

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

**“BIORREATORES DE ACETILCOLINESTERASE:
ESTUDO DE CONDIÇÕES PARA A TRIAGEM DE
LIGANTES”**

Kenia Lourenço Vanzolini*

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

Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass
Co-orientadora: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

*** bolsista CNPq**

São Carlos - SP
2013

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

V285ba

Vanzolini, Kenia Lourenço.

Biorreatores de acetilcolinesterase : estudo de condições para a triagem de ligantes / Kenia Lourenço Vanzolini. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

114 f.

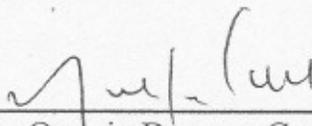
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Análise cromatográfica. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Cromatografia de bioafinidade. 4. Enzimas. 5. Imobilização de enzimas. I. Título.

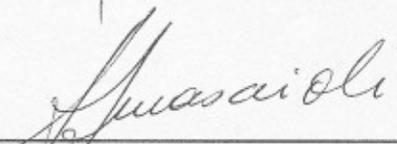
CDD: 543.089 (20^a)

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

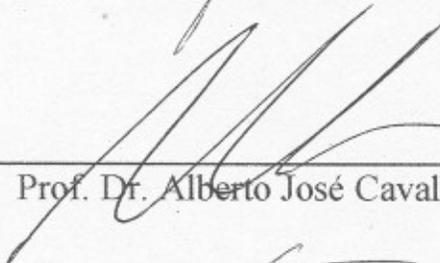
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Kenia Lourenço Vanzolini**, realizada em 03 de maio de 2013:*



Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass



Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli



Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria



Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira

“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho” (Clarice Lispector).

AGRADECIMENTOS

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

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

À professora Dra. Carmen L. Cardoso pela co-orientação e amizade durante esses quatro anos.

Aos professores Dr. Milton N. da Silva, Dr. João B. Fernandes e Dra. Arlene G. Corrêa pela colaboração com doação de amostras para a execução dos estudos aqui apresentados.

Aos professores Dr. Irwin Wainer e Dr. Ruin Moaddel, por me receberem em seu grupo de pesquisa para a realização de estágio. Agradeço a confiança, aos ensinamentos, contribuições e amizade.

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

Aos meus amigos do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE agradeço a amizade construída nestes anos, o clima de apoio mútuo, incentivo, colaboração e momentos de descontração.

Todo o meu amor, carinho e gratidão aos meus pais, José Antônio e Neusa e, ao meu irmão, Igor, aqueles que incondicionalmente sempre me apoiaram e fizeram todo o possível para que eu alcançasse esta conquista.

Ao meu melhor amigo e namorado Fábio N. Sposito, pelo carinho, incentivo, apoio, cumplicidade e alegria.

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

Ao CNPq (142078/2009-3) e a Capes (0112/12-7) pelas bolsas concedidas.

Lista de abreviaturas e símbolos

d.i.	Diâmetro interno
λ	Comprimento de onda
AcCUN	Acetato de cunaniol
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEIs	Inibidores da enzima acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
APTS	3-aminopropiltriétoxisilano
BC	Cromatografia de bioafinidade (do inglês <i>bioaffinity chromatography</i>)
Ch	Colina
CUN	Cunaniol
NL-ZBC	Cromatografia zonal não-linear de bioafinidade (do inglês <i>non-linear zonal bioaffinity chromatography</i>)
NL-ZC	Cromatografia zonal não-linear (do inglês <i>non-linear zonal chromatography</i>)
DAD	Detector de arranjo de diodos (do inglês <i>diode array detector</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>eel</i> AChE	Acetilcolinesterase da espécie <i>Electrophorus electricus</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
HSA	Albumina sérica humana (do inglês <i>human serum albumin</i>)
HTS	Ensaio biológico automatizado em larga escala (do inglês <i>high throughput screening</i>)
<i>hu</i> AChE	Acetilcolinesterase da espécie <i>Homo sapiens</i>
IC ₅₀	Capacidade inibitória

ICER	Biorreatores enzimáticos capilares (do inglês <i>immobilized capillary enzyme reactor</i>)
K_d	Constante de afinidade
K_i	Constante de inibição
K_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{on}	Constante de associação
k_{off}	Constante de dissociação
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>liquid chromatography</i>)
L-ZBC	Cromatografia zonal linear de bioafinidade (do inglês <i>linear zonal bioaffinity chromatography</i>)
L-ZBC-MS	Cromatografia zonal linear de bioafinidade acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>linear zonal bioaffinity chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
MB	Partículas magnéticas (do inglês <i>magnetic beads</i>)
MeOH	Metanol
MRM	Do inglês <i>multiple reaction-monitoring</i>
MS	Espectrômetria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i>)
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase (do inglês <i>purine nucleoside phosphorylase</i>)
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
V_{MAX}	Velocidade máxima de reação
ZBC	Cromatografia zonal de bioafinidade (do inglês <i>zonal bioaffinity chromatography</i>)

Lista de Tabelas

TABELA 1.1- Equação de balanço de massa derivada a partir da solução por <i>Impulse Input</i> com os parâmetros da NL-ZC e L-ZBC e, como eles se relacionam ⁴⁴	9
TABELA 2.1- Faixa de concentração dos ligantes de AChE utilizados nos ensaios de mecanismo de inibição.....	29
TABELA 2.2- Concentração de Ch produzida a partir da injeção de ACh 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no sistema LC-MS.....	36
TABELA 2.3- Valores de K_i e IC_{50} calculados para os ligantes no ICER- <i>eelAChE</i>	46
TABELA 3.1- Parâmetros e condições avaliadas para o ensaio de <i>ligand fishing</i> com as <i>eelAChE(NT)-MB</i>	66
TABELA 3.2- Frações coletadas da amostra S _{T.A.} -4 com os íons esperados em cada fração (de acordo com o <i>fingerprint</i>) e os percentuais de inibição obtidos.....	70
TABELA 3.3- Parâmetros cinéticos determinados a partir do ensaio de NL-ZBC com o ICER- <i>eelAChE</i> para os ligantes tacrina, galantamina e cumarina 16.....	74
TABELA 4.1- Ensaios realizados para otimizar a concentração de <i>eelAChE</i> no ensaio em solução.....	86
TABELA 4.2- Ensaios realizados para otimizar a concentração de AcCUN no ensaio em solução.....	87
TABELA 4.3- Ensaios realizados para otimizar a concentração de <i>eelAChE</i> no ensaio em solução.....	88
TABELA 4.4- Ensaio de inibição com a <i>eelAChE</i> em solução.....	90

Lista de Figuras

FIGURA 1.1- Exemplo de perfil de eluição zonal (A) e frontal (B), onde o composto 2 possui uma maior afinidade pela biomolécula.....	5
FIGURA 1.2- Exemplo de ensaio de deslocamento na L-ZBC. Perfis de eluição para diferentes compostos (1, 2, 3 e 4) no biorreator (A) sem o inibidor e, (B) com o inibidor na fase móvel. Figura adaptada de Wainer et al. ⁴⁰	8
FIGURA 1.3- Sítio catalítico da AChE (código PDB: 1acl) com os resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica.....	16
FIGURA 1.4- Reação de acetilação-desacetilação na hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.	17
FIGURA 2.1- Sistema de LC-MS utilizado no método de L-ZBC com os ICERs-AChE preparados. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.....	31
FIGURA 2.2- Método de imobilização da enzima <i>eel</i> e <i>huAChE</i> em capilares de sílica fundida.....	32
FIGURA 2.3- Cromatogramas referentes a injeção de 10 µL de uma amostra de ACh 200 µmol.L ⁻¹ no ICER- <i>eelAChE</i> (-) com redução e (-) sem redução e, no ICER- <i>huAChE</i> (-) com redução. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.....	33
FIGURA 2.4- Cromatograma de íons extraídos e espectro de massas referente a injeção de ACh 200 µmol.L ⁻¹ no sistema LC-MS com o ICER- <i>eelAChE</i> monitorando o íon precursor da Ch produzida, [M] ⁺ 104 m/z. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.	35
FIGURA 2.5- Cromatograma de íons extraídos e espectro de massas referente a injeção de ACh 200 µmol.L ⁻¹ no sistema LC-MS com o	

ICER- <i>eelAChE</i> monitorando o íon fragmento da Ch produzida, [C ₂ H ₃ OH]-[M] ⁺ 60 m/z. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.....	35
FIGURA 2.6- Proposta da primeira transição para o íon precursor da colina.....	36
FIGURA 2.7- Sobreposição dos cromatogramas correspondentes à colina produzida pela injeção de 10µL de uma amostra ACh 200µmol.L ⁻¹ nos ICERs- <i>eelAChE</i> : (-) 1,00 mg.L ⁻¹ ; (-) 0,500 mg.L ⁻¹ ; (-) 0,250 mg.L ⁻¹ ; (-) 0,125 mg.L ⁻¹ e (-) 0,0625 mg.L ⁻¹ . Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.....	37
FIGURA 2.8- Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de colina pelo (A) ICER- <i>eelAChE</i> e (B) ICER- <i>eelAChE</i> , variando-se a concentração de acetilcolina.....	39
FIGURA 2.9- Porcentagem de inibição da atividade enzimática da <i>eelAChE</i> no ICER para diferentes concentrações da galantamina e da tacrina.....	40
FIGURA 2.10- Gráfico de duplo-recíproco para a galantamina no ICER- <i>eelAChE</i>	41
FIGURA 2.11- Gráfico de duplo-recíproco para a tacrina no ICER- <i>eelAChE</i>	42
FIGURA 2.12- Determinação de K _i para os inibidores galantamina e tacrina da <i>eelAChE</i> imobilizada.....	42
FIGURA 2.13- Resultados da triagem realizada com os derivados de cumarina, triazóis, flavonas e compostos orgânicos de diferentes classes (Apêndice).....	44

FIGURA 2.14- Porcentagem de inibição da atividade enzimática da <i>eelAChE</i> no ICER para diferentes concentrações das cumarinas 16 e 17.....	45
FIGURA 2.15- Porcentagem de inibição da atividade enzimática da <i>eelAChE</i> no ICER para diferentes concentrações do triazol 2 e da flavona HptBipyCu.....	45
FIGURA 2.16- Porcentagem de inibição da atividade enzimática da <i>eelAChE</i> no ICER para diferentes concentrações das flavonas NNinaBiPyCu e HptFenCu.....	45
FIGURA 2.17- Gráfico de duplo-recíproco para as cumarina (A) 16 e (B) 17, no ICER- <i>eelAChE</i>	46
FIGURA 2.18- Gráfico de duplo-recíproco para as flavonas (A) HptBipyCu, (B) NNinaBipyCu e (C) HptFenCu, no ICER- <i>eelAChE</i>	47
FIGURA 2.19- Resultados das triagens realizadas com os derivados cumarínicos nos ICERs- <i>eel</i> e <i>huAChE</i>	48
FIGURA 3.1- Esquema para o preparo das <i>eelAChE</i> (NT)-MB.	61
FIGURA 3.2- Método de imobilização da enzima <i>eelAChE</i> em partículas magnéticas de óxido de ferro, recobertas com sílica e derivadas com grupos amino na superfície, (NT)-MB.	62
FIGURA 3.3- Sistema LC-MS utilizado durante os ensaios de atividade e validação do <i>ligand fishing</i> com as <i>eelAChE</i> (NT)-MB. Parâmetros cromatográficos e de ionização apresentados na seção 3.2.3.....	63
FIGURA 3.4- Cromatograma de íons extraídos (EIC) obtido a partir da injeção de uma amostra contendo cetamina, tacrina, galantamina,	

labetalol e cumarina 16 na concentração de 1280nmol.L^{-1} e, nicotina 20000nmol.L^{-1} . Parâmetros do LC-MS descritos na seção 3.2.3.....	64
FIGURA 3.5- Representação de um ensaio com as B-MBs.....	65
FIGURA 3.6- Percentual de inibidores encontrados nos sobrenadantes S-1 e S-4 para os ensaios 1 a 11, apresentados na Tabela 3.1.	66
FIGURA 3.7- Percentual de ligantes e não-ligantes encontrados nos sobrenadantes S-1 e S-4 para o ensaio 11, apresentado na Tabela 3.1.	67
FIGURA 3.8- Concentração de tacrina, galantamina, cumarina 16, cetamina e labetalol, presentes nas amostras S-1 e S-4. (A) ensaio com os compostos individualmente; (B) ensaio com a mistura dos compostos.....	68
FIGURA 3.9 - Ensaio de triagem com o ICER- <i>eel</i> AChE para os extratos de <i>Melodinus fusiformis</i>	69
FIGURA 3.10- Cromatograma obtido a partir da injeção de uma amostra do extrato T.A. JSC-E (10mg.mL^{-1}) no sistema LC-DAD-MS (parâmetros cromatográficos e de ionização descritos na seção 3.2.9).	71
FIGURA 3.11- Espectro de massas correspondente à injeção de uma amostra do composto isolado no método de LC-MS desenvolvido para o extrato T.A. JSC-E utilizando o modo positivo de ionização. Parâmetros cromatográficos e de ionização descritos na seção 3.2.7.	71
FIGURA 3.12- Cromatogramas obtidos a partir do ensaio de NL-ZBC com o ICER- <i>eel</i> AChE e os ligantes tacrina, galantamina e cumarina 16 (Cum.16) no sistema LC-MS. Parâmetros cromatográficos e de ionização descritos na seção 3.2.6.1.....	73

FIGURA 4.1- Catálise enzimática para a AChE com o AcCUN como substrato.....	84
FIGURA 4.2- Fluxograma genérico para os ensaios em solução com a enzima <i>eelAChE</i> e o acetato de cunaniol.	85
FIGURA 4.3- Cromatogramas obtidos a partir da injeção dos ensaios de 1 a 5 (Tabela 4.1) no sistema LC-UV. Condições cromatográficas descritas na seção 4.2.2.....	86
FIGURA 4.4- Curva da produção de CUN pela enzima <i>eelAChE</i> nos ensaios de 6 a 10 (Tabela 4.2).....	87
FIGURA 4.5- Curva de produção de CUN pela enzima <i>eelAChE</i> nos ensaios de 11 a 19 (Tabela 4.3).....	88
FIGURA 4.6- Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de cunaniol no ensaio em solução com a <i>eelAChE</i> , variando-se a concentração de acetato de cunaniol.	89
FIGURA 4.7- Esquema do mecanismo bi-substrato do tipo bi-bi aleatório ¹⁴¹	92
FIGURA 4.8- Esquema do mecanismo bi-substrato do tipo bi-bi ordenado ¹⁴¹	92
FIGURA 4.9- Esquema do mecanismo bi-substrato do tipo bi-bi ping-pong ¹⁴¹	93
FIGURA 4.10- Exemplos de gráficos para a catálise enzimática de mecanismo bi-bi substrato (A) de formação de complexo ternário e (B) ping-pong ¹⁴¹	94
FIGURA 4.11- Gráfico de duplo-recíproco para o acetato de cunaniol no ICER- <i>eelAChE</i>	94

RESUMO

“BIORREATORES DE ACETILCOLINESTERASE: ESTUDO DE CONDIÇÕES PARA A TRIAGEM DE LIGANTES”

O desenvolvimento de ensaios para a triagem de ligantes é de grande importância para a descoberta de compostos biologicamente ativos. Neste contexto, o emprego de biorreatores enzimáticos tem sido adotado em ensaios em massa para triagem de ligantes, uma vez que possuem elevada seletividade com alta reprodutibilidade e produtividade. Este trabalho descreve a imobilização covalente da acetilcolinesterase de peixe-elétrico (*Electrophorus electricus*) e humana em capilares de sílica fundida e partículas magnéticas. A enzima selecionada justifica-se uma vez que atua no sistema nervoso central e é um alvo validado para o tratamento da doença de Alzheimer e desenvolvimento de inseticidas. Os biorreatores capilares de acetilcolinesterase foram empregados por cromatografia zonal para determinação das constantes cinéticas, e também para a triagem de 79 compostos com determinação do mecanismo de ação dos 05 ligantes identificados. Um novo modelo de triagem de extratos de produtos naturais foi desenvolvido usando os biorreatores de partículas magnéticas para “pescar” ligantes e os biorreatores capilares para determinar o percentual de atividade. O uso dos biorreatores capilares em cromatografia zonal não-linear permitiu caracterizar a afinidade do ligante selecionado. Este trabalho reporta também, um novo substrato identificado através de ensaios em solução para a acetilcolinesterase e, os estudos por cromatografia zonal de bioafinidade, para o mecanismo bi-substrato.

ABSTRACT**“ACETYLCHOLINESTERASE BIOREACTORS: STUDY OF CONDITIONS FOR LIGAND SCREENING”**

The development of ligand screening assays plays a very important role in the discovery of biologically active compounds. In this context, the use of immobilized capillary reactors has been adopted as a new technique for high throughput screening assays, which furnishes high selectivity, reproducibility. This work describes the covalent immobilization of electric fish (*Electrophorus electricus*) and human acetylcholinesterases (AChE) on fused silica capillaries and magnetic beads. The selected enzyme acts on the central nervous system and is a validated target for the treatment of Alzheimer's disease as for new insecticides. Zonal chromatography with the acetylcholinesterase capillary bioreactors was employed to determine kinetics constants, to a ligand screening assay of 79 compounds, and to inhibition mechanisms determination of the 05 identified ligands. A new approach to the screening of natural product extracts was developed based on ligand fishing experiments and zonal chromatography. For that, the magnetic beads were used for the ligand fishing experiments and capillary bioreactors for the activity assays. The later was employed also under nonlinear condition to determine the affinity constant of the fished ligand. This work reports also the identification by a solution assay of a new acetylcholinesterase substrate and, the studies by zonal bioaffinity chromatography to identify the bi-substrate mechanism.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos.....	vi
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 - Fundamentos teóricos	1
1.1 - Ensaio de elevada eficiência na triagem de ligantes	1
1.2 - Cromatografia de bioafinidade	2
1.2.1 - Cromatografia zonal linear de bioafinidade	5
1.2.2 - Cromatografia zonal não-linear de bioafinidade	8
1.3 - Ensaio de <i>ligand fishing</i>	11
1.4 - Inibidores enzimáticos como candidatos a fármacos	14
1.5 - A enzima acetilcolinesterase	15
1.5.1 - Inibidores da acetilcolinesterase e sua função biológica	17
2 -Biorreatores de acetilcolinesterase: uma ferramenta <i>online</i> para a triagem de ligantes.	19
2.1 - Introdução	19
2.2 - Procedimento Experimental	21
2.2.1 - Materiais	21
2.2.2 - Imobilização da enzima AChE em capilares de sílica fundida	22
2.2.2.1 - Preparo do capilar	22
2.2.2.2 - Imobilização da <i>eelAChE</i> e <i>huAChE</i>	22
2.2.3 - Desenvolvimento do método analítico por cromatografia zonal	23
2.2.3.1 - Otimização das condições de ionização e fragmentação	23
2.2.3.2 - O sistema LC-MS.....	24
2.2.3.3 - Ensaio de estabilidade das soluções de trabalho	25
2.2.4 - Validação do método analítico	25
2.2.5 - Estudo da atividade dos ICERs-AChE	26

2.2.6	- Estudo cinético da ACh com os ICERs-AChE	27
2.2.7	- Estudo de inibição da AChE imobilizada.....	27
2.2.8	- Caracterização dos ligantes identificados da <i>eel</i> AChE.....	28
2.2.8.1	- Determinação da capacidade inibitória (IC_{50})	28
2.2.8.2	- Determinação da constante de inibição (K_i) e mecanismos de ação..	29
2.3	- Resultados e discussão	30
2.3.1	O sistema LC-MS	30
2.3.2	- Preparo dos ICERs-AChE	31
2.3.3	- Validação do método LC-MS	33
2.3.4	- Estudo da atividade dos ICERs-AChE preparados	36
2.3.5	- Estudo cinético da atividade enzimática dos ICERs- <i>eel</i> e <i>hu</i> AChE	37
2.3.6	- Triagem de ligantes com o ICER- <i>eel</i> e <i>hu</i> AChE	39
2.3.6.1	- Validação do ensaio de triagem de ligantes	39
2.3.6.2	- Emprego dos ICERs- <i>eel</i> e <i>hu</i> AChE na triagem de novos ligantes ...	43
2.4	- Conclusões	48
3	- Biorreatores capilares de acetilcolinesterase e partículas magnéticas com a enzima imobilizada: uma ferramenta para a triagem de ligantes em extratos de produtos naturais	50
3.1	- Introdução	50
3.2	- Procedimento experimental	52
3.2.1	- Materiais	52
3.2.2	- Imobilização da enzima <i>eel</i> AChE.....	53
3.2.2.1	- Capilares de sílica fundida.....	53
3.2.2.2	- Partículas magnéticas.....	53
3.2.3	- Sistema LC-MS empregado nos ensaios com as <i>eel</i> AChE(NT)-MB ...	54
3.2.4	- Ensaio de atividade com as <i>eel</i> AChE(NT)-MB	54
3.2.5	- Validação do ensaio de <i>ligand fishing</i> com as <i>eel</i> AChE(NT)-MB	55
3.2.6	- Ensaio de triagem nos extratos de <i>Melodinus fusiformis</i>	56
3.2.6.1	Sistema LC-MS utilizado com o ICER- <i>eel</i> AChE	56

3.2.6.2	Preparo das amostras e ensaio de triagem dos extratos de <i>Melodinus fusiformis</i> com o ICER- <i>eelAChE</i>	57
3.2.7	- Método LC-MS para análise do extrato total álcali JSC-E	57
3.2.8	- Ensaio de <i>ligand fishing</i> e triagem do extrato total álcali JSC-E	58
3.2.9	- Isolamento do composto ativo	59
3.2.10	- Ensaio de cromatografia zonal não-linear de bioafinidade	59
3.3	- Resultados e discussão	60
3.3.1	- Imobilização da enzima <i>eelAChE</i> em partículas magnéticas	60
3.3.2	- Validação do ensaio de <i>ligand fishing</i> com as <i>eelAChE(NT)</i> -MB	63
3.3.3	- Ensaio de triagem com os extratos de <i>Melodinus fusiformis</i>	68
3.3.4	- Caracterização dos ligantes por cromatografia zonal não-linear de bioafinidade	72
3.4	- Conclusões	74
4	- Acetato de cunaniol: um substrato para a enzima AChE	76
4.1	- Introdução	76
4.2	- Procedimento experimental	78
4.2.1	- Materiais	78
4.2.2	- Desenvolvimento do método cromatográfico para monitorar a atividade da enzima <i>eelAChE</i> em solução	79
4.2.3	- Ensaio enzimático com a <i>eelAChE</i> em solução através da quantificação do cunaniol formado por LC-UV	80
4.2.3.1	- Tampão utilizado	80
4.2.3.2	- Pré-tratamento da amostra	80
4.2.3.3	- Ensaio de atividade	80
4.2.4	- Estudo cinético para a enzima <i>eelAChE</i> em solução através da quantificação do cunaniol formado	82
4.2.5	- Ensaio de inibição com a <i>eelAChE</i> em solução	82
4.2.6	- Ensaio para a caracterização do substrato acetato de cunaniol	83
4.3	- Resultados e discussão	84

4.3.1 - Desenvolvimento do método LC-UV	84
4.3.2 - Pré-tratamento da amostra	84
4.3.3 - Otimização do ensaio com a <i>eelAChE</i> em solução	85
4.3.4 - Estudo cinético com o acetato de cunaniol e a <i>eelAChE</i> em solução...	89
4.3.5 - Ensaio de inibição com a <i>eelAChE</i> em solução	90
4.3.6 - Ensaio de bi-substrato com a <i>eelAChE</i>	91
4.4 - Conclusões	95
5 - Conclusões	96
6 - Referências Bibliográficas	98
Apêndice	111

CAPÍTULO 1

1 - Fundamentos teóricos

1.1 - Ensaios de elevada eficiência na triagem de ligantes

O número de modelos de triagem para a descoberta de novos fármacos tem aumentado desde o início dos anos 90, principalmente com os avanços nas áreas de química, biologia molecular e robótica¹. O grande número de moléculas novas, especialmente desenhadas contra um alvo patogênico, o mapeamento do sítio ativo de proteínas alvo e o desenvolvimento de modelos para triagem são algumas das contribuições da área de química. A biologia molecular e genética têm contribuído com a identificação e expressão, *in vitro*, de novos alvos biológicos. A robótica integra a química combinatória com a biologia molecular automatizando os ensaios de triagem com reprodutibilidade e agilidade².

Um bom ensaio de triagem deve ter como características: relevância, efetividade, velocidade, robustez, precisão e exatidão. Ou seja, o ensaio deve ser rápido, com resultados precisos e exatos, sem falso-positivos ou falso-negativos, estar de acordo com a resposta do ensaio *in vivo* com o ligante, eliminando os compostos que não possuíram uma boa afinidade pelo alvo selecionado².

Os ensaios de elevada eficiência HTS, do inglês *High Throughput Screening*, englobam algumas destas características, fornecendo um grande número de resultados em um curto espaço de tempo. Estes fatores fizeram desta técnica uma prática diária na pesquisa de novos fármacos, principalmente nas indústrias farmacêuticas³. Usualmente estes ensaios são utilizados para a triagem de inibidores, no formato de multi-poços, empregando ensaios colorimétricos, espectrofotométricos ou fluorimétricos^{4,5}.

Uma das desvantagens das técnicas de HTS é o elevado número de resultados, que muitas vezes não são objetivos e reprodutíveis. O custo das análises é um outro fator que deve ser considerado, uma vez que a faixa de custo em um ensaio habitual, com 100 μL de volume final empregando placas de 96 e 384 poços, está diretamente relacionada com a quantidade de reagentes utilizados^{6,7}. Assim, com o desenvolvimento de placas com 1536 poços ou mais, a diminuição do volume dos ensaios para $\leq 1 \mu\text{L}$ foi uma alternativa, inovando como μHTS ⁸⁻¹¹.

A miniaturização dos ensaios de HTS resultou em três benefícios significantes: redução dos custos, no tempo das análises e do espaço necessário⁸. Entretanto, a baixa reprodutibilidade e seletividade, com resultados não confiáveis, diminuem a credibilidade do ensaio. Desta forma, o desenvolvimento de métodos de triagem capazes de identificar novos ligantes e que amenizem os problemas observados nos métodos convencionais torna-se de crucial importância.

1.2 - Cromatografia de bioafinidade

O termo cromatografia de bioafinidade (BC), biocromatografia ou cromatografia de afinidade analítica é utilizado quando um alvo biológico imobilizado é empregado como fase estacionária (biorreator) em análises cromatográficas¹². O princípio fundamental desta técnica é a distribuição do soluto entre as fases móvel e estacionária governada pela sua interação com o alvo imobilizado¹³. Assim, esta técnica surge como uma alternativa aos ensaios convencionais de HTS, uma vez que reúne a seletividade de uma biomolécula com a reprodutibilidade de um sistema de cromatografia líquida.

O grande número de informações fornecidas pelos resultados desta técnica reflete no fato de que princípios fundamentais do processo de metabolização de fármacos no organismo (ação, absorção e distribuição) são dinâmicos na natureza e tem muito em comum com os mecanismos básicos envolvidos na cromatografia líquida, como as interações hidrofóbicas,

eletrostáticas e ligações de hidrogênio¹⁴. Portanto, as interações intermoleculares que determinam o comportamento de compostos no ambiente biológico são as mesmas do ambiente cromatográfico, tornando a cromatografia de bioafinidade uma ferramenta útil em HTS, mimetizando o ambiente biológico^{15,16}.

A BC foi reportada pela primeira vez há 102 anos, para purificar a proteína α -amilase utilizando o substrato (amido) como suporte e alvo imobilizado¹⁷. Os alvos utilizados para imobilização são de origem biológica (anticorpos, enzimas, proteínas de diversas classes, antígenos, hormônios, sequências de DNA ou RNA) e, devido a elevada seletividade as colunas obtidas podem ser utilizadas para isolar, medir ou estudar alvos específicos mesmo quando presentes em matrizes complexas¹².

Três etapas envolvem os ensaios por BC: a imobilização do alvo (biomolécula) no suporte cromatográfico para produção dos biorreatores, a avaliação da atividade da biomolécula após a imobilização e, a determinação dos parâmetros cinéticos e de afinidade pelo ligante, após a inserção do biorreator no sistema cromatográfico¹⁴.

O processo de imobilização de biomoléculas pode ser realizado *in situ* ou *in batch*. No processo *in batch* ocorre inicialmente a imobilização da biomolécula sobre o suporte para posterior empacotamento da coluna, enquanto que no processo *in situ*, a biomolécula é imobilizada em uma coluna previamente empacotada. Estudos realizados nos dois modos de imobilização, com a enzima *Penicillin G acylase* (PGA) demonstraram que durante o processo *in batch* pode ocorrer a inativação da enzima, além de uma menor quantidade de PGA ligada em comparação com o processo *in situ*^{18,19}.

De acordo com as propriedades da biomolécula alvo, diversas técnicas têm sido empregadas para a imobilização, que se baseiam nas ligações físicas ou químicas entre a biomolécula e o suporte. As técnicas mais utilizadas são: adsorção, ligação covalente, imobilização em gel ou polímero, encapsulação e o intercruzamento^{19,20}. A imobilização através da formação de

ligação covalente entre a biomolécula e o suporte, é um dos métodos mais utilizados e empregados em BC, que possui como vantagens: diminuição de inativação espontânea (como ocorre na auto-digestão de proteases), evitar o fenômeno de dessorção e, aumentar o tempo de vida útil do biorreator com um aumento da estabilidade frente a modificações na temperatura, pH e percentual de solvente orgânico da fase móvel¹⁸.

A estrutura do suporte é um fator determinante no preparo dos biorreatores, pois define o fácil acesso do substrato aos sítios ativos da biomolécula. Portanto, características como uma ampla superfície com elevada densidade de grupos reativos, mínimo impedimento estérico e inerte ao final do procedimento de imobilização, são importantes durante a escolha do suporte²¹.

Suportes baseados em capilares tubulares abertos confeccionados com sílica fundida garantem à BC um baixo tempo de análise, baixa pressão de volta e a diminuição de interações não-específicas^{18,22}. Material monolítico, baseado em sílica ou polímero orgânico, têm sido empregado na imobilização de diversas proteínas, possuindo como principal vantagem a possibilidade de utilizar elevadas vazões sem aumentar a pressão de volta²³⁻²⁵. Partículas magnéticas são um outro tipo de suporte eficientemente empregados para estudo de interações biomolécula-biomolécula ou biomolécula-ligante, que possuem como vantagem a facilidade em isolar uma substância ativa de uma mistura de compostos, sem etapas adicionais^{22,26}.

Vários outros suportes estão disponíveis comercialmente e a escolha, bem como a técnica de imobilização, dependem da natureza da biomolécula, do ligante e de sua aplicação final. Portanto, não existe um método de imobilização universal¹⁸.

Para avaliar a afinidade dos biorreatores por possíveis ligantes, dois métodos cromatográficos podem ser empregados, a cromatografia zonal ou frontal. Na cromatografia zonal, o soluto é introduzido em um pulso, resultando em uma banda cromatográfica ou zona, diferentemente da cromatografia frontal,

onde o soluto é continuamente introduzido na coluna até completa saturação, resultando em uma curva de saturação (*breakthrough curve*)^{13,27}, como demonstrado na Figura 1.1. Uma das desvantagens da cromatografia frontal é a necessidade de uma grande quantidade de amostra, em torno de 10 a 20 mL por análise, dependendo da capacidade de separação do complexo biomolécula-ligante formado²⁸.

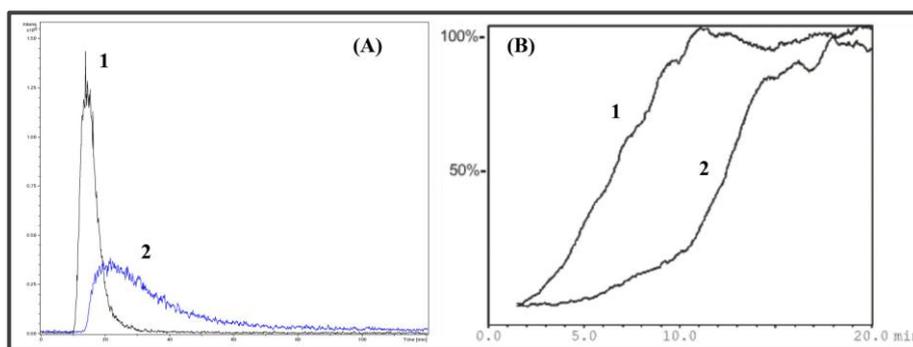


FIGURA 1.1- Exemplo de perfil de eluição zonal (A) e frontal (B), onde o composto 2 possui uma maior afinidade pela biomolécula.

Neste trabalho optamos pelo uso da cromatografia zonal linear e não-linear de bioafinidade.

1.2.1 - Cromatografia zonal linear de bioafinidade

No método cromatográfico zonal, uma pequena quantidade de amostra é injetada no sistema cromatográfico e a banda (ou zona) é monitorada. Deste modo, seguindo os princípios de linearidade, esta banda tende a ter uma distribuição Gaussiana²⁹.

Na cromatografia zonal linear de bioafinidade (L-ZBC), a determinação da atividade da biomolécula imobilizada na fase estacionária é realizada em um excesso de substrato e, a área da banda cromatográfica do produto formado pela biocatálise é medida e relacionada com sua concentração através de uma curva de calibração, o que permite o monitoramento da atividade do biorreator. A enzima acetilcolinesterase foi eficientemente imobilizada em

suportes cromatográficos de sílica, apresentando valores da constante de Michaelis-Menten que demonstraram a afinidade da enzima pelo substrato acetiltiocolina³⁰⁻³².

Monitorar a atividade da biomolécula imobilizada é uma ferramenta útil para verificar o melhor método de imobilização a ser empregado. Isso foi demonstrado por Cardoso et al.³³, no qual diferentes soluções tampão foram utilizadas durante o procedimento de imobilização da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), em capilares de sílica fundida e, estocagem do biorreator preparado. A atividade foi monitorada medindo-se a produção de NADH a partir de NAD⁺ e, comparada com a atividade da enzima em solução. Observou-se que 99% e 50% da atividade catalítica foram mantidas por 24 horas quando utilizada a solução tampão Tris-HCl (50mM, pH 8,6; contendo b-mercaptoetanol, 1mM e arseniato de sódio heptahidratado 30mM) e fosfato de potássio (50mM, pH 7,0), respectivamente. Biorreatores foram preparados com a GAPDH humana e de *Trypanosoma cruzi*, para a avaliação dos efeitos do procedimento de imobilização na estrutura enzimática. Através da medida da produção de NADH a partir de NAD⁺ foram determinados os valores de K_M, que indicaram uma diminuição na afinidade das enzimas imobilizadas quando comparado com a enzima livre. Entretanto, os elementos estruturais necessários para o procedimento de reconhecimento molecular e atividade biológica permaneceram inalterados³⁴.

