem de inibição da atividade enzimática da *Sm*PNP no biorreator para diferentes concentrações do composto 1 nas condições otimizadas.

A IC_{50} obtida para este inibidor com a enzima imobilizada foi de $7,49 \pm 1,33 \mu\text{mol.L}^{-1}$, que está de acordo com a IC_{50} determinada através dos ensaios em

solução, de $4,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. No entanto, vale ressaltar que para a determinação da IC_{50} com precisão seria necessário atingir maiores valores de inibição, o que não foi alcançado neste ensaio.

Considerando a elevada potência descrita para estes compostos contra a *SmPNP* em solução (Tabela 4.4), os percentuais de inibição obtidos para a enzima imobilizada estão muito baixos.

Quando o método de Kalckar¹²⁷ é empregado para monitorar a atividade da enzima PNP em ensaios de triagem de inibidores, é recomendável que a seletividade da inibição seja investigada⁹⁴, para evitar falsos positivos como resultados. Neste ensaio enzimático acoplado, a inibição das enzimas PNP e/ou da xantina oxidase reduz a formação de ácido úrico formado (esquema 4.1). Assim, quando a diminuição na produção do ácido úrico é detectada, é necessário avaliar qual enzima está sofrendo a ação do inibidor. No entanto, alguns trabalhos relatam o uso de excesso da X.O., como estratégia para garantir a seletividade de inibição^{107,117}.

A grande vantagem do método desenvolvido neste projeto é a eliminação da utilização do ensaio acoplado, visto que a hipoxantina formada na reação catalisada pela PNP é diretamente quantificada através da separação cromatográfica obtida na segunda dimensão. Embora o ensaio desenvolvido para monitorar a atividade da enzima *SmPNP* em solução, através da quantificação da hipoxantina formada por HPLC (seção 4.2.4), tenha se mostrado uma alternativa eficiente para monitorar a atividade da enzima em solução através de um ensaio direto, se mostrou ineficiente na avaliação da atividade inibitória da série de compostos selecionada. Devido a grande similaridade estrutural destas moléculas com o produto da reação enzimática hipoxantina, este método não pode ser empregado nos ensaios de triagem de inibidores.

Assim, como grande parte dos compostos avaliados dessa série demonstrou baixa potência inibitória para o *SmPNP*-IMER, a capacidade de inibição dos compostos 1-9 para a xantina oxidase foi examinada.

4.2.6.1. Avaliação da atividade inibitória dos compostos selecionados contra a enzima xantina oxidase

A seletividade de inibição dos compostos 1-9 para enzimas *Sm*PNP e X.O. foi avaliada usando a xantina oxidase em solução. Para isso, foram mantidas exatamente as mesmas condições utilizadas para triagem de inibidores da *Sm*PNP no ensaio acoplado em solução, ajustando-se apenas o tempo em que a reação foi monitorada. A formação de ácido úrico foi monitorada por apenas 15 segundos. A alteração do tempo de monitoramento fez-se necessário devido ao grande excesso de X.O. usado, o que causa a completa conversão da hipoxantina em ácido úrico em aproximadamente 40 segundos. As análises foram realizadas em duplicata, como descrito no item 3.15.2, e os valores de inibição obtidos a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos compostos são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Valores médios de porcentagem de inibição, a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos compostos avaliados, obtidos no ensaio em solução da enzima xantina oxidase .

Composto	% de inibição da enzima XO
1	17,6
2	67,9
3	98,9
4	55,1
5	31,6
6	23,0
7	100
8	100
9	100

Os resultados evidenciam que o excesso de xantina oxidase empregado no ensaio acoplado não é suficiente para que seja desprezada a inibição desta enzima. Mesmo nas baixas concentrações avaliadas, $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, três compostos da série

inibem a X.O. em 100%. A elevada capacidade inibitória destes compostos pode ser relacionada a similaridade estrutural da série com o substrato da enzima (hipoxantina). Todos os inibidores possuem o anel purínico idêntico, diferindo apenas pelo átomo presente na posição 9 do anel e pela substituição na mesma posição, como ilustrado na Figura 4.14.

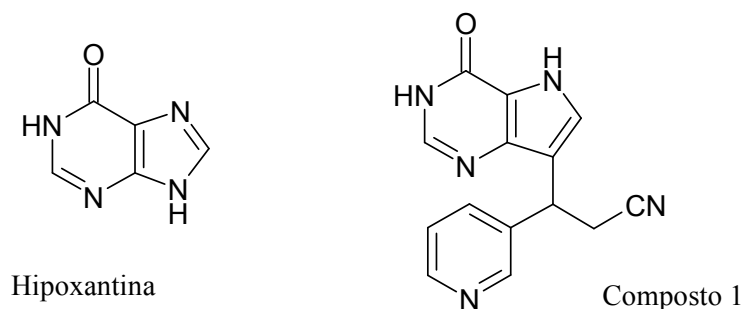


Figura 4.14. Estrutura da hipoxantina e do composto 1.

Estes resultados corroboram os obtidos com a enzima imobilizada. Nos ensaios realizados com o biorreator, apenas o composto 1 apresentou atividade inibitória significativa para a *SmPNP* (72,7 % de inibição a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e ainda assim muito menos pronunciada do que a atividade reportada para este composto ¹¹⁷.

Esses estudos demonstram a importância da investigação da seletividade de inibição para compostos identificados através de ensaios enzimáticos acoplados de triagem.

Baseando-se nos resultados apresentados, apenas os compostos 1 e 7 desta série atuam como inibidores não seletivos da *SmPNP*.

É importante destacar ainda que o tampão utilizado nos estudos de inibição da X.O., assim como a constante dielétrica e o pH, que são fatores que influenciam diretamente a atividade enzimática, foram os mesmos empregados nos ensaios acoplados com as enzimas *SmPNP/X.O.* ¹¹⁷. Isto foi feito a fim de se obter os valores de inibição nas condições de ensaio publicadas para a série ¹¹⁷. Dessa forma, faz-se necessário avaliar a eficiência catalítica da X.O. nessas condições.

A constante de Michaelis-Menten para o substrato hipoxantina com a enzima X.O. foi determinada nas condições descritas na seção 3.15.3. As diferenças de absorbância a 293 nm, devido a formação do ácido úrico, foram correlacionadas as concentrações de hipoxantina no meio reacional através do método de regressão não-

linear de melhor ajuste, para se obter a hipérbole de Michaelis-Menten apresentada na Figura 4.15. As análises foram feitas em duplicata.

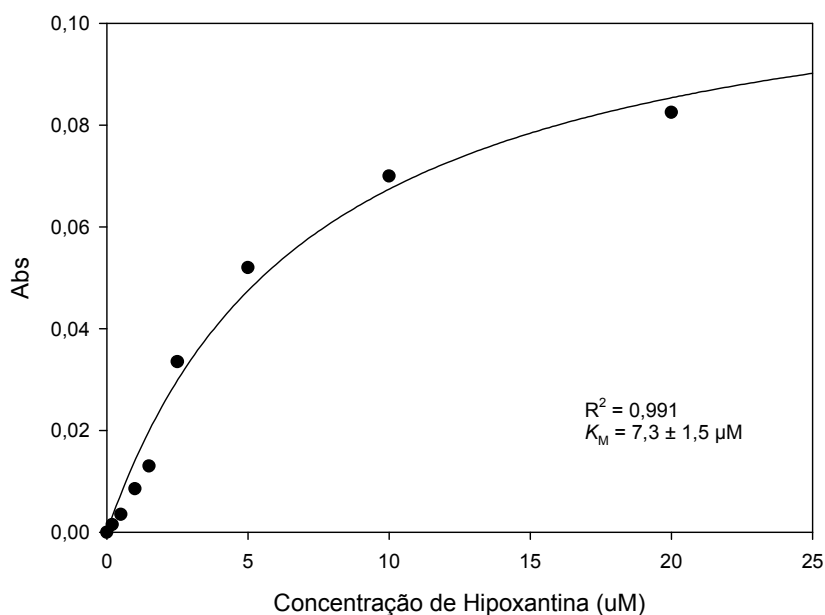


Figura 4.15. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de ácido úrico para a enzima xantina oxidase em solução.

O perfil da hipérbole obtida está de acordo com a equação de Michaelis-Menten. Em baixas concentrações de substrato, a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração do substrato. Já em elevadas concentrações do substrato, a velocidade da reação se aproxima do seu máximo e se torna independente da concentração do substrato.

O valor da constante K_M obtida para a hipoxantina de $7,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ está de acordo com os valores reportados na literatura para a enzima xantina oxidase de leite bovino ($9,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$)¹³⁹⁻¹⁴¹. Este resultado evidencia que as condições empregadas na triagem dos compostos 1-9 (Tabela 4.4) para a enzima X.O. são adequadas. Portanto, a atividade observada nos ensaios reportados¹¹⁷ deve-se a inibição dessa enzima pelos compostos avaliados.

Os resultados obtidos com os biorreatores preparados com a enzima *SmPNP* demonstraram que a enzima imobilizada preservou sua atividade catalítica com elevada estabilidade e que os compostos 1-9 selecionados para triagem inicial não apresentaram inibição contra o *SmPNP*-IMER. Os estudos realizados com a enzima

xantina oxidase evidenciaram que a série de 9-deazaguanina são seus inibidores e que o método de triagem aqui desenvolvido é seletivo e não leva a falsos positivos, dado que se quantifica diretamente a hipoxantina formada pela catálise da *SmPNP*.

4.2.7. Estudo cinético com a enzima *HsPNP* imobilizada

Para a determinação da K_M para o substrato inosina com a enzima PNP humana imobilizada, foram empregadas concentrações crescentes de inosina (1 – 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) até que fosse atingido um patamar de saturação, onde o aumento da concentração do substrato não mais produzisse alterações na velocidade da reação. A hipoxantina formada na catálise enzimática em cada injeção foi quantificada através do método cromatográfico multidimensional previamente validado. Os valores obtidos de concentrações de hipoxantina formada foram relacionados às concentrações do substrato para se obter a hipérbole de Michaelis-Menten. Considerando os resultados obtidos anteriormente com a *SmPNP* imobilizada, onde verificou-se a marcante influência da concentração de fosfato na afinidade da enzima pelo substrato, o K_M para o biorreator com a enzima *HsPNP* foram determinados adicionando-se 5 mmol.L^{-1} ou 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato na amostra. As amostras empregadas nos estudos cinéticos foram injetadas em duplicata com um volume de injeção de 15 μL .

O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados coletados para a produção de hipoxantina pelo *HsPNP*-IMER variando-se a concentração de inosina na presença de 5 mmol.L^{-1} , gerando a curva de Michaelis-Menten em função da concentração do substrato inosina, sendo assim determinado o valor de K_M como ilustrado na Figura 4.16.

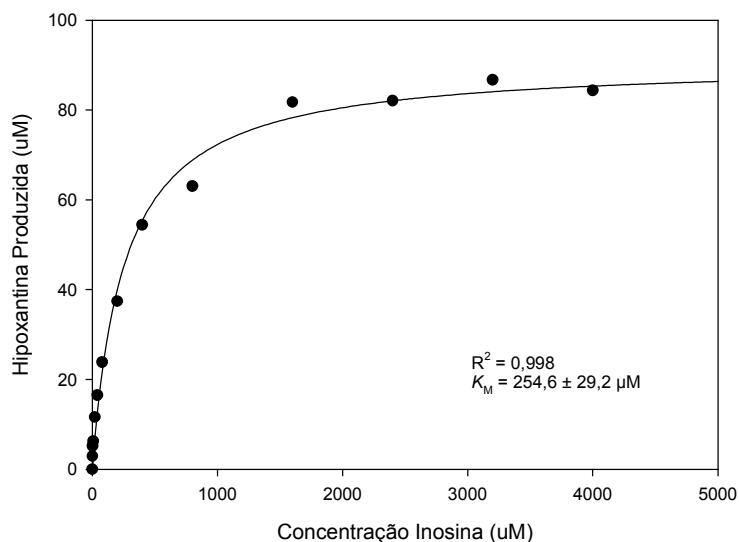


Figura 4.16. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo *HsPNP-IMER*, variando-se a concentração de inosina, com 5 mmol.L⁻¹ de fosfato na amostra.

O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados coletados para a produção de hipoxantina pelo *HsPNP-IMER*, variando-se a concentração de inosina na presença de 400 μmol.L⁻¹ de fosfato, gerando a curva de Michaelis-Menten em função da concentração do substrato inosina, sendo assim determinado o valor de K_M como ilustrado na Figura 4.17.

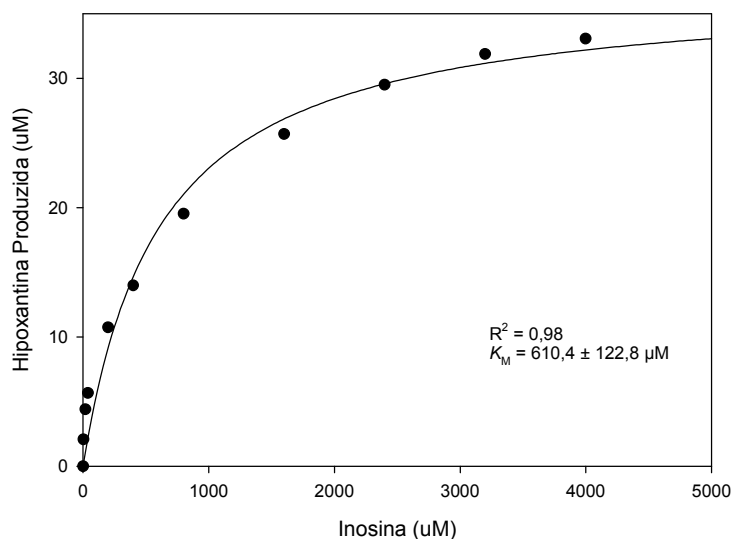


Figura 4.17. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo *HsPNP-IMER*, variando-se a concentração de inosina, com 400 μmol.L⁻¹ de fosfato na amostra.