Na L-ZBC a triagem de ligantes é usualmente realizada de modo individual, monitorando a área da banda correspondente ao produto da reação^{32,35}. Informações como a constante de inibição, mecanismos de inibição e capacidade inibitória (IC₅₀) são eficientemente determinados empregando esta técnica. Assim, como demonstrado por de Moraes et al.³⁵, a atividade inibitória pode ser monitorada *online* utilizando-se um sistema cromatográfico multidimensional. A enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) humana foi imobilizada em capilares de sílica fundida e a triagem de ligantes foi validada

empregando o inibidor de referência DI4G, que apresentou um valor de IC_{50} igual a $40,6 \pm 0,36$ nM .

Biorreatores preparados com a enzima beta-secretase (BACE1) humana foram utilizados na triagem de 38 ligantes selecionados a partir de uma triagem virtual. Um dos compostos mais ativos foi um derivado de bis-indanona, para o qual foram determinados os valores de IC_{50} e K_i ³⁶.

Wang et al.³⁷⁻³⁹ demonstraram o uso de biorreatores preparados com receptores e proteínas na triagem de ligantes em extratos de produtos naturais e/ou misturas. O biorreator preparado com a proteína albumina sérica humana (HSA) foi utilizado na identificação de 19 compostos biologicamente ativos do medicamento Longdan Xiegan Decoction (LDX), prescrito na medicina chinesa³⁸. Empregando a cromatografia multidimensional, foram identificados 14 compostos do extrato de *Schisandra chinensis* que interagem com o lipossoma imobilizado na coluna cromatográfica da primeira dimensão. Em uma segunda dimensão, os compostos foram identificados por ultravioleta e espectrometria de massas³⁹.

Estudos de deslocamento também são comuns nos ensaios por L-ZBC. O ensaio consiste na injeção do ligante sozinho e na presença de um inibidor na fase móvel, para competição. Assim, são determinados os fatores de retenção em ambos os casos e relacionados com a concentração do ligante empregado na fase móvel. A Figura 1.2 exemplifica os cromatogramas obtidos empregando esta técnica. Nota-se que a presença do inibidor com maior afinidade pela biomolécula na fase móvel diminuiu o fator de retenção do ligante injetado. Trabalhos com receptores nicotínicos imobilizados em suportes cromatográficos são encontrados na literatura, validando o método para a triagem de ligantes^{16,40-42}.

Yoo et al.⁴³ empregaram os estudos de deslocamento para identificar o sítio de ligação da imipramina na HSA. Usando a cromatografia zonal de bioafinidade, foi identificada a competição direta do L-triptofano com a

imipramina, propondo uma interação específica com o sítio indol-benzodiazepínico Sudlow II.

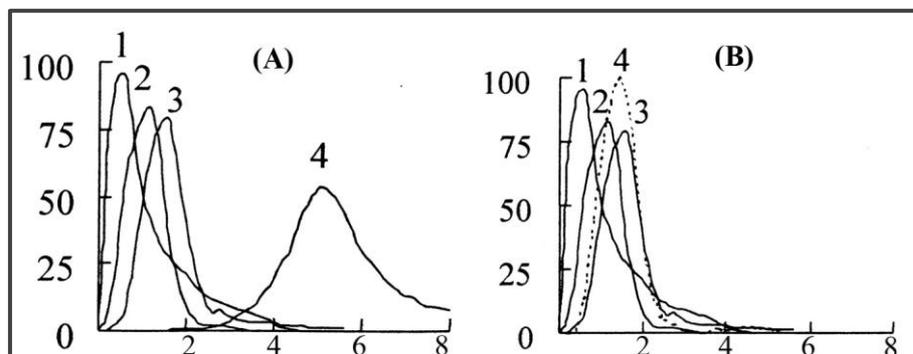


FIGURA 1.2- Exemplo de ensaio de deslocamento na L-ZBC. Perfis de eluição para diferentes compostos (1, 2, 3 e 4) no biorreator (A) sem o inibidor e, (B) com o inibidor na fase móvel. Figura adaptada de Wainer et al.⁴⁰

1.2.2 - Cromatografia zonal não-linear de bioafinidade

A técnica de cromatografia zonal esta diretamente relacionada com bandas cromatográficas de distribuição Gaussianas, diferentemente das bandas assimétricas que são usualmente observadas. Efeitos como a transferência de massa heterogênea e a heterogenicidade da fase estacionária são os responsáveis por essa assimetria, que é um problema em separações analíticas mas uma ferramenta importante para caracterizar o processo de separação por cromatografia zonal não-linear (NL-ZC)^{22,44}.

O desvio da distribuição Gaussianiana (assimetria) esta diretamente relacionado com a concentração de analito utilizada no ensaio^{22,44}. Assim, a técnica de NL-ZC pode ser utilizada para medir os parâmetros cinéticos envolvidos na formação e dissociação do complexo soluto-fase estacionária.

Aplicando a NL-ZC à cromatografia de bioafinidade surge a técnica de cromatografia zonal não-linear de bioafinidade (NL-ZBC), onde a fase estacionária possui uma biomolécula imobilizada e os processos cromatográficos incluem as interações de ligação e afinidade entre a biomolécula e o ligante. Portanto, as constantes de velocidade de associação

(k_{on}) e dissociação (k_{off}), equilíbrio (K_a) e afinidade (K_d) podem ser determinadas^{26,45}.

Grande parte dos trabalhos envolvendo a NL-ZBC utilizam uma equação de balanço de massa desenvolvida por Wade et al.⁴⁵, que é derivada dos parâmetros cromatográficos não-lineares a partir da solução de *Impulse Input*. Softwares que empregam esta equação são disponibilizados para tratamento dos dados obtidos a partir do ensaio por NL-ZC. A Tabela 1.1 apresenta a equação com os parâmetros utilizados para descrever as bandas cromatográficas e calcular as constantes k_{off} , k_{on} , K_a e K_d .

TABELA 1.1- Equação de balanço de massa derivada a partir da solução por *Impulse Input* com os parâmetros da NL-ZC e L-ZBC e, como eles se relacionam⁴⁴.

$y = \frac{a_0}{a_3} \left[1 - \exp\left(-\frac{a_3}{a_2}\right) \right] \frac{\left[\sqrt{\frac{a_1}{x}} I_1 \left(\frac{2\sqrt{a_3x}}{a_2} \right) \exp\left(\frac{(-x - a_1)}{a_2}\right) \right]}{\left[1 - T \left[\left(\frac{a_1}{a_2} \right)^{x/a_2} \right] [1 - \exp(-a_3/a_2)] \right]}$		
Parâmetros NL-ZC	a_0	Parâmetro de área
	a_1	Parâmetro de centro
	a_2	Parâmetro de comprimento
	a_3	Parâmetro de distorção
Parâmetros L-ZBC	k'	Fator de retenção; $k' = a_1$
	k_{off}	Constante de velocidade de dissociação; $k_{off} = 1/a_2t_0$, onde t_0 é o volume morto da coluna
	k_{on}	Constante de velocidade de associação; $k_{on} = K_dK_a$
	K_a	Constante de equilíbrio; $K_a = a_3/C_0$, onde C_0 é a concentração de soluto injetada multiplicada por a_2
	K_d	Constante de afinidade; $K_d = 1/K_a$

A NL-ZC é usualmente empregada para medir as interações entre o soluto e colunas de fase estacionária compostas por proteínas, identificando os

sítios responsáveis pela adsorção enantiosseletiva⁴⁶⁻⁴⁸. Poucos trabalhos foram publicados na área para caracterização de ligantes por NL-ZBC. As constantes de dissociação (k_{off}) de 12 inibidores não-competitivos foram determinadas empregando uma fase estacionária composta pelos receptores nicotínicos neuronais (nAChR), subtipo $\alpha_3\beta_4$, e a NL-ZBC⁴⁹. Além disso, foi verificada a capacidade de reconhecimento de inibidores não-competitivos por biorreatores preparados com diferentes subtipos dos nAChR ($\alpha_3\beta_2$, $\alpha_3\beta_4$, $\alpha_4\beta_2$ e $\alpha_4\beta_4$) antes e depois de sofrerem uma mudança conformacional causada pela eluição de uma solução de epibatidina (indução agonista). Um aumento na afinidade dos biorreatores preparados pelos ligantes foi verificado pelo aumento nos fatores de retenção obtidos⁴⁹⁻⁵¹.

Neste contexto, o k_{off} e os parâmetros termodinâmicos foram determinados para os ligantes enantioméricos dos nAChR, dextrometorfano (DM) e levometorfano (LM). A NL-ZBC foi capaz de identificar a seletividade do receptor pelo DM, com um fator de retenção 1,62 vezes maior quando comparado com o LM, demonstrando uma elevada estabilidade do complexo DM-nAChR formado⁵²⁻⁵⁴.

A proteína Hsp90 α (*heat shock 90 α*) foi covalentemente imobilizada em um suporte cromatográfico via os grupamentos amina e ácidos carboxílicos, formando os biorreatores Hsp90 α (NT) e Hsp90 α (CT). A NL-ZBC foi utilizada para determinar as constantes de associação e de dissociação do ligante C-terminal novobiocina empregando o biorreator Hsp90 α (NT). O valor de K_d calculado ($K_d= 122$ nM) foi similar ao valor calculado utilizando a técnica de cromatografia frontal de bioafinidade ($K_d= 100$ nM), indicando que a NL-ZBC pode ser utilizada para determinar a afinidade de ligantes pela proteína Hsp90 α ⁵¹.

Receptores de estrogênio, EER α e EER γ , foram imobilizados na superfície de aminopropil sílica produzindo-se biorreatores. Os parâmetros cinéticos foram determinados para os ligantes de referência (4-

hidroxitamoxifeno, endoxifeno e tamoxifeno) e o valor de K_d obtido foi consistente com os valores de IC_{50} , indicando que os biorreatores preparados com os receptores $EER\alpha$ e $EER\gamma$ podem ser empregados na caracterização de ligantes desconhecidos por NL-ZBC⁵⁵.

1.3 - Ensaios de *ligand fishing*

Os ensaios de *ligand fishing* ou pesca de ligantes foram inicialmente empregados para a extração de proteínas e enzimas de matrizes celulares. Este procedimento envolve a imobilização da biomolécula alvo (proteínas, enzimas, receptores) em micro ou nano-partículas que são imersas diretamente na matriz. Qualquer composto, presente na matriz, que possua afinidade pela biomolécula imobilizada liga-se a ela e permanece retido, enquanto os que não possuem ficam na solução e são eliminados. Posteriormente, os ligantes podem ser eluídos para a identificação injetando-se a solução em um espectrômetro de massas⁵⁶.

Suportes magnéticos, micro ou nano-particulados são os mais utilizados na imobilização de biomoléculas para o emprego em ensaios de *ligand fishing*, uma vez que o uso de separadores magnéticos permite uma boa extração e a automatização é possível com separadores magnéticos automáticos⁵⁷. Trabalhos envolvendo o uso de partículas magnéticas (MB, do inglês *magnetic beads*) para ensaios de *ligand fishing* apresentaram um número de publicações igual a 33 no ano de 2012 e 10 neste início de 2013 (pesquisa realizada na base de dados Scopus para as palavras *magnetic beads* e *screening*), demonstrando um significativo crescimento anual.

O tamanho das partículas magnéticas permanece na faixa de poucos nanômetros (nm) a centenas de micrometros (μm). Basicamente, elas são compostas por óxido de ferro recoberto com sílica ou polímero, onde empregando a metodologia correta, a superfície de cada partícula pode ser modificada pela adição de grupos funcionais ou biomoléculas. A manipulação das MB é possível com campos magnéticos externos, sem contato com a

solução, evitando assim contaminação e interferência da matriz durante o processo de extração^{56,57}.

Moaddel et al.²⁶ utilizaram as MB, pela primeira vez, para realizar ensaios de *ligand fishing*. A HSA foi imobilizada na superfície das MB de sílica para pescar ligantes de uma mistura de compostos conhecida. Os resultados obtidos correlacionaram com os resultados previamente reportados utilizando os biorreatores e cromatografia de bioafinidade.

A afinidade da HSA pela camptotecina e seus análogos é uma característica importante para estudos do potencial terapêutico no tratamento de câncer. Assim, HSA-MB foram preparadas e a partir de ensaios de *ligand fishing* foram determinadas as constantes de equilíbrio (K_a) entre a proteína e os ligantes. Os resultados apresentaram valores consistentes com os dados previamente reportados na literatura, validando o emprego do ensaio de *ligand fishing* para a determinação das constantes cinéticas^{58,59}.

Adalberto et al.⁶⁰ sintetizaram, caracterizaram e modificaram a superfície de MB para imobilizar a enzima pectinase proveniente do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. A enzima na forma livre e imobilizada apresentou comportamento térmico, químico e cinético similar, caracterizando o biorreator como uma boa ferramenta na triagem de ligantes.

A proteína Hsp90 α foi imobilizada na superfície de MB e os ensaios de *ligand fishing* isolaram ligantes de referência de uma mistura conhecida de compostos. Com isso, o método foi utilizado para pescar proteínas em uma matriz celular e, os resultados demonstraram que a Hsp90 α manteve a afinidade para formar múltiplos complexos proteicos^{22,61}.

Os ensaios de *ligand fishing* foram empregados para determinar a atividade inibitória dos ligantes de referência, huperzina A e huperzina B, da enzima acetilcolinesterase. O ensaio foi realizado com a AChE imobilizada em MB e a atividade monitorada por um acoplamento com o espectrômetro de

massas. Ao final, a atividade inibitória do extrato da espécie *Huperzia serrata* foi calculada⁶².

A enzima lisossomal, α -galactosidase humana (GLA) foi imobilizada em diferentes tipos de MB pelo procedimento de formação de ligação covalente e adsorção. Todas as GLA-MB preparadas apresentaram atividade enzimática⁶³.

Na área da proteômica, os ensaios de *ligand fishing* são usualmente empregados para isolar e identificar macromoléculas, como as proteínas. Como demonstrado por Ershov et al.⁶⁴, o ensaio permitiu a identificação de 38 proteínas pescadas do extrato de células HeLa e MDA a partir de partículas magnéticas imobilizadas com plasmídeos⁶⁵.

A identificação de biomarcadores em amostras clínicas é uma outra aplicabilidade dos ensaios de *ligand fishing*. O anticorpo policlonal anti-pep5 foi imobilizado nas MB. O experimento foi realizado no soro coletado de pacientes que apresentavam diagnóstico de carcinoma hepatocelular e, o biomarcador pep5 foi isolado com sensibilidade de 78% e especificidade de 90%⁶⁶.

Nos últimos anos, tem aumentado o emprego dos ensaios de *ligand fishing* para extrair ligantes e biomarcadores de extratos de produtos naturais, especialmente quando integrados a um espectrômetro de massas para identificar e caracterizar os ligantes pescados. Desta forma, ligantes da HSA foram pescados, isolados e caracterizados a partir de extratos de *Dioscorea nipponica* e *Puerariae lobata*⁶⁷⁻⁷⁰.

A enzima α -glucosidase esta diretamente envolvida com a digestão e absorção de carboidratos no intestino, portando é um alvo no tratamento da diabetes. Ensaios de *ligand fishing* utilizando a α -glucosidase imobilizada nas MB permitiram a triagem em extratos de produtos naturais e pesca de seis ligantes^{71,72}.

Como demonstrado nos trabalhos citados anteriormente, nos ensaios de *ligand fishing* as MB podem ser utilizadas com a biomolécula

imobilizada na sua superfície, pescando os ligantes de misturas a partir da formação do complexo biomolécula-ligante (MB-B-L). Por outro lado, a biomolécula pode ser empregada diretamente na mistura, formando inicialmente o complexo biomolécula-ligante (B-L) que então será pescado com a adição das MB e formação do complexo (MB-B-L)⁷³⁻⁷⁵.

Neste contexto, o ensaio de dois estágios foi empregado para pescar ligantes a partir de uma mistura com 1000 compostos bioativos. O alvo foi a proteína Melittina (Mel) que foi complexada a calmodulina (CAM) e o complexo proteína-ligante foi pescado utilizando MB modificadas com Ni(II). Desta forma, 8 ligantes foram identificados⁷⁴.

Jonker et al.⁷³ demonstraram o emprego das MB para pescar o complexo ligante-proteína em um sistema *online*, por LC-MS. Após a incubação da mistura de ligantes e não-ligantes com os receptores de estrogênio, os complexos ligante-proteína foram pescados através da adição das MB. Em seguida os ligantes foram eluídos *online* e identificados por espectrometria de massas.

A variedade e o aumento do número de MB disponíveis com diversos modificadores químicos na superfície, associada à diversidade de ensaios automatizados *online* torna a técnica de *ligand fishing* uma importante ferramenta para estudos de afinidade e triagem de ligantes em matrizes complexas.

1.4 - Inibidores enzimáticos como candidatos a fármacos

Envolvendo diferentes áreas de pesquisa, o processo de descoberta de um novo fármaco é longo, em torno de 15 anos⁷⁶. A busca pelo fármaco para o tratamento de uma determinada enfermidade se inicia pela identificação de um alvo do agente patogênico causador desta enfermidade cuja atividade é associada a uma desordem ou doença. As enzimas representam uma importante classe de biomoléculas que atuam como alvos em aproximadamente 28% dos fármacos que atuam como inibidores enzimáticos^{77,78}.

É extensa a lista de fármacos que agem como inibidores enzimáticos, entre os anos de 2006 e 2007, 54 novos fármacos foram aprovados pelo FDA onde 16 atuam em alvos enzimáticos¹⁸. Muitas doenças são causadas pela disfunção ou expressão desregulada de enzimas; em outros casos, a inibição de enzimas funcionais do agente patogênico (vírus, bactérias, parasitas) é um método atrativo para o tratamento de diversas doenças.

Assim, a seletividade das enzimas aliada ao fato de elas participarem de processos bioquímicos vitais, como catalisar quase todas as reações envolvidas em processos celulares, garantem que elas sejam um alvo potencial no desenvolvimento de novos fármacos.

1.5 - A enzima acetilcolinesterase

A enzima AChE, também conhecida como colinesterase de glóbulo vermelho (CGV), colinesterase verdadeira eritrocitária e, acetilcolina acetilhidrolase, está presente principalmente nas hemácias, músculos estriados e terminações nervosas, mais precisamente na região onde ocorrem as sinapses nervosas¹⁴. Ela é a enzima responsável por regular o nível do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no sistema nervoso central, portanto esta relacionada ao mecanismo pelo qual um potencial de ação estimula a liberação do neurotransmissor ACh que por sua vez, se liga ao receptor e altera a permeabilidade da membrana pós-sináptica^{79,80}. Resumidamente, a AChE está correlacionada ao funcionamento das sinapses colinérgicas, isto é, as sinapses que usam a acetilcolina como neurotransmissor⁷⁹.

A AChE é uma serina-esterase, com o mecanismo catalítico similar ao das serina-proteases. É uma enzima com 75 kD, de atuação rápida, e que está complexada a um GPI (glicosil-fosfatidilinositol) à superfície da membrana pós-sináptica.

Em 1967, foi obtido o primeiro cristal de AChE extraída do peixe-elétrico de água doce, *Electrophorus electricus*, *eel*.⁸¹ e, posteriormente foi realizada a caracterização preliminar da estrutura dos cristais obtidos via

difração de raios X^{82,83}. Em 1999, Bourne et al.⁸⁴ resolveram duas estruturas cristalinas do tetrâmetro da *eelAChE*. E, neste mesmo ano, foi determinada a estrutura da AChE proveniente do peixe-elétrico de água salgada, *Torpedo californica*⁸⁵.

O banco de dados de proteínas (PDB) contém mais de 150 estruturas determinadas para a enzima AChE. Dentre elas, apenas 17 são provenientes da espécie *Homo sapiens*⁸⁶. A estrutura cristalina da AChE humana recombinante foi resolvida no ano 2000 por Kryger et al.⁸⁷ e, mais recentemente a estrutura 3D foi reportada⁸⁸.

A similaridade estrutural entre as AChE provenientes de diversas espécies (como peixe-elétrico e humana) foi verificada por Bon et al.⁸⁹ em 1979. A *eelAChE* (código PDB: 1C2o) e a *huAChE* (código PDB: 3LII) apresentaram uma similaridade na sequência de aminoácidos igual a 84%, utilizando o PDB e a ferramenta matemática *blast2seq*.

A tríade catalítica da enzima AChE é composta pelos resíduos de aminoácidos Ser 200, His 440 e Glu 237 (Figura 1.3)⁸⁵.

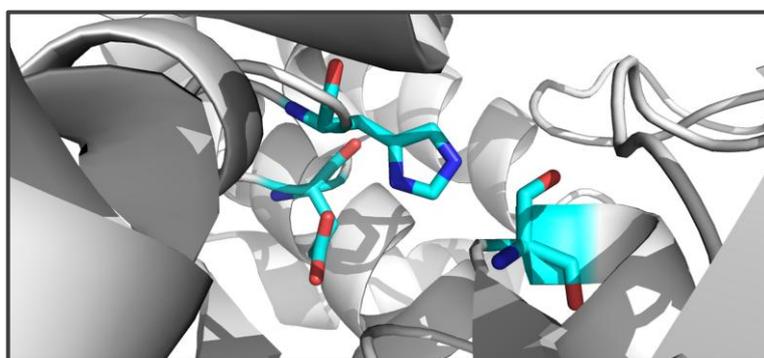


FIGURA 1.3- Sítio catalítico da AChE (código PDB: 1acl) com os resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica.

Uma molécula de ACh que participa na transmissão de um determinado impulso nervoso deve ser degradada pouco antes (milissegundos) da chegada do próximo impulso nervoso e é a AChE que desempenha esta

função. A colina resultante é captada pela membrana pré-sináptica por meio de um simporte Na^+ -colina, para ser utilizada na ressíntese de ACh^{79,90,91}. Assim, a hidrólise da acetilcolina é realizada em um ciclo de acetilação-desacetilação. Como ilustrado na Figura 1.4, após a formação do complexo enzima-substrato a Ser do sítio catalítico é acetilada e a porção colina do substrato é liberada. Em seguida, a enzima acetilada sofre um ataque nucleofílico por uma molécula de água liberando ácido acético e assim fechando o ciclo⁹².

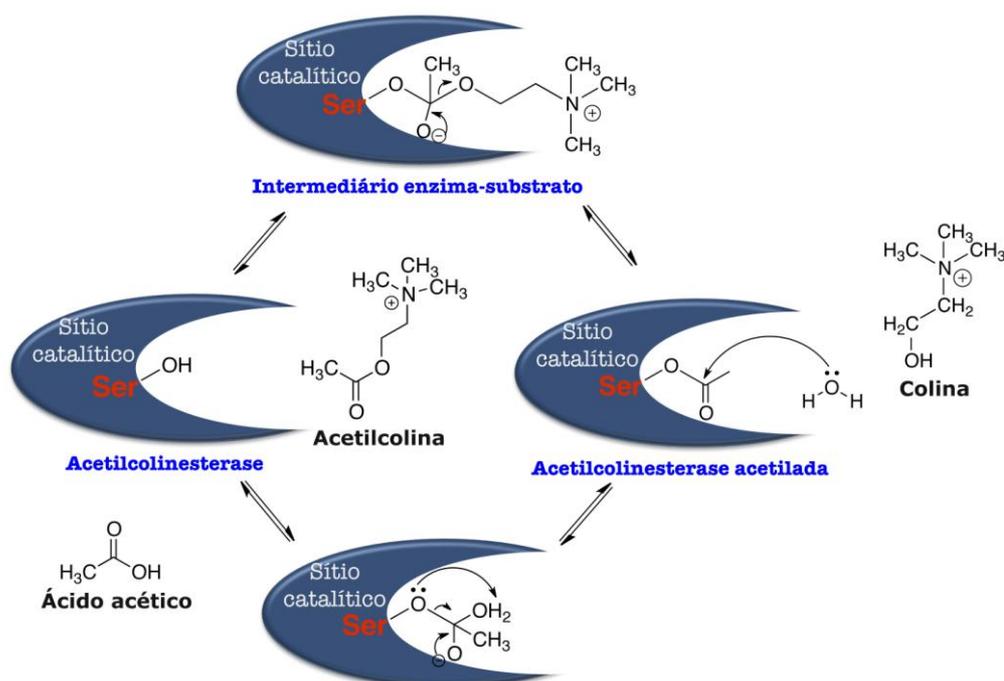


FIGURA 1.4- Reação de acetilação-desacetilação na hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.

Devido à diversidade estrutural dos inibidores, a facilidade na obtenção da enzima e de inibidores de referência, a acetilcolinesterase foi o modelo selecionado para o desenvolvimento do trabalho.

1.5.1 - Inibidores da acetilcolinesterase e sua função biológica

A enzima AChE atua principalmente no sistema nervoso central, levando à formação de colina a partir da reação com a molécula de acetilcolina. A inibição da AChE leva a um aumento na taxa de acetilcolina, com

consequente reestruturação da função colinérgica. Assim, muitos dos fármacos empregados para o tratamento da doença de Alzheimer possuem como alvo a enzima AChE, uma vez que o tratamento sintomático envolve a reestruturação da função colinérgica^{90,93}.

A doença de Alzheimer foi identificada pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907 e trata-se de uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível do sistema nervoso central, associada a déficits dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina que acarreta em perda de memória e diversos distúrbios cognitivos^{94,95}.

Esta enzima também possui um papel importante na transmissão do impulso nervoso colinérgico em insetos, onde sua inibição ocasiona a dessensibilização do receptor de acetilcolina levando ao bloqueio da transmissão com consequente morte⁹⁶. Portanto, esta enzima é alvo de estudos no desenvolvimento de novos inseticidas, cada vez mais eficiente e menos agressivos ao meio ambiente e à saúde humana⁹⁶⁻⁹⁹. Os inseticidas organofosforados e carbamatos utilizados comercialmente inibem irreversivelmente a atividade da enzima AChE através da fosforilação ou carbamatização do resíduo serina do núcleo do sítio ativo^{100,101}.

CAPÍTULO 2

2 -Biorreatores de acetilcolinesterase: uma ferramenta *online* para a triagem de ligantes.

2.1 - Introdução

Na última década, com os avanços na área da biologia molecular, o interesse por compostos de baixo peso molecular, que atuem como alvos no desenvolvimento de novos fármacos tem aumentado⁷⁶. Assim, os ensaios de elevada eficiência para a triagem de ligantes são utilizados frequentemente.

A acetilcolinesterase vem ganhando um interesse significativo como alvo biológico e, um dos fatores responsáveis, é o seu envolvimento na diminuição do nível de acetilcolina nas sinapses nervosas. Inibidores da AChE (AChEIs) reestabelecem a função colinérgica em humanos, aumentando os níveis de acetilcolina no sistema nervoso central; enquanto em insetos a inibição da AChE está relacionada com a morte. Portanto, os AChEIs são uma terapia aprovada e mais recomendada mundialmente para o tratamento da doença de Alzheimer e para a produção de inseticidas^{96,97,99,102}.

A triagem de ligantes da enzima AChE frequentemente envolve ensaios em solução. Usualmente são métodos colorimétricos como o de Ellman¹⁰³ e o de Gomori^{104,105} que utilizam ensaios por micropoços e cromatografia em camada, respectivamente.

O emprego do método de Ellman é líder na literatura, sendo aplicado mesmo com a enzima imobilizada, como nos trabalhos de da Silva et al.³² e Forsberg et al.³¹.

Trabalhos como o de Rhee et al.¹⁰⁶ e Di Giovanni et al.¹⁰⁷ estudaram o efeito falso-positivo nos resultados dos ensaios colorimétricos, nos quais os compostos tidos como ligantes da AChE podem inibir a enzima ou

impedir a reação entre a tiocolina e o revelador (reagente de Ellman-DTNB ou o sal de azul sólido B). Para a maioria dos compostos analisados, 83%, os resultados foram similares; dos demais, 15% apresentaram atividade inibitória no ensaio em micropoços, mas se mostraram inativos no ensaio em TLC e 2% foram ativos em TLC e inativos no ensaio em micropoços. Os dados apontam as divergências nos resultados baseados em métodos colorimétricos, o que motiva o desenvolvimento de novas técnicas HTS.

Neste contexto, a cromatografia zonal (linear e não-linear) ou frontal de bioafinidade tem sido explorada para mimetizar ações biológicas mostrando-se como uma importante e nova ferramenta de ensaios HTS, que possibilita a triagem de ligantes bem como a determinação dos mecanismos de inibição dos ligantes identificados^{5,15,16,22,25}. Fornecendo resultados rápidos e precisos dos valores das constantes cinéticas e termodinâmicas destes³⁵.

Assim, a enzima acetilcolinesterase tem sido imobilizada em diferentes suportes^{30,31,108}. Recentemente, foi reportada a imobilização da AChE de *Electrophorus electricus* em capilares de sílica fundida para a produção de ICERs (do inglês, *immobilized capillary enzyme reactors*) e, sua utilização para ensaios de triagem, identificando e caracterizando novos ligantes³². Para medida do produto da catálise enzimática, o método de Ellman foi utilizado com a acetiltiocolina como substrato.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para a triagem e caracterização de ligantes pela quantificação em fluxo do produto da catálise enzimática. Para isso, o modelo utilizado foi a enzima acetilcolinesterase (peixe-elétrico) e a colina produzida, a partir da catálise enzimática com a acetilcolina (substrato natural da enzima), foi quantificada por espectrometria de massas (MS).

2.2 - Procedimento Experimental

2.2.1 - Materiais

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

As análises foram realizadas à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$). A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE). E, os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC.

As soluções salinas preparadas foram filtradas a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45 μm .

As fases móveis preparadas foram degaseificados em um ultrassom COLE-PARMER modelo 8852.

A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex PHOENIX modelo AP56.

Para a pesagem analítica dos reagentes foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo modelo AL204, com precisão 0,0001g.

As medidas de pH foram realizadas em um pH-metro Logen, com precisão 0,01.

Para o preparo do capilar e imobilização da enzima foi utilizada uma bomba-seringa Harvard Apparatus modelo 11Plus.

As acetilcolinesterases do peixe-elétrico, *Electrophorus electricus*, (*eelAChE*) tipo VI-S e humana expressa de células HEK 293 (*huAChE*), foram obtidas da Sigma-Aldrich.

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

2.2.2 - Imobilização da enzima AChE em capilares de sílica fundida

2.2.2.1 - Preparo do capilar

O capilar de sílica fundida (0,100 mm d.i. x 0,375 mm x 300 mm) foi limpo eluindo através de uma bomba-seringa, à 130 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 2,0 mL de uma solução HCl na concentração de 2,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ seguido por 1,0 mL de água. O capilar foi colocado em estufa à 120°C por 60 minutos. Preparou-se uma solução de 3-aminopropiltriétoxisilano (APTS) diluindo-se 250 μL de solução APTS 99% em 2,5 mL de água. Um volume de 1,0 mL dessa solução foi eluído através do capilar que novamente foi colocado em estufa à 120°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez e então o capilar foi deixado à temperatura ambiente por 720 minutos.

2.2.2.2 - Imobilização da *eelAChE* e *huAChE*

No capilar pré-tratado, utilizando-se uma bomba-seringa (na vazão de 130 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) eluiu-se à temperatura ambiente: 1,5 mL de solução glutaraldeído 1% em tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4 ; 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0), seguido de 1,0 mL do tampão KH_2PO_4 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0). A 4°C foi eluído 1,0 mL da solução enzimática por duas vezes.

Foram utilizadas cinco diferentes concentrações da solução de *eelAChE*, preparando cinco ICERs-*eelAChE*: 1,000; 0,5000; 0,2500; 0,1250 e 0,0625 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. O ICER-*huAChE* foi preparado com a enzima na concentração

de 0,125 mg.mL⁻¹. Todas as soluções foram preparadas no tampão KH₂PO₄ (50 mmol.L⁻¹, pH 7,0).

Os ICERs preparados foram lavados com o tampão de estocagem TRIS-HCl (100 mmol.L⁻¹, pH 8,0) e mantidos a 4°C com as extremidades imersas no mesmo tampão.

Antes da estocagem, o ICER-*huAChE* teve as bases de Schiff reduzidas eluindo-se por 60 minutos uma solução de borohidreto de sódio à 5,0 μL.min⁻¹ (5,0 mg.mL⁻¹ preparada no tampão KH₂PO₄ 50mmol.L⁻¹, pH 7,0). Em seguida, foi eluído o tampão KH₂PO₄ (50mmol.L⁻¹, pH 7,0) por 5 minutos e então uma solução de monoetanolamina 0,10 mol.L⁻¹ (preparada no tampão KH₂PO₄ 50mmol.L⁻¹, pH 7,0) por 60 minutos. Ao final, o ICER-*huAChE* foi lavado com 1,0 mL do tampão de estocagem e armazenado à 4°C com as extremidades imersas no mesmo tampão.

Para comparação, o procedimento de redução foi realizado para o preparo de um ICER-*eelAChE*.

2.2.3 - Desenvolvimento do método analítico por cromatografia zonal

2.2.3.1 - Otimização das condições de ionização e fragmentação

No desenvolvimento do método analítico foram avaliadas as condições de ionização e fragmentação para a colina (Ch) e a acetilcolina (ACh). Para isso foram preparadas soluções estoque a 0,10 mg.mL⁻¹ solubilizando-se 1,0 mg do composto em 10 mL de água. A partir de uma alíquota de 10 μL de cada solução estoque foram preparados 10 mL das soluções de trabalho à 100 ng.mL⁻¹, em diferentes fases móveis: água, solução acetato de amônio (15mmol.L⁻¹, pH 8,0), MeOH:H₂O (50:50, v/v), MeOH:H₂O (80:20, v/v), ACN:H₂O (50:50, v/v), ACN:H₂O (80:20, v/v), MeOH:solução acetato de amônio 15mmol.L⁻¹ pH 8,0 (50:50, v/v), MeOH:solução acetato de

amônio 15mmol.L⁻¹, pH 8,0 (80:20, v/v), ACN:solução acetato de amônio 15mmol.L⁻¹, pH 8,0 (50:50, v/v) e ACN:solução acetato de amônio 15mmol.L⁻¹, pH 8,0 (80:20, v/v).

Utilizando uma bomba-seringa na vazão de 10 µL.min⁻¹, foram realizadas as infusões de cada solução no espectrômetro de massas, separadamente. A otimização dos parâmetros de ionização e fragmentação no modo positivo foi realizada com a ajuda do software Esquire 6000 no modo Expert, para cada solução preparada.

Tendo a intensidade do íon como parâmetro, foi selecionada a fase móvel de trabalho onde se obteve uma maior intensidade e estabilidade do sinal, MeOH:solução acetato de amônio 15mM pH8,0 (50:50, v/v). Assim, os parâmetros do MS otimizados para o íon precursor da ACh [M]⁺ 146m/z e Ch [M]⁺ 104m/z com seu íon fragmento [C₂H₃OH]-[M]⁺ 60m/z foram: voltagem no capilar: 4500 V; voltagem no *skimmer*: 31.7 V; amplitude de fragmentação: 0.71 V; pressão do gás de nebulização (N₂): 15 psi; vazão do gás de secagem (N₂): 5,0 L.min⁻¹; temperatura da fonte: 280 °C

2.2.3.2 - O sistema LC-MS

Foi desenvolvido um método de cromatografia zonal linear de bioafinidade (L-ZBC) para a quantificação da colina produzida pelos ICERs preparados. Para isso, um sistema de cromatografia líquida (LC) foi acoplado em série a um espectrômetro de massas (MS) com analisador do tipo *ion-trap* (IT). As condições cromatográficas foram: bomba A- solução aquosa de acetato de amônio (15mmol.L⁻¹, pH 8,0) na vazão de 0,05 mL.min⁻¹; bomba B- metanol na vazão de 0,05 mL.min⁻¹ e volume de injeção igual a 10 µL. Os parâmetros otimizados para o MS foram: voltagem no capilar- 4500 V; voltagem no *skimmer*- 31,7 V; amplitude de fragmentação- 0,71 V; pressão do gás de nebulização (N₂)- 30 psi; vazão do gás de secagem (N₂)- 7,5 L.min⁻¹; temperatura da fonte de ionização- 335 °C.

No modo MRM (*Multiple Reaction-Monitoring*) foi monitorado o íon precursor da colina $[M]^+$ 104m/z e o seu íon fragmento $[C_2H_3OH]-[M]^+$ 60m/z com uma janela de isolamento igual a 1,0 m/z. O íon precursor foi utilizado para a quantificação e a sua razão com o íon fragmento para confirmação da proposta.

2.2.3.3 - Ensaio de estabilidade das soluções de trabalho

A possibilidade de hidrólise espontânea da solução de acetilcolina no auto-injetor do sistema cromatográfico e no capilar pré-tratado foi avaliada injetando-se em um ICER-*eel*AChE inativo uma solução de ACh 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (5,46 mg de ACh em 100 mL de água). Monitorando os íons precursores para a ACh $[M]^+$ 146m/z e Ch $[M]^+$ 104m/z foram realizadas 11 injeções consecutivas (com um volume de 10 μL por injeção), totalizando um período de 220 minutos.

2.2.4 - Validação do método analítico

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas de calibração com padrão externo, em duas faixas de concentração (alta e baixa). Para isso, uma solução padrão de Ch na concentração de 32000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (7,39 mg de Ch solubilizado em 1,00 mL de água) foi preparada. A partir de alíquotas apropriadas da solução padrão, foram preparadas (em água) as soluções estoque na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a curva baixa e 25600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a curva alta.

As soluções de trabalho para as curvas de calibração e controles de qualidade (CQs) foram preparadas (em água) a partir das soluções estoque. Curva baixa: 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 1,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Curva alta: 128; 256; 512; 1024; 2048; 4096 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. CQ (curva baixa): 0,6; 28,8; 57,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. CQ (curva alta): 153,6; 7372,8; 14745,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Os valores de concentrações dos CQs do método foram calculados da seguinte forma:

1- O CQ de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação ao ponto de menor concentração da curva de calibração.

2- O CQ de concentração média em torno de 40-60%, em relação a ponto de maior concentração da curva de calibração.

3- O CQ de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação a ponto de mais alta concentração da curva de calibração.

Para preparar os padrões de calibração e as amostras CQ, alíquotas (10 μL) da solução de trabalho apropriada foram adicionadas a 90 μL de água. As soluções foram homogeneizadas e alíquotas de 90 μL foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. Amostras de 10 μL foram injetadas em um ICER-*eelAChE* inativo no sistema LC-MS.

Os padrões de calibração foram preparados em triplicata e a curva de calibração construída através de regressão não-linear do tipo logarítmica, a partir da área da banda cromatográfica em função de uma dada concentração de Ch.

A precisão e exatidão intra e inter- lotes do método foi determinada pela análise das amostras CQs. Cinco amostras de cada concentração foram preparadas em água. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada para as concentrações examinadas pelo cálculo de volta e, expressa como o percentual de desvio entre as concentrações encontradas e as concentrações nominais.

A seletividade do método foi verificada com a injeção de amostras branco (água).

2.2.5 - Estudo da atividade dos ICERs-AChE

Foram preparados cinco ICERs com diferentes concentrações da solução *eelAChE* eluída. Para cada um foi realizado o ensaio de atividade onde, uma amostra de ACh na concentração 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi injetada no sistema LC-MS e a Ch produzida monitorada e correlacionada com a curva de calibração. Para o ICER-*huAChE* o ensaio de atividade foi realizado da mesma maneira.

2.2.6 - Estudo cinético da ACh com os ICERs-AChE

A partir da adição de água a alíquotas apropriadas das soluções padrão de ACh (6,25; 200 e 6400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) para um volume final igual a 100 μL , foram preparadas soluções de ACh nas seguintes concentrações: 0,3125; 0,6250; 1,250; 2,500; 5,000; 10,00; 20,00; 40,00; 80,00; 160,0; 320,0; 640,0; 2560; 5120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e, em seguida, alíquotas de 90 μL de cada amostra foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. Amostras de 90 μL de água foram utilizadas como branco.

Foram injetados 10 μL das amostras, em duplicata, no sistema LC-MS empregando o método L-ZBC.

2.2.7 - Estudo de inibição da AChE imobilizada

Para a validação do uso dos ICERs no reconhecimento de inibidores da AChE, os fármacos tacrina e galantamina foram utilizados como ligantes de referência. A triagem inicial dos compostos foi realizada avaliando-se o percentual de inibição a 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Foram analisadas bibliotecas sintéticas contendo: 17 cumarinas, 17 triazóis, 28 flavonas e, 7 compostos de diferentes classes (peptídeos, indóis e derivados de uréia) (Apêndice). As soluções de trabalho foram preparadas, em metanol, a partir de uma solução estoque na concentração de 1,00 mg.mL^{-1} . A partir de alíquotas apropriadas foram preparadas as soluções trabalho, 100 μL , com acetato de amônio (15 mM; pH8.0) contendo ACh 490 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e os compostos à 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Para cada amostra analisada foi utilizada uma amostra controle negativo (ausência de ACh) e uma controle positivo (ausência do ligante). O percentual de inibição, I(%), para cada composto foi calculado de acordo com a equação 2.1.

$$I (\%) = 100 - \left(\frac{P_i}{P_0} \times 100 \right) \quad \text{EQUAÇÃO 2.1}$$

onde, P_i é a produção de colina quantificada a partir da hidrólise da acetilcolina na presença dos ligantes testados e P_0 é a produção de colina da amostra controle positivo.

Os compostos que apresentaram $I(\%)$ superior a 80% foram selecionados para a construção de curvas dose-resposta.

2.2.8 - Caracterização dos ligantes identificados da *eelAChE*

2.2.8.1 - Determinação da capacidade inibitória (IC_{50})

Os valores de IC_{50} foram calculados pela quantificação da produção de Ch a partir da hidrólise de ACh em diferentes concentrações dos ligantes testados.

Soluções estoque dos inibidores de referência, galantamina (0,05; 1,60; 51,2 e 1638,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e tacrina (0,005; 0,160; 5,12 e 10,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), foram preparadas em água. As amostras (galantamina: 0,0025 - 655,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e tacrina: $0,025 \cdot 10^{-3}$ - 7,17 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foram preparadas pela diluição de alíquotas apropriadas das soluções estoque em água junto com o substrato ACh na concentração fixa de 490 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Para o ensaio com os ligantes identificados, alíquotas (10 μL) das soluções contendo ACh 490 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e concentrações crescentes da cumarina **16** (0,5000 a 128,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), da cumarina **17** (0,5000 a 2048 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), do triazol **2** (0,5 a 1024 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e das flavonas NNinaBipyCu, HptBipyCu e HptFenCu (0,5000 a 640,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foram injetadas no sistema cromatográfico. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Como controle positivo, alíquotas de 10 μL de uma solução aquosa de ACh 490 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foram injetadas no sistema cromatográfico e a produção de Ch quantificada. Os resultados foram dados como 100% de atividade e

comparados com a concentração de colina obtida na hidrólise da acetilcolina na presença dos ligantes testados. Então, o I(%) foi calculado de acordo com a equação 2.1.

As curvas dose-resposta foram obtidas pela regressão não-linear do tipo hiperbólica plotando o I(%) em função da concentração do ligante testado, no software SigmaPlot (versão 12).

2.2.8.2 - Determinação da constante de inibição (K_i) e mecanismos de ação

O mecanismo de inibição foi verificado através da construção dos gráficos duplo-recíproco ($1/[Ch] \times 1/[ACh]$). Para isso, soluções de ACh (160 - 5120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) contendo concentrações fixas do ligante (Tabela 2.1) foram preparadas em duplicata e injetadas no sistema LC-MS para a quantificação da Ch produzida¹⁰⁹.

TABELA 2.1- Faixa de concentração dos ligantes de AChE utilizados nos ensaios de mecanismo de inibição.

Ligantes	Faixa de concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Tacrina	0,200 a 0,800
Galantamina	1,86 a 7,44
Cumarina 16	0,178 a 0,534
Cumarina 17	3,00 a 12,0
NNinaBipyCu	17,0 a 100
HptBipyCu	23,0 a 69,0
HptFenCu	19,0 a 56,0

O software OriginPro 8.0 foi utilizado para a construção dos gráficos de mecanismo de inibição e K_i . Os dados obtidos foram tratados de

acordo com as equações 2.2 e 2.3, que descrevem os mecanismos de inibição competitivo e não-competitivo, respectivamente.

$$V = \frac{VA}{K_a \left(1 + \frac{I}{K_{is}}\right) + A} \quad \text{EQUAÇÃO 2.2}$$

$$V = \frac{VA}{K_a \left(1 + \frac{I}{K_{is}}\right) + A \left(1 + \frac{I}{K_{is}}\right)} \quad \text{EQUAÇÃO 2.3}$$

onde I e A são as concentrações de inibidor e substrato, respectivamente e, K_{is} é a inclinação, a constante de inibição (K_i).

Os valores das constantes de inibição para a tacrina, galantamina, cumarinas **16** e **17** e flavonas NNinaBipyCu, HptBipyCu e HptFenCu foram determinados individualmente plotando-se K_m/V_{MAX} (calculado para cada concentração de ligante) em função da concentração de ligante. O gráfico foi construído através de uma regressão linear, onde o quociente da divisão entre os coeficientes linear e angular da reta fornece o valor de K_i .

2.3 - Resultados e discussão

2.3.1 O sistema LC-MS

O sistema de LC-MS foi configurado como ilustrado na Figura 2.1 para desenvolvimento do método cromatográfico zonal linear de bioafinidade. Nesta configuração a catálise enzimática é feita em fluxo e a colina produzida é monitorada diretamente pelo MS. A constante eluição de metanol após o ICER garantiu uma melhora na ionização da colina sem afetar a atividade da enzima.

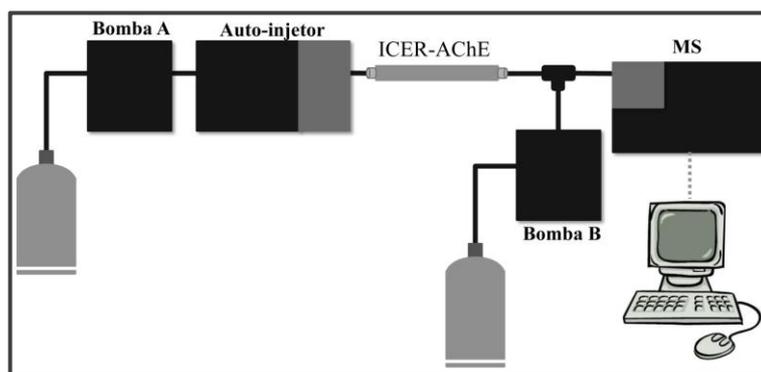


FIGURA 2.1- Sistema de LC-MS utilizado no método de L-ZBC com os ICERs-AChE preparados. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.

2.3.2 - Preparo dos ICERs-AChE

O emprego dos capilares de sílica fundida como suporte no processo de imobilização apresenta diversas vantagens como, por exemplo, a minimização de interações secundárias entre os compostos analisados e o suporte. A grande área de superfície por volume permite interações adequadas entre o substrato e a enzima imobilizada e, também uma baixa pressão de volta no capilar que é uma vantagem, pois não prejudica a estrutura da enzima. 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 massa³³.

O procedimento de imobilização utilizado para a enzima *eel* e *huAChE* foi baseado em trabalhos já desenvolvidos anteriormente no grupo com a imobilização das enzimas GAPDH humana e de *T.cruzi*^{33,110}, PNP humana e de *Schistosoma mansoni*³⁵ e AChE de *eel*³², que se resume em três etapas identificadas na Figura 2.2 : limpeza e ativação do capilar com reação de sililação, adição do espaçador e, imobilização da enzima.

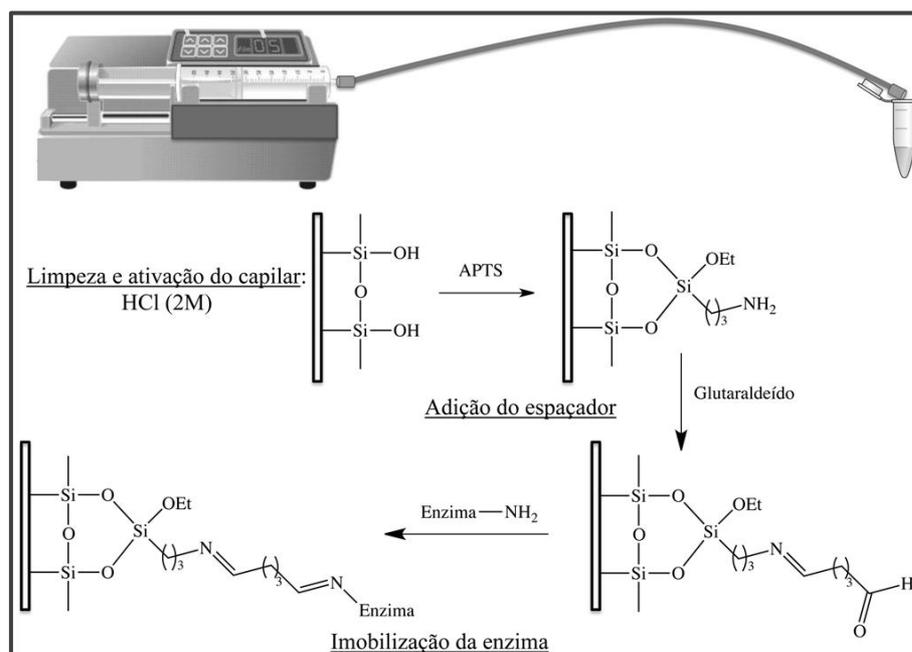


FIGURA 2.2- Método de imobilização da enzima *eel* e *huAChE* em capilares de sílica fundida.

A primeira etapa envolve a limpeza e ativação do capilar, que pode ser realizada através da eluição, pelo capilar, de soluções NaOH ou HCl^{33,110-112}. Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo, foi demonstrado uma maior eficiência na imobilização com a utilização de uma solução de HCl 2 mol.L⁻¹. Portanto, esta foi a solução selecionada para o trabalho. O procedimento de ativação do capilar consiste na corrosão da parede interna e liberação dos grupos silanóis, com o objetivo de aumentar a área superficial para imobilização da enzima e garantir a reprodutibilidade do processo.

O processo de sililação se resume em uma reação de substituição nucleofílica dos grupos silanóis livres do capilar e o APTS. Para imobilização covalente da enzima, o reagente bifuncional glutaraldeído foi usado como espaçador através da formação das bases de Schiff.

As bases de Schiff são facilmente hidrolisadas em meio ácido, justificando que vários trabalhos relatem a sua redução com o reagente borohidreto de sódio^{20,113,114}. Os pHs ótimos de catálise das AChEs selecionadas são entre 7,4 e 8,0 portanto, o procedimento de redução não se faz necessário.

Mesmo assim, a eficiência do procedimento de imobilização com e sem redução foi avaliada, monitorando a atividade dos ICERs preparados. A redução das bases de Schiff levou a uma diminuição de 84% na atividade do ICER (Figura 2.3) e, portanto, o método de imobilização sem redução foi o adotado durante o trabalho.

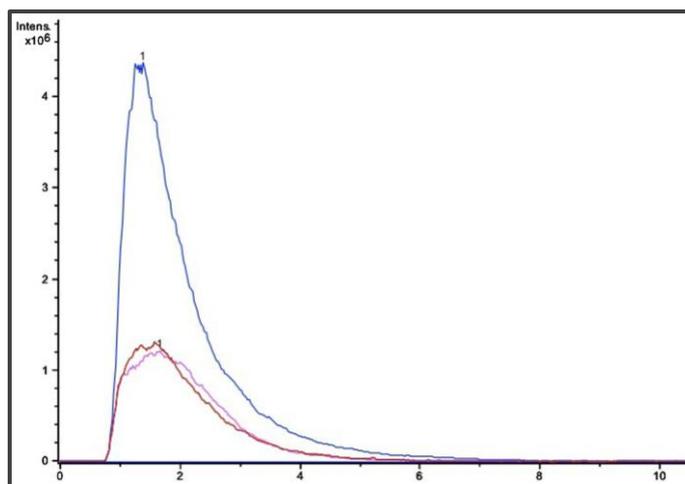


FIGURA 2.3- Cromatogramas referentes a injeção de 10 μL de uma amostra de ACh $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no ICER-*eelAChE* (-) com redução e (-) sem redução e, no ICER-*huAChE* (-) com redução. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.

2.3.3 - Validação do método LC-MS

Os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, estabilidade, precisão e exatidão intra e inter-lotes. De acordo com o guia da Comunidade Européia (EC)¹¹⁵ para a confirmação e identificação de compostos em matrizes complexas utilizando LC-MS como técnica analítica, é necessário o monitoramento de dois ou mais íons. Neste estudo, foram monitoradas duas transições por MRM (o íon molecular, como íon precursor e, o íon fragmento da primeira transição). O íon precursor foi utilizado para a quantificação e a primeira transição para a confirmação do analito.

A seletividade foi avaliada através da injeção de uma amostra branco (água) no método validado, onde não foi observada a presença de interferentes co-eluinto com a colina e assim prejudicando sua ionização.

As curvas de calibração foram logarítmicas na faixa de concentração estudada, com coeficientes de determinação (R^2) iguais ou superiores a 0,99 para uma amostragem igual a 3. As curvas analíticas obtidas foram:

- curva baixa: $y = (-3,04245 \times 10^8) + (1,7158 \times 10^8 \times \ln(x + 5,90793))$

- curva alta: $y = (-3,48814 \times 10^9) + (7,31589 \times 10^8 \times \ln(x + 146,767))$

O CV% para as replicatas foi inferior a 15% e a exatidão apresentou um desvio menor do que 15% do valor nominal (exceto para o limite de quantificação- primeiro ponto das curvas), indicando que não ocorreu *carry-over* entre as injeções. Valores de precisão entre 86 e 113% para a curva baixa e entre 85 e 112% para a curva alta indicam que ambas estão de acordo com os critérios para validação de método adotado.

A precisão e exatidão intra e inter-lotes do método foi determinada analisando-se cinco replicatas dos três controles de qualidade. Os resultados foram valores de precisão entre 1,81 e 12,8% para a curva baixa e 1,43 e 2,03% para a curva alta. A exatidão variou entre 87,7 e 94,2% para a curva alta e 88,1 e 101% para a curva baixa, que estão de acordo com os critérios para validação de método adotado.

A possibilidade de hidrólise espontânea da ACh foi verificada através da estabilidade da amostra em auto-injetor de acordo com o procedimento descrito na seção 2.2.3.3 onde, uma amostra de ACh $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi injetada, analisada imediatamente (tempo zero) e a cada 20 minutos por um período de 220 minutos. Não foi observado o íon $[M]^+$ 104 m/z, correspondente a Ch e, o íon $[M]^+$ 146 m/z relativo a ACh se manteve estável com um CV% igual a 1,6 (n=11) correspondente às áreas das bandas cromatográficas.

O método validado foi aplicado injetando-se uma amostra de acetilcolina ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no ICER- *eelAChE*. Os cromatogramas de íons extraídos (EIC) com os respectivos espectros de massas para a colina e seu íon fragmento encontram-se nas figuras 2.4-5, respectivamente.

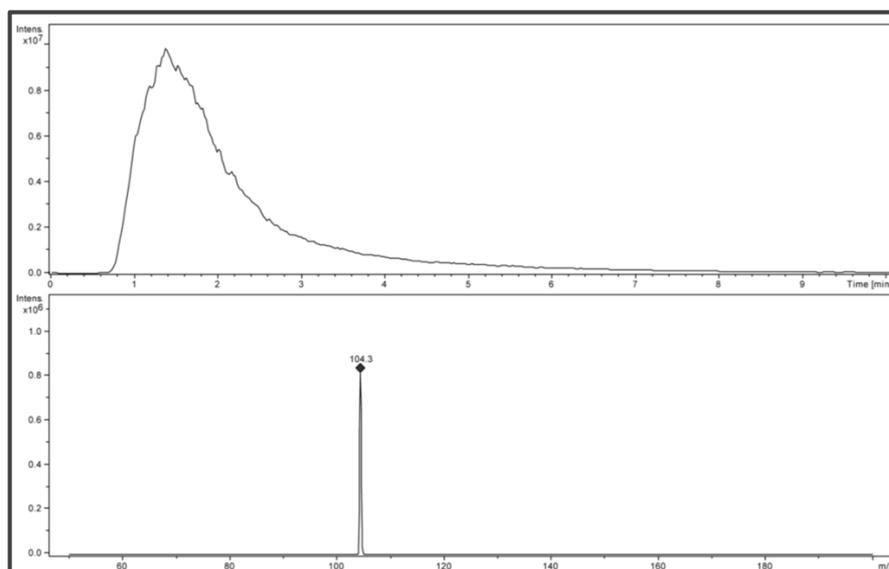


FIGURA 2.4- Cromatograma de íons extraídos e espectro de massas referente a injeção de ACh $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no sistema LC-MS com o ICER-*eelAChE* monitorando o íon precursor da Ch produzida, $[\text{M}]^+$ 104 m/z. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.

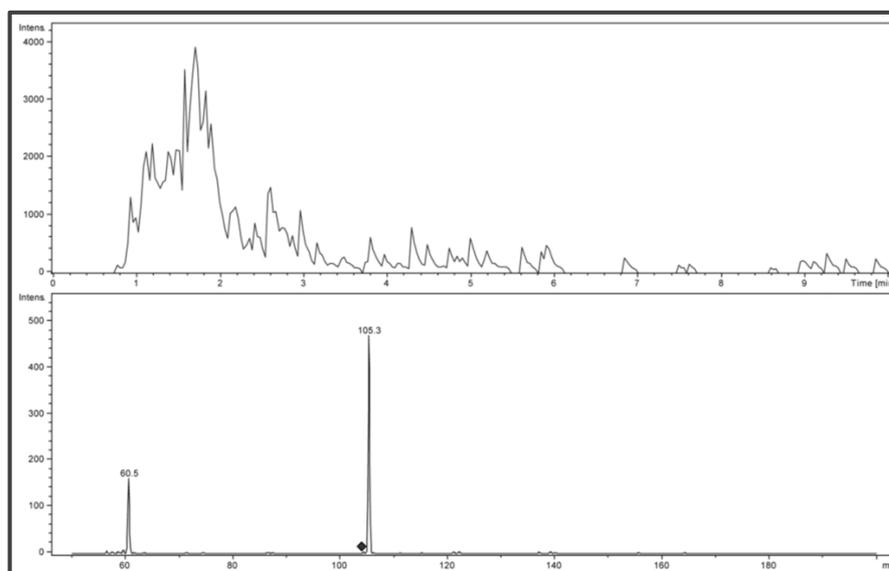


FIGURA 2.5- Cromatograma de íons extraídos e espectro de massas referente a injeção de ACh $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no sistema LC-MS com o ICER-*eelAChE* monitorando o íon fragmento da Ch produzida, $[\text{C}_2\text{H}_3\text{OH}]-[\text{M}]^+$ 60 m/z. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.

A primeira transição (Figuras 2.5-6) corresponde à perda de $[M-C_2H_3OH]^+$ ($m/z=60,0$), e está de acordo com os dados reportados na literatura para este composto^{62,116,117}.

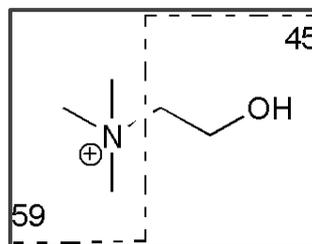


FIGURA 2.6- Proposta da primeira transição para o íon precursor da colina.

2.3.4 - Estudo da atividade dos ICERs-AChE preparados

O método L-ZBC-MS foi utilizado para monitorar a atividade das AChEs imobilizadas. Nesta abordagem, o substrato (ACh) foi injetado em pequenos volumes, ou zonas, e o produto da catálise enzimática (Ch) foi quantificado. Assim, a importância da concentração de proteína no preparo dos ICERs foi investigada e, os resultados mostraram que o aumento da concentração foi prejudicial para a atividade (Tabela 2.2). A Figura 2.7 ilustra os cromatogramas obtidos para cada ICER preparado.

TABELA 2.2- Concentração de Ch produzida a partir da injeção de ACh 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no sistema LC-MS.

[solução <i>ee</i> AChE] (mg.mL^{-1})	[Ch _{produzida}] ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
0,0625	154 ± 14,0
0,125	198 ± 15,9
0,250	206 ± 10,1
0,500	10,0 ± 0,100
1,00	0,140 ± 1,00

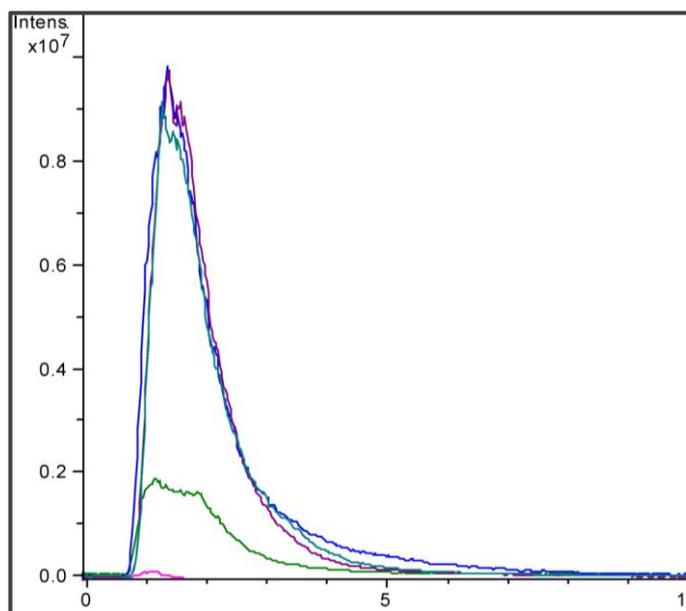


FIGURA 2.7- Sobreposição dos cromatogramas correspondentes à colina produzida pela injeção de $10\mu\text{L}$ de uma amostra $\text{ACh } 200\mu\text{mol.L}^{-1}$ nos ICERs-*eelAChE*: (-) $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$; (-) $0,500 \text{ mg.L}^{-1}$; (-) $0,250 \text{ mg.L}^{-1}$; (-) $0,125 \text{ mg.L}^{-1}$ e (-) $0,0625 \text{ mg.L}^{-1}$. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 2.2.3.2.

Isto pode ser explicado pelos efeitos causados no procedimento de imobilização, como mudanças na estrutura quaternária, flexibilidade e acessibilidade do substrato ao sítio ativo, que podem ser potencializados em alta concentração de proteína. No entanto, a estrutura responsável pelo reconhecimento molecular não foi prejudicada, e atividade da enzima preservada.

A pequena diferença na atividade dos ICERs preparados com $0,125$ e $0,250 \text{ mg.mL}^{-1}$ de *eelAChE* justifica a escolha pela menor concentração de proteína para o preparo dos ICERs.

2.3.5 - Estudo cinético da atividade enzimática dos ICERs- *eel* e *huAChE*

Durante o procedimento de imobilização, a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte pode resultar em uma distorção ou

inacessibilidade do sítio ativo, o que leva a uma diminuição da atividade catalítica. Assim, a realização dos estudos cinéticos, com a enzima imobilizada é uma ferramenta útil para avaliar essas possíveis modificações estruturais sofridas pela enzima pois, permite verificar a afinidade de ligação entre a enzima e o substrato assim como a eficiência catalítica do biorreator.

A constante de Michaelis-Menten, K_M , é definida como a concentração do substrato onde se obtém uma velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de catálise. Essa constante foi determinada para o substrato acetilcolina medindo-se a atividade enzimática através do método de L-ZBC desenvolvido e validado. Para isso, foram utilizadas concentrações crescentes do substrato até que fosse atingido um patamar de saturação onde, o aumento na concentração de acetilcolina não alterasse a velocidade da reação.

Para os ICERs-*eel* e *huAChE* foram utilizadas concentrações de ACh na faixa de 0,3125 a 5120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As áreas das bandas de colina produzida durante o estudo cinético foram correlacionadas às concentrações através das curvas de calibração. As amostras empregadas nos estudos cinéticos foram injetadas em duplicata com um volume de injeção igual a 10 μL .

Os valores obtidos de concentrações de colina foram relacionados às concentrações do substrato e o método de regressão não-linear de melhor ajuste foi utilizado para se obter as hipérboles de Michaelis-Menten, determinando-se assim os valores de K_M , como ilustrado na Figura 2.8.

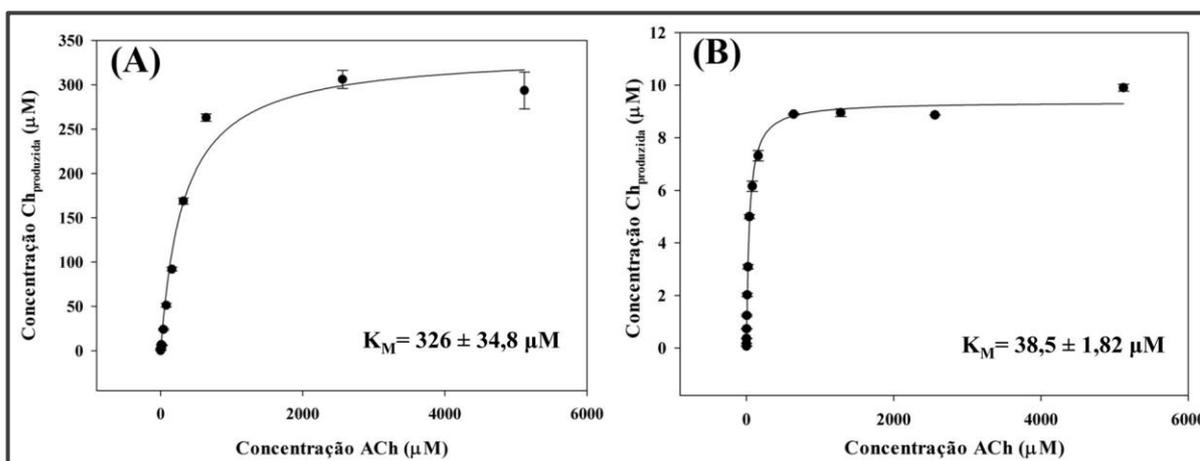


FIGURA 2.8- Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de colina pelo (A) ICER-*eelAChE* e (B) ICER-*eelAChE*, variando-se a concentração de acetilcolina.

As hipérboles obtidas estão de acordo com a equação de Michaelis-Menten onde, 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.

2.3.6 - Triagem de ligantes com o ICER-*eel* e *huAChE*

2.3.6.1 - Validação do ensaio de triagem de ligantes

O ICER produzido com a enzima *eelAChE* foi selecionado para a validação do ensaio de triagem de ligantes. Fatores como a similaridade da sequência de aminoácidos da *eelAChE* com a *huAChE*, o seu menor custo e o seu grande emprego como modelo em ensaios HTS justificam a escolha deste ICER⁸⁹.

Os fármacos tacrina e galantamina foram selecionados como inibidores de referência, uma vez que são terapias aprovadas mundialmente para o tratamento da doença de Alzheimer. São fármacos que diferem no mecanismo de inibição e afinidade pela enzima AChE e, portanto, a escolha destes

possibilita conferir a capacidade do biorreator em distinguir entre inibidores de diferentes potências e tipos de inibição.

Como ilustrado na Figura 2.9, foram construídas curvas dose-resposta (IC_{50}) para cada inibidor e, verificou-se que o ICER-*eelAChE* identificou inibidores concentração-dependente, sendo que um aumento na concentração do inibidor resultou em um aumento na porcentagem de inibição. Para a galantamina obteve-se uma IC_{50} de $7,44 \pm 0,663 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e de $0,385 \pm 0,0436 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a tacrina.

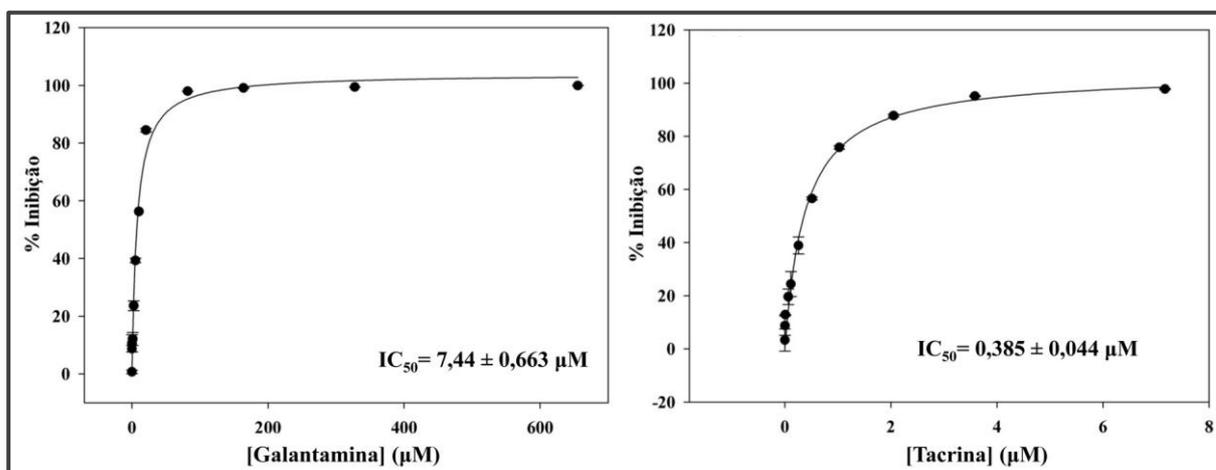


FIGURA 2.9- Porcentagem de inibição da atividade enzimática da *eelAChE* no ICER para diferentes concentrações da galantamina e da tacrina.