O perfil das hipérboles obtidas está de acordo com a equação de Michaelis-Menten. Em concentrações baixas de substrato ($[S] \ll K_M$), a velocidade da reação V_0 é diretamente proporcional à concentração do substrato. Já em elevadas concentrações do substrato ($[S] \gg K_M$), V_0 se aproximada do seu máximo e a velocidade da reação se torna independente da concentração do substrato, o que pode ser observado na hipérbole mostrada nas Figuras 4.16 e 4.17.

Assim como realizado com o *Sm*PNP-IMER, foi avaliado o efeito da concentração de fosfato na amostra sobre a atividade do *Hs*PNP-IMER, visando otimizar as condições reacionais para a enzima imobilizada. Os valores de K_M obtidos evidenciam que a afinidade da enzima imobilizada pelo substrato inosina diminui cerca de 2,4 vezes quando a concentração de fosfato na amostra é reduzida de 5 mmol.L⁻¹ para 400 μmol.L⁻¹. Além disso, pode-se notar, através da análise dos dados apresentados nas Figuras 4.16 e 4.17, que a atividade na enzima diminuiu substancialmente quando a menor concentração de fosfato foi empregada. Assim, a concentração de 5 mmol.L⁻¹ de fosfato foi selecionada para a realização dos demais estudos com a enzima *Hs*PNP imobilizada.

Os resultados observados para o *Hs*PNP-IMER evidenciam que o tempo de contato em função da vazão utilizada no método desenvolvido foi suficiente para se obter uma atividade enzimática mensurável por LC, corroborando a possibilidade de sua utilização para os objetivos propostos neste projeto.

Utilizando-se o método de detecção de hipoxantina para monitorar a atividade da *Hs*PNP^{23,129} nos ensaios em solução obteve-se um K_M de 133 ± 15 μmol.L⁻¹²³, valor 1,9 vezes menor que o obtido para a enzima imobilizada. No entanto, deve ser considerado que no IMER a reação ocorre em fluxo, e, conseqüentemente, o tempo de contato entre a enzima e o substrato é menor. Além disso, o processo de imobilização pode ter afetado a estrutura quaternária da enzima, sua flexibilidade, bem como a acessibilidade do substrato ao sítio catalítico. Estes resultados, entretanto, representam uma etapa crucial no desenvolvimento do método de triagem proposto, pois demonstra que a enzima imobilizada reteve sua atividade catalítica.

4.2.8. Estudo da estabilidade e reprodutibilidade do *HsPNP-IMER*

A estabilidade do *HsPNP-IMER* preparado foi estudada a fim de se avaliar a possibilidade de reutilizar a enzima em diversos ensaios e comparar sua estabilidade com a enzima livre em solução. O monitoramento da atividade enzimática foi realizado em triplicata, semanalmente, avaliando-se a produção de hipoxantina com a injeção de 20 μL uma solução controle contendo 382,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de inosina e 5 mmol.L^{-1} de fosfato pH 7,0. A enzima imobilizada reteve 30% de sua atividade catalítica inicial após 2 meses do seu preparo, mantendo sua atividade acima do limite de quantificação do método, evidenciando que o *HsPNP-IMER* pode ser empregado em diversas análises.

A reprodutibilidade do preparo dos *HsPNP-IMERS* também foi investigada medindo-se, em duplicata, a atividade inicial de seis *HsPNP-IMERS* diferentes recém-preparados, injetando-se 20 μL de soluções controle com 382,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de inosina e 5 mmol.L^{-1} de fosfato. O desvio padrão relativo para a atividade inicial dos seis *HsPNP-IMERS* (atividade inicial média $65,9 \pm 10,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com CV = 15,4%, n= 6) demonstra a robustez do método de imobilização empregado também no preparo deste biorreator.

4.2.9. Validação do emprego do *HsPNP-IMER* na triagem de ligantes

A triagem inicial com o *HsPNP-IMER* foi realizada com os compostos derivados de 9-deazaguanina (compostos 1 – 9, Tabela 4.4) e um derivado de Imucilina de 4ª geração (DI4G, composto 10), caracterizado como um inibidor promissor da PNP humana nos ensaios em solução monitorando-se diretamente a formação de hipoxantina. A estrutura do composto 10 é apresentada na Figura 4.18.

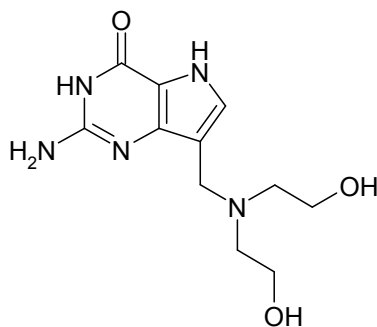


Figura 4.18. Estrutura do derivado de Imucilina de 4ª geração, composto 10, identificado como potente inibidor da *HsPNP* através dos ensaios em solução.

O composto 10 foi caracterizado como inibidor competitivo da enzima *HsPNP* ($IC_{50} = 40,6 \pm 0,3$ nM, $K_i = 12 \pm 2$ nM²³) nos ensaios em solução, competindo com o substrato inosina pelo sítio ativo. O composto 7 é descrito na literatura como um potente inibidor da PNP humana, sintetizado com base em estudos estruturais, com IC_{50} de 36 nM¹⁰⁵.

Inicialmente foi avaliada a atividade inibitória de cada composto a 200 μ M. A concentração do substrato inosina empregada nesses ensaios foi padronizada com base nos estudos cinéticos anteriormente realizados. O valor de K_M determinado com 5 mmol.L⁻¹ de fosfato na amostra foi de $255 \pm 29,2$ μ M, assim a concentração de 382,5 μ M de inosina foi utilizada nos ensaios de inibição ($[S]/K_M = 1,5$). O ensaio de inibição com a enzima imobilizada foi realizado em duplicata, como descrito no item 3.18. Os resultados obtidos utilizando 200 μ M dos inibidores estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Porcentagem de inibição dos compostos da série de derivados da 9-deazaguanina e DI4G.

Composto	Inibição (em %)
1	88,8
2	84,6
3	2,77
4	86,2
5	69,1
6	83,8
7	97,2
8	93,7
9	92,0
10	94,3

Dentre a série considerada apenas o composto 3 demonstrou baixa capacidade inibitória a 200 μ M. No entanto, só os compostos 8 e 10 foram selecionados para prosseguir com os estudos de determinação da potência inibitória (IC_{50}) e do mecanismo de inibição, devido a não disponibilidade de amostras dos demais compostos.

4.2.10. Determinação da potência inibitória (IC_{50}) para inibidores da *HsPNP*

Para se construir as curvas dose-resposta, foram analisadas as porcentagens de inibição de cada composto selecionado em uma ampla faixa de concentração, buscando-se atingir 5 – 95% de inibição. As análises foram realizadas em duplicata, como descrito na seção 3.20. As curvas dose-resposta obtidas para os compostos 8 e 10 são apresentadas nas Figuras 4.19 e 4.20, respectivamente.

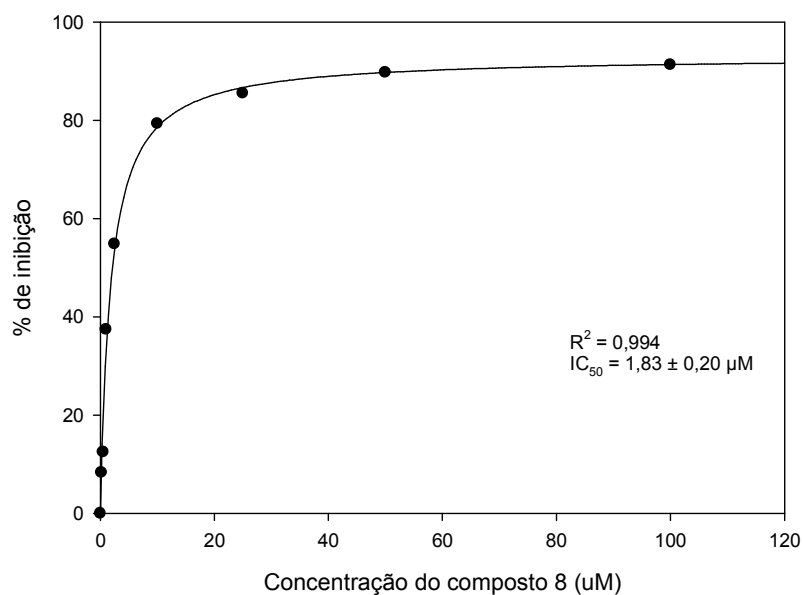


Figura 4.19. Curva dose-resposta para o composto 8 no *HsPNP-IMER*.

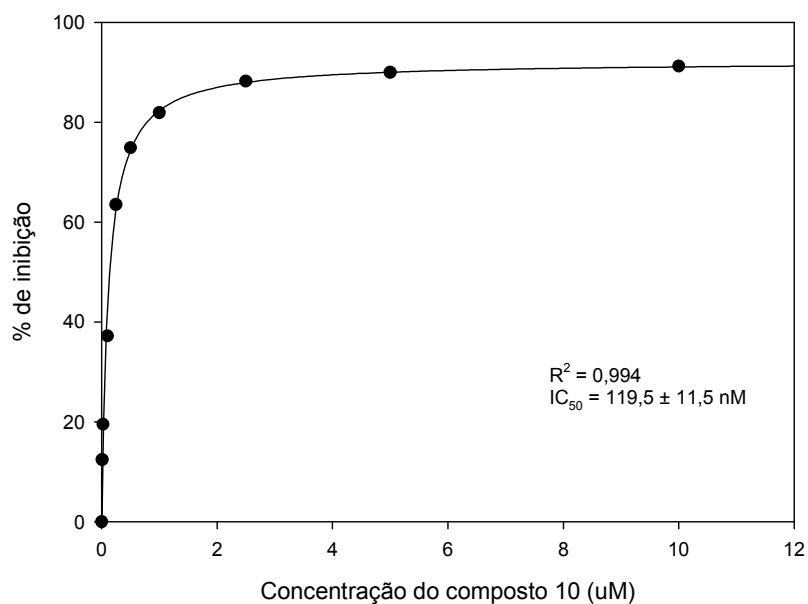


Figura 4.20. Curva dose-resposta para o composto 10 no *HsPNP-IMER*.

Através das curvas ilustradas nas Figuras 4.19 e 4.20 verificou-se que o biorreator preparado com a enzima PNP humana identifica inibidores concentração-dependente, onde um aumento na concentração do inibidor resulta em um aumento na porcentagem de inibição. Para o composto 8, obteve-se uma IC_{50} de $1,83 \pm 0,20 \mu\text{M}$, e de $119,5 \pm 11,5 \text{ nM}$ para o composto 10. Estes resultados demonstram que o *HsPNP-*

IMER é capaz de reconhecer inibidores com diferentes potências inibitórias e que o modelo proposto pode também ser empregado na caracterização destes ligantes.

4.2.11. Determinação do mecanismo de inibição e do K_i para inibidores da *HsPNP*

O valor da constante de inibição (K_i) evidencia a afinidade do inibidor pela enzima alvo na formação do complexo enzima-inibidor, e é um importante parâmetro a ser determinado nos estudos de caracterização de um novo ligante.

Para a determinação do mecanismo e constante de inibição dos compostos 8 e 10, foram construídos gráficos de duplo-recíproco, como ilustrado nas Figuras 4.21 e 4.22, em que a curva de menor inclinação corresponde à cinética na ausência do inibidor, e as demais curvas foram realizadas em concentrações crescentes do ligante.

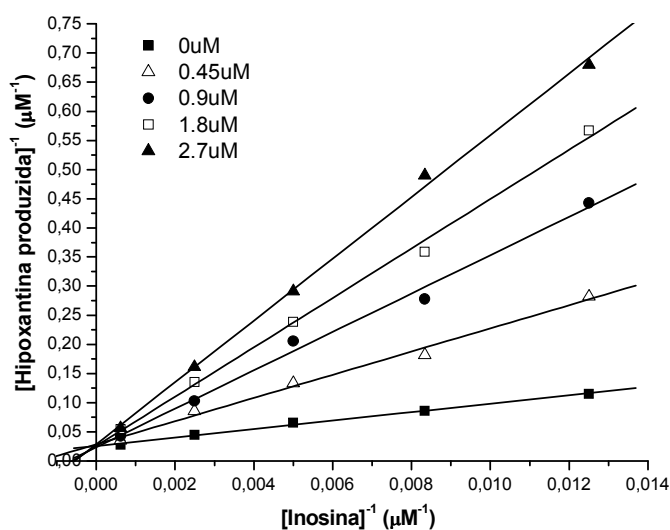


Figura 4.21. Gráfico de duplo recíproco para o composto 8 no *HsPNP*-IMER.

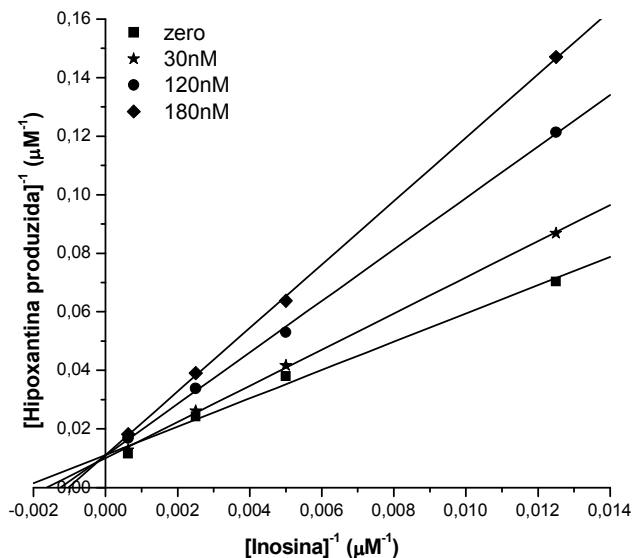


Figura 4.22. Gráfico de duplo recíproco para o composto 10 no *HsPNP-IMER*.