A afinidade da enzima pelo inibidor na formação do complexo enzima-inibidor é medida pela constante de inibição, K_i , um importante parâmetro a ser determinado para a caracterização de um novo ligante.

Os mecanismos e constantes de inibição para cada inibidor foram determinados através da construção de curvas de duplo-recíproco para a colina produzida em diferentes concentrações de inibidor, como ilustrado nas Figuras 2.10-11 onde, as curvas de menor inclinação correspondem à cinética na ausência do inibidor e as demais curvas foram realizadas em concentrações crescentes do ligante. O aumento na concentração de galantamina resultou em um conjunto de linhas que interceptam o eixo y ($1/V_{MAX}$) no mesmo ponto, mas

com inclinações (K_M/V_{MAX}) diferentes, interceptando a abscissa ($-1/K_M$) em valores diferentes. Ou seja, a presença do inibidor não afetou a velocidade máxima da catálise enzimática; enquanto que, o aumento na concentração do inibidor resultou em maiores valores de K_M^{app} , definido como $K_M \cdot (1 + [I]/K_i)$. Este comportamento é característico de inibidores reversíveis competitivos.

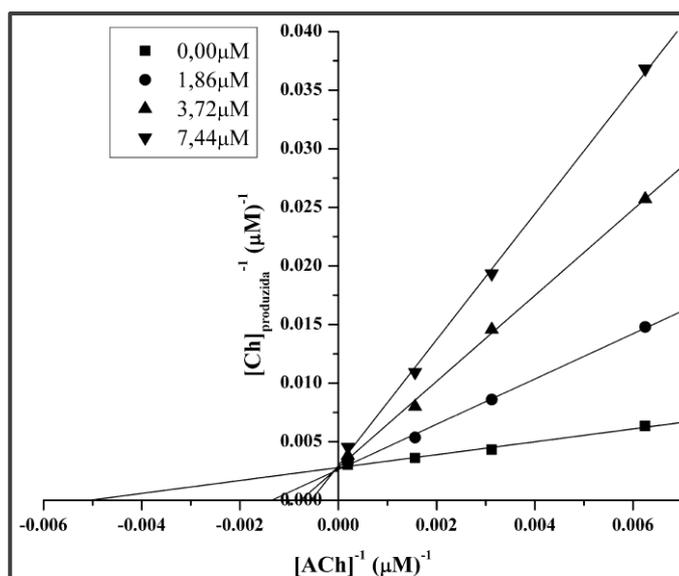


FIGURA 2.10- Gráfico de duplo-recíproco para a galantamina no ICER-eelAChE.

Caracterizando um inibidor reversível não-competitivo, o aumento na concentração da tacrina resultou em linhas com diferentes inclinações (Figura 2.11), que interceptam o eixo x no mesmo ponto e o eixo y em diferentes valores ou seja, a velocidade da catálise enzimática é afetada na presença do inibidor e o K_M^{app} permanece inalterado.

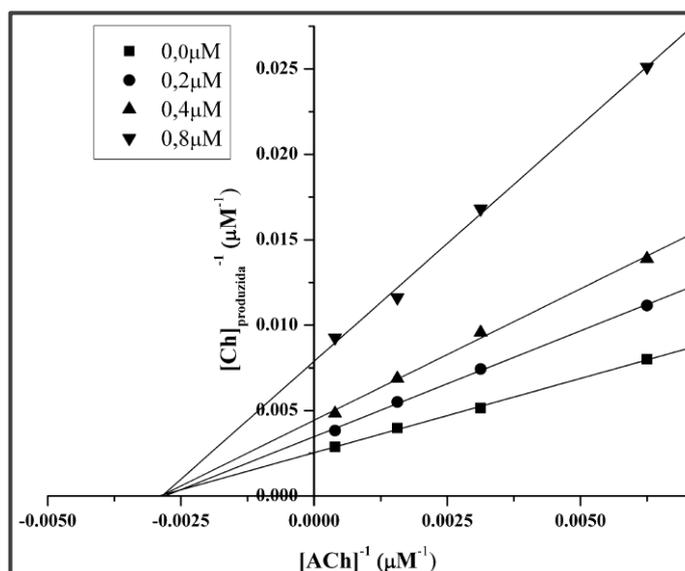


FIGURA 2.11- Gráfico de duplo-recíproco para a tacrina no ICER-*eelAChE*.

As constantes de inibição foram determinadas plotando-se K_M^{app}/V_{MAX}^{app} em função da concentração do inibidor onde, a intersecção com o eixo x fornece os valores de K_i (Figura 2.12). Foram obtidos K_i iguais a $1,06 \pm 0,274$ e $0,340 \pm 0,097 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a galantamina e tacrina, respectivamente.

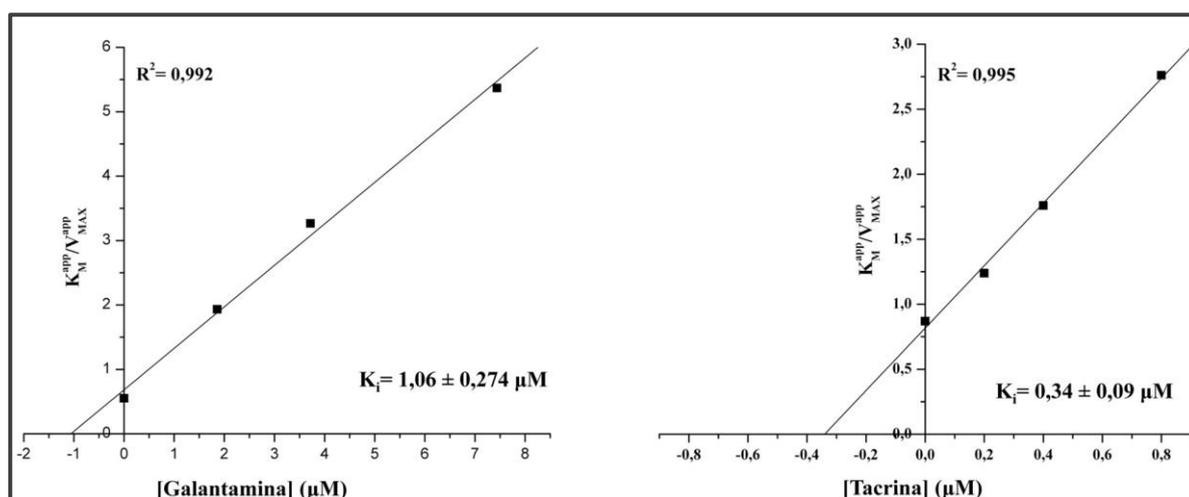


FIGURA 2.12- Determinação de K_i para os inibidores galantamina e tacrina da *eelAChE* imobilizada.

Os resultados obtidos seguem a mesma tendência dos resultados previamente publicados para estes inibidores de referência da AChE^{118,119}, isto é, a tacrina como o inibidor reversível não-competitivo de maior potencial inibitório, e a galantamina o inibidor de menor potencial inibitório e mecanismo reversível competitivo. Assim, o ICER-*eel*AChE foi capaz de reconhecer inibidores com diferentes potências inibitórias e mecanismos de inibição, validando o modelo proposto para ser empregado na triagem e caracterização de novos ligantes.

2.3.6.2 - Emprego dos ICERs- *eel* e *hu*AChE na triagem de novos ligantes

Após a caracterização dos ICERs- *eel* e *hu*AChE através de estudos cinéticos e, validação no reconhecimento de inibidores, o ICER-*eel*AChE foi empregado na triagem de novos ligantes em coleções de compostos sintéticos (Apêndice) gentilmente cedidas pelos grupos da Profa. Dra. Arlene G. Corrêa e do Prof. Dr. João Batista Fernandes. A atividade inibitória foi avaliada a 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com uma concentração de substrato acima do valor de K_M (1,5 vezes), o que garantiu que o ICER estivesse saturado.

Os resultados apresentados no gráfico da Figura 2.13 evidenciam compostos que apresentaram porcentagem de inibição superior ou igual a 80%, como as cumarinas 16 e 17, o triazol 2 e, as flavonas: HptFenCu, HptBipyCu e NNinaBipyCu. Para estes, foram realizados os ensaios de IC_{50} , através da construção das curvas dose-resposta. O NarBipyCu apresentou uma porcentagem de inibição igual a 82%, no entanto, a baixa solubilidade do composto em metanol não permitiu atingir-se um patamar de saturação onde o aumento na concentração do ligante não alterasse a velocidade da reação.

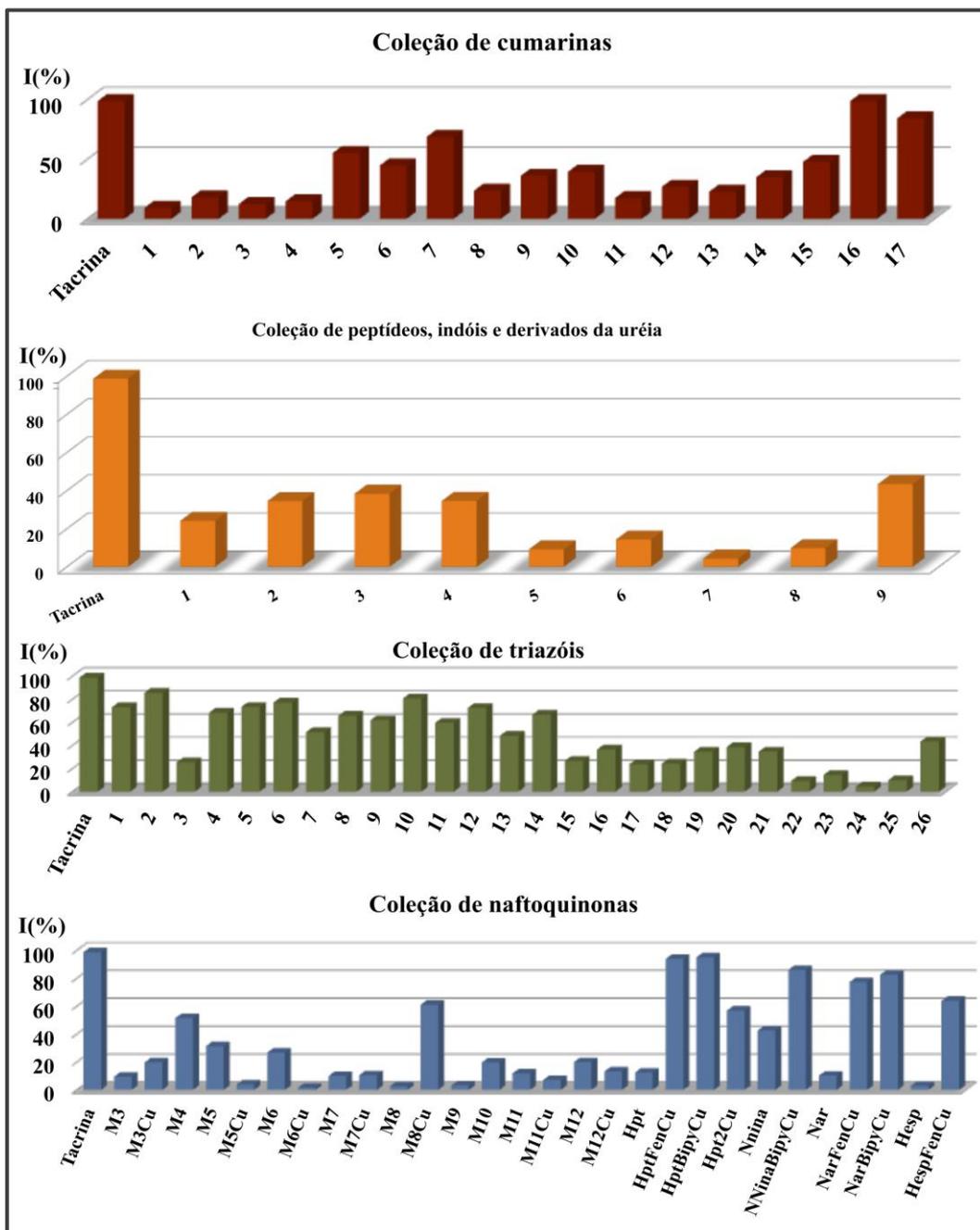


FIGURA 2.13- Resultados da triagem realizada com os derivados de cumarina, triazóis, flavonas e compostos orgânicos de diferentes classes (Apêndice).

As curvas de dose-resposta obtidas (Figuras 2.14-16) mostram que a cumarina 16 apresentou uma potencial inibitório similar ao da tacrina, que foi confirmado pelo K_i calculado igual a $0,031 \pm 0,010 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Já a cumarina 17 apresentou um IC_{50} similar ao da galantamina enquanto nos demais compostos o valor foi superior ao deste inibidor de referência.

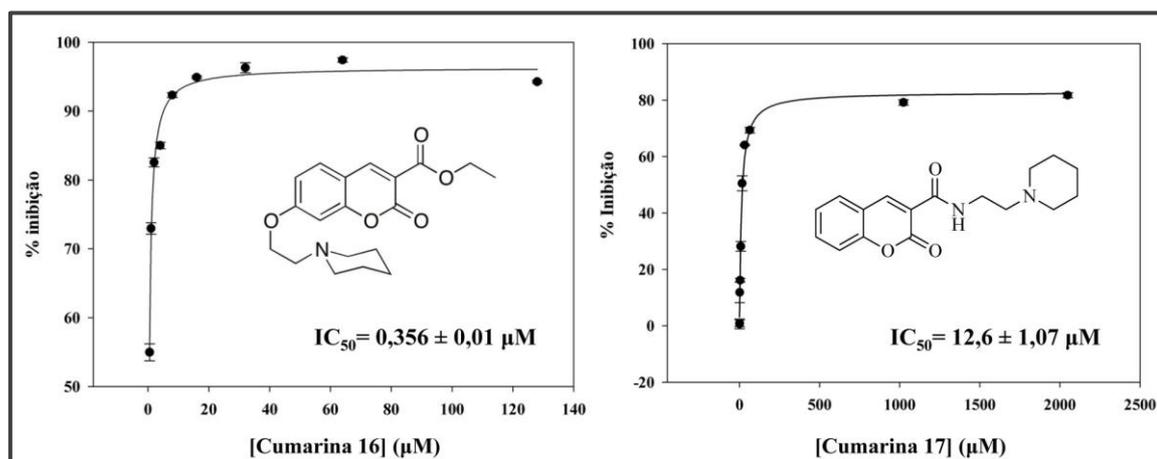


FIGURA 2.14- Porcentagem de inibição da atividade enzimática da *eelAChE* no ICER para diferentes concentrações das cumarinas 16 e 17.

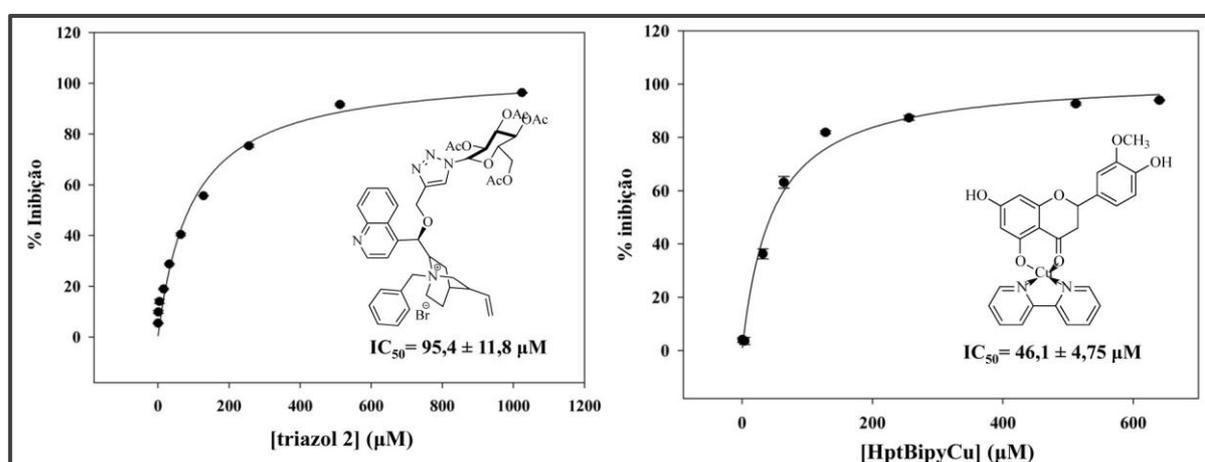


FIGURA 2.15- Porcentagem de inibição da atividade enzimática da *eelAChE* no ICER para diferentes concentrações do triazol 2 e da flavona HptBipyCu.

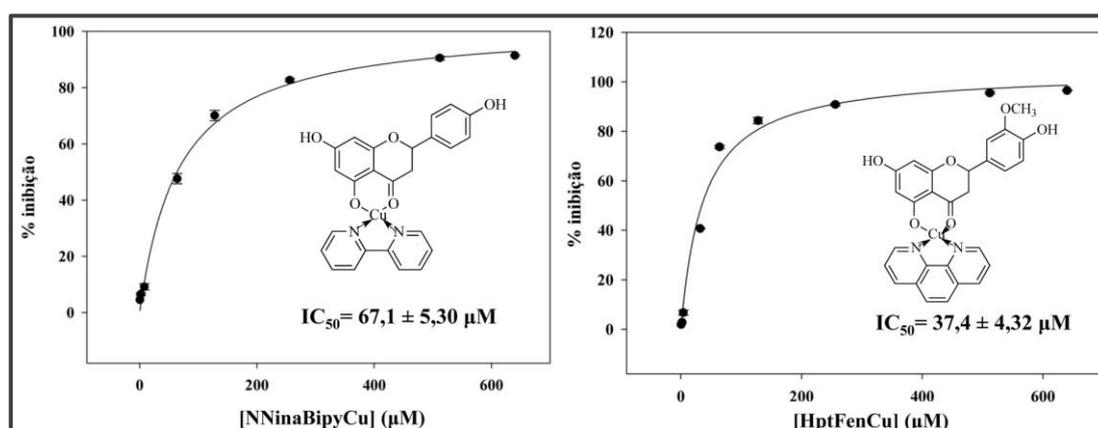


FIGURA 2.16- Porcentagem de inibição da atividade enzimática da *eelAChE* no ICER para diferentes concentrações das flavonas NNinaBiPyCu e HptFenCu.

A continuidade dos ensaios de caracterização dos ligantes foi realizada com os compostos que apresentaram um valor de IC_{50} inferior a $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$, garantindo uma seleção de ligantes com elevada potência. Portanto, o ligante triazol 2 foi eliminado dos ensaios já que apresentou um valor de IC_{50} igual a $95,4 \pm 11,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Foram traçadas as curvas de duplo-recíproco para cada ligante, (Figuras 2.17-18) e, a partir destas foram calculados os valores de K_i apresentados na Tabela 2.3.

TABELA 2.3- Valores de K_i e IC_{50} calculados para os ligantes no ICER-*eelAChE*.

Ligantes	K_i ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Tacrina	$0,340 \pm 0,097$	$0,386 \pm 0,044$
Galantamina	$1,06 \pm 0,274$	$7,44 \pm 0,663$
Cumarina 16	$0,031 \pm 0,010$	$0,356 \pm 0,010$
Cumarina 17	$13,8 \pm 1,10$	$12,6 \pm 1,07$
HptBipyCu	$14,7 \pm 0,133$	$46,1 \pm 4,75$
NNinaBipyCu	$14,8 \pm 0,294$	$67,1 \pm 5,30$
HptFenCu	$14,0 \pm 0,368$	$37,4 \pm 4,32$

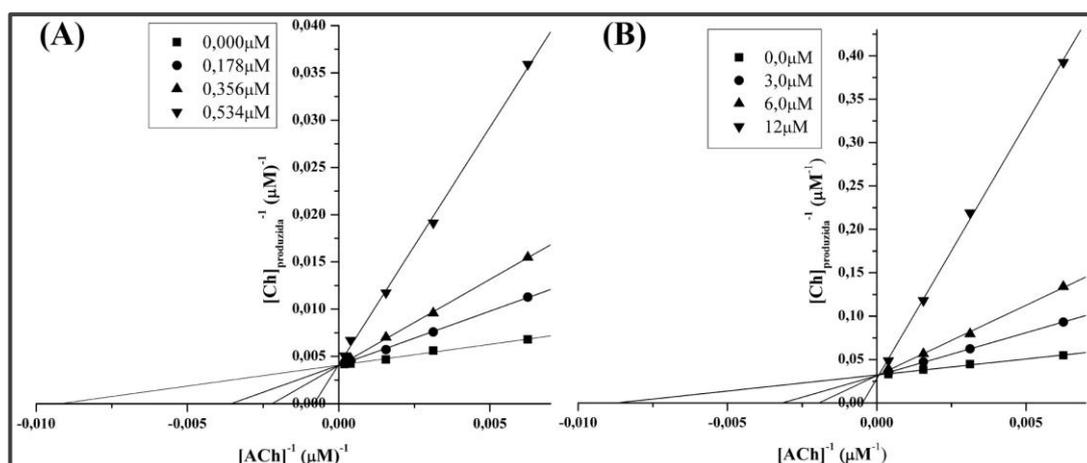


FIGURA 2.17- Gráfico de duplo-recíproco para as cumarina (A) 16 e (B) 17, no ICER-*eelAChE*.

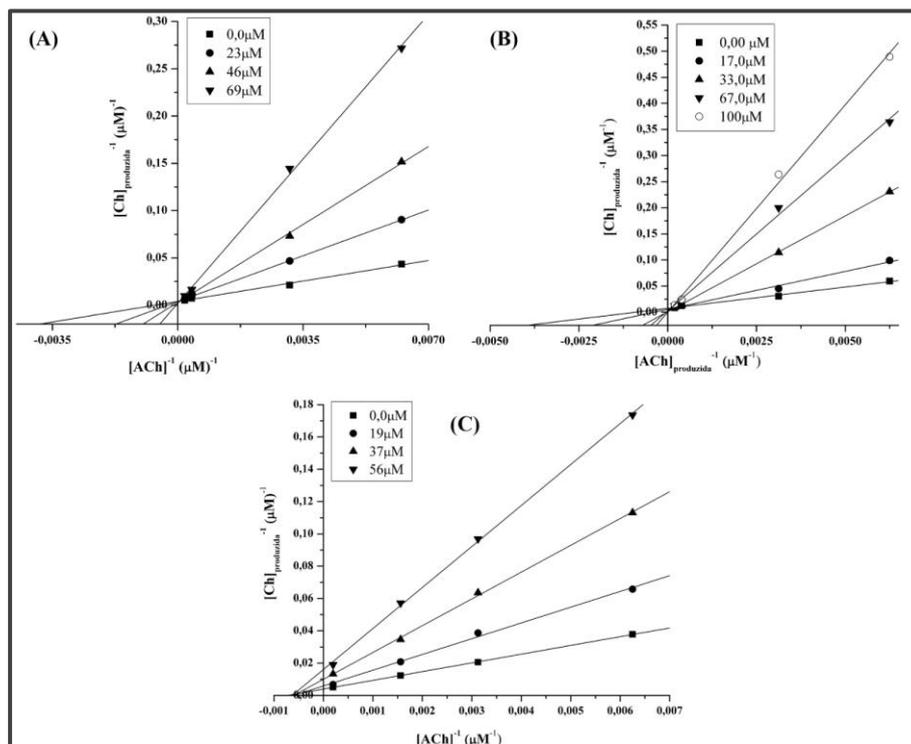


FIGURA 2.18- Gráfico de duplo-recíproco para as flavonas (A) HptBipyCu, (B) NNinaBipyCu e (C) HptFenCu, no ICER-*eelAChE*.

Dentre todos os ligantes identificados para a *eelAChE*, apenas a flavona HptFenCu apresentou um mecanismo de inibição do tipo não-competitivo, enquanto os demais foram caracterizados como inibidores reversíveis competitivos. A cumarina 17 e as flavonas HptBipyCu, HptFenCu e NNinaBipyCu apresentaram valores de K_i superiores ao da galantamina mas, que seguem a mesma tendência dos valores de IC_{50} calculados, ou seja, a cumarina 17 e a flavona NNinaBipyCu como os ligantes de maior e menor potencial inibitório, respectivamente. Desta maneira, o uso dos ICERs-AChE nos estudos de triagem fornece rapidamente dados de inibição e seletividade. A constante de inibição calculada para a cumarina 16 teve valor inferior ao da tacrina, assim como o valor de IC_{50} , valorizando o potencial inibitório desta coleção de compostos. Portanto, a biblioteca de cumarinas foi submetida à triagem com o ICER-*huAChE*, na busca por um inibidor para esta espécie.

A triagem foi realizada a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a Figura 2.19 ilustra os resultados obtidos. A diferença de afinidade das *eelAChE* e *huAChE* pelos derivados cumarínicos fica evidente comparando os valores de inibição obtidos, demonstrando assim a capacidade do modelo de triagem em reconhecer a seletividade de enzimas de diferentes espécies com similaridade estrutural⁸⁹. No entanto, os resultados obtidos validam o uso dos ICERs-*eelAChE* para a triagem e identificação de novos hits e, os ICERs-*huAChE* para a confirmação.

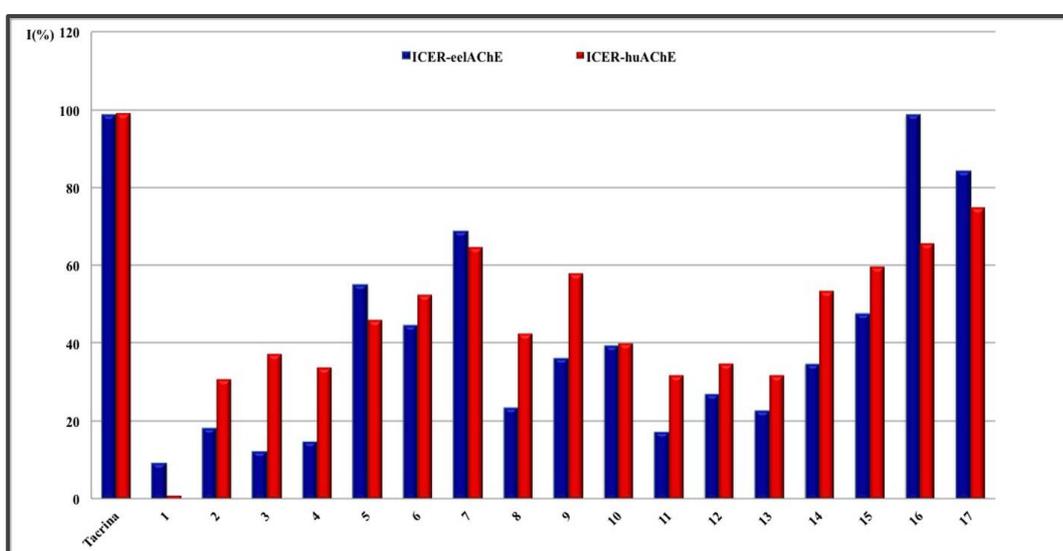


FIGURA 2.19- Resultados das triagens realizadas com os derivados cumarínicos nos ICERs- *eel* e *huAChE*.

Assim, a automatização do ensaio com a catálise enzimática ocorrendo em fluxo nos ICERs ligados a um sistema LC-MS demonstrou a facilidade na obtenção dos parâmetros cinéticos e de inibição (capacidade inibitória, constante e mecanismo de inibição) para os ligantes da AChE.

2.4 - Conclusões

Os ICERs-*eel* e *huAChE* foram eficientemente utilizados para estudos cinéticos através da quantificação direta da colina produzida. O ensaio de triagem de ligantes foi validado com os inibidores de referência da acetilcolinesterase, tacrina e galantamina e, utilizado para a triagem de 79

compostos. Enquanto o ICER-*eel*AChE foi empregado na triagem, o ICER-*hu*AChE foi utilizado para avaliar a seletividade da enzima na coleção de cumarinas. Cinco novos ligantes foram identificados sendo 1 deles com valor de IC_{50} similar ao da tacrina e K_i inferior. O modelo foi empregado para determinar o mecanismo de inibição dos *hits* através da construção de curvas duplo-recíproco.

Assim, o modelo para quantificação *online* por LC-MS da colina produzida pelos ICERs- *eel* e *hu*AChE é uma ferramenta fácil e reprodutível para a identificação e caracterização de novos ligantes. Além disso, a seletividade e sensibilidade do método aliada ao pequeno tempo por análise permite a triagem de mais de 100 amostras por dia.

CAPÍTULO 3

3 - Biorreatores capilares de acetilcolinesterase e partículas magnéticas com a enzima imobilizada: uma ferramenta para a triagem de ligantes em extratos de produtos naturais

3.1 - Introdução

O uso de biomoléculas imobilizadas em suportes cromatográficos capilares e partículas magnéticas para a triagem de ligantes garante seletividade ao ensaio. A afinidade da biomolécula imobilizada pode ser avaliada utilizando as técnicas de cromatografia zonal linear e não-linear. A triagem de ligantes por cromatografia zonal linear empregando enzimas imobilizadas é usualmente realizada de maneira individual, monitorando a atividade enzimática^{32,35,120}. Na cromatografia zonal não-linear, a afinidade do ligante pela biomolécula imobilizada é medida individualmente, através da assimetria das bandas cromatográficas⁴⁴.

Embora existam diversas vantagens no uso da cromatografia de bioafinidade, o processo envolvendo a triagem de ligantes em misturas complexas ainda é um desafio. Uma alternativa é a “pesca de ligantes” (do inglês, *ligand fishing*) onde, o ensaio é realizado *off-line* utilizando a biomolécula imobilizada em partículas magnéticas (B-MB)^{26,61,62,75,121}. É uma técnica que pode ser automatizada com separadores magnéticos automáticos, onde as B-MB são imersas diretamente na mistura e os compostos que possuem afinidade pela biomolécula imobilizada ligam-se a ela e permanecem retidos, enquanto os que não possuem ficam na solução e são eliminados. Posteriormente, os ligantes podem ser eluídos para a identificação injetando-se a solução em um espectrômetro de massas^{26,61,62,121,122}.

A importância na pesquisa de coleções combinatórias naturais como alvo na busca de novos ligantes foi demonstrada por Newman et al.¹²³ onde, de 1981 à 2006, mais de 70% dos fármacos aprovados para comercialização são derivados ou possuem estruturas baseadas em compostos naturais, o que incita a busca de novas substâncias anticolinesterásicas em coleções combinatórias naturais ou sintéticas.

Dentre os quatro inibidores conhecidos da AChE e que atuam como fármacos comercializados para o tratamento da DA (tacrina, galantamina, donepezil e rivastigmina), um é derivado de produto natural. A galantamina é extraída da espécie *Galantus nivalis*¹²⁴, e aprovada pelo FDA desde o ano 2001 para comercialização. O alcalóide Huperzina A, extraído de extratos do gênero *Lycopodium*¹²⁵ é um outro exemplo de AChEIs, juntamente com alcalóides indólicos da espécie *Ervatamia hainanensis*¹²⁶.

O modelo selecionado para o desenvolvimento do trabalho foi o uso de extratos de espécies do gênero *Melodinus* que, embora ainda não tenha sido investigada em relação à atividade anticolinesterásica, apresentam-se como uma fonte promissora de alcalóides indólicos, como por exemplo a reserpina, a ioimbina e a camptotecina^{125,127}. Ensaios farmacológicos utilizando extratos brutos ou purificados das espécies *Melodinus genus* e *Melodinus tenuicaudatus* mostraram efeitos citotóxicos contra linhagens de células tumorais humanas e bacterianas.

A triagem de ligantes em misturas, como coleções combinatórias naturais ou sintéticas, frequentemente é realizada pelo fracionamento bioguiado, um método de baixa eficiência e elevado custo. Portanto, a integração das duas técnicas de triagem de ligantes, cromatografia zonal (linear e não linear) de bioafinidade e *ligand fishing*, é uma inovação em relação aos trabalhos encontrados na literatura, que assegura uma maior seletividade, reprodutibilidade e produtividade durante o processo de triagem, proporcionada pela enzima imobilizada e o sistema de cromatografia líquida. Os biorreatores

de partículas magnéticas possibilitaram o uso de coleções combinatórias sintéticas ou naturais, “pescando” os ligantes presentes onde, com posterior integração ao biorreator capilar, foi possível caracterizar-se o inibidor em relação aos valores de K_i , K_d e IC_{50} .

Esta parte do trabalho foi desenvolvida durante o doutorado sanduíche, financiado pela CAPES, realizado durante 6 meses sob a co-orientação do pesquisador Ruin Moaddel, no *Laboratory of Clinical Investigations* do *Biomedical Research Center*, no *National Institute on Aging, National Institutes of Health* - Baltimore, Maryland/Estados Unidos.

3.2 - Procedimento experimental

3.2.1 - Materiais

O sistema de cromatografia líquida utilizado (Agilent, Califórnia, Estados Unidos) modelo HP 1100, consiste de duas bombas binárias, um auto-injetor, um degaseificador à vácuo, um detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detector*) e uma interface conectando o sistema. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent, Califórnia, Estados Unidos) equipado com uma fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI), operando no modo positivo e negativo e, analisador do tipo quadrupolo. A aquisição dos dados foi realizada através do software Agilent ChemStation.

As análises foram realizadas à temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$). A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE). E, os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC.

O separador magnético manual Dynal, modelo MPC-S e, o thermomixer Eppendorf modelo R, foram utilizados durante os ensaios com as partículas magnéticas.

A enzima acetilcolinesterase do peixe-elétrico, *Electrophorus electricus*, (*eelAChE*) tipo VI-S foi obtida da Sigma-Aldrich.

Para o preparo do capilar e imobilização da enzima foi utilizada uma bomba-seringa Cole-Parmer modelo 230VAC.

Para a imobilização da enzima, foram utilizadas partículas magnéticas Bioclone (BcMagTM) de 1,0 µm de diâmetro, constituídas por ferrita, recobertas com sílica e derivadas com grupos amino na superfície.

Os extratos do gênero *Melodinus* foram doados pelo grupo da pesquisadora Xiao-Qi Zhang do *Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products (Jinan University, Guangzhou, China)*. O derivado cumarínico 16¹²⁰, foi doado pelo grupo de “Síntese de Produtos Naturais, Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira” da Universidade Federal de São Carlos.

Os reagentes, equipamentos e demais produtos químicos utilizados estão descritos na seção 2.2.1 (Capítulo 2).

3.2.2 - Imobilização da enzima *eelAChE*

3.2.2.1 - Capilares de sílica fundida

Os ICERs-*eelAChE* foram preparados de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 2 desta tese, seção 2.2.2.

3.2.2.2 - Partículas magnéticas

Baseando-se em trabalhos anteriores²⁶, 25 mg de partículas magnéticas (MBs) foram transferidas para um tubo de microcentrifugação de volume igual a 1,5 mL. Utilizando-se um separador magnético manual para excluir o sobrenadante, as MBs foram lavadas três vezes com 1,0 mL de uma solução de piridina (10 mmol.L⁻¹, pH 6,0). Em seguida, as MBs foram ressuspensas em 1,0 mL de uma solução glutaraldeído 5% (v/v) preparada na solução de piridina (10 mmol.L⁻¹, pH 6,0) e, colocadas para agitar a 4 °C por um período igual a 3 horas.

Após a separação magnética manual, com exclusão do sobrenadante, o procedimento de lavagem foi repetido mais três vezes com 1,0 mL da solução de piridina (10 mmol.L⁻¹, pH 6,0). Em seguida, o sobrenadante

foi descartado, adicionada a solução enzimática (0,4 mg de *eelAChE* solubilizadas em 500 μL da solução de piridina 10 mmol.L^{-1} , pH 6,0) e então a reação foi deixada sob agitação, por 16 horas a 4 °C. Ao final, o sobrenadante foi descartado, as *eelAChE(NT)*-MB lavadas três vezes com 500 μL do tampão Tris-HCl (100 mmol.L^{-1} , pH 8,0) e, estocadas nesta mesma solução tampão.

3.2.3 - Sistema LC-MS empregado nos ensaios com as *eelAChE(NT)*-MB

Foi configurado um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas para medir a atividade das *eelAChE(NT)*-MB preparadas e validar o ensaio de *ligand fishing*. Os parâmetros cromatográficos otimizados foram: coluna Atlantis[®] HILIC (2,1 x 150 mm; 5,0 μm); fase móvel- ACN: acetato de amônio (10 mmol.L^{-1} , pH 4,5) (80:20, v/v) a uma vazão de 0,20 mL.min^{-1} ; volume de injeção- 10 μL . Parâmetros de ionização no MS: voltagem no capilar- 4500 V; pressão do gás de nebulização (N_2)- 55,0 psi; vazão do gás de secagem- 10,0 L.min^{-1} ; temperatura da fonte de ionização- 350°C.

As amostras obtidas a partir dos ensaios de *ligand fishing* foram analisadas monitorando os íons precursores de cada composto presente na mistura de referência: tacrina $[\text{M}+\text{H}]^+$ 199 m/z, galantamina $[\text{M}+\text{H}]^+$ 288 m/z, cumarina 16 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 346 m/z, cetamina $[\text{M}+\text{H}]^+$ 238 m/z, labetalol $[\text{M}+\text{H}]^+$ 329 m/z e o padrão interno nicotina $[\text{M}+\text{H}]^+$ 162,4 m/z.

3.2.4 - Ensaio de atividade com as *eelAChE(NT)*-MB

Inicialmente, foram adicionados 500 μL de uma solução acetilcolina 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, preparada em acetato de amônio (15 mmol.L^{-1} , pH 8,0), nas *eelAChE(NT)*-MB. O tubo de microcentrifugação foi agitado em um vórtex por 10 segundos e colocado em um separador magnético manual por 120 segundos. O sobrenadante foi coletado e injetado no sistema LC-MS. As *eelAChE(NT)*-MB foram lavadas por três vezes, descartando o sobrenadante,

com a solução acetato de amônio (15 mmol.L^{-1} , pH 8,0) e armazenadas em tampão Tris-HCl (100 mmol.L^{-1} , pH8,0).

3.2.5 - Validação do ensaio de *ligand fishing* com as *eelAChE(NT)-MB*

Inicialmente, 25,0 mg das *eelAChE(NT)-MB* preparadas foram ressuspensas em 500 μL de uma solução acetato de amônio (15 mmol.L^{-1} , pH 8,0) contendo a mistura de referência (tacrina, galantamina, cumarina 16, cetamina e labetalol) na concentração de 100 nmol.L^{-1} para cada composto. O tubo de microcentrifugação foi agitado por 30 segundos (em vórtex), deixado em repouso por mais 90 segundos e colocado em um separador magnético manual, por 120 segundos. O sobrenadante foi coletado e armazenado (S-1). As *eelAChE(NT)-MB* foram lavadas com 500 μL de uma solução acetato de amônio (15 mmol.L^{-1} , pH 8,0) agitando-se, em vórtex, por 10 segundos. O sobrenadante foi coletado após 120 segundos no separador magnético manual. O procedimento de lavagem foi realizado duas vezes (S-2 e S-3). Seguida da lavagem, foi realizada a extração dos ligantes através da adição de 500 μL de uma solução de acetilcolina $1826 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (preparada em acetato de amônio 15 mmol.L^{-1} , pH 8,0, contendo 20% de metanol, v/v). O tubo foi agitado, em um thermomixer, a 300 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 600 segundos. O sobrenadante foi separado por 120 segundos (separador magnético manual), coletado e armazenado (S-4). Ao final, as *eelAChE(NT)-MB* foram lavadas mais duas vezes de acordo com o procedimento de lavagem descrito, coletando os sobrenadantes S-5 e S-6.

Com o objetivo de manter o mesmo percentual de solvente orgânico em todas as amostras, foi adicionado 100 μL de metanol aos sobrenadantes S-1, S-2, S-3, S-5 e S-6. Ao S-4, foi adicionado 100 μL da solução acetato de amônio (15 mmol.L^{-1} , pH 8,0), conservando o mesmo volume final em todas as amostras.

Nicotina na concentração de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi utilizada como padrão interno para ionização.

Curvas de calibração foram construídas para quantificar os compostos presentes em cada sobrenadante coletado no ensaio. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque, em metanol, com os compostos à $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A partir de volumes adequados da solução estoque, foram preparados $500 \mu\text{L}$ das soluções de trabalho, em metanol, nas seguintes concentrações: 0,20; 0,40; 0,80; 1,6; 3,2 e $6,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Para preparar os padrões de calibração, alíquotas ($10 \mu\text{L}$) da solução de trabalho apropriadas foram adicionadas a $90 \mu\text{L}$ de uma solução contendo: $83 \mu\text{L}$ da solução acetato de amônio 15mmol.L^{-1} , pH 8,0 e $7,0 \mu\text{L}$ de metanol. Em cada padrão foi adicionado $1,0 \mu\text{L}$ da solução do padrão interno, nicotina $2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As soluções foram homogeneizadas e alíquotas de $90 \mu\text{L}$ foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. Amostras de $10 \mu\text{L}$ foram injetadas no sistema LC-MS.

As curvas de calibração foram construídas no software OriginPro 8.0, plotando-se a razão entre área do composto e a área do padrão interno (A/A_{PI}), em função da concentração do composto.

3.2.6 - Ensaio de triagem nos extratos de *Melodinus fusiformis*

3.2.6.1 Sistema LC-MS utilizado com o ICER-*eelAChE*

Foi mantida a configuração do sistema LC-MS, empregado no método de L-ZBC desenvolvido e validado no Capítulo 2 desta tese. Ajustes nos parâmetros de ionização foram necessários e, o método otimizado foi: bomba A- acetato de amônio (15mmol.L^{-1} , pH 8,0) a uma vazão de $0,05 \text{mL.min}^{-1}$; bomba B- metanol a uma vazão de $0,05 \text{mL.min}^{-1}$; volume de injeção- $10 \mu\text{L}$; voltagem no capilar- 4500V ; pressão do gás de nebulização (N_2)- $55,0 \text{psi}$; vazão do gás de secagem- $10,0 \text{L.min}^{-1}$; temperatura da fonte de ionização- 350°C .

3.2.6.2 Preparo das amostras e ensaio de triagem dos extratos de *Melodinus fusiformis* com o ICER-eelAChE

Os extratos usados foram extratos secos das frações acetato de etila (JSC-E e total álcali JSC-E), butanol (JSC-B e total álcali JSC-B) e éter de petróleo (JSC-P), da espécie *Melodinus fusiformis*. Soluções estoque de cada extrato foram preparadas na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, em DMSO. A partir de alíquotas apropriadas da solução estoque, as soluções de trabalho ($1,0 \text{ mL}$) foram preparadas (em água) na concentração de $1,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras na concentração de $1, 10$ e 250 ng.mL^{-1} do extrato (contendo ACh $490 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$), foram preparadas em água, a partir das soluções de trabalho. Alíquotas de $10 \text{ }\mu\text{L}$ das amostras preparadas foram injetadas no sistema LC-MS e, a razão entre a colina produzida e a acetilcolina residual foi determinada. O extrato que apresentou o menor quociente, maior inibição, foi selecionado para continuar os ensaios.

3.2.7 - Método LC-MS para análise do extrato total álcali JSC-E

Foi desenvolvido um método de LC-MS para analisar o extrato total álcali JSC-E da fração acetato de etila da espécie *Melodinus fusiformis*. A coluna C_{18} Zorbax Eclipse XDB ($4,60 \times 150 \text{ mm}$, $5,00\mu\text{m}$) foi selecionada para o desenvolvimento do método. Uma solução aquosa de ácido fórmico $0,05\%$, v/v (A) e metanol (B) foram combinados como fase móvel em eluição gradiente. A condição cromatográfica que apresentou maior número de bandas e reprodutibilidade nos cromatogramas foi: em uma vazão igual a $0,08 \text{ mL.min}^{-1}$, o percentual do solvente B variou de $20\text{-}25\%$ nos primeiros 20 minutos, de 25 a 40% em $0,01$ minutos, de 40 a 70% em 40 minutos e, de 70 a 90% em $0,01$ minutos, com um tempo total de análise igual a 100 minutos e volume de injeção igual a $10 \text{ }\mu\text{L}$. Os parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas foram: vazão igual a $10,0 \text{ L.min}^{-1}$ e temperatura de $350 \text{ }^\circ\text{C}$ para o gás de secagem (N_2), com pressão de nebulização igual a $55,0 \text{ psi}$. O analisador foi

utilizado no modo *full scan*, nos modos de ionização positivo e negativo, monitorando dois canais em diferentes faixas de íons: de 50,0 a 400 m/z e de 400 a 800 m/z.

3.2.8 - Ensaio de *ligand fishing* e triagem do extrato total álcali JSC-E

O método desenvolvido para os ensaios de *ligand fishing*, seção 3.2.5, foi empregado em uma solução aquosa do extrato total álcali JSC-E na concentração de $2,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Brevemente, as *eelAChE(NT)*-MB foram ressuspensas na solução do extrato e, os sobrenadantes $S_{T.A.}-1$ e $S_{T.A.}-4$ coletados e injetados ($10 \mu\text{L}$) no sistema LC-MS, empregando o método desenvolvido para o extrato (seção 3.2.7).

Comparando os cromatogramas obtidos, foram identificados compostos, através da relação m/z e do tempo de retenção, presentes em diferentes intensidades nas amostras $S_{T.A.}-1$ e $S_{T.A.}-4$. Assim, empregando o método LC-MS previamente utilizado, cinco frações foram coletadas e, o percentual de inibição de cada fração foi calculado através do ensaio de triagem com o ICER-*eelAChE*. Deste modo, as frações coletadas foram secas em fluxo de nitrogênio, ressuspensas em $100 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de ACh $490 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e injetadas no sistema LC-MS (seção 3.2.6.1). Um controle positivo (presença de acetilcolina) e um controle negativo (ausência de acetilcolina) foi utilizado para cada fração analisada.

A razão entre a área de colina produzida e de acetilcolina residual foi determinada e, a fração que apresentou um menor valor (maior inibição) em relação ao do controle positivo foi selecionada e injetada no sistema LC-MS utilizando o método desenvolvido para o extrato, (seção 3.2.7) para determinar o íon do composto ativo.

3.2.9 - Isolamento do composto ativo

O composto ativo foi isolado através da injeção de 20 μL de uma solução do extrato total álcali JSC-E na concentração de 10 mg.mL^{-1} (preparada em $\text{DMSO:H}_2\text{O}$ (20:80, v/v)) em uma coluna semi-preparativa C_{18} -Zorbax Eclipse XDB (9,6 x 250 mm; 5,0 μm) nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel- água (A) e acetonitrila (B) em uma eluição gradiente variando a concentração de B de 30 a 50% em 30 minutos, a uma vazão igual a $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$. A fração com o composto ativo foi coletada no intervalo de 6 a 7 minutos, monitorando o comprimento de onda igual a 284 nm em um detector de DAD. Ao final, a coluna foi limpa por 60 minutos a 90% de B. Foram coletadas 24 frações, que secas (em fluxo de nitrogênio) resultaram em uma massa igual a 1,0 mg do composto isolado.

Para verificar a pureza do composto isolado, foi preparada uma solução estoque na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (em metanol). A partir de alíquotas iguais a 20 μL da solução estoque, foram preparadas (em metanol) as amostras a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, das quais 10 μL foram injetados no sistema LC-MS empregando o método descrito na seção 3.2.7.

3.2.10 - Ensaios de cromatografia zonal não-linear de bioafinidade

O método cromatográfico foi inicialmente validado com os inibidores de referência: tacrina, galantamina e cumarina 16¹²⁰.

Baseando-se no trabalho de Sanghvi et al.²², os valores das constantes de afinidade (K_d) foram determinados através da injeção de diferentes concentrações dos inibidores no sistema LC-MS com o ICER-*eel*AChE (seção 3.2.6.1). A partir de diluições em série, com um fator igual a 0,5, foram preparadas amostras (em água) nas faixas de concentração: 1,25 a 20 nmol.L^{-1} para a tacrina, 0,25 a 4 nmol.L^{-1} para a cumarina 16 e, 6,25 a 100 nmol.L^{-1} para a galantamina. Monitorando os íons moleculares correspondentes a cada

inibidor, os perfis das bandas cromatográficas obtidas foram utilizados para determinar os parâmetros a_1 , a_2 e a_3 para cada concentração (Equação 3.1) e então, foram calculadas as constantes: $k_{\text{off}}=1/(a_2/t_0)$, $K_a= a_3/C_0$, $K_d= 1/K_a$ e $k_{\text{on}}= K_d.K_a$; onde, C_0 é a concentração do composto multiplicada pelo volume injetado e, t_0 é o volume morto da coluna.

$$y = \frac{a_0}{a_3} \left[1 - \exp\left(-\frac{a_3}{a_2}\right) \right] \left[\frac{\sqrt{(a_1/x)} I_1\left(2\sqrt{a_3x}/a_2\right) \exp\left((-x-a_1)/a_2\right)}{1 - \Gamma\left[(a_1/a_2)(x/a_2)\right] [1 - \exp(-a_3/a_2)]} \right] \text{EQUAÇÃO 3.1}$$

A partir da solução estoque (1,0 mg.mL⁻¹) do composto isolado, foi preparada a solução trabalho na concentração de 62,0 ng.mL⁻¹. Diluições em série da solução trabalho, com um fator igual a 0,75, foram empregadas para preparar as amostras com concentrações entre 0,465 e 4,18 ng.mL⁻¹. Os cromatogramas foram analisados utilizando o software PeakFit versão 4.12 e, os parâmetros a_1 , a_2 e a_3 determinados para cada concentração.

3.3 - Resultados e discussão

3.3.1 - Imobilização da enzima *eel*AChE em partículas magnéticas

O esquema apresentado na Figura 3.1 ilustra o procedimento de imobilização realizado de acordo com o protocolo dado pelo fabricante¹²⁸.

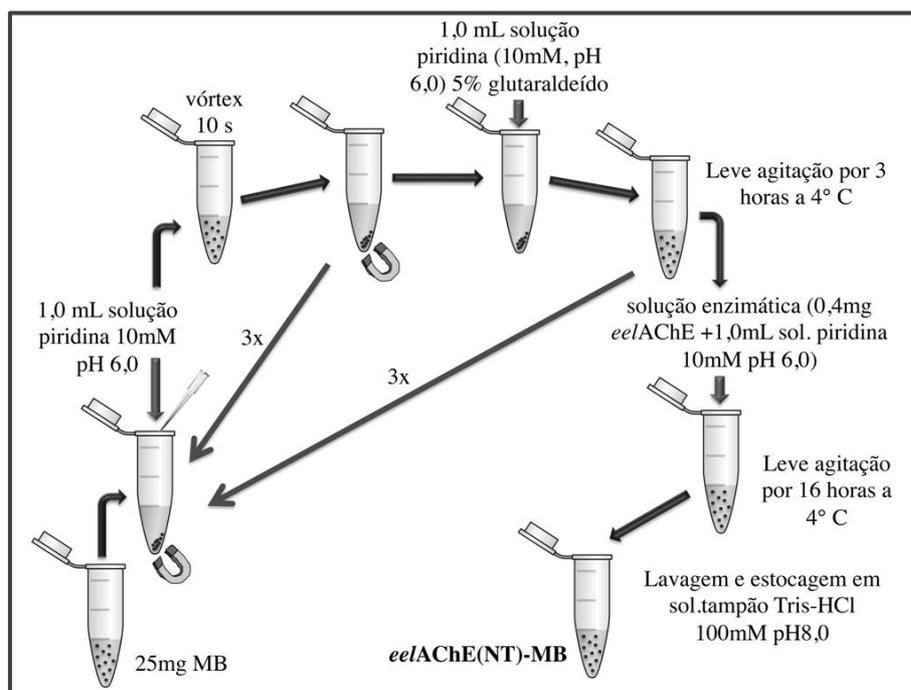


FIGURA 3.1- Esquema para o preparo das *eelAChE(NT)-MB*.

Foram três etapas realizadas (Figura 3.2). A etapa 1 envolve a limpeza, onde as partículas foram lavadas com uma solução piridina 10,0 mmol.L⁻¹, pH 6,0, o que garantiu a estrutura da amina na superfície da partícula, impedindo reações secundárias; Na etapa 2 é realizada a adição do espaçador, o reagente bifuncional glutaraldeído, através da formação de uma ligação do tipo base de Schiff com os grupamentos amino da superfície da partícula; a imobilização da enzima é realizada na etapa 3, onde os resíduos de aminoácidos com grupamentos amina livres da enzima *eelAChE* reagiram com os grupos aldeído presentes no agente espaçador formando ligações do tipo base de Schiff.

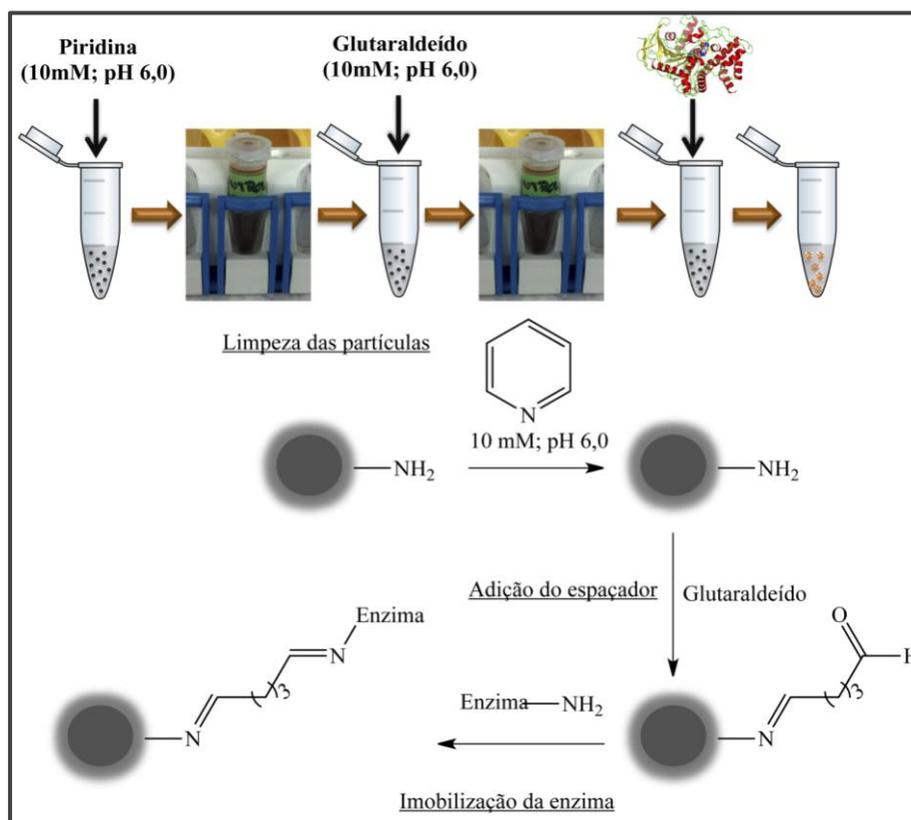


FIGURA 3.2- Método de imobilização da enzima *eelAChE* em partículas magnéticas de óxido de ferro, recobertas com sílica e derivadas com grupos amino na superfície, (NT)-MB.

A atividade da enzima imobilizada foi avaliada a partir da reação das *eelAChE*(NT)-MB com acetilcolina a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e, a colina obtida e acetilcolina utilizada foram monitoradas no modo HILIC de eluição por LC-MS (Figura 3.3).

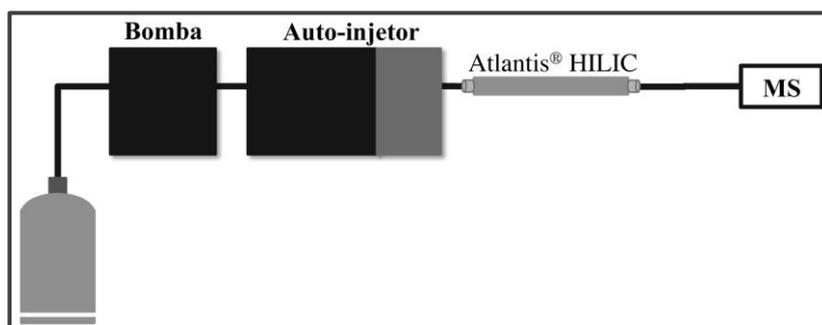


FIGURA 3.3- Sistema LC-MS utilizado durante os ensaios de atividade e validação do *ligand fishing* com as *eelAChE(NT)*-MB. Parâmetros cromatográficos e de ionização apresentados na seção 3.2.3.

A atividade calculada foi igual a 85% (em área, razão entre a área de colina e a área de acetilcolina), demonstrando que a afinidade da enzima pelo substrato foi mantida com o procedimento de imobilização empregado.

3.3.2 - Validação do ensaio de *ligand fishing* com as *eelAChE(NT)*-MB

Para a validação do ensaio, uma mistura de referência foi preparada com os ligantes e não ligantes da AChE; deste modo, se fez necessário o desenvolvimento de um método por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para a separação desta mistura. O sistema LC-MS configurado está ilustrado na Figura 3.3.

Devido à polaridade dos compostos, o modo HILIC de eluição foi selecionado, empregando eluição no modo isocrático. As condições cromatográficas e de ionização são aquelas apresentadas na seção 3.2.3 e, o cromatograma de íons extraídos obtido está ilustrado na Figura 3.4.

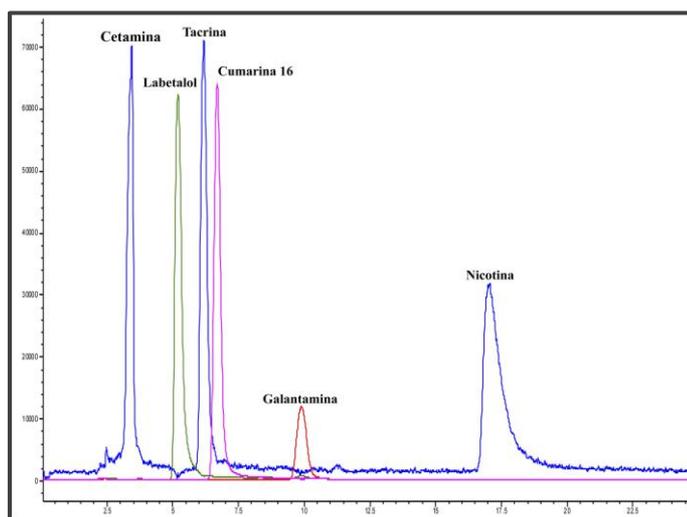


FIGURA 3.4- Cromatograma de íons extraídos (EIC) obtido a partir da injeção de uma amostra contendo cetamina, tacrina, galantamina, labetalol e cumarina 16 na concentração de 1280nmol.L^{-1} e, nicotina 20000nmol.L^{-1} . Parâmetros do LC-MS descritos na seção 3.2.3.

O ensaio de *ligand fishing* foi inicialmente otimizado utilizando os inibidores de referência tacrina, galantamina e cumarina 16.

Em um ensaio ideal (Figura 3.5), na etapa 1, as partículas magnéticas imobilizadas com a biomolécula (B-MB) são imersas em uma mistura de compostos onde, os ligantes ficam retidos e os não-ligantes permanecem na mistura e são separados no sobrenadante S-1. Na etapa 2, as B-MB são lavadas com a solução 1 (sobrenadantes S-2 e S-3) extraíndo os compostos que possuam uma baixa afinidade ou que permaneceram retidos nos poros das partículas. Para a extração dos ligantes, etapa 3 (sobrenadante S-4), é comumente utilizada uma solução (solução 2) contendo um pequeno percentual de solvente orgânico e/ou um composto de elevada afinidade pela biomolécula, que deslocará os ligantes do sítio ativo ou alostérico da biomolécula para a solução. Ao final, a etapa de lavagem é repetida coletando os sobrenadantes S-5 e S-6, que não devem apresentar vestígios dos compostos encontrados nas soluções anteriores.

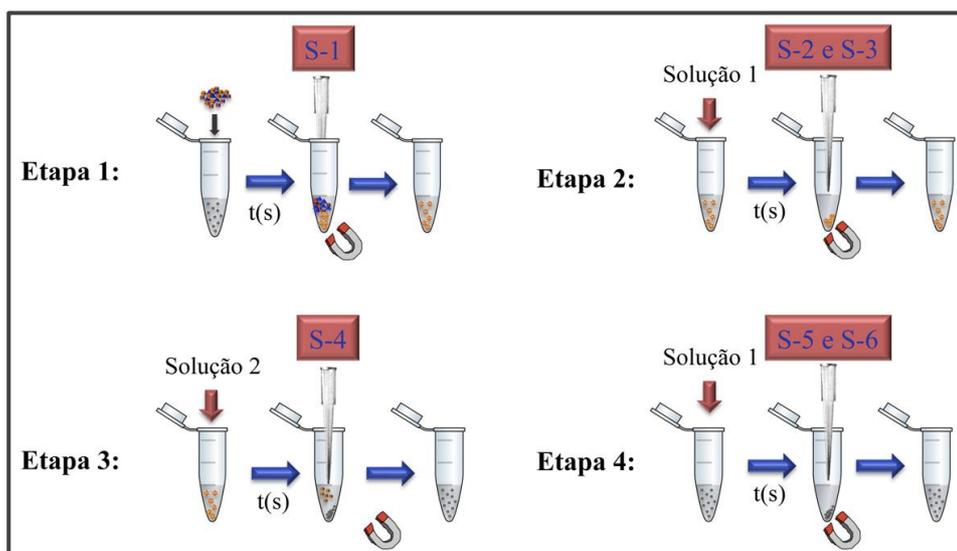


FIGURA 3.5- Representação de um ensaio com as B-MBs.

Neste contexto, a otimização do ensaio foi realizada buscando um maior percentual dos ligantes no sobrenadante S-4 (etapa 3) e, um menor percentual em S-1(etapa 1).

Como descrito na Tabela 3.1 foram realizados 11 ensaios. Com o objetivo de homogeneizar a mistura e extrair os ligantes de baixa e alta afinidade pela AChE, o parâmetro tempo de agitação foi otimizado nas etapas 1, 2 e 3. O percentual de solvente orgânico, a temperatura e a concentração de acetilcolina foram os parâmetros otimizados na etapa 3. A presença do solvente orgânico variou a polaridade da solução, aumentando ou diminuindo a solubilidade dos ligantes de maior afinidade pela enzima, assim como a temperatura. A acetilcolina foi utilizada com o objetivo de melhorar a extração através do deslocamento dos ligantes do sítio ativo da AChE para a solução.

Desta maneira, as amostras S-1 e S-4 obtidas para cada condição avaliada foram injetadas no sistema LC-MS (Figura 3.3) e, o percentual de inibidores encontrados em S-1 e S-4 foi calculado para cada ensaio. Os resultados encontram-se no gráfico da Figura 3.6.

TABELA 3.1- Parâmetros e condições avaliadas para o ensaio de *ligand fishing* com as *eelAChE(NT)*-MB.

Ensaio	Etapa 1		Etapa 2		Etapa 3				
	Tempo (s)		Tempo (s)		Tempo (s)	T (°C)	(%) MeOH	[ACh] (μM)	
	Agit.	Rep.	Agit.	Rep.	Agit.	Rep.			
1	30*	30	0	60	20*	100	20	20	0
2	30*	90	0	60	20*	100	20	20	0
3	30*	270	0	60	20*	100	20	20	0
4	30*	90	10*	0	20*	100	20	20	0
5	30*	90	10*	0	1200**	0	25	20	0
6	30*	90	10*	0	1800**	0	25	20	0
7	30*	90	10*	0	2400**	0	25	20	0
8	30*	90	10*	0	1800**	0	25	20	780
9	30*	90	10*	0	600**	0	25	20	780
10	30*	90	10*	0	600**	0	25	20	1218
11	30*	90	10*	0	600**	0	25	20	1826

* agitação em vórtex; ** agitação em termo-misturador à 300rpm

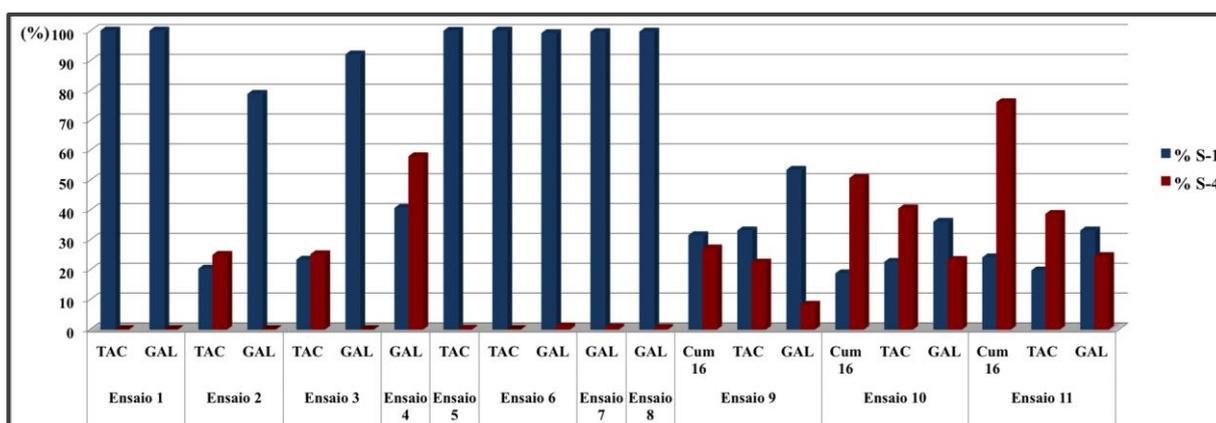


FIGURA 3.6- Percentual de inibidores encontrados nos sobrenadantes S-1 e S-4 para os ensaios 1 a 11, apresentados na Tabela 3.1.

O maior percentual de ligantes presentes em S-4 foi obtido no ensaio 11: 38% para tacrina, 25% para galantamina e 76% para a cumarina 16.

Assim, o ensaio foi repetido utilizando a mistura de referência, contendo os ligantes e não-ligantes (labetalol e cetamina) da AChE. Os resultados encontram-se na Figura 3.7 e demonstram que como esperado, tem-se um elevado percentual de labetalol e cetamina em S-1 e um baixo percentual em S-4.

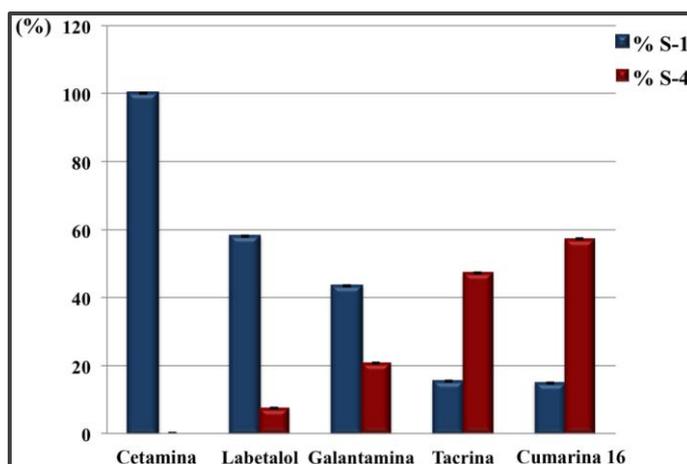


FIGURA 3.7- Percentual de ligantes e não-ligantes encontrados nos sobrenadantes S-1 e S-4 para o ensaio 11, apresentado na Tabela 3.1.

Com o objetivo de quantificar os compostos encontrados no ensaio otimizado, foram construídas curvas de calibração. As curvas foram lineares na faixa de concentração estudada para cada composto, com valores de coeficientes de determinação ($n=3$) iguais ou superiores a 0,99. Os valores de precisão e exatidão variaram entre 3,16 - 5,08% e 92,4 - 109%, respectivamente.

O comportamento das *eelAChE(NT)*-MB foi analisado repetindo o ensaio otimizado com a mistura de referência e, com os compostos individualmente. Os resultados apresentados na Figura 3.8 mostram que como esperado, cetamina e labetalol estão presentes apenas em S-1, comprovando que as *eelAChE(NT)*-MB não apresentaram afinidade pelos não-ligantes. Embora estejam presentes em S-1, os ligantes tacrina e galantamina estão em S-4, o sobrenadante da etapa 3. A concentração da cumarina 16 encontrada em S-4 é superior à concentração de tacrina, que é superior à concentração de

galantamina, demonstrando que a capacidade de “pesca” está associada com a afinidade pela enzima e as constantes de inibição.

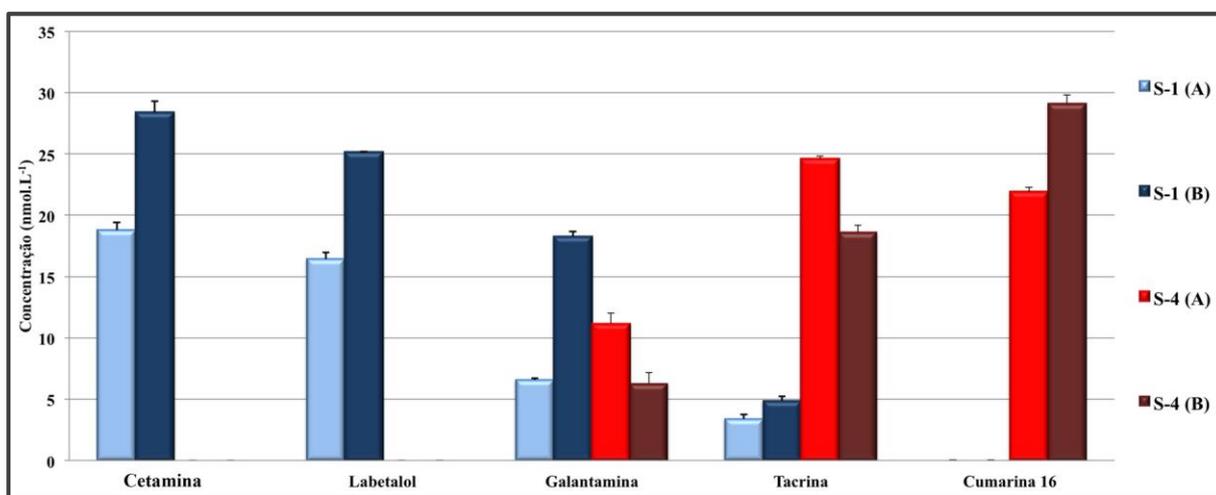


FIGURA 3.8- Concentração de tacrina, galantamina, cumarina 16, cetamina e labetalol, presentes nas amostras S-1 e S-4. (A) ensaio com os compostos individualmente; (B) ensaio com a mistura dos compostos.