Como pode ser observado no gráfico, os inibidores 8 e 10 exibem um comportamento característico de inibição competitiva com o substrato inosina. As Figuras 4.21 e 4.22 mostram um conjunto de gráficos duplo recíproco na ausência do inibidor e em três diferentes concentrações dos inibidores avaliados. O aumento da concentração do ligante resulta em um conjunto de linhas que interceptam o eixo Y ($1/V_{MAX}$) no mesmo ponto, mas com inclinações (K_M/V_{MAX}) diversas e interceptando a abscissa ($-1/K_M$) em valores diferentes. Ou seja, a velocidade máxima da reação enzimática não é afetada devido a presença do inibidor, enquanto K_M^{app} , definido como $K_M (1+[I]/K_i)$, aumentou com o aumento da concentração do inibidor, comportamento característico de um inibidor competitivo. Este mesmo modo de inibição foi observado também nos experimentos com a enzima em solução e eram previstos, considerando que os inibidores possuem elevada similaridade estrutural com o substrato inosina.

A determinação da constante de inibição, K_i , é particularmente relevante neste estudo, onde os valores de IC_{50} foram determinados empregando-se apenas uma concentração de substrato. De uma maneira geral, os valores de IC_{50} para inibidores competitivos tendem a diminuir em concentrações menores de substrato¹⁰². A partir da intersecção com o eixo x, de gráficos construídos plotando-se K_M^{app}/V_{max}^{app} , pode-se obter os valores de K_i para os inibidores 8 e 10, como representado na Figura 4.23.

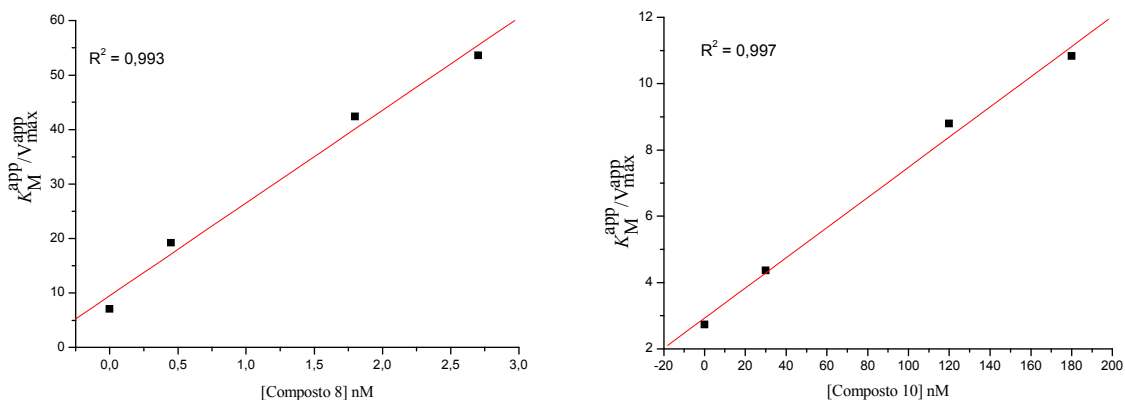


Figura 4.23. Determinação de K_i para os inibidores 8 e 10 da *HsPNP* imobilizada.

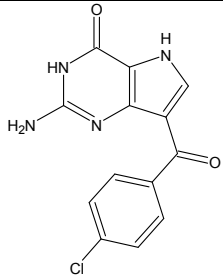
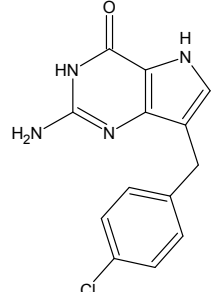
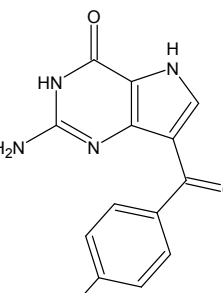
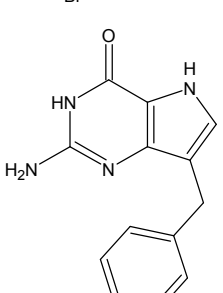
O composto 10 apresentou elevada afinidade pela enzima, com $K_i = 64,3 \pm 0,2$ nM, enquanto nos ensaios em solução obteve-se do $K_i = 12 \pm 2$ nM. Para o composto 8, obteve-se $K_i = 0,56 \pm 0,08$ μ M (valor de K_i em solução não determinado para este inibidor).

Os resultados obtidos demonstram que o *HsPNP*-IMER é uma excelente alternativa para a triagem e caracterização de inibidores, principalmente por se tratar de um ensaio enzimático direto e seletivo, e devido a possibilidade de reutilizar a mesma enzima em diversos ensaios. Assim, os IMERs preparados com as enzimas *PNP* humana e de *S.mansoni* foram utilizados na triagem de novos inibidores.

4.2.12. Emprego dos *SmPNP* e *HsPNP*-IMERs na triagem de novos ligantes

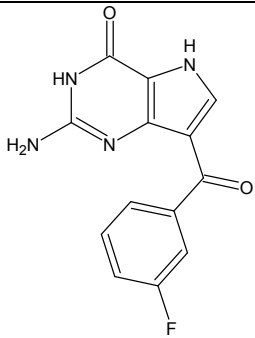
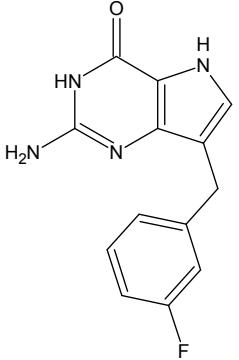
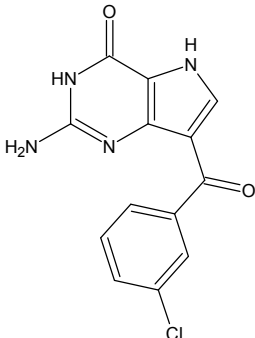
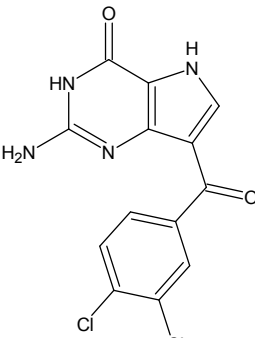
Após a caracterização dos *Sm* e *HsPNP*-IMER, através de estudos cinéticos, e da sua validação no reconhecimento de ligantes, os biorreatores foram empregados na triagem de novos inibidores em uma coleção de derivados de 7-deazaguanina, sintetizada e gentilmente cedida pelo Grupo da Profa. Dra. Arlene G. Côrrea. A atividade inibitória para o *HsPNP*-IMER e o *SmPNP*-IMER desta coleção foi avaliada a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, como descrito nas seções 3.14 e 3.18. Os resultados obtidos e as estruturas dos compostos avaliados são mostrados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Resultados da triagem realizada com os derivados de 9-deazaguanina contra o *HsPNP-IMER* e *SmPNP-IMER*.

Código	Estrutura	% de Inibição a 200 μ M	
		<i>HsPNP-IMER</i>	<i>SmPNP-IMER</i>
11		7,13	2,52
12		68,0	11,9
13		19,8	12,8
14		63,9	0,0

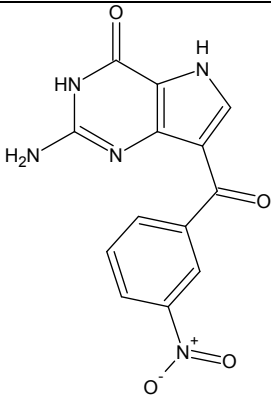
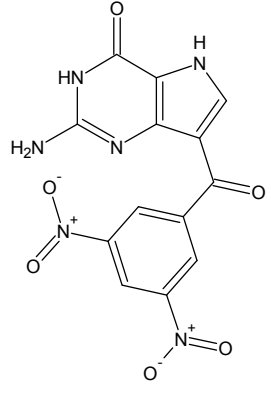
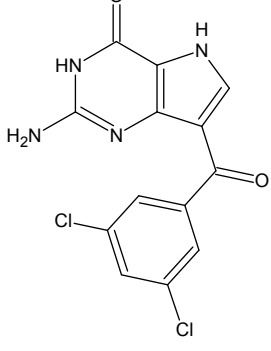
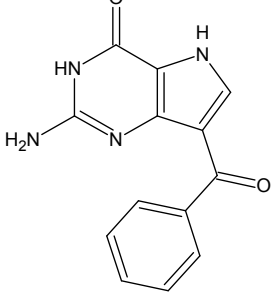
Continua

Continuação da Tabela 4.8

15		0,0	0,0
16		37,3	4,73
17		0,0	6,39
18		0,0	4,21

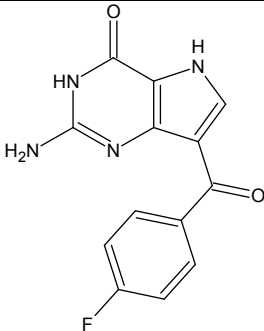
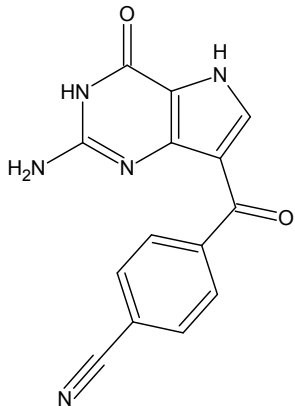
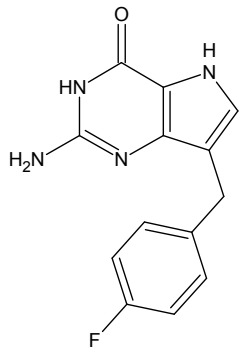
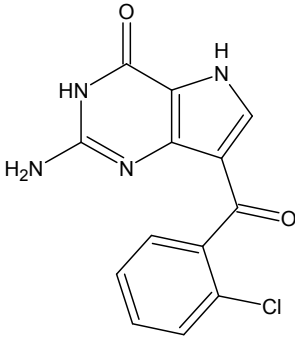
Continua

Continuação da Tabela 4.8

19		25,7	1,50
20		74,6	0,0
21		0,0	3,75
22		0,0	0,0

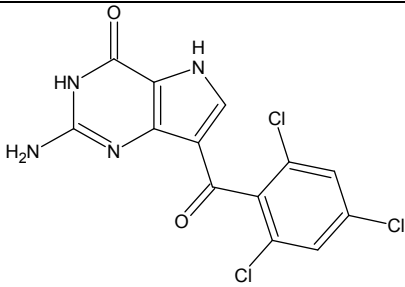
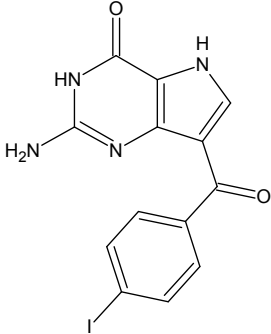
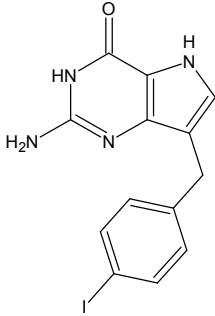
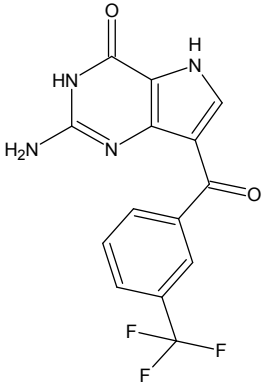
Continua

Continuação da Tabela 4.8

23		0,0	0,0
24		0,0	0,0
25		47,9	0,0
26		0,0	0,0

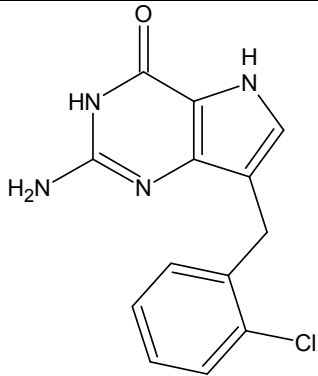
Continua

Continuação da Tabela 4.8

27		0,0	0,0
28		0,0	0,0
29		41,8	8,62
30		60,7	7,02

Continua

Continuação da Tabela 4.8

31		0,0	0,72
Padrão*	DI4G	95,6	0,0

*DI4G é um inibidor seletivo da *Hs*PNP. A enzima *Sm*PNP ainda não possui um inibidor padrão para ser utilizado nos ensaios.

Dentre os compostos da série avaliada, nenhum deles apresentou um elevado potencial de inibição para os dois biorreatores avaliados. Apenas 4 compostos (12, 14, 20 e 30) apresentaram %I > 60% a 200 μ M para a enzima *Hs*PNP. No entanto, analisando-se o percentual de inibição destes compostos em concentrações maiores, não foi possível atingir %I > 90%, o que inviabiliza o cálculo da IC₅₀. Este estudo demonstrou a aplicabilidade dos *Hs* e *Sm*PNP-IMERs nos estudos de triagem, fornecendo rapidamente dados de inibição e seletividade.