O ensaio foi repetido com partículas magnéticas controle, preparadas na ausência da enzima *eelAChE*. Como esperado, todos os compostos foram encontrados em S-1 em uma concentração superior a 90% e, estiveram ausentes em S-4, com exceção da cumarina 16 onde 13% foi encontrado em S-4 e 87% em S-1. Isto pode ser explicado por interações secundárias entre o ligante e o suporte, que resulta em um pequeno *carry-over* entre as análises.

Portanto, os ensaios evidenciaram a capacidade das *eelAChE*(NT)-MB em “pescar” ligantes em uma mistura conhecida de compostos, validando os ensaios de *ligand fishing* para serem aplicados em uma mistura desconhecida.

3.3.3 - Ensaio de triagem com os extratos de *Melodinus fusiformis*

O modelo de triagem empregando o ICER-*eelAChE* foi utilizado para determinar o extrato de *Melodinus fusiformis* mais ativo. A razão entre a área de colina produzida e acetilcolina residual foi usada para identificar o

extrato que apresentou inibição concentração-dependente. A Figura 3.9 ilustra os resultados obtidos.

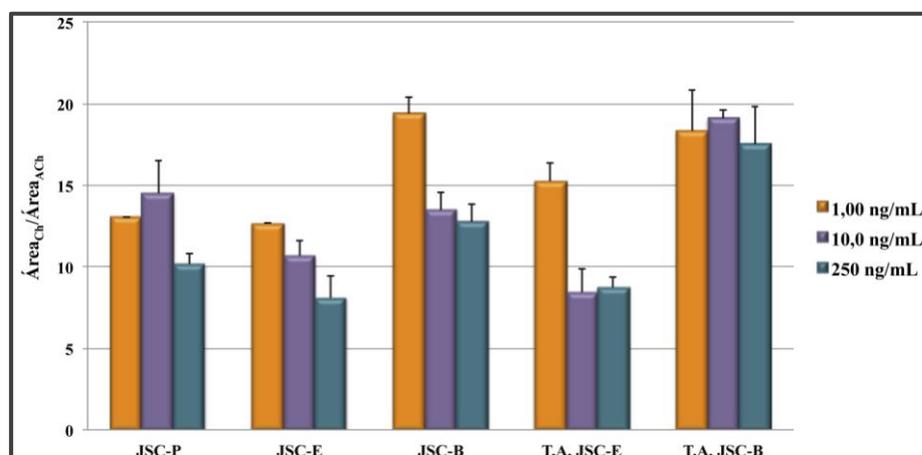


FIGURA 3.9 - Ensaio de triagem com o ICER-*eelAChE* para os extratos de *Melodinus fusiformis*.

Dentre os cinco extratos analisados, os derivados da fração acetato de etila, JSC-E e total álcali JSC-E (T.A. JSC-E), demonstraram um maior efeito concentração-dependente, ou seja, a inibição foi pronunciada com o aumento da concentração de extrato. Contudo, o T.A. JSC-E apresentou uma maior atividade (menor produção de Ch) em relação ao JSC-E portanto, foi o extrato selecionado para dar continuidade aos ensaios.

Para verificar os íons presentes no extrato selecionado, foi utilizado o método de LC-MS desenvolvido. Empregando o modo de eluição gradiente e uma coluna C₁₈ Zorbax Eclipse XDB, uma amostra do extrato T.A. JSC-E foi injetada no sistema LC-MS, no modo *full scan*, registrando os cromatogramas de íons totais nos modos positivo e negativo de ionização.

O ensaio de *ligand fishing* com as *eelAChE*(NT)-MBs foi realizado para “pescar” os ligantes presentes neste extrato e, os sobrenadantes coletados correspondentes às etapas 1 (S_{T.A.}-1) e 3 (S_{T.A.}-4) foram analisados, no modo *fullscan*, nas condições desenvolvidas para o extrato (seções 3.2.7-8). Desta maneira, analisando os cromatogramas de íons totais (TICs), foram verificadas

(tempo de retenção) mais de 30 bandas cromatográficas com diferentes intensidades nas amostras S_{T.A.}-1 e S_{T.A.}-4, no modo positivo de ionização.

Para identificar as bandas cromatográficas e íons responsáveis pela inibição da *eelAChE*, foi realizado o fracionamento da amostra S_{T.A.}-4. Cinco frações foram coletadas, baseando-se nos tempos de retenção (Tabela 3.2) e, o percentual de inibição para cada uma foi avaliado usando o ICER-*eelAChE*. Os resultados indicam baixos percentuais de inibição (Tabela 3.2), sendo a fração 1 a que apresentou a maior atividade inibitória.

TABELA 3.2- Frações coletadas da amostra S_{T.A.}-4 com os íons esperados em cada fração (de acordo com o *fingerprint*) e os percentuais de inibição obtidos.

Fração	Faixa de tempo	Íons esperados (m/z)	Área _{Ch} / Área _{ACh}	I(%)
1	1,0 a 10 min	156,2	6,6	40%
2	45 a 50 min	363,7 e 368,7	10	9,0%
3	52 a 56 min	300,7; 484,0 e 489,0	8,6	22%
4	62 a 80 min	206,4; 358,7; 363,7; 368,7; 369,0; 374,8; 390,8; 400,0; 406,0; 406,8; 412,8; 420,8; 428,9; 436,0; 436,9; 484,0; 489,0; 522,4; 550,0; 579,2; 581,2; 582,2; 583,0 e 641,2	10,9	0,90%
5	83 a 90 min	368,8; 337,9 e 402,8	9,9	10%
Controle (+)	-	-	11	-

A re-análise da fração 1 no modo *full scan* mostrou apenas a presença do íon 156 m/z. Para isolar o composto responsável pela atividade, o

extrato T.A. JSC-E foi purificado por cromatografia semi-preparativa. O cromatograma ilustrado na Figura 3.10 mostra como as frações foram coletadas.

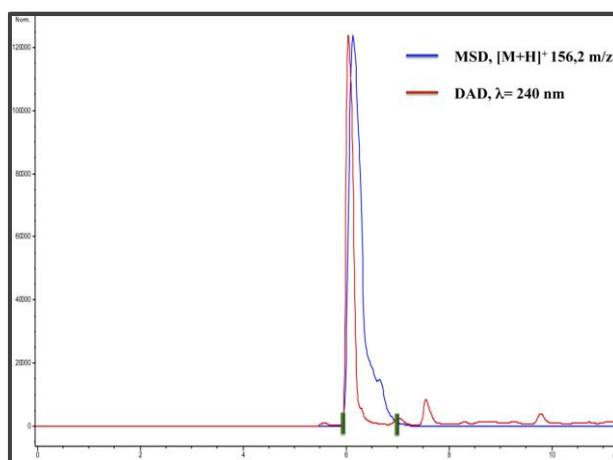


FIGURA 3.10- Cromatograma obtido a partir da injeção de uma amostra do extrato T.A. JSC-E ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) no sistema LC-DAD-MS (parâmetros cromatográficos e de ionização descritos na seção 3.2.9).

A pureza do composto isolado foi verificada por LC-MS no modo *full scan*. O cromatograma de íons totais e espectro de massas obtidos no modo positivo de ionização revelaram apenas a presença do íon de relação m/z 156,2 (Figura 3.11).

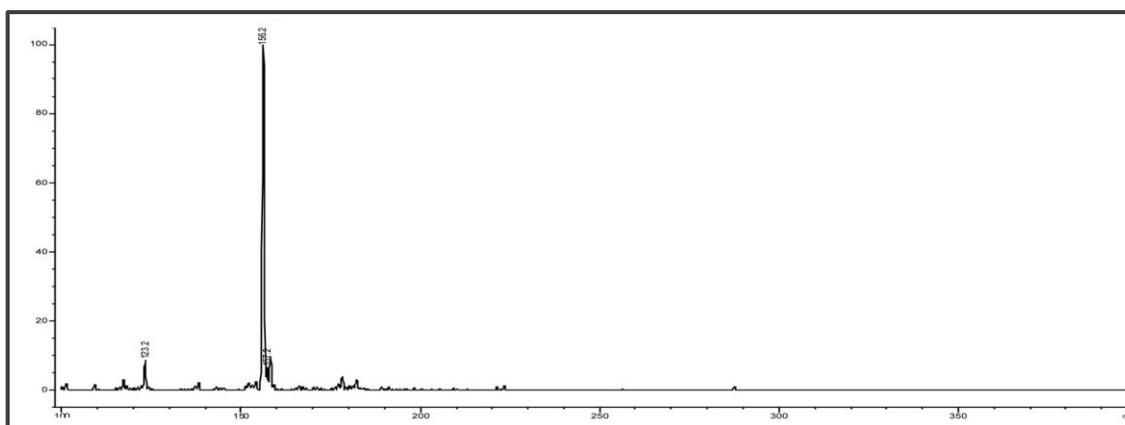


FIGURA 3.11- Espectro de massas correspondente à injeção de uma amostra do composto isolado no método de LC-MS desenvolvido para o extrato T.A. JSC-E utilizando o modo positivo de ionização. Parâmetros cromatográficos e de ionização descritos na seção 3.2.7.

Para a caracterização do potencial inibitório do composto isolado, a constante de afinidade (K_d) foi determinada através da cromatografia zonal não-linear de bioafinidade.

3.3.4 - Caracterização dos ligantes por cromatografia zonal não-linear de bioafinidade

A cromatografia zonal não-linear de bioafinidade vem se destacando como uma nova técnica para determinação da constante de afinidade, K_d ⁴⁴. Embora ainda seja pouco utilizada quando comparada à cromatografia frontal de bioafinidade, esta técnica apresenta como principal vantagem a pequena quantidade de amostra necessária para os ensaios.

O ensaio foi inicialmente validado no reconhecimento de ligantes com diferentes potenciais inibitórios. Para isso, os inibidores de referência da *eelAChE*, tacrina, galantamina e, a cumarina 16 foram selecionados (seção 3.2.10). Como ilustrado na Figura 3.12, as bandas cromatográficas obtidas nos ensaios são assimétricas (distribuição não-Gaussiana), com um maior desvio em concentrações mais elevadas. Analisando os cromatogramas no software PeakFit, os parâmetros a_1 , a_2 e a_3 (Equação 3.1) foram determinados e as constantes k_{on} , k_{off} e K_d calculadas, Tabela 3.3.

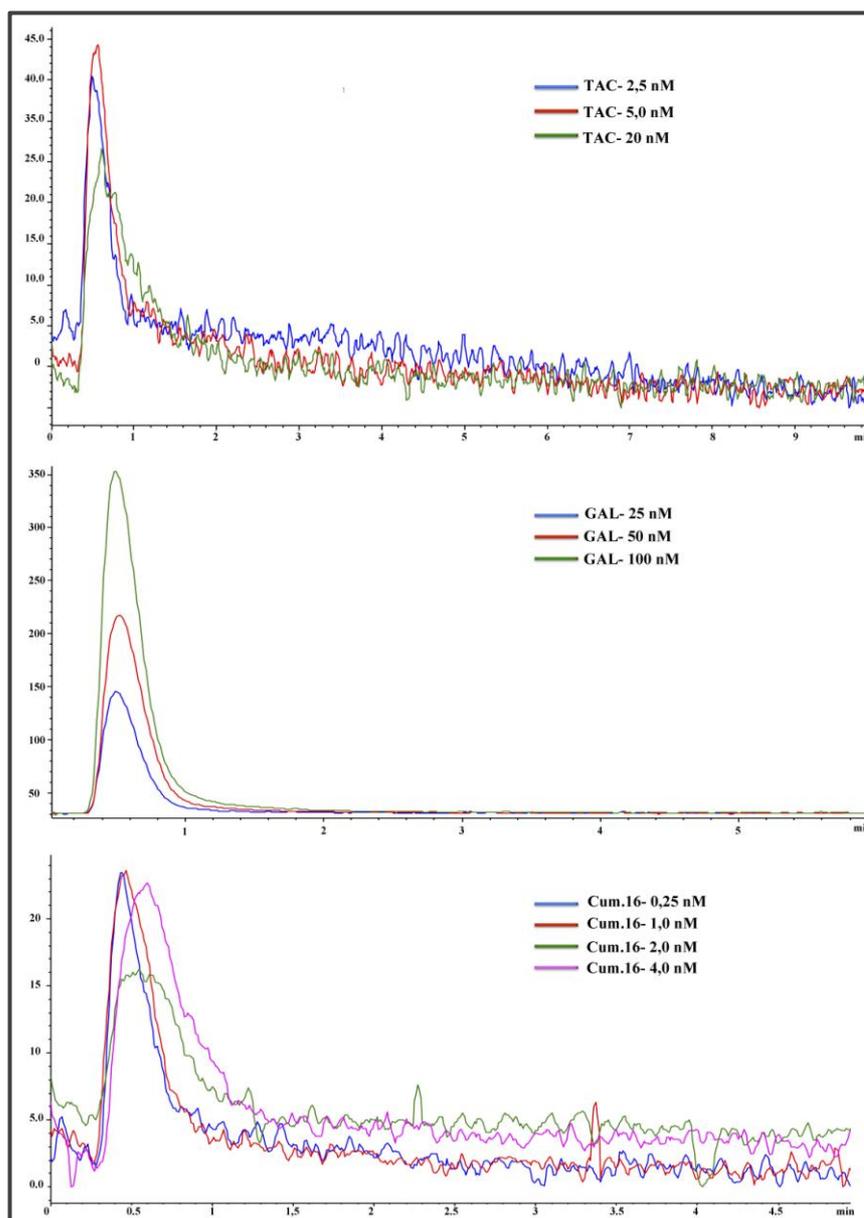


FIGURA 3.12- Cromatogramas obtidos a partir do ensaio de NL-ZBC com o ICER-*eelAChE* e os ligantes tacrina, galantamina e cumarina 16 (Cum.16) no sistema LC-MS. Parâmetros cromatográficos e de ionização descritos na seção 3.2.6.1.

Como esperado, os valores de K_d obtidos (Tabela 3.3) seguem a mesma tendência dos valores da constante de inibição (K_i)¹²⁰, evidenciando a mesma ordem de afinidade, a cumarina 16 como um forte inibidor e a galantamina como o mais fraco. Portanto, os ensaios de NL-ZBC podem ser utilizados para determinar a afinidade de novos ligantes pela enzima *eelAChE*.

TABELA 3.3- Parâmetros cinéticos determinados a partir do ensaio de NL-ZBC com o ICER-*eel*AChE para os ligantes tacrina, galantamina e cumarina 16.

Inibidores	Concentração (nmol.L ⁻¹)	k _{off} (nmol.L ⁻¹)	k _{on} (nmol.L ⁻¹)	K _d (nmol.L ⁻¹)
Tacrina	2,50	1,43	0,149	9,75
	5,00	1,35	0,125	
	20,0	0,479	0,051	
Galantamina	25,0	1,21	0,013	198
	50,0	1,14	0,006	
	100	1,18	0,004	
Cumarina 16	0,250	1,48	1,93	3,74
	1,00	1,26	0,410	
	2,00	0,655	0,148	
	4,00	0,804	0,114	

Para cálculo da constante de afinidade, o ensaio de NL-ZBC foi realizado com o composto isolado, em uma faixa de concentração de 0,465 a 4,18 ng.mL⁻¹. Calculado em relação à massa, já que não foi realizada a determinação estrutural, o valor de K_d foi igual a 124 ng.mL⁻¹, cerca de duas vezes o valor calculado para o inibidor de referência com menor afinidade pela enzima, a galantamina (56,8 ng.mL⁻¹). Portanto, com uma baixa afinidade, o composto isolado não pode ser considerado um *hit*, mas não pode ser descartada a hipótese de ser um modelo para síntese de novos inibidores.

3.4 - Conclusões

O ensaio de *ligand fishing* foi otimizado, validado e, pela primeira vez, partículas magnéticas imobilizadas com a enzima AChE, foram utilizadas para pescar ligantes de uma mistura de produtos naturais. Os ligantes pescados foram extraídos e através de um fracionamento bioguiado em fluxo, com o

ICER-*eel*AChE, a fração responsável pela atividade inibitória foi determinada. A cromatografia semi-preparativa foi utilizada para isolar o composto ativo e ensaios de cromatografia zonal não-linear de bioafinidade foram empregados para cálculo da constante de afinidade. A integração dos dois modelos de triagem facilitou o reconhecimento de um ligante fraco ($K_d = 800 \text{ nmol.L}^{-1}$) no extrato T.A. JSC-E da espécie *Melodinus fusiformis*, validando a aplicação para a triagem de ligantes em coleções naturais e sintéticas.

CAPÍTULO 4

4 - Acetato de cunaniol: um substrato para a enzima AChE

4.1 - Introdução

Plantas da espécie *Clibadium sylvestre* são popularmente conhecidas como cunambi e abundantemente encontradas na América Latina, principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil¹²⁹. As folhas desta espécie vegetal são extensivamente utilizadas para a pesca predatória, devido às suas propriedades ictiotóxicas onde, após o peixe ingerir a planta inicia-se os sinais de intoxicação, com hiperatividade seguido de imobilidade na superfície da água, o que permite a captura destes animais. Esses sinais podem levar o peixe à morte ou ao retorno da normalidade, dependendo da quantidade de material ingerido¹³⁰. Além deste efeito ictiotóxico, as folhas maceradas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de erisipela, hemorragias, inchaços e também como um inseticida natural¹³¹.

No que diz respeito à composição química deste vegetal pouco foi estudado. O álcool C₁₄ tetraidropiranyl poliacetileno foi encontrado nas folhas em 1969 por Clark et al.¹³². No mesmo ano, o cunaniol foi encontrado em toda a planta e posteriormente mais três compostos foram identificados nas folhas: acetato de amirina, acetato de ictioterol e o ictioterol^{133,134}.

Filgueiras et al.¹³⁵ estudaram o efeito de extratos de folhas e frutos da espécie *Clibadium sylvestre*, em diferentes concentrações, para o controle do pulgão *Myzus persicae*. O extrato aquoso do fruto demonstrou mortalidade das ninfas em todas as concentrações avaliadas (1, 2, 4 e 8% peso/volume), com maior eficiência a 8%.

Em um outro trabalho desenvolvido com a mesma espécie vegetal, Costa et al.¹³⁰ demonstraram que a administração, via oral, do extrato etanólico

das folhas (250 mg.kg^{-1}) em camundongos, induziu convulsões tônico-clônicas e morte 30 minutos após a administração. A purificação deste extrato levou a uma fração única, que apresentou o efeito convulsionante nos camundongos. Estudos de RMN ^1H identificaram o acetato de cunaniol como o composto presente nesta fração.

Uma mistura dos produtos naturais cunaniol e acetato de cunaniol têm sido encontrada em extratos de folhas da espécie citada anteriormente sendo que ambos demonstraram efeitos de indução de convulsões clônicas^{136,137} além de serem poderosos estimulantes do sistema nervoso central e neuromuscular, sendo capazes de reverter quadros de bloqueios cardíacos¹³⁸.

Trabalhos realizados no Laboratório de Neuroquímica da Universidade Federal do Pará evidenciaram que quando administrado via intraperitoneal, o extrato bruto aquoso da folhas deste vegetal foi capaz de desencadear convulsões em mamíferos. A análise do plasma extraído do sangue coletado dos animais identificou apenas um composto, o cunaniol¹³⁹.

Então, foi levantada a hipótese de que o acetato de cunaniol (presente no extrato) seria biotransformado *in vivo* em cunaniol portanto, este seria o responsável pela atividade convulsionante.

A reação de desacetilação que ocorre para formar cunaniol a partir de acetato de cunaniol e a atuação destes compostos no sistema nervoso central levou à proposição de que a enzima acetilcolinesterase estaria envolvida. Assim, este trabalho teve o objetivo de verificar a atividade da acetilcolinesterase com o acetato de cunaniol como substrato, levando à formação de cunaniol. Para isso, foi realizada uma colaboração com o grupo do Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva (Universidade Federal do Pará), onde as amostras de cunaniol e acetato de cunaniol foram isoladas e caracterizadas.

4.2 - Procedimento experimental

4.2.1 - Materiais

Sistema LC-MS: descrição apresentada da seção 2.2.1 do Capítulo 2 desta tese.

Sistema LC-UV: O sistema de cromatografia líquida utilizado (SHIMADZU, Quioto, Japão) consiste de duas bombas modelo LC-20 AD, um auto-injetor modelo SIL-20A com loop de volume igual a 50 μ L, um degaseificador modelo DGU-20A5, um detector de ultravioleta modelo SPD-20A e, uma interface modelo CBM-20A conecta o sistema. A aquisição dos dados foi realizada através do software CLASS-VP.

As análises foram realizadas à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$). A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE). E, os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC.

As soluções salinas preparadas e as fases móveis utilizadas no sistema de cromatografia líquida foram filtradas a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando membranas de nylon PHENOMENEX de 0.45 μm .

O acetato de cunaniol (AcCUN) e o cunaniol (CUN) foram extraídos, isolados e caracterizados a partir da fração hexânica do extrato de folhas da espécie *Clibadium surinamense* pelo grupo do Prof. Dr. Milton (Universidade Federal do Pará) e doados ao nosso grupo de pesquisa.

A coluna cromatográfica utilizada para a separação analítica dos compostos AcCUN e CUN foi a C₁₈ Gemini[®] (150 x 4,60 mm; 5,0 μm ; Phenomenex).

A enzima acetilcolinesterase do peixe-elétrico, *Electrophorus electricus*, (*eelAChE*) tipo VI-S foi obtida da Sigma-Aldrich.

O ICER-*eelAChE* utilizado nos ensaios foi preparado de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 2, seção 2.2.2.

Os reagentes, equipamentos e demais produtos químicos utilizados estão descritos na seção 2.2.1 (Capítulo 2).

4.2.2 - Desenvolvimento do método cromatográfico para monitorar a atividade da enzima *eel*AChE em solução

No sistema LC-UV, a separação do substrato (acetato de cunaniol) e produto (cunaniol) da reação foi realizada em uma coluna C₁₈ Gemini[®] (150 x 4,60 mm; 5,0 μm), utilizando a coluna guarda C₁₈ Phenomenex (4,0 x 3,0 mm). Foi selecionado o modo de eluição isocrático, com a mistura acetonitrila: água (50:50, v/v) como fase móvel, na vazão de 1,5 mL.min⁻¹. Os compostos foram identificados por detecção ultravioleta monitorando o comprimento de onda igual a 242 nm.

Com o objetivo de quantificar a produção de cunaniol, foram construídas curvas de calibração em uma ampla faixa de concentração. A curva baixa variou de 0,12 a 3,84 μmol.L⁻¹ e a curva alta de 3,84 a 123 μmol.L⁻¹. Para isso, foi preparada uma solução padrão de cunaniol na concentração de 3000 μmol.L⁻¹ (1,284 mg solubilizados em 2,0 mL de ACN). A partir desta, foram preparadas as soluções estoque em ACN para a curva baixa, 15 μmol.L⁻¹ e, para a curva alta, 1920 μmol.L⁻¹.

A partir de alíquotas apropriadas das soluções estoque foram preparadas as soluções trabalho (em ACN). Curva baixa: 1,2; 2,4; 4,8; 9,6; 19,2 e 38,4 μmol.L⁻¹. Curva alta: 38,4; 76,8; 154; 307; 614 e 1229 μmol.L⁻¹.

Alíquotas de 10 μL da solução trabalho apropriada foram adicionadas a 90 μL de água para preparar os padrões de calibração. As soluções foram homogêneas e alíquotas de 90 μL foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. Amostras de 10 μL foram injetadas no sistema LC-UV. Os padrões de calibração foram preparados em triplicata e a curva de calibração construída através de regressão linear, a partir da área da banda cromatográfica em função de uma dada concentração de cunaniol.

A seletividade do método foi verificada através da injeção de uma amostra branco (água).

4.2.3 - Ensaio enzimático com a *eelAChE* em solução através da quantificação do cunaniol formado por LC-UV

4.2.3.1 - Tampão utilizado

Tampão A: fosfato de potássio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,4 preparado a partir da mistura de uma solução fosfato de potássio monobásico 100 mmol.L⁻¹ (1,36 g solubilizados em 100 mL de água) e fosfato de potássio dibásico 100 mmol.L⁻¹ (2,28 g solubilizados em 100 mL de água), combinados até que o pH desejado fosse obtido.

4.2.3.2 - Pré-tratamento da amostra

Para pré-tratamento da amostra, o método de precipitação proteica foi adotado. Após a reação enzimática, foi adicionado 200 µL de ACN e a solução foi centrifugada por 5 minutos à 12000 rpm e 20 °C. Em seguida, 90 µL do sobrenadante foram transferidos para os *vials* do auto-injetor e 10 µL injetados no método desenvolvido.

Para o estudo de recuperação do cunaniol durante o procedimento de precipitação proteica foram preparadas amostras controle (ausência da enzima) e amostras de recuperação (presença da enzima), em quintuplicata, com o cunaniol na concentração de 100 µmol.L⁻¹ e a *eelAChE* na concentração de 0,037 U.mL⁻¹.

4.2.3.3 - Ensaio de atividade

O ensaio em solução com a enzima *eelAChE* foi baseado no trabalho de da Silva¹⁴⁰. Para que fosse atingida uma condição ótima da catálise enzimática, com máxima produção de cunaniol, parâmetros como a concentração da enzima e do substrato (acetato de cunaniol) foram otimizados.

Uma solução padrão de *eelAChE* 500 U.mL^{-1} foi preparada no tampão A. Uma alíquota de $7,4 \mu\text{L}$ da solução padrão foi adicionada à $992,6 \mu\text{L}$ do tampão A, para se obter uma solução estoque na concentração de $3,7 \text{ U.mL}^{-1}$. Mantendo a concentração de acetato de cunaniol igual a $99,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e o volume final da reação igual a $200 \mu\text{L}$, foram realizados os ensaios adicionando em um tubo de microcentrifugação $51 \mu\text{L}$ de uma solução AcCUN $390 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e alíquotas apropriadas da solução estoque de *eelAChE* $3,7 \text{ U.mL}^{-1}$ para obter concentrações finais da solução enzimática iguais a $0,037$; $0,074$; $0,148$; $0,296$ e $0,592 \text{ U.mL}^{-1}$. Após 10 segundos sob agitação manual, foi adicionado $200 \mu\text{L}$ de ACN e, o tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 5 min a 20°C . $90 \mu\text{L}$ do sobrenadante foi adicionado aos *vials* do auto-injetor sendo $10 \mu\text{L}$ injetados no sistema LC-UV para determinação do CUN formado.

Para otimizar a concentração de substrato a ser utilizada nos ensaios, foi preparada uma solução padrão de acetato de cunaniol $7800 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($2,0 \text{ mg}$ solubilizados em $2,0 \text{ mL}$ de ACN). O ensaio foi realizado adicionando-se em um tubo de microcentrifugação $32 \mu\text{L}$ da solução de *eelAChE* $3,7 \text{ U.mL}^{-1}$ e alíquotas apropriadas da solução padrão de AcCUN ($2,5$; $5,0$; 10 ; 20 e $80 \mu\text{L}$) mantendo o volume final igual a $200 \mu\text{L}$. Após 10 segundos sob agitação manual, foi realizado o pré-tratamento da amostra (como descrito anteriormente) e, $10 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram injetados no sistema LC-UV.

Estabelecida a melhor concentração para o substrato, AcCUN, foram realizados ensaios para se determinar a concentração da solução enzimática variando a concentração de $0,20$ a $51,2 \text{ U.mL}^{-1}$. A partir de alíquotas apropriadas da solução padrão *eelAChE* 500 U.mL^{-1} , foram preparadas as soluções estoque (no tampão A) na concentração de $3,7$ e 64 U.mL^{-1} . O ensaio foi realizado estabelecendo um volume final igual a $200 \mu\text{L}$ onde, foi adicionado em um tubo de microcentrifugação $5,0 \mu\text{L}$ da solução padrão de AcCUN $7800 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e alíquotas apropriadas das soluções estoque de *eelAChE*, obtendo-se

concentrações finais iguais a 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 25,6 e 51,2 U.mL⁻¹. Após 10 segundos de reação e o procedimento de pré-tratamento, um volume igual a 90 µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado aos *vials* do auto-injetor e, 10 µL foram injetados no sistema LC-UV.

Ao final, a condição otimizada onde obteve-se uma maior produção de cunaniol foi: 5 µL de AcCUN 7800 µmol.L⁻¹ (195 µmol.L⁻¹) + 80 µL de *eelAChE* 64,0 U.mL⁻¹ (25,6 U.mL⁻¹) + 115 µL do tampão A.

A possibilidade de uma reação de hidrólise espontânea do acetato de cunaniol para a formação de cunaniol foi verificada realizando o ensaio otimizado na ausência da enzima e, comparando com o ensaio na presença da enzima.

4.2.4 - Estudo cinético para a enzima *eelAChE* em solução através da quantificação do cunaniol formado

As concentrações de acetato de cunaniol para a construção da curva de Michaelis-Menten foram obtidas a partir da reação de 179,6 µL do tampão A com 10 µL da solução de AcCUN (20,00 - 5120 µmol.L⁻¹, preparadas em metanol) e 10,4 µL da solução *eelAChE* 500 U.mL⁻¹. As reações foram realizadas em duplicata para cada ponto e, alíquotas de 90 µL do sobrenadante foram transferidas para os *vials* do auto-injetor. 10 µL de cada amostra foram injetados no sistema LC-UV para a quantificação do CUN formado.

4.2.5 - Ensaio de inibição com a *eelAChE* em solução

A capacidade da enzima reconhecer um inibidor tendo o acetato de cunaniol como substrato foi verificada utilizando os inibidores de referência tacrina e galantamina na concentração de 200 µmol.L⁻¹. O ensaio foi realizado adicionando na reação enzimática o substrato AcCUN, na concentração de 215µmol.L⁻¹, contendo os inibidores de referência. Após o pré-tratamento das

amostras, alíquotas de 10 μL foram injetadas no sistema LC-UV para a quantificação do CUN formado.

Como controle positivo foi utilizada uma amostra preparada na ausência do inibidor. Assim, o percentual de inibição, $I(\%)$, para cada composto foi calculado de acordo com a equação 4.1 onde, P_i é a produção de cunaniol quantificada a partir da hidrólise do acetato de cunaniol na presença dos ligantes testados e P_0 é a produção de cunaniol da amostra controle positivo.

$$I(\%) = 100 - \left(\frac{P_i}{P_0} \times 100 \right) \quad \text{EQUAÇÃO 4.1}$$

4.2.6 - Ensaio para a caracterização do substrato acetato de cunaniol

Um ensaio de reação multi-substrato foi realizado para caracterizar o mecanismo pelo qual o substrato acetato de cunaniol interage com a enzima *eelAChE* na presença do substrato natural da enzima, a acetilcolina. O método desenvolvido e validado, por LC-MS para a quantificação *online* da colina produzida pelos ICERs-AChE foi utilizado neste ensaio (Capítulo 2, seção 2.2.3).

O mecanismo foi verificado através da construção dos gráficos duplo-recíproco ($1/[\text{Ch}] \times 1/[\text{ACh}]$). Para isso, soluções de ACh (160 - 5120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) contendo concentrações fixas do acetato de cunaniol (100, 200, 400 e 800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foram preparadas em duplicata e injetadas no sistema LC-MS com o ICER-*eelAChE* para a quantificação da Ch produzida.

O software OriginPro 8.0 foi utilizado para a construção dos gráficos de mecanismo e, os dados obtidos foram propriamente tratados de acordo com a equação que descreveu o mecanismo bi-substrato de melhor ajuste.

4.3 - Resultados e discussão

4.3.1 - Desenvolvimento do método LC-UV

A baixa solubilidade do acetato de cunaniol e do cunaniol na fase móvel do ICER-AChE inviabilizou o emprego do método de cromatografia de bioafinidade desenvolvido¹²⁰. Conseqüentemente, a atividade da AChE tendo o AcCUN como substrato (Figura 4.1) foi monitorada por LC-UV com a enzima em solução. A separação cromatográfica foi realizada no modo reverso com eluição isocrática, de acordo com as condições previamente desenvolvidas¹³⁹.

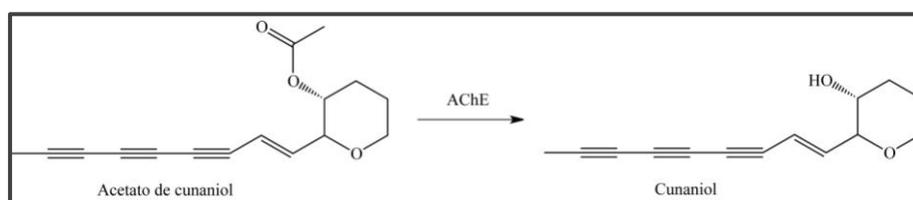


FIGURA 4.1- Catálise enzimática para a AChE com o AcCUN como substrato.

A linearidade foi determinada em duas faixas de concentração para atender a determinação da constante de Michaelis-Menten. As curvas obtidas, $y = 531,59701 + 24730,34628 \times x$ e $y = 22608,32338 + 24777,13682 \times x$, mostraram-se lineares com coeficientes de determinação superiores a 0,99, os coeficientes de variação e exatidões para as replicatas (n=3) estiveram entre 0,63 e 8,5% e 80 e 111%, respectivamente, em ambas as curvas.

4.3.2 - Pré-tratamento da amostra

Por se tratar de um ensaio em solução com análise do produto da reação por LC-UV, a enzima presente na amostra pode prejudicar os resultados, precipitando e/ou entupindo a coluna cromatográfica. Portanto, foi necessária a precipitação da enzima através da adição de solvente orgânico. A acetonitrila foi o solvente orgânico utilizado para desnaturar a *ee*lAChE e precipitá-la no meio reacional, finalizando a reação. A recuperação foi calculada de acordo com a

Equação 4.2, onde a quantidade de cunaniol nas amostras controle positivo (ausência da enzima, P_0) foi comparada com a das amostras de recuperação (presença da enzima, P_R).

$$R(\%) = 100 - \left(\frac{P_R}{P_0} \times 100 \right) \quad \text{EQUAÇÃO 4.2}$$

O $R(\%)$ calculado foi igual a 98%, com uma precisão de 1,6% ($n=5$) o que assegura uma eficiente extração do CUN. Portanto, a precipitação proteica foi o método de pré-tratamento adotado.

4.3.3 - Otimização do ensaio com a *eelAChE* em solução

Baseando-se no trabalho já desenvolvido com a *eelAChE* em solução¹⁴⁰, o ensaio representado na Figura 4.2 foi configurado. Os parâmetros otimizados foram a concentração da solução enzimática e a concentração do substrato.

A concentração da solução de *eelAChE* foi o primeiro parâmetro a ser avaliado, a partir da construção de uma curva com valores crescentes de concentração (Tabela 4.1). O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.3.3, iniciando com uma concentração já estabelecida igual a $0,037 \text{ U.mL}^{-1}$ ¹⁴⁰.

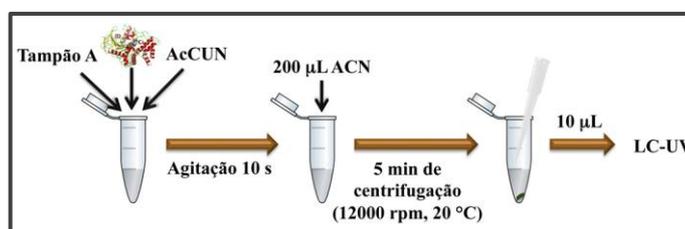


FIGURA 4.2- Fluxograma genérico para os ensaios em solução com a enzima *eelAChE* e o acetato de cunaniol.

TABELA 4.1- Ensaio realizados para otimizar a concentração de *eelAChE* no ensaio em solução.

Ensaio	Tampão A (μL)	<i>eelAChE</i> 3,7 U.mL^{-1} (μL)	AcCUN $390\mu\text{mol.L}^{-1}$ (μL)	$[\textit{eelAChE}]_{\text{final}}$ (U.mL^{-1})
1	147	2	51	0,037
2	145	4	51	0,074
3	141	8	51	0,148
4	133	16	51	0,296
5	117	32	51	0,592

Os cromatogramas da Figura 4.3 ilustram os resultados obtidos, onde uma maior concentração da solução enzimática forneceu uma maior produção de cunaniol.

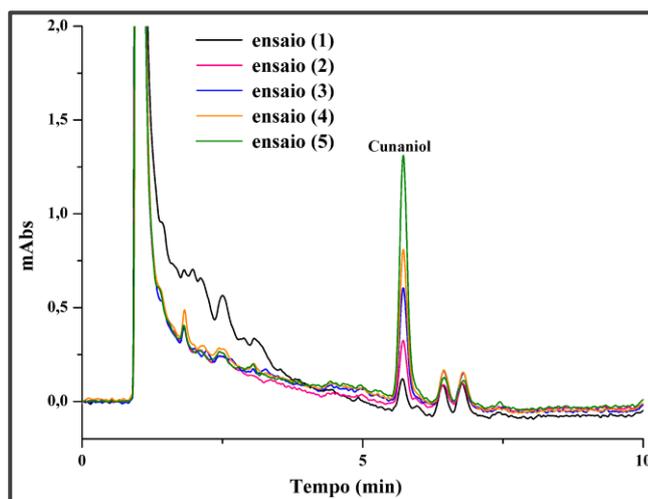


FIGURA 4.3- Cromatogramas obtidos a partir da injeção dos ensaios de 1 a 5 (Tabela 4.1) no sistema LC-UV. Condições cromatográficas descritas na seção 4.2.2.

Estabelecendo a concentração da solução de *eelAChE* em $0,592 \text{ U.mL}^{-1}$, foi variada a concentração de substrato na faixa de $97,50$ a $3120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 4.2 e, em seguida injetadas no sistema LC-UV. O gráfico da Figura 4.4 ilustra os resultados obtidos.

TABELA 4.2- Ensaios realizados para otimizar a concentração de AcCUN no ensaio em solução.

Ensaio	Tampão A (μL)	<i>ee</i> lAChE 3,7 U.mL^{-1} (μL)	AcCUN 7800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (μL)	[AcCUN] _{final} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
6	165	32	2,5	97,5
7	163	32	5,0	195
8	158	32	10	390
9	148	32	20	780
10	88,0	32	80	3120

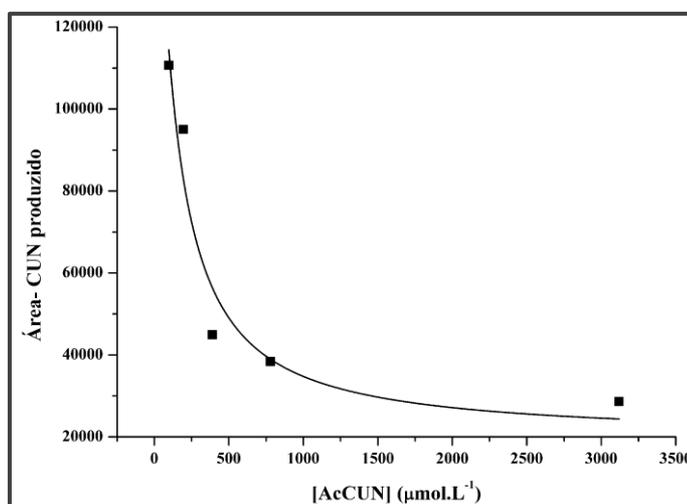


FIGURA 4.4- Curva da produção de CUN pela enzima *ee*lAChE nos ensaios de 6 a 10 (Tabela 4.2).

A baixa solubilidade do acetato de cunaniol e do cunaniol em solventes polares dificultou os ensaios realizados. A queda brusca na produção de CUN observada a partir do ensaio 8 (Figura 4.4), possivelmente está relacionada com uma pequena disponibilidade do AcCUN caracterizada pela turvação das amostras 8, 9 e 10 durante a reação. Assim, a concentração do AcCUN foi estabelecida em $195 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a concentração de *ee*lAChE mais uma vez investigada.

As amostras foram preparadas como descrito na Tabela 4.3 e, o gráfico da produção de CUN em função da concentração enzimática apresentado

na Figura 4.5, indica um máximo de produção a partir do ensaio 18, com 25,6 U.mL⁻¹ de *eelAChE*.

TABELA 4.3- Ensaio realizado para otimizar a concentração de *eelAChE* no ensaio em solução.

Ensaio	Tampão A (μL)	<i>eelAChE</i>	AcCUN 7800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (μL)	$[\textit{eelAChE}]_{\text{final}}$ (U.mL ⁻¹)
3,7 U.mL ⁻¹ (μL)				
11	184,2	10,8	5	0,2
12	173,4	21,6	5	0,4
13	151,8	43,2	5	0,8
14	108,5	86,5	5	1,6
64 U.mL ⁻¹ (μL)				
15	185	10,0	5	3,2
16	175	20,0	5	6,4
17	155	40,0	5	12,8
18	115	80,0	5	25,6
19	35	160	5	51,2

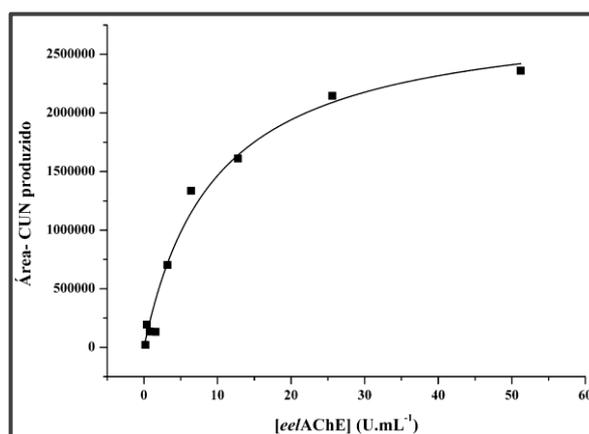


FIGURA 4.5- Curva de produção de CUN pela enzima *eelAChE* nos ensaios de 11 a 19 (Tabela 4.3).

Portanto, a condição otimizada estabelecida para o ensaio em solução da enzima *eelAChE* tendo como substrato o AcCUN foi: AcCUN 195

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ e *eelAChE* $25,6 \text{ U.mL}^{-1}$, para um volume final igual a $200 \mu\text{L}$, com o meio reacional constituído pelo tampão A.

4.3.4 - Estudo cinético com o acetato de cunaniol e a *eelAChE* em solução

A afinidade da enzima *eelAChE* pelo substrato (acetato de cunaniol) foi medida através do ensaio em solução otimizado, com a quantificação do produto formado por LC-UV. O ensaio foi realizado com concentrações crescentes do AcCUN ($1,0 - 256 \text{ mmol.L}^{-1}$), enquanto a concentração da enzima foi mantida fixa em $25,6 \text{ U.mL}^{-1}$ até que o aumento na concentração de substrato não alterasse a velocidade da catálise enzimática.

Empregando o método de regressão não-linear de melhor ajuste, no software Sigma-Plot 12, foi plotada a concentração de CUN produzido em função da concentração de AcCUN utilizada (Figura 4.6). Assim, foi construída a curva de Michaelis-Menten, caracterizada por uma velocidade, V_0 , diretamente proporcional à concentração de substrato, em concentrações baixas de substrato. Já em concentrações elevadas do substrato, a velocidade da reação se torna independente da concentração.

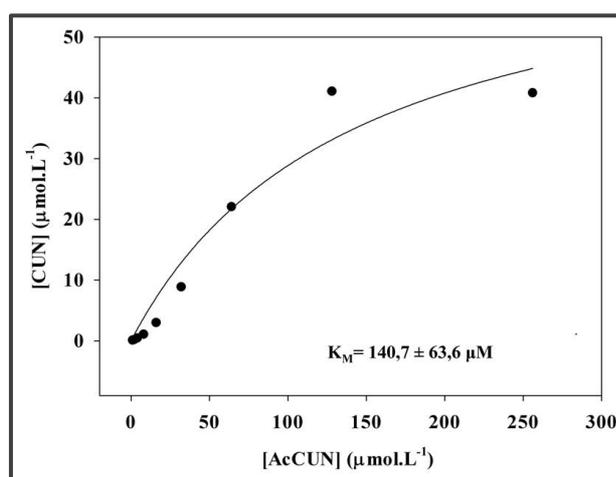


FIGURA 4.6- Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de cunaniol no ensaio em solução com a *eelAChE*, variando-se a concentração de acetato de cunaniol.

Como ilustrado na Figura 4.6, o valor de K_M calculado no ensaio foi igual a $140,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$, um resultado superior (numericamente) quando comparado ao ensaio empregando a acetiltiocolina como substrato e o método de Ellman para análise¹⁴⁰, onde o valor da constante foi de $76,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A razão entre os valores de K_M ($K_{M(\text{AcCUN})}/K_{M(\text{Acetiltiocolina})}$) foi igual a 1,8, indicando que a afinidade da enzima pela acetiltiocolina é aproximadamente o dobro da afinidade pelo acetato de cunaniol, mesmo se tratando em ambos os casos de substratos não naturais da enzima AChE.

4.3.5 - Ensaio de inibição com a *eelAChE* em solução

Inibidores de referência da enzima AChE, tacrina e galantamina, foram utilizados para verificar a capacidade da enzima em reconhecer inibidores tendo como substrato o acetato de cunaniol. Os ensaios foram realizados de acordo com a Tabela 4.4.

TABELA 4.4- Ensaio de inibição com a *eelAChE* em solução.

Ensaio	Tampão A (μL)	<i>eelAChE</i> 500 U.mL^{-1} (μL)	AcCUN 7800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (μL)	AChEIs 4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (μL)	ACN (μL)
1 (GAL)	174,1	10,4	5,5	10	-
2 (TAC)	174,1	10,4	5,5	10	-
Controle (+)	174,1	10,4	5,5	-	10

Diversos trabalhos na literatura empregando a enzima AChE no reconhecimento de inibidores utilizam a tacrina e a galantamina como inibidores de referência^{31,32,120}. Os diferentes potenciais inibitórios e mecanismos de ação são características importantes destes ligantes, pois verifica-se a competência do método empregado em reconhecer ligantes de diferentes potenciais inibitórios.

No ensaio em solução desenvolvido, os percentuais de inibição calculados, $I(\%)$, foram iguais a 93 e 99% para a galantamina e tacrina,

respectivamente. Os valores são similares aos previamente obtidos utilizando a acetilcolina como substrato¹⁴⁰.

4.3.6 - Ensaio de bi-substrato com a *eelAChE*

Catálises enzimáticas multi-substrato são comumente encontradas na natureza. Reações de mecanismos ordem três ou superiores são conhecidas, entretanto, menos comuns quando comparadas com as de ordem dois, denominadas reações de mecanismo bi¹⁴¹.

Reações enzimáticas onde um único substrato leva à formação de dois produtos possuem um mecanismo do tipo uni-bi e, quando dois substratos se combinam para formar um único produto o mecanismo é denominado bi-uni¹⁴¹.

Nos mecanismos bi-bi, dois substratos se ligam à enzima formando um complexo ternário. A enzima catalisa a reação aproximando os grupos reativos dos substratos A e B pelo posicionamento de ambos no sítio ativo, facilitando assim a reação. A sequência com que um ou outro substrato se liga à enzima não é importante entretanto, a ordem com que estes se dissociam do complexo ternário formado determina se o mecanismo é aleatório ou ordenado¹⁴¹.

No mecanismo bi-bi aleatório, Figura 4.7, a característica cinética evidente é que diferentes valores de K_d são obtidos para a dissociação dos substratos do complexo ternário e do complexo binário. Por exemplo, o valor de K_d para o complexo E:AX é igual a K_{AX} e, a afinidade de AX pela enzima pode ser modificada pela presença do substrato B. Portanto, a constante de dissociação de AX do complexo ternário E:AX:B é diferente de K_{AX} , possuindo um fator α que define o grau de desvio positivo ou negativo da afinidade de AX pelo complexo binário E:B. A equação apresentada na Figura 4.9 define este tipo de reação¹⁴¹.

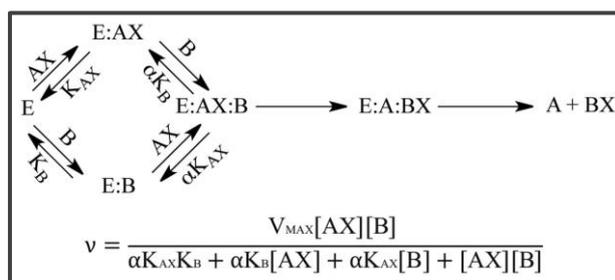


FIGURA 4.7- Esquema do mecanismo bi-substrato do tipo bi-bi aleatório¹⁴¹.

Um outro tipo de mecanismo com a formação de complexo ternário é o bi-bi ordenado, ilustrado na reação da Figura 4.8. Para este tipo de mecanismo, uma catálise produtiva ocorre apenas quando o segundo substrato se liga logo após o primeiro. Este comportamento é explicado pelo fato de que em muitos casos, o segundo substrato possui uma baixa afinidade pela enzima isolada, mas uma elevada afinidade pelo complexo binário enzima-primeiro substrato (E:AX)¹⁴¹.

A formação do complexo binário com o segundo substrato pode resultar em um fenômeno conhecido como inibição por substrato onde, o complexo binário formado é não reativo, diminuindo a quantidade de enzima livre para catalisar a reação com o primeiro substrato¹⁴¹.

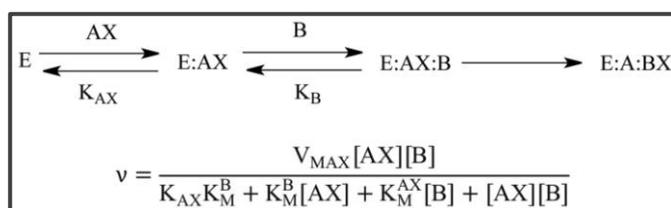


FIGURA 4.8- Esquema do mecanismo bi-substrato do tipo bi-bi ordenado¹⁴¹.

Quando a inibição pelo substrato não é significativa, a equação de velocidade para este tipo de mecanismo é dada na Figura 4.8, combinando as constantes de dissociação com as constantes cinéticas de Michaelis-Menten¹⁴¹.

Um terceiro tipo de mecanismo bi-substrato é o bi-bi ping-pong, onde não ocorre a formação de um complexo ternário e a reação se processa em

duas etapas (Figura 4.9). Na primeira etapa, o substrato AX se liga à enzima transferindo o grupo X para o sítio ativo, produzindo o intermediário E-X (frequentemente formado por uma ligação covalente) e o primeiro produto da reação, A. Em uma segunda etapa, o segundo substrato se liga ao intermediário E-X, e então ocorre a transferência do grupo X para o substrato B, no sítio ativo da enzima. A reação então se completa com a dissociação do segundo produto BX¹⁴¹.

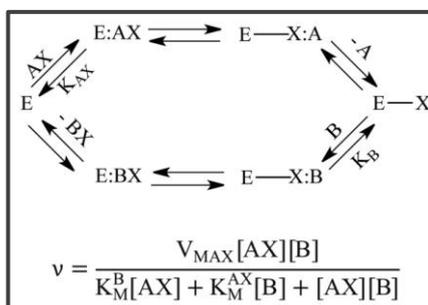


FIGURA 4.9- Esquema do mecanismo bi-substrato do tipo bi-bi ping-pong¹⁴¹.

Assim, o mecanismo bi-bi ping-pong ocorre através da formação de vários intermediários portanto, diferentes estruturas enzimática. A equação de velocidade deste mecanismo está apresentada na Figura 4.9.

Os mecanismos de reação do tipo bi-bi substrato com formação de complexo ternário ou não (ping-pong), podem ser diferenciados através da construção de curvas duplo-recíproco para o produto produzido a partir de um dos substratos (AX) em diferentes concentrações do outro substrato (B). Como apresentado na Figura 4.10, um conjunto de linhas paralelas, que interceptam o eixo y (1/v) em diferentes valores é característico de um mecanismo do tipo ping-pong. Quando as linhas possuem inclinações diferentes mas, interceptam o eixo y no mesmo ponto, o mecanismo é do tipo bi-bi com formação de complexo ternário. Entretanto, a distinção entre mecanismo aleatório ou ordenado só é possível através de ensaios aprofundados do mecanismo¹⁴¹.

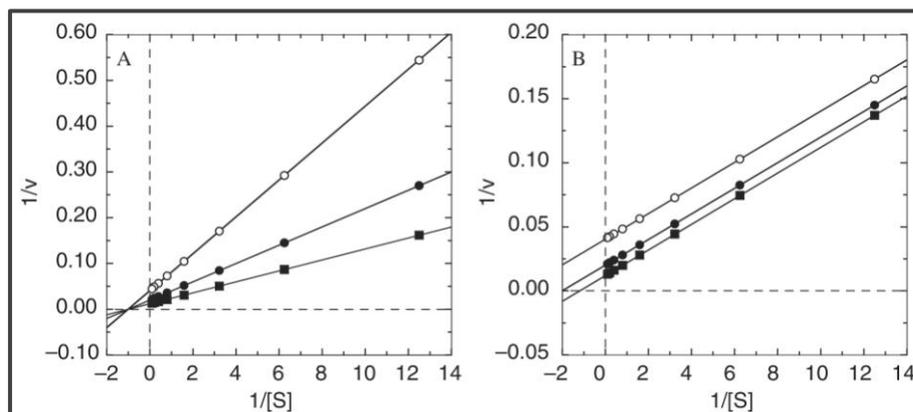


FIGURA 4.10- Exemplos de gráficos para a catálise enzimática de mecanismo bi-bi substrato (A) de formação de complexo ternário e (B) ping-pong¹⁴¹.

A fim de se determinar como o acetato de cunaniol interage com a enzima na presença do substrato natural (acetilcolina), o método de bioafinidade com o ICER-*eelAChE* foi empregado para medir a produção de colina, variando-se a concentração do acetato de cunaniol. A curva de duplo-recíproco obtida encontra-se ilustrada na Figura 4.11.

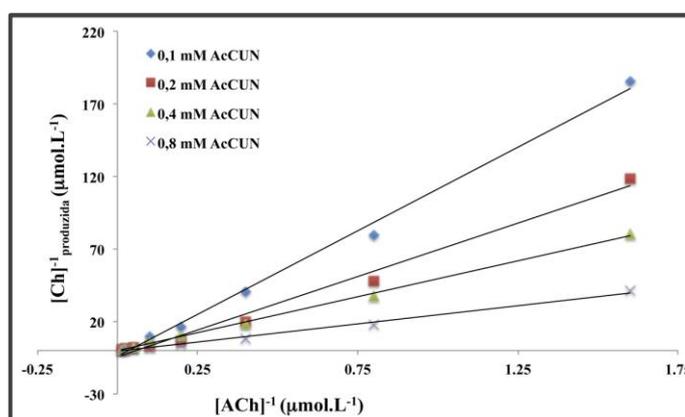


FIGURA 4.11- Gráfico de duplo-recíproco para o acetato de cunaniol no ICER-*eelAChE*.

Baseando-se neste gráfico, o mecanismo que rege a catálise enzimática da *eelAChE* com os substratos acetilcolina e acetato de cunaniol é do tipo bi-bi com formação de complexo ternário, aleatória ou ordenada.

4.4 - Conclusões

Neste trabalho, foi demonstrado com a enzima em solução, e quantificação por LC-UV, que o acetato de cunaniol é um substrato da AChE. A constante de Michaelis-Menten obtida infere que este substrato tem uma afinidade 1,8 menor que a acetiltiocolina. Entretanto, a inibição da enzima pelos inibidores de referência tacrina e galantamina é preservada com este substrato.

Em se tratando de um modelo natural com interesse farmacológico, o mecanismo de interação do acetato de cunaniol em presença da acetilcolina foi determinado em fluxo, usando o ICER-*eel*AChE, por LC-MS. O gráfico de duplo-recíproco obtido caracteriza a interação como bi-bi para a formação do complexo ternário.

CAPÍTULO 5

5 - Conclusões

Os ensaios desenvolvidos por cromatografia zonal linear de bioafinidade foram eficazes na caracterização das enzimas imobilizadas através da determinação das constantes cinéticas (K_M) para cada ICER preparado. Os ensaios de triagem foram realizados de maneira individual através da quantificação *online* da colina produzida pelos ICERs e, demonstraram ser uma ferramenta fácil e reprodutível para a identificação e caracterização de novos ligantes. Este modelo de triagem permite também a reutilização da enzima em diversos ensaios, sendo que, os ICERs-*eel* e *huAChE* permaneceram ativos por até 365 e 30 dias, respectivamente.

Na busca por um modelo de triagem de ligantes em amostras complexas, como extratos de produtos naturais, a enzima acetilcolinesterase foi eficientemente imobilizada na superfície de partículas magnéticas modificadas. O ensaio de *ligand fishing* foi otimizado, validado e aplicado no extrato de *Melodinus fusiformis*. Os ligantes pescados foram extraídos e, através de um fracionamento bioguiado empregando o método de cromatografia zonal linear de bioafinidade e o cromatograma de íons totais do extrato, o ligante foi reconhecido. O isolamento foi realizado através de cromatografia semi-preparativa e a identificação estrutural é o principal objetivo.

Os ensaios por cromatografia zonal não-linear de bioafinidade com o *eelAChE*-ICER é uma estratégia promissora para a rápida classificação de ligantes quanto a afinidade pela enzima imobilizada. Foram calculados os valores da constante de afinidade (K_d) para os inibidores de referência (tacrina, galantamina e cumarina 16) e para o novo ligante proveniente do extrato da espécie *Melodinus fusiformis*.

O acetato de cunaniol foi identificado como substrato para a enzima acetilcolinesterase da espécie *Electrophorus electricus*. Os parâmetros cinéticos foram determinados e o mecanismo de interação entre a *eelAChE* e os substratos acetilcolina e acetato de cunaniol foi identificado como do tipo bi-bi com formação de complexo ternário.

Os resultados obtidos demonstraram que os métodos propostos nesta tese representam ferramentas analíticas importantes na busca por ligantes específicos em coleções combinatórias sintéticas ou naturais. Além disso, aumenta-se a perspectiva de se desenvolver um método para acoplar o ensaio de *ligand fishing* (com campos magnéticos externos) e, a cromatografia zonal linear e não-linear de bioafinidade, o que permite a identificação de ligantes através do fracionamento bioguiado *online* e, completa caracterização em misturas complexas.

CAPÍTULO 6

6 - Referências Bibliográficas

1. SUNDBERG, S.A., "High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches". *Anal. Biotechnol.* **11**: 47, 2000.
2. WHITE, R.E., "High-throughput screening in drug metabolism and pharmacokinetic support of drug discovery". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**: 133, 2000.
3. HOWARD, M.H.; CENIZAL, T.; GUTTERIDGE, S.; HANNA, W.S.; TAO, Y.; TOTROV, M.; WITTENBACH, V.A. & ZHENG, Y.-J., "A novel class of inhibitors of peptide deformylase discovery through high-throughput screening and virtual ligand screening". *J. Med. Chem.* **47**: 6669, 2004.
4. HOUSTON, J.G. & BANKST, M., "The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology". *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 734, 1997.
5. HODGSON, R.J.; BESANGER, T.R.; BROOK, M.A. & BRENNAN, J.D., "Inhibitor screening using immobilized enzyme reactor chromatography/mass spectrometry". *Anal. Chem.* **77**: 7512, 2005.
6. HOUSTON, J.G., "HTS: productivity or oblivion?". *J. Biomol. Screen.* **4**: 229, 1999.
7. SUNDBERG, S.A.; CHOW, A.; NIKIFOROV, T. & WADA, H.G., "Microchip-based systems for target validation and HTS". *Drug Discov. Ther.* **5**: S92, 2000.
8. BURBAUM, J.J., "Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon?". *Drug Discov. Ther.* **3**: 313, 1998.
9. MODEL, M.A. & HEALY, K.E., "Optimization of the cost and sensitivity of receptor- and enzyme-based assays". *Anal. Biochem.* **271**: 59, 1999.
10. WOLCKE, J. & ULLMANN, D., "Miniaturized HTS technologies- μ HTS". *Drug Discov. Ther.* **6**: 637, 2001.
11. BATTERSBY, B.J. & TRAU, M., "Novel miniaturized systems in high-throughput screening". *Trends Biotechnol.* **20**: 167, 2002.
12. HAGE, D.S.; ANGUIZOLA, J.A.; BI, C.; LI, R.; MATSUDA, R.; PAPASTAVROS, E.; PFAUNMILLER, E.; VARGAS, J. & ZHENG, X., "Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69**: 93, 2012.
13. ARNOLD, F.H.; SCHOFIELD, S.A. & BLANCH, H.W., "Analytical affinity chromatography: I. Local equilibrium theory and the

- measurement of association and inhibition constants". *J. Chromatogr.* **355**: 1, 1986.
14. BERTUCCI, C.; BARTOLINI, M.; GOTTI, R. & ANDRISANO, V., "Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **797**: 111, 2003.
 15. KAMIMORE, H. & KONISHI, M., "Evaluation and application of liquid chromatographic columns coated with intelligent ligands, (III), immobilized enzymes phospholipid column". *Anal. Sci.* **17** 2001.
 16. MOADDEL, R.; LU, L.L.; BAYNHAM, M. & WAINER, I.W., "Immobilized receptor- and transporter-based liquid chromatographic phases for on-line pharmacological and biochemical studies: a mini-review". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **768**: 41, 2002.
 17. HAGE, D.S., "Affinity Chromatography ", IN *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Lincoln, John Wiley & Sons, 2012. p 1.
 18. CARDOSO, C.L.; DE MORAES, M.C. & CASS, Q.B., "Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas". *Quím. Nova.* **32**: 175, 2009.
 19. NIE, Y.I. & WANG, W.H., "Immobilized enzyme reactor in on-line LC and its application in drug screening". *Chromatographia.* **69**: S5, 2009.
 20. GIRELLI, A.M. & MATTEI, E., "Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review". *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **819**: 3, 2005.
 21. MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M. & FERNANDEZ-LAFUENTE, R., "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques". *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 1451, 2007.
 22. SANGHVI, M.; MOADDEL, R. & WAINER, I.W., "The development and characterization of protein-based stationary phases for studying drug-protein and protein-protein interactions". *J. Chromatogr. A.* **1218**: 8791, 2011.
 23. CALLERI, E.; MASSOLINI, G.; LUBDA, D.; TEMPORINI, C.; LOIODICE, F. & CACCIALANZA, G., "Evaluation of a monolithic epoxy silica support for penicillin G acylase immobilization". *J. Chromatogr. A.* **1031**: 93, 2004.
 24. 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". *Anal. Chim. Acta.* **564**: 106, 2006.
 25. CALLERI, E.; TEMPORINI, C. & MASSOLINI, G., "Frontal affinity chromatography in characterizing immobilized receptors". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54**: 911, 2011.

26. MOADDEL, R.; MARSZALL, M.P.; BIGHI, F.; YANG, Q.; DUAN, X. & WAINER, I.W., "Automated ligand fishing using human serum albumin-coated magnetic beads". *Anal. Chem.* **79**: 5414, 2007.
27. CALLERI, E.; TEMPORINI, C.; CACCIALANZA, G. & MASSOLINI, G., "Target-based drug discovery: the emerging success of frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry". *Chem. Med. Chem.* **4**: 905, 2009.
28. HAGE, D.S. & TWEED, S.A., "Recent advances in chromatographic and electrophoretic methods for the study of drug-protein interactions". *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **699**: 499, 1997.
29. ARNOLD, F.H. & BLANCH, H.W., "Analytical affinity chromatography: II. Rate theory and the measurement of biological binding kinetics". *J. Chromatogr.* **355**: 13, 1986.
30. 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". *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **753**: 375, 2001.
31. 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". *Anal. Chem.* **83**: 5230, 2011.
32. DA SILVA, J.I.; DE MORAES, M.C.; VIEIRA, L.C.C.; CORRÊA, A.G.; CASS, Q.B. & CARDOSO, C.L., "Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **73**: 44, 2013.
33. CARDOSO, C.L.; LIMA, V.V.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D.; WAINER, I.W.; MOADDEL, R. & CASS, Q.B., "Development and characterization of an immobilized enzyme reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies". *J. Chromatogr. A.* **1120**: 151, 2006.
34. GUIDO, R.V.C.; CARDOSO, C.L.; DE MORAES, M.C.; ANDRICOPULO, A.D.; CASS, Q.B. & OLIVA, G., "Structural insights into the molecular basis responsible for the effects of immobilization on the kinetic parameters of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* and Human". *JBCS.* **21**: 1845, 2010.
35. DE MORAES, M.C.; DUCATI, R.G.; DONATO, A.J.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; CARDOSO, C.L. & CASS, Q.B., "Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: a new approach for ligands identification and characterization". *J. Chromatogr. A.* **1232**: 110, 2012.
36. DE SIMONE, A.; MANCINI, F.; COSCONATI, S.; MARINELLI, L.; LA PIETRA, V.; NOVELLINO, E. & ANDRISANO, V., "Human recombinant beta-secretase immobilized enzyme reactor for fast hits"

- selection and characterization from a virtual screening library". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **73**: 131, 2013.
37. WANG, S.; SUN, M.; ZHANG, Y.; DU, H. & HE, L., "A new A431/cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening epidermal growth factor receptor antagonists from *Radix sophorae flavescentis*". *J. Chromatogr. A.* **1217**: 5246, 2010.
38. WANG, Y.; KONG, L.; HU, L.; LEI, X.; YANG, L.; CHOU, G.; ZOU, H.; WANG, C.; BLIGH, S.W.A. & WANG, Z., "Biological fingerprinting analysis of the traditional Chinese prescription Longdan Xiegan Decoction by on/off-line comprehensive two-dimensional biochromatography". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **860**: 185, 2007.
39. WANG, S.; WANG, C.-M.; ZHAO, X.; MAO, S.; WU, Y. & FAN, G., "Comprehensive two-dimensional high performance liquid chromatography system with immobilized liposome chromatography column and monolithic column for separation of the traditional Chinese medicine *Schisandra chinensis*". *Anal. Chim. Acta.* **713**: 121, 2012.
40. 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". *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **724**: 65, 1999.
41. BAYNHAM, M.T.; PATEL, S.; MOADDEL, R. & WAINER, I.W., "Multidimensional on-line screening for ligands to the $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor using an immobilized nicotinic receptor liquid chromatographic stationary phase". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **772**: 155, 2002.
42. MOADDEL, R. & WAINER, I.W., "Immobilized nicotinic receptor stationary phases: going with the flow in high-throughput screening and pharmacological studies". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**: 1715, 2003.
43. YOO, M.; SMITH, Q.R. & HAGE, D.S., "Studies of imipramine binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**: 1149, 2009.
44. 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 $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor liquid chromatographic stationary phase". *Anal. Chem.* **74**: 4618, 2002.
45. WADE, J.L.; BERGOLD, A.F. & CARR, P.W., "Theoretical description of nonlinear chromatography, with applications to physicochemical measurements in affinity chromatography and implications for preparative-scale separations". *Anal. Chem.* **59**: 1286, 1987.

46. GOTMAR, G.; ALBAREDA, N.R. & FRORNSTEDT, T., "Investigation of the heterogeneous adsorption behavior of selected enantiomers on immobilized alpha1-acid glycoprotein". *Anal. Chem.* **74**: 2950, 2002.
47. SZABELSKI, P., "A simple model of enantioselective adsorption on chiral stationary phases". *Appl. Surf. Sci.* **227**: 94, 2004.
48. ASNIN, L.; KACZMARSKI, K. & GUIOCHON, G., "Features of the adsorption of naproxen enantiomers on weak chiral anion-exchangers in nonlinear chromatography". *J. Chromatogr. A.* **1192**: 62, 2008.
49. MOADDEL, R.; JOZWIAK, K.; WHITTINGTON, K. & WAINER, I.W., "Conformational mobility of immobilized $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, and $\alpha 4\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors". *Anal. Chem.* **77**: 895, 2005.
50. MOADDEL, R.; JOZWIAK, K.; YAMAGUCHI, R. & WAINER, I.W., "Direct chromatographic determination of dissociation rate constants of ligand-receptor complexes: assessment of the interaction of noncompetitive inhibitors with an immobilized nicotinic acetylcholine receptor-based liquid chromatography stationary phase". *Anal. Chem.* **77**: 5421, 2005.
51. MARSZALL, M.P.; MOADDEL, R.; JOZWIAK, K.; BERNIER, M. & WAINER, I.W., "Initial synthesis and characterization of an immobilized heat shock protein 90 column for online determination of binding affinities". *Anal. Biochem.* **373**: 313, 2008.
52. JOZWIAK, K.; HERNANDEZ, S.C.; KELLAR, K.J. & WAINER, I.W., "Enantioselective interactions of dextromethorphan and levomethorphan with the alpha3beta4-nicotinic acetylcholine receptor: comparison of chromatographic and functional data". *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **797**: 373, 2003.
53. MOADDEL, R. & WAINER, I.W., "Development of immobilized membrane-based affinity columns for use in the online characterization of membrane bound proteins and targeted affinity isolations ". *Anal. Chim. Acta.* **564**: 97, 2006.
54. JOZWIAK, K.; MOADDEL, R.; RAVICHANDRAN, S.; PLAZINSKA, A.; KOZAK, J.; PATEL, S.; YAMAGUCHI, R. & WAINER, I.W., "Exploring enantiospecific ligand-protein interactions using cellular membrane affinity chromatography: chiral recognition as a dynamic process". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **875**: 200, 2008.
55. 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 alpha and estrogen related receptor gamma". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**: 777, 2010.
56. MARSZALL, M.P., "Application of magnetic nanoparticles in pharmaceutical sciences". *Pharm. Res.* **28**: 480, 2011.