4.3. Ensaios de afinidade por cromatografia frontal

4.3.1. Experimentos de classificação de ligantes por cromatografia de afinidade frontal utilizando o *Hs*PNP-IMER

Como descrito na seção 3.21, considerando a aplicação do *Hs*PNP-IMER em ensaios por FAC-MS, a primeira etapa do estudo consistiu na avaliação da estabilidade da enzima livre em solução em um tampão volátil, compatível com MS. A atividade da enzima no tampão controle (TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0) e no tampão volátil (acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0) foi avaliada por 7 dias. Após esse período, verificou-se que a enzima no tampão utilizado como controle perdeu 34% de sua atividade inicial, enquanto a *Hs*PNP no tampão acetato de amônio 5

mmol.L⁻¹ pH 7,0 perdeu 26% de sua atividade inicial. Assim, conclui-se que a substituição do tampão utilizado nos ensaios de atividade (TRIS-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,4) pelo tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0 não afetaria a estabilidade da enzima nos ensaios de FAC-MS, e, portanto, este tampão foi estabelecido para uso nos estudos de afinidade.

O primeiro experimento realizado para validar o uso do *HsPNP-IMER* no reconhecimento de ligantes em mistura com diversas afinidades através dos estudos por FAC-MS envolveu a infusão contínua de uma mistura de três compostos com diferentes capacidades inibitórias de acordo com os ensaios por cromatografia zonal: composto 15 (sem atividade inibitória), composto 8 (IC₅₀ 1,83 μM) e composto 10 (IC₅₀ 0,12 μM), cujas estruturas são apresentadas na Figura 4.24.

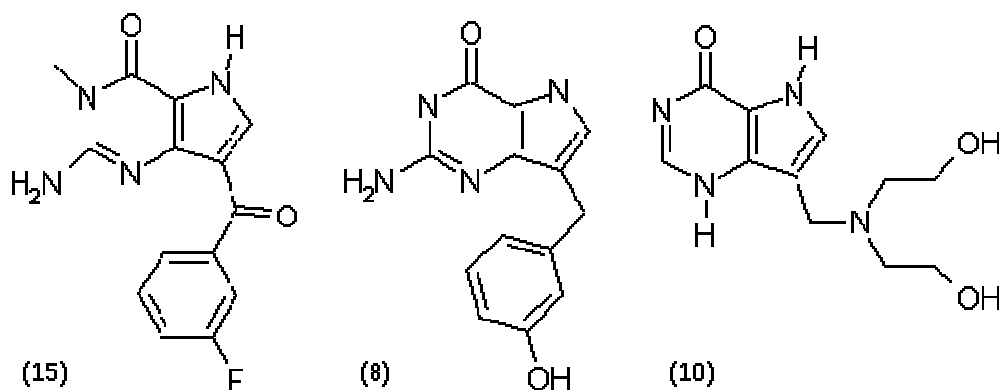
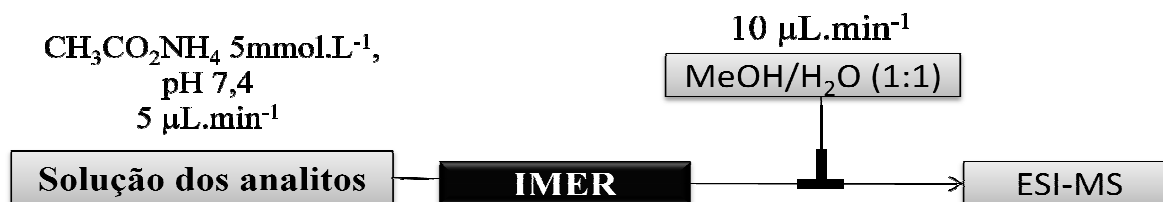


Figura 4.24. Estruturas dos compostos selecionados para os experimentos de *ranking* por cromatografia de afinidade frontal.

De uma maneira geral, os inibidores devem possuir afinidade pela proteína, uma vez que para inibir a atividade enzimática, o composto deve interagir com o sítio ativo. Nos ensaios por cromatografia de afinidade frontal, os ligantes com maior afinidade devem permanecer mais tempo retidos no biorreator, eluindo mais tardiamente. No início da análise, a quantidade de analito infundido que elue é baixa, devido a grande quantidade de sítios disponíveis para interagir. Posteriormente tem-se uma grande fração dos sítios da biomolécula ligados ao analito, e assim a quantidade de analito que elue aumenta gradativamente. Em seguida, o IMER fica saturado e a

concentração de analito que elue é igual a concentração infundida. A eluição dos compostos foi acompanhada por ESI-MS/MS, como descrito na seção 3.22 e com o sistema configurado segundo ilustrado no esquema 4.2.



Esquema 4.2. Sistema FAC-ESI-MS/MS utilizado.

Nestas condições, foi obtido o perfil cromatográfico apresentado na Figura 4.25 abaixo.

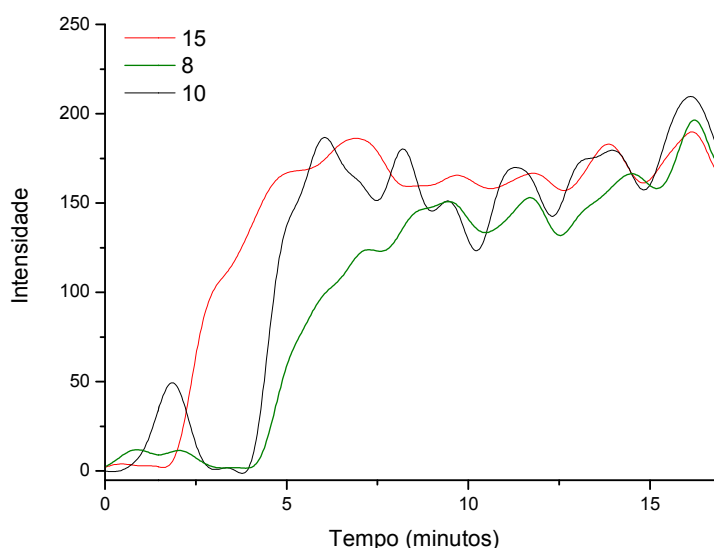


Figura 4.25. Perfil obtido por FAC-ESI-MS/MS no experimento de classificação com os compostos 15 (sem atividade inibitória), 8 (IC₅₀ 1,83 µM) e 10 (IC₅₀ 0,12 µM), a concentração de 100 nM de cada composto, utilizando a coluna capilar aberta como suporte.

O ensaio de classificação realizado demonstrou que o *HsPNP*-IMER é capaz de discriminar as diferenças de afinidade entre inibidores e não inibidores. O composto 15, que não possui atividade inibitória contra a *HsPNP*, eluiu primeiro, com um volume de ruptura (V , *breakthrough volume*) de 16 µL, indicando que não possui afinidade pela enzima. Enquanto os compostos 8 e 10, que são inibidores da *HsPNP*,

permanecem um maior tempo retidos no biorreator, eluindo mais tardiamente, com volumes de ruptura de 25,5 μL e 23 μL , respectivamente. No entanto, os resultados demonstram uma falta de correlação entre a atividade inibitória e a afinidade pela biomolécula. O composto 8 ($\text{IC}_{50} = 1,83 \mu\text{M}$) é um inibidor menos potente que o 10 (com $\text{IC}_{50} 0,12 \mu\text{M}$), e possui maior afinidade pela enzima, com maior volume de ruptura ($V_8 = 25,5 \mu\text{L}$ e $V_{10} = 23 \mu\text{L}$). Uma correlação entre atividade funcional e afinidade é descrita na literatura também para inibidores enzimáticos^{5,60,76}, o que torna estes resultados intrigantes.

A inversão observada na relação afinidade/atividade inibitória pode ser causada por alguns fatores, como: i) interações secundárias com o suporte (interações não-específicas); ii) falta de fosfato na fase móvel durante os ensaios de FAC-MS; iii) interações inespecíficas dos ligantes com outras regiões da proteína, que não o sítio ativo.

A hipótese (i), da presença de interações secundárias com o suporte, é pouco relevante para o estudo apresentado, devido ao uso da coluna de sílica fundida tubular aberta, onde a proteína se liga diretamente as paredes do capilar, impedindo interações secundárias com o suporte. No entanto, o emprego de outros suportes também foi avaliado e será discutido posteriormente.

A hipótese (ii) considera que a falta de fosfato na fase móvel durante os ensaios de FAC-MS pode causar alterações estruturais na conformação da proteína que resultem na alteração da relação afinidade/atividade observada. O fosfato atua como segundo substrato, e nos estudos por cromatografia zonal foi demonstrada a importância de sua concentração na atividade enzimática. No entanto, o fosfato foi retirado da fase móvel nos estudos de FAC-MS para preservar o espectrômetro de massas, por se tratar de um tampão não-volátil.

A hipótese (iii) questiona a possibilidade de interações inespecíficas entre o ligante 8 e a proteína. Quando a atividade inibitória é avaliada, observa-se o efeito apenas das interações entre o ligante (inibidor) e o sítio ativo, que resulta na inibição da atividade enzimática. No entanto, quando se avalia a afinidade, o ligante pode possuir interações também com regiões da proteína diferentes do sítio ativo (interações inespecíficas), o que resultaria numa interação que não reflete na atividade

enzimática. Esta hipótese pode ser esclarecida comparando-se os valores das respectivas constantes de dissociação (K_i e K_d) dos compostos estudados. A constante K_i mede a dissociação do complexo enzima-inibidor, e é calculada medindo-se o efeito da presença de diferentes concentrações de inibidor nas constantes cinéticas (K_M e V_{MAX}) da enzima, através de ensaios de atividade enzimática, e portanto, se restringe a interações entre o inibidor e a proteína que resultem em alteração da atividade enzimática. No caso de inibidores competitivos puros, como os compostos 8 e 10 para a *HsPNP*, essas interações ocorrem especificamente com o sítio ativo. A constante K_d corresponde a dissociação do complexo enzima-ligante, e avalia a força das interações entre o ligante e a enzima como um todo, e é calculada através de ensaios de bioafinidade. Dessa forma, se um inibidor, em um ensaio de afinidade, interagir com uma região da enzima diversa do sítio ativo, possuirá um K_d menor que o K_i . Caso seja um inibidor específico, que interage somente com o sítio ativo, o K_d será igual ao K_i .

Outro resultado interessante que pode ser observado no perfil de FAC-MS apresentado na Figura 4.25 é o efeito “*roll-up*”, descrito pela primeira vez por Chan e colaboradores⁵⁷. O fenômeno de “*roll-up*” ocorre quando ligantes com diferentes afinidades são infundidos na mesma mistura. Ligantes com diferentes valores de K_d atravessam a coluna com velocidades diferentes: ligantes mais fracos eluem mais rapidamente que ligantes mais fortes. Quando co-infundidos, um deslocamento do ligante mais fraco ocorre quando a curva de saturação do ligante mais forte passa por uma área do biorreator através da qual o ligante mais fraco já passou. O deslocamento do ligante fraco, devido a maior afinidade do ligante forte pela enzima, aumenta a quantidade de ligante fraco que elue, dando origem a um excesso temporário na concentração⁵⁷. O fenômeno de “*roll-up*” pode ser observado no início da curva de saturação do composto 8 (0,5 a 3,1 minutos) apresentado na Figura 4.25, indicando também que este composto é o ligante mais fraco da *HsPNP* nas condições de análise utilizadas.

4.3.2. Estudo da recuperação da atividade de *HsPNP*-IMERs após o uso nos ensaios FAC-MS

Os ensaios FAC-MS envolvendo o *ranking* dos compostos selecionados foram realizados empregando-se IMERs com 5 cm de comprimento, como descrito na seção 3.22. Antes da primeira análise o biorreator foi condicionado com o tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0 por 10 minutos. Em seguida a mistura foi infundida e então, após a análise, o biorreator foi lavado com tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0 por 30 minutos e uma nova infusão foi realizada. No entanto, utilizando-se esse procedimento, observou-se a falta de reprodutibilidade entre os perfis FAC-MS obtidos. Após a primeira infusão de ligantes em um biorreator novo, as diferenças nos volumes de retenção para cada ligante não se reproduziam: todos os ligantes saíam no mesmo volume de saturação do composto 15 (que não inibe a enzima), aproximadamente 16 µL. A perda de seletividade do *HsPNP*-IMER passou a ser investigada, e avaliando-se a atividade do biorreator antes e após a infusão da mistura de ligantes nos ensaios por FAC-MS, observou-se uma perda de 81% da atividade enzimática inicial.

A perda de seletividade foi então relacionada a perda da atividade enzimática, causada por possíveis modificações estruturais ou pelo bloqueio dos sítios catalíticos quando a mistura de ligantes foi infundida. Assim, a série de procedimentos de lavagem descrita na seção 3.26 foi realizada em *HsPNP*-IMERs após o uso nos ensaios FAC-MS. Na seleção das soluções de lavagem foram considerados: diferentes pHs, que poderiam causar modificações estruturais na proteína; lavagem por um tempo prolongando; lavagem com solução de inosina, devido a sua elevada afinidade pelo sítio catalítico; lavagem com diferentes vazões do tampão utilizado no ensaio; lavagem com diferentes concentrações e vazões do tampão fosfato, por atuar como segundo substrato; infusão de solução de inosina e fosfato; e adição de solvente orgânico na solução. Todas as condições avaliadas foram selecionadas visando eluir os ligantes que poderiam estar bloqueando o sítio catalítico.

A atividade do biorreator antes e após cada experimento foi mensurada através do método cromatográfico multidimensional. Nenhuma das condições estudadas resultou na recuperação da atividade enzimática.

Para excluir a possibilidade do tampão, nas condições de FAC-MS, estar interferindo na estabilidade do biorreator, foi simulada uma infusão por FAC-MS, utilizando-se um IMER novo, onde apenas o tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0 foi infundido por 40 minutos a 5 µL.min⁻¹. Verificou-se que nesta condição a atividade enzimática não foi afetada.

Outro teste realizado consistiu na infusão de uma solução contendo 100 nmol.L⁻¹ de inosina em tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0 por 40 minutos, em um biorreator novo, a 5 µL.min⁻¹. Nesta condição a enzima perdeu cerca de 90% de sua atividade inicial.

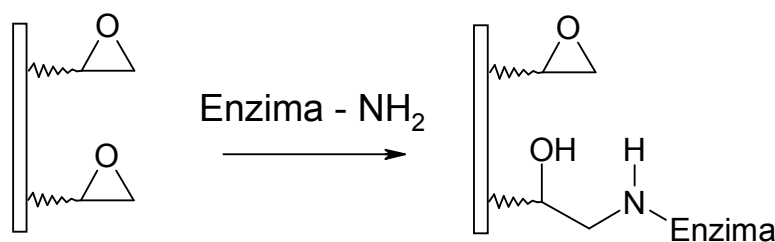
Em outro experimento, uma solução contendo 100 nmol.L⁻¹ de inosina e 1 µmol.L⁻¹ de fosfato em tampão acetato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0 foi infundida em um IMER novo por 40 minutos a 5 µL.min⁻¹. Nesta análise, a enzima imobilizada perdeu apenas 30% de sua atividade inicial. Este ensaio demonstrou que um dos fatores mais relevantes para a perda da atividade enzimática é a falta de fosfato na solução que é infundida no *HsPNP*-IMER.

A adição de fosfato na solução infundida no biorreator se torna inviável uma vez que a eluição dos compostos é monitorada por MS. Os procedimentos de lavagem avaliados, visando a recuperação da atividade do IMER após seu uso em um único ensaio por FAC-MS, mostraram-se ineficazes. Dessa forma, estabeleceu-se que cada *HsPNP*-IMER com 5 cm de comprimento seria utilizado em uma única análise FAC-MS, e então descartado.

4.3.3. Estudo da aplicação de novos suportes capilares para os ensaios por cromatografia de afinidade frontal

Diante dos resultados obtidos com a coluna capilar de sílica fundida tubular aberta, e também considerando a importância do estudo da aplicação de novos suportes nos ensaios por cromatografia de afinidade frontal, foi avaliado o emprego de dois novos capilares monolíticos, i) baseado em sílica-epóxi e ii) polimérico orgânico-epóxi²⁹, como suportes para a imobilização da *HsPNP*. O capilar monolítico baseado em sílica epóxi foi desenvolvido pela Merck® e gentilmente cedido para a realização deste estudo. No entanto, ainda não é disponível comercialmente, pois passa por

processos de otimização. O capilar monolítico polimérico foi desenvolvido pelo grupo do Prof. Gasparini, da Universidade de Roma, e já foi anteriormente utilizado para a imobilização de tripsina na análise de proteínas²⁹. As condições utilizadas no processo de imobilização da *HsPNP*, como pH, força iônica, tampões utilizados foram selecionados com base em estudos previamente realizados para a imobilização da α -quimotripsina em suportes epóxi. O esquema 4.3 representa a reação envolvida.



Esquema 4.3. Representação esquemática da imobilização de enzimas em suportes derivados com grupo epóxi.

Com descrito na seção 3.24, após a eluição da enzima, e sua imobilização através da formação de ligações covalentes com os grupos epóxidos presentes no suporte, uma solução concentrada de glicina é eluída através do capilar. A glicina bloqueia os grupos epóxidos que não reagiram no processo de imobilização, resultando em um suporte com superfície hidrofílica inerte¹⁴².

Após o preparo dos biorreatores, estes foram empregados nos estudos de caracterização da *HsPNP* imobilizada através da determinação por cromatografia zonal dos parâmetros cinéticos, como descrito na seção 3.26. O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados coletados, gerando a curva de Michaelis-Menten em função da concentração do substrato inosina, sendo assim determinado o valor de K_M para os dois novos IMERs, como ilustrado na Figura 4.26 e 4.27.

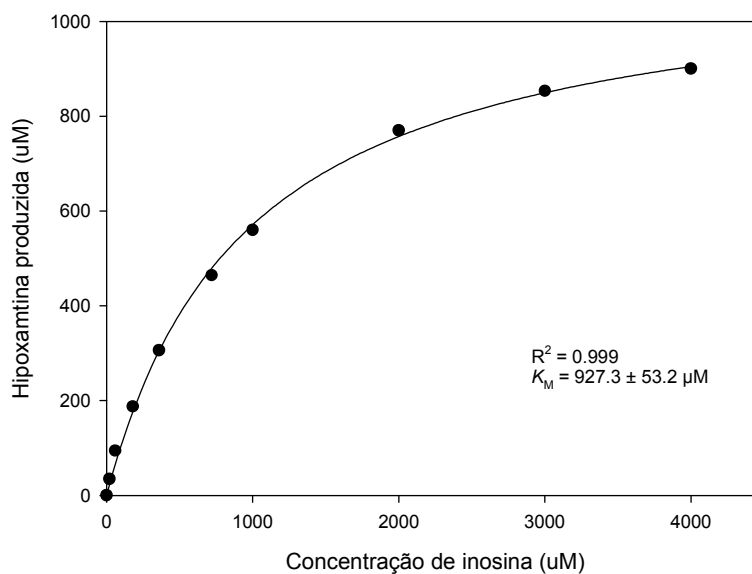


Figura 4.26. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo IMER- *Hs*PNP preparado com o capilar monolítico baseado em polímero orgânico epóxi, variando-se a concentração de inosina, com 5 mmol.L^{-1} de fosfato na amostra.

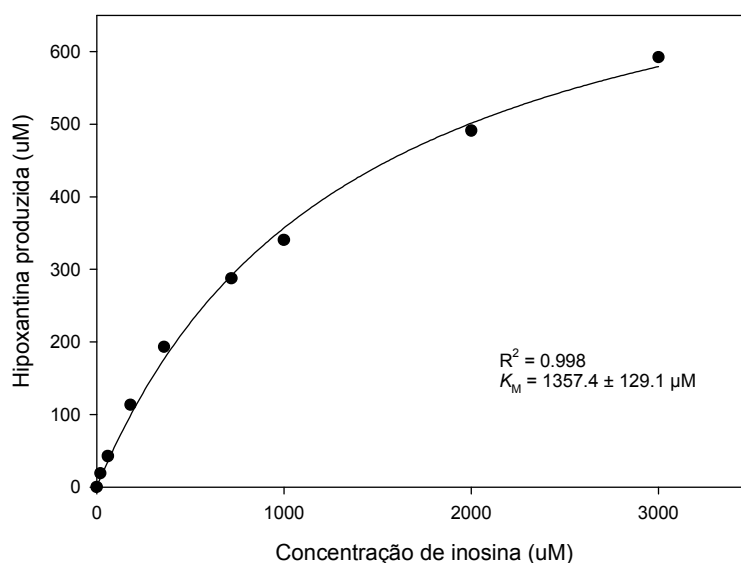


Figura 4.27. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de hipoxantina pelo IMER- *Hs*PNP preparado com o capilar monolítico baseado em sílica epoxi, variando-se a concentração de inosina, com 5 mmol.L^{-1} de fosfato na amostra.

O perfil das hipérboles obtidas nos estudos cinéticos com os novos biorreatores está de acordo com a equação de Michaelis-Menten. Em concentrações baixas de substrato ($[S] \ll K_M$), a velocidade da reação V_0 é diretamente proporcional

à concentração do substrato. Já em elevadas concentrações do substrato ($[S] \gg K_M$), V_0 se aproxima do seu máximo e a velocidade da reação se torna independente da concentração do substrato, o que pode ser observado na hipérbole mostrada nas Figuras 4.26 e 4.27.

Os valores obtidos para a constante de Michaelis-Menten para a enzima livre em solução e imobilizada nos três suportes selecionados são apresentados na Tabela 4.9 abaixo.

Tabela 4.9. Valores de K_M para a *HsPNP* livre e imobilizada nos suportes selecionados e capacidade máxima de produção de hipoxantina dos biorreatores preparados.

Sistema	K_M ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	K_M imobilizada / K_M livre	Produção máxima de hipoxantina ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Livre em solução	133,2	-	-
Capilar tubular aberto	254,6	1,91	84,77
Capilar monolítico polimérico orgânico epóxi	927,3	6,96	902,6
Capilar monolítico baseado em sílica epóxi	1357,4	10,2	594,2

Os resultados obtidos apresentados na Tabela 4.9, demonstram que a imobilização da *HsPNP* nos suportes derivados com grupos epóxido afetaram mais a afinidade da enzima pelo substrato do que quando a enzima é imobilizada na coluna capilar tubular aberta através do uso do glutaraldeído como espaçador. Estes novos suportes podem ter interferido substancialmente na difusão do substrato, afetando suas concentrações nas regiões próximas a enzima e resultando em uma maior resistência a transferência de massa. Este efeito se torna mais pronunciado quando o suporte empregado é o capilar monolítico baseado em sílica-epóxi, no qual a proteína se liga aos grupos epóxidos presentes nos poros da sílica.

Tendo em vista que os ensaios de classificação por cromatografia de afinidade frontal dependem da habilidade da separação frontal de ligantes com diferentes afinidades, a presença de um número maior de sítios de interação na coluna proporciona uma maior resolução das curvas de saturação. Assim, colunas com uma maior quantidade de biomolécula imobilizada (maior B_t) podem ser utilizadas para aumentar a resolução das curvas de saturação. No entanto, a escolha do suporte deve ser feita de maneira minuciosa, a fim de não aumentar o número de interações não-específicas entre os ligantes avaliados e o suporte selecionado ⁶³. Dessa forma, o emprego destes novos biorreatores nos ensaios por cromatografia de afinidade frontal foi avaliado. Foram utilizadas as mesmas condições empregadas nos experimentos de classificação, descritas na seção 3.22. As Figuras 4.28 e 4.29 ilustram os perfis cromatográficos obtidos.

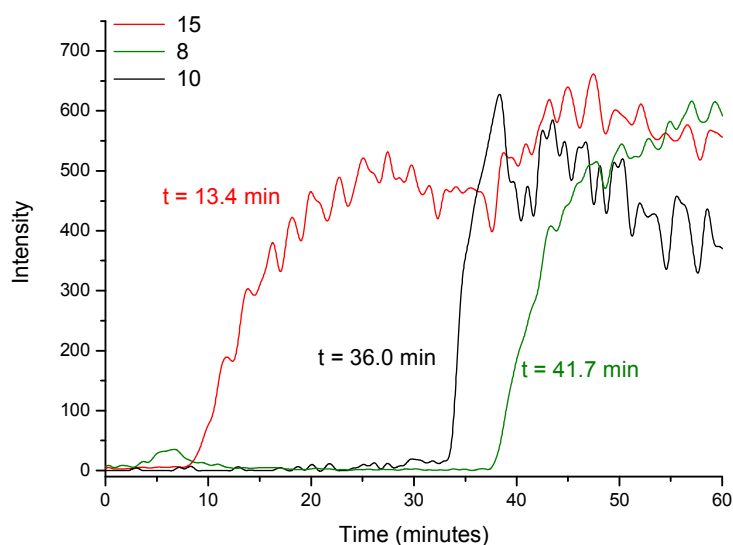


Figura 4.28. Perfil obtido por FAC-ESI-MS/MS no experimento de classificação com os compostos 15 (sem atividade inibitória), composto 8 (IC_{50} 1,83 μ M) e composto 10 (IC_{50} 0,12 μ M, a concentração de 100 nM de cada composto, utilizando a coluna capilar com monolito polimérico orgânico epóxi como suporte.

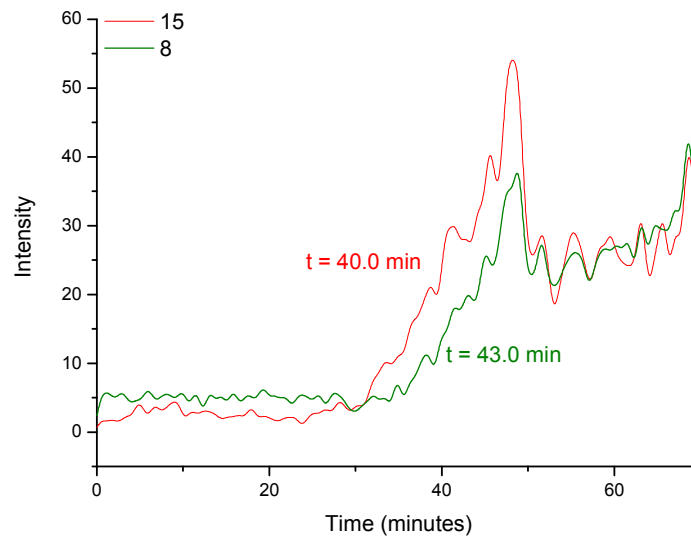


Figura 4.29. Perfil obtido por FAC-ESI-MS/MS no experimento de ranking com os compostos 15 (sem atividade inibitória), composto 8 (IC_{50} 1,83 μ M) e composto 10 (IC_{50} 0,12 μ M), a concentração de 100 nM de cada composto, utilizando a coluna capilar com monólito baseado em sílica como suporte.

O perfil cromatográfico mostrado na Figura 4.28 obtido empregando o capilar com monólito polimérico orgânico epóxi como suporte, apresenta as curvas de saturação para os três compostos avaliados com uma resolução muito maior do que aquele obtido com o capilar tubular aberto. A maior resolução das curvas de saturação está associada a maior quantidade de enzima imobilizada, o que pode ser observado através dos dados de capacidade máxima de conversão de inosina a hipoxantina para cada biorreator preparado, Tabela 4.9, onde verifica-se uma maior atividade enzimática para este biorreator em relação ao preparado com capilar tubular aberto. Empregando-se como suporte uma coluna capilar com diâmetro maior (diâmetro interno de 0,25 mm, enquanto para a coluna tubular aberta tem-se um diâmetro interno de 0,10 mm), e preenchida com monólito polimérico, é possível imobilizar uma quantidade maior de enzima. Além de ter-se uma área superficial interna maior no capilar com monólito polimérico, quando se utiliza esse suporte, a enzima não se liga a parede do capilar, mas a todo o material contido na coluna.