57. PAMME, N., "On-chip bioanalysis with magnetic particles". *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 436, 2012.
58. MARSZALL, M.P. & BUCINSKI, A., "A protein-coated magnetic beads as a tool for the rapid drug-protein binding study". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52**: 420, 2010.
59. MARSZALL, M.P.; BUCINSKI, A.; KRUSZEWSKI, S. & ZIOMKOWSKA, B., "A new approach to determine camptothecin and Its analogues affinity to human serum albumin". *J. Pharm. Sci.* **100**: 1142, 2011.
60. ADALBERTO, P.R.; DOS SANTOS, F.J.; GOLFETO, C.C.; IEMMA, M.R.C.; DE SOUZA, D.H.F. & CASS, Q.B., "Immobilization of pectinase from *Leucoagaricus gongylophorus* on magnetic particles". *Analyst.* **137**: 4855, 2012.
61. MARSZAŁŁ, M.P.; MOADDEL, R.; KOLE, S.; GANDHARI, M.; BERNIER, M. & WAINER, I.W., "Ligand and protein fishing with heat shock protein 90 coated magnetic beads". *Anal. Chem.* **80**: 7571, 2008.
62. HU, F.; ZHANG, H.; LIN, H.; DENG, C. & ZHANG, X., "Enzyme inhibitor screening by electrospray mass spectrometry with immobilized enzyme on magnetic silica microspheres". *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **19**: 865, 2008.
63. CORCHERO, J.L.; MENDOZA, R.; FERRER-MIRALLES, N.; MONTRAS, A.; MARTINEZ, L.M. & VILLAVARDE, A., "Enzymatic characterization of highly stable human alpha-galactosidase A displayed on magnetic particles". *Biochem. Eng. J.* **67**: 20, 2012.
64. ERSHOV, P.; MEZENTSEV, Y.; GNEDENKO, O.; MUKHA, D.; YANTSEVICH, A.; BRITIKOV, V.; KALUZHSKIY, L.; YABLOKOV, E.; MOLNAR, A.; IVANOV, A.; LISITSA, A.; GILEP, A.; USANOV, S. & ARCHAKOV, A., "Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: experimental simulation and SPR validation". *Proteomics.* **12**: 3295, 2012.
65. DU PUCH, C.B.M.; BARBIER, E.; KRAUT, A.; COUTE, Y.; FUCHS, J.; BUHOT, A.; LIVACHE, T.; SEVE, M.; FAVIER, A.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; SAUVAIGO, S. & BRETON, J., "TOX4 and its binding partners recognize DNA adducts generated by platinum anticancer drugs". *Arch. Biochem. Biophys.* **507**: 296, 2011.
66. FU, H.Y.; YUAN, J.; ZHOU, X.M.; SUN, Y.B.; HUANG, Y.J.; HOU, L.P.; SONG, C.Y.; YANG, B.A.; ZHEN, P.; GAO, R.; MAO, P.Y.; LIN, L.Z.; XU, S.F.; XIAO, H.Z. & WEI, K.H., "Determination of hepatocellular carcinoma serum polypeptide based on antibody pre-concentration coupled with mass spectrometry". *Chinese J. Anal. Chem.* **40**: 1803, 2012.
67. QING, L.S.; SHAN, X.Q.; XU, X.M.; XUE, Y.; DENG, W.L.; LI, B.G.; WANG, X.L. & LIAO, X., "Rapid probe and isolation of bioactive compounds from *Dioscorea panthaica* using human serum albumin

- functionalized magnetic nano-particles (HSA-MNPs)-based ligand fishing coupled with electrospray ionization mass spectrometry". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**: 3335, 2010.
68. QING, L.S.; XUE, Y.; ZHENG, Y.; XIONG, J.; LIAO, X.; DING, L.S.; LI, B.G. & LIU, Y.M., "Ligand fishing from *Dioscorea nipponica* extract using human serum albumin functionalized magnetic nanoparticles". *J. Chromatogr. A.* **1217**: 4663, 2010.
69. QING, L.S.; XUE, Y.; DENG, W.L.; LIAO, X.; XU, X.M.; LI, B.G. & LIU, Y.M., "Ligand fishing with functionalized magnetic nanoparticles coupled with mass spectrometry for herbal medicine analysis". *Anal. Bioanal. Chem.* **399**: 1223, 2011.
70. LIU, L.L.; MA, Y.J.; CHEN, X.Q.; XIONG, X. & SHI, S.Y., "Screening and identification of BSA bound ligands from *Puerariae lobata* flower by BSA functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coupled with HPLC-MS/MS". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **887**: 55, 2012.
71. QING, L.S.; TANG, N.; XUE, Y.; LIANG, J.; LIU, Y.M. & LIAO, X., "Identification of enzyme inhibitors using therapeutic target protein-magnetic nanoparticle conjugates". *Anal. Methods.* **4**: 1612, 2012.
72. TAO, Y.; ZHANG, Y.F.; CHENG, Y.Y. & WANG, Y., "Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR". *Biomed. Chrom.* **27**: 148, 2013.
73. JONKER, N.; KRETSCHMER, A.; KOOL, J.; FERNANDEZ, A.; KLOOS, D.; KRABBE, J.G.; LINGEMAN, H. & IRTH, H., "Online magnetic bead dynamic protein-affinity selection coupled to LC-MS for the screening of pharmacologically active compounds". *Anal. Chem.* **81**: 4263, 2009.
74. MCFADDEN, M.J.; JUNOP, M.S. & BRENNAN, J.D., "Magnetic "fishing" assay to screen small-molecule mixtures for modulators of protein-protein interaction". *Anal. Chem.* **82**: 9850, 2010.
75. POCHET, 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". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**: 1781, 2011.
76. ESPADA, A.; MOLINA-MARTIN, M.; DAGE, J. & KUO, M.-S., "Application of LC/MS and related techniques to high-throughput drug discovery". *Drug Discovery Today.* **13**: 417, 2008.
77. COPELAND, R.A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery.* ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 2005. 271 p.
78. DE BOER, A.R.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W.M.A. & IRTH, H., "Mass spectrometry-based biochemical assays for enzyme-inhibitor screening". *TrAC.* **26**: 867, 2007.

79. VOET, D. & VOET, J.G., "Transporte através de membranas", IN Bioquímica, HORN, F., Editor. Porto Alegre, ARTMED, 2006. p 750.
80. TANG, Z.; WANG, T. & KANG, J., "Immobilized capillary enzyme reactor based on layer-by-layer assembling acetylcholinesterase for inhibitor screening by CE". Electrophoresis. **28**: 2981, 2007.
81. LEUZINGER, W. & BAKER, A.L., "Acetylcholinesterase, I. Large-scale purification, homogeneity, and amino acid analysis". Proc. N. A. S. **57**: 446, 1967.
82. CHOTHIA, C. & LEUZINGER, W., "Acetylcholinesterase: the structure of crystals of a globular form from electric eel". J. Mol. Biol. **97**: 55, 1975.
83. SCHRAG, J.D.; SCHMID, M.F.; MORGAN, D.G.; PHILLIPS JR, G.N.; CHIULL, W. & TANG, L., "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of 11 S acetylcholinesterase". J. Biol. Chem. **263**: 9795, 1988.
84. BOURNE, Y.; GRASSI, J.; BOUGIS, P.E. & MARCHOT, P., "Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by X-ray crystallography". J. Biol. Chem. **274**: 30370, 1999.
85. SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L. & SILMAN, I., "Atomic structure of acetylcholinesterase from *torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein". Science. **253**: 872, 1991.
86. PDB, Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?grid=2416E117&tabtoshow=Current>. acessado em 25-03-2013
87. KRYGER, G.; HAREL, M.; GILES, K.; TOKER, L.; VELAN, B.; LAZAR, A.; KRONMAN, C.; BARAK, D.; ARIEL, N.; SHAFFERMAN, A.; SILMAN, I. & SUSSMAN, J.L., "Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II". Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr. **56**: 1385, 2000.
88. DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T.L. & SUSSMAN, J.L., "Acetylcholinesterase: from 3D structure to function". Chem.-Biol. Inter. **187**: 10, 2010.
89. BON, S.; VIGNY, M. & MASSOULIE, J., "Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds". Proc. N. A. S. **76**: 2546, 1979.
90. FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M. & WILCOCK, G.K., "The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress". J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. **66**: 137, 1999.
91. GOMES, A.D.M., "Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular". Rev. Psiq. RS. **27**: 197, 2005.
92. SILMAN, I.; MILLARD, C.B.; ORDENTLICH, A.; GREENBLATT, H.M.; HAREL, M.; BARAK, D.; SHAFFERMAN, A. & SUSSMAN, J.L., "A

- preliminary comparison of structural models for catalytic intermediates of acetylcholinesterase". *Chem.-Biol. Inter.* **119–120**: 43, 1999.
93. GREENBLATT, H.M.; DVIR, H.; SILMAN, I. & SUSSMAN, J.L., "Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's Disease". *J. Mol. Neurosci.* **20**: 369, 2003.
 94. SMITH, M.A.C., "Doença de Alzheimer". *Genética.* **21**: SII3, 1999.
 95. TREVISAN, M.T.S. & MACEDO, F.V.V., "Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer". *Quím. Nova.* **26**: 301, 2003.
 96. BOURGET, D.; ROIG, A.; TOUTANT, J.P. & ARPAGAUS, M., "Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species". *Neurochem. Int.* **31**: 65, 1997.
 97. CHARPENTIER, A.; MENOZZI, P.; MARCEL, V.; VILLATTE, F. & FOURNIER, D., "A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects". *Anal. Biochem.* **285**: 76, 2000.
 98. BRUHLMANN, C.; OOMS, F.; CARRUPT, P.A.; TESTA, B.; CATTO, M.; LEONETTI, F.; ALTOMARE, C. & CAROTTI, A., "Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase". *J. Med. Chem.* **44**: 3195, 2001.
 99. CORBEL, V.; STANKIEWICZ, M.; PENNETIER, C.; FOURNIER, D.; STOJAN, J.; GIRALD, E.; DIMITROV, M.; MOLGÓ, J.; HOUGARD, J.M. & LAPIED, B., "Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet". *BMC Biol.* **7**: 47, 2009.
 100. HOSEA, N.A.; BERMAN, H.A. & TAYLOR, P., "Specificity and orientation of trigonal carboxyl esters and tetrahedral alkylphosphonyl esters in cholinesterases". *Biochemistry.* **34**: 11528, 1995.
 101. WEILL, M.; FORT, P.; BERTHOMIEU, A.; DUBOIS, M.P.; PASTEUR, N. & RAYMOND, M., "A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*". *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* **269**: 2007, 2002.
 102. HOUGHTON, P.J.; YUHAO RENA, Y. & HOWESB, M.-J., "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi". *Nat. Prod. Rep.* **23**: 181, 2006.
 103. ELLMAN, G.L.K.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.J. & FEATHERSTONE, R.M., "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88, 1961.
 104. VAN ASPEREN, K., "A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method". *J. Ins. Physiol.* **8**: 401, 1962.
 105. MARSTON, A.; KISSLING, J. & HOSTETTSMANN, K., "A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and

- butyrylcholinesterase inhibitors in plants". *Phytochem. Anal.* **13**: 51, 2002.
106. RHEE, I.K.; VAN RIJN, R.M. & VERPOORTE, R., "Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography". *Phytochem. Anal.* **14**: 127, 2003.
107. DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P.-A. & REIST, M., "In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods". *Eur. J. Pharm Sci.* **33**: 109, 2008.
108. BARTOLINI, M.; CAVRINI, V. & ANDRISANO, V., "Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies". *J. Chromatogr. A.* **1031**: 27, 2004.
109. DIXON, M. & WEBB, E.C. *Enzymes*. 3a ed. New York, Academic Press, 1979. 1116 p.
110. CARDOSO, C.L.; DE MORAES, M.C.; GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D.; WAINER, I.W. & CASS, Q.B., "The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: the effect of species' specific differences on the immobilization". *Analyst.* **133**: 93, 2008.
111. YANG, Q.; LIU, X.-Y.; MIYAKE, J. & TOYOTAMA, H., "Self-assembly and immobilization of liposomes in fused-silica capillary by avidin-biotin binding". *Supramol. Sci.* **5**: 769, 1998.
112. SHI, Y. & CROUCH, S.R., "Micro-scale determination of glucose by capillary flow injection with an immobilized enzyme reactor". *Anal. Chim. Acta.* **381**: 165, 1999.
113. 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". *J. Chromatogr. A.* **987**: 331, 2003.
114. 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.
115. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results., <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>. acessado em 16-04-2010
116. NIROGI, R.; MUDIGONDA, K.; KANDIKERE, V. & PONNAMANENI, R., "Quantification of acetylcholine, an essential neurotransmitter, in

- brain microdialysis samples by liquid chromatography mass spectrometry". *Biomed. Chrom.* **24**: 39, 2010.
117. LIU, L.; HUANG, J.; LI, K.; HU, X. & SUN, C., "Analysis of acetylcholine from extracellular fluid in brain by in vivo microdialysis and LC-ESI-MS/MS with the stable isotope-labeled internal standard". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**: 56, 2011.
118. BRUHLMANN, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; P-A., C. & TESTA, B., "Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors". *Chem. Biodivers.* **1**: 819, 2004.
119. LEÓN, R.; DE LOS RÍOS, C.; MARCO-CONTELLES, J.; HUERTAS, O.; BARRIL, X.; LUQUE, F.J.; LÓPEZ, M.G.; GARCÍA, A.G. & VILLARROYA, M., "New tacrine-dihydropyridine hybrids that inhibit acetylcholinesterase, calcium entry, and exhibit neuroprotection properties". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 7759, 2008.
120. VANZOLINI, K.L.; VIEIRA, L.C.C.; CORRÊA, A.G.; CARDOSO, C.L. & CASS, Q.B., "Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry: an on-flow tool for ligand screening". *J. Med. Chem.* **56**: 2038, 2013.
121. YASUDA, M.; WILSON, D.R.; FUGMANN, S.D. & MOADDEL, R., "Synthesis and characterization of SIRT6 protein coated magnetic beads: identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts". *Anal. Chem.* **83**: 7400, 2011.
122. OUJJI, N.B.; BAKAS, I.; ISTAMBOULIÉ, G.; AIT-ICHOU, I.; AIT-ADDI, E.; ROUILLON, R. & NOGUER, T., "Acetylcholinesterase immobilized on magnetic beads for pesticides detection: application to olive oil analysis". *Sensors.* **12**: 7893, 2012.
123. NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M., "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.". *J. Nat. Prod.* **70**: 461, 2007.
124. JUNIOR, C.V.; BOLZANI, V.D.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M. & BARREIRO, E.J., "Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer". *Quím. Nova.* **27**: 655, 2004.
125. YANG, Y.; XI-QIANG, L.; CHUN-PING, T. & SHENG, Y., "Natural products chemistry research 2010's progress in China". *Chinese J. Nat. Med.* **10**: 1, 2012.
126. ZHAN, Z.-J.; YU, Q.; WANG, Z.-L. & SHAN, W.-G., "Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**: 6185, 2010.
127. LAMBERT, M.; WOLFENDER, J.-L.; STÆRK, D.; CHRISTENSEN, S.B.; HOSTETTMANN, K. & JAROSZEWSKI, J.W., "Identification of natural products using HPLC-SPE combined with CapNMR". *Anal. Chem.* **79**: 727, 2007.
128. Bioclone Inc, <http://bioclone.us/amine-terminated-magnetic-beads-particle-resin-matrix.html>. acessado em 04-03-2013

129. TSENG, Y.-H.; WANG, C.-M. & PENG, C.-I., "*Clibadium surinamense* L. (Asteraceae): A Newly Naturalized Plant in Taiwan". *Taiwania*. **53**: 103, 2008.
130. COSTA, E.A.; ROCHA, F.F.; TORRES, M.L.B.; SOUCCAR, C.; DE LIMA, T.C.M.; LAPA, A.J. & LIMA-LANDMAN, M.T.R., "Behavioral effects of a neurotoxic compound isolated from *Clibadium surinamense* L (Asteraceae)". *Neurotoxicol. Teratol.* **28**: 349, 2006.
131. HAMOY, M. Caracterização comportamental e eletroencefalográfica das convulsões induzidas pelo cunaniol e acetato de cunaniol extraídos das folhas de *Clibadium sylvestre*. Um modelo de convulsão generalizada experimental em ratos (wistar). Belém, Departamento de Ciências Biológicas, 2011. Tese de Doutorado, 148 p.
132. CLARK, J.B., "Effect of a polyacetylenic fish poison on the oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria". *Biochem. Pharmacol.* **18**: 73, 1969.
133. QUILLIAN, J.P. & STABLES, R., "Convulsant effects of cunaniol, a polyacetylenic alcohol isolated from the plant *Clibadium sylvestre*, on frogs and mice". *Pharmacol. Res. Comm.* **1**: 7, 1969.
134. GORINSKY, C.; TEMPLETON, W. & ZAIDI, S.A., "Isolation of ichthyothereol and its acetate from *Clibadium sylvestre*". *Lloydia*. **36**: 352, 1973.
135. FILGUEIRAS, C.C.; FARIAS, P.R.S.; CARDOSO, M.D.G.; VENDRAMIM, J.D.; RAMOS, E.M.L.S. & CANTÃO, F.R.D.O., "Bioactivity of aqueous extracts of *Clibadium sylvestre* (Aubl.)Baill. and *Derris amazonica* killip on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae)". *Ciênc. Agrotec.* **35**: 1059, 2011.
136. CASCON, S.C.; MORS, W.B.; TURSCH, B.M.; APLIN, R.T. & DURHAM, L.J., "Ichthyothereol and its acetate, the active polyacetylene constituents of *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) malme, a fish poison from the lower Amazon.". *JACS.* **87**: 5237, 1965.
137. QUILLIAN, J.P. & STABLES, R., "The effect of cunaniol, a polyacetylenic alcohol isolated from the plant *Clibadium sylvestre*, on piscine behaviour". *Brit. Pharmacol. Soc.* **34**: 679, 1968.
138. VILLAMÉA, L. & PINTO, M.G., Índio quer patente: caciques preparam ação internacional contra cientista que registrou conhecimento indígena, IN Isto é- Independente. Editora Abril, 2000.
139. SILVA, C.Y.Y. Quantificação do cunaniol em plasma de ratos por HPLC-DAD para estudo de modelo epiléptico. Belém, Departamento de Química, 2012. Tese de Doutorado, 120 p.
140. DA SILVA, J.I. Acetilcolinesterase imobilizada em capilares de sílica fundida: novo formato para a triagem de inibidores seletivos. Ribeirão Preto, Instituto de Química, 2011. Dissertação de Mestrado, 118 p.

141. COPELAND, R.A., "Reactions involving multiple substrates", IN Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. New Jersey, John Wiley & Sons, 2005. p 42.

Apêndice

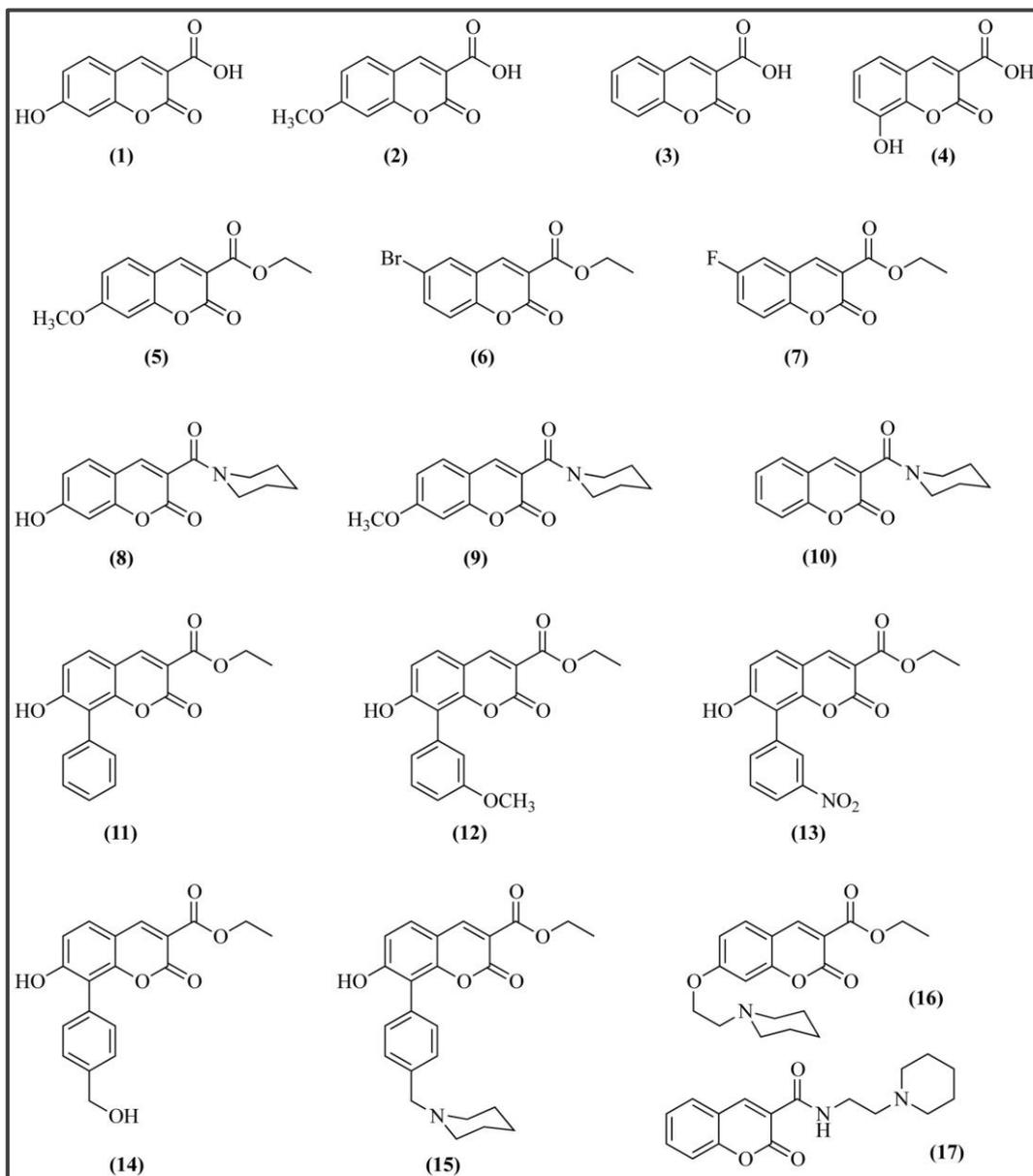


FIGURA A.1- Coleção de cumarinas.

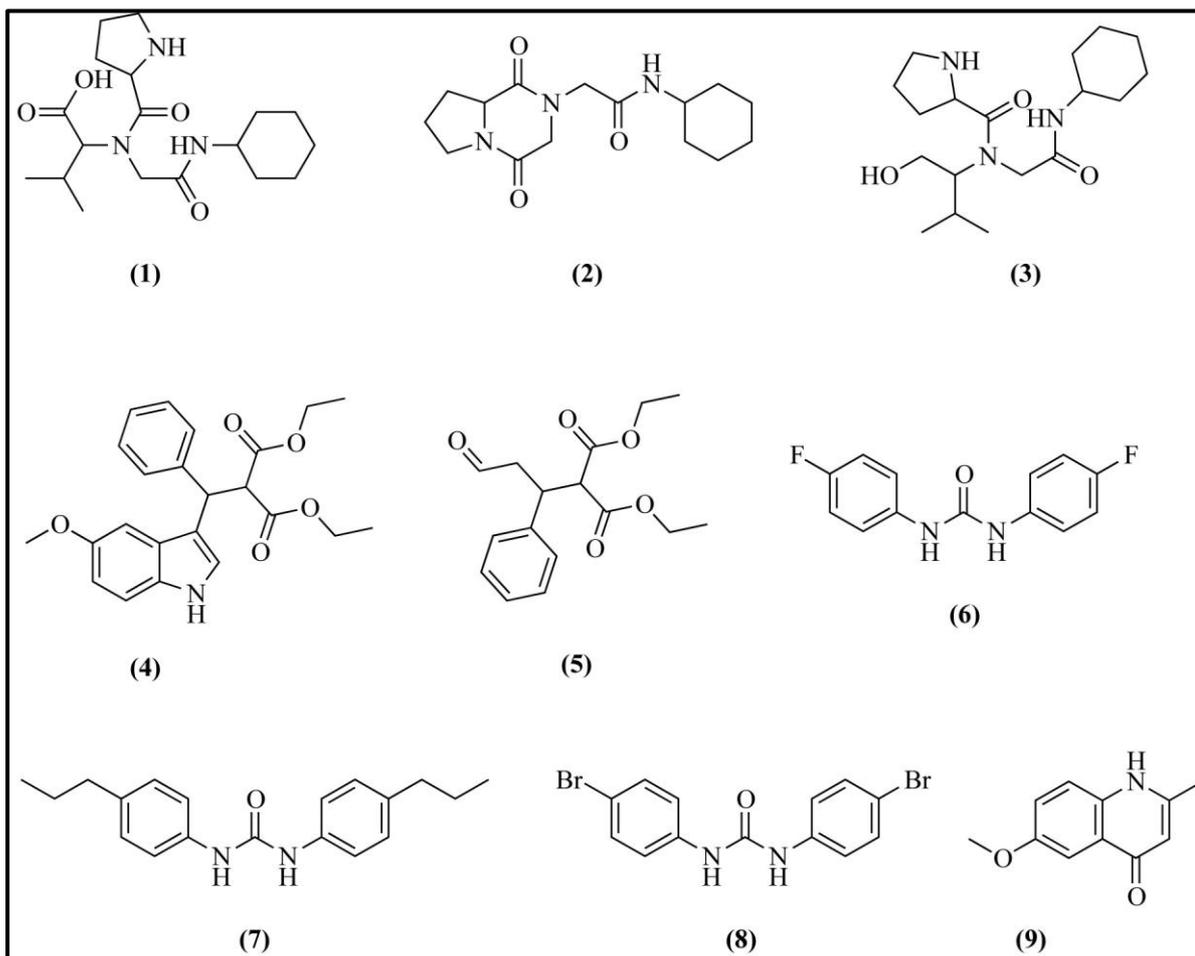


FIGURA A.2- Coleção de peptídeos, indóis e derivados de uréia.

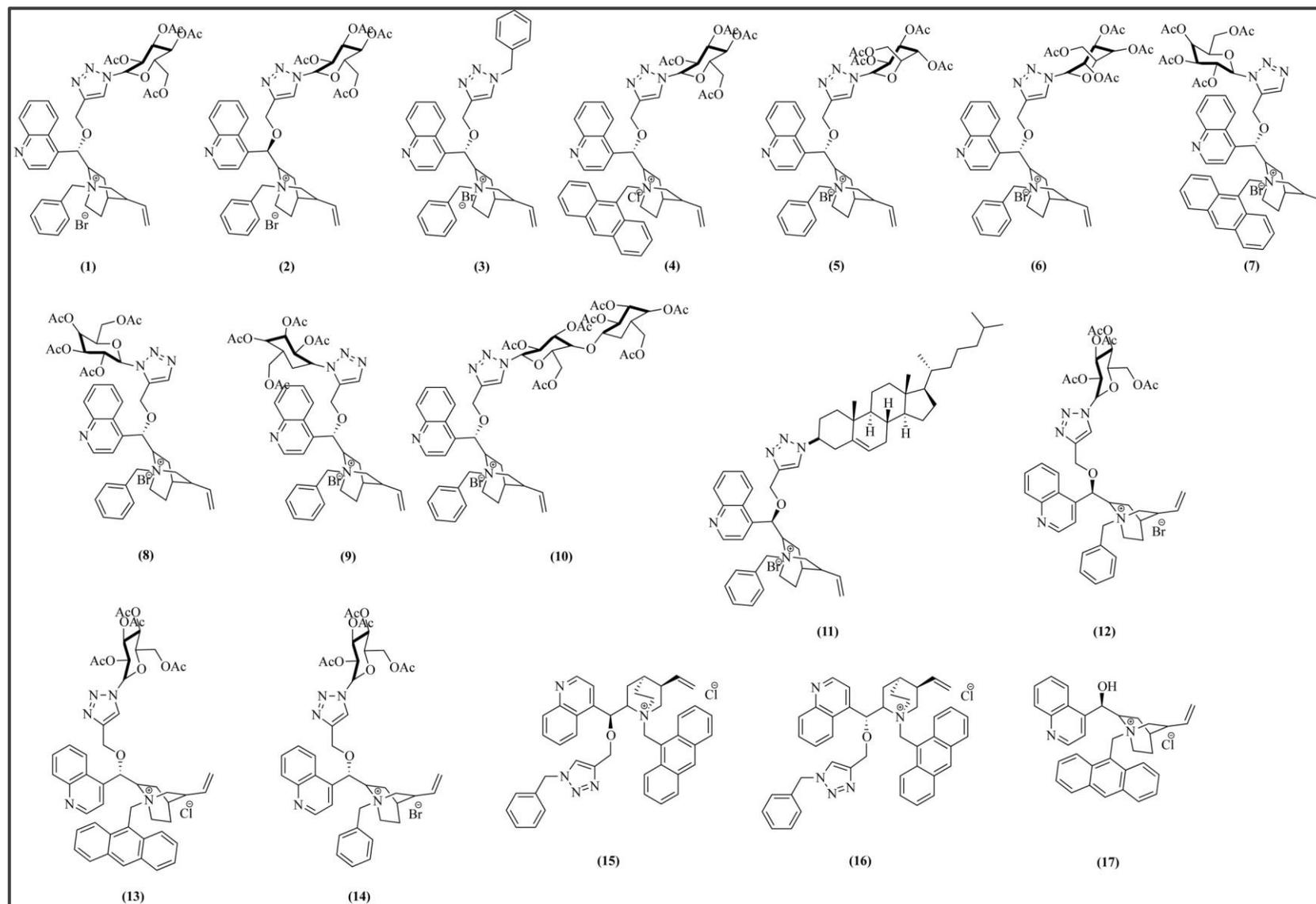


FIGURA A.3- Coleção de triazóis.

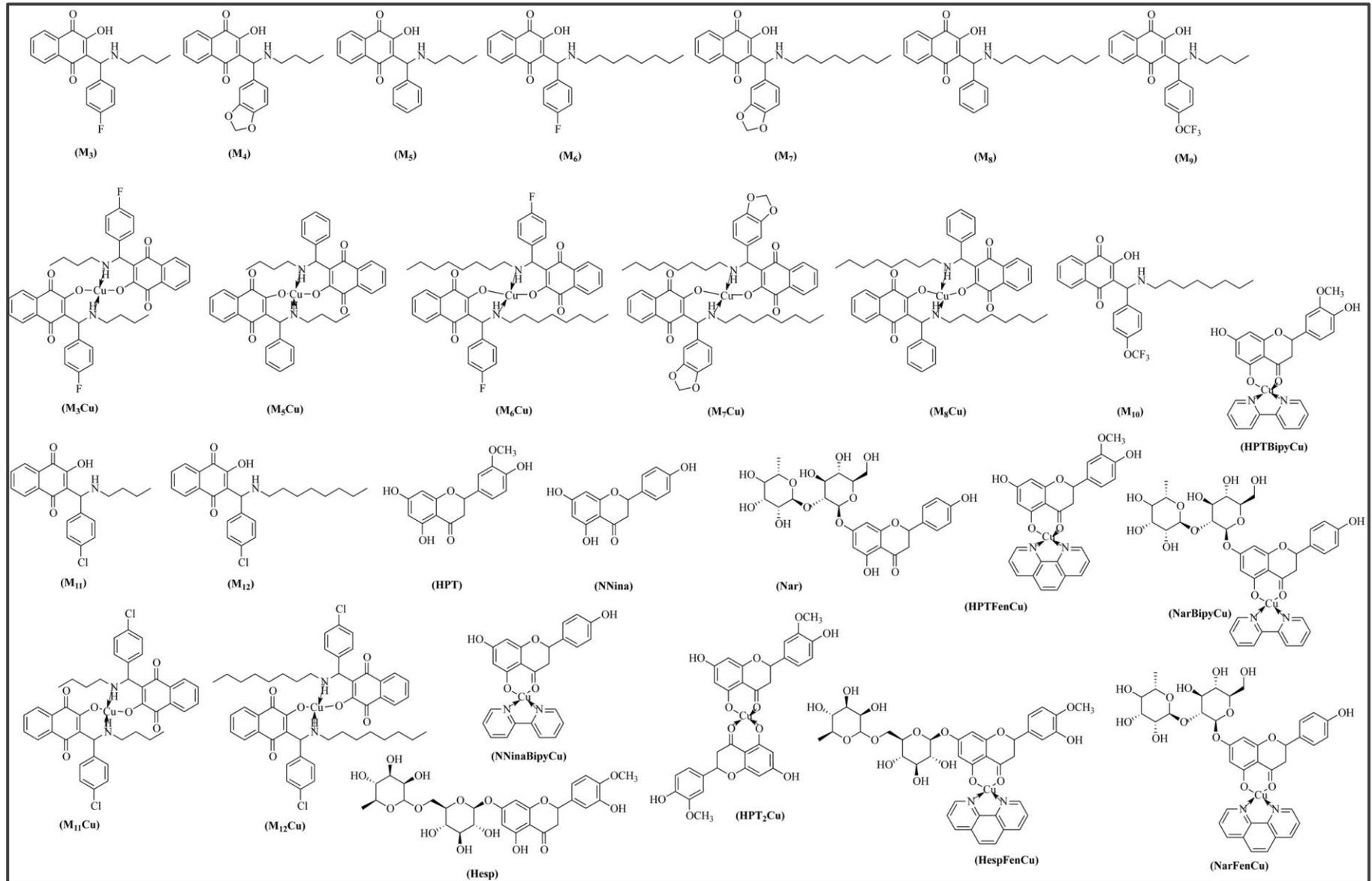


FIGURA A.4- Coleção de flavonas.