Na Figura 4.28 observa-se também a mesma ordem de eluição obtida quando o capilar tubular aberto foi utilizado nos experimentos de classificação. O

composto 8, inibidor menos potente, também demonstrou maior afinidade no *HsPNP*-IMER preparado com o capilar com monólito polimérico orgânico-epóxi. Este resultado evidencia que a inversão na ordem de afinidade, com relação a ordem de potência inibitória, não está associada a interações não-específicas com o suporte, como discutido na hipótese (i) da seção 4.2.7.

Apesar dos resultados promissores obtidos nos perfis por cromatografia de afinidade frontal, este suporte apresentou baixa resistência mecânica, rompendo-se facilmente durante o manuseio do biorreator para a realização das análises. Em contato com o Prof. Gasparini, que desenvolveu este suporte, obteve-se a informação que esta mesma dificuldade é encontrada também em outras aplicações do capilar com monólito polimérico orgânico-epóxi, e pode estar associada ao método de preparo do suporte.

Na Figura 4.29 observa-se o perfil cromatográfico referente ao experimento de classificação com o biorreator preparado com o capilar monolítico baseado em sílica epóxi. Neste estudo foi infundida uma mistura contendo os três ligantes, no entanto observam-se as curvas de saturação de apenas dois deles. Devido a elevada pressão de retorno deste suporte, a vazão da infusão nos ensaios por FAC-ESI-MS/MS foi reduzida de $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. O emprego de uma vazão menor prejudicou a sensibilidade do método, além disso o composto 10 não possui uma amina primária ligada a 9-deazaguanina (Figura 4.24) em sua estrutura e, portanto, em solução tem menor ionização dificultando a detecção.

Dessa forma, o *HsPNP*-IMER preparado com o capilar tubular aberto apresentou diversas vantagens frente aos demais suportes avaliados, como baixa pressão de volta, elevada resistência mecânica e menor alteração no valor de K_M . Por isso este IMER foi selecionado para os estudos de determinação das constantes de dissociação (K_d).

4.3.4. Determinação da constante de dissociação (K_d) para o composto 10

Para avaliar a aplicabilidade do *HsPNP*-IMER na caracterização dos ligantes por FAC-ESI-MS/MS, e também a fim de se elucidar a inversão observada na

relação afinidade/ potência inibitória, como discutido na hipótese (iii) da seção 4.2.7, através da investigação da especificidade da interação ligante-enzima, o valor da constante de dissociação (K_d) para o composto 10 foi obtida como descrito na seção 3.26. Para isso, foram infundidas concentrações entre 80 e 200 nmol.L⁻¹ do composto 10, e os volumes de ruptura foram obtidos como descrito na seção 3.22. O composto 15 foi utilizado como marcador de volume morto (V_0). Traçando-se o inverso da diferença entre os volumes de eluição do composto 10 avaliado em diferentes concentrações $(V-V_0)^{-1}$ em função da concentração do composto 10 injetado $[10]_0$, obtém-se a quantidade de biomolécula imobilizada B_t (inverso da inclinação da reta) e a constante de dissociação K_d (intercepção com o eixo x)⁵², como ilustrado na Figura 4.30.

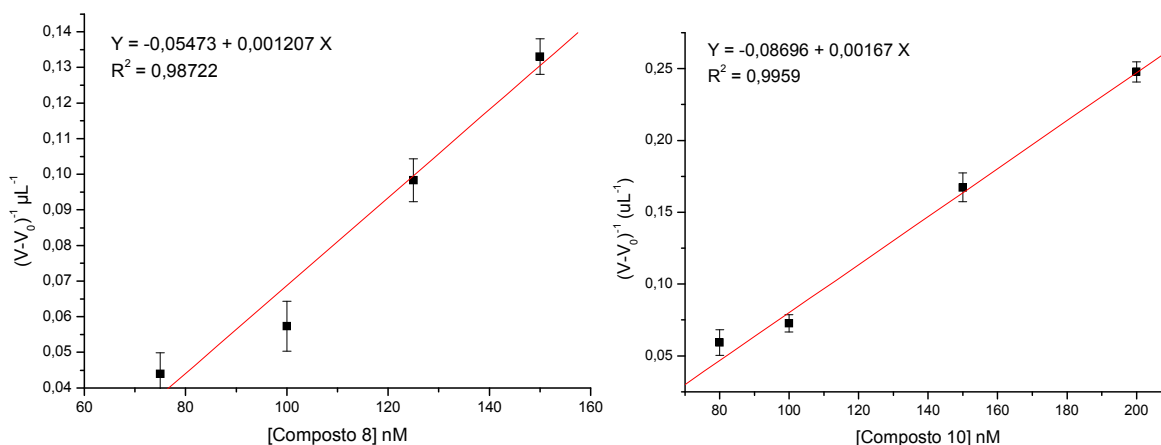


Figura 4.30. Gráfico traçado para a obtenção de K_d para o composto 8 e 10, e cálculo de B_t para o *HsPNP-IMER*.

A partir do gráfico construído, obteve-se $B_t = 598,8 \pm 49,69$ mmol para o *HsPNP-IMER* preparado com a coluna tubular aberta, e $K_d = 52,1 \pm 9,15$ nmol.L⁻¹ para o composto 10. Do gráfico construído para o cálculo da K_d para o composto 8, obteve-se $B_t = 828,5 \pm 68,3$ mmol e $K_d = 45,3 \pm 12,1$ nM. Os dois diferentes *HsPNP-IMERS* utilizados para o cálculo das constante de dissociação dos dois compostos selecionados foram preparados em momentos distintos, e utilizando enzimas purificadas em diferentes lotes. Considerando-se este fator, e comparando-se os valores de B_t obtidos para os diferentes *IMERS*, pode-se considerar que o preparo dos biorreatores foi reprodutível.

A constante de dissociação para o ligante 10 está bem próxima do valor obtido para a constante de inibição ($64,3 \pm 0,2 \text{ nmol.L}^{-1}$). Os valores de K_i e K_d foram calculados a partir de dois modelos diversos, e apresentam boa correlação ($K_i/K_d = 0,81$). Considerando uma inibição competitiva com o substrato inosina, como discutido através dos ensaios por cromatografia zonal, a correlação entre esses dois valores implica numa inibição competitiva pura, ou seja, o inibidor interage especificamente com o sítio ativo, ocasionando a diminuição na atividade inibitória^{143,144}.

Por outro lado, a constante de dissociação calculada para o composto 8 ($45,3 \pm 12,1 \text{ nM}$) é bem menor que a sua respectiva constante de inibição ($560 \pm 80 \text{ nM}$), com uma relação $K_i/K_d = 12,4$. Esta diferença demonstra que este composto possui elevada afinidade pela *HsPNP*. No entanto, algumas das interações ligante-proteína não resultam na inibição da enzima, pois ocorrem em regiões distintas do sítio ativo e que não interferem na catálise enzimática (interações inespecíficas). Este resultado está de acordo com a classificação de ligantes realizada por FAC-MS (seção 4.3.1), que evidenciou que o composto 8 (inibidor menos potente da série selecionada) possui maior afinidade pela enzima do que o composto 10 (inibidor mais potente), resultando em um menor K_d para o composto 8.

O preparo do *HsPNP*-IMER foi uma etapa crucial do projeto desenvolvido. A seleção de uma enzima com inibidores conhecidos e caracterizados proporcionou a validação do emprego dos ensaios biocromatográficos propostos na triagem e caracterização de ligantes através do monitoramento da atividade enzimática por cromatografia zonal, e também através da avaliação da afinidade dos ligantes pela biomolécula, empregando-se a cromatografia de afinidade frontal acoplada a espectrometria de massas.

5. Conclusões

Os ensaios desenvolvidos por cromatografia zonal multidimensional foram eficazes na caracterização das enzimas imobilizadas através da determinação das constantes cinéticas (K_M) para cada IMER. Nos métodos de triagem desenvolvidos, a atividade inibitória de cada composto foi avaliada individualmente, através da quantificação *on line* da hipoxantina produzida pelos IMERs, sendo efetivo nos estudos de identificação e caracterização de novos ligantes. Além disso, os IMERs demonstraram ser uma ferramenta valiosa nos estudos seletividade de inibidores das PNP's estudadas. Este modelo de triagem permite também a reutilização da enzima em diversos ensaios, e requer uma pequena quantidade de amostra dos analitos. O curto tempo de análise e a especificidade e robustez dos ensaios desenvolvidos com os IMERs, associados ao uso de um auto-injetor, permite a triagem de aproximadamente cem compostos por dia, por meio de um sistema automatizado.

Os ensaios por cromatografia de afinidade frontal com o *Hs*PNP-IMER demonstraram ser uma estratégia promissora para a rápida classificação de ligantes quanto a afinidade pela enzima imobilizada. O IMER foi capaz de discriminar inibidores de não-inibidores através deste método. No entanto, não foi observada uma correlação entre afinidade e atividade inibitória, embora esta relação tenha sido relatada na literatura para outras coleções de enzimas e inibidores. Esta falta de correlação pode estar associada à composição da fase móvel (ausência de fosfato), ou às interações inespecíficas de um dos ligantes selecionados, o que foi evidenciado pelas comparações nos valores de K_d e K_i obtidos. Assim, quando um método de avaliação da afinidade é empregado como método de triagem, é necessário estudar se a interação com a biomolécula resulta na modulação da atividade biológica desejada.

Os resultados obtidos demonstram que os métodos propostos nesta tese representam uma ferramenta analítica valiosa na busca por novos ligantes específicos, de coleções sintéticas combinatórias ou de extratos naturais, no processo de descoberta de novos fármacos.

6. Referências Bibliográficas

1. RATTI, E. & TRIST, D., "The continuing evolution of the drug discovery process in the pharmaceutical industry". *Il Farmaco*. **56**(1-2): 13, 2001.
2. GÓMEZ-HENS, A. & AGUILAR-CABALLOS, M.P., "Modern analytical approaches to high-throughput drug discovery". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **26**(3): 171, 2007.
3. HERGENROTHER, P.J., "Obtaining and screening compound collections: a user's guide and a call to chemists". *Current Opinion in Chemical Biology*. **10**(3): 213, 2006.
4. HOUSTON, J.G. & BANKS, M., "The chemical-biological interface: Developments in automated and miniaturised screening technology". *Current Opinion in Biotechnology*. **8**(6): 734, 1997.
5. SLON-USAKIEWICZ, J.J.; NG, W.; DAI, J.-R.; PASTERNAK, A. & REDDEN, P.R., "Frontal affinity chromatography with MS detection (FAC-MS) in drug discovery". *Drug Discovery Today*. **10**(6): 409, 2005.
6. DE BOER, A.R.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W.M.A. & IRTH, H., "Mass spectrometry-based biochemical assays for enzyme-inhibitor screening". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. **26**(9): 867, 2007.
7. ZHU, Z. & CUOZZO, J., "High-throughput affinity-based technologies for small-molecule drug discovery". *Journal of Biomolecular Screening*. **14**(10): 1157, 2009.
8. 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.
9. NIE, Y.-I. & WANG, W.-H., "Immobilized enzyme reactor in on-line LC and its application in drug screening". *Chromatographia*. **69**: S5, 2009.
10. 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.
11. 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.
12. KAMIMORI, H. & KONISHI, M., "Evaluation and Application of Liquid Chromatographic Columns Coated with "Intelligent" Ligands. (III) Immobilized Enzyme Phospholipid Column". *Analytical Sciences*. **17**(9): 1085, 2001.
13. KALISZAN, R. & WAINER, I.W., *Combination of biochromatography and chemometrics: a potencial new research strategy in molecular pharmacology and drug design*, in *Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition*, JINNO, K., Editor. 1997, Wiley: New York. p. 273.
14. SANGHVI, M.; MOADDEL, R. & WAINER, I.W., "The development and characterization of protein-based stationary phases for studying drug-protein

- and protein-protein interactions". *Journal of Chromatography A*. **1218**(49): 8791, 2011.
15. 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.
 16. HOPKINS, A.L. & GROOM, C.R., "The druggable genome". *Nat Rev Drug Discov*. **1**(9): 727, 2002.
 17. COPELAND, R.A., *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. 2005, New York: Wiley. 265.
 18. BICKERSTAFF, G.F., *Immobilization of enzymes and cells: some practical considerations*, in *Immobilization of enzymes and cells*, BICKERSTAFF, G.F., Editor. 1997, Humana Press: New Jersey. p. 1.
 19. FANG, S.-M.; WANG, H.-N.; ZHAO, Z.-X. & WANG, W.-H., "Immobilized enzyme reactors in HPLC and its application in inhibitor screening: A review". *Journal of Pharmaceutical Analysis*, (in press)
 20. CARDOSO, C.L.; MORAES, M.C. & CASS, Q.B., "Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas". *Química Nova*. **32**(1): 175, 2009.
 21. BICKERSTAFF, G.F., *Immobilization of enzymes and cells*. 1997, Totowa, N.J.: Humana Press. xiv.
 22. 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.
 23. DE MORAES, M.C.; DUCATI, R.G.; DONATO, A.J.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; CARDOSO, C.L. & CASS, Q.B., "Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: A new approach for ligands identification and characterization". *Journal of Chromatography A*: in press, 2012.
 24. 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.
 25. STIGTER, E.C.A.; DE JONG, G.J. & VAN BENNEKOM, W.P., "Pepsin immobilized in dextran-modified fused-silica capillaries for on-line protein digestion and peptide mapping". *Analytica Chimica Acta*. **619**(2): 231, 2008.
 26. MARSZALL, M.P.; BUCINSKI, A.; GORYN,SKI, K.; PROSZOWSKA, A. & KALISZAN, R., "Magnetic beads method for determination of binding of drugs to melanin". *Journal of Chromatography A*. **1218**(2): 229, 2011.
 27. SUN, L.; LI, Y.; YANG, P.; ZHU, G. & DOVICH, N.J., "High efficiency and quantitatively reproducible protein digestion by trypsin-immobilized magnetic microspheres". *Journal of Chromatography A*. **1220**(0): 68, 2012.
 28. MOADDEL, R.; MARSZALL, M.P.; BIGHI, F.; YANG, Q.; DUAN, X. & WAINER, I.W., "Automated Ligand Fishing Using Human Serum Albumin-Coated Magnetic Beads". *Analytical Chemistry*. **79**(14): 5414, 2007.

29. CALLERI, E.; TEMPORINI, C.; GASPARRINI, F.; SIMONE, P.; VILLANI, C.; CIOGLI, A. & MASSOLINI, G., "Immobilized trypsin on epoxy organic monoliths with modulated hydrophilicity: Novel bioreactors useful for protein analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1218**(49): 8937, 2011.
30. 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**(1): 106, 2006.
31. CALLERI, E.; MASSOLINI, G.; LUBDA, D.; TEMPORINI, C.; LOIODICE, F. & CACCIALANZA, G., "Evaluation of a monolithic epoxy silica support for penicillin G acylase immobilization". *Journal of Chromatography A*. **1031**(1-2): 93, 2004.
32. BARTOLINI, M.; CAVRINI, V. & ANDRISANO, V., "Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies". *Journal of Chromatography*. **1031**(1-2): 27, 2004.
33. JOSIC, D.; SCHWINN, H.; STRANCAR, A.; PODGORNIK, A.; MILOS, B.; LIM, Y.-P. & VODOPIVEC, M., "Use of compact, porous units with immobilized ligands with high molecular masses in affinity chromatography and enzymatic conversion of substrates with high and low molecular masses". *Journal of Chromatography A*. **803**(1-2): 61, 1998.
34. WANG, S.; LI, Q.; LÜ, X.; LIU, T.; ZHANG, W.; GENG, L. & DENG, Y., "Preparation and evaluation of an enzymatic microreactor based on HILIC matrix for digestion and identification of proteins". *Chinese Science Bulletin*. **55**(10): 910, 2010.
35. CHUI, W.-K. & WAINER, I.W., "Enzyme-based high-performance liquid chromatography supports as probes of enzyme activity and inhibition: The immobilization of trypsin and α -chymotrypsin on an immobilized artificial membrane high-performance liquid chromatography support". *Analytical Biochemistry*. **201**(2): 237, 1992.
36. YANG, C.Y.; CAI, S.J.; LIU, H. & PIDGEON, C., "Immobilized Artificial Membranes - screens for drug membrane interactions". *Advanced Drug Delivery Reviews*. **23**(1-3): 229, 1997.
37. MARKOGLU, 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.
38. AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I. & PALLESCHI, G., "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring". *Biosensors & Bioelectronics*. **21**(8): 1405, 2006.
39. 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.
40. SANGHVI, M.; MOADDEL, R.; FRAZIER, C. & WAINER, I.W., "Synthesis and characterization of liquid chromatographic columns containing the immobilized ligand binding domain of the estrogen related receptor $\hat{I}\pm$ and estrogen related

- receptor \hat{I}^3 ". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **53**(3): 777, 2010.
41. 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.
 42. RODRIGUES, R.C.; BOLIVAR, J.M.; PALAU-ORS, A.; VOLPATO, G.; AYUB, M.A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. & GUI SAN, J.M., "Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*". *Enzyme and Microbial Technology*. **44**(6-7): 386, 2009.
 43. BOLIVAR, J.M.; ROCHA-MARTIN, J.; MATEO, C.; CAVA, F.; BERENQUER, J.; VEGA, D.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. & GUI SAN, J.M., "Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **58**(1-4): 158, 2009.
 44. MA, J.; ZHANG, L.; LIANG, Z.; SHAN, Y. & ZHANG, Y., "Immobilized enzyme reactors in proteomics". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **30**(5): 691, 2011.
 45. DENG, G.J. & SANYAL, G., "Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **40**(3): 528, 2006.
 46. BARTOLINI, M.; GREIG, N.H.; YU, Q.-S. & ANDRISANO, V., "Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease". *Journal of Chromatography A*. **1216**(13): 2730, 2009.
 47. 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.
 48. FREITAS, R.F.; PROKOPCZYK, I.M.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D.; TREVISAN, M.T.S.; VILEGAS, W.; SILVA, M.G.V. & MONTANARI, C.A., "Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **17**(6): 2476, 2009.
 49. TEMPORINI, C.; CERUTI, S.; CALLERI, E.; FERRARIO, S.; MOADDEL, R.; ABBRACCHIO, M.P. & MASSOLINI, G., "Development of an immobilized GPR17 receptor stationary phase for binding determination using frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry". *Analytical Biochemistry*. **384**(1): 123, 2009.
 50. ZHAO, R.; FANG, C.; YU, X.; LIU, Y.; LUO, J.; SHANGGUAN, D.; XIONG, S.; SU, T. & LIU, G., "Screening of inhibitors for influenza A virus using high-performance affinity chromatography and combinatorial peptide libraries". *Journal of Chromatography A*. **1064**(1): 59, 2005.
 51. POCHE T, L.; HEUS, F.; JONKER, N.; LINGEMAN, H.; SMIT, A.B.; NIESSEN, W.M.A. & KOOL, J., "Online magnetic bead based dynamic protein affinity

- selection coupled to LC-MS for the screening of acetylcholine binding protein ligands". *Journal of Chromatography B*. **879**(20): 1781, 2011.
52. CALLERI, E.; TEMPORINI, C. & MASSOLINI, G., "Frontal affinity chromatography in characterizing immobilized receptors". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **54**(5): 911, 2011.
53. KIM, H.S. & WAINER, I.W., "Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC)". *Journal of Chromatography B*. **870**(1): 22, 2008.
54. 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.
55. JOSEPH, K.S. & HAGE, D.S., "Characterization of the binding of sulfonylurea drugs to HSA by high-performance affinity chromatography". *Journal of Chromatography B*. **878**(19): 1590, 2010.
56. MOADDEL, R.; ROSENBERG, A.; SPELMAN, K.; FRAZIER, J.; FRAZIER, C.; NOCERINO, S.; BRIZZI, A.; MUGNAINI, C. & WAINER, I.W., "Development and characterization of immobilized cannabinoid receptor (CB1/CB2) open tubular column for on-line screening". *Analytical Biochemistry*. **412**(1): 85, 2011.
57. CHAN, N.W.C.; LEWIS, D.F.; HEWKO, S.; HINDSGAUL, O. & SCHRIEMER, D.C., "Frontal Affinity Chromatography for the Screening of Mixtures". *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. **5**: 395, 2002.
58. ZHANG, B.; PALCIC, M.M.; SCHRIEMER, D.C.; ALVAREZ-MANILLA, G.; PIERCE, M. & HINDSGAUL, O., "Frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry for screening mixtures of enzyme inhibitors". *Analytical Biochemistry*. **299**(2): 173, 2001.
59. CHAN, N.W.C.; LEWIS, D.F.; ROSNER, P.J.; KELLY, M.A. & SCHRIEMER, D.C., "Frontal affinity chromatography-mass spectrometry assay technology for multiple stages of drug discovery: applications of a chromatographic biosensor". *Analytical Biochemistry*. **319**(1): 1, 2003.
60. SLON-USAKIEWICZ, J.J.; NG, W.; FOSTER, J.E.; DAI, J.R.; DERETAY, E.; TOLEDO-SHERMAN, L.; REDDEN, P.R.; PASTERNAK, A. & REID, N., "Frontal affinity chromatography with MS detection of EphB2 tyrosine kinase receptor. 1. Comparison with conventional ELISA". *Journal of Medicinal Chemistry*. **47**(21): 5094, 2004.
61. WAINER, I.W.; ZHANG, Y.; XIAO, Y. & KELLAR, K.J., "Liquid chromatographic studies with immobilized neuronal nicotinic acetylcholine receptor stationary phases: effects of receptor subtypes, pH and ionic strength on drug-receptor interactions". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **724**(1): 65, 1999.
62. JOZWIAK, K.; HAGINAKA, J.; MOADDEL, R. & WAINER, I.W., "Displacement and Nonlinear Chromatographic Techniques in the Investigation of Interaction of Noncompetitive Inhibitors with an Immobilized $[\alpha]^{3H}$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Liquid Chromatographic Stationary Phase". *Analytical Chemistry*. **74**(18): 4618, 2002.
63. SHARMA, J.; BESANGER, T.R. & BRENNAN, J.D., "Assaying Small-Molecule-Receptor Interactions by Continuous Flow Competitive Displacement

- Chromatography/Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*. **80**(9): 3213, 2008.
64. PI, N.A.; YU, Y.H.; MOUGOUS, J.D. & LEARY, J.A., "Observation of a hybrid random ping-pong mechanism of catalysis for NodST: A mass spectrometry approach". *Protein Science*. **13**(4): 903, 2004.
65. ANDRISANO, V.; BARTOLINI, M.; GOTTI, R.; CAVRINI, V. & FELIX, G., "Determination of inhibitors' potency (IC50) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **753**(2): 375, 2001.
66. 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**(1-2): 331, 2003.
67. PASTERNYK DI MARCO, M.; FELIX, G.; DESCORPS, V.; DUCHARME, M.P. & WAINER, I.W., "On-line deconjugation of glucuronides using an immobilized enzyme reactor based upon [beta]-glucuronidase". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **715**(2): 379, 1998.
68. MANCINI, F. & ANDRISANO, V., "Development of a liquid chromatographic system with fluorescent detection for [beta]-secretase immobilized enzyme reactor on-line enzymatic studies". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **52**(3): 355, 2010.
69. FORSBERG, E.M.; GREEN, J.R.A. & BRENNAN, J.D., "Continuous Flow Immobilized Enzyme Reactor-Tandem Mass Spectrometry for Screening of AChE Inhibitors in Complex Mixtures". *Analytical Chemistry*. **83**(13): 5230, 2011.
70. SCHRIEMER, D.C.; BUNDLE, D.R.; LI, L. & HINDSGAUL, O., "Micro-Scale Frontal Affinity Chromatography with Mass Spectrometric Detection: A New Method for the Screening of Compound Libraries". *Angewandte Chemie International Edition*. **37**(24): 3383, 1998.
71. CALLERI, E.; TEMPORINI, C.; CACCIALANZA, G. & MASSOLINI, G., "Target-Based Drug Discovery: the Emerging Success of Frontal Affinity Chromatography Coupled to Mass Spectrometry". *Chemmedchem*. **4**(6): 905, 2009.
72. NG, E.S.M.; YANG, F.; KAMEYAMA, A.; PALCIC, M.M.; HINDSGAUL, O. & SCHRIEMER, D.C., "High-Throughput Screening for Enzyme Inhibitors Using Frontal Affinity Chromatography with Liquid Chromatography and Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*. **77**(19): 6125, 2005.
73. ZHU, L.; CHEN, L.; LUO, H. & XU, X., "Frontal Affinity Chromatography Combined On-Line with Mass Spectrometry: A Tool for the Binding Study of Different Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors". *Analytical Chemistry*. **75**(23): 6388, 2003.
74. GREIS, K.D., "Mass spectrometry for enzyme assays and inhibitor screening: An emerging application in pharmaceutical research". *Mass Spectrometry Reviews*. **26**(3): 324, 2007.
75. KASAI, K.-I.; ODA, Y.; NISHIKATA, M. & ISHII, S.-I., "Frontal affinity chromatography: Theory for its application to studies on specific interactions of

- biomolecules". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **376**(0): 33, 1986.
76. TOLEDO-SHERMAN, L.; DERETAY, E.; SLON-USAKIEWICZ, J.J.; NG, W.; DAI, J.R.; FOSTER, J.E.; REDDEN, P.R.; UGER, M.D.; LIAO, L.C.; PASTERNAK, A. & REID, N., "Frontal affinity chromatography with MS detection of EphB2 tyrosine kinase receptor. 2. Identification of small-molecule inhibitors via coupling with virtual screening". *Journal of Medicinal Chemistry*. **48**(9): 3221, 2005.
77. VOET, D. & VOET, J.G., *Biochemistry*. 2nd ed. 1995, New York: J. Wiley & Sons. xvii.
78. MOADDEL, R. & WAINER, I.W., "Conformational mobility of immobilized proteins". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **43**(2): 399, 2007.
79. VERLI, H. & BARREIRO, E.J., "Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores." *Química Nova*. **28**(1): 95, 2005.
80. VOET, D.; VOET, J.G. & PRATT, C.W., *Fundamentos de Bioquímica*. 2000, Porto Alegre: Artmed Editora.
81. NELSON, D.L. & COX, M.M., *Lehninguer. Princípios de Bioquímica*. 3ª ed ed. 2002, São Paulo: Sarvier.
82. BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. & STRYER, L., *Biochemistry*. 5th ed. 2002, New York: W. H. Freeman and Co. xxxviii.
83. DE BOER, A.R.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W.M.A. & IRTH, H., "Mass spectrometry-based biochemical assays for enzyme-inhibitor screening". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **26**(9): 867, 2007.
84. XU, Z.; YAO, S.; WEI, Y.; ZHOU, J.; ZHANG, L.; WANG, C. & GUO, Y., "Monitoring Enzyme Reaction and Screening of Inhibitors of Acetylcholinesterase by Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Fourier Transform Mass Spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **19**(12): 1849, 2008.
85. CHAPLIN, M.F. & BUCKE, C., *Enzyme technology*. 1990, Cambridge England ; New York: Cambridge University Press. xvi.
86. SILVERMAN, R.B., *The organic chemistry of drug design and drug action*. 2nd ed. 2004, Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. xix.
87. 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.
88. CARDOSO, C.L. & MORAES, M.C.D., *Immobilized enzymes in the identification of new ligands*, in *Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences*, LOPES, N.P. & GUARATINI, T., Editors. 2009, Transworld research networks: Kerala, India. p. 91.
89. CenterWatch: List of Newly Approved Drug Thearapies, <http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approvals/default.aspx?DrugYear=2007>. Acessado em 17 de janeiro de 2012
90. KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T. & MADSEN, U., *A textbook of drug design and discovery*. 2nd ed. 1996, Amsterdam: Netherlands: Harwood Academic Press. 543.

91. LESKOVAC, V., *Comprehensive Enzyme Kinetics*. 2004, New York: Kluwer Academic Publishers.
92. BISSWANGER, H., *Enzyme kinetics: principles and methods*. 2nd ed. 2008, Weinheim: WILEY-VCH.
93. LESKOVAC, V., *Comprehensive Enzyme Kinetics*. 2003, New York: Kluwer Academic Publishers.
94. BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E. & SHUGAR, D., "Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects". *Pharmacology & Therapeutics*. **88**(3): 349, 2000.
95. KICSKA, G.A.; TYLER, P.C.; EVANS, G.B.; FURNEAUX, R.H. & SCHRAMM, V.L., "Purine-less death in *Plasmodium falciparum* induced by immucillin-H, a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase". *The Journal of Biological Chemistry*. **277**: 3226, 2002.
96. PEREIRA, H.M.; BERDINI, V.; CLEASBY, A. & GARRATT, R.C., "Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase complexed to a novel purine analogue". *FEBS Letters*. **581**(26): 5082, 2007.
97. PEREIRA, H.D.M. *Enzima purina nucleosídeo fosforilase de Schistosoma mansoni: estruturas cristalográficas, estudos cinéticos e descoberta de novos ligantes*. São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, 2003. p 202.
98. PEREIRA, H.M.; BERDINI, V.R.; FERRI, M.R.; CLEASBY, A. & GARRATT, R.C., "Crystal structure of *Schistosoma* purine nucleoside phosphorylase complexed with a novel monocyclic inhibitor". *Acta Tropica*. **114**(2): 97, 2010.
99. DA SILVEIRA, N.J.F.; UCHÔA, H.B.; CANDURI, F.; PEREIRA, J.H.; CAMERA JR, J.C.; BASSO, L.A.; PALMA, M.S.; SANTOS, D.S. & DE AZEVEDO JR, W.F., "Structural bioinformatics study of PNP from *Schistosoma mansoni*". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **322**(1): 100, 2004.
100. CRABTREE, G.W. & SENFT, A.W., "Pathways of Nucleotide-Metabolism in *Schistosoma-Mansoni* .5. Adenosine Cleavage Enzyme and Effects of Purine Analogs on Adenosine Metabolism in-Vitro". *Biochemical Pharmacology*. **23**(3): 649, 1974.
101. STEGMAN, R.J.; SENFT, A.W.; BROWN, P.R. & ROBERT E. PARKS, J., "Pathways of nucleotide metabolism in *schistosoma mansoni*—IV *1: Incorporation of adenosine analogs in vitro ". *Biochemical Pharmacology*. **22**(4): 459, 1973.
102. POSTIGO, M.P.; KROGH, R.; TERNI, M.F.; PEREIRA, H.M.; OLIVA, G.; CASTILHO, M.S. & ANDRICOPULO, A.D., "Enzyme kinetics, structural analysis and molecular modeling studies on a series of *Schistosoma mansoni* PNP inhibitors". *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **22**(3): 583, 2011.
103. BANTIA, S.; MILLER, P.J.; PARKER, C.D.; ANANTH, S.L.; HORN, L.L.; KILPATRICK, J.M.; MORRIS, P.E.; HUTCHISON, T.L.; MONTGOMERY, J.A. & SANDHU, J.S., "Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 (Immucillin-H)--a novel potent and orally active immunosuppressive agent". *International Immunopharmacology*. **1**(6): 1199, 2001.
104. TIMMERS, L.F.S.M.; CACERES, R.A.; VIVAN, A.L.; GAVA, L.M.; DIAS, R.; DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. & DE AZEVEDO JR, W.F., "Structural studies of human purine nucleoside phosphorylase: Towards a new

- specific empirical scoring function". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **479**(1): 28, 2008.
105. VIEGAS, T.; OMURA, G.; STOLTZ, R. & KISICKI, J., "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of peldesine (BCX-34), a purine nucleoside phosphorylase inhibitor, following single and multiple oral doses in healthy volunteers". *The journal of clinical pharmacology*. **40**: 410, 2000.
106. MURKIN, A.S.; CLINCH, K.; MASON, J.M.; TYLER, P.C. & SCHRAMM, V.L., "Immucillins in custom catalytic-site cavities". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **18**(22): 5900, 2008.
107. CASTILHO, M.S.; POSTIGO, M.P.; PEREIRA, H.M.; OLIVA, G. & ANDRICOPULO, A.D., "Structural basis for selective inhibition of purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*: Kinetic and structural studies". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **18**(4): 1421, 2010.
108. TODOROVA, N.A. & SCHWARZ, F.P., "Effect of the phosphate substrate on drug-inhibitor binding to human purine nucleoside phosphorylase". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **480**(2): 122, 2008.
109. SECRIST, J.A.; MONTGOMETRY, J.A.; EALICK, S.E.; BUGG, C.E.; BABU, S.; ERION, M.D. & GUIDA, W.C., "Structure-based drug design: Inhibitors of purine nucleoside phosphorylase (PNP)". *Antiviral Research*. **15**(Supplement 1): 106, 1991.
110. PEREIRA, H.M.; REZENDE, M.M.; CASTILHO, M.S.; OLIVA, G. & GARRATT, R.C., "Adenosine binding to low-molecular-weight purine nucleoside phosphorylase: the structural basis for recognition based on its complex with the enzyme from *Schistosoma mansoni*". *Acta Crystallographica Section D*. **66**(1): 73, 2010.
111. SHEEN, M.R.; KIM, B.K. & PARKS, R.E., "Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes. III. Inhibition by the inosine analog formicyn B of the isolated enzyme and of nucleoside metabolism in intact erythrocytes". *Molecular Pharmacology*. **4**: 292, 1968.
112. MILES, R.W.; TYLES, P.C.; EVANS, G.B.; FURNEAUX, R.H.; PARKIN, D.W. & SCHRAMM, V.L., "Iminoribitol Transition State Analogue Inhibitors of Protozoan Nucleoside Hydrolases". *Biochemistry*. **38**: 13147, 1999.
113. EVANS, G.B.; FURNEAUX, R.H.; GAINSFORD, G.J.; SCHRAMM, V.L. & TYLER, P.C., "Synthesis of Transition State Analogue Inhibitors for Purine Nucleoside Phosphorylase and N-Riboside Hydrolases". *Tetrahedron*. **56**(19): 3053, 2000.
114. BANTIA, S.; PARKER, C.; UPSHAW, R.; CUNNINGHAM, A.; KOTIAN, P.; KILPATRICK, J.M.; MORRIS, P.; CHAND, P. & BABU, Y.S., "Potent orally bioavailable purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-4208 induces apoptosis in B- and T-lymphocytes--A novel treatment approach for autoimmune diseases, organ transplantation and hematologic malignancies". *International Immunopharmacology*. **10**(7): 784, 2010.
115. BANTIA, S.; MILLER, P.J.; PARKER, C.D.; ANANTH, S.L.; HORN, L.L.; BABU, Y.S. & SANDHU, J.S., "Comparison of in vivo efficacy of BCX-1777 and cyclosporin in xenogeneic graft-vs.-host disease: the role of dGTP in antiproliferative action of BCX-1777". *International Immunopharmacology*. **2**(7): 913, 2002.

116. KAMATH, V.P.; XUE, J.; JUAREZ-BRAMBILA, J.J.; MORRIS, C.B.; GANORKAR, R. & MORRIS JR, P.E., "Synthesis of analogs of Forodesine HCl, a human purine nucleoside phosphorylase inhibitor - Part I". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **19**(10): 2624, 2009.
117. 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.
118. SILVA, R.G.; CARVALHO, L.P.S.; OLIVEIRA, J.S.; PINTO, C.A.; MENDES, M.A.; PALMA, M.S.; BASSO, L.A. & SANTOS, D.S., "Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase". *Protein Expression and Purification*. **27**(1): 158, 2003.
119. GILL, S.C. & VON HIPPEL, P.H., "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data". *Analytical Biochemistry*. **182**(2): 319, 1989.
120. 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.
121. FÉLIX, G. & DESCORPS, V., "Stereochemical resolution of racemates, in HPLC, using a chiral stationary phase based upon immobilized α -chymotrypsin. I. Structural chiral separations". *Chromatographia*. **49**(11-12): 595, 1999.
122. NAWROCKI, J., "The silanol group and its role in liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **779**: 29, 1997.
123. ZNALEZIONA, J.; PETR, J.; KNOB, R.; MAIER, V. & SEVCIK, J., "Dynamic coating agents in CE". *Chromatographia Supplement*. **67**: S5, 2008.
124. 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.
125. SHI, Y. & CROUCH, R., "Micro-scale determination of glucose by capillary flow injection with an immobilized enzyme reactor". *Analytica Chimica Acta*. **381**: 165, 1999.
126. MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J. & WALDRON, K.C., "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking". *BioTechniques*. **37**: 790, 2004.
127. KALCKAR, H.M., "Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes: I. Determination of hydroxypurines." *Journal of Biological Chemistry*. **167**: 429, 1947.
128. POSTIGO, M.P.; GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; CASTILHO, M.S.; DA R. PITTA, I.; DE ALBUQUERQUE, J.F.C. & ANDRICOPULO, A.D., "Discovery of New Inhibitors of Schistosoma mansoni PNP by Pharmacophore-Based Virtual Screening". *Journal of Chemical Information and Modeling*. **50**(9): 1693, 2011.
129. PARKIN, D.W. & SCHRAMM, V.L., "Binding modes for substrate and a proposed transition-state analog of protozoan nucleoside hydrolase". *Biochemistry*. **34**(42): 13961, 1995.
130. 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.

131. 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.
132. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas". *Química Nova*. **32**(4): 1021, 2009.
133. CANDURI, F.; FADEL, V.; BASSO, L.A.; PALMA, M.S.; SANTOS, D.S. & DE AZEVEDO JR, W.F., "New catalytic mechanism for human purine nucleoside phosphorylase". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **327**(3): 646, 2005.
134. CHENG, J.; FARUTIN, V.; WU, Z.; JACOB-MOSIER, G.; RILEY, B.; HAKIMI, R. & CORDES, E.H., "Purine Nucleoside Phosphorylase-Catalyzed, Phosphate-Independent Hydrolysis of 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurine Ribonucleoside". *Bioorganic Chemistry*. **27**(4): 307, 1999.
135. KLINE, P.C. & SCHRAMM, V.L., "Purine nucleoside phosphorylase. Inosine hydrolysis, tight binding of the hypoxanthine intermediate, and third-the-sites reactivity". *Biochemistry*. **31**(26): 5964, 1992.
136. SUVER, M.; ZINIC, B.; PORTADA, T.; BZOWSKA, A. & GLAVAS-OBROVAC, L., "9-Deazaguanine and its methyl derivatives: Synthesis, antitumor activity *in vitro* and effects on purine nucleoside phosphorylase gene expression". *Croatica Chemica Acta*. **81**(1): 147, 2008.
137. CASTILHO, M.S.; POSTIGO, M.P.; DE PAULA, C.B.V.; MONTANARI, C.A.; OLIVA, G. & ANDRICOPULO, A.D., "Two- and three-dimensional quantitative structure-activity relationships for a series of purine nucleoside phosphorylase inhibitors". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **14**(2): 516, 2006.
138. FREITAS, H.F.; POSTIGO, M.P.; ANDRICOPULO, A.D. & CASTILHO, M.S., "Descriptor-and fragment-based QSAR models for a series of Schistosoma mansoni purine nucleoside inhibitors". *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **22**(9): 1718, 2011.
139. KADAM, R. & IYER, K., "Isolation of different animal liver xanthine oxidase containing fractions and determination of kinetic parameters for xanthine". *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **69**(1): 41, 2007.
140. LALANNE, M. & WILLEMOT, J., "Xanthine oxidase from mouse skeletal muscle purification and kinetic studies". *International Journal of Biochemistry*. **6**(7): 479, 1975.
141. MASUOKA, N. & KUBO, I., "Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1688**(3): 245, 2004.
142. MATEO, C.; GRAZU, V.; PALOMO, J.M.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. & GUISAN, J.M., "Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports". *Nat. Protocols*. **2**(5): 1022, 2007.
143. KONDRATOVA, V.N.; BOTEZATU, I.V.; SHELEPOV, V.P. & LICHTENSTEIN, A.V., "Tube gel isotachopheresis: A method for quantitative isolation of nucleic acids from diluted solutions". *Analytical Biochemistry*. **408**(2): 304, 2011.

144. LU, G.; CHHUM, S. & KRISHNASWAMY, S., "The Affinity of Protein C for the Thrombin-Thrombomodulin Complex Is Determined in a Primary Way by Active Site-dependent Interactions". *Journal of Biological Chemistry*. **280**(15): 15471, 2005.